

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

Ανίχνευση και προσδιορισμός αφλατοξινών, φουμονισινών και μυκοτοξικογόνων μυκήτων *Aspergillus* spp. και *Fusarium* spp. σε καλλιέργειες καλαμποκιού στη Θεσσαλία και Μακεδονία

ANNA A. ΓΚΑΤΖΟΥΝΗ

**Μεταπτυχιακή διατριβή υποβληθείσα στο
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

ΑΘΗΝΑ 2016

ANNA A. ΓΚΑΤΖΟΥΝΗ

Ανίχνευση και προσδιορισμός αφλατοξινών, φουμονισινών και μυκοτοξικογόνων μυκήτων *Aspergillus* spp. και *Fusarium* spp. σε καλλιέργειες καλαμποκιού στη Θεσσαλία και Μακεδονία



**Μεταπτυχιακή διατριβή υποβληθείσα στο
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

ΑΘΗΝΑ 2016

Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπων: Δ.Ι. Τσιτσιγιάννης, Επίκουρος Καθηγητής

Μέλη: Ε.Ι. Παπλωματάς, Καθηγητής

Α.Κ. Τζίμα, Λέκτορας

.....σ' όσους ήρθαν για να μείνουν,

σ' όσους έφυγαν πριν γίνουν....

(Γ. Ευαγγελάτος)

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών την περίοδο Σεπτεμβρίου 2014 - Απριλίου 2016, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Φυτοπαθολογίας, Δημητρίου Τσιτσιγιάννη.

Θερμές είναι οι ευχαριστίες προς τον επιβλέποντα Κ. Τσιτσιγιάννη, ο οποίος επέλεξε να μου εμπιστευθεί την εν λόγω μεταπτυχιακή εργασία και ήταν παρών σε όλα τα στάδια της εκπόνησής της. Το αντικείμενο της μελέτης ήταν ιδιαίτερος επίκαιρο και απόλυτα εντός των ενδιαφερόντων μου. Ευχαριστώ λοιπόν τον καθηγητή μου διότι ήταν αδιάκοπα και αγόγγυστα «συνεργός» στη διεκπεραίωση της εργασίας αυτής, κάνοντας πάντοτε εύστοχες και απαραίτητες επισημάνσεις, δίνοντας εναύσματα για την ορθότερη και αρτιότερη ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών, και για την επισταμένη διόρθωση του παρόντος κειμένου. Τέλος τον ευχαριστώ θερμά για την άψογη συνεργασία καθόλη την διάρκεια της παραμονής μου στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας.

Ουσιαστική ήταν η συμβολή του Καθηγητή Φυτοπαθολογίας, Επαμεινώνδα Παπλωματά, ο οποίος παρακολουθούσε διακριτικά την εξέλιξη των πειραμάτων αλλά και την πορεία μου στον εργαστηριακό χώρο. Ήταν πάντοτε διατεθειμένος να με συμβουλέψει, να με βοηθήσει κατά την πειραματική διαδικασία και κυρίως στην φυλογενετική ανάλυση, αλλά και να κάνει διορθώσεις στο τελικό κείμενο ώστε το αποτέλεσμα να είναι το επιθυμητό.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Λέκτορα Αλίκη Τζίμα, ή αλλιώς την « Αλίκη μου....», η οποία είχε ειλικρινές ενδιαφέρον για την εξέλιξη και την επιτυχία των πειραμάτων μου. Ήταν συνεχής η επαφή μας και δεν ήταν λίγες οι φορές που μου παρείχε βιβλιογραφικό υλικό ώστε να με διευκολύνει και να δώσει λύσεις στα πειραματικά προβλήματά μου. Επίσης με δίδαξε πώς να κατασκευάσω τα φυλογενετικά δένδρα με μεγάλη υπομονή!

Ευγνωμοσύνη νιώθω για την «Κυρία μου...», την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πολύμνια Αντωνίου, η οποία στάθηκε σύμβουλος τόσο σε πειραματικά ζητήματα όσο και σε προσωπικά. Την ευχαριστώ γιατί το γραφείο της ήταν πάντα ανοικτό για μένα!

Ευχαριστώ τη Δρ. Μυρτώ Δημακοπούλου για το ενδιαφέρον της για την μελέτη αυτή αλλά και την γλυκύτητά με την οποία με αντιμετώπιζε, την Επίκουρο Καθηγήτρια Ελισάβετ Χατζηβασιλείου για την παροχή συσκευών ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού μυκοτοξινών, τον Επίκουρο Καθηγητή Σωτήρη Τζάμο για το ενδιαφέρον του για την διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής και τη Δρ. Γαρυφαλιά Φραγκογεώργη για τις μακροσκελείς συζητήσεις μας.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλο το «φοιτητικό» δυναμικό του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας. Πιο συγκεκριμένα τη Φίλη μου – Υποψήφια διδάκτορα Μαρία Ηλιάδη για την συμπαράστασή της, την παιδική μου συνοδοιπόρο Μαρία Καϊάφα, τον Υποψήφιο διδάκτορα Μιχάλη Καμινιάρη για την βοήθειά του και τη Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια Χριστίνα Λαγογιάννη για το ενδιαφέρον της, ευχαριστώ από καρδιάς. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ειρήνη Κίσσα για την βοήθεια και την αγάπη της, την Κατερίνα Αρσένη και την Ελισάβετ Βαρβούνη για την συμπαράστασή τους, τον Νίκο Μαστροδήμο για την παιδικότητά του, την Υποψήφια Διδάκτορα Δανάη Γκίζη για τα γρήγορα πρωτόκολλα που ανακάλυπτε και τον Υποψήφιο Διδάκτορα Σταύρο Παλαβούζη ο οποίος ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει και με άφηνε πάντα να «κλέβω νόμιμα» υλικά από τα κουτιά του.

Τέλος, δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που στέκεται δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια με αυτοθυσία και λέγοντας πάντα μια φράση: «Πάτησε σ' εμάς και ανέβα ψηλότερα....».

Σας ευχαριστώ!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	1
Abstract.....	2
1.Εισαγωγή.....	3
1.1Αραβόσιτος (<i>Zea mays</i>).....	3
1.1.1.Ο Αραβόσιτος στην Ελλάδα.....	6
1.2.Ασθένειες Αραβοσίτου.....	7
1.2.1.Σήψεις σπάδικα (Ear Rots).....	10
1.3.Το γένος <i>Fusarium</i> spp.....	10
1.3.1 Ο μύκητας <i>Fusarium graminearum</i>	12
1.3.2 Ο μύκητας <i>Fusarium verticillioides</i>	14
1.3.3 Ο μύκητας <i>Fusarium proliferatum</i>	17
1.3.4 Ο μύκητας <i>Fusarium subglutinans</i>	18
1.3.5 Ο μύκητας <i>Fusarium incarnatum- semitectum</i>	19
1.3.6 Ο μύκητας <i>Fusarium thapsinum</i>	21
1.3.7. Μοριακή ταυτοποίηση ειδών <i>Fusarium</i> sp.....	22
1.4 Το γένος <i>Aspergillus</i> spp.....	24
1.4.1 1. <i>Aspergillus</i> spp. section <i>Flavi</i>	26
1.4.1.1 <i>Aspergillus flavus</i> – <i>Aspergillus parasiticus</i>	26
1.4.2 <i>Aspergillus</i> spp. section <i>Nigri</i>	28
1.4.3. Μοριακή ταυτοποίηση ειδών <i>Aspergillus</i> sp.....	29
1.5. Μυκοτοξίνες.....	30
1.5.1 Οι Φουμονισίνες.....	31
1.5.2 Οι Τριχοθηκίνες.....	33
1.5.3 Η Ζεαραλενόνη.....	34

1.5.4 Οι Αφλατοξίνες.....	35
1.5.5 Αντιμετώπιση μυκοτοξινών.....	38
1.6 Μέθοδοι Ανίχνευσης Μυκοτοξινών.....	39
1.6.1 Αναλυτικές τεχνικές.....	40
1.7 Η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία.....	41
1.8 Διατροφικά σκάνδαλα.....	42
2. Σκοπός της μελέτης.....	44
3. Υλικά και μέθοδοι.....	45
3.1 Δειγματοληψία Αραβοσίτου.....	45
3.2 Επεξεργασία Σπαδικών Αραβοσίτου.....	47
3.3 Τεχνική Απομόνωσης Μυκήτων.....	47
3.3.1 Θρεπτικά Υλικά Απομόνωσης Μυκήτων.....	49
3.4 Ανάλυσης Μυκοτοξινών.....	50
3.4.1 Ανάλυση Μυκοτοξινών από Αραβόσιτο.....	50
3.4.2 Ανάλυση Μυκοτοξινών από Στελέχη.....	52
3.5 Διαδικασία ταυτοποίησης μυκήτων <i>Fusarium sp.</i> και <i>Aspergillus sp.</i>	52
3.5.1 Διαχωρισμός με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	52
3.5.2 Μοριακός χαρακτηρισμός.....	52
3.5.2.1 DNA Extraction.....	53
3.5.2.2 PCR reactions- PCR Purification Kit.....	53
3.5.2.3 Αλληλούχιση δειγμάτων.....	54
3.6 Φυλογενετική ανάλυση.....	54
4. Αποτελέσματα.....	56
4.1 Αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας σε αγρούς αραβοσίτου της Ελλάδας.....	56
4.2 Αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθένειας σε αγρούς αραβοσίτου της Ελλάδας.....	59

4.3 Ανίχνευση και προσδιορισμός αφλατοξινών και φουμονισινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας.....	61
4.4 Απομονώσεις μυκήτων <i>Fusarium</i> spp. και <i>Aspergillus</i> spp. από αγρούς Θεσσαλίας και Μακεδονίας.....	64
4.4.1 Μορφολογική διάκριση μυκήτων <i>Fusarium</i> spp. και <i>Aspergillus</i> spp. από αγρούς Θεσσαλίας και Μακεδονίας.....	64
4.4.2 Πληθυσμιακή διακύμανση και σύνθεση μυκοτοξικογόνων μυκήτων του γένους <i>Aspergillus</i> και <i>Fusarium</i> spp. σε καλλιέργειες καλαμποκιού της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας.....	69
4.4.3 Σύνθεση μυκοτοξικογόνων μυκήτων του γένους <i>Aspergillus</i> και <i>Fusarium</i> spp. σε καλλιέργειες καλαμποκιού της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας.....	74
4.5 Φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων των μυκήτων <i>Fusarium</i> spp. και <i>Aspergillus</i> spp. από αγρούς Θεσσαλίας και Μακεδονίας.....	83
4.6 Προσδιορισμός μετεωρολογικών δεδομένων της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας.....	94
5. Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	100
6. Βιβλιογραφία.....	102

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μύκητες των γενών *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. προκαλούν σήψεις σπαδικών και παράγουν τις καρκινογόνες μυκοτοξίνες φουμονισίνες και αφλατοξίνες αντίστοιχα, στην καλλιέργεια του καλαμποκιού. Η μόλυνση του καλαμποκιού με τους μυκοτοξικογόνους μύκητες ξεκινά με το μετάξωμα του σπάδικα, συνεχίζεται μέχρι την φυσιολογική ωρίμανση των σπόρων και αυξάνεται μέχρι το στάδιο της συγκομιδής ενώ το πρόβλημα εντείνεται σε μετασυλλεκτικό επίπεδο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η καταγραφή της υφιστάμενης κατάστασης στη Θεσσαλία, στην Κεντρική και Ανατολική Μακεδονία όσον αφορά τα επίπεδα μυκοτοξινών που παράγονται από τα είδη των γενών *Aspergillus* και *Fusarium* αλλά και την πληθυσμιακή τους διακύμανση στο καλαμπόκι, μια ιδιαίτερα σημαντική καλλιέργεια της Ελλάδας όπου καλλιεργούνται περισσότερα από 1.300.000 στρέμματα σε αυτές τις περιοχές. Απώτερος στόχος της μελέτης είναι η βελτίωση της ποιότητας του καλαμποκιού που θα μπορούσε να οδηγήσει στην αύξηση της ανταγωνιστικότητας και της εμπορικότητάς του στην ελληνική και διεθνή αγορά.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια σειρά εκτεταμένων δειγματοληψιών καλαμποκιού σε 70 επιλεγμένους αγρούς της Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας (Ν. Καρδίτσας, Ν. Τρικάλων, Ν. Λάρισας, Ν. Μαγνησίας & Ν. Καβάλας, Ν. Ξερρών, Ν. Δράμας). Στους αγρούς έγινε εκτίμηση της έντασης της ασθένειας των σήψεων σπαδικών καλαμποκιού (ποσοστό μολυσμένων σπαδικών με συμπτώματα σήψεων από *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. ανά αγρό) όπου υπήρχε διακύμανση της προσβολής από 5-100%, ενώ η σοβαρότητα της ασθένειας των σήψεων των σπαδικών (ποσοστό μολυσμένων σπόρων με συμπτώματα σήψεων ανά σπάδικα ανά αγρό) κυμαινόταν από 0-100%. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ποσοτικός έλεγχος αφλατοξινών και φουμονισινών κατά το στάδιο της ωρίμανσης των συλλεχθέντων σπαδικών, όπου έδειξε ότι σε πολλές περιοχές της Θεσσαλίας και Μακεδονίας τα ποσοστά τοξινών ήταν υψηλότερα από τα ανώτατα θεσπισμένα όρια και κυμαινόταν από 0-100 ppm για τις φουμονισίνες και 0-150 ppb για τις αφλατοξίνες.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της πληθυσμιακής διακύμανσης και σύνθεσης των μυκοτοξικογόνων μυκήτων στους επιλεγμένους αγρούς. Από τους συλλεχθέντες σπάδικες απομονώθηκαν μύκητες του γένους *Aspergillus* spp. και *Fusarium* spp. και ακολούθησε ταυτοποίησή τους με μορφολογικές και μοριακές μεθόδους. Τα αποτελέσματα έδειξαν για πρώτη φορά στην Ελλάδα την απομόνωση και ταυτοποίηση των ειδών *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. incarnatum*, *F. thapsinum*, *F. solani*, *F. oxysporum* και *F. brachygibbosum* καθώς και των ειδών *A. flavus* και *A. niger*. Τα στελέχη αυτά εξετάστηκαν στη συνέχεια ως προς τη φυλογενετική τους συγγένεια. Ακολούθησε εξέταση 130 στελεχών ως προς τη μυκοτοξικογόνο ικανότητά τους ώστε να πραγματοποιηθεί ποσοτικός προσδιορισμός της παραγόμενης φουμονισίνης και αφλατοξίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα περισσότερα είδη φουζαρίων είναι ισχυρά τοξικογόνα και παράγουν περισσότερη από 20 ppm φουμονισίνη ενώ τα περισσότερα είδη ασπεργίλλων είναι μη τοξικογόνα με εξαίρεση να αποτελούν π.χ. το στέλεχος 40 που παρήγαγε 40 ppb αφλατοξίνη.

Τέλος, με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στα επίπεδα των παραγόμενων αφλατοξινών και φουμονισινών στην καλλιέργεια καλαμποκιού, έγινε συσχέτιση τους με τα μετεωρολογικά δεδομένα των τριών τελευταίων χρόνων (2012-2014) από διάφορες περιοχές της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας, τα οποία έδειξαν ότι οι βροχοπτώσεις του 2014 πιθανόν να συντέλεσαν στα έντονα συμπτώματα σήψεων από τα είδη του γένους *Fusarium* spp. και περιορίσαν τις προσβολές από είδη του γένους *Aspergillus* spp. χωρίς όμως να περιοριστούν σημαντικά οι αφλατοξίνες στο καλαμπόκι.

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή τακτικών ελέγχων ανίχνευσης μυκοτοξινών στον αραβόσιτο σε προσυλλεκτικό και μετασυλλεκτικό επίπεδο από τους παραγωγούς, εμπόρους και αρμόδιες υπηρεσίες με απώτερο στόχο στη βελτίωση της ποιότητας και ασφάλειας του καλαμποκιού. Οι έλεγχοι αυτοί είναι απαραίτητοι για την αύξηση της ανταγωνιστικότητας και της εμπορικότητάς του αραβοσίτου στην ελληνική και διεθνή αγορά αφού θα το καθιστούν αυτόματα αξιόπιστο προϊόν με πλήρη φάκελο ιχνηλασιμότητας.

Λέξεις κλειδιά: *Fusarium*, *Aspergillus*, Φουμονισίνη, Αφλατοξίνη, Αραβόσιτος.

ABSTRACT

Various species of *Aspergillus* and *Fusarium* cause ear and grain molds in maize and produce carcinogenic mycotoxins (i.e. aflatoxins and fumonisins) that are particularly harmful to humans and animals. *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. infection starts usually at physiological maturity of the seed at preharvest level and increase up to storage at postharvest level. The purpose of this study is to evaluate the disease incidence and severity of ear rots and evaluate the aflatoxin and fumonisin contamination caused by *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. in maize fields in Thessaly, in Central and Eastern Macedonia that are major corn producing areas of Greece with varying climatic conditions. Maize is a very important crop in Greece where more than 1.3 million acres to be grown in the above mentioned regions. The ultimate goal of the study is to improve the quality of corn that could lead to increase its competitiveness and marketability in national and international market.

Initially, field surveys were conducted and ear samples were collected from 70 fields of Central and Northern Greece (in Prefectures of Karditsa, Trikala, Larisa, Magnesia, Kavala, Serres and Drama). The disease incidence of maize ear rots (percentage of infected plants with ear rot symptoms caused by *Fusarium* spp. and *Aspergillus* spp. per field) ranged from 5% to 100% whereas the disease severity of ear rots (percentage of infected grain rot symptoms per ear per field) ranged from 0% to 100%. In parallel, quantification of aflatoxins and fumonisins content of the harvested ears, demonstrated that in many regions of Thessaly and Macedonia, mycotoxin levels were higher than the maximum approved EU limits and ranged between 0-100 ppm for fumonisins and 0-150 ppb for aflatoxins.

Then, in order to assess the geographical and physiological divergence and distribution among *Aspergillus* and *Fusarium* species in maize fields, a collection of more than 1000 fungal isolates was created and analyzed for morphological, microscopic and molecular differences. The results showed for the first time in Greece, the isolation and identification of the following species: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. incarnatum*, *F. thapsinum*, *F. solani*, *F. oxysporum* and *F. brachygibbosum* and the *A. flavus* and *A. niger* species. These strains were then analyzed for their phylogenetic relationships. Next, in order to assess the dynamics of the population composition of aflatoxins and fumonisins producers during the maize growing season, 130 strains were examined for their mycotoxigenic ability. The results showed that most *Fusarium* species were highly toxigenic and able to produce more than 20 ppm fumonisin while most *Aspergillus* species are non-toxicogenic, with an exception of strain 40 that was able to produce 40 ppb of aflatoxin.

Finally, in order to assess the influence of environmental conditions at the level of aflatoxins and fumonisins produced in maize, a correlation was performed between meteorological data of the last three years (2012-2014) from different regions of Thessaly and Macedonia and the mycotoxin contamination levels that were found. The results demonstrated that the high amount of rainfall in 2014 likely contributed to the severe observed ear rot symptoms from the species of the genus *Fusarium* and the restricted ear rot symptoms caused by *Aspergillus* spp. without though observing a reduced contamination of aflatoxin in corn samples.

Based on the results of this study, it is apparent the necessity to conduct regular inspections for mycotoxins in maize at pre- and postharvest level from all involved partners (producers, traders and authorities) with a goal to improve the maize quality and safety. These inspections are necessary to increase the competitiveness and marketability of maize in national and international markets since maize will be considered as a reliable product with full traceable production history. Additionally, a better understanding of the epidemiology of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. and their associated mycotoxins in Greece would facilitate the implementation of an integrated management approach to control and reduce ear rots and mycotoxins contamination in maize.

Keywords: *Fusarium*, *Aspergillus*, Fumonisin, Aflatoxin, Maize

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αραβόσιτος (*Zea mays*)

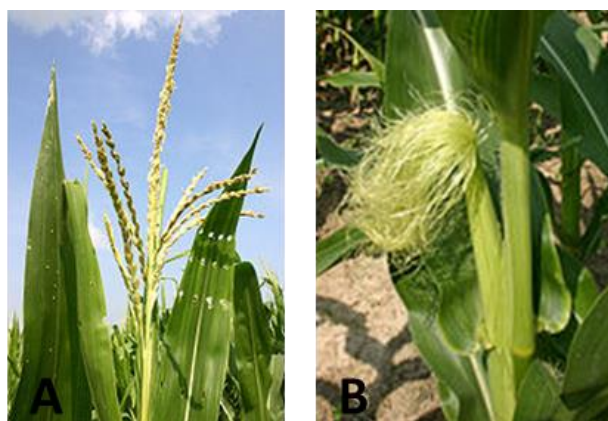
Ο Αραβόσιτος ή καλαμπόκι (*Zea mays* L.) είναι σιτηρό της οικογένειας των Ποσειδών (*Poaceae*) ή των Αγρωστωδών (*Gramineae*). Η καταγωγή του είναι από την Αμερικανική Ήπειρο, όπου από το 5200 π.Χ. φαίνεται να καλλιεργείται στο Μεξικό. Από την Κεντρική Αμερική διαδόθηκε στη Νότια Αμερική και καλλιεργήθηκε από τους Αζτέκους, τους Μάγια και τους Ίνκας. Στην Ευρώπη εμφανίζεται στα μέσα του 15^{ου} αιώνα και εισάγεται στην Ελλάδα το 1600 μ.Χ. από τη Βόρεια Αφρική με το όνομά του, «αραβόσιτος», να σημαίνει «σίτος των Αράβων» (Καραμάνος, 2002).

Σε παγκόσμιο επίπεδο ο αραβόσιτος καλλιεργείται πρωτίστως για τον καρπό του και δευτερευόντως για παραγωγή βιομάζας για άμεση κατανάλωση ή ενσίρωση. Ο καρπός του αραβοσίτου χρησιμοποιείται σε ποσοστό 82% ως κτηνοτροφή και σε μικρό ποσοστό για τη διατροφή του ανθρώπου. Η ξηρή ουσία του καρπού του αραβοσίτου έχει υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται στη βιομηχανία κυρίως για την εξαγωγή αμύλου. Ο αραβόσιτος ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του σπόρου κατατάσσεται σε επτά κατηγορίες, σε οδοντοειδής (*Zea mays* var. *indentata*), σκληρόκοκκος (*Zea mays* var. *indurata*), αμυλώδης (*Zea mays* var. *amylacea*), σακχαρώδης (*Zea mays* var. *saccharata*), κηρώδης (*Zea mays* var. *ceratina*), μικρόκοκκος (*Zea mays* var. *evarta*) και επενδεδυμένος (*Zea mays* var. *tunicata*) (Εικόνα 1). Ως κτηνοτροφή χρησιμοποιείται κυρίως ο καρπός, σε νωπή ή αποξηραμένη μορφή, αλλά και το ενσίρωμα, αν και ως τεχνική απαιτεί ιδιαίτερες γνώσεις, τόσο για το κατάλληλο υβρίδιο, όσο και για την εποχή συγκομιδής της καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα κατά την περίοδο μεταξύ της άνθησης και του αλωνισμού για ενσίρωμα, η ξηρή ουσία αυξάνεται σταδιακά, το άμυλο αυξάνεται, η περιεκτικότητα σε αζωτούχες ενώσεις (πρωτεΐνες) παραμένει σχεδόν σταθερή ενώ η περιεκτικότητα σε ινώδεις ουσίες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη κ.α.) μειώνεται. Κατά την περίοδο συγκομιδής είναι σημαντικό τα βασικά αυτά συστατικά του ενσιρώματος να βρίσκονται σε σωστή αναλογία ώστε να επιτυγχάνεται καλής ποιότητας και υψηλού δυναμικού ενσίρωμα ενώ η προσλαμβανόμενη ενέργεια από τα ζώα να ανέρχεται στα επιθυμητά επίπεδα. Η ισορροπημένη σχέση όλων των παραπάνω αποτελεί χαρακτηριστικό του υβριδίου αλλά και της εποχής συγκομιδής για ενσίρωμα (Ξηρά ουσία 30-35%). Τέλος, τα υποπροϊόντα του αραβοσίτου αξιοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων και σε πλήθος βιομηχανικών χρήσεων (Καραμάνος, 2002).



Εικόνα 1. Τύποι καλαμποκιού: Α. Οδοντοειδής, Β. Σκληρόκοκκος, Γ. Αμυλώδης, Δ. Σακχαρώδης, Ε. Κηρώδης, Ζ. Μικρόκοκκος, Η. Επενδεδυμένος (<https://en.wikipedia.org/wiki/Maize>).

Τα αναπαραγωγικά όργανα του αραβοσίτου είναι η αρσενική και η θηλυκή ταξιανθία. Η αρσενική ταξιανθία είναι φόβη με τον κεντρικό της άξονα να αποτελεί προέκταση του βλαστού (Εικόνα 2Α). Σύμφωνα με μελέτες, ως συνάρτηση του γονοτύπου του αραβοσίτου προκύπτει ο αριθμός των γυρεοκόκκων, ο οποίος κυμαίνεται από 2 έως 5 εκατομμύρια. Η φόβη είναι εξαιρετικά εύθραυστη στο σημείο ένωσης του ποδίσκου της με το βλαστό λόγω του μήκους της που είναι περί τα 30 cm. Αυτό το χαρακτηριστικό της φόβης είναι ιδιαίτερος σημαντικό για τα υβρίδια σποροπαραγωγής, όπου πρέπει να αφαιρείται. Οι θηλυκές ταξιανθίες, μπορεί να είναι περισσότερες της μιας, καλούνται σπάδικες και αναπτύσσονται σε βραχείες διακλαδώσεις του κεντρικού στελέχους, περίπου στη μέση του βλαστού καθώς το βάρος τους είναι μεγάλο και θα ήταν σχεδόν αδύνατο να συγκρατηθεί στη κορυφή του φυτού χωρίς να το πλαγιάσει (Εικόνα 2Β) (Καραμάνος, 2002).



Εικόνα 2. Α. Αρσενική ταξιανθία/ φόβη του αραβοσίτου, Β. Θηλυκή ταξιανθία/ σπάδικας του αραβοσίτου (<https://en.wikipedia.org/wiki/Maize>).

Ο σπόρος του αραβοσίτου φυτρώνει και επέρχεται ανάδυση των φυταρίων όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και αερισμού είναι ευνοϊκές, ώστε να είναι δυνατές οι απαραίτητες μορφολογικές και χημικές μεταβολές. Καθοριστικός είναι ο ρόλος της θερμοκρασίας για την ταχύτητα βλάστησης του σπόρου. Εν γένει σε θερμοκρασίες μικρότερες των 10°C η βλάστηση δεν είναι δυνατή, ενώ σε θερμοκρασίες εδάφους περί τους 20°C η ανάδυση του φυταρίου πραγματοποιείται σε 4-6 ημέρες μετά τη σπορά (Aldrich et al., 1975). Το ριζικό σύστημα του αραβοσίτου αναπτύσσεται ταχύτατα σε συνάρτηση πάντοτε με την υφή, τη δομή, τη θερμοκρασία και την υγρασία του εδάφους και φτάνει σε βάθος μεγαλύτερο των 2 m. Η ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος του φυτού για αρκετό χρονικό διάστημα περιορίζεται μόνο στα πρώτα φύλλα, χωρίς σημαντική επιμήκυνση ώστε να σχηματιστούν οι βλαστικές καταβολές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό της βλαστικής ανάπτυξης σε δύο περιόδους: α) την περίοδο μέχρι το τέλος του σχηματισμού βλαστικών καταβολών του κορυφαίου μεριστώματος, όπου θα έχουν αναπτυχθεί 8-10 φύλλα και β) την περίοδο από την διαφοροποίηση του κορυφαίου μεριστώματος από βλαστικό σε αναπαραγωγικό, όπου εμφανίζεται η αρσενική ταξιανθία. Η διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης εξαρτάται τόσο από το γονότυπο, όσο από τη θερμοκρασία και τη φωτοπερίοδο, καθώς το διάστημα από την ανάδυση των φυτών έως την εμφάνιση της φόβης προσδιορίζει τους πρώιμους ή όψιμους γονοτύπους. Τόσο η φωτοσύνθεση όσο και η βλαστική ανάπτυξη φαίνεται πως φτάνουν στα υψηλότερα επίπεδα όταν η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 30-33°C, με τη φωτοσύνθεση να επηρεάζει την ανάπτυξη του φυτού μόνο κατά την διάρκεια της ημέρας, ενώ ο ρυθμός ανάπτυξης να είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας του εικοσιτετραώρου (Καραμάνος, 2002).

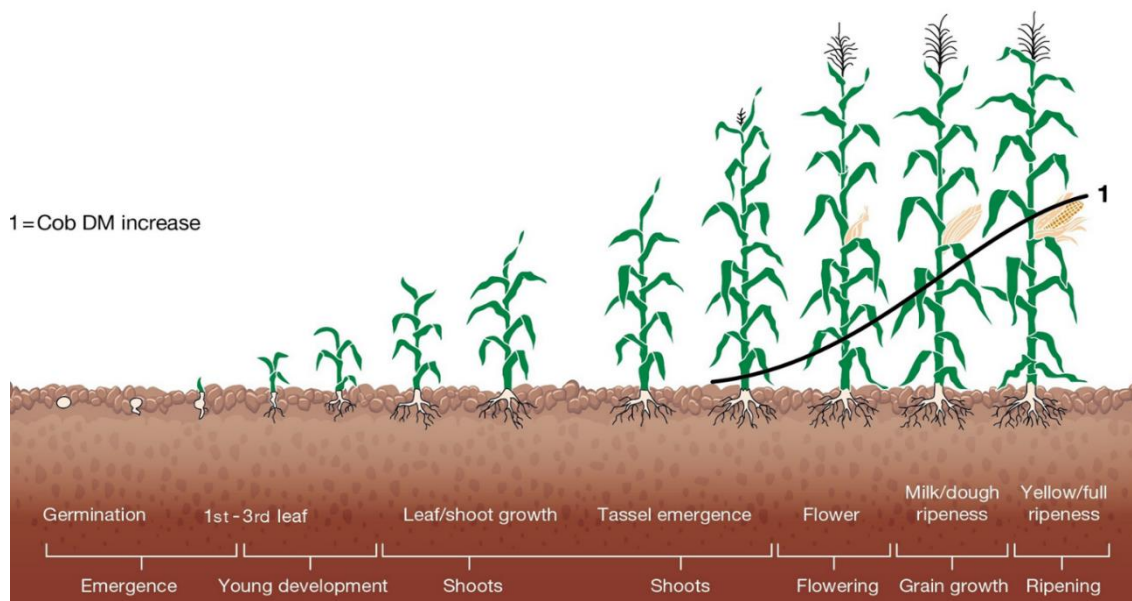
Η ολοκλήρωση και της τελευταίας καταβολής φύλλου του κορυφαίου μεριστώματος έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη της αναπαραγωγικής ανάπτυξης με το σχηματισμό των αρσενικών και θηλυκών ταξιανθιών. Η αναπαραγωγική ανάπτυξη αρχικά δεν είναι οπτικά αντιληπτή καθώς υπάρχει χρονική ταύτιση με τη βλαστική ανάπτυξη στο φυτό του αραβοσίτου. Η βλαστική ανάπτυξη ολοκληρώνεται λίγο πριν την έξοδο της φόβης σε αντίθεση με την αναπαραγωγική που αποπερατώνεται στα τελευταία στάδια της ζωής του φυτού. Από τη στιγμή της εμφάνισης της φόβης έως την πλήρη ωρίμανσή της μεσολαβεί διάστημα 10 ημερών, οπότε και ολοκληρώνεται και η βλαστική ανάπτυξη. Η άνθηση της φόβης δεν είναι ομοιόμορφη και αυτό έχει ως

αποτέλεσμα η διάρρηξη των ανθέρων να απαιτεί ένα χρονικό διάστημα 5-8 ημερών ώστε να επιτευχθεί η επικονίαση και η γονιμοποίηση (Εικόνα 3Α). Οι καταβολές των σπαδικών σχηματίζονται λίγο μετά την καταβολή της φόβης, πλευρικά, στον 6^ο- 8^ο κόμβο κάτω από την φόβη, αλλά για διάστημα 10 ημερών παραμένουν υπανάπτυκτες. Το τελικό μέγεθος του σπάδικα καθορίζεται σε μια περίοδο 10-15 ημερών πριν την εμφάνιση των σηλών (μετάξωμα) (Εικόνα 3Β), με πιθανή έλλειψη νερού ή θρεπτικών συστατικών του εδάφους στο διάστημα αυτό να επιφέρει μειωμένο μέγεθος σπάδικα και περιορισμό του αριθμού των καρπών σε αυτόν. Ταυτόχρονα οι δυσμενείς συνθήκες μπορεί να επιφέρουν καθυστέρηση της ανάπτυξης του σπάδικα σε σχέση με τη φόβη, με αποτέλεσμα την ατελή επικονίαση λόγω επιβράδυνσης του μεταξώματος (Καραμάνος, 2002).



Εικόνα 3. Α. Ανθισμένοι ανθήρες αρσενικής ταξιανθίας, Β. Εμφάνιση μεταξώματος σε νεαρές θηλυκές ταξιανθίες (<https://en.wikipedia.org/wiki/Maize>).

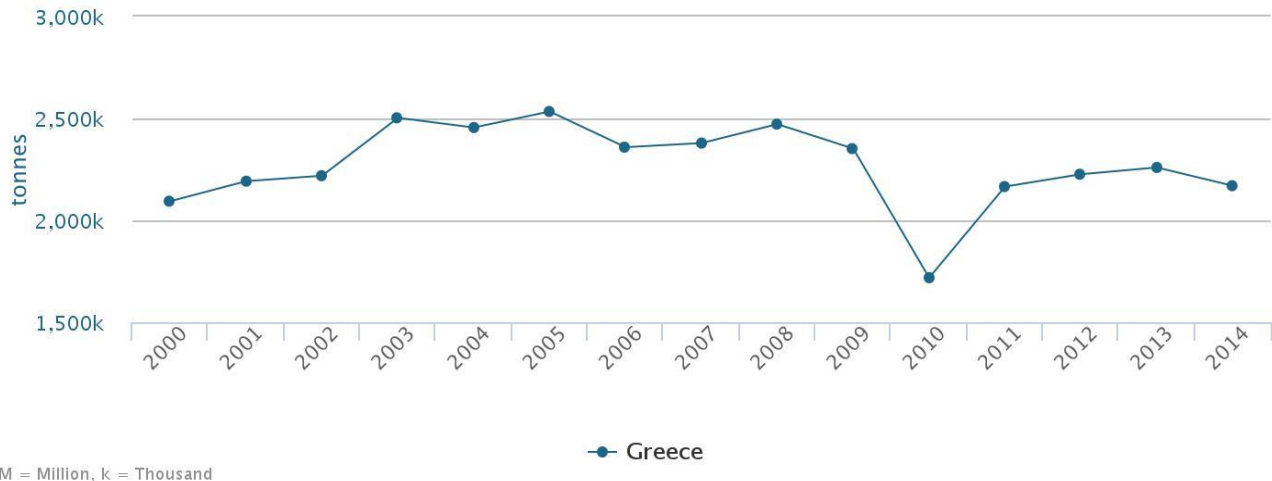
Ο αραβόσιτος είναι φυτό ανεμόφιλο, ως εκ τούτου η γύρη μεταφέρεται σε μεγάλες αποστάσεις με τη βοήθεια του ανέμου, ενώ τα έντομα φαίνεται πως δεν συμβάλουν στην επικονίαση δεδομένου ότι δεν επισκέπτονται τους σπάδικες (Aldrich et al., 1975). Η επικονίαση στον αραβόσιτο, όπως σε όλα τα ανεμόφιλα φυτά, χαρακτηρίζεται από σπατάλη γύρης και διαρκεί 5-8 ημέρες, με μέγιστη παραγωγή γύρης κατά της 3^η ημέρα της άνθησης των ανθέρων. Αν ληφθεί υπόψη ο αριθμός των γυρεοκόκκων σε σχέση με τον αριθμό των στύλων που αναπτύσσει ο σπάδικας, υπολογίζεται ότι αντιστοιχούν περίπου 4.500 γυρεόκοκκοι σε κάθε στύλο. Ο χρόνος από την επικονίαση μέχρι την γονιμοποίηση είναι συνάρτηση της ποικιλίας, της θερμοκρασίας, της ατμοσφαιρικής υγρασίας και κυρίως του μήκους του στύλου. Ο χρόνος από την εμφάνιση των στύλων και τη γονιμοποίηση έως την ωρίμανση του σπάδικα είναι σχεδόν σταθερός και κυμαίνεται από 50-63 ημέρες. Ο σπάδικας θεωρείται ώριμος όταν ποσοστό μεγαλύτερο του 75% των καρπών είναι φυσιολογικά ώριμοι, ενώ η φυσιολογική ωρίμανση του καρπού επιτυγχάνεται όταν παύσει η συσσώρευση ξηρού βάρους, με την υγρασία να κυμαίνεται από 29-40 % (Εικόνα 4) (Καραμάνος, 2002).



Εικόνα 4. Στάδια ανάπτυξης αραβόσιτου (DM= dry matter : ξηρή ουσία) (www.kwschina.com).

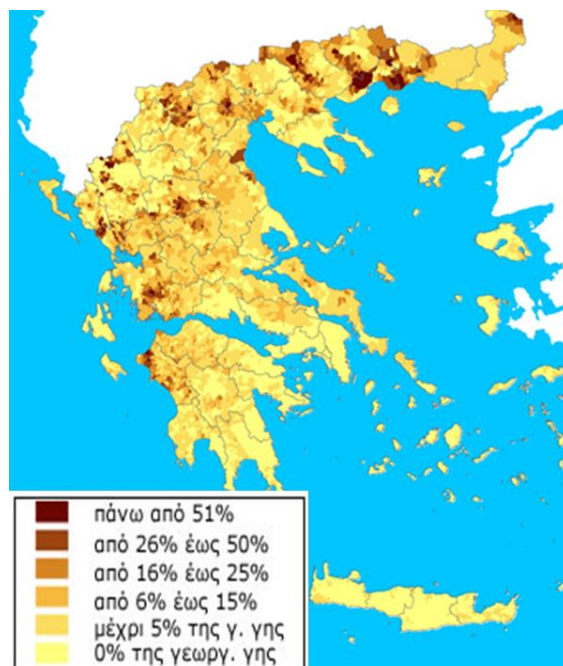
1.1.1. Ο Αραβόσιτος στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα σύμφωνα με πληροφορίες του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στα τέλη του 20^{ου} αιώνα από τη συνολική καλλιεργούμενη έκταση των 37.000.000 στρεμμάτων, ο αραβόσιτος καλλιεργούνταν στα 2.200.000 στρέμματα και η παραγωγή του κυμαινόταν σε επίπεδο 550.000 τόνων. Σύμφωνα όμως με νεότερα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) παρατηρείται αύξηση των καλλιεργούμενων εκτάσεων, οι οποίες έχουν ανέλθει στα 2.379.000 στρέμματα, ενώ η παραγωγή έχει πολλαπλασιαστεί και ανέρχεται στους 2.259.000 τόνους το 2014 (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Πορεία παραγωγής αραβοσίτου από το 2000-2014 στην Ελλάδα σύμφωνα με τον FAO.

Οι κύριες παραγωγές περιοχές είναι η Μακεδονία, η Θράκη και η Θεσσαλία, από τις οποίες προέρχεται το 80% της παραγωγής αραβοσίτου, ενώ ακολουθούν η Στερεά Ελλάδα, η Πελοπόννησος και Ήπειρος. Για την Βόρεια Ελλάδα η καλλιέργεια του αραβοσίτου είναι πολύ σημαντική καθώς καλλιεργούνται περισσότερα από 1.000.000 στρέμματα, ενώ στην Κεντρική Ελλάδα καλλιεργούνται περισσότερα από 300.000 στρέμματα (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Ο χάρτης της Ελλάδας με την κατανομή των εκτάσεων καλλιέργειας αραβοσίτου.

1.2. Ασθένειες και εχθροί Αραβοσίτου

Κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του αραβοσίτου το φυτό είναι δυνατό να προσβληθεί από πλήθος ασθενειών και εχθρών (Καραμάνος, 2002). Οι ασθένειες είναι κυρίως μυκητολογικές και βακτηριολογικές και περιλαμβάνουν (Θανασουλόπουλος 1995, Κατής 2010):

- i. **Τήξεις νεαρών φυταρίων** που οφείλονται τόσο σε προσβολές του σπόρου πριν ή κατά τη βλάστησή του όσο και σε προσβολές των νεαρών φυτών πριν και μετά την ανάδυσή τους και ευνοούνται από συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασιών μικρότερων των 10°C (*Pythium* sp., *Diplodia zeae*, *Gibberella zeae*, *Gibberella fugikuroi*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp.) (Εικόνα 7- Τήξη νεαρού φυταρίου από *Pythium* sp. - crops.extension.iastate.edu).
- ii. **Σηψιρριζίες** που οφείλονται σε προσβολή των ριζών του αραβοσίτου σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης με αποτέλεσμα το νανισμό, τη μειωμένη ευρωστία και την τάση των φυτών για πλάγιασμα (*Pythium* sp., *Diplodia zeae*, *Gibberella zeae* και *Gibberella fugikuroi*) (Εικόνα 8 – Σηψιρριζία από *Pythium* sp., - Maize diseases, 2004).
- iii. **Σήψεις στελέχους και σπαδικών** οι οποίες χαρακτηρίζονται από φαιό χρωματισμό στους κατώτερους κόμβους και περισσότερο εύθραυστο στέλεχος. Τα φυτά παρουσιάζουν συμπτώματα μάρανσης και τάση για πλάγιασμα. Χαρακτηριστικό σημείο είναι η εμφάνιση μαύρων στιγμάτων (πυκνίδια: καρποφορίες του μύκητα *Diplodia zeae*) κοντά στους κόμβους. Η προσβολή του στελέχους γίνεται από μολύσματα που μεταφέρονται με τον άνεμο και εγκαθίστανται μεταξύ κολεού και στελέχους. Η σήψη του σπάδικα χαρακτηρίζεται εξωτερικά από κιτρίνισμα των βρακτίων και εσωτερικά από λευκό μυκήλιο στο διάστημα μεταξύ διαδοχικών γραμμών των κόκκων. Είναι δυνατό σπάδικες χωρίς εμφανή συμπτώματα κατά τη συγκομιδή να παρουσιάσουν όλα τα συμπτώματα της ασθένειας κατά την αποθήκευση, ενώ παράλληλα οι μολυσμένοι καρποί είναι ακατάλληλοι για πολλαπλασιαστικό υλικό και για διατροφή μηρυκαστικών (*Diplodia zeae*). Επίσης σήψη στελέχους με ανάλογα συμπτώματα μπορεί να παρατηρηθεί, συνοδευόμενη όμως από ρόδινο μεταχρωματισμό της εντεριώνης και κάλυψη του στελέχους από λευκό μυκήλιο με μαύρα στίγματα (περιθήκια: καρποφορίες του μύκητα *Gibberella zeae*) (Εικόνα 9 – Σήψη σπάδικα από το μύκητα *Gibberella zeae* – Maize diseases, 2004).
- iv. **Μαύρη σήψη στελέχους** με την προσβολή να εμφανίζεται στους κατώτερους κόμβους, οι οποίοι παρουσιάζουν έναν καστανόφαιο χρωματισμό, ενώ εσωτερικά παρατηρούνται τα σκληρώτια του μύκητα. Αποτέλεσμα της προσβολής είναι η εμφάνιση συμπτωμάτων πρώιμης ωρίμανσης και η τάση των στελεχών να θραύονται στο ύψος του λαιμού. Λόγω της ικανότητας να σχηματίζει σκληρώτια, ο μύκητας έχει τη δυνατότητα να διατηρείται στο έδαφος και στα φυτικά υπολείμματα. Η ασθένεια ευνοείται στην καλλιέργεια σε ξηρά εδάφη και υψηλές θερμοκρασίες (*Macrophomina phaseolina*) (Εικόνα 10 – Μαύρος μεταχρωματισμός από τον μύκητα *M. phaseolina* σε στέλεχος καλαμποκιού, Maize diseases, 2004).
- v. **Βακτηριακή σήψη στελέχους νεαρών και ανεπτυγμένων φυτών αραβοσίτου** με τη μορφή αποχρωματισμένης κηλίδας στον λαιμό του φυτού, η οποία εξελίσσεται σε υγρή σήψη εντοπισμένη στο ίδιο μεσογονάτιο της αρχικής προσβολής. Αποτέλεσμα της προσβολής είναι η θραύση του στελέχους στο ύψος του λαιμού. Οι προσβολές ευνοούνται σε υγρά εδάφη. Τα βακτήρια εισχωρούν στο στέλεχος μέσα από τα στομάτια, φακίδια ή τυχόν πληγές (*Erwinia dissolvens*) (Εικόνα 11 – Σήψη στο λαιμό του στελέχους του αραβοσίτου από τον μύκητα *E. dissolvens*, Maize diseases, 2004).

vi. **Σήψη σπόρων αραβοσίτου** όχι εντοπισμένη αλλά διάσπαρτη στο σπάδικα, όπου οι σπόροι που έχουν προσβληθεί λαμβάνουν ένα ανοικτό ρόδινο χρώμα στην κορυφή τους, το οποίο εξελίσσεται σε βαμβακώδες ρόδινο μυκήλιο. Οι προσβολές εμφανίζονται σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης του αραβοσίτου, συνήθως μετά την εμφάνιση του βαθουλώματος στην κορυφή του οδοντοειδούς αραβοσίτου. Υγρός και θερμός καιρός θεωρείται ότι ευνοεί την εξάπλωση της ασθένειας (*Gibberrela fugikuroi*) (Εικόνα 12 – Σήψη σπόρων σε σπάδικα καλαμποκιού από τον μύκητα *Gibberrela fugikuroi*, Maize diseases, 2004).



vii. **Σήψη του άξονα του σπάδικα**, όπου προκαλεί γκριζό αποχρωματισμό ενώ παράλληλα προσβάλλονται και οι βάσεις των σπόρων όπου εμφανίζονται οι καρποφορίες του μύκητα με τη μορφή μαύρων σιγμάτων. Η ασθένεια γίνεται αντιληπτή συνήθως μετά τη συγκομιδή. Ο μύκητας έχει μειωμένη παθογένεια και προσβάλλει μόνο φυτά αραβοσίτου καταπονημένα από παγετό, ξηρασία ή άλλους παράγοντες και συνήθως ανώριμους σπάδικες. Οι προσβολές αυξάνονται όταν μετά την καταπόνηση ακολουθήσει βροχερός καιρός. Το παθογόνο διαδίδεται με τα υπολείμματα της καλλιέργειας του αραβοσίτου του και κυρίως με τους δευτερεύοντες σπάδικες που δεν έχουν συλλεγεί (*Nigrospora oryzae*) (Εικόνα 13 – Μελανός αποχρωματισμός του άξονα του σπάδικα αραβοσίτου από τον μύκητα *N. oryzae* Maize diseases, 2004).



viii. **Κοινός άνθρακας του αραβοσίτου**, ο οποίος προσβάλλει όλα σχεδόν τα υπέργεια τμήματα του φυτού του αραβοσίτου, αλλά κυρίως το σπάδικα και προκαλεί όγκους ποικίλου μεγέθους. Οι όγκοι καλύπτονται από μία μεμβράνη λευκού χρώματος η οποία περικλείει τα τελειοσπόρια του μύκητα. Σε ορισμένο στάδιο η μεμβράνη διαρρηγνύεται και ελευθερώνονται τα σπόρια του μύκητα. Η έκταση της ζημιάς που προκαλείται εξαρτάται από το μέγεθος και τον αριθμό των όγκων και το τμήμα του φυτού όπου αναπτύσσεται ο όγκος, ενώ μεγάλοι όγκοι στη φόβη ή επάνω από το σπάδικα μειώνουν την γονιμοποίηση κατά 30-100%. Όγκοι στο στέλεχος προκαλούν κάμψη του στελέχους (*Ustilago maydis*) (Εικόνα 14 – Όγκοι στελέχους καλαμποκιού προερχόμενοι από τον μύκητα *U. maydis*, Maize diseases, 2004).



ix. **Ελμινθοσποριάσεις των φύλλων του αραβοσίτου**, αρχίζοντας από τα κατώτερα και προχωρώντας προς τα ανώτερα φύλλα, προκαλώντας κηλιδώσεις με ευκρινή όρια. Οι κηλιδώσεις μετατρέπονται σε νεκρώσεις και λόγω της μειωμένης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπολογίζεται ότι οι ασθένειες αυτές μπορούν να μειώσουν τις αποδόσεις μέχρι 50% (*Exserohilum turcicum*, *Cochliobolus heterostrophus* και *Cochliobolus carbonum*) (Εικόνα 15 – Κηλίδες σε φύλλο αραβοσίτου προερχόμενες από τον μύκητα *C. heterostrophus*, Maize diseases, 2004).



x. **Σκωρίαση στα φύλλα** με δημιουργία κηλίδων οι οποίες εξελίσσονται σε φλύκταινες. Οι επιπτώσεις στην καλλιέργεια σπάνια είναι σοβαρές επειδή οι μολύνσεις συνήθως γίνονται προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Ο μύκητας διαχειμάζει με τα τελειοσπόρια που βρίσκονται στα υπολείμματα φύλλων του αραβοσίτου, ενώ οι μολύνσεις ευνοούνται από υγρή ατμόσφαιρα, τις μέτριες θερμοκρασίες και την ευπάθεια του φυτού (*Puccinia sorghi*) (Εικόνα 16 – Σκωρίαση σε φύλλο αραβοσίτου από το μύκητα *P. sorghi*, Maize diseases, 2004).



- xi. **Βακτηριακή κηλίδωση** των φύλλων με σχηματισμό κίτρινων επιμηκών κηλίδων στα φύλλα, οι οποίες βαθμιαία επεκτείνονται παράλληλα προς το κεντρικό νεύρο και μεταπίπτουν σε νεκρώσεις με αποτέλεσμα την ξήρανση μεγάλου μέρους του ελάσματος. Στο σύνολό τους τα φυτά παρουσιάζουν καχεξία, νανισμό, μάρανση και αυξημένη θνησιμότητα. Από τα αγγεία των προσβεβλημένων φύλλων ή του βλαστού εξέρχεται βακτηριακή εξίδρωση. Ο βλαστός σε εγκάρσια τομή παρουσιάζει μαύρα στίγματα (ένδειξη απόφραξης) στις θέσεις των ηθμαγγειωδών δεσμίδων. Τέλος μπορεί να προσβάλλονται και οι σπάδικες οπότε δημιουργείται κηλίδωση των βρακτίων. Το βακτήριο διαδίδεται με μολυσμένους σπόρους οπότε παρουσιάζονται συμπτώματα νανισμού, ξαφνικής μάρανσης και αποπληξίας σε νεαρά φυτά αραβοσίτου (*Pantoea stewartii*) (Εικόνα 17 – Επιμήκεις κηλίδες σε φύλλα νεαρών φυτών αραβοσίτου από το βακτήριο *Pantoea stewartii*, Maize diseases, 2004).



Εικ. 17

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του αραβοσίτου το φυτό μπορεί να προσβληθεί από διάφορους εχθρούς οι οποίοι διακρίνονται σε:

- i. Εχθροί που προσβάλλουν τα νεαρά φυτά, όπως είναι ο **σιδηροσκώληκας** (*Agriotes* spp. (Εικόνα 18 (A) και *Melanotus* spp. (Εικόνα 18B)), οι **αγρότιδες** (*Agrotis* spp. (Εικόνα 18Γ)) και ο ***Hylemya cilicrura*** (Εικόνα 18Δ) (www.syngenta.com).
- ii. Εχθροί που προσβάλλουν το ριζικό σύστημα, όπως είναι τα είδη του γένους ***Diabrotica*** (Εικόνα 19A) και **αφίδες των ριζών** (*Anuraphis maidi- radices*) (Εικόνα 19B) (http://ipm.ncsu.edu)
- iii. Εχθροί που προσβάλλουν το στέλεχος και τα αναπαραγωγικά όργανα, όπως είναι το **πράσινο σκουλήκι** (*Heliothis armigera*) (Εικόνα 20A) , η **πυραλίδα του αραβοσίτου** (*Pyrausta nubilalis*) (Εικόνα 20B) και η ***Sesamia cretica*** (Εικόνα 20Γ) (www.alamy.com).
- iv. Εχθρούς που προσβάλλουν τα φύλλα του καλαμποκιού, όπως είναι ο ***Blissus leucopterus*** (Εικόνα 21A), η **αφίδα των φύλλων του αραβοσίτου** (*Aphis maydis*) (Εικόνα 21B) και οι **ακρίδες** (Εικόνα 21Γ) (www.gaiapedia.gr).



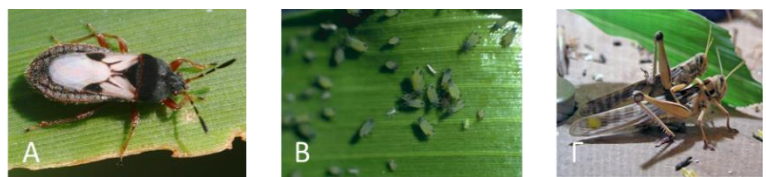
Εικόνα 18



Εικόνα 19



Εικόνα 20



Εικόνα 21

Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια εκτός από τις προαναφερθείσες προσβολές έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση του ποσοστού προσβολών από μύκητες των γενών *Fusarium* και *Aspergillus* στην καλλιέργεια του αραβοσίτου οι οποίοι προκαλούν σήψη των σπαδικών (Εικόνα 22). Οι μύκητες αυτοί είναι ιδιαίτερος σημαντικοί καθώς ευθύνονται και για την παραγωγή μυκοτοξινών, ουσιών που ανιχνεύονται συχνά σε αραβόσιτο. Το 2013, ανιχνεύθηκε σημαντική ποσότητα αφλατοξίνης σε αραβόσιτο προερχόμενο από την Ελλάδα με αποτέλεσμα να ενεργοποιηθεί ο Οργανισμός Ασφαλείας Τροφίμων της Ευρωπαϊκής Ένωσης (RASFF) (https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList) .

1.2.1 Σήψεις σπάδικα (Ear Rots)

Οι σήψεις σπάδικα στην καλλιέργεια αραβοσίτου είναι μια από τις σημαντικότερες ασθένειες, με κύρια παθογόνα αίτια τους μύκητες του γένους *Fusarium* και *Aspergillus* (Munkovold, 2003; Campbell et al., 1995). Οι μύκητες που επιφέρουν τη σήψη του σπάδικα εξαπλώνονται στη καλλιέργεια όταν επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, όταν έχει προηγηθεί προσβολή της καλλιέργειας από έντομα και όταν οι καλλιεργητικές τεχνικές που εφαρμόζονται συμβάλλουν στην εξέλιξη της ασθένειας (Kumar et al., 2000). Η παρουσία των παραπάνω μυκήτων στην καλλιέργεια καλαμποκιού έχει ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση του προϊόντος καθώς τόσο στελέχη των γενών *Fusarium* όσο και *Aspergillus* παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι καλούνται μυκοτοξίνες και αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για την ασφάλεια των τροφίμων καθώς είναι ισχυρά καρκινογόνες ουσίες για τον άνθρωπο και τα ζώα (Campbell et al., 1995). Τα μέτρα για την αντιμετώπιση της ασθένειας δεν είναι αποτελεσματικά, καθώς οι μύκητες του γένους *Fusarium* αποικίζουν ολόκληρο το φυτό και μεταδίδονται με το σπόρο εκ νέου, χωρίς πάντα να γίνονται αντιληπτά τα συμπτώματα, ενώ οι μύκητες του γένους *Aspergillus* αποικίζουν τους σπάδικες αλλά οι διαχειμάζουσες μορφές διατηρούνται για χρόνια (Munkovold et al., 1997). Οι σήψεις που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Fusarium* διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες, αυτή της κόκκινης σήψης του σπάδικα και αυτή της ροζ σήψης του σπάδικα, ενώ στην περίπτωση των σήψεων από μύκητες του γένους *Aspergillus* δεν πραγματοποιείται παρόμοιος διαχωρισμός (Εικόνα 22) (Bottalico, 1998; Clements and White, 2004).

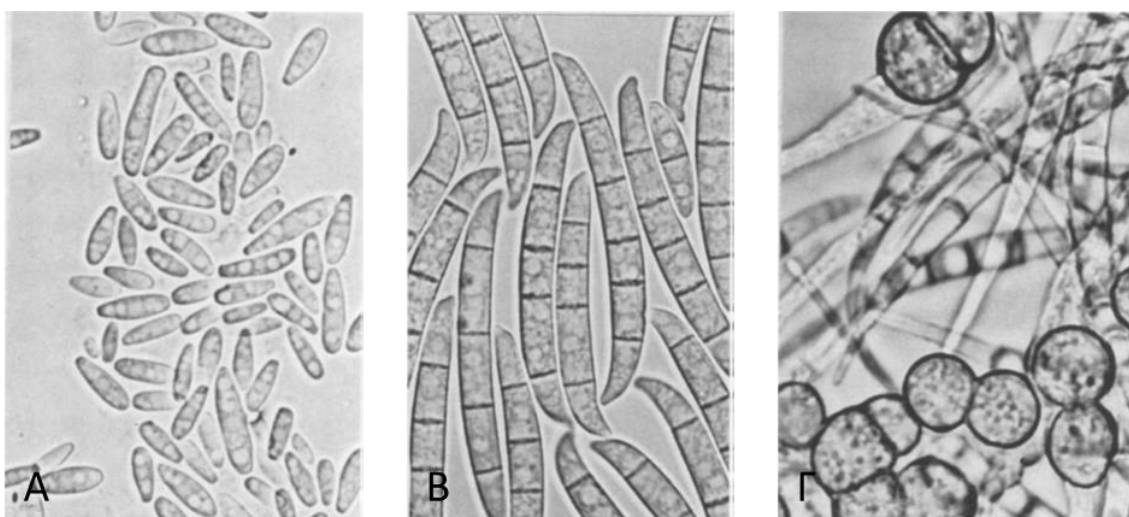


Εικόνα 22. Σήψη σπάδικα προερχόμενη από μύκητες A. του γένους *Fusarium* και B. του γένους *Aspergillus* (www.pioneer.com).

1.3 Το γένος *Fusarium* spp.

Ένα από τα σημαντικότερα φυτοπαθογόνα γένη μυκήτων θεωρείται το γένος *Fusarium* καθώς προκαλεί σοβαρές καταστρεπτικές ασθένειες σε πλήθος ξενιστών, όπως αδρομυκώσεις, σηψιρριζίες, σήψεις της βάσεως του στελέχους και των καρπών, τήξεις σπορείων αλλά και εναέριες προσβολές ανθέων (Leslie and Summerell, 2006).

Τα είδη του γένους *Fusarium* παράγουν τρεις τύπους σπορίων, τα μικροκονίδια, τα μακροκονίδια, και τα χλαμυδοσπόρια με μερικά είδη να παράγουν και τους τρεις τύπους σπορίων, ενώ άλλα όχι (Nelson, et al., 1994). Τα μικροκονίδια δημιουργούνται πάνω στο φιαλίδιο, που σχηματίζεται επί της υφής ή αποτελεί διακλάδωση του κονιδιοφόρου, με το σχήμα τους να είναι ωοειδές- ελλειψοειδές ή κυλινδρικό. Τα μακροκονίδια σχηματίζονται είτε στους κονιδιοφόρους, είτε στα σποριοδόχεια, διαθέτουν λεπτά τοιχώματα, με 3- 5 εγκάρσια χωρίσματα, και οξυκατάλυκτα άκρα. Τα χλαμυδοσπόρια είναι επάκρια ή ενδιάμεσα και σχηματίζονται συνήθως μεμονωμένα και περιστασιακά κατά ζεύγη ή σε αλυσίδες (Εικόνα 23) (Τζάμος, 2007).



Εικόνα 23. Α. Μικροκονίδια ειδών *Fusarium* spp., Β. Μακροκονίδια ειδών *Fusarium* spp. και Γ. Χλαμυδοσπόρια του μύκητα ειδών *Fusarium* spp. (Nelson et al., 1994).

