

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ  
ΤΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΟΓΟΝΟΥ ΜΥΚΗΤΑ  
*Aspergillus flavus* ΣΤΟ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ Σ. ΛΑΓΟΓΙΑΝΝΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2016**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ**  
**ΤΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΟΓΟΝΟΥ ΜΥΚΗΤΑ**  
***Aspergillus flavus* ΣΤΟ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ Σ. ΛΑΓΟΓΙΑΝΝΗ**

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΤΣΙΤΣΙΓΙΑΝΝΗΣ**, Επικ. Καθηγητής Φυτοπαθολογίας  
(Επιβλέπων)

**ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΠΑΠΛΩΜΑΤΑΣ**, Καθηγητής Φυτοπαθολογίας

**ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΤΖΑΜΟΣ**, Επικ. Καθηγητής Φυτοπαθολογίας

**ΑΘΗΝΑ 2016**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας κ. Δημήτρη Τσιτσιγιάννη για την δυνατότητα που μου προσέφερε να εκπονήσω την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη, υπομονή και στήριξή του καθ' όλο αυτό το διάστημα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά και Επίκουρο Καθηγητή κ. Σωτήρη Τζάμο για τις πολύτιμες συμβουλές και τη στήριξή τους. Σημαντική ήταν επίσης η βοήθεια που μου προσέφεραν απλόχερα η κ. Μυρτώ Δημακοπούλου (μέλος ΕΔΙΠ του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας) και η κ. Πολύμνια Αντωνίου (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας) καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μελέτης. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, τους υποψήφιους διδάκτορες Μιχάλη Καμινιάρη, Μαρία Ηλιάδη, Δανάη Γκίζη και Σταύρο Παλαβούζη, τους υπόλοιπους μεταπτυχιακούς φοιτητές Άννα Γκατζούνη και Ειρήνη Κίσσα καθώς και όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές.

Σας ευχαριστώ όλους θερμά για την απλόχερη βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια...

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα είδη του γένους *Aspergillus* προκαλούν σημαντικά προβλήματα σήψεων καρπών σε φυτά μεγάλης καλλιέργειας (μεταξύ των οποίων και η καλλιέργεια του καλαμποκιού), αμπέλια, ακρόδρυα, πυρηνόκαρπα κ.α. σε προσυλλεκτικό και μετασυλλεκτικό στάδιο. Οι σήψεις αυτές συνήθως συνοδεύονται από την παραγωγή διαφόρων μυκοτοξινών. Μια από τις πιο γνωστές ομάδες μυκοτοξινών είναι οι αφλατοξίνες, ιδιαίτερα καρκινογόνες ουσίες. Στα πλαίσια της παρούσης μελέτης αξιολογήθηκαν διάφορα σκευάσματα και μη παθογόνοι βιοτικοί παράγοντες στην αντιμετώπιση του μύκητα *Aspergillus flavus* και των αφλατοξινών που παράγει στο καλαμπόκι. Πειράματα έγιναν σε σπόρους και φυτά καλαμποκιού με τους ακόλουθους παράγοντες: α) ζεόλιθος, ένα ορυκτό με ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες, του οποίου η δράση στη φυτοπροστασία δεν έχει μελετηθεί, β) Agri-Fos 600<sup>®</sup>, ένα εμπορικό σκευάσμα που επάγει το αμυντικό σύστημα των φυτών χάρη στα φωσφορικά ανιόντα καλίου, γ) Trianum<sup>®</sup>, που βασίζεται στο μύκητα *Trichoderma harzianum*, ο οποίος δρα διεγείροντας την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και κάνοντας δυσχερή την εγκατάσταση και ανάπτυξη παθογόνων, δ) Botector<sup>®</sup>, εμπορικό σκευάσμα που περιέχει τη ζύμη *Aureobasidium pullulans* και του οποίου η δράση βασίζεται στην παρεμπόδιση αποικισμού του παθογόνου λόγω έλλειψης χώρου και θρεπτικών συστατικών, ε) *Paenibacillus alvei* K-165, ένα ωφέλιμο ριζοβακτήριο που έχει τη δυνατότητα να επάγει το αμυντικό σύστημα των φυτών, στ) Serenade Max<sup>®</sup>, ένα βιο-μυκητοκτόνο/βιο-βακτηριοκτόνο που επάγει τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών και έχει και τη δυνατότητα να προωθεί την ανάπτυξη, ζ) Vacciplant<sup>®</sup>, ένα εμπορικό σκευάσμα που περιέχει laminarine, μια ουσία που δρα ως επαγωγέας της άμυνας των φυτών και η) ένα μη-τοξικογόνο στέλεχος του *Aspergillus flavus* από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης, αξιολογήθηκαν τα χημικά σκευάσματα Switch<sup>®</sup>, Quadris<sup>®</sup>, Geoxe<sup>®</sup>, Chorus<sup>®</sup> και Cantus<sup>®</sup>. Όλα τα σκευάσματα εφαρμόστηκαν σε εργαστηριακές δοκιμές αλλά και σε καλλιέργεια καλαμποκιού στον αγρό του Γ.Π.Α. Τα συμπεράσματα που απορρέουν από τα παραπάνω πειράματα δείχνουν πως τα χημικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν μειώνουν σημαντικά την προσβολή από το μύκητα *A. flavus* σε πειράματα *in vitro* και αγρού και. Συγκεκριμένα, το χημικό σκευάσμα Switch<sup>®</sup> μείωσε τόσο την σοβαρότητα ασθένειας όσο και την παραγωγή αφλατοξίνης κατά 70%. Σε έλεγχο παρεμπόδισης ανάπτυξης μυκηλίου οι δραστικές ουσίες του Switch<sup>®</sup>, cyprodinil και fludioxonil έδειξαν παρεμπόδιση 89% και 87% αντίστοιχα. Από τα βιολογικά σκευάσματα, αυτά που έδειξαν την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην παρεμπόδιση ανάπτυξης αφλατοξίνης ήταν τα Botector<sup>®</sup> και Mycostop<sup>®</sup> μειώνοντας το ποσοστό της παραγόμενης αφλατοξίνης έως και 50%. Γενικό συμπέρασμα είναι ότι με την εφαρμογή ορθών γεωργικών πρακτικών και με συνδυασμό βιολογικών παραγόντων και χημικών σκευασμάτων σε συγκεκριμένα στάδια της καλλιέργειας καλαμποκιού η μόλυνση του καρπού με αφλατοξίνες θα μπορούσε να περιοριστεί σημαντικά.

## ABSTRACT

*Aspergillus* species cause significant diseases (rots) in field crops (including maize), grapes, nuts and fruits at both pre- and post-harvest level. These fruit rots are usually associated with the production of various mycotoxins such as the carcinogenic aflatoxins. In this study, several formulations and non-pathogenic biotic factors were evaluated for the control of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in maize crops. *In vitro* experiments were performed on maize kernels with the following factors: a) Zeolite, a mineral with special physicochemical properties, b) Agri-fos 600®, a commercial product based on potassium phosphonate anions that induce the immune system of plants, c) Trianium®, a commercial product based on the fungus *Trichoderma harzianum* that works by stimulating the growth of the root system and inhibiting the infection and colonization of pathogenic fungi, d) Botector®, a commercial product containing the yeast *Aureobasidium pullulans* whose action is based on inhibition of the pathogen colonization due to space and nutrient, e) *Paenibacillus alvei* K-165, an antagonistic rhizobacterium that induces systemic resistance of plants, f) Serenade Max®, a bio-fungicide/bio-bactericide that also stimulates natural plant defense mechanisms and has demonstrated increased plant growth effects, g) Vacciplant®, a commercial product that contains laminarine, a promoter of the immune system of plants, and h) a non-toxicogenic strain of *Aspergillus flavus*. Finally, the fungicides Switch®, Geoxe®, Granuflo®, Cantus®, Chorus® and Quadris® were tested. All biocontrol and chemical products were applied in maize kernels by immersing the seeds for 30 min at highest label doses. The infection with conidia of *A. flavus* was carried out 24h later by applying on each corn kernel a droplet of 10 µl (10<sup>6</sup> conidia/ml). All formulations were applied on laboratory tests (*in vitro*) and in field. The experiments demonstrated that the chemical formulations reduced significantly the infection of the fungus *A. flavus* in field experiments and *in vitro*. In particular, the fungicide Switch® reduced disease severity and aflatoxin production by 70%. The active ingredients of the fungicide Switch®, cyprodinil and fludioxonil showed 89% and 87% inhibition in mycelium growth respectively. Additionally, the biopesticides Botector® and Mycostop® reduced the aflatoxin maize contamination by 50%. In conclusion, by applying good agricultural practices and a combination of biological agents and fungicides at the growth stage of maize anthesis and silking, the contamination of aflatoxins could be significantly reduced.

## Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	2
ABSTRACT .....	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
1.1. Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ .....	7
1.1.1. Καταγωγή, ιστορία και βοτανικοί χαρακτήρες .....	7
1.1.2. Χρήση και θρεπτική αξία.....	11
1.1.3. Σημαντικότητα καλλιέργειας και οικονομικά στοιχεία.....	12
1.1.4. Προετοιμασία αγρού, λίπανση, άρδευση, συγκομιδή και αποθήκευση.....	12
1.1.5. Αποδόσεις και ενεργειακές δυνατότητες .....	14
1.1.6. Εχθροί και ασθένειες του καλαμποκιού .....	14
1.2. ΟΙ ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΟΙ.....	18
1.2.1. Οι μύκητες του γένους <i>Aspergillus</i> - Ιστορικά στοιχεία.....	18
1.2.2. Μορφολογία.....	18
1.2.3. Οικολογία, χρήσεις.....	19
1.2.4. Η ομάδα <i>Aspergillus section Flavi</i> - Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των ειδών της ομάδας <i>Flavi</i> .....	20
1.2.5. Κύκλος ασθένειας και επιδημιολογία του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	23
1.2.6. Γονιδιωματική ανάλυση του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	24
1.3. ΟΙ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ.....	25
1.3.1. Ιστορικά-στατιστικά στοιχεία.....	25
1.3.2. Παθογόνα αίτια – Είδη αφλατοξινών .....	25
1.3.3. Φυσικές και χημικές ιδιότητες αφλατοξινών .....	26
1.3.4. Επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και των ανθρώπων.....	27
1.3.5. Βιοσύνθεση αφλατοξίνης.....	29
1.3.6. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης .....	30
1.3.7. Νομοθεσία.....	31
1.3.8. Οικονομικές επιπτώσεις από μόλυνση με αφλατοξίνες.....	31
1.4. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ.....	33
1.4.1. Έλεγχος του προβλήματος πριν τη συγκομιδή .....	33
1.4.1.1. Προληπτικά μέτρα.....	33
1.4.1.2. Δημιουργία ανθεκτικών-ανεκτικών ποικιλιών .....	33
1.4.1.3. Βιολογική καταπολέμηση .....	34

1.4.1.4. Χημική αντιμετώπιση .....	34
1.4.2. Έλεγχος του προβλήματος μετασυλλεκτικά .....	35
1.4.2.1. Προληπτικά μέτρα.....	35
1.4.2.2. Διαλογή .....	36
1.4.2.3. Διεργασίες αποτοξικοποίησης και μεταβολισμού των αφλατοξινών .....	36
1.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ.....	37
1.5.1. GRANUFLO® .....	37
1.5.2. GEOXE® .....	38
1.5.3. CHORUS® .....	38
1.5.4. CANTUS® .....	38
1.5.5. QUADRIIS® .....	39
1.5.6. SWITCH® .....	39
1.5.7. VACCIPLANT® .....	39
1.5.8. SERENADE MAX® .....	39
1.5.9. BOTECTOR® .....	40
1.5.10. TRIANUM® .....	40
1.5.11. MYCOSTOP® .....	41
1.5.12. AGRI-FOS 600® .....	41
1.5.13. ΖΕΟΛΙΘΟΣ .....	41
1.5.14. ΜΗ-ΤΟΞΙΚΟΓΟΝΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>A. flavus</i> .....	42
1.5.15. <i>Paenibacillus alvei</i> K-165 .....	42
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	43
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
3.1. Πρωτόκολλα .....	44
3.2. Βιολογικό υλικό και στελέχη μύκητα .....	45
3.3. Ταυτοποίηση και αλληλούχιση .....	45
3.4. Προετοιμασία βιολογικών και χημικών σκευασμάτων .....	46
3.5. <i>In vitro</i> αξιολόγηση των σκευασμάτων στην παρεμπόδιση κονιδιογένεσης του μύκητα <i>A. flavus</i> .....	47
3.6. <i>In vitro</i> αξιολόγηση των σκευασμάτων στην παρεμπόδιση ανάπτυξης αφλατοξίνης .....	48
3.7. Αξιολόγηση των βιολογικών σκευασμάτων στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα .....	49
3.8. Αξιολόγηση ανθεκτικότητας του <i>A. flavus</i> σε διάφορες δραστικές ουσίες.....	49
3.9. Πιλοτικό πείραμα αγρού .....	50

3.10. Τελικό πείραμα αγρού .....	51
3.11. Αξιολόγηση ποικιλιών DECALB ως προς την ανθεκτικότητά τους στην παραγωγή αφλατοξίνης και την ικανότητά τους στην παρεμπόδιση ανάπτυξης κονιδίων .....	51
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
4.1 Αποτελέσματα αλληλούχισης .....	53
4.2. <i>In vitro</i> αξιολόγηση των σκευασμάτων στην παρεμπόδιση σποριοποίησης του <i>A. flavus</i> .....	56
4.3. <i>In vitro</i> αξιολόγηση των σκευασμάτων στην παρεμπόδιση ανάπτυξης αφλατοξίνης/μέθοδος TLC.....	60
4.4. Αξιολόγηση των βιολογικών σκευασμάτων στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα .....	65
4.5. Αξιολόγηση δραστικών ουσιών στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα .....	66
4.6. Πιλοτικό πείραμα αγρού .....	73
4.7. Τελικό πείραμα αγρού .....	75
4.8. Αξιολόγηση υβριδίων DEKALB ως προς την ανθεκτικότητά τους στην παραγωγή αφλατοξίνης και την ικανότητά τους στην παρεμπόδιση ανάπτυξης κονιδίων .....	78
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	80
5.1 <i>In vitro</i> αξιολόγηση των σκευασμάτων στην παρεμπόδιση σποριοποίησης και παραγόμενης αφλατοξίνης .....	80
5.2. Αξιολόγηση δραστικών ουσιών στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα <i>A. flavus</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα .....	81
5.3. Αξιολόγηση επιλεγμένων σκευασμάτων σε πειράματα αγρού.....	82
5.4. Γενικό συμπέρασμα - Σύστημα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης αφλατοξινών στο καλαμπόκι .....	83
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	85



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ

#### 1.1.1. Καταγωγή, ιστορία και βοτανικοί χαρακτήρες



**Εικ. 1.** Φυτά καλαμποκιού

Το καλαμπόκι ή αραβόσιτος ή αραποσίτι (σίταρος ή σιταροπούλα στην Κύπρο) έχει την επιστημονική ονομασία *Zea mays* (Εικ. 1). Η ελληνική επιστημονική ονομασία του φυτού είναι Αραβόσιτος ο κοινός ή Ζέα η μαϋς. Είναι σιτηρό της οικογένειας των Ποσειδών (*Poaceae*) ή Αγρωστωδών (*Gramineae*) και κατάγεται από την Αμερικάνικη ήπειρο όπου ήδη πριν από 5.500 χρόνια το καλλιεργούσαν οι Ίνκας, οι Μάγια και οι Αζτέκοι. Η Ελληνική ονομασία του, «αραβόσιτος», σημαίνει «ο σίτος (σιτάρι) των Αράβων» και εισήχθη στην Ελλάδα το 1600 από τη Βόρεια Αφρική. Καλλιεργείται συνήθως για τον καρπό του και δευτερευόντως για την παραγωγή βιομάζας. Το σημερινό είδος αραβοσίτου που καλλιεργείται θεωρείται ότι είναι προϊόν διασταύρωσης μεταξύ ενός αρχικού προγόνου (*Euchlaena maxicana*) και ενός άγνωστου άγριου φυτού (Harshberger, 1896).

#### **Συστηματική ταξινόμηση**

Βασίλειο: Φυτά (Plantae)

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)

Ομοταξία: Μονοκοτυλήδονα (Liliopsida)

Τάξη: Κυπειρώδη (Cyperales)

Οικογένεια: Ποσειδή (*Poaceae*)

Γένος: *Zea*

Είδος: *mays*

## Χαρακτηριστικά

Είναι ετήσιο, ψηλό φυτό με χοντρό όρθιο και συμπαγή βλαστό, στενά και μακριά φύλλα σε σχήμα σπαθιού και κυματιστά άκρα. Στην κορυφή του φυτού υπάρχει η αρσενική ταξιανθία που σχηματίζει θύσανο, έχει δε την ονομασία φόβη. Η θηλυκή ταξιανθία αποτελείται από ένα πλατύ στάχυ με παχύ άξονα, πάνω στον οποίο βρίσκονται τα άνθη σε σειρές. Η ταξιανθία αυτή ονομάζεται σπάδικας. Στη συνέχεια τη θέση των ανθών παίρνουν οι κόκκοι που καλύπτονται από φύλλα ενώ στην κορυφή του σπάδικα (Εικ. 2) υπάρχει θύσανος αποτελούμενος από πολλές μακριές τριχοειδείς κλωστές (Καραμάνος, 1999).

## Καρπός



**Εικ. 2.** Καρπός καλαμποκιού

Ο καρπός του αραβοσίτου είναι καρύοψη, δηλαδή είδος ξηρού καρπού, μονόσπερμου, με πολύ λεπτό περικάρπιο που περιβάλλει το σπέρμα. Αποτελείται από τέσσερα τμήματα: το περικάρπιο, το ενδοσπέρμιο, το έμβρυο και τον ποδίσκο. Το περικάρπιο αποτελείται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνες και έχει ρόλο να προστατεύει το σπέρμα από εχθρούς, μολύνσεις και την είσοδο του νερού. Μόλις το περικάρπιο σπάσει, το νερό εισέρχεται στο σπέρμα και ξεκινά η βλάστηση. Το ενδοσπέρμιο αποτελείται από κύτταρα με λεπτά κυτταρικά τοιχώματα, τα οποία είναι γεμάτα με αμυλόκοκκους. Αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του καρπού και περιέχει υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και μικρές ποσότητες ανόργανων αλάτων και ελαίων. Χωρίζεται με βάση την υφή του σε υαλώδες και αλευρώδες ενδοσπέρμιο. Ο τρόπος που κατανέμονται τα δύο αυτά είδη στον καρπό επηρεάζει το σχήμα και τη σκληρότητά του. Οι εξωτερικές στρώσεις κυττάρων του ενδοσπερμίου διαθέτουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα και συγκροτούν ένα διαφοροποιημένο ιστό που ονομάζεται αλευρώνη. Η αλευρώνη περιέχει μεγάλες πρωτεϊνικές δομές, τα πρωτεϊνικά σώματα, τα οποία περικλείονται σε μεμβράνες. Το ενδοσπέρμιο είναι η βασική πηγή ενέργειας και τροφοδοσίας, καθώς είναι εξοπλισμένο με όλα τα απαραίτητα υλικά για τη διαδικασία της βλάστησης, μέχρι το νεαρό φυτό να γίνει αυτότροφο.

Το έμβρυο είναι μια μικρογραφία του φυτού και φέρει τις καταβολές των πρώτων οργάνων του. Αποτελείται από τον εμβρυακό άξονα και το ασπίδιο. Στον εμβρυακό άξονα διακρίνεται το πτερίδιο, το μεσοκοτύλιο και το ριζίδιο. Το πτερίδιο φέρει το σημείο αύξησης και τις διαφοροποιημένες καταβολές των πρώτων πέντε φύλλων του φυτού. Καλύπτεται από το κολεόπτιλο, έναν προστατευτικό ιστό που λόγω του ατρακτοειδούς

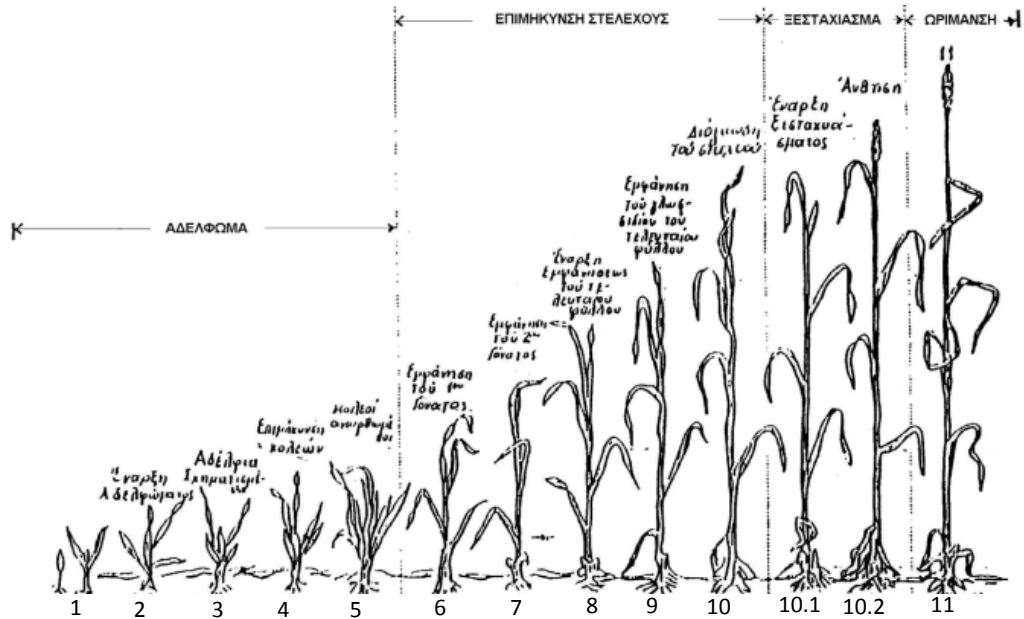
σχήματος βοηθάει στην ανάδυση του φυταρίου από το έδαφος. Το μεσοκοτύλιο είναι το όργανο που στηρίζει το φυτό και συνδέει το ριζικό με το υπέργειο μέρος. Επίσης φέρει τις καταβολές των δευτερογενών εμβρυακών ριζών και συμβάλλει ουσιαστικά με την επιμήκυσή του στην ανάδυση του φυταρίου. Το ριζίδιο εξελίσσεται στην πρωτογενή εμβρυακή ρίζα και καλύπτεται από την κολεόρριζα, που έχει προστατευτικό χαρακτήρα. Το ασπίδιο ή κοτύλη διαθέτει εξειδικευμένα κύτταρα που υδρολύουν το άμυλο του ενδοσπερμίου και μεταφέρουν τα προϊόντα στον εμβρυακό άξονα. Το έμβρυο στο σύνολό του έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε έλαια και πρωτεΐνες καθώς και το μεγαλύτερο ποσοστό των ανόργανων θρεπτικών ουσιών του καρπού. Τέλος ο ποδίσκος είναι το όργανο με το οποίο στηρίζεται ο καρπός πάνω στον σπάδικα και μεταφέρει υλικά από το μητρικό φυτό κατά το γέμισμα του καρπού (Καραμάνος, 1999).

### **Ριζικό σύστημα**

Στο ριζικό σύστημα του αραβοσίτου, σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, διακρίνεται η διαδοχική έκφυση τεσσάρων κύριων τύπων ριζών. Αρχικά παρατηρείται ένα εμβρυακό ριζικό σύστημα αποτελούμενο από μία πρωτογενή ρίζα και έναν ποικίλο αριθμό δευτερογενών ριζών και στη συνέχεια, ένα μεταεμβρυακό ριζικό σύστημα αποτελούμενο από νεοσχηματιζόμενες ρίζες. Οι νεοσχηματιζόμενες ρίζες που εκφύονται από διαδοχικούς κόμβους κάτω από την επιφάνεια του εδάφους ονομάζονται βλαστογενείς ρίζες ενώ οι αντίστοιχες ρίζες που εκφύονται από διαδοχικούς κόμβους που βρίσκονται πάνω από την επιφάνεια του εδάφους ονομάζονται εναέριας ρίζες. Πλάγιες ρίζες οι οποίες εκφύονται από όλους τους κύριους τύπους ριζών ανήκουν, επίσης, στο μεταεμβρυακό ριζικό σύστημα. Κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο εβδομάδων ανάπτυξης, οι πρωτογενείς και δευτερογενείς εμβρυακές ρίζες αποτελούν το κύριο μέρος του ριζώματος των φυτών. Αργότερα, οι μεταεμβρυακές ρίζες γίνονται κυρίαρχες και σχηματίζουν τον κύριο σκελετό του ριζικού συστήματος του αραβοσίτου (Καραμάνος, 1999).

### **Βλαστός - Φύλλα**

Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης ο βλαστός αποτελείται ουσιαστικά από τους κόμβους και το κορυφαίο μερίστωμα (Εικ. 3). Το σημείο αύξησης του νεαρού φυτού βρίσκεται κοντά ή κάτω από την επιφάνεια του εδάφους. Οι κόμβοι διαφοροποιούνται με γρήγορο ρυθμό αλλά τα μεσογονάτια διαστήματα δεν επιμηκύνονται πριν ολοκληρωθεί ο σχηματισμός όλων των οργάνων του υπέργειου μέρους. Έτσι ο βλαστός μένει βραχύς με κωνικό σχήμα και καλύπτεται από τους κολεούς των φύλλων. Το κορυφαίο μερίστωμα είναι επιφορτισμένο με τη δημιουργία νέων οργάνων του υπέργειου. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία του σχηματισμού των φύλλων το κορυφαίο μερίστωμα μεταπίπτει σε αναπαραγωγική καταβολή η οποία θα εξελιχθεί σε φόβη. Τα φύλλα του αραβοσίτου εκφύονται κατ' εναλλαγή από το βλαστό. Αποτελείται από τον κολεό που βρίσκεται στη βάση του φύλλου και από το έλασμα που βρίσκεται στο άκρο του και χωρίζονται μεταξύ τους από το όριο που δημιουργεί το ωτίο με την γλωσσίδα. Το έλασμα του φύλλου είναι λογχοειδές, στενό και επίμηκες με παράλληλη νεύρωση. Κατά την ανάπτυξή του ξετυλίγεται σταδιακά μέσα από το προηγούμενο φύλλο. Το εμβρυακό φύλλο είναι πιο βραχύ από τα επόμενα κανονικά φύλλα (Καραμάνος, 1999).



**Εικ. 3.** Στάδια ανάπτυξης καλαμποκιού. Στάδιο 1-5: αδελφώμα, στάδιο 6-10: επιμήκυνση στελέχους, στάδιο 10.1-10.2: άνθιση, στάδιο 11: ωρίμανση (Καραμάνος, 2012)

### Τύποι

Το καλαμπόκι κατατάσσεται σε 7 τύπους, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των σπόρων του σε: σκληρό, οδοντωτό, αλευρώδες, σακχαρώδες, κηρώδες, μικρό και «ντυμένο» (Εικ. 4).

- 1) Ο **αλευρώδης τύπος** χρησιμοποιείται για την παρασκευή κυρίως αλευριού, οι δε κόκκοι του αποτελούν μία αμυλώδη μάζα.
- 2) Ο **κηρώδης τύπος** έχει κόκκινη απόχρωση και χρησιμοποιείται στη βιομηχανική παραγωγή συγκολλητικών ουσιών.
- 3) Ο **ντυμένος τύπος** είναι χαμηλής ποιότητας και χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή.
- 4) Ο **σακχαρώδης τύπος** έχει σπόρια με γλυκιά νόστιμη γεύση, συρρικνωμένα ενώ το σάκχαρο του φυτού δεν μετατρέπεται σε άμυλο όπως συμβαίνει με τους άλλους τύπους. Οι κόκκοι του τρώγονται απευθείας από το βρασμένο ή ψητό σπάδικα.
- 5) Στον **οδοντωτό τύπο** τα σπόρια είναι συρρικνωμένα στην κορυφή.
- 6) Στο **σκληρό καλαμπόκι** το εξωτερικό περίβλημα του κόκκου εμποδίζει τη συρρίκνωσή του αφού δημιουργεί ένα πέπλο σκληρού φλοιού. Ο συγκεκριμένος τύπος προτιμάται στην κονσερβοποιία.
- 7) Τέλος ο **μικρός τύπος** χαρακτηρίζεται από σπόρους μικρούς και πολύ σκληρούς. Όταν θερμανθούν διαστέλλονται και σκάνε παράγοντας το γνωστό ποπ κορν (Καραμάνος, 1999).



**Εικ. 4.** Οι διαφορετικοί τύποι καλαμποκιού

### 1.1.2. Χρήση και θρεπτική αξία

Παρότι το καλαμπόκι είναι βασική πηγή διατροφής σε πολλές χώρες, η θρεπτική του αξία είναι μικρότερη απ' ό τι στα άλλα σιτηρά. Επίσης το ψωμί που παράγεται από το καλαμπόκι, γνωστό με το όνομα μπομπότα, δεν είναι καλής ποιότητας. Το άμυλο καλαμποκιού (γνωστό και ως κορν φλάουρ ή άνθος αραβοσίτου) χρησιμοποιείται στη ζαχαροπλαστική, στην παραγωγή αμυλούχων προϊόντων και στην αλλαντοποιία. Στη Λατινική Αμερική το καλαμπόκι χρησιμοποιείται ως βάση ενός είδους ζύμης από την οποία παρασκευάζονται οι «τορτίγιας», επίπεδες πίτες που αντικαθιστούν το ψωμί.

Στη διατροφή επίσης χρησιμοποιείται και το λάδι του καλαμποκιού, το γνωστό αραβοσιτέλαιο. Οι κόκκοι του καλαμποκιού, με κατάλληλη επεξεργασία, μπορεί να γίνουν και αλκοόλη βιομηχανικής χρήσης.

Όμως χρήσιμα είναι και τα μη φαγώσιμα μέρη. Έτσι από το καλάμι φτιάχνεται χαρτί και χαρτόνι. Οι άξονες των σπαδικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν καύσιμο (συνήθως σε φωτιά) και στην παραγωγή διαφόρων χρήσιμων διαλυτών στη βιομηχανία. Τα υπολείμματα από την κατεργασία του καλαμποκιού αποτελούν και μια από τις σημαντικότερες πηγές βιομάζας (Καραμάνος, 1999).

Ακόμη, η ενσίρωση αποτελεί μία από τις χρήσεις καλλιέργειας του καλαμποκιού η οποία είναι ευρύτατα διαδεδομένη σε όλες τις ζώνες όπου καλλιεργείται το καλαμπόκι και ιδιαίτερα στην Δυτική Ευρώπη και την Αμερική. Στην Ελλάδα η ενσίρωση καλαμποκιού δεν είναι πολύ διαδεδομένη, όμως έχει αυξηθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια και το 15% περίπου των καλλιεργούμενων στρεμμάτων με καλαμπόκι προορίζεται πλέον για κοπή ενσιρώματος. Οι κυριότεροι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην επιλογή ενός υβριδίου που προορίζεται για ενσίρωμα είναι: ποιοτικοί και ποσοτικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αξία διατροφής αλλά και την συμπεριφορά του ζώου όπως η περιεκτικότητα σε ινώδεις ουσίες, η πεπτικότητα και αποδόμηση αυτών, η ενέργεια και η πρωτεϊνική σύσταση, η περιεκτικότητα και πεπτικότητα αμύλου και φυσικά όλοι εκείνοι οι παράγοντες που είναι σημαντικοί και για ένα υβρίδιο που προορίζεται για την συγκομιδή του σπόρου του. Οι παράγοντες αυτοί εξαρτώνται από το γενετικό υλικό του υβριδίου και αξιολογούνται κατά

το κρίσιμο στάδιο της κοπής για ενσίρωμα. Συνήθως τα υβρίδια που είναι αποδοτικά σε σπυρί, με υψηλό, χοντρό και πράσινο στέλεχος καθώς και αυτά που έχουν πλούσιο φύλλωμα και ανθεκτικό σε προσβολές από ασθένειες, είναι αυτά που πληρούν τους παραπάνω ποιοτικούς και ποσοτικούς παράγοντες.

### 1.1.3. Σημαντικότητα καλλιέργειας και οικονομικά στοιχεία

Το καλαμπόκι και η καλλιέργειά του είναι διαδεδομένη παγκοσμίως. Οι Η.Π.Α έχουν τη μεγαλύτερη παραγωγή στον κόσμο με 285 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Ακολουθούν η Κίνα, η Βραζιλία και το Μεξικό.

Στην Ελλάδα καλλιεργείται κυρίως στη Μακεδονία, τη Θράκη, τη Στερεά και την Πελοπόννησο. Η ετήσια παραγωγή φτάνει το 1,5 εκατομμύριο τόνους (Πίνακας 1).

#### Εγχώρια παραγωγή αραβοσίτου (2014)

ΑΝ.ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	545.162 στρ.
ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	473.478 στρ.
ΔΥΤΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	130.464 στρ.
ΗΠΕΙΡΟΣ	79.670 στρ.
ΘΕΣΣΑΛΙΑ	640 στρ.
ΙΟΝΙΟ	1.070 στρ.
Ν. ΑΙΓΑΙΟ	247.500 στρ.
ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ	96.096 στρ.

Πίνακας 1.Πηγή ΥΠΑΑΤ, 2014

### 1.1.4. Προετοιμασία αγρού, λίπανση, άρδευση, συγκομιδή και αποθήκευση

Κατά τη φθινοπωρινή περίοδο, συστήνεται όργωμα σε μέτριο βάθος που εξυπηρετεί στη βελτίωση της υγρασίας και αερισμού του εδάφους καθώς και στην καταπολέμηση των χειμερινών ζιζανίων. Κατά το τέλος του χειμώνα ή την αρχή της άνοιξης πραγματοποιείται ελαφρά κατεργασία με εδαφοκαλλιεργητή για τη δημιουργία σποροκλίνης με κατάλληλη δομή για την εξασφάλιση γρήγορου και ομοιόμορφου φυτρώματος, τη βελτίωση των φυσικών ιδιοτήτων του εδάφους και την καταπολέμηση των ανοιξιάτικων ζιζανίων.

Η σπορά πραγματοποιείται την άνοιξη. Στη χώρα μας, η σπορά γίνεται κατά την περίοδο από τέλη Μαρτίου με τέλη Απριλίου και ως επίσπορη καλλιέργεια ο αραβόσιτος σπέρνεται τους μήνες Ιούνιο ή Ιούλιο. Γενικά, συστήνεται πρώιμη σπορά για την αποφυγή καταστροφής των σπορόφυτων από τις ξηροθερμικές συνθήκες του καλοκαιριού. Η σπορά γίνεται με πνευματικές μηχανές. Το βάθος σποράς εξαρτάται από τη θερμοκρασία, υγρασία και σύσταση του εδάφους.

## **Λίπανση**

Οι σύγχρονες ποικιλίες-υβρίδια αραβοσίτου χαρακτηρίζονται από υψηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία. Οι ανάγκες της καλλιέργειας εξαρτώνται από την πρωιμότητα της ποικιλίας και είναι υψηλότερες για τα υβρίδια μεγάλου βιολογικού κύκλου.

## **Άρδευση**

Οι απαιτήσεις του αραβοσίτου σε νερό είναι αυξημένες συγκριτικά με άλλα σιτηρά και κυμαίνονται μεταξύ 400 και 800 χιλ στη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης, οι ανάγκες σε νερό είναι σχετικά χαμηλές και συνήθως αποφεύγεται η άρδευση έτσι ώστε να αναγκαστεί το φυτό να αναπτύξει βαθύ ριζικό σύστημα για την αποτελεσματική χρήση της εδαφικής υγρασίας και την ελαχιστοποίηση του κινδύνου πλαγιάσματος. Οι μεγαλύτερες απαιτήσεις του φυτού σε νερό παρουσιάζονται πριν και κατά την περίοδο της άνθισης έως και το πέρας της φυσιολογικής ωρίμανσης του φυτού.

Στην Ελλάδα, όπου οι ετήσιες βροχοπτώσεις αποδίδουν περίπου 250 χιλ νερού, απαιτείται η εφαρμογή 150-550 χιλ. νερού άρδευσης κατανεμημένου με τρόπο που να καλύπτονται οι ανάγκες του φυτού στα επιμέρους στάδια ανάπτυξης. Κατά κανόνα και εφόσον υπάρχει διαθέσιμο νερό τα φυτά θα πρέπει να αρδεύονται πριν εκδηλωθούν συμπτώματα μαρασμού. Όταν το νερό άρδευσης είναι περιορισμένο συνιστώνται τρεις αρδεύσεις και εφαρμόζονται 15 περίπου ημέρες πριν το ξεστάχασμα, κατά το ξεστάχασμα και 15 ημέρες μετά το ξεστάχασμα. Στη χώρα μας, η εφαρμογή άρδευσης πραγματοποιείται με καταιονισμό, αυλάκια, ή με σταγόνες.

## **Συγκομιδή**

Ο αραβόσιτος συγκομίζεται όταν το ποσοστό υγρασίας των σπόρων είναι μεταξύ 14 και 30%. Περαιτέρω επιμήκυνση της περιόδου συγκομιδής δεν επιδρά στις αποδόσεις αλλά συμβάλλει στη φυσιολογική ξήρανση του κόκκου υπό φυσικές συνθήκες. Μακροσκοπικά το στάδιο της ωριμότητας του αραβοσίτου συμπίπτει με το κιτρίνισμα των φύλλων και την σταδιακή ξήρανση των βράκτιων φύλλων. Εάν είναι αδύνατη η φυσική μείωση της υγρασίας, το καλαμπόκι συγκομίζεται με υψηλότερη υγρασία και οδηγείται σε ξηραντήρια ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο με παράλληλη όμως αύξηση του κόστους παραγωγής.

Η συγκομιδή του αραβοσίτου πραγματοποιείται α) με συλλεκτικές μηχανές σπαδικών, που συγκομίζουν τους σπάδικες από δύο ή περισσότερες γραμμές ταυτόχρονα και ακολούθως αυτοί αφήνονται για φυσική ξήρανση ή β) με θεριζοαλωνιστικές μηχανές που κατά τη συγκομιδή αφαιρούν τα βράκτια και δίνουν απευθείας τον σπόρο.

## **Αποθήκευση**

Κατά την αποθήκευση, η υγρασία του σπόρου θα πρέπει να είναι μικρότερη του 14%. Εάν η συγκομιδή πραγματοποιηθεί όταν η υγρασία του καρπού είναι υψηλότερη συστήνεται ξήρανση με φυσικά ή τεχνητά μέσα. Η ξήρανση πραγματοποιείται σε ειδικά ξηραντήρια που λειτουργούν είτε με τη δίοδο ρεύματος αέρα ή με διακοπτόμενη ξήρανση και εξαερισμό. Η αποθήκευση του αραβοσίτου πραγματοποιείται σε κατάλληλα σιλό.

