

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΓΕΩΡΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

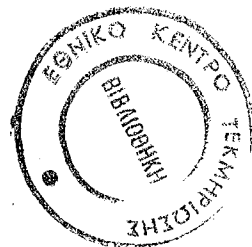


ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΤΡΙΑΖΟΛΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ Π. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ

Υποβλήθηκε στο Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Αθήνα 1992

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΓΕΩΡΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΤΡΙΑΖΟΛΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ Π. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ

Υποβλήθηκε στο Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Αθήνα 1992



ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Β. Ζιώγας

Χ. Παναγόπουλος

Σ. Γεωργόπουλος

Ε. Μουρκίδου

Χ. Χριστιάς

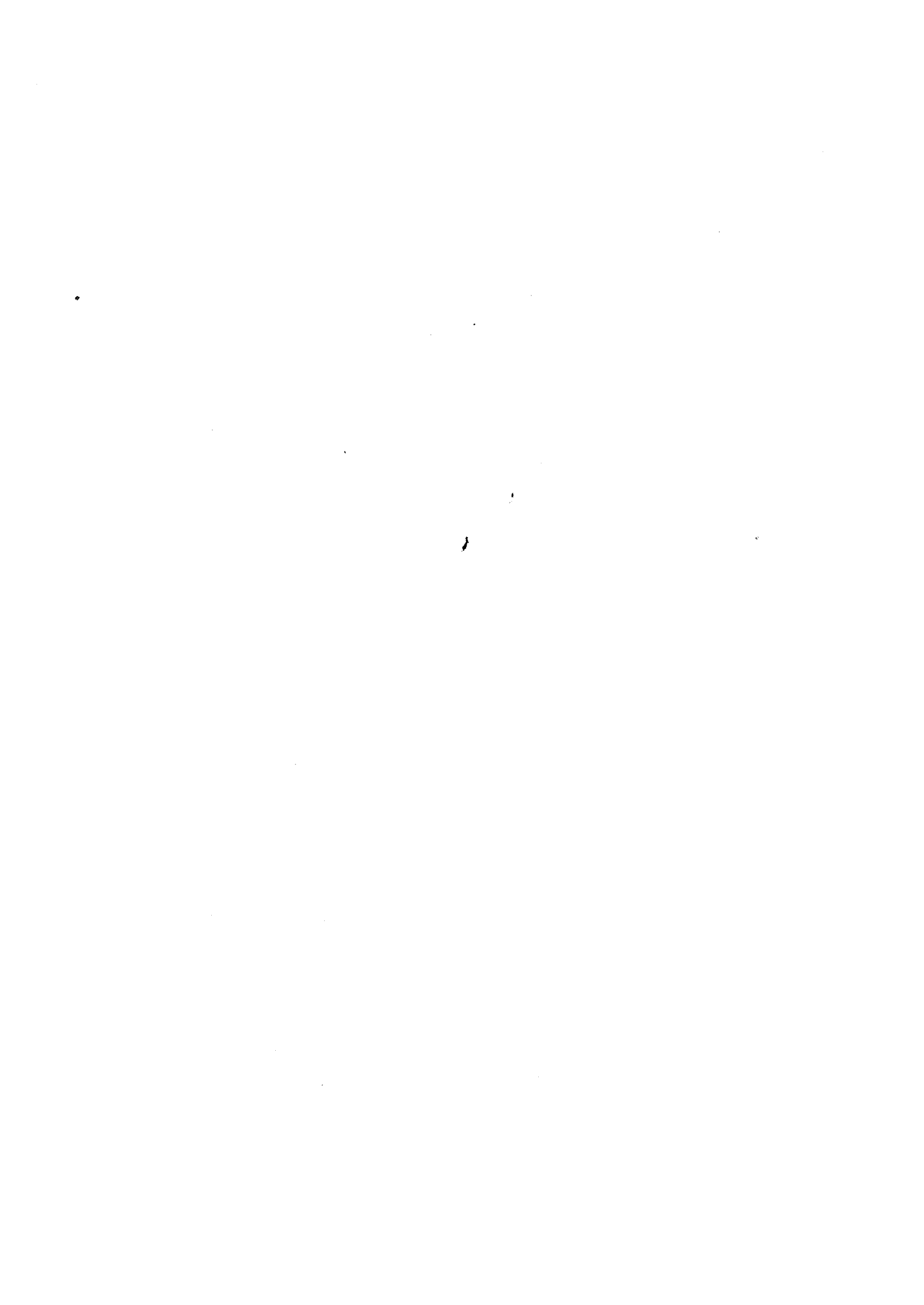
Επ. Καθηγητής Γ.Π.Α.

Καθηγητής Γ.Π.Α.

τ. Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αν. Καθηγήτρια Α.Π.Θ.

Αν. Καθηγητής Παν. Πατρών



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος της στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωργικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του Επ. Καθηγητή κ. Β. Ζιώγα. Ο σωστός σχεδιασμός, το συνεχές ενδιαφέρον του κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και οι πολύτιμες συμβουλές του κατά την ερμηνεία και συγγραφή των αποτελεσμάτων υπήρξαν καθοριστικές παράμετροι για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Σημαντική ήταν και η συνεισφορά του Διευθυντή του Εργαστηρίου, Καθηγητή κ. Χ. Παναγόπουλου που διευκόλυνε την προσπέλαση πολλών τεχνικών και αντικειμενικών δυσκολιών.

Στην τεκμηρίωση και αρτιότερη τελική παρουσίαση του κειμένου συνέβαλαν και οι χρήσιμες παρατηρήσεις των υπολοίπων μελών της Τριμελούς και Εξεταστικής Επιτροπής κ. Σ. Γεωργόπουλου τ. Καθηγητή, κ. Μ. Χρυσάγη Αν. Καθηγήτριας, κ. Ε. Μουρκίδου Αν. Καθηγήτριας και κ. Χ. Χριστιά Αν. Καθηγητή.

Ουσιαστική όμως ήταν και η συνεργασία με τον κ. Γ. Αϊβαλάκι, βοηθό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών κατά την εκτέλεση των πειραμάτων ηλεκτροφόρησης, τον Δρ Β. Μαζωμένο του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος" κατά την ανάλυση των στερολών, τον κ. Μ. Πολυσίου, Αν. Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας κατά τη μετάφραση ξενόγλωσσων χημικών όρων αλλά και τον προπτυχιακό φοιτητή κ. Α. Μάρκογλου σε πειράματα επιλογής ανθεκτικών στελεχών. Κατά τη μελέτη της αναγωγής του triadimefon, χρήσιμη ήταν και η ευγενική παραχώρηση του συστήματος αεριοχρωματογραφίας, από τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Λευκοκομίας, Καθηγητή κ. Κ. Ποντίκη.

Σημαντική διευκόλυνση αποτέλεσε η, σε καθημερινή βάση, συνεργασία και φιλική διάθεση με τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
SUMMARY.....	15
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1. ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	21
1.1.1. Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	22
1.1.2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	25
1.1.2.1. Αλλαγή της θέσης δράσης.....	25
1.1.2.2. Μειωμένη περατότητα των μεμβρανών.....	26
1.1.2.3. Αποτοξικοποίηση.....	27
1.1.2.4. Μειωμένη μετατροπή.....	27
1.1.2.5. Αυξημένη απέκκριση.....	27
1.2. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ (EBI's).....	29
1.2.1. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ, ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	29
1.2.1.1. Πιπεραζινικά.....	32
1.2.1.2. Μορφολινικά.....	34
1.2.1.3. Πυριδινικά.....	35
1.2.1.4. Πυριμιδινικά.....	35
1.2.1.5. Ιμιδαζολικά.....	36
1.2.1.6. Τριαζολικά.....	37
1.2.1.7. Άλλοι παρέμποδιστές της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης.....	39
1.3. Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ.....	41
1.3.1. Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ.....	43
1.3.1.1. Αναερόβια φάση.....	43
1.3.1.2. Αερόβια φάση.....	45
Σχηματισμός της λανοστερόλης.....	45
Μεθυλίωση του C-24.....	48
Απομεθυλίωση του C-14.....	49
Απομεθυλίωση του C-4.....	51
Αναδιάταξη και εισαγωγή διπλών δεσμών.....	52
1.3.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ.....	53
1.3.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	56

1.4. ΘΕΣΕΙΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ EBΙ's.....	59
1.4.1. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΠΟΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ C-14 (DMIs).....	59
1.4.2. ΜΟΡΦΟΛΙΝΙΚΑ.....	61
1.4.3. ΣΤΕΡΕΟΙΣΟΜΕΡΕΙΑ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ EBΙ's.....	65
1.5. Η ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΥΣ EBΙ's.....	66
1.5.1. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ.....	66
1.5.2. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΑΓΡΟ.....	69
1.6. ΤΟ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P-450.....	71
1.6.1. ΤΟ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P-450 _{14DM}	73
1.7. Η ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΟΥ TRIADIMEFON ΣΕ TRIADIMENOL.....	76
1.8. ΣΚΟΠΟΣ ΑΥΤΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	81
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	85
2.1.1. <i>NECTRIA HAEMATOCOCCA</i> VAR. <i>CUCURBITAE</i>	85
2.1.2. <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	89
2.2. ΧΗΜΙΚΑ.....	91
2.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	91
2.2.2. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ.....	92
2.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	94
2.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	95
2.5. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	96
2.5.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ.....	96
2.5.2. ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ.....	97
2.6. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ.....	98
2.6.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ.....	98
2.6.1.1. Μέτρηση της παρεμπόδισης σε στερεό θρεπτικό υλικό.....	98
2.6.1.2. Μέτρηση της παρεμπόδισης σε υγρό θρεπτικό υλικό.....	99
2.6.1.3. Παράγοντας Ανθεκτικότητας και Διασταυρωτή Ανθεκτικότητα....	100

2.6.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ.....	101
2.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ TRIADIMEFON.....	102
2.7.1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	102
2.7.2. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	103
2.7.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	103
2.7.3.1. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας - Βιοδοκιμή.....	104
2.7.3.2. Αεριοχρωματογραφία.....	104
2.8. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΛΩΝ.....	106
2.8.1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	106
2.8.2. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	107
2.8.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	107
2.8.4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΛΩΝ.....	107
2.9. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ P-450.....	109
2.9.1. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ.....	109
2.9.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	110
2.9.2.1. Μέθοδος Laemmli.....	110
2.9.2.2. Μέθοδος Fairbanks.....	111
2.9.2.3. Χρώση του πηγματος.....	111
2.9.3. ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ.....	112
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΟΥ <i>tri-1</i> ΣΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>N. HAEMATOCOCCA</i> VAR. <i>CUCURBITAE</i> ΣΤΟΥΣ ΕΒΙ's.....	117
3.1.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΥΚΗΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ TRIADIMENOL ΣΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΤΑ <i>tri-1</i> ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	117
3.1.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΥΚΗΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΩΝ ΤΩΝ ΕΒΙ's ΣΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΤΑ <i>tri-1</i> ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	120
3.1.3. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΤΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	127
3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ TRIADIMEFON ΑΠΟ ΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΤΟ TL-34 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΟ TRIADIMENOL ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>N. HAEMATOCOCCA</i> VAR. <i>CUCURBITAE</i>	132
3.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΣΤΕΡΕΟΙΣΟΜΕΡΩΝ ΤΟΥ TRIADIMENOL ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ <i>tri-1</i> ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	132

3.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ TRIADIMEFON ΑΠΟ ΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΤΟ TL-34 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ.....	134
3.2.2.1. Ανάλυση των εκχυλισμάτων με συνδυασμό χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας και βιοδοκιμής.....	136
3.2.2.2. Ανάλυση των εκχυλισμάτων με αεριοχρωματογραφία.....	138
3.2.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΦΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ TRIADIMEFON.....	142
3.2.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΝΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ TRIADIMENOL ΑΠΟ ΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΤΟ TL-34 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ.....	144
3.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ TRIADIMEFON.....	146
3.3.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ TRIADIMEFON ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>N. HAEMATOCOCCA</i> VAR. <i>CUCURBITAE</i>	147
3.3.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΛΛΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ TRIADIMEFON.....	151
3.4. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ <i>tri-1</i> ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>N. HAEMATOCOCCA</i> VAR. <i>CUCURBITAE</i>	157
3.4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΣΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΕΝΑ <i>tri-1</i> (TL-34) ΣΤΕΛΕΧΟΣ.....	157
3.4.1.1. Μελέτη της επίδρασης των πολυενίων στην ανάπτυξη του μύκητα.....	158
3.4.1.2. Μελέτη της βιοσύνθεσης στερολών παρουσία triadimenol.....	160
3.4.1.3. Μελέτη της βιοσύνθεσης στερολών παρουσία άλλων EBI's.....	162
3.4.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ P-450 ΣΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΕΝΑ <i>tri-1</i> (TL-34) ΣΤΕΛΕΧΟΣ.....	172
3.4.2.1. Ηλεκτροφόρηση.....	172
Προσδιορισμός του μοριακού βάρους.....	173
Μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου.....	178
Επίδραση με triadimefon.....	180
3.4.2.2. Ισοηλεκτρική εστίαση.....	180
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	187
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	205

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανθεκτικότητα των φυτοπαθογόνων μυκήτων στους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (EBI's) είναι συνήθως χαμηλού επιπέδου, ελέγχεται μάλλον από πολυγονικά συστήματα κληρονομικότητας και συχνά συνοδεύεται από μειωμένη προσαρμοστικότητα. Μια εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση των εργαστηριακά επιλεγμένων *tri-1* στελεχών του μύκητα *Nectria haematococca* var. *cucurbitae* που είναι ανθεκτικά στο τριαζολικό μυκητοκτόνο triadimenol και τα χαρακτηρίζει η υψηλή ανθεκτικότητα που ελέγχεται από ένα μόνο γόνο και η προσαρμοστικότητα που είναι παρόμοια μ' αυτή των αγρίων, ευαίσθητων στο μυκητοκτόνο, στελεχών.

Στην εργασία μας, μελετήθηκε αρχικά η ευαισθησία ενός αγρίου και τεσσάρων *tri-1* στελεχών του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε αντιπροσώπους τόσο της ομάδας των τριαζολικών μυκητοκτόνων όσο και άλλων ομάδων των EBI's. Διαπιστώθηκε ότι τα *tri-1* στελέχη χαρακτηρίζονται από υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα μόνο στην περίπτωση του triadimenol (παράγοντας ανθεκτικότητας με βάση τις ED₅₀s: 55,6) ενώ στα άλλα μέλη της ομάδας των τριαζολικών που δοκιμάστηκαν (triadimefon, bitertanol, propiconazole, flusilazol, flutriafol) η ανθεκτικότητα είναι χαμηλού επιπέδου (παράγ. ανθεκτ.: 2,2-6). Στις άλλες ομάδες των EBI's, που δρουν στην ίδια με τα τριαζολικά βαθμίδα της απομεθυλίωσης του C-14 κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (DMIs), ο γόνος *tri-1* ή δεν επηρεάζει την ευαισθησία των στελεχών (πιπεραζινικά, πυριμιδινικά) ή την αυξάνει (ιμιδαζολικά, με εξαίρεση το imazalil). Σε παρεμποδιστές που δρουν σε άλλες βαθμίδες της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (μορφολινικά, αλλυλαμίνες) η ευαισθησία των *tri-1* στελεχών είναι παρόμοια μ' αυτή του αγρίου στελέχους.

Το μόριο του triadimenol μπορεί να υπάρχει σε δύο διαστεreoϊσομερείς μορφές Α και Β, η τοξικότητα των οποίων συνήθως διαφέρει σημαντικά. Το διαστεreoϊσομερές Α, στην περίπτωση του αγρίου στελέχους του *N. haematococca* var. *cucurbitae* βρέθηκε 28,1 φορές πιο τοξικό από το Β ενώ στην περίπτωση των *tri-1* στελεχών μόλις 2,6 φορές. Ο γόνος *tri-1*, ενώ προσδίδει υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο διαστεreoϊσομερές Α (παράγ. ανθεκτ.: 58), η μείωση της ευαισθησίας στο διαστεreoϊσομερές Β είναι πολύ μικρότερη (παράγ. ανθεκτ.: 5,5), κάτι που δείχνει τη στερεοεξειδίκευση του

γόνου *tri-1* για ανθεκτικότητα στο διαστεροεισομερές A του triadimenol.

Το τριαζολικό triadimefon δεν είναι αυτό καθ' αυτό ιδιαίτερα τοξικό, αλλά δρα μετά από αναγωγή του προς triadimenol από τους μύκητες, τα βακτήρια και τα ανώτερα φυτά. Η διαφορετικού επιπέδου ανθεκτικότητα των *tri-1* στελεχών που παρατηρήθηκε μεταξύ του triadimenol (παράγ. ανθεκτ.:55,6) και του προδρόμου του triadimefon (παράγ. ανθεκτ.: 6) διερευνήθηκε με τη βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας και αεριοχρωματογραφίας. Διαπιστώθηκε ότι από την αναγωγή του triadimefon, τόσο από το άγριο όσο και από ένα *tri-1* στέλεχος παράγεται κυρίως το λιγότερο τοξικό διαστεροεισομερές B του triadimenol, με αποτέλεσμα η διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ του αγρίου και των *tri-1* στελεχών στο triadimefon να αντικατοπτρίζει τη διαφορά της ευαισθησίας τους σ' αυτό το διαστεροεισομερές του triadimenol. Ο βαθμός μετατροπής του triadimefon προς triadimenol αυξάνει τόσο με το χρόνο επώασης όσο και με την αρχική συγκέντρωση του triadimefon. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του αγρίου και του *tri-1* στελέχους ως προς τη συσσώρευση των μυκητοκτόνων (triadimefon και triadimenol) στο εσωτερικό του μυκηλίου και το βαθμό μετατροπής του triadimefon.

Η μελέτη της βιοσύνθεσης των στερολών από το άγριο στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* παρουσία διαφόρων EBI's (triadimenol, bitertanol, clotrimazole, terbinafine, fenpropimorph), έδειξε ότι σ' όλες τις περιπτώσεις το επίπεδο της παρεμπόδισης της ανάπτυξης είναι ανάλογο με την παρεμπόδιση της παραγωγής της εργοστερόλης. Αντίθετα, σ' ένα *tri-1* στέλεχος που μελετήθηκε, η παρουσία triadimenol δεν προκάλεσε μείωση της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης ανάλογη με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης που παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου και που φαίνεται να οφείλεται σε δευτερογενείς επιδράσεις του παρεμποδιστή αυτού. Η αρνητική συσχέτιση του ιμιδαζολικού clotrimazole με το triadimenol ως προς την επίδραση του γόνου *tri-1* οφείλεται στην αυξημένη, συγκριτικά με το άγριο, παρεμπόδιση της απομεθυλίωσης του C-14 της λανοστερόλης. Στην περίπτωση των terbinafine και fenpropimorph που δρουν σε άλλα στάδια πριν και μετά την απομεθυλίωση του C-14 της λανοστερόλης, η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης στο *tri-1* στέλεχος ήταν παρόμοια μ' αυτή του αγρίου. Τα στοιχεία αυτά υποστηρίζουν ότι η δράση του γόνου *tri-1* εντοπίζεται αποκλειστικά στο στάδιο της απομεθυλίωσης του C-14 της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης και μάλιστα με τρόπο που να επηρεάζεται αρνητικά η δράση των τριαζολικών (κυρίως του triadimenol), θετικά αυτή των ιμιδαζολικών (με

εξαίρεση το imazalil) και να μην επηρεάζεται αυτή των πιπεραζινικών και πυριμιδινικών.

Κύριο συστατικό του ενζυμικού συστήματος της απομεθυλίωσης του C-14 της λανοστερόλης και θέση δράσης των DMIs είναι το κυτόχρωμα P-450, το οποίο βρίσκεται στο μικροσωματικό αλλά και το μιτοχονδριακό κλάσμα και φέρει σαν προσθετική ομάδα έναν αιμικό δακτύλιο. Η ηλεκτροφορητική μελέτη μικροσωμαστικών και μιτοχονδριακών παρασκευασμάτων του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* έδειξε την ύπαρξη ενός κυτοχρώματος P-450 με μοριακό βάρος 125 ± 5 Kd, ισοηλεκτρικό σημείο 4,4 και που φαίνεται να είναι ένα πολυμερές ένζυμο αποτελούμενο από μικρότερου μοριακού βάρους πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Στις συγκεκριμένες ηλεκτροφορητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν, η σύνδεση του αιμικού δακτυλίου με το αποπρωτεϊνικό τμήμα του ενζύμου, εμφανίσθηκε ασταθέστερη στην περίπτωση ενός *tri-1* στελέχους, συγκριτικά με το άγριο. Παρουσία triadimefon στο υλικό της καλλιέργειας, παρατηρείται σημαντική αύξηση της παραγωγής του κυτοχρώματος σε παρόμοια επίπεδα στο άγριο και το *tri-1* στέλεχος.

Από τα παραπάνω στοιχεία σχετικά με την έκφραση του γόνου *tri-1* και συγκεκριμένα:

1. Την ικανότητά του να ξεχωρίζει τα τριαζολικά από τα άλλα μυκητοκτόνα της ομάδας των DMIs στο επίπεδο της ανάπτυξης και της βιοσύνθεσης των στερολών.
2. Την στερεοεξειδίκευσή του για ανθεκτικότητα κυρίως στο διαστερο-ισομερές A του triadimenol.
3. Την απουσία επίδρασης στη συσσώρευση των μορίων του triadimefon και του triadimenol στο εσωτερικό του μυκηλίου, κάτι που αποκλείει ότι ο γόνος επηρεάζει τη λειτουργία ενός μηχανισμού απέκκρισης των τοξικών μορίων.
4. Την ατελή παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης από το triadimenol σ' ένα *tri-1* στέλεχος, ακόμα και σε συγκεντρώσεις που προκαλούν ισχυρή παρεμπόδιση της ανάπτυξης.
5. Την παρόμοιου επιπέδου αύξηση της παραγωγής του κυτοχρώματος P-450 στο άγριο και ένα *tri-1* στέλεχος από το triadimefon.
6. Την μειωμένη σταθερότητα στη σύνδεση του αιμικού δακτυλίου με το αποπρωτεϊνικό τμήμα του κυτοχρώματος P-450 ενός *tri-1* στελέχους σε σχέση με το άγριο

προκύπτει ότι η βιοχημική έκφραση του γόνου *tri-1* αφορά αλλαγές στη δομή του κυτοχρώματος P-450 που είναι η θέση δράσης των DMIs. Οποσδήποτε, για την τελική απόδειξη αυτής της άποψης θα πρέπει να μελετηθεί σε

μικροσωματικά παρασκευάσματα η αλληλεπίδραση του ενζύμου με τους DMIs τόσο στην περίπτωση του αγριού όσο και των *tri-1* στελεχών.

Προσπάθειες για την απόκτηση στελεχών του *N. haematococca* var. *cucurbitae* και του *Botrytis cinerea* με μειωμένη ευαισθησία στο triadimefon αλλά όχι και στο triadimenol δεν ήταν επιτυχείς. Συνεπώς, ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο triadimefon λόγω τροποποίησης του συστήματος μετατροπής σε triadimenol δεν φαίνεται να είναι δυνατή, τουλάχιστον στους δύο αυτούς μύκητες, στους οποίους η ανθεκτικότητα στο triadimefon συνδεόταν πάντοτε με ανθεκτικότητα στο triadimenol. Στον *N. haematococca* var. *cucurbitae* απομονώθηκαν στελέχη τύπου *tri* (υψηλής ανθεκτικότητας στο triadimenol, χαμηλής στα άλλα τριαζολικά και αυξημένης ευαισθησίας στα ιμιδαζολικά, με εξαίρεση το imazalil) και στελέχη τύπου *fen* (μικρού επιπέδου ανθεκτικότητας σ' όλους τους DMIs). Διαπιστώθηκε δηλαδή ότι υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο ίδιο μυκητοκτόνο όχι μόνο με δύο διαφορετικά συστήματα κληρονομικότητας (ολιγογονικό, πολυγονικό) αλλά και με δύο διαφορετικούς βιοχημικούς μηχανισμούς (αυξημένη απέκκριση των τοξικών μορίων, αλλαγή της θέσης δράσης). Τα ανθεκτικά στελέχη του *B. cinerea* που απομονώθηκαν ήταν όλα τύπου *fen*.

Μέρος των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής έχουν παρουσιασθεί:

1. Kalamarakis A. E., Demopoulos V. P., Ziogas B. N. and Georgopoulos S. G., A highly mutable major gene for triadimenol resistance in *N. haematococca* var. *cucurbitae*, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95(suppl. 1), 109 (1989).
2. Demopoulos V. P., Ziogas B. N. and Georgopoulos S. G., The expression of a triadimenol resistance mutation in *N. haematococca* var. *cucurbitae* on media containing triadimenol diastereoisomers, in *Proceedings of SCI International Rothamsted Symposium on "Achievements and developments in Combating Resistance"*, *Pesticide Science*, 34, 365 (1992).
3. Demopoulos V. P., Ziogas B. N. and Georgopoulos S. G., Stereo-selectivity of a mutation of *N. haematococca* var. *cucurbitae* to triadimenol diastereoisomers and its effect on sensitivity to triadimefon, in *Proceedings of 10th Reinhrdsbrunn Symposium on "Modern Pesticides and Antifungal Compounds"*, May 1992.

SUMMARY

Resistance of plant pathogenic fungi to ergosterol biosynthesis inhibitors (EBI's) is usually of low level, is controlled by polygenic systems and is accompanied by decreased fitness. An exception seem to be the laboratory selected *tri-1* mutants of *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*, which is characterised by high resistance to triadimenol and is controlled by a single gene (*tri-1*) which has no obvious effects on fitness-determining characteristics.

In the present work, the sensitivity of a wild type and four *tri-1* mutants of *N. haematococca* var. *cucurbitae* to representatives of triazoles and other chemical groups of EBI's was studied first. The *tri-1* mutants were found highly resistant only to triadimenol (resistance factor based on ED₅₀ values: 55,6), while resistance to all other triazoles tested (triadimefon, bitertanol, propiconazole, flusilazole, flutriafol) was of low level (resistance factors: 2.2-6.0). The same mutation reduces resistance to imidazoles (with the exception of imazalil) and has no effect on sensitivity to other EBI's (piperazines, pyrimidines, morpholines and allylamines).

Triadimenol occurs in two diastereoisomeric forms A and B, whose toxicity may be differ widely. Diastereoisomer A was found 28,1 times more toxic than B to the wild type strain of *N. haematococca* var. *cucurbitae*, and only 2,6 times to the *tri-1* mutants. The mutant gene has a strong effect on sensitivity to diastereoisomer A (resistance factor: 58) while it affects only slightly the fungitoxicity of diastereoisomer B (resistance factor: 5,5), indicating stereospecificity of the *tri-1* mutation for resistance to triadimenol A.

The triazole derivative triadimefon is not toxic itself and it is activated after reduction to triadimenol by fungi, bacteria and plants. The reason for the large difference in the level of resistance of *tri-1* mutants to triadimenol (resistance factor: 55.6) with its precursor triadimefon (resistance factor: 6.0) was studied with thin layer and gas chromatography. It was found that both wild type and *tri-1* mutant strains

convert triadimefon mainly to the less toxic diastereoisomer B of triadimenol. Thus, the difference in sensitivity of wild type and *tri-1* mutant strains to triadimefon is determined by their sensitivity to diastereoisomer B of triadimenol. The extent of triadimefon reduction increases with the incubation time and with the initial concentration. No consistent differences between wild type and *tri-1* mutant strains were observed regarding the fungicide (triadimefon and triadimenol) accumulation into the mycelium and the amount of triadimefon transformation.

A study of sterol biosynthesis by a wild type stain of *N. haematococca* var. *cucurbitae* in presence of a number of EBI's (triadimenol, bitertanol, clotrimazole, terbinafine, fenpropimorph) showed that growth inhibition results in all cases from the decrease in biosynthesis of ergosterol. In contrast, there was a low decrease in C-14 demethylase activity in a *tri-1* mutant strain at triadimenol concentration highly inhibitory to fungal growth, which probably is due to secondary affects of this fungicide at high concentrations. The observed negative correlation between the imidazole clotrimazole and triadimenol when the *tri-1* gene is considered, was due to higher inhibition of C-14 demethylation in mutant strain by clotrimazole. No differences were observed between wild type and *tri-1* strains regarding the inhibition of ergosterol biosynthesis by terbinafine and fenpropimorph which act before or after the demethylation of lanosterol at the C-14 position during sterol biosynthesis. These observations indicate that the *tri-1* major gene affects the C-14 demethylation step, decreasing the activity of triazoles, especially of triadimenol, increasing the fungitoxicity of certain imidazoles and leaving the toxicity of other DMIs unaffected.

A cytochrome P-450 is the main component of lanosterol C-14 demethylase and it is the target site of DMIs. It is located at the microsomal and the mitochondrial fractions and has heme as the prosthetic group. An electrophoretic study of microsomal and mitochondrial preparations of *N. haematococca* var. *cucurbitae* showed the presence of a cytochrome P-450 with a molecular weight of 125 ± 5 Kd and an isoelectric point 4.4 which seems to be a polymeric enzyme consisting of lower molecular weight polypeptide chains. Under certain electrophoretic conditions, the linkage of heme with the apoprotein of the enzyme was found unstable in the case of a *tri-1* mutant strain. The presence of triadimefon in the growth

medium causes the same increase of the production of cytochrome P-450 in the wild type and the *tri-1* mutant strains.

From the above data regarding the expression of the *tri-1* gene and particularly:

1. The ability of *tri-1* gene to discriminate between triazoles and other DMIs when growth and ergosterol biosynthesis are considered.
2. The specificity for the diastereoisomer A of triadimenol.
3. The absence of differential accumulation of triadimefon and triadimenol in the mycelia of wild type and mutant strains, which does not support a mechanism of resistance based on increased efflux of the compounds.
4. The relatively low inhibition of C-14 demethylase activity in *tri-1* mutants at concentrations of triadimenol highly inhibitory to growth.
5. The similar increase in the production of cytochrome P-450 in wild type and mutant strains by triadimefon.
6. The decreased stability of the linkage of heme with the apoprotein of cytochrome P-450 in *tri-1* strains

it may be concluded that a change in the structure of cytochrome P-450 is probably caused by the *tri-1* gene. However, final proof of this hypothesis will be obtained only after the study of the affinity of the enzyme from wild type and mutant strains for triadimenol.

Efforts to obtain strains of *N. haematococca* var. *cucurbitae* and of *Botrytis cinerea* resistant to triadimefon but sensitive to triadimenol were unsuccessful. It seems that it is not possible for triadimefon resistance development in the above fungal species with a mechanism based on a change of the activation pattern of triadimefon to triadimenol. In *N. haematococca* var. *cucurbitae*, strains of the *tri-1* type (highly resistant to triadimenol, less to other triazoles and with increased sensitivity to certain imidazoles) and strains of the *fen* type (low resistance to all DMIs) were isolated. Thus, it was demonstrated that resistance development in the same fungus-fungicide combination is possibly by two different genetic control systems (major gene and polygenic) and two different biochemical mechanisms (change of the target site and increased energy-dependent efflux of toxic compounds). In the case of *B. cinerea*, all the isolated triadimefon-resistant strains belonged to the *fen* type.

Part of the above results have been presented in the following publications:

1. Kalamarakis A. E., Demopoulos V. P., Ziogas B. N. and Georgopoulos S. G., A highly mutable major gene for triadimenol resistance in *N. haematococca* var. *cucurbitae*, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95(suppl. 1), 109 (1989).
2. Demopoulos V. P., Ziogas B. N. and Georgopoulos S. G., The expression of a triadimenol resistance mutation in *N. haematococca* var. *cucurbitae* on media containing triadimenol diastereoisomers, *in* Proceedings of SCI International Rothamsted Symposium on "Achievements and developments in Combating Resistance", *Pesticide Science*, 34, 365 (1992).
3. Demopoulos V. P., Ziogas B. N. and Georgopoulos S. G., Stereo-selectivity of a mutation of *N. haematococca* var. *cucurbitae* to triadimenol diastereoisomers and its effect on sensitivity to triadimefon, *in* Proceedings of 10th Reinhrdsbrunn Symposium on "Modern Pesticides and Antifungal Compounds", May 1992.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Βασική προϋπόθεση για να χρησιμοποιηθεί μια ουσία σαν γεωργικό μυκητοκτόνο είναι να επιδεικνύει επιλεκτική τοξική δράση κατά του παθογόνου-στόχου συγκριτικά τόσο με το φυτό-ξενιστή όσο και με τον άνθρωπο, τα ανώτερα θηλαστικά και άλλες κατηγορίες οργανισμών. Η εκλεκτική τοξικότητα μπορεί να οφείλεται είτε στην αδυναμία του τοξικού παράγοντα να εισέλθει στο εσωτερικό οργανισμών που δεν θέλουμε να επηρεασθούν είτε στην αλληλεπίδρασή του με κυτταρικά συστατικά ή άλλα ενζυμικά συστήματα του παθογόνου που δεν υφίστανται ή διαφέρουν από αυτά των οργανισμών-μη στόχων.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα ανόργανα, τα οργανομεταλλικά και τα οργανικά προστατευτικά μυκητοκτόνα, τα οποία παρεμβαίνουν σε πολλές, κοινές για όλες τις κατηγορίες οργανισμών, λειτουργίες του κυττάρου και χαρακτηρίζονται σαν μη εξειδικευμένοι παρεμποδιστές (multi-site inhibitors) (Kaars Sijpesteijn, 1970· Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Η μικρή (ή καθόλου) φυτοτοξικότητα αυτών των μυκητοκτόνων στηρίζεται στην αδυναμία τους να διαπεράσουν την εφυμενίδα του φυτού και να έρθουν σε επαφή με το φυτικό πρωτόπλασμα, γι' αυτό και μπορούν να ασκήσουν μόνο προστατευτική δράση. Αντίθετα, τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να κινούνται στο εσωτερικό του φυτού, χαρακτηρίζονται από υψηλού βαθμού εκλεκτική τοξικότητα που συχνά στηρίζεται στην παρεμπόδιση μιας και μόνο κυτταρικής λειτουργίας του παθογόνου (single-site inhibitors). Τα μυκητοκτόνα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο προστατευτικά, όσο και θεραπευτικά.

Η επαναλαμβανόμενη όμως και εκτεταμένη χρήση των διασυστηματικών μυκητοκτόνων σε συνδυασμό με τον εξειδικευμένο τρόπο δράσης τους εμπεριέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας εκ μέρους των παθογόνων. Τέτοιου είδους προβλήματα ήταν άγνωστα μέχρι το 1960, σήμερα όμως η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα στη φυτοπροστασία. Προκαλεί, σοβαρές πολλές φορές απώλειες της παραγωγής με οικονομικό αντίκτυπο στον καλλιεργητή και τις εταιρείες φυτοφαρμάκων αλλά και προβλήματα στους γεωπόνους τις υπηρεσίες έγκρισης γεωργικών φαρμάκων και την οικονομία κάθε χώρας.

1.1.1. Η ΓΕΝΕΡΙΚΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού παθογόνου σε κάποιο τοξικό παράγοντα καθορίζεται από δύο κυρίως παραμέτρους. Η πρώτη αφορά την ύπαρξη ή την πιθανότητα δημιουργίας του κατάλληλου γονότυπου και η δεύτερη την παθογόνο προσαρμοστικότητα του αντίστοιχου φαινότυπου (Georgopoulos, 1986). Η παρεμπόδιση μιας ή έστω λίγων κυτταρικών λειτουργιών από τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα, σε συνδυασμό με την ικανότητα των μυκήτων να πολλαπλασιάζονται γρήγορα, αυξάνει την πιθανότητα επιλογής στελεχών που είναι ανθεκτικά λόγω τυχαίων γενετικών αλλαγών (μεταλλαγών, mutations). Οι γόννοι ανθεκτικότητας, ιδιαίτερα όταν δεν επηρεάζουν αρνητικά την προσαρμοστικότητα του παθογόνου, μπορούν να διασπαρούν στον πληθυσμό μέσω των διαφόρων μηχανισμών ανταλλαγής γενετικού υλικού των μυκήτων (Dekker, 1973). Αν η πίεση επιλογής του μυκητοκτόνου στον πληθυσμό είναι συνεχής, τότε τα ανθεκτικά στελέχη θα κυριαρχήσουν και η καταπολέμηση θα οδηγηθεί σε πλήρη αποτυχία (Georgopoulos και Skylakakis, 1986).

Ο φυλετικός αναπαραγωγικός κύκλος των μυκήτων χαρακτηρίζεται, όπως και στην περίπτωση των ανώτερων οργανισμών, από εναλλαγή απλοειδούς και διπλοειδούς φάσης, όπου ο πυρήνας περιέχει μία ή δύο πλήρεις σειρές χρωματοσωμάτων αντίστοιχα. Το πέρασμα από την διπλοειδή στην απλοειδή φάση πραγματοποιείται με μειωτική διαίρεση του διπλοειδούς πυρήνα, ενώ από την απλοειδή στην διπλοειδή με συγχώνευση δύο απλοειδών πυρήνων (καρυογαμία). Στους Βασιδιομύκητες και στους Ασκομύκητες, η μειωτική διαίρεση γίνεται αμέσως μετά την καρυογαμία, με αποτέλεσμα οι μύκητες αυτοί να χαρακτηρίζονται από απλοειδή αγενή φάση. Αντίθετα οι *Peronosporales* των φυκομυκήτων είναι διπλοειδείς καθ' όλη τη διάρκεια της αγενούς φάσης, αφού οι μειωτικές διαιρέσεις πραγματοποιούνται λίγο πριν την καρυογαμία. Σε πολλούς μύκητες παρατηρείται και το φαινόμενο της ετεροκαρύωσης, κατά το οποίο δύο ή περισσότεροι γενετικά διαφορετικοί πυρήνες συνυπάρχουν στο κυτόπλασμα και επηρεάζουν από κοινού το φαινότυπο του μυκηλίου (Georgopoulos, 1987).

Στους απλοειδείς μύκητες, η έκφραση των γόνων ανθεκτικότητας είναι άμεση, ανεξάρτητα από το αν είναι κυρίαρχοι ή υπολειπόμενοι. Αντίθετα, στους διπλοειδείς μύκητες, η πρόκληση μεταλλαγών ανθεκτικότητας οδηγεί σε ετεροζυγωτία και κατά συνέπεια η σχέση τους με τους αντίστοιχους μη μεταλλαγμένους αλληλόμορφους αποκτά ιδιαίτερη σημασία (Georgopoulos,

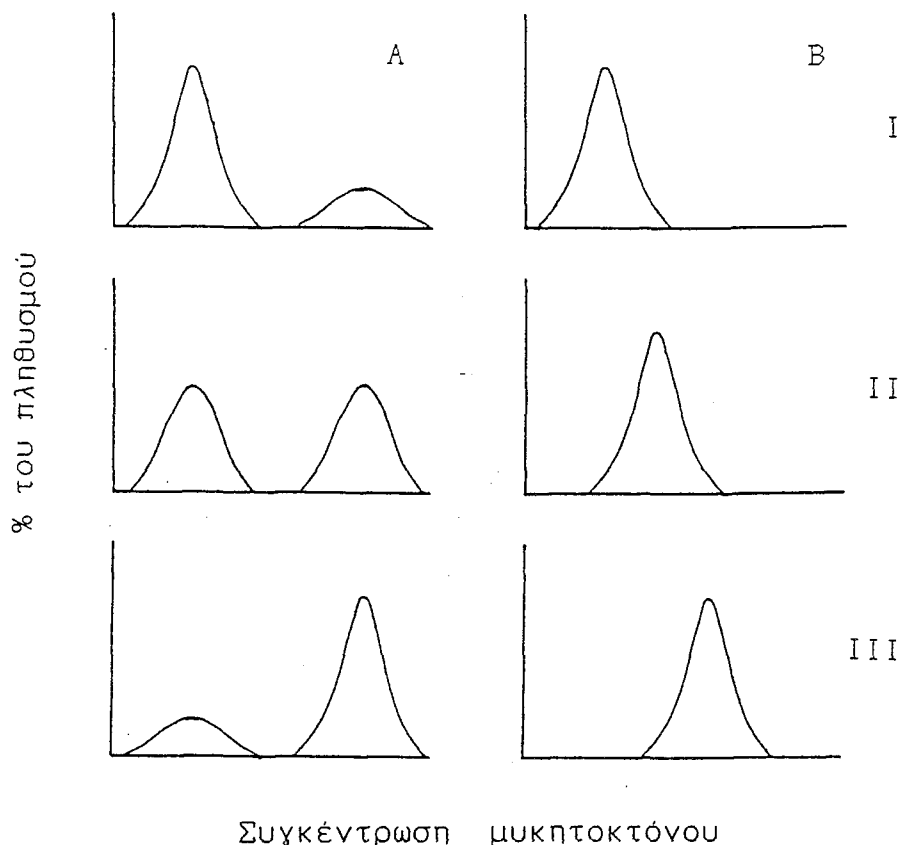
1986). Στην περίπτωση που κάποιοι πυρήνες ενός ετεροκαρυωτικού μυκηλίου φέρουν γόνους ανθεκτικότητας, το ποσοστό τους μπορεί να αυξάνει με τη συνεχή έκθεση του μύκητα στον τοξικό παράγοντα, με αποτέλεσμα να αυξάνει και η ανθεκτικότητα του οργανισμού στο μυκητοκτόνο (Georgopoulos, 1987).

Ανάλογα με τον αριθμό μεταλλαγμένων γόνων που απαιτούνται για την επίτευξη του μεγαλύτερου δυνατού επιπέδου ανθεκτικότητας σ' ένα μυκητοκτόνο, διακρίνουμε την "ολιγογονική" ή "ανθεκτικότητα μειζόνων γόνων" (major gene resistance) και την "πολυγονική" (polygenic resistance).

Στην πρώτη περίπτωση, ο υψηλότερος δυνατός βαθμός ανθεκτικότητας μπορεί να επιτευχθεί με την μεταλλαγή ενός μόνο γόνου. Αυτό όμως δε σημαίνει ότι η ευαισθησία του οργανισμού ελέγχεται από ένα μόνο γόνο. Δεν αποκλείεται και άλλες μεταλλαγές να προσδίδουν παρόμοιου ή μικρότερου επιπέδου ανθεκτικότητα, χωρίς όμως να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους έτσι ώστε αθροιστικά να προκύψει αύξηση του επιπέδου ανθεκτικότητας (Georgopoulos, 1987). Η παρουσία τέτοιων γόνων ανθεκτικότητας σ' έναν πληθυσμό που βρίσκεται υπό την επίδραση του μυκητοκτόνου, δημιουργεί αμέσως δύο σαφώς διακρινόμενα, από πλευράς ευαισθησίας τμήματα του πληθυσμού (Σχήμα 1). Αν η επιλεκτική πίεση του τοξικού παράγοντα συνεχισθεί, τότε το τμήμα εκείνο του πληθυσμού με πολύ υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας θα επικρατήσει και πολύ γρήγορα θα αποτελέσει το σύνολο του πληθυσμού (Georgopoulos και Skylakakis, 1986· Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Στην περίπτωση της "πολυγονικής" ανθεκτικότητας κάθε γόνος, προσδίδει μια μικρού βαθμού ανθεκτικότητα, και για την επίτευξη υψηλότερου επιπέδου απαιτείται η αθροιστική δράση πολλών μεταλλαγμένων γόνων (Georgopoulos, 1987). Διαφορετικοί συνδυασμοί γόνων προσδίδουν διαφορετικού επιπέδου ανθεκτικότητα, με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολη η διάκριση τμημάτων του πληθυσμού με σημαντικά διαφορετική ευαισθησία (Σχήμα 1). Σημαντικής χρονικής διάρκειας έκθεση του πληθυσμού στο μυκητοκτόνο, θα οδηγήσει όχι μόνο στη διασπορά των γόνων ανθεκτικότητας, αλλά και στη συσσώρευσή τους στον ίδιο γονότυπο, η μετατόπιση όμως του πληθυσμού σε υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας είναι σταδιακή (Georgopoulos και Skylakakis, 1986).

Ανάλογα με την επίδραση των γόνων ανθεκτικότητας στην προσαρμοστικότητα του οργανισμού, τα διάφορα μυκητοκτόνα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες κινδύνου ανθεκτικότητας (resistance risk). Στην πρώτη, που χαρακτηρίζεται σαν ομάδα "υψηλού κινδύνου" (high risk), κατατάσσονται



Σχήμα 1. Ανάπτυξη ολιγονικής (A) και πολυγονικής (B) ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού που βρίσκεται κάτω από τη συνεχή επιλεκτική πίεση του μυκητοκτόνου. I. Αρχικό, II. Μέσο, III. Τελικό στάδιο εξέλιξης (Προσαρμογή από Georgopoulos και Skylakakis, 1986).

μυκητοκτόνα στα οποία έχουμε ανάπτυξη ανθεκτικότητας από "μείζονες γόνους", οι οποίοι δεν επηρεάζουν την προσαρμοστικότητα (ρυθμό αύξησης, παραγωγή κονιδίων, παθογόνο ικανότητα) των ανθεκτικών στελεχών. Κατά την εφαρμογή των μυκητοκτόνων αυτών στην πράξη, η εμφάνιση ανθεκτικότητας εκ μέρους του παθογόνου είναι συνήθως απότομη και οδηγεί σε πλήρη απώλεια της αποτελεσματικότητάς τους. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα βενζιμιδαζολικά, τα φαινυλαμίδια, τα καρβοξαμιδικά και η polyoxin. Αν η ανθεκτικότητα ελέγχεται από πολυγονικά συστήματα ή από "μείζονες γόνους" οι οποίοι όμως έχουν σημαντική αρνητική επίδραση στην προσαρμοστικότητα των μεταλλαγμένων στελεχών, τότε τα μυκητοκτόνα χαρακτηρίζονται σαν "μέσου κινδύνου" (moderate risk). Στην περίπτωση αυτή, τα προβλήματα ανθεκτικότητας στην πράξη δεν εμφανίζονται απότομα και δεν είναι της ίδιας έντασης όπως στην ομάδα "υψηλού κινδύνου". Σαν "μέσου κινδύνου" χαρακτηρίζονται οι

αρωματικοί υδρογονάνθρακες, το dodine, τα 2-αμινοπυριμιδινικά, οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (EBI's) και η kasugamycin. Τέλος, μυκητοκτόνα όπως το θείο, τα χαλκούχα, τα διθειοκαρβαμιδικά, τα φθαλιμίδια, οι κινόνες, το dinocap και το chlorothalonil, ταξινομούνται στην ομάδα "χαμηλού κινδύνου" (low risk), αφού ποτέ κατά την εφαρμογή τους δεν έχει αναφερθεί περίπτωση ανάπτυξης ανθεκτικότητας και πιθανότατα δεν υπάρχουν γόνιοι ανθεκτικότητας γι' αυτά τα μυκητοκτόνα (Georgopoulos, 1986).

1.1.2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οι θεωρητικά πιθανοί βιοχημικοί μηχανισμοί που μπορεί να οδηγήσουν σε ανθεκτικότητα είναι οι ακόλουθοι:

1. Αλλαγή της χημικής δομής της θέσης δράσης (ενζυμικό σύστημα ή άλλο κυτταρικό συστατικό) του παρεμποδιστή.
2. Μειωμένη περατότητα των μεμβρανών στον τοξικό παράγοντα.
3. Μηχανισμοί αποτοξικοποίησης του τοξικού μορίου.
4. Μειωμένη μετατροπή του μη τοξικού μορίου σε τοξικό.
5. Αυξημένη απέκκριση του παρεμποδιστή.
6. Αυξημένη παραγωγή του ενζύμου-στόχου.
7. Μειωμένη εξάρτηση του κυττάρου από το συστατικό του οποίου η βιοσύνθεση είναι στόχος του παρεμποδιστή.
8. Αυξημένη παραγωγή κάποιου συστατικού με ανταγωνιστική δράση ως προς τον παρεμποδιστή.
9. Λειτουργία εναλλακτικών βιοσυνθετικών συστημάτων.

Για τον ίδιο παρεμποδιστή μπορεί να λειτουργούν διαφορετικοί βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας ανάλογα με το μεταλλαγμένο γόνο σε διαφορετικούς ή ακόμα και στον ίδιο οργανισμό (Georgopoulos, 1977).

Από τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν, στην περίπτωση των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται στη γεωργική πράξη μόνο οι πέντε πρώτοι έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντικοί.

1.1.2.1. Αλλαγή της θέσης δράσης.

Ο μηχανισμός αυτός της ανθεκτικότητας στηρίζεται σε γενετικές αλλαγές που τροποποιούν τη χημική δομή του ενζύμου ή άλλου κυτταρικού συστατικού, με το οποίο αλληλεπιδρά ο παρεμποδιστής, χωρίς όμως να επηρεάζεται, σημαντικά

τουλάχιστον, η λειτουργικότητά του ή ο ρόλος του στο συνολικό μεταβολισμό του κυττάρου. Αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών είναι να μειώνεται η συγγένεια (affinity) του τοξικού μορίου για το ένζυμο ή συστατικό-στόχο και κατά συνέπεια η αποτελεσματικότητα της παρεμπόδισης (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Στην περίπτωση των διασυστηματικών μυκητοκτόνων, όπου οι θέσεις δράσης είναι λίγες και συγκεκριμένες, η εμφάνιση τέτοιων αλλαγών είναι αποτέλεσμα μεταλλαγής ενός ή λίγων γόνων που συνήθως οδηγούν σε υψηλού βαθμού ανθεκτικότητα. Από τη μελέτη τέτοιων μεταλλαγών προκύπτουν πολύτιμες πληροφορίες όχι μόνο για το πρόβλημα της ανθεκτικότητας αλλά και σημαντικά στοιχεία για τη βιοχημεία και τη φυσιολογία του κυττάρου γενικότερα (Georgopoulos, 1977).

Ανθεκτικότητα αυτού του είδους έχει αναφερθεί σε πολλές κατηγορίες παρεμποδιστών, από τους οποίους ενδεικτικά αναφέρουμε τα βενζιμιδαζολικά (Davidse, 1982), τα καρβοξαμιδικά (Georgopoulos και Ziogas, 1977), τα φαινυλαμίδια (Davidse, 1987) και τα αντιβιοτικά kasugamycin (Taga και συνεργάτες, 1979) και cycloheximide (Vomvoyanni, 1974).

1.1.2.2. Μειωμένη περατότητα των μεμβρανών.

Όλες οι τοξικές ουσίες που αλληλεπιδρούν με συστατικά ή συστήματα που βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου, για να "προσεγγίσουν" τη θέση δράσης τους πρέπει να περάσουν δια μέσου της κυτοπλασματικής μεμβράνης. Συχνά η είσοδος των τοξικών μορίων στο εσωτερικό του κυττάρου, ελέγχεται από ειδικά ενζυμικά συστήματα μεταφοράς (περμηάσες) που εδράζονται στην κυτοπλασματική μεμβράνη και βρίσκονται κάτω από γενετικό έλεγχο. Είναι λοιπόν πιθανό μια κατάλληλη μεταλλαγή να μειώσει την περατότητα της μεμβράνης στο τοξικό μόριο, με αποτέλεσμα αυτό να μη συσσωρεύεται, σε σημαντικές τουλάχιστον ποσότητες στο εσωτερικό του κυττάρου, και να οδηγήσει έτσι σε ανθεκτικότητα (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Τέτοιες περιπτώσεις ανθεκτικότητας έχουν αναφερθεί στις περιπτώσεις του carbendazim (Nachmias και Barash, 1976) και του αντιβιοτικού polyoxin (Horí και συνεργάτες, 1974).

Φαίνεται όμως ότι ο μηχανισμός της μειωμένης περατότητας των μεμβρανών δεν περιορίζεται στην κυτοπλασματική μεμβράνη, αλλά περιλαμβάνει και τις

μεμβράνες των κυτταρικών οργανιδίων, όταν σ'αυτά βρίσκονται οι θέσεις δράσης των παρεμποδιστών (Georgopoulos, 1977).

1.1.2.3. Αποτοξικοποίηση.

Αφορά κυρίως μηχανισμούς ενζυμικής αποικοδόμησης του τοξικού μορίου προς λιγότερο ή καθόλου τοξικά παράγωγα. Η ανθεκτικότητα του *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* στο dodine (Bartz και Mitchell, 1970), αλλά και η μειωμένη ευαισθησία ορισμένων ειδών στο PCNB (Nakanishi και Oku, 1969) φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της λειτουργίας τέτοιων μηχανισμών. Σαν μηχανισμός αποτοξικοποίησης μπορεί να θεωρηθεί και η αδρανοποίηση του τοξικού μορίου μέσω της δέσμευσής του από υποκυτταρικά συστατικά, τα οποία δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τον μεταβολισμό του κυττάρου. Ένας τέτοιος μηχανισμός έχει αναφερθεί στην περίπτωση των οργανικών υδραργυρούχων μυκητοκτόνων (Greenaway, 1972).

1.1.2.4. Μειωμένη μετατροπή.

Ορισμένες ενώσεις που χρησιμοποιούνται σαν μυκητοκτόνα δεν είναι αυτές καθ' αυτές δραστικές, αλλά μετατρέπονται σε μυκητοτοξικές ουσίες από συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα του ίδιου του μύκητα. Στις περιπτώσεις αυτές ανθεκτικότητα μπορεί να δημιουργηθεί σαν αποτέλεσμα αλλαγών στα ενζυμικά αυτά συστήματα που οδηγούν σε μειωμένη μετατροπή της αρχικής μη τοξικής ουσίας σε τοξική. Τέτοιοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας έχουν αναφερθεί στις περιπτώσεις των 6-azauracil (Dekker, 1967) και pyrazophos (De Waard και Van Nistelrooy, 1980a). Το πρώτο έχει χρησιμοποιηθεί μόνο πειραματικά αλλά το δεύτερο είναι εμπορικό σκεύασμα.

1.1.2.5. Αυξημένη απέκκριση

Η συσσώρευση των τοξικών μορίων στο εσωτερικό του κυττάρου είναι αποτέλεσμα της λειτουργίας δύο αντιθέτων διαδικασιών. Η μία αφορά την είσοδο του παρεμποδιστή και η άλλη την απέκκρισή του με τη βοήθεια μηχανισμών ενεργού μεταφοράς. Αυξημένη λειτουργία τέτοιων μηχανισμών απέκκρισης, προκαλεί μειωμένη συσσώρευση του παρεμποδιστή στο εσωτερικό του κυττάρου, περιορίζοντας έτσι την τοξική του δράση. Ένας τέτοιος

μηχανισμός ανθεκτικότητας έχει αναφερθεί στην περίπτωση του fenarimol (Kalamarakis και συνεργάτες, 1991. De Waard και Van Nistelrooy, 1984).

1.2. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ (EBI's)

Οι παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (Ergosterol Biosynthesis Inhibitors, EBI's) που τώρα ονομάζονται συνήθως παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης των στερολών (Sterol Biosynthesis Inhibitors, SBI's), είναι μια ομάδα διασυστηματικών, κατά κανόνα μυκητοκτόνων που έκαναν την εμφάνισή τους στα τέλη της δεκαετίας του 1960 σαν αποτέλεσμα ερευνών από πολλές αναξάρτητα εργαζόμενες ερευνητικές ομάδες (Scheinflug και Kuck, 1987· Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Είναι μυκητοκτόνα χρήσιμα τόσο στη γεωργική πράξη για την καταπολέμηση ενός σημαντικού αριθμού φυτοπαθογόνων μυκήτων, όσο και στην ιατρική σαν αντιμυκωτικοί και αντιβακτηριακοί παράγοντες (Schwinn, 1984).

1.2.1. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ, ΕΠΙΠΡΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Όλοι οι EBI's εισέρχονται στο εσωτερικό του φυτού και οι περισσότεροι έχουν την ικανότητα αποπλαστικής κίνησης, κάτι που δυσκολεύει τη χρήση τους κατά παθογόνων του ριζικού συστήματος και των αγγείων του ξύλου (Edgington, 1981). *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί παρεμποδιστές ενός μεγάλου αριθμού μυκήτων που ανήκουν στους Ασκομύκητες, τους Βασιδιομύκητες και τους Αδηλομύκητες. Στην πράξη χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την αντιμετώπιση των ωιδίων στα σιτηρά (Kingsland, 1982, Becker, 1978), τα μηλοειδή (Hickey, 1981), τα κολοκυνθοειδή (Kolbe, 1981a), τα ψυχανθή (Brown και Hall, 1981) και τα καλλωπιστικά (Quinn, 1982, Kolbe, 1981b), των σκωριάσεων στα σιτηρά (Paul, 1982), τα μηλοειδή (Wackers και συνεργάτες, 1978) και τα ψυχανθή (Nieuwoudt, 1984), του φουζικλαδίου (Szkolnik, 1981· Kelley και Jones, 1981) και της αλτερναρίωσης (Prusky και Ben-Arie, 1981) των μηλοειδών, της σεπτορίωσης των σιτηρών (Clark και συνεργάτες, 1984), της κερκοσπορίωσης των τεύτλων (Scheinflug και Kuck, 1987) και της εργοτίασης των σιτηρών (Shaw, 1984) αλλά και μετασυσπαστικά για την προστασία των εσπεριδοειδών (Scheinflug και Kuck, 1987). Ιδιαίτερα σημαντικές είναι και οι εφαρμογές τους που αφορούν την αντιμετώπιση παθογόνων που μεταφέρονται με το σπόρο, όπως ο *Gaeumannomyces graminis* (Bateman και Gutteridge, 1984), και είδη του γένους *Ustilago*, καθώς και για την προστασία του σπόρου από παθογόνα

εδάφους κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των φυταρίων. Αντίθετα οι Ωομύκητες, στους οποίους ανήκουν σημαντικοί από οικονομικής πλευράς φυτοποθογόνοι μύκητες, καθώς και ο *Botrytis cinerea* δεν μπορούν να καταπολεμηθούν με μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής (Fuchs και συνεργάτες, 1983).

Παρά τον σημαντικό ρόλο της εργοστερόλης στη φυσιολογία του κυττάρου (Κεφάλαιο 1.3), η διακοπή της βιοσύνθεσής της από τους EBI's, δεν προκαλεί άμεσα αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης (Siegel και Ragsdale, 1978). Επιπλέον η βλάστηση των σπορίων δεν επηρεάζεται σημαντικά (Sherald και συνεργάτες, 1973· Sisler και συνεργάτες, 1983), τουλάχιστον σε συγκεντρώσεις EBI's που παρεμποδίζουν το σχηματισμό αποικιών σε στερεό θρεπτικό υλικό (Ziogas και συνεργάτες, 1990). Αυτό πιθανά οφείλεται στο ότι ο ρυθμός "παραγωγής" της εργοστερόλης είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό "κατανάλωσής" της για την βιοσύνθεση των μεμβρανών, με αποτέλεσμα η υπάρχουσα στα κύτταρα ποσότητα εργοστερόλης κατά την εφαρμογή του μυκητοκτόνου είναι ικανή να υποστηρίξει αρχικά την ανάπτυξη του μυκηλίου (Siegel, 1981). Στη συνέχεια όμως ταυτόχρονα με τη μείωση της ποσότητας της εργοστερόλης παρατηρούνται μια σειρά από αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και το μεταβολισμό του κυττάρου (Ragsdale, 1977).

Οι μορφολογικές αλλαγές αφορούν κυρίως ανωμαλίες στο σχηματισμό των βλαστικών σωλήνων, του τοιχώματος, των οργανιδίων και των μεμβρανών του μυκηλίου. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη βλάστηση των σπορίων παρουσία EBI's, έχουν αναφερθεί διογκώσεις των βλαστικών σωλήνων, ανομοιόμορφες παχύνσεις του κυτταρικού τοιχώματος (Pring, 1984· Βιτωράτος, 1991), ανωμαλίες στο σχηματισμό των septa, (Richmond, 1984) και αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων, του ενδοπλασματικού δικτύου και των λιπιδίων (Hippe, 1984· Βιτωράτος, 1991). Σε μύκητες που πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση (budding), έχει αναφερθεί και αλλαγή προς την κατεύθυνση της μυκηλιακής ανάπτυξης (Hippe και Giesen, 1988). Σε μυκηλιακούς μύκητες έχουν παρατηρηθεί ανωμαλίες στην αύξηση του μυκηλίου με διογκωμένες και έντονα διακλαδιζόμενες υφές (Sherald και συνεργάτες, 1973· Ziogas και συνεργάτες, 1990), καθώς και αδυναμία σχηματισμού σκληρωτίων από τον *Sclerotinia sclerotiorum* (Stiers και συνεργάτες, 1980). Στην κυτταρική μεμβράνη εμφανίζονται συσσωματώματα των εσωμεμβρανώδη σωματίδια (intramembrane particles) (Hippe, 1985), ημισφαιρικές κοιλότητες και κρατηροειδείς κατασκευές (Hippe και Niedermeyer, 1984).

Στο επίπεδο του μεταβολισμού και των κυτταρικών λειτουργιών, παρουσία EBI's, παρατηρείται μειωμένη περατότητα των κυτταρικών μεμβρανών (Sancholle και συνεργάτες, 1984), και σημαντική συσσώρευση άλλων, εκτός της εργοστερόλης, στερολών καθώς και ελεύθερων λιπαρών οξέων (Henry και Sisler, 1981). Αντίθετα δεν φαίνεται να επηρεάζονται άμεσα η αναπνοή, η πρωτεϊνοσύνθεση, και η βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων (Buchenaue, 1977). Σε συγκεντρώσεις EBI's, που μειώνουν την ικανότητα σχηματισμού αποικιών περισσότερο από 90%, διαπιστώθηκαν και γενετικές επιδράσεις των EBI's που αφορούν ανώμαλη κατανομή των χρωματοσωμάτων και ασυνήθη ανάπτυξη διαχωριστικής πυρηνικής μεμβράνης κατά το σχηματισμό των θυγατρικών πυρήνων (Ziogas και συνεργάτες, 1990).

Όλες αυτές οι αλλαγές στη μορφολογία, το μεταβολισμό και τη διαίρεση του κυττάρου, εκτός από τη συσσώρευση των στερολών, φαίνεται ότι δεν είναι άμεσο αποτέλεσμα της δράσης των EBI's, αλλά δευτερογενείς επιδράσεις που συνδέονται με τη μείωση της ποσότητας της εργοστερόλης και τον πολυδιάστατο ρόλο της στη φυσιολογία των μυκήτων. Οι ανωμαλίες στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος και των εγκαρσίων διαφραγμάτων (septa) δεν φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της άμεσης παρεμπόδισης του πολυμερισμού της χιτίνης (Kato και συνεργάτες, 1974), αλλά μάλλον στην απορρύθμιση των μηχανισμών σύνθεσης των κυτταρικών αυτών κατασκευών (Sisler και Ragsdale, 1983). Παρόμοια, η συσσώρευση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, φαίνεται να οφείλεται στην ανατροπή της ισορροπίας μεταξύ της σύνθεσης και της χρησιμοποίησής τους εξαιτίας της αποδιοργάνωσης των μεμβρανών, που προκαλείται από την απουσία εργοστερόλης (Sisler και Ragsdale, 1977).

Η τοξικότητα όμως των EBI's δεν περιορίζεται μόνο στους μύκητες αλλά επεκτείνεται και σε άλλες κατηγορίες οργανισμών που δεν συνθέτουν εργοστερόλη. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, οι EBI's προκαλούν καθυστέρηση στην ανάπτυξη του στελέχους και του ριζικού συστήματος των φυτών (Buchenaue και Rohner, 1981), μείωση του αριθμού των στοματίων, καταστροφή του τονοπλάστη και των χλωροπλαστών (Pring, 1986) και παρεμπόδιση της βλάστησης της γύρης (Bristow, 1981). Οι επιδράσεις αυτές των EBI's, που φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της δράσης τους τόσο στη βιοσυνθετική διαδικασία των φυτοστερολών όσο και στην βιοσύνθεση των γιββερελλινών (Burden και συνεργάτες, 1989), εμφανίζονται πιο έντονες στα δικοτυλήδονα και λιγότερο στα μονοκοτυλήδονα φυτά (Scheinpflug και Kuck, 1987).

Από χημική άποψη, οι EBI's χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός αζωτο-ετεροκυκλικού δακτυλίου στο μόριό τους και με βάση αυτόν (Σχήμα 2) μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες ως εξής: (Schwinn, 1984)

1. EBI's με μη αρωματικό αζωτο-ετεροκυκλικό δακτύλιο:

1.1. Πιπεραζινικά (Piperazines).

1.2. Μορφολινικά (Morpholines).

2. EBI's με αρωματικό αζωτο-ετεροκυκλικό δακτύλιο:

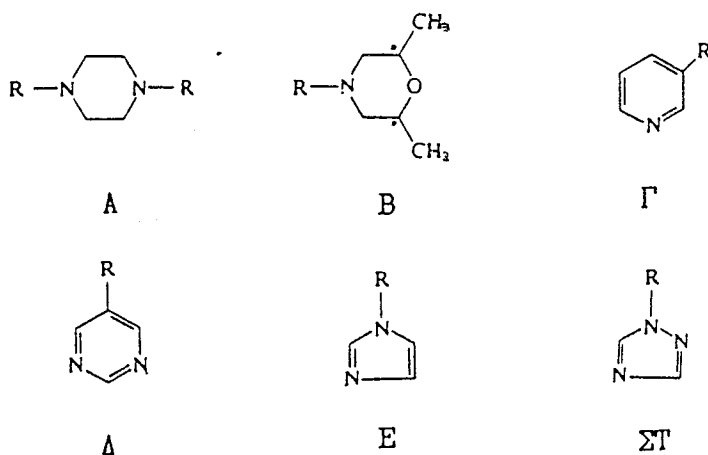
2.1. Πυριδινικά (Pyridines).

2.2. Πυριμιδινικά (Pyrimidines).

2.3. Ιμιδαζολικά (Imidazoles).

2.4. Τριαζολικά (Triazoles).

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι πιο σημαντικοί αντιπρόσωποι των παραπάνω ομάδων των EBI's και τα εμπορικά τους ονόματα.



Σχήμα 2. Οι χαρακτηριστικοί αζωτο-ετεροκυκλικοί δακτύλιοι των διαφόρων ομάδων των EBI's. Α. Πιπεραζινικά. Β. Μορφολινικά. Γ. Πυριδινικά. Δ. Πυριμιδινικά. Ε. Ιμιδαζολικά. ΣΤ. Τριαζολικά. Με R συμβολίζεται η λιπόφιλη ανθρακική αλυσίδα και με αστερίσκο τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα.

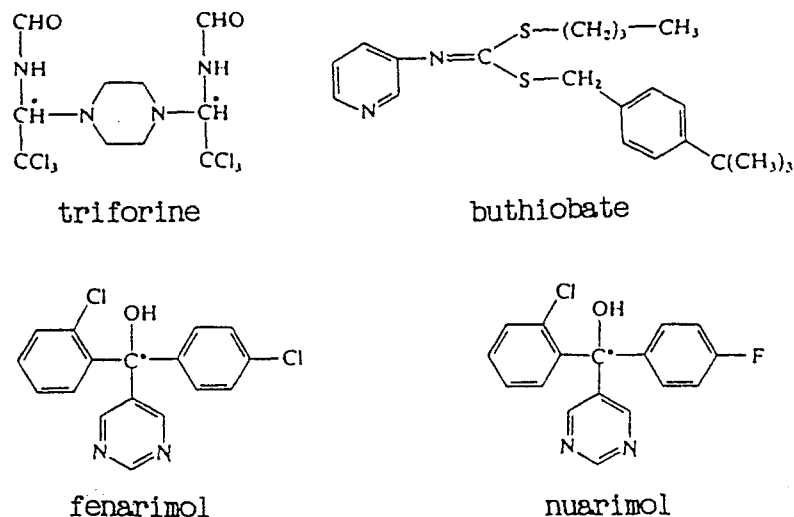
1.2.1.1. Πιπεραζινικά.

Το triforine (Σχήμα 3) είναι το μόνο πιπεραζινικό που από το 1969 χρησιμοποιείται στην γεωργική πράξη (Scheinpflug και Kuck, 1987). Η χημική του δομή είναι διαφορετική συγκριτικά με τους άλλους EBI's και το

Πίνακας 1. Κυριότεροι παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ασθενειών των φυτών ή μυκητιάσεων στα ανώτερα θηλαστικά.

Χημική ομάδα	Κοινό όνομα	Έτος εμφ.	Χρήση ^α	Εμπορικά ονόματα
Πιπεραζινικά	triforine	1969	Γ	Saprol, Funginex
Μορφολινικά	dodemorph	1965	Γ	Meltatox
	tridemorph	1969	Γ	Calixin
	fenpropimorph	1980	Γ	Corbel
Πυριδινικά	buthiobate	1975	Γ	Denmert
	pyrifenox		Γ	Dorado
Πυριμιδινικά	fenarimol	1975	Γ	Rimidin, Rubigan
	nuarimol	1975	Γ	Trimidal, Triminol
Ιμιδαζολικά	clotrimazole	1967	I	Canesten, Lotrimine
	miconazole	1967	I	Daktar, Daktarin
	imazalil	1972	Γ	Fungaflor
	prochloraz	1977	Γ	Sportak, Sporgon
	ketoconazole	1978	I	Nizoral
	triflumizole	1983	Γ	Trisosol, Trifmine
Τριαζολικά	fluotrimazole	1973	Γ	Persulon
	triadimefon	1973	Γ	Bayleton
	triadimenol	1977	Γ	Baytan, Summit
	bitertanol	1978	Γ	Baycor, Sibutol
	etaconazole	1979	Γ	Vangard, Sonax
	propiconazole	1979	Γ	Tilt, Desmel
	flutriafol	1983	Γ	Impact
	flusilazol	1984	Γ	Nustar, Punch

^α Γεωργική (Γ) ή ιατρική (I) χρήση.

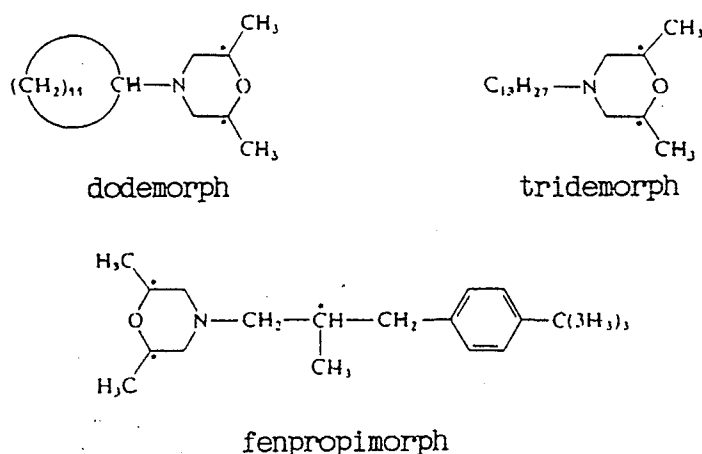


Σχήμα 3. Αντιπρόσωποι της ομάδας των πιπεραζινικών (triforine), των πυριδινικών (buthiobate) και των πυριμιδινικών (fenarimol, nuarimol) μυκητοκτόνων. Με αστερίσκο σημειώνονται τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα.

μόριό του συμπληρώνεται από μία απλή λιπόφιλη ανθρακική αλυσίδα που συνδέεται με τον ετεροκυκλικό δακτύλιο (Sisler και Ragsdale, 1983). Σε αντίθεση με τα ιμιδαζολικά και τα τριαζολικά, δεν προκαλεί προβλήματα ανάπτυξης στα φυτά (Attabhanyo και Holcomb, 1976), αν και έχει αναφερθεί ότι παρεμποδίζει τη βλάστηση της γύρης (Bristow, 1981). Χρησιμοποιείται σε ψεκασμούς φυλλώματος για την αντιμετώπιση των ωιδίων, των σκωριάσεων και του φουζικλαδίου (Fuchs και Drandarevski, 1973).

1.2.1.2. Μορφολινικά.

Από τα μορφολινικά (Σχήμα 4) το dodemorph χρησιμοποιείται κατά των ωιδίων ιδιαίτερα των καλλωπιστικών (Frost και Pattissen, 1971). Το tridemorph είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό κατά των ωιδίων των σιτηρών αλλά και κατά πολλών άλλων φυτοπαθογόνων ασκομυκήτων, βασιδιομυκήτων και μερικών αδηλομυκήτων αν και σε συνθήκες υψηλής ηλιοφάνειας έχει παρατηρηθεί φυτοτοξικότητα (Pommer, 1987). Το fenpropimorph τέλος επιδεικνύει ευρύ φάσμα δράσης και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα κατά ειδών των γενών *Puccinia*, *Erysiphe*, *Uromyces*, *Pyricularia* και *Rhynchosporium* (Pommer, 1987).



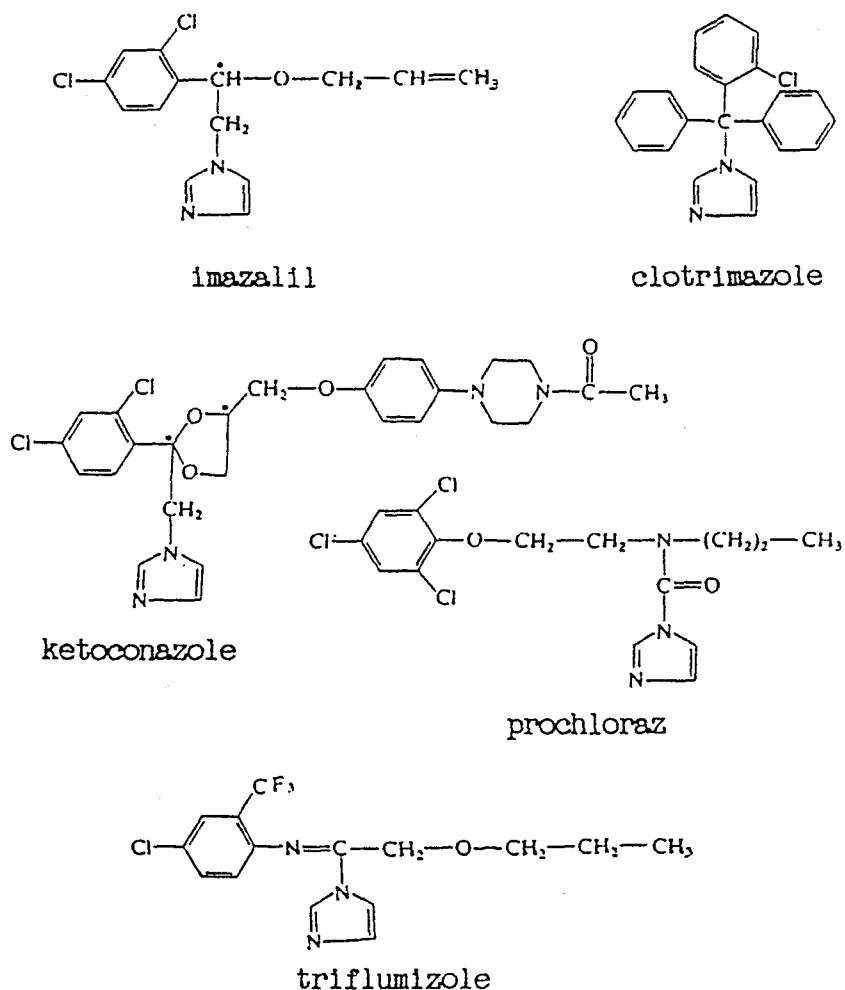
Σχήμα 4. Αντιπρόσωποι της ομάδας των μορφολινικών μυκητοκτόνων. Με αστερίσκο σημειώνονται τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα.

1.2.1.3. Πυριδινικά.

Από τα πυριδινικά (Σχήμα 3), το *buthiobate* χρησιμοποιείται κυρίως στην Ιαπωνία για την αντιμετώπιση των ωιδίων, ενώ το *pyrifenoх* κατά παθογόνων του φυλλώματος όπως είδη των γενών *Cercospora*, *Fusicladium*, *Septoria* και *Monilinia* (Scheinflug και Kuck, 1987). Το *buthiobate*, ενώ έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικό σε *in vitro* μελέτες κατά διαφόρων Ασκομυκήτων και Αδηλομυκήτων, είναι ελάχιστα τοξικό στους Βασιδιομύκητες (Kato και συνεργάτες, 1975) και παρουσιάζει συγκριτικά με τους άλλους EBI's, μειωμένη διασυστηματική κίνηση (Ohkawa και συνεργάτες, 1976).

1.2.1.4. Πυριμιδινικά.

Το πυριμιδινικό *triarimol* (Σχήμα 3), αν και ήταν η πρώτη ένωση που αποδείχθηκε ότι παρεμποδίζει την βιοσύνθεση της εργοστερόλης (Ragsdale και Sisler, 1972) δεν χρησιμοποιήθηκε ποτέ στη γεωργική πράξη. Τα δύο άλλα πυριμιδινικά, *fenarimol* και *nuarimol*, έχουν αποδειχθεί *in vitro*, ιδιαίτερα αποτελεσματικά κατά Ασκομυκήτων, Βασιδιομυκήτων και Αδηλομυκήτων (Buchenaue, 1979) και στην πράξη κατά των ωιδίων, των σκωριάσεων, του φουζικλαδίου (Brown και Hall, 1981) και παθογόνων του σπόρου και του



Σχήμα 5. Αντιπρόσωποι της ομάδας των ιμιδαζολικών μυκητοκτόνων. Με αστερίσκο σημειώνονται τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα.

εδάφους (Scheinpflug και Kuck, 1987).

1.2.1.5. Ιμιδαζολικά.

Τα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής (Σχήμα 5) βρήκαν ευρεία εφαρμογή στην ιατρική. Αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικά για την αντιμετώπιση πολλών δερματομυκητιάσεων του ανθρώπου ενώ μερικά από αυτά (miconazole, ketoconazole) εμφανίσθηκαν να είναι κατάλληλα και κατά πολλών θετικών κατά

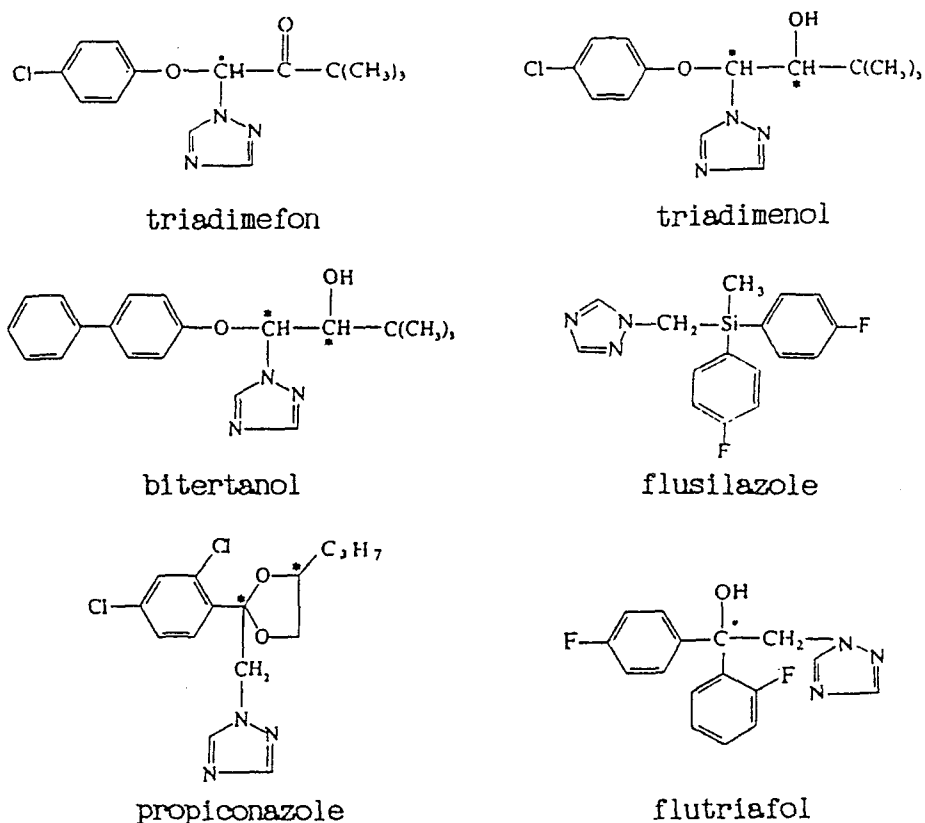
Gram βακτηρίων (Schwinn, 1984).

