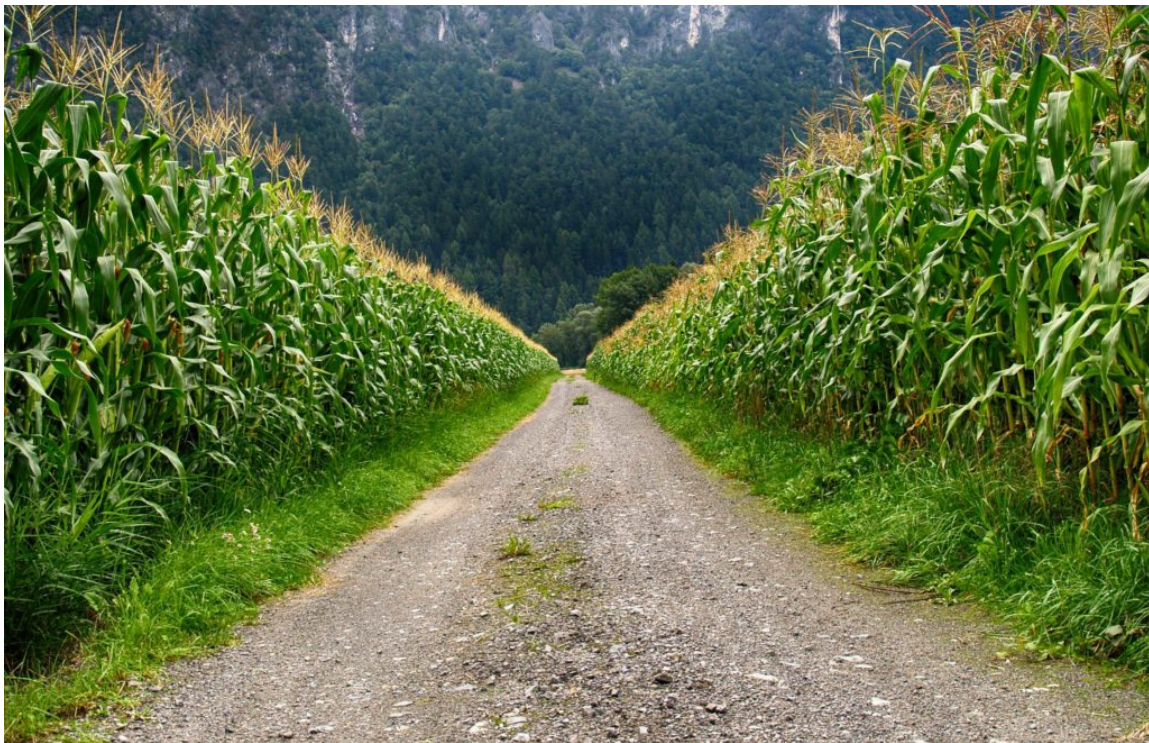


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Ταυτοποίηση και συχνότητα παθογόνων αιτίων
σήψεων σπαδίκων καλαμποκιού και ανίχνευση μυκοτοξινών
σε καλλιέργειες αραβοσίτου στην Ελλάδα**



ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ ΓΚ. ΠΑΝΤΖΟ

ΑΘΗΝΑ 2019

Επιβλέπων: Δ.Ι. Τσιτσιγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Ταυτοποίηση και συχνότητα παθογόνων αιτίων
σήψεων σπαδίκων καλαμποκιού και ανίχνευση μυκοτοξινών
σε καλλιέργειες αραβοσίτου στην Ελλάδα**

**Idetification and frequency of causal agents of ear rots and
detection of mycotoxins in maize crops in Greece**

ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ ΓΚ. ΠΑΝΤΖΟ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Δ.Ι. Τσιτσιγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλη: Ε.Ι. Παπλωματάς, Καθηγητής

Σ.Ε. Τζαμος, Επίκουρος Καθηγητής

«Προσπάθησε να μη γίνεις ένας άνθρωπος της επιτυχίας
αλλά ένας άνθρωπος της αξίας».....

Albert Einstein

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημητρίου Τσιτσιγιάννη τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη βοήθεια του κατά τη διεξαγωγή της μελέτης, την καθοδήγησή του, την εμπιστοσύνη που έδειξε απέναντί μου κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, το χρόνο που αφιέρωσε για την κατάστρωση της πειραματικής διαδικασίας και για τη διόρθωση της παρούσας διατριβής. Ο Καθηγητής κ. Επαμεινώνδας Παπλωματάς και ο Επίκουρος Καθηγητής κ. Σ. Τζάμος αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές τους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψηφία διδάκτωρ Μαρία Ηλιάδη για την υποστήριξη της, τις γνώσεις που μου μετέφερε, το χρόνο που αφιέρωσε.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου που ήταν δίπλα μου και με στήριξαν καθ'ολη την διάρκεια της μελέτης καθώς και στην αδελφή μου Ναταλί για την πολύτιμη υποστήριξή της κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους για την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα της προσπάθειάς μου και ανέχτηκαν την ελλιπή μου παρουσία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Αραβόσιτος (<i>Zea mays</i>).....	9
1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	11
1.1.2 Ο αραβοσιτος στην Ελλάδα.....	18
1.2 Ασθένειες και Εχθροί Αραβοσίτου.....	20
1.2.1 Σήψεις σπαδικά (Ear Rots).....	30
1.3 Το γένος <i>Fusarium</i> spp.....	31
1.3.1 Ο μύκητας <i>Fusarium graminearum</i>	32
1.3.2 Ο μύκητας <i>Fusarium proliferatum</i>	33
1.3.3 Ο μύκητας <i>Fusarium verticillioides</i>	35
1.3.4 Ο μύκητας <i>Fusarium subglutinans</i>	37
1.3.5 Ο μύκητας <i>Fusarium semitectum</i> (<i>Fusarium incarnatum</i>).....	38
1.3.6 Ο μύκητας <i>Fusarium thapsinum</i>	39
1.3.7 Μοριακή ταυτοποίηση ειδών <i>Fusarium</i> spp.....	40
1.4 Το γένος <i>Aspergillus</i> spp.....	43
1.4.1 Περιγραφή.....	44
1.4.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	44
1.4.2 Η ομάδα <i>Aspergillus flavus</i>	45
1.4.2.1 Το είδος <i>Aspergillus parasiticus</i> - Γενικά χαρακτηριστικά.....	46
1.4.2.2 <i>Aspergillus flavus</i> - Γενικά χαρακτηριστικά.....	46
1.4.3 <i>Aspergillus</i> spp. Section <i>Nigri</i>	47
1.4.4 Μοριακή ταυτοποίηση ειδών <i>Aspergillus</i> spp.....	48
1.5 Μόλυνση των δημητριακών και των προϊόντων τους με μυκοτοξίνες	51
1.5.1 Αφλατοξίνες - Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες.....	52
1.5.1.1 Μύκητες που παράγουν αφλατοξίνες.....	53
1.5.1.2 Ανίχνευση αφλατοξινών στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του.....	53
1.5.1.3 Όρια αφλατοξινών με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του.....	54
1.5.1.4 Επιπτώσεις αφλατοξινών στην υγεία των καταναλωτών.....	54
1.5.2 Φουμονισίνες - Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες.....	55
1.5.2 .1 Μύκητες που παράγουν φουμονισίνες.....	56
1.5.2 .2 Ανίχνευση φουμονισινών στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του.....	56
1.5.2.3 Όρια φουμονισινών με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του.....	57
1.5.2 .4 Επιπτώσεις φουμονισινών στην υγεία των καταναλωτών.....	58
1.5.3 Ζεαραλενόνες - Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες.....	58
1.5.3.1 Μύκητες που παράγουν ζεαραλενόνες.....	59

1.5.3.2	Ανίχνευση ζεαραλενόνων στον αραβόσιτο.....	59
1.5.3.3	Επιπτώσεις ζεαραλενόνων στην υγεία των καταναλωτών.....	59
1.5.4	Τριχοθηκίνες-Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες.....	60
1.5.4.1	Μύκητες που παράγουν τριχοθηκίνες	60
1.5.4.2	Ανίχνευση τριχοθηκινών στον αραβόσιτο.....	61
1.5.4.3	Επιπτώσεις τριχοθηκινών στην υγεία των καταναλωτών.....	61
1.5.5	Τεχνικές προσδιορισμού μυκοτοξινών.....	61
1.5.5.1	ΤεχνικέςΧρωματογραφία.....	61
1.5.5.2	Ενζυμική Δοκιμή Ανοσοπροσρόφησης (Enzyme Linked Immunosorbent Assays, ELISA).....	62
1.5.5.3	Προσδιορισμός μυκοτοξινών με την χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υλικών ανάπτυξης μυκήτων ικανών να παράγουν μυκοτοξίνες.....	62
1.5.5.4	Ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή μυκοτοξινών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	63
1.6	Ευρωπαϊκή νομοθεσία.....	64
1.7	Διατροφικά σκάνδαλα.....	66
2.	Σκοπός	68
3.	Υλικά και μέθοδοι	70
3.1	Δειγματοληψία αραβοσίτου.....	70
3.2	Επεξεργασία σπαδικών αραβοσίτου.....	73
3.3	Τεχνική απομόνωσης μυκήτων.....	73
3.3.1	Θρεπτικά υλικά απομόνωσης μυκήτων.....	75
3.4	Ανάλυση μυκοτοξινών	76
3.4.1	Ανάλυση μυκοτοξινών από αραβόσιτο.....	76
3.4.1.1.	Διαδικασία εκχύλισης των τοξινών από κάθε δείγμα.....	77
3.4.1.2.	Agra Quant® ELISA Fumonis (0,25-5ppm), Romer Lab.....	77
3.4.1.2	Agra Quant® ELISA Aflatoxin (4-40 ppb), Romer Labs.....	78
3.5	Διαδικασία ταυτοποίησης μυκήτων <i>Fusarium</i> spp. και <i>Aspergillus</i> spp.....	79
3.5.1	Διαχωρισμός με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	79
3.5.2	Μοριακος χαρακτηρισμός	80
3.5.2.1	Εξαγωγή DNA.....	80
3.5.2.2	Ενίσχυση και καθαρισμός προϊόντων DNA για αλληλούχιση	81
3.5.2.3	Καθαρισμός προϊόντος PCR χωρίς στήλες με Ammonium acetate	82
3.5.2.4	Αλληλούχιση δειγμάτων.....	82
3.5.2.5	Φυλογενετική ανάλυση.....	82
4.	Αποτελέσματα	85
4.1	Αξιολόγηση της έντασης της ασθeneias στους αγρούς αραβοσιτου στην Θεσσαλία και Μακεδονία	85

4.2 Αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθένειας σε αγρούς αραβοσίτου στην Ελλάδα.....	86
4.3 Ανίχνευση και προσδιορισμός αφλατοξινών και φουμονισινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας	88
4.4 Απομονώσεις μυκήτων <i>Fusarium</i> spp. και <i>Aspergillus</i> spp. από αγρούς Θεσσαλίας και Μακεδονίας	92
4.5 Μορφολογική διάκριση μυκήτων <i>Fusarium</i> spp. και <i>Aspergillus</i> spp. από αγρούς Θεσσαλίας και Μακεδονίας.....	93
4.6 Πληθυσμιακή διακύμανση μυκήτων του γένους <i>Fusarium</i> spp. και <i>Aspergillus</i> spp. σε καλλιέργειες αραβοσίτου στην Θεσσαλία και Μακεδονία.....	98
4.7 Φυλογενετική ανάλυση απομονώσεων μυκήτων <i>Fusarium</i> spp. και <i>Aspergillus</i> spp. από καλλιέργειες αραβοσίτου στην Θεσσαλία και Μακεδονία.....	104
4.8 Προσδιορισμός μετεωρολογικών δεδομένων της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας.....	113
5. Συμπεράσματα.....	119
6. Βιβλιογραφία.....	124

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μύκητες του γένους *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.* προσβάλλουν μεγάλο εύρος ξενιστών και ανήκουν στην ομάδα των κύριων μυκοτοξικογόνων μυκήτων, καθώς παράγουν φουμονισίνες και αφλατοξίνες, αντίστοιχα. Στον αραβόσιτο προκαλούν σήψεις σπαδικών και η μόλυνση ξεκινά προσυλλεκτικά από το μετάξωμα και συνεχίζεται σε μετασυλλεκτικό στάδιο όπου και εντείνεται. Στη χώρα μας οι μύκητες αυτοί προκαλούν σοβαρά προβλήματα σήψεων στο καλαμπόκι και συχνά επιμόλυνση των σπόρων με μυκοτοξίνες, με αποτέλεσμα τη σημαντική υποβάθμιση του προϊόντος. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η απομόνωση και ταυτοποίηση μυκήτων του γένους *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.* από σπάδικες σε καλλιέργειες καλαμποκιού σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας, καθώς και η ανίχνευση των παραγόμενων μυκοτοξινών. Για το σκοπό αυτό, το 2016 πραγματοποιήθηκε μια σειρά δειγματοληψιών καλαμποκιού, από 75 αγρούς της Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας. Ακολούθησε απομόνωση και μοριακή ταυτοποίηση των μυκήτων, έγινε εκτίμηση της έντασης και σοβαρότητας της ασθένειας για τον κάθε αγρό όπου υπήρχε διακύμανση της προσβολής από 0-100%. Επιπροσθέτως πραγματοποιήθηκε ποσοτικός έλεγχος αφλατοξινών και φουμονισινών. Τα ποσοστά μυκοτοξινών κυμαίνονταν από 0-373 ppm για τις φουμονισίνες και 0-261 ppb για της αφλατοξίνες. Τα ποσοστά μυκοτοξινών σε αρκετές περιοχές ήταν υψηλότερα από τα ανώτατα θεσπισμένα όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή τακτικών ελέγχων ανίχνευσης μυκοτοξινών στον αραβόσιτο σε προσυλλεκτικό και μετασυλλεκτικό επίπεδο με απώτερο στόχο στη βελτίωση της ποιότητας και ασφάλειας του καλαμποκιού.

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

ABSTRACT

Fusarium spp. and *Aspergillus* spp. strains can produce carcinogenic mycotoxins (i.e. fumonisins and aflatoxins) that are particularly harmful in animals and humans. They have a wide range of hosts and the infection usually starts during anthesis or the physiological maturity of the seed at preharvest level and can further increase at postharvest level in storage, resulting in degradation of the produced product. In maize, they cause ear rots and the infection usually starts at the silking corn stage or after insect infestations at preharvest level and increase during storage at postharvest level. In Greece, these fungi cause severe corn ear rots and often contaminate the kernels with mycotoxins, resulting in significant degradation of the product and reduction of corn quality. The goal of this study was the isolation and identification of *Fusarium* spp. and *Aspergillus* spp. strains and the detection of the produced mycotoxins from greek maize fields. In 2016, a number of samples were collected from 75 different maize fields from Central and Northern Greece and a large number *Fusarium* and *Aspergillus* strains were isolated and identified by molecular methods. The disease incidence and severity was assessed in each field and ranged between 0 and 100%. In addition, quantitative analysis of aflatoxins and fumonisins was performed by ELISA. The levels of mycotoxins were ranged from 0-373 ppm for fumonisins and 0-261 ppb for aflatoxins and in some fields, mycotoxin levels were higher than the maximum established EU limits of contamination. Based on the results of this study, it is necessary to conduct regular inspections for mycotoxins in maize at pre- and postharvest level to improve the quality of the product and securing the safety of the consumers.

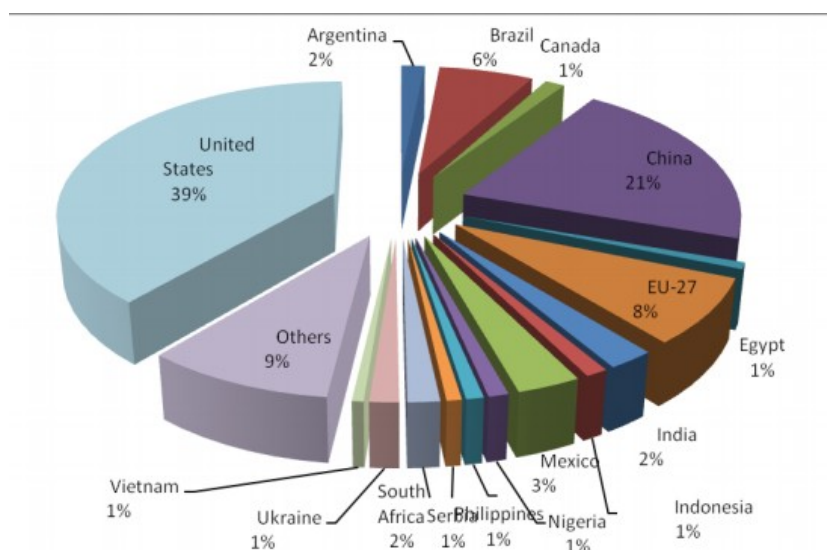
Keywords: *Fusarium*, *Aspergillus*, Fumonisins, Aflatoxins, Maize

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αραβόσιτος (*Zea mays*)

Το καλαμπόκι ή αραβόσιτος ανήκει στο γένος *Zea* και στο είδος *Zea mays* L. και είναι το τρίτο σε σπουδαιότητα σιτηρά στον κόσμο μετά το σιτάρι και το ρύζι. Παρόλο ότι είναι ένα από τα φυτά που μελετήθηκαν περισσότερο, ακόμη δεν υπάρχει σύμπτωση απόψεων μεταξύ των επιστημόνων ως προς την περιοχή προέλευσης του και την πορεία εξέλιξής του. Θεωρείται φυτό της Αμερικής και κατά γενική άποψη αναφέρεται ότι εξημερώθηκε πριν από 7000 έως 10000 χρόνια στο Νότιο Μεξικό (Wilkes 2004).

Ο αραβόσιτος καλλιεργείται ουσιαστικά σε όλες τις χώρες του κόσμου (Εικ. 1). Προσαρμόζεται σε ευρύ φάσμα κλιματολογικών συνθηκών, λόγω των πολλών διαφορετικών τύπων του, οι οποίοι έχουν βιολογικό κύκλο από 2 έως 11 μήνες. Η καλλιεργούμενη έκταση με καλαμπόκι το 2006 ανήλθε σε 1444 εκ. στρ. και η παραγωγή σε 695 εκατομ. τόνους σπόρου (FAOSTAT 2006).

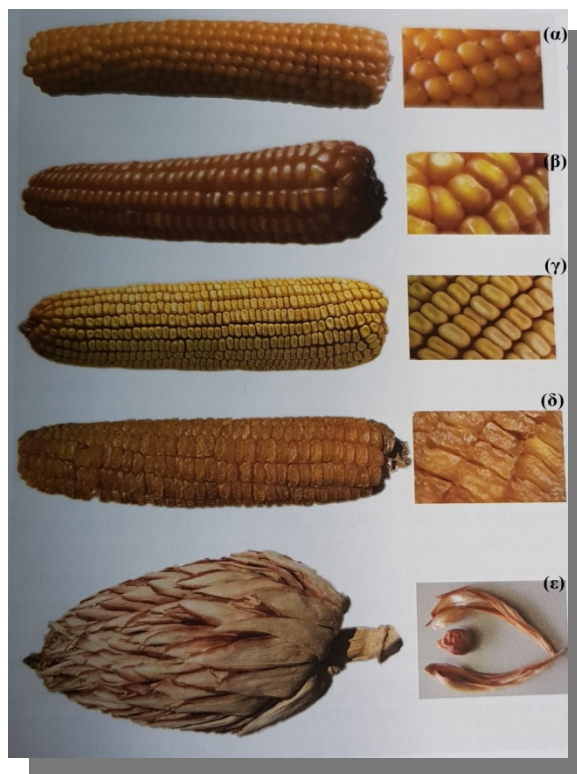


Εικόνα 1. Κατανομή % της παγκόσμιας παραγωγής καλαμποκιού (2008 Foreign Agricultural Service /USDA)

Σε παγκόσμιο επίπεδο καλλιεργείται κυρίως για τον καρπό του και δευτερευόντως για παραγωγή βιομάζας. Ο καρπός χρησιμοποιείται κυρίως ως ζωοτροφή, μια όμως σημαντική ποσότητα καταναλώνεται από τον άνθρωπο με διάφορους τρόπους (λαχανικό, αλεύρι) και επίσης αποτελεί πηγή διαφόρων βιομηχανικών προϊόντων. Το άμυλο που είναι το κύριο συστατικό του σπόρου, είναι η βάση για τις περισσότερες βιομηχανικές χρήσεις του σπόρου του καλαμποκιού. Τα τελευταία χρόνια ο καρπός χρησιμοποιείται ευρέως στις ΗΠΑ καθώς και σε άλλες χώρες για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Το λάδι των σπόρων καταναλώνεται από τον άνθρωπο και έχει

διάφορες χρήσης στη χημική βιομηχανία. Η χλωρή βιομάζα χρησιμοποιείται στη διατροφή των ζώων με άμεση κατανάλωση ή μετά από ενσίρωση. Τα στελέχη αξιοποιούνται ως καύσιμη ύλη, για παρασκευή χαρτιού κ.λπ. Με την πρόοδο της βιοτεχνολογίας αναμένεται να δημιουργηθούν υβρίδια καλαμποκιού για ειδικές βιομηχανικές χρήσεις, αλλάζοντας τη χημική σύσταση του σπόρου.

Το καλαμπόκι παρουσιάζει μεγάλη πολυμορφία τύπων (Εικ. 2). Ανάλογα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, την δομή και τις ιδιότητες του αμύλου του κόκκου διακρίνουμε έξι βασικούς τύπους. Αυτοί είναι: το μικρόκοκκο (pop), το σκληρό (flint), το οδοντόμορφο (dent), το αλευρώδες (floury), το γλυκό (sweet) και το ενδεδυμένο (pod) καλαμπόκι. Ωστόσο δημιουργήθηκαν και ειδικοί τύποι καλαμποκιού που αφορά κυρίως ορισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπόρου, που συνδέονται με την παραγωγή εξειδικευμένων προϊόντων. Οι τύποι είναι: καλαμπόκι με βελτιωμένη ποιότητα πρωτεΐνης, καλαμπόκι με υψηλή περιεκτικότητα σε λάδι, καλαμπόκι με υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη, κηρώδες καλαμπόκι, γλυκό καλαμπόκι, λευκό καλαμπόκι, popcorn, baby corn, καλαμπόκι για ενσίρωση, καλαμπόκι για κατασκευή πίπας καπνίσματος (pipe corn).



Εικόνα 2. Σπάδικες και κόκκοι των βασικών τύπων καλαμποκιού (α) μικρόκοκκο, (β) σκληρό, (γ) οδοντόμορφο, (δ) γλυκό, (ε) ενδεδυμένο (Τασοπούλου-Παπακώστα Δέσποινα, 2012)

1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο αραβόσιτος είναι μονοκότυλο, ποώδες, ετήσιο φυτό, μόνοικο-δίκλινο, σταυρογονιμοποιούμενο και ανεμόφιλο και παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλία φαινοτύπων από όλα τα σιτηρά (Εικ. 3). Αυτή η ποικιλομορφία δίνει τη δυνατότητα και το πλεονέκτημα στους βελτιωτές να συνδυάζουν διαφορετικούς γενοτύπους και να επιλέγουν μορφολογικά επιθυμητούς φαινοτύπους.



Εικόνα 3. Νεαρό φυτό καλαμποκιού
(<https://sp.depositphotos.com/20087015/stock-photo-sunlit-young-corn-plants.html>)

Το **ριζικό σύστημα** του αραβοσίτου διακρίνεται:

1. Στο εμβρυακό ριζικό σύστημα που αποτελείται:

α) από την πρωτογενή εμβρυακή ρίζα, προέκταση του ριζιδίου και

β) από τις δευτερογενείς εμβρυακές ρίζες (3-5 συνήθως). Το εμβρυακό ριζικό σύστημα μπορεί να επιζήσει σε όλη τη διάρκεια της ζωής του φυτού και να φθάσει σε βάθος 1,5-2 m.

2. Στο κύριο ριζικό σύστημα που αποτελείται:

α) από τις ρίζες που εκφύονται μέσα στο έδαφος και

β) από τις εναέριες ρίζες που εκφύονται από τους πρώτους κόμβους του στελέχους πάνω από την επιφάνεια του εδάφους. Οι εναέριες ρίζες που εκφύονται από κόμβους κοντά στην επιφάνεια του εδάφους εισχωρούν στο έδαφος και συμβάλλουν στη στήριξη και διατροφή του φυτού. Το κύριο ριζικό σύστημα του αραβοσίτου είναι πλούσιο και μπορεί να φτάσει σε βάθος 2,5 m, αν και ο κύριος όγκος του αναπτύσσεται στα πρώτα 60 cm του εδάφους.

Στέλεχος

Το στέλεχος του αραβοσίτου είναι συμπαγές, κυλινδρικό και αποτελείται από κόμβους και μεσογονάτια διαστήματα. Τα μεσογονάτια είναι βραχύτερα προς τη βάση του φυτού και είναι ευθύγραμμα και σχεδόν κυλινδρικά στο επάνω μέρος του φυτού και αυλακωτά στο κάτω μέρος

(Εικ. 4). Σε κάθε κόμβο, εκτός από τον τελευταίο, υπάρχει καταβολή οφθαλμού, ενώ στους κατώτερους κόμβους υπάρχουν και καταβολές ριζών.



Εικόνα 4. Καλλιεργούμενος αγρός με αραβόσιτο (<https://pxhere.com/el/photo/1096871>)

Οι οφθαλμοί βρίσκονται εναλλάξ στο στέλεχος, στις μασχάλες των φύλλων και στη βάση του αυλακιού του μεσογονατίου. Από τους οφθαλμούς, εκείνοι που βρίσκονται στο μέσο και ανώτερο τμήμα του στελέχους μπορεί να εξελιχθούν σε σπάδικες (δευτερεύοντα στελέχη χωρίς δικό τους ριζικό σύστημα) από τους οποίους οι περισσότεροι εκφυλίζονται και μόνο ο ένας ή οι δύο ανώτεροι εξελίσσονται σε κανονικούς σπάδικες, ενώ εκείνοι που βρίσκονται κοντά στη βάση του στελέχους (λίγο πιο πάνω από την επιφάνεια του εδάφους ή αμέσως κάτω απ' αυτή) μπορεί να εξελιχθούν σε δευτερεύοντα στελέχη, γνωστά σαν «αδέλφια» που αναπτύσσουν δικό τους ριζικό σύστημα. Το ύψος του φυτού του αραβοσίτου και η διάμετρος του στελέχους του κυμαίνονται εντός ευρύτατων ορίων, αν και τα περισσότερα υβρίδια που καλλιεργούνται σήμερα στη χώρα έχουν ύψος 2-2,5 m και διάμετρο στελέχους 3-5.

Φύλλα

Ο αριθμός και το μέγεθος των φύλλων ποικίλλουν πολύ στον αραβόσιτο ανάλογα με την πρωιμότητα της κάθε ποικιλίας (ή υβριδίου) και το περιβάλλον. Έτσι ο αριθμός των φύλλων κυμαίνεται από 9-44, το μήκος τους από 30-150cm και το πλάτος τους από 8-15 cm. Τα φύλλα του αραβοσίτου εκφύονται κατ' εναλλαγή από τους κόμβους του στελέχους και αποτελούνται από τον κολεό και το έλασμα (στη βάση και στο άκρο του φύλλου, αντίστοιχα). Ο κολεός περιβάλλει στενά το μεσογονάτιο του στελέχους μέχρι τον επόμενο προς τα επάνω κόμβο. Το έλασμα του φύλλου είναι λογχοειδές, επίμηκες, φέρει πολλές τρίχες μικρού μεγέθους στην

επάνω επιφάνεια και είναι τραχύ, ενώ στην κάτω επιφάνεια δεν έχει τρίχες και είναι λείο. Το έλασμα, σε αντίθεση με τον κολεό, απομακρύνεται από το στέλεχος. Στο σημείο που διαχωρίζεται ο κολεός με το έλασμα υπάρχει μια μεμβρανώδης εκβλάστηση που ονομάζεται «γλωσσίδα». Δεξιά και αριστερά από το κεντρικό νεύρο και τη βάση του, το έλασμα προεκτεινόμενο σχηματίζει τα «ωτία», που είναι δύο μικρές, τριγωνικές επεκτάσεις, με χρώμα ανοικτότερο πάντα από το χρώμα του ελάσματος και πάχος μικρότερο. Εκτός από τα κύρια φύλλα υπάρχουν και τα βράκτια φύλλα, που εκφύονται από τους κόμβους της βάσης του σπάδικα και τον καλύπτουν πλήρως ή μερικώς (Εικ. 5).



Εικόνα 5. Φύλλα και σπάδικας καλαμποκιού. (Τασοπούλου-Παπακώστα, 2012)

Ταξιανθία και άνθη

Ο αραβόσιτος είναι φυτό μόνοικο-δίκλινο, επομένως στο ίδιο φυτό υπάρχουν και τα αρσενικά και τα θηλυκά άνθη, σε ξεχωριστές όμως ταξιανθίες. Η αρσενική ταξιανθία βρίσκεται στην κορυφή του κύριου στελέχους, ενώ οι θηλυκές ταξιανθίες εκφύονται από κόμβους του στελέχους. Κατά την άνθηση του αραβόσιτου πρώτη εμφανίζεται η αρσενική ταξιανθία (φόβη) και μετά από 7-10 ημέρες εμφανίζονται οι πρώτοι στύλοι της θηλυκής ταξιανθίας (σπάδικας), γι' αυτό και χαρακτηρίζεται σαν φυτό πρωτανδρικό. Τα άνθη στη νεαρή τους ηλικία μπορεί να είναι ερμαφρόδιτα, αργότερα όμως αποβάλλονται τα αρσενικά όργανα από τα άνθη του σπάδικα και τα θηλυκά από τα άνθη της φόβης. Η εμφάνιση καμιά φορά σπόρων στη φόβη και αρσενικών ανθέων στην άκρη του σπάδικα εξηγείται από το γεγονός ότι μερικά άνθη έμειναν ερμαφρόδιτα.

