



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Κυτταρική επικοινωνία του Βοτρύτη (*Botrytis cinerea*) με το περιβάλλον και βιολογική αντιμετώπιση του σε ελληνικούς αμπελώνες με έμφαση σε μικροβιακούς εχθρούς και φυτικά εκχυλίσματα

Μάριος Τότκας

ΑΜ: 151124

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Ευάγγελος Μπερής

Αθήνα, Ιούλιος 2022



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES**

BACHELOR THESIS

Cellular communication of *Botrytis (Botrytis cinerea)* with the environment and its biological control in Greek vineyards with emphasis on microbial control agents and plant extracts

Marios Totkas

Registration Number: 151124

Supervisor: Dr Evangelos Beris

Athens, July 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:
**«Κυτταρική επικοινωνία του Βοτρύτη (*Botrytis cinerea*) με το περιβάλλον και βιολογική
αντιμετώπιση του σε ελληνικούς αμπελώνες με έμφαση σε μικροβιακούς εχθρούς και
φυτικά εκχυλίσματα»** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1^{ου} Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2^{ου} Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3^{ου} Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογράφων Τότκας Μάριος του Ιωάννη με αριθμό μητρώου 151124 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου Αμπέλου και Πότω, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

Τότκας Μάριος



Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματεύεται την επικοινωνία σε κυτταρικό επίπεδο, του μύκητα του βοτρυτή (*Botrytis cinerea*) με το περιβάλλον κατά την εκβλάστηση και ανάπτυξη του στο αμπέλι και την βιολογική αντιμετώπιση βασιζόμενη σε παράγωγα μικροοργανισμών ή φυτικών εκχυλισμάτων. Γίνεται αναφορά στις βασικές λειτουργίες και οργανίδια του φυτικού κυττάρου, στις διαδικασίες άμυνας του κατά την προσβολή από παθογόνα για την επιβίωση του φυτού, αλλά και από τη μεριά των παθογόνων στις μεθόδους παράκαμψης της άμυνας των φυτών. Αναφέρονται οι κυριότερες ασθένειες και εχθροί που προσβάλλουν τους αμπελώνες με έμφαση στον ασκομύκητα *Botrytis cinerea*. Γίνεται περιγραφή στο πως συμπεριφέρεται ο μύκητας ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τα οργανίδια που χρησιμοποιεί για την ανάπτυξη του. Αναλύεται η απόκριση του μύκητα στα διαφορετικά ερεθίσματα του περιβάλλοντός του και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται στο εσωτερικό του κυττάρου, ώστε να πετύχει να επιτελέσει τις κυτταρικές λειτουργίες για την βλάστηση και ανάπτυξη του. Επιπρόσθετα, παρατίθενται οι μέθοδοι αναπαραγωγής του *Botrytis cinerea* και το πώς εμφανίζονται τα συμπτώματα του μύκητα στην καλλιέργεια, καθώς και οι ζημιές που προκαλεί. Ακολούθως, στην τελευταία ενότητα της εργασίας, περιγράφονται οι τρόποι αντιμετώπισης του μύκητα τόσο από τη μεριά του φυτού όσο και από μηχανική παρέμβαση του ανθρώπου στην καλλιέργεια, με έμφαση στη βιολογική αντιμετώπιση του από παραγόμενα φυτοφάρμακα σχετιζόμενα με την αντίσταση έναντι του μύκητα, που βασίζονται σε οργανικές ενώσεις προερχόμενες από φυτικά εκχυλίσματα ή οργανισμούς ή ακόμα και από καθαυτού μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται ανταγωνιστικά έναντι του *Botrytis cinerea*.

Abstract

The present thesis focuses on the communication at cellular level of the fungus *Botrytis cinerea* with the environment during its germination and growth on the vine and its biological control based on derivatives of microorganisms or plant extracts. The basic functions and organelles of the plant cell, its defence processes against pathogen attack for the survival of the plant and from the pathogen's point of view, methods of bypassing the plant's defence against pathogens, are discussed. The diseases and pests affecting vineyards are mentioned, with emphasis on the ascomycete *Botrytis cinerea*. A description is given of how the fungus is modulated according to environmental conditions and the organelles it uses for its growth. The response of the fungus to the different stimuli of its environment and the signalling pathways that are activated inside the cell in order for it to succeed in carrying out the cellular functions for germination and growth are analysed. Moreover, reproduction of *Botrytis cinerea* as well symptomatology and damages caused by the fungus, are listed. Subsequently, in the last section of the paper, the ways to control the fungus both from the plant's side and by mechanical human intervention in the crop are described. Emphasis is given on the biological control by produced pesticides related to resistance against the fungus that are based on organic compounds derived from plant extracts or organisms, or even from whole microorganisms that grow competitively against *Botrytis cinerea*.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
Λεξικό Ειδικών Όρων.....	8
1. Γενική εισαγωγή.....	12
1.1. Στόχοι και σκοποί της εργασίας.....	12
1.2. Εισαγωγή στον ελληνικό αμπελώνα.....	13
2. Βιβλιογραφική επισκόπηση.....	15
2.1. Φυτικό κύτταρο και οι αλληλεπιδράσεις του με μικροοργανισμούς.....	15
2.1.1. Γνωριμία με το φυτικό κύτταρο και τη λειτουργία του.....	15
2.1.2. Αλληλεπιδράσεις με τους μικροοργανισμούς.....	17
2.2. Άμπελος η οиноφόρος και οι αλληλεπιδράσεις της με μικροοργανισμούς.....	19
2.2.1. Εχθροί και ασθένειες στους Ελληνικούς αμπελώνες.....	19
2.2.2. Ασθένειες της Αμπέλου.....	20
2.2.3. Μυκητολογικές ασθένειες της Αμπέλου.....	21
2.3. Βοτρυτής (ή βοτρυτιδα) της Αμπέλου.....	22
2.3.1. Μορφολογία του μύκητα.....	23
2.3.2. Φυσιολογία του μύκητα.....	27
2.3.3. Βιολογικός κύκλος.....	36
2.3.4. Συμπτώματα - Σημεία του Βοτρυτή στα όργανα της Αμπέλου.....	41
2.3.5. Ζημιές - Οικονομική σημασία στον αμπελώνα	43
2.4. Αντιμετώπιση του Βοτρυτή της Αμπέλου.....	45
2.4.1. Εγγενής Αντιμετώπιση	45
2.4.2. Συμβατική Αντιμετώπιση	47
2.4.3. Βιολογική Αντιμετώπιση	50
Βιβλιογραφία.....	56

Λεξικό Ειδικών Όρων

- ABA:** Αμπισικό οξύ είναι μια φυτοορμόνη που διεγείρει την γήρανση των φυτικών ιστών και επάγει τον λήθαργο και το κλείσιμο των στομάτων.
- AlCl₃:** Χλωριούχο αργίλιο ανόργανη χημική ένωση, χρησιμοποιείται ως καταλύτης στη χημική βιομηχανία.
- AMP:** Μονοφωσφορική αδενοσίνη είναι νουκλεοτίδιο που παράγεται κατά την υδρόλυση δύο φωσφορικών ομάδων της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP).
- Appressorium:** Το appressorium είναι ένα εξειδικευμένο κύτταρο τυπικό πολλών μυκητιακών παθογόνων φυτών που χρησιμοποιείται για τη μόλυνση των φυτών ξενιστών. Είναι ένα πεπλατυσμένο υφικό όργανο, μετά την προσκόλληση σπορίων και τη βλάστηση στην επιφάνεια του ξενιστή, ο αναδυόμενος βλαστικός σωλήνας αντιλαμβάνεται φυσικές ενδείξεις, όπως η σκληρότητα της επιφάνειας και η υδροφοβία, καθώς και χημικά σήματα, συμπεριλαμβανομένων των μονομερών κεριού που πυροδοτούν το σχηματισμό appressorium.
- ATP:** Τριφωσφορική αδενοσίνη χρησιμεύει ως παροχή ενέργειας στις βιοχημικές αντιδράσεις καθώς υδρολύονται οι φωσφορικές ομάδες του.
- bac:** Αδενυλική κυκλάση είναι ένζυμο σκοπός του είναι η μετατροπή του ATP σε κυκλικό AMP
- bcg1,2,3:** Είναι τρία διαφορετικά γονίδια, που καθορίζει το καθένα την πρωτεϊνική κωδικοποίηση μιας διαφορετικής πρωτεΐνης, υπομονάδας, των Gα πρωτεΐνων.
- BTH:** Βενζο(1,2,3) θειαδιαζολο-7-καρβοθειοϊκού οξέος S-μεθυλεστέρας είναι οργανική χημική ένωση.
- cAMP:** 3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, προέρχεται από το ATP και λειτουργεί ως ενδοκυττάριος αγγελιαφόρος μεταγωγής σήματος.
- CDPKs:** Οι ασβεστοεξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (CDPKs), που αναγνωρίζονται συνήθως στα φυτά, είναι ένα είδος ζωτικής σημασίας ρυθμιστικής πρωτεΐνης που αποκρυπτογραφεί τα σήματα ασβεστίου που ενεργοποιούνται από διάφορα αναπτυξιακά και περιβαλλοντικά ερεθίσματα.
- ER:** Ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ένα σύστημα αγωγών και κύστεων, μέρος του ενδομεμβρανικού συστήματος μέσα στο κυτταρόπλσμα.

- ETI:** Effector triggered immunity, είναι η φυτική ανοσοαπόκριση που περιλαμβάνει συγκεκριμένες διαδικασίες μεταγραφής στον πυρήνα του ξενιστή.
- Gα:** Υποομάδα των G πρωτεϊνών, πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης, είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες μέσα στα κύτταρα και εμπλέκονται στη μετάδοση σημάτων από μια ποικιλία ερεθισμάτων έξω από ένα κύτταρο στο εσωτερικό του.
- GTP:** 5'-τριφωσφορική γουανοσίνη, όπου εμπλέκεται στη μεταφορά ενέργειας μέσα στο κύτταρο. Για παράδειγμα, ένα μόριο GTP δημιουργείται από ένα από τα ένζυμα στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Αυτό ισοδυναμεί με τη δημιουργία ενός μορίου ATP, αφού το GTP μετατρέπεται εύκολα σε ATP με νουκλεοσιδική-διφωσφορική κινάση.
- GDP:** Διφωσφορική γουανοσίνη, το GDP είναι το προϊόν της αποφωσφορυλίωσης GTP, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα πυροσταφυλικής κινάσης για την παραγωγή GTP για υποστήριξη της βιοσύνθεσης RNA.
- HR:** Υπερευαισθησία είναι ένας μηχανισμός που χρησιμοποιείται από τα φυτά για την πρόληψη της εξάπλωσης της μόλυνσης από μικροβιακά παθογόνα
- INA:** 2,6-διχλωροϊσονικωτινικού οξύ, οργανική ένωση που χρησιμοποιείται στη σύνθεση φυτοφαρμάκων.
- MAMPs** (microbe-associated molecular pattern): Είναι μικροβιακά μόρια, που αναφέρονται ως μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με μικρόβια ή παθογόνα (MAMPs), αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων του ανοσοποιητικού συστήματος των φυτών (PRRs).
- MAPK (mitogen-activated protein kinase):** Είναι ενεργοποιημένη από μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση, ένας τύπος πρωτεϊνικής κινάσης που είναι ειδικός για τα αμινοξέα σερίνη και θρεονίνη. Τα MAPK εμπλέκονται στην κατεύθυνση των κυτταρικών σημάτων σε μια ποικιλία από ερεθίσματα, όπως τα μιτογόνα, το οσμωτικό στρες, το θερμικό σοκ και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Ρυθμίζουν τις κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της γονιδιακής έκφρασης, της διαφοροποίησης, της μίτωσης, κυτταρική επιβίωση και απόπτωση.
- MAT-1,2:** Τα γονίδια τύπου ζευγαρώματος, τα γονίδια MAT συμμετέχουν στη σεξουαλική γονιμότητα, τη γονιδιακή ρύθμιση, τη μείωση και τη μορφογένεση.
- NO:** Το μονοξείδιο του αζώτου είναι ένα σημαντικό κυτταρικό σηματοδοτικό μόριο που εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες.

- PCD:** Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μια γενετικά ελεγχόμενη οδός που εξαλείφει συγκεκριμένα κύτταρα.
- PGIPs:** Πρωτεΐνες αναστολέα πολυγαλακτουρονάσης, είναι φυτικές πρωτεΐνες ικανές να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων πολυγαλακτουρονάσης (PG) που παράγονται από βακτηριακά και μυκητιακά παθογόνα. Οι PGs μπορούν να παραχθούν από παθογόνα για την αποικοδόμηση του συστατικού πολυγαλακτουρονών των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων.
- PRRs:** Υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων, παίζουν κρίσιμο ρόλο στη σωστή λειτουργία του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Τα PRR είναι αισθητήρες αναγνώρισης ξενιστή, οι οποίοι ανιχνεύουν μόρια τυπικά για τα παθογόνα.
- Ras:** Οι πρωτεΐνες Ras είναι ρυθμιστές της μεταγωγής σήματος από το εξωτερικό του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες Ras είναι τα ιδρυτικά μέλη μιας υπεροικογένειας μικρών πρωτεϊνών σύνδεσης και υδρόλυσης GTP (GTPases).
- ROS:** Αντιδραστικά είδη οξυγόνου είναι χημικές ουσίες υψηλής αντίδρασης που σχηματίζονται από O_2 , τα ROS είναι υποπροϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού του οξυγόνου, έχουν ρόλο στη σηματοδότηση των κυττάρων και την ομοιόσταση. Στα φυτά, τα ROS εμπλέκονται σε μεταβολικές διεργασίες που σχετίζονται με τη φωτοπροστασία και την ανοχή σε διάφορους τύπους στρες.
- SA:** Σαλικυλικό οξύ, αυτό το άχρωμο κρυσταλλικό οργανικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως στην οργανική σύνθεση και λειτουργεί ως φυτική ορμόνη, προέρχεται από τον μεταβολισμό της σαλικίνης.
- SEM:** Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σαρώνει μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων πάνω από μια επιφάνεια για να δημιουργήσει μια εικόνα. Τα ηλεκτρόνια στη δέσμη αλληλοεπιδρούν με το δείγμα, παράγοντας διάφορα σήματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με την τοπογραφία και τη σύνθεση της επιφάνειας.
- SSH:** αφαιρετικός υβριδισμός καταστολής είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον διαχωρισμό μορίων DNA και τον εντοπισμό αλληλουχιών DNA.
- TEM:** Ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης, είναι μια τεχνική μικροσκοπίας στην οποία μια δέσμη ηλεκτρονίων μεταδίδεται μέσω ενός δείγματος για να σχηματίσει μια εικόνα. Το δείγμα είναι συνήθως ένα εξαιρετικά λεπτό τμήμα πάχους μικρότερου από 100 nm ή μια ανάρτηση σε πλέγμα. Μια εικόνα σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων

με το δείγμα καθώς η δέσμη μεταδίδεται μέσω του δείγματος. Στη συνέχεια, η εικόνα μεγεθύνεται και εστιάζει σε μια συσκευή απεικόνισης, όπως μια οθόνη φθορισμού, ένα στρώμα φωτογραφικού φιλμ ή έναν αισθητήρα όπως ένας σπινθηριστής συνδεδεμένος σε μια συσκευή σύζευξης φορτίου.

WT: Άγριος τύπος, είναι ο φαινότυπος της τυπικής μορφής ενός είδους όπως εμφανίζεται στη φύση.

ΗΠΑ: Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής

1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Στόχοι και σκοποί της εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να κατανοήσουν οι αναγνώστες ποιες είναι οι βασικές λειτουργίες που εκτελούνται μέσω συγκεκριμένων οργανιδίων στο φυτικό κύτταρο της οиноφόρου αμπέλου, πως αυτές επηρεάζονται κατά την προσβολή του κυττάρου από έναν μικροοργανισμό ή ασθένεια. Μελετάμε τους βασικούς εχθρούς και ασθένειες που εμφανίζονται στον ελληνικό αμπελώνα, με αντικείμενο εκτενούς μελέτης τον μύκητα *Botrytis cinerea*. Αρχικά μελετάμε την μορφολογία του βοτρώτη ως προς τις μορφολογικές καταστάσεις που παρατηρούνται κατά τα στάδια ζωής του μύκητα ανάλογα με τις συνθήκες υποστρώματος και περιβάλλοντος που υπάρχουν. Στη συνέχεια αναλύουμε τη βιολογία του μύκητα, τα οργανίδια του κυττάρου του και τις λειτουργίες που επιτελούν, τις σηματοδοτικές οδούς στα διάφορα στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος του μύκητα και τις μεταβολικές του διεργασίες στο εσωτερικό του κυττάρου. Ακόμα γίνεται ανάλυση του βιολογικού κύκλου του βοτρώτη μέσα στον αμπελώνα και τις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά προσβολή ενός κυττάρου της αμπέλου από το μύκητα. Τέλος αναφερόμαστε στις μεθόδους αντιμετώπισης του βοτρώτη είτε από την ίδια την άμπελο είτε με διάφορα φυτο-προστατευτικά παρασκευάσματα, αλλά και σε βιολογικούς μεθόδους αντιμετώπισης. Στους βιολογική αντιμετώπιση παρουσιάζουμε τις αλληλεπιδράσεις του βοτρώτη με άλλους μικροοργανισμούς και φυτικά εκχυλίσματα και το πώς μπορεί να ελέγχει η ανάπτυξη του. Επίσης γίνεται αναφορά και στον αντίκτυπο της ασθένειας της βοτρώτιδας τόσο στις καλλιεργούμενες εκτάσεις όσο και στην οικονομία του κλάδου της αμπελουργίας και οινολογίας. Σκοπός της εργασίας είναι μετά από βιβλιογραφική μελέτη, ο έλεγχος των πληθυσμών του βοτρώτη στην αμπελουργία με την εφαρμογή βιολογικών μεθόδων όπως φυτικών εκχυλισμάτων ή μικροοργανισμών, φυσικών εχθρών του βοτρώτη. Αποτέλεσμα της παρούσας διατριβής θα είναι η καταπολέμηση της μυκητολογικής ασθένειας που προκαλεί ο βοτρώτης με φιλικά και μη τοξικά προς το περιβάλλον σκευάσματα.

1.2. Εισαγωγή στον Ελληνικό αμπελώνα

Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν και πιστοποιούν την ελληνική αμπελουργία είναι ιστορικοί, γεωγραφικοί, κλιματικοί, και βιολογικοί (Νικολάου, 2011).

Ως προς τις ιστορικές παραμέτρους, είναι γεγονός ότι η άμπελος και ο οίνος αποτελούν αναπόσπαστο στοιχείο του ελληνικού πολιτισμού. Οι αναφορές στα αρχαία κείμενα και οι παρουσίες του σε αρχαία ευρήματα είναι πολυάριθμες και αναδεικνύουν την σημασία του φυτού και των προϊόντων του.

Όσον αφορά τις γεωγραφικές παραμέτρους θα πρέπει να σημειωθεί η Ελλάδα αποτέλεσε πεδίο πολλών συγκρούσεων δύο διαφορετικών πολιτισμικά κόσμων, της ανατολής και της δύσης, με πιο χαρακτηριστικό σταθμό την εμφάνιση των Οθωμανών και τη μακροχρόνια επιβολή στην περιοχή ενός ισλαμικού κράτους, στο οποίο επικρατούσε μια αντίληψη εχθρική προς την κατανάλωση των αλκοολούχων ποτών και του οίνου. Αυτό σε συνδυασμό με τα μεγάλα επισιτιστικά προβλήματα των λαών της περιοχής, είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές μεταβολές στη ποικιλιακή σύνθεση των αμπελώνων της περιοχής, αλλά και τον περιορισμό της αμπελοκαλλιέργειας σε σχέση με τις άλλες χώρες της Δύσης.

Για τους κλιματικούς και γεωγραφικούς παραμέτρους, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ελληνική αμπελοκαλλιέργεια επηρεάζεται σημαντικά από το μεσογειακό κλίμα, το οποίο παρουσιάζει πάρα πολλές ιδιαιτερότητες κατά περιοχές, με κοινά χαρακτηριστικά τις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα, οι οποίες όμως είναι ευνοϊκές για την αμπελοκαλλιέργεια και το ξηρό καλοκαίρι, όπου η σταδιακή είσοδος των φυτών σε κατάσταση μιας ήπιας υδατικής καταπόνησης από την έναρξη της ωρίμανσης και ύστερα, έχει ως συνέπεια την ικανοποιητική ωρίμανση των καρπών και την παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιοτικής στάθμης. Επιπλέον σε πολλές περιοχές παρατηρείται μια ευνοϊκή επίδραση γειτονικών ορεινών όγκων ή και της θάλασσας με αποτέλεσμα η ωρίμανση να εξελίσσεται κάτω από ηπιότερες θερμοκρασίες, πράγμα το οποίο συμβάλλει στη σημαντική βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων. Οι κλιματικοί παράγοντες σε συνδυασμό με εξειδικευμένες καλλιεργητικές τεχνικές, αντανακλώνται στα υψηλής ποιοτικής στάθμης αμπελοοινικά προϊόντα, που κυκλοφορούν στην εσωτερική και εξωτερική αγορά.

Στους βιολογικούς παραμέτρους στον Ελλαδικό χώρο απαντάται ένας μοναδικός πλούτος τοπικών ποικιλιών των οποίων οι ιδιότητες και οι δυνατότητες δεν έχουν πλήρως μελετηθεί. Επιπλέον στην Ελλάδα καλλιεργείται ένας αριθμός ποικιλιών ξενικής

προέλευσης, οι οποίες παράγουν υψηλής στάθμης προϊόντα οινοποιίας και επιτραπέζια σταφύλια.

Η πλεονεκτική θέση λοιπόν της ελληνικής αμπελουργίας, έχει ως αποτέλεσμα να διακινούνται σήμερα στην αγορά επώνυμα προϊόντα υψηλής ποιότητας τόσο από μεγάλα, επώνυμα οινοποιία όσο και από μικρά, οικογενειακά οινοποιία (Νικολάου, 2011).



Εικόνα 1. Επανεκτύπωση από το περιοδικό Γαστρονόμος, Ο Κρητικός αμπελώνας σε συνεχή άνοδο των εκδόσεων Καθημερινές Εκδόσεις Μονοπρόσωπη Α.Ε.