Το imazalil ήταν το πρώτο ιμιδαζολικό που χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση παθογόνων του σπόρου και του εδάφους αλλά και μετασυλλεκτικά για την προστασία των εσπεριδοειδών (Scheinpflug και Kuck, 1987). Ακολούθησαν το prochloraz και το triflumizole. Το prochloraz παρ' ότι επιδεικνύει μειωμένη διασυστηματική κίνηση (Cooke και συνεργάτες, 1979), εμφανίζει ευρύ φάσμα δράσης (Birchmore και συνεργάτες, 1977) με εξαίρεση ίσως τους Βασιδιομύκητες (Copping και συνεργάτες, 1984). Το triflumizole εμφανίζεται σαν προστατευτικό και θεραπευτικό μυκητοκτόνο με ευρύ φάσμα δράσης (Scheinpflug και Kuck, 1987).

1.2.1.6. Τριαζολικά.

Τα τριαζολικά (Σχήμα 6) είναι η σημαντικότερη ομάδα των EBI's με πάρα πολλούς αντιπροσώπους και σημαντικές εφαρμογές στη γεωργία. Πρωτοεμφανίστηκαν το 1972 με το fluotrimazole, το οποίο παρά το ευρύ φάσμα δράσης του (Buchenaue, 1979), χρησιμοποιήθηκε ελάχιστα, κυρίως λόγω της πολύ μικρής διασυστηματικής του κίνησης (Steffens και Wienecke, 1981). Ακολούθησε το triadimefon, που *in vitro* και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, παρουσιάστηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό κατά Ασκομυκήτων, Βασιδιομυκήτων και Αδηλομυκήτων (Buchenaue, 1979). Στην πράξη έδειξε να υπερτερεί έναντι πολλών άλλων EBI's επιδεικνύοντας ταυτόχρονα προστατευτική και θεραπευτική δράση κατά την αντιμετώπιση, σημαντικών από οικονομικής πλευράς, παθογόνων σε διάφορες καλλιέργειες (Scheinpflug και Kuck, 1987). Διαπερνά πολύ εύκολα την επιδερμίδα των ριζών, του στελέχους και των φύλλων των φυτών (Sanders και συνεργάτες, 1978) και έχει πολύ καλή αποπλαστική κίνηση (Kraus, 1981). Σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως οι περισσότεροι EBI's, προκαλεί επιβράδυνση της ανάπτυξης των φυτών (Pepin και συνεργάτες, 1980). Δευτερογενώς όμως φαίνεται να αυξάνει την αντοχή των φυτών στο ψύχος (Fletcher και Hofstra, 1985) και ταυτόχρονα να μειώνει την ένταση της διαπνοής, ασκώντας θετική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες έλειψης νερού (Fletcher και Nath, 1984).

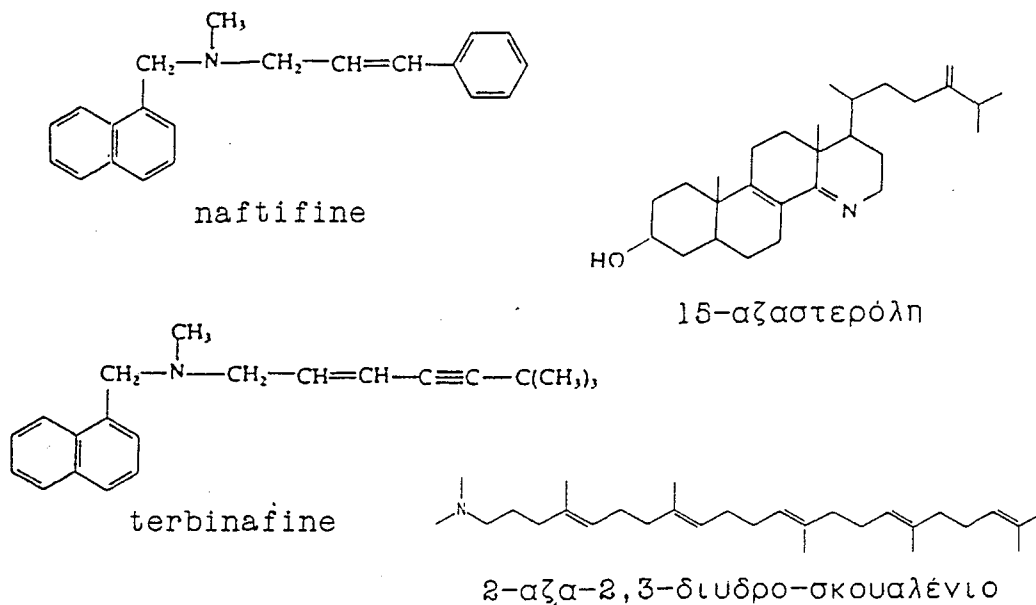
Το triadimefon, το οποίο δεν είναι άμεσα τοξικό, ενεργοποιείται μέσω της μετατροπής του προς την αντίστοιχη αλκοόλη, το triadimenol που είναι και ο τοξικός παράγοντας (Gasztonyi και Josepovits, 1979). Το triadimenol σαν μυκητοκτόνο παρουσιάζει παρόμοια χαρακτηριστικά με το triadimefon ως προς



Σχήμα 6. Αντιπρόσωποι της ομάδας των τριαζολικών μυκητοκτόνων. Με αστερίσκο σημειώνονται τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα.

το φάσμα δράσης, αλλά επιδεικνύει αυξημένη θεραπευτική ικανότητα (Scheinflug και Kuck 1987). Εμφανίζεται με δύο διαστεροϊσομερείς μορφές και η ευαισθησία των διαφόρων παθογόνων σ' αυτά είναι σημαντικά διαφορετική (Deas και συνεργάτες, 1984b). Η σημασία των διαστεροϊσομερών του triadimenol, καθώς και ο μηχανισμός αναγωγής του triadimefon περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1.4.

Το bitertanol χαρακτηρίζεται από μειωμένη διασυστηματική κίνηση (Brandes και συνεργάτες, 1979) και θεωρείται σαν το καταλληλότερο από τα τριαζολικά κατά πολλών Αθλομυκήτων (Kraus, 1979). Το propiconazole και το αιθυλ-ανάλογό του etaconazole, είναι πολύ τοξικά σ' ένα μεγάλο αριθμό παθογόνων (Scheinflug και Kuck, 1987) και παρουσιάζουν ισχυρή διασυστηματική κίνηση (Kelley και Jones, 1982). Το flusilazol τέλος που είναι το μόνο



Σχήμα 7. Αντιπρόσωποι της ομάδας των αλλυλαμινών (naftifine, terbinafine) και των αζαστερολών (25-αζαστερόλη, 2-αζα-2,3-διυδρο-σκουαλένιο).

τριαζολικό μυκητοκτόνο με πυρίτιο στο μόριό του, επιδεικνύει προστατευτική και θεραπευτική δράση κατά πολλών παθογόνων σε διάφορες καλλιέργειες (Scheinpflug και Kuck, 1987).

1.2.1.7. Άλλοι παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης.

Η βιοσύνθεση της εργοστερόλης παρεμποδίζεται στους μυκηλιακούς μύκητες και τις ζύμες και από άλλες ενώσεις με διαφορετική χημική δομή από τους προαναφερθέντες EBI's και που δεν χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Οι αλλυλαμίνες (Σχήμα 7) είναι μια σημαντική ομάδα τέτοιων ενώσεων που αναπτύχθηκαν για την αντιμετώπιση τοπικών δερματομυκητιάσεων του ανθρώπου (Ryder, 1989). Οι κύριοι αντιπρόσωποι της ομάδας, naftifine και terbinafine, παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου "εποξειδάση του σκουαλενίου" των μυκήτων (Ryder, 1987) ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά το αντίστοιχο ενζυμικό σύστημα της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης

στα θηλαστικά (Ryder και Dupont, 1985). Συνέπεια της παρεμπόδισης είναι η συσσώρευση σκουαλενίου στο εσωτερικό του κυττάρου σε πολύ υψηλά ποσοστά, που κατά μια άποψη είναι η αιτία θανάτωσης των παθογόνων (Ryder, 1989).

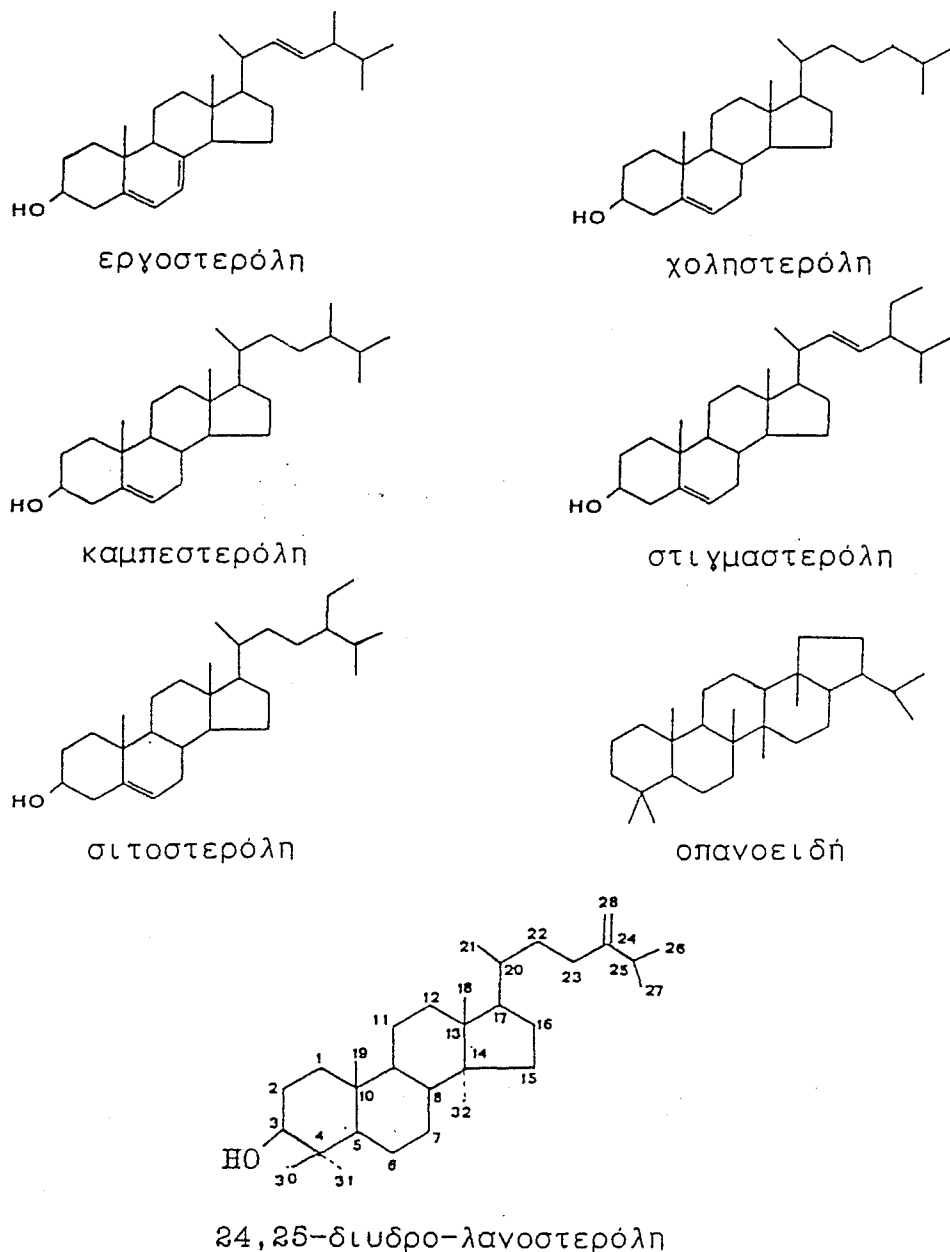
Οι αζαστερόλες (Σχήμα 7) που είναι μια ομάδα παρεμποδιστών με δομή παρόμοια μ' αυτή των στερολών, παρεμβαίνουν σε διάφορα στάδια της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης. Το 2-άζα-2,3-διυδροσκουαλένιο παρεμποδίζει την κυκλοποίηση του σκουαλενίου (Balliano και συνεργάτες, 1988), η 25-αζαστερόλη την μεθυλίωση του C-24 της ζυμοστερόλης των ζυμών (Oechslager και συνεργάτες, 1984), και η 23-αζαστερόλη δρα στο στάδιο της αναγωγής του $\Delta^{24(28)}$ διπλού δεσμού (Pierce και συνεργάτες, 1978). Τέλος, το αντιβιοτικό 15-άζα-24-μεθυλεν-D-ομοχολεστα-8,14-διεν-3β-όλη, που παράγεται από τον μύκητα *Geotrichum flavo-brunneum* (Boeck και συνεργάτες, 1975), φαίνεται να είναι ένας ισχυρός, μη ανταγωνιστικός παρεμποδιστής της αναγωγής του Δ^{14} διπλού δεσμού τόσο στις ζύμες (Bottema και Parks, 1978) όσο και στους μυκηλιακούς μύκητες (Woloshuk και συνεργάτες, 1979).

1.3. Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ

Η εργοστερόλη ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε εκχυλίσματα από εργότια το 1889 και στη συνέχεια σε άλλους μύκητες και ζύμες (Mercer, 1984). Η δομή του μορίου της, που προσδιορίστηκε το 1949, χαρακτηρίζεται από έναν τετρακυκλικό "πυρήνα", το περυδρο-κυκλοπεντανο-φαιναθρένιο ή στεράνιο (Nes, 1977) με μια υδροξυλομάδα στη θέση C-3, δύο μεθυλομάδες στις θέσεις C-10 και C-13 και μια πλευρική αλυσίδα από 9 άτομα άνθρακα στη θέση C-17. Στο μόριο υπάρχουν επίσης τρεις διπλοί δεσμοί, δύο στις θέσεις C-5 και C-7 του τετρακυκλικού "πυρήνα" και ένας στη θέση C-22 της πλευρικής αλυσίδας (Weete, 1974). Συνολικά λοιπόν η εργοστερόλη είναι μια αλκοόλη με 28 άτομα άνθρακα (Σχήμα 8).

Παρ' ότι η εργοστερόλη είναι η κύρια στερόλη των κυτταρικών μεμβρανών των μυκήτων, θα πρέπει σημειωθεί ότι δεν παράγεται απ' όλα τα είδη των μυκήτων και ότι και άλλοι οργανισμοί βιοσυνθέτουν εργοστερόλη. Για παράδειγμα, εργοστερόλη συντίθεται από κάποια πρωτόζωα της οικογένειας *Trypanosomatidae* μερικά είδη πρασίνων φυκών (green alga) του γένους *Chlorella* (Mercer, 1984), το τραχεόφυτο *Lycopodium complanatum* (Nes και συνεργάτες 1975) και το βακτήριο *Azotobacter chroococcum* (Schubert και συνεργάτες, 1968). Από τους ωομύκητες, τα είδη των γενών *Pythium* και *Phytophthora* αδυνατούν να συνθέσουν οποιαδήποτε στερόλη (Hendrix, 1966), παρ' ότι η παρουσία της φαίνεται να είναι απαραίτητες κατά τη διαδικασία της εγγενούς αναπαραγωγής τους (Hendrix, 1964, 1965). Επιπλέον, η στιγμαστερόλη με 29 άτομα άνθρακα, φαίνεται ότι είναι η κύρια στερόλη της κυτοπλασματικής μεμβράνης στους Uredinales των Βασιδιομυκήτων (Mercer, 1984).

Τα θηλαστικά συνθέτουν κυρίως χοληστερόλη και τα ανώτερα φυτά άλλες στερόλες όπως καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη και σιτοστερόλη (Nes, 1977). Τα βακτήρια σχηματίζουν άλλες, παρόμοιες με τις στερόλες, ενώσεις που ονομάζονται οπανοειδή και τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός πεντακυκλικού "πυρήνα" στο μόριό τους (Σχήμα 8). Για τη βιοσύνθεση των οπανοειδών δεν απαιτείται μοριακό οξυγόνο (Vanden Bossche, 1988), φαίνεται όμως ότι ο ρόλος τους στη φυσιολογία των βακτηρίων είναι παρόμοιος μ' αυτόν των στερολών στους άλλους οργανισμούς (Taylor, 1984).



Σχήμα 8. Χημική δομή των κυριότερων στερολών: εργοστερόλη των μυκήτων, χοληστερόλη των θηλαστικών, καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη και σιτοστερόλη των φυτών των οπανοειδών των βακτηρίων, και της 24,25-διυδρο-λανοστερόλης που αποτελεί τη βάση για την αρίθμηση των ατόμων άνθρακα στο μόριο και των υπολοίπων στερολών. Σαν C-29 αριθμείται ο δευτερος άνθρακας όταν υπάρχει αιθυλ-ομάδα στη θέση C-24.

Για την περιγραφή της χημικής δομής των στερολών χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σημειολογία: Διατηρείται η αρίθμηση των ατόμων άνθρακα του μορίου της 24,25-διυδρο-λανοστερόλης (Σχήμα 8) και στις άλλες στερόλες. Ο διπλός δεσμός αναφέρεται με το ελληνικό γράμμα δέλτα (Δ) και έναν αριθμητικό εκθέτη που δηλώνει το πρώτο άτομο άνθρακα του δεσμού όταν το δεύτερο είναι το αμέσως επόμενο με βάση την αρίθμηση στο μόριο της 24,25-διυδρο-λανοστερόλης. Όταν αυτό δεν ισχύει, τότε ακολουθεί σε παρένθεση και η αρίθμηση του δευτέρου ατόμου άνθρακα του διπλού δεσμού. Τα υδρογόνα και οι προσθετικές ομάδες που βρίσκονται πάνω από το επίπεδο του χαρτιού σημειώνονται με συνεχή γραμμή και είναι β διαμόρφωσης. Αντίθετα αυτά που βρίσκονται κάτω από το επίπεδο του χαρτιού σημειώνονται με διακεκομμένη γραμμή και είναι α διαμόρφωσης.

1.3.1. Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ

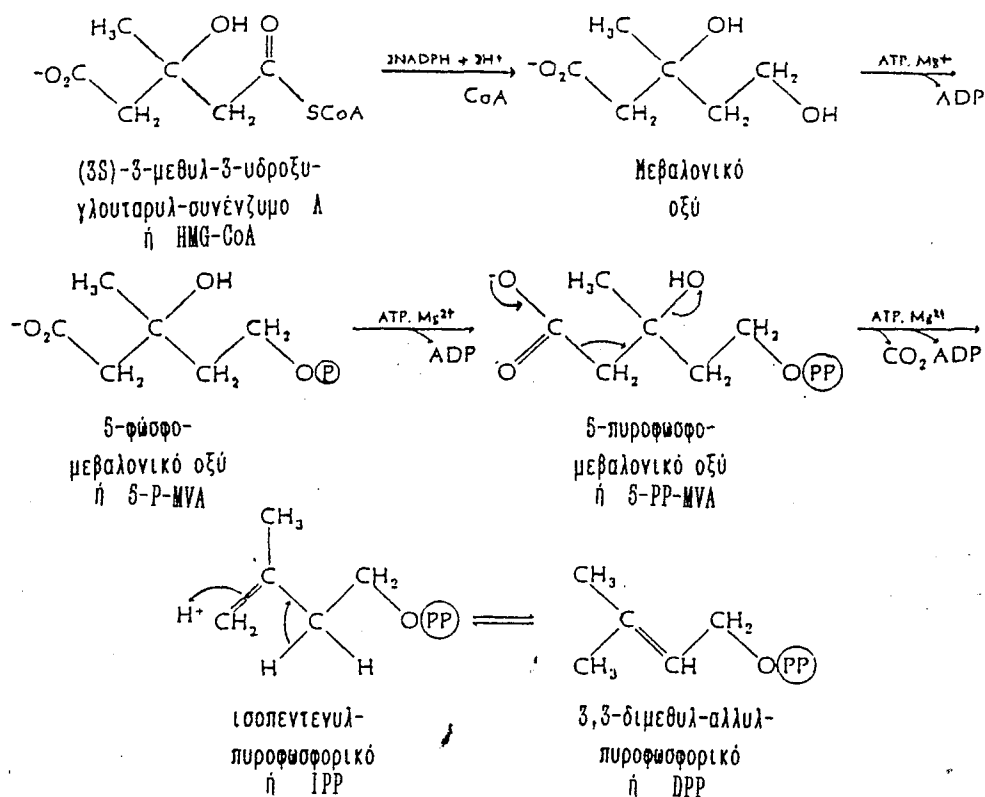
Η όλη διαδικασία μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις. Η πρώτη, που πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες, ξεκινάει από το ακετυλο-συνένζυμο Α και μετά από μια αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων και ενδιάμεσων προϊόντων καταλήγει στο σχηματισμό του μη πολικού μορίου του σκουαλένιου (Murphy και West, 1969). Το στάδιο αυτό είναι κοινό κατά τη βιοσύνθεση όλων των στερολών σε φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς (Nes, 1977). Κατά τη δεύτερη και αερόβια φάση, το σκουαλένιο μεταφέρεται στις κυτταρικές μεμβράνες όπου στην περίπτωση των μυκήτων κυκλοποιείται προς λανοστερόλη. Ακολουθεί μια σειρά από αντιδράσεις, η πλειοψηφία των οποίων είναι οξειδωτικές, που οδηγεί στο σχηματισμό της εργοστερόλης (Murphy και West, 1969).

1.3.1.1. Αναερόβια φάση.

Η φάση αυτή αρχίζει στα μιτοχόνδρια, όπου δύο μόρια ακετυλο-συνενζύμου Α υφίστανται έναν "κεφαλή-ουρά" (head to tail) πολυμερισμό με τη δράση του ενζύμου "ακετυλ-τρανσφεράση του ακετυλ-συνενζύμου Α" (acetyl CoA acetyl transferase) σχηματίζοντας το ακετο-ακετυλο-συνένζυμο Α (Smith και συνεργάτες, 1985). Ακολουθεί η προσθήκη ενός ακόμα μορίου ακετυλο-συνενζύμου Α που οδηγεί στο σχηματισμό του (3S)-3-μεθύλ-3-υδροξυ-γλουταρυλ-συνενζύμου Α ή HMG-CoA. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται στο κυτόπλασμα και καταλύεται από το ένζυμο "συνθετάση του 3-υδροξυ-3

-μεθυλγλουταρυλ-συνενζύμου A" (3-Hydroxy-3 methylglutaryl Coenzyme A synthase ή HMG-CoA synthase) (Miziorko και συνεργάτες, 1975). Το HMG-CoA ανάγεται προς μεβαλονικό οξύ με την οξείδωση δύο μορίων NADPH και την καταλυτική δράση του ενζύμου "αναγωγή του HMG-CoA" (HMG-CoA reductase) το οποίο βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Williams και συνεργάτες, 1986). Οι αντιδράσεις αυτές της μετατροπής του HMG-CoA προς μεβαλονικό οξύ είναι μη αντιστρεπτές (Durr και Rudney, 1960). Το μεβαλονικό οξύ υφίσταται δύο διαδοχικές φωσφορυλιώσεις με αποτέλεσμα αρχικά το σχηματισμό του 5-φωσφο-μεβαλονικού ή 5-P-MVA και στη συνέχεια του 5-πυροφωσφο-μεβαλονικού οξέος ή 5-PP-MVA. Η πρώτη αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο "κινάση του μεβαλονικού" (mevalonic kinase) (Tchen, 1958. Levy και Popjak, 1960), και η δεύτερη από το "κινάση του 5-φωσφο-μεβαλονικού" (5-phosphomevalonic kinase) (Henning και συνεργάτες, 1959). Το 5-PP-MVA μετατρέπεται σε ισοπεντενυλ-πυροφωσφορικό ή IPP, μετά από αφαίρεση του άνθρακα C-1 σαν διοξειδίο του άνθρακα. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο "αποκαρβοξυλάση του πυροφωσφο-μεβαλονικού" (pyrophosphomevalonate decarboxylase), και απαιτεί την "κατανάλωση" ενός μορίου ATP (Bloch και συνεργάτες, 1959). Μερικά μόρια του IPP μετατρέπονται στο ισομερές 3,3-διμεθυλ-αλλυλ-πυροφωσφορικό ή DPP μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο "ισομεράση του ισοπεντενυλ-πυροφωσφορικού" (isopentanyl pyrophosphate isomerase) (Agranoff και συνεργάτες 1960) (Σχήμα 9).

Ο σχηματισμός του DPP δημιουργεί το έναυσμα για να αρχίσει μια διαδικασία πολυμερισμού των δύο ισομερών για το σχηματισμό του φαρνεσυλ-πυροφωσφορικού. Κατά τον πολυμερισμό αυτό, αρχικά ένα μόριο DPP ενώνεται μ' ένα μόριο IPP από την καταλυτική δράση του ενζύμου "πρενυλ-τρανσφεράση" (prenyl transferase), σχηματίζοντας το γερανυλ-πυροφωσφορικό. Στη συνέχεια προστίθεται ένα ακόμα μόριο IPP δημιουργώντας το τελικό φαρνεσυλ-πυροφωσφορικό. Δεν είναι σαφές αν και η δεύτερη αυτή αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από το ίδιο (Holloway και συνεργάτες, 1967) ή άλλο ένζυμο (Smith και συνεργάτες, 1985). Δύο μόρια φαρνεσυλ-πυροφωσφορικού, υφίστανται έναν "ουρά-ουρά" (tail to tail) πολυμερισμό, σχηματίζοντας το πυροφωσφορικό προσκουαλένιο ή PSDP που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός κυκλοπροπανικού δακτυλίου με τρία ασύμμετρα άτομα άνθρακα (Billing, 1966. Epstein και Billing, 1970). Η αναδιάταξη αυτού του δακτυλίου και η ταυτόχρονη αναγωγή του μ' ένα μόριο NADPH, οδηγεί στο σχηματισμό του συμμετρικού μη πολικού μορίου του σκουαλένιου με 30 άτομα άνθρακα (Muscio και συνεργάτες, 1974). Τα ένζυμα που καταλύουν αυτές τις βιοχημικές



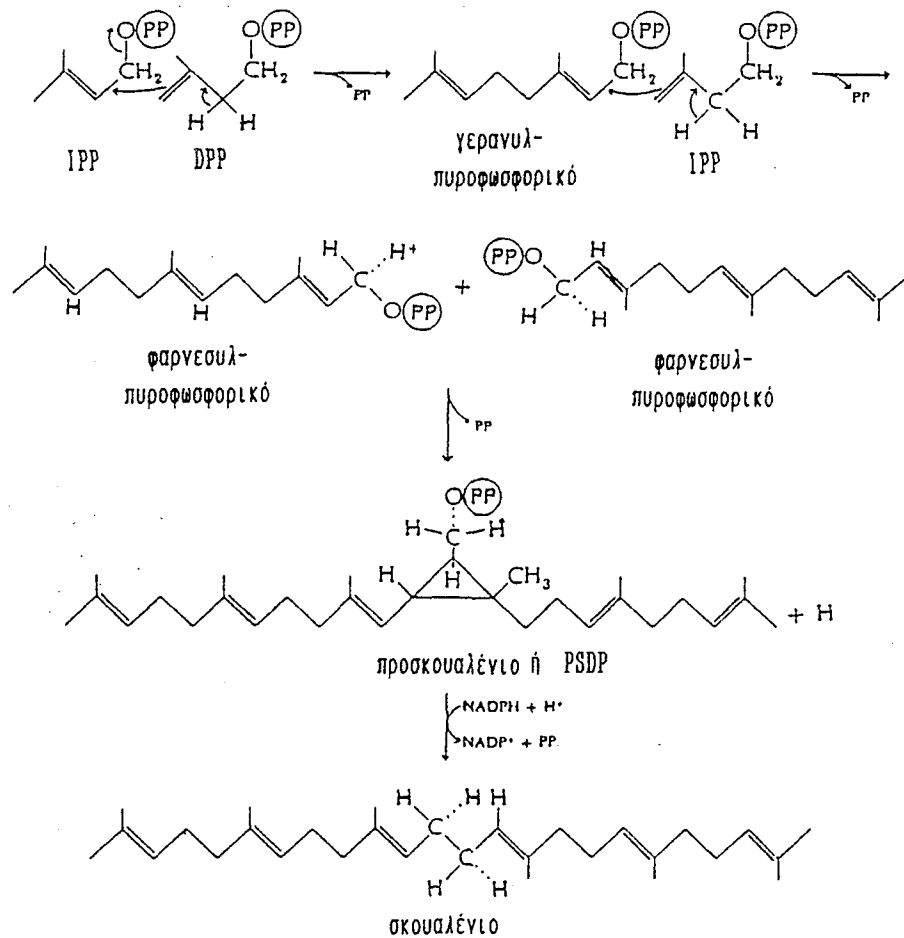
Σχήμα 9. Μηχανισμός σχηματισμού των ισοπεντενυλ-πυροφωσφορικού (IPP) και 3,3-διμεθυλ-αλλυλ-πυροφωσφορικού (DPP) από το (3S)-3-μεθυλ-3-υδροξυ-γλουταρυλ-συνένζυμο Α (HMG-CoA) (Προσαρμογή από Smith και συνεργάτες, 1985).

αντιδράσεις είναι τα "συνθετάση του προσκουαλενίου" (presqualene synthase) και "συνθετάση του σκουαλενίου" (squalene synthase) αντίστοιχα (Smith και συνεργάτες, 1985) και βρίσκονται στο μικροσωματικό κλάσμα (Shechter και Block, 1971) (Σχήμα 10).

1.3.1.2. Αερόβια φάση.

Σχηματισμός της λανοστερόλης.

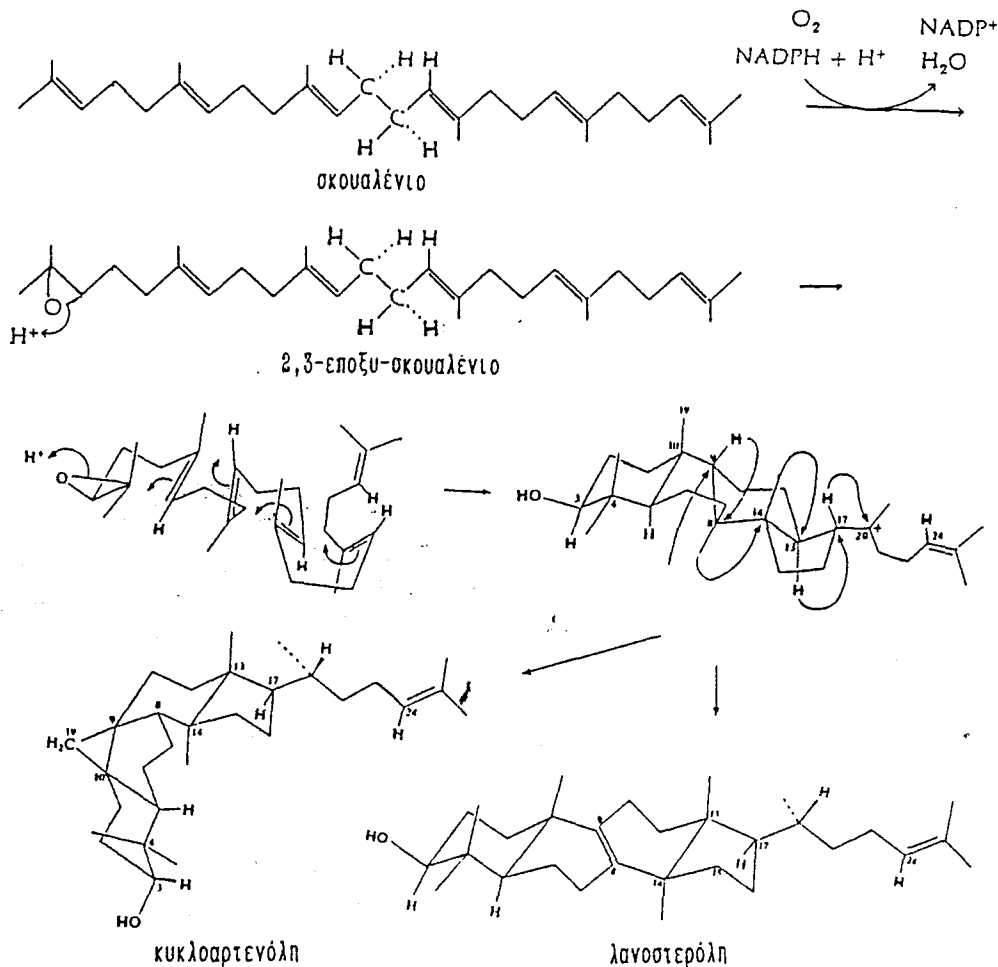
Το σκουαλένιο με την καταλυτική επίδραση του ενζύμου "εποξειδάση του σκουαλενίου" (squalene epoxidase) και την παρουσία ενός μορίου NADPH, εποξειδώνεται και σχηματίζεται το 2,3-εποξυ-σκουαλένιο. Αυτό είναι το



Σχήμα 10 Μηχανισμός σχηματισμού του σκουαλενίου από τα ισοπεντανυλ-πυροφωσφορικό (IPP) και 3,3-διμεθυλ-αλλυλ-πυροφωσφορικό (DPP) (Προσαρμογή από Smith και συνεργάτες, 1985).

πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης που απαιτεί μοριακό οξυγόνο (Corey και συνεργάτες, 1966· Yamamoto και Bloch, 1970). Η κυκλοποίηση του 2,3-εποξυ-σκουαλενίου, υπό αναερόβιες συνθήκες οδηγεί στην περίπτωση των μη φωτοσυνθετικών οργανισμών στο σχηματισμό της λανοστερόλης ενώ αντίθετα στην περίπτωση των φωτοσυνθετικών το τελικό προϊόν είναι η κυκλοαρτενόλη (Goodwin, 1979). (Σχήμα 11).

Κατά τη διαδικασία σχηματισμού της λανοστερόλης, καθώς το εποξείδιο υφίσταται μια ανάκλιτρο-λουτήρας (chair-boat) διαμόρφωση από το ένζυμο "οξειδάση του σκουαλενίου" (squalene 2,3 oxide), προστίθεται ένα πρωτόνιο



Σχήμα 11. Κυκλοποίηση του σκουαλενίου προς λανοστερόλη (μύκητες) ή κυκλοαρτενόλη (φυτά) (Προσαρμογή από Mercer, 1984).

στο οξυγόνο του μορίου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας σειράς ηλεκτρονιακών μετατοπίσεων και το σχηματισμό τριών εξαμελών και ενός πενταμελούς δακτυλίου και μιας πλευρικής ανθρακικής αλυσίδας. Αυτό είναι το πρώτο τετρακυκλικό τριτερπένιο κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (Mercer, 1984). Το ηλεκτρονικό έλλειμα που τελικά εμφανίζεται στον C-20, καλύπτεται με δύο 1,2 μετατοπίσεις υδρογόνου από τον C-17 στον C-20 και από τον C-13 στον C-17 (Jayme και συνεργάτες, 1970) και δύο 1,2 μετατοπίσεις μεθυλ-ομάδων από τον C-14 στον C-13 και από τον C-8 στον C-14 (Maudgal και συνεργάτες, 1958). Το καρβονίον που τελικά δημιουργείται στη θέση C-8 σταθεροποιείται με την αφαίρεση ενός πρωτονίου από τον C-9 και το

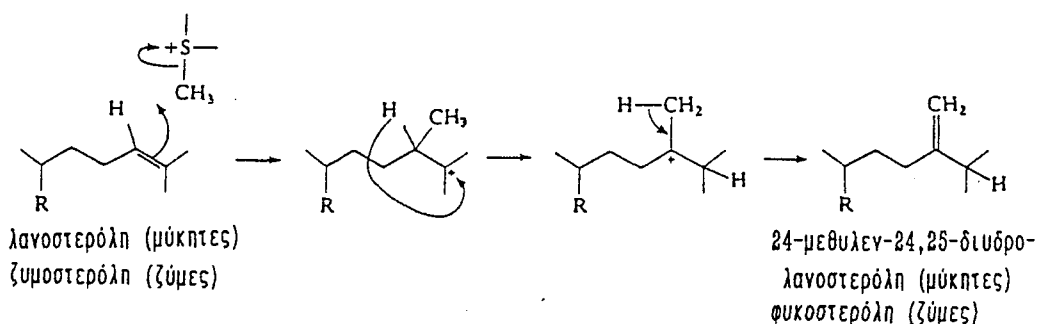
σχηματισμό ενός Δ⁸ διπλού δεσμού (Cornforth και συνεργάτες, 1965) (Σχήμα 11).

Στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς η κυκλοποίηση του σκουαλενίου έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός κυκλοπροπανικού δακτυλίου που ενώνει τα άτομα C-9, 10 και 19 του μορίου της κυκλοαρτενόλης (Rees και συνεργάτες, 1968). Στα βακτήρια υπό αναερόβιες συνθήκες και την καταλυτική επίδραση ενός μη εξειδικευμένου ενζύμου, η κυκλοποίηση του σκουαλενίου οδηγεί στο σχηματισμό του πεντακυκλικού "πυρήνα" των οπανοειδών (Anding και συνεργάτες, 1976).

Η παραπέρα μετατροπή της λανοστερόλης σε εργοστερόλη, που θα περιγραφεί στη συνέχεια, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που πραγματοποιείται σε πολλά στάδια και καταλύεται από ένζυμα των κυτταρικών μεμβρανών. Σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στον C-24, την απομάκρυνση των μεθυλομάδων του C-4 και του C-14 της λανοστερόλης και την αναδιάταξη κάποιων διπλών δεσμών της πλευρικής αλυσίδας και του τετρακυκλικού "πυρήνα". Η αλληλουχία αυτών των βιοχημικών αντιδράσεων δεν είναι σταθερή και μπορεί να διαφέρει σημαντικά στους διάφορους οργανισμούς (Mercer, 1984).

Μεθυλίωση του C-24.

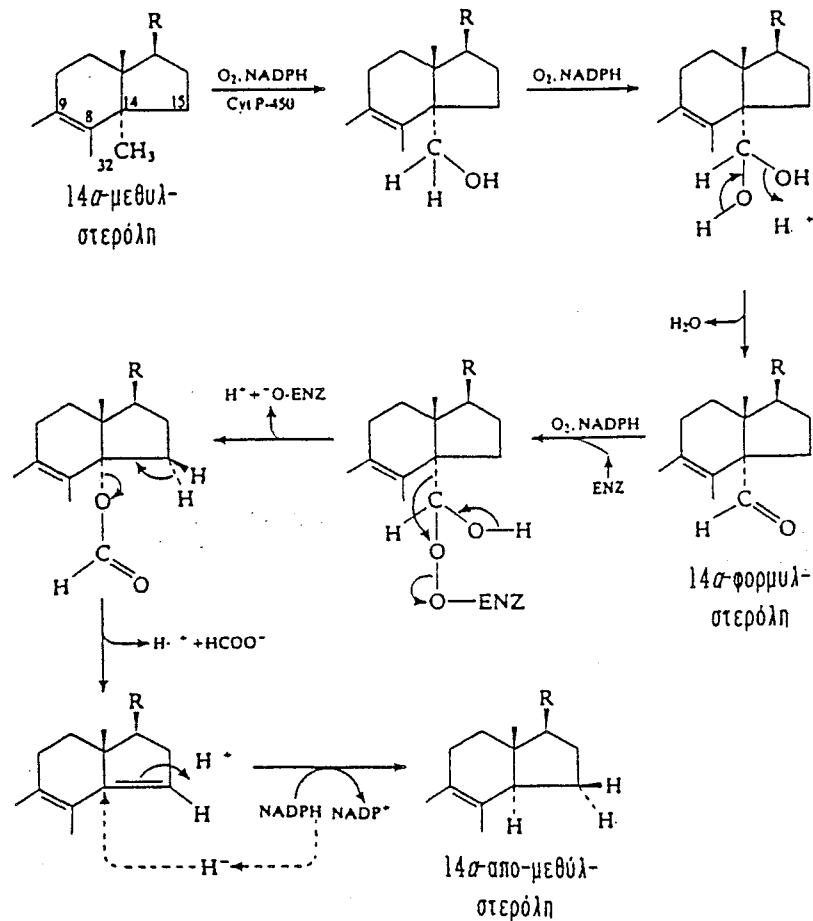
Στους μύκητες η μεθυλίωση του C-24 πραγματοποιείται αμέσως μετά το σχηματισμό της λανοστερόλης με αποτέλεσμα το σχηματισμό της 24-μεθυλ-24,25-διυδρο-λανοστερόλης ή εμπουρικόλης, με έναν Δ²⁴⁽²⁸⁾ διπλό δεσμό (Akhtar και συνεργάτες, 1967). Στις ζύμες του γένους *Saccharomyces* (Ascomycotinia, Endomycetales), προηγούνται οι απομεθυλιώσεις των C-4 και C-14. Στην περίπτωση αυτή η στερόλη που υφίσταται την μεθυλίωση δεν είναι η λανοστερόλη αλλά η ζυμοστερόλη και το προϊόν η φυκοστερόλη (Moore και Gaylor, 1970). Βασική προϋπόθεση για την πραγματοποίηση αυτής της μεθυλίωσης είναι η ύπαρξη ενός Δ²⁴ διπλού δεσμού (Russell και συνεργάτες, 1967). Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η "μεθυλτρανσφεράση των Δ²⁴-στερολών" (Δ²⁴-sterol methyltransferase), το οποίο εδράζεται στο μικροσωματικό κλάσμα (Moore και Gaylor, 1969). Σαν πιο κατάλληλος δότης της μεθυλομάδας θεωρείται η S-αδενοσυλ-μεθειονίνη (SAM) (Parks, 1968) (Σχήμα 12).



Σχήμα 12. Μηχανισμός μεθυλίωσης του C-24 κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης στους μύκητες (Προσαρμογή από Mercer, 1984).

Απομεθυλίωση του C-14.

Στους μύκητες και τα θηλαστικά η απομεθυλίωση του C-14, λαμβάνει χώρα πριν την απομάκρυνση των δύο μεθυλομάδων του C-4 (Gibbons, 1974), αν και η σειρά αυτή μπορεί να αλλάξει παρουσία ουσιών που εμποδίζουν την απομάκρυνση της 14α-μεθυλομάδας (Mercer, 1984). Η 14α-μεθυλ-ομάδα υφίσταται τρεις διαδοχικές οξειδώσεις και απομακρύνεται με τη μορφή μυρμηκικού οξέος. Στην περίπτωση του ζυμομύκητα *S. cerevisiae* το αρχικό υπόστρωμα είναι η 24,25-διυδρο-λανοστερόλη και το τελικό προϊόν είναι η 4,4-διμεθυλ-5α-χολεστα-8,14-διεν-3β-όλη. Οι ενδιάμεσες όμως οξυ-στερόλες, που σχηματίζονται, λόγω της μεγάλης συγγενειάς τους με το κυτόχρωμα, παραμένουν προσκολλημένες στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα το κυτόχρωμα P-450 να φαίνεται ότι δρα όχι σαν μονοοξυγενάση αλλά σαν μια λύση των απλών δεσμών μεταξύ ατόμων άνθρακα (Aoyama και συνεργάτες, 1987). Στα θηλαστικά σαν υπόστρωμα μπορεί να λειτουργήσει τόσο η 24-μεθυλεν-24(25)-διυδρο-λανοστερόλη, όσο και η 24,25-διυδρο-λανοστερόλη. Αρχικά σχηματίζεται μια διόλη και στη συνέχεια μια αλδεΐδη η οποία τελικά απομακρύνεται με τη μορφή μυρμηκικού οξέος σχηματίζοντας την 4,4-διμεθυλ-24-μεθυλεν-χολεστα-8,14-διεν-3β-όλη, που έχει έναν Δ⁸ διπλό δεσμό (Trzaskos και συνεργάτες, 1986b). Οι αντιδράσεις αυτές, στις οποίες συμμετέχει NADPH και μοριακό οξυγόνο καταλύονται από ένα και μόνο ισοένζυμο του κυτοχρώματος P-450 που βρίσκεται στο μικροσωματικό κλάσμα (Trzaskos και συνεργάτες, 1984). Η συγγένεια του ενζύμου με το αρχικό υπόστρωμα και τις ενδιάμεσες οξυ-στερόλες είναι διαφορετική και φαίνεται

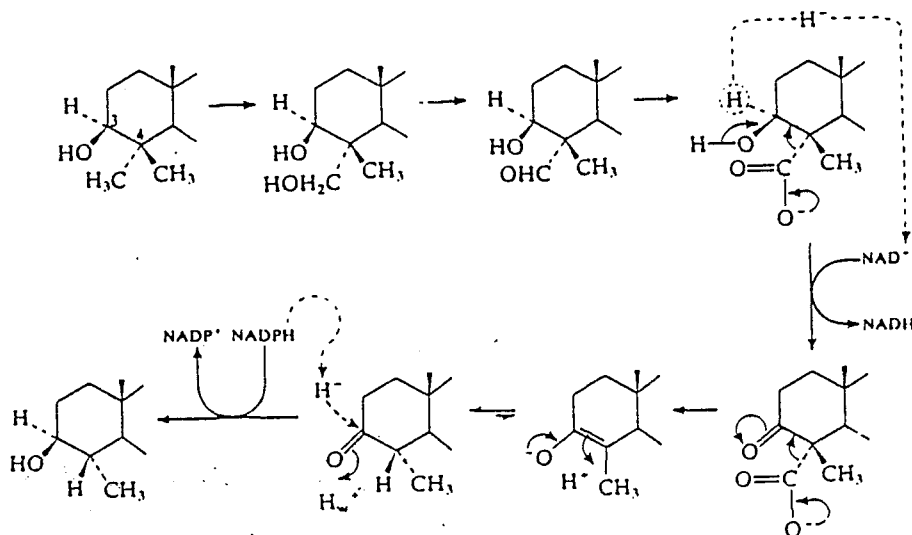


Σχήμα 13. Μηχανισμός απομεθυλίωσης του C-14 κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης στους μύκητες (Προσαρμογή από Mercer, 1984).

να είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση της αλκοόλης (Trzaskos και συνεργάτες, 1986a) (Σχήμα 13).

Η απομεθυλίωση του C-14 ολοκληρώνεται με την αναγωγή του Δ^{14} διπλού δεσμού. Η τελευταία αυτή αντίδραση αφορά την προσθήκη ενός υδρογόνου από NADPH στον C-14 και ενός άλλου στον C-15. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση και χαρακτηρίζεται σαν Δ^{14} αναγωγάση, δεν είναι σαφές αν εδράζεται στο μικροσωματικό (Watkinson και συνεργάτες, 1971) ή στο κυτοπλασματικό κλάσμα (Bottema και Parks, 1978) και μπορεί να αναγάγει και στερόλες χωρίς μεθυλομάδες στη θέση C-4 (Wilton και συνεργάτες, 1970) (Σχήμα 13).



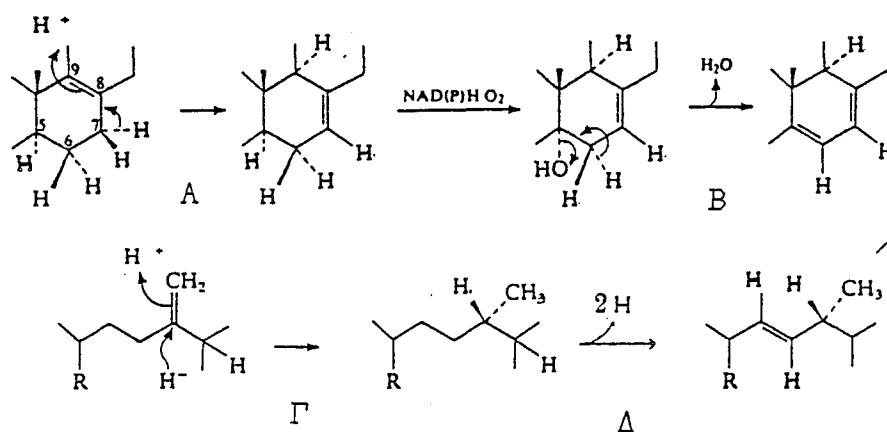


Σχήμα 14. Μηχανισμός απομεθυλίωσης του C-4 κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης στους μύκητες (Προσαρμογή από Mercer, 1984).

Απομεθυλίωση του C-4.

Η διαδικασία αρχίζει με τη βαθμιαία οξείδωση της 4 α -μεθυλ-ομάδας η οποία μετατρέπεται διαδοχικά σε 4 α -υδροξυμεθυλ-ομάδα, 4 α -φορμυλ-ομάδα και τελικά σε 4 α -καρβοξυλ-ομάδα (Miller και Gaylor, 1970a). Όλες αυτές οι μετατροπές καταλύονται από ένα οξειδωτικό ενζυμικό σύστημα που βρίσκεται στο μικροσωματικό κλάσμα, απαιτεί NADH και μοριακό οξυγόνο (Miller και Gaylor, 1970b) και στο οποίο πιθανά συμμετέχει και το κυτόχρωμα b₅ (Aoyama και συνεργάτες, 1981). Ακολουθεί, υπό αναερόβιες συνθήκες, παρουσία NAD⁺ και την καταλυτική επίδραση μιας "4-αποκαρβοξυλάσης" (4-decarboxylase), η απομάκρυνση της 4 α -καρβοξυλ-ομάδας με τη μορφή CO₂ (Swindell και Gaylor, 1968), και ο σχηματισμός μιας 4 β -μεθυλ-Δ³-εν-3 β -όλης. Η τελευταία ταυτομερίζεται προς την πιο σταθερή κέτο-μορφή με ταυτόχρονη επαναδιάταξη των υποκαταστατών του C-4 (Lindberg και συνεργάτες, 1963). Το τελευταίο στάδιο της απομεθυλίωσης αφορά την αναγωγή της 3-κέτο-ομάδας προς 3 β -υδροξυλ-ομάδα με τη βοήθεια NADPH και μιας "αναγωγάσης των 3-κετοστεροειδών" (3-ketosteroid reductase) (Rahimtula και Gaylor, 1972) (Σχήμα 14).

Ακολουθεί η απομάκρυνση της δεύτερης C-4 μεθυλομάδας που γίνεται με τον



Σχήμα 15. Αναδιάταξη και εισαγωγή διπλών δεσμών της πλευρικής αλυσίδας και του τετρακυκλικού "πυρήνα" κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης στους μύκητες. Α. Ισομερίωση του διπλού δεσμού από τη θέση Δ⁸ στη Δ⁷. Β. Σχηματισμός του Δ⁵ διπλού δεσμού. Γ. Αναγωγή του Δ²⁴ διπλού δεσμού. Δ. Σχηματισμός του Δ²² διπλού δεσμού (Προσαρμογή από Mercer, 1984).

ίδιο ακριβώς τρόπο και καταλύεται από το ίδιο ενζυμικό σύστημα (Gaylor και συνεργάτες, 1975).

Αναδιάταξη και εισαγωγή διπλών δεσμών.

Μετά την απομάκρυνση των μεθυλομάδων, η διαδικασία σχηματισμού της εργοστερόλης ολοκληρώνεται με την αναδιάταξη και την εισαγωγή κάποιων διπλών δεσμών στον τετρακυκλικό "πυρήνα" και την πλευρική αλυσίδα. Πιο συγκεκριμένα στον "πυρήνα" λαμβάνει χώρα ισομερίωση του διπλού δεσμού από τη θέση Δ⁸ στη θέση Δ⁷ και ο σχηματισμός ενός ακόμα στη θέση Δ⁵. Στην πλευρική αλυσίδα ανάγεται ο Δ²⁴(28) διπλός δεσμός και εισάγεται ένας νέος στη θέση Δ²².

Κατά την Δ⁸-Δ⁷ ισομερίωση, αρχικά λαμβάνει χώρα πρωτονίωση του C-9, στη συνέχεια απομάκρυνση ενός ατόμου υδρογόνου από τον C-7 και τέλος μεταφορά του διπλού δεσμού από τη θέση C-8 στην θέση C-7 (Lee και συνεργάτες, 1969). Αν και ο πλήρης ενζυμικός μηχανισμός δεν είναι απόλυτα γνωστός, η όλη διαδικασία φαίνεται να καταλύεται από μια εξειδικευμένη "Δ⁸-Δ⁷ ισομεράση" (Δ⁸-Δ⁷ isomerase) που εδράζεται στο μικροσωματικό κλάσμα τόσο

των θηλαστικών όσο και των ζυμών (Akhtar και συνεργάτες, 1970) (Σχήμα 15).

Η διαδικασία σχηματισμού του Δ⁵ διπλού δεσμού δεν έχει ακόμα επαρκώς διευκρινισθεί αλλά φαίνεται να στηρίζεται σ' έναν μηχανισμό υδροξυλίωσης/αφυδάτωσης που πραγματοποιείται σε δύο στάδια (Fryberg και συνεργάτες, 1973). Αρχικά λαμβάνει χώρα μια υδροξυλίωση του C-5 ή του C-6 που απαιτεί μοριακό οξυγόνο (Dempsey και συνεργάτες, 1964) και NADPH (Scallen και συνεργάτες, 1968) και ακολουθεί υπό αναερόβιες συνθήκες μια αφυδάτωση που οδηγεί στο σχηματισμό του Δ⁵ διπλού δεσμού (Topham και Gaylor, 1970) (Σχήμα 15).

Η ανόρθωση του Δ²⁴⁽²⁸⁾ διπλού δεσμού καταλύεται από μια "αναγωγή των Δ²⁴⁽²⁸⁾-στερολών" (Δ²⁴⁽²⁸⁾-sterol reductase) που εδράζεται στο μικροσωματικό κλάσμα, και απαιτεί NADPH. Το ένζυμο είναι εξειδικευμένο έτσι ώστε να προσδίδει β διαμόρφωση στην προκύπτουσα C-28 μεθυλομάδα (Jarman και συνεργάτες, 1975) (Σχήμα 15).

Λίγα είναι γνωστά σχετικά με το σχηματισμό του Δ²² διπλού δεσμού της πλευρικής αλυσίδας. Έχει διαπιστωθεί όμως, ότι στην περίπτωση του *S. cerevisiae*, η αντίδραση καταλύεται από ένα ενζυμικό σύστημα που εδράζεται στα μικροσώματα (Nishino και συνεργάτες, 1981), απαιτεί μοριακό οξυγόνο (Osumi και συνεργάτες, 1978) και NADPH είναι ανθεκτικό στο CN⁻ και ευαίσθητο στο CO. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι τυπικά ενός ενζυμικού συστήματος που περιέχει κυτόχρωμα P-450. Η όλη διαδικασία θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα ενδιάμεσο υδροξυλιωμένο παράγωγο, το οποίο στη συνέχεια υφίσταται αφυδάτωση σχηματίζοντας τον Δ²² διπλό δεσμό (Hata και συνεργάτες, 1981) (Σχήμα 15).

1.3.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ

Η βιοσύνθεση της εργοστερόλης είναι μια ενζυμική λειτουργία, και σαν τέτοια είναι λογικό να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το οξυγόνο, η θερμοκρασία και η ικανοποίηση των θρεπτικών απαιτήσεων του οργανισμού. Η δράση των παραγόντων αυτών ασκείται είτε απευθείας στα ενζυμικά συστήματα της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης είτε εμμέσως επηρεάζοντας το συνολικό μεταβολισμό του κυττάρου.

Η ποσότητα της εργοστερόλης που συντίθεται φαίνεται να συνδέεται άμεσα με

τον οξειδωτικό μεταβολισμό του κυττάρου (Klein, 1955). Σε πειράματα που έγιναν με τον *S. cerevisiae*, παρατηρήθηκε ότι υπό αναερόβιες συνθήκες καλλιέργειας, αρχικά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με τον ίδιο ρυθμό όπως και υπό αερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια όμως, μετά από μερικές περιόδους αναδιπλασιασμού, ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται και τελικά οι κυτταρικές διαιρέσεις σταματούν (Andreasen και Stier, 1954). Αυτό συμβαίνει όταν η περιεκτικότητα του κυττάρου σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και στερόλες πλησιάζει το 25% της ποσότητας των ενώσεων αυτών όταν ο οργανισμός αναπτύσσεται υπό αερόβιες συνθήκες (Gordon και Stewart, 1972). Η υποστήριξη της ανάπτυξης υπό αναερόβιες συνθήκες μπορεί να γίνει με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων εργοστερόλης ή ελαϊκού οξέος στο υλικό της καλλιέργειας (Andreasen και Stier, 1954) και σε μικρότερο βαθμό και από άλλες στερόλες που όμως πρέπει να έχουν μια 3β-υδροξυλ-ομάδα (Proudlock και συνεργάτες, 1968) διπλούς δεσμούς Δ⁵, Δ⁷ και Δ²² και μια 24β-μεθυλ-ομάδα στην πλευρική αλυσίδα (Nes και συνεργάτες, 1976).

Στην περίπτωση του *S. cerevisiae* ο μέγιστος ρυθμός βιοσύνθεσης στερολών επιτυγχάνεται σ' εκείνη τη θερμοκρασία η οποία θεωρείται η άριστη για την ανάπτυξη του οργανισμού. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες επώασης, ταυτόχρονα με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης, παρατηρείται και σημαντική μείωση των στερολών του κυττάρου. Η παρεμπόδιση αυτή μπορεί να αντιστραφεί με την προσθήκη εργοστερόλης και ακορέστων λιπαρών οξέων στο υλικό της καλλιέργειας, όπως και στην περίπτωση της έλλειψης οξυγόνου (Starr και Parks, 1962a). Η μείωση της εργοστερόλης σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, φαίνεται να οφείλεται στην μειωμένη αποτελεσματικότητα τεσσάρων ενζυμικών συστημάτων της βιοσυνθετικής διαδικασίας, που αφορούν την σύνθεση του μεβαλονικού οξέος, την κυκλοποίηση του σκουαλενίου, την απομεθυλίωση της λανοστερόλης και την αναγωγή της εργοστα-5,7,24(28)-τριεν-3β-όλη (Shimizu και Katsuki, 1975).

Όταν η ανάπτυξη λαμβάνει χώρα σε πλούσιο θρεπτικό υλικό, ευνοείται και η σύνθεση των στερολών, συχνά μάλιστα είναι και ανάλογη της διαθέσιμης ποσότητας υδρογονανθράκων (Starr και Parks, 1962b). Παρ' όλα αυτά σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί μείωση της εργοστερόλης λόγω τροφικών συνθηκών. Στην περίπτωση για παράδειγμα του *S. cerevisiae*, η έλλειψη παντοθενικού οξέος από το υλικό της καλλιέργειας έχει σαν αποτέλεσμα μείωση της ποσότητας των στερολών του κυττάρου (Klein και Lippmann, 1953). Υψηλή συγκέντρωση θειαμίνης προκαλεί συσσώρευση σκουαλενίου, λανοστερόλης και άλλων στερολών (Nagai και συνεργάτες, 1974)

ενώ η ομοκουστεΐνη φαίνεται να παρεμποδίζει την απομεθυλίωση των στερολών (Hatanaka και συνεργάτες, 1974).

Η εργοστερόλη αλλά και άλλες πρόδρομες στερόλες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και τις κυτταρικές μεμβράνες με τη μορφή ελευθέρων στερολών ή σε λιποσταγονίδια (cytosolic lipid droplets) εστεροποιημένες με λιπαρά οξέα (Rodriguez και συνεργάτες, 1985). Η εστεροποίηση των στερολών συνήθως πραγματοποιείται με ακόρεστα λιπαρά οξέα που έχουν 16 ή 18 άτομα άνθρακα (Madyastha και Parks, 1969). αλλά έχει παρατηρηθεί ότι παρουσία παρεμποδιστών όπως το trifluoperidol, συμμετέχουν σε υψηλά ποσοστά και οξέα με 12 ή 14 άτομα άνθρακα (Sobus και συνεργάτες, 1977). Κατά την εκθετική φάση το ποσοστό εστεροποίησής τους διατηρείται σταθερό στη συνέχεια όμως και με την είσοδο της καλλιέργειας στην μεταλογαριθμική φάση παρατηρείται μια σημαντική αύξηση του ρυθμού εστεροποίησης (Bailey και Parks, 1975a). Αύξηση της εστεροποίησης των στερολών έχει παρατηρηθεί και κατά τη διαδικασία σχηματισμού των ασκών, αλλά αυτό θα πρέπει να οφείλεται στην ταυτόχρονη μείωση της ανάπτυξης που παρατηρείται και όχι σε κάποιο ειδικό ρόλο των εστεροποιημένων στερολών στο σχηματισμό των ασκών (Illingworth και συνεργάτες, 1973). Ο βιολογικός ρόλος της εστεροποίησης των στερολών δεν είναι απόλυτα γνωστός, αλλά μάλλον δεν μπορεί να θεωρηθεί σαν ένας μηχανισμός αποθήκευσης των στερολών, αφού υδρόλυση των εστεροποιημένων ενδιάμεσων στερολών πραγματοποιείται σε μικρό ποσοστό και κατά συνέπεια ελάχιστα μεταβολίζονται προς εργοστερόλη (Nagai και συνεργάτες, 1977).

Η βιοσύνθεση της εργοστερόλης είναι μια ενεργειακά πολυδάπανη διαδικασία αφού απαιτούνται τουλάχιστον 25 αντιδράσεις στις οποίες "καταναλώνονται" 10 μόρια ATP και 16 NADPH. Είναι λοιπόν λογικό να υπάρχει ένας βιοχημικός μηχανισμός ελέγχου της ποσότητας των στερολών που συντίθενται ιδιαίτερα σε συνθήκες που δεν ευνοούν την ανάπτυξη του οργανισμού (Parks, 1978). Ο μηχανισμός αυτός εμφανίζεται στα πρώτα στάδια της βιοσυνθετικής διαδικασίας και αφορά τη ρύθμιση του επιπέδου δραστηριότητας των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις σχηματισμού του μεβαλονικού οξέος. Στην περίπτωση των θηλαστικών έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει ένας μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης (feed back) μεταξύ της ποσότητας της χοληστερόλης και της δραστηριότητας του ενζύμου "αναγωγή του HMG-CoA" (White και Rudney, 1970). Ένας παρόμοιος μηχανισμός φαίνεται να ενεργοποιείται και από τη συσσώρευση ενδιάμεσων οξυ-στερολών (Saucier και συνεργάτες, 1989). Στις ζύμες έχει παρατηρηθεί ότι υπό αναερόβιες συνθήκες η ποσότητα του ενζύμου "αναγωγή του HMG-CoA" μειώνεται

σημαντικά, ενώ παρουσία οξυγόνου η ποσότητά του αυξάνει αναλογικά με την ποσότητα της εργοστερόλης (Berndt και συνεργάτες, 1973). Αλλά και το ένζυμο "συνθετάση του HMG-CoA" που καταλύει το σχηματισμό του HMG υφίσταται υπό ανασερόβιες συνθήκες σημαντική μείωση της δραστητικότητάς του (Trocha και Sprinson, 1976).

Ο έλεγχος της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης γίνεται, σε μικρότερο βαθμό και σε άλλα στάδια όπως για παράδειγμα κατά την ισομερίωση του IPP, την κυκλοποίηση του σκουαλενίου (Slakey και συνεργάτες, 1972) και στη μεθυλίωση της ζυμοστερόλης (Bailey και Parks, 1975b). Οι ρυθμίσεις όμως αυτές είναι χωρίς ιδιαίτερη σημασία για την ενεργειακή οικονομία του κυττάρου, αφού στις περισσότερες περιπτώσεις ένα μεγάλο μέρος της βιοσυνθετικής διαδικασίας έχει ήδη πραγματοποιηθεί (Parks, 1978).

1.3.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Παρ' ότι η εργοστερόλη είναι γνωστή περίπου εδώ και έναν αιώνα, ο ρόλος της στη φυσιολογία των μυκήτων δεν έχει απόλυτα διευκρινισθεί. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι στερόλες συμβάλλουν σημαντικά τόσο στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής, όσο και στη λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών (Vanden Bossche, 1988).

Η βασική λειτουργία των ελεύθερων (μη εστεροποιημένων) στερολών συνίσταται στη διατήρηση της ρευστότητας των κυτταρικών μεμβρανών σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται οι στερόλες με τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών δεν είναι απόλυτα γνωστός. Φαίνεται όμως ότι σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου της καρβοξυλομάδας των φωσφολιπιδίων και της 3β-υδροξυλ-ομάδας των στερολών. Ίσως όμως να υπάρχουν και άλλες πιο σημαντικές, μη πολικές αλληλεπιδράσεις (Vanden Bossche, 1988). Η παρουσία της εργοστερόλης στις μεμβράνες επιτρέπει στους οργανισμούς να αναπτύσσονται σ' ένα πολύ μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, συγκριτικά με τη χοληστερόλη των θηλαστικών. Έχει παρατηρηθεί ότι τα περισσότερα στελέχη του *S. cerevisiae* μπορούν να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 0° και 42° C. Η υπεροχή αυτή της εργοστερόλης έναντι της χοληστερόλης θα πρέπει να αναζητηθεί σε μοριακό επίπεδο. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει ο υποκαταστάτης στη θέση C-24 του μορίου, αφού κατά τον εγκλιματισμό των οργανισμών σε χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρείται αύξηση των ελεύθερων στερολών στις κυτταρικές

μεμβράνες και ιδιαίτερα εκείνων με αιθυλομάδες στη θέση C-24 (Vanden Bossche, 1988). Θεωρείται ότι η παρουσία της C-24 μεθυλομάδας της εργοστερόλης αυξάνει τον όγκο του μορίου της και οδηγεί στην εξασθένηση των αλληλεπιδράσεων van der Waals με συνέπεια την αύξηση της κινητικότητας των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών (Vanden Bossche, 1988).

Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι όλοι σχεδόν οι οργανισμοί που έχουν την εργοστερόλη σαν κύρια στερόλη των μεμβρανών τους χαρακτηρίζονται ταυτόχρονα και από την παρουσία ενός άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στους οργανισμούς που συνθέτουν χοληστερόλη, η οποία φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά και στην μηχανική αντοχή των μεμβρανών (Parks, 1978). Πολλοί όμως μύκητες έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν σε μεγάλο βαθμό πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία επίσης συνεισφέρουν στη ρευστότητα των μεμβρανών. Οι μύκητες αυτοί μπορούν να αντιμετωπίζουν τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας χωρίς την παρουσία εργοστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες. Το γεγονός αυτό δημιουργεί ισχυρές ενδείξεις ότι η διατήρηση της ρευστότητας των μεμβρανών είναι ένας σημαντικός αλλά όχι ο μοναδικός ρόλος της εργοστερόλης στη φυσιολογία του κυττάρου (Vanden Bossche, 1988).

Σημαντικός πρέπει να είναι και ο ρόλος των στερολών στη ρύθμιση της περατότητας των μεμβρανών στα διάφορα κατιόντα. Έχει βρεθεί ότι στα θηλαστικά η χοληστερόλη συμβάλλει σημαντικά στον έλεγχο της ανταλλαγής ιόντων Na^+ και Ca^{2+} διαμέσου των μεμβρανών (Vemuri και Philipson, 1989). Παρόμοια, σε στελέχη του μύκητα *Rhodotorula gracilis*, που στερούνται της δυνατότητας παραγωγής εργοστερόλης, παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη περατότητα των μεμβρανών στα ιόντα K^+ και H^+ (Kunemund και Hofer, 1983).

Κάποιο στέλεχος του μύκητα *U. maydis*, στο οποίο η βιοσύνθεση της εργοστερόλης σταματούσε στο στάδιο της απομεθυλίωσης του C-14 μπορούσε να επιβιώνει αλλά με μειωμένη ανάπτυξη χωρίς εξωγενή προσθήκη στερολών (Sisler και συνεργάτες, 1983). Τέτοιου είδους στελέχη έχουν παρατηρηθεί και στις περιπτώσεις των ζυμών *Candida albicans* (Subden και συνεργάτες, 1977), και *S. cerevisiae* (Trocha και συνεργάτες, 1977), όχι όμως και σε μυκηλιακούς μύκητες. Φαίνεται ότι οι απαιτήσεις των ζυμών και των μυκήτων που αναπτύσσονται σαν ζύμες μπορούν, εν μέρη τουλάχιστον, να ικανοποιηθούν και από στερόλες με μεθυλομάδα στη θέση C-14 (Sisler και συνεργάτες, 1983). Κάποια άλλα στελέχη του *S. cerevisiae* που δεν είχαν τη δυνατότητα της βιοσύνθεσης στερολών, μπορούσαν να καλύπτουν τις ανάγκες τους με

εξωγενή προμήθεια και άλλων, εκτός της εργοστερόλης στερολών. Όμως μόνο αυτές που είχαν μεθυλ-ομάδα στη θέση C-24 μπορούσαν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του οργανισμού (Pinto και συνεργάτες, 1983). Ακόμα όμως και σ' αυτή την περίπτωση, ήταν απαραίτητη η παρουσία εργοστερόλης στο υλικό της καλλιέργειας, έστω και σε ελάχιστα ποσά, παρόμοια μ' αυτά των βιταμινών (Rodriguez και συνεργάτες, 1982).

Ο εξειδικευμένος αυτός ρόλος της εργοστερόλης στην έναρξη της ανάπτυξης (sparking function), φαίνεται να συνδέεται άμεσα με την ύπαρξη του Δ⁵ διπλού δεσμού του μορίου της. Η παρουσία της C-24 μεθυλομάδας δεν επηρεάζει τον ειδικό αυτό ρόλο της εργοστερόλης, διευκολύνει όμως *in vivo* το σχηματισμό του Δ⁵ διπλού δεσμού (Rodriguez και Parks, 1983). Η χοληστερόλη έχει και αυτή έναν Δ⁵ διπλό δεσμό στο μόριό της, και έχει βρεθεί ότι και αυτή σε μικρότερο όμως βαθμό, μπορεί να ασκήσει αυτόν τον εξειδικευμένο ρόλο στον πολλαπλασιασμό του *S. cerevisiae* (Dahl και Dahl, 1985).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η εργοστερόλη συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων δεν είναι απόλυτα γνωστός. Πρόσφατα, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο εξειδικευμένος αυτός ρόλος έχει σχέση με τη διαίρεση των κεντροσωματίων από τα οποία ελέγχεται ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου (Ziogas και συνεργάτες, 1990). Ο ρυθμιστικός ρόλος της εργοστερόλης ίσως δεν ασκείται απ' αυτό καθ' αυτό το μόριό της, αλλά μέσω ενός άλλου παράγοντα (Sparking Ergosterol Replacement Factor, SERF). Δεν είναι σαφές αν ο παράγοντας αυτός είναι ένα προϊόν μεταβολισμού της εργοστερόλης ή μια διαφορετική ουσία που ενεργοποιείται ή προάγεται η παραγωγή της παρουσία εργοστερόλης (Parks και συνεργάτες, 1986).

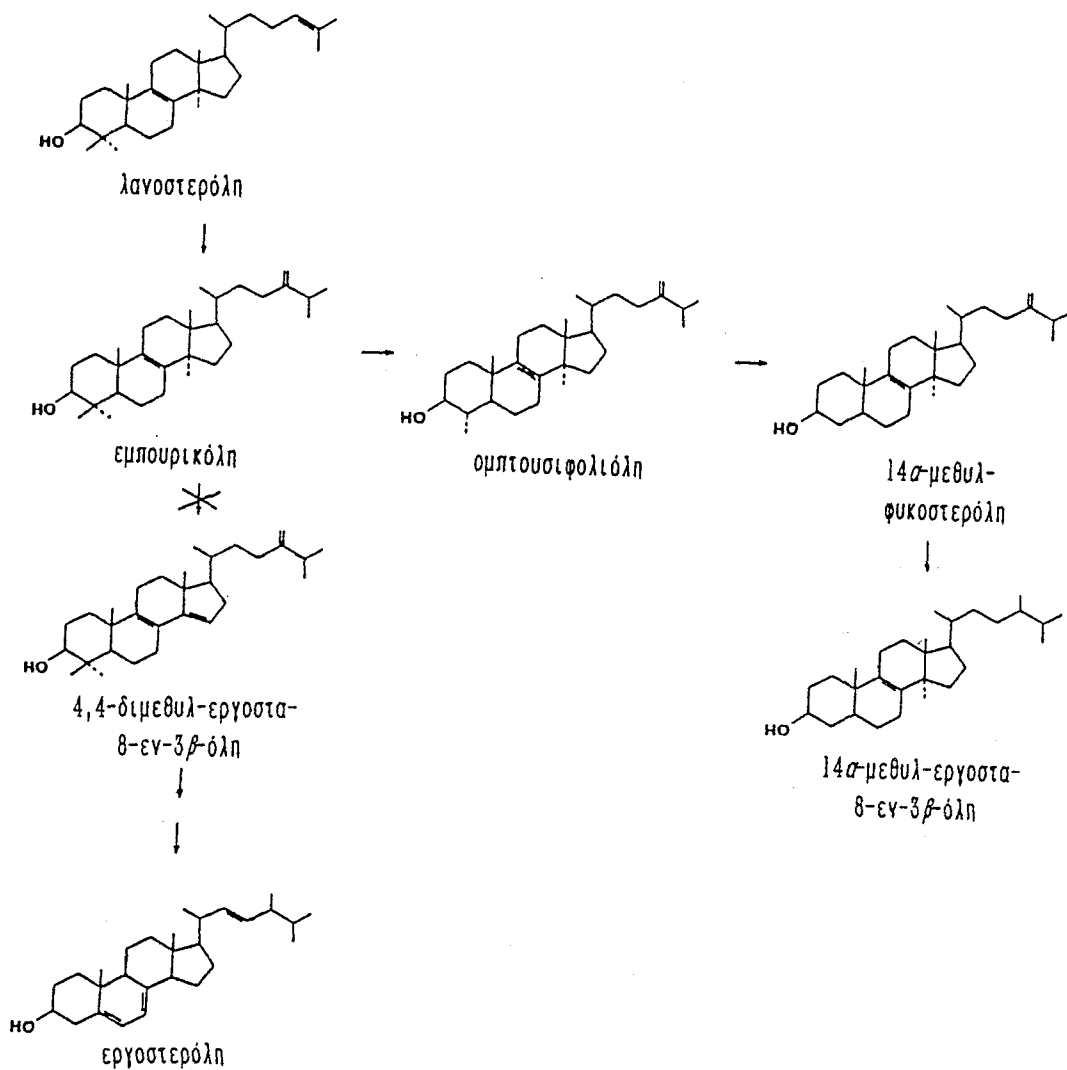
Απ' όσα αναφέρθηκαν γίνεται φανερό ότι η εργοστερόλη, συγκριτικά με τις άλλες στερόλες "εξυπηρετεί" καλύτερα τις κυτταρικές λειτουργίες των μυκήτων και των ζυμών και είναι δύσκολο αν όχι αδύνατον να αντικατασταθεί πλήρως. Παρ' ότι ο ρόλος της στη φυσιολογία των οργανισμών αυτών δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένος, το βέβαιο είναι ότι δεν περιορίζεται μόνο στη δομή και τη λειτουργία των μεμβρανών αλλά επεκτείνεται στη ρύθμιση και άλλων βιοχημικών μηχανισμών που συνδέονται με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό αυτών των οργανισμών.

1.4. ΘΕΣΕΙΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ EBI'S

Αρχικά είχε διατυπωθεί η άποψη ότι ο τρόπος δράσης των EBI's συνίσταται στην αλληλεπίδρασή τους με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών προκαλώντας έτσι βλάβες στη λειτουργία τους, ειδικά όσον αφορά την ρύθμιση της περατότητας σε ορισμένα κατιόντα (Cope, 1980). Σύντομα όμως αποδείχθηκε ότι η άμεση καταστροφή των μεμβρανών (direct membrane damage, DMD) από τους EBI's είναι μάλλον μια δευτερογενής τοξική επίδραση (Marriott, 1980) και η κύρια θέση δράσης τους εντοπίζεται στην παρεμπόδιση συγκεκριμένων ενζυμικών αντιδράσεων της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης.

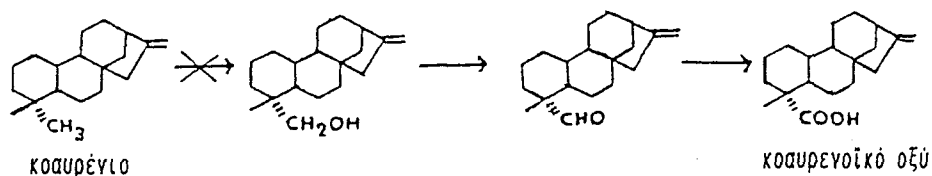
1.4.1. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΠΟΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ C-14 (DMIs)

Όλες οι ομάδες που αναφέρθηκαν νωρίτερα (Κεφάλαιο 1.2) με εξαίρεση τα μορφολινικά, τις αλλυλαμίνες και τις αζα-στερόλες, δρουν στο στάδιο της απομεθυλίωσης του C-14 και γι αυτό χαρακτηρίζονται και σαν παρεμπόδιστες απομεθυλίωσης (Demethylation Inhibitors, DMIs). Η μεθυλίωση του C-24 και οι απομεθυλώσεις του C-4 δεν επηρεάζονται από την παρουσία των DMIs (Mercer, 1984). Αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της απομεθυλίωσης του C-14 είναι η διακοπή της διαδικασίας της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης και η συσσώρευση προδρόμων και ασυνήθιστων στερολών (Σχήμα 16). Οι στερόλες αυτές χαρακτηρίζονται σαν 14 α -μεθυλ-στερόλες και με βάση το βαθμό απομεθυλίωσης του C-4 διακρίνονται σε C-4 -διμεθυλ-, C-4-μεθυλ και C-4 -απομεθυλ-στερόλες με δύο, μία και καμία μεθυλ-ομάδες αντίστοιχα στη θέση C-4 (Siegel, 1981). Στην περίπτωση των μυκήτων, όπου η μεθυλίωση του C-24 προηγείται της απομεθυλίωσης του C-14, οι στερόλες αυτές είναι η εμπουρικόλη (C-4-διμεθυλ-), η ομπουσιφολιόλη (C-4-μεθυλ-), η 14 α -μεθυλ-φυκοστερόλη (Sisler και συνεργάτες, 1983) και η 14 α -μεθυλ-εργοστα-8(9)-εν-3 β -όλη (C-4-απομεθυλ-) (Baldwin και Wiggins, 1984). Για το πιπεραζινικό triforine υπάρχουν ενδείξεις ότι παρεμποδίζει και την αντίδραση σχηματισμού του Δ^{22} διπλού δεσμού της εργοστερόλης (Ragsdale, 1975), η οποία όπως έχει αναφερθεί (Κεφάλαιο 1.3) καταλύεται από ένα κυτόχρωμα P-450. Ίσως μάλιστα να αλληλεπιδρά με διαφορετικό τρόπο με το ένζυμο συγκριτικά με τους άλλους DMIs (Henry, 1982).



Σχήμα 16. Συσσώρευση των 14α-μεθυλ-στερολών κατά την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης από του DMIs (προσαρμογή από Ziogas και συνεργάτες, 1991).

