

**ΜΑΡΙΑ Κ. ΗΛΙΑΔΗ**

**Μοριακή ταυτοποίηση, αξιολόγηση παθογένειας και  
βιοσύνθεσης φουμονισινών  
διαφόρων στελεχών των μυκήτων  
*Fusarium proliferatum* και *Fusarium verticillioides*  
σε γενετικό υλικό καλαμποκιού**

**Μεταπτυχιακή διατριβή υποβληθείσα στο  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

**Αθήνα 2015**

**ΜΑΡΙΑ Κ. ΗΛΙΑΔΗ**

**Μοριακή ταυτοποίηση, αξιολόγηση παθογένειας και  
βιοσύνθεσης φουμονισινών διαφόρων στελεχών των μυκήτων  
*Fusarium proliferatum* και *Fusarium verticillioides*  
σε γενετικό υλικό καλαμποκιού**

**Μεταπτυχιακή διατριβή υποβληθείσα στο  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Επιβλέπων: Δ.Ι. Τσιτσιγιάννης, Επίκουρος Καθηγητής  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
ΠΜΣ: Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας**



**Αθήνα 2015**

**ΜΑΡΙΑ Κ. ΗΛΙΑΔΗ**

**Μοριακή ταυτοποίηση, αξιολόγηση παθογένειας και  
βιοσύνθεσης φουμονισινών διαφόρων στελεχών των μυκήτων**

***Fusarium proliferatum* και *Fusarium verticillioides***

**σε γενετικό υλικό καλαμποκιού**

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

**Τριμελής Επιτροπή**

**Επιβλέπων: Δ.Ι. Τσιτσιγιάννης, Επίκουρος Καθηγητής**

**Μέλη: Ε.Ι. Παπλωματάς, Καθηγητής**

**Π.Π. Αντωνίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια**

## Περίληψη

Οι μύκητες *Fusarium proliferatum* και *F. verticillioides* προκαλούν σήψεις σπαδικών στην καλλιέργεια του αραβόσιτου, ενώ παράλληλα παράγουν φουμονισίνες, μυκοτοξίνες με καρκινογόνο δράση και ιδιαιτέρως επιβλαβείς για την άνθρωπο και τα ζώα. Η εξέλιξη της μόλυνσης από τα διάφορα είδη *Fusarium* spp. και η παραγωγή φουμονισινών ξεκινά όταν οι σπόροι του καλαμποκιού βρίσκονται στη φυσιολογική τους ωρίμανση και αυξάνεται μέχρι το στάδιο της συγκομιδής. Ένας από τους αποτελεσματικότερους τρόπος αντιμετώπισης των μυκήτων αυτών και μείωσης των αρνητικών επιπτώσεων των φουμονισινών είναι η καλλιέργεια ανθεκτικών υβριδίων. Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν να γίνει α) αξιολόγηση γενετικού υλικού καλαμποκιού για την επιλογή ανθεκτικών ή ανεκτικών υβριδίων ως προς τη μόλυνση τους από τους μύκητες *F. verticillioides* και *F. proliferatum* και την παραγωγή φουμονισινών, και β) χαρακτηρισμός διαφόρων ελληνικών στελεχών *Fusarium* spp. τα οποία απομονώθηκαν από φυτά καλαμποκιού ως προς τη μολυσματικότητα και παραγωγή φουμονισινών τους.

Προκαταρκτικά πειράματα παθογένειας *in vitro* σε σπόρους καλαμποκιού έδειξαν σημαντική μείωση συμπτωμάτων σήψης σε μερικά υβρίδια, καθώς και μείωση παραγωγής κονιδίων και φουμονισινών μετά από μόλυνση με μίγμα τεσσάρων διαφορετικών στελεχών *F. verticillioides* και *F. proliferatum*. Μετά την ολοκλήρωση των *in vitro* πειραμάτων, έγινε επιλογή 30 υβριδίων με μειωμένα ποσοστά σοβαρότητας ασθένειας, μειωμένη παραγωγή κονιδίων και φουμονισινών τα οποία καλλιεργήθηκαν σε πειραματικό αγρό του ΓΠΑ. Οι σπάδικες των υβριδίων μολύνθηκαν με αιώρημα κονιδίων τεσσάρων διαφορετικών στελεχών *F. verticillioides* και *F. proliferatum*, κατά τη διάρκεια του μεταξώματος. Η αξιολόγηση των συμπτωμάτων και η επιμόλυνση με φουμονισίνες πραγματοποιήθηκε στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Τα αποτελέσματα της σοβαρότητας της ασθένειας έδειξαν σημαντική παραλλακτικότητα στις μολύνσεις από 10% ως 75% ενώ τα αποτελέσματα της βιοσύνθεσης φουμονισινών οδήγησε στην επιλογή 10 υβριδίων τα οποία παρήγαγαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα φουμονισινών, από 235-545 ppm.

Σε μια περαιτέρω προσπάθεια να βρεθούν ελληνικά στελέχη *Fusarium* spp. από καλλιέργειες καλαμποκιού, μολυσμένοι σπόροι από αγρούς της Θεσσαλίας συλλέχθηκαν και δημιουργήθηκε μια συλλογή 45 απομονώσεων. Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν μοριακά με τη χρήση εκκινητών που ενίσχυαν δύο διαφορετικούς γενετικούς τόπους, του γονιδίου της καλμοντουλίνης (CAM) και του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Τα αποτελέσματα της μοριακής και φυλογενετικής ανάλυσης έδειξαν ότι όλα τα στελέχη ανήκουν στο είδος *F. verticillioides*, με ένα στέλεχος (E24) να διαφοροποιείται αρκετά από τα υπόλοιπα στελέχη. Για τη διερεύνηση της παραλλακτικότητας των διαφόρων ελληνικών απομονώσεων επιλέχθηκαν δύο ανεκτικά υβρίδια καλαμποκιού στην παραγωγή φουμονισινών από *F. verticillioides* και πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας που έδειξαν

σημαντική παραλλακτικότητα ως προς τη σοβαρότητα της ασθένειας, την παραγωγή κονιδίων και φουμονισινών.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης οδήγησαν: α) στην επιλογή ανεκτικών ποικιλιών καλαμποκιού στις επιμολύνσεις από φουμονισίνες από μύκητες του γένους *F. verticillioides* και *F. proliferatum* και β) στη δημιουργία της πρώτης ελληνικής συλλογής 45 απομονώσεων *F. verticillioides* από καλλιέργειες καλαμποκιού που έδειξε σημαντική παραλλακτικότητα ως προς τη μολυσματικότητα και την παραγωγή φουμονισινών.

## **Elucidation of the interactions between the mycotoxigenic fungi *Fusarium proliferatum* - *Fusarium verticillioides* and maize germplasm**

*Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* cause ear and grain rots and produce the carcinogenic mycotoxins fumonisins in maize that are very harmful to human and animal health. *Fusarium* infection and fumonisin contamination occur as maize kernels reach to physiological maturity, and increase during the season up to the average harvest date. A major strategy to control these pathogens and to reduce the detrimental effects of fumonisins is breeding of less susceptible plant genotypes. The objectives of the current study were to characterize at species level different *Fusarium* species isolated from maize plants in Greece and to evaluate a number of hybrid lines after infection with a mixture of four different *F. verticillioides* and *F. proliferatum* strains. The goal was to collect data on disease incidence and severity and fumonisin production and if there is a positive association between visible symptoms caused by *Fusarium* infection and mycotoxin concentration. In *in vitro* experiments of corn kernels infections, a number of hybrids showed a significant reduction in symptom development and in conidia and fumonisins production by the mixture of the four different *Fusarium* strains. The hybrids that showed significant resistance are currently evaluated in field trials and at molecular level to investigate if genes involved in plant defenses are activated. A better understanding of the resistance mechanisms would facilitate the implementation of strategic agriculture to breeding of resistant germplasm and to contribute to reduction of ear rot and production of fumonisins in maize.

Στον παππού μου....

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Δημητρίου Τσιτσιγιάννη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου Δ. Τσιτσιγιάννη, ο οποίος μου εμπιστεύτηκε το συγκεκριμένο επιστημονικό θέμα, το οποίο ήταν απαιτητικό αλλά ιδιαιτέρως ενδιαφέρον. Η επικοινωνία ήταν συνεχής και η ανταλλαγή απόψεων είχε ως αποτέλεσμα την επίλυση των διαφόρων ζητημάτων που προέκυψαν κατά την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών. Το ενδιαφέρον του και η καθοδήγησή του συνετέλεσαν στην κατανόηση των σύγχρονων και πολύπλοκων εργαστηριακών τεχνικών. Τέλος, η συμβολή του στη συγγραφή της παρούσας μελέτης και οι εύστοχες διορθώσεις του, είχαν ως αποτέλεσμα την αρτιότερη απόδοση του κειμένου.

Ουσιαστική ήταν η συμβολή του Καθηγητή Επαμεινώνδα Παπλωματά για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Ο Δρ. Παπλωματάς είχε συνεχή επικοινωνία μαζί μου και οι συμβουλές του με βοήθησαν τόσο στην πειραματική διαδικασία όσο και στην συγγραφή του μεταπτυχιακού. Τον ευχαριστώ επίσης για το ενδιαφέρον του και την συμπαράστασή του τα χρόνια της παραμονής μου στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας.

Θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πολύμνια Αντωνίου που παρακολουθούσε την πρόοδό μου τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο και ήταν πρόθυμη να με συμβουλέψει σε όλα τα στάδια του πειράματός μου. Παράλληλα θέλω να την ευχαριστήσω για την αγάπη και την προστασία που μου εξασφάλισε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Μυρτώ Δημακοπούλου για τις ευχάριστες συζητήσεις μας και το απaráμιλλο ενδιαφέρον της, την Επίκουρο Καθηγήτρια Ελισάβετ Χατζηβασιλείου για την παραχώρηση του εξοπλισμού για την ανάλυση των μυκοτοξινών, τον Επίκουρο Καθηγητή Σωτήριο Τζάμο για την συμπαράσταση του καθόλη τη διάρκεια της διατριβής αυτής, τη Λέκτορα Αλίκη Τζίμα καθώς υπήρξε πολύ καλός συνομιλητής καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο περιβάλλον εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον Ομότιμο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας Ελευθέριο Τζάμο, ο οποίος μου έδωσε το έναυσμα να αφοσιωθώ στην επιστήμη της Φυτοπαθολογίας και στήριξε τα βήματά μου.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Γεωργίας, Δημήτριο Μπιλάλη, ο οποίος με συμβούλευε διαρκώς όσον αφορά το πείραμα του αγρού για την καλλιέργεια του καλαμποκιού, καθώς πραγματοποιούσε



και συχνές επισκέψεις στον πειραματικό αγρό, με στόχο την επίβλεψη της εξέλιξης της καλλιέργειας.

Κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης, πέραν της απόκτησης γνώσεων και εμπειριών σε επιστημονικό επίπεδο, σημαντική ήταν και η δημιουργία μιας δυνατής φιλίας. Ευχαριστώ μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Άννα Γκατζούνη της οποίας η παρουσία και βοήθεια, τόσο σε πειραματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο ήταν κομβική για τη διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα να πω επίσης να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Λαγογιάννη, για την βοήθεια και συμπαράσταση της, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μου στον αγρό του Γ.Π.Α.. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μου στον αγρό του Γ.Π.Α δέχτηκα επίσης βοήθεια και από φοιτητές που πραγματοποιούσαν την πρακτική τους εκείνη την περίοδο στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας. Θέλω λοιπόν να πω ένα ευχαριστώ στον Νίκο Μαστροδήμο, στην Ελισάβετ Βαρβούνη, στην Κέλλυ Αρκουμανέα, στην Κατερίνα Αρσένη, στην Ειρήνη Κίσσα, στην Μαρίνα Ανδριολάτου, στον Μαρίνο Σταματελάτο και τον υποψήφιο διδάκτορα Μιχάλη Καμινιάρη, για την στήριξη και βοήθειά τους σε μια περίοδο αρκετά απαιτητική και δύσκολη για μένα.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Paola Battilani από το Πανεπιστήμιο Cattolica (Faculty of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Università Cattolica del S. Cuore di Piacenza), καθώς και το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο για την παραχώρηση μυκοτοξικογόνων μυκήτων του γένους *Fusarium*.

## Περιεχόμενα

|  |    |
|--|----|
| 1. Εισαγωγή.....   | 4  |
| 1.1 Σήψεις σπάδικα (Ear Rots).....   | 5  |
| 1.1.1 Κόκκινη σήψη σπάδικα (Red Ear Rot).....  | 5  |
| 1.1.2 Ροζ σήψη σπάδικα (Pink Ear Rot).....   | 8  |
| 1.1.3 Μέτρα αντιμετώπισης.....   | 10 |
| 1.2 Το γένος <i>Fusarium</i> sp. ....  | 13 |
| 1.2.1 Ο μύκητας <i>Fusarium graminearum</i> .....  | 14 |
| 1.2.2 Ο μύκητας <i>Fusarium verticillioides</i> .....  | 15 |
| 1.2.3 Ο μύκητας <i>Fusarium proliferatum</i> .....   | 16 |
| 1.2.4 Μοριακή ταυτοποίηση ειδών <i>Fusarium</i> sp. ....   | 17 |
| 1.3 Μυκοτοξίνες.....   | 19 |
| 1.3.1 Φουμονισίνες.....  | 21 |
| 1.3.2 Τριχοθηκίνες.....  | 23 |
| 1.3.3 Ζεαραλενόνη.....   | 24 |
| 1.4 Η καλλιέργεια του καλαμποκιού.....   | 26 |
| 1.4.1 Η χρήση των υβριδίων στην αντιμετώπιση των σήψεων σπάδικα στην καλλιέργεια του καλαμποκιού.....  | 28 |
| 1.4.2 Διερεύνηση μεταγραφικών και μεταβολομικών αλλαγών κατά τη μόλυνση υβριδίων καλαμποκιού με τους μύκητες του γένους <i>Fusarium</i> sp. .... | 29 |
| 2. Σκοπός μελέτης.....   | 33 |
| 3. Υλικά και Μέθοδοι.....  | 34 |
| 3.1 Μόλυνση σπόρων υβριδίων <i>in vitro</i> .....  | 34 |
| 3.2 Μέτρηση φουμονισινών.....  | 35 |
| 3.3 Μόλυνση καλαμποκιών στον αγρό.....   | 37 |

|   |    |
|---|----|
| 3.4 Απομόνωση μυκήτων του γένους <i>Fusarium</i> από σπόρους καλαμποκιού.....   | 40 |
| 3.5 Διαδικασία ταυτοποίησης μυκήτων <i>Fusarium</i> sp.....   | 41 |
| 3.5.1 Διαχωρισμός με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά.....   | 41 |
| 3.5.1.1 <i>In vitro</i> αξιολόγηση ελληνικών στελεχών μυκήτων <i>Fusarium</i> spp. ....                                 | 41 |
| 3.5.2 Μοριακός χαρακτηρισμός.....   | 41 |
| 3.5.2.1 DNA Extraction.....   | 41 |
| 3.5.2.2 PCR reactions- PCR Purification Kit.....  | 42 |
| 3.5.2.3 Αλληλούχιση δειγμάτων.....  | 43 |
| 3.6 Φυλογενετική ανάλυση.....   | 43 |
| 4. Αποτελέσματα.....  | 45 |
| 4.1. Παραγωγή φουμονισινών από στελέχη των μυκήτων <i>Fusarium proliferatum</i> - <i>Fusarium verticillioides</i> ..... | 45 |
| 4.2 Αξιολόγηση <i>in vitro</i> .....  | 45 |
| 4.2.1 Αξιολόγηση μολυσματικότητας.....  | 45 |
| 4.2.2 Αξιολόγηση παραγωγής κονιδίων.....  | 47 |
| 4.2.3 Αξιολόγηση παραγωγής φουμονισινών.....  | 48 |
| 4.3 Μόλυνση στον αγρό.....  | 49 |
| 4.3.1 Αξιολόγηση μολυσματικότητας.....  | 49 |
| 4.3.2 Αξιολόγηση παραγωγής φουμονισινών.....  | 51 |
| 4.4 Ταυτοποίηση ελληνικών απομονώσεων του γένους <i>Fusarium</i> από ελληνικά καλαμπόκια.....                           | 52 |
| 4.4.1. Επιλογή ελληνικών απομονώσεων <i>Fusarium</i> spp. από καλαμπόκια.....   | 52 |
| 4.4.2. Μορφολογικός χαρακτηρισμός <i>Fusarium</i> spp. ....   | 52 |
| 4.4.3. Μοριακός χαρακτηρισμός <i>Fusarium</i> spp. ....   | 55 |
| 4.4.4 Φυλογενετική ανάλυση.....   | 56 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.5 Αξιολόγηση μολυσματικής ικανότητας ελληνικών απομονώσεων <i>F. verticillioides</i> και <i>F. proliferatum</i>.....</b> | <b>62</b> |
| <b>4.5.1 Αξιολόγηση μολυσματικότητας.....</b>   | <b>62</b> |
| <b>4.5.2 Αξιολόγηση παραγωγής κονιδίων.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>4.5.3 Αξιολόγηση παραγωγής φουμονισινών.....</b>   | <b>67</b> |
| <b>5. Συζήτηση- Συμπεράσματα.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>6. Βιβλιογραφία.....</b>   | <b>74</b> |
| <b>7. Παράρτημα.....</b>  | <b>82</b> |

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο αραβόσιτος (*Zea mays* L.) ή καλαμπόκι αποτελεί παγκοσμίως, ένα από τα βασικότερα είδη διατροφής. Καλλιεργείται κυρίως, για τη διατροφή ζώων σε ποσοστό 82%, με μόνο το 4% της παραγωγής να προορίζεται για κατανάλωση από τον άνθρωπο (υπό μορφή σπόρων σε διάφορα στάδια ωρίμανσης ή αλεσμένων προϊόντων), το 12% να χρησιμοποιείται για παραγωγή προϊόντων αμύλου και το 2% για άλλες χρήσεις (Battilani *et al.* 2010).

Οι κυριότερες ασθένειες και εχθροί της καλλιέργειας του καλαμποκιού με τα αντίστοιχα παθογόνα τους είναι οι ακόλουθες:

Ασθένειες (Μυκητολογικές και βακτηριολογικές): Τήξεις νεαρών φυταρίων (*Pythium* sp., *Diplodia zeae*, *Gibberella zeae*, *G. fugikuroi*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium* spp. και *Aspergillus* spp.), Σηψιρριζίες (*Pythium* sp., *Diplodia zeae*, *Gibberella zeae* και *G. fugikuroi*), Σήψεις στελέχους και σπαδικών (*Diplodia zeae* και *Gibberella zeae*), Μαύρη σήψη στελέχους (*Macrophomina phaseolina*), Βακτηριακή σήψη στελέχους (*Erwinia dissolvens*), Σήψη πυρήνων (*Gibberella fugikuroi*), Σήψη του άξονα του σπάδικα (*Nigrospora oryzae*), Κοινός άνθρακας του αραβοσίτου (*Ustilago maydis*), Άνθρακας των ταξιανθιών (*Sphacelotheca reiliana*), Ελμινθοσποριώσεις (*Helminthosporium turcicum*, *H. maydis* και *H. carbonum*), Σκωρίαση (*Puccinia sorghi*), Βακτηριακή κηλίδωση των φύλλων (*Xanthomonas stewartii*).

Εχθροί: Σιδηροσκώλικες (*Agriotes* spp. και *Melanotus* spp.), Αγρότιδες (*Agrotis* spp.), *Calendra maidis*, *Hylemya ciliocrura*, Είδη του γένους *Diabrotica*, Αφίδα των ριζών (*Anuraphis maidi- radidis*), Πράσινο σκουλήκι (*Heliothis armigera*), Πυραλίδα του αραβοσίτου (*Pyrausta nubilalis*), *Sesamia cretica*, *Blissus leucopterus*, Αφίδα των φύλλων του αραβοσίτου (*Aphis maydis*), *Laphygma exigua*, Ακρίδες.

Στη χώρα μας, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αυξημένο ποσοστό προσβολής από μύκητες του γένους *Fusarium* και *Aspergillus*, μύκητες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή μυκοτοξινών στην καλλιέργεια του καλαμποκιού.

## 1.1 Σήψεις σπάδικα (Ear Rots)

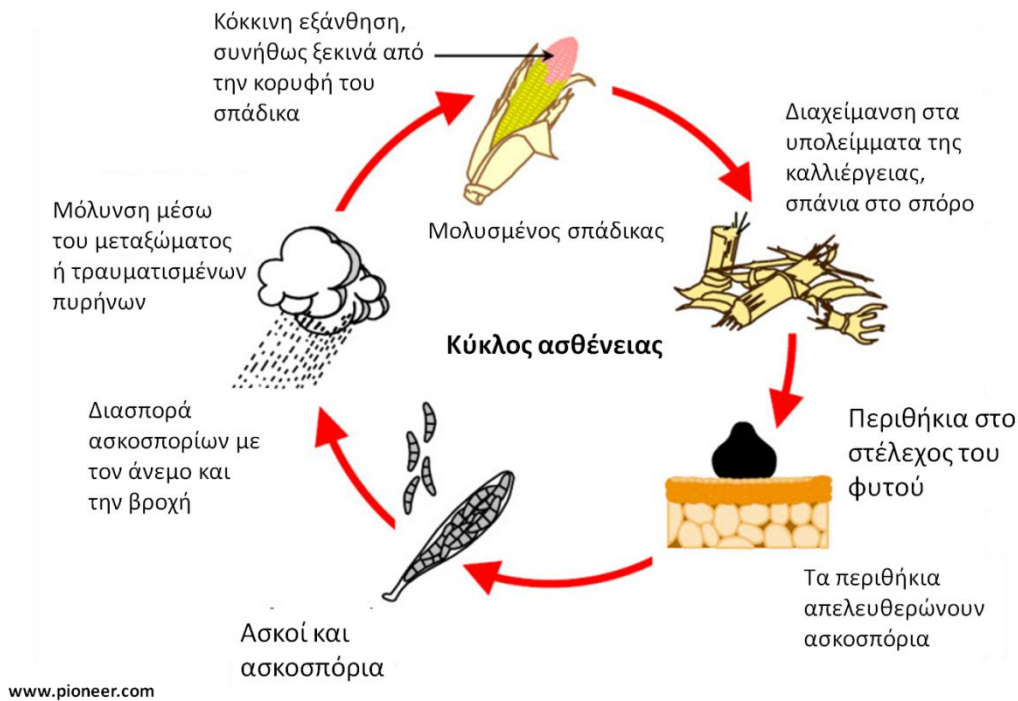
Μια από τις σημαντικότερες ασθένειες στην καλλιέργεια του αραβοσίτου, είναι οι σήψεις σπάδικα, με τους μύκητες του γένους *Fusarium* να αποτελούν τα κύρια παθογόνα αίτια της ασθένειας αυτής (Munkovold, 2003). Η επικράτηση και η εξάπλωση των μυκήτων που προκαλούν τη σήψη εξαρτάται α) από περιβαλλοντολογικούς παράγοντες, όπως θερμοκρασία και υγρασία, β) την προσβολή από έντομα και γ) τις καλλιεργητικές τεχνικές που συμβάλλουν στην εξέλιξη της ασθένειας (Bottalico, 1998; Munkovold *et al.*, 1997). Στην προσβεβλημένη με σήψεις σπαδικών καλλιέργεια καλαμποκιού παρατηρείται μείωση των αποδόσεων και υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος καθώς οι μύκητες αυτοί παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι καλούνται μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες αποτελούν σημαντικό πρόβλημα όσον αφορά την ασφάλεια των τροφίμων, δεδομένου ότι έχουν επιπτώσεις στην υγεία τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων (Bennett & Klich, 2003). Χημικά και αγρονομικά μέτρα, τα οποία στοχεύουν στην αντιμετώπιση της ασθένειας δεν είναι αποτελεσματικά, καθώς οι μύκητες του γένους *Fusarium* έχουν την ικανότητα να αποικίζουν ολόκληρο το φυτό χωρίς να προκαλούν συμπτώματα και μπορούν να μεταδοθούν από το σπόρο στο φυτό και μετέπειτα στους σπόρους του σπάδικα χωρίς συχνά αυτό να γίνει πολλές φορές αντιληπτό (Munkovold and Desjardins, 1997, Wilke *et al.* 2007). Οι σήψεις μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες ασθενειών, με βάση το παθογόνο αίτιο, την κόκκινη σήψη σπάδικα ή κόκκινη φουζαρίωση και την ροζ σήψη σπάδικα ή ροζ φουζαρίωση (Bottalico, 1998).

### 1.1.1 Κόκκινη σήψη σπάδικα (Red Ear Rot)

Η κόκκινη σήψη σπάδικα προκαλείται από το μύκητα *Gibberella zeae* (τέλεια μορφή). Ανήκει στη κατηγορία των ασκομυκήτων και η ατελής μορφή του καλείται *Fusarium graminearum*. Ο μύκητας επιβιώνει με τη μορφή περιθιγίων στα υπολείμματα της καλλιέργειας στην επιφάνεια του εδάφους (ΕΙΚ.1).

Κατά τη διάρκεια δροσερού και υγρού καιρού τα σπόρια του μύκητα παράγονται στους μολυσμένους ιστούς των υπολειμμάτων για ένα έως και τρία χρόνια μετά τη συγκομιδή της ευπαθούς καλλιέργειας. Τα ασκοσπόρια του μύκητα μεταφέρονται με τη βροχή ή τον αέρα στο μετάξωμα των φυτών καλαμποκιού, όπου βλαστάνουν κάτω από συνθήκες υψηλής υγρασίας. Ο μύκητας προσβάλλει το μετάξωμα οχτώ έως δέκα ημέρες μετά την εμφάνισή του. Μέσω του μεταξώματος εισέρχεται στο εσωτερικό του σπάδικα και προκαλεί σήψη. Οι σπόροι στο σπάδικα ξεκινούν να παίρνουν ένα σκούρο κόκκινο χρώμα, ενώ λίγο αργότερα ξεκινά να εμφανίζεται η υπόλευκη- κόκκινη εξάνθηση του μύκητα στον προσβεβλημένο σπάδικα. Η σήψη ξεκινά από την κορυφή του σπάδικα και εκτείνεται προς τη βάση του (ΕΙΚ 2.). Η προσβολή μπορεί να προχωρήσει και στο μίσχο του σπάδικα, με εμφάνιση κοκκινωπού αποχρωματισμού του. Υγρός καιρός και ήπιες θερμοκρασίες την

περίοδο του μεταζώματος ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα. Ιδιαίτερα αυξημένες συγκεντρώσεις μυκοτοξινών έχουν παρατηρηθεί σε καλλιέργειες όπου η συγκομιδή έχει καθυστερήσει. Σημαντική παράμετρος στην αύξηση της συγκέντρωσης των μυκοτοξινών είναι οι συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του προϊόντος, όπου συνθήκες αυξημένης υγρασίας ευνοούν την αύξηση της συγκέντρωσης των μυκοτοξινών (Vincelli & Parker, 2002).



**Εικόνα 1.** Κύκλος ασθένειας του μύκητα *F. graminearum*.



**Εικόνα 2.** Χαρακτηριστική κοκκινωπή εξάνθηση σε προσβεβλημένους σπάδικες από το μύκητα *F. graminearum*. Η προσβολή ξεκινά από την κορυφή του σπάδικα και προχωρά προς τη βάση του.



### 1.1.2 Ροζ σήψη σπάδικα (Pink Ear Rot)

Η ροζ σήψη σπάδικα είναι μια ασθένεια, η οποία έχει προκαλέσει προβλήματα σε καλλιέργειες ανά τον κόσμο, με τα παθογόνα αίτια να είναι οι μύκητες *Fusarium verticillioides* (τ.μ. *Gibberella moniliformis*), *Fusarium proliferatum* (τ.μ. *Gibberella intermedia*) και *Fusarium subglutinans* (τ.μ. *Gibberella subglutinans*). Οι μύκητες αυτοί ανήκουν σε ένα γενικότερο σύμπλεγμα μυκήτων, το οποίο καλείται *Gibberella fujikuroi* (Leslie & Summereli, 2006).

Συνθήκες ξηρασίας και επικράτηση υψηλών θερμοκρασιών ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων *Fusarium verticillioides* και *Fusarium proliferatum*, ενώ κάτω από συνθήκες υψηλής υγρασίας και χαμηλής θερμοκρασίας αναπτύσσεται ο μύκητας *Fusarium subglutinans*, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι και οι τρεις μύκητες δεν μπορούν να συνυπάρχουν στην ίδια καλλιέργεια (Logrieco *et al.*, 2002).

Φυτά και σπόροι καλαμποκιού οι οποίοι έχουν προσβληθεί από το μύκητα *Fusarium verticillioides* συνήθως δεν παρουσιάζουν συμπτώματα. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος μόλυνσης των πυρήνων είναι μέσω του μεταξώματος. Ο μύκητας έχει την ικανότητα να επιβιώνει υπό μορφή κονιδίων στα υπολείμματα της καλλιέργειας, τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια του εδάφους. Τα αερομεταφερόμενα κονίδια του μύκητα επικάθονται στο μετάξωμα των φυτών, βλαστάνουν και ξεκινά η μόλυνση. Όταν το μετάξωμα έχει πράσινο χρώμα είναι σχετικά ανθεκτικό στη μόλυνση, ενώ η περίοδος κατά την οποία μεταχρωματίζεται σε καφέ είναι η πιο κρίσιμη. Ο μύκητας προχωρά μέσω του μεταξώματος στους αναπτυσσόμενους σπόρους, όπου ρωγμές και σπασίματα στο περίβλημά τους ευνοούν την περαιτέρω ανάπτυξή του (EIK. 3), (Vincelli & Parker, 2002).

Ένας άλλος πολύ συχνός τρόπος εξάπλωσης του μύκητα είναι μέσω της πυραλίδας του αραβοσίτου ή και από προσβολή και από άλλα έντομα. Τα έντομα αυτά μπορούν να μεταφέρουν τα κονίδια του μύκητα τόσο στο μετάξωμα των φυτών της καλλιέργειας, όσο και στους τραυματισμένους σπόρους (Vincelli & Parker, 2002).

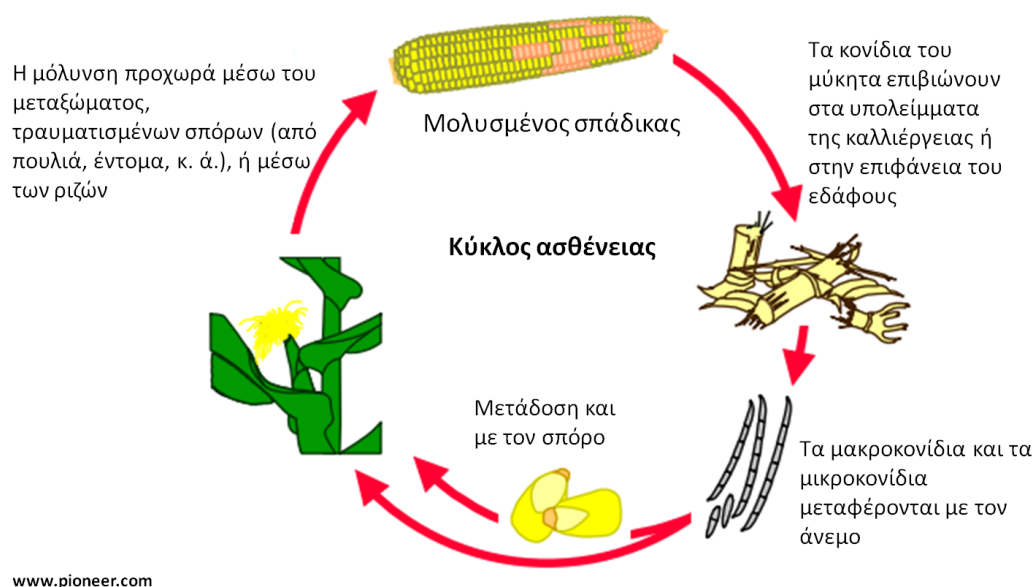
Φυτό καλαμποκιού που προέρχεται από σπόρο μολυσμένο με το μύκητα *Fusarium verticillioides* μπορεί επίσης να παρουσιάσει συμπτώματα. Καθώς το φυτό αναπτύσσεται αποικίζει εσωτερικά το στέλεχος του φυτού, την ωτίδα και τελικώς τους σπόρους. Κάτω από συνθήκες καταπόνησης για το φυτό, ο μύκητας προκαλεί την ασθένεια στους προσβεβλημένους ιστούς. Οι μολυσμένοι σπόροι του καλαμποκιού βλαστάνουν φυσιολογικά και προκύπτουν υγιή φυτά, όμως ο μύκητας είναι ικανός να προκαλέσει σήψη στις ρίζες αυτών των φυτών (Vincelli & Parker, 2002).

Δεν υπάρχουν διαγνωστικά συμπτώματα τα οποία μπορούν να προσδιορίσουν την ασθένεια της ροζ φουζαρίωσης και συχνά είναι δύσκολος ο διαχωρισμός της από την κόκκινη φουζαρίωση. Προσβεβλημένα φυτά παρουσιάζουν στα κατώτερα

μεσογονάτια ένα υπόλευκο- ροζ μεταχρωματισμό της εντεριώνης (ΕΙΚ. 4), (Vincelli & Parker, 2002).

Οι προσβεβλημένοι σπόροι στο σπάδικα του καλαμποκιού εμφανίζουν ροζ εξάνθηση, η ανάπτυξη του μύκητα (ΕΙΚ.5). Ένα ακόμη σύμπτωμα της μόλυνσης από το μύκητα *Fusarium verticillioides* είναι η εμφάνιση λευκών ραβδώσεων, οι οποίες ξεκινούν από τη βάση του σπόρου και εκτείνονται προς τη βάση του ("starblasting"), (ΕΙΚ. 6), (Vincelli & Parker, 2002).

Σήψεις που προκαλούνται από τον μύκητα *Fusarium verticillioides* σχετίζονται με την ανίχνευση μυκοτοξινών στα προσβεβλημένα προϊόντα. Πιο συγκεκριμένα, σε σπόρους καλαμποκιού παρατηρούνται υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης φουμονισινών, ουσίες με αρνητικές επιπτώσεις στον άνθρωπο και στα ζώα.



**Εικόνα 3.** Κύκλος ασθένειας του μύκητα *F. verticillioides*.



**Εικόνα 4.** Ροζ μεταχρωματισμός της εντεριώνης σε προσβεβλημένο στέλεχος καλαμποκιού από το μύκητα *Fusarium verticillioides*.