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

2.1. Φυτικό κύτταρο και οι αλληλεπιδράσεις του με μικροοργανισμούς

2.1.1. Γνωριμία με το φυτικό κύτταρο και τη λειτουργία του

Το φυτικό κύτταρο, ανήκει στην κατηγορία των ευκαριωτικών κυττάρων, αποτελείται από άκαμπτο **κυτταρικό τοίχωμα** και τον **πρωτοπλάστη**. Ο όρος πρωτοπλάστης έχει προκύψει από το πρωτόπλασμα, η οποία αναφέρεται στο περιεχόμενο του κυττάρου. Ο πρωτοπλάστης είναι η μονάδα πρωτοπλάσματος μέσα στο κυτταρικό τοίχωμα.

Ο **πρωτοπλάστης** αποτελείται από το κυτόπλασμα και το πυρήνα. Το κυτόπλασμα περιλαμβάνει συγκεκριμένες οντότητες που περιβάλλονται από μεμβράνη (οργανίδια όπως πλαστίδια και μιτοχόνδρια), συστήματα μεμβρανών (ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi) και άλλες δομές (όπως ριβοσώματα, ινίδια ακτίνης και μικροσωληνίσκους). Το υπόλοιπο από το κυτόπλασμα, μέσα στο οποίο ο πυρήνας και άλλες οντότητες ή μεμβρανικά συστήματα αιωρούνται- αναφέρονται ως κυτοδιάλυμα (cytosol). Το κυτόπλασμα περιβάλλεται από μια μεμβράνη, την πλασματική μεμβράνη (plasma membrane).

Η **πλασματική μεμβράνη** επιτελεί αρκετές σημαντικές λειτουργίες: 1) διαχωρίζει των πρωτοπλάστη από το εξωτερικό περιβάλλον, 2) διαμεσολαβεί στη μεταφορά ουσιών μέσα και έξω από τον πρωτοπλάστη, 3) συντονίζει τη σύνθεση και τη συγκρότηση των μικροϊνιδίων κυτταρικού τοιχώματος και 4) ανιχνεύει και διευκολύνει τις αντιδράσεις σε ορμονικά και περιβαλλοντικά σήματα τα οποία εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης.

Τα φυτικά κύτταρα αναπτύσσουν μια ή περισσότερες, συχνά γεμάτες με υγρό κοιλότητες, ή **χυμοτόπια** (vacuoles), εντός του κυτοπλάσματος τους. Το χυμοτόπιο περιβάλλεται από μια μοναδιαία μεμβράνη που ονομάζεται τονοπλάστης (tonoplast).

Σε ένα ζωντανό φυτικό κύτταρο, το κυτόπλασμα βρίσκεται συνεχώς σε κίνηση και μπορεί να παρατηρηθεί, τα οργανίδια καθώς ότι βρίσκονται αιωρούμενα σε αυτό, να παρασύρονται με οργανωμένο τρόπο από το κινούμενο ρεύμα. Αυτό το ρεύμα είναι γνωστό ως κυτοπλασματικό ρεύμα (cytoplasmic streaming) ή κύκλωση (cyclosis) και αυτό συμβαίνει όσο το κύτταρο είναι ζωντανό. Το κυτοπλασματικό ρεύμα διευκολύνει τη μεταφορά συστατικών μέσα στο κύτταρο αλλά και μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντος του.

Ο **πυρήνας** είναι η πιο εμφανής δομή μέσα στον πρωτοπλάστη των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ο πυρήνας επιτελεί δύο βασικές λειτουργίες: 1) ελέγχει τις τρέχουσες δραστηριότητες του κυττάρου, προσδιορίζοντας ποια μόρια πρωτεΐνης παράγονται από το κύτταρο, αλλά και πότε πρέπει να παραχθούν και 2) αποθηκεύει τις γενετικές πληροφορίες (DNA), μεταφέροντας τις στα θυγατρικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Συνολικά οι γενετικές πληροφορίες που είναι αποθηκευμένες στον πυρήνα αναφέρονται ως πυρηνικό γονιδίωμα (nuclear genome). Γενετικές πληροφορίες στα φυτικά κύτταρα επίσης αποθηκεύονται και στα πλαστίδια αλλά και στο DNA των μιτοχονδρίων.

Ο **πυρήνας** περιβάλλεται από ένα ζεύγος μεμβρανών το οποίο αναφέρεται ως πυρηνικός φάκελος (nuclear envelope). Στον πυρηνικό φάκελο εντοπίζεται μεγάλος αριθμός κυκλικών πόρων διαμέτρου 30-100 nm, η εξωτερική και η εσωτερική μεμβράνη ενώνονται στην περιφέρεια κάθε πόρου, σχηματίζοντας ένα όριο του ανοίγματος. Οι πόροι παρέχουν μια άμεση δίοδο μέσω του πυρηνικού φακέλου για την ανταλλαγή συστατικών μεταξύ του πυρήνα και του κυτοπλάσματος. Σε διαφορετικές περιοχές, η εξωτερική μεμβράνη μπορεί να εμφανίζει συνέχεια με το ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmatic reticulum), ένα πολύπλοκο σύστημα μεμβρανών το οποίο παίζει κεντρικό ρόλο στη βιοσύνθεση στα κύτταρα. Ο πυρηνικός φάκελος μπορεί να θεωρηθεί ως ένα εξειδικευμένο τμήμα του ενδοπλασματικού δικτύου.

Εάν το κύτταρο υποστεί ειδική επεξεργασία με τεχνικές χρώσης, λεπτά νημάτια και κόκκοι χρωματίνης καθίστανται ορατά και διαχωρίζονται από το πυρηνόπλασμα. Η χρωματίνη αποτελείται από DNA, το οποίο μεταφέρει της κληρονομικές πληροφορίες του κυττάρου, συνδυασμένο με τις ιστόνες οι οποίες είναι πρωτεΐνες. Κατά την πυρηνοδιαίρεση η χρωματίνη σταδιακά συμπυκνώνεται τόσο ώστε γίνεται ορατή με τη μορφή διακριτών χρωμοσωμάτων (chromosomes).

Τα **ριβοσώματα** αποτελούμενα από πρωτεΐνη και RNA, συγκροτούνται στο κυτοδιάλυμα και αποτελούν τους τόπους σύνθεσης των πρωτεϊνών. Στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα τα ριβοσώματα βρίσκονται σε αφθονία και παρατηρούνται είτε ελεύθερα στο κυτοδιάλυμα είτε προσαρτημένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα πλαστίδια και τα μιτοχόνδρια περιέχουν μικρότερα σε μέγεθος ριβοσώματα, παρόμοια με αυτά των προκαρυωτικών κυττάρων.

Τα ριβοσώματα, τα οποία παράγουν πρωτεΐνες σε μεγάλες ποσότητες, συχνά διαθέτουν ένα εκτεταμένο σύστημα ενδοπλασματικού δικτύου επί του οποίου είναι

προσαρτημένα τα ριβοσώματα. Όλα τα ριβοσώματα ενός συγκεκριμένου οργανισμού είναι δομικά και λειτουργικά πανομοιότυπα ενώ διαφέρουν ως προς τις πρωτεΐνες που παράγουν σε κάθε δεδομένη στιγμή. (Raven et. al, 2014)

2.1.2. Αλληλεπιδράσεις με τους μικροοργανισμούς

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (PCD) είναι μια συντηρημένη ευκαρυωτική διαδικασία που εξυπηρετεί πλήθος λειτουργικών ρόλων κατά τη διάρκεια του φυσικού κύκλου ζωής του οργανισμού. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος περιλαμβάνει την αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από συγκεκριμένα χωροχρονικά ερεθίσματα, τα οποία παρέχουν οφέλη επιβίωσης. Στα φυτικά κύτταρα, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μια ουσιαστική διαδικασία που εμπλέκεται στη γήρανση, την ανάπτυξη εμβρύων, τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την ανοσία. Η αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος δεν είναι καθολικό χαρακτηριστικό του PCD στα φυτά. Υπάρχουν τρεις μορφές κυτταρικού θανάτου.

Ένα είδος PCD στα φυτά είναι ο **αποπτωτικός** (aroptotic) κυτταρικός θάνατος, είναι η καλύτερα κατανοητή μορφή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ορίζεται από τη συρρίκνωση του πρωτοπλάστη των κυττάρων και τον πυρηνικό κατακερματισμό, το κυτταρικό τοίχωμα αποτρέπει τον σχηματισμό φυσαλίδων. Τα φυτικά κύτταρα που δεσμεύονται για PCD απελευθερώνουν αυτόλυτες ενώσεις, οι οποίες είναι αποθηκευμένες στο χυμοτόπιο. Ταυτόχρονα με την συρρίκνωση του πρωτοπλάστη του κυττάρου, το χυμοτόπιο διογκώνεται και τα κυτταρικά οργανίδια αποδομούνται από τις αυτόλυτες ενώσεις του χυμοτοπίου (Inoue & Tani, 2014).

Μία άλλη μορφή PCD είναι ο **νεκροπτωτικός** κυτταρικός θάνατος (necroptosis) διακρίνεται από τη διόγκωση των οργάνων του κυττάρου και την επακόλουθη ρήξη του πρωτοπλάστη του κυττάρου, όπου και πάλι το κυτταρικό τοίχωμα αποτρέπει τον σχηματισμό φυσαλίδων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η νέκρωση είναι προφλεγμονώδεις μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που απενεργοποιείται από μικροβιακές λοιμώξεις και άλλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να αναπτύξει διατρήσεις για την απορρόφηση και την ανακύκλωση κυτταρικών συστατικών από γειτονικά κύτταρα (Reape et al., 2008).

Και τέλος μια εξειδικευμένη μορφή θανάτου φυτικών κυττάρων που ονομάζεται **υπερευαισθησία** (HR) ξεκινά ως αμυντική απόκριση στην παθογόνο μόλυνση. Επιπλέον, η

HR είναι μοναδικό στο ότι προκαλεί μια σηματοδοτική αλληλουχία διάδοσης της ανοσίας σε γειτονικά κύτταρα καθώς και στους πρωταρχικούς ιστούς για πιθανή πρόκληση παθογόνου, ένα φαινόμενο γνωστό ως συστηματική επίκτητη αντίσταση (Tully et al. 2014).

Τα παθογόνα έχουν αναπτύξει στρατηγικές για την παράκαμψη και/ή την καταστολή διαφορετικών ανοσολογικών αποκρίσεων, ιδίως του θανάτου των φυτικών κυττάρων. Ενώ πολλοί από αυτούς τους μηχανισμούς περιλαμβάνουν έμμεση απενεργοποίηση ανοδικών ανοσοαποκρίσεων για την αποφυγή κυτταρικού θανάτου και ο άμεσος χειρισμός ρυθμιστών του κυτταρικού θανάτου από παθογόνους παράγοντες.

Για να ξεκινήσει η μόλυνση, ποικίλα φυτοπαθογόνα συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων και ωομυκητών εισέρχονται στον φυτικό ιστό μέσω φυσικών ανοιγμάτων, όπως στοματικά ανοίγματα, και κατοικούν στον εξωκυτταρικό χώρο γνωστό ως αποπλάστης (apoplast). Ο HR παίζει διαφορετικούς ρόλους στις αμυντικές αποκρίσεις με βάση τις στρατηγικές ζωής των παθογόνων. Οι βιότροφοι επιβιώνουν συνήθως στους αποπλάστες φυτικών κυττάρων και από τα μεταβολικά προϊόντα από ζωντανά κύτταρα. Αντίθετα, οι νεκρότροφοι προκαλούν κυτταρικό θάνατο ή απελευθερώνουν τοξίνες για να σκοτώσουν τα φυτικά κύτταρα και να τροφοδοτηθούν από τα υπολείμματα. Ενώ ο κυτταρικός θάνατος είναι ένας αμυντικός μηχανισμός ενάντια στους βιοτροφικούς, είναι μια στρατηγική μόλυνσης για τους νεκροτροφικούς μικροοργανισμούς. Τα φυτά ανιχνεύουν μοριακά συστατικά των παθογόνων που εισβάλλουν και συχνά αποκρίνονται με αποτελεσματικές ανοσοαποκρίσεις. Αντίθετα, τα παθογόνα χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς στοχεύοντας σε μονοπάτια ανοσοποιητικής σηματοδότησης του ξενιστή, για να προσπαθήσουν να διαταράξουν τις αποκρίσεις άμυνας.

Το πρώτο στρώμα άμυνας ευρέος φάσματος εναντίον βιοτρόπων ξεκινά με την ανίχνευση συντηρημένων **μικροβιακών σχετιζόμενων μοριακών προτύπων** (MAMPs) από **υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων** (PRRs) εντοπισμένους στην πλασματική μεμβράνη. Τα φυτά έχουν αναπτύξει ένα επιπλέον στρώμα υποδοχέων παθογόνου που μπορούν τυπικά να αντιληφθούν τις δραστηριότητες των μορίων παθογόνου μολυσματικότητας έμμεσα ή άμεσα από τους κυτταροπλασματικούς **νουκλεοτιδικούς δεσμούς λευκίνης πλούσια επαναλαμβανόμενους** (NLR) όπου εντοπίζονται από υποδοχείς και ξεκινούν μια αμυντική απόκριση που ονομάζεται **ανοσία** (ETI). Το ETI χαρακτηρίζεται από την ταχεία παραγωγή ειδών **αντιδραστικού οξυγόνου** (ROS) όπως υπεροξειδίο και νιτρικό οξείδιο (NO), ενεργοποίηση **μιτογόνων πρωτεϊνικών κινασών** (MAPKs) και εξαρτώμενες από ασβέστιο

πρωτεϊνικές κινάσες (CDPKs), απόθεση καλλόζης (callose) στο κυτταρικό τοίχωμα ώστε να κλείσουν οι είσοδοι στο εσωτερικό του κυττάρου, απελευθέρωση αντιμικροβιακών ενώσεων, αλληλεπίδραση του μεταγραφικού επαναπρογραμματισμού για επαγωγή γονιδιακής έκφρασης που σχετίζεται με την άμυνα. Η απόκριση της ETI είναι πολύ γρήγορη και ισχυρή και συχνά εκδηλώνεται με τη μορφή HR (Pajerowska-Mukhtar et al., 2013), (Tully et al., 2014).

Εν τω μεταξύ, εξειδικευμένα παθογόνα έχουν αναπτύξει δράσεις και τοξίνες που ρυθμίζουν τη φυσιολογία των κυττάρων-ξενιστών και υποστηρίζουν τον παρασιτισμό αποφεύγοντας την ανίχνευση ή την ανατροπή της ETI σε διάφορα επίπεδα. Η παραβίαση ορμονικού σταδίου για την αναδρομολόγηση της σηματοδότησης και, τελικά, των αμυντικών αποκρίσεων είναι ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα παθογόνα μπορούν να αλλάξουν τους μηχανισμούς του ξενιστή για να επιτρέψουν τη μόλυνση. Ενώ τα gram-αρνητικά βακτήρια χρησιμοποιούν συστήματα έκκρισης τύπου III (T3SS) για επηρεάσουν τους μηχανισμούς του ξενιστή, στα φυτικά κύτταρα, η δράση των μυκητιακών παθογόνων είναι πολύ πιο περίπλοκη και υπόκειται σε διαφορετικά μοντέλα (Petre & Kamoun, 2014).

2.2. Άμπελος η οينوφόρος και οι αλληλεπιδράσεις της με μικροοργανισμούς

Οργανισμός είναι κάθε βιολογική οντότητα που έχει δυνατότητα αναπαραγωγής ή μεταφοράς γενετικού υλικού. Με τον όρο επιβλαβείς οργανισμοί εννοούνται τα είδη, στελέχη ή βιότυποι οργανισμών που ανήκουν στο ζωικό ή στο φυτικό βασίλειο ή είναι παθογόνοι μικροοργανισμοί και προκαλούν παθήσεις ή ζημιές στα καλλιεργούμενα φυτά ή στα φυτικά προϊόντα. Τα έντομα, οι φυτοπαθολογικές ασθένειες, τα ακάρεα, οι νηματώδεις καταστρέφουν ετησίως ένα μεγάλο μέρος των γεωργικών καλλιεργειών και προϊόντων. Κάθε εκτροπή από τη φυσιολογική λειτουργία ενός φυτού, επιζήμια για την παραγωγικότητα του και την ομαλή ανάπτυξη του, χαρακτηρίζεται ως πάθηση.

2.2.1. Εχθροί και ασθένειες στους Ελληνικούς αμπελώνες

Σύμφωνα με τον υπ' αριθ. 1107/2009 Ευρωπαϊκό Κανονισμό ως **επιβλαβής οργανισμός** ορίζεται κάθε είδος, στέλεχος ή βιότυπος του φυτικού ή ζωικού βασιλείου ή βιοτικός παθογόνος παράγοντας που είναι επιβλαβής για τα φυτά ή για τα φυτικά προϊόντα. Ως **μικροοργανισμός** ορίζεται κάθε μικροβιολογική οντότητα, μεταξύ άλλων οι κατώτεροι μύκητες και ιοί, η οποία μπορεί να αντιγράφεται, αναπαράγεται ή να

μεταφέρει γενετικό υλικό. Ως **ορθή πρακτική φυτοπροστασίας** ορίζεται η πρακτική κατά την οποία η επέμβαση με φυτοπροστατευτικά προϊόντα εφαρμόζεται σε συγκεκριμένα φυτά ή φυτικά προϊόντα, σύμφωνα με τους όρους της *εγκεκριμένης χρήσης*, λαμβάνοντας υπόψη τις τοπικές συνθήκες και τις δυνατότητες για καλλιεργητικό και βιολογικό έλεγχο. Οι μύκητες, ιοί, ιοειδή, βακτήρια, φυτοπλάσματα, χρώμιστα, ψευδομύκητες και σπειροπλάσματα αποτελούν τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, όπου μολύνουν τα φυτά και προκαλούν τις **ασθένειες** των φυτών. Από την άλλη πλευρά τα τρωκτικά, τα έντομα, τα ακάρεα, τα σαλιγκάρια, τα ακάρεα και οι νηματώδης είναι οι **εχθροί** της αμπέλου και προκαλούν την προσβολή των φυτών.

Ασθένεια είναι η απόκλιση από τη κανονικότητα φυσιολογικών, βιοχημικών και μοριακών διεργασιών, δηλαδή ανωμαλία της φυσιολογικής λειτουργίας κυττάρων ή ιστών του φυτού λόγω ερεθισμού από ορισμένο παθογόνο αίτιο το οποίο μεταδίδεται, μολύνει και εκδηλώνεται με μεταβολές στη μορφολογία ή και στη φυσιολογία του φυτού. Η **προσβολή** από εχθρούς χαρακτηρίζεται από τεμαχισμό ιστών ή μύζηση χυμών με συνέπεια την εξασθένηση των φυτών, την υποβάθμιση εμπορεύσιμων φυτικών οργάνων της αμπέλου ή και ολόκληρου του φυτού, ενώ ταυτόχρονα διευκολύνει μολύνσεις από φυτοπαθογόνα (Ναβροζίδης & Κατερίνης, 2015).

2.2.2. Ασθένειες της Αμπέλου

Ασθένεια ή φυτονόσος έχει ως αποτέλεσμα οποιαδήποτε ανωμαλία στη μορφή και στην φυσιολογία του φυτού, ώστε να επηρεάσει παροδικά ή μόνιμα την κανονική ανάπτυξη του φυτού ή την ποιότητα των προϊόντων. Στους ελληνικούς αμπελώνες οι ασθένειες που εμφανίζονται είναι:

1. Οι **μυκητολογικές ασθένειες**, οι ζημιές οι οποίες προκαλούνται από τις μυκητολογικές ασθένειες είναι μεγαλύτερες εν σύγκριση με τις άλλες ασθένειες και τους εχθρούς της αμπέλου, αυτού του είδους οι ασθένειες μπορούν να προσβάλουν όλα τα μέρη φυτού εφόσον υπάρχουν οι κατάλληλες περιβαλλοντολογικές συνθήκες ανάπτυξης τους.
2. Οι **βακτηριολογικές ασθένειες**, στο αμπέλι εμφανίζονται λίγες ασθένειες αυτής της κατηγορίας και δεν έχουν και ιδιαίτερη οικονομική σημασία. Τα βακτήρια βρίσκοντας τις κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξής τους μολύνουν το αμπέλι.
3. Οι **μη παρασιτικές ασθένειες**, σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν η ασθένεια της ξήρανσης της ράχης, οι διάφορες τροφοπενίες, οι ζημιές από κακή χρήση των

φυτοπροστατευτικών προϊόντων, από κεραυνούς, ξηρασία κ.α. Η ξήρανση της ράχης μπορεί να μειώσει αρκετά την παραγωγή σε μέρη με ελαφρά και με μικρή συγκέντρωση σε οργανική ουσία εδάφη. Τα τελευταία χρόνια και υπερβολική χρήση των λιπασμάτων όξινε το πρόβλημα. Η έλλειψη σιδήρου, μαγνησίου, καλίου και βορείου ανήκουν επίσης σε αυτή τη κατηγορία ασθενειών. Αλλά και η κακή χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, όπως ζιζανιοκτόνα, μπορεί να προκαλέσουν ζημιές στο αμπέλι.

4. Οι **ιώσεις και παρεμφερείς ασθένειες**, οι ιοί είναι υπερμικροσκοπικές μολυσματικές οντότητες που αποτελούνται συνήθως απλά από RNA, με προστατευτικό πρωτεϊνικό περίβλημα και μπορούν να αναρπαχτούν μόνο μέσα στα κύτταρα κατάλληλου ξενιστή. Οι βλαβεροί για τα φυτά ιοί επομένως είναι υποχρεωτικά και μεταδοτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα- παθογόνα των φυτών, αφού απαιτούν για την αναπαραγωγή τους τα ριβοσώματα και άλλα συστατικά του κυττάρου του φυτού ξενιστή. Αν αποτελούνται μόνο από RNA, χωρίς προστατευτικό πρωτεϊνικό περίβλημα λέγονται **ιοειδή**. Είναι πιο μικρές μολυσματικές οντότητες και πολλαπλασιάζονται μόνο μέσα σε κύτταρα φυτών. οι ιοί και τα ιοειδή μεταδίδονται με έντομα, ακάρεα, νηματώδεις, ψευδομήκητες, με μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό ή και με μηχανικό τρόπο μέσω φυτικού χυμού που μεταφέρεται από ανθρώπινα χέρια, εργαλεία κτλ. (Ναβροζίδης & Κατερίνης, 2015).