### 1.1.5. Αποδόσεις και ενεργειακές δυνατότητες

Η μέση απόδοση του αραβοσίτου στη χώρα μας είναι περί τα 1000-1100 χλγ/στρ. ενώ το εύρος αποδόσεων που έχει σημειωθεί κυμαίνεται από 600 έως και 1700 χλγ/στρ. Συνήθως, η απομένουσα φυτική μάζα (στελέχη) έχει το ίδιο βάρος με αυτό του συγκομιζόμενου καρπού. Με βάση την απόδοση σε καρπό, και με δεδομένο ότι από 1 χλγ καρπού σιτηρών παράγονται 0,39 λίτρα βιοαιθανόλης (δεδομένα από σύγχρονη βιομηχανική μονάδα), από ένα στρέμμα αραβοσίτου μπορούν να παραχθούν περί τα 380-400 λίτρα βιοαιθανόλης. Όμως, το ενεργειακό ισοζύγιο της παραγωγής είναι ιδιαίτερα μικρό (1,3) ενώ και η μείωση των αερίων του θερμοκηπίου, σε σχέση με τη βενζίνη, είναι επίσης μικρή (περί το 18-20%). Παράγονται επίσης 350 χλγ. υψηλής προστιθέμενης αξίας ζωοτροφή.

Εάν αξιοποιηθούν τα λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα της συγκομιδής για παραγωγή βιοαιθανόλης 2ης γενιάς, τότε προστίθενται περί τα 250 λίτρα στη στρεμματική απόδοση που έτσι φθάνει τα 630-650 λίτρα βιοαιθανόλης. Επειδή το ενεργειακό ισοζύγιο για λιγνοκυτταρινούχα βιοαιθανόλη είναι τουλάχιστον 5-6 και η μείωση των αερίων του θερμοκηπίου περίπου 70-80% είναι εμφανές ότι εκτός από την αύξηση της απόδοσης, υπάρχει σημαντική συνολική βελτίωση των περιβαλλοντικών ιδιοτήτων της βιοαιθανόλης. Βεβαίως στην πράξη, για λόγους διατήρησης των ιδιοτήτων του εδάφους, θα αφαιρείται μόνο το 30% των υπολειμμάτων με αντίστοιχη μείωση των προστιθέμενων ωφελειών.

### 1.1.6. Εχθροί και ασθένειες του καλαμποκιού

#### Νεαρά φυτά

#### Εχθροί:



Εικ. 5. Προνύμφες σιδηροσκώληκα

1) Οι σιδηροσκώληκες (*Agriotes spp.*) προσβάλλουν τους σπόρους ως προνύμφες. Αποτέλεσμα είναι η ανομοιόμορφη φυτεία με πολλές κενές θέσεις φύτευσης. Η αντιμετώπιση περιλαμβάνει καλλιεργητικές τεχνικές σε συνδυασμό με χημική καταπολέμηση.

2) Οι αγρότιδες (*Agriotis spp*) προσβάλλουν ως κάμπιες τα νεαρά φυτά με αποτέλεσμα την αποκοπή του στελέχους. Η αντιμετώπιση γίνεται με φθινοπωρινό όργωμα για ενσωμάτωση φυτικών υπολειμμάτων και καταστροφή νεαρών προνυμφών. Υπάρχει και δυνατότητα χημικής καταπολέμησης.

3) Η *Calendra maidis* προσβάλλει ως ακμαίο τα φύλλα και το κορυφαίο μερίστωμα και ως προνύμφη τα στελέχη των περισσότερο ανεπτυγμένων καλαμποκιών. Τρόπος αντιμετώπισης είναι η στράγγιση των υγρών εδαφών και η καταστροφή αυτοφυούς βλάστησης (Θανασουλόπουλος, 1995).



### Ασθένειες:



**Εικ. 6.** Τήξεις σε φυτά καλαμποκιού από το ωμόκητα *Pythium*

1) Τήξεις νεαρών φυτών που παρατηρούνται πριν ή κατά τη βλάστηση του σπόρου από *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Diplodia zeae*, *Gibberella zeae*, *G. fujikuroi*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.* Οι ωμόκητες του γένους *Pythium* είναι μύκητες εδάφους και προκαλούν έντονες προσβολές σε συνθήκες που δεν ευνοούν το γρήγορο φύτερωμα και την ανάπτυξη των νεαρών φυτών. Τα υπόλοιπα είδη προκαλούν βλάβες ακόμα και στο υπέργειο τμήμα. Για την αντιμετώπισή τους συνιστάται η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και από χημικής πλευράς συνιστάται η απολύμανση σπόρων με μυκητοκτόνα (Captan®, Maneb®, Thiram®) (Θανασουλόπουλος, 1995).

### Ριζικό σύστημα

#### Εχθροί:

1) Είδη του γένους *Diabrotica spp.* προσβάλλουν ως προνύμφες τις ρίζες και τους οφθαλμούς της βάσης με αποτέλεσμα το πλάγιασμα των φυτών. Τα ακμαία εμφανίζονται το καλοκαίρι και προσβάλλουν τα φύλλα. Μερικές από τις λύσεις είναι η αμειψισπορά και η χρήση χημικών εδάφους.

2) Η αφίδα των ριζών (*Aphis maidiradicis*) απομυζά τις ρίζες με αποτέλεσμα το νανισμό. Αποτελεσματικός τρόπος είναι η αμειψισπορά και ένα όργωμα λίγο πριν τη σπορά.

#### Ασθένειες:

1) Οι σηψιρριζίες προκαλούνται από μύκητες του γένους *Pythium* και *Fusarium* και τα αποτελέσματα είναι ο νανισμός, η μειωμένη ευρωστία και η τάση για πλάγιασμα. Αντιμετωπίζονται με τη συμμετοχή των ψυχανθών στην αμειψισπορά και με τη χρήση ανθεκτικών υβριδίων.

## Στέλεχος και αναπαραγωγικά όργανα

### Εχθροί:



**Εικ. 7.** Πράσινο σκουλήκι (*Heliothes armigera*)

1) Πράσινο σκουλήκι. Προσβάλλει ως κάμπια τα νεαρά φύλλα, τις ταξιανθίες και τους καρπούς και μειώνει τις αποδόσεις μέχρι και 50%. Εάν τα βράκτια φύλλα δεν είναι συμπαγή, το σκουλήκι προσβάλλει και τον σπάδικα. Ένας τρόπος αντιμετώπισης είναι η χρήση υβριδίων με σκληρά βράκτια φύλλα. Η χημική καταπολέμηση εφαρμόζεται όπου θεωρείται ότι συμφέρει οικονομικά.



**Εικ. 8.** Πυραλλίδα του αραβοσίτου

2) Πυραλλίδα του αραβοσίτου. Προσβάλλει ως κάμπια όλα τα όργανα του υπέργειου μέρους και σε αυτήν οφείλονται μεγάλες οικονομικές ζημιές. Εισέρχονται ακόμα και στα στελέχη και προσβάλλουν την εντεριώνη. Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος είναι η καταστροφή των φυτικών υπολειμμάτων που αποτελούν καταφύγια διαχείμασης. Η χημική καταπολέμηση εφαρμόζεται όταν συμφέρει οικονομικά.

3) *Sesamia nonagrioides*. Προσβάλλει ως κάμπια τα νεαρά στελέχη και τους σπάδικες με αποτέλεσμα τη θραύση και τη μάρανση του στελέχους. Προκαλεί μεγάλες οικονομικές ζημιές. Η χημική καταπολέμηση και εδώ εφαρμόζεται όταν συμφέρει οικονομικά.

### Ασθένειες:

1) Σήψεις στελέχους και σπαδικών: Οι μύκητες που επιφέρουν τις σημαντικότερες οικονομικές ζημιές και απώλειες στην καλλιέργεια του καλαμποκιού είναι κυρίως αυτοί που προσβάλλουν το στέλεχος και τα αναπαραγωγικά όργανα. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι οι μύκητες των γενών *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Εκτός από τήξεις, οι μύκητες αυτοί είναι υπεύθυνοι και για την παραγωγή μυκοτοξινών. Ο μύκητας *A. flavus* είναι υπεύθυνος για την παραγωγή αφλατοξινών η οποία προκαλεί πολλά προβλήματα υγείας (ακόμη και θάνατο) σε πολλές περιπτώσεις. Οι μύκητες του γένους *Fusarium* είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή φουμονισινών και ευνοούνται από υγρασία κατά την άνθιση. Οι μύκητες αυτοί

είναι υπεύθυνοι και για την παραγωγή τριχοθηκινών και ζεαραλενόνης, εξίσου σημαντικών τοξινών.

2) Κοινός άνθρακας αραβοσίτου: πρόκειται για τον μύκητα *Ustilago maydis* ο οποίος προσβάλλει όλα τα υπέργεια μέρη του φυτού προκαλώντας όγκους ποικίλου μεγέθους. Οι όγκοι περικλείονται από μια μεμβράνη λευκού χρώματος και μέσα περιέχονται τα τελειοσπόρια του μύκητα. Η ένταση της μόλυνσης εξαρτάται από τον αριθμό των όγκων. Η εξάπλωση ευνοείται από υγρό καιρό και άγονο έδαφος ή έδαφος με υπερβολική ποσότητα αζώτου. Η πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση είναι η χρήση ανθεκτικών υβριδίων (Θανασουλόπουλος, 1995).

## Φύλλα

### Εχθροί:

1) Αφίδα των φύλλων του αραβοσίτου (*Rhopalosiphum maidis*): προσβάλλει κυρίως τα κορυφαία φύλλα και τη φόβη του καλαμποκιού. Έχει μέχρι και 9 γενεές το χρόνο. Από μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν υβρίδια ανθεκτικά στις αφίδες.

2) *Spodoptera exigua*: προσβάλλει κυρίως ως κάμπια τα φύλλα και έχει έως και 6 γενεές το χρόνο. Σε προχωρημένο στάδιο οι κάμπιες μπορούν να τραφούν και με νεαρούς σπάδικες. Μετά το μετάξωμα προσβάλλουν τα βράκτια, τον άξονα του σπάδικα και τους καρπούς της κορυφής.

### Ασθένειες:



**Εικ. 9.** Μόλυνση σε φύλλο αραβοσίτου από *Helminthosporium maydis* (<http://www.niaes.affrc.go.jp>)

1) Ελμινθοσποριώσεις από τον μύκητα *Helminthosporium turcicum* (Εικ. 9). Προσβάλλονται κυρίως τα κατώτερα φύλλα και προκαλούνται κηλιδώσεις με ευκρινές όριο. Οι κηλιδώσεις μετατρέπονται σε νεκρώσεις με αποτέλεσμα τη νέκρωση των φύλλων. Τα παθογόνα διαχειμάζουν σε υπολείμματα φύλλων και οι μολύνσεις γίνονται με κονίδια την επόμενη άνοιξη. Υπάρχει αποτελεσματική αντιμετώπισή τους με χημικά σκευάσματα.

2) Σκωρίαση από το μύκητα *Puccinia sorghi*. Προσβάλλει τα φύλλα και προκαλεί κηλίδες που εξελίσσονται σε φλύκταινες, οι επιπτώσεις στην καλλιέργεια είναι σπάνια σοβαρές διότι η μόλυνση εμφανίζεται προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Ενδιάμεσος ξενιστής είναι τα φυτά του γένους *Oxalis*. Οι μολύνσεις του μύκητα αυτού ευνοούνται από υγρή ατμόσφαιρα.

3) Βακτηριακή κηλίδωση από το βακτήριο *Erwinia stewartii*. Χαρακτηρίζεται από κίτρινες επιμήκεις κηλίδες στα φύλλα που επεκτείνονται προς το κεντρικό νεύρο και έχουν ως αποτέλεσμα την ξήρανση μεγάλου μέρους του φύλλου. Στο σύνολό τους τα φυτά παρουσιάζουν καχεξία και νανισμό. Σε μερικές περιπτώσεις προσβάλλονται και οι σπάδικες με αποτέλεσμα την τοπική ατροφία των κόκκων. Διάδοση της ασθένειας γίνεται με μολυσμένους σπόρους ή μέσω των εντόμων *Chaetocnema* και *Diabrotica*. Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης είναι η χρήση ανθεκτικών υβριδίων.

4) Νανισμός καλαμποκιού από το παθογόνο *Spiroplasma kunkelii*. Οφείλεται σε ελικοειδή μυκοπλάσματα με κινητικότητα που περιορίζονται στα αγγεία του ηθμού και μεταφέρονται με έντομα (Θανασουλόπουλος, 1995).

## 1.2. ΟΙ ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΟΙ

### 1.2.1. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* - Ιστορικά στοιχεία

Βασίλειο: Fungi/ Φύλο: Ascomycota/ Τάξη: Eurotiales/ Οικογένεια: Moniliaceae/ Γένος *Aspergillus*

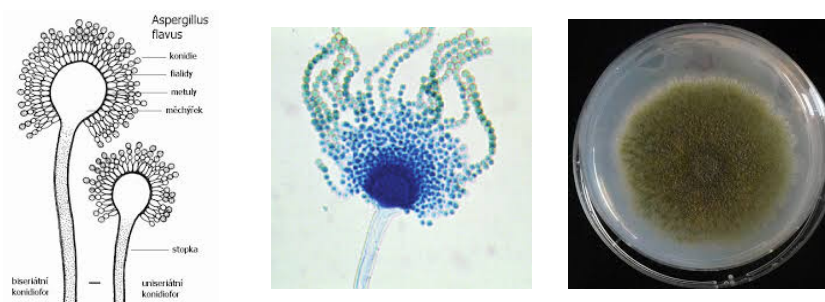
Λίγοι μύκητες είναι τόσο σημαντικοί όσο τα είδη του γένους *Aspergillus* (Baker & Bennet, 2008). Τα χαρακτηριστικά τους έχουν μεγάλο παθολογικό, γεωργικό, βιομηχανικό, φαρμακευτικό, καλλιεργητικό και επιστημονικό ενδιαφέρον. Αναφέρονται από την αρχαία Ελλάδα (Νίκανδρος ο Κολοφώνιος, 185 π.Χ.) ως και στην Εβραϊκή Βίβλο (Λευιτικόν, Κεφ. 13-14) (Raper & Fennel, 1965). Η πρώτη γνωστή αξιοποίηση των ασπεργίλλων ήταν στην Κίνα, πριν από 2000 χρόνια για την ενίσχυση της γεύσης του ρυζιού, της σόγιας και άλλων φυτικών προϊόντων υποστηρίζοντας έτσι, την περαιτέρω ζύμωσή τους από ζύμες και βακτήρια (Baker & Bennet, 2008).

Η επιστημονική μελέτη των Ασπεργίλλων, αλλά και των άλλων μυκήτων ξεκίνησε αμέσως μετά την ανακάλυψη του μικροσκοπίου. Οι μύκητες αυτοί πρωτοαναφέρθηκαν το 1729 στο "Nova Plantarum Genera" (Raper and Fennel, 1965). Ο Micheli ήταν ο πρώτος που διέκρινε τις χαρακτηριστικές κεφαλές των κονιδιοφόρων του γένους αυτού και λόγω του ότι ήταν ιερέας, τους ονόμασε Ασπεργίλλους από το λατινικό *aspergillum*, σκεύος που η Ρωμαιοκαθολική εκκλησία χρησιμοποιούσε στους αγιασμούς και με το οποίο προσομοίασε τις αποικίες του μύκητα (Bennett & Klich, 1992). Ήδη από τα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα, οι ασπεργίλλοι άρχισαν να αναγνωρίζονται ως παθογόνα του ανθρώπου και των ζώων και ως δραστικοί παράγοντες στις διαδικασίες ζύμωσης και αποσύνθεσης των βιολογικών υλικών. Το 1901 τελικά, οι μύκητες αυτοί πήραν οριστική θέση ως ξεχωριστό γένος από τον Wehmer (Raper & Fennel, 1965).

### 1.2.2. Μορφολογία

Τα είδη του γένους *Aspergillus* είναι μυκηλιακοί μύκητες και η ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους βασίζεται στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Η τέλεια μορφή αναφέρεται για μερικά μόνο είδη του γένους αυτού και ανήκει στα γένη *Eurotium* (Τζάμος, 2007) και *Petromyces* (Amalike & Keller, 2011). Τα περισσότερα είδη θεωρούνται ατελείς μορφές και δεν έχει παρατηρηθεί η εγγενούς αναπαραγωγής (τέλεια) μορφή τους. Το γένος *Aspergillus*

χαρακτηρίζεται από πολυκύτταρο υαλώδες ή ανοικτού χρώματος μυκήλιο με πλούσια διακλαδιζόμενες υφές, το οποίο είναι εν μέρει εναέριο και εν μέρει βυθισμένο εντός του υποστρώματος. Οι κονιδιοφόροι είναι μη-διακλαδιζόμενοι, σχηματίζονται από μυκηλιακή υφή και στην κορυφή τους σχηματίζουν μια χαρακτηριστική διόγκωση σφαιροειδούς, ροπαλοειδούς ή ωσειδούς σχήματος που ονομάζεται κύστη. Στο επάνω μέρος της διόγκωσης αυτής υπάρχουν τα φιαλίδια του μύκητα, είτε απευθείας, είτε επάνω σε στηρίγματα, σε μια ή σε δύο σειρές (Εικ.10).



**Εικ 10.** Κονιδιοφόρος και αποικία του μύκητα *Aspergillus flavus* με κονίδια, φιαλίδια, κύστη και στέλεχος ([www.slideplayer.gr](http://www.slideplayer.gr))

### 1.2.3. Οικολογία, χρήσεις

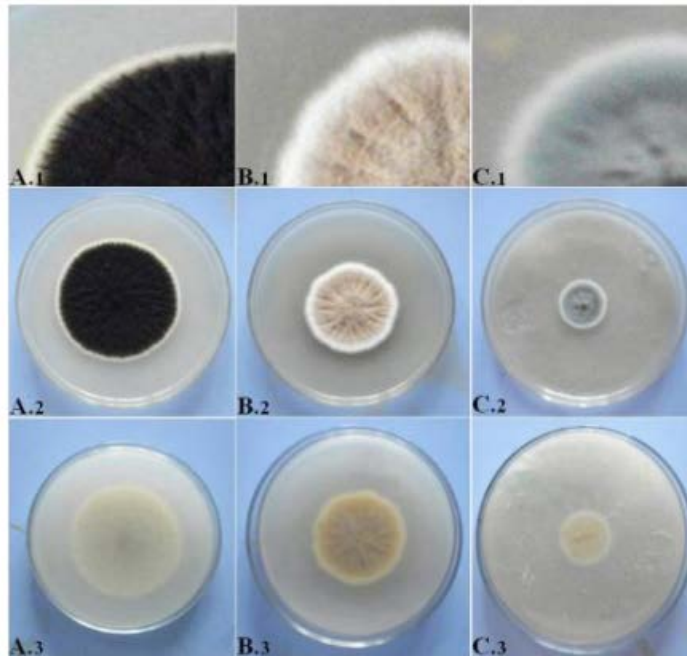
Το γένος αυτό περιλαμβάνει περισσότερα από 200 είδη, κυρίως σαπρόφυτα αλλά και ασθενή παράσιτα τα οποία προκαλούν προβλήματα κυρίως κατά τη διακίνηση και την αποθήκευση διαφόρων προϊόντων (Amalike & Keller, 2011). Περίπου 20 είδη έχει αναφερθεί ότι προκαλούν προβλήματα και στον άνθρωπο με τη μορφή λοιμώξεων (ασπεργιλώσεις), αλλεργιών (π.χ. τουμπερκούλωση) και τοξικών (π.χ. αφλατοξίκωση) (Adams & Moss, 2008). Είναι ευρέως διαδεδομένοι και συχνά απαντώμενοι στη φύση, διότι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται σε πολλές και διαφορετικές πηγές άνθρακα, εμφανίζοντας μια καταπληκτική θρεπτική ευελιξία (Baker & Bennett, 2008). Αυτή η μεγάλη και κοσμοπολίτικη ομάδα μυκήτων έχει ένα σημαντικό ρόλο στο οικοσύστημα, διότι εμπλέκεται στην αποδόμηση ενός μεγάλου εύρους φυσικών οργανικών υποστρωμάτων, ιδιαιτέρως φυτικών υλικών (Raper & Fennel, 1965). Έχουν απομονωθεί από το έδαφος, από φυτικά υπολείμματα, από τον ατμοσφαιρικό αέρα εσωτερικών και εξωτερικών χώρων και από διάφορες άλλες πηγές, όπως στα καύσιμα αεροσκοφών, σε αιγυπτιακές μούμιες, πλαστικά προϊόντα κ.α.

Η ποικιλία των ενζύμων και των οργανικών οξέων που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως θρεπτικά συστατικά, συμπληρώνεται από τη μεταβολική τους ικανότητα να εκκρίνουν πολλούς χαμηλού μοριακού βάρους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι θεωρείται ότι έχουν το ρόλο χημικών σημάτων επικοινωνίας μεταξύ τους, αλλά και με άλλους μικροοργανισμούς (Spraker et al., 2014). Αυτές οι ουσίες περιλαμβάνουν αντιβιοτικά, μυκοτοξίνες, ανοσοκατασταλτικά και παράγοντες μείωσης χοληστερόλης (Bennett, 1985). Δύο από τις πιο σημαντικές ενώσεις δευτερογενούς μεταβολισμού των ασπεργίλλων είναι η λοβαστατίνη και η αφλατοξίνη. Η πρώτη συνεισφέρει θετικά στην ανθρώπινη ζωή διότι χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία της υπερ-χοληστερολαιμίας, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο καρδιακών προσβολών, ενώ η δεύτερη θεωρείται μία από τις πιο ισχυρές

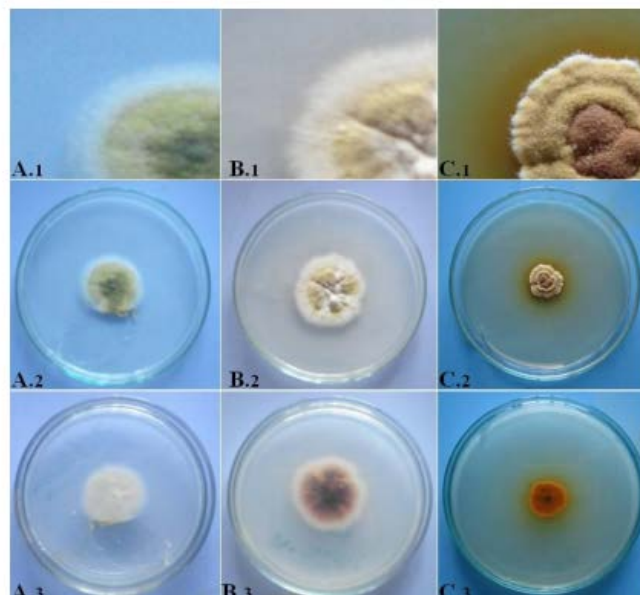
καρκινογόνες ουσίες (Baker & Bennett, 2008). Επίσης, πολλές βιομηχανικές διεργασίες βασίζονται σε διάφορα είδη του γένους *Aspergillus*. Οι ασπέργιλλοι είναι σημαντικοί στη βιομηχανία οινοπνευματωδών, στη φαρμακοβιομηχανία και στην ενζυμική βιομηχανία. Πολλά ένζυμά τους έχουν απομονωθεί και έχουν ευρεία βιομηχανική (π.χ. αμυλάσες). Μία άλλη σημαντική χρήση των ασπεργίλλων στη βιομηχανία είναι η παραγωγή κιτρικού οξέος (Baker & Bennett, 2008). Για δεκαετίες πλέον, το είδος *A. niger* θεωρείται το βιολογικό εργοστάσιο παραγωγής κιτρικού οξέος για μαζική παραγωγή και χρήση του στη βιομηχανία αναψυκτικών και ποτών.

#### **1.2.4. Η ομάδα *Aspergillus section Flavi* - Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των ειδών της ομάδας *Flavi***

Η αναγνώριση και ταυτοποίηση των ειδών της ομάδας αυτής έχει παραδοσιακά βασιστεί στη μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. Δεδομένης όμως της πολυπλοκότητας που εμφανίζει το γένος φαινοτυπικά, η ταυτοποίηση αποδεικνύεται ένα πολύ δύσκολο έργο το οποίο απαιτεί χρόνο και εμπειρία. Γι αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια διάφορες δημοσιευμένες μελέτες ταξινόμησης του γένους *Aspergillus* χρησιμοποιούν μοριακές μεθόδους αναλύοντας τα δεδομένα αλληλούχισης του DNA και του RNA των ειδών και ελέγχου τις φυλογενετικές ομοιότητες μεταξύ των διαφόρων ειδών (Peterson, 2008). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά στα οποία βασίζεται η ταξινόμηση των ειδών, διακρίνονται σε μακρο-μορφολογικά και μικρο-μορφολογικά χαρακτηριστικά (Rodrigues et al., 2009) (Εικ. 11, 12, 13). Στα μακρο-μορφολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνονται το χρώμα του μυκηλίου και των κονιδίων (αγενή σπόρια), η μέση διάμετρος της αποικίας, το αντίστροφο χρώμα της αποικίας, η παραγωγή εκκριμάτων, η παρουσία σκληρωτίων και κλειστοθηκίων. Αντίστοιχα, ο χαρακτηρισμός με βάση τα μικρο-μορφολογικά χαρακτηριστικά αναφέρεται στα σχετικά μήκη των κονιδιοφόρων, στην τοποθέτηση των φιαλιδίων επάνω στις κονιδιοφόρους κεφαλές, στο σχήμα και στο μέγεθος των φιαλιδίων και στην μορφολογία των κονιδίων και των ασκοσπορίων (Rodrigues et al., 2007). Η μοριακή ταξινόμηση βασίζεται στα δεδομένα αλληλούχισης του DNA και του RNA. Κάποιες από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι οι: AFLPs (Amplified fragment length polymorphism), RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) ή PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis). Η μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως τα τελευταία χρόνια είναι η αλληλούχιση μέσω BLAST analysis (Basic Local Alignment Search Tool). Κατά αυτή τη μέθοδο, εντοπίζονται περιοχές όμοιες μεταξύ αλληλουχιών και συγκρίνονται αλληλουχίες με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων και υπολογίζεται το ποσοστό ομοιότητας.



**Εικ. 11.** Μορφολογικός χαρακτηρισμός διαφόρων ειδών *Aspergillus* σε θρεπτικό υλικό Czapek dox agar. A: *Aspergillus niger*, B: *A. terreus*, C: *A. fumigatus*. (1=όρια αποικίας, 2=επάνω επιφάνεια, 3=κάτω επιφάνεια) (Gautam, 2012)



**Εικ. 12.** Μορφολογικός χαρακτηρισμός διαφόρων ειδών *Aspergillus* σε θρεπτικό υλικό Czapek Dox agar. A: *Aspergillus flavus*, B: *A. nidulans*, C: *A. amstelodami*. (1=όρια αποικίας, 2=επάνω επιφάνεια, 3=κάτω επιφάνεια) (Gautam, 2012)

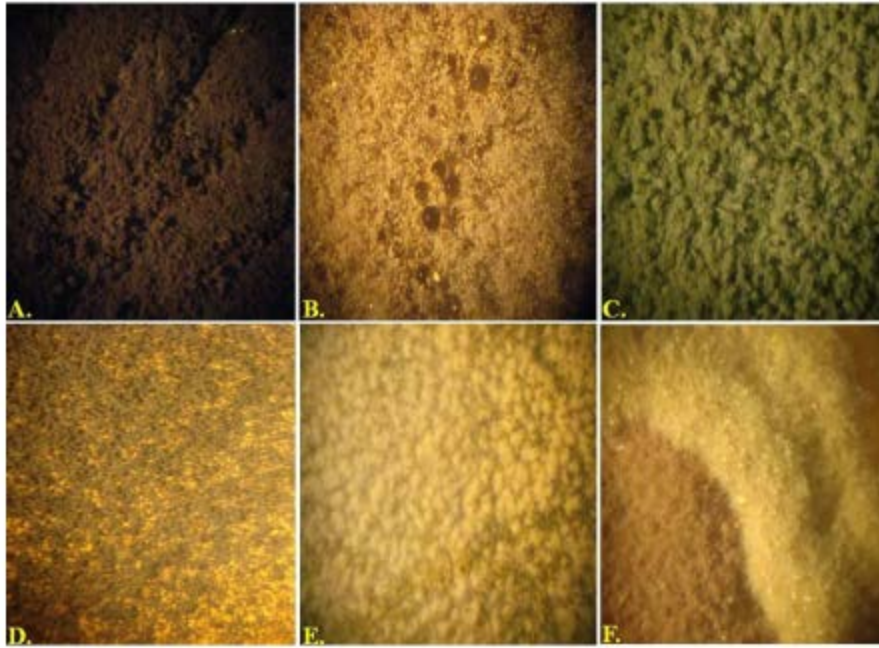
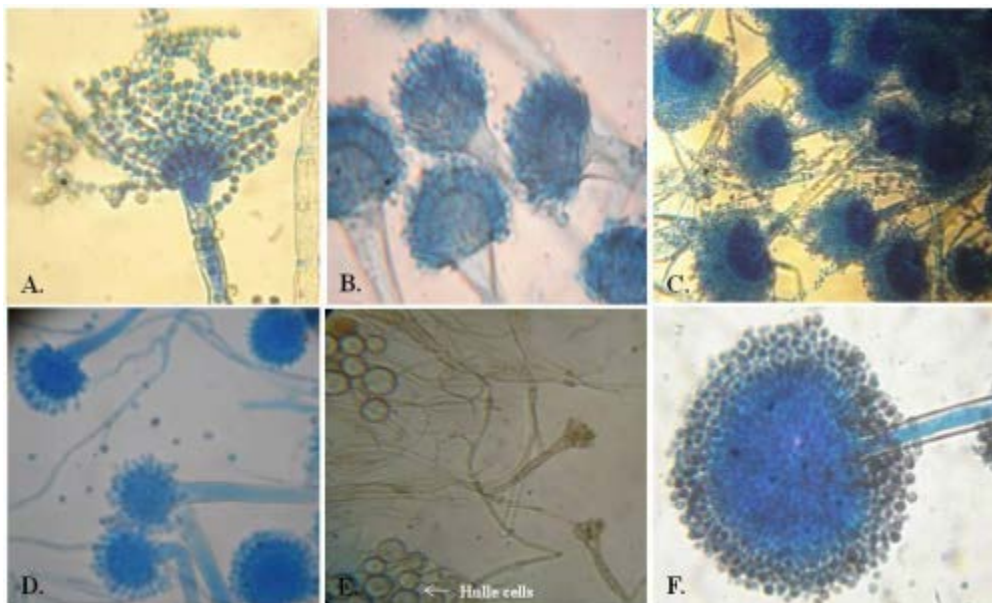


Figure 2. Colony texture of different *Aspergillus* species under stereo microscope: A: *Aspergillus niger*, B: *A. terreus*; C: *A. flavus*; D: *A. fumigatus*; E: *A. nidulans* and; F: *A. amstelodami*.

**Εικ. 13.** Μορφολογία αποικίας διαφόρων ειδών *Aspergillus*. A: *A. niger*, B: *A. terreus*, C: *A. flavus*, D: *A. fumigatus*, E: *A. nidulans*, F: *A. amstelodami*. (Gautam, 2012)



**Εικ. 14.** Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά απομονώσεων *Aspergillus*. A: *A. flavus*, B: *A. fumigatus*, C: *A. terreus*, D: *A. amstelodami*, E: *A. nidulans*, F: *A. niger*. (Gautam, 2012)

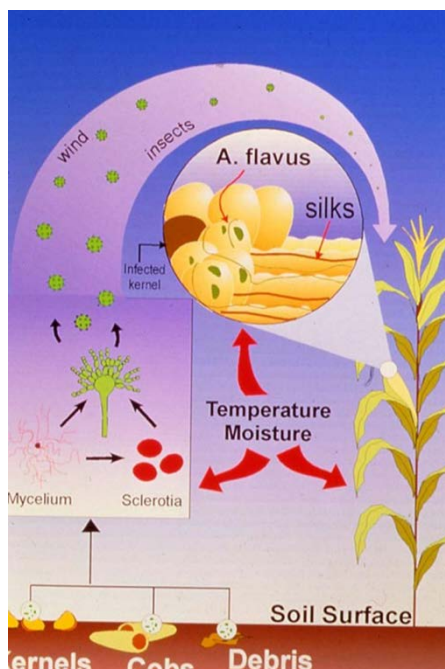


### 1.2.5. Κύκλος ασθένειας και επιδημιολογία του μύκητα *Aspergillus flavus*

Το είδος *A. flavus* είναι ο πιο συχνά απαντώμενος Ασπέργγιλλος στα γεωργικά προϊόντα και υπεύθυνος για τη μόλυνσή τους με αφλατοξίνη μαζί με τον *A. parasiticus*. Όπως όλα τα είδη του γένους αυτού, είναι ευρέως διαδεδομένος σε όλο τον κόσμο, γεγονός που πιθανότατα προκύπτει από τα πολυάριθμα κονίδια (ξηροσπόρια) που παράγει και τα οποία εύκολα μεταφέρονται με τον αέρα και μολύνουν τους εναέριους φυτικούς ιστούς (Hedayati et al., 2007) (Εικ.15). Απομονώνονται από διάφορες κλιματικές ζώνες. Ο *A. flavus* βρίσκεται πιο συχνά σε πιο υγρά και ζεστά κλίματα ενώ σπανιότερα σε γεωγραφικό πλάτος μεγαλύτερο από 45° (Cotty & Jaime-Garcia, 2007). Στο έδαφος βρίσκεται με τη μορφή σπορίων και σκληρωτίων ενώ στους φυτικούς ιστούς με τη μορφή μυκηλίου. Τα σκληρώτια επιβιώνουν στο έδαφος για πολύ καιρό και κάτω από ιδιαίτερα αντίξοες συνθήκες περιβάλλοντος. (Georgianna et al., 2010, Amaike & Keller, 2011). Ανάλογη είναι και η οικολογία του είδους *A. parasiticus* με τη διαφορά ότι έχει χαμηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγής αφλατοξίνης και αυτό ίσως εξηγεί το γεγονός ότι συναντάται συχνότερα σε υπόγειους καρπούς π.χ. αραχίδα (Amaike & Keller, 2011). Από μυκητολογική άποψη, παρατηρούνται μεγάλες ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στην τοξικογόνο ικανότητα διαφόρων στελεχών του ίδιου είδους γεγονός που αποδίδεται στο ότι η αφλατοξίνη είναι δευτερογενής μεταβολίτης του μύκητα. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες σπάνια επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων σε συνθήκες εργαστηρίου, αλλά παίζουν σημαντικό ρόλο στην οικολογία τους ως παράγοντες προσαρμογής, όπως προστασία από υπεριώδεις ακτινοβολία ή απωθητικές ουσίες των εχθρών τους. Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η παραγωγή αφλατοξίνης είναι πολυάριθμοι. Γενικά, επίδραση έχει αναφερθεί από τις κλιματολογικές συνθήκες (υγρασία, θερμοκρασία, βροχοπτώσεις), την καταλληλότητα του υποστρώματος ανάπτυξης, την ύπαρξη πληγών και τις συνθήκες αερισμού. Η μολυσματική ικανότητα αυτού του μύκητα συνδέεται στενά με διάφορους παράγοντες, όπως είναι η σποριοποίηση και ο δευτερογενής μεταβολισμός, η προσαρμοστικότητα σε αντίξοες συνθήκες και η παρεμπόδιση των μορίων σημάτων στο σύστημα άμυνας του ξενιστή. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι οξυλιπίνες μια ομάδα οξυγονωμένων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, οι οποίες προέρχονται από τις οξυγενάσες, εμπλέκονται στα συστήματα επικοινωνίας μεταξύ των μυκήτων αυτών και των ξενιστών τους, αλλά και με άλλους μικροοργανισμούς (Tsitsigiannis & Keller, 2007). Στον *A. flavus* ειδικότερα, φαίνεται ότι οι οξυλιπίνες ρυθμίζουν την παραγωγή σκληρωτίων και κονιδίων, το δευτερογενή μεταβολισμό αλλά επηρεάζουν και τις αλληλεπιδράσεις μύκητα-ξενιστή (Tsitsigiannis et al., 2005). Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή κονιδίων-σκληρωτίων είναι η πυκνότητα του πληθυσμού. Σε μεγάλη πυκνότητα έχει παρατηρηθεί αύξηση παραγωγής κονιδίων και μείωση παραγωγής αφλατοξίνης (Horowitz et al., 2008). Άλλοι παράγοντες, οι οποίοι συνδέονται με τη μολυσματική ικανότητα του μύκητα είναι η παρουσία ενζύμων αποικοδόμησης και τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα. Αυτά σχετίζονται με την επιτυχία αποίκησης στον ξενιστή, αλλά έχουν και ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή των σπορίων και της αφλατοξίνης (Amaike & Keller, 2011).

Η προσβολή από το μύκητα και η επακόλουθη μόλυνση με αφλατοξίνη είναι δυνατό να συμβεί πριν ή μετά τη συγκομιδή σπαδικών καλαμποκιού. Η αποίκηση ενισχύεται όχι μόνο όταν επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά και από την παρουσία εντόμων.

Οι τραυματισμοί και η μηχανική ζημιά που προκαλούν στο φυτικό ιστό, αποτελούν τα σημεία εισόδου του μύκητα στο προϊόν. Σε διάφορες μελέτες έχει συσχετιστεί η αυξημένη προσβολή από το μύκητα και η υψηλή συγκέντρωση αφλατοξίνης, με την παρουσία εντομολογικών προσβολών στους σπάδικες. Η μόλυνση μετά τη συγκομιδή είναι επίσης δυνατή λόγω ακατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης (Cotty, 1997).



Εικ. 15. κύκλος ασθένειας του μύκητα *Aspergillus flavus* στο καλαμπόκι (en.wikipedia.com)

### 1.2.6. Γονιδιωματική ανάλυση του μύκητα *Aspergillus flavus*

Η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος του *Aspergillus flavus* γνωστοποιήθηκε το 2005 και υπολογίστηκε στα 36,8 Mb και αποτελείται από περίπου 12.000 λειτουργικά γονίδια, πολλά εκ των οποίων αφορούν το δευτερογενή μεταβολισμό (Amaike & Keller, 2011). Τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών βρίσκονται συνήθως σε δέσμες (clusters), οι οποίες περιέχουν ενζυμικά γονίδια και παράγοντες μεταγραφής (transcriptional factors) (Throckmorton et al., 2015). Η παραγωγή αφλατοξίνης συνδέεται με μια μεγάλη δέσμη γονιδίων κοντά στην τελομερική περιοχή του χρωμοσώματος 3 του *A. flavus* (Amaike & Keller, 2011). Στον *Aspergillus nidulans*, η δέσμη γονιδίων της στεριγματοκουστίνης περιέχει 23 γονίδια, ενώ η αντίστοιχη ομάδα γονιδίων της αφλατοξίνης στον *Aspergillus flavus* είναι ένα σύμπλεγμα 26 γονιδίων μεγέθους 67 kb. Τα γονίδια είναι αρκετά συντηρημέρα μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ η σειρά γονιδίων, ο προσανατολισμός και ομοιότητα αλληλουχίας είναι λιγότερο συντηρημένα (Keller et al., 2010). Χαρακτηριστική είναι η παρουσία των γονιδίων *afIR* και *afIS*, ο ρόλος των οποίων είναι η ενεργοποίηση του μηχανισμού της έκφρασης και της ρύθμισης της βιοσύνθεσης, αντίστοιχα (Yu et al., 2008). Απενεργοποίηση του γονιδίου *afIR* οδηγεί σε απώλεια έκφρασης των γονιδίων της βιοσυνθετικής οδού και στη διακοπή παραγωγής αφλατοξίνης (Flaherty & Payne, 1997). Αντίστοιχα, η απενεργοποίηση του γονιδίου *afIS* έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία παραγωγής αφλατοξίνης. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι στους αγρούς καλαμποκιού ένα σημαντικό ποσοστό στελεχών δεν παράγουν αφλατοξίνες.