Το γένος *Fusarium* περιλαμβάνει ποικιλία ειδών, πολλά από τα οποία προσβάλλουν μεγάλο εύρος ξενιστών. Συχνά έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν νανισμό και σήψεις στα σιτηρά, συμπεριλαμβανομένης και της καλλιέργειας του καλαμποκιού (Doohan et al., 2003). Μερικά από τα σημαντικότερα είδη που προσβάλλουν την καλλιέργεια του καλαμποκιού, προκαλώντας σήψη είναι οι μύκητες *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans* (Sutton, 1982; Leslie et al., 2003; Velluti et al., 2000; Torres et al., 2001). Σε πιο πρόσφατες μελέτες έχει ταυτοποιηθεί ότι και άλλα είδη *Fusarium* προκαλούν σήψη σπάδικα, όπως το *Fusarium culmorum*, *Fusarium incarnatum-equiseti* και το *Fusarium thapsinum* (τέλεια μορφή *Gibberella thapsina*), το οποίο είχε βρεθεί ότι προσβάλλει το σόργο (Doohan et al., 2003; Leslie et al., 2003). Οι μύκητες αυτοί μειώνουν τις αποδόσεις, υποβαθμίζουν την ποιότητα του προϊόντος και παράγουν τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι καλούνται μυκοτοξίνες, στο προσβεβλημένο προϊόν (Parry et al., 1995; Goswani & Kistler, 2004; Osborne & Stein, 2007; Miller, 2008).

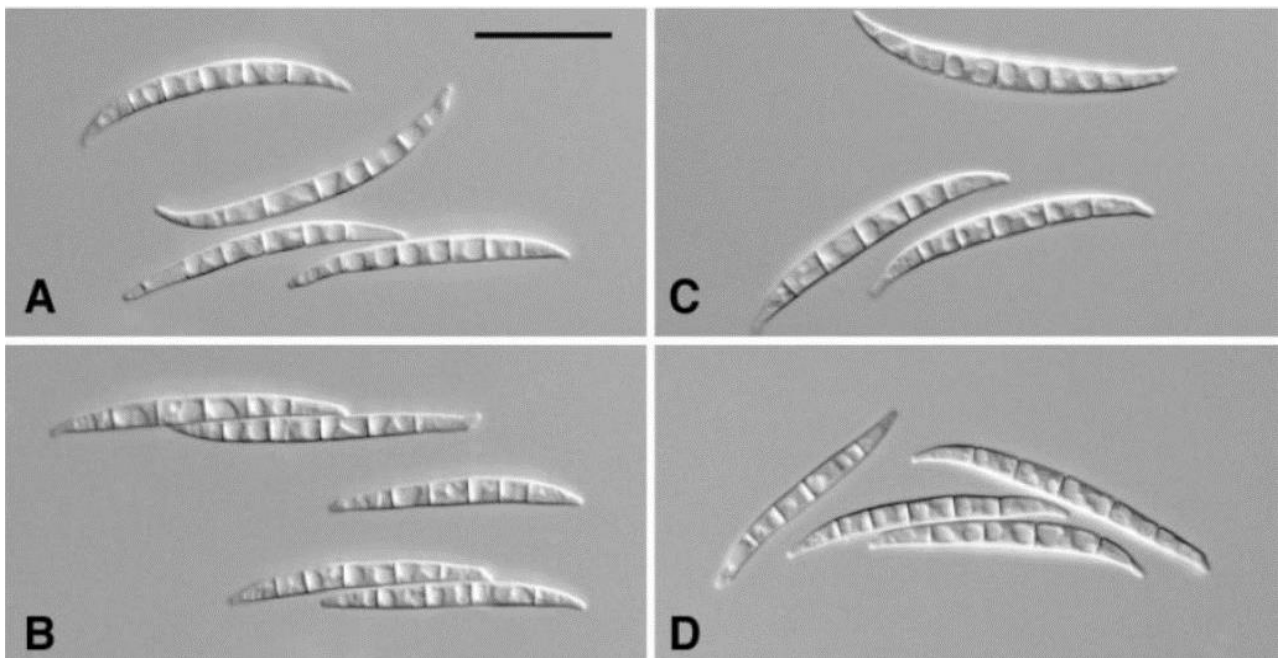
Τα είδη του γένους *Fusarium* έχουν την ικανότητα να προκαλούν διαφόρους τύπους σήψεων σε σπάδικες αραβοσίτου. Τα είδη εκείνα που προκαλούν κόκκινη σήψη σπάδικα ή κόκκινη φουζαρίωση ανήκουν στην κατηγορία *Discolour* με κύρια να είναι το *F. graminearum* (τέλεια μορφή *Gibberella zeae*), το *F. culmorum*, το *F. cerealis* (syn. *F. crookwellense*), και το *F. avenaceum* (τέλεια μορφή *G. avenacea*). Αντιθέτως, τα είδη εκείνα που προκαλούν ροζ σήψη σπάδικα ή ροζ φουζαρίωση ανήκουν στην κατηγορία *Liseola* με κύρια να είναι το *F. verticillioides* (syn. *F. moniliforme*), το *F. proliferatum*, και το *F. subglutinans* (Logrieco et al., 2002). Τα είδη της κατηγορίας *Liseola* διαχωρίστηκαν αρχικά σε τρεις κατηγορίες Α,Β,С ενώ μέχρι σήμερα έχει γίνει διαχωρισμός σε 11 κατηγορίες ανάλογα και με τις τέλειες μορφές των ειδών (Εικόνα 24) (Leslie and Summerell 2006).

MP	Anamorph	Teleomorph
MP-A	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Gibberella moniliformis</i>
MP-B	<i>F. sacchari</i>	<i>G. sacchari</i>
MP-C	<i>F. fujikuroi</i>	<i>G. fujikuroi</i>
MP-D	<i>F. proliferatum</i>	<i>G. intermedia</i>
MP-E	<i>F. subglutinans</i>	<i>G. subglutinans</i>
MP-F	<i>F. thapsinum</i>	<i>G. thapsina</i>
MP-G	<i>F. nygamai</i>	<i>G. nygamai</i>
MP-H	<i>F. circinatum</i>	<i>G. circinata</i>
MP-I	<i>F. kunzum</i>	<i>G. konza</i>
MP-J	<i>F. gaditjirrii</i>	<i>G. gaditjirrii</i>
MP-K	<i>F. xylarioides</i>	<i>G. xylarioides</i>

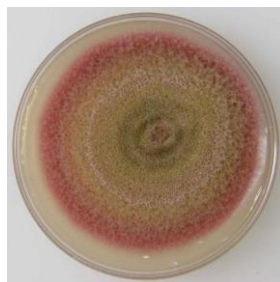
Εικόνα 24. Είδη της κατηγορίας *Liseola* (σύμφωνα με κατηγοριοποίηση των Leslie and Summerell 2006).

1.3.1 Ο μύκητας *Fusarium graminearum*

Ο μύκητας *Fusarium graminearum* είναι η ατελής μορφή του μύκητα *Gibberella zeae* (τέλεια μορφή), ανήκει στην κατηγορία των ασκομυκήτων και προκαλεί την κόκκινη σήψη του σπάρδικα στην καλλιέργεια του αραβοσίτου, ενώ παράλληλα αποτελεί το σημαντικότερο παθογόνο της καλλιέργειας του σιταριού. Λόγω των μορφολογικών διαφορών των κονιδίων του μύκητα και του τρόπου που προκαλείται η ασθένεια, έχει γίνει διαχωρισμός του πληθυσμού σε δύο ομάδες, την ομάδα 1 και την ομάδα 2 (Εικόνα 25). Τα στελέχη που συγκαταλέγονται στην ομάδα 1 είναι ετεροθαλικά και ως επί το πλείστον σχετίζονται με τη σήψη του σιταριού (Francis et al, 1977). Αντιθέτως τα στελέχη που συγκαταλέγονται στην ομάδα 2 είναι ομοθαλικά και προκαλούν σήψη στην ταξιανθία του σιταριού, του κριθαριού αλλά και του σπάρδικα του καλαμποκιού (Leslie and Summerell, 2006). Μεταξύ των στελεχών των δύο ομάδων παρατηρούνται διαφορές ως προς την γεωγραφική κατανομή τους και ως προς τη συμπτωματολογία στις διάφορες καλλιέργειες των σιτηρών. Στελέχη της ομάδας 1 αποτελούν εδαφογενή παθογόνα διαφόρων χωρών, όπως της Αυστραλίας (Francis and Burgess, 1977; Wearing and Burgess, 1977; Burges et al., 1990), της Αφρικής (Marasas et al., 1988; Van Wyk et al., 1988; Lamprecht et al., 1990) και της Αμερικής (Cook 1980) σε καλλιέργειες βρώμης και μηδικής. Τα στελέχη που ανήκουν στην ομάδα 2 είναι παθογόνα που μεταδίδονται κυρίως με το σπόρο (Mc Mullen et al., 1997). Τα στελέχη και των δύο ομάδων του *Fusarium graminearum* παράγουν μυκοτοξίνες και πιο συγκεκριμένα της τριχοθηκίνες, οι οποίες διαχωρίζονται σε τύπου Α και Β. Οι τριχοθηκίνες τύπου Β είναι οι πιο σημαντικές με την δεοξινιβαλενόλη (DON) να κυριαρχεί (Moss et al., 2004). Το *Fusarium graminearum* παράγει επίσης ζεαραλενόνη (ZEA) που έχει τα ίδια αποτελέσματα με τη δεοξινιβαλενόλη (Bottalico et al., 1991). Σε *in vitro* καλλιέργεια του μύκητα το μυκήλιο αναπτύσσεται εναέρια και επιφέρει κόκκινο μεταχρωματισμό σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) (Εικόνα 26).

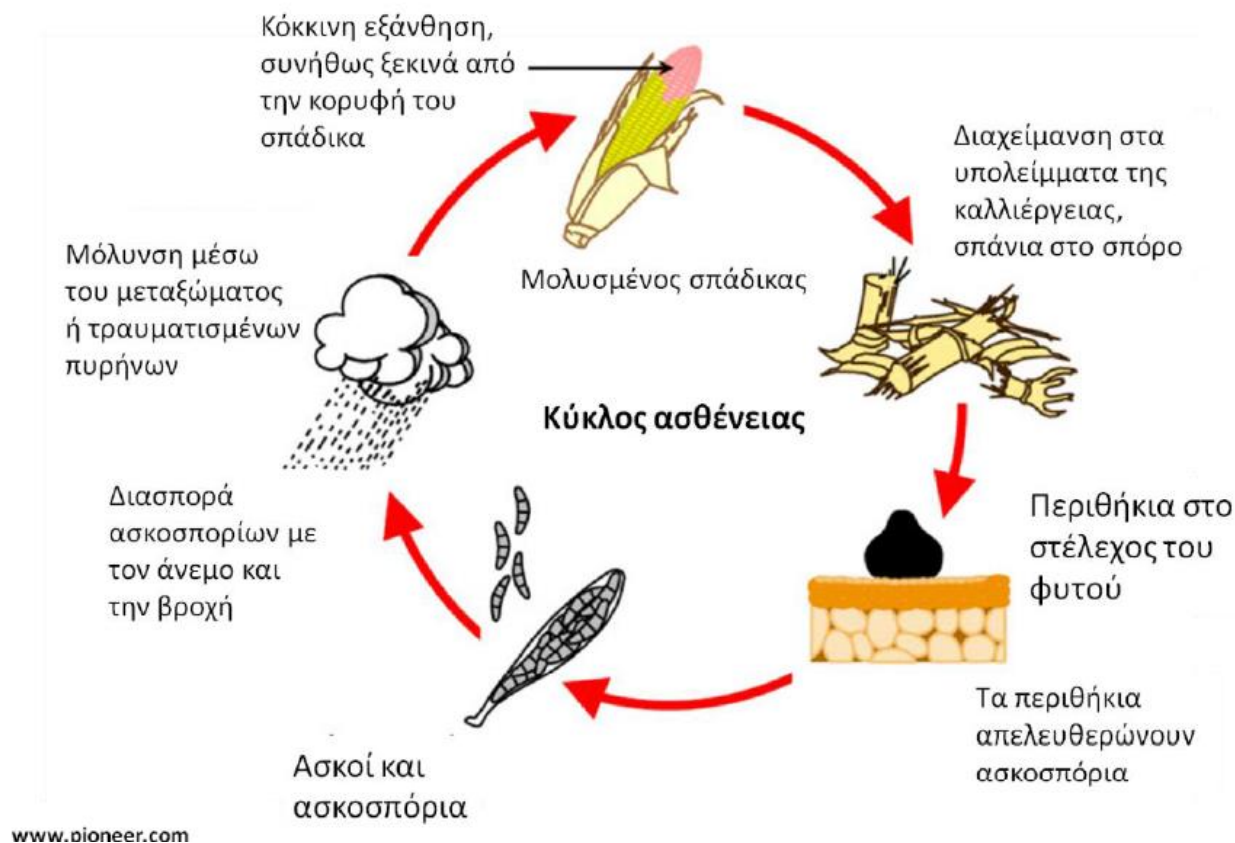


Εικόνα 25. Μακροκονίδια του μύκητα *F. graminearum* (μέγεθος κλίμακας: 25 μm), (Leslie and Summerell, 2006).



Εικόνα 26. *In vitro* ανάπτυξη του μύκητα *F. graminearum* σε PDA (<http://fungi.myspecies.info>).

Ο μύκητας *Fusarium graminearum* επιβιώνει με τη μορφή περιθηκίων στα υπολείμματα της καλλιέργειας του αραβοσίτου στην επιφάνεια του εδάφους. Κατά τη διάρκεια δροσερού και υγρού καιρού (βέλτιστη θερμοκρασία των ασκοσπορίων 16°C) τα σπόρια του μύκητα παράγονται στους μολυσμένους ιστούς των υπολειμμάτων ακόμα και για ένα έως και τρία χρόνια μετά τη συγκομιδή της ευπαθούς καλλιέργειας. Τα ασκοσπόρια του μύκητα μεταφέρονται με τη βροχή ή τον αέρα στο μεταξύ των φυτών καλαμποκιού, όπου βλαστάνουν κάτω από συνθήκες υψηλής υγρασίας (Munkvold, 2003). Ο μύκητας προσβάλλει το μεταξύ έξι ημέρες μετά την εμφάνισή του και μέσω του μεταξύ εισέρχεται στο εσωτερικό του σπάδικα, εγκαθίσταται και προκαλεί σήψη (Reid et al., 1996) (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Κύκλος ασθένειας του μύκητα *Fusarium graminearum* (www. pioneer.com)

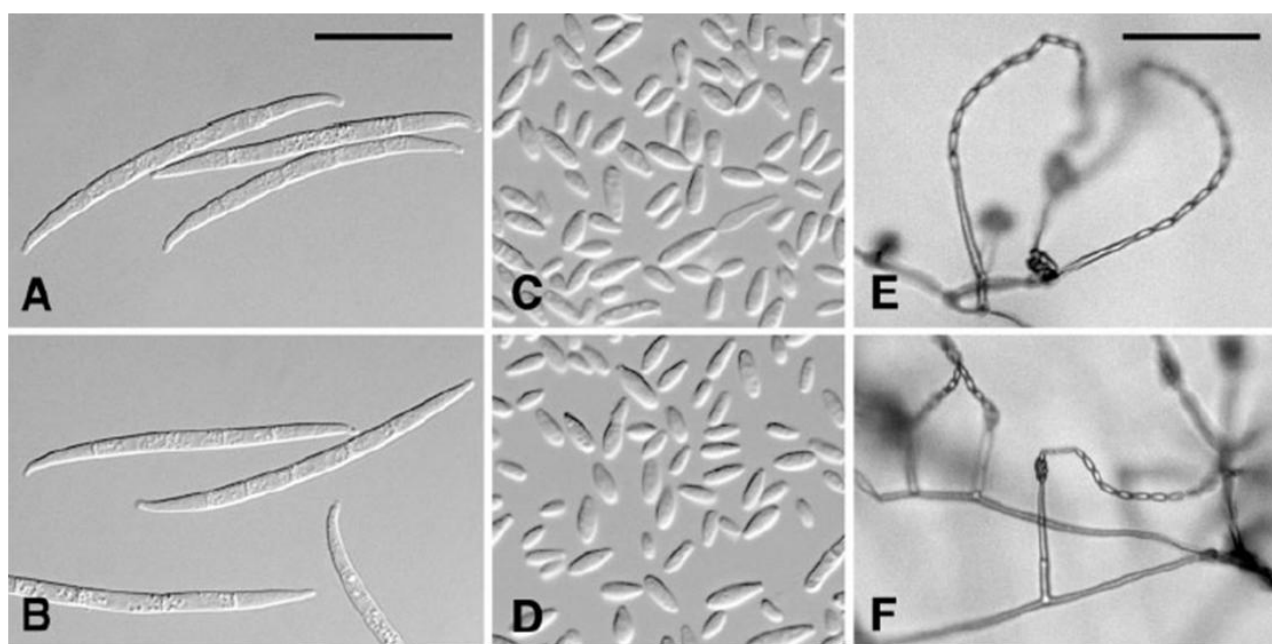
Μετά τη μόλυνση οι σπόροι στο σπάδικα ξεκινούν να παίρνουν ένα σκούρο κόκκινο χρώμα, ενώ λίγο αργότερα ξεκινά να εμφανίζεται η υπόλευκη- κόκκινη εξάνθηση του μύκητα στον προσβεβλημένο σπάδικα. Η σήψη ξεκινά από την κορυφή του σπάδικα και εκτείνεται προς τη βάση του και σε ορισμένες περιπτώσεις η προσβολή μπορεί να προχωρήσει και στο μίσχο του σπάδικα, με εμφάνιση κοκκινωπού αποχρωματισμού του (Munkvold, 2003) (Εικόνα 28). Υγρός καιρός και ήπιες θερμοκρασίες την περίοδο του μεταξύ ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα, ενώ παρατηρούνται αυξημένες συγκεντρώσεις μυκοτοξινών όταν καθυστερήσει η συγκομιδή. Συνθήκες υγρασίας ευνοούν την συσσώρευση μυκοτοξινών και σε συνδυασμό με συνθήκες αυξημένης υγρασίας κατά την αποθήκευση του προϊόντος εντείνουν το πρόβλημα (Marin et al., 1999).



Εικόνα 28. Χαρακτηριστική κοκκινωπή εξάνθηση σε προσβεβλημένους σπάδικες από το μύκητα *F. graminearum*. Η προσβολή ξεκινά από την κορυφή του σπάδικα και προχωρά προς τη βάση του (Dragich and Nelson, 2014).

1.3.2 Ο μύκητας *Fusarium verticillioides*

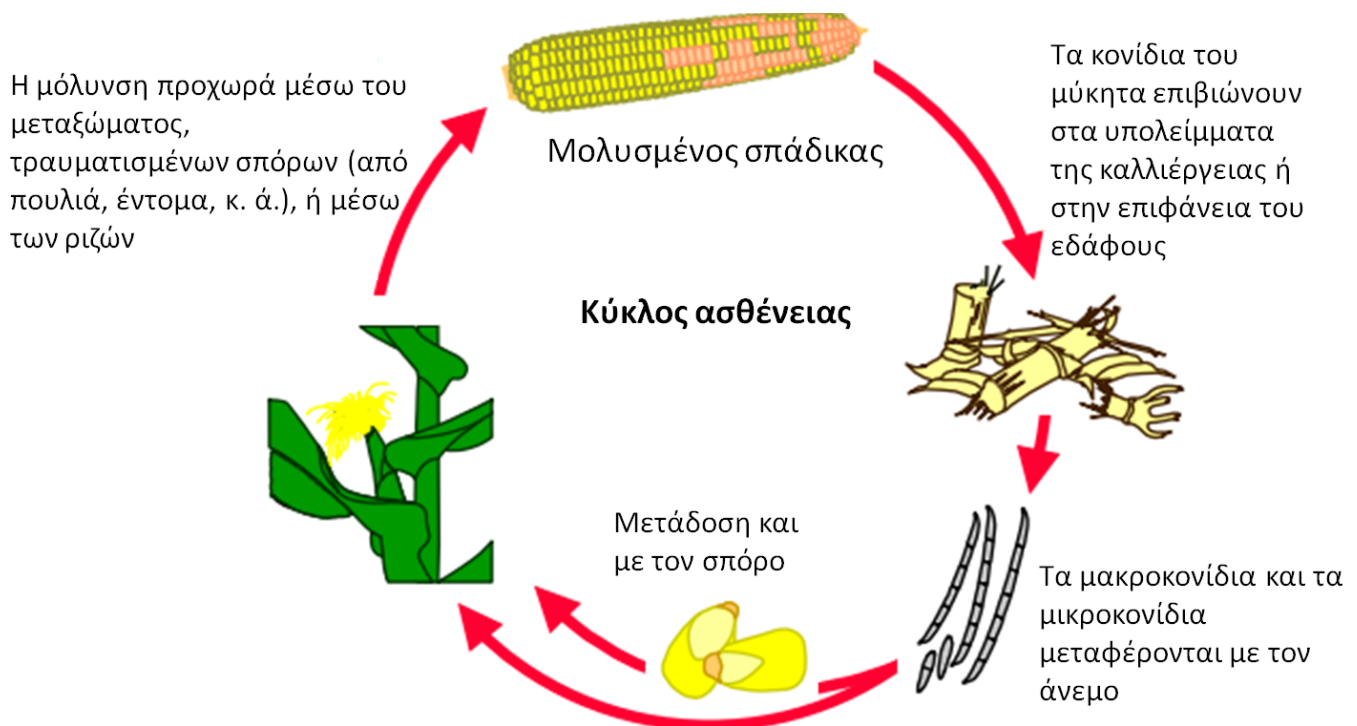
Η καλλιέργεια των σιτηρών πλήττεται και από ένα ακόμα πολύ σημαντικό παθογόνο, το μύκητα *F. verticillioides*. Το *F. verticillioides* ανήκει στη κατηγορία *Liseola* και η τέλεια μορφή του μύκητα είναι *Gibberella moniliformis* (Leslie, 1991). Ο εν λόγω μύκητας παράγει μικροκονίδια και μακροκονίδια ως αγενή σπόρια ώστε να προκαλέσει τη μόλυνση. Όπως φανερώνει και το όνομά τους τα μακροκονίδια είναι μεγαλύτερα των μικροκονιδίων και το σχήμα τους είναι χαρακτηριστικό ελλειψοειδές, ενώ στις περισσότερες απομονώσεις απαντώνται σπάνια. Αντιθέτως ο μύκητας παράγει μεγάλες ποσότητες μικροκονιδίων τα οποία σχηματίζονται από τα μονοφαλίδια και παρατίθενται ως αλυσίδα. Ο μύκητας δεν παράγει χλαμυδοσπόρια αν και σε ορισμένες περιπτώσεις τα διογκωμένα κύτταρα των υφών δίνουν αυτή της ψευδαίσθηση (Leslie et al., 2006)(Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Αγενή σπόρια του μύκητα *F. verticillioides*. **A-B:** Μακροκονίδια, **C-D:** Μικροκονίδια, **E-F:** Μικροκονίδια *in situ* σε θρεπτικό υπόστρωμα Carnation Leaf Agar (CLA), (A-D: μέγεθος κλίμακας: 25 μm, E-F: μέγεθος κλίμακας: 50 μm.), (Leslie and Summerell, 2006).

Ο μύκητας *F. verticillioides* ευνοείται όταν οι συνθήκες που επικρατούν χαρακτηρίζονται από ξηρασία και υψηλές θερμοκρασίες χωρίς απαραίτητως να γίνονται αντιληπτά τα συμπτώματα ιδιαιτέρως σε καλλιέργεια αραβοσίτου (Logrieco et al., 2002). Όπως και στην περίπτωση του *F. graminearum*, έτσι και στο *F. verticillioides* ο συνήθης τρόπος μόλυνσης των σπαδικών είναι μέσω του μεταξώματος, καθώς κονίδια τα οποία διαχειμάζουν στα υπολείμματα της καλλιέργειας επί του εδάφους μεταφέρονται με τον αέρα και επικάθονται στο μετάξωμα των φυτών. Μετά την εγκατάσταση των κονιδίων στο μετάξωμα ξεκινούν να βλαστάνουν και να μολύνουν, ιδιαιτέρως αν αυτό βρίσκεται στο κρίσιμο στάδιο του μεταχρωματισμού από πράσινο σε καστανό. Στη συνέχεια ο μύκητας περνά δια του μεταξώματος και εγκαθίστανται στους σπόρους του σπάδικα είτε από τα σημεία επαφής τους με το μετάξωμα, είτε από τυχόν ρωγμές. Ένας άλλος τρόπος εξάπλωσης του *F. verticillioides* είναι από την πυραλίδα του αραβοσίτου και τη σεζάμια, όπου εξαπλώνουν τα σπόρια του μύκητα στο μετάξωμα ή μεταφέρουν τα σπόρια σε ρωγμές των σπόρων ή απευθείας διατρυπών τους σπόρους και ο μύκητας εγκαθίστανται (Εικόνα 30) (Vincelli & Parker, 2002).

Σε πολλές περιπτώσεις είναι δυνατή η μόλυνση των σπόρων του αραβοσίτου από το ίδιο το φυτό, αν αυτό προέρχεται από ήδη μολυσμένο σπόρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον εσωτερικό αποικισμό του στελέχους από το μύκητα, στη συνέχεια του σπάδικα και σε τελικό στάδιο εκ νέου των σπόρων. Αν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι δυσμενείς για την καλλιέργεια του αραβοσίτου τότε τα συμπτώματα της μόλυνσης είναι εμφανή. Η μόλυνση των σπόρων δεν επηρεάζει τη βλαστική τους ικανότητα και τα φυτά που προκύπτουν είναι υγιή αλλά έχουν περισσότερες πιθανότητες να παρουσιάσουν σηψιρριζίες, ιδιαιτέρως αν πρόκειται για σακχαρώδες τύπο αραβοσίτου (Vincelli & Parker, 2002).



www.pioneer.com

Εικόνα 30. Κύκλος ασθένειας του μύκητα *F. verticillioides* (www.pioneer.com).

Τα συμπτώματα της μόλυνσης από τον μύκητα *F. verticillioides* εντοπίζονται σε μεμονωμένους σπόρους ή σε υποσύνολο σπόρων του σπάδικα που εμφανίζουν ροζ εξάνθηση (Εικόνα 31), ενώ στην περίπτωση που δεν είναι κατάλληλες οι συνθήκες του περιβάλλοντος παρατηρείται το φαινόμενο του «starbursting» κατά το οποίο εμφανίζονται λευκές ακτινωτές ραβδώσεις στη βάση του σπόρου, χωρίς όμως να είναι ένα παθολογικό σύμπτωμα (Εικόνα 32) (Vincelli & Parker, 2002). Σε *in vitro* απομόνωση του μύκητα παρατηρείται εναέριο λευκό μυκήλιο (Εικόνα 33).



Εικόνα 31. Προσβεβλημένοι πυρήνες σε σπάδικα αραβοσίτου/ ροζ εξάνθηση.



Εικόνα 32. Λευκές ραβδώσεις στη βάση του σπόρου, "starbursting".

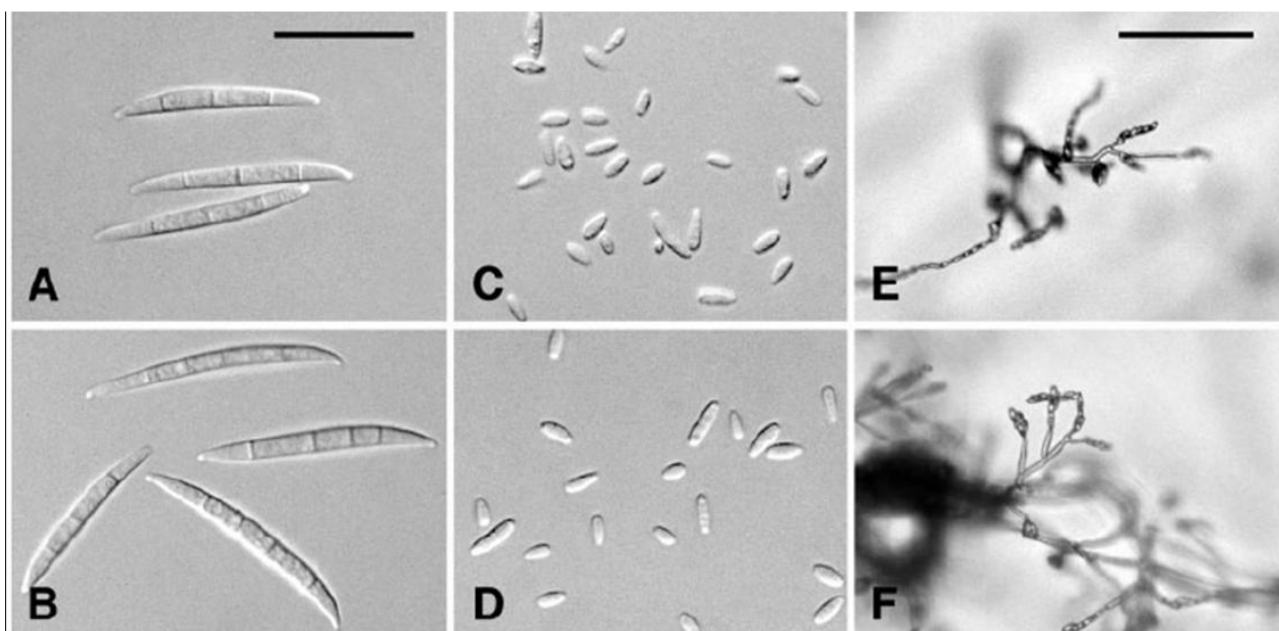


Εικόνα 33. *In vitro* ανάπτυξη του μύκητα *F. verticillioides* σε PDA (www.microbialinheritance.org).

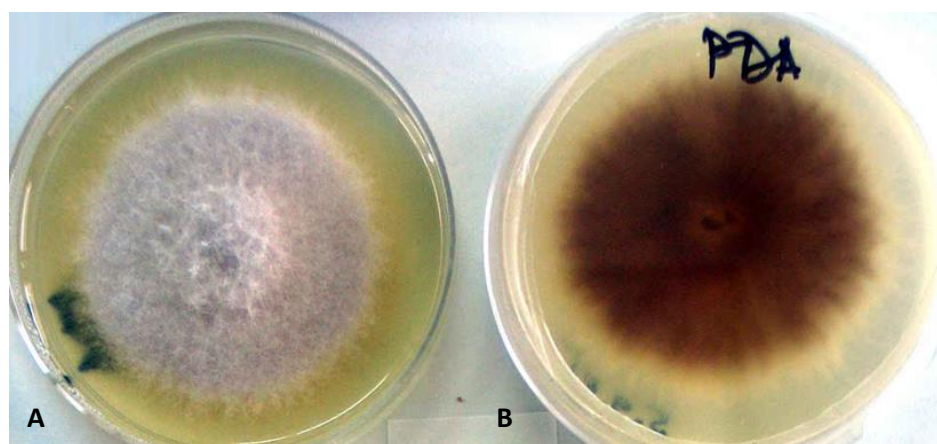
Σήψεις που προκαλούνται από το μύκητα *Fusarium verticillioides* σχετίζονται με την ανίχνευση μυκοτοξινών και συγκεκριμένα φουμονισινών στα προσβεβλημένα προϊόντα. Σε πολλές περιπτώσεις μπορεί οι σπόροι να φαίνονται ανέπαφοι αλλά η μυκοτοξίνη να είναι ανιχνεύσιμη. Συχνά το πρόβλημα των φουμονισινών εντείνεται κατά την ωρίμανση του σπόρου, αν υπάρξει τραυματισμός του από πτηνά ή από λεπιδόπτερα, με αποτέλεσμα τα ποσοστά της τοξίνης να είναι υψηλότερα από ασυμπτωματικές περιπτώσεις (Vincelli & Parker, 2002).

1.3.3 Ο μύκητας *Fusarium proliferatum*

Ο μύκητας *Fusarium proliferatum* ανήκει στη κατηγορία *Liseola* και ως τέλεια μορφή έχει τον *Gibberella intermedia* (Leslie, 1991). Σε συνδυασμό με το *F. verticillioides* προκαλεί τη ροζ φουζαρίωση στην καλλιέργεια του αραβοσίτου. Η μορφολογία του *Fusarium proliferatum* καθιστά δύσκολο τον διαχωρισμό του από το *G. fugikuroi* και τα άλλα είδη της κατηγορίας *Liseola* (Leslie et al., 2007). Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του *Fusarium proliferatum* εντοπίζεται στα μικροκονίδια του, τα οποία ναι μεν σχηματίζουν αλυσίδες, όπως και στην περίπτωση του *Fusarium verticillioides* αλλά είναι κοντότερες σε σχέση με τα άλλα είδη της κατηγορίας. Τα μακροκονίδια του μύκητα είναι λεπτά και διαθέτουν λεπτά τοιχώματα, ενώ το σχήμα τους είναι ευθείς και παρομοιάζεται με το σχήμα του *G. fugikuroi*. Σε νέες καλλιέργειες *in vitro* ο αριθμός των μακροκονιδίων είναι υψηλός ενώ τα μικροκονίδια είναι λιγιστά. Χλαμυδοσπόρια και σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρούνται (Εικόνα 34) (Leslie and Summerell, 2006) και το λευκό μυκήλιο σχηματίζεται εναέρια, ενώ παρατηρείται έντονος καφέ μεταχρωματισμός στην κάτω επιφάνεια (Εικόνα 35).



Εικόνα 34. Αγενή σπόρια του μύκητα *F. proliferatum*. **A-B:** Μακροκονίδια, **C-D:** Μικροκονίδια, **E-F:** Μικροκονίδια *in situ* σε θρεπτικό υπόστρωμα Carnation Leaf Agar (CLA), (A-D: μέγεθος κλίμακας: 25 μm, E-F: μέγεθος κλίμακας: 50 μm.), (Leslie and Summerell, 2006).



Εικόνα 35. *In vitro* ανάπτυξη του μύκητα *F. proliferatum* σε PDA A. επάνω όψη, B. κάτω όψη τρυβλίου (www.ppis.moag.gov.il).

Ο μύκητας *F. proliferatum* εκτός από πλήθος άλλων ουσιών φαίνεται πως είναι υπεύθυνος και για την παραγωγή μυκοτοξινών σε υψηλά επίπεδα ιδιαιτέρως σε απομονώσεις από την καλλιέργεια του αραβοσίτου. Συγκεκριμένα εκτός από φουμονισίνες, μπορεί να παράγει μονιλιφορμίνη (Miller et al., 1995; Chelkowski et al., 1990), φουζαπρολιφερίνη (Ritieni et al., 1995) και μπεαβερισίνη (Reynoso et al., 2004). Ο συνδυασμός της παραγωγής των τοξινών με τη δυνατότητα του μύκητα να διαχειμάζει σε υπολείμματα καλλιέργειας αραβοσίτου περισσότερο από 900 ημέρες τον καθιστά σημαντικό παθογόνο για την καλλιέργεια του αραβοσίτου, που δύσκολα αντιμετωπίζεται (Εικόνα 36) (Cotten and Munkvold, 1998).



Εικόνα 36. Προσβολή από *F. proliferatum* σε σπάδικα αραβοσίτου (Chamber of Agriculture, Styria, Austria).

1.3.4 Ο μύκητας *Fusarium subglutinans*

Ο μύκητας *Fusarium subglutinans* με τέλεια μορφή το μύκητα *Gibberella subglutinans* είναι ένα ακόμα σημαντικό είδος το οποίο έχει ανιχνευθεί σε πλήθος καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένης της καλλιέργειας του αραβοσίτου, ιδιαιτέρως σε πιο ψυχρές περιοχές (Logrieco et al., 2002). Ανήκει λόγω των μορφολογικών του χαρακτηριστικών στην κατηγορία Liseola και απαντάται συνήθως σε συνδυασμό με το *F. verticillioides* και το *F. proliferatum* εντείνοντας τα συμπτώματα σήψης στελέχους και σπάδικα στον αραβόσιτο (Εικόνα 37) (Cotten and Munkvold 1998).

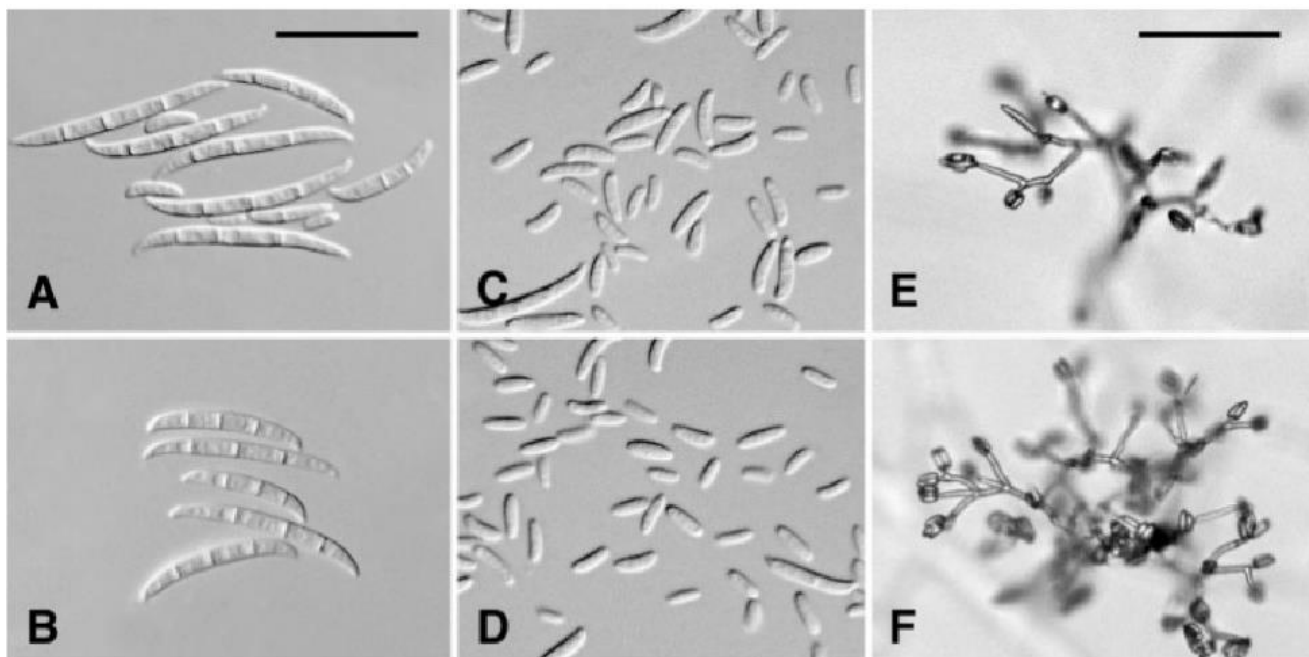


Εικόνα 37. Εγκάρσια τομή σπάδικα με εμφανή σήψη από *F. subglutinans* (gardener.wikia.com).

Τα μικροκονίδια του *F. subglutinans* σχηματίζονται σε αλυσίδες, το σχήμα τους είναι οβάλ και σχηματίζονται πάνω σε μονοφιαλίδια και πολυφιαλίδια, με τα πολυφιαλίδια να πολλαπλασιάζονται έντονα. Τα μακροκονίδια του μύκητα έχουν τυπική μορφή, είναι σχετικά λεπτά, με λεπτά τοιχώματα και δρεπανοειδή μορφή. Σε *in vitro* καλλιέργεια του μύκητα το μυκήλιο αναπτύσσεται εναέρια (Εικόνα 38), ενώ δεν σχηματίζονται χλαμυδοσπόρια (Εικόνα 39) (Leslie and Summerell, 2006).



Εικόνα 38. Ανάπτυξη του μύκητα *F. subglutinans* σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) (www.researchgate.net).



Εικόνα 39. Αγενή σπόρια του μύκητα *F. subglutinans*. A-B: Μακροκονίδια, C-D: Μικροκονίδια, E-F: Μικροκονίδια in situ σε θρεπτικό υπόστρωμα Carnation Leaf Agar (CLA), (A-D: μέγεθος κλίμακας: 25 μm , E-F: μέγεθος κλίμακας: 50 μm .), (Leslie and Summerell, 2006).

Ο μύκητας *F. subglutinans* φαίνεται πως είναι υπεύθυνος και για την παραγωγή πλήθους ενζύμων που διασπούν αντιμυκητιακές ενώσεις (Rujol et al., 1997). Σε απομονώσεις από την καλλιέργεια του αραβοσίτου τα επίπεδα φουμονισινών δεν είναι υψηλά, όμως έχει παρατηρηθεί ότι παράγει μονιλιφορμίνη (Miller et al., 1995; Chelkowski et al., 1990), φουζαπρολιφερίνη (Ritieni et al., 1995) και μπεαβερισίνη (Reynoso et al., 2004). Ο συνδυασμός της θερμοκρασίας και της ανάπτυξης του μύκητα φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στα επίπεδα των μυκοτοξινών (Leslie and Summerell, 2006).

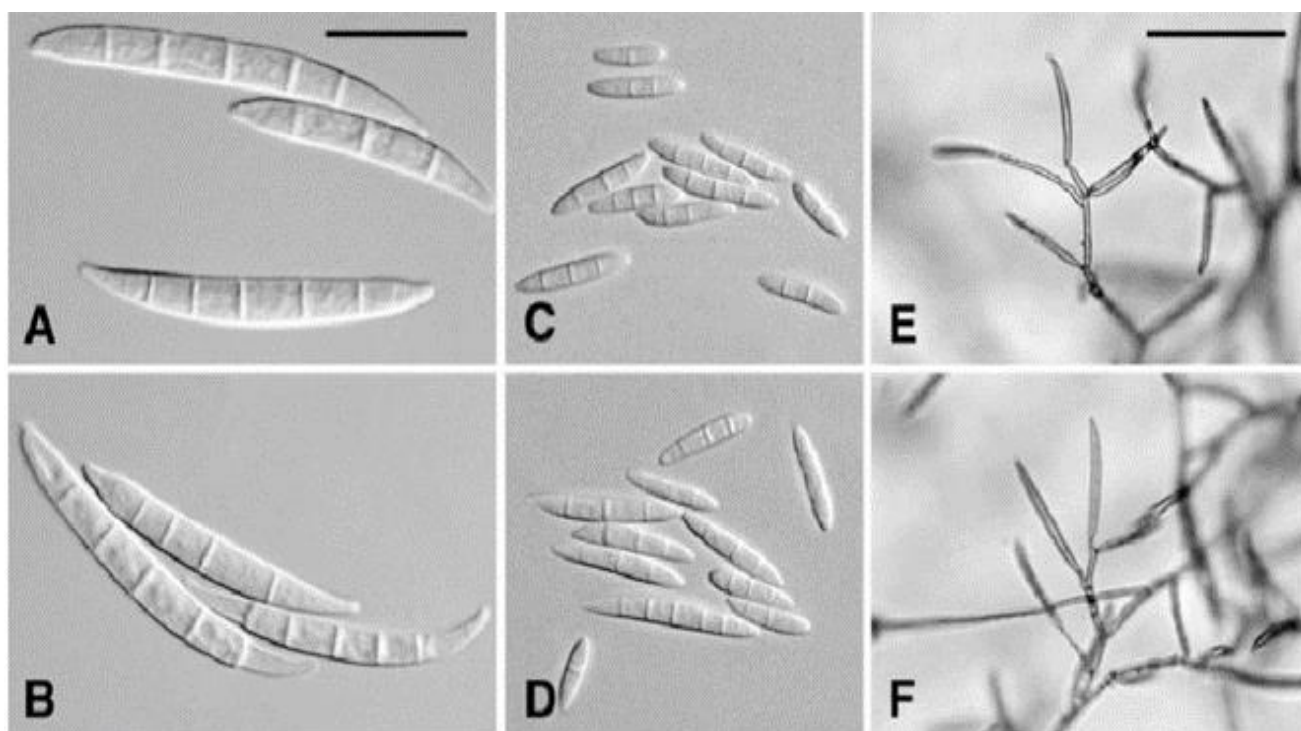
1.3.5 Ο μύκητας *Fusarium incarnatum*

Ο μύκητας *Fusarium incarnatum* (Συνώνυμο *F. semitectum*) δεν έχει μέχρι στιγμής ανακαλυφθεί αν έχει τέλεια μορφή, ενώ απαντάται συχνά σε τροπικές περιοχές και κυρίως σε αποθηκευμένα προϊόντα. Σε πολλές περιπτώσεις ο μύκητας αυτός συγχέεται με το *F. subglutinans* καθώς τα μικροκονίδιά του αναπτύσσονται επί των πολυφιαλιδίων και σε πολλές περιπτώσεις είναι σε ζεύγη σχηματίζοντας «αυτιά λαγού» (rabbit ear). Ο διαχωρισμός όμως από άλλα είδη είναι εύκολος σε *in vitro* καλλιέργεια καθώς επιφέρει καστανό μεταχρωματισμό σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Εικόνα 40).

Τα μικροκονίδια του μύκητα είναι πολυμορφικά και σε πολλές περιπτώσεις παρουσιάζουν 1-2 χωρίσματα (septa), ενώ παράλληλα σχηματίζονται και μεσοκονίδια που διαθέτουν 3-5 χωρίσματα. Το μυκήλιο είναι εναέριο με τη διαφορά ότι σ' αυτό το είδος σχηματίζεται ένα σπόριο ανά μονοφιαλίδιο ή δύο σπόρια ανά πολυφιαλίδιο. Στο μυκήλιο τα μεσοκονίδια είναι άφθονα, ενώ τα μικροκονίδια είναι λιγοστά, όπως και τα μακροκονίδια τα οποία επίσης διαθέτουν 3-5 χωρίσματα. Το *Fusarium incarnatum* παράγει και χλαμυδοσπόρια, τα οποία όμως είναι λιγοστά και δεν αποτελούν διαγνωστικό χαρακτηριστικό (Εικόνα 41) (Leslie and Summerell, 2006).



Εικόνα 40. Καστανός μεταχρωματισμός PDA από *F. incarnatum* (www.boldsystems.org).

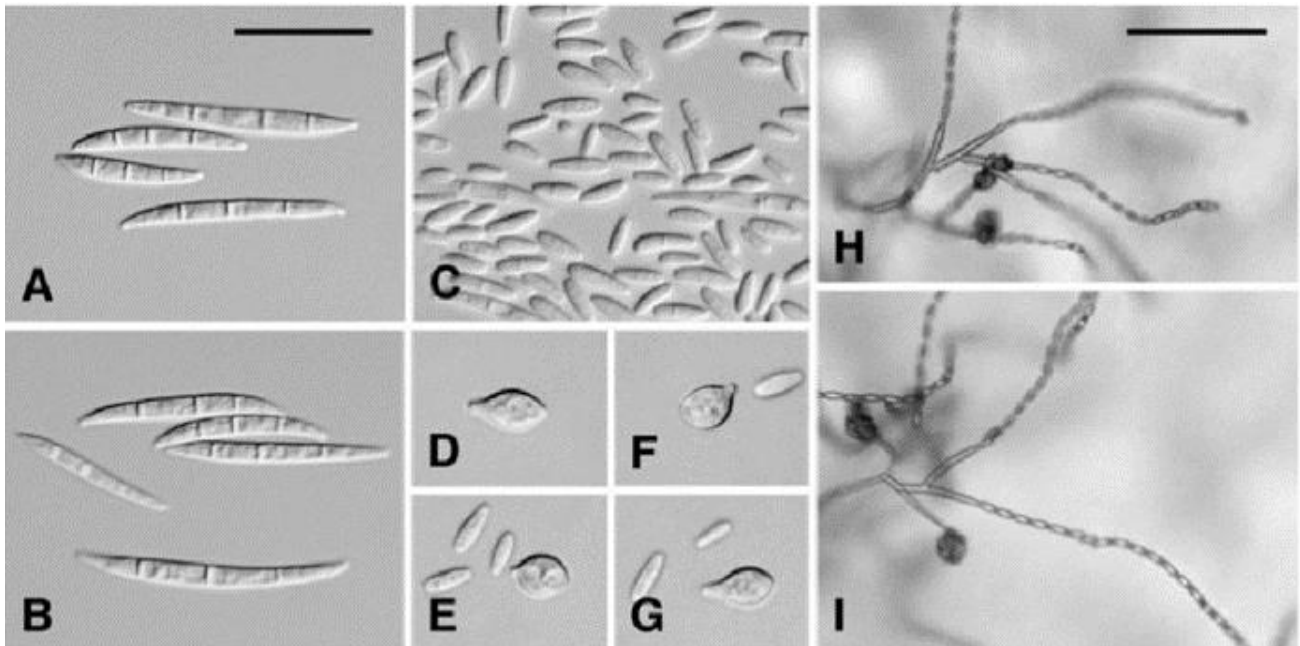


Εικόνα 41. Αγενή σπόρια του μύκητα *Fusarium incarnatum*. A-B: Μακροκονίδια, C-D: Μεσοκονίδια, E-F: Μεσοκονίδια in situ σε θρεπτικό υπόστρωμα CLA, (A-D: μέγεθος κλίμακας: 25 μm, E-F: μέγεθος κλίμακας: 50 μm.), (Leslie and Summerell, 2006).

Το *F. incarnatum - semitectum* έχει απομονωθεί από πλήθος ξενιστών και σε πολλές περιπτώσεις έχει θεωρηθεί σημαντικό παθογόνο καθώς δημιουργεί σημαντικά προβλήματα και σε μετασυλλεκτικό επίπεδο. Επίσης είναι γνωστό ότι παράγει αμπισιδίνη (Singh et al., 1997), μπεαβερισίνη, μονιλιφορμίνη (Wheeler et al. 1999), τριχοθηκίνη και ζεαραλενόνη (Rabie et al., 1982).

1.3.6 Ο μύκητας *Fusarium thapsinum*

Ο μύκητας *Fusarium thapsinum* με τέλεια μορφή το είδος *Gibberella thapsina* (Klittich et al., 1997) ανήκει στην κατηγορία *Liseola*, αλλά διαφοροποιείται από το *F. proliferatum* καθώς σχηματίζει μόνο μονοφαλίδια. Τα μακροκονίδια του μύκητα είναι τυπικά, αρκετά λεπτά, ελαφρώς δρεπανοειδή και με λεπτά τοιχώματα, ενώ διαθέτουν 3-5 χωρίσματα και είναι δύσκολο να εντοπιστούν. Τα μικροκονίδια του *Fusarium thapsinum* σχηματίζουν αλυσίδες και συχνά απαντώνται σε συστάδες, ενώ το σχήμα τους έχει πεπλατυσμένη βάση αλλά δεν παράγονται χλαμυδοσπόρια (Εικόνα 42) (Leslie and Summerell, 2006). Σε *in vitro* καλλιέργεια του μύκητα το μυκήλιο που σχηματίζεται είναι υποκίτρινο, ενώ κίτρινος είναι και ο μεταχρωματισμός του θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Agar (PDA) (Εικόνα 43).



Εικόνα 42. Αγενή σπόρια του μύκητα *Fusarium thapsinum*. A-B: Μακροκονίδια, C: Μικροκονίδια, D-G: Γογγυλοειδή μικροκονίδια, H-I: Μικροκονίδια *in situ* σε θρεπτικό υπόστρωμα CLA, (A-G: μέγεθος κλίμακας: 25 μm , H-I: μέγεθος κλίμακας: 50 μm .), (Leslie and Summerell, 2006).



Εικόνα 43. Ανάπτυξη του μύκητα *F. thapsinum* σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) (crlittle.macmate.me).

Ο εν λόγω μύκητας απασχόλησε αρκετά λόγω των έντονων προσβολών του σε καλλιέργειες σόργου, όμως φαίνεται να προσβάλλει και άλλες καλλιέργειες όπως αραβόσιτου και αραχίδιας. Όσον αφορά την καλλιέργεια του αραβοσίτου φαίνεται πως δεν αποτελεί σημαντικό πρόβλημα σε επίπεδο αγρού, όμως το πρόβλημα εντείνεται σε μετασυλλεκτικό επίπεδο καθώς προκαλεί σήψη στελέχους και σπάδικα. Επιπλέον έχει ανιχνευθεί ότι παράγει πολύ υψηλά ποσοστά μυκοτοξινών και συγκεκριμένα, μονιφορμίνης και φουμονισίνης (Btyden et al., 2001; Porter et al., 2000).

1.3.7. Μοριακή ταυτοποίηση ειδών *Fusarium* spp.

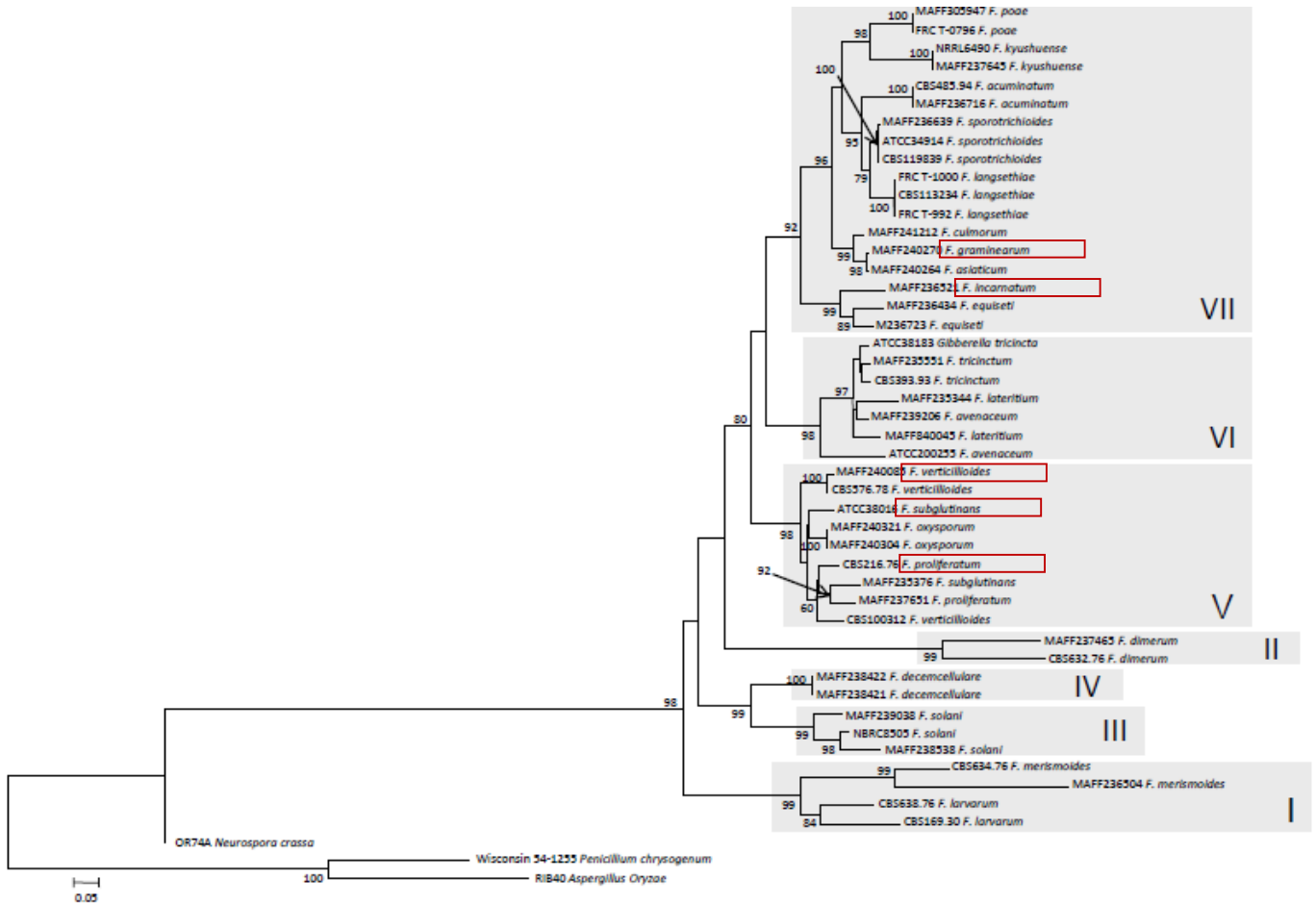
Το γένος *Fusarium* spp. είναι ένα από τα σημαντικότερα γένη μυκήτων, λόγω του εύρους των ξενιστών, της πολυπλοκότητας των ασθενειών που προκαλεί, αλλά και της τοξικογόνου ικανότητας των περισσότερων ειδών. Η μορφολογική ταυτοποίηση των ειδών του *Fusarium* sp. είναι το πρώτο και πιο δύσκολο βήμα της διαδικασίας, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι δυνατή η πλήρης ταυτοποίηση αλλά γίνεται σημαντική συλλογή πληροφοριών για τα γενικά χαρακτηριστικά του γένους (Klemsdal et al., 2008). Στις περισσότερες περιπτώσεις απλή μορφολογική παρατήρηση είχε ως αποτέλεσμα τον λανθασμένο χαρακτηρισμό ειδών, ιδιαίτερα για μέλη της κατηγορίας *G. fugikuroi*.

Το γεγονός της αδυναμίας αξιόπιστου προσδιορισμού των ειδών είχε ως αποτέλεσμα την ανάγκη εφαρμογής μοριακών τεχνικών, καθώς αυτές αποτελούν άριστο εργαλείο φυλογενετικής ανάλυσης σε εργαστηριακό επίπεδο. Η φυλογενετική ανάλυση των ειδών *Fusarium* sp. είναι βασισμένη στη Γενεαλογική Αντιστοιχία Φυλογενετικής Αναγνώρισης των ειδών (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition- GCPSR), (GCPSR; Taylor et al., 2000), μια μέθοδο η οποία αναγνωρίζει τμήματα μεταξύ γονιδίων και οι διαφορές στις αλληλουχίες των γονιδίων του DNA είναι αυτές που χρησιμοποιούνται για την φυλογενετική ανάλυση συγγενών ειδών. Πιο συγκεκριμένα για την ταυτοποίηση γίνεται χρήση δύο ή και περισσότερων γονιδίων, αν και σε πολλές περιπτώσεις είναι δυνατή η χρήση έστω και ενός γονιδίου αν αυτό ταυτίζεται με το γονίδιο αναφοράς (O'Donnell et al., 2004). Τα γονίδια που χρησιμοποιούνται για την φυλογενετική ανάλυση είναι τμήματα γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και έχουν την τάση της γρήγορης μεταλλαγής, πιο σύντομης από εκείνης του είδους. Ο πλέον εφαρμοσμένος δείκτης για τους μύκητες είναι η ITS περιοχή του ριβοσωμικού RNA (rRNA), που στην περίπτωση του γένους *Fusarium* sp. φαίνεται πως οδηγεί σε λανθασμένα αποτελέσματα (Geiser, 2004).

Η αδυναμία χρήσης του γονιδίου ITS για αξιόπιστα αποτελέσματα, οδήγησε τις έρευνες στην εύρεση ενός μεταγραφικού παράγοντα, του *tef-1* (TEF – 1a), ο οποίος κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη και δίνει τη δυνατότητα φυλογενετικής ανάλυσης του *Fusarium* sp. σε επίπεδο είδους. Για το συγκεκριμένο γονίδιο πραγματοποιήθηκε σε αρχικό επίπεδο σχεδιασμός εκκινητών για διαχωρισμό του συγκροτήματος των *F. oxysporum* (O'Donnell et al., 1998c). Στη συνέχεια ο σχεδιασμός των εκκινητών ήταν τέτοιος ώστε να καλύπτει πλήθος ασκομυκήτων. Οι εκκινητές αυτοί, *ef1* (forward primer; 5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') και *ef2* (reverse primer; 5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') (O'Donnell et al., 1998c), ενισχύουν μια περιοχή περίπου 700 βάσεων στο γονίδιο TEF, ενώ συμπεριλαμβάνονται 3 ιντρόνια σε όλα τα γνωστά *Fusarium* spp. (Εικόνα 44). Η χρήση των παραπάνω εκκινητών σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες αποτυπώνει τη φυλογενετική σχέση των ειδών του *Fusarium* spp. (Εικόνα 45).



Εικόνα 44. Απεικόνιση της περιοχής του γονιδίου TEF για την ταυτοποίηση *Fusarium* spp.