**Εικόνα 5.** Ροζ φουζαρίωση. Προσβεβλημένοι πυρήνες διάσπαρτοι στο σπάδικα.



**Εικόνα 6.** Λευκές ραβδώσεις που ξεκινούν από την κορυφή του πυρήνα και εκτείνονται προς τη βάση του (“starblusting”).

### 1.1.3 Μέτρα αντιμετώπισης

Ο αραβόσιτος αποτελεί παγκοσμίως μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες. Χρησιμοποιείται κυρίως στη διατροφή των ζώων, αποτελεί ένα από τα βασικότερα προϊόντα στη διατροφή του ανθρώπου, καθώς χρησιμοποιείται και στην παραγωγή προϊόντων αμύλου. Κάθε χρόνο η καλλιέργεια του αραβοσίτου απειλείται από ένα εύρος παθογόνων. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* spp. αποτελούν μεγάλο κίνδυνο για το καλαμπόκι καθώς προκαλούν υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος και εκκρίνουν δευτερογενείς μεταβολίτες, τις μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες είναι ιδιαίτερα τοξικοί και καρκινογόνοι δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους και αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες απειλές για την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων. Η αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και κατ’ επέκταση της εμφάνισης των μυκοτοξινών στα προσβεβλημένα

προϊόντα είναι πολύ δύσκολη, για το λόγο αυτό λαμβάνονται τα εξής προληπτικά μέτρα:

- *Αμειψισπορά:* Οι μύκητες που προκαλούν τις σήψεις στο σπάδικα επιβιώνουν στο έδαφος και στα υπολείμματα της καλλιέργειας για μεγάλο χρονικό διάστημα. Όταν λοιπόν ο αραβόσιτος καλλιεργείται ως μονοκαλλιέργεια, ή ακολουθεί του σιταριού, οι πιθανότητες εμφάνισης της ασθένειας αυξάνονται.
- *Απομάκρυνση υπολειμμάτων καλλιέργειας:* Συνίστανται η αποσύνθεση των υπολειμμάτων χρησιμοποιώντας διεγέρτες θρεπτικών συστατικών ή επιλεγμένους μικροοργανισμούς. Με τη χρήση του καλλιεργητή τα υπολείμματα της καλλιέργειας αναμοχλεύονται με το έδαφος και η αποσύνθεσή τους είναι άμεση. Επιπλέον, πριν το όργωμα προτείνεται κοπή των φυτών μηχανικά, για επιτάχυνση της αποσύνθεσής τους.
- *Ισορροπημένη λίπανση:* Η αναλογία αζώτου- καλίου πρέπει να είναι σε ισορροπία, καθώς αυξημένη συγκέντρωση αζώτου και μειωμένη συγκέντρωση καλίου έχει ως αποτέλεσμα τα φυτά του αραβοσίτου να είναι πιο ευπαθή στη προσβολή από μύκητες του γένους *Fusarium*.
- *Χρήση ανθεκτικών ποικιλιών:* Έχουν παρατηρηθεί δύο τύποι ανθεκτικότητας στα υβρίδια του αραβοσίτου. Ο πρώτος τύπος αφορά στο μονοπάτι του μεταξώματος, με το μύκητα να μην μπορεί να διεισδύσει μέσω αυτού στους σπόρους, ενώ ο δεύτερος τύπος αφορά την παρεμπόδιση μεταφοράς του μύκητα από σπόρο σε σπόρο. Η πολυγονική ανθεκτικότητα στους μύκητες *Fusarium* spp. κληρονομείται ποσοτικά, αλλά μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κανένας γονότυπος ο οποίος να παρουσιάζει πλήρη ανθεκτικότητα. Έχει παρατηρηθεί ότι υβρίδια με κάθετους σπάδικες, οι οποίοι δεν καλύπτονται πλήρως από τα βράκτια φύλλα είναι πιο επιρρεπή στη ροζ φουζαρίωση, ενώ υβρίδια με σκληρό φλοιό είναι πιο ευάλωτα στην κόκκινη φουζαρίωση.
- *Ποιότητα σπόρου:* Επιλογή σπόρων καλής ποιότητας και απαλλαγμένων από ασθένειες και έντομα εξασφαλίζει υψηλότερο ποσοστό παραγωγής.
- *Εποχή σποράς:* Πρώιμη σπορά μειώνει την πιθανότητα τραυματισμού των πυρήνων.
- *Σύστημα καλλιέργειας:* Μεγάλη πυκνότητα σποράς επηρεάζει την εμφάνιση της ασθένειας, καθώς όταν η φύτευση είναι πυκνή το ποσοστό υγρασίας στο εσωτερικό της καλλιέργειας αυξάνεται, δημιουργώντας έτσι ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης της ασθένειας.
- *Εποχή συγκομιδής και συνθήκες αποθήκευσης:* Η καθυστέρηση της συγκομιδής αποτελεί μείζονα παράγοντα κινδύνου. Για αυτό είναι σημαντικό οι ποικιλίες που επιλέγονται να είναι προσαρμοσμένες στις εκάστοτε τοπικές κλιματολογικές συνθήκες. Μετά τη συγκομιδή, η ασθένεια μπορεί να συνεχίζει να εξελίσσεται, εφόσον οι σπάδικες διατηρούνται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και κακού αερισμού. Τα προϊόντα θα πρέπει να αποξηραίνονται και να αποθηκεύονται όταν η

σχετική τους υγρασία είναι 15% και κάτω. Οι καλές συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία και υγρασία), ο καλός αερισμός, η καταπολέμηση των εντομολογικών προσβολών στα αποθηκευμένα προϊόντα μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο της μόλυνσης (Czembor, 2010).

Υπάρχουν και μέτρα τα οποία υπάγονται στον άμεσο έλεγχο της ασθένειας:

- *Χημική καταπολέμηση:* Ψεκασμός με μυκητοκτόνα στην αρχή της καλλιέργειας, μπορεί να περιορίσει τη μόλυνση. Αν η ασθένεια εμφανιστεί προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, η χρήση χημικών δεν συνίσταται. Αν η καλλιέργεια έχει προσβληθεί από τους μύκητες *Fusarium spp.*, η συγκομιδή πρέπει να ολοκληρωθεί το συντομότερο δυνατό.
- *Έλεγχος ζιζανίων:* Ο έλεγχος των ζιζανίων έχει χαμηλή επίδραση στη μείωση της ασθένειας. Η ύπαρξη των ζιζανίων στην καλλιέργεια του καλαμποκιού αυξάνει την υγρασία εντός της καλλιέργειας, συνθήκη ευνοϊκή για την εξέλιξη της καλλιέργειας.
- *Καταπολέμηση εντόμων:* Ο έλεγχος των εντόμων θα μειώσει τη μόλυνση. Για παράδειγμα, αρθρόποδα που παρασιτούν το καλαμπόκι, μπορούν να προκαλέσουν στρες στα φυτά και τα σημεία τα οποία τρέφονται, διευκολύνουν τη μόλυνση. Οι προνύμφες της πυραλίδας του αραβοσίτου μεταφέρουν τα κονίδια του μύκητα από το εξωτερικό περίβλημα στο εσωτερικό του σπάδικα ή στο εσωτερικό του στελέχους του φυτού, όπου και η μόλυνση ξεκινά. Ποικιλίες καλαμποκιού που φέρουν το γονίδιο Bt, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στην πυραλίδα του αραβοσίτου. Επιπροσθέτως, τα Bt υβρίδια έχουν δείξει μειωμένη μόλυνση από τους μύκητες *Fusarium spp.* και μειωμένη συγκέντρωση μυκοτοξινών. (Czembor, 2010).

## 1.2 Το γένος *Fusarium* sp.

Το γένος *Fusarium* θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα φυτοπαθογόνα γένη μυκήτων, καθώς προκαλεί σοβαρές καταστρεπτικές ασθένειες, όπως αδρομυκώσεις, σηψιρριζίες, σήψεις της βάσσεως και του στελέχους, τήξεις σπορείων αλλά και εναέριες προσβολές ανθέων, όπως στα σιτηρά (Τζάμος, 2007).

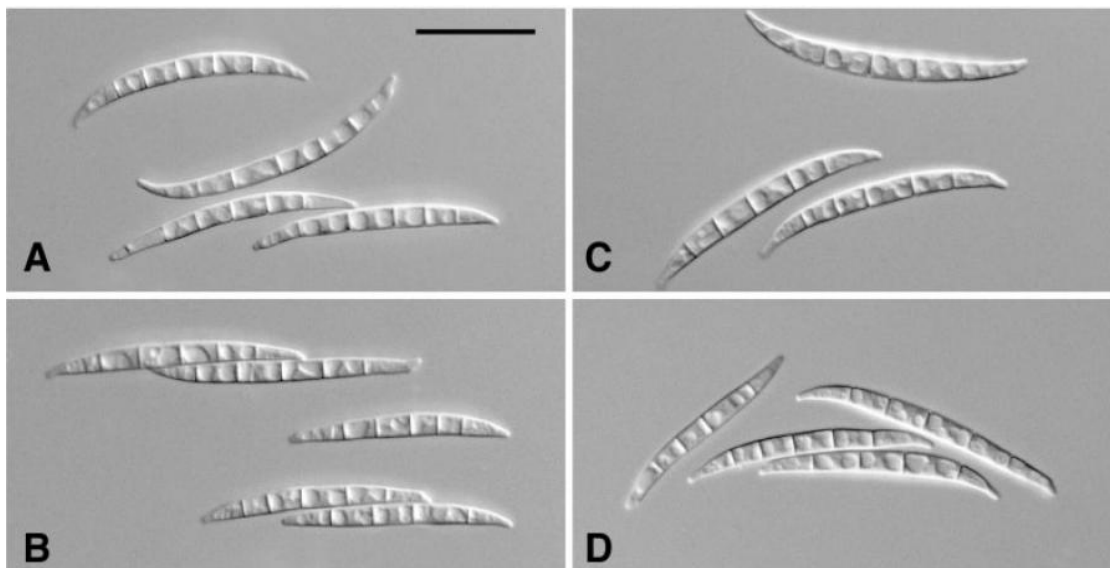
Τα είδη του γένους *Fusarium* παράγουν τρεις τύπους σπορίων, τα μακροκονίδια, τα μικροκονίδια και τα χλαμυδοσπόρια (Nelson, Toussoun & Marasas, 1994). Μερικά είδη παράγουν και τους τρεις τύπους σπορίων, ενώ άλλα όχι (Nelson, *et al.*, 1994). Τα μακροκονίδια σχηματίζονται είτε στους κονιδιοφόρους, είτε στα σποριοδόχεια. Διαθέτουν λεπτά τοιχώματα με 3- 5 εγκάρσια χωρίσματα και οξυκατάλυκτα άκρα. Τα μικροκονίδια δημιουργούνται πάνω σε ένα φιαλίδιο, που σχηματίζεται στην υφή ή αποτελεί διακλάδωση του κονιδιοφόρου, ενώ το σχήμα τους μπορεί να είναι ωοειδές- ελλειψοειδές ή κυλινδρικό. Τα χλαμυδοσπόρια είναι επάκρια ή ενδιάμεσα και σχηματίζονται συνήθως μεμονωμένα και περιστασιακά κατά ζεύγη ή σε αλυσίδες (Τζάμος, 2007).

Οι μύκητες του γένους *Fusarium* προσβάλουν μεγάλο εύρος ξενιστών, συμπεριλαμβανομένου και της καλλιέργειας του καλαμποκιού. Μερικά από τα σημαντικότερα είδη που προσβάλλουν την καλλιέργεια του καλαμποκιού, προκαλώντας σήψη είναι οι μύκητες *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* και *Fusarium proliferatum*. Οι μύκητες αυτοί μειώνουν τις αποδόσεις, υποβαθμίζουν την ποιότητα του προϊόντος και παράγουν τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι καλούνται μυκοτοξίνες, στο προσβεβλημένο προϊόν (Parry *et al.*, 1995; Goswani & Kistler, 2004; Osborne & Stein, 2007; Miller, 2008).

### 1.2.1 Ο μύκητας *Fusarium graminearum*

Το *Fusarium graminearum* (ΕΙΚ. 7), (τ.μ. *G. zaeae*), (Discolor section) αποτελεί το σημαντικότερο παθογόνο στις καλλιέργειες του σιταριού και του αραβοσίτου.

Ο πληθυσμός του μύκητα έχει χωριστεί σε δύο ομάδες, την ομάδα 1 (Group 1) και την ομάδα 2 (Group 2), λόγω μορφολογικών διαφορών (Burgess *et al.*, 1975). Το κύριο στοιχείο διαφοροποίησης των δύο ομάδων έγκειται στο γεγονός του ότι τα κονίδια του Group 2, σχηματίζονται σε μεγάλες ποσότητες, από ομοθαλικά περιθήκια του μύκητα *G. zaeae* (Franciss and Burges, 1977; Burges *et al.*, 1988). Μεταξύ των στελεχών των δύο ομάδων παρατηρούνται διαφορές ως προς την γεωγραφική τους κατανομή και ως προς την συμπτωματολογία που προκαλούν στις διάφορες καλλιέργειες των σιτηρών. Στελέχη της ομάδας 1 αποτελούν εδαφογενή παθογόνα σε διάφορες χώρες, όπως η Αυστραλία (Francis and Burgess, 1977; Wearing and Burgess, 1977; Burges *et al.*, 1990), η Αφρική (Marasas *et al.*, 1988; Van Wyk *et al.*, 1988; Lamprecht *et al.*, 1990) και η Αμερική (Cook 1980) στην βρώμη και στη μηδική. Τα στελέχη που ανήκουν στην ομάδα 2, προκαλούν σήψεις στην καλλιέργεια του αραβοσίτου (ear rot) και του σιταριού (head scab), ενώ στο κριθάρι τα παθογόνα μεταφέρονται κυρίως με το σπόρο (Mc Mullen *et al.*, 1997). Τα στελέχη και των δύο ομάδων παράγουν μυκοτοξίνες και πιο συγκεκριμένα, τριχοθηκίνες, με τις πιο σημαντικές να είναι η δεοξινιβαλενόλη (DON) και η ζεαραλενόνη (ZEA) (Syderham *et al.*, 1991).

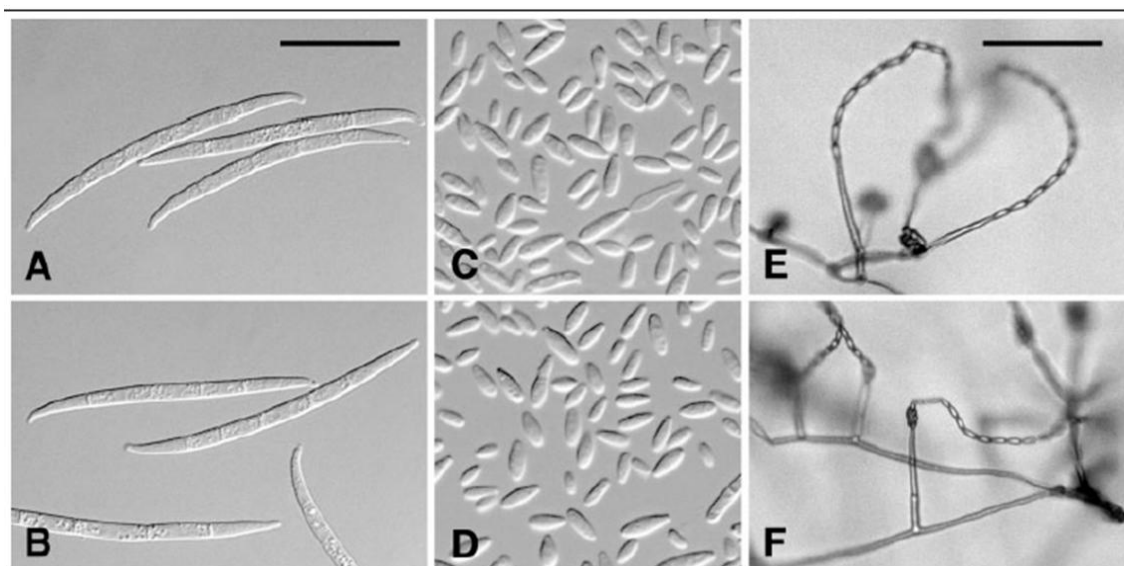


**Εικόνα 7.** Μακροκονίδια του μύκητα *F. graminearum* (μέγεθος κλίμακας: 25  $\mu\text{m}$ ), (Leslie and Summerell, 2006).

### 1.2.2 Ο μύκητας *Fusarium verticillioides*

Ο μύκητας *F. verticillioides* (ΕΙΚ. 8), (τ.μ. *G. moniliformis*), (Liseola section) είναι ένα από τα σημαντικότερα παθογόνα στις καλλιέργειες των σιτηρών.

Πρόκειται για έναν μυκηλιακό (filamentous) μύκητα, ο οποίος παράγει δύο τύπους κονιδίων τα μακροκονίδια και τα μικροκονίδια. Τα μακροκονίδια είναι μεγαλύτερα από τα μικροκονίδια και έχουν χαρακτηριστικό σχήμα. Ο μύκητας παράγει σε μεγάλες ποσότητες, μικροκονίδια και σε μικρότερες, μακροκονίδια (Li *et al.*, 2006). Τα μικροκονίδια αποτελούν το πρωταρχικό μόλυσμα για τα φυτά. Τα μικροκονίδια συγκροτούνται σε αλυσίδες, στην κορυφή του φιαλιδίου (Leslie *et al.*, 2006; Glass *et al.*, 2000; Glenn 2006). Ο μύκητας *F. verticillioides* παράγει μυκοτοξίνες στους προσβεβλημένους ιστούς, τις φουμονισίνες, οι οποίες αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων.



**Εικόνα 8.** Αγενή σπόρια του μύκητα *F. verticillioides*. **A-B:** Μακροκονίδια, **C-D:** Μικροκονίδια, **E-F:** Μικροκονίδια *in situ* σε θρεπτικό υπόστρωμα CLA, (A-D: μέγεθος κλίμακας: 25  $\mu\text{m}$ , E-F: μέγεθος κλίμακας: 50  $\mu\text{m}$ .), (Leslie and Summerell, 2006).

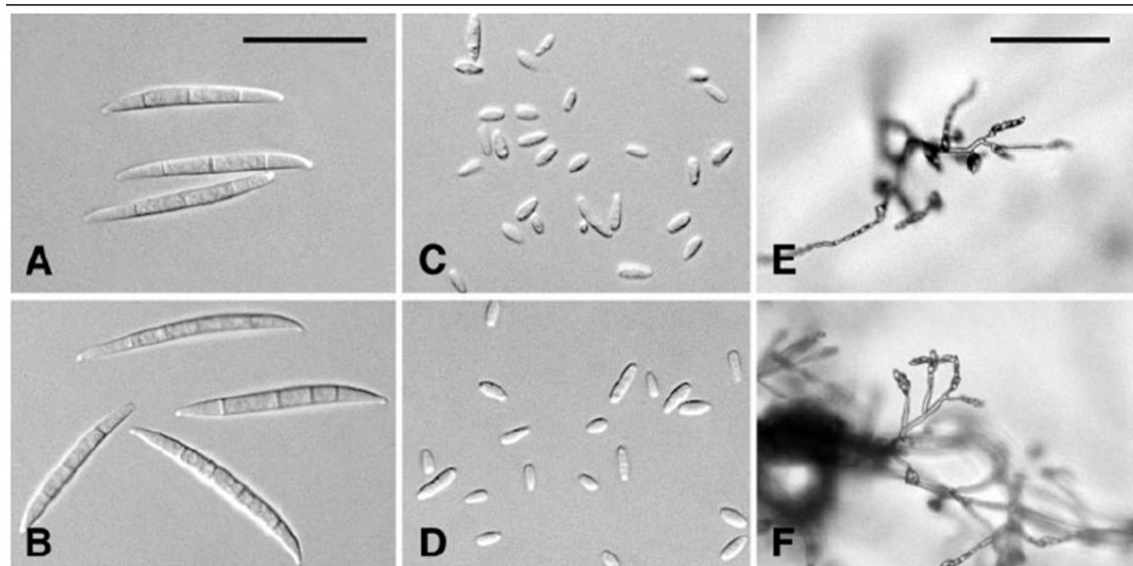


### 1.2.3 Ο μύκητας *Fusarium proliferatum*

Ο μύκητας *F. proliferatum* (ΕΙΚ. 9), (*G. fujikoroi*), (Liseola section) αποτελεί σημαντικό παθογόνο στην καλλιέργεια του αραβοσίτου, όπου σε συνδυασμό με το μύκητα *F. verticillioides*, προκαλούν την ροζ φουζαρίωση (pink ear rot) στην καλλιέργεια του καλαμποκιού.

Μορφολογικά ο μύκητας *F. proliferatum* διαφοροποιείται από τους μύκητες που ανήκουν στην κατηγορία Liseola, καθώς οι αλυσίδες που σχηματίζουν τα μικροκονίδια πάνω στα πολυφιαλίδια είναι πιο κόντες από αυτές των υπολοίπων ειδών της κατηγορίας αυτής και δεν παράγουν χλαμυδοσπόρια (Nirenberg, 1976; Gerlact and Nirenberg, 1982; Burgess *et al.*, 1988). Το *F. proliferatum* μοιάζει σε πολλά στοιχεία με το *F. verticillioides*. Το πρωταρχικό κριτήριο διαφοροποίησης αυτών των δύο μυκήτων είναι η δομή του πολυφιαλιδίου και το ότι το *F. proliferatum* σχηματίζει κοντύτερες αλυσίδες κονιδίων από το *F. verticillioides* (Burgess *et al.*, 1988).

Στην καλλιέργεια του καλαμποκιού ο μύκητας *F. proliferatum* παράγει διάφορα είδη μυκοτοξινών, όπως οι φουμονισίνες, η φουζαροπρολιφερίνη, η μπεαουβερισίνη και η μονιλιφορμίνη (Chelkowski *et al.*, 1990; Chelkowski and Lew, 1992; Nelson *et al.*, 1992; Moretti *et al.*, 1994; Ritieni *et al.*, 1997).



**Εικόνα 9.** Αγενή σπόρια του μύκητα *F. proliferatum*. **A-B:** Μακροκονίδια, **C-D:** Μικροκονίδια, **E-F:** Μικροκονίδια *in situ* σε θρεπτικό υπόστρωμα CLA, (A-D: μέγεθος κλίμακας: 25  $\mu\text{m}$ , E-F: μέγεθος κλίμακας: 50  $\mu\text{m}$ .), (Leslie and Summerell, 2006).

#### 1.2.4 Μοριακή ταυτοποίηση ειδών *Fusarium* sp.

Το γένος *Fusarium* sp. είναι από τα σημαντικότερα γένη τοξικογόνων μυκήτων, του οποίου η ταξινόμηση των ειδών είναι περίπλοκη και ασταθής, καθώς παράγοντες όπως η έλλειψη εύκολα διακριτών μορφολογικών χαρακτηριστικών διαχωρισμού σε επίπεδο είδους, η διακύμανση και οι μεταλλάξεις του πληθυσμού των *Fusarium* sp., οδηγούν στην δημιουργία συστημάτων ταξινόμησης τα οποία δεν αντικατοπτρίζουν επακριβώς την ποικιλομορφία των ειδών. Το αποτέλεσμα των λανθασμένων συστημάτων ταξινόμησης είναι η μη σωστή εφαρμογή ονοματολογίας διαφόρων τοξικογόνων και παθογόνων στελεχών (O'Donnell *et al.*, 2004).

Τα τελευταία χρόνια, η εύρεση πολλαπλών φυλογενετικών μεθόδων, επιτρέπει την ακριβέστερη αναγνώριση των ειδών (Taylor *et al.*, 2000), ενώ έχουν επίσης αποσαφηνιστεί οι σχέσεις μεταξύ διάφορων ειδών του γένους *Fusarium* sp., υποδεικνύοντας την επικράτηση λανθασμένων χαρακτηρισμών ειδών, οι οποίοι βασιζόνταν σε μορφολογικά χαρακτηριστικά (Aoki and O'Donnell, 1999; Geiser *et al.*, 2001; O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 1998a, b, c; Ward *et al.*, 2002). Οι περισσότερες απομονώσεις *Fusarium* sp. που μελετήθηκαν από εξειδικευμένους επιστήμονες κατά τη διάρκεια του 20<sup>ου</sup> αιώνα αρχικά αναγνωρίστηκαν λάθος, λόγω της χρήσης απλοποιημένων μορφολογικών συστημάτων αναγνώρισης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η τοξίνη νιβαλενόλη, όπου πήρε το όνομα της από λάθος αναγνώριση ενός απομονωμένου στελέχους που την παρήγαγε, το οποίο χαρακτηρίστηκε ως *Fusarium nivale*. Από τότε, το *Fusarium nivale* ανήκει σε διαφορετικό είδος, το είδος *Microdochium*, και το είδος που παράγει τη νιβαλενόλη έχει επαναπροσδιοριστεί, αρχικά στο *F. tricinctum* και το *F. sporotrichioides* από δύο διαφορετικούς ερευνητές, με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά και τελικώς οδηγηθήκαμε σε ένα νέο είδος, το *F. kyushuense*, με βάση τη μοριακή φυλογενετική (Aoki and O'Donnell, 1998). Η συσχέτιση των μυκοτοξινών και των τοξικογόνων στελεχών που τις παράγουν, με βάση τις προηγούμενες αναφορές, κρίνεται αναγκαίο να επαναπροσδιοριστεί με φυλογενετικές μεθόδους, καθώς είδη τα οποία εντοπίστηκαν πρόσφατα και χαρακτηρίστηκαν με σύγχρονες φυλογενετικές τεχνικές, θα ήταν δύσκολο να προσδιοριστούν με τη χρήση συμβατικών μορφολογικών χαρακτηριστικών (Aoki *et al.*, 2003). Οι μοριακές φυλογενετικές μέθοδοι χαρακτηρισμών των ειδών αποτελούν ένα άριστο και αξιόπιστο εργαλείο για την αναγνώριση τους, σε εργαστηριακό επίπεδο. Η φυλογενετική ανάλυση των ειδών *Fusarium* sp. έχει βασιστεί κυρίως, στη Γενεαλογική Αντιστοιχία Φυλογενετικής Αναγνώρισης των ειδών (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition- GCPSR), (GCPSR; Taylor *et al.*, 2000), μια μέθοδο, η οποία αναγνωρίζει τμήματα μεταξύ γονιδίων ως στόχους για τον προσδιορισμό μυκήτων σε επίπεδο είδους. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται δύο ή και παραπάνω γονίδια-στόχοι, αν και σε πολλά είδη έχει χρησιμοποιηθεί ένα γονίδιο-στόχος, εφόσον ο ίδιος δείκτης έχει χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο αναφοράς μαζί με άλλα γονίδια-στόχους (O'Donnell *et al.*, 2004).

Τα γονίδια-στόχοι τα οποία χρησιμοποιούνται στη φυλογενετική είναι τμήματα γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Geiser, 2003). Οι περιοχές των γονιδίων αυτών τείνουν να εξελίσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό από εκείνο που παρατηρείται σε επίπεδο είδους, με τους πιο κοινά εφαρμοσμένους δείκτες να είναι η μεταγραφική περιοχή ITS του rRNA (O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 1998a). Πολλά φουζάρια που ανήκουν στο σύμπλεγμα *Gibberella* διαθέτουν μη ορθόλογα αντίγραφα του ITS2, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα φυλογενετικά αποτελέσματα (O'Donnell and Cigelnik, 1997; O'Donnell *et al.*, 1998a).

Ο μεταγραφικός παράγοντας *tef1-a* κωδικοποιεί μέρος μίας πρωτεΐνης, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη φυλογενετική καθώς, παρέχει πολλές πληροφορίες σε επίπεδο είδους στα *Fusarium* sp., δεν έχουν ανιχνευτεί μη ορθόλογα αντίγραφα του γονιδίου αυτού στο είδος και έχουν σχεδιαστεί εκκινητές, οι οποίοι ενισχύουν σε όλο το φυλογενετικό εύρος του γένους. Οι δείκτες αυτοί είχαν χρησιμοποιηθεί αρχικά, για το διαχωρισμό ειδών των Λεπιδοπτέρων (Cho *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 1997). Οι εκκινητές, *ef1* και *ef2*, ενισχύουν μια περιοχή 700 βάσεων στο γονίδιο TEF. Το γονίδιο αυτό έχει ένα μόνο αντίγραφο στο γένος *Fusarium* και παρουσιάζει μεγάλο πολυμορφισμό σε συγγενικά είδη του γένους ακόμα και σε σύγκριση με γονίδια όπως η καλμοντουλίνη, η β-τουμπουλίνη και η ιστόνη H3. Για αυτούς τους λόγους το γονίδιο TEF αποτελεί σημαντικό εργαλείο στη φυλογενετική των *Fusarium* sp. (O'Donnell *et al.*, 2004).

Ένα δεύτερο γονίδιο το οποίο χρησιμοποιείται στη φυλογενετική ανάλυση στο σύμπλεγμα *Gibberella fujikoro* και στα είδη του γένους *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2000) είναι αυτό της καλμοντουλίνης (CAM) και είναι ένα γονίδιο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη γενετική ανάλυση πληθυσμών. Οι εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί ενισχύουν μια περιοχή εντός του γονιδίου της καλμοντουλίνης, με μέγεθος 650 περίπου βάσεων (O'Donnell *et al.*, 2000).

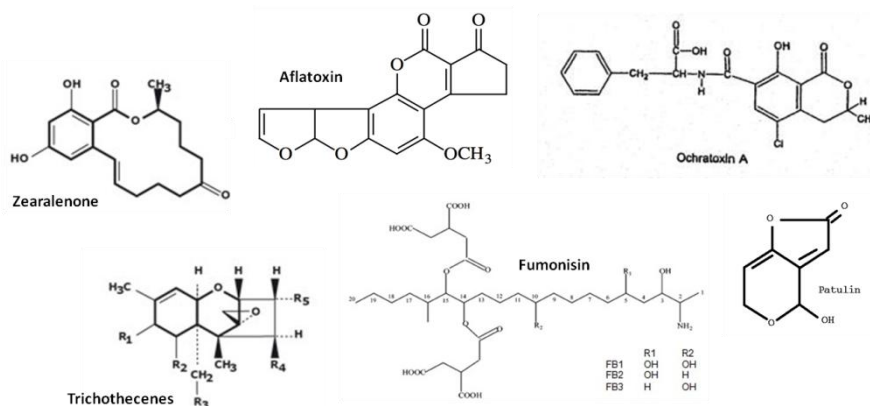
Στην καλλιέργεια του καλαμποκιού οι μύκητες *Fusarium* sp. παρουσιάζουν διαφορετικά προφίλ όσον αφορά την παραγωγή των μυκοτοξινών, με αποτέλεσμα να κρίνεται αναγκαία η εύρεση εξειδικευμένων εργαλείων αναγνώρισης των ειδών, τα οποία απομονώνονται από μολυσμένους ιστούς. Ο ακριβής προσδιορισμός του είδους των απομονώσεων θα μας δώσει πιο σαφή εικόνα για την ασθένεια και τις παραγόμενες μυκοτοξίνες (González-Jaén *et al.*, 2005).

### 1.3 Μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξίνες είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, με τοξική δράση, οι οποίες παράγονται από τους μύκητες και αποτελούν σημαντικό κίνδυνο σε παγκόσμιο επίπεδο, τόσο στην υγεία του ανθρώπου, όσο και των ζώων (Moretti *et al.*, 2013). Οι μυκοτοξίνες απατώνται στη φύση και προσβάλλουν περίπου το 25% της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων και ζωοτροφών (FAO, 2004). Οι καλλιέργειες των σιτηρών πλήττονται περισσότερο και λόγω του ότι τα παραγόμενα προϊόντα τους αποτελούν σημαντικό μέρος της κύριας διατροφής μεγάλου ποσοστού του πληθυσμού, οι μυκοτοξίνες αποτελούν το σημαντικότερο πρόβλημα στα τρόφιμα. Σε παγκόσμιο επίπεδο, οι μυκοτοξίνες βρίσκονται στο επίκεντρο των επιστημονικών ερευνών και του οικονομικού ενδιαφέροντος, καθώς μερικές από τις οικονομικές απώλειες που επιφέρουν σχετίζονται με τη μείωση της ζωοπαραγωγής και του διεθνούς εμπορίου (Moretti *et al.*, 2013). Οι μυκοτοξίνες αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού (secondary metabolites) ορισμένων ειδών μυκήτων. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται από τους μικροοργανισμούς κατά τη μεταβολική τους δραστηριότητα, χωρίς να είναι άμεσα χρήσιμες για την ανάπτυξή τους. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες συσσωρεύονται κυρίως στα μεγαλύτερης ηλικίας τμήματα της αποικίας, ενώ μπορεί να παρατηρείται ταυτόχρονη ανάπτυξη των επάκριων τμημάτων των υφών του μύκητα (Καπετανάκου, 2012).

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες προάγεται η παραγωγή των μυκοτοξινών είναι περιορισμένες συγκριτικά με τις αντίστοιχες που επιτρέπουν την ανάπτυξη των τοξικογόνων μυκήτων. Η ανάπτυξη των μυκήτων και η παραγωγή των μυκοτοξινών ευνοείται από διάφορους περιβαλλοντικούς ή μη παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, ο ξενιστής, κ.ά. (Καπετανάκου, 2012).

Τα γένη των μυκήτων *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των πιο συχνά ανιχνεύσιμων μυκοτοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Πιο συγκεκριμένα, συνήθως παράγουν αφλατοξίνες, φουμονισίνες, ωχρατοξίνη Α, πατουλίνη, τριχοθηκίνες και ζεαραλενόνη (ΕΙΚ. 10), (Marasas *et al.*, 2008).



**Εικόνα 10.** Χημική δομή των συχνότερων μυκοτοξινών στα τρόφιμα.

Λόγω το μεγάλο εύρος των αρνητικών επιπτώσεων που προκαλεί η ύπαρξη των μυκοτοξινών, σε πληθώρα γεωργικών προϊόντων κρίνεται επιτακτική και άμεση η ανάγκη εξεύρεσης αποτελεσματικότερων και ασφαλέστερων μεθόδων αντιμετώπισης των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και διαχείρισης των μυκοτοξινών, με βελτίωση των συνθηκών παραγωγής και φυτοπροστασίας των γεωργικών προϊόντων. Η αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων επιχειρείται σήμερα κυρίως με την εφαρμογή κατάλληλων μετασυλλεκτικών χειρισμών, όπως η αποθήκευση των προϊόντων σε ξηρό περιβάλλον και χαμηλή θερμοκρασία ή σε περιβάλλοντα με τροποποιημένες ατμόσφαιρες (π.χ. μειωμένη συγκέντρωση O<sub>2</sub>, εφαρμογές όζοντος), η εφαρμογή χημικών και φυσικών μεθόδων αποτοξικοποίησης των μυκοτοξινών (θερμική αποδόμηση, επεξεργασία με οξέα, αμμωνιοποίηση, οζονοποίηση, τροφικά πρόσθετα, κ.α.) σε νωπά και μεταποιημένα γεωργικά προϊόντα, η εφαρμογή βιολογικών παραγόντων και αντιμικροβιακών ενώσεων, η χρήση κατάλληλων προσροφητικών ουσιών (προσθήκη δεσμευτικών στις ζωτροφές), κ.α. Παρ' όλες ωστόσο τις δυσκολίες αντιμετώπισης των μυκοτοξινών αυτό που κυρίως μπορούμε να κάνουμε είναι η πρόληψη του σχηματισμού τους. Η διατήρηση μιας υγιούς καλλιέργειας με τη δημιουργία ενός ευνοϊκού περιβάλλοντος για την ανάπτυξη των φυτών και την ελαχιστοποίηση των δυσμενών παραγόντων που μπορεί να προκαλέσουν «στρες» στα φυτά (ξηρασία, εντομολογικές προσβολές, τροφοπενίες κ.α.) καθώς και η δημιουργία ιδανικών συνθηκών αποθήκευσης των καρπών, δημητριακών ελαιούχων σπόρων και ζωτροφών, μπορούν να περιορίσουν την προσβολή τους με μύκητες. Μεταξύ όλων των διαθέσιμων προσεγγίσεων, η αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων θα πρέπει να βασίζεται σήμερα κυρίως στις ακόλουθες πρακτικές που φαίνεται να περιορίζουν την προσβολή των φυτών και των φυτικών προϊόντων από μυκοτοξίνες στο χωράφι και στους χώρους αποθήκευσης:

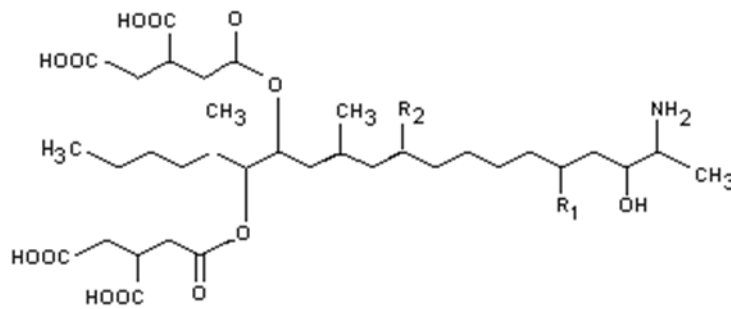
- Περιορισμοί στην εγκατάσταση και εξάπλωση των παθογόνων στον αγρό
  - καλλιεργητικές πρακτικές π.χ. κλάδεμα, καταστροφή ζιζανίων, μείωση ή αύξηση της υγρασίας ανάλογα με το είδος του μύκητα που πρέπει να αντιμετωπιστεί (π.χ. άρδευση της καλλιέργειας σε θερμό και ξηρό καιρό για αποφυγή καταπόνησης της καλλιέργειας), καταστροφή των υπολειμμάτων καλλιέργειας, αμειψισπορά (εναλλαγή καλλιεργειών)
  - αποφυγή δημιουργίας πληγών στους καρπούς και στους σπόρους στον αγρό και κατά τη συγκομιδή
  - χρήση μυκητοκτόνων (ελάχιστα είναι εγκεκριμένα και αποτελεσματικά)
  - βιολογική καταπολέμηση με συγγενείς μύκητες που δεν παράγουν μυκοτοξίνες (στη χώρα μας δεν εφαρμόζεται ακόμα αυτή η μέθοδος)
  - καταπολέμηση εντόμων (ως φορείς σπορίων των μυκήτων ή ως παράγοντες δημιουργίας πληγών).