Η τοξικότητα των DMIs οφείλεται στην αλληλεπίδραση του μορίου τους με το κυτόχρωμα P-450 το οποίο είναι βασικό συστατικό του ενζυμικού συστήματος της απομεθυλίωσης του C-14. Ένα από τα άτομα αζώτου του ετεροκυκλικού δακτυλίου των DMIs ενώνεται με το πρωταίμικό άτομο του σιδήρου του κυτοχρώματος, εμποδίζοντας έτσι τη δέσμευση του O₂ και στη συνέχεια την οξείδωση του υποστρώματος. Στην σταθεροποίηση του συμπλόκου κυτοχρώματος-παρεμποδιστή, φαίνεται να συμβάλλει και το υπόλοιπο λιπόφιλο τμήμα του μορίου των DMIs, το οποίο αλληλεπιδρά με την γύρω από τη θέση δράσης



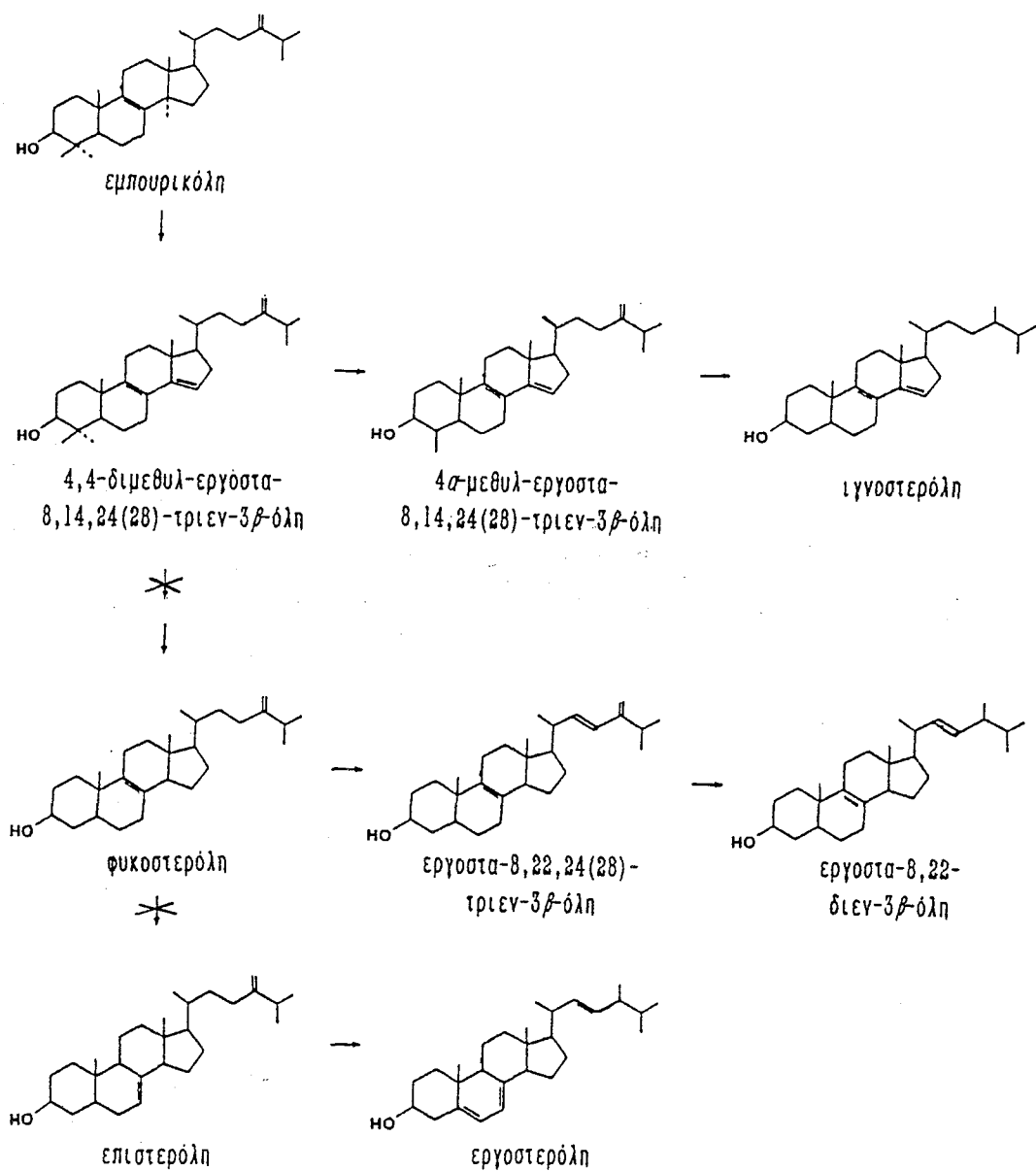
Σχήμα 17. Μετατροπή του κοαυρένιου προς κοαυρενοϊκό οξύ κατά τη βιοσύνθεση των γιββερελλινών των φυτών (προσαρμογή από Murphy και West, 1969).

περιοχή του ενζύμου (Gadher και συνεργάτες, 1983).

Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των φυτών από τους DMIs είναι αποτέλεσμα της δράσης τους σε βιοσυνθετικές λειτουργίες οι οποίες βασίζονται άμεσα στο κυτόχρωμα P-450. Η παρεμπόδιση της σύνθεσης των φυτοστερολών στο στάδιο της απομεθυλίωσης του C-14, που είναι παρόμοιο μ' αυτό της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης στους μύκητες, έχει σαν συνέπεια τη συσσώρευση 14 α -μεθυλ-στερολών (Haughan και συνεργάτες, 1987) και την αποδιοργάνωση των κυτταρικών μεμβρανών (Pring, 1986). Έχει επίσης βρεθεί ότι κατά την διαδικασία της βιοσύνθεσης των γιββερελλινών η οποία έχει πολλά κοινά σημεία μ' αυτή των στερολών (Upper και West, 1967), η οξείδωση του κοαυρένιου προς κοαυρενοϊκό οξύ καταλύεται από ένα ενζυμικό σύστημα στο οποίο συμμετέχει κυτόχρωμα P-450 (Murphy και West, 1969) και φαίνεται να επηρεάζεται από τους DMIs (Σχήμα 17). Η επιβράδυνση της ανάπτυξης των φυτών, σαν αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της σύνθεσης των γιββερελλινών, μπορεί σε κάποιο βαθμό να ανατραπεί με εξωγενή παροχή γιββερελλινικού οξέος (Buchenaue και Rohner, 1981). Οποσδήποτε όμως οι επιδράσεις αυτές των DMIs στα φυτά, παρατηρούνται σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες συγκριτικά με τους μύκητες. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι το κυτόχρωμα P-450 των φυτών είναι διαφορετικό από αυτό των μυκήτων με αποτέλεσμα η συγγένεια (affinity) των DMIs με το κυτόχρωμα P-450 των φυτών να είναι πολύ μικρότερη (Burden και συνεργάτες, 1989).

1.4.2. ΜΟΡΦΟΛΙΝΙΚΑ

Σε αντίθεση με τους DMIs, τα μορφολινικά δρούν σε δύο διαφορετικές θέσεις στη διαδικασία της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (Σχήμα 18). Πιό



Σχήμα 18. Συσσώρευση των $\Delta^{8,14}$ - και Δ^8 -στερολών κατά την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης από τα μορφολινικά μυκητοκτόνα (προσαρμογή από Ziogas και συνεργάτες, 1991).

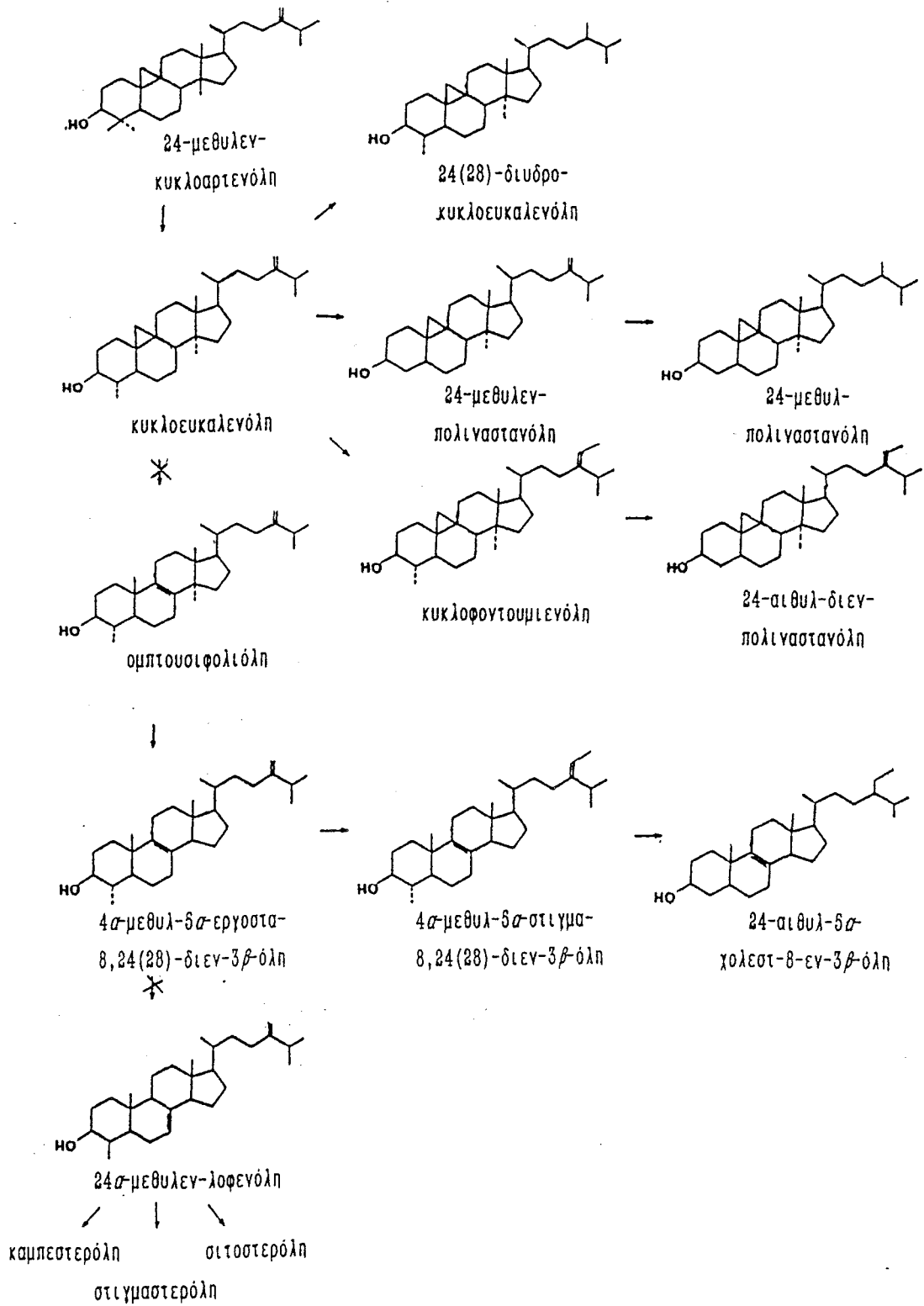
συγκεκριμένα, παρεμποδίζουν την αναγωγή του Δ^{14} διπλού δεσμού και στην Δ^8 - Δ^7 ισομερίωση. Αποτέλεσμα της παρεμπόδισης είναι η συσσώρευση προδρόμων στερολών που χαρακτηρίζονται σαν Δ^{14} - και Δ^8 -στερόλες αντίστοιχα (Baloch και Mercer, 1987). Από τις Δ^{14} -στερόλες, συνήθως παρατηρούνται οι

4,4-διμεθυλ-εργοστα-8,14,24(28)-τριεν-3β-όλη και ιγνοστερόλη (Baloch και συνεργάτες, 1984), ενώ από τις Δ⁸-στερόλες οι φυκοστερόλη, εργοστα-8,22,24(28)-τριεν-3β-όλη και εργοστα-8,22-διεν-3β-όλη (Kato και συνεργάτες, 1980).

Η συγγένεια των διαφόρων αντιπροσώπων των μορφολινικών με τις δύο αυτές θέσεις φαίνεται να είναι σημαντικά διαφορετική στα διάφορα είδη μυκήτων (Kerckenaar, 1987). Τα tridemorph και dodemorph φαίνεται να παρεμποδίζουν σχεδόν αποκλειστικά την Δ⁸-Δ⁷ ισομερίωση με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται μόνο οι Δ⁸-στερόλες (Leroux και Gradt, 1983). Στην περίπτωση του tridemorph παρατηρήθηκε και η συσσώρευση του Ζ-στερεοϊσομερούς της εργοστερόλης, αλλά τόσο ο μηχανισμός επίδρασης του παρεμποδιστή στο ενζυμικό σύστημα του σχηματισμού του Δ²² διπλού δεσμού, όσο και ο ρόλος αυτού του ισομερούς στη λειτουργία των μεμβρανών δεν έχει διευκρινισθεί (Ziogas και συνεργάτες, 1991).

Το fenpropimorph παρεμποδίζει τόσο την αναγωγή του Δ¹⁴ διπλού δεσμού όσο και την Δ⁸-Δ⁷ ισομερίωση αλλά παρ' ότι η συγγένειά του με την Δ⁸ ισομεράση είναι μεγαλύτερη απ' ότι με την Δ¹⁴ αναγωγή, συνήθως παρατηρείται συσσώρευση των Δ¹⁴-στερολών. Αυτό οφείλεται στο ότι η αναγωγή του Δ¹⁴ διπλού δεσμού προηγείται της Δ⁸-Δ⁷ ισομερίωσης με αποτέλεσμα σε υψηλές συγκεντρώσεις να συσσωρεύονται κυρίως οι Δ^{8,14} στερόλες (Baloch και συνεργάτες, 1984. Ziogas και συνεργάτες, 1991). Στον μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία fenpropimorph προκαλεί και συσσώρευση σκουαλενίου που σημαίνει ότι η εποξείδωση του σκουαλενίου είναι πιθανά μια τρίτη θέση δράσης του fenpropimorph στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης από το μύκητα αυτό (Ziogas και συνεργάτες, 1991).

Τα μορφολινικά παρεμποδίζουν και τη βιοσύνθεση των φυτοστερολών αλλά σε διαφορετικές θέσεις συγκριτικά με τους μύκητες (Σχήμα 19). Σε μικρές συγκεντρώσεις παρεμποδίζεται η δράση της Δ⁸-Δ⁷ ισομεράσης με αποτέλεσμα τη συσσώρευση Δ⁸-φυτοστερολών (Taton και συνεργάτες, 1987), ενώ σε υψηλότερες η "ισομεράση της κυκλοευκαλενόλης-ομπτουσιφολιόλης" (cycloeucalenol-obtusifoliol isomerase) και συσσωρεύονται οι 9β,19 -κυκλοπροπιλ-στερόλες (Blandoche και Benveniste, 1983). Σε αντίθεση με τους μύκητες, στα φυτά δεν φαίνεται να παρεμποδίζεται η Δ¹⁴ αναγωγή (Rahier και συνεργάτες, 1986).



Σχήμα 19. Συσώρευση των Δ^8 - και $\Theta^{\beta,19}$ -κυκλοπροπύλ-στερολών κατά την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των στερολών των φυτών από τα μορφολινικά μυκητοκτόνα (προσαρμογή από Kerkenaar, 1987).

1.4.3. ΣΤΕΡΕΟΙΣΟΜΕΡΕΙΑ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ EBI's

Η δέσμευση των DMIs στο σίδηρο του κυτοχρώματος P-450 και κατά συνέπεια η παρεμποδιστική τους δράση επηρεάζεται σημαντικά από την τρισδιάστατη δομή του μορίου τους. Με ελάχιστες εξαιρέσεις, οι DMIs χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ή δύο ασύμμετρων ατόμων άνθρακα, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται με δύο εναντιομερείς (R,S) ή τέσσερις στερεοϊσομερείς (RS,SR,RR,SS) μορφές αντίστοιχα (Koller, 1987). Οι ισομερείς αυτές μορφές συχνά διαφέρουν σημαντικά ως προς την τοξικότητά τους (Deas και συνεργάτες, 1984b), ίσως μάλιστα να αλληλεπιδρούν και διαφορετικά με το κυτόχρωμα P-450 (Anderson και συνεργάτες, 1984).

Παρ' ότι οι ισομερείς μορφές έχουν μελετηθεί σε ελάχιστες περιπτώσεις, ως προς τη μυκητοτοξικότητα και τη φυτοτοξικότητά τους, κάποια πρώτα συμπεράσματα μπορούν με επιφυλάξεις, να διατυπωθούν. Όσον αφορά τα εναντιομερή, η μυκητοτοξικότητά τους δε φαίνεται να διαφέρει σημαντικά, τουλάχιστον στην περίπτωση του triadimefon (Koller, 1987). Αντίθετα, σημαντικές διαφορές έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των στερεοϊσομερών στις περιπτώσεις των triadimenol και raclobutrazol. Το τελευταίο χρησιμοποιείται στην πράξη σαν ρυθμιστής της ανάπτυξης των φυτών (Sterrett, 1985). Διαπιστώθηκε ότι τα στερεοϊσομερή στα οποία το ασύμμετρο άτομο άνθρακα με υποκαταστάτη υδροξύλιο (C-2 στο triadimenol και C-3 στο raclobutrazol) είναι R διαμόρφωσης, επιδεικνύουν αυξημένη μυκητοτοξικότητα. Αντίθετα η S διαμόρφωση του ιδίου ατόμου αυξάνει τη δραστηριότητα του παρεμποδιστή κατά τη βιοσύνθεση των γιββερελλινών. Τέλος η σειρά τοξικότητας των στερεοϊσομερών που παρατηρείται στην περίπτωση της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης φαίνεται να διαφέρει απ' αυτή στην περίπτωση της βιοσύνθεσης των φυτοστερολών (Burden και συνεργάτες, 1987).

Στην περίπτωση των μορφολινικών έχει παρατηρηθεί ότι η τοξικότητα των *cis* και *trans* στερεοϊσομερών του dodemorph είναι παρόμοια (Pommer, 1984). Αντίθετα η *cis* μορφή του fenpropimorph είναι περισσότερο τοξική από την *trans* μορφή, τουλάχιστον στις περιπτώσεις των μυκήτων *Puccinia recondita* και *Erysiphe graminis* (Pommer και Himmele, 1979).

1.5. Η ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΥΣ EBI'S

Οι EBI's είναι μυκητοκτόνα με εξειδικευμένο τρόπο δράσης σε υποκυτταρικό επίπεδο και κατά συνέπεια ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας εκ μέρους των παθογόνων είναι θεωρητικά αυξημένος. Όμως παρά την εκτεταμένη χρήση τους στη γεωργική πράξη για την αντιμετώπιση πολλών μυκητολογικών ασθενειών, σε ελάχιστες περιπτώσεις η καταπολέμηση έχει οδηγηθεί σε πλήρη αποτυχία εξαιτίας της ανθεκτικότητας (Scheinflug και Kuck, 1987). Εκείνο που συνήθως παρατηρείται είναι μια μείωση της ευαισθησίας του πληθυσμού ορισμένων παθογόνων, η οποία όμως δεν φτάνει σε επίπεδα απαγορευτικά για την παραπέρα χρήση των EBI's (Schepers, 1983). Εργαστηριακά, η μελέτη της ανθεκτικότητας στους EBI's έχει γίνει κυρίως με χρήση μυκήτων που δεν είναι φυτοπαθογόνοι και έχουν εξαχθεί χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη γενετική και τους μηχανισμούς της ανθεκτικότητας.

1.5.1. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Η δημιουργία στελεχών ανθεκτικών στους EBI's, μπορεί εργαστηριακά να γίνει σχετικά εύκολα σε υλικό επιλογής που περιέχει έναν από τους παρεμποδιστές αυτούς και συνήθως αφού προηγηθεί μεταλλαξογένεση με τη χρήση υπερϊώδους ακτινοβολίας ή N-μεθυλ-N-νιτρο -N-νιτροσογουανιδίνη (NTG) (Buchenaue, 1987). Η μελέτη της ανθεκτικότητας στους EBI's με τη βοήθεια ανθεκτικών στελεχών έχει γίνει στις περιπτώσεις των μυκήτων *Cladosporium cucumerinum* (Fuchs και συνεργάτες, 1977), *Aspergillus nidulans* (De Waard και Gieskes, 1977), *Ustilago maydis* (Barug και Kerkenaar, 1984), *Penicillium italicum* (De Waard και συνεργάτες, 1982), *Botrytis cinerea* (Leroux και Gredt, 1984), *Bipolaris oryzae* (Kardin, 1983) και *Nectria haematococca* (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989, 1991). Το επίπεδο ανθεκτικότητας των στελεχών, με ελάχιστες εξαιρέσεις (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989), ήταν χαμηλού έως μέσου επιπέδου (Scheinflug, 1988) και συνήθως η συχνότητα εμφάνισής τους δεν διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη για ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα άλλων ομάδων (Koller, 1988).

Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι στελέχη που επελέγησαν σαν ανθεκτικά σ' ένα EBI, παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία και σε άλλα μέλη της

ομάδας που δρουν στο ίδιο στάδιο της βιοσυνθετικής διαδικασίας της εργοστερόλης. Για παράδειγμα, στελέχη του μύκητα *U. maydis*, ανθεκτικά στο triadimefon ή το fenarimol, ενώ παρουσιάστηκαν ανθεκτικά και σε άλλους αντιπροσώπους των DMIs, δεν είχαν μειωμένη ευαισθησία και στα μορφολινικά (Leroux και Gredt, 1984). Στην περίπτωση μάλιστα του *P. italicum*, στελέχη ανθεκτικά στο fenarimol έδειξαν αυξημένη ευαισθησία στα μορφολινικά, συγκριτικά πάντα με το άγριο στέλεχος (De Waard και συνεργάτες, 1982).

Η ανθεκτικότητα στους EBI's συνήθως συνοδεύεται από μείωση της προσαρμοστικότητας και της παθογόνου δύναμης των στελεχών, συχνά μάλιστα σε βαθμό ανάλογο του επιπέδου ανθεκτικότητας (Buchenauer, 1987). Ανθεκτικά στελέχη του *A. nidulans* (De Waard και Gieskes, 1977), του *C. cucumerinum* (Fuchs και Drandarevski, 1976) και του *N. haematococca* (fen μεταλλαγές) (Kalamarakis και συνεργάτες, 1991), παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή κονιδίων και υστέρηση στη μυκηλιακή ανάπτυξη και την ταχύτητα βλάστησης των σπορίων. Αντίθετα, στελέχη του *P. italicum* ανθεκτικά στο fenarimol (De Waard και συνεργάτες, 1982), του *U. avenae* στο triadimefon (Hippe και Koller, 1986) και του *N. haematococca* στο triadimenol (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989), δεν υστερούσαν σε τίποτα από τα αντίστοιχα άγρια, κάτι που σημαίνει ότι η ανθεκτικότητα στους EBI's δεν συνδέεται πάντα αρνητικά με την προσαρμοστικότητα.

Η γενετική της ανθεκτικότητας στους EBI's έχει μελετηθεί σε πολύ λίγες περιπτώσεις και μάλιστα μόνο στους ασκομύκητες *A. nidulans* και *N. haematococca*. Στην περίπτωση του *A. nidulans*, η γενετική ανάλυση έδειξε ότι η ανθεκτικότητα στο imazalil είναι πολυγονικού τύπου και αναγνωρίστηκαν οκτώ χρωματοσωματικοί γόννοι (*ima*) κατανομημένους σε έξι διαφορετικές ομάδες σύνδεσης (linkage groups). Ο κάθε γόννος προσέδιδε διαφορετικού βαθμού ανθεκτικότητα, συνήθως χαμηλού επιπέδου, αλλά παρατηρήθηκε και προσθετική δράση μεταξύ των μη συνδεδεμένων γόννων που αύξανε σημαντικά το επίπεδο ανθεκτικότητας ορισμένων στελεχών (Van Tuyl, 1977). Πολυγονικού τύπου είναι και η ανθεκτικότητα του *N. haematococca* στο fenarimol (Kalamarakis και συνεργάτες, 1991) και στο fenpropimorph (Demakourou και συνεργάτες, 1989· De Falandre και συνεργάτες, 1991) όπου αναγνωρίστηκαν εννέα (*fen*) και τρεις (*fpm*) γόννοι ανθεκτικότητας αντίστοιχα. Αντίθετα, στον ίδιο οργανισμό διαπιστώθηκε ότι η υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο triadimenol ελέγχεται από ένα γόνο (*tri-1*) και φαίνεται ότι είναι η μόνη μέχρι τώρα γενετικά μελετημένη περίπτωση ανθεκτικότητας στους EBI's, που οφείλεται σε "μείζονα γόνο" (Kalamarakis

και συνεργάτες, 1989).

Η μελέτη της ανθεκτικότητας στους FBI's σε διάφορους οργανισμούς έδειξε ότι περισσότεροι από έναν βιοχημικοί μηχανισμοί μπορεί να είναι υπεύθυνοι για το φαινόμενο. Η πιο "χαρακτηριστική" περίπτωση αφορά την αυξημένη απέκκριση του παρεμποδιστή από το κύτταρο και έχει διαπιστωθεί στην περίπτωση της ανθεκτικότητας των μυκήτων *A. nidulans* (De Waard και Van Nistelrooy, 1979), *P. italicum* (De Waard και Van Nistelrooy, 1984) και *N. haematococca* (Kalamarakis και συνεργάτες, 1991) στο fenarimol. Πρόκειται για ένα σύστημα ενεργού απέκκρισης το οποίο ενώ είναι επαγωγίμο στο άγριο στέλεχος, υπάρχει "εκ συστάσεως" στα ανθεκτικά στελέχη και δεν επιτρέπει τη συσσώρευση του μυκητοκτόνου στο εσωτερικό του μυκηλίου σε υψηλά, τουλάχιστον, επίπεδα (De Waard και Van Nistelrooy, 1980b). Παρουσία του παρεμποδιστή, η αποτελεσματικότητα της λειτουργίας αυτού του συστήματος απέκκρισης αυξάνει με την πάροδο του χρόνου τόσο στο ευαίσθητο όσο και στα ανθεκτικά στελέχη. Στην περίπτωση του *N. haematococca* η διαφορετικού επιπέδου ανθεκτικότητα συνδέεται άμεσα με το βαθμό συσσώρευσης του παρεμποδιστή στο εσωτερικό του μυκηλίου και είναι αποτέλεσμα της παρουσίας διαφορετικών γόνων ανθεκτικότητας (Kalamarakis και συνεργάτες, 1991). Η λειτουργία ενός τέτοιου μηχανισμού ανθεκτικότητας στους FBI's φαίνεται να συνδέεται με μείωση των παραμέτρων εκείνων που χαρακτηρίζουν την παθογόνο προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών (De Waard και Van Nistelrooy, 1984). Σε αλλαγή της περατότητας των μεμβρανών στο τοξικό μόριο φαίνεται να οφείλεται και η ανθεκτικότητα του *Candida albicans* στο ketoconazole, χωρίς όμως να έχει διευκρινισθεί αν λειτουργεί και εδώ ένας παρόμοιος μηχανισμός ενεργού απέκκρισης (Ryley και συνεργάτες, 1984).

Η μη λειτουργία του ενζυμικού συστήματος της απομεθυλίωσης του C-14 είναι ένας άλλος βιοχημικός μηχανισμός υπεύθυνος για ανθεκτικότητα στους DMIs και το φαινόμενο έχει μελετηθεί στις περιπτώσεις των *U. maydis*, *S. cerevisiae* και *C. albicans*. Πιο συγκεκριμένα, ένα στέλεχος του *U. maydis*, το οποίο όμως παρουσίαζε μορφολογικές ανωμαλίες και μειωμένη ανάπτυξη δεν συνέθετε εργοστερόλη και η βιοσυνθετική διαδικασία σταματούσε στο σχηματισμό των 14 α -μεθύλ-στερολών (Walsh και Sisler, 1982). Παρόμοια, πειράματα με ενζυμικά παρασκευάσματα ενός στελέχους του *S. cerevisiae* ανθεκτικού στο buthioate έδειξαν ότι το πυριδινικό αυτό μυκητοκτόνο δεν αλληλεπιδρούσε με το υπεύθυνο για τη απομεθυλίωση του C-14 κυτόχρωμα P-450. Το αλλαγμένο όμως κυτόχρωμα P-450 του στελέχους αυτού είχε χάσει τις καταλυτικές του ιδιότητες και η βιοσύνθεση της εργοστερόλης σταματούσε

στο στάδιο της απομεθυλίωσης του C-14 (Aoyama και συνεργάτες, 1983). Μειωμένη αλληλεπίδραση τροποποιημένου (με μεταλλαγή) κυτοχρώματος με μερικούς αντιπροσώπους των EBI's έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση του *C. albicans* (Vanden Bossche και συνεργάτες, 1987). Οι περιπτώσεις αυτές αποτελούν τις πρώτες αναφορές ανθεκτικότητας στους EBI's που οφείλονται σε αλλαγές στη θέση δράσης των μυκητοκτόνων.

1.5.2. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΑΓΡΟ

Μείωση της ευαισθησίας σε φυσικούς πληθυσμούς παθογόνων μετά από παρατεταμένη χρήση των EBI's έχει αναφερθεί στις περιπτώσεις του ωιδίου των κολοκυνθοειδών (*Sphaerotheca fuliginea*) στο imazalil και το fenarimol (Huggenberger και συνεργάτες, 1984· Schepers, 1985b), του ωιδίου του σιταριού (*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*) και του κριθαριού (*E. graminis* f. sp. *hordei*) στο triadimenol (Fletcher και Wolfe, 1981· Hollomon και συνεργάτες, 1984) και στα μορφολινικά (Robertson και συνεργάτες, 1990), του δαυλίτη των σιτηρών (*Tilletia foetida*) στο imazalil (Skorda, 1977) και της μαύρης σκωρίασης των σιτηρών (*Puccinia recondita* και *P. hordei*) στο triadimefon και στο propiconazole (Boyle και συνεργάτες, 1988) και του *Panicillium digitatum* (Eckert, 1987) και του *Colletotrichum coffeanum* στο imazalil (Mwang'ombe, 1992).

Μερικές απομονώσεις των παραπάνω παρασίτων με μειωμένη ευαισθησία σε κάποιο μυκητοκτόνο εμφανίστηκαν ανθεκτικές και σε άλλους αντιπροσώπους των EBI's, χωρίς αυτό να είναι κανόνας χωρίς εξαιρέσεις. Για παράδειγμα κάποιες απομονώσεις του μύκητα *Rhynchosporium secalis*, υψηλής ανθεκτικότητας στο triadimenol, έδειξαν μειωμένη ευαισθησία και στα propiconazole και prochloraz (Kendall και Hollomon, 1990). Παρόμοια ήταν και η συμπεριφορά κάποιων ανθεκτικών στο triadimefon και το prochloraz στελεχών του *E. graminis* τα οποία ήταν ανθεκτικά και στα propiconazole και flutriafol (Enisz, 1988). Απομονώσεις του ίδιου μύκητα, ανθεκτικές στο triadimenol, παρέμειναν ευαίσθητες στα μορφολινικά, τα οποία όπως έχει αναφερθεί (Κεφάλαιο 1.4) δρουν σε διαφορετικά στάδια της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (Butters και συνεργάτες, 1984).

Η προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στους EBI's στελεχών που έχουν βρεθεί στον αγρό δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά απ' αυτή των ευαίσθητων. Η παθογένεια (Butters και συνεργάτες, 1984), το μέγεθος των νεκρωτικών

κηλίδων στα φυτά (Laws και συνεργάτες, 1982), η παραγωγή κονιδίων και η βλαστικότητα των σπορίων (Schepers, 1985a) παραμένει ουσιαστικά ανεπηρέαστη. Στην περίπτωση στελεχών του μύκητα *R. secalis* με μειωμένη ευαισθησία στο triadimenol, διαπιστώθηκε ότι τόσο η είσοδος των τοξικών μορίων στο εσωτερικό του μυκηλίου, όσο και ο μεταβολισμός τους προς μη τοξικά παράγωγα, δεν συνδέεται με την ανθεκτικότητα (Kentall και Hollomon, 1990).

1.6. ΤΟ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P-450

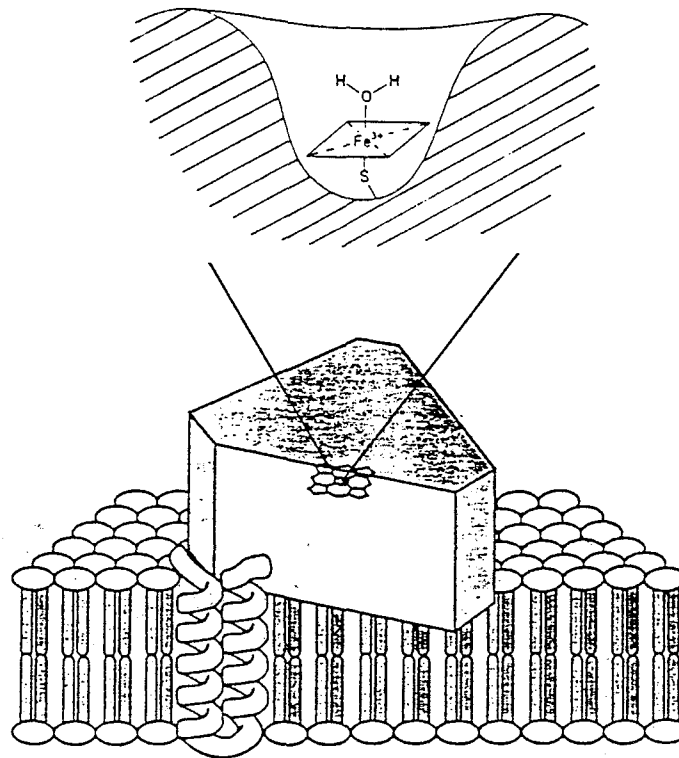
Ο όρος "κυτόχρωμα P-450" χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μιας οικογένειας αιμοπρωτεϊνών των οποίων τα σύμπλοκα με το μονοξειδίο του άνθρακα δίνουν ένα μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος περίπου 450 nm. Το ένζυμο αυτό που πρωτοαναφέρθηκαν το 1958 (Klingenberg, 1958· Garfinkel, 1958), είναι ευρύτατα διαδεδομένο στη φύση και απαντά στους περισσότερους ζωικούς ιστούς, τα φυτά και τους μικροοργανισμούς. Δρα σαν μονοοξυγενάση λιποφιλων υποστρωμάτων κατά την τυπική αντίδραση (White και Coon, 1980):



όπου RH το υπόστρωμα.

Το κυτόχρωμα P-450 δεν καταλύει μόνο αλειφατικές και αρωματικές υδροξυλιώσεις αλλά και N-οξειδώσεις, σουλφοξειδώσεις, εποξειδώσεις, N-S- και O-απαλκυλιώσεις, υπεροξειδώσεις, απαμινώσεις, αποθειώσεις, και απαλογονώσεις όπως και αντιδράσεις αναγωγής αζο-ομάδων και νιτρο-ομάδων. Τα φυσιολογικά υποστρώματά του είναι συνήθως λιπαρά οξέα, προσταγλαδίνες και στεροειδή. Συμμετέχει όμως και στην αποτοξικοποίηση ξένων προς τον οργανισμό ουσιών όπως φάρμακα, παράγωγα του πετρελαίου, αναισθησιολόγια (White και Coon, 1980), εντομοκτόνα (Kurihara και συνεργάτες, 1984) και διάφορες καρκινογόνες ουσίες, αλλά σε μερικές περιπτώσεις τα σχηματιζόμενα προϊόντα εμφανίζουν αυξημένες τοξικές, μεταλλαξογόνες ή καρκινογόνες ιδιότητες (Koser και συνεργάτες, 1988).

Στο ενεργό κέντρο του φέρει σαν προσθετική ομάδα έναν αιμικό δακτύλιο (Σχήμα 20) που βρίσκεται σε μια πλατειά υδρόφοβη κοιλότητα και συνδέεται μάλλον χαλαρά με το αποπρωτεϊνικό τμήμα του ενζύμου (Rein και συνεργάτες, 1976). Ο σίδηρος, ο οποίος στις σύμπλοκες ενώσεις έχει αριθμό σύνταξης έξι, είναι ενωμένος με τα τέσσερα άτομα αζώτου του δακτυλίου της πορφίνης ενώ τα υπόλοιπα δύο σθένη είναι κάθετα στο επίπεδο του αιμικού δακτυλίου (Νιαβής, 1981· Αλεξάνδρου και Βάρβογλη, 1981). Το ένα απ' αυτά φαίνεται να σχηματίζει θειολικό δεσμό με την κυστεΐνη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Dolphin και συνεργάτες, 1979) και το άλλο σχηματίζει χαλαρό δεσμό με ένα μόριο νερού. Σε αναγωγικές συνθήκες, το μόριο του νερού μπορεί να



Σχήμα 20. Σύνδεση του κυτοχρώματος P-450 με την κυτταρική μεμβράνη και σχηματική απεικόνιση του ενεργού κέντρου του (Προσαρμογή από Nelson και Strobel, 1988· White και Coon, 1980).

αντικατασταθεί από μοριακό οξυγόνο ή άλλα διατομικά μόρια όπως μονοξείδιο του άνθρακα (CO), μονοξείδιο του αζώτου (NO) και κυανίου (CN⁻) (White και Coon, 1980). Το ένζυμο συγκρατείται στις κυτταρικές μεμβράνες μέσω δύο καταληκτικών αμινομάδων (NH₂-terminal transmembrane segments), με τρόπο ώστε ο δακτύλιος της αίμης να είναι τοποθετημένος παράλληλα προς τη διπλή στοιβάδα των λιπιδίων (Nelson και Strobel, 1988).

Συνήθως μια αναγωγάση (NAD(P)H cytochrome P-450 reductase) καταλύει την μεταφορά των ηλεκτρονίων από το πυριδιν-νουκλεοτίδιο στο κυτόχρωμα P-450. Το ανηγμένο κυτόχρωμα αλληλεπιδρά με το μοριακό οξυγόνο έτσι ώστε το ένα άτομο να ανάγεται προς νερό και το άλλο να μεταφέρεται στο οργανικό υπόστρωμα (Lehninger, 1975). Το όλο ενζυμικό σύστημα εδράζεται στις κυτταρικές μεμβράνες κυρίως του ενδοπλασματικού δικτύου (μικροσωματικό κλάσμα) (Depierre και Dallner, 1975) αλλά και των μιτοχονδρίων (Niranjan και συνεργάτες, 1988). Στον ίδιο οργανισμό το κυτόχρωμα P-450 μπορεί να

εμφανίζεται με διάφορες ισοενζυμικές μορφές οι οποίες διαφέρουν σημαντικά ως προς τις καταλυτικές τους ιδιότητες (Welton και συνεργάτες, 1975) αλλά και το μοριακό τους βάρος (Welton και Aust, 1974).

Διάφορες ουσίες όπως η φαινοβαρβιτάλη (Niranjan και συνεργάτες, 1984), η β-ναφθο-φλαβόνη (Raza και Avadhani, 1988), η πυραζόλη (Palakodety και συνεργάτες, 1988), η 3-μεθυλ-χολανθρίνη (Niranjan και συνεργάτες, 1988) αλλά και μερικοί EBI's όπως το prochloraz (Riviere, 1983) και το imazalil (Riviere και συνεργάτες, 1984) προάγουν την παραγωγή του κυτοχρώματος και ιδιαίτερα κάποιων επιμέρους ισοενζυμικών μορφών του. Αύξηση της παραγωγής του κυτοχρώματος P-450 παρατηρείται και στην περίπτωση του *S. cerevisiae* όταν η ανάπτυξη του οργανισμού γίνεται υπό αναερόβιες συνθήκες (Ishidate και συνεργάτες, 1969b) ή με παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (20%) στο υλικό της καλλιέργειας (Wiseman και συνεργάτες, 1978). Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται ισχυρή παρεμπόδιση του σχηματισμού των μιτοχονδρίων, και της αναπνοής που σημαίνει ότι η αύξηση της παραγωγής του κυτοχρώματος P-450 συνδέεται με μια πιθανή συμμετοχή του σ' ένα εναλλακτικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Ishidate και συνεργάτες, 1969a).

Το μοριακό βάρος των διαφόρων ισοενζυμικών μορφών του κυτοχρώματος P-450 έχει προσδιορισθεί με τη βοήθεια ηλεκτροφορητικών μεθόδων (SDS-PAGE) και για τον *S. cerevisiae* κυμαίνεται μεταξύ 51 (Yoshida και συνεργάτες, 1977) και 55,5 Kd (Azari και Wiseman, 1982) ενώ για το βακτήριο *Pseudomonas putida* μεταξύ 44 και 46 Kd (Yu και Gunsalus, 1974). Για τα θηλαστικά έχουν αναφερθεί τιμές μεταξύ 44 (Welton και Aust, 1974) και 60 Kd (Haugen και συνεργάτες, 1975).

Η παραγωγή του κυτοχρώματος P-450 στον *S. cerevisiae* ελέγχεται από έναν χρωματοσωματικό γόνο αλλά η ποσότητά του φαίνεται να καθορίζεται και από τη δράση ενός άλλου τροποποιητή γόνου (King και συνεργάτες, 1983). Υπάρχουν ενδείξεις ότι ένα παρόμοιας μορφής μονογονικό σύστημα λειτουργεί και στην περίπτωση των θηλαστικών (Okey και συνεργάτες, 1979).

1.6.1. ΤΟ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P-450_{14DM}

Σαν "κυτόχρωμα P-450_{14DM}" χαρακτηρίζεται το κυτόχρωμα που καταλύει την απομεθυλίωση του C-14 της λανοστερόλης. Η μελέτη του έχει γίνει σε μεγάλο

βαθμό με τη βοήθεια υποκυτταρικών παρασκευασμάτων του *S. cerevisiae* (Alexander και συνεργάτες, 1974· Ohba και συνεργάτες, 1978· Aoyama και Yoshida, 1978) των φυτών (Bahier και Taton, 1986) και των θηλαστικών (Trzaskos και συνεργάτες, 1984).

Η αλληλεπίδραση των DMIs με το κυτόχρωμα P-450_{14DM} επιτυγχάνεται με την ένωση ενός μη κορεσμένου ατόμου αζώτου του μορίου τους με τον αιμικό δακτύλιο του κυτοχρώματος σαν έκτος υποκαταστάτης του σιδήρου, παρεμποδίζοντας έτσι την δέσμευση του οξυγόνου. Στην περίπτωση των ιμιδαζολικών και των τριαζολικών μυκητοκτόνων, το άζωτο που ενώνεται με τον σίδηρο είναι το N-3 του ιμιδαζολικού και το N-4 του τριαζολικού δακτυλίου αντίστοιχα (Kelly και συνεργάτες, 1989). Το σύμπλοκο που σχηματίζεται δίνει φάσμα απορρόφησης με ένα μέγιστο στα 425-430 nm και ένα ελάχιστο στα 390-410 nm (Jefcoate, 1979). Τέτοιου είδους φάσματα έχουν παρατηρηθεί μετά από αλληλεπίδραση διαφόρων αντιπροσώπων των DMIs με το κυτόχρωμα P-450_{14DM} του ζυμομύκητα *S. cerevisiae* (Aoyama και συνεργάτες, 1983b· Wiggins και Baldwin, 1984) αλλά και στους μυκηλιακούς μύκητες *Aspergillus fumigatus* (Marichal και συνεργάτες, 1989) και *Penicillium italicum* (Guan, 1992).

Ο βαθμός συγγένειας των διαφόρων παρεμποδιστών με το ένζυμο διαφέρει σημαντικά και μπορεί να υπολογισθεί με βάση το ρυθμό αντικατάστασής τους στο σύμπλοκο με το κυτόχρωμα από το μονοξείδιο του άνθρακα (Yoshida και Aoyama, 1987). Διαφορετικού βαθμού συγγένεια με το ένζυμο έχει παρατηρηθεί και μεταξύ των στερεοϊσομερών μορφών του ίδιου παρεμποδιστή (Yoshida και συνεργάτες, 1986) αλλά και για τον ίδιο παρεμποδιστή με κυτοχρώματα P-450_{14DM} από διαφορετικούς οργανισμούς (Vanden Bossche και συνεργάτες, 1987).

Γενετικές αλλαγές που έχουν σαν αποτέλεσμα αλλαγές στη δομή του κυτοχρώματος συχνά επηρεάζουν τόσο τη φασματοφωτομετρική συμπεριφορά όσο και τη συγγένεια του ενζύμου με το φυσικό υπόστρωμα και τους EBI's. Για παράδειγμα, το κυτόχρωμα κάποιων στελεχών του *S. cerevisiae* ανθεκτικών στο πολυένιο nystatin παρουσίαζε σημαντικά διαφορετικές φασματοφωτομετρικές ιδιότητες συγκριτικά μ' αυτό του αγρίου στελέχους (King και συνεργάτες, 1985). Παρόμοια, το κυτόχρωμα κάποιου στελέχους του ίδιου οργανισμού που είχε χάσει την καταλυτική του ικανότητα, έδινε διαφορετικής μορφής φάσματα απορρόφησης μετά από αλληλεπίδραση με το buthiobate (Aoyama και συνεργάτες, 1983a) και το diniconazole (Aoyama και συνεργάτες, 1987). Το

κυτόχρωμα του στελέχους αυτού είχε σταθερά σαν έκτο υποκαταστάτη του σιδήρου έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο του αποπρωτεϊνικού τμήματος του ενζύμου (Yoshida και συνεργάτες, 1985).

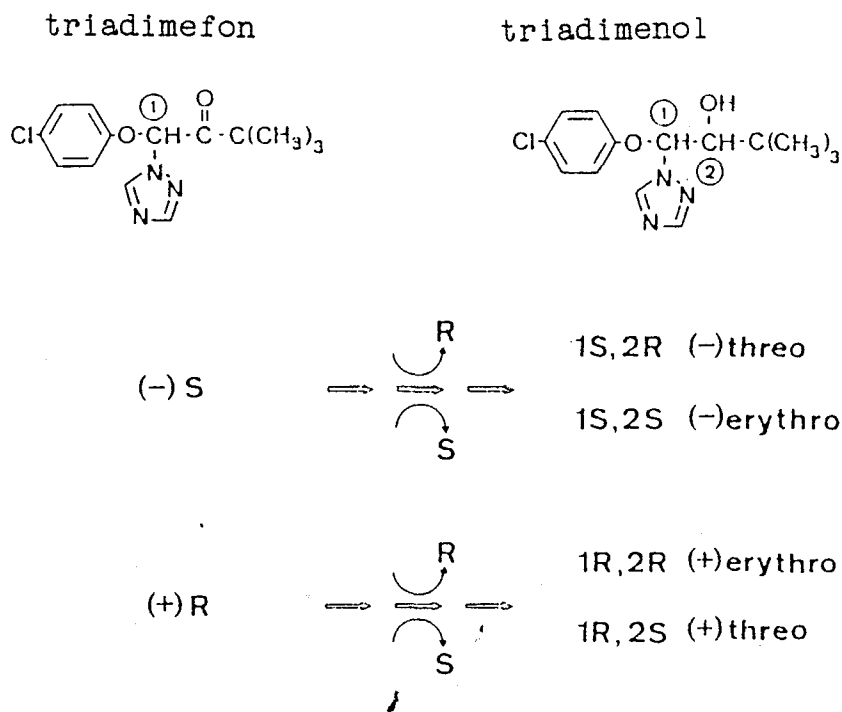
1.7. Η ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΟΥ TRIADIMEFON ΣΕ TRIADIMENOL

Όπως έχει αναφερθεί (Κεφάλαιο 1.1), υπάρχουν χημικές ενώσεις που δεν είναι οι ίδιες τοξικές αλλά ενεργοποιούνται με την μετατροπή τους σε άλλα μόρια που είναι τοξικά. Μια τέτοια περίπτωση είναι και το τριαζολικό μυκητοκτόνο triadimefon το μόριο του οποίου δεν είναι ιδιαίτερα τοξικό, αλλά μετατρέπεται γρήγορα από τα ενζυμικά συστήματα διαφόρων κατηγοριών οργανισμών σ' ένα κατά πολύ τοξικότερο μόριο, το triadimenol (Gasztonyi και Josepovits, 1979). Ο μεταβολισμός του triadimefon σε triadimenol που είναι από χημικής πλευράς μιά αναγωγή, γίνεται από μύκητες, βακτήρια και σε μικρότερο βαθμό από ανώτερα φυτά και μπορεί να χαρακτηριστεί σαν μιά διαδικασία ενεργοποίησης του μορίου του triadimefon (Gasztonyi και Josepovits, 1984).

Το μόριο του triadimefon έχει ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα C-1 και κατά συνέπεια εμφανίζεται με δύο οπτικά ισομερή, τα εναντιομερή R και S. Με την αναγωγή του triadimefon σε triadimenol δημιουργείται ένα δεύτερο κέντρο ασυμμετρίας στον C-2 με αποτέλεσμα το triadimenol να παρουσιάζεται με τέσσερα στερεοϊσομερή τα 1R2S, 1S2R, 1R2R και 1S2S. Τα δύο πρώτα 1R2S, 1S2R αποτελούν τη θρέο-μορφή ή διαστεροϊσομερές A ή triadimenol I ή triadimenol A, ενώ τα δύο επόμενα 1R2R, 1S2S την έρυθρο-μορφή ή διαστεροϊσομερές B ή triadimenol II ή triadimenol B (Gasztonyi και Josepovits, 1984· Deas και συνεργάτες, 1984) (Σχήμα 21).

Σε έναν μεγάλο αριθμό μυκήτων διαφόρων γενών που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι ο βαθμός μετατροπής του triadimefon προς triadimenol, κυμαίνεται μεταξύ ευρυτάτων ορίων (από 1% στον *Mycosphaerella brassicicola*, έως 90% στον *Gaeumannomyces graminis*). Τα πιο ευαίσθητα είδη παρουσίασαν σημαντικό βαθμό μετατροπής, ενώ στην περίπτωση των ανθεκτικών παρατηρήθηκε κατά κανόνα, αλλά όχι πάντα, μικρός βαθμός μετατροπής, γεγονός που υποστηρίζει ότι η ευαισθησία στο triadimefon καθορίζεται και από άλλους παράγοντες (Deas και συνεργάτες, 1986).

Τα διάφορα είδη μυκήτων που ανάγουν το triadimefon σε triadimenol παράγουν μιά αναλογία στερεοϊσομερών μορφών του triadimenol που σε γενικές γραμμές μπορεί να θεωρηθεί χαρακτηριστική για το κάθε είδος (Gasztonyi, 1981, Deas



Σχήμα 21. Μηχανισμός σχηματισμού των τεσσάρων στερεοϊσομερών (1R2S, 1S2R, 1R2R, 1S2S) του triadimenol από την αναγωγή των εναντιομερών R και S του triadimefon (Προσαρμογή από Koller, 1987).

και συνεργάτες, 1984b). Έχουν όμως αναφερθεί και περιπτώσεις όπου διαφορετικές απομονώσεις του ίδιου μύκητα εμφανίστηκαν να παράγουν, αναφορικά με τα στερεοϊσομερή, διαφορετικής ποσοτικής σύνθεσης triadimenol (Deas και συνεργάτες, 1984b). Η σύνθεση των στερεοϊσομερών μπορεί να μεταβάλλεται σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης και την αρχική συγκέντρωση του triadimefon στο υλικό της καλλιέργειας (Deas και συνεργάτες, 1984a).

Εκείνο όμως που έχει ιδιαίτερη σημασία, και που ουσιαστικά φαίνεται να καθορίζει την ευαισθησία ενός οργανισμού στο triadimefon, είναι η επιμέρους τοξικότητα των στερεοϊσομερών μορφών του triadimenol που παράγονται. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τις μέχρι τώρα εργασίες δείχνουν ότι στους περισσότερους μύκητες η σειρά μυκητοτοξικότητας των στερεοϊσομερών του triadimenol είναι 1S2R >> 1R2R ≈ 1S2S > 1R2S (Deas και συνεργάτες, 1984b). Η τοξικότητα ενός επιμέρους ισομερούς μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ ευρυτάτων ορίων στα διάφορα είδη μυκήτων και βέβαια εξαρτάται και από τις συνθήκες καλλιέργειας (Deas και συνεργάτες, 1984b,

Deas και συνεργάτες, 1986).

Η ταυτόχρονη παρουσία 2, 3 ή 4 στερεοϊσομερών μπορεί να δημιουργεί συνθήκες ανταγωνισμού ή και συνεργασίας μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται αρνητικά ή θετικά η συνολική μυκητοτοξικότητα του μίγματος. Όταν το triadimenol δεν προστίθεται εξωγενώς αλλά δημιουργείται *in situ* με αναγωγή από το triadimefon, γίνεται περισσότερο δύσκολη η εκτίμηση της συνεισφοράς των επιμέρους στερεοϊσομερών στη συνολική παρεμπόδιση (Deas και συνεργάτες, 1984b). Επιπλέον, η ευαισθησία ενός οργανισμού στα στερεοϊσομερή του triadimenol όταν αυτά παράγονται από αναγωγή του triadimefon, μπορεί να διαφέρει συγκριτικά με την ευαισθησία που παρατηρείται όταν αυτά προστίθενται εξωγενώς, αφού καθώς παράγονται σταδιακά, ο οργανισμός μπορεί να αντιδράσει με παραπέρα μεταβολισμό των τοξικών μορίων (Deas και συνεργάτες, 1986) ή με αύξηση της παραγωγής του κυτοχρώματος P-450 που είναι η θέση δράσης του triadimenol (Gadher και συνεργάτες, 1983).

Η αναγωγή του triadimefon είναι αποτέλεσμα ενζυμικής δράσης που δε φαίνεται να πραγματοποιείται τουλάχιστον στην περίπτωση του *C. cucumerinum* από εξωκυτταρικά ένζυμα, αλλά αποκλειστικά και μόνο στο εσωτερικό του κυττάρου. Από μια σειρά παρασκευασμάτων οξειδοαναγωγικών ενζύμων που ελέγχθηκαν, κατάλληλων για την αναγωγή κετονομάδων, μόνο το ένζυμο "αφυδρογονάση του μηλικού" (malate dehydrogenase) αποδείχθηκε ικανό να πραγματοποιεί την μετατροπή αλλά με μοναδικό προϊόν μόνο το διαστερεοϊσομερές A του triadimenol (Gasztonyi, 1982). Πρέπει όμως και άλλα, λιγότερο εξειδικευμένα ένζυμα να ανάγουν το triadimefon και οι διαφορές που παρατηρούνται στις αναλογίες των ισομερών του triadimenol στα διάφορα είδη μυκήτων να οφείλονται στη διαφορετική δραστηριότητα αυτών των ενζύμων (Gasztonyi και Joseponits, 1984, Deas, και συνεργάτες, 1984a). Τα επιμέρους κυτταρικά κλάσματα, όταν επώστηκαν με triadimefon, έδειξαν όχι μόνο διαφορετική αναγωγική ισχύ αλλά παράγαν triadimenol με διαφορετική αναλογία ισομερών. Το κυτόπλάσμα και τα μικροσώματα εμφανίστηκαν να παράγουν τριπλάσια ποσότητα triadimenol συγκριτικά με τα μιτοχόνδρια, πράγμα που δημιουργεί ισχυρές ενδείξεις ότι εκεί κυρίως εδράζονται τα υπεύθυνα για την αναγωγή του triadimefon ένζυμα (Gasztonyi, 1982).

Η εξέταση ενός μεγάλου αριθμού ειδών βακτηρίων των γενών *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* και *Xanthomonas*, έδειξε ότι το triadimefon

εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου και ότι πολλά είδη το αναγάγουν προς triadimenol. Σ' όλες τις περιπτώσεις το διαστεροεισομερές Β του triadimenol παραγόταν σε μεγαλύτερες ποσότητες, με εξαίρεση το *Rhizobium japonicum* που παρήγαγε μόνο το διαστεροεισομερές Α. Διαπιστώθηκε επίσης ότι και οι δύο μορφές του triadimenol εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου, με εξαίρεση την περίπτωση του *Micrococcus luteus* στο οποίο εισέρχεται μόνο το διαστεροεισομερές Α. Από τις δύο διαστεροεισομερείς μορφές του triadimenol, μόνο το διαστεροεισομερές Β εμφανίσθηκε να είναι τοξικό στα βακτήρια, ενώ το Α είναι ουσιαστικά μη δραστικό. Φαίνεται όμως ότι η ευαισθησία των βακτηρίων στο triadimefon δεν προαπαιτεί και δε συνδέεται με την αναγωγή του προς triadimenol (Oros και Gasztonyi, 1987).

Στα ανώτερα φυτά ο μεταβολισμός του triadimefon ακολουθεί μια διαδικασία παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην περίπτωση των μυκήτων. Από μελέτες σε φυτά αγγουριάς, σιταριού, τομάτας και φασολιού, προέκυψε ότι ένα μικρό ποσοστό μεταβολίζεται σε triadimenol και ότι το ποσοστό αυτό ποικίλει στα διάφορα φυτικά είδη και επηρεάζεται σημαντικά από τον τρόπο εφαρμογής του triadimefon (Gasztonyi και Josepovits, 1978). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση του τριφυλλιού όταν το triadimefon εφαρμόσθηκε στο έδαφος. Μετά από 12 εβδομάδες, triadimefon και triadimenol ανιχνεύτηκαν τόσο στις ρίζες όσο και στο φύλλωμα του φυτού (Fisher και συνεργάτες, 1979). Έκθεση φυτών κριθαριού σε triadimefon για μεγάλο χρονικό διάστημα (66 ημέρες) είχε σαν αποτέλεσμα την μετατροπή του προς triadimenol σε ποσοστό 20,3% (Rouchaud και συνεργάτες, 1982). Η αναλογία όμως των διαστεροεισομερών του triadimenol αλλάζει σε συνάρτηση με το χρόνο. Πιο συγκεκριμένα, ενώ μετά από 3 ημέρες η αναλογία Α:Β ήταν 1,7:1, μετά από 24 ημέρες γινόταν περίπου 1:1 (Buchenauer και Rohner, 1982). Σε πειράματα με κολοκυθιάς, παρατηρήθηκε ότι τα δύο ισομερή του triadimenol παράγονταν σε ίσες ποσότητες (Clark και συνεργάτες, 1978)

Η μελέτη του μεταβολισμού του triadimenol από τους βασιδιομύκητες *Coriolus versicol* και *Rizoctonia solani*, έδειξε ότι είναι δυνατή σε κάποιο βαθμό (8%) η οξείδωσή του προς triadimefon (Deas και Clifford, 1984). Η μετατροπή αυτή παρατηρήθηκε σε μικρό ποσοστό (0,5%) και στην περίπτωση του ζυμομύκητα *S. cereviciae*, όχι όμως και στις περιπτώσεις, των μυκήτων *C. cucumerinum* και *F. oxysporum*, (Gasztonyi, 1981) ούτε και στην περίπτωση των βακτηρίων (Oros και Gasztonyi, 1987). Έτσι, αν η αναγωγή του triadimefon προς triadimenol θεωρείται μια διαδικασία ενεργοποίησης ενός μη τοξικού μορίου, η οξείδωση του triadimenol προς triadimefon μπορεί να

χαρακτηρισθεί σαν ένας μηχανισμός αποτοξικοποίησης του triadimenol (Deas και Clifford, 1984).

Το γεγονός ότι το triadimefon χρησιμοποιείται ευρύτατα στη γεωργική πράξη για την αντιμετώπιση πολλών μυκητολογικών ασθενειών, δημιουργεί σειρά ερωτηματικών που αφορούν τόσο την αποτελεσματικότητά του όσο και την εμφάνιση ανθεκτικότητας εκ μέρους των παθογόνων. Τα ερωτήματα αυτά εστιάζονται στις εξής βασικές παραμέτρους που καθορίζουν την ευαισθησία των παθογόνων μυκήτων στο triadimefon.

1. Σε ποιά βαθμό το μόριο του triadimefon μπορεί να μεταφέρεται και να συσσωρεύεται στο εσωτερικό του κυττάρου του παθογόνου;
2. Με τι ρυθμό και σε τί ποσοστό ο ίδιος ο μικροοργανισμός μετατρέπει το triadimefon σε triadimenol;
3. Σε ποιά αναλογία παράγονται οι δύο διαστεροϊσομερείς μορφές του triadimenol;
4. Ποιά είναι η σχετική ευαισθησία του παθογόνου στις επιμέρους διαστεροϊσομερείς μορφές τα triadimenol;
5. Ποιά η πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στο triadimefon και στο triadimenol εκ μέρους των παθογόνων;
6. Ποιά είναι η σχέση μεταξύ της ανθεκτικότητας στο triadimefon και αυτής στο triadimenol;
7. Ποιός είναι ο βιοχημικός μηχανισμός της ανθεκτικότητας;

Στην περίπτωση που και το φυτό ξενιστής μπορεί να πραγματοποιεί την αναγωγή του triadimefon, τα τρία πρώτα ερωτήματα μπορούν να τεθούν και για το φυτό, αφού η εξωγενής παρουσία του triadimenol δημιουργεί ένα επιπλέον τοξικό περιβάλλον για το παθογόνο (Gasztonyi και Josepovits, 1978). Όπως προκύπτει λοιπόν από τα παραπάνω, η τοξικότητα του triadimefon είναι ένα σύνθετο φαινόμενο που απαιτεί πολύπλευρη μελέτη και αφορά την μετατροπή του triadimefon σε triadimenol από το σύστημα παθογόνο-ξενιστής.

1.8. ΣΚΟΠΟΣ ΑΥΤΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η χημική καταπολέμηση, παρά τις σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες προς άλλες κατευθύνσεις, αποτελεί σήμερα την κύρια και συχνά τη μοναδική δυνατότητα για την αντιμετώπιση των μυκητολογικών ασθενειών των φυτών. Η είσοδος στη γεωργική πράξη μυκητοκτόνων με εξειδικευμένα, σε υποκυτταρικό επίπεδο δράση, που έχουν τη δυνατότητα να κινούνται στο εσωτερικό του φυτού και να ασκούν ταυτόχρονα προστατευτική και θεραπευτική επίδραση, όχι μόνο έδωσε λύσεις σε πολλά προβλήματα φυτοπροστασίας αλλά και βελτίωσε σημαντικά την "οικολογική εικόνα" του γεωργικού φαρμάκου. Η εκλεκτική τοξικότητα των διασυστηματικών μυκητοκτόνων στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα ή λίγα κυτταρικά συστατικά ή ενζυμικά συστήματα του παθογόνου, που δεν υφίστανται ή διαφέρουν απ' αυτά των οργανισμών μη-στόχων. Το γεγονός αυτό όμως σε συνδυασμό με τον πολύ γρήγορο πολλαπλασιασμό πολλών μυκήτων αυξάνει την πιθανότητα επιλογής ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου.

Οι FBI's είναι σήμερα, και φαίνεται ότι θα παραμείνουν και στο άμεσο μέλλον, η σημαντικότερη ομάδα μυκητοκτόνων εξειδικευμένης δράσης. Οι λόγοι είναι ότι:

1. Επιδεικνύουν ευρύ φάσμα δράσης και είναι, σαν ομάδα, κατάλληλοι για την καταπολέμηση πολλών μυκήτων, με εξαίρεση κύρια τους *ωομύκητες*.
2. Οι διάφορες επιμέρους ομάδες των FBI's δρουν σε διαφορετικά στάδια της βιοσυνθετικής διαδικασίας, αν και οι περισσότερες παρεμβαίνουν στη βαθμίδα της απομεθυλίωσης του C-14 (DMIs).
3. Ο βαθμός αλληλεπίδρασης των FBI's με τα αντίστοιχα ενζυμικά συστήματα της βιοσύνθεσης των στερολών άλλων, πλην των μυκήτων, οργανισμών είναι σημαντικά μειωμένος.
4. Παρά τη συνεχή και εκτεταμένη χρήση τους σε λίγες περιπτώσεις, συγκριτικά με άλλες κατηγορίες διασυστηματικών μυκητοκτόνων, έχουν δημιουργηθεί προβλήματα λόγω επιλογής ανθεκτικών στελεχών των παθογόνων.

Τα τριαζολικά μυκητοκτόνα αποτελούν τη μεγαλύτερη και σημαντικότερη για τη γεωργία ομάδα των DMIs που συνεχώς διευρύνεται με την προσθήκη νέων μελών. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα τριαζολικά μυκητοκτόνα έχει αναφερθεί στην περίπτωση του *Rhynchosporium secalis* (Kendall και Hollomon, 1990), του ωιδίου (Fletcher και Wolfe, 1981· Butters και συνεργάτες, 1984· Ehisz,

1988) και της μαύρης σκωρίασης των σιτηρών (Boyle και συνεργάτες, 1988). Η μελέτη ανθεκτικών απομονώσεων από φυσικούς πληθυσμούς και εργαστηριακά επιλεγμένων στελεχών, έδειξε ότι η ανθεκτικότητα στα τριαζολικά είναι συνήθως χαμηλού επιπέδου, συνδέεται με μειωμένη ευαισθησία και στις άλλες ομάδες των DMIs (Leroux και Gredt, 1984) ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις επηρεάζει αρνητικά την προσαρμοστικότητα των στελεχών (Hippe και Koller, 1986). Παρ' όλα αυτά, οι γνώσεις μας για τη δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας των φυτοπαθογόνων μυκήτων στα τριαζολικά και για τους βιοχημικούς μηχανισμούς της ανθεκτικότητας αυτής είναι περιορισμένες.

Η μελέτη της γενετικής της ανθεκτικότητας του *N. haematococca* var. *cucurbitae* στους DMIs έχει δείξει την ύπαρξη δύο συστημάτων κληρονομικότητας. Ενός πολυγονικού, από γόνους με μικρή ο καθένας επίδραση στην ευαισθησία έναντι όλων των DMIs (γόνος *fen*) (Kalamarakis, 1991) και ενός μονογονικού, υψηλής ανθεκτικότητας στο triadimenol (γόνος *tri-1*) (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989). Ο "μείζων" αυτός γόνος παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί δεν επηρεάζει σημαντικά την ευαισθησία σε άλλους DMIs και την παθογόνο ικανότητα και προσαρμοστικότητα του μύκητα.

Η παρούσα εργασία επεδίωξε τη μελέτη της βιοχημικής έκφρασης του γόνου *tri-1* και περιέλαβε τέσσερα στάδια. Στο πρώτο εξετάσθηκε η επίδραση του γόνου αυτού στην ευαισθησία του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* τόσο σε διάφορους αντιπροσώπους των τριαζολικών μυκητοκτόνων όσο και στις άλλες ομάδες των FBI's. Στο δεύτερο στάδιο εξετάσθηκε κατά πόσο η μεταλλαγή επηρεάζει την αναγωγή του triadimefon προς triadimenol και τη διαστερεοϊσομερή σύσταση του παραγόμενου triadimenol. Το τρίτο στάδιο απέβλεπε στην, σε υποκυτταρικό επίπεδο, διερεύνηση της βιοχημικής έκφρασης του γόνου *tri-1* μέσω της μελέτης της βιοσύνθεσης των στερολών και του ενζυμικού συστήματος της απομεθυλίωσης του C-14 της λανοστερόλης. Στο τέταρτο, τέλος, στάδιο εξετάσθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο triadimefon μέσω μηχανισμών μη ενεργοποίησής του προς triadimenol.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Σαν βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν οι φυτοπαθογόνοι μύκητες *Nectria haematococca* var. *cucurbitae* και *Botrytis cinerea*.

2.1.1. *NECTRIA HAEMATOCOCCA* VAR. *CUCURBITAE*

Ο μύκητας *N. haematococca* var. *cucurbitae*, Dingley ανήκει στην οικογένεια *Hypocreaceae* των Ασκομυκήτων (Dingley, 1961) και εμφανίζεται και με τα συνώνυμα *Hypomyces solani*, Rke. & Berth. (Reinke και Berthold, 1879) f. *cucurbitae*, Snyder & Hansen (Snyder και Hansen, 1941) και *H. ipomoeae*, Hals. (Halsted, 1892). Η στελής του μορφή *Fusarium solani*, Mart. (Martius, 1842) f. *cucurbitae*, Snyder & Hansen (Snyder και Hansen, 1941) ανήκει στην οικογένεια *Tuberculariaceae* των Αδηλομυκήτων.

Ο μύκητας σχηματίζει 4 είδη σπορίων, όλα απλοειδή. Αγενώς παράγονται μακροκονίδια, μικροκονίδια και χλαμυδοσπόρια που μεταφέρονται με το έδαφος, το νερό και το σπόρο και εγγενώς ασκοσπόρια που παράγονται σε περιθήκια είναι μυξοσπόρια και μεταφέρονται με τη βροχή (Snyder και Hansen, 1954). Μεταξύ των διαφόρων στελεχών του μύκητα έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές ως προς την παθογένεια και το ρυθμό ανάπτυξης χωρίς όμως να έχει διαπιστωθεί κάποια σύνδεση μεταξύ αυτών των δύο χαρακτηριστικών (Prasad, 1949).

Έχουν αναγνωρισθεί δύο φυλές αυτού του μύκητα που δεν διαφέρουν μορφολογικά (αγενή σπόρια ή περιθήκια) και δεν διασταυρώνονται μεταξύ τους. Η διάκρισή τους γίνεται με βάση τα μέρη του ξενιστή που μπορούν να παρασιτίσουν. Πιο συγκεκριμένα ενώ η φυλή 1 (race 1) προκαλεί σήψη των ριζών, του στελέχους και του καρπού, η φυλή 2 (race 2) προσβάλλει μόνο τον καρπό. Παρ' ότι η παθογένεια της φυλής 1 έχει διαπιστωθεί σχεδόν σε όλα τα μέλη της οικογένειας των κολοκυνθοειδών (καρπούζι, πεπόνι, κολοκύθι), στην πράξη προβλήματα έχουν εμφανισθεί μόνο σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες κολοκυθιάς, προκαλώντας απώλεια μέχρι και 75% της παραγωγής (Tousson και Snyder, 1961).

Και οι δύο φυλές μεταφέρονται κυρίως με το σπόρο τόσο εξωτερικά, όσο και σε λανθάνουσα μορφή μεταξύ του περιβλήματος και των κοτυληδόνων χωρίς να επηρεάζεται η βιωσιμότητα ή η βλαστικότητα του. Μετά τη βλάστηση του σπόρου το παθογόνο εγκαθίσταται στο έδαφος απ' όπου σε συνθήκες υψηλής εδαφικής υγρασίας μπορεί να προσβάλλει το στέλεχος ή τον καρπό σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξης του φυτού (Tousson και Snyder, 1961). Στο στέλεχος και κοντά στην επιφάνεια του εδάφους σχηματίζονται πολυάριθμα σποριοδόχεια και κονίδια τα οποία διασπείρονται στο έδαφος με τη βοήθεια του νερού και των καλλιεργητικών φροντίδων. Απ' αυτά τα κονίδια περίπου το 30-50% μετατρέπεται σε χλαμυδοσπόρια σε διάστημα 1-8 εβδομάδων, από τα οποία ελάχιστα επιβιώνουν για περισσότερο από 2 χρόνια (Nash και Alexander, 1965). Η προσβολή του καρπού καταλήγει σε ξηρή σήψη και το παθογόνο εισέρχεται στο σπόρο όπου και ολοκληρώνει το βιολογικό του κύκλο (Tousson και Snyder, 1961).

Έχει διαπιστωθεί ότι ο μύκητας εμφανίζει διπολικό ετεροθαλλισμό που ελέγχεται από ένα γόνιο με δύο αλληλομόρφους *A* και *a*. Κατά συνέπεια για την εμφάνιση της τέλει μορφής (περιθήκια, ασκοί, ασκοσπόρια) είναι αναγκαία η σύζευξη γαμεταγγείων αντιθέτου συζευκτικού τύπου (Dimock, 1937). Οι δύο συζευκτικοί τύποι παραμένουν σημαντικά απομακρυσμένοι γεωγραφικά μεταξύ τους και ποτέ δεν έχουν απομονωθεί και οι δύο στον ίδιο αγρό, πράγμα που εξηγεί γιατί δεν εμφανίζεται στη φύση το τέλει στάδιο του μύκητα (Snyder και συνεργάτες, 1975).

Το μυκήλιο παραμένει απλοειδές κατά το μεγαλύτερο μέρος του βιολογικού κύκλου του μύκητα και μόνο κατά τη φάση της εμφάνισης του τελείου σταδίου λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός διπλοειδούς πυρήνα (El-Ani, 1956). Η διαδικασία της γονιμοποίησης είναι η τυπική ενός ασκομύκητα. Το ασκογόνιο εδράζεται στο πρωτοπεριθήκιο το οποίο αφού γονιμοποιηθεί αναπτύσσεται σε περιθήκιο (Snyder και συνεργάτες, 1975). Η γονιμοποίηση μπορεί να γίνει από διαφορετικά είδη κυττάρων που προέρχονται από αντιθέτου συζευκτικού τύπου θαλλό, όπως μικροκονίδια, μακροκονίδια, βλαστικούς σωλήνες ή οποιοδήποτε άλλο σωματικό κύτταρο (Dimock 1937). Μετά το σχηματισμό του διπλοειδούς πυρήνα στο μητρικό ασκογόνιο κύτταρο, λαμβάνει χώρα μειωτική διαίρεση που οδηγεί στο σχηματισμό των απλοειδών ασκοσπορίων (El-Ani, 1956). Διπλοειδή σωματικά κύτταρα δεν παράγονται σε καμιά φάση του βιολογικού κύκλου και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατός ο έλεγχος των σχέσεων κυριαρχίας μεταξύ αλληλομόρφων γόνων στο γονότυπο του μύκητα (Snyder και συνεργάτες, 1975). Ο αριθμός των χρωματοσωμάτων ή των ομάδων

σύζευξης του μύκητα φαίνεται να είναι $n=4$ (El-Ani, 1956) αν και έχουν διατυπωθεί και αντίθετες απόψεις (Howson και συνεργάτες, 1963).

Ο βιοχημικός μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η γονιμοποίηση του πρωτοπεριθηκίου δεν είναι επαρκώς γνωστός. Φαίνεται πάντως να υπάρχουν κάποιες ουσίες που εκκρίνονται από το μυκήλιο που πρόκειται να λειτουργήσει σαν δέκτης του γενετικού υλικού και οι οποίες τροποποιούν τη μορφή και τη λειτουργία των αντιθέτου συζευτικού τύπου κονιδίων, καθιστώντας τα "σεξουαλικά ενεργά". Αυτά τα ενεργοποιημένα κύτταρα εκκρίνουν άλλες ουσίες οι οποίες δρουν στα τριχόγυνα του πρωτοπεριθηκίου τα οποία στη συνέχεια αναπτύσσονται προς την κατεύθυνση του κονιδίου. Ακολουθεί πλασμογαμία μεταξύ κονιδίου και τριχόγυνου με αποτέλεσμα το σχηματισμό δικάρου μυκηλίου (Bistis και Georgopoulos, 1979).

Το άγριο στέλεχος είναι σεξουαλικά ερμαφρόδιτο δηλαδή παράγει πρωτοπεριθήκια τα οποία μπορούν, αφού γονιμοποιηθούν από αντιθέτου συζευτικού τύπου γαμέτες, να εξελιχθούν σε περιθήκια και ταυτόχρονα μυκήλιο και κονίδια τα οποία μπορούν να γονιμοποιήσουν αντιθέτου συζευτικού τύπου πρωτοπεριθήκια. Εργαστηριακά όμως έχουν μελετηθεί δύο μεταλλαγές που τροποποιούν την ερμαφρόδιτη αυτή συμπεριφορά του αγρίου στελέχους, μία προς την κατεύθυνση του αρσενικού και μία προς την κατεύθυνση του θηλυκού. Οι γόννοι αυτοί έχουν ονομασθεί c και m αντίστοιχα. Το ερμαφρόδιτο άγριο στέλεχος χαρακτηρίζεται σαν c^+m^+ (El-Ani, 1956).

Στελέχη που φέρουν το γόνο c ενώ κατά τα άλλα χαρακτηριστικά δεν διαφέρουν μορφολογικά και φυσιολογικά από το άγριο στέλεχος, δεν σχηματίζουν πρωτοπεριθήκια και κατά συνέπεια δεν μπορούν να λειτουργήσουν σαν δέκτες γενετικού υλικού. Σε συνθήκες αγρού τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν μικρή προσαρμοστικότητα πιθανά λόγω μειωμένης παθογόνου δύναμης ή δυνατότητας σχηματισμού χλαμυδοσπορίων ή ζωτικότητας ή συνδυασμού όλων αυτών των παραγόντων. Αντίθετα ο γόνος m δεν επηρεάζει το σχηματισμό κανενός οργάνου αφού δεν υπάρχουν εξειδικευμένα αρσενικά όργανα αλλά ούτε τα κονίδια ούτε κανένα άλλο είδος σωματικού κυττάρου του θαλλού είναι ικανό να γονιμοποιήσει πρωτοπεριθήκια αντιθέτου συζευτικού τύπου. Η παρουσία του γόνου m δεν μειώνει την προσαρμοστικότητα των στελεχών και μπορούν με επιτυχία να προκαλέσουν την ασθένεια (Snyder και συνεργάτες, 1975).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι για μια επιτυχή διασταύρωση που θα οδηγήσει

στο σχηματισμό ασκοσπορίων πρέπει να εκπληρώνονται δύο συνθήκες: 1. Τα στελέχη να είναι αντιθέτου συζευτικού τύπου και 2. Ο θαλλός του στελέχους που θα λειτουργήσει σαν δότης γενετικού υλικού πρέπει να φέρει το γόνο m^+ και αντίστοιχα αυτός που θα λειτουργήσει σαν δέκτης το γόνο c^+ (El-Ani, 1956). Έτσι, μόνο οι διασταυρώσεις (αρσενικό x θηλυκό) $c^+m^+ \times c^+m^+$, $c^+m^+ \times c^+m$, $cm^+ \times c^+m^+$ και $cm^+ \times c^+m$ είναι επιτυχείς. Η τελευταία διασταύρωση έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση εξ ανασυνδυσμού και απογόνων τύπου cm που είναι στείροι (neuter) και μορφολογικά δεν διαφέρουν από τα στελέχη του τύπου cm^+ (El-Ani, 1954). Οι γόνοι c και m είναι συνδεδεμένοι και το επί τοις εκατό ποσοστό ανασυνδυασμού έχει υπολογισθεί από διάφορους ερευνητές μεταξύ 26 (Hansen και Snyder, 1946) και 16 (Georgopoulos, 1963). Οι διαφορές αυτές φαίνεται να οφείλονται στο γεγονός ότι οι γόνοι αυτοί χωρίζονται από το κεντρομέρος και είναι στενά συνδεδεμένοι μ' αυτό (Georgopoulos, 1963). Επιπλέον με συγκριτικές μελέτες έχει δειχθεί ότι η ωρίμανση των πρωτοπεριθηκίων γίνεται πιο γρήγορα όταν γονιμοποιούνται από θαλλό τύπου cm^+ ή όταν προέρχονται από γονότυπο τύπου c^+m (Baker, 1956).

Ένας άλλος γόνος που έχει μελετηθεί αρκετά καλά είναι αυτός που ελέγχει το χρώμα των περιθηκίων. Έχουν απομονωθεί στελέχη που παράγουν λευκά πρωτοπεριθήκια και άλλα που παράγουν κόκκινα αλλά ποτέ δεν έχει παρατηρηθεί το ίδιο στέλεχος να παράγει πρωτοπεριθήκια και των δύο ή άλλου ενδιάμεσου χρώματος (Snyder, 1940). Πιθανά τα στελέχη που σχηματίζουν λευκά πρωτοπεριθήκια να έχουν προέλθει από αυτά που σχηματίζουν κόκκινα με μεταλλαγή σ' ένα γόνο που ελέγχει τη βιοσύνθεση συγκεκριμένης χρωστικής. Ο γόνος αυτός έχει ονομασθεί w και εκφράζεται με δύο αλληλομόρφους w για τα λευκά και w^+ για τα κόκκινα πρωτοπεριθήκια. Μετά τη γονιμοποίηση, το χρώμα των περιθηκίων καθορίζεται από το γονότυπο του στελέχους που λειτουργεί σαν δέκτης του γενετικού υλικού. Στην περίπτωση διασταύρωσης στελεχών με διαφορετικούς αλληλομόρφους ως προς το χρώμα των πρωτοπεριθηκίων, οι μισοί απόγονοι σχηματίζουν κόκκινα και οι άλλοι μισοί λευκά πρωτοπεριθήκια (Snyder, 1940, Georgopoulos, 1963).