α) Αρσενική ταξιανθία: Είναι φόβη με κλώνους που είναι διατεταγμένοι σπειροειδώς γύρω από τον άξονά της (Εικ. 6). Από κάθε κόμβο των κλώνων εκφύονται σταχύδια συνήθως κατά ζεύγη, που το ένα είναι έμμισχο και το άλλο άμισχο. Κάθε σταχύδιο περιβάλλεται από δύο χνουδωτά ωοειδούς σχήματος λέπυρα και αποτελείται από δύο άνθη από τα οποία το ένα είναι πιο ανεπτυγμένο. Κάθε άνθος περικλείνεται από τον χιτώνα και τη λεπίδα και περιέχει 3 στήμονες,

δύο μικρές γλωχίνες και υποτυπώδη στύλο. Η πλήρης ανάπτυξη της αρσενικής ταξιανθίας υποδηλώνει το τέλος της αύξησης του φυτού σε ύψος (Δαλιάνης, 1983).



Εικόνα 6. Η θηλυκή και η αρσενική ταξιανθία του καλαμποκιού (Τασοπούλου-Παπακώστα, 2012)

β) Θηλυκή ταξιανθία είναι στάχυς με παχυμένο τον άξονα και ονομάζεται σπάδικας ή ρόκα (Εικ 6). Στην περιφέρειά του βρίσκονται τα σταχύδια σε ζεύγη και διατεταγμένα σε σειρές (συνήθως 16-22) κατά μήκος. Ο σπάδικας αποτελείται από την κνήμη, τα βράκτια και τον άξονα. Η κνήμη αποτελεί τον μίσχο που συνδέει τον σπάδικα με το στέλεχος και έχει κόμβους και μεσογονάτια διαστήματα, που είναι μεγαλύτερα στη βάση και μικρότερα στην κορυφή, συμβαίνει δηλαδή το αντίστροφο απ' ό τι στα μεσογονάτια του στελέχους. Ο κύριος σπάδικας του φυτού αναπτύσσεται στον έκτο περίπου κόμβο κάτω από τη φόβη, ενώ στους 4 έως 6 κόμβους που βρίσκονται πιο κάτω απ' αυτόν εμφανίζονται υποτυπώδεις σπάδικες και σε περίπτωση μικρής πυκνότητας των φυτών μπορεί ένας απ' αυτούς να δημιουργήσει άξονα και να παράγει σπόρους.

Εξαίρεση αποτελούν τα πολύδυμα υβρίδια που παράγουν περισσότερους από έναν κανονικούς σπάδικες κατά φυτό. Κάθε σταχύδιο έχει δύο κοντά λέπυρα και περιλαμβάνει δύο άνθη από τα οποία μόνο το ανώτερο είναι συνήθως γόνιμο. Κάθε άνθος αποτελείται από τον χιτώνα, τη λεπίδα και τον ύπερο. Ο χιτώνας και η λεπίδα βρίσκονται δεξιά και αριστερά από κάθε άνθος και είναι πιο λεπτά και πιο κοντά από τα λέπυρα. Ο ύπερος αποτελείται από την ωοθήκη και τον στύλο. Ο στύλος έχει τριχοειδή στίγματα και γι' αυτό έχει χνουδωτή εμφάνιση. Οι στύλοι των ανθέων της βάσης και του μέσου του σπάδικα αναπτύσσονται ταυτόχρονα και νωρίτερα από τους στύλους των ανθέων της κορυφής, αν και εμφανίζονται πρώτοι οι στύλοι του μέσου

σπάδικα σε σχέση με αυτούς της βάσης, επειδή οι τελευταίοι έχουν να διανύσουν μεγαλύτερη απόσταση.



Εικόνα 7. Γύρη καλαμποκιού επάνω σε φύλλο καλαμποκιού (<https://pixabay.com/el>)

Ο αραβόσιτος είναι φυτό σταυρογόνιμο, επομένως η γύρη ενός φυτού σπάνια γονιμοποιεί τους στύλους του ίδιου φυτού (Εικ. 7). Σε συνθήκες αγρού το 97% ή και περισσότερο των σπόρων ενός σπάδικα γονιμοποιείται με γύρη από άλλα φυτά και σπάνια μπορεί να συμβούν και αυτογονιμοποιήσεις, σε μικρό ποσοστό. Η πρωτανδρική ιδιότητα του αραβοσίτου και κυρίως η άφθονη παραγωγή γύρης ευνοούν τις σταυρογονιμοποιήσεις.

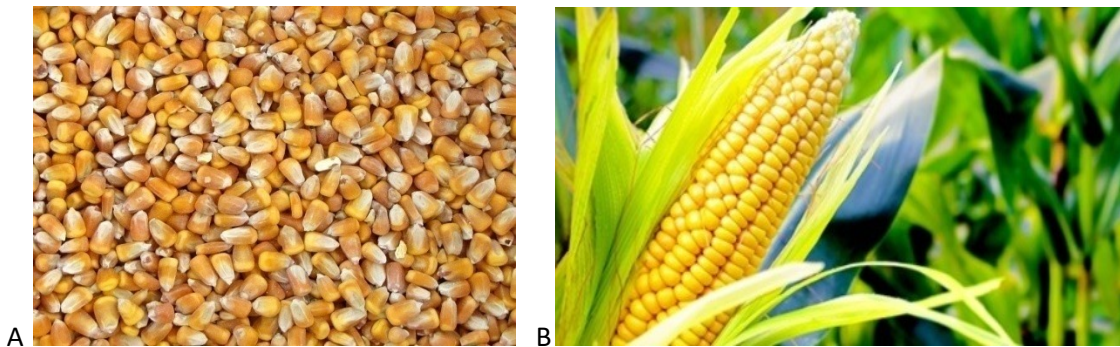
Καρπός και σπόρος

Ο σπόρος του αραβοσίτου είναι καρύωση, δηλαδή καρπός ξηρός, μονόσπερμος με περικάρπιο περγαμνηνοειδές που συμφύεται με το σπέρμα. Το σχήμα του σπόρου ποικίλλει και μπορεί να είναι πεπλατυσμένο, τριγωνικό, ωοειδές, σφαιρικό ή κωνικό. Το μέγεθος του σπόρου ποικίλλει, ενώ και το βάρος των χιλίων σπόρων μπορεί να κυμαίνεται εντός ευρύτατων ορίων (100-400 g). Ο αραβόσιτος κατατάσσεται σε 7 τύπους ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των σπόρων του και πιο συγκεκριμένα σε σκληρό, οδοντωτό, αλευρώδη, σακχαρώδη, κηρώδη, μικρόκοκκο και «ντυμένο».(Εικ 8). Οι διαφορές μεταξύ των παραπάνω τύπων τους κάνουν κατάλληλους για διαφορετικές χρήσεις (π.χ. ο μικρός για ποπ-κόρν, ο ντυμένος για ζωοτροφή κ.ο.κ.).

Κάθε σπόρος αραβοσίτου διακρίνεται σε τρία κύρια μέρη: το περικάρπιο, το ενδοσπέρμιο και το έμβρυο. Το τμήμα με το οποίο συνδέεται ο σπόρος με τον άξονα λέγεται ποδίσκος. Το περικάρπιο είναι το εξωτερικό μέρος του σπόρου και ο ρόλος του είναι προστατευτικός, παρεμποδίζοντας ουσιαστικά την είσοδο παθογόνων (μυκήτων ή βακτηρίων) στο εσωτερικό του. Το ενδοσπέρμιο φέρει εξωτερικά το περίβλημα ή testa (τοιχώματα σπερματικής βλάστης) που περιβάλλεται από το περικάρπιο. Και τα δύο μαζί αποτελούν τον φλοιό του σπόρου, τα πίτυρα,

που είναι πλούσια σε κυτταρίνες και ημικυτταρίνες και αποτελούν το 6% περίπου του βάρους του. Το ενδοσπέρμιο αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του σπόρου (περίπου 80%), αποτελείται από άμυλο και πρωτεΐνες και έχει σύσταση υαλώδη, αλευρώδη ή και μικτή (Εικ. 8).

Το εξωτερικό τμήμα των κυττάρων του ενδοσπερμίου αποτελεί την αλευρώνη, που χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες και αποτελεί το 8-12% του βάρους του σπόρου. Ο κύριος ρόλος του ενδοσπερμίου είναι τροφοδοτικός για το νεαρό φυτάρειο μέχρι να αρχίσει η δραστηριοποίηση της ρίζας και η λειτουργία της φωτοσύνθεσης. Το έμβρυο είναι μια μικρογραφία του φυτού και φέρει τις καταβολές των πρώτων οργάνων του. Βρίσκεται στη μια πλευρά του σπόρου και μάλιστα προς το οξύ άκρο (σημείο σύνδεσης με τον άξονα του σπάδικα) και αποτελείται από δύο κύρια μέρη, τον άξονα του εμβρύου και το ασπίδιο. Ο άξονας του εμβρύου αποτελείται από το ριζίδιο και το πτερίδιο που θα δώσουν γέννηση στο υπόγειο και υπέργειο τμήμα του φυτού, αντίστοιχα.



Εικόνα 8. (Α) Σπόροι και (Β) Καρπός αραβοσίτου αντίστοιχα (<https://pixabay.com/el>)

Το ριζίδιο περιβάλλεται από την κολεόρριζα και το πτερίδιο περιβάλλεται από το κολεόπτιλο, που αποτελούν μέρη του κεντρικού άξονα του εμβρύου και έχουν ρόλο προστατευτικό. Το ασπίδιο περιβάλλει τον κεντρικό άξονα του εμβρύου, αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του και συνιστά την κοτύλη. Το ασπίδιο είναι πλούσιο σε λάδι (35-40%) και περιέχει πολλές ουσίες που παίζουν σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια του φυτρώματος και της αναπτύξεως. Το μέγεθος του εμβρύου ποικίλλει εντός ευρύτατων ορίων ανάλογα με τον τύπο και το υβρίδιο του αραβοσίτου. Το χρώμα του σπόρου ποικίλλει από λευκό έως μαύρο ανάλογα με το περίβλημα, την αλευρώνη ή το ενδοσπέρμιο. Οι σπόροι που προέρχονται από τον ίδιο σπάδικα διαφέρουν στο μέγεθος και το σχήμα ανάλογα με τη θέση τους στον άξονα του σπάδικα. Οι σπόροι που βρίσκονται κοντά στη βάση και την κορυφή του σπάδικα είναι στρογγυλοί, ενώ οι υπόλοιποι είναι λιγότερο ή περισσότερο πεπιεσμένοι.

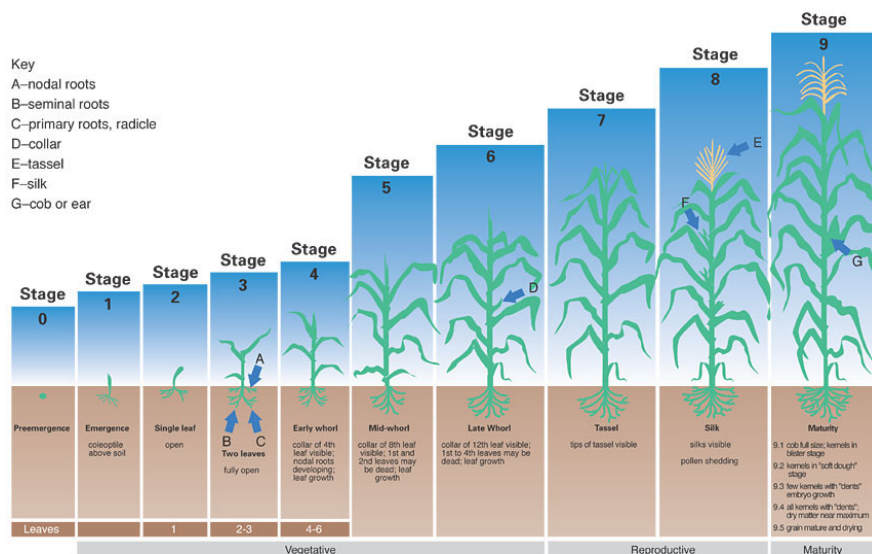
Σημαντικές διαφορές επίσης υπάρχουν μεταξύ των ποικιλιών αλλά και των υβριδίων ως προς το σχήμα των σπόρων. Από πλευράς σύστασης, ο σπόρος του αραβοσίτου περιέχει κατά μέσο όρο 61% άμυλο, 13,5% νερό, 10% πρωτεΐνη, 6% πεντοζάνες, 4% λάδι, 2,3% κυτταρίνες, 1,4%

σάκχαρο, 1,4% ανόργανες ύλες και 0,4% διάφορες άλλες ουσίες. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αραβόσιτος θεωρείται το δεύτερο πλουσιότερο δημητριακό σε λάδι μετά τη βρώμη (Καραμάνος, 1999).

Στάδια ανάπτυξης

Το πρώτο στάδιο του βιολογικού κύκλου περιλαμβάνει τη βλάστηση του σπόρου, το φύτεμα και την εμφάνιση του νεαρού φυταρίου. Κατά τη σπορά, ο σπόρος του αραβόσιτου έρχεται σε επαφή με την υγρασία του εδάφους, απορροφά νερό από το περικάρπιο και αρχίζει να διογκώνεται. Πρώτα επιμηκύνεται το ριζίδιο και η κολεόρριζα που το περιβάλλει και βγαίνουν από το περικάρπιο μέσα σε 2-3 ημέρες, ενώ 1-2 ημέρες αργότερα πραγματοποιείται και η έξοδος του περιδίου με το κολεόπτιλο που το περιβάλλει. Το ριζίδιο τρυπά στη συνέχεια την κολεόρριζα και επιμηκύνεται ακόμα περισσότερο, ενώ σταδιακά εμφανίζονται και οι υπόλοιπες εμβρυακές ρίζες που χρησιμεύουν για να στερεώσουν το νεαρό φυτό και να το βοηθήσουν στην απορρόφηση νερού και θρεπτικών στοιχείων κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του.

Η έξοδος (ανάδυση) του φυταρίου πάνω από την επιφάνεια του εδάφους γίνεται με επιμήκυνση του κολεόπτιλου και του πρώτου μεσογονατίου διαστήματος. Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ σποράς και φυτρώματος εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την υγρασία και την επάρκεια οξυγόνου στο έδαφος. Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης το νεαρό φυτάριο εξέρχεται από την επιφάνεια του εδάφους 6-10 ημέρες μετά τη σπορά. Ο αραβόσιτος βλαστάνει σε θερμοκρασίες πάνω από 10 °C, ενώ σε θερμοκρασίες 10-15 °C ο χρόνος φυτρώματος επιμηκύνεται και μπορεί να φθάσει τις 14 ημέρες. Ικανοποιητικό και ομοιόμορφο φύτεμα επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες 16-20 °C (Καραμάνος, 1999). Η βλαστική ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από ταχύτατη αύξηση του ριζικού συστήματος, επιμήκυνση των μεσογονατίων του στελέχους και γρήγορη εμφάνιση και ανάπτυξη των φύλλων (Εικ. 9).



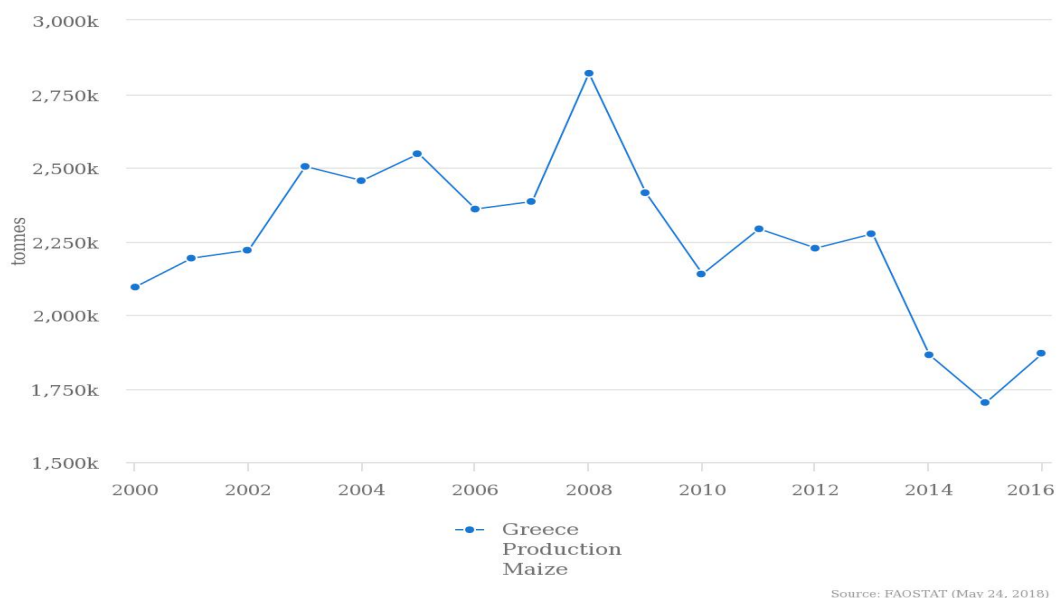
Εικόνα 9. Στάδια ανάπτυξης φυτού (βλαστική φάση). (Τασοπούλου-Παπακώστα, 2012)

Το τελικό ύψος του φυτού είναι σύνθετο αποτέλεσμα του αριθμού και του μήκους των μεσογονατίων, που επηρεάζονται κυρίως από τις υδατικές συνθήκες και τη θερμοκρασία. Επάρκεια υγρασίας και υψηλές θερμοκρασίες (30-33°C) μικραίνουν την περίοδο της βλαστικής ανάπτυξης. Γενικά, η περίοδος από το φύτευμα μέχρι την εμφάνιση της φόβης διακρίνει τους γονότυπους σε πρώιμους ή όψιμους. Κατά την άνθηση του αραβοσίτου πρώτα εμφανίζεται η φόβη στην κορυφή του φυτού, που προηγείται 7-10 ημέρες από την εμφάνιση των στύλων των θηλυκών ανθέων του σπάδικα. Η γύρη ωριμάζει σταδιακά, είναι άφθονη και μεταφέρεται με τον άνεμο σε μεγάλες αποστάσεις. Κατά τη διάρκεια της άνθησης των θηλυκών ανθέων του σπάδικα, επιμηκύνονται οι στύλοι και εμφανίζονται ως νήματα έξω από τα βράκτεια φύλλα του σπάδικα (στάδιο μεταξώματος). Οι γυρεόκοκκοι προσκολλώνται στο στίγμα, βλαστάνουν και η εκβλάστηση εισέρχεται στον στύλο και επιμηκύνεται με κατεύθυνση την ωοθήκη. Στο άκρο της εκβλάστησης υπάρχουν ο βλαστικός πυρήνας και οι δύο σπερματικοί πυρήνες, οι οποίοι εισέρχονται στον εμβρυόσακκο. Ο ένας σπερματικός πυρήνας ενώνεται με το ωοκύτταρο σχηματίζοντας το έμβρυο, ενώ ο δεύτερος ενώνεται με τους δύο πολικούς πυρήνες και παράγεται το ενδοσπέρμιο που είναι τριπλοειδές (διπλή γονιμοποίηση αγγειοσπέρμων).

Αποτέλεσμα της διπλής γονιμοποίησης είναι το φαινόμενο της ξενίας που παρατηρείται στον αραβόσιτο με την εκδήλωση της κυριαρχίας των γονιδίων της γύρης (πατρική κυριαρχία). Το φαινόμενο είναι εμφανές όταν υπάρχει διαφορά μεταξύ των γονέων σε χαρακτηριστικά του ενδοσπερμίου όπως στο χρώμα ή στη σύστασή του. Υψηλές θερμοκρασίες και ξηρασία κατά την επικονίαση επηρεάζουν δυσμενώς την ικανότητα των στύλων να συγκρατούν και να προωθούν τη βλάστηση των γυρεοκόκκων, αποξηραίνοντας την επιφάνειά τους με αποτέλεσμα τον μειωμένο αριθμό των γονιμοποιημένων σπερμοβλαστών (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2008). Μετά τη γονιμοποίηση ο κόκκος αναπτύσσεται σχηματίζοντας αρχικά ένα γαλακτώδες υγρό πλούσιο σε ζάχαρα που σε διάστημα 15 ημερών μετατρέπεται σε άμυλο. Στη συνέχεια παρατηρείται αφυδάτωση του κόκκου και σκλήρυνσή του. Ένδειξη φυσιολογικής ωρίμανσης στον αραβόσιτο αποτελεί η εμφάνιση μιας ζώνης μαύρου χρωματισμού στον ποδίσκο του κόκκου. Στη χώρα μας, η συγκομιδή του αραβοσίτου πραγματοποιείται σε υγρασία κόκκων περίπου 15% (Καραμάνος, 1999).

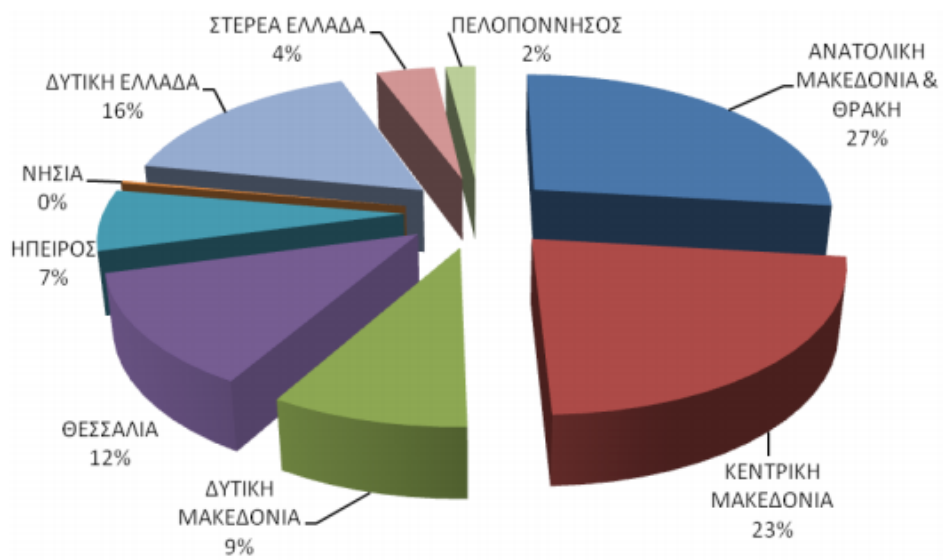
1.1.2 Ο αραβόσιτος στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα τέλη του 20^{ου} αιώνα ο αραβόσιτος καλλιεργούνταν στα 2.200.000 στρέμματα από τη συνολική καλλιεργούμενη έκταση των 37.000.000 στρεμμάτων και η απόδοση κυμαινόταν σε επίπεδο 550.000 τόνων, σύμφωνα με πληροφορίες του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Σύμφωνα με νεότερα στοιχεία του Παγκοσμίου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) παρατηρείται αύξηση των καλλιεργούμενων εκτάσεων καθώς και πολλαπλασιασμός της παραγωγής όπου ανέρχεται στους 1.702.230 τόνους το 2016 (Εικ. 10).



Εικόνα 10. Πορεία παράγωγης αραβόσιτου από το 2000-2016 σύμφωνα με τον FAO

Περισσότερο ο αραβόσιτος καλλιεργείται στη Μακεδονία, στη Θράκη και στη Θεσσαλία, από της όποιες προέρχεται το 80 % της παραγωγής, ενώ ακολουθούν η Στερεά Ελλάδα, η Πελοπόννησος και η Ήπειρος. Πιο σημαντική η καλλιέργεια είναι στην Βόρεια Ελλάδα καθώς καλλιεργούνται περισσότερα από 1.000.000 στρέμματα, ενώ στην Κεντρική Ελλάδα καλλιεργούνται περισσότερα από 300.000 στρέμματα (Εικ. 11).



Εικόνα 11. Κατανομή καλλιεργούμενης έκτασης σε αραβόσιτο στην Ελλάδα (ΕΣΥΕ 2016)

1.2 Ασθένειες και Εχθροί Αραβοσίτου

Οι κυριότερες μυκητολογικές και βακτηριολογικές ασθένειες που αποτελούν πρόβλημα για τη χώρα μας είναι οι παρακάτω (Θανασουλοπουλος 1995, Κατής 2010)

1. Σήψεις ριζών (*Pithium* spp., *Diplodia zae*, και *Gibberella fugikuroi*)

Δημιουργείται πρόβλημα όταν επικρατούν συνθήκες που δεν ευνοούν το γρήγορο φύτρωμα των σπόρων (υψηλή υγρασία εδάφους, χαμηλή θερμοκρασία, κακής ποιότητας σπόρος κ.α). για την αντιμετώπιση τους συνιστάται η χρησιμοποίηση υγιούς και καλής ποιότητας απολυμασμένου σπόρου, αβαθής σπορά, ισορροπημένη λίπανση, όψιμη σπορά και αμειψισπορά με καλλιέργειες που δεν παρουσιάζουν ευπάθεια στους μύκητες αυτούς (Εικ. 12).



Εικόνα 12. Σήψεις ριζών (*Pithium* spp.)(www.pioneer.com)

2. Τήξεις νεαρών φυταρίων (*Pithium* spp., *Diplodia zae*, και *Gibberella fugikuroi*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp.)

Δημιουργείται πρόβλημα τόσο από προσβολές του σπόρου πριν η κατά τη βλάστηση του καθώς και σε προσβολές φυτών πριν η μετά την ανάδυση τους ευνοούνται από υψηλή υγρασία και χαμηλή θερμοκρασία) (Εικ. 13).



Εικόνα 13. Τήξεις νεαρών φυταρίων από *Diplodia zeae*, και *Gibberella fugikuroi* (www.pioneer.com)

3. Σήψεις στελέχους και σπαδικών (*Diplodia zeae*, *Gibberella zeae*)

Ασθένεια διαδεδομένη σε περιοχές με ψυχρό και υγρό καιρό. Η σήψη του στελέχους που προκαλείται από τον *Diplodia zeae* χαρακτηρίζεται από φαιό χρωματισμό στους κατώτερους κόμβους, ενώ το στέλεχος γίνεται πιο εύθραυστο. Τα φυτά παρουσιάζουν συμπτώματα μάρανσης και τάση για πλάγιασμα. Το χαρακτηριστικό σημείο της ασθένειας είναι η εμφάνιση μαύρων στιγμάτων (πυκνίδια= καρποφορίες του παθογόνου) κοντά στους κόμβους. Η σήψη στελέχους από τον *Gibberella zeae* παρουσιάζει ανάλογα συμπτώματα, αλλά μπορεί να διακριθεί από τη ρόδινη- κόκκινη απόχρωση που παίρνει η εντεριόνη των προσβεβλημένων φυτών. Με υγρό καιρό το στέλεχος καλύπτεται από λευκό μυκήλιο με μαύρα στίγματα (περιθήκια= καρποφορίες του μύκητα). Η σήψη του σπάδικα που προκαλείται από τον *Diplodia zeae* εκδηλώνεται εξωτερικά με κιτρίνισμα των βρακτείων φύλλων, ενώ εσωτερικά αναπτύσσεται λευκό μυκήλιο. Σε αντίθεση, όταν οι κόκκοι παραμένουν υπανάπτυκτοι, η σήψη στους σπάδικες οφείλεται στον μύκητα *Gibberella zeae*, τα βράκτια φύλλα παίρνουν εξωτερικά ένα κοκκινωπό χρωματισμό, ενώ εσωτερικά αναπτύσσεται λευκό-ρόδινο μυκήλιο. Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι δυνατό να εκδηλωθούν και μετά τη συγκομιδή, κατά την αποθήκευση (Εικ. 14).



Εικόνα 14. Σήψεις σπαδικα *Gibberella zeae* (www.pioneer.com)

4. Άνθρακας (*Ustilago maydis* D.C.)

Ο κοινός άνθρακας του καλαμποκιού προσβάλλει κυρίως το σπάδικα και σπάνια τα λοιπά υπέργεια τμήματα του φυτού. Χαρακτηριστικό της ασθένειας είναι οι όγκοι των τελειοσπορείων οι οποίοι περιβάλλονται από μια αρκετά ανθεκτική μεμβράνη μέχρι την ωρίμανση (Εικ. 15).