- χρήση υγιούς πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού και ανθεκτικών ή ανεκτικών ποικιλιών σε έντομα και μύκητες (αν είναι διαθέσιμες)
- Περιορισμοί στην εγκατάσταση και εξάπλωση των παθογόνων στην αποθήκη
  - γρήγορη και κατάλληλη αποξήρανση των σπόρων (π.χ. σε ξηραντήρες) ώστε να μειωθεί το ποσοστό υγρασίας σε ασφαλή επίπεδα π.χ. 12-13% για σιτηρά και 7% για ελαιούχους σπόρους
  - κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης π.χ. κατάλληλα μέτρα υγιεινής στις αποθήκες και στον εξοπλισμό, καλή κυκλοφορία αέρα, διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας και υγρασίας, χρήση εγκεκριμένων βιοκτόνων, χρήση συντηρητικών ουσιών, συστηματικός οπτικός έλεγχος για παρουσία μούχλας
- Χημικοί έλεγχοι ανίχνευσης μυκοτοξινών σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας

### 1.3.1 Φουμονισίνες

Οι φουμονισίνες ανήκουν στην οικογένεια των κετονών. Έχουν ενοχοποιηθεί επιδημιολογικά για μερικές μορφές του καρκίνου του οισοφάγου στον άνθρωπο καθώς και για βλάβες στο νευρικό σωλήνα. Σε εργαστηριακά πειράματα έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν διάφορες ασθένειες σε κτηνοτροφικά ζώα και τρωκτικά (Gelderblom *et al.*, 1988; Marasas *et al.*, 2004).

Οι μυκοτοξίνες αυτές συνίσταται από μια γραμμική αλυσίδα ατόμων C, η οποία έχει μια ομάδα αζώτου, ένα έως τέσσερα υδροξύλια και δύο τρικαρβοξυλικούς εστέρες σε διάφορες θέσεις κατά μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. Λόγω της παραλλακτικότητας στη δομή οι φουμονισίνες χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες, την A, την B, την C και την P, οι οποίες βασίζονται στην παραλλακτικότητα γύρω από το άτομο του αζώτου και τις διαφορές στο μήκος της ανθρακικής αλυσίδας (Musser and Plattner, 1997; Sewram *et al.*, 2005). Οι ομάδες A, B και P έχουν 20 άτομα άνθρακα, ενώ η C έχει 19 άτομα άνθρακα. Στις κατηγορίες B και C, η ομάδα του αζώτου είναι ελεύθερη αμίνη, στην A είναι μια ακετυλομένη αμίνη και στην P είναι μέρος υδροξυπυρινικού δακτυλίου (EIK. 11), (Musser and Plattner, 1997; Sewram *et al.*, 2005).

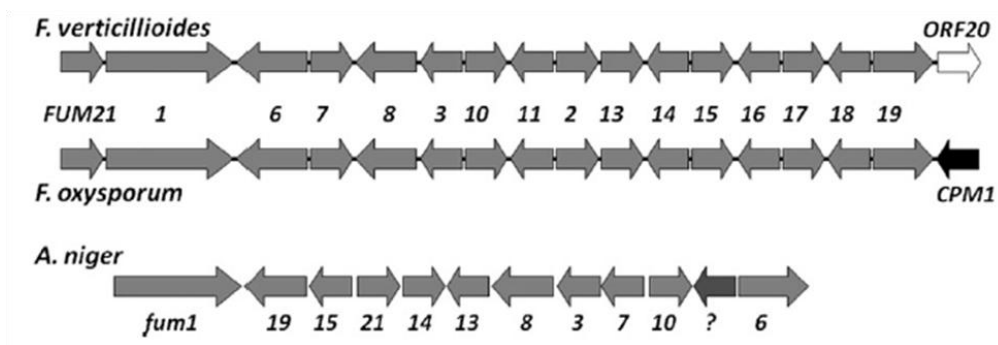


|                          | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Formula  | CAS Number  | Molecular mass |
|--------------------------|----------------|----------------|--|-------------|----------------|
| Fumonisin B <sub>1</sub> | OH             | OH             | C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>15</sub> | 116355-83-0 | 721.838        |
| Fumonisin B <sub>2</sub> | OH             | H              | C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub> | 116355-84-1 | 705.839        |
| Fumonisin B <sub>3</sub> | H              | OH             | C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub> | 136379-59-4 | 705.839        |
| Fumonisin B <sub>4</sub> | H              | H              | C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>13</sub> | 136379-60-7 | 689.840        |

[www.inchem.org](http://www.inchem.org)

**Εικόνα 11** . Χημική δομή των φουμονισινών.

Τα πιο γνωστά μυκοτοξικογόνα γένη μυκήτων του είδους *Fusarium* ανήκουν στο σύμπλεγμα *Fusarium fujikuroi* και συνήθως παράγουν τέσσερα ανάλογα φουμονισινών (FB), τα FB1, FB2, FB3 και FB4, με την FB1 να απαντάται συχνότερα και σε μεγαλύτερη αναλογία, συγκριτικά με τις υπόλοιπες (Nelson *et al.*, 1992; Proctor *et al.*, 2004; Rheeder *et al.*, 2002). Οι φουμονισίνες της Β ομάδας διαφέρουν δομικά μεταξύ τους ως προς την παρουσία ή απουσία υδροξυλίων στον άνθρακα πέντε (C-5) και στον άνθρακα δέκα (C-10). Πιο συγκεκριμένα, η FB1 έχει ένα υδροξύλιο στον C-5 και στον C-10, ενώ η FB2 έχει μόνο ένα στον C-5, η FB3 έχει μόνο στον C-10 και η FB4 δεν έχει υδροξύλιο, σε καμία από τις δύο θέσεις (Moretti *et al.*, 2013). Το σύμπλεγμα γονιδίων που εμπλέκεται στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των φουμονισινών (ΕΙΚ. 12) έχει περιγραφεί στο στέλεχος FRC O- 1890 *F. oxysporum* (Proctor *et al.*, 2008) και στους μύκητες *F. verticillioides* και *F. proliferatum* του συμπλέγματος *F. fujikuroi* (Proctor *et al.*, 2003; Walwijk *et al.*, 2000). Σε αυτό το σύμπλεγμα των γονιδίων συμμετέχουν 16 γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν βιοσυνθετικά ένζυμα, πρωτεΐνες μεταφοράς και έναν μεταγραφικό παράγοντα (Brown *et al.*, 2007; Proctor *et al.*, 2003). Ο χαρακτηρισμός του συμπλέγματος γονιδίων σε λειτουργικό επίπεδο, στο *F. verticillioides* μέσω διαφόρων μεθόδων έχει αποσαφηνίσει το ρόλο πολλών γονιδίων του συμπλέγματος αυτού (Butchko *et al.*, 2003a, b 2006; Ding *et al.*, 2004, Yi *et al.*, 2005; Zaleta- Rivera *et al.*, 2006). Το παραπάνω αποτέλεσμα σε συνδυασμό με την πιο περιορισμένη ανάλυση σε ένα μυκοτοξικογόνο στέλεχος του *F. oxysporum*, μας έχει οδηγήσει σε μια βαθύτερη κατανόηση της γενετικής βάσης για μεγάλο εύρος της δομικής παραλλακτικότητας των αναλόγων των φουμονισινών (Moretti *et al.*, 2013).

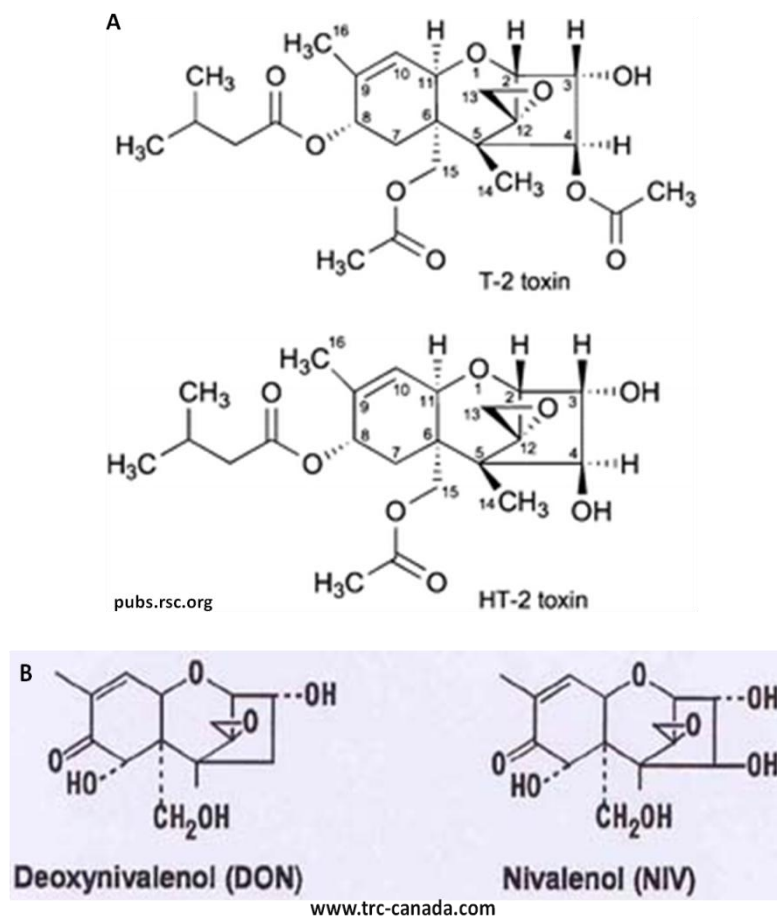


**Εικόνα 12.** Το βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής φουμονισινών (FUM cluster) στους μύκητες *F. oxysporum*, *F. verticillioides* και *A. niger*, (Proctor *et al.*, 2003, 2008). Το γονίδιο το οποίο είναι σημασμένο με ερωτηματικό στο σύμπλεγμα γονιδίων του *A. niger* δεν παρατηρείται στο σύμπλεγμα γονιδίων των *Fusarium* sp..

### 1.3.2 Τριχοθηκίνες

Οι τριχοθηκίνες ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων, παράγονται από πολλά είδη του γένους *Fusarium*, όπως το *F. graminearum*, *F. sporothrichioides* κ.ά. και υπάγονται στις πιο σημαντικές μυκοτοξίνες ανά τον κόσμο, λόγω της σύστασής τους και της ανίχνευσής τους σε σημαντικές καλλιέργειες, όπως το κριθάρι, ο αραβόσιτος και το σιτάρι (CAST, 2003). Οι μυκοτοξίνες αυτές είναι τοξικές για το φυτό και συμβάλλουν στην παθογένεια του *Fusarium* σε μερικές καλλιέργειες (Desjardins *et al.*, 1996; Maier *et al.*, 2006). Όλες οι τριχοθηκίνες έχουν τρικυκλική δομή, με μια υποξειδική ομάδα, όμως μπορεί να διαιρεθούν σε δύο δομικά διακριτές ομάδες, με βάση την απουσία (τύπος Α τριχοθηκινών) ή την παρουσία (τύπος Β τριχοθηκινών) μιας κετο-ομάδας, στον άνθρακα οχτώ (C-8). Από την ομάδα Α, οι σημαντικότερες τριχοθηκίνες είναι οι τοξίνες T-2 και HT-2, ενώ από την ομάδα Β η δεοξινιβαλενόλη (DON), η νιβαλενόλη (NIV) και τα παράγωγά τους ( ΕΙΚ. 13), (Desjardins *et al.*, 2006).



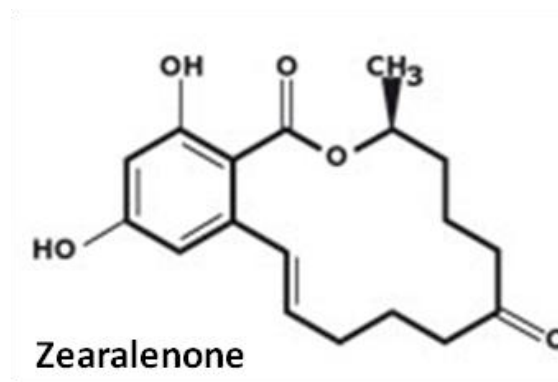


**Εικόνα 13** . Χημική δομή των T-2, HT-2 (A), DON και NIV (B).

### 1.3.3 Ζεαραλενόνη

Η ζεαραλενόνη (ZEA) χημικά χαρακτηρίζεται ως φαινολική λακτόνη του ρεσορκυκλικού οξέως (ΕΙΚ. 14) και παράγεται από είδη μυκήτων του γένους *Fusarium*, όπως το *F. culmorum*, *F. graminearum* και *F. crookwellense*. Οι μύκητες αυτοί απατώνται συχνά στις καλλιέργειες των σιτηρών, όπου αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες ήπιων θερμοκρασιών και υγρασίας την περίοδο ανάπτυξης των φυτών και κατά τη συγκομιδή αυτών. Η ζεαραλενόνη είναι ένα φυσικώς απαντώμενο οιστρογόνο, το οποίο προκαλεί ορμονικές βλάβες στα κτηνοτροφικά ζώα, ιδίως στους χοίρους. Η ζεαραλενόνη ανιχνεύεται σε καταναλωτικά προϊόντα, τα οποία προέρχονται από καλλιέργειες όπως του ρυζιού, του κριθαριού, του σιταριού και του καλαμποκιού. Στα σιτηρά και στις ζωτροφές έχουν επίσης ανιχνευθεί παράγωγα στενά συνδεδεμένα με την ζεαραλενόνη καθώς και συζευγμένα προϊόντα με αυτήν. Μερικές από αυτές τις ενώσεις θεωρούνται πιο ισχυρά οιστρογόνα από τη ζεαραλενόνη. Λόγω αυτών των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων, μερικές από αυτές τις ενώσεις μπορούν να εισέλθουν στην

τροφική αλυσίδα, στα ζωικά προϊόντα, όπως στο κρέας και το γάλα. Γίνονται προσπάθειες για τον προσδιορισμό της σοβαρότητας αυτής της δευτερογενούς μόλυνσης. Η ζεαραλενόνη επιδρά στο αναπαραγωγικό σύστημα. Έχει γίνει γνωστή εδώ και χρόνια η ικανότητα της ΖΕΑ να προκαλεί υπεριοιστρογόνωση, ιδίως σε χοίρους. Περιορισμένα είναι όμως τα στοιχεία που υπάρχουν για το αν μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση, ενώ έρευνες πάνω στην γονοτοξικότητα ήταν αντιφατικά, αν και προτείνεται ότι προκαλεί γονιδιακές διαταραχές σε ποντίκια. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να αλλάξουν από είδος σε είδος και περαιτέρω μελέτες πρέπει να γίνουν για να διαπιστωθεί αν η ζεαραλενόνη αποτελεί καρκινογόνο ή μεταλλαξιογόνο παράγοντα στον άνθρωπο. (<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=12>).

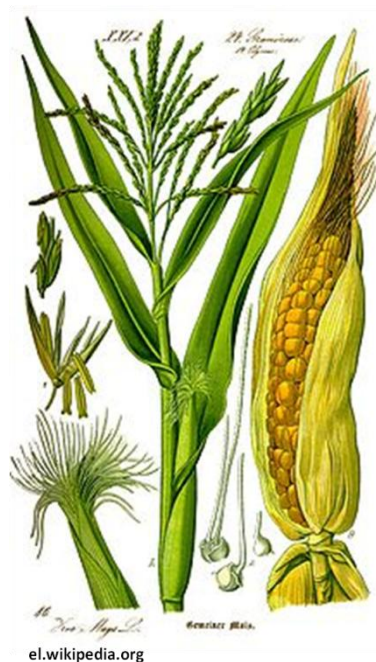


**Εικόνα 14.** Χημική δομή της ζεαραλενόνης.

## 1.4 Η καλλιέργεια του καλαμποκιού

Το καλαμπόκι ή αραβόσιτος (*Zea mays*, Ζέα ή μαϋς) είναι σιτηρό της οικογένειας των ποωειδών ή αγρωστωδών και κατάγεται από την Αμερικανική Ήπειρο, όπου ήδη πριν από 5.500 χρόνια το καλλιεργούσαν οι Ίνκας, οι Μάγια και οι Αζτέκοι. Η Ελληνική του ονομασία "αραβόσιτος" σημαίνει ή "σίτος" (σιτάρι των Αράβων και εισήχθη στην Ελλάδα περίπου το 1600 από τη Βόρεια Αφρική. Ο αραβόσιτος καλλιεργείται κυρίως για τον καρπό του και δευτερευόντως για παραγωγή βιομάζας για άμεση κατανάλωση ή για ενσίρωση. Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των σπόρων ο αραβόσιτος κατατάσσεται σε σκληρό, οδοντωτό, αλευρώδες, σακχαρώδες, κηρώδες, μικρό και «ντυμένο». Ο καρπός του αραβοσίτου χρησιμοποιείται κυρίως ως κτηνοτροφή (κυρίως το «ντυμένο» είδος) σε νωπή, αποξηραμένη ή ενσιρωμένη μορφή, ενώ σε διάφορες περιοχές αποτελεί σημαντικό προϊόν διατροφής του ανθρώπου και τα υποπροϊόντα του χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων ή για ποικίλες βιομηχανικές χρήσεις (Καραμάνος, 2007).

Τα άνθη του αραβοσίτου, που είναι φυτό μόνικο- δίκλινο, σχηματίζουν ταξιανθίες. Η αρσενική ταξιανθία είναι φόβη και ο κεντρικός της άξονας αναπτύσσεται ως προέκταση του άκρου του βλαστού. Η φόβη παράγει 2-5 εκατομμύρια γυρεοκόκκους, σε συνάρτηση του γονοτύπου. Το μήκος της είναι περίπου 30 εκ., γεγονός που την καθιστά εύθραυστη στο σημείο συνένωσης του ποδίσκου της με το άκρο του βλαστού. Αυτή η ιδιότητα είναι ιδιαιτέρως χρήσιμη στην περίπτωση σποροπαραγωγής υβριδίων. Η μία ή περισσότερες θηλυκές ταξιανθίες του αραβοσίτου, που καλούνται σπάδικες, αναπτύσσονται πλευρικά επάνω σε βραχείες διακλαδώσεις του κεντρικού στελέχους, στο μέσο περίπου του βλαστού (ΕΙΚ. 15), (Καραμάνος, 2007).



**Εικόνα 15.** Θηλυκή και αρσενική ταξιανθία στην καλλιέργεια του αραβοσίτου.

Στην καλλιέργεια του αραβοσίτου όταν ο σπόρος βρεθεί σε ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και αερισμού, ξεκινά η βλάστηση ή το φύτερωμα του, μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από μορφολογικές και χημικές μεταβολές. Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ σποράς και φυτρώματος εξαρτάται από την υγρασία του εδάφους, τη θερμοκρασία και τον επαρκή αερισμό. Όταν η υγρασία και ο αερισμός είναι σε ιδανικά επίπεδα τότε καθοριστικός είναι ο ρόλος της θερμοκρασίας για την ταχύτητα βλάστησης. Όταν η θερμοκρασία είναι 20°C η ανάδυση του φυταρίου πραγματοποιείται 4-6 ημέρες μετά τη σπορά. Η βλαστική ανάπτυξη μπορεί να υποδιαιρεθεί σε δύο περιόδους: α) την περίοδο που φτάνει μέχρι το τέλος του σχηματισμού βλαστικών καταβολών στο κορυφαίο μερίστωμα και β) την περίοδο που αρχίζει από τη διαφοροποίηση του κορυφαίου μεριστώματος από βλαστικό σε αναπαραγωγικό. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τόσο η βλαστική ανάπτυξη όσο και η φωτοσύνθεση του αραβοσίτου φτάνουν στο μέγιστο σε θερμοκρασία 33°C, αλλά η θερμοκρασία επιδρά στη βλαστική ανάπτυξη όλο το εικοσιτετράωρο, ενώ στη φωτοσύνθεση μόνο κατά την διάρκεια της ημέρας (Καραμάνος, 2007).

Η αναπαραγωγική ανάπτυξη αρχίζει μετά το σχηματισμό και της τελευταίας καταβολής φύλλου στο κορυφαίο μερίστωμα, οπότε αρχίζουν να σχηματίζονται και να αναπτύσσονται οι καταβολές των αρσενικών και των θηλυκών ταξιανθιών. Στον αραβόσιτο υπάρχει ένα σημαντικό χρονικό διάστημα όπου βλαστική και αναπαραγωγική ανάπτυξη συμβαδίζουν, όμως η βλαστική ανάπτυξη ολοκληρώνεται μετά την έξοδο της φόβης ενώ η αναπαραγωγική στα τελευταία στάδια της ζωής του φυτού. Εν γένει από την εμφάνιση της φόβης έως και την πλήρη ωρίμανση της μεσολαβεί ένα διάστημα 10 ημερών μέσα στο οποίο ολοκληρώνεται η βλαστική ανάπτυξη. Από την άνθιση της φόβης μέχρι την επικονίαση και τη γονιμοποίηση απαιτείται ένα διάστημα 5-8 ημερών. Όσον αφορά το σπάδικα, ο οποίος αναπτύσσεται πλευρικά στον 6<sup>ο</sup>-8<sup>ο</sup> κόμβο από τη φόβη, συνήθως είναι ένας ανά φυτό και σπάνια δύο ή περισσότεροι όταν η πυκνότητα των φυτών είναι μικρή ή χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα υβρίδια. Το μέγεθος του σπάδικα καθορίζεται σε μια περίοδο 10-15 ημερών πριν την εμφάνιση των στύλων (μετάξωμα). Πιθανή έλλειψη νερού και θρεπτικών συστατικών στο έδαφος την περίοδο αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους του σπάδικα και του αριθμού των σπόρων που μπορεί να αναπτύξει. Επιπλέον καθυστέρηση της ανάπτυξης του σπάδικα σε σχέση με τη φόβη, μπορεί να οδηγήσει σε ατελή επικονίαση λόγω επιβράδυνσης του μεταξώματος (Καραμάνος, 2007).

Τέλος, ο αραβόσιτος είναι φυτό ανεμόφιλο και η γύρη μεταφέρεται με τη βοήθεια του ανέμου σε μεγάλες αποστάσεις, αν και το μεγαλύτερο ποσοστό περιορίζεται σε μια ακτίνα 6-15 μέτρα. Όπως συμβαίνει σε όλα τα ανεμόφιλα φυτά, έτσι και στην περίπτωση του αραβοσίτου υπάρχει μια σπατάλη γύρης, όπου η μέγιστη παραγωγή της παρουσιάζεται την 3<sup>η</sup> ημέρα μετά την άνθηση (Καραμάνος, 2007).

#### 1.4.1 Η χρήση των υβριδίων στην καλλιέργεια του καλαμποκιού

Στην Ευρώπη, η ασθένεια της σήψης σπάδικα (ear rot) προκαλείται κυρίως, από τους μύκητες *F. graminearum* και *F. verticillioides*, καθώς και από τους μύκητες *F. culmorum*, *F. subglutinans* και *F. proliferatum* (Logrieco *et al.*, 2002). Ο μύκητας *F. verticillioides* επικρατεί σε όλη την Ευρώπη, ενώ ο *F. graminearum* κυριαρχεί στην κεντρική και ανατολική Ευρώπη (Bottalico, 1998; Logrieco *et al.*, 2002). Η σήψη αυτή προκαλεί σημαντικές απώλειες αποδόσεων και μειώνει την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος (Presello *et al.*, 2008; Vigier *et al.*, 2001). Οι μύκητες *F. graminearum* και *F. verticillioides* παράγουν μυκοτοξίνες στην καλλιέργεια του καλαμποκιού, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν σημαντικά προβλήματα στον άνθρωπο και τα ζώα.

Η ανησυχία της βιομηχανίας για την επιμόλυνση του αραβοσίτου με μυκοτοξίνες ήταν μεγάλη με αποτέλεσμα διάφορες ομάδες ερευνητών από διάφορα ερευνητικά κέντρα και Πανεπιστήμια να ξεκινήσουν προγράμματα βελτίωσης ώστε να εντοπίσουν πηγές ανθεκτικότητας στη σήψη και στην παραγωγή φουμονισινών στην καλλιέργεια των σιτηρών. Η πρόοδος των διαφόρων προγραμμάτων εξελίχθηκε με γρήγορους ρυθμούς, κυρίως λόγω της εμπειρίας που έχει αποκτηθεί μέσω της μελέτης των μηχανισμών ανθεκτικότητας στις αφλατοξίνες στην καλλιέργεια του καλαμποκιού. Στο Πανεπιστήμιο του Ιλινόις από το 1999, έχουν αναπτυχθεί πάνω από 1500 υβρίδια F1 γενιάς, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα. Το 2000 αναπτύχθηκαν οι F2 και BC1 γενιές από όλα τα F1 υβρίδια (Clements, 2002), με την ελπίδα ότι πολλοί από αυτούς τους γονοτύπους θα είναι χρήσιμοι στη διερεύνηση του τρόπου κληρονομής της ανθεκτικότητας καθώς και στον προσδιορισμό μοριακών δεικτών, οι οποίοι σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Το 2001, οι F3 και οι BC1S1 γενιές αναπτύχθηκαν μαζί με 35 γονότυπους, οι οποίοι είχαν επιλεγεί το 2000. Οι γονότυποι που επελέγησαν το 2000 μολύνθηκαν με το μύκητα και αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους στη σήψη και τη συγκέντρωση των φουμονισινών σε καλλιέργειες που περιλάμβαναν τις γονικές σειρές F1, F2 και τις γενιές αναδιασταύρωσης (Clements *et al.*, 2003b). Στην αξιολόγηση των γονοτύπων συμμετείχε και η εταιρεία Monsanto. Από το 2002 και μετά ερευνήθηκαν οι τύποι και η σημασία της δράσης των γονιδίων, καθώς και ο προσδιορισμός πολλών περιοχών QTL, που συμμετέχουν στην ανθεκτικότητα (Clemens & White, 2004).

Στην Ευρώπη έως σήμερα, δεν έχει γίνει δυνατός ο έλεγχος της ασθένειας, με χρήση μυκητοκτόνων. Στις Η.Π.Α. και στον Καναδά έχει αναφερθεί μειωμένη συγκέντρωση μυκοτοξινών, σε καλλιέργειες καλαμποκιού, καθώς παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα και στα δύο είδη μυκήτων του γένους *Fusarium* sp. (Reid *et al.*, 1996b; Robertson *et al.*, 2006). Η ανίχνευση και ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών καλαμποκιού αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο αντιμετώπισης της μείωσης των αποδόσεων και της παραγωγής των μυκοτοξινών. Η ανθεκτικότητα στους μύκητες αυτούς κληρονομείται ποσοτικά, ακλουθώντας κανονική κατανομή

μεταξύ των απογόνων της F1 γενιάς (Ding *et al.*, 2008; Pérez-Brito *et al.*, 2001; Robertson-Hoyt *et al.*, 2006).

Στην κεντρική και ανατολική Ευρώπη συνίσταται η χρήση πρώιμων υβριδίων, όταν πρόκειται για ενσίρωση, λόγω του μικρού βιολογικού κύκλου τους κι της σύντομης διάρκειας του σταδίου ωρίμανσης των πυρήνων πάνω στον σπάδικα. Συχνά, μολύνονται από τον μύκητα *F. graminearum*, ενώ σε περιόδους όπου επικρατεί ξηρασία και υψηλές θερμοκρασίες κυριαρχεί ο μύκητας *F. verticillioides* (Bottalico 1998; Görtz *et al.*, 2008; Munkvold 2003). Στη δυτική Γαλλία, Ουγγαρία, Ιταλία, Ισπανία και στις Βαλκανικές χώρες ο αραβόσιτος καλλιεργείται για τον σπόρο και χρησιμοποιούνται μεσοπρώιμες και όψιμες ποικιλίες (Löffler *et al.*, 2009).

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες με στόχο την εύρεση ανθεκτικών υβριδίων στους μύκητες *F. graminearum* και *F. verticillioides*. Στην Γερμανία παρατηρήθηκαν αρκετά υποσχόμενα αποτελέσματα σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μεγάλο αριθμό υβριδίων, ως προς την ανθεκτικότητα τους στους μύκητες *F. graminearum* και *F. verticillioides* (Löffler *et al.*, 2009).

Προσπάθειες ανεύρεσης ανθεκτικών υβριδίων στους ανωτέρω μύκητες έχουν πραγματοποιηθεί και στην Αφρική. Αναλυτικότερα, στη Νιγηρία βρέθηκαν δύο σειρές υβριδίων (02C14624 και 02C14585), οι οποίες παρουσίαζαν μειωμένες συγκεντρώσεις μυκοτοξινών (Afolabi *et al.*, 2007). Στη Νιγηρία οι σειρές αυτές ελέγχονται επίσης, και ως προς την ανθεκτικότητά τους στους μύκητες του γένους *Aspergillus* sp. και ως προς τη συγκέντρωση των αφλατοξινών.

Στην Αμερική, στη βόρεια Καρολίνα μέσω συνεχόμενων αναδιασταυρώσεων οδηγήθηκαν στην βελτίωση μιας εμπορικής σειράς (FR1064), η οποία παρουσίασε ανθεκτικότητα στη σήψη και στη συγκέντρωση των μυκοτοξινών, χωρίς μείωση των αποδόσεων (Holland *et al.*, 2010).

Οι έρευνες για την ανεύρεση ανθεκτικών υβριδίων καλαμποκιού πρέπει να συνεχιστούν καθώς η σήψη και οι παραγόμενες μυκοτοξίνες από τους μύκητες του γένους *Fusarium* sp. αποτελούν σημαντική απειλή ανά τον κόσμο.

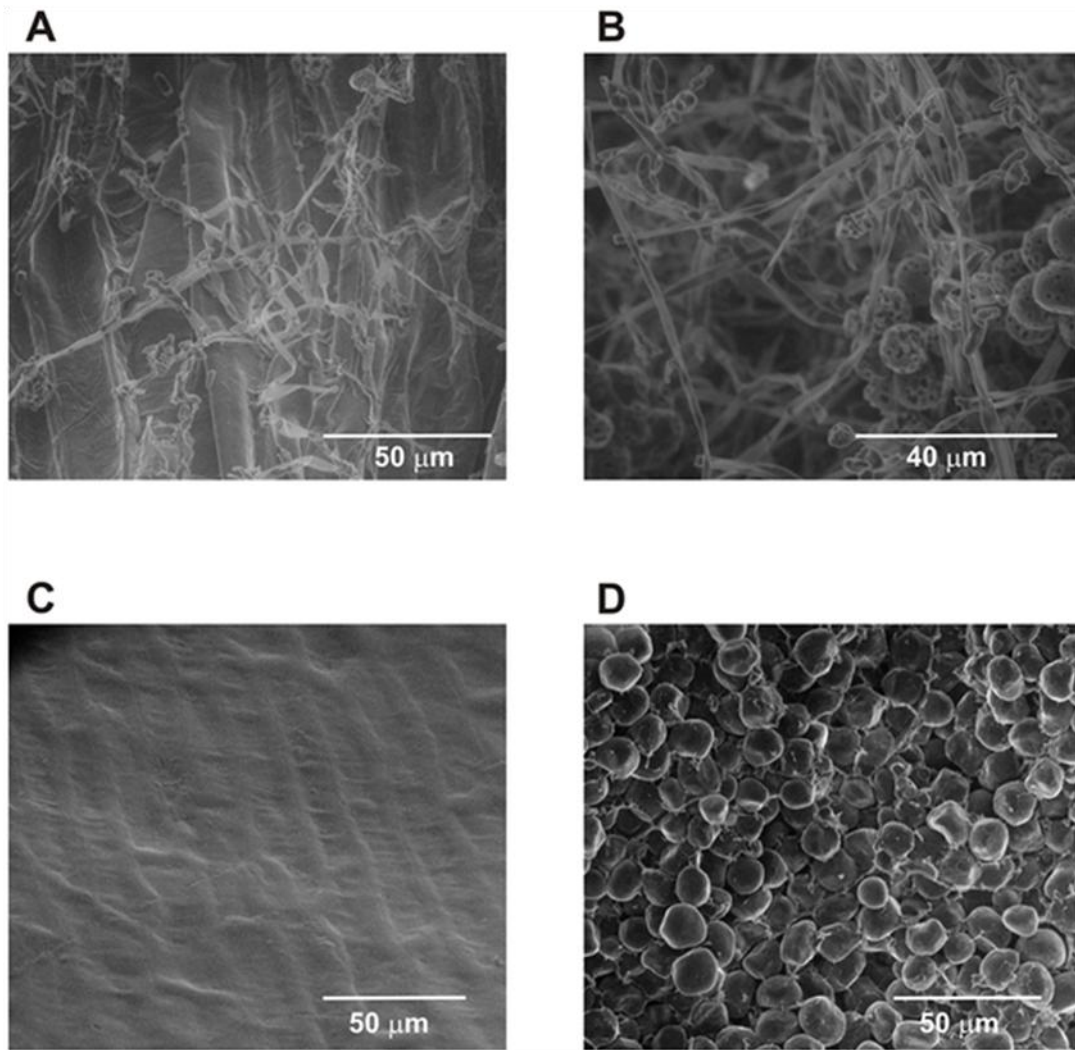
#### **1.4.2 Διερεύνηση μεταγραφικών και μεταβολομικών αλλαγών κατά τη μόλυνση υβριδίων καλαμποκιού με τους μύκητες του γένους *Fusarium* sp.**

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο μύκητες του γένους *Fusarium* sp. απαντώνται συχνά στην καλλιέργεια του αραβοσίτου, προκαλώντας σημαντικά προβλήματα ανά τον κόσμο. Η σήψη του σπάδικα, που προκαλείται από τους μύκητες *F. verticillioides*, *F. proliferatum* και *F. subglutinans*, μειώνει τις αποδόσεις και συνοδεύεται από ένα ανεπιθύμητο γεγονός, τη συγκέντρωση μυκοτοξινών, των φουμονισινών, στο προσβεβλημένο προϊόν, με αρνητικές επιπτώσεις και στην παγκόσμια οικονομία.