Ο μύκητας έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν με επιτυχία σαν βιολογικό υλικό για τη μελέτη της γενετικής της ανθεκτικότητας στην περίπτωση των αρωματικών υδρογονανθράκων (Georgopoulos, 1962), του dodine (Kappas και Georgopoulos, 1970) και των παρεμποδιστών της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989, Kalamarakis και συνεργάτες, 1991). Για το λόγο αυτό και επιπλέον εξαιτίας του γεγονότος ότι στο εργαστήριο φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α. υπάρχουν τα κατάλληλα στελέχη και συσσωρευμένη

πείρα στο χειρισμό αυτού του μύκητα, επελέγη σαν κατάλληλο βιολογικό υλικό για την εκπόνηση αυτής της μελέτης.

Το άγριο στελέχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* που χρησιμοποιήθηκε και που υπάρχει στη συλλογή του εργαστηρίου φυτοπαθολογίας ανήκει στη φυλή I και έχει τα εξής γενετικά χαρακτηριστικά

38: A w⁺ c⁺ m⁺

όπου:

A, a: οι αλληλόμορφοι που ελέγχουν το συζευτικό τύπο.

w⁺, w: οι αλληλόμορφοι που ελέγχουν το χρώμα των περιθηκίων.

c⁺, c: οι αλληλόμορφοι που ελέγχουν την ικανότητα του στελέχους να λειτουργεί σαν δέκτης γενετικού υλικού.

m⁺, m: οι αλληλόμορφοι που ελέγχουν την ικανότητα του στελέχους να λειτουργεί σαν δότης γενετικού υλικού.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης και τα στελέχη TL-31, TL-34, TL-316 και TL-320 που απομονώθηκαν από το άγριο στελέχος 38 και χαρακτηρίζονται από υψηλή ανθεκτικότητα στο triadimenol, έχουν μελετηθεί γενετικά και έχει διαπιστωθεί ότι η ανθεκτικότητα στο triadimenol ελέγχεται από ένα γόνου κοινό και για τα 4 στελέχη που ονομάστηκε *tri-1*. Η παρουσία του γόνου αυτού στο γονότυπο, δεν φαίνεται να επηρεάζει την προσαρμοστικότητα των στελεχών αυτών όσο αφορά το ρυθμό αύξησης, την παραγωγή των κονιδίων και την παθογόνο δύναμη (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989).

2.1.2. *BOTRYTIS CINEREA*

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* (Persoon:Fries) ανήκει στην οικογένεια *Moniliaceae* της τάξης *Moniliales* των Αδηλομυκήτων. Η τέλεια μορφή του, *Botryotinia fuckeliana* (συν. *Sclerotinia fuckeliana*), είναι Ασκομύκητας και ανήκει στην τάξη *Helotiales* της ομάδας των δισκομυκήτων.

Η ατελής του μορφή σχηματίζει κονιδιοφόρους που αποτελούνται από έναν μακρύ, καστανού χρώματος ποδίσκο ο οποίος στην κορυφή του και σε μικρές κατ' εναλλαγή εκφυόμενες διακλαδώσεις φέρει υαλώδη, ωσειδή ή σφαιρικά μονοκύτταρα κονίδια κατά κεφαλές υπό μορφή βότρουος (Παναγόπουλος, 1987, 1990). Τα κονίδια μεταφέρονται με τον άνεμο (ξηροσπόρια) και σε συνθήκες

υψηλής υγρασίας βλαστάνουν γρήγορα δίνοντας έναν ή δύο (σπανιότερα μέχρι πέντε) βλαστικούς σωλήνες (Epton και Richmond, 1980). Επιβιώνει σαπροφυτικά με τη μορφή μυκηλίου επί νεκρών φυτικών ιστών ή επί προσβεβλημένων καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών αλλά και με τα σκληρώτια του που αποτελούν ανθεκτικές μορφές επιβίωσης του μύκητα (Παναγόπουλος, 1987). Τα σκληρώτια είναι κυρτά, μαύρου χρώματος, αναπτύσσονται συνήθως επάνω ή μόλις κάτω από την επιφάνεια των προσβεβλημένων φυτικών ιστών, σπανιότερα στο κέντρο της εντεριώνης του βλαστού και όταν βλαστάνουν σε συνθήκες αγρού σχηματίζουν κονιδιοφόρους (Coley-Smith, 1980).

Ο μύκητας εμφανίζει διπολικό ετεροθαλλισμό (Hansen και Smith, 1932) και κατά συνέπεια για το σχηματισμό της τέλει μορφής απαιτείται η σύζευξη στελεχών αντιθέτου συζευτικού τύπου. Ρόλο θηλυκών γαμεταγγείων παίζουν δεκτικές υφές οι οποίες αφού γονιμοποιηθούν με αναστόμωση από βλαστάνοντα μικροκονίδια κατάλληλου συζευτικού τύπου εξελίσσονται σε μικρά κυπελοειδή αποθήκια (Drayton, 1934). Πάνω στα αποθήκια και στα μητρικά κύτταρα των ασκών λαμβάνει χώρα καρυογάμια, μείωση και στη συνέχεια σχηματισμός των ασκών και των ασκοσπορίων. Η τέλεια μορφή σπάνια εμφανίζεται στη φύση και κατά συνέπεια μικρό μόνο ρόλο παίζει στην επιδημιολογία του μύκητα (Jarvis, 1980).

Ο μύκητας προσβάλλει όλα σχεδόν τα καλλιεργούμενα φυτά, προκαλώντας ασθένεια γνωστή σαν "τεφρά σήψη". Η μόλυνση γίνεται με μυκήλιο ή κονίδια και διευκολύνεται από την ύπαρξη πληγών και εξασθενημένων ή γηρασμένων φυτικών ιστών. Τα συμπτώματα της ασθένειας ποικίλουν ανάλογα με το είδος και την ηλικία των προσβεβλημένων φυτικών οργάνων και των συνθηκών του περιβάλλοντος. Συνήθως παρατηρούνται κηλιδώσεις φύλλων, ανθέων και καρπών, έλκη βλαστών και σήψεις καρπών, κονδύλων και φυταρίων (Παναγόπουλος, 1987, 1990). Η ασθένεια είναι ιδιαίτερα σοβαρή σε καλλιέργειες θερμοκηπίων όπου η σχετική υγρασία είναι συνήθως υψηλή, κάτι που ευνοεί την ανάπτυξη και εξάπλωση του παθογόνου αλλά και μετασυλλεκτικά αφού ο μύκητας μπορεί να αναπτύσσεται ακόμα και σε θερμοκρασίες ψυγείου.

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το άγριο στέλεχος του *Botrytis cinerea* B3 που απομονώθηκε από τομάτα και βρίσκεται στη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α.

2.2. ΧΗΜΙΚΑ

Οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν διακρίνονται ανάλογα με τη χρήση τους σε αντιδραστήρια και παρεμποδιστές.

2.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα διάφορα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και η προέλευσή της κατά κατηγορία χρήσης ήταν:

Για την παρασκευή των διαφόρων θρεπτικών υλικών καλλιέργειας των μυκήτων: Άγαρ (agar-agar, "Serva"), βιοτίνη (D(+)-biotin, "Serva"), γλυκόζη (δεξτρόζη) (α -D-glucose, "Serva"), δισόξινο φωσφορικό κάλιο (potassium dihydrogen phosphate, "Ferak"), εκχύλισμα ζύμης (extract of yeast powder, "Merck"), θειαμίνη (aneurin, "Merck"), θειικό αμμώνιο (ammonium sulfate, "Ferak"), θειικό μαγγάνιο (manganese sulfate, "Merck"), θειικό μαγνήσιο (magnesium sulfate, "Merck"), θειικός σίδηρος (ferrus sulfate, "Mallinckrodt"), θειικός χαλκός (cupric sulfate, "Mallinckrodt"), θειικός ψευδάργυρος (zinc sulfate, "B.D.H."), θειώδες νάτριο (sodium sulfite, "Merck"), ινοσιτόλη (myo-inosit, "Merck"), καζαμινοξέα (pepton from casein C/HSH, "Serva"), μολυβδαινικό νάτριο (sodium molybdate, "Merck"), νιασίνη (nicotinic acid, "Sigma"), νιτρικό αμμώνιο (ammonium nitrate, "Ferak"), νιτρικό κάλιο (potassium nitrate, "Merck"), ριβονουκλεϊκά οξέα (ribonucleic acid, "Serva"), όξινο φωσφορικό κάλιο (di-Potassium hydrogen phosphate, "Riedel-deHaen"), όξινο φωσφορικό νάτριο (hydrogen phosphate dry di-sodium, "Merck"), παντοθενικό ασβέστιο (calcium D(+)-pantothenate, "Merck"), πυριδοξίνη (pyridoxol hydrochloride, "Merck"), χλωριούχο ασβέστιο (calcium chloride, "Mallinckrodt"), χλωριούχο κάλιο (potassium chloride, "Ferak") και χλωριούχο νάτριο (sodium chloride, "Ferak").

Για τη μελέτη του μεταβολισμού του triadimefon: διαιθυλ-αιθέρας (ethyl ether, "N.Κράλλης"), μυρμηκικό οξύ (formic acid, "Merck"), οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate, "Riedel deHaen"), πετρελαϊκός αιθέρας (petroleum benzin, "Ferak") και χλωροφόρμιο (chloroform, "Prolabo").

Για τη μελέτη των στερολών: εξάνιο (hexane HPLC, "Mallinckrodt"), εργοστερόλη (ergosterol, "Sigma"), καυστικό κάλιο (potassium hydroxide, "Ferak"), λανοστερόλη (lanosterol 50-60%, "Sigma"), σκουαλένιο (squalene, "Sigma") και χοληστερόλη (cholesterin, "Serva").

Για τη μελέτη των ηλεκτροφορητικών ιδιοτήτων του κυτοχρώματος P-450: ακρυλαμίδιο (acrylamide, "Sigma"), αλβουμίνη (albumine bovine, "Sigma"), αμφολύτες (servalyt 3-10, "Serva"), APS ή υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, "Serva"), βρωμοφαινόλη (bromophenol blue, "Serva"), γλουταμικό οξύ (L-glutamic acid, "Merck"), γλυκερόλη (glycerol, "Serva"), γλυσίνη (glycine, "Serva"), δισ-ακρυλαμίδιο (N,N'-Methylene-bisacrylamide, "Serva"), EDTA ή αιθυλενοδιαμίνιο-τετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetraacetic acid, "Sigma"), ισοπροπυλική αλκοόλη (2-propanol, "Ferak"), καυστικό νάτριο (sodium hydroxide, "Mallinckrodt"), κουμάωση G250 (coomassie brilliant blue G250, "Serva"), κουμάωση R250 (coomassie brilliant blue R250, "Serva"), μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol, "Merck"), οξικό νάτριο (sodium acetate, "Ferak"), οξικό οξύ (acetic acid, "Merck"), SDS ή λαυροθειικό νάτριο (lauryl sulfate sodium salt, "Sigma"), σουκρόζη (sucrose, "Serva"), TEMED ή N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθυλεν-διαμίνη, (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine, "Serva"), TMBZ ή 3,3',5,5'-τετραμεθυλ-βενζιδίνη (3,3',5,5-tetramethyl-benzidine, "Serva"), Tris ή τρις-υδροξυ-μεθυλ-μεθυλαμίνη (tris (hydroxymethyl)-aminomethane, "Merck"), τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid, "Merck"), υδροχλωρικό οξύ (hydrochloric acid, "Merck"), υπεροξειδίο του υδρογόνου (perhydrol 30% H₂O₂, "Merck"), φωσφορικό οξύ (ortho-phosphate acid 85%, "Ferak") και χολικό νάτριο (cholic acid Na-salt, "Sigma"). Χρησιμοποιήθηκε επίσης μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (SDS molecular weight markers 6H, "Serva").

Σαν χημικός μεταλλαξογόνος παράγοντας: N-μεθυλ-N-νιτρο-N-νιτροσο-γουανιδίνη (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, "Serva").

Τέλος, σαν διαλύτες γενικής χρήσης: αιθανόλη (ethyl alcohol, "Mallinckrodt") και μεθανόλη (methyl alcohol, "Mallinckrodt").

2.2.2. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ

Οι παρεμποδιστές που χρησιμοποιήθηκαν, η καθαρότητα και η προέλευσή τους

με βάση τη χημική τους ομάδα, ήταν:

Τριαζολικά: triadimenol 96%, triadimenol A 98,6%, triadimenol B 99%, triadimefon 93,6%, bitertanol απολύτου καθαρότητας από την Bayer AG, Leverkusen, Germany, propiconazole 99,1% από την Ciba-Geigy, Basle, Switzerland, flutriafol 95,8% από την ICI Fernhurst Haslemere Surrey, England και flusilazol 98,7% από την Du Pont de Nemours, Geneva, Switzerland.

Ιμιδαζολικά: clotrimazole απολύτου καθαρότητας από την Bayer AG, Leverkusen, Germany, imazalil και ketoconazole απολύτου καθαρότητας από την Janssen Pharmaceutica N. V., Beerse, Belgium και triflumizole απολύτου καθαρότητας από την Nippon Soda Co., Tokyo, Japan.

Πιπεραζινικά: triforine απολύτου καθαρότητας από την Ciba Merck GmbH & Co., Ingelheim/Rhein, Germany.

Πυριμιδινικά: fenarimol 96% από την Eli Lilly and Co. Greenfield, Indiana, USA.

Μορφολινικά: fenpropimorph 60% από την Dr. R. Maag Ltd., Dielsdorf, Switzerland, και tridemorph 99% από την BASF AG, Limburgerhof, Germany.

Αλλυλαμίνες: terbinafine απολύτου καθαρότητας από την Sandoz, Forschungsinstitutive, Vienna, Austria.

Πολυένια: pimaricin >95% από την Ciba Merck GmbH&Co., Ingelheim/Rhein, Germany και nystatin απολύτου καθαρότητας από την Serva Feinbiochemica GMBH & Co, Heidelberg, Germany.

Σαν διαλύτες για όλους τους παρεμποδιστές χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη με εξαίρεση τα πολυένια που χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη.

2.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για την καλλιέργεια των μυκήτων και ανάλογα με τη φύση του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υλικά:

Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη (PDA): Εκχύλισμα από 200 g πατάτα, δεξτρόζη 20 g, άγαρ 20 g και απεσταγμένο νερό μέχρι όγκο 1.000 ml.

Νερό με άγαρ (WA): Άγαρ 20 g και απεσταγμένο νερό μέχρι όγκο 1.000 ml.

Πλήρες θρεπτικό υλικό (CM): Γλυκόζη 10 g, εκχύλισμα ζύμης 1 g, καζαμινοξέα 3 g, νουκλεϊκά οξέα 0,5 g, διάλυμα βιταμινών 1 ml, διάλυμα αλάτων 250 ml, άγαρ 15 g και απεσταγμένο νερό μέχρι όγκο 1.000 ml (Holliday, 1961).

Η περιεκτικότητα του διαλύματος αλάτων ανά λίτρο απεσταγμένου νερού ήταν: νιτρικό αμμώνιο 12 g, δισόξινο φωσφορικό κάλιο 8 g, θειώδες νάτριο 2 g, χλωριούχο κάλιο 4 g, θειικό μαγνήσιο 1 g, χλωριούχο ασβέστιο 0,5 g και διάλυμα ιχνοστοιχείων 1,2 ml.

Το διάλυμα ιχνοστοιχείων ανά 300 ml απεσταγμένου νερού περιείχε: θειικό μαγγάνιο 46 mg, θειικός ψευδάργυρος 65 mg, θειικός χαλκός 60 mg, θειικός σίδηρος 75 mg, και μολυβδενικό νάτριο 37,5 mg.

Η περιεκτικότητα του διαλύματος βιταμινών ανά 100 ml απεσταγμένου νερού ήταν: θειαμίνη 20 mg, παντοθενικό ασβέστιο 20 mg, βιοτίνη 10 mg, πυριδοξίνη 10 mg, νιασίνη 20 mg και ινοσιτόλη 200 mg.

Coursen και Sisler (C&S): Γλυκόζη 10 g, δισόξινο φωσφορικό κάλιο 2 g, όξινο φωσφορικό κάλιο 1,5 g, θειικό αμμώνιο 1 g, θειικό μαγνήσιο 0,8 g, διάλυμα ιχνοστοιχείων 0,3 ml και απεσταγμένο νερό μέχρι όγκο 1.000 ml (Coursen και Sisler, 1960).

Η αποστείρωση των υλικών γινόταν σε κλίβανο υγρής θερμότητας στους 120°C για 15 λεπτά εκτός από το PDA που αποστειρωνόταν στην ίδια θερμοκρασία για 20 λεπτά.

2.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η καλλιέργεια των στελεχών του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, γινόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με περίπου 5 ml θρεπτικό υλικό PDA. Η επώαση των καλλιιεργειών γινόταν σε επωαστικό θάλαμο τύπου Conviron, σε θερμοκρασία 25°C, σχετική υγρασία 50% και φωτοπερίοδο 14 ώρες ανα 24ωρο. Για το φωτισμό χρησιμοποιούνται λάμπες φθορισμού "OSRAM" daylight με εκπομπή συνεχούς φάσματος ακτινοβολίας μεταξύ 340 και 750 nm.

Οι καλά ανεπτυγμένες καλλιέργειες διατηρούντο σε θερμοκρασία 10°C και ανανεώνονταν κάθε 30-40 ημέρες με την τεχνική της μεταφοράς ενός μακροκονιδίου (single conidial transfer). Για το σκοπό αυτό αιώρημα κονιδίων σε αποστειρωμένο νερό "απλώνονταν" σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υλικό WA. Ακολουθούσε επώαση για 48 ώρες και ένα μικρό κομμάτι υλικού με ένα βλαστημένο μακροκονίδιο μεταφερόταν σε σωλήνα με θρεπτικό υλικό PDA. Συνήθως από κάθε στέλεχος εμβολιάζονταν 4-5 σωλήνες οι οποίοι στη συνέχεια επωάζονταν για 7-10 ημέρες όπως περιγράφεται παραπάνω.

Στο μεσοδιάστημα των 30-40 ημερών οι καλλιέργειες συχνά ανανεώνονταν με μεταφορά τεμαχίου μυκηλίου (mass transfer). Κατ' αυτήν μικρές ποσότητες υλικού με μυκήλιο και κονίδια από ανεπτυγμένη καλλιέργεια, μεταφέρονταν σε σωλήνες με PDA και επωάζονταν όπως περιγράφεται παραπάνω.

Στην περίπτωση του μύκητα *Botrytis cinerea*, η διατήρηση και η ανανέωση των στελεχών γινόταν με τον ίδιο τρόπο, με τη διαφορά ότι η επώαση των καλλιιεργειών γινόταν σε θερμοκρασία 21°C.

2.5. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η αρχή των μεθόδων που εφαρμόστηκαν αφορούσε την πρόκληση γενετικών αλλαγών (μεταλλάξεων) σε πληθυσμό κυττάρων του υπό μελέτη οργανισμού και στη συνέχεια δημιουργία καταλλήλων συνθηκών επιλογής για την απομόνωση των επιθυμητών γονοτύπων. Ανάλογα με την περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε είτε η τεχνική της ακτινοβόλησης σε μεγάλο αριθμό σπορίων είτε η επίδραση με μεταλλαξογόνο χημικό παράγοντα.

2.5.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ

Η παραγωγή μεγάλου αριθμού κονιδίων από τα άγρια στελέχη των μυκήτων *N. haematococca* var. *cucurbitae* και *Botrytis cinerea* γινόταν όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.6.1. Τα κονίδια παραλαμβάνονταν σε περίπου 5 ml αποστειρωμένο νερό έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα αιώρημα κονιδίων με πυκνότητα περίπου 10^7 κονίδια ml^{-1} . Μέρος του αιωρήματος ακτινοβολείτο για 2,5 λεπτά με ήπια και συνεχή ανατάραξη και από απόσταση 40 cm με λυχνία τύπου TUV Philips των 15 W με εκπομπή γραμμικού φάσματος ακτινοβολίας στα 253,7 nm. Μετά την ακτινοβόληση το αιώρημα παρέμενε στο σκοτάδι για 30 λεπτά έτσι ώστε να σταθεροποιηθούν οι μεταλλαγές που προκλήθηκαν.

Η εκτίμηση του ποσοστού θνησιμότητας των κονιδίων από την ακτινοβόληση γινόταν με βάση τον αριθμό των αποικιών που αναπτύσσονταν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό και είχαν εμβολιασθεί με κατάλληλες αραιώσεις του αιωρήματος πριν και μετά την ακτινοβόληση.

Με το ακτινοβολημένο αιώρημα εμβολιάζονταν τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό και κατάλληλη συγκέντρωση του προς μελέτη παρεμποδιστή. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 25°C και σε τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε 2-3 ημέρες), οι αποικίες που αναπτύσσονταν μεταφέρονταν σε τρυβλία με το ίδιο θρεπτικό υλικό και την ίδια συγκέντρωση παρεμποδιστή. Όσες από τις αποικίες συνέχιζαν να αναπτύσσονται μεταφέρονταν σε σωλήνες με PDA, γίνονταν μονοσποριακές απομονώσεις, πιο λεπτομερής έλεγχος της ευαισθησίας τους και κατάταξή τους σε κατηγορίες με βάση το επίπεδο ανθεκτικότητάς τους.

2.5.2. ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ

Σε πυκνό αιώρημα κονιδίων προστίθετο από διάλυμα N-μεθυλ-N-νιτρο-N-νιτροσογουανιδίνη (NTG) σε αιθανόλη, ποσότητα, μέχρι τελικής συγκέντρωσης $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Τα κονίδια παρέμεναν υπό την επίδραση του μεταλλαξογόνου χημικού παράγοντα για 4 ώρες υπό συνεχή ανάδευση. Η εκτίμηση του ποσοστού θνησιμότητας και η επιλογή των ανθεκτικών στελεχών γινόταν όπως και στην περίπτωση της μεταλλαξογένεσης με ακτινοβολία (Ziogas και Girgis, 1992).

2.6. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ

2.6.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ

Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των στελεχών του *N. haematococca* var. *cucurbitae* και του *B. cinerea* στα μυκητοκτόνα και τους άλλους παρεμποδιστές χρησιμοποιήθηκε κατά περίπτωση είτε η μέθοδος που στηρίζεται στην μέτρηση της διαμέτρου των αποικιών όταν τα στελέχη αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υλικό, είτε η μέθοδος της μέτρησης του ξηρού βάρους της καλλιέργειας σε υγρό θρεπτικό υλικό (Georgopoulos, 1982).

2.6.1.1. Μέτρηση της παρεμπόδισης σε στερεό θρεπτικό υλικό.

Τρυβλία με θρεπτικό υλικό WA εμβολιάζονταν με τα προς μελέτη στελέχη και ακολουθούσε επώαση στους 25°C για 48 ώρες. Αφού οι αποικίες είχαν σχηματισθεί, με την βοήθεια στερεοσκοπίου γινόταν μεταφορά ενός μικρού τμήματος θρεπτικού υλικού διαστάσεων 2x2 mm, από την περιφέρεια της μυκηλιακής αποικίας σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό CM που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις του παρεμποδιστή. Η προσθήκη του παρεμποδιστή γινόταν από διαλύματα (stock solutions) κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε η προστιθέμενη ποσότητα να μην ξεπερνά το 1% του όγκου του υλικού. Ίση ποσότητα διαλύτη προστίθετο και στον μάρτυρα (τρυβλίο χωρίς παρεμποδιστή).

Τα τρυβλία επωάζονταν (στους 25°C για τον *N. haematococca* var. *cucurbitae* και στους 21°C για τον *B. cinerea*) για 4 ημέρες και ακολουθούσε μέτρηση της διαμέτρου των ανεπτυγμένων αποικιών. Για κάθε συγκέντρωση του παρεμποδιστή η ανάπτυξη του στελέχους εκφραζόταν με βάση την επί τοις εκατό ανάπτυξη της αποικίας στη συγκεκριμένη συγκέντρωση ως προς την ανάπτυξη του ίδιου στελέχους στο μάρτυρα με εφαρμογή της σχέσης:

$$\text{Ανάπτυξη \%} = [(\Delta.\Sigma. - \Delta.A.M.) / (\Delta.M. - \Delta.A.M.)] \times 100$$

όπου:

$\Delta.\Sigma.$ = Η διάμετρος του στελέχους στη συγκεκριμένη συγκέντρωση.

$\Delta.A.M.$ = Η διάμετρος του αρχικού τεμαχίου της καλλιέργειας (inoculum).

$\Delta.M.$ = Η διάμετρος του ίδιου στελέχους στο μάρτυρα.

Από τις τιμές αυτές της ανάπτυξης στις διάφορες συγκεντρώσεις προέκυπτε η καμπύλη ευαισθησίας του στελέχους στο συγκεκριμένο παρεμποδιστή.

2.6.1.2. Μέτρηση της παρεμπόδισης σε υγρό θρεπτικό υλικό.

Τα στελέχη του *N. haemeticoccca* var. *cucurbitae* εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υλικό PDA (συνήθως 3 μολύσματα ανά τρυβλίο) και επώζονταν στους 25°C για 7-10 ημέρες έτσι ώστε να αναπτυχθούν καλά οι αποικίες και να παραχθεί μεγάλος αριθμός κονιδίων. Το θρεπτικό υλικό μαζί με τις αποικίες κοβόταν σε μικρά κομμάτια, τοποθετείτο σε φιάλη με 50 ml αποστειρωμένου νερού και ακολουθούσε ισχυρή ανατάραξη έτσι ώστε να απελευθερωθούν τα κονίδια και να σχηματισθεί ένα πυκνό αιώρημα. Η εκτίμηση της πυκνότητας του αιωρήματος γινόταν με αιματοκυτόμετρο τύπου Neubauer.

Με το αιώρημα κονιδίων εμβολιάζονταν 50 ml υγρό θρεπτικό υλικό CM σε φιάλες Erlenmeyer των 250 ml, έτσι ώστε να προκύπτει μια τελική πυκνότητα κονιδίων στο υλικό 5×10^4 σπόρια ml^{-1} . Λίγο πριν τον εμβολιασμό του θρεπτικού υλικού γινόταν προσθήκη του υπό μελέτη παρεμποδιστή όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.5.1.1 και ακολουθούσε επώαση των καλλιέργειών στους 25°C σε επωαστικό θάλαμο τύπου Gallenkamp με περιστροφική κίνηση 150 rev min^{-1} έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ο συνεχής αερισμός της καλλιέργειας.

Μετά από 24 ώρες επώαση γινόταν παραλαβή του μυκηλίου με διήθηση της καλλιέργειας μέσω διηθητικού χάρτου Whatman No 4, πλύσιμο με απεσταγμένο νερό έτσι ώστε να απομακρυνθούν όλα τα θρεπτικά συστατικά και μεταφορά σε προξηραμένα, προζυγισμένα μικρά δοχεία αλουμινίου. Ακολουθούσε ξήρανση σε κλίβανο με θερμοκρασία 65°C μέχρι σταθερού βάρους (συνήθως μετά από 24 ώρες), ξαναζύγισμα των δοχείων και υπολογισμός του ξηρού βάρους του μυκηλίου. Η ανάπτυξη του στελέχους στις διάφορες συγκεντρώσεις εκφραζόταν με βάση την επί τοις εκατό ανάπτυξη του στελέχους στο μάρτυρα, με εφαρμογή της σχέσης:

$$\text{Ανάπτυξη \%} = [(B.S.-B.A.M.) / (B.M.-B.A.M.)] \times 100$$

όπου:

B.S. = Το ξηρό βάρος του στελέχους στη συγκεκριμένη συγκέντρωση.

B.A.M. = Το ξηρό βάρος του αρχικού αιωρήματος κονιδίων (inoculum).

B.M. = Το ξηρό βάρος του ιδίου στελέχους στο μάρτυρα.

2.6.1.3. Παράγοντας Ανθεκτικότητας και Διασταυρωτή Ανθεκτικότητα.

Στην περίπτωση των ανθεκτικών στελεχών χρειάστηκε να οριστεί ένα μέτρο εκτίμησης της ανθεκτικότητάς τους ως προς το άγριο στέλεχος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η έννοια του "Παράγοντα Ανθεκτικότητας" που εκφράζεται από τις σχέσεις:

$$\text{Παρ. Ανθ.} = \text{ED}_{50} \text{ Ανθ. Στ.} / \text{ED}_{50} \text{ Αγρ. Στ.}$$

ή

$$\text{Παρ. Ανθ.} = \text{MIC Ανθ. Στ.} / \text{MIC Αγρ. Στ.}$$

όπου:

ED_{50} Ανθ. Στ. και ED_{50} Αγρ. Στ. = Η συγκέντρωση του παρεμποδιστή με την οποία επιτυγχάνεται το 50% της παρεμπόδισης της ανάπτυξης στο ανθεκτικό και το άγριο στέλεχος αντίστοιχα.

MIC Ανθ. Στ. και MIC Αγρ. Στ. = Η ελάχιστη συγκέντρωση του παρεμποδιστή με την οποία επιτυγχάνεται το 100% της παρεμπόδισης της ανάπτυξης στο ανθεκτικό και το άγριο στέλεχος αντίστοιχα.

Όταν τα προς μελέτη στελέχη είναι ανθεκτικά ο παράγοντας ανθεκτικότητας είναι μεγαλύτερος από τη μονάδα και αυξάνει αναλογικά με το βαθμό της ανθεκτικότητας. Συνήθως ένα στέλεχος θεωρείται ανθεκτικό όταν ο παράγοντας ανθεκτικότητας είναι μεγαλύτερος του δύο. Όταν τα στελέχη εμφανίζονται το ίδιο ή περισσότερο ευαίσθητα από το άγριο, τότε η τιμή του παράγοντα ανθεκτικότητας είναι ίση ή μικρότερη από τη μονάδα αντίστοιχα.

Για τη μελέτη της ανθεκτικότητας στους διάφορους παρεμποδιστές χρησιμοποιήθηκε η έννοια της "Διασταυρωτής Ανθεκτικότητας". Κατ' αυτήν όταν ένα στέλεχος λόγω μεταλλαγής σ' ένα γόνο εμφανίζεται να είναι ανθεκτικό σε κάποιον παρεμποδιστή, τότε ανάλογα με την ευαισθησία αυτού του στελέχους σ' έναν άλλο παρεμποδιστή, διακρίνουμε τις εξής περιπτώσεις (Georgopoulos, 1977):

- αν είναι λιγότερο ευαίσθητο από το άγριο, τότε οι παρεμποδιστές αυτοί συνδέονται θετικά μεταξύ τους από την άποψη της διασταυρωτής ανθεκτικότητας.

- αν είναι περισσότερο ευαίσθητο από το άγριο, τότε οι παρεμποδιστές συνδέονται αρνητικά μεταξύ τους.

- αν η ευαισθησία του είναι παρόμοια μ' αυτή του αγρίου, τότε οι παρεμποδιστές δεν συνδέονται μεταξύ τους από την άποψη της διασταυρωτής ανθεκτικότητας.

2.6.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ

Η μέτρηση του ρυθμού αύξησης έγινε σε υγρό θρεπτικό υλικό CM. Η παραγωγή του αρχικού μολύσματος, ο εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού χωρίς παρεμποδιστή και η επώαση γινόταν όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.5.1.2. Σε τακτά χρονικά διαστήματα δύο φιάλες αποσύρονταν από τον επωαστικό θάλαμο και γινόταν μέτρηση του ξηρού βάρους της καλλιέργειας όπως περιγράφεται παραπάνω. Η καμπύλη του ρυθμού αύξησης προέκυπτε από τους μέσους όρους των ξηρών βαρών κάθε χρονικής στιγμής μέτρησης σε συνάρτηση με τον χρόνο από την έναρξη της καλλιέργειας.

2.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ TRIADIMEFON

Χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε από τους Gasztonyi και Joseponits (Gasztonyi και Joseponits, 1979) με αρκετές τροποποιήσεις. Κατά τη μέθοδο αυτή το triadimefon προστίθεται σε καλά ανεπτυγμένη υγρή καλλιέργεια του μύκητα και ακολουθεί επώαση για αρκετό χρονικό διάστημα έτσι ώστε να παραχθεί ανιχνεύσιμη ποσότητα triadimefol. Η παραλαβή των τοξικών μορίων από τη βιομάζα και το υλικό της καλλιέργειας, γίνεται με εκχύλιση με οργανικό διαλύτη και ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή αεριοχρωματογραφία.

2.7.1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για την παραγωγή του αρχικού μολύσματος, τα στελέχη αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό PDA όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.4 έτσι ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητική παραγωγή κονιδίων. Τα κονίδια παραλαμβάνονταν σε αποστειρωμένο νερό και εμβολιάζονταν 50 ml θρεπτικού υλικού C&S ενισχυμένου με εκχύλιμα ζύμης (1 g l^{-1}) σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml. Το υλικό αυτό επιλέχθηκε γιατί δεν δίνει πολλές ξένες ουσίες κατά την εκχύλισή του με οργανικούς διαλύτες και ταυτόχρονα επιτυγχάνεται ανάπτυξη του μύκητα παρόμοια μ' αυτή στο πλήρες θρεπτικό υλικό. Περίπου $2,5 \times 10^6$ κονίδια χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό του θρεπτικού υλικού σε κάθε φιάλη. Οι καλλιέργειες επωάζονταν σε κλίβανο τύπου Gallenkamp με περιστροφική κίνηση 150 rev min^{-1} και θερμοκρασία 25°C .

Μετά από επώαση 24 ωρών και ενώ η καλλιέργεια βρισκόταν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, γινόταν προσθήκη της επιθυμητής ποσότητας του triadimefon από διάλυμα σε αιθυλική αλκοόλη κατάλληλης συγκέντρωσης έτσι ώστε ο προστιθέμενος όγκος να μην υπερβαίνει το 1% του όγκου της καλλιέργειας. Ίση ποσότητα αλκοόλης προστίθετο και στον μάρτυρα. Χρησιμοποιούνταν 2 φιάλες για κάθε επέμβαση και η επώαση της καλλιέργειας συνεχιζόταν στις ίδιες συνθήκες.

2.7.2. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Μετά την συμπλήρωση του επιθυμητού χρόνου επώασης, γινόταν διαχωρισμός του μυκηλίου από το υλικό της καλλιέργειας με διήθηση μέσω διηθητικού χάρτου Whatman No 4. και πλύσιμο του μυκηλίου με απεσταγμένο νερό έτσι ώστε να ξεπλυθούν και τα ίχνη των παρεμποδιστών που πιθανά βρίσκονταν στο εξωτερικό του μυκηλίου. Μετά το διαχωρισμό του υλικού της καλλιέργειας από το μυκήλιο για την επαναποστείρωσή του, όταν αυτό ήταν αναγκαίο, γινόταν διήθηση μέσω βακτηριακού φίλτρου (Lelectron filter 0,2 μm) με τη βοήθεια σύριγγας Ultra Asept.

Το μυκήλιο ζυγιζόταν και αποθηκευόταν στους -10°C για 24 ώρες. Το σπάσιμο των κυττάρων γινόταν σε ιγδίο πορσελάνης με άμμο και οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 1:2:3 (w:w:v) για 5 λεπτά. Μετά από προσθήκη 15-20 ml οξικού αιθυλεστέρα το παρασκεύασμα και φυγοκέντριση στα 3.000 g για 5 λεπτά σε φυγόκεντρο Hettich Universal II, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η άμμος και τα κομμάτια του μυκηλίου. Το υπερκείμενο καθαριζόταν από τα διάφορα κυτταρικά οργανίδια με διήθηση μέσω διηθητικού χάρτου "Macherey-Nagel+Co" 100 Runfilter, το οποίο πλενόταν με μερικά ml οξικού αιθυλεστέρα. Ο διαλύτης απομακρυνόταν με περιστροφικό εξατμιστή (rotory evaporator) τύπου Haake Buchler στους 40°C υπό κενό αέρος. Η ξηρά ουσία παραλαμβανόταν σε λίγα ml χλωροφορμίου το οποίο στη συνέχεια εξατμιζόταν σε ρεύμα αζώτου. Η αποθήκευση γινόταν στους -28°C .

Στο υλικό που συλλεγόταν μαζί με το νερό από το πλύσιμο του μυκηλίου (περίπου 120 ml), προστίθεντο 20 ml κορεσμένου υδατικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου και ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml χλωροφορμίου σε δύο δόσεις και γινόταν διαχωρισμός των δύο φάσεων με διαχωριστική χοάνη. Η φάση του χλωροφορμίου που παραλαμβανόταν, ογκομετρείτο και ακολουθούσε απομάκρυνση του διαλύτη, παραλαβή και αποθήκευση της ξηράς ουσίας όπως και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του μυκηλίου.

2.7.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε συνδυασμό με βιοδοκιμή (bioassay) και αεριοχρωματογραφία (GLC).

2.7.3.1. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας – Βιοδοκιμή.

Η ανάπτυξη των εκχυλισμάτων έγινε σε πλάκες χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας Kieselgel 60 F254 (Merck) και σαν σύστημα διαλυτών χρησιμοποιήθηκε οξικός αιθυλεστέρας, πετρελαϊκός αιθέρας και μυρμηκικό οξύ σε αναλογίες 60:40:2 κατ' όγκο (Deas et al. 1984a).

Η ανίχνευση των τοξικών μορίων του triadimefon και των διαστερεοϊσομερών του triadimenol έγινε με τη βοήθεια ενός ευαίσθητου στα τριαζολικά στελέχους του μύκητα *Cladosporium cucumerinum* (Homans and Fuchs, 1970). Για την παραγωγή μεγάλου αριθμού κονιδίων του μύκητα, εμβολιάζονταν 5-6 σωλήνες με PDA και επωάζονταν στους 25°C για 7-8 ημέρες. Τα κονίδια παραλαμβάνονταν σε περίπου 25 ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος έτσι ώστε να σχηματίζεται ένα πυκνό αιώρημα. Η περιεκτικότητα του θρεπτικού διαλύματος σε ανόργανα άλατα ανά 100 ml απεσταγμένου νερού ήταν: KH_2PO_4 1 g, Na_2HPO_4 0,43 g, KNO_3 0,57 g, MgSO_4 0,14 g και NaCl 0,14 g. Μετά το σχηματισμό του αιωρήματος των κονιδίων, προστίθετο και 1 g γλυκόζης σαν πηγή άνθρακα.

Οι πλάκες χρωματογραφίας πάνω στις οποίες είχε γίνει η ανάπτυξη των εκχυλισμάτων ψεκάζονταν με αιώρημα κονιδίων του μύκητα *C. cucumerinum* και ακολουθούσε επώαση στους 25°C και σε περιβάλλον κορεσμένο υδρατμών για 3 ημέρες έτσι ώστε να βλαστήσουν τα κονίδια του μύκητα και να εμφανισθούν οι ζώνες μυκητοτοξικότητας.

2.7.3.2. Αεριοχρωματογραφία.

Χρησιμοποιήθηκε αεριοχρωματογράφος τύπου Perkin Elmer Sigma 300 gas chromatograph με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID), συνδεδεμένος με ολοκληρωτή τύπου Perkin Elmer LCI 100 computing integrator και εφοδιασμένος με γυάλινη στήλη 180cmx0,4 cm εσ. δ. 3% OV-225 60/80 σε chromosorb W-HP "Supelco Inc.". Η θερμοκρασία για την στήλη και το σύστημα εισαγωγής του δείγματος ήταν 230°C, ενώ για τον ανιχνευτή 240°C. Σαν φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε άζωτο υψηλής καθαρότητας με ροή 40 ml min⁻¹.

Λίγο πριν την ανάλυση του δείγματος η ξηρά ουσία επαναδιαλυτοποιείται σε 0,5 ml διεθυλ-αιθέρα και όγκος 1 μl εισαγόταν στη στήλη.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του triadimefon και των διαστεροϊσομερών του triadimenol στα εκχυλίσματα, προσδιορίσθηκε η καμπύλη απόκρισης του ανιχνευτή. Χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης αναλυτικής καθαρότητας triadimefon και triadimenol και υπολογίσθηκε η εξίσωση που συνδέει το χρωματογραφικό σήμα του ολοκληρωτή με την ποσότητα των παραπάνω ουσιών στο δείγμα (Pecsok και συνεργάτες, 1980).

2.8. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΛΩΝ

Για την μελέτη των στερολών που συσσωρεύονται μετά από επίδραση με παρεμποδιστές βιοσύνθεσης της εργοστερόλης στο μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική που περιγράφεται από τους Ziogas και συνεργάτες (Ziogas και συνεργάτες, 1991). Η μεθοδολογία αυτή στηρίζεται στην σαπωνοποίηση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα το διαχωρισμό των στερολών (μη σαπωνοποιήσιμων λιπιδίων), παραλαβή τους μετά από εκχύλιση με εξάνιο και ταυτοποίηση με αεριοχρωματογραφία. Έτσι, προσδιορίζεται τόσο η εργοστερόλη που συντίθεται όσο και οι άλλες στερόλες που συσσωρεύονται σε συνάρτηση με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης που επιτυγχάνεται από τις διάφορες συγκεντρώσεις των παρεμποδιστών.

2.8.1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η παραγωγή του αρχικού μολύσματος γινόταν με την ίδια τεχνική όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.6.1. Με το αιώρημα των κονιδίων εμβολιάζονταν 500 ml θρεπτικού υλικού C&S σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 2 l με σκοπό να παραχθεί ικανοποιητική ποσότητα βιομάζας για την εξαγωγή των στερολών. Περίπου 25×10^6 κονίδια προστίθεντο στο θρεπτικό υλικό κάθε φιάλης. Λίγο πριν τον εμβολιασμό, είχε προστεθεί στο υλικό η επιθυμητή ποσότητα του υπό μελέτη παρεμποδιστή από κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματα αιθανόλης έτσι ώστε, ο προστιθέμενος όγκος του διαλύτη να μην ξεπερνά το 1% του όγκου της καλλιέργειας. Ίση ποσότητα αλκοόλης προστίθετο και στον μάρτυρα. Οι καλλιέργειες επωάζονταν σε κλίβανο τύπου Gallenkamp με περιστροφική κίνηση 150 rev min^{-1} και θερμοκρασία 25°C για 24 ώρες.

Για την μέτρηση της παρεμπόδισης, εμβολιάζονταν με περίπου $2,5 \times 10^6$ κονίδια, 50 ml από το ίδιο θρεπτικό υλικό και με τις ίδιες συγκεντρώσεις παρεμποδιστή σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml. Οι καλλιέργειες επωάζονταν όπως παραπάνω και μετά από 24 ώρες υπολογιζόταν η παρεμπόδιση με βάση το ξηρό βάρος της καλλιέργειας όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.5.1.2.

2.8.2. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Μετά την συμπλήρωση του χρόνου επώασης, γινόταν παραλαβή του μυκηλίου με διήθηση μέσω διηθητικού χάρτου Whatman No 4, και πλύσιμο με απεσταγμένο νερό. Ακολουθούσε σαπωνοποίηση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών του μυκηλίου σε γυάλινους σωλήνες που έκλειναν αεροστεγώς με βιδωτό πώμα και περιείχαν 8 ml διαλύματος 16% KOH σε 80% μεθανόλη. Ο υπερκείμενος αέρας αντικαθίστατο με άζωτο και οι σωλήνες επωάζονταν στους 70°C για 1,5 ώρα υπό συνεχή ανατάραξη σε υδατόλουτρο τύπου GFL-Shaking Bath 1083. Στη συνέχεια για καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων προστίθεντο 8 ml απεσταγμένου νερού. Τα μη σαπωνοποιημένα λιπίδια (ελεύθερες στερόλες) εκχυλιζόνταν τρεις φορές με 3x8 ml εξανίου. Ο διαλύτης απομακρυνόταν με περιστροφικό εξατμιστή τύπου Haake Buchler στους 36°C υπό κενό. Η ξηρά ουσία παραλαμβάνονταν σε λίγα ml εξανίου το οποίο εξατμιζόταν σε ροή αζώτου. Οι στερόλες διατηρούνταν στους -28°C, στο σκοτάδι και σε ατμόσφαιρα αζώτου μέχρι την αεριοχρωματογραφική ανάλυσή τους.

2.8.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Χρησιμοποιήθηκε αεριοχρωματογράφος τύπου Varian 3300 Gas chromatograph με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) συνδεδεμένος με ολοκληρωτή Varian CDS 401 και εφοδιασμένος με τριχοειδή (capillary) στήλη DB-5 30 m x 0,32 mm εσ. δ. Η θερμοκρασία της στήλης από 210°C κατά την στιγμή εισαγωγής του δείγματος αυξάνε μέχρι τους 300°C με ρυθμό 15°C min⁻¹. Η θερμοκρασία εισόδου του δείγματος ήταν 240°C ενώ εκείνη του ανιχνευτή 320°C. Σαν φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο υψηλής καθαρότητας με ροή 25 ml min⁻¹.

Λίγο πριν την ανάλυση του δείγματος, η ξηρά ουσία διαλυτοποιείτο με τη βοήθεια συσκευής υπερήχων τύπου Bronson 5200 σε 200 μl εξανίου. Στο δείγμα προστίθεντο και 50 μl διαλύματος χοληστερόλης συγκέντρωσης 1000 μg ml⁻¹. Η χοληστερόλη χρησίμευε σαν εσωτερικό standard για τον προσδιορισμό των υπολοίπων στερολών.

2.8.4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΛΩΝ

Η ταυτοποίηση των στερολών έγινε με τη βοήθεια του σχετικού χρόνου ανάκτησης (Relative Retention Time, RRT) κάθε στερόλης ως προς τον

αντίστοιχο της χοληστερόλης (RRT_{cho1}) που καθοριζόταν σαν ίσος με 1,00. Η τιμή αυτή είναι σταθερή και χαρακτηριστική για κάθε στερόλη σε συγκεκριμένες συνθήκες. Η αναγνώριση των στερολών έγινε με βάση τους αντίστοιχους RRT_{cho1} στερολών που χρησιμοποιήθηκαν ως standards ή με αυτούς προηγούμενης ταυτοποίησης στερολών που παράγονται από τον *N. haematococca* var. *cucurbitae* μετά από παρόμοιες επεμβάσεις και συνθήκες ανάλυσης με συνδυασμό αεριοχρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζης (Ziogas και συνεργάτες, 1991).

2.9. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ P-450

Η μελέτη του κυτοχρώματος P-450 έγινε με υποκυτταρικά παρασκευάσματα μιτοχονδρίων και μικροσωμάτων και τη χρήση μεθόδων ηλεκτροφόρησης (electrophoresis, SDS-PAGE) και ισοηλεκτρικής εστίασης (isoelectric focusing, IEF) σε πηγάματα (gels) πολυακρυλαμιδίου. Η πρώτη μέθοδος στηρίζεται στο σχηματισμό αρνητικά φορτισμένων συμπλόκων των πρωτεϊνικών μορίων με το SDS και την κλασμάτωσή τους σε πηγάματα, με βάση το μοριακό βάρος, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ισοηλεκτρική εστίαση αφορά την δημιουργία πηγάματος με διαβάθμιση ως προς το pH και την κλασμάτωση των πρωτεϊνικών μορίων με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο και ανεξάρτητα από το μοριακό τους βάρος.

2.9.1. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Οι συνθήκες καλλιέργειας των στελεχών ήταν παρόμοιες μ' αυτές που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2.6.1, με τη διαφορά ότι για κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 3 φιάλες των 2 l με 500 ml θρεπτικό υλικό C&S και για τον εμβολιασμό κάθε φιάλης χρησιμοποιήθηκαν 5×10^7 κονίδια. Στην περίπτωση της επίδρασης με triadimefon η προσθήκη γινόταν με την έναρξη της καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες επωάζονταν για 48 ώρες και ακολουθούσε παραλαβή του μυκηλίου με διήθηση, πλύσιμο τρεις φορές με κρύο (8°C) ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,05 M pH 7,4, σουκρόζη 0,05 M και αποθήκευση στους -10°C για 24 ώρες.

Το σπάσιμο των κυττάρων γινόταν με ομογενοποιητή Sorvall για 2 λεπτά με άμμο και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,01 M pH 6,8, EDTA 1 mM, σουκρόζη 1 mM, γλυκερόλη 20% (v:v) σε αναλογία 1:2:3 (w:w:v). Ακολουθούσε φυγοκέντριση δύο φορές στα 1.000 g για 10 λεπτά σε φυγόκεντρο τύπου Sorvall RC-5B έτσι ώστε να απομακρυνθεί η άμμος και τα κομμάτια του μυκηλίου. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείτο στα 10.000 g για 10 λεπτά, γινόταν παραλαβή του ιζήματος και του υπερκείμενου. Για την παραλαβή του μιτοχονδριακού κλάσματος γινόταν πλύσιμο του ιζήματος με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και επαναφυγοκέντριση στα 10.000 g για 10 λεπτά.

Η παραλαβή του μικροσωματικού κλάσματος γινόταν από το υπερκείμενο, μετά την παραλαβή του μιτοχονδριακού κλάσματος με φυγοκέντριση στα 40.000 g για 1 ώρα, πλύσιμο με τον ίδιο τρόπο, επαναφυγοκέντριση και παραλαβή του ιζήματος. Όλη η διαδικασία παραλαβής των υποκυτταρικών παρασκευασμάτων γινόταν στους 4°C και η αποθήκευσή τους στους -28°C.

2.9.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Για την απελευθέρωση των ενζύμων από τις κυτταρικές μεμβράνες των μικροσωμάτων γινόταν επίδραση με χολικό νάτριο. Μέρος του μικροσωματικού κλάσματος επαναιωρείτο σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, γλυκερόλη 20% (v:v), χολικό νάτριο 1% (v:v) και παρέμενε για 60 λεπτά στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθούσε φυγοκέντριση στα 40.000 g για 1 ώρα στην περίπτωση του μικροσωματικού κλάσματος ή στα 10.000 g για 10 λεπτά στην περίπτωση του μιτοχονδριακού και παραλαμβάνονταν το υπερκείμενο διάλυμα πρωτεϊνών.

Η μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης γινόταν με τη μέθοδο Bearden (Bearden, 1978). Κατ' αυτήν 2 μl του άγνωστης συγκέντρωσης διαλύματος πρωτεΐνης προστίθεντο σε 1,5 ml απεσταγμένο νερό. Ακολουθούσε προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος κουμάσσης G250 0,025% (w:v) σε φωσφορικό οξύ 20%, ισχυρή ανατάραξη για 1 λεπτό και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 595 nm με φωτόμετρο τύπου Spectronic 20 (Bausch and Lomb). Η εκτίμηση της ολικής πρωτεΐνης γινόταν με αναγωγή από καμπύλη απορρόφησης γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης.

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήγματα πολυακρυλαμιδίου διαστάσεων 8x8x0,4 cm με συσκευή τύπου Uniscil και χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι Laemmli (Laemmli, 1970) και Fairbanks (Fairbanks και συνεργάτες, 1971) με αρκετές τροποποιήσεις.

2.9.2.1. Μέθοδος Laemmli.

Το πήγμα αποτελείτο από δύο τμήματα: το τμήμα σώρευσης (stacking gel) που είχε σύσταση Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, ακρυλαμίδιο 3,9%, δισ-ακρυλαμίδιο 0,1%, SDS 0,1%, και το τμήμα ανάλυσης μήκους 5,5 cm με σύσταση Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, ακρυλαμίδιο 7,3%, δισ-ακρυλαμίδιο 0,2%, SDS 0,1%. 0

πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου γινόταν χημικά με την προσθήκη 1 ml διαλύματος APS 1,5% (w:v) και 50 μl TEMED για 30 ml όγκου πήγματος σώρευσης ή 80 ml πήγματος ανάλυσης.

Στο διάλυμα των πρωτεϊνών των μικροσωμάτων, λίγο πριν την τοποθέτησή του στο πήγμα προστίθετο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer) του οποίου η σύσταση ήταν Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, γλυκερόλη 20% (v:v), SDS 2% (w:v), βρωμοφαινόλη 0,017% (w:v) σε αναλογία 1:1,5 (Waters και Nix, 1988). Το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (electrophoresis tank buffer) είχε σύσταση Tris 0,3% (w:v), γλυσίνη 1,5% (w:v) και SDS 0,1% (w:v). Η ηλεκτροφόρηση γίνονταν στο σκοτάδι και σε χαμηλή θερμοκρασία με τάση 20 V για 18 περίπου ώρες.

Για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών των δειγμάτων, σε κάθε πήγμα γινόταν ταυτόχρονα και η ανάπτυξη μίγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Το μίγμα περιείχε τις πρωτεΐνες καρβονική ανυδράση, οβαλβουμίνη, αλβουμίνη, φωσφορμλάση Β, β-γαλακτοσιδάση και μυοσίνη με μοριακό βάρος 29, 45, 66, 97,4, 116 και 205 kD αντίστοιχα.

2.9.2.2. Μέθοδος Fairbanks.

Το πήγμα είχε σύσταση Tris-οξικό 0,04 M pH 7,4, ακρυλαμίδιο 5,4% (w:v), δις-ακρυλαμίδιο 0,2 (w:v), οξικό νάτριο 20 mM, EDTA 2 mM, SDS 0,1% (w:v). Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου γινόταν χημικά με την προσθήκη 2 ml APS 1,5% (w:v) και TEMED 50 μl για όγκο πήγματος 80 ml. Το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης είχε σύσταση Tris-οξικό 0,04 pH 7,4, οξικό νάτριο 20 mM, EDTA 2 mM, SDS 0,1% (w:v). Το ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος και οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν ίδιες όπως και στη μέθοδο Laemmli. Χρησιμοποιήθηκε και εδώ το ίδιο μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.

2.9.2.3. Χρώση του πήγματος.

Μετά την ανάπτυξη των δειγμάτων, για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στο πήγμα, χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές χρώσης: μία γενική για τις ολικές πρωτεΐνες του δείγματος (Chrambach και συνεργάτες, 1967) και μία εξειδικευμένη για την ανίχνευση των αιμοπρωτεϊνών (Thomas και συνεργάτες, 1976) με κάποιες τροποποιήσεις.

Κατά τη χρώση ολικής πρωτεΐνης το πήγμα εμβαπτίζεται σε 50 ml διαλύματος τριχλωροξικού οξέος 10% (w:v) σε μεθανόλη 35% (v:v) για 1 ώρα με ανακίνηση σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ακολουθούσε ξέπλυμα σε απεσταγμένο νερό, εμβάπτιση σε 50 ml διαλύματος αιθανόλης 25% (v:v) που περιείχε οξικό οξύ 8% (v:v) για 30 λεπτά και χρώση σε διάλυμα κουμάσσης R250 0,25% (w:v) σε αιθανόλη 25% (v:v) και οξικό οξύ 8% (v:v) για περίπου 18 ώρες. Η εμφάνιση των ζωνών πρωτεΐνης (bands) γινόταν μετά από 6-7 διαδοχικά ξεπλύματα του πηγματος με διάλυμα αιθανόλης 25% (v:v) που περιείχε οξικό οξύ 8% (v:v) για περίπου 24 ώρες.

Η τεχνική χρώσης των αιμοπρωτεϊνών στηρίζεται στην ιδιότητά τους να καταλύουν αντιδράσεις υπεροξειδώσεως ενώσεων όπως η 3,3,5,5-τετραμεθυλ-βενζιδίνη σχηματίζοντας έγχρωμα παράγωγα (Smith και συνεργάτες, 1985). Το πήγμα εμβαπτίζεται σε 50 ml διαλύματος οξικού νατρίου 0,25 M pH 5,0 σε μεθανόλη 30% (v:v) που περιείχε 3,3,5,5-τετραμεθυλ-βενζιδίνη 6,3 mM και παρέμενε στο σκοτάδι για 1,5 ώρα με ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ακολουθούσε προσθήκη 0,2 ml H₂O₂ και μετά από 30 λεπτά το πήγμα ξεπλενόταν 2-3 φορές σε διάλυμα οξικού νατρίου 0,25 M pH 5,0 σε ισοπροπυλική αλκοόλη 30% (v:v).

Για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους των αιμοπρωτεϊνών, το τμήμα του πηγματος στο οποίο είχε γίνει η ανάπτυξη του μίγματος των πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος κοβόταν και χρωματιζέτο με την τεχνική για τις ολικές πρωτεΐνες. Επειδή οι τεχνικές χρώσης προκαλούν διαφορετική επιμήκυνση του πηγματος, ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους γινόταν με βάση το R_f κάθε αιμοπρωτεΐνης συγκριτικά με τα αντίστοιχα R_f των πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που αναπτύχθηκαν στο ίδιο πήγμα.

Η εκτίμηση της ποσότητας των πρωτεϊνών μετά την χρώση τους στηρίχθηκε στη μέτρηση της έντασης χρωματισμού με συσκευή σάρωσης πηγμάτων, τύπου Helena France Jr. plus.

2.9.3. ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα ισοηλεκτρικής εστίασης τύπου Hoefer Scientific Instrument, Model PS 500XT με λουτρό τύπου Mighty Small II SE 250. Το πήγμα είχε διαστάσεις 7x8x0,15 cm και σύσταση: ακρυλαμίδιο 5,35% (w:v), δι-ακρυλαμίδιο 0,15% (w:v), αμφολίτες (pH 3-10) 2,87% (v:v), γλουταμικό

οξύ 3 mM. Ο πολυμερισμός γινόταν χημικά με 1 ml APS 1% και TEMED 30 μl για όγκο πηγματος 30 ml. Το ρυθμιστικό διάλυμα για την άνοδο ήταν οξικό οξύ 20 mM και για την κάθοδο καυστικό νάτριο 15 mM. Η ηλεκτρική ισχύς που εφαρμόστηκε ήταν κατά μέσο όρο 1,2 W για 2,5 ώρες.

Η χρώση του πηγματος για την ανίχνευση των αιμοπρωτεϊνών έγινε όπως και στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης. Για τον υπολογισμό του ισοηλεκτρικού σημείου των αιμοπρωτεϊνών, μέρος του πηγματος τεμαχιζόταν οριζόντια ανά 0,5 cm. Κάθε τμήμα τοποθετείτο σε 5 ml απεσταγμένο νερό για 24 ώρες υπό συνεχή ανάδευση έτσι ώστε να απελευθερωθούν οι αμφολίτες και ακολουθούσε μέτρηση του pH του διαλύματος με πεχάμετρο τύπου Corning Model 5 και κατασκευή της καμπύλης κλασμάτωσης του pH στο πήγμα σε σχέση με την απόσταση από το σημείο εκκίνησης του δείγματος (Zervakis και Labarere, 1992).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

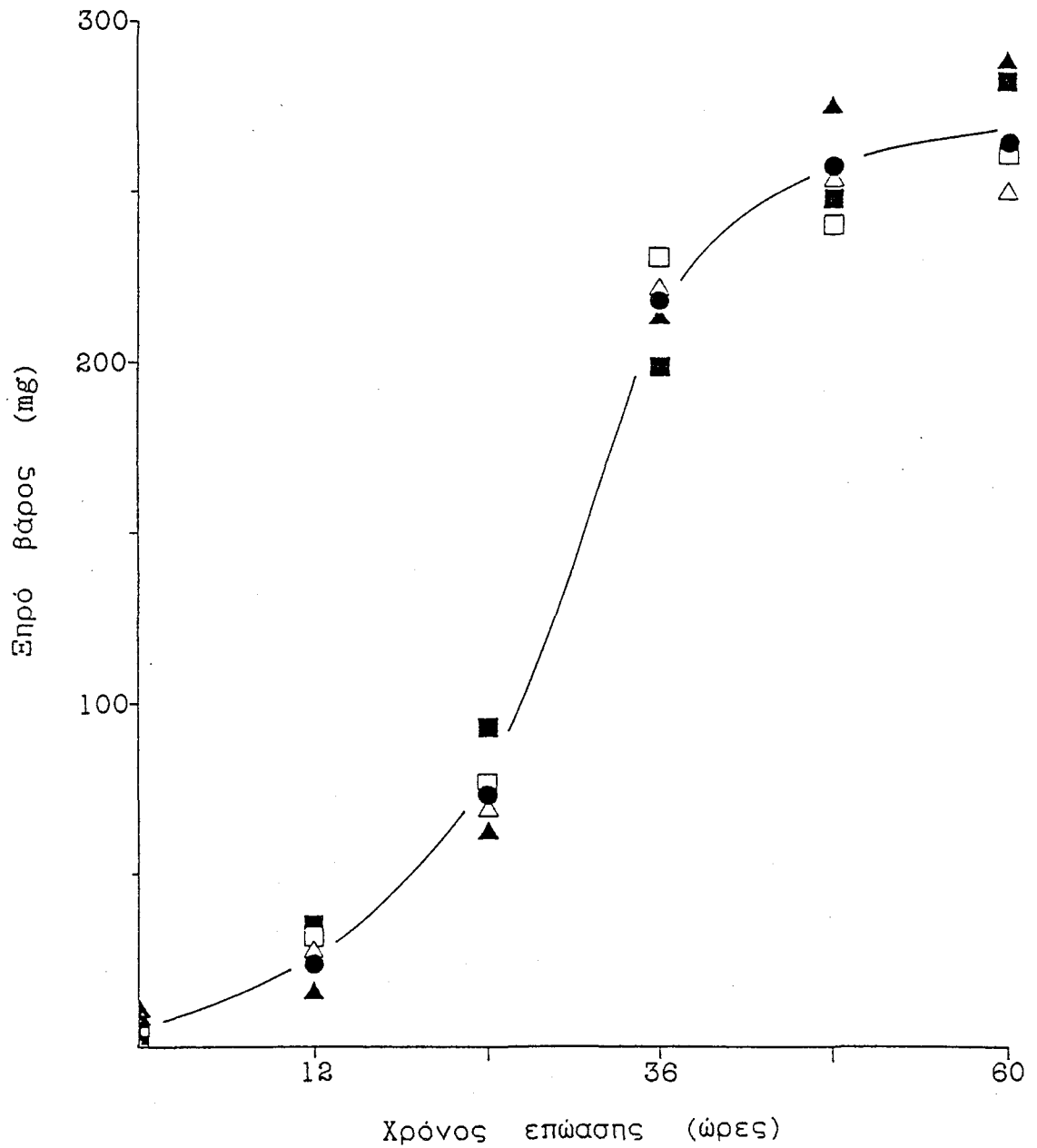
3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΟΥ *tri-1* ΣΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *N. HAEMATOCOCCA* VAR. *CUCURBITAE* ΣΤΟΥΣ ΕΒΙ'S

Μελετήθηκε η επίδραση του χρωματοσωματικού γόνου *tri-1* (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989) στο ρυθμό αύξησης των ανθεκτικών στελεχών και την ευαισθησία τους σε αντιπροσώπους των διαφόρων ομάδων των ΕΒΙ's. Σκοπός ήταν να επιβεβαιωθεί αλλά και να διερευνηθεί καλύτερα η υψηλή προσαρμοστικότητα και ανθεκτικότητα στο triadimenol των *tri-1* στελεχών και επιπλέον η ύπαρξη ή όχι συσχέτισης από την άποψη της διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ του triadimenol και αντιπροσώπων άλλων ομάδων των παρεμποδιστών της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης. Για τη μελέτη του ρυθμού αύξησης και τη μέτρηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2.5.

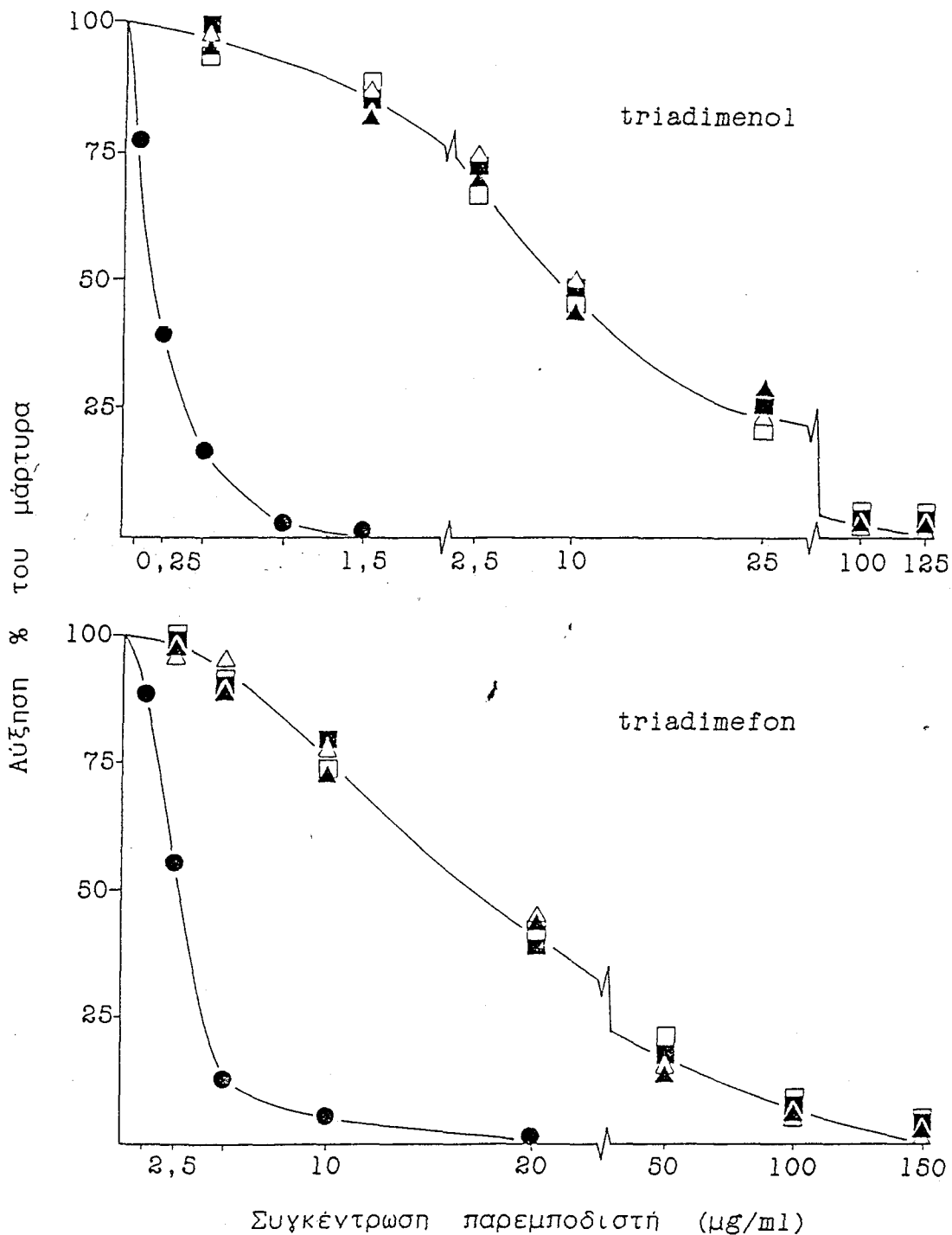
3.1.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΥΚΗΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ TRIADIMENOL ΣΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΤΑ *tri-1* ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα αποτελέσματα της μελέτης του ρυθμού αύξησης με βάση το ξηρό βάρος της καλλιέργειας του αγρίου και των *tri-1* στελεχών δίνονται στο Σχήμα 22. Όλα τα στελέχη ακολουθούν τον ίδιο ρυθμό ανάπτυξης με το άγριο και κατά συνέπεια επιβεβαιώνεται το δεδομένο ότι η παρουσία του γόνου *tri-1* δεν επηρεάζει, σε εργαστηριακές συνθήκες, την προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989). Οι καλλιέργειες όλων των στελεχών βρίσκονται στο μέσο της εκθετικής φάσης 30 περίπου ώρες μετά την έναρξη της επώασης και στο μέγιστο της ανάπτυξης 18 ώρες αργότερα.

Η ευαισθησία του αγρίου και των *tri-1* στελεχών στο triadimenol δίνονται στο Σχήμα 23. Παρατηρούμε ότι τα τέσσερα διαφορετικά *tri-1* στελέχη δε διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ευαισθησία στο triadimenol. Ο παράγοντας ανθεκτικότητας με βάση την ED₅₀ και την MIC, υπολογίστηκε να είναι 55,6 και 83,3 αντίστοιχα, κάτι που επιβεβαιώνει τον υψηλό βαθμό ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών που είχε διαπιστωθεί από προηγούμενη εργασία (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989).



Σχήμα 22. Ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (△) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε υγρό θρεπτικό υλικό CM στους 25°C χωρίς παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων.



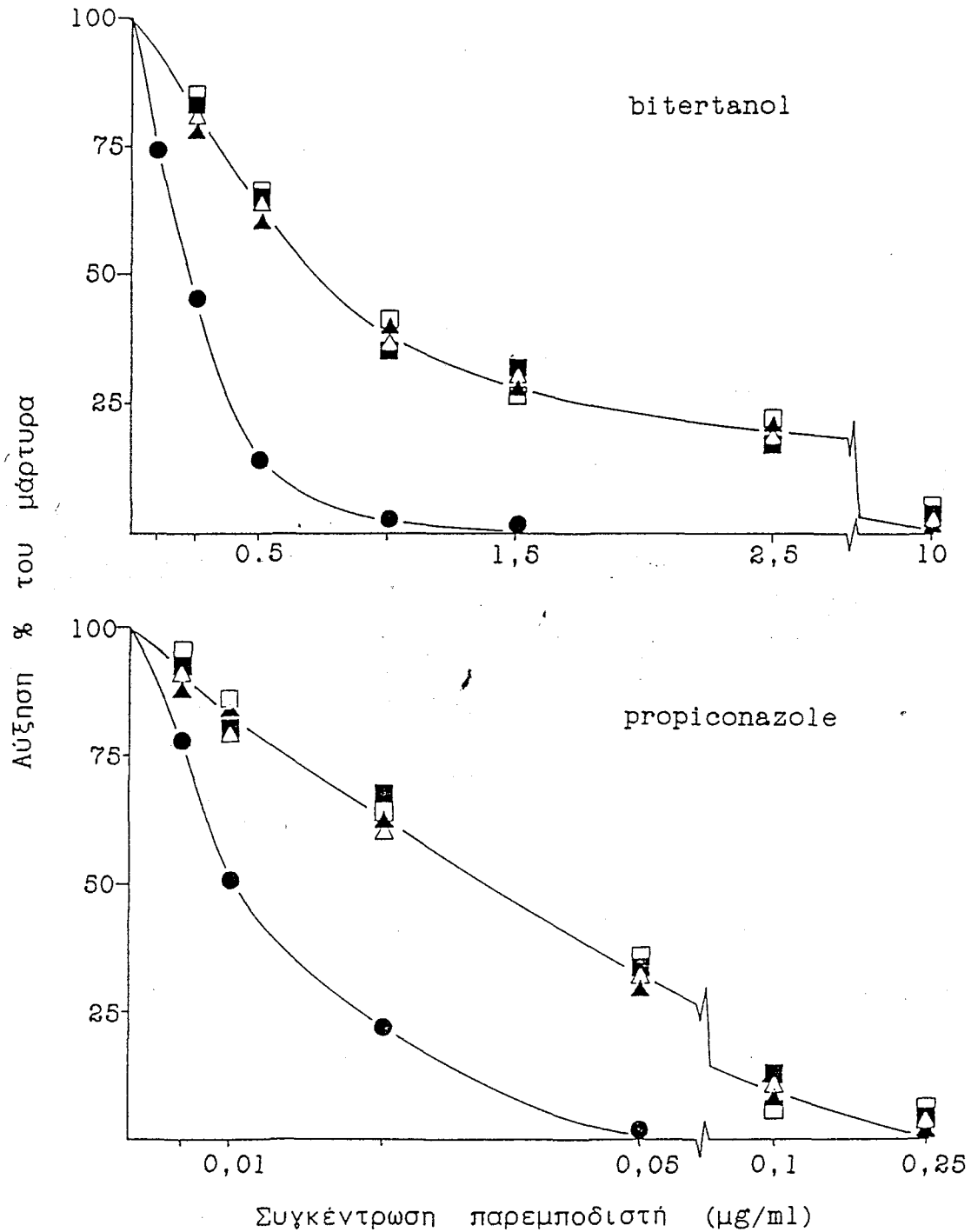
Σχήμα 23. Επίδραση των τριαζολικών μυκητοκτόνων triadimenol και triadimefon στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (△) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25°C παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

3.1.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΥΚΗΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΩΝ ΤΩΝ EBI's ΣΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΤΑ *tri-1* ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

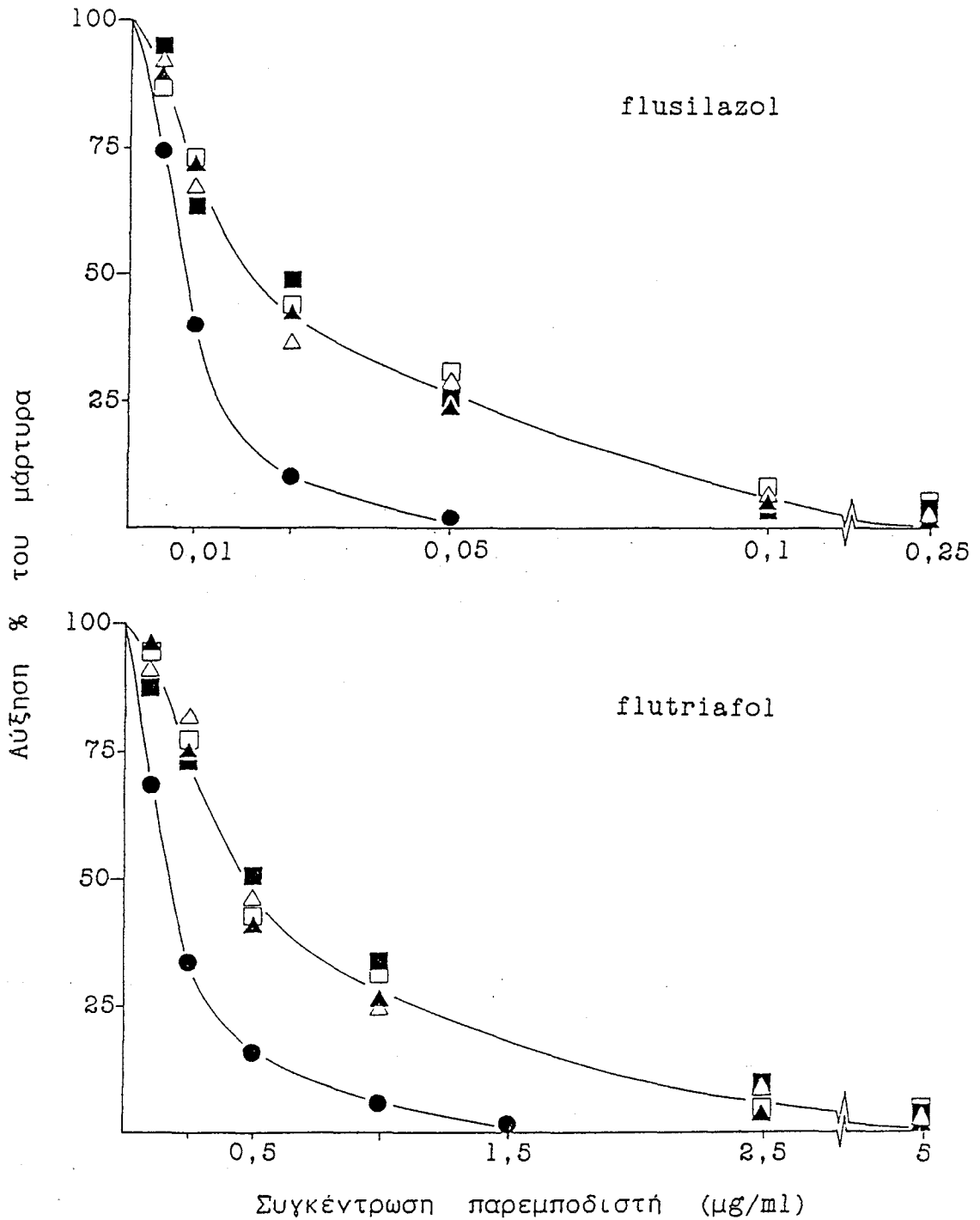
Μετά την επιβεβαίωση της υψηλής ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών στο triadimenol, ελέγχθηκε η ευαισθησία τους σε άλλα τριαζολικά και σε αντιπροσώπους άλλων ομάδων των EBI's. Από την ομάδα των τριαζολικών, στην οποία ανήκει και το triadimenol, μελετήθηκαν τα triadimefon, bitertanol, propiconazole, flusilazol και flutriafol. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα που δίνονται στα Σχήματα 23, 24, και 25, τα *tri-1* στελέχη εμφανίζονται λιγότερο ευαίσθητα από το άγριο στα μυκητοκτόνα αυτά αλλά το επίπεδο ανθεκτικότητας είναι σημαντικά χαμηλότερο απ' ό τι στην περίπτωση του triadimenol. Ο παράγοντας ανθεκτικότητας με βάση την ED₅₀, κυμαίνεται μεταξύ 2,2 και 6.

Από την ομάδα των ιμιδαζολικών μελετήθηκαν τα triflumizole, clotrimazole, ketoconazole και imazalil και τα αποτελέσματα δίνονται στα Σχήματα 26 και 27. Σ' αυτή την ομάδα, με εξαίρεση το imazalil και σε αντίθεση με ό τι συμβαίνει στα τριαζολικά, η παρουσία του γόνου *tri-1* φαίνεται να αυξάνει αντί να μειώνει την ευαισθησία των στελεχών (αρνητική συσχέτιση).