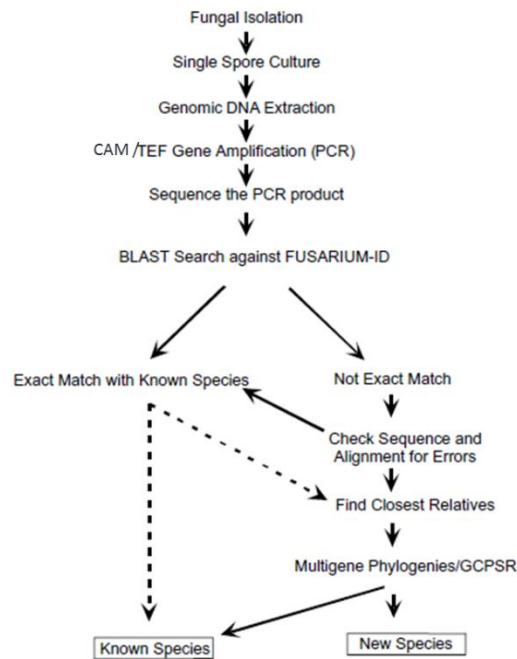


Εικόνα 45. Απεικόνιση της φυλογενετικής σχέσεις των ειδών του *Fusarium* spp. με τους εκκινητές του γονιδίου TEF (Διαχωρισμός σε επτά κλάδους I-VII) (Watanabe, 2011).

Το γονίδιο αυτό φαίνεται να παρουσιάζει μόνο ένα αντίγραφο στα *Fusarium* spp. με αποτέλεσμα να είναι υψηλό το επίπεδο πολυμορφισμού μεταξύ των ειδών, συγκρινόμενο ακόμα και με γονίδια όπως η καλμοντουλίνη (calmodulin –CAM), η β- τουμπουλίνη (beta- tubulin – TUB) και η ιστόνη 3 (histone- H3), με αποτέλεσμα να αποτελεί σημαντικό στοιχείο της φυλογενετικής ανάλυσης (O’Donnell et al., 2004). Λόγω της μεγάλης σημαντικότητας του εν λόγω γονιδίου το 2003 κατασκευάστηκε η βάση δεδομένων FUSARIUM- ID v.1.0, η οποία είναι προσβάσιμη και διαθέτει περισσότερες από 440 αλληλουχίες του γονιδίου TEF (O’Donnell et al., 2004).

Σε αρκετές περιπτώσεις για την φυλογενετική ανάλυση στο σύμπλεγμα *G. fugikuroi* φαίνεται να είναι αναγκαία η χρήση και άλλων γονιδίων ώστε να αποφευχθούν λανθασμένα φυλογενετικά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό γίνεται χρήση και άλλων πέντε γονιδίων με επικρατέστερο αυτό της καλμοντουλίνης. Οι εκκινητές της καλμοντουλίνης, CAM 1 (forward primer; 5’-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC- 3’) και CAM 2 (reverse primer; 5’- TTTTGCATCATGAGTTGGAC – 3’), έχουν σχεδιαστεί ώστε να ενισχύουν μια περιοχή περίπου 650 βάσεων στο εσωτερικό του γονιδίου (O’Donnell et al., 2000).

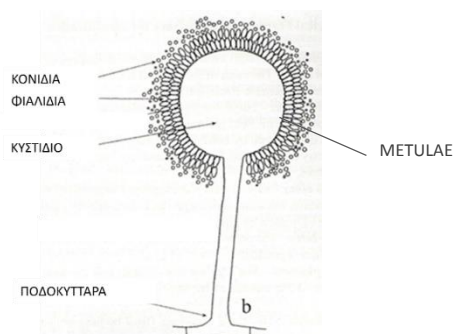
Η χρήση περισσότερων του ενός γονιδίων ταυτοποίησης είναι αναγκαία σε πολλές περιπτώσεις, ιδιαιτέρως αν το παθογόνο έχει πολλές διαφοροποιήσεις και αν η σημασία του είναι μεγάλη τόσο για τις καλλιέργειες όσο και για τον άνθρωπο. Τέτοια περίπτωση είναι οι μύκητες του γένους *Fusarium* spp., που είναι καταστροφικοί για της καλλιέργειες και επιβλαβείς για τον άνθρωπο λόγω της παραγωγής μυκοτοξινών, με αποτέλεσμα η ταυτοποίησή τους να είναι αναγκαία για την ολοκληρωμένη διαχείρισή τους (Εικόνα 46).



Εικόνα 46. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας ταυτοποίησης μυκήτων *Fusarium* sp.

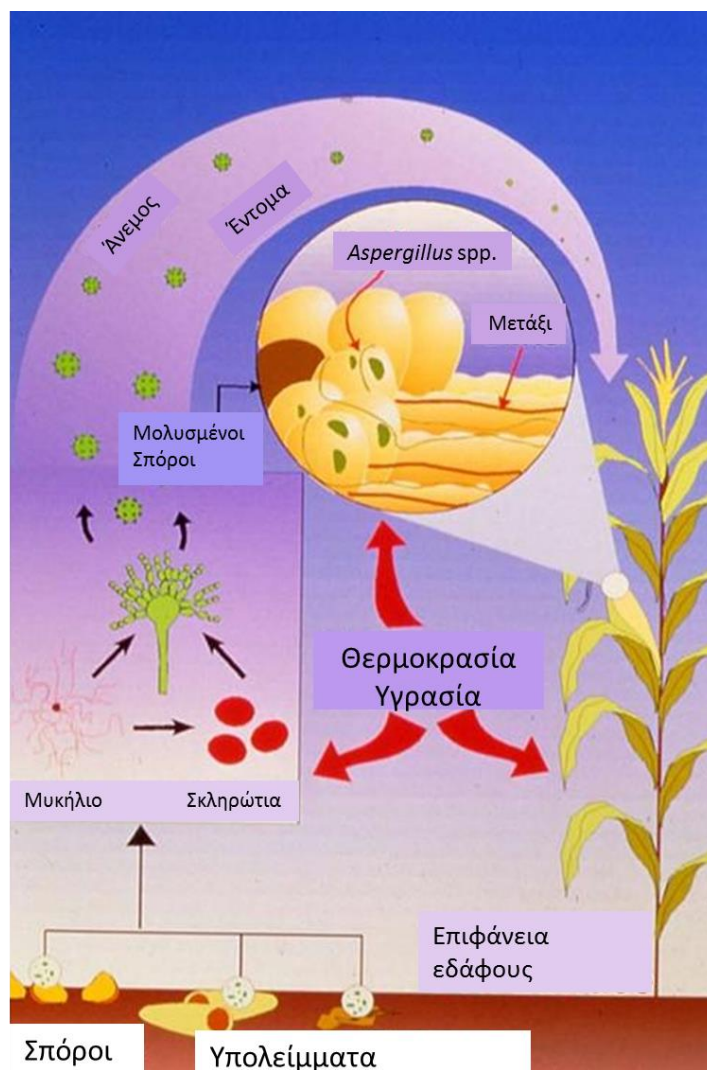
1.4 Το γένος *Aspergillus* spp.

Λίγοι μύκητες είναι τόσο σημαντικοί όσο τα είδη του γένους *Aspergillus* sp., καθώς αποτελούν μία ομάδα οργανισμών που έχουν θετική και αρνητική επίδραση τόσο για τις καλλιέργειες όσο και για τους ανθρώπους. Τα είδη των *Aspergillus* sp. έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται σε πολλά και διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα και σε διάφορες κλιματολογικές συνθήκες. Ο Micheli ήταν ο πρώτος που διέκρινε τους χαρακτηριστικούς κονιδιοφόρους και κεφαλές του γένους αυτού, αλλά αντιμετωπίστηκαν ως ξεχωριστό γένος μυκήτων από τον Wehmer το 1901 (Amaiike and Keller, 2011). Το εν λόγω γένος ανήκει στην οικογένεια *Trichocomaceae*, της κλάσης *Hyphomycetes* των αδηλομυκήτων και είναι ατελής μορφή ασκομυκήτων. Το βλαστικό μυκήλιό τους αποτελείται από διακλαδιζόμενες υφές με εγκάρσια χωρίσματα (septa), οι οποίες μπορεί να είναι άχρωμες ή έγχρωμες ή τοπικά έγχρωμες. Επί των υφών βρίσκονται τα σπόρια του μύκητα (κονίδια) και το σύνολό τους σχηματίζει τον κονιδιοφόρο, ο οποίος στο άκρο του σχηματίζει μια κεφαλή. Οι κονιδιοφόροι σχηματίζονται από εξειδικευμένα κύτταρα των υφών, τα οποία είναι ευμεγέθη, με παχύτερο κυτταρικό τοίχωμα, τα «foot cells». Στο άκρο και περιμετρικά της κεφαλής υπάρχει μία ή δύο σειρές κυττάρων, των στηριγμάτων τα οποία φέρουν τα κονίδια. Το χρώμα, το σχήμα και το μέγεθος των κονιδιοφόρων, των κεφαλών, των στηριγμάτων και των κονιδίων αποτελούν ταξινομικά χαρακτηριστικά του γένους (Εικόνα 47).



Εικόνα 47: Τυπική καρποφορία του *Aspergillus* sp.

Ορισμένα είδη μυκήτων του γένους *Aspergillus* spp. σχηματίζουν σκληρώτια ή ψευδοσκληρώτια και σε ορισμένες περιπτώσεις παράγουν ασκοσπόρια (εγγενή σπόρια) τα οποία απαιτούν μήνες για να ωριμάσουν. Η εγγενής αναπαραγωγή τους γίνεται με τη σύζευξη ανθηριδίου και ασκογονίου. Οι σχηματισμοί των ασκοκαρπίων είναι κλειστοθήκια που μπορούν να περιβάλλονται από περίδια ή κύτταρα Hulle, ενώ πολλές φορές ο σεξουαλικός πολλαπλασιασμός ξεκινά από ειδικά ασκογόνα σπειράματα (Πορετσάνου, 1984). Λόγω του ότι σχετικά λίγα είδη του γένους *Aspergillus* spp. παράγουν κλειστοθήκια και ασκοσπόρια, η ταξινόμηση για την πλειοψηφία των απομονώσεων βασίζεται στα χαρακτηριστικά της αποικίας και στις λεπτομέρειες της μορφολογίας των σχηματισμών που φέρουν τα κονίδια. Ο συνηθισμένος τρόπος αναπαραγωγής των *Aspergillus* spp. είναι ο αγενής δηλαδή η κονιδιογένεση, αν και σε πολλά είδη έχει περιγραφεί και εγγενής τρόπος αναπαραγωγής με ασκοσπόρια. Η εξάπλωση του μύκητα στις καλλιέργειες γίνεται συνήθως με μεταφορά σπορίων του μύκητα από τα υπολείμματα προηγούμενων καλλιεργειών (Εικόνα 48).



Εικόνα 48. Κύκλος ασθένειας των ειδών *Aspergillus* spp. (www.aspergillusflavus.org)

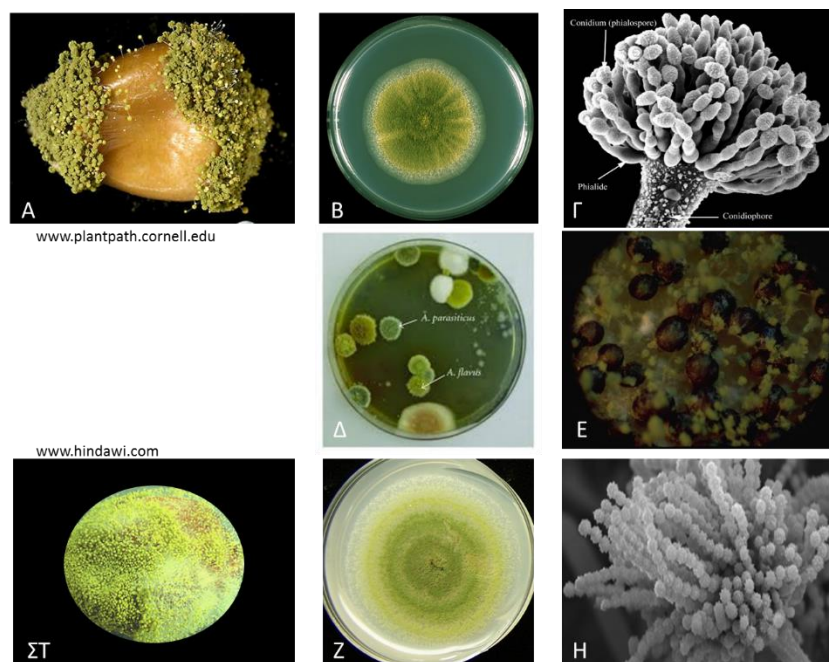
Μέχρι σήμερα υπάρχουν πάνω από 185 είδη του *Aspergillus* spp. ταξινομημένα, με τα περισσότερα να δημιουργούν σοβαρά προβλήματα σε πλήθος καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένης της καλλιέργειας αραβοσίτου (Samson, 1992). Τα πλέον επιβλαβή είδη, ιδιαιτέρως για την καλλιέργεια του αραβοσίτου, είναι ο *Aspergillus flavus*, ο οποίος προκαλεί σήψη σπάδικα και είναι ο «κύριος υπαίτιος» της παραγωγής αφλατοξινών, ο *Aspergillus parasiticus*, ο οποίος ενοχοποιείται επίσης για παραγωγή αφλατοξινών, και ο *Aspergillus niger*, ο οποίος παράγει ωχρατοξίνη (ΟΤΑ) αλλά και φουμονισίνη καθώς φέρει το αντίστοιχο γονίδιο για την παραγωγή φουμονισίνης του *Fusarium verticillioides* (Frisvad, 2011).

1.4.1 *Aspergillus* spp. section *Flavi*

Η ομάδα *Flavi*, περιλαμβάνει πολλά είδη όπως τα *A. oryzae*, *A. zonatus*, *A. avenaceus* κ.α., τα οποία διαχωρίστηκαν μορφολογικά αν και υπάρχει διαφωνία εάν ο *A. flavus* και ο *A. oryzae* αντιπροσωπεύουν τελικά διαφορετικά είδη. Στην ίδια ομάδα, είδη με κοντύτερους κονιδιοφόρους, τα οποία διατηρούσαν διαρκώς κιτρινο-πράσινες κεφαλές διαχωρίστηκαν σε δύο είδη: στον *A. flavus* και στον *A. parasiticus*. Τα δύο αυτά είδη διαχωρίστηκαν μερικώς από το χρώμα τους καθώς οι αποικίες του *A. flavus* είναι πρασινο-κίτρινες ή πράσινες, ενώ του *A. parasiticus* είναι σκούρες πράσινες. Επίσης, σημαντικό στοιχείο διαχωρισμού ήταν τα μήκη των κονιδιοφόρων, αλλά και τα φιαλίδια (*sterigmata*), τα οποία στον *A. flavus* είναι τυπικά με δυο σειρές και στον *A. parasiticus* σχηματίζονται σε μια μόνο σειρά. Τέλος, ο *A. parasiticus* συνήθως δεν σχηματίζει σκληρώτια (*Raper and Fennell, 2008*).

1.4.1.1 *Aspergillus flavus* – *Aspergillus parasiticus*

Τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν διαφέρουν σημαντικά στα δύο είδη, *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*, τα οποία αποτελούν την κύρια αιτία παραγωγής αφλατοξίνης πριν και μετά τη συγκομιδή σε διάφορες καλλιέργειες. Πιο συγκεκριμένα φέρουν κονδιακές κεφαλές οι οποίες είναι σφαιρικές έως ακτινωτές ή κιονοειδής, με ανοιχτό κίτρινο-πράσινο, βαθύ πράσινο χρώμα, ή καστανό. Οι κονιδιοφόροι είναι άχρωμοι, συνήθως τραχείς (ποικίλουν από λείοι έως σχεδόν τραχύς) και χωρίς διαφράγματα. Η κορυφαία εξόγκωση κονιδιοφόρου (*vesicles*) είναι σφαιρική ή σχεδόν σφαιρική στα είδη με ευμεγέθεις κεφαλές ενώ στα είδη με μικρές κεφαλές παραμένει ροπαλοειδής ή σε σχήμα φιαλιδίου. Τα φιαλίδια σχηματίζονται σε μία ή δύο σειρές και τα κονίδια (σπόρια) στα περισσότερα είδη είναι σφαιρικά ή σχεδόν σφαιρικά, με τραχεία επιφάνεια και σημαντική παραλλακτικότητα στο μέγεθος. Τέλος, τόσο στη φύση όσο και σε θρεπτικό υπόστρωμα έχουν βρεθεί σκληρώτια τα οποία έχουν καφέ ή μαύρο χρώμα και είναι σφαιρικά ή σχεδόν σφαιρικά (Εικόνα 49) (*Raper and Fennell, 2008*).



Εικόνα 49. Α. *A. flavus* σε σπόρο καλαμποκιού, Β. *A. flavus* σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, Γ. Κονιδιοφόρος του *A. flavus* με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, Δ. Αποικίες *A. flavus* και *A. parasiticus* σε *in vitro* καλλιέργεια, Ε. Σκληρώτια του *A. flavus* σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, ΣΤ. *A. parasiticus* σε σπόρο καλαμποκιού, Ζ. *A. parasiticus* σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, Η. Κονιδιοφόρος του *A. parasiticus* με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Την τελευταία δεκαετία, έχουν γίνει σημαντικά βήματα στην αποκρυπτογράφηση του βιοσυνθετικού μονοπατιού της αφλατοξίνης το οποίο φαίνεται ότι είναι παρόμοιο στα δύο είδη: *A. flavus* και *A. parasiticus*. Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ειδών είναι η απουσία των γονιδίων *norB* και *cypA* στον *A. flavus*, γονίδια τα οποία είναι απαραίτητα για τη βιοσύνθεση της ομάδας G των αφλατοξινών. Με εξαίρεση ένα υποείδος, ο *A. flavus* παράγει μόνο την ομάδα Β (B1, B2) των αφλατοξινών ενώ ο *A. parasiticus* και τις δύο. Οι πληθυσμοί του *A. flavus* είναι γενετικά διαφοροποιημένοι σε δύο υποείδη, τα στελέχη των οποίων διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους των σκληρωτίων και αναφέρονται ως L (Large) για τα μεγάλα σκληρώτια και S (Small) για τα μικρά. Τα περισσότερα στελέχη L παράγουν μόνο Β αφλατοξίνες, ενώ μερικά στελέχη S παράγουν και τα δύο είδη. Γενικά τα S στελέχη παράγουν περισσότερες ποσότητες αφλατοξίνης, λίγα κονίδια και πολλά σκληρώτια, ενώ τα L στελέχη παράγουν άφθονα κονίδια και σκληρώτια (Yu et al, 2008).

Οι δύο μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι συγγενείς και αναπτύσσονται σε φυτικά υλικά τόσο πάνω όσο και μέσα στο έδαφος. Επιπροσθέτως, ο *A. flavus* παράγει πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων μυκοτοξινών, όπως ασπερτοξίνη, αφλατρέμη, ασπεργιλλικό οξύ και αφλατοξίνες. Οι τελευταίες, οι οποίες είναι τοξικές και καρκινογόνες συσσωρεύονται στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Λόγω των επιπτώσεών τους στην υγεία έχουν γίνει πολλές έρευνες, οι οποίες εστιάζουν στην κατανόηση της βιολογίας και οικολογίας του πληθυσμού του μύκητα καθώς και του δευτερογενούς μεταβολισμού του (Goldman and Osmani, 2008).

Τα προαναφερθέντα είδη απαντώνται συνήθως σε υποτροπικές ζεστές κλιματικές περιοχές. Ο *A. flavus* συναντάται κυρίως σε θερμοκρασίες μεταξύ 26°C και 35°C. Απομονώνεται κυρίως από καλλιεργούμενα εδάφη, αλλά μπορεί να βρεθεί σε διάφορα υποστρώματα όπως δασικά εδάφη. Ο *A. flavus* καθώς και ο *A. parasiticus* μπορεί να βρεθούν σε σπόρους βαμβακιού, αραβοσίτου, φυσιτικού και άλλων ξηρών καρπών, με τον *A. flavus* να είναι το πιο κυρίαρχο είδος. Ο *A. parasiticus* έχει μία ελαφρώς χαμηλότερη άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξίνης, γεγονός το οποίος εξηγεί γιατί βρίσκεται περισσότερο στην αραχίδα (υπόγειος καρπός) απ' ότι σε υπέργειους καρπούς (π.χ. σπάδικας αραβοσίτου) (Goldman and Osmani, 2008).

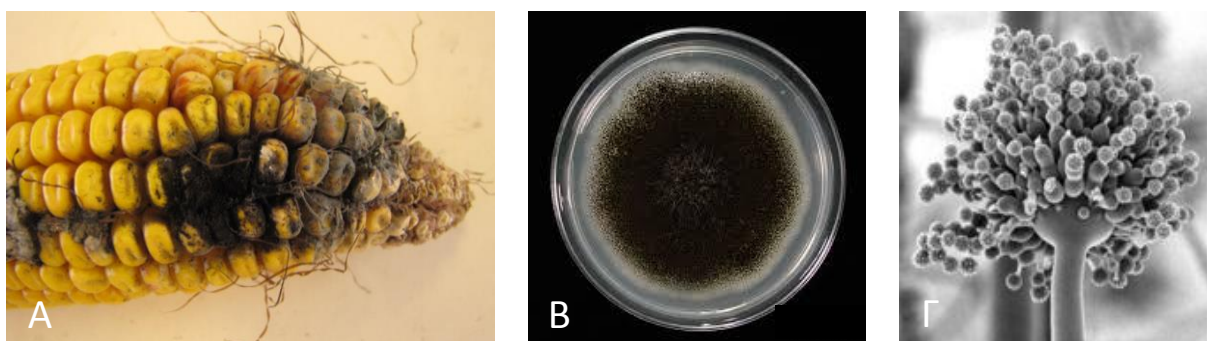
Ο *A. flavus* είναι ένα προαιρετικό παθογόνο των αναπτυσσόμενων καρπών, κυρίως του αραβοσίτου, του βαμβακιού, της αραχίδας και των ξηρών καρπών. Δεν είναι επιθετικό παθογόνο και η αποίκισή του συχνά απαιτεί το φυτό-ξενιστή να έχει κατεσταλμένη άμυνα, συνήθως λόγω ξηρασίας και θερμοκρασιακού στρες. Η παρουσία του κυρίως σχετίζεται με τραυματισμένους καρπούς όπου μπορεί να εισβάλει και να τους μολύνει και αν και προαιρετικό παθογόνο είναι πολύ καλά προσαρμοσμένο στην αποίκιση καρπών, με αποτέλεσμα να καθιστά δύσκολη την αποίκιση τους από άλλους μύκητες (Goldman and Osmani, 2008).

Τέλος, ο *A. flavus* είναι το δεύτερο παθογόνο αίτιο της πρόκλησης ασπεργίλλωσης στους ανθρώπους μετά τον *A. fumigatus* και ο βασικός παθογόνος παράγοντας της χρόνιας ρινικής μόλυνσης (chronic indolent invasive sinonasal infection) σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Η θνησιμότητα από τις μολύνσεις με ασπεργίλλους είναι υψηλή λόγω του περιορισμένου αριθμού αντιμυκητιακών φαρμάκων καθώς και της παρουσίας ανθεκτικών στελεχών στα υπάρχοντα φαρμακευτικά σκευάσματα. Σε μια έρευνα κατά την οποία παρακολουθούνταν οι συγκεντρώσεις σε σπόρια ασπεργίλλων, ο *A. flavus* ήταν δεύτερος σε ποσοστό μετά τον *A. niger* (Goldman and Osmani, 2008; Raper and Fennell, 2008).

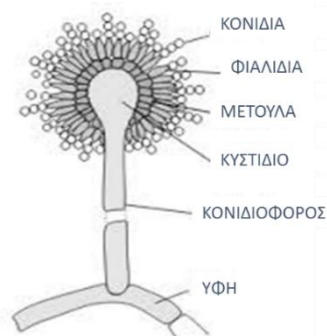
1.4.2 *Aspergillus* spp. section *Nigri*

Ο *Aspergillus niger* είναι ένας ακόμα σημαντικός μύκητας που ανήκει στους μαύρους ασπέργιλλους (*Aspergillus niger*). Ο *Aspergillus niger* αποτελεί τον πιο συχνά απαντώμενο ασπέργιλλο καθώς υπάρχει παντού στη φύση. Ο μύκητας αυτός έχει απασχολήσει σε μεγάλο βαθμό τους ερευνητές καθώς προκαλεί ασπεργιλλίωση στον άνθρωπο, παράγει σημαντικές ποσότητες μυκοτοξινών ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται στη βιομηχανία. Η χρήση του στη βιομηχανία στηρίζεται στην παραγωγή οργανικού οξέος (Karaffa et al., 2003; Goldberg et al., 2006; Archer et al., 1990), στην παραγωγή ενζύμων (Pariza et al., 2010), αλλά και στην βιοαποδόμιση και την επεξεργασία των αποβλήτων (Parker et al., 2007). Τρία στελέχη του *A. niger* έχουν ήδη αλληλουχηθεί πλήρως, αλλά η μελέτη τους συνεχίζεται με χρήση νέων τεχνικών (transcriptomics και metabolomics) για να είναι κατανοητός ο τρόπος ανάπτυξης, διαφοροποίησης και φυσιολογίας του είδους αυτού (Pel et al., 2007; Nielsen et al., 2009). Στα τρία στελέχη που έχουν μελετηθεί φαίνεται ότι υπάρχει το σύμπλεγμα γονιδίων που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή φουμονισίνης και είναι παρόμοιο με αυτό του *Fusarium verticillioides* (= *Gibberella moniliformis*) (Brown et al., 2005; Proctor et al., 2003). Στελέχη του *A. niger* έχει αποδειχθεί ότι παράγουν φουμονισίνες B2, B4 και B6, αλλά δεν παράγουν την B1 φουμονισίνη (Frisvad et al., 2007; Mansson et al., 2010). Στην καλλιέργεια του αραβοσίτου έχουν γίνει απομονώσεις και έχει παρατηρηθεί ότι πέραν της παραγωγής φουμονισινών, ο *A. niger* είναι υπεύθυνος για την παραγωγή ωχρατοξινών (OTA). Χαρακτηριστικό δε, είναι το γεγονός ότι αν και ο *A. carbonarius* είναι ο πιο γνωστός για την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων ωχρατοξίνης, μολτατά ο *A. niger* απαντάται σε περισσότερες καλλιέργειες και τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου του αραβοσίτου (Frisvad et al., 2009).

Όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα, οι αποικίες του *A. niger* αποτελούνται από λευκές υφές που σύντομα καλύπτονται από τα αγενή αναπαραγωγικά όργανά του, τα κονίδια. Οι μυκηλιακές υφές του μύκητα έχουν εγκάρσια χωρίσματα (septa) και απ' αυτές εκπτύσσονται οι κονιδιοφόροι, το μήκος των οποίων κυμαίνεται από 900-1600 μm σε μήκος. Στην κορυφή του κονιδιοφόρου υπάρχουν σφαιρικοί σχηματισμοί, τα κυστίδια, που κυμαίνονται από 40-60 μm σε διάμετρο. Κάθε κυστίδιο είναι πλήρως καλυμμένο με φιαλίδια, τα οποία εκπτύσσονται από καφέ μέτουλες (metulae). Επί των φιαλιδίων αναπτύσσονται τα κονίδια του μύκητα τα οποία έχουν διάμετρο 3 έως 5 μm (Debets et al., 1990) (Εικόνα 50,51).



Εικόνα 50. Α. Σπάδικας αραβοσίτου με προσβολή από *A. niger*, Β. Καλλιέργεια *A. niger* σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, Γ. Κονιδιοφόρος του μύκητα *A. niger* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus_niger).



Εικόνα 51. Απεικόνιση του κονιδιοφόρου του *A. niger* με τους χαρακτηριστικούς σχηματισμούς του, της μέτουλης.

1.4.3. Μοριακή ταυτοποίηση ειδών *Aspergillus* sp.

Η ταυτοποίηση των ειδών *Aspergillus* spp. εν γένει είναι βασισμένη στη μορφολογική και μικροσκοπική παρατήρηση των αποικιών. Η απομόνωση των μυκήτων και ο προσδιορισμός με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αποτελεί εύκολη και γρήγορη διαδικασία αρκεί να γίνεται χρήση κατάλληλων θρεπτικών υποστρωμάτων και να υπάρχει ολοκληρωμένη γνώση των μορφολογικών διαφορών των ειδών σε μικροσκοπικό επίπεδο (Diba et al, 2007).

Οι μελέτες όμως έχουν στραφεί και στην ανάδειξη μοριακών τεχνικών ώστε να είναι αξιόπιστος ο διαχωρισμός σε επίπεδο είδους. Οι μοριακές τεχνικές είναι γρήγορες και δίνουν ασφαλές αποτέλεσμα σε 24 ώρες από την εξαγωγή του DNA. Με τη χρήση γονιδίων πραγματοποιείται αλληλούχιση καθορισμένων περιοχών και ανάλυση των αποτελεσμάτων με φυλογενετικές μεθόδους (Φυλογενετική ανάλυση ειδών / Phylogenetic Species Recognition (PSR)). Η χρήση του PSR έχει αποσαφηνίσει σε μεγάλο βαθμό την ταξινόμηση των ειδών. Ωστόσο, αυτή η μεθοδολογία είναι ακριβή και απαιτεί φυλογενετική τεχνογνωσία, η οποία μπορεί να είναι περιοριστικός παράγοντας (Taylor et al., 2000).

Σήμερα η μέθοδος που χρησιμοποιείται βασίζεται στην ενίσχυση με PCR, επιλεγμένων περιοχών του DNA (target locus) και ταυτοποίηση των ειδών με χρήση βάσης δεδομένων, η οποία εξετάζει το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των ειδών. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η χρήση της περιοχής ITS του ριβοσώματος (ITS 1, 5.8S rRNA, και ITS2) που βρίσκεται μεταξύ της μικρής και μεγάλης υπομονάδας του πυρηνικού rRNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση του είδους του *Aspergillus* (White et al., 1990; Hinrikson et al., 2005). Η περιοχή ITS ικανοποιεί την ανάγκη «καθολικής» περιοχής και μπορεί να ενισχυθεί με αξιοπιστία για τους περισσότερους μύκητες, καθώς είναι συντηρημένη, είναι παρούσα ως πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδίωμα, αποδίδει επαρκή ταξινομική ανάλυση για τους περισσότερους μύκητες, και έχει το πρόσθετο πλεονέκτημα ότι η GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), το Ευρωπαϊκό Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας (<http://www.ebi.ac.uk/emb1/>), και η βάση δεδομένων της Ιαπωνίας (DNA Data Bank of Japan) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) περιέχουν μεγάλο αριθμό αλληλουχιών αυτού του τύπου, που καθιστά δυνατή τη σύγκριση με ένα άγνωστο προϊόν απομόνωσης (Balajee et al., 2009).

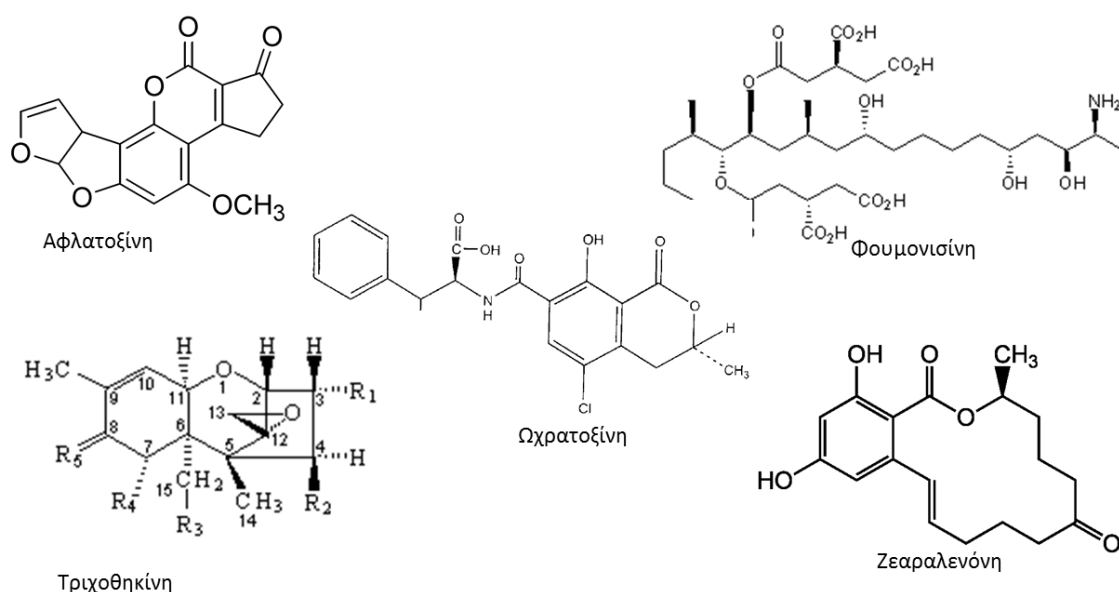
Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιείται σύγκριση του γονιδίου ITS 1–5.8S–ITS 2, με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών (ITS 1, 5'-TCC GTA GGTGAA CCT GCG G- 3' και ITS 4, 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3'), όπου σε συνδυασμό με μελέτη του γονιδίου παραγωγής αφλατοξίνης *afIT* (forward primer; 5'-AAGCTCCGGGATAGCTGTA-3' και reverse primer; 5'-AGGCCACTAAACCCGAGTA-3'), το οποίο παρουσιάζει μικρή ομολογία εκτός του section *Flavi*, δίνετε πλήρη ταξινόμηση των ειδών του *Aspergillus* sp. (Godet et al., 2010). Επίσης μπορεί να γίνει χρήση και του γονιδίου της β- τουμπουλίνης (β- tub), το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη και δίνει τη δυνατότητα φυλογενετικής ανάλυσης του *Aspergillus* sp. σε επίπεδο είδους (Balajee et al., 2009).

1.5. Μυκοτοξίνες

Τα φυτοπαθογόνα στελέχη των γενών *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. είναι υπεύθυνα όχι μόνο για την προσβολή πλήθους καλλιεργειών αλλά και για την παραγωγή μυκοτοξινών. Οι μυκοτοξίνες είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που «εμφανίζονται» στον αγρό και συνεχίζουν τη βιοσύνθεση και τη δράση τους σε μετασυλλεκτικό επίπεδο όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές (Logrieco et al., 2007). Οι ενώσεις αυτές έχουν σημαντικά τοξικά δράση και απασχολούν την επιστημονική κοινότητα λόγω των επιδράσεών τους τόσο στην υγεία του ανθρώπου, όσο και των ζώων. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού διαφόρων ειδών μυκήτων, ενώ δεν φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο με την ανάπτυξή τους. Επίσης οι συνθήκες κάτω από τις οποίες αναπτύσσονται οι μυκοτοξίνες δεν συσχετίζονται άμεσα με τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των μυκήτων (Logrieco et al., 2007).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) οι απώλειες τροφίμων που οφείλονται σε μυκοτοξίνες και οι δαπάνες της διαχείρισής τους αυξάνονται σε ανησυχητικό επίπεδο παγκοσμίως. Κάθε χρόνο περισσότερο από το 25-30% των γεωργικών προϊόντων μολύνονται με μυκοτοξίνες, προκαλώντας σοβαρές απώλειες με σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο στη γεωργική παραγωγή, τις βιομηχανίες τροφίμων, την κτηνοτροφία και την εθνική και παγκόσμια οικονομία, αλλά και σοβαρές επιπτώσεις στον άνθρωπο και τα ζώα. Λόγω της τόσο μεγάλης σημασίας τους για την υγεία, την οικονομία και το εμπόριο, οι μυκοτοξίνες βρίσκονται στο επίκεντρο, ενώ εκτιμάται ότι ο αριθμός τους θα αυξηθεί, γεγονός που προκαλεί μεγάλη ανησυχία (CAST 2003).

Η σοβαρότητα της δράσης μιας μυκοτοξίνης δεν εξαρτάται μονάχα από τη συχνότητα εμφάνισής της, αλλά και από το είδος της ασθένειας που προκαλεί. Σύμφωνα με τα στοιχεία των υπαρχουσών μελετών, οι σημαντικότεροι μυκοτοξικογόνοι μύκητες ανήκουν στα γένη *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* και *Alternaria* (Miller, 1995), με τα τρία πρώτα γένη να αποτελούν τα κυρίαρχα στην ανίχνευση μυκοτοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Πιο συγκεκριμένα οι σπουδαιότεροι τοξικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται είναι οι αφλατοξίνες, που παράγονται κυρίως από είδη του γένους *Aspergillus* spp., οι ωχρατοξίνες, που παράγονται από είδη των γενών *Aspergillus* spp. και *Penicillium* spp., οι φουμονισίνες, που παράγονται από είδη του γένους *Fusarium* spp. αλλά και σύμφωνα με τελευταία στοιχεία και από τον *A. niger* (Frisvad et al., 2007), οι τριχοθηκίνες και η ζεαραλενόνη που παράγονται επίσης από είδη του γένους *Fusarium* spp. (Εικόνα 52) (Jackson et al., 1999).



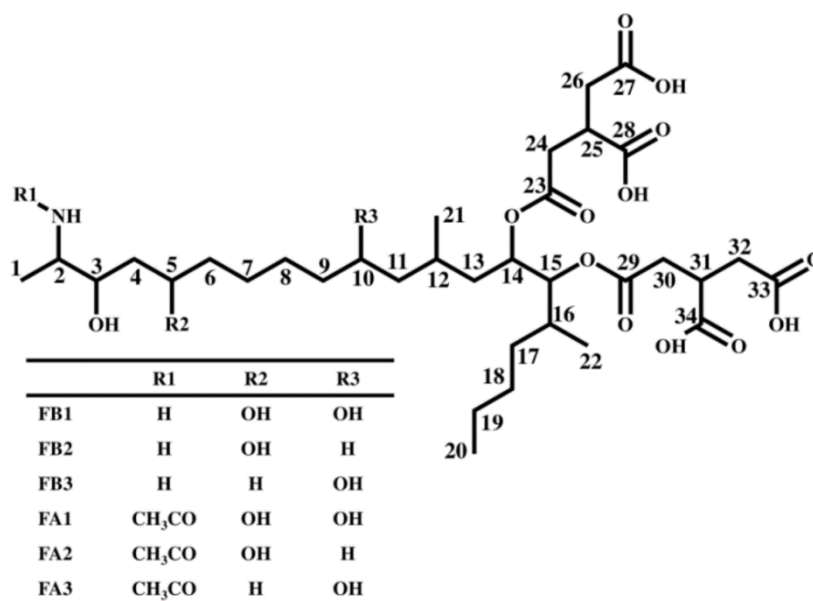
Εικόνα 52. Χημική δομή των συχνότερα εμφανιζόμενων μυκοτοξινών των τροφίμων.

Η παρουσία μυκοτοξινών στα γεωργικά προϊόντα έχει αποδειχθεί πως επηρεάζεται από ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες και ως εκ τούτου, η έκταση της μόλυνσης ποικίλει με τη γεωγραφική θέση, τις γεωργικές και αγρονομικές εφαρμογές, και την ευαισθησία των προϊόντων στη μόλυνση στις περιόδους πριν τη συγκομιδή, την αποθήκευση και επεξεργασία. Λόγω του πλήθους των αρνητικών επιπτώσεων που προκαλεί η ύπαρξη των μυκοτοξινών κρίνεται επιτακτική η ανάγκη εύρεσης αποτελεσματικών και ασφαλών μεθόδων αντιμετώπισης των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και διαχείρισης των παραγόμενων μυκοτοξινών, με βελτίωση των συνθηκών παραγωγής των γεωργικών προϊόντων (Tsitsigiannis et al., 2012).

1.5.1 Οι Φουμονισίνες

Οι φουμονισίνες αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα μυκοτοξινών που παράγεται από διάφορα είδη του γένους *Fusarium*. Το γένος αυτό περιλαμβάνει μια σημαντική ομάδα φυτοπαθογόνων μυκήτων που προσβάλλουν σημαντικές καλλιέργειες όπως τα σιτηρά, τα σολανώδη, το σπαράγγι, την πατάτα κ.α., και προκαλούν σοβαρές απώλειες της γεωργικής παραγωγής. Μέχρι πρόσφατα ήταν γνωστό ότι οι φουμονισίνες παράγονται από τα είδη *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) και *F. proliferatum*, που προσβάλλουν κυρίως τον αραβόσιτο. Τα τελευταία όμως χρόνια έχουν αναγνωρισθεί και άλλα μυκοτοξικογόνα είδη του ίδιου γένους, όπως τα *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. dlaminii* και *F. anthophilum* στα σιτηρά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι πολύ πρόσφατα διαπιστώθηκαν και μυκοτοξικογόνα είδη άλλων γενών να παράγουν φουμονισίνες, όπως το είδος *Aspergillus niger* (Frisvad et al., 2007).

Οι φουμονισίνες ανήκουν στην οικογένεια των πολυκετιδίων (polyketides), ενώ ενοχοποιούνται για ορισμένες μορφές καρκίνου του οισοφάγου του ανθρώπου καθώς και για βλάβες στο νευρικό σωλήνα. Σε πειράματα έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν διάφορες ασθένειες σε κτηνοτροφικά ζώα και τρωκτικά (Gelderblom et al., 1988; Marasas et al., 2004). Οι μυκοτοξίνες αυτές συνίσταται από μια γραμμική αλυσίδα ατόμων C, η οποία έχει μια ομάδα αζώτου, ένα έως τέσσερα υδροξύλια και δύο τρικαρβοξυλικούς εστέρες σε διάφορες θέσεις κατά μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. Λόγω της παραλλακτικότητας στη δομή οι φουμονισίνες χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες, την A, την B, την C και την P, οι οποίες βασίζονται στην παραλλακτικότητα γύρω από το άτομο του αζώτου και τις διαφορές στο μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. Οι ομάδες A, B και P έχουν 20 άτομα άνθρακα, ενώ η C έχει 19 άτομα άνθρακα. Στις κατηγορίες B και C, η ομάδα του αζώτου είναι ελεύθερη αμίνη, στην A είναι μια ακετυλιομένη αμίνη και στην P είναι μέρος υδροξυπυρινικού δακτυλίου (Εικόνα 53), (Musser and Plattner, 1997; Sewram et al., 2005; Moretti et al., 2013).

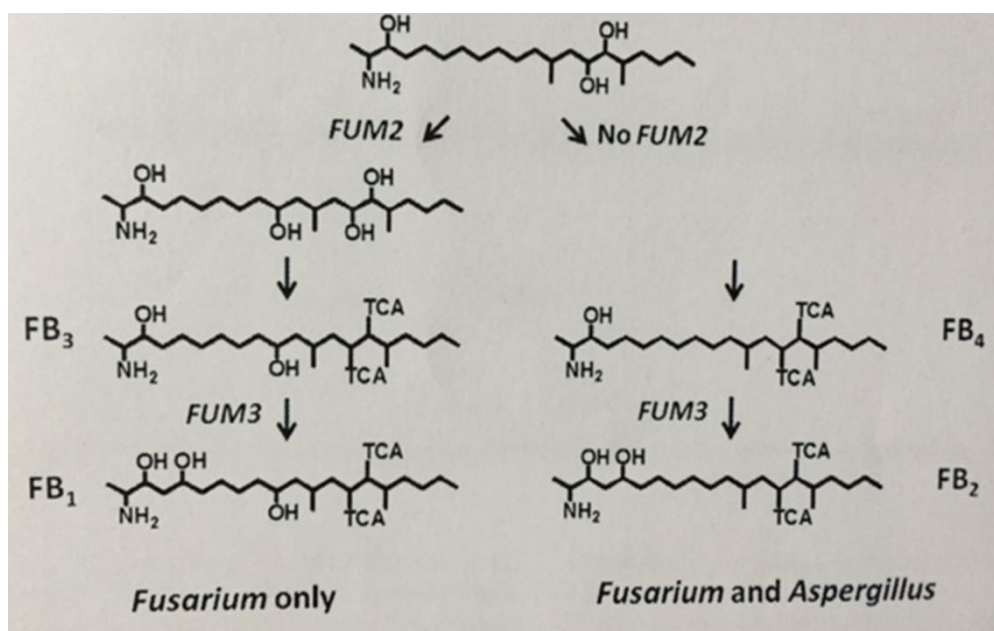


Εικόνα 53. Χημική δομή φουμονισινών (Tamura et al., 2014).

Η βιολογική δράση των φουμονισινών φαίνεται να συνδέεται με το μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων, παραμένουν όμως ακόμα πολλά σημεία ανεξερεύνητα για το μηχανισμό με τον οποίο οι φουμονισίνες είναι τοξικές και καρκινογόνες. Υψηλά επίπεδα φουμονισινών εμφανίζονται σε ζεστό και ξηρό καιρό, που ακολουθείται από περιόδους υψηλής υγρασίας (D’Mello et al., 1999). Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί περίπου 20 διαφορετικές φουμονισίνες, σημαντικότερες των οποίων είναι η FB1, FB2, FB3 και FB4, οι οποίες είναι ισχυρά καρκινογόνες και γονοτοξικές. Τα πιο γνωστά μυκοτοξικογόνα γένη που παράγουν τις 4 αυτές μυκοτοξίνες ανήκουν στο σύμπλεγμα *Gibberella fujikuroi*, με την FB1 να απαντάται συχνότερα και σε μεγαλύτερη αναλογία, συγκριτικά με τις υπόλοιπες (Rheeder et al., 2002). Οι φουμονισίνες της Β ομάδας διαφέρουν δομικά μεταξύ τους ως προς την παρουσία ή απουσία υδροξυλίων στον άνθρακα πέντε (C-5) και στον άνθρακα δέκα (C-10), καθώς η FB1 έχει ένα υδροξύλιο στον C-5 και στον C-10, η FB2 έχει μόνο ένα στον C-5, η FB3 έχει μόνο στον C-10 και η FB4 δεν έχει υδροξύλιο, σε καμία από τις δύο θέσεις (Moretti et al., 2013).

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της σύνθεσης των φουμονισινών σχετίζεται με συγκεκριμένα γονίδια που έχουν περιγραφεί στους μύκητες *F. oxysporum*, *F. verticillioides* και *F. proliferatum* του συμπλέγματος *F. fujikuroi* (Proctor et al., 2003; Waalwijk et al., 2004). Στο σύμπλεγμα αυτό συμμετέχουν 16 γονίδια, ενώ η αποσαφήνιση του λειτουργικού τους ρόλου έχει οδηγήσει σε βαθύτερη γνώση της παραλλακτικότητας των φουμονισινών (Moretti et al., 2013).

Όσον αφορά την παραγωγή φουμονισινών από μαύρους ασπεργίλλους (*Aspergillus niger*) έχει παρατηρηθεί ότι παράγουν FB2, FB4, και FB6 αλλά όχι FB1 και FB3. Σε μια συλλογή απομονώσεων *A. niger* παρατηρήθηκε ότι το 77% παρήγαγε FB2 και FB4, ενώ κανένα απ’ αυτά δεν παρήγαγε ωχρατοξίνη (Εικόνα 54) (Medina et al., 2005).

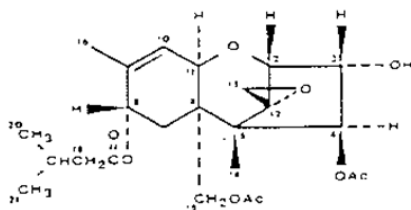


Εικόνα 54. Βιοσυνθετικό μονοπάτι φουμονισινών από στελέχη *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. (Tamura et al., 2014).

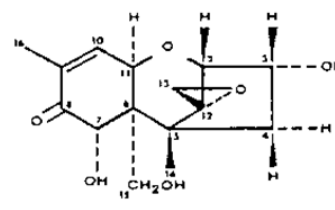
1.5.2 Οι Τριχοθηκίνες

Οι τριχοθηκίνες είναι μια μεγάλη ομάδα τετρακυκλικών τερπενοειδών που παράγονται από διάφορα είδη του γένους *Fusarium*, όπως *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, κ.α., αλλά και από μύκητες των γενών *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Stachybotrys*, κ.α. και υπάγονται στις πλέον σημαντικές μυκοτοξίνες λόγω της ανίχνευσής τους σε πλήθος καλλιεργειών (Desjardins et al., 2006). Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί περισσότερες από 20 ενώσεις με παρόμοια χημική δομή, σημαντικότερες των οποίων είναι οι τριχοθηκίνες της ομάδας A: T-2 τοξίνη, HT-2 τοξίνη, νεοσολανιόλη (NEO), διακετοξυσκίρπενόλη (DAS). Σημαντικά είναι και είδη της ομάδας B όπως η δεοξυνιβαλενόλη (DON ή βομιτοξίνη) και τα παράγωγά της 3-ακετυλο και 15-ακέτυλο (3-ADON, 15-ADON), καθώς και η νιβαλενόλη (NIV) (Desjardins et al., 2006). Οι περισσότερες από τις προαναφερθείσες τριχοθηκίνες αναφέρεται ότι μπορούν να προκαλέσουν ανασοκαταστολή στον άνθρωπο και τα ζώα. Η T-2 τοξίνη έχει βρεθεί ότι προκαλεί αιμορραγική διάρροια, νεκρώσεις δέρματος και μειωμένη παραγωγή. Η δεοξυνιβαλενόλη (DON) χαρακτηρίζεται από την πρόκληση εμετού και άρνηση τροφής στα ζώα, προκαλώντας επίσης διαταραχές του πεπτικού συστήματος, αιμορραγία εντέρων, πρόκληση οιδημάτων, πρόκληση νευρικών διαταραχών, απώλεια βάρους και διάρροια που μπορεί να οδηγήσει μέχρι και το θάνατο.

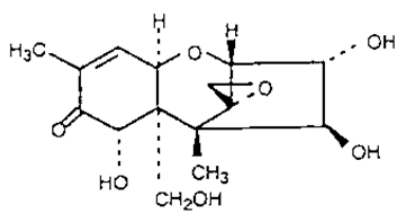
Η δομή των τριχοθηκινών είναι τρικυκλική, με μια υποξειδική ομάδα, ενώ μπορεί να διαιρεθούν σε δύο δομικά διακριτές ομάδες, με βάση την απουσία (τύπος A τριχοθηκινών) ή την παρουσία (τύπος B τριχοθηκινών) μιας κετονομάδας, στον άνθρακα οχτώ (C-8) (Εικόνα 55) (Desjardins et al., 2006).



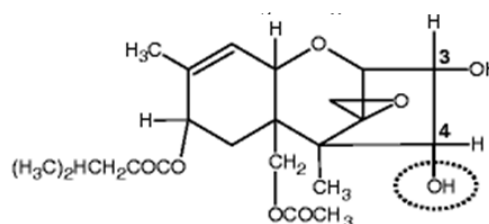
(a) T-2 toxin



(b) Deoxynivalenol



(c) Nivalenol



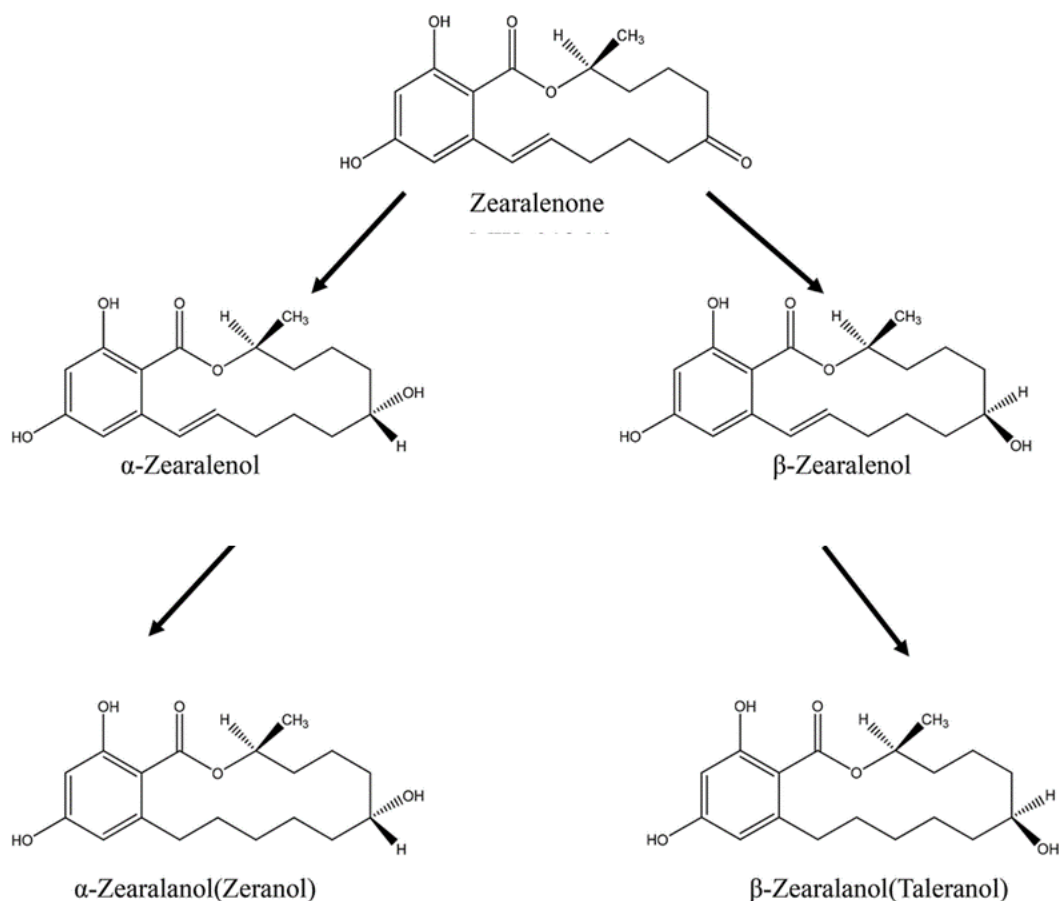
(d) HT-2 toxin

Εικόνα 55. Χημική δομή των (a)T-2, (b)DON, (c) NIV και (d)HT-2 των τριχοθηκινών (FAO).

1.5.3 Η Ζεαραλενόνη

Είδη μυκήτων του γένους *Fusarium*, όπως το *F. culmorum*, *F. graminearum* και *F. crookwellense* ευθύνονται για την παραγωγή ζεαραλενόνης (ZON), μιας μυκοτοξίνης που ανιχνεύεται σε προϊόντα που προέρχονται από την καλλιέργεια του ρυζιού, του κριθαριού, του σιταριού αλλά και του αραβοσίτου. Η ζεαραλενόνη είναι μια λακτόνη του 6 (10-υδρόξυ-6-όξο-τρανς-1-εντενέκυλο)-β-ρεσορκυκλικού οξέος με μοριακό τύπο $C_{18}H_{22}O_5$ και μοριακό βάρος 318,36. Οι μεταβολίτες α- και β-ZEN είναι τα δύο ισομερή που σχηματίζονται με την αναγωγή της κετονο-ομάδας του άνθρακα στη θέση 6 του δακτυλίου της λακτόνης, σε υδροξυλ-ομάδα ($C=O \rightarrow C-OH$). Η ζεαραλενόνη απαντάται στους δημητριακούς καρπούς (σιτάρι, κριθάρι, σόγια, βρώμη, αραβόσιτο, κ.λπ.), όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας κατά την αποθήκευσή τους ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων. Οι μύκητες του γένους *Fusarium* παράγουν τα υψηλότερα ποσοστά ZON σε σχετική υγρασία 45% και θερμοκρασία 20-25°C (Palysik et al., 1980).

Ο μεταβολισμός της ζεαραλενόνης αποτελεί αντικείμενο μελέτης δεδομένου ότι μερικοί από τους μεταβολίτες είναι επιβλαβέστεροι της ZON. Οι κύριοι μεταβολίτες της ζεαραλενόνης είναι η α- και η β-ζεαραλενόνη (α-ZEN και β-ZEN). Δευτερευόντως ανιχνεύονται η α-ζεαραλανόλη (ζερανόλη) και η β-ζεαραλανόλη (ταλερανόλη). Γενικά, οι μεταβολίτες της ZON δημιουργούν χημικές ενώσεις με το γλυκουρονικό οξύ, όμως στα διάφορα είδη ζώων έχουν διαπιστωθεί διαφορές ως προς το μεταβολισμό της (Εικόνα 56) (Jolbauer et al., 2000; Malekinejad et al., 2006).



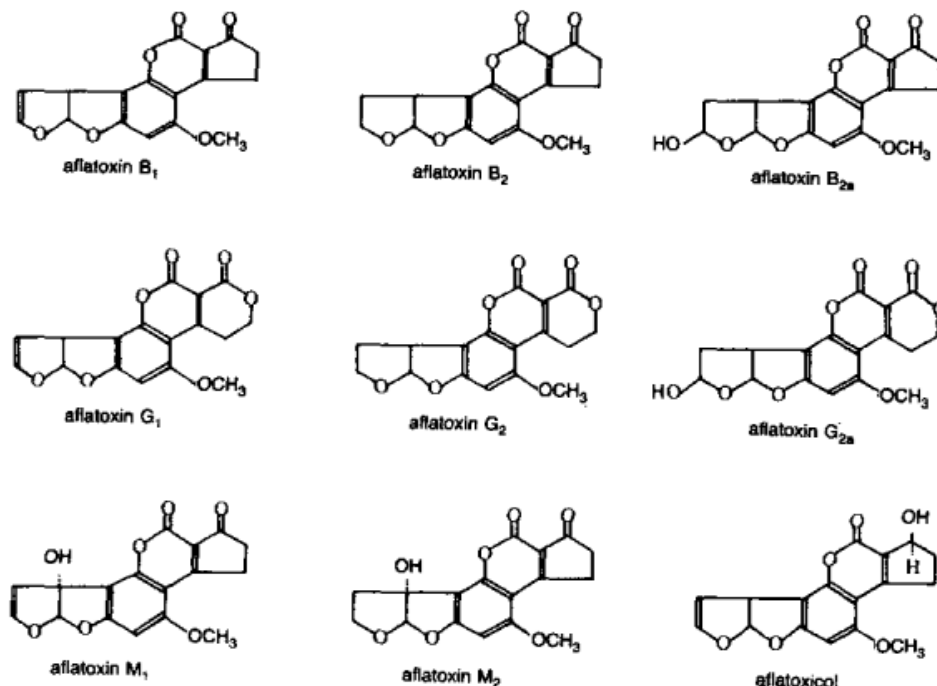
Εικόνα 56. Χημική δομή ζεαραλενόνης και των κύριων μεταβολιτών της.

1.5.4 Οι Αφλατοξίνες

Οι αφλατοξίνες είναι ίσως οι πιο μελετημένες μυκοτοξίνες και παράγονται από διάφορα είδη του γένους *Aspergillus* με κύρια τον *A. flavus* και *A. parasiticus*. Τα παθογόνα αυτά απαντώνται σε μεγάλα ποσοστά στις καλλιέργειες κυρίως στις περιοχές με θερμό και υγρό κλίμα. Ήταν οι πρώτες μυκοτοξίνες που προσδιορίστηκαν και θεωρήθηκαν πιθανός κίνδυνος για την υγεία των ανθρώπων και ζώων, αφού πέθαναν 100.000 γαλοπούλες από μια οξεία νέκρωση του συκωτιού τους μετά από κατανάλωση αραχίδας μολυσμένης με *A. flavus*. Το είδος αυτό των τοξινών απαντάται σε πλήθος καλλιεργειών όπως αραβοσίτου, φυσιτικής, βαμβακόσπορου, καρυδιών, αραχίδας, καρυκευμάτων, κ.α.

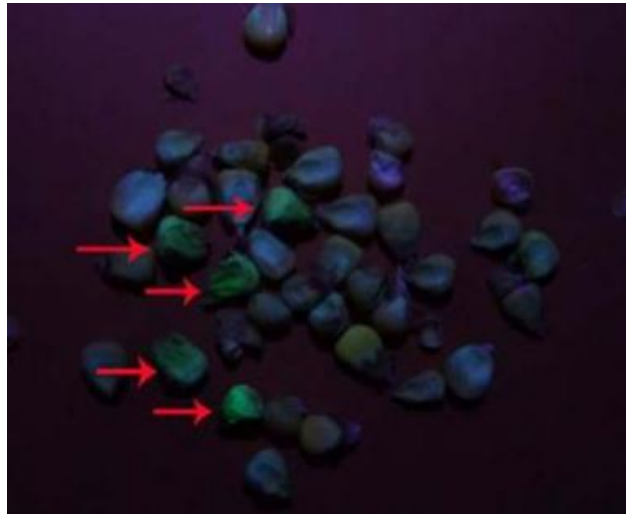
Οι αφλατοξίνες είναι οι πλέον καρκινογόνες τοξίνες και μετά την εισαγωγή τους στον οργανισμό μεταβολίζονται στο ήπαρ. Η κατάποση δόσης αφλατοξίνης μέσω της τροφής έχει ως αποτέλεσμα να προκληθεί αφλατοξίκωση. Η αφλατοξίκωση έχει δύο μορφές, αυτή της έντονης μορφής ενδοτοξίνωσης όπου υπάρχει άμεση βλάβη του ήπατος και επέρχεται ακόμα και θάνατος, και αυτή της χρόνιας έκθεσης με εκδήλωση διαφόρων συμπτωμάτων. Ανάλογα με την έκθεση στις αφλατοξίνες μπορεί να προκληθεί α) κίρρωση του ήπατος (σε υψηλές δόσεις), β) ανασοκαταστολή (χρόνια έκθεση), γ) πιθανή εκδήλωση καρκίνου (Weidenborner, 2008; Yu et al., 2008).