2.2.3. Μυκητολογικές ασθένειες της Αμπέλου

Οι **μύκητες** ή ευμύκητες είναι κοινοκύτταροι ή πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, ετερότροφοι αφού στερούνται χλωροφύλλης. Αναπτύσσονται παρασιτικά πάνω ή μέσα σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς κυρίως φυτικών ή σε υπολείμματα αυτών (σαπροφυτικοί μύκητες) για να αποκομίζουν έτοιμες οργανικές ουσίες. Υπάρχουν και ωφέλιμοι μύκητες ανταγωνιστικοί των παθογόνων, εντομοπαθογόνοι, ζυμομύκητες για την βιομηχανία τροφίμων και βρώσιμα μανιτάρια. Μπορεί να αναπαράγονται αγενώς ή/και εγγενώς. Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες μολύνουν τα φυτά συνήθως με διαφόρων μορφών σπόρια τα οποία βλαστάνουν δίνοντας θαλλό (germ tube) ο οποίος εισέρχεται στους φυτικούς ιστούς και ο οποίος δημιουργεί μυζητήρες μέσα στα κύτταρα του φυτού ξενιστή. Ο θαλλός έχει βλαστικό τμήμα αποτελούμενο από διακλαδιζόμενες νηματοειδής υφές (μυκηλιακές υφές), που λέγεται μυκήλιο. Αυτό αναπτυσσόμενο πάνω και μέσα στο φυτικούς ιστούς παράγει όργανα αναπαραγωγής τα οποία δίνουν διαφόρων ειδών σπόρια που η διάδοση τους γίνεται συνήθως με άνεμο ή βροχή και προκαλεί νέες δευτερογενείς

μολύνσεις. Για την διαχείμανση τους οι μύκητες μπορεί να παράγουν διάφορα ανθεκτικά όργανα (κλειστοθήκια, περιθήκια, σκληρώτια κτλ.).

Τα χαρακτηριστικά αναγνώρισης των μυκήτων είναι συνήθως τα όργανα αναπαραγωγής και διαχείμασης τους, τα μυκήλια που σχηματίζουν, η μορφή των αποικιών τους, καθώς και τα είδη των φυτών που μολύνουν και τα συμπτώματα που προκαλούν σε αυτά. Οι μύκητες αυτοί αναπτύσσονται σε βάρος του φυτού ξενιστή, ενώ ταυτόχρονα παράγουν τοξικές ουσίες (**μυκοτοξίνες**). Επηρεάζουν αρνητικά τη φυσιολογία, τη μορφολογία και τελικά την παραγωγή του φυτού-ξενιστή. Τα συμπτώματα των μυκήτων στα φυτά είναι κηλιδώσεις, μεταχρωματισμοί, νεκρώσεις και σήψεις αρχικά σε συγκεκριμένους φυτικούς ιστούς και όργανα αλλά με ευνοϊκές συνθήκες προς την ανάπτυξη του μύκητα τα συμπτώματα επεκτείνονται σε όλο το φυτό που το εξασθενούν και μπορεί να οδηγήσουν σε μερική ή ολική νέκρωση. (Ναβροζίδης & Κατερίνης, 2015), (Ρούμπος & Ρούμπου, 2016)

2.3. Βοτρύτης (ή βοτρύτιδα) της Αμπέλου

Βοτρύτης με επιστημονική ονομασία *Botrytis cinerea Pers.*, είναι η ασθένεια που προκαλεί σήψη στους βότρυες και νέκρωση σε βλαστούς, φύλλα και ταξιανθίες. Είναι γνωστή και σαν «τερφή σήψη». Ο μύκητας που την προκαλεί αναπτύσσεται και αναπαράγεται σε αλλοιωμένους ή νεκρούς φυτικούς ιστούς και προσβάλλει ένα μεγάλο αριθμό από διαφορετικά φυτικά είδη. Στην άμπελο προκαλεί ιδιαίτερα μεγάλες ζημιές σε ποικιλίες που παράγουν πυκνόραγους βότρυες με σφικτά συμπιεσμένες ράγες. Ζημιές μπορεί ακόμη να προκαλέσει κατά την αποθήκευση και μεταφορά των επιτραπέζιων σταφυλιών. Η προσβολή του βοτρύτη στα ώριμα σταφύλια ορισμένων ποικιλιών, κάτω από ειδικές κλιματολογικές συνθήκες, οδηγεί στην καλούμενη «ευγενική σήψη», η οποία προσδίδει στο παραγόμενο κρασί μία ιδιαιτερότητα, τέτοια κρασιά είναι τα Auslese, Beerenauslese και Trockenbeerauslese της Γερμανίας, τα κρασιά του Bordeaux της Γαλλίας και τα Tokay της Ουγγαρίας. (Ρούμπος & Ρούμπου, 2016).

Ο *Botrytis cinerea* είναι ένας νεκροτροφικός παθογόνος που μολύνει φυτικούς ιστούς σε αποσύνθεση, στους οποίους παράγει ένα σπορώδες γκριζο μυκήλιο (grey mould) και έχει επίσης εξαιρετικές σαπροτροφικές δυνατότητες. Αυτός ο μύκητας έχει δύο κύκλους ζωής τον asexual και τον sexual. Κατά τον asexual κύκλο ζωής παράγει μακροκονίδια, όπου τα ξηρά σπόρια που περιέχονται διασκορπίζονται από τον άνεμο σε μεγάλη

απόσταση μολύνουν τους ξενιστές αναπτύσσοντας μυκήλια. Κατά τον sexual κύκλο ζωής παράγει μικροκονίδια που δεν είναι μολυσματικά αλλά παίζουν το ρόλο των σπερματοζωαρίων, ο *Botrytis cinerea*, δημιουργεί μία αποθήκη (arothecia) που προκύπτει είτε από σκληρότια που έχουν βλαστήσει είτε από μικροκονίδια, απελευθερώνοντας ασκοσπόρια και οδηγώντας πάλι στην ανάπτυξη μυκηλίων στον ξενιστή. Ο *Botrytis cinerea* ξεχειμωνιάζει ως μυκήλιο ή ως σκληρότια σε αποσυντιθέμενο φυτικό υλικό.

2.3.1. Μορφολογία του μύκητα

Σκληρότια

Όλα τα είδη του *B.cinerea* σχηματίζουν σκληρότια που μπορεί να διαφέρουν σε μέγεθος και σχήμα. Τα σκληρότια θεωρούνται γενικά ως οι πιο σημαντικές δομές που εμπλέκονται στην επιβίωση των ειδών *B.cinerea*. Τα σκληρότια μπορούν να επιβιώσουν σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, μπορούν να προκαλέσουν ασκοκάρπια μετά από το σέξουαλ τρόπο αναπαραγωγής και έχουν σημαντική ικανότητα να παράγουν διαδοχικές καλλιέργειες κονιδίων σε πολλά είδη βοτράνη (Coley-Smith, 1980). Υπό φυσικές συνθήκες, οι βροχοπτώσεις αναμένεται να απομακρύνουν τα κονίδια από τα βλαστάνοντα σκληρότια και να ξεκινήσουν την βλάστηση. Τα σκληρότια συνήθως βλασταίνουν για να παράγουν μυκήλια ή κονίδια, αλλά μετά από κατάλληλη προετοιμασία και γονιμοποίηση, μπορεί να βλαστήσουν για να δημιουργήσουν αποθήκια (arothecia), που περιέχει ασκοσπόρια που προκύπτουν από μείωση.



Εικόνα 2.1. Σκληρώτιο *B.cinerea*. Επανεκτύπωση από το άρθρο «Studies of *Botrytis cinerea* causing *botrytis* gray mold disease in chickpea», Biological Science 22: 69-76 των εκδόσεων Institute of Biological Sciences, Rajshahi University.

Τα σκληρότια αρχίζουν να αναπτύσσονται νωρίς την άνοιξη σε εύκρατες περιοχές για να παράγει κονιδιοφόρα και πολυπύρρηνα κονίδια, αποτελούν τη βασική πηγή ανάπτυξης του μύκητα σε μια καλλιέργεια. Το μυκήλιο επιβιώνει επίσης μέσα σε μολυσμένους νεκρούς ιστούς ξενιστή, ως υπολείμματα καλλιέργειας. Στις πολυετείς καλλιέργειες, τα νεκρά φύλλα, τα λουλούδια και τα φρούτα περιέχουν μάζες μυκηλίου που μπορούν συχνά να οδηγήσουν στην παραγωγή κονιδίων και την έναρξη λοιμώξεων (Beever & Weeds, 2004).

Χλαμυδιοσπόρια

Χλαμυδιοσπόρια έχουν βρεθεί σε *B.cinerea* (Coley-Smith, 1980). Τα χλαμυδιοσπόρια του *B.cinerea* είναι κύτταρα ποικίλης μορφής και μεγέθους. Βρίσκονται γενικά σε καλλιέργειες γήρανσης και συνήθως εμφανίζονται στους τομείς των καλλιεργειών του μύκητα που είναι μολυσμένοι από άλλους οργανισμούς. Τα χλαμυδιοσπόρια σχηματίζονται ως τερματικά ή ενδιάμεσα κύτταρα από μετασχηματισμό βλαστικών τμημάτων μυκηλίου και απελευθερώνονται με αποσύνθεση των υφών του μύκητα. Υπό συνθήκες υγρασίας και χωρίς πρόσθετα θρεπτικά συστατικά, τα χλαμυδιοσπόρια φυτρώνουν στα φύλλα από μικροκονίδια που παρέμεναν αδρανείς. Στον καρπό της ντομάτας, η ανεπιτυχής διείδυση συσχετίστηκε συχνά με τους βλαστικούς σωλήνες οι οποίοι, μετά την προσκόλληση στον ξενιστή, διαφοροποιούνται σε πολλά κύτταρα (χλαμυδιοσπόρια) στο σημείο προσκόλλησης (Rijkenberg et. al., 1980). Σε καρπούς νεκταρινιού, δαμάσκηνου και αχλαδιού, ξηρά αερομεταφερόμενα κονίδια *B.cinerea* σχημάτισαν χλαμυδιοσπόρια ανέπτυξαν βλαστικούς σωλήνες όταν τα φρούτα υποβλήθηκαν σε διαλείπουσες περιόδους ξηρασίας ή διατηρήθηκαν για 48 ώρες στους 5°C (Holz, 1999). Τα χλαμυδιοσπόρια μπορούν επομένως να χρησιμεύσουν ως βραχυπρόθεσμες δομές επιβίωσης που μπορεί να βοηθήσουν τον μύκητα να ξεπεράσει σύντομες δυσμενείς περιόδους που συναντώνται στις επιφάνειες των φυτών.

Κονίδια

Ο *B.cinerea* είναι τυπικός ασκομύκητας καθώς οι μικρογραφίες κυττάρων με τομή παρουσιάζουν χαρακτηριστικά δομικά στοιχεία κοινά σε αυτήν την τάξη μυκήτων. Τα κονίδια αποτελούν τους κύριους πολλαπλασιαστές του μύκητα. Εμφανίζονται στρογγυλά έως ελλειπτικά με κοντό λαιμό και ουλή που δημιουργείται κατά την εξωτερική αποβολή από κονιδιοφόρα. Τα κονίδια του *B.cinerea* έχουν μέγεθος περίπου 10 x 8,5 μm (Pezet & Pont, 1990). Ένα κονίδιο σε λήθαργο περιέχει έναν πρωτοπλάστη (Epton & Richmond, 1980). Μέσα στην πλασματική μεμβράνη του *B.cinerea*, υπάρχει ένα σύνολο οργανιδίων τυπικών για τους ασκομύκητες: αρκετοί πυρήνες ο καθένας περιτριγυρισμένος από πυρηνικό περίβλημα με πυρηνικούς πόρους, στρογγυλά έως ωοειδή μιτοχόνδρια, λίγα μικρά σφαιρικά κενοτόπια (προκενοτόπια) οριοθετούνται από μεμονωμένες μεμβράνες, πολυσωματικά σώματα (κυστίδια με μεμβρανώδη εγκλείσματα), μικρόβια, αραιό ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), δικτυόσωμα, κυστίδια, σώματα αποθήκευσης στην

περιφέρεια κονιδίου, λιπιδικά σώματα, ριβοσώματα και πολυσώματα. Όσον αφορά τα γεγονότα έκκρισης και σηματοδότησης, η οργάνωση της μεμβράνης του πλάσματος και των εσωτερικών μεμβρανών έχει μεγάλη σημασία. Λεπτομερείς όψεις των εσωτερικών και εξωτερικών επιφανειών του *Botrytis fabae*, παρόμοιο του *Botrytis cinerea*, που παρέχονται με μέθοδο κατεψυγμένης εγχάραξης και TEM εμφανίζουν διάφορους διακριτούς τύπους σωματιδίων και διακλαδισμένες εισχωρήσεις, οι οποίες πιθανότατα αντιστοιχούν στο κυματοειδές περίγραμμα που βρέθηκε σε κομμένα κονίδια. Μικρά κυστίδια περνούν μέσα



από το κυτταρικό τοίχωμα. Το πιο σημαντικό είναι ότι τα δείγματα που έχουν χαραχθεί με κατάψυξη αποκάλυψαν σημαντικό αριθμό

δεξαμενών ER. Τα κυστίδια φάνηκε να προέρχονται από κλώνοι ER (ενδοπλασματικό δίκτυο) αλλά όχι από διαμερίσματα Golgi, τα οποία θεωρήθηκαν ότι απουσίαζαν στο *B. fabae* (Richmond & Pring, 1971) και δεν είναι καλά προσδιορισμένα στους ασκομύκητες (Mendgen et al., 1995). Σε δείγματα του *B. cinerea*, τα κενοτόπια έχουν ακανόνιστα, χαραγμένα περιγράμματα και συχνά ενσωματώνουν τμήματα του κυτταροπλάσματος ή του πυκνού ηλεκτρονίου υλικού (Richmond & Pring, 1971).

Η επιφάνεια των υδρόφοβων κονιδίων μεταβάλλεται από την επαφή με το υπόστρωμα (Doss et al., 1993) υποδεικνύοντας μια συγκολλητική λειτουργία που πιθανώς μεσολαβείται από υδροφοβίνες, πρωτεΐνες που προκαλούν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Σύμφωνα με το πρότυπο SEM, οι επιφάνειες των κονιδίων του *B. cinerea* είναι σχεδόν λείες χωρίς εμφανή σημάδια, αγκάθια ή διακριτικά μοτίβα (Epton & Richmond, 1980). Όταν παρατηρείται με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης χαμηλής θερμοκρασίας (LTSEM), τα κονίδια του *B. cinerea* παρουσιάζουν μια λεπτή κοκκώδη επιφάνεια (Williamson et al., 1995), αλλά τα κατεψυγμένα χαραγμένα (freeze etching) αντίγραφα και το TEM αποκάλυψε

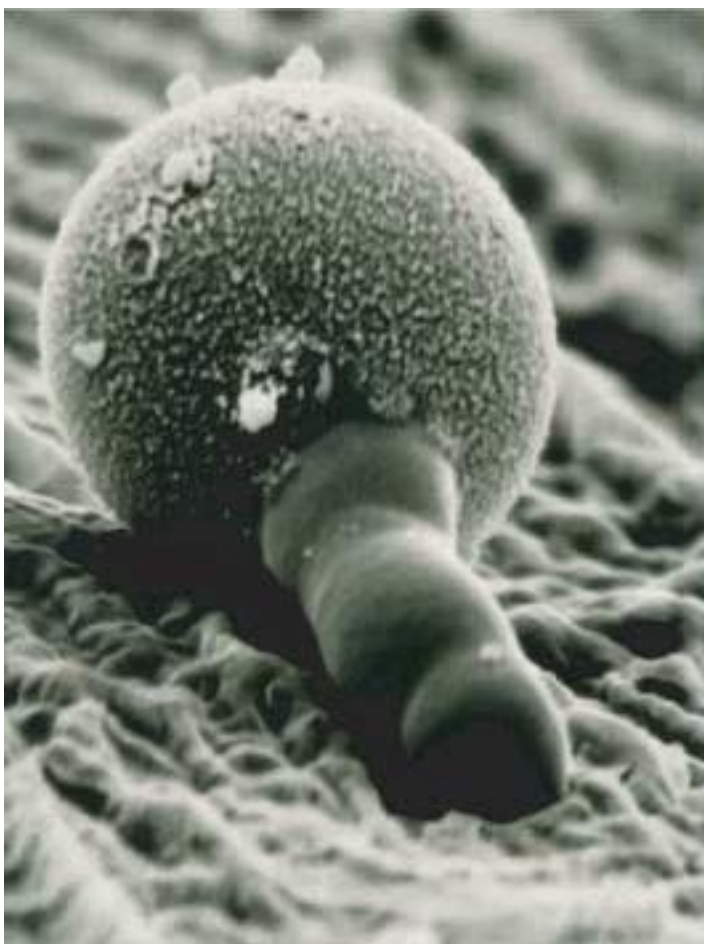
Εικόνα 2.2. Κονιδιοφόροι με ώριμα κονίδια *B. cinerea*. Επανεκτύπωση από το εξώφυλλο του βιβλίου *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Εκδόσεις Springer Science and Business Media

ένα λακκοειδές τοίχωμα καλυμμένο με μικρά σωματίδια, εμφανιζόμενα σε μικρές κορυφογραμμές παράλληλες μεταξύ τους (Richmond & Pring, 1971). Η επιφάνεια των ξηρών κονιδίων ήταν τραχιά με πολυάριθμες κοντές προεξοχές 200 έως 250 nm που εξαφανίστηκαν με την ενυδάτωση και την εκ νέου ξήρανση, πράγμα που οφείλεται στην υδροφοβικότητα των κονιδίων (Doss et al. , 1997).

Σωλήνες Βλάστησης (Germ Tubes)

Εάν πληρούνται ορισμένες απαιτήσεις που περιλαμβάνουν διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και νερού κατά τον εμβολιασμό, τα κονίδια διογκώνονται και βλασταίνουν (Verhoeff, 1980; Salinas and Verhoeff, 1995), συνήθως με έναν ή δύο σωλήνες βλάστησης.

Κατά τη διάρκεια της βλάστησης των κονιδίων το εξωτερικό τοίχωμα σπάει και το εσωτερικό στρώμα εκτείνεται μέσα από αυτό στο βλαστικό σωλήνα (Hawker & Hendy, 1963). Χρησιμοποιώντας βελτιωμένες τεχνικές προετοιμασίας TEM, αυτή η πρώτη εσφαλμένη αναπαράσταση διορθώθηκε. Αντί το τοίχωμα των κονιδίων να αδυνατεί λόγω διόγκωσης του κονιδίου, το τοίχωμα παχαίνει και εμφανίζονται στο εσωτερικό του νεο-σχηματισμένα στρώματα 4 ώρες μετά την επώαση. Μέσα σε αυτά τα στρώματα, ένα άλλο στρώμα επικολλάται στο σημείο βλάστησης, το οποίο είναι συνεχές με το αναδυόμενο τοίχωμα του βλαστικού σωλήνα (Gull & Trinci, 1971; Richmond & Pring, 1971).



Εικόνα 2.3.. Κονίδιο *B.cinerea* με σωλήνα βλάστησης. Επανεκτύπωση από το άρθρο «Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*», Mycological Research 99: 1303–1310 των εκδόσεων Elsevier

Στον αναδυόμενο βλαστικό σωλήνα δεν υπάρχουν μεγάλα κενά, ενώ στο κονίδιο σχηματίζεται ένα κεντρικό κενοτόπιο ενώ έχουν φύγει τα προ-κενά. Ένα πλούσιο κυτταρόπλασμα σε πολυριβοσώματα και οργανίδια, πυρήνες και πολλά μιτοχόνδρια, προχωρούν προς τα μέσα στον αναδυόμενο βλαστικό σωλήνα (germ tube), εμφανίζοντας μια ροή προς την άκρη του σωλήνα (Hawker & Hendy, 1963; Richmond & Pring, 1971).

Παρατηρήθηκε ένα διόγκωμα στο *B.cinerea* κοντά στην κορυφή των βλαστικών σωλήνων, αλλά όχι νωρίτερα σε αδρανή κονίδια. Είναι μια ημισφαιρική δομή από υλικό πυκνό σε ηλεκτρόνια, που μερικές φορές έχει μεμβρανώδη εμφάνιση, περιβάλλεται από υλικό κυτταρικού τοιχώματος και περιστασιακά συνδέεται με το κυτταρόπλασμα (Gull & Trinci, 1971; Richmond & Pring, 1971). Μια παρόμοια δομή βρέθηκε στο γένος *Phytophthora* της συνομοταξίας των ωμοκλήτων και προτείνεται ότι μπορεί να εμπλέκεται είτε στη διάλυση του τοιχώματος των κονιδίων είτε στην διόγκωση των βλαστικών σωλήνων (Bartnicki-Garcia, 1969). Ωστόσο, τέτοια σωματίδια δεν έχουν βρεθεί σε άλλους μύκητες (Girbardt, 1969).

Μυκήλιο

Η λέξη μυκήλιο σημαίνει κυριολεκτικά «περισσότερα από ένα». Η λέξη έχει λατινική και ελληνική προέλευση και πρωτοεμφανίστηκε στα κείμενα στις αρχές του 1800 και αναφέρεται στο νήμα που μοιάζει με σώμα ενός μύκητα. Το κύριο μέρος του μύκητα είναι τα μυκήλια, τα οποία ζουν μέσα στο υπόστρωμα (βλαστό, φύλλα, καρπό κλπ). Τα μυκητιακά σπόρια μπορούν γρήγορα να εξελιχθούν σε ένα δίκτυο νημάτων (ή υφών). Τα σπόρια βλασταίνουν για να παράγουν μια μάζα από συνυφασμένες, μονοκύτταρες δομές ευρείες γνωστές ως υφές. Συλλογικά, μάζες υφών αποτελούν το μυκήλιο. Ο μύκητας απορροφά θρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον του μέσω του μυκηλίου του σε μια διαδικασία δύο σταδίων. Πρώτον, οι υφές εκκρίνουν ένζυμα στο υπόστρωμα. Αυτά τα ένζυμα διασπούν τα βιολογικά πολυμερή σε μικρότερες μονάδες όπως τα μονομερή. Το μυκήλιο στη συνέχεια απορροφά αυτά τα μονομερή.