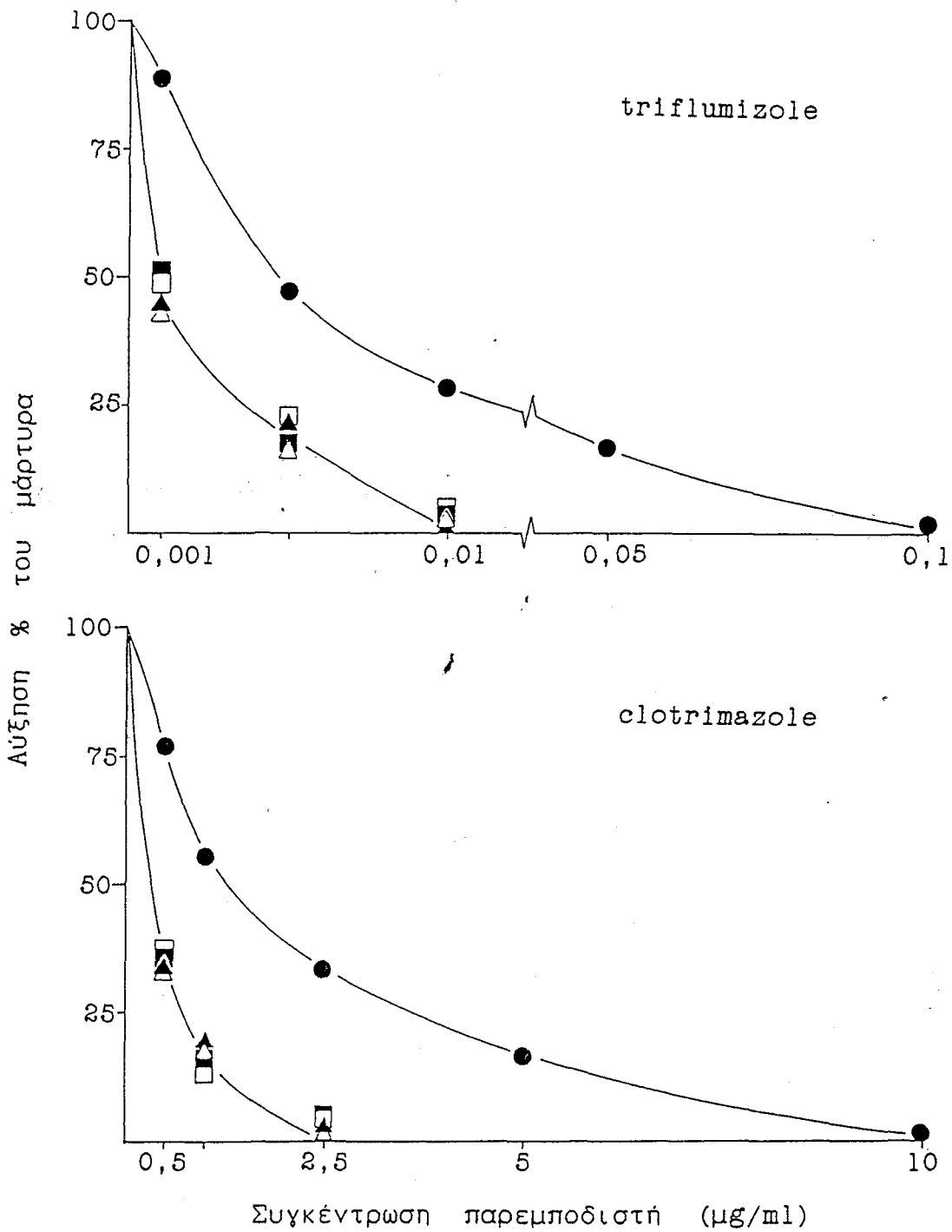
Από τις άλλες ομάδες μελετήθηκαν το πιπεραζινικό triforine, το πυριμιδινικό fenarimol, τα μορφολινικά fenpropimorph και tridemorph και η αλλυλαμίνη terbinafine. Από τα αποτελέσματα που δίνονται στα Σχήματα 28, 29 και 30, προκύπτει ότι ο γόνος *tri-1* δεν επηρεάζει την ευαισθησία σε μυκητοκτόνα αυτών των ομάδων.



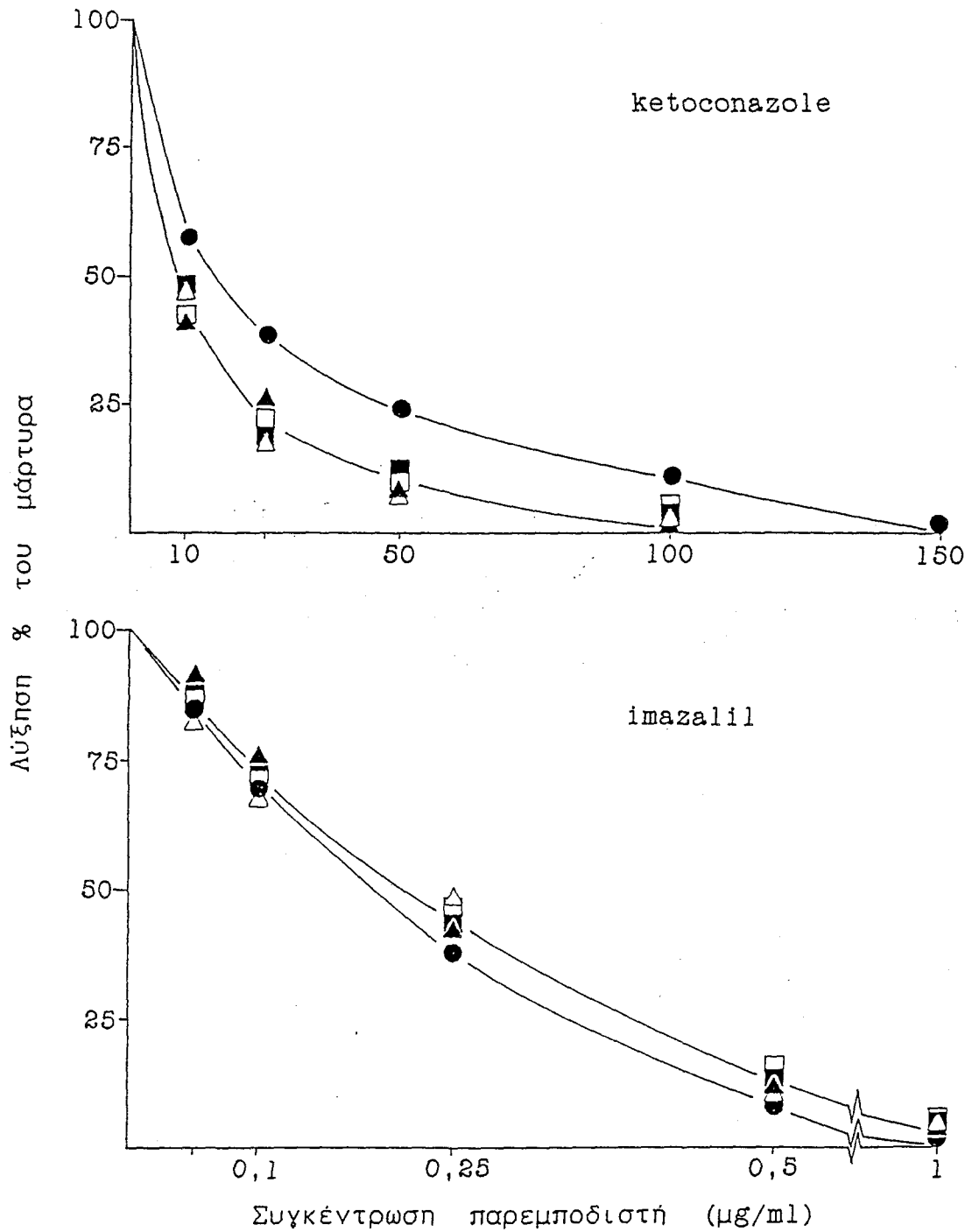
Σχήμα 24. Επίδραση των τριαζολικών μυκητοκτόνων bitertanol και propiconazole στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (△) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25°C παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



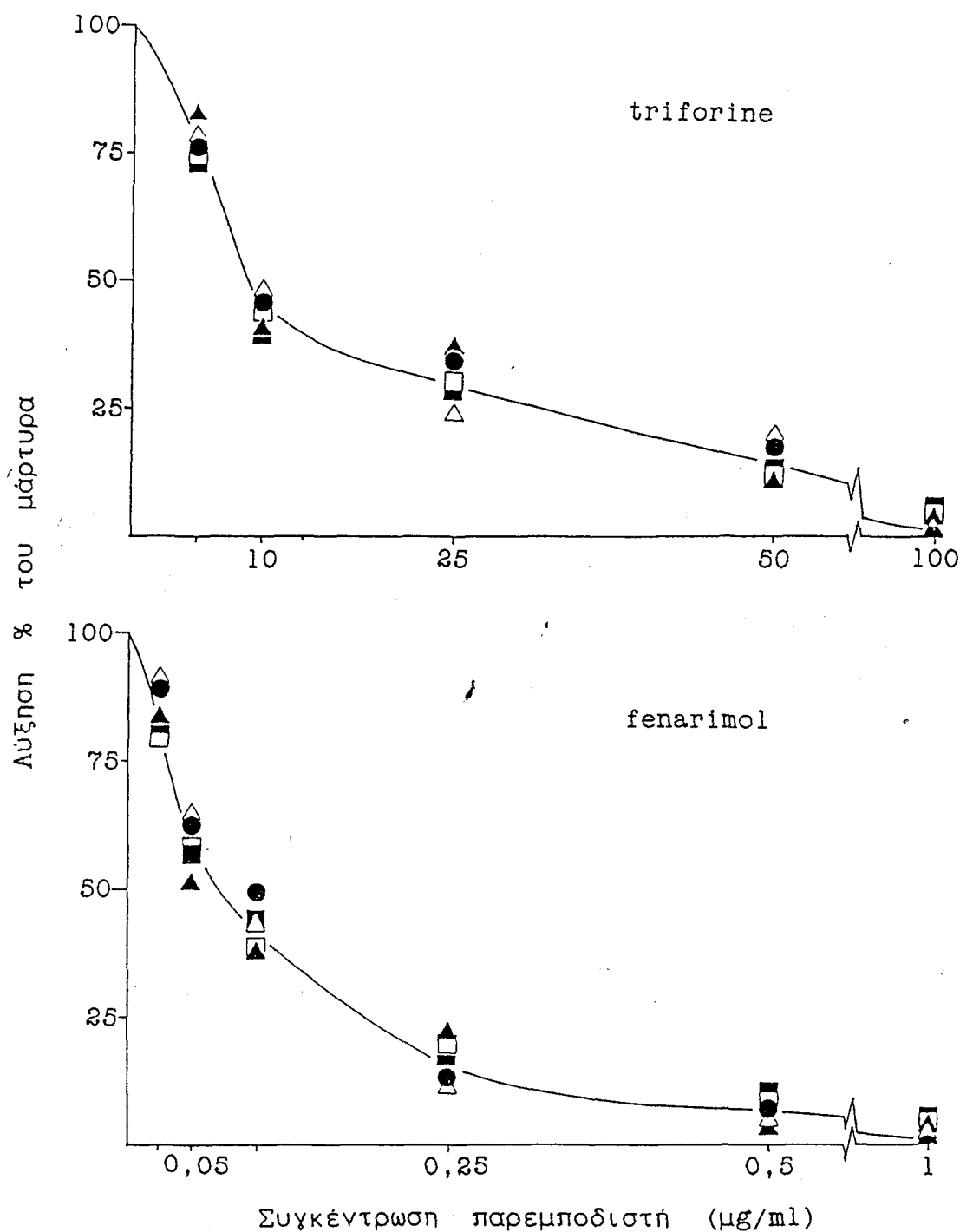
Σχήμα 25. Επίδραση των τριαζολικών μυκητοκτόνων flusilazol και flutriafol στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (△) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25°C παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



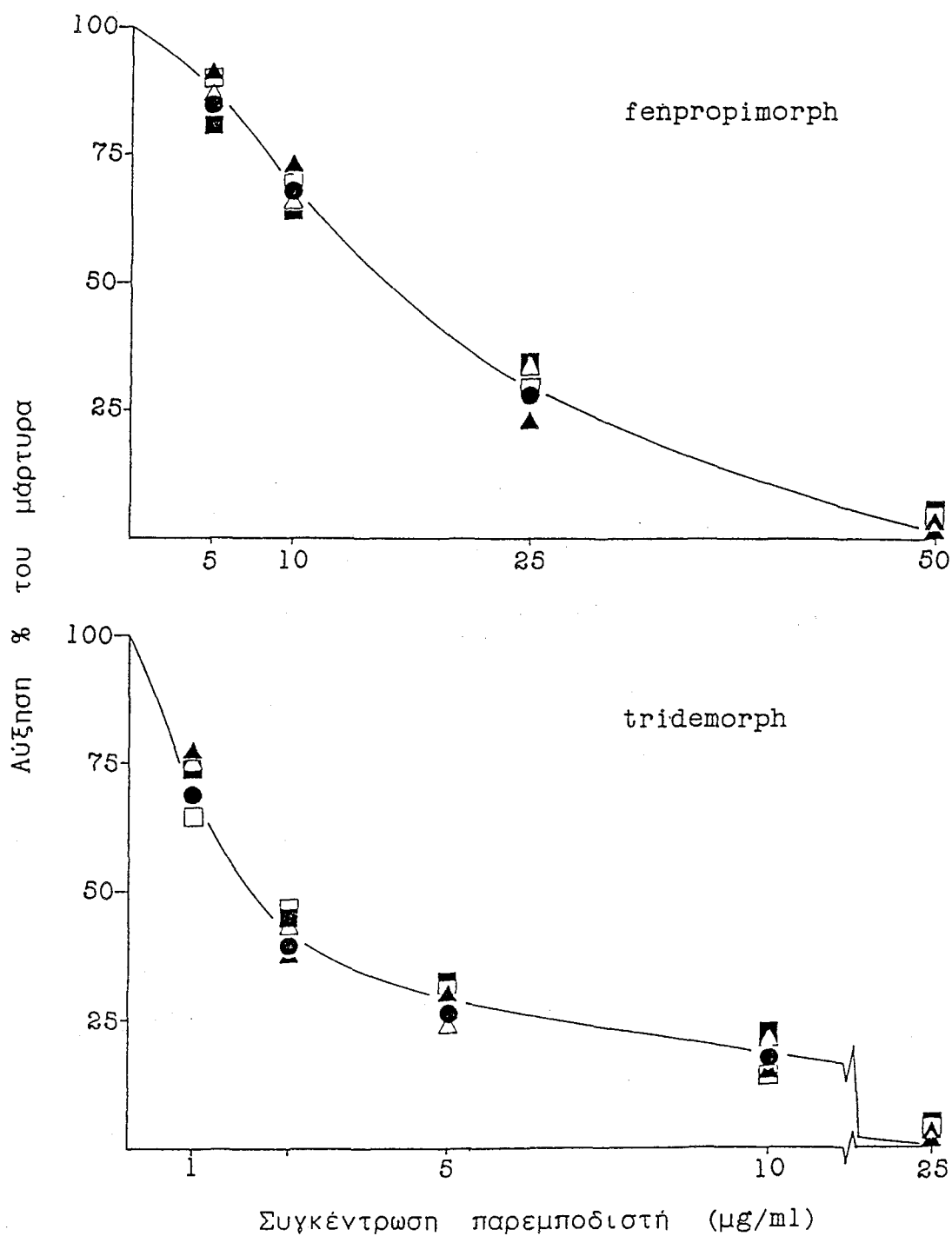
Σχήμα 26. Επίδραση των ιμιδαζολικών μυκητοκτόνων triflumizole και clotrimazole στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (△) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25°C παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



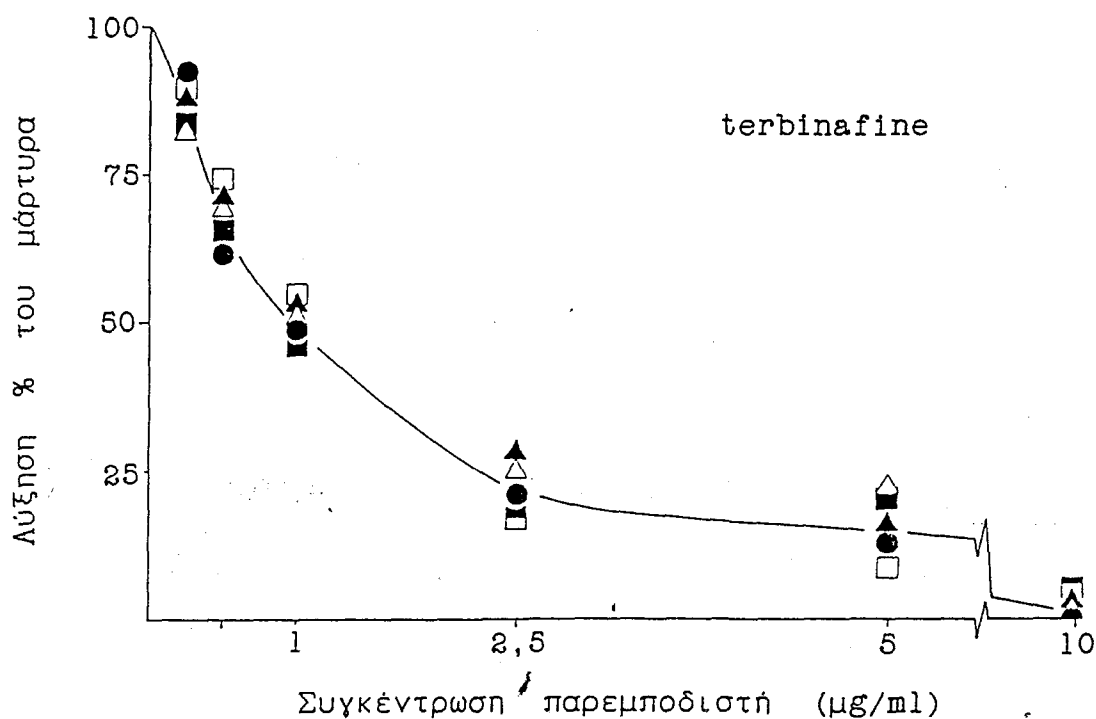
Σχήμα 27. Επίδραση των ιμιδαζολικών μυκητοκτόνων ketoconazole και imazalil στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (△) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25°C παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



Σχήμα 28. Επίδραση του πιπεραζινικού μυκητοκτόνου triforine και του πυριμιδινικού μυκητοκτόνου fenarimol στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (△) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25°C παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



Σχήμα 29. Επίδραση των μορφολινικών μυκητοκτόνων fenpropimorph και tridemorph στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (Δ) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25°C παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



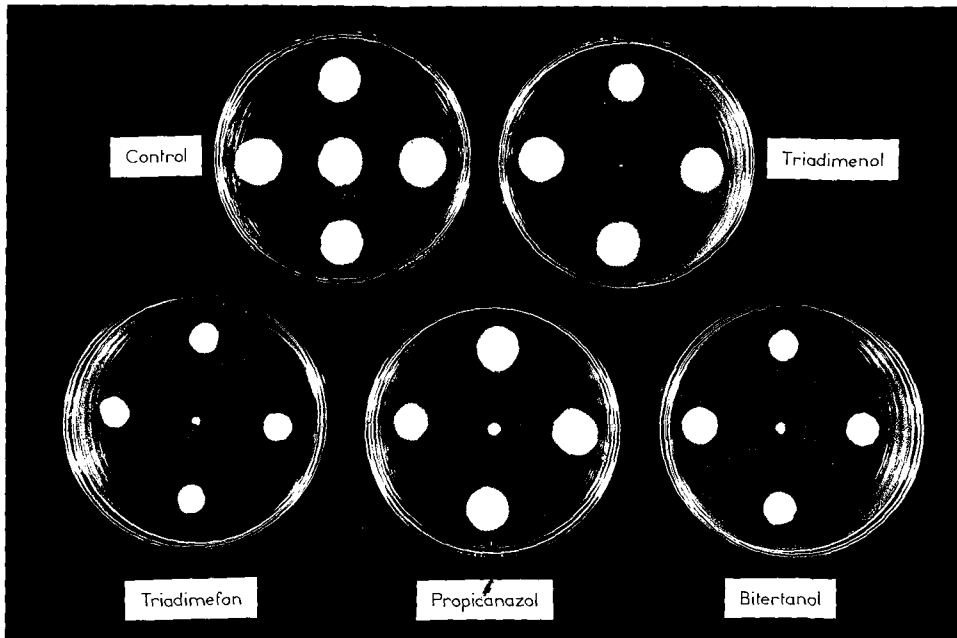
Σχήμα 30. Επίδραση της αλλυλαμίνης terbinafine στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (Δ) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25°C παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

3.1.3. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΤΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της ευαισθησίας του αγρίου και των *tri-1* στελεχών στους διάφορους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης. Παρατηρούμε ότι για όλους τους παρεμποδιστές που μελετήθηκαν, η τιμή της MIC είναι πολλαπλάσια αυτής της ED_{50} τόσο στο άγριο όσο και στα ανθεκτικά στελέχη. Στα *tri-1* στελέχη οι διαφορές αυτές είναι συνήθως μεγαλύτερες. Φαίνεται δηλαδή ότι η ανάπτυξη δεν ακολουθεί μια αναλογική μείωση καθώς αυξάνει η συγκέντρωση του παρεμποδιστή, αλλά εκφράζεται από μια τυπική σιγμοειδή καμπύλη.

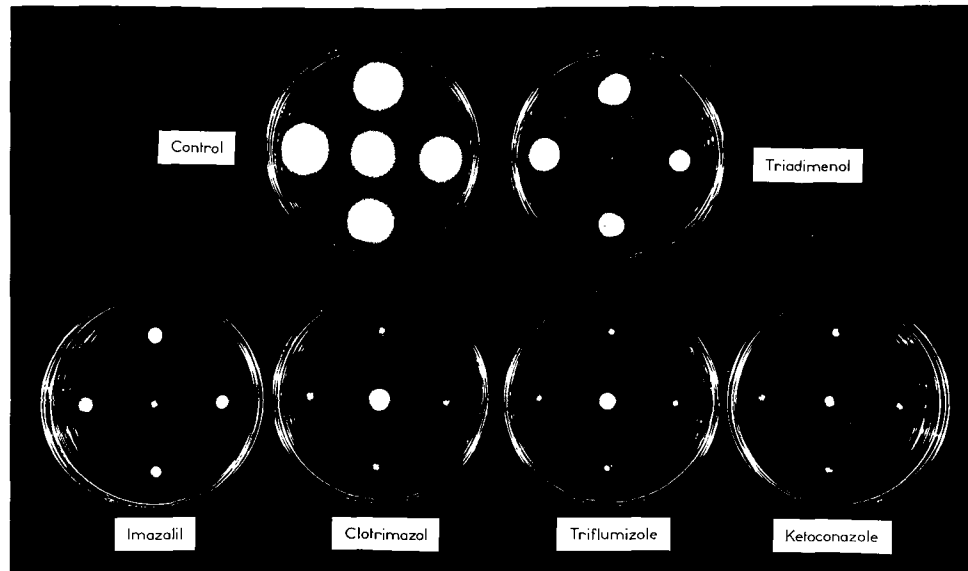
Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις παρεμποδιστών σε $\mu\text{g ml}^{-1}$ με τις οποίες επιτυγχάνεται το 50% (ED₅₀) και το 100% (MIC) της παρεμπόδισης στο άγριο και τα *tri-1* ανθεκτικά στο triadimenol στελέχη του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*.

Παρεμποδιστής	Άγριο Στέλεχος		<i>tri-1</i> Στελέχη		Παράγ. Ανθεκτ. με βάση	
	ED ₅₀	MIC	ED ₅₀	MIC	ED ₅₀	MIC
Τριαζολικά						
triadimenol	0,18	1,5	10	125	55,6	83,3
triadimefon	3,1	20	18,5	150	6	7,5
bitertanol	0,2	1,5	0,7	10	3,5	6,7
propiconazole	0,01	0,05	0,034	0,25	3,4	5
flusilazol	0,0085	0,05	0,019	0,25	2,2	5
flutriafol	0,17	1,5	0,46	5	2,7	3,3
Ιμιδαζολικά						
triflumizole	0,0046	0,1	0,001	0,01	0,22	0,1
clotrimazole	1,28	10	0,32	2,5	0,25	0,25
ketoconazole	15	150	8,4	100	0,56	0,67
imazalil	0,19	1	0,2	1	1,05	1
Πιπεραζινικά						
triforine	9	100	9	100	1	1
Πυριμιδινικά						
fenarimol	0,07	1	0,07	1	1	1
Μορφολινικά						
fenpropimorph	15,8	50	15,8	50	1	1
tridemorph	1,9	25	1,9	25	1	1
Αλλυλαμίνες						
terbinafine	1	10	1	10	1	1



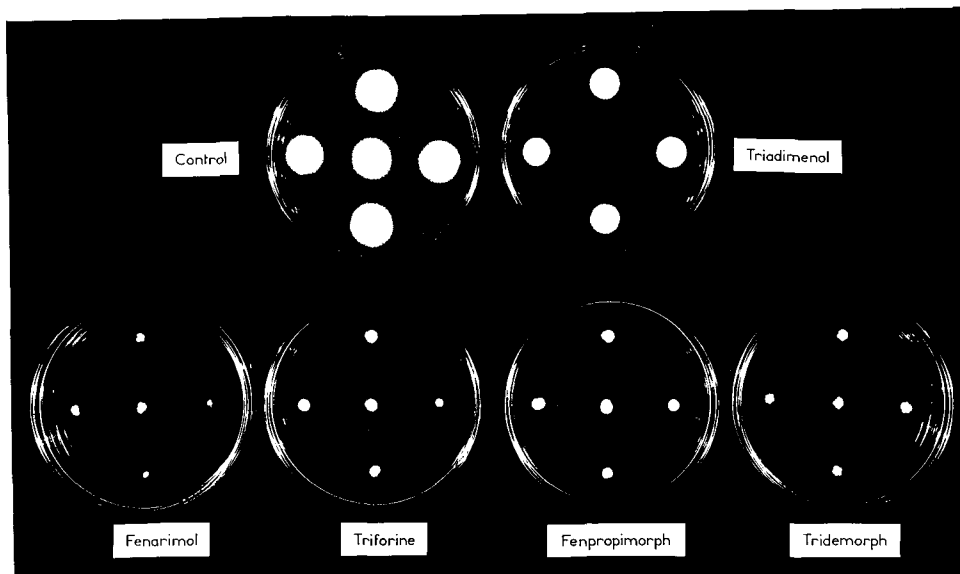
Εικόνα 1. Θετική συσχέτιση μεταξύ τεσσάρων αντιπροσώπων των τριαζολικών μυκητοκτόνων από την άποψη της επίδρασης του γόνου *tri-1* στην ευαισθησία του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*. Το άγριο (στο κέντρο του τρυβλίου) συγκρίνεται με τα τέσσερα *tri-1* ανθεκτικά στο triadimenol (στην περιφέρεια του τρυβλίου) στελέχη. Συγκεντρώσεις παρεμποδιστών (σε $\mu\text{g/ml}$): triadimenol 2,5, triadimefon 20, propiconazole 0,025 bitertanol 1.

Από πλευράς τοξικότητας και κάτω από τις συγκεκριμένες εργαστηριακές συνθήκες, οι παρεμποδιστές που μελετήθηκαν μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την αποτελεσματικότητά τους κατά του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε δύο ομάδες. Υψηλής τοξικότητας χαρακτηρίζονται τα triadimenol, bitertanol, propiconazole, flusilazol, flutriafol, triflumizole, imazalil και fenarimol με MIC στην περίπτωση του αγρίου στελέχους ίση ή μικρότερη από $1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Σαν χαμηλής τοξικότητας μπορούν να χαρακτηρισθούν τα triadimefon, clotrimazole, ketoconazole, triforine, fenpropimorph, tridemorph και terbinafine με MIC για το άγριο στέλεχος ίση ή μεγαλύτερη από $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.



Εικόνα 2. Σύγκριση του triadimenol και τεσσάρων αντιπροσώπων των ιμιδαζολικών μυκητοκτόνων ως προς την επίδρασή τους στο άγριο και τέσσερα *tri-1* στελέχη του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*. Το άγριο (στο κέντρο του τρυβλίου) συγκρίνεται με τα τέσσερα *tri-1* ανθεκτικά στο triadimenol (στην περιφέρεια του τρυβλίου) στελέχη. Συγκεντρώσεις παρεμποδιστών (σε µg/ml): triadimenol 2,5, imazalil 0,5, clotrimazole 1,5, triflumizole 0,00075, ketoconazole 75.

Με βάση τον παράγοντα ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών που υπολογίσθηκε από τις τιμές ED₅₀ και MIC προκύπτει ότι τα μέλη της ομάδας των τριαζολικών βρίσκονται σε θετική συσχέτιση μεταξύ τους από την άποψη της διασταυρωτής ανθεκτικότητας (Εικόνα 1). Όμως με εξαίρεση το triadimenol, όπου ο παράγοντας ανθεκτικότητας είναι πολύ υψηλός, συνολικά στα τριαζολικά η ανθεκτικότητα των *tri-1* στελεχών θα μπορούσε να χαρακτηριστεί σαν χαμηλού επιπέδου. Στην περίπτωση των ιμιδαζολικών, με εξαίρεση το imazalil, ο παράγοντας ανθεκτικότητας υπολογίσθηκε να είναι μικρότερος της μονάδας και κατά συνέπεια οι παρεμποδιστές αυτοί παρουσιάζουν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα με το triadimenol όσον αφορά τον γόνο *tri-1*



Εικόνα 3. Σύγκριση του triadimenol και αντιπροσώπων των πυριμιδινικών (fenarimol), πιπεραζινικών (triforine) και των μορφολινικών (fenpropimorph, tridemorph) μυκητοκτόνων ως προς την επίδρασή τους στο άγριο και τέσσερα *tri-1* στελέχη του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*. Το άγριο (στο κέντρο του τρυβλίου) συγκρίνεται με τα τέσσερα *tri-1* ανθεκτικά στο triadimenol (στην περιφέρεια του τρυβλίου) στελέχη. Συγκεντρώσεις παρεμποδιστών (σε $\mu\text{g/ml}$): triadimenol 2,5, fenarimol 0,25, triforine 75, fenpropimorph 25, tridemorph 10.

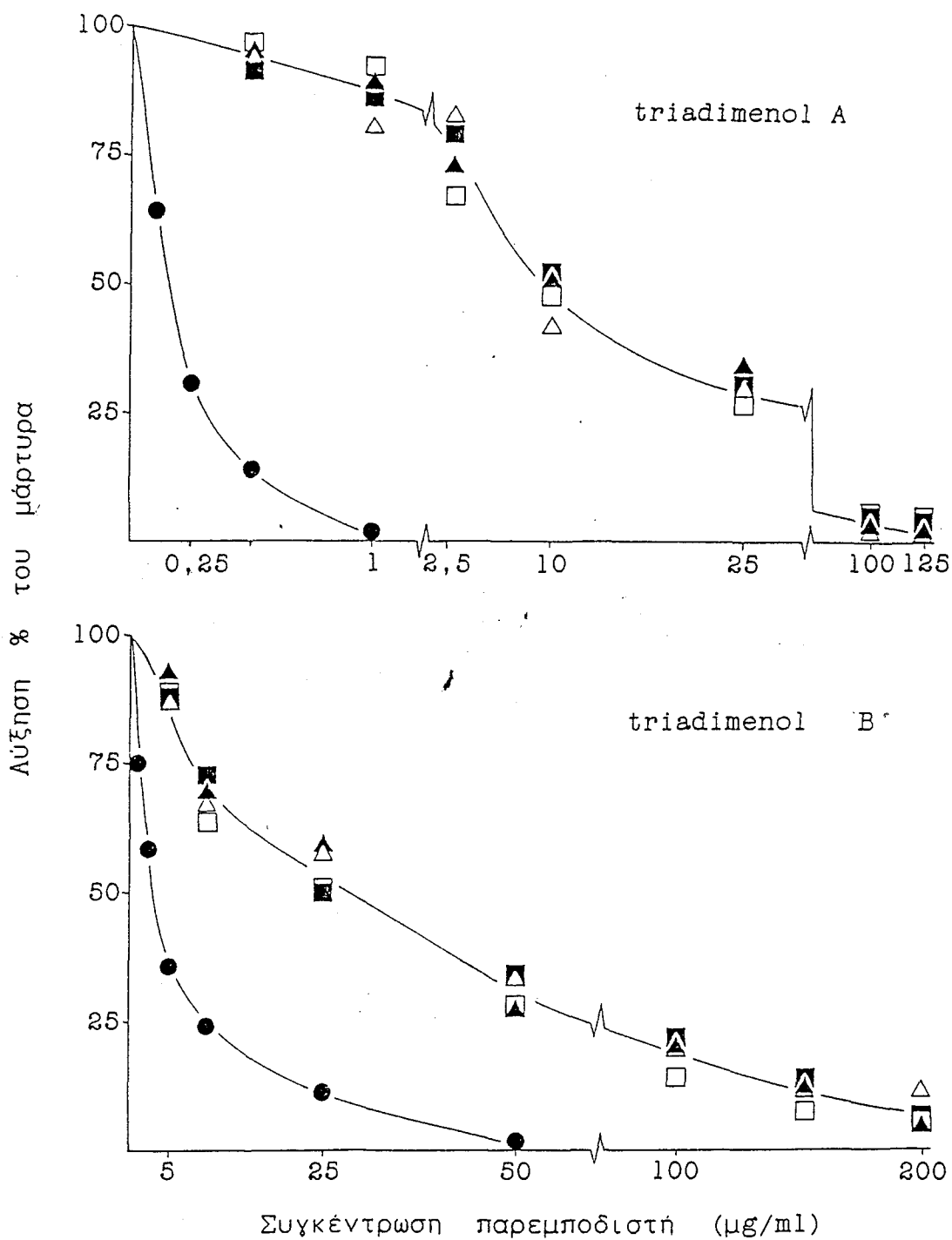
(Εικόνα 2). Στις άλλες ομάδες που μελετήθηκαν, ο γόνος *tri-1* δεν επηρεάζει την ευαισθησία και κατά συνέπεια οι παρεμποδιστές αυτοί δεν παρουσιάζουν θετική ή αρνητική συσχέτιση με το triadimenol (Εικόνα 3).

3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ TRIADIMEFON ΑΠΟ ΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΤΟ TL-34 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΟ TRIADIMENOL ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *N. HAEMATOCOCCA* VAR. *CUCURBITAE*

Όπως έχει αναφερθεί (Κεφάλαιο 1.7), το triadimefon δεν είναι ιδιαίτερα μυκητοτοξικό μόριο, αλλά η αποτελεσματικότητά του αυξάνει μετά από την αναγωγή του προς triadimenol από τα ίδια τα παθογόνα και τα φυτά. Από τη μελέτη της μυκητοτοξικότητας των δύο αυτών μυκητοκτόνων στο άγριο και τα *tri-1* ανθεκτικά στελέχη (Κεφάλαιο 3.1), διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση ως προς την επίδραση του γόνου *tri-1*, αλλά ο γόνος αυτός δίνει πολύ μικρότερη ανθεκτικότητα στο triadimefon απ' ό τι στο triadimenol. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών, με βάση την ED₅₀, είναι 55,6 για το triadimenol αλλά μόλις 6 για το triadimefon. Για τη διερεύνηση της διαφοράς αυτής στην ανθεκτικότητα των *tri-1* στελεχών που δεν είναι θεωρητικά αναμενόμενη, μελετήθηκε η μυκητοτοξικότητα των διαστερεοϊσομερών του triadimenol, ο ρυθμός και η έκταση της αναγωγής του triadimefon και η διαστερεοϊσομερική σύνθεση του triadimenol, που παράγεται μετά από επίδραση με triadimefon από το άγριο και τα *tri-1* ανθεκτικά στελέχη. Η μελέτη αυτή ήταν απαραίτητη για να εξηγηθεί αυτή η διαφορετική ευαισθησία των *tri-1* στελεχών στο triadimefon και το triadimenol, αφού η μυκητοτοξικότητα του triadimefon εξαρτάται από την μεταβολική ενεργοποίησή του σε triadimenol.

3.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΣΤΕΡΕΟΙΣΟΜΕΡΩΝ ΤΟΥ TRIADIMENOL ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ *tri-1* ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Από τη μελέτη της ευαισθησίας του αγρίου και των *tri-1* στελεχών στα διαστερεοϊσομερή Α και Β του triadimenol σε στερεό θρεπτικό υλικό (Σχήμα 31), διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές τόσο στην μυκητοτοξικότητα των δύο διαστερεοϊσομερών μορφών του triadimenol, όσο και στο βαθμό ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών σ' αυτά (Πίνακας 3). Το διαστερεοϊσομερές Α εμφανίσθηκε να είναι πιο δραστικό από το Β τόσο στο άγριο όσο και τα *tri-1* ανθεκτικά στελέχη, αλλά η σχετική μυκητοτοξικότητα των δύο διαστερεο-



Σχήμα 31. Επίδραση των διαστερεοϊσομερών Α και Β του triadimenol στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (△) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25°C παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

Πίνακας 3. Επίδραση του triadimefon των διαστεροϊσομερών Α και Β και του μίγματος (Α:Β=80:20) του triadimenol στην ανάπτυξη του αγρίου και των *tri-1* ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25° C.

	ED ₅₀ (μg ml ⁻¹)				Σχετική μυκητοτοξικ. διαστεροϊ- σομερών
	triadimefon	A:Β=80:20	A	B	
Άγριο Στέλεχος	3,1	0,18	0,16	4,5	28,1
<i>tri-1</i> Στελέχη	18,5	10	9,5	25	2,6
Παράγ. Ανθεκτ. ^β	6	55,6	57,8	5,5	

α Ο λόγος ED₅₀ για το διαστεροϊσομερές Β : ED₅₀ για το διαστεροϊσομερές Α.

β Ο λόγος ED₅₀ για τα *tri-1* ανθεκτικά στελέχη : ED₅₀ για το άγριο στέλεχος.

ισομερών διέφερε σημαντικά. Συγκεκριμένα, το διαστεροϊσομερές Α ήταν 28,1 και 2,6 φορές πιο τοξικό από το Β στην περίπτωση του αγρίου και των *tri-1* στελεχών αντίστοιχα. Τα *tri-1* στελέχη εμφανίσθηκαν να είναι πιο ανθεκτικά από το άγριο στέλεχος και στα δύο διαστεροϊσομερή, όμως ο παράγοντας ανθεκτικότητας που υπολογίσθηκε με βάση τις ED₅₀s, ήταν 57,8 για το Α αλλά μόλις 5,5 για το Β. Τόσο οι τιμές αυτές του παράγοντα ανθεκτικότητας όσο και η μυκητοτοξικότητα των διαστεροϊσομερών Α και Β παρουσίασαν αξιολογική ομοιότητα μ' αυτές που παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του μίγματος 80:20 (Α:Β) του triadimenol και του triadimefon αντίστοιχα (Πίνακας 3).

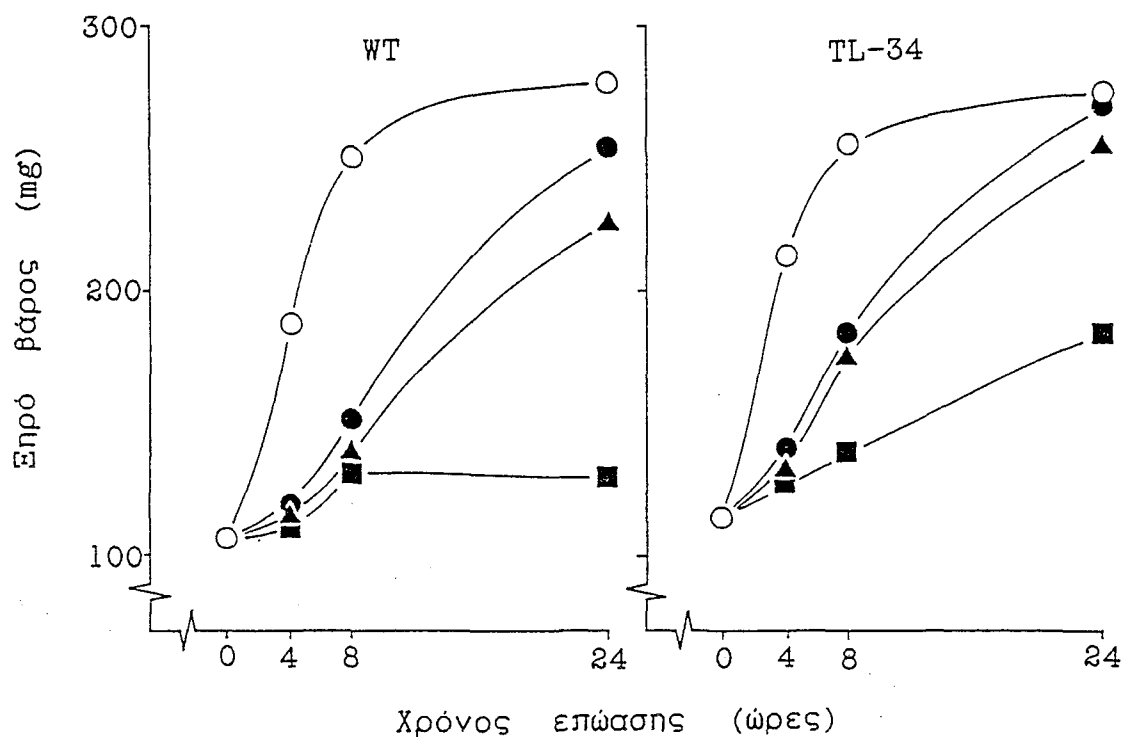
3.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ TRIADIMEFON ΑΠΟ ΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΤΟ TL-34 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ

Για τη μελέτη του μεταβολισμού του triadimefon προς triadimenol από το

άγριο και τα ανθεκτικά στο triadimenol στελέχη, έγιναν ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα με σκοπό τον προσδιορισμό των κατάλληλων συγκεντρώσεων του παρεμπόδιση και των χρόνων επίδρασης του στην καλλιέργεια έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των συγκεντρώσεων, απέβλεπαν στο να επιλεγούν εκείνες που απ' την μια μεριά θα παρείχαν στο μυκήλιο ικανοποιητική ποσότητα triadimefon έτσι ώστε να παράγεται ανιχνεύσιμη ποσότητα triadimenol και από την άλλη δεν θα προκαλούσαν ισχυρή παρεμπόδιση στο άγριο στέλεχος, τουλάχιστον στα πρώτα στάδια της επέμβασης. Η προσθήκη του triadimefon αποφασίστηκε να γίνεται όταν η καλλιέργεια βρίσκεται λίγο πριν το μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (24 ώρες), γιατί τότε το μυκήλιο είναι σε αρκετή ποσότητα για την πραγματοποίηση του μεταβολισμού και ταυτόχρονα δεν παρουσιάζει στοιχεία γήρανσης. Για την επιλογή των κατάλληλων χρονικών περιόδων επώασης, θεωρήθηκε σκόπιμο να μην είναι ιδιαίτερα μεγάλες έτσι ώστε η καλλιέργεια να μην οδηγείται σε φυσιολογική γήρανση και αυτόλυση του μυκηλίου.

Από τα προκαταρκτικά αυτά πειράματα παρατηρήθηκε ότι τόσο στο άγριο όσο και στο TL-34 ανθεκτικό στέλεχος η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου σ' όλες τις συγκεντρώσεις του triadimefon που χρησιμοποιήθηκαν, εμφανίζεται να είναι πολύ πιο έντονη κατά τις πρώτες ώρες επίδρασης (4 και 8 ώρες επώασης). Στη συνέχεια η παρεμπόδιση μειώνεται αισθητά με εξαίρεση τη συγκέντρωση των $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, όπου παραμένει σε υψηλά επίπεδα κυρίως στο άγριο στέλεχος. Η μείωση αυτή της παρεμπόδισης φαίνεται να είναι πιο έντονη στην περίπτωση του ανθεκτικού στελέχους (Σχήμα 32). Για την καλύτερη προσέγγιση αυτού του φαινομένου έγινε επίδραση με triadimefon ταυτόχρονα με την έναρξη της καλλιέργειας και ακολούθησε μέτρηση της παρεμπόδισης στην αρχή (20 ώρες) και στο τέλος (40 ώρες) της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Και στα δύο στελέχη (άγριο και ανθεκτικό), η παρεμπόδιση εμφανίστηκε πολύ πιο έντονη στην αρχή της εκθετικής φάσης ενώ μετά από 40 ώρες επώασης μειωνόταν σημαντικά στο άγριο και σχεδόν μηδενιζόταν στο ανθεκτικό στέλεχος (Σχήμα 33).

Για την μελέτη του μεταβολισμού του triadimefon προς triadimenol χρησιμοποιήθηκαν η μέθοδος της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) και η της αεριοχρωματογραφίας όπως περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2.6. Για να προκύψει μια πλήρης εικόνα της επίδρασης τόσο της συγκέντρωσης όσο και του χρόνου επώασης στο βαθμό μετατροπής του triadimefon και τη διαστεροϊσομερική σύνθεση του triadimenol που παράγεται επιλέχθηκαν και

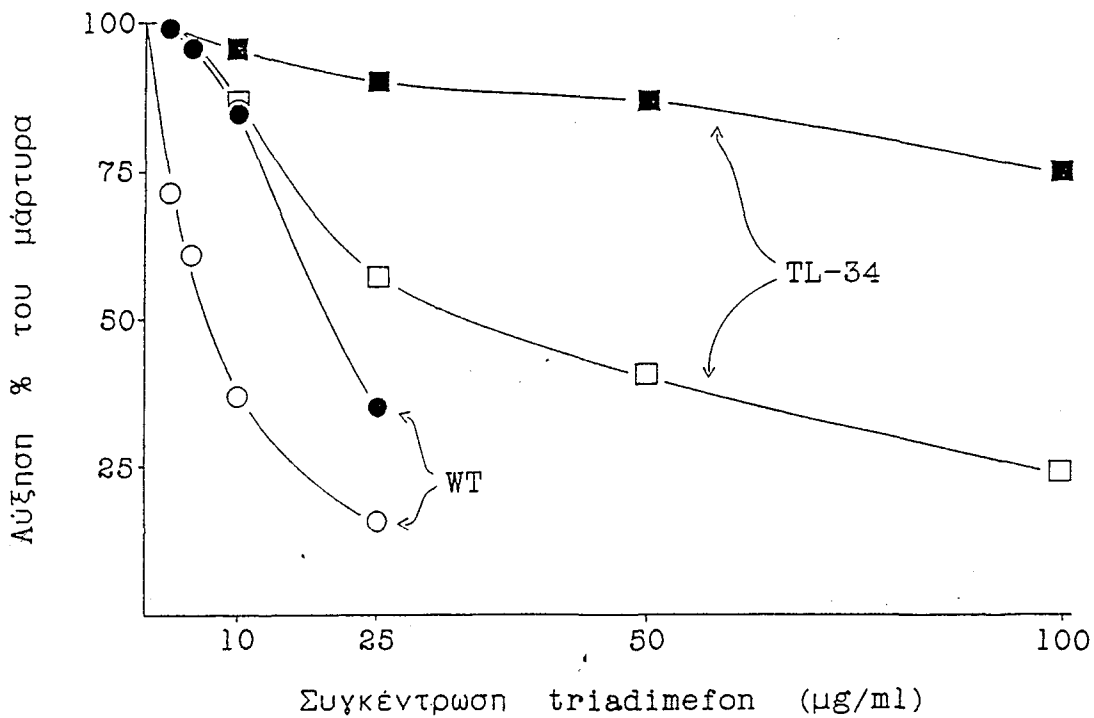


Σχήμα 32. Ανάπτυξη του αγρίου (WT) και του TL-34 ανθεκτικού στο triadimenol στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* απουσία παρεμποδιστή (○) και παρουσία triadimefon συγκέντρωσης 10 (●), 25 (▲) και 100 (■) μg/ml σε ενισχυμένο με εκχύλισμα ζύμης υγρό θρεπτικό υλικό C&S. Η προσθήκη του παρεμποδιστή έγινε όταν η καλλιέργεια βρισκόταν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (24 ώρες).

χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί συγκεντρώσεων triadimefon 10, 25 και 100 μg ml⁻¹ και περιόδων επώασης 8, 24 και 48 ωρών.

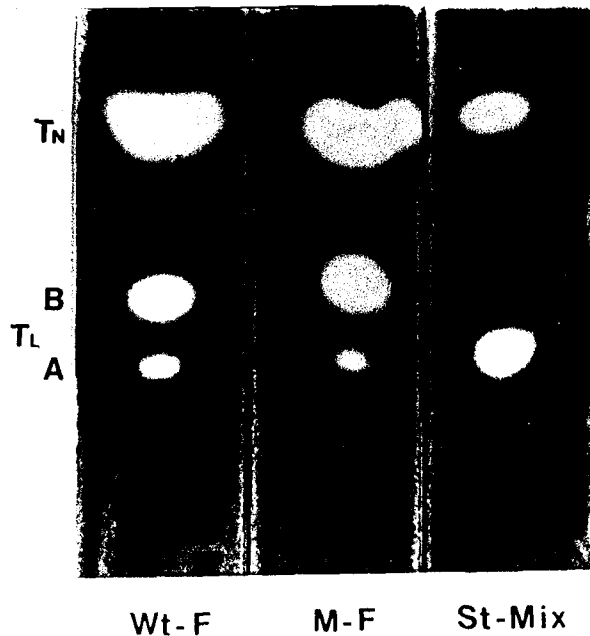
3.2.2.1. Ανάλυση των εκχυλισμάτων με συνδυασμό χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας και βιοδοκιμής.

Η ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων από το υλικό της καλλιέργειας με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και βιοδοκιμής με τη βοήθεια ενός πολύ ευαίσθητου στους EBI's στελέχους του μύκητα *C. cucumerinum*, έδειξε τρεις ζώνες μυκητοτοξικότητας με τιμές Rf 0,89, 0,55 και 0,66. Οι τιμές αυτές ταιριάζουν με τις ζώνες μυκητοτοξικότητας του triadimefon και των



Σχήμα 33. Επίδραση του triadimefon στην ανάπτυξη του αγρίου (WT) και του TL-34 ανθεκτικού στο triadimenol στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* μετά από 20 (○, □) και 40 (●, ■) ώρες επώασης αντίστοιχα σε ενισχυμένο με εκχύλισμα ζύμης υγρό θρεπτικό υλικό C&S. Η προσθήκη του παρεμποδιστή έγινε από την αρχή της καλλιέργειας.

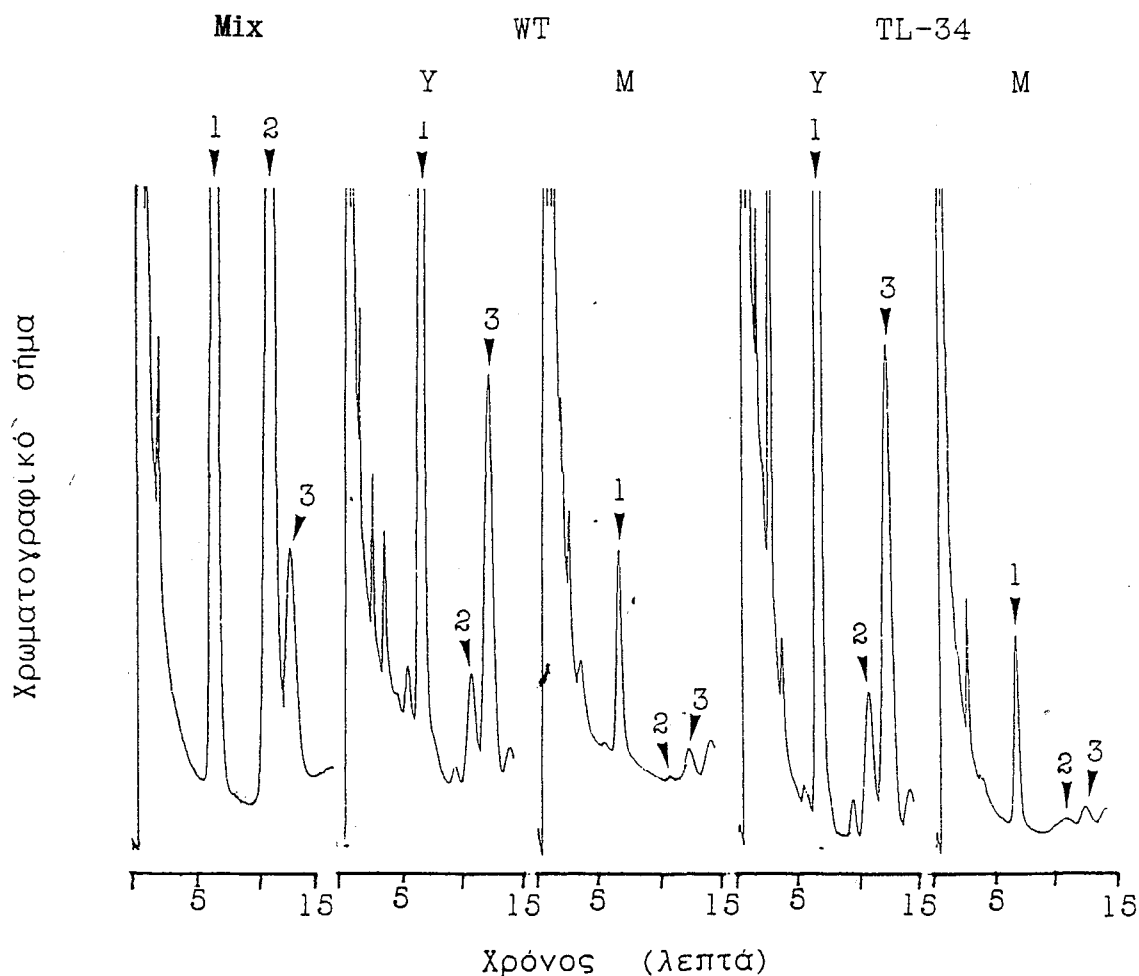
διαστεροϊσομερών A και B του triadimenol αντίστοιχα (Εικόνα 4). Μια πρώτη εκτίμηση της αναλογίας των διαστεροϊσομερών του triadimenol που παράγεται, προκύπτει από το μέγεθος των κηλίδων μυκητοτοξικότητας. Στην Εικόνα 4 για παράδειγμα, η ζώνη παρεμπόδισης του διαστεροϊσομερούς B, που προέκυψε μετά από αναγωγή του triadimefon είτε από το ευαίσθητο είτε από το *tri-1* στέλεχος, είναι 4-5 φορές μεγαλύτερη απ' αυτή του διαστεροϊσομερούς A παρότι το B είναι 10 φορές λιγότερο τοξικό από το A στο συγκεκριμένο στέλεχος του *C. cucumerinum* που χρησιμοποιήθηκε (Κεφάλαιο 3.3). Φαίνεται δηλαδή ότι μετά από 48 ώρες επώασης παρουσία 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ triadimefon το διαστεροϊσομερές B παράγεται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες (ίσως 50 φορές) από το A τόσο από το άγριο όσο και από το ανθεκτικό στέλεχος.



Εικόνα 4. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και βιοδοκιμή μίγματος (St-Mix) triadimefon (TN) και triadimenol 80:20 (A:B) (TL) και εκχυλισμάτων από το υλικό της καλλιέργειας του αγρίου (WT-F) και ενός *tri-1* (M-F) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* μετά από επίδραση με triadimefon σε συγκέντρωση 100 µg/ml για 48 ώρες. Στα εκχυλίσματα διακρίνονται οι κηλίδες παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μύκητα *C. cucumerinum* από το triadimefon και τα διαστεροεισομερή A και B του triadimenol. Όταν στο μίγμα η ζώνη παρεμπόδισης του διαστεροεισομερούς A είναι σημαντικά μεγαλύτερη, η κηλίδα του διαστεροεισομερούς B δεν είναι εμφανής λόγω της πολύ μικρής τοξικότητάς του στο συγκεκριμένο μύκητα.

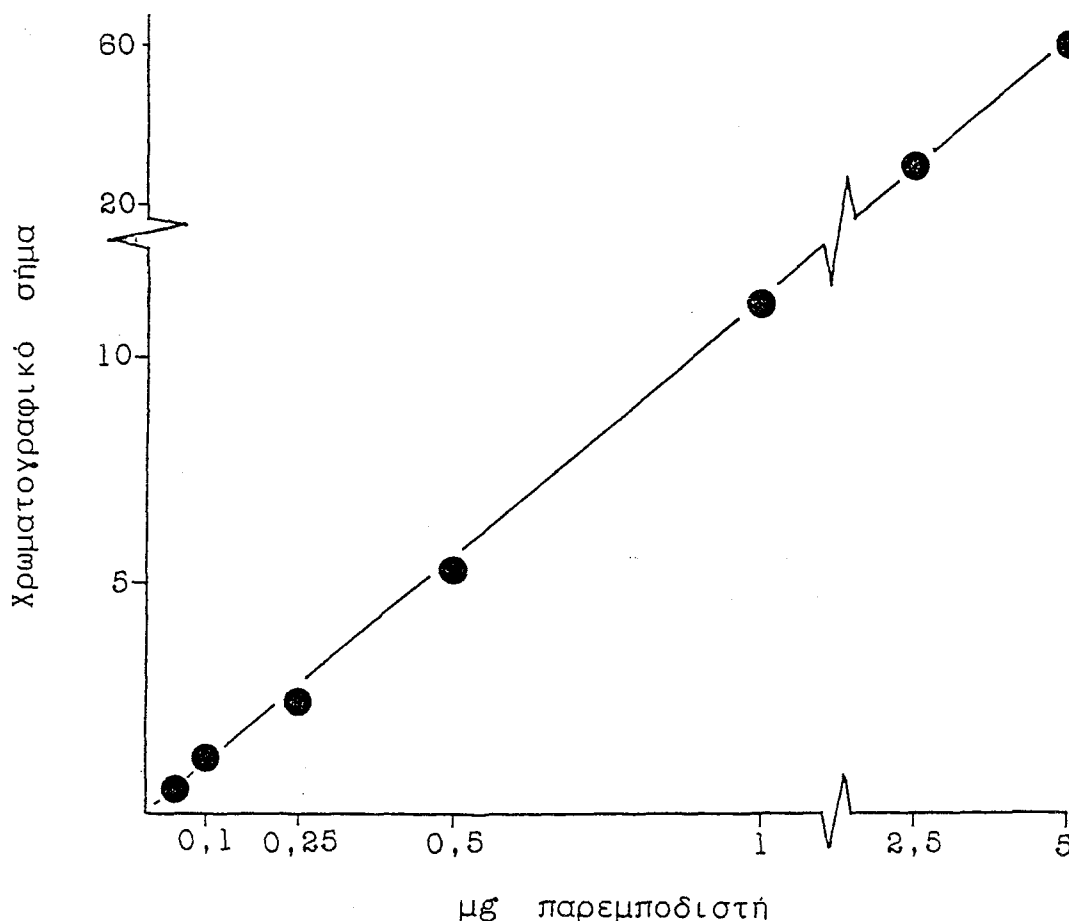
3.2.2.2. Ανάλυση των εκχυλισμάτων με αεριοχρωματογραφία.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μεταβολισμού του triadimefon προς triadimenol χρησιμοποιήθηκε η στήλη 3% OV-225 που έχει την δυνατότητα να διαχωρίζει καλά το triadimefon και τα διαστεροεισομερή A και B του triadimenol (Σχήμα 34). Ο σχετικός χρόνος εξόδου (Relative Retention Time, RRT), που προσδιορίσθηκε για τα διαστεροεισομερή του triadimenol ως προς το χρόνο εξόδου του triadimefon, ήταν 1,61 και 1,84 για το A και το B αντίστοιχα. Με βάση την απόκριση του ανιχνευτή για τα triadimefon και triadimenol, προσδιορίσθηκε η ευθεία ελαχίστων τετραγώνων για τα δύο αυτά μόρια και διαπιστώθηκε ότι συμπεριφέρονται παρόμοια, δηλαδή ίδια ποσότητα



Σχήμα 34. Αεριοχρωματογραφική ανάλυση μίγματος triadimefon και triadimenol (Mix) και εκχυλισμάτων από το υλικό της καλλιέργειας (Y) και το μυκήλιο (M) του αγρίου (WT) και ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* μετά από επίδραση με triadimefon 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για 48 ώρες σε ενισχυμένο με εκχύλισμα ζύμης υγρό θρεπτικό υλικό C&S. Ταυτοποίηση κορυφών ως εξής: 1. triadimefon, 2. triadimenol A και 3. triadimenol B.

των δύο αυτών ουσιών έδινε το ίδιο χρωματογραφικό σήμα. Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη ποσότητα ήταν 0,01 μg και η σχέση μεταξύ της ποσότητας της ουσίας και του χρωματογραφικού σήματος παρέμενε γραμμική από 0,01 έως 5 μg (Σχήμα 35).



Σχήμα 35. Απόκριση του ανιχνευτή του αεριοχρωματογράφου Perkin Elmer Sigma 300 στα μόρια του triadimefon και του triadimenol. Η απόκριση του ανιχνευτή στα δύο αυτά μόρια ήταν παρόμοια.

Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης των εκχυλισμάτων του υλικού της καλλιέργειας και του μυκηλίου μετά από επίδραση με διάφορες συγκεντρώσεις triadimefon και για διάφορες περιόδους επώασης, δίνονται στον Πίνακα 4. Η συνολική ανάκτηση των τοξικών μορίων κάθε επέμβασης που είναι το άθροισμα των ποσοτήτων του triadimefon και του triadimenol που ανιχνεύθηκε, ήταν συνήθως μεταξύ 80 και 95% της αρχικής ποσότητας του triadimefon ανεξάρτητα από τον χρόνο επώασης και την συγκέντρωση. Το μεγαλύτερο ποσοστό του triadimefon και του triadimenol (συνήθως περισσότερο από 85%) ανιχνεύθηκε στο υλικό της καλλιέργειας. Το ποσοστό του triadimefon που μεταβολίζεται προς triadimenol αυξάνει με το χρόνο επώασης τόσο στο άγριο όσο και στο ανθεκτικό στέλεχος. Κάποιες διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο στελεχών

Πίνακας 4. Ανάλυση των εκχυλισμάτων της καλλιέργειας και του μυκηλίου από πειράματα μεταβολισμού του triadimefon από το άγριο και ένα *tri-1* (TL-34) ανθεκτικό στο triadimenol στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε ενισχυμένο με εκχύλισμα ζύμης υγρό θρεπτικό υλικό C&S.

Συγκέντρωση triadimefon ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Περίοδος επώασης (ώρες)	Ανάκτηση τοξ.μορ. ^α %	Ποσοστό % του συνόλου ^β		Μυκήλιο		Συνολική αναγωγής του triadimefon %
			Υλικό TN ^γ	TL ^δ	TN	TL	
Άγριο Στέλεχος							
10	8	90,4	90,5	7,5	0,6	1,4	8,9
	24	93,1	77,8	15,5	4,2	2,5	18,0
	48	89,8	61,6	32,1	4,4	1,9	34,0
25	8	97,8	96,1	2,7	0,4	0,8	3,5
	24	84,7	80,6	13,2	5,0	1,2	14,4
	48	91,6	60,1	26,6	11,1	2,2	28,8
100	8	90,2	98,4	1,1	0,3	0,2	1,3
	24	65,6	91,8	4,7	3,0	0,5	5,2
	48	56,1	69,2	6,8	22,4	1,6	8,4
<i>tri-1</i> Στέλεχος							
10	8	92,0	62,5	14,1	21,7	1,7	15,8
	24	85,5	56,1	27,5	14,0	2,4	29,9
	48	92,4	62,2	32,8	3,7	1,3	34,1
25	8	89,8	71,1	15,8	12,0	1,1	16,9
	24	85,4	72,2	18,2	8,4	1,2	19,4
	48	55,8	59,9	18,3	19,0	2,8	21,1
100	8	92,9	93,0	3,6	3,0	0,4	4,0
	24	83,9	82,0	9,8	5,7	0,5	10,3
	48	79,6	72,5	9,9	16,5	1,1	11,0

^α Το άθροισμα των ποσοτήτων του triadimefon και του triadimenol που ανιχνεύθηκαν ως προς την αρχική ποσότητα του triadimefon που εφαρμόστηκε.

^β Η % αναλογία του triadimefon ή του triadimenol. Σαν triadimenol θεωρείται το άθροισμα των δύο ισομερών Α και Β.

^γ triadimefon. ^δ triadimenol.

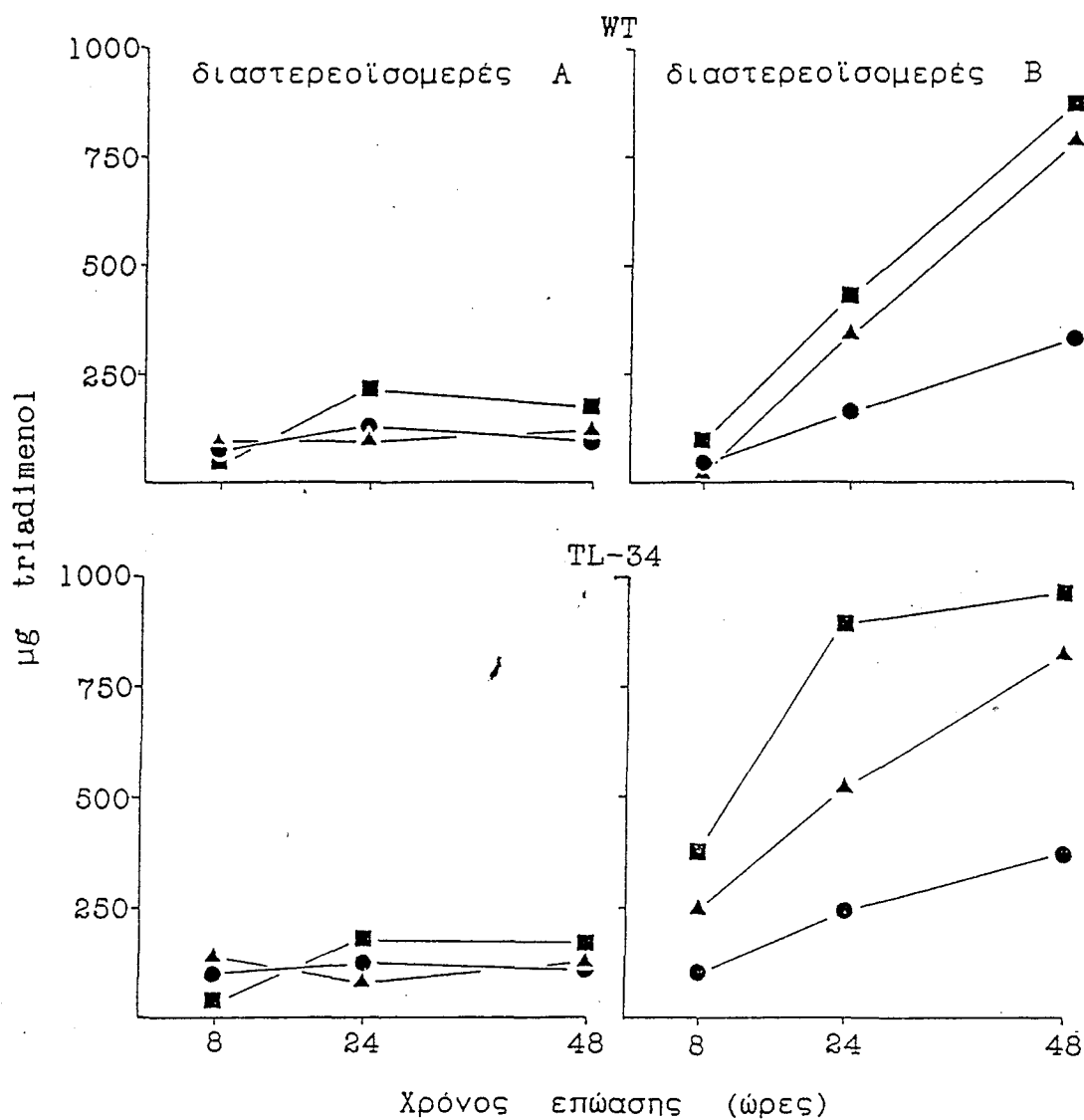
στο ρυθμό παραγωγής του triadimenol και πió συγκεκριμένα το ανθεκτικό στέλεχος ανάγει το triadimefon πió γρήγορα από το άγριο στέλεχος στα πρώτα στάδια της επίδρασης (8 ώρες επώασης) όμως μετά από επώαση 48 ωρών οι διαφορές μεταξύ των στελεχών εξαφανίζονται.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ως προς τα διαστερεοϊσομερή του triadimenol στο συνολικό εκχύλισμα (μυκήλιο και υλικό) κάθε επέμβασης στο άγριο και το ανθεκτικό στέλεχος δίνονται στο Σχήμα 36. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι το σύνολο σχεδόν του διαστερεοϊσομερούς A παράγεται και από τα δύο στελέχη κατά τις πρώτες 8 ώρες της επίδρασης του triadimefon και στη συνέχεια η παραγωγή του σχεδόν σταματάει με αποτέλεσμα η ποσότητά του να παραμένει σχεδόν σταθερή. Αντίθετα, το διαστερεοϊσομερές B στην αρχή παράγεται σε μικρές ποσότητες, σαφώς μεγαλύτερες στην περίπτωση του ανθεκτικού στελέχους αλλά η παραγωγή του είναι συνεχής με αποτέλεσμα η ποσότητά του να αυξάνει σημαντικά τόσο στο άγριο όσο και στο ανθεκτικό στέλεχος. Η παραγωγή του διαστερεοϊσομερούς A είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του triadimefon, σε αντίθεση με εκείνη του B, η παραγόμενη ποσότητα του οποίου αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης του triadimefon και από τα δύο στελέχη.

3.2.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΦΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ TRIADIMEFON

Για να επιβεβαιωθεί κατά πόσο η αναγωγή του triadimefon υπό τις συνθήκες του πειράματος γίνεται από ένζυμα του μύκητα ή υπάρχει δυνατότητα μετατροπής του triadimefon προς triadimenol χωρίς τον κυτταρικό μεταβολισμό, επώασθηκαν 50 ml θρεπτικού υλικού με συγκέντρωση triadimefon 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ χωρίς την παρουσία του μύκητα για 48 ώρες. Στο εκχύλισμα που παραλήφθηκε, ανιχνεύθηκε μόνο triadimefon σε ποσοστό 97,8% του αρχικού ποσού.

Παρόμοια, για να διερευνηθεί αν η μετατροπή πραγματοποιείται και με εξωκυτταρικά ένζυμα, έγινε καλλιέργεια του μύκητα σε 50 ml θρεπτικού υλικού για 24 ώρες. Η ανεπτυγμένη βιομάζα απομακρύνθηκε και το υλικό της καλλιέργειας αποστειρώθηκε με διήθηση μέσω βακτηριακού φίλτρου. Στο υλικό προστέθηκε triadimefon σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ και επώασθηκε για 48 ώρες. Μετά την ανάλυση του εκχυλίσματος δεν διαπιστώθηκε καμιά αναγωγή του triadimefon προς triadimenol. Συνεπώς, ακόμα και το triadimenol που ανιχνεύεται στο υλικό καλλιέργειας παράγεται μετά από



Σχήμα 36. Διαστεροϊσομερική σύνθεση του triadimenol που παράγεται από το άγριο (WT) και ένα *tri-1* (TL-34) στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, μετά από επίδραση με 10 (●), 25 (▲) και 100 (■) μg/ml triadimefon σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης.

επίδραση ενδοκυτταρικών ενζύμων και στη συνέχεια εκκρίνεται στο περιβάλλον.

Πίνακας 5. Ανάλυση των εκχυλισμάτων του υλικού της καλλιέργειας και του μυκηλίου από πειράματα μεταβολισμού του triadimenol (A:B=80:20) από το άγριο και ένα *tri-1* (TL-34) στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, σε ενισχυμένο με εκχύλισμα ζύμης υγρό θρεπτικό υλικό C&S.

Συγκέντρωση triadimenol ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Περίοδος επάσης (ώρες)	Ανάκτηση τοξ.μορ. ^α %	Διαστεροϊσομερή του triadimenol	
			A : B Υλικό	(%) Μυκήλιο
Άγριο Στέλεχος				
10	8	80,1	80,6 : 19,4	Δ.Π. ^β
	24	94,3	81,2 : 18,8	Δ.Π.
	48	94,7	81,6 : 18,4	76,7 : 23,3
<i>tri-1</i> Στέλεχος				
10	8	97,2	81,1 : 18,9	Δ.Π.
	24	95,5	87,9 : 12,1	75,8 : 24,2
	48	93,7	81,8 : 18,2	83,3 : 16,2

^α Το άθροισμα των ποσοτήτων των διαστεροϊσομερών του triadimenol που ανιχνεύθηκαν ως προς την αρχική ποσότητα του μίγματος του triadimenol που εφαρμόσθηκε.

^β Δεν Προσδιορίσθηκε.

3.2.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΝΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ TRIADIMENOL ΑΠΟ ΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΤΟ TL-34 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ

Για να διερευνηθεί η δυνατότητα επανοξειδωσης (re-oxidation) του triadimenol από τον μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, καθώς και η πιθανότητα μετατροπής του ενός ισομερούς προς το άλλο, έγινε επίδραση με μίγμα triadimenol 80:20 (A:B) σε συγκέντρωση $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, σε καλλιέργειες 24 ωρών του αγρίου και του TL-34. Μετά από 48 ώρες, ακολούθησε παραλαβή των εκχυλισμάτων από το μυκήλιο και το υλικό της καλλιέργειας και ανάλυσή τους με αεριοχρωματογραφία όπως και κατά τη μελέτη του μεταβολισμού του triadimefon. Σε καμιά περίπτωση δεν ανιχνεύθηκε triadimefon και η αναλογία των διαστεροϊσομερών του triadimenol στο εκχύλισμα από το υλικό της καλλιέργειας παρέμεινε η ίδια με την αρχική τόσο στο άγριο όσο και στο

ανθεκτικό στέλεχος. Τα δύο διαστεροϊσομερή ανιχνεύθηκαν στο μυκήλιο και των δύο στελεχών αλλά σε πολύ μικρές ποσότητες (Πίνακας 5).

3.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ TRIADIMEFON

Στον μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* έχουν αναγνωρισθεί δύο διαφορετικά συστήματα κληρονομικότητας για ανθεκτικότητα στους EBI's. Ένα πολυγονικό, υπεύθυνο για χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο fenarimol και τους άλλους DMIs (γόνος *fen*) (Kalamarakis και συνεργάτες, 1991) και ένα ολιγογονικό υπεύθυνο για υψηλή ανθεκτικότητα στο triadimenol (γόνος *tri-1*) (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι είναι δυνατή η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τον ίδιο οργανισμό, στο ίδιο μυκητοκτόνο και με τα δύο συστήματα κληρονομικότητας. Για τη διερεύνηση αυτής της δυνατότητας επιχειρήθηκε επιλογή και μελέτη στελεχών του *N. haematococca* var. *cucurbitae* ανθεκτικών στο triadimefon. Η επιλογή του triadimefon σε μια τέτοια μελέτη, δίνει ταυτόχρονα και τη δυνατότητα αναγνώρισης ενός μηχανισμού ανθεκτικότητας που θα στηρίζεται σε μειωμένη μετατροπή ή ενεργοποίηση του μορίου του παρεμποδιστή, δεδομένου ότι το triadimefon ενεργοποιείται μετά από αναγωγή του προς triadimenol. Τέτοιου είδους ανθεκτικότητα δεν έχει μέχρι τώρα διαπιστωθεί στην περίπτωση των EBI's.

Η αναλογία των διαστερεοϊσομερών του triadimenol που παράγονται μετά από μεταβολισμό του triadimefon είναι χαρακτηριστική για κάθε μύκητα και η σχετική μυκητοτοξικότητα των δύο διαστερεοϊσομερών είναι συνήθως σημαντικά διαφορετική (Κεφάλαιο 1.7). Είναι λοιπόν θεωρητικά δυνατή η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο triadimefon με ένα μηχανισμό ο οποίος δεν θα επέτρεπε ή θα μείωνε τη μετατροπή του σε triadimenol ή θα προκαλούσε αλλαγή της διαστερεοϊσομερούς σύνθεσης του παραγόμενου triadimenol προς την κατεύθυνση της αύξησης της παραγωγής του λιγότερο τοξικού διαστερεοϊσομερούς. Στην περίπτωση λειτουργίας ενός τέτοιου μηχανισμού, τα ανθεκτικά στο triadimefon στελέχη θα παρουσιάζουν ευαισθησία στο triadimenol παρόμοια μ' εκείνη των αγρίου τύπου στελεχών. Για τη διαπίστωση ενός τέτοιου μηχανισμού ανθεκτικότητας, κατάλληλο βιολογικό υλικό θα ήταν ένας μύκητας με σημαντικά διαφορετική ευαισθησία στα επιμέρους διαστερεοϊσομερή του triadimenol και ταυτόχρονα η ευαισθησία του στο triadimefon να οφείλεται στην παραγωγή σε υψηλά ποσοστά του πιο τοξικού διαστερεοϊσομερούς του triadimenol. Από τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου 3.2. προκύπτει ότι ένα τέτοιο βιολογικό υλικό δεν μπορεί να

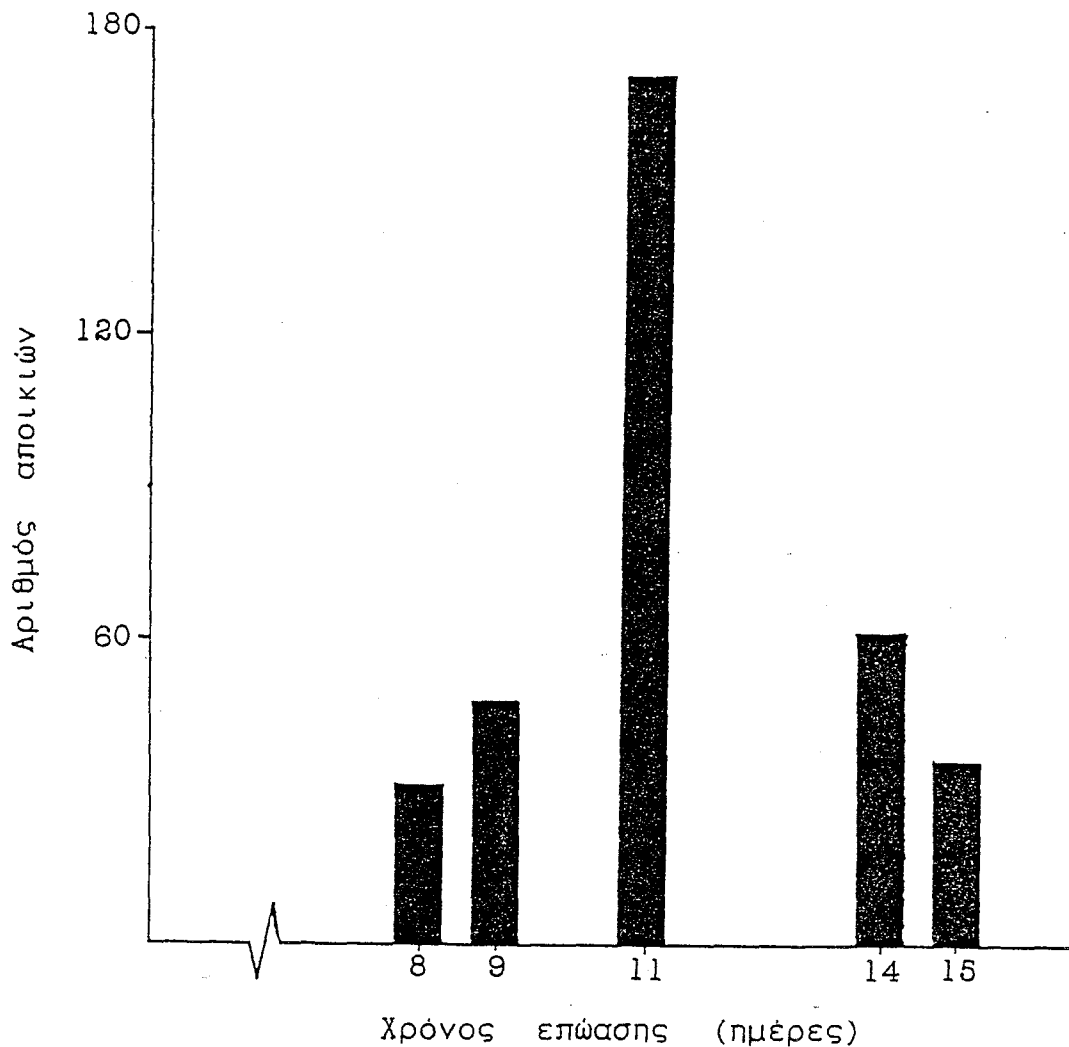
είναι ο μύκητας *N. haematococca* var. *cucurbitae* γιατί παράγει σε υψηλά ποσοστά το λιγότερο τοξικό διαστερεοϊσομερές B του triadimenol. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε ο μύκητας *Botrytis cinerea* μετά από κατάλληλη διερεύνηση του μεταβολισμού του triadimefon από τον μύκητα αυτό.

