

ΑΒΣΚΤ 00413

2020

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**



**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ**

**ΑΝΔΡΕΑ Γ. ΒΙΤΩΡΑΤΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
που υποβλήθηκε
στο Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

ΑΘΗΝΑ 1990.

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ**

**ΑΝΔΡΕΑ Γ. ΒΙΤΩΡΑΤΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
που υποβλήθηκε
στο Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

ΑΘΗΝΑ 1990.

**Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Γεωργικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών δεν υποδηλοί αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως.**

N. 5343/ 1932 αρθρ. 202.

**Αφιερώνεται στην Υπεραγία Θεοτόκο
σαν την ελαχίστη προσφορά μου.**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το μεγαλύτερο μέρος αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωργικού Πανεπιστημίου Αθηνών ενώ το τελευταίο μέρος που αφορούσε κυτταρογενετικές μελέτες με κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών διεξήχθη στο Εργαστήριο Φυσιολογικής Γενετικής του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε. ΚΕ. Φ. Ε. " Δημόκριτος".

Το θέμα της διατριβής μου ανετέθη από τον τ. Καθηγητή του Γεωργικού Πανεπιστημίου κ.Σ. Γεωργόπουλο ο οποίος συνέβαλε σημαντικά και στην τελική διαμόρφωση αυτής της μελέτης, γι' αυτό και τον ευχαριστώ θερμά.

Τις πλέον θερμές μου ευχαριστίες εκφράζω στον Επ. Καθηγητή κ. Β. Ζιώγα για την ανεκτίμητη συμβολή του στην πραγματοποίηση αυτής της διατριβής. Με εισήγαγε με υπομονή στο ερευνητικό πλαίσιο της εργασίας, αφιέρωσε ατέλειωτες ώρες του πολύτιμου χρόνου του για συζήτηση και ερμηνεία των ερευνητικών αποτελεσμάτων και τέλος και ίσως πιο σημαντικό για μένα, με ενθάρρυνε στις δύσκολες στιγμές να συνεχίσω την εκπλήρωση του στόχου μου.

Θερμά ευχαριστώ τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Καθηγητή κ. Χ. Παναγόπουλο για τις πολύ χρήσιμες παρατηρήσεις του που συνέβαλαν σημαντικά στη βελτίωση του όλου κειμένου και στην εκπλήρωση του επιστημονικού του προορισμού.

Ιδιαίτερως ευχαριστώ τον Επ. Καθηγητή κ. Κ. Φασσέα ο οποίος με εισήγαγε στις επίπονες και κουραστικές μεθόδους που προϋποθέτει η παρατήρηση με το Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Επίσης θερμά ευχαριστώ τον Δρα Σιδέρη του εργαστηρίου Φυσιολογικής Γενετικής του Ε. ΚΕ. Φ. Ε. " Δημόκριτος" για την διάθεση των επιστημονικών μέσων και την εισαγωγή μου στις μεθόδους για την πραγματοποίηση του τμήματος της διατριβής που αφορούσε κυτταρογενετικές μελέτες με κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών.

Τέλος ευχαριστώ το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) του οποίου είχα την τιμή να είμαι υπότροφος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
SUMMARY	15
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
I.1. Γενικά	21
I.2. Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs)	25
I.2.α. Μηχανισμός δράσης	27
I.2.β. Επίδραση των EBIs στην ανάπτυξη, μορφολογία και κυτταρική δομή	30
I.2.γ. Γενετική δραστικότητα των EBIs	31
I.3. Δικαρβοξυμιδικά	33
I.3.α. Μηχανισμός δράσης	33
I.3.β. Επίδραση των δικαρβοξυμιδικών στην ανάπτυξη, μορφολογία και κυτταρική δομή	34
I.3.γ. Γενετική δραστικότητα των δικαρβοξυμιδικών	35
I.4. Φθαλιμίδια και άλλα συγγενή μυκητοκτόνα	37
I.4.α. Μηχανισμός δράσης	38
I.4.β. Γενετική δραστικότητα των φθαλιμιδίων	38
I.5. Βενζιμιδαζολικά	40
I.5.α. Μηχανισμός δράσης	40
I.5.β. Επίδραση των βενζιμιδαζολικών στην ανάπτυξη, μορφολογία και κυτταρική δομή.	42
I.5.γ. Γενετική δραστικότητα των βενζιμιδαζολικών	43
I. 6. Σκοπός της μελέτης	45
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
II.1. Βιολογικό υλικό	49
II.2. Θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια του μύκητα <i>Aspergillus nidulans</i>	54
II.3. Μυκητοκτόνα	56
II.4. Μέτρηση της μυκητοτοξικότητας και της γενετικής επίδρασης	57
II.5. Κατάταξη προϊόντων μπιωτικού ανασυνδυασμού	59
II.6. Μέθοδοι οπτικής μικροσκοπίας	61
II.7. Μέθοδοι ηλεκτρονικής μικροσκοπίας	62
II.8. Μελέτη της επίδρασης των fenarimol και clotrimazole σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικού	64
II.8.α. Πειραματικό υλικό	64
II.8.β. Υλικό καλλιέργειας	64
II.8.γ. Συλλογή των κυττάρων και ανανέωση καλλιεργειών	65
II.8.δ. Επέμβαση με μυκητοκτόνα και διαδικασία στερέωσης και χρώσης	

για παρατηρήσεις στη μίτωση	65
II.8.ε. Μέτρηση μυκητοτοξικότητας	66

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1. Μέτρηση της μυκητοτοξικότητας των μυκητοκτόνων fenarimol, clotrimazole, iprodione και benomyl	69
III.2. Επίδραση του fenarimol και clotrimazole στη βλάστηση των κονιδίων	74
III.3. Μέτρηση γενετικής δραστηριότητας των μυκητοκτόνων	74
III.4. Γενετική ανάλυση των προϊόντων μιτωτικής διάσχισης	79
III.5. Επίδραση των μυκητοκτόνων στη μορφολογία του μύκητα <i>Aspergillus nidulans</i> και στο επίπεδο οπτικού μικροσκοπίου	81
III.5.α. Επίδραση των μυκητοκτόνων fenarimol, clotrimazole, iprodione, carptafoi και benomyl στο ρυθμό διαίρεσης των πυρήνων στον <i>A.nidulans</i>	81
III.5.β. Παρατηρήσεις στη μορφολογία των υφών και στη συμπεριφορά του χρωματοσωματικού υλικού κατά την πορεία της μίτωσης, απουσία παρεμποδιστή	85
III.5.γ. Επίδραση των μυκητοκτόνων fenarimol, clotrimazole, iprodione και carptafoi στη μορφολογία και τη μίτωση του <i>A. nidulans</i>	89
III.6. Παρατηρήσεις με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	103
III.6.α. Παρατηρήσεις στο κυτταρικό τοίχωμα	105
III.6.β. Παρατηρήσεις στο πλασμάλημμα	115
III.6.γ. Παρατηρήσεις στα μιτοχόνδρια	121
III.6.δ. Παρατηρήσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο	133
III.6.ε. Παρατηρήσεις στα χυμοτόπια	143
III.6.ζ. Παρατηρήσεις στον πυρήνα	149
III.7. Επίδραση των fenarimol και clotrimazole σε κυτταροκαλλιέργειες "Κρηικού Αργυρόχρους" (chinese hamster), <i>Cricetulus griseus</i>	181

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

213

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Από προηγούμενες εργασίες ήταν γνωστό ότι οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs), οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες και τα δικαρβοξυμιδικά (AHDs), τα φθαλιμίδια και τέλος τα βενζιμιδαζολικά αυξάνουν τη συχνότητα μιτωτικών ανασυνδυασμών σε διπλοειδή στελέχη του *Aspergillus nidulans*. Με εξαίρεση την τελευταία κατηγορία μυκητοκτόνων, δεν υπήρχε μέχρι σήμερα επαρκής γνώση του μηχανισμού αυτής της αντιμιτωτικής δράσης. Επιχειρήσαμε γι' αυτό μια διερεύνηση της γενετικής δραστηριότητας με μελέτες: α) Γενετικής ανάλυσης των μιτωτικών ανασυνδυασμών που προκαλούνται σε ένα διπλοειδές στέλεχος του *A. nidulans*, από την παρουσία αυτών των παρεμποδιστών. β) Οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας κονιδίων του *A. nidulans* που βλάστησαν παρουσία των μυκητοκτόνων. Οι μελέτες μας αυτές επικεντρώθηκαν ιδιαίτερα στη διαδικασία της πυρηνικής διαίρεσης. γ) Στην περίπτωση των EBIs προχωρήσαμε σε διερεύνηση της αντιμιτωτικής δράσης σε κύτταρα του θηλαστικού *Cricetulus griseus* (chinese hamster).

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης fenarimol και clotrimazole αυξάνουν τη συχνότητα των μιτωτικών ανασυνδυασμών στο διπλοειδές στέλεχος Η.Α. του *A. nidulans*. Για να διαπιστωθεί όμως σαφής γενετική δραστηριότητα, πρέπει να χρησιμοποιηθούν συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου, που προκαλούν πάνω από 90% παρεμπόδιση της αύξησης του μύκητα. Δεδομένου ότι το benomyl, που δρα απ' ευθείας στη λειτουργία της μίτωσης, αυξάνει τη συχνότητα της μιτωτικής διάσχισης ακόμα και σε συγκεντρώσεις, που προκαλούν μικρή παρεμπόδιση της αύξησης, συμπεραίνει κανείς ότι η γενετική δραστηριότητα του fenarimol και του clotrimazole είναι αποτέλεσμα δευτερογενούς επίδρασης. Η ανάλυση των προϊόντων μιτωτικής διάσχισης φανερώνει ότι τα δύο μυκητοκτόνα όπως και άλλα μυκητοκτόνα της κατηγορίας των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης μπορεί να προκαλούν μη διαχωρισμό των χρωματοσωμάτων (non - disjunction). Παρατηρείται αύξηση τόσο των απλοειδών όσο και των διπλοειδών προϊόντων μιτωτικού ανασυνδυασμού, αλλά τα διπλοειδή που παράγονται με μιτωτικό διασκελισμό δεν είναι περισσότερα απ' ότι σε κονίδια, που βλάστησαν απουσία μυκητοκτόνου. Εξέταση κονιδίων, που βλάστησαν παρουσία μη θανατηφόρων δόσεων fenarimol και clotrimazole, στο επίπεδο της οπτικής μικροσκοπίας διαπίστωσε αξιόλογες επιδράσεις στη δομή και τη διαίρεση των πυρήνων. Μετά από επίδραση των μυκητοκτόνων αυτών ποτέ δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη κεντροσωματίων αλλά ούτε και τα τυπικά στάδια της μιτωτικής διεργασίας στον μύκητα *A. nidulans*. Παρατηρούνται άνισες και ανόμοιες μάζες χρωματοσωματικού υλικού, γεγονός που φανερώνει το σχηματισμό ανευπλοειδών πυρήνων. Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία παρατηρείται σημαντική επίδραση του fenarimol και clotrimazole στην πυρηνική διαίρεση. Αντί του τυπικού τρόπου διαίρεσης που βασίζεται σε επιμήκυνση και διαχωρισμό του πυρήνα σε δύο όμοιους λοβούς,

παρατηρείται σχηματισμός μίας διπλής διαχωριστικής μεμβράνης που τον χωρίζει σε δύο άνισους θυγατρικούς πυρήνες με ανόμοια περιεκτικότητα χρωματίνης. Φαίνεται ότι αυτή η ανώμαλη διαίρεση είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό ανευπλοειδών πυρήνων, από τους οποίους μπορεί στη συνέχεια να παραχθούν απλοειδείς ή διπλοειδείς με νέους συνδυασμούς γόνων. Η προσθήκη fenarimol ή clotrimazole σε κυτταροκαλλιέργεια *Cricetulus griseus* (chinese hamster), προκάλεσε μεγάλη αύξηση του μιτωτικού δείκτη και της συχνότητας των μιτωτικών ανωμαλιών. Οι ανωμαλίες αφορούν κυρίως σχηματισμό συμπλεγμάτων από χρωματοσώματα στη μετάφαση και δημιουργία πολυπολικών αναφάσεων. Με βάση τα δεδομένα αυτά, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το fenarimol, το clotrimazole αλλά και γενικότερα οι EBIs παρεμβάλλονται άμεσα μάλλον παρά έμμεσα σε λειτουργίες που σχετίζονται με τη δόμηση και το ρόλο της μιτωτικής ατράκτου. Πιθανόν οι λειτουργίες αυτές αφορούν στα κεντροσώματα και έχουν σχέση με τη ρυθμιστική δράση των στερολών.

Το δικαρβοξυμιδικό μυκητοκτόνο iprodione αυξάνει σημαντικά τα προϊόντα διαχωρισμού στον *A. nidulans* και η αύξηση αυτή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του φαρμάκου. Η ανάλυση των προϊόντων μιτωτικού ανασυνδυασμού, που προκλήθηκε από τη δράση του iprodione έδειξε αύξηση τόσο στα απλοειδή όσο και στα διπλοειδή προϊόντα διαχωρισμού. Τα διπλοειδή όμως φαίνεται να προέρχονται μάλλον από το μηχανισμό του μιτωτικού διασκελισμού (crossing-over) και όχι από το μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων (non-disjunction). Με το οπτικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκαν κανονικά τα στάδια της μιτωτικής διεργασίας παρουσία iprodione όπως είχαν παρατηρηθεί σε κονίδια που επώασθηκαν σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκαν θυγατρικοί πυρήνες με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα αλλά και με σημαντικά ανοίγματα της πυρηνικής μεμβράνης. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης, διότι ανώμαλος διαχωρισμός χρωματοσωμάτων και παραγωγή ανευπλοειδών πυρήνων δεν αναμένεται στην περίπτωση επαγωγής μιτωτικού διασκελισμού. Φαίνεται λοιπόν ότι οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες και τα δικαρβοξυμιδικά δρουν πάνω στα ίδια τα χρωματοσώματα με αποτέλεσμα να προκαλούνται θραύσεις και ελλείψεις, όπως είχαν εισηγηθεί προηγούμενες εργασίες. Μια τέτοια άποψη θα συμφωνούσε με την πρόσφατα διατυπωθείσα υπόθεση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων σαν αιτίας της τοξικής δράσης των δικαρβοξυμιδικών (228). Οποσδήποτε, και τα ανοίγματα της πυρηνικής μεμβράνης, που παρατηρήσαμε, φαίνεται ότι συμβάλλουν στη γενετική δραστηριότητα αυτών των μυκητοκτόνων.

Το cartafol, σε συγκεντρώσεις ελάχιστα τοξικές στον *A. nidulans*, αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των διπλοειδών ανασυνδυασμών που προέρχονται από μιτωτικό διασκελισμό. Με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία, διαπιστώθηκε ότι

τα στάδια της μίτωσης δεν επηρεάζονται από το carptafol. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν οπωσδήποτε τα δεδομένα της γενετικής ανάλυσης, ότι δηλαδή η γενετική δραστικότητα του carptafol, στις μικρές συγκεντρώσεις, οφείλεται στην επαγωγή μιτωτικού διασκελισμού. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του carptafol, που προκαλούν μεγάλη παρεμπόδιση της αύξησης, η γενετική ανάλυση διαπίστωσε αύξηση των απλοειδών ανασυνδυασμών, που προέρχονται από το μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων. Αυτή η άποψη ενισχύθηκε και από παρατηρήσεις στο επίπεδο της οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Κύτταρα που βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης, μετά την επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων carptafol εμφανίζουν πυρήνες με διαφορετική ποσότητα και πυκνότητα χρωματοσωματικού υλικού (οπτική μικροσκοπία) όπως και με διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα (ηλεκτρονική μικροσκοπία). Στην τελευταία περίπτωση η διαίρεση του πυρήνα πραγματοποιείται με σχηματισμό λοβού που φαίνεται να έχει διαφορετική ποσότητα χρωματοσωματικού υλικού. Με βάση τα δεδομένα αυτά φαίνεται ότι το carptafol, σε συγκεντρώσεις, που προκαλούν μεγάλη παρεμπόδιση της αύξησης, επηρεάζει τη δομή ή λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου.

Εξέταση κονιδίων, που βλάστησαν παρουσία μη θανατηφόρων δόσεων του βενζιμιδαζολικού μυκητοκτόνου benomyl, με το οπτικό μικροσκόπιο διαπίστωσε έντονη επίδραση στη μιτωτική διεργασία, κάτι που αναμενόταν, αφού ήταν γνωστή η δράση του μυκητοκτόνου αυτού στην μιτωτική ατράκτο, δράση που προκαλεί μη αποχωρισμό χρωματοσωμάτων. Δεν ήταν δυνατό να διακρίνουμε τα τυπικά στάδια της μίτωσης σε κύτταρα του *A. nidulans*, που υποβλήθηκαν στην επίδραση του benomyl. Αντίθετα, παρατηρήθηκαν ανώμαλοι πυρήνες, με άνισες μάζες χρωματοσωματικού υλικού κατά μήκος των υφών. Στο επίπεδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, η πυρηνική διαίρεση φαίνεται να συντελείται με το σχηματισμό δύο λοβών με διάφορη ηλεκτρονική πυκνότητα. Οι παρατηρήσεις αυτές φανερώνουν ότι το benomyl προκαλεί το σχηματισμό ανευπλοειδών πυρήνων, που μεταπίπτουν σε νέους ευπλοειδείς γονοτύπους.

Από τα πειραματικά δεδομένα αυτής της εργασίας προκύπτει ότι η έντονη γενετική δραστικότητα των παραπάνω μυκητοκτόνων αποτελεί σαφή ένδειξη για να τα θεωρήσουμε υποψήφια πρόκλησης δυσμενών επιδράσεων στον άνθρωπο και το περιβάλλον γενικότερα. Ιδιαίτερα μάλιστα για τα fenarimol και clotrimazole, που προκαλούν μιτωτικές ανωμαλίες και σε κυτταροκαλλιέργεια θηλαστικού, οργανισμού που η κυτταροβιολογία του προσεγγίζει περισσότερο αυτής του ανθρώπου, ο κίνδυνος πρόκλησης τέτοιων δυσμενών επιδράσεων φαίνεται να είναι ακόμα μεγαλύτερος. Η ασφαλής όμως εκτίμηση των πραγματικών κινδύνων που θα καθορίσουν τελικά και την απομάκρυνση ή μη του προϊόντος από την κυκλοφορία, απαιτεί εκτενέστερες ερευνητικές προσπάθειες που αφορούν κυρίως πειράματα εμβρυοτοξικότητας, τερατογένεσης, ιστοπαθολογικές εξετάσεις κ.ά.



SUMMARY

It was known from previous studies, that sterol biosynthesis inhibitors (SBIs), aromatic hydrocarbons and dicarboximides (AHDs), phthalimides and finally benzimidazoles increase the frequency of mitotic recombination in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. With the exception of the benzimidazoles, no sufficient information was available about the mechanism of genetic activity of the above fungicides. For this reason, we undertook a study of the genetic activity by: a) analysis of fungicide - induced mitotic recombinants of a diploid strain of *A. nidulans*, b) light and electron microscopy of conidia of *A. nidulans* allowed to germinate grown in the presence of the toxicants. These studies mainly focused on the process of nuclear division, c) in the case of SBIs we proceeded to study effects on mitosis in mammalian cells (chinese hamster).

The ergosterol biosynthesis inhibitors fenarimol and clotrimazole increase the frequency of mitotic segregation in the diploid strain H.A. of *A. nidulans*, but only when inocula were exposed to concentrations, causing more than 90% inhibition of growth in the fungus, was there a high increase in the amount of sectoring. Considering that benomyl which acts directly on mitosis, increases the frequency of mitotic segregation even at concentrations causing little growth inhibition, one may conclude that the genetic activity of fenarimol and clotrimazole seems to be a secondary effect. The analysis of the products of mitotic segregation for their ploidy and their nutritional requirements suggested that ergosterol biosynthesis inhibitors may cause chromosome non - disjunction. There was a high increase of haploid and of chromosomal diploid segregants, but the diploids derived from mitotic crossing - over remained at the same level as with untreated conidia. Light microscopy of conidia germinating in the presence of sublethal concentrations of fenarimol or clotrimazole revealed a remarkable effect on the structure and the division of nuclei. The spindle pole bodies in the periphery of the nucleus and the normal stages of the mitotic process in the fungus *A. nidulans* were never observed following treatment with fenarimol or clotrimazole. Unequal and dissimilar masses of chromatin were observed indicating formation of aneuploid nuclei. By means of electron microscopy a striking effect of fenarimol and clotrimazole on nuclear division was observed. Instead of the normal procedure of elongation and separation in two equal lobes, the nucleus divided by the formation of a double cross membrane into two unequal daughter nuclei with dissimilar chromatin content. It seems that this irregular division leads to the formation of aneuploid nuclei from which haploid and/ or diploid nuclei may then be produced, carrying new combinations of genes. The addition of fenarimol or clotrimazole in cell cultures of *Cricetulus griseus* (chinese hamster), caused a high increase of the mitotic index and of the frequency of mitotic abnormalities. The disturbances mainly concern the formation of clusters of chromosomes at metaphase and of multi - polar mitoses. On the basis of this in-

formation , it can be concluded that EBIs interfere directly rather than indirectly with the build up or the function of the mitotic apparatus. An interference with the replication of the spindle organizing centra and with the regulatory action of sterols is suggested.

The dicarboximide fungicide iprodione increases significantly the frequency of mitotic segregation in *A. nidulans* and this increase is dose - depended. The analysis of iprodione induced mitotic recombinants showed an increase of haploid and diploid segregants, but the diploid ones seemed to result from mitotic crossing - over rather than from non - disjunction. At the light microscope level, the normal stages of the mitotic process were observed in presence of iprodione, as in the case of conidia germinating in fungicide - free medium. By means of electron microscopy, daughter nuclei with a uniform electron density, but frequently with large openings in the nuclear membrane were observed. This information fits well with the results of the analysis of induced recombinants because disturbance in chromosome separation and formation of aneuploid nuclei is not to be expected in case of induction of mitotic crossing - over. It appears that aromatic hydrocarbons and dicarboximides act on the chromosomes themselves and this results in breakage - deletions, as suggested by previous studies. Such a mechanism would support the recently expressed view that the toxic action of dicarboximides depends on lipid peroxidation. The openings in the nuclear membrane, also seem to contribute to the genetic activity of these fungicides.

Captafol, at concentrations slightly inhibitory to *A. nidulans* increases significantly the frequency of diploid recombinants as a result of mitotic crossing - over. By means of light and electron microscopy it was found that the normal stages of mitosis are not affected by low concentrations of captafol. These results certainly support the data from the analysis of induced recombinants according to which the genetic activity of the captafol at low concentrations is due to induction of mitotic crossing - over. At higher concentrations, causing high lethality, the analysis showed that captafol can also cause an increase in the frequency of haploid recombinants, resulting from non - disjunction of the chromatids. This view was supported by light and electron microscopical observations. Nuclei with a different quantity and density of chromatin (light microscopy) as well with a different electron density (electron microscopy) were observed in captafol - treated *A. nidulans*. The nuclear division was observed to take place by formation of a lobe which seems to have a different quantity of chromatin than the remaining part of the nucleus. On the basis of these observations, it appears that captafol at concentrations, which cause high growth inhibition affects the structure or the function of the mitotic spindle.

Light microscopy of conidia of *A. nidulans* germinating in the presence of sublethal concentrations of the benzimidazole fungicide benomyl revealed a striking effect on the mitotic process which was to be expected to result from its known action on the structure of the mitotic apparatus, leading to chromosome non -

disjunction. It was impossible to observe the normal stages of mitosis in benomyl - treated *A. nidulans*. Abnormal nuclei with unequal masses of chromosomal material were observed along the hyphae. At the electron microscopy level, the nuclear division seemed to take place by the formation of lobes having different electron density. These observations indicate the formation of aneuploid nuclei from which haploid or diploid with new combinations of genes may eventually be produced.

The information obtained in the present work indicates that the genetic activity of the fungicides studied on *A. nidulans* may be a good enough reason to suspect adverse effects on humans and other non-target higher organisms. In particular fenarimol and clotrimazole which were found to cause mitotic abnormalities also in mammalian cells, are more likely to have similar effects on man. It must be stated, however, that risk assessment requires additional studies on embryotoxicity, teratogenesis etc.



I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.Γενικά

Με την ανάπτυξη της χημικής βιομηχανίας, η παραγωγή και χρησιμοποίηση συνθετικών χημικών ουσιών, έχει πάρει τεράστια έκταση σε όλους τους τομείς της ζωής μας. Χιλιάδες χημικά παρασκευάσματα παράγονται και χρησιμοποιούνται, χωρίς να είναι γνωστές οι επιπτώσεις που έχουν πολλά από αυτά στους οργανισμούς διαφόρων κατηγοριών και ιδιαίτερα στο γενετικό υλικό των οργανισμών(47, 114, 203, 216, 333).

Η ρύπανση του περιβάλλοντος με γενετικά δραστικές ουσίες αναφέρεται σαν "περιβαλλοντική μεταλλαξιγένεση" ή "γενετική τοξικολογία"(178). Τα προβλήματα από τη μόλυνση αυτή συνέχεια μεγαλώνουν εξ' αιτίας της χρησιμοποίησης ολοένα και περισσότερων χημικών προϊόντων, μερικά από τα οποία φαίνεται να έχουν άμεση επίδραση στην κληρονομικότητα των οργανισμών, αφού προκαλούν αλλαγές στη δομή του γενετικού υλικού (11, 199, 204).

Μεταλλαγή είναι κάθε αλλαγή στη δομή του γενετικού υλικού που μπορεί να κληρονομηθεί(80). Τα διάφορα είδη των μεταλλαγών κατατάσσονται συνήθως σε τρεις κατηγορίες(80, 214). Η πρώτη περιλαμβάνει τις μικρής έκτασης (ένα έως δύο ζευγάρια βάσεων στο DNA) αλλαγές ενός γονιδίου από τη μια αλληλόμορφη κατάσταση στην άλλη, δηλαδή τις γονιδιακές ή σημειακές μεταλλαγές. Η δεύτερη περιλαμβάνει τις χρωματοσωματικές μεταλλαγές, δηλαδή τις χρωματοσωματικές αναδιατάξεις εξ' αιτίας θραύσεων, ελλείψεων, διπλοποιήσεων, μετατοπίσεων και αναστροφών των χρωματίδων. Τέλος η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει τις γονιδιώματικές μεταλλαγές, που οφείλονται σε αλλαγές στην ποσότητα του χρωματοσωματικού υλικού που αναφέρονται σε ολόκληρα χρωματοσώματα ή σε ολόκληρα γονιδιώματα (80).

Στη φύση παρατηρούνται τέτοιες αλλαγές με πολύ μικρή συχνότητα. Η χρησιμοποίηση όμως ορισμένων χημικών προϊόντων, όπως φάρμακα, συντηρητικά τροφίμων, απορρυπαντικά, καλλυντικά κ.ά. φαίνεται να μεγαλώνει το ρυθμό δημιουργίας διαφόρων τύπων μεταλλαγών και ιδιαίτερα επιβλαβών μεταλλαγών (112, 213, 221, 358). Οι υποψίες αυτές ανάγκασαν πολλούς ερευνητές να στρέψουν την προσοχή τους σ' αυτά τα χημικά παρασκευάσματα με καθημερινή χρήση και παρατήρησαν ότι πράγματι πολλά από αυτά έχουν μεταλλοξογόνο δράση, ανάλογη με εκείνη που προκαλούν οι ακτινοβολίες(7, 75, 171, 217, 255, 342).

Από αυτή την άποψη σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα φυτοφάρμακα, εξ' αιτίας της ευρείας και, πολλές φορές, εντατικής χρήσης τους στη γεωργία(224, 225, 347). Σήμερα, πολλά από τα έμβια όντα του πλανήτη μας

εκτίθενται καθημερινά σε μικρές ποσότητες φυτοφαρμάκων ή μεταβολιτών τους. Οι έρευνες έδειξαν ότι, σε όλες τις κύριες κατηγορίες φυτοφαρμάκων (εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα) υπάρχουν ενώσεις με μεταλλαξογόνο δράση(172, 245, 255). Στις περισσότερες, πάντως, περιπτώσεις οι κίνδυνοι δεν έχουν προς το παρόν θεωρηθεί αρκετά σοβαροί ώστε να επιβάλλεται η απαγόρευση της χρήσης τέτοιων προϊόντων(30).

Τα μυκητοκτόνα, στα οποία ειδικότερα αναφέρεται αυτή η μελέτη, ενώ εμφανίζουν μάλλον μικρά προβλήματα οξείας τοξικότητας, φαίνεται να παρουσιάζουν σοβαρά προβλήματα χρόνιας τοξικότητας, και ιδιαίτερα από άποψη γενετικής δραστηριότητας(82, 111, 365). Για παράδειγμα τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα benomyl, thiophanate-methyl, το προϊόν της υδρολυσεώς τους carbendazim και το thiabendazole παρουσιάζουν αντιμιτωτική δράση(85, 183). Το carbendazim που είναι και το δραστικό συστατικό στις περισσότερες περιπτώσεις, ενώνεται με τις β-υπομονάδες της σωληνίνης των μικροσωληνίσκων και παρεμποδίζει έτσι το σχηματισμό της ατράκτου στους ευαίσθητους μύκητες(89). Όλα τα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής προκαλούν την εμφάνιση εγχρώμων τομέων(sectors) σε καλλιέργειες διπλοειδών στελεχών του *Aspergillus nidulans*, που οφείλονται σε μη κανονικό αποχωρισμό των θυγατρικών χρωματοσωμάτων(133). Τα μυκητοκτόνα της ομάδας των αρωματικών υδρογονανθράκων και δικαρβοξυμιδικών φαίνεται ότι αυξάνουν τη συχνότητα του μιτωτικού ανασυνδυασμού στον *A. nidulans* (133). Δεν είναι όμως ακόμα ξεκαθαρισμένη η πρωταρχική τους επίδραση στο υποκυτταρικό επίπεδο. Παρεμπόδιση της βιοσυνθέσεως του DNA έχει παρατηρηθεί για τα chloroneb, vinclozolin, procymidone και dicloran(52, 79, 136). Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης triarimol, fenarimol, triadimenol, bitertanol και imazalil παρουσιάζουν επίσης αντιμιτωτική δράση στον παραπάνω μύκητα (133). Υποστηρίζεται ότι οι ενώσεις αυτές προκαλούν βλάβες στην πυρηνική μεμβράνη που οδηγούν σε ανωμαλίες στην οργάνωση της ατράκτου και την κατανομή των θυγατρικών χρωματοσωμάτων με αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας της μιτωτικής διάσχισης(23).

Το γεγονός ότι η μεταλλαξιγένεση, δηλαδή η αλλαγή στη δομή του DNA, στη δομή ή στον αριθμό των χρωματοσωμάτων ή στον ανασυνδυασμό του γενετικού υλικού που γίνεται στην κυτταρική διαίρεση, σχετίζεται άμεσα με την καρκινογένεση, έκανε ακόμα πιο ενδιαφέρουσα την έρευνα γύρω από το θέμα της γενετικής τοξικολογίας(4, 309). Σχετικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στο Berkeley της Καλιφόρνιας από ομάδες επιστημόνων με επικεφαλής τον B. Ames, που εξέτασε πάνω από 300 καρκινογόνες ουσίες και έδειξε ότι το 90% από αυτές είναι πολύ δραστικά μεταλλαξιγόνα(4). Έτσι, πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι οι καρκινογόνες ουσίες προκαλούν καρκίνο με ένα μηχανισμό που έχει άμεση σχέση με την πρόκληση σωματικών μεταλλαγών και επομένως η μεταλλαξογόνος δράση μιας χημικής ένωσης, πρέπει να μας προβληματίζει για

μια πιθανή καρκινογόνο δράση της(4, 19).

Ένα από τα συστήματα που χρησιμοποιούνται σήμερα για την αναγνώριση χημικών ουσιών με μεταλλαξογόνο δράση και που χρησιμοποιήσαμε και εμείς στην εργασία μας, είναι ο παραφυλετικός κύκλος κατάλληλων διπλοειδών στελεχών του ασκομύκητα *A. nidulans*, δεδομένου ότι ο *A. nidulans* είναι ευκαρυωτικός οργανισμός(175, 176, 308). Τα διπλοειδή αυτά στελέχη, είναι ετεροζυγωτικά για το άσπρο και κίτρινο χρώμα των κονιδίων και για ορισμένες βιοχημικές απαιτήσεις (135). Στις αποικίες αυτών των στελεχών, οι σωματικοί (μιτωτικοί) διαχωρισμοί αναγνωρίζονται από την εμφάνιση τομέων με άσπρο ή κίτρινο χρώμα(141, 271, 272).

Οπωσδήποτε η αντιμιτωτική ή μη δράση μιας χημικής ουσίας στον *A. nidulans* δεν συνεπάγεται αντίστοιχη δράση στα ζωικά κύτταρα και τον άνθρωπο. Χρειάζεται εκτεταμένη έρευνα για συσχέτιση της αντιμιτωτικής δράσης στους μύκητες με αντιμιτωτική δράση στον άνθρωπο. Το τεστ όμως αυτό θα μπορούσε να αποδειχθεί πολύτιμο για μια γρήγορη διερεύνηση των χημικών ουσιών και για υπόδειξη των υπόπτων να έχουν γενετική επίδραση στον άνθρωπο(177, 179).



2. Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs)

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης, είναι ή σημαντικότερη σήμερα ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων και σε πολλές περιπτώσεις εξασφαλίζουν την καλύτερη δυνατή καταπολέμηση πολύ σημαντικών ασθενειών των φυτών που προκαλούνται από φυτοπαθογόνους Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες και Αδηλομύκητες(306). Οποσδήποτε το φάσμα δράσης ποικίλλει για το καθένα από τα μέλη της ομάδας. Τα περισσότερα είναι κατάλληλα για την καταπολέμηση ωιδίων και σκωριάσεων. Πολλά όμως από αυτά είναι κατάλληλα και για αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από είδη των γενών *Monilinia*, *Septoria*, *Venturia*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Cercospora*, *Thielaviopsis*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia* και *Botrytis*, (94, 120, 191, 322). Μέλη της ομάδας χρησιμοποιούνται εξ' άλλου με μεγάλη αποτελεσματικότητα από την φαρμακευτική και κτηνιατρική στην αντιμετώπιση μυκητιάσεων σε ανθρώπους και ζώα(33, 41, 51, 122).

Η ταξινόμησή τους γίνεται με βάση τον κοινό μηχανισμό δράσης που είναι η παρεμβολή τους, σε διάφορες θέσεις στην οδό βιοσύνθεσης της εργοστερόλης(101, 196). Η ομάδα των EBIs είναι ετερογενής, αλλά οι χημικές ενώσεις που την αποτελούν έχουν τρία κοινά χαρακτηριστικά:

- α.- Είναι ετεροκυκλικές ενώσεις με ένα τουλάχιστον άτομο αζώτου (N) στο δακτύλιο.
- β.- Με μερικές εξαιρέσεις (buthiobate, clotrimazole, dodecylimidazole, fluotrimazole, prochloraz) περιέχουν ένα τουλάχιστον ασύμμετρο άτομο άνθρακα (*C).
- γ.- Με εξαίρεση τα μορφολινικά, όλοι οι EBIs έχουν σαν κύρια θέση δράσης την παρεμπόδιση απομεθυλίωσης του άνθρακα -14 στο μόριο της 24- μεθυλενο-διυδρολانوστερόλης.

Στον πίνακα 1, περιλαμβάνονται τα σημαντικότερα μυκητοκτόνα αυτής της ομάδας, με τα κοινά και εμπορικά τους ονόματα (178,228).

Ειδικότερα για τις ενώσεις που διαπραγματεύεται αυτή η μελέτη, το fenarimol είναι αποτελεσματικό εναντίον ωιδίων σε πολλές καλλιέργειες, φουζικλαδίων και σκωριάσεων στη δένδροκομία και τη λαχανοκομία. Ιδιαίτερα χρησιμοποιείται προστατευτικά και θεραπευτικά για τον έλεγχο του φουζικλάδιου (*Venturia inaequalis*) και του ωιδίου (*Podosphaera leucotricha*) των μηλοειδών, επίσης ενάντιον ωιδίων σε αμπέλια, ροδάκινα, κολοκυνθοειδή, τομάτες, πιπεριές και τέλος εναντίον της κερκοσπορίωσης στα σακχαρότευτλα (228). Το clotrimazole ανήκει στη χημική ομάδα των ιμιδαζολικών και έχει εμπορικό όνομα Canestan. Βρίσκει εφαρμογή στη δημόσια υγεία για αντιμετώπιση μυκητιάσεων του ανθρώπινου οργανισμού (28, 56, 228).

Οι EBIs διακρίνονται από δύο βασικά πλεονεκτήματα που τους δίνουν σήμερα μια κυριαρχία μεταξύ των διασυστηματικών μυκητοκτόνων. Ήτοι:

α.- Έχουν ευρύ φάσμα δράσης στους μύκητες με μοναδική εξαίρεση τους ωομύκητες(68, 126, 207, 208).

β.- Την έλλειψη ιδιαίτερα σοβαρού προβλήματος ανθεκτικότητας, παρ' όλο που οι ενώσεις αυτές έχουν εξειδικευμένη θέση δράσης(59, 67, 124, 157, 335).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Κυριότερα μυκητοκτόνα της ομάδας των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης.

Χημική ομάδα	Κοινό όνομα	Εμπορικές ονομασίες
Πιπεραζίνες	triforine	Saprol, Funginex
Μορφολινικά	dodemorph fenpropimorph tridemorph aldimorph trimorphamide	Meltatox Corbel Calixin Falimorph Fademorf
Πυριδίνες	buthiobate pyrifenox	Denmert Dorado
Πυριμιδίνες	fenarimol nuarimol triarimol	Ridimin, Bloc, Rubigan Trimidal, Trimunol EL-273
Ιμιδαζόλες	imazalil prochloraz triflumizole miconazole econazole clotrimazole isoconazole ketoconazole	Fungaflor, Fecundal Sportac, Sporgon Trisosol, Trifludol, Trifmine Dactar, Dactarin Pevaryl Canestan Travocort Nizoral
Τριαζόλες	fluotrimazole triadimefon triadimenol bitertanol diclobutrazole propiconazole etaconazole flutriafol flusilazol myclobutanil tebuconazole	Persulon Bayleton Baytan, Bayfidan Baycor, Sibutol Vigil Tilt, Desmel Vanguard, Sonax Impact, Ferrax Nustar, Punch Systhane Folicur

2α. Μηχανισμός Ώράσης

Προκειμένου να κατανοηθεί ο τρόπος δράσης των EBIs, χρειάζεται να γίνει αναφορά στη μεταβολική οδό βιοσύνθεσης της εργοστερόλης και για το ρόλο που έχει αυτή η ένωση στη δομή και λειτουργία του κυττάρου.

Οι στερόλες χημικά υπάγονται στην κατηγορία των στεροειδών που μαζί με τα καροτινοειδή, τα τερπενοειδή και τις λιποδιαλυτές βιταμίνες αποτελούν την ομάδα των ισοπρενοειδών ενώσεων(2). Αυτές με τη σειρά τους ανήκουν στη μεγάλη κατηγορία χημικών ουσιών, τα λιποειδή. Τα στεροειδή είναι παράγωγα του στερανίου ή γονανίου και είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση μια και αποτελούν απαραίτητα συστατικά όλων των οργανισμών.

Στους ζωϊκούς οργανισμούς η σπουδαιότερη στερόλη είναι η χοληστερόλη που χρησιμεύει και σαν πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση άλλων στεροειδών(2). Στα φυτά σπουδαιότερες στερόλες είναι η σιτοστερόλη (sitosterol), η στιγμαστερόλη(stigmasterol) και η 24-methylcholest-5-en-3β-ol (63). Τέλος στις ζύμες και στους μύκητες, με εξαίρεση τους ωομύκητες, σπουδαιότερη στερόλη είναι η εργοστερόλη που αποτελεί δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών(35, 119). Λαμβάνει μέρος στη ρύθμιση της περατότητας της μεμβράνης που έχει σχέση με την ενεργό μεταφορά ουσιών εντός ή εκτός του κυττάρου, του πυρήνα και των μιτοχονδρίων(265, 364).

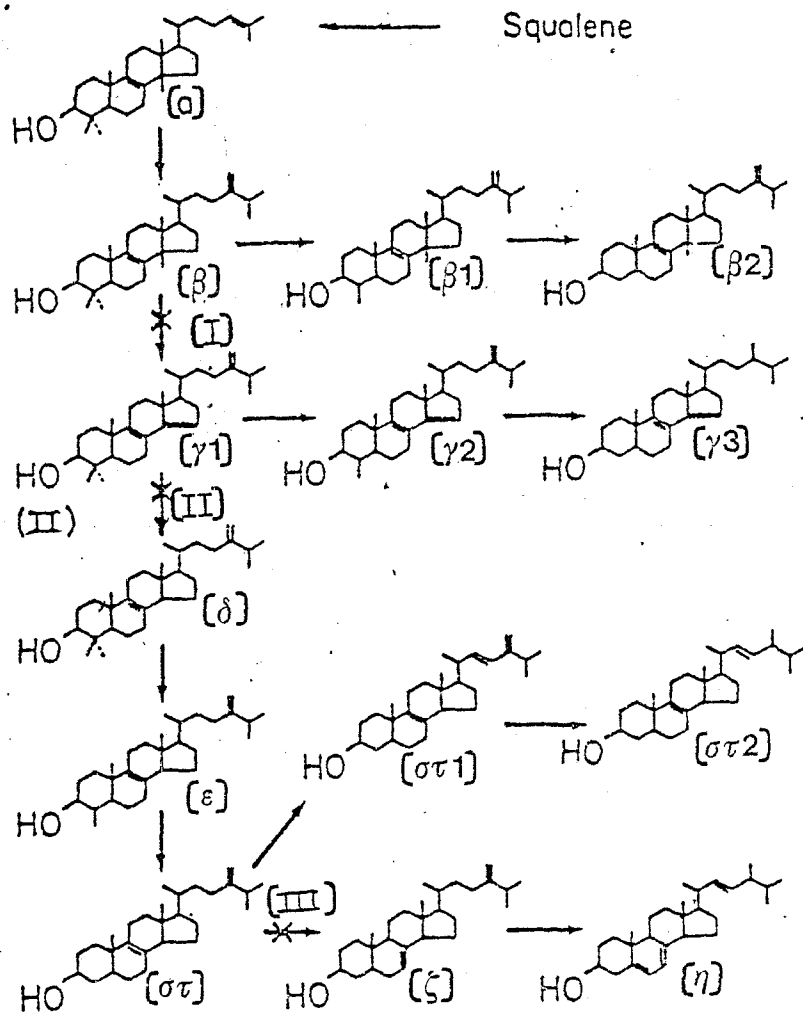
Οι στερόλες απαιτούνται σε μεγάλα σχετικά ποσά για τη δόμηση των μεμβρανών, και συμβάλλουν ουσιαστικά στη ρύθμιση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων αυτών (102, 267). Πρόσφατες δημοσιεύσεις (150, 266, 299) διαπίστωσαν ότι σε ελάχιστα ποσά, που συγκρίνονται μ' αυτά των ορμονών-βιταμινών, οι χημικές αυτές ενώσεις έχουν και ρόλο ρυθμιστικό που σχετίζεται με τη διαίρεση ή τον πολλαπλασιασμό γενικότερα κυττάρων ζωϊκών, φυτικών και ζυμομυκήτων. Έτσι στους ζυμομύκητες και τα φυτά, η εργοστερόλη ή άλλες 24-αλκυλο- στερόλες έχουν κάποια ρυθμιστική λειτουργία που έχει σχέση με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αλλά και στα θηλαστικά, η βιοσύνθεση χοληστερόλης φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαίρεση (13, 63).

Σε γενικές γραμμές η μεταβολική οδός παραγωγής της εργοστερόλης αρχίζει από το σκουαλένιο το οποίο κυκλοποιείται και μετατρέπεται σε λανοστερόλη (265, 307). Στην περίπτωση των μυκήτων το πρώτο βήμα μετά τη σύνθεση της λανοστερόλης, είναι η απομεθυλίωση του άνθρακα-14(C-14) με τη βοήθεια ενζυμικών συστημάτων κυριότερο συστατικό των οποίων είναι το κυτόχρωμα P-450(9, 37, 148, 201, 236). Το κυτόχρωμα P-450 αποτελεί επίσης κύριο συστατικό ενζυμικών συστημάτων που λαμβάνουν μέρος σε λειτουργίες βιοσύνθεσης στερολών σε ανώτερα φυτά και θηλαστικά(246, 283, 296, 344, 354, 360). Μετά την απομεθυλίωση αρχίζει νέο μεταβολικό στάδιο που καταλήγει στη βιοσύνθεση της επιστερόλης από την οποία συντίθεται η εργοστερόλη(24, 137, 240, 280).

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης με εξαίρεση τη χημική ομάδα των μορφολινικών, δρουν παρεμποδίζοντας την απομεθυλίωση του C-14 στο μόριο της λανοστερόλης (σχήμα1, θέση I) (10, 39, 188, 212, 261). Η παρεμπόδιση απομεθυλίωσης του C-14 από τα παράπανω μυκητοκτόνα είναι αποτέλεσμα δέσμευσης του αμικού σιδήρου του κυτοχρώματος P-450 από το ετεροκυκλικό άτομο άζωτου που διαθέτουν στο μόριό τους αυτές οι ενώσεις(109, 151, 229, 235). Παρουσία αυτών των ενώσεων σταματάει ο σχηματισμός της εργοστερόλης, ενώ συγκεντρώνονται στερόλες που στη θέση του άνθρακα-14 του μορίου τους περιέχουν μεθυλική ομάδα(34, 153, 343). Τέτοιες ενώσεις για παράδειγμα είναι η eburicol, obtusifoliol και 14a-methylfecosterol (128, 137, 356). Έτσι π.χ. το μυκητοκτόνο triarimol στα σπορίδια του μύκητα *Ustilago maydis* παρεμποδίζει το σχηματισμό της 4,4- dimethylergosta-8, 14, 24(28)-trienol με συνέπεια να συσσωρεύονται οι στερόλες 14-methylfecosterol, eburicol και obtusifoliol(26, 279, 281). Παρόμοια συμπεριφέρονται τα buthiobate (38), triforine(305, 314, 330), fenarimol(103, 104, 105, 169), nuarimol(28), imazalil(142, 323) triadimefon(53, 58, 130), clotrimazole(56, 238), miconazole(40, 152, 359), etaconazole(116, 304), propiconazole(153, 304, 355).

Οι C-14 μεθυλοστερόλες που συσσωρεύονται στα κύτταρα μετά την επίδραση αυτών των ενώσεων, θεωρούνται ακατάλληλες για τη διατήρηση της βιωσιμότητας, ιδιαίτερα στους μυκηλιακούς μύκητες π.χ *Monilinia*, *Pyricularia*, *Aspergillus* (106, 206, 238, 332). Παρ' όλα αυτά όμως υπάρχουν και ορισμένοι μύκητες που μπορούν να χρησιμοποιήσουν μεθυλοστερόλες για τη δόμηση των μεμβρανών τους, οι οποίες κατά κάποιο τρόπο μπορούν και συμπεριφέρονται κανονικά (353). Για παράδειγμα, ο μύκητας *Saprolegnia ferax* όταν υποστεί την επίδραση του triarimol, συνεχίζει να διατηρεί κανονική την αναπτυξή του, παρ' όλο που η μόνη στερόλη που ανευρέθηκε ήταν η λανοστερόλη (25, 27).

Για τα μυκητοκτόνα της υποομάδας των μορφολινικών έχουν προταθεί δύο θέσεις δράσης στη μεταβολική οδό βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (14, 192, 195, 269). Η μία αφορά την παρεμπόδιση του ενζύμου Δ^{14} -αναγωγή (Δ^{14} -reductase) που είναι υπεύθυνο για την αναγωγή του διπλού δεσμού C- 14 (15), με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ιγνοστερόλης (ignosterol) (σχήμα1, θέση II) (16, 43, 197). Η δεύτερη αφορά την παρεμπόδιση του ενζύμου Δ^8 - Δ^7 -ισομεράση (Δ^8 - Δ^7 isomerase) που είναι υπεύθυνο για τη μετατόπιση του διπλού δεσμού από τον C-8 (9) στον C-7 (8) με αποτέλεσμα την συσσώρευση fecosterol, ergosta-8, 22, 24 (28)- trien- 3b-ol και ergosta- 8, 22- dien- 3b- ol (σχήμα 1, θέση III) (14, 189).



Σχ. 1.- Πορεία βιοσύνθεσης της εργοστερόλης και οι θέσεις δράσης των παρεμποδιστών με τις αναπτυσσόμενες πλευρικές οδούς:

α) lanosterol, β) eburicol, β1) obtusifoliol, β2) 14α - methylfecosterol, γ) 4,4 - dimethylergosta - 8 - 14, 24 (28) - trien - 3b - ol, γ1) 4α - methylergosta - 8, 14, 24 (28) trien - 3b - ol, γ2) ignosterol, δ) 4,4 - dimethyl - 8, 24 (28) - dien - 3b - ol, ε) 4α - methylergosta - 8, 24 (28) - dien - 3b - ol, σ) 4α - fecosterol, σ1) ergosta - 8, 22; 24 (28) trien - 3b - ol, σ2) ergosta - 8, 22 - dien - 3b - ol, z) episterol, η) ergosterol.

2β. Επίδραση των EBIs στην ανάπτυξη , μορφολογία και κυτταρική δομή του μύκητα *A. nidulans*.

Τα αποτελέσματα των επιδράσεων των EBIs στην ανάπτυξη, εμφανίζονται πολύ γρήγορα και συχνά μέσα σε διάστημα δύο ωρών από την εφαρμογή του μυκητοκτόνου (87, 90, 187, 239). Η βλάστηση των σπορίων κατά κανόνα δεν επηρεάζεται αλλά οι βλαστικοί σωλήνες και οι υφές διογκώνονται και παραμορφώνονται (193, 274, 326).

Σε μελέτες της λεπτής δομής, διαπιστώθηκε ότι οι EBIs προκαλούν εκφυλιστικές αλλοιώσεις στο κυτταρικό τοίχωμα και το πλασμαλήμμα, όπως επίσης και σημαντική αύξηση των μεμβρανωδών συστατικών του κυττάρου (81, 159, 297).

Ειδικότερα έχουν περιγραφεί οι παρακάτω αλλοιώσεις παρουσία των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης:

Τα bifonazole και miconazole εμποδίζουν τον αποχωρισμό των βλαστοκυττάρων του μύκητα *Candida albicans* με αποτέλεσμα το σχηματισμό αλυσίδων (20, 36, 74, 170). Το τελευταίο μυκητοκτόνο σε συγκεντρώσεις 10^{-6} M και 10^{-5} M προκαλεί επί πλέον την προοδευτική φθορά του πλασμαλήματος και των κυτταροπλασματικών οργανιδίων (99, 253). Το κατεστραμμένο υλικό τελικά απομακρύνεται από το πρωτόπλασμα και εισέρχεται στο κεντρικό χυμοτόπιο (98). Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως (scanning electron microscope) έδειξε ότι οι μυκητοστατικές δόσεις του miconazole (10^{-7} M και 10^{-6} M), προκαλούν ανωμαλίες στην επιφάνεια των κυττάρων και διεγείρουν το σχηματισμό μεγάλου αριθμού αποπροσανατολισμένων βλαστικών διογκώσεων (buds) και βλαστικών ουλών (bud scars) (99). Αντίθετα, στη μυκητοκτόνο συγκέντρωση 10^{-4} M οι κυτταρικές επιφάνειες παραμένουν λείες, καλύπτονται όμως από πολυάριθμες φλυκτενώδεις κατασκευές, που κατά πάσα πιθανότητα αντιπροσωπεύουν κυτταροπλασματικά υπολείμματα εκφυλισμένων κυττάρων (99).

Τα κονίδια του μύκητα *Botrytis allii* παρουσία του triadimefon βλαστάνουν , αλλά οι βλαστικοί σωλήνες είναι βραχείς και διογκωμένοι (288). Το κυτταρικό τοίχωμα εμφανίζει έντονη πάχυνση και στο εσωτερικό του κυττάρου παρατηρούνται πολλά λιποσωματίδια και χυμοτόπια. Τα εγκάρσια διαφράγματα των υφών (septa) παραμένουν ημιτελή και σε αρκετές περιπτώσεις δεν σχηματίζονται καθόλου. Οποσδήποτε αυτού του είδους αλλοιώσεις δείχνουν επέμβαση της συγκεκριμένης ένωσης στο μηχανισμό κατασκευής του τοιχώματος της υφής και των εγκαρσίων διαφραγμάτων (161, 288).

Το ίδιο μυκητοκτόνο σε συγκεντρώσεις 62.5μM - 125μM μειώνει σημαντικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη και το σχηματισμό σκληρωτίων του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* (339). Επί πλέον, παρατηρείται αύξηση του ενδοπλασματικού δικτύου , που κατανέμεται τυχαία στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή σωρών ή συμπλεγμάτων μεμβρανών (339). Τέλος στο διάστημα που παρεμβάλλεται μεταξύ

του πλάσμαλήμματος και του κυτταρικού τοιχώματος, παρατηρούνται πολυάριθμα κυστίδια, που περιβάλλονται από απλή μεμβράνη (276, 339).

Το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα *Ustilago avenae* παρουσιάζει ημιρικοί εμφανίζει σημαντική πάχυνση. Στην κυτταροπλασματική μεμβράνη δημιουργούνται ενθυλακώσεις (invaginations) και στο εσωτερικό του κυττάρου παρατηρείται αυξημένος αριθμός λιποσωματιδίων και χυμοτοπιίων (154, 155).

Το imazalil προκαλεί τις ίδιες αλλοιώσεις με το προηγούμενο μυκητοκτόνο, σε μικρότερη όμως ένταση. Τα εγκάρσια διαφράγματα των υφών του *U. avenae* παραμορφώνονται, ενώ ο αριθμός των μιτοχονδρίων συξάνει και μειώνεται η διάμετρός τους (158, 160).

Η παρουσία των buthiobate και tridemorph αναστέλλει επίσης την ανάπτυξη του *B. cinerea* και προκαλεί το σχηματισμό περισσοτέρων του ενός βλαστικών σωλήνων ανά κονίδιο, ενώ και οι υφές παρουσιάζουν αυξημένες διακλαδώσεις (61, 189).

Τέλος το μυκητοκτόνο fenpropimorph αποδιοργανώνει τα εγκάρσια διαφράγματα των υφών του μύκητα *Penicillium italicum* ενώ και το κυτταρικό τοίχωμα παραμορφώνεται εξ' αιτίας της ακανόνιστης εναπόθεσης χιτίνης σ' αυτό (107, 194).

2γ. Γενετική δραστικότητα των EBIs

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης προκαλούν αύξηση στη συχνότητα της μιτωτικής διάσχισης (mitotic segregation) σε διπλοειδή στελέχη του μύκητα *A. nidulans* (133). Για να διαπιστωθεί όμως σαφής γενετική δραστικότητα, πρέπει να χρησιμοποιηθούν συγκεντρώσεις, που προκαλούν υψηλή παρεμπόδιση της αύξησεως του μύκητα (133). Η ανάλυση των προϊόντων μιτωτικής διάσχισης, έδειξε ότι οι EBIs αυξάνουν τόσο τα απλοειδή όσο και τα διπλοειδή προϊόντα μιτωτικού ανασυνδυασμού. Τα διπλοειδή όμως προϊόντα προέρχονται όχι από το μηχανισμό του μιτωτικού διασκελισμού αλλά από το μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων που φαίνεται τελικά να είναι ο μηχανισμός ο υπεύθυνος για τη γενετική δραστικότητα των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης.

Ο Bellincampi και οι συνεργάτες του διατύπωσαν την άποψη ότι στους Ασκομύκητες επειδή η μίτωση είναι ενδοπυρηνική, δηλαδή στη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης παραμένει ανέπαφη η πυρηνική μεμβράνη, ο μη διαχωρισμός των χρωματοσωμάτων φαίνεται να είναι αποτέλεσμα βλάβης της πυρηνικής μεμβράνης που οφείλεται στην παρεμπόδιση βιοσύνθεσης εργοστερόλης (23).

3. Δικαρβοξιμιδικά

Τα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα εμφανίσθηκαν στη δεκαετία του 1970 και ταξινομούνται σήμερα σε μία κοινή ομάδα με τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες, στην ομάδα των " αρωματικών υδρογονανθράκων και δικαρβοξιμιδικών (AHDs) ", εξ' αιτίας της θετικής συσχέτισης από άποψη διασταυρωτής ανθεκτικότητας που παρούσιάζουν (cross-resistance) (219, 231), αλλά και επειδή αυξάνουν τη συχνότητα της μιτωτικής διάσχισης στις αποικίες του διπλοειδούς στελέχους του μύκητα *A. nidulans* (136)

Η ανάπτυξη των δικαρβοξιμιδικών ευνοήθηκε σημαντικά απο τέσσερις κυρίως παράγοντες:

- α.- Τη χαμηλή τοξικότητα που εμφανίζουν στα θηλαστικά.
- β.- Το χαμηλό κόστος παραγωγής.
- γ.- Την καλή μυκητοτοξικότητα.
- δ.- Από την εμφάνιση ανθεκτικότητας, του μύκητα *B. cinerea* στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα.

Τα μυκητοκτόνα αυτής της ομάδας χρησιμοποιούνται σε επεμβάσεις σπόρου αλλά και για ψεκασμούς υπεργείων οργάνων, είναι δε πολύ σημαντικά για την καταπολέμηση των μετασυλλεκτικών σήψεων (228). Οπωσδήποτε στο σύνολό τους δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι έχουν ευρύ φάσμα δράσης. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά εναντίον μυκήτων που ανήκουν στα γένη : *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Alternaria*, *Sclerotium*, *Phoma*, *Tilletia* και *Penicillium* (222, 228, 303).

Στον πίνακα 2, περιλαμβάνονται τα σημαντικότερα μέλη της υποομάδας των δικαρβοξιμιδικών με εφαρμογή στη γεωργική πράξη.

Ειδικότερα για το iprodione που διαπραγματεύεται η παρούσα εργασία, χρησιμοποιείται στη καταπολέμηση μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Botrytis*, *Monilinia*, *Sclerotium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia*, *Corticium*, *Typhula*, *Fusarium* σε αμπέλια, οπωροφόρα, λαχανικά, καλλωπιστικά και δημητριακά (21, 218).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Κυριώτερα μυκητοκτόνα της ομάδας των δικαρβοξιμιδικών.

Κοινό όνομα	Εμπορικές ονομασίες
procymidone	Sumisclex, Sumilex
vinclozolin	Ronilan
iprodione	Rovral
metomeclan	Drawifol
chlozolate	Serinal

3α. Μηχανισμός δράσης

Παρά τις έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί από τα πρώτα χρόνια της δεκαετίας του 1960 μέχρι σήμερα, εν τούτοις ο μηχανισμός (ή οι μηχανισμοί) τοξικότητας των αρωματικών υδρογονανθράκων και δικαρβοξιμιδικών συνεχίζει να παραμένει αδιευκρίνιστος. Η ομοιότητα στη χημική δομή, οι παρόμοιες επιδράσεις που έχουν στους μύκητες και τέλος η διασταυρωτή ανθεκτικότητα, στηρίζουν την άποψη ότι όλες αυτές οι ενώσεις έχουν κοινό μηχανισμό δράσης (22, 231, 346).

Σε μέλη της ομάδας έχουν αποδοθεί παρεμπόδιση της πρωτεϊνοσύνθεσης (228), αλλαγή της συστάσεως των κυτταρικών τοιχωμάτων (234, 345), μεταβολές στις ημιπερατές ιδιότητες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (228), παρεμβολή σε ένα σύστημα με το οποίο επιτυγχάνεται τοπικά πλαστικοποίηση του κυτταρικού τοιχώματος που επιτρέπει εκβλαστήσεις (228), και τελευταία παρεμβολή στο σχηματισμό των μικροϊνιδίων του κυττάρου (186). Σε ερευνητική εργασία των Pappas και Fisher (263), υποστηρίχθηκε ότι το μυκητοκτόνο iprodione προκαλεί συσσώρευση 4,4 dimethyl-sterol, πράγμα που θα μπορούσε να οφείλεται σε παρεμπόδιση βιοσύνθεσης εργοστερόλης. Πειράματα όμως που πραγματοποιήθηκαν με το μύκητα *Cladosporium cucumerinum*, φανέρωσαν την ύπαρξη χαμηλών επιπέδων διασταυρωτής ανθεκτικότητας δύο στελεχών του ανωτέρω μύκητα που ήταν ανθεκτικά στο fenarimol, με τα iprodione-vinclozolin ενώ δεν υπήρχε διασταυρωτή ανθεκτικότητα στο procymidone (124). Παρόμοια ερευνητικά δεδομένα διαπιστώθηκαν και για τους μύκητες *A. nidulans* και *P. italicum* (124).

Τα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνητικών εργασιών πάνω στη δράση των

δικαρβοξυμιδικών σε ευαίσθητους μύκητες όπως οι *M. mucedo* και *B. cinerea*, (117, 143, 163), υποστηρίζουν την άποψη ότι οι ενώσεις αυτές συμπεριφέρονται ανάλογα με τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες (232) και προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων. Οι κυριότερες θέσεις πραγματοποίησης αυτής της αντίδρασης είναι η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, το ενδοπλασματικό δίκτυο και πολύ πιθανόν, σε μικρότερο βαθμό, η κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα μυκητοκτόνα αυτά υποστηρίζεται ότι αντιδρούν με τα φλαβινικά ένζυμα όπως π.χ. η αναγωγή του κυτοχρώματος c ή παρόμοιες μονοοξυγονάσες, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η μεταφορά ηλεκτρονίων από τη φλαβίνη στο υπόστρωμα και να προκαλείται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών, υπεροξειδωση των φωσφολιπιδίων (228).

Φαίνεται ότι αυτός ο μηχανισμός δράσης, μπορεί να εξηγήσει τις επιδράσεις των δικαρβοξυμιδικών που έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα. Έτσι μια τέτοια οξειδωση των λιπιδίων μέσα στα μιτοχόνδρια, πρέπει κατά πάσα πιθανότητα να καταστρέφει τη δομή του συστήματος της εσωτερικής μεμβράνης και μ' αυτόν τον τρόπο μειώνεται η κυτταρική αναπνοή, χωρίς εξειδικευμένη παρεμπόδιση της αναπνευστικής αλυσίδας (228). Παράλληλα, η παραγωγή των ελευθέρων ριζών και η λιπιδιακή υπεροξειδωση μέσα στην πυρηνική μεμβράνη, όχι μόνο βλάπτει τη λειτουργία της και τη μεταφορά του RNA αλλά μπορεί να επιδράσει και στο ίδιο το DNA με αποτέλεσμα ρήξεις αλυσίδων και χρωματοσωματικές ανωμαλίες (6, 46). Αυτό οφείλεται στο ότι τα δεοξυριβονουκλεοτίδια είναι πολύ ευαίσθητα τόσο στο μονοατομικό οξυγόνο όσο και στις ρίζες υδροξυλίου. Η συγκεκριμένη δράση στο DNA μπορεί να εξηγήσει τις γενετικές επιδράσεις αυτών των μυκητοκτόνων που παρατηρήθηκαν από τον Georgopoulos και τους συνεργάτες του (136) και στις οποίες θα αναφερθούμε παρακάτω.

3β. Επίδραση στην κυτταρική δομή, ανάπτυξη και μορφολογία του μύκητα *A. nidulans*.

Σε αντίθεση με πολλά προστατευτικά μυκητοκτόνα, τα δικαρβοξυμιδικά επηρεάζουν τη βλάστηση σπορίων λιγότερο απ' ό,τι την ανάπτυξη μυκηλίου (52, 263, 286). Διάφορες ερευνητικές εργασίες κατά καιρούς έχουν αναφέρει τις παρακάτω μεταβολές στη μορφολογία και τη λεπτή δομή των μυκήτων, παρουσία ενώσεων αυτής της κατηγορίας. Η επιμήκυνση των βλαστικών υφών του *B. cinerea* σε διάλυμα σακχαρόζης διεγείρεται από πολύ χαμηλές συγκentrώσεις του vinclozolin (0.143mg/lit) ενώ σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0.143mg/lit η επιμήκυνση περιορίζεται και οι βλαστικές υφές διογκώνονται και παραμορφώνονται (223, 264). Πάντως ακόμα και σε συγκέντρωση 143mg/lit το 26% των κωνιδίων βλαστάνουν. Εάν η βλάστηση λάβει χώρα σε υδατικό διάλυμα που

περιέχει το μυκητοκτόνο procymidone, τότε οι περισσότερες από τις βλαστικές υφές τελικά διαρρηγνύονται(162). Το ίδιο είχε παρατηρηθεί και παλιότερα με επίδραση αρωματικών υδρογονανθράκων. Διάρρηξη κυττάρων υφών, εκτεθειμένων σε vinclozolin και iprodione, έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (295).

Οπωσδήποτε, οι επιδράσεις αυτές αποδεικνύουν μια διατάραξη της κανονικής σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος, μπορούν όμως να προκληθούν και από άλλες χημικές ενώσεις με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Τέτοιες είναι για παράδειγμα το κύκλοεξιμίδιο που παρεμποδίζει την πρωτεϊνσύνθεση (338), το carbendazim που παρεμποδίζει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης και το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων (166) και τέλος οι EBIs (282) για τους οποίους αναφερθήκαμε νωρίτερα. Συνεπώς, αυτές οι μορφολογικές επιδράσεις από μόνες τους δίνουν μόνο μια μικρή ιδέα σχετικά με τον τρόπο δράσης των δικαρβοξιμιδικών μυκητοκτόνων.

Οι παρατηρήσεις σε υποκυτταρικό επίπεδο έδειξαν τα δικαρβοξιμιδικά να προκαλούν λύση των εσωτερικών μιτοχονδριακών μεμβρανών καθώς επίσης και των μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου (162, 233). Το κυτταρικό τοίχωμα από μορφολογική άποψη φαίνεται να μην επηρεάζεται από τα δικαρβοξιμιδικά, σε αντίθεση με τη συγγενή υποομάδα των αρωματικών υδρογονανθράκων που φαίνεται να προκαλούν σημαντική πάχυνση (230).

3γ. Γενετική δραστικότητα των δικαρβοξιμιδικών

Τα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα διαπιστώθηκε ότι αυξάνουν σημαντικά τη συχνότητα μιτωτικής διάσχισης στα διπλοειδή στελέχη του μύκητα *A. nidulans*, η ικανότητά τους δε αυτή αποτέλεσε ένα επιπλέον κριτήριο για την ομαδοποίηση τους με τους αρωματικούς υδρογονανθράκες (135, 180). Η προσθήκη αυτών των ενώσεων στο θρεπτικό υλικό όπου αναπτύσσεται ο ανωτέρω μύκητας, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας των παραγόμενων κίτρινων και λευκών τομέων (135). Από τον Georgoroulos και τους συνεργάτες του υποστηρίχθηκε ότι ίσως η επίδραση τους στα χρωματοσώματα και πιθανόν στη μιτωτική άτρακτο είναι μια κύρια αιτία της μυκητοτοξικότητας των δικαρβοξιμιδικών (136).

Σήμερα υπάρχουν δύο απόψεις σχετικά με τη γενετική δραστικότητα των χημικών αυτών ουσιών. Η πρώτη προέρχεται απ' τα δεδομένα ερευνητικής εργασίας του Karras (180) και υποστηρίζει ότι οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες και τα δικαρβοξιμιδικά προκαλούν στους μύκητες θραύση χρωματοσωμάτων, ενώ εκείνη (η άποψη) του Azevedo και των συνεργατών του (12) ότι εμποδίζουν τον αποχωρισμό των θυγατρικών χρωματοσωμάτων. Οπωσδήποτε, προσπάθεια να αποσαφηνισθεί ο μηχανισμός της γενετικής δραστικότητας θα συνέβαλε

οπωσδήποτε και στην κατανόηση γενικότερα της δράσης αυτών των
μικητοκτόνων σε υποκυτταρικό επίπεδο.

4. Φθαλιμίδια και άλλα συγγενή μυκητοκτόνα

Τα προστατευτικά αυτά μυκητοκτόνα από χημική άποψη είναι ετεροκυκλικές ενώσεις αζώτου, που χαρακτηρίζονται από ένα πολυαλογονωμένο αλκύλιο ενωμένο με θείο. Το πολυαλογονωμένο αυτό αλκύλιο είναι και υπεύθυνο για τη μυκητοτοξικότητα (132). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναγνωρισθεί μεταλλαξιγόνες και τερατογόνες ιδιότητες των φθαλιμιδίων σε πολλούς οργανισμούς, γεγονός που έχει προκαλέσει μείωση της γεωργικής χρησιμοποίησής τους (77).

Στον πίνακα 3 περιλαμβάνονται οι ενώσεις της ομάδας αυτής, με τα αντίστοιχα εμπορικά τους ονόματα, που βρίσκουν εφαρμογή στη γεωργική πράξη.

Το captafol, που διαπραγματεύεται η παρούσα εργασία, έχει ευρύ φάσμα δράσης με μεγάλη σταθερότητα. Η χρήση του έχει απαγορευθεί σε πολλές χώρες εξ' αιτίας των μεταλλαξιγόνων ιδιοτήτων που εμφανίζει. Είναι προστατευτικό κατάλληλο για εφαρμογές στο φύλλωμα. Ελέγχει το φουζικλάδιο των μηλοειδών (*Venturia inaequalis*), το κορύνεο των πυρηνοκάρπων (*Stigmia carporhila*), τον εξώασκο της ροδακινιάς (*Taphrina deformans*), τον περονόσπορο (*Plasmopara viticola*) και τη τεφρά σήψη της αμπέλου (*Botrytis cinerea*), τις προσβολές από *Alternaria* spp και *Phytophthora infestans* στην πατάτα, τη σεπτορίωση του σέλινου (*Septoria* spp) και του σίτου (*Septoria tritici*) καθώς και πλήθος άλλων ασθενειών στις τομάτες, εσπεριδοειδή, κρεμμύδια, κολοκύθια, αραβόσιτο, σόργο κ.λ.π. Χρησιμοποιείται επίσης σε επεμβάσεις στο σπόρο για τον έλεγχο μυκήτων του γένους *Pythium* και *Phoma* σε σακχαρότευτλα, βαμβάκι και ρύζι.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Φθαλιμίδια και άλλα συγγενή μυκητοκτόνα

Κοινό όνομα	Εμπορικές ονομασίες
captafol	Difolatan
captan	Orthocide, Merpan
folpet	Phaltan
dichlofluanid	Euparen, Elvaron
tolyfluanid	Euparen M.

4α. Μηχανισμός δράσης

Τα μυκητοκτόνα αυτής της ομάδας έχουν μη εξειδικευμένη δράση, με αποτέλεσμα να αντιδρούν με περισσότερα από ένα κυτταρικά συστατικά, όταν βρεθούν στο εσωτερικό του κυττάρου, παρεμποδίζοντας έτσι περισσότερες από μία κυτταρικές διεργασίες (108, 252, 310). Όσον αφορά το μηχανισμό δράσης, τα φθαλιμίδια αντιδρούν τόσο με τις διαλυτές όσο και με τις αδιάλυτες θειόλες, με συνέπεια να αναστέλλεται ένας σημαντικός αριθμός μεταβολικών λειτουργιών του κυττάρου (293, 319). Έτσι π.χ. το captan αντιδρά με τη σουλφυδριλική ομάδα του συνενζύμου A παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του κιτρικού οξέος από το οξεικό οξύ (258, 292). Για τον ίδιο ακριβώς λόγο η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεύδης που είναι ένα σημαντικό έγκυμο για τη ζύμωση της γλυκόζης στα κύτταρα των ζυμομυκήτων, παρεμποδίζεται από το captan και το folpet (164, 242). Στους ευαίσθητους μύκητες η αναπνοή παρεμποδίζεται πιθανότατα από αντίδραση των μυκητοκτόνων αυτής της ομάδας με ένζυμα που έχουν σουλφυδριλική ομάδα στο ενεργό κέντρο και ακόμα με το συνένζυμο Q που έχει επίσης τέτοια ομάδα (294, 321). Η τοξικότητα των φθαλιμιδίων μειώνεται σημαντικά αν πριν την προσθήκη του μυκητοκτόνου, αυξηθεί η ποσότητα των σουλφυδριλικών ομάδων (-SH) στο υλικό καλλιέργειας (320).

Κατά την αποικοδόμηση των φθαλιμιδίων ή κατά την αλληλοεπίδραση τους με τα κυτταρικά συστατικά παράγονται διάφορες ενώσεις όπως θειοφωσγένιο, διθειοφωσγένιο, τριχλωρομεθυλθειομάδες, τετραϋδροφθαλιμίδιο, υδρόθειο και τέλος μονοξειδίο του θείου (320, 324). Το θειοφωσγένιο και οι τριχλωρομεθυλθειομάδες που απελευθερώνονται μπορούν και αλληλοεπιδρούν με αμινομάδες, υδροξυλομάδες, σουλφυδριλομάδες και ίσως και με άλλες ομάδες με αποτέλεσμα να δημιουργούνται επί πλέον χημικές αντιδράσεις που συμβάλλουν στην εμφάνιση της μυκητοτοξικότητας αυτών των ενώσεων (227, 325).