Έρευνες των τελευταίων δεκαετιών, έχουν στραφεί στην εύρεση ανθεκτικών υβριδίων καλαμποκιού, με στόχο την αντιμετώπιση της ασθένειας αλλά και τη μείωση της συγκέντρωσης των φουμονισινών, με αποτέλεσμα την εύρεση ύπαρξης γενετικής παραλλακτικότητας ως προς την ανθεκτικότητα στην ασθένεια, χωρίς όμως να υπάρχουν στοιχεία για πλήρη ανθεκτικότητα σε καμία από τις δύο παραμέτρους (ασθένεια και συγκέντρωση μυκοτοξινών). Η δυσκολία δημιουργίας ανθεκτικών υβριδίων έγκειται στο γεγονός του ότι δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μόλυνση από το μύκητα *F. verticillioides* και την συγκέντρωση των φουμονισινών (Andreo *et al.*, 2013).

Όταν ένα παθογόνο εισέλθει στο φυτό ενεργοποιούνται πολλαπλοί μηχανισμοί άμυνας. Μόλις το φυτό αναγνωρίσει την ύπαρξη του παθογόνου, ενεργοποιείται το δίκτυο μεταφοράς σημάτων, το οποίο οδηγεί σε εκ νέου προγραμματισμό του κυτταρικού μεταβολισμού, ως αποτέλεσμα αλλαγών στην έκφραση πολλών γονιδίων (Odjakova & Hadjiivanova, 2001). Η έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων των οποίων τα προϊόντα εμπλέκονται σε διάφορα πρωτογενή ή δευτερογενή μεταβολικά μονοπάτια, υπερεκφράζονται ή εκφράζονται με έντονα υψηλό ρυθμό (Rushton and Samssich, 1998). Οι αντιδράσεις αυτές από τη μεριά του φυτού οδηγούν στην επαγωγή διαφόρων γονιδίων παθογένειας (π.χ. Pathogenesis Related Proteins-PR), τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή γλουκανασών και χιτινασών, δευτερογενών μεταβολιτών ή ουσιών που ενισχύουν τα κυτταρικά τοιχώματα. Η ταυτοποίηση των γονιδίων που ελέγχουν τη ανθεκτικότητα στον μύκητα που προκαλεί τη σήψη αυτή (ear rot) θα διευκολύνει σημαντικά στη δημιουργία υβριδίων με αυξημένη ανθεκτικότητα (Andreo *et al.*, 2013).

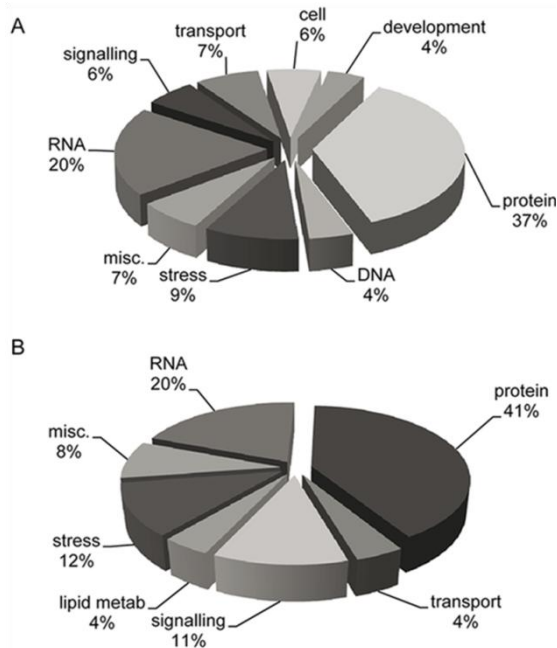
Σε πρόσφατη μελέτη που έγινε από τους Andreo *et al.*, 2013 βρέθηκαν μεταγραφικοί και μεταβολομικοί παράγοντες στο γονιδίωμα του καλαμποκιού που μπορούν να συμβάλουν στην ανθεκτικότητα στη μόλυνση από το *F. verticillioides*. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν δύο υβρίδια, ένα ανθεκτικό (L4637) και ένα ευαίσθητο (L4674), με βάση πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στον αγρό. Μετά από μόλυνση των υβριδίων, με το μύκητα *F. verticillioides*, μέσω του μεταξώματος, το υβρίδιο L4637 παρουσίασε μειωμένο δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας και μειωμένη συγκέντρωση μυκοτοξινών, συγκριτικά με την ευαίσθητη ποικιλία. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσδιορισμού της μυκηλιακής βιομάζας του μύκητα σε σπόρους και των δύο υβριδίων, μέσω μέτρησης της εργοστερόλης, η οποία αποτελεί συστατικό της μεμβράνης του μύκητα, και παρατηρήθηκε μειωμένη συγκέντρωσή της στο ανθεκτικό υβρίδιο [EIK.15(1)].



**Εικόνα 15(1)** Παρατηρείται η αύξηση των υφών στην επιφάνεια του περικαρπίου. **A.** και στο ενδοσπέρμιο, στο ευαίσθητο υβρίδιο. Απουσία εξωτερικά **C.** και εσωτερικά **D.** της ανάπτυξης του μύκητα, στην ανθεκτική ποικιλία (Andreo *et al.*, 2013).

Σύγκριση των διαφορετικών εκφραζόμενων γονιδίων στα δύο διαφορετικά υβρίδια έδειξε ότι στην πλειοψηφία τους, οι μεταγραφικοί παράγοντες που παρουσίασαν διαφορές ως προς την έκφραση των γονιδίων που τους κωδικοποιούν, ανήκαν σε πρωτεΐνες, RNA, DNA, πρωτεΐνες που σχετίζονται με το στρες, με τη μεταφορά ουσιών, με τη μετάδοση σημάτων και με διάφορες μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου [ΕΙΚ. 15(2)].





**Εικόνα 15(2).** Σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων σε πυρήνες του ανθεκτικού υβριδίου **A.** και του ευαίσθητου υβριδίου **B.**, μετά από μόλυνσή τους με το μύκητα *F. verticillioides*.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το αποτέλεσμα που προέκυψε από τη σύγκριση των δύο υβριδίων, πριν τη μόλυνσή τους με το μύκητα *F. verticillioides*, όπου το ανθεκτικό υβρίδιο L4637 παρουσίασε υπερέκφραση 408 γονιδίων, συγκριτικά με το ευαίσθητο L4674, πολλά από τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο αμυντικό σύστημα του φυτού. Μερικοί από τους μεταγραφικούς παράγοντες που υπερεκφράστηκαν ανήκαν στην κατηγορία των γλυκοσιδασών, ήταν μέρος του 26S πρωτεοσώματος, το ισοένζυμο AXAH-II, ένας μεταγραφικός παράγοντας WRKY και μια πρωτεΐνη δεύσμησης DNA.

Μελέτες επίσης έχουν δείξει (Guangtang *et al.*, 2012), σε σύγκριση πάντα μιας ανθεκτικής σειράς υβριδίου με μία ευαίσθητη, την υπερέκφραση 7 γονιδίων, τα οποία κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα στη μόλυνση από το *F. verticillioides* και αυτά είναι τα PR1, PR3, P450, UPD, SAMS, MAPK, CDPK, MYB, WORKY, POD, GL. Οι πιθανές λειτουργίες των γονιδίων αυτών χωρίστηκαν στις εξής λειτουργίες, για την ανθεκτική σειρά καλαμποκιού: σε πρωτεΐνες άμυνας με αντιμικροβιακή δράση (15%), σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον μεταβολισμό και την παραγωγή ενέργειας (14%), σε πρωτεΐνες μεταφοράς σήματος (12%), σε ρυθμιστές μεταγραφής (11%), σε δεσμευτές ελεύθερων ριζών οξυγόνου (11%), σε μεταφορείς (5%), σε πρωτεΐνες προσδιορισμού ουσιών (7%) και σε πρωτεΐνες στρες (3%).

Είναι ευρέως γνωστό, ότι η ανθεκτικότητα που παρουσιάζει το φυτό, στις διάφορες ασθένειες, όπως αυτή της σήψης που προκαλείται από τους μύκητες του γένους *Fusarium* sp. είναι πολυγονική και συνδέεται με γονίδια ποσοτικών χαρακτήρων (QTL), (Young, 1996).

## 2. Σκοπός μελέτης

Η καλλιέργεια του αραβοσίτου συγκαταλέγεται στις πιο σημαντικές καλλιέργειες ανά τον κόσμο, καθώς χρησιμοποιείται στη διατροφή των ζώων, αποτελεί ένα από τα βασικότερα προϊόντα στη διατροφή του ανθρώπου, και χρησιμοποιείται στην παραγωγή προϊόντων αμύλου. Η καλλιέργεια του αραβοσίτου απειλείται από ένα εύρος παθογόνων, με τους μύκητες που ανήκουν στο γένος *Aspergillus* και *Fusarium* spp. να αποτελούν πολύ μεγάλο κίνδυνο για την καλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα, οι μύκητες αυτοί οφείλονται συχνά για την υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος, καθώς εκτός των σήψεων που προκαλούν στο σπάδικα, εκκρίνουν μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες είναι ιδιαίτερα τοξικοί και καρκινογόνοι δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους και αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες απειλές για την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων. Για την αποφυγή των αρνητικών επιπτώσεων που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Fusarium* sp. στο καλαμπόκι, έρευνες των τελευταίων δεκαετιών, έχουν στραφεί στην εύρεση ανθεκτικών υβριδίων καλαμποκιού, με στόχο την αντιμετώπιση της ασθένειας αλλά και τη μείωση της συγκέντρωσης των παραγόμενων από αυτούς μυκοτοξινών, των φουμονισινών.

Αρχικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση γενετικού υλικού καλαμποκιού, της εταιρείας Σπύρου, ως προς την ανθεκτικότητά του σε μυκοτοξικογόνα στελέχη των μυκήτων *F. verticillioides* και *F. proliferatum* και στις παραγόμενες φουμονισίνες. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού πραγματοποιήθηκαν πειράματα αξιολόγησης των διαφορετικών υβριδίων ως προς το δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας, την ικανότητα παραγωγής κονιδίων και την ικανότητα παραγωγής φουμονισινών σε *in vitro* μελέτες και σε πειράματα σε πειραματικό αγρό.

Ένας δεύτερος σκοπός της μελέτης ήταν η απομόνωση διαφόρων στελεχών *Fusarium* spp. από μολυσμένους σπάδικες καλαμποκιού από αγρούς της Θεσσαλίας, με στόχο τη μοριακή ταυτοποίηση τους με τη χρήση εκκινητών που ενίσχυαν περιοχές στο γονίδιο της καλμοντουλίνης (CAM) και του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) και την αξιολόγηση της παραλλακτικότητάς τους, ως προς τη μολυσματική τους ικανότητα και την παραγωγή φουμονισινών σε δύο ανεκτικά υβρίδια καλαμποκιού στους μύκητες *F. verticillioides* και *F. proliferatum*.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Μόλυνση σπόρων υβριδίων *in vitro*

Η προκαταρκτική αξιολόγηση των υβριδίων καλαμποκιού από το γενετικό υλικό της Εταιρείας Σπύρου ως προς την ανθεκτικότητα τους στους μύκητες *F. verticillioides* και *F. proliferatum* έγινε σε πρώτο στάδιο *in vitro*, όπου σπόροι από κάθε υβρίδιο μολύνθηκαν με αιώρημα κονιδίων του μίγματος των 4 στελεχών του *F. verticillioides* και *F. proliferatum* (Kernel Inoculation Assay). Αξιολογήθηκαν διάφορες τεχνικές επιφανειακής απολύμανσης των σπόρων και μόλυνση των μυκήτων με διάφορους τρόπους και επίπεδα μολύσματος. Αρχικά, ως προς τη μέθοδο απολύμανσης των σπόρων πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση των σπόρων σε διάλυμα χλωρίνης 0,006%, για 10 λεπτά και ακολούθησε καλό ξέπλυμά τους με αποστειρωμένο νερό, αυτό όμως που παρατηρήθηκε ήταν ότι παρά την παραμονή των σπόρων στο διάλυμα της χλωρίνης, υπήρχαν επιμολύνσεις στα τριβλία μάρτυρες. Όσον αφορά την τεχνική μόλυνσης με τα είδη *Fusarium* spp., στους σπόρους δοκιμάστηκαν διάφοροι μέθοδοι, όπως α) τοποθέτηση των σπόρων στο τριβλίο και έγχυση σταγόνας μολύσματος στην επιφάνεια τους, με ή χωρίς τεχνητή πληγή στο έμβρυο του σπόρου και β) τοποθέτηση των σπόρων σε αιώρημα κονιδίων, ανακίνηση για 3 λεπτά και τοποθέτησή τους στο τριβλίο για επώαση. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ως προς το επίπεδο μόλυνσης, όπου ελέχθησαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του μολύσματος, όπως η συγκέντρωση  $5 \times 10^4$ ,  $10^5$  και  $10^6$ . Στόχοι των παραπάνω δοκιμών ήταν α) η εύρεση μιας διαδικασίας μόλυνσης κατά την οποία οι σπόροι θα αποστειρωνόταν επιφανειακά επιτυχώς, χωρίς να πραγματοποιούνταν νέκρωσή ή βλάστηση του εμβρύου κατά τη διαδικασία απολύμανσης και μόλυνσης, β) η εύρεση μιας μεθόδου για τεχνική μόλυνση των σπόρων που θα έδινε υψηλότερα ποσοστά μόλυνσης και γ) η εύρεση του ιδανικού επιπέδου μολύσματος που θα έδινε την καλύτερη ανάπτυξη του μύκητα στους σπόρους. Τελικά ακολουθήθηκε η παρακάτω βελτιστοποιημένη διαδικασία μόλυνσης.

Διαδικασία μόλυνσης: Οι σπόροι καλαμποκιού αποστειρώθηκαν με διαδοχικές εμβάπτισεις α) σε 0.005% υποχλωριώδες νάτριο (χλωρίνη εμπορίου) για 10min, β) ξέπλυμα με αποστειρωμένο νερό για 30 sec, γ) εμβάπτιση σε 70% αιθανόλη για 5 min και δ) μια τελευταία πλύση σε νερό για 2 min. Τα στελέχη των *F. verticillioides* και *F. proliferatum* επώαστηκαν σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MEA στους 28°C με φωτοπερίοδο 12h κάτω από λάμπες λευκού φωτός μέχρι πλήρης κάλυψης των τριβλίων, με μυκήλιο και κονίδια των μυκήτων. Τα κονίδια συλλέχθηκαν με αποστειρωμένο νερό από ίσο αριθμό τριβλίων για κάθε μια από τις 4 απομονώσεις, έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης των κονιδίων με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου και τελικά ρυθμίστηκε η συγκέντρωση κάθε στελέχους *Fusarium* spp. σε  $2,5 \times 10^5$  κονίδια/ml. Το τελικό αιώρημα δημιουργήθηκε από την ανάμιξη ίσων όγκων κάθε στελέχους ( $2,5 \times 10^5$  κονίδια/ml) ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση μολύσματος  $10^6$  κονίδια/ml.

Για την αξιολόγηση των συμπτωμάτων και σημείων της ασθένειας στους σπόρους καλαμποκιού από τα τέσσερα στελέχη *Fusarium* spp. καταγράφηκε α) η μόλυνση καθ' όλη τη διάρκεια επώασής τους, καθώς και β) η ικανότητα κονιδιογένεσης των μυκήτων. Αναλυτικότερα, 30 σπόροι από κάθε υβρίδιο καλαμποκιού αναμίχθηκαν με αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης  $10^6$  κονίδια/ml των 4 στελεχών (όπως περιγράφηκε προηγουμένως) και στη συνέχεια οι σπόροι τοποθετήθηκαν ανά 10 σε 3 γυάλινα τριβλία επάνω σε 2 διηθητικά χαρτιά εμποτισμένα με 1 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Σε κάθε τριβλίο είχε επίσης τοποθετηθεί ανάποδα και ένα καπάκι από σωληνάριο Falcon 50 ml γεμισμένο με 2 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού ώστε να εξασφαλίζεται υψηλή συγκέντρωση υγρασίας μέσα στο τριβλίο. Οι μολυσμένοι σπόροι επώαστηκαν στα τριβλία για 7 ημέρες στους  $28^{\circ}\text{C}$ , με φωτοπερίοδο 12h κάτω από λάμπες λευκού φωτός. Η σοβαρότητα της ασθένειας εκτιμήθηκε με βάση το ποσοστό μόλυνσης των σπόρων ανά υβρίδιο με μια κλίμακα υπολογισμού (δείκτης ασθένειας) της εμφανούς μόλυνσης: 0=0% μολυσμένη επιφάνεια σπόρου, 1=5-10%, 2=10-30%, 3=30-50%, 4=50-75%, 5=75-100% και 6=100%, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση. Επίσης, η ασθένεια εκτιμήθηκε με την κονιδιογένεση των 4 μυκήτων με μέτρηση των κονιδίων 7 ημέρες μετά τη μόλυνση. Οι σπόροι συλλέχθηκαν σε 5 ml νερό, ακολούθησε ανάδευση για 2 min και καταμέτρηση των κονιδίων με αιματοκυτταρόμετρο.

### 3.2 Μέτρηση φουμονισινών

Η προκαταρκτική αξιολόγηση των υβριδίων καλαμποκιού από το γενετικό υλικό της Εταιρείας Σπύρου ως προς την παρουσία φουμονισινών έγινε *in vitro*, όπου σπόροι από κάθε υβρίδιο μολύνθηκαν με αιώρημα κονιδίων του μίγματος των 4 στελεχών του *F. verticillioides* και *F. proliferatum* (Kernel Inoculation Assay). Αξιολογήθηκαν διάφορες τεχνικές επιφανειακής απολύμανσης των σπόρων και μόλυνση των μυκήτων με διάφορους τρόπους και επίπεδα μολύσματος (παράγραφος 3.1) και τελικά ακολουθήθηκε η παρακάτω βελτιστοποιημένη διαδικασία μόλυνσης.

Διαδικασία μόλυνσης: Οι σπόροι καλαμποκιού αποστειρώθηκαν με διαδοχικές εμβαπτίσεις α) σε 0,005% υποχλωριώδες νάτριο (χλωρίνη εμπορίου) για 10 min, β) ξέπλυμα με αποστειρωμένο νερό για 30 sec, γ) εμβάπτιση σε 70% αιθανόλη για 5 min και δ) μια τελευταία πλύση σε νερό για 2 min. Τα στελέχη των *F. verticillioides* και *F. proliferatum* επώαστηκαν σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MEA στους  $28^{\circ}\text{C}$ , με φωτοπερίοδο 12h κάτω από λάμπες λευκού φωτός μέχρι πλήρους κάλυψης των τριβλίων. Τα κονίδια συλλέχθηκαν με αποστειρωμένο νερό από ίσο αριθμό τριβλίων για κάθε μια από τις 4 απομονώσεις, έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης των κονιδίων με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου και τελικά ρυθμίστηκε η συγκέντρωση κάθε στελέχους *Fusarium* spp. σε  $2,5 \times 10^5$  κονίδια/ml. Το τελικό

αιώρημα δημιουργήθηκε από την ανάμιξη ίσων όγκων κάθε στελέχους ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση μολύσματος  $10^6$  κονίδια/ml.

Για την παραγωγή φουμονισινών, 40 gr σπόρων από κάθε υβρίδιο αναμίχθηκαν με το αιώρημα κονιδίων σε κωνικές φιάλες και ακολούθησε ανάδευση για μισή ώρα, στις 150 rpm (ΕΙΚ. 16). Το αιώρημα των κονιδίων αφαιρέθηκε και οι μολυσμένοι σπόροι επώαστηκαν για 15 ημέρες στους 28°C (σε συνθήκες σκότους) όπου και καλύφθηκαν πλήρως με το μυκήλιο των μυκήτων. Ακολούθησε κονιορτοποίηση των μολυσμένων σπόρων σε ηλεκτρικό μύλο, εκχύλιση των φουμονισινών με 70% μεθανόλη και ακολούθησε η διαδικασία που περιγράφεται στο kit ανάλυσης Agra Quant® ELISA Fumonisin (250-5000 ppb) της Romer Labs.



**Εικόνα 16.** Διαδικασία μόλυνσης σπόρων καλαμποκιού πριν το στάδιο της ανάδευσης των σπόρων με το αιώρημα των κονιδίων των 4 στελεχών του *F. verticillioides* και *F. proliferatum*.

#### Εκχύλιση τοξίνης

- 1) Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των μολυσμένων σπόρων καλαμποκιού, με τη χρήση μύλου.
- 2) Έγινε ζύγιση 20 gr δείγματος.
- 3) Έγινε προσθήκη 100 ml διαλύματος (1/5 δείγμα/διάλυμα εκχύλισης) 70% μεθανόλης (70/30 v/v μεθανόλη/νερό).
- 4) Ανακίνηση για 3 λεπτά.
- 5) Το δείγμα έμεινε για 30 λεπτά και στη συνέχεια, διήθηση του υπερκειμένου, μέσω Whatman #1. Το pH των δειγμάτων πρέπει να είναι 7-8.
- 6) Αραίωση (1:20) των δειγμάτων με απιονισμένο νερό και τα δείγματα ήταν έτοιμα για χρήση.

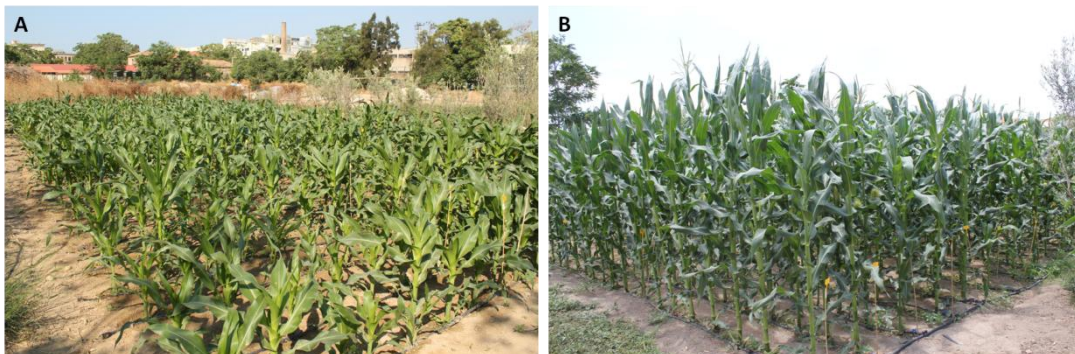
#### Agra Quant® ELISA Fumonisin kit (250-5000 ppb), Romer Labs

- 1) Τοποθετήθηκε ο κατάλληλος αριθμός Dilution Strips (σημασμένα με πράσινο χρώμα) στην πλάκα ELISA. Το κάθε strip αντιστοιχεί σε ένα δείγμα.

- 2) Τοποθετήθηκε ο αντίστοιχος αριθμός από τα Antibody Coated Microwell strips, στην αντίστοιχη για αυτά πλάκα ELISA.
- 3) Με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor), έγχυση 200μl διαλύματος Conjugate, σε κάθε ένα από τα Dilution Strips.
- 4) Τοποθετήθηκε 100μl από κάθε δείγμα στα Dilution Strips.
- 5) Με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor), ανακίνηση 3 φορές του μίγματος και γρήγορα μεταφορά 100μl από κάθε Dilution Strip, στο αντίστοιχο Antibody Coated Microwell strip, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 λεπτά.
- 6) Στη συνέχεια, αφαιρείται το περιεχόμενο. Ακολουθούν 5 πλύσεις με νερό των strips.
- 7) Ακολουθεί καλό στέγνωμα των strips, με χρήση πετσέτας ή διηθητικού χαρτιού.
- 8) 100 μl από το διάλυμα Substrate, σε κάθε ένα από τα strips με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor), επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 λεπτά. Με το πέρας του χρόνου επώασης το διάλυμα στο εσωτερικό των strips, από διαφανές γίνεται μπλε.
- 9) 100 μl από το διάλυμα Stop Solution σε κάθε ένα από τα strips με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor). Το χρώμα του διαλύματος στο εσωτερικό των strips, από μπλε γίνεται κίτρινο.
- 10) Τέλος, μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) της πλάκας, με φίλτρα 450 nm-630 nm.

### 3.3 Μόλυνση καλαμποκιών στον αγρό

Μετά από τα αποτελέσματα των πειραμάτων *in vitro*, επιλέχθηκαν 30 υβρίδια καλαμποκιού, τα οποία παρουσίασαν μειωμένο δείκτη σοβαρότητας ασθένειας, παραγωγής κονιδίων και φουμονισινών με στόχο την αξιολόγησή τους στον αγρό. Η αξιολόγηση έγινε σε πειραματικά τεμάχια σε πλήρες τυχαίοποιημένο σχέδιο, σε πειραματικό αγρό του Γ.Π.Α.. Για κάθε υβρίδιο πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις, όπου κάθε επανάληψη είχε επτά φυτά (ΕΙΚ. 17).



| Γ         |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |
|-----------|----|----|----|----|----|----|------|------|------|------|----|----|----|----|----|----|------|------|------|------|----|----|----|----|----|----|------|------|------|------|
| ΒΡΥΣΗ     |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |
| 21        | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 |
| 20        | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 |
| 19        | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 |
| 18        | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 |
| 17        | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 |
| 16        | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 |
| 15        | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 |
| 14        | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   |
| 13        | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   |
| 12        | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   |
| 11        | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   |
| 10        | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   |
| 9         | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   |
| 8         | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   |
| 7         | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   |
| 6         | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   |
| 5         | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   |
| 4         | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   |
| 3         | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   |
| 2         | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   |
| 1         | N1 | N2 | N4 | N7 | N8 | N9 | 1809 | 1811 | 1812 | 1814 | 2  | 6  | 8  | 15 | 17 | 19 | 21   | 22   | 23   | 24   | 26 | 27 | 28 | 33 | 34 | 35 | 36   | 38   | 39   | 40   |
|           | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7    | 8    | 9    | 10   | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17   | 18   | 19   | 20   | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27   | 28   | 29   | 30   |
| ΒΡΥΣΗ     |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |
| ΠΟΤΙΣΤΙΚΑ |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |      |      |      |      |

**Εικόνα 17.** Πειραματικός αγρός Γ.Π.Α.. **Α.** Υβρίδια 40 ημέρες μετά τη σπορά, **Β.** Υβρίδια 60 ημέρες μετά τη σπορά, **Γ.** Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού αγρού.

Ο αγρός είχε διαστάσεις 18 x 8,4 (m), με αποστάσεις επί των γραμμών 0,4 m και μεταξύ των γραμμών 0,6 m. Ένα μήνα πριν την σπορά πραγματοποιήθηκε φρεζάρισμα του χωραφιού, ενώ 20 ημέρες πριν τη σπορά πραγματοποιήθηκε λίπανση στο χωράφι χρησιμοποιώντας λίπασμα με σύσταση 20-20-20 (Εταιρεία AgriFarm). Η καλλιέργεια αρδευόταν με σύστημα στάγδην ημερησίως μια ώρα κάθε απόγευμα, ενώ 1 μήνα πριν τη συγκομιδή το πότισμα διεκόπη. Τρεις μήνες μετά τη σπορά πραγματοποιήθηκε ένας ψεκασμός με το εντομοκτόνο KARATE (συνιστώμενη δόση ετικέτας) με πλήρη κάλυψη των φυτών για την καταπολέμηση αφίδων. Τα ζιζάνια καθόλη τη διάρκεια του πειράματος στον αγρό αφαιρούνταν με τα χέρια ανά εβδομάδα. Η σπορά έγινε στις 30 Απριλίου 2014, η μόλυνση των σπαδικών έγινε στις 21 Ιουλίου 2014, την περίοδο όπου είχε σχεδόν ολοκληρωθεί το μετάξωμα (κρίσιμη περίοδος για μόλυνση) και η συλλογή των σπαδικών πραγματοποιήθηκε στις 5 Σεπτεμβρίου 2014.

Διαδικασία μόλυνσης: α) Επτά ημέρες μετά το μετάξωμα, 2 ml αιωρήματος κονιδίων συγκέντρωσης  $10^6$  κον/ml εγχέονται, με χρήση σύριγγας, στο μετάξωμα του κάθε σπάδικα (ΕΙΚ. 18Α), (Chen *et al.*, 2012), β) Δεκαπέντε ημέρες μετά το μετάξωμα, 2 ml αιωρήματος κονιδίων συγκέντρωσης  $10^6$  κον/ml εγχέονται, με χρήση σύριγγας, στο κέντρο του σπάδικα (ΕΙΚ. 18Β), (Yates *et al.*, 2007). Η προετοιμασία του μολύσματος περιγράφεται στην παράγραφο 3.2, με τη μόνη διαφορά ότι στην περίπτωση της μόλυνσης στον αγρό στο τελικό διάλυμα μόλυνσης προστέθηκε διάλυμα Tween 20 (200 ml/1l). Η τεχνητή μόλυνση πραγματοποιήθηκε στα μέσα προς τέλος του μεταξώματος, με 4 ml αιωρήματος  $10^6$  κονιδίων /ml (με προσθήκη 200ml Tween 20 / lt), με ένεση μέσα στον σπάδικα (από την κορυφή του ανάμεσα στους σύλους) και διαμέσου των βράκτιων φύλλων το ίδιου σπάδικα. Μετά τη μόλυνση οι σπάδικες σκεπάστηκαν με χάρτινη σακούλα, για 2 ημέρες, για αποφυγή έκλυσης του μολύσματος από τυχόν βροχή και για διατήρηση της σχετικής υγρασίας σε υψηλά επίπεδα τα οποία θα εξασφάλιζαν την επιτυχία της

μόλυνσης (ΕΙΚ. 18Γ). Οι σπάδικες συλλέχθηκαν δύο μήνες μετά τη μόλυνση τους στον αγρό, όταν το ποσοστό υγρασίας τους κυμαινόταν στο 15-20%, ενώ ακολούθησε ξήρανση μερικών σπόρων υβριδίων στους 32<sup>0</sup>C, μέχρι το ποσοστό υγρασίας έφτασε στο 14-15%.



**Εικόνα 18.** Διαδικασία μόλυνσης των επιλεγμένων υβριδίων, στον αγρό. **A.** Έγχυση μολύσματος στην κορυφή του σπάδικα. **B.** Έγχυση μολύσματος στο κέντρο του σπάδικα. **Γ.** Κάλυψη των σπαδικών με χάρτινη σακούλα, για δύο ημέρες.



### 3.4 Απομόνωση μυκήτων του γένους *Fusarium* από σπόρους καλαμποκιού

Σπόροι από διάφορες περιοχές της Μακεδονίας και της Θεσσαλίας συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Roze Bengal, για 5 ημέρες, σε θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 12h, με στόχο την ανάπτυξη μυκήτων του γένους *Fusarium* sp.

Μετά το πέρας των 5 ημερών για κάθε σπόρο στον οποίο παρατηρήθηκε εξάνθηση, ετοιμάστηκαν τριβλία Petri, με Roze Bengal και με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας πραγματοποιήθηκε απόξεση στα σημεία εξάνθησης των μυκήτων και ακολούθησε γραμμική διασπορά (streaking), με στόχο την απομόνωση των διαφόρων ειδών *Fusarium* sp.. Τα τριβλία επώαστηκαν για 3 ημέρες σε θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 12h. Στη συνέχεια, ακολούθησε επιλογή μονόσπορων αποικιών, οι οποίες παρουσίαζαν διαφορετικό φαινότυπο στο θρεπτικό υπόστρωμα Roze Bengal και επανακαλλιέργειά τους σε Roze Bengal με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς (streaking), για περαιτέρω καθαρισμό των αποικιών. Οι αποικίες που προέκυψαν αναπτύχθηκαν σε ένα πιο φτωχό θρεπτικό υπόστρωμα, το 5- 2 Low nutrient medium, για 5 μέρες σε θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 12h. Τέλος, οι αποικίες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar) και μετά από 5 ημέρες πραγματοποιήθηκε συλλογή των διαφόρων μυκηλίων σε κρυσταλλίδια, τα οποία περιείχαν διάλυμα γλυκερόλης με συγκέντρωση 25%, με σκοπό τη διατήρησή τους στους -80°C.

#### Θρεπτικά υλικά:

##### PDA (Potato Dextrose Agar)

Για 1 λίτρο PDA:

Σε μια κωνική φιάλη του 1 lt, τοποθετήθηκαν 500 ml απιονισμένου νερό και 200 gr τεμαχισμένης πατάτας σε κύβους 1x1 εκατοστά. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε δοχείο με νερό που έβραζε και παρέμεινε για 45 λεπτά. Το εκχύλισμα της πατάτας φιλτραρίστηκε σε τουλπάνι, ογκομετρήθηκε και προστέθηκε σε νερό έως τελικό όγκο 1 lt. Έγινε προσθήκη 20 gr γλυκόζης και 20 gr agar και αποστείρωση στον κλίβανο, στους 121 °C για 20 λεπτά.

##### Dichloran roze Bengal chloramphenicol agar (DRBC)

Για 1 λίτρο DRBC:

|  |  |
|--|--|
| Γλυκόζη: 10 gr                               | Απεσταγμένο νερό: 1000 ml                |
| Πεπτόνη: 5 gr                                | Rose Bengal: 25 mgr                      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 1 gr       | Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline): |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O: 0,5 gr | 2mgr                                     |
| Agar Oxoid No3: 15 gr                        | Chloramphenicol: 100 mgr                 |

Ακολουθεί αποστείρωση στον κλίβανο, στους 121°C για 20 λεπτά.

## 5-2: Low Nutrient Utility Medium

Για 1 λίτρο 5-2:

Σε 950 ml απιονισμένο νερό προσθέτω 50 ml V8 χυμό. Ανακατεύω καλά για να ομογενοποιηθούν όλα τα υλικά και ρυθμίζω το pH να είναι ίσο με 6. Ακολουθεί αποστείρωση στον κλίβανο, στους 121°C για 20 λεπτά.

## **3.5 Διαδικασία ταυτοποίησης μυκήτων *Fusarium* sp.**

### **3.5.1 Διαχωρισμός με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά**

Τα στελέχη του γένους *Fusarium* sp. αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar) και MEA (Malt Extract Agar) στους 28 °C, με φωτοπερίοδο 12h κάτω από λάμπες λευκού φωτός μέχρι πλήρους κάλυψης των τριβλίων. Μετά το πέρας 5 ημερών δείγμα από όλα τα στελέχη και από τα δύο υλικά παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο, με στόχο την εξέταση των μακροκονιδίων και μικροκονιδίων.