Εικόνα 15. Παραμορφωμένος σπάδικας με όγκους προκαλούμενος από τον μύκητα *Ustilago maydis* (https://www.allposters.com/-sp/Corn-Zea-Mays-Infected-with-Corn-Smut-Ustilago-Maydis-Posters_i6016227_.htm)

5. Μαύρη σήψη στελέχους (*Macrophomina phaseolina*)

Η προσβολή εμφανίζεται στους κατώτερους κόμβους, οι οποίοι παρουσιάζουν έναν καστανόφαιο ή αχυρόχρωμο χρωματισμό. Εσωτερικά παρατηρείται πλήρης διαλυτοποίηση της εντεριώνης και πληθώρα μικρών μαύρων σκληρωτίων του μύκητα. Αποτέλεσμα της προσβολής είναι η εμφάνιση συμπτωμάτων πρώιμης ωρίμανσης και η τάση των στελεχών να θραύονται στο ύψος του λαιμού. Τα συμπτώματα αυτά εμφανίζονται σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης των φυτών του αραβόσιτου. Λόγω της ικανότητας να σχηματίζει σκληρώτια, ο μύκητας έχει τη δυνατότητα να διατηρείται στο έδαφος και τα φυτικά υπολείμματα επί μακρό χρονικό διάστημα και υπό αντίξοες συνθήκες. Για τον λόγο αυτό δεν υπάρχουν αποτελεσματικά μέτρα καταπολέμησης. Η ασθένεια ευνοείται στην καλλιέργεια σε ξηρά εδάφη και υψηλές θερμοκρασίες (Εικ 16).



Εικόνα 16. Προσβολή των κατώτερων κόμβων από τον μύκητα *M. phaseolina* και εμφάνιση καστανοφαίου μεταχρωματισμού (<http://www.agphd.com/ag-phd-newsletter/2016/12/19/anthracnose-stalk-rot>)

6. Ελμινθοσποριάσεις (*Helminthosporium turcicum* Pass., *Helminthosporium carbonum* Ullstrup., *Helminthosporium maydis*)

Προσβάλλουν τα φύλλα του αραβόσιτου (αρχίζοντας από τα κατώτερα και προχωρώντας προς τα επάνω) και προκαλούν κηλιδώσεις με ευκρινή όρια. Οι κηλιδώσεις μετατρέπονται σε νεκρώσεις οι οποίες σε έντονες προσβολές προκαλούν την αδρανοποίηση και τον θάνατο των φύλλων. Λόγω μειωμένης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας υπολογίζεται ότι οι ασθένειες αυτές μπορούν να μειώσουν τις αποδόσεις μέχρι 50%. Οι προσβολές από το *H. turcicum* προκαλούν κηλίδες επιμήκεις μεγαλύτερες από εκείνες που οφείλονται στο *H. maydis*. Οι κηλίδες από το *H. carbonum* μοιάζουν με εκείνες του αλλά το *H. maydis* αλλά το *H. carbonum* προσβάλλει και τους σπάδικες. Τα παθογόνα διαχειμάζουν σε υπολείμματα προσβεβλημένων φύλλων στον αγρό. Οι μολύνσεις γίνονται με κονίδια την άνοιξη και ευνοούνται από υγρό καιρό και υψηλές θερμοκρασίες (Εικ. 17).



Εικόνα 17. Κηλιδώσεις με ευκρινή όρια σε φύλο καλαμποκιού *Helminthosporium maydis* (<http://questromtech.wixsite.com/juanmagsasaka/single-post/2015/12/31/Corn-Disease-and-Disease-Management>)

7. Σήψη σπόρων αραβόσιτου (*Gibberella fugikuroi*)

Η προσβολή εμφανίζεται όχι εντοπισμένη αλλά διάσπαρτη σε διάφορους σπόρους του σπάδικα. 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 αραβόσιτου, συνήθως μετά την εμφάνιση του βαθουλώματος στην κορυφή του οδοντοειδούς αραβοσίτου. Η αρχική μόλυνση πιστεύεται ότι γίνεται από τις οπές που προκαλούν τα διάφορα έντομα που προσβάλλουν τον σπάδικα, αλλά επίσης και μέσω των βρακτείων, όταν αυτά είναι αραιά ή αφήνουν ακάλυπτο ένα τμήμα του σπάδικα. Ξηρός και θερμός καιρός θεωρείται ότι ευνοεί την εξάπλωση της ασθένειας. Μπορεί να αντιμετωπισθεί με τη χρήση ειδικών υβριδίων ανεκτικών στις προσβολές (Εικ. 18).



Εικόνα 18. Προσβολή σπάδικα και εμφανής εξάνθηση του μύκητα *Gibberella fugikuroi* (www.pioneer.com)

8. Σήψη του άξονα του σπάδικα (*Nigrospora oryzae*)

Ο μύκητας προσβάλλει αρχικά τη ράχη του σπάδικα όπου προκαλεί έναν γκρίζο αποχρωματισμό και διαλυτοποιεί τα κύτταρα της εντεριώνης ενώ αφήνει ανέπαφο μόνο τον αγωγό ιστό. Παράλληλα προσβάλλονται και οι βάσεις των σπόρους όπου εμφανίζονται οι καρποφορίες του μύκητα με τη μορφή μαύρων στιγμάτων. Η ασθένεια γίνεται αντιληπτή συνήθως μετά τη συγκομιδή. Ο μύκητας έχει μειωμένη παθογένεια και προσβάλλει μόνο φυτά αραβόσιτου 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 αραβόσιτου και κυρίως με τους δευτερεύοντες σπάδικες που δεν έχουν συλλέγει (Εικ. 19).



Εικόνα 19. Σήψη του σπάδικα από *Nigrospora oryzae* (<https://u.osu.edu/mastercorn/nigrospora-ear-rot>)

9. Ανθρακας των ταξιανθιών (*Sphacelotheca reliana*)

Προσβάλλει μόνο τις δύο ταξιανθίες του φυτού του αραβόσιτου οι οποίες μετατρέπονται μερικά ή ολικά σε μάζες μαύρων σπορίων (αρχικά οι μάζες περιβάλλονται από λεπτή μεμβράνη η οποία όμως διαρρηγνύεται σύντομα). Τα συμπτώματα εμφανίζονται μόνο μετά την εμφάνιση των δύο ταξιανθιών ενώ τα φυτά δεν παρουσιάζουν νανισμό. Η ασθένεια μεταδίδεται από το έδαφος και τον μολυσμένο σπόρο. Τα χλαμυδοσπόρια βλαστάνουν την άνοιξη και τα δημιουργούμενα σπόρια μολύνουν τα φυτάρια. Το μυκήλιο εξαπλώνεται σε ολόκληρο το φυτικό σώμα και σχηματίζει στις ταξιανθίες όγκους που περιέχουν τις μάζες των σπορίων. Η αρχική μόλυνση ευνοείται από ξηρό έδαφος (Εικ. 20).



Εικόνα 20. Σήψη σπάδικα από τον μύκητα *Sphacelotheca reliana* (<https://www.forestryimages.org>)

10. Σκωρίαση στα φύλλα (*Puccinia sorghi*)

Η ασθένεια προσβάλλει τα φύλλα και προκαλεί κηλίδες οι οποίες εξελίσσονται σε φλύκταινες που ελευθερώνουν ουρεδοσπόρια και τελειοσπόρια του μύκητα. Οι επιπτώσεις στην καλλιέργεια σπάνια είναι σοβαρές επειδή οι μολύνσεις συνήθως γίνονται προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Διαχειμάζει με τα τελειοσπόρια που βρίσκονται στα υπολείμματα φύλλων του αραβόσιτου. Την άνοιξη από τα τελειοσπόρια παράγονται βασιδιοσπόρια που μολύνουν φυτά του γένους *Oxalis* (ενδιάμεσος ξενιστής). Τα αικιδιοσπόρια από τα *Oxalis* μολύνουν τα φύλλα

του αραβοσίτου. Οι μολύνσεις ευνοούνται από υγρή ατμόσφαιρα, μέτριες θερμοκρασίες και ευπάθεια του φυτού (π.χ. υδαρείς ιστούς από έντονη αζωτούχο λίπανση). Λόγω της μικρής της σημασίας, σπάνια απαιτούνται ειδικά μέτρα αντιμετώπισης (Εικ. 21).



Εικόνα 21. Σκωρίαση στα φύλλα αραβοσίτου από τον μύκητα *Puccinia sorghi*
(<https://www.forestryimages.org>)

11. Βακτηριακή κηλίδωση των φύλλων (*Erwinia stewartii*)

Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από κίτρινες επιμήκεις κηλίδες 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 κίτρινο υγρό που περιέχει βακτήρια. 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 βρακτείων και τοπική ατροφία των σπόρων(Εικ. 22).



Εικόνα 22. Βακτηριακή κηλίδωση των φύλλων *Erwinia stewartii*
(<https://www.forestryimages.org>)

Το καλαμπόκι προσβάλλεται στη χώρα μας και από αρκετούς εχθρούς, πολλοί από τους οποίους δεν είναι αποκλειστικοί του εχθροί αλλά προσβάλουν παράλληλα και άλλα καλλιεργούμενα φυτά.

Τα **κυριότερα έντομα** παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την χώρα μας είναι:

I. Καραφατμέ (*Agrotis segetum* Schiff)

Το τέλειο έντομο είναι νυκτόβιο λεπιδόπτερο. Τις ζημιές στην καλλιέργεια του καλαμποκιού προκαλούν οι νεαρές προνύμφες οι οποίες έχουν γκριζωπό χρώμα με δυο κατά μήκος παράλληλες γραμμές στο ραχιαίο τμήμα τους. Το τελικό μέγεθος τους φτάνει 4,5 -5 cm. Οι προνύμφες τρέφονται και πολλές φορές κόβουν τα στελέχη των νεαρών φυτών του καλαμποκιού στη βάση τους. Συνήθως ακολουθούν τις γραμμές σποράς και προσβάλουν περισσότερα φυτά από όσα χρειάζονται για να τραφούν (Εικ. 23).



Εικόνα 23. Προνύμφες *Agrotis segetum* (<http://gardener.wikia.com>)

II. Σιδεροσκώλικες (*Agriotes spp*)

Στο γένος αυτό υπάρχουν πολλά βλαβερά είδη που είναι πολυφάγα. Το τέλειο έντομο είναι ένα κολεόπτερο με σκούρο χρωματισμό και οι ζημιές που προκαλεί στα υπέργεια τμήματα των φυτών είναι μάλλον περιορισμένες. Οι νεαρές προνύμφες έχουν υπόλευκο χρωματισμό και αργότερα κιτρινοκαφέ και προσβάλουν κυρίως το ριζικό σύστημα και τα φυτικά μέρη κοντά στο λαιμό, χωρίς να αποκλείεται και η είσοδος τους μέσα στις ρίζες και στα στελέχη. Όταν τα φυτά είναι νεαρά, τέτοια προσβολή οδηγεί σε σπάσιμο τους (Εικ. 24).



Εικόνα 24. Προνύμφες *Agriotes spp* (<http://gardener.wikia.com>)

III. Αφίδες (*Rhopalosiphum maidis* Fitch)

Έχουν κίτρινο- πράσινο χρωματισμό και απαντώνται σε μεγάλους πληθυσμούς στην άνω επιφάνεια των φύλλων, προκαλούν τη συστρόφη τους και τα σταμάτημα της ανάπτυξης. Εκτός από τα φύλλα απαντώνται στους βλαστούς, στις φόβες και στους νεαρούς σπαδικες. Παράλληλα σε περίπτωση έντονης προσβολής έχουμε ανάπτυξη καπνιάς στα μελιτώδη απορρίμματα που εκκρίνουν (Εικ. 25)



Εικόνα 25. *Rhopalosiphum maidis* (<https://www.forestryimages.org>)

IV. Σκουλήκι του καλαμποκιού (*Sesamia nonagrioides*)

Στα νεαρά φυτά η προσβολή από τις προνύμφες προκαλεί τη μάρανση του ακραίου φύλλου και την καταστροφή της κορυφής, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη πλευρικών στελεχών και την επακόλουθη καθυστέρηση στην ανάπτυξη του. Οι προνύμφες εκτός από τα στελέχη, εντοπίζονται και στους σπάδικες των οποίων τρώνε τη ράχη και τους σπόρους (Εικ. 26).



Εικόνα 26. Προνύμφη *Sesamia nonagrioides* (<https://www.ipmimages.org>)

V. Πυραλίδα του καλαμποκιού (*Ostrinia nubilalis*)

Η πυραλίδα του καλαμποκιού είναι γνωστή σε κάθε περιοχή της Ευρώπης αλλά συναντάται πιο σπάνια στα βόρεια. Το έντομο έχει πολλές γενιές στις νότιες περιοχές της Ευρώπης. Η ζημιά που προκαλεί είναι η κατάρρευση του στελέχους και σημαντική είναι επίσης η έμμεση ζημιά στην παραγωγή. Ζημιές προκαλεί και στο ξηρό και στο γλυκό αραβόσιτο, στο γλυκό αραβόσιτο προκαλεί προβλήματα και στην ποιότητα διότι μερικές φορές προσβάλλει τον σπάδικα (Εικ. 27)



Εικόνα 27. *Ostrinia nubilalis* (<https://www.ipmimages.org>)

VI. Πράσινο σκουλήκι (*Helicoverpa armigera*)

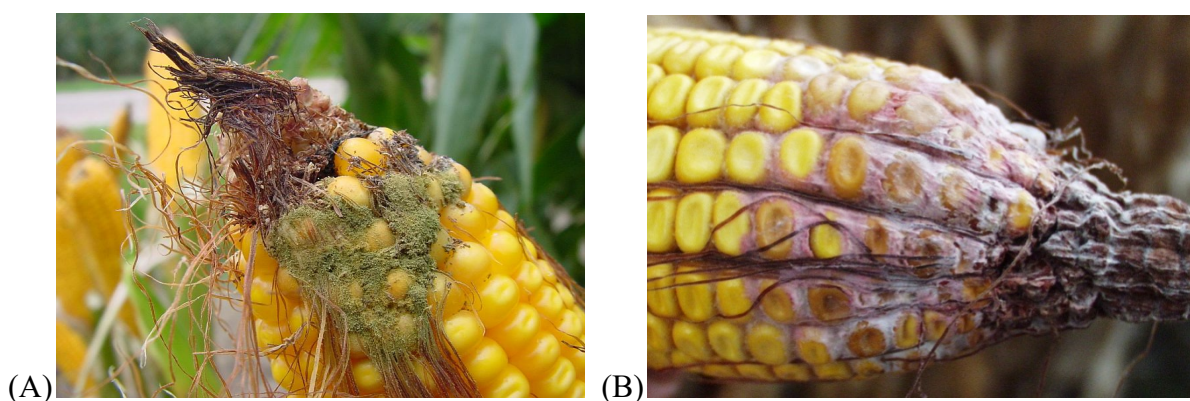
Προσβάλλει τα φύλλα, τις ταξιανθίες και τους σπάδικες όπου εισχωρεί και προχωρώντας κατά μήκος αυτού τον τρώει (Εικ. 28)



Εικόνα 28. *Helicoverpa armigera* (<https://blog.csiro.au>)

1.2.1 Σήψεις σπαδικα (*Ear Rots*)

Στον αραβόσιτο από της σημαντικότερες ασθένειες είναι οι σήψεις του σπάδικα με κύρια παθογόνα αίτια τους μύκητες του γένους *Fusarium* και *Aspergillus*. Ωστόσο οι μύκητες αυτοί εξαπλώνονται στην καλλιέργεια όταν επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, όταν εφαρμόζονται καλλιεργητικές τεχνικές που συμβάλλουν στην εξέλιξη της ασθένειας και όταν έχει προηγηθεί προσβολή της καλλιέργειας από έντομα. Η προσβολή της καλλιέργειας από τους μύκητες αυτούς έχει ως αποτέλεσμα την ποιοτική και ποσοτική υποβάθμιση της παραγωγής καθώς και οι δυο μύκητες παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες, της μυκοτοξίνες που είναι ιδιαίτερα βλαβερές ουσίες για τον άνθρωπο και για τα ζώα. (Εικ. 29)



Εικόνα 29. Σήψη σπάδικα προερχόμενη από μύκητες (A) του γένους *Aspergillus* και (B) του γένους *Fusarium* (www.pioneer.com)

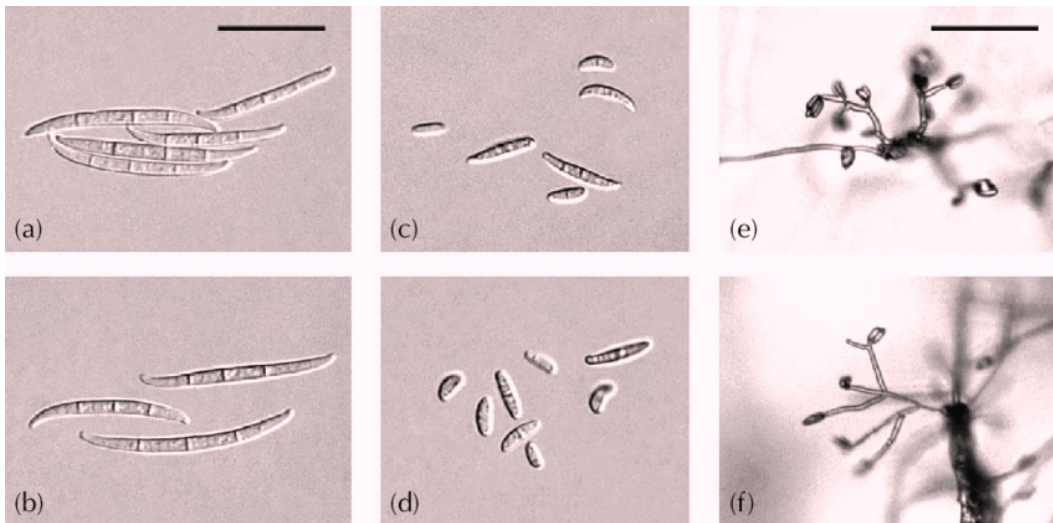
Η αντιμετώπιση της ασθένειας δεν είναι πολύ αποτελεσματική διότι οι μύκητες του γένους *Aspergillus* αποικίζουν τους σπάδικες αλλά οι διαχειριζόμενες μορφές διατηρούνται για χρόνια ενώ οι μύκητες του γένους *Fusarium* αποικίζουν ολόκληρο το φυτό και μεταδίδονται εκ νέου με το σπόρο. Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για την διαχώριση των μυκήτων του γένους *Fusarium*

με αποτέλεσμα να κατηγοριοποιούνται στους μύκητες που προκαλούν κόκκινη σήψη του σπάδικα και αυτή της ροζ σήψης του σπάδικα, ενώ στην περίπτωση των σήψεων από μύκητες του γένους *Aspergillus* δεν υπάρχει κάποιος διαχωρισμός.

1.3 Το γένος *Fusarium* spp.

Το γένος *Fusarium* θεωρείται από τα σημαντικότερα φυτοπαθογόνα γένη μυκήτων και προκαλεί πολύ σοβαρές ζημιές με την προσβολή του σε πλήθος ξενιστών. Οι ασθένειες που προκαλεί είναι ανδρομυκώσεις, σηψιρριζίες, σήψεις της βάσεως του στελέχους και των καρπών, τήξεις σπορείων αλλά και εναέριες προσβολές ανθέων.

Τρεις είναι οι τύποι σπορίων που παράγουν τα είδη του γένους *Fusarium* τα μακροκονίδια, τα μικροκονίδια, και τα χλαμυδοσπόρια. Τα μικροκονίδια δημιουργούνται πάνω στο φιαλίδιο, που σχηματίζεται επί της υψής ή αποτελεί διακλάδωση του κονιδιοφόρου, με το σχήμα τους να είναι ωοειδές – ελλειψοειδές ή κυλινδρικό. Τα μακροκονίδια σχηματίζονται είτε στους κονιδιοφόρους, είτε στα σποροδόχεια, διαθέτουν λεπτά τοιχώματα, με 3 – 5 εγκάρσια χωρίσματα, και οξυκαταλυτικά άκρα. Τα χλαμυδοσπόρια είναι επάκρια η ενδιάμεσα και σχηματίζονται συνήθως μεμονωμένα και περιστασιακά κατά ζεύγη ή σε αλυσίδες.



Εικόνα 30. (a,b) Μακροκονίδια ειδών *Fusarium* spp., (c,d) μικροκονίδια ειδών *Fusarium* spp., (e,f) χλαμυδοσπόρια ειδών *Fusarium* spp.(<https://www.pioneer.com>)

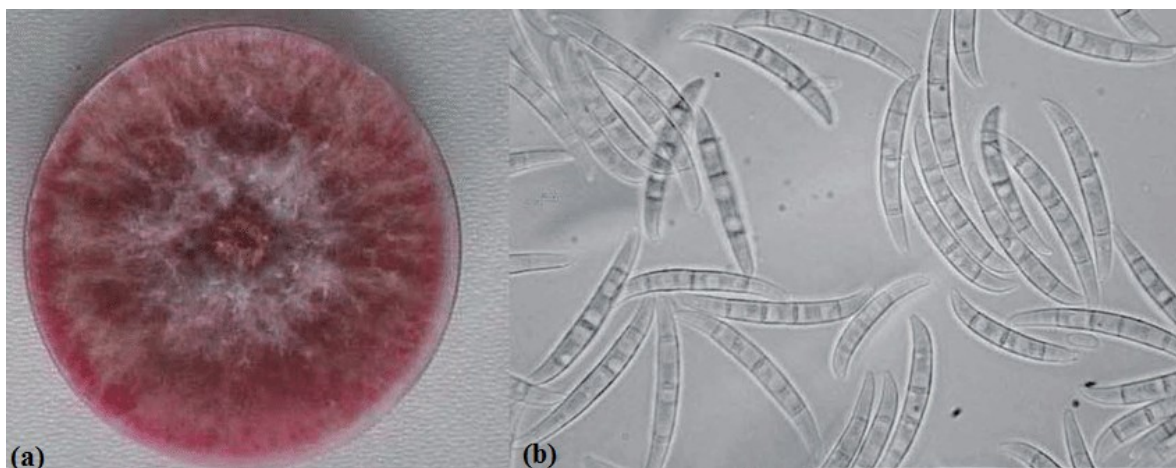
Το γένος *Fusarium* περιλαμβάνει πολλά είδη οπου προσβάλλουν μεγάλο εύρος ξενιστών. Τα συμπτώματα που έχουν παρατηρηθεί είναι νανισμός και σήψεις στα σιτηρά καθώς και στο καλαμπόκι. Τα πιο ευρέως διαδεδομένα είδη που προσβάλλουν τον αραβόσιτο προκαλώντας σήψεις είναι οι μύκητες *Fusarium verticillioides*, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium*

proliferatum και *Fusarium subglutinans*. Οι μυκητες αυτοί έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης καθώς και την υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος, και μόλυνση με τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες στο προσβεβλημένο προϊόν.

Οι σήψεις που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Fusarium* διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες, αυτή της κόκκινης σήψης του σπάδικα και αυτή της ροζ σήψης του σπάδικα. Τα είδη που προκαλούν κόκκινη σήψη ή κόκκινη φουζαρίωση ανήκουν στην κατηγορία Discolour με κύρια να είναι το *F. graminearum*, το *F. culmorum*, το *F. cerealis* , και το *F. avenaceum*. Αντιθέτως, τα είδη εκείνα που προκαλούν ροζ σήψη σπαδικα ανήκουν στην κατηγορία Liseola με κύρια να είναι το *F. verticillioides*, το *F. proliferatum*, και το *F. subglutinans*.

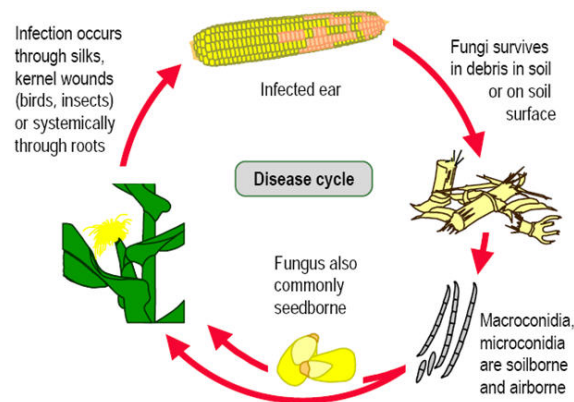
1.3.1 Ο μύκητας *Fusarium graminearum*

Ο μύκητας *Fusarium graminearum* είναι η ατελής μορφή του *Gibberella zeae*, προκαλεί κόκκινη σήψη του σπάδικα στην καλλιέργεια του αραβόσιτου .Το παθογόνο αυτό είναι υπεύθυνο για οικονομικές απώλειες ύψους δισεκατομμυρίων παγκοσμίως κάθε χρόνο (Εικ. 31). Η μόλυνση επηρεάζει τη βιοχημική σύνθεση αμινοξέων του σίτου με αποτέλεσμα τη συρρίκνωση των πυρήνων και τη μόλυνση των σπόρων με μυκοτοξίνες. Συγκεκριμένα παράγουν της τριχοθηκίνες οι οποίες διαχωρίζονται σε τύπου Α και Β. Οι τριχοθηκίνες τύπου Β είναι οι σημαντικές με την δεοξινιβαλενόλη και την ζεαραλενόνη να είναι οι πιο σημαντικές. Λογω μορφολογικών διαφορών των κονιδίων του μύκητα και τα τρόπου που προκαλείται η ασθένεια έχει γίνει διαχωρισμός του πληθυσμού σε δυο ομάδες, την ομάδα 1 και την ομάδα 2. Στην ομάδα 1 συγκαταλέγονται τα στελέχη που είναι ετεροθαλικά ενώ τα στελέχη που συγκαταλέγονται στην ομάδα 2 είναι ομοθαλικά και προσβάλλουν τον σπάδικα του καλαμποκιού.



Εικόνα 31. (α) *In vitro* ανάπτυξη του μύκητα *F. graminearum* και (β) Μακροκονίδια του μύκητα *F. graminearum* (μέγεθος κλίμακας 25 μm) (www.researchgate.net)

Διαχειμάζει με τη μορφή περιθηκίων στα υπολείμματα της καλλιέργειας του αραβόσιτου στην επιφάνεια του εδάφους. Όταν οι συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας θα είναι ευνοϊκές τα σπόρια του μύκητα παράγονται στους μολυσμένους ιστούς των υπολειμμάτων ακόμα και μετά από 3 χρόνια μετά την συγκομιδή της καλλιέργειας. Τα ασκοσπόρια μεταφέρονται με τη βροχή και τον αέρα στο μετάξωμα των φυτών καλαμποκιού, όπου βλαστάνουν κάτω από συνθήκες υψηλής υγρασίας. Το μετάξωμα προσβάλλεται 6 ημέρες μετά την εμφάνιση του από τον μύκητα και έτσι το παθογόνο εισέρχεται στο εσωτερικό του σπάδικα, εγκαθίσταται και προκαλεί σήψη (Εικ. 32).

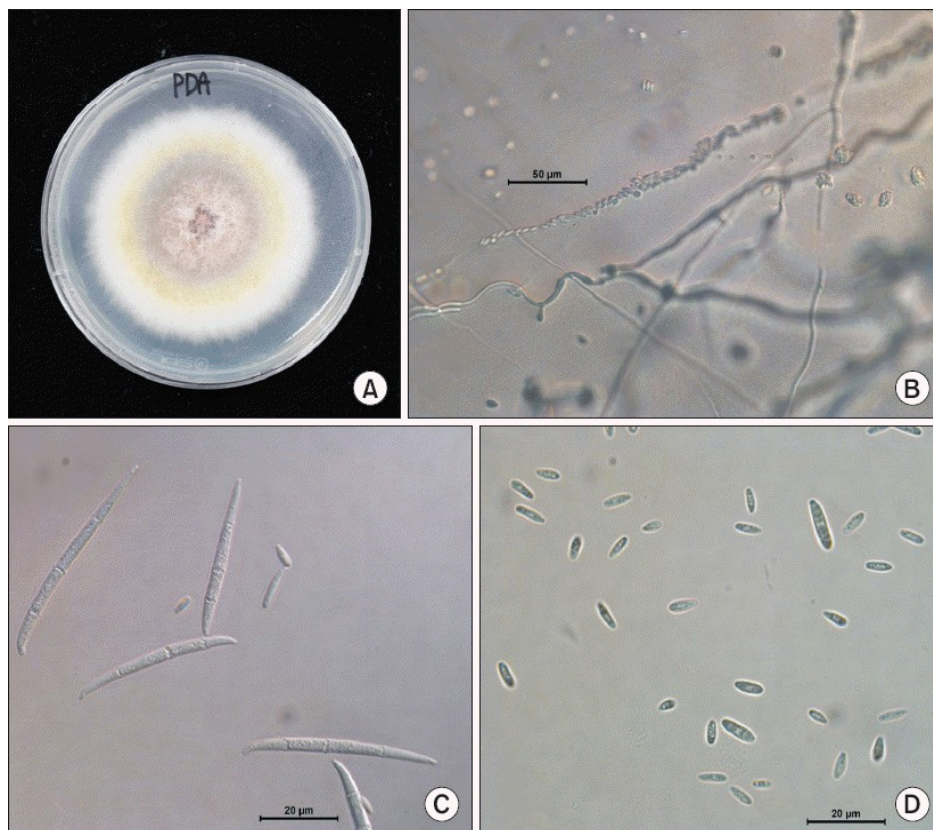


Εικόνα 32. Κύκλος ασθένειας του μύκητα *Fusarium graminearum* (www.pioneer.com)

Μετά τη μόλυνση οι σπόροι ξεκινούν να παίρνουν ένα σκούρο κόκκινο χρώμα, ενώ λίγο αργότερα ξεκινά να εμφανίζεται η υπόλευκη – κόκκινη εξάνθηση του μύκητα στον προσβεβλημένο σπάδικα. Η προσβολή και τα συμπτώματα είναι εμφανή από την κορυφή του σπάδικα και εκτείνεται προς την βάση με εμφάνιση κοκκινωπού αποχρωματισμού. Ήπιες θερμοκρασίες και υγρός καιρός ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα, ενώ παρατηρούνται αυξημένες συγκεντρώσεις μυκοτοξινών όταν καθυστερήσει η συγκομιδή.