4β. Γενετική δραστηριότητα των φθαλιμιδίων

Τα captan, folpet αποτέλεσαν τα δύο πρώτα μυκητοκτόνα της κατηγορίας των φθαλιμιδίων για τα οποία διαπιστώθηκε μεταλλαξιγόνο δράση (49). Οι έρευνες των Legator (215), Clarke (69), Bridges (48, 49) και Shirasu (317), έδειξαν ότι οι δύο αυτές ενώσεις είναι υπεύθυνες για την πρόκληση μεταλλαγών σε διάφορα μικροβιακά συστήματα, κυρίως βακτήρια, ενώ ο Kappas (177) σε άλλη ερευνητική εργασία διαπίστωσε ότι η παρουσία αυτών των ενώσεων αυξάνει σημαντικά τα "έγχρωμα προϊόντα διάσχισης" σε διπλοειδή στελέχη του μύκητα *Aspergillus nidulans*.

Τελευταία οι Ziogas και Georgopoulos (363) διερεύνησαν τον μηχανισμό πρόκλησης του μιτωτικού ανασυνδυασμού στον *A. nidulans* και διαπίστωσαν ότι οι μικρές συγκεντρώσεις των φθαλιμιδίων είναι υπεύθυνες για την αύξηση της συχνότητας των μιτωτικών διασκελισμών (crossing-over) ενώ οι μεγάλες για την αύξηση της συχνότητας του μη αποχωρισμού των χρωματίδων. Κατάλληλα πειράματα από τους ίδιους ερευνητές έδειξαν ότι πτητικό παράγωγο ή παράγωγα των φθαλιμιδίων είναι κατά πάσα πιθανότητα υπεύθυνα για την αύξηση των μιτωτικών διασκελισμών στις μικρές συγκεντρώσεις (363). Οι Couch και Siegel (77, 78) διαπίστωσαν ότι τα μυκητοκτόνα αυτά μπορούν να δεσμεύονται στις ιστόνες. Η ικανότητα τους αυτή φαίνεται ότι οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της δομής του DNA και σε αύξηση της συχνότητας των θραύσεων από την δράση των κυτταρικών ενζύμων. Με το μηχανισμό αυτό εξηγείται οπωσδήποτε η αύξηση της συχνότητας του μιτωτικού διασκελισμού όχι όμως και του απλοειδισμού.

Με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών της Käfer (176), οι Ziogas και Georgopoulos (363) συμπέραναν ότι τα φθαλιμίδια πρέπει να θεωρηθούν γενικά μεταλλαξιγόνα εξ' αιτίας των επιδράσεων που έχουν. Πιο συγκεκριμένα, είναι ενώσεις που προκαλούν την εμφάνιση ευπλοειδικών προϊόντων διάσχισης όλων των τύπων αυξάνοντας τη συχνότητα των μεταλλαγών, των ανωμάτων χρωματοσωματικών διαχωρισμών και των μιτωτικών διασκελισμών.



5. Βενζιμιδαζολικά

Η εμφάνιση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων στα τέλη της δεκαετίας του 1960, δημιούργησε μια καινούργια εποχή στη φυτοπροστασία. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα πρώτα διασυστηματικά φάρμακα, με ευρύ φάσμα προληπτικής και θεραπευτικής δράσης, μικρή φυτοτοξικότητα, μικρή τοξικότητα για τα θερμόαιμα και μεγάλη υπολειμματική δράση (88, 254).

Στην ομάδα αυτή των μυκητοκτόνων εμφανίζονται ευαίσθητοι οι περισσότεροι από τους ασκομύκητες, τους βασιδομύκητες και τους αδηλομύκητες. Αντίθετα οι ωομύκητες δεν παρουσιάζουν καμμία απολύτως ευαισθησία (32, 127, 262).

Στον πίνακα 4 περιλαμβάνονται οι κυριότεροι εκπρόσωποι των βενζιμιδαζολικών και των συγγενών μυκητοκτόνων που βρίσκουν εφαρμογή στη γεωργική πράξη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Βενζιμιδαζολικά και άλλα συγγενή μυκητοκτόνα.

Κοινό όνομα	Εμπορικές ονομασίες
benomyl	Benlate , Tersan , Fundazol
carbendazim	Delsene , Bavistin , Derosal
fuberidazole	Neo - Voronit
thiabendazole	Mertect , Tecto
thiophanate	Cercobin , Topsin
thiophanate-methyl	Cercobin-M , Topsin-M

Η εικόνα που εμφανίζεται σήμερα γι' αυτή τη κατηγορία φυτοφαρμάκων είναι οπωσδήποτε λιγότερο αισιόδοξη από ότι ήταν στις αρχές της πρακτικής τους εφαρμογής, εξ' αιτίας κυρίως δύο βασικών λόγων (96, 97, 348).

- α.- Η γενετική δραστηριότητα αυτών των μυκητοκτόνων
- β.- Η ευκολία με την οποία στους ευαίσθητους μύκητες δημιουργούνται με μεταλλαγές ανθεκτικά στελέχη.

5α. Μηχανισμός δράσης

Το benomyl και το thiophanate-methyl, αποδείχθηκε ότι σε υδατικό διάλυμα μετατρέπονται σε μεθυλεστέρα του βενζιμιδαζολοκαρβαμιδικού οξέος (MBC),

μάλλον γενικής αποδοχής παραπάνω άποψη δεν συμφωνούν πλήρως τα ερευνητικά δεδομένα του Kumari και των συνεργατών του (210). Οι μελέτες στα βλαστημένα κονίδια του *Fusarium oxysporum*, έδειξαν ότι η παρουσία του benomyl (3μM και 10μM) συντελεί στην παρεμπόδιση της σύνθεσης του DNA προτού τα κύτταρα εισέλθουν στη μίτωση. Έτσι υποστηρίχθηκε ότι το μυκητοκτόνο ίσως έχει και άμεση επίδραση στη σύνθεση του DNA, διαφορετική από αυτή που παρατηρείται εξ' αιτίας της παρεμπόδισης της μίτωσης από το μυκητοκτόνο.

Η αντιμιτωτική δράση του MBC στον *A. nidulans* παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την αντιμιτωτική δραστηριότητα της κολχικίνης, η οποία παρεμποδίζει τη δημιουργία της ατράκτου εξ' αιτίας της σύνδεσής της με τις υπομονάδες πρωτεΐνης των μικροσωληνίσκων της ατράκτου στους ανώτερους ζωικούς οργανισμούς (18,148,250). Αποτέλεσμα είναι να διαταραχθεί ένας σημαντικός αριθμός κυτταρικών λειτουργιών στις οποίες υπεισέρχονται αυτές οι κατασκευές, όπως π.χ. η μίτωση, η μείωση και η ενδοκυττάρια μεταφορά οργανιδίων (66,100,228).

Το MBC δεσμεύεται στις β- υπομονάδες της τουμπουλίνης και παρεμποδίζει έτσι τον πολυμερισμό των διμερών αβ και κατά συνέπεια το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων (91,278). Η Sheir- Neiss και οι συνεργάτες της (316) πραγματοποιώντας γενετική ανάλυση 28 μεταλλαγμένων στελεχών ανθεκτικών στο benomyl, βρήκαν ότι τα 18 από αυτά είχαν μεταβολές στους γόνους που κωδικοποιούσαν τη β-υπομονάδα της τουμπουλίνης, ενώ κανένα δεν είχε μεταβολές για την α-τουμπουλίνη. Οι Davidse και Flach (91) κατάφεραν επίσης να απομονώσουν από εκχυλίσματα κυττάρων μυκηλίου του *A. nidulans* μια πρωτεΐνη που είχε την ικανότητα να δεσμεύει ραδιενεργό carbendazim. Οι βιοχημικές ιδιότητες αυτής της πρωτεΐνης ήταν χαρακτηριστικές της β-τουμπουλίνης. Τα ερευνητικά αυτά αποτελέσματα έδειξαν ότι το MBC δεσμεύεται στην υπομονάδα της β-τουμπουλίνης και εμποδίζει έτσι τον πολυμερισμό και τον σχηματισμό των μικροσωληνίσκων.

5B. Επίδραση των βενζιμιδαζολικών στην κυτταρική δομή, μορφολογία και ανάπτυξη του μύκητα *A. nidulans*.

Σε μελέτες οπτικής μικροσκοπίας, διαπιστώθηκε ότι η κυτταρική δομή σε διάφορους μύκητες, εμφανίζει σημαντικές μεταβολές μετά από επίδραση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων (275, 290).

Έτσι, στα κονίδια του *B. fabae* το benomyl προκαλεί το σχηματισμό διογκωμένων και παραμορφωμένων βλαστικών σωλήνων με αυξημένες διακλαδώσεις των υφών σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Παράλληλα τα κυτταροπλασματικά οργανίδια στα κορυφαία τμήματα των υφών εμφανίζονται

αποδιοργανωμένα (290).

Το ίδιο μυκητοκτόνο σε συγκέντρωση 5μg/ ml προκαλεί επίσης σημαντικές μεταβολές στα βλαστημένα κονίδια του μύκητα *F. oxysporum* f. sp. *melanis*, 48 ώρες μετά τη βλάστηση (64). Το 10% των βλαστανόντων κονιδίων διαρρηγνύεται, ενώ μειώνεται σημαντικά στα υπόλοιπα κύτταρα η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα. Το κυτταρικό τοίχωμα αποκτά ανώμαλη μορφολογία και σε αρκετές περιπτώσεις πάχυνση (64, 93).

Στις παρατηρήσεις ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ο πυρήνας φαίνεται να έχει υποστεί σημαντικές αλλοιώσεις. Στο εσωτερικό του παρατηρούνται αρκετά συχνά " μεμβρανώδη συστατικά", ενώ η πυρηνική μεμβράνη, παρουσιάζει ενθυλακώσεις. Τέλος το ενδοπλασματικό δίκτυο κατακερματίζεται σε πολύ μικρά κυστίδια (290).

Οι νεότερες ερευνητικές εργασίες των Howard και Aist (166) έδειξαν ότι το carbendazim προκαλεί απομάκρυνση των μιτοχονδρίων από τις κορυφές των υφών στο μύκητα *F. acuminatum*. Τα " μυτερά σωμάτια" (spitzenkorpers) που εντοπίζονται στις κορυφές των υφών και συμμετέχουν στην ανάπτυξη τους εξαφανίζονται.

Σε άλλη ερευνητική εργασία των ίδιων συγγραφέων μελετήθηκε η λεπτή δομή των κορυφών των υφών του μύκητα *F. acuminatum* με τη μέθοδο της ψυκτοαντικατάστασης (freeze-substitute) (167). Αυτή η τεχνική έχει τη δυνατότητα να παρατηρήσει κατασκευές και οργανίδια που με τους συνηθισμένους τρόπους στερέωσης καταστρέφονται. Έτσι στα κύτταρα του μάρτυρα εντοπίζονται πολυάριθμοι μικροσωληνίσκοι και κυστίδια συκεντρωμένα στα άκρα των υφών. Η δεκάλεπτη όμως παρουσία του carbendazim προκαλεί την εξαφάνιση των μικροσωληνίσκων από τις κορυφές των υφών, ενώ τα κυστίδια κατανέμονται σε όλο το μήκος της υφής. Οι ερευνητές αυτοί κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το carbendazim μπλοκάροντας τη συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων παρεμποδίζει την ενδοκυττάρια μεταφορά υλικών του κυτταρικού τοιχώματος.

5γ. Γενετική δραστικότητα των βενζιμιδαζολικών

Το benomyl ήταν το πρώτο σε γεωργική χρήση μυκητοκτόνο που βρέθηκε ότι αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των άσπρων και κίτρινων τομέων στις αποικίες διπλοειδών στελεχών του μύκητα *A. nidulans* που είναι ετεροζύγωτα για τους γόνους *w*, που ελέγχουν το χρώμα των κονιδίων (*y* για το κίτρινο και *w* για το λευκό) (146, 289).

Αυτή η παρατήρηση αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ότι η συγκεκριμένη ένωση δρα στη μίτωση. Ακόμα και σε συγκεντρώσεις που προκαλούν μόνο 10% παρεμπόδιση στην ανάπτυξη, εμφανίζεται σημαντική αύξηση των εγχρώμων τομέων (183). Τα περισσότερα προϊόντα μιτωτικής διάσχισης που προκύπτουν με

παρουσία του benomyl, ή άλλων βενζιμιδαζολικών είναι απλοειδή ή διπλοειδή που προέρχονται από το μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων (non-disjunction) (147, 350).

Το benomyl έχει αναφερθεί ότι προκαλεί σημειακές μεταλλάξεις στον μύκητα *F. oxysporum* καθώς επίσης και σε ορισμένα βακτήρια (311, 312, 313, 341).

Ο Kappas και οι συνεργάτες του (181, 184) έδειξαν ότι το benomyl δρα στα βακτήρια προκαλώντας γονιδιακές μεταλλάξεις (πλαισιοτροποποιητικές), γιατί μπορεί να ενσωματωθεί στο DNA σαν-ανάλογο πουρίνης και να προκαλέσει λανθασμένη συγκρότηση του γενετικού μυνήματος. Παρόμοια, το carbendazim έχει αναφερθεί ότι προκαλεί σημειακές μεταλλάξεις σε στελέχη του *A. nidulans* και *Cladosporium cucumerinum* (334). Η συχνότητα πρόκλησης αυτών των μεταλλάξεων βρίσκεται σε άμεση εξάρτηση από το pH του μέσου. Έτσι οι μεταλλάξεις στον *A. nidulans* φαίνεται να συμβαίνουν μόνο σε pH 5.2-5.3 ενώ στον *C. cucumerinum* μόνο σε pH 6.8. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μεταλλαξογόνος ικανότητα του carbendazim εξαρτάται σημαντικά από το pH και μπορεί να εξηγήσει τυχόν προηγούμενες συγκρουόμενες απόψεις.

I. 6. Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός αυτής της μελέτης, είναι η διερεύνηση των μηχανισμών γενετικής δραστηριότητας μερικών μελών από τις τέσσερις μεγάλες κατηγορίες μυκητοκτόνων: (α) τους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs), (β) τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες με τα δικαυβοξυμιδικά (AHDs), (γ) τα φθαλιμίδια και (δ) τα βενζιμιδαζολικά. Στις τέσσερις αυτές ομάδες ανήκει το μεγαλύτερο ποσοστό από τα χρησιμοποιούμενα σήμερα μυκητοκτόνα, για αντιμετώπιση μυκητολογικών ασθενειών στα φυτά αλλά και στα θηλαστικά. Κατανόηση των μηχανισμών γενετικής δραστηριότητας είναι, οπωσδήποτε, χρήση για την αποτίμηση των κινδύνων που ενδεχομένως συνεπάγεται η χρήση γενετικά δραστικών ουσιών για τη δημόσια υγεία.

Τα βενζιμιδαζολικά, αποτελούν τα μόνα για τα οποία γνωρίζουμε επακριβώς το μηχανισμό μυκητοτοξικής δράσης, ο οποίος είναι και υπεύθυνος της γενετικής δραστηριότητας αυτών των μυκητοκτόνων. Γι' αυτό το λόγο επιλέξαμε το benomyl σαν αντιπροσωπευτικό της κατηγορίας, προκειμένου να συγκριθούν οι επιδράσεις του σε υπόκυτταρικό κυρίως επίπεδο, με εκείνες των υπόλοιπων μυκητοκτόνων που σκοπεύαμε να μελετήσουμε.

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs) έχουν γνωστό σε λεπτομέρειες μηχανισμό δράσης. Η γενετική τους δραστηριότητα που εμφανίζεται έντονη μόνο με υψηλές συγκεντρώσεις έχει προταθεί ότι οφείλεται στην εκτεταμένη βλάβη της πυρηνικής μεμβράνης, που είναι αποτέλεσμα της παρεμπόδισης βιοσύνθεσης εργοστερόλης. Οι βλάβες αυτές οδηγούν σε ανωμαλίες στην οργάνωση της ατράκτου και την κατανομή των θυγατρικών χρωματοσωμάτων. Οπωσδήποτε, οι υποθέσεις αυτές δεν έχουν τεκμηριωθεί, ενώ υπάρχει το ενδεχόμενο οι υψηλές συγκεντρώσεις που απαιτούνται για εμφάνιση σαφούς γενετικής δραστηριότητας να επηρεάζουν και άλλες λειτουργίες σημαντικές και για τους ανώτερους οργανισμούς.

Ο μηχανισμός δράσης των αρωματικών υδρογονανθράκων και δικαυβοξυμιδικών δεν είναι ακόμα γνωστός και συνεπώς η γενετική δραστηριότητα βασίζεται και εδώ σε υποθέσεις. Πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα της επίδρασης των στα χρωματοσώματα και πιθανόν πάνω στη μιτωτική άτρακτο.

Οι περιορισμένες γνώσεις του μηχανισμού (ή μηχανισμών) δράσης των φθαλιμιδίων, έδωσε και σ' αυτή την περίπτωση τη δυνατότητα στους ερευνητές να διατυπώσουν διάφορες απόψεις σχετικά με την εμφάνιση της γενετικής δραστηριότητας. Οι γενετικές επιδράσεις που έχουν στις κυτταρικές διεργασίες δεν μπορούν να τις κατατάξουν σε ενώσεις που δρούν μόνο στο DNA ή μόνο στη μιτωτική άτρακτο ή τέλος μόνο στην πυρηνική μεμβράνη. Πιστεύεται ότι η ικανότητα δέσμευσης των στις ιστόνες οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της δομής του DNA και αύξηση της συχνότητας των θραύσεων από τη δράση νουκλεασών.

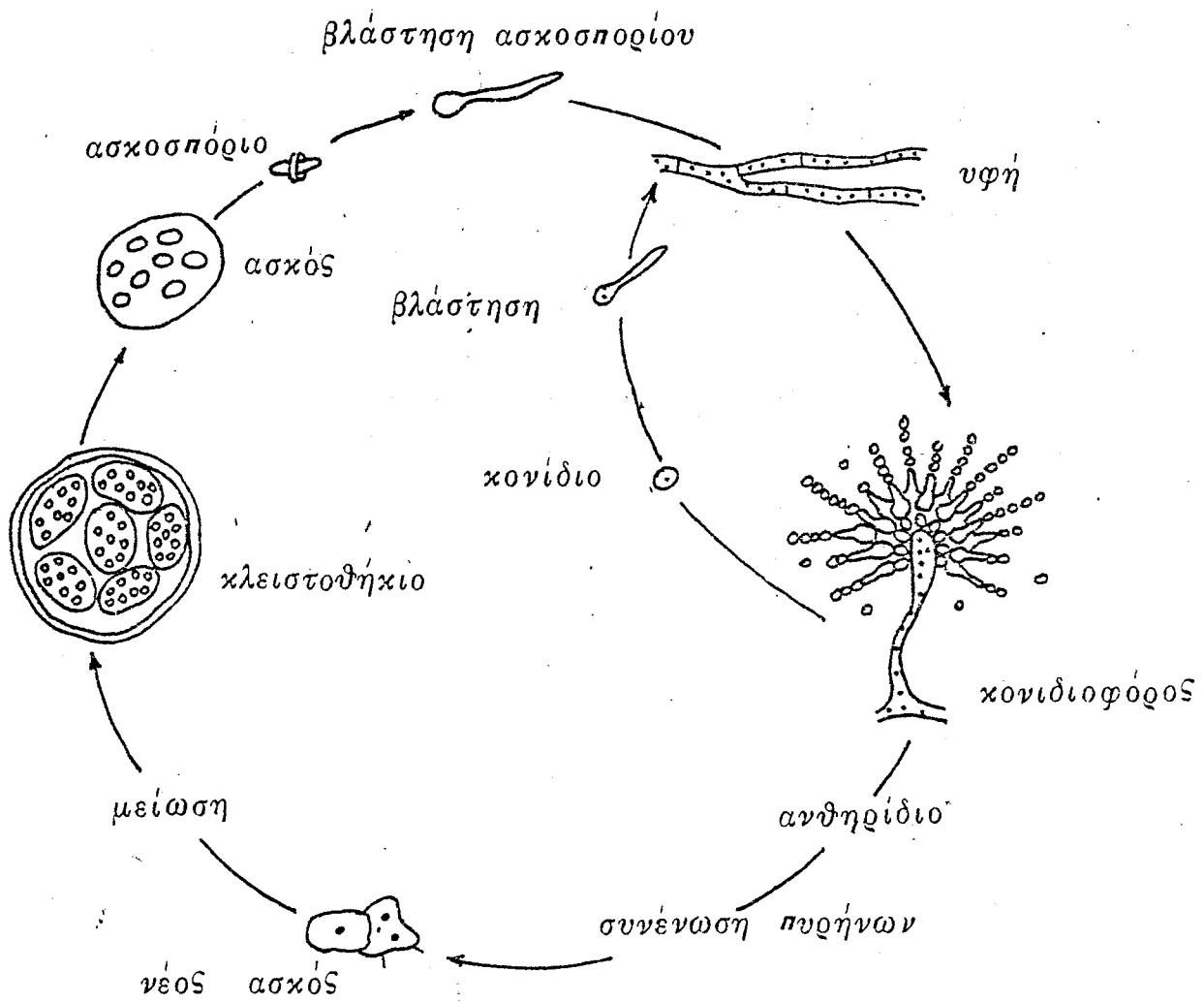
Με το μηχανισμό αυτό εξηγείται οπωσδήποτε η αύξηση της συχνότητας του μιτωτικού διασκελισμού όχι όμως και του απλοειδισμού.

Η παρούσα εργασία προσπαθεί να συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών γενετικής δραστικότητας των παραπάνω μυκητοκτόνων μετά από μελέτη των επιδράσεών τους στην μικροσκοπική και υπομικροσκοπική δομή των κυττάρων του ευαίσθητου μύκητα *A. nidulans*.

Το πρώτο στάδιο της εργασίας αφορά την αναγνώριση της γενετικής δραστικότητας των διαφόρων υπο μελέτη ουσιών, στον μύκητα *A. nidulans* και τον προσδιορισμό του υπεύθυνου μηχανισμού. Το δεύτερο στάδιο αφορά τις μελέτες της οπτικής μικροσκοπίας, μέσα από τις οποίες θα διαπιστώσουμε την επίδραση αυτών των ενώσεων στη μορφολογία, την ανάπτυξη και τα στάδια της μιτωτικής διεργασίας. Στο τρίτο στάδιο θα παρατηρήσουμε σε υποκυτταρικό επίπεδο την επίδραση που έχουν αυτά τα μυκητοκτόνα στα διάφορα κυτταρικά οργανίδια, επικεντρώνοντας την προσοχή κυρίως σε βλάβες της πυρηνικής μεμβράνης ή σε άλλες τυχόν αλλαγές στον πυρήνα και στη διαδικασία της πυρηνικής διαίρεσης. Τέλος στο τέταρτο στάδιο θα μελετήσουμε πάλι με τη βοήθεια της οπτικής μικροσκοπίας, την επίδραση των EBIs στη λειτουργία της μίτωσης σε κυτταροκαλλιέργεια *C. griseus*. Επειδή στα θηλαστικά η μίτωση δεν είναι ενδοπυρηνική, όπως στους μύκητες και οι μεμβράνες στερούνται εργοστερόλης, πιστεύεται ότι η μελέτη της επίδρασης των EBIs στη μίτωση κυττάρων θηλαστικών θα βοηθήσει στη διερεύνηση της ορθότητας της υπόθεσης των Bellicampi και συνεργατών, ότι η αυξημένη συχνότητα μιτωτικής διάσχισης είναι αποτέλεσμα βλαβών στην πυρηνική μεμβράνη.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.





Σχ. 3.- Βιολογικός κύκλος του μύκητα *A. nidulans*.

βλαστικών τους σωλήνων. Έτσι πυρήνες διαφορετικών στελεχών του μύκητα είναι δυνατόν, μετά από αναστόμωση των υφών να βρεθούν στο ίδιο κύτταρο, το οποίο στη συνέχεια διαιρούμενο σχηματίζει ετεροκαρυωτικό μυκήλιο, που τα κύτταρά του φέρουν διαφορετικούς πυρήνες (270). Το γεγονός ότι ο φαινότυπος των μυκήτων καθορίζεται από ένα πληθυσμό πυρήνων των οποίων η ποιοτική και ποσοτική σύσταση παίζει αποφασιστικό ρόλο στη διαμόρφωση του, δείχνει ότι η ετεροκαρύωση αποτελεί ένα πρόσθετο μηχανισμό παραλλακτικότητας στους μύκητες, ανεξάρτητο από την εγγενή αναπαραγωγή και παρουσιάζεται ακόμα και σε μύκητες που δεν έχουν εγγενή κύκλο αναπαραγωγής, όπως στους αδηλομύκητες.

β. - Σωματικός διπλοειδισμός. Στις ετεροκαρυωτικές υφές μπορεί να γίνει ένωση δύο ανομοίων απλοειδών πυρήνων, δηλαδή πυρήνων διαφορετικού γονοτύπου, σε μικρή βέβαια συχνότητα και να προκύψουν ετεροζύγωτοι διπλοειδείς πυρήνες (301). Αυτοί διαιρούνται στη συνέχεια μιτωτικώς και δίνουν στέλεχος σταθερά διπλοειδές. Τα διπλοειδή στελέχη αναγνωρίζονται εύκολα, α) από τον αγρίου τύπου φαινότυπόν τους ως προς το χρώμα των κονιδίων (οι μεταλλαγμένοι αλληλόμορφοι y και w είναι υπολειπόμενοι ως προς τους μη μεταλλαγμένους) (σχ. 5), β) από το ότι αναπτύσσονται σε υλικό ελαχίστων απαιτήσεων (minimal medium ή MM), δηλαδή είναι πρωτότροφα γιατί έχουν γίνει ετεροζύγωτα ως προς τις διάφορες θρεπτικές απαιτήσεις, σε αντίθεση με τα απλοειδή που επειδή έχουν θρεπτικές απαιτήσεις (υπάρχουν και απλοειδή στελέχη, που είναι άγρια και αναπτύσσονται σε MM) δεν αναπτύσσονται. Σ' αυτή την περίπτωση θα πρέπει να τονισθεί ότι τα δύο στελέχη που θα δώσουν ετεροκαρυωτικό μυκήλιο πρέπει να έχουν διαφορετικές θρεπτικές απαιτήσεις γιατί αν έχουν έστω και μία κοινή απαίτηση, τότε τα διπλοειδή κονίδια δεν θα δώσουν αποικίες σε MM, γ) από το μέγεθος των κονιδίων που παράγουν και τα οποία είναι 1,3 φορές περίπου μεγαλύτερα από τη διάμετρο των απλοειδών (301) και δ) από την ποσότητα του DNA, που είναι φυσικά, διπλάσια από ότι στα απλοειδή κονίδια.

γ. - Μιτωτικός διαχωρισμός. Περαιτέρω γενετική παραλλακτικότητα προκύπτει κατά τη μιτωτική διαίρεση των ετεροζυγωτών διπλοειδών πυρήνων. Σε αποικίες διπλοειδών στελεχών του *A. nidulans* που είναι ετεροζύγωτα για το χρώμα των κονιδίων, εμφανίζονται τομείς (sectors) ή στίγματα ή κηλίδες άσπρου χρώματος ή κίτρινου που σχηματίζονται από κονιδιοφόρους με άσπρο ή κίτρινο χρώμα κονιδίων με διαφορετική γονοτυπική σύσταση από το αρχικό στέλεχος. Η δημιουργία τους μπορεί να οφείλεται είτε σε μιτωτικό διασκελισμό (mitotic crossing-over), είτε σε μη αποχωρισμό των χρωματίδων (non-disjunction) κατά τη μιτωτική διαίρεση, είτε ακόμα σε θραύση- έλλειψη χρωματίδων (174).

Κατά το μιτωτικό διασκελισμό σχηματίζονται νέοι διπλοειδείς γονότυποι που προκύπτουν από ανταλλαγή ενός τμήματος χρωματίδος σε ένα χρωματόσωμα

II. 1. Βιολογικό υλικό

Ο μύκητας *A. nidulans* (Eidam G. Wint.) που χρησιμοποιήθηκε στα πειραματά μας έχει τέλεια μορφή *Emericella nidulans* και ανήκει στην τάξη *Eurotiales* των Ασκομυκήτων. Η ατελής του μορφή (imperfect-stage) ανήκει στην οικογένεια *Moniliaceae* της τάξεως *Moniliales* των Αδηλομυκήτων (122, 134, 120, 179, 248, 285 a). Κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου (σχ. 3) μπορούν και συνυπάρχουν, κάτω από ορισμένες συνθήκες, ο εγγενής και ο αγενής αναπαραγωγικός κύκλος.

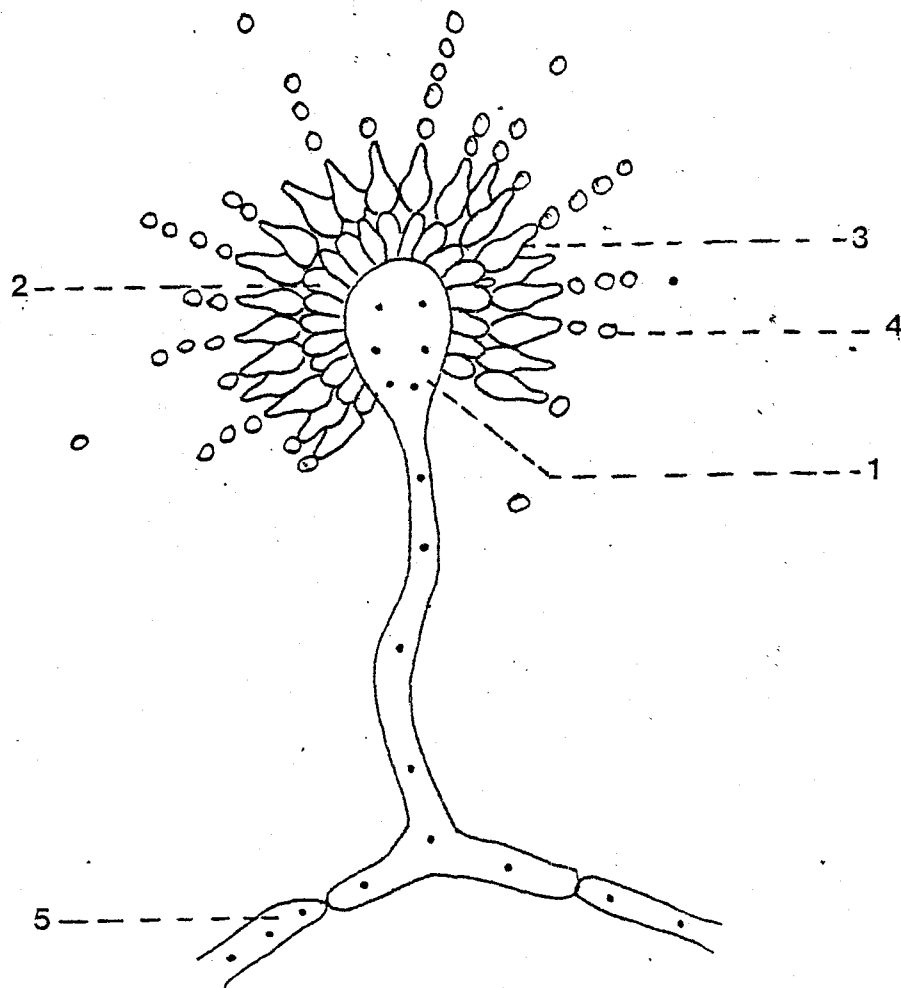
Αγενώς, από απλοειδές μονοπύρρηνο σπόριο, σχηματίζεται μυκήλιο με πολυπύρρηνα κύτταρα, μερικά από τα οποία διαφοροποιούμενα δίνουν κονιδιοφόρους, που αναπτύσσονται έξω από το υλικό καλλιέργειας. Οι κονιδιοφόροι αυτοί αποτελούνται από κορυνοειδή πολυπύρρηνα κύτταρα, όπου σχηματίζονται τα πρωτογενή μονοπύρρηνα στηρίγματα. Οι πυρήνες των πρωτογενών στηριγμάτων διαιρούνται και σχηματίζονται δύο ή περισσότερα δευτερογενή στηρίγματα. Στο καθένα από αυτά μια πρώτη μίτωση δίνει δύο πυρήνες. Από αυτούς ο προς τα έξω θα γίνει ο πυρήνας του πρώτου κονιδίου, ενώ αυτός που βρίσκεται προς τη βάση του στηρίγματος διαιρείται και πάλι. Έτσι σχηματίζονται μακριές παράλληλες αλυσίδες κονιδίων (μία από κάθε στήριγμα) με τα νεότερα κονίδια προς τα μέσα (σχ.2) (122, 302).

Ως προς την εγγενή αναπαραγωγή, ο μύκητας σχηματίζει ασκοσπόρια (εγγενή σπόρια) μέσα σε κλειστοθήκια, είτε μετά από ένωση ομοίων πυρήνων, δηλαδή από το μυκήλιο ενός ομοκαρυωτικού στελέχους, είτε μετά από ένωση ανομοίων πυρήνων δηλαδή από ετεροκαρυωτικό μυκήλιο ή από διαφορετικά ομοκαρυωτικά στελέχη (122, 302). Η τέλεια μορφή του μύκητα είναι κλειστοθήκιο ειδικού τύπου, που χαρακτηρίζει και την τάξη. Οι ασκοί σχηματίζονται από ασκογόνες υφές διαφορετικού μήκους και έτσι βρίσκονται σε διαφορετικά επίπεδα. Κάθε ασκός περιέχει 8 ασκοσπόρια, απλοειδή, διπύρρηνα, κόκκινου χρώματος (273). Οι ασκοί διαλύονται μέσα στο κλειστοθήκιο και τα ασκοσπόρια ελευθερώνονται μετά τη διάρρηξη των τοιχωμάτων του κλειστοθηκίου.

Η δημιουργία νέων συνδυασμών γόνων μπορεί να γίνει είτε με την εγγενή αναπαραγωγή (φυλετικός κύκλος) είτε με τον παραφυλετικό κύκλο που είναι γνωστό ότι υπάρχει στον *A. nidulans* (118, 270) και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- α. Ετεροκαρύωση
- β. Σωματική διπλοειδωση (ένωση ανομοίων πυρήνων στην ετεροκαρυωτική υφή)
- γ. Μιτωτικό διαχωρισμό.

α. - Ετεροκαρύωση είναι η κατάσταση που προκύπτει από τη συνύπαρξη στο ίδιο μυκήλιο πυρήνων διαφορετικού γονοτύπου και είναι συνήθως αποτέλεσμα βλαστικών αναστομών των υφών. Ετεροκάρυα μπορούν ακόμα να προκύψουν από τυχαία μεταλλαγή ενός από τους πυρήνες του μυκηλίου και με πολλαπλασιασμό αυτού ή ακόμα με βλάστηση σπορίων και με αναστόμωση των



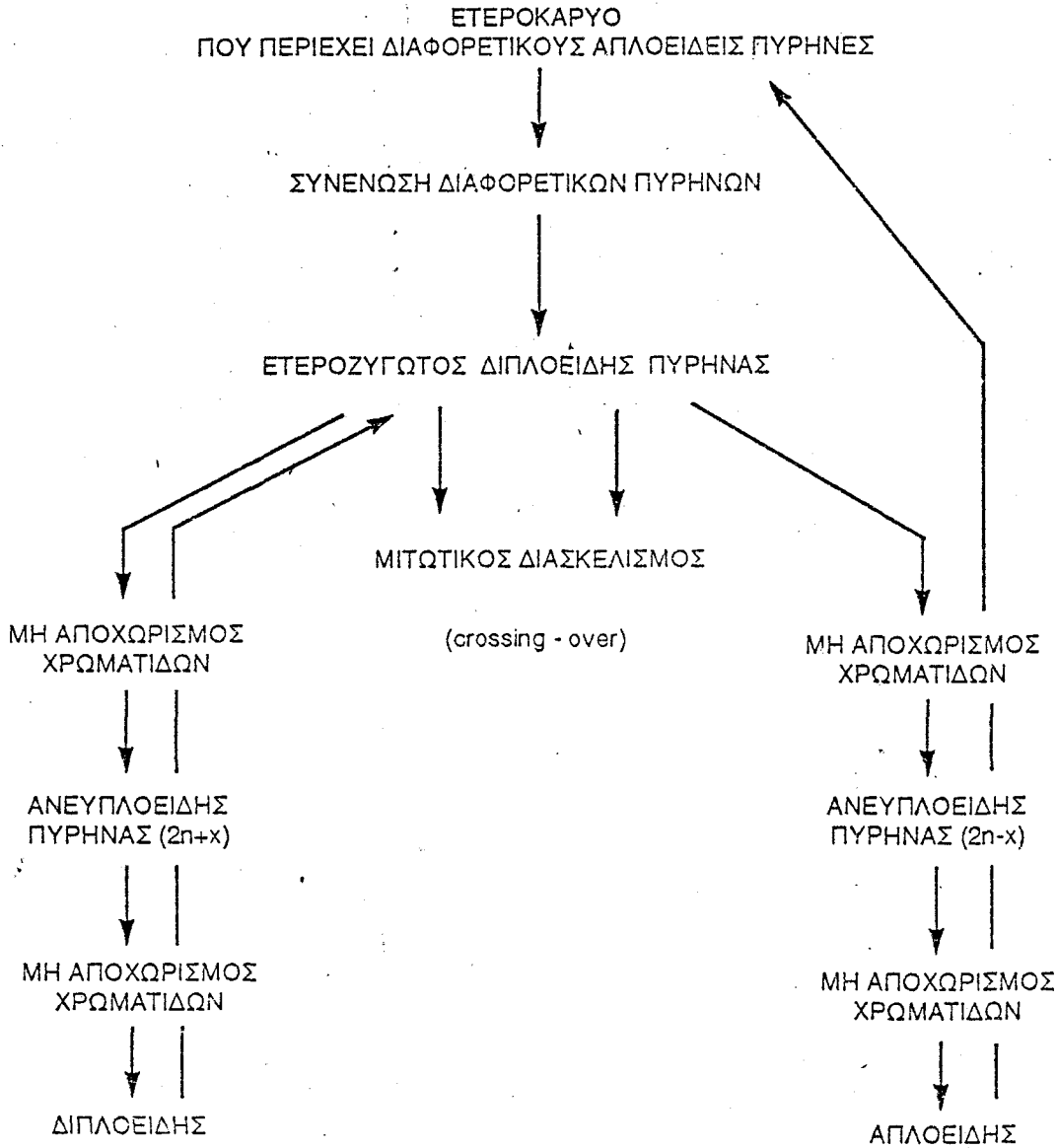
Σχ. 2.- Κονιδιοφόρος του μύκητα *A. nidulans*

- (1) Σφαιρικό πολυπύρρηνο κύτταρο
- (2) Πρωτογενή μονοπύρρηνα στηρίγματα
- (3) Δευτερογενή μονοπύρρηνα στηρίγματα
- (4) Αλυσίδα κονιδίων
- (5) Πολυπύρρηνη υφή



του μύκητα (271), ενώ κατά το μη αποχωρισμό των χρωματίδων σχηματίζονται τόσο απλοειδείς όσο και νέοι διπλοειδείς γονότυποι. Υποστηρίζεται ότι οι νέοι γονότυποι προκύπτουν από ανευπλοειδείς κατ' αρχήν πυρήνες μετά από απώλεια ενός χρωματοσώματος κάθε φορά σε διαδοχικές φάσεις (174).

Ο παραφυλετικός κύκλος του μύκητα *A. nidulans* φαίνεται στο σχήμα 4 (139).



Σχ. 4. Παραφυλετικός κύκλος του μύκητα *A. nidulans*

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η ύπαρξη νέων γονοτύπων, που στην περίπτωση μυκηλίου ετεροζύγωτου ως προς το κίτρινο ή το λευκό χρώμα των κωνιδίων, προσδιορίζεται από την παρουσία διαφορετικού χρώματος περιοχών στις αποικίες του μύκητα, δείχνει, ότι κατά την ανάπτυξη του έγιναν γενετικές αλλαγές σε ποσο-

στό ανάλογο της εμφάνισης περιοχών διαφορετικού χρώματος. Άρα είναι δυνατόν με μακροσκοπική εξέταση των αποικιών να πάρουμε πληροφορίες για τη συχνότητα των γενετικών αλλαγών που γίνονται στο γονότυπο. Μπορούμε δηλαδή εύκολα να μελετήσουμε τη γενετική δράση μιας ουσίας, παρατηρώντας τη συχνότητα εμφάνισης εγχρώμων τομέων αλλά και διερευνώντας τον υπεύθυνο μηχανισμό για την εμφάνιση των μιτωτικών αυτών ανασυνδυασμών.

Στην εργασία μας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Η.Α. του *A. nidulans*, προερχόμενο από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γ.Π. , που είναι πρωτότροφο, διπλοειδές, ετεροζύγωτο και παράγει κονίδια πράσινου χρώματος, έχει όμως υπολειπόμενους γόνους για κίτρινο και άσπρο χρώμα κονιδίων σε ετεροζύγωτη κατάσταση, όπως και σε ετεροζύγωτη κατάσταση βρίσκονται και οι γόνοι για τις διάφορες βιοχημικές απαιτήσεις (173).

Ο γονότυπος του στελέχους φαίνεται στο σχήμα 5. Το διπλοειδές αυτό στέλεχος δημιουργήθηκε από δύο απλοειδή στελέχη, από τα οποία το ένα σχηματίζει κονίδια άσπρου και το άλλο κίτρινου χρώματος (179).

Ο γονότυπος του στελέχους που σχηματίζει κίτρινα κονίδια είναι:
suA1 ad E₂₀ (I), yA₂ (I), ad E₂₀ (I), Acr A1 (II), gal A1 (III), pyro A₄ (IV), fac A₃₀₃ (V), sB₃ (VI), nic B₈ (VII), ribo B₂ (VIII) (73).

Ο γονότυπος του στελέχους που σχηματίζει άσπρα κονίδια είναι:
paba A1 (I), bi A1 (I), wA₃ (II), thi A₄ (II), cnx E₁₆ (II), Acr A1 (II), cnx B₁₁ (VIII).
(Τα σύμβολα επεξηγούνται στη σελίδα 25. Οι λατινικοί αριθμοί σε παρένθεση, αντιστοιχούν με τους αριθμούς των χρωματοσωμάτων) (73).

II. 2. Θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια του μύκητα

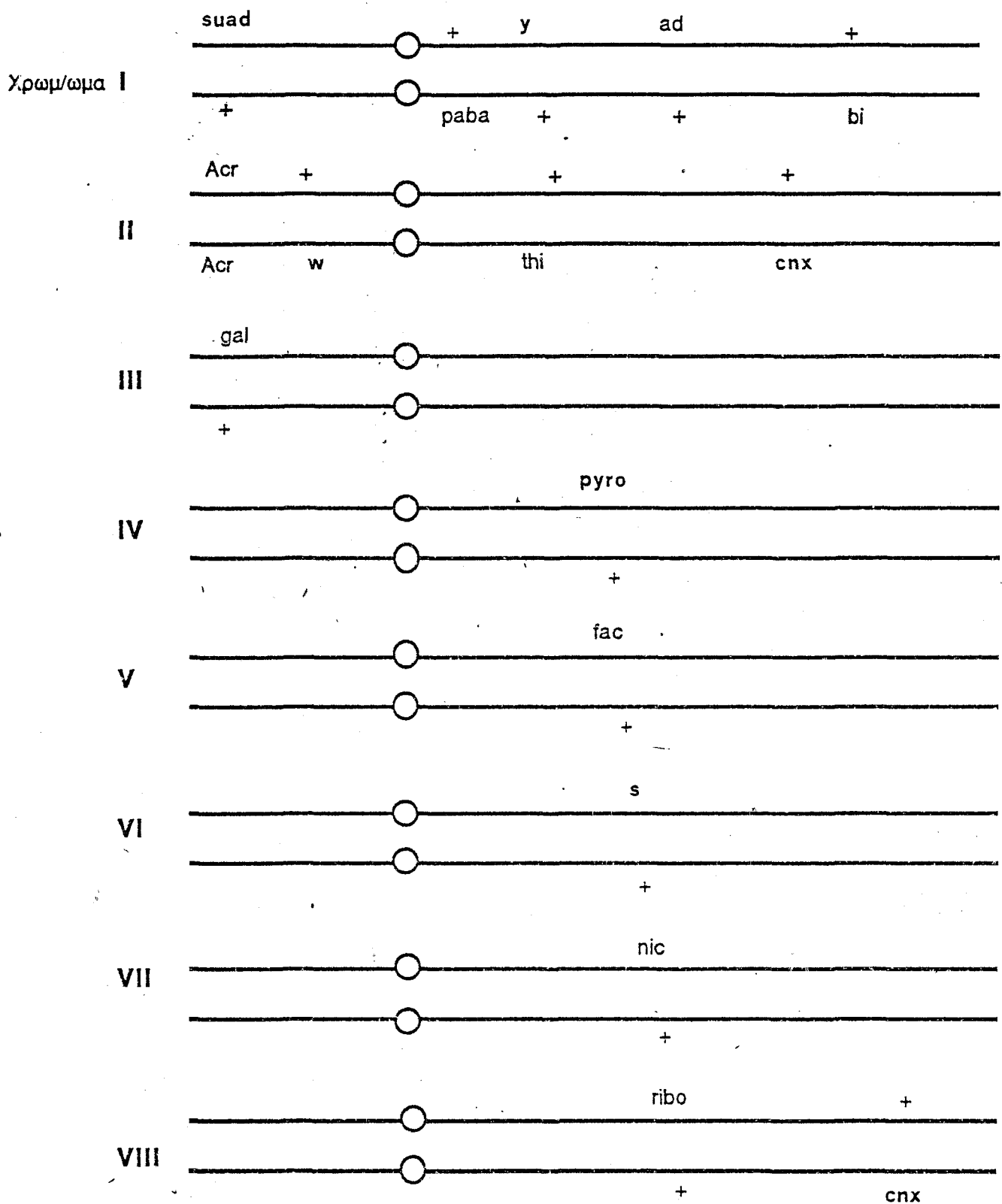
Χρησιμοποιήθηκαν δύο υλικά, ένα ελαχίστων απαιτήσεων (minimal medium ή MM) για τη διατήρηση του ετεροζύγωτου διπλοειδούς στελέχους ΗΑ και ένα πλήρες θρεπτικό υλικό (complete medium ή CM) στο οποίο μπορούν να αναπτυχθούν και στελέχη που έχουν θρεπτικές απαιτήσεις (273).

α. Το θρεπτικό υλικό ελαχίστων απαιτήσεων έχει την ακόλουθη σύσταση:

Γλυκόζη ("Serva" a-D- Glucose)	10g
Διάλυμα αλάτων (salt solution)	250ml
Απιονισμένο νερό	750ml
Άγαρ	15g

β. Το πλήρες θρεπτικό υλικό έχει την ακόλουθη σύσταση:

Γλυκόζη ("Serva" a-D- Glucose)	10g
--------------------------------	-----



Σχ. 5. Γονότυπος του διπλοειδούς στελέχους Η.Α. του μύκητα *A. nidulans*.

] : κεντρόμερος

y : κίτρινο χρώμα κονιδίων

w : άσπρο χρώμα κονιδίων

paba : απαίτηση παρααμινοβενζοϊκού οξέος

bi : απαίτηση βιοτίνης

thi : απαίτηση θειαμίνης

cnx : απαίτηση αμμωνιακού αζώτου

pyro : απαίτηση πυριδοξίνης

s : απαίτηση θείου

nic : απαίτηση νικοτινικού οξέος

ad : απαίτηση αδενίνης

ribo : απαίτηση ριβοφλαβίνης

suad : αναστολέας της απαίτησης αδενίνης

Acr : ανθεκτικότητα στην ακριφλαβίνη

gal : Όχι ανάπτυξη σε υλικό που περιέχει γαλακτόζη

fac : ανθεκτικότητα σε φθορικό οξύ.

Νουκλεϊκά οξέα ("Serva" Yeast Nucleic acids)	0.5g
Καζαμινοξέα ("Serva" Casamino acids)	3g
Εκχύλισμα ζύμης ("Difco" Yeast Extract)	1g
Διάλυμα βιταμινών	1ml
Διάλυμα αλάτων (salt solution)	250ml
Απιονισμένο νερό	750ml
Άγαρ	15g

Η σύσταση του διαλύματος βιταμινών είναι η ακόλουθη:

Θειαμίνη[" Merck" thiaminium dichlorid (vitamin B ₁)]	0.02g
Παντοθενικό ασβέστιο(" Merc" calcium- D(+)- pantothenat)	0.02g
Βιοτίνη ("Serva" -D(+)- Biotin)	0.01g
Πυριδοξίνη [" Serva" pyridoxine.HCl (vitamin B ₆)]	0.01g
Νιασίνη ("Sigma" Nicotinic acid)	0.02g
Ινοσιτόλη (" Merck" myo-inosit)	0.20g
Απιονισμένο νερό	100 ml

Η σύσταση του διαλύματος αλάτων είναι:

Νιτρικό αμμώνιο ("Ferak" Ammonium nitrate)	12g
Δισόξινο Φωσφορικό Κάλιο (" Ferak" Potassium dihydrogen phosphate)	8g
Θειικό νάτριο (" Merc" Sodium Sulphate)	2g
Χλωριούχο κάλιο (" Merck" Potassium chloride)	4g
Θειικό Μαγνήσιο (" Merck" Magnesium sulphate)	1g
Χλωριούχο ασβέστιο (" Mallinckrodt" calcium chloride)	0.5g
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Trace element solution)	1.2ml
Απιονισμένο νερό	1000ml

Το διάλυμα ιχνοστοιχείων έχει τη σύσταση:

στοιχείο	άλας	
Μαγγάνιο (Mn)	MnSO ₄ · H ₂ O (" Merc" Manganese Sulfate)	0.559g
Ψευδάργυρος (Zn)	ZnSO ₄ · 7H ₂ O (" BDH " Zinc sulfate)	0.891g
Χαλκός (Cu)	CuSO ₄ · 5 H ₂ O (Mallinckrodt " Cupric sulfate)	0.826g
Σίδηρος (Fe)	FeSO ₄ · 7H ₂ O (" Merck " Ferrus Sulfate)	1.052g
Μολυβδένιο (Mo)	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O (" Merck " Sodium molybdate)	0.598g
Απιονισμένο νερό		300ml

II.3. Μυκητοκτόνα

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η δράση των παρακάτω μυκητοκτόνων:

1. Από τους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs) το πυρμιδινικό fenarimol και το ιμιδαζολικό clotrimazole. Και τα δύο μυκητοκτόνα ήταν αναλυτικής καθαρότητας δείγματα των εταιρειών Elli Lilly και Bayer A.G. αντίστοιχα.
2. Από τα δικαρβοξυμιδικά το iprodione που αποκτήθηκε με ανακρυστάλλωση από το εμπορικό σκεύασμα "Rovral".
3. Από τα φθαλιμίδια το carptafoi, αναλυτικής καθαρότητας δείγμα της εταιρείας Chevron Chemical Co.
4. Από τα βενζιμιδαζολικά το benomyl, αναλυτικής καθαρότητας δείγμα της εταιρείας Du pont de Nemours and Co. (Inc) (Wilmington, Del.).

II.4. Μέτρηση της μυκητοτοξικότητας και της γενετικής επίδρασης

Για τη μέτρηση της γενετικής δραστηριότητας των μυκητοκτόνων, το διπλοειδές στέλεχος HA του *A. nidulans* εμβολιάστηκε σε τρυβλία διαμέτρου 9 cm, που περιείχαν πλήρες θρεπτικό υλικό (CM), έτσι ώστε να μην εμποδιστεί η ανάπτυξη των προϊόντων μιτωτικού διαχωρισμού, που είχαν θρεπτικές απαιτήσεις. Σαν διαλύτης για την παρασκευή των διαλυμάτων όλων των μυκητοκτόνων που προαναφέραμε (stock solutions), χρησιμοποιήθηκε η αιθυλική αλκοόλη. Η τελική συγκέντρωση της αιθυλικής αλκοόλης στο υλικό ανάπτυξης, δεν ξεπερνούσε το 1% και ένα ίσο ποσό αλκοόλης προστίθετο στο μάρτυρα. Με εξαίρεση τους EBIs, στα τρυβλία με το CM και μυκητοκτόνο ή χωρίς μυκητοκτόνο (μάρτυρας) μεταφέρονταν μπλοκάκια 1mm² περίπου από τρυβλία που περιείχαν υλικό ελαχίστων απαιτήσεων (MM), στα οποία είχε απλωθεί την προηγούμενη ημέρα αιώρημα κονιδίων του στελέχους HA του *A. nidulans* και είχαν επωαστεί στους 37°C. Η μεταφορά γινόταν σε τέσσερα σημεία στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους, ώστε όλες οι αποικίες να έχουν τον ίδιο χώρο για να αναπτυχθούν και επομένως τις ίδιες δυνατότητες να παρουσιάσουν προϊόντα διαχωρισμού. Μετά τρεις ημέρες επώασης στους 37°C που είναι η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μύκητα, μετρήθηκε η διάμετρος των αποικιών για να προσδιοριστεί η μυκητοτοξικότητα της ουσίας, που εκφράζεται ως % μείωση της διαμέτρου των αποικιών, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Ο αριθμός των κίτρινων και άσπρων περιοχών μετρείται μακροσκοπικά, μετά απο επώαση 7-10ημερών, ώστε να πάρουν οι αποικίες τη μεγαλύτερη δυνατή ανάπτυξη και να φανούν τα προϊόντα διαχωρισμού. Κατ' αυτό τον τρόπο εδοκιμάστηκαν περίπου 80-100 αποικίες τόσο για το μάρτυρα όσο και για κάθε συγκέντρωση της καθεμιάς από τις χρησιμοποιούμενες μυκητοτοξικές ενώσεις. Στο μέτρημα δόθηκε προσοχή ώστε να περιληφθούν και οι πιο μικρές κίτρινες και

άσπρες κηλίδες που διακρίνονταν. Παρ' όλα αυτά είναι σίγουρο ότι υπήρχαν περιοχές που δεν μπορούσαν να μετρηθούν μακροσκοπικά και που φαίνονταν με τη βοήθεια στερεοσκοπικού μικροσκοπίου. Έτσι ο αριθμός των προϊόντων διαχωρισμού που παίρνεται από τη μακροσκοπική μέτρηση είναι μικρότερος από τον πραγματικό, δεχόμαστε όμως ότι αυτό δεν επηρέασε τα συγκριτικά αποτελέσματα.

Για την μέτρηση της δραστηριότητας των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs), πλώθηκε αιώρημα κονιδίων του διπλοειδούς στελέχους HA του *A. nidulans* στην επιφάνεια τρυβλίων με μυκητοκτόνο ή χωρίς μυκητοκτόνο (μάρτυρας) σε CM (179). Επιδίωξή μας ήταν, η πυκνότητα των κονιδίων να είναι τέτοια ώστε οι αποικίες που προέκυπταν από αυτά να μπορούν να μετρηθούν.

Το αιώρημα κονιδίων γίνεται κατά τον ακόλουθο τρόπο:

Από δοκιμαστικούς σωλήνες ή τρυβλία με MM στα οποία διατηρείται το διπλοειδές στέλεχος HA του *A. nidulans* και με τη βοήθεια στερεοσκοπίου παραλαμβάνονται μόνο πράσινα ετεροζύγωτα κονίδια και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 5ml απεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό, με 3-4 σταγόνες Tween 60/ 100ml H₂O (το Tween 60 χρησιμεύει για να μην σχηματίζονται συσσωματώματα κονιδίων). Γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης των κονιδίων με αιματοκυτόμετρο. Ακολουθούν κατάλληλες αραιώσεις του αρχικού αιωρήματος, μετά από ισχυρή ανατάραξη, με στόχο κάθε αποικία, που θα προκύψει αργότερα να προέρχεται από ένα κονίδιο. Με την τελική αραιώση, τοποθετούνται 100-200 κονίδια ανά τρύβλιο. Η μέτρηση της μυκητοτοξικότητας γινόταν με την καταμέτρηση των βλαστημένων κονιδίων και των αποικιών που αναπτύσσονταν μετά από 6 ώρες και 3 ημέρες αντίστοιχα στον μάρτυρα και στις διάφορες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Αφού καταμετρήθηκαν οι μονοσποριακές αποικίες, μεταφέρθηκε τυχαίο δείγμα σε τρυβλία με πλήρες θρεπτικό υλικό (CM) χωρίς παρεμποδιστή. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν 26 αποικίες σε θέσεις που είχαν προσημειωθεί από ειδικό μεταφορέα (replicator). Ο μεταφορέας αυτός αποτελείται από επίπεδη επιφάνεια, με 26 βελόνες μήκους περίπου 2cm σε 6 συμμετρικές σειρές (5 σειρές x 5 βελόνες + 1 σειρά x 1 βελόνα). Η εκτίμηση της γενετικής δραστηριότητας έγινε όπως και προηγουμένως με μέτρηση μακροσκοπικά των κίτρινων και άσπρων περιοχών μετά από επώαση 7-10 ημερών στους 35-37°C.

Για την καλύτερη αναγνώριση της γενετικής επίδρασης υπολογιζόταν ο δείκτης επαγωγής διάσχισης (induced segregation-index) για κάθε επέμβαση. Ο δείκτης επαγωγής διάσχισης υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο (135).

Δ.Ε.Δ. (I.S.I.): έγχρωμοι τομείς σε 100 αποικίες επέμβασης
έγχρωμοι τομείς σε 100 αποικίες μάρτυρα.

II.5. Κατάταξη προϊόντων μιτωτικού διαχωρισμού

Τα αναγνωριζόμενα προϊόντα μιτωτικού διαχωρισμού του ετεροζύγωτου διπλοειδούς στελέχους HA του *A. nidulans* μπορεί να είναι απλοειδή ή διπλοειδή και να παράγουν κονίδια κίτρινου ή άσπρου χρώματος (248).

α. Ανασυνδυασμοί με κίτρινο χρώμα κονιδίων.

i) **Απλοειδή**: Θα έχουν οπωσδήποτε το χρωματόσωμα I που θα έχει τη μεταλλαγή για το κίτρινο χρώμα των κονιδίων, άρα δεν θα απαιτούν αδενίνη, γιατί συνυπάρχει στο ίδιο χρωματόσωμα το γονίδιο της απαίτησης αδενίνης με το γονίδιο αναστολής της απαίτησης αυτής. Θα απαιτούν όμως ριβοφλαβίνη ή αμμωνιακό άζωτο, βιοχημικές απαιτήσεις των οποίων οι γόννοι είναι σε ετεροζύγωτη κατάσταση στο χρωματόσωμα VIII (σχ. 5). Τα απλοειδή αυτά προϊόντα μιτωτικής διάσχισης μπορεί να έχουν και άλλες θρεπτικές απαιτήσεις ανάλογα με τους συνδυασμούς χρωματοσωμάτων που θα προκύψουν. Άρα μπορούν να εμφανισθούν απλοειδή κίτρινα στελέχη με τις παρακάτω απαιτήσεις:

<i>ribo</i>	<i>ribo</i>	<i>ribo+nic+meth</i>
<i>cnx</i>	<i>ribo+meth</i>	<i>ribo+pyro+nic+meth</i>
<i>ribo+pyro</i>	<i>ribo+pyro+meth</i>	<i>cnx+pyro</i>
<i>cnx+meth</i>	<i>cnx+pyro+nic</i>	<i>cnx+pyro+nic+meth</i>
<i>cnx+pyro+meth</i>	<i>cnx+nic+methii</i>	

ii) **Διπλοειδή**: Τα διπλοειδή κίτρινου χρώματος, αν προέρχονται από μιτωτικό διασκελισμό (crossing-over) θα απαιτούν μόνο αδενίνη. Η πιθανότητα και άλλων απαιτήσεων από τη ταυτόχρονη ύπαρξη και άλλων μιτωτικών διασκελισμών στα άλλα χρωματοσώματα είναι πολύ μικρή.

Τα διπλοειδή από μη αποχωρισμό των χρωματίδων, θα είναι πρωτότροφα, δεν θα έχουν δηλαδή καμία απαίτηση.

β. Ανασυνδυασμοί με άσπρο χρώμα κονιδίων

i) **Απλοειδή**: Αυτοί οι ανασυνδυασμοί θα απαιτούν θειαμίνη και αμμωνιακό άζωτο. Συγχρόνως μπορεί να έχουν μία ή περισσότερες επί πλέον απαιτήσεις που ελέγχονται από γόνους, που βρίσκονται σε άλλα χρωματοσώματα.

ii) **Διπλοειδή**: Τα διπλοειδή θα είναι πρωτότροφα, δηλαδή δεν θα έχουν καμία απαίτηση, αν προέρχονται από μιτωτικό διασκελισμό ή θα απαιτούν θειαμίνη και αμμωνιακό άζωτο αν προέρχονται από μη αποχωρισμό των χρωματίδων.

Η διάκριση των τελευταίων από τα λευκά απλοειδή που απαιτούν θειαμίνη και αμμωνιακό άζωτο μόνο, γίνεται με το μέγεθος των κονιδίων. Η διάμετρος των διπλοειδών είναι 1.3 φορές μεγαλύτερη από τη διάμετρο των απλοειδών. Εκτός από τις παραπάνω περιπτώσεις που αναφέρθηκαν, μπορεί να γίνει διπλός μιτωτικός διασκελισμός σε ένα ή περισσότερα χρωματοσώματα, πράγμα που είναι

πολύ σπάνιο στην πράξη. Ακόμα μπορεί να υπάρχουν προϊόντα διαχωρισμού με πράσινο χρώμα κονιδίων (δεν γίνονται αλλαγές στα I και II χρωματοσώματα που βρίσκονται οι γόνοι για το χρώμα) με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διακριθούν από τα υπόλοιπα διπλοειδή και να μην λαμβάνονται υπ' όψη στην τελική μέτρηση των αποτελεσμάτων του πειράματος. Εξ' άλλου για κάθε άσπρο ή κίτρινο προϊόν διαχωρισμού παράγεται και ένα πράσινο, που επίσης δεν μπορεί να αναγνωρισθεί.

Για την αναγνώριση της γονοτυπικής σύστασης των προϊόντων διαχωρισμού που εμφανίστηκαν στις αποικίες που καλλιεργήθηκαν παρουσία μυκητοκτόνου και επομένως να βρεθεί με ποιό μηχανισμό δρα στο κύτταρο η χημική ένωση χρησιμοποιήθηκε η εξής τεχνική:

Με τη βοήθεια του στερεοσκοπικού μικροσκοπίου και με ασηπτικές συνθήκες μεταφέρθηκαν κονίδια από άσπρες και κίτρινες περιοχές των αποικιών που μετρήθηκαν, σε τρυβλία με πλήρες θρεπτικό υλικό. Σε κάθε τρυβλίο έγιναν 4 μεταφορές από 4 διαφορετικές περιοχές σε σταυροειδή διάταξη και σημειώθηκε με τον ίδιο αριθμό η περιοχή απ' όπου πάρθηκε και η θέση όπου έγινε η μεταφορά, καθώς και το χρώμα των κονιδίων που αναμένεται. Μετά από επώαση για 3-4 ημέρες εμφανίστηκε το χρώμα στις γραμμές του σταυρού που είχαμε σχηματίσει. Από τις περιοχές που το κίτρινο ή άσπρο χρώμα ήταν καθαρό και σύμφωνα με αυτό που αναμενόταν, μεταφέρθηκαν κονίδια σε σωλήνες καλλιέργειας με πλήρες θρεπτικό υλικό και επώασθηκαν ξανά. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκε ο καθαρισμός των εγχρώμων προϊόντων μιτωτικού ανασυνδυασμού ιδιαίτερα στην περίπτωση των πολύ μικρών τομέων. Ακολούθησε όσο το δυνατόν γρηγορότερα η γενετική ανάλυση των προϊόντων της μιτωτικής διάσχισης προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος αλλαγής των γονοτύπων, δεδομένου ότι μερικά προϊόντα διάσχισης είναι ασταθή. Από τους σωλήνες μεταφέρονται κονίδια σε τρυβλία με πλήρες θρεπτικό υλικό σε 26 θέσεις, που σημειώθηκαν με τη βοήθεια του μεταφορέα που περιγράφηκε προηγουμένως. Σε κάθε μία θέση από τις 26 του τρυβλίου μεταφέρθηκαν τα κονίδια από ένα σωλήνα καλλιέργειας (απομονωμένα προϊόντα ανασυνδυασμού). Στην 26^η θέση τοποθετιόταν πάντα το ετεροζύγωτο (και αυτότροφο) διπλοειδές στέλεχος HA.

Μετά επώαση 2 ημερών κονίδια από τις μικρές αποικίες μεταφέρθηκαν με τον παραπάνω μεταφορέα σε μια σειρά από τρυβλία με τους παρακάτω συνδυασμούς θρεπτικών συστατικών στο υλικό καλλιέργειας:

1. Πλήρες θρεπτικό υλικό (CM)
2. Θρεπτικό υλικό ελαχίστων απαιτήσεων (MM)
3. MM + όλες τις θρεπτικές απαιτήσεις του γονότυπου του χρησιμοποιούμενου στελέχους
4. MM + όλες τις θρεπτικές απαιτήσεις εκτός από μία κάθε φορά σε διάφορους συνδυασμούς, για παράδειγμα:
 - α. MM + όλες - αδενίνη

- β. MM + όλες - θειαμίνη
- γ. MM + όλες - $\text{NH}_4 \text{NO}_3$
- δ. MM + όλες - πυριδοξίνη
- ε. MM + όλες - νικοτινικό οξύ
- στ. MM + όλες - παρααμινοβενζοϊκό οξύ
- ζ. MM + όλες - μεθειονίνη

Ο συνδυασμός MM + όλες - ριβοφλαβίνη δεν χρησιμοποιήθηκε γιατί η μεταλλαγή ribo_2 δεν σταματά τελείως τη μεταβολική οδό που οδηγεί στη βιοσύνθεση της ριβοφλαβίνης, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο διαχωρισμός των προϊόντων του ανασυνδυασμού, που έχουν θρεπτική απαίτηση από εκείνα που δεν την έχουν.

Θα πρέπει να τονισθεί ιδιαίτερα ότι τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του MM είναι μεγάλης καθαρότητας (analytical grade). Για την αποφυγή προσμίξεων, το γυάλινο υλικό (τρυβλία, κωνικές φιάλες) τοποθετείται για 24 ώρες σε διάλυμα χρωμοθειϊκού οξέος. Στη συνέχεια τα τρυβλία και οι κωνικές φιάλες πλένονται με άφθονο νερό της βρύσης και μετά με απεσταγμένο νερό.

II.6. Μέθοδοι οπτικής μικροσκοπίας

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των μυκητοκτόνων στη μιτωτική διεργασία με τη βοήθεια της οπτικής μικροσκοπίας, ακολουθήθηκε η παρακάτω τεχνική:

Δίσκος αποστειρωμένος ζελατίνης τοποθετήθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό, στο οποίο είχαν προστεθεί προηγουμένως οι διάφορες συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων. Ακολούθησε εμβολιασμός με αιώρημα κονιδίων του διπλοειδούς στελέχους H.A. του *A. nidulans* και εν συνεχεία επώαση στους 37°C . Ανά διαστήματα μιας ώρας περίπου, μετά την έναρξη βλάστησης, απομακρυνόταν από το υλικό ανάπτυξης κάθε τρυβλίου τμήμα του δίσκου ζελατίνης με τα επ' αυτού βλαστημένα κονίδια και εμβαπτιζόταν για 10 λεπτά σε τροποποιημένο διάλυμα Helly's (83) (5% χλωριούχος υδράργυρος, 3% διχρωμικό κάλιο σε νερό με 6% από ένα 3% διάλυμα φολμαδεύδης που προστίθεται αμέσως πριν τη χρήση). Μετά τη στερέωση ακολουθούσε ξέπλυμα του δείγματος με 70% αιθυλική αλκοόλη και υδρόλυση για 12 λεπτά σε 1N HCl στους 60°C . Ακολούθως γινόταν νέο ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό και χρώση με εμβάπτιση της ζελατίνης σε κυλινδρικό δοχείο που περιείχε Giemsa (2ml Giemsa's Lösung, Merck σε 100ml 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0) για χρονικό διάστημα μιας ώρας. Προκειμένου να γίνει μέτρηση των πυρήνων στους βλαστικούς σωλήνες και να συγκριθούν οι επιδράσεις των μυκητοκτόνων στο ρυθμό μιτώσεων στον *A.*

nidulans επώασθησαν κονίδια σε κωνικές φιάλες με 50ml υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό (CM) στους 37°C. Αμέσως μετά την έναρξη βλάστησης προστέθηκαν τα μυκητοκτόνα σε ποσότητες που να δίνουν τις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Ανά διαστήματα μιας ώρας περίπου παραλαμβάνονταν από κάθε φιάλη ποσότητα 10 ml υλικού ανάπτυξης και ακολουθούσε η φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού. Το υπερκείμενο υγρό θρεπτικό υλικό αφαιρείται με προσοχή και προστίθεται στους σωλήνες φυγοκέντρησης, με τα βλαστημένα ή και αβλάστητα κονίδια, τροποποιημένο διάλυμα Helly's για 10 λεπτά προκειμένου να γίνει η στερέωση των κονιδίων. Ακολουθεί απομάκρυνση του στερεωτικού, πάλι με τη διαδικασία της φυγοκέντρησης, και προσθήκη 70% αιθυλικής αλκοόλης για να γίνει ξέπλυμα του δείγματος. Μετά την αφαίρεση της αιθυλικής αλκοόλης τοποθετείται στους σωλήνες 1N HCl και πραγματοποιείται υδρόλυση στους 60°C για 12 λεπτά. Με νέα φυγοκέντρηση αφαιρείται το HCl και πραγματοποιείται πλύσιμο με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί η προσθήκη χρωστικής Giemsa για χρονικό διάστημα μιας ώρας. Μετά την απομάκρυνση της χρωστικής, γίνεται παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο και μέτρηση του αριθμού των πυρήνων σε 100 τουλάχιστον βλαστικούς σωλήνες ανά επέμβαση.

II.7. Μέθοδοι ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

α. Στερέωση (fixation)

Κονίδια του *A. nidulans* επωάζονται μέσα σε κωνικές φιάλες με 50 ml υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό (CM) η καθεμιά παρουσία και απουσία των διαφόρων παρεμποδιστών. Η επώαση γινόταν στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο με περιστρεφόμενη βάση (120rpm). Ανά διαστήματα μιας ώρας περίπου μετά την έναρξη βλάστησης, παραλαμβάνονταν από κάθε φιάλη ποσότητα 10ml υλικού ανάπτυξης και ακολουθούσε η φυγοκέντρωσή του. Μετά τη φυγοκέντρηση τα κονίδια, βλαστημένα και αβλάστητα, βρίσκονται με τη μορφή ιζήματος στον πυθμένα των σωλήνων φυγοκέντρησης. Το υγρό θρεπτικό υλικό αφαιρείται με προσοχή, και προστίθεται στους σωλήνες 7ml KMnO₄ 1%. Ακολουθεί ανακίνηση για να ξαναπροκύψει αιώρημα και εν συνεχεία μεταφορά στους 0-4°C για 10 περίπου λεπτά, για να ολοκληρωθεί η στερέωση.

β. Αφυδάτωση (dehydration)

Μετά την απομάκρυνση του στερεωτικού, πραγματοποιούνται αφυδατώσεις με σειρά διαλυμάτων ακετόνης ως εξής:

1. Σε 30% διάλυμα ακετόνης για μισή ώρα
2. Σε 50% διάλυμα ακετόνης για μισή ώρα
3. Σε 70% διάλυμα ακετόνης + 1% οξεικό ουρανύλιο για 12 ώρες
4. Σε 90% διάλυμα ακετόνης για μισή ώρα και
5. Σε 100% διάλυμα ακετόνης για μισή ώρα (2 φορές)

Μετά από την παραμονή στο κάθε διάλυμα ακετόνης για τον αντίστοιχο χρόνο, γινόταν φυγοκέντρηση, απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη του επόμενου διαλύματος κ.ο.κ.

γ. Εμπότιση- Έγκλιση (embedding)

Μετά την ολοκλήρωση της τελευταίας φυγοκέντρησης και της απομάκρυνσης του 100% διαλύματος ακετόνης, το υλικό που έχει κατακαθίσει σε μορφή ιζήματος στον πυθμένα των σωλήνων φυγοκέντρησης, τοποθετείται μέσα σε πλαστικές κάψουλες προκειμένου να γίνει εμπότιση και έγκλιση σε μίγμα ρητινών EPON - ARALDITE, Μετά την προσθήκη των ρητινών οι κάψουλες τοποθετούνται για πολυμερισμό σε κλίβανο 60°C για 48 ώρες.