2.3.2. Φυσιολογία του μύκητα

Κυτταρική επικοινωνία

Τα κύτταρα όπως και οι πολυκύτταροι οργανισμοί πρέπει να αντιλαμβάνονται τι συμβαίνει στο περιβάλλον τους και να απαντούν κατάλληλα. Για παράδειγμα, ένας

μονοκύτταρος οργανισμός πρέπει να οσμίζεται τις θρεπτικές ουσίες, να αντιλαμβάνεται τη διαφορά ανάμεσα στο φως και στο σκοτάδι και να ανιχνεύει και να αποφεύγει τα δηλητήρια και τους διώκτες του. Ένα τέτοιο κύτταρο, προκειμένου να έχει κοινωνική ζωή, πρέπει να χρησιμοποιεί τις αισθήσεις του για να επικοινωνεί με άλλα κύτταρα. Όταν για παράδειγμα ένα κύτταρο *Saccharomyces cerevisiae* είναι έτοιμο να ζευγαρώσει εκκρίνει μια μικρή πρωτεΐνη γνωστή ως παράγοντας ζευγαρώματος (mating factor)(Segall, 1993), στην οποία είναι ευαίσθητα άλλα κύτταρα σακχαρομυκήτων. Τα κύτταρα αυτά ανιχνεύουν τον παράγοντα και απαντούν αναστέλλοντας την πορεία του κυτταρικού κύκλου τους και προβάλλοντας μια προεξοχή προς το κύτταρο.

Η επικοινωνία του κυττάρου με το περιβάλλον συνίσταται σε μετατροπή των πληροφοριών από μια μορφή σε άλλη. Τα κρίσιμα σημεία μετάδοσης μηνυμάτων του κυττάρου βρίσκονται εκεί όπου οι πληροφορίες μετατρέπονται από την μία μορφή στην άλλη. Αυτή η διεργασία μετατροπής αποκαλείται **μεταβίβαση σημάτων** (signal transduction).

Η διεργασία της σηματοδότησης αρχίζει εκεί όπου ένα σήμα από το εξωτερικό περιβάλλον συναντά ένα μόριο-στόχο που ανήκει στο κύτταρο. Σε κάθε περίπτωση, το μόριο-στόχος είναι μια **πρωτεΐνη** που δρα ως **υποδοχέας** (receptor protein). Η πρωτεΐνη αυτή συνήθως ενεργοποιείται μόνο από ένα είδος σήματος. Ο υποδοχέας εκτελεί το πρώτο βήμα της μεταβίβασης, παραλαμβάνει το εξωτερικό σήμα και απαντά δημιουργώντας ένα νέο ενδοκυτταρικό σήμα. Αυτό είναι μόνο η αρχή για μια ακολουθία ενδοκυττάρων διεργασιών μεταβίβασης σήματος. Τα περισσότερα σηματοδοτικά μόρια είναι πολύ μεγάλα ή υδρόφιλα και δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου. Επομένως, οι αντίστοιχοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς πρέπει να είναι ενσωματωμένοι στην κυτταρική μεμβράνη κατά τέτοιο τρόπο, ώστε ν' ανιχνεύσουν ένα σήμα στο εξωτερικό και να μεταβιβάσουν το μήνυμα υπό νέα μορφή διαμέσου της μεμβράνης προς το εσωτερικό του κυττάρου. Οι περισσότεροι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας ανήκουν σε μια από τις τρεις μεγάλες οικογένειες: α) **υποδοχείς που διασυνδέονται με διαύλους ιόντων** β) **υποδοχείς που διασυνδέονται με G πρωτεΐνες** και γ) **υποδοχείς που διασυνδέονται με ένζυμα** (Alberts et al., 2003).

Οι υποδοχείς των τριών κατηγοριών διαφέρουν ως προς τη φύση του ενδοκυττάρου σήματος που παράγουν μόλις το εξωκυττάριο σηματοδοτικό μόριο προσδεθεί στον υποδοχέα. Για τους υποδοχείς που συνδέονται με διαύλους ιόντων, το ενδοκυττάριο σήμα

είναι η ροή ιόντων διαμέσου της μεμβράνης που παράγεται ένα ηλεκτρικό ρεύμα. Για τους υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες, είναι η ενεργοποιημένη μορφή μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης, η οποία απελευθερώνεται και διαχέεται στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης πυροδοτώντας μια ακολουθία άλλων γεγονότων. Για τους υποδοχείς που διασυνδέονται με ένζυμα, το ενδοκυττάριο σήμα είναι η ενζυμική ενεργότητα που διεγείρεται στην κυτταροπλασματική πλευρά του υποδοχέα και δημιουργεί ποικίλα σηματοδοτικά μόρια, μεταξύ των οποίων και μόρια που απελευθερώνονται στο κυτταροδιάλυμα.

Ενδοκυττάρια σηματοδοτική αλληλουχία του *Botrytis Cinerea*

Ο *B.cinerea* επηρεάζει σχεδόν όλα τα είδη δικοτυλήδων, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων λαχανικών και φρούτων, λουλουδιών, ξυλώδη και καλλιεργειών θερμοκηπίου. Έτσι, ο μύκητας πρέπει να έχει ανάπτυξη στρατηγικές ώστε να μπορεί να «αναγνωρίσει» του ξενιστές, να διεισδύσει και να εισβάλει στους φυτικούς ιστούς και να ξεπεράσει την άμυνα του ξενιστή. Για να ανταποκριθεί σ' αυτά τα στάδια, ο μύκητας είναι ικανός να αντιλαμβάνεται χημικά και φυσικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος του από διαφορετικά φυτά ξενιστές και να ανταποκρίνεται με τις κατάλληλες μεταβολικές δραστηριότητες που απαιτούνται για την παθογόνο ανάπτυξη. Γενικά, τέτοιες μεταβολικές προσαρμογές περιλαμβάνουν προσκόλληση κονιδίων στην επιφάνεια του φυτού, κατευθυνόμενη ανάπτυξη μικροβιακού σωλήνα (germ tube), διαφοροποίηση των δομών μόλυνσης και την έκκριση λυτικών ενζύμων και τοξινών (Knogge, 1996). Αυτή η ανταπόκριση στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος απαιτούν ένα δίκτυο μεταγωγής σήματος, όπως η ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών (Bölker, 1998), την παραγωγή του σηματοδοτικού μορίου κυκλικού AMP (cAMP) (Mitchell & Dean, 1995) και το σύστημα μεταβίβασης σήματος της MAP-κινάσης (MAPK) (Xu, 2000), ώστε να διαβιβαστεί το εξωτερικό σήμα στο γονιδίωμα του μύκητα έτσι ώστε το κατάλληλο γονίδιο ή σύνολα γονιδίων να ενεργοποιηθούν και να διαμορφώσουν τις λειτουργίες του παθογόνου ανάλογα με τα εξωτερικά ερεθίσματα.

Φυσικά και Χημικά ερεθίσματα που ενεργοποιούν την βλάστηση του *B.cinerea*

Τα φυσικά και χημικά σήματα που διεγείρουν την βλάστηση των κονιδίων του φυτικού παθογόνου *B.cinerea*, μπορούν να διακριθούν σε παράγοντες που διεγείρουν την

βλάστηση ως α) την επιφανειακή σκληρότητα, β) την επιφανειακή υδροφοβικότητα, γ) τις οργανικές πηγές άνθρακα και δ) τα πλούσια θρεπτικά υποστρώματα, παραδείγματος χάρη εκχύλισμα βύνης. Είναι γνωστό ότι η βλάστηση των κονιδίων και η μόλυνση μέσω ανέπαφων φυτικών επιφανειών διεγείρονται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών (Kosuge & Hewitt, 1964 ; Orellana & Thomas, 1962). Σε αδρανείς τεχνητές επιφάνειες, διάφορα αμινοξέα και σάκχαρα προκάλεσαν αποτελεσματικά τη βλάστηση των κονιδίων, ενώ τα ανόργανα άλατα όπως το αμμώνιο και το φωσφορικό άλας ήταν αποτελεσματικά μόνο παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων σακχάρων (Blakeman, 1975). Σε επιδερμικές επιφάνειες, τα ξηρά εμβολιασμένα κονίδια μπορούν επίσης να βλαστήσουν σε υψηλή υγρασία απουσία υγρού νερού (Prins et al., 2000).

Η σκληρότητα της επιφάνειας είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας, επειδή σε απουσία μιας σκληρής επιφάνειας, οι άλλοι παράγοντες βλάστησης είναι λιγότερο αποτελεσματικοί ή και αναποτελεσματικοί. Η επιφανειακή υδροφοβικότητα σε συνδυασμό με την επιφανειακή σκληρότητα οδηγούν αποτελεσματικά στη βλάστηση των κονιδίων του βοτρυτή ακόμη και σε απουσία θρεπτικών ουσιών. Τα κεριά των επιδερμικών φυτικών κυττάρων διεγείρουν τη βλάστηση σε σκληρές επιφάνειες, το σήμα βλάστησης που παρέχεται από στρώματα κεριού ήταν κυρίως η υδροφοβικότητά τους. Η αρχική πρόσφυση των κονιδίων του *B.cinerea*, που προκαλείται από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την επιφάνεια του φυτού, είναι σχετικά ασθενής, η ισχυρή προσκόλληση με απελευθέρωση συγκολλητικών ουσιών δεν λαμβάνει χώρα έως ότου συμβεί βλάστηση.

Σε πλούσια θρεπτικά υποστρώματα παρατηρείται ταχεία βλάστηση των κονιδίων. Ο μηχανισμός ανίχνευσης θρεπτικών ουσιών από το *B. cinerea* είναι άγνωστος. Καθώς τα διαφορετικά σάκχαρα και οξέα προκαλούν βλάστηση με παρόμοια αποτελεσματικότητα, φαίνεται απίθανο να συμβεί ανίχνευση θρεπτικών ουσιών από πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης (Doehlemann et al., 2006) , όπως οι αισθητήρες μεταφοράς σακχάρων Snf3 και Rgt2 που εντοπίζονται στις ζύμες (Forsberg & Ljungdahl, 2001).

Ο μύκητας για να ανταποκριθεί στα σάκχαρα με βλάστηση, τα κονίδια πρέπει να αισθανθούν την παρουσία τους, είτε στη μεμβράνη του πλάσματος είτε μετά τη μεταφορά τους στο κύτταρο. Από τα σάκχαρα, η φρουκτόζη έχει επισημανθεί ως ο καλύτερος **επαγωγέας βλάστησης** στο *B.cinerea*, είναι πιο αποτελεσματική από τη γλυκόζη και άλλες εξόζες ή δισακχαρίτες (Blakeman, 1975). Αυτό είναι εκπληκτικό δεδομένο διότι η γλυκόζη είναι συνήθως η πιο αποτελεσματική εξόζη όχι μόνο ως θρεπτικό συστατικό, αλλά και ως

μοριακή ένωση ενεργοποίησης της σηματοδοτικής αλληλουχίας. Η φρουκτόζη είναι σημαντικά πιο αποτελεσματική από τη γλυκόζη ως επαγωγέας βλάστησης στο στέλεχος άγριου τύπου του μύκητα, από την άλλη πλευρά, πειράματα **πρόσληψης** σακχάρων σε άγριου τύπου ή μεταλλαγμένα κονίδια αποκάλυψαν σημαντικά υψηλότερη έλξη (affinity) για την πρόσληψη γλυκόζης από ότι για τη φρουκτόζη. Αυτό πιθανότατα οφείλεται σε άγνωστους μεταφορείς εξόζης που υπάρχουν στα κονίδια (Doehlemann et al., 2005).

Υπομονάδες της τριμερούς G-πρωτεΐνης

Οι πρωτεΐνες σύνδεσης νουκλεοτιδίων ετεροτριμερικής γουανίνης (πρωτεΐνες G) εμπλέκονται στη ρύθμιση μιας ποικιλίας κυτταρικών λειτουργιών στα ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως είναι και μύκητες. Αλληλεπιδρούν με ενεργοποιημένους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης και διαχέονται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης έως ότου συναντήσουν τις πρωτεΐνες στόχους τους. Όλες οι G πρωτεΐνες έχουν παρόμοια δομή και λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο. Αποτελούνται από τρεις πρωτεϊνικές υπομονάδες, τις α , β και γ . Δύο από αυτές τις υπομονάδες συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη με μικρές λιπιδικές ουρές. Σε κατάσταση ηρεμίας η μονάδα α είναι συνδεδεμένη με GDP και η G-πρωτεΐνη είναι αδρανής. Όταν ένας εξωκυττάριος συνδέτης προσδεθεί στον υποδοχέα, ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με την G-πρωτεΐνη και την ενεργοποιεί αναγκάζοντας την α υπομονάδα ν' αποβάλλει το συνδεδεμένο GDP και να το αντικαταστήσει με GTP. Η ενεργοποίηση καταλήγει σε διάσπαση της G-πρωτεΐνης σε μια ενεργοποιημένη α υπομονάδα με συνδεδεμένο GTP και σ' ένα σύμπλοκο $\beta\gamma$. Έτσι, παράγονται δύο ξεχωριστά μόρια που διαχέονται ελεύθερα κατά μήκος της μεμβράνης. Τα δύο ενεργοποιημένα τμήματα μιας G-πρωτεΐνης, δηλαδή η υπομονάδα α και το σύμπλοκο $\beta\gamma$, αλληλεπιδρούν άμεσα με στόχους που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, οι οποίοι με τη σειρά τους μεταβιβάζουν το σήμα σε άλλους προορισμούς.

Η συμπεριφορά της α υπομονάδας καθορίζει το χρονικό διάστημα που τα δύο ενεργοποιημένα τμήματα της G-πρωτεΐνης δρουν ανεξάρτητα. Η α υπομονάδα διαθέτει εγγενή ενεργότητα υδρολάσης του GTP (GTPase) και μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα υδρολύει το συνδεδεμένο GTP σε GDP. Και στη συνέχεια επανασυνδέεται με το σύμπλοκο $\beta\gamma$, όπου και διαβίβαση του σήματος σταματά. Αυτή η αλληλουχία που περιγράψαμε σταματάει λίγα δευτερόλεπτα μετά την ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες-στόχοι της κυτταρικής μεμβράνης που αλληλεπιδρούν οι ενεργοποιημένες

μορφές των μονάδων της G-πρωτεΐνης μπορεί να είναι **δίαυλοι ιόντων** ή **μεμβρανικά ένζυμα**. Οι διάφοροι στόχοι επηρεάζονται από διαφορετικά είδη G-πρωτεϊνών και στη συνέχεια οι G-πρωτεΐνες ενεργοποιούνται από διαφορετικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Έτσι, η πρόσδεση ενός εξωκυττάριου σηματοδοτικού μορίου σ' έναν υποδοχέα που συνδέεται με μια G-πρωτεΐνη επιδρά μόνο σε ένα υποσύνολο πρωτεϊνικών στόχων, που είναι κατάλληλοι γι' αυτό το σήμα και γι' αυτό το είδος κυττάρου (Alberts et al., 2003).

Gα πρωτεΐνη και οι υπομονάδες της

Στο *B.cinerea*, έχουν αναγνωριστεί τρία γονίδια στις υπομονάδες Gα μιας G πρωτεΐνης, το γονίδιο *bcg1*, *bcg2* (Schulze-Gronover et al., 2001) και το *bcg3* (Dohlemann et al., 12/2005). Η αλληλουχία αμινοξέων του *bcg1* έχει το υψηλότερο ποσοστό ταύτισης με τις υπομονάδες Gα με άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες. Όλες αυτές οι υποομάδες των πρωτεϊνών Gα είναι ομόλογες με την οικογένεια Gα-πρωτεϊνών των θηλαστικών. Τα πειράματα RT-PCR έδειξαν ξεκάθαρα ότι και τα δύο γονίδια (*bcg1*, *bcg2*) εκφράζονται *in planta* στα κονίδια σε πολύ πρώιμα στάδια μόλυνσης του ξενιστή (Tudzynski & Gronover, 2007). Ο χαρακτηρισμός των *bcg1* και *bcg2* αποκάλυψε ότι και οι δύο υποομάδες της Gα-πρωτεΐνης επηρεάζουν την ανάπτυξη και την μυκητιακή παθογένεια με διαφορετικούς τρόπους. Το *bcg1* ελέγχει πολλαπλές λειτουργίες, ενεργοποιώντας μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού, την αυξητική ανάπτυξη, τη μελάγχρωση, τη πρωτεϊνόλυση και παθογένεια αλλά επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αποικισμού στον ιστό του ξενιστή με την ενεργοποίηση της βλάστησης. Η βλάστηση των κονιδίων και η διείσδυση σταματά μετά το σχηματισμό πρωτοπαθών βλαβών. Μετά από 48 ώρες, σε φύλλα μολυσμένα με άγριου τύπου κονίδια, σχηματίζονται ταχέως διευρυνόμενες αλλοιώσεις μαλακής σήψης. Ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπικής (SEM) των προκαλούμενων από μεταλλαγμένα κονίδια (*Δbcg1*), που περιείχαν μόνο *bcg1* γονίδια, πρωτοπαθών βλαβών έδειξε ξεκάθαρα ότι οι υφές του μεταλλάγματος διεισδύουν στην επιφάνεια του φυτού με τρόπο που δεν διαφέρει από τον άγριο τύπο κονιδίων. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η πρωτεΐνη *bcg1* φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της εισβολής στον φυτικό ιστό των φύλλων. Σε αντίθεση με το *bcg1*, το *bcg2* παρουσιάζουν μορφολογία αποικίας WT σε αξενική καλλιέργεια και εξακολουθούν να παράγουν και εκκρίνουν ένα σύνολο πρωτεασών ορατών ως αλογόνο γύρω από τις αποικίες σε άγαρ γάλακτος (Schulze-Gronover et al., 2001). Η διαδικασία μόλυνσης είναι συγκρίσιμη με του άγριου τύπου (WT),

εκτός του ότι οι βλάβες που προκαλούνται από κονίδια από μεταλλαγμένα κονίδια $\Delta bcg2$ εξαπλώνονται πιο αργά. Το γονίδιο $bcg3$ επιτελεί τις ίδιες λειτουργίες με το γονίδιο $bcg1$, ενεργοποιώντας και αυτό την οδό μεταβίβασης σήματος του κυκλικού AMP, παίρνοντας μέρος στην μορφογένεση, βλάστηση και την ανάπτυξη κατά την εισβολή του μύκητα στον ξενιστή (Williamson et al., 2007)

Στο παρελθόν, χρησιμοποιήθηκε αφαιρετικός υβριδισμός καταστολής (SSH) για την ταυτοποίηση μυκητιακών γονιδίων, τα οποία εκφράζονται ειδικά στο φυτό ξενιστή (Schulze-Gronover et al., 2004). Μεταξύ των 22 διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων βρέθηκαν πολλά που κωδικοποιούν άγνωστες πρωτεάσες, μερικά ένζυμα που εμπλέκονται στον δευτερογενή μεταβολισμό και άλλα που κωδικοποιούν ένζυμα που αποικοδομούν τα κύτταρα. Τα περισσότερα από τα γονίδια που ελέγχονται από το $bcg1$ στον καταρράκτη σήματος εξακολουθούν να εκφράζονται σε μεταλλάγματα αδενυλικής κυκλάσης (bac) στα φυτά. Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι το $bcg1$ εμπλέκεται τουλάχιστον σε έναν επιπρόσθετο καταρράκτη σηματοδότησης δίπλα στην εξάρτηση από το cAMP.



Εικόνα 2.4.. Μεταφορά μηνύματος από το εξωτερικό του κυττάρου μέσω μιας G-πρωτεΐνης. Τόσο η ενεργοποιημένη α υπομονάδα όσο και το σύμπλοκο βγ μπορούν να ρυθμίζουν πρωτεΐνες-στόχους. Η α υπομονάδα μιας G-πρωτεΐνης απενεργοποιείται υδρολύοντας το προσδεμένο GTP σε GDP. Επανεκτύπωση από το βιβλίο «Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας» από τις εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης και Broken Hill.

Η οδός του κυκλικού AMP (cyclic AMP)

Πολλά εξωκυτταρικά σήματα τα οποία δρουν μέσω υποδοχέων που διασυνδέονται με G πρωτεΐνες και επηρεάζουν την ενεργότητα της **αδενυλικής κυκλάσης (bac)** (adenylate cyclase) και αυτή με τη σειρά της μεταβάλλει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της **κυκλική μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP)**. Συνήθως η ενεργοποιημένη α υπομονάδα της G-πρωτεΐνης ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η σύνθεση του AMP από ATP. Η συγκέντρωση του AMP μπορεί να μεταβληθεί ταχύτητα σε απάντηση των εξωτερικών σημάτων, είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο το οποίο μπορεί να μεταφέρει το σήμα από την θέση της μεμβράνης που συντίθεται σε πρωτεΐνες μέσα στο κύτταρο, στον πυρήνα ή άλλα οργανίδια. Οι διάφορες επιδράσεις του cAMP στο κύτταρο ασκούνται μέσω της ενεργοποίησης της εξαρτώμενης από το cAMP πρωτεϊνικής κινάσης (cyclic-AMP-dependent protein kinase) ή A-κινάσης (A-kinase). Το ένζυμο αυτό είναι ανενεργό σένα σύμπλοκο με μια άλλη πρωτεΐνη. Η πρόσδεση του cAMP προκαλεί μια αλλαγή διαμόρφωσης που απελευθερώνει το ενεργό ένζυμο. Στη συνέχεια η ενεργός πρωτεϊνική κινάση καταλύει την φωσφορυλίωση διαφόρων πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο. Κάποιες από αυτές τις δράσεις του cAMP είναι και οι μεταβολές της έκφρασης των γονιδίων, όπου η A-κινάση φωσφορυλιώνει ρυθμιστικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη μεταγραφή επιλεγμένων γονιδίων. (Alberts et al., 2003)

Η βλάστηση που οφείλεται σε πηγές άνθρακα απαιτεί σηματοδότηση cAMP. Εργαστηριακές αναλύσεις μας έχουν δείξει ότι μεταλλαγμένα κονίδια ($\Delta bcg3$) που περιείχαν μόνο πρωτεΐνες $bcg3$ και μεταλλαγμένα κονίδια (Δbac) με πρωτεΐνες bac , ήταν ελαττωματικά στη βλάστηση που προκαλείται από πηγές άνθρακα στο γυαλί. Όταν όμως τα μεταλλαγμένα κονίδια επώαστηκαν σε γυάλινες επιφάνειες σε φρουκτόζη και προσθέσαμε CRT-cAMP, άλας που λειτουργεί σαν ενεργοποιητής της cAMP, αποκαταστήθηκε η βλάστηση σχεδόν σε επίπεδα του άγριου τύπου κονίδια (Doehlemann et al., 2005). Το συμπέρασμα είναι ότι μόνο οι πρωτεΐνες bac και $bcg3$, και πιθανόν της $bcg1$, δεν αρκούν για να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της βλάστησης αλλά απαραίτητο στοιχείο είναι για το μονοπάτι μεταβίβασης του σήματος για την ενεργοποίηση της βλάστησης, είναι η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP).