1.3.2 Ο μύκητας *Fusarium proliferatum*

Ο μύκητας *Fusarium proliferatum* έχει ως τέλεια μορφή τον *Gibberella intermedia*. Προκαλεί τη ροζ φουζαρίωση στην καλλιέργεια του αραβόσιτου και ανήκει στη κατηγορία Liseola. Έχει πολλά κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά με τα άλλα είδη της κατηγορίας όπου ανήκει. Τα μακροκονίδια του μύκητα είναι λεπτά με λεπτά τοιχώματα και ευθείς σχήμα όπου παρομοιάζεται με τα σχήμα του *G. fujikuroi* (Εικ 33).



Εικόνα 33. Α *In vitro* ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium proliferatum*, Β Μικροκονίδια σε αλυσίδες, Γ Μακροκονίδια και Δ μικροκονίδια (C,D μέγεθος κλίμακας 20 µm)(Β μέγεθος κλίμακας 50 µm) (www.researchgate.net)

Τα μικροκονίδια σχηματίζουν αλυσίδες όπως τα άλλα είδη της κατηγορίας με τη μόνη διαφορά ότι είναι κοντύτερες. Δεν παρατηρούνται χλαμυδοσπόρια και το μυκήλιο σχηματίζεται εναέρια με καφέ μεταχρωματισμό στην κάτω επιφάνεια. Το άφθονο μυκήλιο είναι λευκό αρχικά και στην συνέχεια γίνεται μωβ ιώδες. Τα σποριοδόχεια μπορεί να υπάρχουν αλλά δεν είναι καθόλου διακριτά (Εικ. 34).

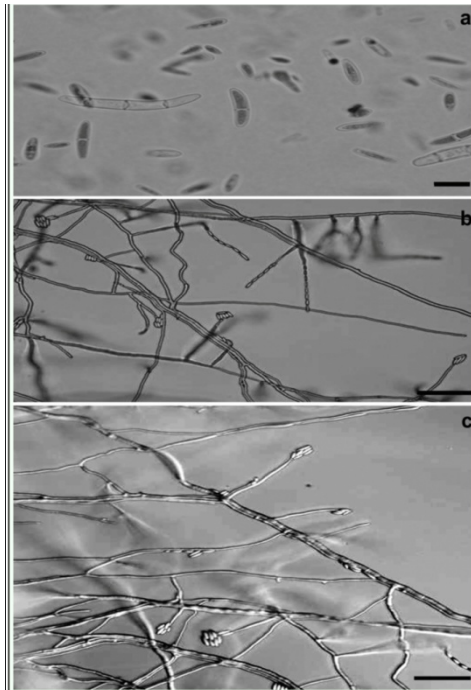


Εικόνα 34. Προσβολή σπάδικα αραβοσίτου από τον μύκητα *Fusarium proliferatum* (www.pioneer.com)

Ο μύκητας *Fusarium proliferatum* είναι υπεύθυνος για την παραγωγή μυκοτοξινών σε υψηλά επίπεδα ιδιαιτέρως σε απομονώσεις υπό την καλλιέργεια του αραβόσιτου. Ποιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι μπορεί να παράγει μονιλοφορμίνη, μπεαβερισίνη και φουζαπρολιφερίνη έκτος από της φουμονισίνες. Ο μύκητας διαχειμάζει στα υπολείμματα καλλιέργειας αραβοσίτου περισσότερο από 900 ημέρες και σε συνδυασμό με την παράγωγή τοξίνης τον καθίστα σημαντικό παθογόνο για την καλλιέργεια.

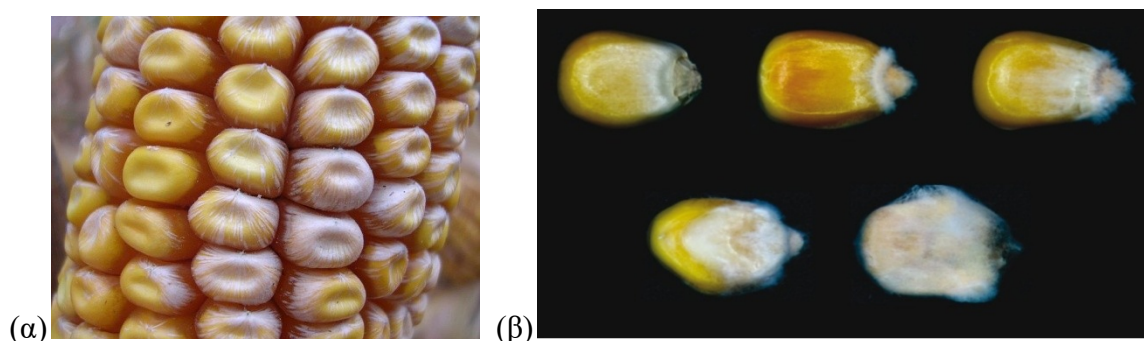
1.3.3 Ο μύκητας *Fusarium verticillioides*

Ένα πολύ σημαντικό παθογόνο παγκοσμίως στην καλλιέργεια του αραβόσιτου είναι ο μύκητας *F. verticillioides*. Ο εν λόγω μύκητας ανήκει στην κατηγορία Liseola και μολύνει με τα αγενή του σποριά μικροκονίδια και μακροκονίδια. Τα μακροκονίδια είναι σχετικά μακρόστενα ευθεία η ελλειψοειδές και έχουν λεπτό τοίχωμα. Έπεισες μορφολογικό χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία 3 – 5 διαφραγμάτων (septa), ωστόσο αναλόγως το στέλεχος μπορεί και να μην απαντώνται. Τα μικροκονίδια από την άλλη παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και παρατίθενται ως αλυσίδα. Το σχήμα τους είναι οβάλ με πεπλατυσμένη βάση και δεν έχουν καθόλου septa στα κύτταρα τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα διογκωμένα κύτταρα των υφών δίνουν την ψευδαίσθηση ότι ο μύκητας παράγει χλαμυδοσπόρια (Εικ. 35).



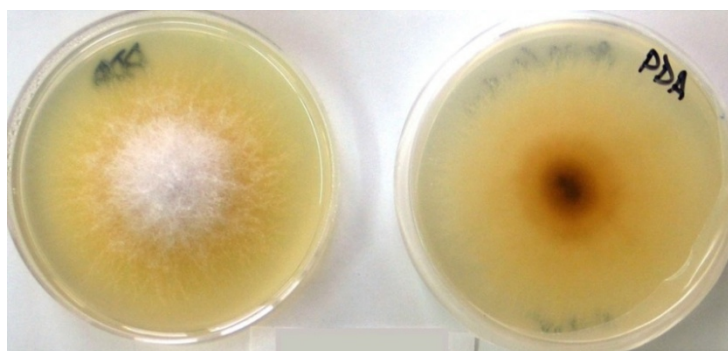
Εικόνα 35. (α) Μικροκονίδια και μακροκονίδια, (β) φιαλίδια και μικροκονίδια σε αλυσίδα και σε ομαδοποιημένες στης κεφαλές (α) 10 μm ; (b-c) 30 μm .(www.researchgate.net)

Όταν επικρατήσουν οι κατάλληλες συνθήκες ξηρασίας και υψηλής θερμοκρασίας ευνοείται η ανάπτυξη του μύκητα χωρίς απαραίτητα να γίνονται αντιληπτά τα συμπτώματα. Ο σύνηθες τρόπος μόλυνσης είναι μέσω του μεταξώματος, όπου από τα υπολείμματα της καλλιέργειας που διαχειμάζει ο μύκητας τα κονίδια μεταφέρονται με τον αέρα και επικάθονται στο μετάζωμα των φυτών. Αφού εγκατασταθούν τα κονίδια στο μετάζωμα ξεκινούν να μολύνουν, περνούν δια του μεταξώματος και εγκαθίστανται στους σπόρους του σπάρδικα από της ρωγμές ή τα σημεία επαφής τους με το μετάζωμα. Άλλος τρόπος εξάπλωσης είναι από εχθρούς όπως σεζάμια και πυραλίδα του καλαμποκιού, όπου μεταφέρουν τα σπόρια σε ρωγμές των σπόρων ή απευθείας διατρύπουν τους σπόρους (Εικ. 36).



Εικόνα 36. (α) Λευκές ακτινωτές ραβδώσεις στη βάση του σπόρου και (β) Σπόροι με εξάνθηση του μύκητα *Fusarium verticillioides* (www.pioneer.com)

Όταν οι συνθήκες ευνοούν την εξάπλωση και μόλυνση του μύκητα *F. verticillioides* εμφανίζεται ροζ εξάνθηση, ενώ σε 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 παθογνωμικό σύμπτωμα (Εικ. 37).



Εικόνα 37. *In vitro* ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium verticillioides* σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (<http://www.moag.gov.il>)

Ο μύκητας αυτός σχετίζεται με την ανίχνευση μυκοτοξινών και συγκεκριμένα φουμονισινών στα προσβεβλημένα προϊόντα. Δεν είναι αναγκαίο να είναι μολυσμένοι οι σπόροι, πολλές φορές είναι

ανέπαφοι αλλά η μυκοτοξίνη να είναι ανιχνεύσιμη. Το πρόβλημα εκτίνεται κατά την ωρίμανση του σπόρου, αν υπάρξει τραυματισμός του από πτηνά ή λεπιδόπτερα, με αποτέλεσμα τα ποσοστά της τοξίνης να είναι υψηλότερα από ασυμμετρικές περιπτώσεις.

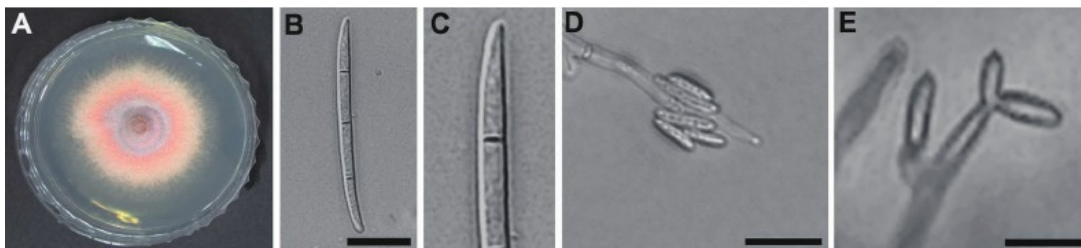
1.3.4 Ο μύκητας *Fusarium subglutinans*

Ο μύκητας *Fusarium subglutinans* είναι ακόμη ένα σημαντικό είδος που ανιχνεύεται στην καλλιέργεια του αραβόσιτου και έχει ως τέλεια μορφή το μύκητα *Gibberella subglutinans*. Συναντάται σε περιοχές που είναι ψυχρές και ανήκει στην κατηγορία Liseola εντείνοντας τα συμπτώματα σήψης στελέχους και σπάδικα στον αραβόσιτο (Εικ. 38).



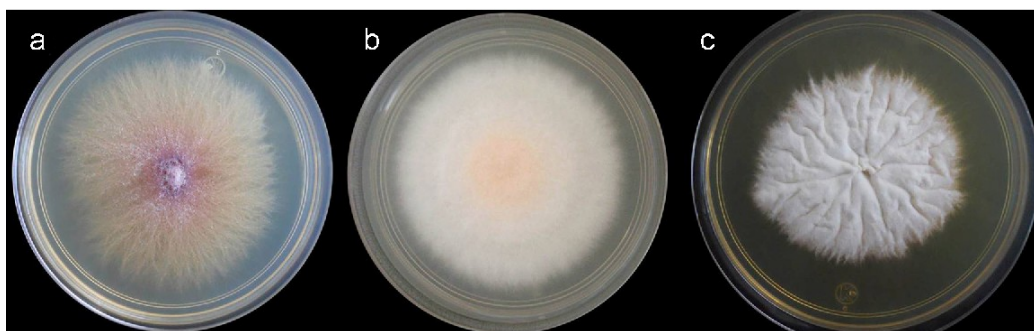
Εικόνα 38. Τομή σπαδικών και εμφανή σήψη του μύκητα *F. subglutinans*
(Springer Berlin Heidelberg, 2015)

Το *Fusarium subglutinans* διαχωρίζεται σχετικά εύκολα από άλλα κύρια είδη στο σύμπλεγμα ειδών του *G. fujikuroi*. Το *F. subglutinans* παράγει μικροκονίδια μόνο σε ψευδείς κεφαλές μονοφιαλίδια και πολυφιαλίδια, με σχήμα οβάλ όπου το διακρίνει τόσο από τον *F. proliferatum* όσο και από τον *F. verticillioides*, τα οποία και παράγουν μικροκονίδια σε αλυσίδες. Τα μακροκονίδια είναι λεπτά, ελαφρώς πτυχωτά, με πολύ λεπτά τοιχώματα, τυπικά από αυτά που παράγονται από τα είδη στο σύμπλεγμα ειδών *Gibberella fujikuroi*. Έχουν βρεθεί σποροδόχεια σε *in vitro* καλλιέργεια του μύκητα σε PDA και CLA όπου χαρακτηρίζονται από έντονο πορτοκαλί χρώμα. Το μυκήλιο του μύκητα αναπτύσσεται εναέρια σε *in vitro* καλλιέργεια, ενώ έχουμε απουσία χλαμυδοσπορίων (Εικ. 39).



Εικόνα 39. Α. *In vitro* ανάπτυξη του μύκητα *F. subglutinans* σε PDA, Β-Γ. Μακροκονίδια, Δ. Μικροκονίδια σε κεφάλες, Ε. πολυφιαλίδια σε CLA

(www.researchgate.net/figure/Morphological-characteristics-of-F-subglutinans)



Εικόνα 40. *In vitro* ανάπτυξη του μύκητα *F. subglutinans* σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα (a) PDA, (b) SDA, and (c) YPD. (https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3885953_gr2&req=4)

Ο μύκητας *Fusarium subglutinans* παράγει πλήθος ενζύμων που διασπούν αντιμυκητιακές ενώσεις όπως χιτινάση, οξειδάση της. Η ικανότητα αυτή είναι ένας από τους λόγους που ο μύκητας είναι ένα ισχυρό παθογόνο αραβόσιτου. Δεν παράγει φουμονισίνες σε υψηλά ποσοστά ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι παράγει μονιλοφορμίνη, φουζαπρολιφερίνη και μπεαβερισίνη (Εικ. 40).

1.3.5 Ο μύκητας *Fusarium semitectum* (*Fusarium incarnatum*)

Μέχρι στιγμής δεν έχει ανακαλυφθεί αν έχει τέλεια μορφή ο μύκητας *F. semitectum*, ενώ απαντάται συχνά σε τροπικές περιοχές και κυρίως σε αποθηκευμένα προϊόντα. Τα μικροκονίδια αναπτύσσονται επί των πολυφιαλιδίων και σε πολλές περιπτώσεις είναι σε ζεύγη σχηματίζοντας «αυτιά λαγού». Τα μικροκονίδια είναι πολυμορφικά και σε πολλές περιπτώσεις παρουσιάζουν 1-2 χωρίσματα, ενώ σχηματίζονται και τα μεσοκονίδια που διαθέτουν 3-5 χωρίσματα. Τα μικροκονίδια είναι λιγοστά στο μυκήλιο ενώ τα μακροκονίδια είναι άφθονα. Το μυκήλιο είναι εναέριο με τη διαφορά ότι σε αυτό το είδος σχηματίζεται ένα σπόριο ανά μονοφιαλίδιο ή δυο σπόρια ανά πολυφιαλίδιο. Τα μακροκονίδια είναι σχετικά λεπτά έχοντας καμπυλωτή εξωτερική επιφάνεια και ευθεία την εσωτερική επιφάνεια. Σε *in vitro* καλλιέργεια επιφέρει καστανό

μεταχρωματισμό σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA όπου κάνει πιο εύκολο τον διαχωρισμό από τα άλλα είδη (Εικ. 41).

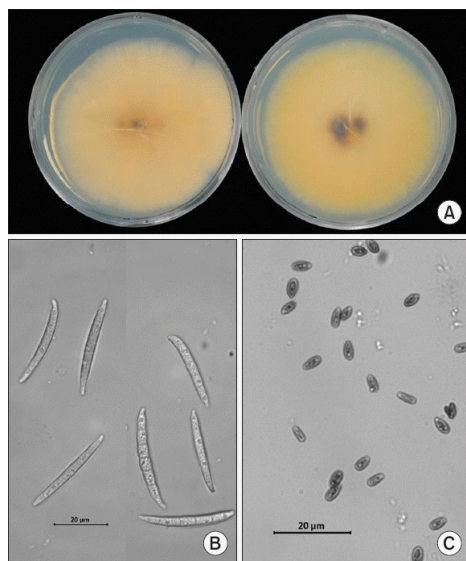


Εικόνα 41.(a) *In vitro* ανάπτυξη σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, (b) Μακροκονίδια, (c) Μικροκονίδια, (d) Πολυφιαλίδια σε CLA του μύκητα *Fusarium semitectum* (www.notulaebotanicae.ro)

Το *F. 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, μπεαβερισίνη, μονιλιφορμίνη, τριχοθηκίνη και ζεαραλενόνη.

1.3.6 Ο μύκητας *Fusarium thapsinum*

Ο μύκητας *Fusarium thapsinum* ανήκει στην κατηγορία Liseola με τέλεια μορφή το είδος *Gibberella thapsina* διαφοροποιείται από τα άλλα είδη καθώς σχηματίζει μόνο μονοφιαλίδια. Τα μακροκονίδια είναι τυπικά όπως εκείνα που παράγονται από τα άλλα είδη στο σύμπλεγμα *Gibberella fujikuroi*. Είναι αρκετά λεπτά, ελαφρός δρεπανοειδή και με λεπτά τοιχώματα, έχουν 3-5 σέπτα και δυσκολο να εντοπιστούν. Τα μικροκονίδια έχουν πεπλατυσμένη βάση και σχηματίζουν αλυσίδες ή συστάδες. Σε *in vitro* καλλιέργεια του μύκητα το μυκήλιο έχει χρώμα υποκίτρινο καθώς και το θρεπτικό υπόστρωμα PDA παρουσιάζει ίδιο μεταχρωματισμό (Εικ. 42).



Εικόνα 42. (A) *In vitro* καλλιέργεια του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, (B) Μακροκονίδια, (C) Μικροκονίδια του μύκητα *Fusarium thapsinum* (www.notulaeobotanicae.ro)

Ο εν λόγω μυκητας δεν αποτελεί σημαντική ασθένεια του αραβόσιτου σε επίπεδο αγρού, το πρόβλημα ανιχνεύεται σε μετασυλλεκτικό επίπεδο καθώς προκαλεί σήψη στελέχους και σπαδικα. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι παράγει υψηλά ποσοστά μυκοτοξινών και συγκεκριμένα, μονιλοφορμίνης και φουμονισίνης. Ο μυκητας *Fusarium thapsinum* προσβάλλει έντονα της καλλιέργειες σόργου και αραχίδας για αυτό και έχει απασχολήσει πολύ τους ερευνητές.

1.3.7 Μοριακή ταυτοποίηση ειδών *Fusarium* spp.

Το γένος *Fusarium* spp. έχει μεγάλο εύρος ειδών με μεγάλη γεωργική και οικονομική σημασία, λόγω της πολυπλοκότητας των ασθενειών που προκαλεί, αλλά και της παραγωγής μυκοτοξινών. Η σωστή ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του είδους και της μυκοτοξίνης είναι πρωταρχικής σημασίας. Η μορφολογική ταυτοποίηση των ειδών δεν είναι πλήρως εφικτή καθώς της περισσότερες φορές η απλή μορφολογική παρατήρηση είχε ως αποτέλεσμα τον λανθασμένο χαρακτηρισμό ειδών, ιδιαιτέρως για μελή της κατηγορίας *G. fugikuroi*. Η αδυναμία του προσδιορισμού των ειδών είχε ως αποτέλεσμα την εφαρμογή άλλων τεχνικών συγκεκριμένα μοριακών τεχνικών, καθώς αποτελούν άριστο εργαλείο μοριακής και 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*) μια μέθοδο που αναγνωρίζει τα κοινά και της διαφορές στα τμήματα μεταξύ γονιδίων του DNA. Οι διαφορές είναι αυτές που χρησιμοποιούνται για την φυλογενετική ανάλυση των συγγενών ειδών. Για αποτελεσματική ταυτοποίηση των ειδών γίνεται χρήση δυο ή και περισσότερων γονιδίων, σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιείται μόνο ένα γονίδιο που ταυτίζεται με το γονίδιο αναφοράς. Τα

γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ευρέως στη μυκητολογία για φυλογενετικές αναλύσεις ή την ταυτοποίηση ειδών. Το ριβοσωμικό DNA αποτελεί ενδιαφέροντα στόχο για τη φυλογενετική διαφοροποίηση των μυκήτων, δεδομένου ότι κωδικοποιεί μια υψηλά πολυμορφική περιοχή 600-800 bp ITS (*Internal Transcribed Spacers*), η οποία χρησιμοποιείται και για τη διαφοροποίηση πολλών ειδών ζυμών και μυκήτων. Στην περίπτωση του γένους *Fusarium* sp. φαίνεται όμως οδηγεί σε λανθασμένα αποτελέσματα.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ευρέως στη μυκητολογία για φυλογενετικές αναλύσεις ή την ταυτοποίηση ειδών.

Οι ακολουθίες των ITS έχουν χρησιμοποιηθεί για διαφορετικά είδη που έχουν ταυτοποιηθεί και περιέχουν γένη *Pezizomykotina* με μικρότερο αναδιπλασιασμό, όπως γένη με οικονομική σημασία πχ *Fusarium*. Οι ασκομύκητες είναι γενικά ανωτέρα σε rRNA. Εξειδικευμένες βάσεις αναγνώρισης χρησιμοποιούν μοριακούς δείκτες, όπως ο παράγοντας επιμήκυνσης *tef* -1, η β - τουμπουλίνη, η καλμοντουλίνη και η ιστόνη 3 (Εικ. 43).

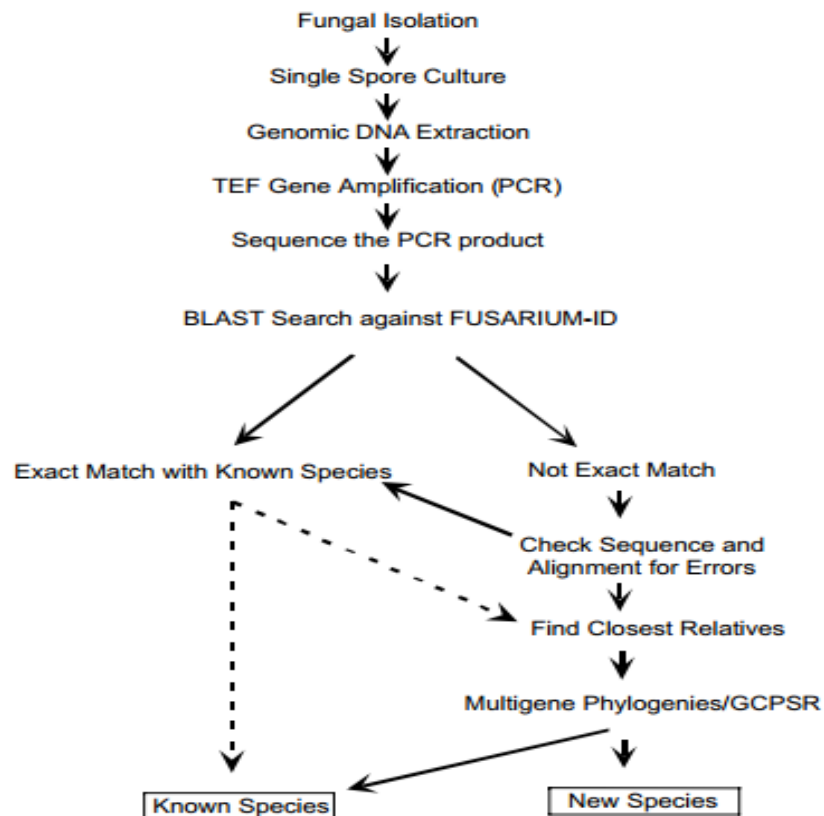


Εικόνα 43. Απεικόνιση της περιοχής του γονιδίου TEF για την ταυτοποίηση *Fusarium* spp. (Ο' Donnell et al., 1998)

Για το συγκεκριμένο γονίδιο TEF πραγματοποιήθηκε σε αρχικό επίπεδο σχεδιασμός εκκινητών για διαχωρισμό του συγκροτήματος των *F. oxysporum* (Ο' 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') (Ο' Donnell et al., 1998c), ενισχύουν μια περιοχή περίπου 700 βάσεων στο γονίδιο TEF, ενώ συμπεριλαμβάνονται 3 ιντρόνια σε όλα τα γνωστά *Fusarium* spp. Η χρήση των παραπάνω εκκινητών σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες αποτυπώνει τη φυλογενετική σχέση των ειδών του *Fusarium* spp. Λόγω της μεγάλης σημαντικότητας του εν λόγω γονιδίου το 2003 κατασκευαστική η βάση δεδομένων FUSARIUM-ID v.1.0, η οποία είναι προσβάσιμη και διαθέτει από 440 αλληλουχίες του γονιδίου TEF (Ο' Donnell et al., 2004).

Σε αρκετές περιπτώσεις για τη φυλογενετική ανάλυση στο σύμπλεγμα *G. fugikuroi* φαίνεται να είναι αναγκαία η χρήση και άλλων γονιδίων ώστε να αποφευχθούν λανθασμένα φυλογενετικά αποτελέσματα (Εικ. 44). 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'-

TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3'), έχουν σχεδιαστεί ώστε να ενισχύσουν μια περιοχή περίπου 650 βάσεων στο εσωτερικό του γονιδίου (O' Donnell et al., 2000).



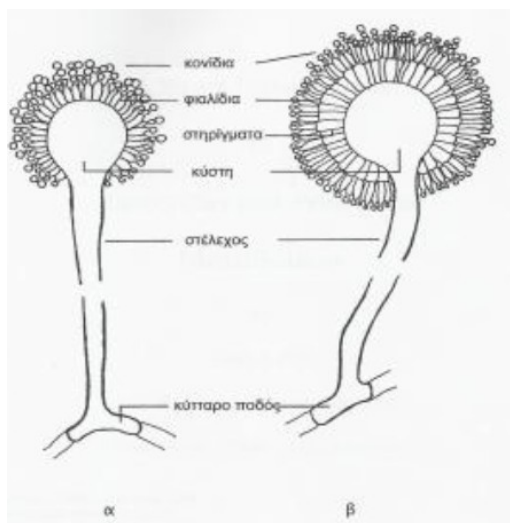
Εικόνα 44. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας ταυτοποίησης μυκήτων *Fusarium* spp.

Η χρήση περισσότερων του ενός γονιδίου ταυτοποίησης είναι αναγκαία σε πολλές περιπτώσεις, ιδιαίτερα 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 μυκητες του γένους *Fusarium* spp., που είναι καταστροφικοί για της καλλιέργειες και επιβλαβείς για τον άνθρωπο λόγω της παράγωγης μυκοτοξινών, με αποτέλεσμα η ταυτοποίηση τους να είναι αναγκαία για την ολοκληρωμένη διαχείριση τους.

1.4 Το γένος *Aspergillus* spp.

Το γένος *Aspergillus* ανήκει στους Hyphomycetes και έχει φτάσει να περιλαμβάνει περίπου 250 αναγνωρισμένα είδη μέχρι σήμερα. Ξεκίνησε το 1965 σαν μία συλλογή 150 διαφορετικών

τάξεων, το 2000 προστέθηκαν 68 επιπλέον, ενώ ακολούθησε η δημοσίευση ακόμη 40 νέων ειδών. Μέλη του γένους απαντούν σε μία ευρεία ποικιλία προϊόντων του περιβάλλοντος. Είναι περισσότερο γνωστά ως σαπρόφυτα στο έδαφος και σε αποθηκευτικούς χώρους τροφίμων, ενώ προκαλούν αποσύνθεση σε φυτά σε τροπικές και ημιτροπικές περιοχές. Εκτός όμως από τη σαπροφυτική τους δράση, ορισμένα είδη είναι παράσιτα σε έντομα, φυτά και ζώα καθώς επίσης και στον ίδιο τον άνθρωπο. Τέλος, υπάρχουν και ορισμένα είδη με ιδιαίτερη οικονομική σημασία καθώς χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες ζυμώσιμων τροφίμων από το 1940, ως πηγή ενζύμων και άλλων χημικών προϊόντων. Πρέπει ακόμη να σημειωθεί ότι οι μύκητες του γένους αυτού παράγουν ισχυρές μυκοτοξίνες, ενώ άλλοι προκαλούν βιοαποσυνθέσεις (Εικ. 45).