## 1.3. ΟΙ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

### 1.3.1. Ιστορικά-στατιστικά στοιχεία

Οι αφλατοξίνες αποτελούν την πιο συχνή ομάδα μυκοτοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Αναμφίβολα είναι οι πιο μελετημένες μυκοτοξίνες, λόγω της ευρείας παρουσίας τους σε πολλά αγροτικά προϊόντα σε όλο τον κόσμο, όπως τα δημητριακά (καλαμπόκι, ρύζι, σιτάρι, κριθάρι, αλεύρι), τα όσπρια, τους ξηρούς καρπούς (αραχίδα, φιστίκια, αμύγδαλα, καρύδια), το σόργο, τα σύκα, τα αποξηραμένα φρούτα, τα μπαχαρικά και τη μπύρα (Smith, 1997).

Η πρώτη αναφορά στη μόλυνση με αφλατοξίνες τοποθετείται το 1960, όταν στη Μεγάλη Βρετανία περισσότερες από 100.000 γαλοπούλες πέθαναν λόγω μόλυνσης από τοξικούς μεταβολίτες μυκήτων (Baker & Bennet, 2008). Η αιτία της ασθένειας αποδόθηκε σε ένα συστατικό της διατροφής τους, τις αραχίδες, οι οποίες είχαν επιμολυνθεί από το μύκητα *A. flavus*, ο οποίος συχνά αναπτύσσεται σε αυτόν τον καρπό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και αποθήκευσής του (Raper & Fennel, 1965). Η ανάλυση αυτής της ζωοτροφής αποκάλυψε μια σειρά φθοριζουσών ουσιών οι οποίες αναγνωρίστηκαν ως μυκοτοξίνες και στη συνέχεια μετονομάστηκαν σε αφλατοξίνες. Παρόμοια περιστατικά μυκοτοξίκωσης προκλήθηκαν τον επόμενο χρόνο σε βοοειδή και χοίρους, οι οποίοι επίσης είχαν επίσης διατραφεί με μολυσμένη αραχίδα (Raper & Fennel, 1965). Περίπου την ίδια περίοδο στις Η.Π.Α. παρατηρήθηκε μια έξαρση καρκίνου του ήπατος σε πέστροφες, η οποία αργότερα αποδόθηκε στο μολυσμένο με αφλατοξίνες βαμβακόσπορο, ο οποίος περιλαμβάνονταν στα συστατικά της διατροφής των ψαριών (Yu et al., 2008).

### 1.3.2. Παθογόνα αίτια – Είδη αφλατοξινών

Τα τρόφιμα αποικίζονται από ένα μεγάλο αριθμό μυκήτων, κάποιοι από τους οποίους παράγουν μυκοτοξίνες, όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ευνοϊκές, με αποτέλεσμα τη μόλυνση του τροφίμου. Οι αφλατοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίοι παράγονται από μύκητες της ομάδας *Aspergillus section Flavi* και κυρίως από τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus*. Ωστόσο και άλλα είδη ασπεργίλλων είναι ικανά να παράγουν αφλατοξίνες (*A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudoamarii*). Να επισημανθεί ότι ο *A. nomius* είναι τοξικογόνο είδος αλλά σπάνια προσβάλλει γεωργικά προϊόντα (Ehrlich et al., 2007).

Οι κύριες αφλατοξίνες που εντοπίζονται στα φυτικά προϊόντα είναι οι B1, B2, G1, G2. Η λέξη 'αφλατοξίνη' προέρχεται από τα πρώτα γράμματα του γένους και του είδους του μύκητα από τον οποίο παράγονται (Yu et al., 2008). Τα ζωικά προϊόντα επιμολύνονται μέσω της διατροφής των ζώων και ειδικότερα στα γαλακτοκομικά προϊόντα συναντώνται οι μεταβολίτες των B1, B2, G1, G2, οι M1, M2 (Batillani, 2010). Στην πορεία των ερευνών από καλλιέργειες των *A. flavus* απομονώθηκαν και οι αφλατοξίνες P1, Q1, B2A, G2A που όμως παρατηρούνται σε πολύ μικρότερες ποσότητες (Yu et al., 2008) (Πίνακας 2).

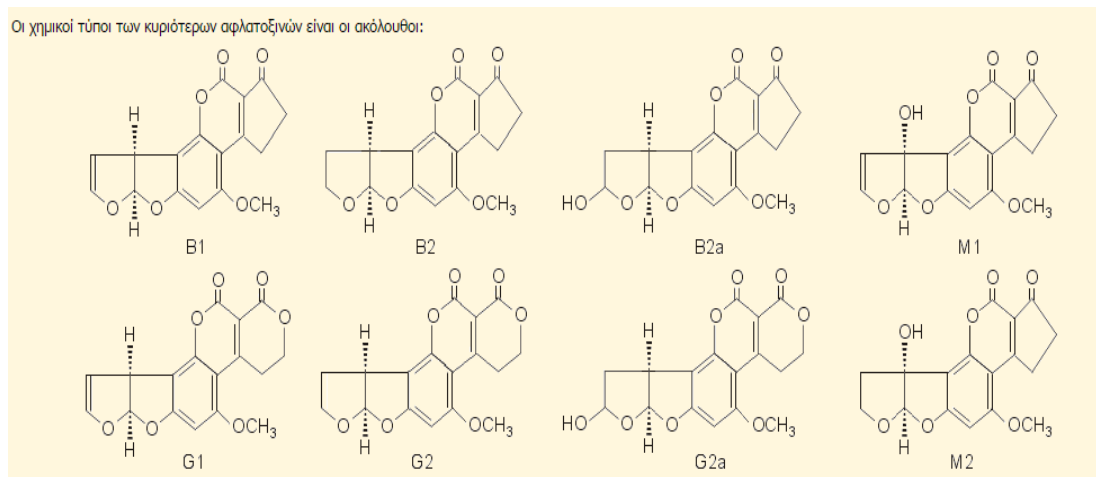
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ	ΣΗΜΕΙΟ ΤΗΞΗΣ	ΠΗΓΕΣ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
B1	312,28	268-269	Παράγεται από τον <i>Aspergillus flavus</i> και τον <i>Aspergillus parasiticus</i> . Κυανός φθορισμός (425 nm). Θεωρείται ως η ισχυρότερη καρκινογόνος ουσία για το ήπαρ.
B2	314,29	286-289	Παράγεται από τον <i>Aspergillus flavus</i> και τον <i>Aspergillus parasiticus</i> . Κυανός φθορισμός (425 nm).
G1	328,28	244-246	Παράγεται από τον <i>Aspergillus parasiticus</i> . Πράσινος φθορισμός (450 nm).
G2	330,29	237-240	Παράγεται από τον <i>Aspergillus parasiticus</i> . Πράσινος φθορισμός (450 nm).
M1	328,28	299	Μεταβολίτης της B1 στους ανθρώπους και τα ζώα. Βρίσκεται στο μητρικό γάλα σε ποσότητες ng.
M2	330,29	293	Μεταβολίτης της B2 στους ανθρώπους και τα ζώα. Βρίσκεται στο γάλα (και σε γαλακτοκομικά προϊόντα) βοοειδών που τρέφονται με τροφές μολυσμένες με B2.
B2α	330,29	240	Προϊόν προσθήκης ύδατος (καταλυόμενη από οξέα) στην B1. Κυανός φθορισμός (425 nm).
G2a	346,29	190	Προϊόν προσθήκης ύδατος (καταλυόμενη από οξέα)

**Πίν. 2.** Φυσικές και χημικές ιδιότητες των αφλατοξινών και μύκητες από τους οποίους παράγονται.

### 1.3.3. Φυσικές και χημικές ιδιότητες αφλατοξινών

Από χημική άποψη, οι αφλατοξίνες είναι μία ομάδα υψηλά οξυγονωμένων ετεροκυκλικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, διαλυτές σε πολικούς διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, ακετόνη, ακετονουτρίλιο). Αυτή η χαρακτηριστική τους φυσική ιδιότητα παίζει ρόλο στη διαδικασία εκχύλισης του δείγματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αφλατοξίνης. Πρόκειται για παράγωγα διφουρανοκουμαρίνης που παράγονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των πολυκετιδίων (Bennet & Klich, 2003). Οι υψηλά συζευγμένες και σταθερές ρίζες στη δομή τους προσδίδουν την ιδιότητα του φθορισμού στο υπεριώδες φως, σε μπλε ή πράσινο χρώμα. Αυτό το χαρακτηριστικό διακρίνει τις B αφλατοξίνες (**Blue**) από τις πράσινες (**Green**) (Jaimez et al., 2000).

Οι χημικοί τύποι των κυριότερων αφλατοξινών είναι οι ακόλουθοι:



**Εικ. 16.** Χημικοί τύποι των κυριότερων αφλατοξινών  
(<http://www.fabe.gr/images/stories/KAINOTOMIAS/gewnatstexn.pdf>).

Όπως φαίνεται από το παραπάνω σχήμα (Εικ. 16), υπάρχουν διαφοροποιήσεις στη δομή των αφλατοξινών. Οι B1, G1 έχουν διπλό δεσμό στο φουρανικό δακτύλιο πράγμα που τις καθιστά λιγότερο φθορίζουσες αλλά πολύ πιο τοξικές, ενώ παρατηρείται και διαφορά στο χρωματισμό όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Επίσης και οι τέσσερις ομάδες είναι αρκετά σταθερές σε θερμοκρασία πάνω από 100° C και σε σκοτάδι (Jaimez et al., 2000). Εργαστηριακά ανιχνεύονται με τη χρήση UV φωτός. Οι επικρατέστερες μέθοδοι είναι οι TLC (Thin Layer Chromatography), HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Η πιο αξιόπιστη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού είναι η HPLC, καθώς οι άλλες μέθοδοι χαρακτηρίζονται ως ποιοτικές ή ημιποσοτικές (Gilbert & Anklam, 2002).

#### 1.3.4. Επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και των ανθρώπων



**Εικ. 17.** Συμπτώματα μυκοτοξινών σε ζώα. Α) αποτέλεσμα μολυσμένης ζωτροφής με T-2 τοξίνη σε κοτόπουλα, Β) προσβολή ζεαραλενόλης σε ποντίκια, Γ) ήπαρ ζώων προσβεβλημένα από αφλατοξίνη. (Book of Mycotoxins, CAST Report)

Κατηγορία	Βαθμός στον οποίο αποδεικνύεται καρκινογένεση		Συνολική αξιολόγηση καρκινογένεσης για τον άνθρωπο
	Άνθρωπος	Ζώα	
Αφλατοξίνες, φυσικής προέλευσης ξεχωριστά ή ως μείγματα	S	S	1
Αφλατοξίνη B <sub>1</sub>	S	S	
Αφλατοξίνη B <sub>2</sub>		L	
Αφλατοξίνη G <sub>1</sub>		S	
Αφλατοξίνη G <sub>2</sub>		L	2B
Αφλατοξίνη M <sub>1</sub>	L	S	2B

S, επαρκή αποδεικτικά στοιχεία καρκινογένεσης; L, Περιορισμένες ενδείξεις καρκινογένεσης; I, ανεπαρκή αποδεικτικά στοιχεία καρκινογένεσης; Ομάδα 1, καρκινογόνος για τον άνθρωπο; 2B ομάδα, πιθανός καρκινογόνος για τον άνθρωπο;

**Πίνακας 3.** Πίνακας IARC αξιολογήσεις αφλατοξινών. IARC, 2011

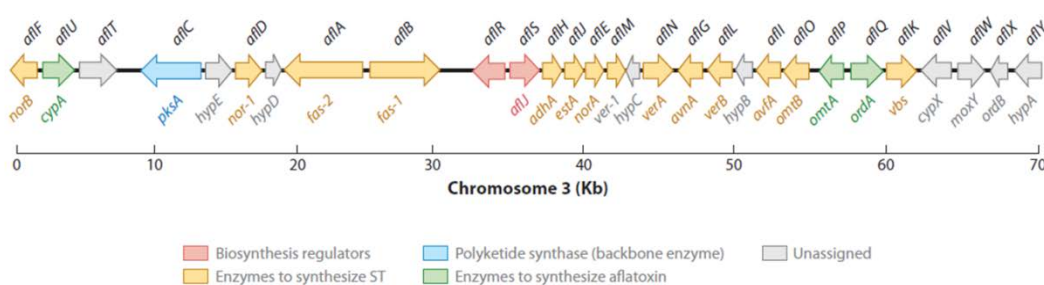
Η παρουσία των αφλατοξινών είναι ανεπιθύμητη στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές διότι μπορεί να προκαλέσουν πολύ σοβαρά προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων (Εικ.17). Τοξικολογικές μελέτες τις κατατάσσουν ως ουσίες υψηλής τοξικότητας με μεταλλαξιγόνο, καρκινογόνο και τερατογόνο δράση σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών (Massey et al., 1995). Κατατάσσονται στην κατηγορία 1Α σύμφωνα με τον IARC, δηλαδή στην ομάδα με τις πιο ισχυρά καρκινογόνες ουσίες για τον άνθρωπο (Πίνακας 3). Επίσης, ταξινομούνται ως ο πιο σημαντικός, μη-μολυσματικός, χρόνιος παράγοντας διατροφικού κινδύνου, υψηλότερος από τα συνθετικά, τις φυτικές τοξίνες, τα πρόσθετα και τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Yu et al., 2008). Από όλες τις αφλατοξίνες, η B1 χαρακτηρίζεται ως η πιο τοξική (Εικ. 16). Σε μελέτες αναφέρεται ως ισχυρά καρκινογόνος ουσία, η οποία επάγει τη δημιουργία όγκων στο ήπαρ, στα νεφρά, στους πνεύμονες και στο παχύ έντερο (Liu & Wu, 2010).

Οι ασθένειες που προκαλούνται από τις αφλατοξίνες έχουν τη γενική ονομασία 'αφλατοξίκωση'. Η 'αφλατοξίκωση' είναι το αποτέλεσμα της μόλυνσης από χορήγηση μεσαίας έως υψηλής δόσης αφλατοξίνης μέσω της τροφής (Yu et al., 2008). Η οξεία αφλατοξίκωση προκαλεί θάνατο ενώ η χρόνια καρκίνο, καταστολή του ανοσοποιητικού και άλλες παθολογικές καταστάσεις. Περιπτώσεις οξείας τοξικότητας έχουν αναφερθεί στην Κένυα (1981-1008), Ινδία (1974, 397 περιστατικά, 108 θάνατοι), Μαλαισία και Ταϊλάνδη (Farombi, 2006, Baker and Bennett, 2008). Στην Κένυα, τον Ιούλιο του 2004 καταγράφηκαν 317 περιστατικά οξείας αφλατοξίκωσης από κατανάλωση καλαμποκιού και 125 άνθρωποι πέθαναν (Probst et al., 2010). Έξαρση αφλατοξίκωσης καταγράφηκε σε σκύλους στις Η.Π.Α. το 1998, το 2005 και το 2006 από κατανάλωση μολυσμένης ζωοτροφής (Stenske et al., 2006). Ασθένειες οι οποίες έχουν συνδεθεί με την παρουσία αφλατοξινών στον οργανισμό είναι το σύνδρομο Reye (συμπτώματα εγκεφαλοπάθειας σε παιδιά) και η γνωστή ως 'Ινδική' παιδική κίρρωση (Adams & Moss 2008). Αξιοσημείωτη είναι η πιθανή σύνδεση του ιού της ηπατίτιδας Β με την παρουσία αφλατοξίνης στο διαιτολόγιο, ως αιτία ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος. Παρατηρήθηκε ότι αν οι δύο αυτοί παράγοντες συνυπάρχουν, τότε ο κίνδυνος είναι ακόμη υψηλότερος (Bennett & Klich, 2003).

### 1.3.5. Βιοσύνθεση αφλατοξίνης

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης είναι ένα από τα πιο μελετημένα μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων λόγω των επιπτώσεων στη δημόσια υγεία. Η συνεχής έρευνα του δευτερογενούς μεταβολισμού στους μύκητες έχει οδηγήσει στην απομόνωση και ταυτοποίηση ενός πολύ μεγάλου αριθμού φυσικών ουσιών, οι οποίες όχι μόνο δεν χαρακτηρίζονται πλέον ως 'μεταβολικά απόβλητα', αλλά αποδεικνύονται ως ζωτικής σημασίας ενώσεις τόσο για τη βιολογική δοκιμή, όσο και για το μηχανισμό άμυνας και επικοινωνίας των οργανισμών αυτών (Lim & Keller, 2014). Η λειτουργία του δευτερογενούς μεταβολισμού απαιτεί έναν απρόσκοπτο και ορθολογισμένο συντονισμό όλων των μηχανισμών που εμπλέκονται αλλά και ενσωμάτωσή τους στις πρωτογενείς μεταβολικές διεργασίες (Lim & Keller, 2014). Ωστόσο, δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστοί οι 'μοριακοί διακόπτες', οι οποίοι ελέγχουν τη βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών, όπως είναι η αφλατοξίνη.

Έχει αποδειχθεί ότι η βιοσύνθεση της αφλατοξίνης περιλαμβάνει 23 τουλάχιστον ενζυμικές αντιδράσεις ενώ παράλληλα έχουν ταυτοποιηθεί 15 ενδιάμεσες ενώσεις (Yu et al., 2008). Ο βιοσυνθετικός μηχανισμός της αφλατοξίνης φαίνεται ότι ξεκινά στα υπεροξυσωμάτια του κυτταροπλάσματος (Lim & Keller, 2014). Αυτά τα μικροσωμάτια είναι μονομεμβρανικά σφαιρικά ή ωσειδή οργανίδια, με διάμετρο από 0,1-1μm και τα οποία εντοπίζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αρχικά ήταν γνωστά για τη λειτουργία της αποτοξικοποίησης που επιτελούν στο κύτταρο λόγω του ότι φιλοξενούν οξειδοαναγωγάσες και καταλάσες, οι οποίες σχετίζονται με οξειδωτικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει μοριακό οξυγόνο. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες εμπλέκουν τα υπεροξυσωμάτια σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου και μεταβολικά μονοπάτια μεταξύ αυτών και στη βιοσύνθεση πολυκετιδίων (Lim & Keller, 2014). Από εκεί η βιοσύνθεση αφλατοξίνης συνεχίζει σε εξειδικευμένα πολύ-λειτουργικά κυστίδια, όπως τα αφλατοξισωμάτια, τα οποία περιέχουν ένζυμα που εμπλέκονται στα διάφορα στάδια του βιοσυνθετικού μονοπατιού (Εικ.18,19) (Roze et al., 2011).

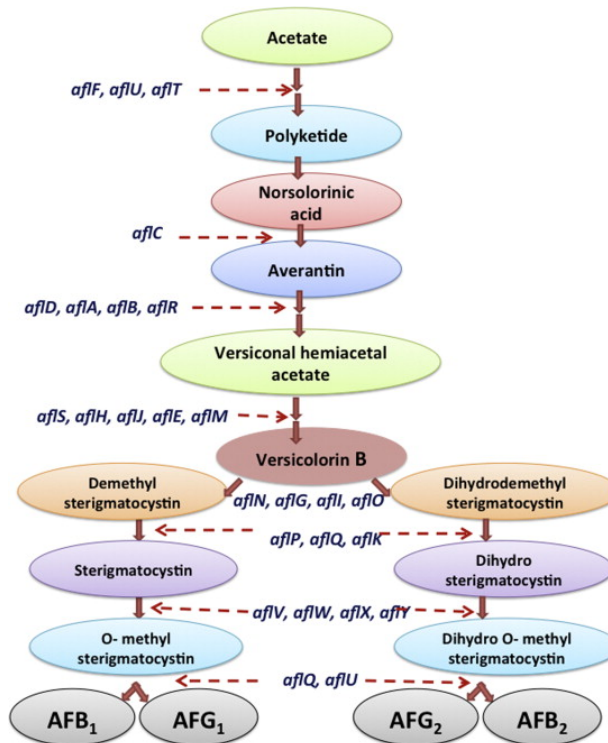


**Εικ. 18.** Δέσμη γονιδίων αφλατοξίνης στο μύκητα *A. flavus* που αποτελείται από 30 περίπου διαφορετικά γονίδια. Στην πάνω πλευρά φαίνεται η νέα ονομασία των γονιδίων και στην κάτω η παλιά. Τα γονίδια με κίτρινο χρώμα είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία της στεριγματοκυστίνης και τα γονίδια με πράσινο χρώμα για τη δημιουργία της αφλατοξίνης.

### 1.3.6. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης

Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων θρεπτικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης από τα τοξικογόνα στελέχη των ασπεργίλλων. Γενικά, οι κλιματολογικές συνθήκες, η καταλληλότητα του υποστρώματος, η ευαισθησία του φυτικού ιστού και τα έντομα είναι οι κυριότεροι παράγοντες, από τους οποίους εξαρτάται η προσβολή από μύκητες και η παραγωγή αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή (Hill et al., 1983). Σε κάθε περίπτωση, η παραγωγή αφλατοξίνης συνδέεται με παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση όπως ξηρασία, μειωμένη γονιμότητα, ανταγωνισμός με ζιζάνια και άλλους μικροοργανισμούς (Moss & Frank, 1985). Ωστόσο, πιο στρεσογόνο παράγοντας φαίνεται να είναι η ξηρασία, η οποία συνδυάζεται και με τη μειωμένη παραγωγή φυτοαλεξινών από τη μεριά του φυτού (Hill et al., 1983). Η ανάπτυξη του μύκητα *A. flavus* σε καλλιέργειες καλαμποκιού ευνοείται από ξηροθερμικές συνθήκες. Ο μύκητας αναπτύσσεται κυρίως σε θερμοκρασίες γύρω από τους 28° C ενώ η παραγωγή αφλατοξίνης ευνοείται από την ξηρασία και τη μειωμένη αντοχή του φυτού.

Πολύ σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση αφλατοξίνης παίζει το γονίδιο *laeA*. Το γονίδιο αυτό έχει προσδιοριστεί ως μια πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για την έκφραση του γονιδίου *aflR* που κωδικοποιεί το μεταγραφικό ρυθμιστή των γονιδίων της στεριγματοκυστίνης στον *A. nidulans* και των γονιδίων της αφλατοξίνης στον *A. flavus*. Έχει βρεθεί πως με διαγραφή του γονιδίου αυτού στον *A. flavus* παράγονται πολύ χαμηλά επίπεδα του *aflR* και περιορίζεται σημαντικά η παραγωγή αφλατοξίνης. Επίσης με τη διαγραφή του γονιδίου αυτού, επηρεάζονται παράγοντες που συμβάλλουν στην κονιδιογένεση (Perng-Kuang Chang, 2012).



Εικ. 19. Μονοπάτι βιοσύνθεσης αφλατοξίνης και ρόλος των αντίστοιχων γονιδίων (Bhatnagar-Mathur, 2015).



Μετά τη συλλογή, τόσο η ανάπτυξη τοξικογόνων μυκήτων όσο και η ενδεχόμενη παραγωγή αφλατοξίνης, επηρεάζονται από πλήθος παραγόντων, όπως υγρασία, θερμοκρασία και pH του προϊόντος, η χρονική διάρκεια των διεργασιών που ευνοούν την ανάπτυξή τους, η κατάσταση του προϊόντος (πληγές), οι συνθήκες αερισμού και η παρουσία ή απουσία χημικών παρεμποδιστών (Moss & Frank, 1985). Η παραγωγή αφλατοξίνης στον *A. flavus* συσχετίζεται στενά με τις αλλαγές του pH, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται σε όξινα υποστρώματα, αλλά να παρεμποδίζεται σε αλκαλικά (Yu et al., 2008). Το εύρος των συνθηκών θερμοκρασίας και ενεργότητας νερού για την παραγωγή αφλατοξίνης είναι πιο περιορισμένο, από αυτό που απαιτείται για την ανάπτυξη του μύκητα. Περιοριστικός παράγοντας για την προσβολή των σπαδικών καλαμποκιών αποτελεί η χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία.

### 1.3.7. Νομοθεσία

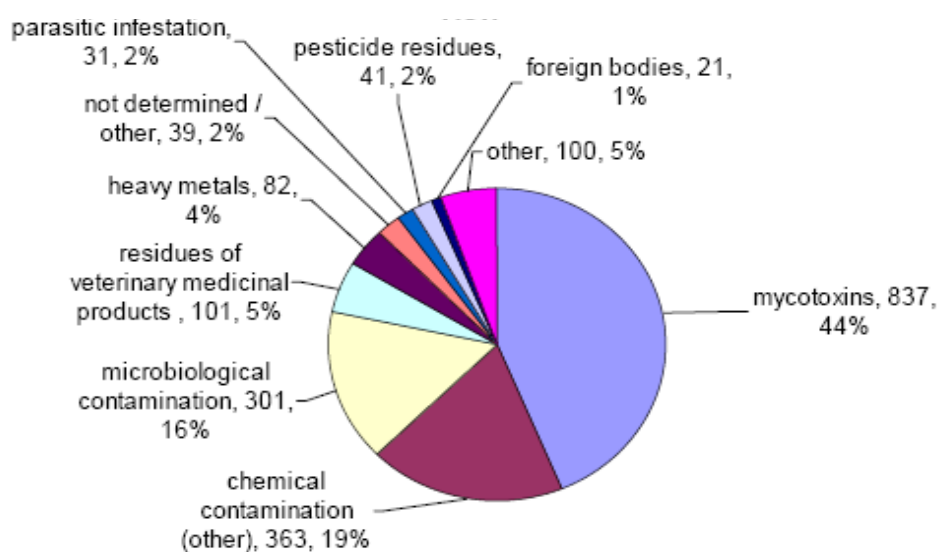
Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, για λόγους ασφαλείας και δημόσιας υγείας κρίθηκε απαραίτητο να ληφθούν νομοθετικά μέτρα, ώστε να περιορισθεί η περιεκτικότητά τους στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Γι αυτό το λόγο οι αφλατοξίνες έχουν αναγνωρισθεί και νομοθετικά ως επιμολυντές των τροφίμων (KAN. ΕΚ 1881/2006) και έχουν τεθεί μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα συγκέντρωσης ανά κατηγορία τροφίμων και ζωοτροφών, λαμβάνοντας υπόψη και την πιθανή έκθεση των πιο ευαίσθητων ομάδων του πληθυσμού (βρέφη, παιδιά, ανοσοκατεσταλμένοι). Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει μέγιστη τιμή συγκέντρωσης της AFB1 τα 2 ppb, ενώ για το σύνολο των αφλατοξινών τα 4 ppb (4 µg/Kg). Συγκεκριμένα για το γάλα τα 0.05 ppb M1 έχουν θεσπιστεί ως το ανώτατο αποδεκτό όριο. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι για την θέσπιση ανώτατων ορίων συνεργάζονται πολλοί επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και υπηρεσίες (WHO, Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, IARC, Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου) και η κοινή επιτροπή για τα πρόσθετα και τους επιμολυντές τροφίμων του FAO. Παρόλα αυτά όμως παρατηρούνται διαφορές στα ανώτατα αποδεκτά όρια για τις μυκοτοξίνες ακόμη και αν αφορούν το ίδιο τρόφιμο σε διάφορες ηπείρους ή χώρες, προκαλώντας έτσι προβλήματα στο εμπόριο (Van Edmond & Junker, 2005).

Γενική αλήθεια είναι όμως το γεγονός πως αν εφαρμοστεί μηχανική διαλογή ή άλλες φυσικές διαδικασίες είναι δυνατόν να μειωθεί η περιεκτικότητά σε αφλατοξίνες σε διάφορα τρόφιμα όπως στα αράπικα φιστίκια, το καλαμπόκι και άλλους ξηρούς καρπούς. Έτσι, προκειμένου να μειωθούν οι επιπτώσεις στο διεθνές εμπόριο, γίνονται αποδεκτές υψηλότερες τιμές, αν και εφόσον τα προϊόντα αυτά δεν προορίζονται για ανθρώπινη χρήση. Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης με τους ευρωπαϊκούς κανονισμούς, οι προβληματικές παρτίδες τροφίμων καταστρέφονται και απορρίπτονται. Είναι αυτονόητο επίσης πως απαγορεύεται να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά άλλων τροφίμων.

### 1.3.8. Οικονομικές επιπτώσεις από μόλυνση με αφλατοξίνες

Η μόλυνση των γεωργικών προϊόντων από αφλατοξίνη είναι ένα μακροχρόνιο πρόβλημα σε πολλές παραγωγικές χώρες του κόσμου με σημαντικές οικονομικές ζημιές σε όλη την αλυσίδα παραγωγής αλλά και στο κομμάτι της διανομής. Τα στοιχεία από τον RASFF

(Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για Τρόφιμα και Ζωοτροφές) δείχνουν ότι η μόλυνση με αφλατοξίνες είναι η πιο συχνή αιτία απόρριψης τροφίμων στα σημεία εισόδου της Ε.Ε. συγκριτικά με τους υπόλοιπους χημικούς κινδύνους. (Εικ. 20).



**Εικ. 20.** Διάγραμμα αιτιών απόρριψης προϊόντων (RASFF, 2005).

Επιπλέον, ο αριθμός προειδοποιήσεων που αφορά τις αφλατοξίνες είναι σαφώς μεγαλύτερος σε σχέση με τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες (Πίν. 4).

	<b>Hazard</b>	<b>Product category</b>	<b>Origin</b>	<b>Notifications</b>
1	<b>aflatoxins</b>	<b>Feed materials</b>	<b>India</b>	<b>80</b>
2	<b>aflatoxins</b>	<b>Fruits &amp; Vegetables</b>	<b>Turkey</b>	<b>75</b>
3	<b>aflatoxins</b>	<b>Nuts, nut products</b>	<b>China</b>	<b>60</b>
4	<b>Salmonella spp.</b>	<b>Fruits &amp; Vegetables</b>	<b>Bangladesh</b>	<b>54</b>
5	<b>aflatoxins</b>	<b>Nuts, nut products</b>	<b>Turkey</b>	<b>53</b>
6	<b>migration of chromium</b>	<b>Food contact materials</b>	<b>China</b>	<b>48</b>
7	<b>migration of formaldehyde</b>	<b>&gt;&gt;</b>	<b>China</b>	<b>45</b>
8	<b>living &amp; dead mites</b>	<b>Nuts, nut products</b>	<b>Ukraine</b>	<b>43</b>
9	<b>aflatoxins</b>	<b>Herbs &amp; Spices</b>	<b>India</b>	<b>40</b>
10	<b>aflatoxins</b>	<b>Nuts, nut products</b>	<b>Iran</b>	<b>39</b>

**Πίν. 4.** Πίνακας προειδοποιήσεων σχετικά με επιμολύνσεις σε τρόφιμα από αφλατοξίνες, RASFF, 2011.

## 1.4. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

### 1.4.1. Έλεγχος του προβλήματος πριν τη συγκομιδή

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, η καλύτερη αντιμετώπιση για τις αφλατοξίνες είναι η πρόληψη. Γι αυτό και η αποτελεσματικότερη τακτική είναι τα προληπτικά μέτρα, η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών και η βιολογική καταπολέμηση στον αγρό. Βέβαια για την αντιμετώπιση ενός τόσο μεγάλου προβλήματος, εφαρμόζονται και μετασυλλεκτικά κάποιες τεχνικές, όπως η διαλογή και οι διεργασίες αποτοξικοποίησης των αφλατοξινών.

#### 1.4.1.1. Προληπτικά μέτρα

Η πρόληψη ως στρατηγική αντιμετώπισης των αφλατοξινών επιτυγχάνεται σε δύο τομείς: Α) προλαμβάνοντας τη μόλυνση και Β) τροποποιώντας το περιβάλλον, ώστε να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη των μυκήτων, άρα και η παραγωγή αφλατοξίνης. Στον πρώτο τομέα περιλαμβάνεται η εφαρμογή κανόνων ορθής γεωργικής πρακτικής, οι οποίοι στοχεύουν στη διατήρηση της καλής υγείας του προϊόντος και στην αποφυγή πρακτικών που ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα. Σημαντικό ρόλο παίζει η προστασία της καλλιέργειας καλαμποκιού από ασθένειες και εχθρούς, διότι έχει παρατηρηθεί ότι έπειτα από εντομολογική προσβολή το ποσοστό αφλατοξίνης στους συγκεκριμένους σπάδικες αυξάνεται. Σαν μέτρο προτείνεται η απομάκρυνση ή η βαθειά ενσωμάτωση φυτικών υπολειμμάτων έτσι ώστε να μειωθεί ο πληθυσμός των σπορίων και των σκληρωτίων του μύκητα στην καλλιέργεια. Στον δεύτερο τομέα εντάσσονται οι 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 καταπόνησής της), καταστροφή των υπολειμμάτων, αμειψισπορά (εναλλαγή καλλιεργειών), αποφυγή δημιουργίας πληγών στους καρπούς και στους σπόρους στον αγρό και κατά τη συγκομιδή. Ακόμη, 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) και καταπολέμηση εντόμων (ως φορέων σπορίων των μυκήτων ή ως παραγόντων δημιουργίας πληγών). Τέλος, απαιτείται η χρήση υγιούς πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού και ανθεκτικών ή ανεκτικών ποικιλιών σε έντομα και μύκητες (αν είναι διαθέσιμες).

#### 1.4.1.2. Δημιουργία ανθεκτικών-ανεκτικών ποικιλιών

Έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες ανάπτυξης ανθεκτικών ποικιλιών καλαμποκιού ως προς το μύκητα *A. flavus* κυρίως από διάφορες εταιρίες με ειδίκευση επάνω στον τομέα αυτόν (Pioneer, DuPont, Monsanto κα). Στόχος είναι οι διάφορες αυτές ποικιλίες να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα ή ανεκτικότητα στην προσβολή του μύκητα, στις εντομολογικές προσβολές και κατ' επέκταση να συμβάλλουν στη δημιουργία αντίξοων συνθηκών για την ανάπτυξη αφλατοξινών, αναγνωρίζοντας κάποιες σχετικές πρωτεΐνες ή άλλους βιοχημικούς ή γενετικούς δείκτες. Συνήθης τακτική είναι να αναπτύσσονται διαγονιδιακές Βt ποικιλίες (από τη χρήση του *Bacillus thuringiensis*) (Naidoo et al., 2002, Liang et al., 2005). Στις ποικιλίες αυτές έχει ενσωματωθεί γονίδιο από το προαναφερόμενο βακτήριο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης η οποία είναι τοξική σε διάφορα έντομα.

Η επιτυχής αντιμετώπιση των εντομολογικών προσβολών μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα επιμολύσεων με μυκοτοξίνες γιατί συχνά τα έντομα λειτουργούν ως φορείς μετάδοσης των σπορίων των μυκοτοξικογόνων μυκήτων στα φυτά μεγάλης καλλιέργειας. Μέχρι στιγμής όμως το επίπεδο ανθεκτικότητας δεν είναι ικανοποιητικό, ούτε και σταθερά τα αποτελέσματα των εκάστοτε ποικιλιών (Abbas et al., 2008). Στα σιτηρά ειδικότερα, το πρόβλημα είναι σύνθετο, διότι απαιτείται ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε όλες τις μυκοτοξίνες που είναι πιθανοί κίνδυνοι. Η ανάπτυξη υβριδίων είναι πολλά υποσχόμενη μέθοδος αλλά ακόμη βρίσκεται κάτω από έρευνα.

#### 1.4.1.3. Βιολογική καταπολέμηση

Η βιολογική καταπολέμηση περιλαμβάνει την εφαρμογή διαφόρων μικροοργανισμών όπως βακτήρια, σαπροφυτικές ζύμες ή μη-τοξικογόνα στελέχη του *A.flavus* (Zanon et al., 2013) με στόχο τη μείωση των τοξικογόνων στελεχών λόγω ανταγωνισμού. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι διάφορα είδη βακτηρίων όπως τα *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Flavobacterium* και διάφορα είδη μυκήτων όπως *Trichoderma*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Sporotrichum* είτε συμβάλλουν στην αποτοξικοποίηση, είτε στην αποικοδόμηση της B1 αφλατοξίνης (Tsitsigiannis et al., 2012). Αν η βιολογική καταπολέμηση εντοπιστεί στη χρήση μη-τοξικογόνων στελεχών, αυτά θα πρέπει να είναι ανταγωνιστικά ως προς τα τοξικογόνα για να επικρατήσουν. Θα πρέπει να ανήκουν σε διαφορετική ομάδα βλαστικής συμβατότητας έτσι ώστε να μην αναστομώνονται και μετατραπούν σε τοξικογόνα. Η εφαρμογή των μη-τοξικογόνων στελεχών στην Αμερική είναι μια αναγνωρισμένη και πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική με θεαματικά αποτελέσματα. Ήδη έχουν πάρει παγκοσμίων έγκριση για την καλλιέργεια του καλαμποκιού 3 σκευάσματα μη-τοξικογόνων στελεχών (Afla-guard®, Afla-safe®, AF36®). Αντίστοιχες προσπάθειες έχουν γίνει και σε άλλες περιοχές συμπεριλαμβανομένου και της Ελλάδας (Tsitsigiannis et al., 2012). Επίσης, τα τελευταία χρόνια γίνεται αρκετή προσπάθεια, τόσο από κρατικά και πανεπιστημιακά εργαστήρια όσο και από μεγάλες εταιρείες παραγωγής φυτοφαρμάκων, για την αξιολόγηση και έγκριση μυκητοκτόνων και βιολογικών παραγόντων (βιο-αντιπαθογονικά) αποτελεσματικών στην αντιμετώπιση μυκοτοξικογόνων μυκήτων και την ανάπτυξη κατάλληλων στρατηγικών φυτοπροστασίας με σκοπό την πρόληψη της προσβολής γεωργικών προϊόντων και την προστασία των καλλιεργειών στον αγρό.