δ. Τομές

Λεπτές τομές πάχους περίπου 600-900 Å⁰ επιτεύχθηκαν με τον υπερμικροτόμο "REICHERT OM U₃" θερμικής προώθησης. Τα γιάλυνα μαχαριδία που χρησιμοποιήθηκαν, κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο με ειδική συσκευή κοπής μαχαριδίων (LKB knife maker). Οι τομείς φέρονται σε μικρολουτρό νερού που κατασκευάζεται με τη βοήθεια ειδικής ταινίας. Στη συνέχεια εκτείνονται με τη δράση ατμών χλωροφόρμιο και τελικά συλλέγονται με ειδικά χάλκινα πλέγματα (grids).

ε. Μεμβράνες υποστήριξης των τομών (supporting films)

Τα πλέγματα πριν από τη χρησιμοποίησή τους καλύπτονται με μεμβράνη κολλωδίου (polyvinyl formvar). Ανάλογα με το επιθυμητό πάχος χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα 0.5%-1% μέσα σε χλωροφόρμιο ή 0.15%-3% μέσα σε διχλωροαιθυλένιο. Οι μεμβράνες παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο Drummond (113) και ενισχύθηκαν με εξαχνωθέντα άνθρακα. Η εξαχνωση έγινε σε ειδική συσκευή εξαχνωσης (evaporator Hitachi) μέσα σε κενό 10⁻⁴ - 10⁻⁵ Torr (44, 45).

στ. Χρώση

Η χρώση των τομών έγινε με τη μέθοδο Echlin (287) που βασίζεται στη χρησιμοποίηση οξεικού ουρανυλίου (uranyl acetate) 1% pH 5 και ακολούθως κιτρικού μολύβδου (287). Στην επιφάνεια οδοντιατρικού κεριού τοποθετούμε σταγόνα οξεικού ουρανυλίου, στην οποία αφήνουμε να επιπλεύσουν χάλκινα πλέγματα (grids), με την επιφάνεια που φέρνει τις τομές προς τα κάτω. Η χρώση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά. Ακολουθεί ξέπλυμα των τομών με απεσταγμένο νερό και επανατοποθέτηση των χάλκινων πλεγμάτων (grids) σε κιτρικό μολύβδο για 10 λεπτά.

II.8. Μελέτη της επίδρασης των fenarimol και clotrimazole σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικού

II. 8.α. Πειραματικό υλικό

Σαν πειραματικό υλικό για τη μελέτη τυχόν επιδράσεων στα θηλαστικά χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα chinese hamster του κλώνου V-79 που χρησιμοποιούνται σε εργασίες μεταλλαξιγένεσης. Τα κύτταρα αυτής της γραμμής (line) απομονώθηκαν αρχικά από τους πνεύμονες ενός άρρενος ατόμου *Cricetulus griseus* (κρικητού του αργυρόχρους) $2n=22$ (318), και παραχωρήθηκαν από τον Κ^Ο Σιδέρη του εργαστηρίου Φυσιολογικής Γενετικής του Κέντρου Πυρηνικών Ερευνών " Δημόκριτος". Ο κλώνος V-79 έχει ευρύτητα χρησιμοποιηθεί εξαιτίας της σταθερότητας του, του σχετικά μικρού αριθμού συμπαγών χρωματοσωμάτων τα οποία βάζονται και παρατηρούνται εύκολα στο μικροσκόπιο, της δυνατότητας να απομονωθούν σειρές με βιοχημικές μεταλλαγές και της ευκολίας με την οποία απομονώνεται μη μετουσιωμένο DNA. Λεπτομερειακή περιγραφή για την απομόνωση και κυρίως τον τρόπο διατήρησης της γραμμής αυτής δίδεται από τους Yu και Sinclair (361). Τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται στους 37°C σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ μέσα σε ερμητικά κλεισμένες φιάλες των 50ml που περιείχαν 10ml θρεπτικό υλικό.

Όλοι οι χειρισμοί που αφορούν την καλλιέργεια και γενικά οποιαδήποτε "επέμβαση" στα κύτταρα, γίνονται μετά από ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο στείρων συνθηκών, (Laminar Flow Hood). Τα γυάλινα σκεύη αποστειρώνονται σε υγρό κλίβανο και τα διαλύματα με διήθηση από φίλτρο τύπου GS σε συσκευή Millipore.

II.8.6. Υλικό καλλιέργειας

Σαν θρεπτικό υλικό καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε η παραλλαγή υλικού καλλιέργειας ελαχίστων απαιτήσεων (Minimal Essential Medium, Modified-MEM)

με άλατα κατά Earl's (Flow Lab No. If - 121C), στο οποίο προστέθηκαν για να γίνει πλήρες (C- MEM), 15% ορός εμβρύου βοός, (Flow Cab. Cat. No. 4 - 055M), 9ml/l Γλουταμίνη (Glutamine) 200mM (Flow Lab), 10ml/l Πενικιλίνη - Στρεπτομυκίνη (Penicillium - Streptomycin) 5000 I.U./ ml (Flow Cab. Cat. No. 7 - 010 D) και Δικαρβονικό Νάτριο (Sodium Bicarbonate) 7.5% (Flow Lab).

II.8.γ. Συλλογή των κυττάρων και ανανέωση καλλιέργειών

Τα κύτταρα συλλέγονται από καλλιέργειες 2 ημερών με τη βοήθεια διαλύματος θρυψίνης. Δηλαδή αφαιρείται το υλικό καλλιέργειας και αντικαθίσταται με θρυψίνη, 0.025% σε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων, Dulbecco A, pH=7,3 που αποτελείται από NaCl 8gr/l, KCl 0.2gr/l, Na₂HPO₄ 1.15gr/l και KH₂PO₄ 0.2gr/l.

Αφού τα κύτταρα επωασθούν με το διάλυμα θρυψίνης για 10-15min στους 37°C αποκολλώνται από την επιφάνεια της φιάλης και σχηματίζεται ένα εναιώρημα κυττάρων. Το εναιώρημα αυτό φυγοκεντρείται για 2-4min στα 1500RPM με επιτραπέζιο φυγόκεντρο τύπου Hettich Universal II, απομακρύνεται η θρυψίνη και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό, C- MEM.

Επιθυμητός αριθμός κυττάρων προστίθεται σε κάθε κωνική φιάλη και συμπληρώνεται με C- MEM για τελικό συνολικό όγκο 10ml. Επιδιώκεται να υπάρχουν 50x10⁴ κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού.

II.8.δ. Επέμβαση με τα μυκητοκτόνα και διαδικασία στερέωσης και χρώσης για παρατηρήσεις στη μίτωση

Τα κύτταρα συλλέγονται από καλλιέργειες 2 ημερών με θρυψινοποίηση όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και αφού επαναιωρηθούν σε C- MEM γίνεται μέτρηση της πυκνότητάς των με αιματοκυτταρόμετρο.

Σε τρυβλία Petri διαμέτρου 5cm προστίθενται 5ml πλήρους θρεπτικού υλικού που περιέχουν 20x10⁴ κύτταρα. Τα τρυβλία αυτά τοποθετούνται σε ερμητικά κλειστά πλαστικά κουτιά, επωάζονται για 20 περίπου ώρες στους 37°C και σε ατμόσφαιρα CO₂ (ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂). Ακολουθεί η προσθήκη των μυκητοκτόνων διαλελυμένων σε αιθυλική αλκοόλη, σε ποσότητες που να δίνουν τις συγκεντρώσεις που θέλουμε. Η συγκέντρωση της αλκοόλης ήταν 0.5%. Ακολουθεί παράταση της επώασης για άλλες 24-48 ώρες, οπότε αρχίζει διαδικασία στερέωσης και χρώσης που βασίζεται στην παρακάτω τεχνική:

- α. Το περιεχόμενο θρεπτικό υλικό C- MEM αποχύνεται και ακολουθεί προσθήκη 5ml ανά τρυβλίο υδατικού διαλύματος 0.56% KCl. Στο KCl τα κύτταρα μένουν για 20 min.
- β. Ακολουθεί απόχυση του KCl και προσθήκη 3ml στερεωτικού διαλύματος (αιθυλική αλκοόλη: οξεικό οξύ 3:1) για 10min. Τέλος, αποχύνεται το

στερεωτικό και προστίθενται άλλα 3ml του ίδιου στερεωτικού διαλύματος, επίσης για 10min.

- γ. Εν συνεχεία αποχύνεται όλο το υγρό, και τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν. Τα χρωματοσώματα βάφονται με Giemsa, κατά τη μέθοδο του Moorhead (243).

Χρησιμοποιούνται τα παρακάτω διαλύματα:

I. Giemsa N^o 9204, Merck.

II. Διάλυμα A: Ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen KH_2PO_4 9.1gr/l.

III. Διάλυμα B: Ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen Na HPO_4 24gr/l.

Τα διαλύματα A και B αναμιγνύονται σε μία αναλογία A: B περίπου 3: 1 ώστε το pH του τελικού διαλύματος να είναι 6.8 και προστίθεται 3ml Giemsa/ 100ml AB ρυθμιστικό διάλυμα. Η Giemsa πριν τη διαλυση της στο διάλυμα φωσφορικών αλάτων, αναδεύεται καλά. Στη συνέχεια 5ml διαλύματος Giemsa προστίθεται σε κάθε τρυβλίο για 12 min. Ακολουθεί απόχυση του διαλύματος Giemsa και ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό για να φύγει η περίσσεια χρωστικής και στέγνωμα τουλάχιστον για 4 ώρες. Όλα τα ζωντανά κύτταρα εμφανίζονται με ένα σκούρο μπλέ χρώμα.

Προκειμένου να διερευνηθεί καλύτερα η επίδραση των μυκητοκτόνων στη μιτωτική διεργασία, χρησιμοποιήθηκε και μία άλλη σειρά τρυβλίων με τις ίδιες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων που όμως η τεχνική στερέωσης και χρώσης δεν περιλάμβανε το πρώτο στάδιο της έκθεσης σε KCl. Έτσι παρατηρήθηκαν οι μιτώσεις χωρίς να γίνει καταστροφή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

II.8.ε. Μέτρηση μυκητοτοξικότητας

Για τη μέτρηση της μυκητοτοξικότητας τα τρυβλία Petri έμβολιάσθηκαν με 100-200 κύτταρα το καθένα και εν συνεχεία επωάσθηκαν παρουσία και απουσία (μάρτυρας) μυκητοκτόνου για 7 ημέρες στους 37°C. Ακολούθησε η αφαίρεση του υλικού καλλιέργειας (C-MEM) από κάθε τρυβλίο και έγινε προσθήκη 2-3ml υδατικού διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 1% για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απόχυση της χρωστικής και τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν για 24 ώρες. Τότε ξεπλένονται με νερό βρύσης για να φύγει η περίσσεια χρωστικής. Όλα τα ζωντανά κύτταρα που έχουν σχηματίσει αποικίες, εμφανίζονται με ένα σκούρο μπλε χρώμα και μετρούνται εύκολα.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



III.1. Μέτρηση μυκητοτοξικότητας των μυκητοκτόνων fenarimol, clotrimazole, iprodione και benomyl

Η μέτρηση της μυκητοτοξικότητας του fenarimol, clotrimazole και benomyl στο διπλοειδές στέλεχος του *A. nidulans* έγινε με μελέτη της επίδρασης στη βλάστηση των κονιδίων και στον αριθμό των αποικιών που αναπτύσσονται από γνωστό αριθμό κονιδίων. Στην περίπτωση του iprodione η μυκητοτοξικότητα προσδιορίστηκε με βάση την επίδραση στη γραμμική αύξηση των υφών, γιατί το μυκητοκτόνο αυτό δεν επηρεάζει ούτε τη βλάστηση των κονιδίων ούτε το σχηματισμό μικρών αποικιών.

Στο σχήμα 6 βλέπουμε ότι ο αριθμός των αποικιών, σε σχέση με τη συγκέντρωση clotrimazole παρουσιάζει μείωση, που είναι ιδιαίτερα απότομη μεταξύ των τιμών 0.05μg/ml και 0.1μg/ml. Διαπιστώθηκε ότι το παραπάνω μυκητοκτόνο στις συγκεντρώσεις 0.08μg/ml και 0.2μg/ml παρεμποδίζει την εμφάνιση αποικιών κατά 50% και 95% αντίστοιχα.

Μία ανάλογη σιγμοειδής καμπύλη παρατηρείται παρουσία και του άλλου παρεμποδιστή βιοσυνθέσεως εργοστερόλης, του fenarimol (σχ.7). Οι συγκεντρώσεις που προκαλούν 50% και 95% παρεμπόδιση, στην εμφάνιση αποικιών του *A. nidulans* είναι 1.2 και 5μg/ml αντίστοιχα.

Για τα μυκητοκτόνα fenarimol και clotrimazole τα αποτελέσματα ήταν ο μέσος όρος τριών πειραμάτων με τρεις επαναλήψεις ανά επέμβαση. Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη του 1%.

Η επίδραση του iprodione στη γραμμική αύξηση του μύκητα, φαίνεται να αποδίδεται καλύτερα από ευθεία γραμμή μάλλον παρά από καμπύλη (σχ.8). Διαπιστώθηκε 50% και 80% παρεμπόδιση στην αύξηση του μύκητα σε συγκεντρώσεις 1.5μg/ml και 2.5μg/ml iprodione αντίστοιχα.

Τέλος, η επίδραση του benomyl στην εμφάνιση αποικιών του *A. nidulans*, σε αντίθεση με τα μυκητοκτόνα fenarimol και clotrimazole, απεικονίζεται και αυτή με ευθεία γραμμή. Οι συγκεντρώσεις που προκαλούν 50% και 95% παρεμπόδιση είναι 1.0μg/ml και 2.0μg/ml αντίστοιχα (σχ.9).

Για τα μυκητοκτόνα iprodione και benomyl τα αποτελέσματα ήταν ο μέσος όρος τριών πειραμάτων με 24 επαναλήψεις ανά επέμβαση. Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη του 1%.

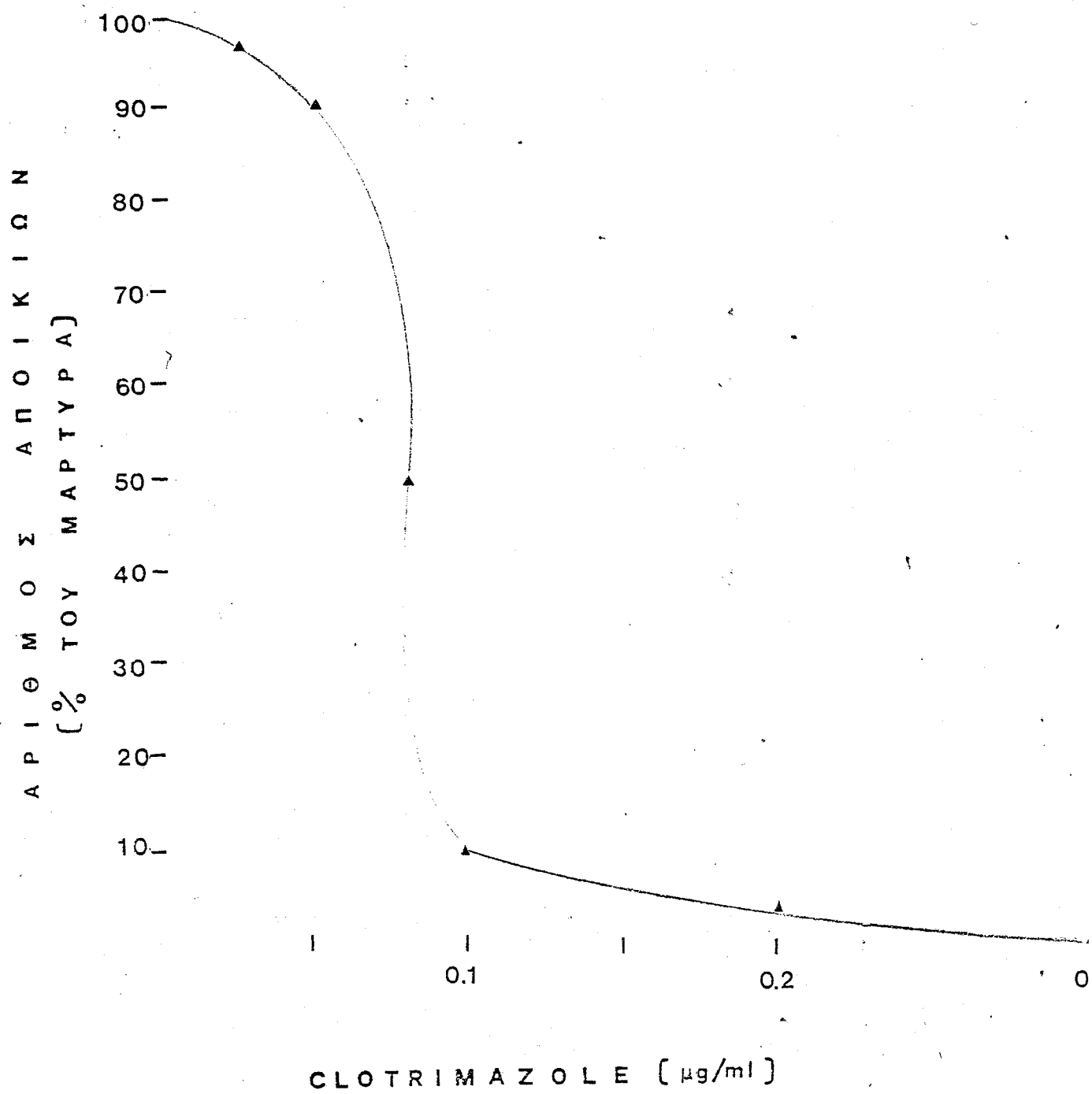
Ο πίνακας που ακολουθεί περιλαμβάνει συνοπτικά τους παραπάνω παρεμποδιστές με τις συγκεντρώσεις που προκαλούν 50% και 95% παρεμπόδιση (ED₅₀ και ED₉₅).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων, που προκαλούν κατά προσέγγιση 50% και 95% τοξικότητα στην αύξηση του *A. nidulans*

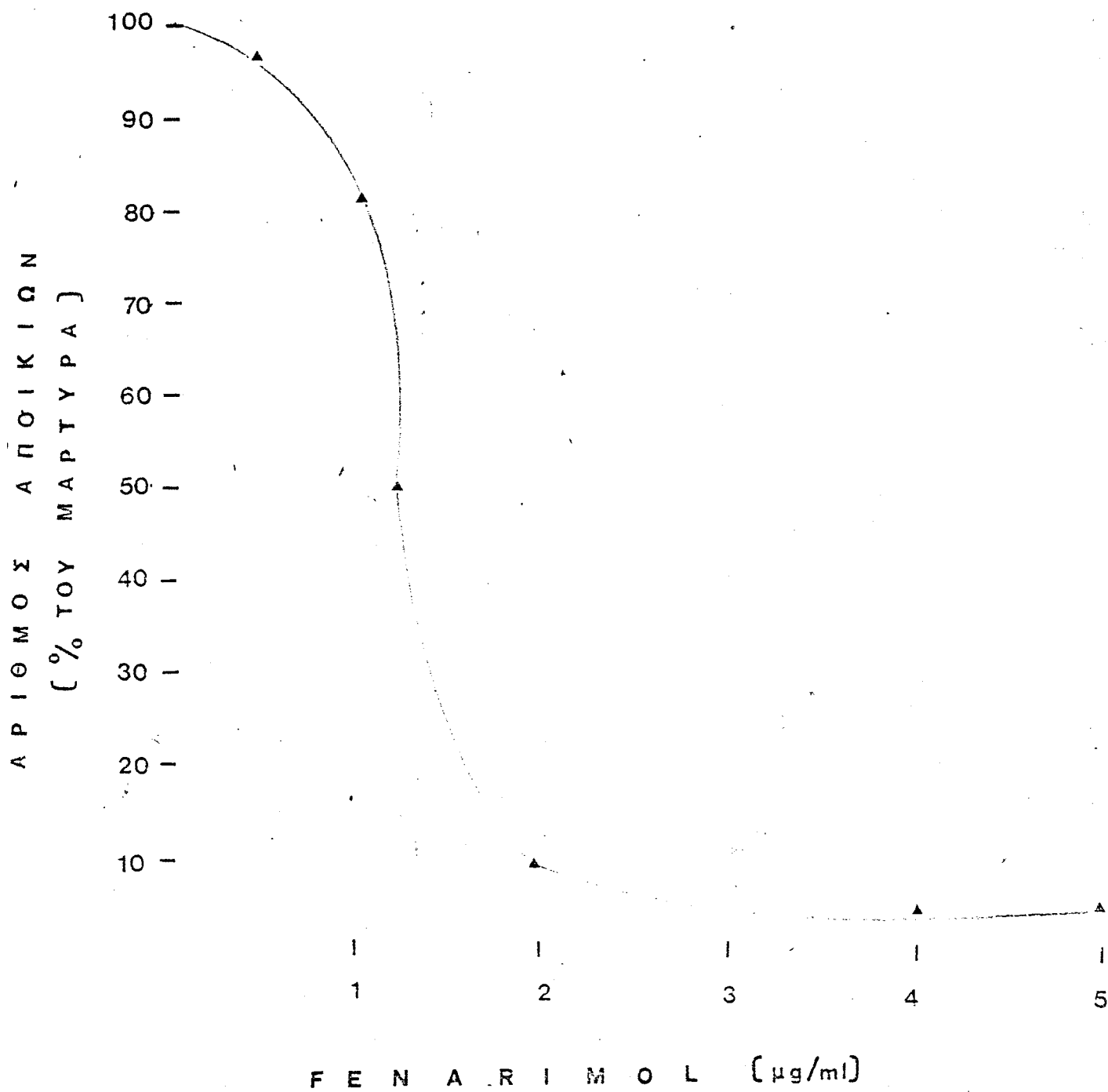
ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ	ED ₅₀	ED ₉₅
Fenarimol ¹	1.2 μg/ml	5.0 μg/ml
Clotrimazole ¹	0.08 μg/ml	0.2 μg/ml
Iprodione ²	1.5 μg/ml	2.7 μg/ml
Benomyl ¹	1.0 μg/ml	2.0 μg/ml

1. Μέτρηση τοξικότητας με την παρεμπόδιση εμφάνισης αποικιών.

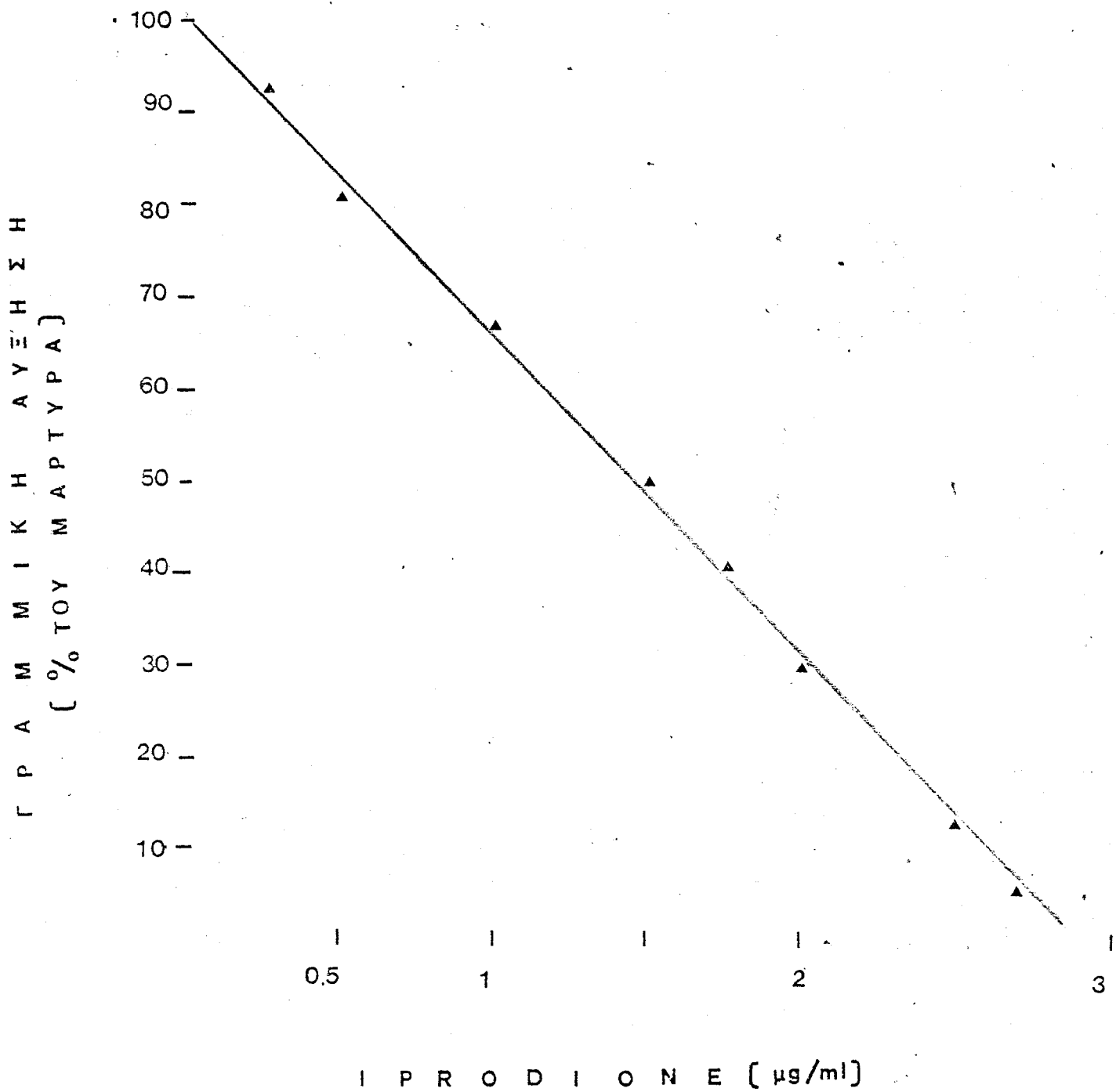
2. Μέτρηση τοξικότητας με την παρεμπόδιση γραμμικής αύξησης του μύκητα.



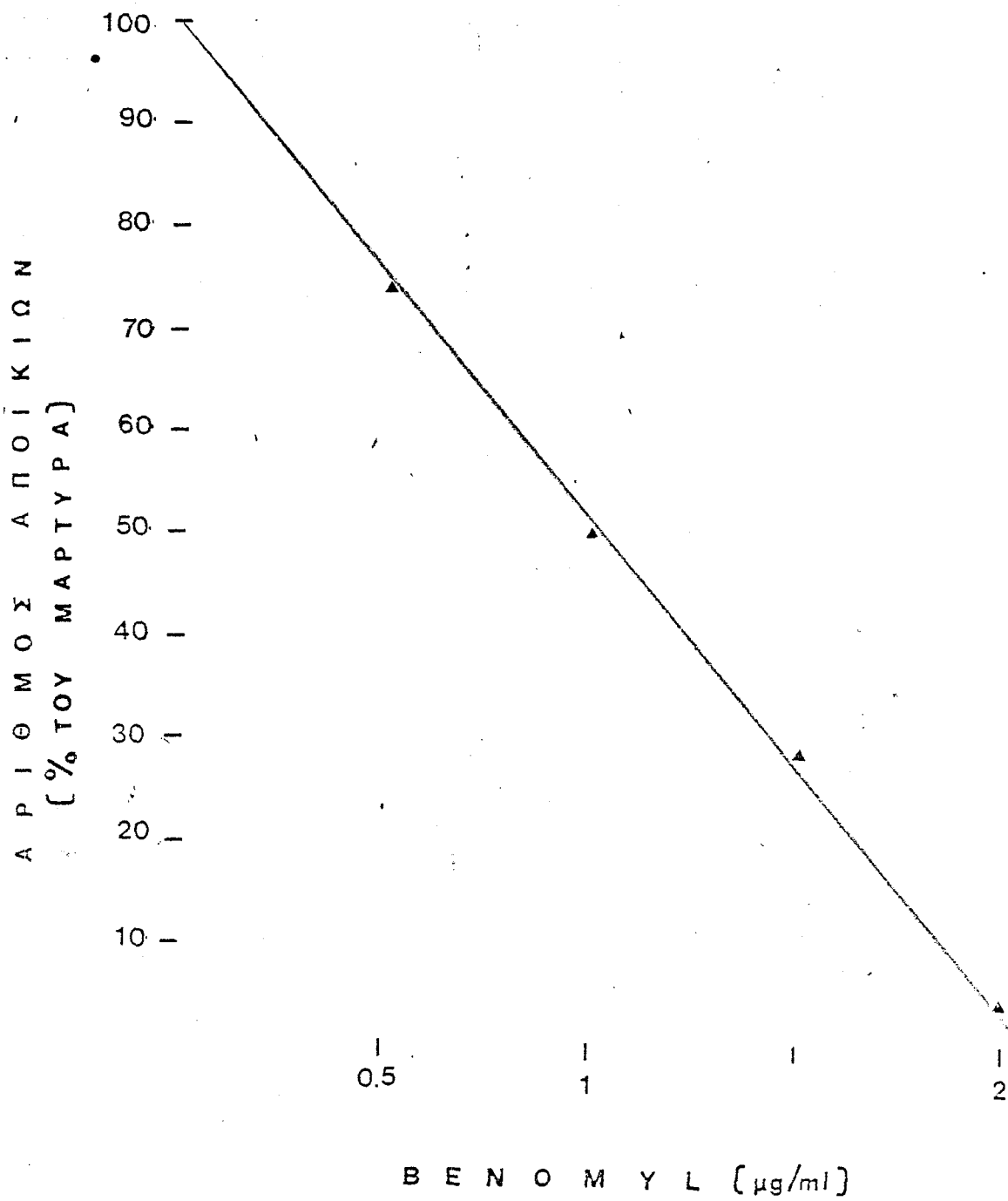
Σχ. 6.- Επίδραση του clotrimazole στο σχηματισμό αποικιών του μύκητα *A. nidulans*



Σχ. 7.- Επίδραση του fenarimol στο σχηματισμό αποικιών του μύκητα *A. nidulans*



Σχ. 8.- Επίδραση του Iprodione στη γραμμική αύξηση του μύκητα *A. nidulans*



Σχ. 9.- Επίδραση του benomyl στο σχηματισμό αποικιών του μύκητα *A. nidulans*

Και τα τέσσερα μυκητοκτόνα είναι αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση της αύξησης του *A. nidulans*. Πρέπει να σημειωθεί η ιδιαίτερα μεγάλη αποτελεσματικότητα του clotrimazole που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των μυκητιάσεων στον άνθρωπο και τα θηλαστικά γενικότερα (28, 56).

III.2. Μέτρηση βλάστησης των κονιδίων μετά την επίδραση του fenarimol, clotrimazole

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα μυκητοκτόνα fenarimol, clotrimazole σε διάφορες συγκεντρώσεις προκειμένου να προσδιορισθεί η επίδραση που έχουν στη βλάστηση των κονιδίων του *A. nidulans*.

Από τα σχήματα 10 και 11 είναι φανερό ότι και οι δύο παρεμποδιστές, προκαλούν καθυστέρηση στην έναρξη βλάστησης αλλά και μείωση του τελικού αριθμού βλαστανόντων κονιδίων σε σχέση με τον μάρτυρα. Οπωσδήποτε όμως απαιτείται διπλάσια περίπου συγκέντρωση για 50% παρεμπόδιση της βλάστησης των κονιδίων απ' ότι για αντίστοιχη παρεμπόδιση στην εμφάνιση αποικιών (σχ. 12,13), πράγμα που σημαίνει ότι πολλά από τα κονίδια που βλαστάνουν, δεν μπορεί να δώσουν ανάπτυξη τέτοια ώστε να παραχθεί μακροσκοπικά ορατή αποικία. Ιδιαίτερα για τις μικρότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία μας, το clotrimazole 0.1μg/ ml και το fenarimol 2μg/ ml παρεμποδίζουν 25% περίπου τη βλάστηση των κονιδίων και 90% περίπου το σχηματισμό αποικιών.

Για τα μυκητοκτόνα fenarimol και clotrimazole τα αποτελέσματα ήταν ο μέσος όρος τριών πειραμάτων με τρεις επαναλήψεις ανά επέμβαση. Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη του 1%.

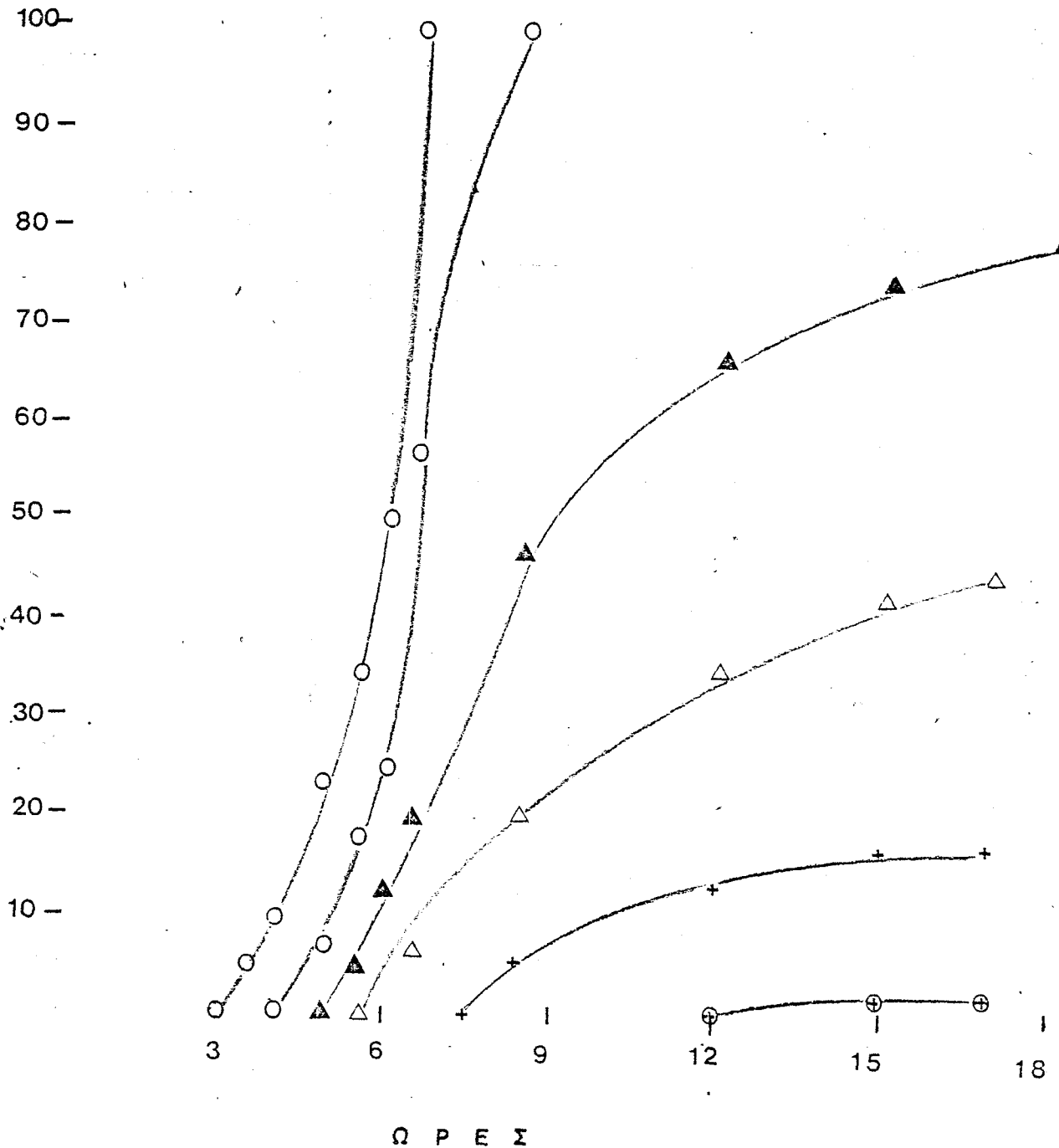
III.3. Μέτρηση γενετικής δραστικότητας των μυκητοκτόνων

Το διπλοειδές στέλεχος HA του *A. nidulans*, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, με τις γενετικές σημάνσεις για άσπρο και κίτρινο χρώμα κονιδίων που φέρει στο γονοτύπο του σε ετεροζύγωτη κατάσταση, είναι κατάλληλο για τη διαπίστωση της επίδρασης των υπό μελέτη χημικών παραγόντων στο σωματικό διαχωρισμό (somatic segregation).

Η γενετική δραστικότητα των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιήσαμε στην εργασία μας μελετήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις, από τις οποίες η μια προκαλούσε μέτρια (50%) και η άλλη υψηλή (~ 80%-90%) παρεμπόδιση στην εμφάνιση αποικιών.

Για το σκοπό αυτό μετρήθηκε ο αριθμός των άσπρων και κίτρινων τομέων που εμφανίζονται σαν αποτέλεσμα της επίδρασης του φαρμάκου και σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράψαμε στα υλικά και μέθοδοι. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με το δείκτη επαγωγής διάσχισης (Induced Segregation Index) για

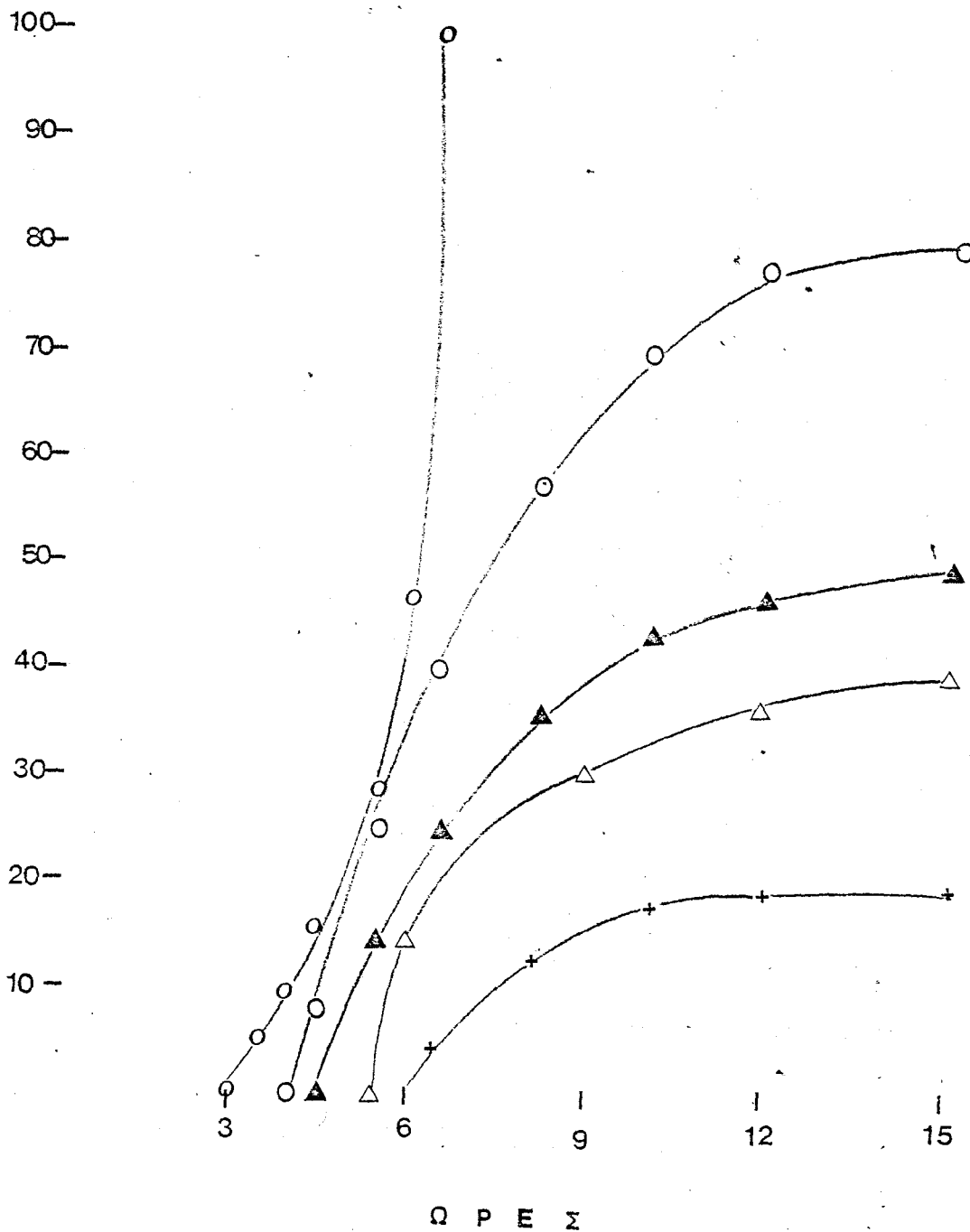
ΑΡΙΘΜΟΣ ΒΛΑΣΤΗΜΕΝΩΝ ΚΟΝΙΔΙΩΝ
 [% ΤΟΥ ΜΑΡΤΥΡΑ]



Σχ. 10.- Επίδραση του fenarimol στη βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. nidulans*

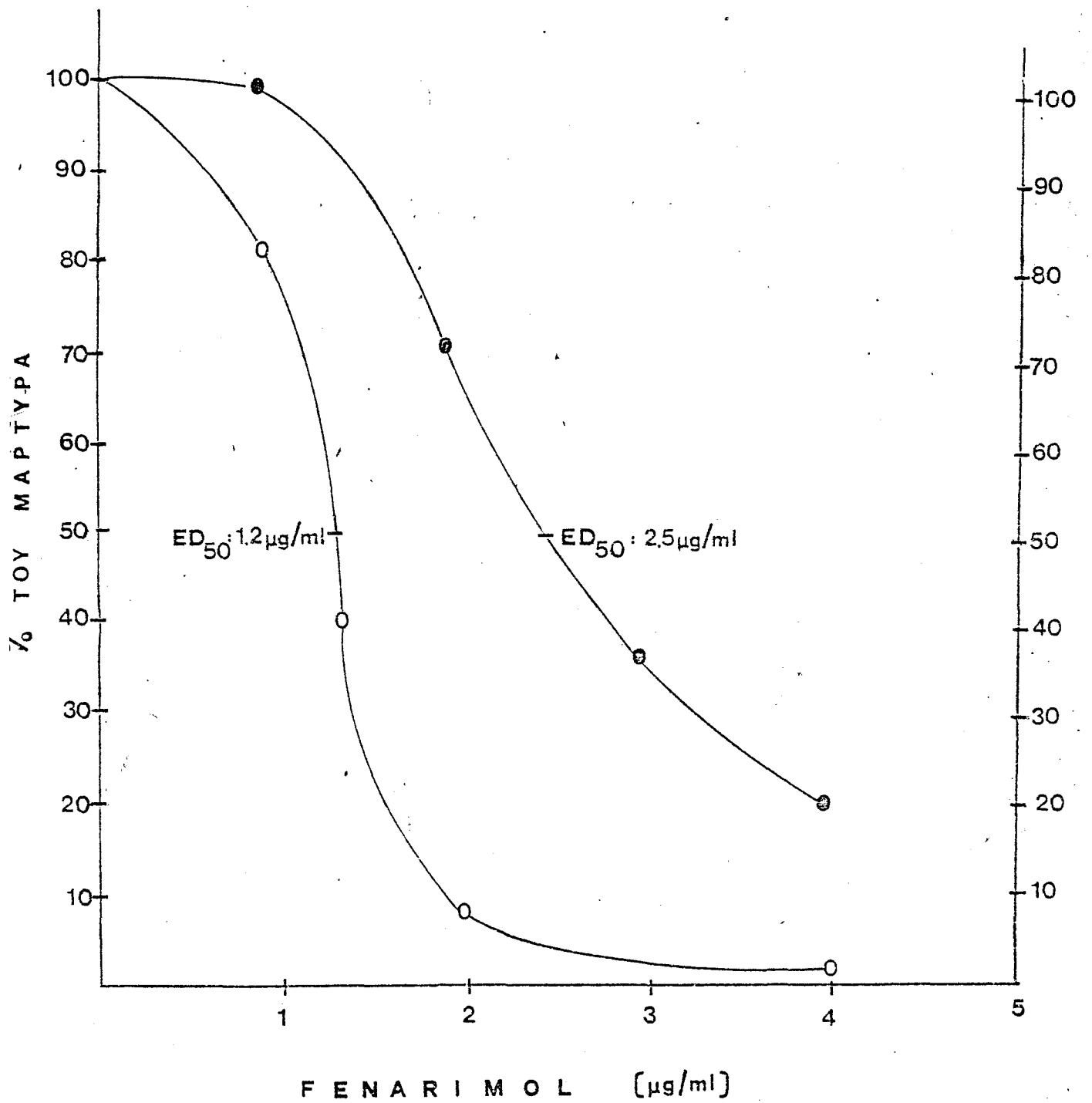
(●—● μάρτυρας, ○—○ fenarimol 1μg/ml, ▼—▼ fenarimol 2μg/ml, ▽—▽ fenarimol 3μg/ml, +—+ fenarimol 4μg/ml, ⊕—⊕ fenarimol 5μg/ml).

ΑΡΙΘΜΟΣ ΒΛΑΣΤΗΜΕΝΩΝ ΚΟΝΙΔΙΩΝ
 (% ΤΟΥ ΜΑΡΤΥΡΑ)

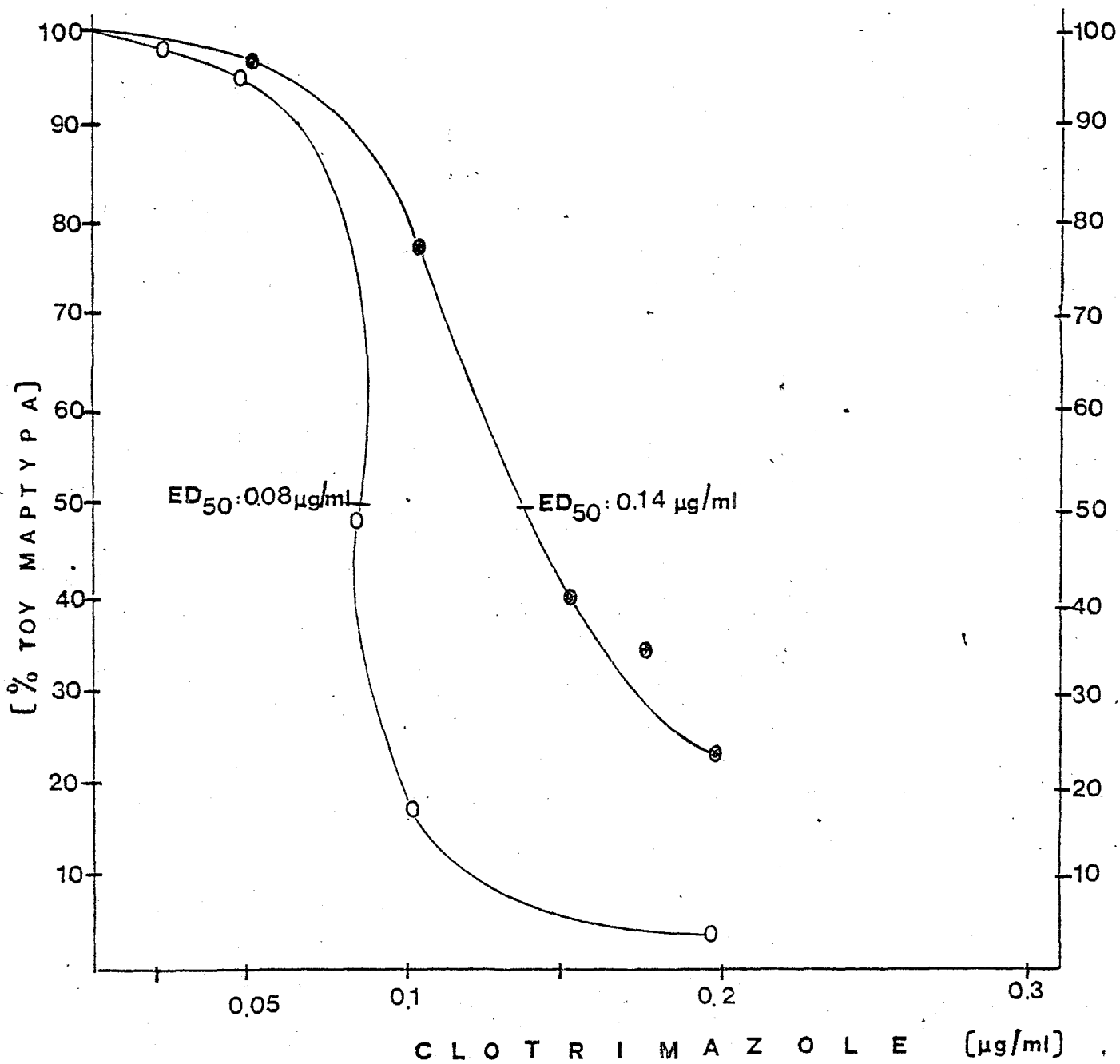


Σχ. 11.- Επίδραση του clotrimazole στη βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. nidulans*

(●—● μάρτυρας, ○—○ clotrimazole 0.1μg/ml, ▼—▼ clotrimazole 0.15μg/ml, ▽—▽ clotrimazole 0.175μg/ml, +—+ clotrimazole 0.2μg/ml).



Σχ. 12.- Επίδραση του fenarimol στην εμφάνιση αποικιών και στη βλάστηση των κονιδίων (μετά από 15 ώρες επώαση) του μύκητα *A. nidulans*



Σχ. 13.- Επίδραση clotrimazole στην εμφάνιση αποικιών και στη βλάστηση κονιδίων (μετά απο 15 ώρες επώαση) του μύκητα *A. nidulans*

κάθε επέμβαση. Ο Δ.Ε.Δ. (I.S.I) καθορίζεται σαν ο λόγος των εγχρώμων τομέων σε 100 αποικίες επέμβασης προς τους εγχρώμους τομείς σε 100 αποικίες μάρτυρα. Έτσι λοιπόν για τα τρία μυκητοκτόνα προέκυψε:

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Επίδραση των μυκητοκτόνων στη συχνότητα του διαχωρισμού στο διπλοειδές στελέχος HA. του *A. nidulans*.

Μυκητοκτόνο	Συγκέντρωση (μg/ml)	Τοξικότητα (%)	Έγχρωμοι Ανασυνδυασμοί ανά 100 αποικίες	Δείκτης Επαγωγής Διάσχισης
Μάρτυρας	-	0	5	1
Fenarimol ¹ (EBI)	1.2 5.0	50 95	10 82	2 16.4
Clotrimazole ¹ (EBI)	0.08 0.2	50 95	20 35	4 7
Iprodione ² (Δικαρ/κό)	1.5 2.5	50 80	75 95	15 19
Benomyl ¹ (Βενζιμ/κό)	0.5 1.0	30 50	30 100	6 20

1. Μέτρηση τοξικότητας με την παρεμπόδιση εμφάνισης αποικιών.
2. Μέτρηση τοξικότητας με την παρεμπόδιση γραμμικής αύξησης του μύκητα.

Τα αποτελέσματα της γενετικής δραστηριότητας ήταν ο μέσος όρος τριών πειραμάτων όπου σε κάθε πείραμα εξετάζονταν 80 - 100 αποικίες τόσο για τον μάρτυρα όσο και για κάθε επέμβαση. Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη του 1%

Απο τα αποτελέσματα, που συνοψίζονται στον πίνακα 6, φαίνεται ότι και τα τρία μυκητοκτόνα fenarimol, clotrimazole και iprodione προκαλούν σημαντική αύξηση στη συχνότητα των μιτωτικών ανασυνδυασμών του διπλοειδούς στελέχους HA του *A. nidulans*. Οποσδήποτε όμως στην περίπτωση των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs) γαι να διαπιστωθεί εντυπωσιακή γενετική δραστηριότητα έπρεπε να χρησιμοποιηθούν συγκεντρώσεις που προκαλούν μεγάλη τοξικότητα. Το iprodione αντίθετα, παρουσιάζει έντονη γενετική δραστηριότητα ακόμα και στη συγκέντρωση 1.5μg/ml (ED₅₀) συμπεριφερόμενο κατά κάποιο τρόπο παρόμοια με το benomyl το οποίο όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, παρεμποδίζει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι

να παρατηρείται σημαντική αύξηση στη συχνότητα του μιτωτικού διαχωρισμού ακόμα και σε συγκεντρώσεις που προκαλούν μικρή μυκητοτοξικότητα.

III.4. Γενετική ανάλυση των προϊόντων μιτωτικής διάσχισης

Για τον προσδιορισμό του μηχανισμού με τον οποίο τα μυκητοκτόνα αυξάνουν τη συχνότητα των μιτωτικών ανασυνδυασμών διερευνήθηκε η γονοτυπική σύσταση των εγχρώμων τομέων που εμφανίσθηκαν με την επίδραση των παρεμποδιστών. Για το σκοπό αυτό προσδιορίσθηκαν οι θρεπτικές απαιτήσεις των προϊόντων μιτωτικής διάσχισης. Τα απλοειδή εμφανίζουν διάσχιση των αλληλομόρφων σε πολλούς από τους αρχικά ετεροζύγωτους γόνους ενώ τα διπλοειδή εμφανίζουν διάσχιση για το γόνο του χρώματος και ίσως για κάποιες θρεπτικές απαιτήσεις, που ελέγχονται από γόνους συνδεδεμένους με το γόνο αυτό.

Αναλύθηκαν γενετικά όλα τα προϊόντα διαχωρισμού, δηλαδή όλες οι περιοχές λευκού και κίτρινου χρώματος που περιελάμβαναν μεγάλους τομείς αλλά και μικρά σημεία και στίγματα. Αρχικά τα προϊόντα διάσχισης εξετάσθηκαν με τον τρόπο που προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι για τον πλοειδισμό τους, δηλαδή εάν ήταν απλοειδή ή διπλοειδή. Κατόπιν τα διπλοειδή εξετάσθηκαν για να διαπιστωθεί κατά πόσο μπορεί να οφείλονται σε μη αποχωρισμό των χρωματίδων ή σε μιτωτικό διασκελισμό. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των προϊόντων μιτωτικής διάσχισης που προέκυψαν από την επίδραση των fenarimol, clotrimazole και iprodione συνοψίζονται στον πίνακα 7.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Κατάταξη προϊόντων μιτωτικής διάσχισης που προέκυψαν από την επίδραση των μελετηθέντων παρεμποδιστών στο διπλοειδές στέλεχος HA του *A. nidulans*

Μυκητοκτόνο	Συγκέντρωση ($\mu\text{g/ml}$)	Σύνολο προϊόντων διαχωρισμού που αναλύθηκαν	Προϊόντα διαχωρισμού ανά 100 αποικίες		
			Απλοειδή	Διπλοειδή από	
				Μη αποχωρισμό	Μιτωτικό διασκελισμό
Μάρτυρας	0	65	1.75	0.40	2.85
Fenarimol	5	44	48.38	29.52	4.1
Clotrimazole	0.2	42	15.83	16.67	2.50
Iprodione	2.5	60	26.9	25.3	42.75

Από την ανάλυση αυτή προκύπτει ότι το clotrimazole και fenarimol προκαλούν αύξηση τόσο των απλοειδών όσο και των διπλοειδών προϊόντων μιτωτικού ανασυνδυασμού. Τα διπλοειδή όμως προϊόντα μιτωτικής διάσχισης προέρχονται όχι από το μηχανισμό του μιτωτικού διασκελισμού αλλά από το μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων που φαίνεται να είναι ο υπεύθυνος μηχανισμός γενετικής δραστηριότητας των clotrimazole, fenarimol. Το iprodione (2.5μg/ ml) επίσης αυξάνει τόσο τα απλοειδή όσο και τα διπλοειδή. Τα διπλοειδή όμως φαίνεται να προέρχονται περισσότερο από το μηχανισμό του μιτωτικού διασκελισμού και λιγότερο από το μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων.

III.5. Επίδραση των μυκητοκτόνων στη μορφολογία του μύκητα *A. nidulans* και στο επίπεδο οπτικού μικροσκοπίου

Με την οπτική μικροσκοπία προσπαθήσαμε να διαπιστώσουμε αλλαγές στη μορφολογία της υψής αλλά και στη συμπεριφορά του χρωματοσωματικού υλικού, κατά τη διάρκεια της μίτωσης, που προκαλούνται από τα μυκητοκτόνα fenarimol, clotrimazole, iprodione, captafol και benomyl στο μύκητα *A. nidulans*.

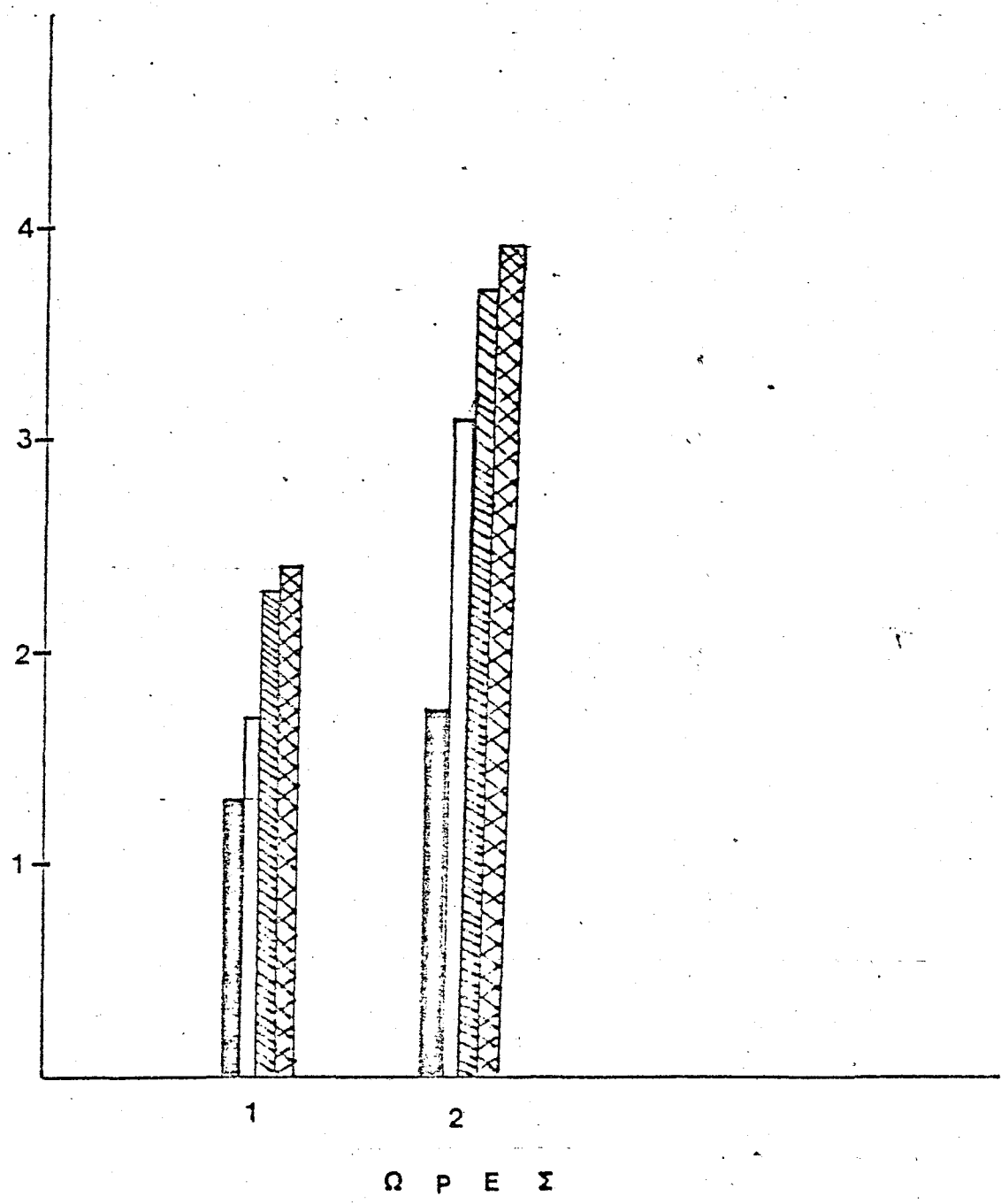
Η πορεία αυτής της μελέτης πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: Στο πρώτο, έγιναν παρατηρήσεις στο ρυθμό διαίρεσης των πυρήνων σε βλαστικούς σωλήνες του μύκητα παρουσία και απουσία των παρεμποδιστών. Στο δεύτερο στάδιο έγιναν παρατηρήσεις στη δομή του μυκηλίου και στη συμπεριφορά του χρωματοσωματικού υλικού κατά τη μίτωση με το μύκητα αναπτυγμένο σε υλικό μάρτυρα και παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των μυκητοκτόνων. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε έχει τη δυνατότητα να αποτυπώνει τη μορφολογία των υψών καθώς επίσης και το χρωματοσωματικό υλικό του πυρήνα. Άλλα κυτταρικά έγκλειστα και οργανίδια, όπως π.χ. τα μιτοχόνδρια, χυμοτόπια ή ενδοπλασματικό δίκτυο δεν είναι ορατά.

III.5.α. Επίδραση των μυκητοκτόνων fenarimol, clotrimazole, iprodione, captafol και benomyl στο ρυθμό διαίρεσης των πυρήνων στον *A. nidulans*

Στα σχήματα 14 και 15 φαίνονται οι επιδράσεις των μυκητοκτόνων fenarimol, clotrimazole, iprodione, captafol και benomyl στο ρυθμό διαίρεσης των πυρήνων σε βλαστικούς σωλήνες κωνιδίων διπλοειδούς στελέχους του *A. nidulans*.

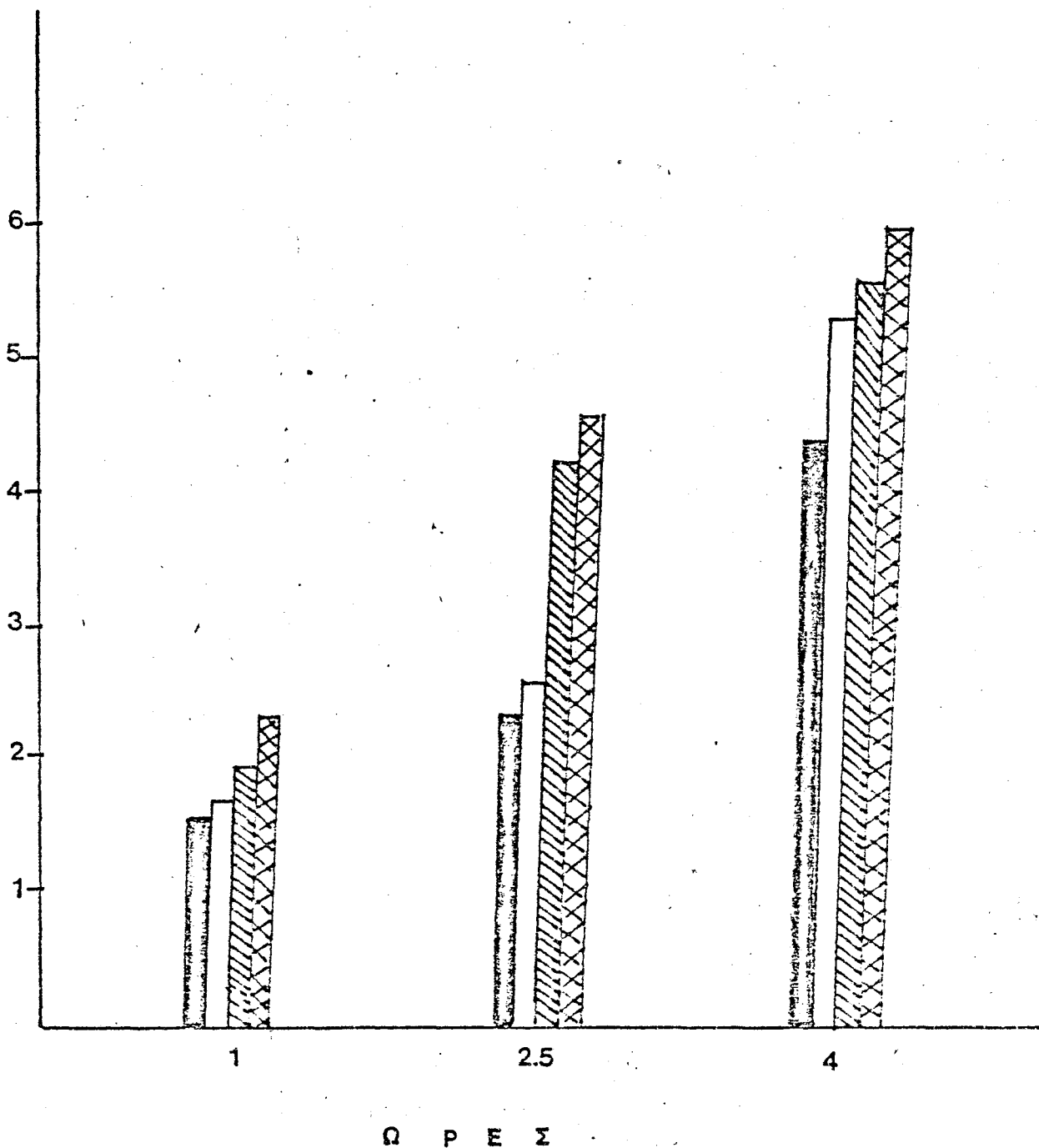
Τα αποτελέσματα ήταν ο μέσος όρος τριών πειραμάτων η δε τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη του 1%.

ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΠΥΡΗΝΩΝ
ΑΝΑ ΒΛΑΣΤΙΚΟ ΣΩΛΗΝΑ



Σχ. 14.-Επίδραση των captafol 0.075µg/ ml, captafol 0.15µg/ ml, benomyl 1.5µg/ ml, στην αύξηση του αριθμού των πυρήνων ανά βλαστικό σωλήνα του μύκητα *A. nidulans*. (μάρτυρας).

ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΠΥΡΗΝΩΝ
ΑΝΑ ΒΛΑΣΤΙΚΟ ΣΩΛΗΝΑ



Σχ. 15.- Επίδραση των fenarimol 2μg/ml, clotrimazole 0,1μg/ml, iprodione 1.5μg/ml στην αύξηση του αριθμού των πυρήνων ανά βλαστικό σωλήνα του μύκητα *A. nidulans*. (μάρτυρας).

Το benomyl 1.5μg/ ml (σχ. 14) παρεμποδίζει ισχυρά την αύξηση του αριθμού των πυρήνων ανά βλαστικό σωλήνα. Το αποτέλεσμα αυτό αναμένεται βέβαια λόγω της δράσης του benomyl στη διαδικασία σχηματισμού των μικροσωληνίσκων της ατράκτου που οδηγεί στην παρεμπόδιση της μιτωτικής διεργασίας.

Το cartafol, γνωστό μεταλλαξιγόνο και τερατογόνο, στις συγκεντρώσεις 0.075μg/ ml και 0.15μg/ ml που παρεμποδίζουν την αύξηση του μήκους 30% και 58% αντίστοιχα (363) φαίνεται να ασκεί μικρή επίδραση στην αύξηση του αριθμού των πυρήνων. Η επίδραση αυτή είναι περισσότερο εμφανής στην υψηλότερη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου.

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης fenarimol 2μg/ ml και clotrimazole 0.1μg/ ml (σχ. 15) παρ' όλο που δρούν, άμεσα τουλάχιστον, σε θέσεις που δεν έχουν σχέση με τη λειτουργία της μίτωσης, φαίνεται να καθυστερούν την έναρξη του πολλαπλασιασμού των πυρήνων στα βλαστώνοντα κονίδια κατά τις τρεις πρώτες ώρες επώασης. Αργότερα όμως παρατηρείται αύξηση του αριθμού των πυρήνων στους βλαστικούς σωλήνες, ενδεικτικό ότι γίνονται μιτωτικές διαιρέσεις σε ρυθμό που πλησιάζει κατά κάποιο τρόπο εκείνο του μάρτυρα.

Για το iprodione τα μέχρι στιγμής δεδομένα της βιβλιογραφίας δεν μπορούν να δώσουν σαφή εικόνα για το μηχανισμό δράσης του. Πάντως φαίνεται να μην έχει σχέση με την αναστολή των μιτώσεων. Στη συγκέντρωση 1.5μg/ ml (ED₅₀) δεν παρατηρείται καμιά αξιόλογη παρεμπόδιση της αύξησης του αριθμού των πυρήνων του βλαστικού σωλήνα (σχ. 15).

III.5.6. Παρατηρήσεις στη μορφολογία των υφών και στη συμπεριφορά του χρωματοσωματικού υλικού κατά την πορεία της μίτωσης, απουσία παρεμποδιστή.

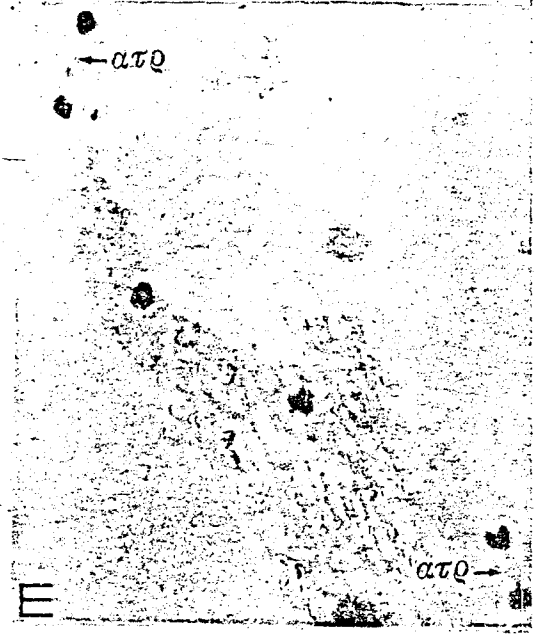
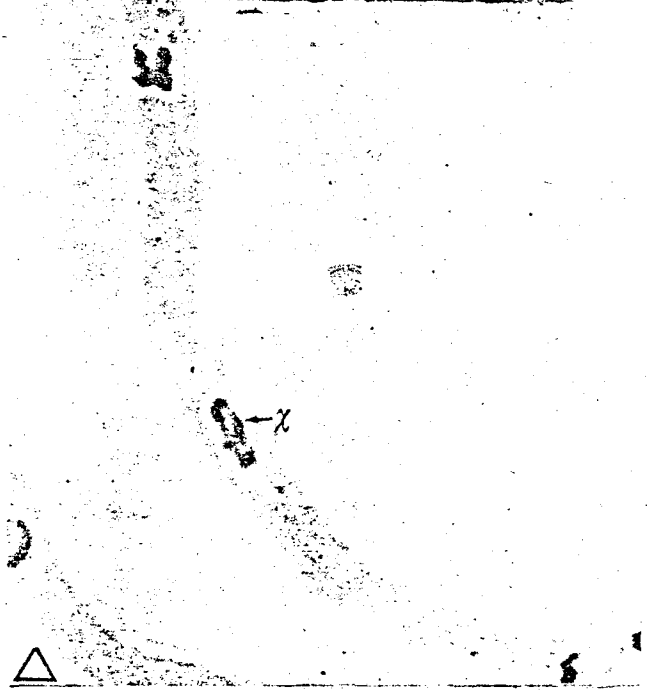
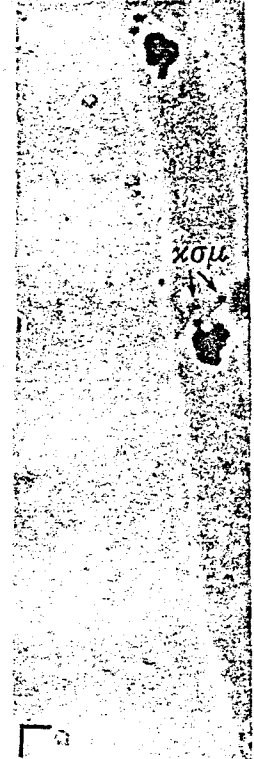
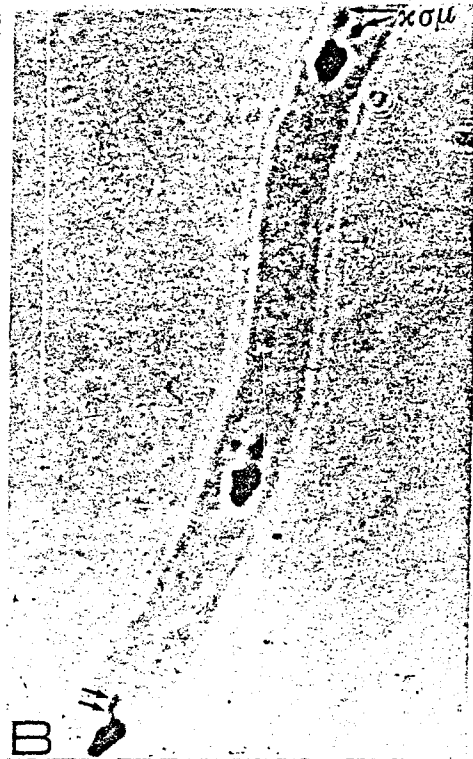
Στο στερεό θρεπτικό υλικό (CM) απουσία παρεμποδιστή, οι υφές του μύκητα *A. nidulans* εμφανίζουν αραιές διακλαδώσεις, ενώ στο εσωτερικό τους παρατηρούνται πυρήνες, με ομοιόμορφη κατά μήκος κατανομή, σε μεσόφαση αλλά και σε διάφορα στάδια μιτωτικής διεργασίας. Στη μεσόφαση διαπιστώνεται η παρουσία πυρηνίσκου ο οποίος περιβάλλεται από μάζα χρωματίνης. Η τελευταία είναι συσσωρευμένη κυρίως στον ένα πόλο του πυρήνα (εικ. 1Α).