3.3.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ TRIADIMEFON ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *N. HAEMATOCOCCA* VAR. *CUCURBITAE*

Για την επιλογή ανθεκτικών στο triadimefon στελεχών χρησιμοποιήθηκε το άγριο στέλεχος Νο 38. Αιώρημα κονιδίων με πυκνότητα 10^7 σπόρια ml^{-1} ακτινοβολήθηκε με υπεριώδη ακτινοβολία όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.7. Το ποσοστό θνησιμότητας από την ακτινοβόληση ήταν 96,4%. Χρησιμοποιήθηκαν 2,8 ml ακτινοβοληθέντος αιωρήματος για να εμβολιασθούν 14 τρυβλία με θρεπτικό υλικό CM στο οποίο είχε προστεθεί triadimefon σε συγκέντρωση $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 25°C και απομόνωση των αποικιών που αναπτύσσονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα.

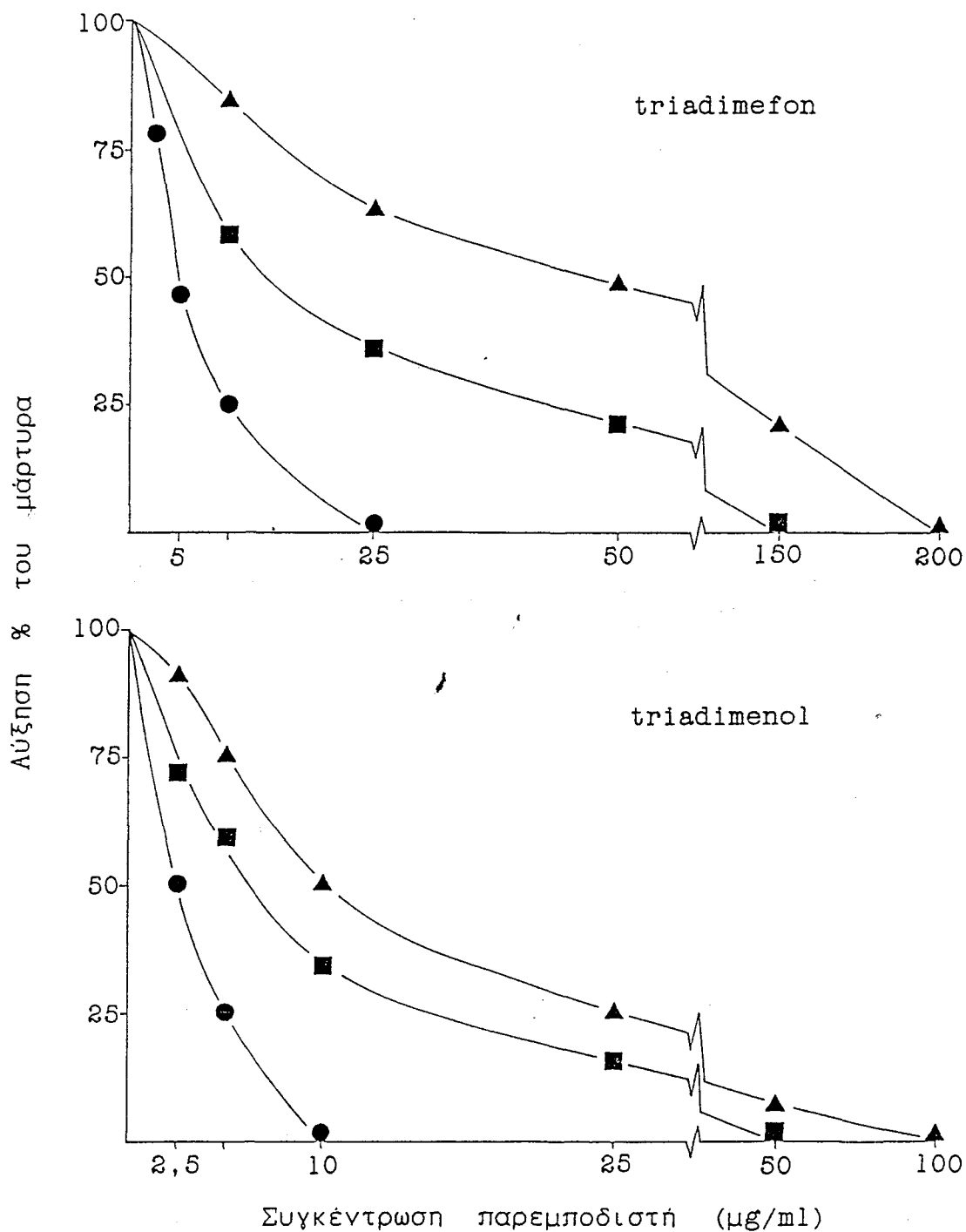
Ο αριθμός των ανθεκτικών αποικιών που εμφανίσθηκαν σε συνάρτηση με το χρονικό διάστημα από την ακτινοβόληση δίνονται στο Σχήμα 37. Από τις αποικίες αυτές γίνονταν μονόσπορες απομονώσεις, λεπτομερής έλεγχος της ευαισθησίας τους στο triadimefon και ταξινόμησή τους σε κατηγορίες με βάση το επίπεδο ανθεκτικότητάς τους (Σχήμα 38). Η συχνότητα εμφάνισης των ανθεκτικών στελεχών ήταν της τάξεως του $3,5 \times 10^{-4}$. Προσδιορίσθηκαν δύο κατηγορίες στελεχών, μέσης και χαμηλής ανθεκτικότητας με συχνότητα εμφάνισης $2,1 \times 10^{-4}$ και $1,4 \times 10^{-4}$ αντίστοιχα. Ο παράγοντας ανθεκτικότητας που υπολογίσθηκε με βάση τις ED_{50} , ήταν 5,5 για τα μέσης και 2,0 για τα χαμηλής ανθεκτικότητας στελέχη. Η γενική εμφάνιση όλων των ανθεκτικών στελεχών που απομονώθηκαν σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο ήταν παρόμοια μ' αυτή του αρχικού αγρίου στελέχους.

Από κάθε κατηγορία επιλέχθηκαν 4 απομονώσεις για πιο λεπτομερή έλεγχο της ευαισθησίας τους στο triadimenol (Σχήμα 38) και τα διαστερεοϊσομερή του A και B (Σχήμα 39). Επιπλέον, τα στελέχη αυτά δοκιμάσθηκαν και στα τριαζολικά bitertanol και propiconazole, το ιμιδαζολικό clotrimazole και το πυριμιδινικό fenarimol (Πίνακας 6). Τα στελέχη με μέσο επίπεδο ανθεκτικότητας στο triadimefon παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στο triadimenol και τα διαστερεοϊσομερή του A και B, παρόμοια μ' αυτή των *tri-1* στελεχών. Παρόμοια ήταν και η συμπεριφορά των στελεχών αυτών και στους άλλους

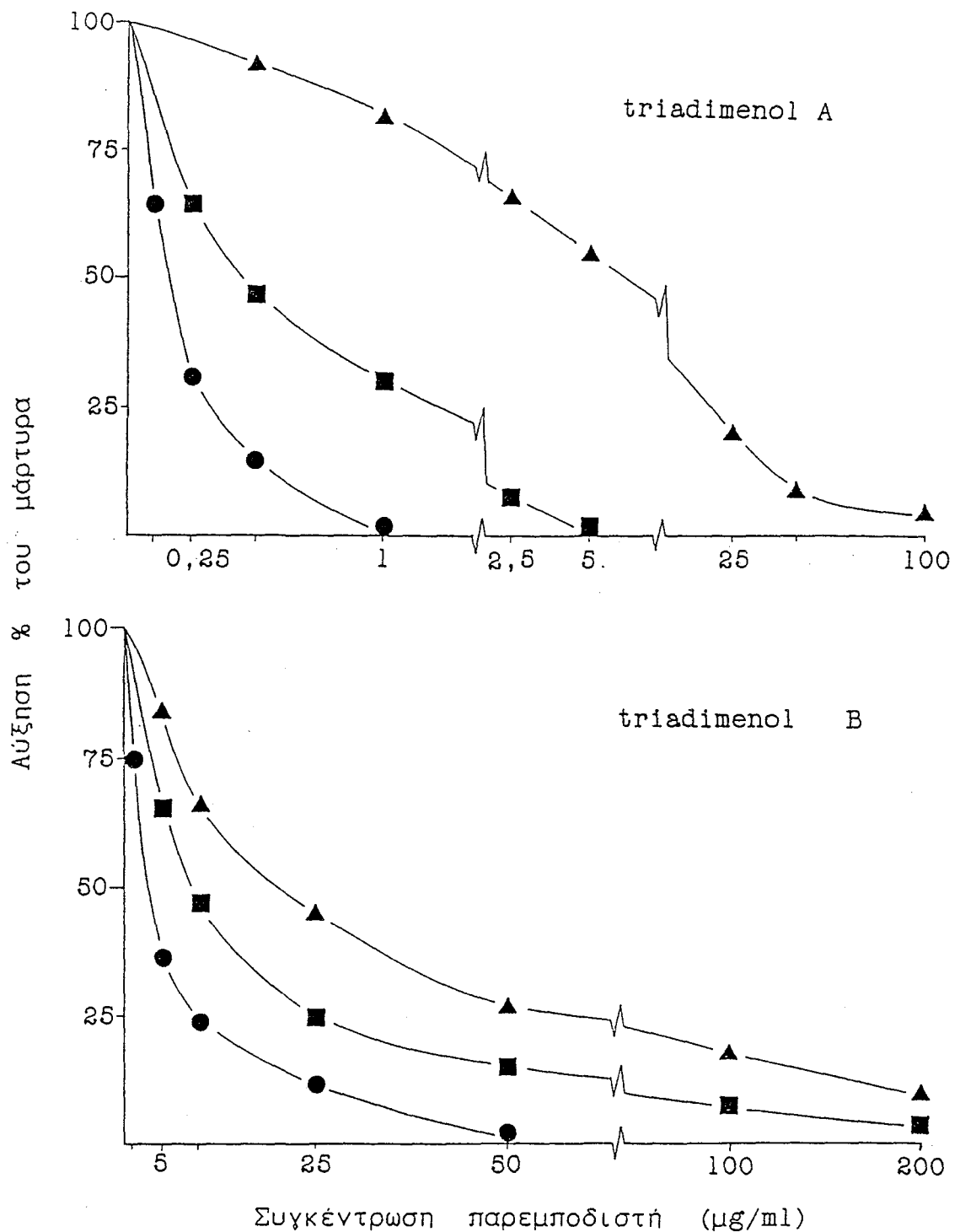


Σχήμα 37. Ιστόγραμμα της εμφάνισης ανθεκτικών στο triadimefon αποικιών του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε θρεπτικό υλικό CM με triadimefon (100 µg/ml) σε συνάρτηση με το χρόνο που μεσολάβησε από την ακτινοβόληση.

παρεμποδιστές που δοκιμάστηκαν, δηλαδή τα στελέχη αυτά παρουσιάζονται ανθεκτικά στα bitertanol και propiconazole, το ίδιο ευαίσθητα με το άγριο στο fenarimol και περισσότερο ευαίσθητα απ' αυτό στο clotrimazole, όπως ακριβώς και τα *tri-1* στελέχη. Αντίθετα, τα χαμηλής ανθεκτικότητας στο triadimefon στελέχη εμφανίζουν χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα σε όλους τους παρεμποδιστές που δοκιμάστηκαν, όπως δηλαδή συμβαίνει και με τα *fen* στελέχη του ιδίου οργανισμού. Συνεπώς, η προσπάθεια αυτή δεν οδήγησε σε αναγνώριση νέου τύπου ανθεκτικότητας στο triadimefon.



Σχήμα 38. Επίδραση του triadimefon και του triadimenol στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των με μέσο (▲) και χαμηλό (■) επίπεδο ανθεκτικότητας στο triadimefon στελεχών του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* που απομονώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό με triadimefon. Επίσπαση επί 4 ημέρες στους 25°C σε στερεό θρεπτικό υλικό CM παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές για τα ανθεκτικά στελέχη είναι ο μέσος όρος τεσσάρων απομονώσεων της ίδιας κατηγορίας ως προς το βαθμό ανθεκτικότητας στο triadimefon.



Σχήμα 39. Επίδραση των διαστεροϊσομερών A και B του triadimenol στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των με μέσο (▲) και χαμηλό (■) επίπεδο ανθεκτικότητας στο triadimefon στελεχών του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* που απομονώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό με triadimefon. Επώαση επί 4 ημέρες στους 25°C σε στερεό θρεπτικό υλικό CM παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές για τα ανθεκτικά στελέχη είναι ο μέσος όρος τεσσάρων απομονώσεων της ίδιας κατηγορίας ως προς το βαθμό ανθεκτικότητας στο triadimefon.

Πίνακας 6. Επίδραση διαφόρων αντιπροσώπων των EBI's στην ανάπτυξη των επιλεχθέντων σε υλικό με triadimefon στελεχών του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25° C.

Παρεμποδιστής	Συγκέντρ. (μg/ml)	Άγριο Στέλ.	Ανάπτυξη % του μάρτυρα		
			<i>tri-1</i> Στέλ.	M.A. ^α	X.A. ^β
bitertanol	0,5	14,1	63,0	66,7	46,9
	1,5	0,0	31,1	36,7	30,6
propiconazole	0,025	21,9	67,2	75,5	60,7
	0,05	0,0	33,1	43,3	42,9
clotrimazole	0,5	76,9	28,8	26,7	85,3
	1	54,4	15,5	10,4	61,2
fenarimol	0,25	21,8	19,3	16,3	38,4
	1	0,0	0,0	0,0	24,4

^α Μέσος όρος τεσσάρων στελεχών μέσης ανθεκτικότητας στο triadimefon.

^β Μέσος όρος τεσσάρων στελεχών χαμηλής ανθεκτικότητας στο triadimefon.

3.3.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΛΛΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ TRIADIMEFON

Για την επιλογή ενός καταλληλότερου βιολογικού υλικού για τη διερεύνηση της λειτουργίας μηχανισμού μη ενεργοποίησης του triadimefon μελετήθηκαν οι μύκητες *Cladosporium cucumerinum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* και *P. digitatum*, ως προς την ευαισθησία τους στο triadimefon, τα διαστεροεισομερή του triadimenol αλλά και ως προς την αναλογία των διαστεροεισομερών του triadimenol που παράγεται μετά από μεταβολισμό του triadimefon. Για το σκοπό αυτό, καλλιέργειες των παραπάνω μυκήτων επώασθηκαν για 48 ώρες παρουσία 100 μg ml⁻¹ triadimefon και η παραλαβή και ανάλυση των εκχυλισμάτων από το υλικό της καλλιέργειας έγινε με τον ίδιο τρόπο όπως και στην περίπτωση του *N. haematococca* var. *cucurbitae*. Από τα

Πίνακας 7. Επίδραση του triadimefon και των διαστεροϊσομερών A και B του triadimenol στην ανάπτυξη τεσσάρων φυτοπαθογόνων μυκήτων και ποσοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων του υλικού της καλλιέργειας (C&S ενισχυμένο με εκχύλισμα ζύμης) μετά από επώαση με 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ triadimefon για 48 ώρες.

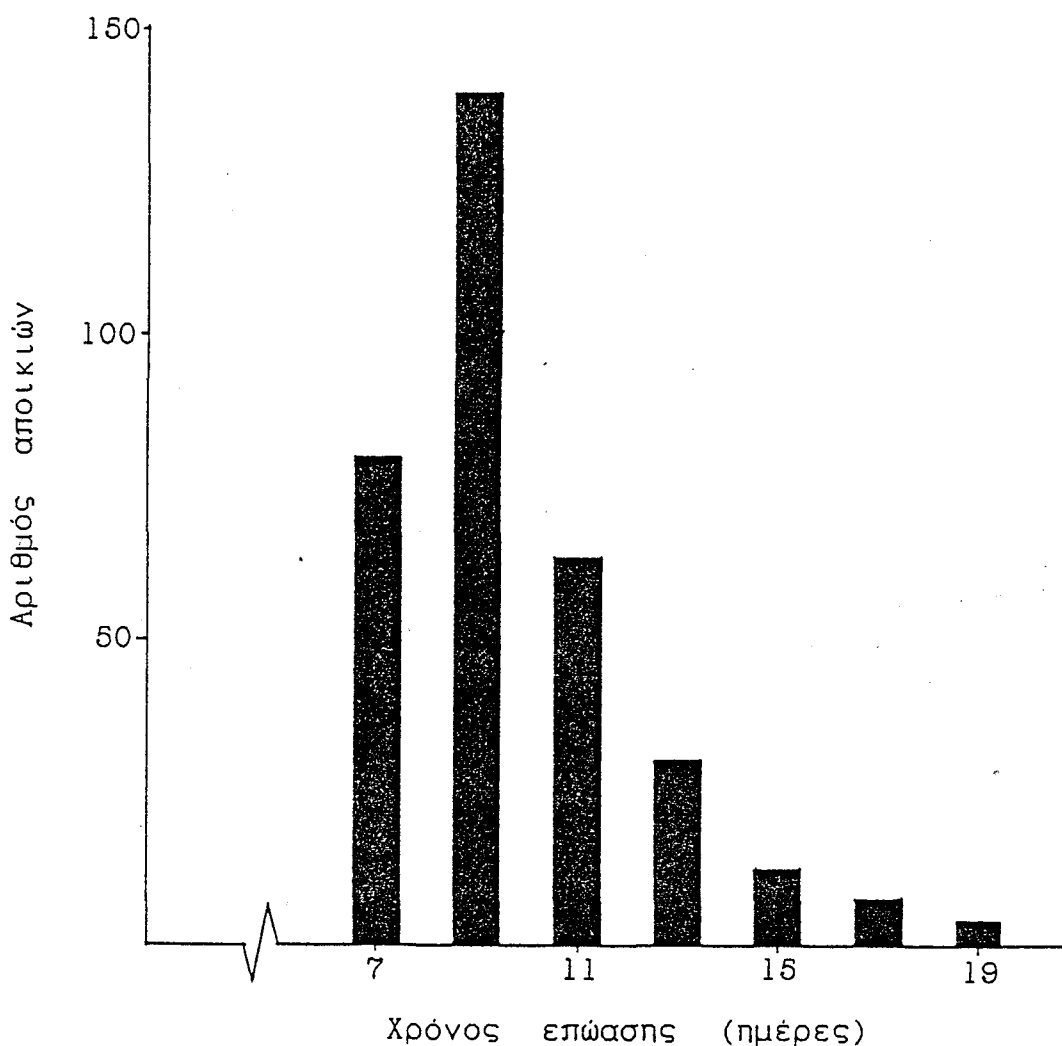
Μύκητας	T _N	ED ₅₀ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		Σχετ. τοξικ. διαστ. ^α	Αναγ. T _N %	Αναλογία διαστερ. A : B
		A	B			
<i>Cladosporium sp.</i>	1	0,25	2,5	10	21,4	48,3 : 51,7
<i>B. cinerea</i>	4,5	1,25	12,5	10	30,6	92,2 : 7,8
<i>P. italicum</i>	1,5	1,5	6	4	8,1	37,3 : 62,7
<i>P. digitatum</i>	1,5	1,5	6	4	8,2	32,9 : 67,1

^α Ο λόγος ED₅₀ για τα διαστεροϊσομερές B : ED₅₀ για το διαστεροϊσομερές A.

αποτελέσματα που δίνονται στον Πίνακα 7, προκύπτει ότι ο *B. cinerea* πληροί τις προϋποθέσεις για ανάπτυξη ανθεκτικότητας με μείωση του βαθμού ενεργοποίησης του triadimefon. Πιο συγκεκριμένα, το διαστεροϊσομέρες A βρέθηκε να είναι 10 φορές πιο τοξικό από το B και επιπλέον ένα υψηλό ποσοστό, περίπου 30%, του triadimefon μεταβολίζεται σε triadimenol από το οποίο το 92% είναι το διαστεροϊσομερές A. Δηλαδή θα μπορούσε να επιλεγούν στελέχη του μύκητα αυτού με μικρότερο βαθμό αναγωγής του triadimefon σε triadimenol ή με αλλαγή της αναλογίας των παραγόμενων διαστεροϊσομερών του triadimenol με αποτέλεσμα μειωμένη ευαισθησία στο triadimefon.

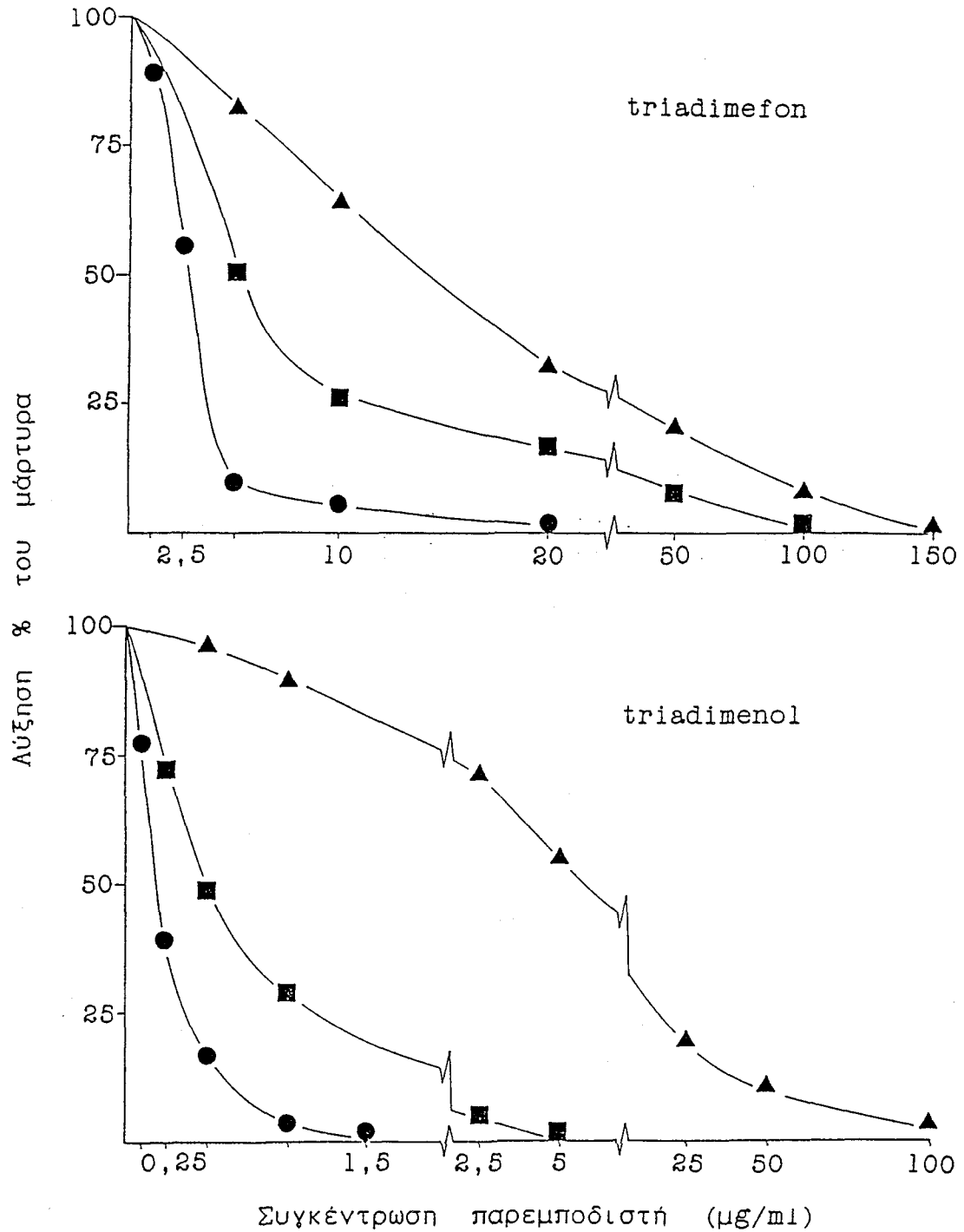
Για την επιλογή των επιθυμητών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το άγριο στέλεχος B₃ του *B. cinerea*. Αιώρημα κονιδίων με πυκνότητα 4×10^7 σπόρια ml^{-1} επώασθη με ΝΥΓ για 5 ώρες όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.7. Το ποσοστό θνησιμότητας από την επίδραση του μεταλλαξογόνου χημικού παράγοντα ήταν 95,0%. Μετά τη μεταλλαξογόνο επίδραση, το αιώρημα απλώθηκε σε 20 τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA που περιείχε 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ triadimefon. Ακολούθησε επώαση στους 21°C και απομόνωση των αποικιών που αναπτύσσονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Ο αριθμός των ανθεκτικών αποικιών που εμφανίσθηκαν σε συνάρτηση με το



Σχήμα 40. Ιστόγραμμα της εμφάνισης ανθεκτικών στο triadimefon αποικιών του μύκητα *B. cinerea* σε θρεπτικό υλικό PDA με triadimefon (100 $\mu\text{g/ml}$) σε συνάρτηση με το χρόνο που μεσολάβησε από την ακτινοβολία.

χρονικό διάστημα από την μεταλλαξογένεση δίνεται στο Σχήμα 40. Από τις αποικίες αυτές έγιναν μονόσπορες απομονώσεις και στη συνέχεια λεπτομερής έλεγχος της ευαισθησίας τους στο triadimefon (Σχήμα 41) και ταξινόμησή τους σε κατηγορίες με βάση το επίπεδο ανθεκτικότητάς τους. Η συχνότητα εμφάνισης των ανθεκτικών στελεχών ήταν της τάξεως του $3,9 \times 10^{-5}$. Προσδιορίστηκαν δύο κατηγορίες στελεχών, μέσης και χαμηλής ανθεκτικότητας με συχνότητες εμφάνισης $2,5 \times 10^{-5}$ και $1,4 \times 10^{-5}$ αντίστοιχα. Ο παράγοντας ανθεκτικότητας που υπολογίστηκε με βάση την ED_{50} ήταν 10,4 για τα μέσης



Σχήμα 41. Επίδραση του triadimefon και του triadimenol στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των με μέσο (▲) και χαμηλό (■) επίπεδο ανθεκτικότητας στο triadimefon στελεχών του μύκητα *B. cinerea* που απομονώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό με triadimefon. Επώαση επί 4 ημέρες στους 21°C σε θρεπτικό υλικό PDA παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές για τα ανθεκτικά στελέχη είναι ο μέσος όρος τεσσάρων απομονώσεων της ίδιας κατηγορίας ως προς το βαθμό ανθεκτικότητας στο triadimefon.

Πίνακας 8. Ευαισθησία του αγρίου και τεσσάρων μέσου επιπέδου ανθεκτικότητας στο triadimefon στελεχών του μύκητα *B. cinerea* σε πέντε άλλους EBI's σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 4 ημερών στους 21°C.

Παρεμποδιστής	ED ₅₀ (μg ml ⁻¹)		
	Άγριο Στέλ.	Ανθεκτ. Στελ. ^α	Παράγ. Ανθεκτ.
bitertanol	1,56	7	4,5
propiconazole	0,14	0,5	3,6
clotrimazole	0,6	2,5	4,2
fenarimol	1,4	8,7	6,3
fenpropimorph	0,18	0,18	1

^α Μέσος όρος τεσσάρων μέσου επιπέδου ανθεκτικότητας στο triadimefon στελεχών.

και 3,1 για τα χαμηλής ανθεκτικότητας στελέχη. Η γενική εμφάνιση σε υλικό χωρίς παρεμποδιστή όλων των ανθεκτικών στελεχών που απομονώθηκαν ήταν παρόμοια μ' αυτή του αρχικού αγρίου στελέχους.

Τα ανθεκτικά στο triadimefon στελέχη δοκιμάστηκαν και ως προς την ευαισθησία τους στο triadimenol (Σχήμα 41). Διαπιστώθηκε και εδώ η ύπαρξη δύο κατηγοριών και πιο συγκεκριμένα τα μέσης ή χαμηλής ανθεκτικότητας στο triadimefon ήταν παρόμοια μέσης ή χαμηλής ανθεκτικότητας στο triadimenol. Ο παράγοντας ανθεκτικότητας που υπολογίστηκε με βάση την ED₅₀ για τις δύο κατηγορίες ήταν 4.0 και 2,5 για τα μέσης και χαμηλής ανθεκτικότητας στελέχη αντίστοιχα. Δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη κανενός ανθεκτικού στο triadimefon αλλά ευαίσθητου στο triadimenol στελέχους. Μελετήθηκε επίσης η ευαισθησία του αγρίου και των μέσης ανθεκτικότητας στο triadimefon στελεχών σε άλλα μέλη των EBI's και συγκεκριμένα στα τριαζολικά bitertanol και propiconazole, το ιμιδαζολικό clotrimazole, το πυριμιδινικό fenarimol και το μορφολινικό fenpropimorph (Πίνακας 8). Σ' όλες τις περιπτώσεις, με

εξαιρέση το fenpropimorph, η ευαισθησία των ανθεκτικών στο triadimefon στελεχών ήταν, συγκριτικά με το άγριο, μειωμένη και ο παράγοντας ανθεκτικότητας που υπολογίσθηκε με βάση την ED₅₀ κυμαινόταν μεταξύ 3,6 και 6,3. Αντίθετα, στο fenpropimorph η ευαισθησία του αγρίου και των ανθεκτικών στο triadimefon στελεχών ήταν παρόμοια. Συνεπώς ούτε στον *B. cinerea* αναγνωρίσθηκε ανθεκτικότητα στο triadimefon λόγω τροποποιημένης ικανότητας αναγωγής προς triadimenol.

3.4. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ *tri-1* ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *N. HAEMATOCOCCA* VAR. *CUCURBITAE*

Έχει αναφερθεί (Κεφάλαιο 1.5) ότι η ανθεκτικότητα στους EBI's είναι συνήθως χαμηλού επιπέδου, ελέγχεται μάλλον από πολυγονικά συστήματα κληρονομικότητας και συχνά συνοδεύεται από μείωση της προσαρμοστικότητας των στελεχών. Αντίθετα, τα *tri-1* στελέχη του *N. haematococca* var. *cucurbitae* χαρακτηρίζονται από υψηλή ανθεκτικότητα στο triadimenol που ελέγχεται από ένα μόνο γόνο που δεν επηρεάζει την προσαρμοστικότητα. Τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν μια ιδιόμορφη, από την άποψη της διασταυρωτής ανθεκτικότητας, συμπεριφορά στους EBI's (Κεφάλαιο 3.1) και επιπλέον τέτοιου τύπου στελέχη επαναπομονώνονται εύκολα και μετά από επιλογή στο triadimefon (Κεφάλαιο 3.3).

Η μελέτη του μηχανισμού της πολυγονικής ανθεκτικότητας στο fenarimol στην περίπτωση του *A. nidulans* (De Waard και Van Nistelrooy, 1979), του *P. italicum* (De Waard και Van Nistelrooy, 1984) και του *N. haematococca* var. *cucurbitae* (Kalamarakis και συνεργάτες, 1991) απέδειξε τη λειτουργία ενός μηχανισμού ενεργού απέκκρισης του παρεμποδιστή από το εσωτερικό του κυττάρου. Μειωμένη αλληλεπίδραση των DMIs με το ενζυμικό σύστημα της απομεθυλίωσης του C-14 της λανοστερόλης σαν αποτέλεσμα αλλαγών στη δομή του κυτοχρώματος P-450 έχει αναφερθεί σε ζύμες (Aoyama και συνεργάτες, 1983a. Vanden Bossche και συνεργάτες, 1987) όχι όμως και στην περίπτωση των μυκηλιακών μυκήτων. Τα στοιχεία αυτά μας οδήγησαν στη σκέψη να μελετήσουμε τον βιοχημικό μηχανισμό της ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών στο triadimenol και συγκεκριμένα την επίδραση του γόνου *tri-1* τόσο στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης όσο και στο επίπεδο του ενζυμικού συστήματος της απομεθυλίωσης του C-14 της λανοστερόλης, που αποτελεί τη θέση δράσης του triadimenol και έχει κύριο συστατικό το κυτόχρωμα P-450.

3.4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΣΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΣΕ ΕΝΑ *tri-1* (TL-34) ΣΤΕΛΕΧΟΣ

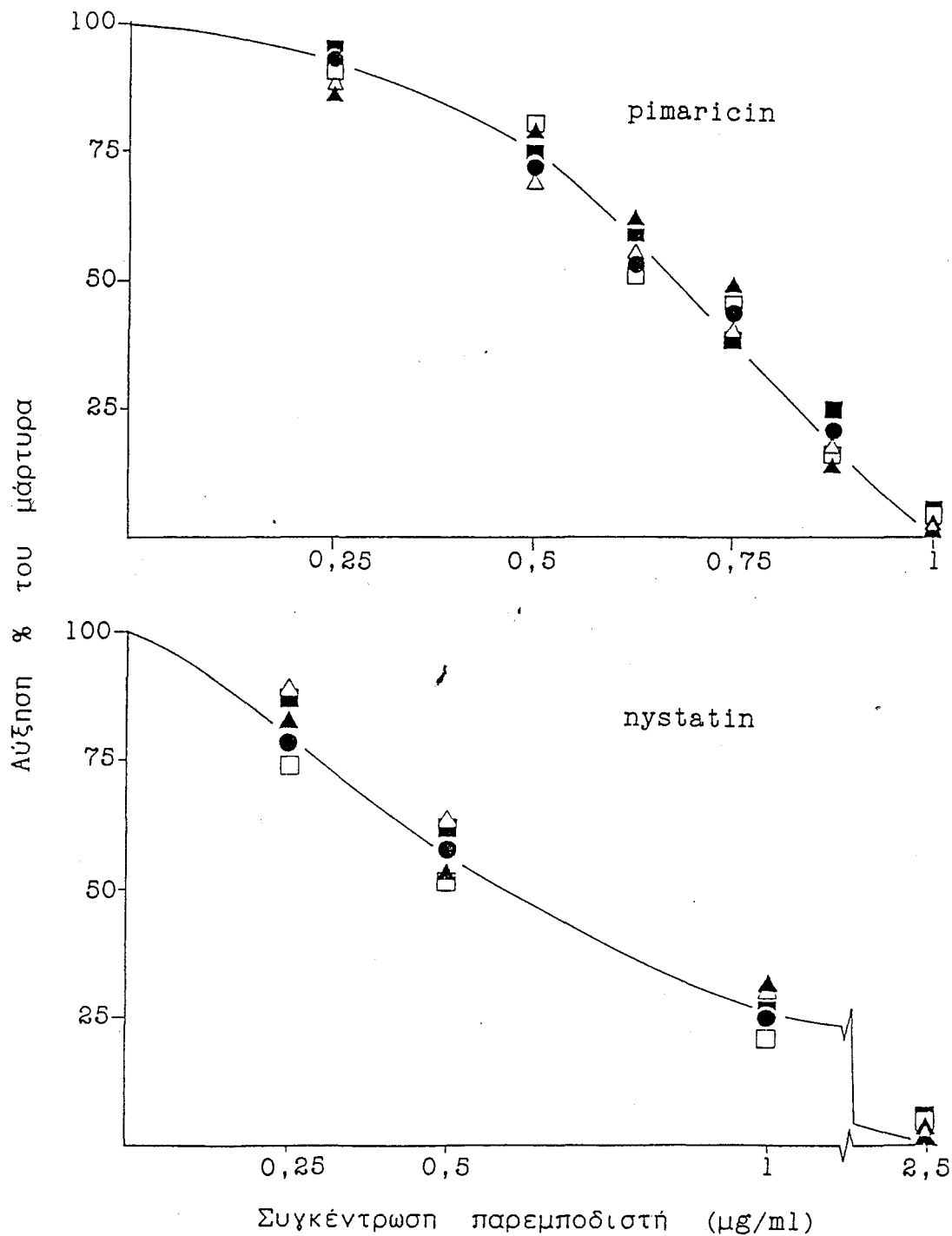
Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.3, η εργοστερόλη είναι η κύρια στερόλη στις

κυτταρικές μεμβράνες των περισσότερων μυκήτων και ο βιολογικός της ρόλος είναι καθοριστικός για την βιωσιμότητα των οργανισμών αυτών. Έτσι, για την προσέγγιση του μηχανισμού ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί αν η εργοστερόλη είναι το τελικό προϊόν της βιοσυνθετικής διαδικασίας των στερολών σ' αυτά τα στελέχη και αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της παρεμπόδισης της παραγωγής της εργοστερόλης και της μείωσης της ανάπτυξης από την παρουσία των EBI's στο άγριο και ένα *tri-1* στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*. Ένας παράλληλος στόχος ήταν η διερεύνηση των αποτελεσμάτων από τη μελέτη της διασταυρωτής ανθεκτικότητας (Κεφάλαιο 3.1) και στο επίπεδο των στερολών. Πιο συγκεκριμένα θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν παρουσία διαφόρων αντιπροσώπων των EBI's η μείωση της παραγωγής της εργοστερόλης είναι η κύρια παράμετρος που καθορίζει τη μείωση της ανάπτυξης του μύκητα και αν η διαφορετική ευαισθησία μεταξύ του αγρίου και των *tri-1* στελεχών, σε όσες περιπτώσεις παρατηρείται, εκφράζεται και στο ποσοστό της εργοστερόλης στο σύνολο των στερολών που συντίθενται.

3.4.1.1. Μελέτη της επίδρασης των πολυενίων στην ανάπτυξη του μύκητα.

Τα πολυένια, pimaricin και nystatin, είναι αντιβιοτικά που παράγονται από είδη του γένους *Streptomyces* και παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με την εργοστερόλη. Ο τρόπος δράσης τους συνίσταται στη δυνατότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με τα μόρια της εργοστερόλης, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η φυσιολογική της δράση και τελικά να αποδιοργανώνεται η δομή και η λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών (Kobayashi και Medoff, 1977). Οι ουσίες αυτές είναι φωτοευαίσθητες και για το λόγο αυτό δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη γεωργική πράξη σε ψεκασμούς φυλλώματος.

Η μελέτη της μυκητοτοξικότητας των πολυενίων θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα για να διερευνηθεί αν η εργοστερόλη παίζει τον ίδιο σημαντικό ρόλο στη δόμηση των κυτταρικών μεμβρανών των ανθεκτικών στελεχών ή έχει αντικατασταθεί, εν μέρη τουλάχιστον, από άλλες στερόλες (Ziogas και συνεργάτες, 1983). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αυτή που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.5 με τη διαφορά ότι η επώαση των τρυβλίων έγινε στο σκοτάδι, έτσι ώστε να αποφευχθεί η φωτόλυση των πολυενίων. Από τα αποτελέσματα που δίνονται στο Σχήμα 42, προκύπτει ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ του αγρίου και των *tri-1* στελεχών ως προς την ευαισθησία στα δύο πολυένια, κάτι που αποτελεί μια πρώτη ισχυρή ένδειξη ότι η εργοστερόλη υπάρχει στις κυτταρικές μεμβρά-



Σχήμα 42. Επίδραση των πολυενίων, pimaricin και nystatin στην ανάπτυξη του αγρίου (●) και των *tri-1* ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών TL-31 (■), TL-34 (▲), TL-316 (△) και TL-320 (□) του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε στερεό θρεπτικό υλικό CM μετά από επώαση 4 ημερών στους 25°C παρουσία του παρεμποδιστή. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

νες και είναι εξίσου απαραίτητη για την ανάπτυξη τόσο του αγρίου όσο και των *tri-1* στελεχών.

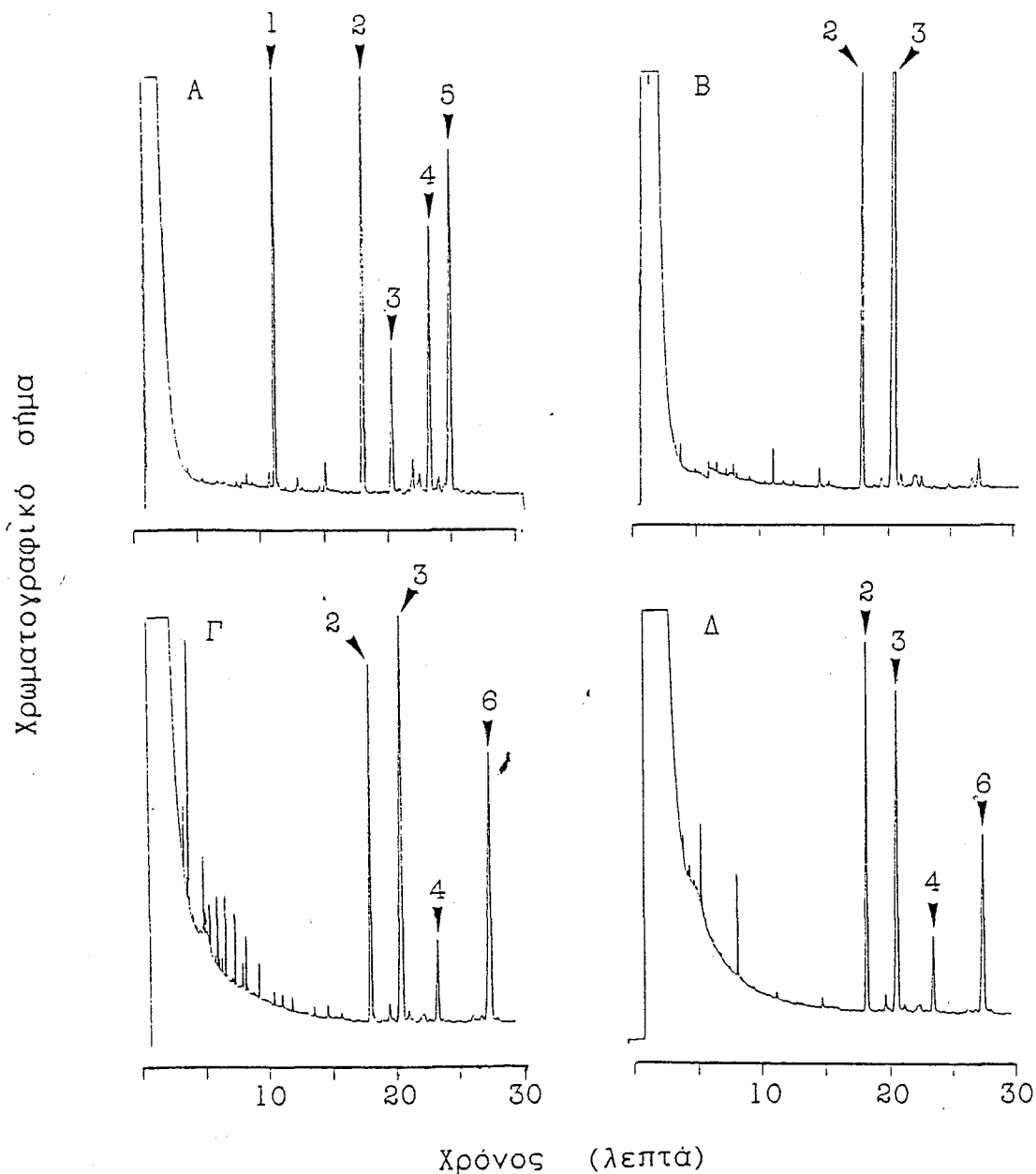
3.4.1.2. Μελέτη της βιοσύνθεσης των στερολών παρουσία triadimenol.

Αρχικά μελετήθηκαν οι στερόλες που παράγονται απουσία παρεμποδιστών στο άγριο και το ανθεκτικό στο triadimenol TL-34 στέλεχος του *N. haematococca* var. *cucurbitae*. Η ταυτοποίηση των στερολών στα δείγματα έγινε με τη βοήθεια μίγματος στερολών σε καθαρή μορφή και πιο συγκεκριμένα σκουαλενίου, χοληστερόλης, εργοστερόλης και λανοστερόλης. Το σκεύασμα της λανοστερόλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν καθαρότητας 50-60% με κύρια πρόσμιξη την ομπτουσιφολιόλη (Σχήμα 43A). Διαπιστώθηκε τόσο στο άγριο, όσο και στο *tri-1* στέλεχος η παρουσία της εργοστερόλης σε υψηλά ποσοστά επί του συνόλου των στερολών με $RRT_{\text{ελόι}}$ 1,13 (Σχήμα 43B).

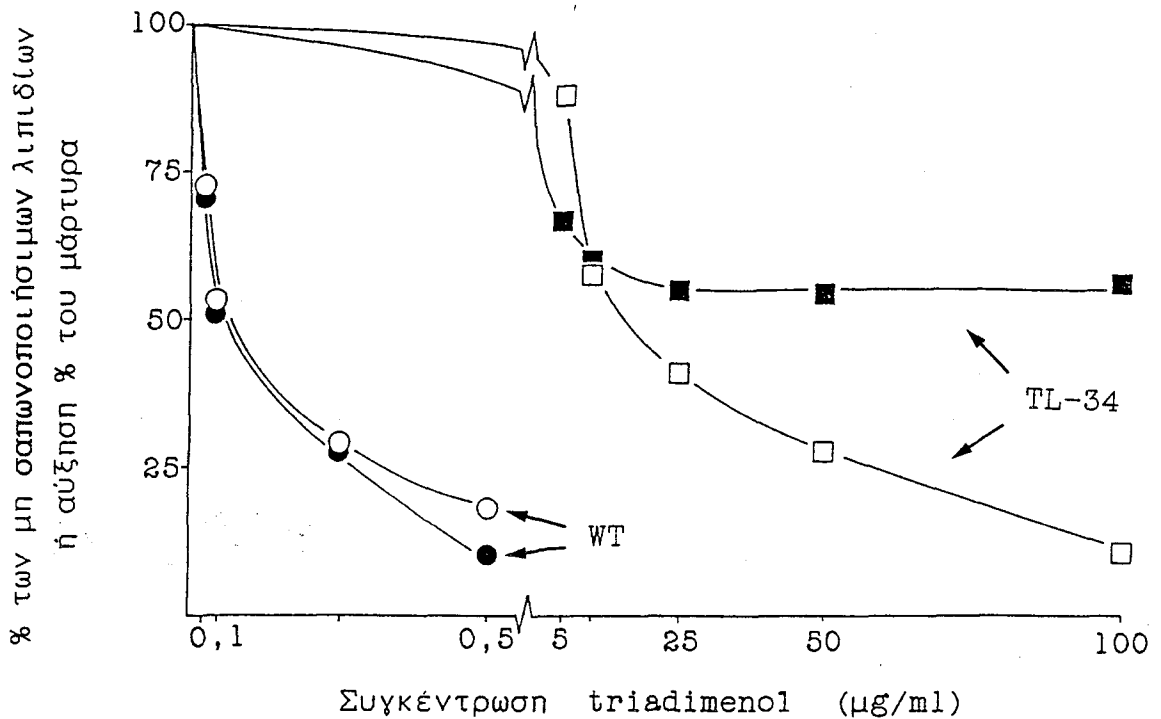
Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά από συγκεντρώσεις triadimenol στο άγριο στέλεχος έτσι ώστε να έχουμε διάφορους βαθμούς παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μύκητα. Στα εκχυλίσματα που αναλύθηκαν, εκτός από την εργοστερόλη ανιχνεύθηκαν και δύο άλλες στερόλες που αναγνωρίστηκαν σαν εμπουρικόλη και ομπτουσιφολιόλη με $RRT_{\text{ελόι}}$ 1,28 και 1,50 αντίστοιχα (Σχήμα 43Γ). Η εμπουρικόλη βρίσκεται πριν από την απομεθυλίωση του C-14 της λανοστερόλης στη μεταβολική οδό βιοσύνθεσης της εργοστερόλης και αποτελεί το υπόστρωμα αυτής της ενζυμικής αντίδρασης. Η ομπτουσιφολιόλη προέρχεται από την εμπουρικόλη και προκύπτει από την απομάκρυνση μιας μεθυλομάδας από τη θέση C-4 του μορίου της εμπουρικόλης όταν παρεμποδίζεται η απομεθυλίωση του C-14 που είναι και η θέση δράσης του triadimenol και των άλλων DMIs.

Από τα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό της εργοστερόλης μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του παρεμποδιστή και ακολουθεί πορεία σχεδόν παράλληλη μ' αυτή της μείωσης της ανάπτυξης του μυκηλίου (Σχήμα 44). Αντίθετα, η συσσώρευση της εμπουρικόλης και σε σημαντικά μικρότερο βαθμό της ομπτουσιφολιόλης, αυξάνει καθώς αυξάνει η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα (Σχήμα 45).

Για τη μελέτη της επίδρασης του triadimenol στο TL-34 στέλεχος, εφαρμόστηκαν συγκεντρώσεις 100πλάσιες απ' ότι στην περίπτωση του αγρίου έτσι ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητική παρεμπόδιση της ανάπτυξης. Στα εκχυλίσματα ανιχνεύθηκαν οι ίδιες στερόλες μ' αυτές που προσδιορίστηκαν



Σχήμα 43. Αεριοχρωματογραφική ανάλυση: Α. μίγματος σκουαλενίου, χοληστερόλης, εργοστερόλης, ομπουσιφολιόλης και λανοστερόλης. Β. εκχυλίσματος από το μυκήλιο ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* μετά από 24 ώρες επώαση στους 25°C σε υγρό θρεπτικό υλικό C&S απουσία παρεμποδιστή. Γ. εκχυλίσματος από το άγριο στέλεχος μετά από επίδραση με triadimenol συγκέντρωσης 0,1 μg/ml για 24 ώρες και επώαση στις ίδιες συνθήκες. Δ. εκχυλίσματος από το TL-34 στέλεχος μετά από επίδραση με triadimenol συγκέντρωσης 50 μg/ml. για 24 ώρες και επώαση στις ίδιες συνθήκες. Ταυτοποίηση κορυφών ως εξής: 1. σκουαλένιο, 2. χοληστερόλη, 3. εργοστερόλη, 4. ομπουσιφολιόλη, 5. λανοστερόλη και 6. εμπουρικόλη.

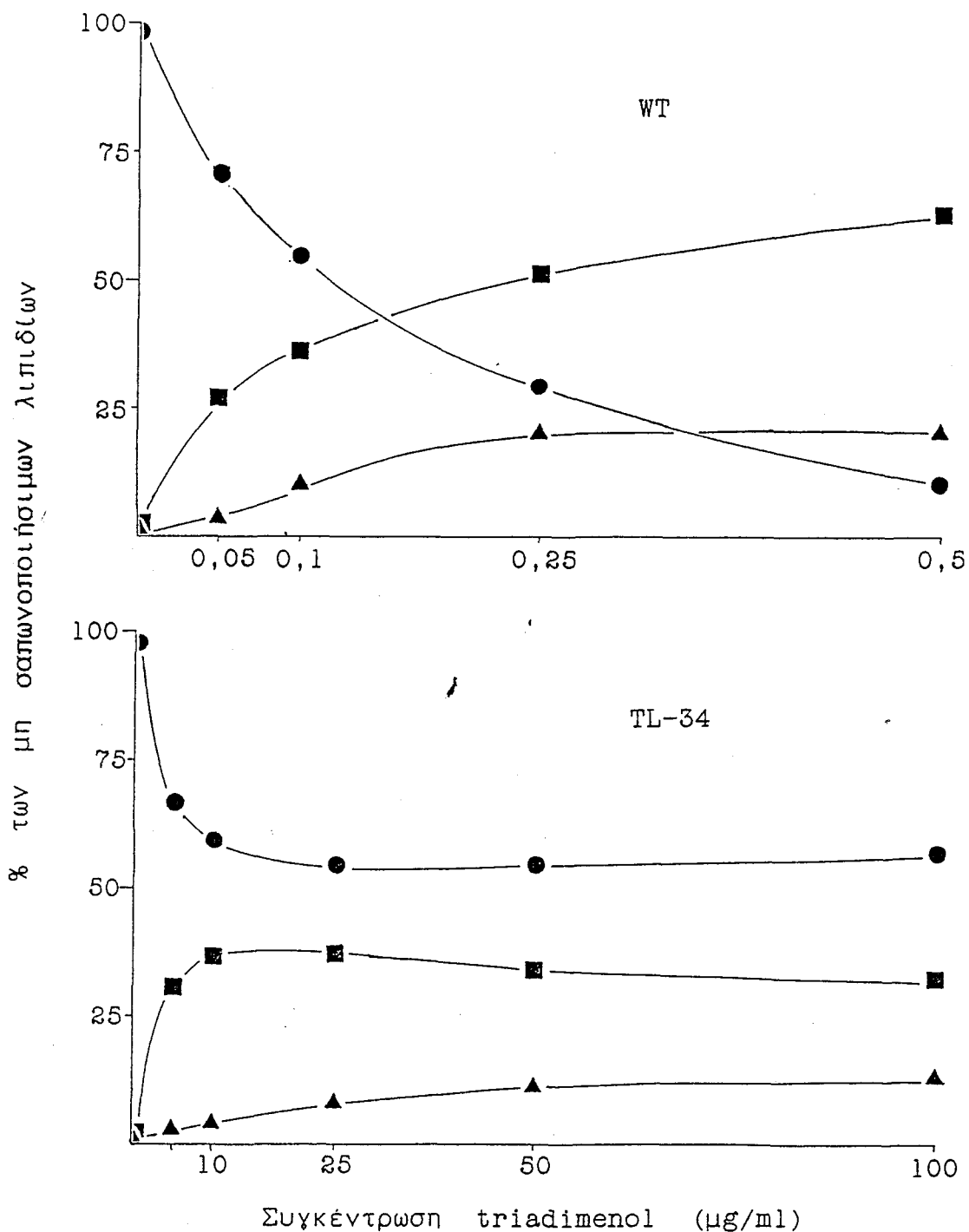


Σχήμα 44. Επίδραση του triadimenol στην ανάπτυξη (○, □) και τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (●, ■) στο αγρίου (WT) και ένα *tri-1* (TL-34) στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, μετά από 24 ώρες επώαση στους 25°C σε υγρό θρεπτικό υλικό C&S παρουσία του παρεμποδιστή.

στην περίπτωση του αγρίου στελέχους (Σχήμα 43Α), αλλά η συσχέτιση της παραγωγής τους με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης ήταν διαφορετική. Πιο συγκεκριμένα, ενώ αρχικά το ποσοστό της εργοστερόλης μειώνεται παράλληλα με τη μείωση της ανάπτυξης του μυκηλίου, στη συνέχεια σταθεροποιείται σ' ένα ποσοστό της τάξεως του 55% του συνόλου των στερολών παρά την συνεχιζόμενη μείωση της ανάπτυξης (Σχήμα 44). Οι δύο άλλες στερόλες, εμπουρικόλη και ομπουσιφολιόλη, σταθεροποιούνται σε ποσοστά της τάξεως του 35 και 10% του συνόλου των στερολών αντίστοιχα (Σχήμα 45).

3.4.1.3. Μελέτη της βιοσύνθεσης στερολών παρουσία άλλων EBI's.

Η επιλογή των υπόλοιπων EBI's που μελετήθηκαν, έγινε τόσο με βάση τη θέση

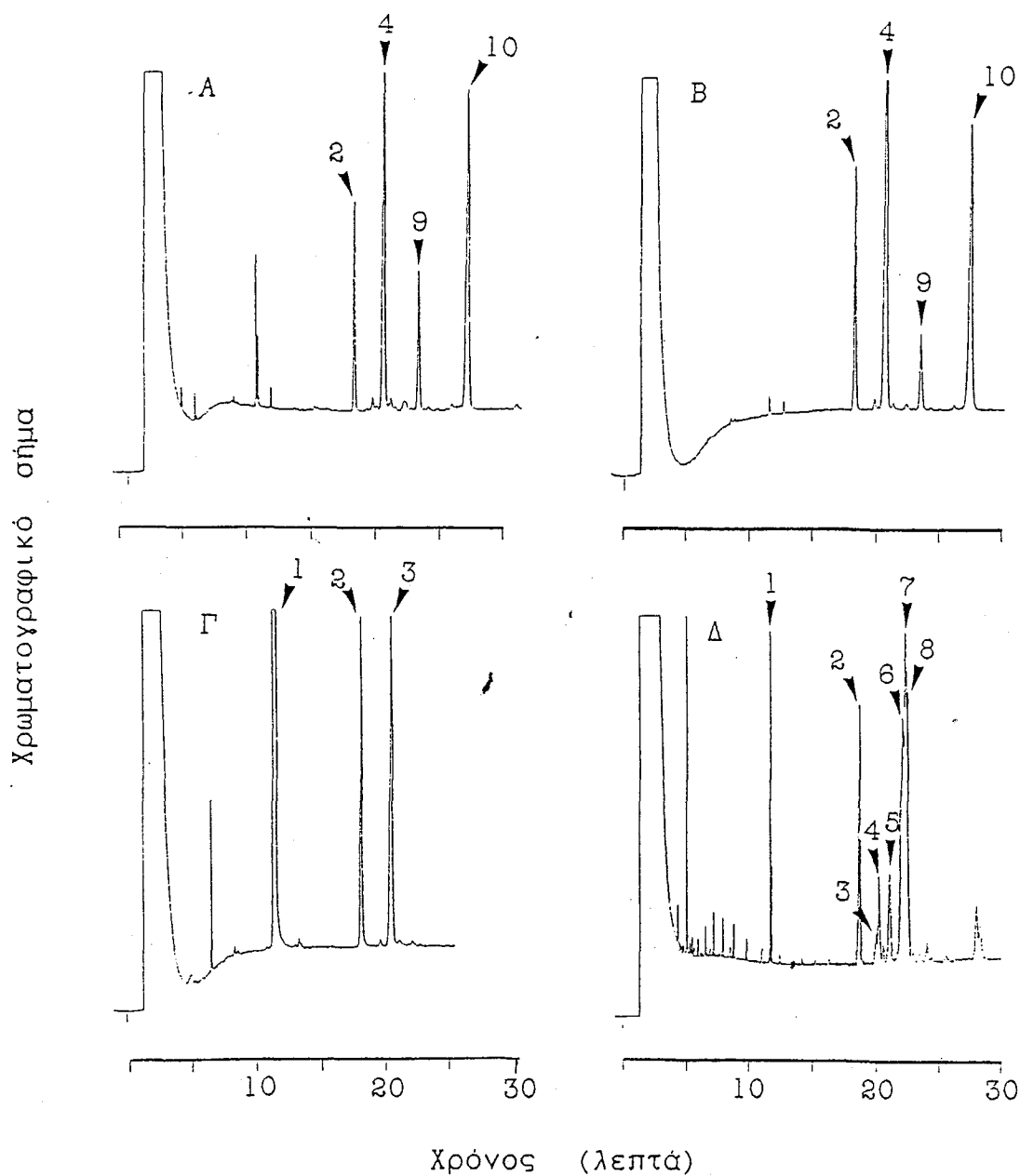


Σχήμα 45. Επίδραση του triadimenol στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (●) και τη συσσώρευση των 14α-μεθυλ-στερολών ομπουσιφολιόλη (▲) και εμπουρικόλη (■) στο μυκήλιο του αγρίου (WT) και ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, μετά από 24 ώρες επώαση στους 25°C σε υγρό θρεπτικό υλικό C&S παρουσία του παρεμποδιστή.

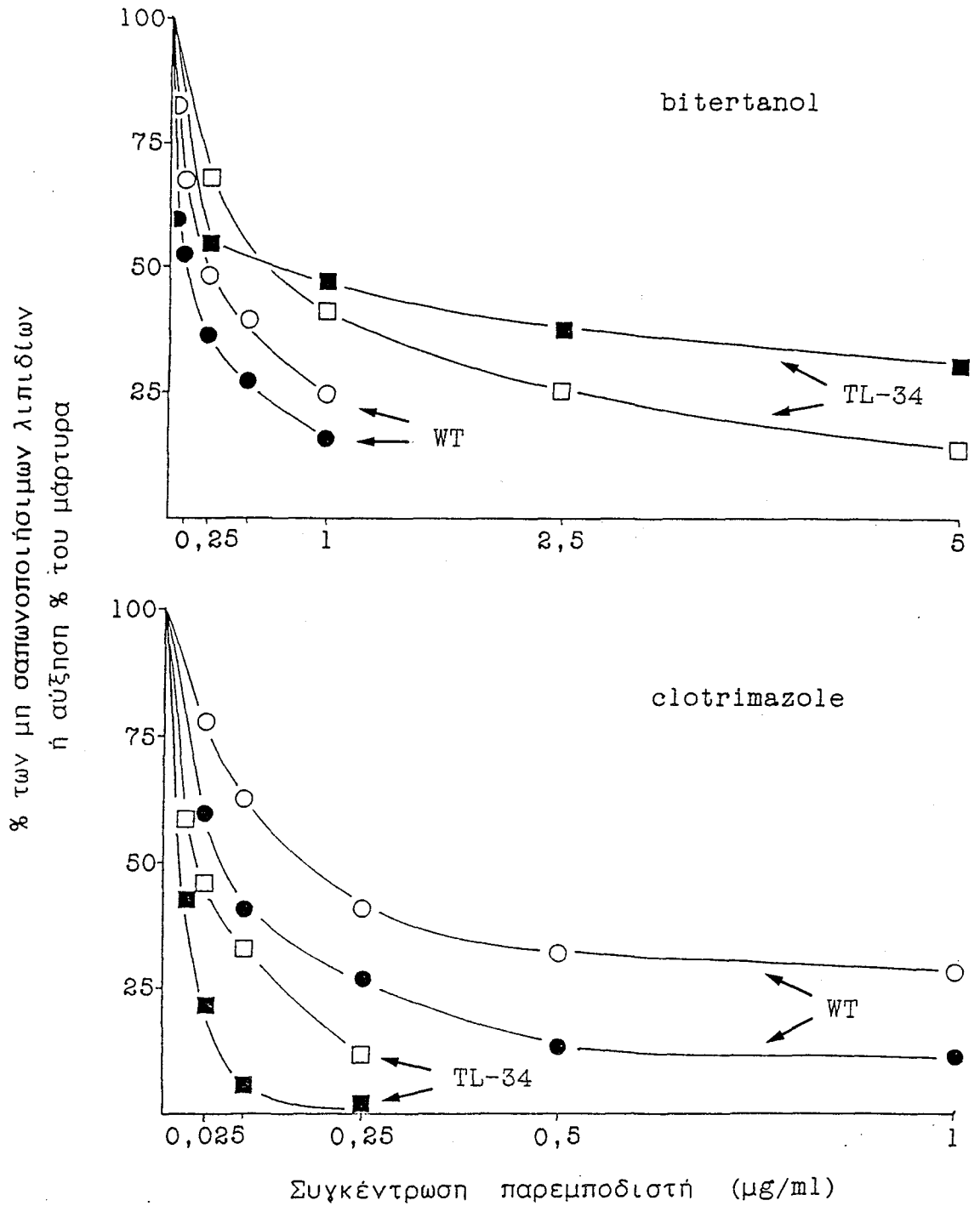
δράσης τους στη διαδικασία βιοσύνθεσης της εργοστερόλης όσο και με βάση τη συσχέτισή τους από την άποψη της διασταυρωτής ανθεκτικότητας με το triadimenol. Από τους DMIs επελέγησαν το τριαζολικό bitertanol και το ιμιδαζολικό clotrimazole που βρίσκονται σε θετική και αρνητική με το triadimenol συσχέτιση αντίστοιχα. Μελετήθηκαν επίσης η αλλυλαμίνη terbinafine και το μορφολινικό fenpropimorph, που δεν συσχετίζονται από την άποψη της διασταυρωτής ανθεκτικότητας με το triadimenol και δρουν σε άλλες θέσεις της μεταβολικής οδού που οδηγεί στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (Κεφάλαιο 1.2).

Κατά την επίδραση με bitertanol τόσο στο άγριο όσο και στο TL-34 ανθεκτικό στέλεχος, ανιχνεύθηκαν οι ίδιες στερόλες όπως και στην περίπτωση του triadimenol (Σχήμα 46A). Στην περίπτωση του αγρίου στελέχους η μείωση του ποσοστού της εργοστερόλης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση, ακολουθεί πορεία παράλληλη μ' αυτή της ανάπτυξης, αλλά σε πιο χαμηλά επίπεδα (Σχήμα 47). Οι πρόδρομες στερόλες εμπουρικόλη και ομπουσιφολιόλη, αντίθετα, συσσωρεύονται αντιστρόφως ανάλογα της παρουσίας εργοστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες (Σχήμα 48). Στην περίπτωση του ανθεκτικού στελέχους, οι συγκεντρώσεις bitertanol που εφαρμόστηκαν ήταν θπλάσιες απ' αυτές που εφαρμόστηκαν στην περίπτωση του αγρίου έτσι ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητική παρεμπόδιση της ανάπτυξης. Το ποσοστό της εργοστερόλης στο σύνολο των στερολών ακολουθεί αρχικά καθοδική πορεία σε συνάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης αλλά στη συνέχεια εμφανίζει τάσεις σταθεροποίησης σε επίπεδα υψηλότερα απ' αυτά της ανάπτυξης του μυκηλίου (Σχήμα 47). Αντίθετα η συσσώρευση των δύο άλλων προδρόμων στερολών αρχικά αυξάνει με την αύξηση της παρεμπόδισης αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις bitertanol το ποσοστό της εμπουρικόλης σταθεροποιείται στο επίπεδο του 50% του συνόλου των στερολών (Σχήμα 48).

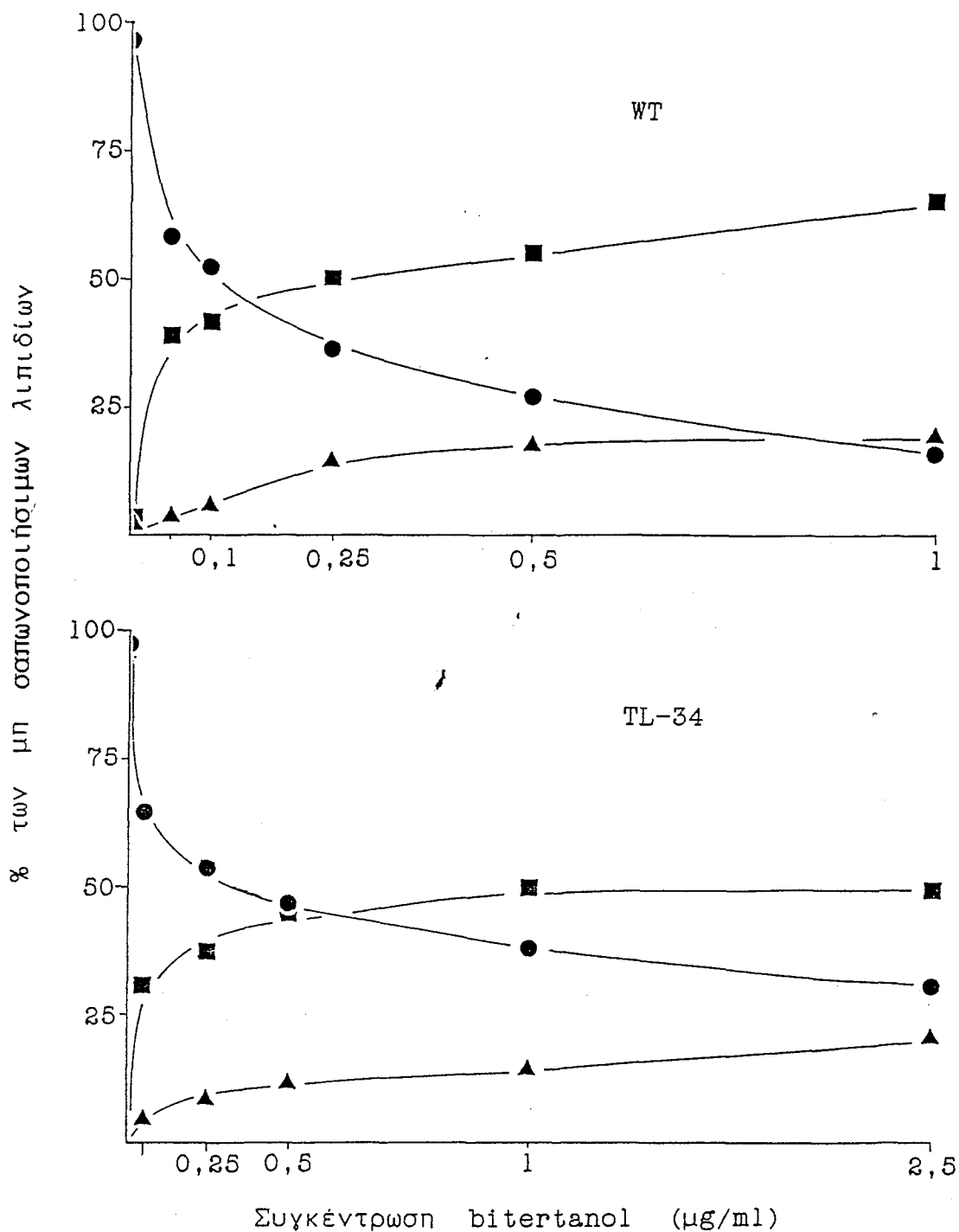
Στην περίπτωση της επίδρασης του clotrimazole στο άγριο και το TL-34 ανθεκτικό στέλεχος, οι στερόλες που ανιχνεύθηκαν ήταν οι ίδιες που παρατηρήθηκαν και στους δύο άλλους DMIs που μελετήθηκαν (Σχήμα 46B). Αντίθετα με ότι συμβαίνει στα τριαζολικά, τα *tri-1* στελέχη είναι περισσότερο ευαίσθητα από το άγριο στα ιμιδαζολικά και γι' αυτό οι συγκεντρώσεις του clotrimazole που εφαρμόστηκαν στην περίπτωση του στελέχους TL-34 ήταν 4 φορές μικρότερες απ' αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση του αγρίου, προκειμένου να έχουμε παρόμοια ποσοστά παρεμπόδισης στην ανάπτυξη και των δύο στελεχών. Παρατηρήθηκε ότι και στα δύο στελέχη η μείωση του ποσοστού της εργοστερόλης ακολουθεί πορεία παράλ-



Σχήμα 46. Αεριοχρωματογραφική ανάλυση εκχυλισμάτων από το μυκήλιο ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* μετά από 24 ώρες επώαση στους 25°C σε υγρό θρεπτικό υλικό C&S παρουσία: Α. bitertanol συγκέντρωσης 2,5 μg/ml. Β. clotrimazole συγκέντρωσης 0,05 μg/ml. Γ. terbinafine συγκέντρωσης 0,1 μg/ml. Δ. fenpropimorph συγκέντρωσης 2 μg/ml. Ταυτοποίηση κορυφών ως εξής: 1. σκουαλένιο, 2. χοληστερόλη, 3. Z ισομερές της εργοστερόλης, 4. εργοστερόλη, 5. εργοστα-8,14,24(28)-τριεν-3β-όλη, 6. ιγνοστερόλη, 7. φυκοστερόλη, 8. εργοστα-8-εν-3β-όλη, 9. ομπουσιφολιόλη και 10. εμπουρικόλη



Σχήμα 47. Επίδραση του bitertanol και του clotrimazole στην ανάπτυξη (○, □) και τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (●, ■) στο άγριο (WT) και ένα *tri-1* (TL-34) στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, μετά από 24 ώρες επώαση στους 25°C σε υγρό θρεπτικό υλικό C&S παρουσία του παρεμποδιστή.



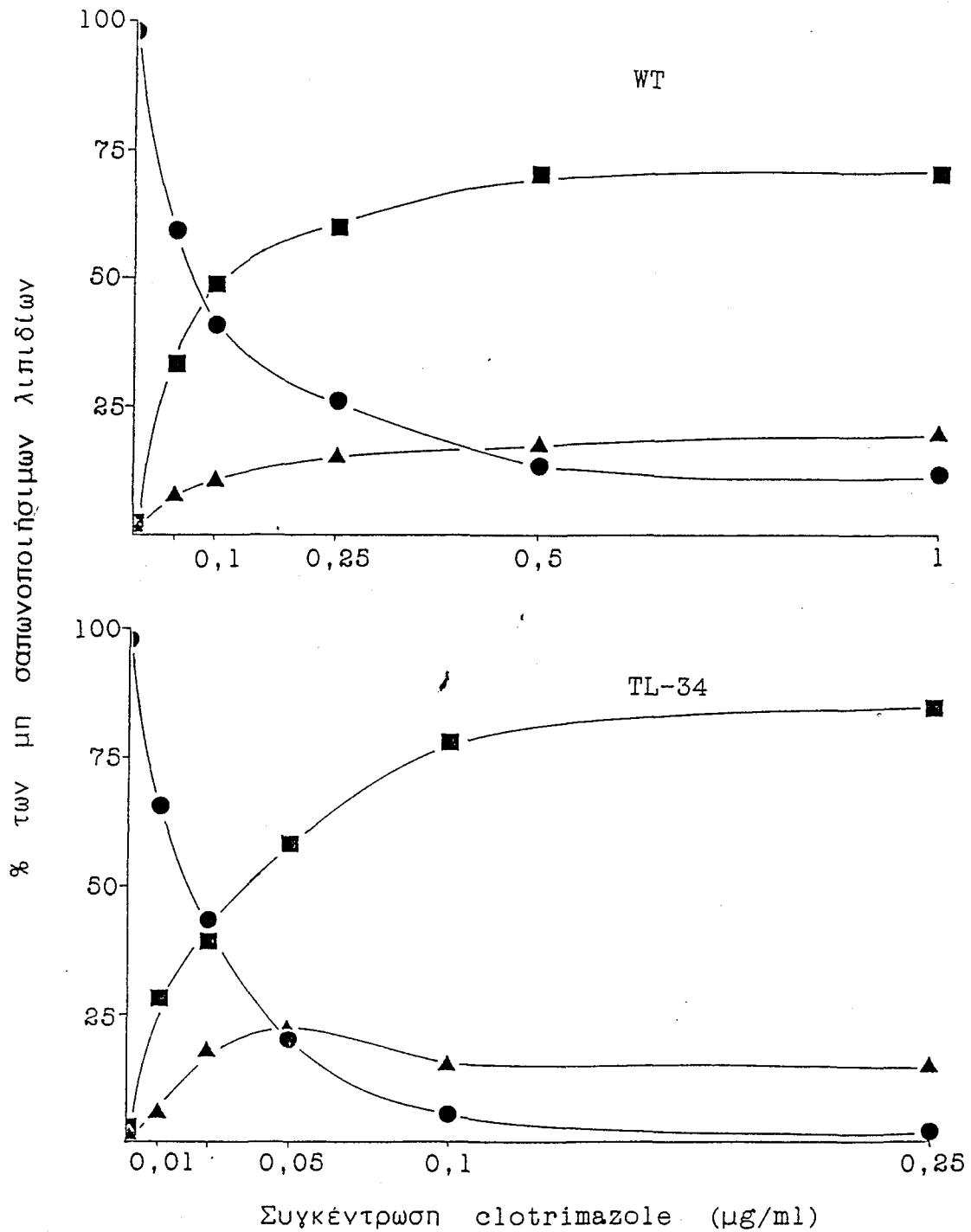
Σχήμα 48. Επίδραση του bitertanol στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (●) και τη συσσώρευση των 14 α -μεθυλ-στερολών ομπουσιφολιόλη (▲) και εμπουρικόλη (■) στο μυκήλιο του αγρίου (WT) και ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, μετά από 24 ώρες επώαση στους 25°C σε υγρό θρεπτικό υλικό C&S παρουσία του παρεμποδιστή.

ληλή μ' αυτή της ανάπτυξης και πάντα σε χαμηλότερα επίπεδα απ' αυτήν (Σχήμα 47). Δηλαδή η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του *triadimenol* και του *clotrimazole* ως προς το γόνο *tri-1* επιβεβαιώνεται και στο επίπεδο της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης. Η συσσώρευση των δύο άλλων στερολών, εμπουρικόλης και ομπουσιφολιόλης αυξάνει συνεχώς με την αύξηση της παρεμπόδισης τόσο στο άγριο όσο και στο *tri-1* στέλεχος (Σχήμα 49).

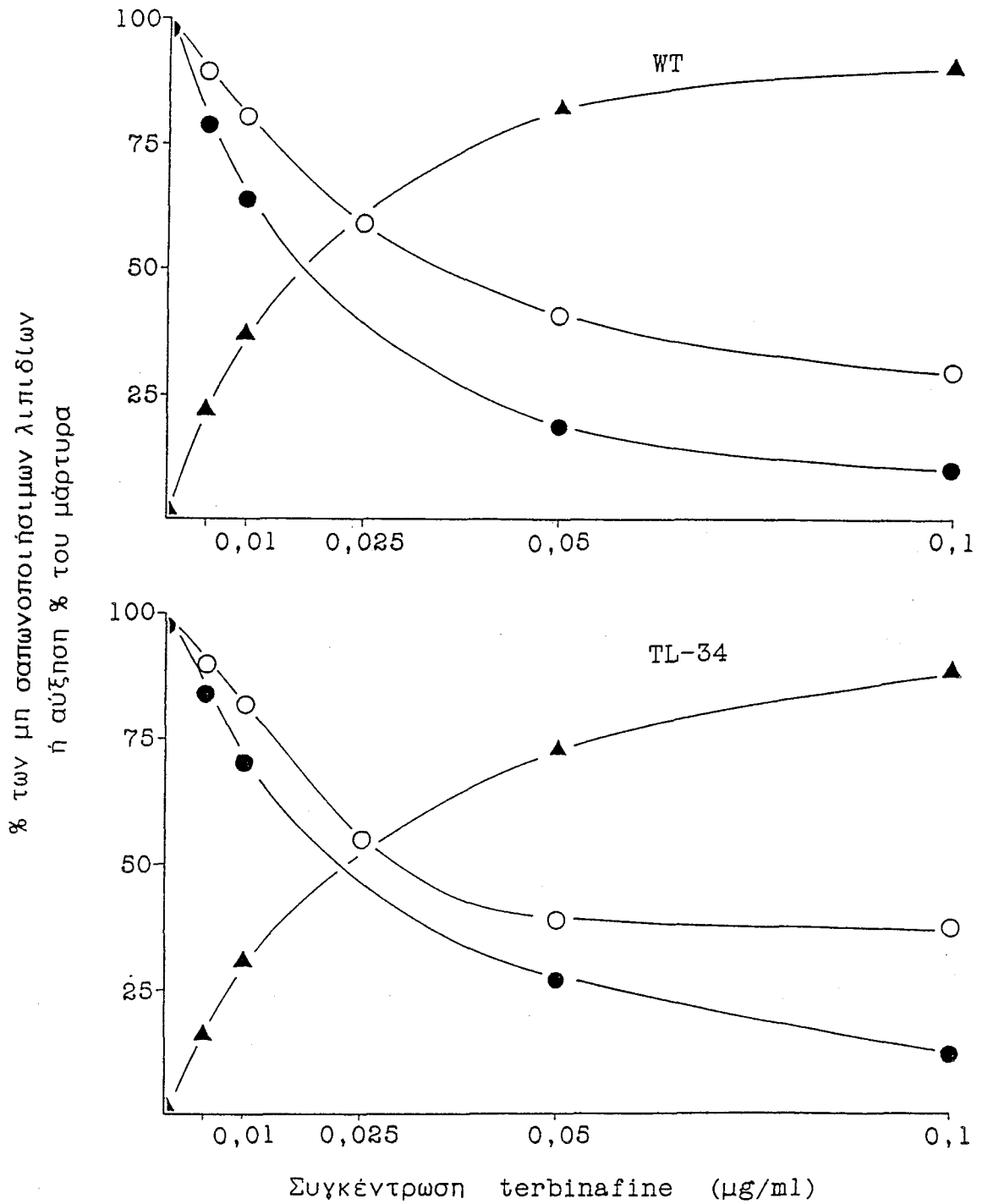
Διαφορετικά αποτελέσματα προέκυψαν από τη μελέτη της επίδρασης με *terbinafine*. Στα εκχυλίματα των μη σαπωνοποιήσιμων λιπιδίων εκτός από την εργοστερόλη ανιχνεύθηκε τόσο στο άγριο όσο και στο TL-34 ανθεκτικό στέλεχος μόνο το σκουαλένιο με RRT_{cho1} 0,63 (Σχήμα 46Γ). Οι συγκεντρώσεις του *terbinafine* που εφαρμόστηκαν ήταν και για τα δύο στελέχη οι ίδιες, αφού όπως έχει αναφερθεί η ευαισθησία τους σ' αυτόν τον παρεμποδιστή είναι παρόμοια. Το ποσοστό της εργοστερόλης στο σύνολο των μη σαπωνοποιήσιμων λιπιδίων ακολουθεί πορεία παράλληλη μ' αυτή της μείωσης της ανάπτυξης αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα τόσο στην περίπτωση του αγρίου, όσο και στην περίπτωση του TL-34 ανθεκτικού στελέχους (Σχήμα 50). Αντίθετα το ποσοστό του σκουαλενίου αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης του παρεμποδιστή.