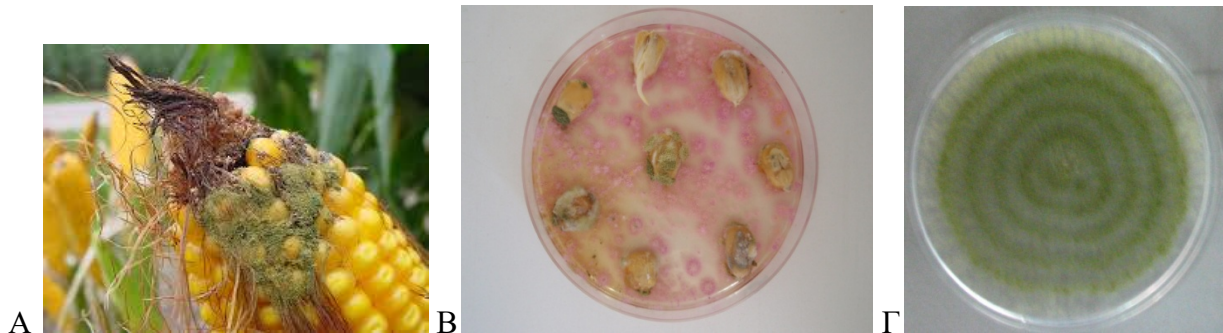
Εικόνα 45. Χαρακτηριστικά του κονιδιοφόρου του γένους *Aspergillus*. α) Μονόσειρη και β) δίσειρη κονιδιακή κεφαλή. (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2010/06/aspergillus-niger.html>)

Από τη στιγμή που ο *Aspergillus* αναγνωρίστηκε με τη βοήθεια του μικροσκοπίου ακολούθησαν χιλιάδες μελέτες. Ο ιταλός βοτανολόγος Pier Antonio Michelli ήταν εκείνος που ανακάλυψε πρώτος το 1729 το γένος αυτό. Η μικροσκοπική εικόνα του μύκητα τον παρέπεμψε στο aspergill, ένα εκκλησιαστικό σκεύος που χρησιμοποιείται για το ράντισμα (ραντίζω = aspergere (lat.)) του αγιασμού στη λειτουργία, το οποίο έδωσε στο μύκητα την ονομασία του, *Aspergillus*.

1.4.1 Περιγραφή

Οι ατελείς μύκητες του *Aspergillus* (anamorphic) παράγουν αγενή σπόρια (αλυσίδες κονιδίων), ενώ οι τελειομύκητες (teleomorphic) αναπαράγονται και εγγενώς. Οι τελειομύκητες

αποτελούνται από κλειστοθήκια, τα οποία είναι ασκοί που όταν φθάσουν στο στάδιο της ωριμότητας σπάζουν και ελευθερώνονται τα περιεχόμενα σε αυτούς σπόρια (ασκοσπόρια). Η φύση του τοιχώματος του ασκοκάρπιου και το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα και η επιφάνεια των ασκοσπόριων είναι σημαντικά για την αναγνώριση των τελειόμορφων ειδών, στα οποία ανήκουν τα *Emericella* και *Eurotium*.



Εικόνα 46. (Α) Προσβολή σπάδικα από μυκητες του γένους *Aspergillus* spp.;(Β) *In vitro* ανάπτυξη μυκήτων σε θρεπτικό υπόστρωμα DRBC; (Γ) *In vitro* ανάπτυξη μύκητα του γένους *Aspergillus*. (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2010/06/aspergillus-flavus.html>)

Η μορφή μιας αποικίας του μύκητα *Aspergillus* είναι συνάρτηση της σύστασης του υποστρώματος, της θερμοκρασίας, του φωτισμού και της ηλικίας της καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό πρέπει, για την ανάπτυξη της αποικίας, οι συνθήκες να διευκρινίζονται πλήρως (Εικ. 46).

1.4.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

1. Κύτταρο βάση ή κύτταρο ποδός (foot cell). Κύτταρα με ενισχυμένα κυτταρικά τοιχώματα. Από κάθε τέτοιο κύτταρο προκύπτει μία κατακόρυφη κονιδιοφόρος.
2. Κονιδιοφόρος ή στόλωνας ή στέλεχος (stalk). Μη διακλαδισμένες υφές με κονιδιοκεφαλές. Ο κονιδιοφόρος, σε σπάνιες περιπτώσεις, φέρνει εγκάρσια τοιχώματα.
3. Κυστίδιο (vesicle). Μία σφαιροειδής ή ελλειπτική δομή στην απόληξη κάθε κονιδιοφόρου. Αναπτύσσει στην επιφάνειά του κύτταρα που φέρουν σπόρια.
4. Στηρίγματα (metulae). Ένα στρώμα κυττάρων που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των κυστιδίων και παράγουν κονίδια. Το σχήμα και το μέγεθος των στηριγμάτων είναι χαρακτηριστικό του γένους *Aspergillus*. Τα στηρίγματα είναι κυλινδρικά και αφού φθάσουν σε ορισμένο μήκος στενεύουν στην άκρη σε ένα σωλήνα που παράγει κονίδια. Τα στηρίγματα δεν υπάρχουν σε όλα τα είδη του *Aspergillus*.

5. Κονίδια (conidia). Τα σπόρια του μύκητα, με τα οποία πολλαπλασιάζεται αγενώς. Ο πυρήνας του στηρίγματος διαιρείται και ένας από τους θυγατρικούς πυρήνες περνά στον ακραίο σωλήνα και διαχωρίζεται από το στήριγμα. Αν αυτό επαναληφθεί πολλές φορές παράγονται συνεχώς νέα κονίδια και τα παλαιότερα προωθούνται προς τα επάνω με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία αλυσίδας αποτελούμενης από αριθμό κονιδίων μικρότερο ή ίσο του 100 αποκομμένων από την άκρη του ίδιου στηρίγματος. Τα κονίδια κατά μέσον όρο είναι μονοπυρηνικά και όταν ωριμάσουν διαχωρίζονται τελείως από το μητρικό κύτταρο με δευτερεύον κυτταρικό τοίχωμα που τους προσδίδει χαρακτηριστικό χρώμα και υφή.

6. Σκληρώτια (sclerotia). Πρόκειται για σώματα σφαιροειδή, πολυκύτταρα, σκληρής σύστασης που σχηματίζονται από πλεκτεγχηματικές – μεγάλοι σχηματισμοί υφών παραγόμενοι από νηματοειδείς μύκητες – διαφοροποιήσεις υφών, τα οποία βρίσκονται συνήθως σε κατάσταση λήθαργου. Χρησιμεύουν ως αποθησαυριστικά και ληθαργικά όργανα, καθώς περιέχουν γλυκογόνο και αποταμιευτικές ουσίες και επιτρέπουν στο μύκητα να επιβιώνει υπό δυσμενείς συνθήκες - ξηρασία, ψύχος ή ακόμη και σχετικά υψηλές θερμοκρασίες. Σε ευνοϊκές συνθήκες βλαστάνουν και σχηματίζουν νέο μυκήλιο. Το χρώμα τους ποικίλλει από κίτρινο έως καφέ ή μαύρο.

7. Κλειστοθήκια (cleistothecia). Σφαιρικά κλειστά ασκοκάρπια που όταν ωριμάζουν ανοίγουν δια ρήξεως και ελευθερώνονται τα ασκοσπόρια.

1.4.2 Η ομάδα *Aspergillus flavus*

Η ομάδα *Aspergillus flavus* αποτελεί μία από τις 14 συνολικά ομάδες του γένους *Aspergillus*. Σε αυτήν κατατάσσονται 5 είδη: *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sojae* και *A. tamarii*, εκ των οποίων δύο είναι εκείνα που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον – ο *A. flavus* και ο *A. parasiticus* – καθώς είναι τα κύρια είδη που παράγουν αφλατοξίνες. Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες έρευνες, σε μικρότερο βαθμό, αφλατοξίνες εντοπίστηκαν και σε άλλες ομάδες του γένους αυτού και συγκεκριμένα στα ακόλουθα είδη: *A. parvisclerotigenus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii*, *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*, *A. pseudocaelatus* και *A. pseudonomius*. Οι μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι πολύ διαδεδομένοι και έχουν τεράστια σημασία για την οικονομία πολλών χωρών, καθώς προκαλούν εκτεταμένες αλλοιώσεις σε διάφορες σημαντικές κατηγορίες τροφίμων. Τα δύο αυτά είδη έχουν εκπληκτικές μεταξύ τους ομοιότητες και πολύ δύσκολα μπορούν να διακριθούν. Ο Pitt προτείνει η αναγνώριση των δύο ειδών να γίνεται με βάση τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τους, μία πρακτική που εφαρμόζεται σε ευρεία κλίμακα εξαιτίας της υψηλής της ακρίβειας και σαφήνειας (specificity). Συγκεκριμένα αναφέρει ότι ο *A. flavus* παράγει κυρίως αφλατοξίνες B, ενώ ο *A. parasiticus*

παράγει αφλατοξίνες B και G, δεν παράγει όμως κυκλοπιαζονικό οξύ, όπως κάποια στελέχη του *A. flavus*. Σε μικροσκοπικό επίπεδο, το πιο αποτελεσματικό κριτήριο για το διαχωρισμό των *A. flavus* και ο *A. parasiticus* είναι η υφή των κονιδιακών τους τοιχωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα κονίδια του *A. flavus* έχουν σχετικά λεπτά τοιχώματα και όχι ιδιαίτερα άγρια, ενώ το σχήμα των κονιδίων ποικίλει από σφαιρικό έως ελλειψοειδές. Αντίθετα, ο *A. parasiticus* παράγει κονίδια με τραχιά ή ακανθώδη υφή, τα οποία έχουν όλα σχεδόν σφαιρική μορφή και σχετικά χοντρά τοιχώματα.

1.4.2.1 *Aspergillus parasiticus* - Γενικά χαρακτηριστικά

Οι αποικίες του μύκητα *A. parasiticus* σε θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar αναπτύσσονται γρήγορα σε θερμοκρασία δωματίου 24-26 °C και η διάμετρός τους φτάνει στα 2,5-4,0 cm σε 8-10 ημέρες. Αποτελούνται από ένα βασικό μυκήλιο που είναι συμπαγές και αναπτύσσεται από το κέντρο προς την περιφέρεια. Ανεστραμμένες έχουν μία ελαφρώς καφέ απόχρωση. Μερικά στελέχη εμφανίζουν ορισμένα κενά από άσπρες, μη σποριογόνες, στείρες υφές. Σε άλλα στελέχη οι αποικίες αναπτύσσονται και υπόγεια όπου σχηματίζουν ακτινωτές αυλακώσεις.

Οι κονιδιοκεφαλές του μύκητα όταν είναι νέες έχουν κιτρινοπράσινο χρώμα ενώ με την πάροδο του χρόνου γίνονται σκούρες πράσινες. Οι κονιδιοφόροι ξεκινούν από μία στενή βάση και στο άκρο μεγεθύνονται δίνοντας κυστίδια σε σχήμα σφαιροειδές. Οι κονιδιοφόροι ποικίλουν σε μήκος από 200 μm μέχρι, σε σπάνιες περιπτώσεις, 1 mm. Συνήθως κυμαίνονται από 300-700 μm. Πάνω στο κυστίδιο υπάρχει μία σειρά στηριγμάτων άχρωμων ή κιτρινοπράσινων σε πυκνή διάταξη. Τα κονίδια είναι σφαιρικά, με τραχεία τοιχώματα, χρώματος κίτρινου ή πράσινου και έχουν διάμετρο 3,5-5,5 μm. Τέλος, ο *A. parasiticus* σπάνια σχηματίζει σκληρότια.

1.4.2.2 *Aspergillus flavus* - Γενικά χαρακτηριστικά

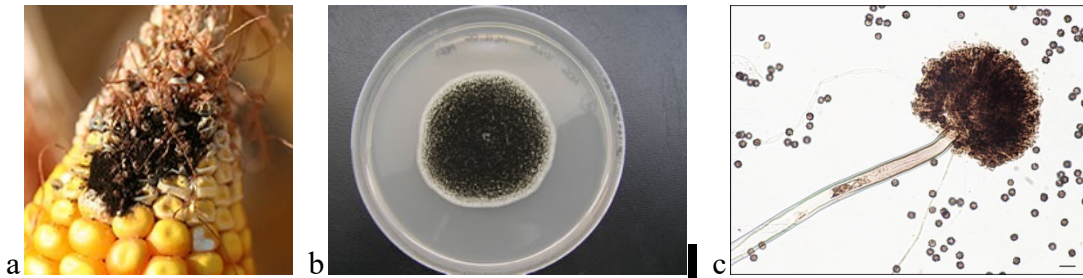
Οι αποικίες στο PDA (Patatto Dextrose Agar), μετά από επώαση 7 ημερών στους 25 °C, έχουν διάμετρο 50-70 mm, είναι επίπεδες, με ενδιάμεση πυκνότητα και περιμετρικά έχουν βελούδινη υφή. Στο κέντρο η αποικία είναι νηματοειδής και ορισμένες φορές αναπτύσσεται αρκετά βαθιά. Το μυκήλιο είναι εμφανές μόνο στις νηματοειδείς περιοχές και είναι λευκό. Οι κονιδιακές κεφαλές συνήθως βρίσκονται ομοιόμορφα γύρω από όλη την αποικία, ενώ είναι αραιές ή απουσιάζουν τελείως σε περιοχές με νηματοειδή ανάπτυξη ή παραγωγή σκληρωτίων. Οι κονιδιοκεφαλές έχουν χαρακτηριστικό γκρι – πράσινο χρώμα έως λαδί. Μερικές φορές αρχικά έχουν αμιγώς κίτρινο χρώμα, ενώ καθώς αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου μετατρέπεται σε πράσινο. Ανεστραμμένες, οι αποικίες είναι άχρωμες έως υποκίτρινες.

Ο *A. flavus* είναι συγγενές είδος με τον *A. parasiticus* και αναπτύσσεται ταχύτατα σε θερμοκρασίες 25-37°C. Είναι ένας μύκητας που απαντάται σε ημιτροπικά και τροπικά κλίματα και μάλιστα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τον *A. parasiticus* στις περιοχές

αυτές. Είναι ευρύτερα γνωστός για την παραγωγή αφλατοξινών. Προϊόντα που κυρίως προσβάλλει είναι: φυστίκια (Αιγίνης και cashew), αμύγδαλα, άλλοι ξηροί καρποί, βαμβακόσπορος, καλαμπόκι, δημητριακά, καρποί ελιάς, σύκα, μπαχαρικά. Εμφανίζεται επίσης συχνά, σε καλλιεργούμενα εδάφη ή ζει παρασιτικά σε έντομα και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παθογόνο δράση στον άνθρωπο (ασπεργίλλωσις). Το 50% των στελεχών που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα ήταν τοξινογόνα.

1.4.3 *Aspergillus spp. Section Nigri*

Η ομάδα του *Aspergillus spp. section Niger* έχει σημαντική επιδραση στην σημερινή κοινωνία καθώς υπάρχει παντού στην φύση. Έχει απασχολήσει πολύ τους ερευνητές καθώς χρησιμοποιείται στην βιομηχανία, παράγει σημαντικές ποσότητες μυκοτοξινών ενώ παράλληλα προκαλεί ασθένειες στον άνθρωπο και στα ζώα όπως ασπεργιλλίωση. Ο *Aspergillus niger* είναι από τους σημαντικότερους μύκητες που ανήκει στην ομάδα των μαύρων ασπέργιλλων (Εικ. 47).



Εικόνα 47. (α) Προσβολή σπάδικα από μύκητα του γένους *Aspergillus spp. Section Nigri*; (b) *In vitro* ανάπτυξη του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA; (c) Κονιδιοφόρος του μύκητα *A. niger* (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2010/06/aspergillus-niger.html>)

Η χρήση του στην βιομηχανία στηρίζεται στην παραγωγή οργανικών οξέος, στην βιοαποδόμηση και επεξεργασία των αποβλήτων και στην παραγωγή ενζύμων. Ωστόσο οι μαύροι ασπέργιλλοι είναι η πιο δύσκολη και προβληματική ομάδα για την ταυτοποίησή τους. Έχουν περιγραφεί 12 είδη στην ομάδα αυτή εκ των οποίων τρία στελέχη του *A. niger* έχουν αλληλουχηθεί πλήρως, αλλά η μελέτη τους συνεχίζεται με χρήση νέων τεχνικών ώστε να είναι πιο κατανοητός ο τρόπος ανάπτυξης τους, της διαφοροποίησης και φυσιολογίας του είδους αυτού. Στα είδη που έχουν μελετηθεί φαίνεται να υπάρχει παρόμοιο σύμπλεγμα γονιδίων με αυτό του *Fusarium verticillioides* που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή φουμονισίνης. Έχει αποδειχθεί ότι στελέχη του *A. niger* παράγουν φουμονισίνες B2, B4 και B6, αλλά δεν παράγουν την B1 φουμονισίνη. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι ο *A. niger* είναι υπεύθυνος για την παραγωγή ωχροτοξινών.

Όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα, οι αποικίες του *A. niger* αποτελούνται από λευκές υφές που σύντομα καλύπτονται από τα αγενή αναπαραγωγικά όργανα του, τα

κονίδια. Οι μυκηλιακές υφές του μύκητα έχουν εγκάρσια χωρίσματα (septa) και απ' αυτές εκπύσσονται οι κονιδιοφόροι, το μήκος των οποίων κυμαίνεται από 900 -1600 μm σε μήκος. Στην κορυφή του κονιδιοφορου υπάρχουν σφαιρικοί σχηματισμοί, τα κυστίδια, που κυμαίνονται από 40-60 μm σε διάμετρο. Κάθε κυστίδιο είναι πλήρως καλυμμένο με φιαλίδια, τα οποία εκπύσσονται από καφέ μύτες. Επί των φιαλιδίων αναπτύσσονται τα κονίδια του μύκητα τα οποία έχουν διάμετρο 3 έως 5 μm .

1.4.4 Μοριακή ταυτοποίηση ειδών *Aspergillus* sp.

Η πρώτη ολοκληρωμένη προσπάθεια αναγνώρισης και ταυτοποίησης των ειδών του γένους *Aspergillus* πραγματοποιήθηκε το 1965 από τους Raper και Fennell. Συνολικά αναγνωρίστηκαν 132 είδη τα οποία διαχωρίστηκαν σε 18 διαφορετικές ομάδες με βάση φαινοτυπικές διαφορές. Ένα από τα κύρια κριτήρια ταυτοποίησης των ειδών των Ασπεργίλλων είναι οι διαφορές των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών (Samson et al., 2014). Το σχήμα της κεφαλής των κονιδιοφόρων και η παρουσία ή απουσία διπλής σειράς κυττάρων (φιαλιδίων) στην κεφαλή τους είναι ορισμένα από τα χαρακτηριστικά που ελέγχονται για την ταυτοποίηση. Επίσης, εξετάζεται το μέγεθος, το πάχος των τοιχωμάτων καθώς και η μορφολογία των ασκοσπορίων και η δημιουργία ή όχι σκληρωτίων.

Παρότι τα παραπάνω μορφολογικά χαρακτηριστικά αποτελούν ένα αρκετά αξιόπιστο κριτήριο ταυτοποίησης, η χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων και οι διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία, σχετική υγρασία) των μυκήτων, επηρεάζουν την εγκυρότητα αυτών των κριτηρίων, μειώνοντας την αξιοπιστία αυτής της μεθόδου (Okuda 1994; Okuda et al., 2000). Πολλές φορές η ταυτοποίηση με βάση τις μορφολογικές διαφορές των ειδών συνδυάζεται και με διαφορές που αφορούν την φυσιολογία των μυκήτων, όπως είναι η διάμετρος της αποικίας στο υπόστρωμα ανάπτυξης και η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Geiser et al., 2000). Η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί ένα σχετικά αξιόπιστο κριτήριο ταξινόμησης των ειδών σε αθροίσματα διότι πολλές φορές είδη ενός συγκεκριμένου αθροίσματος παράγουν έναν συγκεκριμένο μεταβολίτη όπως στην περίπτωση του αθροίσματος *Flavi* όπου όλα τα είδη που ανήκουν σε αυτό παράγουν κοζικό οξύ (Varga et al., 2011).

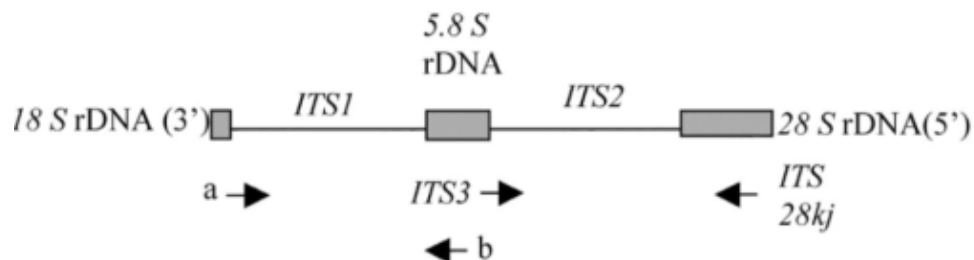
Τα τελευταία χρόνια όμως, η ταυτοποίηση των Ασπεργίλλων βασίζεται κυρίως σε μοριακές τεχνικές. Μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό είναι οι πολυμορφισμοί μεγέθους τμημάτων περιορισμού του DNA (restriction fragment length polymorphisms; RFLP' s), το τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (random amplified polymorphic DNA; RAPD' s) και οι πολυμορφισμοί μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (amplified fragment length polymorphisms; AFLP' s) (Geiser et al., 2007).

Οι ταυτοποιήσεις των ειδών των μαύρων Ασπεργίλλων με χρήση RFLP' s τόσο του πυρηνικού (nDNA) όσο και του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) έχουν διαδεδομένη χρήση και επιτυχημένη εφαρμογή. Ο Parenicova το 2001 με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων της πυρουβικής κινάσης (pkiA) και λυάση της πηκτίνης A (peIA) διαχώρισε τα είδη *A. japonicus* και *A. aculeatus* ενώ κατέγραψε ότι τα είδη *A. niger* και *A. brasiliensis* παρουσιάζουν όμοιο προφίλ μετά από πέψη με την χρήση των περιοριστικών ενζύμων PstI και SalI. Επίσης, επιτυχή διαχωρισμό ορισμένων ειδών (*A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. brasiliensis* κ.α.) είχε και η χρήση της μεθόδου τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD' s) (Megnegneau et al., 1993). Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου διαχώρισε μεταξύ τους τα είδη *A. carbonarius* και *A. japonicus*, τα *A. aculeatus* και *A. japonicus* και το *A. brasiliensis* με το *A. niger* (Hamari et al., 1997; Kevei et al., 1996; Varga et al., 2000). Πολλές μελέτες επίσης, πραγματοποιήθηκαν από διάφορους ερευνητές για τον διαχωρισμό των Ασπεργίλλων με την μέθοδο AFLP' s, ωστόσο η εφαρμογή της στους μαύρους Ασπεργίλλους είναι αρκετά περιορισμένη (Perrone et al., 2006; Abarca et al., 2006; Varga et al., 2007a).

Μια ακόμη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των ειδών των μαύρων Ασπεργίλλων είναι η αλληλούχηση μιας γονιδιακής περιοχής ύστερα από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με πέψη περιοριστικών ενζύμων με την μέθοδο RFLP' s (PCR – RFLP' s). Η αρχική αλληλούχηση της γονιδιακής περιοχής ITS και η πέψη με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου RsaI, διαχώρισε με επιτυχία τα είδη *A. niger* και *A. tubingensis* (Accensi et al., 2001; Bau et al., 2006; Martinez - Culebras and Ramon, 2007; Medina et al., 2005). Η ανάλυση PCR – RFLP' s με πολλαπλασιασμό της περιοχής ITS εφαρμόστηκε και με τη χρήση άλλων περιοριστικών ενζύμων όπως τα HhaI και NlaIII, για τον διαχωρισμό των ειδών *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* και *A. aculeatus* (Martinez – Culebras and Ramon, 2007). Άλλες γονιδιακές περιοχές, αμινοξέα ή και ένζυμα που αλληλουχήθηκαν με PCR και οδήγησαν στην ταυτοποίηση ορισμένων ειδών των μαύρων Ασπεργίλλων είναι αυτά που κωδικοποιούν τα ακόλουθα: intergenic spacer region (IGS) και η β-τουμπουλίνη (Zanzotto et al., 2006).

Άλλες μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η PCR σε συνδυασμό με τη μέθοδο AFLP' s (PCR – AFLP' s) και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rtPCR). Ο πολυμορφισμός διάταξης μονόκλωνης αλυσίδας (single strand conformation polymorphism; SSCP) αποτελεί μια μέθοδο όπου το δείγμα DNA πολλαπλασιάζεται με PCR και το προϊόν αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες οι οποίες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση. Η λογική της μεθόδου βασίζεται στο ότι η ταχύτητα ηλεκτροφόρησης των αλλοιωμένων μονόκλωνων αλυσίδων είναι διαφορετική σε σχέση με την αντίστοιχη φυσιολογική αλληλουχία, λόγω των διαφορών στην τρισδιάστατη δομή του μορίου. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς με

αλληλούχιση του γονιδίου της καλμοδουλίνης για το διαχωρισμό πολλών ειδών των μαύρων Ασπεργίλλων όπως είναι ενδεικτικά, μεταξύ άλλων, τα είδη *A. brasiliensis*, *A. niger*, *A. uvarum*, *A. ibericus* κ.α. (Susca et al., 2007). Επίσης ο Bufflier το 2007 διαχώρισε τα είδη *A. carbonarius*, *A. ibericus*, *A. aculeatus* και *A. japonicus* με την μέθοδο ολιγονουκλεοτιδικών μικροσυστοιχιών χαμηλής πολυπλοκότητας (low complexity oligonucleotide microarray; OLISA), η οποία βασίστηκε στην χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού ανιχνευτή με φθορίζουσα χρωστική ουσία και της αλληλουχίας του γονιδίου της καλμοδουλίνης.



Εικόνα 48. ITS περιοχή

Η αλληλούχιση της συντηρημένης περιοχής ITS (internal transcribed region) του ριβοσωμικού DNA (rDNA) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των περισσότερων ειδών του μύκητα, με εξαίρεση τα είδη που ανήκουν στους μαύρους Ασπεργίλλους (άθροισμα Nigri). (Εικ. 48). Τα είδη *A. carbonarius* και *A. sclerotioniger* που ανήκουν σε αυτό το άθροισμα έχουν πανομοιότυπες αλληλουχίες ITS, όπως επίσης και τα είδη *A. japonicus*, *A. aculeatus* και *A. uvarum* (Samson et al., 2007). Άλλες γονιδιακές περιοχές – γονίδια, αμινοξέα ή και ένζυμα που αλληλουχήθηκαν με PCR και οδήγησαν στην ταυτοποίηση ορισμένων ειδών των μαύρων Ασπεργίλλων είναι αυτά που κωδικοποιούν τα ακόλουθα: Cox1 (cytochrome oxidase subunit 1), IGS (intergenic spacer region), πυρουβική κινάση, λύαση της πηκτίνης, πολυγαλακτουρονάση, πυρουβική καρβοξυλάση, translation intitation factor 2, chaperonin complex component (TCP1) κ.α. (De Vries et al., 2005; Gielkens et al., 1997; Parenicova et al., 2001; Witiak et al., 2007). Οι αλληλουχήσεις των γονιδίων CamA (καλμοδουλίνης) και BenA (β - τουμπουλίνης) ύστερα από PCR είναι αυτές που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ταυτοποίηση των μαύρων Ασπεργίλλων, καθώς σε περιοχές αυτών των γονιδίων φαίνεται ότι τα περισσότερα είδη εμφανίζουν τις περισσότερες διαφορές μεταξύ τους. Η αλληλούχιση του γονιδίου της καλμοδουλίνης δίνει σε μεγάλο βαθμό αξιόπιστα αποτελέσματα, με πολύ μικρές εξαιρέσεις όπως στην περίπτωση των ειδών *A. udagawae*, *A. elegans* και *A. steynii* όπου δεν υπάρχει ξεκάθαρος διαχωρισμός (Novakova et al., 2014; Visagie et al., 2014).

Η χρήση του γονιδίου της καλμοδουλίνης θεωρείται η πιο διαδεδομένη επιλογή για την ταυτοποίηση των μαύρων Ασπεργίλλων. Μέχρι σήμερα, είναι γνωστό ότι η χρήση αλληλουχιών της β – τουμπουλίνης μπορεί να ταυτοποιήσει όλα τα είδη εκτός από το *A. laticoffeatus* που έχει πανομοιότυπη αλληλουχία με ορισμένα στελέχη του *A. niger* (Samson et al., 2004; Varga et al., 2007a). Άλλες γονιδιακές περιοχές που χρησιμοποιούνται σε μικρότερη συχνότητα για την ταυτοποίηση αυτών των ειδών είναι οι: EF1 α (translation elongation factor 1 - α) και RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit) (Peterson, 2000). Οι περισσότεροι ερευνητές βασίζονται στα γονίδια της καλμοδουλίνης και της β – τουμπουλίνης για τον μοριακό χαρακτηρισμό των μαύρων ασπεργίλλων, ενώ η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων αυξάνεται με τον συνδυασμό και άλλων μεθόδων ταυτοποίησης (φαινοτυπικές διαφορές, μοριακοί δείκτες).