Η μίτωση διακρίνεται σε τέσσερα στάδια, πρόφαση-μετάφαση-ανάφαση-τελόφαση. Στο στάδιο I (πρόφαση): Το χρωματοσωματικό υλικό αποτυπώνεται έντονα και διατάσσεται με διάφορες μορφές συμπαγούς μάζας κατά μήκος της υφής. Τα κεντροσωμάτια που αποτελούν τα κέντρα οργάνωσης της μιτωτικής ατράκτου, απομακρύνονται προκειμένου να καταλάβουν αντιδιαμετρικές θέσεις (εικ. 1Β, Γ). Σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται μικρό τμήμα χρωματοσωματικού υλικού να αποσπάται από τη κύρια μάζα χρωματοσωμάτων, να συνδέεται όμως μ' αυτή με νημάτια (εικ. 1Β). Στο στάδιο II (μετάφαση), τα χρωματοσώματα διατάσσονται σε δύο παράλληλες κατά μήκος της υφής σειρές, ενώ αρχίζει να κάνει την εμφανισή της η μιτωτική άτρακτος (εικ. 1Δ). Στο στάδιο III (ανάφαση), το χρωματοσωματικό υλικό μετακινείται στα δύο άκρα κάθε αλυσίδας και η άτρακτος αποτυπώνεται πλέον με ευκρίνεια (εικ. 1Ε). Τέλος στο στάδιο IV (τελόφαση) η άτρακτος βαθμιαία εξαφανίζεται (εικ. 1Ζ, Η) και προκύπτουν δύο θυγατρικοί πυρήνες με πυκνή μάζα χρωματίνης (εικ. 1Η).

Εικόνα 1: Υφές του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε στερεό πλήρες θρεπτικό υλικό, απουσία παρεμποδιστή.

Παρατηρούνται πυρήνες σε μεσόφαση και στα χαρακτηριστικά στάδια της μιτωτικής διεργασίας. Στη μεσόφαση (Α) η χρωματίνη (χ), με τεχνική χρώσης Giemsa, διακρίνεται με έντονο σκούρο χρωματισμό να περιβάλλει τον πυρηνίσκο (πρν), ο οποίος βρίσκεται πλησιέστερα στον ένα πόλο του πυρήνα. Στην πρόφαση (Β, Γ) τα κεντροσωμάτια (κσμ), που αποτελούν τα κέντρα οργάνωσης της μιτωτικής ατράκτου, απομακρύνονται προκειμένου να καταλάβουν αντιδιαμετρικές θέσεις. Σε μερικές περιπτώσεις (Β) διαπιστώνεται η παρουσία μικρού τμήματος χρωματίνης να έχει απομακρυνθεί και να συνδέεται με το κύριο άθροισμα χρωματοσωμάτων με νημάτια (μαύρα βέλη). Στη μετάφαση, τα χρωματοσώματα (χ) διατάσσονται σε δύο παράλληλες κατά μήκος της υψής σειρές (Δ). Στην ανάφαση (Ε, Ζ) έχει ήδη αρχίσει να πραγματοποιείται μετακίνηση χρωματοσωμάτων στο άκρο κάθε αλυσίδας, ενώ αποτυπώνεται με ευκρίνεια η άτρακτος (ατρ). Στο τελευταίο στάδιο της μίτωσης, την τελόφαση (Η) έχει ολοκληρωθεί ο σχηματισμός θυγατρικών πυρήνων με πυκνή μάζα χρωματίνης (χ).

Όλες οι φωτογραφίες × 2112.





III.5.γ. Επίδραση των μυκητοκτόνων fenarimol, clotrimazole, iprodione και captafol στη μορφολογία και τη μίτωση του *A. nidulans*

Με τη βοήθεια της οπτικής μικροσκοπίας, επιχειρήσαμε να προσδιορίσουμε τις επιδράσεις των μυκητοκτόνων fenarimol, clotrimazole, iprodione και captafol στη μορφολογία των υφών αλλά και στη μιτωτική διεργασία του μύκητα *A. nidulans*.

Οποσδήποτε, οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν ίδιες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στις ανάλογες μελέτες της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και η επιλογή τους έγινε με βάση την παρατηρηθείσα παρεμπόδιση στη βλάστηση των κονιδίων και στο σχηματισμό άποικιών. Μ' αυτό τον τρόπο δόθηκε η δυνατότητα να εκτιμήσουμε τις επιδράσεις όλων αυτών των παρεμποδιστών, στη μορφολογία αλλά και στη μιτωτική διεργασία, με συνθήκες μέτριας και υψηλής μυκητοτοξικότητας αντίστοιχα.

Έτσι από τους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs), το fenarimol χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 2 και 5μg/ml ενώ το clotrimazole αντίστοιχα σε 0.1 και 0.2μg/ml.

Από την κατηγορία των δικαρβοξυμιδικών, το iprodione μελετήθηκε στη συγκέντρωση 1.5μg/ml, που προκαλεί 50% παρεμπόδιση στη γραμμική αύξηση των υφών (ED₅₀) και στη συγκέντρωση 2.5μg/ml όπου προκαλεί 80% παρεμπόδιση.

Τέλος από την κατηγορία των φθαλιμιδίων, μελετήθηκε το μυκητοκτόνο captafol στις συγκεντρώσεις 0.075μg/ml και 0.15μg/ml. Το βασικό κριτήριο που συνετέλεσε στην επιλογή και μελέτη των δύο παραπάνω συγκεντρώσεων, ήταν οπωσδήποτε ο διαφορετικός μηχανισμός γενετικής δραστηριότητας στον *A. nidulans*, όπως είχε διαπιστωθεί από τους Ziogas και συνεργάτες (363). Έτσι στη χαμηλή συγκέντρωση (0.075μg/ml), τα περισσότερα προϊόντα μιτωτικού διαχωρισμού φαίνεται να είναι αποτέλεσμα του μιτωτικού διασκελισμού (mitotic crossing-over), ενώ ο μη αποχωρισμός χρωματοσωμάτων (non-disjunction) εμφανίζεται στην υψηλότερη συγκέντρωση (0.15μg/ml).

Παρακάτω, περιγράφονται αναλυτικά οι επιδράσεις των παραπάνω παρεμποδιστών, όπως παρατηρούνται με την οπτική μικροσκοπία.

Το fenarimol και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε προκαλεί έντονη παραμόρφωση των βλαστικών σωλήνων του μύκητα *A. nidulans*. Τα εκφυλιστικά αυτά φαινόμενα εμφανίζονται οπωσδήποτε εντονότερα στην υψηλότερη συγκέντρωση του παρεμποδιστή. Το πάχος των υφών είναι ιδιαίτερα αυξημένο και σε αρκετές περιπτώσεις γίνεται διπλάσιο σε σύγκριση με εκείνο που παρατηρήθηκε σε υφές που αναπτύχθηκαν σε υλικό μάρτυρα (εικ. 2A). Τα εγκάρσια διαγράμματα (septa) εμφανίζονται πιο συχνά κατά μήκος των υφών, με

αποτέλεσμα τα κύτταρα να είναι βραχύτερα και να έχουν βαρελοειδή μορφή (εικ. 2Γ). Παράλληλα παρατηρείται και σημαντική αύξηση των διακλαδώσεων στις υφές (εικ. 2B). Σημαντικές μεταβολές παρατηρούνται επίσης στη μιτωτική διεργασία αλλά και στη διάταξη των πυρήνων κατά μήκος των υφών. Σε καμιά απολύτως περίπτωση δεν εμφανίσθηκαν τα τυπικά στάδια της μίτωσης, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Αντίθετα, παρατηρούνται πολυάριθμοι ανόμοιοι πυρήνες (εικ. 2B) με ακανόνιστη διάταξη (εικ. 2Γ) και, το πλέον σημαντικό, με διαφορετική ποσότητα χρωματοσωματικού υλικού, γεγονός που δηλώνει ότι προηγήθηκαν ανώμαλες μιτώσεις (εικ. 2Δ).

Το clotrimazole σε συγκεντρώσεις 0.1 και 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ φαίνεται να έχει επιδράσεις στα βλαστώνοντα κονίδια του μύκητα *A. nidulans*, ανάλογες με εκείνες που παρατηρήθηκαν και παρουσία του άλλου παρεμποδιστή βιοσύνθεσης εργοστερόλης του *fenarimol*. Έτσι οι βλαστικοί σωλήνες και οι υφές εμφανίζονται έντονα παραμορφωμένοι. Παρατηρείται σημαντική αύξηση του πάχους των, που σε πολλές περιπτώσεις γίνεται διπλάσιο σε σύγκριση με τον μάρτυρα (εικ. 3A). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την αυξημένη παρουσία εγκαρσίων διαφραγμάτων (*septa*) οδηγεί στην εμφάνιση κυττάρων με βαρελοειδή μορφή (εικ. 3E). Στη διαπιστωθείσα παραμόρφωση φαίνεται επίσης να συμβάλλει σημαντικά και η έντονη διακλάδωση των υφών. Σε καμιά απολύτως περίπτωση δεν παρατηρούνται τα τυπικά στάδια της μιτωτικής διεργασίας, παρουσία clotrimazole, ενώ οι πολυάριθμοι πυρήνες κατανέμονται ακανόνιστα κατά μήκος των υφών. Οι τελευταίοι φαίνεται να διαφέρουν στην ποσότητα και πυκνότητα χρωματοσωματικού υλικού, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι προηγήθηκαν μη κανονικοί διαχωρισμοί χρωματοσωμάτων κατά τη διάρκεια των μιτώσεων (εικ. 3B, Γ, Δ).

Το iprodione σε συγκεντρώσεις 1.5 και 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ φαίνεται να μην προκαλεί σημαντικές τουλάχιστον, μορφολογικές μεταβολές στα βλαστώνοντα κονίδια του μύκητα *A. nidulans*. Η μορφολογία των υφών αυτών εμφανίζεται χωρίς αλλοιώσεις, σε σύγκριση με υφές από κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα (εικ. 4A).

Σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρούνται πυρήνες στο στάδιο της μεσόφασης με ευδιάκριτους τους πυρηνίσκους να περιβάλλονται από χρωματοσωματικό υλικό. Οι πυρήνες κατανέμονται κατά μήκος της υφής ομοιόμορφα, όπως και στην περίπτωση του μάρτυρα (εικ. 4A). Την μιτωτική διεργασία δεν φαίνεται να την επηρεάζει καμιά από τις συγκεντρώσεις του παρεμποδιστή. Έτσι τα τυπικά στάδια της μίτωσης, όπως : στάδιο I (πρόφαση) (εικ. 4 B, Γ), στάδιο II (μετάφαση) (εικ. 4Δ), στάδιο III (ανάφαση) (εικ. 4 E, Z,H) και στάδιο IV (τελόφαση) (εικ. 4 Θ, I) παρατηρούνται με την ίδια συχνότητα που παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση κονιδίων, που βλάστησαν σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Το carptafol στη συγκέντρωση των 0.075 $\mu\text{g}/\text{ml}$ δεν φαίνεται να προκαλεί

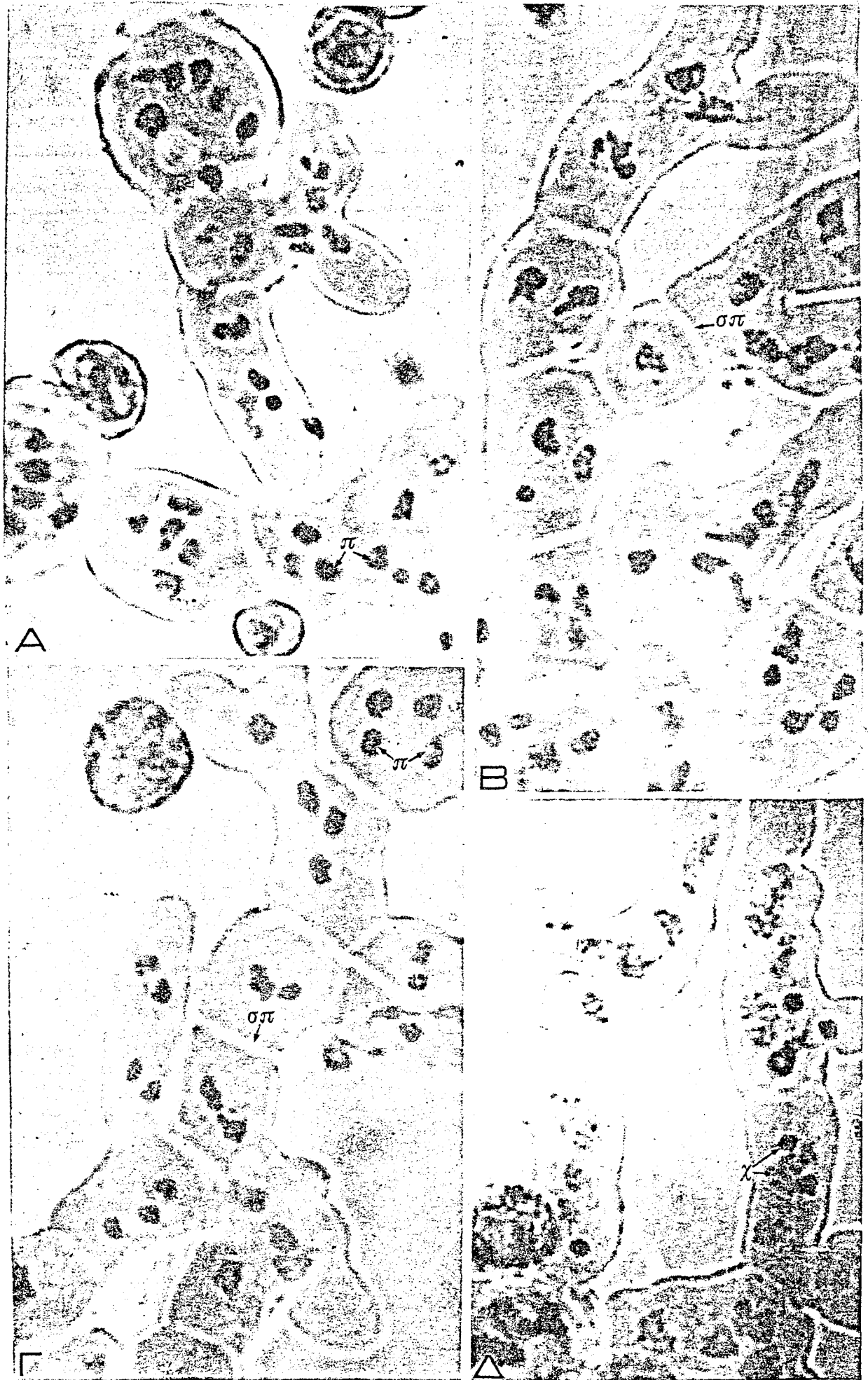
ορατές, στο οπτικό μικροσκόπιο, αλλαγές στα στάδια της μιτωτικής διεργασίας και στη μορφολογία των υφών του μύκητα *A. nidulans*. Η πλειονότητα των πυρήνων βρίσκεται στη μεσόφαση με ευδιάκριτους τους πυρηνίσκους να περιβάλλονται από χρωματοσωματικό υλικό (εικ. 5 Α, Β), όπως συμβαίνει και σε κονίδια, που βλαστάνουν απουσία μυκητοκτόνου. Τα υπόλοιπα στάδια της πυρηνικής διαίρεσης, στα οποία περιγράψαμε τη βλάστηση σε υλικό μάρτυρα, παρατηρούνται επίσης με την ίδια διαδοχή και χωρίς εμφανείς τουλάχιστον ανωμαλίες (εικ. 5, Γ, Δ, Ε, Ζ).

Το captafol 0:15μg/ ml προκαλεί σημαντικές μορφολογικές και χρωματοσωματικές ανωμαλίες στο μύκητα *A. nidulans*. Συνήθως τα ακραία τμήματα των υφών παρουσιάζουν ελαφρά διόγκωση και το χρωματοσωματικό υλικό επιμηκύνεται σε μακρά νημάτια με παράλληλη μεταξύ τους διεύθυνση, κάθετη στον κατά μήκος άξονα της υφής (εικ. 6 Β, Δ, Ε, Ζ). Οι αυξημένοι σε αριθμό πυρήνες, διατάσσονται ακανόνιστα ενώ εμφανίζονται με διαφορετικές ποσότητες χρωματοσωματικού υλικού ενδεικτικό ότι προηγήθηκαν μιτώσεις στις οποίες πραγματοποιήθηκε μη ισομερής καταμερισμός χρωματοσωμάτων (εικ. 6 Α, Γ).

Εικόνα 2: Επίδραση του fenarimol 2μg/ ml (Α, Β) και 5μg/ ml στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επωάσθηκαν σε στερεό πλήρες θρεπτικό υλικό που περιείχε μυκητοκτόνο.

Παρατηρούνται έντονα παραμορφωμένες υφές με πολυάριθμους πυρήνες στο εσωτερικό τους. Η παραμόρφωση είναι αποτέλεσμα κυρίως της σημαντικής αύξησης του πάχους των υφών (Α) που σε αρκετές περιπτώσεις γίνεται διπλάσιο σε σύγκριση με κονίδια που αναπτύχθηκαν σε υλικό μάρτυρα. Αύξηση παρατηρείται επίσης και στον αριθμό των εγκαρσίων διαφραγμάτων (σπ) (Β, Γ), που προσδίδουν στα κύτταρα βαρελοειδή μορφή. Οι πυρήνες (π) διατάσσονται ακανόνιστα κατά μήκος των υφών και φαίνεται να περιέχουν διαφορετική ποσότητα και πυκνότητα χρωματοσωματικού υλικού (χ) (Δ), γεγονός άλλωστε που δηλώνει ότι προηγήθηκε μη κανονικός διαχωρισμός χρωματοσωμάτων στη διάρκεια της μιτωτικής λειτουργίας. Ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει επίσης και η αυξημένη διακλάδωση των υφών (Β, Γ).

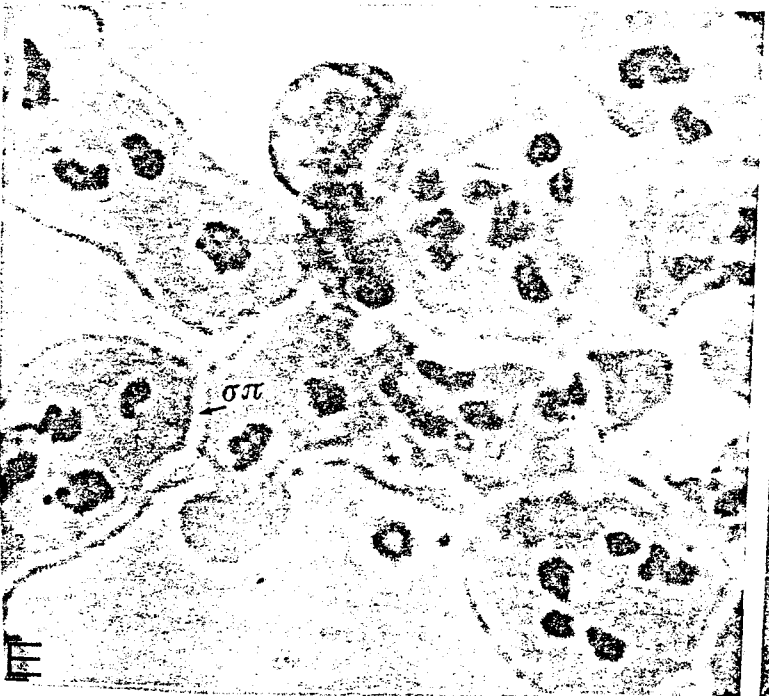
Όλες οι φωτογραφίες ×2112



Εικόνα 3: Επίδραση του clotrimazole 0.1μg/ ml (Α, Β, Γ) και 0.2μg/ ml (Δ, Ε, Ζ) στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επωάσθησαν σε στερεό πλήρες θρεπτικό υλικό που περιείχε το μυκητοκτόνο.

Μικροφωτογραφίες στις οποίες παρατηρούνται έντονα παραμορφωμένες υφές (υ), αποτέλεσμα του αυξημένου πάχους, των σημαντικών διακλαδώσεων (Ζ) αλλά και του μεγάλου αριθμού εγκαρσίων διαφραγμάτων (σπ), που προσδίδουν στα κύτταρα βαρελοειδή μορφή (Δ, Ε). Το πάχος των υφών, σε αρκετές περιπτώσεις, γίνεται διπλάσιο σε σύγκριση με τα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα. Στο εσωτερικό, παρατηρούνται πολυάριθμοι πυρήνες με διαφορετική ποσότητα και πυκνότητα χρωματοσωματικού υλικού (χ) (Α, Β, Γ, Δ) γεγονός που δηλώνει μη κανονικό διαχωρισμό χρωματοσωμάτων στη διάρκεια της μίτωσης.

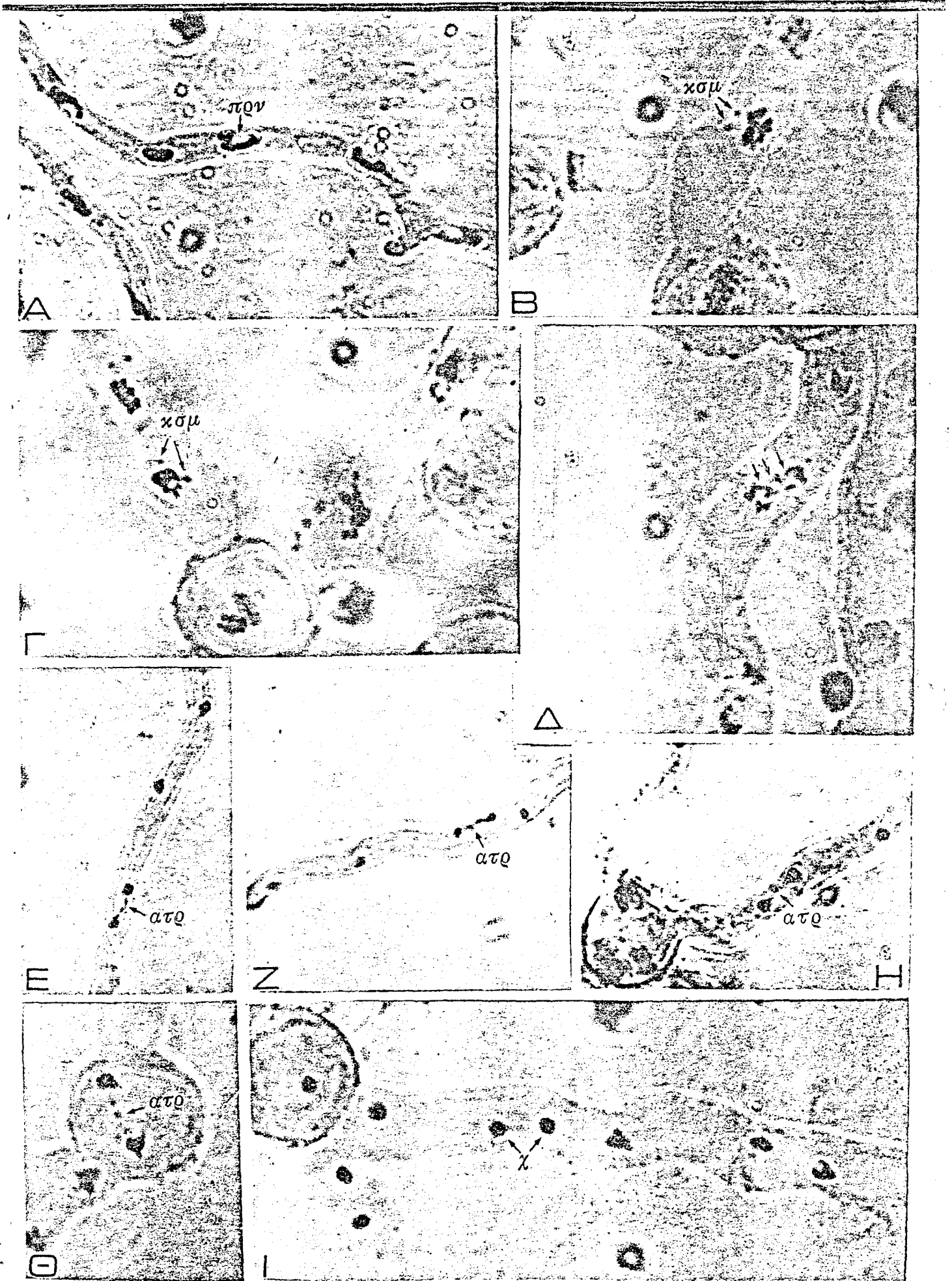
Όλες οι φωτογραφίες ×2112



Εικόνα 4: Μικροφωτογραφίες υφών του μύκητα *A. nidulans*, που επώασθηκαν σε στερεό πλήρες θρεπτικό υλικό που περιείχε iprodione 2μg/ml .

Παρατηρούνται πυρήνες σε μεσόφαση (Α) και στα διαφορετικά στάδια της μιτωτικής διεργασίας (Β-Ι). Στη μεσόφαση (Α) είναι ευδιάκριτοι οι πυρηνίσκοι (πρν), που εντοπίζονται κυρίως στη μια πλευρά του πυρήνα. Στην πρόφαση (Β, Γ), είναι ορατά τα κεντροσώματα (κσμ) που τείνουν να καταλάβουν αντιδιαμετρικές θέσεις για την οργάνωση της ατράκτου. Στη μετάφαση (Α), παρατηρείται η χαρακτηριστική διάταξη των χρωματοσωμάτων σε δύο σειρές (μαύρα βέλη), παράλληλες με το κύριο άξονα της υφής. Η ανάφαση (Ε, Ζ, Η), έχει σαν χαρακτηριστικό γνώρισμα τη μιτωτική άτρακτο (ατρ) η οποία σταδιακά εξαφανίζεται (Θ, Ι) για να οδηγηθούμε στο τελευταίο στάδιο της μίτωσης, τη τελόφαση (Ι). Σ' αυτή την περίπτωση παρατηρούνται δυο συμπαγείς μάζες χρωματοσωμάτων που αποτελούν τους νέους θυγατρικούς πυρήνες.

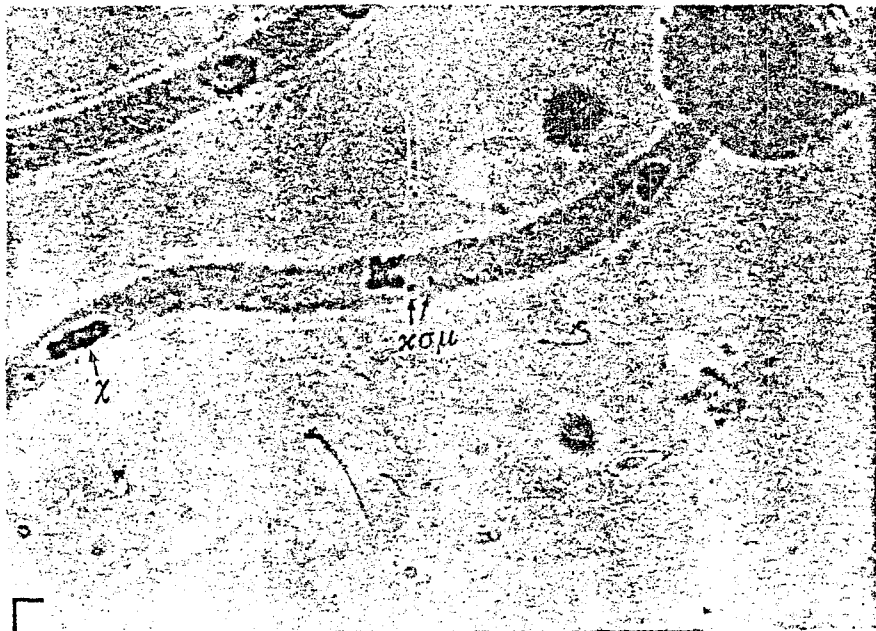
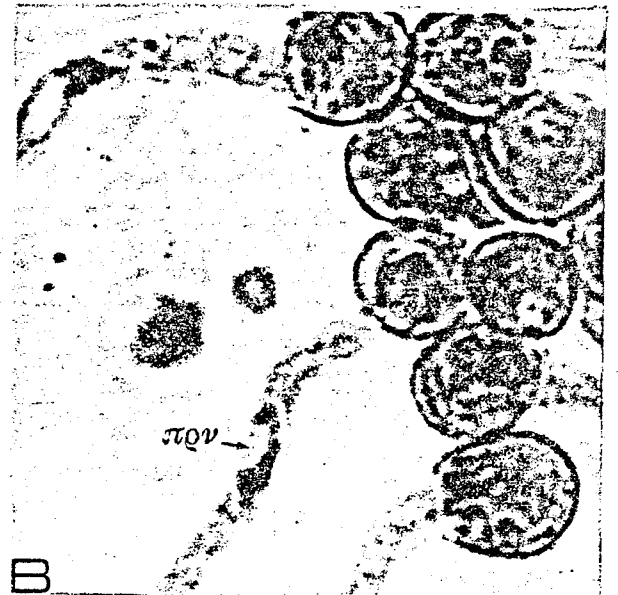
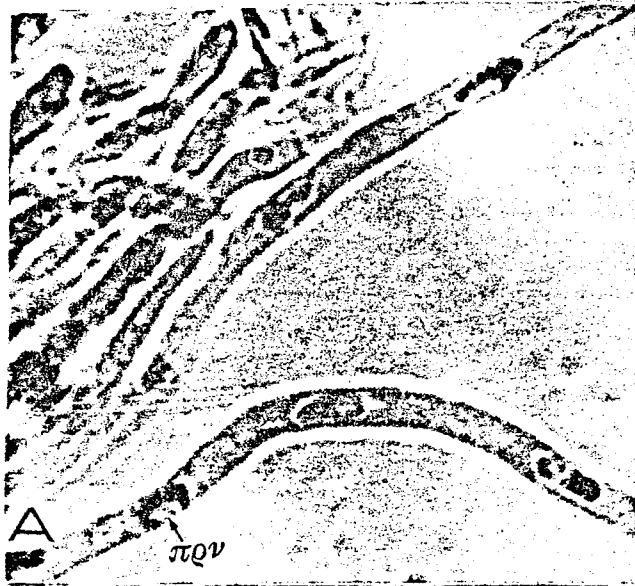
Α,Ε,Ζ,Η,Θ × 1689 - Β,Δ × 3168 - Γ × 2112 - Ι × 2534



Εικόνα 5: Μικροφωτογραφίες βλαστημένων κονιδίων και υφών του μύκητα *A. nidulans*, που επώασθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό με captafol 0.075μg/ ml.

Παρατηρούνται πυρήνες σε μεσόφαση με ευδιάκριτους τους πυρηνίσκους (Α, Β), σε πρόφαση με ορατά τα κεντροσώματα (κσμ) (Γ), σε μετάφαση με χαρακτηριστικό γνώρισμα τη διάταξη των χρωματοσωμάτων σε δύο σειρές παράλληλες με τον κύριο άξονα της υψής (Γ, Δ) σε ανάφαση με την άτρακτο (ατρ) να συνδέει δύο συμπαγείς μάζες χρωματοσωματικού υλικού (Ε, Ζ) και σε τελόφαση όπου προκύπτουν δύο νέοι θυγατρικοί πυρήνες (Ζ).

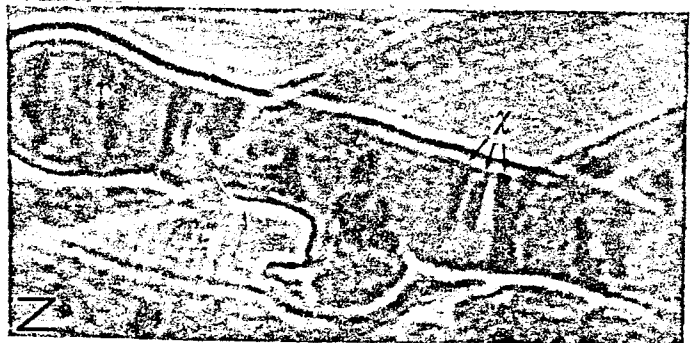
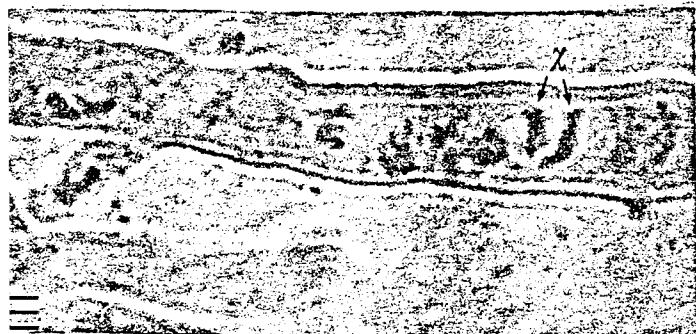
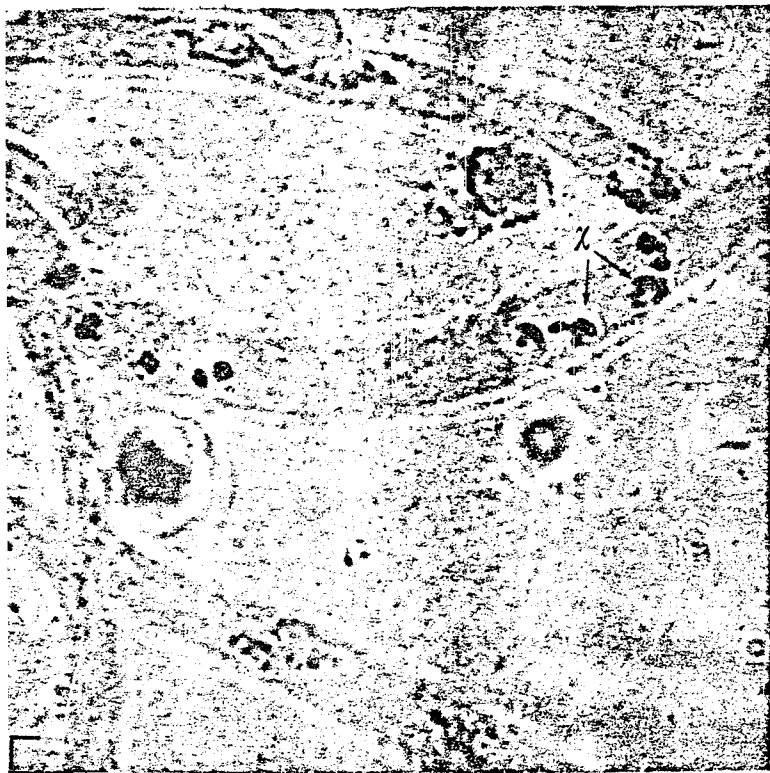
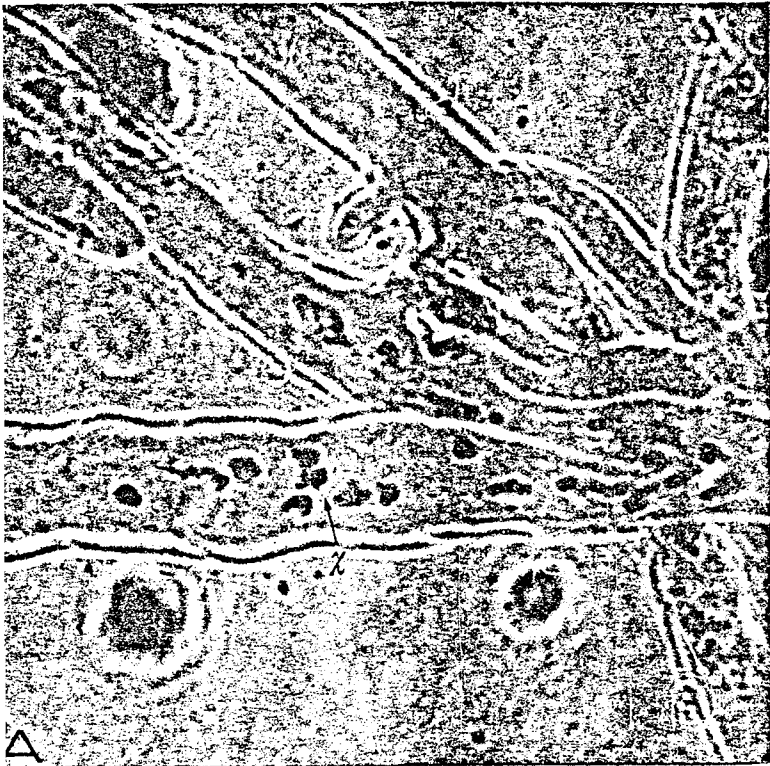
Α,Β,Γ,Ε,Ζ × 1056 - Δ × 2112



Εικόνα 6: Επίδραση του captafol 0.15μg/ ml, στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επώασθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε το μυκητοκτόνο.

Παρατηρούνται παραμορφωμένα ακραία τμήματα υφών, στο εσωτερικό των οποίων το χρωματοσωματικό υλικό φαίνεται να έχει επιμηκυνθεί σε παράλληλες σειρές, κάθετες στον επιμήκη άξονα της υφής (B, Δ, Z). Επί πλέον διαπιστώνονται πολυάριθμοι πυρήνες (A), ακανόνιστα διατεταγμένοι (Γ), με διαφορετική ποσότητα χρωματοσωματικού υλικού (χ), ενδεικτικό ότι προηγήθηκαν ανώμαλες μιτώσεις (Γ).

Όλες οι φωτογραφίες x 2112





III.6. Παρατηρήσεις με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο επιχειρήσαμε να μελετήσουμε τις αλλαγές που τα μυκητοκτόνα fenarimol, clotrimazole, iprodione, captafol και benomyl προκαλούν στη δομή του *A. nidulans*, στο κυτταρικό επίπεδο, προσεγγίζοντας έτσι το θέμα της διερεύνησης της γενετικής δραστικότητας αυτών των ενώσεων.

Σαν βιολογικό υλικό, ο μύκητας αυτός είναι εξαιρετικά δύσκολος για στερέωση, εξ' αιτίας της μεγάλης ποσότητας πολυσακχαριτών, που εκκρίνει και που μένουν προσκολλημένοι πάνω στο κυτταρικό του τοίχωμα. Οι πολυσακχαρίτες αυτοί εμποδίζουν την είσοδο των στερεωτικών υλικών.

Δοκιμάζοντας διάφορους μεθόδους, βρήκαμε τελικά τα κατάλληλα συστήματα στερέωσης, έγκλεισης σε ρητίνες και βαφής των τομών και επιτύχαμε τη λήψη μικροφωτογραφιών όπου απεικονίζονται καθαρά οι πυρήνες, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και άλλα οργανίδια σε κονίδια που βλάστησαν παρουσία και απουσία των μυκητοκτόνων.

Η πορεία της μελέτης που αφορούσε τη λεπτή δομή του *A. nidulans* αλλά και την επίδραση των παρεμποδιστών σ' αυτήν έγινε σε δύο στάδια: Στο πρώτο, μελετήσαμε τη λεπτή δομή του μύκητα ανεπτυγμένου υπό κανονικές συνθήκες, δηλαδή απουσία των παρεμποδιστών. Στο δεύτερο στάδιο έγινε μελέτη της λεπτής δομής του μύκητα ανεπτυγμένου σε διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων. Ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων με σκοπό την εντόπιση τυχόν αλλαγών που προκαλούν οι παρεμποδιστές στη δομή του μύκητα, επικεντρώνοντας την προσοχή κυρίως σε αλλοιώσεις της πυρηνικής περιοχής.

Οι παρατηρήσεις της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης fenarimol και clotrimazole προκαλούν σημαντικές αλλαγές στη δομή των κυττάρων του μύκητα *A. nidulans*. Το fenarimol χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 2 και 5μg/ml. Στη συγκέντρωση των 2μg/ml έχουμε μικρή παρεμπόδιση στη βλάστηση των κονιδίων (25%) ενώ στη συγκέντρωση 5μg/ml έχουμε αρκετά υψηλή παρεμπόδιση (90%) (σχ. 10). Αντίθετα ο σχηματισμός αποικιών από τις συγκεντρώσεις 2μg/ml και 5μg/ml παρεμποδίζεται σε πολύ υψηλότερο βαθμό που προσεγγίζει ποσοστά 90% και 95% αντίστοιχα (σχ. 7). Το clotrimazole χρησιμοποιήθηκε στις συγκεντρώσεις 0.1 και 0.2μg/ml. Στη συγκέντρωση 0.1μg/ml παρεμποδίζεται η βλάστηση των κονιδίων και ο σχηματισμός αποικιών κατά 22% και 80% αντίστοιχα (σχ.6, 11). Στη συγκέντρωση 0.2 μg/ml η βλάστηση των κονιδίων παρεμποδίζεται κατά 80% ενώ παρατηρείται πλήρης παρεμπόδιση στο σχηματισμό αποικιών (σχ. 6,11).

Από την κατηγορία των δικαρβοξιμιδικών μελετήθηκε το iprodione σε συγκεντρώσεις 1.5 και 2.5μg/ml. Στις συγκεντρώσεις αυτές παρεμποδίζεται η γραμμική αύξηση 50% και 80% αντίστοιχα (σχ.8). Όπως θα δούμε παρακάτω,

φαίνεται ότι στις συγκεντρώσεις αυτές η επίδραση του iprodione εντοπίζεται κύρια, στον πυρήνα του κυττάρου.

Από την κατηγορία των φθαλιμιδίων μελετήθηκε το captafol σε συγκεντρώσεις 0.075 και 0.15μg/ ml. Η επιλογή αυτών των συγκεντρώσεων έγινε βάσει των αποτελεσμάτων της γενετικής ανάλυσης των προϊόντων μιτωτικής διάσχισης που προκύπτουν με παρουσία του μυκητοκτόνου (363). Σύμφωνα με αυτά διαπιστώθηκε ότι στη συγκέντρωση 0.075μg/ ml ο υπεύθυνος μηχανισμός για την αύξηση της συχνότητας των ανασυνδυασμών είναι ο μιτωτικός διασκελισμός, ενώ αντίθετα στη συγκέντρωση 0.15μg/ ml τα προϊόντα μιτωτικής διάσχισης προκύπτουν κυρίως από μη αποχωρισμό των χρωματίδων (non-disjunction). Με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας επιχειρήσαμε να παρατηρήσουμε αλλαγές στη δομή των βλαστημένων και αβλάστητων κονιδίων, εντοπίζοντας την προσοχή κυρίως στον πυρήνα, όπου η ύπαρξη ανωμαλιών θα μπορούσε να βοηθήσει στην ερμηνεία της γενετικής δραστηριότητας του captafol.

Από την κατηγορία των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων μελετήθηκε το benomyl σε συγκέντρωση 1.5μg/ ml. Το μυκητοκτόνο αυτό παρεμποδίζει το σχηματισμό μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η λειτουργία της μίτωσης (78). Έτσι με τη μελέτη του μυκητοκτόνου αυτού επιδιώχθηκε η αναζήτηση συσχετισμού βιοχημικού μηχανισμού δράσης και επίδρασης στη λεπτή δομή. Οι παρατηρήσεις που θα ακολουθήσουν, σε συσχετισμό με τη γενετική δραστηριότητα του benomyl θα πρέπει να συγκριθούν με τις προηγούμενες διαπιστώσεις σχετικά με την επίδραση του fenarimol, του clotrimazole, του iprodione και του captafol.

Στη συνέχεια δίνονται οι παρατηρήσεις μας στα επί μέρους στοιχεία της λεπτής δομής του κυττάρου του *A. nidulans*, όπως το κυτταρικό τοίχωμα, το πλασμαλήμμα, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα χυμοτόπια και ο πυρήνας.

III. 6α. Παρατηρήσεις στο κυτταρικό τοίχωμα:

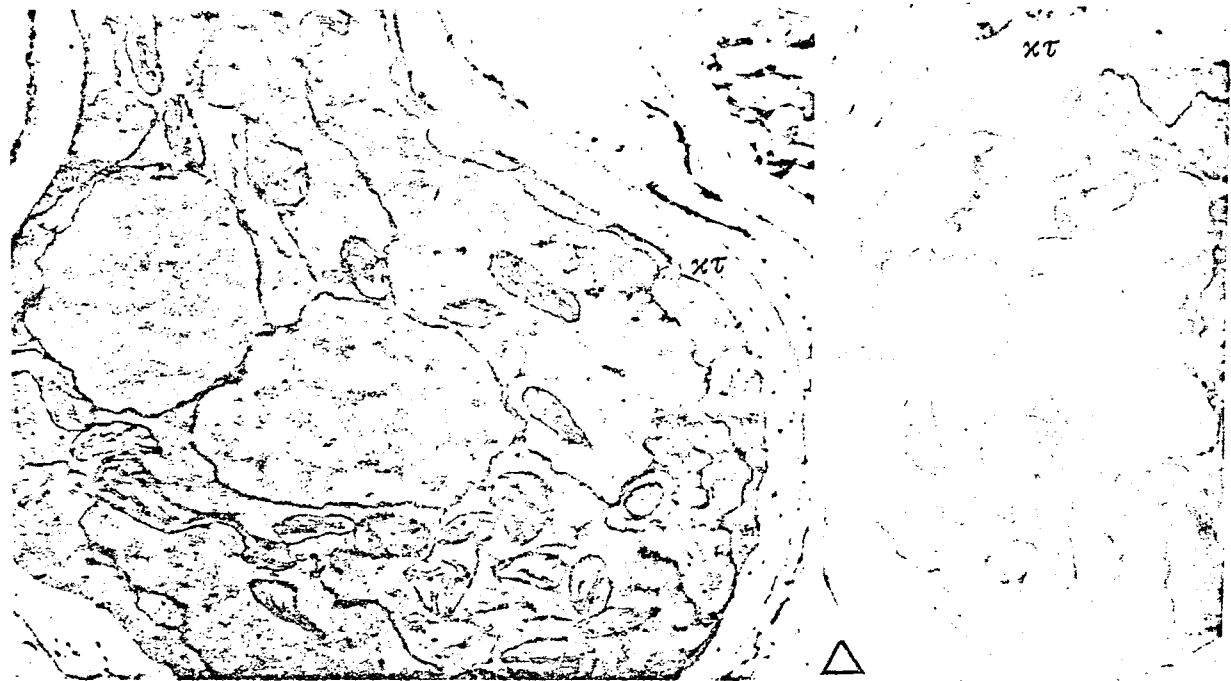
Η παρουσία των μυκητοκτόνων fenarimol και clotrimazole, προκαλεί σημαντική αύξηση του πάχους του κυτταρικού τοιχώματος (εικ. 7Γ,Δ-8Δ,Ε,Ζ-9Γ,Δ) σε σχέση με τα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα (εικ. 7Α-8Α-9Α-10Α). Κατά περιοχές παρατηρούνται εξογκώματα που φαίνονται να εισχωρούν στο πρωτόπλασμα του κυττάρου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία έντονα παραμορφωμένου κυτταρικού τοιχώματος (εικ. 7Β,Ζ-8Γ-9Ζ). Επί πλέον, παρατηρείται σημαντική παρουσία ηλεκτρονικά πυκνών κυστιδίων με ακανόνιστο σχήμα και μέγεθος που περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη (εικ. 7Ε,Ζ-8Β-9Β,Ε). Τα κυστίδια αυτά εμφανίζουν ανομοιόμορφη κατανομή στο εσωτερικό του τοιχώματος και η συσσώρευσή τους παρουσιάζεται περισσότερο έντονη στις προαναφερθείσες διογκωμένες περιοχές (εικ. 7Ζ-8Β).

Το μυκητοκτόνο iprodione αντίθετα, δεν φαίνεται να προκαλεί αλλαγές στο πάχος και τη μορφολογία του κυτταρικού τοιχώματος (εικ. 10Β). Το κυτταρικό τοίχωμα φαίνεται να μην επηρεάζεται επίσης και στις δύο συγκεντρώσεις του captafol. Η μορφολογία και το πάχος του διατηρείται όπως και στα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα (εικ. 10Γ). Επώαση παρουσία benomyl δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το κυτταρικό τοίχωμα τόσο στα βλαστημένα όσο και στα αβλάστητα κονίδια του *A. nidulans* (εικ. 10Δ,Ε).

Εικόνα 7: Τομές κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθησαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό χωρίς μυκητοκτόνο (Α) ή σε υλικό που περιείχε fenarimol 2μg/ml (Β,Γ,Δ,Ε,Ζ). Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στο κυτταρικό τοίχωμα (κτ).

Παρατηρείται χαρακτηριστική διόγκωση του κυτταρικού τοιχώματος που έχει εισχωρήσει στο πρωτόπλασμα του κυττάρου. Στο εσωτερικό των διογκώσεων αυτών αλλά και σε όλο το μήκος του κυτταρικού τοιχώματος διαπιστώνεται η παρουσία μεγάλου αριθμού κυστιδίων (κδ) (βέλη) που περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη (Β,Ε,Ζ). Επί πλέον η παρουσία του μυκητοκτόνου, έχει οδηγήσει σε ανομοιόμορφη πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος (Γ,Δ).

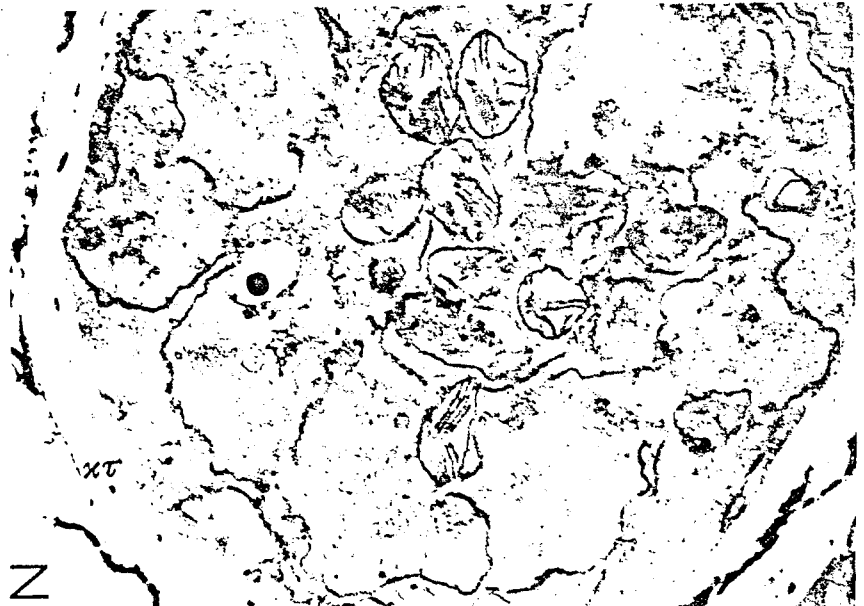
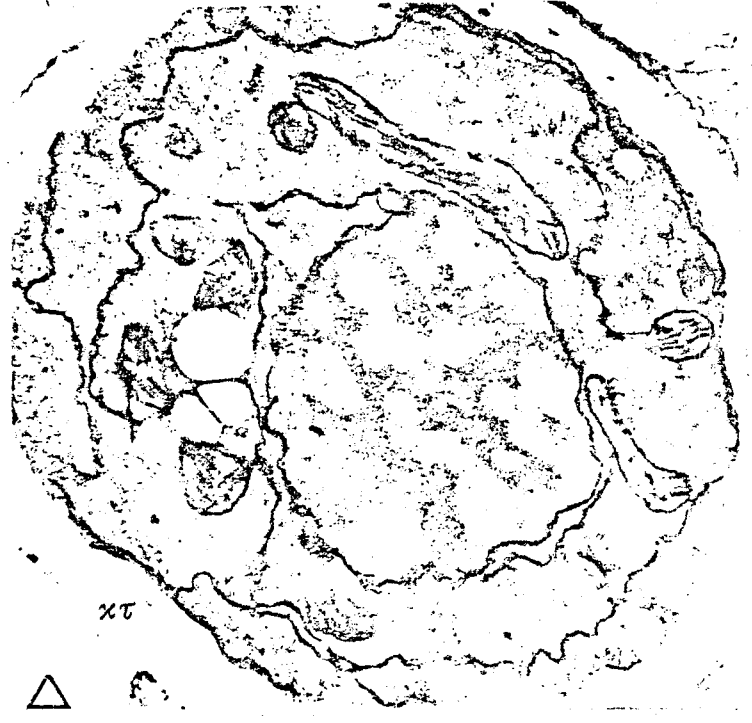
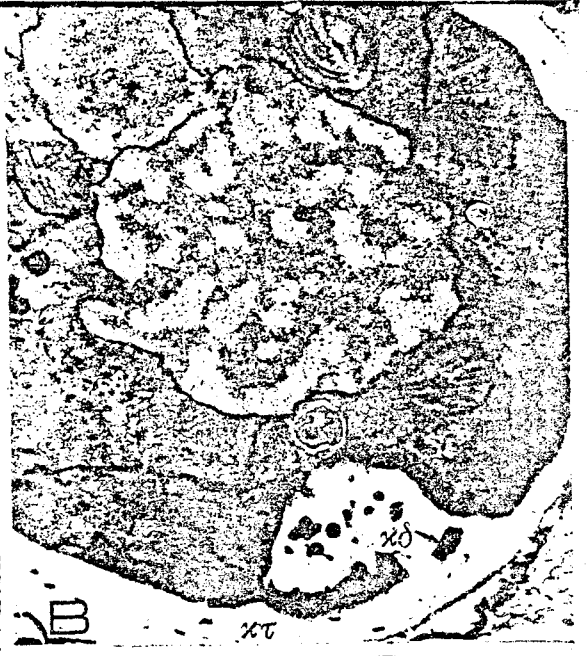
Α,Β,Γ,Ζ, × 17780 - Δ,Ε × 14224



Εικόνα 8: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες που δείχνουν την επίδραση του fenarimol 5μg/ ml στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επωάσθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό που περιείχε την παραπάνω συγκέντρωση του παρεμποδιστή. Η φωτογραφία Α απεικονίζει κονίδιο που επωάσθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο. Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στο κυτταρικό τοίχωμα (κτ).

Παρατηρούνται χαρακτηριστικές διογκώσεις του κυτταρικού τοιχώματος που εισχωρούν στο πρωτόπλασμα του κυττάρου. Στο εσωτερικό των διογκώσεων αυτών παρατηρείται μεγάλος αριθμός κυστιδίων (κδ) που περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη (Β, Γ). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η σημαντική αύξηση του πάχους του κυτταρικού τοιχώματος (Δ,Ε,Ζ).

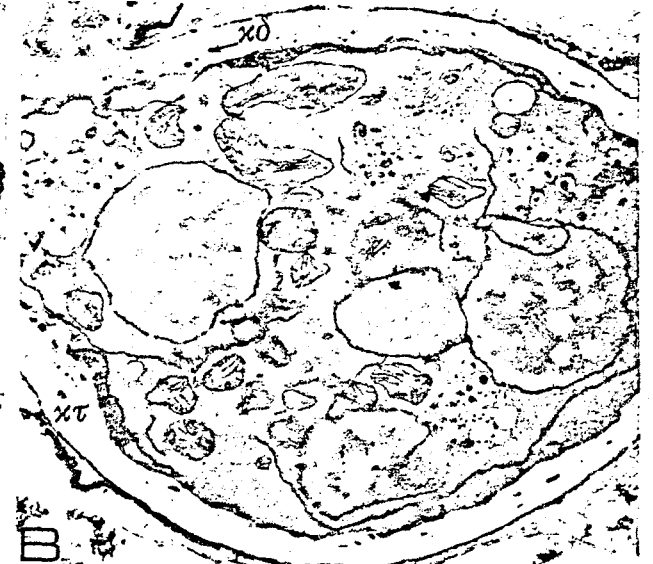
Α,Ε × 14224 - Β,Γ,Δ,Ζ × 17780



Εικόνα 9: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες που δείχνουν την επίδραση του clotrimazole 0.1μg/ ml (Β,Γ,Δ) και 0.2μg/ ml (Ε,Ζ) στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επώασθησαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό. Η φωτογραφία Α απεικονίζει κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο. Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στο κυτταρικό τοίχωμα (κτ).

Παρατηρείται σημαντική πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ στο εσωτερικό του εμφανίζεται μεγάλος αριθμός κυστιδίων (κδ) (βέλη) που περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη και κατανέμονται ανομοιόμορφα (Β,Γ,Δ,Ε). Επί πλέον ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι χαρακτηριστικές διογκώσεις της παραπάνω κατασκευής που εισχωρούν στο πρωτόπλασμα και συμβάλλουν στην παραμόρφωση της (Ζ).

Α,Β × 10668 - Γ,Δ,Ε,Ζ × 14224

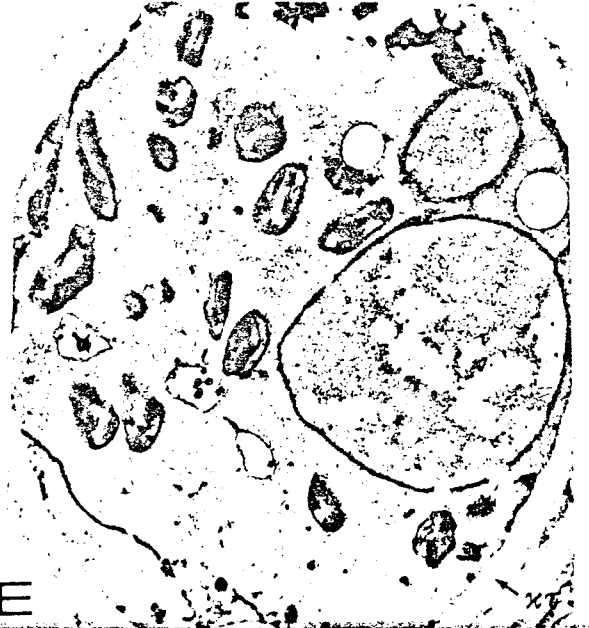
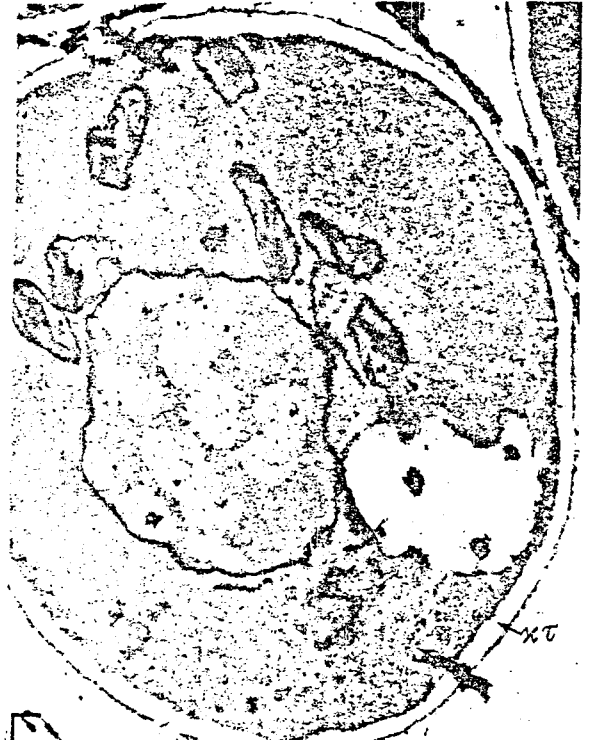
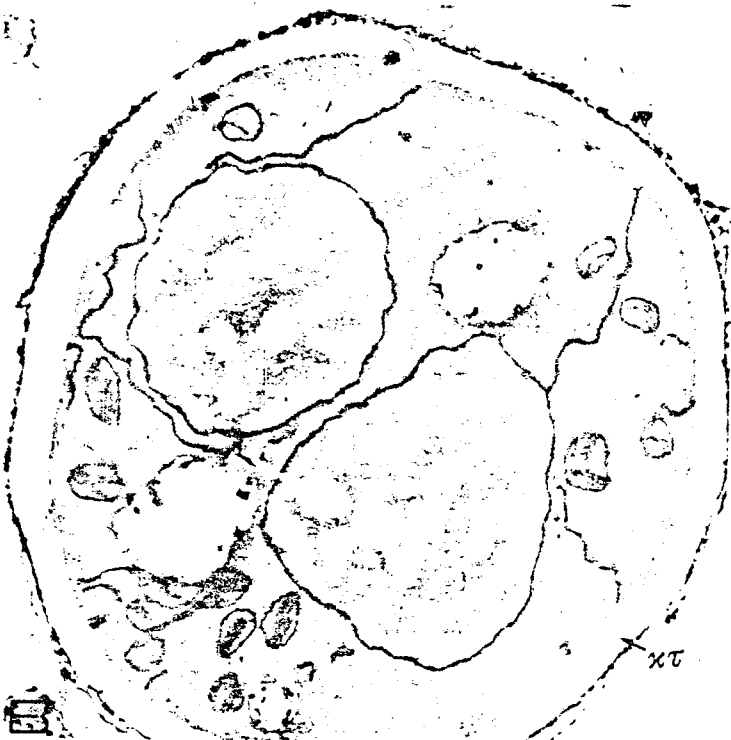


Εικόνα 10: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες που δείχνουν την επίδραση του iprodione 2.5μg/ ml (Β), carptafol 0.15μg/ ml (Γ) και benomyl (Δ,Ε) στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επώασθησαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό. Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται σε πιθανές αλλοιώσεις του κυτταρικού τοιχώματος. Η φωτογραφία Α αντιστοιχεί σε βλαστημένο κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Παρουσία των τριών μυκητοκτόνων το κυτταρικό τοίχωμα (κτ) δεν φαίνεται να παρουσιάζει αλλοιώσεις σε σχέση με τα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα Α,Ε, × 10668 - Β,Γ,Δ × 14224



A



Δ

E



III. 66. Παρατηρήσεις στο πλασμαλήμμα:

Στα κονίδια που βλαστάνουν σε υλικό μάρτυρα το κυτταρόπλασμα περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη που ονομάζεται πλασμαλήμμα και βρίσκεται κάτω ακριβώς από το τελευταίο στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος (εικ. 11A-12A).

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης fenarimol και clotrimazole φαίνεται να προκαλούν ορισμένες αλλοιώσεις του πλασμαλήμματος που οπωσδήποτε είναι περισσότερο έντονες στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτού του είδους οι μεταβολές αφορούν κυρίως απομάκρυνση της εξωτερικής από την εσωτερική μεμβράνη (εικ. 11B,E,Z) ή σπασίματα κατά θέσεις που έχουν σαν συνέπεια την άμεση επαφή του κυτταροπλάσματος με το κυτταρικό τοίχωμα (εικ. 11Γ,Δ). Σε αρκετές περιπτώσεις η διπλή μεμβράνη δημιουργεί εγκολπώσεις, μέσα στις οποίες εγκυστώνεται κυτταροπλασματικό υλικό και οι οποίες τελικά αποσπώμενες κατευθύνονται στο εσωτερικό του κυτταρικού τοιχώματος, δημιουργώντας έτσι, τα χαρακτηριστικά κυστίδια, για τα οποία μιλήσαμε προηγουμένως, αναφερόμενοι στις αλλοιώσεις του κυτταρικού τοιχώματος (εικ. 11H,Θ).

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη όπως άλλωστε και το κυτταρικό τοίχωμα, δεν επηρεάζεται από την παρουσία του iprodione. Παρατηρείται η διπλή μεμβράνη που διατρέχει όλη την περίμετρο του κυττάρου και διαχωρίζει το πρωτόπλασμα από το κυτταρικό τοίχωμα (εικ. 12B).

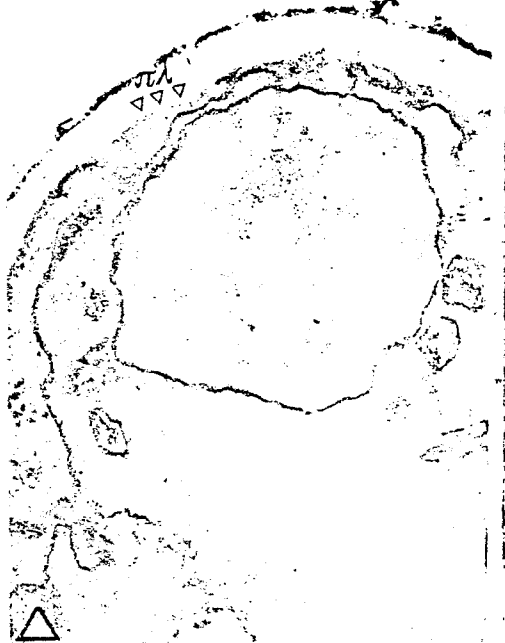
Το carptafoi επίσης, δεν φαίνεται να επιδρά δυσμενώς στη δομή του πλασμαλήμματος (εικ. 12Γ,Δ,Z). Μόνο σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις στην αυξημένη συγκέντρωση του παρεμποδιστή (0.15μg/ ml) και σε παρατεταμένο χρόνο επώασης (περισσότερο από 11 ώρες) διαπιστώθηκαν αλλοιώσεις που είχαν τη μορφή απομάκρυνσης της εξωτερικής από την εσωτερική μεμβράνη (εικ. 12E).

Παρόμοια, το benomyi δεν φαίνεται να επηρεάζει τη διπλή μεμβράνη του πλασμαλήμματος η οποία περιβάλλει όλο το πρωτόπλασμα του κυττάρου. Ακόμα και σε παρατεταμένη παρουσία του μυκητοκτόνου (8 ώρες) δεν παρατηρούνται ανωμαλίες στη δομή του πλασμαλήμματος (εικ. 12H).

Εικόνα 11: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που βλάστησαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό παρουσία fenarimol 2μg/ml (Β,Γ), fenarimol 5μg/ml (Δ,Ε), clotrimazole 0.1μg/ml (Ζ,Η) και clotrimazole 0.2μg/ml (Θ). Το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στο πλασμαλήμμα. Η φωτογραφία Α απεικονίζει κονίδιο που επώασθη σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Παρατηρείται σημαντική αλλοίωση του πλασμαλήμματος (πλ), εξ' αιτίας της δράσης των δύο μυκητοκτόνων. Οι ανωμαλίες εκδηλώνονται κυρίως με απομάκρυνση της εξωτερικής από την εσωτερική μεμβράνη (Β,Γ,Δ,Ζ) (λευκά βέλη) που συνοδεύεται σε αρκετές περιπτώσεις από σπασίματα (Β) (μαύρα βέλη). Στις φωτογραφίες Η και Θ παρατηρείται η διαδικασία προέλευσης των κυστιδίων (κδ), που εντοπίζονται στο κυτταρικό τοίχωμα (κτ). Όπως φαίνεται, αυτά περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη, ενώ τα σημεία του πλασμαλήμματος (πλ) απ' όπου απεσπάσθησαν, αναπληρώνουν συνήθως τη συνέχεια τους, χωρίς έτσι να παρατηρούνται ανοίγματα.

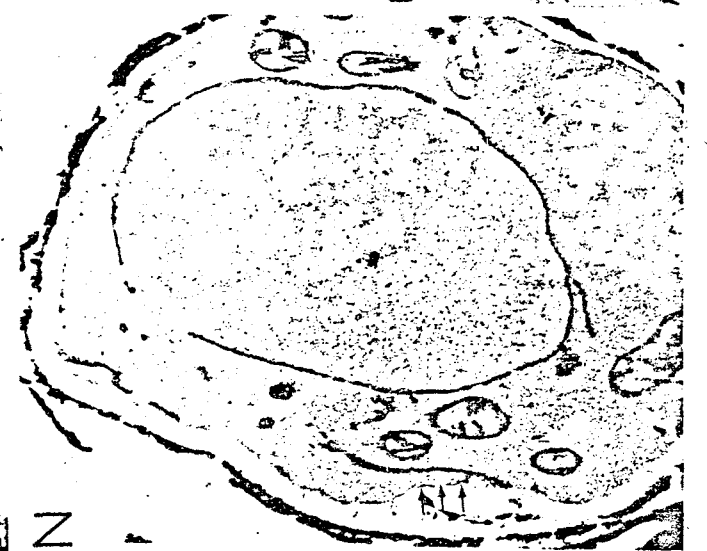
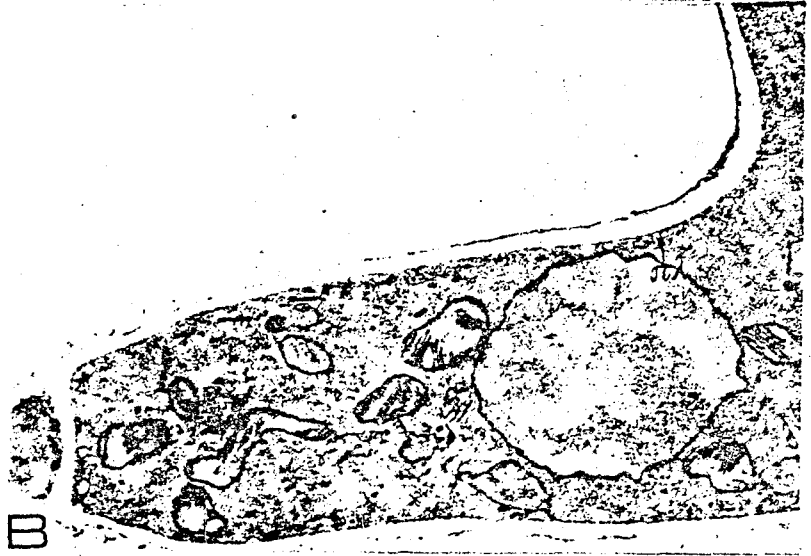
Α,Β,Δ,Η,Θ × 17780 - Γ,Ε × 14224 - Ζ × 21336



Εικόνα 12: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες που δείχνουν την επίδραση του iprodione 2.5μg/ ml (B), captafol 0.075μg/ ml (Γ,Δ) captafol 0.15μg/ ml (E,Z) και benomyl 1.5μg/ ml (H). Στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό. Το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στο πλασμάλλημα. Η φωτογραφία A απεικονίζει κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Παρουσία των τριών μυκητοκτόνων δεν φαίνεται το πλασμάλλημα (πλ) να παρουσιάζει αλλοιώσεις. Όπως και στα κονίδια που επώασθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς παρεμποδιστή η διπλή μεμβράνη διατρέχει όλη την περίμετρο του κυττάρου, διαχωρίζοντας το πρωτόπλασμα από το κυτταρικό τοίχωμα. Σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις μετά την επίδραση captafol 0.15μg/ ml και σε παρατεταμένο χρόνο επώασης (περισσότερο από 11 ώρες) διαπιστώθηκε αλλοίωση με τη μορφή απομάκρυνσης της εξωτερικής από την εσωτερική μεμβράνη (Z) (μαύρα βέλη)

A,B,E × 14224 - Γ,Δ,H,Z × 10668





III. 6γ. Παρατηρήσεις στα μιτοχόνδρια:

Όπως διαπιστώνεται από κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα, τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια χωρίς σταθερό σχήμα αλλά ούτε και σταθερό μέγεθος. Έτσι άλλοτε εμφανίζονται επιμήκη, άλλοτε ελλειψοειδή και άλλοτε σφαιρικά (εικ. 13A,15A). Η δομή τους είναι χαρακτηριστική: Αποτελούνται από μία εξωτερική και μία εσωτερική μεμβράνη που διαφοροποιείται σε πολυάριθμες πτυχώσεις (*cristae*). Πρόκειται για τα μεγαλύτερα οργανίδια του κυττάρου του μύκητα μετά τον πυρήνα και παρουσιάζουν αυτόνομη διαίρεση. Στην εικ. 14A παρατηρούνται επιμηκυσμένα μιτοχόνδρια με χαρακτηριστική στένωση στο μέσον, ενδεικτική του τρόπου με τον οποίο αυτά διαιρούνται.

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης *fenarimol* και *clotrimazole* φαίνεται να προκαλούν αύξηση στον αριθμό των μιτοχονδρίων (εικ. 13Γ, E-14E,H), παρόμοια δε αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (158,287). Το σχήμα των κυτταρικών αυτών οργανιδίων δεν φαίνεται να επηρεάζεται και είναι άλλοτε επίμηκες, άλλοτε ελλειψοειδές και άλλοτε σφαιρικό. Παρόμοια και το μέγεθος δεν παρεκκλίνει σε σύγκριση με το μάρτυρα. Σε ελάχιστες μόνο περιπτώσεις παρατηρούνται υπερμεγέθη μιτοχόνδρια των οποίων οι διαστάσεις είναι λίγο μικρότερες από εκείνες του πυρήνα (εικ. 14Γ). Ανάλογες παρατηρήσεις είχαν αναφερθεί από την Hirpe (155), που μελέτησε την επίδραση του *imazalil* στα σπορίδια του μύκητα *U. avenae*, τους έδωσε δε την ονομασία μεγαμιτοχόνδρια. Η διπλή μεμβράνη που περιβάλλει τα μιτοχόνδρια, στις μικρές τουλάχιστον συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων, εμφανίζεται με εκφυλιστικές αλλοιώσεις μικρής έντασης που οπωσδήποτε γίνονται εντονότερες, σε βαθμό μάλιστα αποδιοργάνωσης, στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (εικ. 13B, Δ, Z-14B, Z). Η διαίρεσή των μιτοχονδρίων δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τα *fenarimol*, *clotrimazole*. Ο τυπικός τρόπος διαίρεσης που αναφέρεται για τα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα παρατηρείται και παρουσία των μυκητοκτόνων αυτών. (εικ. 14 Δ). Σε σπάνιες μάλλον περιπτώσεις διαπιστώνεται απόκλιση του τυπικού τρόπου διαίρεσης των κυτταρικών οργανιδίων, που βασίζεται σε ανάπτυξη διαχωριστικής μεμβράνης με αποτέλεσμα το σχηματισμό δύο νέων μιτοχονδρίων (εικ. 13H).