Πολύ διαφορετικά ήταν τα αποτελέσματα της ανάλυσης των στερολών που παράγονται παρουσία *fenpropimorph*. Ο λόγος είναι ότι το *fenpropimorph* δρα σε τρεις θέσεις στη διαδικασία βιοσύνθεσης της εργοστερόλης στο μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* και μάλιστα με διαφορετική συγγένεια για κάθε μία απ' αυτές (Κεφάλαιο 1.4). Η ευαισθησία του αγρίου και των *tri-1* στελεχών στο *fenpropimorph* είναι παρόμοια και κατά συνέπεια για την μελέτη των στερολών χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις και για τα δύο στελέχη. Στα εκχυλίματα που αναλύθηκαν, εκτός από το σκουαλένιο και την εργοστερόλη, σε υψηλά ποσοστά ανιχνεύθηκαν από τις Δ⁸-στερόλες οι φυκοστερόλη και εργοστα-8-εν-3β-όλη και από τις Δ¹⁴-στερόλες οι εργοστα-8,14,24(28)-τριεν-3β-όλη και ιγνοστερόλη (Σχήμα 46Δ). Ανιχνεύθηκε επίσης και το Ζ-στερεοϊσομερές της εργοστερόλης, σε απόλυτη συμφωνία με όσα έχουν αναφερθεί στην εργασία των Ziogas και συνεργατών (Ziogas και συνεργάτες, 1991).

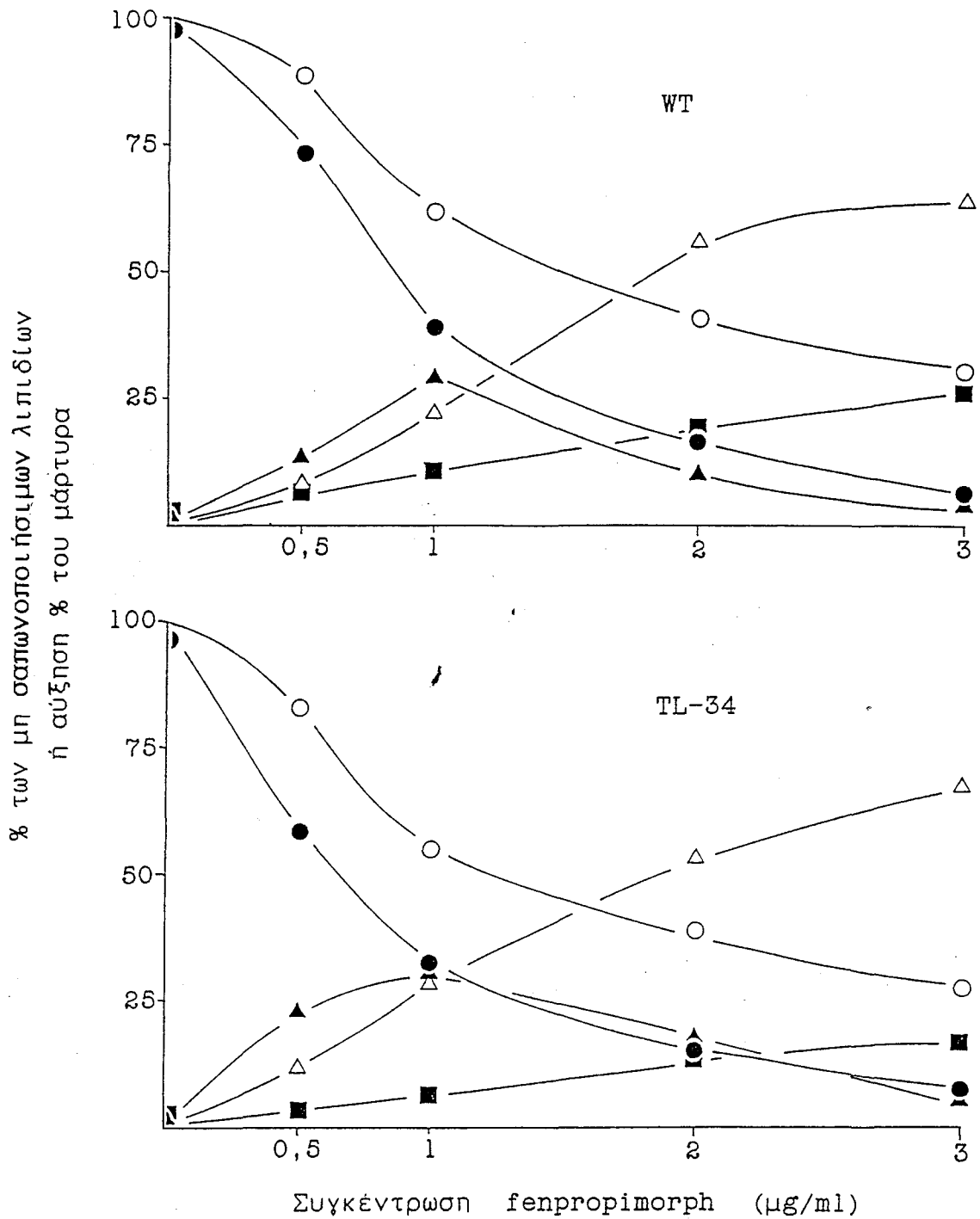
Οι αναλογίες των στερολών στο σύνολο των μη σαπωνοποιήσιμων λιπιδίων για το άγριο και το TL-34 στέλεχος σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του *fenpropimorph* δίνονται στο Σχήμα 51. Παρατηρούμε, ότι καθώς αυξάνει η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου, το ποσοστό της εργοστερόλης ακολουθεί πτωτική πορεία παράλληλη μ' αυτή της ανάπτυξης αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα.



Σχήμα 49. Επίδραση του clotrimazole στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (●) και τη συσσώρευση των 14α-μεθυλ-στερολών ομπουσιφολιόλη (▲) και εμπουρικόλη (■) στο μυκήλιο του αγρίου (WT) και ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, μετά από 24 ώρες επώαση στους 25°C σε υγρό θρεπτικό υλικό C&S παρουσία του παρεμποδιστή.



Σχήμα 50. Επίδραση του terbinafine στην ανάπτυξη (○), τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (●) και τη συσσώρευση του σκουαλενίου (▲) στο μυκήλιο του αγρίου (WT) και ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, μετά από 24 ώρες επώαση στους 25°C σε υγρό θρεπτικό υλικό C&S παρουσία του παρεμποδιστή.



Σχήμα 51. Επίδραση του fenpropimorph στην ανάπτυξη (○), τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (●), τη συσώρευση των Δ⁸- (▲), Δ¹⁴-στερολών (△) και του σκουαλενίου (■) στο μυκήλιο του αγρίου (WT) και ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, μετά από 24 ώρες επώαση στους 25°C σε υγρό θρεπτικό υλικό C&S παρουσία του παρεμποδιστή.

Η συσσώρευση των Δ⁸-στερολών αρχικά αυξάνει, στη συνέχεια όμως μειώνεται σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Αντίθετα οι Δ¹⁴-στερόλες ακολουθούν σταθερά ανοδική πορεία και προσεγγίζουν το 65% του συνόλου των στερολών. Το σκουαλένιο τέλος, καθώς αυξάνει η παρεμπόδιση συσσωρεύεται όλο και σε υψηλότερα ποσοστά και στα δύο στελέχη.

Συμπερασματικά στα *tri-1* στελέχη η παρεμπόδιση της ανάπτυξης που προκαλούν διάφοροι ΗΒΙ's φαίνεται να είναι άμεση συνέπεια της παρεμπόδισης της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης. Το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε καλή αύξηση του μυκηλίου με μεγάλη παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης, σημαίνει ότι ο γόνος *tri-1* δεν κάνει λιγότερο σημαντική τη στερόλη αυτή για την ανάπτυξη του μύκητα.

3.4.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ P-450 ΣΤΟ ΑΓΡΙΟ ΚΑΙ ΕΝΑ *tri-1* (TL-34) ΣΤΕΛΕΧΟΣ

Μελετήθηκαν οι ηλεκτροφορητικές ιδιότητες του κυτοχρώματος P-450 το οποίο αποτελεί σε υποκυτταρικό επίπεδο τη θέση-στόχο των DMIs. Ταυτόχρονα, και στην προσπάθεια να προσεγγίσουμε το μηχανισμό ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών θεωρήθηκε σημαντικό να διερευνηθεί αν υπάρχουν διαφορές μεταξύ του αγρίου και των ανθεκτικών στελεχών όσον αφορά την ηλεκτροφορητική συμπεριφορά των κυτοχρωμάτων τους. Χρησιμοποιήθηκαν υποκυτταρικά παρασκευάσματα μικροσωμάτων και μιτοχονδρίων, στα οποία όπως έχει αναφερθεί (Κεφάλαιο 1.6), εδράζεται το κυτόχρωμα P-450.

3.4.2.1. Ηλεκτροφόρηση.

Από προκαταρκτικά πειράματα ηλεκτροφόρησης διαπιστώθηκε ότι η ελευθέρωση του κυτοχρώματος P-450 από τις μεμβράνες και η είσοδός τους στο πήγμα γίνονταν σταδιακά με αποτέλεσμα να μην γίνεται σωστά η κλασμάτωσή τους. Το πρόβλημα αυτό γινόταν πιο έντονο λόγω της έμφραξης των πόρων του πήγματος από τα μεγάλα τεμάχια μεμβράνων με συνέπεια να παρεμποδίζεται η γρήγορη και πλήρης είσοδος του δείγματος στο πήγμα. Για την αποφυγή αυτών των προβλημάτων θεωρήθηκε αναγκαίο, πριν την τοποθέτηση του δείγματος στο πήγμα, η ελευθέρωση των πρωτεϊνών με επίδραση με χολικό νάτριο και η απομάκρυνση των μεμβρανών με φυγοκέντριση. Επιπλέον, αποφασίσθηκε η εφαρμογή ήπιων συνθηκών ηλεκτροφόρησης (χαμηλή τάση, χαμηλή θερμοκρασία,

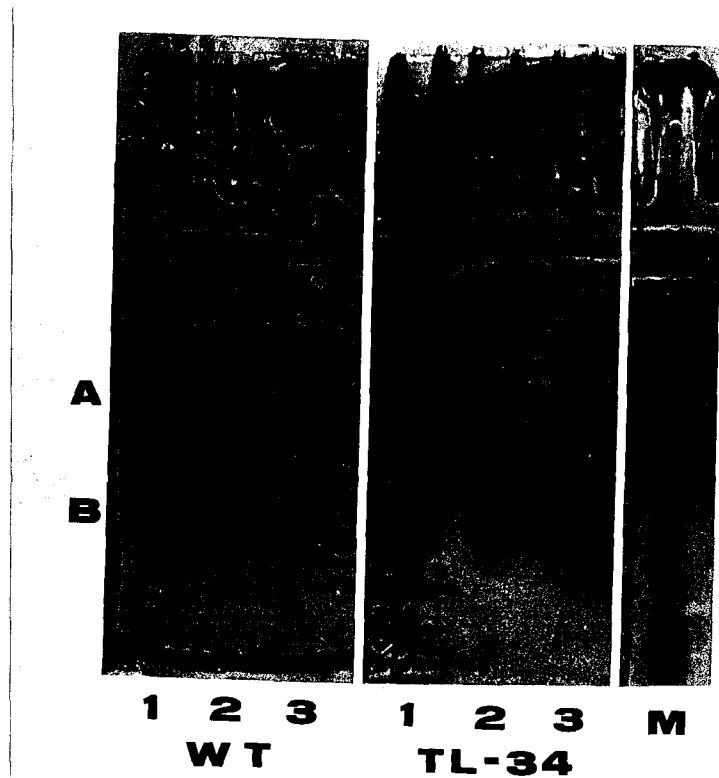
μειωμένος φωτισμός) οι οποίες φαίνεται να επηρεάζουν θετικά τη διατήρηση εκείνων των ιδιοτήτων του ενζύμου, που είναι σημαντικές για την τεχνική της χρώσης των αιμοπρωτεϊνών.

Προσδιορισμός του μοριακού βάρους.

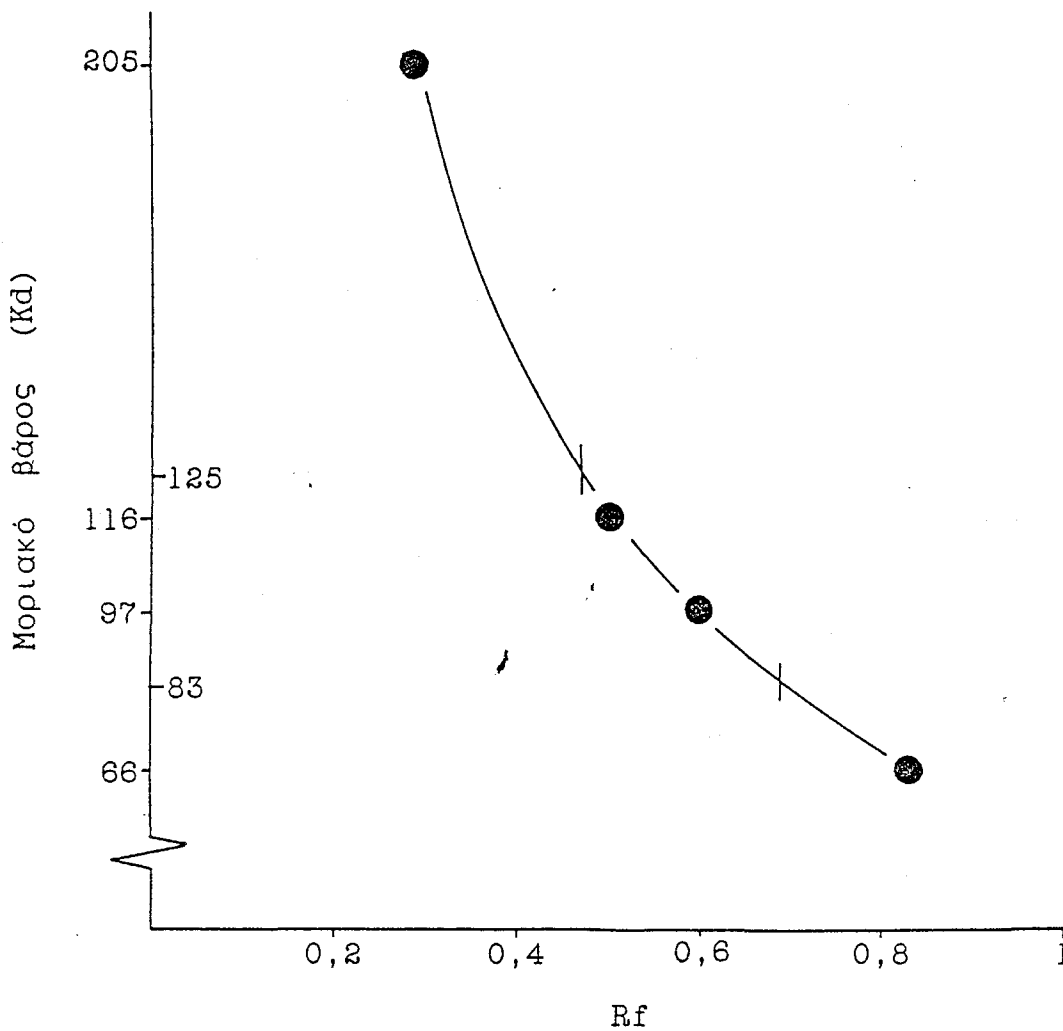
Η χρώση του πήγματος για την ανίχνευση των αιμοπρωτεϊνών μετά από την ανάπτυξη μικροσωματικών παρασκευασμάτων με τη μέθοδο Laemmli τόσο από το αγρίο όσο και από το TL-34 στέλεχος, έδειξε να υπάρχουν δύο ζώνες αίμης (Εικόνα 5). Μία κύρια (A) με $R_f=0,45\pm 0,02$ και μια δευτερεύουσα (B) με $R_f=0,66\pm 0,02$ που με βάση την ανάπτυξη του μίγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους αντιστοιχούν σε μοριακά βάρη 125 ± 5 και 83 ± 3 Kd αντίστοιχα (Σχήμα 52). Παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των μικροσωματικών παρασκευασμάτων των στελεχών ως προς την ένταση της χρώσης της ζώνης B η οποία ήταν πιο έντονη στην περίπτωση του *tri-1* στελέχους. Η αναλογία της έντασης χρώσης των ζωνών A:B ήταν 85:15 στην περίπτωση του αγρίου και 60:40 στην περίπτωση του *tri-1* στελέχους (Σχήμα 53).

Η χρώση του πήγματος για την ανίχνευση όλων των πρωτεϊνών του δείγματος έδειξε την ύπαρξη μιας κύριας ζώνης πρωτεΐνης στο ίδιο R_f με τη ζώνη A και μιας δευτερεύουσας σ' αυτό της ζώνης B κατά τη χρώση για αιμοπρωτεΐνες στα μικροσωματικά παρασκευάσματα και των δύο στελεχών (Εικόνα 6). Με σκοπό να βελτιωθεί η κλασμάτωση των πρωτεϊνών στο πήγμα έγινε προσθήκη μερκαπτοαιθανόλης, η οποία καταστρέφει την τεταρτοταγή και τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος σε συγκέντρωση 6% (v:v). Η παρουσία της όμως στο δείγμα αδρανοποιούσε πλήρως την αντίδραση χρώσης των αιμοπρωτεϊνών με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανίχνευσή τους στο πήγμα και με τις δύο μεθόδους (χρώση αιμοπρωτεϊνών, ολικών πρωτεϊνών). Η χρώση για ολικές πρωτεΐνες του πήγματος, μετά από επίδραση με μερκαπτοαιθανόλη στα μικροσωματικά παρασκευάσματα του αγρίου και του TL-34 στελέχους, έδειξε την ύπαρξη μιας, σημαντικά μειωμένης έντασης χρωματισμού, ζώνης πρωτεΐνης στο ύψος των 125 Kd. Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν και άλλες ζώνες πρωτεΐνης σε μικρότερα μοριακά βάρη που δεν είχαν ανιχνευθεί απουσία μερκαπτοαιθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (Εικόνα 6).

Η ανάπτυξη των μικροσωματικών παρασκευασμάτων με τη μέθοδο Fairbanks και χρώση του πήγματος για την ανίχνευση των αιμοπρωτεϊνών έδειξε μια κύρια

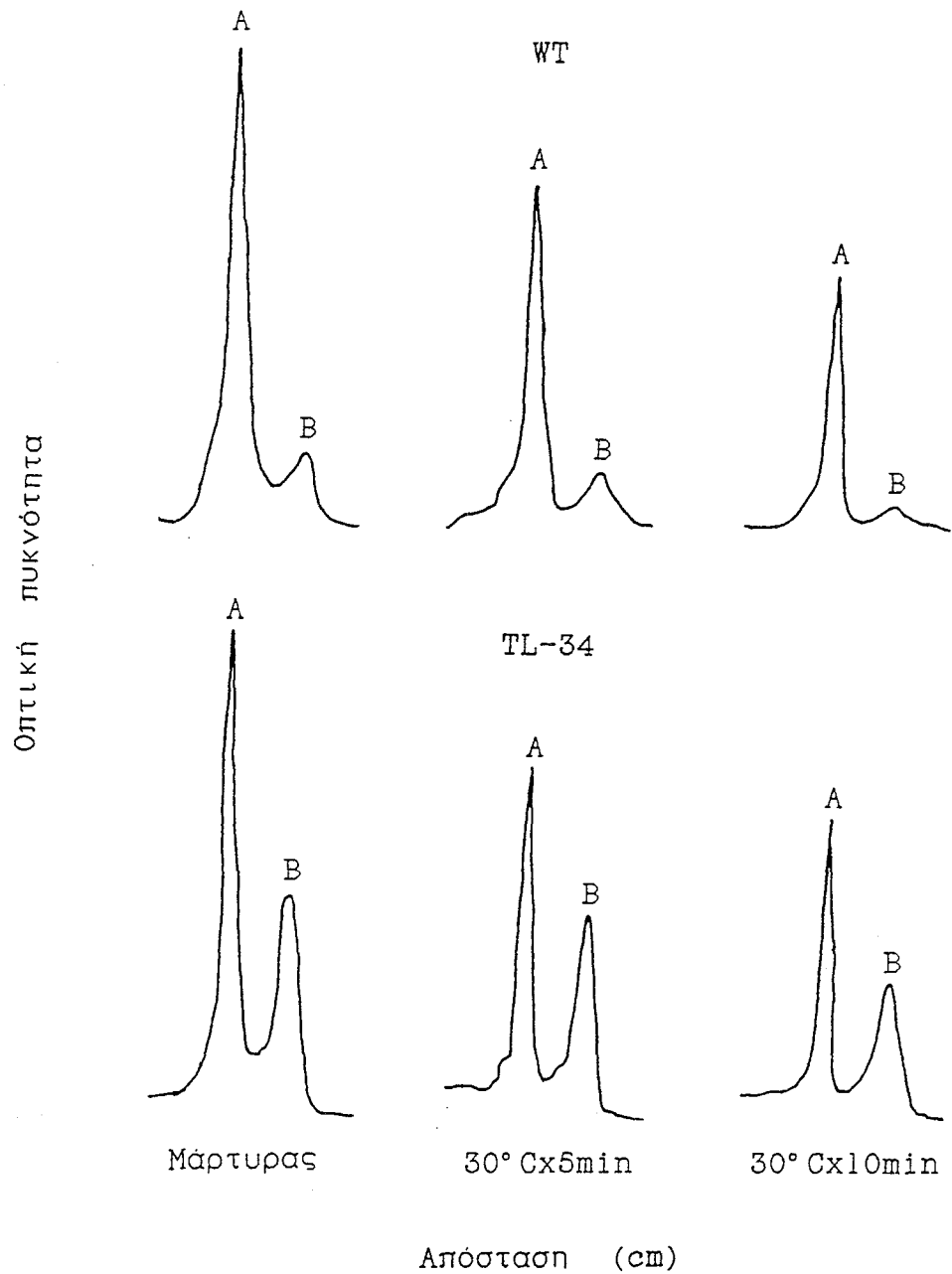


Εικόνα 5. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών από μικροσωματικά παρασκευάσματα του αγρίου (WT) και ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* μετά από επίδραση με θερμοκρασία και με βάση την μέθοδο Laemmli. 1. Μάρτυρας. 2. Επίδραση με θερμοκρασία 30°C για 5 λεπτά. 3. Επίδραση με θερμοκρασία 30°C για 10 λεπτά. Κάθε δείγμα περιείχε ολική πρωτεΐνη 100 μg BSA. Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε μίγμα γνωστών πρωτεϊνών (M) που ήταν (από πάνω προς τα κάτω): μυοσίνη (205 Kd), β-γαλακτοσιδάση (116 Kd), φωσφορυλάση B (97 Kd) και αλβουμίνη (66 Kd), η χρώση των οποίων έγινε με τη μέθοδο για την ανίχνευση όλων των πρωτεϊνών. Μετά τη χρώση των πηγμάτων για την ανίχνευση των αιμοπρωτεϊνών διακρίνονται δύο ζώνες αίμης, μια κύρια (A) στα 125 Kd και μία δευτερεύουσα (B) στα 83 Kd.

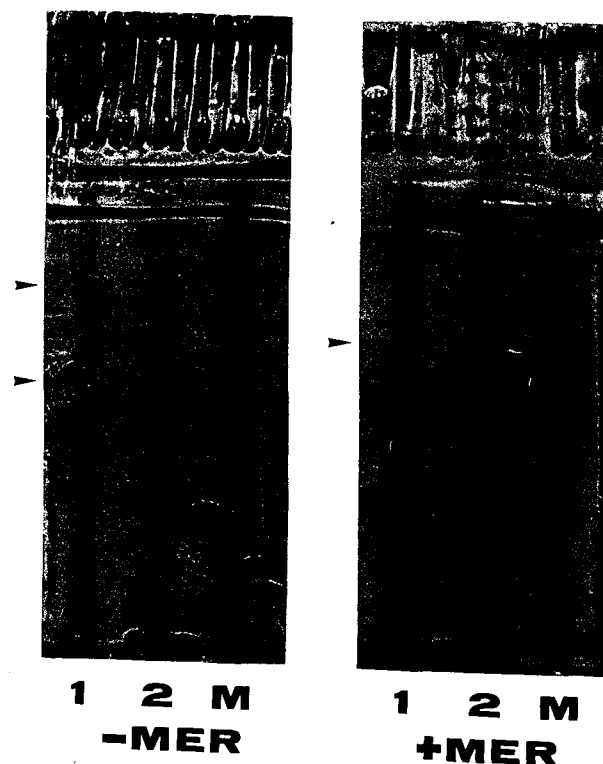


Σχήμα 52. Κλασμάτωση των πρωτεϊνών στο πήγμα της ηλεκτροφόρησης κατά την εφαρμογή της μεθόδου Laemmli με βάση το μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις ζώνες αιμοπρωτεΐνης που ανιχνεύθηκαν μετά την ανάπτυξη μικροσωματικών παρασκευασμάτων από το άγριο και ένα *tri-1* (TL-34) στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*.

ζώνη αίμης με $R_f=0,35\pm 0,03$ (Εικόνα 7) που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος 125 ± 5 Kd (Σχήμα 54). Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν και 2-3 άλλες ζώνες με μεγαλύτερο R_f και πολύ μικρότερη ένταση χρωματισμού αλλά χωρίς επαναληψιμότητα.



Σχήμα 53. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των ζωνών αίμης A και B στο πήγμα της ηλεκτροφόρησης με βάση τη μέθοδο Laemmli μικροσωματικών παρασκευασμάτων από το άγριο (WT) και ένα *tri-1* (TL-34) στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* μετά από επίδραση με θερμοκρασία 30°C για 5 και 10 λεπτά.



Εικόνα 6. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών από μικροσωματικά παρασκευάσματα του αγρίου (1) και ενός *tri-1* (2) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* απουσία (-MER) και παρουσία (+MER) μερκαπτοαιθανόλης με βάση την μέθοδο Laemmli και χρώση των πηγμάτων για την ανίχνευση όλων των πρωτεϊνών. Κάθε δείγμα περιείχε ολική πρωτεΐνη 100 μg BSA. Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε μίγμα γνωστών πρωτεϊνών (M) που ήταν (από πάνω προς τα κάτω): μυσίνη (205 Kd), β -γαλακτοσιδάση (116 Kd), φωσφορυλάση B (97 Kd), αλβουμίνη (66 Kd), και οβαλβουμίνη (45 Kd). Απουσία μερκαπτοαιθανόλης διακρίνονται μία κύρια ζώνη πρωτεΐνης στα 125 Kd και μία δευτερεύουσα στα 83 Kd (πάνω και κάτω βέλος αντίστοιχα). Παρουσία μερκαπτοαιθανόλης η ένταση χρώσης της ζώνης στα 125 Kd είναι σημαντικά εξασθενημένη και έχουν εμφανισθεί και άλλες ζώνες σε μικρότερα μοριακά βάρη.

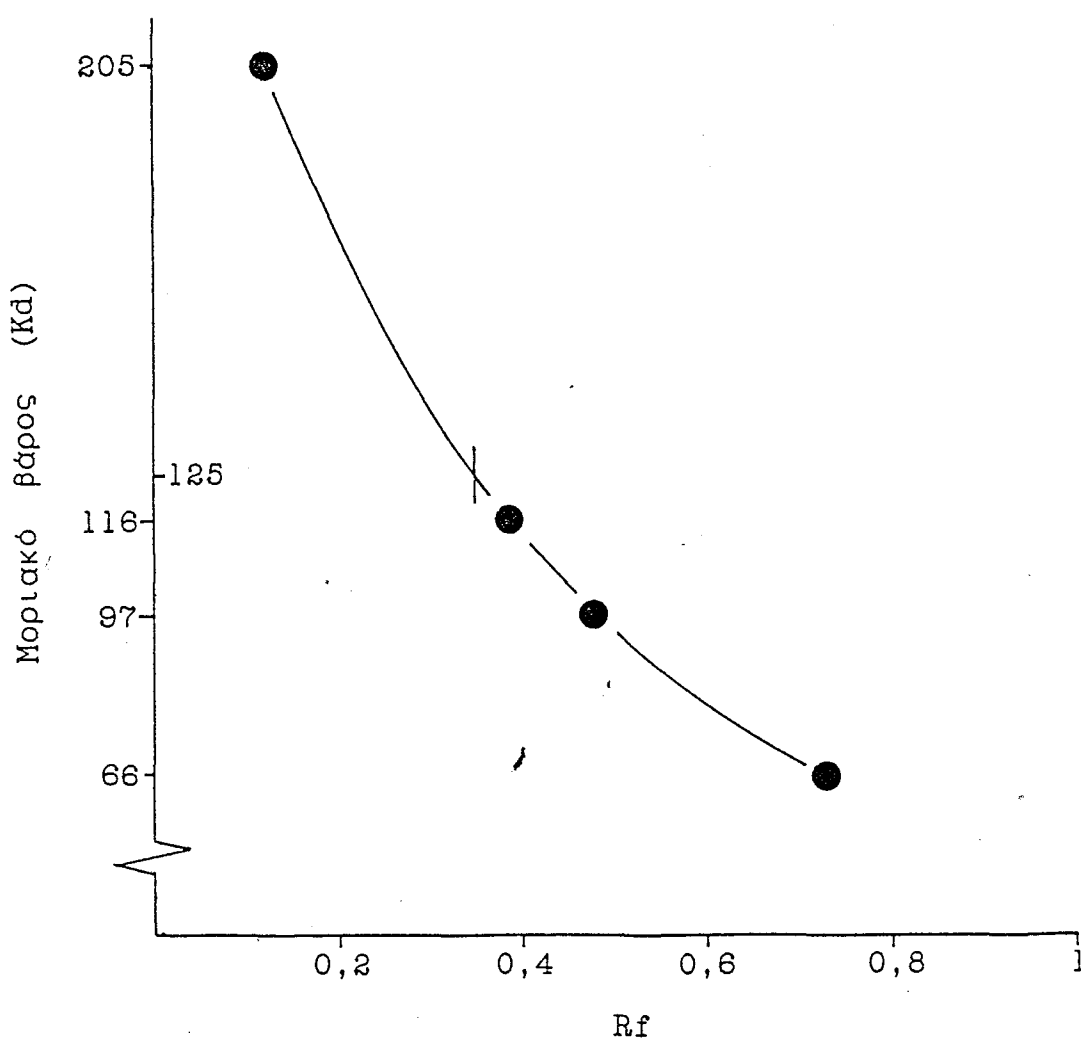


Εικόνα 7. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών από μικροσωματικά παρασκευάσματα του αγρίου (1) και ενός *tri-1* (2) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* με βάση την μέθοδο Fairbanks. Κάθε δείγμα περιείχε ολική πρωτεΐνη 25 μ g BSA. Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε μίγμα γνωστών πρωτεϊνών (M) που ήταν (από πάνω προς τα κάτω): μυοσίνη (205 Kd), β -γαλακτοσιδάση (116 Kd), φωσφορυλάση B (97 Kd) και αλβουμίνη (66 Kd), η χρώση των οποίων έγινε με τη μέθοδο για την ανίχνευση όλων των πρωτεϊνών. Μετά τη χρώση του πηγματος για την ανίχνευση των αιμοπρωτεϊνών διακρίνεται μία ζώνη αίμης στα 125 Kd.

Η μελέτη των μιτοχονδριακών παρασκευασμάτων από το αγριο και το TL-34 ανθεκτικό στο triadimenol στέλεχος με τη μέθοδο Laemmli έδειξε και εδώ την ύπαρξη δύο ζωνών αίμης με τα ίδια Rf όπως στην περίπτωση των μικροσωματικών παρασκευασμάτων και τις ίδιες διαφορές μεταξύ των στελεχών ως προς την ένταση χρώσης της ζώνης B.

Μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου.

Κατά την αποθήκευση των μικροσωμάτων στους -28°C παρατηρήθηκε ότι το κυτόχρωμα του αγρίου στελέχους διατηρούσε σε μεγάλο βαθμό τη δραστηριότητά του ακόμα και μετά από διάστημα αποθήκευσης 6-8 μηνών. Αντίθετα, το κυτόχρωμα του *tri-1* ανθεκτικού στελέχους παρουσιαζόταν περισσότερο ασταθές



Σχήμα 54. Κλασμάτωση των πρωτεϊνών στο πήγμα της ηλεκτροφόρησης κατά την εφαρμογή της μεθόδου Fairbanks με βάση το μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Η κάθετη γραμμή αντιπροσωπεύει τη ζώνη αιμοπρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε μετά την ανάπτυξη μικροσωματικών παρασκευασμάτων από το αγριο και ένα *tri-1* (TL-34) στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*.

με αποτέλεσμα μετά από παρατεταμένη αποθήκευση οι ζώνες αίμης στο πήγμα της ηλεκτροφόρησης να εμφανίζουν μικρότερη ένταση χρωματισμού. Με σκοπό να διερευνηθεί αυτή η διαφορά μεταξύ του αγρίου και του ανθεκτικού στελέχους ως προς την σταθερότητα του ενζύμου, μικροσωματικά παρασκευάσματα και των δύο στελεχών εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 30°C για 5 και 10 λεπτά πριν την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος του δείγματος. Μετά την ηλεκτροφόρηση και τη χρώση του πηγματος για αιμοπρωτεΐνες

παρατηρήθηκε μείωση της έντασης της χρώσης και των δύο ζωνών αίμης κατά 30–40% τόσο στο άγριο όσο και στο TL-34 στέλεχος (Εικόνα 5). Έκθεση σε θερμοκρασία 40°C για 10 λεπτά των μικροσωματικών παρασκευασμάτων και των δύο στελεχών, είχε σαν συνέπεια την πλήρη καταστροφή του ενζύμου με αποτέλεσμα μετά τη χρώση για αιμοπρωτεΐνες να μην ανιχνεύεται καμία ζώνη αίμης στο πήγμα.

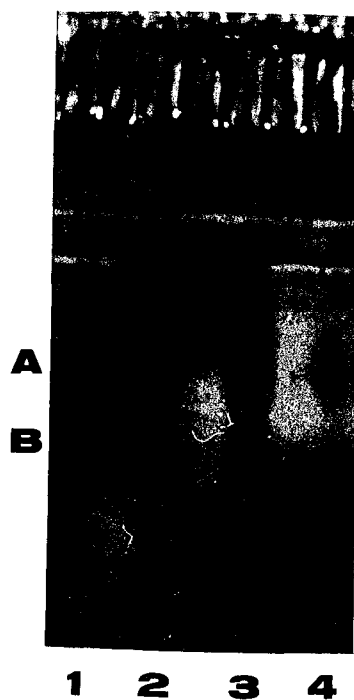
Επίδραση με triadimefon.

Έχει αναφερθεί (Κεφάλαιο 1.6) ότι σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται αύξηση της παραγωγής του κυτοχρώματος P-450 μετά από επίδραση με DMIs. Θεωρήθηκε λοιπόν ενδιαφέρον να διερευνηθεί αν αυτό συμβαίνει και στην περίπτωση του *N. haematococca* var. *cucurbitae* και αν υπάρχει κάποια σύνδεση του φαινομένου με την ανθεκτικότητα των *tri-1* στελεχών. Προτιμήθηκε για το σκοπό αυτό το triadimefon, γιατί η σταδιακή μετατροπή του, *in situ*, προς triadimenol που είναι και ο τοξικός παράγοντας, θα έδινε τον απαραίτητο χρόνο για την ενεργοποίηση των πιθανών μηχανισμών αύξησης της παραγωγής του ενζύμου. Η επίδραση έγινε με την έναρξη της καλλιέργειας των στελεχών και με συγκεντρώσεις που να προκαλούν το 50% της παρεμπόδισης (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ για το άγριο και 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ για το TL-34 ανθεκτικό στέλεχος).

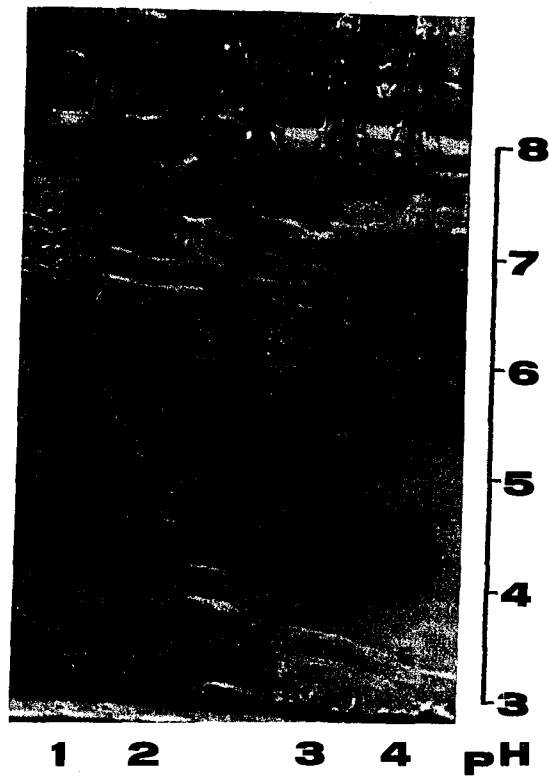
Η ανάπτυξη των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο Laemmli και η εκτίμηση της ποσότητας του ενζύμου με βάση την ένταση χρώσης των αιμοπρωτεϊνών. Τόσο στο μικροσωματικό (Εικόνα 8) όσο και στο μιτοχονδριακό κλάσμα παρατηρήθηκε σημαντική (σχεδόν τριπλασιασμός) και παρόμοιου επιπέδου αύξηση της έντασης χρώσης των ζωνών αίμης και στα δύο στελέχη.

3.4.2.2. Ισοηλεκτρική εστίαση.

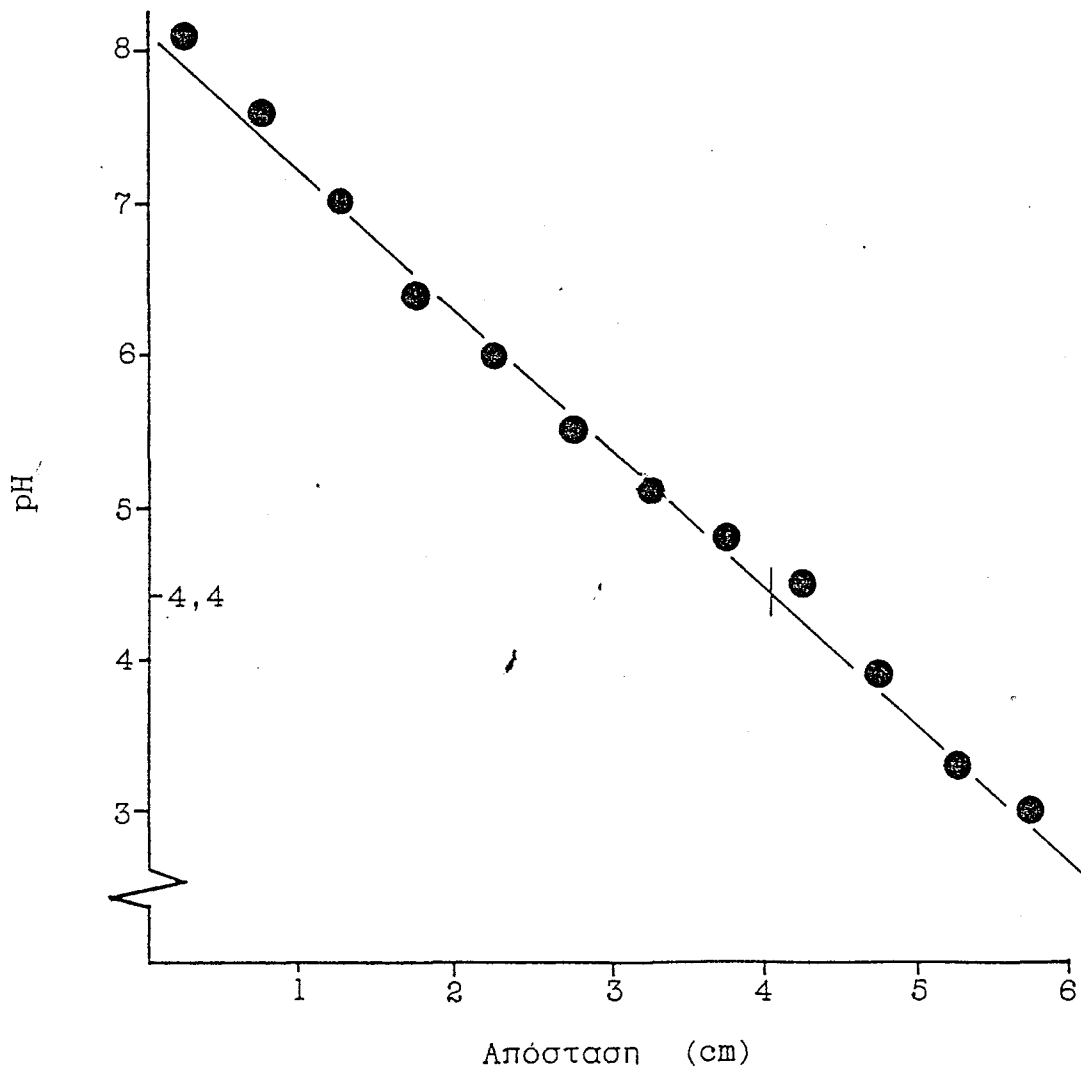
Σκοπός ήταν να προσδιορισθεί το ισοηλεκτρικό σημείο του κυτοχρώματος P-450 και να διερευνηθεί αν υπάρχουν διαφορές μεταξύ του αγρίου και των *tri-1* στελεχών. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.9 και η χρώση του πήγματος έγινε με την τεχνική χρώσης για αιμοπρωτεΐνες. Μετά την ανάπτυξη μικροσωματικών παρασκευασμάτων από το άγριο και το TL-34 στέλεχος και τη χρώση του πήγματος διαπιστώθηκε η ύπαρξη μιας ζώνης αίμης (Εικόνα 9) με ισοηλεκτρικό σημείο 4,4 και στα δύο στελέχη (Σχήμα 55).



Εικόνα 8. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών από μικροσωματικά παρασκευάσματα του αγρίου και ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* μετά από επίδραση με triadimefon για 48 ώρες με βάση την μέθοδο Laemmli. Μικροσωματικό παρασκεύασμα από: 1. Άγριο στέλεχος μετά από επώαση παρουσία triadimefon 10 $\mu\text{g/ml}$. 2. Άγριο στέλεχος χωρίς επίδραση. 3. TL-34 στέλεχος μετά από επώαση παρουσία triadimefon 50 $\mu\text{g/ml}$. 4. TL-34 χωρίς επίδραση. Κάθε δείγμα περιείχε ολική πρωτεΐνη 25 μg BSA. Μετά τη χρώση του πηγματος για την ανίχνευση των αιμοπρωτεϊνών παρατηρείται σημαντική αύξηση της έντασης χρωματισμού των ζωνών αίμης στην περίπτωση της επίδρασης με triadimefon, σε παρόμοια επίπεδα και στα δύο στελέχη.



Εικόνα 9. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών από μικροσωματικά παρασκευάσματα του αγρίου και ενός *tri-1* (TL-34) στελέχους του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (ηλεκτρική προσεστίαση) και χρώση του πήγματος με τη μέθοδο για την ανίχνευση των αιμοπρωτεϊνών. 1. και 2. Μικροσωματικά παρασκευάσματα από το άγριο και το TL-34 στέλεχος αντίστοιχα, μετά από παραμονή στους -28°C για 8 μήνες. 3. και 4. Μικροσωματικά παρασκευάσματα από το άγριο και το TL-34 στέλεχος αντίστοιχα, μετά από παραμονή στους -28°C για 4 μήνες. Διακρίνεται μία ζώνη αιμοπρωτεΐνης με ισοηλεκτρικό σημείο 4,4 και στα δύο στελέχη και παρατηρείται σημαντική μείωση της έντασης χρωματισμού στην περίπτωση του TL-34 στελέχους τόσο συγκριτικά με το άγριο στέλεχος όσο και με την παράταση του χρόνου αποθήκευσης.



Σχήμα 55. Κλασμάτωση του πύγματος της ισοηλεκτρικής προσεστίασης ως προς το pH. Η κάθετη γραμμή αντιπροσωπεύει τη ζώνη αιμοπρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε μετά την ανάπτυξη μικροσωματικών παρασκευασμάτων από το άγριο και ένα *tri-1* (TL-34) στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η είσοδος των διασυστηματικών μυκητοκτόνων στη γεωργική πράξη τα τελευταία 25 χρόνια έδωσε ουσιαστικές και ικανοποιητικές λύσεις σε πολλά προβλήματα φυτοπροστασίας. Η συνεχής όμως και παρατεταμένη χρήση τους σε συνδυασμό με την εξειδικευμένη δράση τους δημιούργησε τις προϋποθέσεις να αναδειχθεί σε κυρίαρχο και συχνά απαγορευτικό για τη χρήση τους το πρόβλημα της ανθεκτικότητας. Η προσέγγιση αυτού του προβλήματος άπτεται ζητημάτων που σχετίζονται τόσο με τον τρόπο δράσης των μυκητοκτόνων αυτών σε υποκυτταρικό επίπεδο όσο και με τους γενετικούς και βιοχημικούς, υπεύθυνους για την ανθεκτικότητα μηχανισμούς. Κατά συνέπεια, η μελέτη τέτοιου είδους προβλημάτων όχι μόνο δίνει απαντήσεις σε ερωτήματα που σχετίζονται με την πρακτική εφαρμογή των γεωργικών μυκητοκτόνων αλλά ταυτόχρονα διευρύνει και εμβαθύνει το γνωσιολογικό πεδίο των βιολογικών επιστημών.

Οι παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (EBI's) είναι η μεγαλύτερη και ίσως η σημαντικότερη ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων με μεγάλο εύρος εφαρμογών στη γεωργική πράξη. Παρά όμως την εκτεταμένη για περίπου μια εικοσαετία χρήση τους, σε λίγες, συγκριτικά με άλλες ομάδες μυκητοκτόνων, περιπτώσεις έχουν αναφερθεί προβλήματα και σε ελάχιστες το πρόγραμμα φυτοπροστασίας οδηγήθηκε σε πλήρη αποτυχία εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα αυτά εκ μέρους των παθογόνων (Schepers, 1983). Η μελέτη απομονώσεων από φυσικούς πληθυσμούς παθογόνων αλλά και μεταλλαγμένων ανθεκτικών στελεχών που επελέγησαν στο εργαστήριο, έδειξε ότι κατά κανόνα η ανθεκτικότητα είναι χαμηλού επιπέδου, ελέγχεται μάλλον από πολυγονικά συστήματα και συχνά συνοδεύεται από μείωση της προσαρμοστικότητας ή της παθογένειας των στελεχών (Buchenaue, 1987). Μια εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση των εργαστηριακά επιλεγμένων *tri-1* στελεχών του ασκομύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, ανθεκτικών στο τριαζολικό μυκητοκτόνο triadimenol και τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή ανθεκτικότητα που ελέγχεται από ένα "μειζονα" γόνο και εμφανίζουν προσαρμοστικότητα παρόμοια μ' αυτή του αγρίου στελέχους. Η ύπαρξη ενός τέτοιου γόνου ανθεκτικότητας σε συνδυασμό με τη μεγάλη μεταλλακτικότητά του, θα μπορούσε να κατατάξει το triadimenol στην ομάδα μυκητοκτόνων "υψηλού κινδύνου" σε αντίθεση με τους άλλους EBI's που χαρακτηρίζονται σαν

"μέσου κινδύνου" μυκητοκτόνα (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989).

Στην εργασία μας, από τη μελέτη της ευαισθησίας του αγρίου και τεσσάρων *tri-1* στελεχών του *N. haematococca* var. *cucurbitae* σε αντιπροσώπους των διαφόρων ομάδων των EBI's διαπιστώθηκαν τα εξής:

1. Τα *tri-1* στελέχη είναι ανθεκτικά, συγκριτικά με το άγριο και στα τριαζολικά μυκητοκτόνα triadimefon, bitertanol, propiconazole, flusilazol και flutriafol. Ο παράγοντας ανθεκτικότητας που υπολογίσθηκε με βάση την ED₅₀ είναι 6 για το triadimefon ενώ για τους υπόλοιπους παρεμποδιστές κυμαίνεται μεταξύ 2,2 και 3,5, σε πολύ μικρότερα δηλαδή επίπεδα απ' ότι στην περίπτωση του triadimenol που είναι 55,6.
2. Ο γόνος *tri-1* αυξάνει 2 έως 5 φορές την ευαισθησία των στελεχών στα ιμιδαζολικά μυκητοκτόνα triflumizole, clotrimazole και ketoconazole ενώ φαίνεται να μην επηρεάζει την ευαισθησία τους, συγκριτικά με το άγριο, στο imazalil.
3. Στους αντιπροσώπους των άλλων ομάδων των DMIs και πιο συγκεκριμένα στο πιπεραζινικό triforine και το πυριμιδινικό fenarimol η ευαισθησία των *tri-1* στελεχών ήταν παρόμοια μ' αυτή του αγρίου.
4. Σε παρεμποδιστές που δρουν σε άλλα εκτός της απομεθυλίωσης του C-14, στάδια της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης όπως τα μορφολινικά fenpropimorph και tridemorph και η αλλυλαμίνη terbinafine, ο γόνος *tri-1* δεν έχει καμιά επίδραση.

Από τα στοιχεία αυτά γίνεται φανερό η ιδιαιτερότητα της δράσης του γόνου *tri-1* συγκριτικά με τα όσα έχουν μέχρι τώρα αναφερθεί για την ανθεκτικότητα των μυκήτων στους EBI's. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι η υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα των *tri-1* στελεχών περιορίζεται κυρίως στην περίπτωση του triadimenol και λιγότερο στην πρόδρομή του ένωση triadimefon, ενώ στα άλλα μέλη της ομάδας των τριαζολικών η ανθεκτικότητά τους είναι χαμηλού επιπέδου. Στις άλλες ομάδες των DMIs που δρουν στην ίδια με τα τριαζολικά, βαθμίδα της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης, ο γόνος *tri-1* ή δεν επηρεάζει (πιπεραζινικά, πυριμιδινικά) ή και αυξάνει (ιμιδαζολικά με εξαίρεση το imazalil) την ευαισθησία των *tri-1* στελεχών. Μέχρι τώρα δεν έχει αναφερθεί τέτοιου υψηλού επιπέδου μονογονική ανθεκτικότητα, εξειδικευμένη σε μια μόνο κατηγορία των DMIs και μάλιστα χωρίς επίδραση στην προσαρμοστικότητα των στελεχών. Εκείνο που συνήθως παρατηρείται είναι μια μικρού βαθμού μείωση της ευαισθησίας στο σύνολο των DMIs χωρίς να επηρεάζεται, όπως και στην περίπτωση του *tri-1*, γόνου η ευαισθησία σε παρεμποδιστές που δρουν σε άλλα στάδια της βιοσύνθεσης της

εργαστηρίου όπως τα μορφολινικά (Leroux και Gredt, 1984. Kalamarakis και συνεργάτες, 1991). Η εξειδίκευση αυτή του *tri-1* γόνου θα μπορούσε να εξηγηθεί με μια αλλαγή στη θέση δράσης των DMIs έτσι ώστε να επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά ή να μην επηρεάζεται η συγγένεια των διαφόρων ομάδων των DMIs με το ενζυμικό σύστημα της απομεθυλίωσης του C-14 της λανοστερόλης.

Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τις παρατηρήσεις μας σχετικά με την τοξικότητα των διαστεροϊσομερών του triadimenol στο άγριο και τα *tri-1* στελέχη που έδειξαν εξειδίκευση του γόνου ανθεκτικότητας κυρίως ως προς το διαστεροϊσομερές A. Τα *tri-1* στελέχη είναι ανθεκτικά, συγκριτικά με το άγριο, και στα δύο διαστεροϊσομερή του triadimenol, όμως η μείωση της ευαισθησίας είναι 57,8 φορές για το διαστεροϊσομερές A και μόνο 5,5 φορές για το διαστεροϊσομερές B. Έτσι, η μεγάλη διαφορά που υπάρχει στην στερεοεξειδίκευση των διαστεροϊσομερών στο άγριο στέλεχος όπου το A είναι 28,1 φορές πιο τοξικό από το B, σχεδόν εξαλείφεται στην περίπτωση των *tri-1* στελεχών όπου η διαφορά αυτή μειώνεται στο 2,6. Η καλύτερη εξήγηση για την επίδραση της μεταλλαγής στην ικανότητα του μύκητα να κάνει διάκριση ανάμεσα στα δύο διαστεροϊσομερή είναι ότι το μεταλλαγμένο συστατικό είναι εκείνο που αντιδρά με το τοξικό μόριο.

Διαφορές στην τοξικότητα των διαστεροϊσομερών του triadimenol έχουν παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές σε διάφορα είδη μυκήτων (Deas και συνεργάτες, 1984b). Μείωση στη διαφορά της τοξικότητας των διαστεροϊσομερών του triadimenol έχει αναφερθεί και στην περίπτωση ανθεκτικών στους DMIs στελεχών του μύκητα *C. cucumerinum* που όμως συνοδεύονταν από αύξηση στη διαφορά της τοξικότητας των διαστεροϊσομερών άλλων DMIs όπως τα bitertanol, diclobutrazol, etaconazole και propiconazole (Fuchs και De Vries, 1984).

Η μελέτη της αναγωγής του triadimefon προς triadimenol έχει γίνει σε διάφορα είδη μυκήτων και αρκετά στοιχεία έχουν προκύψει σχετικά με το ρόλο αυτής της μετατροπής στην ευαισθησία των μυκήτων στο triadimefon. Για πρώτη όμως φορά η μελέτη γίνεται ταυτόχρονα σε ευαίσθητο και ανθεκτικό στο triadimenol στέλεχος του ίδιου μύκητα, δίνοντας τη δυνατότητα να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό της μετατροπής και το ρόλο των διαστεροϊσομερών του triadimenol στην ευαισθησία των μυκήτων στο triadimefon αλλά και παρέχοντας τα απαραίτητα στοιχεία για την ερμηνεία της μικρής επίδρασης του γόνου *tri-1* στην ευαισθησία των ανθεκτικών στελεχών στο triadimefon συγκριτικά με το triadimenol.

Επιβεβαιώθηκε και στην περίπτωση του *N. haematococca* var. *cucurbitae* ότι η αναγωγή του triadimefon δεν είναι αποτέλεσμα της δράσης εξωκυτταρικών ενζύμων αλλά πραγματοποιείται αποκλειστικά και μόνο στο εσωτερικό του μυκηλίου, σε απόλυτη συμφωνία με όσα έχουν αναφερθεί και στην περίπτωση του *C. cucumerinum* (Gasztonyi, 1982). Δεν διαπιστώθηκε κανενός βαθμού οξειδωση του triadimenol προς triadimefon, ούτε μετατροπή του ενός διαστερεοϊσομερούς του triadimenol προς το άλλο.

Από την ανάλυση των εκχυλισμάτων από το μυκήλιο και το υλικό της καλλιέργειας με αεριοχρωματογραφία και συνδυασμό χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας και βιοδοκιμής, διαπιστώθηκε η αναγωγή του triadimefon προς triadimenol τόσο από το άγριο όσο και από το *tri-1* ανθεκτικό στελέχος. Η ποσότητα του triadimefon που μετατρέπεται προς triadimenol και από τα δύο στελέχη αυξάνει τόσο με το χρόνο επώασης όσο και με την αρχική συγκέντρωση του triadimefon από 10 έως 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ που εφαρμόζεται. Ο ρυθμός μετατροπής κατά τα πρώτα στάδια της επίδρασης είναι σχετικά πιο έντονος στην περίπτωση του ανθεκτικού στελέχους και προφανώς οφείλεται στην μικρότερη παρεμπόδιση που υφίσταται. Μετά όμως από 48 ώρες επώαση και ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του triadimefon, το ποσοστό μετατροπής του προς triadimenol είναι παρόμοιο και στα δύο στελέχη. Το μεγαλύτερο μέρος του triadimenol που παράγεται εξέρχεται από το μυκήλιο με αποτέλεσμα στο υλικό της καλλιέργειας η ποσότητα του triadimenol να αυξάνει με το χρόνο επώασης ενώ στο εσωτερικό του μυκηλίου παραμένει ένα μικρό μόνο ποσοστό, παρόμοιο και για τα δύο στελέχη και ανεξάρτητα από το χρόνο επώασης και τη συγκέντρωση του triadimefon.

Από τα στοιχεία αυτά φαίνεται να μην υπάρχουν διαφορές στην περατότητα των μεμβρανών μεταξύ του αγρίου και του ανθεκτικού στελέχους στα τοξικά μορία του triadimefon και του triadimenol. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει ότι η βιοχημική έκφραση του γόνου *tri-1* είναι διαφορετική από αυτή των γόνων *fen* που δίνουν μικρή ανθεκτικότητα σ' όλους τους DMIs μέσω ενός μηχανισμού ενεργού απέκκρισης των παρεμποδιστών από το εσωτερικό του κυττάρου (Kalamarakis και συνεργάτες, 1991).

Η ποσοτική ανάλυση της διαστερεοϊσομερικής σύνθεσης του triadimenol που παράγεται από την αναγωγή του triadimefon έδειξε μεταβολές στη σχετική αναλογία των διαστερεοϊσομερών σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης και την αρχική συγκέντρωση του triadimefon και στα δύο στελέχη. Η ποσότητα του λιγότερο τοξικού διαστερεοϊσομερούς Β που παράγεται, αυξάνει σταθερά σε

συνάρτηση με το χρόνο επώασης και τη συγκέντρωση του triadimefon και μετά από 48 ώρες αποτελεί το 75-90% του συνολικού triadimenol και στα δύο στελέχη. Αντίθετα, το σύνολο σχεδόν του διαστεροϊσομερούς A παράγεται τις πρώτες 8 ώρες της επίδρασης σε παρόμοια επίπεδα και στα δύο στελέχη αλλά στη συνέχεια η παραγωγή του σχεδόν σταματάει.

Μεταβολές της διαστεροϊσομερικής σύνθεσης του triadimenol σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση και το χρόνο επίδρασης του triadimefon έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές και φαίνεται να συνδέονται με την εξειδίκευση ως προς την παραγωγή των επιμέρους διαστεροϊσομερών (Gasztonyi, 1982) και τη διαφορετική δραστηριότητα (Gasztonyi και Josepovits, 1984. Deas και συνεργάτες, 1984a) των υπεύθυνων για την αναγωγή του triadimefon ενζύμων. Στην περίπτωση του *N. haematococca* var. *cucurbitae*, τα υπεύθυνα για την αναγωγή του triadimefon προς triadimenol A ένζυμα φαίνεται να είναι ιδιαίτερα δραστικά κατά την έναρξη της επώασης όμως πολύ γρήγορα η δράση τους περιορίζεται σημαντικά με αποτέλεσμα η παραγωγή του διαστεροϊσομερούς A ουσιαστικά να μηδενίζεται. Αντίθετα η δράση των εξειδικευμένων για την παραγωγή του triadimenol B ενζύμων είναι συνεχής με αποτέλεσμα το διαστεροϊσομερές B να αυξάνει σταθερά με το χρόνο επώασης. Οι διαφορές μεταξύ των στελεχών ως προς το ρυθμό παραγωγής του διαστεροϊσομερούς B που παρατηρήθηκαν μεταξύ των στελεχών κατά τα πρώτα στάδια της επίδρασης φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της διαφορετικού επιπέδου παρεμπόδισης που υφίστανται.

Τα αποτελέσματα αυτά της ανάλυσης της διαστεροϊσομερικής σύνθεσης του triadimenol που παράγεται μετά από το μεταβολισμό του triadimefon εξηγούν πλήρως την μικρή ευαισθησία του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* στο triadimefon και την μικρή σχετικά με το triadimenol μείωση της ευαισθησίας των *tri-1* στελεχών στο triadimefon. Έτσι, ο διαφορετικός παράγοντας ανθεκτικότητας μεταξύ του triadimefon (6) και του triadimenol (55,6) που προσδιορίστηκε για τα *tri-1* στελέχη, με βάση την ED₅₀ σε στερεό θρεπτικό υλικό μετά από επώαση 4 ημερών, είναι αποτέλεσμα της παραγωγής κατά κύριο λόγο του διαστεροϊσομερούς B του triadimenol. Ουσιαστικά δηλαδή η διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ του αγρίου και των ανθεκτικών στελεχών στο triadimefon αντικατοπτρίζει τη διαφορά της ευαισθησίας τους στο διαστεροϊσομερές B του triadimenol στο οποίο ο παράγοντας ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών (5,5) είναι σε παρόμοιο επίπεδο μ' αυτό στην περίπτωση του triadimefon (6).

Για την παραπέρα προσέγγιση του μηχανισμού ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών μελετήθηκε η βιοσύνθεση των στερολών στο αγριο και το TL-34 ανθεκτικό στο triadimenol στέλεχος. Σκοπός ήταν να διερευνηθεί αν η εργοστερόλη είναι το τελικό προϊόν της βιοσυνθετικής διαδικασίας των στερολών και στα *tri-1* στελέχη και αν, παρουσία διαφόρων αντιπροσώπων των EBI's, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης του κάθε στελέχους και της μείωσης της παραγωγής της εργοστερόλης. Ικανότητα ανθεκτικών στους EBI's στελεχών να αναπτύσσονται καλύπτοντας τις ανάγκες τους με άλλες στερόλες, εκτός της εργοστερόλης, έχει αναφερθεί στις περιπτώσεις των ζυμών *C. albicans* (Subden και συνεργάτες, 1977), *S. cerevisiae* (Trocha και συνεργάτες, 1977) και του αυξανόμενου με εκβλάστηση μύκητα *U. maydis* (Walsh και Sisler, 1982). Σ' όλες όμως αυτές τις περιπτώσεις τα ανθεκτικά στελέχη παρουσίαζαν μορφολογικές ανωμαλίες και μειωμένη ανάπτυξη.

Η μελέτη της επίδρασης των πολυενίων rimaricin και nystatin στην ανάπτυξη, έδειξε να μην υπάρχουν διαφορές ως προς την ευαισθησία στα αντιβιοτικά αυτά ανάμεσα στο αγριο και τα *tri-1* στελέχη. Το στοιχείο αυτό αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ότι υπάρχει εργοστερόλη στις κυτταρικές μεμβράνες και ότι είναι εξίσου απαραίτητη για την ανάπτυξη τόσο του αγρίου όσο και των ανθεκτικών στελεχών. Η παρουσία της εργοστερόλης στις μεμβράνες του αγρίου και ενός *tri-1* στελέχους επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια με αεροχρωματογραφική ανάλυση ενώ καμιά άλλη στερόλη δεν ανιχνεύθηκε σε υψηλά ποσοστά. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τη θέση της εργοστερόλης στη δομή και τη λειτουργία των μεμβρανών των *tri-1* στελεχών δεν έχουν πάρει άλλες στερόλες.

Κατά την ανάπτυξη του αγρίου και ενός *tri-1* ανθεκτικού στελέχους παρουσία των DMIs triadimenol, bitertanol και clotrimazole διαπιστώθηκε η συσσώρευση 14 α -μεθυλ-στερολών κυρίως της εμπουρικόλης και σε μικρότερο βαθμό της ομπουσιφολιόλης με δύο και μία C-4 μυθυλ-ομάδες αντίστοιχα. Δεν ανιχνεύθηκαν οι C-4-απομεθύλ-στερόλες, 14 α -μεθυλ-φυκοστερόλη και 14 α -μεθυλ-εργόστα-8(9)-εν-3 β -όλη που σημαίνει ότι στην περίπτωση του *N. haematococca* var. *cucurbitae* παρουσία των παραπάνω παρεμποδιστών, η απομεθυλίωση του C-4 δεν ολοκληρώνεται ούτε γίνεται ανόρθωση του $\Delta^{24(28)}$ διπλού δεσμού σε αντίθεση με ότι έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση του *U. maydis* (Baldwin και Wiggins, 1984). Δεν παρατηρήθηκε επίσης η συσσώρευση οποιασδήποτε άλλης στερόλης, που δείχνει ότι οι παρεμποδιστές αυτοί δεν επηρεάζουν κανένα άλλο, πλην της απομεθυλίωσης του C-14, στάδιο της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης και στα δύο στελέχη του μύκητα *N.*

haematococca var. *cucurbitae*.

Στην περίπτωση του αγρίου στελέχους, διάφορες συγκεντρώσεις triadimenol προκαλούσαν μείωση της ανάπτυξης που ήταν ανάλογη με τη μείωση του ποσοστού της εργοστερόλης στο σύνολο των στερολών, που ανιχνεύθηκαν και με αντίστοιχη αύξηση των 14 α -μεθυλ-στερολών. Αντίθετα στο *tri-1* ανθεκτικό στέλεχος, το ποσοστό της εργοστερόλης δεν έπεφτε κάτω από το 55% του συνόλου των στερολών ακόμα και σε 100πλάσιες συγκεντρώσεις του παρεμποδιστή, ενώ η ανάπτυξη συνέχισε να μειώνεται. Τα ποσοστά των 14 α -μεθυλ-στερολών, εμπουρικόλης και ομπτουσιφολιόλης, σταθεροποιούνταν σε ποσοστά της τάξεως του 35 και 10% του συνόλου των στερολών αντίστοιχα. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι ενώ στην περίπτωση του αγρίου στελέχους η παρεμπόδιση της ανάπτυξης συνδέεται άμεσα με την παρεμπόδιση της παραγωγής της εργοστερόλης, δεν συμβαίνει το ίδιο και στην περίπτωση του ανθεκτικού, όπου παρά του ότι η εργοστερόλη παράγεται σε υψηλά ποσοστά η ανάπτυξη εξακολουθεί να μειώνεται. Τα αίτια της μείωσης της ανάπτυξης του ανθεκτικού στελέχους στις υψηλές συγκεντρώσεις triadimenol που εφαρμόστηκαν θα πρέπει ίσως να αποδοθούν σε άλλες, εκτός της παρεμπόδισης της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης, δευτερογενείς επιδράσεις του τοξικού μορίου στον κυτταρικό μεταβολισμό του μύκητα.

Το τριαζολικό bitertanol και το ιμιδαζολικό clotrimazole επιλέχθηκαν για να διερευνηθεί αν η θετική και αρνητική αντίστοιχα συσχέτισή τους με το triadimenol ως προς την επίδραση του γόνου *tri-1*, εκφράζεται και στο επίπεδο των στερολών. Στην περίπτωση του αγρίου στελέχους και για τους δύο παρεμποδιστές, διαπιστώθηκε ότι η παρεμπόδιση της ανάπτυξης συνδέεται άμεσα με τη μείωση της παραγωγής της εργοστερόλης, όπως είχε διαπιστωθεί και με χρήση triadimenol. Για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *tri-1* στελέχους χρησιμοποιήθηκαν 5πλάσιες και υποτετραπλάσιες, συγκριτικά με το άγριο, συγκεντρώσεις για το bitertanol και το clotrimazole αντίστοιχα. Στην περίπτωση του bitertanol αρχικά η ανάπτυξη του στελέχους αυτού μειώνεται αναλογικά με τη μείωση του ποσοστού της εργοστερόλης αλλά στη συνέχεια ενώ το ποσοστό της εργοστερόλης παρουσιάζει τάσεις σταθεροποίησης περίπου στο 35% του συνόλου των στερολών, η παρεμπόδιση της ανάπτυξης εξακολουθεί να αυξάνει. Αντίθετα, στην περίπτωση του clotrimazole το ποσοστό της εργοστερόλης μειώνεται συνεχώς παράλληλα με τη μείωση της ανάπτυξης όπως συμβαίνει και στο άγριο στέλεχος.

Από τους παρεμποδιστές που δρουν σε άλλα, εκτός της απομεθυλίωσης του

C-14, στάδια της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης μελετήθηκαν τα *terbinafine* και *fenpropimorph* στα οποία η ευαισθησία των *tri-1* στελεχών είναι παρόμοια μ' αυτή του άγριου στελέχους. Στην περίπτωση του *terbinafine* που παρεμποδίζει τη δράση του ενζύμου εποξειδάση του σκουαλενίου, ταυτόχρονα με τη μείωση της ανάπτυξης παρατηρήθηκε παράλληλη μείωση του ποσοστού της εργοστερόλης και συσσώρευση μόνο του σκουαλενίου σε παρόμοια ποσοστά στο άγριο και το *tri-1* στέλεχος. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι το *terbinafine* δεν παρεμβαίνει σε κανένα άλλο, εκτός από την εποξείδωση του σκουαλενίου στάδιο της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης και στα δύο στελέχη του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* και ότι ο γόνος *tri-1* δεν επηρεάζει τη συγγένεια του *terbinafine* με το ένζυμο εποξειδάση του σκουαλενίου.

Η δράση του *fenpropimorph* σε τρεις βαθμίδες της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης στο άγριο στέλεχος του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* και η διαφορετικού βαθμού συγγένεια του μυκητοκτόνου με τα ένζυμα Δ^8 - Δ^7 -ισομεράση, Δ^{14} -αναγωγή και εποξειδάση του σκουαλενίου έχει μελετηθεί και διευκρινηθεί επαρκώς (Ziogas και συνεργάτες, 1991). Στην περίπτωση του *tri-1* στελέχους διαπιστώθηκε παρόμοια με το άγριο, μείωση του ποσοστού της εργοστερόλης παράλληλα με τη μείωση της ανάπτυξης και συσσώρευση του σκουαλενίου, των Δ^{14} - και Δ^8 -στερολών. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις *fenpropimorph*, όπου η παρεμπόδιση της ανάπτυξης είναι μικρή, συσσωρεύονται σε υψηλά ποσοστά οι Δ^8 - (κυρίως φυκοστερόλη και εργοστα-8-εν- β -όλη), και σε μικρότερο βαθμό οι Δ^{14} -στερόλες (κυρίως εργοστα-8,14,24(28)-τριεν- β -όλη και ιγνοστερόλη). Με την αύξηση της παρεμπόδισης παρατηρείται μείωση του ποσοστού των Δ^8 -στερολών και αντίστοιχη αύξηση του σκουαλενίου και των Δ^{14} -στερολών. Η συσσώρευση σε υψηλότερα ποσοστά των Δ^8 -, συγκριτικά με τις Δ^{14} -στερόλες και το σκουαλένιο σε μικρές συγκεντρώσεις *fenpropimorph*, δείχνει ότι η συγγένεια του τοξικού μορίου με την Δ^8 - Δ^7 ισομεράση είναι μεγαλύτερη απ' ό,τι με τις Δ^{14} αναγωγή και εποξειδάση του σκουαλενίου. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις *fenpropimorph* αρχίζει να αυξάνει και η παρεμπόδιση της Δ^{14} -αναγωγής με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των Δ^{14} - και την αντίστοιχη μείωση των Δ^8 -στερολών αφού η αναγωγή του Δ^{14} διπλού δεσμού προηγείται της Δ^8 - Δ^7 ισομερίωσης. Παρόμοια, η αύξηση της συσσώρευσης του σκουαλενίου, του οποίου η εποξείδωση βρίσκεται στην αρχή της αλληλουχίας των αντιδράσεων της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης, παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις *fenpropimorph*, οπότε και το ποσοστό των Δ^{14} -στερολών τείνει να σταθεροποιηθεί. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι τόσο στο άγριο (Ziogas και

συνεργάτες, 1991) όσο και στο *tri-1* στέλεχος η συγγένεια του fenpropimorph με την Δ⁸-Δ⁷ ισομεράση είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την Δ¹⁴ αναγωγή ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζεται και η εποξειδάση του σκουαλενίου. Ο ρόλος του ισομερούς Z της εργοστερόλης καθώς και ο μηχανισμός παραγωγής του από τη δράση του fenpropimorph παραμένει ασαφής. Πάντως η παραγωγή του ισομερούς διαπιστώθηκε και στη περίπτωση του ανθεκτικού στελέχους και δεν φαίνεται να συνδέεται με τη δράση του γόνου *tri-1*.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της μελέτης της βιοσύνθεσης των στερολών στο άγριο και το *tri-1* ανθεκτικό στέλεχος, προκύπτουν τα εξής στοιχεία:

1. Για όλους τους παρεμποδιστές, που μελετήθηκαν, επιβεβαιώθηκαν οι θέσεις δράσης τους στα διάφορα στάδια της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, και πιο συγκεκριμένα στην απομεθυλίωση του C-14 για τα triadimenol, bitertanol και clotrimazole, στην οξείδωση του σκουαλενίου για το terbinafine και στην Δ⁸ ισομερίωση, την αναγωγή του Δ¹⁴ διπλού δεσμού και την οξείδωση του σκουαλενίου για το fenpropimorph.
2. Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του αγρίου στελέχους απ' όλους τους παρεμποδιστές που μελετήθηκαν, είναι αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της παραγωγής της εργοστερόλης.
3. Στην περίπτωση ενός *tri-1* στελέχους, ο ρόλος της εργοστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες δεν έχει αντικατασταθεί από άλλες στερόλες.
4. Το triadimenol και σε μικρότερο βαθμό το τριαζολικό bitertanol δεν προκαλούν μείωση της ανάπτυξης μόνο σαν αποτέλεσμα παρεμπόδισης της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης στο *tri-1* στέλεχος, κάτι που προφανώς οφείλεται στη μειωμένη συγγένεια του ενζυμικού συστήματος της απομεθυλίωσης του C-14 της λανοστερόλης του στελέχους αυτού για τα τριαζολικά και σε πιθανές δευτερογενείς επιδράσεις των παρεμποδιστών αυτών σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου.
5. Η αρνητική συσχέτιση του clotrimazole με το triadimenol στα στελέχη που φέρουν το γόνο *tri-1*, οφείλεται στην αυξημένη, συγκριτικά με το άγριο στέλεχος, παρεμπόδιση της απομεθυλίωσης του C-14 της λανοστερόλης στα *tri-1* στελέχη, κάτι που υποστηρίζει ότι ο γόνος *tri-1* άλλαξε τη δομή της θέσης δράσης των DMIs.
6. Στην περίπτωση των terbinafine και fenpropimorph η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης ήταν παρόμοια στο άγριο και το ανθεκτικό στέλεχος, που σημαίνει ότι ο γόνος *tri-1* δεν επηρεάζει τη συγγένεια των τοξικών αυτών μορίων για τα αντίστοιχα ένζυμα.

Τα στοιχεία αυτά υποστηρίζουν ότι η δράση του γόνου *tri-1* εντοπίζεται

αποκλειστικά στο στάδιο της απομεθυλίωσης του C-14 της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης και μάλιστα με τρόπο ώστε να επηρεάζεται αρνητικά η δράση των τριαζολικών και θετικά αυτή των ιμιδαζολικών (με εξαίρεση το imazalil) μυκητοκτόνων.

Κύριο συστατικό του ενζυμικού συστήματος απομεθυλίωσης του C-14 της λανοστερόλης και θέση δράσης των DMIs είναι το κυτόχρωμα P-450, το οποίο βρίσκεται στο μικροσωματικό αλλά και το μιτοχονδριακό κλάσμα και φέρει σαν προσθετική ομάδα έναν αιμικό δακτύλιο. Κατά την ηλεκτροφορητική μελέτη του κυτοχρώματος, η ανίχνευση του ενζύμου στηρίζεται στην ιδιότητα της προσθετικής ομάδας να καταλύει αντιδράσεις υπεροξειδωσης ενώσεων όπως η 3,3,5,5-τετραμεθυλ-βενζιδίνη σχηματίζοντας έγχρωμα παράγωγα (Smith και συνεργάτες, 1985).

Στην περίπτωση του *N. haematococca* var. *cucurbitae*, η ηλεκτροφορητική μελέτη του μικροσωματικού κλάσματος του αγρίου και ενός *tri-1* στελέχους με τη μέθοδο Laemmli (pH πήγματος ανάλυσης: 8,8) έδειξε την ύπαρξη δύο ζωνών αίμης στο πήγμα, μιας κύριας και μιας δευτερεύουσας με μοριακά βάρη 125 ± 5 και 83 ± 3 Kd ανίσοιχα. Με τη μέθοδο Fairbanks (pH πήγματος: 7,4) και στα δύο στελέχη προσδιορίσθηκε μία κύρια ζώνη με μοριακό βάρος 125 Kd αλλά μερικές φορές ανιχνεύονταν και άλλες δευτερεύουσες με μικρότερα μοριακά βάρη αλλά χωρίς σταθερότητα και επαναληψιμότητα. Παρόμοια, μία ζώνη αίμης ανιχνεύθηκε και κατά την ηλεκτρική προσεστίαση του μικροσωματικού κλάσματος. Η χρώση του πήγματος για την ανίχνευση όλων των πρωτεϊνών έδειξε μια κύρια ζώνη πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 125 Kd και μια δευτερεύουσα στα 83 Kd. Τα στοιχεία αυτά υποστηρίζουν την ύπαρξη στο μικροσωματικό κλάσμα του *N. haematococca* var. *cucurbitae* μιας και μόνο ισοενζυμικής μορφής του κυτοχρώματος P-450 με μοριακό βάρος 125 ± 5 Kd. Παρόμοιας μορφής ήταν και το κυτόχρωμα P-450 που ανιχνεύθηκε στο μιτοχονδριακό κλάσμα και των δύο στελεχών.

Η εμφάνιση και άλλων ζωνών αίμης στο πήγμα, θα πρέπει να αποδοθεί σε αποσπασμένη από το κυτόχρωμα P-450, αίμη σαν αποτέλεσμα της χαλαρής σύνδεσής της με το υπόλοιπο αποπρωτεϊνικό τμήμα του ενζύμου (Rein και συνεργάτες, 1976). Η απόσπαση της αίμης από το κυτόχρωμα, σε συνθήκες ηλεκτροφόρησης, έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Levin και συνεργάτες, 1972) και αποτελεί ένα μόνιμο πρόβλημα κατά την ηλεκτροφορητική μελέτη του κυτοχρώματος P-450 (Thomas και συνεργάτες, 1976). Η ελεύθερη αίμη, λόγω του μικρού μοριακού της βάρους συνήθως

εμφανίζεται σαν μια διάχυτη ζώνη στην άκρη του πήγματος αμέσως πίσω από το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης. Τέτοιου είδους διάχυτες ζώνες είχαν παρατηρηθεί κατά τα προκαταρκτικά μας πειράματα, όταν η ηλεκτροφόρηση σταματούσε λίγο πριν το μέτωπο φτάσει στην άκρη του πήγματος. Η αύξηση όμως του χρόνου ηλεκτροφόρησης με σκοπό να επιτευχθεί καλύτερη κλασμάτωση των μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνών, είχε σαν αποτέλεσμα τη διάχυση της ελεύθερης αίμης και των μικρού μοριακού βάρους πρωτεϊνών στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Συχνά όμως παρατηρείται και το φαινόμενο να παρεμποδίζεται η κίνηση της ελεύθερης αίμης στο μέτωπο με συνέπεια την δέσμευσή της σε άλλες πρωτεΐνες και την κλασμάτωσή της σε άλλα σημεία του πήγματος με τη μορφή δευτερογενών ζωνών (Thomas και συνεργάτες, 1976). Στη δράση τέτοιων φαινομένων αποδίδεται η εμφάνιση τόσο της ζώνης αίμης στα 83 Kd στο πήγμα κατά την εφαρμογή της μεθόδου Laemmli όσο και των δευτερευουσών ασταθών ζωνών κατά την εφαρμογή της μεθόδου Fairbanks και ουσιαστικά αντιπροσωπεύουν το βαθμό απόσπασης του αιμικού δακτυλίου από το κυτόχρωμα.