Οι τοξίνες αυτές είναι οξυγονωμένες ετεροκυκλικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που παράγονται ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού. Από χημικής απόψεως είναι παράγωγα δι-φουρανο-κουμαρίνης και φέρουν δι-υδροφουρανικά ή τετρα-υδροφουρανικά τμήματα συγχωνευμένα σε ένα υποκατεστημένο τμήμα κουμαρίνης. Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί 16 ενώσεις αφλατοξινών που σχετίζονται δομικά. Οι πιο συχνά απαντώμενες είναι οι B1, B2, G1, G2 και οι μεταβολίτες τους M1, M2 στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι αφλατοξίνες τύπου G διαφέρουν από της B σε χημικό επίπεδο καθώς φέρουν έναν 3-γαλακτονικό δακτύλιο αντί ενός κυκλοπεντενονικού δακτυλίου. Επίσης, παρατηρείται διαφορά μεταξύ B1-G1 και B2-G2 καθώς οι πρώτες φέρουν διπλό δεσμό στον φουρανικό δακτύλιο. Η διαφορά αυτή μπορεί να φαίνεται μικρή όμως έχει σημαντικό αντίκτυπο στην καρκινογόνο δράση, με της B1-G1 να είναι ισχυρά καρκινογόνες και τοξικές (Εικόνα 57) (Yu et al., 2008; Jaimez et al., 2000).



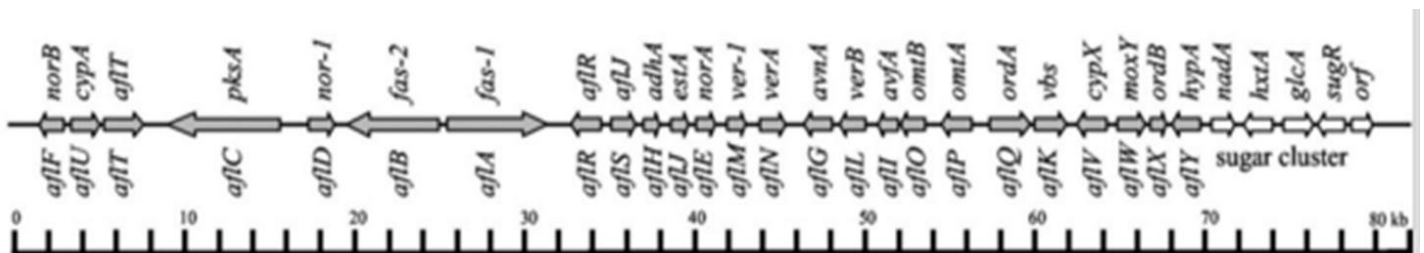
Εικόνα 57. Χημικοί τύποι αφλατοξινών

Ο φθορισμός υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας, που χαρακτηρίζει της αφλατοξίνες, έχει μεγάλη σημασία για την διάκριση των B1 από τις G1 και είναι αποτέλεσμα των συζευγμένων και σταθερών ριζών των αφλατοξινών. Χαρακτηριστικό είναι ότι οι αφλατοξίνες B1 φθορίζουν μπλε ενώ οι G1 φθορίζουν πράσινο (Εικόνα 58)(Jaimez et al., 2000).

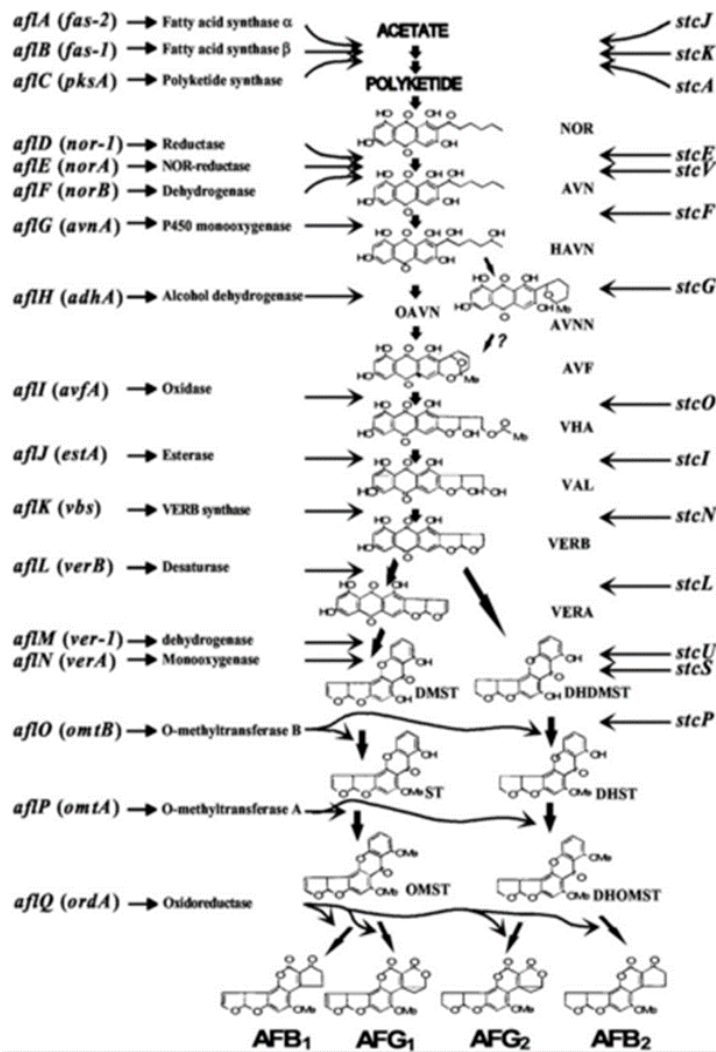


Εικόνα 58. Φθορισμός αφλατοξίνης σε δείγμα αραβοσίτου (www.corntoxins.org).

Η βιοσύνθεση των αφλατοξινών είναι αποτέλεσμα δράσης 29 γονιδίων (Εικόνα 59), τα οποία εμπλέκονται σε 23 ενζυμικές αντιδράσεις. Το νορσολορινικό οξύ (norsolorinic acid- NOR) είναι το πρώτο σταθερό ενδιάμεσο του βιοσυνθετικού μονοπατιού, το οποίο ταυτοποιήθηκε. Οι αφλατοξίνες είναι αποτέλεσμα καλά οργανωμένων οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Το πρώτο γονίδιο που ταυτοποιήθηκε είναι το *aflD* (*nor-1*) το οποίο κωδικοποιεί μία κετο-αναγωγή στον *A. parasiticus* για την μετατροπή του NOR σε averantin (AVN). Εξάλειψη του *aflD* (*nor-1*) γονιδίου οδηγεί στην απώλεια των αφλατοξινών και των ενδιάμεσων προϊόντων στους μύκητες. Το δεύτερο γονίδιο είναι το *aflM* (*ver-1*), το οποίο κωδικοποιεί μια κετο-αναγωγή, η οποία απαιτείται για τη μετατροπή της versicolorin A (VERA) σε διμεθυλ-στερηγματοκυστίνη (DMST) και της versicolorin B (VERB) σε διμεθυλ-διϋδρο-στερηγματοκυστίνη (DMDHST) στον *A. parasiticus*. Το τρίτο γονίδιο είναι το *aflC* (*pksA*), το οποίο κωδικοποιεί τη συνθάση πολυκετιδίου (PKS), διαγραφή του οποίου προκαλεί διακοπή στην παραγωγή αφλατοξίνης και των ενδιάμεσων προϊόντων. Τα γονίδια αυτά είναι απαραίτητα για τη μετατροπή του οξικού σε νορσολορινικό οξύ (NOR) και φαίνεται πως η δράση τους είναι συνδυασμένη (Εικόνα 60) (Yu et al., 2008).



Εικόνα 59. Σύμπλεγμα γονιδίων που επιδρούν στη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης (<http://aem.asm.org>).



Εικόνα 60. Μονοπάτι βιοσύνθεσης αφλατοξίνης. Συντομεύσεις: NOR=norsolorinic acid, AVN=averantin, HAVN=5'-hydroxyaverantin, OAVN=oxoaverantin, AVNN=averufanin, AVF=averufin, VHA=versiconal hemiacetal acetate, VAL=versiconal, VERB=versicolorin B, VERA=versicolorin A, DMST=demethylsterigmatocystin, DHDMST=dihydrodemethylsterigmatocystin, ST=sterigmatocystin, DHST=dihydrosterigmatocystin, OMST=O-methylsterigmatocystin, DHOMST=dihydro-O-methylsterigmatocystin (<http://aem.asm.org>).

Οι παράγοντες που σχετίζονται με την παραγωγή αφλατοξινών είναι βιοτικοί και αβιοτικοί, συμπεριλαμβανομένων θρεπτικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, που επιδρούν στην παραγωγή αφλατοξίνης από τοξικογόνα στελέχη ασπεργίλλων. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες πιθανόν να επιδρούν στο γονίδιο ρύθμισης της αφλατοξίνης *aflR* ή να διαφοροποιούν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων. Η μόλυνση των καρπών με αφλατοξίνες είναι αποτέλεσμα της προσβολής της καλλιέργειας από συγκεκριμένους μύκητες, η οποία μπορεί να λάβει χώρα σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας (καλλιέργεια, συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση, διανομή). Η παρουσία των μυκήτων δεν σηματοδοτεί την ύπαρξη αφλατοξίνης.

Οι κλιματολογικές συνθήκες, το κατάλληλο υπόστρωμα, τα έντομα και η ευαισθησία του φυτού σε μολύνσεις από τους μύκητες του γένους *Aspergillus* spp. είναι οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η προσβολή και η παραγωγή αφλατοξίνης πριν τη συλλογή, σχετιζόμενοι πάντα με συνθήκες στρες (ξηρασία, μειωμένη γονιμότητα, ανταγωνισμός με ζιζάνια και άλλους μικροοργανισμούς) στους μύκητες. Μετασυλλεκτικά η ενδεχόμενη παραγωγή μυκοτοξινών επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων μεταξύ των οποίων η ενεργότητα του νερού (a_w), το επίπεδο υγρασίας, η θερμοκρασία, ο χρόνος, το μέγεθος της ζημιάς που έχουν υποστεί οι καλλιέργειες, οι προσβολές από έντομα και άλλους μικροοργανισμούς (Weidenborner, 2008; Yu et al., 2008; Moss et al., 1985).

1.5.5 Αντιμετώπιση μυκοτοξινών

Η αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και κατ' επέκταση των μυκοτοξινών είναι από τα σημαντικότερα ζητήματα που μελετούν οι ερευνητές. Η καλύτερη λύση για την αντιμετώπισή τους δεν είναι άλλη από την αποφυγή του σχηματισμού τους. Για τον λόγο αυτό είναι αναγκαία η διατήρηση υγιών καλλιεργειών, με ευνοϊκό περιβάλλον για τα φυτά και ελαχιστοποίηση των παραγόντων που εντείνουν την μόλυνση από τους μυκοτοξικογόνους μύκητες. Για τον περιορισμό της εγκατάστασης των παθογόνων είναι αναγκαία η εφαρμογή ορθών γεωργικών πρακτικών, η αποφυγή δημιουργίας πληγών από έντομα ή πουλιά και η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού ή και ανθεκτικών – ανεκτικών ποικιλιών αν είναι διαθέσιμες. Πιο συγκεκριμένα είναι αναγκαία η απομάκρυνση των υπολειμμάτων που φέρουν ενδεχομένως το μόλυσμα ώστε να μειωθεί ο πληθυσμός του μύκητα στην καλλιέργεια. Επίσης, σημαντική διαδικασία είναι η καταστροφή των ζιζανίων, καθώς σ' αυτά συγκεντρώνεται πλήθος εντόμων που είτε μεταφέρουν σπόρια των μυκήτων είτε δημιουργούν πληγές αυξάνοντας την δυνατότητα εγκατάστασης των μυκήτων (Tsitsigiannis et al., 2012).

Στις μέρες μας έχουν γίνει προσπάθειες ανάπτυξης ανθεκτικών ποικιλιών αραβοσίτου ώστε να αντιμετωπιστούν οι μυκοτοξικογόνοι μύκητες. Οι ποικιλίες αυτές παρουσιάζουν ανεκτικότητα-ανθεκτικότητα τόσο στην προσβολή του μύκητα, όσο και στις εντομολογικές προσβολές με αποτέλεσμα τον μερικό έλεγχο των τοξινών (Τσώλης, 2014). Μέχρι στιγμής τ' αποτελέσματα δεν είναι ικανοποιητικά και για τα σιτηρά το πρόβλημα είναι πολύπλοκο καθώς η ανθεκτικότητα είναι πολυγονική και πρέπει να αναπτυχθεί ανθεκτικότητα σε πολλά διαφορετικά παθογόνα. Η ανάπτυξη υβριδίων είναι πολλά υποσχόμενη μέθοδος και οι μελέτες συνεχίζονται ώστε να αναπτυχθούν ανθεκτικά υβρίδια αραβοσίτου (Clements & White, 2004).

Ενθαρρυντικά όμως είναι και τα αποτελέσματα ερευνών που σχετίζονται με τη βιολογική καταπολέμηση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων με δράση μικροοργανισμών ανταγωνιστών (βακτηρίων, ζυμών, μη τοξικογόνων στελεχών). Έχει αποδειχθεί ότι διάφορα βακτήρια, όπως *Lactobacillus*, *Streptococcus*, κ.α., και διάφοροι μύκητες, όπως *Phoma*, *Alternaria*, κ.α., συμβάλλουν στην αποτοξικοποίηση και στην αποικοδόμηση της αφλατοξίνης B1 (Tsitsigiannis et al., 2012). Η χρήση μη τοξικογόνων στελεχών στηρίζεται στην δημιουργία ανταγωνισμού μεταξύ ειδών διαφορετικής βλαστικής συμβατότητας ώστε να μην γίνεται αναστόμωσή τους και μετατρέπονται σε τοξικογόνα. Η μέθοδος αυτή έχει εξετασθεί σε χώρες του εξωτερικού, αλλά και στην Ελλάδα, ενώ για την καλλιέργεια του αραβοσίτου υπάρχουν διαθέσιμα εγκεκριμένα σκευάσματα μη τοξικογόνων στελεχών (Tsitsigiannis et al., 2012).

Η χημική αντιμετώπιση μυκοτοξικογόνων μυκήτων δεν είναι ιδιαιτέρως αποτελεσματική καθώς δεν υπάρχουν εγκεκριμένα φάρμακα για την καλλιέργεια του αραβοσίτου, οι έρευνες όμως προς αυτή την κατεύθυνση είναι συνεχείς. Στόχος είναι η αντιμετώπιση του φαινομένου της ανθεκτικότητας με τη μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας στους μύκητες *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* και με το συνδυασμό διαφόρων δραστικών ουσιών (Markoglou et al., 2008).

Τέλος, εκτός από τον έλεγχο πριν τη συγκομιδή επιχειρείται και εφαρμογή κατάλληλων μετασυλλεκτικών χειρισμών, όπως η αποθήκευση των προϊόντων σε ξηρό περιβάλλον με χαμηλές θερμοκρασίες ή σε περιβάλλοντα με τροποποιημένες ατμόσφαιρες (π.χ. μειωμένη συγκέντρωση O₂, εφαρμογές όζοντος). Η δημιουργία ιδανικών συνθηκών αποθήκευσης των καρπών, δημητριακών, ελαιούχων σπόρων και ζωοτροφών ώστε να μην επικρατεί περιβάλλον κατάλληλο για την ανάπτυξη των μυκήτων, η άμεση ξήρανση των προϊόντων, η διατήρηση χαμηλών θερμοκρασιών, ο περιορισμός της υγρασίας και ο καλός αερισμός στους χώρους της αποθήκευσης συμβάλλουν σημαντικά στην άμβλυνση του προβλήματος. Επίσης, η εφαρμογή χημικών και φυσικών μεθόδων αποτοξικοποίησης των μυκοτοξινών (θερμική αποδόμηση, επεξεργασία με οξέα, αμμωνιοποίηση, οζονοποίηση, τροφικά πρόσθετα, κ.α.) σε νωπά και μεταποιημένα γεωργικά προϊόντα, η εφαρμογή βιολογικών παραγόντων και αντιμικροβιακών ενώσεων, η χρήση κατάλληλων προσροφητικών ουσιών (προσθήκη δεσμευτικών στις ζωοτροφές) κ.α. είναι τεχνικές που έχουν εξετασθεί.

Όλες όμως οι προαναφερθείσες μέθοδοι έχουν μικρή αποτελεσματικότητα και οι περισσότερες από αυτές είναι πρακτικά μη εφαρμόσιμες και οικονομικά μη αποδεκτές, ενώ ελάχιστες σήμερα βρίσκουν εφαρμογή κυρίως κατά την αποθήκευση και μεταποίηση των αγροτικών προϊόντων.

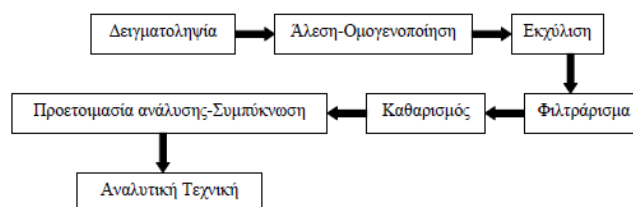
Οι υπάρχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις, καθώς και οι βελτιώσεις των πρακτικών παραγωγής και αποθήκευσης, δεν προλαμβάνουν τη μόλυνση των γεωργικών προϊόντων και δεν παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων αυτών και κατά συνέπεια δεν καθιστούν δυνατό τον έλεγχο της παρουσίας μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Ακόμα και με τις σύγχρονες τεχνολογίες, όταν τα γεωργικά προϊόντα έχουν προσβληθεί από μυκοτοξικογόνους μύκητες, είναι πολύ δύσκολη η πρόβλεψη ή αποτροπή της ύπαρξης μυκοτοξινών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, επεξεργασίας και διακίνησης των γεωργικών προϊόντων.

1.6 Μέθοδοι Ανίχνευσης Μυκοτοξινών

Η ανίχνευση των μυκοτοξινών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον λαμβάνοντας υπόψη τις συνέπειες που επιφέρουν οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες στην υγεία ανθρώπων και ζώων μέσω της ύπαρξή τους σε τρόφιμα και σε ζωοτροφές. Όταν οι έλεγχοι διεξάγονται με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωση των προϊόντων με τα θεσμοθετημένα μέγιστα επιτρεπτά όρια είναι ζωτικής σημασίας το τελικό αναλυτικό αποτέλεσμα να εκφράζει την πραγματική τιμή. Για το λόγο αυτό οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να είναι ακριβείς, αξιόπιστες και επικυρωμένες. Νομοθετικά (Καν. 882/2004 Παρ.3), στις γενικές απαιτήσεις για τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τροφίμων αναφέρεται ότι οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα κριτήρια: α) ορθότητα, β) ευκολία εφαρμογής, γ) όριο ανίχνευσης, δ) όριο προσδιορισμού, ε) ακρίβεια (λαμβάνεται από εργαστηριακή δοκιμή), στ) επαναληψιμότητα, ζ) αναπαραγωγιμότητα, η) ανάκτηση, θ) επιλεκτικότητα, ι) ευαισθησία, ια) γραμμικότητα, ιβ) αβεβαιότητα (Gilbert et al., 2002).

Για την ανάλυση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα υπάρχουν διαθέσιμες στη βιβλιογραφία διάφορες μέθοδοι, καθώς και οι επίσημες μέθοδοι του AOAC (Association of Analytical Communities). Επιπλέον, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων που θα χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό των μυκοτοξινών λαμβάνοντας υπ' όψιν τα θεσμοθετημένα όρια (Gilbert et al., 2002; AOAC, 2005).

Πριν από την ανάλυση των τροφίμων για τον έλεγχο της ύπαρξης μυκοτοξινών προηγούνται μία σειρά πολλών και σύνθετων διαδικασιών, στις οποίες περιλαμβάνονται: η δειγματοληψία, η προετοιμασία του δείγματος, η εκχύλιση των μυκοτοξινών από το δείγμα, ο καθαρισμός του δείγματος και τέλος ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός, με διάφορες μεθόδους (Εικόνα 61).



Εικόνα 61. Διάγραμμα ροής προσδιορισμού μυκοτοξινών.

1.6.1 Αναλυτικές τεχνικές

Διάφορες μέθοδοι για την ανάλυση μυκοτοξινών σε διάφορα τρόφιμα και ζωοτροφές είναι διαθέσιμες και αναφέρονται στη βιβλιογραφία (TLC, HPLC, ELISA, SPR και ανοσοδοκιμές). Η τεχνική ανάλυσης με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC-Thin Layer Chromatography) χρησιμοποιούνταν εκτενέστατα για ανάλυση μυκοτοξίνης και είχε προταθεί ως επίσημη μέθοδος ανάλυσης αφλατοξινών για κελυφωτά φιστίκια από τον AOAC. Αργότερα, σημειώθηκε μία σημαντική αύξηση στη χρήση της Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), η οποία έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης-HPLC (Maroto et al., 2005). Πλέον, η σύγχρονη τάση είναι να χρησιμοποιείται η HPLC για την ανάλυση αφλατοξίνης, αλλά και άλλων μυκοτοξινών (π.χ. πατουλίνης σε χυμό μήλου, ωχρατοξίνης σε αραβόσιτο), λόγω της μεγαλύτερης ακρίβειας σε σχέση με την TLC και της σταθερότητας των αποτελεσμάτων σε σχέση με την μέθοδο της ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent). Οι τεχνικές ανοσοδιαγνωστικής όπως η ELISA επιδεικνύουν ταχύτητα και αξιοπιστία αποτελεσμάτων εντούτοις η χρήση τους μπορεί να χαρακτηριστεί ως συμπληρωματική. Η χρήση της HPLC ολοένα και αυξάνεται με αποτέλεσμα να έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες για την εφαρμογή της στην ανάλυση μυκοτοξινών, αλλά και έχει γίνει αποδεκτή από τις επίσημες μεθόδους ανάλυσης AOAC για μυκοτοξίνες. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου ανάλυσης με HPLC φαίνεται να είναι η δυνατότητα αυτοματοποίησης, η ταχύτητα και η υψηλή ανάλυση (Haghighi et al., 1981). Παρ'όλα αυτά η μέθοδος ανάλυσης με HPLC έχει κόστος και απαιτεί πιο εξειδικευμένο και έμπειρο εργαστηριακό προσωπικό.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη μεθόδων που αφορούν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μυκοτοξινών χρησιμοποιώντας LC-MS/MS (Υγρή Χρωματογραφία/Φασματοσκοπία Μάζας). Αυτή η τάση ήταν αποτέλεσμα της ανακάλυψης ότι πολλές μυκοτοξίνες μπορούσαν να συνυπάρχουν σε ένα υπόστρωμα καθώς επίσης και ότι παρουσίαζαν συνεργιστική δράση. Επιπροσθέτως ήταν εξαιρετικά επιθυμητή η ανάπτυξη μιας μεθόδου που θα επέτρεπε τον ταυτόχρονο προσδιορισμό όλων σχεδόν των μυκοτοξινών πραγματοποιώντας μια και μόνο ανάλυση. Αυτό θα μείωνε εξαιρετικά το κόστος αλλά και τον χρόνο της ανάλυσης. Αν και η φασματοσκοπία μάζας συχνά προσφέρει επαρκή επιλεκτικότητα και ευαισθησία, η εφαρμογή της στην ταυτόχρονη ανάλυση πολλών μυκοτοξινών, παρεμποδίστηκε μόνο από την διαφορετικότητα που παρουσιάζουν στις χημικές ιδιότητες τους οι τοξίνες (οξύτητα, βασικότητα, πολικότητα). Το αρχικό ερέθισμα για την ταυτόχρονη ανάλυση μυκοτοξινών χρησιμοποιώντας LC/MS προήλθε από τον τομέα της μυκητολογίας. Εκεί η φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιήθηκε για να αναγνωρίσει συγκεκριμένα είδη χρησιμοποιώντας τους μεταβολίτες τους. Η ανάπτυξη των βάσεων δεδομένων για την ποιοτική ανίχνευση μυκοτοξινών στην LC/MS, οδήγησε στην ανάπτυξη και ποσοτικών μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τοξινών σε είδη διατροφής (Nielsen et al., 2003). Οι μελέτες που ακολούθησαν στόχευαν στην ανάλυση τοξινών που προέρχονταν από μύκητες του γένους *Fusarium* sp. με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μεθόδου για την ταυτόχρονη ποσοτική ανάλυση ζεαραλενόνης, φουμοσίνης B1, δεοξυνιβαλενόλης σε καλαμπόκι (Spanjer et al., 2005).

Η χρήση μεθόδων οι οποίες βασίζονται σε ανοσοχημικές τεχνικές έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτούν στάδια καθαρισμού ή στάδια εμπλουτισμού της αναλυόμενης ουσίας. Η ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για το γρήγορο έλεγχο των περισσότερων μυκοτοξινών, ειδικά για τον έλεγχο των πρώτων υλών. Αν και οι δοκιμές ELISA εμφανίζουν υψηλή εξάρτηση από το υπόστρωμα, τα πλεονεκτήματά της είναι η μεγάλη ταχύτητα, η ευκολία της λειτουργίας της και η ευαισθησία. Οι δοκιμές ELISA είναι διαθέσιμες στο εμπόριο για τις περισσότερες από τις σημαντικότερες μυκοτοξίνες (Gilbert et al., 2002; Fremy et al., 2003).

1.7 Η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία κατατάσσει τις μυκοτοξίνες στους επιμολυντές των τροφίμων (Καν. 1881/2006). Οι τρέχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις καθώς και οι εφαρμοζόμενες πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη των διαφόρων μυκήτων και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατό να απαλειφθούν πλήρως οι μυκοτοξίνες από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Συνιστάται επομένως να περιορίζεται η παρουσία τους στο κατώτατο εφικτό επίπεδο. Η μείωση της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτού του είδους τις τοξικές ουσίες αποτελεί μέγιστη προτεραιότητα με ταυτόχρονη μείωση των ορίων. Λαμβάνοντας υπόψιν τις παραπάνω επιπτώσεις στον άνθρωπο θεωρείται σκόπιμο να περιοριστεί τόσο η συνολική περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες στα τρόφιμα, όσο και η περιεκτικότητα σε κάποιες συγκεκριμένες τοξίνες (αφλατοξίνη Β1). Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η αφλατοξίνη Μ1 θεωρείται ως γονοτοξική καρκινογόνος ουσία ίση ή λιγότερο επικίνδυνη από ότι η αφλατοξίνη Β1, είναι απαραίτητο να αποφευχθεί η περιεκτικότητά της στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από ανθρώπους και ιδίως από μικρά παιδιά. Αναμφίβολα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν και οι πιο ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού και κυρίως τα βρέφη. Η θέσπιση των μέγιστων ορίων για την παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα αποτελεί μια σύνθετη υπόθεση. Για την οριοθέτηση των μέγιστων συγκεντρώσεων απαιτείται συνυπολογισμός και εκτίμηση πολλών παραγόντων όπως τα τοξικολογικά δεδομένα, ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών, η οξεία και χρόνια τοξικότητα. Παράλληλα πρέπει να υπάρχει σύνδεση των παραπάνω με την παρουσία των τοξινών στα τρόφιμα και την ποσότητα στην οποία εκτίθενται οι καταναλωτές. Σήμερα δεν είναι γνωστό κάποιο όριο κάτω από το οποίο να μην παρατηρούνται αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή από τις μυκοτοξίνες, συνεπώς δεν είναι εύκολο να οριστεί ανεκτή ημερήσια πρόσληψη. Η Ε.Ε. έχει θεσπίσει νομοθετικά όρια στα υλικά που προορίζονται για χρήση ως τρόφιμα ή ως ζωοτροφές.

Για τη θέσπιση των μέγιστων ορίων λαμβάνονται υπ' όψιν πολλοί διαφορετικοί επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και άλλοι φορείς, τα οποία συμπεριλαμβάνονται σε αυτή τη διαδικασία. Εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης αυτή η εκτίμηση διεξάγεται υπ' ευθύνη της Επιστημονικής Επιτροπής για τα Τρόφιμα. Επιπρόσθετα αρκετές ομάδες εργασίας και ειδικές επιτροπές με εξουσιοδότηση από όλα τα κράτη μέλη προετοιμάζουν τις προτάσεις. Η μέγιστη τιμή που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση πχ. των αφλατοξινών στο καλαμπόκι που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι 2 ppb για την αφλατοξίνη Β1 (0,25 ppb αν προορίζεται για παιδικές τροφές) και 4 ppb για το άθροισμα της αφλατοξίνης Β1, Β2, G1 και G2 ενώ για το καλαμπόκι που προορίζεται για ζωοτροφές είναι 5-20 ppb για την αφλατοξίνη Β1 (ανάλογα τη χρήση της ζωοτροφής). Τα επιτρεπτά όρια των φουμονισινών (άθροισμα της Β1 και Β2) στο καλαμπόκι που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι 0,2-4 ppm ενώ για το καλαμπόκι που προορίζεται για ζωοτροφές είναι 60 ppm. Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία αναγνωρίζει ότι οι μέθοδοι διαλογής ή άλλες φυσικές διαδικασίες επιτρέπουν να μειωθεί η περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες σε διάφορα τρόφιμα όπως: στα αράπικα φιστίκια, στους ξηρούς καρπούς με κέλυφος, στα ξηρά φρούτα και στον αραβόσιτο. Έτσι, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις στο εμπόριο, γίνονται αποδεκτές υψηλότερες περιεκτικότητες από τις προαναφερθείσες σε μυκοτοξίνες για τα εν λόγω προϊόντα, εφόσον αυτά δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων. Επομένως, στις περιπτώσεις αυτές, τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις μυκοτοξίνες έχουν καθοριστεί λαμβανομένης υπόψιν της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών που ακολουθούνται και ειδικά για τα κελυφωτά φιστίκια είναι 8,0 μg/kg (ppb) για την Β1 και 15,0 μg/kg (ppb) για το άθροισμα των Β1, Β2, G1 και G2. Στις παρτίδες που ανιχνεύθηκαν μυκοτοξίνες μέσα στα όρια που προορίζονται για διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία θα πρέπει να υπάρχει και η ανάλογη σήμανση. Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης των τροφίμων με τα καθορισμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία τα τρόφιμα αυτά θεωρούνται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση και απαγορεύεται η χρήση τους ως συστατικά τροφίμων. Επιπλέον, απαγορεύεται να αναμειγνύονται με καθαρά από μυκοτοξίνες τρόφιμα, αλλά και να υπόκεινται σε χημικές κατεργασίες για την απομάκρυνσή τους.

Όσον αφορά τις τοξίνες από μύκητες του γένους *Fusarium*, η ΕΕ εξέδωσε διάφορες γνώμες για την αξιολόγηση της δεσοξυ-νιβαλενόλης, θεσπίζοντας ανεκτό όριο ημερήσιας πρόσληψης (ΑΟΗΠ) 1 μg/kg συνολικό βάρος (σ.β.), της ζεαραλενόνης θεσπίζοντας προσωρινό ΑΟΗΠ 0,2 μg/kg σ.β., των φουμονισινών θεσπίζοντας ΑΟΗΠ 2 μg/kg σ.β., της νιβαλενόλης θεσπίζοντας προσωρινό ΑΟΗΠ 0,7 μg/kg σ.β., και της τοξίνης T-2 και HT-2 θεσπίζοντας συνδυασμένο προσωρινό ΑΟΗΠ 0,06 μg/kg σ.β. Με βάση τις επιστημονικές γνώμες και την αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης, είναι σκόπιμο να καθοριστούν μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τη δεοξυνιβαλενόλη, τη ζεαραλενόνη και τις φουμονισίνες. Όσον αφορά τις φουμονισίνες, τα αποτελέσματα του εποπτικού ελέγχου των πρόσφατων συγκομιδών καταδεικνύουν ότι ο αραβόσιτος και τα προϊόντα αραβοσίτου μπορούν να επιμολυνθούν σε πολύ μεγάλο βαθμό από φουμονισίνες και ενδείκνυται να ληφθούν μέτρα προκειμένου να αποφευχθεί η είσοδος τέτοιων μη αποδεκτά επιμολυσμένων αραβοσίτων και προϊόντων αραβοσίτου στην τροφική αλυσίδα. Οι εκτιμήσεις για την πρόσληψη δείχνουν ότι η παρουσία των τοξινών T-2 και HT-2 μπορεί να εγείρει ανησυχίες για τη δημόσια υγεία. Συνεπώς, αποτελεί ανάγκη και άμεση προτεραιότητα η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης και ευαίσθητης μεθόδου, η συλλογή περισσότερων στοιχείων σχετικά με την εμφάνιση των εν λόγω τοξινών και περισσότερη διερεύνηση/έρευνα σχετικά με τους παράγοντες που συντελούν στην παρουσία των τοξινών T-2 και HT-2 στα δημητριακά και στα προϊόντα με βάση τα δημητριακά, ιδίως δε στη βρώμη και στα προϊόντα με βάση τη βρώμη. Όσον αφορά τον αραβόσιτο, δεν είναι ακόμη επακριβώς γνωστοί όλοι οι παράγοντες που συντελούν στη δημιουργία τοξινών από μύκητες του γένους *Fusarium*, ιδίως δε της ζεαραλενόνης και των φουμονισινών B1 και B2. Ως εκ τούτου, δίνεται στους υπεύθυνους των επιχειρήσεων τροφίμων στον τομέα των δημητριακών ένα χρονικό περιθώριο για να μπορέσουν να διεξαγάγουν έρευνες σχετικά με τις πηγές δημιουργίας αυτών των μυκοτοξινών και σχετικά με τον προσδιορισμό των μέτρων διαχείρισης που πρέπει να ληφθούν προκειμένου να αποτραπεί η παρουσία τους στο βαθμό που αυτό είναι ευλόγως δυνατό. Σε περίπτωση που δεν θεσπιστούν νωρίτερα συγκεκριμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα βάσει νέων πληροφοριών για την εμφάνιση και τη δημιουργία των εν λόγω τοξινών, προτείνεται η εφαρμογή, από το 2007, μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων βασισμένων στα μέχρι σήμερα διαθέσιμα δεδομένα (COMMISSION REGULATION (EU) No 165/2010, (ΕΚ)1881/ 2006, Κανονισμός (ΕΚ) 401/2006).

1.8 Διατροφικά σκάνδαλα

Το τελευταίο διάστημα διάφορα διατροφικά σκάνδαλα που εμπλέκουν μυκοτοξίνες έχουν έρθει στο φως της δημοσιότητας. Στη Δυτική Αφρική τα μέσα επίπεδα αφλατοξινών είναι μεγαλύτερα των 100 ppb σε περισσότερα των 50% των αποθηκευμένων σιτηρών. Ερευνητικά δεδομένα έδειξαν ότι σε αποθήκες σπιτιών στη Δυτική Αφρική, το 90% καλαμποκάλευρου ήταν μολυσμένο με *A. flavus* και από 480 παιδιά που εξετάστηκαν το 99% είχε αφλατοξίνη στο αίμα τους. Επίσης, 124 Κενυάτες πέθαναν λόγω λήψης μολυσμένου καλαμποκιού με αφλατοξίνες (20-8000 ppb) το 2004 (Baker and Bennett, 2008).

Το Φεβρουάριο του 2012, βρέθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξινών σε 30 δείγματα γάλακτος 10 διαφορετικών εταιρειών στη Σερβία. Οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από 10% έως και 200% άνω του επιτρεπόμενου ορίου. Στη συνέχεια το σκάνδαλο διευρύνθηκε σε πολλές βαλκανικές χώρες. Το αποτέλεσμα ήταν η παύση παραγωγής γάλακτος σε 73 φάρμες στη Σερβία από την Κτηνιατρική Υπηρεσία της χώρας, έπειτα από την ανίχνευση αφλατοξίνης σε υψηλότερα επίπεδα, άνω των επιτρεπομένων, στο γάλα. Το 2012 ήταν έτος μεγάλης ξηρασίας στη Σερβία, στοιχείο που συνέβαλε στη μόλυνση του καλαμποκιού με αφλατοξίνες από μύκητες του γένους *Aspergillus*. Το μολυσμένο καλαμπόκι χρησιμοποιήθηκε ως ζωοτροφή με αποτέλεσμα να περάσουν οι αφλατοξίνες στο γάλα των αγελάδων. Εκτιμήσεις αναφέρουν ότι ως και το 70% της παραγωγής σερβικού καλαμποκιού το 2012 ήταν μολυσμένο (Tsitsigiannis et al., 2012).

Αντίστοιχα προβλήματα εμφανίστηκαν στις ΗΠΑ, όπου η ξηρασία του 2012 οδήγησε στην προσβολή του 50% της σοδειάς καλαμποκιού του Missouri από *Aspergillus*. Η καρκινογόνος ουσία αφλατοξίνη B1 ανιχνεύτηκε επίσης σε επίπεδα που ξεπερνούν το ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ζωοτροφή καλαμποκιού την

οποία προμηθεύτηκαν τουλάχιστον 3.500 αγροτικές επιχειρήσεις στη Γερμανία. Σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας της Κάτω Σαξονίας, σχεδόν 10.000 τόνοι του καλαμποκιού αυτού από τη Σερβία παραδόθηκαν σε 13 παρασκευαστές ζωοτροφών στο βόρειο κρατίδιο της Κάτω Σαξονίας, οι οποίοι το χρησιμοποίησαν για την παραγωγή τροφής για βοοειδή, χοίρους και πουλερικά (Tsitsigiannis et al., 2012).

Τον Ιούνιο του 2013, σύμφωνα με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες του Υπουργείου Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος της Κύπρου, στο πλαίσιο των ελέγχων που διενεργούν στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα για την διαπίστωση της παρουσίας της Αφλατοξίνης M1, εντοπίστηκαν σε δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος ποσότητες αφλατοξινών σε υψηλότερα από τα επιτρεπτά ή πλησίον των ορίων επίπεδα. Οι έρευνες στράφηκαν σε συγκεκριμένα φορτία ζωοτροφών που έφθασαν στην Κύπρο από το εξωτερικό και σε συγκεκριμένα φορτία σιταριού από τη Βουλγαρία (www.ellinikigeorgia.gr).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η καλλιέργεια του αραβοσίτου συγκαταλέγεται στις πιο σημαντικές καλλιέργειες ανά τον κόσμο, καθώς χρησιμοποιείται στη διατροφή των ζώων, αποτελεί ένα από τα βασικότερα προϊόντα στη διατροφή του ανθρώπου, και χρησιμοποιείται στην παραγωγή προϊόντων αμύλου. Οι εκτάσεις στις οποίες καλλιεργείται το καλαμπόκι είναι πολύ σημαντικές, άλλα λόγω της πτώσης της τιμής σε συνδυασμό με το πλήθος των παθογόνων που απειλούν την καλλιέργεια παρατηρείται σταδιακή μείωσή τους. Οι ασθένειες και οι εχθροί που μολύνουν την καλλιέργεια είναι πολυάριθμοι αλλά οι μύκητες που ανήκουν στο γένος *Aspergillus* spp. και *Fusarium* spp. αποτελούν έναν από τους μεγαλύτερους κινδύνους για τον αραβόσιτο.

Πιο συγκεκριμένα, οι μύκητες αυτοί οφείλονται συχνά για την υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος, καθώς εκτός των σήψεων που προκαλούν στο σπάδικα, και στο στέλεχος εκκρίνουν μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες είναι ιδιαίτερα τοξικοί και καρκινογόνοι δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους και αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες απειλές για την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων. Για την αποφυγή των αρνητικών επιπτώσεων που προκαλούν οι μύκητες των προαναφερθέντων γενών στον αραβόσιτο γίνονται συστηματικές έρευνες τις τελευταίες δεκαετίες. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως δεν είναι εύκολη η αντιμετώπιση των μυκήτων αυτών με χημικά ή καλλιεργητικά μέτρα και έτσι οι έρευνες έχουν στραφεί κυρίως στην βιολογική αντιμετώπιση και στην εύρεση ανεκτικών υβριδίων στους μύκητες *Aspergillus* spp και *Fusarium* spp. Για να είναι όμως δυνατή η αντιμετώπιση του προβλήματος είναι αναγκαία η αποσαφήνιση της παρουσίας των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και των μυκοτοξινών που παράγουν μέσω μελέτης της κατάστασης που επικρατεί στην εγχώρια καλλιέργεια καλαμποκιού.

Στόχος της μελέτης είναι η εμπεριστατωμένη καταγραφή της υφιστάμενης κατάστασης στη Θεσσαλία και στη Μακεδονία, τις κύριες ζώνες καλλιέργειας αραβοσίτου στην Ελλάδα, όσον αφορά τις μυκοτοξίνες που παράγονται από είδη των γενών *Aspergillus* και *Fusarium* αλλά και την πληθυσμιακή τους διακύμανση στο καλαμπόκι. Για την επίτευξη του στόχου πραγματοποιήθηκε:

- ✓ Επίσκεψη αγρών αραβοσίτου της Ελλάδας και πραγματοποίηση δειγματοληψιών ώστε να γίνει προσδιορισμός της έντασης των σήψεων και της σοβαρότητας τους κατά το στάδιο της ωρίμανσης.
- ✓ Αξιολόγηση της πληθυσμιακής διακύμανσης και σύνθεσης μυκοτοξικογόνων μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* spp. σε καλλιέργειες καλαμποκιού στους Νομούς Λάρισας, Καρδίτσας, Τρικάλων, Μαγνησίας, Καβάλας, Δράμας και Σερρών.
- ✓ Ανίχνευση και προσδιορισμός αφλατοξινών και φουμονισινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού των προαναφερθέντων νομών.
- ✓ Μοριακή ταυτοποίηση και ανάλυση φουμονισινών και αφλατοξινών σε διάφορα στελέχη απομονωμένα από καλλιέργειες αραβοσίτου της Ελλάδας.
- ✓ Συγκέντρωση και συσχέτιση μετεωρολογικών δεδομένων με τα επίπεδα αφλατοξινών και φουμονισινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού της Ελλάδας.

Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι αναγκαία για την ολοκληρωμένη αξιολόγηση του προβλήματος, ώστε να βρεθούν λύσεις που θα καταστήσουν τον αραβόσιτο ανταγωνιστικό προϊόν τόσο στην εγχώρια όσο και στην διεθνή αγορά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

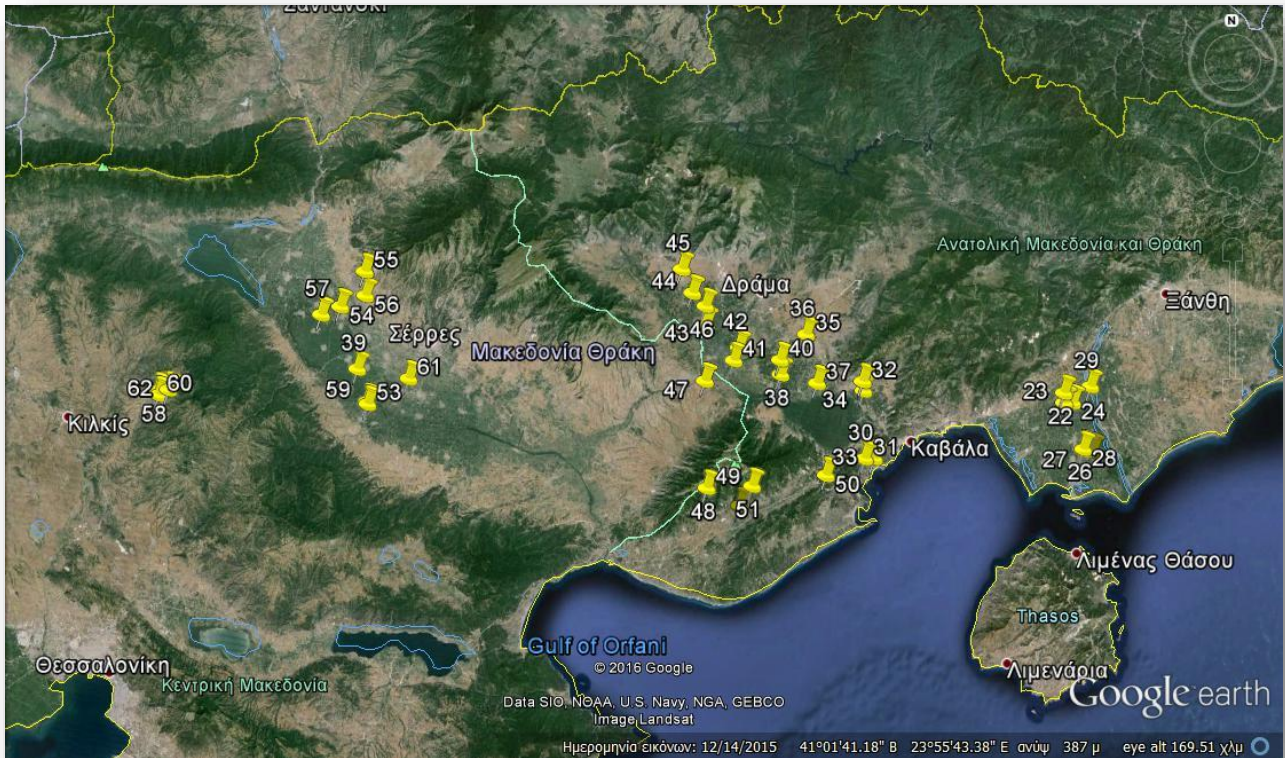
3.1 Δειγματοληψία Αραβοσίτου

Στις αρχές Σεπτεμβρίου του 2014, εντοπίστηκαν και επιλέχθηκαν οι κατάλληλοι πειραματικοί αγροί αραβοσίτου, οι οποίοι θα συμμετείχαν στις δειγματοληψίες και στη μελέτη ως προς τη σήψη σπάδικα από *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. και ως προς την ύπαρξη μυκοτοξινών στο καλαμπόκι. Προσδιορίστηκαν 29 αγροί καλαμποκιού της κεντρικής Ελλάδας και 41 αγροί της Βόρειας Ελλάδας. Από τους προαναφερθέντες αγρούς πραγματοποιήθηκε τυχαία δειγματοληψία και συλλογή σπαδικών από 8 αγρούς (1-8) στο Ν. Καρδίτσας, 8 αγρούς στον Ν. Τρικάλων (9-16), 10 αγρούς στο Ν. Λάρισας (17-21 και 63-67), 3 αγρούς στο Ν. Μαγνησίας (68-70), 15 αγρούς στο Ν. Καβάλας (22-34, 51-52), 16 αγρούς στο Ν. Σερρών (35-50) και 10 αγρούς στο Ν. Δράμας (53-62). Από κάθε αγρό συλλέχθηκαν κατά μέσο όρο 10 σπάδικες, οι οποίες άμεσα μεταφέρθηκαν στο Γ.Π.Α. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο στους 4° C και παρέμειναν εκεί μέχρι να γίνει η ανάλυσή τους.

Οι δειγματοληψίες για τα δείγματα αγρού έγιναν με βάση τον Κανονισμό ΕΚ αριθ. 401/2006 της Επιτροπής, για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων των μυκοτοξινών στα τρόφιμα σε ποσότητα ανάλογη της αναμενόμενης ηρτημένης παραγωγής. Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με τον Κανονισμό κάθε δείγμα το οποίο πρόκειται να εξεταστεί αποτελεί αντικείμενο ξεχωριστής δειγματοληψίας, ενώ οι μεγάλες παρτίδες πρέπει να υποδιαιρούνται σε υποπαρτίδες και να υφίστανται ξεχωριστή δειγματοληψία. Η δειγματοληψία πρέπει να γίνεται από διαφορετικά σημεία και στη συνέχεια να γίνεται συνένωση των στοιχειωδών δειγμάτων. Για την εφαρμογή λοιπόν του κανονισμού τα δείγματα από κάθε αγρό (από διάσπαρτα σημεία του αγρού) συλλέχθηκαν σε σάκους και υπήρχε κατάλληλη σήμανση για κάθε αγρό ξεχωριστά (π.χ. Περιοχή- Αγρός 1- Ημερομηνία), ενώ παράλληλα προσδιοριζόταν η ακριβής τοποθεσία του αγρού με χρήση Παγκοσμίου Συστήματος Στιγματοθέτησης (GPS) (Εικόνα 62 Α και Β).



Εικόνα 62. Α.Χάρτης της Θεσσαλίας με σήμανση των αγρών που συμμετείχαν στην δειγματοληψία καλαμποκιού.



Εικόνα 62. Β. Χάρτης της Μακεδονίας με σήμανση των αγρών που συμμετείχαν στην δειγματοληψία καλαμποκιού.

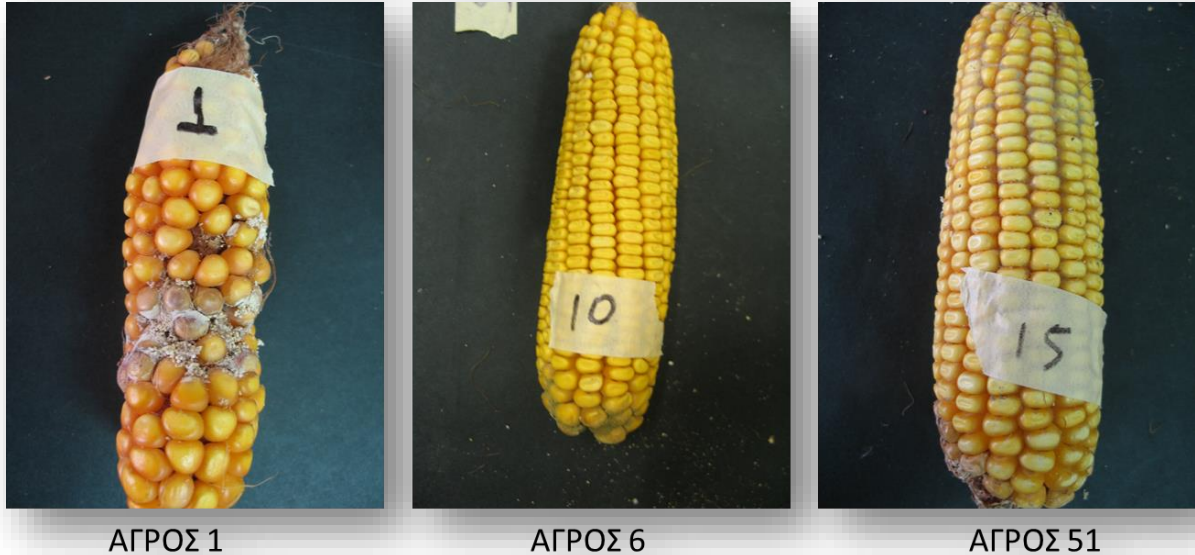
Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν όταν το καλαμπόκι ήταν στο στάδιο της ωρίμανσης και κατά την διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε και εκτίμηση της έντασης της ασθένειας των σήψεων σπαδικών καλαμποκιού με μέτρηση του ποσοστού των μολυσμένων σπαδικών με συμπτώματα σήψεων από *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. ανά αγρό (Εικόνα 63).



Εικόνα 63. Α. Αγρός αραβοσίτου της Κεντρικής Ελλάδας, Β. Σπάδικες με συμπτώματα σήψεων.

3.2 Επεξεργασία Σπαδικών Αραβοσίτου

Η μεταφορά των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε άμεσα στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α., όπου και τοποθετήθηκαν με τους σάκους σε ψυγείο. Στη συνέχεια έγινε αφαίρεση των βρακτίων ώστε να είναι δυνατή η περαιτέρω επεξεργασία των σπαδικών. Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της σοβαρότητας της ασθένειας των σήψεων σπαδικών καλαμποκιού με προσδιορισμό του ποσοστού μολυσμένων σπόρων με συμπτώματα σήψεων από *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. ανά σπάδικα ανά αγρό και αρίθμηση των σπαδικών (Εικόνα 64).



Εικόνα 64. Αριθμητική ταξινόμηση των σπαδικών.

3.3 Τεχνική Απομόνωσης Μυκήτων

Σε τριβλία Petri με κατάλληλο τεχνητό υπόστρωμα Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) πραγματοποιήθηκε μεταφορά σπόρων καλαμποκιού από τους συλλεχθέντες σπάδικες και έγινε μεταφορά τους, για 5 ημέρες σε θερμοκρασία 28° C και φωτοπερίοδο 12h, με στόχο την ανάπτυξη μυκήτων των γενών *Fusarium* και *Aspergillus* spp. (Εικόνα 65).



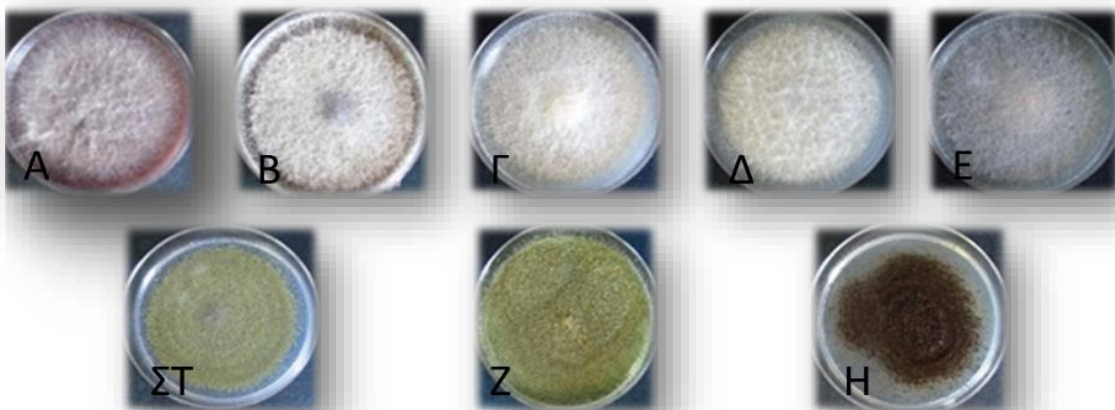
Εικόνα 65. Τριβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα DRBC με εμφανή εξάνθηση σε σπόρους αραβοσίτου από τους μύκητες των γενών *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp.

Μετά από 5 ημέρες επώασης για κάθε σπόρο στον οποίο παρατηρήθηκε εξάνθηση, ετοιμάστηκαν εκ νέου τριβλία Petri, με DRBC και με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας πραγματοποιήθηκε απόξεση στα σημεία εξάνθησης των μυκήτων και γραμμική διασπορά (streaking) τους, με στόχο την απομόνωση των διαφόρων ειδών *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. Τα τριβλία επώαστηκαν για 5 ημέρες σε θερμοκρασία 28° C και φωτοπερίοδο 12h. Στη συνέχεια, ακολούθησε επιλογή μονόσπορων αποικιών, οι οποίες παρουσίαζαν διαφορετικό φαινότυπο στο θρεπτικό υπόστρωμα DRBC και επανακαλλιέργειά τους σε Rose Bengal με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς (streaking), για περαιτέρω καθαρισμό των αποικιών (Εικόνα 66).



Εικόνα 66. Γραμμική διασπορά μυκήτων *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. σε DRBC.

Οι αποικίες που προέκυψαν αναπτύχθηκαν σε ένα πιο φτωχό θρεπτικό υπόστρωμα, το 5-2 Low nutrient medium, για 5 μέρες σε θερμοκρασία 28° C και φωτοπερίοδο 12h, για περαιτέρω επιβεβαίωση της καθαρότητας των αποικιών. Τέλος, οι αποικίες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar) και μετά από 5 ημέρες πραγματοποιήθηκε συλλογή των διαφόρων μυκηλίων σε κρυοφιαλίδια, τα οποία περιείχαν διάλυμα γλυκερόλης με συγκέντρωση 25%, με σκοπό τη διατήρησή τους στους -80°C (Εικόνα 67).



Εικόνα 67. Απομονώσεις μυκήτων *Fusarium* spp. (Α-Ε) και *Aspergillus* spp. (ΣΤ-Η) σε PDA.

3.3.1 Θρεπτικά Υλικά Απομόνωσης Μυκήτων

Dichloran Roze Bengal chloramphenicol agar (DRBC)

Για 1 λίτρο DRBC (Εικόνα 68) απαιτείται:

Γλυκόζη: 10 gr

Πεπτόνη: 5 gr

K₂HPO₄: 1 gr

MgSO₄.7H₂O: 0, 5 gr

Agar Oxoid No3: 15 gr

Απεσταγμένο νερό: 1000 ml

Rose Bengal: 25 mgr

Ακολουθεί αποστείρωση στους 121° C για 20 λεπτά
και προσθήκη των:

Dichloran (2, 6 dichloro-4-nitroaniline): 2 mgr

Chloramphenicol: 100 mgr



Εικόνα 68. Τριβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα DRBC.

5-2 V8: Low Nutrient Utility Medium

Για 1 λίτρο 5-2 (Εικόνα 69) απαιτείται:

Απεσταγμένο νερό: 950 ml

V8 χυμός: 50 ml

Ανάδευση και pH ίσο με 6

Ακολουθεί αποστείρωση στους 121° C για 20 λεπτά



Εικόνα 69. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος V8.

Potato Dextrose Agar (PDA)

Για 1 λίτρο PDA (Εικόνα 70) απαιτείται:

Σε κωνική φιάλη των 2 lit

- 500 ml απεσταγμένου νερού
- 200 gr τεμαχισμένης πατάτας σε κύβους 1x1 εκατοστά.

Τοποθέτηση κωνικής φιάλης σε δοχείο με νερό που βράζει

Παραμονή κωνικής φιάλης στο νερό για 45', από την έναρξη του βρασμού

Φιλτράρισμα εκχυλίσματος πατάτας σε τουλπάνι

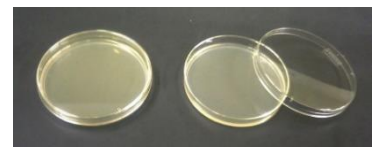
Ογκομέτρηση

Προσθήκη νερού έως τελικό όγκο 1 lit.

Προσθήκη 20 gr γλυκόζης

Προσθήκη 20 gr agar

Ακολουθεί αποστείρωση στους 121° C για 20 λεπτά



Εικόνα 70. Τριβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα PDA.

3.4 Ανάλυση Μυκοτοξινών

3.4.1 Ανάλυση Μυκοτοξινών από Αραβόσιτο

Για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών τα δείγματα από κάθε αγρό μεταφέρθηκαν σε εξωτερικό χώρο του Γ.Π.Α. ώστε να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός των σπόρων από τον σπάδικα με κατάλληλη μηχανή αφαίρεσης των σπόρων του καλαμποκιού του Εργαστηρίου Γεωργίας (Εικόνα 71). Στη συνέχεια οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες και τοποθετήθηκαν για 48h σε θάλαμο με 37° C ώστε να μειωθεί η υγρασία τους σε ποσοστό 12-15%.



Εικόνα 71. Α. Μηχανή διαχωρισμού σπόρων- σπάδικα, Β. Συλλογή σπόρων σε πλαστική σακούλα.

Μετά το πέρας των 48h ακολούθησε κονιορτοποίηση 100gr σπόρων με κατάλληλη μηχανή αλέσματος και ο κονιορτός τοποθετήθηκε σε κατάψυξη στους -18° C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των φουμονισινών και των αφλατοξινών με 70% μεθανόλη και ακολούθησε η διαδικασία που περιγράφεται στο kit ανάλυσης Agra Quant® ELISA Fumonisin (0,25-5 ppm) και Agra Quant® ELISA Aflatoxin (4-40 ppb) της Romer Labs.

Διαδικασία εκχύλισης των τοξινών από κάθε δείγμα:

Ζύγιση 10 gr δείγματος.