Σε κύτταρα που έχουν υποβληθεί στην επίδραση του *iprodisone* τα μιτοχόνδρια εμφανίζουν ανωμαλίες, οι οποίες είναι περισσότερο έντονες στη συγκέντρωση 2.5μg/ml. Οι ανωμαλίες αυτές εντοπίζονται κύρια στο σύστημα των εσωτερικών μεμβρανών (*cristae*). Πιο συγκεκριμένα οι ακρολοφίες παρουσιάζουν διάφορο βαθμό αποδιοργάνωσης, που συχνά καταλήγει σε ολοκληρωτικό εκφυλισμό (εικ. 15 Δ, E). Σε μερικές περιπτώσεις, παρατηρούνται και αλλοιώσεις τμημάτων της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (εικ. 15 Β, Γ) που εμφανίζονται πιο έντονες σε παρατεταμένη έκθεση σε *iprodisone* 2.5μg/ml

(περισσότερο απο 8 ώρες) (εικ. 15 Δ, Ζ). Η διαίρεση των μιτοχονδρίων φαίνεται να ακολουθεί τον τυπικό τρόπο που παρατηρήσαμε σε κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα. Βασίζεται σε επιμήκυνση και εν συνεχεία σύσφιγξη στο μέσον, προκειμένου να σχηματισθούν τα δύο νέα θυγατρικά μιτοχόνδρια (εικ 15 Ζ, Η).

Το σχήμα και το μέγεθος των κυτταρικών αυτών οργανιδίων δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία του carptafol. Αντίθετα ο αριθμός τους φαίνεται να είναι κάπως αυξημένος, ιδιαίτερα στη συγκέντρωση 0.15μg/ ml (εικ. 16Γ). Στα μιτοχόνδρια παρατηρούνται αλλοιώσεις των μεμβρανών που εμφανίζονται περισσότερο έντονες όσο αυξάνει η συγκέντρωση και ο χρόνος επώασης, σε υλικό με carptafol (εικ 16 Β, Δ). Έτσι μπορεί να συμβεί ολοκληρωτικός εκφυλισμός της διπλής μεμβράνης των κυτταρικών αυτών οργανιδίων με αποτέλεσμα μόνο οι ακρολοφίες (cristae) να παραμένουν στο πρωτόπλασμα και αυτές όμως με διάφορο βαθμό αποδιοργάνωσης (εικ. 16 Γ). Η διαίρεση των μιτοχονδρίων είναι παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στα κονίδια του μάρτυρα.

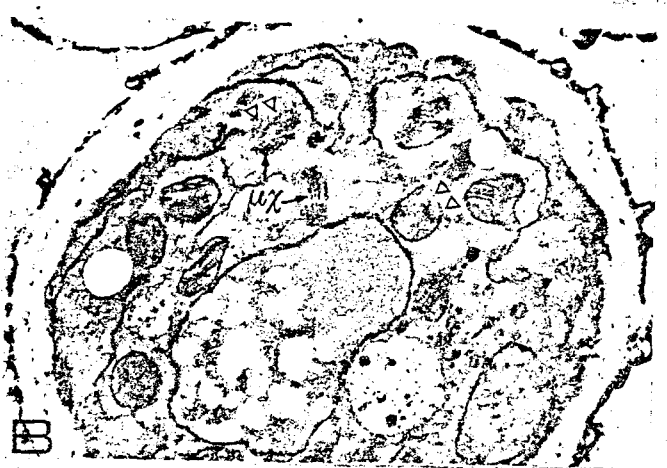
Τέλος το benomyl δεν φαίνεται να προκαλεί μεταβολές στα κυτταρικά αυτά οργανίδια (εικ 16 Ζ, Η). Η διαίρεση ακολουθεί τον τυπικό τρόπο που αναφέρθηκε για τον μάρτυρα (εικ. 16Ε).

Εικόνα 13: Τομές κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με fenarimol 2μg/ ml (B, Γ, Δ) και 5μg/ ml (E, Z, H). Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις επιδράσεις του μυκητοκτόνου στα μιτοχόνδρια. Η φωτογραφία A απεικονίζει κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Παρουσία του παρεμποδιστή, φαίνεται να υπάρχει αύξηση στον αριθμό των μιτοχονδρίων (μχ) (Γ, E, Z). Επί πλέον διαπιστώνεται και αποδιοργάνωση τμημάτων των μεμβρανών τους (λευκά βέλη) (B, Γ, Δ). Στη φωτογραφία H ένα μιτοχόνδριο φαίνεται να έχει αναπτύξει διαχωριστική μεμβράνη (λευκά βέλη) προκειμένου να διαιρεθεί.

A,Δ × 10668 - B,Z × 14224 - Γ,E,H × 17780

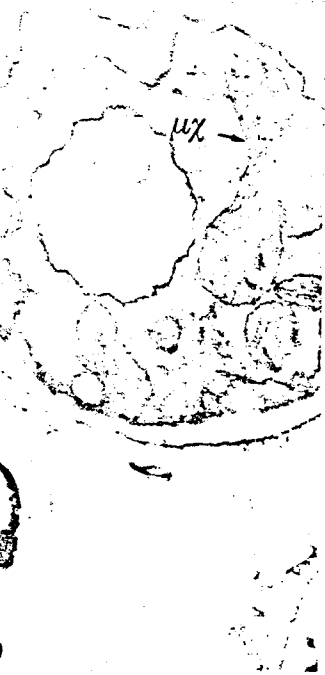
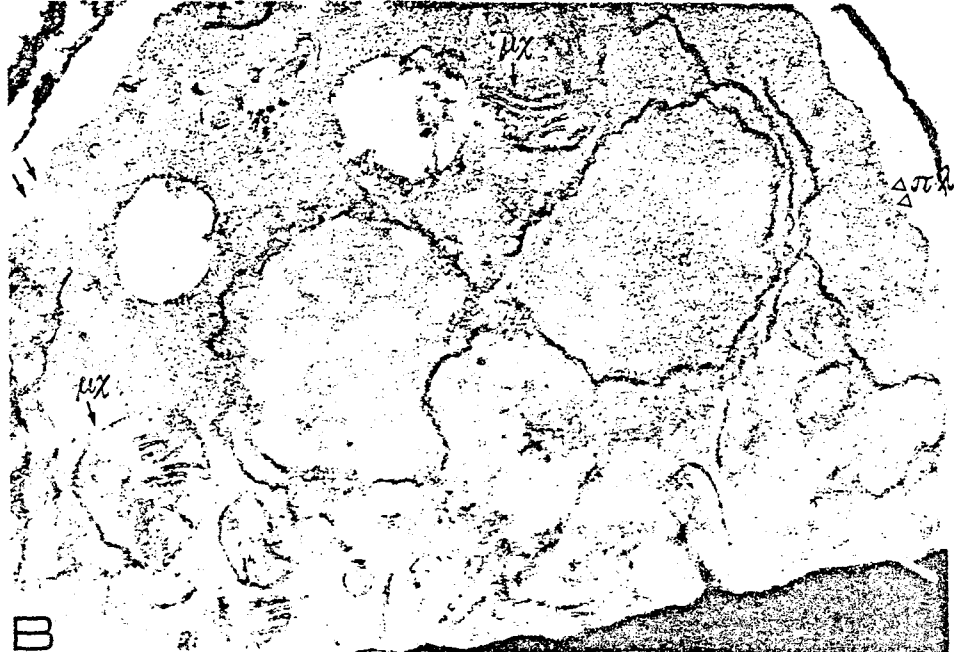




Εικόνα 14: Τομές κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επωάσθηκε σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με clotrimazole 0.1μg/ ml (Β, Γ, Δ) και 0.2μg/ ml (Ε, Ζ, Η). Παρατηρούνται οι σημαντικές μεταβολές στη λεπτή δομή των μιτοχονδρίων. Η φωτογραφία Α απεικονίζει κονίδιο που επωάσθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Παρουσία του μυκητοκτόνου φαίνεται να προκαλείται αύξηση στον αριθμό των μιτοχονδρίων (μχ) (Ε, Η), ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις των μιτοχονδριακών μεμβρανών (Β, Δ, Ε, Ζ, Η). Στις φωτογραφίες Γ, Δ παρατηρούνται μιτοχόνδρια με χαρακτηριστική επιμήκηση και στένωση στο μέσον, ενδεικτικά του τρόπου με τον οποίο αυτά διαιρούνται. Επί πλέον εξ' αιτίας της δράσης του παρεμποδιστή, στη φωτ. Β το πλασμάλημμα φαίνεται να έχει υποστεί αποδιοργάνωση που αποτυπώνεται με απομάκρυνση της εξωτερικής από την εσωτερική μεμβράνη (λευκά βέλη), ενώ σε ορισμένα σημεία παρατηρούνται και σπασίματα (μαύρα βέλη).

A × 10668 - Β × 30226 - Γ, Δ, Η × 17780 - Ε, Ζ × 14224



Εικόνα 15: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων, που δείχνουν την επίδραση του iprodione 1.5μg/ ml (Β, Γ, Δ) και iprodione 2.5μg/ ml (Ε, Ζ, Η) στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό που περιείχε το μυκητοκτόνο. Το ενδιαφέρον εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (μχ). Η φωτογραφία Α απεικονίζει βλαστημένο κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Παρατηρείται αλλοίωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών (Β,Γ) που σε μερικές περιπτώσεις, και ιδίως σε παρατεταμένο χρόνο παρουσίας του μυκητοκτόνου (11ώρες) (Δ, Ε), οδηγούν στην εμφάνιση μόνο των ακρολοφίων (cristae) στο πρωτόπλασμα του κυττάρου. Στις φωτογραφίες Δ, Ζ και Η τα λευκά βέλη δείχνουν μιτοχόνδρια έτοιμα να διαιρεθούν.

Α × 10668 - Β,Δ,Ε × 17780 - Γ, Ζ × 14224 - Η × 10668

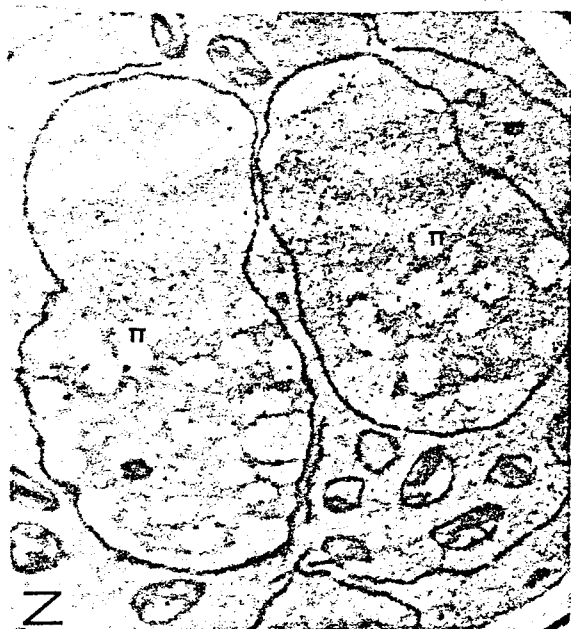
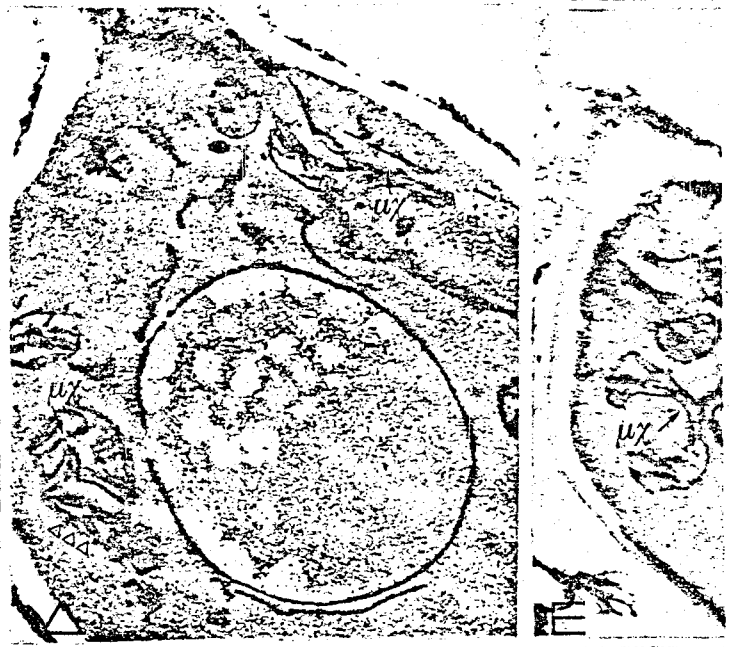
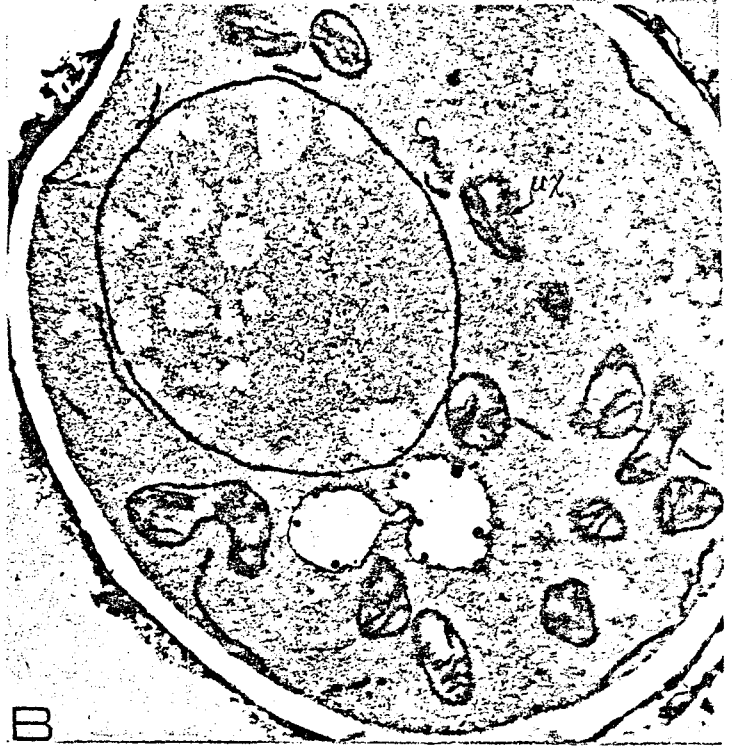
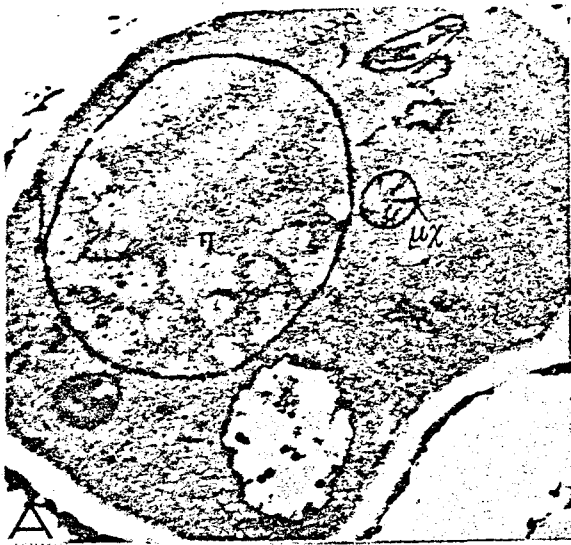


Εικόνα 16: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες που δείχνουν την επίδραση του carptafol 0.075μg/ ml (B), carptafol 0.15μg/ ml (Γ, Δ), και benomyl 1.5μg/ ml (E, Z, H) στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με τα μυκητοκτόνα και το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στα μιτοχόνδρια. Η φωτογραφία A απεικονίζει βλαστημένο κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Φωτογραφία A × 21336: Παρατηρείται πυρήνας (π), μιτοχόνδρια (μχ) και δακτυλιοειδής μορφή ενδοπλασματικού δικτύου (εδ).

Φωτογραφίες B, Γ × 14224 - Δ × 10668: Παρατηρείται αλλοίωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών αλλά και του πυρήνα (φωτ. Γ). Σε μερικές περιπτώσεις η αποδιοργάνωση είναι τόσο έντονη, ώστε μόνο οι ακρολοφίες των μιτοχονδρίων διατηρούνται στο πρωτόπλασμα και αυτές όμως με διάφορους βαθμούς αλλοιώσεις (φωτ. Δ- λευκά βέλη).

Φωτογραφίες E × 14224 - Z × 10668 - H × 14224: Οι πυρήνες (π) έχουν σχηματίσει λοβούς με διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα (φωτ. Z). Επί πλέον παρατηρείται χαρακτηριστική επιμήκυνση μιτοχονδρίων που αποτελεί μέρος της διαίρεσης των κυτταρικών οργανιδίων (φωτ. E, H).





III.6δ. Παρατηρήσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο:

Το ενδοπλασματικό δίκτυο, στα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα, αποτελεί ένα σύστημα μεμβρανών που εκτείνεται σε όλο το κυτταρόπλασμα (εικ. 17 A-19A). Η κατανομή του, όπως φαίνεται στις φωτογραφίες της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, είναι τυχαία, εντοπίζεται όμως κυρίως, κοντά στον πυρήνα και το πλασμάλημμα. Μερικές φορές, σχηματίζει κυκλικές κατασκευές που περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη (εικ. 18A) ενώ σε άλλες πάλι περιπτώσεις πολυτεμαχίζεται σε μικρά κυστίδια που κατανέμονται διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα (εικ. 18A).

Παρουσία fenarimol, clotrimazole φαίνεται να προκαλείται αύξηση του ενδοπλασματικού δικτύου σε σύγκριση με τον μάρτυρα (εικ. 18B). Στα κύτταρα της επέμβασης, το δίκτυο αυτό δεν περιορίζεται μόνο κοντά στο πλασμάλημμα ή τον πυρήνα αλλά επεκτείνεται εξ' ίσου άφθονο σε όλο το κυτταρόπλασμα. Το μήκος των σωληνίσκων ποικίλλει και άλλοτε διατρέχουν μεγάλο τμήμα στο εσωτερικό του κυττάρου (εικ. 17B-18E) άλλοτε έχουν τη μορφή μικρών τμημάτων που εντοπίζονται τυχαία και ακανόνιστα στο πρωτόπλασμα (εικ. 17Γ-18Γ). Οι ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες των κυττάρων που έχουν υποβληθεί στην επίδραση του fenarimol, clotrimazole δείχνουν συχνά την πυρηνική μεμβράνη να επεκτείνεται στο κυτταρόπλασμα συμμετέχοντας στη δημιουργία του ενδοκυττάρου συστήματος των μεμβρανών που συνιστά το ενδοπλασματικό δίκτυο (εικ. 17E, Z-18Δ). Παρόμοια συμπεριφέρεται σε αρκετές περιπτώσεις και η μεμβράνη των μιτοχονδρίων (εικ. 17Δ-18Γ). Συχνά παρατηρούνται συνδέσεις μεταξύ του πυρήνα και των μιτοχονδρίων (εικ. 17E), ενός πυρήνα με άλλον πυρήνα του ίδιου κονιδίου (εικ. 18B) ή τέλος μεταξύ δύο μιτοχονδρίων (εικ. 18Z). Η σύνδεση αυτή στην πραγματικότητα είναι αποτέλεσμα προέκτασης της εξωτερικής μεμβράνης αυτών των οργανιδίων που κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην τάση για επί πλέον ανάπτυξη του συστήματος αυτών των μεμβρανών, παρουσία των παρεμποδιστών. Οι δακτυλιδοειδείς μορφές του ενδοπλασματικού δικτύου κάνουν περισσότερο έντονη την εμφανισή τους στα κονίδια, που υποβλήθηκαν στη δράση του fenarimol, clotrimazole από ότι στα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα (εικ. 17H). Έντονη επίσης ήταν και η παρουσία διάσπαρτων κυστιδίων που φαίνεται ότι έχουν προέλθει από εκφυλισμό τμημάτων του ενδοπλασματικού δικτύου (εικ. 17Γ).

Το iprodione δεν φαίνεται να προκαλεί αλλοιώσεις στο παραπάνω δίκτυο. Κατανέμεται τυχαία στο πρωτόπλασμα του κυττάρου και η παρουσία του είναι περιορισμένη όπως συμβαίνει και σε κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα (εικ. 19B, Γ). Το σύστημα αυτών των μεμβρανών, συχνά σχηματίζει δακτυλιδοειδείς κατασκευές, που μάλλον δεν είναι αποτέλεσμα της παρουσίας

του παρεμποδιστή, αφού ανάλογες είχαν παρατηρηθεί και στον μάρτυρα (εικ. 19B).

Το *carptafol* φαίνεται να επηρεάζει σε μικρό σχετικά βαθμό το σύστημα των μεμβρανών που απαρτίζει το ενδοπλασματικό δίκτυο. Παρατηρείται αλλοίωση που οδηγεί στο σχηματισμό διάσπαρτων κυστιδίων στο εσωτερικό του κυττάρου (εικ. 19Z). Στο κυτταρόπλασμα παρατηρούνται επίσης δακτυλιοειδείς μορφές ανάλογες με εκείνες που είχαν παρατηρηθεί στα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα (εικ. 19E). Οποσδήποτε όμως κατά κανόνα το ενδοπλασματικό δίκτυο κατανέμεται, χωρίς αλλοιώσεις, τυχαία στο πρωτόπλασμα του κυττάρου, όπως είχε παρατηρηθεί στα κονίδια του μάρτυρα (εικ. 19Δ, Η).

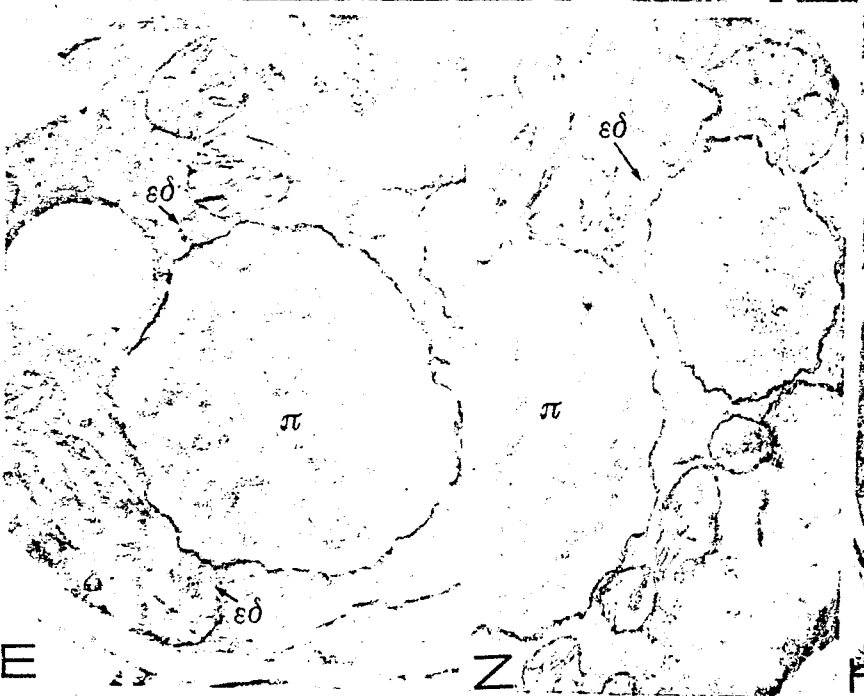
Τέλος το *beηomyl*, δεν φαίνεται να επηρεάζει το παραπάνω δίκτυο (εικ. 19Η). Μόνο σε πολύ λίγες περιπτώσεις διαπιστώθηκαν αλλοιώσεις μικρής έντασης που γίνονται εντονότερες σε παρατεταμένο χρόνο παρουσίας του μυκητοκτόνου (περισσότερο από 8 ώρες). Αυτές αφορούν κυρίως εκφυλισμό τμημάτων του ενδοπλασματικού δικτύου που οδηγεί στο σχηματισμό μικρών κυστιδίων διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα (εικ. 19Θ).

Εικόνα 17: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες που δείχνουν την επίδραση του fenarimol 2μg/ ml (Β, Γ, Δ, Ε) και fenarimol 5μg/ ml (Ζ, Η) στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (εδ). Η φωτογραφία Α απεικονίζει βλαστημένο κονίδιο που επώασθη σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Η μεμβράνη των μιτοχονδρίων (μχ) και του πυρήνα (π) φαίνεται σ' αρκετές περιπτώσεις να επεκτείνεται στο πρωτόπλασμα του κυττάρου συμβάλλοντας στην αύξηση των σωληνοειδών κατασκευών που απαρτίζουν το ενδοπλασματικό δίκτυο (εδ) (Δ, Ε, Ζ). Επί πλέον εξ' αιτίας της παρουσίας του μυκητοκτόνου, εμφανίζονται αλλοιώσεις του παραπάνω δικτύου (Β, Γ) όπως επίσης και αύξηση των δακτυλιοειδών μορφών του (Η).

Α,Β,Γ × 10668 - Δ × 17780 - Ε × 21336 - Ζ,Η × 14224

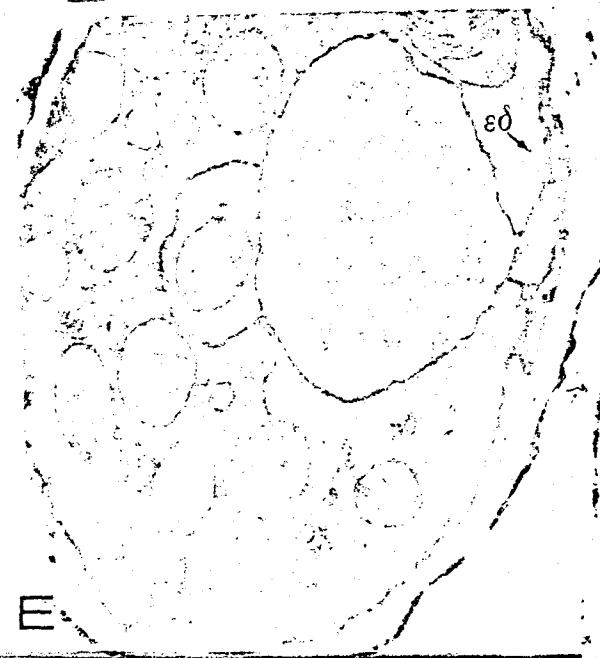
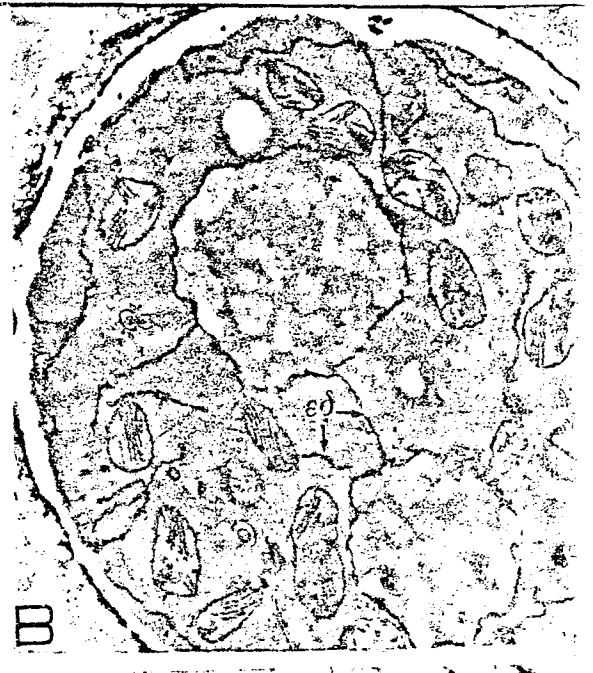




Εικόνα 18: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων που δείχνουν την επίδραση του clotrimazole 0.1μg/ ml (Β, Γ, Δ, Ε) και clotrimazole 0.2μg/ ml (Ζ) στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επώασθησαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό. Το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η φωτογραφία Α απεικονίζει βλαστημένο κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Παρουσία του μυκητοκτόνου, φαίνεται να προκαλείται αύξηση του αριθμού των σωληνίσκων που απαρτίζουν το ενδοπλασματικό δίκτυο (εδ). Συχνά παρατηρούνται συνδέσεις, μέσω τέτοιων σωληνοειδών κατασκευών, πυρήνα και μιτοχονδρίου (Β), μεταξύ δύο πυρήνων (Β) ή μεταξύ δύο μιτοχονδρίων (Ζ). Στην παρατηρούμενη αύξηση του ενδοπλασματικού δικτύου φαίνεται να συμβάλλουν επι πλέον σημαντικά τόσο η μιτοχονδριακή όσο και η πυρηνική μεμβράνη, που συχνά προεκτείνονται στο πρωτόπλασμα του κυττάρου (Γ, Δ, Ε).

A,B,Z × 14224 - Γ, Δ, Ε × 17780



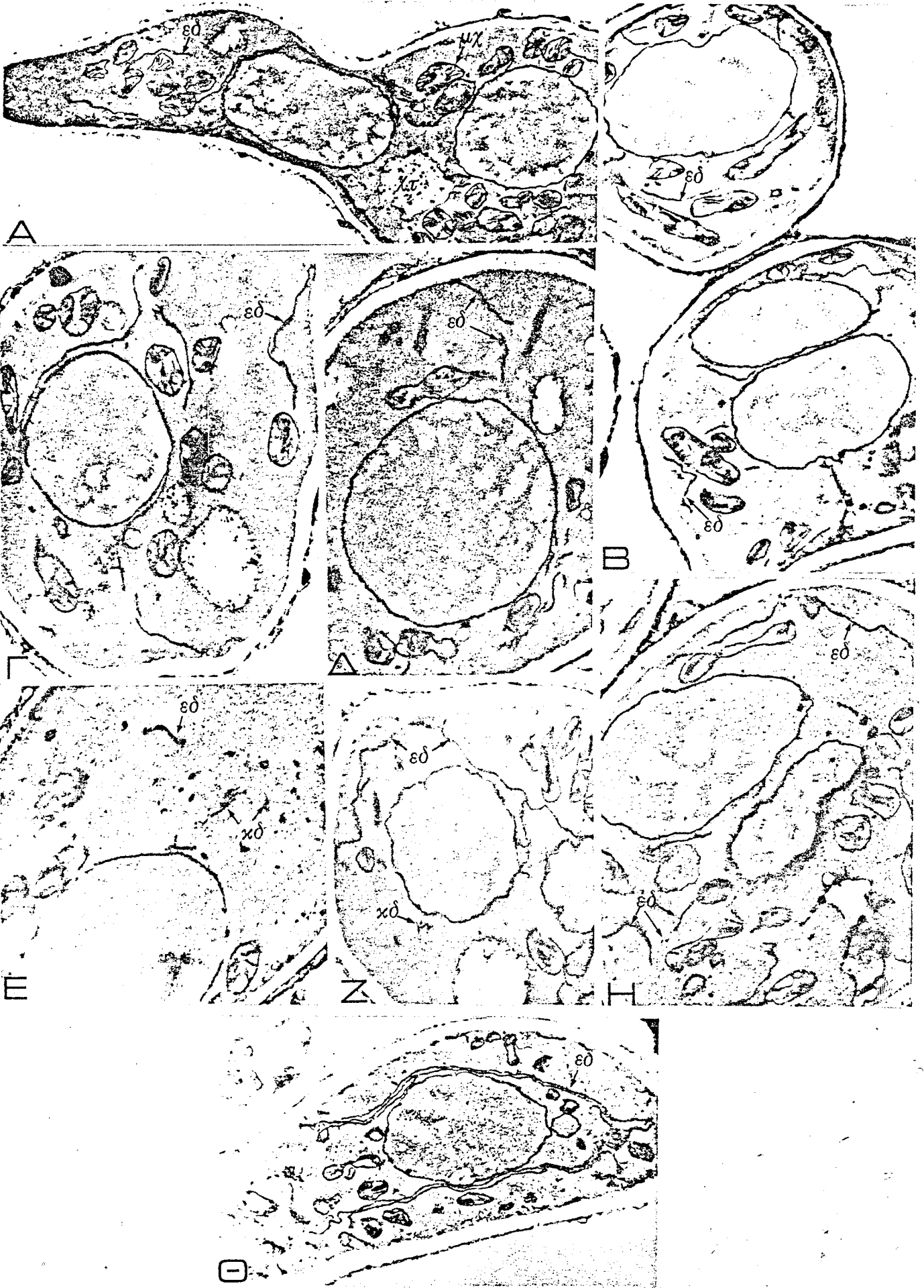
Εικόνα 19: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες που δείχνουν την επίδραση του iprodione 1.5μg/ ml (Β), iprodione 2.5μg/ ml (Γ), captafol 0.075μg/ ml (Δ,Ε), captafol 0.15μg/ ml (Ζ, Η) και benomyl 1.5μg/ ml (φωτ. Θ) στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επώασθησαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό. Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η φωτογραφία Α απεικονίζει βλαστημένο κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Φωτογραφία Α × 8890 : Βλαστημένο κονίδιο στο εσωτερικό του οποίου παρατηρούνται μιτοχόνδρια (μχ), χυμοτόπια (χτ), ενδοπλασματικό δίκτυο (εδ) και δύο πυρήνες, από τους οποίους ο ένας μετακινείται στο εσωτερικό του βλαστικού σωλήνα.

Φωτογραφίες Β × 8890 - Γ × 10668: Το ενδοπλασματικό δίκτυο (εδ) έχει λιτή παρουσία στο πρωτόπλασμα, κατανέμεται τυχαία στο εσωτερικό του κυττάρου και δεν φαίνεται να υπόκειται σε αλλοιώσεις.

Φωτογραφίες Δ × 17780 - Ε × 14224 - Ζ × 10668 - Η × 14224: Παρατηρείται διάφορης έντασης αλλοίωση του ενδοπλασματικού δικτύου (εδ) που οπωσδήποτε γίνεται εντονότερη στην υψηλότερη συγκέντρωση του παρεμποδιστή (φωτ. Ε). Στην τελευταία περίπτωση μπορεί να προκύψει πλήρης κερματισμός των σωληνίσκων του παραπάνω δικτύου, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται διάσπαρτα κυστίδια στο πρωτόπλασμα του κυττάρου.

Φωτογραφία Θ × 8890: Τμήμα υψής, όπου το ενδοπλασματικό δίκτυο διατάσσεται με τη μορφή παράλληλων σωληνίσκων γύρω από τον πυρήνα.





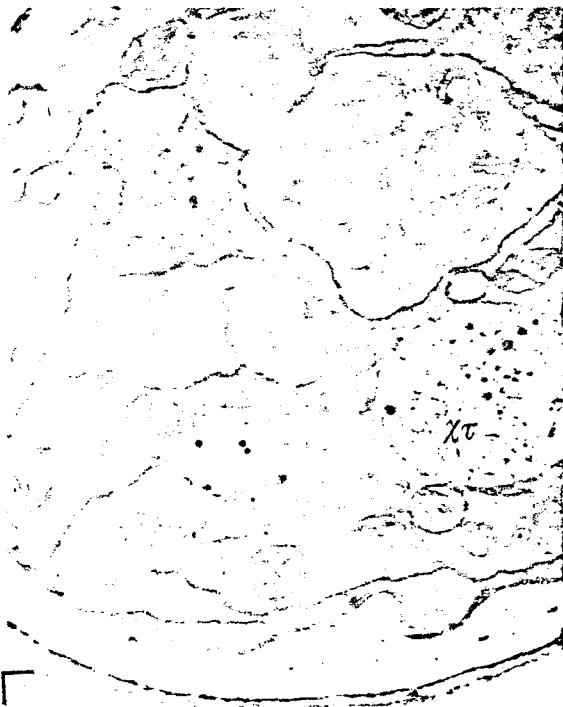
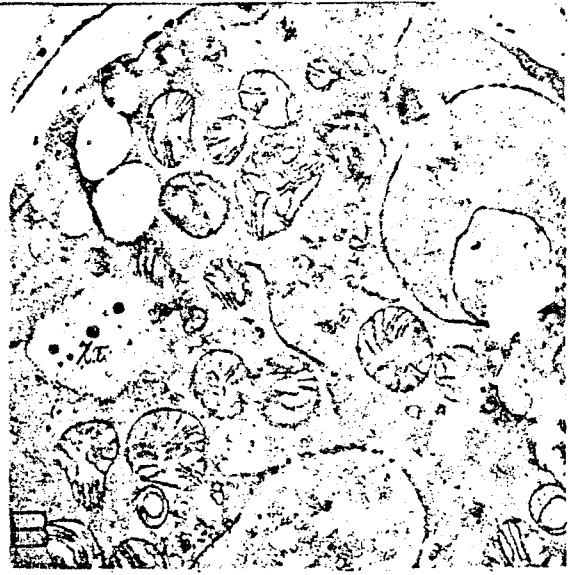
III.6ε. Παρατηρήσεις στα χυμοτόπια:

Τα χυμοτόπια αποτελούν κυτταρικά οργανίδια που περιβάλλονται από μια μεμβράνη που λέγεται τονοπλάστης. Στο χυμοτόπιο αποβάλλονται όλες οι άχρηστες για το κύτταρο ουσίες που σχηματίζονται στο πρωτόπλασμα. Τα οργανίδια αυτά μπορούν να εντοπισθούν τόσο σε κονίδια που είναι έτοιμα να βλαστήσουν, όσο και σε βλαστημένα, ενώ δεν παρατηρούνται σε εκείνα που βρίσκονται σε κατάσταση ληθάργου (εικ. 20Α). Παρουσία των fenarimol, clotrimazole, iprodione, carptafoi και benomyl φαίνεται να προκαλείται αύξηση στον αριθμό, ιδιαίτερα όμως στο μέγεθος των χυμοτοπίων. Τα φαινόμενα αυτά εμφανίζονται πιο έντονα μετά την επίδραση των δύο παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης (εικ. 20B-Z, 21B-K). Στο εσωτερικό τους, προκαλείται συσσώρευση κυτταροπλασματικών υλικών που αποτυπώνονται με τη μορφή ηλεκτρονικά πυκνών σωματιδίων (εικ. 20E-21E). Αυτοί φαίνεται να έχουν προέλθει από αλλοιώσεις που προκάλεσε στο πρωτόπλασμα η παρουσία των μυκητοκτόνων.

Εικόνα 20: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με fenarimol 2μg/ml (B, Γ), fenarimol 5μg/ml (A), clotrimazole 0.1μg/ml (E) και clotrimazole 0.2μg/ml (Z). Το ενδιαφέρον συγκεντρώθηκε στα χυμοτόπια (χτ). Η φωτογραφία A αντιστοιχεί σε κονίδια που επώασθηκαν σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Παρουσία και των δύο μυκητοκτόνων φαίνεται να προκαλείται αύξηση στον αριθμό (Γ,Ε) αλλά και στο μέγεθος των χυμοτοπίων (Γ, Ε, Z). Στο εσωτερικό τους παρατηρείται μεγάλος αριθμός ηλεκτρονικά πυκνών σωματιδίων που κατά πάσα πιθανότητα αντιπροσωπεύουν κυτταροπλασματικά υλικά (B, Δ, E).

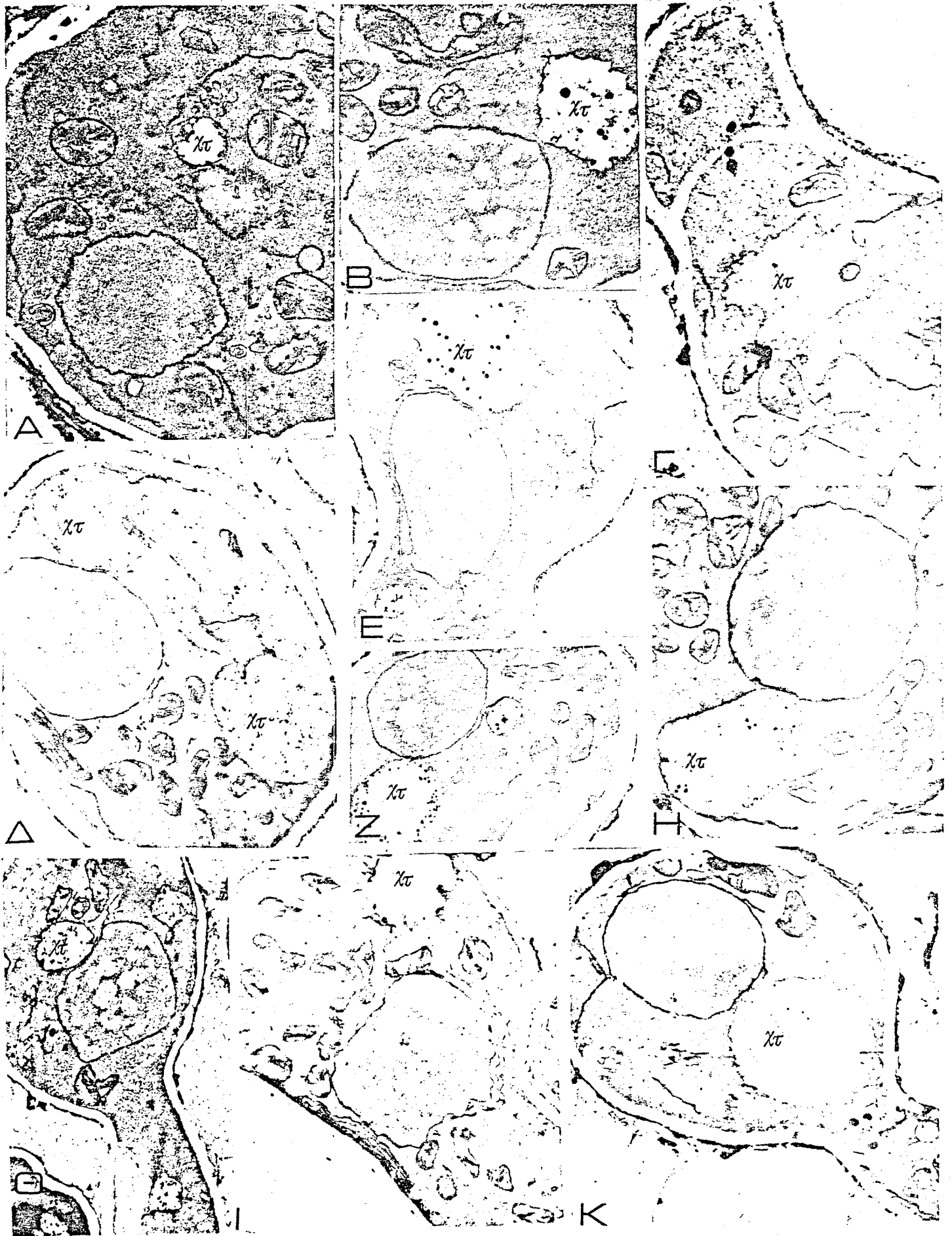
A,B,Γ,Δ,E,Z × 14224



Εικόνα 21: Κονίδια του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με iprodione 1.5μg/ ml (Β, Γ), iprodione 2.5μg/ ml (Α), captafol 0.075μg/ ml (Ε, Ζ, Η), captafol 0.15μg/ ml (Θ) και benomyl 1.5μg/ ml (Κ). Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στα χυμοτόπια. Η φωτογραφία Α αντιστοιχεί σε κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Παρουσία και των τριών μυκητοκτόνων, φαίνεται να προκαλείται αύξηση τόσο στον αριθμό (Δ, Ε, Θ) όσο και στο μέγεθος των χυμοτοπίων (χτ) (Β, Γ, Η, Ι, Κ). Στο εσωτερικό τους παρατηρούνται ηλεκτρονικά πυκνά σωματίδια (Ζ, Θ). Πιθανότατα αυτά αντιπροσωπεύουν κυτταροπλασματικά υλικά εξ' αιτίας της δράσης του μυκητοκτόνου που αποβάλλονται στο εσωτερικό αυτών των κατασκευών.

Α,Γ,Ε,Η,Ι,Κ × 14224 - Β,Δ,Ζ,Θ × 10668





III. 6ζ. Παρατηρήσεις στον πυρήνα:

Στα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα, ο πυρήνας περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη (εικ. 22Α- 29Α- 33Α) που διακόπτεται σε πολλά σημεία από τους πυρηνικούς πόρους (εικ. 28Α-31Α). Το σχήμα του είναι σφαιρικό ή ελαφρά επίμηκες ενώ στο εσωτερικό του παρατηρούνται ηλεκτρονικά λευκές περιοχές ακανονίστου σχήματος και μεγέθους που αντιπροσωπεύουν το δίκτυο της χρωματίνης (εικ. 23Α). Αυτό οφείλεται στο ότι το υπερμαγγανικό κάλιο ($KMnO_4$) που χρησιμοποιήθηκε σαν στερεωτικό, καταστρέφει το χρωματοσωματικό υλικό του οποίου η θέση απεικονίζεται από τις λευκές περιοχές (114) (εικ. 25Α). Σε κονίδια, του *A. nidulans* που βλαστάνουν σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο, η μιτωτική διεργασία αρχίζει πολλές φορές πριν την εμφάνιση του βλαστικού σωλήνα και οδηγεί στο σχηματισμό δύο θυγατρικών πυρήνων (εικ. 27Α-30Α). Ο ένας από αυτούς θα κατευθυνθεί αργότερα στη νεοσχηματισθείσα βλαστική υφή (εικ. 24Α). Άλλοτε η διαίρεση του πυρήνα γίνεται ταυτόχρονα με τη βλάστηση του κονιδίου. Η πυρηνική διαίρεση ακολουθεί το τυπικό τρόπο διαίρεσης που παρατηρείται στους ασκομύκητες. Συγκεκριμένα, ο πυρήνας στο τέλος της ανάφασης επιμυκνείται σχηματίζοντας δύο λοβούς που συνδέονται με στενό λαιμό. Ακολουθεί σύσφιξη του λαιμού και στο τέλος προκύπτουν δύο νέοι θυγατρικοί πυρήνες με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα (εικ. 26Α-32Α-35Α). Σε όλη τη διάρκεια της μίτωσης η πυρηνική μεμβράνη διατηρείται άθικτη (εικ. 27Α).

Η παρουσία των fenarimol, clotrimazole φαίνεται να προκαλεί πολύ σημαντικές μεταβολές στους πυρήνες του *A. nidulans*, μεταβολές που αφορούν τη δομή, τη μορφολογία και το τρόπο διαίρεσης. Η πυρηνική μεμβράνη συχνά εμφανίζεται με ακανόνιστους σχηματισμούς στο περίγραμμά της (εικ. 22Β-23Β-25Δ, Ζ). Στα πλαίσια αυτών των μεταβολών παρατηρούνται εγκοιλώσεις και προεξοχές που περιβάλλουν κυτταρικά οργανίδια, π.χ. μιτοχόνδρια, πολυκυστιδικά σωματίδια, χυμοτόπια, μεμβρανώδεις κατασκευές κ.λ.π., και τα οποία εγκλείονται στο εσωτερικό του πυρήνα (εικ. 22Γ, Ε - 23Γ - 25Γ, Ε). Αποτέλεσμα αυτών των ανωμαλιών είναι να προκύπτουν πυρήνες που στερούνται το τυπικά ελαφρά επίμηκες ή ωοειδές σχήμα και να αποκτούν ακανόνιστη μορφολογία. Όπως διατυπώθηκε παραπάνω, σε συχνές περιπτώσεις η πυρηνική μεμβράνη προεκτείνεται με τη μορφή ενδοπλασματικού δικτύου στο κυτταρόπλασμα γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της μεμβρανώδους αυτής κατασκευής στο εσωτερικό του κυττάρου (εικ. 22Δ-25Β). Παρόλο που η πυρηνική μεμβράνη φαίνεται να δαιτηρεί την ακεραιότητά της παρουσία των μυκητοκτόνων, εν τούτοις σε σπάνιες περιπτώσεις και σε εκτεταμένο χρόνο επώασης (11 ώρες), μπορεί να εμφανιστούν αλλοιώσεις μικρής έντασης (εικ. 22Ζ - 23 Ι). Οι πλέον όμως ενδιαφέρουσες επιδράσεις των fenarimol, clotrimazole παρατηρούνται στη διαδικασία της πυρηνοτομίας. Σε καμία απολύτως περίπτωση δεν εμφανίσθηκε ο

τυπικός τρόπος διαίρεσης που αναφέρθηκε προηγουμένως για την περίπτωση των κονιδίων που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα. Έτσι, αντί της χαρακτηριστικής επιμήκυνσης και εν συνεχεία σύσφιξης του πυρήνα, δημιουργείται ένα είδος λοβού ή σπανιότερα λοβών (εικ. 23Δ, Ε, Ζ) των οποίων η ηλεκτρονική πυκνότητα είναι σαφώς διαφορετική από εκείνη του κυρίως πυρήνα. Η εμφάνιση τέτοιων λοβών, αφ' ενός μεν οδηγεί στην έντονη παραμόρφωση αυτού του οργάνου αφ' ετέρου αποτελεί αρχικό στάδιο ενός ιδιόρρυθμου τρόπου διαίρεσης, διαφορετικού από εκείνον που παρατηρείται στους ασκομύκητες. Από το σημείο της πυρηνικής μεμβράνης που σχηματίζονται οι λοβοί, αναπτύσσεται μια νέα διπλή διαχωριστική μεμβράνη που κατευθύνεται προς το άλλο άκρο του λοβού (εικ. 23Η, Θ- 24Β, Γ, Δ, Ε, Η- 26Β, Γ, Δ, Ε, Ζ-27Β, Γ, Δ, Ε). Μ' αυτόν τον τρόπο γίνεται διαχωρισμός του αρχικού πυρηνοπλάσματος σε δύο νέες πυρηνικές περιοχές οι οποίες αφού αποχωρισθούν θα αποτελέσουν τους δύο νέους θυγατρικούς πυρήνες με κύριο χαρακτηριστικό το διαφορετικό μέγεθος αλλά και την άνιση ηλεκτρονική πυκνότητα (εικ. 24Ζ, Θ, Ι - 27Ζ, Η, Θ). Το τελευταίο γνώρισμα είναι ενδεικτικό της άνισης κατανομής του χρωματοσωματικού υλικού που πραγματοποιήθηκε στην ιδιόρρυθμη αυτή μιτωτική διεργασία.

Παρουσία του iprodione, η πυρηνική μεμβράνη εμφανίζει ανοίγματα των οποίων οι διαστάσεις εξαρτώνται από το χρόνο παρουσίας του μυκητοκτόνου. Αρχικά, παρατηρούνται μικρά ανοίγματα (εικ. 28Β, Γ), αργότερα όμως οι διαστάσεις τους γίνονται εξαιρετικά μεγάλες, εξ' αιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης αλλά και της παρατεταμένης έκθεσης στον παρεμποδιστή, που φυσικό είναι να συντελεί στην βαθμιαία αύξηση των βλαβών (εικ. 28Δ, Ζ - 29Β, Γ). Σε μερικές μάλιστα περιπτώσεις προκαλεί και ολοκληρωτική εξαφάνιση της πυρηνικής μεμβράνης (εικ. 29Δ, Ζ, Η). Στην τελευταία περίπτωση, η διάκριση του πυρήνα είναι πάρα πολύ δύσκολη και μόνο η διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα που έχει, σε σχέση με το πρωτόπλασμα, μας διευκολύνει να τον ξεχωρίσουμε (εικ. 29Ζ). Η παρουσία τέτοιου είδους ανοιγμάτων στην πυρηνική μεμβράνη φαίνεται να οδηγεί στην απώλεια πυρηνικού υλικού στο πρωτόπλασμα του κυττάρου (εικ. 28Η - 29Ε). Εκτός όμως από τα παραπάνω σπασίματα, παρατηρείται και μιας άλλης μορφής αλλοίωση της πυρηνικής μεμβράνης, δηλαδή απομάκρυνση της εσωτερικής από την εξωτερική μεμβράνη (εικ. 29Θ). Οπωσδήποτε όμως διαπιστώνονται και πυρήνες των οποίων η μεμβράνη φαίνεται να διατηρείται αμετάβλητη στην παρουσία του μυκητοκτόνου (εικ. 30Δ, Ζ).

Η διαίρεση των πυρήνων φαίνεται να ακολουθεί τον τυπικό τρόπο που αναφέρθηκε για τα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα. Δηλαδή παραγματοποιείται επιμήκυνση του πυρήνα ο οποίος σχηματίζει δύο λοβούς που συνδέονται με στενό λαιμό. Ακολουθεί σύσφιξη στο μέσον και αποχωρισμός των λοβών που θα αποτελέσουν τους δύο νέους θυγατρικούς πυρήνες με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα (εικ. 28Ε- 30Β, Γ, Δ, Ε, Ζ).

Σε υλικό που περιέχει captafol 0.075μg/ml μεγάλος αριθμός βλαστημένων και αβλάστητων κονιδίων έχουν πυρήνες, που διατηρούν το τυπικό σχήμα και μέγεθος. Η πυρηνική μεμβράνη διατηρείται ακέραιη ενώ η συνέχειά της διακόπτεται συχνά από τους πυρηνικούς πόρους (εικ. 31B, Γ). Σε σπάνιες όμως περιπτώσεις και σε παρατεταμένο χρόνο παρουσίας του παρεμποδιστή (περισσότερο από 11 ώρες) παρατηρούνται σπασίματα της μεμβράνης που φαίνεται να οδηγούν στην εκροή και απώλεια πυρηνικού υλικού στο πρωτόπλασμα του κυττάρου αλλά και στην πιθανή έκθεση του χρωματοσωματικού υλικού σε ένζυμα του κυτταροπλάσματος (εικ. 31Z, Η, Θ, Ι). Γύρω από την περιοχή της μεμβράνης που έσπασε βρίσκονται διάσπαρτα κυστίδια που κατά πάσα πιθανότητα πρέπει να προήλθαν από τα σπασμένα τμήματα αυτής. Η διαίρεση των πυρήνων πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε για τα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα (εικ. 32B, Γ, Δ, Ε). Βασίζεται σε επιμήκυνση, σχηματισμό δύο λοβών που συνδέονται με στενό λαιμό και εν συνεχεία αποχωρισμό, μετά από σύσφιγξη, για το σχηματισμό νέων θυγατρικών πυρήνων με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα (εικ. 31Δ, Ε).

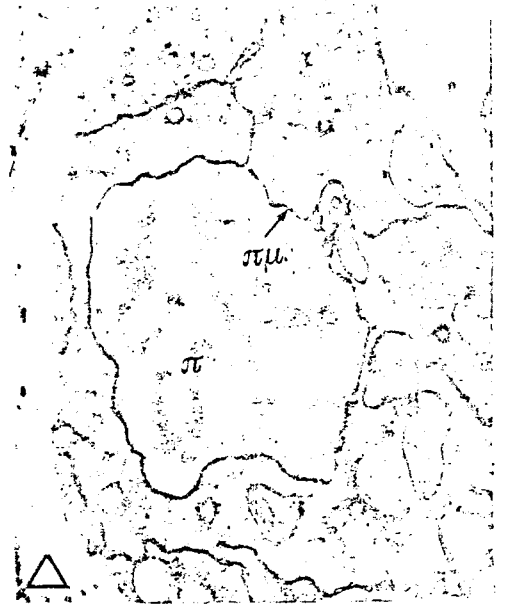
Αντίθετα, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του παρεμποδιστή (0.15μg/ml) παρατηρείται μη τυπική μίτωση. Ο πυρήνας αναπτύσσει λοβό που οδηγεί στο σχηματισμό θυγατρικών πυρήνων με ανομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα (εικ. 32Z, Η, Θ).

Μετά από επώαση σε υλικό που περιέχει benomyl, οι πυρήνες σε αρκετές περιπτώσεις, χάνουν το τυπικό κυκλικό ή ωοειδές σχήμα και αποκτούν ανώμαλη μορφολογία. Παρατηρούνται εγκολπώσεις, προεξοχές και σχηματισμοί λοβών (εικ. 33B). Συνήθως οι εγκολπώσεις αυτές οδηγούν στην έγκλειση κυτταρικών συστατικών στο εσωτερικό του πυρήνα (εικ. 33Γ, Δ). Η πυρηνική διεργασία δεν φαίνεται να ακολουθεί τον τυπικό τρόπο που αναφέρθηκε για τα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα. Διαπιστώνεται ο σχηματισμός λοβού με άνιση ηλεκτρονική πυκνότητα (εικ. 33E - 34A, Β, Γ, Δ, Ε). Σε αντίθεση με τα μυκητοκτόνα fenarimol, clotrimazole, δεν παρατηρήθηκε σε καμία απολύτως περίπτωση η ανάπτυξη διαχωριστικής μεμβράνης. Φαίνεται ότι ο σχηματισμός θυγατρικών πυρήνων βασίζεται σε απλή σύσφιγξη της πυρηνικής μεμβράνης στο σημείο του λοβού και εν συνεχεία απομάκρυνση των νεοσχηματισθέντων πυρήνων, χαρακτηριστικό των οποίων είναι η διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα (εικ. 34Z, Η). Αλλά και στις περιπτώσεις που παρατηρείται η χαρακτηριστική επιμήκυνση του πυρήνα με το σχηματισμό λοβών όπως και στο μάρτυρα, η κατανομή χρωματοσωματικού υλικού φαίνεται να είναι ανισομερής στους νεοσχηματισθέντες λοβούς, προφανώς εξ' αιτίας μη σχηματισμού των μικροσωληνίσκων της ατράκτου (εικ. 35B, Γ, Δ).

Εικόνα 22: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθη σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με fenarimol 2μg/ ml (B, Γ, Δ, E) και fenarimol 5μg/ ml (Z). Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται σε αλλοιώσεις του πυρήνα. Η φωτογραφία A αντιστοιχεί σε κονίδιο που επώασθη σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο και αποτυπώνει τυπικό πυρήνα σε αβλάστητο κονίδιο.

Παρατηρούνται χαρακτηριστικές εγκολπώσεις της πυρηνικής μεμβράνης (πμ) (B) στο εσωτερικό των οποίων εγκλείονται συχνά κυτταροπλασματικές κατασκευές (Γ, E). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η προέκταση της μεμβράνης στο εσωτερικό του πρωτοπλάσματος με τη μορφή ενδοπλασματικού δικτύου (Δ). Στην αυξημένη συγκέντρωση του παρεμποδιστή και σε παρατεταμένο χρόνο επώασης (11ώρες) παρατηρούνται τάσεις αλλοίωσης των κυτταροπλασματικών οργανιδίων, συμπεριλαμβανομένου και του πυρήνα (Z).

A × 21336 - B,Γ,E,Z × 17780 - Δ × 14224



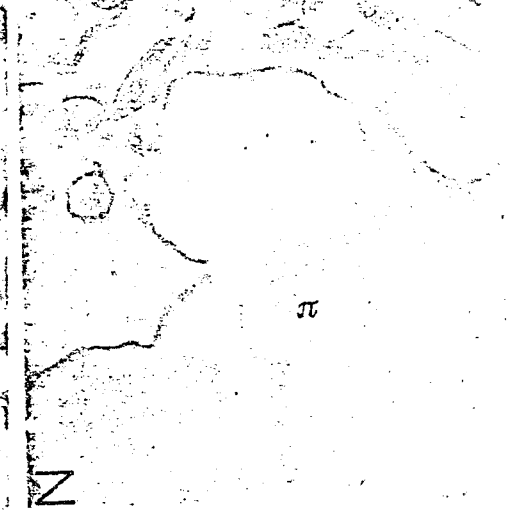
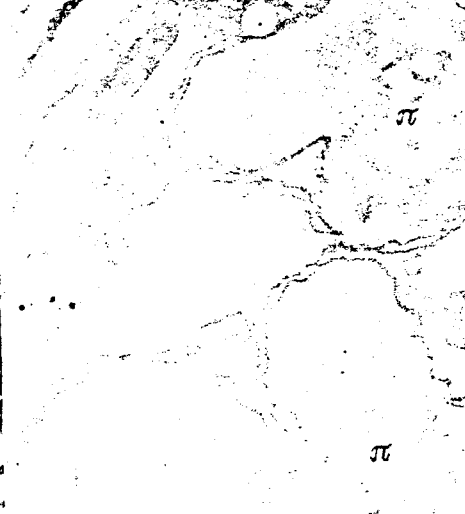
Εικόνα 23: Τομές κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με fenarimol 2μg/ ml (Β, Γ, Δ, Ε, Ζ, Η) και fenarimol 5μg/ ml (Θ). Το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στις αλλοιώσεις του πυρήνα και την ανάπτυξη διαχωριστικής μεμβράνης. Η φωτογραφία Α αντιστοιχεί σε κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Φωτογραφία Α × 10668: Παρατηρούνται πυρήνες (π) με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα και επιμηκυμένο μιτοχόνδριο έτοιμο να διαφραθεί.

Φωτογραφία Β, Γ × 17780: Η πυρηνική μεμβράνη έχει σχηματίσει εγκόλπωση στο εσωτερικό της οποίας περιέχεται κυτταροπλασματικό υλικό. Κατά πάσα πιθανότητα η εγκόλπωση αυτή θα αποκοπεί από το υπόλοιπο τμήμα της μεμβράνης και θα κατευθυνθεί στο πυρηνόπλασμα (Γ).

Φωτογραφίες Δ, Ε × 14224 - Ζ, Η, Θ × 17780: Ο πυρήνας φαίνεται να αναπτύσσει λοβούς με διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα (Δ, Ε, Ζ). Από το σημείο σχηματισμού των λοβών αναπτύσσεται αργότερα διαχωριστική μεμβράνη (Η, Θ).

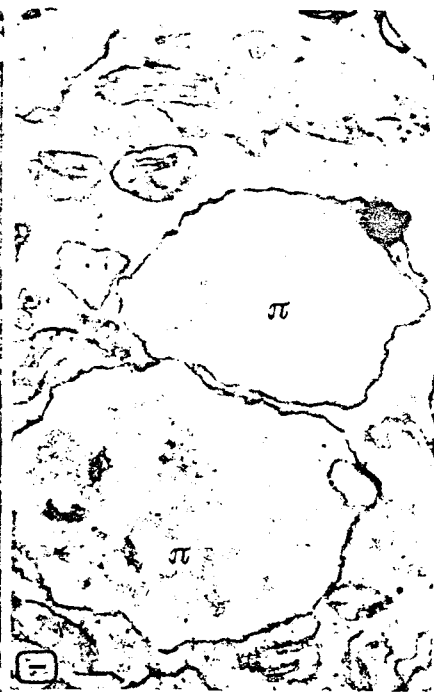
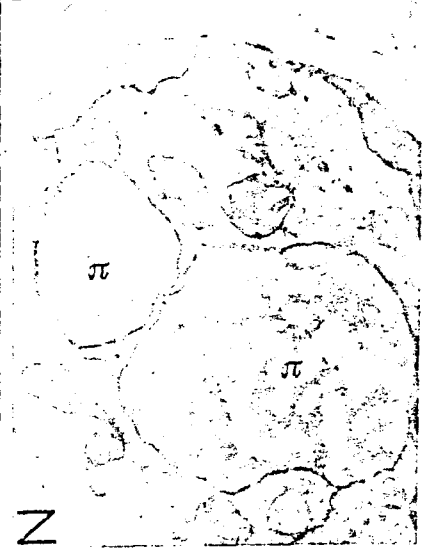
Φωτογραφία Ι × 17780: Σε αυξημένη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου και σε παρατεταμένο χρόνο επώασης (11 ώρες) παρατηρείται τάση αλλοίωσης της πυρηνικής μεμβράνης και του ενδοπλασματικού δικτύου (λευκά βέλη).



Εικόνα 24: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων που δείχνουν την επίδραση του fenarimol 2μg/ ml (Β, Γ, Δ, Ε, Ζ) και fenarimol 5μg/ ml (Η, Θ, Ι) στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό και το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στην ανάπτυξη διαχωριστικής μεμβράνης για τη διαίρεση του πυρήνα (π). Η φωτογραφία Α αντιστοιχεί σε βλαστημένο κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο και αποτυπώνει δύο πυρήνες σε βλαστημένο κονίδιο.

Παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά στάδια ανάπτυξης της διαχωριστικής μεμβράνης για τη διαίρεση του πυρήνα. Στις φωτογραφίες Β και Η παρατηρείται η σταδιακή ανάπτυξη της διαχωριστικής μεμβράνης η οποία θα οδηγήσει στο σχηματισμό δύο ανισομεγέθη περιοχών με διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα (φωτ. Γ, Δ, Ε). Οι περιοχές αυτές αφού αποσπασθούν θα αποτελέσουν τους νέους θυγατρικούς πυρήνες (φωτ. Ζ, Θ, Ι).

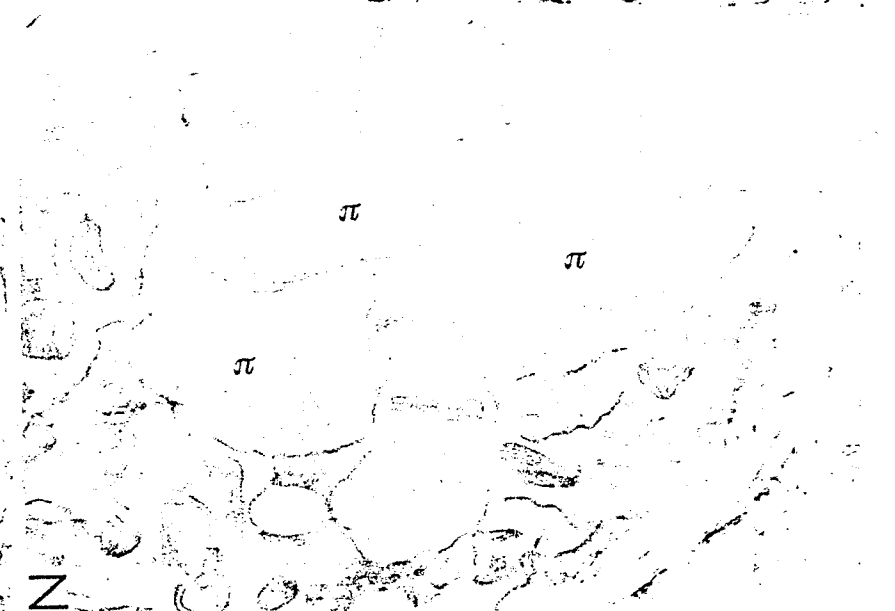
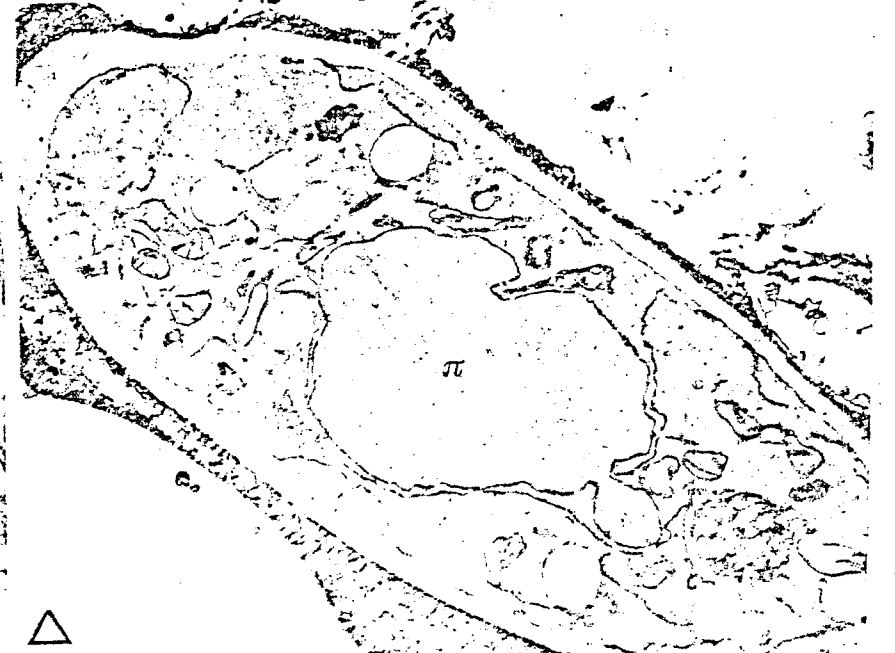
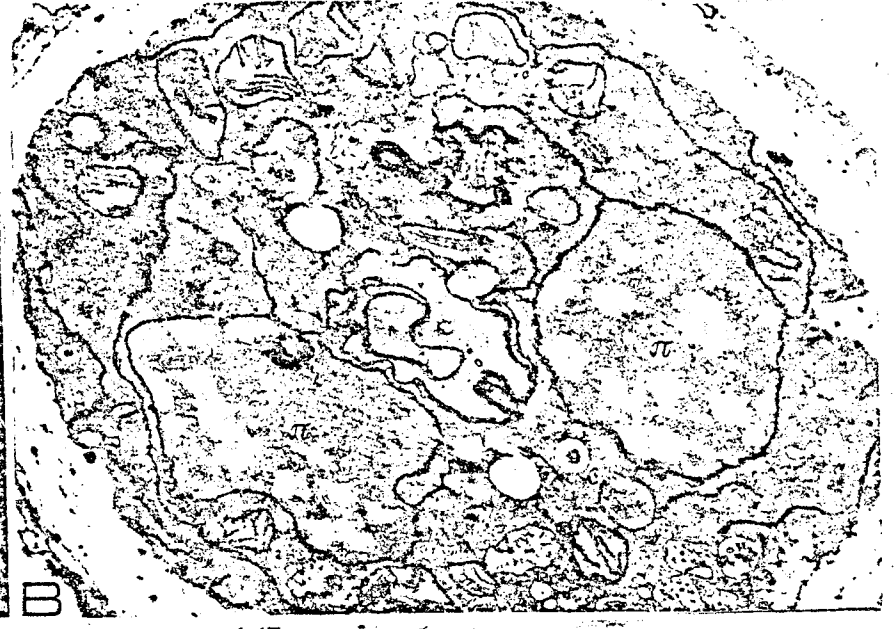
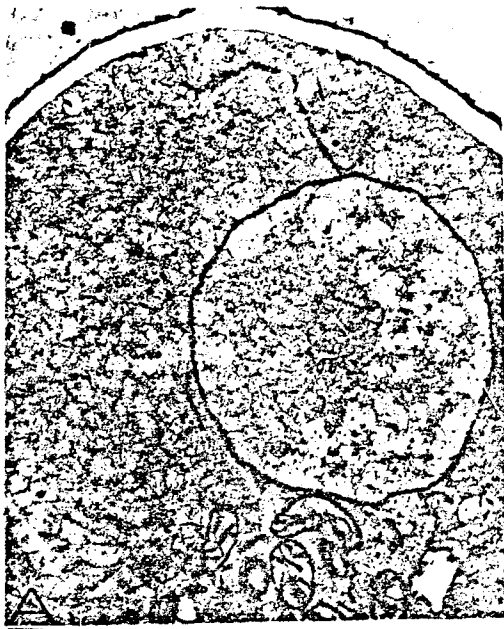
Α, Γ, Ε, Δ, Η, Θ, Ι × 17780 - Β, Ζ × 14224



Εικόνα 25: Κονίδια του μύκητα *A. nidulans* που επωάσθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με clotrimazole 0.1μg/ ml (B, Γ, Δ) και clotrimazole 0.2μg/ ml (E, Z). Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις παραμορφώσεις της πυρηνικής μεμβράνης. Η φωτογραφία A αντιστοιχεί σε κονίδιο που επωάσθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Παρατηρούνται (B, Γ, Δ, Z) έντονα παραμορφωμένοι πυρήνες που έχουν χάσει το τυπικά ελαφρά επίμηκες ή σφαιρικό σχήμα. Οι παραμορφώσεις αυτές αφορούν κυρίως ακανόνιστες εγκολπώσεις, που οδηγούν στο σχηματισμό άτυπων σχημάτων (B, Δ, Z) και που συχνά εγκλείουν κυτταροπλασματικές κατασκευές (Γ, E).

A, Δ × 14224 - B, Γ, E, Z × 17780



Εικόνα 26: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων, που δείχνουν την επίδραση του clotrimazole 0.1μg/ ml στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Τα κονίδια επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό. Το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στη διαδικασία ανάπτυξης διαχωριστικής μεμβράνης του πυρήνα (π), προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μίτωση. Η φωτογραφία Α αντιστοιχεί σε κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο και αποτυπώνει την χαρακτηριστική επιμήκυνση του πυρήνα που αποτελεί μέρος της μιτωτικής διεργασίας.

Παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά στάδια ανάπτυξης διαχωριστικής μεμβράνης του πυρήνα μετά την επίδραση του παρεμποδιστή. Στις φωτογραφίες Β, Γ και Δ η διαχωριστική μεμβράνη δεν έχει συμπληρώσει την ανάπτυξή της. Σταδιακά αυξάνει σε μήκος μέχρις ότου χωρισθεί ο πυρήνας σε δύο διαφορετικές περιοχές από απόψεως μεγέθους και ηλεκτρονικής πυκνότητας (Ε). Θα ακολουθήσει απομάκρυνση των νεοσχηματισθέντων περιοχών που θα αποτελέσουν τους νέους θυγατρικούς πυρήνες (Ζ).