Μικρές G-πρωτεΐνες

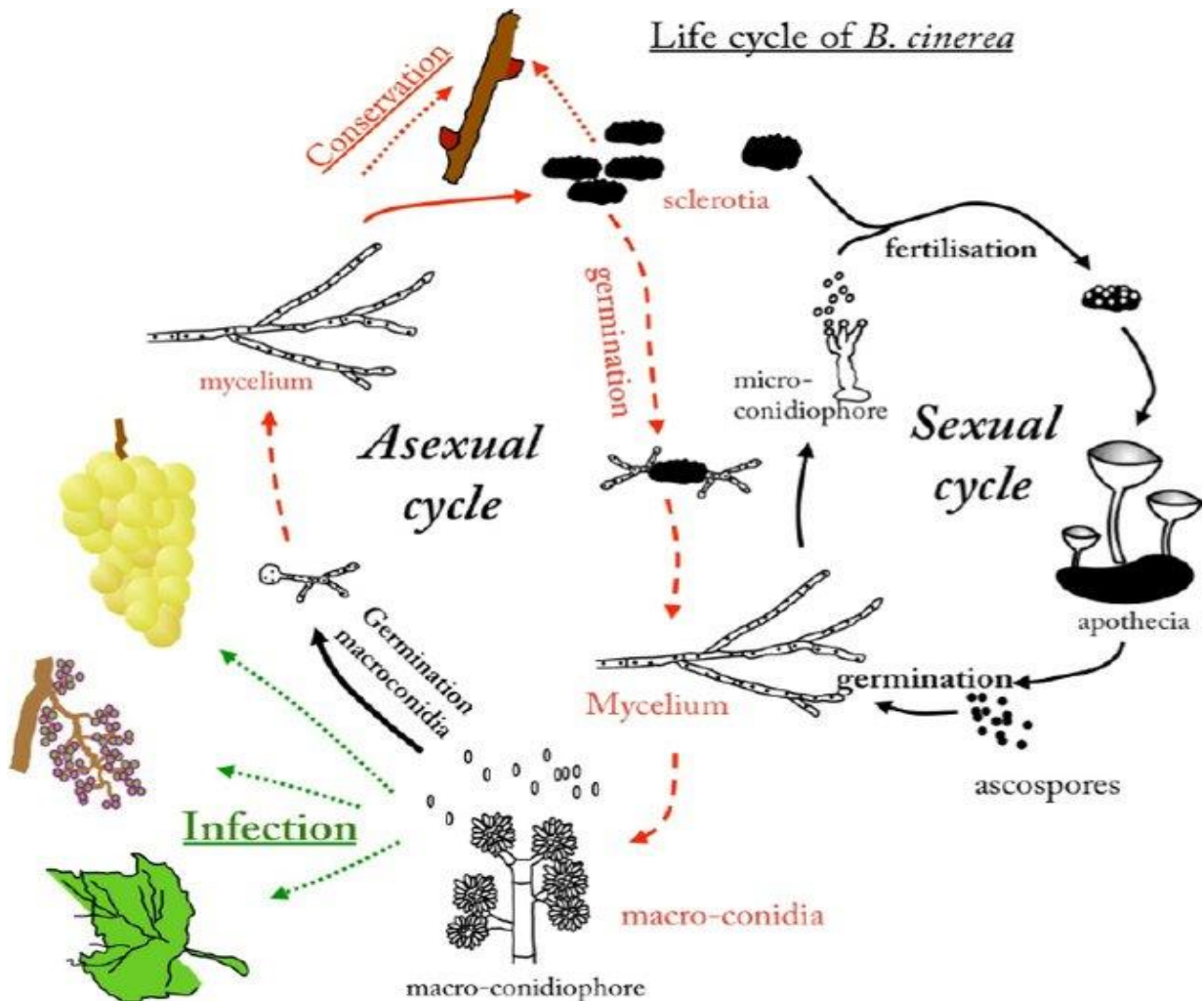
Στην κυτταρική μεμβράνη υπάρχουν μικρές σηματοδοτικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως φυσικοί προσαρμοστές (adaptors). Συγκεκριμένα, αυτές οι πρωτεΐνες δημιουργούν ένα εκτεταμένο συσσωμάτωμα, συνδέονται με τον υποδοχέα και στη συνέχεια μπορεί να προσδεθούν σε άλλες πρωτεΐνες και να τις ενεργοποιήσουν. Έτσι επιτυγχάνεται η προώθηση του σήματος. Μια τέτοια μικρή G-πρωτεΐνη είναι η πρωτεΐνη **Ras**, η οποία προσδέεται με μια λιπιδική ουρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η πρωτεΐνη **Ras** είναι μια μικρή, μονομερής πρωτεΐνη που συνδέεται με το GTP (monomeric GTP-binding protein), την ονομάζουμε μονομερή για να την ξεχωρίσουμε από τις τριμερές πρωτεΐνες που συνδέονται επίσης με GTP, όπου έχει γίνει είδη αναφορά. Η πρωτεΐνη Ras μοιάζει με την α υπομονάδα της μιας G-πρωτεΐνης και λειτουργεί σαν μοριακός διακόπτης με το ίδιο τρόπο. Συγκεκριμένα εναλλάσσεται μεταξύ δύο διαφορετικών καταστάσεων, είναι ενεργός όταν συνδέεται με ένα μόριο GTP και ανενεργός όταν συνδέεται με ένα μόριο GDP. Η αλληλεπίδραση με μια ενεργοποιημένη πρωτεΐνη ωθεί την πρωτεΐνη Ras να ανταλλάξει το GDP με GTP και να μεταπέσει σε ενεργό κατάσταση. Μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα η πρωτεΐνη Ras απενεργοποιείται υδρολύοντας το GTP σε GDP. (Alberts et al., 2003)

Η οδός της MAP-κινάσης

Σε ενεργό κατάσταση η πρωτεΐνη Ras οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας σειράς φωσφορυλιώσεων, στην οποία διάφορες κινάσες φωσφορυλιώνουν και διαδοχικά ενεργοποιούν η καθεμία την επόμενη σειρά. Αύτη η αλληλουχία μεταβίβασης που μεταφέρει το σήμα από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα ονομάζεται ακολουθία της MAP-κινάσης (MAP-kinase cascade). Σε αυτή την ακολουθία, MAP-κινάση (**Bmp1, Bmp3, BcSak1**) φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από το ένζυμο κινάση της MAP-κινάση (**MAPKK**), το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιείται από το ένζυμο κινάση της κινάσης της MAP κινάσης (**MAPKKK**), το οποίο ενεργοποιείται από την **Ras** πρωτεΐνη. Στο τέλος της σηματοδοτικής αλληλουχίας, η MAP κινάση φωσφορυλιώνει ορισμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες γονιδίων σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης και έτσι τροποποιεί την ικανότητα τους να ρυθμίζουν τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων (Takuya-Sumita et al., 2016). Το αποτέλεσμα είναι μια αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων, που μπορεί

να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την επιβίωση τους ή και να ελέγχει την διαφοροποίηση τους, η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από τα άλλα γονίδια που είναι ενεργοποιημένα στο κύτταρο και από τα διάφορα μόρια που επιδρούν στο κύτταρο.

2.3.3. Βιολογικός κύκλος



Εικόνα 2.5.. Κύκλος ζωής του *Botrytis cinerea* σε εργαστηριακές συνθήκες. Σχεδιάγραμμα της Sabine Filingier στο άρθρο «Fenhexamid Resistance in the *Botrytis* Species Complex, Responsible for Grey Mould Disease» του βιβλίου *Fungicides - Beneficial and Harmful Aspects*, εκδότης Nooruddin Thajuddin

Αγενής κύκλος του *Botrytis cinerea*

Αποτελεί τον πιο σύνηθες τρόπο αναπαραγωγής του *B. cinerea*. Τα περισσότερα είδη του Βοτρώτη παράγουν πολυάριθμα κονίδια (μακροκονίδια), είναι άφυλα κονίδια που φέρονται στις άκρες των διακλαδιζόμενων κονιδιοφόρων. Γενικά, τα κονίδια έχουν βραχύ χρόνο επιβίωσής τους ανάλογα με τη θερμοκρασία, την υγρασία, τη μικροβιακή δραστηριότητα και την έκθεση στο ηλιακό φως (Nassr & Bakarar 2013). Το ξεχειμώνασμα

του *Botrytis cinerea* πραγματοποιείται με τη μορφή των σκληρώτιων, τα οποία είναι ανθεκτικά σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (Holtz et al., 2004). Το είδος *B.cinerea*, παράγει αρκετά μεγάλα σκληρώτια (~4 mm). Κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, όπως διακοπτόμενες περιόδους υγρασίας την άνοιξη, τα σκληρώτια θα βλαστήσουν για να παράγουν μυκήλια και κονίδια. Τα σκληρώτια πιστεύεται ότι είναι η πηγή πρώιμων λοιμώξεων στην αρχή της καλλιεργητικής περιόδου (Hsiang & Chastagner, 1992).

Ο *B.cinerea* μπορεί επίσης να παράγει προσωρινές δομές γνωστές ως χλαμυδιοσπόρια. Αυτές οι δομές μπορεί να διαφέρουν σημαντικά σε μέγεθος και σχήμα, μπορούν να επιβιώσουν σε περιόδους ξηρασίας έως και 3 μήνες (Urbasch, 1983). Συχνά βρίσκονται σε καλλιέργειες γήρανσης είτε εντός υφών είτε στα άκρα των υφών. Σε ευνοϊκές συνθήκες μπορούν να βλαστάνουν για να παράγουν υφές ή μικροκονίδια.

Εγγενής κύκλος του *Botrytis cinerea*

Ο εγγενής κύκλος του *B.cinerea*, παλαιότερα γνωστό ως “*Botryotinia*”, δεν εμφανίζεται συνήθως στη φύση. Αυτό μπορεί εν μέρει να οφείλεται στην έλλειψη αναγνώρισης των καρποφοριών. Τα μικροκονίδια, τα οποία μπορούν να παραχθούν τόσο από την ανάπτυξη μακροκονιδίων μετά τη βλάστηση όσο και από τον ενδογενή σχηματισμό σε παλιές υφές, είναι μη πυρηνικά και έχουν πλέον επιβεβαιωθεί ότι δρουν ως σπερματοζωάρια (Fukumori et al., 2004). Η γονιμοποίηση των δεκτικών σκληρωτικών δομών από τα σπερματοζωάρια επάγει την παραγωγή αποθηκίων (apothecia), τις σεξουαλικές δομές (Urbasch, 1983), όπου δημιουργούνται ασκοί και ασκοσπόρια. Οι Faretra & Antonacci (1987) ήταν οι πρώτοι που προκάλεσαν το σεξουαλικό στάδιο στο *B.cinerea* υπό εργαστηριακές συνθήκες. Οι ασκοί, που περιέχουν ασκοσπόρια, φέρονται στην άνω επιφάνεια του αποθήκιου. Η



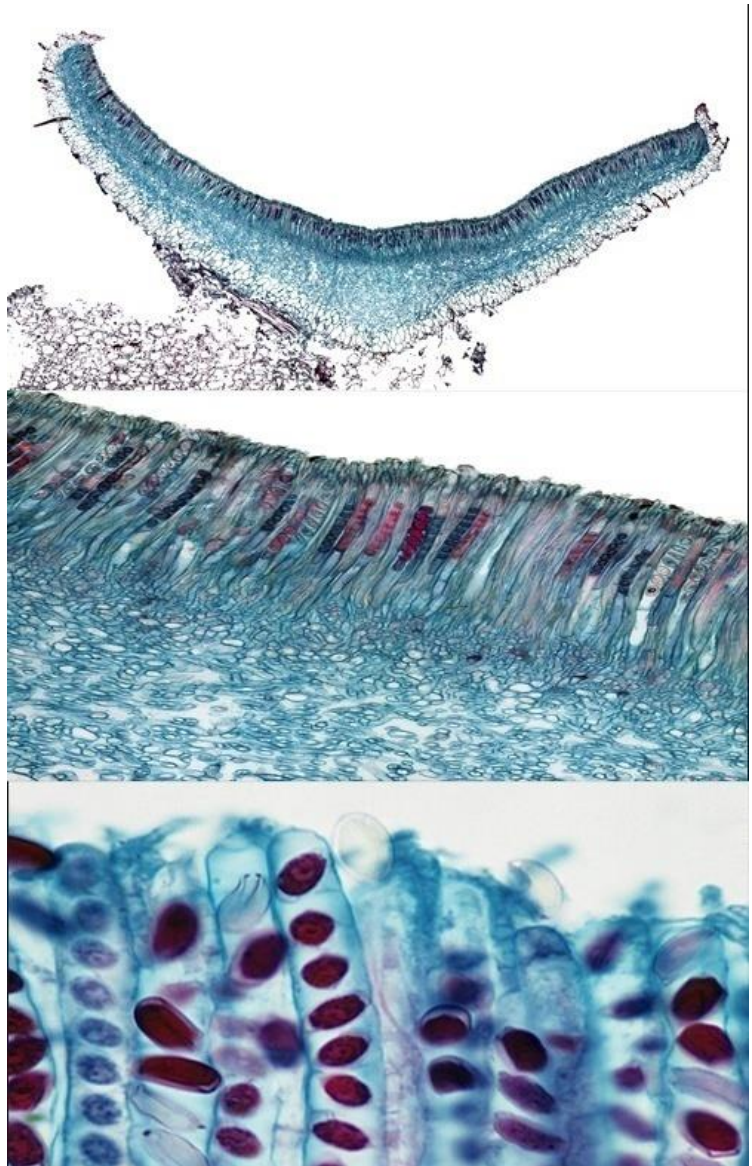
Εικόνα 2.6. Αποθήκια *B.cinerea*. Επανεκτύπωση από το άρθρο «Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*», *Mycological Research* 99: 1303–1310 των εκδόσεων Elsevier

σεξουαλική συμβατότητα ελέγχεται από έναν μοναδικό τύπο ζευγαρώματος με δύο

αλληλόμορφα, το MAT-1 και το MAT-2. Και οι δύο τύποι ζευγαρώματος είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση και τα περισσότερα στελέχη είναι ετεροφυλικά, δηλαδή μπορούν να παράγουν ασκοσπόρια μόνο όταν διασταυρωθούν με τον αντίθετο τύπο ζευγαρώματος (Farettra et al., 1988).

Επιδημιολογία

Τα σκληρώτια αναπτύσσονται μέσα στους νεκρούς ιστούς του ξενιστή και όπως προαναφέρθηκε, αντιπροσωπεύουν έναν σημαντικό μηχανισμό επιβίωσης του *B.cinerea*, αλλά έχουν πολύ μεταβλητό μέγεθος και δεν είναι άμεσα εμφανείς σε όλες καλλιέργειες. Ο φλοιός που περικλείει το μυκήλιο είναι πλούσιος σε μελανίνη και β-γλυκάνες όπου προστατεύουν τα σκληρώτια από την αποξήρανση, την υπεριώδη ακτινοβολία και τις μικροβιακές προσβολές για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Backhouse & Willets, 1984). Τα σκληρώτια αρχίζουν να αναπτύσσονται νωρίς την άνοιξη σε εύκρατες περιοχές και να παράγουν κονιδιοφόρα και πολυπύρρηνα κονίδια, χρησιμεύοντας ως κύρια πηγή προσβολής σε μια καλλιέργεια. Το μυκήλιο επιβιώνει επίσης μέσα σε μολυσμένους νεκρούς ιστούς ξενιστή που έχουν αφεθεί ως υπολείμματα καλλιέργειας και μέσα σε μερικούς σπόρους για



Εικόνα 2.7. Αποθήκιο *B.cinerea* σε μεγένθηση όπου διακρίνονται οι ασκοί και τα σκοσπόρια που βρίσκονται εντός. Επανεκτύπωση από την ιστοσελίδα Biology 130 Lab Review Images, University of Wisconsin - Stevens Point Department of Biology.

να χρησιμεύσει ως πρωτογενές εμβόλιο. Στις πολυετείς καλλιέργειες, τα νεκρά φύλλα, τα λουλούδια και τα φρούτα περιέχουν μάζες μυκηλίου που μπορούν συχνά να βρίσκονται σε ιδανική τοποθεσία μέσα σε ένα κάλυμμα καλλιέργειας για την παραγωγή κονιδίων και την έναρξη λοιμώξεων. Ο σεξουαλικός κύκλος περιλαμβάνει τη σπερματοποίηση των σκληρώτιων δημιουργώντας αποθήκια και οδηγώντας στην παραγωγή ασκοκάρπιων με οκτώ διπύρηνια ασκοσπόρια. Επιπλέον, τα ασκοκάρπια είναι μη καταγεγραμμένα ή σπάνια στις περισσότερες καλλιέργειες που δέχθηκαν επίθεση από το *B.cinerea* και τυχόν συμπεράσματα σχετικά με τον ρόλο τους στο σεξουαλικού κύκλου στο είδος βασίζονται κυρίως στη μοριακή ανάλυση γενετικών παραλλαγών (Beever & Weeds, 2004).

Τα κονίδια που δημιουργούνται κατά την αρχή της βλάστησης του μύκητα ακολουθούν έναν καλά καθορισμένο ημερήσιο κύκλο έναρξης, παραγωγής και διάδοσης που ρυθμίζεται από τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και της υγρασίας. Η ταχεία μείωση της υγρασίας με την αύξηση της θερμοκρασίας νωρίς το πρωί προκαλεί συστροφή και ξήρανση των κονιδιοφόρων, εξαγωγή κονιδίων με ρεύματα αέρα (Jarvis, 1962a), είτε μεμονωμένα είτε σε μικρές συστάδες (Harrison & Lowe, 1987). Τα σταγονίδια νερού μπορούν επίσης να διασκορπίσουν τα κονίδια, αλλά αυτό πιθανότατα δεν είναι μια σημαντική μέθοδος διασποράς (Jarvis, 1962b). Ο σχηματισμός κονιδίων διεγείρεται από συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός (Epton & Richmond, 1980) και κοντά στην υπεριώδη ακτινοβολία προκαλείται γενικά η σπορογέννηση στην καλλιέργεια. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες μεμονωμένες περιπτώσεις σπορογέννησης στο σκοτάδι. Τα κονίδια μπορούν να



Εικόνα 2.8. Κονίδιο *B.cinerea* κατά τη διάρκεια της βλάστησης σε φύλλο καλλιέργειας φράουλας. Επανεκτύπωση από το άρθρο «*Botrytis Cinerea*: a highly infectious crop killer - in detail» της Garcia Inaki, δημοσίευση στην ιστοσελίδα www.cannagardening.com

κινούνται σε ρεύματα αέρα από γειτονικές καλλιέργειες, ωστόσο τα περισσότερα κονίδια πιθανόν να παράγονται από πρωτογενείς πηγές εντός της καλλιέργειας. Όπως και σε πολλούς μύκητες, τα κονίδια περιέχουν έναν αυτό-αναστολέα και πρέπει να πλυθούν για να προκαλέσουν υψηλά ποσοστά βλάστησης *in vitro* (Williamson et al., 2007).

Ο *B.cinerea* δείχνει αξιοσημείωτη ευελιξία στη χρήση διαφορετικών περιβαλλόντων για τη βλάστηση και τη λήψη θρεπτικών συστατικών από ένα φυτό ξενιστή. Ανακαλύφθηκε ότι τα ξηρά εμβολιασμένα κονίδια παρήγαγαν έναν, δύο έως και πέντε κοντούς βλαστικούς σωλήνες και καμία προφανή τερματική αποθήκευση πριν πραγματοποιήσουν την είσοδο σε ένα άθικτο επιδερμίδα ξενιστή σε φύλλα, πέταλα ή φρούτα. Μια εξωκυτταρική μήτρα ανιχνεύθηκε μόνο γύρω από την περιοχή διείσδυσης του βλαστικού σωλήνα μετά από ξηρό εμβολιασμό φύλλων φασολιών και επώαση σε υψηλή υγρασία (Cole et al., 1996). Το *B.cinerea* είναι σε θέση να σχηματίσει *appressoria* αλλά δεν υπάρχει τοίχωμα μεταξύ του *appressorium* και του βλαστικού σωλήνα (Tenberge, 2004). Οι σωλήνες βλάστησης του *B.cinerea* περιέχουν μελανίνη στην εξωκυτταρική μήτρα, η οποία συνδέεται με το μυκητιακό κυτταρικό τοίχωμα (Doss et al., 2003).

Σε μικρούς καρπούς, τα ανθικά όργανα είναι σημαντικές θέσεις για την πρωτογενή μόλυνση, έπειτα το παθογόνο μπορεί να παραμείνει ανενεργό για σημαντικό χρονικό διάστημα πριν καταστρέψει γρήγορα τους ιστούς κατά την ωρίμανση του καρπού. Στα σταφύλια υπάρχουν ισχυρές ιστολογικές ενδείξεις (Viret et al., 2004) ότι τα κονίδια μολύνουν κυρίως το δοχείο λουλουδιών (ανθοδόχη), και σε μικρότερο βαθμό το στίγμα, το στύλο ή την ωοθήκη. Ο παθογόνος στη συνέχεια διατηρείται σε ήρεμη κατάσταση από τις άμυνες του ξενιστή. Οι μικροσκοπικές ρωγμές στην επιδερμίδα του σταφυλιού παίζουν επίσης ρόλο σε μεταγενέστερες λοιμώξεις, ειδικά αν τα σταφύλια είναι πρησμένα μετά από βροχή. Η σχετική υγρασία είναι ένας κρίσιμος περιβαλλοντικός παράγοντας για το *B.cinerea* (Harrison et al., 1994). Τιμές της σχετικής υγρασίας άνω του 93% απαιτείται για την βλάστηση των κονιδίων απουσία σταγονιδίων νερού (Williamson et al., 1995). Η διατήρηση υψηλής σχετικής υγρασίας στην ατμόσφαιρα κατά τις περιόδους ανθοφορίας οδηγεί σε διαδοχικούς κύκλους μόλυνσης και σπορογέννησης, μην αφήνοντας καμία ευκαιρία για έγκαιρη απομάκρυνση των ωριμασμένων φρούτων και μπορεί να προκύψουν επιζήμιες επιδημίες χωρίς επαρκή μέτρα ελέγχου.