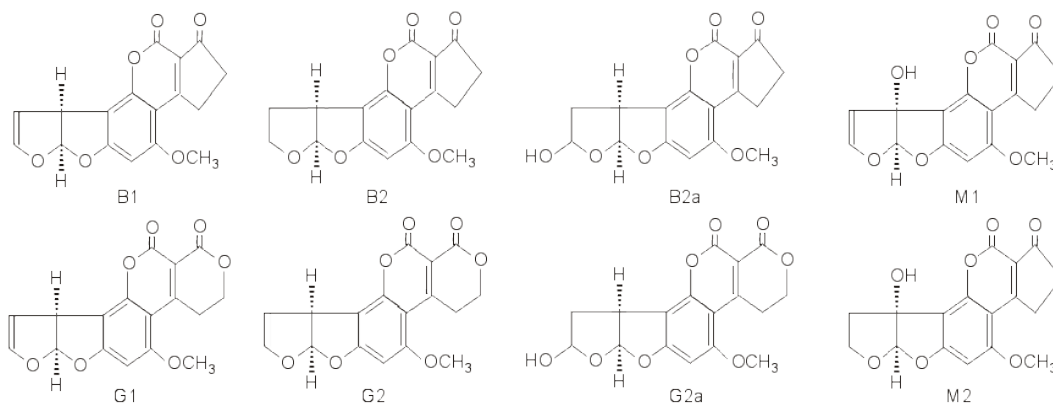
1.5 Μόλυνση των δημητριακών και των προϊόντων τους με μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων και έχουν ανιχνευθεί σε πολλά γεωργικά προϊόντα όπου έχουν εντοπιστεί τοξικογόνοι μύκητες (CAST, 2003). Η παρουσία τους στα τρόφιμα σε υψηλά επίπεδα μπορεί να επιφέρει τοξικές επιδράσεις οι οποίες μπορεί να είναι οξείες ή χρόνιες όπως μεταλλάξεις, τερατογενέσεις, γενετικές ανωμαλίες, νευροτοξικότητα ή ακόμα κα θάνατο (ICMSF, 1996). Επιπλέον, το ποικίλο διαιτολόγιο μπορεί να εκθέτει τους καταναλωτές σε μακροχρόνια λήψη χαμηλών επιπέδων μίας ή περισσοτέρων τοξινών και αυτού του είδους η έκθεση μακροπρόθεσμα μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία τους (Lopez-Garcia et al., 1999). Η παρουσία μυκοτοξινών στα τρόφιμα δεν είναι ορατή όπως αυτό συμβαίνει με άλλες ασθένειες, όπου τα συμπτώματα είναι ορατά στα μέρη του φυτού. Η παγκόσμια κοινότητα πλέον είναι ευαισθητοποιημένη για την πιθανότητα μόλυνσης τροφίμων όπως φυστίκια, μπαχαρικά, δημητριακά με μυκοτοξίνες με συνέπεια 77 χώρες να έχουν θεσπίσει κανονισμούς για τις μυκοτοξίνες (CAST, 2003, FAO, 2004). Οι πιο σημαντικές ομάδες των μυκοτοξινών που ανιχνεύονται στα δημητριακά και στα προϊόντα τους είναι: αφλατοξίνες, φουμονισίνες ωχρατοξίνες, ζεαραλενόνες και τριχοθηκίνες ενώ σε χαμηλό ποσοστό έχει ανιχνευθεί η μυκοτοξίνη κιτρινίνη σε δημητριακά (RASFF, 2012, EFSA, 2012).

1.5.1 Αφλατοξίνες - Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες

Οι αφλατοξίνες είναι ομάδα μυκοτοξινών. Εντοπίστηκαν για πρώτη φορά το 1961 στην Αγγλία από τους Sargeant et al., (1961), σε ζωοτροφές που προκάλεσαν το θάνατο σε 100.000 γαλοπούλες. Οι συγκεκριμένες ζωοτροφές βρέθηκε ότι ήταν προσβεβλημένες από το μύκητα *A. flavus*. Οι αφλατοξίνες ταξινομούνται σε τρεις υποομάδες που περιέχουν δύο τοξίνες η κάθε μία:

Την υποομάδα B με δύο τοξίνες B1 και B2, την υποομάδα G με δύο τοξίνες την G1 και G2 και την υποομάδα M με τις τοξίνες M1 και M2. Η ονομασία των δύο πρώτων προέρχεται από το φθορισμό που παρατηρείται μετά από έκθεση αυτών σε υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα παρατηρείται μπλε φθορισμός (Blue) για την υποομάδα B, κιτρινο-πράσινος φθορισμός (Green) για την υποομάδα G ενώ οι τοξίνες της υποομάδας M εμφανίζουν μπλε ιώδη φθορισμό. Η αφλατοξίνη M1 είναι ο κύριος μεταβολίτης της αφλατοξίνης B1 ο οποίος ανιχνεύεται στο γάλα εκτρεφόμενων θηλαστικών που έχουν καταναλώσει τροφή η οποία περιείχε αφλατοξίνη B1. (Εικ. 50). Επίσης έχει ανιχνευθεί και στο γάλα θηλαζουσών μητέρων (IARC,1993).



Εικόνα 50. Ο στερεο-χημικός τύπος των αφλατοξινών B1, B2, G1, G2 (http://195.134.76.37/chemicals/chem_aflatoxins.htm)

1.5.1.1 Μύκητες που παράγουν αφλατοξίνες

Οι αφλατοξίνες παράγονται από μύκητες του γένους *Aspergillus* που ανήκουν στην υποομάδα (section) *Flavi*. Το section *Flavi* αποτελείται από δύο υποομάδες ειδών. Η πρώτη υποομάδα περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τα αφλατοξικόγωνα είδη *A. arachidicola*, *A. flavus*, *A. minisclerotium*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis* και *A. toxicarius*. Η άλλη υποομάδα περιλαμβάνει είδη τα οποία δεν παράγουν αφλατοξίνες μεταξύ των οποίων είναι τα *A. avenaceus*, *A. caelatus*, *A. lanosus*, *A. leporis*, *A. oryzae*, *A. sojae*, και *A. tamarii* (Samson et al., 2006).

Τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus* αποτελούν τα κύρια είδη που παράγουν αφλατοξίνες (Bennett and Klich 2003, Horn, 2007). Η διαφορά μεταξύ των δύο ειδών είναι ότι το είδος *A. flavus* παράγει μόνο αφλατοξίνη B1 και κάποιες φορές κυκλοπιαζονικό οξύ ενώ το είδος *A. parasiticus* παράγει αφλατοξίνη B1, B2, G1, G2 (Pitt, 1993b) αλλά δεν παράγει κυκλοπιαζονικό οξύ (Horne, 2003). Ωστόσο σε μελέτη τους οι Geiser et al., (1998, 2000) με απομονώσεις του είδους *A. flavus* προτείνουν ότι το είδος αυτό μπορεί να χωριστεί σε δύο υποομάδες και πρότειναν ότι η δεύτερη υποομάδα διέφερε αρκετά από την πρώτη, ώστε να μπορεί να διαχωριστεί και σε διαφορετικό είδος. Μία από τις διαφορές της δεύτερης υποομάδας είναι και η παραγωγή αφλατοξίνης G, εκτός της αφλατοξικογόνες B, καθώς και κυκλοπιαζονικού οξέος σε αντίθεση με όλες τις άλλες απομονώσεις τους *A. flavus*. Η συγκεκριμένη υποομάδα φαίνεται να εμφανίζεται μόνο στο νότιο ημισφαίριο.

Το είδος *A. flavus* είναι περισσότερο διαδεδομένο και αποικίζει τα υπέργεια μέρη του φυτού αντίθετα το είδος *A. parasiticus* έχει πιο περιορισμένη γεωγραφική κατανομή και αναφέρεται κυρίως ως μύκητας του εδάφους (EFSA, 2007). Οι περισσότερες από τις απομονώσεις του είδους *A. parasiticus* είναι αφλατοξιγόνες, σε ποσοστό που φθάνει το 80% με 90% ενώ το ποσοστό των αφλατοξιγόνων απομονώσεων για το είδος *A. flavus* φθάνει το 30% με 40% (Klich and Pitt, 1988). Τέλος τα είδη *A. nomius* και *A. bombycis* παράγουν αφλατοξίνη B και G (Saito et al., 1989, Pitt, 1993, Peterson et al., 2001).

1.5.1.2 Ανίχνευση αφλατοξινών στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του

Ένας από τους κυριότερους ξενιστές του είδους *A. flavus* είναι το καλαμπόκι με συνέπεια στο συγκεκριμένο προϊόν να είναι υπαρκτός ο κίνδυνος μόλυνσης με αφλατοξίνες (Pitt & Hocking, 1997). Απαντάται σε υψηλά ποσοστά σε τροπικές περιοχές ενώ εμφανίζεται σε χαμηλά ποσοστά σε εύκρατες περιοχές και δεν εμφανίζεται καθόλου σε περιοχές με δροσερό εύκρατο κλίμα εκτός αν τα τρόφιμα έχουν εισαχθεί από τροπικές περιοχές (IARC, 2002). Το συγκεκριμένο είδος προσβάλλει τον αραβόσιτο στον αγρό και μπορεί να συνεχίσει την προσβολή και κατά την αποθήκευση.

Ο βιολογικός κύκλος του παθογόνου μπορεί να διαιρεθεί σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση είναι το σαπροφυτικό στάδιο όπου παρατηρείται ο αποικισμός των φυτικών υπολειμμάτων από το μύκητα, ενώ στη δεύτερη φάση λαμβάνει χώρα μόλυνση των αναπτυσσόμενων φυτών. Τα σκληρώτια του μύκητα που υπάρχουν στο έδαφος βλαστάνουν στο τέλος του χειμώνα ή στην αρχή της άνοιξης, προς μυκήλιο και κονιδιοφόρους και μολύνουν τα φυτά είτε απευθείας μέσω των ιστών πλησίον του εδάφους που έρχονται σε επαφή με το μυκήλιο σπόρια, ή από κονίδια

που έχουν μεταφερθεί από τον άνεμο, είτε τέλος από έντομα που προκαλούν πληγές στα φυτά και φέρουν σπόρια του μύκητα (Abbas et al., 2009).

Επισημαίνεται ότι το κύριο είδος του γένους *Aspergillus* που μολύνει το καλαμπόκι είναι το είδος *A. flavus*. Παρότι το είδος *A. parasiticus* έχει την ίδια γεωγραφική εξάπλωση με το είδος *A. flavus* είναι λιγότερο διαδεδομένο και συνήθως δεν απαντάται στον αραβόσιτο (Pitt et al., 1994).

1.5.1.3 Όρια αφλατοξινών με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του

Με βάση τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης 11881 του 2006 έχουν θεσπιστεί τα όρια αφλατοξινών που είναι: Για το καλαμπόκι που υπόκειται σε διαλογή ή κατεργασία πριν την κατανάλωση ή τη χρήση ως συστατικό τροφίμων σε 5 µg/Kg για την αφλατοξίνη B1 και σε 10 µg/Kg για το σύνολο των αφλατοξινών B1, B2, G1, G2. Για τα μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και τις παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά σε 0,10 µg/Kg (EC, 2007).

1.5.1.4 Επιπτώσεις αφλατοξινών στην υγεία των καταναλωτών

Οι αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2 έχουν καταταχθεί στις καρκινογόνες ουσίες της ομάδας 1 ενώ οι αφλατοξίνη M1 στις πιθανόν καρκινογόνες ουσίες της ομάδας B2. Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα η καρκινογόνος δράση της M1 είναι 10 φορές μικρότερη σε σχέση με την B1 (IARC, 1993, 2002). Η τοξικότητα της ομάδας αυτής των μυκοτοξινών μπορεί να διακριθεί σε οξεία και σε χρόνια. Οξεία τοξικότητα παρατηρείται κατά την κατανάλωση τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα αφλατοξίνης όπως στην περίπτωση που προαναφέρθηκε στην Κένυα (Baker and Bennett, 2008). Η οξεία τοξικότητα λόγω αφλατοξίνης περιλαμβάνει κοιλιακό άλγος πνευμονικό ή εγκεφαλικό οίδημα καταστροφή του ήπατος, άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν ανορεξία, φωτοευαισθησία, ίκτερο, διάρροια (Lewis et al., 2005). Η χρόνια τοξικότητα είναι αυτή που εμφανίζεται συχνότερα λόγω κατανάλωσης μικρών ποσοτήτων αφλατοξινών για παρατεταμένο διάστημα. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από την ηλικία, το φύλλο, τη διατροφική κατάσταση και το μέγεθος της έκθεσης (Marin et al., 2013).

Οι ασθένειες για τις οποίες ενοχοποιούνται οι αφλατοξίνες λόγω χρόνιας τοξικότητας είναι οι ακόλουθες:

1. Καρκίνος του ήπατος. Υπάρχουν δεδομένα ότι ο ιός της ηπατίτιδας B και ο ιός της ηπατίτιδας C λειτουργούν συνεργιστικά μαζί με τις αφλατοξίνες στην ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος (Hepatocellular carcinoma, HCC). Σε περιοχές της Ασίας και της Αφρικής με υψηλά ποσοστά

εμφάνισης ηπατικού καρκινώματος τα ποσοστά αυτά αποδίδονται στις λοιμώξεις από ιούς ηπατίτιδας και σε διατροφή με τρόφιμα που περιέχουν αφλατοξίνες (Palliyaguru and Wu, 2013).

2.Επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα. Στους αρένες με παρατεταμένη κατανάλωση αφλατοξινών έχουν παρατηρηθεί καθυστερημένη ή ελαττωματική ανάπτυξη αναπαραγωγικού συστήματος, μειωμένο αναπαραγωγικό δυναμικό, γενετικές ανωμαλίες στα σπερματικά κύτταρα, μειωμένη συγκέντρωση τεστοστερόνης (CAST, 2003).

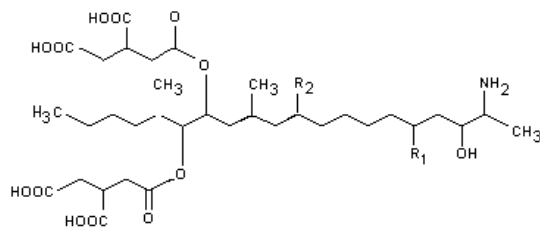
3.Επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα. Όπως μειωμένη δραστηριότητα των T και B λεμφοκυττάρων καθώς και παρεμπόδιση της φαγοκύτωσης (Jiang et al., 2008).

4.Πιθανή σύνδεση κατανάλωσης αφλατοξινών με το σύνδρομο του Reye. Οι αφλατοξίνες έχουν βρεθεί στο ήπαρ παιδιών που έχουν πεθάνει από το σύνδρομο του Reye, ως εκ τούτου υπάρχουν υπόνοιες ότι αποτελούν την αιτία για την ασθένεια χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί αυτή η θεωρία (Dvorackova et al., 1977).

5.Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση λόγω έκθεσης σε αφλατοξίνες, όχι όμως από κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων αλλά μέσω της αναπνευστικής οδού (Dvorackova and Pnchova, 1986).

1.5.2 Φουμονισίνες - Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες

Οι φουμονισίνες είναι μία ομάδα μυκοτοξινών. Η πρώτη φουμονισίνη απομονώθηκε το 1988 από καλλιέργεια του μύκητα *Fusarium verticillioides* (συν. *F. moniliforme*) (Gelderblom et al., 1988). Από τότε τουλάχιστον 18 φουμονισίνες έχουν προσδιοριστεί και ταξινομηθεί σε τέσσερις υποομάδες με βάση τη χημική τους δομή. Οι υποομάδες αυτές είναι οι A, B, C, P (Wan Norhasima et al., 2009). Από αυτές, οι φουμονισίνες B1, B2 και B3 ανιχνεύονται συχνότερα στα τρόφιμα (Krska et al., 2007) (Εικ. 51). Από τοξικολογική άποψη η φουμονισίνη B1 είναι η πιο σημαντική μυκοτοξίνη (IARC, 1993).



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

1.5.2 .1 Μύκητες που παράγουν φουμονισίνες

Σήμερα είναι γνωστό ότι αρκετά είδη του γένους *Fusarium* παράγουν φουμονισίνες όπως, *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. beomiforme*, *F. dlamini*, *F. globosum*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. polyphialidicum*, *F. subglutinans* και *F. thapsinum* (IARC, 2002). Επίσης ο μύκητας *Alternaria alternate* f. sp. *lycopersici* έχει βρεθεί ότι παράγει φουμονισίνες που ανήκουν στην Β υποομάδα (Abbas & Riley, 1996). Επιπλέον, το είδος *Aspergillus niger* έχει αναφερθεί ότι παράγει φουμονισίνη B2 (Frisvad et al., 2007).

1.5.2 .2 Ανίχνευση φουμονισίνων στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του

Η ομάδα αυτή των μυκοτοξινών έχει βρεθεί σε καλαμπόκι και προϊόντα του ενώ η πιο συχνά απαντώμενη φουμονισίνη είναι η B1 (Thiel et al., 1992). Τα είδη *F. verticillioides* και *F. proliferatum* αποτελούν τα σημαντικότερα είδη που παράγουν φουμονισίνες και είναι μεταξύ των πιο κοινών μυκήτων που προσβάλλουν τον αραβόσιτο. Αυτοί οι μύκητες μπορούν να απομονωθούν από τους περισσότερους πυρήνες αραβοσίτου ακόμα και αυτούς που φαίνονται υγιείς (Pitt et al., 1993). Προκαλούν σήψη των πυρήνων του καλαμποκιού, η οποία αποτελεί τη σημαντικότερη ασθένεια σε θερμές περιοχές όπου καλλιεργείται ο αραβόσιτος (King & Scott, 1981). Τα είδη αυτά παράγουν κυρίως φουμονισίνη B1 και σε μικρότερες ποσότητες φουμονισίνες B2 και B3. Οι τρεις αυτές φουμονισίνες στο καλαμπόκι βρέθηκαν σε αναλογία B1:B2, 3 προς 1 ενώ η αναλογία B1:B3 ήταν 12 προς 1 (Ross et al., 1990, 1992).

Υπάρχει θετική συσχέτιση ως προς την ύπαρξη μυκοτοξινών στο καλαμπόκι και την ανίχνευση προσβολής στον αγρό από τα δύο αναφερόμενα είδη μυκήτων τα οποία κυριαρχούν στο τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης (Chulze et al., 1996). Προσβολή φυτών αραβοσίτου από το είδος *F. verticillioides* λαμβάνει χώρα είτε μέσω των κονιδίων που προσβάλλουν το υπέργειο τμήμα μεταφερόμενα από τον άνεμο ή πάνω στο σώμα εντόμων είτε μέσω των ριζών από μυκήλιο ή κονίδια που υπάρχουν στο έδαφος είτε τέλος μέσω μολυσμένου σπόρου (Munkvold et al., 1997). Η συγκέντρωση φουμονισινών σε ακατέργαστο καλαμπόκι βρέθηκε αυξημένη όταν επικράτησαν θερμές και ξηρές συνθήκες τις οποίες ακολούθησε περίοδος υψηλής υγρασίας δηλαδή ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης των ειδών *F. verticillioides* και *F. proliferatum*.

Στο εργαστήριο η ανάπτυξη των μυκήτων αυτών ευνοείται όταν η ενεργότητα νερού (a_w) είναι μεταξύ 0,92 και 0,98 και φτάνει στο μέγιστο όταν η θερμοκρασία είναι 30°C για το πρώτο είδος και 35°C για το δεύτερο είδος (Shelby et al., 1994a,b). Έχει βρεθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις μυκοτοξινών ανιχνεύονται όταν υπάρχει ζημιά από έντομα (Miller, 2000). Επιπλέον

διαγονιδιακά φυτά καλαμποκιού που φέρουν γονίδια του βακτηρίου *Bacillus thuringiensis* εμφάνισαν μικρότερη προσβολή από τα παραπάνω είδη και η συγκέντρωση των φουμονισινών ήταν μικρότερη συγκρινόμενη με μη διαγονιδιακά φυτά (Munkvold et al., 1997). Η συγκέντρωση φουμονισινών στα προϊόντα καλαμποκιού εξαρτάται κυρίως από την κατεργασία ή την επεξεργασία που αυτά υφίστανται. Ο πυρήνας του αραβόσιτου αποτελείται από το άμυλο, το φύτρο, τη γλουτένη και το περικάρπιο. Οι φουμονισίνες συγκεντρώνονται στο περικάρπιο και στο φύτρο.

1.5.2.3 Όρια φουμονισινών με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του

Με βάση τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης 11881 του 2006 έχουν θεσπιστεί τα όρια φουμονισινών για το καλαμπόκι και τα προϊόντα του που είναι: Για μη μεταποιημένο αραβόσιτο 4000 $\mu\text{g/Kg}$, για καλαμπόκι που προορίζεται για άμεση κατανάλωση 1000 $\mu\text{g/Kg}$, για δημητριακά με βάση τον αραβόσιτο και σνακ με βάση τον αραβόσιτο 800 $\mu\text{g/Kg}$, για μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τον αραβόσιτο και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά 200 $\mu\text{g/Kg}$ (EC, 2007). Επίσης με βάση την ορθή γεωργική πρακτική ο FDA έχει ορίσει τα κατωτέρω όρια για το σύνολο των FB1, FB2 και FB3 που είναι α) 2.000 ng/g για αποφλοιωμένους κόκκους, κόκκους, σιμιγδάλι αραβοσίτου, αλεύρι αραβοσίτου που προέρχονται από αποφυτρωμένο καλαμπόκι ξηρής άλεσης, β) 4.000 ng/g για αποφλοιωμένους κόκκους, κόκκους, σιμιγδάλι αραβοσίτου, αλεύρι αραβοσίτου που προέρχονται από ξηρή άλεση ολόκληρου του καλαμποκιού ή μερικώς αποφυτρωμένου, γ) 4.000 ng/g για το αλεσμένο πίτουρο καλαμποκιού, δ) 4.000 ng/g για καθαρισμένο καλαμπόκι που προορίζεται για μαζική παραγωγή και ε) 3.000 ng/g για καθαρισμένο καλαμπόκι που προορίζεται για pop corn (FDA, 2001).

1.5.2 .4 Επιπτώσεις φουμονισινών στην υγεία των καταναλωτών

Οι φουμονισίνες έχουν καταταχθεί στις πιθανόν καρκινογόνες ουσίες της ομάδας 2B (IARC, 1993, 2002). Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί για τον τρόπο δράσης των φουμονισινών που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε αλλαγές στις μεταβολικές οδούς που είναι ζωτικής σημασίας για κυτταρικές βιολογικές διεργασίες όπως ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, διαφοροποίηση των κυττάρων και απόπτωση. Ο ένας μηχανισμός αναφέρεται σε αλλαγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και συναθροίσεις φωσφολιπιδίων στο ήπαρ (Gelderblom, et al., 2001). Ο δεύτερος αναφέρεται στην αναστολή της σύνθεσης ενζύμου που επάγει τη σύνθεση σφιγγολιπιδίων τα οποία ρυθμίζουν τη διαπερατότητα

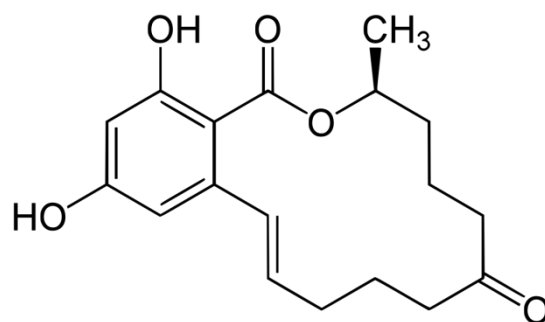
των κυτταρικών μεμβρανών (Merrill et al., 2001). Οι φουμονισίνες ενοχοποιούνται ότι προκαλούν: καρκίνο του οισοφάγου, καρκίνο του ήπατος, ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα και καρδιαγγειακά προβλήματα (IARC, 2002).

Σε περιοχές όπως Βραζιλία, Κίνα, Ιράν, Βόρεια Ιταλία έχουν διεξαχθεί έρευνες που έχουν συσχετίσει το υψηλό ποσοστό εμφάνισης του καρκίνου του οισοφάγου με την κατανάλωση τροφίμων που περιείχαν φουμονισίνες (IARC, 2002). Αυτή η ασθένεια αποτελεί την έβδομη σε σειρά αιτία θανάτου μεταξύ των ανδρών στη Βραζιλία και έχει συσχετισθεί με το διαιτολόγιο και την κατανάλωση τροφών που προέρχονται από καλαμπόκι και τα προϊόντα του (Van der Westhuizen et al., 2003).

Επίσης στην Κίνα έχουν γίνει έρευνες που δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του υψηλού ποσοστού εμφάνισης καρκίνου του ήπατος και της κατανάλωσης τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε φουμονισίνες (Sun et al., 2007). Επιπλέον, η υψηλή συχνότητα εμφάνισης ανωμαλιών του νευρικού σωλήνα που είναι οι εκ γενετής ανωμαλίες του εγκεφάλου, της σπονδυλικής στήλης ή του νωτιαίου μυελού φαίνεται ότι συσχετίζεται με την κατανάλωση τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε φουμονισίνες (Marasas et al., 2004).

1.5.3 Ζεαραλενόνες - Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες

Οι ζεαραλενόνες είναι ομάδα μυκοτοξινών στην οποία ανήκουν μια σειρά από δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων με σημαντικότερους την ζεαραλενονη Α και ζεαραλενονη Β (Richardson et al., 1985). Πρόκειται για σταθερά μόρια σε υψηλές θερμοκρασίες (μέχρι και 150 °C). Διάσπασή τους έχει παρατηρηθεί σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες ή σε αλκαλικές συνθήκες (Ryu et al., 1999). Επομένως η σταθερότητα του μορίου τους δεν επηρεάζεται από τη διαδικασία του μαγειρέματος παρά μόνο αν αυτό γίνεται υπό αλκαλικές συνθήκες οπότε και παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του μορίου τους που έφθασε στο 40% (EFSA, 2011a). (Εικ. 52)



Εικόνα 52. Ο στερεο-χημικός τύπος της ζεαραλενόνης ([http:// www.biosite.dk/ leksikon/ zearalenon. htm](http://www.biosite.dk/leksikon/zearalenon.htm))

1.5.3.1 Μύκητες που παράγουν ζεαραλενόνες

Οι ζεαραλενόνες παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium* με κυριότερο το είδος *F. graminearum* (συν. *F. roseum*), ενώ επίσης τα είδη *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. cerealis*, *F. verticillioides*, *F. incarnatum* έχει βρεθεί ότι παράγουν τη μυκοτοξίνη. Οι μύκητες αυτοί προσβάλλουν τα φυτά στο στάδιο της άνθησης όταν επικρατούν υγρές συνθήκες και σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο η ανάπτυξη αυτών των μυκήτων και η παραγωγή μυκοτοξινών μπορεί να συνεχιστεί και μετά τη συγκομιδή εάν οι συνθήκες αποθήκευσης είναι ακατάλληλες (EFSA, 2011a).

1.5.3.2 Ανίχνευση ζεαραλενόνων στον αραβόσιτο

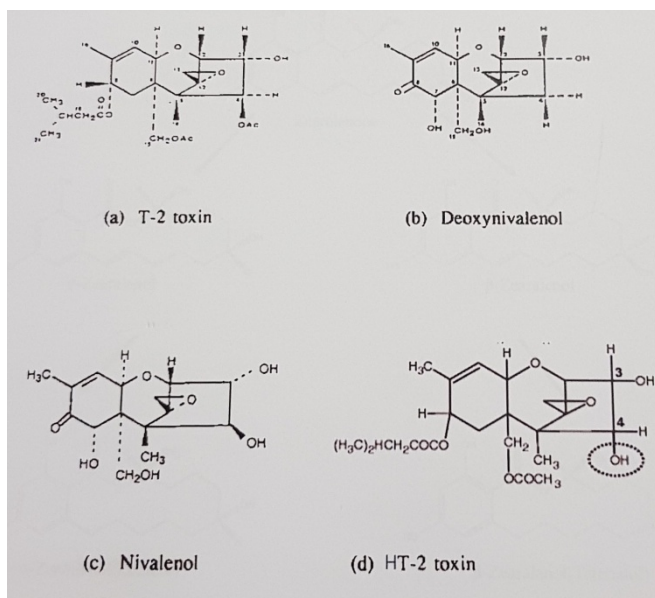
Η ζεαραλενόνη Α βρέθηκε σε υψηλά επίπεδα σε σπόρους καλαμποκιού σε ποσοστό 33% των εξεταζόμενων δειγμάτων καθώς και σε προϊόντα άλεσης με βάση το καλαμπόκι σε ποσοστό 44%. Τα υποπροϊόντα που προέκυψαν από τον καθαρισμό κατά τη διαδικασία της άλεσης είχαν από 3-30 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις από τους καθαρισμένους σπόρους και επίσης στο πίτουρο βρέθηκαν διπλάσιες συγκεντρώσεις (EFSA, 2011a).

1.5.3.3 Επιπτώσεις ζεαραλενόνων στην υγεία των καταναλωτών

Όλες οι ζεαραλενόνες είναι οιστρογονικές ενώσεις, ενώ εντονότερη οιστρογόνο δράση έχει η ζεαραλενόνη Α σε σχέση με τη ζεαραλενόνη Β (Hagler et al., 1979). Η έντονη οιστρογόνο δράσης της ζεαραλενόνης Α πιθανόν οφείλεται στη μεγαλύτερη συγγένεια του μορίου της ένωσης με τους υποδοχείς των οιστρογόνων (Fitzpatrick et al., 1989).

1.5.4 Τριχοθηκίνες-Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες

Έχουν εντοπιστεί και ταυτοποιηθεί περίπου 170 ενώσεις που ανήκουν στις τριχοθηκίνες και έχουν καταταχθεί στις παρακάτω τέσσερις υποομάδες Α, Β, C, D. Οι κυριότερες υποομάδες είναι η Α και Β με την υποομάδα Α να εκπροσωπείται από την HT-2 και την T- TT2 τοξίνη ενώ η υποομάδα Β από τη δεοξυνιβαλενολη (DON) (Grove, 1988, 1993). Οι τριχοθηκίνες είναι πολύ σταθερά μόρια και δε διασπώνται κατά την αποθήκευση, την άλεση, τις υψηλές θερμοκρασίες, την επεξεργασία ή το μαγείρεμα (Εικ. 53) (Eriksen and Alexander, 1998).