Προσθήκη 50 ml διαλύματος (αναλογία 1/5 για κάθε δείγμα/διάλυμα εκχύλισης) 70% μεθανόλης (70/30 v/v μεθανόλη/νερό).

Ανακίνηση για 3 λεπτά.

Παραμονή δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά

Διήθηση του υπερκευμένου, μέσω διηθητικού χαρτιού Whatman #1

Μέτρηση pH των δειγμάτων και ρύθμιση του με 1M NaOH, ώστε να είναι 7-8.

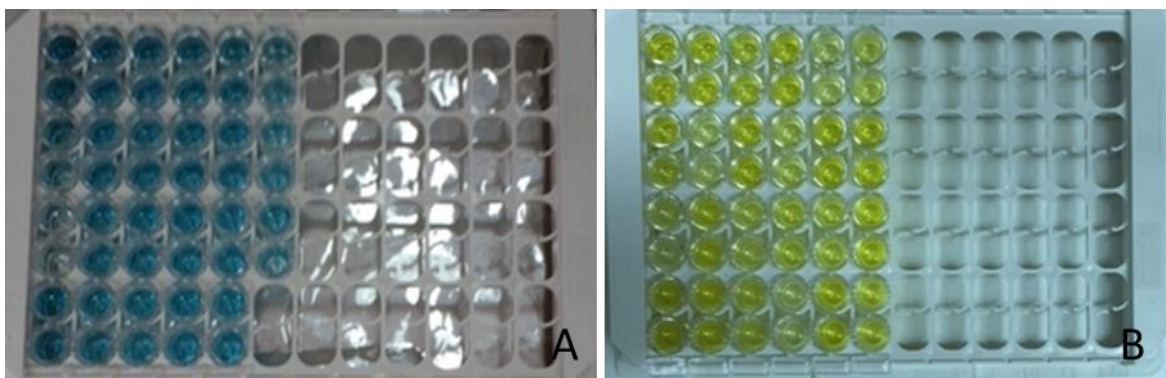
Agra Quant® ELISA Fumonisin kit (0, 25-5 ppm), Romer Labs:

- 1) Επιλογή κατάλληλου αριθμού Dilution Strips (σημασμένα με πράσινο χρώμα) στην πλάκα ELISA. Το κάθε strip διαθέτει 8 πηγαδάκια και κάθε ένα αντιστοιχεί σε ένα δείγμα.
- 2) Επιλογή αντίστοιχου αριθμού από τα Antibody Coated Microwell strips, στην αντίστοιχη για αυτά πλάκα ELISA.
- 3) Με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor), έγχυση 200μl διαλύματος Conjugate, σε κάθε ένα από τα Dilution Strips.
- 4) Τοποθέτηση 100 μl από κάθε δείγμα στα Dilution Strips, αραιωμένο 500 φορές.

- 5) Με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor), ανακίνηση 3 φορές του μίγματος και γρήγορη μεταφορά 100 μl από κάθε Dilution Strip, στο αντίστοιχο Antibody Coated Microwell Strip,
- 6) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 λεπτά.
- 7) Απόρριψη του περιεχομένου. Ακολουθούν 5 πλύσεις με απιονισμένο νερό των strips.
- 8) Καλό στέγνωμα των strips, με χρήση πετσέτας ή διηθητικού χαρτιού.
- 9) Προσθήκη 100 μl από το διάλυμα Substrate, σε κάθε ένα από τα strips με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor)
- 10) Επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 λεπτά. Με το πέρας του χρόνου επώασης το διάλυμα από διαφανές γίνεται μπλε (Εικόνα 72A).
- 11) Προσθήκη 100 μl από το διάλυμα Stop Solution σε κάθε ένα από τα strips με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor). Το χρώμα του διαλύματος στο εσωτερικό των strips, από μπλε γίνεται κίτρινο (Εικόνα 72B).
- 12) Τέλος, μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) της πλάκας, με φίλτρα 450 nm- 630 nm σε φωτόμετρο ELISA (Awareness Technology INC).

Agra Quant® ELISA Aflatoxin kit (4-40 ppb), Romer Labs:

- 1) Επιλογή κατάλληλου αριθμού Dilution Strips (σημασμένα με πράσινο χρώμα) στην πλάκα ELISA. Το κάθε strip διαθέτει 8 πηγαδάκια και κάθε ένα αντιστοιχεί σε ένα δείγμα.
- 2) Επιλογή αντίστοιχου αριθμού από τα Antibody Coated Microwell strips, στην αντίστοιχη για αυτά πλάκα ELISA.
- 3) Με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor), έγχυση 200μl διαλύματος Conjugate, σε κάθε ένα από τα Dilution Strips.
- 4) Τοποθέτηση 100 μl από κάθε δείγμα στα Dilution Strips, χωρίς περαιτέρω αραιώση.
- 5) Με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor), ανακίνηση 3 φορές του μίγματος και γρήγορη μεταφορά 100 μl από κάθε Dilution Strip, στο αντίστοιχο Antibody Coated Microwell Strip.
- 6) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, για 15 λεπτά.
- 7) Απόρριψη του περιεχομένου. Ακολουθούν 5 πλύσεις με απιονισμένο νερό των strips.
- 8) Καλό στέγνωμα των strips, με χρήση πετσέτας ή διηθητικού χαρτιού.
- 9) Προσθήκη 100 μl από το διάλυμα Substrate, σε κάθε ένα από τα strips με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor)
- 10) Επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 λεπτά. Με το πέρας του χρόνου επώασης το διάλυμα από διαφανές γίνεται μπλε (Εικόνα 72A).
- 11) Προσθήκη 100 μl από το διάλυμα Stop Solution σε κάθε ένα από τα strips με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας (8-channel pipettor). Το χρώμα του διαλύματος στο εσωτερικό των strips, από μπλε γίνεται κίτρινο (Εικόνα 72B).
- 12) Τέλος, μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) της πλάκας, με φίλτρα 450 nm- 630 nm σε φωτόμετρο ELISA (Awareness Technology INC).



Εικόνα 72. Α. Πλάκα ELISA μετά την προσθήκη του Substrate, Β. Πλάκα ELISA μετά την προσθήκη Stop Solution.

3.4.2 Ανάλυση Μυκοτοξινών από Στελέχη

Για να εξετασθούν τα είδη του γένους *Aspergillus* ως προς την παραγωγή αφλατοξίνης και τα είδη του γένους *Fusarium* ως προς την παραγωγή φουμονισίνης, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό MEA (Malt Extract Agar), και ομογενοποιήθηκαν μετά από επώαση 10 ημερών σε θερμοκρασία 28° C και φωτοπερίοδο 12h.

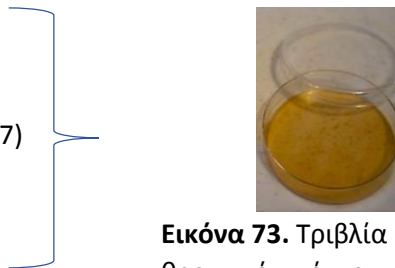
MEA (Malt Extract Agar)

Για 1 lt MEA (Εικόνα 73):

Σε 950 ml απιονισμένο νερό προσθέτω 50 gr MEA (LAB M, Lab 037)

Ογκομέτρηση και προσθήκη νερού έως το 1 lt τελικό όγκο

Ακολουθεί αποστείρωση στους 121° C για 10 λεπτά



Εικόνα 73. Τριβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα MEA.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξαγωγή της τοξίνης με χρήση μίξερ χειρός ώστε να πραγματοποιηθεί η ανάμιξη του θρεπτικού υλικού με τον διαλύτη στις αναλογίες που περιγράφονται στη παράγραφο 3.4.1 και ακολούθησε μέτρηση της τοξίνης σύμφωνα με τα kit ανάλυσης AgraQuant® ELISA Aflatoxin (4-40 ppb) και AgraQuant® ELISA Fumonisin (0,25-5 ppm) της Romer Labs, αντίστοιχα.

3.5 Διαδικασία ταυτοποίησης μυκήτων *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.*

3.5.1 Διαχωρισμός με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα στελέχη του γένους *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.* αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar) στους 28 °C, με φωτοπερίοδο 12h κάτω από λάμπες λευκού φωτός μέχρι πλήρης κάλυψης των τριβλίων. Μετά το πέρας 5 ημερών πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών ώστε να πραγματοποιηθεί μια πρώτου βαθμού ταξινόμησή τους.

3.5.2 Μοριακός χαρακτηρισμός

Από τους μύκητες *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.* που απομονώθηκαν από τους σπόρους καλαμποκιού από την περιοχή της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας, απομονώθηκε γενωματικό DNA και με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές, ενισχύθηκαν περιοχές από το γένωμα του κάθε στελέχους. Πιο συγκεκριμένα για όλα τα στελέχη ενισχύθηκε μια περιοχή περίπου 650 βάσεις του γονιδίου της καλμοντουλίνης (CAM), (O'Donnell et al., 2000), για 23 στελέχη *Aspergillus spp.* ενισχύθηκε μια περιοχή 700 βάσεων του γονιδίου της περιοχής 18S του ριβοσώματος και για 63 στελέχη *Fusarium spp.* ενισχύθηκε μία περιοχή περίπου 700 βάσεων του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF), (O'Donnell et al., 1998).

3.5.2.1 Εξαγωγή DNA

Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με τη μέθοδο των Tendulkar et al., 2003.

- 1) Σε eppendorf tube 5 mg μυκήλιο από νέα καλλιέργεια.
- 2) Προσθήκη 50 μ l TE Buffer (500 mM EDTA pH 8,0 - 1M Tris – HCl pH 8,0).
- 3) Χρήση οδοντογλυφίδας, για καλή διαβροχή του μυκηλίου.
- 4) Καλή ανακίνηση (vortex) για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση (spin) για 1 λεπτό.
- 5) Τοποθέτηση σε φούρνο μικροκυμάτων στα 2450 MHz (max) για 30 sec.
- 6) Επώαση δείγματος σε θερμοκρασία 28° C για 5 λεπτά.
- 7) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στις 13000 rpm.
- 8) Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωλήνα (tube).
- 9) Προσθήκη RNase και επώαση στους 37° C για 10 λεπτά.
- 10) Απενεργοποίηση RNase με 10 λεπτά στους 68° C.

3.5.2.2 Ενίσχυση και καθαρισμός προϊόντων DNA για αλληλούχιση.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction)

Για την ενίσχυση της περιοχής στο γονίδιο της καλμοντουλίνης (*cam*) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές CL1 (GARTWCAAGGAGGCCTTCTC) και CL2 (TTTTCATCATGAGTTGGAC), όπως περιγράφεται και στο κεφάλαιο 1.3.7 (O'Donnell et al., 2000). Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλάμβανε τα εξής στάδια: 40 κύκλους με αρχική αποδιάταξη στους 94° C για 2 λεπτά και στη συνέχεια αποδιάταξη 30 sec στους 94° C, υβριδισμός 30 sec στους 57° C και επέκταση 1 λεπτό (1 λεπτό για κάθε 1000 βάσεις προϊόντος) στους 72° C και τέλος επέκταση για 10 λεπτά στους 72° C. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 650 βάσεων.

Για την ενίσχυση της περιοχής στο γονίδιο του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (*ef*) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές EF1 (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) και EF2 (GGARGTACTACCAGTSATCATGTT), όπως περιγράφεται και στο κεφάλαιο 1.3.7 (O'Donnell et al., 1998). Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλάμβανε τα εξής στάδια: 40 κύκλους με αρχική αποδιάταξη στους 94° C για 2 λεπτά και στη συνέχεια με αποδιάταξη 30 sec, στους 94° C υβριδισμός 30 sec, στους 54° C και επέκταση 1 λεπτό (1 λεπτό για κάθε 1000 βάσεις προϊόντος) στους 72° C και τέλος επέκταση για 10 λεπτά στους 72° C. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 700 βάσεων.

Για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου της ριβοσωμικής εσωτερικά μεταγραφόμενης περιοχής (ITS 1–5.8S–ITS 2), χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS4 (TCCTCC GCTTATTGATATG) και ITS5 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), όπως περιγράφεται και στο κεφάλαιο 1.4.3 (Godet et al., 2010). Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλάμβανε τα εξής στάδια: 35 κύκλοι με αρχική αποδιάταξη στους 94° C για 2 λεπτά και στη συνέχεια αποδιάταξη 30 sec στους 94° C, υβριδισμός 30 sec στους 55,5° C και επέκταση 1 λεπτό (1 λεπτό για κάθε 1000 βάσεις προϊόντος) στους 72° C και τέλος επέκταση για 5 λεπτά στους 72° C. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 700 βάσεων.

Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για τις παραπάνω αντιδράσεις είναι η Taq πολυμεράση της εταιρίας Qiagen και η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων ήταν η συνιστώμενη (1 μ l γενωματικού DNA, 0,5 μ l Taq πολυμεράση, 1,5 μ l MgCl₂ (συγκέντρωση 50 mM, 5 μ l (1x συγκέντρωση) ρυθμιστικού διαλύματος, 2 μ l 2,5 mM νουκλεοτιδίων) και 2 μ l από κάθε εκκινητή (συγκέντρωση 10 mM). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50 μ l.

Καθαρισμός προϊόντος PCR –MIN Elute PCR Purification Kit (Qiagen)

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

3.5.2.3 Αλληλούχιση δειγμάτων

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

3.6 Φυλογενετική ανάλυση

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τα διάφορα στελέχη αλληλούχισης επεξεργάστηκαν, με αφαίρεση από αυτές τμημάτων από την αρχή και το τέλος των αλληλουχιών που δεν ήταν καθαρές με βάση τα χρωματογραφήματα με τη χρήση του προγράμματος Finch TV 11.4 (Geospiza). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε BLAST ανάλυση, με στόχο τη σύγκριση και αναζήτηση ομοιότητας της αλληλουχίας, με διάφορα μυκοτοξικογόνα στελέχη του γένους *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. Στην παρούσα μελέτη, ο έλεγχος της κάθε αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων αλληλουχιών GenBank του NCBI (Benson, et al., 2008). Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με το διαδικτυακό πρόγραμμα nucleotide BLAST για να διαπιστωθεί ότι η κάθε αλληλουχία προερχόταν από το σωστό είδος και να αποφευχθεί η χρήση λανθασμένων αλληλουχιών κατά την ανάλυση.

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Πολλαπλή στοίχιση (alignment) των αλληλουχιών
2. Επιλογή κατάλληλου μοντέλου εξέλιξης
3. Καθορισμός μεθόδου κατασκευής δένδρου
4. Αξιολόγηση αξιοπιστίας δένδρου.

Πριν τη στοίχιση οι αλληλουχίες τοποθετήθηκαν σε ένα αρχείο και αποθηκεύτηκαν με τη μορφή «fasta». Στο πρόγραμμα Clustal W χρησιμοποιήθηκαν παράμετροι για ανά ζεύγη (pairwise) στοίχιση και ορίστηκε ο έλεγχος του πλήθους των επαναλήψεων. Το αρχείο με τις στοιχισμένες αλληλουχίες επεξεργάστηκε με το πρόγραμμα MEGA6.

Αναλυτικότερα, το πρώτο βήμα για την διαδικασία της φυλογενετικής ανάλυσης ήταν η στοίχιση των αλληλουχιών (alignment), καθώς οι αλληλουχίες δεν αναμενόταν να είναι πανομοιότυπες αλλά να

παρουσιάζουν διαφορές ως προς τις βάσεις ορισμένων νουκλεοτιδικών θέσεων. Η στοίχιση αποσκοπούσε στον προσδιορισμό των ομόλογων βάσεων των αλληλουχιών και την εύρεση σωστών φυλογενετικών σχέσεων των υπό εξέταση στελεχών. Η σωστή στοίχιση είναι απαραίτητη για να αποφευχθούν τα λάθη στα φυλογενετικά δένδρα και ως εκ τούτου και τα λάθος φυλογενετικά συμπεράσματα. Στη παρούσα μελέτη για τη στοίχιση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Clustal W 2.1 καθώς αποτελεί αποδεδειγμένα κατάλληλο εργαλείο για πολλούς τύπους αλληλουχιών (ριβοσωμικών, αμινοξικών κ.α.) (Larkin et al., 2007).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου εξέλιξης, καθώς το αποτέλεσμα των διαφόρων μεθόδων, εξαρτάται από το μοντέλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη φυλογενετική ανάλυση. Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί πλήθος μοντέλων, τα οποία διαφέρουν ως προς την πολυπλοκότητα σε συνάρτηση με τον αριθμό των παραμέτρων που χρησιμοποιούν για να εξηγήσουν το σύνολο των εξελικτικών αλλαγών. Όλα τα είδη των μοντέλων εξετάζουν τουλάχιστον τρεις βασικές παραμέτρους, α) τη συχνότητα εμφάνισης των βάσεων A,T,G και C στο σύνολο των νουκλεοτιδικών θέσεων των αλληλουχιών, β) την υποκατάσταση βάσεων, δηλαδή την τάση υποκατάστασης μιας βάσης από μια άλλη, και γ) το ρυθμό ετερογένειας, δηλαδή την πιθανότητα αλλαγής νουκλεοτιδίων. Στη παρούσα μελέτη το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων ήταν το K2, το οποίο στηρίζεται στην υπόθεση ότι οι συχνότητες των τεσσάρων βάσεων είναι ίδιες αλλά είναι δυνατός ο διαχωρισμός των ρυθμών μεταπτώσεων (αλλαγή μιας βάσης με βάση του ίδιου είδους) και μεταστροφών (αλλαγή μια βάσης με βάση διαφορετικού είδους) (Kimura, 1980).

Για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου έγινε επιλογή της μεθόδου αποστάσεων - ομαδοποίησης, η οποία στηρίζεται στη χρήση ενός αλγορίθμου. Η μέθοδος αυτή είναι εύχρηστη καθώς δίνει άμεσο αποτέλεσμα, χωρίς να υπάρχει καθυστέρηση με έλεγχο εναλλακτικών σεναρίων. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκει η υποκατηγορία Neighbor - Joining (NJ) (Μέθοδος Σύνδεσης Γειτόνων), η οποία αποτελεί δημοφιλή μέθοδο κατασκευής φυλογενετικών δένδρων συνδυάζοντας την υπολογιστική δύναμη και τη μοναδική λύση, καθώς δίνει μόνο ένα δένδρο (Saitou et al., 1987).

Τέλος αξιολογήθηκε η αξιοπιστία των δένδρων με τη χρήση της μεθόδου Bootstrap κατά την οποία γίνεται τυχαία δειγματοληψία δεδομένων με αντικατάσταση ορισμένων από τα αρχικά δεδομένα, ώστε σε κάθε αναδειγματοληψία κάποια από τα αρχικά δεδομένα να απουσιάζουν και κάποια να επαναλαμβάνονται μια και δύο φορές. Όταν τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά τότε η στατιστική παράμετρος που προκύπτει είναι εντός των ορίων που έχουν προσδιοριστεί και τότε προκύπτει ένα σταθερό τελικό δένδρο (Felsenstein, 1985).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας σε αγρούς αραβοσίτου της Ελλάδας

Για την αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας της σήψης σπάδικα σε αγρούς αραβοσίτου της Ελλάδας έγινε επιλογή διαφόρων αγρών από τις κύριες περιοχές παραγωγής καλαμποκιού. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν 29 αγροί καλλιέργειας καλαμποκιού από την Κεντρική Ελλάδα και 41 αγροί από την Βόρεια Ελλάδα και πραγματοποιήθηκε τυχαία δειγματοληψία και συλλογή σπαδικών, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1 (Πίνακας 1) (Εικόνα 74). Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε με μέτρηση σπαδικών που έφεραν συμπτώματα σήψεων από τους μύκητες *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. ως προς τους υγιείς σπάδικες.

Κεντρική Ελλάδα	Βόρεια Ελλάδα
Καρδίτσα - 8 Αγροί (A1 - A8)	Καβάλα - 15 Αγροί (A22 - A34, A51 - A52)
Τρίκαλα - 8 Αγροί (A9 - A16)	Σέρρες- 16 Αγροί (A35 - A50)
Λάρισα - 10 Αγροί (A17 - A21, A63 - A67)	Δράμα - 10 Αγροί (A53 - A62)
Μαγνησία - 3 Αγροί (A68 - A70)	

Πίνακας 1. Περιοχές συλλογής σπαδικών και αριθμός επισκέψιμων αγρών ανά περιοχή.



A. Νομός Καρδίτσας



B. Νομός Τρικάλων



Γ. Νομός Λάρισας



Δ. Νομός Μαγνησίας



Ε. Νομός Καβάλας



ΣΤ. Νομός Σερρών



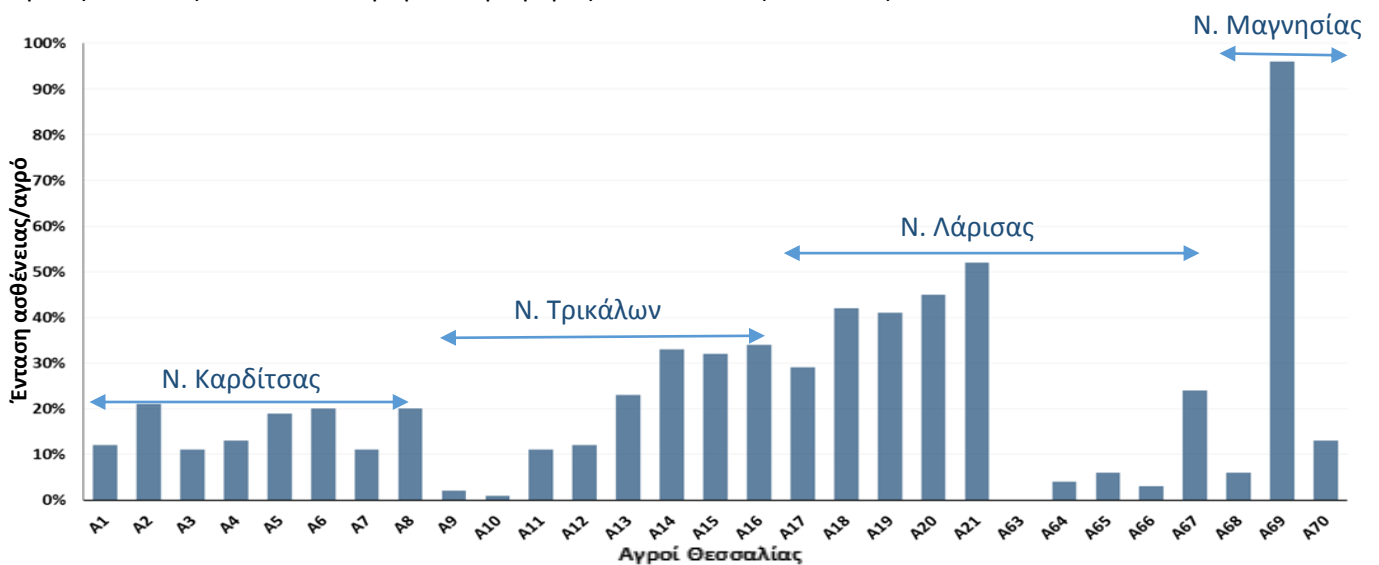
Ζ. Νομός Δράμας

Εικόνα 74. Απεικόνιση σπαδικών από αγρούς των Νομών Α. Καρδίτσας, Β. Τρικάλων, Γ. Λάρισας, Δ. Μαγνησίας, Ε. Καβάλας, ΣΤ. Σερρών και Ζ. Δράμας.

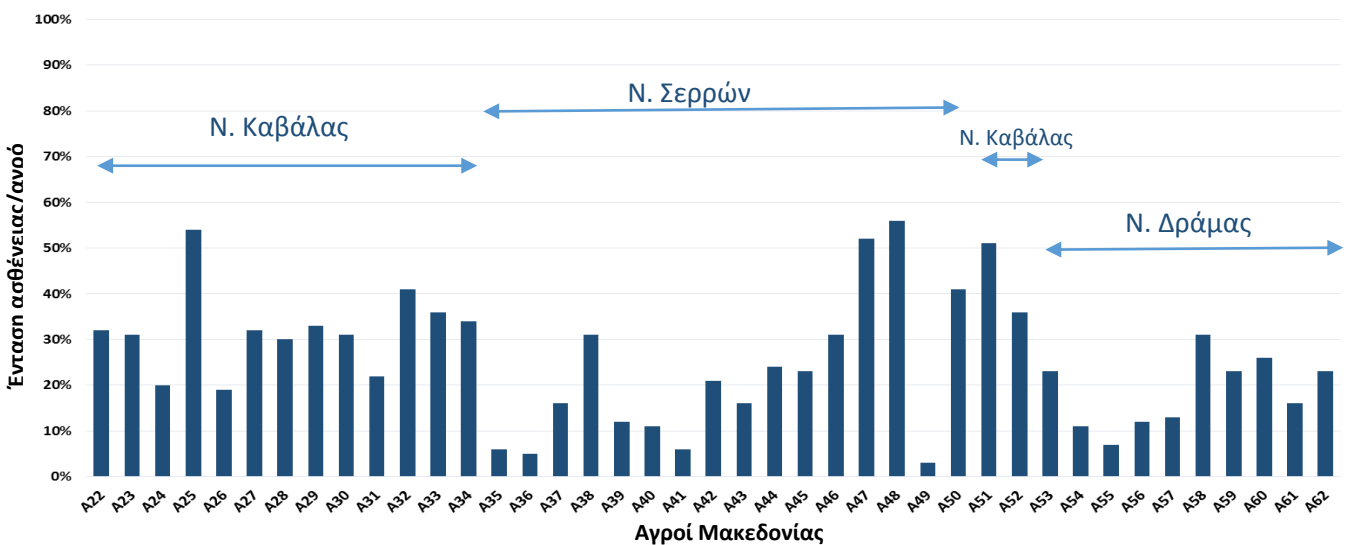
Σε όλους τους νομούς τα ποσοστά σήψεων στους σπάδικες καλαμποκιού ήταν ιδιαίτερα υψηλά το Σεπτέμβριο του 2014 τόσο στη Θεσσαλία, όσο και στη Μακεδονία. Πιο συγκεκριμένα στη Θεσσαλία, στο Ν. Καρδίτσας στους αγρούς 1-8 η ένταση της ασθένειας κυμάνθηκε από 11-21 % (δηλαδή το 11-21 % των σπαδικών είχαν συμπτώματα σήψεων ανά αγρό), στο Ν. Τρικάλων στους αγρούς 9-16 η ένταση της ασθένειας κυμάνθηκε από 1-34 % και στο Ν. Λάρισας στους αγρούς 17-21 και 63-67 η ένταση της ασθένειας κυμάνθηκε από 0-52 % ενώ στο Ν. Μαγνησίας στους αγρούς 68-70 η ένταση της ασθένειας κυμάνθηκε από 6-96 % (Εικόνα 75).

Όσον αφορά τη Μακεδονία τα ποσοστά της έντασης ήταν ανάλογα. Πιο συγκεκριμένα στο Ν. Καβάλας στους αγρούς 22- 34 και 51- 52 η ένταση κυμάνθηκε από 20-54 %, στο Ν. Σερρών στους αγρούς 35- 50 η ένταση κυμάνθηκε από 3-41 % και τέλος στο Ν. Δράμας στους αγρούς 53- 62 η ένταση κυμάνθηκε από 7-31 % (Εικόνα 76).

Η ένταση της ασθένειας φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία εντομολογικών προσβολών (πυραλίδα, σεζάμια, πράσινο σκουλήκι κ.α.) και σε πολλές περιπτώσεις είχε ως αποτέλεσμα η εξάνθηση των μυκητών να εξαπλώνεται σε μεγαλύτερο μέρος του σπάδικα (Εικόνα 77).



Εικόνα 75. Ποσοστό της μέσης έντασης της ασθένειας των σήψεων σπαδικών καλαμποκιού ανά αγρό που προκαλείται από τους μύκητες *Aspergillus* spp. και *Fusarium* spp. στην Θεσσαλία.



Εικόνα 76. Ποσοστό της μέσης έντασης της ασθένειας των σήψεων σπαδικών καλαμποκιού ανά αγρό που προκαλείται από τους μύκητες *Aspergillus* spp. και *Fusarium* spp. στη Μακεδονία.

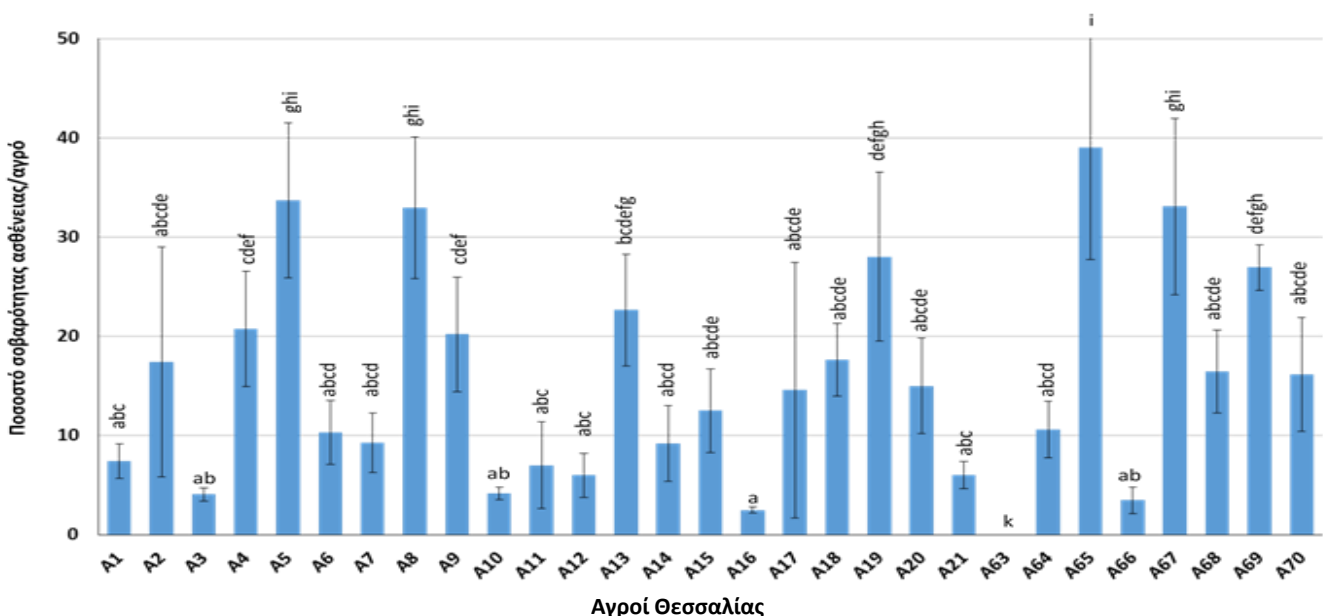


Εικόνα 77. Συμπτώματα σήψεων σπαδικών καλαμποκιού από μύκητες του γένους *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. σε συνεργισμό με εντομολογική προσβολή.

4.2 Αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθένειας σε αγρούς αραβοσίτου της Ελλάδας

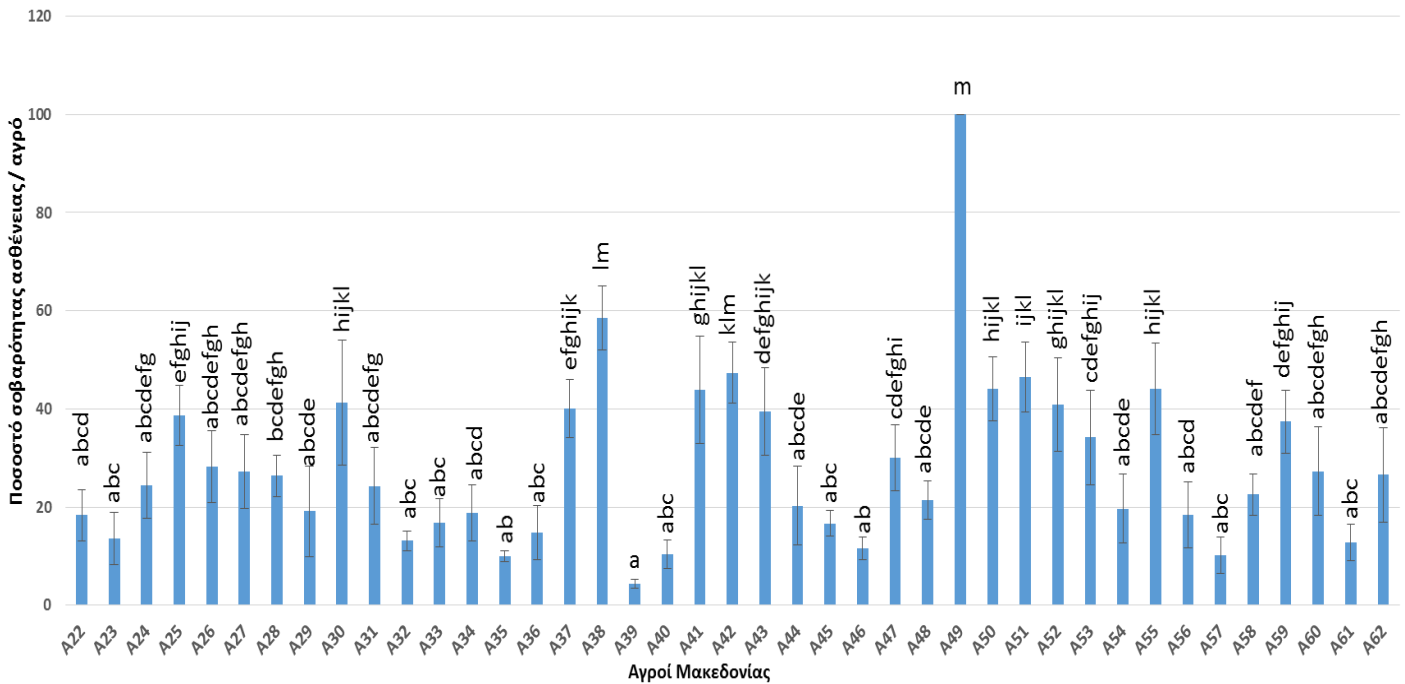
Για την αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθένειας της σήψης σπάδικα έγινε χρήση των συλλεχθέντων σπαδικών από τους προαναφερθέντες αγρούς. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των σπόρων κάθε σπάδικα ανά αγρό και για την εκτίμηση της σοβαρότητας της ασθένειας προσδιορίστηκε το ποσοστό των μολυσμένων σπόρων με συμπτώματα σήψεων από *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. ως προς το συνολικό αριθμό σπόρων κάθε σπάδικα ανά αγρό.

Από την προαναφερθείσα καταμέτρηση υπολογίστηκε η σοβαρότητα της ασθένειας για κάθε αγρό της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας και τα αποτελέσματα ήταν τα παρακάτω. Στη Θεσσαλία, στο Ν. Καρδίτσας στους αγρούς 1-8 η σοβαρότητα της ασθένειας κυμάνθηκε από 4-34 % (δηλαδή κατά μέσο όρο το 4-34% των σπόρων του κάθε μολυσμένου σπάδικα παρουσίαζε εμφανή συμπτώματα σήψεων ανά αγρό), στο Ν. Τρικάλων στους αγρούς 9-16 η σοβαρότητα της ασθένειας κυμάνθηκε από 2,5-23 %, στο Ν. Λάρισας στους αγρούς 17-21 και 63-67 η σοβαρότητα της ασθένειας κυμάνθηκε από 0-39 % και τέλος, στο Ν. Μαγνησίας στους αγρούς 68-70 η σοβαρότητα της ασθένειας κυμάνθηκε από 16-27 % (Εικόνα 78).



Εικόνα 78. Μέτρηση της σοβαρότητας της ασθένειας (ποσοστό μολυσμένων σπόρων με συμπτώματα σήψεων ανά σπάδικα ανά αγρό) που προκαλείται από τους μύκητες *Aspergillus* spp. και *Fusarium* spp. σε αγρούς Θεσσαλίας. Στην κάθε μέτρηση σημειώνεται το τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0, 05$).

Όσον αφορά τη σοβαρότητα της ασθένειας στους αγρούς της Μακεδονίας τα αποτελέσματα έδειξαν στο Ν. Καβάλας στους αγρούς 22- 34 και 51- 52 η σοβαρότητα κυμάνθηκε από 13,1-46 %, στο Ν. Σερρών στους αγρούς 35-50 η σοβαρότητα κυμάνθηκε από 4,3-100 %, ενώ στο Ν. Δράμας στους αγρούς 53-62 η σοβαρότητα κυμάνθηκε από 10,1-46,4 % (Εικόνα 79).



Εικόνα 79. Μέτρηση της σοβαρότητας της ασθένειας (ποσοστό μολυσμένων σπόρων με συμπτώματα σήψεων ανά σπάδικα ανά αγρό) που προκαλείται από τους μύκητες *Aspergillus* spp. και *Fusarium* spp. σε αγρούς Μακεδονίας. Στην κάθε μέτρηση σημειώνεται το τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0, 05$).

Όπως και στην περίπτωση της έντασης της ασθένειας έτσι και στη σοβαρότητα φάνηκε να υπάρχει επιδείνωση των προσβολών και του ποσοστού εξάνθησης, όταν υπήρχε συνδυασμός μυκητολογικών και εντομολογικών προσβολών (Εικόνα 80).



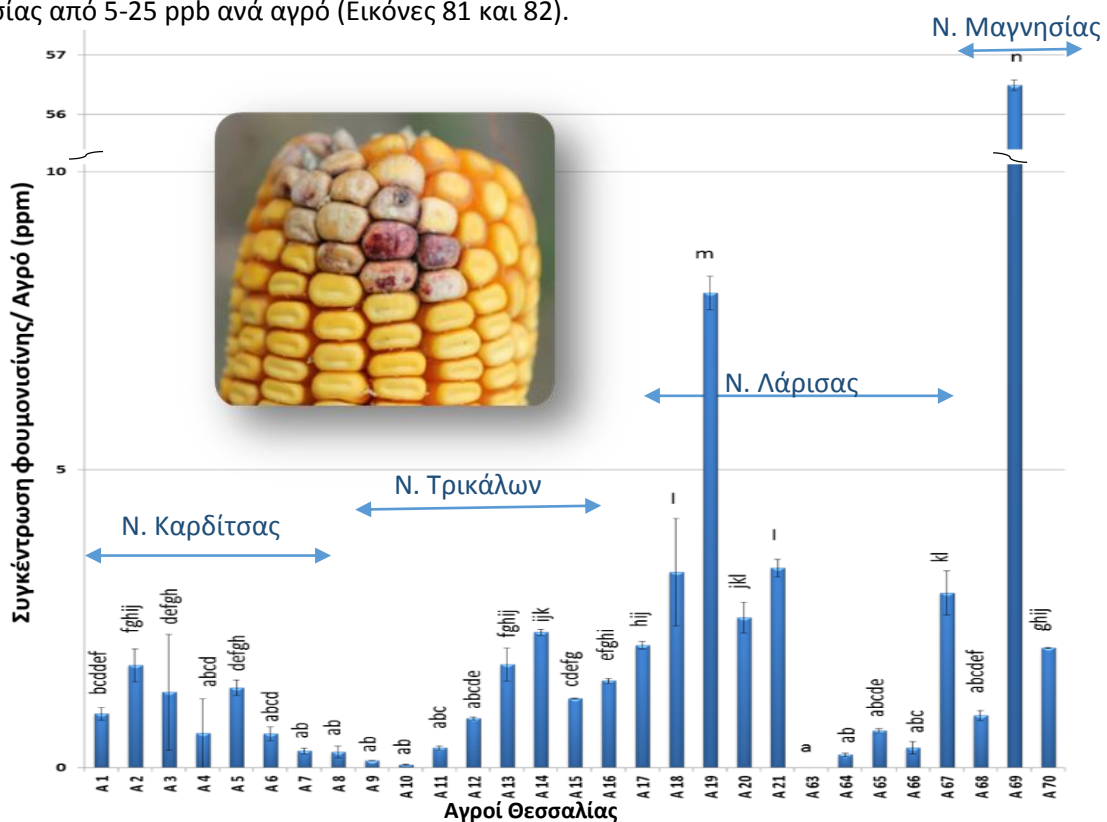
Εικόνα 80. Συμπτώματα σήψεων σπαδικών καλαμποκιού από μύκητες του γένους *Fusarium* spp. σε συνεργισμό με εντομολογική προσβολή, όπου φαίνεται η χαρακτηριστική πορεία του εντόμου και η εξάνθηση στα ανάλογα σημεία.

4.3 Ανίχνευση και προσδιορισμός αφλατοξινών και φουμονισινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας

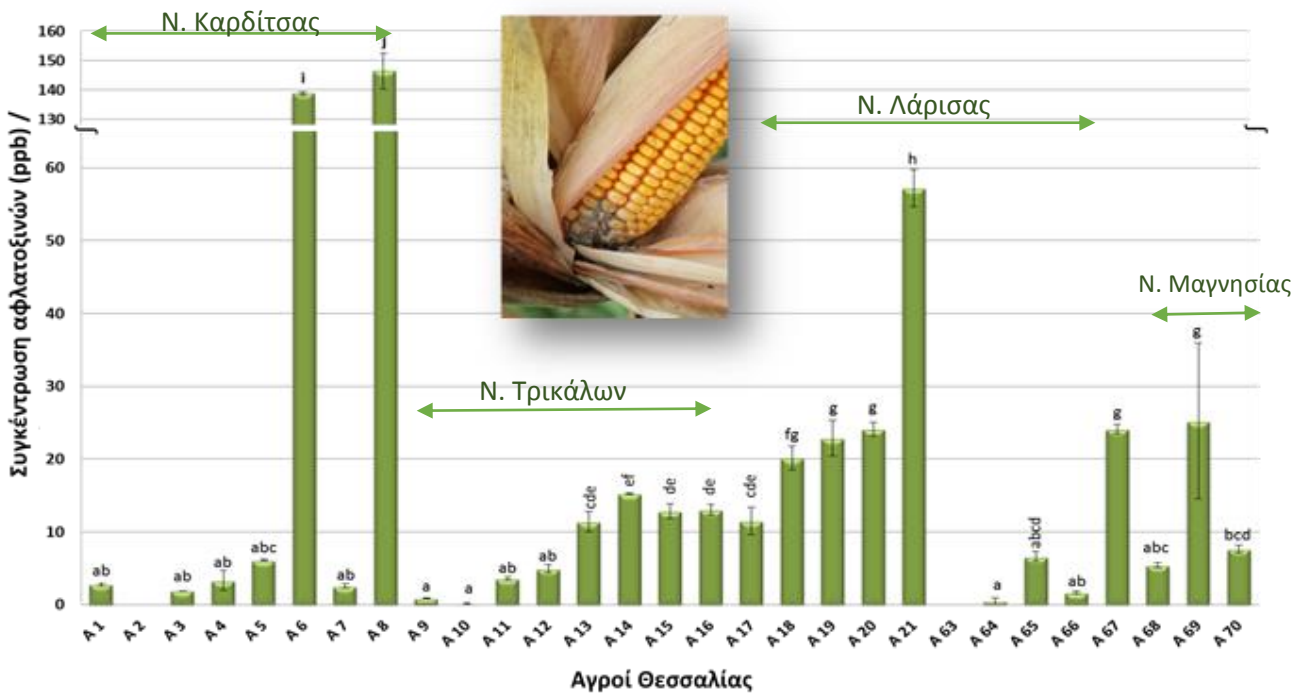
Οι δειγματοληψίες από κάθε αγρό της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης Νο 401/2006 (B.4. Μέθοδος δειγματοληψίας για τα σιτηρά και τα προϊόντα σιτηρών για παρτίδες <50 τόνους) ώστε τα δείγματα να είναι αντιπροσωπευτικά και ο προσδιορισμός των μυκοτοξινών να είναι ακριβής. Τα επιτρεπτά όρια των αφλατοξινών στο καλαμπόκι που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι 2 ppb για την αφλατοξίνη B1 (0,25 ppb αν προορίζεται για παιδικές τροφές) και 4 ppb για το άθροισμα της αφλατοξίνης B1, B2, G1 και G2 ενώ για το καλαμπόκι που προορίζεται για ζωοτροφές είναι 5-20 ppb για την αφλατοξίνη B1 (ανάλογα τη χρήση της ζωοτροφής). Τα επιτρεπτά όρια των φουμονισινών (άθροισμα της B1 και B2) στο καλαμπόκι που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι 0,2-4 ppm ενώ για το καλαμπόκι που προορίζεται για ζωοτροφές είναι 60 ppm.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φουμονισινών και των αφλατοξινών που υπήρχαν σε κάθε αγρό έγινε ομογενοποίηση των σπαδικών και κονιοροποίησης τους (Παράγραφος 3.4.). Με εφαρμογή καθορισμένου πρωτοκόλλου έγινε εξαγωγή καθαρής τοξίνης και στη συνέχεια έγινε χρήση του kit ανάλυσης AgraQuant® ELISA Fumonisin (0,25-5 ppm) και του kit ανάλυσης AgraQuant® ELISA Aflatoxin (4-40 ppb) της Romer Labs. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς.

Στη Θεσσαλία, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει μικρή διακύμανση ανά αγρό με τις φουμονισίνες να κυμαίνονται από 0 έως και 56 ppm ανά αγρό και για τις αφλατοξίνες από 0-150 ppb. Πιο συγκεκριμένα στο Νομό Καρδίτσας οι μέσες τιμές φουμονισινών διακυμάνθηκαν από 0-2 ppm (Αγροί 1-8), στο Νομό Τρικάλων (Αγροί 9-16) από 0-2 ppm, στο Νομό Λάρισας (Αγροί 17-21 και 63-67) από 1-8 ppm και στο Νομό Μαγνησίας (68-70) από 2 ως 56 ppm ανά αγρό. Όσον αφορά τις αφλατοξίνες οι μέσες τιμές διακυμάνθηκαν στο Νομό Καρδίτσας από 0-146 ppb, στο Νομό Τρικάλων από 1-15 ppb, στο Νομό Λάρισας από 0-57 ppb και στο Νομό Μαγνησίας από 5-25 ppb ανά αγρό (Εικόνες 81 και 82).

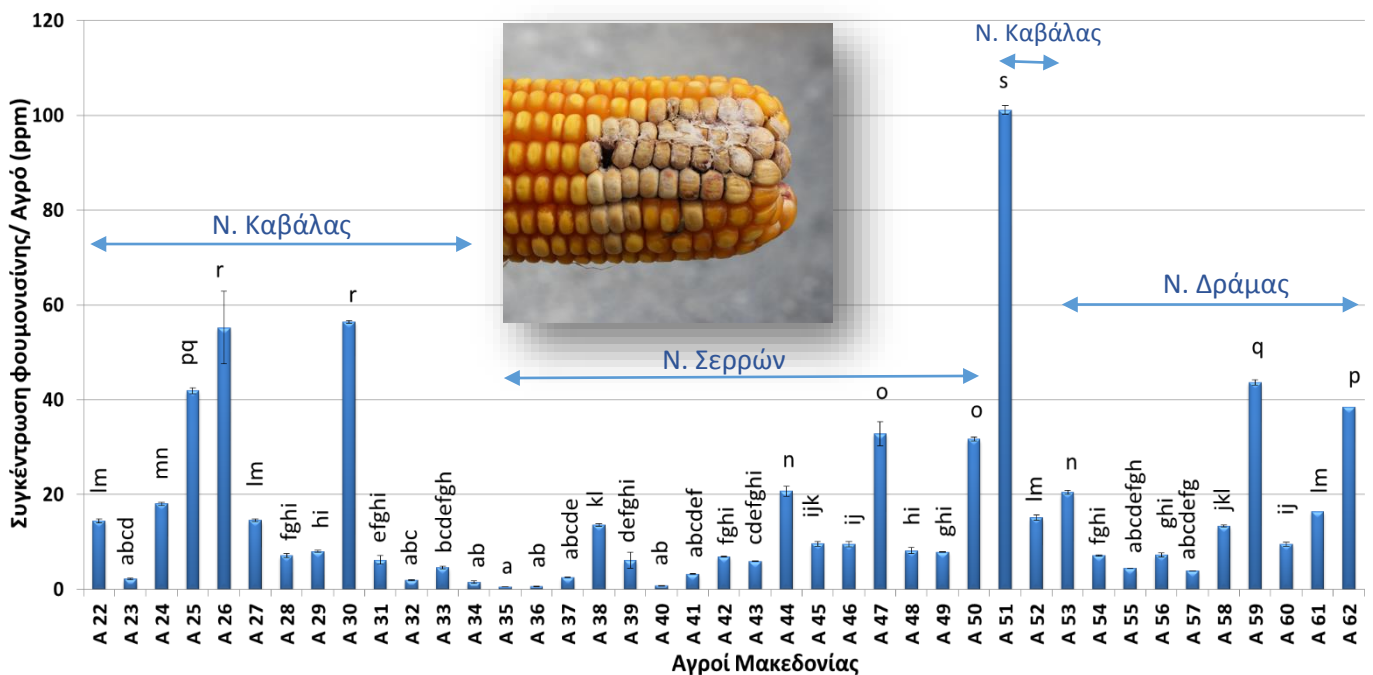


Εικόνα 81. Μέτρηση των φουμονισινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού στην περιοχή της Θεσσαλίας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία κατά Duncan (P <0,05).

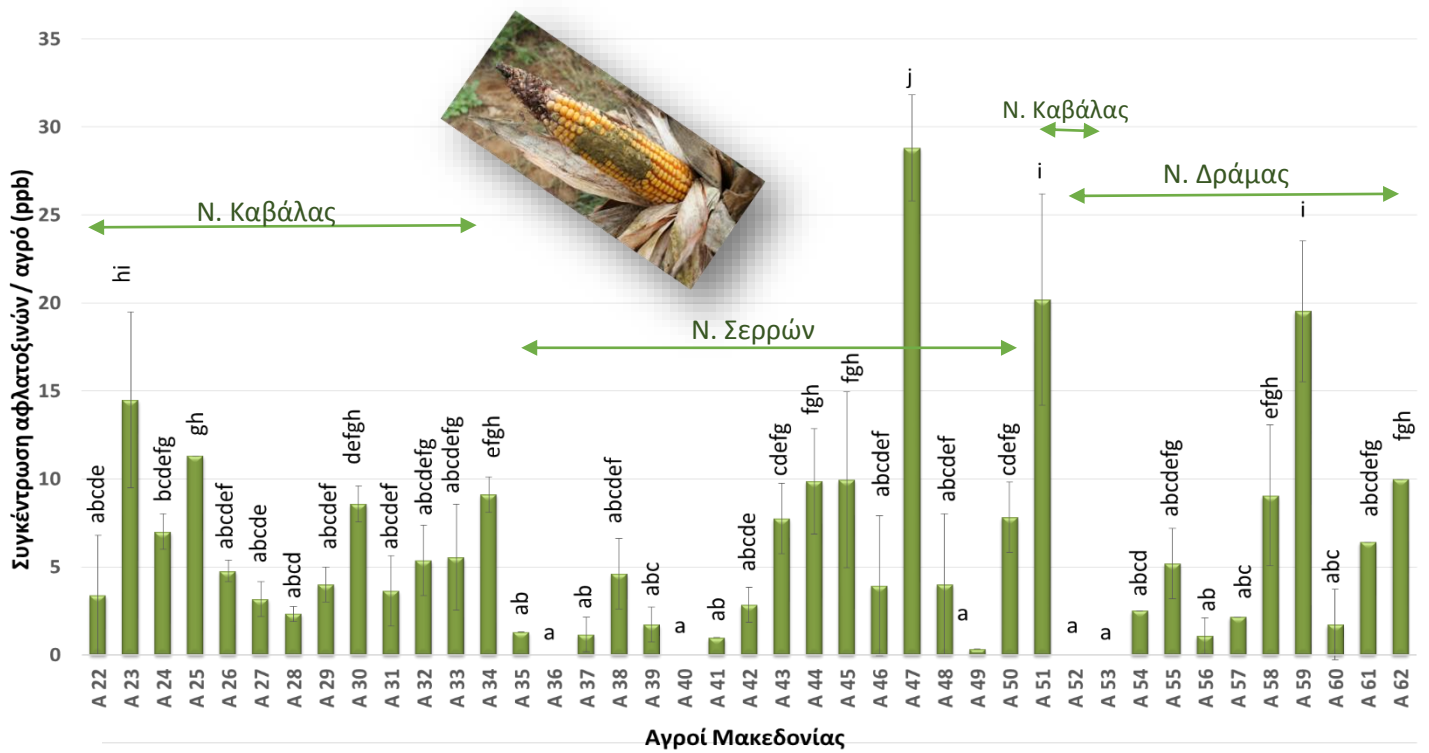


Εικόνα 82. Μέτρηση των αφλατοξινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού στην περιοχή της Θεσσαλίας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0,05$).

Στη Μακεδονία, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει διακύμανση ανά αγρό με τις φουμονισίνες να κυμαίνονται από 0 έως και 101 ppb ανά αγρό και για τις αφλατοξίνες από 0-29 ppb. Πιο συγκεκριμένα στο Νομό Καβάλας οι μέσες τιμές φουμονισινών διακυμάνθηκαν από 2-101 ppb (Αγροί 22-34 και 51-52), στο Νομό Σερρών (Αγροί 35-50) από 0-33 ppb και στο Νομό Δράμας (53-62) από 4 ως 38 ppb ανά αγρό. Όσον αφορά τις αφλατοξίνες οι μέσες τιμές διακυμάνθηκαν στο Νομό Καβάλας από 2-20 ppb, στο Νομό Σερρών από 0-29 ppb και στο Νομό Δράμας από 0-20 ppb ανά αγρό (Εικόνες 83 και 84).



Εικόνα 83. Μέτρηση των φουμονισινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού στην περιοχή της Μακεδονίας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0,05$).



Εικόνα 84. Μέτρηση των αφλατοξινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού στην περιοχή της Μακεδονίας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0,05$).

4.4 Απομονώσεις μυκήτων *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. από αγρούς Θεσσαλίας και Μακεδονίας

Από τους μολυσμένους σπάδικες που συλλέχθηκαν και από τους 70 αγρούς της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις μυκήτων των γενών *Aspergillus* spp. και *Fusarium* spp. σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά Rose Bengal και V8 ώστε να γίνει τελικά επιλογή μονόσπορων αποικιών (Εικόνα 85A ΚΑΙ 85B).

Ο αριθμός των απομονώσεων από την περιοχή της Θεσσαλίας ανήλθε σε 340 για το γένος *Fusarium* spp. και 110 για το γένος *Aspergillus* spp. section *Flavi*. Για την Μακεδονία οι αντίστοιχες απομονώσεις ανήλθαν σε 480 για το γένος *Fusarium* spp. και 130 για το γένος *Aspergillus* spp. section *Flavi* και section *Nigri*. Για την ορθή επιλογή των απομονώσεων έγινε παρατήρηση σε στερεοσκόπιο αλλά και πραγματοποίηση μικροσκοπικών παρασκευασμάτων. Ως αποτέλεσμα των παρατηρήσεων έγινε διαχωρισμός των απομονώσεων ώστε να είναι δυνατή η επιλογή στελεχών με μορφολογική διαφοροποίηση (Εικόνα 86 & 87) τα οποία εξετάστηκαν στη συνέχεια σε μοριακό επίπεδο (Εικόνα 88 & 89).

4.4.1 Μορφολογική διάκριση μυκήτων *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. από αγρούς Θεσσαλίας και Μακεδονίας

Όπως προαναφέρθηκε, οι διάφορες απομονώσεις Φουζαρίων και Ασπεργίλλων από καλαμπόκι καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA και μετά από 5 ημέρες έγινε μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση τους. Παρατηρήθηκε σημαντική μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ των διαφόρων απομονώσεων *F. verticillioides* με την παρουσία διαφόρων ερυθρών χρωστικών ή την παρουσία διαφορετικής μυκηλιακής ανάπτυξης της αποικίας.

Τα στελέχη που βάσει της μοριακής ανάλυσης ανήκουν στο section *Flavi* ανέπτυξαν το χαρακτηριστικό πράσινο μυκήλιο, με αυτά του *Aspergillus flavus* σε πολλές περιπτώσεις να σχηματίζουν σκληρώτια όταν αφέθηκαν για περισσότερες των 7 ημερών σε κατάλληλες συνθήκες. Ο *Aspergillus parasiticus* ανέπτυξε μυκήλιο επίσης πράσινο αλλά με ανοιχτόχρωμη περιφερειακή ζώνη. Τέλος, τα στελέχη που με βάση την μοριακή ανάλυση ανήκουν στο section *Nigri* παρουσίασαν την χαρακτηριστική μαύρη μυκηλιακή ανάπτυξη (Εικόνα 86A).

Τα στελέχη που με βάση τη μοριακή ανάλυση έχουν προσδιοριστεί ως *F. verticillioides* εμφάνισαν λευκό μυκήλιο αλλά μεταχρωμάτισαν το θρεπτικό υλικό στις περισσότερες περιπτώσεις σε ερυθρό. Ανάλογη είναι και η εικόνα στα στελέχη που με βάση τη μοριακή ανάλυση είναι *F. proliferatum* με τη διαφορά ότι η κάτω πλευρά των τριβλίων παρουσίασε σχεδόν μελανό κέντρο ενώ παράλληλα το μυκήλιο είναι πιο πυκνό. Τα στελέχη που αντιστοιχούν σε *F. subglutinans* παρουσίασαν πιο ερυθρό και υδαρές μυκήλιο, ενώ τα στελέχη του *F. graminearum* ανέπτυξαν πολύ αραιό μυκήλιο. Τέλος, τα στελέχη που ανήκουν στο είδος *F. incarnatum* σχημάτισαν φαιό μυκήλιο με καστανή όψη στην κάτω επιφάνεια του τριβλίου και τα στελέχη του είδους *F. thapsinum* είχαν υποκίτρινο, πυκνό και εναέριο μυκήλιο (Εικόνα 86B).

A. flavus



A 1/ Σ 3
Καρδίτσα



A 6/ Σ 40
Καρδίτσα



A 23/ Σ 202
Καβάλα



A 51/ Σ 514
Καβάλα



A 58/ Σ 23
Δράμα



A 68/ Σ 669
Μαγνησία

A. parasiticus

Aspergillus spp.

A. niger



A 2/ Σ 6
Καρδίτσα



A 13/ Σ 107
Τρίκαλα



A 25/ Σ 233
Καβάλα



A 53/ Σ 534
Δράμα



A 37/ Σ 355
Σέρρες



A 58/ Σ 570
Δράμα

Εικόνα 85A. Σπάδικες αραβοσίτου από διάφορους ελληνικούς αγρούς από τους οποίους πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις μυκήτων του γένους *Aspergillus* spp. (A= Αγρός, Σ= Στέλεχος).