Θρεπτικό υλικό:

MEA ( Malt Extract Agar)

Για 1 lt MEA:

Σε 950 ml απιονισμένο νερό προσθέτω 50 gr MEA, ογκομέτρηση και προσθήκη νερού έως το 1 lt τελικό όγκο. Αποστείρωση στους 115 °C, για 10 min.

#### **3.5.1.1 *In vitro* αξιολόγηση ελληνικών στελεχών μυκήτων *Fusarium* spp.**

Η αξιολόγηση της παραλλακτικότητας στελεχών ελληνικών απομονώσεων πραγματοποιήθηκε σε δύο υβρίδια καλαμποκιού, το 1812 και το 28, τα οποία παρουσίασαν στα *in vitro* πειράματα (παράγραφος 4.2) χαμηλό δείκτη σοβαρότητας ασθένειας, χαμηλά επίπεδα παραγωγής κονιδίων και φουμονισινών. Αναλυτικότερα, επιλέχθηκαν τα στελέχη A31, B51, Γ33, Γ52, Δ512, E24, E42, H21, Θ31, Ι21, 1371, 2545, 2549, 2565, 2569 (Πίνακας 4) και πραγματοποιήθηκαν για τα υβρίδια 1812 και 28 πειράματα αξιολόγησης μολυσματικότητας, παραγωγής κονιδίων και φουμονισινών (Kernel Inoculation Assay). Η διαδικασία μόλυνσης περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.1, η αξιολόγηση των συμπτωμάτων στο κεφάλαιο 3.1 και η διαδικασία μόλυνσης για παραγωγή φουμονισινών στο κεφάλαιο 3.2.

### **3.5.2 Μοριακός χαρακτηρισμός**

#### **3.5.2.1 DNA Extraction**

Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA

- Σε eppendorf tube 100 mg λυοφιλιωμένο μυκήλιο.
- 700μl LETS buffer (20 mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS, 10 mM Tris – HCl pH 8,0, 0.1M LiCl), (για λύση των κυτταρικών μεμβρανών). Χρήση οδοντογλυφίδας,

για καλή διαβροχή του μυκηλίου και τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην απαγωγό εστία :

- 700μl phenol: CHCl<sub>3</sub>: isomyl alcohol. Ανακίνηση 10- 15 φορές, αναστρέφοντας τα δείγματα μου. Επώαση δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά (αποδιάταξη πρωτεϊνών).
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C, στις 13000 rpm.
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωλήνα και προσθήκη ίσης ποσότητας phenol: CHCl<sub>3</sub>: isomyl alcohol με αυτή του υπερκειμένου. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στους 4°C, στις 13000 rpm.
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωλήνα και προσθήκη 1 ml 95% EtOH. Ανακινώ καλά και φυγοκεντρώ στους 4°C, στις 13000 στροφές (κατακρήμνιση DNA).
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και προσθήκη 500 μl 70% EtOH για πλύση του ιζήματος.
- Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στους 37 °C, στις 13000 rpm.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και στέγνωμα ιζήματος για 5 λεπτά, σε RT.
- Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 40 μl 10 Mm Tris Buffer (pH 8.0) και προσθήκη 2 μl RNase (10mg /ml stock).
- Θερμική αδρανοποίηση DNase και καταστροφή RNA για 30 λεπτά στους 50°C, τα σωληνάκια erpendorf με το DNA διατηρούνται στους -20°C.

### 3.5.2.2 PCR reactions- PCR Purification Kit

#### PCR ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction)

Για την ενίσχυση της περιοχής στο γονίδιο του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (*ef*) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές EF1 (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) και EF2 (GGARGTACTACCAGTSATCATGTT), (O'Donnell *et al.*, 1998). Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιελάμβανε τα εξής στάδια: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 λεπτά με 40 κύκλους με αναδιάταξη 30 sec, στους 94°C υβριδισμός 30 sec, στους 54°C και επέκταση 1 λεπτό (1 λεπτό για κάθε 1000 βάσεις προϊόντος) στους 72°C και τέλος επέκταση για 10 λεπτά στους 72°C. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 700 βάσεων.

Για την ενίσχυση της περιοχής στο γονίδιο της καλμοντουλίνης (*cam*) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές CL1 (GARTWCAAGGAGGCCTTCTC) και CL2 (TTTTGCATCATGAGTTGGAC), (O'Donnell *et al.*, 2000). Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιελάμβανε τα εξής στάδια: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 λεπτά με 40 κύκλους με αναδιάταξη 30 sec, στους 94°C υβριδισμός 30 sec, στους 57°C και επέκταση 1 λεπτό (1 λεπτό για κάθε 1000 βάσεις προϊόντος) στους 72°C και τέλος επέκταση για 10 λεπτά στους 72°C. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 650 βάσεων.

Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για τις άνωθεν αντιδράσεις είναι η *Taq* πολυμεράση της εταιρίας Qiagen και η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων ήταν η συνιστώμενη (1μl DNA, 0,5 μl *Taq* πολυμεράση, 1,5 μl MgCl<sub>2</sub>, 5 μl (1x συγκέντρωση) ρυθμιστικού διαλύματος, 2 μl 2,5 mM νουκλεοτιδίων). Η συγκέντρωση των εκκινητών ήταν 10 Mm (προσθήκη 2 μl, για κάθε εκκινητή. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50 μl.

#### Καθορισμός προϊόντος PCR –MIN Elute PCR Purification Kit (Qiagen)

- 1) Προσθήκη 5 όγκων Buffer PB1 σε έναν όγκο PCR και ανακίνηση.
- 2) Έλεγχος χρώματος μετά την μίξη. Θα πρέπει να είναι κίτρινο (παρεμφερές με το χρώμα PBI, χωρίς το PCR προϊόν).
- 3) Τοποθέτηση μιας στήλης Min Elute σε ένα παρεχόμενο συλλεκτικό σωληνάκι.
- 4) Για δέσμευση του DNA, τοποθετώ το δείγμα στη στήλη Min Elute και φυγοκεντρώ για 1 λεπτό.
- 5) Απομάκρυνση του διερχόμενου υγρού και επανατοποθέτησης της στήλης στο συλλεκτικό σωληνάκι.
- 6) Προσθήκη 750 μl Buffer PE και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό, για ξέπλυμα του DNA.
- 7) Απόρριψη διηθήματος και τοποθέτηση στον συλλεκτικό σωλήνα για μια επιπλέον φυγοκέντρωση για 1 λεπτό.
- 8) Τοποθέτηση της στήλης Min Elute, σε eppendorf tube, όγκου 1,5 ml.
- 9) Για έκπλυση του DNA προσθήκη 50 μl Buffer EB (10Mm Tris-HCl, pH 8,5) ή νερού (pH 7-8,5), στο κέντρο της μεμβράνης και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό, αφού όμως έχω αφήσει το δείγμα να σταθεί για 1 λεπτό μετά την προσθήκη του Buffer EB.

#### **3.5.2.3 Αλληλούχιση δειγμάτων**

Πραγματοποιήθηκε αραιώση των δειγμάτων (20 ng/μl με ελάχιστη ποσότητα τα 10 μl) και τα δείγματα εστάλησαν μαζί με τους αντίστοιχους εκκινητές, στην εταιρεία CEMIA SA.

#### **3.6 Φυλογενετική ανάλυση**

Από τους μύκητες *Fusarium* spp. που απομονώθηκαν από τους σπόρους καλαμποκιού από την περιοχή της Θεσσαλίας, απομονώθηκε γενωματικό DNA και με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές, ενισχύθηκαν δύο διαφορετικές περιοχές από το γένωμα του κάθε στελέχους, μια περιοχή περίπου 650 βάσεις του γονιδίου της καλμοντουλίνης (CAM), (O'Donnell *et al.*, 2000) και μία άλλη περιοχή περίπου 700 βάσεων του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF), (O'Donnell

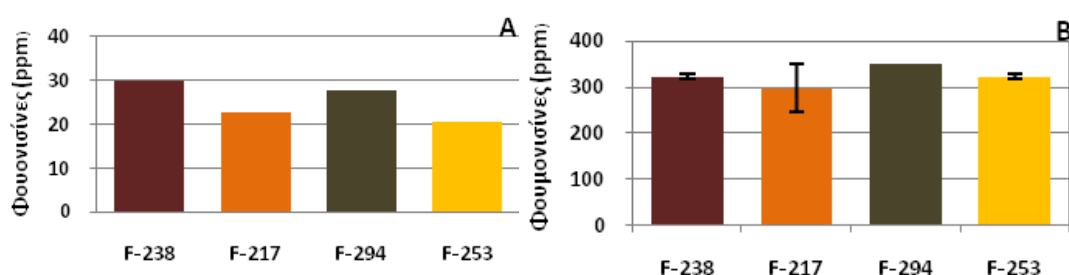
*et al.*, 1998). Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τη διαδικασία της αλληλούχισης επεξεργάστηκαν, με αφαίρεση από αυτές τμημάτων από την αρχή και το τέλος των αλληλουχιών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε BLAST ανάλυση, με στόχο τη σύγκριση και αναζήτηση ομοιότητας της αλληλουχίας, με διάφορα μυκοτοξικογόνα στελέχη του γένους *Fusarium* sp.. Στην παρούσα μελέτη, ο έλεγχος της κάθε αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων αλληλουχιών GenBank του NCBI (Benson, *et al.*, 2008).

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA6. Αναλυτικότερα, το πρώτο βήμα για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων ήταν η στοίχιση των αλληλουχιών (alignment), με στόχο τον προσδιορισμό των ομόλογων βάσεων των αλληλουχιών και την εύρεση σωστών φυλογενετικών σχέσεων των υπό εξέταση στελεχών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου εξέλιξης, καθώς το αποτέλεσμα των διαφόρων μεθόδων, εξαρτάται από το μοντέλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη φυλογενετική ανάλυση. Στη παρούσα μελέτη το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων ήταν το K2 (Kimura M., 1980).

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Παραγωγή φουμονισινών από στελέχη των μυκήτων *Fusarium proliferatum* - *Fusarium verticillioides*

Για την αξιολόγηση των διαφόρων υβριδίων καλαμποκιού, επιλέχθησαν τα στελέχη 294 και 253 του *F. verticillioides* και 217 και 238 του *F. proliferatum* (προσφορά της Prof. P. Battilani, Università Cattolica del Sacro Cuore, Ιταλία). Αρχικά έγινε η επιβεβαίωση των διαφόρων στελεχών *F. verticillioides* και *F. proliferatum* να παράγουν φουμονισίνες σε θρεπτικό υπόστρωμα Malt Extract Agar (MEA) και σε σπόρους καλαμποκιού χρησιμοποιώντας το kit ανάλυσης AgraQuant® ELISA Fumonisin (250-5000 ppb) της Romer Labs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα 4 στελέχη είχαν την ικανότητα να παράγουν υψηλά ποσοστά φουμονισινών τόσο στο θρεπτικό υπόστρωμα MEA (ΕΙΚ. 19Α) όσο και σε σπόρους καλαμποκιού (Εικόνα 19Β).



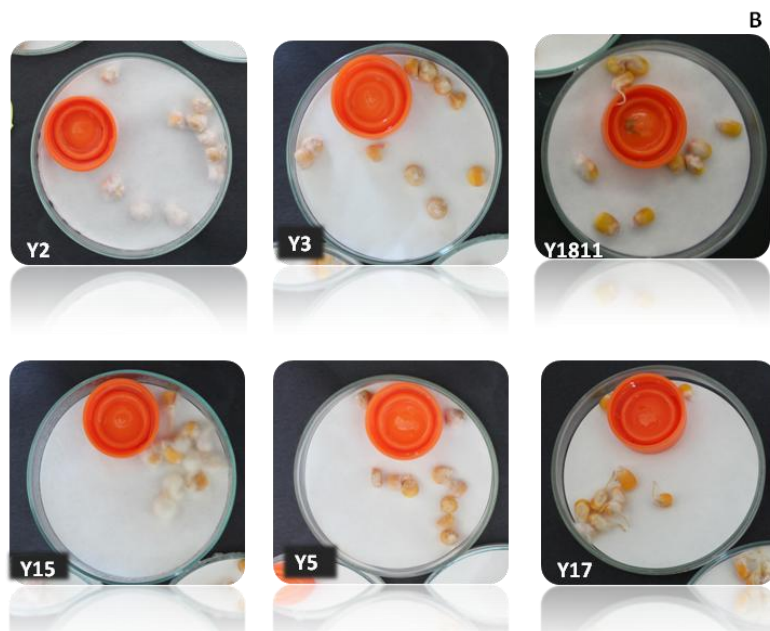
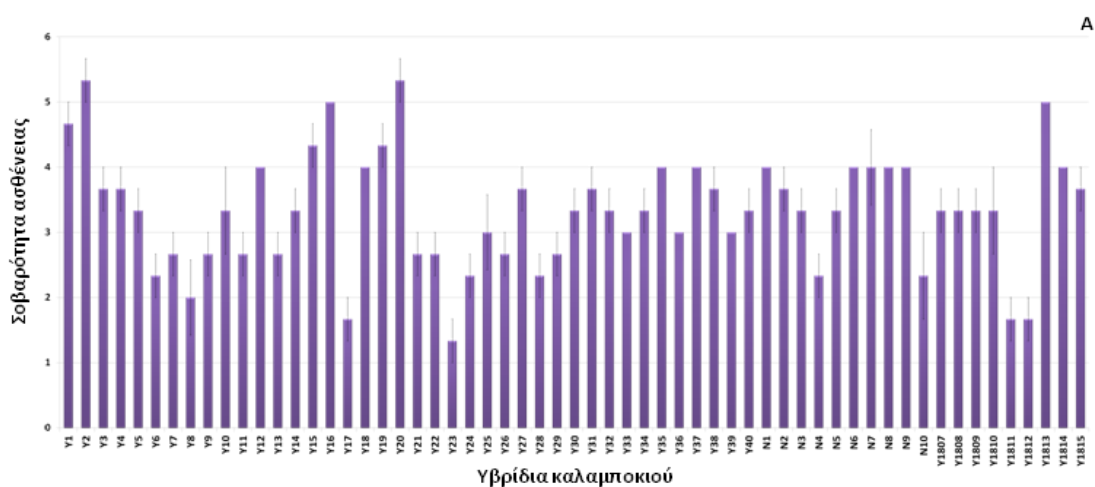
**Εικόνα 19.** Παραγωγή φουμονισινών των 4 στελεχών *F. verticillioides* 294 και 253, *F. proliferatum* 217 και 238 σε θρεπτικό υπόστρωμα MEA, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση (A) και σε σπόρους καλαμποκιού, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση (B).

### 4.2 Αξιολόγηση υβριδίων καλαμποκιού ως προς την ανθεκτικότητά τους στους μύκητες *Fusarium proliferatum* - *Fusarium verticillioides* σε *in vitro* πειράματα

#### 4.2.1 Αξιολόγηση μολυσματικότητας

Με στόχο την αξιολόγηση της έντασης των συμπτωμάτων και των σημείων της σήψης στα διαφορετικά υβρίδια υπολογίστηκε ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας. Η σοβαρότητα της ασθένειας εκτιμήθηκε με βάση το ποσοστό μόλυνσης των σπόρων ανά υβρίδιο με μια κλίμακα υπολογισμού (δείκτης ασθένειας) της εμφανής μόλυνσης: 0=0% μολυσμένη επιφάνεια σπόρου, 1=5-10%, 2=10-30%, 3=30-50%, 4=50-75%, 5=75-100% και 6=100%, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα υβρίδια μολύνθηκαν με αιώρημα κονιδίων των 4 στελεχών *Fusarium proliferatum* και *Fusarium verticillioides* (που προαναφέρθηκαν) και τα αποτελέσματα της σοβαρότητας της ασθένειας έδειξαν ότι όλα τα υβρίδια καλαμποκιού που εξετάστηκαν, μετά από 7 ημέρες μόλυνσης, έδειξαν ποσοστά με δείκτη ασθένειας 1-5, δηλαδή από 10% ως 100% (ΕΙΚ. 20.Α.). Πιο συγκεκριμένα, τα υβρίδια 2 και 15

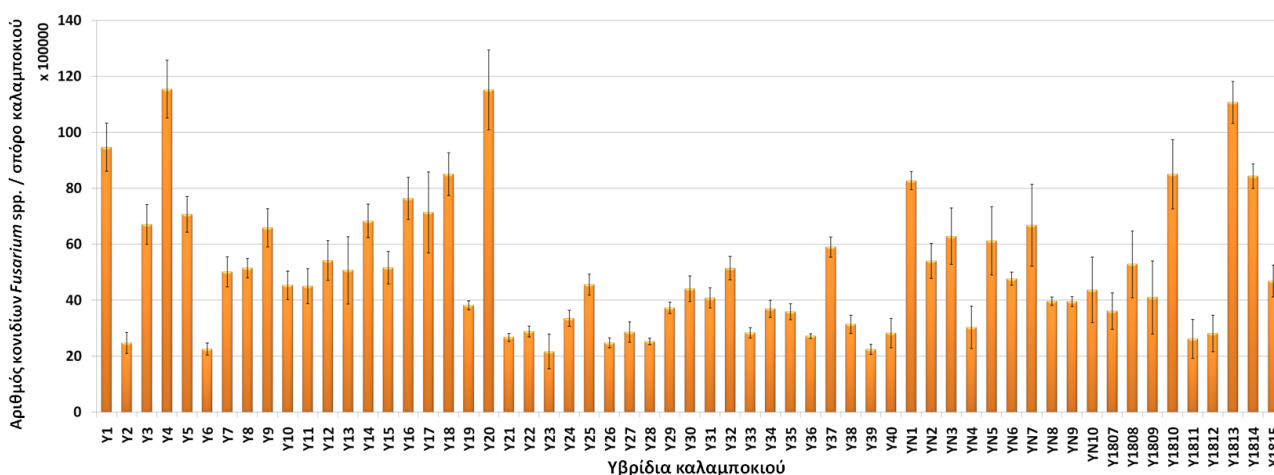
παρουσίασαν αυξημένο ποσοστό μόλυνσης το οποίο ήταν πάνω από 75%. Τα υβρίδια 3 και 5 παρουσίασαν ποσοστά μόλυνσης, τα οποία κυμαίνονταν γύρω στο 50%, ενώ στα υβρίδια 17 και 1811 παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό μόλυνσης, το οποίο κυμαίνονταν περίπου στο 15% (ΕΙΚ. 20.Β.). Τα υβρίδια 8, 17, 23, 1811, 1812 παρουσίασαν ποσοστό μόλυνσης χαμηλότερο του 20%. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS και παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Η παραλλακτικότητα που παρατηρείται όσον αφορά την μολυσματικότητα στα διάφορα υβρίδια υποδηλώνει την παρουσία γενετικών παραγόντων στα υβρίδια που μπορούν να συμβάλλουν στην ανεύρεση πιθανής ανθεκτικότητας στους μυκοτοξικογόνους μύκητες που εξετάστηκαν.



**Εικόνα 20. Α)** Μέτρηση της σοβαρότητας της ασθένειας που προκαλείται από τους μύκητες *F. verticillioides* και *F.proliferatum* σε διαφορετικά υβρίδια καλαμποκιού, **Β)** Παραλλακτικότητα των συμπτωμάτων και σημείων της σήψης στα διαφορετικά υβρίδια.

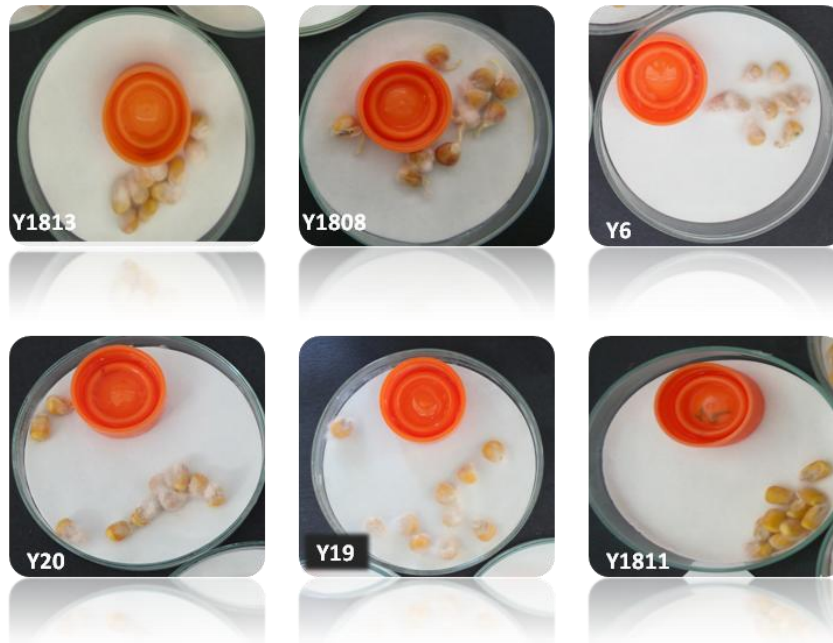
#### 4.2.2 Αξιολόγηση παραγωγής κονιδίων

Μετά την αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθένειας πραγματοποιήθηκε συλλογή των μολυσμένων σπόρων καλαμποκιού 7 ημέρες με τη μόλυνση τους με τα 4 διαφορετικά στελέχη των μυκήτων *F. verticillioides* και *F. proliferatum*. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων κονιδίων έδειξαν ότι όλα τα υβρίδια καλαμποκιού που εξετάστηκαν είχαν συγκέντρωση κονιδίων (σύνολο μακρο- και μικροκονιδίων) από  $2 \times 10^6$  έως  $11,5 \times 10^7$  κονίδια/σπόρο (ΕΙΚ. 21). Πιο συγκεκριμένα, στα υβρίδια 4, 20 και 1813 η συγκέντρωση των κονιδίων ήταν υψηλότερη από  $10^8$  κονίδια/σπόρο. Τα υβρίδια 2, 6, 19, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, N4, 1807, 1811 και 1812 είχαν συγκέντρωση κονιδίων η οποία ήταν κάτω από την τιμή  $4 \times 10^7$  κονίδια/σπόρο. Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε σε μερικά υβρίδια μεταξύ συμπτωμάτων και κονιδιογένεσης είναι αναμενόμενη διότι οι μύκητες μπορεί να αναπτύσσουν μυκήλιο στους σπόρους και να οδηγούν σε υψηλό δείκτη ασθένειας χωρίς όμως να έχουν την ικανότητα να παράγουν σημαντικό αριθμό κονιδίων (ΕΙΚ. 22). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS και παρουσιάζεται στον Πίνακα 2. Αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες των υβριδίων που συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της κονιδιογένεσης, αλλά όχι της ανάπτυξης του μυκηλίου.



**Εικόνα 21.** Αριθμός κονιδίων των μυκήτων *F. verticillioides* και *F. proliferatum* /σπόρο καλαμποκιού για τα διαφορετικά υβρίδια.



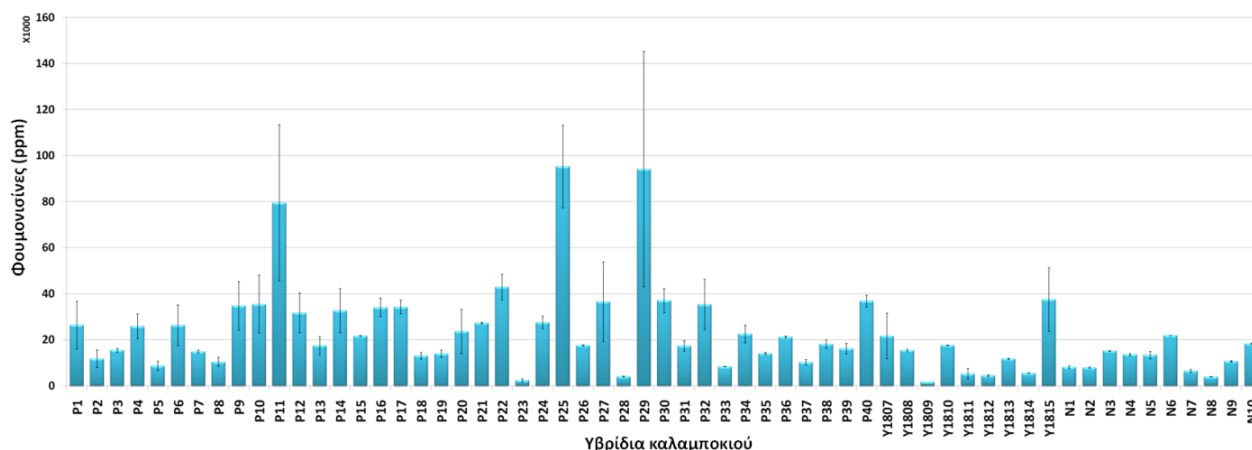


**Εικόνα 22.** Μόλυνση 6 διαφορετικών υβριδίων καλαμποκιού με *F. verticillioides* και *F. proliferatum*. Διαπιστώνονται τα διαφορετικά επίπεδα της ασθένειας ανάλογα με το υβρίδιο.

#### 4.2.3 Αξιολόγηση παραγωγής φουμονισινών

Η προκαταρκτική αξιολόγηση των υβριδίων καλαμποκιού από το γενετικό υλικό της Εταιρείας Σπύρου ως προς την παρουσία φουμονισινών έγινε *in vitro*, όπου σπόροι από κάθε υβρίδιο μολύνθηκαν με αιώρημα κονιδίων του μίγματος των 4 στελεχών του *F. verticillioides* και *F. proliferatum* (Kernel Inoculation Assay). Η μέτρηση των φουμονισινών έγινε με τη μέθοδο της ELISA και πιο συγκεκριμένα με το kit ανάλυσης Agra Quant® ELISA Fumonisin (250-5000 ppb) της Romer Labs. Τα αποτελέσματα της παραγωγής φουμονισινών από τα 4 στελέχη *Fusarium* spp. στα υβρίδια καλαμποκιού που εξετάστηκαν *in vitro* έδειξαν ένα ευρύ φάσμα τιμών-μολύνσεων που κυμαίνονταν από  $1,7 \times 10^3$  ως  $95,2 \times 10^3$  ppm (ΕΙΚ. 23). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS και παρουσιάζεται στον Πίνακα 3. Τα υβρίδια 11, 25, 29 παρουσίασαν συγκεντρώσεις φουμονισινών άνω των  $80 \times 10^3$  ppm ενώ τα υβρίδια 23, 28, 1809 και N8 παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα παραγωγής φουμονισινών, με συγκεντρώσεις οι οποίες κυμαίνονταν κάτω από  $4 \times 10^3$  ppm. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS και παρουσιάζεται στον Πίνακα 3. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την παρουσία γενετικών παραγόντων στα υβρίδια που επηρεάζουν σημαντικά τη βιοσύνθεση φουμονισινών. Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε σε μερικά υβρίδια μεταξύ συμπτωμάτων, κονιδιογένεσης και παραγωγής φουμονισινών είναι αναμενόμενη διότι είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία (Vincelli & Parker, 2002), ότι δεν συνδέεται πάντα η ανάπτυξη των μυκοτοξικογόνων μυκήτων στους σπόρους με τη βιοσύνθεση

μυκοτοξινών. Επιπλέον, αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες των υβριδίων που συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης φουμονισινών, αλλά όχι της κονιδιογένεσης ή της ανάπτυξης του μυκηλίου.

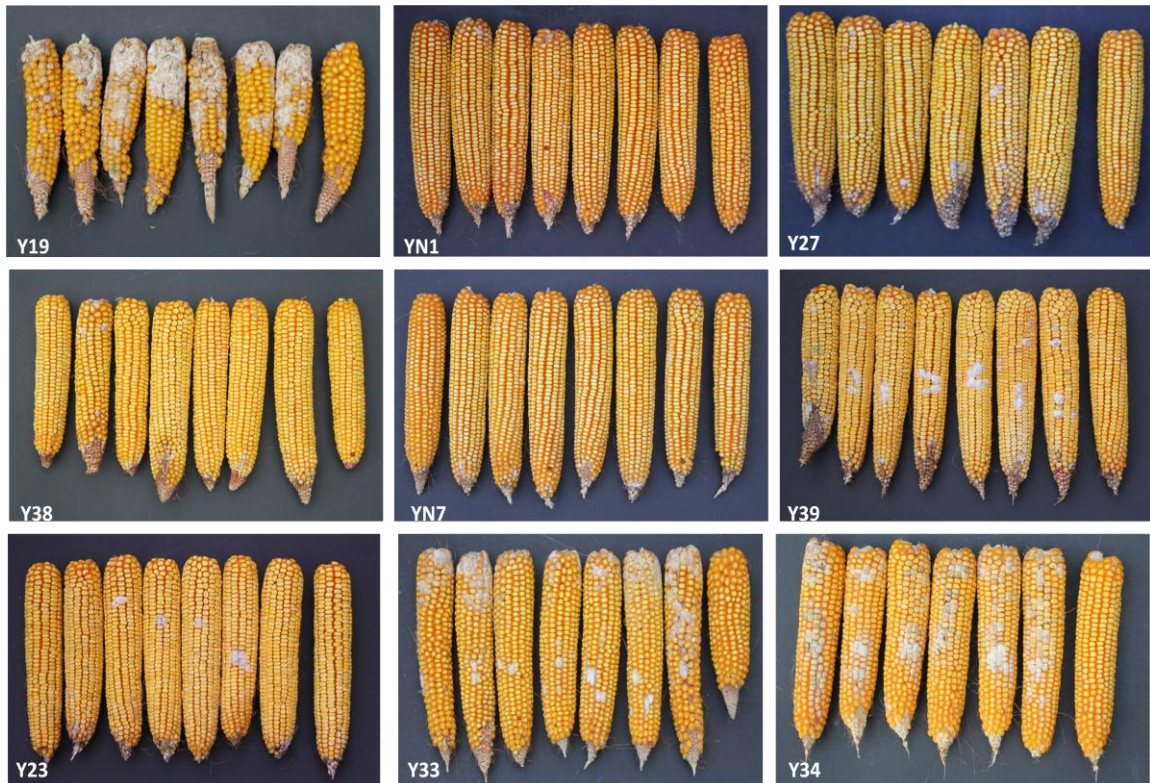
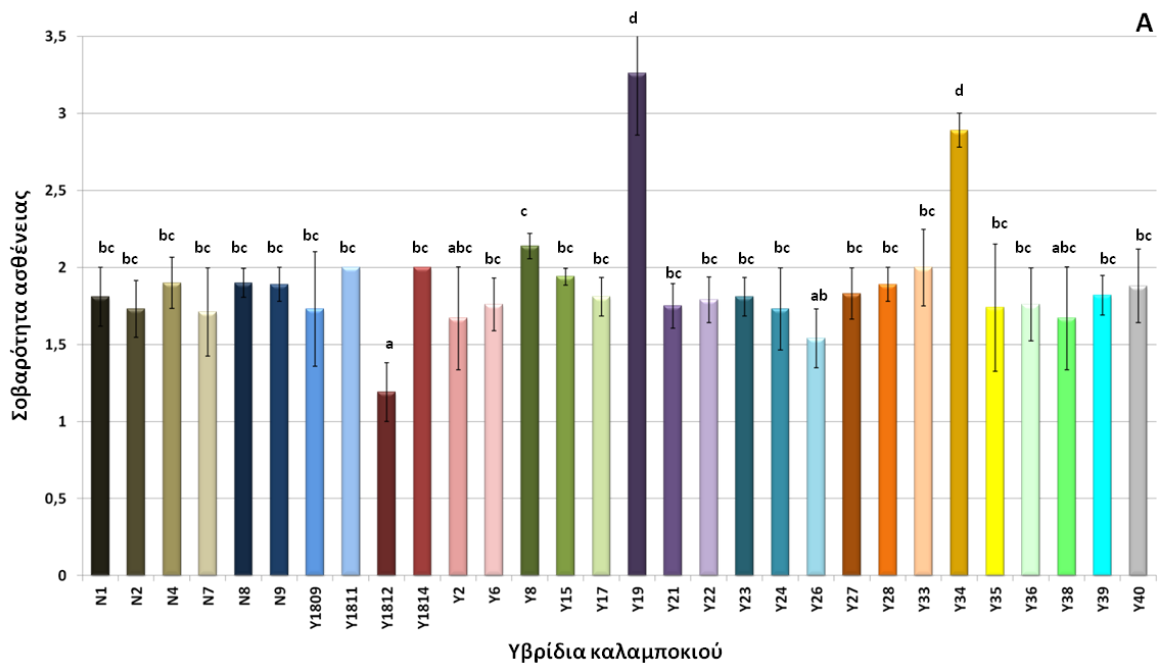


**Εικόνα 23.** Μέτρηση φουμονισινών που παρήχθησαν από τους μύκητες *F. verticillioides* και *F. proliferatum* σε διαφορετικά υβρίδια καλαμποκιού.