Εικόνα 53. Ο στερεο-χημικός τύπος των (a) T-2, (b) DON, (c) NIV και (d) HT-2 τριχοθηκινών (FAO)

1.5.4.1 Μύκητες που παράγουν τριχοθηκίνες

Οι τριχοθηκίνες των υποομάδων A και B παράγονται από αρκετά είδη του γένους *Fusarium* (Thrane, 2001), αλλά και από κάποια είδη του γένους *Trichoderma* (Nielsen et al., 2005). Οι τοξίνες T-2 και HT-2 παράγονται από τα είδη *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. acuminatum* ενώ η δεοξινιβαλενόλη παράγεται από τα είδη *F. graminearum*, *F. culmorum*, και *F. cerealis* (Eriksen and Alexander, 1998).

1.5.4.2 Ανίχνευση τριχοθηκινών στον αραβόσιτο

Στον αραβόσιτο η δεοξινιβαλενόλη έχει εντοπιστεί σε καλαμπόκι στο 89% των εξετασθέντων δειγμάτων (SCOOP, 2003) αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Παρότι όπως αναφέρεται παραπάνω πρόκειται για σταθερά μόρια που γενικά δε διασπώνται στις υψηλές θερμοκρασίες προϊόντα με βάση το σιτάρι και τον αραβόσιτο μεταξύ των οποίων δημητριακά πρωινού, μπισκότα, ζυμαρικά, ψωμί περιείχαν συγκεντρώσεις δεοξινιβαλενόλης πολύ χαμηλότερες σε σχέση με την πρώτη ύλη γεγονός που σημαίνει ότι οι υψηλές θερμοκρασίες που μεσολάβησαν κατά το ψήσιμο οδήγησαν σε μείωση της ποσότητας δεοξινιβαλενόλης (Bullerman and Bianchini, 2007).

Σε ότι αφορά τις τοξίνες T-2 και HT-2 η βρώμη γενικά περιέχει σε μεγαλύτερο ποσοστό και υψηλότερες συγκεντρώσεις τις τοξίνες αυτές, σε αντίθεση με τον αραβόσιτο και το σιτάρι. Η επεξεργασία των δημητριακών κατανέμει τις παραπάνω τοξίνες στα διάφορα κλάσματα. Από μετρήσεις των συγκεντρώσεων των τριχοθηκινών στα κλάσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία άλεσης οι τοξίνες αυτές εντοπίζονται κυρίως στο περίβλημα των σπόρων με συνέπεια η συγκέντρωσή τους να είναι αυξημένη στο πίτουρο (EFSA, 2011c).

1.5.4.3 Επιπτώσεις τριχοθηκινών στην υγεία των καταναλωτών

Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι οι συγκεκριμένες μυκοτοξίνες αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση (Cundliff and Davies, 1977). Επίσης η T- 2 τοξίνη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη σύνθεση του DNA και RNA (WHO, 1990).

1.5.5 Τεχνικές προσδιορισμού μυκοτοξινών

Για την ανίχνευση των μυκοτοξινών χρησιμοποιούνται μια σειρά από μεθόδους. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι μέθοδοι ανίχνευσης μυκοτοξινών πρέπει να πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια όπως: α) προσδιορισμός ομάδας μυκοτοξινών, β) ταχύτητα, γ) ακρίβεια, δ) δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των συγκεντρώσεων (Pittet, 2005)

1.5.5.1 Τεχνικές Χρωματογραφίας

Στο παρελθόν η πιο διαδεδομένη τεχνική ήταν η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Σήμερα εφαρμόζεται κυρίως η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) για την οποία απαιτείται οι προς εξέταση μυκοτοξίνες να είναι ανθεκτικές στις υψηλές θερμοκρασίες, (κάτι που συμβαίνει με τις περισσότερες) καθώς και να είναι πτητικές ή να μπορούν να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα.

Επίσης εφαρμόζεται η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) η οποία αποτελεί την πλέον επίσημη τεχνική και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για την ανίχνευση των μυκοτοξινών (Moss, 2000). Οι μυκοτοξίνες συνδέονται σε σύμπλοκα με άλλα μακρομόρια όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια επίσης κάποιες από αυτές είναι υδρόφιλα και άλλες λιπόφιλα μόρια. Συνήθως μετά την προετοιμασία του δείγματος και πριν τη χρωματογραφία απαιτείται ένας καθαρισμός του δείγματος για την απομάκρυνση ελαίων και λιπών. Η διαδικασία καθαρισμού του δείγματος εξαρτάται από την μυκοτοξίνη και το προς εξέταση προϊόν (Moss, 2000).

1.5.5.2 Ενζυμική Δοκιμή Ανοσοπροσρόφησης (Enzyme Linked Immunosorbent Assays, ELISA)

Η τεχνική της ELISA εφαρμόζεται επίσης για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών και πλεονεκτεί στο ότι παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Το πλεονέκτημά αυτό είναι σημαντικό όταν απαιτούνται συχνοί έλεγχοι για πιθανή μόλυνση με μυκοτοξίνες ενός μεγάλου αριθμού προϊόντων και ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων ωστόσο η ακρίβεια της αμφισβητείται. Επιπλέον η εξειδίκευση των μονόκλωνων αντισωμάτων επιτρέπει τον έλεγχο για μεμονωμένες μυκοτοξίνες όπως είναι η αφλατοξίνη B1 ή M1. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μειωμένη ακρίβεια της (Moss, 2000). Η εφαρμογή των παραπάνω τεχνικών σε μια σειρά από βιβλιογραφικές αναφορές βασίζονται στην ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης των μυκοτοξινών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το ίδιο το προϊόν ή το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των μυκοτοξιογόνων μυκήτων που απομονώθηκαν από το προς εξέταση προϊόν.

1.5.5.3 Προσδιορισμός μυκοτοξινών με την χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υλικών ανάπτυξης μυκήτων ικανών να παράγουν μυκοτοξίνες

Οι απομονώσεις ίδιου είδους μυκήτων διαφέρουν μεταξύ τους γενετικά. Μεταξύ των απομονώσεων μυκοτοξιογόνων μυκήτων του ίδιου είδους υπάρχει διαφοροποίηση ως προς την ικανότητα παραγωγής μυκοτοξινών. Για παράδειγμα μόνο το 40% των απομονώσεων του είδους *Aspergillus flavus* παράγουν αφλατοξίνη, ενώ σχεδόν όλες οι απομονώσεις του είδους *Aspergillus parasiticus* παράγουν αφλατοξίνη. (Klich and Pitt, 1988). Ήδη από το 1960 ένα από τα αντικείμενα της έρευνας αποτέλεσε η παρασκευή ενός εξειδικευμένου θρεπτικού υλικού ανάπτυξης μυκοτοξιογόνων μυκήτων, με τη χρήση του οποίου να είναι δυνατή η ανίχνευση μυκοτοξινών μέσω του φθορισμού ύστερα από παρατήρηση υπό υπεριώδη ακτινοβολία.

Χρησιμοποιήθηκαν σύνθετα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά που περιείχαν εκτός από άγαρ διάφορα άλατα καθώς και εκχυλίσματα ή αποστάγματα από υλικά όπως φιστίκια ή καλαμπόκι. (Davis et al., 1987). Οι Lin και Dianese, (1976), πρώτοι περιέγραψαν τη παρασκευή ενός θρεπτικού μέσου που περιείχε άγαρ και καρύδα για το γρήγορο προσδιορισμό αφλατοξίνης. Έκτοτε και άλλοι ερευνητές ασχολήθηκαν χρησιμοποιώντας την καρύδα ως πρώτη ύλη για την παρασκευή τέτοιων θρεπτικών υλικών. Οι Dyer και Mc Cammon, (1994), σε έρευνα τους διαπίστωσαν ότι μεταξύ των θρεπτικών μέσων ανάπτυξης αφλατοξιογόνων μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αφλατοξίνης, το Coconut Cream Agar αποτέλεσε το καλύτερο θρεπτικό υλικό για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης μέσω του φθορισμού ύστερα από παρατήρηση υπό υπεριώδη ακτινοβολία.

Τα αποτελέσματα της έρευνας τους συσχετίστηκαν μέσω ανάλυσης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Στο 90,5% των απομονώσεων στο οποίο παρατηρήθηκε φθορισμός σε Coconut Cream Agar, ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη μέσω TLC. Σε μετέπειτα έρευνες το Coconut Cream Agar προσδιορίστηκε ως κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την ανίχνευση ωχρατοξίνης που παράγεται από μύκητες του είδους *Aspergillus carbonarius* και από μύκητες του *Aspergillus section Circumdati* (Heenan et al., 1998) καθώς και για την ανίχνευση κιτρινίνης που παράγεται από το μύκητα *Penicillium citrinum* (Mohamed et al., 2013).

1.5.5.4 Ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή μυκοτοξινών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Οι πρώτες τεχνικές για τον εντοπισμό αλληλουχιών DNA, με τη χρήση εξιδικευμένων εκκινητών περιγράφηκαν πριν από περίπου 30 χρόνια (Southern, 1975). Η PCR επιτρέπει την αντιγραφή μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας -στόχου του DNA ώστε να παραχθούν δεκάδες εκατομμύρια πανομοιότυπα αυτής της αλληλουχίας. Η PCR πραγματοποιείται με ειδικά σχεδιασμένα ολιγονουκλεοτιδια – εκκινητές τα οποία προσδένονται στα άκρα της αλληλουχίας στόχου και οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να αντιγραφεί. Η αντιγραφή του συγκεκριμένου τμήματος πραγματοποιείται με τη βοήθεια θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω εναλλαγής θερμοκρασιών και επαναλαμβανόμενων κύκλων (Seidman, 2011).

Οι διαγνωστικές μέθοδοι που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι ακριβείς, διότι η ταυτοποίηση των ειδών βασίζεται σε γενοτυπικές διαφορές. Επίσης, είναι ιδιαίτερη ευαίσθητη μέθοδος, αφού εντοπίζουν τα DNA κύτταρα στόχους σε σύνθετα μείγματα ακόμη και όταν το μυκήλιο δεν είναι πλέον ζωτικό ((Yoder and Christianson 1997; Patino et al. 2004). Η βιοσύνθεση φουμονισίνης ξεκινάει με την σύνθεση ενός πολυκετιδίου (Proctor et al., 1999). Η ανίχνευση του γονιδίου *fum1*, το οποίο ενπλέκεται στον σχηματισμό φουμονισίνης, μπορεί να επιτευχθεί με την μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, διότι έχουν σχεδιαστεί εξειδικευμένοι εκκινητές που υβριδίζουν στα άκρα του (Bluhm et al., 2004).

Η βιοσύνθεση των αφλατοξινών πραγματοποιείται σε 21 στάδια και ξεκινάει και αυτή με τη σύνθεση ενός πολυκετιδίου (Bhatnagar et al., 2003). Έχουν σχεδιαστεί εξειδικευμένοι εκκινητές για τον εντοπισμό αυτών των γονιδίων μεταξύ των οποίων εκκινητές για το γονίδιο *afl R* (Manonmani et al., 2005).

1.6 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 υπόψη 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 B1). Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η αφλατοξίνη Μ1 θεωρείται ως γονοτοξική καρκινογόνος ουσία ίση ή λιγότερο επικίνδυνη από ότι η αφλατοξίνη B1, 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 υπόψη 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 [Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006]. 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 και συνεπώς δεν μπορεί 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 υπόψη πολλοί διαφορετικοί επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και άλλα σώματα, τα οποία συμπεριλαμβάνονται σε αυτή τη διαδικασία.

Μία περίληψη για την τοξικολογική εκτίμηση των μυκοτοξινών με αναφορά στην επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον, πραγματοποιείται με τη συνεργασία μεταξύ των ακόλουθων οργανισμών [Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006]: S Διεθνές Πρόγραμμα για την Χημική Ασφάλεια (International Programm S on Chemical Safety-IPCS, www.who.int/pcs/) Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου (International Agency on Research on Cancer-IARC, www.iarc.fr) S Κοινή FAO/WHO Επιτροπή για τα Πρόσθετα και τους

Επιμολυντές των Τροφίμων (Joint FAO/WHO Committee on Food Additives and Contaminants) S JECFA, (www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm.) Εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αυτή η εκτίμηση διεξάγεται υπ' ευθύνη της Επιστημονικής Επιτροπής για τα τρόφιμα (http://europa.eu.int/comm/food/fs/cs/csfi/index_en.html). 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, π.χ. για κελυφωτά φιστίκια που προορίζονται για άμεση κατανάλωση ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα είναι 2,0 μg/kg (ppb) για την αφλατοξίνη B1 και 4,0 pg/kg (ppb) για το άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2. 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 προαναφερόμενες 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 υπόψη της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών που ακολουθούνται και ειδικά για τα κελυφωτά φιστίκια είναι 5,0 μg/kg (ppb) για την B1 και 10,0 pg/kg (ppb) για το άθροισμα των B1, B2, 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.

1.7 Διατροφικά σκάνδαλα

Τελευταία, όλο ένα και περισσότερα διατροφικά σκάνδαλα βγαίνουν στην δημοσιότητα διατροφικά σκάνδαλα που σχετίζονται με μολυσμένα τρόφιμα από της μυκοτοξίνες. Τον Φεβρουάριο του 2012, βρεθήκαν υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξινών σε γάλα που προερχόταν από διάφορες εταιρίες στην Σερβία και Κροατία. Οι συγκεντρώσεις κυμαινόντουσαν από 10% έως και 200% άνω του επιτρεπτού ορίου. Το σκάνδαλο έπειτα από περαιτέρω διερεύνηση στις βαλκανικές χώρες είχε ως αποτέλεσμα την παύση παραγωγής γάλακτος σε 73 φάρμες στην Σερβία από την κτηνιατρική υπηρεσία της χώρας καθώς η ανίχνευση μυκοτοξίνης ήταν σε

υψηλότερα επίπεδα από τα επιτρεπτά όρια στο γάλα. Το 2012 οι καιρικές συνθήκες στην Σερβία ευνόησαν την 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 σχεδόν το 70% της παραγωγής σέρβικου καλαμποκιού ήταν μολυσμένο το 2012 (Tsitsigiannis et al., 2012).

Παρόμοια προβλήματα έχουν εμφανιστεί και στις ΗΠΑ, όπου η ξηρασία του 2012 οδήγησε στην προσβολή του 50% της σοδιάς καλαμποκιού του Missouri του *Aspergillus*. Η καρκινογόνος ουσία αφλατοξίνη B1 ανιχνεύτηκε επίσης σε επίπεδο που ξεπερνούν το ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ζωοτροφή καλαμποκιού την οποία προμηθευτήκαν τουλάχιστον 3500 αγροτικές επιχειρήσεις στη Γερμανία. Σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας της κάτω Σαξονίας, σχεδόν 10.000 τονοί του καλαμποκιού αυτού από τη Σερβία παραδόθηκαν σε 13 παρασκευαστές ζωοτροφών στο βόρειο κρατίδιο της κάτω Σαξονίας, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή τροφής για βοοειδή, χοίρους και πουλερικά (Tsitsigiannis et al., 2012).

Στη Δυτική Αφρική τα 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)

Τον Ιούνιο του 2013, σύμφωνα με 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 η πλησίον των ορίων επίπεδα. Οι έρευνες στράφηκαν σε συγκεκριμένα φορτία ζωοτροφών που έφτασαν στην Κύπρο από το εξωτερικό και σε συγκεκριμένα φορτία σιταριού από την Βουλγαρία.(www.ellinikigeorgia.gr)

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο αραβόσιτος κατατάσσεται σε παγκόσμια κλίμακα ως το τρίτο σε σημαντικότητα καλλιεργούμενο δημητριακό, μετά το ρύζι και το σιτάρι. Θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά δημητριακά στον κόσμο, αφού αποτελεί βασικό είδος διατροφής για τον άνθρωπο, για ζωοτροφή και χρησιμοποιείται στην παραγωγή προϊόντων αμύλου.

Οι εκτάσεις που καλλιεργείται το καλαμπόκι είναι πολύ σημαντικές, αλλά λόγω της πτώσης της τιμής σε συνδυασμό με το πλήθος παθογόνων που απειλούν την καλλιέργεια, παρατηρείται σταδιακή μείωση 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.

Οι μύκητες του γένους *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.* ανήκουν στην ομάδα των κύριων τοξικογόνων μυκήτων, καθώς παράγουν φουμονισίνες και αφλατοξίνες, αντίστοιχα. Προσβάλλουν μεγάλο εύρος ξενιστών. Στον αραβόσιτο προκαλούν σήψεις σπαδικών και η επιμόλυνση με τους μυκοτοξικογόνους μύκητες ξεκινά προσυλλεκτικά με το μετάξωμα και συνεχίζεται έως το μετασυλλεκτικό επίπεδο όπου εντείνεται. Στη χώρα μας απαντώνται στην καλλιέργεια του καλαμποκιού, προκαλούν σήψεις στους σπάδικες και σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη επιμόλυνση των σπόρων με μυκοτοξίνες, οδηγούμαστε στην υποβάθμιση του προϊόντος. Για την αποφυγή όλων αυτών των επιπτώσεων που προκαλούνται από τα προαναφερθέντα γένη μυκήτων διεξάγονται σημαντικές έρευνες τις τελευταίες δεκαετίες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν είναι δυνατή η αποτελεσματική αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών με καλλιεργητικά και χημικά μέσα, και έτσι έχει γίνει μια στροφή ως προς την βιολογική καταπολέμηση και την εύρεση ανεκτικών υβριδίων ως προς τους μύκητες αυτούς.

Στόχος της μελέτης είναι η καταγραφή της υφιστάμενης κατάστασης στην Θεσσαλία και Μακεδονία, στις κύριες ζώνες καλλιέργειας καλαμποκιού στην Ελλάδα, όσον αφορά τις μυκοτοξίνες που παράγονται από είδη των γενών *Fusarium* και *Aspergillus* αλλά και την πληθυσμιακή τους διακύμανση στο καλαμπόκι.

Για την επίτευξη του στόχου πραγματοποιήθηκε:

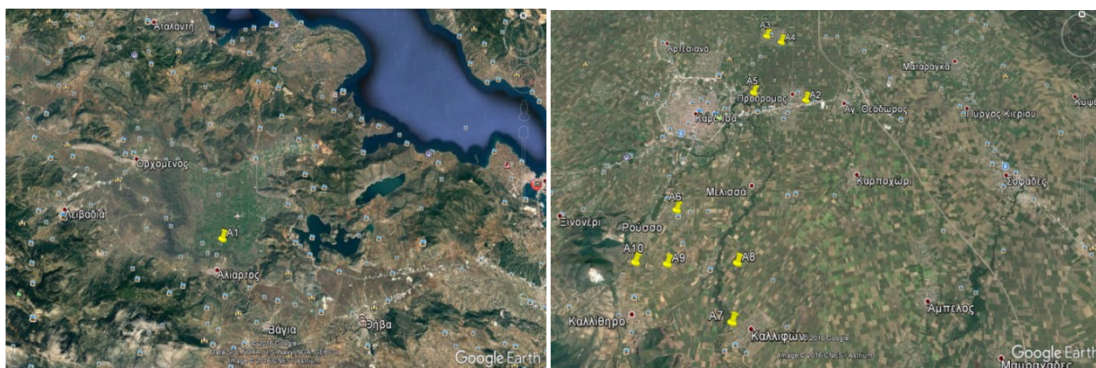
1. Επίσκεψη αγρών αραβοσίτου της Ελλάδας και πραγματοποίηση δειγματοληψιών ώστε να γίνει προσδιορισμός της έντασης των σήψεων και της σοβαρότητας τους κατά το στάδιο της ωρίμανσης

2. Αξιολόγηση της πληθυσμιακής διακύμανσης και σύνθεσης μυκοτοξικογόνων μυκήτων του γένους *Fusarium* και *Aspergillus* σε καλλιέργειες καλαμποκιού στους νομούς Λάρισας, Καρδίτσας, Τρικάλων, Μαγνησίας, Καβάλας, Δράμας και Σερρών.
3. Ανίχνευση και προσδιορισμός αφλατοξινών και φουμονισινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού στους παραπάνω νομούς
4. Μοριακή ταυτοποίηση σε διάφορα στελέχη απομονωμένα από καλλιέργειες αραβοσιτου της Ελλάδας
5. Συγκέντρωση και συσχέτιση μετεωρολογικών δεδομένων με τα επίπεδα αφλατοξινών και φουμονισινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού της Ελλάδας

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δειγματοληψία αραβοσίτου

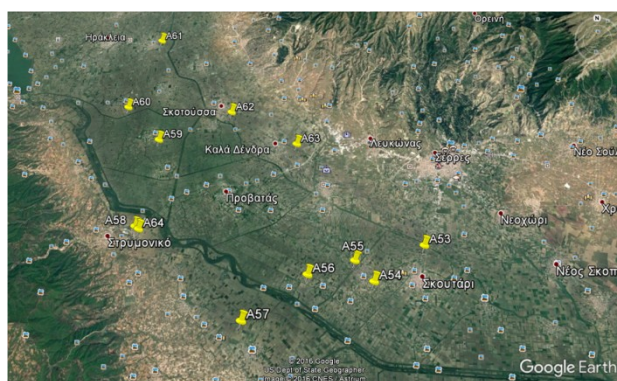
Στις αρχές Σεπτεμβρίου του 2016, εντοπίστηκαν και επιλέχθηκαν οι κατάλληλοι πειραματικοί αγροί αραβοσίτου, οι οποίοι θα συμμετείχαν στις δειγματοληψίες και στη μελέτη ως προς τη σήψη σπαδικα από *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.* και ως προς την ύπαρξη μυκοτοξινών στο καλαμπόκι. Προσδιορίστηκαν 75 αγροί καλαμποκιού της κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν 35 αγροί καλαμποκιού στη Θεσσαλία και 40 αγροί στη Μακεδονία και πραγματοποιήθηκε τυχαία δειγματοληψία και συλλογή σπαδικών από 2 αγρούς (1-2) στο Ν. Βοιωτίας, 8 αγρούς (3-10) στο Ν. Καρδίτσας, 8 αγρούς στον Ν. Τρικάλων (11-18), 12 αγρούς στο Ν. Λάρισας (19-24 και 65-70), 5 αγρούς στο Ν. Μαγνησίας (71-75), 14 αγρούς στο Ν. Καβάλας (25-38), 12 αγρούς στο Ν. Σερρών (53-64) και 14 αγρούς στο Ν. Δράμας (39-52). Από τον κάθε αγρό συλλεχτήκαν κατά μέσο όρο 10 σπαδικες, οι οποίοι άμεσα μεταφέρθηκαν στο Γ.Π.Α. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο στους 4°C και παρέμειναν εκεί μέχρι να γίνει η ανάλυση τους.



Ν. Βοιωτίας και Ν. Καρδίτσας

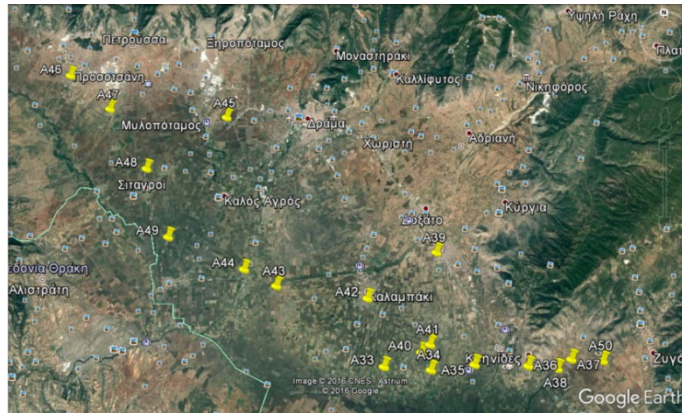


Ν. Τρικάλων και Ν. Λάρισσας

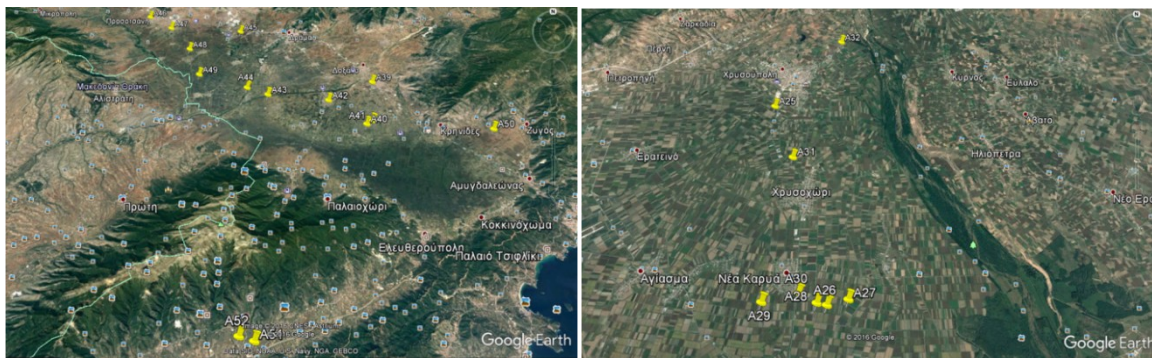


Ν. Λάρισας

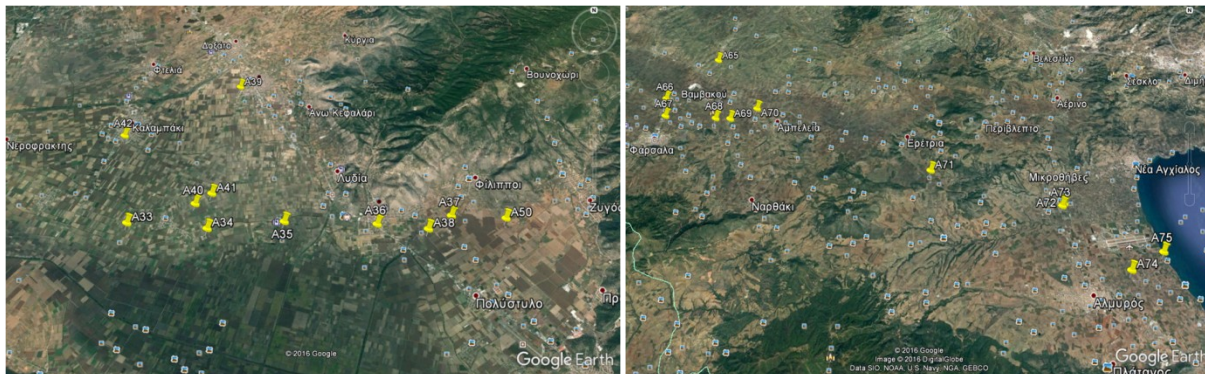
Εικόνα 54. Χάρτες της Θεσσαλίας με σήμανση των αγρών που συμμετείχαν στη δειγματοληψία καλαμποκιού



N. Καβάλας και N. Δράμας



N. Δράμας και N. Καβάλας

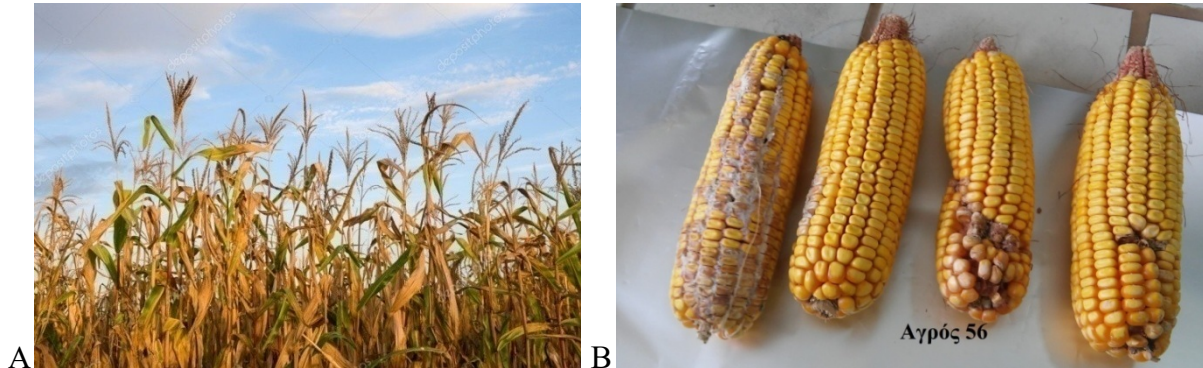


N. Καβάλας και N. Σερρών

Εικόνα 55. Χάρτες της Μακεδονίας με σήμανση των αγρών που συμμετείχαν στην δειγματοληψία καλαμποκιού

Οι δειγματοληψίες για τα δείγματα αγρου έγιναν με βάση τον Κανονισμό ΕΚ αριθ. 401/2006 της Επιτροπής, για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για το 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 γίνεται από διαφορετικά σημεία και στη συνέχεια να γίνεται συνένωση των στοιχειωδών δειγμάτων (Εικ.56). 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, ενώ παράλληλα προσδιορίζονταν η ακριβής τοποθεσία του αγρού με χρήση Παγκοσμίου Συστήματος Στιγματισθείσης (GPS).