#### 1.4.1.4. Χημική αντιμετώπιση

Οι χημικές ενώσεις έχουν κυρίαρχο ρόλο στη χημική φυτοπροστασία και χωρίς καμία αμφιβολία θα συνεχίσουν να είναι άκρως σημαντικές στην προσπάθεια του ανθρώπου να καταπολεμήσει διάφορα παθογόνα με τόσο σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία όπως είναι οι αφλατοξίνες. Η περαιτέρω ανάπτυξη και ορθή χρήση των χημικών σκευασμάτων για τη προστασία των καλλιεργειών θα είναι σίγουρα μία από τις κύριες παραμέτρους για την εξασφάλιση της υγιούς διατροφής του ανθρώπου, απαλλαγμένη από τοξίνες που οφείλονται σε μόλυνση από μύκητες του γένους *Aspergillus*, διότι σε κάθε περίπτωση οι καλλιέργειες που δεν προστατεύονται, κινδυνεύουν πολύ περισσότερο από προσβολή μυκοτοξικογόνων μυκήτων. Η χημική αντιμετώπιση τέτοιων μυκήτων όπως ο *A. flavus* περιλαμβάνει τη χρήση δραστικών ουσιών όπως cyprodinil, fludioxonil, azoxystrobin κ.α. σε

μορφή σκευασμάτων (Dimakoroulou et al., 2002). Οι τρόποι δράσης των σκευασμάτων αυτών βασίζονται στην παρεμπόδιση βλάστησης σπορίων, παρεμπόδιση ανάπτυξης βλαστικού σωλήνα και μυκηλίου, στην εξειδικευμένη παρεμπόδιση ροής των ηλεκτρονίων στο επίπεδο του συμπλόκου των κυτοχρωμάτων (σύμπλοκο III) της αναπνευστικής αλυσίδας, την παρεμπόδιση ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDC) της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων κ.α. Για την καλλιέργεια του καλαμποκιού δεν υπάρχουν εγκεκριμένα σκευάσματα για την αντιμετώπιση των μυκήτων του γένους *Aspergillus* στη χώρα μας, όμως οι ανωτέρω δραστικές ουσίες έχουν πάρει έγκριση υπό τη μορφή των σκευασμάτων Switch (25% w/w fludioxonil, 37,5% w/w cyprodinil), Chorus (50% β/β cyprodinil) και Geoxe (50% β/β fludioxonil) για την αντιμετώπιση του *A. carbonarius* σε καλλιέργεια αμπελιού. Γίνονται συνεχώς δοκιμές για εύρεση νέων δραστικών ουσιών, αλλά και αξιολόγηση των ήδη υπαρχόντων για την αντιμετώπιση του *A. flavus* και των μυκοτοξινών που παράγει στην καλλιέργεια καλαμποκιού (Lagogianni C., 2015).

Για να εδραιωθεί η χρήση της χημικής φυτοπροστασίας με σκοπό την αντιμετώπιση των προσβολών από τους μύκητες του γένους *Aspergillus*, θα πρέπει να ξεπεραστεί το φαινόμενο της ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα είναι ένα φαινόμενο επιλογής, δηλαδή το αποτέλεσμα αλλαγών στις συχνότητες των γονιδίων σε ένα πληθυσμό. Πριν την εισαγωγή ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε μια περιοχή, ο πληθυσμός του στοχευόμενου φυτοπαρασίτου είναι πολυμορφικός και θεωρητικά υπάρχουν άτομα που μπορεί να επιβιώσουν παρουσία του μέσου επιλογής (φυτοπροστατευτικό προϊόν). Η εφαρμογή της πίεσης επιλογής από την παρουσία του φυτοφαρμάκου έχει ως αποτέλεσμα η συχνότητα των γονοτύπων που δεν επηρεάζονται από την έκθεση σε αυτό να αυξάνει και να αλλάζει η κατανομή του πληθυσμού, πρακτικά δηλαδή, όχι μόνο δεν καταπολεμάται ο μύκητας, αλλά όλο και λιγότερα τοξικογόνα στελέχη του περιορίζονται από τις δραστικές ουσίες. Το πρόβλημα αυτό θα ξεπεραστεί με τη μελέτη γονιδίων του μύκητα *A. flavus* που εμπλέκονται στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας, με τη μελέτη του συστήματος παρεμποδιστής-παθογόνο-καλλιέργεια-περιβάλλον, με τον προσδιορισμό παραμέτρων ανθεκτικότητας όπως το επίπεδο ανθεκτικότητας, η κατανομή του πληθυσμού, η ύπαρξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας και η σύγκριση με τα ευαίσθητα αρχικά άτομα του πληθυσμού. Ακόμη, απαραίτητος κρίνεται και ο συνδυασμός διαφορετικών δραστικών ουσιών ή την εναλλαγή τους σε τακτά χρονικά διαστήματα (Markoglou et al., 2008).

## 1.4.2. Έλεγχος του προβλήματος μετασυλλεκτικά

Εκτός από τον έλεγχο του προβλήματος πριν τη συγκομιδή, υπάρχουν τεχνικές που μετά τη συλλογή και κατά την αποθήκευση ενδείκνυνται για την περεταίρω μείωση των μυκοτοξινών.

### 1.4.2.1. Προληπτικά μέτρα

Λαμβάνοντας υπόψη την οικολογία του μύκητα κατανοούμε ότι η προσβολή είναι δυνατή σε κάθε στάδιο. Άρα, το κυριότερο μέτρο πρόληψης μετασυλλεκτικά είναι η εξασφάλιση αντίξων συνθηκών για την ανάπτυξη του μύκητα σε τόσο πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα. Αυτό επιτυγχάνεται με κατάλληλες μεθόδους ξηρασίας και τήρηση ορθών κανόνων υγιεινής

(αποφυγή ανάματος καρπών, απεντομώσεις, χαμηλή υγρασία). Η πρόληψη όπως αναφέρεται σε διάφορους κανονισμούς της Ε.Ε. πρέπει να περιλαμβάνει και συστήματα παρακολούθησης θερμοκρασίας και υγρασίας και εξοπλισμό που να εξασφαλίζει καλή κυκλοφορία αέρα, διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας και υγρασίας, ακόμη και χρήση εγκεκριμένων βιοκτόνων.

#### 1.4.2.2. Διαλογή

Η διαδικασία αυτή είναι πολύ σημαντική διότι θα μπορούσαν έτσι οι αλλοιωμένοι σπάδικες να απομακρυνθούν από το φορτίο και να καταστραφούν. Πρέπει ανάλογα με την ποικιλία, να απορρίπτονται όσοι σπάδικες δεν πληρούν τα αναμενόμενα κριτήρια ποιότητας διότι είναι οι πρώτοι υποψήφιοι για ανάπτυξη μυκοτοξινών (Huff, 1980, Pearson & Wicklow, 2006). Γι αυτό και η πρώτη διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα μετά τον εντοπισμό ενός φορτίου που έχει υπερβεί το όριο σε αφλατοξίνη, είναι η διαλογή. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι τα προϊόντα στα οποία παρατηρούνται αλλοιώσεις δεν είναι απόλυτο να είναι μολυσμένα με αφλατοξίνη. Επίσης, ένα προϊόν δεν είναι απαραίτητο να δείχνει προσβεβλημένο από τον μύκητα για να είναι μολυσμένο με αφλατοξίνη. Στη χώρα μας, η διαλογή γίνεται με τα χέρια από εργατικό προσωπικό. Ένα σχετικά νεότερο σύστημα είναι αυτό της διαλογής με τη βοήθεια UV ακτινοβολίας. Αξιοποιεί μεν την φυσική ιδιότητα των αφλατοξινών αλλά πολλές φορές έχει βρεθεί εμπόρευμα με τοξίνη το οποίο στον σχετικό έλεγχο δεν παρουσίασε φθορισμό. Στην Αμερική, σε σιτηρά και ξηρούς καρπούς αναφέρεται η ανάπτυξη τεχνικής NIR (εγγύς υπέρυθρο φάσμα) και ακτίνων X (Pearson & Wicklow, 2006).

#### 1.4.2.3. Διεργασίες αποτοξικοποίησης και μεταβολισμού των αφλατοξινών

Μία άλλη προσέγγιση που στοχεύει στη μείωση των αφλατοξινών αφορά στις διεργασίες αποτοξικοποίησης των αφλατοξινών, οι οποίες πρακτικά στοχεύουν στην αποικοδόμηση, καταστροφή και απενεργοποίηση του μορίου. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει 5 στάδια:

##### 1) Θερμική επεξεργασία του τροφίμου

Οι αφλατοξίνες είναι πολύ σταθερά χημικά μόρια, ακόμα και σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, παρ'όλα αυτά έχει διερευνηθεί η δυνατότητα αυτή. Δεν υπάρχει όμως σταθερή αποτελεσματικότητα και ο βαθμός καταστροφής εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση (Rustom, 1997). Διερευνήθηκε η θερμική επεξεργασία με χρήση ακτινοβολιών UV, ακτίνων γ και ηλιακής ακτινοβολίας και διαπιστώθηκε πως το τελικό προϊόν είχε μειωμένα επίπεδα αφλατοξινών (Yazdanpanah et al., 2005).

##### 2) Βιοαποικοδόμηση και βιομετατροπή

Πολλές έρευνες γίνονται στο πεδίο αυτό δοκιμάζοντας την ικανότητα διάσπασης του μορίου της αφλατοξίνης από μικροοργανισμούς (μύκητες, ζύμες, οξυγαλακτικά και άλλα βακτήρια, υδρολάσες κ.α. (Karetanakou et al., 2012) στην αποικοδόμηση των αφλατοξινών. Πολύ μικρός αριθμός των μικροοργανισμών αυτών όμως έχει δείξει αποτελέσματα που να μπορούν να εφαρμοστούν στην πράξη.

### 3) Χημειοπροφύλαξη

Η τοξικότητα των αφλατοξινών επηρεάζεται σημαντικά από χημικές ουσίες που τροποποιούν την απόκριση των θηλαστικών στις τοξίνες (τερπενοειδή, πολυφαινόλες, ισοθειοκυάνες και αντιφλεγμονώδη φάρμακα). Οι ουσίες αυτές βοηθούν τα θηλαστικά στις διεργασίες αποτοξικοποίησης και αναστέλλουν τις τοξικές επιδράσεις (Hayes et al., 1998)

### 4) Χημική αποικοδόμηση

Εκχυλίσεις με πολικούς διαλύτες για τη δέσμευση τοξίνης έχουν εφαρμοστεί (Rastom, 1997), αξιοποιώντας ακόμα μία από τις φυσικές ιδιότητες του μορίου αυτού αλλά μετά από τέτοια επεξεργασία το προϊόν μπορεί μόνο να προοριστεί για ζωοτροφή. Στα σιτηρά ακόμη, χρησιμοποιείται η αμμωνία και το όζον αλλά δεν έχουν αποσαφηνιστεί όλα τα προϊόντα αποικοδόμησης που προκύπτουν (McDonough et al., 2011).

### 5) Μείωση βιοδιαθεσιμότητας αφλατοξίνης με αργιλικά υλικά

Μείωση βιοδιαθεσιμότητας έχει παρατηρηθεί μετά από προσθήκη φυλλοπυριτικής αργίλου ή άλλων οργανικών υλικών σε ζωοτροφές των οποίων ο ρόλος είναι η προσρόφηση αφλατοξίνης αφού έχει περάσει στο γαστρεντερικό σύστημα των ζώων (Wang et al. 2005). Το κρίσιμο σημείο στην τεχνική αυτή είναι το ότι δεν έχουν μελετηθεί ολοκληρωτικά οι επιδράσεις στα δευτερογενώς επεξεργασμένα προϊόντα που προέρχονται από αυτά τα ζώα.

## 1.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

Οι μυκοτοξίνες είναι ένα μεγάλο πρόβλημα που απειλεί πολλές καλλιέργειες, μεταξύ αυτών και το καλαμπόκι. Δεδομένου του γεγονότος πως δεν υπάρχουν εγκεκριμένα χημικά σκευάσματα για την καλλιέργεια του καλαμποκιού έτσι ώστε να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, πρέπει να εξεταστεί η δυνατότητα χρήσης βιολογικών σκευασμάτων. Τα βιολογικά σκευάσματα είναι πολλά υποσχόμενα για την αντιμετώπιση διαφόρων παθογόνων γι αυτό και κερδίζουν ολοένα και περισσότερο έδαφος. Σε κάθε περίπτωση, ευνοϊκότερα αποτελέσματα θα αποκομίσουμε μόνο αν ακολουθήσουμε ένα ολοκληρωμένο σύστημα αντιμετώπισης, το οποίο θα βασίζεται στο συνδυασμό των βιολογικών και χημικών σκευασμάτων που θα παρουσιαστούν παρακάτω.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, αξιολογήθηκαν κάποια βιολογικά και χημικά σκευάσματα ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν το μύκητα *A.flavus* και τις αφλατοξίνες που παράγει στην καλλιέργεια του καλαμποκιού. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά αυτά τα σκευάσματα:

### 1.5.1. GRANUFLO®



Είναι ένα φυτοπροστατευτικό προϊόν ευρέως φάσματος που χρησιμοποιείται κυρίως ως προστατευτικό σπόρων. Άλλες χρήσεις του είναι η αντιμετώπιση του βοτρυτή στις φράουλες και η αντιμετώπιση των μυκήτων *Taphrina deformans* και *Rhizopus spp.* σε οπωροφόρα δέντρα. Η δραστική του ουσία είναι το **thiram**, ανήκει στα διθειοκαρβαμιδικά και το ποσοστό δραστικής στο σκεύασμα είναι 75%.

### 1.5.2. GEOXE®



Το συγκεκριμένο χημικό σκεύασμα έχει πάρει έγκριση για τις καλλιέργειες της μηλιάς, της αχλαδιάς και του αμπελιού για την αντιμετώπιση μετασυλλεκτικών ασθενειών και κυρίως του βοτρυτή. Η δραστική του ουσία είναι το **fludioxonil** το οποίο προκαλεί βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες των μυκήτων. Η ομάδα που ανήκει η δραστική αυτή ουσία είναι οι φαινυλοπυρρόλες που περιλαμβάνει προστατευτικά μυκητοκτόνα επαφής. Ο συνήθης τρόπος εφαρμογής είναι ο ψεκασμός. Το **fludioxonil** δεν είναι διασυστηματικό αλλά μυκητοκτόνο επαφής, παραμένει δηλαδή στην επιφάνεια των φύλλων και μόνο ένα μέρος διεισδύει στην εφυμενίδα καρπών και φύλλων. Οι φαινυλοπυρρόλες παρεμποδίζουν τη βλάστηση κονιδίων και την ανάπτυξη των βλαστικών σωλήνων του μυκηλίου (Ζιώγας-Μαρκόγλου, 2007).

### 1.5.3. CHORUS®



Το σκεύασμα αυτό έχει εγκριθεί για τα μηλοειδή και συγκεκριμένα πυρηνόκαρπα για την αντιμετώπιση του φουζικλαδίου και της φαιάς σήψης. Η δραστική του ουσία είναι το **cyprodinil** που ανήκει στις ανιλοπυριμιδίνες και παρουσιάζει αποπ्लाστική και διελασματική δράση. Ο συνήθης τρόπος εφαρμογής είναι ο ψεκασμός. Η δραστική αυτή ουσία ανήκει στις ουσίες που μειώνουν την παθογόνο ικανότητα του μύκητα. Ανήκει στην ομάδα παρεμποδιστών ενζύμων παθογένειας. Οι ανιλοπυριμιδίνες παρεμποδίζουν την επιμήκυνση βλαστικού σωλήνα των σπορίων του μύκητα και την ανάπτυξη μυκηλίου χωρίς να επηρεάζεται η σποριοποίηση και η βλάστηση των σπορίων. Το **cyprodinil** είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο και παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση της μεθειονίνης. Από βιοχημικής άποψης η δράση των ανιλοπυριμιδινών βασίζεται στην παρεμπόδιση διαφόρων λυτικών ενζύμων που είναι απαραίτητα για την αποδιοργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών από τα παθογόνα.

### 1.5.4. CANTUS®

Το CANTUS είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο για την καταπολέμηση του βοτρυτή στο αμπέλι. Δραστική του ουσία είναι το **boscalid** με 50% β/β. Η δραστική αυτή ουσία ανήκει στα καρβοξαμικά (παρεμποδιστές του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας). Είναι διασυστηματικό που παρεμποδίζει το ενζυμικό σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέως που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της λειτουργίας του κύκλου του Krebs.





### 1.5.5. QUADRIS®



Το σκεύασμα αυτό έχει πάρει έγκριση για την καλλιέργεια του αμπελιού και ο τρόπος δράσης του βασίζεται στις στρομπιλουρίνες. Συγκεκριμένα, η δραστική του είναι το **azoxystrobin** με 25% β/β. Είναι προστατευτικό μυκητοκτόνο που ελέγχει μύκητες που ανήκουν στους Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες, Αδηλομύκητες και Ωομύκητες. Η δραστική αυτή ανήκει στους παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας. Οι στρομπιλουρίνες είναι ενώσεις-παράγωγα φυσικών ενώσεων που παράγονται από διάφορα είδη μυκήτων και βακτηρίων. Είναι διασυστηματικά μυκητοκτόνα και παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων.

### 1.5.6. SWITCH®



Μείγμα ενός διασυστηματικού μυκητοκτόνου και ενός επαφής, με προστατευτική και θεραπευτική δράση. Συγκεκριμένα, οι δραστικές του είναι οι **fludioxonil** και **cyprodinil** που ανήκουν στις φαίνυλοπυρρόλες και ανιλοπυριμιδίνες αντίστοιχα. Το ποσοστό κάθε δραστικής ουσίας είναι 25% και 37,5%. Το φάσμα δράσης του εντοπίζεται στην αντιμετώπιση του βοτρώτη στο αμπέλι και σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες, καθώς επίσης για τους μύκητες *Aspergillus*, *Alternaria* και *Sclerotinia*.

### 1.5.7. VACCIPLANT®



Βασίζεται στη δράση της χημικής ουσίας **λαμιναρίνης**. Η λαμιναρίνη είναι ένας υδατάνθρακας, σχεδόν ισοδύναμος με το άμυλο στα φυτά, παραγόμενος από τα φαιοφύκη (*Laminaria spp.*). Χρησιμοποιείται σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες για την αντιμετώπιση βακτηριακής κηλίδωσης, περνοσπόρου και μονίλιας.

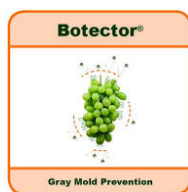
### 1.5.8. SERENADE MAX®



Το στέλεχος του βάκιλλου στο οποίο βασίζεται το σκεύασμα αυτό είναι το **Bacillus subtilis QST 713** σε μορφή βρέξιμης σκόνης για την καταπολέμηση του φουζικλαδίου και του βακτηριακού καψίματος στα μηλοειδή, του βοτρώτη στο αμπέλι, τη φράουλα, τη τομάτα, τη πιπεριά και τη μελιτζάνα, της σκληρωτίνιας στο μαρούλι της φαιάς σήψης στη ροδακινιά, βερικοκιά, δαμασκηνιά, κερασιά και νεκταρινιά και της βακτηριακής κηλίδωσης στη τομάτα με προληπτικές εφαρμογές. Το στέλεχος του *Bacillus subtilis* QST 713 παράγει κυρίως λιποπεπτίδια τα οποία ενεργούν στις κυτταρικές μεμβράνες/κυτταρικό τοίχωμα των παθογόνων καταστρέφοντας τα κύτταρά τους. Έτσι παρεμποδίζεται η βλάστηση των σπορίων των μυκήτων, η επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και η διείσδυσή τους στον φυτικό ιστό. Επιπλέον παράγει ουσίες με

αντιβακτηριακή δράση οι οποίες παρεμποδίζουν το σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος και την παραγωγή πρωτεϊνών στα βακτήρια.

### 1.5.9. BOTECTOR®



Το σκεύασμα αυτό έχει μυκητοκτόνο δράση και είναι προληπτικό ενάντια στον Βοτρύτη (*Botrytis cinerea*) στα αμπέλια. Βασίζεται στη ζύμη *Aureobasidium pullulans*. Η ζύμη αυτή έχει μεγάλη σημασία στην βιοτεχνολογία για την παραγωγή των διαφορετικών ενζύμων, όπως σιδηροφόρα και πουλλουλάνη. Επιπλέον, χρησιμοποιείται σε βιολογικό έλεγχο των ασθενειών των φυτών.

### 1.5.10. TRIANUM®

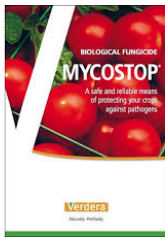


Το TRIANUM είναι ένα βιολογικό ενισχυτικό φυτού που αυξάνει την αντίσταση των φυτών στην καταπόνηση που προκαλείται από διάφορες αιτίες όπως περίσσεια και έλλειψη νερού, χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες κ.α. Βασίζεται στο επιλεγμένο και πατενταρισμένο στέλεχος T-22 του μύκητα *Trichoderma harzianum*. Επίσης, αυξάνει την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος με συνέπεια την καλύτερη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τα φυτά και καλύτερη ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος των φυτών. Εκτενής έρευνα σε διάφορες καλλιέργειες αποδεικνύουν ότι η χρήση του TRIANUM είναι ένα βασικό συστατικό στην παραγωγή μιας υγιούς και ζωντανής καλλιέργειας. Ειδικά όπου η λίπανση, η άρδευση και η θερμοκρασία δεν είναι οι ιδανικές. Η χρήση του TRIANUM οδηγεί στην ποσοτική βελτίωση της ανάπτυξης του φυτού τέτοια όπως αύξηση και διαμόρφωση των ριζικών τριχιδίων, περισσότερα άνθη, μεγαλύτερο φρέσκο και ξηρό βάρος των φυτών, και μία πιο ομοιόμορφη καλλιέργεια. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή των λαχανικών, μαλακών φρούτων (φράουλα), χόρτα, βολβούς, καλλωπιστικά, πολυετή φυτά, χλοοτάπητες και δενδροκομία (τόσο σε προστατευόμενες όσο και σε ανοικτές καλλιέργειες). Το TRIANUM διεγείρει το ριζικό σύστημα, και αυξάνει τον αριθμό των ριζικών τριχιδίων με αποτέλεσμα την βελτίωση της πρόσληψης, νερού και θρεπτικών από την ρίζα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα εύρωστο φυτό που είναι λιγότερο ευαίσθητο σε ασθένειες και μπορεί να απαιτεί λιγότερες εφαρμογές, με χημικά (μυκητοκτόνα) και λιπάσματα. Μετά την εφαρμογή του TRIANUM, βλαστάνουν τα σπόρια και το μυκήλιο αποικίζει την επιφάνεια των ριζών του φυτού. Οι μυκηλιακές υφές αγκαλιάζουν εξωτερικά τα ριζίδια και εμποδίζουν μηχανικά να εισχωρήσουν παθογόνα, ανταγωνίζοντας τα σε χώρο και θρεπτικά. Βασικά θρεπτικά στοιχεία μπορούν να γίνουν περισσότερο διαθέσιμα στα φυτά με την ικανότητα του μύκητα να τα διαλύει.



<http://shop.biocontrol.ch>

### 1.5.11. MYCOSTOP®



Βασίζεται στο βακτηριακό στέλεχος *Streptomyces griseoviridis* στέλεχος K61 και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση *Pythium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Phomopsis* και *Phytophthora*. Πρόκειται για ένα φυσικώς απαντώμενο βακτήριο του εδάφους που απομονώθηκε αρχικά από τύρφη. Φαίνεται να δρά εναντίον των μυκήτων που προκαλούν ασθένειες με τουλάχιστον δύο τρόπους. Έχει ανταγωνιστική δράση σε χώρο και θρεπτικά και επίσης παράγει διάφορα είδη τοξικών χημικών ουσιών για τους μύκητες.

### 1.5.12. AGRI-FOS 600®



Το προϊόν έχει υψηλή περιεκτικότητα σε διαλυτά άλατα φωσφόρου, και είναι γεγονός πως οι φωσφονικές ενώσεις διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη φυτοπροστασία. Οι φωσφονικές ενώσεις περιέχουν ένα οξυγόνο (O) λιγότερο από τις φωσφορικές και αυτό και μόνο είναι υπεύθυνο για την τόσο μεγάλη διαφορά μεταξύ τους που τελικά παρατηρείται. Οι πρώτες ενώσεις είναι πιο διαλυτές στο έδαφος. Επίσης, δρουν θετικά στον μεταβολικό σύστημα των φυτών. Οι φωσφορικές ενώσεις μπορεί να αποδειχθούν τοξικές για τα φυτά. Ακόμη, τα φωσφονικά ανιόντα καλίου ( $K_3PO_3$ ) παρέχουν φώσφορο σε μεγαλύτερες και πιο εύκολα αφομοιώσιμες μορφές από τα φωσφορικά άλατα. Τέλος, έχει διαπιστωθεί πως οι φωσφονικές ενώσεις ευνοούν τους μικροοργανισμούς του εδάφους στη δράση τους απορροφώντας φωσφονικά ιόντα και απελευθερώνοντας φωσφορικά. Το AGRI-FOS 600® είναι ένα μυκητοκτόνο με θεραπευτική και προστατευτική δράση έναντι πολλών παθογόνων της γεωργίας. Απορροφάται πολύ γρήγορα από το ριζικό σύστημα των φυτών και διανέμεται συστηματικά σε όλο το φυτό. Μόλις εισαχθεί μέσα σε αυτό ενεργοποιεί τους φυσικούς μηχανισμούς άμυνας του φυτού για να αντισταθεί σε εισβολή από παθογόνους παράγοντες που προκαλούν την ασθένεια προσφέροντάς του τη δυνατότητα αποθήκευσης ενέργειας σε μορφή ATP. Έχει ελάχιστη επίδραση στο περιβάλλον. Υπάρχει μικρή ανησυχία για την έκθεση του κοινού σε επιφανειακά κατάλοιπα δραστικών συστατικών, επειδή εύκολα αποδομείται σε φυτικούς ιστούς. Έχει ήδη διαπιστωθεί η δράση του στην καταπολέμηση του μύκητα *Phytophthora infestans* (Lovat, Mikkelsen, 2011). Η δράση του οφείλεται σε φωσφονικά ανιόντα όπως προαναφέρθηκε και αυτό τελικά το διαφοροποιεί παντελώς από προϊόντα με δραστικές ουσίες που βασίζονται στα φωσφορικά ανιόντα.

### 1.5.13. ΖΕΟΛΙΘΟΣ



Ο Ζεόλιθος είναι ένα φυσικό πορώδες ορυκτό με τεράστια ιοντοανταλλακτική ικανότητα και χάρη σ' αυτήν, μπορεί να φιλτράρει το νερό δεσμεύοντας μέταλλα και οργανικές ενώσεις. Σε αντίθεση με τα περισσότερα τεκτοφυριτικά ορυκτά η δομή των ζεόλιθων είναι αξιοσημείωτα ανοικτή, με όγκους κενών που φθάνουν το 50% του αφυδατωμένου μέλους. Επιτρέπουν χώρο στα μεγάλα κατιόντα όπως το νάτριο, το κάλιο, το βάριο και το

ασβέστιο, ακόμη και στα σχετικά μεγάλα μόρια και στις ομάδες κατιόντων όπως το ύδωρ, η αμμωνία, τα ιόντα ανθρακικού άλατος και τα ιόντα νιτρικών αλάτων. Μερικοί το ονομάζουν «πέτρα της ζωής» ή «μαγική πέτρα». Το όνομα του προέρχεται από τις λέξεις ζέω = βράζω και λίθος = πέτρα γιατί όταν θερμανθεί αποβάλλει, με τη μορφή φυσαλίδων, το νερό που έχει συκρατήσει, δίνοντας την εντύπωση ότι βράζει. Στη φύση απαντώνται πάνω από 30 είδη φυσικού ζεόλιθου ενώ παρασκευάζονται και πολλά είδη βιομηχανικού ζεόλιθου. Ο καλύτερης ποιότητας φυσικός ζεόλιθος είναι αυτός που περιέχει Κλινοπτιλόλιθο σε ποσοστό άνω του 90%. Κοιτάσματα ζεόλιθου υπάρχουν και στη χώρα μας σε αρκετές περιοχές της Βόρειας Ελλάδας (Πετρωτές Έβρου) με πολύ μεγάλη καθαρότητα (95%) αλλά δυστυχώς δεν έχει δοθεί ακόμη άδεια εκμετάλλευσης του κοιτάσματος και στις Κυκλάδες. Η χρήση του ζεόλιθου όμως, γενικότερα είναι περιορισμένη και πρέπει να αυξηθεί γιατί έχει αποδειχθεί ότι προσφέρει πολύτιμα πλεονεκτήματα στη φυτοπροστασία καθώς μειώνει τα ποσοστά ασθένειας εδαφογενών παθογόνων (Lagogianni et al., 2015). Αξίζει να αναφερθεί και η δράση του ζεόλιθου ως συμπλήρωμα διατροφής καθώς δεσμεύει και αποβάλλει τις βλαβερές ουσίες που εισχωρούν στον οργανισμό. Πολλά από τα οφέλη του είναι τα παρακάτω: βελτίωση λειτουργίας ζωτικών οργάνων, απορρόφηση θρεπτικών ουσιών από τον πεπτικό σωλήνα, δημιουργεί αίσθηση ευεξίας και τέλος λειτουργεί και σαν φυσικό ισοτονικό.

#### **1.5.14. ΜΗ-ΤΟΞΙΚΟΓΟΝΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *A. flavus***

Για την αντιμετώπιση του *A. flavus* αξιολογήθηκε και ένα στέλεχος μη-τοξικογόνο του ίδιου μύκητα (A.f. 124) που έχει απομονωθεί από φιστικιές στην περιοχή της Αίγινας. Η δράση των μη-τοξικογόνων στελεχών στηρίζεται στην αντικατάσταση του αφλατοξικογόνου στελέχους με κάποιο άλλο ενδημικό μη-τοξικογόνο στέλεχος.

#### **1.5.15. *Paenibacillus alvei* K-165**

Ο συγκεκριμένος βάκιλος είναι ένα ριζοσφαιρικό βακτήριο και είναι γνωστός για τη δράση του ως επαγωγέας του αμυντικού συστήματος των φυτών (Tjamos et al., 2004). Ο βάκιλλος αυτός έχει απομονωθεί από ακρορίζια τομάτας που καλλιεργήθηκε σε ηλιοαπολυμανθέν έδαφος. Ο βάκιλλος αυτός δρα και αντιβιοτικά παρεμποδίζοντας μύκητες όπως ο *V. dahliae*.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως τονίστηκε στην εισαγωγή της παρούσας μελέτης, η διαλογή είναι ένα μέτρο που εφαρμόζεται στη χώρα μας σε αρκετές περιπτώσεις αλλά είναι ανεπαρκές και οικονομικά ασύμφορο. Για να δοθεί λύση στο καίριο ζήτημα των μυκοτοξινών και ιδιαίτερα των αφλατοξινών στην καλλιέργεια του καλαμποκιού, θα πρέπει να δημιουργηθεί ένα μοντέλο διαχείρισης των αφλατοξινών. Η παρούσα εργασία στοχεύει στη δημιουργία ενός τέτοιου πιθανού μοντέλου στα πλαίσια του οποίου θα συνδυαστεί η πρόληψη με τη χημική και βιολογική καταπολέμηση. Πρόκειται για ένα μοντέλο που θα συμφέρει οικονομικά τους παραγωγούς καθώς με την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση θα ελαχιστοποιούνται οι απώλειες, αλλά ταυτόχρονα θα μειωθεί σημαντικά το πρόβλημα της απόσυρσης τροφίμων λόγω αφλατοξινών.

Πιο συγκεκριμένα στόχοι της μελέτης είναι:

- 1) Διερεύνηση της δράσης των χημικών σκευασμάτων Switch®, Quadris®, Geoxe®, Chorus®, Cantus®, Granuflo® καθώς και των βιολογικών σκευασμάτων Serenade Max®, Vacciplant®, Botector®, Trianum®, Mycostop®, Agri-fos 600®, ζεολίθου, ενός βάκιλλου (*Paenibacillus alvei* K-165) και ενός μη τοξικογόνου στελέχους του μύκητα *A. flavus* στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα και στην παρεμπόδιση παραγωγής αφλατοξίνης σε *in vitro* πειράματα.
- 2) Έλεγχος δράσης επιλεγμένων χημικών και βιολογικών σκευασμάτων στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του *A. flavus* στους σπάδικες και στη βιοσύνθεση αφλατοξινών σε πειράματα αγρού.
- 3) Αξιολόγηση ανθεκτικότητας των τοξικογόνων στελεχών A 6.10, Δ1.3 και 12S του μύκητα *A. flavus* στις δραστικές ουσίες fludioxonil, cyprodinil, boscalid και azoxystrobin σε *in vitro* πειράματα.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Πρωτόκολλα

##### **PDA (lt)**

200 gr πατάτας,  
20 gr δεξτρόζη και  
20 gr άγαρ

##### **MALT EXTRACT AGAR (lt) (LAB037-LABM)**

30 gr malt extract,  
5 gr mycological peptone και  
15 gr άγαρ

##### **MALT EXTRACT BROTH (lt)**

17 gr malt extract,  
3 gr mycological peptone

##### **WATER AGAR (lt)**

20 gr άγαρ

##### **CZAPEK-DOX AGAR (lt)**

2 gr νιτρικό νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ )  
1 gr μονόξινο φωσφορικό κάλιο ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )  
0,5 gr ένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )  
0,5 gr χλωριούχο κάλιο (KCL)  
0,01 gr ένυδρος θειικός σίδηρος ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )  
30 gr σουκρόζη  
20 gr άγαρ

##### **LETS buffer (200ml)**

8gr 20mM EDTA  
5gr 0.5% SDS  
2gr 10mM Tris-HCl  
5gr 0.1M LiCl

## Εκκινητές:

### 1. Calmodulin

CL1: 5' GAR TWCC AAG GAG GCC TTC TC 3'

CL2A: 5' TTT TGC ATC ATG AGT TGG AC 3'

### 2. Elongation Factor

EF\_F: 5' CCT TCA AGT ACG CYT GGG TTC 3'

EF\_R: 5' TTC TTG GAG TCA CCG GCA A 3'

## 3.2. Βιολογικό υλικό και στελέχη μύκητα

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν 3 άγρια στελέχη του μυκοτοξικογόνου μύκητα *Aspergillus flavus*. Οι ονομασίες τους είναι Δ 1.3, Α6.10 και 12S. Το πρώτο στέλεχος (Δ 1.3) είναι ελληνική απομόνωση από φίστικιά, το δεύτερο από αγρό καλαμποκιού (Α 6.10) στη Καρδίτσα και το τρίτο (12S) είναι απομόνωση από αμερικάνικη βαμβακοφυτεία. Και τα τρία στελέχη είναι αφλατοξικογόνα.

Επίσης, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ελληνικά υβρίδια καλαμποκιού και συγκεκριμένα τα υβρίδια Ν8, Ν9, τα οποία προμηθεύτηκε το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας από την εταιρία 'Σπύρου'. Σε σπόρους των υβριδίων αυτών έγιναν προκαταρκτικά πειράματα μόλυνσης και παραγωγής αφλατοξίνης έπειτα από μόλυνσή τους με τα ανωτέρω στελέχη του *A. flavus*. Τα στελέχη αυτά αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό PDA για 6 ημέρες στους 28° C.

## 3.3. Ταυτοποίηση και αλληλούχιση

Η ταυτοποίηση και ταξινόμηση των διαφόρων ειδών του γένους *Aspergillus* βασίζεται κυρίως στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Οι βασικότεροι ταξινομικοί χαρακτήρες είναι το σχήμα, το χρώμα των κονιδίων, η χαρακτηριστική δομή των κονιδιοφόρων, η υφή και η τραχύτητα της επιφάνειας των κονιδίων, η παρουσία κυττάρων *metulae* και *Hulle*, και η δυνατότητα σχηματισμού σκληρωτίων. Ακόμη, έχουν αναπτυχθεί και διάφορες ταξινομικές τεχνικές για το διαχωρισμό συγγενών ειδών, μερικές από τις οποίες είναι οι παρακάτω:

- μέγεθος και χρώμα αποικιών του μύκητα σε διάφορα θρεπτικά υλικά
- στοιχεία δευτερογενούς μεταβολισμού
- ισοενζυμική ανάλυση
- πολυμορφισμός του DNA
- η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- η μελέτη των καρυστύπων
- η ανάλυση αλληλούχισης γονιδίων
- η ανοσοενζυμική αντίδραση ELISA

Στην παρούσα μελέτη, για να ταυτοποιηθούν τα στελέχη του μύκητα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλληλούχισης γονιδίων, καθώς σε επίπεδο διαφοροποίησης είδους είναι η πιο ακριβής. Καλλιεργήθηκαν τα στελέχη σε θρεπτικό υλικό ΜΕΒ και αφέθηκαν για 48 ώρες στο σκοτάδι για να αναπτυχθεί το μυκήλιο χωρίς την παραγωγή κονιδίων. Ακολούθησε συλλογή μυκηλίου και λειοφυλίωσή του για 24 ώρες. Στη συνέχεια έγινε εξαγωγή γενωματικού DNA με το παρακάτω πρωτόκολλο: τοποθετήθηκαν 0,1 gr λειοφυλιωμένου μυκηλίου σε σωληνάρια (tubes) των 1,5 ml. Προστέθηκαν 700 μl Lets-buffer για τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών, αναδεύτηκαν για 5 λεπτά για καλή διαβροχή και έπειτα προστέθηκαν 700 μl φαινόλη χλωροφόρμιο (Phe-ChI-IAA 15:14:1). Τα δείγματα έμειναν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για αποδιάταξη πρωτεϊνών. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 10 λεπτών στους 4° C και στις 13.000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και προστέθηκε ίση ποσότητα Phe-ChI-IAA με αυτή του υπερκειμένου. Έγινε ακόμα μία φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και προστέθηκε 1 ml 95% αιθανόλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για την κατακρίμνηση του DNA. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500 μl 70% αιθανόλης για καθαρισμό. Έγινε φυγοκέντρηση στους 4° C στις 13.000 για 2 λεπτά. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αιθανόλης με τη βοήθεια πιπέτας. Τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν και στα pellets και προστέθηκαν 40 μl Tris-Buffer (pH=8) και 2μ RNase (FERMENTAS). Έμειναν στο υδατόλουτρο στους 50° C για 15 λεπτά για να καταστραφεί η το RNA. Τέλος, μεταφέρθηκαν στους -20° C. πραγματοποιήθηκε PCR και με τους εκκινητές EF (Elongation factor- παράγοντας επιμήκυνσης που παίζει ρόλο στη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου) και CL (Calmodgulin gene- σύνολο πρωτεϊνών που έχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της κυτταρικής ανάπτυξης). Μετά τον έλεγχο για την παρουσία των προϊόντων, ακολούθησε καθαρισμός τους με το παρακάτω πρωτόκολλο του QIAGEN Gel Purification kit (Cat.No: 28704): προστέθηκε στο πενταπλάσιο ο όγκος του ενισχυμένου προϊόντος από το ρυθμιστικό διάλυμα PB1. Το χρώμα θα πρέπει να παρέμεινε κίτρινο και σε μια στήλη QIAquick τοποθετήθηκε όλο το διάλυμα. Το δείγμα τοποθετήθηκε στη στήλη και φυγοκεντρήθηκε για 30". Το υπόλειμμα που καθίζησε απορρίφτηκε και στο κέντρο της στήλης προστέθηκαν 0,75 ml buffer PE και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση για 30". Απορρίφτηκε το επιπλέον διάλυμα και η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε για ακόμη ένα λεπτό. Η στήλη τοποθετήθηκε σε καθαρό σωληνάριο και προστέθηκαν 50 μl buffer EB στο κέντρο του φίλτρου. Ακολούθησε επαναφυγοκέντρηση για ένα λεπτό. Το τελικό προϊόν αποστέλλεται για αλληλούχιση και πραγματοποιήθηκε BLAST ανάλυση για την εξακρίβωση του είδους του κάθε στελέχους (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3.4. Προετοιμασία βιολογικών και χημικών σκευασμάτων

Τα βιολογικά σκευάσματα που αναφέρθηκαν στην παρ. 1.5 χρησιμοποιήθηκαν στις προτεινόμενες συγκεντρώσεις, ανάλογα με την εκάστοτε ετικέτα. Παρακάτω παρατίθεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας στον οποίο φαίνονται τα σκευάσματα, η δραστική/ές ουσίες από τις οποίες αποτελούνται, η χημική ομάδα στην οποία ανήκουν και το φάσμα δράσης του κάθε σκευάσματος.



ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ	ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΜΑΔΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ % ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ	ΦΑΣΜΑ ΔΡΑΣΗΣ	ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ
Granuflo®	thiram	Διθειοκαρβαμικά	75%	Ευρέως φάσματος μυκητοκτόνο	900 gr/100lt
Cantus®	boscalid	Καρβοξαμικά	50%(β/β)	Βοτρώτης στο αμπέλι	120 gr/100lt
Geoxe®	fludioxonil	Φαινυλοπυρρόλες	50% (β/β)	Βοτρώτη στο αμπέλι	100 gr/100 lt
Chorus®	cyprodinil	Πυριμιδίνες	50%(β/β)	Μονίλιες-φουζικλάδια σε Πυρηνόκαρπα/μηλοειδή	50 gr/100lt
Quadris®	azoxystrobin	Στρομπιλουρίνες	25%(β/ο)	Ωίδια και περονόσποροι στο αμπέλι	100 gr/100lt
Switch®	fludioxonil-cyprodinil	Φαινυλοπυρρόλες-Ανυλοπυριμιδίνες	25%-37,5%	Βοτρώτη στο αμπέλι	100 gr/100lt
Laminarine®	πολυσακχαρίτης γλυκόζης	-	4,50%	Βοτρώτης και περονόσπορος στο αμπέλι	200 gr/lit
Serenade Max®	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	-	15,67% β/β	Επαγωγέας άμυνας	400 gr/100lt
Botector®	<i>Aureobasidium pullulans</i> strains DSM 19940-1	-	80%	Βοτρώτης, Πενικίλλιο, Μονίλια	100 gr/100lt
Trianium®	<i>Trichoderma charzianum</i>	-	1,15%(β/β)	Πρωθητής ανάπτυξης	300 gr/100lt
Mycostop®	<i>Streptomyces-actinobacterium</i> strains	-	5*10 <sup>8</sup> cfu/ml	Πρωθητής ανάπτυξης	50 gr/100lt
Agri-fos 600®	Φοσφωρικά ανιόντα καλίου	-	1,55 kg/lit	Επαγωγέας άμυνας	250-300 cc/lit
Ζεόλιθος	Πέτρωμα	-		Εδαφοβελτιωτικό	50 gr/lit
<i>Raenibacillus alvei</i> K-165	<i>Raenibacillus alvei</i> Βάκυλλος	-	OD=0,8	-	-
Non-toxicogenic strain	Μη τοξικογόνο στέλεχος του <i>Asp. flavus</i>	-	10 <sup>6</sup> κον/ml	-	-

**Πίν. 5.** Πίνακας σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, πληροφορίες και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους σύμφωνα με την εκάστοτε ετικέτα.

### 3.5. *In vitro* αξιολόγηση των σκευασμάτων στην παρεμπόδιση κονιδιογένεσης του μύκητα *A. flavus*

Αρχικά οι σπόροι καλαμποκιού απολυμάνθηκαν με εμβάπτιση 10 λεπτών σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη εμπορίου) 10%, ακολούθησε πλύση με αποστειρωμένο νερό, 3 λεπτά εμβάπτιση σε διάλυμα 70% αιθανόλης και τελική πλύση με αποστειρωμένο νερό.

Δημιουργήθηκαν αιωρήματα των βιολογικών και χημικών σκευασμάτων σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες με αυτές της εκάστοτε ετικέτας (βλ. αντίστοιχο Πίνακα 4). Οι σπόροι χωρίστηκαν ανά τριαντάδες και αφέθηκαν μέσα στα αντίστοιχα αιωρήματα για μισή ώρα σε ανάδευση (200 rpm). Έπειτα, με τη χρήση λαβίδας, τοποθετήθηκαν στα αντίστοιχα τρυβλία, τα οποία περιείχαν διπλή στρώση διηθητικού χαρτιού και δοχείο με 2 ml αποστειρωμένου νερού για εξασφάλιση ικανής υγρασίας (περίπου 100%). Προστέθηκε επίσης, 1 ml αποστειρωμένου νερού στην επιφάνεια του χαρτιού. Οι σπόροι που επιλέχθηκαν ήταν όμοιοι σε βάρος και σχήμα. Μετά από 24 ώρες ακολούθησε μόλυνση με τα στελέχη του μύκητα που προαναφέρθηκαν. Για κάθε στέλεχος ξεχωριστά, δημιουργήθηκε αιώρημα κονιδίων 10<sup>6</sup> κον/ml και κάθε σπόρος καλαμποκιού μολύνθηκε με σταγόνα 10 μl (10.000 κονίδια). Έπειτα από διάστημα 5 ημερών και αφού τα τρυβλία διατηρήθηκαν στους 28° C και σε φωτοπερίοδο 12 ωρών, οι σπόροι απομακρύνθηκαν από τα τρυβλία και

τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια με 5 ml νερό για ανάδευση, απομάκρυνση και μέτρηση κονιδίων.



**Εικ. 21.** Μόλυνση σπόρων καλαμποκιού σε τρυβλία με αιώρημα κονιδίων του μύκητα *A. flavus*.

### 3.6. *In vitro* αξιολόγηση των σκευασμάτων στην παρεμπόδιση ανάπτυξης αφλατοξίνης

Όμοια, οι σπόροι καλαμποκιού απολυμάνθηκαν με εμβάπτιση 10 λεπτών σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 10%, ακολούθησε πλύση με αποστειρωμένο νερό, 3 λεπτά εμβάπτιση σε διάλυμα 70% αιθανόλης και τελική πλύση με αποστειρωμένο νερό. Για το συγκεκριμένο πείραμα ακολούθησε η ίδια διαδικασία (παρ. 3.5), με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 100ml και οι σπόροι καλαμποκιού συνολικά για κάθε κωνική ζύγιζαν 20 gr. Έγιναν 3 επαναλήψεις ανά σκεύασμα. Σε κάθε κωνική προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα αιωρήματος του κάθε σκευάσματος και αφέθηκε επίσης για ανάδευση μισή ώρα. Έπειτα, απομακρύνθηκε το διάλυμα και προστέθηκαν 20 ml αιωρήματος κονιδίων ( $10^8$  κον/ml) ανά κωνική φιάλη. Μετά από μισή ώρα το αιώρημα απομακρύνθηκε και οι κωνικές αφέθηκαν στο σκοτάδι και στους 28° C για 15 ημέρες προκειμένου να παραχθεί η αφλατοξίνη. Μετά το πέρας των 15 ημερών, οι σπόροι κονιορτοποιήθηκαν και ζυγίστηκαν 3 gr κονιορτοποιημένου ιστού για την εξαγωγή τοξίνης. Στην ποσότητα αυτή προστέθηκαν 5 ml νερού με 0,01% Tween 80 και 5 ml ακετόνης και αφέθηκαν για ανάδευση μισή ώρα. Έπειτα, οι κωνικές παρέμειναν για 5 λεπτά σε συνθήκες δωματίου και προστέθηκαν 5 ml χλωροφόρμιου. Μετά από καλή ανάδευση (vortex), και αφού η τοξίνη είχε δεσμευτεί από τους πολικούς διαλύτες, το μίγμα μεταφέρθηκε σε γυάλινο σκεύος αφού πρώτα πέρασε από διηθητικό χαρτί για τη συγκράτηση και απόρριψη του περιττεύοντος ιστού. Στο γυάλινο σκεύος (μπουκάλια McCartney) οι τοξίνες με τους διαλύτες αφέθηκαν για 24 ώρες ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα διαλυτών και να παραμείνει η τοξίνη. Έπειτα έγινε επαναδιαλυτοποίηση της τοξίνης με 50 ml μεθανόλη (MeOH:H<sub>2</sub>O. 70:30) έπειτα από καλή ανάδευση τοποθετήθηκαν με πιπέττα σταγόνες 10μl σε πλάκες TLC 20X20 (Sigma-Aldrich Cat.No.: 60778) στις οποίες είχε γίνει επίστρωση λεπτής στοιβάδας στατικής φάσης διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) με μέγεθος σωματιδίων 0,2 mm. Το σύστημα διαλυτών διαχωρισμού των αφλατοξινών ήταν: διεθυλαιθέρας 96% v/v, μεθανόλη 3% v/v και νερό 1% v/v.

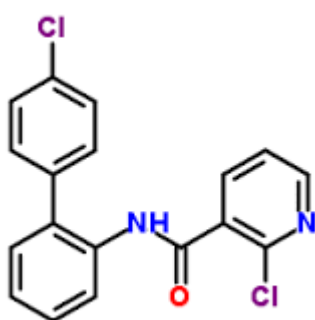
### 3.7. Αξιολόγηση των βιολογικών σκευασμάτων στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα

Για τα βιολογικά σκευάσματα που αναφέρθηκαν, δημιουργήθηκαν αντίστοιχα αιωρήματα (Mycostop®, Trianum®, Serenade Max®) και τοποθετήθηκε σταγόνα αιωρήματος 10μl στην μια πλευρά τρυβλίων με θρεπτικό υλικό PDA. Από το κάθε στέλεχος του *A. flavus* δημιουργήθηκε αιώρημα κονιδίων 10<sup>6</sup> κον/ml και 10μl τοποθετήθηκαν στην αντιδιαμετρική πλευρά του τρυβλίου. Μετά από 3 ημέρες εξετάστηκε η ανάπτυξη ζώνης παρεμπόδισης.

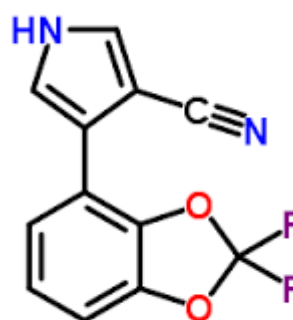
### 3.8. Αξιολόγηση ανθεκτικότητας του *A. flavus* σε διάφορες δραστικές ουσίες

Χρησιμοποιήθηκαν δραστικές ουσίες μυκητοκτόνων από διαφορετικές χημικές ομάδες και με διαφορετικό μηχανισμό δράσης σε υποκυτταρικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι δραστικές boscalid, fludioxonil, cyprodinil και azoxystrobin.

Boscalid



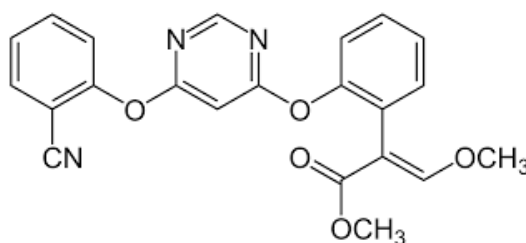
Fludioxonil



Cyprodinil



Azoxystrobin



Για τη δραστική ουσία cyprodinil έγιναν 5 δοκιμές στις παρακάτω συγκεντρώσεις: 0.01 ppm, 0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 50 ppm. Για την δραστική ουσία fludioxonil έγιναν 5 δοκιμές στις παρακάτω συγκεντρώσεις: 0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 250 ppm. Για το boscalid έγιναν 3 δοκιμές στις συγκεντρώσεις: 0.1 ppm, 0.5 ppm, 5 ppm. Για τη δραστική

azoxystrobin έγιναν 3 δοκιμές: 1 ppm, 10 ppm, 50 ppm. Οι διάφορες συγκεντρώσεις των δραστικών ενσωματώθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 ml στις οποίες υπήρχαν από 100 ml θρεπτικού υλικού Czarek-Dox Agar (CZA). Οι δραστικές προστέθηκαν όταν το υλικό είχε ήδη αποστειρωθεί και ήταν σε θερμοκρασία περίπου 50 °C. Δημιουργήθηκαν αντίστοιχα τρυβλία για κάθε δραστική και ο μύκητας μεταφέρθηκε στο κέντρο τους αφού πρώτα είχε ενεργοποιηθεί σε θρεπτικό υλικό Water Agar (WA) και απομονώθηκαν μικρά τμήματα 2x2 mm. Οι διάμετροι μετρούνταν κάθε μέρα ανά 3 ημέρες και για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

### 3.9. Πιλοτικό πείραμα αγρού

Στον αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών έγινε όργωμα και φρεζάρισμα τον Μάρτιο και εφαρμόστηκε ζιζανιοκτονία με το χημικό σκεύασμα Pendigan (Πεντιμεθαλίνη) προφυτρωτικά. Έπειτα από 1 εβδομάδα εφαρμόστηκε λίπανση με Foscamonio (18-46-0) και οι σπόροι σπάρθηκαν σε αποστάσεις 40x40 εκατοστά. Για την εξασφάλιση μεγαλύτερου ποσοστού βλαστικότητας οι σπόροι έμειναν σε νερό για 30 λεπτά πριν τη σπορά. Για την εξασφάλιση της άρδευσης τοποθετήθηκε αυτόματο σύστημα ποτίσματος συνδεδεμένο με λάστιχα Φ20 και Φ16 με σταλάκτες τοποθετημένους στις αντίστοιχες θέσεις φύτευσης των σπόρων. Το πότισμα προγραμματίστηκε να ενεργοποιείται κάθε πρωί και κάθε απόγευμα επί μία ώρα. Όταν τα φυτά ήταν στην αρχή του μεταξώματος έγινε ψεκάσμος με το σκεύασμα Karate® για την αποφυγή προσβολής από έντομα. Στο στάδιο του μεταξώματος τα φυτά ψεκάστηκαν με ψεκαστήρα πλάτης με τα παρακάτω σκευάσματα: Mycostop®, Trianum®, Switch®, Agri-fos 600®, Ζεόλιθος με ψεκάσμο σε όλο το ύψος του φυτού. Οι συγκεντρώσεις των σκευασμάτων ήταν αυτές που αναγράφονται στην εκάστοτε ετικέτα (Πίν. 5). Επιπλέον, δοκιμάστηκε και ένα μη-τοξικογόνο στέλεχος του *A. flavus* με εφαρμογή με αιώρημα κονιδίων. Η δεύτερη εφαρμογή των σκευασμάτων έγινε μαζί με το αιώρημα κονιδίων του τοξικογόνου στελέχους 12S του *A. flavus* με ένεση στον κάθε σπάδικα με ποσότητα 5 ml εκ των οποίων τα 2 ml εισήχθησαν από την κορυφή του σπάδικα (μετάξωμα) και τα υπόλοιπα στο κέντρο του. Όλοι οι σπάδικες καλύφθηκαν με χάρτινη σακούλα για 2 ημέρες για την εξασφάλιση ανάπτυξης του μύκητα και την παραγωγή τοξίνης. Αφού τα φυτά είχαν πλήρως ξηρανθεί (15%-18% υγρασία) περί τα μέσα του Σεπτεμβρίου, οι σπάδικες συγκομίστηκαν και οι σπόροι καλαμποκιού απομακρύνθηκαν από τους σπάδικες με ειδικό μηχάνημα και φυλάχθηκαν στους 5° C σε σακούλες. 20 gr σπόρων από κάθε εφαρμογή λειοτριβήθηκαν με μίξερ και εκχυλίστηκαν με διαλύτη μεθανόλη αραιωμένη με νερό σε αναλογία 70/30. Αφέθηκαν στο διαλύτη για 3 λεπτά με έντονη ανάδευση και έπειτα αφέθηκαν σε γυάλινο σκεύος για να απομονωθεί η τοξίνη. Η διαδικασία αυτή έγινε για να αναλυθούν οι τοξίνες με τη μέθοδο ELISA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δράση ειδικών αντισωμάτων που δεσμεύουν την αφλατοξίνη. Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιγράφεται στο kit Agra-quant Aflatoxin 4-40 ppb και έχει ως εξής: αφού τα δείγματα ρυθμιστούν ώστε το pH να είναι μεταξύ 6-8 με NaOH, τοποθετούμε στα αντίστοιχα strips 100 ml κάθε δείγματος και 100 ml από κάθε standard (καθαρό διάλυμα αφλατοξίνης με συγκεκριμένη συγκέντρωση) που περιέχεται στο kit (περιέχονται standards με 0, 4, 10, 20, 40 ppb). Προστέθηκαν επίσης 200 ml από το conjugate buffer και αναδεύθηκαν με την πιπέττα. Μεταφέρθηκαν 100 ml από το διάλυμα αυτό στα antibody strips που περιέχονται και τα αφέθηκαν για 15 λεπτά σε συνθήκες δωματίου. Απορρίφθηκε η ποσότητα που

υπάρχει σε κάθε θέση και έγιναν πλύσεις με νερό. Η πρώτη διήρκεσε 5 λεπτά και οι υπόλοιπες 4 που ακολούθησαν διήρκεσαν 3 λεπτά. Προστέθηκαν 100 μl από το substrate buffer και αφέθηκαν σε συνθήκες δωματίου για 5 λεπτά. Τέλος, προστέθηκαν 100 μl από το stop solution buffer και η πλάκα τοποθετήθηκε σε φωτόμετρο ELISA για να αποδοθούν αριθμητικά οι αντίστοιχες τιμές απορρόφησης που μετατράπηκαν σε τιμές αφλατοξίνης σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς που δημιουργήθηκε.

### 3.10. Τελικό πείραμα αγρού

Με παρόμοια διαδικασία, έγινε ένα επαναληπτικό πείραμα αγρού στο οποίο ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία και εφαρμόστηκαν τα σκευάσματα Geoxe®, Chorus®, Cantus®, Laminarine®, Botector®, Quadris®, Mycostop®. Η μόνη διαφορά είναι πως στη δεύτερη φορά οι εφαρμογές των σκευασμάτων έγιναν και τις 2 φορές με ψεκασμό του σπάδικα και του φυλλώματος. Οι υπόλοιπες διεργασίες είναι ακριβώς ίδιες όπως στην παράγραφο 3.9.



Εικ. 22. Αγρός Γ.Π.Α. με την καλλιέργεια καλαμποκιού

### 3.11. Αξιολόγηση ποικιλιών DECALB ως προς την ανθεκτικότητά τους στην παραγωγή αφλατοξίνης και την ικανότητά τους στην παρεμπόδιση ανάπτυξης κονιδίων

Οι ποικιλίες καλαμποκιού DKC6728, DKC6340, DKC6795, DKC6724, DKC5276 και DKC6815 της εταιρίας DECALB αξιολογήθηκαν *in vitro* ως προς την ανθεκτικότητά τους στην παραγωγή αφλατοξίνης έπειτα από μόλυνση με το τοξικογόνο στέλεχος καλαμποκιού A 6.10 του *A.flavus*. Αρχικά οι σπόροι καλαμποκιού απολυμάνθηκαν με εμβάπτιση 10 λεπτών σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 10%, ακολούθησε πλύση με αποστειρωμένο νερό, 3 λεπτά εμβάπτιση σε διάλυμα 70% αιθανόλης και τελική πλύση με αποστειρωμένο νερό. Δημιουργήθηκε αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης  $10^6$  κον/ml και τοποθετήθηκε σταγόνα 10 μl σε κάθε σπόρο. 10 σπόροι από κάθε ποικιλία (σε τρεις επαναλήψεις) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με 3 ml αποστειρωμένο νερό και αφέθηκαν για 6 ημέρες σε θερμοκρασία 28° C για να αξιολογηθεί η ανάπτυξη κονιδίων. Για την παραγωγή αφλατοξίνης, 20 γραμμάρια από την κάθε ποικιλία τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες και μολύνθηκαν με αιώρημα κονιδίων ίδιας συγκέντρωσης. Για κάθε κωνική φιάλη χρειάστηκαν 20 ml αιωρήματος κονιδίων. Οι κωνικές με το αιώρημα κονιδίων και τους σπόρους αφέθηκαν για έντονη ανάπτυξη για

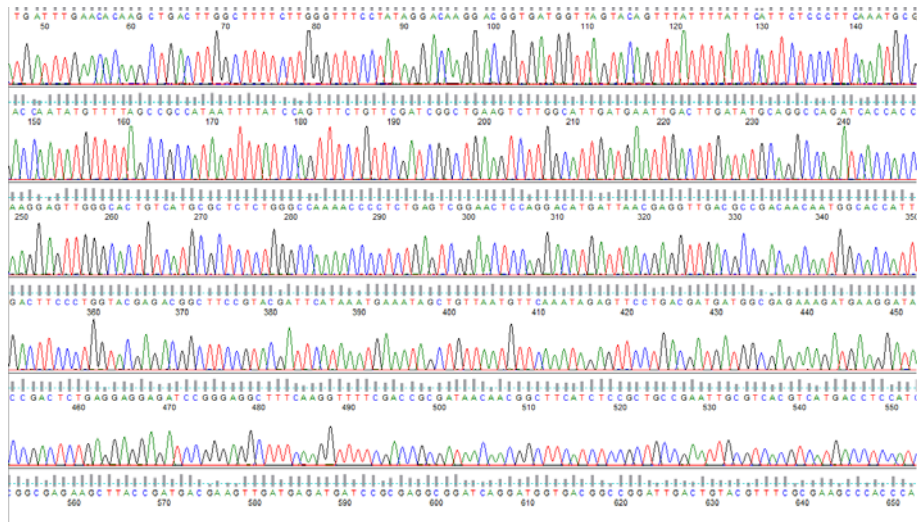
μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, το αιώρημα κονιδίων απομακρύνθηκε και οι φιάλες αφέθηκαν για 13 ημέρες στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 28° C για παραγωγή τοξίνης. Οι σπόροι κονιορτοποιήθηκαν και αφού εκχυλίστηκαν με 70% μεθανόλη για δέσμευση τοξίνης, ελέγχθηκε η ικανότητά τους για παρεμπόδιση στην παραγωγή αφλατοξίνης με τη μέθοδο ELISA (παρ. 3.9).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Αποτελέσματα αλληλούχισης

Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης καθώς και η BLAST analysis της καλμοντουλίνης που έγινε με το πρόγραμμα Finch TV των τριών τοξικογόνων στελεχών A 6.10, 12S, Δ 1.3. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στο είδος *A. flavus* (Εικ. 23-28).

#### 1) A 6.10



**Εικ. 23.** Χρωματογράφημα της αλληλουχίας της καλμοντουλίνης του στελέχους A 6.10 του μύκητα *A. flavus*

Aspergillus flavus strain NRRL 21882 calmodulin A (cmdA) gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|AY974341.1](#) Length: 1115 Number of Matches: 1

Range 1: 232 to 948 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Prev

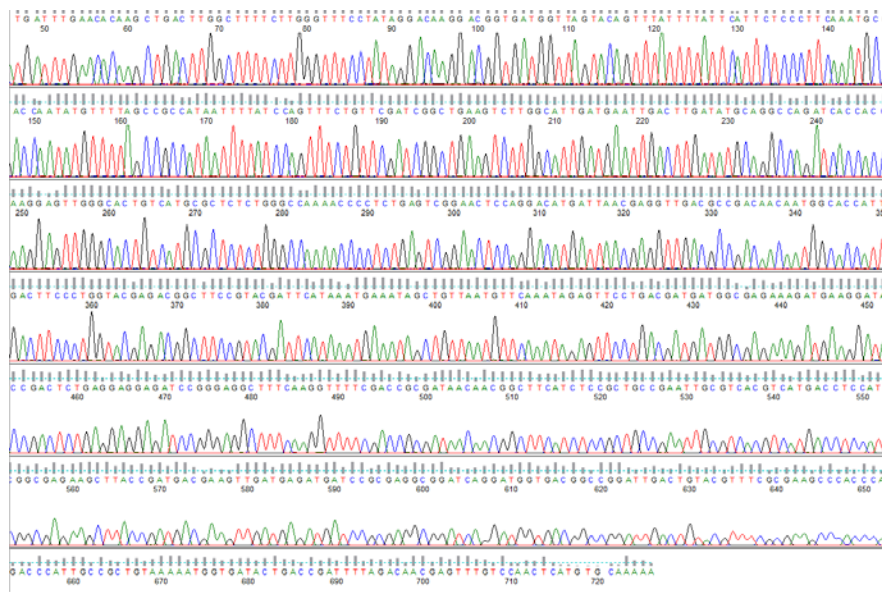
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1267 bits(1404)	0.0	709/717(99%)	0/717(0%)	Plus/Plus
Query	12		TWTCGYCRITCGTGAAAATGGTITTTGTTAGTCGTCATGATTTGAACACAAGCTGACTTG		71
Sbjct	232		TATCGTCGTCGTCGAAAATGGTITTTGTTAGTCGTCATGATTTGAACACAAGCTGACTTG		29
Query	72		GCTTTCCTGGGTTTCCTATAGGACAAGGACGGTGATGGTTAGTACAGTTTATTTTATTCA		13
Sbjct	292		GCTTTCCTGGGTTTCCTATAGGACAAGGACGGTGATGGTTAGTACAGTTTATTTTATTCA		35
Query	132		TTCGCCITCAAATGCGACCAATATGTTTTAGCCGCCATAAATTTTATCCAGTITTCGTGTC		19
Sbjct	352		TTCGCCITCAAATGCGACCAATATGTTTTAGCCGCCATAAATTTTATCCAGTITTCGTGTC		41
Query	192		GATCGGCTGAAGTCTTGCCATTGATGAATTGACTTGATATGCAGGCCAGATCACCACCAA		25
Sbjct	412		GATCGGCTGAAGTCTTGCCATTGATGAATTGACTTGATATGCAGGCCAGATCACCACCAA		47
Query	252		GGAGTGGGCACTGTCAITGCGCTCTCTGGGCCAAAACCCCTCTGAGTCGGAACTCCAGGA		31
Sbjct	472		GGAGTGGGCACTGTCAITGCGCTCTCTGGGCCAAAACCCCTCTGAGTCGGAACTCCAGGA		53
Query	312		CATGATTAAACGAGGTTGACGCCGACAACAATGGCACCATTGACTTCCCTGGTACGAGACG		37
Sbjct	532		CATGATTAAACGAGGTTGACGCCGACAACAATGGCACCATTGACTTCCCTGGTACGAGACG		59
Query	372		GCTTCCGTACGATTCATAAATGAAATAGCTGTTAATGTTCAAATAGAGTTCCTGACGATG		43
Sbjct	592		GCTTCCGTACGATTCATAAATGAAATAGCTGTTAATGTTCAAATAGAGTTCCTGACGATG		65
Query	432		ATGCGGAGAAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAGGCTTTCAGGTT		49
Sbjct	652		ATGCGGAGAAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAGGCTTTCAGGTT		71
Query	492		TTCGACCGCGATAACAACGGCTTCAITCTCCGCTGCCGAATTCGGTACCGTCAITGACCTCC		55
Sbjct	712		TTCGACCGCGATAACAACGGCTTCAITCTCCGCTGCCGAATTCGGTACCGTCAITGACCTCC		77
Query	552		ATCGCGGAGAAGCTTACCGATGACGAAGTTGATGAGATGATCCGCGAGGCGGATCAGGAT		61

**Εικ. 24.** Αλληλουχία της καλμοντουλίνης του τοξικογόνου στελέχους A 6.10 του μύκητα *A. flavus*





3) Δ 1.3



Εικ. 27. Χρωματογράφημα της καλμοντουλίνης του στελέχους Δ 1.3 του μύκητα *A. flavus*

Aspergillus flavus strain NRRL 21882 calmodulin A (cmdA) gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|AY974341.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gb|AY974341.1) Length: 1115 Number of Matches: 1

Range 1: 232 to 948 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

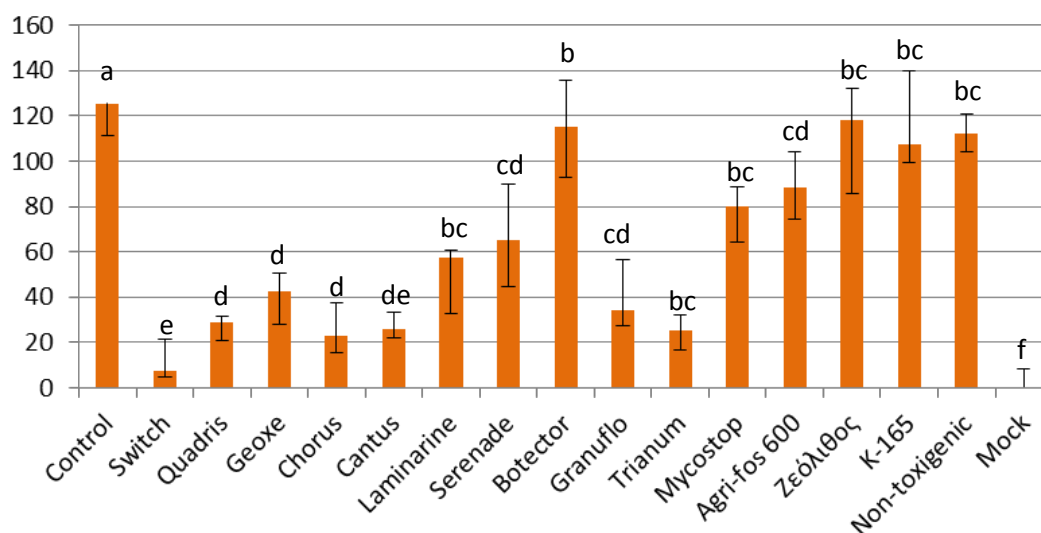
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1272 bits(1410)	0.0	712/717(99%)	1/717(0%)	Plus/Plus
Query	10		TWTCGTCGTTTCGTA...		69
Sbjct	232		TATCGTCGTTTCGTA...		291
Query	70		GCTTTCCTGGGTTTC...		129
Sbjct	292		GCTTTCCTGGGTTTC...		351
Query	130		TTCCTCCCTTCAAAT...		189
Sbjct	352		TTCCTCCCTTCAAAT...		411
Query	190		GATCGGCTGAAGTCT...		249
Sbjct	412		GATCGGCTGAAGTCT...		471
Query	250		GGAGTGGGCACTGTC...		309
Sbjct	472		GGAGTGGGCACTGTC...		531
Query	310		CATGATTAACGAGGT...		369
Sbjct	532		CATGATTAACGAGGT...		591
Query	370		GCTTCCGTACGATTCA...		429
Sbjct	592		GCTTCCGTACGATTCA...		651
Query	430		ATGGCGAGAAAGATGA...		489
Sbjct	652		ATGGCGAGAAAGATGA...		711
Query	490		TTCGACCGGATAACA...		549
Sbjct	712		TTCGACCGGATAACA...		771
Query	550		ATCGGCGAGAAGCTT...		609
Sbjct	772		ATCGGCGAGAAGCTT...		831
Query	610		GGTGACGGCCGGATT...		669
Sbjct	832		GGTGACGGCCGGATT...		891
Query	670		AAATGGTGATACTGAC...		725
Sbjct	892		AAATGGTGATACTGAC...		948

Εικ. 28. Αλληλουχία της καλμοντουλίνης του τοξικογόνου στελέχους Δ 1.3 του μύκητα *A. flavus*

## 4.2. *In vitro* αξιολόγηση των σκευασμάτων στην παρεμπόδιση σποριοποίησης του *A.flavus*

### 1) Στέλεχος Δ 1.3 *A.flavus*

Παρακάτω παρατίθεται διάγραμμα (Διάγραμμα 1) στο οποίο φαίνεται η ανάπτυξη κονιδίων σε σπόρους καλαμποκιού της ποικιλίας N8 έπειτα από εμφάνισή τους σε αιωρήματα των εμπορικών σκευασμάτων που αναφέρθηκαν ανωτέρω (Πίνακας 5) και μόλυνσή τους μετά από 24 ώρες με το τοξικογόνο στέλεχος του *A.flavus* Δ 1.3 (απομόνωση φιστικιάς). Η μέτρηση κονιδίων έγινε 6 ημέρες μετά την μόλυνση. Το πείραμα έγινε σε τρεις επαναλήψεις και η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα StatGraphics με βάση τη μέθοδο ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Διάγραμμα 1.** Μέτρηση κονιδίων του μύκητα *A.flavus* (στέλεχος Δ 1.3) την 6η ημέρα μετά τη μόλυνση.

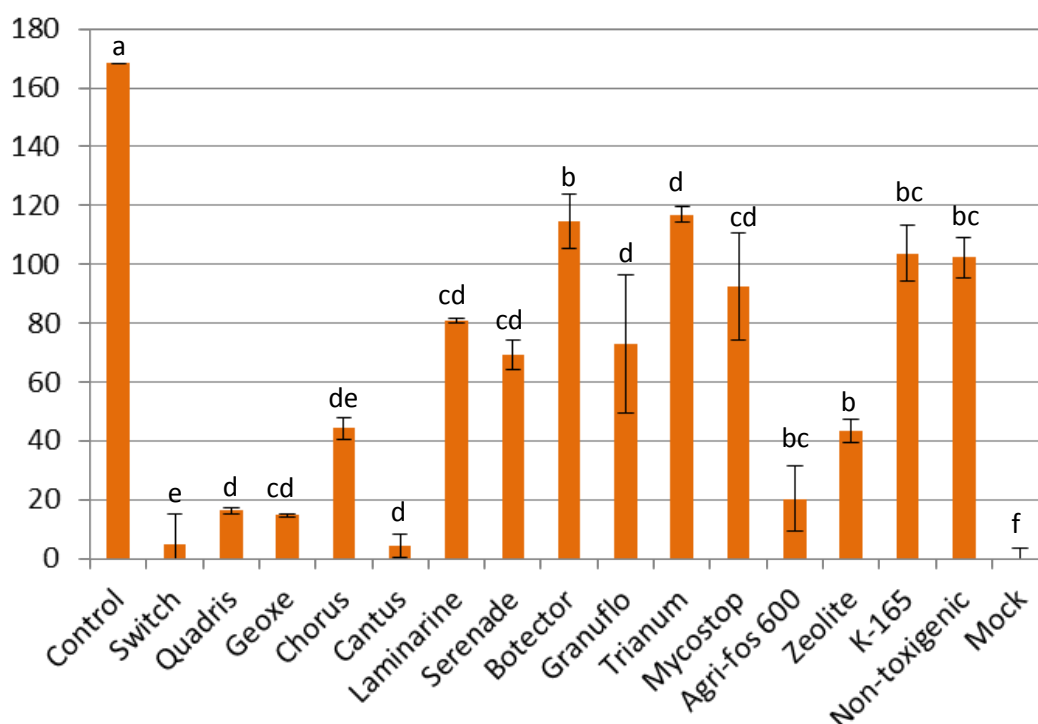
Από το διάγραμμα μέτρησης κονιδίων φαίνεται ότι όλα τα χημικά σκευάσματα παρεμπόδισαν σε μεγάλο ποσοστό τη σποριοποίηση του μύκητα. Όσον αφορά το χημικό σκεύασμα Switch, φαίνεται ότι είναι αποτελεσματικότερο από όλα τα υπόλοιπα σκευάσματα παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα χημικά. Τα βιολογικά σκευάσματα παρεμποδίζουν και αυτά την κονιδιογένεση διαφέροντας στατιστικά σημαντικώς από το μάρτυρα πιο αποτελεσματικά των επεμβάσεων με το σκεύασμα Agri-fos 600® και το Serenade Max®. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα που παρουσιάζει το σκεύασμα Switch® οφείλονται στη συνδυαστική δράση των δραστικών ουσιών από τις οποίες αποτελείται: fludioxonil-boscalid.



**Εικ. 29.** *In vitro* αξιολόγηση βιολογικών και χημικών σκευασμάτων. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται οι περιπτώσεις του μάρτυρα, του χημικού σκευάσματος Switch® και Agri-fos 600® αντίστοιχα.

## 2) Στέλεχος 12S *A.flavus*

Στο διάγραμμα 2 φαίνεται η ανάπτυξη κονιδίων σε σπόρους καλαμποκιού της ποικιλίας N8 έπειτα από εμφύπτυσή τους σε αιωρήματα των εμπορικών σκευασμάτων που αναφέρθηκαν ανωτέρω (Πίνακας 5) και μόλυνσή τους μετά από 24 ώρες με το τοξικογόνο στέλεχος του *A.flavus* 12S (απομόνωση από βαμβακόσπορο). Η μέτρηση κονιδίων έγινε 6 ημέρες μετά την μόλυνση. Το πείραμα έγινε σε τρεις επαναλήψεις και η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα StatGraphics με βάση τη μέθοδο ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Διάγραμμα 2.** Μέτρηση κονιδίων του μύκητα *A.flavus* (στέλεχος 12S) την 6η ημέρα μετά τη μόλυνση.

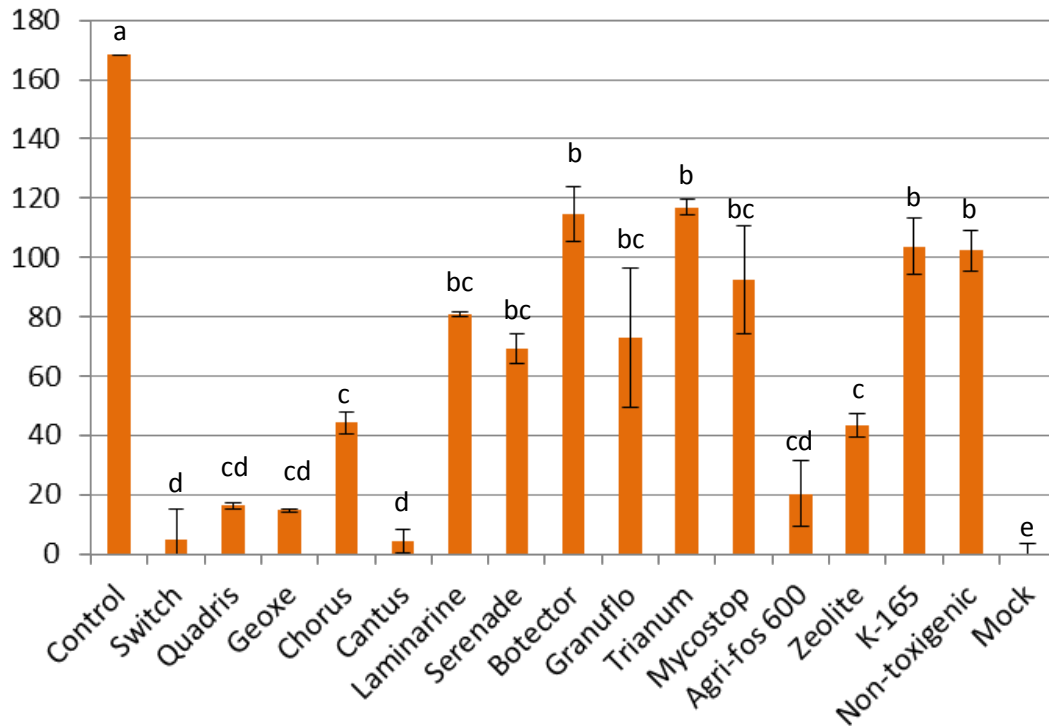
Στο διάγραμμα μέτρησης κονιδίων (Διάγραμμα 2) του συγκεκριμένου στελέχους τα καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζουν τα χημικά σκευάσματα ακόμη μια φορά, με την περίπτωση του Switch να ξεχωρίζει. Τα καλύτερα αποτελέσματα από τα βιολογικά σκευάσματα παρουσιάστηκαν από τα Trianum® και Laminarine®. Το Trianum οφείλει τη δράση του και συνεπώς τα αποτελέσματά του στο μύκητα *Trichoderma harzianum* ο οποίος ανταγωνίζεται σε χώρο και θρεπτικά το παθογόνο. Και σε αυτήν την περίπτωση πρέπει να επισημανθεί η έντονη διαφορά που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα του Switch με αυτά του μάρτυρα.