Ο ρόλος των εντόμων φορέων του *B.cinerea* έχει αναγνωριστεί μόνο τα τελευταία 20 χρόνια. Στα σταφύλια υπάρχουν πολλά έντομα που είναι γνωστό ότι μεταφέρουν κονίδια

του μύκητα, είτε στα εξωτερικά τους προσαρτήματα είτε ακόμη και στο εσωτερικό του εντέρου, και τα εναποθέτουν στην επιφάνεια των φρούτων (Engelbrecht, 2002; Fermaud & Gaunt, 1995). Αν και το *B.cinerea* δεν θεωρείται κυρίως ως παθογόνος πληγής, μπορεί να προσβάλει τον ξενιστή από πληγές όπου προκαλούν τα έντομα (Woodford et al., 2002).

2.3.4. Συμπτώματα - Σημεία του *Botrytis cinerea* στα όργανα της Αμπέλου

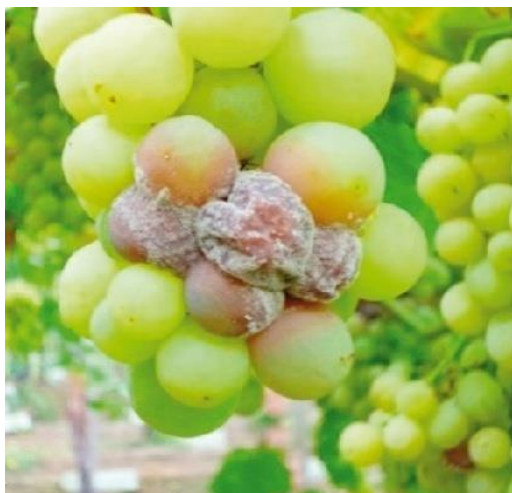
Ο *B.cinerea* είναι υπεύθυνο για ένα πολύ ευρύ φάσμα συμπτωμάτων στα όργανα και τους ιστούς των φυτών. Οι μαλακές σήψεις, που συνοδεύονται από κατάρρευση και



Εικόνα 2.9. Λουλούδια αμπελιού με μαλακή σήψη. Επανεκτύπωση από το άρθρο «Here comes the rain again...» δημοσιευμένο στην ιστοσελίδα www.somerled.com.au

υπερενυδάτωσης (waterksoak) στους ιστούς του παρεγχύματος, που ακολουθείται από ταχεία εμφάνιση γκριζών μαζών αποτελούμενα από τα κονίδια του μύκητα, όπου είναι ίσως τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα στα φύλλα και τους μαλακούς καρπούς. Σε φρούτα με παχύ δέρμα, όπως τα ακτινίδια, το σύμπτωμα της υπερενυδάτωσης

είναι εμφανές μόνο μετά το κόψιμο. Σε πολλά φρούτα και λαχανικά η λοίμωξη αρχίζει συνήθως στα γερασμένα λουλούδια και στη συνέχεια ως μαλακή σήψη εξαπλώνεται για να επηρεάσει τα παρακείμενα αναπτυσσόμενα φρούτα (ανθοφορία), όπως στα κολοκυθάκια, αγγούρια, γαλλικά φασόλια, φράουλες και μήλα. Στα πέταλα λουλουδιών, τα συμπτώματα κυμαίνονται από μικρά σημάδια έως πλήρους κλίμακας μαλακή σήψη ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Στη ντομάτα που καλλιεργείται στο θερμοκήπιο, η μεγαλύτερη ζημιά συμβαίνει στους μίσχους κατά το κλάδεμα των πληγών όπου ο μύκητας μπορεί να σαπίσει σε ολόκληρο το στέλεχος. Η μαλακή σήψη των ώριμων καρπών ντομάτας συμβαίνει κυρίως μετά τη συγκομιδή.



Εικόνα 2.10. Συμπτώματα του *B.cinerea* σε σταφύλια. Επανεκτύπωση από το άρθρο «Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile», εκδόσεων Ciencia E Investigacion Agraria

Σε αμπελοκαλλιέργειες παρατηρείται ότι η μόλυνση του *B.cinerea* σε ώριμα προς γήρανση σταφύλια είναι η πιο κοινή και καταστροφική φάση αυτής της ασθένειας. Τα μολυσμένα σταφύλια εμφανίζονται αρχικά ως μαλακά και υδαρή. Οι ράγες των λευκών ποικιλιών γίνονται καφέ και συρρικνώνονται, και αυτά των κόκκινων καλλιεργειών αναπτύσσουν ένα κόκκινο-καφέ χρώμα. Υπό υψηλή υγρασία τα μολυσμένα σταφύλια συνήθως καλύπτονται με μια γκρίζα ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα, όπου μπορεί να μολυνθεί ένα μούρο ή και ολόκληρο τα τσαμπί.

Γενικά, τα υγιή σταφύλια που αγγίζουν μολυσμένα

θα μολυνθούν. Οι σάπιες ράγες γενικά συρρικνώνονται με το χρόνο και πέφτουν στο έδαφος ως σκληρές και αφυδατωμένες. Ο μύκητας μπορεί επίσης να προκαλέσει ανθοφορία που μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια καλλιέργειας στις αρχές της καλλιεργητικής περιόδου. Τα κονίδια του *B.cinerea* στους βόστρυχους εμφανίζονται σε θερμοκρασίες 10–30 °C, με την προϋπόθεση ότι οι βόστρυχοι είναι υγροί για τουλάχιστον 3 ώρες. Το μυκίλιο αυξάνεται όσο αυξάνεται η διάρκεια της περιόδου υγρασίας, με βέλτιστη ανάπτυξη κονιδίων μετά από 36 ώρες στους 10 °C και 24 ώρες στους 25 °C. (Williamson et al., 2007)



Ο μύκητας μπορεί να σχηματίσει γκρίζες ή καφέ έως ανοικτό καφέ βλάβες σε φύλλα, καλυμμένες με τριχωτές υφές

Εικόνα 2.11. Συμπτώματα του *B.cinerea* στα φύλλα. Grape Pest Management, εκδόσεις University of California Division of Agriculture and Natural Resources

του μυκηλίου που αποτελούν τα σποροφόρα. Η μόλυνση των φύλλων ξεκινά ως θαμπάδα, εμφανίζονται σκούρες πράσινες κυλίδες στην επάνω πλευρά του φύλλου και ανοιχτό γκρι στην κάτω πλευρά. Στα σημεία αυτά γίνονται γρήγορα νεκρωτικές βλάβες στο φυτικό ιστό. (Williamson et al., 2007). Μερικές φορές σχηματίζονται μικροσκοπικά μαύρα σκληρώτια στο νεκρό ιστό (Haware & McDonald, 1992). Ο *B.cinerea* και η άφθονη σπορίωση θα συμβεί εάν οι συνθήκες εντός της καλλιέργειας είναι υγρές. Η αλληλεπίδραση των φύλλων της αμπέλου με ένα προϊόν απομόνωσης *B.cinerea*, οδήγησε στο συμπέρασμα έπειτα από έρευνα, ότι εμφανίζεται μια απόκριση κατά την οποία τα στυλβένια συσσωρεύονται κατά προτίμηση στην άμεση γειτνίαση των φυτικών κυττάρων με τον μύκητα (Derckel et al., 1999).

Στους μίσχους, εκτός από την καταστροφική γκρίζα μούχλα στους καρπούς και στα φύλλα, το παθογόνο εξαπλώνεται προς τους βλαστικούς μίσχους των φύλλων προκαλώντας μια σφηνοειδή καστανή αλλοίωση με κίτρινο περιθώριο που εξαπλώνεται προς στον κόμβο των βλαστικών μίσχων και κατ' επέκταση στους βλαστούς του φυτού, για να δώσει μια εμφανή ανοιχτό καφέ ταχεία εξάπλωση (έως 15 cm) στον πρωτογενή φλοιό του στελέχους. Μια τέτοια μόλυνση δεν εισέρχεται στους μασχαλιαίους οφθαλμούς λόγω των περιδερμικών στιβάδων, αλλά καθυστερεί την ανάπτυξη των οφθαλμών σε μολυσμένους κόμβους με αποτέλεσμα να αποτυγχάνουν να παράγουν γόνιμους πλευρικούς βλαστούς το επόμενο έτος. Μετά τον χειμερινό λήθαργο, οι βλάβες του στελέχους στο φυτό γίνονται λευκές και εμφανίζουν μεγάλα μαύρα σκληρώτια ώστε να παράγουν μάζες γκρίζων κονιδίων την άνοιξη. Στη μαύρη σταφίδα, η μόλυνση των λουλουδιών χωρίς συμπτώματα (που ανιχνεύεται με μικροσκόπιο φθορισμού) από το *B.cinerea* οδηγεί σε πρόωρη αποκοπή των αναπτυσσόμενων καρπών που σχετίζονται με την παραγωγή αιθυλενίου σε μια κατάσταση που ονομάζεται «απορροή». (Williamson et al., 2007). Οι μίσχοι των φύλλων στα αμπέλια ταυτοποιήθηκαν ως ο κύριος



Εικόνα 2.12. Βλάβες που προκύπτουν στους βλαστούς κατά την μόλυνση από *B.cinerea*. Επανεκτύπωση από το άρθρο «Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease», Molecular Plant Pathology 8(5),561–580, εκδόσεων Wiley-Blackwell εξ ονόματος της Βρετανικής Εταιρείας για την Παθολογία

φυτικός ιστός που ξεχειμωνιάζει ο *B.cinerea*. Το μυκίλιο του *B.cinerea* επιβίωσε για έως και 30 εβδομάδες σε κλιματίδες που προέρχονταν από το κλάδεμα της αμπέλου, με τις πρακτικές ελέγχου των ζιζανίων και τη θερμοκρασία να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη μακροζωία των μυκηλίων (Thomas et al., 1983).

2.3.5. Ζημιές - Οικονομική σημασία στον αμπελώνα

Οι επιδημίες που προκαλούνται από το *B.cinerea* μπορεί να είναι σοβαρές και οικονομικά επιζήμιες για πολλές γεωργικές και κηπουρικές καλλιέργειες σε συνθήκες που ευνοούν τη μόλυνση. Αυτές οι απώλειες συνεχίζουν να συμβαίνουν παρά τη διαθεσιμότητα νέων βοτρυτοκτόνων. Ωστόσο, η ελευθερία εφαρμογής μυκητοκτόνων περιορίζεται όλο και περισσότερο και σε ορισμένες περιπτώσεις απαγορεύεται. Αυτοί οι περιορισμοί βασίζονται στις ανησυχίες του κοινού σχετικά με τις δυσμενείς επιπτώσεις των συνθετικών φυτοφαρμάκων στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον και μηδενική ανοχή στα χημικά κατάλοιπα σε πολλές εξαγωγικές αγορές. Η ανάπτυξη της βιολογικής γεωργίας τα τελευταία χρόνια ενθάρρυνε τον αναπροσανατολισμό της σκέψης των γεωπόνων, καθώς μηδενική ή σημαντικά μειωμένη χρήση μυκητοκτόνων. Για να διατηρηθούν οι αποδόσεις σε αυτά τα συστήματα, θα πρέπει να σχεδιαστούν στρατηγικές καταστολής ασθενειών βασισμένες σε ισχυρή επιδημιολογική γνώση. Η αμπελοαγωγή είναι μία από τις σημαντικότερες μορφές καλλιέργειας φρούτων παγκοσμίως και συμβάλλει σημαντικά στη διατροφή του ανθρώπου. Στην αμπελοαγωγή η κατανόηση των επιδημιολογικών διεργασιών του βοτρυτή εξελίσσεται συνεχώς. Ο τομέας της αμπελοκαλλιέργειας έχει ιδιαίτερη οικονομική σημασία σε παγκόσμιο επίπεδο, σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Αμπέλου και Κρασιού (OIV) το 2013 οι καλλιεργούμενες εκτάσεις για παραγωγή σταφυλιών έφταναν τα 7.505.711 εκτάρια και οι εκτιμώμενες απώλειες στις καλλιέργειες λόγω του *B. cinerea* ήταν στο ύψος των 10 δισεκατομμυρίων δολαρίων ΗΠΑ ετησίως (Weiberg et al., 2013).

2.4. Αντιμετώπιση του Βοτρυτή της Αμπέλου

Η διαχείριση του *B.cinerea* στη σύγχρονη καλλιέργεια, βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη χρήση συνθετικών χημικών ουσιών (Rosslenbroich & Stuebler, 2000). Αυτή η προσέγγιση, ωστόσο, δεν θεωρείται βιώσιμη, λόγω της σχετικής ευκολίας με την οποία εμφανίζονται ανθεκτικά στα μυκητοκτόνα στελέχη του *B.cinerea* στους αμπελώνες (Latorre et al., 2002; Legoux, 2004) και αυξανόμενη δημόσια συζήτηση σχετικά με τα φυτοφάρμακα

και την ανθρώπινη και περιβαλλοντική υγεία (Janisiewicz & Korsten, 2002; Spadaro & Gullino, 2005). Κατά συνέπεια, οι αυστηρότεροι κανονισμοί που διέπουν τα υπολείμματα βοτρυοκτόνων έχουν περιορίσει σοβαρά τις επιλογές χημικού ελέγχου σε συμβατικά διαχειριζόμενους αμπελώνες, ιδιαίτερα κατά την περίοδο προ της συγκομιδής. Κατά τη διάρκεια της περιόδου όπου οι ράγες ωριμάζουν ταχέως γίνονται όλο και πιο ευαίσθητα στη μόλυνση από *B.cinerea*. Σε αμπελώνες οργανικής διαχείρισης υπάρχουν πολύ λίγες επιλογές για καταστολή των παθογόνων και ο έλεγχος των ασθενειών εξαρτάται από ποικιλίες με εγγενή αντίσταση (Torfer & Eibach, 2002) και την εφαρμογή «επιλογών ήπιου ελέγχου» όπως τα φυτικά εκχυλίσματα και κομπόστ (Ryan et al., 2005). Υπάρχουν φυσικά εναλλακτικές λύσεις αντί των συνθετικών βοτρυοκτόνων, συμπεριλαμβανομένων των διεγερτικών για την άμυνα των φυτών για την αύξηση της αντίστασης έναντι του ξενιστή και των μικροοργανισμών για την καταστολή επιδημιών και ασθενειών. Ωστόσο, οι πολυπλοκότητες των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και μικροβίων στο πεδίο αποτελούν μια τεράστια πρόκληση για την πρακτική εφαρμογή μεθόδων βιολογικού ελέγχου. Αυτή η ανασκόπηση συζητά τη βιολογική καταστολή του *B.cinerea* στα σταφύλια και εξετάζει πιθανούς περιορισμούς για την πρακτική εφαρμογή μεθόδων βιολογικού ελέγχου στους αμπελώνες.

2.4.1. Μηχανισμοί του φυτού έναντι της παθογένεσης

Τα αμπέλια βασίζονται σε προσχηματισμένους και επαγωγίσιμους μηχανισμούς αντίστασης, παρόμοιους με τους μηχανισμούς αντίστασης του *B.cinerea* που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες ενότητες, για να αμυνθούν έναντι της μόλυνσης από το *B.cinerea* (Gabler et al., 2003; Keller et al., 2003). Η επιδερμίδα και το κυτταρικό τοίχωμα αντιστέκονται φυσικά στη διείσδυση υφών, ενώ οι τανίνες και οι φαινολικές ουσίες στο κυτταρικό τοίχωμα αναστέλλουν τα μυκητιακά ένζυμα που εμπλέκονται στην παθογένεση (Sarig et al., 1998; Goetz et al., 1999). Οι πρώιμες επαγωγίσιμες αποκρίσεις περιλαμβάνουν την εναπόθεση νέου υλικού στο κυτταρικό τοίχωμα, την απελευθέρωση δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και τον υπερευαίσθητο κυτταρικό θάνατο (HR) στη θέση μόλυνσης (Hammerschmidt, 1999). Ωστόσο, ο ρόλος αυτών των αμυντικών αποκρίσεων στην αντίσταση στο *B.cinerea* είναι αμφιλεγόμενος, καθώς έρευνες δείχνουν ότι το *B.cinerea* μπορεί να εκμεταλλευτεί την παραγωγή ROS κατά τον αποικισμό στα φυτά (Lyon et al.,

2004) και ότι το HR μπορεί πράγματι να διευκολύνει τη μόλυνση από νεκροτροφικούς μύκητες (Govrin & Levine, 2000).

Οι καλύτερα χαρακτηριζόμενοι επαγωγίμοι μηχανισμοί αντοχής στο *B.cinerea* στα αμπέλια είναι η συσσώρευση αντιμικροβιακών φυτοαλεξινών και η σύνθεση πρωτεϊνών που σχετίζονται με παθογένεια (PR) (Jeandet et al., 1995). Οι κύριες φυτοαλεξίνες που παράγονται στα αμπέλια είναι η ρεσβερατρόλη και τα παράγωγά της *riceid*, *pterostilbene* και *ε-viniferin* (Jeandet et al., 2002). Η συσσώρευση ρεσβερατρόλης εμφανίζεται στην αξονική επιφάνεια των φύλλων και στις φλούδες των μούρων σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 40 έως 400 μg ανά g νωπού βάρους (Jeandet et al., 1991). Μελέτες σε φυτά σταφυλιών έδειξαν μια θετική συσχέτιση μεταξύ της σύνθεσης ρεσβερατρόλης που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία στα φύλλα και της αντοχής στο πεδίο *B. Cinerea* μεταξύ των 11 *Vitis spp.* (Sbaghi et al., 1995). Μελέτες μυκητοτοξικότητας *in vitro* έδειξαν ότι συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ανέστειλαν τη βλάστηση των κονιδίων κατά 50%, ενώ συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 60 έως 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ μείωσαν την ανάπτυξη των μυκηλίων και προκάλεσαν κυτταρολογικές τροποποιήσεις που συνήθως σχετίζονται με το στρες (Adrian et al., 1997). Στις ράγες, τα επίπεδα ρεσβερατρόλης μειώνονται σταθερά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των καρπών και αυτό συνδυάζεται με αυξημένη ευαισθησία στον βοτρώτη (Jeandet et al., 1991). Τα επίπεδα ρεσβερατρόλης είναι γενικά χαμηλότερα στα λουλούδια από ότι στα φύλλα και οι ράγες και αυτό έχει προταθεί ως ένας παράγοντας που συμβάλλει στην υψηλότερη ευαισθησία τους στο *B.cinerea* (Jeandet et al., 2002). Επιπλέον, οι σχετικές συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων ποικίλλουν σε διαφορετικά μέρη του άνθους με τα χαμηλότερα επίπεδα στην περιοχή του δοχείου, συνήθως όπου η ασθένεια είναι υψηλότερη (Keller et al., 2003). Οι σχετιζόμενες με την παθογένεση πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των χιτινασών, των γλυκανασών και των πρωτεϊνών που μοιάζουν με θαυματίνη, συσσωρεύονται σε ράγες και φύλλα ως απόκριση σε επίθεση παθογόνου και πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην αντίσταση στα αμπέλια με την αποδόμηση των δομικών συστατικών στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων (Giannakis et al., 1998). Το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης PR ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο ιστού, το αναπτυξιακό στάδιο και επίσης με τον τύπο του μολυσματικού παθογόνου (Robert et al., 2002). Στις ράγες σταφυλιού, τα επίπεδα πρωτεΐνης PR παράγονται επίσης ως φυσιολογικό μέρος της διαδικασίας ωρίμανσης (Davies & Robinson, 2000) και αυτό έχει προταθεί για να αντιπροσωπεύει ένα μέτρο ενάντια στο

περιβαλλοντικό στρες και την επίθεση παθογόνων (Davies & Robinson, 2000). Η χιτινάση και η θαυματίνη αντιπροσωπεύουν τις κυρίαρχες πρωτεΐνες PR στις ράγες σταφυλιού (Waters et al., 1998). Οι πρωτεΐνες αναστολέα πολυγαλακτουρονάσης (PGIPs) εκφράστηκαν σε αμπελόφυλλα και ράγες ως απόκριση στη μόλυνση από το *B. Cinerea*. Οι PGIPs πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην αντοχή στις ασθένειες αναστέλλοντας την αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος από τις πολυγαλακτουρονάσες των μυκήτων. (Bezier et al., 2002).

2.4.2. Συμβατική Αντιμετώπιση

Διάφοροι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες έχουν αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την αντίσταση στο *B. cinerea* σε αιωρήματα, φύλλα και σταφυλιών, υποδεικνύοντας έτσι τη δυνατότητά τους να αυξήσουν την αντοχή στις ασθένειες.

Σαλικυλικό οξύ (Salicylic acid)

Το σαλικυλικό οξύ (SA) παίζει ρυθμιστικό ρόλο στο συντονισμό της αντοχής των φυτικών ασθενειών (Hammerschmidt & Smith-Becker, 1999). Η εξωγενής εφαρμογή του SA, συμπεριλαμβανομένου του 2,6-διχλωροϊσονικοτινικού οξέος (INA) και του βενζο(1,2,3)θειαδιαζολο-7-καρβοθειοϊκού οξέος S-μεθυλεστέρας (BTH), έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την αντίσταση σε ιούς, μυκητιακά, ωομυκητιακά και βακτηριακά παθογόνα τόσο σε δικοτυλήδονα όσο και σε μονοκοτυλήδονα φυτά (Reglinski et al., 1997). Σύμφωνα με έρευνα τα επίπεδα σαλικυλικού οξέος που μετρήθηκαν σε κρασιά που παρασκευάζονται από σταφύλια (Reisling, Muller-Thurgau και Pinot Noir) που γίνονται εφαρμογές σαλικυλικού οξέος από 8 έως 13 φορές (0,18–0,48 kg ανά ha) δεν είχε καμία επίδραση στην περιεκτικότητα σε SA σε 23 εμπορικά διαθέσιμα γερμανικά κρασιά από έξι διαφορετικές αμπελουργικές περιοχές. Τα λευκά κρασιά κατά μέσο όρο είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις SA (~50 μg ανά L) από τα κόκκινα κρασιά (~160 μg ανά L) (Pour-Nikfardjam et al., 1999).