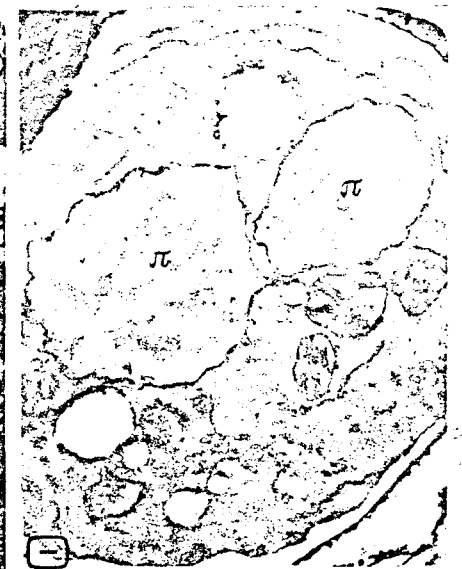
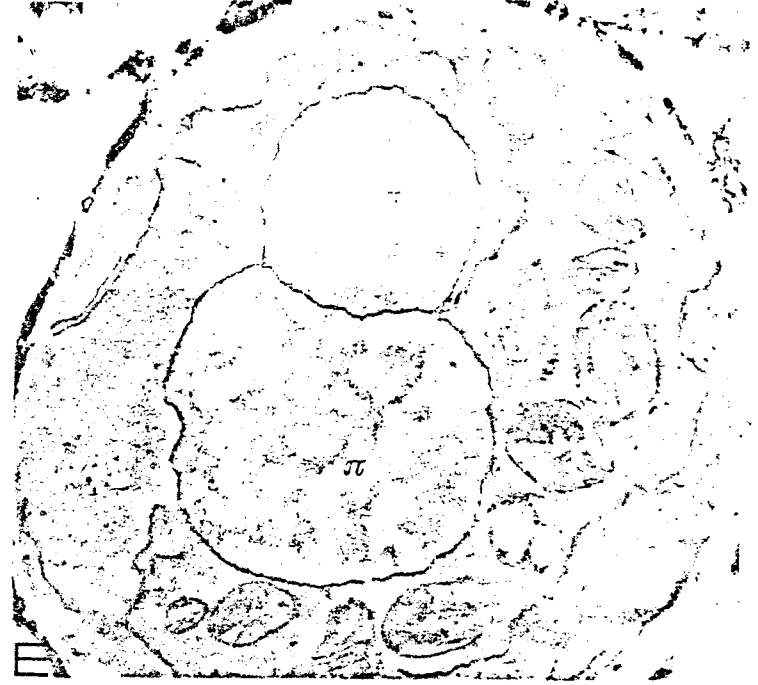
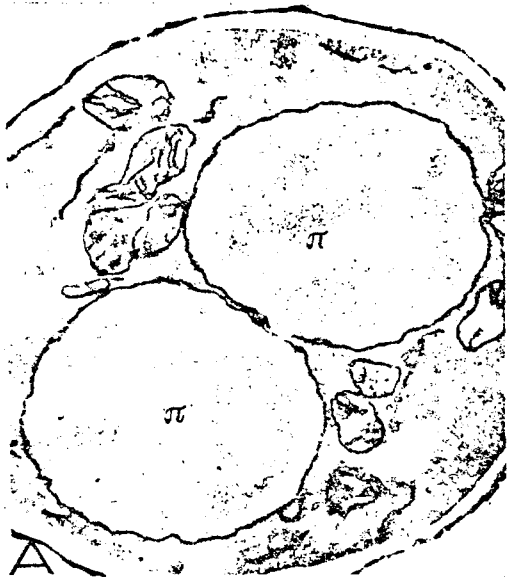
Α × 17780 - Β, Γ, Δ, Ε, Ζ × 14224



Εικόνα 27: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που βλάστησαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό παρουσία clotrimazole 0.2μg/ ml. Το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στον ιδιόρρυθμο μηχανισμό της μιτωτικής διεργασίας. Η φωτογραφία Α αντιστοιχεί σε κονίδιο που επώασθη σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο και αποτυπώνει δύο νεοσχηματισθέντες θυγατρικούς πυρήνες.

Στις φωτογραφίες Β, Γ, Δ και Ε παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά στάδια ανάπτυξης της διαχωριστικής μεμβράνης μετά την επίδραση του μύκητοκτόνου. Με την πλήρη ανάπτυξή της σχηματίζονται δύο ανισομεγέθεις λοβοί με διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα (Δ, Ε) που αφού αποσπασθούν ο ένας από τον άλλον θα αποτελέσουν τους νέους θυγατρικούς πυρήνες (Ζ, Η, Θ)

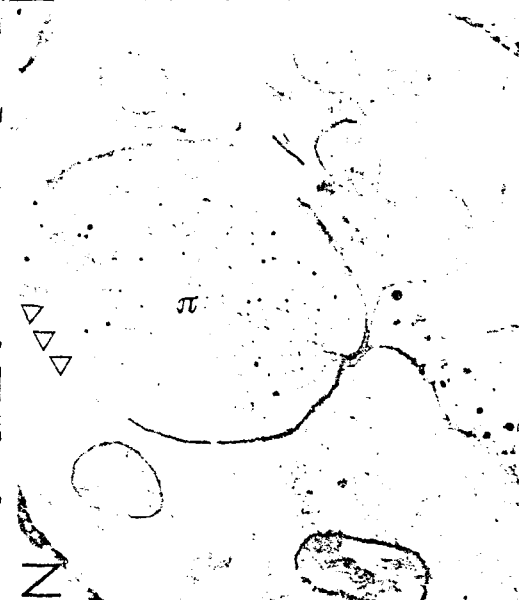
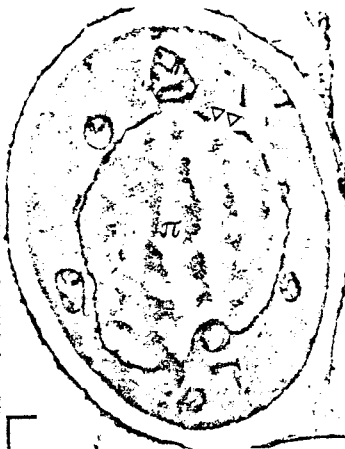
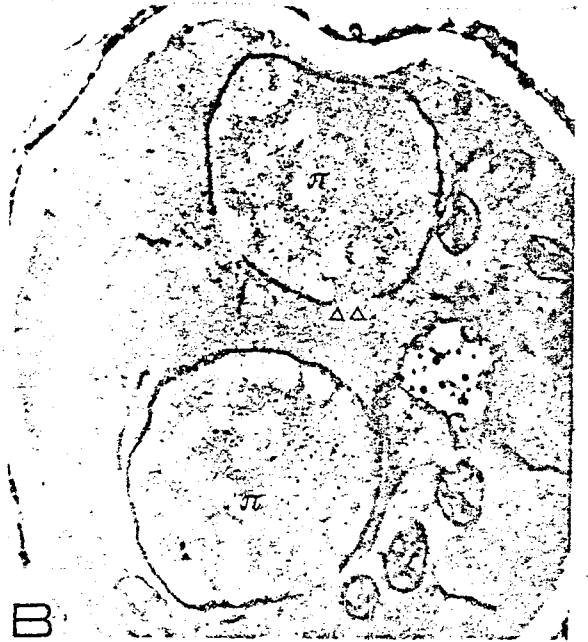
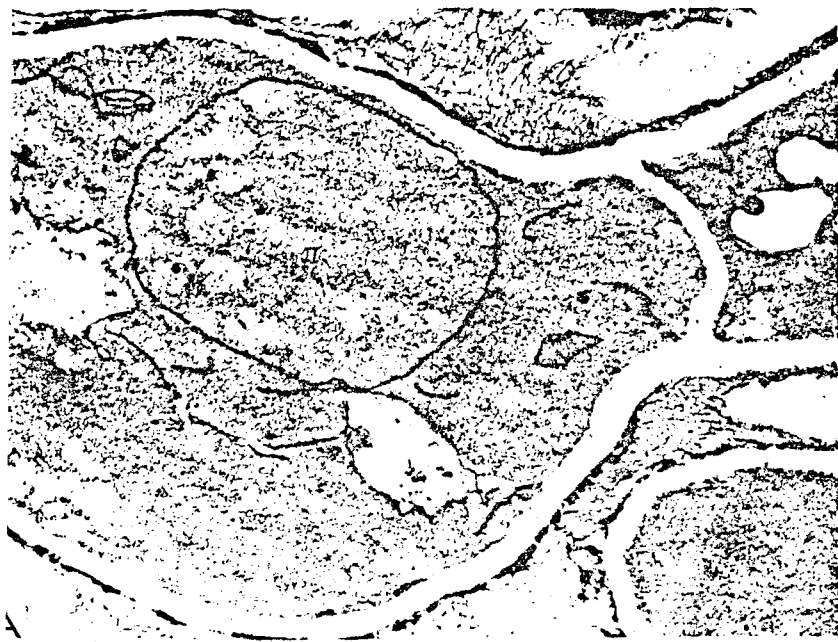
Α × 10668 - Β, Γ, Ζ, Η, Θ × 14224 - Δ, Ε × 17780



Εικόνα 28: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με iprodione 1.5μg/ ml. Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις βλάβες της πυρηνικής μεμβράνης. Η φωτογραφία Α αντιστοιχεί σε βλασθημένο κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο και αποτυπώνει πυρήνα (π) σε βλασθημένο κονίδιο.

Σις φωτογραφίες Β, Γ, Δ, Ε, Ζ και Η διαπιστώνονται τα σημαντικά ανοίγματα της πυρηνικής μεμβράνης μετά την επίδραση του παρεμποδιστή (λευκά βέλη). Τα ανοίγματα αυτά οδηγούν στην άμεση επαφή του πυρηνοπλάσματος με το κυτταρόπλασμα και πιθανότατα στην απώλεια του πυρηνικού υλικού.

Α, Β, Γ, Δ, Ε, Ζ × 10668 - Η, × 14224



Εικόνα 29: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων που δείχνουν την επίδραση του iprodione 1.5μg/ ml (B, Γ, Δ, E) και iprodione 2.5μg/ ml (Z, H, Θ) στη λεπτή δομή του μύκητα *A. nidulans*. Το ενδιαφέρον εντοπίζεται στην αλλοίωση της πυρηνικής μεμβράνης (πμ). Η φωτογραφία A δείχνει βλαστημένο κονίδιο που επώασθη σε θρεπτικό υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Φωτογραφίες B × 14224 - Γ × 10668 - Δ × 7112 - E × 17780: Παρατηρούνται τεράστια ανοίγματα της πυρηνικής μεμβράνης που φαίνεται να οδηγούν στην εκροή πυρηνοπλάσματος στο κυτταρόπλασμα (λευκά βέλη).

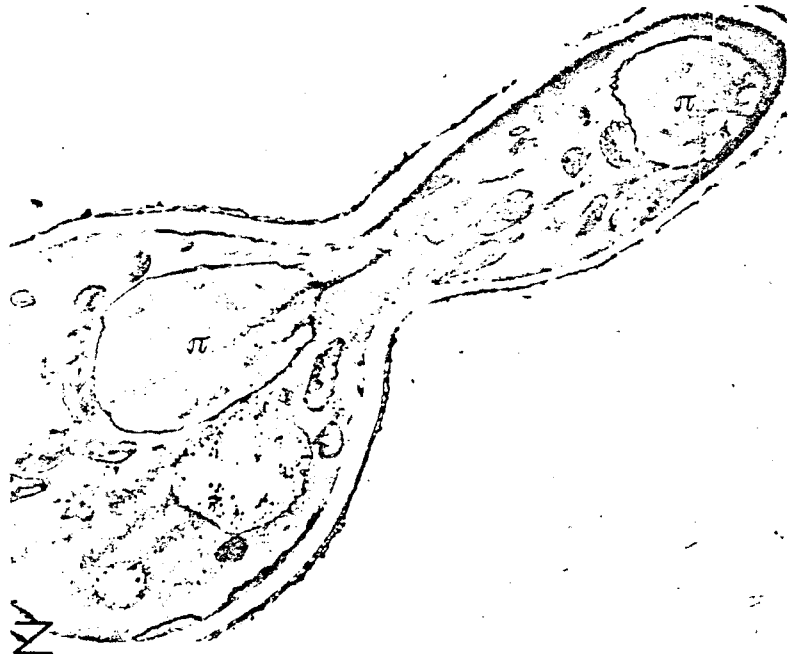
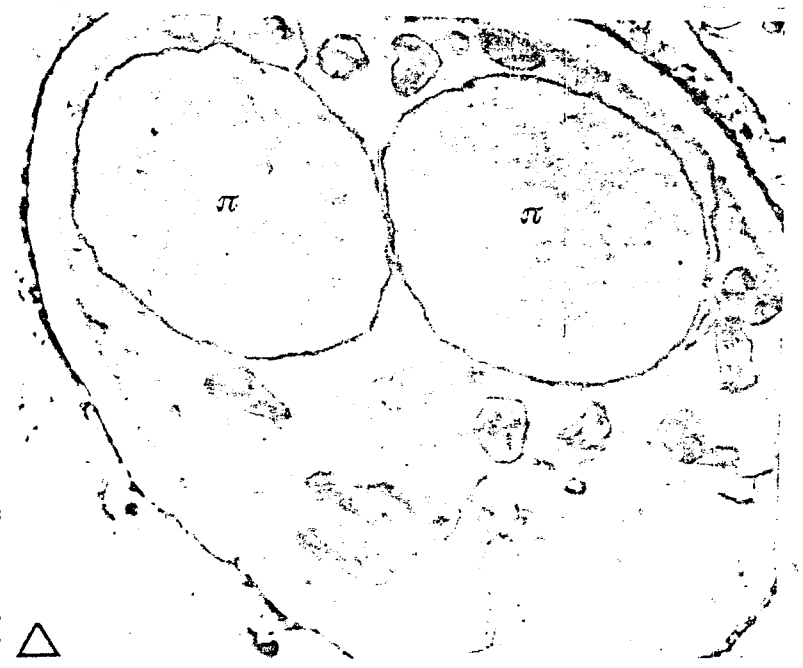
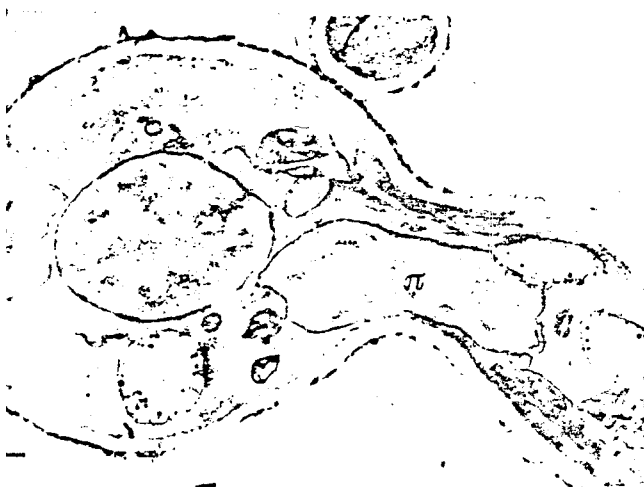
Φωτογραφίες Z, H × 10668 - Θ × 21336: Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του παρεμποδιστή παρατηρούνται εντονότερες εκφυλιστικές αλλοιώσεις της πυρηνικής μεμβράνης. Σε μερικές περιπτώσεις η διάκριση του πυρήνα (π) είναι πάρα πολύ δύσκολη και μόνο η διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα που έχει σε σχέση με το πρωτόπλασμα, μας διευκολύνει να τον ξεχωρίσουμε (Z, H). Στη φωτογραφία Θ παρατηρείται χαρακτηριστική απομάκρυνση της εξωτερικής από την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη που έχει οδηγήσει στο σχηματισμό φλυκταινώδους κατασκευής (μαύρα βέλη).



Εικόνα 30: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με iprodione 1.5μg/ ml (B, Γ, Δ) και iprodione 2.5μg/ ml (E, Z). Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στη μιτωτική διεργασία. Η φωτογραφία A αντιστοιχεί σε κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο και αποτυπώνει δύο θυγατρικούς πυρήνες με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα.

Στις φωτογραφίες B, Γ, Δ, E και Z παρατηρούνται πυρήνες (π) σε διάφορα στάδια της μίτωσης. Την χαρακτηριστική επιμήκυνση και εν συνεχεία σύσφιγξη στο μέσον (B, Γ, E) ακολουθεί ο σχηματισμός θυγατρικών πυρήνων με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα.

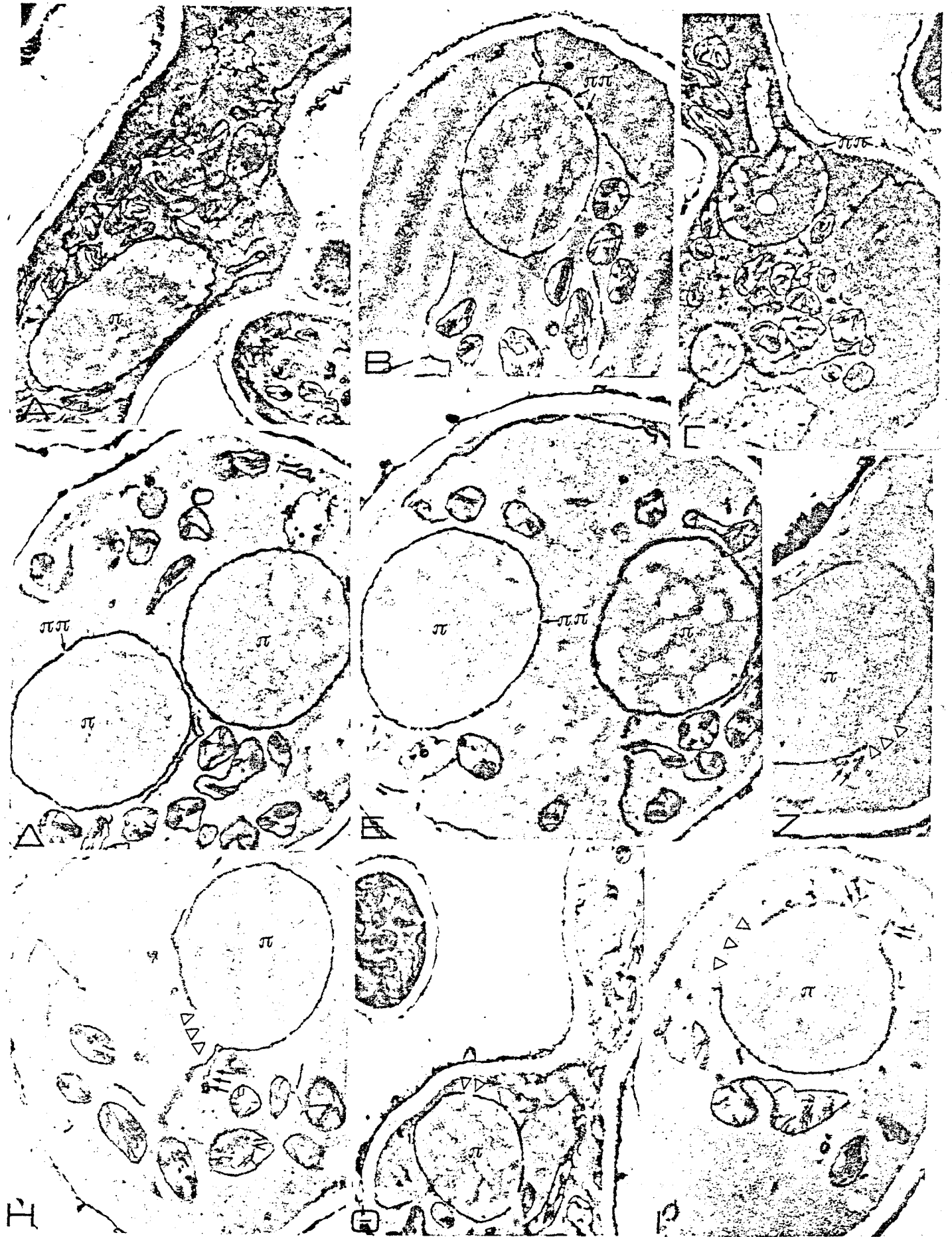
A, B, Γ, E × 10668 - Δ × 14224 - Z × 8890



Εικόνα 31: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με cartafol 0.075μg/ ml. Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στον πυρήνα. Η φωτογραφία Α (× 10668) αντιστοιχεί σε κονίδιο που βλάστησε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο και αποτυπώνει πυρήνα στο εσωτερικό υφής.

Φωτογραφίες Β, Γ, Δ, Ε× 10668: Οι πυρήνες (π) εμφανίζονται χωρίς αλλοιώσεις στην παρουσία του μυκητοκτόνου. Η πυρηνική μεμβράνη διακόπτεται από ανοίγματα, τους πυρηνικούς πόρους (ππ).

Φωτογραφίες Ζ× 17780 - Η× 10668 - Θ× 8890 : Ο παρατεταμένος χρόνος παρουσίας του παρεμποδιστή οδηγεί σε διάφορους βαθμούς αποδιοργάνωσης της πυρηνικής μεμβράνης. Αυτή εκφράζεται με τη μορφή ανοιγμάτων, των οποίων το μέγεθος ποικίλλει (λευκά βέλη). Τα κατεστραμμένα τμήματα των μεμβρανών φαίνεται να διαμοιράζονται με τη μορφή κυστιδίων (μαύρα βέλη) γύρω από τον πυρήνα, ενδεικτικό της περιοχής που προήλθαν.

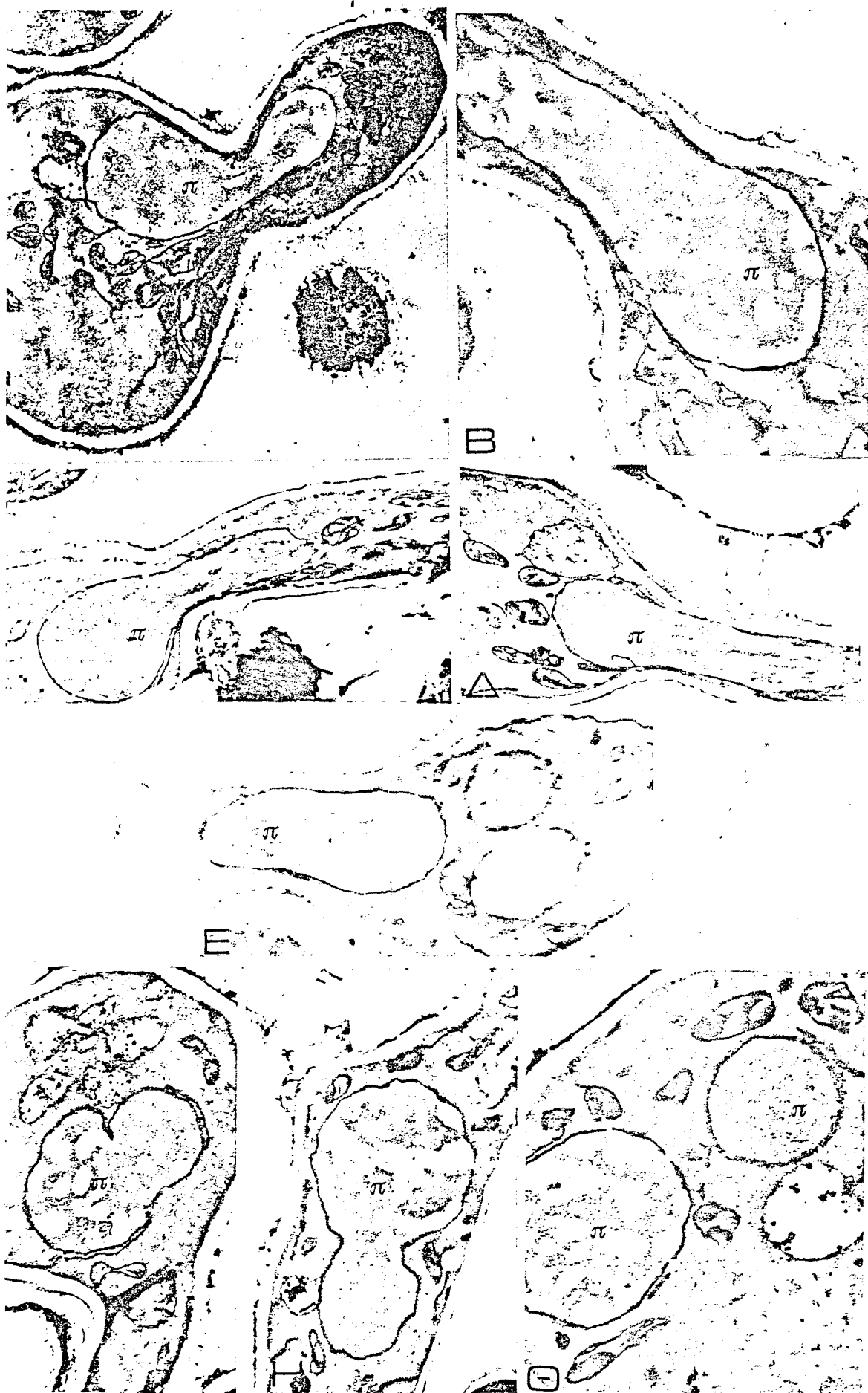


Εικόνα 32: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που βλάστησαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με cartafol 0.075μg/ ml (Β, Γ, Δ, Ε) και cartafol 0.15μg/ ml (Ζ, Η, Θ). Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στη μίτωτική διεργασία. Η φωτογραφία Α αντιστοιχεί στο μάρτυρα.

Φωτογραφία Α × 8890 : Βλαστημένο κονίδιο που επώασθηκε σε θρεπτικό υλικό χωρίς μυκητοκτόνο. Παρατηρείται πυρήνας (π) σε αρχικό στάδιο της μίτωσης. Εμφανίζεται επιμήκυνση και στένωση που θα οδηγήσει στο σχηματισμό δύο θυγατρικών πυρήνων με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα.

Φωτογραφίες Β × 14224 - Γ, Δ × 10668 - Ε × 14224: Χαρακτηριστική επιμήκυνση του πυρήνα, σε βλαστημένα κονίδια, που αποτελεί μέρος της μίτωτικής διεργασίας. Με την ολοκλήρωση της μίτωσης, θα προκύψουν θυγατρικοί πυρήνες με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα.

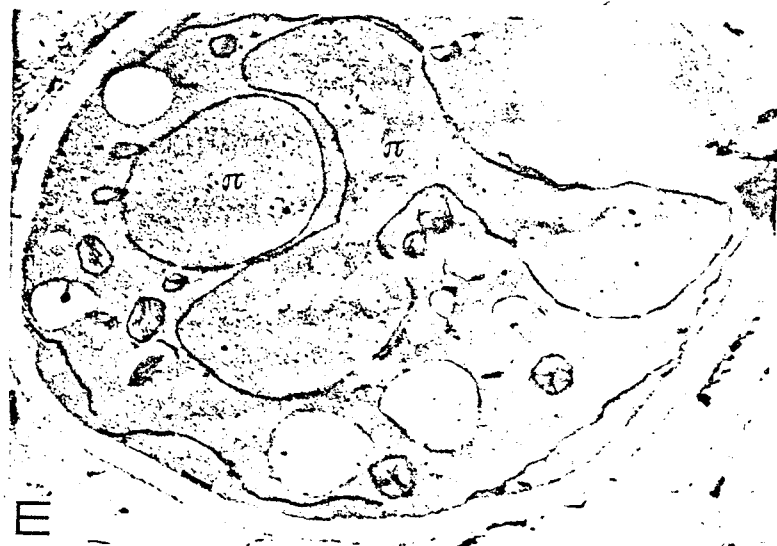
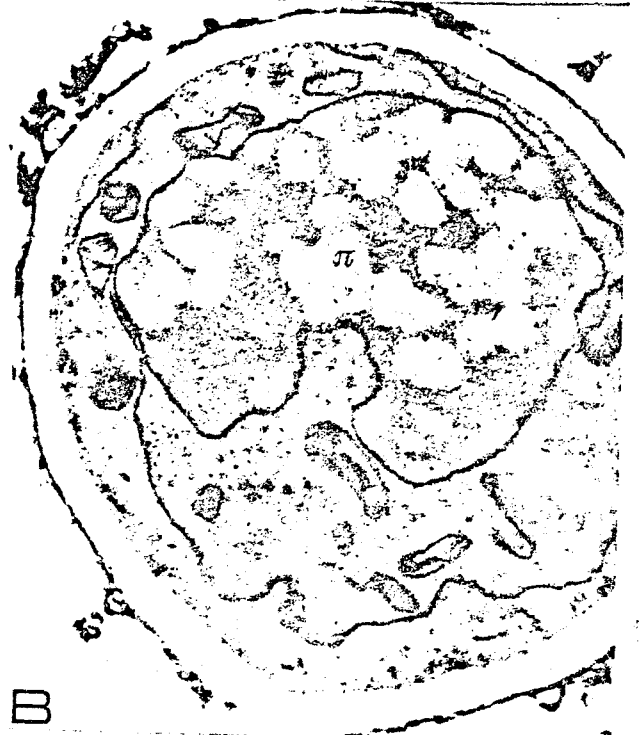
Φωτογραφίες Ζ, Η, Θ × 10668 : Ο πυρήνας σχηματίζει λοβό με διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα (Ζ, Η). Ο λοβός αυτός αργότερα θα αποχωρισθεί και θα αποτελέσει νέο θυγατρικό πυρήνα (Θ).



Εικόνα 33: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με benomyl 1.5μg/ ml. Παρατηρούνται χαρακτηριστικές ανωμαλίες της πυρηνικής μεμβράνης. Η φωτογραφία Α αντιστοιχεί σε κονίδιο που επώασθηκε σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο και αποτυπώνει ένα τυπικό πυρήνα.

Παρουσία του μυκητοκτόνου η πυρηνική μεμβράνη σχηματίζει εγκόλπωση (Β). Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατόν στην εγκόλπωση αυτή να εγκλεισθεί κάποια κυτταροπλασματική κατασκευή (Δ) και να ακολουθήσει αποκόλληση και κατεύθυνση του συμπλέγματος στο εσωτερικό του πυρήνα (Γ). Στην φωτ. Ε ο πυρήνας φαίνεται να οδηγείται σε τριπολική διαίρεση.

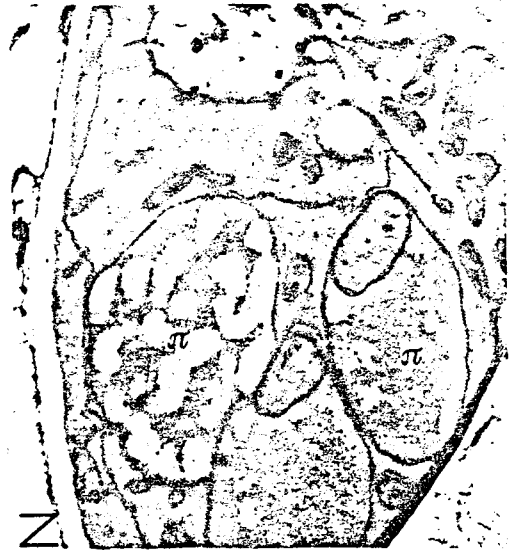
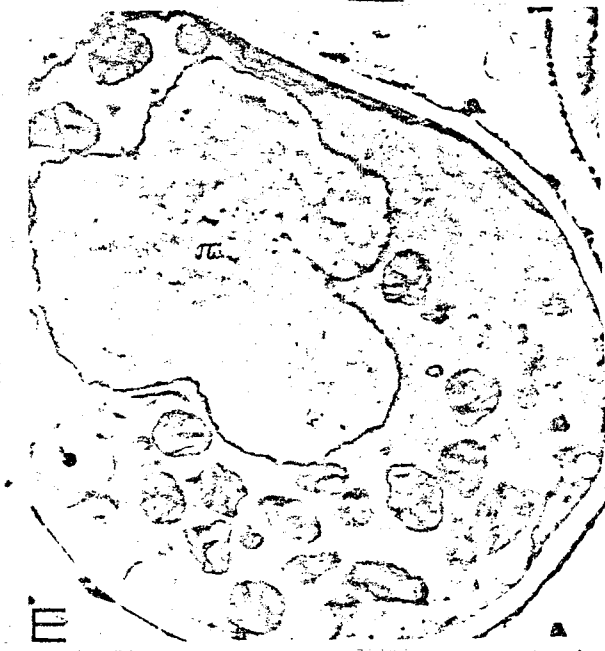
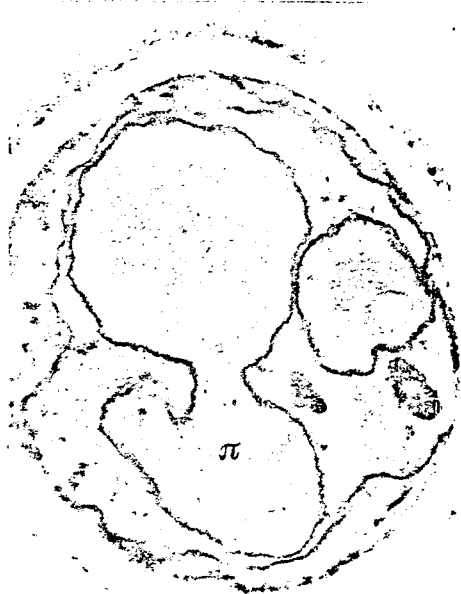
A × 26670 - Β × 14224 - Γ, Δ, Ε × 10668



Εικόνα 34: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με benomyl 1.5μg/ ml. Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην ανώμαλη διεργασία της μίτωσης.

Στις φωτογραφίες Α, Β, Γ, Δ και Ε οι πυρήνες αιτίας της επίδρασης του παρεμποδιστή φαίνεται να μην ακολουθούν τον τυπικό τρόπο μιτωτικής διεργασίας που παρατηρήσαμε στα κύτταρα του μάρτυρα. Αντί της χαρακτηριστικής επιμήκυνσης αναπτύσσουν λοβό με διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα. Αργότερα ακολουθεί σύσφιγξη και απομάκρυνση του λοβού που θα αποτελέσει νέο θυγατρικό πυρήνα (Ζ, Η).

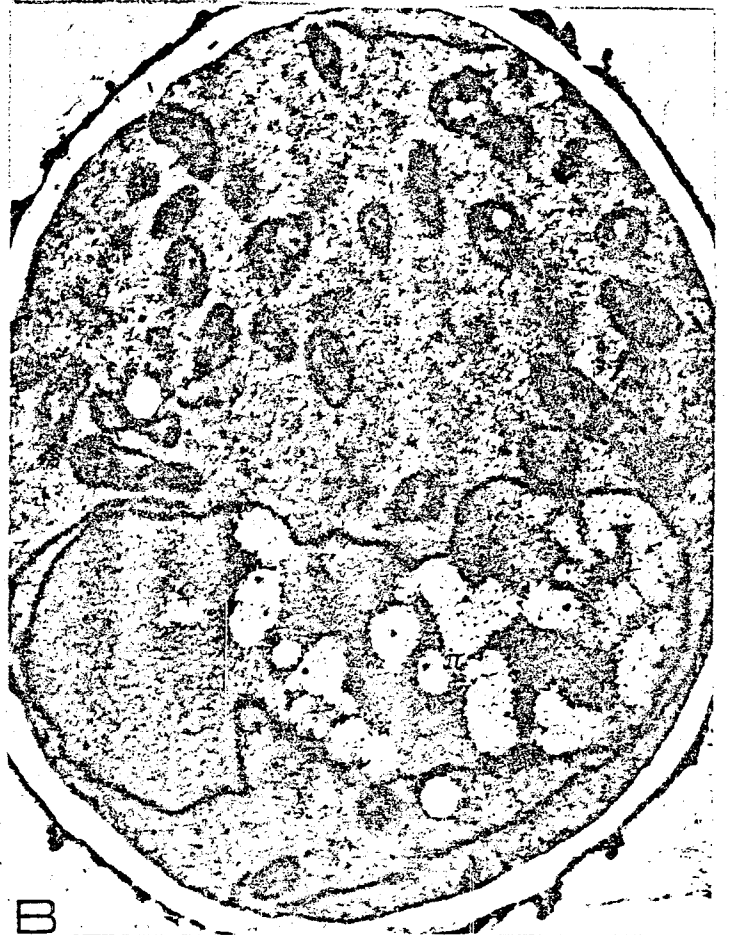
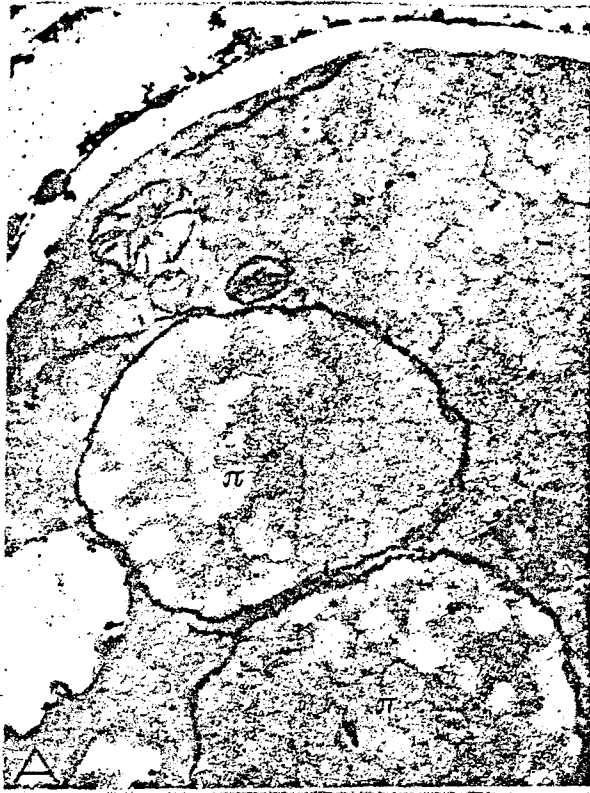
Α, Β, Γ, Ε, Ζ, Η × 10668 - Δ × 17780



Εικόνα 35: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες τομών κονιδίων του μύκητα *A. nidulans* που επώασθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό υλικό με benomyl 1.5μg/ ml. Η φωτογραφία Α αντιστοιχεί στο μάρτυρα και αποτυπώνει δύο νέους θυγατρικούς πυρήνες με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα.

Στις φωτογραφίες Β, Γ και Δ οι πυρήνες (π) βρίσκονται στο στάδιο της μίτωσης. Παρατηρείται επιμήκυνση και σχηματισμός λοβών με διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα. Στην φωτ. Γ ο ήδη επιμηκυσμένος πυρήνας εμφανίζεται παραμορφωμένος, το δε χρωματοσωματικό υλικό κατανέμεται κυρίως στο ένα άκρο του.

Α, Β, Γ × 17780 - Δ × 10668





III.7. Επίδραση των fenarimol και clotrimazole σε καλλιέργειες κυττάρων " Κρικητού του Αργυρόχρους" (*chinese hamster*), *Cricetulus griseus*.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η παρατηρηθείσα στον *A. nidulans* γενετική δραστηριότητα των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs) αλλά και να εκτιμηθεί ο κίνδυνος που συνεπάγεται η χρήση τέτοιων ενώσεων στην καταπολέμηση ιδιαίτερα των μυκητιάσεων σε ανθρώπους και ζώα, μελετήθηκε η επίδραση των μυκητοκτόνων fenarimol και clotrimazole σε κυτταροκαλλιέργειες *C. griseus* (*chinese hamster*).

Τα μυκητοκτόνα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεντρώσεις 1μg/ml και 5μg/ml σε κύτταρα κλώνου V-79 που είχαν απομονωθεί από τους πνεύμονες ενός άρρενος ατόμου *C. griseus*.

Προσθήκη fenarimol ή clotrimazole προκαλεί παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών. Μετά από επτά ημέρες επώαση παρουσία clotrimazole 5μg/ml και fenarimol 5μg/ml δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός αποικιών.

Στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι αναφέρθηκε η χρησιμοποίηση δύο μεθόδων στερέωσης των κυττάρων του θηλαστικού που διακρίνονταν από την έκθεση η μη των κυττάρων σε KCl πριν από τη διαδικασία της στερέωσης και βαφής. Στη μέθοδο χωρίς την επίδραση με KCl, η ισημερινή πλάκα της ατράκτου είναι κάθετη προς τον πυθμένα του τρυβλίου και δεν είναι εύκολη η παρατήρηση των χρωματοσωμάτων, πλην όμως η τεχνική αυτή μας επιτρέπει την παρατήρηση των διαφόρων μιτωτικών φάσεων μέσα στο κύτταρο χωρίς να έχει καταστραφεί η δομή του (εικ. 37). Με την προσθήκη KCl η δομή του κυττάρου καταστρέφεται, τα χρωματοσώματα απλώνονται στην επιφάνεια του τρυβλίου, γεγονός όμως που βελτιώνει την παρατήρηση των επιμέρους χρωματοσωμάτων (εικ. 36).

Στην πρόφαση τα χρωματοσώματα γίνονται ορατά, αφυδατούνται και συσπειρώνονται (εικ. 36A, Γ - 37A). Στη μετάφαση κινούνται και διατάσσονται στο ισημερινό πεδίο (το ισημερινό πεδίο, είναι νοητό επίπεδο κάθετο στο μέσο νοητής γραμμής που ενώνει τους δύο πόλους της ατράκτου). Κάθε χρωματοσώμα είναι διηρημένο σε δύο χρωματίδες (εικ. 36A). Η ανάφαση χαρακτηρίζεται από τέλειο διαχωρισμό των δύο χρωματίδων, που αποτελούν ήδη ανεξάρτητα χρωματοσώματα και από μετακίνηση κάθε μιας σε έναν από τους δύο πόλους (εικ. 36B, - 37A, B). Στη τελόφαση τα θυγατρικά χρωματοσώματα συναθροίζονται στους δύο πόλους και βαθμιαία, ολοκληρούμενης της διαίρεσης του κυττάρου, παύουν να απορροφούν έντονα χρωστική (εικ. 37A, B) και μεταπίπτουν έτσι στη μεσόφαση (εικ. 36Γ).

Τα αποτελέσματα των επιδράσεων των EBIs συνοψίζονται στους πίνακες 8, 9 και ήταν ο μέσος όρος τριών πειραμάτων. Μελετήθηκαν τουλάχιστον χίλια κύτταρα ανά επέμβαση η δε τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη του 3%. Απουσία των παρεμποδιστών περίπου 1% των κυττάρων βρίσκονται σε κάποιο από τα στάδια της μιτωτικής διεργασίας: πρόφαση (πρ) - μετάφαση (μετ) - ανάφαση (αν) - τελόφαση (τελ) (εικ. 36Α, Β, Γ- 37Α, Β). Η παρουσία των μυκητοκτόνων fenarimol και clotrimazole προκαλεί μεταβολές στα παραπάνω στάδια της μιτωτικής διεργασίας. Μετά από επώαση για 24 ώρες παρουσία μικρών συγκεντρώσεων των μυκητοκτόνων, που προκαλούν μόνο 10% περίπου παρεμπόδιση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παρατηρήθηκε δεκαπλάσια περίπου αύξηση στη συχνότητα των κυττάρων που υφίστανται διαίρεση (mitotic - index) (πιν. 8,9). Όσον αφορά τις επί μέρους φάσεις, έχουμε κυρίως αύξηση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε μετάφαση και κατά δεύτερο λόγο σε ανάφαση και τελόφαση. Πέραν όμως της αύξησης του μιτωτικού δείκτη (mitotic - index) το fenarimol και το clotrimazole έχουν δυσμενείς επιδράσεις στη μορφολογία και στη διάταξη των χρωματοσωμάτων. Απουσία ΚCl τα χρωματοσώματα φαίνονται συνδεδεμένα μεταξύ τους και σχηματίζουν κυκλικά σχήματα (εικ. 38Α, Β, Γ - 39Α, Β). Στις ανώμαλες αναφάσεις και τελοφάσεις, το χρωματοσωματικό υλικό διαχωρίζεται σε περισσότερες από δύο μάζες (πολυπολικές αναφάσεις) (εικ. 38Γ - 39Γ, Δ, Ε, Ζ, Η, Θ, Ι) που αποτελούν τελικά τους νέους θυγατρικούς "πυρήνες" (εικ. 39Η). Παρουσία ΚCl, και στο στάδιο της μετάφασης τα χρωματοσώματα φαίνονται συγκολλημένα να σχηματίζουν συμπλέγματα που απέχουν σημαντικά από την τυπική διάταξη των χρωματοσωμάτων που παρατηρήθηκαν στον μάρτυρα (εικ. 40Α, Β, Γ, Δ, Ε).

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΟΥ	(%) ΜΕΣΟΦΑΣΗ	(%) ΠΡΟΦΑΣΗ	ΜΕΤΑΦΑΣΗ ΑΝΩΜΑΛΗ ΟΜΑΛΗ	ΑΝΑΦΑΣΗ ΑΝΩΜΑΛΗ ΟΜΑΛΗ	ΤΕΛΟΦΑΣΗ ΑΝΩΜΑΛΗ ΟΜΑΛΗ	ΣΥΝΟΛΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΙΑΙΡΕΣΗ (%)	ΜΙΤΟΤΙ ΙΝΔΕΞ
Μάρτυρας	98.4	0.33	0	0	0	1.59	
Fenarimol 1μg/ml	87.08	0.11	3.93	0.92	1.72	12.79	8.04
Fenarimol 5μg/ml	87.15	0	3.51	1.25	1.71	12.84	8.07
Clotrimazole 1μg/ml	87.55	0	4.24	0.98	1.74	12.44	7.82
Clotrimazole 5μg/ml	86.73	0	4.9	0.98	1.4	13.26	8.33

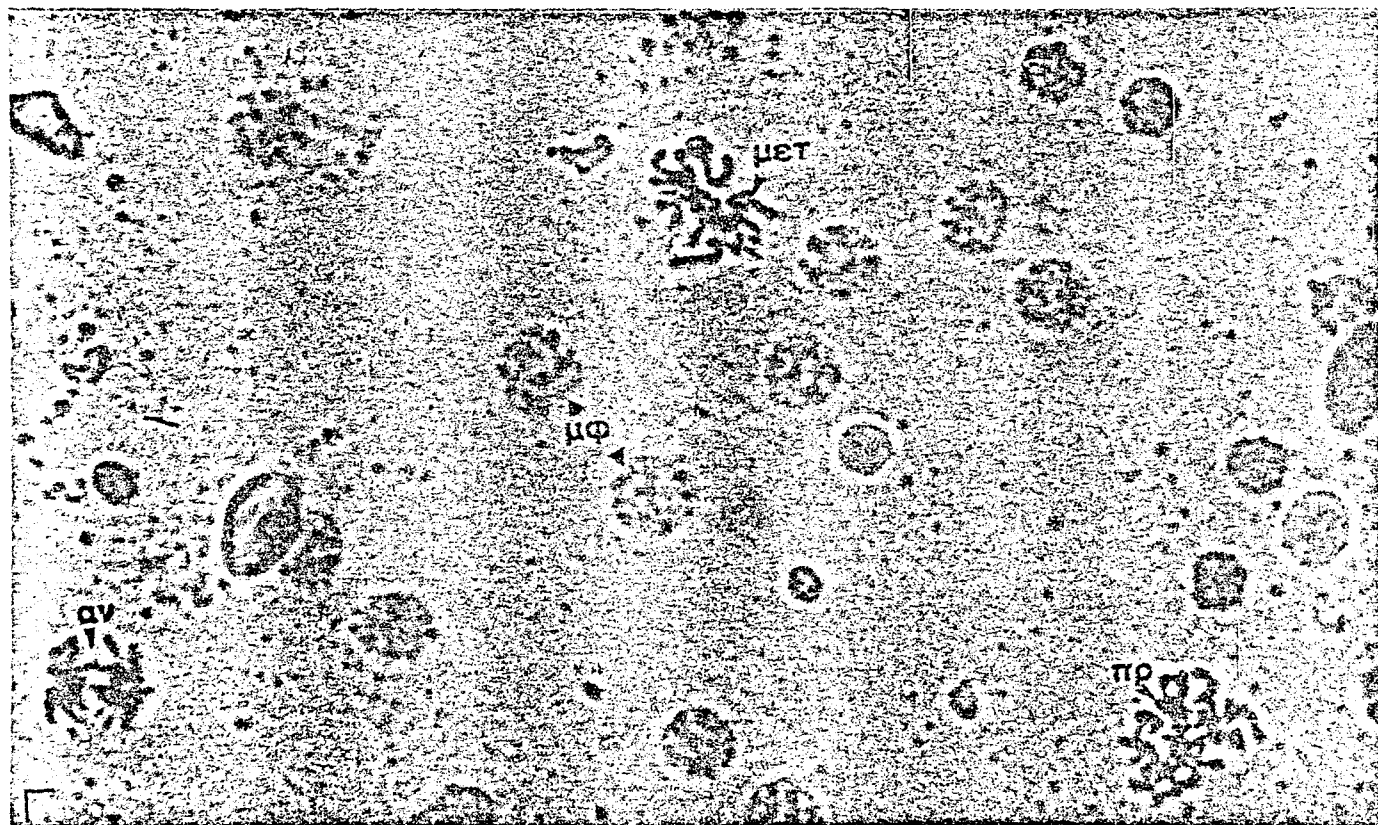
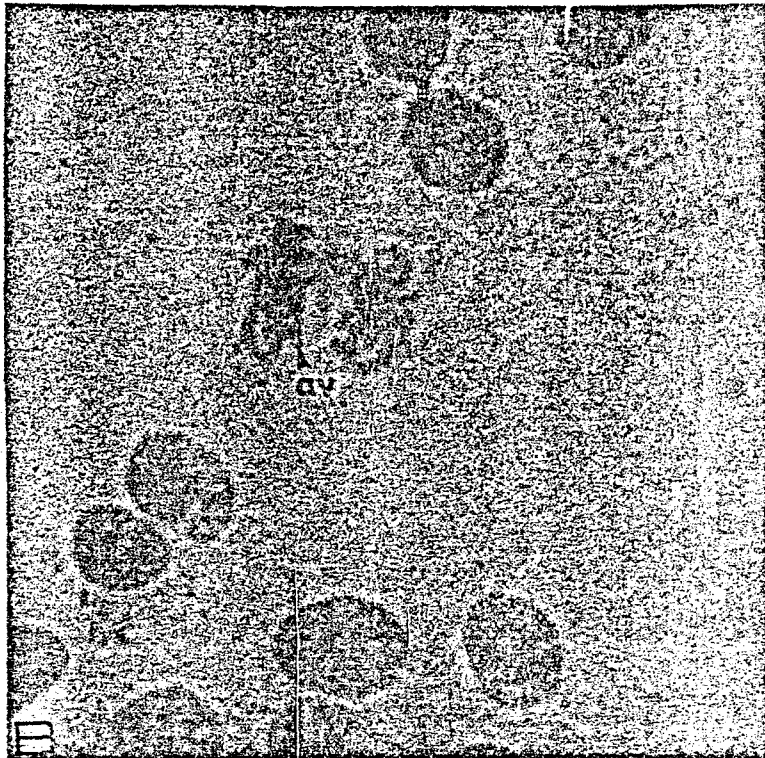
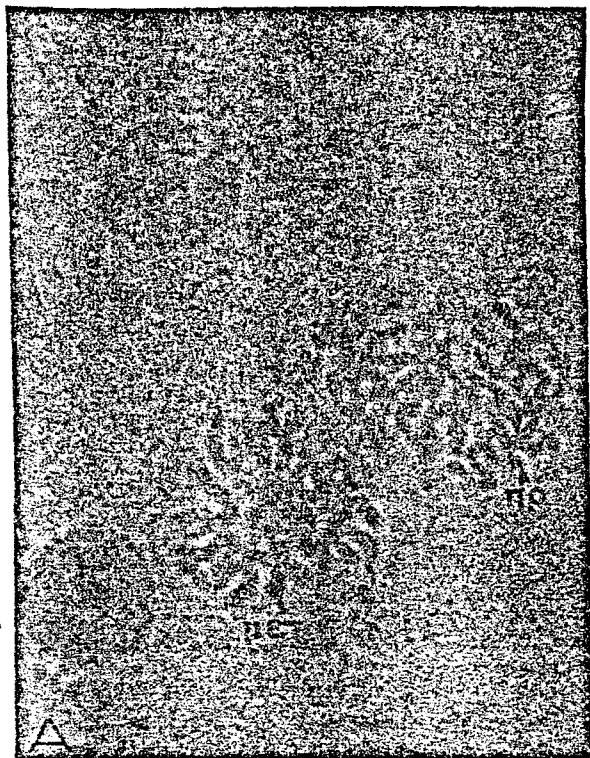
ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Επίδραση των fenarimol, clotrimazole στο ποσοστό εμφάνισης των σταδίων της μιτωτικής διεργασίας (τα κύτταρα επώδωθηκαν με KCl)

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΟΥ	(%) ΜΕΣΟΦΑΣΗ	(%) ΠΡΟΦΑΣΗ	ΜΕΤΑΦΑΣΗ ΑΝΩΜΑΛΗ ΟΜΑΛΗ	ΑΝΑΦΑΣΗ ΑΝΩΜΑΛΗ ΟΜΑΛΗ	ΤΕΛΟΦΑΣΗ ΑΝΩΜΑΛΗ ΟΜΑΛΗ	ΣΥΝΟΛΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΙΑΙΡΕΣΗ (%)	ΜΙΤΟΤΙ ΙΝΔΕΞ
Μάρτυρας	99.2	0	0	0	0	0.79	
Fenarimol 1μg/ml	91.68	0	3.48	0.36	0.55	8.31	10.5
Fenarimol 5μg/ml	91.22	0	3.34	0.18	0.76	8.77	11.1
Clotrimazole 1μg/ml	90.96	0	3.46	0.24	0.55	9.03	11.4
Clotrimazole 5μg/ml	91.19	0	3.78	0	0.25	8.80	11.1

Εικόνα 36: Καλλιέργειες κυττάρων *C. griseus* (chinese hamster), που επώασθησαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς παρεμποδιστή. Η τεχνική στερέωσης περιελάμβανε τη χρησιμοποίηση KCl

Παρατηρούνται πυρήνες στα στάδια της μεσόφασης (μφ), πρόφασης (πρ), μετάφασης (μετ); ανάφασης (αν) και τελόφασης (τελ). Στην πρόφαση τα χρωματοσώματα γίνονται ορατά, αφυδατούνται και συσπειρώνονται. Στη μετάφαση κινούνται και διατάσσονται στο ισημερινό πεδίο. Στην ανάφαση πραγματοποιείται διαχωρισμός των δύο χρωματίδων, που ήδη αποτελούν ανεξάρτητα χρωματοσώματα, και μετακίνηση κάθε μιας στον ένα από τους δύο πόλους.

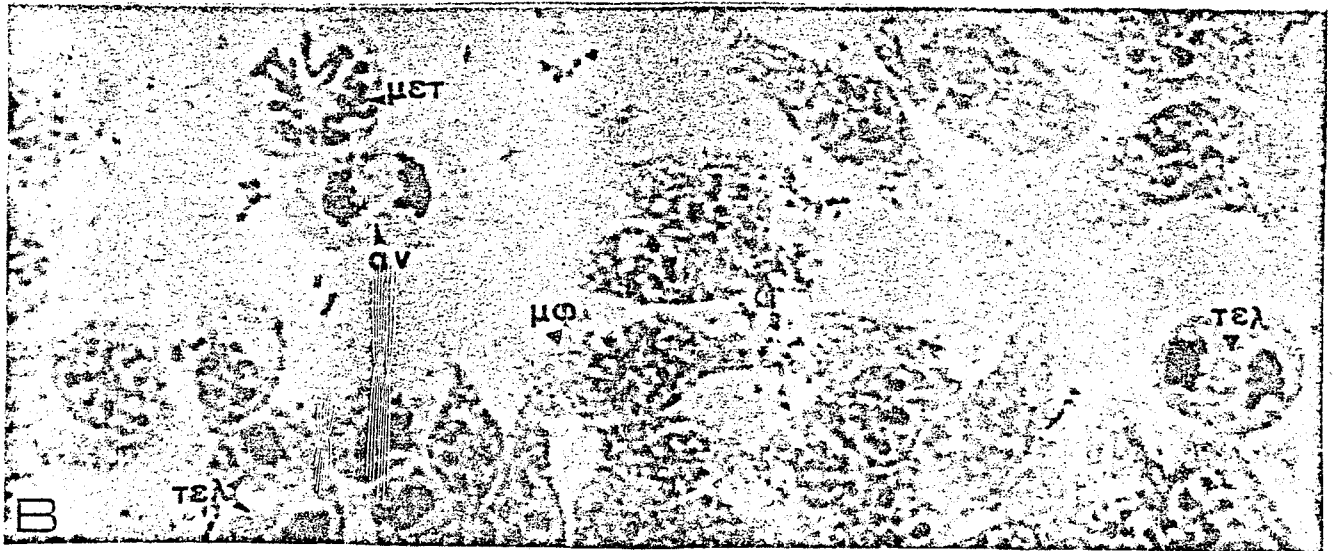
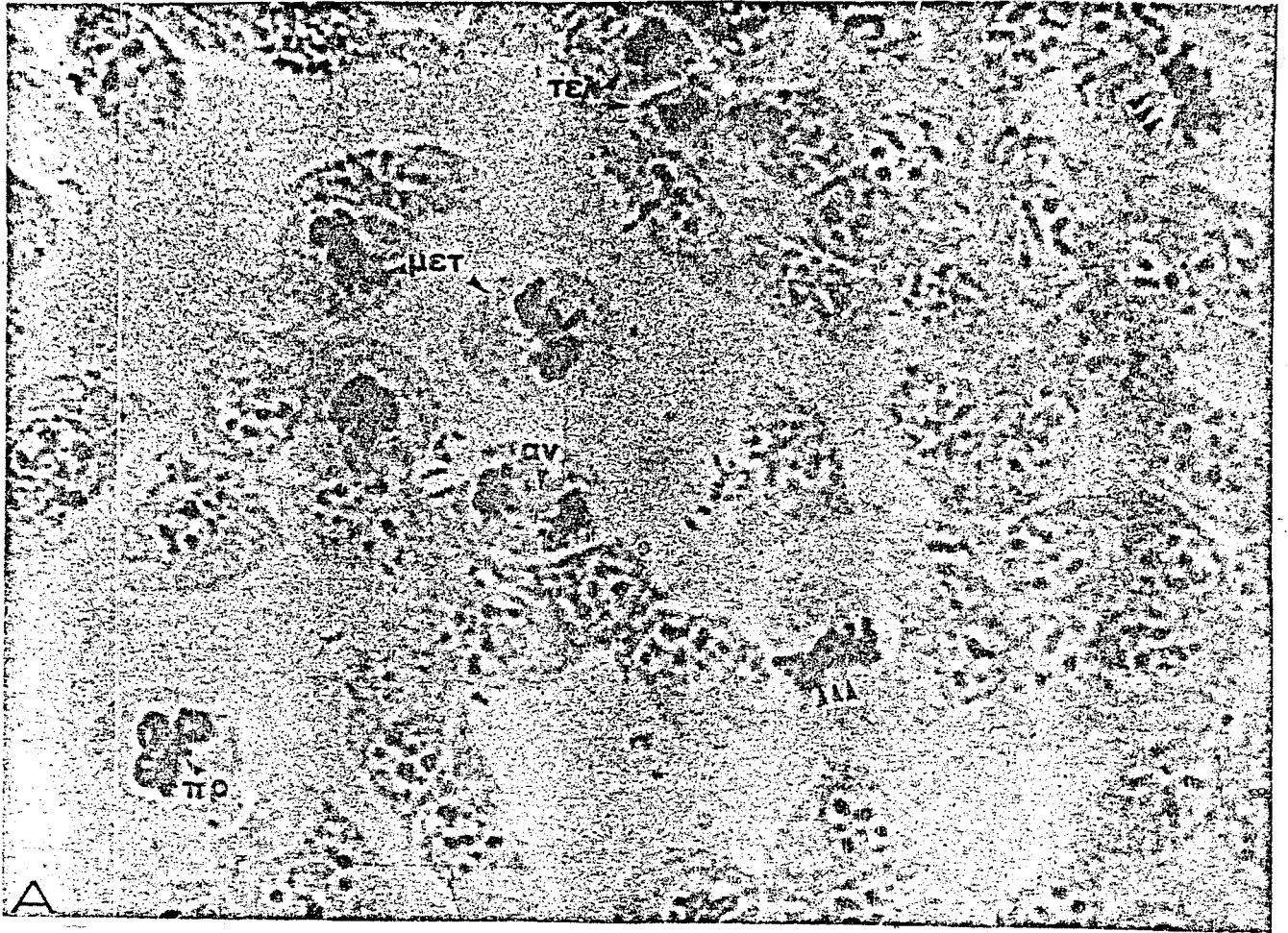
Όλες οι φωτογραφίες x2112



Εικόνα 37: Καλλιέργεια κυττάρων *C. griseus* (chinese hamster), που επώασθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς παρεμποδιστή. Η τεχνική στερέωσης δεν περιελάμβανε τη χρησιμοποίηση KCl.

Στις φωτογραφίες Α και Β παρατηρούνται τα στάδια μιτωτικής διεργασίας: πρόφαση (πρ) - μετάφαση (μετ) - ανάφαση (αν) και τελόφαση (τελ). Απουσία KCl δίνεται η δυνατότητα παρατήρησης των μιτώσεων με άθικτη την κυτταροπλασματική μεμβράνη, η δε ισημερινή πλάκα της ατράκτου διατάσσεται κάθετα προς τον πυθμένα του τρυβλίου (μαύρα βέλη).

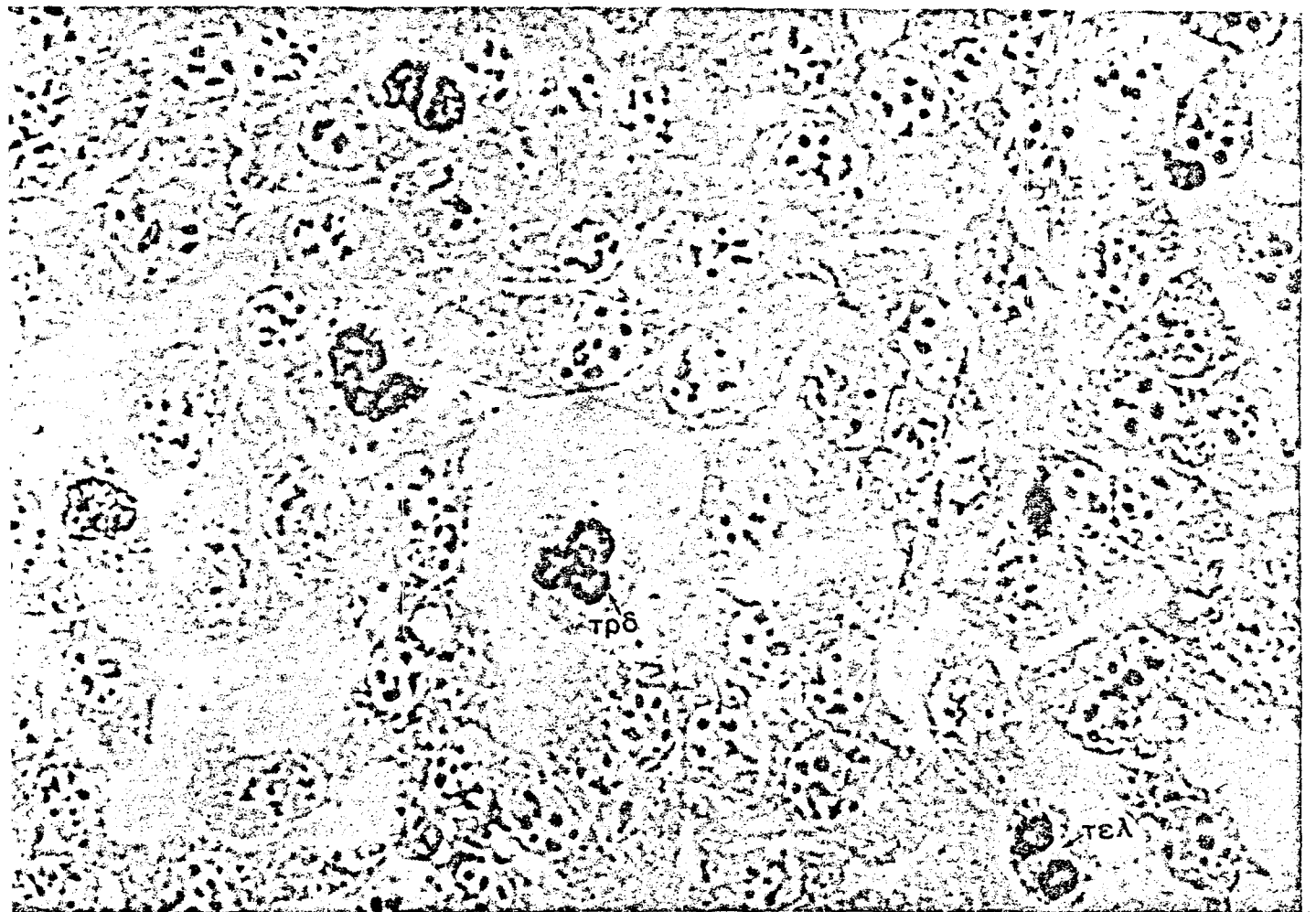
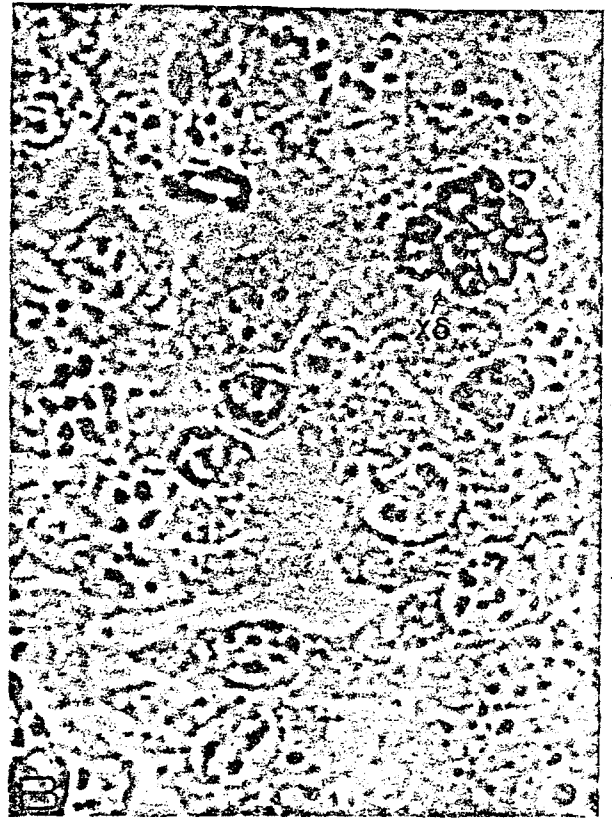
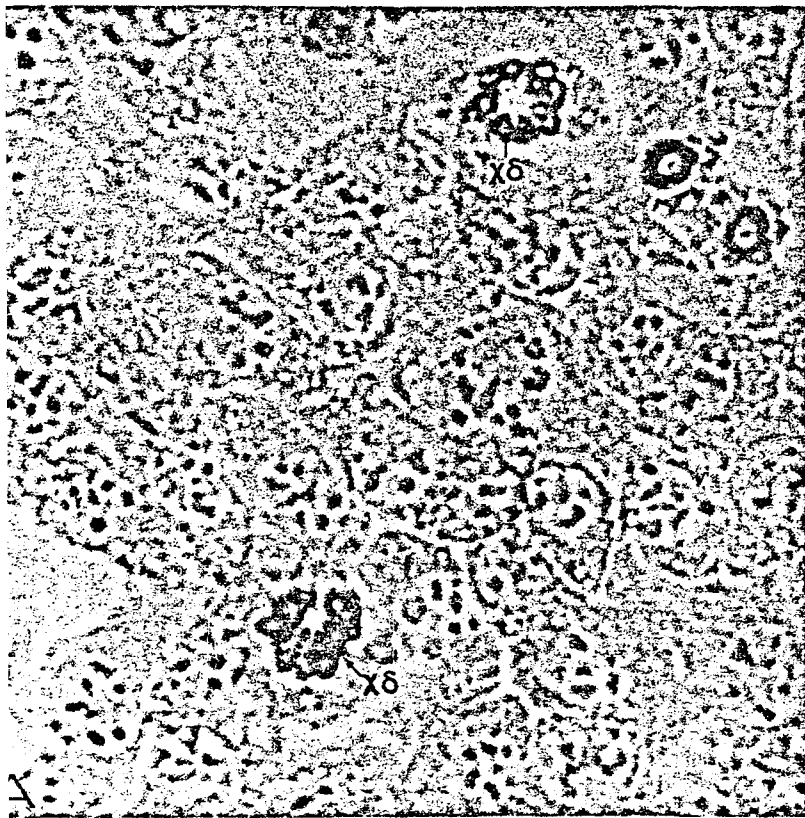
Φωτογραφίες × 2112



Εικόνα 38: Καλλιέργειες κυτάρων *C. griseus* (chinese hamster), που επωάσθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε fenarimol 1mg/ ml (A,B) ή clotrimazole 1μg/ ml (Γ). Η τεχνική στερέωσης δεν περιελάμβανε τη χρησιμοποίηση KCl.

Παρατηρούνται ανώμαλες μεταφάσεις (χδ), αναφάσεις (τρδ) και τελοφάσεις (τελ) εξ' αιτίας της δράσης των παρεμποδιστών. Στις ανώμαλες μεταφάσεις τα χρωματοσώματα είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους και σε πολλές περιπτώσεις σχηματίζουν κυκλικά σχήματα (Α). Στις αναφάσεις συχνά παρατηρούνται πολυπολικοί διαχωρισμοί των χρωματοσωμάτων (τριπολική ανάφαση, φωτ. Γ) που θα οδηγήσουν τελικά στο σχηματισμό νέων θυγατρικών πυρήνων (χδ: χρωματοσωματικοί δακτύλιοι σε ανώμαλη μετάφαση, τρδ: τριπολική διαίρεση σε ανώμαλη ανάφαση).