**Εικ. 30.** *In vitro* αξιολόγηση βιολογικών και χημικών σκευασμάτων. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται οι περιπτώσεις του μάρτυρα, του χημικού σκευάσματος Switch® και Trianum® αντίστοιχα.

### 3) Στέλεχος A 6.10 *A.flavus*

Στο διάγραμμα 3 φαίνεται η ανάπτυξη κονιδίων σε σπόρους καλαμποκιού της ποικιλίας N8 έπειτα από εμφύτευσή τους σε αιωρήματα των εμπορικών σκευασμάτων που αναφέρθηκαν ανωτέρω (Πίνακας 5) και μόλυνσή τους μετά από 24 ώρες με το τοξικογόνο στέλεχος A 6.10 *A.flavus* (απομόνωση καλαμποκιού). Η μέτρηση κονιδίων έγινε 6 ημέρες μετά την μόλυνση. Το πείραμα έγινε σε τρεις επαναλήψεις και η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα StatGraphics με βάση τη μέθοδο ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Διάγραμμα 3.** Μέτρηση κονιδίων του μύκητα *A.flavus* (στέλεχος A 6.10) την 6η ημέρα μετά τη μόλυνση.

Τα καλύτερα αποτελέσματα και σε αυτή την περίπτωση παρουσιάστηκαν από τα χημικά σκευάσματα και συγκεκριμένα, τα Switch® και Cantus® μείωσαν και πάλι σε μεγάλο ποσοστό την ανάπτυξη κονιδίων. Το βιολογικό σκεύασμα με τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν το Agri-fos 600®, καθώς παρεμπόδισε την ανάπτυξη κονιδίων σε σημείο ώστε το αποτέλεσμα να θεωρείται όμοιο με αυτά των χημικών σκευασμάτων. Σε αυτήν την περίπτωση ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρουσιάζει και ο ζεολίθος καθώς μειώνει αρκετά την παραγωγή κονιδίων. Η δράση του αυτή πιθανώς οφείλεται στις φυσικές του ιδιότητες για κάλυψη του σπόρου, παρεμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη κονιδίων του συγκεκριμένου στελέχους.

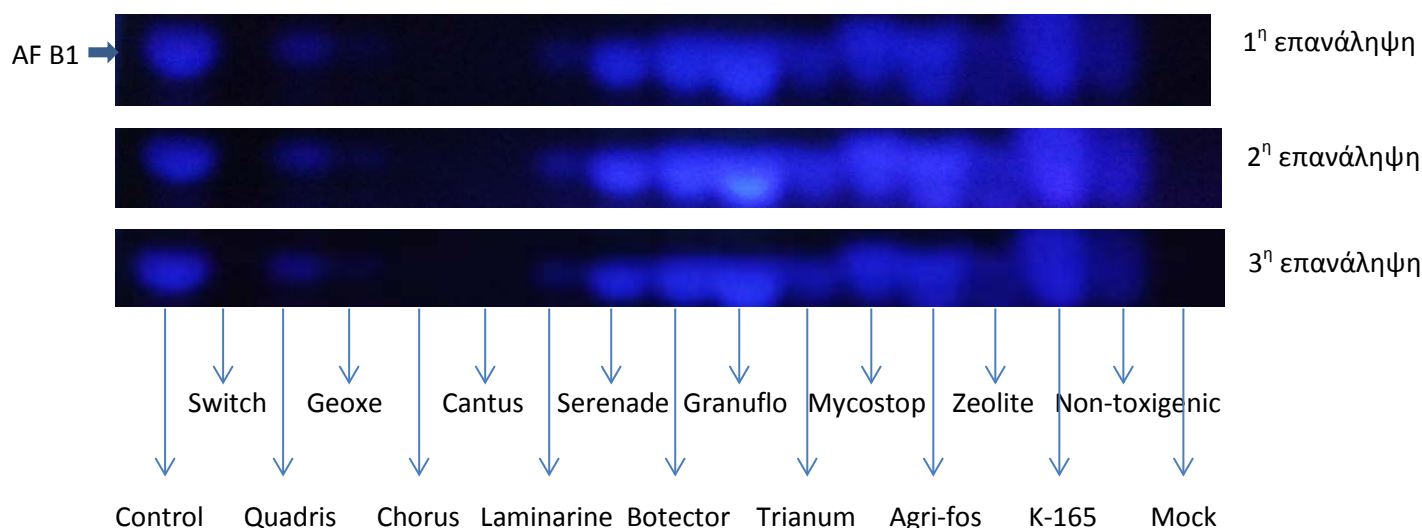


**Εικ. 31.** *In vitro* αξιολόγηση βιολογικών και χημικών σκευασμάτων. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται οι περιπτώσεις του μάρτυρα, του χημικού σκευάσματος Switch® και ζεολίθου αντίστοιχα.

### 4.3. *In vitro* αξιολόγηση των σκευασμάτων στην παρεμπόδιση ανάπτυξης αφλατοξίνης/μέθοδος TLC

#### 1) Στέλεχος Δ 1.3 *A.flavus*

Παρακάτω (Εικ. 32) φαίνεται η δοκιμή χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) στην οποία ελέγχθηκε η παρουσία αφλατοξίνης σε σπόρους καλαμποκιού μετά από μόλυνσή τους με το τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα *A.flavus* Δ 1.3. Οι σπόροι καλαμποκιού είχαν τοποθετηθεί σε κωνικές φιάλες και 24 ώρες πριν τη μόλυνση είχαν εμβαιπιστεί στα προαναφερθέντα εμπορικά σκευάσματα (Πίνακας 5). Μετά από 13 ημέρες παραμονής στο σκοτάδι, οι σπόροι κονιορτοποιήθηκαν και με τη χρήση πολικών διαλυτών έγινε εκχύλιση της αφλατοξίνης που είχε παραχθεί στην κάθε περίπτωση. Για την δοκιμή TLC χρησιμοποιήθηκαν 10 μl διαλύματος από την κάθε εφαρμογή και μετά την ανάπτυξη των διαφορετικών εφαρμογών έγινε οπτικοποίηση της πλάκας TLC με UV.

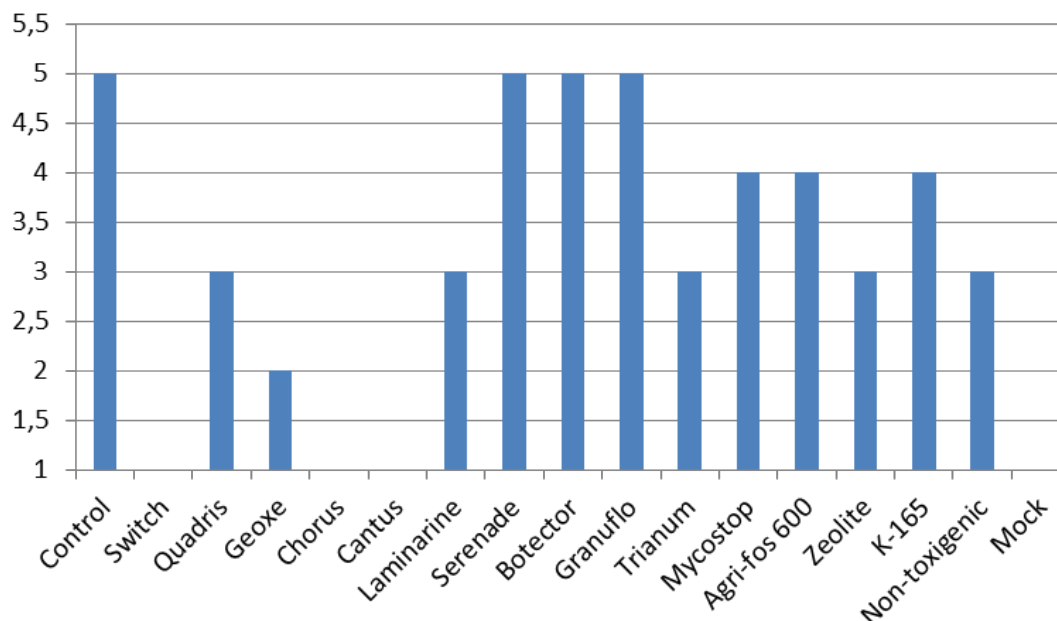


**Εικ. 32.** Δοκιμή TLC για την αποτελεσματικότητα των ανωτέρω σκευασμάτων στην παρεμπόδιση αφλατοξίνης μετά από μόλυνση με το τοξικογόνο στέλεχος Δ 1.3 του μύκητα *A.flavus*.

Στην δοκιμή χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας φαίνεται η ένταση και η παρουσία ή όχι της παραγόμενης αφλατοξίνης. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται ως ποιοτική καθώς δεν μας δίνει αριθμητικό αποτέλεσμα αλλά μόνο μας διευκρινίζει την παρουσία ή όχι των τοξινών.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στη πλάκα αυτή έγινε με αριθμητική κλίμακα (1-5) όπου συγκρίνεται η ένταση της κάθε ζώνης-κηλίδας μεταξύ όλων των δειγμάτων. Η αριθμητική κλίμακα ορίστηκε από το 1 έως το 5, με το 1 να δηλώνει πλήρη απουσία τοξίνης (0%), το 2 να δηλώνει παρουσία τοξίνης από 1%-25%, το 3 από 26%-50%, το 4 από 51%-75% και το 5 να δηλώνει έντονη παρουσία (100%) συγκριτικά με το μάρτυρα. Έτσι, στην θέση 1 με πλήρη απουσία τοξίνης έχουμε τα χημικά σκευάσματα Switch®, Chorus®, Cantus® με αποτελέσματα φαινομενικά ίδια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα, στη θέση 2 έχουμε το χημικό σκεύασμα Geoxe® με αρκετά ασθενή ζώνη, στη θέση 3, τα σκευάσματα Quadris®, Laminarine®, Trianum®, ζεόλιθος, και το μη-τοξικογόνο στέλεχος του

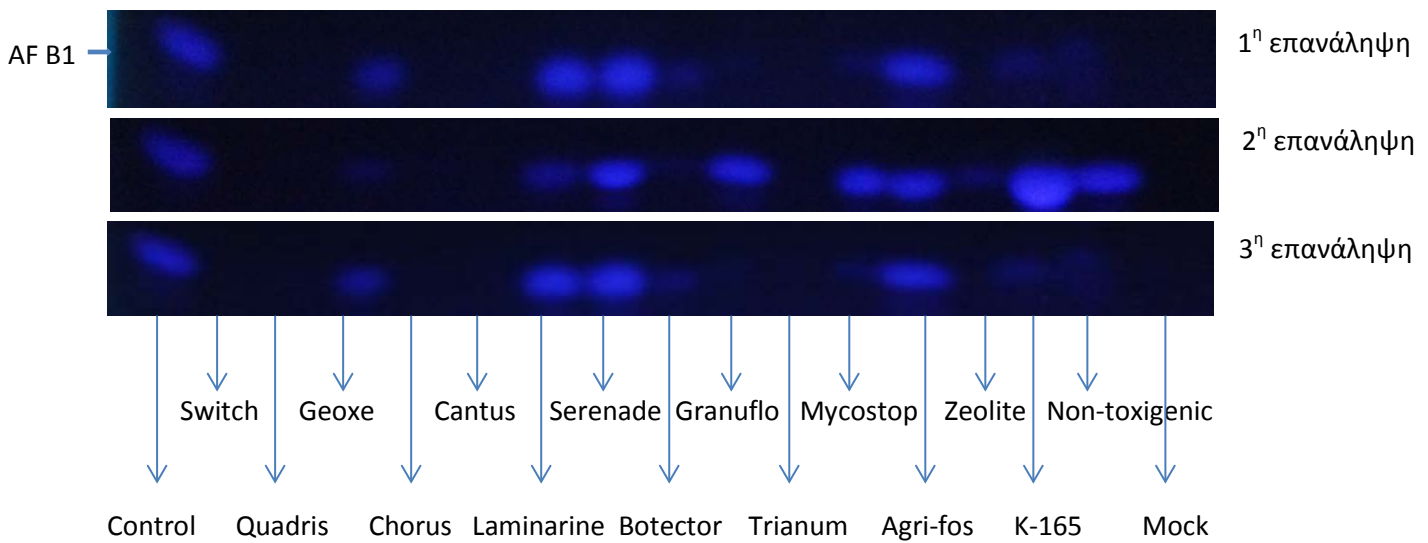
μύκητα, στη θέση 4 έχουμε τα σκευάσματα Mycostop®, Agri-fos 600® και τη δοκιμή με το βακτήριο *Paenibacillus alvei* K-165 και τέλος στην θέση 5 με την πιο έντονη ζώνη έχουμε τα σκευάσματα Serenade Max®, Botector®, Granuflo® που φαινομενικά έχουν παρόμοια αποτελέσματα με το μάρτυρα.



**Διαγρ. 4.** Ένταση ζωνών TLC με βάση αριθμητική κλίμακα από το 1-5 με το 1 να δηλώνει πλήρη απουσία τοξίνης και το 5 έντονη παρουσία για το στέλεχος Δ 1.3 του μύκητα *A.flavus*.

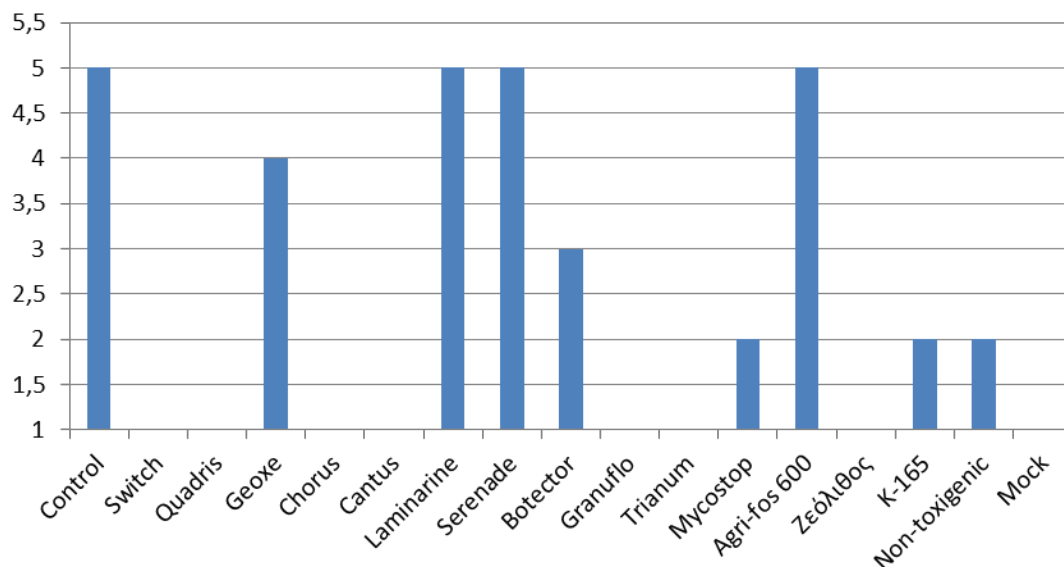
## 2) Στέλεχος 12S *A.flavus*

Παρακάτω (Εικ. 33) φαίνεται η δοκιμή χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) στην οποία ελέγχθηκε η παρουσία αφλατοξίνης σε σπόρους καλαμποκιού μετά από μόλυνσή τους με το τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα *A.flavus* 12S. Οι σπόροι καλαμποκιού είχαν τοποθετηθεί σε κωνικές φιάλες και 24 ώρες πριν τη μόλυνση είχαν εμβαπτιστεί στα προαναφερθέντα εμπορικά σκευάσματα (Πίνακας 4). Μετά από 13 ημέρες παραμονής στο σκοτάδι, οι σπόροι κονιορτοποιήθηκαν και με τη χρήση πολικών διαλυτών έγινε εκχύλιση της αφλατοξίνης που είχε παραχθεί στην κάθε περίπτωση. Για την δοκιμή TLC χρησιμοποιήθηκαν 10 μl διαλύματος από την κάθε εφαρμογή και μετά την ανάπτυξη των διαφορετικών εφαρμογών έγινε οπτικοποίηση της πλάκας TLC με UV.



**Εικ. 33.** Δοκιμή TLC για την αποτελεσματικότητα των ανωτέρω σκευασμάτων στην παρεμπόδιση αφλατοξίνης μετά από μόλυνση με το τοξικογόνο στέλεχος 12S του μύκητα *A.flavus*.

Ακολουθώντας την ίδια μέθοδο με πριν και έχοντας ως αναφορά την ίδια αριθμητική κλίμακα (1-5), έχουμε ανίσοιχα: στη βαθμίδα 1 τα σκευάσματα Switch®, Quadris®, Chorus®, Cantus®, Trianum® και ζεόλιθος με πλήρη απουσία τοξίνης. Στη δεύτερη βαθμίδα έχουμε το σκεύασμα Mycostop® και τις δοκιμές με τον βάκιλλο και το μη-τοξικογόνο στέλεχος. Στην τρίτη βαθμίδα έχουμε το σκεύασμα Botector®, στην τέταρτη το Geoxe® και στην πέμπτη βαθμίδα με την μεγαλύτερη ένταση μπάντας τα σκευάσματα Serenade, Laminarine®, Agri-fos 600® που φαινομενικά έχουν την ίδια ένταση ζώνης με το μάρτυρα.

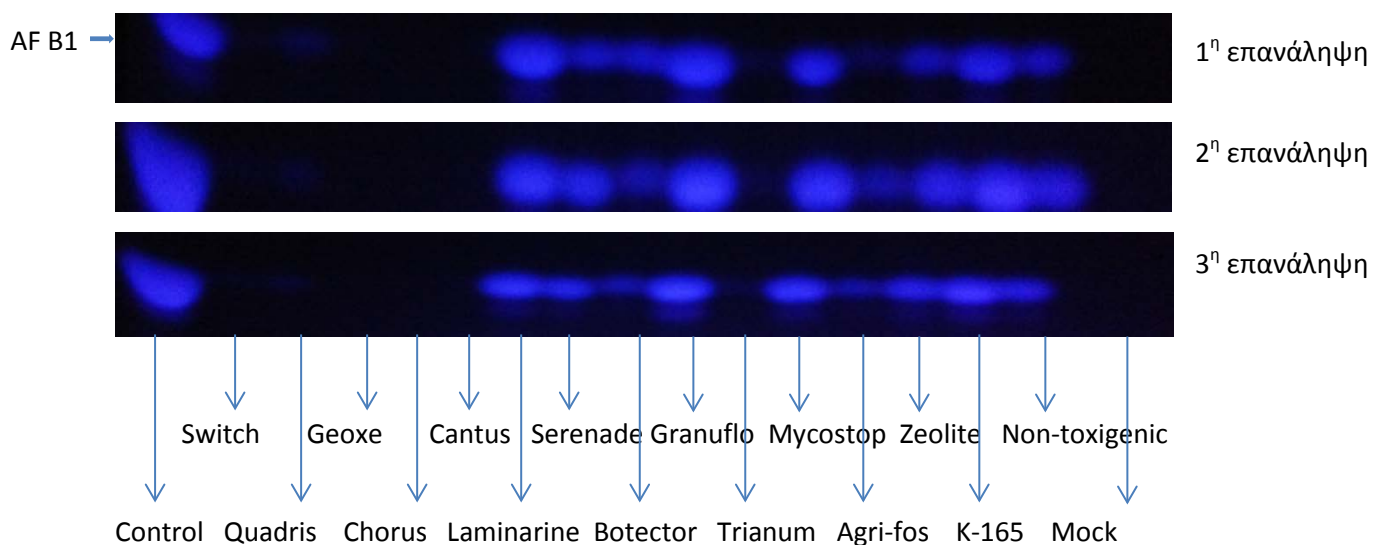


**Διαγρ. 5.** Ένταση ζωνών TLC με βάση αριθμητική κλίμακα από το 1-5 με το 1 να δηλώνει πλήρη απουσία τοξίνης και το 5 έντονη παρουσία για το στέλεχος 12S του μύκητα *A.flavus*



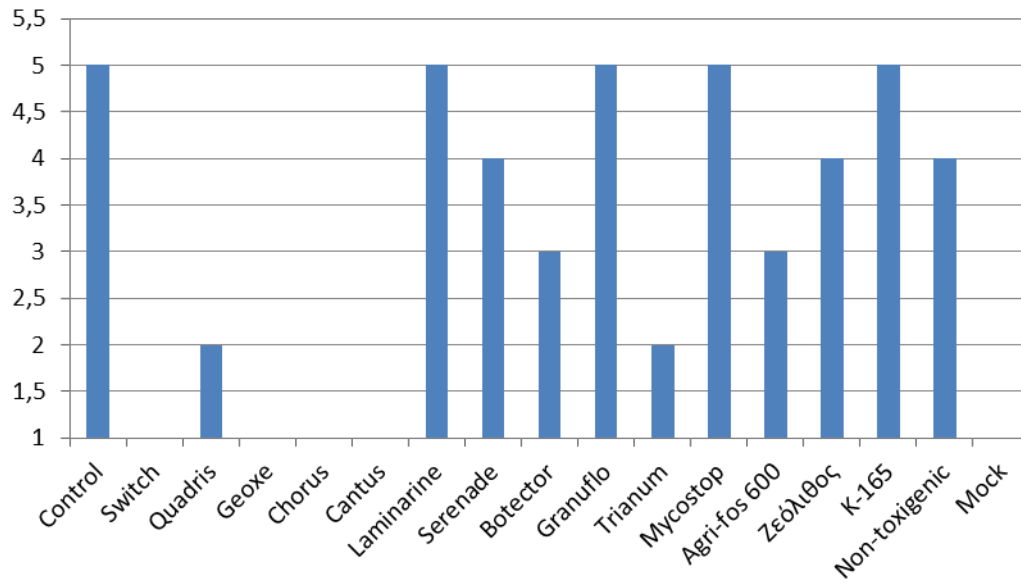
### 3) Στέλεχος A 6.10 *A.flavus*

Στην εικόνα 34 φαίνεται η δοκιμή χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) στην οποία ελέγχθηκε η παρουσία αφλατοξίνης σε σπόρους καλαμποκιού μετά από μόλυνσή τους με το τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα *A.flavus* A 6.10. Οι σπόροι καλαμποκιού είχαν τοποθετηθεί σε κωνικές φιάλες και 24 ώρες πριν τη μόλυνση είχαν εμβαπτιστεί στα προαναφερθέντα εμπορικά σκευάσματα (Πίνακας 3). Μετά από 13 ημέρες παραμονής στο σκοτάδι, οι σπόροι κονιορτοποιήθηκαν και με τη χρήση πολικών διαλυτών εκχυλίστηκε η αφλατοξίνη που είχε παραχθεί στην κάθε περίπτωση. Για την δοκιμή TLC χρησιμοποιήθηκαν 10 μl διαλύματος από την κάθε εφαρμογή.



**Εικ. 34.** Δοκιμή TLC για την αποτελεσματικότητα των ανωτέρω σκευασμάτων στην παρεμπόδιση αφλατοξίνης μετά από μόλυνση με το τοξικογόνο στέλεχος A 6.10 του μύκητα *A.flavus*.

Ακολουθώντας την ίδια μέθοδο όπως προηγουμένως και έχοντας ως αναφορά την ίδια αριθμητική κλίμακα (1-5), έχουμε ανίσοιχα: στη βαθμίδα 1 τα σκευάσματα Switch<sup>®</sup>, Geoxe<sup>®</sup>, Chorus<sup>®</sup>, Cantus<sup>®</sup>, στη δεύτερη βαθμίδα τα σκευάσματα Quadris<sup>®</sup> και Trianum<sup>®</sup>, στην τρίτη τα σκευάσματα Botector<sup>®</sup>, Agri-fos 600<sup>®</sup>, στη τέταρτη τα Serenade, zeolite και την εφαρμογή με το μη-τοξικογόνο στέλεχος και στην Πέμπτη θέση με την πιο έντονη ζώνη και συνεπώς τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αφλατοξίνης, τα Mycostop<sup>®</sup>, Granuflo<sup>®</sup>, Laminarine<sup>®</sup> και την εφαρμογή με τον βράκιλλο που ομοιάζουν σε ένταση με τον μάρτυρα.



**Διαγρ. 6.** Ένταση ζωνών TLC με βάση αριθμητική κλίμακα από το 1-5 με το 1 να δηλώνει πλήρη απουσία τοξίνης και το 5 έντονη παρουσία για το στέλεχος A 6.10 του μύκητα *A.flavus*

#### 4.4. Αξιολόγηση των βιολογικών σκευασμάτων στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα

Φωτογραφίες από αποικίες των βιολογικών σκευασμάτων



*Aureobasidium pullulans*



*Trichoderma harzianum*



*Paenibacillus alvei* K-165



*Bacillus subtilis* QST 713



*Streptomyces griseoviridis*

**Εικ. 35.** Αποικίες από τους βιολογικούς παράγοντες των ανωτέρω σκευασμάτων



Botector



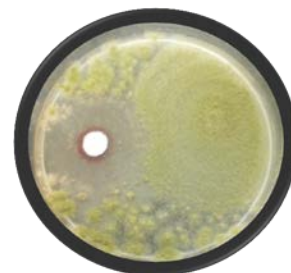
Trianum



*Paenibacillus alvei* K-165



Serenade Max

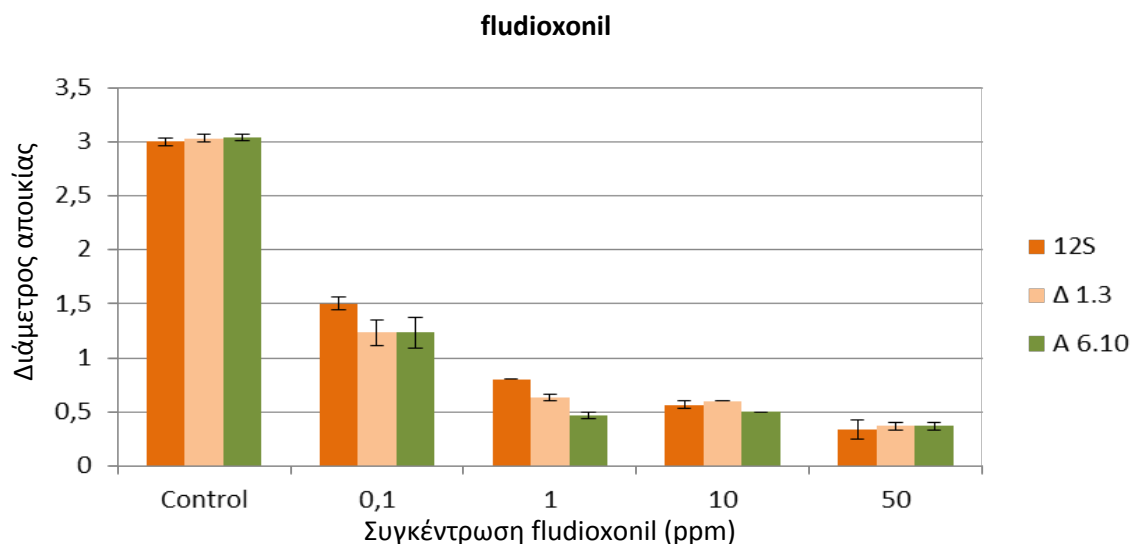


Mycostop

**Εικ. 36.** Παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου του μύκητα *A.flavus* (στέλεχος A 6.10), έπειτα από την επίδραση των βιολογικών παραγόντων στους οποίους βασίζονται τα σκευάσματα Mycostop®, Trianum® και Serenade Max®, Botector® και το βιολογικό ανταγωνιστή *Paenibacillus alvei* K-165.

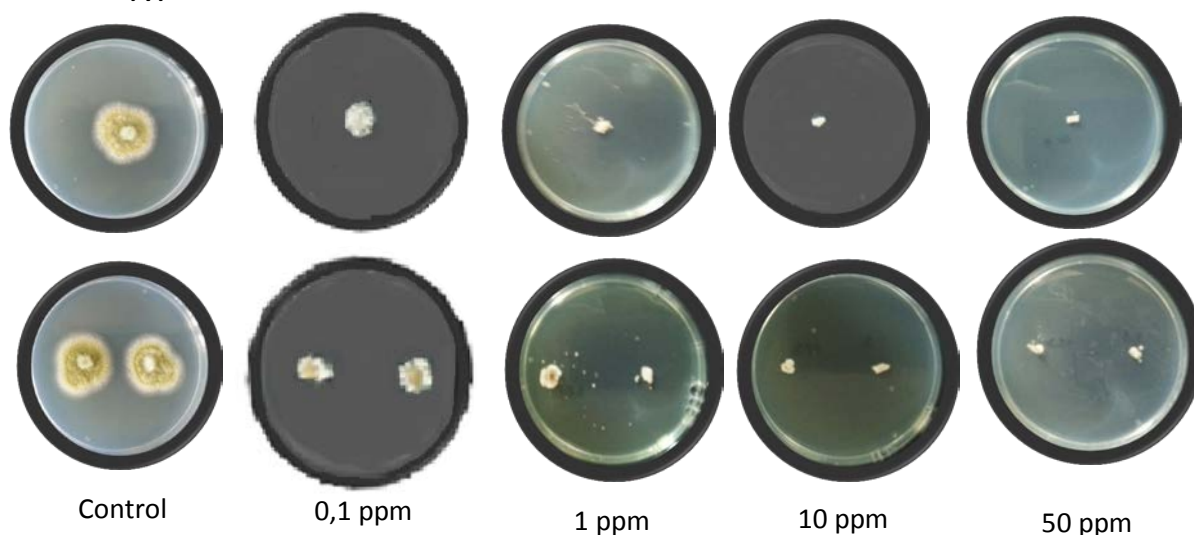
#### 4.5. Αξιολόγηση δραστικών ουσιών στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα

Στο διάγραμμα 7 φαίνεται η παρεμπόδιση ανάπτυξης του μυκηλίου έπειτα από την επίδραση της δραστικής ουσίας fludioxonil σε διάφορες συγκεντρώσεις για τα τρία στελέχη του *A. flavus*.



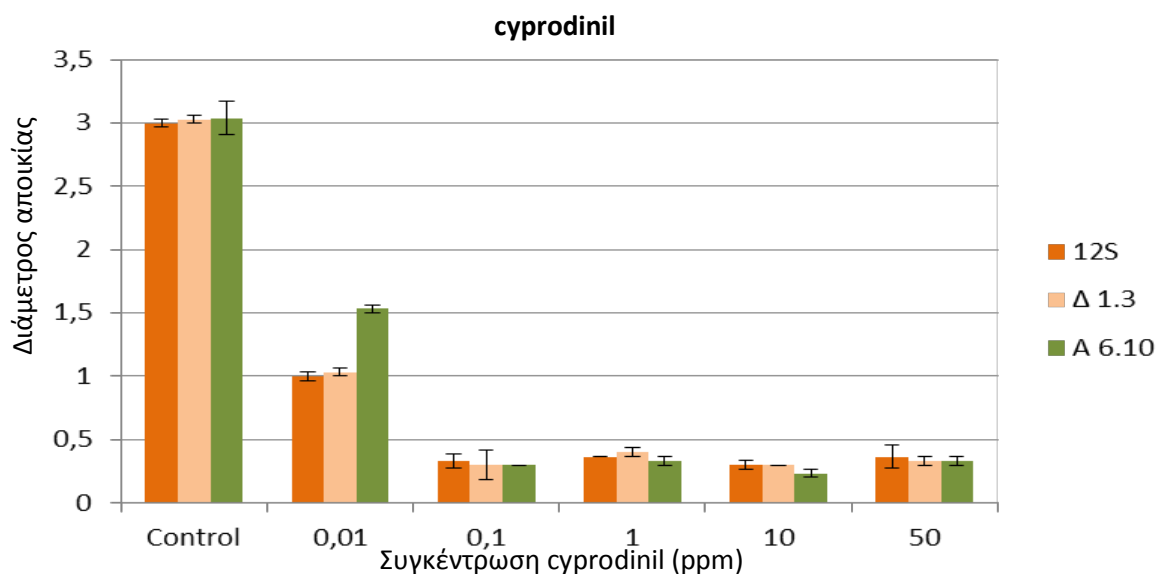
**Διάγρ. 7.** Ανάπτυξη διαμέτρου των μυκηλίων των στελεχών Δ 1.3, 12S, A 6.10 σε διάφορες συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας fludioxonil, την τρίτη ημέρα ανάπτυξής τους. Στις δοκιμές αυτές τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρεμπόδιση ανάπτυξης ξεπέρασε το 50% στις συγκεντρώσεις 1, 10, 50 ppm

**Φωτογραφίες παρεμπόδισης ανάπτυξης των στελεχών του μύκητα *A. flavus* σε θρεπτικό υλικό CZA με τα την προσθήκη της δραστικής ουσίας fludioxonil την τρίτη ημέρα ανάπτυξης**



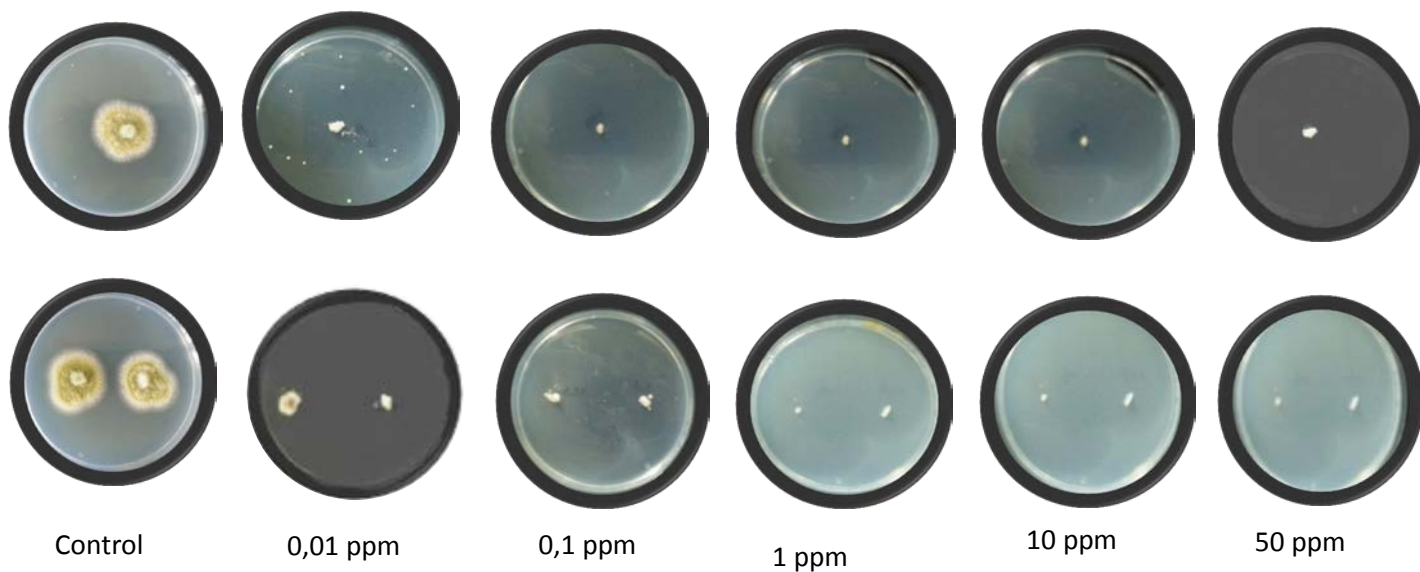
**Εικ. 37.** Παρεμπόδιση ανάπτυξης των στελεχών A 6.10 (πάνω σειρά) , Δ 1.3 (κάτω αριστερά) και 12S (κάτω δεξιά).

Στο διάγραμμα 8 φαίνεται η παρεμπόδιση ανάπτυξης του μυκηλίου έπειτα από την επίδραση της δραστικής ουσίας cyprodinil σε διάφορες συγκεντρώσεις για τα τρία στελέχη του *A. flavus*.



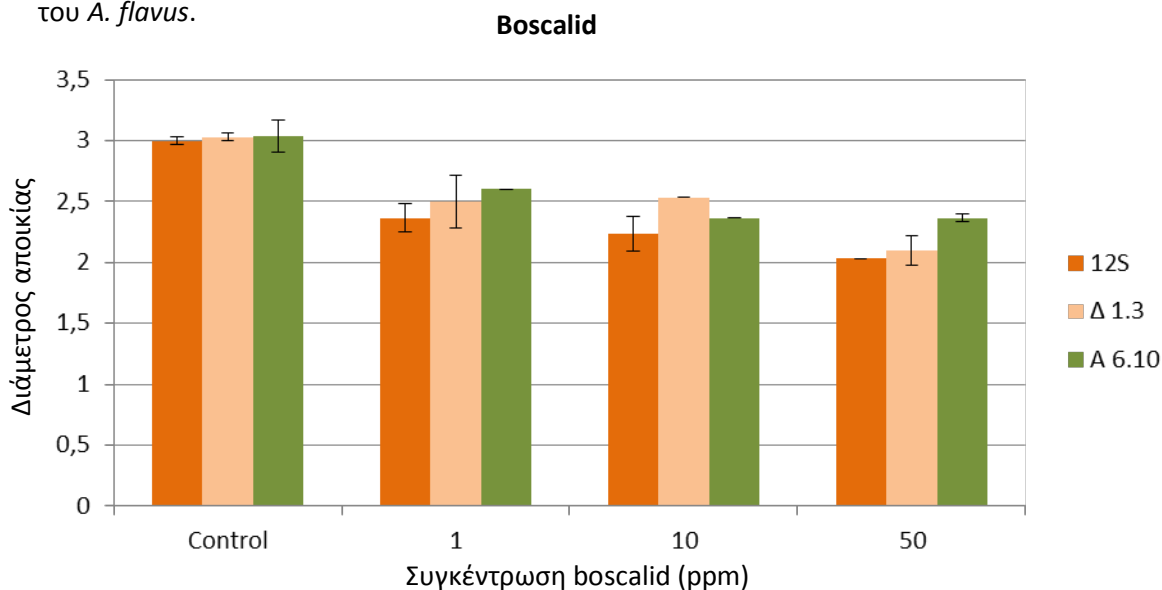
**Διάγρ. 8.** Ανάπτυξη διαμέτρου των μυκηλίων των στελεχών Δ 1.3, 12S, A 6.10 σε διάφορες συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας cyprodinil, την τρίτη ημέρα ανάπτυξής τους. Στις δοκιμές αυτές τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρεμπόδιση ανάπτυξης ξεπέρασε το 66% στις συγκεντρώσεις 0,01, 0,1, 1, 10, 50 ppm.