### 4.3 Αξιολόγηση υβριδίων καλαμποκιού ως προς την ανθεκτικότητά τους στους μύκητες *Fusarium proliferatum* - *Fusarium verticillioides* σε πειράματα αγρού

#### 4.3.1 Αξιολόγηση μολυσματικότητας

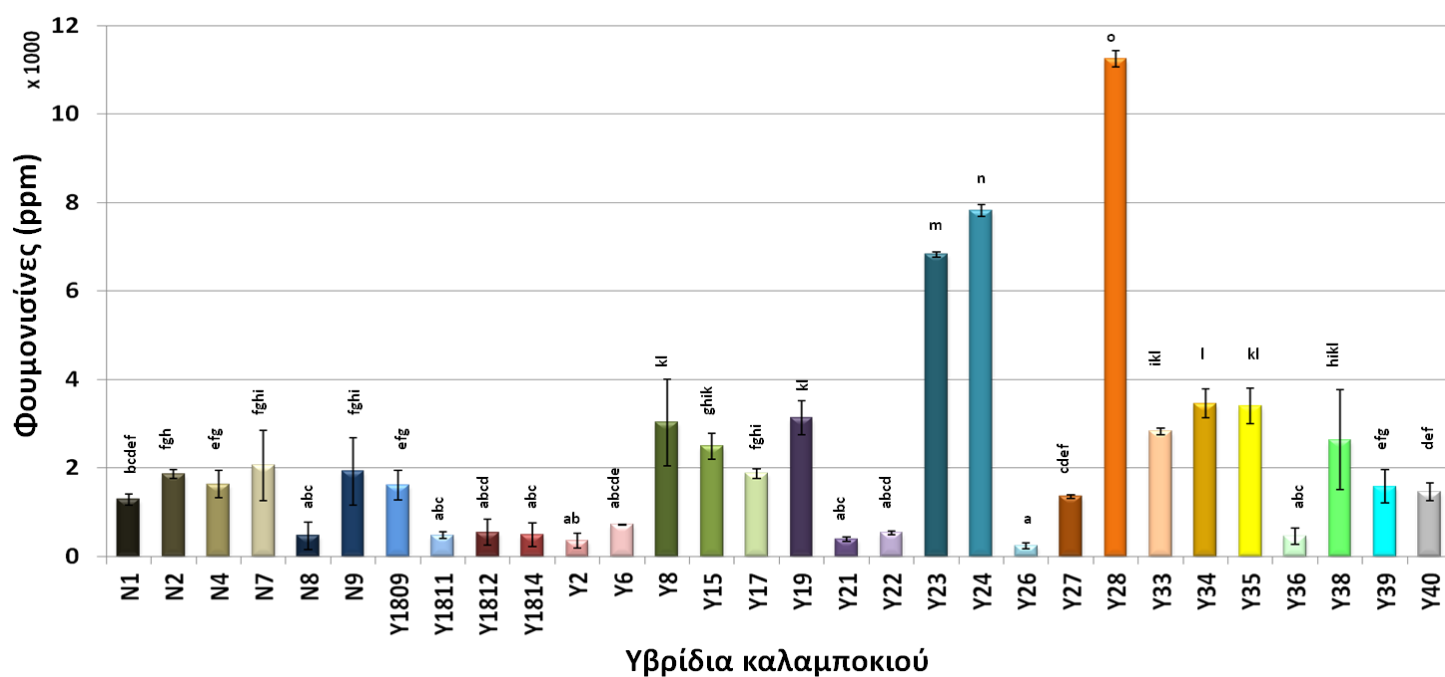
Για την περαιτέρω αξιολόγηση επιλεγμένων υβριδίων καλαμποκιού πραγματοποιήθηκαν πειράματα αγρού σε πειραματικό τεμάχιο του Εργ. Φυτοπαθολογίας στο ΓΠΑ. Μετά την *in vitro* αξιολόγηση, επιλέχθηκαν 30 υβρίδια που παρουσίασαν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, χαμηλά επίπεδα σοβαρότητας της ασθένειας, παραγωγής κονιδίων και παραγωγής φουμονισινών. Τα υβρίδια μολύνθηκαν στο στάδιο του μεταξώματος στις 21 Ιουλίου και η συλλογή των σπαδικών πραγματοποιήθηκε στις 5 Σεπτεμβρίου. Μετά τη συλλογή των σπαδικών πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της σοβαρότητας της ασθένειας, σύμφωνα με την κλίμακα υπολογισμού (δείκτης ασθένειας) της εμφανής μόλυνσης 1=5-10%, 2=10-30%, 3=30-50%, 4=50-75%, 5=75-100% και 6=100%. Τα αποτελέσματα της σοβαρότητας της ασθένειας έδειξαν ότι όλα τα υβρίδια καλαμποκιού που εξετάστηκαν κάλυπταν ποσοστά με δείκτη ασθένειας 1-4, δηλαδή από 10% ως περίπου 75% (ΕΙΚ. 24.Α.). Τα υβρίδια 8, 19 και 34 παρουσίασαν ποσοστό ασθένειας μεγαλύτερο του 30% ενώ το υβρίδιο 1812 παρουσίασε το χαμηλότερο ποσοστό ασθένειας, το οποίο ήταν ίσο με 10%. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS.



**Εικόνα 24. Α.** Διάγραμμα δείκτη σοβαρότητας ασθένειας σε σπάδικες διαφορετικών υβριδίων καλαμποκιού. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω στις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ( $P$ )  $\leq 0,05$ . **Β.** Παραλλακτικότητα των συμπτωμάτων και σημείων της σήψης στους σπάδικες διαφορετικών υβριδίων του αγρού.

### 4.3.2 Αξιολόγηση παραγωγής φουμονισινών

Η αξιολόγηση των επιλεγμένων υβριδίων καλαμποκιού τα οποία καλλιεργήθηκαν στον πειραματικό αγρό του Γ.Π.Α. από το γενετικό υλικό της Εταιρείας Σπύρου ως προς την παρουσία φουμονισινών έγινε με μέτρηση της συγκέντρωσής τους, με τη μέθοδο της ELISA και πιο συγκεκριμένα με το kit ανάλυσης Agra Quant® ELISA Fumonisin (250-5000 ppb) της Romer Labs. Τα αποτελέσματα της παραγωγής φουμονισινών από τα 4 στελέχη *Fusarium* spp. στα υβρίδια καλαμποκιού που εξετάστηκαν έδειξαν ένα ευρύ φάσμα τιμών-μολύνσεων που κυμαίνονταν από 237 ως 11243 ppb (ΕΙΚ. 25). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS. Τα υβρίδια στα οποία παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα φουμονισινών ήταν τα υβρίδια 23, 24 και 28. Στα υβρίδια 8, 19, 33, 34 και 35 τα επίπεδα φουμονισινών κυμάνθηκαν σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, ενώ τα υβρίδια N8, 1811, 1812, 1814, 2, 6, 21, 22, 26, και 36 παρήγαγαν τα πιο χαμηλά επίπεδα φουμονισινών συγκριτικά με τα υπόλοιπα υβρίδια.



**Εικόνα 25.** Μέτρηση φουμονισινών που παρήχθησαν από τους μύκητες *F. verticillioides* και *F. proliferatum* σε διαφορετικά υβρίδια καλαμποκιού, στον αγρό. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω στις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ( $P$ )  $\leq 0,05$ .

## **4.4 Ταυτοποίηση ελληνικών απομονώσεων του γένους *Fusarium* από ελληνικά καλαμπόκια**

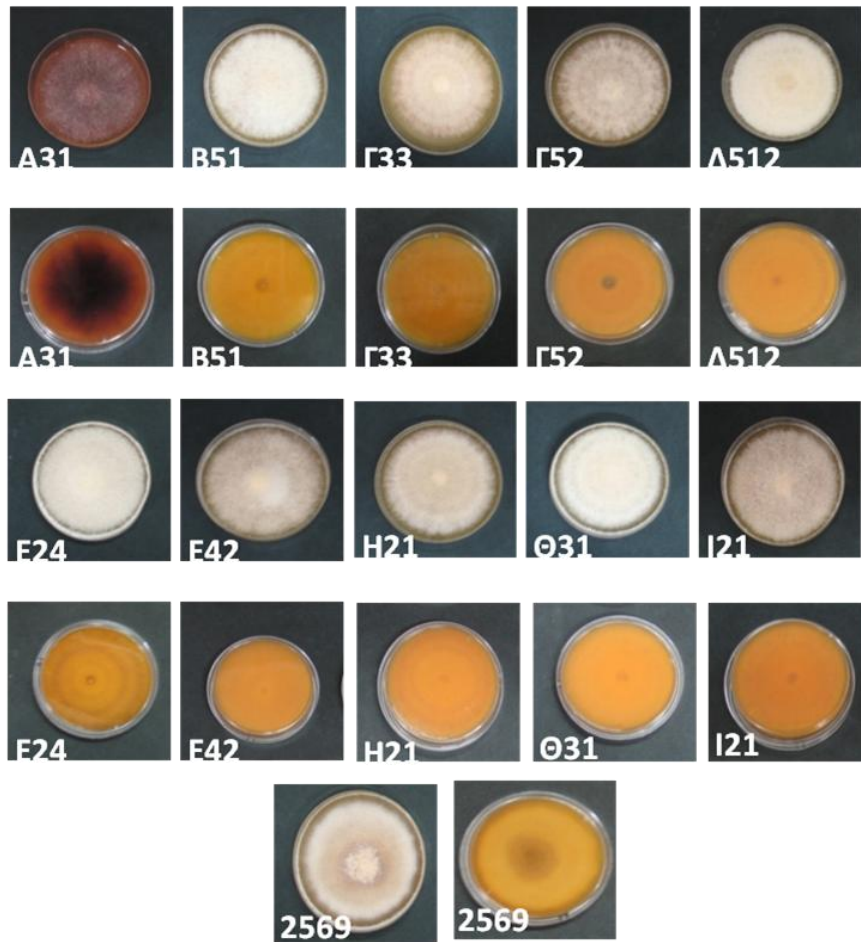
### **4.4.1. Επιλογή ελληνικών απομονώσεων *Fusarium* spp. από καλαμπόκια**

Με στόχο την περαιτέρω αξιολόγηση ως προς τη μόλυνση με διάφορα ελληνικά ενδημικά στελέχη *Fusarium* spp., δύο επιλεγμένων ανεκτικών υβριδίων καλαμποκιού στην παραγωγή φουμονισινών, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση διαφόρων στελεχών *Fusarium* spp. από μολυσμένους σπάδικες καλαμποκιού από αγρούς της Θεσσαλίας. Η απομόνωση των στελεχών έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.1 και ακολούθησε η φαινοτυπική-μορφολογική ανάλυσή και μοριακή ταυτοποίησή τους. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 7 στελέχη από τη συλλογή του Μπεννακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ), τα MP1371, MP2545, MP2549, MP2564, MP2565, MP2569 και MP2577 που είχαν προσδιοριστεί ως *Fusarium proliferatum*.

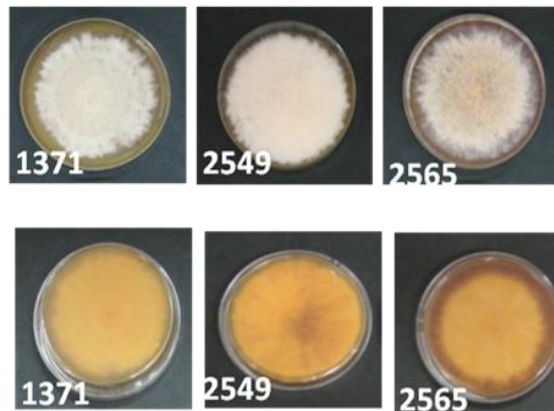
### **4.4.2. Μορφολογικός χαρακτηρισμός *Fusarium* spp.**

Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.5.1, οι διάφορες απομονώσεις *F. verticillioides*, *F. proliferatum* και *F. subglutinans* από καλαμπόκι καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ (ΕΙΚ. 26) και PDA και μετά από 7 ημέρες έγινε μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση τους. Παρατηρήθηκε σημαντική μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ των διαφόρων απομονώσεων *F. verticillioides* με την παρουσία διαφόρων ερυθρών χρωστικών (π.χ. στέλεχος A31) ή την παρουσία διαφορετικής μυκηλιακής ανάπτυξης της αποικίας ( π.χ. στελέχη Γ33, Γ52, Ε42, Η21, Ι21). Το στέλεχος MP2545 που βάσει της μοριακής ανάλυσης πιθανόν να ανήκει στο είδος *F. subglutinans* παρουσίασε έντονη παραγωγή ερυθρών χρωστικών και διαφορετική μυκηλιακή ανάπτυξη στα τριβλία. Ομοίως τα στελέχη *F. proliferatum* MP1371, MP2549, MP2565 διέφεραν σημαντικά μορφολογικά συγκριτικά με τα είδη *F. verticillioides* και *F. subglutinans*.

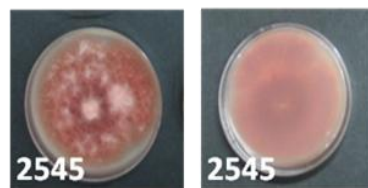
Όσον αφορά τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής παρατήρησης των διαφόρων στελεχών στα θρεπτικά υποστρώματα ΜΕΑ και PDA, στην πλειοψηφία των δειγμάτων παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο μήκος των μακροκονιδίων και των μικροκονιδίων των μυκήτων. Τα στελέχη που με βάση την φυλογενετική ανάλυση ανήκουν στο είδος *Fusarium verticillioides* παρουσίασαν ομοιομορφία ως προς το μέγεθος των κωνιδίων (μάκρο- και μικρο-). Το ίδιο παρατηρήθηκε και μεταξύ των στελεχών που με βάση την φυλογενετική ανάλυση ανήκουν στο είδος *Fusarium proliferatum* (ΕΙΚ. 27). Μικροσκοπικά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη, στα μακροκονίδια και μικροκονίδια του στελέχους MP2545 που βάσει της μοριακής ανάλυσης πιθανόν να ανήκει στο είδος *F. subglutinans*.



*Fusarium verticillioides*

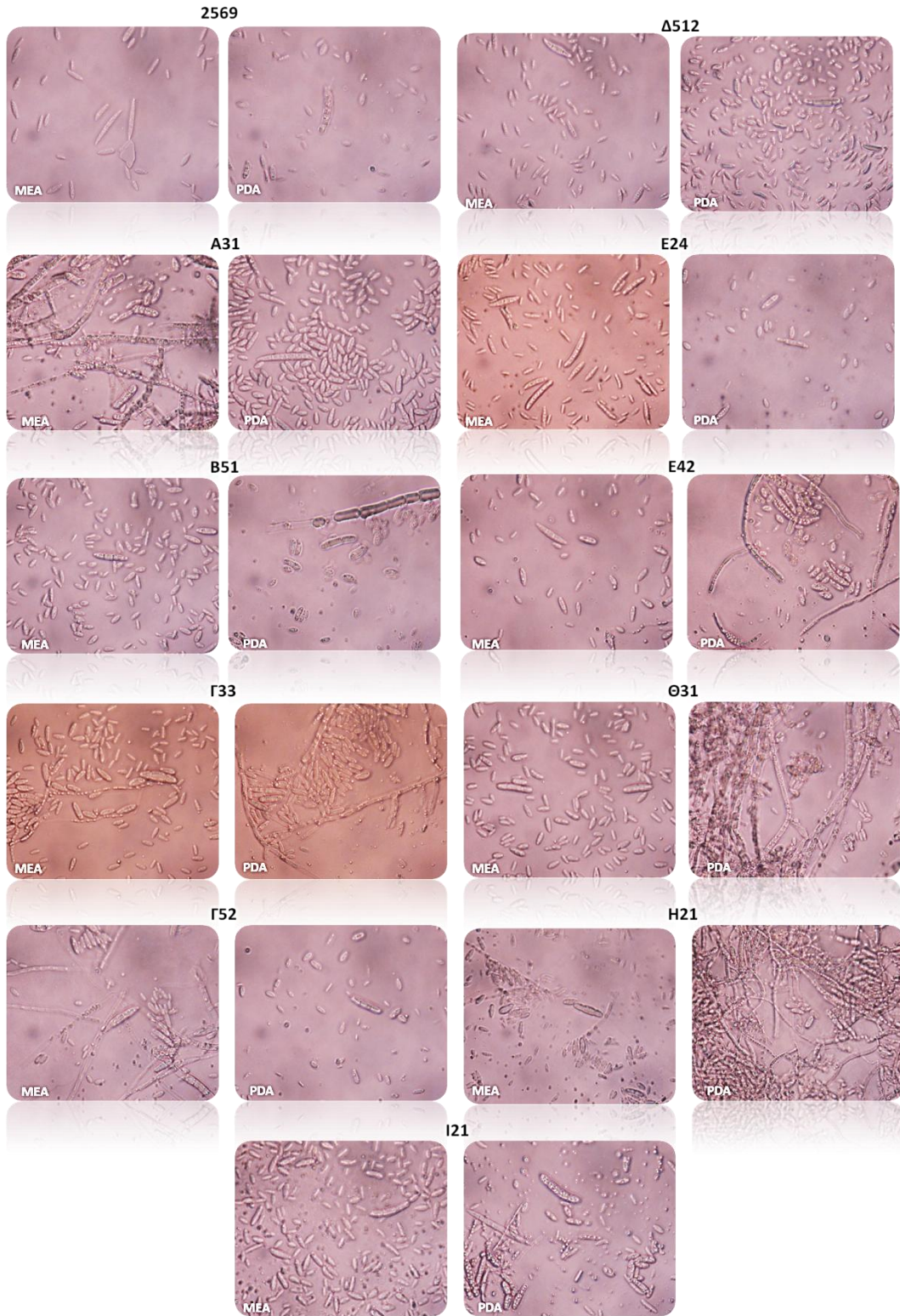


*Fusarium proliferatum*

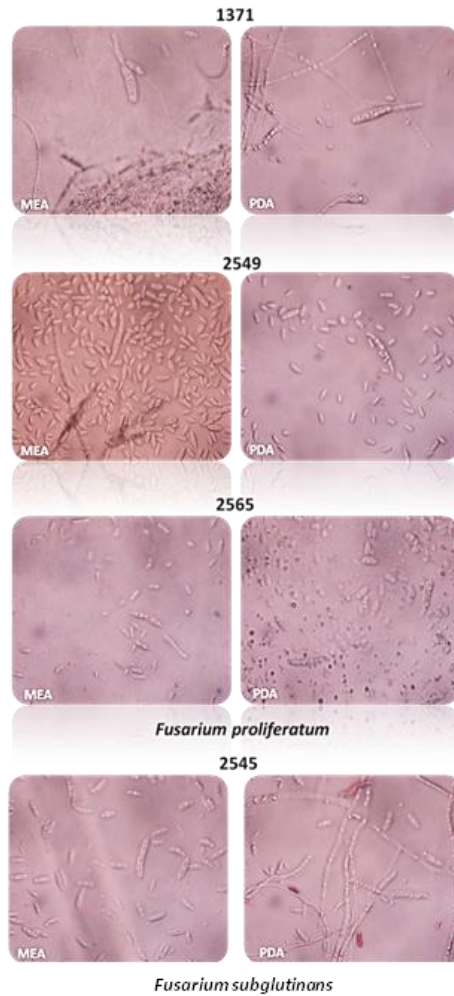


*Fusarium subglutinans*

**Εικόνα 26.** Ανάπτυξη διαφόρων ελληνικών στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ.



*Fusarium verticillioides*



**Εικόνα 27.** Μακροκονίδια και μικροκονίδια διαφόρων στελεχών ελληνικών απομονώσεων σε θρεπτικό υπόστρωμα MEA και PDA.

#### **4.4.3. Μοριακός χαρακτηρισμός *Fusarium* spp.**

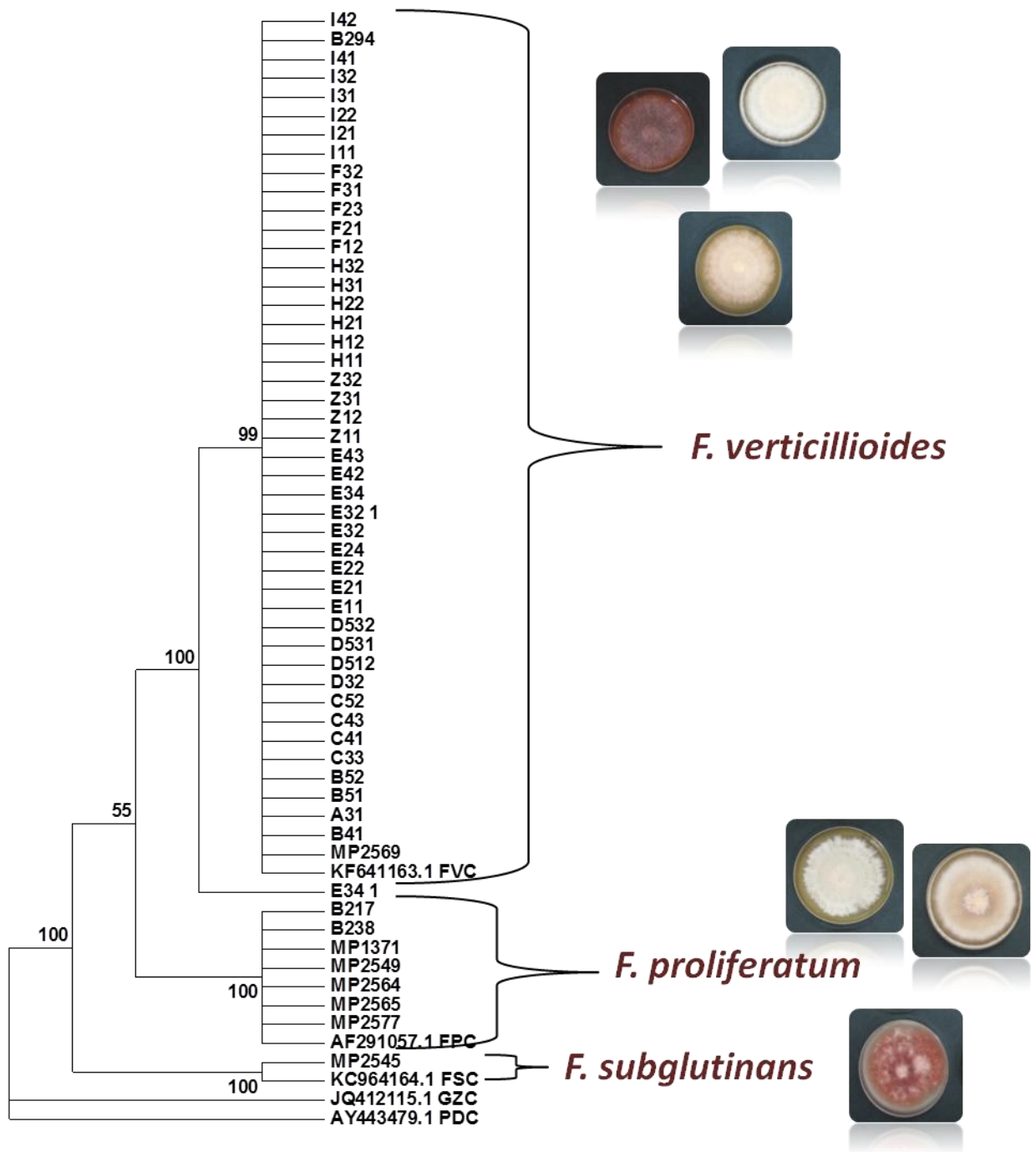
Το τμήμα του DNA των ελληνικών απομονώσεων μυκήτων του γένους *Fusarium* sp. πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της PCR. Στη συνέχεια υπέστη επεξεργασία, καθώς αφαιρέθηκαν από την αρχή και το τέλος τμήματα των αλληλουχιών, ακολούθησε στοίχιση αυτών με τη χρήση του προγράμματος MEGA6 και κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.



#### 4.4.4 Φυλογενετική ανάλυση

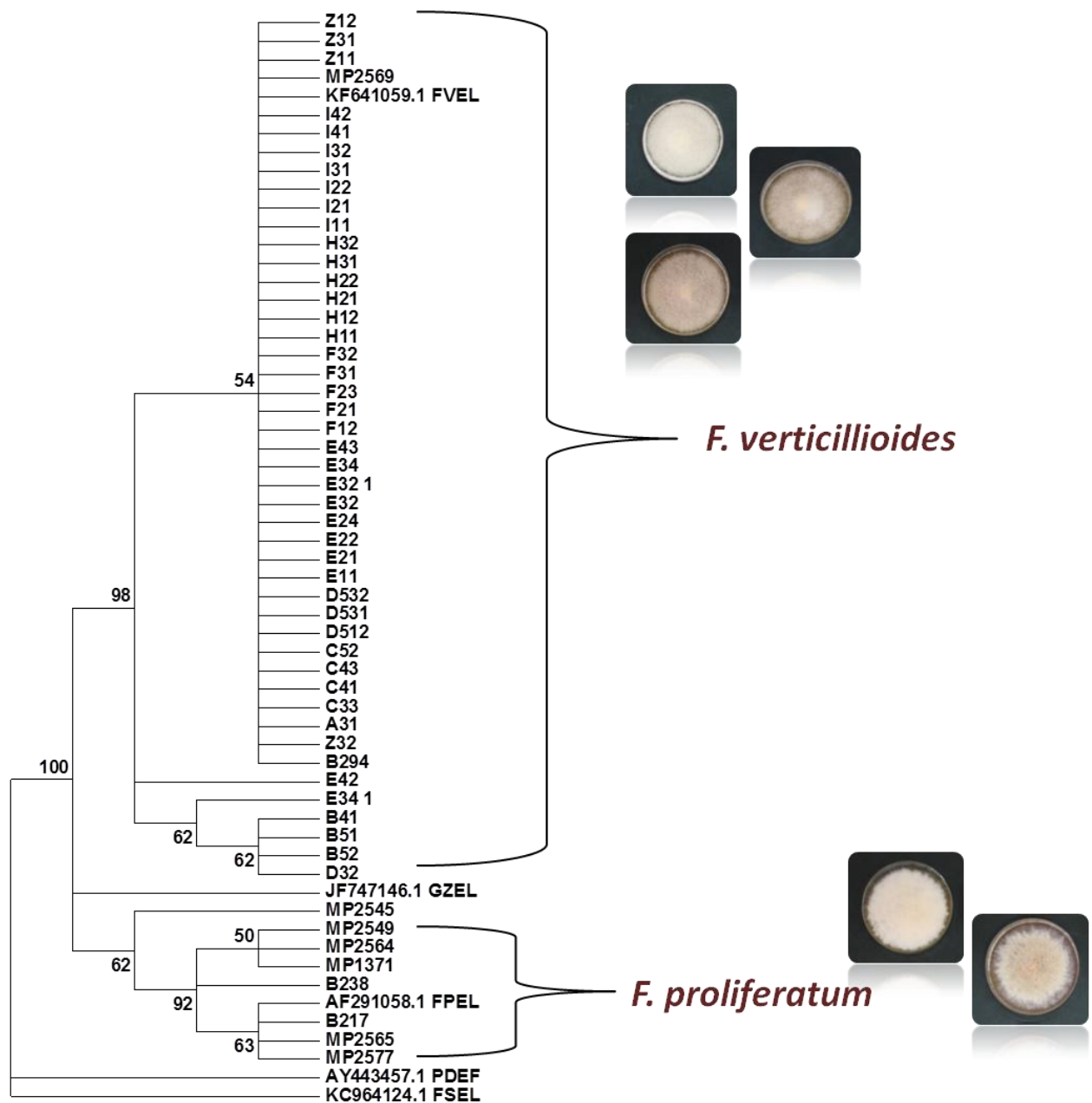
Οι ακολουθίες που προέκυψαν από το μοριακό χαρακτηρισμό των *Fusarium* spp. χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει η φυλογενετική ανάλυση των διαφόρων στελεχών. Με βάση την μεθοδολογία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.6 προέκυψαν τρία φυλογενετικά δέντρα ανάλογα με το γενετικό τόπο που επιλέχθηκε για τη δημιουργία του κάθε δέντρου. Για κάθε φυλογενετικό δέντρο χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες αλληλουχίες. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή των Μέγιστων Πιθανοτήτων- *Maximum Likelihood* μέσω του προγράμματος MEGA6. Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε και στα τρία φυλογενετικά δέντρα ήταν το K2 (Kimura M., 1980). Έγιναν 100 bootstrap επαναλήψεις για να ελεγχθεί η στατιστική υποστήριξη των κλάδων.

Στο πρώτο φυλογενετικό δέντρο (ΕΙΚ. 28), παρουσιάζεται το δέντρο το οποίο αναφέρεται σε ένα γενετικό τόπο, αυτόν του γονιδίου της καλμοντουλίνης (CAM). Παρατηρούμε ότι σχεδόν όλες οι απομονώσεις που προέκυψαν από τους σπόρους καλαμποκιού (παράγραφος 3.4) ανήκουν στο είδος *F. verticillioides* (χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *F. verticillioides* KF641163.1, ως στέλεχος αναφοράς) με το στέλεχος E34\_1 να διαφέρει λίγο περισσότερο από τα υπόλοιπα. Σε αυτή την ομάδα βρίσκεται και το στέλεχος B294 από την Ιταλία. Από τα στελέχη του ΜΦΙ, το στέλεχος MP2569 (Κ.Ε. F628, Κ. Elena, 2002) ανήκει στο είδος *F. verticillioides* και όχι στο είδος *F. proliferatum* όπως αρχικά είχε προσδιοριστεί με βάση τα μορφολογικά του δεδομένα σε παλιότερες μελέτες. Επίσης, με βάση αυτή τη φυλογενετική και μοριακή ανάλυση το στέλεχος MP2545 (Κ.Ε. F430, Κ. Elena, 1995) ανήκει στο είδος *F. subglutinans* (χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *F. subglutinans* KC964164, ως στέλεχος αναφοράς) και όχι στο είδος *F. proliferatum* όπως αναφερόταν σε παλιότερες μελέτες. Τα στελέχη B217, B238 από την Ιταλία και τα ελληνικά MP1371, MP2549 και MP2565 ομαδοποιήθηκαν όλα μαζί ως *F. proliferatum* χρησιμοποιώντας το στέλεχος *F. proliferatum* AF 291057.1, ως στέλεχος αναφοράς.



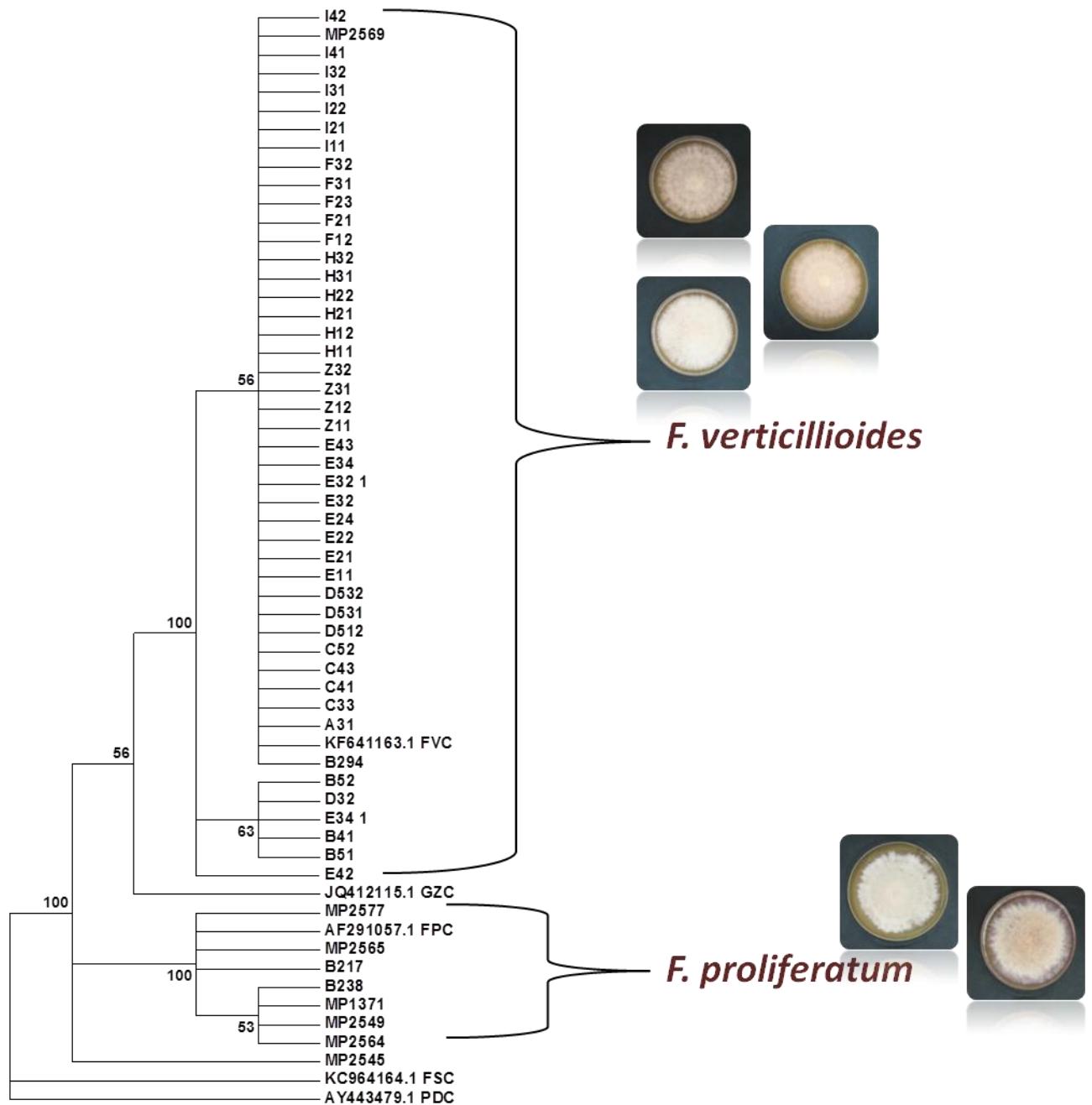
**Εικόνα 28.** Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* και *F. subglutinans* από καλαμπόκι με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (CAM). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KF 641163.1 (*F. verticillioides*), AF 291057.1 (*F. proliferatum*), KC964164.1 (*F. subglutinans*), JQ412115.1 (*F. graminearum*) και AY 443479.1 (*Penicillium* sp.) Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις).

Στο δεύτερο φυλογενετικό δέντρο (ΕΙΚ. 29) παρουσιάζεται το δέντρο το οποίο αναφέρεται σε ένα γενετικό τόπο, αυτόν του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Παρατηρούμε ότι σχεδόν όλες οι απομονώσεις που προέκυψαν από τους σπόρους καλαμποκιού (παράγραφος 3.4) ανήκουν στο είδος *F. verticillioides* (χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *F. verticillioides* KF641163.1, ως στέλεχος αναφοράς) με τα στελέχη E34\_1, E42, B41, B51, B552 και Δ32 να διαφέρουν από τα υπόλοιπα. Σε αυτή την ομάδα βρίσκεται και το στέλεχος B294 από την Ιταλία. Από τα στελέχη του ΜΦΙ, το στέλεχος MP2569 (Κ.Ε. F628, Κ. Elena, 2002) ανήκει στο είδος *F. verticillioides* και όχι στο είδος *F. proliferatum*, όπως αρχικά είχε προσδιοριστεί με βάση τα μορφολογικά του δεδομένα σε παλιότερες μελέτες. Επίσης, με βάση αυτή τη φυλογενετική και μοριακή ανάλυση το στέλεχος MP2545 (Κ.Ε. F430, Κ. Elena, 1995) δεν ανήκει στο είδος *F. subglutinans* (χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *F. subglutinans* KC964164, ως στέλεχος αναφοράς) και ούτε στο είδος *F. proliferatum* όπως αναφερόταν σε παλιότερες μελέτες. Τα στελέχη B217 (από την Ιταλία), MP2565, MP2577 διαφέρουν λίγο από τα στελέχη MP2549, MP2564 και MP1371, ενώ το στέλεχος B238 (από την Ιταλία) διέφερε από τις παραπάνω ομάδες. Όλα μαζί ανήκουν στο είδος *F. proliferatum* χρησιμοποιώντας το στέλεχος *F. proliferatum* AF 291057.1 , ως στέλεχος αναφοράς.



**Εικόνα 29.** Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides* και *F. proliferatum* από καλαμπόκι με βάση το γενετικό τόπο του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KF 641163.1 (*F. verticillioides*), AF 291057.1 (*F. proliferatum*), KC964164.1 (*F. subglutinans*), JQ412115.1 (*F. graminearum*) και AY 443479.1 (*Penicillium* sp.) Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις).

Στο τρίτο φυλογενετικό δέντρο (ΕΙΚ. 30) παρουσιάζεται το δέντρο το οποίο αναφέρεται σε δύο γενετικούς τόπους, αυτόν του γονιδίου της καλμοντουλίνης (CAM) και του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Παρατηρούμε ότι σχεδόν όλες οι απομονώσεις που προέκυψαν από τους σπόρους καλαμποκιού (παράγραφος 3.4) ανήκουν στο είδος *F. verticillioides* (χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *F. verticillioides* KF641163.1, ως στέλεχος αναφοράς) με τα στελέχη E34\_1, E42, B41, B51, B552 και Δ32 να διαφέρουν από τα υπόλοιπα. Σε αυτή την ομάδα βρίσκεται και το στέλεχος B294 από την Ιταλία. Από τα στελέχη του ΜΦΙ, το στέλεχος MP2569 (Κ.Ε. F628, Κ. Elena, 2002) ανήκει στο είδος *F. verticillioides* και όχι στο είδος *F. proliferatum*, όπως αρχικά είχε προσδιοριστεί με βάση τα μορφολογικά του δεδομένα σε παλιότερες μελέτες. Επίσης, με βάση αυτή τη φυλογενετική και μοριακή ανάλυση το στέλεχος MP2545 (Κ.Ε. F430, Κ. Elena, 1995) δεν ανήκει στο είδος *F. subglutinans* (χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *F. subglutinans* KC964164, ως στέλεχος αναφοράς) και ούτε στο είδος *F. proliferatum* όπως αναφερόταν σε παλιότερες μελέτες. Τα στελέχη B217 (από την Ιταλία), MP2565 και MP2577 διέφεραν από τα στελέχη B238, MP1371, MP2549 και MP2564. Όλα μαζί ανήκουν στο είδος *F. proliferatum* χρησιμοποιώντας το στέλεχος *F. proliferatum* AF 291057.1, ως στέλεχος αναφοράς.