Επειδή το σαλικυλικό οξύ είναι φυτική ορμόνη, επηρεάζει τη φυσιολογία του αμπελιού. Σε μελέτες αμπελώνων στα σταφύλια Shiraz, η ωρίμανση των μούρων επιβραδύνθηκε κατά 2-4 εβδομάδες όταν το SA (7,2 mM) εγχύθηκε στις ράγες 2-3 εβδομάδες πριν από το veraison (Kraeva et al., 1998). Αυτή η επίδραση πιστεύεται ότι

οφείλεται σε στην αναστολή του αμπισικού οξέος (ABA), μιας φυτικής ορμόνης που παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του *veraison*. Η θεραπεία σαλικυλικού οξέος προκαλεί επίσης περιορισμένη κυτταρική νέκρωση στο δέρμα του μούρου που μπορεί να είναι ενδεικτική φυτοτοξικότητας. Η διαφυλλική εφαρμογή σαλικυλικού οξέος, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 2 mM, προκαλεί χλώρωση των φύλλων και κάψιμο στο έλασμα τους στα σταφύλια (Elmer & Reglinski, 2006).

Το 5-χλωροσαλικυλικό οξύ (5CSA) είναι ένα χλωρωμένο συνθετικό παράγωγο του σαλικυλικού οξέος και έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο ισχυρός παράγοντας ενεργοποίησης των γενικών αμυντικών μηχανισμών των φυτών από το ίδιο το σαλικυλικό οξύ (Reglinski et al., 2005). Αξιολόγησαν τη χρήση του 5CSA για τον έλεγχο της σήψης των τσαμπιών του βοτρώτη σε σταφύλια Chardonnay στη Νέα Ζηλανδία. Οι τακτικές εφαρμογές (κάθε 14–28 ημέρες) 1 mM 5CSA μείωσαν σημαντικά τη συχνότητα και τη σοβαρότητα της σήψης των τσαμπιών από βοτρώτη. Σε πιο πρόσφατες μελέτες για τα αμπέλια Chardonnay και Merlot, η σοβαρότητα της νόσου μειώθηκε κατά 60–90% σε σύγκριση με τα αμπέλια που δεν είχαν θεραπείες με βοτρουοκτόνο (Elmer & Reglinski, 2006). Ορισμένα προβλήματα συνοδεύουν τη συχνή και επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του 5CSA, συμπεριλαμβανομένου του μειωμένου βάρους των καρπών, της χλώρωσης των φύλλων και των ανιχνεύσιμων χημικών υπολειμμάτων στα σταφύλια και στα κρασιά. Επιπλέον, όταν τα αμπέλια Cabernet Sauvignon υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 0,8 mM 5CSA, σε διαστήματα 3 εβδομάδων από την καρπόδεση έως τη συγκομιδή, σημειώθηκε μείωση 15% στην εκχύλιση ολικών φαινολικών κατά την οινοποίηση και μείωση του δείκτη ποιότητας του κρασιού (Duxbury et al., 2004).

Το συνθετικό «SA mimic» BTH που παράγεται από τη «Syngenta» (Ελβετία) διατίθεται στην αγορά ως «Bion» στην Ευρώπη και είχε αρχικά καταχωρηθεί για τον έλεγχο του ωιδίου στα δημητριακά. Σε μελέτες, όπου πραγματοποιήθηκαν τρεις εφαρμογές 0,3 mM BTH σε Merlot, μέσα σε περίοδο μιας εβδομάδας κατά τη διάρκεια του *veraison*, προκάλεσαν αύξηση 40% στην *trans*-ρεσβερατρόλη και 100% αύξηση στις ανθοκυανίνες σε φλούδες των μούρων, τα αμπέλια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με BTH δεν ξεπέρασε το 25% η σοβαρότητας της νόσου του Βοτρώτη (% των μολυσμένων καρπών ανά συστάδα) (Iriti et al., 2004).

Ιασμονικό οξύ

Το ιασμονικό οξύ και ο ιασμονικός μεθυλεστέρας είναι ενώσεις με βάση τα λιπίδια ευρείας κατανομής στο φυτικό βασίλειο. Οι ιασμονίτες είναι σημαντικοί ρυθμιστές πολλών αναπτυξιακών διαδικασιών των φυτών, συμπεριλαμβανομένης της βλάστησης των σπόρων, της ανάπτυξης των λουλουδιών και των καρπών, της ανάπτυξης και της γήρανσης (Staswick & Lehman, 1999). Ακόμα, οι ιασμονίτες έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν κεντρικό ρόλο σηματοδότησης στις αποκρίσεις άμυνας των φυτών κατά της επίθεσης εντόμων και ορισμένων νεκροτροφικών παθογόνων. Επιπλέον, μαζί με το αιθυλένιο, το ιασμαμονικό οξύ θεωρείται ότι μεσολαβεί στην ενεργοποίηση της επαγόμενης συστημικής αντίστασης (ISR), μιας επαγόμενης απόκρισης αντίστασης που συνήθως σχετίζεται με τον αποικισμό της ρίζας από ορισμένα μη παθογόνα ριζοβακτήρια (Pieterse et al., 2001).

Υπάρχουν πολλές μελέτες που περιγράφουν τη χρήση των ιασμονιτών (jasmonates) για την πρόκληση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα που κανονικά ενεργοποιούνται με τραυματισμό ή ως απόκριση σε επίθεση εντόμων ή/και παθογόνων. Η έκθεση των φύλλων και των μούρων σε ατμό ιασμονικού μεθυλεστέρα για 7 ημέρες (400 nmol ανά L) προκάλεσε την παραγωγή βιοσύνθεσης φαινολικών ενώσεων (Larronde et al., 2003), δεδομένης της αναφερόμενης συσχέτισης των φαινολικών στην αντοχή στο *B.cinerea*, μπορεί να προβλεφθεί κάποια αποτελεσματικότητα κατά της σήψης των τσαμπιών του βοτρώτη (Elmer & Reglinski, 2006).

Ανόργανες Ενώσεις

Το ασβέστιο θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας και της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος και της πλασματικής μεμβράνης στις φλούδες των σταφυλιών χηλικοποιώντας τα πηκτικά συστατικά και έτσι μειώνεται η ευαισθησία στην ενζυμική πέψη (Chardonnnet et al., 1997). Η μείωση των επιπέδων ασβεστίου κατά την ωρίμανση των μούρων μπορεί να συμβάλει στην παρατηρούμενη αύξηση της ευαισθησίας σε μόλυνση. Το εξωτερικά εφαρμοζόμενο ασβέστιο έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την περιεκτικότητα σε ασβέστιο στις ράγες και ότι αυξάνει την αντίσταση στη σήψη του *B.cinerea* τόσο σε τσαμπιά στα αμπέλια όσο και σε τσαμπιά που αποθηκεύονται στον ψυκτικό θάλαμο (Miceli et al., 1999). Τα κυτταρικά τοιχώματα των επεξεργασμένων μούρων έχουν αυξημένα επίπεδα κυτταρίνης. Η αυξημένη αντίσταση στο *B.cinerea* αποδόθηκε στη συμμετοχή ιόντων ασβεστίου στη σταθεροποίηση της δομής του

κυτταρικού τοιχώματος. Το πυριτικό κάλιο έχει επίσης εμπλακεί στην ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων στα αμπελόφυλλα (Bowen et al., 1992).

2.4.3. Βιολογική Αντιμετώπιση

Μικροβιολογική καταστολή του *Botrytis cinerea*

Πολλοί μη παθογόνοι μικροοργανισμοί καταστέλλουν την ανάπτυξη των φυτικών παθογόνων μέσω του ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά, της παραγωγής ανασταλτικών μεταβολιτών ή/και παρασιτισμού, περιορίζοντας έτσι φυσικά τις ασθένειες των φυτών στο περιβάλλον. Πολυάριθμες μελέτες έχουν περιγράψει την απομόνωση ανταγωνιστικών μικροοργανισμών με σκοπό την εκμετάλλευση των δυνατοτήτων τους για βιολογική καταστολή ασθενειών. Ωστόσο, παρά τις πολλές αναφορές επιτυχούς βιοελέγχου του *B.cinerea* σε εργαστηριακές συνθήκες, μόνο ένα μικρό ποσοστό από αυτά έχει επιδείξει αποτελεσματικότητα πεδίου και ένα ακόμη μικρότερο υποσύνολο έχει αναπτυχθεί σε εμπορικά προϊόντα (Elmer & Reglinski, 2006).

Κανένα άλλο μεμονωμένο γένος μυκήτων δεν έχει λάβει τόση προσοχή όσο το *Trichoderma spp.* για τον βιοέλεγχο των φυτικών παθογόνων. Έρευνα βιοελέγχου με *Trichoderma spp.* κατά του *B.cinerea* στα σταφύλια ξεκίνησε πριν από σχεδόν τρεις δεκαετίες (Elmer & Reglinski, 2006). Ένα προϊόν απομόνωσης του *T. harzianum* (T39), που αρχικά απομονώθηκε από αγγούρι, ήταν το πρώτο *Trichoderma spp.* να διαμορφωθεί ειδικά σε εμπορικό προϊόν για τον έλεγχο του *B.cinerea* (Jarvis, 2001). Κατασκευασμένο ως "Trichodex" από την "Makhteshim-Agan" (Ισραήλ), η αποτελεσματικότητα αυτού του προϊόντος αξιολογήθηκε συνολικά σε 139 πειράματα αγρού σε εμπορικούς αμπελώνες σε 19 χώρες σε 34 ποικιλίες μεταξύ 1988 και 1994. Η αποτελεσματικότητα ελέγχου ήταν 36%, σε σύγκριση με το 52% που είχαν τα πρότυπα βοτρυοκτόνα, όταν οι εφαρμογές έγιναν στα τέσσερα στάδια ανάπτυξης· τέλος της ανθοφορίας, κλείσιμο τσαμπιού, veraison, 2–3 εβδομάδες μετά το veraison, σε ποσοστό 4 kg/ha. Η αποτελεσματικότητα μειώθηκε όταν το διάστημα μεταξύ της τελευταίας εφαρμογής πριν από τη συγκομιδή και του τρύγου επεκτάθηκε σε 5 εβδομάδες, υποδεικνύοντας ότι η προστασία της τελευταίας περιόδου, η ωρίμανση των φρούτων, ήταν σημαντική για τον έλεγχο του *B.cinerea* (O'Neill et al., 1996).

Ένα προϊόν απομόνωσης του *T.harzianum* έχει την ικανότητά του να αποικίζει γερασμένα ανθικά υπολείμματα (στήμονες, κάλυπτες και αποβληθέντα καρπούς) και τους πράσινους δομικούς ιστούς του τσαμπιού σταφυλιού, καθώς αυτοί ήταν πιθανοί τόποι για

λανθάνουσες μολύνσεις από *B.cinerea* (Holz et al., 2003). Το συγκρότημα ανταγωνιστών κυμαινόταν μεταξύ των αμπελώνων και μεταξύ των εποχών, αλλά μόνο το *T.harzianum* αποίκισε αποτελεσματικά τις παρακολουθούμενες θέσεις μέσα σε τσαμπιά κατά τη διάρκεια της σεζόν. Το προϊόν T-22 (Bioworks Inc., Η.Π.Α.) περιέχει *T.harzianum* και χρησιμοποιείται κυρίως για τον έλεγχο των παθογόνων που μεταδίδονται στο έδαφος και ως διεγερτικό ανάπτυξης φυτών (Harman, 2000). Στα σταφύλια, η καταστολή του *B.cinerea* με T-22 ήταν ισοδύναμη με ένα τυπικό πρόγραμμα βοτρυτοκτόνου (Harman et al., 1996). Τα προϊόντα απομόνωσης *T.harzianum* (κωδικός S10B και P1) σε ένα εύρος συνθηκών ανάπτυξης της νόσου του Βοτρώτη, το προϊόν απομόνωσης P1 παρείχε αποτελεσματικό έλεγχο της σήψης από βοτρώτη και η αποτελεσματικότητα ήταν ισοδύναμη με ένα πρόγραμμα βοτρυτοκτόνου βασισμένου στο μυκητοκτόνο δικαρβοξιμίδιου, τη βινκλοζολίνη. Η αποτελεσματικότητα του P1 ως διαμορφωμένο βιολογικό μυκητοκτόνο είναι σημαντικά υψηλή (Latorre et al., 1997).

Το “Trichopulvin 25 PU” (κωδικός απομόνωσης *T.atroviride* Td50) αξιολογήθηκε έναντι τριών άλλων βιολογικών μεθόδων ελέγχου για τον έλεγχο της σήψης από βοτρώτη σε σταφύλια που καλλιεργούνται στη Ρουμανία. Τέσσερις εφαρμογές “Trichopulvin 25 PU” ανά σεζόν οδήγησαν σε υψηλά επίπεδα καταστολής της σήψης από βοτρώτη (εύρος 70-96%) και συγκρίθηκαν με ένα πρόγραμμα “Trichodex” (εύρος 51-96%), ένα πρόγραμμα που βασίζεται σε μυκητοκτόνο με δικαρβοξιμίδιο (Sentinel) και ένα νέο βιομυκητοκτόνο που περιέχει *T.atroviride* (LC52) όπου κατασκευάζεται από την “Agrimm Technologies Ltd” και είναι εγγεγραμμένο στη Νέα Ζηλανδία για τον έλεγχο του *B.cinerea* στα σταφύλια (Sesan et al., 1999).

Μηχανισμοί καταστολής του *B.cinerea* από διαφορετικά *Trichoderma spp.* είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν αντιβίωση, ανταγωνισμό, μυκοπαρασιτισμό και ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας των φυτών. Ορισμένα προϊόντα απομόνωσης εμφανίζουν πολλαπλούς τρόπους δράσης: για παράδειγμα, το προϊόν απομόνωσης T39 που χρησιμοποιείται στο “Trichodex” είναι ένας αποτελεσματικός ανταγωνιστής θρεπτικών συστατικών, αλλά επίσης παρεμβαίνει στα πηκτολυτικά ένζυμα του *B.cinerea* και προκαλεί αντίσταση στον ξενιστή (Elmer & Reglinski, 2006).

Σύνθετοι υδρογονάνθρακες

Οι επαγώγιμες άμυνες του ξενιστή ενεργοποιούνται με την αντίληψη των ενεργών διεγερτών ολιγοσακχαριτών που απελευθερώνονται στη διεπιφάνεια φυτού/παθογόνου κατά την απόπειρα μόλυνσης. Οι ενεργοποιητές της άμυνας του φυτού, ολιγοσακχαρίτες, όπως οι γλυκάνες μπορούν επίσης να εξαχθούν από τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων με εκχύλιση με ζεστό νερό ή με μερική όξινη υδρόλυση (Sharp et al., 1984) και αυτά τα εκχυλίσματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες άμυνας φυτών. Τα κομμάτια γλυκάνης είναι από τα πιο ισχυρά και καλύτερα χαρακτηρισμένα (Cote & Hahn, 1994). Τα φυτά ποικίλλουν ως προς την απόκρισή τους σε συγκεκριμένες μυκητιακές γλυκάνες (Yamaguchi et al., 2000), και αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ως απόδειξη για τη συμμετοχή των γλυκανών στην αναγνώριση παθογόνων. Διεγέρτες β-γλυκάνης από *Phytophthora spp.* είναι αποτελεσματικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις ($10^{-9}M$) και βασίζονται σε συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά για τη βιοδραστικότητα (Sharp et al., 1984). Ειδικές θέσεις δέσμησης για διεγέρτες β-γλυκάνης έχουν ταυτοποιηθεί σε αρκετά φυτικά είδη (Cote et al., 2000). Αν και οι συνθετικοί διεγέρτες γλυκάνης φαίνονται σαν μία καλή επιλογή για την προστασία των καλλιεργειών, το κόστος παραγωγής τους, σε βιομηχανική κλίμακα, πιθανότατα έχει εμποδίσει την εμπορευματοποίηση μέχρι σήμερα. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την παρασκευή 3,6 διακλαδισμένων γλυκανών που θεωρούνται κατάλληλες για παραγωγή μεγαλύτερης κλίμακας (Ning et al., 2002). Ακατέργαστα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν από κυτταρικά τοιχώματα *B.cinerea* διέγειραν τη συσσώρευση πρωτεϊνών PR (Repka et al., 2001) και προκάλεσαν τη συσσώρευση ρεσβερατρόλης και άλλων μυκητοστατικών παραγώγων σε κυτταροκαλλιέργειες αμπέλου (Liswidowati et al., 1991).

Στη Γαλλία, τα εργαστήρια της “Laboratoires Goëmar” ανέπτυξαν μια μέθοδο για την εξαγωγή λαμιναρίνης, μιας γραμμικής β-1,3 γλυκάνης, από θαλάσσια καφέ άλγη (*Laminaria digitata*). Η λαμιναρίνη σε 1 g/L προκάλεσε την ενεργοποίηση 11 επιλεγμένων αμυντικών γονιδίων σε κύτταρα σταφυλιού και προκάλεσε αντίσταση στο *B.cinerea* σε φύλλα Chardonnay (Aziz et al., 2003) με τις βλάβες στα φύλλα να μειώνονται σε μέγεθος κατά περίπου 50%. Έχει αναπτυχθεί εμπορικά ένα προϊόν που περιέχει β-1,3 γλυκάνη φυκιών, το “VacciPlant” (Agrimar Corp., ΗΠΑ). Αναφέρεται ότι η εφαρμογή του “VacciPlant” στο φύλλωμα δείχνει αποτελεσματικότητα έναντι μιας σειράς ασθενειών που επηρεάζουν τις

ετήσιες και πολυετείς καλλιέργειες, συμπεριλαμβανομένου του περονόσπορου και του *B.cinerea* στα σταφύλια.

Τα ολιγογαλακτουρονίδια (OGAs) από τα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων αποδείχθηκε πρόσφατα ότι επάγουν πολλαπλούς αμυντικούς μηχανισμούς σε εναιωρήματα κυττάρων σταφυλιού, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής εννέα γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα και διέγερσης των δραστηριοτήτων χιτινάσης και γλυκανάσης (Aziz et al., 2004). Τα OGAs προκάλεσαν επίσης αντίσταση στο *B.cinerea* σε φύλλα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Μελέτες μεταβολικών αναστολέων έδειξαν ότι η επαγόμενη από OGAs αντίσταση στο *B.cinerea* προκαλείται από μονοπάτια σηματοδότησης που περιλαμβάνουν την οξειδωτική έκρηξη και τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Η εταιρία "Elicityl" αναπτύσσει ολιγοσακχαρίτες φυτικής προέλευσης για χρήση στην αμπελουργία.

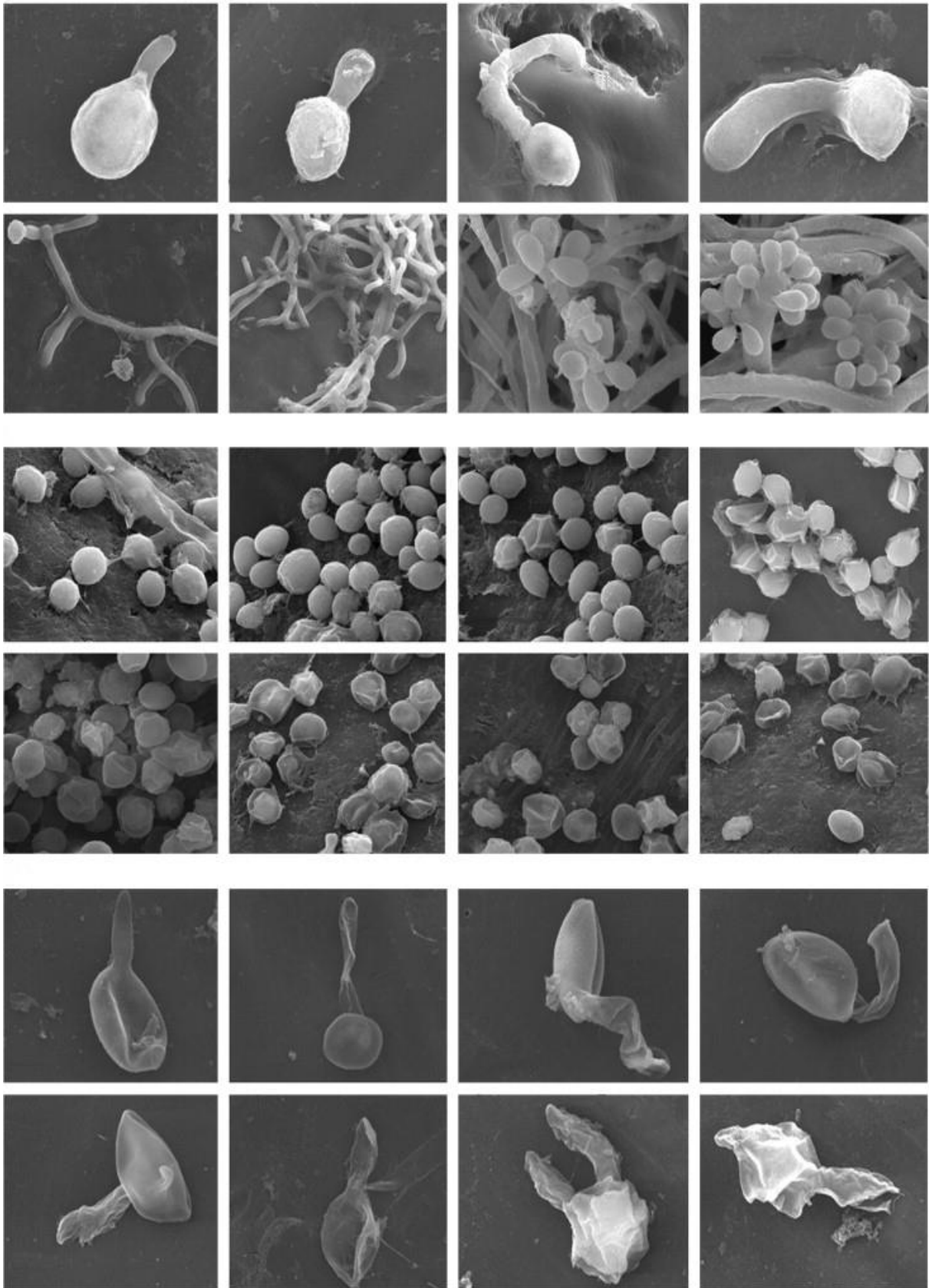
Η χιτοζάνη, ένα αποακετυλιωμένο πολυμερές β-1,4 D-γλυκοζαμίνης, είναι ένα δομικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων. Η χιτοζάνη έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την αντοχή σε ασθένειες έναντι πολλών μυκητιακών ασθενειών, εφαρμόζεται ως θεραπεία πριν ή μετά τη συγκομιδή (Wilson et al., 1994; El Ghaouth, 1997; Reglinski et al., 2004). Επιπλέον, η χιτοζάνη μπορεί να είναι άμεσα αντιμικροβιακή και έχει αποδειχθεί ότι παρεμβαίνει στη βλάστηση και την ανάπτυξη αρκετών φυτοπαθογόνων μυκήτων, συμπεριλαμβανομένου του *Botrytis spp.* (Ben Shalom et al., 2003). Η χιτοζάνη έχει δοκιμαστεί επιτόπου σε μικρό αριθμό μελετών για σταφύλια. Υδατικά διαλύματα με 0,01% έως 0,1% συγκέντρωση σε χιτοζάνη (μοριακή μάζα 2–4 kDa), που εφαρμόστηκαν λίγο μετά την ανθοφορία και στη συνέχεια ξανά 14 ημέρες αργότερα, αναφέρθηκε ότι προκαλούν αντοχή στο ώιδιο στα σταφύλια σε συνθήκες αγρού (Gorbatenko et al., 1996). Εφαρμογή υδατικού διαλύματος χιτοζάνης 0,1% έως 1%, 21 ημέρες ή/και 5 ημέρες πριν από τη συγκομιδή, μείωσε τη σοβαρότητα της σήψης του τσαμπιού από *B.cinerea* σε σταφύλια στο 20% (Romanazzi et al., 2002). Αυτό συγκρίνεται με 75% μόλυνση σε μη επεξεργασμένα σταφύλια και 10% σε σταφύλια που έχουν υποστεί επεξεργασία με το μυκητοκτόνο procymidone. Μια εμβάπτιση χιτοζάνης μετά τη συγκομιδή μείωσε τη συχνότητα και τη σοβαρότητα της σήψης του τσαμπιού από *B.cinerea* με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του διαλύματος σε χιτοζάνη, με 1% χιτοζάνη την πιο αποτελεσματική θεραπεία. Μελέτες αμπελώνων έδειξαν ότι, η εφαρμογή διαλύματος χιτοζάνης 0,01% κάθε 10 ημέρες από την ανθοφορία έως τη συγκομιδή μείωσε τη σήψη των τσαμπιών από *B.cinerea* κατά περίπου 80% στα σταφύλια Chardonnay. Αυτό σε σύγκριση με τον έλεγχο της

νόσου κατά 40% με τη χρήση ενός τυπικού βιομηχανικού προγράμματος μυκητοκτόνου (Elmer & Reglinski, 2006).