**Φωτογραφίες παρεμπόδισης ανάπτυξης των στελεχών του μύκητα *A. flavus* σε θρεπτικό υλικό CZA με τα την προσθήκη της δραστικής ουσίας cyprodinil την τρίτη ημέρα ανάπτυξης**



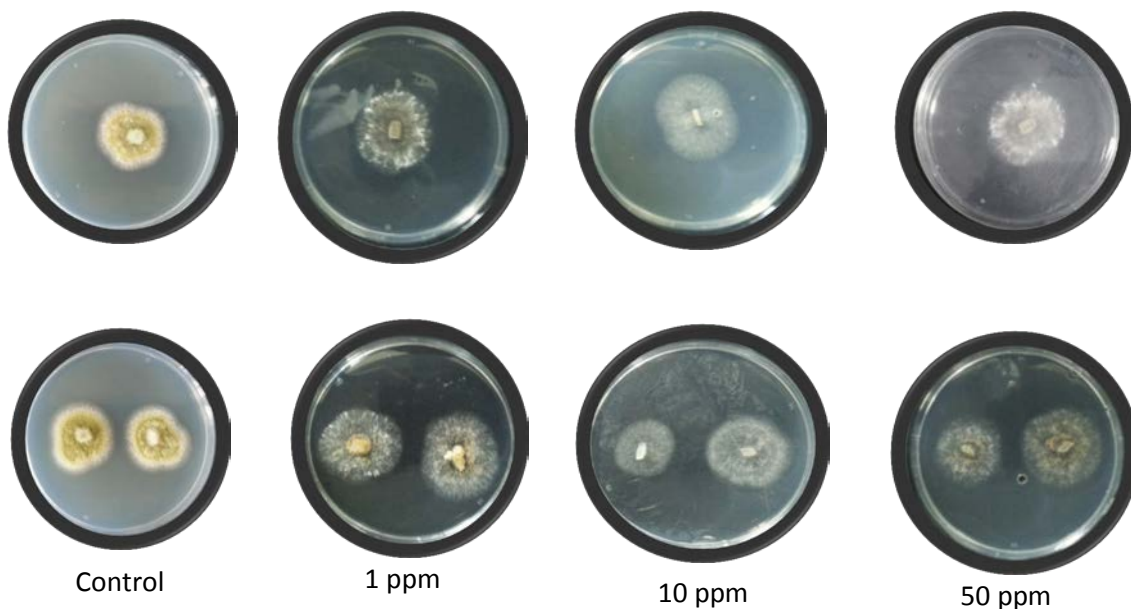
**Εικ. 38.** Παρεμπόδιση ανάπτυξης των στελεχών A 6.10 (πάνω σειρά) , Δ 1.3 (κάτω αριστερά) και 12S (κάτω δεξιά).

Στο διάγραμμα 9 φαίνεται η παρεμπόδιση ανάπτυξης του μυκηλίου έπειτα από την επίδραση της δραστικής ουσίας boscalid σε διάφορες συγκεντρώσεις για τα τρία στελέχη του *A. flavus*.



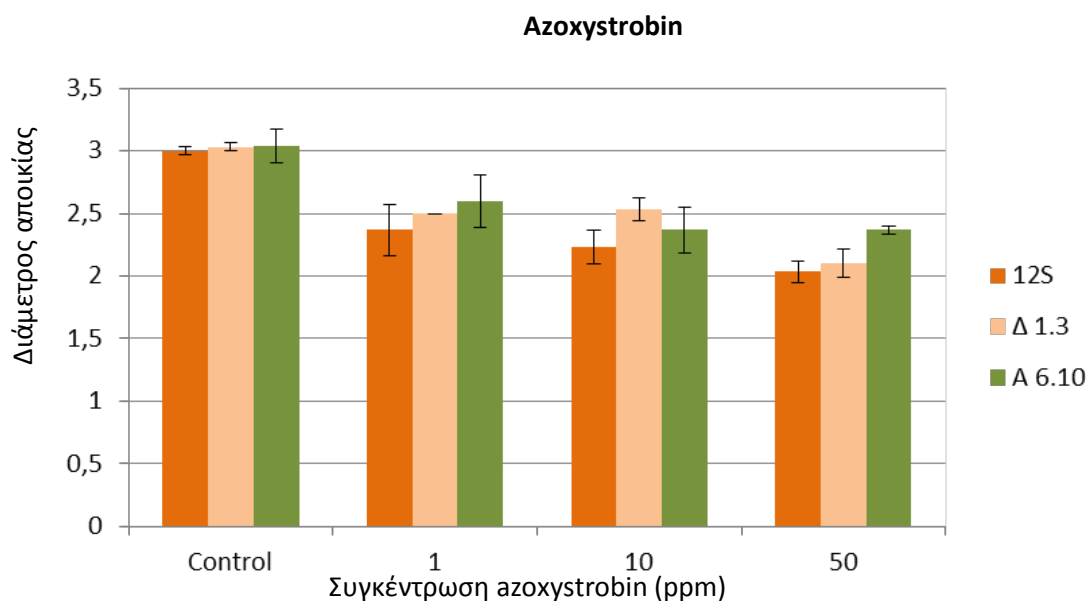
**Διάγρ. 9.** Ανάπτυξη διαμέτρου των μυκηλίων των στελεχών Δ 1.3, 12S, A 6.10 σε διάφορες συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας boscalid, την τρίτη ημέρα ανάπτυξής τους. Στις δοκιμές αυτές τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρεμπόδιση ανάπτυξης έφτασε έως και το 22% στις συγκεντρώσεις 1, 10, 50 ppm.

**Φωτογραφίες παρεμπόδισης ανάπτυξης των στελεχών του μύκητα *A. flavus* σε θρεπτικό υλικό CZA με τα την προσθήκη της δραστικής ουσίας boscalid την τρίτη ημέρα ανάπτυξης**



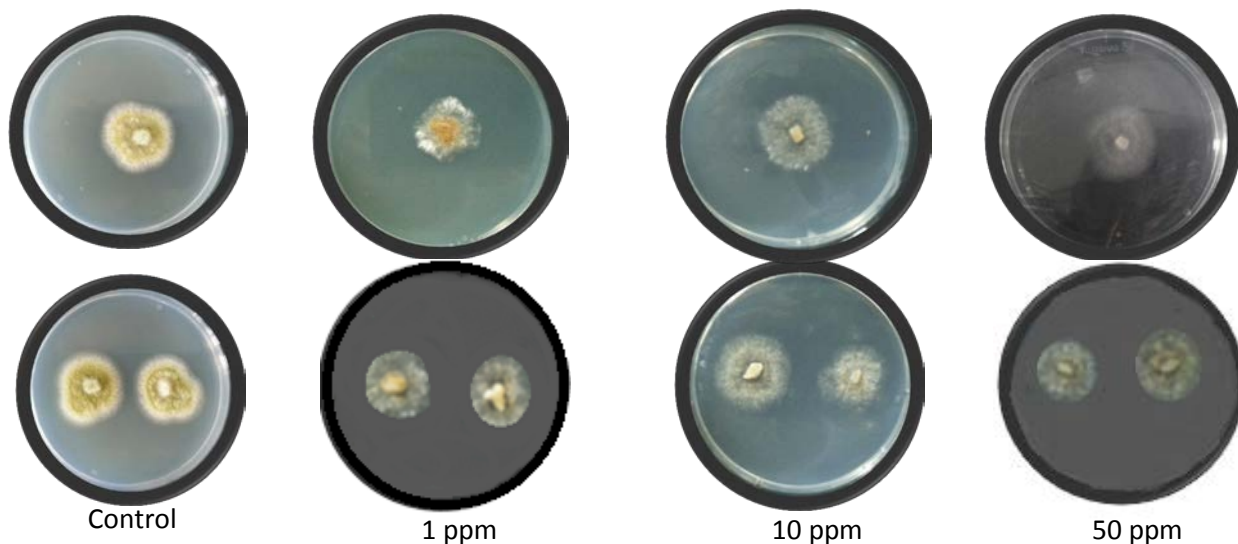
**Εικ. 39.** Παρεμπόδιση ανάπτυξης των στελεχών A 6.10 (πάνω σειρά), Δ1.3 (κάτω αριστερά) και 12S (κάτω δεξιά) του μύκητα *A. flavus* σε θρεπτικό υλικό CZA.

Στο διάγραμμα 10 φαίνεται η παρεμπόδιση ανάπτυξης του μυκηλίου έπειτα από την επίδραση της δραστικής ουσίας azoxystrobin σε διάφορες συγκεντρώσεις για τα τρία στελέχη του *A. flavus*.



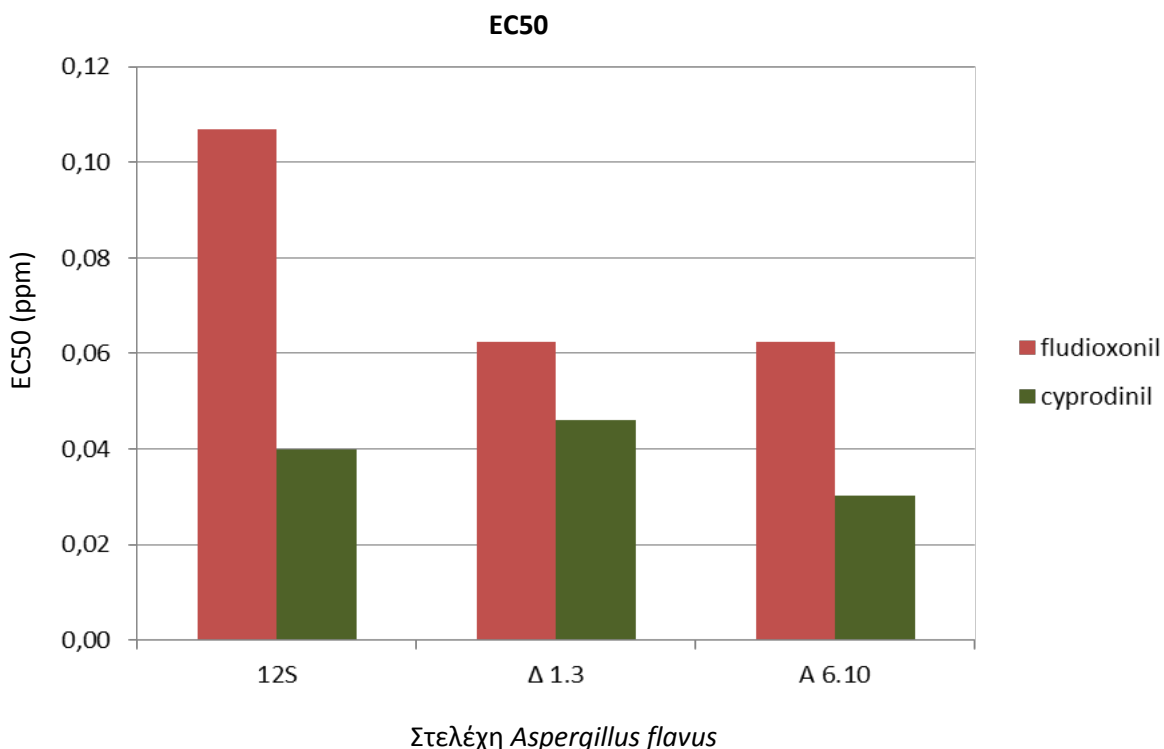
**Διάγρ. 10.** ανάπτυξη διαμέτρου των μυκηλίων των στελεχών Δ 1.3, 12S, A 6.10 σε διάφορες συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας azoxystrobin, την τρίτη ημέρα ανάπτυξής τους. Στις δοκιμές αυτές τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρεμπόδιση ανάπτυξης έφτασε έως και το 19% στις συγκεντρώσεις 1, 10, 50 ppm.

**Φωτογραφίες παρεμπόδισης ανάπτυξης των στελεχών του μύκητα *A. flavus* σε θρεπτικό υλικό CZA με τα την προσθήκη της δραστικής ουσίας azoxystrobin την τρίτη ημέρα ανάπτυξης**



**Εικ.40.** Παρεμπόδιση ανάπτυξης των στελεχών A 6.10 (πάνω σειρά), Δ1.3 (κάτω αριστερά) και 12S (κάτω δεξιά) του μύκητα *A. flavus* σε θρεπτικό υλικό CZA.

Το διάγραμμα 11 απεικονίζει τις τιμές EC50 για τα τρία στελέχη του μύκητα. Προέκυψε από την *in vitro* αξιολόγηση των δραστικών ουσιών fludioxonil και cyprodinil σε θρεπτικό υλικό CZA σε διάφορες συγκεντρώσεις (Παρ. 3.8).

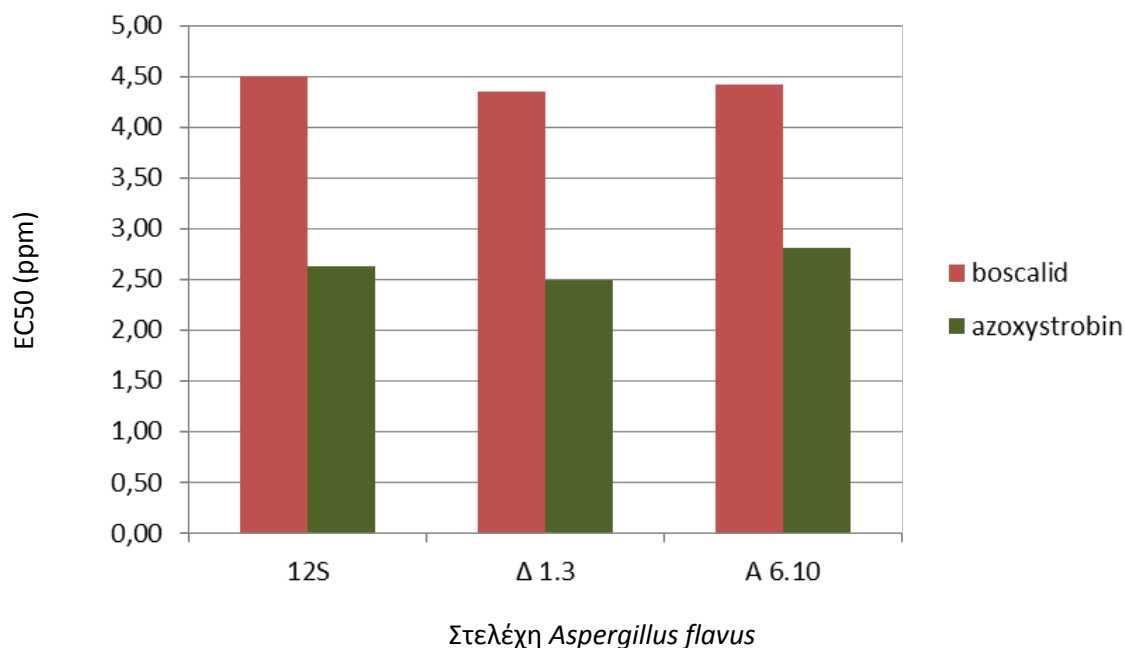


**Διάγραμμα 11.** Επίπεδο ανθεκτικότητας με βάση τις τιμές EC50 των στελεχών A 6.10, 12S, A 6.10 μετά από επώαση 3 ημερών στους 28° C σε θρεπτικό υλικό CZA για τις δραστικές ουσίες cyprodinil και fludioxonil.

Η ανθεκτικότητα υπολογίστηκε με βάση τις τιμές EC50 των ανωτέρω στελεχών. Στην περίπτωση της δραστικής ουσίας fludioxonil οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,06-0,11. Στην περίπτωση της δραστικής ουσίας cyprodinil οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,03-0,04. Συγκεκριμένα, για τη δραστική ουσία fludioxonil οι χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στο στέλεχος Δ 1.3 και για τη δεύτερη δραστική οι χαμηλότερες τιμές εντοπίστηκαν στο στέλεχος A 6.10. Το πιο ανθεκτικό στέλεχος για τη δραστική fludioxonil αποδείχθηκε το 12S και για τη δραστική cyprodinil το στέλεχος Δ 1.3. η ανθεκτικότητα που παρατηρείται δεν είναι σημαντική διότι η τιμή EC50 των δραστικών ουσιών δεν ξεπερνά την μονάδα, τιμή πάνω από την οποία μία δραστική θεωρείται μη-αποτελεσματική. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο αυτές δραστικές ουσίες εμφάνισαν πολύ χαμηλές τιμές EC50 που σημαίνει πως αποδείχθηκαν πολύ αποτελεσματικές για τα συγκεκριμένα στελέχη.

Το διάγραμμα 12 απεικονίζει τις τιμές EC50 για τα τρία στελέχη του μύκητα, όπως προέκυψε από την *in vitro* αξιολόγηση των δραστικών ουσιών boscalid και azoxystrobin σε θρεπτικό υλικό CZA σε διάφορες συγκεντρώσεις (Παρ. 3.8)

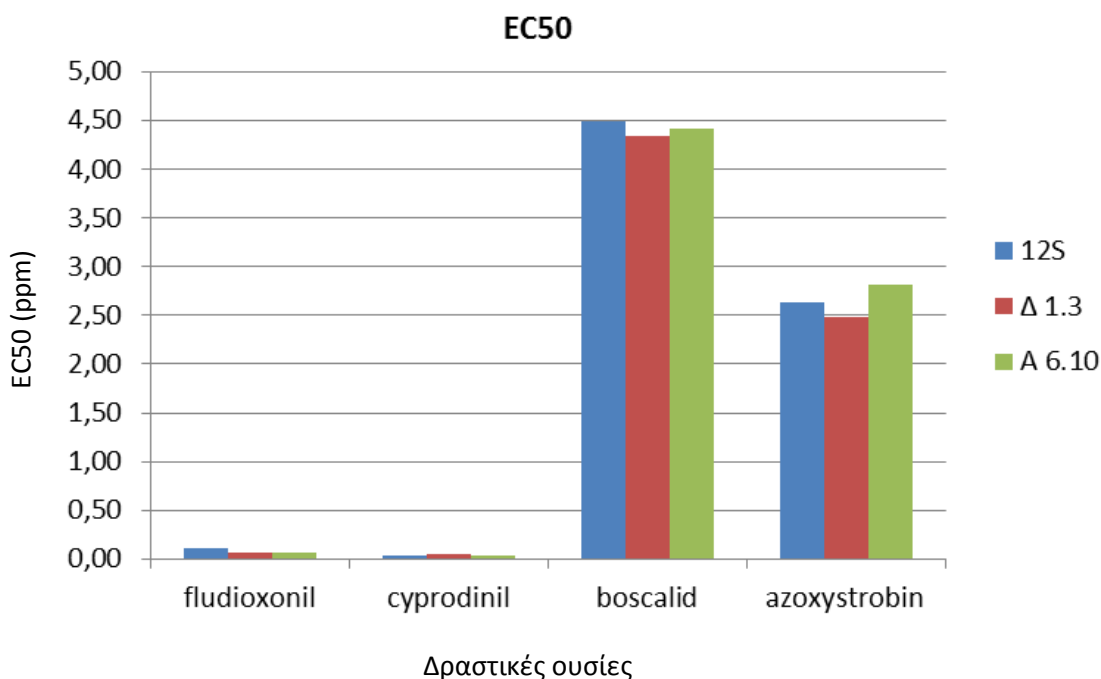




**Διάγραμμα 12.** Επίπεδο ανθεκτικότητας με βάση τις τιμές EC50 των στελεχών A 6.10, 12S, A 6.10 μετά από επώαση 3 ημερών στους 28° C σε θρεπτικό υλικό CZA για τις δραστικές ουσίες azoxystrobin και boscalid.

Η ανθεκτικότητα υπολογίστηκε με βάση τις τιμές EC50 των ανωτέρω στελεχών. Στην περίπτωση της δραστικής ουσίας boscalid οι τιμές κυμάνθηκαν από 4,3-4,5. Στην περίπτωση του azoxystrobin κυμάνθηκαν από 2,5-2,8. Στον έλεγχο παρεμπόδισης αυτών των δραστικών ουσιών, τα τρία στελέχη του μύκητα δεν παρουσίασαν κάποια διαφοροποίηση μεταξύ τους.

Παρακάτω φαίνεται το συγκεντρωτικό διάγραμμα EC50 (διάγραμμα 13) για τα τρία στελέχη του *A. Flavus*, όπως προέκυψε από την *in vitro* αξιολόγηση των δραστικών ουσιών boscalid, azoxystrobin, fludioxonil και cyprodinil σε θρεπτικό υλικό CZA σε διάφορες συγκεντρώσεις (Παρ. 3.8)



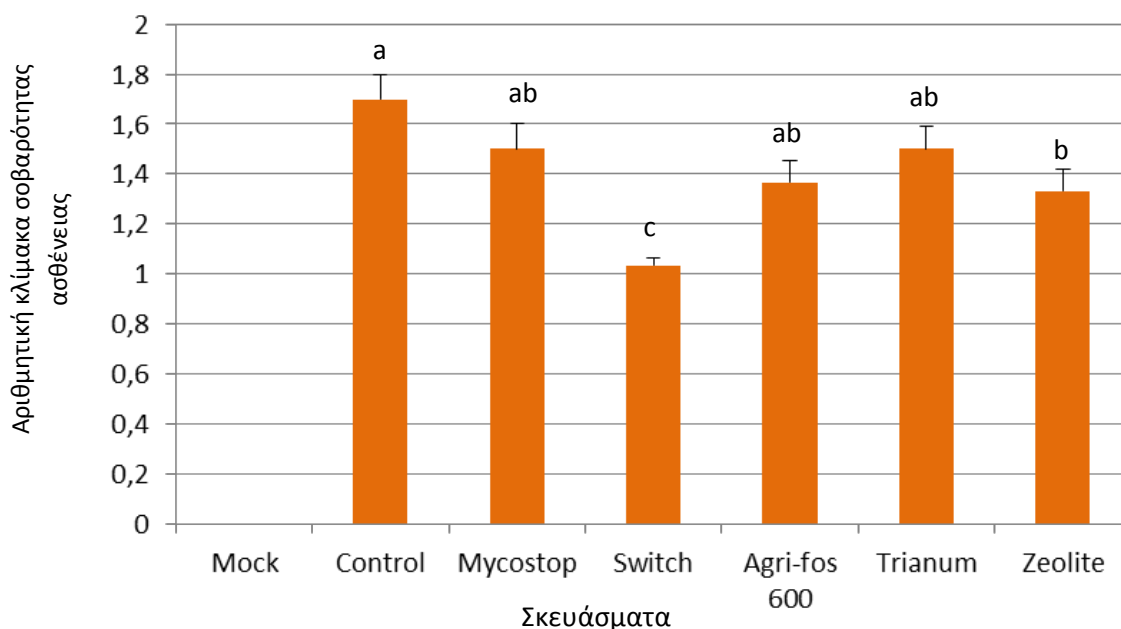
**Διάγραμμα 13.** Επίπεδο ανθεκτικότητας με βάση τις τιμές EC50 των στελεχών A 6.10, 12S, A 6.10 μετά από επώαση 3 ημερών στους 28° C σε θρεπτικό υλικό CZA συγκεντρωτικά για τις δραστικές ουσίες fludioxonil, cyprodinil, azoxystrobin και boscalid.

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως η αποτελεσματικότερη δραστική ουσία είναι το cyprodinil για όλα τα στελέχη που ελέγχθηκαν δίνοντας τις χαμηλότερες τιμές EC50. Με μικρή διαφορά, παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζει και η δραστική ουσία fludioxonil. Μεγάλη διαφορά παρουσιάζουν οι τιμές EC50 που δίνονται από τις δραστικές ουσίες boscalid και azoxystrobin. Τα αποτελέσματα αυτά είναι όμοια και για τα τρία στελέχη που ελέγχθηκαν.

## 4.6. Πιλοτικό πείραμα αγρού

### Διάγραμμα σοβαρότητας ασθένειας

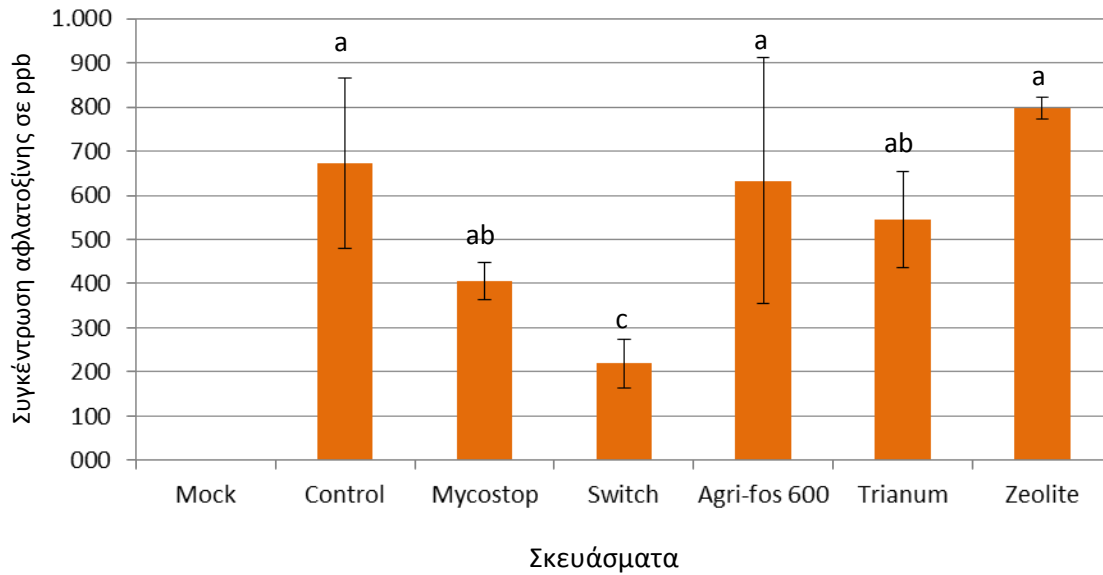
Παρακάτω φαίνεται το διάγραμμα σοβαρότητας ασθένειας που αντιστοιχεί στο πιλοτικό/πρώτο πείραμα αγρού. Η σοβαρότητα ασθένειας είναι μια παράμετρος που χαρακτηρίζει το ποσοστό μόλυνσης του κάθε σπάδικα.



**Διάγραμμα 14.** Σοβαρότητας ασθένειας σπαδικών καλαμποκιού μετά από μόλυνση με το στέλεχος 12S του *A.flavus* και εφαρμογή διαφόρων σκευασμάτων

Στο διάγραμμα 14 φαίνεται συγκεντρωτικά η σοβαρότητα της ασθένειας με βάση μια αριθμητική κλίμακα από το 1 έως το 5. 1:0% μόλυνση, 2:1-3% μόλυνση, 3:4-10% μόλυνση, 4: 11-25% μόλυνση, 5:26-50% μόλυνση, 6:51-75% μόλυνση και 7:76-100% μόλυνση ανά σπάδικα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μυκητοκτόνο Switch® μειώνει πολύ σημαντικά τη σοβαρότητα της ασθένειας και σε μικρότερο βαθμό τα σκευάσματα Agri-fos 600® και ζεόλιθος.

Στο διάγραμμα 15 φαίνονται οι συγκεντρώσεις αφλατοξίνης σε σπάδικες καλαμποκιού αφού μολύνθηκαν με το τοξικογόνο στέλεχος 12 S του μύκητα *A.flavus*, στους οποίους είχε προηγουμένως γίνει εφαρμογή με το εκάστοτε σκεύασμα (Παρ. 3.9). Η μέτρηση συγκέντρωσης αφλατοξίνης έγινε με τη μέθοδο ELISA.



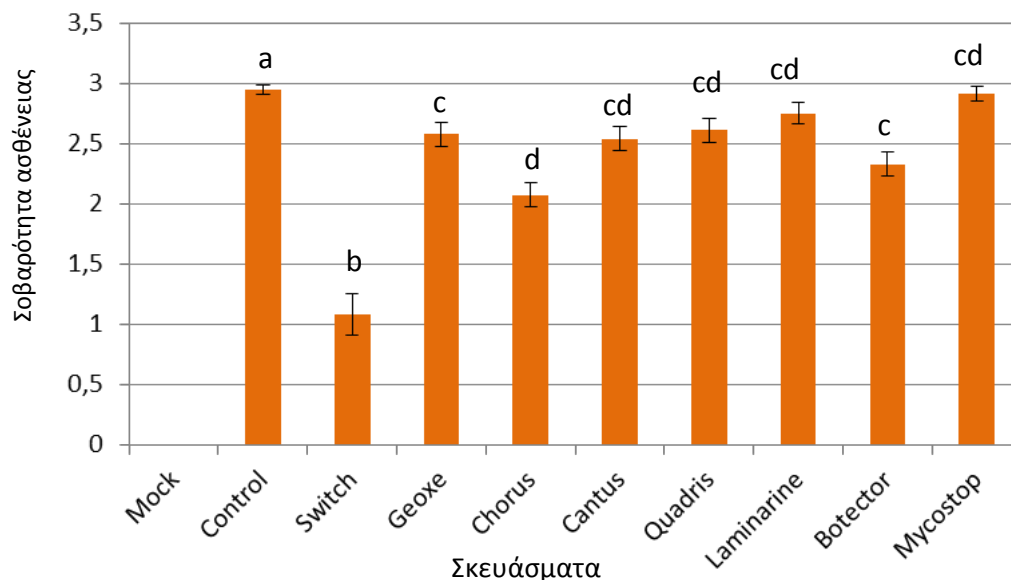
**Διάγραμμα 15.** Συγκέντρωση αφλατοξίνης (ppb) που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ELISA σε μολυσμένα καλαμπόκια με το στέλεχος 12S του μύκητα *A.flavus* έπειτα από την εφαρμογή των ανωτέρω σκευασμάτων.

Η συγκέντρωση αφλατοξίνης προσδιορίστηκε με βάση την ανοσολογική μέθοδο ELISA. Στην περίπτωση του χημικού σκευάσματος Switch® έχουμε σημαντική παρεμπόδιση στη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης και παρόμοια αποτελέσματα έχουμε επίσης στην περίπτωση του Mycostop®. Ακόμη, το σκεύασμα Trianum® που δοκιμάστηκε είχε ενθαρρυντικά αποτελέσματα και η δράση του βασίζεται στον ανταγωνισμό του μύκητα *Trichoderma harzianum*. Όλα τα ανωτέρω σκευάσματα και βιολογικοί παράγοντες που μελετήθηκαν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με το μάρτυρα, εκτός από την περίπτωση του ζεόλιθου και του Agri-fos 600®. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή του σκευάσματος Mycostop® μείωσε τη συγκέντρωση αφλατοξίνης κατά 40%, το σκεύασμα Switch® κατά 66% και η εφαρμογή με το Trianum® κατά 25%.

## 4.7. Τελικό πείραμα αγρού

### Διάγραμμα σοβαρότητας ασθένειας

Παρακάτω φαίνεται το διάγραμμα σοβαρότητας ασθένειας που αντιστοιχεί στο τελικό πείραμα αγρού. Σε αυτό το πείραμα αξιολογήθηκαν τα χημικά σκευάσματα Switch<sup>®</sup>, Chorus<sup>®</sup>, Cantus<sup>®</sup>, Geoxe<sup>®</sup>, Quadris<sup>®</sup>, Laminarine<sup>®</sup> και τα βιολογικά σκευάσματα Botector<sup>®</sup> και Mycostop<sup>®</sup>



**Διάγραμμα 16.** Σοβαρότητα ασθένειας σπαδικών καλαμποκιού μετά από μόλυνση με το στέλεχος A 6.10 του *A.flavus* και εφαρμογή διαφόρων σκευασμάτων

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η σοβαρότητα ασθένειας με βάση μια αριθμητική κλίμακα από το 1 έως το 5. 1:0% μόλυνση, 2:1-3% μόλυνση, 3:4-10% μόλυνση, 4: 11-25% μόλυνση, 5:26-50% μόλυνση, 6:51-75% μόλυνση και 7:76-100% μόλυνση ανά σπάδικα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μυκητοκτόνο Switch<sup>®</sup> μειώνει πολύ σημαντικά τη σοβαρότητα της ασθένειας και σε μικρότερο βαθμό τα σκευάσματα Chorus<sup>®</sup> και Botector<sup>®</sup>.



Mock



Control



Cantus



Geoxe



Switch



Chorus



Mycostop



Quadris



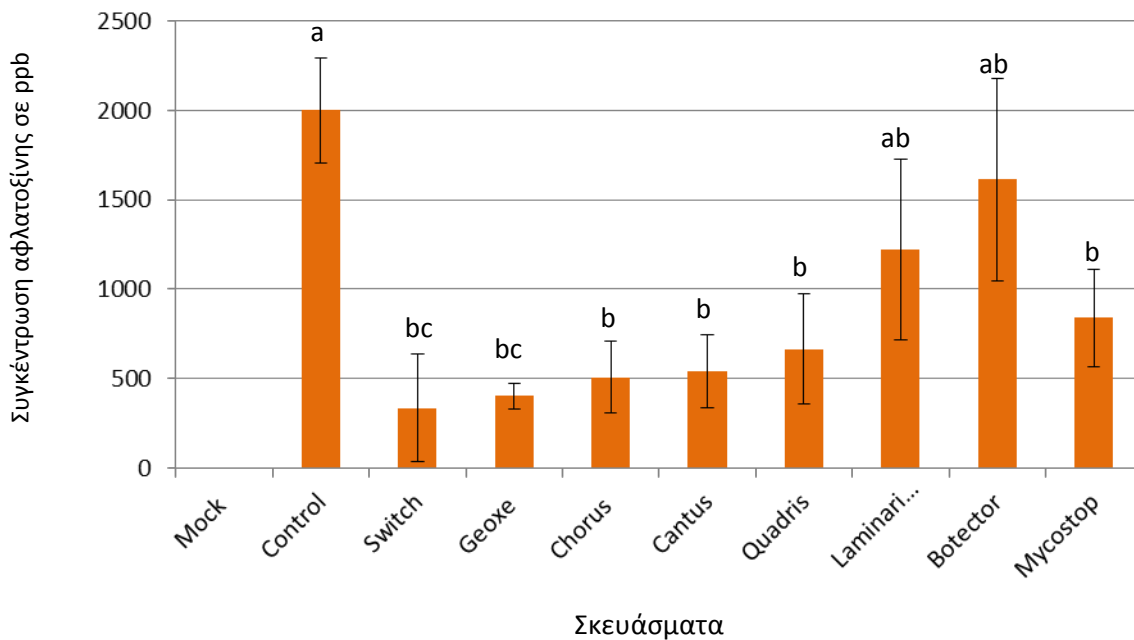
Laminarine



Botector

**Εικ. 41.** Μολυσμένοι σπάδικες της ποικιλίας N8 με το στέλεχος του *A. flavus* A 6.10 μετά τη συλλογή τους. Κάτω από κάθε φωτογραφία απεικονίζεται το σκεύασμα που εφαρμόστηκε στον αγρό.

Στο διάγραμμα 17 φαίνονται οι συγκεντρώσεις αφλατοξίνης σε σπάδικες καλαμποκιού αφού μολύνθηκαν με το τοξικογόνο στέλεχος A 6.10 του μύκητα *A. flavus*, στους οποίους είχε προηγουμένως γίνει εφαρμογή με το εκάστοτε σκεύασμα (Παρ. 3.9). Η μέτρηση συγκέντρωσης αφλατοξίνης έγινε με τη μέθοδο ELISA.

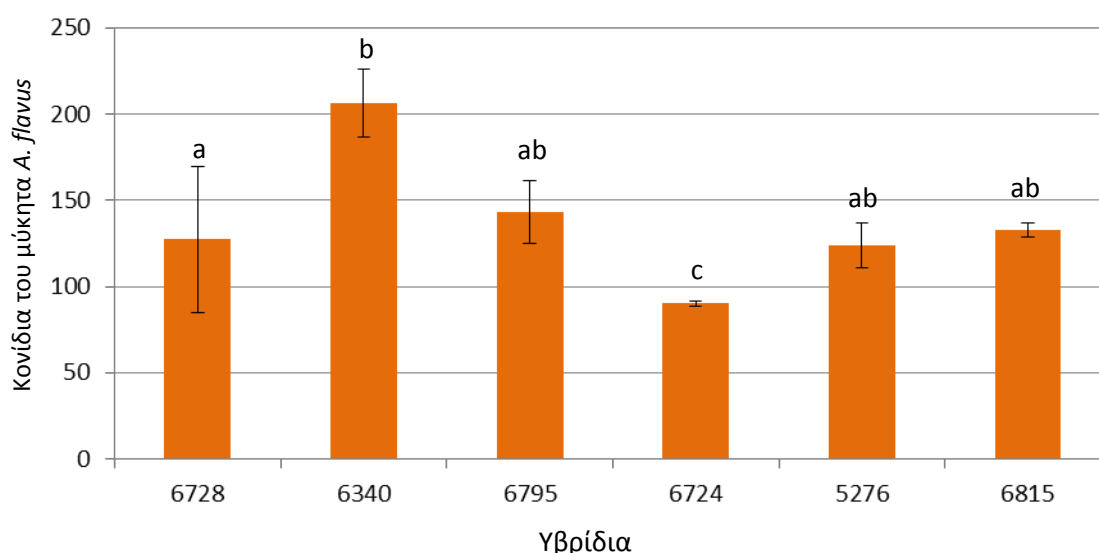


**Διάγραμμα 17.** Διάγραμμα συγκέντρωσης αφλατοξίνης (ppb) που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ELISA σε μολυσμένα καλαμπόκια με το στέλεχος A 6.10 του μύκητα *A.flavus* έπειτα από την εφαρμογή των διαφόρων σκευασμάτων.

Η συγκέντρωση αφλατοξίνης προσδιορίστηκε με βάση την ανοσολογική μέθοδο ELISA. Στην περίπτωση του χημικού σκευάσματος Switch® έχουμε μεγάλη παρεμπόδιση στη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης (πάνω από 80%) και παρόμοια αποτελέσματα έχουμε επίσης στην εφαρμογή με τα χημικά Chorus® και Geoxe® (μείωση της τάξης του 60% και 50% αντίστοιχα) ενώ τα βιολογικά Mycostop® και Botector® έδειξαν μείωση περίπου 50% και 25%. Όλα τα ανωτέρω σκευάσματα και βιολογικοί παράγοντες που μελετήθηκαν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα εκτός από τα Laminarine και Botector. 4.8. Αξιολόγηση υβριδίων DECALB ως προς την ανεκτικότητα τους στην παραγωγή αφλατοξίνης και την ικανότητά τους στην παρεμπόδιση ανάπτυξης κονιδίων

#### 4.8. Αξιολόγηση υβριδίων DEKALB ως προς την ανεκτικότητα τους στην παραγωγή αφλατοξίνης και την ικανότητά τους στην παρεμπόδιση ανάπτυξης κονιδίων

Στο διάγραμμα 18 φαίνεται η ανάπτυξη κονιδίων σε σπόρους καλαμποκιού των υβριδίων DEKALB μετά από μόλυνσή τους με το τοξικογόνο στέλεχος A 6.10 του μύκητα.