F. verticillioides

F. proliferatum

F. subglutinans



A 10/ Σ 65
Τρίκαλα



A 39/ Σ 390
Σέρρες



A 9/ Σ 61
Τρίκαλα



A 41/ Σ 409
Σέρρες



A 5/ Σ 27
Καρδίτσα



A 58/ Σ 584
Δράμα

F. incarnatum

F. thapsinum

F. graminearum



A 29/ Σ 272
Καβάλα



A 43/ Σ 426
Σέρρες



A 66/ Σ 653
Λάρισα



A 68/ Σ 668
Μαγνησία

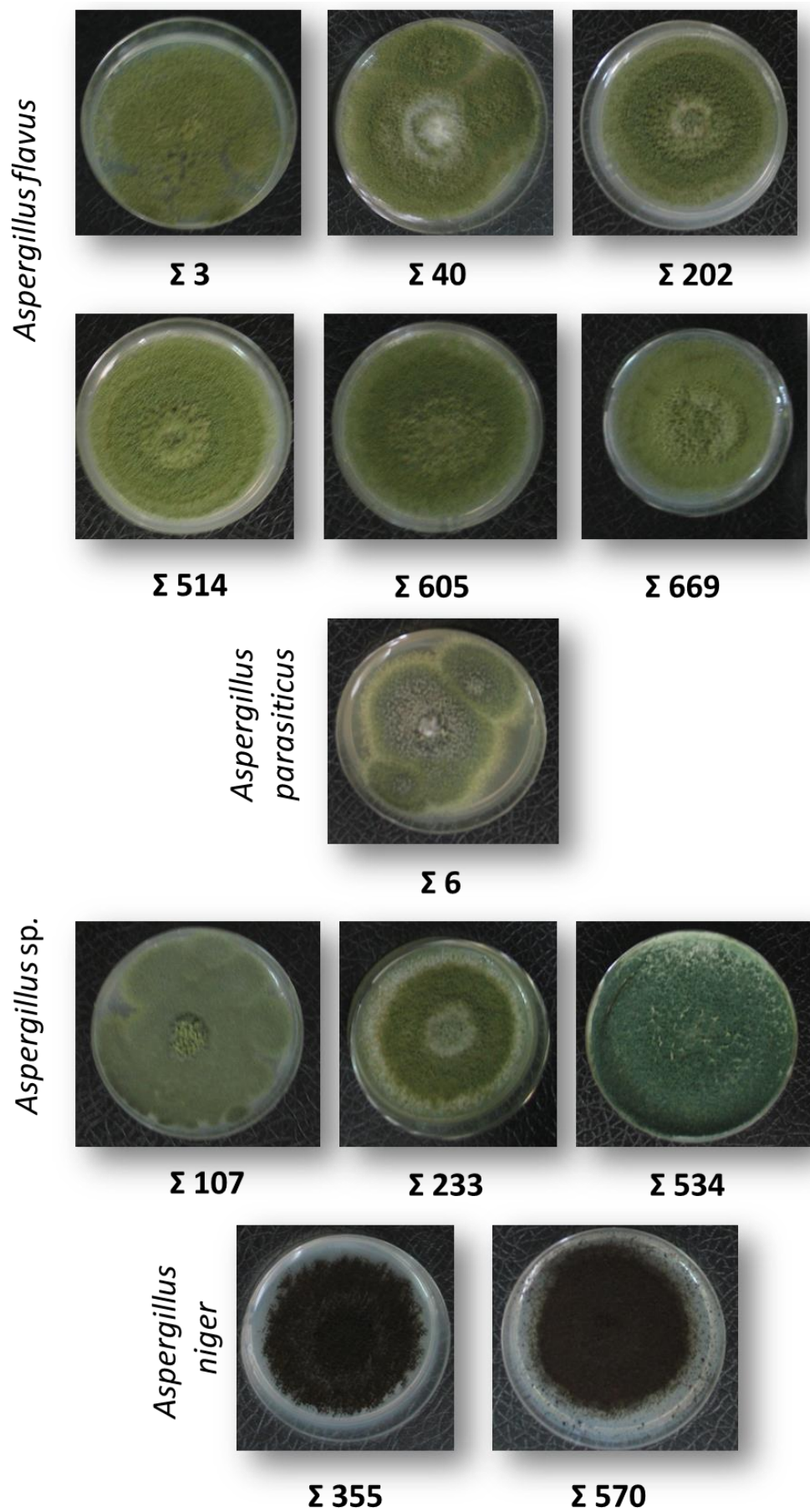


A 24/ Σ 237
Καβάλα

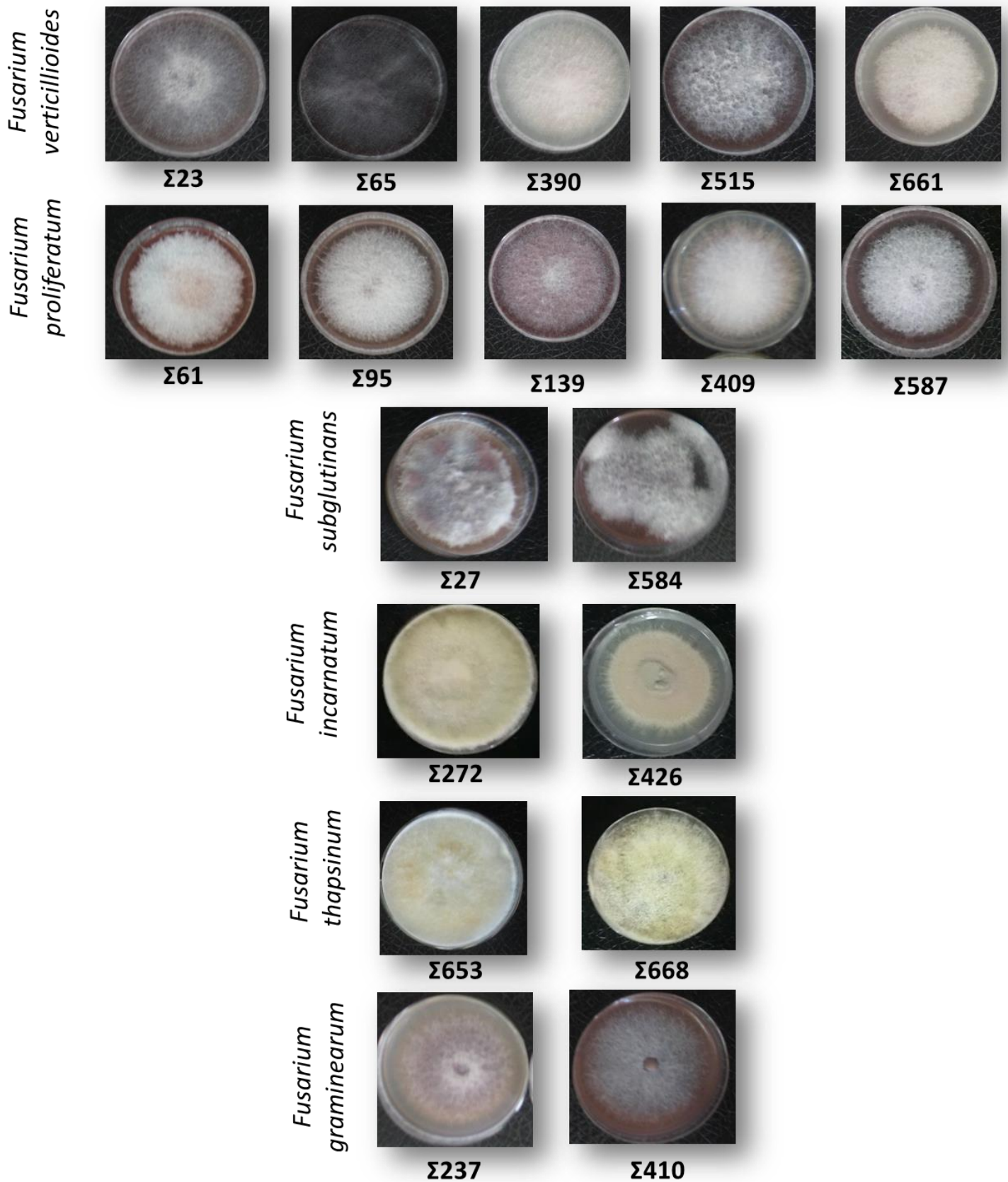


A 41/ Σ 410
Σέρρες

Εικόνα 85B. Σπάδικες αραβοσίτου από διάφορους ελληνικούς αγρούς από τους οποίους πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις μυκήτων του γένους *Fusarium* spp. (A= Αγρός, Σ= Στέλεχος).

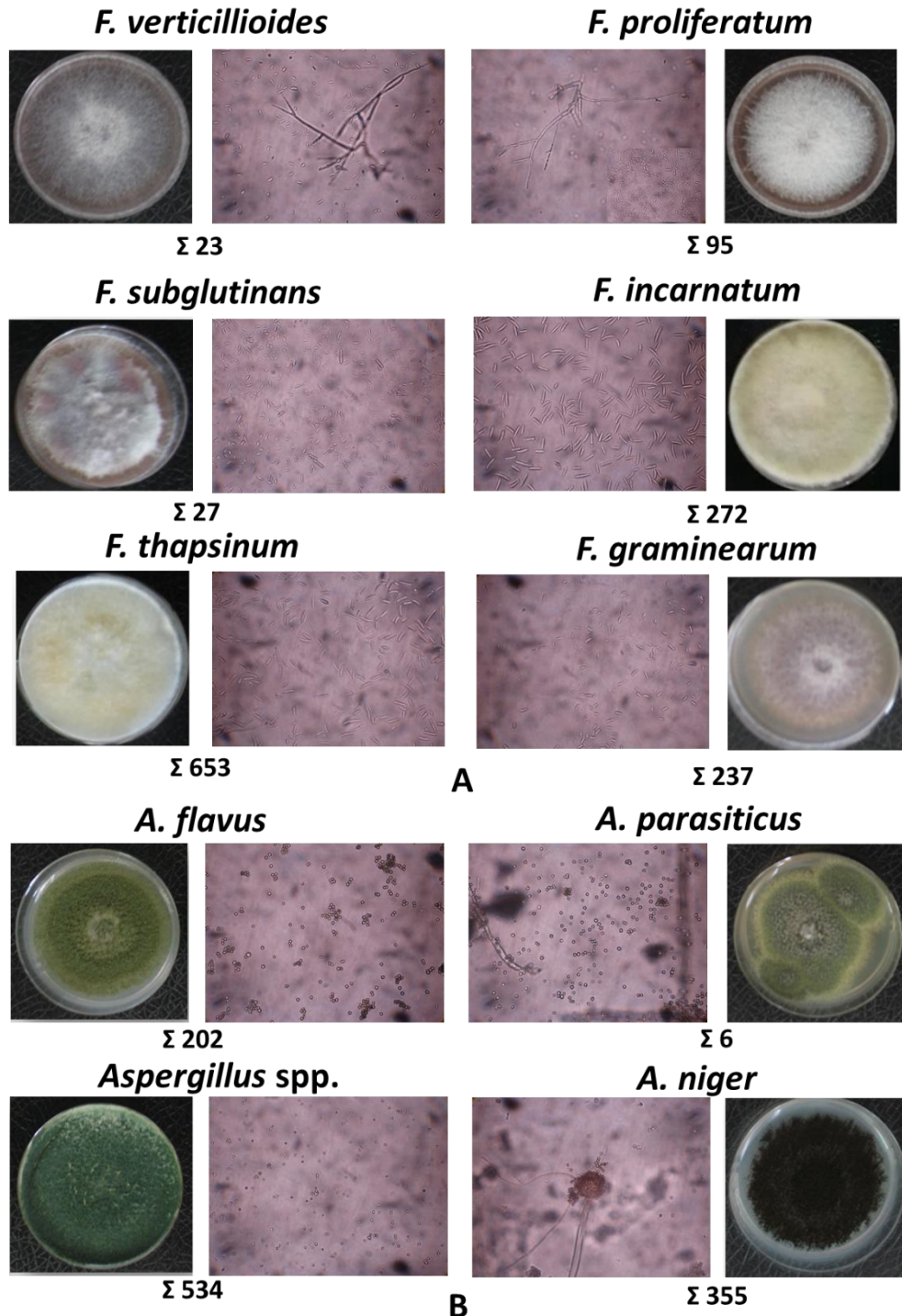


Εικόνα 86Α. Ανάπτυξη ελληνικών στελεχών *Aspergillus* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA.



Εικόνα 86B. Ανάπτυξη ελληνικών στελεχών *Fusarium* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA.

Στη συνέχεια πλήθος στελεχών εξετάστηκαν μικροσκοπικά αφού αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, και όσον αφορά τα στελέχη των φουζαρίων παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο μήκος των μακροκονιδίων και των μικροκονιδίων των μυκήτων. Πιο εμφανής διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στο *F. thapsinum* (Εικόνα 87 – Σ653) και *F. incarnatum* (Εικόνα 87 – Σ272) (με βάση τη μοριακή ταυτοποίηση που ακολούθησε), όπου παρουσίαζαν μεγαλύτερο μήκος στο μήκος των κονιδίων τους σε σχέση με τα άλλα είδη. Στους ασπεργίλλους η διαφοροποίηση δεν ήταν σημαντική μεταξύ των στελεχών σε μικροσκοπικό επίπεδο, ενώ εν γένει τόσο τα είδη των φουζαρίων, όσο και των ασπεργίλλων δεν διαχωρίζονται εύκολα και με ακρίβεια με μικροσκοπικές παρατηρήσεις (Εικόνα 87).



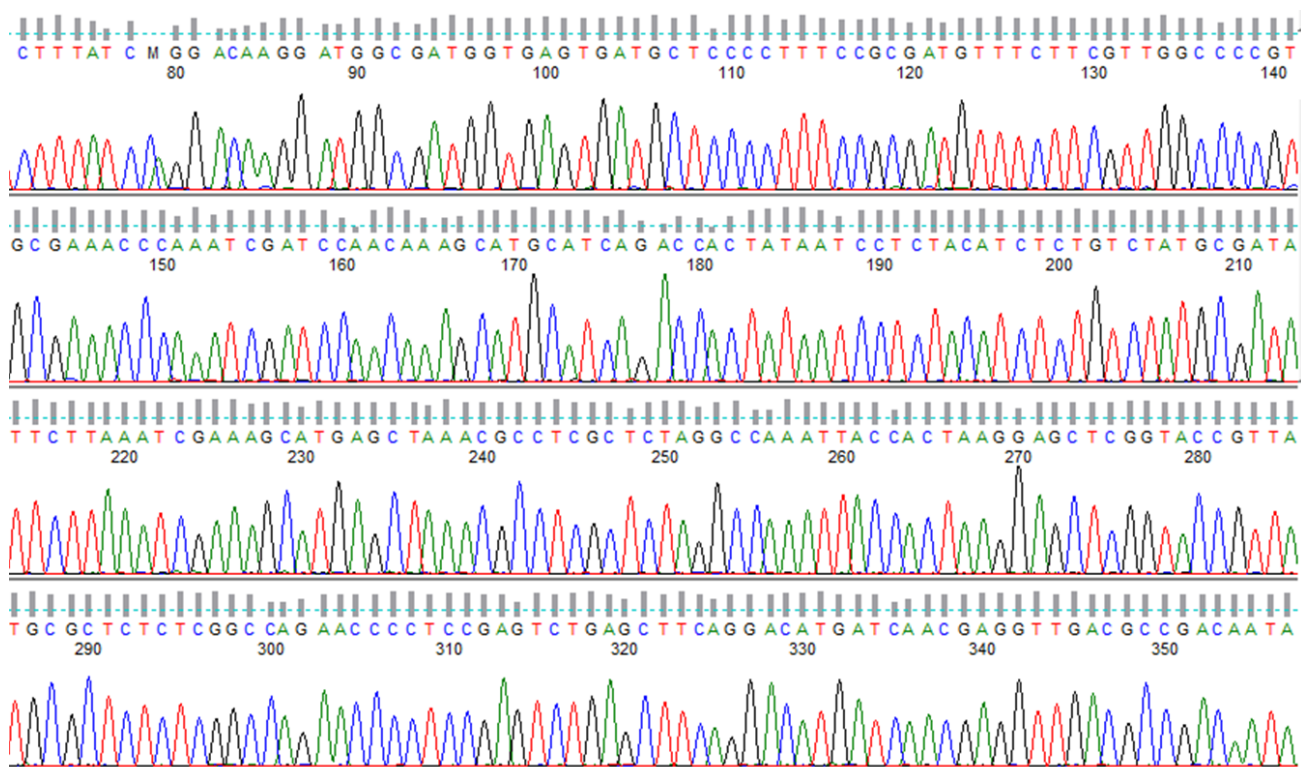
A

B

Εικόνα 87. Α. Μακροκονίδια και μικροκονίδια διαφόρων στελεχών ελληνικών απομονώσεων *Fusarium* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, Β. Κονίδια στελεχών ελληνικών απομονώσεων *Aspergillus* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA.

4.4.2 Πληθυσμιακή διακύμανση μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* spp. σε καλλιέργειες καλαμποκιού της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας

Τα στελέχη των μυκήτων που απομονώθηκαν, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό PDA για 5 ημέρες και συλλέχθηκαν κονίδια της κάθε απομόνωσης σε Glycerol stock ώστε να διατηρηθούν σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μοριακή ταυτοποίηση επιλεγμένων απομονώσεων με μορφολογικές διαφοροποιήσεις ώστε να επιβεβαιωθεί το είδος των μυκοτοξικογόνων μυκήτων. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν 150 στελέχη από τη Θεσσαλία και 150 στελέχη από τη Μακεδονία τα οποία επανακαλλιεργήθηκαν σε PDA ώστε να υπάρχει ικανή ποσότητα για εξαγωγή γενωματικού DNA (Παράγραφος 3.5.2.1). Στη συνέχεια στα επιλεγμένα στελέχη που απομονώθηκαν, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με PCR του γονιδίου της καλμοντουλίνης (CAM), του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) και του γονιδίου της ριβοσωμικής εσωτερικά μεταγραφόμενης περιοχής (ITS) (παράγραφος 3.5.2.2.). Πιο συγκεκριμένα, 190 στελέχη φουζαρίων και 20 στελέχη ασπεργίλλων ενισχύθηκαν με το γονίδιο CAM, 70 στελέχη φουζαρίων ενισχύθηκαν με το γονίδιο EF και 20 στελέχη ασπεργίλλων ενισχύθηκαν με το γονίδιο ITS. Τα στελέχη αυτά στάλθηκαν για αλληλούχιση και προέκυψαν τα χρωματογραφήματα των αλληλουχιών όπως φαίνεται στην Εικόνα 88 π.χ. για το Στέλεχος 392.



Εικόνα 88. Χρωματογράφημα του Στελέχους 392, στο οποίο είχε ενισχυθεί το γονίδιο της καλμοντουλίνης.

Μετά την αλληλούχιση των ενισχυμένων νουκλεοτιδικών περιοχών ακολούθησε BLAST ανάλυση (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ώστε να είναι δυνατή η μοριακή ταυτοποίηση των απομονωθέντων ειδών, όπου συγκεκριμένα π.χ. για το Στέλεχος 392, έδειξε ότι πρόκειται για *F. subglutinans* (Εικόνα 89).

Fusarium subglutinans strain M16084 calmodulin gene, partial cds

Sequence ID: [gb|KC964162.1](#) Length: 715 Number of Matches: 1

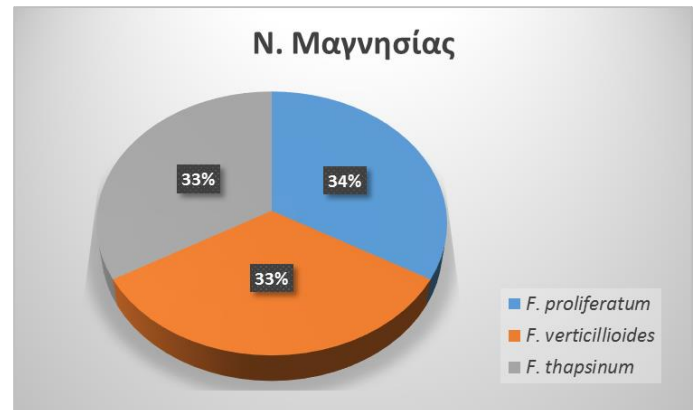
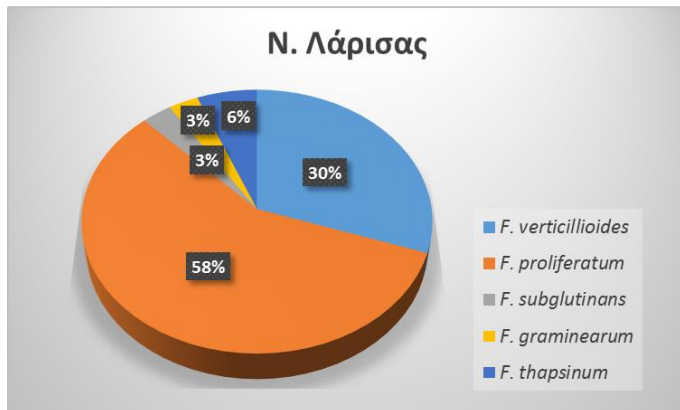
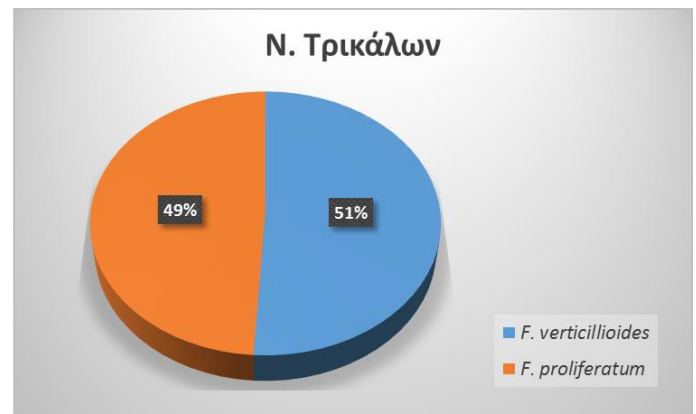
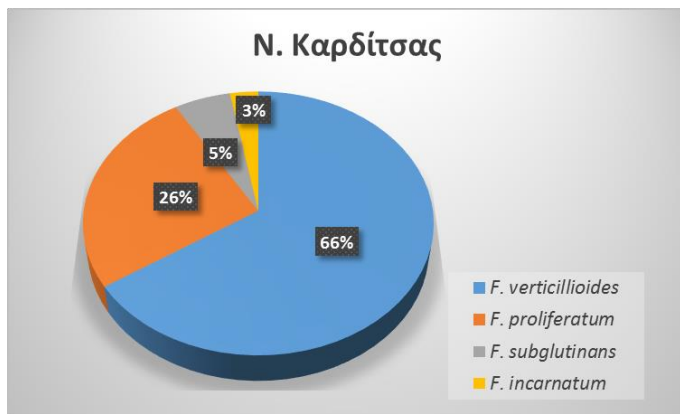
▶ See 1 more title(s)

Range 1: 1 to 714		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1267 bits(1404)	0.0	709/714(99%)	1/714(0%)	Plus/Plus	
Query 19	CTWTGTWTCGCCGCTTGTCTTAGCCGTGTCTTGCTAGAAGCTGTCGCTAACCTCTTTATC			78	
Sbjct 1	CTTTGTTTCGCCGCTTGTCTTAGCCGTGTCTTGCTAGAAGCTGTCGCTAACCTCTTTATC			60	
Query 79	M-GGACAAGGATGGCGATGGT GAGT GATGCTCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCC			137	
Sbjct 61	CAGGACAAGGATGGCGATGGT GAGT GATGCTCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCC			120	
Query 138	CCGTGCGAAACCCAAATCGATCCAACAAGCATGCATCAGACCATAAATCCTCTACAT			197	
Sbjct 121	CCGTGCGAAACCCAAATCGATCCAACAAGCATGCATCAGACCATAAATCCTCTACAT			180	
Query 198	CTCTGTCTATGCGATATTCTTAAATCGAAAGCATGAGCTAAACGCCCTCGCTTAGGCCAA			257	
Sbjct 181	CTCTGTCTATGCGATATTCTTAAATCGAAAGCATGAGCTAAACGCCCTCGCTTAGGCCAA			240	
Query 258	ATTACCACTAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCGGCCAGAACCCCTCCGAGTCT			317	
Sbjct 241	ATTACCACTAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCGGCCAGAACCCCTCCGAGTCT			300	
Query 318	GAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAATAACGGCACCATCGACTTTCT			377	
Sbjct 301	GAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAATAACGGCACCATCGACTTTCT			360	
Query 378	GGTGCGTAGTATTCCAAGGCGATCAGAGGACGGTCACTACTAACCACTGGGTAAGAGTT			437	
Sbjct 361	GGTGCGTAGTATTCCAAGGCGATCAGAGGACGGTCACTACTAACCACTGGGTAAGAGTT			420	
Query 438	CCTCACCATGATGGCAGCAGAGATGAAGGATACCGACTCCGAGGAGGAGATCCCGTGAAGC			497	
Sbjct 421	CCTCACCATGATGGCAGCAGAGATGAAGGATACCGACTCCGAGGAGGAGATCCCGTGAAGC			480	
Query 498	TTTCAAGGTGTTTCGACCGTGACAACAACGGTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGT			557	
Sbjct 481	TTTCAAGGTGTTTCGACCGTGACAACAACGGTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGT			540	
Query 558	CATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCACTGATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGC			617	
Sbjct 541	CATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCACTGATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGC			600	
Query 618	TGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCCTGAGATTAGATATAATACCAA			677	
Sbjct 601	TGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCCTGAGATTAGATATAATACCAA			660	
Query 678	CGTCCATACTGACAAGACCACAGACAACGAGTTTCGTCCTCAACTCATGATGCAAAA			731	
Sbjct 661	CGTCCATACTGACAAGACCACAGACAACGAGTTTCGTCCTCAACTCATGATGCAAAA			714	

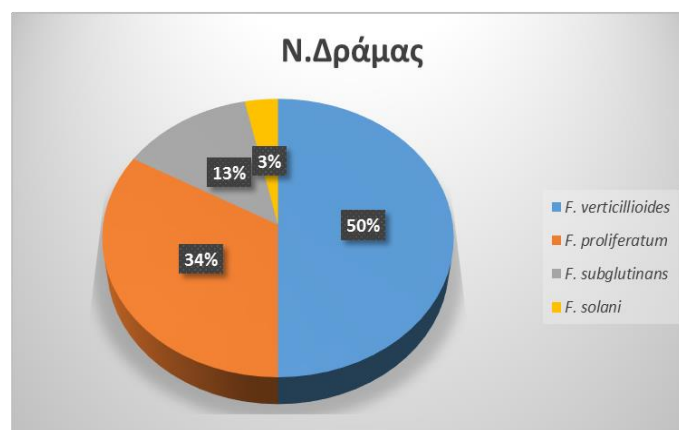
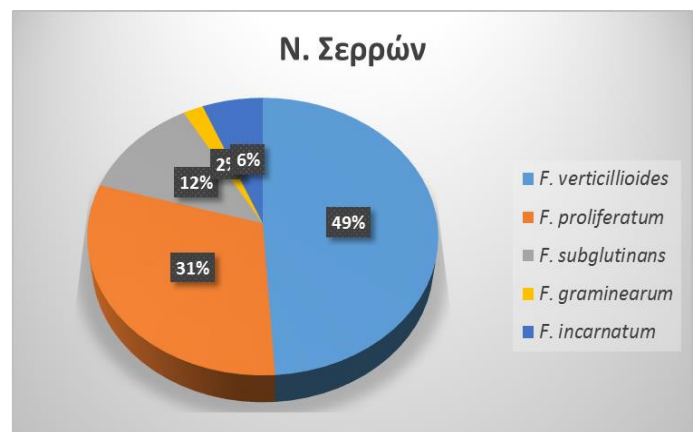
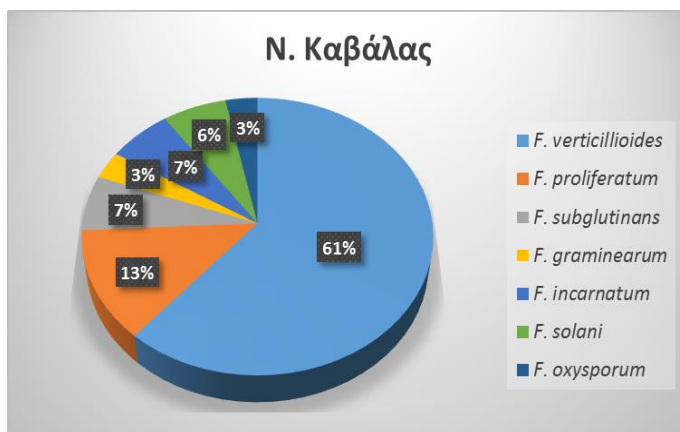
Εικόνα 89. Απεικόνιση της BLAST ανάλυσης του Στελέχους 392 με τη χρήση της νουκλεοτιδικής βάσης δεδομένων του NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Παράλληλα αξιολογήθηκε η πληθυσμιακή διακύμανση των φουζαρίων σε κάθε νομό της Θεσσαλίας (Εικόνα 90) και της Μακεδονίας (Εικόνα 91) (Πίνακας 2, 3) με καταμέτρηση των ειδών και προσδιορισμό του ποσοστού εμφάνισης κάθε είδους ανά νομό. Το είδος το οποίο κυριαρχεί σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι το *F. verticillioides* και ακολουθεί το *F. proliferatum*, ενώ τα υπόλοιπα είδη φουζαρίων παρουσιάζονται σε μικρότερα ποσοστά στους Νομούς της Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας.

Επίσης έγινε προσδιορισμός των ειδών των απομονώσεων 70 φουζαρίων και 60 ασπεργίλλων από τις προαναφερθείσες περιοχές, ενώ για τα συγκεκριμένα είδη αξιολογήθηκε και η παραγωγή φουμονισινών και αφλατοξινών αντίστοιχα (Πίνακας 4, 5, 6, 7).



Εικόνα 90. Πληθυσμιακή διακύμανση *Fusarium* spp. από την περιοχή της Θεσσαλίας.



Εικόνα 91. Πληθυσμιακή διακύμανση *Fusarium* spp. από την περιοχή της Μακεδονίας.

ΝΟΜΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	ΓΕΝΟΣ (Αριθμός απομονώσεων)	ΕΙΔΟΣ (Αριθμός απομονώσεων/είδος)
ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	44	<i>Fusarium</i> spp. (35)	<i>F. verticillioides</i> (23)
			<i>F. proliferatum</i> (9)
			<i>F. subglutinans</i> (2)
			<i>F. incarnatum</i> (1)
		<i>Aspergillus</i> spp. (8)	<i>A. flavus</i> (6)
			<i>A. parasiticus</i> (2)
ΤΡΙΚΑΛΩΝ	55	<i>Fusarium</i> spp. (51)	<i>F. verticillioides</i> (26)
			<i>F. proliferatum</i> (25)
		<i>Aspergillus</i> spp. (4)	<i>A. flavus</i> (4)
ΛΑΡΙΣΑΣ	35	<i>Fusarium</i> spp. (33)	<i>F. verticillioides</i> (10)
			<i>F. proliferatum</i> (19)
			<i>F. subglutinans</i> (1)
			<i>F. thapsinum</i> (2)
			<i>F. graminearum</i> (1)
		<i>Aspergillus</i> spp. (2)	<i>A. flavus</i> (1)
ΜΑΓΝΗΣΙΑ	7	<i>Fusarium</i> spp. (6)	<i>F. verticillioides</i> (2)
			<i>F. proliferatum</i> (2)
			<i>F. thapsinum</i> (2)
		<i>Aspergillus</i> spp. (1)	<i>A. flavus</i> (1)

Πίνακας 2 . Μοριακή ταυτοποίηση επιλεγμένων στελεχών *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. από την περιοχή της Θεσσαλίας και προσδιορισμός των ειδών τους.

ΝΟΜΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	ΓΕΝΟΣ (Αριθμός απομονώσεων)	ΕΙΔΟΣ (Αριθμός απομονώσεων/είδος)
ΚΑΒΑΛΑΣ	34	<i>Fusarium</i> spp. (28)	<i>F. verticillioides</i> (16)
			<i>F. proliferatum</i> (4)
			<i>F. subglutinans</i> (2)
			<i>F. incarnatum</i> (2)
			<i>F. solani</i> (2)
			<i>F. graminearum</i> (1)
			<i>F. oxysporum</i> (1)
		<i>Aspergillus</i> spp. (6)	<i>A. flavus</i> (6)
ΣΕΡΡΕΣ	55	<i>Fusarium</i> spp. (51)	<i>F. verticillioides</i> (24)
			<i>F. proliferatum</i> (15)
			<i>F. subglutinans</i> (6)
			<i>F. graminearum</i> (1)
			<i>F. incarnatum</i> (3)
		<i>Aspergillus</i> spp. (6)	<i>A. flavus</i> (5)
			<i>A. niger</i> (1)
ΔΡΑΜΑ	33	<i>Fusarium</i> spp. (33)	<i>F. verticillioides</i> (15)
			<i>F. proliferatum</i> (10)
			<i>F. subglutinans</i> (4)
			<i>F. solani</i> (1)
		<i>Aspergillus</i> spp. (3)	<i>A. flavus</i> (2)
			<i>A. niger</i> (1)

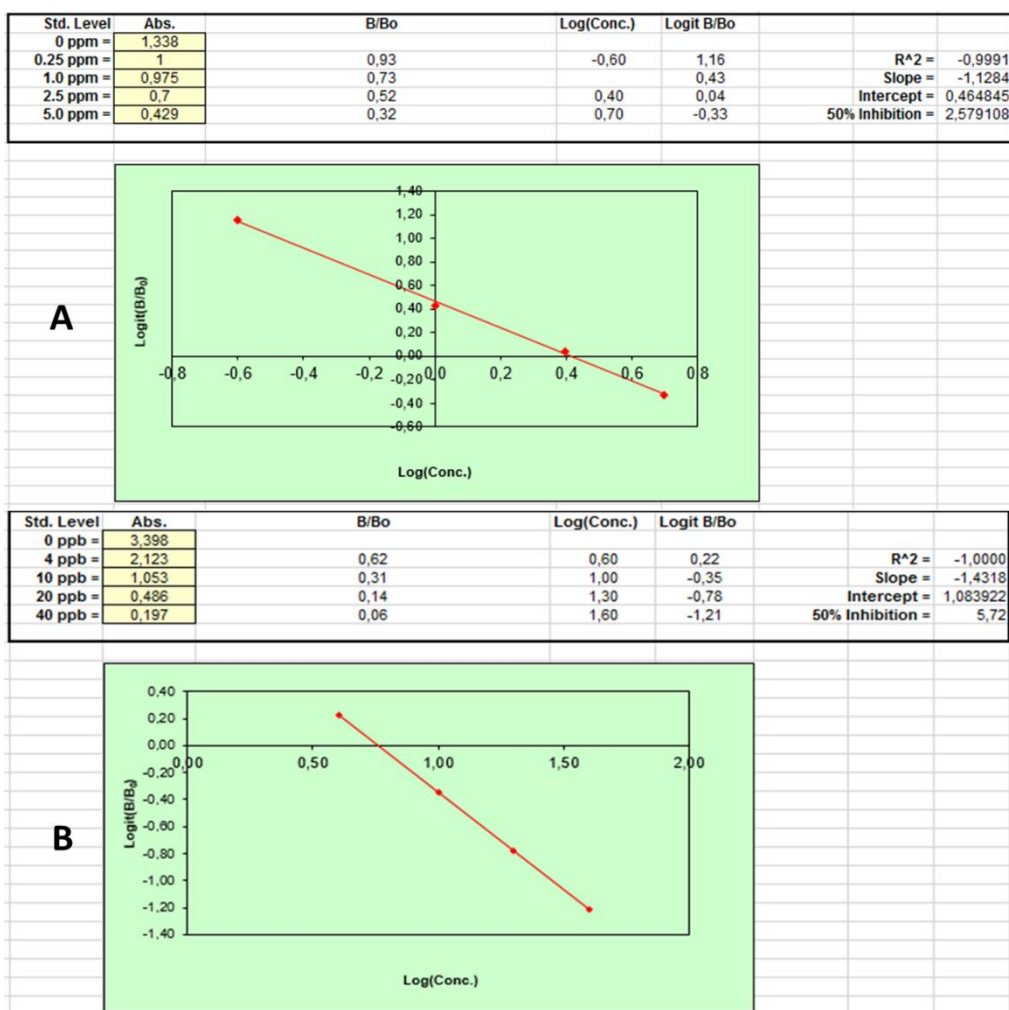
Πίνακας 3 . Μοριακή ταυτοποίηση επιλεγμένων στελεχών *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. από την περιοχή της Μακεδονίας και προσδιορισμός των ειδών τους.

4.4.3 Σύνθεση μυκοτοξικογόνων μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* spp. σε καλλιέργειες καλαμποκιού της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας

Παράλληλα με τη μοριακή ταυτοποίηση έγινε αξιολόγηση της μυκοτοξικογόνου ικανότητας 70 (40 εξετάστηκαν για παραγωγή φουμονισίνης και 30 για παραγωγή αφλατοξίνης) επιλεγμένων στελεχών από αγρούς της Θεσσαλίας και 60 (30 εξετάστηκαν για παραγωγή αφλατοξίνης και 30 για παραγωγή φουμονισίνης) επιλεγμένων στελεχών της Μακεδονίας του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* με τη χρήση ELISA (Πίνακας 4,5,6 και 7).

Για να εξετασθούν τα είδη του γένους *Aspergillus* ως προς την παραγωγή αφλατοξίνης (Κεντρικής και Βόρεια Ελλάδα), αναπτύχθηκαν σε ΜΕΑ (Malt Extract Agar) και ομογενοποιήθηκαν μετά από 10 ημέρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξαγωγή της τοξίνης (παράγραφος 3.4.1.) και ακολούθησε μέτρηση της τοξίνης σύμφωνα με το kit ανάλυσης AgraQuant® ELISA Aflatoxin (4-40 ppb) της Romer Labs (Εικόνα 93 και 94). Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς (Εικόνα 92).

Ανάλογη ήταν και η διαδικασία για τον προσδιορισμό της φουμονισίνης στα επιλεγμένα στελέχη του γένους *Fusarium* (Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας) τα οποία επίσης αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό ΜΕΑ (Malt Extract Agar) για 10 ημέρες. Όπως και για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών, ακολούθησε η διαδικασία εξαγωγής της τοξίνης και στην συνέχεια έγινε προσδιορισμός της φουμονισίνης με το kit ανάλυσης AgraQuant® ELISA Fumonisin (0,25-5 ppm) της Romer Labs (Εικόνα 95 και 96).



Εικόνα 92. Χαρακτηριστική καμπύλη αναφοράς A. για προσδιορισμό φουμονισινών και B. για προσδιορισμό αφλατοξινών.

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΓΡΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΤΟΞΙΝΗ (ppb)	ΕΙΔΟΣ
Ν. ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	A1	Σ.3	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A2	Σ.6	19	<i>Aspergillus parasiticus</i>
	A3	Σ.11	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A3	Σ.15	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A5	Σ.19	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A5	Σ.22	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A6	Σ.34	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A6	Σ.38	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A6	Σ.40	30	<i>Aspergillus flavus</i>
	A7	Σ.50	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A8	Σ.54	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
Ν. ΤΡΙΚΑΛΩΝ	A9	Σ.63	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A11	Σ.70	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A11	Σ.75	5	<i>Aspergillus sp.</i>
	A12	Σ.81	49	<i>Aspergillus sp.</i>
	A12	Σ.86	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A12	Σ.95	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A13	Σ.107	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A14	Σ.115	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A15	Σ.123	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
Ν. ΛΑΡΙΣΑΣ	A16	Σ.131	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A17	Σ.141	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A19	Σ.152	4	<i>Aspergillus flavus</i>
	A20	Σ.160	4	<i>Aspergillus sp.</i>
	A21	Σ.176	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A64	Σ.641	8	<i>Aspergillus flavus</i>
Ν. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	A66	Σ.649	4	<i>Aspergillus sp.</i>
	A68	Σ.669	4	<i>Aspergillus flavus.</i>
	A70	Σ.679	5	<i>Aspergillus sp.</i>
	A70	Σ.682	< ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>

Πίνακας 4 . Ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξινών από διάφορες απομονώσεις *Aspergillus* spp. από την περιοχή της Θεσσαλίας. Επισημαίνεται η μεγάλη παραλλακτικότητα της αφλατοξικογόνου ικανότητας των στελεχών. Το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου είναι 4 ppb.

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΓΡΟΙ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΤΟΞΙΝΗ (ppm)	ΕΙΔΟΣ
Ν. ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	A1	Σ1	7	<i>Fusarium</i> sp.
	A3	Σ9	87	<i>F. proliferatum</i>
	A5	Σ23	10	<i>F. verticillioides</i>
	A5	Σ24	9	<i>Fusarium</i> sp.
	A5	Σ26	21	<i>F. verticillioides</i>
	A5	Σ27	8	<i>F. subglutinans</i>
	A6	Σ35	48	<i>F. proliferatum</i>
	A6	Σ43	33	<i>F. verticillioides</i>
Ν. ΤΡΙΚΑΛΩΝ	A9	Σ56	7	<i>F. verticillioides</i>
	A9	Σ61	51	<i>F. proliferatum</i>
	A9	Σ62	24	<i>Fusarium</i> sp.
	A9	Σ63	95	<i>F. proliferatum</i>
	A10	Σ65	73	<i>F. verticillioides</i>
	A11	Σ68	6	<i>Fusarium</i> sp.
	A11	Σ69	31	<i>Fusarium</i> sp.
	A11	Σ77	9	<i>F. verticillioides</i>
	A12	Σ78	30	<i>F. verticillioides</i>
	A12	Σ95	5	<i>F. proliferatum</i>
	A13	Σ102	7	<i>F. verticillioides</i>
	A15	Σ120	19	<i>F. proliferatum</i>
	A16	Σ130	5	<i>Fusarium</i> sp.
	A16	Σ133	7	<i>F. proliferatum</i>
	A16	Σ138	22	<i>F. proliferatum</i>
	A16	Σ139	4	<i>F. proliferatum</i>
Ν. ΛΑΡΙΣΑΣ	A17	Σ141	2	<i>Fusarium</i> sp.
	A18	Σ144	11	<i>Fusarium</i> sp.
	A20	Σ160	26	<i>F. proliferatum</i>
	A20	Σ165	22	<i>F. proliferatum</i>
	A64	Σ645	22	<i>F. verticillioides</i>
	A66	Σ646	91	<i>F. proliferatum</i>
	A66	Σ653	22	<i>F. thapsinum</i>
	A66	Σ656	17	<i>Fusarium</i> sp.
	A67	Σ657	43	<i>Fusarium</i> sp.
Ν. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	A68	Σ668	18	<i>F. thapsinum</i>
	A68	Σ670	22	<i>Fusarium</i> sp.
	A69	Σ674	38	<i>Fusarium</i> sp.
	A69	Σ673	94	<i>F. proliferatum</i>
	A70	Σ677	21	<i>Fusarium</i> sp.
	A70	Σ685	38	<i>Fusarium</i> sp.

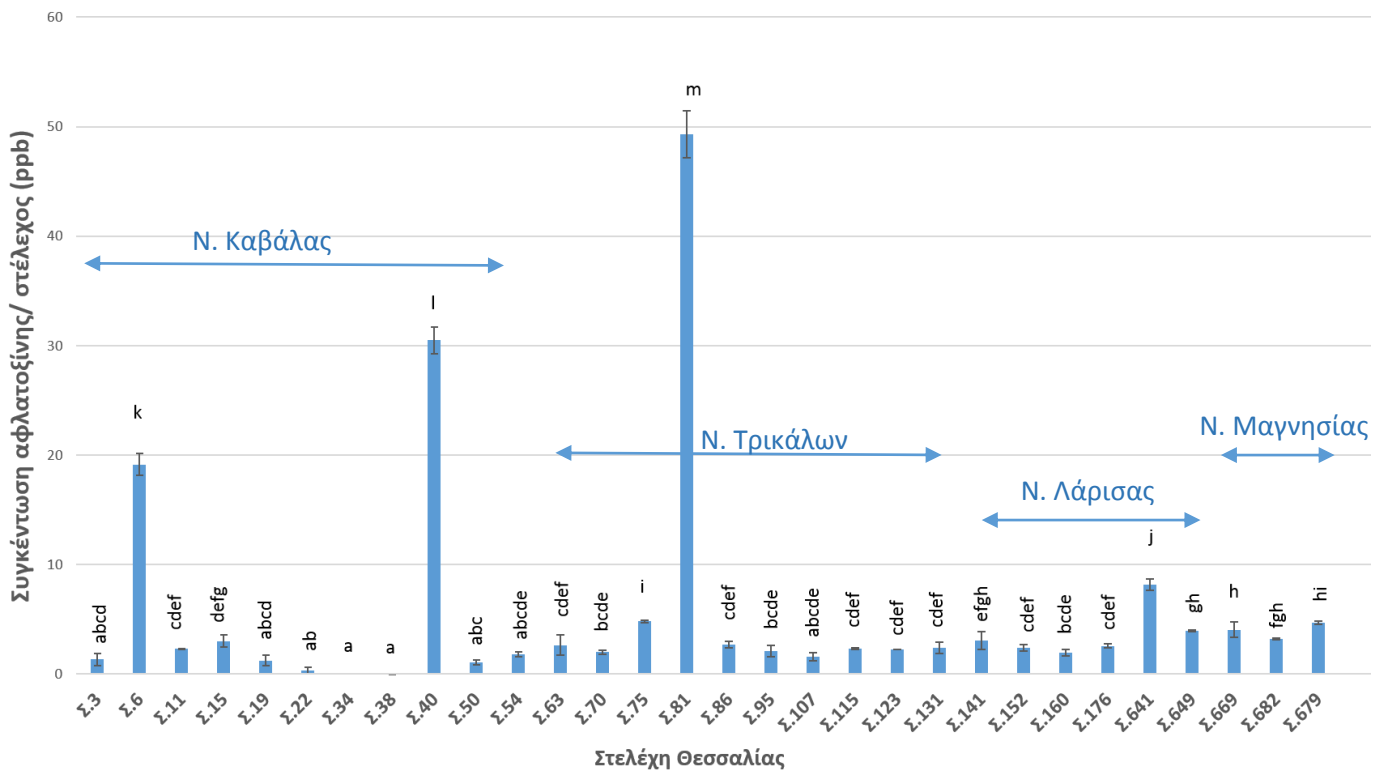
Πίνακας 5 . Ποσοτικός προσδιορισμός φουμονισινών από διάφορες απομονώσεις *Fusarium* spp. από την περιοχή της Θεσσαλίας. Επισημαίνεται η μεγάλη παραλλακτικότητα της ικανότητας των στελεχών να παράγουν φουμονισίνες. Το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου είναι 0.25 ppm.

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΓΡΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΤΟΞΙΝΗ (ppb)	ΕΙΔΟΣ
Ν. ΚΑΒΑΛΑΣ	A23	Σ202	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A23	Σ214	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A24	Σ220	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A25	Σ233	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A30	Σ287	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A32	Σ300	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A51	Σ512	7	<i>Aspergillus sp.</i>
	A51	Σ514	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A52	Σ528	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
Ν. ΣΕΡΡΩΝ	A35	Σ326	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A35	Σ327	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A35	Σ328	17	<i>Aspergillus flavus</i>
	A36	Σ341	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A37	Σ355	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus niger</i>
	A40	Σ405	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A46	Σ476	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A50	Σ500	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A50	Σ503	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
Ν. ΔΡΑΜΑΣ	A53	Σ534	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A54	Σ543	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A55	Σ552	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A55	Σ554	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A57	Σ570	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus niger</i>
	A58	Σ593	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A58	Σ594	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A58	Σ605	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A59	Σ613	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A60	Σ621	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus sp.</i>
	A60	Σ622	<ορίου ανίχνευσης	<i>Aspergillus flavus</i>
	A61	Σ.632	69	<i>Aspergillus sp.</i>

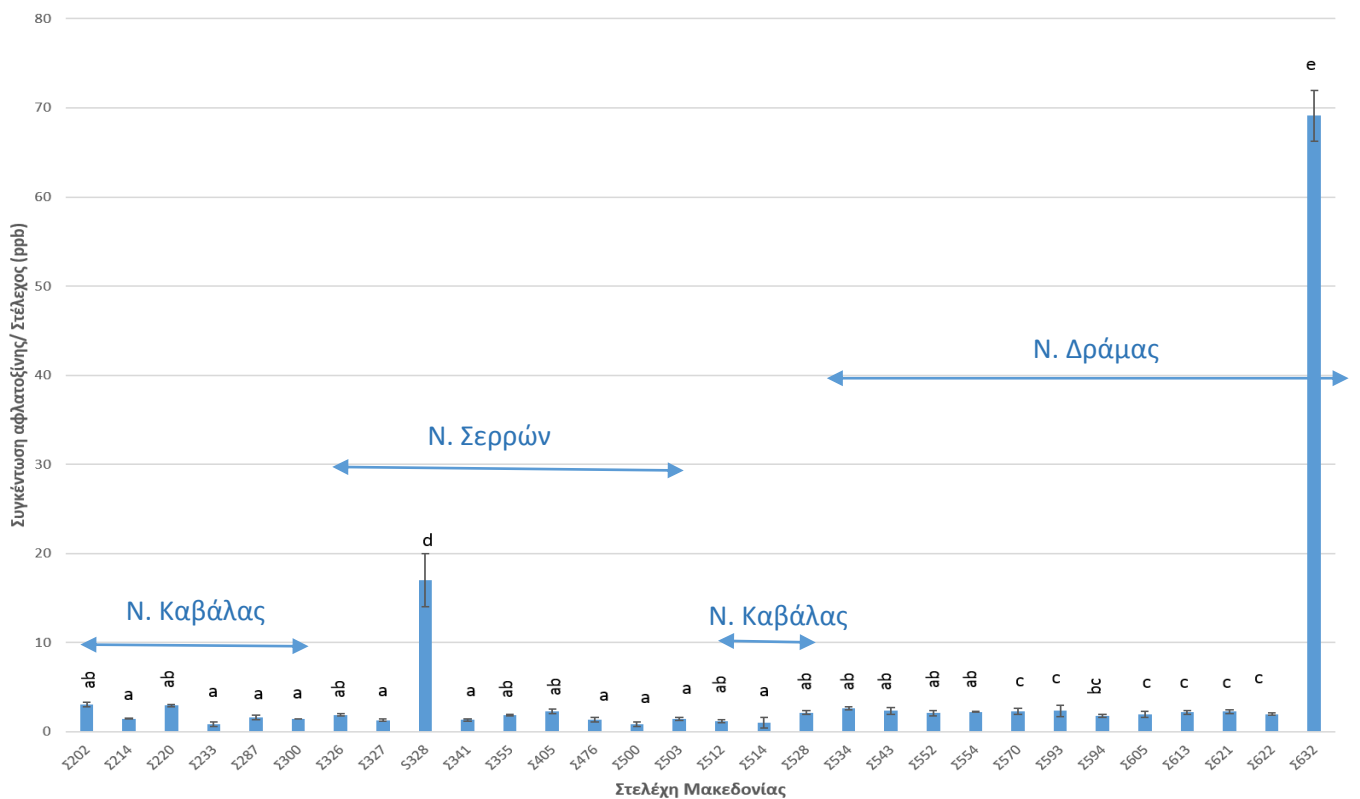
Πίνακας 6. Ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξινών από διάφορες απομονώσεις *Aspergillus spp.* από την περιοχή της Μακεδονίας. Επισημαίνεται η μεγάλη παραλλακτικότητα της αφλατοξικογόνου ικανότητας των στελεχών. Το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου είναι 4 ppb.

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΓΡΟΙ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΤΟΞΙΝΗ (ppm)	ΕΙΔΟΣ
Ν. ΚΑΒΑΛΑΣ	A22	Σ191	<ορίου ανίχνευσης	<i>Fusarium sp.</i>
	A24	Σ223	1	<i>Fusarium sp.</i>
	A24	Σ221	<ορίου ανίχνευσης	<i>Fusarium sp.</i>
	A24	Σ228	<ορίου ανίχνευσης	<i>Fusarium sp.</i>
	A29	Σ272	<ορίου ανίχνευσης	<i>F. incarnatum</i>
	A32	Σ294	<ορίου ανίχνευσης	<i>F. incarnatum</i>
	A33	Σ311	<ορίου ανίχνευσης	<i>Fusarium sp.</i>
	A51	Σ511	1	<i>Fusarium sp.</i>
	A51	Σ515	1	<i>F. verticillioides</i>
Ν. ΣΕΡΡΩΝ	A37	Σ352	1	<i>Fusarium sp.</i>
	A44	Σ436	1	<i>F. verticillioides</i>
	A37	Σ356	<ορίου ανίχνευσης	<i>F. proliferatum</i>
	A38	Σ372	2	<i>F. proliferatum</i>
	A40	Σ398	2	<i>F. verticillioides</i>
	A41	Σ414	11	<i>Fusarium sp.</i>
	A46	Σ468	1	<i>Fusarium sp.</i>
	A46	Σ471	38	<i>Fusarium sp.</i>
	A50	Σ494	1	<i>F. proliferatum</i>
Ν. ΔΡΑΜΑΣ	A55	Σ553	19	<i>F. proliferatum</i>
	A56	Σ558	1	<i>F. verticillioides</i>
	A57	Σ565	1	<i>F. proliferatum</i>
	A58	Σ575	11	<i>F. proliferatum</i>
	A58	Σ587	8	<i>F. proliferatum</i>
	A58	Σ592	6	<i>F. verticillioides</i>
	A58	Σ604	1	<i>F. verticillioides</i>
	A59	Σ508	37	<i>Fusarium sp.</i>
	A59	Σ611	6	<i>F. verticillioides.</i>
	A60	Σ620	1	<i>F. verticillioides</i>
	A62	Σ638	2	<i>F. verticillioides</i>

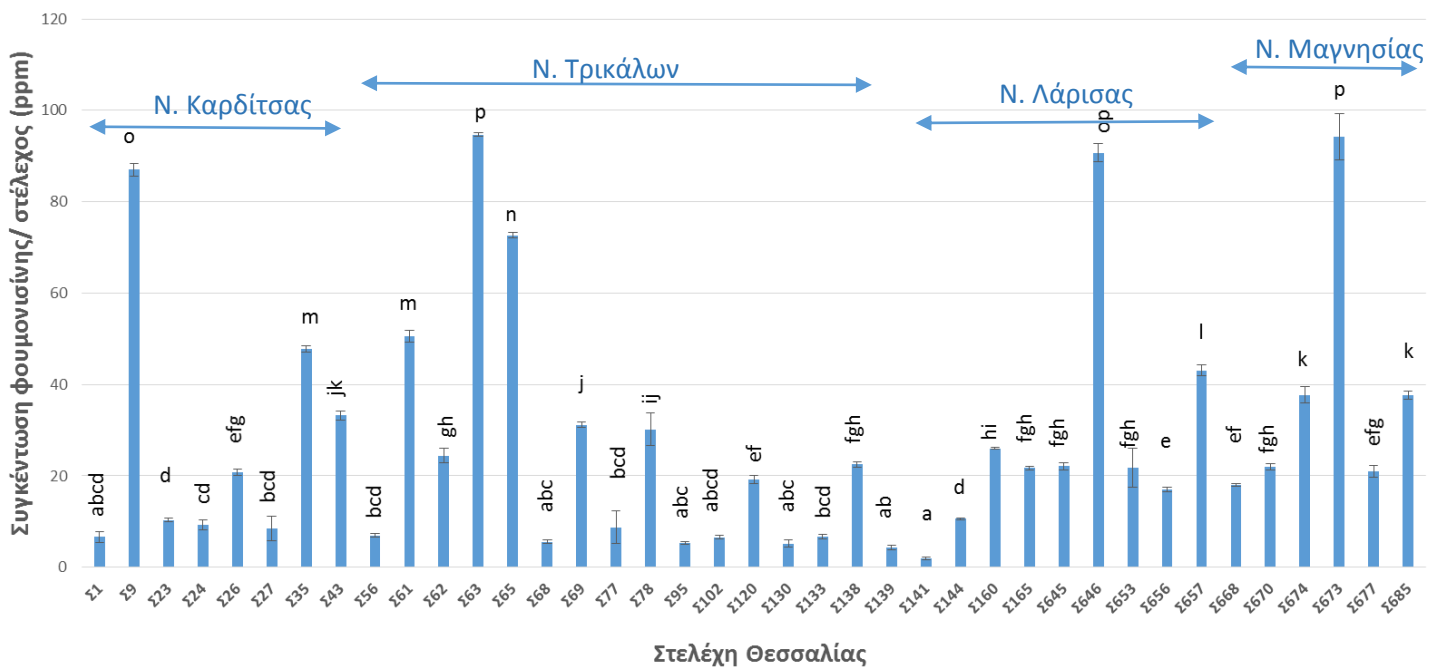
Πίνακας 7. Ποσοτικός προσδιορισμός φουμονισινών από διάφορες απομονώσεις *Fusarium spp.* από την περιοχή της Μακεδονίας. Επισημαίνεται η μεγάλη παραλλακτικότητα της ικανότητας των στελεχών να παράγουν φουμονισίνες. Το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου είναι 0.25 ppm.



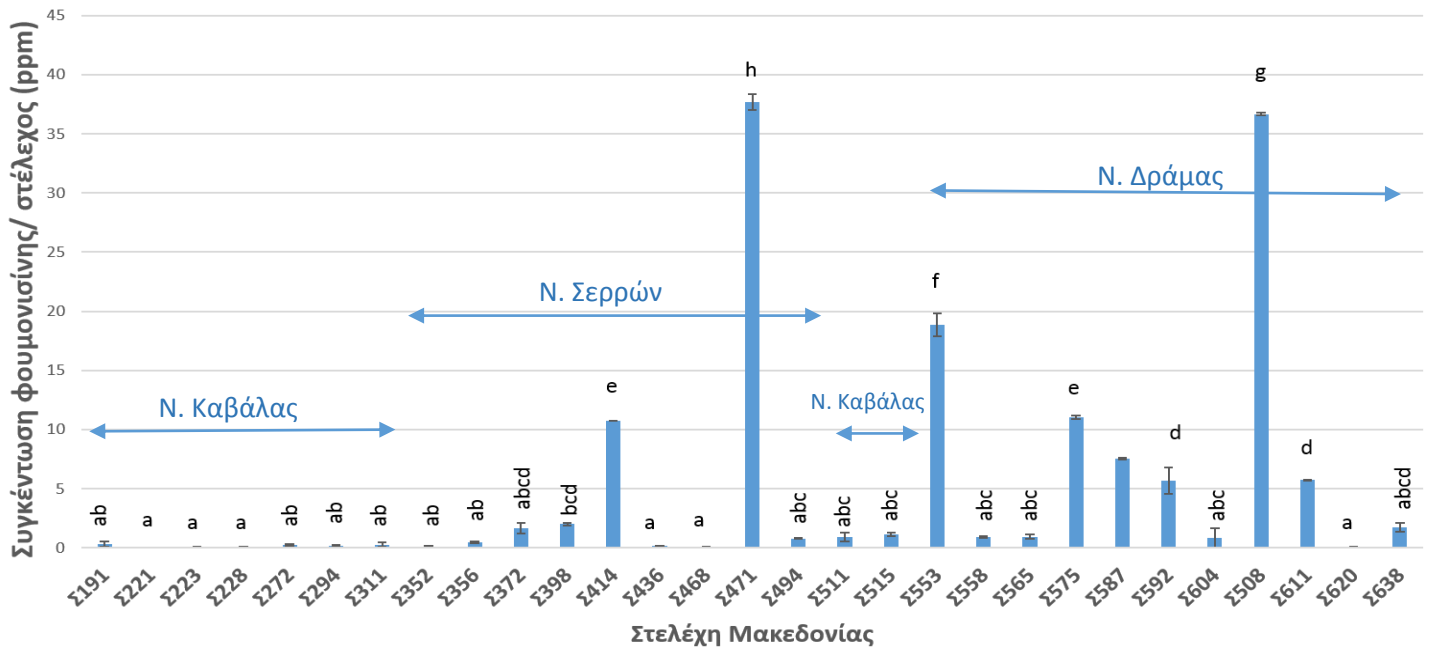
Εικόνα 93. Μέτρηση της παραγόμενης αφλατοξίνης από συγκεκριμένα στελέχη της Θεσσαλίας που προκαλείται από μύκητες του γένους *Aspergillus* spp. του Πίνακα 4. Στην κάθε μέτρηση σημειώνεται το τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0, 05$).



Εικόνα 94. Μέτρηση της παραγόμενης αφλατοξίνης από συγκεκριμένα στελέχη της Μακεδονίας που προκαλείται από μύκητες του γένους *Aspergillus* spp. του Πίνακα 6. Στην κάθε μέτρηση σημειώνεται το τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0, 05$).



Εικόνα 95. Μέτρηση της παραγόμενης φουμονισίνης από συγκεκριμένα στελέχη της Θεσσαλίας που προκαλείται από μύκητες του γένους *Fusarium* spp. του Πίνακα 5. Στην κάθε μέτρηση σημειώνεται το τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0,05$).



Εικόνα 96. Μέτρηση της παραγόμενης φουμονισίνης από συγκεκριμένα στελέχη της Μακεδονίας που προκαλείται από μύκητες του γένους *Fusarium* spp. του Πίνακα 7. Στην κάθε μέτρηση σημειώνεται το τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0,05$).

Τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης (Πίνακες 2 και 3) και της ανάλυσης φουμονισινών και αφλατοξινών σε διάφορα στελέχη (Πίνακες 4-7 και Εικόνες 93-96), έδειξαν για πρώτη φορά στην Ελλάδα, ότι σε όλους τους νομούς της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας επικρατούν τα ιδιαίτερα μυκοτοξικογόνα είδη *F. verticillioides*, *F. proliferatum* και *A. flavus* και *A. parasiticus* γεγονός που εξηγεί και τα ποσοστά μολύνσεων με φουμονισίνες και με αφλατοξίνες σε ορισμένους Ελληνικούς αγρούς.