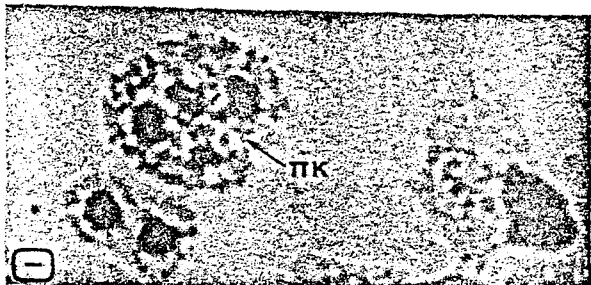
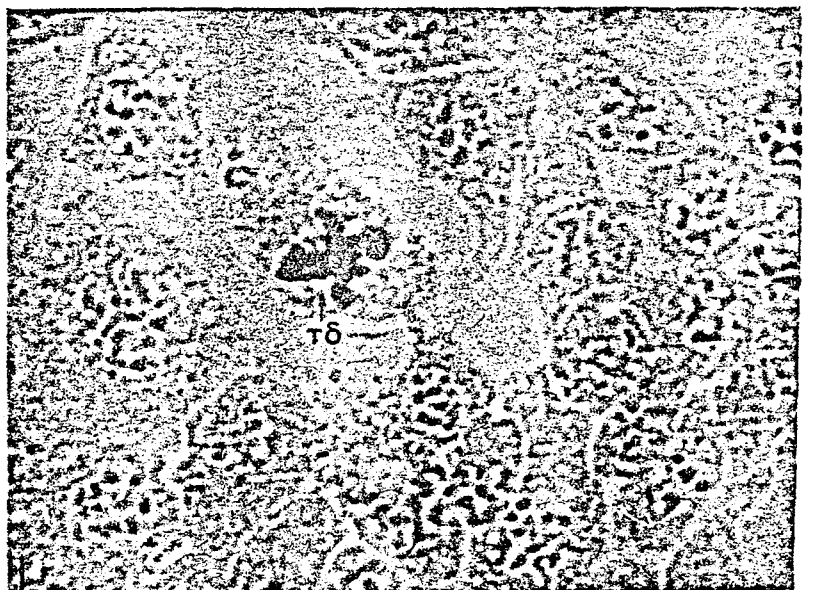
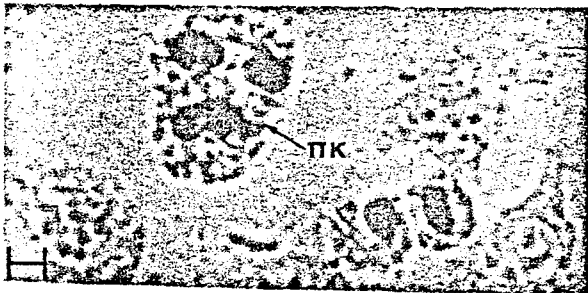
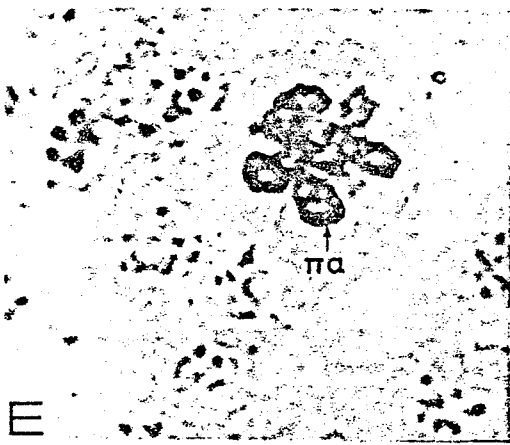
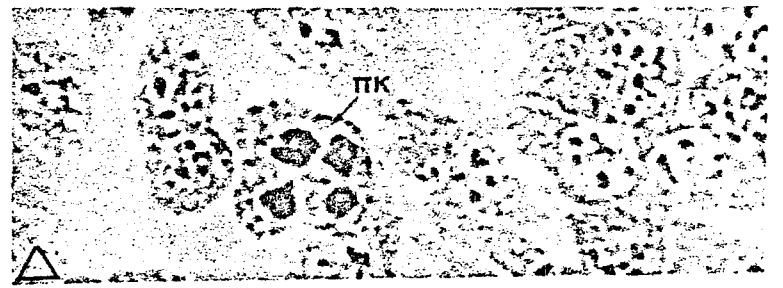
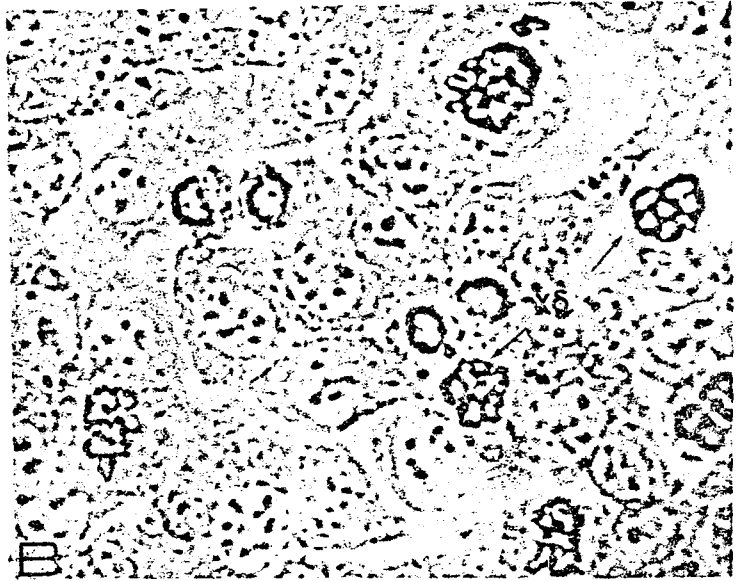
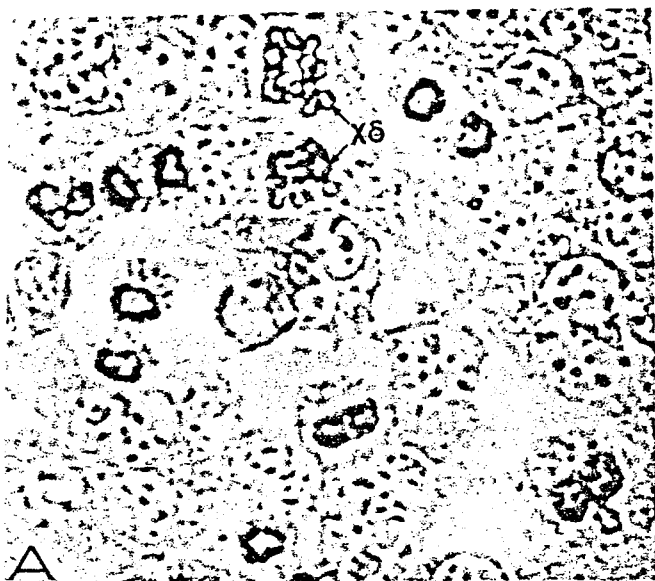
Όλες οι φωτογραφίες x 2112



Εικόνα 39: Καλλιέργειες κυττάρων *C. griseus* (chinese hamster), που επώασθησαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε fenarimol 1mg/ ml (Α,Γ), fenarimol 5μg/ ml (Ε, Θ, Ι), clotrimazole 1μg/ ml (Β, Δ) και clotrimazole 5μg/ ml (Γ, Ζ, Η). Η τεχνική στερέωσης δεν περιελάμβανε τη χρησιμοποίηση ΚCl.

Παρατηρούνται ανώμαλες μεταφάσεις (χδ), αναφάσεις (τδ, πα) και τελοφάσεις (πκ). Σε αρκετές περιπτώσεις στις αναφάσεις το χρωματοσωματικό υλικό διαχωρίζεται σε περισσότερες από δύο ομάδες (πολυπολικές αναφάσεις - φωτ. Ε, Ι) που αποτελούν τους νέους θυγατρικούς πυρήνες (Δ, Ζ, Η, Θ) (χδ: χρωματοσωματικοί δακτύλιοι σε ανώμαλη μετάφαση, τδ: τετραπολική διαίρεση σε ανώμαλη ανάφαση, πκ: πυρηνικά κομμάτια, πα: πολυπολική ανάφαση).

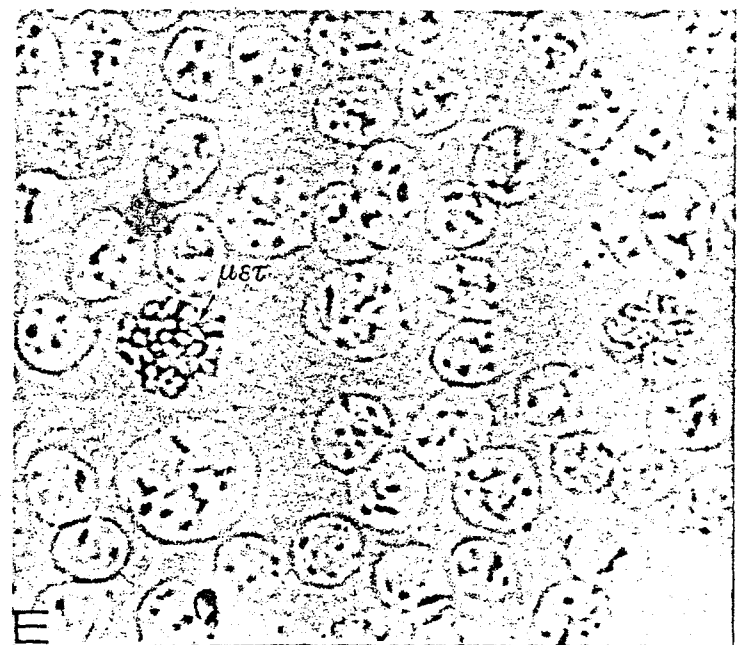
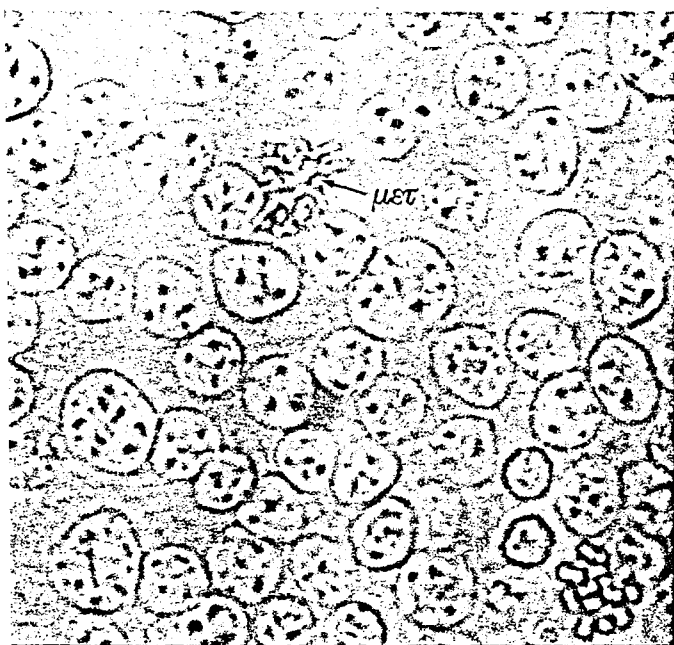
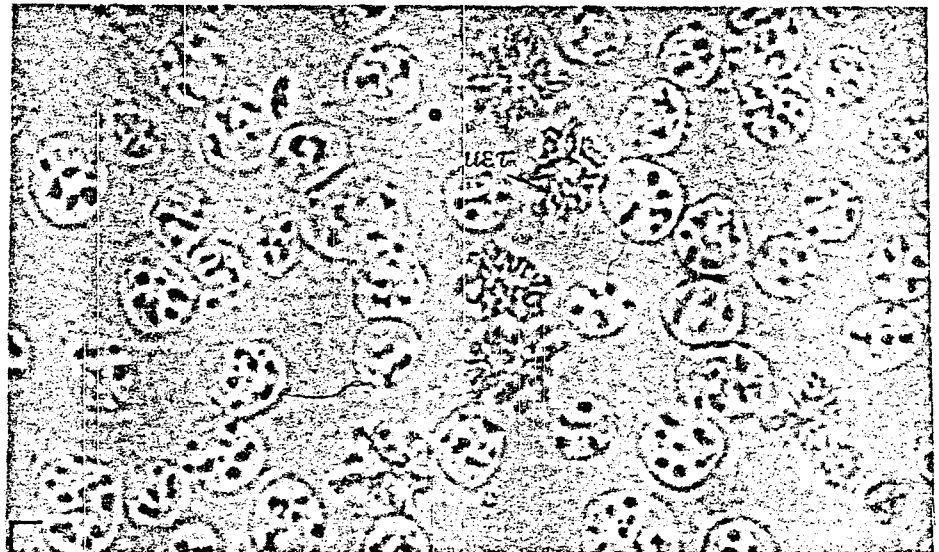
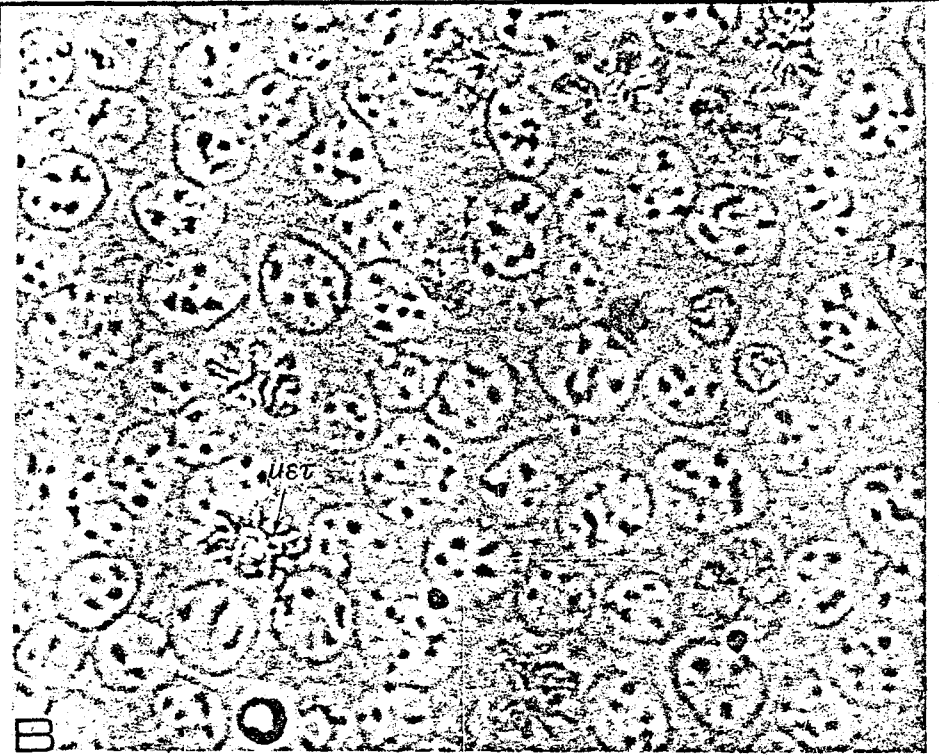
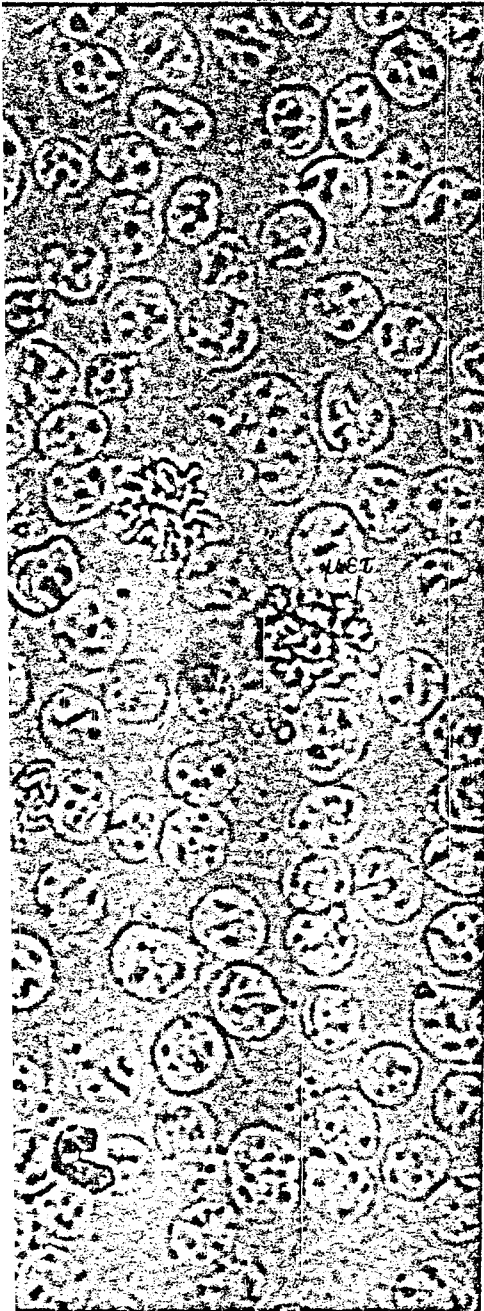
Όλες οι φωτογραφίες x2112



Εικόνα 40: Καλλιέργειες κυττάρων *C. griseus* (chinese hamster), που επώασθησαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε fenarimol 1mg/ ml (A), fenarimol 5μg/ ml (B, Γ), clotrimazole 1μg/ ml (φωτ.Δ) και clotrimazole 5μg/ ml (E). Η τεχνική στερέωσης περιελάμβανε τη χρησιμοποίηση KCl.

Σε όλες τις φωτογραφίες παρατηρούνται ανώμαλες μεταφάσεις (μετ). Τα χρωματοσώματα είναι συγκολλημένα και σχηματίζουν συμπλέγματα που απέχουν σημαντικά από τη τυπική διάταξη των χρωματοσωμάτων, στο συγκεκριμένο στάδιο της μίτωσης, που αναφέραμε στα κύτταρα του μάρτυρα.

Όλες οι φωτογραφίες × 2112





IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Από την κατηγορία των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης τα μυκητοκτόνα που μελετήθηκαν, επιλέγησαν με κριτήριο τη σημασία τους στην καθημερινή πράξη και την ευρεία χρήση τους.

Το fenarimol και το clotrimazole παρεμποδίζουν αποτελεσματικά τη βλάστηση των κονιδίων και το σχηματισμό αποικιών του *A. nidulans*. Οπωσδήποτε όμως απαιτείται διπλάσια περίπου συγκέντρωση για 50% παρεμπόδιση της βλάστησης των κονιδίων από ότι για αντίστοιχη παρεμπόδιση της εμφάνισης αποικιών. Στην περίπτωση του μύκητα *P. italicum* έχει αναφερθεί επίσης ότι η παρεμπόδιση της βλάστησης των κονιδίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μυκητοκτόνων imazalil και etaconazole (110, 327). Γενικά τα αποτελέσματα ερευνητικών εργασιών που κατά καιρούς έχουν δημοσιευθεί, δείχνουν ότι οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης ασκούν πολυ μικρή επίδραση στη βλάστηση των κονιδίων (332). Συγκεντρώσεις που είναι θανατηφόρες ή παρεμποδίζουν ισχυρά τη μυκηλιακή ανάπτυξη, συνήθως δεν παρεμποδίζουν τη βλάστηση (57, 190). Τέτοιου είδους φαινόμενα μπορούν να αποδοθούν στην ύπαρξη αποθεμάτων εργοστερόλης στα κονίδια, που μετά τη δράση του μυκητοκτόνου και μέχρι να ολοκληρωθεί η εξαντλήσή τους, είναι αρκετά για να επιτρέψουν τη βλάστηση αλλά όχι όμως και τη σημαντική ανάπτυξη των βλαστικών υφών (332).

Στην παρούσα διατριβή τα fenarimol και clotrimazole μελετήθηκαν και σε συγκεντρώσεις που επηρεάζουν ελάχιστα τη βλάστηση των κονιδίων και επομένως οποιουδήποτε είδους επίδραση στη μορφολογία, τη λεπτή δομή του κυττάρου και την κυτταρική διαίρεση πρέπει να οφείλεται στην πρωταρχική δράση αυτών των ενώσεων, στο μηχανισμό βιοσύνθεσης εργοστερόλης.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων που στόχευαν στη διερεύνηση της γενετικής δραστηριότητας του fenarimol και του clotrimazole, προκύπτει ότι οι δύο ενώσεις προκαλούν αύξηση της συχνότητας των μιτωτικών ανασυνδυασμών, στο διπλοειδές στέλεχος H.A. του *A. nidulans*. Για να διαπιστωθεί όμως σαφής γενετική δραστηριότητα, πρέπει να χρησιμοποιηθούν συγκεντρώσεις που παρεμποδίζουν πάνω από 90% τη δημιουργία αποικιών του μύκητα. Προφανώς, η παρεμβολή στη μιτωτική διεργασία δεν φαίνεται να είναι η πρωταρχική δράση αυτών των μυκητοκτόνων. Στην περίπτωση όμως του benomyl που η μυκητοτοξική του δράση οφείλεται αποδεδειγμένα στην παρεμπόδιση της μίτωσης, αφού το μυκητοκτόνο αναστέλλει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων της πυρηνικής ατράκτου, έχουμε αύξηση της συχνότητας των μιτωτικών ανασυνδυασμών ακόμα και σε συγκεντρώσεις που προκαλούν μικρή μυκητοτοξικότητα (135, 179).

Από την ανάλυση των προϊόντων μιτωτικής διάσχισης προκύπτει ότι το fenarimol και το clotrimazole αυξάνουν τόσο τα απλοειδή όσο και τα διπλοειδή προϊόντα μιτωτικού ανασυνδυασμού. Τα διπλοειδή όμως δεν προέρχονται από

αύξηση των μιτωτικών διασκελισμών (mitotic crossing-over) που προκαλούν ανασυνδυασμούς ανάμεσα σε γόνους, που βρίσκονται στο ίδιο χρωματόσωμα. Τα περισσότερα διπλοειδή προϊόντα μιτωτικού διαχωρισμού, έχουν ανασυνδυασμούς μόνο ανάμεσα σε γόνους, που βρίσκονται σε διαφορετικά χρωματοσώματα. Μέχρι τώρα γινόταν παραδεκτό ότι για το σχηματισμό τέτοιων διπλοειδών ανασυνδυασμών, αλλά και απλοειδών από διπλοειδή στελέχη υπεύθυνος είναι ο μηχανισμός του μη αποχωρισμού των χρωματίδων (non - disjunction) (135). Χωρίς να μπορεί να αποκλεισθεί ότι και τα μυκητοκτόνα fenarimol και clotrimazole αυξάνουν τη συχνότητα του μη αποχωρισμού, η παρούσα εργασία παρέχει σαφείς ενδείξεις ότι απλοειδισμός και σχηματισμός χρωματοσωματικών διπλοειδών ανασυνδυασμών (chromosomal diploid recombinants) μπορεί να προκληθούν με μια τελείως άτυπη διαίρεση του πυρήνα των σωματικών κυττάρων σε δύο ανόμοια και άνισα μέρη με το σχηματισμό διαχωριστικής μεμβράνης (εικ. 27Δ, Ε).

Η γενετική δραστηριότητα των δύο παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης επιβεβαιώθηκε στο επίπεδο της οπτικής μικροσκοπίας. Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκαν τα τυπικά στάδια της μιτωτικής διεργασίας παρουσία των μυκητοκτόνων fenarimol και clotrimazole. Η εμφάνιση πολυάριθμων πυρήνων με διαφορετική πυκνότητα και ποσότητα χρωματοσωματικού υλικού, υποστηρίζει την άποψη ότι οι παρεμποδιστές προκαλούν τη δημιουργία ανευπλοειδών πυρήνων από τους οποίους μπορεί στη συνέχεια να παραχθούν απλοειδείς ή διπλοειδείς με νέους συνδυασμούς γόνων. Ανάλογες ερευνητικές εργασίες με το βενζιμιδαζολικό benomyl, που αποδεδειγμένα προκαλεί μη αποχωρισμό των χρωματίδων (non - disjunction), έδειξαν επίσης την παρουσία πυρήνων με διαφορετική πυκνότητα χρωματίνης (83).

Ιταλοί ερευνητές υπέθεσαν ότι κατά πάσα πιθανότητα η γενετική δραστηριότητα των EBIs είναι αποτέλεσμα επίδρασης στην οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου κατά έμμεσο τρόπο, λόγω εκτεταμένης βλάβης στην πυρηνική μεμβράνη (23). Στους ασκομύκητες η πυρηνική μεμβράνη παραμένει άθικτη κατά τη διάρκεια της μίτωσης, τα δε πολικά σωματίδια (κεντροσώματα) κινούνται πάνω σ' αυτήν προκειμένου να καταλάβουν αντιδιαμετρικές θέσεις για να οργανώσουν την άτρακτο (1, 249, 298). Η ακεραιότητα της πυρηνικής μεμβράνης πρέπει να είναι ζωτικής σημασίας για τον προσανατολισμό των πολικών σωματίων. Κατά συνέπεια, η παρεμπόδιση στη βιοσύνθεση εργοστερόλης θα μπορούσε να προκαλεί βλάβες στην πυρηνική μεμβράνη που οδηγούν σε ανωμαλίες στην οργάνωση της ατράκτου και την κατανομή των θυγατρικών χρωματοσωμάτων (247). Η παραπάνω διατυπωθείσα υπόθεση φαίνεται όμως να μην υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, γιατί : α) Οι συγκεντρώσεις fenarimol και clotrimazole που παρεμποδίζουν σημαντικό αριθμό κονιδίων να σχηματίσουν αποικίες, προφανώς εξ' αιτίας της παρεμπόδισης βιοσύνθεσης εργοστερόλης, ουσιαστικά δεν αυξάνουν τους

μιτωτικούς ανασυνδυασμούς. β) Οι συγκεντρώσεις των fenarimol ή clotrimazole που αυξάνουν σημαντικά τον αριθμό των προϊόντων μιτωτικού διαχωρισμού, δεν φαίνεται να προκαλούν ζημιά στην πυρηνική μεμβράνη, στο υπομικροσκοπικό τουλάχιστον επίπεδο. γ) Η μίτωση επηρεάζεται από τα fenarimol και clotrimazole και σε κύτταρα θηλαστικών στα οποία η πυρηνική μεμβράνη εξαφανίζεται πριν από την έναρξη της μιτωτικής διεργασίας.

Οπωσδήποτε τα δεδομένα της γενετικής ανάλυσης φανερώνουν ότι τα δύο μυκητοκτόνα επηρεάζουν κάποια πυρηνική λειτουργία που έχει σχέση με την οργάνωση ή τη λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου. Το benomyl για παράδειγμα, που επίσης προκαλεί την εμφάνιση απλοειδισμού και σχηματισμό χρωματοσωμικών διπλοειδών ανασυνδυασμών, εμποδίζει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου (135, 179). Οι παρατηρήσεις μας στο επίπεδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας επιβεβαίωσαν ότι παρουσία του fenarimol ή του clotrimazole, η διαίρεση του πυρήνα του *A. nidulans* παρεκκλίνει του τυπικού για τους ασκομύκητες τρόπου (1, 298). Αντί της χαρακτηριστικής επιμήκυνσης της πυρηνικής μεμβράνης και της σύσφιγξης στο μέσον, αναπτύσσεται απο κάποιο σημείο της μεμβράνης του πυρήνα, μια διπλή διαχωριστική μεμβράνη, που προχωρεί μέχρις ότου χωρίσει τον πυρήνα σε δύο άνισα και ανόμοια μέρη. Η άνιση ηλεκτρονική πυκνότητα των θυγατρικών πυρήνων που προκύπτουν φανερώνει ότι προηγήθηκε τυχαία κατανομή του χρωματοσωματικού υλικού. Δηλαδή έχουμε δημιουργία ασταθών ανευπλοειδών πυρήνων που με βαθμιαία απώλεια χρωματοσωμάτων καταλήγουν στην εμφάνιση νέων απλοειδών και διπλοειδών μιτωτικών ανασυνδυασμών.

Είναι γνωστό, από πρόσφατες σχετικά δημοσιεύσεις, ότι οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης δεν έχουν εξειδικευμένη δράση μόνο στους μύκητες αλλά επηρεάζουν και ανώτερα φυτά και θηλαστικά (60, 62, 65, 140, 165, 277, 357). Στη βιοσύνθεση στερολών στα ανώτερα φυτά και στα θηλαστικά έχουμε ενζυμικά στάδια παρόμοια με εκείνα των μυκήτων με ένζυμα ίσως σε διαφορετικές μορφές (ισοένζυμα) από εκείνες που υπάρχουν στους μύκητες και στις ζύμες (31, 42, 202, 241, 284): Κατά συνέπεια η παρατηρούμενη τοξικότητα σε κυτταροκαλλιέργεια *C. griseus* (chinese hamster), φαίνεται να είναι αναμενόμενη. Αναμενόμενη όμως δεν ήταν ή σημαντική αύξηση του ποσοστού κυττάρων που βρίσκονται σε μίτωση (mitotic - index) όπως και οι έντονες χρωματοσωματικές ανωμαλίες στα στάδια της πυρηνικής διαίρεσης. Η αύξηση του μιτωτικού δείκτη (mitotic - index) είναι αποτέλεσμα του αυξημένου ποσοστού μεταφάσεων. Τόσο στις μεταφάσεις όσο και στις αναφάσεις, το χρωματοσωματικό υλικό εμφανίζεται διάφορο απ' ότι στο μάρτυρα. Στη μετάφαση τα χρωματοσώματα είναι κολλημένα και σχηματίζουν συμπαγείς μάζες, οι δε αναφάσεις είναι συχνά τριπολικές και τετραπολικές. Το πιπεραζινικό μυκητοκτόνο triforine, σε κύτταρα κρεμμυδιού, έχει αναφερθεί να προκαλεί την εμφάνιση παρόμοιων συγκολλημένων

χρωματοσωμάτων στη μετάφαση (76, 285). Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι οι στερόλες έχουν δύο τελικά ρόλους στη λειτουργία του κυττάρου. α) Το ρόλο τους σαν βασικά δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, που προϋποθέτει τη συμμετοχή τους σε μεγάλες ποσότητες και β) το ρυθμιστικό ή ορμονικό που διαπιστώθηκε τα τελευταία χρόνια (149, 150, 266) και κατά τον οποίο απαιτούνται μικρές ποσότητες σε επίπεδα ορμονών ή βιταμινών. Για το ρόλο τους αυτό λίγα είναι γνωστά σήμερα. Φαίνεται ότι οι στερόλες πρέπει να πληρούν ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά όπως η παρουσία αλκυλίου στη θέση C-24, στην περίπτωση φυτών (63) και ζυμομυκήτων (298), για να παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αλλά και η βιοσύνθεση χοληστερόλης φαίνεται να είναι απαραίτητη για την κυτταρική διαίρεση στα θηλαστικά (63). Μελέτες με μεταλλαγμένα στελέχη του ζακχαρομύκητα *S. cerevisiae* φανερώνουν ότι η παρεμβολή των EBIs στο ρυθμιστικό ρόλο των στερολών πρέπει να αναμένεται με συγκεντρώσεις που προκαλούν μεγάλη τοξικότητα (299). Η απουσία πολικών σωματίων στους πυρήνες μυκηλίου του *A. nidulans* που υπέστησαν την επίδραση υψηλής συγκέντρωσης fenarimol ή clotrimazole φαίνεται να υποστηρίζει την άποψη ότι οι EBIs παρεμβάλλονται στον πολλαπλασιασμό και το σχηματισμό των πολικών σωματίων. Πιθανόν ο ρυθμιστικός ρόλος εργοστερόλης ή κάποιου μεταβολίτη της να συνδέεται με την οργάνωση και λειτουργία των πολικών σωματίων. Κατά ανάλογο τρόπο και στην περίπτωση του *C. griseus*, η παρεμπόδιση βιοσύνθεσης χοληστερόλης ή άλλης στερόλης, ή μεταβολίτη αυτής, πιθανόν να οδηγεί σε προβλήματα στο σχηματισμό των κεντροσωματίων και κατά συνέπεια στην οργάνωση και λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου. Την άποψη αυτή στηρίζει η διαπιστωθείσα κατά την εργασία μας παρουσία πολυπολικών αναφάσεων (εικ. 39E, I). Τα κεντροσωμάτια στη διάρκεια της μίτωσης τείνουν να καταλάβουν αντιδιαμετρικές θέσεις για να οργανώσουν την άτρακτο που συμβάλλει στον ισομερή καταμερισμό των χρωματοσωμάτων. Η παρεμπόδιση διαχωρισμού των κεντροσωματίων έχει σαν αποτέλεσμα τα χαρακτηριστικά αυτά οργανίδια να παραμένουν στον ένα πόλο του πυρήνα και στην οργάνωση μονοπολικής ατράκτου (monopolar mitotic spindle). Επομένως δεν υπάρχουν αντιπαράλληλοι μικροσωληνίσκοι για να δημιουργήσουν τις προϋποθέσεις για αντίθετη μετακίνηση των χρωματοσωμάτων στους δύο πυρηνικούς πόλους, διεργασία που αποτελεί χαρακτηριστικό της ανάφασης και τελόφασης (1, 249, 298). Η μονοπολική άτρακτος φαίνεται δεν είναι σε θέση να συνδεθεί με όλα τα χρωματοσώματα στο στάδιο της ανάφασης. Στη μονοπολική άτρακτο ο αριθμός των μικροσωληνίσκων είναι πολύ μικρότερος από ότι στη διπολική άτρακτο και υπάρχουν κινητόχωροι χρωματοσωμάτων που δεν συνδέονται μ' αυτούς. Η απουσία τέτοιας σύνδεσης μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση συμπλεγμάτων απο ελεύθερα χρωματοσώματα που με τυχαίους προσανατολισμούς σχηματίζουν

πολυπολικές αναφάσεις, που όπως αναφέρθηκε η συχνότητά τους παρατηρήθηκε σε μεγάλο βαθμό (352).

Ίσως πάλι ο ρυθμιστικός - μεταβολικός ρόλος των στερολών να έχει σχέση με την ύπαρξη των δεσμών που συγκρατούν μεταξύ τους καθένα από τα ζεύγη των κεντροσωματίων (340). Κάθε ζεύγος (μητρικό - θυγατρικό), όπως αναφέρθηκε προηγούμενα μετακινείται, σαν μονάδα στη διάρκεια της μίτωσης για να καταλάβει τον ένα από τους δύο πόλους του πυρήνα (95). Παρεμπόδιση του ορμονικού ρόλου μπορεί να οδηγεί σε σπάσιμο των δεσμών με αποτέλεσμα να προκύψουν τρία ή τέσσερα απλά κεντροσωμάτια καθένα από τα οποία χρησιμεύει σαν κέντρο οργάνωσης της ατράκτου. Έτσι μπορεί να προκύψουν πάλι πολυπολικές αναφάσεις (339). Οι ενώσεις diazepam (8,168), colcemid (211, 300), vinblastine (211) που είναι γνωστοί αναστολείς της πυρηνικής διαίρεσης στο στάδιο της μετάφασης οδηγούν στην εμφάνιση τριπολικών και τετραπολικών αναφάσεων, σε κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών. Για τις ενώσεις αυτές υποστηρίζεται ότι παρεμποδίζουν τη διαίρεση των κεντροσωματίων. Οπωσδήποτε στο μύκητα *A. nidulans* δεν πρέπει να αποκλεισθεί και η περίπτωση να υπάρχουν και βλάβες στην πυρηνική μεμβράνη, που περιέχει εργοστερόλη, βλάβες που δεν είναι όμως ορατές με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Έτσι μια υπερευστότητα της πυρηνικής μεμβράνης, όπως υποστηρίζεται από τον Steel και τους συνεργάτες του (337) για τη δράση των μορφολινικών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των μυκήτων θα μπορούσε να επηρεάσει τη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{+2} στον πυρήνα. Η οργάνωση και λειτουργία των μικροσωληνίσκων της ατράκτου είναι γνωστό ότι ελέγχεται και από τη συγκέντρωση ιόντων Ca^{+2} (256). Ανώμαλη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του πυρήνα μπορεί όμως και να προκληθεί και από δράση των fenarimol, clotrimazole στα μεμβρανώδη κυστιδία που είναι επίσης στενά συνδεδεμένα με το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων και περιέχουν εργοστερόλη (3). Το σύστημα των μεμβρανωδών κυστιδίων ελέγχει επίσης τη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του πυρήνα κατά τη διάρκεια της μίτωσης (205, 329, 362).

Οπωσδήποτε, μελέτες εξειδικευμένες στη δράση των EBIs κατά τη διαίρεση και λειτουργία των κεντροσωματίων, θα βοηθήσουν σημαντικά τη λεπτομερέστερη διερεύνηση της δράσης των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης στη διαδικασία της μίτωσης.

Στο επίπεδο της οπτικής μικροσκοπίας, οι δύο ενώσεις fenarimol και clotrimazole στις υψηλής τοξικότητας συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν ισχυρά την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα που εμφανίζεται διογκωμένος και έντονα παραμορφωμένος. Οι υφές, στις συγκεντρώσεις τουλάχιστον που επιτρέπεται ο σχηματισμός τους, παρουσιάζουν έντονες διακλαδώσεις με αυξημένο τον αριθμό των εγκαρσίων διαφραγμάτων (septa). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε είδη του γένους *Ustilago* παρουσία των triarimol (279), triadimefon (155),

fenarimol (54), nuarimol (54), imazalil (55) και clotrimazole (56), στο μύκητα *Cladosporium cucumerinum* παρουσία triformine και triarimol (315) και στο μύκητα *P. italicum* παρουσία των imazalil και fenpropimorph (189).

Οι παρατηρήσεις μας στο επίπεδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι τα δύο μυκητοκτόνα fenarimol και clotrimazole προκαλούν ανομοιόμορφη πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος, που σε αρκετές περιπτώσεις είναι ιδιαίτερα έντονη. Τέτοιου είδους επίδραση έχει αναφερθεί και για άλλους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης, στους μύκητες *U. avenae* (156, 158), *C. albicans* (98) και *B. allii* (288). Απ' ό,τι φαίνεται όμως η πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος δεν αποτελεί μοναδικότητα των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs). Ορισμένοι ερευνητές (128) πίστευαν ότι τέτοιου είδους πάχυνση αποτελεί γενική συνέπεια της ανάπτυξης κάτω από μη ευνοϊκές συνθήκες και μπορεί να προκληθεί και από μυκητοκτόνα που δεν έχουν εξειδικευμένη θέση δράσης στο κυτταρικό τοίχωμα. Για παράδειγμα η αντιμυκητική ουσία griseofulvin φαίνεται να επηρεάζει το στρώμα χιτίνης στο μύκητα *M. crassa* (177). Οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες προκαλούν επίσης ισχυρή πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος μυκήτων (228). Μοναδικότητα όμως φαίνεται να αποτελεί για τους EBIs fenarimol και clotrimazole οι χαρακτηριστικές παραμορφώσεις του κυτταρικού τοιχώματος στα κύτταρα των κονιδίων και των υφών. Η πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος που διαπιστώνεται τόσο με την οπτική όσο και με την ηλεκτρονική μικροσκοπία, οφείλεται προφανώς στην έλλειψη εργοστερόλης στις μεμβράνες και στη συσσώρευση αντ' αυτής C-14 μεθυλστερολών που προφανώς δεν ικανοποιούν τις φυσικοχημικές απαιτήσεις των μεμβρανών. Από τη μη ορθή δόμηση της μεμβράνης επηρεάζεται προφανώς η δραστηριότητα του ενζύμου συνθετάση της χιτίνης που συνδέεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (membrane-bound enzyme) (128, 304, 331). Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της χιτίνης του κυτταρικού τοιχώματος και επομένως η τροποποίηση της δράσης του ή η απώλεια ελέγχου (εξ' αιτίας της ανώμαλης δόμησης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης) οδηγεί στην ακανόνιστη εναπόθεση χιτίνης και στην εμφάνιση των παραπάνω παραμορφώσεων (129, 337). Η παρουσία του fenarimol και του clotrimazole προκαλεί το σχηματισμό μεγάλου αριθμού κυστιδίων (vesicles) στο εσωτερικό του κυτταρικού τοιχώματος του *A. nidulans*. Ανάλογα κυστίδια έχουν αναφερθεί στο μύκητα *B. allii* μετά από επίδραση με triadimefon (288) αλλά και στο μύκητα *S. rolfii* μετά από επίδραση cyproconazole (128). Τα κυστίδια αυτά περιβάλλονται από μεμβράνη, για το σχηματισμό τους δε συμβάλλει το πλασμάλημμα. Πιθανόν η άνιση σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος και κυτταροπλασματικής μεμβράνης προκαλεί ενθυλακώσεις (invaginations) της τελευταίας στο εσωτερικό των οποίων εγκλείεται κυτταρόπλασμα. Οι ενθυλακώσεις αυτές σε διαδοχικά στάδια μετατρέπονται σε σφαιρικά κυστίδια τα

οποία αφού αποσπασθούν από το πλασμάλημμα κατευθύνονται στο εσωτερικό του κυτταρικού τοιχώματος (εικ. 11H, θ). Το μεμβρανώδες περίβλημα των κυστιδίων έχει επιβεβαιωθεί από πρόσφατη δημοσίευση στην οποία χρησιμοποιήθηκε ειδική τεχνική χρώσης (128). Οπωσδήποτε τέτοια φαινόμενα αντανακλούν διαταραχή στη δομή της μεμβράνης.

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες (156, 158, 288) παρατηρείται μετά την επίδραση των EBIs αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων και του ενδοπλασματικού δικτύου. Αυτού του είδους οι μεταβολές φαίνεται ότι έχουν σχέση με την ανάγκη του κυττάρου για εντονότερη μεταβολική δραστηριότητα, προκειμένου να καλυφθεί η απαραίτητη ενέργεια για την επί πλέον σύνθεση μεμβρανών.

Το δικαρβοξυμιδικό μυκητοκτόνο iprodione, αυξάνει σημαντικά τα προϊόντα μιτωτικού διαχωρισμού στο μύκητα *A. nidulans* και η αύξηση αυτή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του φαρμάκου (πιν.6). Οπωσδήποτε η παρατηρούμενη γενετική δραστηριότητα επιβεβαιώνει αποτελέσματα προηγούμενων ερευνητικών εργασιών (135, 180). Η συσχέτιση που παρατηρείται μεταξύ παρεμπόδισης της ανάπτυξης και αύξησης του αριθμού των μιτωτικών ανασυνδυασμών, οδηγεί στην άποψη ότι ο μηχανισμός, μέσω του οποίου προκαλείται ο μιτωτικός ανασυνδυασμός, πρέπει εν μέρει τουλάχιστον να είναι υπεύθυνος για τη μυκητοτοξικότητα του iprodione (135). Είναι γνωστό ότι ενώσεις που δρουν στον πυρήνα αυξάνουν τους μιτωτικούς ανασυνδυασμούς σε διπλοειδή στελέχη του *A. nidulans*. Επειδή το iprodione, όπως άλλωστε και οι υπόλοιπες ενώσεις της κατηγορίας των αρωματικών υδρογονανθράκων και δικαρβοξυμιδικών, είναι πολύ αποτελεσματικό στην αύξηση των προϊόντων μιτωτικού ανασυνδυασμού στην καλλιέργεια του *A. nidulans* συμπεραίνεται ότι παρ' όλο που και άλλες κυτταρικές θέσεις μπορεί να επηρεάζονται από το παραπάνω μυκητοκτόνο, αυτό πρέπει να δρα και σε κάποια πυρηνική λειτουργία.

Ο Azevedo με τους συνεργάτες του, μελετώντας τη δράση του chloroneb, διαπίστωσαν αύξηση στην αναλογία των απλοειδών προϊόντων ανασυνδυασμού και εισηγήθηκε το μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων κατά τη μιτωτική διαίρεση, που οπωσδήποτε σημαίνει δράση του μυκητοκτόνου στη μιτωτική άτρακτο ή σε κάποια λειτουργία που σχετίζεται μ' αυτή. Αντίθετα ο Kappas (179) με τα dicloran και chloroneb πήρε σοβαρές ενδείξεις ότι τα διπλοειδή προϊόντα ανασυνδυασμού είναι αποτέλεσμα θραύσεων - ελλείψεων και υποστήριξε ότι πάνω στα ίδια τα χρωματοσώματα βρίσκονται οι θέσεις δράσης των μυκητοκτόνων. Ένα παρόμοιο μηχανισμό πρότεινε και για τη δημιουργία των απλοειδών προϊόντων διαχωρισμού, αν και δεν απέκλεισε την πιθανότητα συμμετοχής και του μη αποχωρισμού των χρωματίδων. Συγκεκριμένα, υποστήριξε ότι τα απλοειδή δεν προκύπτουν από το μη αποχωρισμό των χρωματίδων γιατί δεν υπάρχουν διπλοειδή που να προέρχονται από το μηχανισμό αυτό. Η

πρόκληση όμως των θραύσεων - ελλείψεων μπορεί να εξηγήσει την προέλευση των απλοειδών. Είναι δυνατόν δηλαδή να γίνονται ελλείψεις σε μεγάλα τμήματα χρωματοσωμάτων με συνέπεια να προκύπτουν μη βιώσιμα χρωματοσώματα, οπότε τα κύτταρα μεταπίπτουν σε ανευπλοειδή, μια κατάσταση που κατά την Käfer (174) είναι εξαιρετικά ασταθής και τα κύτταρα τείνουν να χάσουν και άλλα χρωματοσώματα και να καταλήξουν σε ευπλοειδή. Οποσδήποτε οι απόψεις των δύο αυτών ερευνητών αλληλοσυγκρούονται όσον αφορά την ανάλυση των προϊόντων μιτωτικού ανασυνδυασμού αλλά και τον πιθανό μηχανισμό δράσης αυτών των ενώσεων, είτε στη μιτωτική άτρακτο είτε στα ίδια τα χρωματοσώματα.

Από την ανάλυση προϊόντων μιτωτικού ανασυνδυασμού, στην παρούσα εργασία, παρατηρείται ότι το iprodione προκαλεί αύξηση τόσο στα απλοειδή όσο και στα διπλοειδή προϊόντα διαχωρισμού. Τα διπλοειδή όμως φαίνεται να προέρχονται κυρίως από το μηχανισμό του μιτωτικού διασκελισμού (crossing - over) και λιγότερο από το μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων (non - disjunction). Τα αποτελέσματα αυτά προσεγγίζουν περισσότερο τις απόψεις του Karpas για τη δράση του iprodione πάνω στα ίδια τα χρωματοσώματα.

Με το οπτικό μικροσκόπιο δεν είναι δυνατόν να διαπιστωθεί αν η γενετική δραστηριότητα οφείλεται σε μιτωτικό διασκελισμό. Αντίθετα αν οφείλεται σε μη αποχωρισμό των χρωματίδων, η άλλη ανώμαλη πυρηνική διαίρεση αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί στο επίπεδο του οπτικού μικροσκοπίου, όπως άλλωστε συνέβη και με τα βενζιμιδαζολικά και τους EBIs (παρούσα εργασία, 83).

Οι πυρήνες στις υφές του μύκητα *A. nidulans* που αναπτύχθηκαν παρουσία iprodione, ακολουθούν τον τυπικό τρόπο διαίρεσης που αναφέρθηκε για τα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα. Η κατανομή του χρωματοσωματικού υλικού παρουσιάζεται ομοιόμορφη και τα κεντροσώματα που αποτελούν βασικούς παράγοντες για την οργάνωση της ατράκτου, και επομένως για ισομερή καταμερισμό των χρωματοσωμάτων, εμφανίζονται συχνά στη διάρκεια της μιτωτικής διεργασίας (εικ. 4). Οι παρατηρήσεις αυτές φαίνεται να μην υποστηρίζουν τον μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων, που υποστηρίχθηκε από τον Azevedo και τους συνεργάτες του για τη γενετική δραστηριότητα των αρωματικών υδρογονανθράκων και δικαρβοξυμιδικών (12).

Με την οπτική μικροσκοπία δεν εμφανίζεται σημαντική επίδραση του iprodione στη μορφολογία των βλαστικών σωλήνων και υφών του *A. nidulans*, με εξαίρεση μια μικρή αύξηση στη διακλάδωση των υφών (branching). Αντίθετα, η ηλεκτρονική μικροσκοπία φανέρωσε έντονες αλλοιώσεις σε υποκυτταρικό επίπεδο, όπως: λύση των εσωτερικών μιτοχονδριακών μεμβρανών (cristae), καταστροφή τμημάτων ενδοπλασματικού δικτύου και βλάβες στην πυρηνική μεμβράνη, που έχουν τη μορφή ανοιγμάτων ή απομάκρυνσης της εξωτερικής από την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, (vacuolization). Αυτού του είδους οι μεταβολές, εκτός από τα ανοίγματα της πυρηνικής μεμβράνης, αναφέρθηκαν και σε άλλες ερευνητικές

εργασίες, έχουν δε αποδοθεί στην υπεροξειδωση των λιπιδίων (29, 50). Κατά την άποψη των Karagezyan (185) και Lyr (237), οι ελεύθερες ρίζες που προέρχονται απ' αυτήν την αντίδραση, όπως μονοατομικό οξυγόνο, υδροξύλιο ή υπεροξειδίο, και με την καλή διαλυτότητά τους στα λιπίδια, οξειδώνουν τις μεμβράνες και άλλες κυτταρικές κατασκευές (149, 192, 237). Κατά συνέπεια έχουμε οξειδωση των ακορέστων λιπαρών οξέων και σουλφυδρικών ομάδων (-SH) ενζύμων. Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη εξ' αιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (228). Η λιπιδιακή υπεροξειδωση και η παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσα στην πυρηνική μεμβράνη όχι μόνο βλάπτει τη λειτουργία της αλλά επιδρά και στο DNA προκαλώντας ρήγματα και ελλείψεις. Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια είναι πολύ ευαίσθητα στο μονοατομικό οξυγόνο και στις ρίζες υδροξυλίου και αυτή η δράση μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη συχνότητα του μιτωτικού διασκελισμού που παρατηρήθηκε απ' την ανάλυση των προϊόντων μιτωτικού ανασυνδυασμού στην παρούσα εργασία. Επιβεβαιώνει όμως και τις απόψεις του Karras για δράση των δικαρβοξυμιδικών στα ίδια τα χρωματοσώματα που οδηγεί στην παρατηρούμενη γενετική δραστηριότητα, εξ' αιτίας θραύσεων - ελλείψεων (179).

Οπωσδήποτε, και οι λύσεις της συνέχειας της πυρηνικής μεμβράνης είναι πολύ πιθανόν να συμβάλλουν στη γενετική δραστηριότητα μυκητοκτόνου, αφού υπάρχει το ενδεχόμενο να πραγματοποιείται απώλεια χρωματοσωματικού υλικού μέσω αυτών. Σε μια τέτοια περίπτωση προκύπτουν κύτταρα σε κατάσταση ανευπλοειδισμού που οδηγεί γρήγορα κατά την Käfer με παραπέρα απώλεια χρωματοσωμάτων, στην κατάσταση του απλοειδισμού (174).

Από τα φθαλιμίδια επιλέχθηκε για μελέτη στην παρούσα εργασία το carptafoI, η επίδραση του οποίου στο σωματικό διαχωρισμό των διπλοειδών στελεχών του μύκητα *A. nidulans* διερευνήθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γ. Π. Α. (363). Οπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, η ομάδα αυτή των χημικών ενώσεων αντιδρά με πρωτεΐνες που στα μόριά τους περιέχουν σουλφυδρικές ομάδες (209, 226, 257). Οπωσδήποτε τέτοια μη εξειδικευμένη δράση είναι υπεύθυνη για παρεμπόδιση πολλών μεταβολικών λειτουργιών του κυττάρου που κατά καιρούς έχουν αναφερθεί (164, 259, 291) και που καθορίζουν τη μυκητοτοξικότητα αυτών των μυκητοκτόνων.

Προηγούμενες μελέτες διαπίστωσαν ότι τα carpta και folpet, ενώσεις συγγενείς του carptafoI, αυξάνουν σημαντικά τη συχνότητα μιτωτικών ανασυνδυασμών του διπλοειδούς στελέχους του μύκητα *A. nidulans* (179) και επιπλέον, προκαλούν μεταλλαγές σε διάφορα μικροβιακά συστήματα, κυρίως βακτήρια (215, 328).

Το carptafoI, σε συγκεντρώσεις ελάχιστα τοξικές στον *A. nidulans* αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των διπλοειδών ανασυνδυασμών που προέρχονται από μιτωτικό διασκελισμό (crossing - over) (363). Σε μεγαλύτερες όμως

συγκεντρώσεις αυξάνει τα απλοειδή που προέρχονται από το μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων (non - disjunction) (363). Οι παρατηρήσεις με το οπτικό και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαπίστωσαν ότι η μικρή συκέντρωση του carptafol (0.075μg/ ml) δεν προκαλεί αλλαγές στη μορφολογία, στη λεπτή δομή και στη λειτουργία της μίτωσης στον *A. nidulans*. Εξαιρέση αποτέλεσε μόνο η παρουσία ελαφράς διόγκωσης στα κορυφαία τμήματα βλαστικών σωλήνων και υφών που γίνεται εντονότερη, ιδίως σε παρατεταμένο χρόνο παρουσίας του μυκητοκτόνου. Κατά πάσα πιθανότητα τέτοια επίδραση είναι αποτέλεσμα επέμβασης σε κάποια ή κάποιες πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που περιέχουν σουλφυδρικές ομάδες και λαμβάνουν μέρος στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Η παρουσία των τυπικών σταδίων της μιτωτικής διεργασίας, στα οποία αναφερθήκαμε όταν περιγράψαμε τη μίτωση σε κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα, ήταν εμφανής. Παρατηρούνται κεντροσώματα, άτρακτος και θυγατρικοί πυρήνες με ομοιόμορφη κατανομή χρωματοσωματικού υλικού. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία, κατ' ανάλογο τρόπο, επιβεβαίωσε την παρουσία πυρήνων με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα που οπωσδήποτε υποστηρίζει την άποψη για κανονικό διαχωρισμό των χρωματοσωμάτων στη διάρκεια της μίτωσης παρουσία μικρών συγκεντρώσεων carptafol. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με το ότι με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία δεν είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μιτωτικός διασκελισμός, σε περίπτωση ενδοπυρηνικής μίτωσης, ενισχύουν οπωσδήποτε τα δεδομένα της γενετικής ανάλυσης, ότι δηλαδή ο μηχανισμός αυτός είναι υπεύθυνος για την γενετική δραστικότητα.

Οι Couch και Siegel (77) διαπίστωσαν ικανότητα δέσμευσης των φθαλμιδίων στις ιστόνες με αποτέλεσμα αποσταθεροποίηση της δομής του DNA και αύξηση της συχνότητας των θραύσεων από τη δράση κυτταρικών ενζύμων. Τέτοια δράση στα ίδια τα χρωματοσώματα μπορεί οπωσδήποτε να εξηγήσει το αυξημένο ποσοστό μιτωτικού διασκελισμού που παρατηρείται παρουσία carptafol 0.075μg/ml.

Στη μεγαλύτερη συκέντρωση του μυκητοκτόνου (0.15μg/ ml) διαπιστώθηκαν σημαντικές αλλαγές που αφορούσαν κυρίως τη διαίρεση του πυρήνα. Με την οπτική μικροσκοπία σε πολύ λίγες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν τα τυπικά στάδια της μιτωτικής διεργασίας με έκθεση στη συκέντρωση αυτή του μυκητοκτόνου. Οι πυρήνες παρουσίαζαν διαφορετική ποσότητα και πυκνότητα χρωματοσωματικού υλικού όπως επίσης και ανομοιόμορφη κατανομή κατά μήκος των υφών. Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπιστώθηκε διαίρεση του πυρήνα με σχηματισμό λοβού που έχει διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα. Δεδομένου ότι δεν παρατηρούνται βλάβες στην πυρηνική μεμβράνη φαίνεται ότι το carptafol, σε συγκεντρώσεις που προκαλούν μεγάλη παρεμπόδιση στην αύξηση του *A. nidulans* επηρεάζει άμεσα κατά κάποιο τρόπο τη δομή ή λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου.

Ο μηχανισμός δράσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων είναι γνωστός σήμερα και συνίσταται στην παρεμπόδιση του πολυμερισμού των υπομονάδων της τουμπουλίνης, του δομικού συστατικού των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου αλλά και άλλων κατασκευών στο εσωτερικό του κυττάρου. Η παρεμβολή αυτή επηρεάζει την πυρηνική διαίρεση και άλλες λειτουργίες που βασίζονται στην παρουσία μικροσωληνίσκων όπως επίσης και τη μορφολογία του κυττάρου (91, 92, 289, 349).

Το benomyl ουσιαστικά, ήταν το πρώτο γεωργικό φάρμακο που βρέθηκε να αυξάνει δραματικά τον αριθμό των εγχρώμων τομέων στις αποικίες ετεροζύγωτων διπλοειδών στελεχών του *A. nidulans* (84, 146). Η συγκεκριμένη παρατήρηση αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη για δράση του παρεμποδιστή στη λειτουργία της μίτωσης. Το γεγονός ότι αύξηση των εγχρώμων τομέων παρατηρείται και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες προκαλούν μικρή μόνο παρεμπόδιση της αύξησης και επίσης το ότι με την αύξηση των συγκεντρώσεων έχουμε παράλληλα αύξηση της τοξικότητας και της γενετικής δράσης, οδήγησε στην άποψη ότι η τοξικότητα του benomyl σχετίζεται με τη γενετική δράση.

Ανάλυση των προϊόντων μιτωτικής διάσχισης έδειξε ότι το benomyl προκαλεί αύξηση τόσο των απλοειδών όσο και των διπλοειδών προϊόντων μιτωτικού διαχωρισμού στα διπλοειδή στελέχη του *A. nidulans* που προκύπτουν από τον μηχανισμό του μη αποχωρισμού των χρωματίδων (178). Η δράση αυτή οφείλεται στο μη σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου και οδηγεί στον ανώμαλο καταμερισμό των χρωματοσωμάτων στους θυγατρικούς πυρήνες (183).

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε το benomyl για να δούμε την επίδραση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων, με το γνωστό μηχανισμό δράσης, στη δομή του κυττάρου και περισσότερο στη διαίρεση του πυρήνα με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία. Με την οπτική μικροσκοπία διαπιστώθηκαν σημαντικές παραμορφώσεις στους βλαστικούς σωλήνες των κονιδίων εξ' αιτίας της παρουσίας benomyl. Ο παρεμποδιστής αυτός προκαλεί διόγκωση και παραμόρφωση των βλαστικών σωλήνων του μύκητα *A. nidulans* ενώ παράλληλα διαπιστώνεται και αύξηση των διακλαδώσεων (branching). Ανάλογες παρατηρήσεις για την δράση του benomyl είχαν αναφερθεί από τους Richmond και Pring (290) σε έναν άλλο μύκητα, τον *B. fabae*. Προφανώς, οι επιδράσεις αυτές οφείλονται στην παρεμπόδιση σχηματισμού των μικροσωληνίσκων που συμμετέχουν στη μεταφορά υλικών του τοιχώματος και άλλων συστατικών ή ακόμα στην αποδιοργάνωση των " μυτερών σωματίων " (spitzenkorpers) που συμβάλλουν σημαντικά στην επέκταση των υφών (166).

Το γεγονός ότι τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα είναι αντιμιτωτικές ουσίες, έχουν δηλαδή σαν θέση δράσης τη λειτουργία της μίτωσης, οπωσδήποτε προϋποθέτει δυσμενείς επιδράσεις στη διαίρεση του πυρήνα. Έτσι, ενώ στα

κονίδια του μύκητα *A. nidulans* που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα διαπιστώνονται κανονικά τα στάδια της μιτωτικής διεργασίας, στις υφές που αναπτύχθηκαν παρουσία benomyl τα στάδια αυτά δεν παρατηρούνται. Οι θυγατρικοί πυρήνες εμφανίζονται με διαφορετικές μάζες χρωματοσωματικού υλικού εξ' αιτίας της αναστολής σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου και επομένως της αδυναμίας για ισομερή καταμερισμό των χρωματοσωμάτων στους νεοσχηματισθέντες πυρήνες (83).

Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία και παρουσία benomyl επίσης δεν παρατηρήθηκαν τα τυπικά στάδια της μιτωτικής διεργασίας όπως συνέβαινε στα κονίδια που βλάστησαν σε υλικό μάρτυρα. Αντίθετα οι πυρήνες εμφανίζονταν με παραμορφώσεις διαφόρων ειδών. Είναι πιθανόν τα κυτταρικά αυτά οργανίδια εξ' αιτίας αναστολής σχηματισμού των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου, να προσπαθούν να ολοκληρώσουν την πυρηνική διαίρεση σχηματίζοντας ανισομεγέθεις λοβούς, ανώμαλες επιμηκύνσεις με τυχαίες στενώσεις και συσφίξεις που ως επί το πλείστον οδηγούν στο σχηματισμό θυγατρικών πυρήνων με διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα.

Η παρούσα εργασία έδειξε ότι τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης των μιτωτικών ανασυνδυασμών του διπλοειδούς στελέχους HA του *A. nidulans*, που προκύπτουν από τη δράση μυκητοκτόνων από διαφορετικές χημικές ομάδες επιβεβαιώνονται και συμπληρώνονται από τις μελέτες μας με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία. Στην περίπτωση μάλιστα των EBIs η γενετική δράση επιβεβαιώθηκε και από μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών. Η οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι σε θέση να διαπιστώσουν ποιές ενώσεις προκαλούν μη αποχωρισμό χρωματοσωμάτων, αφού ένας τέτοιος μηχανισμός γενετικής δραστηριότητας στο μεν επίπεδο της οπτικής μικροσκοπίας οδηγεί στην εμφάνιση πυρήνων που έχουν διαφορετική πυκνότητα και ποσότητα χρωματοσωματικού υλικού στο δε επίπεδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας οδηγούν στην εμφάνιση θυγατρικών πυρήνων με ανομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα. Επομένως η οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθούν εξίσου αποτελεσματικά με τη μέθοδο της γενετικής ανάλυσης για την εξακρίβωση μιτωτικών ανωμαλιών, όπως π.χ. συμβαίνει με τα μυκητοκτόνα fenarimol, clotrimazole, captafol και benomyl. Η γενετική ανάλυση πλεονεκτεί στο ότι έχει τη δυνατότητα να διαπιστώσει μηχανισμό γενετικής δραστηριότητας που οφείλεται σε μιτωτικό διασκελισμό (crossing - over) που όμως δεν αναγνωρίζεται με την οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία (iprodiolone, captafol). Η επίδραση των EBIs, στις γενετικές διεργασίες οργανισμών όπως ο *A. nidulans* ή ο *C. griseus* (chinese hamster) εκ πρώτης όψεως μας προσανατολίζει να τα θεωρήσουμε ύποπτα ως επικίνδυνα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον του. Η δράση του φθαλιμιδικού μυκητοκτόνου captafol που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία και το οποίο παρουσιάζει έντονη γενετική δραστηριότητα στον *A. nidulans*

έχει ήδη αποσυρθεί από την κυκλοφορία σε πολλές χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, εξ' αιτίας του ότι έχει βρεθεί να είναι τερατογόνο - μεταλλαξογόνο σε ανώτερους οργανισμούς (77). Η λήψη όμως μιας απόφασης που θα οδηγήσει στην απομάκρυνση αυτών των μυκητοκτόνων από την κυκλοφορία πρέπει να είναι αποτέλεσμα αξιολόγησης δεδομένων από εκτενέστερες ερευνητικές προσπάθειες στις οποίες θα αναφερθούμε λεπτομερέστερα παρακάτω και από τις οποίες θα μπορέσουν να προκύψουν πιο ολοκληρωμένα συμπεράσματα όσον αφορά τους πραγματικούς κινδύνους για τον άνθρωπο. Πάντως το γεγονός ότι παρουσιάζεται γενετική δράση σε συστήματα όπως τα παραπάνω, πρέπει να το θεωρήσουμε σαν ένδειξη ότι τα μυκητοκτόνα αυτά είναι τουλάχιστον ύποπτα πρόκλησης δυσμενών επιδράσεων στον άνθρωπο και το περιβάλλον γενικότερα.

Ασφαλώς η εκτίμηση των πραγματικών κινδύνων δεν μπορεί να προκύψει μόνο από πειραματικά δεδομένα της μορφής που η παρούσα εργασία διαπραγματεύεται. Οι εν λόγω χημικοί παράγοντες, με εξαίρεση τα fenarimol, clotrimazole, εδοκιμάστηκαν για τη γενετική τους δράση σε βιολογικό σύστημα που δεν αρκεί μόνο του για να εξαχθούν θετικά και σαφή συμπεράσματα για ανάλογη δράση αυτών στον άνθρωπο. Η χρησιμοποίηση συστημάτων μικροοργανισμών δεν μπορεί να δώσει σαφείς πληροφορίες που να αφορούν ανώτερους οργανισμούς, γιατί πολλές χημικές ενώσεις που είναι δραστικές σε μικροοργανισμούς μπορεί να αποτοξικοποιούνται σε ανώτερους οργανισμούς ή και το αντίθετο. Οποιαδήποτε βέβαια προσπάθεια συμβολής στο θέμα γενετικής δράσης χημικών παραγόντων με τη χρησιμοποίηση αξιόπιστου και αποτελεσματικού συστήματος, έστω και αν τα συμπεράσματα εξ' αυτού δεν μπορούν να γενικευθούν αποτελεί θετική και αξιόλογη συνεισφορά.

Για τους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης fenarimol, clotrimazole, και γενικότερα ίσως όλες τις ενώσεις αυτής της κατηγορίας, πρέπει να υπάρξει προβληματισμός όσον αφορά πιθανούς κινδύνους στον άνθρωπο και τούτο γιατί προκαλούν μιτωτικές ανωμαλίες και σε κυτταροκαλλιέργεια θηλαστικού, του οποίου η κυτταροβιολογία είναι ευνόητο ότι προσεγγίζει περισσότερο αυτή του ανθρώπου. Δεδομένου δε ότι πολλοί EBIs όπως το clotrimazole χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση δερματικών παθήσεων του ανθρώπου (μυκητιάσεις), ο κίνδυνος είναι ιδιαίτερα αυξημένος. Όπως προαναφέρθηκε, χρειάζεται εκτεταμένη διερεύνηση με περαιτέρω πειράματα για να αποκτηθεί ολοκληρωμένη εικόνα των πιθανών κινδύνων που συνεπάγεται η χρήση τους στη γενετική σύσταση. Συνήθως τα πειράματα που σχετίζονται με γενετική-καρκινογόνο δράση κάποιας ένωσης μυκητοκτόνου εκτός των δοκιμασιών μεταλλαξιγένεσης, που αφορούν δοκιμές σε κύτταρα θηλαστικών για την εξακρίβωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών όπως και μικροβιακές δοκιμές, με μεταβολική ενεργοποίηση και μη για την εξακρίβωση μεταβολών στο γένωμα, πραγματοποιούνται και τα παρακάτω:

α.- Δοκιμές για την επίδραση στην αναπαραγωγή, συμπεριλαμβανομένων των επιδράσεων στη γονιμότητα και στα έμβρυα (εμβρυοτοξικότητα, τερατογένεση).

β.- Στοιχεία για τη συμπεριφορά του φαρμάκου στο σώμα των θερμόαιμων (άπορρόφηση, κατανομή, εμμόνη, μεταβολισμός, αποβολή).

γ.- Δοκιμές χρόνιας τοξικότητας που γίνονται με χορήγηση του γεωργικού φαρμάκου στα πειραματόζωα (κυρίως λευκός επίμυς) και περιλαμβάνουν παρατηρήσεις στη συμπεριφορά και την εξωτερική εμφάνιση των ζώων, στη λήψη της τροφής και το βάρος τους, αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις και τέλος ιστοπαθολογικές εξετάσεις.

Επιπλέον χρησιμοποιούνται παρασκευάσματα μικροσωμάτων θηλαστικών σε συνδυασμό με συστήματα μικροοργανισμών για τη δοκιμή διαφόρων χημικών παραγόντων και τον έλεγχο της πιθανότητας μετατροπής των σε γενετικά δραστικά ή μη προϊόντα μετά από μεταβολισμό τους.

Τα φυτοφάρμακα σήμερα αποτελούν το επίκεντρο του ενδιαφέροντος εξ' αιτίας των δυσμενών επιδράσεων τους στο οικοσύστημα. Όμως για την αξιολογήσή τους θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη όχι μόνο τα αρνητικά τους σημεία αλλά και η θετική προσφορά τους στο σημαντικό τομέα της διατροφής του ανθρώπου. Ιδιαίτερα θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ότι σήμερα με τους αυστηρούς ελέγχους και τους εξίσου αυστηρούς περιορισμούς που προϋποθέτει η έγκριση φυτοφαρμάκων, οι αρνητικές επιδράσεις στο περιβάλλον πρέπει να αποδοθούν κατά κύριο λόγο στην εντατική και αλόγιστη χρήση από τους καλλιεργητές και πολύ λιγότερο στην καθ' αυτό τοξική δράση των ενώσεων σε ανώτερους οργανισμούς. Τα φυτοφάρμακα απετέλεσαν, αποτελούν και φαίνεται ότι θα αποτελούν για σημαντικό διάστημα στο μέλλον τον κύριο τρόπο αντιμετώπισης των εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών. Είναι σύμμαχοι του ανθρώπου στην προσπάθεια του να εξασφαλίσει επάρκεια αγαθών, εφ' όσον βέβαια χρησιμοποιούνται με μέτρο και μεθοδικότητα. Επί πλέον θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψη ότι ο άνθρωπος δε βρίσκεται μόνο υπό την απειλή των χημικών ενώσεων που παρασκευάζει ο ίδιος. Στο φυσικό του περιβάλλον υπάρχει πλήθος ουσιών εξ' ίσου ή και σε σημαντικό βαθμό πιο επικίνδυνων για την υγεία του. Για παράδειγμα τα φυτά παράγουν τοξίνες που εισέρχονται στον οργανισμό του ανθρώπου με την καθημερινή διατροφή, από τις οποίες αρκετές έχουν διαπιστωθεί ότι είναι καρκινογόνες. Μελέτες που έγιναν στις Η.Π.Α. υποστηρίζουν ότι ο άνθρωπος, καθημερινά τρώει 1500mg φυτικές τοξίνες, 10.000 φορές δηλαδή περισσότερο από τα συνθετικά υπολείμματα φυτοφαρμάκων που εισάγονται στον οργανισμό του (5).

Σήμερα καταβάλλεται μια προσπάθεια για περιορισμό της χημικής καταπολέμησης και ανάπτυξη άλλων μεθόδων αντιμετώπισης των ασθενειών. Σ' αυτή την προσπάθεια έχει δοθεί το μεγαλύτερο βάρος στη δημιουργία

ανθεκτικών ποικιλιών. Όμως πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι σε μερικές περιπτώσεις η αποτελεσματικότητά τους βασίζεται κυρίως στην παραγωγή τοξινών, στα πλαίσια του αμυντικού τους μηχανισμού, που δεν είναι δυστυχώς, αθώες χημικές ενώσεις όπως ασφαλώς θα θέλαμε. Για παράδειγμα η προσπάθεια εγκατάστασης από ορισμένους βελτιωτές μιάς ποικιλίας πατάτας ανθεκτικής σε προσβολές από έντομα εγκαταλήφθηκε εξ' αιτίας των αυξημένων επιπέδων σολανίνης (solanine) και κακονίνης (chaconine) δύο φυσικών αλκαλοειδών της πατάτας που είναι γνωστές τερατογόνες ουσίες (5).

Αλλά και στην υποθετική εκείνη περίπτωση που δεν γίνει καμμία προσπάθεια αντιμετώπισης των προσβολών, πέραν της μειωμένης παραγωγής, ο άνθρωπος θα εκτεθεί σε περισσότερες τοξίνες, που θα παραχθούν τόσο από τα φυτά σαν αντίδραση στην προσβολή τους από τα παθογόνα, όσο και από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς όπως είναι για παράδειγμα οι αφλατοξίνες, επικίνδυνες καρκινογόνες ουσίες, που παράγονται από τον μύκητα *A. flavus*.

Σαν συμπέρασμα θα μπορούσε να λεχθεί ότι η χημική καταπολέμηση, προς το παρόν τουλάχιστον, πρέπει να θεωρείται η πλέον αποτελεσματική μέθοδος αντιμετώπισης φυτικών εχθρών και ασθενειών. Ο περιορισμός των δυσμενών επιδράσεων στον άνθρωπο είναι αποτέλεσμα των σωστών οδηγιών χρήσης και της συγκρατημένης εφαρμογής τους. Με τον τρόπο αυτό πιστεύεται ότι θα επιτευχθεί η επιδιωκόμενη ασφάλεια για το οικοσύστημα και η επάρκεια των αγαθών.



(1). AIST J.R. and WILLIAMS P.H., Ultrastructure and time course of mitosis in the fungus *Fusarium oxysporum*, *J. Cell. Biol.* 55, 368 (1972).

(2). ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ Ν.Ε και ΒΑΡΒΟΓΛΗ Α.Γ., Μαθήματα Οργανικής Χημείας, Β' Έκδοση, Θεσσαλονίκη, (1980).

(3). ALLEN R.D., Evidence for firm linkages between microtubules and membrane - bounded vesicles, *J. Cell Biol.*, 64, 497 (1975).

(4). AMES B.N., Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer, *Science*, 204, 587 (1979).

(5). AMES B.N. and GOLD S., Dietary carcinogens, environmental pollution and cancer: Some misconceptions, Symposium on " Nutrition and Cancer, " Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, September 21 -22, 1989.

(6). AMES B.N., HOLLSTEIN M.C. and CATHCART R., Lipid peroxidation damage to DNA. In : YAGI, K. (Ed): Lipidperoxides in biology and medicine. *Academic Press Inc*, New York, 339 (1982).

(7). AMES B.N., KÄMMEN H.O. and YAMASAKI E., Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients, *Proc. Nat. Akad. Sci. U.S.A.*, 72, 2423 (1975).

(8). ANDERSON L.C., LEHTO V.-P., BADLEY A. and VINTANEN I., Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation, *Nature* (London), 291, 247 (1981).

(9). AOYAMA Y. and YOSHIDA Y., Interaction of lanosterol to cytochrome P - 450 purified from yeast microsomes evidence for contribution of cytochrome P - 450: to lanosterol metabolism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 82, 33 (1978).

(10). AOYAMA Y. , YOSHIDA Y., HATA S., NISHINO T. and KATSUKI H. , Buthiobate: A potent inhibitor for yeast cytochrome P - 450 catalyzing 14a -

demethylation of lanosterol, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 115, 642 (1983).

(11). AUERBACH C. , The effects of six years of mutagen testing on our attitude to the problems posed by it, *Mutation Research*, 33, 3 (1975).

(12). AZEVEDO J.L., SANTANA E.P. and BONATELLI R., Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1-4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*, *Mutation Research*, 48, 163 (1977).

(13). BACH T.J. , Selected natural and synthetic enzyme inhibitors of sterol biosynthesis as molecular probes for in vivo studies concerning the regulation of plant growth, *Plant Science*, 39, 183, (1985).

(14). BALOCH R.I. and MERCER E.I. , Inhibition of sterol $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ isomerase and Δ^{14} - reductase by fenpropimorph, tridemorph and fenpropidin in cell-free enzyme systems from *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytochemistry*, 26, 663 (1987).

(15). BALOCH R.I., MERCER E.I., WIGGINST T.E. and BALDWIN B.C., Where do morpholines inhibit sterol biosynthesis? *Brit. Crop. Protect. Conf. on Pests Dis.*, Vol. 3, 893 (1984 a).

(16). BALOCH R.I., MERCER E.I., WIGGINST T.E. and BALDWIN B.C., Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Ustilago maydis* by tridemorph, fenpropimorph and fenpropidin, *Phytochemistry*, 23, 2219 (1984 b).