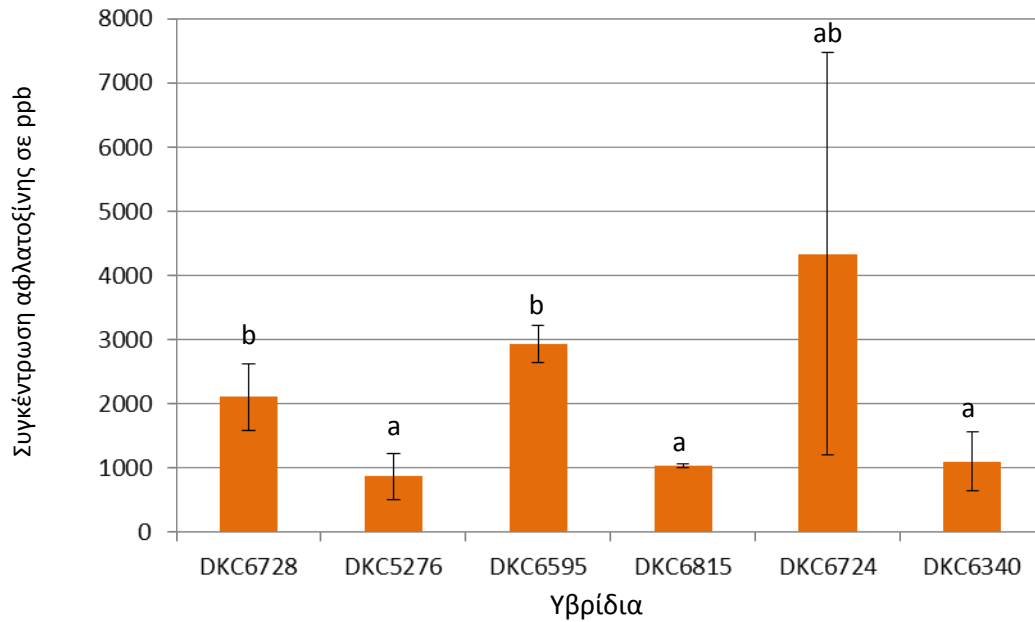


**Διάγραμμα 18.** Μέτρηση κονιδίων του μύκητα *A. flavus* (στέλεχος A 6.10) την 6η ημέρα μετά τη μόλυνση.

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως οι ποικιλίες DEKALB που εξετάστηκαν δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ τους στην παρεμπόδιση σποριοποίησης. Την μεγαλύτερη παρεμπόδιση παρουσιάζει η ποικιλία 6724, ενώ αυτή με τη μικρότερη παρεμπόδιση είναι η 6340. Οι υπόλοιπες παρεμποδίσεις κυμαίνονται σε ενδιάμεσες τιμές.

Στο διάγραμμα 19 φαίνεται η συγκέντρωση της παραγόμενης αφλατοξίνης (ppb) μετά από τεχνητή μόλυνση σπόρων καλαμποκιού των ποικιλιών DEKALB με το τοξικογόνο στέλεχος του *A.flavus*, A 6.10.





**Διάγραμμα 19.** Διάγραμμα συγκέντρωσης αφλατοξίνης (ppb) που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ELISA σε μολυσμένα καλαμπόκια των ανωτέρω ποικιλιών DECALB με το στέλεχος A 6.10 του μύκητα *A.flavus*.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως κανένα από τα υβρίδια DECALB που εξετάστηκαν δεν παρουσίασε σημαντικά επίπεδα ανθεκτικότητας στη μόλυνση με τον *A.flavus* και τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης. Οι DKC6815, DKC6340 και DKC5276 έδειξαν επίπεδα αφλατοξίνης κοντά στα 1.000 ppb, ενώ τα υβρίδια DKC6724, DKC6728 και DKC6595, έδειξαν αντίστοιχα επίπεδα πάνω από 2.000 ppb. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών πιο ανεκτικών και των 2 πιο ευαίσθητων υβριδίων

**Φωτογραφίες σπόρων καλαμποκιού των υβριδίων DECALB έπειτα από μόλυνσή τους με το τοξικογόνο στέλεχος του *A. flavus* A 6.10.**



**Εικ. 42.** Σπόροι καλαμποκιού των υβριδίων DECALB έπειτα από μόλυνσή τους με το τοξικογόνο στέλεχος του *A. flavus* A 6.10.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μυκοτοξίνες και ιδιαίτερα οι αφλατοξίνες αποτελούν σε παγκόσμιο επίπεδο μία από τις μεγαλύτερες απειλές για την ποιότητα των τροφίμων και την ασφάλεια του διατρεφόμενου πληθυσμού. Πρόκειται για ιδιαίτερα τοξικούς και καρκινογόνους δευτερογενείς μεταβολίτες, χαμηλού μοριακού βάρους που παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων όπως *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*. Έχουν εντοπιστεί πάνω από 300 είδη μυκοτοξινών, που διαφέρουν από χημική άποψη, αλλά έχουν σαν κοινή ιδιότητα ότι μολύνουν τρόφιμα και ζωοτροφές με οξεία ή χρόνια τοξικότητα για ανθρώπους και ζώα. Σύμφωνα με στοιχεία του FAO και της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) προκύπτει ότι κάθε χρόνο το 25-30% των γεωργικών προϊόντων μολύνεται με μυκοτοξίνες σε παγκόσμιο επίπεδο, προκαλώντας σοβαρές απώλειες με σημαντική οικονομική ζημία στη γεωργική παραγωγή, στη βιομηχανία τροφίμων, στην κτηνοτροφία και τελικά στην εθνική και παγκόσμια οικονομία, αλλά και σοβαρές επιπτώσεις στον άνθρωπο και τα ζώα. Σύμφωνα με στοιχεία του οργανισμού RASFF (EU Rapid Alert System For Food and Feed) οι μυκοτοξίνες βρίσκονται στην πρώτη θέση (με ποσοστό 44%) ως αίτιο απόρριψης εισαγωγών διαφόρων προϊόντων στην ΕΕ, ενώ δεύτερο αίτιο απόρριψης είναι οι χημικές επιμολύνσεις που φθάνουν σε ποσοστό μόλις 19% (RASFF, 2005). Στην παρούσα εργασία γίνεται κατανοητό το γεγονός ότι με τη χρήση ενός ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης των μυκοτοξικογόνων μυκήτων του γένους *Aspergillus* και των αφλατοξινών που παράγουν στο καλαμπόκι, επιτυγχάνεται σημαντική μείωση της προσβολής σε προσυλλεκτικό στάδιο, συνεπώς και μείωση κινδύνου απόσυρσης του καλαμποκιού.

### 5.1 *In vitro* αξιολόγηση των σκευασμάτων στην παρεμπόδιση σποριοποίησης και παραγόμενης αφλατοξίνης

Μετά την τεχνητή μόλυνση των σπόρων καλαμποκιού της ποικιλίας N8 με τα τρία τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus*, παρατηρήθηκαν αρκετές διαφορές σχετικά με την ικανότητα των σκευασμάτων να παρεμποδίζουν τη σποριοποίηση και τη βιοσύνθεση αφλατοξινών. Όσον αφορά το στέλεχος Δ 1.3, τα χημικά σκευάσματα είναι αυτά που έδειξαν τις μεγαλύτερες τιμές στην παρεμπόδιση κονιδιογένεσης (από 80-90%) ενώ παρόμοια αποτελέσματα δίνουν τα βιολογικά σκευάσματα Agri-fos 600® (περίπου 70% παρεμπόδιση) και Serenade Max® (περίπου 60% παρεμπόδιση). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών σχετικά με την αποτελεσματικότητα των δραστικών ουσιών έναντι του μύκητα *A. flavus*, όπως αναφέρεται στη μελέτη των Malandrakis et al., 2013, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η δράση των φαινυλοπυρρολών δρα εξίσου αποτελεσματικά στον *A. carbonarius* (strain NRRL 67), όχι όμως και σε μεταλλαγμένα στελέχη του ανθεκτικά ως προς το fludioxonil. Το Quadris® είναι μια στρομπιλουρίνη η οποία δρα παρεμποδίζοντας την σποριοποίηση. Τα χημικά Switch®, Geoxe® και Chorus® που βασίζονται στις φαινυλοπυρρόλες και ανυλοπυριμιδίνες παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μυκηλίου δρώντας παρεμποδιστικά στη λειτουργία διαφόρων λυτικών ενζύμων και αποδιοργανώνοντας τη λειτουργία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Το χημικό σκεύασμα Cantus® δρα παρεμποδιστικά στη λειτουργία του κύκλου του Krebs (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007), όπου διαπιστώθηκε μετά από δοκιμές πως μεταλλαγμένα στελέχη του *A. parasiticus* ως προς την ανθεκτικότητά τους στο

fludioxonil, παρουσιάζουν δυσλειτουργίες στην παθογένεια και τη σποριοποίηση. Το βιολογικό σκεύασμα Serenade Max® βασίζεται στον ανταγωνισμό του βάκιλλου από τον οποίο αποτελείται σε θρεπτικά και χώρο. Όσον αφορά στα χημικά σκευάσματα, παρόμοια αποτελέσματα έχουμε και για τα δύο επόμενα τοξικογόνα στελέχη (12S και A 6.10). Στην περίπτωση του στελέχους 12S το βιολογικό σκεύασμα που έδρασε καλύτερα ήταν το Trianum® που η δράση του βασίζεται στον μύκητα *Trichoderma charzianum*, δίνοντας ποσοστό παρεμπόδισης περίπου 70%. Η δράση του συγκεκριμένου μύκητα οφείλεται στον ανταγωνισμό, τον υπερπαρασιτισμό και στην επαγωγή της αντιοξειδωτικής άμυνας, όπως αναφέρουν οι Gazera et al, 2015 και χρησιμοποιείται συχνά για την αντιμετώπιση στελεχών των μυκήτων του γένους *Aspergillus*. Στην περίπτωση του τρίτου στελέχους τα βιολογικά σκευάσματα με τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν το Agri-fos 600® και ο ζεολίθος με παρεμποδίσεις περίπου 80% και 60%. Όσον αφορά στη δράση του ζεολίθου, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν ότι όταν χρησιμοποιείται για επίταση σπόρων, παρεμποδίζει την ανάπτυξη υφών του μύκητα.

Σχετικά με την παρεμπόδιση στην παραγόμενη αφλατοξίνη έπειτα από τεχνητή μόλυνση, για το στέλεχος Δ 1.3, παρατηρείται μια σχετική αναλογία μεταξύ της παρεμπόδισης ανάπτυξης κονιδίων και της αφλατοξίνης. Πιο συγκεκριμένα, τα χημικά σκευάσματα εμφανίζουν μεγάλη παρεμπόδιση αφλατοξίνης και από τα βιολογικά σκευάσματα, τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν μετά από εφαρμογή των Laminarine®, Serenade®, Trianum® και ζεολίθου. Τα χημικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν εμφάνισαν πολύ καλά αποτελέσματα για όλα τα τοξικογόνα στελέχη του μύκητα. Στην περίπτωση, όμως του 12S, τα βιολογικά που παρεμπόδισαν περισσότερο την παραγόμενη αφλατοξίνη είναι τα Botector®, Trianum®, Mycostop® και ο ζεολίθος. Στην περίπτωση του στελέχους αυτού (12S) πρέπει να τονιστεί ότι δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της παρεμπόδισης κονιδιογένεσης και της παρεμπόδισης ανάπτυξης αφλατοξίνης. Αυτό είναι εμφανές κυρίως στην περίπτωση του Botector®, Mycostop® και ζεολίθου διότι οι αντίστοιχες εφαρμογές με αυτά τα σκευάσματα δεν έδειξαν παρεμπόδιση κονιδιογένεσης παρά μόνο παρεμπόδιση ανάπτυξης αφλατοξίνης. Σχετικά με το A 6.10, εκτός από τα χημικά σκευάσματα, ευνοϊκά αποτελέσματα είχαν τα Botector®, Trianum® και Agri-fos 600®. Από αυτά τα τρία, μόνο το τελευταίο έδειξε παρεμπόδιση κονιδιογένεσης, ενώ τα δύο πρώτα όχι. Συνεπώς και σε αυτήν την περίπτωση δεν παρατηρείται αντιστοιχία μεταξύ των δύο αυτών φαινομένων. Πρέπει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι από παλαιότερες μελέτες είναι γνωστό πως η ανάπτυξη του μύκητα δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη αφλατοξίνης (Amalike & Keller, 2011). Πολλές φορές μάλιστα, το φαινόμενο αυτό είναι υπεύθυνο για την απόρριψη ή ανάκληση προϊόντων που κρίνονται μολυσμένα από μυκοτοξίνες παρόλο που έχουν περάσει από διαλογή.

## 5.2. Αξιολόγηση δραστικών ουσιών στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα *A. flavus* σε θρεπτικό υπόστρωμα

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα διαγράμματα στα οποία αξιολογήθηκε η ανθεκτικότητα με βάση τις τιμές EC50 των τριών τοξικογόνων στελεχών δείχνουν πως αποτελεσματικότερη δραστική ουσία για την παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα είναι το cyprodinil με ποσοστό παρεμπόδισης περίπου 90%. Η δραστική ουσία fludioxonil έδειξε

παρόμοια αποτελέσματα και για τα τρία προαναφερθέντα στελέχη με ποσοστό παρεμπόδισης περίπου 80%. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με παλαιότερες μελέτες των Dimakoroulou et al., 2002 και Markoglou et al, 2011, όπου επαληθεύεται η δράση των ανιλοπυρριμιδινών στην παρεμπόδιση σποριοποίησης και ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξινών σε ποσοστά 85%-95% σε στελέχη του *A.parasiticus*. Οι δραστικές ουσίες boscalid και azoxystrobin έδειξαν παρεμποδίσσεις περίπου 27% και 30% αντίστοιχα. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στο γεγονός πως οι στρομπιλουρίνες δρουν παρεμποδιστικά στη βλάστηση κονιδίων και όχι στην ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007), ενώ η χημική ομάδα των καρβοξαμιδικών στα οποία ανήκει το boscalid δρα παρεμποδιστικά στα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας. Αυτό σημαίνει πως στις δύο αυτές περιπτώσεις το μυκήλιο αυξάνεται αλλά ο μύκητας δεν παράγει κονίδια. Οι δύο πρώτες δραστικές ουσίες δρουν παρεμποδιστικά στην επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα, συνεπώς η ανάπτυξη του μυκηλίου σταματά. Δεν παρεμποδίζουν όμως τη βλάστηση κονιδίων. Πρέπει να σημειωθεί πως τα εμπορικά σκευάσματα που βασίζονται σε αυτές τις δραστικές ουσίες (Chorus®, Geoxe®, Cantus®, Quadris®) έδειξαν σε όλες τις περιπτώσεις έντονη παρεμπόδιση στην παραγόμενη αφλατοξίνη. Ειδικά το χημικό σκεύασμα Switch® που αποτελεί συνδυασμό των δύο πιο αποτελεσματικών δραστικών ουσιών έδειξε τα καλύτερα αποτελέσματα και στην παρεμπόδιση κονιδιογένεσης αλλά και στην παρεμπόδιση ανάπτυξης αφλατοξίνης κάτι που επαληθεύει μια σχετική μελέτη των Kim et al., 2007, όπου χρησιμοποιήθηκε cyprodinil και fludioxonil σε συνδυασμό με azoxystrobin για μείωση ανάπτυξης ωχρατοξίνης στο αμπέλι. Η αξιολόγηση των ανωτέρω δραστικών ουσιών και το αντίστοιχο διάγραμμα των τιμών EC50 έγινε την τρίτη ημέρα μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων με τα στελέχη του μύκητα που μελετήθηκαν και αξίζει να αναφερθεί πως από τη δραστική ουσία cyprodinil χρειάστηκαν μόνο 0,1ppm για την παρεμπόδιση ανάπτυξης των στελεχών κατά περίπου 88%.

### 5.3. Αξιολόγηση επιλεγμένων σκευασμάτων σε πειράματα αγρού

Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα αγρού στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Στο πρώτο πείραμα αξιολογήθηκαν τα σκευάσματα Mycostop®, Agri-fos 600®, Trianum®, ζεόλιθος, και το χημικό σκεύασμα Switch. Όπως προαναφέρθηκε, τα σκευάσματα εφαρμόστηκαν με ψεκασμό στις αναφερόμενες στην εκάστοτε ετικέτα συγκεντρώσεις δύο φορές πριν από τη μόλυνση που έγινε με το τοξικογόνο στέλεχος 12S. Η αξιολόγηση των σκευασμάτων ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παραγόμενης αφλατοξίνης έγινε με τη μέθοδο ELISA. Η μικρότερη συγκέντρωση αφλατοξίνης παρατηρήθηκε στην περίπτωση του χημικού σκευάσματος Switch® του οποίου η δράση αναφέρθηκε ανωτέρω. Από τα βιολογικά σκευάσματα, μικρότερη συγκέντρωση αφλατοξίνης παρουσίασαν τα Mycostop® και Trianum®. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε πλήρη ταύτιση με αυτά που παρατηρήθηκαν από τα πειράματα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας και την *in vitro* αξιολόγησή τους. Η δράση των σκευασμάτων αυτών οφείλεται στον ανταγωνισμό των βιολογικών παραγόντων στους οποίους βασίζονται (Παρ. 1.5.10, 1.5.11). Στο δεύτερο πείραμα αξιολογήθηκαν τα σκευάσματα Geoxe®, Chorus®, Cantus®, Laminarine®, Switch®, Quadris®, Botector® και Mycostop® με την ίδια ακριβώς μέθοδο. Στο πείραμα αυτό η μόλυνση έγινε με το τοξικογόνο στέλεχος A 6.10. Η αξιολόγηση των σκευασμάτων ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την

ανάπτυξη παραγόμενης αφλατοξίνης έγινε και πάλι με τη μέθοδο ELISA. Με βάση το αντίστοιχο διάγραμμα (διάγραμμα 9) επαληθεύεται η ικανότητα του χημικού σκευάσματος Switch® στην παρεμπόδιση ανάπτυξης αφλατοξίνης. Επίσης, παρατηρείται η ομοιότητα των αποτελεσμάτων των χημικών σκευασμάτων με τα βιολογικά Mycostop® και Botector®. Μείωση της παραγόμενης αφλατοξίνης στις περιπτώσεις των δύο βιολογικών σκευασμάτων παρατηρείται και στην πλάκα TLC που αναφέρεται στο στέλεχος A 6.10 (Εικ. 17). Η ζύμη *Aureobasidium pullulans* στην οποία βασίζεται το σκεύασμα Botector® έχει αποδειχθεί πως έχει παρόμοια αποτελέσματα και κατά του *A. carbonarius* στο αμπέλι με μείωση έως και 50% σε μολυσμένους ιστούς (Dimakoroulou et al., 2008), ενώ η ζύμη *Streptomyces griseoviridis* στην οποία βασίζεται το Mycostop® δρά ανταγωνιστικά, όπως επαληθεύεται από τους Hansen et al., 2010.

Τα αντίστοιχα διαγράμματα σοβαρότητας ασθένειας αν συγκριθούν με τα διαγράμματα μέτρησης αφλατοξίνης δεν εμφανίζουν κάποια σχετική αναλογία και αυτό οφείλεται στο φαινόμενο που τονίστηκε παραπάνω (Παρ. 5.1) δηλαδή στο γεγονός πως δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην συγκέντρωση αφλατοξίνης και στην ανάπτυξη του μύκητα. Η μόνη περίπτωση στην οποία παρατηρήθηκε σχετική αναλογία είναι η περίπτωση του χημικού Switch®.

#### 5.4. Γενικό συμπέρασμα - Σύστημα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης αφλατοξινών στο καλαμπόκι

Το γενικό συμπέρασμα που απορρέει από τη μελέτη είναι η αναγκαιότητα εφαρμογής ενός ολοκληρωμένου συστήματος εφαρμογής χημικών και βιολογικών σκευασμάτων καθώς και ορθών γεωργικών πρακτικών προσαρμοσμένων στην καλλιέργεια του καλαμποκιού που μέχρι σήμερα ήταν ανύπαρκτο. Οι τεχνικές αυτές θα πρέπει να είναι οικονομικά προσιτές και φιλικές ως προς το χρήστη και το περιβάλλον. Έτσι, εάν εφαρμοστούν τα αποτελέσματα στην πράξη, δημιουργείται το παρακάτω μοντέλο: Προτείνεται αρχικά, εμπλουτισμός του εδάφους με ζεόλιθο και επίταση σπόρων με Mycostop® ή Trianum® ή ζεόλιθο ή συνδυασμό τους για ανταγωνισμό και υπερπαρασιτισμό ενάντια εδαφογενών παθογόνων που προκαλούν σήψεις και τήξεις από το στάδιο της σποράς (συμπεριλαμβανομένου και του μυκοτοξικογόνου μύκητα *A. flavus*). Απαραίτητοι θεωρούνται οι ψεκασμοί για εντομοκτονία σε διάφορα στάδια της καλλιέργειας του καλαμποκιού διότι όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή της μελέτης, οι προσβολές από έντομα ευνοούν την ανάπτυξη παθογόνων όπως ο *A. flavus* και τη βιοσύνθεση αφλατοξινών. Κατά την άνθιση και προς το τέλος του μεταξώματος (σε περιοχές που ενδημεί ο μυκοτοξικόγονος μύκητας *A. flavus*) προτείνεται να γίνεται ψεκασμός με το χημικό σκεύασμα Switch® (εφόσον πάρει τη σχετική έγκριση για την καλλιέργεια του καλαμποκιού), καθώς αποτελείται από ένα συνδυασμό δύο ιδιαίτερα αποτελεσματικών δραστικών ουσιών (cyprodinil και fludioxonil) που εξετάστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη (παρεμπόδιση επιπέδου αφλατοξίνης έως και 90%). Στη συνέχεια και κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της καλλιέργειας προτείνεται αύξηση ποτισμάτων ιδιαίτερα τους καλοκαιρινούς και θερμούς μήνες όπου επικρατούν ξηροθερμικές συνθήκες ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος προσβολής από τον ξηροθερμικό μύκητα *A. flavus* και της παραγωγής αφλατοξινών αυξάνεται. Μετασυσπλεκτικά, θα πρέπει να εξασφαλισθούν σωστές συνθήκες αποθήκευσης και αερισμού για την αποφυγή 'ανάμματος' των καρπών, ακόμη και πιθανός

εμπλουτισμός του σπόρου με ζεόλιθο, καθώς έχει αποδειχθεί με προκαταρκτικά πειράματα εργαστηρίου πως μπορεί να δεσμεύει μόρια αφλατοξίνης (Εικ. 43). Με το παραπάνω ολοκληρωμένο σύστημα αντιμετώπισης, μπορεί να μειωθεί σημαντικά η ένταση του προβλήματος των αφλατοξινών στο καλαμπόκι.



**Εικόνα 43.** Ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια καλαμποκιού.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbas HK, Zablotowicz RM, Bruns HA, Abel CA. 2006. Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Sci Technol.* 16(5):437–449.
2. Abdel-Hadi A., Schmidt-Heydt M., Parra R., Geisen R. and Magan N., 2012. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *J. R. Soc. Interface* (69):757-67
3. Adegoke G. and Letuma P., 2003. Strategies for the Prevention and Reduction of Mycotoxins in Developing Countries,
4. Alaniz Zanon M., Chiotta M., G. Giaj-Merlera, G. Barros, S. Chulze, 2013. Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 162(3):220-225
5. Amaike and Keller, 2011. *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 49: 107-133
6. Anna Chiara Manetta, 2011. Aflatoxins: Their Measure and Analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 1997 October; 63(10): 3995–4000.
7. Asters M., W. Williams P., Perkins A., J. Mylroie E., Gary L. Windham & Xueyan Shan, 2013. Relating significance and relations of differentially expressed genes in response to *Aspergillus flavus* infection in maize. *Scientific reports*, 4815 (2014); doi :10.1038
8. Baker and Bennet, 2008. Biofuels and Bioproducts Produced through Microbial Conversion of Biomass, *Food and industrial bioproducts and bioprocessing*, 8(1), 165-173.
9. Bennet & Klich, 1992. *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*, in J. W. Bennett and M. A. Klich, Eds. 21: 134–137
10. Bhatnagar-Mathur P, Sunkara S., Bhatnagar-Panwar M., Waliyar F., Kiran K., Sharma, 2015. Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science*, 234, 119-132.
11. Blandino M., Reyneri A., Vanara F., G. Tamietti and A. Pietri, 2009. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection, fumonisin and deoxynivalenol contamination of maize kernels. *World Mycotoxin Journal*, 2, 409-418.
12. Bock, and Cotty, 2006. Methods to sample air borne propagules of *Aspergillus flavus*, 2006. *European Journal of Plant Pathology*, 22: 110-117
13. Bhatnagar-Mathur P, Sunkara, S. Bhatnagar-Panwar M., Waliyar F., Kumar Sharma K. 2015. Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science*, 234: 119-132
14. Brodhagen M., Tsitsigiannis D., Hornung E., Goebel C, Feussner I. and Keller, N.P. 2008. Reciprocal oxylipin-mediated cross-talk in the *Aspergillus*–seed pathosystem. *Molecular Microbiology*, 285(14): 10353-61
15. CAST Report, *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. 2003., Ames, Iowa, USA, pp 159
16. Chiott M., Susca A., G. Stea, G. Mulè, G. Perrone, A. Logrieco, S.N. Chulze, 2011. Phylogenetic characterization and ochratoxin A – Fumonisin profile of black

- Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. International Journal of Food Microbiology, 59 (13): 7514-7518
17. Chiotta M., Ponsone M., Sosa D., Combina M., Chulze S., 2013. Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. Food Microbiology, 36(2):182-90.
  18. Cleveland T, Jiujiang Yu, Natalie Fedorova, Bhatnagar D., Gary A. Payne, William C. Nierman, and Joan W. Bennett, Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology, 27(2 ):63–128
  19. Cleveland T., Dowd P., Desjardins A., Bhatnagar D., and Cotty P., 2003. Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. Pest Management Science, 59:629–642
  20. Cuijuan S., Peisheng Y., Jiafei L., Hanqi W., Qianwei L. and Shanshan G. , 2014. Biocontrol of *Fusarium graminearum* Growth and Deoxynivalenol Production in Wheat Kernels with Bacterial Antagonists. International Journal of Environmental Research and Public Health, 11(1)
  21. Cvetni Z. and Pepeljnick S., 2007. Interaction between certain molds and aflatoxin B1 producer *Aspergillus flavus* NRRL 3251, 58:429-434
  22. De Curtis F., De Felice D., G. Ianiri, V. De Cicco, R. Castoria, 2012. Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape. International Journal of Food Microbiology, 159:17–24
  23. De Felice V., M. Solfrizzo, F. De Curtis, G. Lima, A. Visconti, and R. Castoria, 2008. Strains of *Aureobasidium pullulans* Can Lower Ochratoxin A Contamination in Wine Grapes. Postharvest Pathology and Mycotoxins, Phytopathology 98:1261-1270.
  24. Deepak B., Bruce F. 2012. Effects of laeA deletion on *Aspergillus flavus* conidial development and hydrophobicity may contribute to loss of aflatoxin production. Fungal biology, 81(3):240-6
  25. Dimakopoulou M., Tjamos S.E., Antoniou P.P., Pietri A., Battilani P., Avramidis N., Markakis E.A., Tjamos E.C., 2008. Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. Biol. Control. 46:158–165
  26. Donner M., Atehnkeng J., A. Sikora, Ranajit Bandyopadhyay, Peter J. Cotty, 2009. Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of maize fields in three. Soil Biology & Biochemistry, 41:37–44
  27. Ehrlich K., Frisvad J., Larsen T., R. de Vries, M. Meijer, J. Houbraken, F.J. Cabañes, , R.A. Samson, 2007. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins, Stud Mycol. 59: 31–37.
  28. Ehrlich K., 2014. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. Frontiers in microbiology, 5: 50.
  29. F. Wu, D. Bhatnagar, T. Bui-Klimke, I. Carbone, R. Hellmich, G. Munkvold, P. Paul, G. Payne and E. Takle, 2011. Climate change impacts on mycotoxin risks in US maize. World Mycotoxin Journal, 4(1): 79-93
  30. Farzaneh M., Zhi-Qi Shi b, Ghassempour A., Narges Sedaghat, Masoud Ahmadzadeh, Mansoureh Mirabolfathy, Mohammad Javan-Nikkhah, 2012. Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. Food Control, 23(1):100–106



31. Felix D'Mello JP, Macdonald A., Postel D., Wilko T.P. Dijkma, Aude Dujardin and Cristina M. Placinta, 1998. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 104(8):741-751.
32. Flaherty J., Payne A., 1997. Overexpression of *aflR* Leads to upregulation of Pathway Gene Transcription and Increased Aflatoxin Production in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10): 3995–4000
33. Friedman M., and Reuven R., 2013. Review of the Inhibition of Biological Activities of Food-Related Selected Toxins by Natural Compounds, 5(4), 743-775;
34. Gajera HP, Katakpara ZA, Patel SV, Golakiya BA, 2015. Antioxidant defense response induced by *Trichoderma viride* against *Aspergillus niger* Van Tieghem causing collar rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Microbial pathogenesis*, 91:26-34
35. Gautam A., 2012. Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala powder. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(104), pp. 16814-16823.
36. Georgianna DR, Fedorova ND, Burroughs JL, Dolezal AL, Bok JW, Horowitz-Brown S, Woloshuk CP, Yu J, Keller NP, Payne GA, 2010. Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. *Molecular Plant Pathology*, 11:213–26
37. Gilbert, J. & Anklam, E. 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs, *Trends Anal Chem.* 21(6-7):468-486.
38. Hans P. van Egmonda & Marco A. Jonkera, 2005. Worldwide Regulations on Aflatoxins—The Situation in 2002. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 113(12):1763-7
39. Hansen VM, Winding A, Madsen AM, 2010. Exposure to bioaerosols during the growth season of tomatoes in an organic greenhouse using Supresivit (*Trichoderma harzianum*) and Mycostop (*Streptomyces griseoviridis*). *Applied and Environmental Microbiology*, 11, 129–138.
40. Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW., 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153, 1677–1692
41. Henrique F., Samuel J., Tiago D., I., Luis R., José C. 2003, Biological control of mycotoxin-producing molds (Review), *Ciencia e Agrotecnologia* 36(5) vol.36 no.5
42. Hill RA, Blankenship PD, Cole RJ, Sanders TH. 1983. Effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. *Appl Environ Microbiol* 45:628–633.
43. Horowitz D. , N.Fedorova, Burroughs J., Dolezal a., J. Bok S., j. Yu, N.P. Keller, and G. Payne, 2010. Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. *Mol Plant Pathol.* 11(2): 213–226.
44. Hruska Z., Rajasekaran K., Haibo Y., Kincaid R., Darlington D., Brown L., Deepak B. and Cleveland T., 2014. Co-inoculation of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* to study fungal invasion, colonization and competition in maize kernels. *Frontiers in microbiology*, 5: 122

45. Huff W., Doerr J., Hamilton P., Hamann D., Peterson R., Ciegler A., 1980. Evaluation of Bone Strength During Aflatoxicosis and Ochratoxicosis, *Appl Environ Microbiol.* July; 40(1): 102–107.
46. Hyang S., Hyun J., Hyun E., Jin H., Duck H., 2007. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, 102(1):1-434
47. Jamali M., Karimipour M., Ghahfarokhi M., Akram A., Mehdi Razzaghi-Abyaneh, 2013. Expression of aflatoxin genes aflO (omtB) and aflQ (ordA) differentiates levels of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains from soils of pistachio orchards. *Research in Microbiology*,10:1-7
48. Jia L., Yuan S., Michael W., Samir D., Yongsheng L., 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal, *Applied and Environmental Microbiology*, 81:1-9
49. Kai W., Yan P., Li C., Ding Q., Chi S.,and Zhao T., 2013. Potential of Chitinolytic *Serratia marcescens* Strain JPP1 for Biological Control of *Aspergillus parasiticus* and Aflatoxin. *BioMed Research International*, 2013(7):397142
50. Kapetanakou, A.E., Panagou, E.Z., Gialitaki, M., Drosinos, E.H. and Skandamis, P.N., 2009. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. *Food Control* 20, 725–732.
51. Kendra D., Dyer R., 2007. Opportunities for biotechnology and policy regarding mycotoxin issues in international trade. *International Journal of Food Microbiology*, 119:147–151.
52. Kensler T., Roebuck B., Wogan G. and Groopman J., 2011. Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology. *Toxicological sciences*, 91(2): 243-9.
53. Klem K., Váňová M., Hajšlová J.,Lancová K., M. Sehnalová, 2009. A neural network model for prediction of deoxynivalenol content in wheat grain based on weather data and preceding crop, *Plant Soil Environ.*, 645(1-2): 56–63.
54. Krska R. & Molinelli A., 2007. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Anal Bioanal Chem*, 389:931-40.
55. Lanubile A., Logrieco A., Battilani P., Proctord R., Maroccoa A., 2013. Transcriptional changes in developing maize kernels in response to fumonisin-producing and nonproducing strains of *Fusarium verticillioides*. *Plant science*, 210:183-192.
56. Lehoczki-Krsjak S., Varga M., Mesterházy A., 2014. Distribution of prothioconazole and tebuconazole between wheat ears and flag leaves following fungicide spraying with different nozzle types at flowering. *Research Article, Pest management science*, 71(1):105-13
57. Lehoczki-KrsjakS., Varga M., Szabo-Hever A. and Mesterhazy A., 2012. Translocation and degradation of tebuconazole and prothioconazole in wheat following fungicide treatment at flowering. *Research Article, Phytopathology*, 98(9): 999-1011
58. Maiorano A., Reyneri A., Magni A., Ramponi C., 2009. A decision tool for evaluating the agronomic risk of exposure to fumonisins, *Agricultural systems* 102(1):17-23.
59. Markoglou AN , Doukas EG , Ziogas BN, 2008. Phenylpyrrole-resistance and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* Speare. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2):130-6

60. Matarese F., Sarrocco S., Gruber S., V. Seidl-Seiboth and G. Vannacci, 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology*, 158:98–106
61. Medina A., Schmidt-Heydt M, Diana L. Cardenas-Chavez, Parra R., Geisen R. and Magan N., 2013. Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B1 and B2 production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental factors. *J. R. Soc. Interface* 10(85):24-36
62. Meng Luo, Robert L. Brown, Zhi-Yuan Chen, Abebe Menkir, Jiujiang Yu and Deepak Bhatnagar, 2011. Transcriptional Profiles Uncover *Aspergillus flavus*-Induced Resistance in Maize Kernels. *Toxins*, 3:766-786
63. Mesterházy A., Beáta T., VargaM. , Bartók T., Szabó-Hevér A. , Farády L. and Szabolcs Lehoczki-Krsjak, 2011. Role of Fungicides, Application of Nozzle Types, and the Resistance Level of Wheat Varieties in the Control of *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol. *Toxins*, 3(11):1453-1483
64. Miraglia M., Marvin H.J.P., Kleter G.A., Battilani P., C. Brera, E. Coni, F. Cubadda, L. Croci, B. De Santis, S. Dekkers, L. Filippi, R.W.A. Hutje, M.Y. Noordam, M. Pisante, G. Piva, A. Prandini, L. Toti, G.J. van den Born, A. Vespermann, 2009. Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* 47(5):911-4
65. Morteza Azizollahi A., Fatemeh (Elham) A., Mahya Mohammadi and Reza Kazemi Darsanaki, 2013. Biological Control of Aflatoxins. *Pelagia Research Library*, 3(2): 162-166
66. Munkvold G., 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology*, 8: 33-38.
67. Peterson S., Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, Andes D, Kontoyiannis DP, Perrone G, Brandt ME, Pappas PG, Chiller T, 2009. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *Clin. Microbiol.*, 47(10):3138-41
68. Ponsone M., Chiotta M., Combina M., Ana Dalcerro, Sofía Chulze, 2011. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 151(1):1-124
69. Raper & Fennel, 1965. Identification Key for *Aspergillus* Species Isolated from Maize and Soil of Nandi County, Kenya. *Advances in Microbiology*, 5(4): 1-38
70. Reverberi M., Punelli M., Smith C., Slaven Zjalic, Marzia Scarpari, Valeria Scala, Giorgia Cardinali, Nicaela Aspite, Flavia Pinzari, Gary A. Payne, Anna A. Fabbri, Corrado Fanelli, 2012. How Peroxisomes Affect Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus flavus*, *J. Agric. Food Chem.*, 63(19):4879–4885
71. Robert A. Holmes & Rebecca S. Boston & Gary A. Payne, 2008. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 78:559–572 561
72. Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z, Lima N, 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *Food microbiology*, 129:187–193.
73. Schmidt-Heydt M., Stoll D. , Geisen R. , 2013. Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. *International Journal of Food Microbiology*, 53:1785–1796

74. Smith A., Adams B., Lowe D., Scazzocchio C., Demais S., Bray R., 2002. Expression of *Drosophila melanogaster* xanthine dehydrogenase in *Aspergillus nidulans* and some properties of the recombinant enzyme. *Biochem J.* 362(1):223–229.
75. Spanjer M. , Rensen M.& Scholten J., 2014. LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives & Contaminants* 17(10):75– 84
76. Spraker JE, Jewell K, Roze LV, Scherf J, Ndagano D, Beaudry R, Linz JE, Allen C, Keller NP, 2014. A volatile relationship: profiling an inter-kingdom dialogue between two plant pathogens, *Ralstonia Solanacearum* and *Aspergillus flavus*. *Journal of chemical ecology*, 14(1):149-60
77. Sui Sheng T. Hua & Cesaria E. McAlpin & Perng-Kuang Chang & Siov Bouy L. Sarreal, 2012. Characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates from pistachio. *Mycotoxin Res*, 28:67–75
78. Sui Sheng T. Hua & John J. Beck & Siov Bouy L. Sarreal & Wai Gee, 2014. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Res*, 30(2):71-78
79. Sulyok M., Berthiller F., Krska R. and Schuhmacher R., 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid communications in mass spectrometry*, 21(7):178–38
80. Throckmorton K, Lim FY, Kontoyiannis DP, Zheng W, Keller NP., 2015. Redundant synthesis of a conidial polyketide by two distinct secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. *Environm. Microbiology*, 7(1):3572-3607
81. Tsitsigiannis D., and Keller N., 2005. Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals. *Trends in Microbiology* 15(3): 109-18
82. Tsitsigiannis D., Kunze S., Willis D., Feussner I., and Nancy P. Keller, 2005. *Aspergillus* Infection Inhibits the Expression of Peanut 13S-HPODE–Forming Seed Lipoxygenases. *MPMI* 18(10):1081-9.
83. Turnera N., Subrahmanyamb S., Piletskyb S., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632(2):168-80
84. Van der Gaag B., Spath S., Dietrich H., Stigter E. , Boonzaaijer G., Ton van Osenbruggen, Kees Koopal, 2003. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food control* 14:251–254.
85. Yazdanpanah H, Mohammadi T, Abouhossain G, Cheraghali AM., 2005. Effect of roasting on degradation of Aflatoxins in contaminated pistachio nuts. *Food chem toxicology*, 45:812-816.
86. Yongchao L., Wanchun S., Peter C., 2005. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environmental Pollution*, 84:247-53
87. Yu Y. Tang & Hsu Y. Lin & Ying C. Chen & Wei T. Su & Si C. Wang & Lih C. Chiueh & Yang C. Shin, 2013. Development of a Quantitative Multi-Mycotoxin Method in Rice, Maize, Wheat and Peanut Using UPLC-MS/MS. *Food Anal. Method*, 141(3):1747-1755
88. Yueju Z., Selvaraj J., Fuguo X., Lu Z., Yan W., Huimin S., Xinxin T., Lichao S., Lancine S., Yawa M., Yang L., 2014. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 9(3): e92486.

89. Zheng M., Richard J. & Johann Binder, 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161(5):261-273
90. Θανασσουλόπουλος, 1995, Μυκητολογικές ασθένειες φυτών μεγάλης καλλιέργειας. Εκδόσεις Ζήτη
91. Καραμάνος, 1999. Τα σιτηρά των εύκρατων κλιμάτων. Εκδόσεις Παπαζήση