Στο Ν. Καρδίτσας, όπου οι μέσες τιμές φουμονισινών στους αγρούς 1-8 κυμάνθηκαν από 0-2 ppm (τιμές κάτω των ορίων της Ε.Ε. για καλαμπόκι που προορίζεται για ζωοτροφή) , κυριαρχούσε το *F. verticillioides* σε ποσοστό 66%, ενώ τα στελέχη Σ23, Σ26 και Σ43 που απομονώθηκαν από το Ν. Καρδίτσας και είναι ταυτοποιημένα ως *F. verticillioides*, παρήγαγαν φουμονισίνη 10, 21 και 33 ppm αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι αν και τα μεμονωμένα ποσά φουμονισινών ήταν αρκετά υψηλά, λόγω της χαμηλής έντασης της ασθένειας στο νομό αυτό (15 % κατά μέσο όρο), η συνολική ανιχνεύσιμη φουμονισίνη περιορίζεται σημαντικά. Όσον αφορά τις αφλατοξίνες στο νομό αυτό, οι τιμές κυμάνθηκαν από 0- 146 ppb (ανώτατο όριο αφλατοξινών για ζωοτροφή 20 ppb), ενώ το είδος που κυριαρχούσε ήταν ο *A. flavus* με το Σ40 που απομονώθηκε από τον αγρό 6 (που παρουσίασε συνολική τιμή αφλατοξίνης 139 ppb), να παράγει 30 ppb αφλατοξίνης.

Στο Ν. Τρικάλων, οι μέσες τιμές φουμονισινών στους αγρούς 9-16 κυμάνθηκαν από 0-2 ppm (τιμές κάτω των ορίων της Ε.Ε. για καλαμπόκι που προορίζεται για ζωοτροφή), ενώ ήταν σχεδόν ίση η κατανομή του *F. verticillioides* με ποσοστό 51% και του *F. proliferatum* με ποσοστό 49 %. Τα στελέχη Σ65 και Σ78 που απομονώθηκαν από το Ν. Τρικάλων και είναι ταυτοποιημένα *F. verticillioides*, παρήγαγαν φουμονισίνη 73 και 30 ppm αντίστοιχα, ενώ τα στελέχη Σ61, Σ63, Σ120 και Σ138 που είναι ταυτοποιημένα ως *F. proliferatum* παρήγαγαν φουμονισίνη 51, 95, 19 και 22 ppm αντίστοιχα (ανώτατο όριο φουμονισινών για ζωοτροφή 60 ppm). Όσον αφορά τις αφλατοξίνες στο νομό αυτό, οι τιμές κυμάνθηκαν από 0- 15 ppb, και το είδος που κυριαρχούσε ήταν ο *A. flavus*. Τα ποσά των τοξινών ανά στέλεχος ήταν όμως σχετικά χαμηλά γεγονός που δείχνει ότι πρόκειται για μη- τοξικογόνα στελέχη του μύκητα, κάτι που θα μπορούσε να δικαιολογήσει τις χαμηλές τιμές αφλατοξινών που παρατηρήθηκαν στους αγρούς αυτούς.

Στο Ν. Λάρισας, οι μέσες τιμές φουμονισινών στους αγρούς 17-21 και 63-67 κυμάνθηκαν από 1-8 ppm, ενώ κυριαρχούσε με ποσοστό 58 % το *F. proliferatum*, και με ποσοστό 30 % το *F. verticillioides*. Τα στελέχη Σ160, Σ165 και Σ646 που είναι ταυτοποιημένα ως *F. proliferatum* παρήγαγαν υψηλές τιμές φουμονισίνης 26, 22 και 91 ppm γεγονός που σε συνδυασμό και με την αυξημένη ένταση της ασθένειας (περίπου στο 30% στο Ν. Λάρισας) εξηγεί και τη συνολική αυξημένη τιμή των φουμονισινών. Όσον αφορά τις αφλατοξίνες στο νομό αυτό, οι τιμές κυμάνθηκαν από 0- 57 ppb (> του ορίου της Ε.Ε. για τις ζωοτροφές), ενώ το είδος που κυριαρχούσε ήταν ο *A. flavus*.

Στο Ν. Μαγνησίας, οι μέσες τιμές φουμονισινών στους αγρούς 68-70 κυμάνθηκαν από 2-56 ppm, ενώ υπήρχε ισοκατανομή των *F. proliferatum*, *F. verticillioides* και *F. thapsinum*. Το στέλεχος Σ668 το οποίο είναι ταυτοποιημένο ως *F. thapsinum* παρήγαγε φουμονισίνη 18 ppm, ενώ το στέλεχος Σ673, το οποίο απομονώθηκε από τον αγρό 69 (ο οποίος είχε συνολική τιμή φουμονισινών 56ppm) και είναι ταυτοποιημένο ως *F. proliferatum* παρήγαγε φουμονισίνη 94 ppm. Όσον αφορά τις αφλατοξίνες του Ν. Μαγνησίας , οι τιμές κυμάνθηκαν από 5-25 ppb (> του ορίου της Ε.Ε. για τις ζωοτροφές), ενώ το είδος που κυριαρχούσε και πάλι ήταν ο *A. flavus*.

Στη Μακεδονία, στο Ν. Καβάλας οι μέσες τιμές φουμονισινών στους αγρούς 22-34 και 51- 52 κυμάνθηκαν από 2-101 ppm (> από το ανώτατο όριο της Ε.Ε. για παραγωγή ζωοτροφών) με το *F. verticillioides* να κυριαρχεί και πάλι σε ποσοστό 61%, ενώ τα είδη *F. incarnatum*, *F. solani*, *F. graminearum* και *F. oxysporum* έδειξαν να μην έχουν την ικανότητα βιοσύνθεσης φουμονισινών. Οι αφλατοξίνες στον Ν. Καβάλας ήταν 2-20 ppb, αλλά κανένα από τα εξετασθέντα στελέχη δεν έδειξε υψηλά ποσοστά αφλατοξίνης.

Στο Ν. Σερρών οι μέσες τιμές φουμονισινών στους αγρούς 35-50 κυμάνθηκαν από 0-33 ppm (< από το ανώτατο όριο της Ε.Ε. για ζωοτροφές) με το *F. verticillioides* να κυριαρχεί σε ποσοστό 49%, το *F. proliferatum* σε ποσοστό 31% και το *F. subglutinans* σε ποσοστό 12%. Κανένα από τα ταυτοποιημένα στελέχη δεν έδειξε

να έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης φουμονισινών, ενώ το Σ471 (που ακόμα δεν είναι επίσημα ταυτοποιημένο) παρήγαγε φουμονισίνη 38 ppm. Οι αφλατοξίνες στον Ν. Σερρών ήταν 0-29 ppb (όριο = 20 ppb για ζωοτροφές), με τον *A. flavus* να κυριαρχεί ως είδος στις απομονώσεις, και με το Σ328 να παράγει 17 ppb αφλατοξίνη.

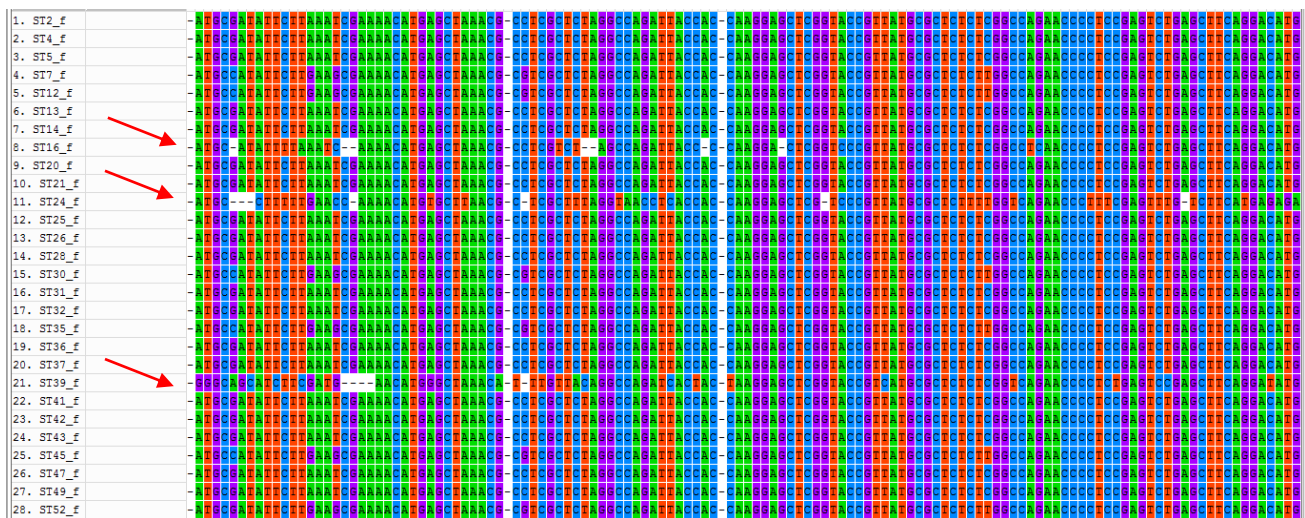
Στο Ν. Δράμας οι μέσες τιμές φουμονισινών στους αγρούς 53-62 κυμάνθηκαν από 4-38 ppm ανά αγρό (< από το ανώτατο όριο της Ε.Ε. για ζωοτροφές) με το *F. verticillioides* να κυριαρχεί σε ποσοστό 50%, το *F. proliferatum* σε ποσοστό 34% και το *F. subglutinans* σε ποσοστό 13%. Από τα ταυτοποιημένα στελέχη, το Σ553, το Σ575 και το Σ587, τα οποία είναι *F. proliferatum* έδειξαν να έχουν την ικανότητα βιοσύνθεσης φουμονισινών, με τιμές 19, 11 και 8 ppm αντίστοιχα. Οι αφλατοξίνες στον Ν. Δράμας κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα από 0-20 ppb (όριο = 20 ppb για ζωοτροφές), με τον *A. flavus* να κυριαρχεί ως είδος στις απομονώσεις, αλλά κανένα στέλεχος απ' αυτά να μην είναι τοξικογόνο, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τις χαμηλές τιμές αφλατοξίνης των αγρών αυτών.

Εν γένει τα περισσότερα είδη *Fusarium* spp. που εξετάστηκαν είχαν την ικανότητα βιοσύνθεσης φουμονισινών με πιο υψηλά επίπεδα να παρατηρούνται από το είδος *F. verticillioides* και *F. proliferatum*, ενώ από τους Ασπέργιλλους που εξετάστηκαν το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν μη-τοξικογόνα στελέχη του μύκητας *A. flavus*.

4.5 Φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων των μυκήτων *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.* από αγρούς Θεσσαλίας και Μακεδονίας

Τα στελέχη των ελληνικών απομονώσεων των μυκήτων του γένους *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.* αφού απομονώθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3, αναπτύχθηκαν εκ νέου σε θρεπτικό υπόστρωμα για να γίνει εξαγωγή γενωματικού DNA από αυτά (παράγραφος 3.5). Στη συνέχεια ακολούθησε ενίσχυση των προϊόντων με τη μέθοδο της PCR ώστε να είναι δυνατή η αλληλούχισή τους.

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν υπέστησαν επεξεργασία, καθώς αφαιρέθηκαν από την αρχή και το τέλος τμήματα τους, ώστε να είναι δυνατή η στοίχιση αυτών (alignment) με τη χρήση του προγράμματος MEGA6 (παράγραφος 3.6) (Εικόνα 97). Ως αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας ήταν η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.

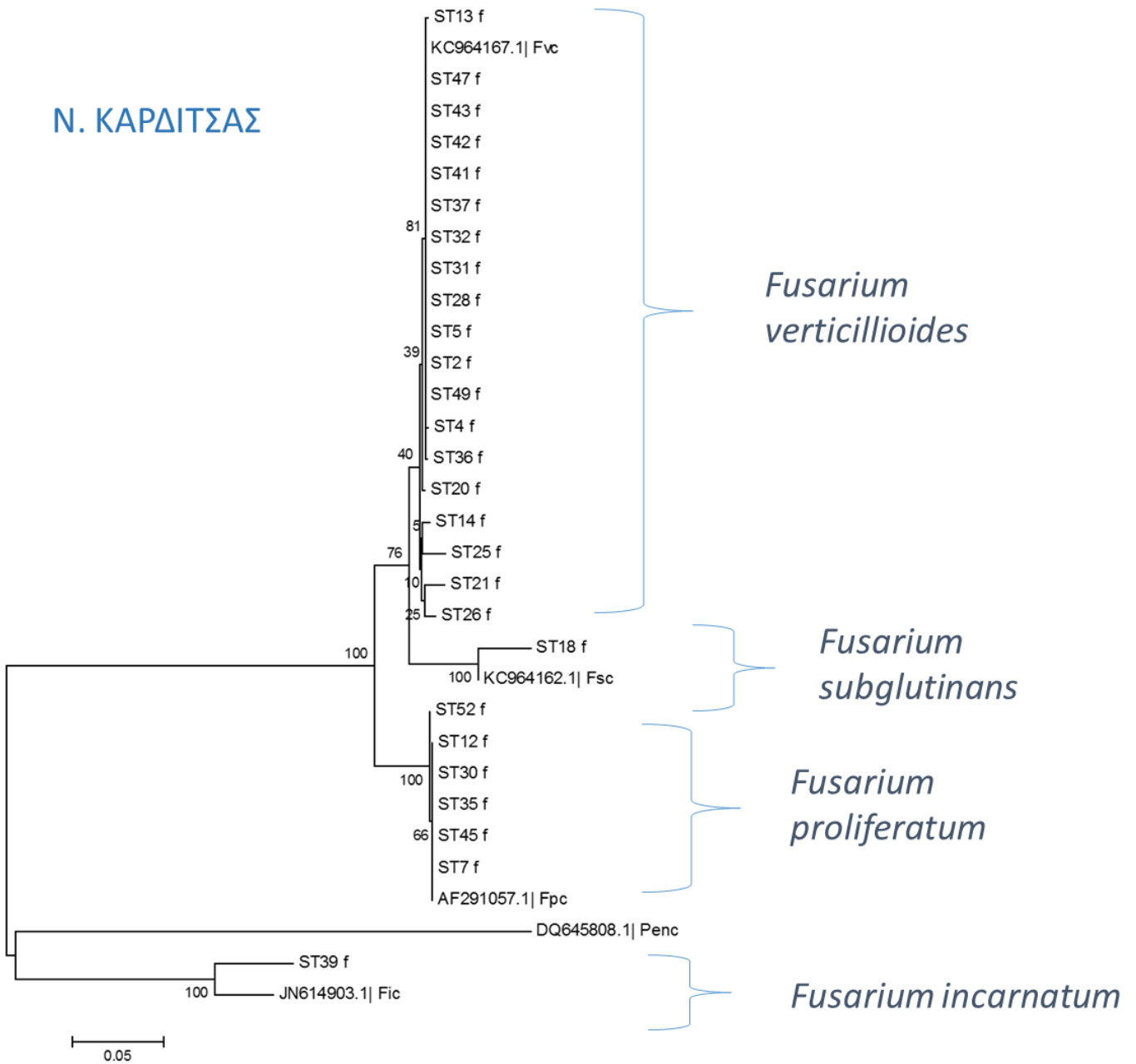


Εικόνα 97. Απεικόνιση της στοίχισης των φουζαρίων του Νομού Καρδίτσας όπου φαίνεται η ταύτιση/διαφοροποίηση των βάσεων στις νουκλεοτιδικές θέσεις.

Με βάση την μεθοδολογία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.6 προέκυψαν δέκα φυλογενετικά δέντρα ανάλογα με το γενετικό τόπο που επιλέχθηκε για τη δημιουργία του κάθε δέντρου και με διαχωρισμό των στελεχών ανάλογα με το Νομό από τον οποίο προερχόταν. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή της σύνδεσης γειτόνων- Neighbor Joining μέσω του προγράμματος MEGA6. Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα φυλογενετικά δέντρα ήταν το K2 (Kimura M., 1980). Έγιναν 100 bootstrap επαναλήψεις για να ελεγχθεί η στατιστική υποστήριξη των κλάδων.

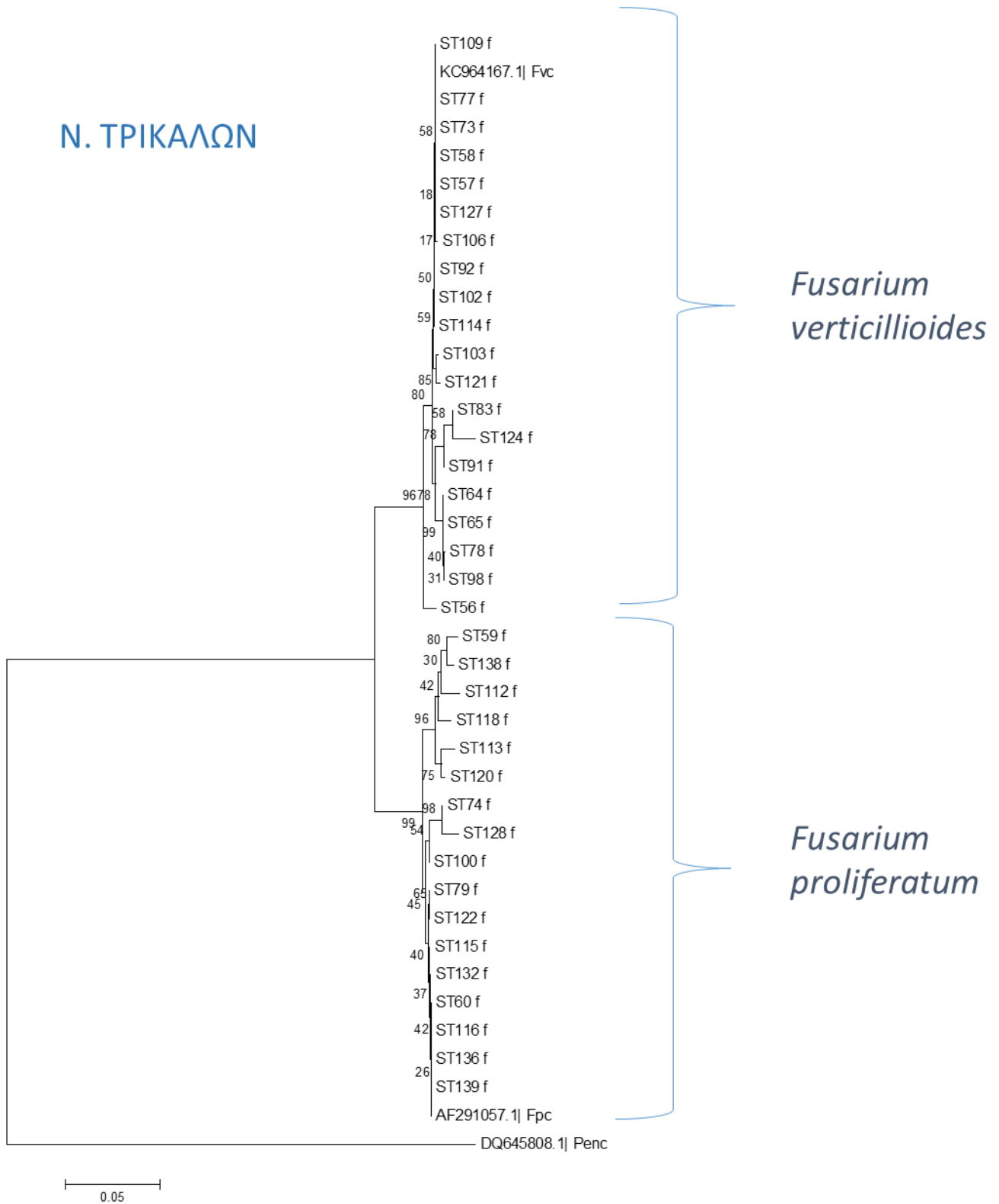
Το πρώτο φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 98), παρουσιάζει τη σύγκριση διαφόρων αλληλουχιών *Fusarium spp.* με βάση το γονίδιο της καλμοντουλίνης (CAM). Παρατηρείται ότι οι περισσότερες απομονώσεις που προέκυψαν από τους σπόρους καλαμποκιού της περιοχής του Ν. Καρδίτσας ανήκουν στο είδος *F. verticillioides*. Ταυτόχρονα παρατηρείται διακλάδωση με τα στελέχη που ανήκουν στο είδος *F. proliferatum*, στο είδος *F. subglutinans* και στο είδος *F. incarnatum* (Στέλεχος 39), στελέχη που πρώτη φορά απαντώνται στον Ελλαδικό χώρο.

N. ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ



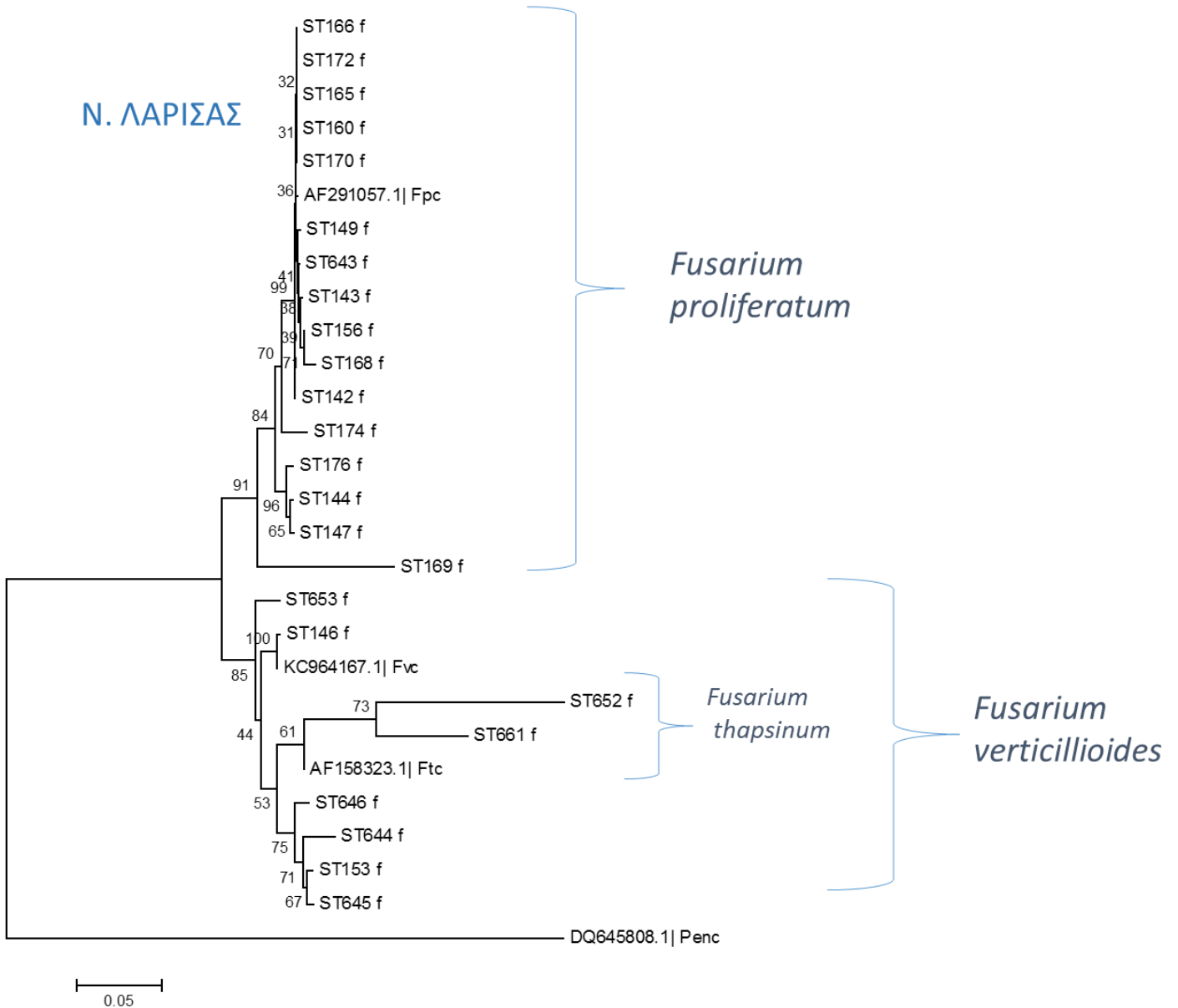
Εικόνα 98. Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* και *F. incarnatum* από καλαμπόκια του Ν. Καρδίτσας, με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (CAM). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KC964167.1 (*F. verticillioides*), AF291057.1 (*F. proliferatum*), KC964162.1 (*F. subglutinans*), JN614903.1 (*F. incarnatum*) και DQ645808.1 (*Penicillium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) και η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Το δεύτερο φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 99), παρουσιάζει επίσης το γενετικό τύπο της καλμοντουλίνης και αναφέρεται σε στελέχη που απομονώθηκαν από καλαμπόκια του Ν. Τρικάλων. Τα στελέχη αυτά διαχωρίστηκαν σε δύο μεγάλες ομάδες αυτή του *F. verticillioides* και του *F. proliferatum*.



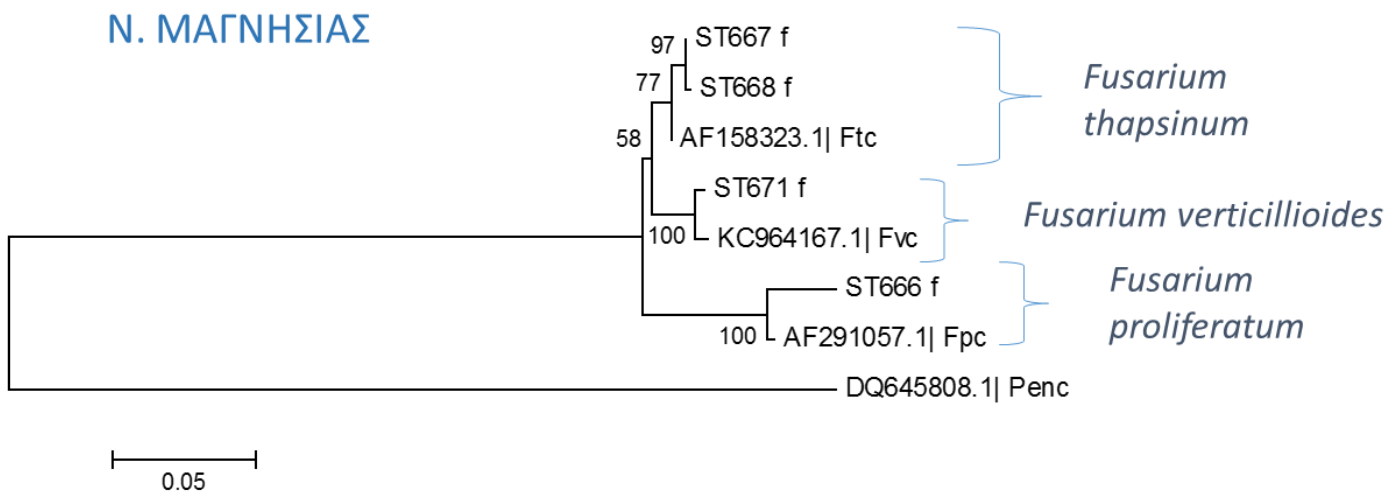
Εικόνα 99. Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides* και *F. proliferatum* από καλαμπόκια του Ν. Τρικάλων, με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (CAM). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KC964167.1 (*F. verticillioides*), AF291057.1 (*F. proliferatum*) και DQ645808.1 (*Penicillium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) ή τη τιμή 0,05 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Το τρίτο φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 100), παρουσιάζει το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης και τα στελέχη τα οποία εξετάστηκαν είναι τα απομονωθέντα από καλαμπόκια του Ν. Λάρισας. Στην ταξινόμηση αυτή παρουσιάζεται εκ νέου ο διαχωρισμός ειδών *F. verticillioides* και *F. proliferatum*, ενώ τα *F. thapsinum* (Στελέχη 652 και 661) τα οποία επίσης βρέθηκαν για πρώτη φορά στην καλλιέργεια του καλαμποκιού, φαίνεται πως είναι γενετικά συγγενή με το *F. verticillioides* και φαίνεται ότι χρειάζεται να αλληλουχηθούν και να συγκριθούν επιπλέον γενετικοί τόποι για το διαχωρισμό τους.



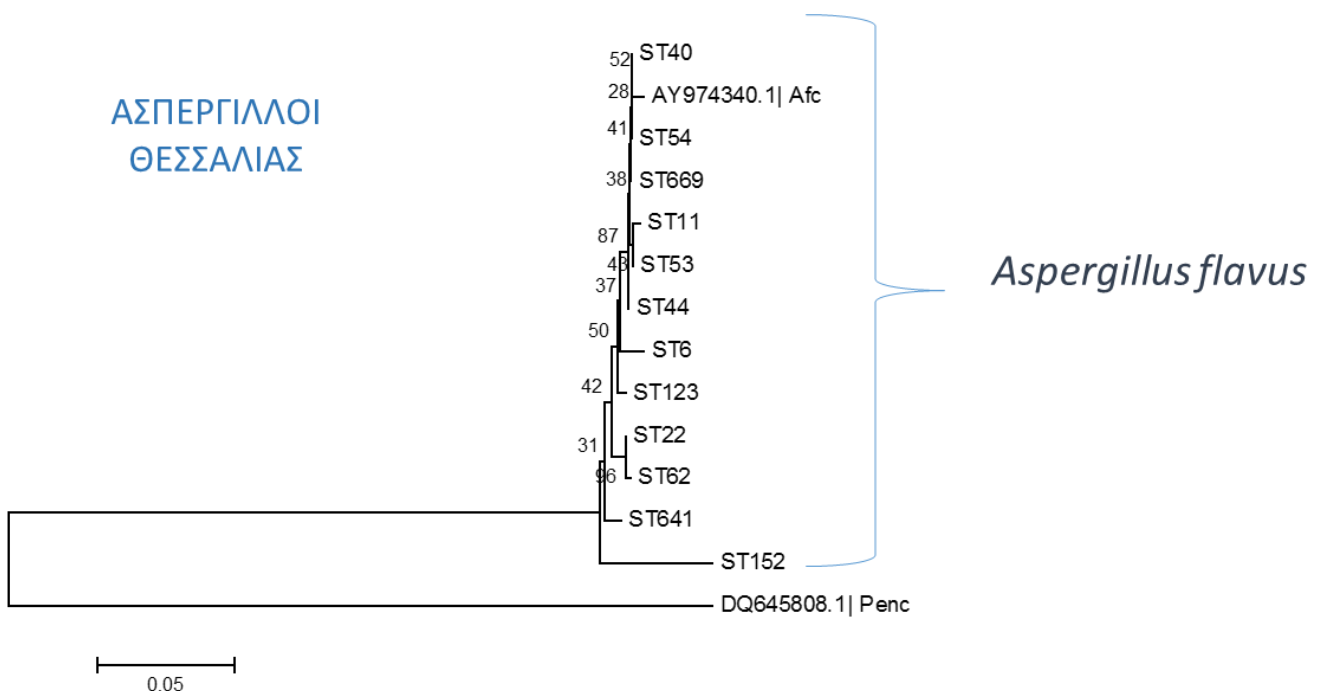
Εικόνα 100. Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* και *F. thapsinum* από καλαμπόκια του Ν. Λάρισας, με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (CAM). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KC964167.1 (*F. verticillioides*), AF291057.1 (*F. proliferatum*), AF158323.1 (*F. thapsinum*) και DQ645808.1 (*Penicillium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις), η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Το φυλογενετικό δένδρο της Εικόνας 101, παρουσιάζει το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης και τα στελέχη τα οποία εξετάστηκαν είναι τα απομονωθέντα από καλαμπόκια του Ν. Μαγνησίας. Στην ταξινόμηση παρουσιάζεται εκ νέου ο διαχωρισμός ειδών *F. verticillioides* και *F. proliferatum*, ενώ το *F. thapsinum* και πάλι είναι πιο πλησιέστερο γενετικά με το *F. verticillioides*.



Εικόνα 101. Φυλογενετικό δέντρο απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* και *F. thapsinum* από καλαμπόκια του Ν. Μαγνησίας, με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (CAM). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KC964167.1 (*F. verticillioides*), AF291057.1 (*F. proliferatum*), AF158323.1 (*F. thapsinum*) και DQ645808.1 (*Penicillium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις), η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

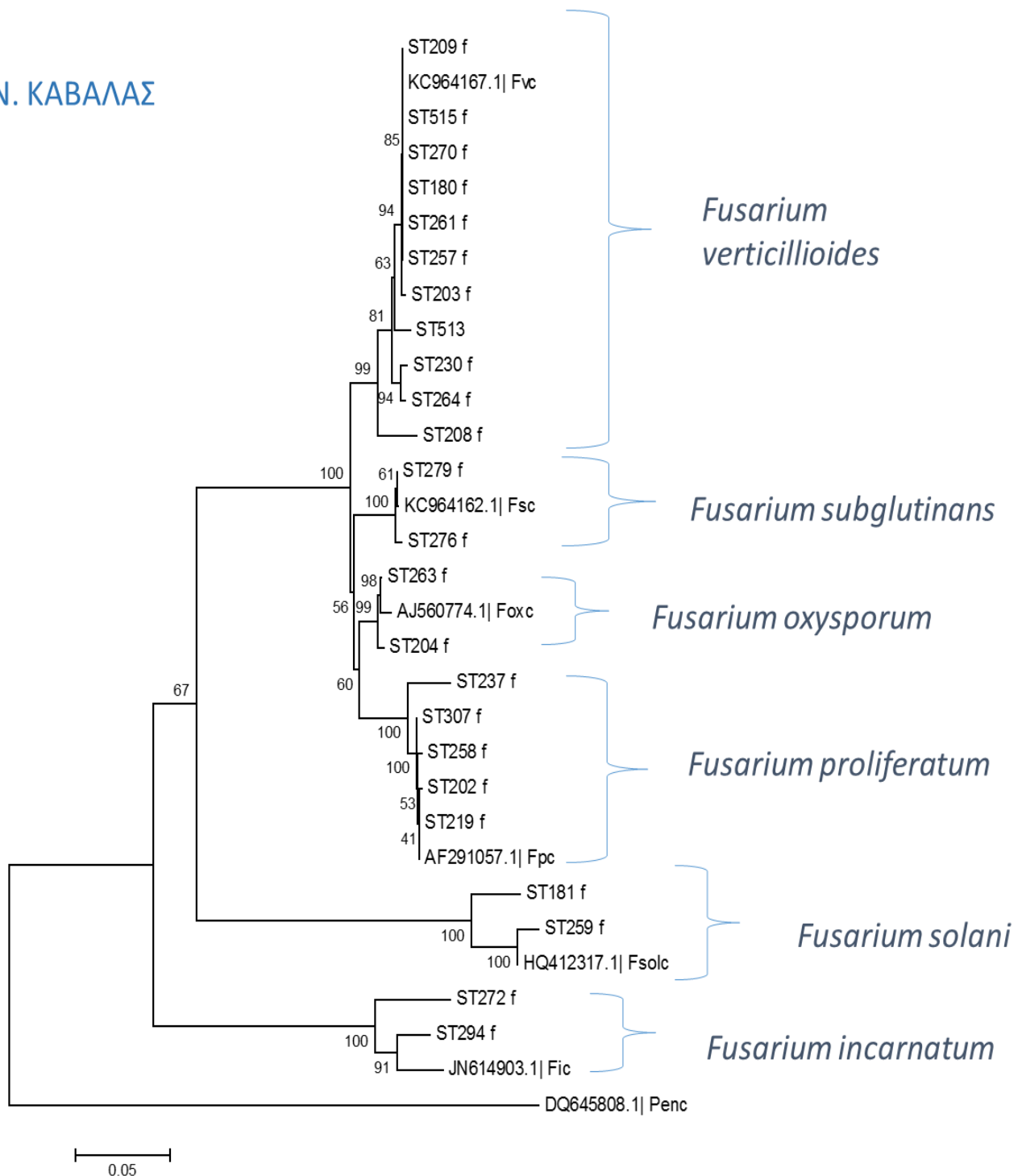
Στη συνέχεια έγινε μελέτη ειδών *Aspergillus* sp. όλης της περιοχής της Θεσσαλίας και κατασκευάστηκε το παρακάτω φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 102), το οποίο παρουσιάζει επίσης το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης. Στην ταξινόμηση αυτή παρουσιάζεται μικρός διαχωρισμός των *Aspergillus flavus*.



Εικόνα 102. Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων Ασπεργίλλων από καλαμπόκια της Θεσσαλίας, με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (CAM). Τα στελέχη αναφοράς είναι AY974340.1 (*A. flavus*) και DQ645808.1 (*Penicillium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις), η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

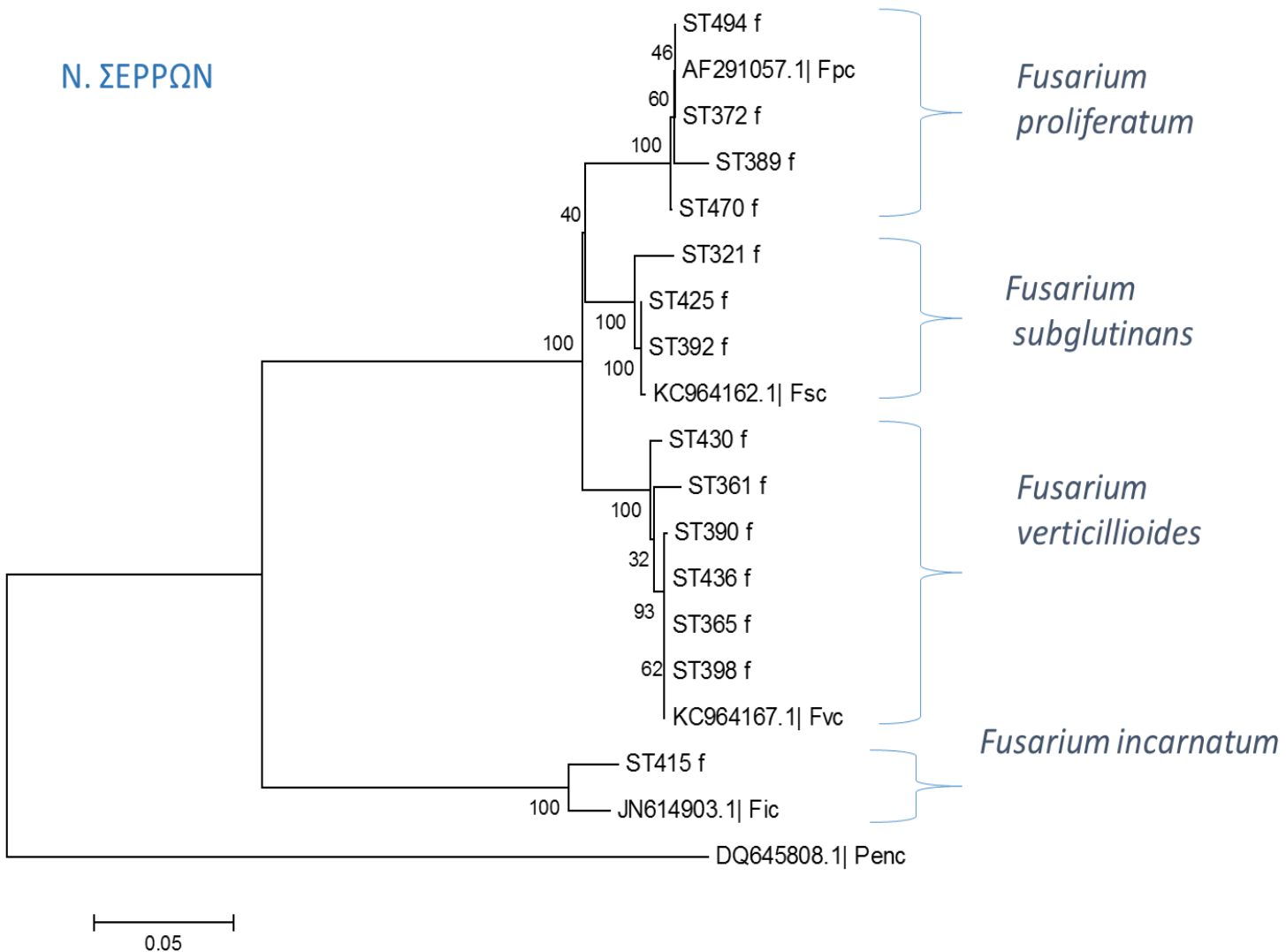
Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε και για τις απομονώσεις από καλαμπόκια της Μακεδονίας. Πιο συγκεκριμένα οι απομονώσεις του Ν. Καβάλας εξετάστηκαν με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (Εικόνα 103). Τα στελέχη αυτά διαχωρίστηκαν σε περισσότερα υποσύνολα καθώς παρουσιάστηκαν και άλλα είδη πέραν του *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. incarnatum*, όπως το *F. solani* (Στελέχη 181 και 259) και το *F. oxysporum* (Στελέχη 204 και 263).

N. ΚΑΒΑΛΑΣ



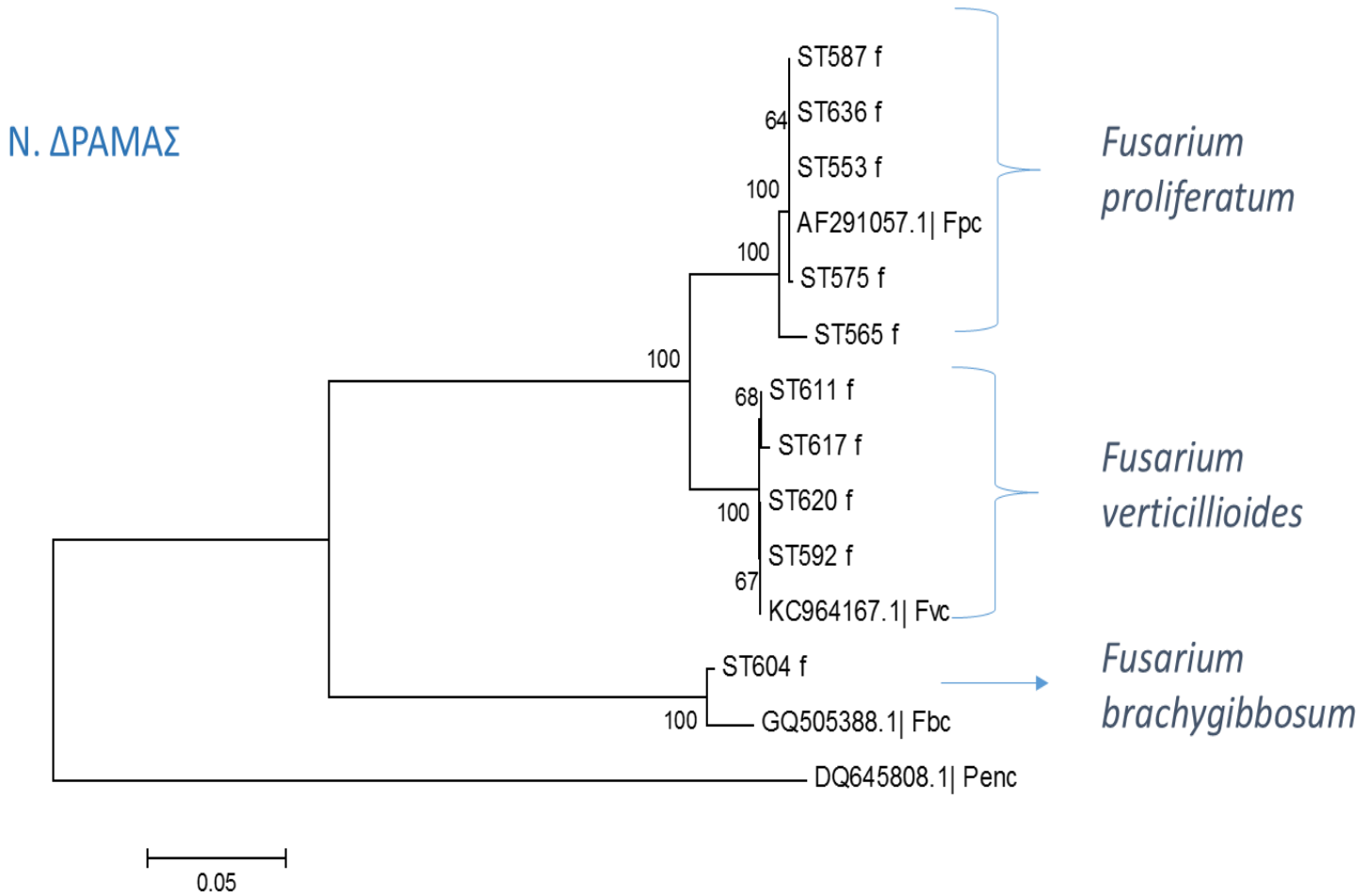
Εικόνα 103. Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. incarnatum*, *F. solani* (Στελέχη 181 και 259) και *F. oxysporum* (Στελέχη 204 και 263) από καλαμπόκια του Ν. Καβάλας, με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (CAM). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KC964167.1 (*F. verticillioides*), AF291057.1 (*F. proliferatum*), KC964162.1 (*F. subglutinans*), JN614903.1 (*F. incarnatum*), HQ412317.1 (*F. solani*), AJ560774.1 (*F. oxysporum*) και DQ645808.1 (*Penicillium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις), η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Το παρακάτω φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 104), απεικονίζει τη συγγένεια στελεχών του Ν. Σερρών τα οποία εξετάστηκαν με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης διαχώρισε τα στελέχη σε *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* και *F. incarnatum* (Στέλεχος 415).



Εικόνα 104. Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* και *F. incarnatum* από καλαμπόκια του Ν. Σερρών, με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (CAM). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KC964167.1 (*F. verticillioides*), AF291057.1 (*F. proliferatum*), KC964162.1 (*F. subglutinans*), JN614903.1 (*F. incarnatum*) και DQ645808.1 (*Penicillium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις), η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

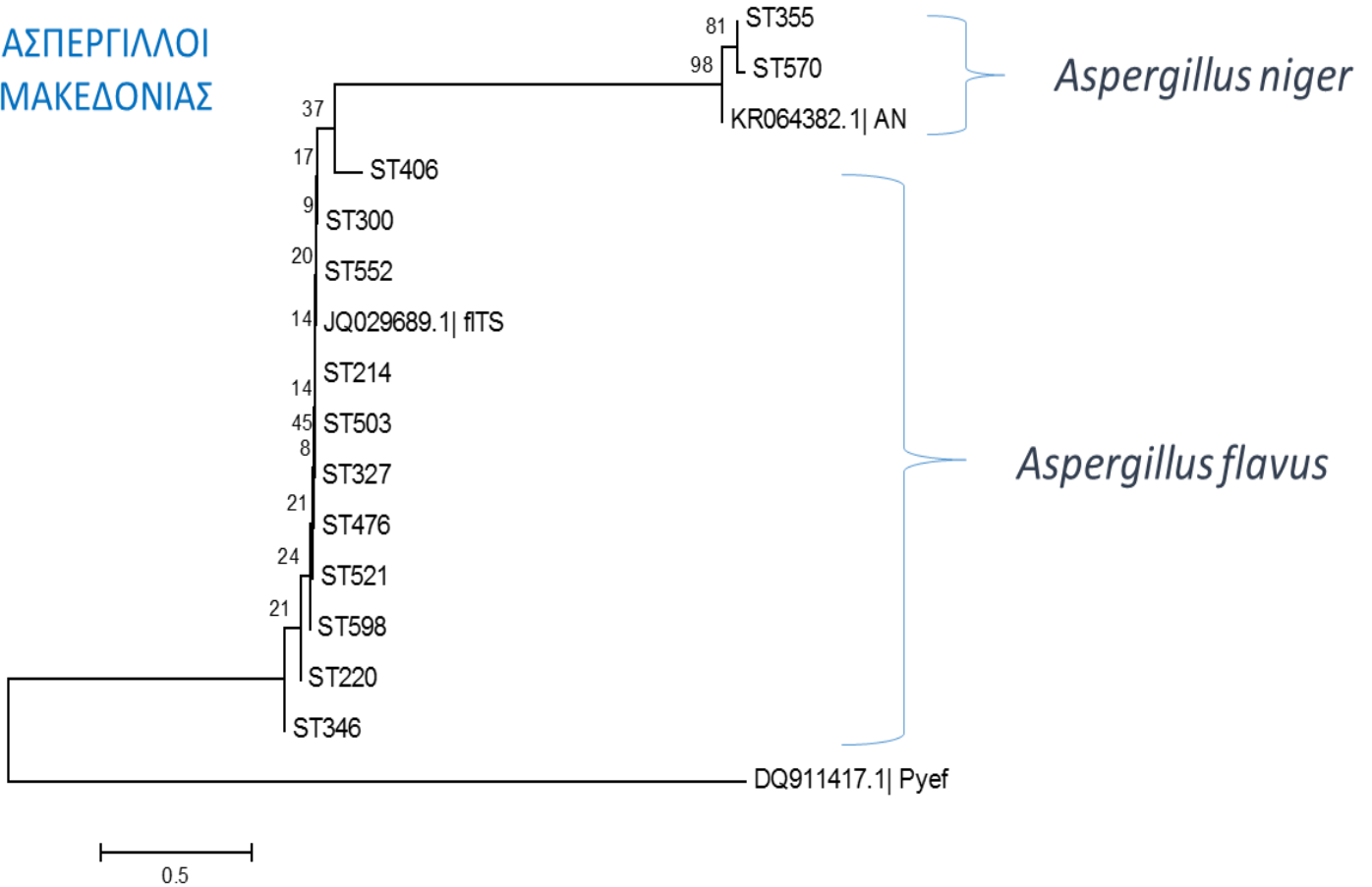
Το παρακάτω φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 105), περιγράφει τη συγγένεια στελεχών που απομονώθηκαν από καλαμπόκια του Ν. Δράμας, τα οποία εξετάστηκαν με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης διαχώρισε τα στελέχη σε *Fusarium verticillioides* και *F. proliferatum*, αλλά και ενός ακόμα νέου είδους για την εν λόγω καλλιέργεια, το *F. brachygibbosum* (Στέλεχος 604).



Εικόνα 105. Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* και *F. brachygibbosum* από καλαμπόκια του Ν. Δράμας, με βάση το γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (CAM). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KC964167.1 (*F. verticillioides*), AF291057.1 (*F. proliferatum*), GQ505388.1 (*F. brachygibbosum*) και DQ645808.1 (*Penicillium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις), η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Τα στελέχη των Ασπεργίλλων της Μακεδονίας εξετάστηκαν συνολικά αλλά αυτή τη φορά με χρήση του γονιδίου της ριβοσωμικής εσωτερικά μεταγραφόμενης περιοχής (ITS) (Εικόνα 106). Το γονίδιο αυτό διαχώρισε τα στελέχη σε δύο υποομάδες, αυτή του *Aspergillus flavus* και αυτή του *A. niger*, γεγονός αναμενόμενο καθώς ο μεν *A. flavus* ανήκει στους πράσινους Ασπεργίλλους (section *Flavi*), ενώ ο *A. niger* ανήκει στους μαύρους Ασπεργίλλους (section *Nigri*).

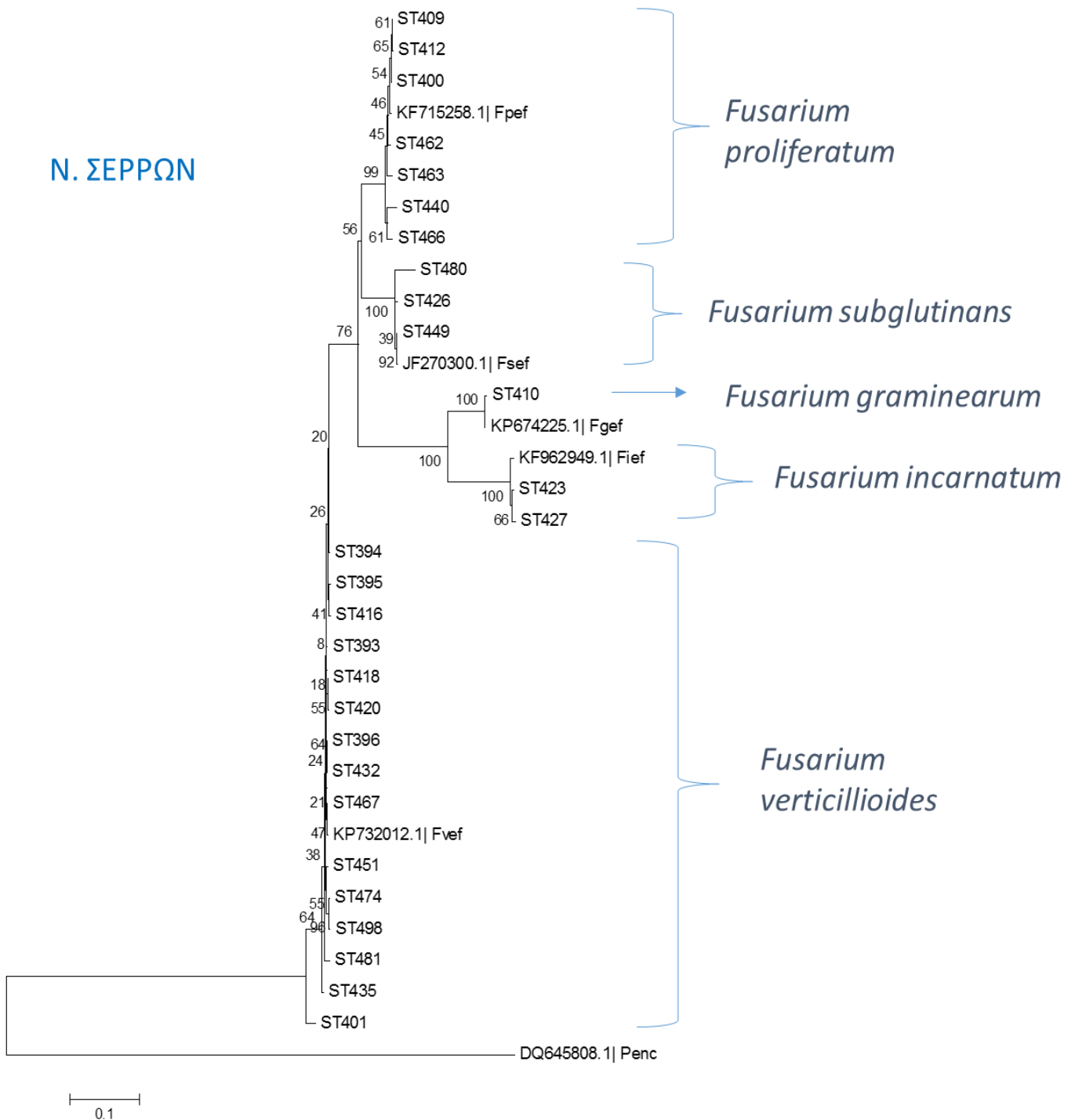
ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΟΙ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ



Εικόνα 106. Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Aspergillus flavus* και *A. niger* από καλαμπόκια της Μακεδονίας, με βάση το πυρηνικό τόπο του ριβοσώματος ITS. Τα στελέχη αναφοράς είναι JQ029689.1 (*A. flavus*), KR064382.1 (*A. niger*) και DQ911417.1 (*Pythium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις), η τιμή 0,5 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

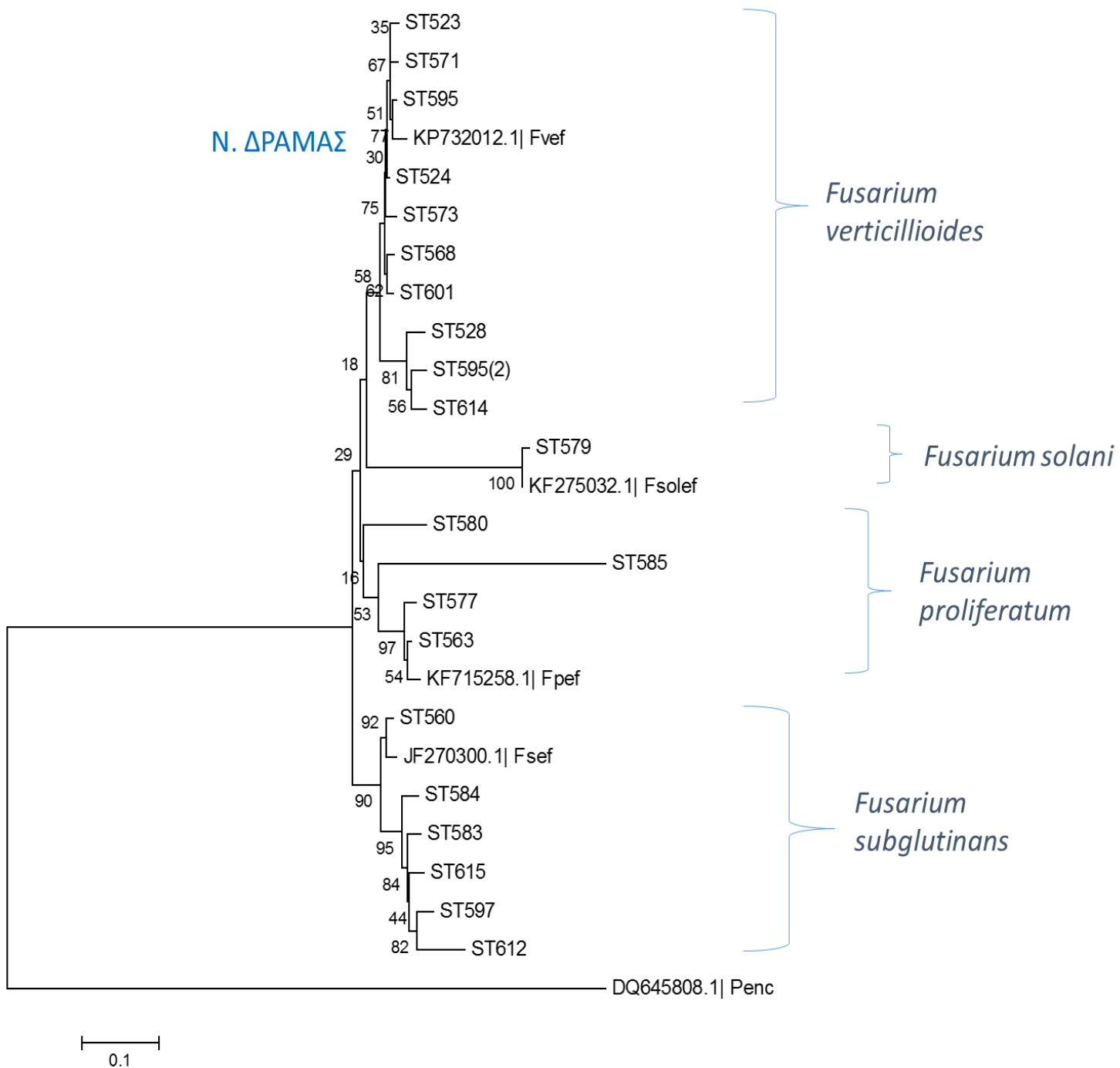
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη στελεχών *Fusarium* sp. από το Ν. Σερρών και με ένα άλλο γονιδιακό τόπο, αυτό του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) (Εικόνα 107). Τα στελέχη με τη χρήση του εν λόγω γονιδίου διαχωρίστηκαν σε 5 υποομάδες με κυρίαρχες αυτή των *Fusarium verticillioides* και *F. proliferatum*. Ταυτόχρονα υπήρχε διαχωρισμός ειδών σε *F. subglutinans* (Στελέχη 449,480,426), *F. graminearum* (Στέλεχος 410) και *F. incarnatum* (Στελέχη 423 και 427).

N. ΣΕΡΡΩΝ



Εικόνα 107. Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* (Στελέχη 449,480,426), *F. graminearum* (Στέλεχος 410) και *F. incarnatum* (Στελέχη 423 και 427), από καλαμπόκι με βάση το γενετικό τόπο του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KP674225.1 (*F. graminearum*), KP732012.1 (*F. verticillioides*), KF962949.1 (*F. incarnatum*) JF270300.1 (*F. subglutinans*), KF715258.1 (*F. proliferatum*) και DQ645808.1 (*Penicillium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις), η τιμή 0,1 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Ανάλογη ήταν και η εικόνα από μελέτη στελεχών του Ν. Δράμας με τον μεταφραστικό παράγοντα επιμήκυνσης. Τα στελέχη σ' αυτή την περίπτωση διαχωρίστηκαν σε τέσσερις υποομάδες, αυτές των *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. solani* (Στέλεχος 579) και *F. subglutinans*. Μεγαλύτερη συσχέτιση υπήρξε μεταξύ των ειδών *F. verticillioides* και *F. solani*, ενώ το *F. subglutinans* φαίνεται να απέχει περισσότερο από το *F. verticillioides* (Εικόνα 108).