(17). BARTELS - SHOOLEY J., MACNELL B.H., A comparison of the modes of action of three benzimidazoles, *Phytopathology*, 61, 816 (1971).

(18). BARTELS P.G. and HILTON J.L., Comparison of trifluazin, oryzalin, pronamide, propham and colchicine treatments on microtubules, *Pestic. Biochem and Physiology*, 3, 462, (1973).

(19). BARTSCH H. and MONTESANO R. , Mutagenic and carcinogenic effects of vinyl chloride, *Mutation Research*, 32, 93, (1975).

(20). BARUG D. , SAMSON R.A. and KERKENAAR A., Microscopic studies of *Candida albicans* and *Torulopsis glabata* after in vitro treatment with bifonazole, *Arzeim-Forsch, Drug Res* 33, 528 (1983).

(21). BEEVER R.E., Osmotic sensitivity of fungal variants resistant to dicarboximide fungicides, *Transactions of the British Mycolog. Soc.* , 80, 327 (1983).

(22). BEEVER R.E., BYRDE R.J.W., Resistance to the dicarboximide fungicides. In: Dekker, J. and Georgopoulos, S.G. (Eds.): *Fungicide Resistance in Crop Protection*, Pudoc, Wageningen, 101 (1982).

(23). BELLINGAMPI, GUALANDI G., LA-MONICA E., POLEY C. and MORPURGO G.P., Membrane-damaging agents cause mitotic non-disjunction in *Asperillus nidulans*, *Mutation Research*, 79,169 (1980).

(24). BENVENISTE. P., Sterol biosynthesis, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 37,275 (1986).

(25). BENVENISTE P. BLADOCHA M. , COSTET M- F. EHRHARD A. , Biochemical mode of action of fungicides. Studies on ergosterol biosynthesis inhibitors " BURDICK and JACKSON " Symp. 188th ACS National Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, August 27, 1, (1984).

(26). BERG L.R. , The effects of triarimol and tridemorph on sterol biosynthesis of five species of Oomycetes, Ph. D. thesis, University of Maryland, (1983).

(27). BERG L.R. , PATTERSON G.W. and LUSBY W.R. , Effect of triarimol and tridemorph on sterol biosynthesis in *Saprolegnia ferax*, *Lipids*, 18, 448 (1983)

(28). BERG D. , KRAEMER W. , REGEL E. , BUECHEL K. H. , HOLMWOOD G. , PLEMBEL M. and SCHEIN PELUG H. , Mode of action of fungicides : Studies on ergosterol biosynthesis inhibitors, *British Crop Protection Conf. - Pests and Diseases*, vol. 3, 887 (1984).

(29). BHUYAN K. C., BHUYAN D. K., KUCK J. F. R. , KUCK K.D. and KERN H.L., Increase lipid peroxidation and altered membrane functions in binary mouse, *Cataract. Curr. Eye Res.* 2, 597 (1982/ 1983).

(30). BIGNAMI M., AULICINO F. VELCICH A. , CARERE A. and MORPURGO G. , Mutagenic and recombinogenic action of pesticides in *Aspergillus nidulans*, *Mutation Research*, 46, 395 (1977).

(31). BLADOCHA M. and BENVENISTE P. , Manipulation by tridemorph, a

systemic fungicide, of the sterol composition of maize leaves and roots, *Plant physiol*, 71, 756 (1983).

(32). BOLLEN G.J., A comparison of the in vitro antifungal spectra of thiophanates and benomyl, *Neth. J.Pl. Path.*, 78, 55 (1972).

(33). BORELLI D., FUENTES J., LEIDERMAN R., RESTREPO M.A., BRAN J.L., LEGENDRE R., LEVINE H.B. and STEVENS D.A., Ketoconazole on oral antifungal : Laboratory and clinical assessment of imidazole drugs, *Postgrad. Med. J.*, 55, 657 (1979).

(34). BOSSCHE VANDEN H., Biochemical effects of miconazole on fungi I. effects on the uptake and/ or utilization of pyrimidines, nucleosides, amino-acids and glucose by *Candida albicans*, *Biochemical Pharmacology* 23, 887 (1974).

(35). BOSSCHE VANDEN H., Importance and role of sterol in fungal membranes, in " Biochemistry of cell walls and membranes in fungi" Kuhn et al, 135 (1988).

(36). BOSSCHE VANDEN H., WILLEMSSENS G. and CUTSEM V.J.M., The action of miconazole on the growth of *Candida albicans*, *Sabouraudia*, 13, 63 (1975).

(37). BOSSCHE VANDEN H., WILLEMSSENS G. and MARICHAL P., Cytochrome P-450 inhibitors at the origin of deteriorated fungal membranes. A summary, *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, 307 (1984).

(38). BOSSCHE VANDEN H., MARICHAL P., GEERTS H. and JANSSEN P.A.J. , The molecular basis for itraconazoles activity against *Aspergillus fumigatus*, from ASPERGILLUS and ASPERGILLOSIS, edited by Hugo VANDEN BOSSCHE, Donald W.R. Mackenzie and Geert Cauwenberg, (Plenum Publishing Corporation, (1988), (171)

(39). BOSSCHE VANDEN H., MARICHAL P., GORRENS J., GEERTS H. and JANSSEN P.A., Mode of action studies. Basis for the search of New Antifungal Drugs, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 544, 191 (1988).

(40). BOSSCHE VANDEN H., WILLEMSSENS S.G., COOLS W., LAUWERS W.F.J. and LE JEUNE L. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*

by miconazole, *Current Chemotherapy*, 3, 228 (1978).

(41). BOSSCHE VANDEN H., WILLEMSSENS S.G., MARICHAL P., COOLS W., and LAUWERS W., The molecular basis for the antifungal activities of N-substituted azole derivatives, Department of comparative Biochemistry and Analytical Department Janssen Pharmaceutica, Research Laboratories B.2340 Beerse, Belgium, 1 (1983).

(42). BOSSCHE VANDEN H. , MARICHAL P. , GORRENS J. , BELLENS D. , VERHOEVEN H. , COEVE M.-C. , LAUWERS W. and JANSSEN A. J. , Interaction of azole derivatives with cytochrome P-450 isozymes in yeast, fungi, plants and mammalian cells, *Pest. Sci.*, 21, 289 (1987).

(43). BOTTEMA C.K. and PARKS L.W., Δ -14-sterol reductase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 531, 301 (1978).

(44). BRADLEY D.E., A high resolution evaporated - carbon replica technique for the electron microscope, *Journal of the Institute of Metals*, 83, 35 (1954 a).

(45). BRADLEY D.E., Evaporated carbon films for use in electron microscopy, *Brit. J. Appl. Phys.* 5, 65 (1954 b).

(46). BRAUN K. and FRIDOVICH I. DNA strand scission by enzymatically generated oxygen radicals, *Arch. Biochem Biophys.*, 206, 414 (1981).

(47). BRIDGES B.A., Screening for environmental agents causing genetic damage, *Laboratory practice*, 21, 411 (1972).

(48). BRIDGES B.A., MOTTERSHEAD R.P. and COLLELLA C., Induction of forward mutations to colicin E2 resistance in repair deficient strains of *Escherichia coli*: Experiments with ultraviolet light and captan, *Mutation research*, 21, 303, (1973).

(49). BRIDGES B.A., The mutagenicity of captan and related fungicides, *Mutation Research*, 32, 3 (1975).

(50) BRUNORI M. and ROTILO G., Biochemistry of oxygen radical species. In: COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O. (Eds): *Methods of Enzymology*, Vol. 105., Academic Press, New York. (1984).

(51). BUCHEL K.H., The history of azole chemistry, in *Fungicide Chemistry, Advances and Practical Applications* (M.B. GREEN and D.A. SPILKER, EDs), P.1., American Chemical Society, Washington D.C. (1986).

(52). BUCHENAUER H., Preliminary studies on the mode of action of vinclozolin, *Meded. Fak. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent* 41, 1509 (1976).

(53). BUCHENAUER H., Mode of action of triadimefon in *Ustilago avenae*, *Pestic. Biochem. and Physiology*, 7, 309 (1977).

(54). BUCHENAUER H., Biochemical effects of the systemic fungicides fenarimol and nuarimol in *Ustilago avenae*, *Pfl. Krankh., Pfl. Schutz*, 84, 286 (1977).

(55). BUCHENAUER H., Mechanism of action of the fungicide imazalil in *Ustilago avenae*, *Pfl. Krankh. Pfl. Schutz*, 84, 440 (1977).

(56). BUCHENAUER H., Analogy in the mode of action of fluotrimazole and clotrimazole in *Ustilago avenae*, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 8, 15 (1978).

(57). BUCHENAUER H., Comparative studies on the antifungal activity of triadimefon, triadimenol, fenarimol, nuarimol, imazalil and fluotrimazole, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 86, 341 (1979a).

(58). BUCHENAUER H., Conversion of triadimefon into two diastereomers, triadimenol-I and triadimenol-II, by fungi and plants, Abstracts of papers IX International Congress of Plant Protection and 71st Annual Meeting of the American Phytopathological Society, Washington D.C., U.S.A., Abstract No 939 (1979b).

(59). BUCHENAUER H., Studies on resistance of *Ustilago avenae*, *Erysiphe graminis f. sp. tritici* and *E. graminis f. sp. hordei*, against the ergosterol biosynthesis inhibitors, 4th Intern. Congr. Pl. Path., Melbourne, Abstract 308 (1983).

(60). BUCHENAUER H. and ROHNER E., Effect of triadimefon and triadimenol on growth of various plant species as well as on gibberellin content and sterol metabolism in shoots of Barley Seedlings, *Pestic. Biochem. and Physiol.*, 15, 58 (1981).

(61). BUCKLEY P.M. ,SJAHOLM V.E. and SOMMER N.F. , Electron microscopy of *Botrytis cinerea* conidia, *Journal of Bacteriology*, 91, 2037 (1966).

(62). BURDEN R.S. , CLARK T. and HOLLOWAY D.J. , Effects of sterol biosynthesis inhibiting fungicides and plant growth regulators on the sterol composition of barley plants, *Pestic. Biochem and Physiology*, 27, 289 (1987).

(63). BURDEN R.S., COOKE D.T. and CARTER A.G., Inhibitors of sterol biosynthesis and growth in plants and fungi, *Phytochemistry*, 28, 1791 (1989).

(64). BURGOIS J.J. , BRONCHART R., DELTOYR R. and BARSY T., Ultrastructural and histoautoradiographic study of benomyl action on microconidia of *Fusarium oxysporum* in germination, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 7, 97 (1977).

(65). BURDEN R.S., CARTER G.A., CLARK T., COOK D.T., CROKER J.S., DEAS A.H.B., HEDDEN P., JAMES C.S. and LENTON R.J., Comparative activity of the enantiomers of triadimenol and paclobutrazol as inhibitors of fungal growth and plant sterol and gibberellin biosynthesis, *Pestic sci.* 21, 253, (1987).

(66). BURLAND T.G. and GULL K., Molecular and cellular aspects of the interaction of benzimidazole fungicides with tubulin and microtubules. In: TRINCI, A.P.J., and RYLEY J.F. (Eds): Mode of action of antifungal agents. Brit. Mycologic.Soc. Symposia Series 8, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 299 (1984).

(67). BUTTERS J., CLARK J. and HOLLOMON D.W., Resistance to inhibitors of sterol biosynthesis in barley powdery mildew, *Meded. Fac. Landb. wet. Rijksuniv. Gent.* 49, 143 (1984).

(68) CARTER G.A., KENDALL S.J., BURDEN R.S., JAMES C.S. AND CLARK T., The lipid compositions of two isolates of *Cladosporium cucumerinum* do not explain their differences in sensitivity to fungicides which inhibit sterol biosynthesis, *Pest. sci.*, 26, 181, (1989).

(69). CLARKE C.H., The mutagenic specificities of pentachloronitrobenzene and captan, two environmental mutagens, *Mutation Research*, 11, 247 (1971).

- (70). CLEMONS G.P. and SISLER H.D., Formation of a fungitoxic derivative from benlate, *Phytopathology*, 59, 705 (1969)
- (71) CLEMONS G.P. and SISLER H.D., Localization of the site of action of a fungitoxic benomyl derivative, *Pestic. Biochem Physiol.*, 1,32 (1971).
- (72). CLEVELAND D.W. and SULLIVAN K.F., Molecular biology and genetics of tubulin, *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 331 (1985).
- (73). CLUTTERBUCK A.J., Gene symbols in *Aspergillus nidulans*, *Genet. Res. Camb.*, 21, 291 (1973).
- (74). COPE J.E., Mode of action of miconazole in *Candida albicans*. Effect on growth, viability and K⁺ release *Journal of General Microbiology*, 119, 245 (1980a).
- (75). CORTES F., MATEOS S., ORTIZ T. and NERO P.J., Effects of caffeine and inhibitors of DNA synthesis on chromatid-type aberrations induced by acetaldehyde in root-tip cells, *Mutation Research*, 180, 183 (1987).
- (76). CORTES F., ESCALZA P., MORENO J. and LOPEZ-CAMPOS J.L., Effects of the fungicide tridemorph on mitosis in *Allium cepa*, *Cytobios.*, 34, 181 (1982).
- (77). COUCH R.C. and SIEGEL M.R., Interaction of captan and folpet with mammalian DNA and histones, *Pestic. Biochem and Physiol.*, 7, 531 (1977).
- (78). COUCH R.C. , SIEGEL M.R and DOROUGH H.W., Fate of captan and folpet in rats and their effects on isolated liver nuclei, *Pestic. Biochem. and Physiol.*, 7, 547 (1977).
- (79). CRAIG G.D. and PEBERDY J.F., The mode of action of S-benzyl-o,o-di-isopropyl phosphorothioate and of dichloran on *Aspergillus nidulans*, *Pesticide Sci*, 14, 17 (1983).
- (80). ΓΡΑΝΙΤΣΑΣ Ν., Γενική Βιολογία (1984).
- (81) DAHMEN H., HOCH H.C. and STAUB T., Differential effects of sterol

inhibitors on growth cell membrane permeability, and ultrastructure of two target fungi , *Phytopathology*, 78, 1033 (1988).

(82). DASSENOY B. and MEYER J.A. , Mutagenic effect of benomyl on *Fusarium oxysporum*, *Mutation Research*, 21 119, (1973).

(83). DAVIDSE L.C., Antimitotic activity of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*, *Pest.Biochem. Phys.* , 3, 317 (1973).

(84). DAVIDSE L.C, Mode of action of methyl benzimidazole-2-yl-carbamate (MBC) and some biochemical aspects of acquired resistance against this fungicide in *Aspergillus nidulans* i " Systemfungizide-systemic fungicides " (H. LYR and C. Polter, Eds) p. 137, Akademie Verlag, Berlin (1975).

(85). DAVIDSE L.C., Antimitotic activity of methyl-benzimidazole-2-yl-carbamate (MBC) in fungi and its binding to cell lar protein. In : Borgers, M. and M. de Brabander Eds., microtubules and microtubule inhibitors, 483, North-Holland Publ. Co., Amsterdam (1975).

(86). DAVIDSE L.C., Mode of action, selectivity and mutagenicity of benzimidazole compounds, *Neth. J. Pl. Path.*, 83, 135 (1977).

(87). DAVIDSE L.C., In systemic fungicides (H. LYR and C. Polter, eds) pp. 227, Akademie - Verlag Berlin (1979).

(88). DAVIDSE L.C.; Benzimidazole compounds; Selectivity and resistance, in : Dekker J. and Georgopoulos S.G. (Eds): Fungicide Resistance in Crop Protection. Pudoc, Wageningen pp. 60-70 (1982).

(89). DAVIDSE L.C., Benzimidazole fungicides. Mechanism of action and biological impact, *Ann. Rev. Phytopathology*, 24, 43 (1986).

(90). DAVIDSE L.C., and DE WAARD M.A., Systemic fungicides. In: INGRAM D.S. and WILLIAMS P.H. (Eds): Advances in Plant Pathology, Vol. 2 Academic Press, London, pp. 191- 257 (1984).

(91). DAVIDSE L.C. and FLACH W., Differential binding of methyl benzimidazole-2-yl-carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*, *J. Cell. Biol.*, 72, 174 (1977).

(92). DAVIDSE L.C. and FLACH W., Interaction of thiabendazole with fungal tubulin, *Biochemistry et Biophysica Acta*, 543, 82 (1978).

(93). DE CALLONE J.R. , GENOT M. and MEYER J.A. , Effects of benomyl, carbendazim and thiophanates on respiration and oxidative phosphorylation of *Fusarium oxysporum* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Pest. sci.* 6, 113 (1975).

(94). DE FALANDRE A. , BOUVIER - FOURCADE I. , SENG J.M. and LEROUX P. , Induction and characterization of *Penicillium caseicola* mutants resistant to ergosterol biosynthesis inhibitors, *Applied and Environmental Microbiology*, 1500 (1987).

(95). DE FOOR P.H. and STUBBLEFIELD E. , Effects of actinomycin D, amethopterin and 5-fluoro-2-deoxuridine on procentriole formation in chinese hamster fibroblast: in culture, *Exp. Cell Res.*, 85, 136 (1974).

(96). DEKKER J., Resistance, Pages 117, 187 in : R.W. MARSH, ed. systemic fungicides, Longman, London and New York, 401 pp. (1977).

(97) DEKKER J., The development of resistance to fungicides. In: HUTSON D.H. and ROBERTS T.R. (Eds): *Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology*, Vol. 4. Wiley and Sons Ltd., New York, pp. 165-218 (1985).

(98). DE NOLLIN S. and BORGERS M., The ultrastructure of *Candida albicans* after in vitro treatment with miconazole, *Sabouraudia*, 12, 341 (1974).

(99). DE NOLLIN S. and BORGERS M., Scanning electron microscopy of *Candida albicans* after in vitro treatment with miconazole, *Antimicrob. Agents chemother.*, 7, 704 (1975).

(100). DE ROBERTIS E. and SAEZ F., *Cell Biology*, 6th ed., p. 497, Saunders, Philadelphia (1975).

(101): DE WAARD M.A. and FUCHS A., Resistance to ergosterol biosynthesis inhibitors.II.Genetic and Physiological aspects. Fungicide resistance in crop protection, ed. J. DEKKER and S.G. GEORGOPOULOS, pp. 87, Wageningen: Pudoc (1982).

(102). DE WAARD M.A. and GIESKES S.A., Characterization of fenarimol resistant of *Aspergillus nidulans*, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 835, 177 (1977).

(103). DE WAARD M.A. and SISLER H.D., Resistance to fenarimol in *Aspergillus nidulans*, *Meded. Facult Landb. Rijus. Gent.* 41, 571 (1986).

(104). DE WAARD M.A. and VAN NISTELROOY J.G.M., Mechanism of resistance to fenarimol in *Aspergillus nidulans*, *Pestic. Biochem. and Physiol.*, 10, 219 (1979).

(105). DE WAARD M.A. and VAN NISTELROOY J.G.M., An energy - dependent efflux mechanism for fenarimol in a wild-type strain and fenarimol - resistant mutants of *Aspergillus nidulans*, *Pestic. Biochem. and Physiol.*, 13, 255 (1980).

(106). DE WAARD M.A. and VAN NISTELROOY J.G.M., Induction of fenarimol-efflux activity in *Aspergillus nidulans* by fungicides inhibiting sterol biosynthesis, *Journal of General Microbiology*, 126, 483 (1981).

(107). DE WAARD M.A. and VAN NISTELROOY J.G.M., Toxicity of fenpropimorph to fenarimol-resistant isolates of *Penicillium italicum*, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88, 231 (1982a).

(108). DE WAARD M.A. and VAN NISTELROOY J.G.M., Effects of phthalimide fungicides on the accumulation of fenarimol by *A. nidulans*, *Pest. Sci.*, 15, 55 (1984b).

(109) DE WAARD M.A. and VAN NISTELROOY J.G.M., Accumulation of SBI fungicides in wild-type and fenarimol-resistant isolates of *Penicillium italicum*, *Pest. Sci.*, 22, 371 (1988).

(110). DE WAARD M.A., GROENE WEG. H. and VAN NISTELROOY J.G.M., Laboratory resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in *Penicillium italicum*, *Neth. J. pl. Path.*, 88, 99 (1982).

(111). DILLWITH J.W. and LEWIS R.A., Inhibition of DNA polymerase b-activity in isolated Bovine Lincr Nuclei by captan and related compounds, *Pestic. Biochem. and Physiol.*, 14, 208 (1980).

(112). DOMINQUEZ O.V. and SAMUELS L.T. , Mechanism of inhibition of adrenal steroid 11b-hydroxylase by me tho pyrapone (metopirone), *Endocrinology*, 73, 304 (1963).

(113). DRUMMOND D.G. , The practice of electron microscopy, *J. ROY Micr. Soc.*,70, 1(1950).

(114). DUGGER W.M. HUMPHREYS T.E. and CALHOUN B., Influence of N-(trichloromethylthio) - 4 - Cyclohexene - 1,2 - dicarboximide (captan) on higher plants. II. Effect of specific enzyme systems, *Amer. J. Botany*, 46,151 (1959).

(115). DUSTIN P. , Microtubules, 2nd edit. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg, 482pp (1984).

(116). EBERT E., GAUDIN J., MUECKE W., RAMSTEINER K., CHRISTIAN V. and FUHRER H., Inhibition of ergosterol biosynthesis by itaconazole in *Ustilago maydis*, *Z. Naturforschung* 38:28 (1983).

(117). EDLICH W. and LYR H., Occurrence and properties of a cytochrome c-reductase in *Mucor* and its interaction with some fungicides, *Tangusber. Akad. Landwirtschaftswiss. DDR*, 222: 37 (1984).

(118). ELLIOT C.G., The cytology of *Aspergillus nidulans*, *Genet. Res. Camb.*, 1, 462 (1960).

(119). EVANS J.L. and GEALT M.A., The sterols of growth and stationary phases of *Aspergillus nidulans*, cultures, *Journal of General Microbiology*, 131, 279 (1985).

(120). FARR D.F., BILLS F.G., CHAMURIS P. and ROSSMAN A.Y., Fungi on plants and plant products in the United States, 693 (1989).

(121). FALANDRE DE A., BOUVIER-FOURCADE I., SENG J.M. and LEROUX P., Induction and characterization of *Penicillium caseicola* mutants resistant to ergosterol biosynthesis inhibitors, *Applied and Environmental Microbiology*, 1500 (1987).

(122). FINCHAM J.R.S. and DAY P.R., Fungal Genetics, Blackwell Sci, Publ., Oxford (1965).

(123). FROMTLING R.A., Imidazoles as medically important antifungal agents : an overview, *Drugs of Today* 20, 325 (1984).

(124). FUCHS A. and DE WAARD M.A., Resistance to ergosterol biosynthesis inhibitors: I. Chemistry and phenomenological aspects. In: Dekker, J. and

Georgopoulos S.G. (Eds), Fungicide resistance in Crop Protection. Pudoc, Wageningen, p. 71 (1982).

(125). FUCHS A., DE VRIES F.W. and DE WAARD M.A., Simoultaneous resistance in fungi to ergosterol biosynthesis inhibitors and dicarboximides, *Neth. J. Plant. Pathol.*, 90, 3 (1984).

(126). FUCHS A. and DRANDAREVSKI C.A., The likelihood of development of resistance to systemic fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis, *Neth. J. Pl. Path.* 82, 85 (1976).

(127). FUCHS A., VAN DE BERG G.A. and DAVIDSE L.C., A comparison of benomyl and thiophanates with respect to some chemical and systematic fungitoxic characteristics, *Pest. Bioch. Physiol.*, 2, 191 (1972).

(128). FULLER M.S. , ROBERSON R.W. and GISI U., Effects of the sterol demethylase inhibitor, cyproconazole on hyphal tip cells of *Scletotium rolfsii*. III Cell wall Cytochemistry, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 36, 115, (1990).

(129). GADHER P., MERCER E.I., BALOWIN B.C. and WIGGINS T.E., A comparison of the potency of some fungicides as inhibitors of sterol 14-demethylation, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 19, 1 (1983).

(130). GAMBINO J., BERGEN L.C. and MORRIS N.R., Effects of mitotic and tubulin mutations on microtubule architecture in actively protoplasts of *Aspergillus nidulans*, *J. Cell Biol.*, 99, 830 (1984).

(131). GASTONYI M. and JOSEPOVITS G., The activation of triadimefon and its role in the selectivity of fungicide action, *Pesticide Science*, 10, 57 (1979).

(132). ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΣ Σ.Γ., Καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών, Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών, Αθήνα σελ. 72, (1979).

(133). GEORGOPOULOS S.G., Use of heterozygous diploid strains of *Aspergillus nidulans* for the recognition on genetically active pesticides in IUPAC PESTICIDE CHEMISTRY, Human Welfare and Environment, ed. Miyamoto, J. et al., Vol. 3, pp. 159, Pergamon Press, 1983.

(134). ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΣ Σ.Γ., Βασικές γνώσεις Φυτοπαθολογίας, Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών, Αθήνα σελ. 95, (1984).

(135). GEORGOPOULOS S.G., KAPPAS A. and HASTIE A.G., Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes, *Phytopathology*, 66, 217 (1976).

(136). GEORGOPOULOS S.G., SARRIS M. and ZIOGAS B.N., Mitotic instability in *Aspergillus nidulans* caused by the fungicides iprodione, procymidone and vinclozolin, *Pest. Sci.*, 10, 389 (1979).

(137). GESTEL VAN J., HEERES J., JANSEN M. and REET VAN G., Synthesis and screening of a new group of fungicides: 1-(2-phenyl-1, 3-dioxolan-2-ylmethyl)-1, 2, 4- triazoles, *Pest. Sci.*, 11, 95-99 (1980).

(138). GIBBONS F.G., PULLINGER C.R. and MITROPOULOS A., Studies on the mechanism of lanosterol 14 α -demethylation. A requirement for two distinct types of mixed function oxidase systems, *Biochem. J.*, 183, 309 (1979).

(139). GREENWAY W. and WHATLEY F.R., Resistance to systemic fungicides-causes and cures, *Current Advanc., Plant Sci.*, 20, 335 (1975).

(140). GRANDMOUGIN A., BOUVIER - NAVE P., ULLMANN P., BENVENISTE P. and HARTMANN M.A., Cyclopropyl sterol and phospholipid composition of membrane fractions from maize roots treated with fenpropimorph, *Plant Physiol.*, 90, 591 (1989).

(141). GUALANDI G. and BELLINCAMPI D., Induced gene mutation and mitotic non-disjunction in *Aspergillus nidulans*, *Toxicology letters* 9, 389 (1981).

(142). GUAN J., KERKENAAR A. and DE WAARD M.A., Effects of imazalil on sterol composition of sensitive and DMI-resistant isolates of *Penicillium italicum*, *Neth. J. Plant Path.*, 95, 73 (1989).

(143). GULLINO M.L. and SISLER H.D., Antagonism of iprodione toxicity to *Botrytis cinerea* by mixed function oxidase inhibitors, *Pest. Science*, 215 (1985).

(144). HAMERSHLAG R.S. and SISLER H.D., Differential action of benomyl and methyl - 2- bendimidazole carbamate (MBC) in *Saccharomyces pastorianus*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2, 123 (1972).

(145). HAMERSHLAG R.S. and SISLER H.D., Benomyl and methyl-2-benzimidazole carbamate (MBC): Biochemical, cytological and chemical aspects of toxicity to *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Pestic. Biochem Physiol.*, 3, 42 (1973).

(146). HASTIE A.C., Benlate- induced instability of *Aspergillus nidulans*, *Nature*, 226, 771 (1970).

(147). HASTIG A.C., Benomyl induced instability of *Aspergillus* diploids, Proc. 6th. Br. Insectic. Fungic. Conf. (1971) 283-286.

(148). HATA S., NISHINO T., KOMORI M. and KATSUKI H., Involvement of cytochrome P-450 in $\Delta 22$ - desaturation in ergosterol biosynthesis of yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 272 (1981).

(149). HAUGHAN P.A., LENTON J.R. and GOAD J.L., Paclobutrazol inhibition of sterol biosynthesis in a cell suspension culture and evidence of an essential role for 24-ethylsterol in plant cell division, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 146, 510 (1987).

(150). HAUGHAN P.A., LENTON J.R. and GOAD J.L., Sterol requirements and paclobutrazol inhibition of a celery cell culture, *Phytochemistry*, 27, 2491 (1988).

(151). HENRY M.J., Effects of sterol biosynthesis inhibiting (SBI) fungicides on cytochrome P-450 oxygenations in fungi, Ph. D. thesis, University of Maryland (1982).

(152). HENRY M.J. and SISLER H.D., Effects of miconazole and dodecylimidazole on sterol biosynthesis in *Ustilago maydis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 603 (1979).

(153). HENRY M.J. and SISLER H.D., Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Ustilago maydis* by the fungicide 1- [2- (2, 4- dichlorophenyl)- 4- ethyl- 1, 3- dioxolan- 2- ylmethyl] -1H- 1, 2, 4 - triazole, *Pesticide Science*, 12, 98 (1981).

(154). HIPPE S., Morphology of *Ustilago avenae* after treatment with systemic fungicides as studied by scanning electron microscopy, *Phytopathol. Zeitsch.*, 106, 321 (1983).

(155). HIPPE S. , Ultrastructure changes induced by the systemic fungicides triadimefon, nuarimol and imazalil nitrate in sporidia of *Ustilago avenae*, *Pestic. Sci.* 15,210 (1984)

(156). HIPPE S. , Electron microscopic investigations on the cytology of *Ustilago avenae* as influenced by the systemic fungicides - triadimefon, nuarimol and imazalil - nitrate: A thin section and freeze - fracture study, *Pestic. Biochem. Physiol.* , 21, 170 (1984).

(157). HIPPE S. , and GIESEN U. The effect of triadimenol on the cytology and growth of sensitive and resistant strains of *Ustilago avenae*, *Ann. Appl. Biol.* 112, 79 (1988).

(158). HIPPE S., and GROSSMANN F. , The ultrastructure of sporidia of *Ustilago avenae* after treatment with the fungicides nuarimol and imazalil nitrate, *Pestic. sci.* , 13, 447 (1982).

(159). HIPPE S. and KOLLER W., Ultrastructure and sterol composition of laboratory strains of *Ustilago avenae* resistant to triazole fungicides, *Pestic. Biochem. and Physiology*, 26, 209 (1986).

(160). HIPPE S. and NIEDERMEYER W., Freeze-fracture electron microscopy of the plasmalemma of *Ustilago avenae* treated with systemic fungicides: A quantitative analysis of the intramembrane particles, *Pestic. Biochem. and Physiology*, 21, 184 (1984).

(161). HIPPE S. , BUCHENAUER H. and GROSSMANN F., Influence of triadimefon on ultrastructure of sporidia of *Ustilago avenae* , *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 87, 423 (1980).

(162). HISADA Y. and KAWASE Y., Morphological studies on antifungal action of N-(3', 5' - dichlorophenyl)- 1,2- dimethyl- cyclopropane- 1, 2- dicarboximide on *Botrytis cinerea*, *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.*, 43, 151 (1977).

(163). HISADA Y., KATO T. and KAWASE Y., Mechanism of antifungal action of procymidone in *Botrytis cinerea*, *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.*, 44, 509 (1978).

(164). HOCHSTEIN P.E. and COX C.E., Studies on the fungicidal action of N-(trichloromethylthio)- 4 - cyclohexene- 1, 2, - dicarboximide (captan)., *Amer. J. Botany*, 43, 437 (1956).

(165). HOSOKAWA G., PATTERSON G.W. and LUSBY W.R., Effects of triarimol, triademorph and triparanol on sterol biosynthesis in carrot, tobacco and soybean suspension cultures, *Lipids*, 19, 449 (1984).

(166). HOWARD R.J. and AIST J.R., Effects of MBC on hyphal tip organization, growth and mitosis of *Fusarium acuminatum* and their antagonism by D2O, *Protoplasma*, 92, 195 (1977).

(167). HOWARD R.J. and AIST J.R., Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: Ultrastructural effects of methyl benzimidazole - 2 - yl carbamate determined by freeze- substitution of hyphal tip cells, *J. cell Biol.*, 87, 55 (1980)

(168). HSU T.C., LIANG J.C. and SHIRLEY L.R., Aneuploidy induction by mitotic arrestants. Effects of diazepam on diploid chinese hamster cells, *Mutation Research*, 122, 201 (1983).

(169). HUGGENBERGER F., COLLINS M.A. and SKYLAKAKIS G., Decreased sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* to fenarimol and other ergosterol biosynthesis inhibitors, *Crop. Protection*, 3, 137 (1984).

(170). IWATA K., KANDA Y., YAMAGUCHI H. and OSUMI M., Electron microscopic studies on the mechanism of action of clotrimazole on *Candida albicans*, *Sabourandia*, 11, 205 (1973).

(171). IWATA K., SHIBUYA H., OHKAWA V. and INUI N., Chromosomal aberrations in V-79 cells induced by superoxide radical generated by the hypoxanthine-xanthine oxidase systems. *Toxicol. Letters* 22, 75 (1984).

(172). JOHNSON G.A. and JALAL S.M., DDT Induced chromosomal damage in mice, *J. Heratity*, 64, 7 (1973).

(173). KAFER E., An 8 - chromosome map of *Aspergillus nidulans* , *Adv. Genet.*, 9, 105 (1958).

(174). KAFER E., The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*, *Genetics*, 46, 1581 (1961).

(175). KAFER E., Disruptive effects of ethyl alcohol on mitotic chromosome segregation in diploid and haploid strains of *Aspergillus nidulans*, *Mutation Research*, 135, 53 (1984).

(176). KAFER E., SCOTT BARRY R., and KAPPAS A., Systems and results of test for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *A. nidulans*, *Mutation Research*, 1 (1986).

(177). KAFER E., SCOTT BARRY R., GORDON L. and STAFFORD R., *Aspergillus nidulans*. Systems and results of tests for chemical induction of mitotic segregation and mutation. I. Diploid and duplication assay systems, *Mutation Research*, 98, 1 (1982).

(178). ΚΑΛΑΜΑΡΑΚΗ ANNA, Διδακτορική διατριβή υποβληθείσα στην Α.Γ.Σ.Α. (1988).

(179). ΚΑΠΠΑΣ Α., Έρευνα επί του μηχανισμού της γενετικής δράσεως χημικών παραγόντων του περιβάλλοντος στον μύκητα *Aspergillus nidulans*, Διατριβή επί υφηγεσία, Πανεπιστήμιο Πατρών (1976).

(180). KAPPAS A., On the mechanisms of induced somatic recombination by certain fungicides in *Aspergillus nidulans*, *Mutation Research*, 51, 189 (1978).

(181). KAPPAS A. and BRIDGES B. A., Induction of point mutations by benomyl in DNA - repair - deficient *Aspergillus nidulans*, *Mutation research*, 91, 115(1981).

(182). KAPPAS A. and GEORGOPOULOS S.G., Interference of griseofulvin with the mitotic process in *Aspergillus nidulans* diploids, *Journal of Bacteriology*, 119,334 (1974).

(183). KAPPAS A. and GEORGOPOULOS S.G. and HASTIE A.C., On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid *Aspergillus nidulans*, *Mutation Research*, 26, 17 (1974).

(184). KAPPAS A., GREEN M.H.L., BRIDGES B.A., ROGERS A.M. and MURIEL W.J., Benomyl a novel type of base analogue mutagen. *Mutation Research*, 40, 379 (1976).

(185). KARAGEZYAN K.G., Phospholipid - phospholipid correlations and the dynamics of free radical oxidation of lipids in biological membranes in alloxan diabetes, *Voprosij medicinoi khimii*, 28,56 (1982).

(186). KATO T., Mode of antifungal action of a new fungicide, tolclufos-

methyl, Pesticide Chemistry : Human Welfare and the Environment. Eds. in Chief : J. Miyamoto and P.C. Kearney. Vol. 3, Mode of action, Metabolism and Toxicology. Eds: S. Matsunaka, D.H.HUTSON and S.D. Murphy. Pergamon Press, Oxford, 1983, 569pp.

(187). KATO T., Biosynthetic processes of ergosterol as the target of fungicides : Pesticide Chemistry : Human Welfare and the Environment, Eds. J. Miyamoto et al. Vol. 3. Mode of action, Metabolism and Toxicology, Pergamon Press., Dyfond (1984).

(188). KATO T. and KAWASE Y., Selective inhibition of the demethylation at C-14 in ergosterol biosynthesis by the fungicide, Denmert (S-1358), *Agricultural and Biological Chemistry*, 40, 2379 (1976).

(189). KATO T. , SHOAMI M. and KAWASE Y. , Comparison of tridemorph with buthiobate in antifungal mode of action, *Journal of Pesticide Science*, 5, 69 (1980).

(190). KATO T. , TANAKA S., SHOAMI M. and KAWASE Y. , Effects of the fungicide S-1358 on general metabolism and lipid biosynthesis in *Monilia fructigena*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 38, 2377 (1974).

(191). KATO T., TANAKA S., UEDA M. and KAWASE Y. , Inhibition of sterol biosynthesis in *Monilia fructigena* by the fungicides- 1358, *Agricultural and Biological Chemistry*, 39, 169 (1975).

(192). KERKENAAR A., The mode of action of dimethylmorpholines in " Recent Trends in the Discovery, Development and Evaluation of antifungal agents". Proceedings of an International Telesymposium, 523 (1987).

(193). KERKENAAR A., and BARUG D., Differences in effect of sterol biosynthesis inhibitors on morphology of budding and filamentous fungi, Institute of Applied Chemistry TNO, P.O. BOX 5009, 3502 J.A. Utrecht, The Netherlands (1983).

(194). KERKENAAR A., and BARUG D., Fluorescence microscopic studies of *Ustilago maydis* and *Penicillium italicum* after treatment with imazalil and fenpropimorph, *Pesticide sci.* , 15, 199 (1984).

(195). KERKENAAR A. and SIJPESTEIJN K.A. , On a difference in

the antifungal activity of tridemorph and its formulated product calixin, *Pest. Biochem. and Physiology*, 12, 124 (1979).

(196). KERKENAAR A., BARUG D., and SIJPESTEIJN K., On the antifungal mode of action of tridemorph, *Pest. Bioch. and Phys.*, 12, 195 (1979).

(197). KERKENAAR A., UCHIYAMA M. and VERSLUIS G.G., Specific effects of tridemorph on sterol biosynthesis in *Ustilago maydis*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 16, 97 (1981).

(198). KERKENAAR A., VAN ROSSUM J.M, VERSLUIS G.G. and MARSMAN J.W. , Effect of fenpropimorph and imazalil on sterol biosynthesis in *Penicillium italicum*, *Pesticide sci. ence*, 15, 177 (1984).

(199). KIHLMAN B.A., STURELID S., HARTLEY-ASP B. and NILSSON K., The enhancement by caffeine of the frequencies of chromosomal aberrations induced in plant and animal cells by chemical and physical agents, *Mutation Research*, 26, 105 (1974).

(200). KILMARTIN J.V. and ADAMS A.E., Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*, *J. Cell Biol.*, 98,922 (1984).

(201). KING D.J., WISEMAN A., KELLY D.E. and KELLY S.L., Differences in the cytochrome P-450 enzymes of sterol C-14 demethylase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* 10, 261 (1985).

(202). KINSLER S., LEVI P.E. and HODGSON E., Hepatic and extrahepatic microsomal oxidation of phorate by the cytochrome P-450 and FAD-containing monooxygenase systems in the mouse. *Pestic. Biochem and Physiology*, 31, 54 (1988).

(203). KIRKLAND D.J. and VENITT S., Cytotoxicity of hair colourant constituents: chromosome damage induced by two nitrophenylenediamines in cultures chinese hamster cells, *Mutation Research*, 40, 47 (1976).

(204). KNAAP A.G.A.C. and KRÄMER P.G.N., Mutagenicity of hycanthone in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Research*, 22, 55 (1974).

(205). KNOELL H.E., On the nature of the monooxygenase system involved in ubiquinone-8 synthesis, *Fems Microbiol. Letters* 10, 63 (1981).

(206). KOLLER W., Isomers of sterol synthesis inhibitors: Fungicides effects and plant growth regulator activities, *Pestic. sci.*, 18, 129 (1987).

(207). KOLLER W. and SCHEINPFLUG H., Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: A new challenge, *Plant Disease*, 71, 1066 (1987).

(208). KUHN P.J., The discovery and development of fungicides- Does biochemistry have a role, *Pest. sci.*, 25, 123 (1989).

(209). KUMAR S.S., SIKKA H.C., SAXENA J. and SWEIG G., Membrane damage in Human Erythrocytes caused by captan and captafol, *Pest. Biochem. and Physiol.*, 5, 338 (1975).

(210). KUMARI L., DE CALLONE J.R., MEYER J.A. and TALPAERT M., Interference of benomyl and methyl-2-benzimidazole carbamate (MBC) with DNA metabolism and nuclear divisions in *Fusarium oxysporum*, *Pest. Biochem. and Physiol.* 7, 273 (1977).

(211). LAFI A., PARRY E.M. and PARRY J.M., The effects of benzodiazepines upon the fidelity of mitotic cell division in cultured chinese hamster cells, *Mutation Research*, 189, 319 (1987).

(212). LANGCAKE P., KUHN P.J. and WADE M., The mode of action of systemic fungicides, In progress in *Pesticide Biochemistry and Toxicology*, vol. 3., ed. D.H. HUTSON T.R., ROBERTS, pp 1-109. New York: Wiley 449pp (1983).

(213). LEGATOR M.S., Genetic Toxicology, *Ann. Rev. Pharmacology*, 15, 387 (1975).

(214). LEGATOR M.S., and FLAMM W.G., Environmental mutagenesis and repair, *Ann. Rev. Biochem.*, 42, 683 (1973).

(215). LEGATOR M.S., KELLY F.J., GREEN S. and OSWALD E.J., Mutagenic effects of captan, *Ann. New York Acad. Sci.*, 160, 344 (1969).

(216). LEGATOR M.S., PALMER K.A., GREEN S. and PETERSON K.W., Cytogenetic studies in rats of cyclohexylamine, a metabolite of cyclamate, *Science*, 165, 1139 (1969).

(217). LEONARD A., JACQUET P. and LAUWERYS R.R., Mutagenicity and

teratogenicity of mercury compounds *Mutation Research*, 114, 1 (1983).

(218). LEROUX P. and FRITZ R., Antifungal activity of dicarboximides and aromatic hydrocarbons and resistance to these fungicides. In: TRINCI, A.P.J. and RYLEY J.F. (eds.): Mode of action of antifungal agents, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 207- 237 (1983).

(219). LEROUX P., FRITZ R. and GREDT M., Cross-resistance between 3,5-dichlorophenyl cyclic imid fungicides (dichlozolin, iprodione, procymidone, vinclozolin) and various aromatic compound in:-LYR H. and POLTER C. (Eds.): Systemische Fungizide und Antifungale Verbindungen. Abh. Akad. d. wiss. DDR, Akademie-Verlag, Berlin, pp- 79- 88 (1983).

(220). LEWIS R.A. and BROWN D., The inhibition of nuclear DNA polymerizing activity of captan, *Pestic. Biochem. and Physiol.*, 8, 317 (1978).

(221). LOPRIENO N., BARALE R., BARONCELLI S., BAUER C., BRONZETI G., CAMMELLINI A., CERCIGNANI G., CORSI C., GERVASI G., LEPORINI C., NIERI R., ROSSI A.M., STRETTI G. and TURCHI G., Evaluation of the genetic effects induced by vinyl chloride monomer (VCM) under mammalian metabolic activation: Studies in vitro and in vivo, *Mutation Research*, 40, 85 (1976).

(222). LORENZ G. and POMMER E.H., Pectolytic and cellolytic enzymes of dicarboximide sensitive and resistant stains of *Botrytis cinerea*, *EPO BULL.*, 145 (1982).

(223). LORENZ G. and POMMER E.H. Morphological and physiological characteristics of dicarboximide- sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*, *OEPP/ EPPO Bull.*, 15, 353 (1985).

(224). LUKENS R. J., Fungitoxic action of nonmetallic organic fungicides, in " Biodeterioration of Materials" p. 486, Elsevier, Barkig, England (1969).

(225). LUKENS R. J., Heterocyclic nitrogen compounds in " Fungicides" (D.C. Torgeson, Ed.), vol.2, P. 395, Academic Press, New York (1969).

(226). LUKENS R.J. and SISLER H., Chemical reactions involved in the fungitoxicity of captan, *Phytopathology*, 48, 235 (1958).

(227). LUKENS R.J., RICH S. and HORSFALL J.G., Role of the R-group in the

fungitoxicity of R- SCCI3 compounds, *Phytopathology*, 55, 658 (1965).

(228). LYR H. (ed.), Modern selective fungicides- properties, applications, mechanisms of action. Longman Group U.K. Ltd., London and VEB GUSTAV FISCHER VERLAG, JENA (1987).

(229). LYR H., Lipid peroxidation: A side effect of sterol demethylation inhibitor fungicides in *Mucor mucedo* (L.) FRES and *Ustilago maydis*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 32, 197 (1988).

(230). LYR H. , and CASPERSON G., Anomalous cell wall sythesis in *Mucor mucedo* (L.) Fres. Induced by some fungicides and other compounds related to the problem of dimorphism, *Z. Allg. Mikrobiol.*, 22, 245 (1982).

(231). LYR H. and CASPERSON G., On the mechanism of action and the phenomenon of cross- resistance of aromatic hydrocarbon fungicides and dicarboximide fungicides, *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, Vol. 17, pp 317 (1982).

(232). LYR H. , and EDLICH W. , On the molecular mechanism of action of the fungicides chloroneb and etridiazole. In: LYR H. and POLTER C. (Eds.): Systemic fungicides and Antifungal Compounds. *Tagungsbericht, Akad. Landwirtschafts - wiss DDR 222,59* (1984).

(233). LYR H. (ed.), and WERNER P., On the mechanism of action of the fungicide chloroneb, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18, 69 (1982).

(234). MACRIS B. and GEORGOPOULOS S.G., Apparent effect of pentachloronitrobenzene on the hyphal wall polysacharides of two strains of *Neurospora crassa*, *Zeitschr, Allgem. Mikrob.* 13, 415 (1973).

(235). MARICHAL P., GORRENS J., and VANDEN BOSSCHE H., The action of itraconazole and ketoconazole on growth and sterol synthesis in *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*, *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 23, 13 (1985).

(236). MARICHAL P., BOSSCHE Y.H., GORRENS J., BELLENS D. and JANSSEN P.A.J., Cytochrome P-450 of *Aspergillus fumigatus* - Effects of itraconazole and ketoconazole, in proceeding of the 6th international conference on biochemistry and biophysics of cytochrome P-450 held in Venna at the

University of Economics, July 3-8, 1988, 177 (1989).

(237). MARICHAL P., GORRENS J., VAN CUTSEM J., VAN GERVEN F. and VANDEN BOSSCHE H., Effects of ketoconazole and itraconazole on growth and sterol synthesis in *Pityrosporum ovale*, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 24, 487 (1986).

(238). MARRIOTT M.S., Inhibition of sterol biosynthesis in *Candida albicans* by imidazole- containing antifungals, *Journal of General Microbiology*, 117, 253 (1980).

(239). MEINGASSNER J.G. and SLEYTR U., The effects of naftifine on the ultrastructure of *Candida parapsilosis*: A freeze- fracture study, 20, 199 (1982).

(240). MERGER E.I., The biosynthesis of ergosterol, *Pestic. sci.* , 15, 133 (1984).

(241). MITROPOULOS K.A., GIBBONS G.F. and REEVES B.A., Lanosterol 14-a demethylase. Similarity of the enzyme from yeast and rat liver, *Steroids*, 27, 821 (1976).

(242). MONTIE T.C, and SISLER H.D., Effects of captan on glucose metabolism and growth of *Saccharomyces pastorianus*, *Phytopathology*, 52, 94 (1962).

(243). MOORHEAD P.S., NOWELL P.S., WELLMAN W.I. , BATTIPS D. M. and HUNGERFORD D. A., Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood, *Expl. Cell Res.* 20, 613 (1960)

(244). MOREJOHN L.C. and FOSKET D.E., Taxol - induced rose microtubule polymerization in vitro and its inhibition by colchicine, *J. Cell Biol.*, 99, 141 (1984).

(245). MORIYA M., OHATA T., WATANABE K., MIYAZAWA T., KATO K. and SHIRASU Y., Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems, *Mutation Research*, 116, 185 (1983).

(246). MORELAND D.E., NOVITZKY W.P. and LEVI P.E., Selective inhibition of cytochrome P-450 isozymes by the herbicide synergist tridiphane, *Pestic. Biochem and Physiol.*, 35,42 (1989).

(247). MORPUGO G., Membrane- damaging agents cause mitotic non-

disjunction in *Aspergillus nidulans*, *Mutation Research*, , 79, 169 (1980).

(248). MORPUGO G., BELLINCAMPI D., GUALANDI G., BALDINELLI L. and SERLUPI CRESENZI O., Analysis of mitotic non- disjunction with *Aspergillus nidulans*, *Environmental Health Perspectives*, 31, 81 (1979).

(249). MORRIS N.R., Chromosome structure and the molecular biology of mitosis in eucaryotic micro- organisms in " The Eukatyotic Microbial Cell" (G.W. Gooday, D. Lloyd and A.P.J. Trinci, eds.) Cambridge University Press. pp. 41 (1980).

(250). MURGOLIS R.L. and WILSON L., Addition of colchicine- tubulin complex to microtubule ends; The mecahanism of substoichiometric colchicine poisoning, *Proc. Nath, Acad. Sci. (USA)*, 74, 3466 (1977).

(251). NEFF N.F., THOMAS J.H., GRISAFI P. and BOTSTEIN D., Isolation of the tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function in vivo, *Cell*, 33, 211 (1983).

(252). NEIDERT K., EPPS L.V. and WELCH W., Inhibition of *Penicillium duponti* carboxylesterase by the fungicides captan and folpet, *Pestic. Biochem. and Physiol.*, 23, 221 (1985).

(253). ODDS F.C., COCKAYNE A., HAYWARD J. and ABBOTT A.B., Effects of imidazole and triazole derivative antifungal compounds on the growth and morphological development of *Candida albicans* hyphae, *Journal of General Microbiology*, 131, 2581 (1985).

(254). OLVANG H., Sensitivity of *Pseudocercospora herpotrichoides* to benomyl, *Journal of Plant Disease and Protection*, 90, 515 (1983).

(255). ONG T. and DES SERRES F.J., Mutagenic evaluation of antischistosomal drugs and their derivatives in *Neurospora crassa*, *J. Toxicol. and Environment Health*, 1, 271 (1975).

(256). ONFELT A., Mechanistic aspects on chemical induction of spindle disturbances and abnormal chromosome numbers, *Mutation Research*, 168, 249 (1986).

(257). OWENS R.G. and BLAAC G., Chemistry of the reactions of dichlone

and captan with thiols, *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 20, 475 (1960).

(258). OWENS R.G. and BLAAC G., Site of action of captan and dichlone in the pathway between acetate and citrate in fungus spores, *Contr. Boyce Thompson Inst.*, 20, 459, (1960 a).

(259). OWENS R.G. and NOVOTNY H.M., Mechanism of action of the fungicide captan (N-trichloromethylthio)- 4 - cyclohexene-1,2 - dicarboximide), *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 20, 171 (1959).

(260). PALMER K.A., GREEN S. and LEGATOR M.S., Cytogenic effects of DDT and derivatives of DDT in a cultured mammalian cell line, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17, 276 (1970).

(261). PALTAUF F., DAUM. G., ZUDER G., HOGENÄUER G., SCHULZ G. and SEIDL G., Squalene and ergosterol biosynthesis in fungi treated with naftifine, a new antimycotic agent, *Biochimica et Biophysica Acta*, 712, 268 (1982).

(262). ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΡΟΥ - ΠΕΤΣΙΚΟΥ Ν., Διασυστηματικά μυκητοκτόνα, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, σελ. 37 - 46, Αθήνα (1975).

(263). PAPPAS A.C. and FISHER D.J., A comparison of the mechanism of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*, *Pesticide Science*, 10, 239 (1979).

(264). PAPPAS A.C., COOKE B.K. and JORDAN V.W.L., Insensitivity of *Botrytis cinerea*, to iprodione, procymidone and vinclozolin and their uptake by the fungus, *Plant Pathol.*, 28, 71 (1976).

(265). PARKS L.W., Metabolism of sterols in yeast, *Critical Reviews in Microbiology* 6(4) : 301 (1983).

(266). PARKS L.W., RODRIGUEZ R.J. and LOW C., An essential fungal growth factor derived from ergosterol: A new end product of sterol biosynthesis in fungi, *Lipids*, 21, 89, (1986).

(267). PETRANYI G., RYDER N.S. and STUTZ A., Allylamine derivatives : New class of synthetic antifungal agents inhibiting fungal squalene epoxidase, *Reprint series*, 224, 1239 (1984).

(268). PINTO W.J., LOZANO R., SEKULA B.C. and NES W.R., Stereochemically distinct roles for sterol in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 112, 47 (1983).

(269). POMMER E.H., Morpholine fungicides in "Modern Selective fungicides" (H. LYR, ed.) p. 143, *Longman Scientific and Technical, Essex* (1987).

(270). PONTECORVO G., The parasexual cycle in fungi, *Ann. Rev. Microbiol.*, 10, 393 (1956).

(271). PONTECORVO G. and KAFER E., Genetic analysis by means of mitotic recombination, *Adv. Genet.*, 9, 71 (1958).

(272). PONTECORVO G., TARR GLOOR E. and FORBES E., Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*, *J. Genet.*, 52, 226 (1954).

(273). PONTECORVO G., ROPER J.A., HEMMONS L.M., MAC DONALD K.D. and BUFTON A.W., The genetics of *Aspergillus nidulans*, *Advan. Genet*, 5, 141 (1983).

(274). PONTZEN R. and SCHEINPFLUG H., Effects of triazole fungicides on sterol biosynthesis during spore germination of *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* and *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Neth J. Pl. Path.* 95 (1989) Supplement 1: 151-160.

(275). PORTER D.M., Growth of *Sclerotinia minor* on media containing chlorothalonil and benomyl, *Plant Disease*, 65, 591 (1984).

(276) PRING R.J., Effects of triadimefon on the ultrastructure of rust fungi infecting leaves of wheat and broad bean (*Vicia faba*), *Pestic. Biochem. and Physiology*, 21, 127 (1984)

(277). PRING R.J., Ultrastructural changes occurring in wheat leaves following triadimefon treatment, *Pest. Sci.*, 37, 327 (1986)

(278). QUINLAN R.A., POGSON C.I. and GULL K., The influence of the microtubule inhibitor, methyl bendimidazole- 2- yl- carbamate (MBC) on nuclear division and the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. cell Sci.*, 46, 341 (1980).

(279). RAGSDALE N.N., Specific effects of triarimol on sterol biosynthesis in *Ustilago maydis*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 380, 81 (1975).

(280). RAGSDALE N.N., " Inhibitors of lipid synthesis": In: M.R. Siegel and H.D. Sisler (Eds). Antifungal compounds, Marcel Dekker, New York, Vol. 2: 333, (1977).

(281). RAGSDALE N.N. and SISLER H.D., Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Ustilago maydis* by the fungicide triarimol, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 46, 2048 (1972).

(282). RAGSDALE N.N. and SISLER H.D., Mode of action of triarimol in *Ustilago maydis*, *Pest. Biochem. and Physiology*, 3, 20 (1972).

(283). RAHIER A., and TATON M., The 14a - demethylation of obtusifoliol by a cytochrome P - 450 monooxygenase from higher plants microsomes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 140, 1064 (1986).

(284). RAHIER A., SCHMITT P., HUSS B., BENVEVISTE P. and POMMER E.H., Chemical structure- activity relationships of the inhibition of sterol biosynthesis by N- substituted morpholines in higher plants, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 25, 112 (1986).

(285). RAO C.K., Mitostatic activity of the systemic fungicide piperazin-1, 4 - diyl - bis- [1- (2, 2, 2 - trichloroethyl) formamide] (CA70203) on the roots of *Allium cepa* L., *Vignana Bharathi* 2, 98 (1976).

(285a). RAPER B. K. and FENNELL I. D., The genus *Aspergillus*, *J. Genet.*, (1965)

(286). REILLY C.C. and LAMOUREUX L.G., The effects of the fungicide iprodione on the mycelium of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytopathology*, 71, 722 (1981).

(287). REYNOLDS E.S., The use of lead citrate at high P.H. as an electron - opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.* 17, 208 (1963).

(288). RICHMONDN D.V., Effects of triadimefon on the fine structure of germinating conidia of *Botrytis allii*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 21, 74 (1984).

(289). RICHMONDN D.V., and PHILIPS A., The effect of benomyl and carbendazim on mitosis in hyphae of *Botrytis cinerea*. Pers. ex. Fr. and roots of *Allium cepa* L., *Pestic. Biochem. Physiology*, 5, 367 (1975).

(290). RICHMONDN D.V. and PRING R.J., The effect of benomyl on the fine structure of *Botrytis fabae*, *J. Gen. Microbiol.*, 66, 79 (1971).

(291). RICHMONDN D.V. and SOMERS E., Studies on the fungitoxicity of captan. I. The structural specificity of captan and six N - trichloromethylthio analogues, *Ann. Appl. Biol.*, 50, 33 (1962).

(292). RICHMONDN D.V. and SOMERS E., Studies on the fungitoxicity of captan. III. Relation between the sulphhydryl content of fungal spores and their uptake of captan, *Ann. Appl. Biol.*, 52, 327 (1963).

(293). RICHMONDN D.V. and SOMERS E., Studies on the fungitoxicity of captan. IV. Reactions of captan with cells thiols, *Ann. appl. Biol.*, 57, 231 (1966).

(294). RICHMONDN D.V., SOMERS E. and MILLINGTON P.F., Studies on the fungitoxicity of captan. V. Electron microscopy of captan - treated *Neurospora crassa* conidia, *Ann. Appl. Biol.*, 59, 233 (1967).

(295). RITCHIE D.F., Effect of dichloran, iprodione, procymidone and vinclozolin on the mycelial growth, sporulation and isolation of resistant strains of *Monilia fructicola*, *Plant Disease*, 66, 484 (1982).

(296). RIVIERE J.L., Prochloraz, a potent inducer of microsomal cytochrome P - 450, *Pesticide Biochem. and Physiol.*, 19, 44 (1983).

(297). ROBERSON R.W., FULLER M.S. and GRABSKI C., Effects of the demethylase inhibitor, cyproconazole, on hyphal tip cells of *Sterotium rolfsii*, *Pestic. Biochem. and Physiol.*, 34, 130 (1989).

(298). ROBINOW C.F. and CATEN C.E., Mitosis in *Aspergillus nidulans*, *Cell sci.*, 9, 403 (1969).

(299). RODRIQUEZ R.J., TAYLOR F.R. and PARKS L.W., A requirement for ergosterol to permit growth of yeast sterol auxotrops on cholestanol, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 106, 435, (1982).

(300). ROOTS I. and HILDEBRANDT A.G., Non competitive and competitive inhibition of mixed function oxidase in rat liver microsome by metyrapone, *Naunym - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 277, 27 (1973).

(301). ROPER J.A., Production of heterozygous diploid in filamentous fungi, *Experientia*, 8, 14 (1952).

(302). ROPER J.A., The parasexual cycle in: Ainsworth G.C., A.S. and Sussman eds, *The Fungi* Vol. 2, 589 - 617. Academic Press, New York, London (1966).

(303). SAKURAI H. and FUJITA S., The antifungal activity of polyoxin B and iprodione against phytopathogenic fungi recently isolated from diseased plantas in Japan., *Pest. Sci.*, 9, 207 (1978).

(304). SANCHOLLE M., WEETE J.D. and MONTANT C., Effects of triazoles on fungi: I. Growth and cellular permeability, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 21, 31 (1984).

(305). SCHEINPFLUNG H. and KUCK K.H., Sterol biosynthesis inhibiting piperazine, pyridine, pyrimidine and azole fungicides, in "Modern Selective Fungicides" (H.LYR, ed.) p.173, Longman Scientific and Technical, Essex, (1987).

(306). SCHWINN F., Ergosterol biosynthesis inhibitors. An overview of their history and contribution to medicine and agriculture, *Pesticide Sci.*, 15, 40 (1984).

(307). SCHROEPFER G.J., Sterol biosynthesis, *Ann. Rev. Bioch.*, 50, 586 (1981).

(308). SCOTT B.R., DORN G.L., KAFER E. and STAFFORD R., *Aspergillus nidulans*: Systems and results of tests for induction of mitotic segregation and mutation. II. Haploid assay systems and overall response of all systems, *Mutation Research*, 98, 49 (1982).

(309). SEARLE C.E., HARNDEN D.G., VENITT S. and GYDE O.H.B., Carcinogenicity and mutagenicity tests of some hair colourants and constituents, *Nature*, 255, 506 (1975).

(310). SEIFERT J. and DAVIDEK J., The interaction of folpet with thiamine and two thiamine - dependent systems, *Pest. Biochem. and Physiol.*, 7, 56 (1977).

(311). SEILER J.P., The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. I. Forward and reverse mutations in *Salmonella typhimurium* caused by benzimidazole and some of its derivatives, *Mutation Res.*, 15, 273 (1972).

(312). SEILER J.P., The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. II. Incorporation of benzimidazole into nucleic acids of *Escherichia coli*, *Mutation Research*, 17, 21 (1973).

(313). SEILER J.P., Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds, *Mutation Research.*, 32, 151 (1975).

(314). SHERALD J.L. and SISLER H.D., Antifungal mode of action of triforine, *Pestic. Biochem. and Physiology*, 5, 477 (1975).

(315). SHERALD J.L., RAGSADALE N.N. and SISLER H.D., Similarities between the systemic fungicides triforine and triarimol, *Pesticide Science*, 4, 719 (1973).

(316). SHEIR - NEISS G.M.H, and MORRIS N.R., Identification of a gene for β -tubulin in *Aspergillus nidulans*, *Cell* 15, 639 (1978).

(317). SHIRASU Y., MORIYA M., KATO K., FURUHASHI A. and KADA T., Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system, *Mutation Res.*, 40: 19 (1976).

(318). SIDERIS E.C., TSOLOMYTY A., PIALOGLOV P., VITSA E. and CHARALAMBUS S., A simplified procedure for the observation *in situ* of chromosome aberrations or sister chromatid exchanges and the estimation of the mitotic index in mammalian monolayer cell cultures, *Stain Technology*, 59, 187 (1984).

(319). SIEGEL M.R., Reactions of certain trichloromethyl silyfenyl fungicides with low molecular weight thiols. In vivo studies with cells of *Saccharomyces pastorianus*, *J. Agr. Food Chem.*, 18, 823 (1970).

(320). SIEGEL M.R., Reactions of the fungicide folpet [N- (trichloromethylthio) phthalimide] with a thiol protein, *Pestic. Biochem. and Physiol.* 1, 225 (1971).

(321). SIEGEL M.R., Reactions of the fungicide folpet [N- (trichloromethylthio) phthalimide] with a nonthiol protein, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1, 234 (1971).

(322). SIEGEL M.R., Sterol inhibiting fungicides' Effects on sterol biosynthesis and sites of action, *Plant Disease*, 65, 986 (1981).

(323). SIEGEL M.R. and RAGSDALE N.N., Antifungal mode of action of imazalil, *Pestic. Biochem. and Physiology*, 9, 48 (1978).

(324). SIEGEL M.R. and SISLER H.D., Fate of the phthalimide and trichloromethylthio (SCCI3) moieties of folpet in toxic action on cells of *Saccharomyces pastorianus*, *Phytopathology*, 58, 1123 (1968).

(325). SIEGEL M.R. and SISLER H.D., Reactions of folpet with purified enzymes, nucleic acids and sub - cellular components of *Saccharomyces pastorianus*, *Phytopathology*, 58, 1129 (1968).

(326). SIEGEL M.R. and SOLEL Z., Effects of imazalil on a wild type and fungicide resistant strain of *Aspergillus nidulans*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 15, 222 (1981).

(327). SIEGEL M.R., KERKENAAR A. and SIJPESTEIJN K.A., Antifungal activity of the systemic fungicide imazalil, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83, 121 (1977).

(328). SIJPESTEIJN K.A., " Mechanism of action of fungicides" in *Fungicide Resistance in Crop Protection*, ed. Dekker, j., and Georgopoulos, S.G., Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. pp. 32 (1982).

(329). SILVER R.B., COLE R.D. and CANDE W.J., Isolation of mitotic apparatus containing vesicles with calcium sequestration activity, *Cell*, 19, 505 (1980).

(330). SISLER H.D. and RAGSDALE N.N., Fungitoxicity and growth regulation involving aspects of lipid biosynthesis, *Neth. J. Plant Pathol.*, 83 (suppl. 1) 81 (1977).

(331). SISLER H.D. and RAGSDALE N.N., " Biochemical and cellular aspects of the antifungal action of ergosterol biosynthesis inhibitors ". Reprinted from the symposium of British Mycological Society, Mode of action of antifungal agents edited by A.P.J. Trinci and J.F. Ryley. *British Mycological Society*. Printed in Great Britain (1984).

(332). SISLER H.D. , WALSH R.C. and ZIOGAS B.N., Ergosterol biosynthesis: A target of fungitoxic action. In Pesticide Chemistry human welfare and the environment, Vol. 3, Mode of action, metabolism and toxicology, ed.s. Matsunaka, D.H. Hutson and S.D. Murphy, pp. 129 - 134. New York:Pergamon Press (1983).

(333). SOBELS F.H., Environmental mutagenesis in retrospect, *Mutation Research*, 181, 299 (1987).

(334). SPEAKMAN J.B., and NIRENBERG H.I., Mytogenicity of methyl benzimidazole- 2- yl- carbamate (MBC) towards *Aspergillus nidulans* (EIDAM) WINTER and *Cladosporium cucumerinum* ELLIS and ARTH , *Mutation Research*, 88, 45 (1981).

(335). STANIS V.F. and JONES A.L., Reduced sensitivity to sterol- inhibiting fungicides in field isolates of *Venturia inaequalis* , *Phytopathology*, 1098, (1985).

(336). STAPLES R.C. and HOCH H. C., A possible role for microtubules and microfilaments in the induction of nuclear division in bean rust uredospore , germlings, *Experimental Mycology*, 6, 293 (1982).

(337). STEEL C.C., BALOCH R.I., MERCER E.I. and BALDWIN B.C., The intracellular location and physiological effects of abnormal sterols in fungi grown in the presence of morpholine and functionally related fungicides, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 33, 101 (1989).

(338). STERNLICHT E., KATZ D. and ROSENBERGER R.F., Subapical wall synthesis and wall thickening induced by cycloheximide in hyphae of *Aspergillus nidulans*, *Journal of Bacteriology*, 114, 819 (1973).

(339). STIERS D.L., FELLMAN J.K. and DE LE TOURNEAU, The effects of triadimefon on growth , sclerotial formation and ultrastructure of *Sclerotinia*

sclerotiorum, *Environ. Exp. Bot.*, 20, 181 (1980).

(340). STUBBLEFIED E., Centriole replication in a mammalian cell, in: The proliferation and spread of Neoplastic cells, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 175-193 (1968).

(341). STYLES J.A. and GARNER R., Benzimidazole - carbamate methyl ester - evaluation of its effects in vivo and in vitro, *Mutat. Res.*, 26, 177 (1974).

(342). SZYBALSKI W., Special microbiological systems. II. Observations on chemical mutagenesis in microorganisms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 76, 475 (1968).

(343). TAKANO H., OGURI Y. and KATO T., Mode of action of (e)- 1 - (2,4-dichlorophenyl) - 4,4 - dimethyl -2- (1,3,4- triazol -yl) -1- penten-3-ol (S-3308) in *Ustilago maydis*, *J. Pesticide Sci.*, 8, 575 (1983).

(344). TATON M., ULMANN P., BENVENISTE P. and RAHIER A., Interaction of triazole fungicides and plant growth regulators with microsomal cytochrome P-450 dependent obtusifoliol, *Pestic. Biochem. and Physiology*, 30, 178 (1988).

(345). THRELFALL R.J., Effect of PCNB and other chemicals on sensitive and PCNB - resistant strains of *Aspergillus nidulans*, *J. Gen. Microbiol.*, 71, 173 (1972).

(346). TILLMAN R.W. and SISLER H.D., Effect of chloroneb on the growth and metabolism of *Ustilago maydis*, *Phytopathology*, 63, 219 (1973).

(347). TRIPATHI R.K., KOMMAL K., SCHLÖSSER E. and HESS W.M., Effect of fungicides on the physiology of plants, *Pesticide Sci.*, 13, 395 (1982).

(348). TUYL VAN J.M., DAVIDSE L.C. and DEKKER J., Lack of cross-resistance to benomyl and thiabendazole in some strains of *Aspergillus nidulans*, *Netherl. J.Plant. Pathol.*, 80, 165 (1974).

(349). UPHAM P.M. and DELP C.J., Role of benomyl in the systemic control of fungi and mites on herbaceous plants, *Phytopathology*, 63, 814 (1973).

(350). UPSHALL A., GIDDINGS B. and MORTIMORE I.D., The use of benlate

for distinguishing between haploid and diploid strains of *A. nidulans* and *A. terreus*, *Journal of General Microbiology*, 100, 413 (1987).

(351). VONK J.W., MIHANOVIC B. and SIJPESTEIJN A.K., A biochemical mechanism for the conversion of thiophanate-methyl into methyl benzimidazole-2-yl carbamate (MBC) in plant tissue., *Neth J. Pl. Path.*, 83, 269 (1977).

(352). WALK R.A., JENDERNY J., ROHRBORN G. and HACKENBERG U., Chromosomal abnormalities and sister-chromatic exchange in bone marrow cells of mice and chinese hamsters after inhalation and intraperitoneal administration: I. diepoxybutane, *Mutation Research*, 182, 333 (1987).

(353). WALSH R.C. and SISLER H.D., A mutant of *Ustilago maydis* deficient in sterol C-14 demethylation: characteristics and sensitivity to inhibitors of ergosterol biosynthesis, *Pesticide Biochemistry*, 18, 122 (1982).

(354). WATERS L.C. and NIX C.E., Regulation of insecticide resistance-related cytochrome P-450 expression in *Drosophila melanogaster*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 30, 214 (1988).

(355). WEETE J.D., and WISE M.L., Effects of triazoles on fungi. V. Response by a naturally tolerant species, *Mucor rouxii*, *Experimental Mycology*, 11, 214 (1987).

(356). WEETE J.D., SAN CHOLLE M. and MONTANT C., Effects of triazoles on fungi : II. Lipid composition of *Taphrina deformans*, *Biochim. Biophys. Acta*, 752, 19 (1983).

(357). WIGGINS T.E. and BALDWIN B.C., Binding of azole fungicides related to diclobutrazol to cytochrome P-450, *Pest. Sci.*, 15, 206 (1984).

(358). WUU K.D. and GRANT W.F., Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in barley (*Hordeum vulgare*), *Can. J. Genet. Cytol.* 8, 481 (1966).

(359). YAMAGUCHI H. and IWATA K., Effect of two imidazole antimetabolites, clotrimazole and miconazole on amino acid transport in *Candida albicans*, *Sabouraudia*, 17, 311 (1979).

(360). YOSHIDA Y., AOYAMA Y., KYMAOKA H. and KUBORA S., A highly purified preparation of cytochrome P-450 from microsomes of anaerobically growth yeast, *Biochemical and Biophysical Communications*, 78, 1005 (1977).

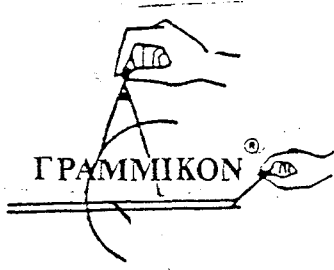
(361). YU C.K. and SINCLAIR W.K., Homogeneity and stability of chromosomes of chinese hamster cells in vitro, *Canad. J. Genet. Cytol.*, 6:109 (1964).

(362). ZIEGLER D.M., POULSEN L.L. and DUFFEL M.W., Kinetic studies on the mechanism and substrate specificity of the microsomal flavin - containing monooxygenases in: *Microsomes, Drug oxidations and chemical carcinogenesis. Acad. Press Inc., New York*, pp. 637 (1980).

(363). ZIOGAS B.N. and GEORGOPOULOS S.G., Genetic effects of phthalimide fungicides on diploid *Aspergillus nidulans*, *Pestic. Sci.*, 20, 193 (1987).

(364). ZIOGAS B.N., SISLER H.D. and LUSBY W.R., Sterol content and other characteristics of pimaricin - resistant mutants of *Aspergillus nidulans*, *Pestic. Biochem. and Physiology*, 20, 320 (1983).

(365). ZORDAN M.J., HEPPNERT J. and DREWES D.C., Teratogenic effects of the fungicide benomyl on posterior segmental regeneration in the earthworm, *Eisenia fetida*, *Pesticide Science*, 17, 641 (1986).



ΕΓΧΡΩΜΑ ΦΩΤΟΑΝ/ΦΑ
Βιβλιοδεσίες εργασιών κ.λ.π.
Εκτυπώσεις RANK XEROX
Φωτοτυπίες - Φωτοαντιγραφή
Α! Γζωρτζ 34 κ' Στουρναρα
τηλ: 3602376 - Αθηνα.
— ∞ —
Β! Ηρώων πολυτεχνειου 72
τηλ: 7786771 - Ζωγραφου