Το μοριακό βάρος των 125 ± 5 Kd που προσδιορίσθηκε για το κυτόχρωμα P-450 του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* είναι ασυνήθιστα υψηλό και περίπου τρεις φορές μεγαλύτερο απ' αυτό του βακτηρίου *Pseudomonas putida* (44-46 Kd) (Yu και Gunsalus, 1974). Παρουσία στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος μερκαπτοαιθανόλης, η οποία καταστρέφοντας την τεταρτοταγή και τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών (Hames, 1988) βοηθά στην καλύτερη κλασμάτωσή τους, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έντασης χρώσης της ζώνης πρωτεΐνης στα 125 Kd και ταυτόχρονα εμφανίσθηκαν άλλες ζώνες πρωτεΐνης με μικρότερα μοριακά βάρη. Τα στοιχεία αυτά αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι πιθανά στην περίπτωση του *N. haematococca* var. *cucurbitae* το κυτόχρωμα P-450 είναι ένα πολυμερές ένζυμο αποτελούμενο από μικρότερου μοριακού βάρους πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

Το ισοηλεκτρικό σημείο του κυτοχρώματος P-450 του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae*, βρέθηκε τόσο στο άγριο όσο και σ' ένα *tri-1* στέλεχος να είναι 4,40, σε παρόμοια δηλαδή επίπεδα μ' αυτό στην περίπτωση του βακτηρίου *P. putida* (4,55) (Dus και συνεργάτες, 1970).

Η συγκριτική μελέτη των μικροσωματικών και των μιτοχονδριακών παρασκευασμάτων από το άγριο και ένα *tri-1* ανθεκτικό στέλεχος του *N. haematococca* var. *cucurbitae* έδειξε να μην υπάρχουν διαφορές ως προς το μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό σημείο των P-450 κυτοχρωμάτων τους.

Αντίθετα, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των στελεχών ως προς τη σταθερότητα σύνδεσης του αιμικού δακτυλίου με το υπόλοιπο αποπρωτεϊνικό τμήμα του ενζύμου. Συγκεκριμένα, μετά από παρατεταμένη παραμονή των μικροσωματικών παρασκευασμάτων στους -28°C , παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση του *tri-1* στελέχους η χρώση των ζωνών αίμης στο πήγμα εμφανίζονταν με σημαντικά μειωμένη ένταση χρωματισμού συγκριτικά μ' αυτές στην περίπτωση του αγρίου στελέχους. Επιπλέον, η ζώνη αίμης στα 83 Kd κατά την εφαρμογή της μεθόδου Laemmli, που ουσιαστικά εκφράζει την αποσπασμένη από το κυτόχρωμα αίμη, βρέθηκε να αντιπροσωπεύει το 40% της συνολικής αίμης του μικροσωματικού παρασκευάσματος από το *tri-1* στέλεχος αλλά μόνο το 15% σ' αυτό του αγρίου. Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν ότι η σύνδεση του αιμικού δακτυλίου με το υπόλοιπο τμήμα του κυτοχρώματος είναι περισσότερο ασταθής στην περίπτωση του *tri-1* στελέχους, που προφανώς οφείλεται σε αλλαγές στη δομή του μορίου του ενζύμου.

Μετά από επώαση μικροσωματικών παρασκευασμάτων σε θερμοκρασία 30°C για 5 και 10 λεπτά, παρατηρήθηκε μικρή μείωση της έντασης χρωματισμού των ζωνών αίμης αλλά σε παρόμοια επίπεδα και στα δύο στελέχη και αναλογικά με το χρόνο επίδρασης της θερμοκρασίας. Το ποσοστό της ελεύθερης αίμης, στο σύνολο της αίμης που ανιχνεύθηκε στο πήγμα, δεν έδειξε να επηρεάζεται από τη θερμοκρασία τόσο στο άγριο όσο και στο ανθεκτικό στέλεχος. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι η θερμοευαισθησία του δεσμού της αίμης με το υπόλοιπο τμήμα του ενζύμου δεν επηρεάστηκε από το γόνιο *tri-1*.

Ανάπτυξη του αγρίου και του *tri-1* ανθεκτικού στελέχους παρουσία *triadimefon*, έχει σαν αποτέλεσμα σημαντική αύξηση του κυτοχρώματος P-450 τόσο στο μικροσωματικό όσο και στο μιτοχονδριακό κλάσμα, σε παρόμοια όμως επίπεδα και για τα δύο στελέχη. Αύξηση της παραγωγής του κυτοχρώματος P-450 από τους EB1's έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Riviere και συνεργάτες, 1984) και πιθανά η αύξηση αυτή συνδέεται με την αύξηση της έκτασης του ενδοπλασματικού δικτύου που προκαλείται από τους παραπάνω παρεμποδιστές (Βιτωράτος, 1991). Πιθανά και η μείωση της μυκητοτοξικότητας του *triadimefon* με το χρόνο επώασης που παρατηρήθηκε τόσο στο άγριο όσο και σ' ένα *tri-1* στέλεχος να οφείλεται και στην αύξηση της παραγωγής του κυτοχρώματος P-450 (Gadher και συνεργάτες, 1983).

Ανακεφαλαιώνοντας, ο υπεύθυνος για την ανθεκτικότητα των *tri-1* στελεχών βιοχημικός μηχανισμός φαίνεται να είναι τροποποίηση της δομής του ενεργού κέντρου του ενζύμου-στόχου των DMIs. Τα στοιχεία που συνηγορούν υπέρ

αυτής της άποψης είναι :

1. Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση δεν έδειξε σημαντικές διαφορές ως προς τη συσσώρευση του triadimefon και του triadimenol στο μυκήλιο του αγρίου και ενός *tri-1* στελέχους που μελετήθηκε, κάτι που αποκλείει τη λειτουργία ενός μηχανισμού απέκκρισης των τοξικών μορίων, όπως στην περίπτωση των *fen* στελεχών (Kalamarakis και συνεργάτες, 1991).
2. Η παρόμοιου επιπέδου επαγωγή της παραγωγής του κυτοχρώματος P-450 στο άγριο και ένα *tri-1* ανθεκτικό στέλεχος μετά από επώαση σε θρεπτικό υλικό με triadimefon, αποκλείει την αυξημένη ποσότητα του ενζύμου μόνο στα ανθεκτικά στελέχη σαν αιτία της ανθεκτικότητας στο triadimenol και τα άλλα τριαζολικά μυκητοκτόνα.
3. Η εξειδίκευση του γόνου *tri-1* για ανθεκτικότητα μόνο στην ομάδα των τριαζολικών μυκητοκτόνων και μάλιστα υψηλού επιπέδου μόνο στην περίπτωση του triadimenol, με αύξηση ταυτόχρονα της ευαισθησίας στα ιμιδαζολικά (με εξαίρεση το imazalil) και χωρίς να επηρεάζεται η ευαισθησία στα πιπεραζινικά και τα πυριμιδινικά.
4. Η στερεοεξειδίκευση του γόνου *tri-1* για υψηλή ανθεκτικότητα μόνο στο διαστεροϊσομερές A του triadimenol.
5. Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης σε υψηλές συγκεντρώσεις triadimenol ενός *tri-1* στελέχους, που μελετήθηκε, δεν συνοδεύεται από παράλληλη αύξηση της συσσώρευσης των 14 α -μεθυλ-στερολών που σημαίνει ότι η παρεμπόδιση της ανάπτυξης στις συγκεντρώσεις αυτές δεν είναι αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης.
6. Η μειωμένη, συγκριτικά με το άγριο, σταθερότητα της σύνδεσης του αιμικού δακτυλίου με το αποπρωτεϊνικό τμήμα του κυτοχρώματος P-450 στο *tri-1* ανθεκτικό στέλεχος.

Μειωμένη αλληλεπίδραση του κυτοχρώματος P-450 ανθεκτικών στελεχών με τους DMIs σαν αποτέλεσμα αλλαγών στη δομή του έχει αναφερθεί στις ζύμες *S. cerevisiae* (Aoyama και συνεργάτες, 1983) και *C. albicans* (Vanden Bossche και συνεργάτες, 1987). Στην περίπτωση όμως του *S. cerevisiae*, το αλλαγμένο κυτόχρωμα είχε χάσει τις καταλυτικές του ιδιότητες και η βιοσύνθεση της εργοστερόλης σταματούσε στο στάδιο της απομεθυλίωσης του C-14 της λανοστερόλης. Αντίθετα, στα *tri-1* ανθεκτικά στελέχη του μύκητα *N. haematococca* var. *cucurbitae* η καταλυτική ικανότητα του αλλαγμένου κυτοχρώματος P-450 δεν φαίνεται να είναι μειωμένη. Κάτι τέτοιο δεν θα μπορούσε άλλωστε να συμβαίνει, αφού στους μυκηλιακούς μύκητες οι 14 α -μεθυλ-στερόλες δεν μπορούν να παίξουν το ρόλο της εργοστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες (Sisler και συνεργάτες, 1983) και κατά συνέπεια

τέτοιου είδους μεταλλαγές θα ήταν θανατηφόρες. Αυξημένη αστάθεια του κυτοχρώματος P-450 έχει παρατηρηθεί και κατά τη μελέτη μικροσωματικών παρασκευασμάτων ανθεκτικών στο imazalil στελεχών του μύκητα *Penicillium italicum* σαν αποτέλεσμα αλλαγών στη δομή του ενζύμου που οδηγούν σε μειωμένη συγγένεια με τους DMIs (Guan, 1982). Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι τόσο στην περίπτωση του *P. italicum*, όσο και σ' αυτή του *N. haematococca* var. *cucurbitae*, η μελέτη αφορά το σύνολο των πιθανών ισοενζυμικών μορφών του κυτοχρώματος P-450, μέρος μόνο των οποίων αντιπροσωπεύει το υπεύθυνο για την απομεθυλίωση του C-14 της λανοστερόλης κυτόχρωμα P-450_{14DM}.

Η παραγωγή του κυτοχρώματος P-450 στον *S. cerevisiae* ελέγχεται από έναν χρωματοσωματικό γόνο (King και συνεργάτες, 1983) και φαίνεται ότι το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση των θηλαστικών (Okey και συνεργάτες, 1979). Τα αποτελέσματα της γενετικής (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989) και βιοχημικής μελέτης (παρούσα εργασία) του γόνου *tri-1* υποστηρίζουν ότι και στην περίπτωση του *N. haematococca* var. *cucurbitae* ένας χρωματοσωματικός γόνος ελέγχει τη δομή του κυτοχρώματος P-450.

Πλήρης απόδειξη του βιοχημικού μηχανισμού ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών μπορεί να προκύψει μόνο με τη λήψη του χαρακτηριστικού φάσματος απορρόφησης του κυτοχρώματος P-450 ή μετά από φασματοφωτομετρική μελέτη της αλληλεπίδρασης του ενζύμου με τους DMIs. Σε αναγωγικό περιβάλλον το μονοξείδιο του άνθρακα δεσμεύεται στη θέση δράσης του ενζύμου σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο, το φάσμα του οποίου δίνει ένα μέγιστο απορρόφησης στην περιοχή των 450 nm. Αλλαγές στη δομή του κυτοχρώματος μπορεί να μεταβάλλουν τη συνολική εικόνα του φάσματος απορρόφησης και κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση ανθεκτικών στη nystatin στελεχών του *S. cerevisiae* (King και συνεργάτες, 1985). Παρόμοια, τα σύμπλοκα του κυτοχρώματος P-450 με τους DMIs δίνουν αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης από τις οποίες μπορεί να υπολογισθεί η συγγένεια του ενζύμου με τους παρεμποδιστές (Wiggins και Baldwin, 1984· Vanden Bossche και συνεργάτες, 1987). Κατά τη διάρκεια της εργασίας μας, έγιναν προσπάθειες λήψης τέτοιου είδους φασμάτων απορρόφησης του κυτοχρώματος P-450 τόσο του αγρίου όσο και ενός *tri-1* στελέχους χωρίς όμως επιτυχία παρά τα κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Η λήψη τέτοιων φασμάτων φαίνεται να είναι ιδιαίτερα δύσκολη στην περίπτωση των μυκηλιακών μυκήτων για λόγους που παραμένουν αδιευκρίνιστοι και που πιθανά σχετίζονται με τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες κατά την εκτέλεση του πειράματος (De Waard,

προσωπική επικοινωνία). Προσπάθειες προς αυτή την κατεύθυνση θα δώσουν όχι μόνο την τελική απόδειξη του μηχανισμού ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών αλλά και θα αναπτύξουν τις απαραίτητες τεχνικές για την πληρέστερη κατανόηση της δράσης των DMIs σε υποκυτταρικό επίπεδο.

Επιπλέον της προσπάθειας για τη διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας των *tri-1* στελεχών, μελετήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο triadimefon σαν αποτέλεσμα ενός βιοχημικού μηχανισμού που θα στηριζόταν στην μειωμένη μετατροπή του triadimefon ή σε αλλαγή της διαστερεοϊσομερούς σύνθεσης του triadimenol που παράγεται από την αναγωγή του triadimefon. Επανελημμένες προσπάθειες προς την κατεύθυνση αυτή με τους μύκητες *Botrytis cinerea* και *N. haematococca* var. *cucurbitae* ήσαν ανεπιτυχείς. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει ότι τουλάχιστον στους μύκητες αυτούς δεν υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο triadimefon με τροποποίηση του μεταβολισμού του σε triadimenol. Μετά από επιλογή ανθεκτικών στο triadimefon στελεχών του μύκητα *Botrytis cinerea* αναγνωρίστηκαν δύο κατηγορίες στελεχών, χαμηλού και μέσου επιπέδου ανθεκτικότητας. Οι δύο αυτές κατηγορίες έδειξαν παρόμοιου επιπέδου ανθεκτικότητα και στο triadimenol και κανένα ανθεκτικό στο triadimefon στέλεχος δεν εμφανίσθηκε να είναι ευαίσθητο στο triadimenol. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι υπάρχει δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας του *B. cinerea* στο triadimefon αλλά το επίπεδο της ανθεκτικότητας δεν είναι ιδιαίτερα υψηλό και πάντα συνδέεται με παρόμοιου επιπέδου ανθεκτικότητα και στο triadimenol. Η σύνδεση της ανθεκτικότητας στο triadimefon με μείωση της ευαισθησίας και στο triadimenol διαπιστώθηκε και στην περίπτωση του *N. haematococca* var. *cucurbitae*, όπου όλα τα ανθεκτικά στο triadimefon στελέχη που επελέγησαν, ήταν ανθεκτικά και στο triadimenol.

Η πιθανότερη εξήγηση είναι ότι πολλά ένζυμα πραγματοποιούν την αναγωγή του triadimefon προς triadimenol (Gasztonyi και Josepovits, 1984· Deas και συνεργάτες, 1984a) και κατά συνέπεια η ταυτόχρονη τροποποίησή τους απαιτεί τη συσσώρευση πολλών μεταλλαγών στον ίδιο γονότυπο. Επιπλέον, μερικά από τα ένζυμα αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του κυττάρου (Gasztonyi, 1982) και κατά συνέπεια οποιαδήποτε τροποποίηση της δομής τους σαν αποτέλεσμα χρωματοσωματικών μεταλλαγών ή είναι θανατηφόρος ή επηρεάζει σε τέτοιο βαθμό την προσαρμοστικότητα ώστε να μην είναι δυνατή, παρουσία παρεμποδιστή, η επιλογή ανθεκτικών στελεχών.

Κατά τη μελέτη της ανθεκτικότητας του *N. haematococca* var. *cucurbitae* στο

triadimefon απομονώθηκαν δύο κατηγορίες στελεχών χαμηλού και μέσου επιπέδου ανθεκτικότητας. Τα μέσου επιπέδου ήταν ανθεκτικά και στα triadimenol, bitertanol και propiconazole, το ίδιο ευαίσθητα με το άγριο στο fenarimol και περισσότερο ευαίσθητα στο clotrimazole και σε επίπεδα παρόμοια μ' αυτά των *tri-1* στελεχών. Αντίθετα, τα χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητας στο triadimefon έδειξαν χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα και σ' όλους τους παραπάνω παρεμποδιστές, παρόμοια δηλαδή συμπεριφορά μ' αυτή των στελεχών τύπου *fen*. Από τα στοιχεία αυτά και παρ' ότι δεν έγινε γενετική ανάλυση για την αναγνώριση των υπευθύνων, για την ανθεκτικότητα των νέων αυτών στελεχών, γόνων, τα μέσης ανθεκτικότητας στελέχη μπορούν να χαρακτηρισθούν σαν τύπου *tri* και τα χαμηλής σαν τύπου *fen*. Σαν στελέχη τύπου *fen* μπορούν να χαρακτηρισθούν και τα μέσης ανθεκτικότητας στελέχη του *B. cinerea* τα οποία έδειξαν παρόμοιου επιπέδου ανθεκτικότητα και σε αντιπροσώπους άλλων ομάδων των DMIs (bitertanol, propiconazole, clotrimazole, fenarimol) όχι όμως και στο μορφολινικό fenpropimorph.

Η χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα των *fen* στελεχών έχει μελετηθεί γενετικά και βιοχημικά και έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός πολυγονικού συστήματος που ελέγχει την, με κατανάλωση ενέργειας, απέκκριση των παρεμποδιστών από το εσωτερικό του κυττάρου (Kalamarakis και συνεργάτες, 1991). Αντίθετα, η υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα των *tri-1* στελεχών που ελέγχεται από ένα μόνο γόνο οφείλεται σε αλλαγή της θέσης δράσης των DMIs, όπως υποστηρίζουν τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας. Αποδείχθηκε δηλαδή ότι, τουλάχιστον στην περίπτωση του *N. haematococca* var. *cucurbitae*, όχι μόνο υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο ίδιο μυκητοκτόνο με δύο διαφορετικά συστήματα κληρονομικότητας αλλά και με δύο διαφορετικούς βιοχημικούς μηχανισμούς. Επιπλέον, η εκ νέου απομόνωση στελεχών τύπου *tri*, αυτή τη φορά μετά από επιλογή σε triadimefon, επιβεβαιώνει τον υψηλό κίνδυνο εμφάνισης στον αγρό αυτού του τύπου ανθεκτικών στο triadimenol στελεχών (Kalamarakis και συνεργάτες, 1989).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

AGRANOFF B. W., EGGERER H., HENNING U. and LYNNEN F., Biosynthesis of terpenes. VII Isopentenyl pyrophosphate isomerase, *The Journal of Biological Chemistry*, 235, 326 (1960).

AKHTAR M., HUNT P. F. and PARVEZ M. A., The transfer of hydrogen from C-24 to C-25 in ergosterol biosynthesis, *Biochemical Journal*, 103, 616 (1967).

AKHTAR M., RAHIMTULA A. D. and WILTON D. C., The stereochemistry of hydrogen elimination from C-7 in cholesterol and ergosterol biosynthesis, *Biochemical Journal*, 117, 539 (1970).

ALEXANDER K. T. W., MITROPOULOS K. A. and GIBBONS G. F., A possible role for cytochrome P-450 during the biosynthesis of zymosterol from lanosterol by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60, 460 (1974).

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ Ν. Ε. και ΒΑΡΒΟΥΛΗ Α. Γ., Μαθήματα Οργανικής Χημείας, Θεσσαλονίκη, 1981.

ANDERSON N. H., BRANCH S. K., LOEFFLER R. S. T., MANN B. E., NOWELL I. W. and WALKER P. E., Structural studies in azolymethanes, *Pesticide Science*, 15, 310 (1984).

ANDING C., ROHMER M., and OURISON G., Nonspecific biosynthesis of hopane triterpens in a cell-free system from *Acetobacter rancens*, *Journal of the American Chemical Society*, 98, 1274 (1976).

ANDREASEN A. A. and STIER T. J. B., Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 43, 271 (1954).

AOYAMA Y. and YOSHIDA Y., The 14 α demethylation of lanosterol by a reconstituted cytochrome P-450 system from yeast microsomes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 85, 28 (1978).

AOYAMA Y., YOSHIDA Y., SONODA Y., and SATO Y., Metabolism of 3 β -hydroxy-24,25-dihydrolanosterol by purified cytochrome P-450_{14DM} from yeast. Evidence for contribution of the cytochrome to whole process of lanosterol 14 α -demethylation, *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 1239 (1987).

AOYAMA Y., YOSHIDA Y., SATO R., SUSANI M. and RUIS H., Involvement of cytochrome *b5* and a cyanide-sensitive monooxygenase in the 4-demethylation of 4,4-dimethyl-zymosterol by yeast microsomes, *Biochemica et Biophysica Acta*, 663, 194 (1981).

AOYAMA Y., YOSHIDA Y., HATA S., NISHINI T. and KATSUKI H., Buthiobate: A potent inhibitor for yeast cytochrome P-450 catalyzing 14 α -demethylation of lanosterol, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 115, 642 (1983b).

AOYAMA Y., YOSHIDA Y., NISHINI T., KATSUKI H., MAITRA U. S., MOHAN V. P. and SPRINSON D. B., Isolation and characterization of an altered cytochrome P-450 from a yeast mutant defective in lanosterol 14 α -demethylating, *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 14260 (1987).

AOYAMA Y., YOSHIDA Y., HATA S., NISHINI T., KATSUKI H., MAITRA U. S., MOHAN V. P. and SPRINSON D. B., Altered cytochrome P-450 in a yeast mutant blocked in demethylating C-3 β of lanosterol, *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 9040 (1983a).

ATTABHANYO A. and HOLCOMB G. E., Control of *Fusarium* wilt of mimosa with systematic fungicides, *Plant Disease Reporter*, 60, 56 (1976).

AZARI M. R. and WISEMAN A., Purification and characterization of the cytochrome P-448 component of a benzo(α)pyrene hydroxylase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Analytical Biochemistry*, 122, 129 (1982).

BAILEY R. B. and PARKS L. W., Yeast sterol ester and their relationship to the growth of yeast, *Journal of Bacteriology*, 124, 606 (1975a).

BAILEY R. B. and PARKS L. W., Potassium translocation in yeast mitochondria and its relationship to ergosterol biosynthesis, *Journal of Bacteriology*, 122, 606 (1975b).

- BAKER R., Fertilization ability of males and hermaphrodites in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*, *Phytopathology*, 46, 644 (1956).
- BALDWIN B. C. and WIGGINS T. E., Action of fungicidal triazoles of the diclobutrazol series on *Ustilago maydis*, *Pesticide Science*, 15, 156 (1984).
- BALLIANO G., VIOLA F., GERUTI M. and CATTEL L., Inhibition of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by N,N-diethylazasqualene and derivatives, *Biochimica et Biophysica Acta*, 959, 9 (1988).
- 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).
- BALOCH R. I., MERCER E. I., WIGGINS T. E. and BALDWIN B. C., Inhibition of ergosterol biosynthesis by tridemorph, fenpropimorph, and fenpropidin, *Phytochemistry*, 23, 2219 (1984).
- BARTZ J. A. and MITCHELL J. E., Evidence for the metabolic detoxification of n-dodecylguanidine acetate by ungerminated macroconidia of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Phytopathology*, 60, 350 (1970).
- BARUG D. and KERKENAAR A., Resistance in mutagen-induced mutants of *Ustilago maydis* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis, *Pesticide Science*, 15, 78 (1984).
- BATEMAN G. L. and GUTTERIDGE R. J., Triadimenol seed treatment: Implications for take-all, *British Crop Protection conference*, p. 43 (1984).
- BEARDEN J. C., Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay, *Biochimica et Biophysica Acta*, 533, 525 (1978).
- BECKER G., Use of Bayleton for the control of mildew in winter barley in autumn, *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, 31, 145 (1978).

BERNDT J., BOLL M., LOWER M. and GAUMERT R., Regulation of sterol biosynthesis in yeast: induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by glucose, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 51, 843 (1973).

BIRCHMORE R. J., BROOKS R. F., COPPING L. G. and WELLS W. H., BTS 40 542-a new broad spectrum fungicide, *Proceedings of British Crop Protection Conference*, p. 593 (1977).

BISTIS G. N. and GEORGOPOULOS S. G., Some aspects of sexual reproduction in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*, *Mycologia*, 71, 127 (1979).

ΒΙΤΩΠΑΤΟΣ Α. Γ., Διερεύνηση γενετικής δραστηριότητας μυκητοκτόνων, Διδακτορική διατριβή, Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 1990.

BLADOCHA M. and BENVENISTE P., Manipulation by tridemorph, a systemic fungicide, on the sterol composition of maize leaves and roots, *Plant Physiology*, 71, 756 (1983).

BLOCH K., CHAYAKIN S., PHILLIPS A. H. and DE WAARD A., Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate, *The Journal of Biological Chemistry*, 234, 2595 (1959).

BOECK L. D., HOEHN M. M., WESTHEAD J. E., WOLTER R. K. and THOMAS D. N., New azasteroidal antifungal antibiotics from *Geotrichum flavo-frunneum*. I. Discovery and fermentation studies, *Journal of Antibiotics*, 28, 95 (1975).

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

BOYLE F., GILMOUR J., LENNARD J. H., CLIFFORD B. C. and JONES E. R. L., Sensitivity of cereal brown rust fungi to triadimefon and propiconazole, *Proceedings of British Crop Protection Conference*, p. 379 (1988).

BRANDES W., KASPERS H. and KRAMER W., Baycor, a new foliar-applied fungicide of the biphenyloxy triazolyl methane group, *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, 32, 1 (1979).

BRISTOW P. R., Effect of triforine on pollen germination and fruit set in

highbush blueberry, *Plant Disease*, 65, 350 (1981).

BROWN I. F. and HALL H. R., Certain biological properties of fenarimol applicable to its field use, *Proceedings of British Crop Protection Conference*, p. 573 (1981).

BUCHENAUER H., Mode of action of triadimefon in *Ustilago avenae*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 7, 309 (1977).

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

BUCHENAUER H., Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds, in "Modern Selective Fungicides" (H. Lyr, Ed.), p. 205 Longman, Essex 1987.

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, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 15, 58 (1981).

BUCHENAUER H. und ROHNER E., Uptake, translocation and transformation of triadimefon in cultivated plants, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 89, 385 (1982).

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

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

BUTTERS J., CLARK J. and HOLLOWOMON D. W., Resistance to inhibitors of sterol biosynthesis in barley powdery mildew, *Mededelingen van de*

Faculteit Landbouwwetenschappen der Rijsuniversiteit Gent, 49, 143 (1984).

CHRAMBACH A., REISFELD R. A., WYCKOFF M. and ZACCARI J., A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 20, 150 (1967).

CLARK D. C., HODGSON P. N. and LLOYD R. J., Field studies on the effect of a triadimenol based seed treatment on winter wheat 1978-1984, *British Crop Protection conference*, p. 59 (1984).

CLARK T., CLIFFORD D. R., DEAS A. H. B., GANDLE P. and WATKINS D. A. M., Photolysis, metabolism and other factors influencing the performance of triadimefon as a powdery mildew fungicide, *Pesticide Science*, 9, 497 (1978).

COLEY-SMITH J. R., Sclerotia and other structures in survival, in "The Biology of *Botrytis*" (J. R. Coley-Smith, K Verhoeff, W. R. Jarvis, Eds.), p. 85, Academic press, New York, 1980.

COOKE B. K., PAPPAS A. C., JORDAN V. W. L. and WESTERN N. M., Translocation of benomyl, prochloraz and procymidone in relation to control of *Botrytis cinerea* in strawberries, *Pesticide Science*, 10, 467 (1979).

COPE J. F., Mode of action of miconazole on *Candida albicans*: Effect on growth, viability and K⁺ release, *Journal of General Microbiology*, 119, 245 (1980).

COPPING L. G., BIRCHMORE R. J., WRIGHT K. and GODSON D. H., Structure-activity relationships in a group of imidazole-1-carboxamides, *Pesticide Science*, 15, 280 (1984).

COREY E. J., RUSSEY W. E. and ORTIZ DE MORTELLANO P. R., 2,3 Oxidosqualene, an intermediate in the biological synthesis of sterols from squalene, *Journal of the American Chemical Society*, 88, 4750 (1966).

CORNFORTH J. W., CORNFORTH R. H., DONNINGER C., POPJAK G., SHIMIZU Y., ICHII S., FORCHIELLI E. and CASPI E., The migration and elimination of

hydrogen during biosynthesis of cholesterol from squalene, *Journal of the American Chemical Society*, 87, 3224 (1965).

COURSEN B. W. and SISLER H. D., Effect of the antibiotic cycloheximide on the metabolism and growth of *Saccharomyces pastorianus*, *American Journal of Botany*, 47, 541 (1960).

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

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

DAVIDSE L. C., Biochemical aspects of phenylamide fungicides-action and resistance, in "Modern Selective Fungicides" (H. Lyr Ed.), p. 275, Longman, Essex 1987.

DE FALANDRE A., DABOUSSI M. J. and LEROUX P., Inheritance of resistance to fenpropimorph and terbinafine, two sterol biosynthesis inhibitors in *N. haematococca*, *Phytopathology*, 81, 1432 (1991).

DE WAARD M. A. and GIESKES S. A., Characterization of fenarimol-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83(Suppl. 1), 177 (1977).

DE WAARD M. A. and VAN NISTELROOY J. G. M., Mechanism of resistance to fenarimol in *Aspergillus nidulans*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 10, 219 (1979).

DE WAARD M. A. and VAN NISTELROOY J. G. M., Mechanism of resistance to pyrazophos in *Pyricularia oryzae*, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 86, 251 (1980a).

DE WAARD M. A. and VAN NISTELROOY J. G. M., An energy-dependent efflux mechanism for fenarimol in a wild-type and fenarimol-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 13, 255

(1980b).

DE WAARD M. A. and VAN NISTELROOY J. G. M., Defferential accumulation of fenarimol by a wild-type isolate and fenarimol-resistant isolates of *Penicillium italicum*, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 90, 143 (1984).

DE WAARD M. A., GROENEWEG H. and VAN NISTELROOY J. G. M., Laboratory resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in *Penicillium italicum*, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88, 99 (1982).

DEAS A. H. B., and CLIFFORD D. R., Reductive and oxidative metabolism of triazolmethanes by two basidiomycete fungi, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22, 276 (1984).

DEAS A. H. B., CLARK T. and CARTER G. A., The enantiomeric composition of triadimenol produced during metabolism of triadimefon by fungi. Part I: Influence of dose and time of incubation, *Pesticide Science*, 15, 63 (1984a).

DEAS A. H. B., CLARK T. and CARTER G. A., The enantiomeric composition of triadimenol produced during metabolism of triadimefon by fungi. Part II: Differences between fungal species, *Pesticide Science*, 15, 71 (1984b).

DEAS A. H. B., CLARK T., CLIFFORD D. R. and JAMES C. S., The enantiomeric composition of triadimenol produced during metabolism of triadimefon by fungi. Part III: Relationship with sensitivity to triadimefon, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 26, 10 (1986).

DEKKER J., Conversion of 6-azauralil in sensitive and resistant strains of *Cladosporium cucumerinum*, in "Mechanisms of Action of Fungicides and Antibiotics. (W. Girbardt, Ed.), p. 333 Akademie Verlag, Berlin (1967).

DEKKER J., Selectivity of and resistance against systemic fungicides., *OEPP/EPPO*, 10, 47 (1973).

DEMAKOPOULOU M. G., ZIOGAS B. N. and GEORGOPOULOS S. G., Evidence for polygenic control of fenpropimorph, *ISPP Chemical Control Newsletter*, 12,

34 (1989).

DEMPSEY M. E., SEATON J. D., SCHROEPPFER G. J. and TROCKMAN R. W., The intermediary role of $\Delta^{5,7}$ -cholestadien- 3β -ol in cholesterol biosynthesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 1381 (1964).

DEPIERRE J. W. and DALLNER G., Structural aspects of the membrane of the endoplasmatic reticulum, *Biochimica et Biophysica Acta*, 415, 411 (1975).

DIMOCK A. W., Observations on sexual relations in *Hypomyces ipomoeae*, *Mycologia*, 39, 116, (1937).

DINGLEY J. M., New records of fungous diseases in New Zealand, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 4, 336 (1961).

DOLPHIN D., JAMES B. R., and WELBORN H. C., Proton activities for three states of cytochrome P-450_{cam}, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 88, 415 (1979).

DRAYTON F. L., The sexual mechanism of *Sclerotinia gladioli*, *Mycologia*, 26, 46 (1934).

DURR I. F. and RUDNEY H., The reduction of β -Hydroxy- β -methylglutaryl Coenzyme A to mevalonic acid, *The Journal of Biological Chemistry*, 235, 2572 (1960).

DUS K., KATAGIRI M., YU C. A., ERBES D. L. and GUNSALUS I. C., Chemical characterization of cytochrome P-450_{cam}, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40, 1423 (1970).

ECKERT J. W., *Penicillium digitatum* biotypes with reduced sensitivity to imazalil, *Phytopathology*, 77, 1728 (1987).

EDGINGTON L. V., Structural requirements of systemic fungicides, *Annual Review of Phytopathology*, 19, 107 (1981).

EL-ANI A. S., The genetics of sex in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*, *American Journal of Botany*, 41, 110 (1954).

EL-ANI A. S., Ascus development and nuclear behavior in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*, *American Journal of Botany*, 43, 769 (1956).

ENISZ J., Variation in sensitivity of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* to SBI fungicides in Western Hungary, *Brighton Crop Protection Conference*, p. 373 (1988).

EPSTEIN W. W. and RILLING H. C., Studies on the mechanism of squalene biosynthesis. The structure of presqualene pyrophosphate, *The Journal of Biological Chemistry*, 245, 4597 (1970).

EPTON H. A. S. and RICHMOND D. V., Formation, structure and germination of conidia, in "The Biology of *Botrytis*" (J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff, W. R. Jarvis, Eds.), p. 41, Academic press, New York, 1980.

FAIRBANKS G., STECK T. L. and WALLASH D. F. H., Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Biochemistry*, 10, 2606 (1971).

FISHER D. J., PICKARD J. A., MCKENZIE G. M., Uptake of the systemic fungicide triadimefon by clover and its effect on symbiotic nitrogen fixation, *Pesticide Science*, 10, 75 (1979).

FLETCHER J. T. and WOLFE M. S., Insensitivity of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* to triadimefon, triadimenol and other fungicides, *Proceedings of British Crop Protection Conference*, p. 633 (1981).

FLETCHER R. A. and NATH V., Triadimefon reduces transpiration and increases yield in water stressed plants, *Physiolog. Plant.*, 62, 422 (1984).

FLETCHER R. A. and HOFSTRA G., Triadimefon a plant multi-protectant, *Plant and Cell Physiology*, 26, 775 (1985).

FROST A. and PATTISSEN N., Some results obtained in the United Kingdom using dodemorph for the control of powdery mildews in roses and other ornamentals, *Proceedings of the 6th British Insecticide and Fungicide Conference*, p. 349 (1971).

FRYBERG M., OEHLISCHLAGER A. C. and UNRAU A. M., Formation of a 5 α hydroxy sterol by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 51, 219 (1973).

FUCHS A. und DRANDAREVSKI C. A., Fungitoxic spectrum and effectiveness of triforine *in vitro* and *in vivo*, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 80, 403 (1973).

FUCHS A. and DRANDAREVSKI C. A., The likelihood of development of resistance to systemic fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 82, 85 (1976).

FUCHS A. and DE VRIES F. W., Diastereomer-selective resistance in *Cladosporium cucumerinum* to triazole-type fungicides, *Pesticide Science*, 15, 90 (1984).

FUCHS A., DAVIDSE L. C., DE WAARD M. A. and DE WIT P. J. G. M., Competitions and speculations on novel approaches in the control of plant diseases, *Pesticide Science*, 14, 272 (1983).

FUCHS A., DE RUIG S. P., VAN TUYL J. M. and DE VRIES F. W., Resistance to triforine: a nonexistent problem?, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83(Suppl 1), 189 (1977).

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

GARFINKEL D., Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pirment composition of different microsomes fractions, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 77, 493 (1958).

GASZTONYI M., The diastereomeric ratio in the triadimenol produced by fungal metabolism of triadimefon and its role in fungicidal selectivity, *Pesticide Science*, 12, 433 (1981).

GASZTONYI M., The possible role of different enzymes in the activation of triadimefon, *Akad. Wiss. DDR Systemische Fungizide und Antifungale Verbindungen NI*, p.113 (1982).

GASZTONYI M. and JOSEPOVITS G., Translocation and metabolism of triadimefon in different plant species, *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 13, 403 (1978).

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

GASZTONYI M. and JOSEPOVITS G., Metabolism of some sterol inhibitors in fungi and higher plants, with special referance to the selectivity of fungicidal action, *Pesticide Science*, 15, 48 (1984).

GAYLOR J. L., MIYAKE Y. and YAMANO T., Stoichiometry of 4-methyl sterol oxidase of rat liver microsomes, *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 7159 (1975).

ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΣ Σ. Γ. και ΖΙΩΓΑΣ Β. Ν., Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενειών των Φυτών, Αθήνα, 1992.

GEORGOPOULOS S. G., Genetic nature of tolerance of *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* to penta- and tetra chloronitrobenzene, *Nature*, 194, 148 (1962).

GEORGOPOULOS S. G., Genetic markers and linkage relationships in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*, *Canadian Journal of Botany*, 41, 649 (1963).

GEORGOPOULOS S. G., Development of fungal resistance to fungicides in "Antifungal Compounds" (M. R. Siegel and H. D. Sisler, Eds.), Vol 2, p. 439, Marcel Dekker INC, New York 1977.

GEORGOPOULOS, S. G., Detection and measurement of fungicide resistance in "Fungicide resistance in crop protection" (J. Dekker and S. G. Georgopoulos, Eds.), p. 24, Pudoc, Wageningen 1982.

GEORGOPOULOS S. G., The development of fungicide resistance, in "Population of Plant Pathogens; Their Dynamics and Genetics", (M. S. Wolfe and C. E. Caten Eds.), p. 239, Blackwell Sci. Publ., Oxford 1986.

GEORGOPOULOS S. G., The genetics of fungicide resistance, in "Modern Selective Fungicides" (H Lyr Ed.), p. 53 Longman, Essex 1987.

GEORGOPOULOS S. G., and ZIOGAS B. N., A new class of carboxin-resistant mutant of *Ustilago maydis*, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83(Suppl. 1), 235 (1977).

GEORGOPOULOS S. G. and SKYLAKAKIS G., Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance., *Crop Protection*, 5, 299 (1986).

GIBBONS G. F., The metabolic sequence by which some 4,4-dimethyl sterols are converted into cholesterol, *Biochemical Journal*, 144, 59 (1974).

GOODWIN T. W., Biosynthesis of terpenoids, *Annual Review of Plant Physiology*, 30, 369 (1979).

GORDON P. A. and STEWART P. R., Effect of lipid status on cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis in anaerobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of General Microbiology*, 72, 231 (1972).

GREENAWAY W., Permiability of phenyl-Hg⁺-resistant and phenyl-Hg⁺-susceptible isolates of *Pyrenophora avenae* to the phenyl-Hg⁺ ion, *Journal of General Microbiology*, 73, 251 (1972).

GUAN J., Mechanism of resistance in *Penicillium italicum* to fungicides which inhibit sterol 14 α -demethylation, PhD thesis, Wageningen, 1992.

HALSTED B. D., The egg plant stem rot (*Nectria ipomoeae* Hals.), *New Jersey Agriculture Experimental Station Annual Report*, 12, 281 (1892).

HAMES B. D., An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis, in *Gel Electrophoresis of Proteins* (B. D. Hames and D. Rickwood Eds.), p. 1, IRL Press, Oxford 1988.

HANSEN H. N. and SMITH R. E., The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*, *Phytopathology*, 22, 953 (1932).

HANSEN H. N. and SNYDER W. C., Inheritance of sex in fungi, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 32, 272 (1946).

HATA S., NISHINO T., KOMORI M. and KATSUKI H., Involvement of cytochrome P-450 in Δ^2 -desaturation in ergosterol biosynthesis of yeast, *Biochemical*

and *Biophysical Research Communications*, 103, 272 (1981).

HATANAKA H., ARIGA N., NAGAI J. and KATSUKI H., Accumulation of a sterol intermediate during reaction in the presence of homocysteine with cell-free extract of yeast, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60, 787 (1974).

HAUGEN D. A., VAN DER HOEVEN T. A. and COON M. J., Purified liver microsomal cytochrome P-450. Separation and characterization of multiple forms, *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 3567 (1975).

HAUGHAN, P. A., LENTON J. R. and GOAD L. J., 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).

HENDRIX J. W., Sterol intuction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*, *Science*, 144, 1028 (1964).

HENDRIX J. W., Influence of sterols on growth and reproduction of *Pythium* and *Phytophthora* spp., *Phytopathology*, 55, 790 (1965).

HENDRIX J. W., Inability of *Pythium aphanidermatum* and *Phytophthora palmivora* to incorporate acetate into digitonin-precipitable sterols, *Mycologia*, 58, 307 (1966).

HENNING U., MOSLEIN E. M. and LYNEN F., Biosynthesis of terpenes. V. Formation of 5-pyrophosphomevalonic acid by phosphomevalonic kinase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 83, 259 (1959).

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

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).

HICKEY K. D., Field performance of sterol-inhibiting fungicides against

apple powdery mildew in the mid-Atlantic apple growing region, *Plant Disease*, 65, 1002 (1981).

HIPPE S., Ultrastructural changes induced by the systemic fungicides triadimefon, nuarimol and imazalil nitrate in sporidia of *Ustilago avenae*, *Pesticide Science*, 15, 210 (1984).

HIPPE S., Hexagonal clustering of intramembrane particles in the plasmalemma of *Ustilago avenae* after fungicide treatment, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 24, 161 (1985).

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, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 21, 184 (1984).

HIPPE S. and KOLLER W., Ultrastructural and sterol composition of laboratory strains of *Ustilago avenae* resistant to fungicides, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 26, 209 (1986).

HIPPE S. and GIESEN U., The effect of triadimenol on the cytology and growth of sensitive and resistant strains of *Ustilago avenae*, *Annals of Applied Biology*, 112, 79 (1988).

HOLLIDAY R., The genetics of *Ustilago maydis*, *Genetical Research*, 2, 204 (1961).

HOLLOMON D. W. BUTTERS J. and CLARK J., Genetic control of triadimenol resistance in barley powdery mildew, *Proceedings of British Crop Protection Conference-Pests and Diseases*, p. 477 (1984).

HOLLOWAY P. W. and POPJAK G., The purification of 3,3-dimethylallyl- and geranyl-transferase and of isopentenyl pyrophosphate isomerase from pig liver, *Biochemical Journal*, 104, 57 (1967).

HOMANS A. L. and FUCHS A., Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances, *Journal of Chromatography*, 51, 327 (1970).

HORI M., EGUSHI J., KAKIKI K. and MISATO T., Studies on the mode of action of polyoxins. VI. Effects of polyoxin B on chitin synthesis in polyoxin-sensitive and resistant strains of *Alternaria kikuchiana*, *Journal of Antibiotics*, 27, 260 (1974).

HOWSON W. T., MCGINNIS R. C. and GORDON W. C., Cytological studies of the perfect stage of the species of *Fusarium*, *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 5, 60 (1963).

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).

ILLINGWORTH R. F., ROSE A. H. and BACKETT A., Changes in the lipid composition and fine structure of *Saccharomyces cerevisiae* during ascus formation, *Journal of Bacteriology*, 113, 373 (1973).

ISHIDATE K., KAWAGUCHI K. and TAGAWA K., Change in P-450 content accompanying aerobic formation of mitochondria in yeast, *The Journal of Biochemistry*, 65, 385 (1969a).

ISHIDATE K., KAWAGUCHI K., TAGAWA K. and HAGIHARA B., Hemoproteins in anaerobically grown yeast cells, *The Journal of Biochemistry*, 65, 375 (1969b).

JARMAN T. R., GUNATILAKA A. A. L. and WIDDOWSON D. A., Investigations on the biosynthesis of steroids and terpenoids. XI. The 24-methylene sterol 24(28)-reductase of *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioorganic Chemistry*, 4, 202 (1975).

JARVIS W. R., Epidemiology, in "The Biology of *Botrytis*" (J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff, W. R. Jarvis, Eds.), p. 219, Academic press, New York, 1980.

JAYME M., SCHAEFFER P. C. and RICHARDS J. H., The nature of the hydrogen migrations in the cyclization of squalene oxide to lanosterol, *Journal of the American Chemical Society*, 92, 2059 (1970).

JEFCOATE J. R., Measurement of substrate and inhibitor binding to

microsomal cyt P-450 by optical-difference spectroscopy, in "Methods in Enzymology" (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), p. 258, Academic press, New York, 1979.

KAARS SIJPESTEIJN A., Biochemical modes of action of agricultural fungicides, *World Review of Pesticide Control*, 9, 85 (1970).

KALAMARAKIS A. E., DE WAARD M. A., ZIOGAS B. N. and GEORGOPOULOS S. G., Resistance to fenarimol in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 40, 212 (1991).

KALAMARAKIS A. E., DEMOPOULOS V. P., ZIOGAS B. N. and GEORGOPOULOS S. G., A highly mutable major gene for triadimenol resistance in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95(suppl. 1), 109 (1989).

KAPPAS A. and GEORGOPOULOS S. G., Genetic analysis of dodine resistance in *Nectria haematococca* (syn. *Hypomyces solani*), *Genetics*, 66, 617 (1970).

KARDIN M. K., Resistance of *Bipolaris oryzae* to fenapanil, *Plant Disease*, 67, 871 (1983).

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

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

KATO T., YAMAMOTO S., KAWASE Y. and UEDA M., Fungitoxic properties of a N-3-pyridylimidadithiocarbonate derivative, *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 41, 1 (1975).

KELLEY R. D. and JONES A. L., Evaluation of two triazoles fungicides for postinfection control of apple scab, *Phytopathology*, 71, 737 (1981).

KELLEY R. D. and JONES A. L., Volatility and systemic properties of etaconazole and fenapanil in apple, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 243 (1982).

KELLY S. L., KENNA S., BRIGH H. F. J., WATSON P. F., STANSFIELD I., ELLIS S. W. and KELLY D. E., Lanosterol to ergosterol. Enzymology, inhibition and genetics, in "Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi" (P. J. Kuhn, A. P. J. Trinci, M. J. Jung, M. W. Goosex and L. G. Copping, Eds.), p. 223, New York, 1989.

KENDALL S. G. and HOLLOMON D. W., DMI resistance and sterol 14 α demethylation in *Rhynchosporium secalis*, *Brighton Conferance-Pest and Diseases*, p. 1129 (1990).

KERKENAAR A., Mechanism of action of morpholine fungicides, in "Modern Selective Fungicides" (H. Lyr, Ed.), p. 159, Longman, Essex 1987.

KING D. J., WISEMAN A. and WILKIE D., Studies on the genetic regulation of cytochrome P-450 production in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and General Genetics*, 192, 466 (1983).

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*, *Current Genetics*, 10, 261 (1985).

KINGSLAND G. C., Triadimefon for control of powdery mildew of wheat, *Plant Disease*, 66, 139 (1982).

KLEIN H. P., Synthesis of lipids in resting cells of *Saccharomyces ceravisiae*, *Journal of Bacteriology*, 69, 620 (1955).

KLEIN H. P. and LIPMANN F., The relationship of coenzyme A to lipid synthesis. I Experiments with yeast, *Journal of Biological Chemistry*, 203, 95 (1953).

KLINGENBERG M., Pigments of rat liver microsomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75, 376 (1958).

KOBAYASHI G. S. and MEDOFF G., Antifungal agents: Recent developments, *Annual Review of Microbiology*, 31, 291 (1977).

KOLBE W., Trials for the control of powdery mildew on field-grown cucumber varieties with Baycor and Bayleton (1975-1981), *Pflanzenschutz Nachrichten*

Bayer, 34, 80 (1981a).

KOLBE W., Trials for the control of fungal diseases on roses with Baycor (1976-1981), *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, 34, 85 (1981b).

KOLLER W., Isomers of sterol synthesis inhibitors: Fungicidal effects and plant growth regulator activities, *Pesticide Science*, 18, 129 (1987).

KOLLER W., Sterol demethylation inhibitors: Mechanism of action and resistance, in "Fungicide Resistance in North America", (C. J. Delp Ed.), p. 79, APS Press, Minnesota 1988.

KOSER P. L., FALATTO M. B., MACCUBBIN A. E. and GURTOO H. L., The genetics of aflatoxin B₁ metabolism. Association of the induction of aflatoxin B₁-4-hydroxylase with the transcriptional activation of cytochrome P₃-450 gene, *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 12584 (1988).

KRAUS P., Studies on the mechanism of action of Baycor, *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, 32, 17 (1979).

KRAUS P., Studies on uptake and translocation of Bayleton in grape plants, *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, 34, 197 (1981).

KUNEMUND A. and HOEFER M., Passive fluxes of K⁺ and H⁺ in wild strain and nystatin-resistant mutant of *Rhodotorula gracilis* (ATCC 26194), *Biochemical et Biophysical Acta*, 735, 203 (1983).

KURIHARA N., HORI N. and ICHINOSE R., Cytochrome P-450 content and aldrin epoxidation to dieldrin in isolated rat hepatocytes, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 21, 63 (1984).

LAEMMLI U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature*, 227, 680 (1970).

LAWS F. A., WALMSLEY-WOODWARD D. J. and WHITTINGTON W. J., Germination and growth of single-pustule isolates of *Erysiphe graminis* tolerant and sensitive to tridemorph and ethirimol, *Annual Applied Biology*, 100, 253 (1982).

LEE W. H., KAMMERECK R., LUTSKY B. N., McCLOSKEY J. A. and SCHROEPFER G. J., Studies on the mechanism of the enzymatic conversion of Δ^8 -cholesten- 3β -ol to Δ^7 -cholesten- 3β -ol, *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 2033 (1969).

LEHNINGER A. L., *Biochemistry*, p. 502, Worth publishers, Inc., New York 1975.

LEVIN W., LU A. Y. H., RYAN D., WEST S., KUNTZMAN R. and CONNEY A. H., Partial purification and properties of cytochrome P-450 and P-448 from rat liver microsomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 153, 543 (1972).

LEROUX P. and GREDT M., Etudes sur les inhibiteurs de la biosynthese des sterols fongiques: I. Fongicides provoquant l'accumulation des desmethylsterols, *Agronomie*, 3, 123 (1983).

LEROUX P. and GREDT M., Resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in laboratory strains of *Botrytis cinerea* and *Ustilago maydis*, *Pesticide Science*, 15, 85 (1984).

LEVY H. R. and POPJAK G., Studies on the biosynthesis of cholesterol. 10. Mevalonic kinase and phosphomevalonic kinase from liver, *Biochemical Journal*, 75, 417 (1960).

LINDBERG M. and BLOCH K., Ketonic intermediates in the demethylation of lanosterol, *The Journal of Biological Chemistry*, 238, 1661 (1963).

MADYASTHA P. B. and PARKS L. W., The effect of cultural conditions on the ergosterol ester components of yeast, *Biochimica et Biophysica Acta*, 176, 858 (1969).

MARICHAL P., VANDEN BOSSCHE H., GORRENS J., BELLENS D. and JANSSEN P. A. J., Cytochrome P-450 of *Aspergillus fumigatus*. Effect of itraconazole and ketoconazole, in "Proceedings of the 6th International Conference on Biochemistry and Biophysics of Cytochrome P-450" (I. Schuster, Ed.), p. 177, Taylor & Francis, London New York, Philadelphia, 1989.

MARRIOTT M. S., Inhibition of sterol biosynthesis in *Candida albicans* by

imidazole-containing antifungals, *Journal of General Microbiology*, 117, 253 (1980).

MARTIUS C. Fr. Ph., Kartoffelpeidemic der latzen Jahre, oder die Stockfaule und Roude der Kartoffeln, gaschildert und ihren ursachlichen Verhaltnissen erortert, Denkschrift Munchen Akad. Wiss. 70 S (1842).

MAUDGAL R. K., TCHEN T. T. and BLOCH K., 1,2-Methyl shifts in the cyclization of squalene to lanosterol, *Journal of the American Chemical Society*, 80, 2589 (1958).

MERCER E. I., The biosynthesis of ergosterol, *Pesticide Science*, 15, 133 (1984).

MILLER W. L. and GAYLOR J. L., Investigation of the component reactions of oxidative sterol demethylation. Oxidation of a 4 α -methyl sterol to a 4 α -carboxylic acid during cholesterol biosynthesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 245, 5369 (1970a).

MILLER W. L. and GAYLOR J. L., Investigation of the component reactions of oxidative sterol demethylation. Oxidation of a 4,4-dimethyl sterol to a 4 β -methyl-4 α -carboxylic acid during cholesterol biosynthesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 245, 5375 (1970b).

MIZIORKO H. M., CLINKENBEARD K. D., REED W. D. and LANE M. D., 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Synthase. Evidence for an acetyl-S-enzyme intermediate and identification of a cysteinyl sulfhydryl as the site of acetylation, *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 5768 (1975).

MOORE J. T. and GAYLOR J. L., Isolation and purification of an S-Adenosylmethionine: Δ^24 -Sterol methyltransferase from yeast, *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6334 (1969).

MOORE J. T. and GAYLOR J. L., Investigation of an S-Adenosylmethionine: Δ^24 -Sterol methyltransferase in ergosterol biosynthesis in yeast. Specificity of sterol substrates and inhibitors, *The Journal of Biological Chemistry*, 245, 4684 (1970).

MURPHY P. J. and WEST C. A., The role of mixed function oxidases in

kaurene metabolism in *Echinocystis macrocarpa* greene endosperm, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 133, 395 (1969).

MUSCIO F., CARLSON J. P., KUEHL L. and RILLING H. C., Presqualene pyrophosphate. A normal intermediate in squalene biosynthesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 3746 (1974).

MWANG'OMBE A. W., Tolerance in isolates of *Colletotrichum coffeanum* Noack. to prochloraz-manganese in Kenya, *Pesticide Science*, 34, 365 (1992).

NACHMIAS A. and BARASH I., Decreased permeability as a mechanism of resistance to methyl benzimidazole-2-yl carbamate (MBC) in *Sporobolomyces roseus*, *Journal of General Microbiology*, 94, 167 (1976).

NAGAI J., KAWAMURA S. and KATSUKI H., Occurrence of fatty acid esters of sterol intermediates in ergosterol synthesis by yeast during respiratory adaptation, *Journal of Biochemistry*, 81, 1665 (1977).

NAGAI J. KATSUKI H., NISHIKAWA Y., NAKAMURA I., KAMIHARA T. and FUKUI S., Effects of thiamine and pyridoxine on the content and composition of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* 4228, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60, 555 (1974).

NAKANISHI T. and OKU H., Metabolism and accumulation of pentachloro-nitrobenzene by phytopathogenic fungi in relation to selective toxicity, *Phytopathology*, 59, 1761 (1969).

NASH S. M. and ALEXANDER J. V., Comparative survival of *Fusarium solani* f. *cucurbitae* and *F. solani* f. *phaseoli* in soil, *Phytopathology*, 55, 963 (1965).

NELSON D. R. and STROBEL H. W., On the membrane topology of vertebrate cytochrome P-450 proteins, *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 6038 (1988).

NES W. R., The biochemistry of plant sterols, *Advances in Lipid Research*, 15, 233 (1977).

NES W. R., ADLER J. H., SEKULA B. C. and KREVITZ K., Discrimination

between cholesterol and ergosterol by yeast membranes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71, 1296 (1976).

NES W. R., KREVITZ K., BEHZADAN S., PATTERSON G. W., LANDREY J. R. and CONNER R. L., The configuration of $\Delta^{5.7.22}$ -sterols in a tracheophyte, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 66, 1462 (1975).

NIABΗΣ K. A., Μαθήματα Φυσιολογίας Φυτών, Αθήνα, 1981.

NIEUWOUDT C. J. L., Baycor, a new foliar applied fungicide for the control of rust caused by *Uromyces appendiculatus* (Pers.) unger on reans (*Phaseolus* spp.), *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, 37, 21 (1984).

NIRANJAN B. G., WILSON N. M., JEFICOATE C. R. and AVADHANI N. G., Hepatic mitochondrial cytochrome P-450 system. Distinctive features of cytochrome P-450 involved in the activation of aflatoxin B₁ and benzo(a)pyrene, *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 12495 (1984).

NIRANJAN B. G., RAZA H., SHAYIQ R. M., JEFICOATE C. R. and AVADHANI N. G., Hepatic mitochondrial cytochrome P-450 system. Identification and characterization of a precursor form of mitochondrial cytochrome P-450 induced by 3-methylcholanthrene, *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 675 (1988).

NISHINO T., HATA S., TAKETANI S., YABUSAKI Y. and KATSUKI H., Subcellular localization of the enzymes involved in the late stage of ergosterol biosynthesis in yeast, *Journal of Biochemistry*, 89, 1391 (1981).

OEHLSCHLAGER A. C., ANGUS R. H., PIERCE A. M., PIERCE H. D. Jr and SRINIVASAN R., Azasterol inhibition of Δ^{24} -sterol methyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry*, 23, 3582 (1984).

OHBA M., SATO R., YOSHIDA Y., NISHINO T. and KATSUKI H., Involment of cytochrome P-450 and a cyanide-sensitive enzyme in different steps of lanosterol demethylation by yeast microsomes *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 85, 21 (1978).

OHKAWA H., SHIBAIKE R., OKIHARA V., MORIDAWA M. and MIYAMOTO J., Degradation of the fungicide Denmert (s-n-butyl-S-p-tetr-butylbezyI N-3

-pyridyldithiocarbazonimide, S-1358) by plants, soils and light, *Agricultural and Biological Chemistry*, 40, 943 (1976).

OKEY A. B., BONDY G. P., MASON K. E., KAHL G. F., EISEN H. J., GUENTHER T. M. and NEBERT D. W., Regulatory gene product of the *Ah* locus. Characterization of the cytosolic inducer receptor complex and evidence for its nuclear translocation, *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 11636 (1979).

OROS G. and GASZTONYI M., Reduction of triadimefon to triadimenol by plant related bacteria *ISPP Chemical Control Newsletter*, 8, 24 (1987).

OSUMI T., TAKEHANI S., KATSUKI H., KUHARA T. and MATSUMOTO I., Ergosterol biosynthesis in yeast. Pathways in the late stage and their variations under various conditions, *The Journal of Biochemistry*, 83, 681 (1978).

PALAKODETY R. B., CLEJAN L. A., KRIKUM G., FEIERMAN D. E. and CADERBAUM A. I., Characterization and identification of a pyrazole-inducible form of cytochrome P-450, *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 878 (1988).

ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ Χ. Γ., Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου, (Εκδόσεις Καραμπερόπουλος Α. Ε.), Αθήνα, 1987.

ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ Χ. Γ., Ασθένειες Λαχανικών, Βιομηχανικών και Καλλωπιστικών Φυτών, Αθήνα, 1991.

PARKS L. W., S-Adenosylmethionin and ergosterol synthesis, *Journal of the American Chemical Society* 80, 2023 (1958).

PARKS L. W., Metabolism of sterols in yeast, *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 6, 301 (1978).

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).

PAUL V. H., Studies on the effect of Bayleton on pathogenesis of brown rust of wheat (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*), *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, 35, 229 (1982).

PECSOK R. L., SHIELDS L. D., CAIRNS T. and McWILLIAM I. G., Modern Methods of Chemical Analysis (J. Wiley & Sons, Eds.), Μετάφραση Σ. Βολιώτης (Α. Πνευματικός, Εκδ.), σ. 100, Αθήνα, 1980.

PEPIN H. S., MAC PHERSON E. A. and CLEMENTS S. J., Effect of triadimefon on the growth of Willamette red raspberry, *Canadian Journal of Plant Science*, 60, 1203 (1980).

PIERCE H. D. Jr., PIERCE A. M., SRINIVASAN R., UNRAV A. M. and OEHL-SCHLAGER A. C., Azasterol inhibition in yeast. Inhibition of the 24-methylene-sterol $\Delta^{24(28)}$ -reductase and Δ^{24} -sterol methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* by 23-aza-cholesterol, *Biochemica et Biophysica Acta*, 529 429 (1978).

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).

POMMER E. H., Chemical structure-fungicidal activity relationship in substituted morpholines, *Pesticide Science*, 15, 285 (1984).

POMMER E. H., Morpholine fungicides, in "Modern Selective Fungicides" (H. Lyr, Ed.), p. 143, Longman, Essex 1987.

POMMER E. H. and HIMMELE W., Die Bekämpfung wichtiger Getreidekrankheiten mit Fenpropemorph, einem neuen Morpholinderivat, *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen der Rijsuniversiteit Gent*, 44, 499 (1979).

PRASAD N., Variability of the cucurbit root-rot fungus *Fusarium (Hypomyces) solani* f. *cucurbitae*, *Phytopathology*, 39, 133 (1949).

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

PRING R. J., Unstructural changes occurring in wheat leaves following triadimefon treatment, *Pesticide Science*, 37, 327 (1986).

PROUDLOCK J. W., WHEELDON L. W., JOLLOW D. J. and LINNANE A. W., Role of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 152, 434 (1968).

PRUSKY D. and BEN-ARIE R., Control by imazalil of fruit storage rots caused by *Alternaria alternata*, *Annals of Applied Biology*, 98, 87 (1981).

QUINN J. A., Effectiveness of new systemic fungicides for control of powdery mildew of begonia, *Plant Disease*, 66, 718 (1982).

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

RAGSDALE N. N., Inhibitors of lipid synthesis, in "Antifungal Compounds" (H. D. Sisler and M. R. Siegel, Eds.), Vol. II, p. 333, Marcel Dekker, New York, 1977.

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

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

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

RAHIMTULA A. D. and GAYLOR J. L., Investigation of the component reactions of oxidative sterol demethylation. Partial purification of a microsomal sterol 4α -carboxylic acid decarboxylase, *The Journal of Biological Chemistry*, 247, 9 (1972).

RAZA H. and AVADHANI N G., Hepatic mitochondrial cytochrome P-450 system. Purification and characterization of two distinct forms of mitochondrial cytochrome P-450 from β -naphthoflavone-induced rat liver, *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 9533 (1988).

REES H. H., GOAD L. J. and GOODWIN T. W., Studies in phytosterol biosynthesis. Mechanism of biosynthesis of cycloartenol, *Biochemical Journal*, 107, 417 (1968).

REIN H., MARICIC S., JANIG G. R., VUK PAVLOVIC S., BENKO B., RISTAU O. and RUCKPAUL K., Haem accessibility in cytochrome P-450 from rabbit liver. A proton magnetic relaxation study by stereochemical probes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 446, 325 (1976).

REINKE J. and BERTHOLD G., Die Zersetzung der Kartoffel durch Pilze Untersuch a. d. Bot. Lab. d. Univ. Gottingen. Helt 1. 100 S. Berlin (1879).

RICHMOND D. V., Effects of triadimenol on the fine structure of germinating conidia of *Botrytis alli*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 21, 74 (1984).

RILLING H. C., A new intermediate in the biosynthesis of squalene, *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 3233 (1966).

RIVIERE J. L., Prochloraz, a potent inducer of the microsomal cytochrome P-450 system, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 19, 44 (1983).

RIVIERE J. L., LEROUX P., BACH J. and GREYF M., Effect of some ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides on sterol and cytochrome P-450 from the japanese quail *Coturnix coturnix*, *Pesticide Science*, 15, 317 (1984).

ROBERTSON S., GILMOUR J., NEWMAN D. and LENNARD J. H., Sensitivity of barley powdery mildew isolates to morpholine fungicides, *Brighton Crop Protection Conference*, p. 1159 (1990).

RODRIGUEZ R. J. and PARKS L. W., Structural and physiological features of sterols necessary to satisfy bulk membrane and sparking requirements in yeast sterol auxotrophs, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 225, 861 (1983).

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

RODRIGUEZ R. J., LOW C., BOTTEMA C. D. K. and PARKS L. W., Multiple function for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 837, 336 (1985).

ROUCHAUD J., MOONS C. and MAYER J., Metabolism of [¹⁴C]triadimefon in barley shoots, *Pesticide Science*, 13, 169 (1982).

RUSSELL P. T., VAN ALLER R. T. and NES W. R., The mechanism of introduction of alkyl groups at C-24 of sterols. II. The necessity of the Δ^{24} bond, *The Journal of Biological Chemistry*, 242, 5802 (1967).

RYDER N. S., Squalene epoxidase as the target of antifungal allylamines, *Pesticide Science*, 21, 281 (1987).

RYDER N. S., Squalene epoxidase-enzymology and inhibition, in "Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi" (P. J. Kuhn, A. P. J. Trinci, M. J. Jung, M. W. Goosey and L. G. Copping, Eds.), p. 189, New York, 1989.

RYDER N. S. and DYPONT M. C., Inhibition of squalene epoxidase by allylamine antimycotic compounds: A comparative study of the fungal and mammalian enzymes, *The Biochemical Journal*, 230, 765 (1985).

RILEY J. F., WILSON R. G. and BARRETT-BEE K. J., Azole resistance in *Candida albicans*, *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 22, 53 (1984).

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).

SANDERS P. L., BUPREE L. K., COLE H. Jr. and DUICH J. M., Uptake, translocation and efficacy of triadimefon in control of turfgrass pathogens, *Phytopathology*, 68, 1482 (1978).

SAUCIER S. E., KANDUTSCH A. A., GAYEN A. K., SWAHN D. K. and SPENCER T. A., Oxysterols regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in liver. Effect of dietary cholesterol, *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 6863 (1989).

SCALLEN T. J., DEAS W. J. and SCUSTER M. W., Enzymatic conversion of squalene to cholesterol by an acetone powder of rat liver microsomes, *The Journal of Biological Chemistry*, 243, 5202 (1968).

SCHEINPFLUG H., History of DMI fungicides and monitoring for resistance, in "Fungicide Resistance in North America" (C. J. Delp, Ed.); p. 77 APS Press, Minnesota, 1988.

SCHEINPFLUG 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 & Technical, Essex, 1987.

SCHEPERS H. T. A. M., Decreased sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 89, 185 (1983).

SCHEPERS H. T. A. M., Fitness of isolates of *Sphaerotheca fuliginea* resistant or sensitive to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 91, 65 (1985a).

SCHEPERS H. T. A. M., Changes during a three-year period in the sensitivity to ergosterol biosynthesis inhibitors of *Sphaerotheca fuliginea* in the Netherlands, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 91, 105 (1985b).

SCHUBERT K., ROSE G., WACHTEL H., HORHOLD C. and IKEKHAWA N., Zum Vorkommen von Sterimen in Bakterien, *European Journal of Biochemistry*, 5, 246 (1968).

SCHWINN F. J., Ergosterol biosynthesis inhibitor. An overview of their history and contribution to medicine and agriculture, *Pesticide Science*, 15, 40, (1984).

SHAW S., Evaluation of triadimenol and other chemical seed treatments for the control of ergot (*Claviceps purpurea*) in contaminated seed, *British Crop Protection Conference*, p. 53 (1984).

SHECHTER I. and BLOCH K., Solubilization and purification of *trans*-farnesyl pyrophosphate-squalene synthetase, *The Journal of Biological Chemistry*, 246, 7690 (1971).

SHERALD J. L., RAGSDALE N. N. and SISLER H. D., Similarities between the systemic fungicides triforine and triarimol, *Pesticide Science*, 4, 1 (1973).

SHIMIZU I. and KATSUKI H., Effect of temperature on ergosterol biosynthesis in yeast, *Journal of Bacteriology*, 77, 1023 (1975).

SIEGEL M. R., Sterol-inhibiting fungicides: Effect on sterol biosynthesis and sites of action, *Plant Disease*, 65, 986 (1981).

SIEGEL M. R. and RAGSDALE N. N., Antifungal mode of action of imazalil, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 9, 48 (1978).

SISLER H. D. and RAGSDALE N. N., Fungitoxicity and growth regulation involving aspects of lipid biosynthesis, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83(Suppl. 1), 81 (1977).

SISLER H. D. and RAGSDALE N. N., Biochemical and cellular aspects of the antifungal action of ergosterol biosynthesis inhibitors, in "Mode of action of antifungal agents" (A. P. J. Trinci & J. F. Ruley, Eds.) p. 257 Cambridge University Press, Cambridge, 1983.

SISLER H. D., WALSH R. C. and ZIOGAS B. N., Ergosterol biosynthesis: A target of fungicidal action, in "IUPAC Pesticide Chemistry Human Welfare and the Environment" (J. Miyamoto and P. C. Kearny, Eds.), p. 129, Pergamon, New York, 1983.

SKORDA E. A., Insensitivity of wheat bunt to hexachlorobenzene and quitozene (pentachloronitrobenzene) in Greece, *Proceedings of British Crop Protection Conference*, p. 67 (1977).

SLAKEY L. L., CRAIG M. C., BEYTIA E., BRIEDIS A., FELDBRUEGGE D. H., DUGGAN R. E., QURESHI A. A., SUBBARAYAN C. and PORTER J. W., The effects of fasting, refeeding, and time of day on the levels of enzymes effecting the conversion of β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A to squalene, *The*

Journal of Biological Chemistry, 247, 3014 (1972).

SMITH E. L., HILL R. L., LEHMAN I. R., LEFKOWITZ R. J., HANDLER P. and WHITE A., Principles of Biochemistry. General Aspects (R. S. Laufer, E. Werren and D. McIvor, Eds.), London, 1985.

SNYDER W. C., White perithecia and the taxonomy of *Hypomyces ipomoeae*, *Mycologia*, 32, 646 (1940).

SNYDER W. C. and HANSEN H. N., The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*, *American Journal of Botany*, 28, 738 (1941).

SNYDER W. C. and HANSEN H. N., Species concept, genetics and pathogenicity in *Hypomyces solani*, *Phytopathology*, 44, 338 (1954).

SNYDER W. C., GEORGOPOULOS S. G., WEBSTER R. K. and SMITH S. N., Sexuality and genetic behaviour in the fungus *Hypomyces (Fusarium) solani* f. sp. *cucurbitae*, *Hilgardia*, 43, 161 (1975).

SOBUS M. T., HOLMLUND C. E. and WITTAKER N. F., Effect of the hypocholesteremic agent trifluoperidol on the sterol, steryl ester, and fatty acid metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bacteriology*, 130, 1310 (1977).

STARR P. R. and PARKS L. W., Effect of temperature on sterol metabolism in yeast, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 107 (1962a).

STARR P. R. and PARKS L. W., Some factors affecting sterol formation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bacteriology*, 83, 1042 (1962b).

STEFFENS W. and WIENECKE J., Behaviour and fate of the ¹⁴C-labelled mildew fungicide fluotrimazole in plant and soil. II. Radioactivity distribution in treated spring barley and in the soil of field lycimeters and uptake by untreated rotational crops, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 88, 343 (1981).

STERRETT J. P., Pactobutrazole: A promising growth inhibitor for injection into woody plants, *Journal of the American Society Horticultural Science*,

110, 4 (1985).

STIERS D. L., FELLMAN J. K. and LE TOURNEAU D., The effects of triadimefon on growth, sclerotial formation, and ultrastructure of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Environmental and Experimental Botany*, 20, 181 (1980).

SUBDEN R. E., SAFE T., MORRIS D. C., BROWN R. G. and SAFE S., Eburicol, lichesterol, ergosterol and obtusifoliol from polyene antibiotic-resistant mutants of *Candida albicans*, *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 751 (1977).

SWINDELL A. C. and GAYLOR J. L., Investigation of the component reactions of oxidative sterol demethylation. Formation and metabolism of 3-ketosteroid intermediates, *The Journal of Biological Chemistry*, 243, 5546 (1968).

SZKOLNIK M., Physical modes of action of sterol-inhibiting fungicides against apple diseases, *Plant disease*, 65, 981 (1981).

TAGA M., NAKAGAWA H., TSUDA M. and VEYAMA A., Identification of three different loci controlling kasugamicin resistance in *Pericularia oryzae*, *Phytopathology*, 69, 463 (1979).

TATON M., BENVENISTE P. and RAHIER A., Comparative study of the inhibition of sterol biosynthesis in *Rubus fruticosus* suspension cultures and *Zea mays* seedlings by N-(1,5,9-trimethyldecyl)-4 α ,10-dimethyl-8-aza-trans-decal-3 β -ol and derivatives, *Phytochemistry*, 26, 385 (1987).

TAYLOR R. F., Bacterial triterpenoids, *Microbiological Review*, 48, 181 (1984).

TCHEN T. T., Mevalonic kinase: Purification and properties, *The Journal of Biological Chemistry*, 233, 1100 (1958).

THOMAS P. E., RYAN D. and LEVIN W., An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 75, 168 (1976).

TOPHAM R. W. and GAYLOR J. L., Isolation and purification of a

5 α -hydroxysterol dehydrase of yeast, *The Journal of Biological Chemistry*, 245, 2319 (1970).

TOUSSON T. A. and SNYDER W. C., The pathogenicity, distribution and control of two races of *Fusarium (Hypomyces) solani* f. *cucurbitae*, *Phytopathology*, 51, 17 (1961).

TROCHA P. J., and SPRINSON D. B., Location and regulation of early enzymes of sterol biosynthesis in yeast, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 174, 45 (1976).

TROCHA P. J., JASNE S. J. and SPRINSON D. B., Yeast mutants blocked in removing the methyl group of lanosterol at C-14. Separation of sterols by high-pressure liquid chromatography, *Biochemistry*, 16, 4721 (1977).

TRZASKOS J. M., FISCHER R. T. and FAVATA M. F., Mechanistic studies of lanosterol C-32 demethylation. Conditions which promote oxysterol intermediate accumulation during their demethylation process, *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 16937 (1986a).

TRZASKOS J. M., KAWATA S. and GAYLOR J. L., Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. Purification of lanosterol 14 α -methyl demethylase cytochrome P-450 from hepatic microsomes, *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 14651 (1986b).

TRZASKOS J. M., BOWEN W. D., SHAFIEE A., FISCHER R. T. and GAYLOR J. M., Cytochrome P-450-dependent oxidation of lanosterol in cholesterol biosynthesis. Microsomal electron transport and C-32 demethylation, *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 13402 (1984).

UPPER C. D. and WEST C. A., Biosynthesis of gibberellins. II. Enzymic cyclization of geranylgeranyl pyrophosphate to kaurene, *The Journal of Biological Chemistry*, 242, 3285 (1967).

VAN TUYL T. M., Genetics of fungal resistance to systemic fungicides, *Mededelingen Landbouwhogeschool, Wageningen*, 77, 1 (1977).

VANDEN BOSSCHE H., Importance and role of sterols in fungal membranes, in "Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi", p. 135, New York,

1988.

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

DEMURI R. and PHILIPSON K. D., Influence of sterols and phospholipids on sarcolemmal and sarcoplasmic reticular cation transporters, *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 8680 (1989).

VOMVOYANNI V. E., Multigenic control of ribosomal properties associated with cycloheximide sensitivity in *Neurospora crassa*, *Nature*, 248, 508 (1974).

WACKERS R. W., VANDEN BERGE C. and SPEK J., Experiences with Bayleton (triadimefon) for the control of mildew and rusts in cereal and fruit crops in the Netherlands, *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, 31, 151 (1978).

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 and Physiology*, 18, 122 (1982).

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).

WATKINSON I. A., WILTON D. C., MUNDAY K. A. and AKHTAR M., The formation and reduction of the 14,15-double bond in cholesterol biosynthesis, *Biochemical Journal*, 121, 131 (1971).

WEETE J. D., Sterols, in "Fungal Lipid Biochemistry", p. 151, Plenum press, New York, 1974.

WELTON A. F. and AUST S. D., Multiplicity of cytochrome P450 hemoproteins in rat liver microsomes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 56, 898 (1974).

WELTON A. F., O'NEAL F. O., CHANEY L. C. and AUST S. D., Multiplicity of cytochrome P-450 hemoproteins in rat liver microsomes, *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 5631 (1975).

WHITE L. W. and RUDNEY H., Regulation of 3-hydroxy-3-methyl-glutarate and mevalonate biosynthesis by rat liver homogenates. Effects of *asting, cholesterol feeding, and triton administration, *Biochemistry*, 9, 2725 (1970).

WHITE R. E. and COON M. J., Oxygen activation by cytochrome P-450, *Annual Review of Biochemistry*, 49, 315 (1980).

WIGGINS T. E. and BALDWIN B. C., Binding of azole fungicides related to dichlobutrazol to cytochrome P-450, *Pesticide Science*, 15, 206 (1984).

WILLIAMS S., CRABBE T. B., HASLAM J. M. and QUAIN D. E., The control of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemical Society Transactions*, 14, 970 (1986).

WILTON D. C., WATKINSON I. A. and AKHTAR M., The stereochemistry of hydrogen transfer from reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the reduction of ethylenic linkages during cholesterol biosynthesis, *Biochemical Journal*, 119, 673 (1970).

WISEMAN A., LIM T. K. and WOODS L. F. J., Regulation of the biosynthesis of cytochrome P-450 in brewers yeast. Role of cyclic AMP, *Biochemica et Biophysica Acta*, 544, 615 (1978).

WOLOSHUK C. P., SISLER H. D. and DUTKY S. R., Mode of action of the azasteroid antibiotic 15-aza-24-methylenele-D-homocholesta-8,14-dien-3 β -ol in *Ustilago maydis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16, 98 (1979).

YAMAMOTO S. and BLOCH K., Studies on squalene epoxidase of rat liver, *The Journal of Biological Chemistry*, 245, 1670 (1970).

YOSHIDA Y. and AOYAMA Y., Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-450_{14DM} purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes, *Biochemical Pharmacology*, 36, 229 (1987).

YOSHIDA Y., AOYAMA Y., KUMAOKA H. and KUBOTA S., A highly purified preparation of cytochrome P-450 from microsomes of anaerobically grown yeast, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78, 1005 (1977).

YOSHIDA Y., AOYAMA Y., TAKENO H. and KATO T., Stereo-selective interaction of enantiomers of diniconazole, a fungicide with purified P-450/14DM from yeast, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 137, 513 (1986).

YOSHIDA Y., AOYAMA Y., NISHINO T., KATSUKI H., MAITRAU. S., MOHAN V. P. and SPRINSON D. B., Spectral properties of a novel cytochrome P-450 of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant SGI. A cytochrome P-450 species having a nitrogenous ligand trans to thiolate, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 127, 623 (1985).

YU C. A. and GUNSALUS I. C., Cytochrome P-450_{cam}. I. Crystallization and properties, *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 94 (1974).

ZERVAKIS G. and LABARERE J., Taxinomic relationship within the gungal genus *Pleuvotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns, *Journal of General Microbiology*, 138, 635 (1992).

ZIOGAS B. N. and GIRGIS M., A three type cross-resistance relationship between benzimidazole and N-phenylacarbamate fungicides in *Botrytis cinerea* and *Ustilago maydis*, to be submitted (1992).

ZIOGAS B. N., SISLER H. D. and LUSBY W. R., Sterol content and other characteristics of pimarinic-resistance mutant of *Aspergillus nidulans*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 20, 320 (1983).

ZIOGAS B. N., VITORATOS A. G., SIDERIS E. G. and GEORGOPOULOS S. G., Effects of sterol biosynthesis inhibitors on mitosis, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 37, 254 (1990).

ZIOGAS B. N., OESTERHELT G., MASNER P., STEEL C. C. and FURTER R., Fenpropimorph: A three site inhibitor of ergosterol biosynthesis in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 39, 74 (1991).