Εικόνα 108. Φυλογενετικό δέντρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* και *F. solani* (Στέλεχος 579)), από καλαμπόκι με βάση το γενετικό τόπο του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Τα στελέχη αναφοράς είναι τα KP732012.1 (*F. verticillioides*), JF270300.1 (*F. subglutinans*), KF715258.1 (*F. proliferatum*), KF275032.1 (*F. solani*) και DQ645808.1 (*Penicillium* sp.). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις), η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στη γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

4.6 Προσδιορισμός μετεωρολογικών δεδομένων της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας

Με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στα επίπεδα των αφλατοξινών και των φουμονισινών στην καλλιέργεια καλαμποκιού έγινε συγκέντρωση διαφόρων κλιματολογικών παραμέτρων των τριών τελευταίων χρόνων από διάφορες περιοχές της Θεσσαλίας (Πίνακας 8) και της Μακεδονίας (Πίνακας 9) κατά τους μήνες Ιούνιο-Ιούλιο-Αύγουστο-Σεπτέμβριο από 2012-2014. Όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες οι θερμοκρασίες που επικρατούσαν το 2014 που πραγματοποιήθηκε η συγκομιδή των σπαδικών καλαμποκιού από την περιοχή της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας δεν διέφεραν σημαντικά από τα προηγούμενα χρόνια εκτός από τον Σεπτέμβριο του 2014 που ήταν λίγο μειωμένες. Η σημαντική διαφοροποίηση σημειώνεται στα επίπεδα βροχόπτωσης τα οποία ήταν αυξημένα καθόλη τη διάρκεια των θερινών μηνών του 2014, ιδιαιτέρως στην ευρύτερη περιοχή της Μακεδονίας. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από την Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία.

ΜΗΝΑΣ/ ΕΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	Tmin (°C)	Tmax (°C)	Tmean (°C)	Υετός (mm)
Ιούνιος 2012	Τρίκαλα	15,9	32,1	26,6	3
	Λάρισα	18,1	33,6	28	0
	Αγχίαλος	18,8	30,5	26,9	0
Ιούλιος 2012	Τρίκαλα	17,0	43,1	29,5	24,2
	Λάρισα	21	36,6	31,1	0
	Αγχίαλος	30	21,7	34	0
Αύγουστος 2012	Τρίκαλα	17,2	40	27,7	28
	Λάρισα	19	35,5	28,8	3
	Αγχίαλος	28,5	33,4	39,21	0
Σεπτέμβριος 2012	Τρίκαλα	11,4	34,9	23,3	33
	Λάρισα	15,3	30,2	23,5	42
	Αγχίαλος	17,2	28	23,3	41
Ιούνιος 2013	Τρίκαλα	10,8	36,5	24,8	14,2
	Λάρισα	16,8	31,5	26	56
	Αγχίαλος	17,9	29,3	25,3	21
Ιούλιος 2013	Τρίκαλα	16,7	38,3	26,4	11
	Λάρισα	18,7	33,1	27,9	28
	Αγχίαλος	19,6	31,6	27,6	19
Αύγουστος 2013	Τρίκαλα	18,9	38,2	27,7	1,6
	Λάρισα	19,3	34,3	28,5	0
	Αγχίαλος	20,6	32,2	28	0
Σεπτέμβριος 2013	Τρίκαλα	13,5	35,1	23,7	10,4
	Λάρισα	15,2	30,7	23,5	10
	Αγχίαλος	16,8	28,7	23,9	8

Ιούνιος 2014	Τρίκαλα	13,3	38,5	24,5	57,2
	Λάρισα	17	32	26,5	25
	Καρδίτσα	11,8	38,9	24,2	39,8 RH 31,3(min) – 83(max)
	Αγχίαλος	17,7	29,7	25,4	27
Ιούλιος 2014	Τρίκαλα	16,2	36,8	26,8	11,2
	Λάρισα	19,1	33,6	28,4	16
	Καρδίτσα	15,0	36,4	25,7	4,6 RH 32.6(min)-85,7(max)
	Αγχίαλος	20,2	31,9	27,7	11
Αύγουστος 2014	Τρίκαλα	16,3	39,6	27,7	6
	Λάρισα	19,2	34,6	28,1	8
	Καρδίτσα	14,2	38,3	25,8	8,8 RH 32.6(min)-89,6(max)
	Αγχίαλος	20,7	32,4	28	17
Σεπτέμβριος 2014	Τρίκαλα	11,3	34,7	21,7	41,4
	Λάρισα	15,9	28,1	22,2	70
	Καρδίτσα	7,5	32,9		100,4
	Αγχίαλος	17,1	27,2	22,7	48

Πίνακας 8. Μετεωρολογικά δεδομένα θερμοκρασίας και υετού (βροχοπτώσεων) για τους μήνες Ιούνιο-Σεπτέμβριο των ετών 2012-2014 στις περιοχές της Λάρισας, των Τρικάλων, της Καρδίτσας και της Αγχιάλου Μαγνησίας όπου πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες καλαμποκιού.

ΜΗΝΑΣ/ ΕΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	Tmin (°C)	Tmax (°C)	Tmean (°C)	Υετός (mm)
Ιούνιος 2012	Καβάλα	-	-	-	-
	Σέρρες	6,4	25,3	16,4	8,4
	Δράμα	11,8	36,4	24,8	15,4
Ιούλιος 2012	Καβάλα	-	-	-	-
	Σέρρες	10,7	28,6	19,1	28,6
	Δράμα	14,8	37,7	27,4	24,2
Αύγουστος 2012	Καβάλα	-	-	-	-
	Σέρρες	7,1	29,5	18,8	31,2
	Δράμα	13,2	39,2	35,8	28,6
Σεπτέμβριος 2012	Καβάλα	-	-	-	-
	Σέρρες	1,3	24,2	14,5	27,4
	Δράμα	8	32,7	21,3	48,8
Ιούνιος 2013	Καβάλα	-	-	-	-
	Σέρρες	12,5	36,5	23,3	50
	Δράμα	10,4	35,2	22,4	87
Ιούλιος 2013	Καβάλα	-	-	-	-
	Σέρρες	16,5	37,7	26,1	18,4
	Δράμα	14,1	36,9	25	35,6
Αύγουστος 2013	Καβάλα	-	-	-	-
	Σέρρες	17,9	37,7	27,5	5
	Δράμα	16,3	37,7	26,4	1,4
Σεπτέμβριος 2013	Καβάλα	-	-	-	-
	Σέρρες	12,6	31,7	21,5	29,8
	Δράμα	9,7	32,6	20,7	34,2
Ιούνιος 2014	Καβάλα	11,6	36,7	22,7	69
	Σέρρες	12,9	36,1	23,5	74,2
	Δράμα	10,7	36,4	22,2	97,2
Ιούλιος 2014	Καβάλα	15,8	32,8	24,8	25,6
	Σέρρες	17,1	34,6	25,4	70
	Δράμα	14,4	33,1	24,4	37
Αύγουστος 2014	Καβάλα	15,6	35,2	25,3	117,6
	Σέρρες	16,2	37,6	26,1	24,4
	Δράμα	14,2	35,7	25,7	60
Σεπτέμβριος 2014	Καβάλα	8,5	29,1	20,7	62
	Σέρρες	8,9	31,1	20,2	77
	Δράμα	6,2	30,1	20,4	57,9

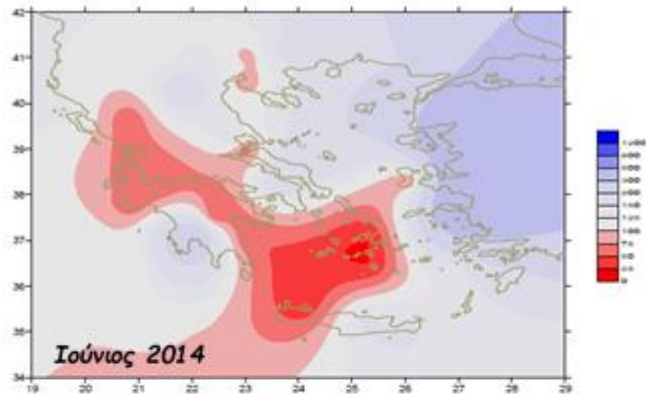
Πίνακας 9. Μετεωρολογικά δεδομένα θερμοκρασίας και υετού (βροχοπτώσεων) για τους μήνες Ιούνιο-Σεπτέμβριο των ετών 2012-2014 στις περιοχές της Καβάλας, των Σερρών, και της Δράμας όπου πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες καλαμποκιού.

Όπως φαίνεται από τους κλιματικούς χάρτες (Εικόνα 109), τα ποσά υετού που σημειώθηκαν τον Ιούνιο και τον Ιούλιο του 2014 στην περιοχή της Θεσσαλίας και στη Μακεδονία ήταν γενικά υψηλότερα από τις κανονικές τιμές. Η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε κοντά στις κανονικές τιμές. Οι περισσότερες βροχές και η αυξημένη υγρασία αποτελούν παράγοντες που ευνοούν τις μολύνσεις μυκοτοξικογόνων μυκήτων κυρίως του *Fusarium* spp. μέσω του μεταξώματος κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης του σπάδικα του καλαμποκιού.

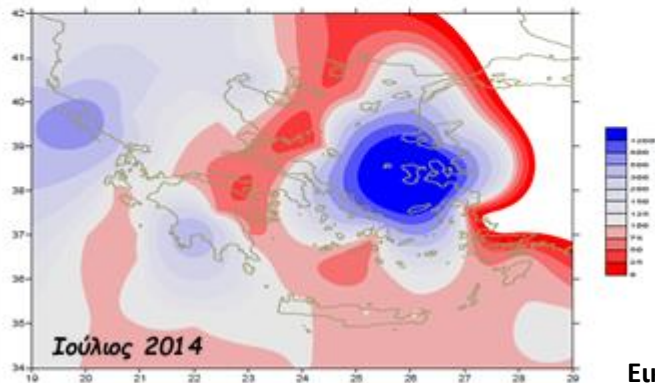
Ο Αύγουστος του 2014, χαρακτηρίστηκε από αυξημένη σχετική υγρασία κυρίως μετά τα μέσα του μήνα. Το πρώτο δεκαήμερο εκδηλώθηκαν ισχυρές βροχές, καταιγίδες και χαλαζοπτώσεις σε αρκετές περιοχές της Κεντρικής και Βόρεια Ελλάδας. Τα ποσά υετού που σημειώθηκαν ήταν υψηλότερα από τις κανονικές τιμές γενικά στην Κεντρική και Βόρεια ηπειρωτική χώρα. Η μέση θερμοκρασία που ήταν γύρω στους 28°C ευνόησε τις μολύνσεις από τους μύκητες του γένους *Fusarium* spp.

Ο Σεπτέμβριος του 2014, είχε σημαντικές αυξομειώσεις στη θερμοκρασία. Ωστόσο το κύριο χαρακτηριστικό του ήταν οι ισχυρές βροχές και καταιγίδες. Τα ποσά υετού που σημειώθηκαν ήταν υψηλότερα από τις κανονικές τιμές στη Θεσσαλία και η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε πάνω από τις κανονικές τιμές.

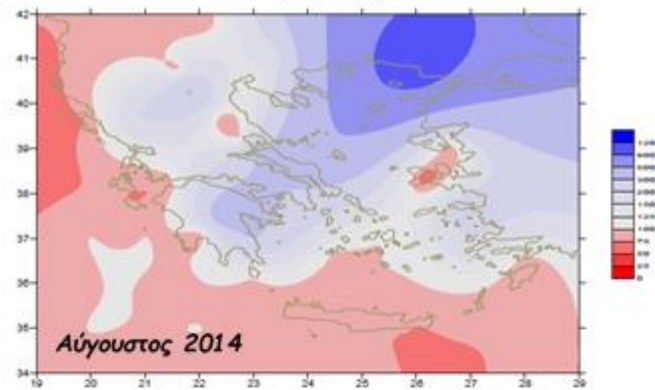
Το φαινόμενο των ιδιαίτερα πολλών βροχοπτώσεων τόσο στην Θεσσαλία όσο και στη Μακεδονία κατά το 2014, αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό μετεωρολογικό δεδομένο για τη συγκεκριμένη μελέτη καθώς η υγρασία φαίνεται να σηματοδοτεί τις προσβολές και την εξέλιξη των σήψεων από μύκητες του γένους *Fusarium* spp. και σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούσαν στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας κατά το μήνα Σεπτέμβριο να δικαιολογεί τις αυξημένες σήψεις των σπαδικών του αραβοσίτου. Αντίθετα, οι πολλές βροχοπτώσεις δεν ευνοούν ιδιαίτερα την ανάπτυξη σήψεων από *Aspergillus* spp. όπως παρατηρήθηκε και στα πειράματα της συγκεκριμένης μελέτης κατά το 2014 όπου οι μολύνσεις από *Aspergillus* spp. ήταν πολύ περιορισμένες στους σπάδικες σε αντίθεση όμως με τα επίπεδα αφλατοξινών που ήταν σχετικά υψηλά. Αντίθετα, προηγούμενα δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι ξηροφυτικές συνθήκες που επικράτησαν τον Αύγουστο του 2012 οδήγησαν σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα αφλατοξινών και την επικράτηση μυκήτων του γένους *Aspergillus* spp. Για την ακριβέστερη συσχέτιση των περιβαλλοντικών συνθηκών που επηρεάζουν την ανάπτυξη της ασθένειας και την παραγωγή αφλατοξινών – φουμονισινών στα καλαμπόκια σε προσυλλεκτικό επίπεδο είναι αναγκαία η επανάληψη της ανάλυσης της έντασης της ασθένειας και της παραγωγής φουμονισινών τα επόμενα χρόνια ώστε να είναι πιο ολοκληρωμένη η αξιολόγηση.



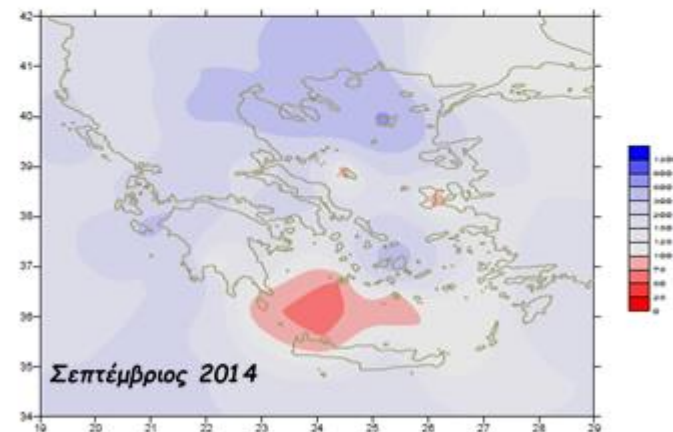
Απόκλιση μηνιαίου ύψους υετού από τις κανονικές τιμές (%)



Απόκλιση μηνιαίου ύψους υετού από τις κανονικές τιμές (%)



Απόκλιση μηνιαίου ύψους υετού από τις κανονικές τιμές (%)



Απόκλιση μηνιαίου ύψους υετού από τις κανονικές τιμές (%)

Εικόνα 109. Μετεωρολογικοί χάρτες της Ελλάδος για τους θερινούς μήνες του 2014.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο αραβόσιτος αποτελεί παγκοσμίως μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες καθώς χρησιμοποιείται κυρίως για τη διατροφή των ζώων, αλλά ταυτόχρονα αποτελεί και ένα από τα βασικότερα προϊόντα της διατροφής του ανθρώπου, μέσω της παραγωγής διαφόρων προϊόντων αμύλου.

Ο αραβόσιτος συγκαταλέγεται στις σημαντικές καλλιέργειες για την Ελλάδα, καθώς μεγάλες εκτάσεις διατίθενται κάθε χρόνο για την καλλιέργειά του. Λόγω της σημαντικότητας της καλλιέργειας του καλαμποκιού όλο και περισσότερες έρευνες στρέφονται προς τη μελέτη του εύρους των παθογόνων και των εχθρών που την προσβάλλουν. Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν εστιαστεί σε δυο σημαντικά γένη μυκήτων αυτά των *Aspergillus* και *Fusarium* spp., καθώς αποτελούν μεγάλο και σοβαρό κίνδυνο για το καλαμπόκι επιφέροντας σημαντική υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος λόγω των σήψεων των σπαδικών και των προσβολών των ριζών και του λαιμού των φυτών που προκαλούν. Ταυτόχρονα το πρόβλημα εντείνεται λόγω της έκκρισης επικίνδυνων δευτερογενών μεταβολιτών που ονομάζονται μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες είναι ιδιαίτερα τοξικοί και καρκινογόνοι δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους και αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες απειλές για την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων. Η κατανάλωση γεωργικών προϊόντων που περιέχουν μυκοτοξίνες μπορεί να προκαλέσει πολύ σοβαρά προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση σοβαρών ασθενειών, γνωστές ως μυκοτοξικώσεις.

Η αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και κατ' επέκταση της εμφάνισης των μυκοτοξινών στα προσβεβλημένα προϊόντα είναι πολύ δύσκολη καθώς για την καλλιέργεια του καλαμποκιού δεν υπάρχουν εγκεκριμένα φάρμακα για την αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* spp. και για το λόγο αυτό, η αντιμετώπισή τους, στηρίζεται κατά κύριο λόγο στην εφαρμογή μέτρων τα οποία προλαμβάνουν την εμφάνιση τους στο καλαμπόκι. Λόγω της τόσο μεγάλης σημασίας των μυκήτων αυτών αλλά και των κρουσμάτων του εγγύς παρελθόντος με ανίχνευση υψηλών επιπέδων μυκοτοξινών (υψηλότερα από τα ορισθέντα από την Ε.Ε.) σε ζωοτροφές προερχόμενες από Ελληνικούς αγρούς, κρίθηκε αναγκαία η αποσαφήνιση της υφιστάμενης κατάστασης στην καλλιέργεια του αραβοσίτου σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επίσκεψη στις κύριες καλλιεργητικές περιοχές αραβοσίτου της Ελλάδας ώστε να προσδιοριστεί η ένταση των συμπτωμάτων σήψεων σπαδικών αραβοσίτου και ταυτοχρόνως να συλλεχθούν σπάδικες οι οποίοι μεταφέρθηκαν στο Γ.Π.Α. για περαιτέρω ερευνητική μελέτη. Η ένταση των σήψεων και προσβολών είχε μεγάλη διακύμανση μεταξύ των 70 επιλεγθέντων αγρών, των επιμέρους περιοχών, με τα ποσοστά να κυμαίνονται από μηδενική σήψη (π.χ. αγρός 63 στην περιοχή της Λάρισας), έως και προσβολή 100% (π.χ. αγρός 69 στην περιοχή της Μαγνησίας). Σε γενικές γραμμές φαίνεται πως η σήψη ήταν αρκετά σημαντική στους περισσότερους αγρούς τον Σεπτέμβριο του 2014, ενώ ήταν αξιοσημείωτο ότι οι προσβολές ήταν πιο έντονες όταν δεν είχαν γίνει εφαρμογές εντομοκτόνων στους εν λόγω αγρούς, με αποτέλεσμα να υπάρχει εμφάνιση εντομολογικών προσβολών και σήψεων, γεγονός απόλυτα «φυσιολογικό» καθώς υπάρχουν και άλλες αναφορές περί συσχέτισης των προσβολών από τους εν λόγω μύκητες με τις προσβολές από έντομα π.χ. πυραλίδα (Cardwell et al., 2009).

Η συνέχεια της μελέτης επέβαλε τον προσδιορισμό της σοβαρότητας της σήψης σε κάθε αγρό με καταμέτρηση των προσβεβλημένων σπόρων ως προς το σύνολο των σπόρων για κάθε αγρό. Η σοβαρότητα των σήψεων φάνηκε να έχει και πάλι έντονη διακύμανση με τους αγρούς της Θεσσαλίας (1-21 και 63-69) να παρουσιάζουν σοβαρότητα από 0 (αγρός 63) έως και 39 % (αγρός 65). Στη Μακεδονία η σοβαρότητα της ασθένειας συνολικά ήταν πιο έντονη με ακραίες τιμές αυτές του 4,3 % (για τον αγρό 39) και 100% (για τον αγρό 49), αλλά με το μέσο όρο να υπολογίζεται περί το 45%. Αυτά τα επίπεδα σοβαρότητας της ασθένειας ήταν «αναμενόμενα» καθώς ανάλογες τιμές έχουν παρατηρηθεί και στις άλλες μεσογειακές χώρες, όπου π.χ. η σοβαρότητα της ασθένειας στην Βόρεια Ιταλία το Σεπτέμβρη του 2012 ήταν 30% (Logrieco et al. 2002).

Όσον αφορά τις μετρήσεις των μυκοτοξινών, φουμονισινών και αφλατοξινών ανά αγρό, παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση στις μολύνσεις ανά αγρό με τις φουμονισίνες να κυμαίνονται από 0 έως και 100 ppm (mg/kg) ανά αγρό και για τις αφλατοξίνες από 0-150 ppb (mg/tn) ανά αγρό στο σύνολο των 70 εξετασθέντων αγρών. Πιο συγκεκριμένα στη Θεσσαλία η συγκέντρωση φουμονισινών ήταν μικρότερη των 10 ppm/ αγρό με εξαίρεση τον αγρό 69 στο Νομό Μαγνησίας που παρουσίασε υψηλή συγκέντρωση τοξίνης (57 ppm) με το 100% των σπαδικών να παρουσιάζουν το φαινόμενο του “starbursting”. Όσον αφορά τις αφλατοξίνες η συγκέντρωση ήταν περί τα 30 ppb, ενώ σε ορισμένους αγρούς τα ποσοστά ήταν ιδιαίτερα υψηλά (αγρός 6- 137 ppb, αγρός 8- 146 ppb, αγρός 21- 57 ppb). Στη Μακεδονία τα ποσά φουμονισινών ήταν υψηλότερα από της Θεσσαλίας, ενώ αρκετοί αγροί παρουσίασαν τιμές πάνω από 35ppm (αγρός 25- 41ppm, αγρός 26- 52 ppm, αγρός 30- 53ppm, αγρός 47- 37ppm, αγρός 50- 35 ppm, αγρός 51- 100 ppm, αγρός 59- 43ppm, αγρός 62- 39ppm). Τα ποσά αφλατοξινών στη Μακεδονία ήταν χαμηλότερα από της Θεσσαλίας (λιγότερο από 15 ppb) με εξαίρεση τους αγρούς 51 (20 ppb), 59 (19 ppb) και 47 (28 ppb). Αντίστοιχη είναι η εικόνα των μυκοτοξινών και στις άλλες Ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου όπου το 68% των εξετασθέντων δειγμάτων καλαμποκιού είναι θετικά σε φουμονισίνες και το 40% παρουσιάζει τιμές υψηλότερες των θεσπισμένων ορίων της Ε.Ε. (Griessler et al., 2010). Το παράδοξο όμως παρουσιάστηκε σε δείγματα καλαμποκιού της Βόρειας Ιταλίας, όπου οι τιμές των φουμονισινών ανήλθαν έως τα 35 ppm, ποσό πολύ υψηλότερο από τις αντίστοιχες τιμές φουμονισινών στα εξετασθέντα δείγματα από την Ισπανία, την Πορτογαλία και την Ελλάδα, αν και στην Ελλάδα το 50% των δειγμάτων είχε υψηλό ποσό φουμονισινών (3,2 ppm) και το 33% είχε και υψηλό ποσό αφλατοξινών (16 ppb) (Griessler et al., 2010). Η διαφοροποίηση στις τιμές των τοξινών που παρατηρήθηκε στους Ελληνικούς αγρούς είναι συνάρτηση τόσο του πληθυσμού των μυκοτοξικογόνων μυκήτων, όσο και των κλιματολογικών συνθηκών που επικρατούσαν στην Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα. Πιο συγκεκριμένα οι αυξημένες βροχοπτώσεις που προηγήθηκαν της περιόδου δειγματοληψιών είχαν ως αποτέλεσμα τα υψηλά ποσά συγκέντρωσης φουμονισινών (υψηλότερα των θεσπισμένων ορίων από την Ε.Ε.) και σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούσαν κατά το μήνα Σεπτέμβριο είναι δικαιολογημένα τα αυξημένα ποσοστά βιοσύνθεσης φουμονισινών. Όσον αφορά της αφλατοξίνες φαίνεται πως αν και οι σήψεις δεν ήταν τόσο έντονες, παρόλα αυτά η βιοσύνθεση των τοξινών ευνοήθηκε από τις υψηλές θερμοκρασίες που επικράτησαν το διάστημα Ιουνίου – Σεπτεμβρίου 2014. Τα δεδομένα αυτά είναι σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία, όπου σε αντίστοιχη μελέτη του 2011-2012 στην Πολωνία παρατηρήθηκε πως η υψηλές θερμοκρασίες που επικράτησαν είχαν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μυκοτοξινών στην καλλιέργεια του αραβόσιτου (Czembor et al., 2015).

Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση των μυκήτων από τους συλλεχθέντες σπάδικες ώστε να προσδιοριστούν τα είδη τους και να γίνει προσδιορισμός της τοξικογόνου ή μη ικανότητάς τους. Οι απομονώσεις οδήγησαν στη δημιουργία συλλογής 1060 μυκήτων των γενών *Aspergillus* και *Fusarium* spp. μια συλλογής που πρώτη φορά δημιουργείται από καλλιέργεια αραβοσίτου στην Ελλάδα. Οι μύκητες αυτοί διαχωρίστηκαν σε πρώτη φάση με τη χρήση μακροσκοπικών και μικροσκοπικών μεθόδων ώστε να επιτευχθεί ένας πρωταρχικός διαχωρισμός. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επιλογή 150 στελεχών από τη Θεσσαλία και 150 από τη Μακεδονία τα οποία ελέγχθηκαν με μοριακές μεθόδους για την ακριβέστερη ταυτοποίησή τους, με το γονίδιο της καλμοντουλίνης, ένα γονίδιο που χρησιμοποιείται ευρέως και από άλλους ερευνητές για το διαχωρισμό των ειδών τόσο των φουζαρίων, όσο και των ασπεργίλλων (O’Donnell et al., 2000), το γονίδιο του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό των ειδών των φουζαρίων (O’Donnell et al., 1998c; Czembor et al., 2015) και το γονίδιο της ριβοσωμικής εσωτερικά μεταγραφόμενης περιοχής (ITS), το οποίο χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό κυρίως των ασπεργίλλων (Godet et al., 2009). Στις περισσότερες μελέτες αυτά είναι τα γονίδια τα οποία χρησιμοποιούνται για το μοριακό διαχωρισμό των ειδών, αν και σε πολλές περιπτώσεις γίνεται χρήση και του γονιδίου της τουμπουλίνης (β - tub) κυρίως για το διαχωρισμό των φουζαρίων (Watanabe et al., 2011), ενώ σε πολλές μελέτες γίνεται χρήση δύο και τριών γονιδίων ταυτόχρονα ώστε να βρεθούν τυχόν διαφοροποιήσεις και να γίνουν περαιτέρω συσχετισμοί μεταξύ των ειδών (Balajee et al., 2009). Τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης των μυκήτων σε όλους τους νομούς της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας έδειξαν ότι επικρατούν τα ιδιαίτερα μυκοτοξικογόνα είδη *F. verticillioides*, *F. proliferatum* και *A.*

flavus. Το γεγονός αυτό δεν ήταν παράδοξο καθώς σε όλη τη Μεσογειακή λεκάνη αλλά και στις περισσότερες παραγωγικές χώρες αραβοσίτου είναι αυτά τα στελέχη που κυριαρχούν. Σε μια αντίστοιχη τριετή μελέτη για την καλλιέργεια του αραβοσίτου σε όλη την Ευρώπη παρατηρήθηκε ότι το *F. verticillioides* κυριαρχεί σε ποσοστό 63%, το *F. proliferatum* ακολουθεί με 41% (στις μεσογειακές χώρες), ενώ στις χώρες της Βόρειας Ευρώπης ακολουθεί το *F. subglutinans* με ποσοστό 51%. Σημαντικό όμως είναι το γεγονός ότι στους νομούς Θεσσαλίας και Μακεδονίας υπήρχαν σημαντικές απομονώσεις και άλλων ειδών Φουζαρίων όπως *F. subglutinans*, *F. incarnatum*, *F. thapsinum*, *F. graminearum*, *F. brachygibbosum*, *F. oxysporum* και *F. solani*, είδη τα οποία δεν έχουν παλαιότερες βιβλιογραφικές αναφορές για την καλλιέργεια του καλαμποκιού στην Ελλάδα. Σε άλλες χώρες της Ευρώπης τα είδη *F. incarnatum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* και *F. solani*, έχουν απομονωθεί σε πολύ μικρά ποσοστά, ενώ το *F. thapsinum* και το *F. brachygibbosum* δεν έχει αναφορές στην καλλιέργεια του καλαμποκιού (Logrieco et al., 2002; Czembor et al., 2015). Όσον αφορά τις απομονώσεις Ασπεργίλλων πέραν του *A. flavus* υπήρξαν και απομονώσεις, σε μικρότερο βέβαια ποσοστό, του *A. niger*, ο οποίος δεν παρήγαγε αφλατοξίνη, γεγονός αναμενόμενο από τις προηγούμενες μελέτες (Frisvad et al., 2011).

Τα είδη τα οποία ταυτοποιήθηκαν γενετικά, στη συνέχεια εξετάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος MEGA 6 ώστε να γίνει φυλογενετική ανάλυσή τους. Στη Θεσσαλία και συγκεκριμένα για το Νομό Καρδίτσας οι 44 απομονώσεις φάνηκαν να διαχωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, του *F. verticillioides*, του *F. proliferatum* που συμπεριλαμβάνει το *F. incarnatum* (στέλεχος 39) και του *F. subglutinans*, με το *F. verticillioides* να παρουσιάζει ποσοστό εμφάνισης 66%. Τα 55 στελέχη που εξετάστηκαν από το Νομό Τρικάλων διαχωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες του *F. verticillioides* και του *F. proliferatum* και διαχωρίστηκαν ισόποσα (51% *F. verticillioides* και 49% *F. proliferatum*). Ο Νομός Λάρισας είχε ανάλογη διακλάδωση με διαχωρισμό των *F. verticillioides* και των *F. proliferatum*, όπου το *F. verticillioides* φαίνεται πως έχει μεγαλύτερη γενετική συγγένεια με το *F. thapsinum* (στέλεχος 652 και 661) το οποίο πρώτη φορά ανιχνεύθηκε σε καλλιέργεια αραβοσίτου. Ανάλογη ήταν και η διακλάδωση των τεσσάρων φουζαρίων που εξετάστηκαν για το Νομό Μαγνησίας. Τέλος όσον αφορά τους Ασπεργίλλους που απομονώθηκαν από την περιοχή της Θεσσαλίας υπήρξε γενετικός διαχωρισμός των *A. flavus* με μικρές γενετικές αποστάσεις.

Στη Μακεδονία ταυτοποιήθηκαν και άλλα είδη μυκήτων με τη μεγαλύτερη παραλλακτικότητα να παρατηρείται στο Νομό Καβάλας. Πιο συγκεκριμένα πέραν του *F. verticillioides* που αποτελούσε το 45 % των απομονώσεων βρέθηκαν αρκετά στελέχη που ανήκουν στα είδη *F. proliferatum* και *F. subglutinans*, ενώ απομονώθηκαν και στελέχη *F. incarnatum* (στέλεχη 272 και 294), *F. oxysporum* (στέλεχη 204 και 263) και *F. solani* (στέλεχη 181 και 259). Ο διαχωρισμός ήταν ανάλογος και για τις απομονώσεις του Νομού Σερρών όπου σχηματίστηκαν δύο μεγάλες διακλαδώσεις με τη μια να αποτελείται από απομονώσεις *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, και *F. subglutinans* και τη δεύτερη του *F. incarnatum* (στέλεχος 415). Όσον αφορά το Νομό Δράμας η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ήταν αποτελούνταν από δύο ομάδες, με τη πρώτη να διαιρείται σε ομάδες με στελέχη *F. verticillioides* και *F. proliferatum*, ενώ η δεύτερη περιείχε ένα ακόμα νέο είδος για την καλλιέργεια του αραβοσίτου το *F. brachygibbosum* (στέλεχος 604). Περαιτέρω μελέτη της συγγένειας των ειδών πραγματοποιήθηκε για στελέχη του Νομού Σερρών και με άλλο γονίδιο αναφοράς, αυτό του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF), όπου ο διαχωρισμός ήταν ανάλογος και αποδείχθηκε εν νέου ότι το *F. proliferatum*, το *F. subglutinans*, *F. graminearum* και το *F. incarnatum* ομαδοποιούνται μεταξύ τους και απέχουν σημαντικά από το *F. verticillioides*. Για το Ν. Δράμας, στελέχη του οποίου εξετάστηκαν επίσης με EF, αποδείχθηκε πως γενετικά είναι πιο συγγενή το *F. verticillioides* με το *F. solani* και το *F. proliferatum* με το *F. subglutinans*. Τέλος η μελέτη των Ασπεργίλλων έδειξε σημαντική γονιδιακή απόσταση του *A. flavus* και του *A. niger*, γεγονός αναμενόμενο καθώς ο πρώτος ανήκει στο section *Flavi* και ο δεύτερος στο section *Nigri*. Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν συγκρίθηκαν με κατάλληλες αλληλουχίες αναφοράς από τη Βάση Δεδομένων του NCBI.

Η συνέχεια της μελέτης απαιτούσε τον προσδιορισμό της μυκοτοξικογόνου ικανότητας επιλεγμένων στελεχών Φουζαρίων και Ασπεργίλλων με χρήση εγκεκριμένης μεθόδου ELISA. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν 70 στελέχη *Fusarium* spp. (40 από Θεσσαλία και 30 από Μακεδονία) τα οποία εξετάστηκαν για παραγωγή φουμονισίνης και 60 στελέχη *Aspergillus* spp. (30 από τη Θεσσαλία και 30 από τη Μακεδονία), τα οποία

εξετάσθηκαν ως προς τη παραγωγή αφλατοξίνης. Όσον αφορά την παραγωγή φουμονισίνης φάνηκε πως τα πλέον ισχυρά μυκοτοξικογόνα στελέχη ήταν αυτά που ανήκουν στο είδος *F. verticillioides* και *F. proliferatum* με τις τιμές να κυμαίνονται από 0 έως 95 ppm στο σύνολο των εξετασθέντων απομονώσεων. Τα δύο αυτά είδη είναι γνωστό ότι είναι ισχυρά μυκοτοξικογόνα από το 1992, ενώ είναι αξιοσημείωτο ότι παράγουν υψηλότερα ποσά τοξινών σε απομονώσεις της Νότιας Ευρώπης γεγονός που επαληθεύεται και από την παρούσα μελέτη (Logrieco et al., 2002). Οι αφλατοξίνες είχαν επίσης σημαντική διαβάθμιση και το πλέον μυκοτοξικογόνο στέλεχος φάνηκε να είναι ο *A. flavus* γεγονός που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Klich, 2007). Τα ποσοστά αφλατοξίνης κυμάνθηκαν από 0- 69 ppb στο σύνολο των εξετασθέντων απομονώσεων. Επίσης, το γεγονός ότι υπάρχει ένα σημαντικό ποσοστό μη-τοξικογόνων στελεχών του γένους *Aspergillus flavus* στους αγρούς της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας, είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό και μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία ιδιαίτερα αποτελεσματικών βιολογικών τρόπων αντιμετώπισης των αφλατοξινών στο καλαμπόκι με εφαρμογή μη τοξικογόνων στελεχών για αντιμετώπιση των τοξικογόνων, όπως έγινε με το μη τοξικογόνο στέλεχος AF36 στη καλλιέργεια του βαμβακιού το οποίο έχει υψηλή ικανότητα επιβίωσης και μεγάλη αποτελεσματικότητα στη μείωση του επιπέδου των αφλατοξινών (Chang et al., 2007).

Επισημαίνεται ότι οι μυκοτοξικογόνοι μύκητες έχουν την ικανότητα να παράγουν μυκοτοξίνες χωρίς να είναι εμφανή τα συμπτώματα στους διαφόρους ξενιστές, ενώ μπορεί επίσης να αποικίζουν εκτεταμένα τον ξενιστή και να μην υπάρχει αξιόλογη παραγωγή μυκοτοξινών. Επίσης, θα πρέπει να τονιστεί ότι η συγκομιδή καλαμποκιού από διάφορα χωράφια που παρουσιάζουν σημαντική διακύμανση επιμολύνσεων με μυκοτοξίνες μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της ανίχνευσης μυκοτοξινών κάτω από τα επιτρεπτά όρια λόγω ανάμιξης των σπόρων. Αυτό όμως δεν σημαίνει ότι δεν παραμένουν τα hot spots στους χώρους αποθήκευσης τους σε σιλό που θα μπορούσαν κάτω από κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες να συμβάλλουν σε εκτεταμένες μετασυσπλεκτικές μολύνσεις με μυκοτοξίνες.

Με βάση τα προαναφερθέντα δεδομένα, κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή τακτικών ελέγχων ανίχνευσης μυκοτοξινών στο καλαμπόκι σε προσυλλεκτικό και μετασυλλεκτικό επίπεδο από τους παραγωγούς, εμπόρους και αρμόδιες υπηρεσίες με απώτερο στόχο στη βελτίωση της ποιότητας και ασφάλειας του καλαμποκιού που θα μπορούσε να οδηγήσει στην αύξηση της ανταγωνιστικότητας και της εμπορικότητάς του στην ελληνική και διεθνή αγορά.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aldrich S, Scott W, Leng E (1975). Modern Corn Production 2nd edition, A. & L. Publications, Illinois.
2. Amaike S. and Keller N. (2010) *Aspergillus flavus* Annual review of Phytopathology. 49:107–33
3. AOAC Official Method 2005.08 «Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts and Peanut Butter», Liquid Chromatography with Post-Column Photochemical Derivatization, First Action 2005, 49.2.18A, (2005)
4. AOAC Official Method 999.07 Aflatoxin B1 and Total Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder–Immuno affinity Column Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization, First Action, 49.2.29, (1999)
5. Archer DB, Jeenes DJ, Mackenzie DA, Brightwell G, Lambert N, et al. (1990) Hen egg-white lysozyme expressed in, and secreted from, *Aspergillus niger* is correctly processed and folded. Bio-Technology 8: 741–745.
6. Baker S. and Bennett J., (2008), “ An overview of the Genus *Aspergillus*”, Ch. 1., p. 3-14, CRC Press
7. Balajee, Rui Kano, John W. Baddley, Stephen A. Moser, Kieren A. Marr, Barbara D. Alexander, David Andes, Dimitris P. Kontoyiannis, Giancarlo Perrone, Stephen Peterson, Mary E. Brandt, Peter G. Pappas, and Tom Chiller (2009) Molecular Identification of *Aspergillus* Species Collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. Journal of clinical microbiology, p. 3138–3141 Vol. 47, No. 10.
8. Benson D., (2008), GenBank. Nucleic Acids Research, 36, p. 25-30.
9. Bottalico, A. (1998) *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. J. Plant Pathol. 80, 85–103.
10. Brown DW, Cheung F, Proctor RH, Butchko RAE, Zheng L, et al. (2005) Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin producing fungus *Fusarium verticillioides*. Fungal Genet Biol 42: 848–861.
11. Bryden W.L., Logrieco A., Porter H.K., Vesonder R.F., Richard J.L., and Cole R.J. (2001). Other significant *Fusarium* mycotoxins. APS Press, Minnesota, pp.360-392.
12. Burgess L.W. , Jeffery S. (1990). Growth of *Fusarium graminearum* Schwabe group 1 on media amended with atrazine, chlorsulfuron or glyphosate in relation to temperature and osmotic potential. Soil Biology and Biochemistry. Volume 22, Issue 5, 665-670.
13. Burgess LW., Wearing AH, (1977). Distribution of *Fusarium roseum* 'Graminearum' group 1 and its mode of survival in eastern Australian wheat belt soils. Trans Br Mycol Soc 69:429-442.
14. Campbell KW, White DG. (1995). Inheritance of resistance to *Aspergillus* ear rot and aflatoxin in corn genotypes. Phytopathology 85: 886-96.
15. Cardwell K.F., J. G. Kling, B. Maziya-Dixon, and N. A. Bosque-Pérez. (2009). Interactions Between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and Insect Infestation in Four Maize Genotypes in Lowland Africa. Phytopathology 90:276-284.
16. CAST (Council for Agricultural Science, Technology), (2003). Mycotoxins. Risks in plants, animals and human systems. Task Force Report, 139 January, 2003. Ames, Iowa, U.S.A.

17. Chang p., Sheng S., Hua T., (2007). Nonafatoxigenic *Aspergillus flavus* TX9-8 competitively prevents aflatoxin accumulation by *A. flavus* isolates of large and small sclerotial morphotypes. International Journal of food Microbiology 114 257-279.
18. Cheeke, (1998) Natural toxicants in feeds forages and poisonous plants, 2nd Edition. Interstate Publishers Inc., Danville, IL, pp. 87-136.
19. Chelkowski, J., Zawadzki M., Zajkowski P., Logrieco A., and Bottalico A., (1990) Moniliformin production by *Fusarium* species. Mycotoxin Research 6: 41-45.
20. Clements, M.J. & White, D.G. (2004) Identifying sources of resistance to aflatoxin and fumonisin Contamination in corn grain. Journal of Toxicology, Vol.23, Nos. 2 & 3 pp. 381-396.
21. Cook RJ. (1980). *Fusarium* foot rot of wheat and its control in the Pacific Northwest. PI Dis 64:1061-1066.
22. Cotten and G. P. Munkvold (1998) Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in Maize Stalk Residue Ecology and Population Biology.
23. Czembor E, Stępień Ł, Waśkiewicz A. (2015) Effect of Environmental Factors on *Fusarium* Species and Associated Mycotoxins in Maize Grain Grown in Poland. PLoS ONE 10(7): e0133644. doi:10.1371/journal.pone.0133644
24. D'Mello J.P., C.M. Placinta, A.M.C. Macdonald (1999). *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. Animal Feed Science and Technology. Volume 80, Issues 3–4, 30 August 1999, Pages 183–205
25. Debets A.J., Swart K., Holub E.F., Goosen T., Bos C.J. (1990). Genetic analysis of *amdS* transformants of *Aspergillus niger* and their use in chromosome mapping. Molecular and General Genetics MGG, Volume 222, Issue 2, pp 284-290.
26. Desjardins, A.E., 2006. *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology. APS Press, St. Paul.
27. Diba K, Kordbacheh P, Mirhendi SH, Rezaie S and Mahmoudi M, 2007. Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. Pak. J. Med. Sci. 23(6):867-872.
28. Doohan, F.M., Brennan, J. & Cooke, B.M., (2003) Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. European Journal of Plant Pathology 109, 755–768.
29. Dragich M. and Nelson S. (2014). *Gibberella* and *Fusarium* Ear Rots of Maize in Hawai'i. College of Tropical Agriculture and Human Resources Plant Disease, PD-102
30. Felsenstein J., (1985) Confidence limits on phylogenies. An approach using the bootstrap. Evolution 39 (4), p783-191
31. Francis RG, Burgess LW. (1977). Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* 'Graminearum' in eastern Australia. Trans Br Mycol Soc 68:421-427.
32. Frey J.M., E. Usleber, Policy on characterization of antibodies used in immunochemical methods of analysis for mycotoxins and phycotoxins. Journal of AOAC International 86, pp. 868-871, (2003)
33. Frisvad J.C., T. O. Larsen, U. Thrane, M. Meijer, J. Varga, R. Samson, K. Nielsen. (2011). Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. PLoS ONE 6(8): e23496. doi:10.1371/journal.pone.0023496.
34. Frisvad JC, Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, (2009), Review of secondary metabolites and mycotoxin from the *Aspergillus niger* group. Anal Bioanal Chem .395:1225–1242.

35. Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-Omethylsterigmatocystin, *Aspergillus rambelli* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 28:442–53.
36. Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U (2007). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. J Agric Food Chem 55: 9727–9732.
37. Geiser, D. M. et al., (2004) FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Eur. J. Plant Pathol. 110, 473–479.
38. Gelderblom, K. Jaskiewicz, W.F. Marasas, P.G. Thiel, R.M. Horak, R. Vleggaar, N.P. Kriek, (1988). Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl Environ Microbiol. 54:1806-1811.
39. Gilbert J., Anklam E., (2002) Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. Trends in Analytical Chemistry 21, pp. 468-486,
40. Godet M & Munaut F. (2010). Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. FEMS Microbiol Lett 304 (2010) 157–168
41. Goldberg I, Rokem J S, Pines O (2006) Organic acids: old metabolites, new themes. J Chem Tech Biotechnology 81: 1601–1611.
42. Goldman G.H & Osmani S.A. «*The Aspergilli*», (2008). Mycology, 26, CRC Press.
43. Goswani R.S., Kistler H.C., (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular Plant Pathology 5, 515–25.
44. Griessler K., Rodrigues I., Handl J., and Hofstetter (2010). Occurrence of mycotoxins in Southern Europe. World Mycotoxin Journal, 3 (3): 301-309
45. Haghghi B., Thorpe C., Pohland A., Barnett R. «Development of a sensitive high-performance liquid chromatographic method for detection of aflatoxins in pistachio nuts», Journal of Chromatography, 206 p.101-108 (1981)
46. Hinrikson H., S. Hurst, T. Lott, D. Warnock, and C. Morrison. (2005) Assessment of ribosomal large-subunit D1–D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* Species. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, p. 2092–2103
47. Hinrikson H., S.F. Hurst, T.J. Lott, D.W. Warnock, C.J. Morrison., Jackson L.S. , J.J. Hlywka, K.R. Senthil, L.B. Bullerman, S.M. Musser, (1996) Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B-1 in an aqueous model system. J. Agric. Food Chem. 44, 906.
48. Jackson L.S., Bullerman L.B. (1999) Effect of processing on *Fusarium* Mycotoxins. Impact of processing on food safety. Volume 459 of the series Advances in Experimental Medicine and Biology pp 243-261
49. Jaimez J., C.A. Fente, B.I. Vazquez, C.M. Franco, A. Cepeda, G. Mahuzier, P. Prognon, (2000). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. Journal of Chromatography A, 882 p.1-10
50. Jodlbauer J. , P. Zöllner, W. Lindner (2000), Determination of zearanol, taleranol, zearalenone, α - and β -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chromatographia, Volume 51, Issue 11, pp 681-687
51. Karaffa L., Kubicek C. (2003). *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? Appl Microbiol Biotechnology 61(3):189-96.

52. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.BIB
53. Klemsdal S., Rahjoo V, J. Zad, J. Nikkhah, M. Gohari, M. Okhovvat, R. Bihmata, J. Razzaghian (2008). Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *J of Plant Pathology*. 90:463–468.
54. Klittich C.J, Leslie J.F., Nelson P.E. and Marasas W.F., (1997). *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A New Species in Section Liseola from Sorghum. *Mycologia* Vol. 89, No. 4, pp. 643-652
55. Kumar, P. Lava, S. Vera Reddy, and Waliyar, F. (2000). Management of aflatoxins in maize; J. of International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Andrah, Pradesh, India.
56. Lamprecht SC., Marasas WFO, Knox-Davies PS, Calitz FJ. (1990). Seed treatment and cultivar reaction of annual *Medicago* species and wheat to *Fusarium avenaceum* and *Fusarium graminearum*. gr. I. *Phytophylactica* 22: 201-208.
57. Larkin M., (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Application Note*, 23, PP 2947-48.
58. Leslie JF (1991). Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section Liseola). *Phytopathology* 81:1058–1060
59. Leslie, J. F., Anderson, L. L., Bowden, R. L. & Lee, Y. W., (2007) Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 25–32.
60. Leslie, J.F., Summerell, B.A., (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Pub., Ames, Iowa, USA.
61. Logrieco A., Moretti, A., Perrone, G. & Mulè, G., (2007) Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 11–16.
62. Logrieco A., Mulé G., Moretti A., Bottalico, A., (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 597-609.
63. Malekinejad, H; Maas-Bakker, R; Fink-Gremmels, J. (2006). Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet. J*, 172, 96–102.
64. Malekinejad, R. Maas-Bakker, J. Fink-Gremmels. (2006) Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *The Veterinary Journal* Volume 172, Issue 1, Pages 96–102
65. Mansson, M., M. L. Klejnstrup, R. K. Phipps, K. F. Nielsen, J. C. Frisvad, C. H. Gotfredsen, and T. O. Larsen. (2010). Isolation and NMR characterization of fumonisin B2 and a new fumonisin B6 from *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* 58:949–953.
66. Marasas W., Voigt W., Lamprecht S., Wyk P. (1988). Crown rot and head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* groups 1 and 2 in the southern Cape Province. *Phytophylactica* 20:385-389.
67. Marasas W.F.O., et al., (2004) Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: A potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming Fumonisin-Contaminated maize. *Journal of Nutrition* 134, 711-716.
68. Marin S., N.Magan, N.Belli, A.J. Ramos, R. Canela, V. Sanchis, (1999). Two dimensional profiles of fumonisin B sub(1) production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to

- environmental factors and potential for modeling toxin formation in maize grain, *Int. J. Food Microbiol.*, 51, 159–67.
69. Markoglou A., Doukas E., Ziogas B., 2008. Phenylpyrrole- resistance and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* Speare. *International Journal of Food Microbiology*, 146 (2): 130-6
 70. Maroto A., R. Boque, J. Riu, I. Ruisanchez, M. Odena «Uncertainty in aflatoxin B1 analysis using information from proficiency tests», *Anal. Bioanal Chem* 382, p.1562-1566 (2005)
 71. McMullen M, Jones R, Gallenberg D. (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81:1340-1348.
 72. Medina A, Mateo R, Lopez-Ocana L, Valle-Algarra FM, Jimenez M (2005) *Appl. Environ. Microbiology* .71:4696–4702
 73. Miller J.D., (1995), *Fungi and Mycotoxins in Grain: Implication for Stored Product Research*. Pergamon Vol. 31, No. 1, pp 1-16.
 74. Miller J.D., (2008) *Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges*. *Food Additives & Contaminants: Part A* 25,219–30.
 75. Miller J.D., Savard M.E., Schaafsma A.W., Seifert KA, Reid LA (1995) *Mycotoxin production by Fusarium moniliforme and Fusarium proliferatum from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop*. *Can. J. Plant Pathology* 17:233-239.
 76. Moretti, A., Susca, A., Mulé, G., Logrieco, A. F. & Proctor, R. H. (2013) *Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety*. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 57–66.
 77. Moss and Frank (1985), “The influence on mycotoxin production of interaction between fungi and their environment”. *Trichothecenes and other mycotoxins*, Edited by Lacey, chapter 24 p 257-268.
 78. Moss M., and Thrane H., (2004). *Fusarium taxonomy with relation to trichothecenes formation*. *Toxicol. Lett* 153: 23-28.
 79. Munkvold, G. P., (2003) *Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears*. *European Journal of Plant Pathology* 109, 705–713.
 80. Munkvold, G., McGee, D.C., Carlton, W.M., (1997) *Importance of different pathways for maize kernel infection by Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87, 209–217.
 81. Musser, SM and Plattner, RD. 1997. *Fumonisin composition in cultures of Fusarium moniliforme, Fusarium proliferatum and Fusarium nygamai*. *J Agric Food Chem*, 45: 1169–1173.
 82. Nelson P.E., Dignani C.M., Anaissie E.J. (1994), *Clinical Microbiology Reviews*, Vol 7, No 4, p. 479-504.
 83. Nielsen K.F., J. Smedsgaard, *Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology*. *Journal of Chromatography A* 1002, pp. 111-136, (2003)
 84. Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC (2009) *Review of secondary metabolites and mycotoxins from the Aspergillus niger group*. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 1225–1242.
 85. O’Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E and Ploetz RC (1998c). *Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2044–2049.

86. O'Donnell K., (2004). FUSARIUM-IDv.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473-479.
87. O'Donnell, K. (2000) Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*—*Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92: pp. 919-938.
88. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K. & Casper, H. H., (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7905–7910.
89. O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T, Cigelnik, E., (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41: pp. 61-78.
90. Osborne, L. E. & Stein, J. M. (2007). Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 103–108.
91. Palyusik M., B. Harrach, C.J. Mirocha, S.V. Pathre, (1980). Transmission of zearalenone and zearalenol into porcine milk. *Acta Vet Acad. Scient. Hungar.* 28: 217-222
92. Pariza M.W., Cook M. (2010) Determining the safety of enzymes used in animal feed. *Reg Toxicol Pharmacol* 56: 332–342.
93. Parker W, Ousmanova D, (2007) .Fungal generation of organic acids for removal of lead from contaminated soil. *Water Air Soil Pol* 179: 365–380.
94. Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L. (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology* 44, 207–38.
95. Pel H.J., de Winde J.H., Archer D.B., Dyer P.S., Hofmann G., et al. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnology*. 25:221–31.
96. Porter J.K., Bacon C.W., Wray E.M., Kuldau G.A., Leslie J.F., (2000). Fusaric acid (FA), other alkylopyridinecarboxylic acids (APAs), and Fumonisin (FB1) by *Fusarium thapsinum* and *Fusarium moniliforme*. *GC/MS analysis*, p41-47.
97. Proctor R.H., Brown D.W., Plattner R.D., Desjardins A.E., (2003) Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology*, 38 pp. 237–249.
98. Pujol I, J Guarro, J Gené and J Sala (1997) In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *Oxford Journals Medicine & Health Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Volume 39 Issue 2Pp. 163-167.
99. Rabie, C.J., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Lubben, A. & Vlegaar, R. 1982. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from southern Africa. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 517-521.
100. Raper K. and Fennell N. (2008) « The Genus *Aspergillus*». The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
101. Reid L.M., Hamilton R.E., Mather D.E., (1996) Screening maize for resistance to *Gibberella* Ear Rot, vol. 62 *Agriculture and Agri-Food Canada: Technical Bulletin*, Ottawa, ON, Canada.
102. Reynoso, Torres, Chulze, (1995) Fusaproliferin, beauvericin and fumonisin production by different mating populations among the *Gibberella fujikuroi* complex isolated from maize.

103. Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Vismer H.F., (2002) Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. Applied and Environmental Microbiology p. 2101–5.
104. Rheeder, Marasas, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, G.S. Shephard, D.J. Schalkwyk, (1992) *Fusarium moniliforme* and Fumonisin in Corn in Relation to Human Esophageal Cancer in Transkei. Phytopathologia 82, 353
105. Ritieni A, Logrieco A, Moretti A, Bottalico A, Corda P (1995) Occurrence and toxigenity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. Plant Dis 79:727–731
106. Ritieni A., Fogliano V, Randazzo G, Scarallo A, Logrieco A, Moretti A, Bottalico A and Mannina L (1995) Isolation and characterization of fusaproliferin, a new toxic metabolite from *Fusarium proliferatum*. Natural Toxins 3: 17–20
107. Saitou N. and Nei M. (1987). The Neighbor – Joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular and Biology Evolution, 16. p218- 233.
108. Samson RA. (1992). Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. Biotechnology 23:335–90.
109. Samson, R. A., and E. S. Van Reenen-Hoekstra. (1988). Introduction to food-borne fungi, 3rd ed. Central Bureau Voor Schimmel Culturs, Baam, The Netherlands.
110. Sewram V., Mshicileli N., Shepard G.S., Vismer H.F., Rheeder J.P., Lee Y.W., Leslie J.F., Marasas W.F.O., (2005). Production of fumonisin B and C analogues by several *Fusarium* species. J. Agric. Food Chem. 53, 4861–4866.
111. Singh SB, Zink DL, Polishook JD, Dombrowski AW, Darkin-Rattray SJ, Schmatz DM, Goetz MA. (1997) Apicidins: Novel cyclic tetrapeptides as coccidiostats and antimalarial agents from *Fusarium pallidoroseum*. Tetrahedron Lett. 37 (45):8077–8080.
112. Smith, E G McMillan and J B Castillo (1997). Effect of feeding blends of *Fusarium* mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. Journal of Animal Science. Vol. 75 No. 8, p. 2184-2191.
113. Spanjer M., P. Rensen, J. Scholten, (2005) Multimycotoxin analysis by LC-MS/MS in a single extract Book of abstracts, The World Mycotoxin Forum-The Third Conference, 10-11 November 2005, Noordwijk aan Zee, The Netherlands , Presentation
114. Sutton J.C., (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology 71, 499-504.
115. Taylor & Francis (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum* - Canadian Journal of Plant Pathology. Volume 4, Issue 2, 195-209
116. Taylor J.W., Geiser D.M., J.W. Dorner and B.W. Horn, (2000). The phylogenetic of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. Fungal Genetics and Biology 31, 169–179.
117. Tendulkar S., Gupra A., Chattoo B., (2003). A simple protocol for isolation of fungal DNA. Biotechnology Letters, 25 (22), p 1941-1944.
118. The CIMMYT Maize Program. (2004). Maize Diseases: A Guide for Field Identification. 4th edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.
119. Torres AM, Reynoso MM, Rojo FG, Ramirez ML, and Chulze SN. (2001). *Fusarium* species (section *Liseola*) and its mycotoxins in maize harvested in northern Argentina. Food Addit Contam. (9):836-43.

120. Tsitsigiannis, D.I., Dimakopoulou M., Antoniou P.P., Tjamos E.C. (2012). Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1): 158–174
121. Van Wyk PS, Pauer GDC, Rheeder JP, Los O, Marasas WFO. (1988). Reaction of different wheat cultivars to crown rot caused by *Fusarium graminearum* group 1. *Phytophylactica* 20:69-72
122. Velluti A., Marín B., Bettucci A., Ramos B., Sanchis B., (2000). The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology* Volume 59, Issues 1–2, Pages 59–66.
123. Vincelli, P., & Parker, G. (2002) Fumonisin, Vomitoxin, and Other Mycotoxins in Corn Produced by *Fusarium* Fungi. UK Cooperative Extension Service. University of Kentucky – College of Agricultural ID-121.
124. Waalwijk C., Van der Lee T., Vries, I., Hesselink T., Arts J., Kema G., (2004). Synteny in toxigenic *Fusarium* species: the fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 533–544.
125. Watanabe M., Takahiro Yonezawa, Ken-ichi Lee, Susumu Kumagai, Yoshiko Sugita-Konishi, Keiichi Goto and Yukiko Hara-Kudo, (2011) Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology* 2011, 11:322
126. Wearing A.H., Burgess L.W., (1977). Distribution of *Fusarium roseum* ‘Graminearum’ Group 1 and its mode of survival in eastern Australian wheat belt soils. *Transactions of the British Mycological Society.* Volume 69, Issue 3, 429–442.
127. Weidenborner M. (2008), “Mycotoxins in Food Stuffs”. Springer USA
128. Wheeler, Stipanovic and Puckhaber. (1999). Phytotoxicity of equisetin and epi-equisetin isolated from *Fusarium equiseti* and *F. pallidoroseum* *Mycological Research* Volume 103 / Issue 08, pp 967-973.
129. White, T., T. Burns, S. Lee, and J. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
130. Yu J, G.A. Payne, B.C. Campbell, B. Guo, T.E. Cleveland, J.F. Robens, N.P. Keller, J.W. Bennett, W.C. Nierman, (2008), «Mycotoxin Production and Prevention of Aflatoxin Contamination in Food and Feed» *The Aspergilli*. Ch.27, p.457-472.
131. Θανασουλόπουλος, (1995), *Μυκητολογικές ασθένειες φυτών μεγάλης καλλιέργειας*, Ζήτη
132. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 «για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα».
133. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Επιτροπής της 23ης Φεβρουαρίου 2006 «για καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα».
134. Καραμάνος Α., (2002). *Τα σιτηρά των εύκρατων κλιμάτων*. Εκδόσεις Παπαζήσης, Αθήνα
135. Κατής Ν. (2010). *Ιολογία Φυτών*, Εκδόσεις Πήγασος
136. Πορετσάνου-Χατζηνικολάου Άννα (1984, ΕΚΠΑ) «Επιδημιολογική έρευνα Ασπεργίλλωσης σε αγροτικές περιοχές».

137. Τζάμος Ε., (2007). Γενική Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα- Πειραιάς
138. Τσώλης (2014) Αραβόσιτος, Βαμβάκι, Ρύζι. Τελευταίες εξελίξεις, νέες τάσεις στην καλλιέργεια. Αγροτύπος