Φυτικά εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα από τα φύλλα του φυτού *Reynoutria sachalinensis*, έχουν αποδειχθεί ότι είναι ένας ισχυρός διεγέρτης άμυνας και ότι ελέγχουν το ωίδιο (Fofana et al., 2002). Εμπορευματοποιημένα σκευάσματα του *R.sachalinensis* με την επωνυμία “Milsana, BASF” παρήχθησαν στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Αυτό το προϊόν περιέχει 5% του αιθανολικού εκχυλίσματος του *R.sachalinensis*. Σε δοκιμές σε αμπελώνες στη Γερμανία μεταξύ 1999 και 2001, το “Milsana” εφαρμόστηκε κάθε 7-10 ημέρες μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης του ωιδίου και του *B.cinerea* στον ίδιο βαθμό ή καλύτερα από το θείο και προϊόντα που περιέχουν χαλκό (Schmitt et al., 2002). Στις ΗΠΑ, οκτώ εφαρμογές με το παρασκεύασμα “Milsana” κατά τη διάρκεια της σεζόν μείωσαν τη σοβαρότητα του ωιδίου των φύλλων κατά 75% σε σύγκριση με τους μάρτυρες χωρίς επεξεργασία, ενώ τέσσερις εφαρμογές, που εφαρμόστηκαν μεταξύ της καρπόδεσης και της συγκομιδής, μείωσαν τη συχνότητα εμφάνισης του *B.cinerea* στις συστάδες σταφυλιών κατά 50% (Schilder et. al., 2002).

Το προϊόν Synermix από την εταιρία “Laboratoires Goëmar” περιέχει εκχύλισμα φυκιών και $AlCl_3$, έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί συσσώρευση ρεσβερατρόλης σε φύλλα αμπέλου των ποικιλιών Pinot noir και Rupestris du Lot. Η συσσώρευση ρεσβερατρόλης ήταν μεγαλύτερη στο Rupestris du Lot, υποδεικνύοντας ότι η προκαλούμενη συσσώρευση εξαρτάται από την ποικιλία (Jeandet et al., 1996, 2000).



Εικόνα 2.13. Η εξέλιξη της ανάπτυξης του *B.cinerea* κατά την επίδραση κατασταλτικών ουσιών. Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του Qili Li του άρθρου «Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit» του βιβλίου *Biological Control* των εκδόσεων Elsevier

Βιβλιογραφία

- Νικολάου Ν.Α. (2011). Ποσοτικά μεγέθη και χαρακτηριστικά της αμπελοκαλλιέργειας στην Ελλάδα. *Αμπελουργία* 1.4: 20-23.
- Ναβροζίδης Ε. και Κατερίνης Σ. (2015). Βασικές έννοιες και αρχές φυτοπροστασίας 7-261
- Ρούμπος Ι. και Ρούμπου Α. (2016). Μυκητολογικές ασθένειες. 19-21,61-70
- Adrian M., Jeandet P., Veneau J., Weston L.A., Bessis R., (1997). Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* **23**: 1689–1702.
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2003), *Essential cell biology* Chap. **16**: 661-708
- Aziz A., Heyraud A., Lambert B., (2004). Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* **218**: 767–774.
- Aziz A., Pionssot B., Daire X., Adrian M., Bezier A., Lambert B., Joubert J.M., Pugin A., (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **16**: 1118–1128.
- Backhouse D. and Willets H.J. (1984). A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Can. J. Microbiol.* **30**:171–178.
- Bartnicki-Garcia S. (1969). Cell wall differentiation in the Phycomycetes. *Phytopathology* **59**: 1065-1071
- Beever R.E. and Weeds P.L. (2004). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 29–52.
- Ben Shalom N., Ardi R., Pinto R., Aki C., Fallik E., (2003). Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection* **22**: 285–90.
- Bezier A., Lambert B., Baillieul F., (2002). Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 111–20.

- Blakeman J.P. (1975). Germination of *Botrytis cinerea* conidia in vitro in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. *Transactions of the British Mycological Society* Vol. **65**: 239–247.
- Bölker M. (1998). Sex and crime: Heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis, *Fungal Genetics and Biology* **25**: 143-156
- Bowen P., Menzies J., Ehret D., Samuels L., Glass A.D.M., (1992). Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **17**: 906–12.
- Chardonnet C., L’Hyvernay A.L., Doneche B., (1997). Effect of calcium treatment prior to *Botrytis cinerea* infection on the changes in pectic composition of grape berry. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**: 213–218.
- Cole, L., Dewey, F.M. and Hawes, C.R. (1996). Infection mechanisms of *Botrytis* species: pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycol. Res.* **100**: 277–286.
- Coley-Smith J.R. (1980). Sclerotia and other structures in survival. In: *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK, pp. 85-114
- Cote F. and Hahn M.G. (1994). Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* **26**: 1379–1411.
- Cote F., Roberts K.A. and Hahn M.G. (2000). Identification of highaffinity binding sites for the hepta-beta-glucoside elicitor in membranes of the model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Planta* **211**: 596–605.
- Davies C. and Robinson S.P. (2000). Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiology* **122**: 803–812.
- Derckel J.P., Baillieul F., Manteau S., Audran J.C., Haye B., Lambert B. and Legendre L. (1999) Differential induction of grapevine defences by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **89**: 197-203
- Doehlemann G., Berndt P., Hahn M. (12/2005), Different signalling pathways involving a Gα protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Molecular Microbiology* **59**: 821-835

- Doehlemann G., Molitor F., Hahn M. (2005), Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics Biology* **42**: 601–610.
- Doss RP, Potter SW, Chastagner GA and Christian JK (1993) Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1786-1791
- Doss RP, Potter SW, Christian JK, Soeldner AH and Chastagner GA (1997) The conidial surface of *Botrytis cinerea* and several other *Botrytis* species. *Canadian Journal of Botany* **75**: 612-617
- Doss, R.P., Deisenhofer, J., Von Nidda, H.A.K., Soelder, A.H. and McGuire, R.P. (2003) Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, **63**: 687–691.
- Duxbury M., Hotter G.S., Reglinski T., Sharpe N., (2004). Effect of chitosan and 5-chlorosalicylic acid on total phenolic content of grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **55**: 191–194.
- El Ghaouth A, (1997). Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**: 160–2.
- Elmer G. and Reglinski T. (2006), Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* **55**: 155–177
- Engelbrecht, R.W. (2002) The role of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, in *Botrytis* bunch rot on grape. MSc thesis, University of Stellenbosch, South Africa.
- Epton HAS and Richmond DV (1980) Formation, structure and germination of conidia. In: *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK, 41-83
- Faretra F, Antonacci E (1987) Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de bary) Whetz. Under controlled environmental conditions. *Phytopathol Mediterr* **26**:29–35
- Faretra F, Antonacci E, Pollastro S (1988) Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Microbiology* **134**: 2543–2550
- Fermaud, M. and Gaunt, R.E. (1995) Thrips *obscuratus* as a potential vector of *Botrytis cinerea* in kiwifruit. *Mycol. Res.* **99**: 267–273.
- Fofana B, McNally DJ, Labbe C, Boulanger R, Benhamou N, Seguin A, Belanger RR, (2002). Milsana-induced resistance in powdery mildew-infected cucumber plants correlates

- with the induction of chalcone synthase and chalcone isomerase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**: 121–32.
- Forsberg H., Ljungdahl P.O. (2001), Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* Chap. **40**: 91–109.
- Fukumori Y, Nakajima M, Akuts K (2004) Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. *J Gen Plant Pathology* **70**:256–260.
- Gabler FM, Smilanick JL, Mansour M, Ramming DW, Mackey BE, 2003. Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **93**: 1263–73.
- Giannakis C, Bucheli CS, Skene KGM, Robinson SP, Scott NS, 1998. Chitinase and beta-1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **4**: 14–22.
- Girbardt M (1969) Die Ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhypen. *Protoplasma* **67**: 413-441
- Goetz G, Fkyerat A, Metais N, Kunz M, Tabacchi R, Pezet R, Pont V, 1999. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52**: 759–67.
- Gorbatenko IY, Onishchuk IA, Krivtsov GG, Vanyushin BF, 1996. Eliciting and growth-regulating effects of chitosan on plants. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences* **23**: 327–30.
- Govrin EM, Levine A, 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**:751–757.
- Gull K and Trinci APJ (1971) Fine structure of spore germination in *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* **68**: 207-220
- Hammerschmidt R, 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 77–84.
- Harrison, J.G. and Lowe, R. (1987) Wind dispersal of conidia of *Botrytis* spp. pathogenic to *Vicia faba*. *Plant Pathology* **36**: 5–15.
- Harrison, J.G., Lowe, R. and Williams, N.A. (1994) Humidity and fungal diseases of plants — Problems. In: *Ecology of Plant Pathogens*, Wallingford: CAB International 79–97.

- Harman G.E., Latorre B., Agosin E., San Martin R., Riegel D.G., Nielsen P.A., Tronsmo A., Pearson R.C. (1996). Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biological Control* **7**: 259–66.
- Harman G.E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* **84**: 377–93.
- Haware M.P., McDonald D. (1992). Integrated management of botrytis gray mold of chickpea. In “*Botrytis* gray mold of chickpea”. Patancheru, India. 3–6.
- Hawker L.E. and Hendy R.J. (1963). An electron-microscope study of germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* **33**: 43-46
- Holz G. (1999). Behaviour and infection pathways of diverse fungal pathogens on fruit. In: Conference Handbook, 12th Biennial Australasian Plant Pathology Society Conference, Canberra, Australia, p.257
- Holz G., Gutschow M., Coertze S., Calitz F.J. (2003). Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease suppression at different positions on leaves and bunches of grape. *Plant Disease* **87**: 351–358.
- Holtz G., Coertze S., Williamson B. (2004). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: *Botrytis : biology, pathology and control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 9–24
- Hsiang T., Chastagner G.A. (1992). Production and viability of sclerotia from fungicide resistant and sensitive isolates of *B. cinerea* , *B. elliptica* and *B. tulipae* . *Plant Pathology* **41**: 600–605
- Inoue H.. and Tani K. (2014). Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ.* **21**: 39–49.
- Iriti M., Rossoni M., Borgo M., Faoro F. (2004). Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 4406–4413.
- Janisiewicz W.J., Korsten L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* **40**:411–441.
- Jarvis W.R. (1962a) The dispersal of spores of *Botrytis cinerea* Fr. in a raspberry plantation. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **45**: 549–559.
- Jarvis, W.R. (1962b) Splash dispersal of spores of *Botrytis cinerea* Pers. *Nature (London)*, **193**: 599.

- Jarvis P. (2001), *Biopesticides: Trends and Opportunities*. Richmond, PJB Publications Ltd., London, 45–50.
- Jehandet P., Adrian M., Joubert J.M., Hubert F., Bessis R. (1996). Stimulating the natural defences of grape. A complement to phytosanitary control of *Botrytis*. *Phytoma* **488**: 21–25.
- Jehandet P., Adrian M., Breuil A.C., Sbaghi M., Debord S., Bessis R., Weston L.A., Harmon R. (2000). Chemical induction of phytoalexin synthesis in grapevines: application to the control of grey mould in the vineyard. *Acta Horticulturae* **528**: 591–596.
- Jehandet P., Bessis R., Gaugheron B. (1991). The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture* **42**: 41–46.
- Jehandet P., Bessis R., Sbaghi M., Meunier P. (1995). Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *Journal of Phytopathology* **143**: 135–139.
- Jehandet P, Douillet Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M, 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 2731–2741.
- Keller M., Viret O., Cole M. (2003). *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency and disease expression. *Phytopathology* **93**: 316–322.
- Knogge W. (1996). Fungal infection of plants. *The Plant Cell* **8**: 1711-1722
- Kosuge T., Hewitt W.B. (1964). Exudates of grape berries and their effect on germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* Vol. **5**: 167-172
- Kraeva E, Andary C, Carbonneau A, Deloire A (1998). Salicylic acid treatment of grape berries retards ripening. *Vitis* **37**: 143–144.
- Larronde F, Gaudillere JP, Krisa S, Decendit A, Deffieux G, Merillon JM, (2003). Airborne methyl jasmonate induced stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *American Journal of Enology and Viticulture* **54**: 63–66.
- Latorre BA, Agosin E, Martin Rs Vasquez GS, San Martin R (1997). Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection* **16**: 209–214.

- Latorre BA, Spadaro I, Rioja ME (2002). Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection* **21**: 957–961.
- Leroux P, (2004). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 195–222.
- Liswidowati Melchior F, Hohmann F, Schwer B, Kindl H, 1991. Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells. *Planta* **183**: 307–314.
- Miceli A, Ippolito A, Linsalata V, Nigro F, (1999). Effect of preharvest calcium treatments on decay and biochemical changes in table grape during storage. *Phytopathologia Mediterranea* **38**: 47–53.
- Mitchell TK and Dean RA (1995), The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* **7**: 1869-1878.
- Mendgen K, Bachem U, Stark-Urnau M and Xu H (1995) Secretion and endocytosis at the interface of plants and fungi. *Canadian Journal of Botany (Suppl. 1)* **73**(S): 640-648
- Nassr S, Bakarar R (2013) Effect of factors on conidium germination of *Botrytis cinerea* in vivo . *Int J Plant Soil Sci* **2**: 41–54
- Ning J, Heng LS, Kong FZ, 2002. A highly efficient synthesis of an octasaccharide, the repeating unit of the cell-wall mannan of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*. *Carbohydrate Research* **337**: 1159–1164.
- O'Neill TM, Elad Y, Shtienberg D, Cohen A (1996). Control of grapevine grey mould with *Trichoderma harzianum* T39. *Biocontrol Science and Technology* **6**: 139–146.
- Pajeroska-Mukhtar K.M., Emerine D.K. and Mukhtar M.S. (2013). Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends Plant Sci.* **18**: 402–411.
- Petre B. and Kamoun S. (2014). How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? *PLoS Biol.* **12**: e1001801.
- Pezet R and Pont V (1990) Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* Pers. *Journal of Phytopathology* **129**: 19-30
- Pieterse CMJ, Van Pelt JA, Van Wees SCM, Ton J, Leon-Kloosterziel KM, Keurentjes JJB, Verhagen BWM, Knoester M, Van der Sluis I, Bakker PAHM, Van Loon LC, (2001). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 51–61.

- Pour-Nikfardjam M, Patz CD, Kauer R, Schultz H, Dietrich H, 1999. A modified HPLC method to detect salicylic acid in must and wine after its application in the field to induce fungus resistance. *Vitis* **38**: 179–82.
- Reape T.J., Molony E.M. and McCabe P.F. (2008). Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *J. Exp. Bot.* **59**: 435–444.
- Reglinski T, Poole PR, Whitaker G, Hoyte SM, 1997. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in kiwifruit leaves. *Plant Pathology* **46**: 716–21.
- Reglinski T, Taylor JT, Dick MA, 2004. Chitosan induces resistance to pitch canker in *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science* **43**: 49–58.
- Reglinski T, Elmer PAG, Taylor JT, Parry FJ, Marsden R, Wood PN, 2005. Suppression of *Botrytis* bunch rot in Chardonnay grapevines by induction of host resistance and fungal antagonism. *Australasian Plant Pathology* **34**: 481–488.
- Repka V, Fischerova I, Silharova K, (2001). Biological activity of the elicitor released from mycelium of a grapevine isolate of the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Vitis* **40**: 205–212.
- Raven P., Evert R. and Eichhorn S. (2014). Βιολογία του φυτικού κυττάρου. Βιολογία των Φυτών **1**: 20-90.
- Richmond DV and Pring RJ, (1971) Fine structure of *Botrytis fabae* Sacc. conidia. *Annals of Botany* **35**: 175-182.
- Rijkenberg FHJ, Leeuw GTN de and Verhoeff K (1980) Light and electron microscope studies on the infection of tomato fruits by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany* **58**: 1394-1404
- Robert N, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, Esnault R, Buffard D, (2002). Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Science* **162**: 389–400.
- Romanazzi G, Nigro E, Ippolito A, Di Venere D, Salerno M, (2002). Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science* **67**: 1862–1867.
- Rosslenbroich HJ, Stuebler D, (2000). *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* **19**: 557–561.
- Salinas J. and Verhoeff K. (1995) Microscopical studies of the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **101**: 377-386.

- Sarig P, Zutkhi Y, Lisker N, Shkelerman Y, Ben Arie R, Bielski R, Laing W, Clark C, 1998. Natural and induced resistance of table grapes to bunch rots. *Acta-Horticulturae* **464**: 65–70.
- Sbaghi M, Jeandet P, Faivre B, Bessis R, Fournioux JC, 1995. Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine in vitro cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). *Euphytica* **86**: 41–47.
- Schilder A, Gillet J, Sysak R, Wise J, 2002. Evaluation of environmentally friendly products for control of fungal diseases of grapes. *Proceedings of the 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture, Weinsberg, Germany*. Weinsburg, Germany: FOKO, 163–167.
- Schmitt A, Kunz S, Nandi S, Seddon B, Ernst A, 2002. Use of *Reynoutria sachalinensis* plant extracts, clay preparations and *Brevibacillus brevis* against fungal diseases of grape berries. *Proceedings of the 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems Organic Fruit-Growing and Viticulture Weinsberg, Germany*. Weinsburg, Germany, 146–151.
- Schulze Gronover C., Kasulke D., Tudzynski P. and Tudzynski B. (2001), The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **14**: 1293–1302.
- Schulze Gronover C., Schorn C. and Tudzynski B. (2004), Identification of *Botrytis cinerea* genes upregulated during infection and controlled by the G α subunit BCG1 using suppression subtractive hybridization (SSH). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 537- 546
- Sesan T, Oprea M, Podosu Cristescu A, Tica C, Oancea F, 1999. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine with *Trichoderma* spp. and *Saccharomyces chevalieri*. *Bulletin of the Polish Academy of Biological Sciences* **47**: 197–205.
- Sharp JK, McNeil M, Albersheim P, 1984. The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa (beta-d-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* *Journal of Biological Chemistry* **259**: 11321-11336.
- Spadaro D, Gullino ML, 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection* **24**: 601–13.

- Staswick PE, Lehman CC, 1999. Jasmonic acid-signaled responses in plants. In: Agrawal AA, Tuzun S, Bent E., Induced Plant Defences Against Pathogens and Herbivores. St. Paul, MN, USA: APS Press, 117–360.
- Tenberge, K.B. (2004) Morphology and cellular organization in *Botrytis* interactions with plants. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 67–84.
- Thomas AC, Matthee FN and Kotze JM (1983) Survival of *Botrytis cinerea* as mycelium in vine prunings as affected by different methods of weed control. XVIII Congress International de la vigne et du vin de **O.I.V.**: 209-221
- Topfer R, Eibach R, 2002. Breeding for organic wine production. *Beitrage zur Zuchtungsforschung – Bundesanstalt fur Zuchtungsforschung an Kulturpflanzen* **8**: 55–62.
- Tully J.P., Hill A.E., Ahmed H.M., Whitley R., Skjellum A. and Mukhtar M.S. (2014). Expression-based network biology identifies immunerelated functional modules involved in plant defense. *BMC Genomics* **15**: 421.
- Urbasch I (1983) On the genesis and germination of chlamydospores of *Botrytis cinerea* . *J Phytopathol* **108**: 54–60.
- Verhoeff K (1980) The infection process and host-pathogen interactions. In *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK, 153-180.
- Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V.G. and Cole, M.F. (2004) *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology*, **94**: 850–857.
- Waters EJ, Hayasaka Y, Tattersall DB, Adams KS, Williams PJ, 1998. Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 4950–4957.
- Weiberg A., Wang M., Feng-Mao L., Zhao H., Zhang Z., Kaloshian I., Huang H. and Jin H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science (New York, N.Y.)*, **342**: 118–123.
- Williamson B, Duncan GH, Harrison JG, Harding LA, Elad Y and Zimand G (1995) Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **99**: 1303-1310

- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. and Van Kan J. (2007), Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* (8) **5**: 561–580
- Wilson CL, El Ghaouth A, Chalutz E, Droby S, Stevens C, Lu JY, Khan V, Arul J, 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease* **78**: 837–44.
- Woodford, J.A.T., Williamson, B. and Gordon, S.C. (2002) Raspberry beetle damage decreases shelf-life of raspberries also infected with Botrytis cinerea. *Acta Hortic.* **585**: 423–426.
- Yamaguchi T, Yamada A, Hong N, Ogawa T, Ishii T, Shibuya N, 2000. Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *The Plant Cell* **12**: 817–26.