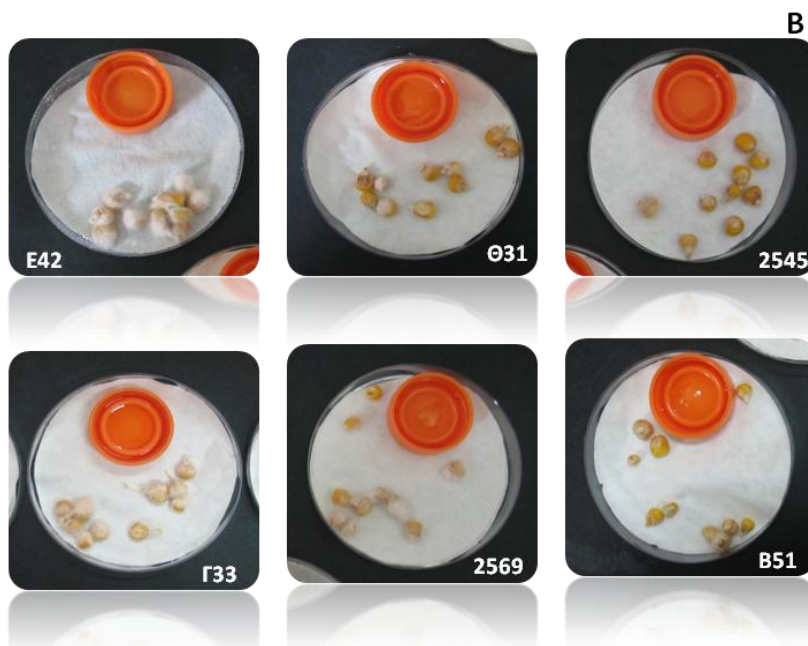
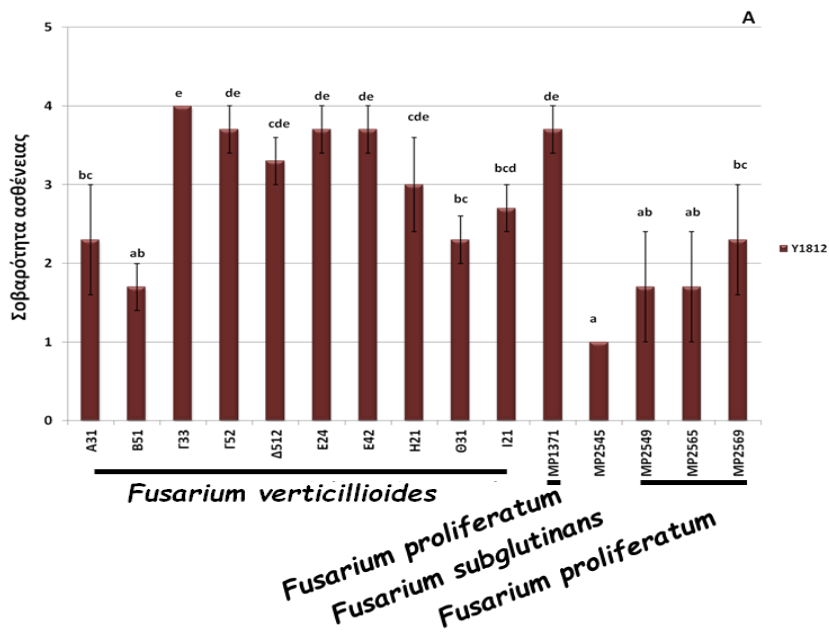
**Εικόνα 30.** Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides* και *F. proliferatum* από καλαμπόκι με βάση το γενετικό τόπο του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) και το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (CAM).. Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KF 641163.1 (*F. verticillioides*), AF 291057.1 (*F. proliferatum*), KC964164.1 (*F. subglutinans*), JQ412115.1 (*F. graminearum*) και AY 443479.1 (*Penicillium* sp.) Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις).

#### **4.5 Αξιολόγηση μολυσματικής ικανότητας ελληνικών απομονώσεων *F. verticillioides* και *F. proliferatum***

Με στόχο να διερευνήσουμε την παραλλακτικότητα των διαφόρων ελληνικών απομονώσεων που περιγράφηκαν σε προηγούμενα κεφάλαια, επιλέχθηκαν δύο υβρίδια καλαμποκιού, το 28 και το 1812, τα οποία παρουσίασαν χαμηλό δείκτη σοβαρότητας ασθένειας, χαμηλά επίπεδα παραγωγής κονιδίων και φουμονισινών στα *in vitro* πειράματα (παράγραφος 4.2). Αναλυτικότερα, επιλέχθηκαν τα στελέχη *F. verticillioides* A31, B51, Γ33, Γ52, Δ512, E24, E42, Η21, Θ31, Ι21, τα στελέχη *F. proliferatum* MP1371, MP2549, MP2565, MP2569 και το πιθανό στέλεχος *F. subglutinans* MP2545. Τα διάφορα στελέχη αξιολογήθηκαν ως προς τη μολυσματικότητα, παραγωγή κονιδίων και παραγωγή φουμονισινών στα υβρίδια 28 και 1812.

##### **4.5.1 Αξιολόγηση μολυσματικότητας**

Με στόχο την αξιολόγηση των συμπτωμάτων και των σημείων της σήψης των διαφόρων στελεχών υπολογίστηκε ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας. Η σοβαρότητα της ασθένειας εκτιμήθηκε με βάση το ποσοστό μόλυνσης των σπόρων ανά υβρίδιο με μια κλίμακα υπολογισμού (δείκτης ασθένειας) της εμφανής μόλυνσης: 0=0% μολυσμένη επιφάνεια σπόρου, 1=5-10%, 2=10-30%, 3=30-50%, 4=50-75%, 5=75-100% και 6=100%, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση. Με βάση την κλίμακα αυτή, το υβρίδιο 1812 παρουσίασε σημαντική διαφοροποίηση στις μολύνσεις από 10% ως 75% (δείκτης ασθένειας 1-4) (ΕΙΚ. 31.Α.) μετά τη μόλυνση με τα διάφορα στελέχη του γένους *Fusarium* sp. . Πιο συγκεκριμένα, μόλυνση του υβριδίου 1812 με τα στελέχη E42 και Γ33 παρουσίασε αυξημένα ποσοστά μόλυνσης, πάνω από 65%. Στο ίδιο υβρίδιο τα στελέχη Θ31 και MP2569 παρουσίασαν ποσοστά μόλυνσης, τα οποία κυμαίνονταν γύρω στο 30%, ενώ για τα στελέχη MP2545 και B51 παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό μόλυνσης, το οποίο ήταν περίπου 10-15% (ΕΙΚ. 31.Β.). Αντιθέτως, τα υβρίδια A31, B51, Θ31, MP2545, MP2549, MP2565 και MP2569 παρουσίασαν ποσοστό μόλυνσης χαμηλότερο του 20%. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS.

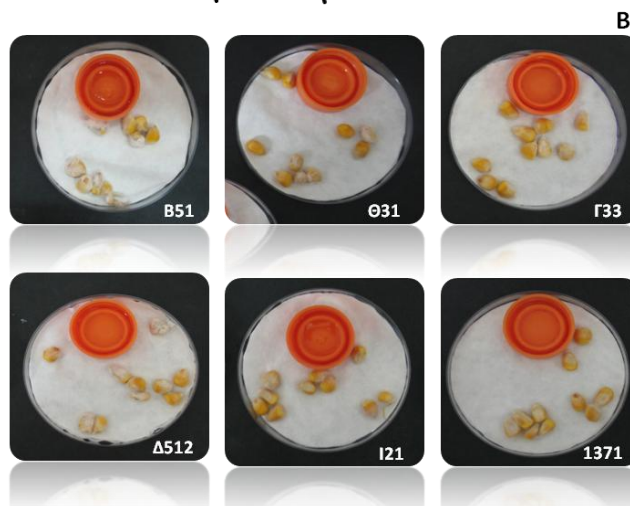
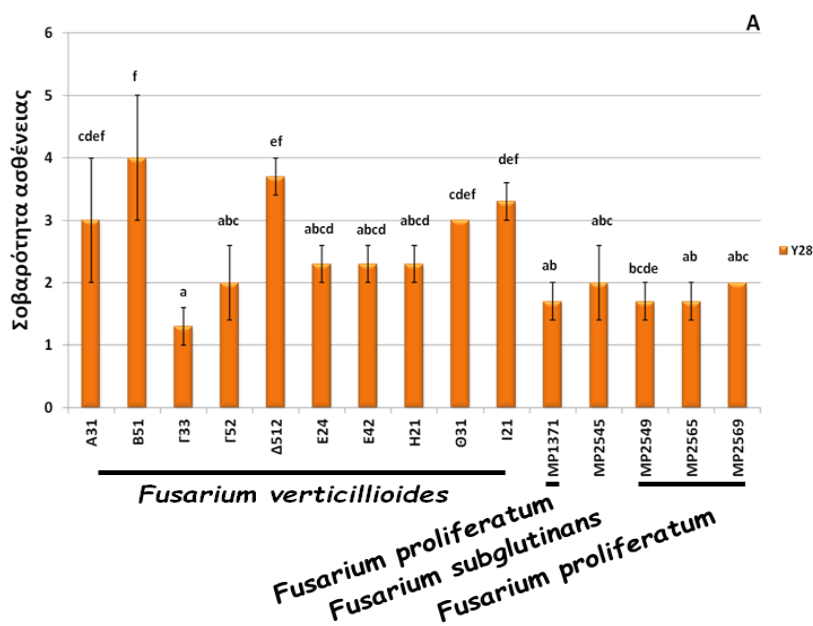


**Εικόνα 31. Α)** Μέτρηση της σοβαρότητας της ασθένειας που προκαλείται από τα διάφορα ελληνικά στελέχη *F. verticillioides* και *F. proliferatum* στο υβρίδιο καλαμποκιού 1812. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω στις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ). **Β)** Παραλλακτικότητα των συμπτωμάτων και σημείων της σήψης από τα διάφορα στελέχη του γένους *Fusarium* sp.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της σοβαρότητας της ασθένειας, για το υβρίδιο 28 έδειξαν ότι όλα τα στελέχη του γένους *Fusarium* sp. παρουσίασαν ποσοστά μόλυνσης με δείκτη ασθένειας 1-4, δηλαδή από 10% ως 75% (ΕΙΚ. 32.Α.). Πιο συγκεκριμένα, στο υβρίδιο 28 το οποίο είχε μολυνθεί με τα στελέχη Β51 και Δ512



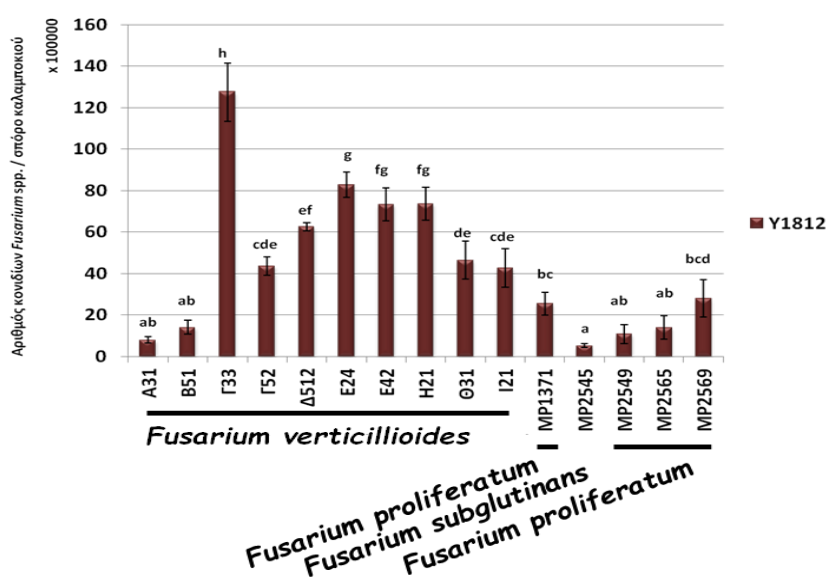
παρουσίασαν αυξημένο ποσοστό μόλυνσης το οποίο ήταν πάνω από 65%. Στο ίδιο υβρίδιο τα στελέχη Ι21 και Θ31 παρουσίασαν ποσοστά μόλυνσης, τα οποία κυμαίνονταν γύρω στο 30%, ενώ για τα στελέχη Γ33 και 1371 παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό μόλυνσης, το οποίο ήταν περίπου 10-15% (ΕΙΚ. 32.Β.). Τα υβρίδια Γ33, Γ52, Ε24, Ε42, Η21, 1371, ΜΡ2545, ΜΡ2549, ΜΡ2565 και ΜΡ2569 παρουσίασαν ποσοστό μόλυνσης χαμηλότερο του 20%. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το STATGRAPHICS.



**Εικόνα 32. Α)** Μέτρηση της σοβαρότητας της ασθένειας που προκαλείται από τα διάφορα ελληνικά στελέχη *F. verticillioides* και *F. proliferatum* στο υβρίδιο καλαμποκιού 28. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω στις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ). **Β)** Παραλλακτικότητα των συμπτωμάτων και σημείων της σήψης από τα διάφορα στελέχη του γένους *Fusarium* sp..

#### 4.5.2 Αξιολόγηση παραγωγής κονιδίων

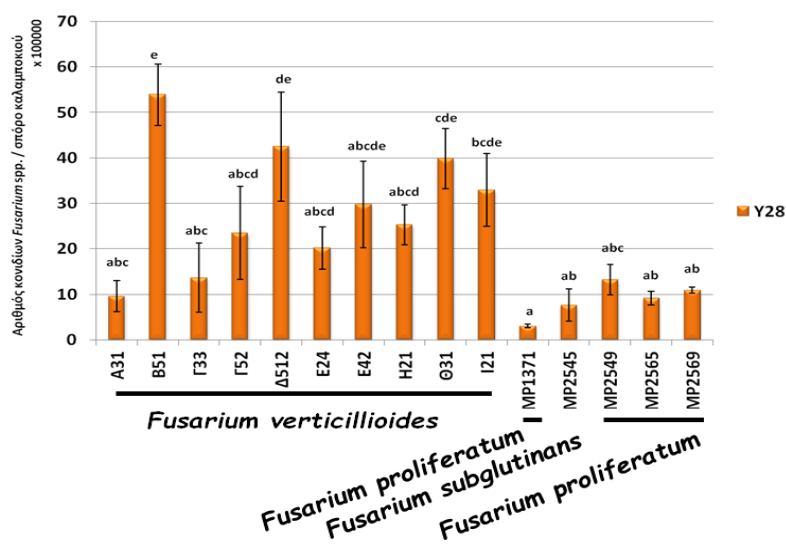
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων κονιδίων στο υβρίδιο 1812 έδειξαν ότι όλα τα στελέχη του *Fusarium* sp. που εξετάστηκαν παρήγαν κονίδια, των οποίων η συγκέντρωση κυμαινόταν  $5,3 \times 10^4$  έως  $12,7 \times 10^6$  κονίδια/σπόρο (ΕΙΚ. 33). Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος Γ33 παρήγαγε την υψηλότερη συγκέντρωση κονιδίων, που παρατηρήθηκε στο υβρίδιο 1812, η οποία ήταν ίση με  $12,7 \times 10^6$ . Τα στελέχη Ε42 και Η21 παρήγαγαν συγκέντρωση κονιδίων η οποία ξεπερνούσε την τιμή  $4 \times 10^6$ , ενώ τα στελέχη Α31 και 2545 παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή κονιδίων, σε επίπεδα κάτω του  $8 \times 10^5$ . Τα στελέχη Α31, Β51, 2545, 2549, 2565 παρουσίασαν χαμηλές συγκεντρώσεις παραγωγής κονιδίων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS.



**Εικόνα 33. Α.** Αριθμός κονιδίων διαφόρων στελεχών *F. verticillioides* και *F. proliferatum* /σπόρο καλαμποκιού στο υβρίδιο 1812. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω στις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ( $P$ )  $\leq 0,05$ . **Β.** Μόλυνση υβριδίου 1812 καλαμποκιού με 3 διαφορετικά στελέχη *Fusarium* sp.. Διαπιστώνονται τα διαφορετικά επίπεδα της ασθένειας ανάλογα με το στέλεχος.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων κονιδίων στο υβρίδιο 28 έδειξαν ότι όλα τα στελέχη του *Fusarium* sp. που εξετάστηκαν παρήγαν κονίδια, των οποίων η συγκέντρωση κυμαινόταν  $3 \times 10^5$  έως  $5,3 \times 10^6$  κονίδια/σπόρο (ΕΙΚ. 34). Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος B51 παρήγαγε την υψηλότερη συγκέντρωση κονιδίων, που παρατηρήθηκε στο υβρίδιο 28, η οποία ήταν ίση με  $5,3 \times 10^6$ . Τα στελέχη Δ512 και Θ31 παρήγαγαν συγκέντρωση κονιδίων η οποία ξεπερνούσε την τιμή  $3 \times 10^6$ , ενώ τα στελέχη 1371 και 2545 παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή κονιδίων, σε επίπεδα κάτω του  $8 \times 10^5$ . Τα στελέχη A31, 1371, 2545 και 2565 παρουσίασαν χαμηλές συγκεντρώσεις παραγωγής κονιδίων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS.

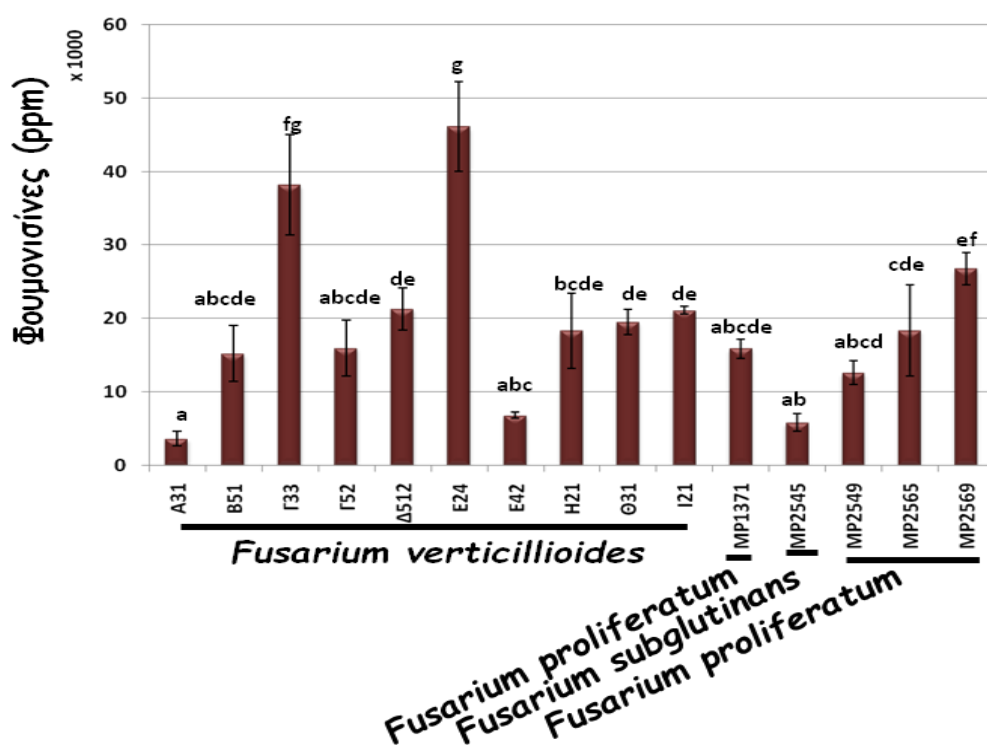
Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε στα διάφορα στελέχη μεταξύ συμπτωμάτων και κονιδιογένεσης είναι αναμενόμενη διότι οι μύκητες μπορεί να αναπτύσσονται μολύνοντας τους σπόρους και να οδηγούν σε υψηλό δείκτη ασθένειας χωρίς όμως να έχουν την ικανότητα να παράγουν σημαντικό αριθμό κονιδίων. Αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες του υβριδίου που συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της κονιδιογένεσης, αλλά όχι της ανάπτυξης του μυκηλίου.



**Εικόνα 34.A.** Αριθμός κονιδίων διαφόρων στελεχών *F. verticillioides* και *F. proliferatum* /σπόρο καλαμποκιού στο υβρίδιο 28. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω στις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ). **B.** Μόλυνση υβριδίου 28 καλαμποκιού με 3 διαφορετικά στελέχη *Fusarium* sp.. Διαπιστώνονται τα διαφορετικά επίπεδα της ασθένειας ανάλογα με το στέλεχος.

#### 4.5.3 Αξιολόγηση παραγωγής φουμονισινών

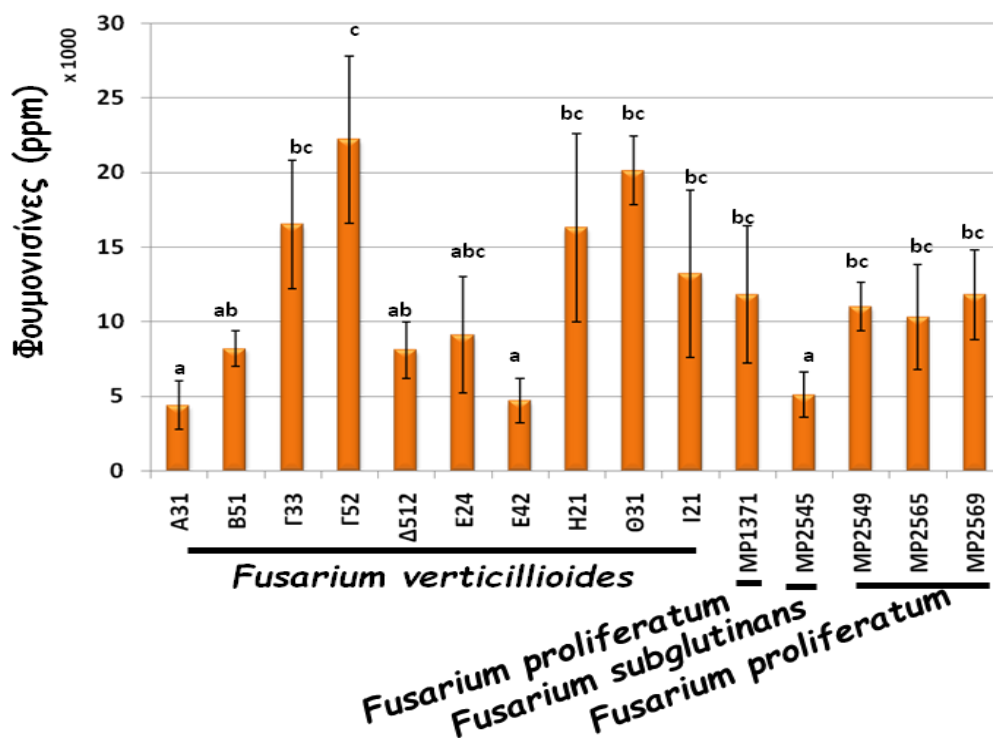
Η ικανότητα παραγωγής φουμονισινών διαφόρων ελληνικών στελεχών στα υβρίδια καλαμποκιού 28 και 1812 αξιολογήθηκε *in vitro*, όπου σπόροι από κάθε υβρίδιο μολύνθηκαν με αιώρημα κονιδίων για κάθε στέλεχος. Η μέτρηση των φουμονισινών έγινε με τη μέθοδο της ELISA και πιο συγκεκριμένα με το kit ανάλυσης Agra Quant® ELISA Fumonisin (250-5000 ppb) της Romer Labs. Τα αποτελέσματα της παραγωγής φουμονισινών από τα διάφορα στελέχη *Fusarium* spp. στο υβρίδιο 1812 έδειξαν ένα ευρύ φάσμα τιμών-μολύνσεων που κυμαίνονταν από  $3,6 \times 10^3$  ως  $4,6 \times 10^4$  ppm (ΕΙΚ. 35). Τα στελέχη A31, E42 και MP2545 παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή φουμονισινών, με συγκεντρώσεις οι οποίες ήταν κάτω από  $7 \times 10^3$  ppm. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS.



**Εικόνα 35.** Μέτρηση φουμονισινών που παρήχθησαν από τα διάφορα στελέχη *F. verticillioides* και *F. proliferatum* στο υβρίδιο 1812. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω στις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας  $(P) \leq 0,05$ .

Τα αποτελέσματα της παραγωγής φουμονισινών από τα διάφορα στελέχη *Fusarium* spp. στο υβρίδιο 28 έδειξαν επίσης ένα ευρύ φάσμα τιμών-μολύνσεων που κυμαίνονταν από  $4,7 \times 10^3$  ως  $2,2 \times 10^4$  ppm (ΕΙΚ. 36). Τα στελέχη A31, E42 και MP2545 παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή φουμονισινών, με συγκεντρώσεις οι οποίες ήταν κάτω από  $5,1 \times 10^3$  ppm. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS.

Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε στα υβρίδια 1812 και 28, μεταξύ συμπτωμάτων, κονιδιογένεσης και παραγωγής φουμονισινών είναι αναμενόμενη διότι είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι δεν συνδέεται πάντα η ανάπτυξη των μυκοτοξικογόνων μυκήτων στους σπόρους με τη βιοσύνθεση μυκοτοξινών. Επιπλέον, αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες των υβριδίων που συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης φουμονισινών, αλλά όχι της κονιδιογένεσης ή της ανάπτυξης του μυκηλίου.



**Εικόνα 36.** Μέτρηση φουμονισινών που παρήχθησαν από τα διάφορα στελέχη *F. verticillioides* και *F. proliferatum* στο υβρίδιο 28. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω στις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας (P) ≤ 0,05.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο αραβόσιτος αποτελεί παγκοσμίως μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες. Χρησιμοποιείται κυρίως για τη διατροφή των ζώων, αποτελεί ένα από τα βασικότερα προϊόντα στη διατροφή του ανθρώπου, καθώς χρησιμοποιείται και στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων αμύλου.

Η καλλιέργεια του αραβοσίτου απειλείται συνεχώς από ένα εύρος παθογόνων. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* spp. αποτελούν μεγάλο και σοβαρό κίνδυνο για το καλαμπόκι καθώς μπορούν να προκαλέσουν σημαντική υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος μέσω των σήψεων των σπαδικών και των προσβολών των ριζών και του λαιμού των φυτών και μέσω της έκκρισης επικίνδυνων δευτερογενών μεταβολιτών που ονομάζονται μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες είναι ιδιαίτερα τοξικοί και καρκινογόνοι δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους και αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες απειλές για την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων. Η κατανάλωση γεωργικών προϊόντων που περιέχουν μυκοτοξίνες μπορεί να προκαλέσει πολύ σοβαρά προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση σοβαρών ασθενειών, γνωστές ως μυκοτοξικώσεις.

Η αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και κατ' επέκταση της εμφάνισης των μυκοτοξινών στα προσβεβλημένα προϊόντα είναι πολύ δύσκολη. Πιο συγκεκριμένα, στην καλλιέργεια του καλαμποκιού δεν υπάρχουν εγκεκριμένα φάρμακα για την αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* spp., για το λόγο αυτό πρέπει να λαμβάνονται μέτρα τα οποία προλαμβάνουν την εμφάνιση τους στο καλαμπόκι.

Έρευνες των τελευταίων ετών έχουν στραφεί στην ανεύρεση υβριδίων, τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα τόσο στην σήψη που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Fusarium* spp., όσο και στην παραγωγή των μυκοτοξινών που εκκρίνονται από τους μύκητες αυτούς. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια αξιολόγησης γενετικού υλικού της Εταιρείας Σπύρου, για την εύρεση ανθεκτικών ή ανεκτικών υβριδίων ως προς τη μόλυνσή τους από τους μύκητες *Fusarium verticillioides* και *Fusarium proliferatum* και την παραγωγή φουμονισινών, μυκοτοξίνες που παράγονται από αυτούς τους μύκητες.

Πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα *in vitro* με στόχο την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας 59Φ υβριδίων καλαμποκιού. Αναλυτικότερα, έγινε επιλογή τεσσάρων στελεχών του γένους *Fusarium* sp.(στελέχη 294 και 253 του *F. verticillioides* και 217 και 238 του *F. proliferatum*) και πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιβεβαίωσης της μυκοτοξικογόνου ικανότητας των στελεχών, τόσο σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ, όσο και σε σπόρους καλαμποκιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα 4 στελέχη είχαν την ικανότητα να παράγουν υψηλά ποσοστά φουμονισινών τόσο στο θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ, όσο και σε σπόρους καλαμποκιού. Στη συνέχεια έγινε αξιολόγηση των συμπτωμάτων και σημείων της σήψης των σπόρων στα διαφορετικά υβρίδια υπολογίζοντας το δείκτη

σοβαρότητας της ασθένειας. Η σοβαρότητα της ασθένειας εκτιμήθηκε με βάση το ποσοστό μόλυνσης των σπόρων ανά υβρίδιο, 7 ημέρες μετά τη μόλυνσή τους με το μίγμα των τεσσάρων στελεχών. Τα αποτελέσματα της σοβαρότητας της ασθένειας έδειξαν ότι όλα τα υβρίδια καλαμποκιού που εξετάστηκαν κάλυπταν ποσοστά με δείκτη ασθένειας 1-5, δηλαδή από 10% ως 100%. Τα χαμηλότερα ποσοστά (περίπου 15%) παρατηρήθηκαν στα υβρίδια 17 και 1811 (ΕΙΚ. 20.Β.) ενώ τα υβρίδια 8, 23, και 1812 παρουσίασαν ποσοστό μόλυνσης 15-20%.

Ακολούθησε μέτρηση της παραγωγής των κονιδίων και τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι όλα τα υβρίδια καλαμποκιού που εξετάστηκαν είχαν συγκέντρωση κονιδίων από  $2 \times 10^6$  έως  $11,5 \times 10^7$  κονίδια/σπόρο. Συγκεκριμένα τα υβρίδια 6 και 1811 παρουσίασαν τα πιο χαμηλά επίπεδα παραγωγής κονιδίων (περίπου  $3 \times 10^6$  κονίδια/σπόρο). Η προκαταρκτική *in vitro* αξιολόγηση των υβριδίων καλαμποκιού ολοκληρώθηκε με τη μέτρηση των φουμονισινών, Τα αποτελέσματα της παραγωγής φουμονισινών από τα 4 στελέχη *Fusarium* spp. στα υβρίδια καλαμποκιού που εξετάστηκαν έδειξαν ένα ευρύ φάσμα τιμών-μολύνσεων που κυμαίνονταν από  $1,7 \times 10^3$  ως  $95,2 \times 10^3$  ppm. Τα υβρίδια 23, 28, 1809 και N8 παρουσίασαν σημαντική μείωση παραγωγής φουμονισινών, με συγκεντρώσεις οι οποίες ήταν κάτω από  $4 \times 10^3$  ppm.

Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε στα περισσότερα υβρίδια μεταξύ συμπτωμάτων, κονιδιογένεσης και παραγωγής φουμονισινών ήταν αναμενόμενη διότι είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία (Vincelli & Parker, 2002) ότι δεν συνδέεται πάντα η ανάπτυξη των μυκοτοξικογόνων μυκήτων στους σπόρους με τη βιοσύνθεση μυκοτοξινών. Επιπλέον, αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες των υβριδίων που συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης φουμονισινών, αλλά όχι της κονιδιογένεσης ή της ανάπτυξης του μυκηλίου

Μετά την ολοκλήρωση της αξιολόγησης των *in vitro* αποτελεσμάτων των προκαταρκτικών πειραμάτων, έγινε επιλογή 30 υβριδίων, τα οποία παρουσίασαν μειωμένα ποσοστά σοβαρότητας ασθένειας και/ή μειωμένη παραγωγή κονιδίων και/ή μειωμένη παραγωγή φουμονισινών. Τα υβρίδια αυτά καλλιεργήθηκαν σε πειραματικό αγρό, στο Γ.Π.Α. και ακολούθησαν τεχνητές μολύνσεις με αιώρημα κονιδίων των στελεχών 294 και 253 του *F. verticillioides* και 217 και 238 του *F. proliferatum* κατά τη διάρκεια του μεταξώματος. Τα αποτελέσματα της σοβαρότητας της ασθένειας έδειξαν ότι όλα τα υβρίδια καλαμποκιού που εξετάστηκαν κάλυπταν ποσοστά με δείκτη ασθένειας 1-3,5, δηλαδή από 10% ως 75%. Μόνο τα υβρίδια 8, 19 και 34 παρουσίασαν σοβαρότητα ασθένειας μεγαλύτερη του 30%. Τα περισσότερα υβρίδια έδειξαν δείκτη ασθένειας στον αγρό 1-2.

Στη συνέχεια μετρήθηκε η συγκέντρωση των παραγόμενων φουμονισινών. Τα αποτελέσματα της παραγωγής φουμονισινών από τα 4 στελέχη *Fusarium* spp. στα υβρίδια καλαμποκιού που εξετάστηκαν έδειξαν ένα ευρύ φάσμα τιμών-μολύνσεων που κυμαίνονταν από 237 ως 11243 ppm. Από τα 30 υβρίδια ξεχώρισαν 10 (N8, 1811, 1812, 1814, 2, 6, 21, 22, 26 και 36), τα οποία παρήγαγαν μειωμένα επίπεδα

φουμονισινών που κυμαίνονταν από 237,7 ppm μέχρι 716,8 ppm. Το υβρίδιο 26 παρήγαγε 237 ppm, την μικρότερη ποσότητα φουμονισινών από όλα τα υβρίδια. Το κατώτατο επιτρεπόμενο όριο επιμόλυνσης των σπόρων καλαμποκιού με φουμονισίνες για διατροφή ζώων είναι 100 ppm και 2 ppm για την διατροφή του ανθρώπου. Για το υβρίδιο 26 θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω πειράματα με στόχο την εύρεση των γονιδίων που συμμετέχουν στην ανθεκτικότητα τόσο στους μύκητες *F. verticillioides* και *F. proliferatum* όσο και στις παραγόμενες από αυτούς φουμονισίνες, καθώς ενδιαφέρον θα αποτελούσε πειράματα διασταυρώσεων του υβριδίου 26 με άλλα ανθεκτικά υβρίδια με στόχο την δημιουργία υβριδίων με ακόμα αυξημένη ανθεκτικότητα.

Καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων αυτό το οποίο παρατηρήθηκε ήταν ότι δεν υπάρχει κανένας συσχετισμός των συμπτωμάτων και σημείων της σήψης με τις παραγόμενες μυκοτοξίνες. Αναλυτικότερα παρατηρήθηκε ότι σπάδικες οι οποίες παρουσίαζαν υψηλό δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας, με ποσοστό μόλυνσης 30% (υβρίδιο 1814) παρουσίαζαν μειωμένη παραγωγή μυκοτοξινών 487 ppm αλλά και το αντίστροφο δηλαδή υβρίδια τα οποία παρουσίαζαν μειωμένα συμπτώματα σήψης (υβρίδιο 28), με ποσοστό μόλυνσης 20% παρήγαν υψηλές ποσότητες μυκοτοξινών 11243 ppm (Vincelli & Parker, 2002).

Μολυσμένοι σπόροι καλαμποκιού από διάφορες περιοχές της Θεσσαλίας συλλέχθηκαν και ακολούθησε απομόνωση 45 στελεχών του γένους *Fusarium* sp. Τα στελέχη αυτά ταυτοποιήθηκαν μοριακά με τη χρήση εκκινητών που ενίσχυαν δύο διαφορετικούς γενετικούς τόπους, αυτόν του γονιδίου της καλμοντουλίνης (CAM) και του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης έδειξαν ότι και τα 45 στελέχη ανήκουν στο είδος *Fusarium verticillioides* με το στέλεχος E24 να διαφοροποιείται γενετικά αρκετά από τα υπόλοιπα στελέχη. Στη φυλογενετική ανάλυση συμμετείχαν και επτά στελέχη (MP1371, MP2545, MP2549, MP2564, MP2565, MP2569, MP2577) τα οποία αποτελούν προσφορά του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Και τα επτά στελέχη σε παλιότερες έρευνες είχαν χαρακτηριστεί ως *Fusarium proliferatum*, όμως τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης έδειξαν πως το στέλεχος MP2569 ανήκει στο είδος *Fusarium verticillioides*, ενώ για το στέλεχος MP2545 χρειάστηκε να γίνει περαιτέρω έλεγχος ταυτοποίησης με τη χρήση δύο ακόμα γενετικών τόπων, αυτόν της β-τουμπουλίνης (βt) και το γονίδιο της δεύτερης μεγαλύτερης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης (RPB2).

Με στόχο να διερευνήσουμε την παραλλακτικότητα στη μολυσματικότητα διαφόρων στελεχών ελληνικών απομονώσεων επιλέχθηκαν δύο υβρίδια καλαμποκιού, το 1812 και το 28, τα οποία παρουσίασαν στα *in vitro* πειράματα χαμηλό δείκτη σοβαρότητας ασθένειας, χαμηλά επίπεδα παραγωγής κονιδίων και φουμονισινών. Αναλυτικότερα, από τα 45 στελέχη επιλέχθηκαν τα στελέχη A31, B51, Γ33, Γ52, Δ512, E24, E42, H21, Θ31, Ι21 και από τη συλλογή του ΜΦΙ τα στελέχη MP1371, MP2545, MP2549, MP2565 και MP2569 και πραγματοποιήθηκαν



για τα υβρίδια 1812 και 28 πειράματα αξιολόγησης μολυσματικότητας, παραγωγής κονιδίων και φουμονισινών.

Η αξιολόγηση των συμπτωμάτων και των σημείων της σήψης υπολογίστηκε με το δείκτη σοβαρότητας της ασθένειας με βάση το ποσοστό μόλυνσης των σπόρων ανά υβρίδιο, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση. Όλα τα στελέχη του γένους *Fusarium* sp. στο υβρίδιο 1812 παρουσίασαν δείκτη ασθένειας 1-4, δηλαδή από 10% ως 75%. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη E42 και Γ33 παρουσίασαν αυξημένο ποσοστό μόλυνσης το οποίο ήταν πάνω από 65%. Τα στελέχη Θ31 και MP2569 παρουσίασαν ποσοστά μόλυνσης, τα οποία κυμαίνονταν γύρω στο 30%, ενώ στα στελέχη MP2545 και B51 παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό μόλυνσης, το οποίο ήταν περίπου στο 10-15%. Τα υβρίδια A31, B51, Θ31, MP2545, MP2549, MP2565 και MP2569 παρουσίασαν ποσοστό μόλυνσης χαμηλότερο του 20%.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της σοβαρότητας της ασθένειας για το υβρίδιο 28 όλα τα στελέχη του γένους *Fusarium* sp. παρουσίασαν δείκτη ασθένειας 1-4, δηλαδή από 10% ως 75%. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη B51 και Δ512 παρουσίασαν αυξημένα ποσοστά μόλυνσης πάνω από 65%. Τα στελέχη Ι21 και Θ31 παρουσίασαν ποσοστά μόλυνσης, τα οποία κυμαίνονταν στο 30%, ενώ στα στελέχη Γ33 και MP1371 παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό μόλυνσης, το οποίο ήταν περίπου στο 10-15%. Τα υβρίδια Γ33, Γ52, E24, E42, Η21, MP1371, MP2545, MP2549, MP2565 και MP2569 παρουσίασαν ποσοστά μόλυνσης χαμηλότερο του 20%.

Το στέλεχος B51 παρουσίασε δείκτη σοβαρότητας ασθένειας 2 στο υβρίδιο 1812 και 4 στο υβρίδιο 28. Αντίστοιχη παραλλακτικότητα στα ποσοστά μόλυνσης παρατηρήθηκε και στα στελέχη Γ33 και Γ52.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων κονιδίων στο υβρίδιο 1812 έδειξαν ότι όλα τα στελέχη του *Fusarium* sp. που εξετάστηκαν παρήγαγαν κονίδια, των οποίων η συγκέντρωση κυμαινόταν από  $5,3 \times 10^4$  έως  $12,7 \times 10^6$  κονίδια/σπόρο. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος Γ33 παρήγαγε την υψηλότερη συγκέντρωση κονιδίων, που παρατηρήθηκε στο υβρίδιο 1812, η οποία ήταν ίση με  $12,7 \times 10^6$ . Τα στελέχη E42 και Η21 παρήγαγαν συγκέντρωση κονιδίων η οποία ξεπερνούσε τα  $4 \times 10^6$  κονίδια/σπόρο, ενώ τα στελέχη A31 και MP2545 παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή κονιδίων, σε επίπεδα κάτω του  $8 \times 10^5$  κονίδια/σπόρο. Τα στελέχη A31, B51, MP2545, MP2549, MP2565 παρουσίασαν χαμηλές συγκεντρώσεις παραγωγής κονιδίων.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων κονιδίων στο υβρίδιο 28 έδειξαν ότι όλα τα στελέχη του *Fusarium* sp. που εξετάστηκαν παρήγαγαν κονίδια, των οποίων η συγκέντρωση κυμαινόταν  $3 \times 10^5$  έως  $5,3 \times 10^6$  κονίδια/σπόρο. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος B51 παρήγαγε την υψηλότερη συγκέντρωση κονιδίων, που παρατηρήθηκε στο υβρίδιο 28, η οποία ήταν ίση με  $5,3 \times 10^6$ . Τα στελέχη Δ512 και Θ31 παρήγαγαν συγκέντρωση κονιδίων η οποία ξεπερνούσε τα  $3 \times 10^6$  κονίδια/σπόρο, ενώ τα στελέχη MP1371 και MP2545 παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή κονιδίων, σε

επίπεδα κάτω του  $8 \times 10^5$  κονίδια/σπόρο. Τα στελέχη A31, MP1371, MP2545 και MP2565 παρουσίασαν χαμηλές συγκεντρώσεις παραγωγής κονιδίων.

Η ικανότητα παραγωγής φουμονισινών των ελληνικών στελεχών στα υβρίδια καλαμποκιού 1812 και 28 αξιολογήθηκε *in vitro*, όπου σπόροι από κάθε υβρίδιο μολύνθηκαν με αιώρημα κονιδίων για κάθε στέλεχος. Τα αποτελέσματα της παραγωγής φουμονισινών από τα διάφορα στελέχη *Fusarium* spp. στο υβρίδιο 1812 έδειξαν ένα ευρύ φάσμα τιμών-μολύνσεων που κυμαίνονταν από  $3,6 \times 10^3$  ως  $4,6 \times 10^4$  ppm και στο υβρίδιο 28 από  $4,7 \times 10^3$  ως  $2,2 \times 10^4$  ppm. Τα στελέχη A31, E42 και MP2545 παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή φουμονισινών και στα δύο υβρίδια, με συγκεντρώσεις οι οποίες ήταν κάτω από  $7 \times 10^3$  ppm στο υβρίδιο 1812 και κάτω από  $5,1 \times 10^3$  ppm στο υβρίδιο 28.

Τα υβρίδια 26, 1812, N8, 1811 παρουσίασαν ανθεκτικότητα ως προς την παραγωγή των φουμονισινών. Για να αποσαφηνιστεί περαιτέρω ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στα υβρίδια αυτά του καλαμποκιού θα πρέπει να γίνουν πειράματα διερεύνησης των γονιδίων που συμμετέχουν στην άμυνα του φυτού.

Στην Ελλάδα, στην καλλιέργεια του καλαμποκιού δεν γίνεται καμία επέμβαση με φυτοφάρμακα, με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης της καλλιέργειας με τους μύκητες του γένους *Fusarium* sp. και κατ' επέκταση αύξηση της συγκέντρωσης των φουμονισινών. Από τα κυριότερα μέτρα αντιμετώπισης που λαμβάνονται για τη μείωση των παραπάνω κινδύνων είναι η εύρεση και καλλιέργεια στον αγρό ανθεκτικών υβριδίων. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η αποσαφήνιση των μηχανισμών μόλυνσης των μυκήτων του γένους *Fusarium* sp., η ορθότερη κατανόηση των μονοπατιών βιοσύνθεσης των μυκοτοξινών, καθώς και η αποσαφήνιση των μηχανισμών άμυνας του φυτού που συμβάλλουν στην μείωση της παραγωγής των μυκοτοξινών και θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη εφαρμογής στη γεωργία ανθεκτικών ποικιλιών.

## 6. Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Afolabi, C. G., Ojiambo, P. S., Ekpo, E. J. A., Menkir, A. & Bandyopadhyay, R., (2007) Evaluation of Maize Inbred Lines for Resistance to Fusarium Ear Rot and Fumonisin Accumulation in Grain in Tropical Africa. *Plant Disease* **91**, 279–286
- Alberts, J. F. *et al.*, (1990) Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1729–1733
- Alvarez, C. L. *et al.*, (2011) Genetic diversity in *fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins (Basel)*. **3**, 1294–1309
- Aoki, T, O'Donnell, K (1998) *Fusarium kyushuense*. Japan. *Mycoscience* **39**: pp. 1-6
- Aoki, T, O'Donnell, K (1999) Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia* **91**: pp. 597-609
- Aoki, T, O'Donnell, K, Homma, Y, Lattanzi, AR (2003) Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex — *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia* **95**: pp. 660-684
- Bacon, C. W. & Hinton, D. M., (1996) Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Can. J. Bot. Can. Bot.* **74**, 1195–1202
- Bennett J.W., Klich M., (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 497–516
- Benson, D.A. *et al.*, (2008) GenBank. *Nucleic Acids Research*, 36, pp.25-30
- Blandino, M., Reyneri, A., Vanara, F., Tamiatti, G. & Pietri, A., (2009) Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection, fumonisin and deoxynivalenol contamination of maize kernels. *World Mycotoxin Journal* **2**, 409–418
- Bottalico, A. (1998) *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J. Plant Pathol.* **80**, 85–103
- Boutigny, A. L. *et al.*, (2012) Quantitative detection of *Fusarium* pathogens and their mycotoxins in South African maize. *Plant Pathol.* **61**, 522–531
- Burgess, L. W., Nelson P. E., Toussoun T. A., and Forbes G. A., (1988) Distribution of *Fusarium* species in sections *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, and *Discolor* recovered from grassland, pasture, and pine nursery soils of eastern Australia. *Mycologia* **80**: 815-824
- Butrón, A. *et al.*, (2006) Maize (*Zea mays* L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6113–6117
- Campos-Bermudez, V.A., Fauguel C.M., Tronconi M.A., Casati P., Presello D.A. and Andreo C.S., (2013) Transcriptional and Metabolic Changes Associated to the Infection by *Fusarium verticillioides* in Maize Inbreds with Contrasting Ear Rot Resistance. *PLoS One*. 2013; 8(4): e61580

- Cao, A. *et al.*, (2014) Assessing white maize resistance to fumonisin contamination. *Eur. J. Plant Pathol.* **138**, 283–292
- Cao, A. *et al.*, (2014) Critical environmental and genotypic factors for *Fusarium verticillioides* infection, fungal growth and fumonisin contamination in maize grown in northwestern Spain. *Int. J. Food Microbiol.* **177**, 63–71
- Chang, H. K., Park, S. Y., Lee, Y. H. & Kang, S., (2005) A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 483–492
- Chelkowski, J., Zawadzki M., Zajkowski P., Logrieco A., and Bottalico A., (1990) Moniliformin production by *Fusarium* species. *Mycotoxin Research* **6**: 41-45
- Chen, J., Ding J., (2012) Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to *Fusarium* ear rot in maize. *Molecular Breeding*, Volume **30**, Issue 4, pp. 1649-1656
- Cho, SW, Mitchell, A, Regier, JC, Mitter, C, Poole, RW, Friedlander, TP, Zhao, SW (1995) A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics — Elongation Factor1-Alpha recovers morphology-based tree for Heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution* **12**: pp. 650-656
- Chungu C., Mather D. E., Reid L. M. and Hamilton R. I. (1996b) Inheritance of Kernel Resistance to *Fusarium graminearum* in Maize *J Hered* **87**: 382-385
- Clements, M.J. (2002) Resistance to Fumonisin and *Fusarium* Ear Rot of Corn. Ph.D thesis, UMI Number 3070279, Urbana, IL: University of Illinois, 144 pp
- Clements, M. J., Maragos, C. M., Pataky, J. K. & White, D. G., (2004) Sources of resistance to fumonisin accumulation in grain and *Fusarium* ear and kernel rot of corn. *Phytopathology* **94**, 251–260
- Clements, M.J. & White, D.G. (2004) Identifying Sources of Resistance to Aflatoxin and Fumonisin Contamination in Corn Grain. *Journal of Toxicology*, Vol.**23**, Nos. 2 & 3 pp. 381-396
- Czembor, 2010
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Stessman, R. J., McCormick, S. P. & Millard, M. J., (2005) Identification and heritability of fumonisin insensitivity in *Zea mays*. *Phytochemistry* **66**, 2474–2480
- Ding, J.Q., Wang, X.M., Chander, S., Yan, J.B. & Li, J.S. (2008) QTL mapping of resistance to *Fusarium* ear rot using a RIL population in maize. *Mol. Breed.* **22**, 395–403
- Doohan, F.M., Brennan, J. & Cooke, B.M., (2003) Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 755–768
- Drepper, W.J., Renfro, B.L., (1990) Comparison of methods for inoculation of ears and stalks of maize with *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease* **74** (12): 952-956
- Duncan, K.E. & Howard, R.J., (2010) Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **23**, 6–16

- Duvick, J., (2001) Prospects for reducing fumonisin contamination of Maize through genetic modification. *Environ. Health Perspect.* **109**, 337–342.
- Eller, M.S., Payne, G.A. & Holland, J.B., (2010) Selection for reduced Fusarium ear rot and fumonisin content in advanced backcross maize lines and their topcross hybrids. *Crop Sci.* **50**, 2249–2260
- Epple, P., Apel, K. & Bohlmann, H., (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **9**, 509–520
- Faria, C.B., Abe, C.A.L., da Silva, C.N., Tessmann, D.J. & Barbosa-Tessmann, I.P., (2012) New PCR assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *fusarium subglutinans*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 115–132
- Gao, A.G. *et al.*, (2000) Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1307–1310
- Geiser, D. M. *et al.*, (2004) FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* **110**, 473–479
- Gelderblom, W.C.A. *et al.* (1988) Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1806–1811
- Gelderblom, W. C. A., Marasas, W. F. O., Vleggaar, R., Thiel, P. G. & Cawood, M. E. (1992) Fumonisin: Isolation, Chemical Characterization and Biological Effects. *Mycopathologia* **117**, 11–16
- Gendloff E, Rossman E, Casale W, Isleib T, Hart P., (1986) Components of resistance to Fusarium ear rot in field maize. *Phytopathology* 76:684–688.
- Gerlach, W., and H. Nirenberg. (1982) The genus *Fusarium* A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem)* **209**: 1-405
- Glass, N. L. & Donaldson, G. C., (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1323–1330
- Glass, N. L., D. J. Jacobson, and P. K. T. Shiu. (2000) The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi.
- Görtz A., Oerke E-C., Steiner U., Waalwijk C., Vries I., Dehne H-W. (2008) Biodiversity of *Fusarium* species causing ear rot of maize in Germany. DOI: 10.1556/CRC.36.2008.Suppl.B.51
- Goswani R.S., Kistler H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* **5**, 515–25.
- Guangsheng Y., Zhiming Z., Kui X., Maojun Z., Yaou S., et al., (2012) Large-scale identification of differentially expressed genes in maize inbreds susceptible and resistant to Fusarium ear rot. *Plant Omics* **5**: 471–475

- He, X. *et al.*, (2013) Identification and characterization of international Fusarium head blight screening nurseries of wheat at CIMMYT, Mexico. *Eur. J. Plant Pathol.* **136**, 123–134
- Headrick, J. M. & Pataky, J. K., (1991) Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* **81**, 268–274
- Jurado, M. *et al.*, (2010) Genetic variability and Fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiol.* **27**, 50–57
- Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchis, V. & Teresa González-Jaén, M., (2006) PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 681–689
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**:111-120.BIB
- Kleinschmidt, C. E., Clements, M. J., Maragos, C. M., Pataky, J. K. & White, D. G., (2005) Evaluation of Food-Grade Dent Corn Hybrids for Severity of Fusarium Ear Rot and Fumonisin Accumulation in Grain. *Plant Disease* **89**, 291–297
- Leslie, J. F., Anderson, L. L., Bowden, R. L. & Lee, Y. W., (2007) Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 25–32
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Pub., Ames, Iowa, USA
- Löffler, M., Kessel, B., Ouzunova, M. & Miedaner, T., (2010) Population parameters for resistance to *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* ear rot among large sets of early, mid-late and late maturing European maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* **120**, 1053–1062
- Logrieco A., Mulé G., Moretti A., Bottalico, A., (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. in *European Journal of Plant Pathology* **108**, 611–624
- Logrieco, A., Moretti, A., Perrone, G. & Mulè, G., (2007) Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 11–16
- Maier, F.J., Miedaner, T., Handeler, B, Felk, A., Salomo, S., Lemmens, M Kassner, H., Schäfer, W., (2006) Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley, and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* **7**, 449-461
- Marasas W.F.O., *et al.*, (2004) Fumonisin Disrupt Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and In Vivo: A Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. *Journal of Nutrition* **134**, 711-716
- Marasas, W.F.O., Gelderblom, W.C.A., Vismer, H.F., (2008) Mycotoxins: a global problem. In Leslie, J.F., Bandyopadhyay, R., Visconti, A. (Eds.), *Mycotoxins*. CABI, Oxfordshire, UK, pp. 29-40

- Mazzoni, E., Scandolara, A., Giorni, P., Pietri, A. & Battilani, P., (2011) Field control of Fusarium ear rot, *Ostrinia nubilalis* (Höbner), and fumonisins in maize kernels. *Pest Manag. Sci.* **67**, 458–465
- Miller J.D., (2008) Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Additives & Contaminants: Part A* **25**, 219–30.
- Moretti, A., Susca, A., Mulé, G., Logrieco, A. F. & Proctor, R. H. (2013) Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **167**, 57–66
- Mulè, G., Susca A., Stea G, Moretti A., (2004) A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology* Volume **110**, Issue 5-6, pp 495-502
- Munkvold, G. P. (2003) Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**, 99–116
- Munkvold, G. P., (2003) Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 705–713
- Munkvold, G., McGee, D.C., Carlton, W.M., (1997) Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* **87**, 209–217.
- Munkvold, GP, Desjardins, A.E., (1997) Fumonisins in maize: can we reduce their occurrence. *Plant Dis* **81**: pp. 556-565
- Musser S.M., Plattner R.D. (1997) Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45** pp. 1169–1173
- Nelson P.E., Plattner R.D., Shackelford D.D., Desjardins A.E., (1992) Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in Section Liseola and by some related species. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** pp. 984–989
- Nielsen, L. K. *et al.*, (2011) Fusarium head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* **101**, 960–969
- Nirenberg, H. I. (1976) Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium Sektion Liseola. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem)* **169**: 1-117.
- O'Donnell, K. (2000) Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*—*Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**: pp. 919-938
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K. & Casper, H. H., (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7905–7910
- O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T, Cigelnik, E., (2000) A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* **41**: pp. 61-78

- Odjakova M., Hadjiivanova C. (2001) The complexity of pathogen defense in plants. *Bulg J. Plant Physiol.* **27**: 101–109
- Osborne, L. E. & Stein, J. M., (2007) Epidemiology of Fusarium head blight on small-grain cereals. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 103–108
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L., (1995) Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology* **44**, 207–38.
- Pestka, J. J. (2007) Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim. Feed Sci. Technol.* **137**, 283–298
- Proctor R.H., Brown D.W., Plattner R.D., Desjardins A.E., (2003) Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology*, **38** pp. 237–249
- Proctor R.H., Busman M., Seo J.A., Lee Y.W., Plattner R.D., (2008) A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. *Fungal Genetics and Biology*, **45** pp. 1016–1026
- Proctor R.H., Plattner R.D., Brown D.W., Seo J.A., Lee Y.W., (2004) Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycological Research*, **108** pp. 815–822
- Reid L.M., Hamilton R.E., Mather D.E., (1996) Screening Maize for Resistance to *Gibberella* Ear Ro, vol. **62** Agriculture and Agri-Food Canada: Technical Bulletin, Ottawa, ON, Canada
- Reid L.M., Zhu X., (2005) Screening Corn for Resistance to Common Diseases in Canada. Agriculture and Agri-Food Canada: Ontario Technical Bulletin, Ottawa, ON, Canada
- Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Vismer H.F., (2002) Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* p. 2101–5.
- Robertson, L.A., Kleinschmidt, C.E., White, D.G., Payne, G.A., Maragos, C.M., Holland, J.B., (2006) Heritabilities and correlations of Fusarium ear rot resistance and fumonisin contamination resistance in two maize populations. *Crop Sci* **46**: pp. 353–361
- Rushton P.J., Somssich I.E., (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 311–315
- Sabir, J. S. M., Box, P. O. & Arabia, S., (2006) Genotypic Identification for Some *Fusarium sambucinum* Strains Isolated from Wheat in Upper Egypt. *World* **2**, 06–10
- Santiago, R., Cao, A., Malvar, R. A., Reid, L. M. & Butrón, A., (2013) Assessment of corn resistance to fumonisin accumulation in a broad collection of inbred lines. *F. Crop. Res.* **149**, 193–202
- Santiago, R., Cao, A., Malvar, R. A., Reid, L. M. & Butrón, A., (2013) Assessment of corn resistance to fumonisin accumulation in a broad collection of inbred lines. *F. Crop. Res.* **149**, 193–202
- Schaafsma, A.W., Nicol, R.W., Reid, L.M. (1997) Evaluating commercial maize hybrids for resistance to *Gibberella* ear rot. *Eur J Plant Pathol* **103**: pp. 737–746



- Schjøth, J. E., Tronsmo, A. M. & Sundheim, L., (2008) Resistance to *Fusarium verticillioides* in 20 Zambian Maize Hybrids. *J. Phytopathol.* **156**, 470–479
- Schjøth, J. E., Visconti, A. & Sundheim, L., (2009) Fumonisin in maize in relation to climate, planting time and hybrids in two agroecological zones in Zambia. *Mycopathologia* **167**, 209–219
- Sewram V., Mshicileli N., Shepard G.S., Vismer H.F., Rheeder J.P., Lee Y.W., Leslie J.F., Marasas W.F.O., (2005) Production of fumonisin B and C analogues by several *Fusarium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** pp. 4861–4866
- Small I.M., Flett B.C., Marasas W.F.O., McLeod A., Viljoen A., (2012) Use of resistance elicitors to reduce *Fusarium* ear rot and fumonisin accumulation in maize. *Crop Prot.* **41**:10–6.
- Small, I. M. *et al.*, (2011) Resistance in Maize Inbred Lines to *Fusarium verticillioides* and Fumonisin Accumulation in South Africa. *Plant Dis.* **96**, 881–888
- Stegonpień, L., Koczyk, G. & Waśkiewicz, A., (2011) FUM cluster divergence in fumonisins-producing *Fusarium* species. *Fungal Biol.* **115**, 112–123
- Stephens, A. E., Gardiner, D. M., White, R. G., Munn, A. L. & Manners, J. M., (2008) Phases of infection and gene expression of *Fusarium graminearum* during crown rot disease of wheat. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **21**, 1571–1581
- Stępień, L., Koczyk, G. & Waśkiewicz, A., (2011) Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *J. Appl. Genet.* **52**, 487–96
- Vincelli, P., & Parker, G. (2002) Fumonisin, Vomitoxin, and Other Mycotoxins in Corn Produced by *Fusarium* Fungi
- Voss, K.A., Smith, G.W., Haschek, W.M., (2007) Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Anim Feed Sci Tech* **137**: pp. 299-325
- Waalwijk, C., van der Lee, T., de Vries, I., Hesselink, T., Arts, J., Kema, G.H.J., (2004) Synteny in toxigenic *Fusarium* species: the fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 533–544
- Wilke, A.L., Bronson, C.R., Tomas, A., Munkvold, G.P., (2007) Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant. Dis.* **91**: pp. 1109-1115
- Windels, C.E., (2000) Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern great plains. *Phytopathology* **90**, 17–21.
- Yates, I. E. & Jaworski, A. J., (2000) Differential growth of *Fusarium moniliforme* relative to tissues from ‘Silver Queen’, a sweet maize. *Canadian Journal of Botany* **78**, 472–480
- Yates, I. E. & Sparks, D., (2008) *Fusarium verticillioides* dissemination among maize ears of field-grown plants. *Crop Prot.* **27**, 606–613

Yi, H., Bojja, R., Fu, J., Du, L., 2005. Direct evidence for the function of FUM13 in 3-ketoreduction of mycotoxin fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5456–5460

Zaleta-Rivera, K., Xu, C., Yu, F., Butchko, R.A.E., Proctor, R.H., Hidalgo-Lara, M.E., Raza, A., Dussault, P.H., Du, L., (2006) A bidomain nonribosomal peptide synthetase encoded by FUM14 catalyzes the formation of tricarballic esters in the biosynthesis of fumonisins. *Biochemistry* 45, 2561–2569

Zila, C. T., (2014) Genome-wide association study of Fusarium ear rot disease in the U.S.A. maize inbred line collection. 1–15. doi:10.1186/s12870-014-0372-6

#### Ελληνική βιβλιογραφία

Τζάμος Ε., 2007. Γενική Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα- Πειραιάς

Καραμάνος Α., 2002. Τα σιτηρά των εύκρατων κλιμάτων. Εκδόσεις Παπαζήσης, Αθήνα

## 7. Παράρτημα

| ΠΙΝΑΚΑΣ 1 |          | ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ | ΠΙΝΑΚΑΣ 2 |             | ΚΟΝΙΔΙΑ | ΠΙΝΑΚΑΣ 3 |          | ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΕΣ |
|-----------|----------|------------|-----------|-------------|---------|-----------|----------|--------------|
| ΔΕΙΓΜΑΤΑ  | ΟΜΟΛΟΓΙΑ | LSD/95%    | ΔΕΙΓΜΑΤΑ  | ΟΜΟΛΟΓΙΑ    | LSD/90% | ΔΕΙΓΜΑΤΑ  | ΟΜΟΛΟΓΙΑ | LSD/95%      |
| Y1        | jkl      |            | Y1        | β           |         | Y1        | abcdefg  |              |
| Y2        | l        |            | Y2        | abcd        |         | Y2        | abcdef   |              |
| Y3        | ghi      |            | Y3        | stuvwx      |         | Y3        | abcdefg  |              |
| Y4        | ghi      |            | Y4        | γ           |         | Y4        | abcdefg  |              |
| Y5        | fgh      |            | Y5        | uvwxyz      |         | Y5        | abcde    |              |
| Y6        | bcd      |            | Y6        | abc         |         | Y6        | abcdefg  |              |
| Y7        | cde      |            | Y7        | klmnopq     |         | Y7        | abcdef   |              |
| Y8        | abc      |            | Y8        | klmnopqrs   |         | Y8        | abcdef   |              |
| Y9        | cde      |            | Y9        | qrstuv      |         | Y9        | efg      |              |
| Y10       | fgh      |            | Y10       | hijklmno    |         | Y10       | efg      |              |
| Y11       | cde      |            | Y11       | ghijklmno   |         | Y11       | h        |              |
| Y12       | hij      |            | Y12       | mnopqrst    |         | Y12       | bcdefg   |              |
| Y13       | cde      |            | Y13       | klmnopqr    |         | Y13       | abcdefg  |              |
| Y14       | fgh      |            | Y14       | tuvwxyz     |         | Y14       | cdefg    |              |
| Y15       | ijk      |            | Y15       | klmnopqrs   |         | Y15       | abcdefg  |              |
| Y16       | kl       |            | Y16       | vwxyz       |         | Y16       | defg     |              |
| Y17       | ab       |            | Y17       | uvwxyz      |         | Y17       | defg     |              |
| Y18       | hij      |            | Y18       | γζαβ        |         | Y18       | abcdef   |              |
| Y19       | ijk      |            | Y19       | cdefghijklm |         | Y19       | abcdef   |              |
| Y20       | l        |            | Y20       | γ           |         | Y20       | abcdefg  |              |
| Y21       | cde      |            | Y21       | abcde       |         | Y21       | abcdefg  |              |
| Y22       | cde      |            | Y22       | bcdefg      |         | Y22       | g        |              |
| Y23       | a        |            | Y23       | ab          |         | Y23       | a        |              |
| Y24       | bcd      |            | Y24       | bcdefghij   |         | Y24       | abcdefg  |              |
| Y25       | efg      |            | Y25       | hijklmno    |         | Y25       | h        |              |
| Y26       | cde      |            | Y26       | abcd        |         | Y26       | abcdefg  |              |
| Y27       | ghi      |            | Y27       | bcdef       |         | Y27       | fg       |              |
| Y28       | bcd      |            | Y28       | abcde       |         | Y28       | ab       |              |
| Y29       | cde      |            | Y29       | bcdefghijkl |         | Y29       | h        |              |
| Y30       | fgh      |            | Y30       | fghijklmn   |         | Y30       | fg       |              |
| Y31       | ghi      |            | Y31       | defghijklm  |         | Y31       | abcdefg  |              |
| Y32       | fgh      |            | Y32       | klmnopqrs   |         | Y32       | efg      |              |
| Y33       | efg      |            | Y33       | bcdef       |         | Y33       | abcde    |              |
| Y34       | fgh      |            | Y34       | bcdefghijkl |         | Y34       | abcdefg  |              |
| Y35       | hij      |            | Y35       | bcdefghijk  |         | Y35       | abcdef   |              |
| Y36       | efg      |            | Y36       | abcde       |         | Y36       | abcdefg  |              |
| Y37       | hij      |            | Y37       | nopqrstu    |         | Y37       | abcdef   |              |
| Y38       | ghi      |            | Y38       | bcdefghi    |         | Y38       | abcdefg  |              |
| Y39       | efg      |            | Y39       | abc         |         | Y39       | abcdefg  |              |
| Y40       | fgh      |            | Y40       | bcdef       |         | Y40       | fg       |              |
| N1        | hij      |            | N1        | wxyza       |         | N1        | abcde    |              |
| N2        | ghi      |            | N2        | mnopqrst    |         | N2        | abcde    |              |
| N3        | fgh      |            | N3        | pqrstuv     |         | N3        | abcdefg  |              |
| N4        | bcd      |            | N4        | bcdefgh     |         | N4        | abcdef   |              |
| N5        | fgh      |            | N5        | opqrstuv    |         | N5        | abcdef   |              |
| N6        | hij      |            | N6        | jklmnop     |         | N6        | abcdefg  |              |
| N7        | hij      |            | N7        | rstuvw      |         | N7        | abcd     |              |
| N8        | hij      |            | N8        | defghijklm  |         | N8        | ab       |              |
| N9        | hij      |            | N9        | defghijklm  |         | N9        | abcdef   |              |
| N10       | bcd      |            | N10       | fghijklmn   |         | N10       | abcdefg  |              |
| Y1807     | fgh      |            | Y1807     | bcdefghijk  |         | Y1807     | abcdefg  |              |
| Y1808     | fgh      |            | Y1808     | lmnopqrst   |         | Y1808     | abcdefg  |              |
| Y1809     | fgh      |            | Y1809     | efghijklm   |         | Y1809     | a        |              |
| Y1810     | fgh      |            | Y1810     | γζαβ        |         | Y1810     | abcdefg  |              |
| Y1811     | ab       |            | Y1811     | abcde       |         | Y1811     | abc      |              |
| Y1812     | ab       |            | Y1812     | bcdef       |         | Y1812     | ab       |              |
| Y1813     | kl       |            | Y1813     | a           |         | Y1813     | abcdef   |              |
| Y1814     | ijk      |            | Y1814     | xyzaβ       |         | Y1814     | abc      |              |
| Y1815     | ghi      |            | Y1815     | ijklmnop    |         | Y1815     | fg       |              |

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

*Fusarium proliferatum*

|      |   |
|------|---|
| 1371 | =MPHI 323; ear of Zea mays; Greece, Trikala; isol. Paplomatas, 1986; det. Paplomatas, 1986; hist: Paplomatas > 1986, MPHI > 1989, BPIC; cond: PDA > 22oC; pres: AG, MO > 4°C.           |
| 2545 | =K.E. F430; ear of Zea mays; Greece, Kavala, Chrissoupoli; isol. K.Elena 1995; det. K. Elena, 1995; hist: K.Elena > 1995, K.E. > 2004, BPIC; cond: PDA > 22oC; pres: AG, MO & LY > 4°C. |
| 2549 | =K.E. F494; ear of Zea mays; Greece, Orestiada; isol. K. Elena 1997; det. K. Elena, 1997; hist: K. Elena > 1997, K.E. > 2004, BPIC; cond: PDA > 22oC; pres: LY > 4°C.                   |
| 2564 | =K.E. F620; node of Zea mays; Greece, Karditsa; isol. K. Elena 2001; det. K. Elena, 2001; hist: K. Elena > 2001, K.E. > 2005, BPIC; cond: PDA > 22oC; pres: LY > 4°C                    |
| 2565 | =K.E. F621; root of Zea mays; Greece, Karditsa; isol. K. Elena 2001; det. K. Elena, 2001; hist: K. Elena > 2001, K.E. > 2005, BPIC; cond: PDA > 22oC; pres: LY > 4°C.                   |
| 2569 | =K.E. F628; Zea mays; Greece, Serres; isol. K. Elena, 2002; det. K. Elena, 2002; hist: K. Elena > 2002, K.E. > 2005, BPIC; cond: PDA > 22oC; pres: LY > 4°C.                            |
| 2577 | =K.E. F630; Zea mays; Greece, Serres; isol. K. Elena, 2002; det. K. Elena, 2002; hist: K. Elena > 2002, K.E. > 2005, BPIC; cond: PDA > 22oC; pres: AG, MO > 4°C                         |