Εικόνα 56. Αγρός αραβοσιτου της βόρειας Ελλάδας και σπαδικες με συμπτώματα σήψεων.

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

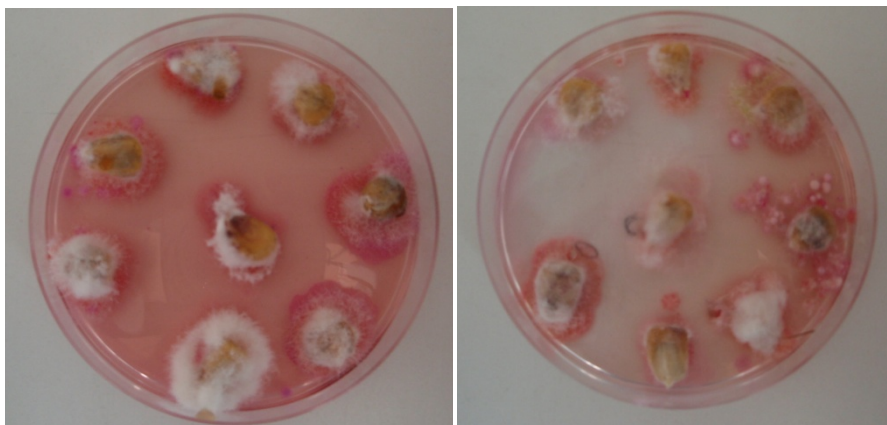
3.2 Επεξεργασία σπαδικών αραβοσιτου

Η μεταφορά των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε άμεσα στο Εργαστήριο φυτοπαθολογίας Γ.Π.Α, όπου και τοποθετηθήκαν 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 ασθeneias των σήψεων σπαδικών καλαμποκιου με προσδιορισμό του ποσοστού μολυσμένων σπόρων με συμπτώματα σήψεων από *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. ανά σπάδικα ανά αγρό και αρίθμηση των σπαδικών.

3.3 Τεχνική απομόνωσης μυκήτων

Οι σπόροι καλαμποκιού από τους συλλεχθέντες σπάδικες υποβλήθηκαν αρχικά σε επιφανειακή απολύμανση και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μεταφορά τους σε τριβλία Petri με

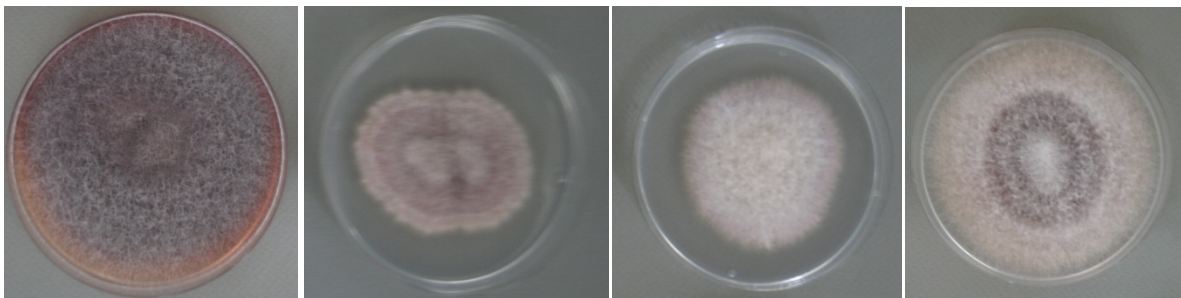
κατάλληλο τεχνητό υπόστρωμα Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC), για 5 ημέρες σε θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 12h, με στόχο την ανάπτυξη μυκήτων των γενών *Fusarium* και *Aspergillus* spp. (Εικ. 57).



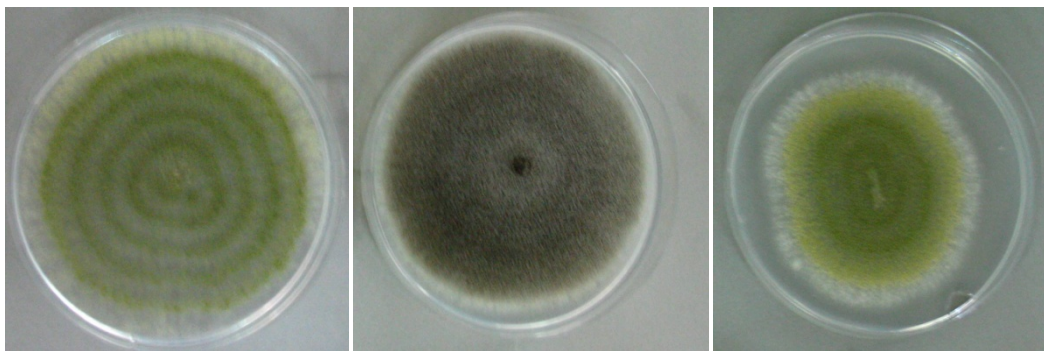
Εικόνα 57. Τριβλία Petri με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα DRBC με εμφανή εξάνθηση των μυκήτων *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. σε σπόρους καλαμποκιού

Μετά από 5 ημέρες επώασης για κάθε σπόρο στον οποίο παρατηρήθηκε εξάνθηση, ετοιμαστήκαν 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 διαφορών ειδών *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. Τα τριβλία επωαστήκαν για 5 ημέρες σε θερμοκρασία 28 0C και φωτοπερίοδο 12h. Στη συνέχεια, ακολούθησε επιλογή μονόσπορων αποικιών, οι οποίες παρουσίαζαν διαφορετικό φαινότυπο στο θρεπτικό υπόστρωμα DRBC και επανακαλλιεργεία τους σε Rose Bengal με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς (streaking), για περαιτέρω καθαρισμό των αποικιών.

Οι αποικίες που πρόεκυψαν αναπτύχθηκαν σε ένα πιο φτωχό θρεπτικό υπόστρωμα το V8, για 5 ημέρες σε θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 12h, για περαιτέρω επιβεβαίωση της καθαριότητας των αποικιών. Τέλος, οι αποικίες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA και μετά από 5 ημέρες πραγματοποιήθηκε συλλογή των κονιδίων σε κρυοφιαλίδια, τα οποία περιείχαν διάλυμα γλυκερόλης με συγκέντρωση 25 %, με σκοπό τη διατήρησή τους στους -80°C (Είκ. 58, 59).



Εικόνα 58. Απομονώσεις του μύκητα *Fusarium* spp.



Εικόνα 59. Απομονώσεις του μύκητα και *Aspergillus* spp.

3.3.1 Θρεπτικά υλικά απομόνωσης μυκήτων

Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)

Για 1 λίτρο DRBC απαιτείται :

Γλυκόζη : 10 gr

Πεπτόνη : 5 gr

K₂HPO₄ : 1 gr

MgSO₄·7H₂O : 0,5 gr

Agar Oxoid No 3: 15 gr

Αποσταγμένο 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

5-2 V8: Low Nutrient Utility Medium

Για 1 λίτρο 5-2 V8 απαιτείται :

Αποσταγμένο νερό : 950 ml

V8 χυμός: 50 ml

Ανάδευση και pH ίσο με 6

Ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά



Patato Dextrose Agar (PDA)

Για 1 λίτρο PDA απαιτείται :

Σε κωνική φιάλη των 2 lit:

500 ml απεσταγμένου νερού

200 gr τεμαχισμένης πατάτας σε κύβους 1 x 1 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

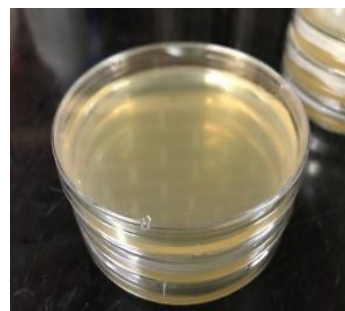
Ογκομέτρηση

Προσθήκη νερού έως τελικό όγκο 1 lit.

Προσθήκη 20 gr γλυκόζης

Προσθήκη 20 gr agar

Ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά



3.4 Ανάλυση μυκοτοξινών

3.4.1 Ανάλυση μυκοτοξινών από αραβόσιτο

Για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών μεταφέρθηκαν τα δείγματα από κάθε αγρό σε εξωτερικό χώρο του Γ.Π.Α ώστε να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός των σπόρων από τον σπαδικά με κατάλληλη μηχανή αφαίρεσης των σπόρων του καλαμποκιού του Εργαστηρίου Γεωργίας. 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 %. Μετά το πέρας των 48h ακολούθησε κονιορτοποίηση 100 gr σπόρων με κατάλληλη μηχανή αλέσματος και το προϊόν 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 Fumnisin (0,25-5ppm) και Agra Quant® ELISA Aflatoxin (4-40 ppb) της Romer Labs.

3.4.1.1.Λιαδικασία 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 υπερκειμένου, μέσω διηθητικού χαρτιού Whatman #1

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

3.4.1.2.Agra Quant® ELISA Fumnisin (0,25-5ppm), Romer Labs:

1. Το κάθε strip διαθέτει 8 πηγαδάκια και κάθε ένα αντιστοιχεί σε ένα δείγμα. Επιλογή κατάλληλου αριθμού Dilution strips (σεσημασμένα με πράσινο χρώμα) στην πλάκα ELISA.
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 200 µl 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. Ακλουθούν 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.
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.
12. Τέλος, μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) της πλακάς, με φίλτρα 450 nm- 630 nm σε φωτόμετρο ELISA. (Awareness Technology INC)



Εικόνα 60. Agra Quant® ELISA Aflatoxin

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

- 1) Το κάθε strip διαθέτει 8 πηγαδάκια και κάθε ένα αντιστοιχεί σε ένα δείγμα. Επιλογή καταλλήλου αριθμού Dilution strips (σημασμένα με πράσινο χρώμα) στην πλάκα ELISA.
- 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 200 μl 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.
- 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.
- 12) Τέλος, μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) της πλάκας, με φίλτρα 450 nm- 630 nm σε φωτόμετρο ELISA. (Awareness Technology INC).

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 πλήρους κάλυψης των τριβλίων. Μετά το πέρας 5 ημερών πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών ώστε να πραγματοποιηθεί μια πρώτου βαθμού ταξινόμησή τους.

Λόγω της ιδιαιτερότητας της ομάδας των *Flavi* να παράγουν αφλατοξίνες, προβάλλεται επιπρόσθετα η αναγκαιότητα διαχωρισμού των ειδών σε τοξικογόνα και μη-τοξικογόνα είδη ή στελέχη. Ο παραπάνω διαχωρισμός, παράλληλα με τον προσδιορισμό του είδους επιτυγχάνεται με τη χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων, εκμεταλλευόμενοι ορισμένες βιοχημικές αντιδράσεις (π.χ. αλλαγή χρώματος της αποικίας) των ειδών της ομάδας με συστατικά του υποστρώματος (Vries et al., 2007). Τέτοια εκλεκτικά υποστρώματα, τα οποία ευρέως χρησιμοποιούνται είναι: το *Aspergillus flavus* and *parasiticus* differentiation agar (AFPA). Ο διαχωρισμός βασίζεται στην ανάπτυξη πορτοκαλί χρώματος στις αποικίες των προαναφερόμενων ειδών, ο οποίος είναι εμφανής αναποδογυρίζοντας το τριβλίο ανάπτυξης (Pitt et al., 1983).

Ο κιτρικός σίδηρος (ferric ammonium citrate) αποτελεί βασικό συστατικό του θρεπτικού υλικού και στην παρουσία του οφείλεται η εμφάνιση χαρακτηριστικών ακτινωτών αποικιών χρώματος καφέ-πορτοκαλί των μυκήτων *A. parasiticus* και *A. flavus* που παρατηρούνται στη ανεστραμμένη όψη τους. Τα είδη των μυκήτων της ομάδας *A. flavus* παράγουν ασπεργιλλικό και νεο-ασπεργιλλικό οξύ, τα οποία αντιδρώντας με τα ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}) σχηματίζουν ένα σύμπλοκο 3 μορίων ασπεργιλλικού οξέος με ιόντα σιδήρου. Πιθανή πηγή λάθους αποτελεί ο μύκητας *A. niger*, όμως η χρώση των ανεστραμμένων αποικιών του είναι υποκίτρινη και μετά από 48 ώρες επώασης αρχίζει η παραγωγή μαύρων κονιδίων που τον διαχωρίζει από τα είδη *A. parasiticus* και *A. flavus*. Ο *A. oryzae* που χρησιμοποιείται στη ζύμωση προϊόντων που προέρχονται από την Άπω Ανατολή και ο *A. tamarii* είναι σπάνιοι, ενώ ο *A. ochraceus* αναπτύσσεται αργά σε θρεπτικό υλικό AFPA και χρωματίζεται μετά από τρεις ημέρες. Κατά συνέπεια μετά την επώαση στους 30°C για 42-48 h, οι χαρακτηριστικές αποικίες αποδίδονται στα τοξικογόνα είδη των *A. parasiticus* και *A. flavus*.

Εκλεκτικό υπόστρωμα AFPA

Σε 1 lt αποσταγμένο H_2O διαλύουμε :

20 gr Yeast extract

10 gr βακτηριολογική πεπτόνη

0.5 gr ferric ammonium citrate

Και ελέγχουμε το pH = 5.0. Στη συνέχεια μοιράζεται το υλικό σε ίσες ποσότητες και σε κάθε 500 ml προστίθενται 10 gr Bacto™ Agar ή 13 gr καθαρή άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 min στους 121°C.

3.5.2 Μοριακός χαρακτηρισμός

Από τους μυκητες *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.* που απομονώθηκαν από σπόρους καλαμποκιού των περιοχών 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. Για 35 στελέχη *Aspergillus spp.* ενισχύθηκε μια περιοχή περίπου 650 βάσεις του γονιδίου της καλμοντουλίνης (CAM), για 3 δείγματα *Trichoderma spp.* ενισχύθηκε μια περιοχή περίπου 700 βάσεων του γονιδίου της περιοχής (ITS 1-5.85-ITS 2) του ριβοσώματος και για 253 στελέχη *Fusarium spp.* ενισχύθηκε μια 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 Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol :

1. Για να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος αυτή πρέπει αρχικά οι απομονώσεις να έχουν ενεργοποιηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA .
2. Μετά από 4-5 μέρες αφού έχει αναπτυχθεί η καλλιέργεια, μεταφέρουμε με streaking το ½ του μυκηλίου σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEB με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα .
3. Ύστερα από 24 ή 48 ώρες (αναλόγως τον μύκητα) στους 28°C και έλλειψη φωτός γίνεται συλλογή του μύκητα και αποστράγγιση της υγρασίας με διηθητικό χαρτί και τοποθετούνται σε αποστειρωμένα erppendorf tube.
4. Στη συνέχεια τα δείγματα πρέπει να λυοφυλιωθούν ώστε να μην υπάρχει καθόλου υγρασία στο tube.
5. Με την χρήση οδοντογλυφίδας, το λυοφυλιωμένο μυκήλιο κονιορτοποιείται. Η σκόνη μυκηλίου θα πρέπει να αντιστοιχεί σε 0,1ml περίπου.
6. Γίνεται προσθήκη 700 µl Lys Buffer. Με μια οδοντογλυφίδα, γίνεται διαβρωχή του μυκηλίου για 5 min.
7. Προστίθενται 700 Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol και αργή ανακίνηση πάνω-κάτω. Ύστερα αφήνεται να σταθεί για 5 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 413000 rpm °C και 13000 rpm.
9. Μεταφορά σε κάθετο tube του υπερκλειμένου και προσθήκη ίδιας ποσότητας Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol με αυτή του υπερκλειμένου.

10. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά, στους 4°C και 13000 rpm.
11. Μεταφορά υπερκείμενου σε καθαρό tube και προσθήκη 1000 µl 95% EtOH. Ύστερα τοποθέτηση για 10 λεπτά στο ψυγείο, αφού ανακατευτεί καλά και ύστερα φυγοκεντρηση για 10 λεπτά στους 4°C.
12. Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 500µl 70% EtOH. (Ανακαίνιση για πλύσιμο του pellet)
13. Φυγοκέντρωση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και 13000 rpm.
14. Αφαίρεση του υπερκείμενου και φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 λεπτά.
15. Επαναδιαλυτοποίηση του pellet 40 µl TRIS BUFFER (pH=8) και 2 µl RNase.
16. Τοποθέτηση των tubes σε υδατολουτρό για 15 λεπτά στους 50°C και ύστερα στους -20°C.

3.5.2.2 Ενίσχυση και καθαρισμός προϊόντων DNA για αλληλούχιση

Εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

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 αποδιατάξη στους 94°C για 2 λεπτά και στη συνέχεια 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. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 700 βάσεων.

Για την ενίσχυση του γονιδίου της καλμοδουλίνης τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: CL1 (5'-GARTWCAAGGAGGCCTTCTC-3') και CL2 (5'-TTTTGCATCATGAGTTGGAC-3'), 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 αποδιατάξη 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 του ITS 1-5.85-ITS 2, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS4 (TCCTCC GCTTATTGATATG) και ITS5 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.4.3 (Godet et al., 2010). Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλάμβανε τα εξής στάδια: 35 κύκλοι με αρχική αποδιατάξη 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 της παραπάνω αντιδράσεις είναι η Ταq πολυμεραση της εταιρίας solar και η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων ήταν η συνιστώμενη (2 μl γενωματικού DNA, 0,5 μl Ταq πολυμεραση, 3 μl MgCl₂, 5μl Buffer B, 2 μl 2.5 mM dNTP's, 2 μl από τον κάθε εκκινητή (συγκέντρωση 10 Mm). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50 μl.

3.5.2.3 Καθαρισμός προϊόντος PCR χωρίς στήλες με Ammonium acetate

1. Στο προϊόν PCR στο eppendorf tube προσθέτουμε μισό όγκο Ammonium acetate 7,5 M.
2. Φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στους 4°C και 13000 rpm.
3. Μεταφορά του υπερκείμενου και τοποθέτηση σε καινούριο αποστειρωμένο eppendorf tube και γίνεται προσθήκη 2,5 όγκους ETOH 100%
4. Φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στους 4°C και 13000 rpm.
5. Αφαίρεση του υπερκείμενου.
6. Προσθήκη 700 ml ETOH 70%.
7. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στους 4°C και 13000 rpm.
8. Αφαίρεση του υπερκείμενου για να στεγνώσει το pellet.
9. Επαναδιαλυτοποίηση του pellet με 30 μl EB.

3.5.2.4 Αλληλούχιση δειγμάτων

Τα δείγματα στάλθηκαν στην εταιρία CEMIA με δυο τρόπους είτε μεμονωμένα πυκνά είτε σε plate. Συγκεκριμένα, 12 μl καθαρισμένου προϊόντος PCR και 5 μl του κατάλληλου εκκινητή συγκέντρωσης 5 pmol/μl στάλθηκαν στην εταιρεία, η οποία μας προμήθευε με τα ανάλογα χρωματογραφήματα. Στην περίπτωση του plate το κάθε δείγμα είχε συγκέντρωση 10-15 ng/μL και τελικό όγκο του δείγματος 15 μL.

3.5.2.5 Φυλογενετική ανάλυση

Οι αλληλουχίες των βάσεων DNA που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Finch TV 11.4 (Geospriza). Η φυλογενετική συσχέτιση των αλληλουχιών βάσεων των μικροοργανισμών της παρούσας μελέτης με τις αλληλουχίες βάσεων διαφόρων μυκοτοξικογόνων στελεχών του γένους *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της διαδικτυακής βάσης 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 ακολουθηθήκαν ήταν τα εξής :

1. Πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών
2. Επιλογή καταλληλού μοντέλου εξέλιξης

3. Καθορισμός μεθόδου κατασκευής δένδρου
4. Αξιολόγηση αξιοπιστίας δένδρου

Πριν τη στοίχιση οι αλληλουχίες τοποθετήθηκαν σε ένα αρχείο και αποθηκεύτηκαν με την μορφή 'Fasta'. Στο πρόγραμμα Clustal W χρησιμοποιούνται παράμετροι για ανά ζεύγη (pairwise) στοίχιση και ορίζεται ο έλεγχος του πλήθους των επαναλήψεων. Το αρχείο με τις στοιχισμένες αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα MEGA X.

Αναλυτικότερα, το πρώτο βήμα για την διαδικασία της φυλογενετικής ανάλυσης είναι η στοίχιση των αλληλουχιών (alignment), καθώς οι αλληλουχίες δεν αναμένονται να είναι πανομοιότυπες αλλά παρουσιάζουν διαφορές ως προς τις βάσεις ορισμένων νουκλεοτιδικών θέσεων. Η στοίχιση αποσκοπεί 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. 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 καταλλήλου μοντέλου εξέλιξης, καθώς το αποτέλεσμα των διαφορών μεθόδων, εξαρτάται από το μοντέλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη φυλογενετική ανάλυση. 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,

- 1) τη συχνότητα εμφάνισης των βάσεων A,T,G και C στο σύνολο των νουκλεοτιδικών θέσεων των αλληλουχιών
- 2) την υποκατάσταση βάσεων, δηλαδή την τάση υποκατάστασης μιας βάσης από μια άλλη
- 3) το ρυθμό ετερογένειας, δηλαδή την πιθανότητα αλλαγής νουκλεοτιδίων.

Στη παρούσα μελέτη το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων είναι 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 μιας 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. Σε 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).

Η αξιοπιστία των δένδρων αξιολογήθηκε 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 δυο 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

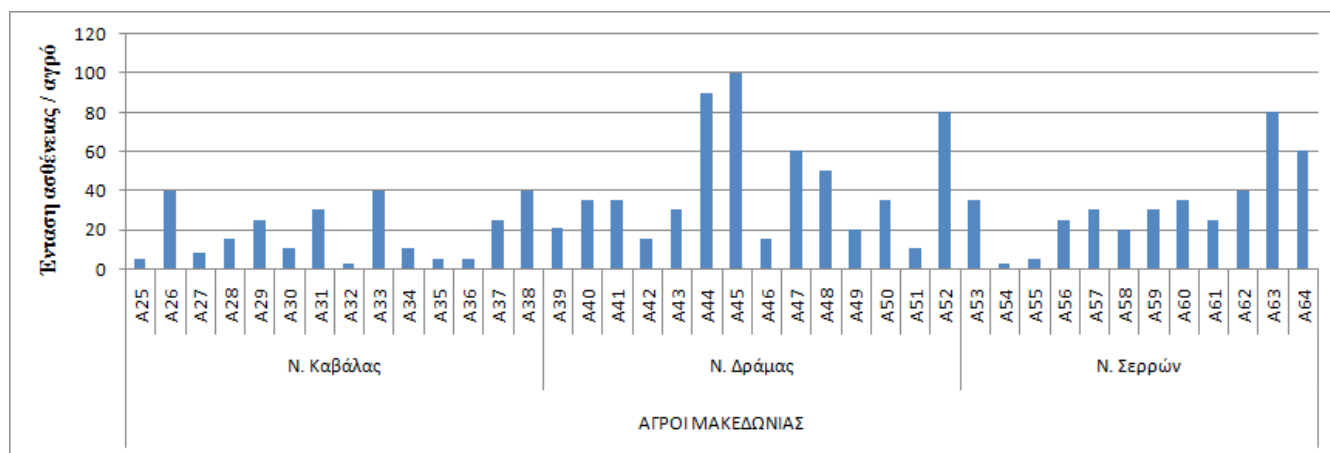
4.1 Αξιολόγηση της έντασης της ασθeneias στους αγρούς αραβοσιτου στην Θεσσαλία και Μακεδονία

Για τη μέτρηση της έντασης της ασθeneias των σήψεων σπαδικών σε καλλιεργήσιμους αγρούς με καλαμπόκι το Σεπτέμβρη του 2016, επιλέχθηκαν αγροί από της κύριες περιοχές παραγωγής καλαμποκιού. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν 35 αγροί καλαμποκιού στη Θεσσαλία και 40 αγροί στη Μακεδονία και πραγματοποιήθηκε τυχαία δειγματοληψία και συλλογή σπαδικών από 2 αγρούς (1-2) στο Ν. Βοιωτίας, 8 αγρούς (3-10) στο Ν. Καρδίτσας, 8 αγρούς στον Ν. Τρικάλων (11-18), 12 αγρούς στο Ν. Λάρισας (19-24 και 65-70), 5 αγρούς στο Ν. Μαγνησίας (71-75), 14 αγρούς στο Ν. Καβάλας (25-38), 12 αγρούς στο Ν. Σερρών (53-64) και 14 αγρούς στο Ν. Δράμας (39-52).

Κεντρική Ελλάδα	Βόρεια Ελλάδα
Ν. Βοιωτίας 2 αγροί (1-2)	Ν. Καβάλας 14 αγροί (25-38)
Ν. Καρδίτσας 8 αγροί (3-10)	Ν. Δράμας 14 αγροί (39-52).
Ν. Τρικάλων 8 αγροί (11-18)	Ν. Σερρών 12 αγροί (53-64)
Ν. Λάρισας 12 αγροί (19-24 και 65-70)	
Ν. Μαγνησίας 5 αγροί (71-75)	

Πίνακας 1 Περιοχές συλλογής σπαδικών και αριθμός αγρών /περιοχή

Η αξιολόγηση της έντασης της ασθeneias πραγματοποιήθηκε με μέτρηση σπαδικών που έφεραν συμπτώματα σήψεων από τους μύκητες *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp.

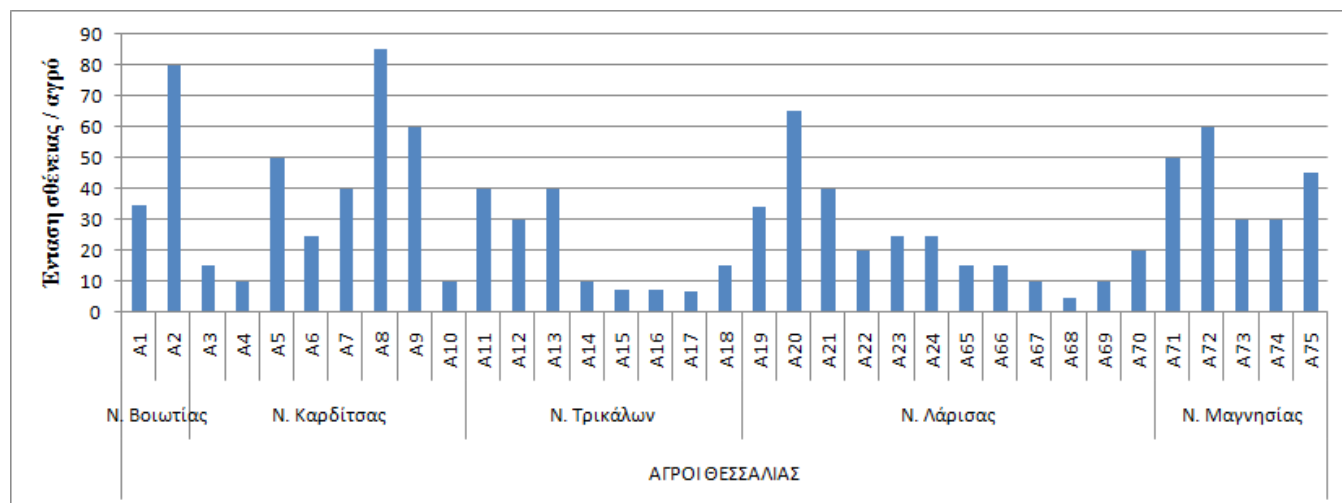


Εικόνα 61. Ποσοστό της μέσης έντασης ανά αγρό της ασθeneias της σήψης των σπαδικών από τους μύκητες *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. στην Μακεδονία.

Τον Σεπτεμβρίο του 2016 τα ποσοστά σήψεων των σπαδικών σε όλους τους αγρούς ήταν πολύ υψηλά τόσο στην Κεντρική Ελλάδα όσο και στην Βόρεια Ελλάδα. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι οι εντομολογικές προσβολές ήταν σε έξαρση οπότε αυτό επηρεάζει σημαντικά την ένταση της

ασθενειας. Οι εντομολογικές προσβολές όπως πυραλίδα, σεζάμια, πράσινο σκουλήκι κ.α είχαν ως αποτέλεσμα η μόλυνση των μυκήτων να εξαπλώνεται σε μεγαλύτερο μέρος του σπάδικα.

Όσον αφορά τα ποσοστά της έντασης στην Θεσσαλία, στο Ν. Βοιωτίας στους αγρούς 1-2 η ένταση της ασθενειας κυμαινόταν 35-80%, στο Ν. Καρδίτσας στους αγρούς 3-10 η ένταση της ασθενειας κυμαινόταν από 10-85%, στο Ν. Τρικάλων στους αγρούς 11-18 η ένταση της ασθενειας κυμάνθηκε από 7-40%, στο Ν. Λάρισας στους αγρούς 19-24 και 65-70 η ένταση της ασθενειας κυμάνθηκε από 5-65% και στο Ν. Μαγνησίας στους αγρούς 71-75 η ένταση της ασθενειας κυμαινόταν από 30-60%. Αντίστοιχη κατάσταση επικρατεί και στην Μακεδονία τα ποσοστά της έντασης ήταν πολύ υψηλά στο Ν. Καβάλας στους αγρούς 25-38 η ένταση κυμάνθηκε από 2-40%, στο Ν. Δράμας στους αγρούς 39-52 η ένταση της ασθενειας κυμάνθηκε από 10-100% ενώ στο Ν. Σερρών στους αγρούς 53-64 η ένταση της ασθενειας κυμαίνονταν από 2-80%.



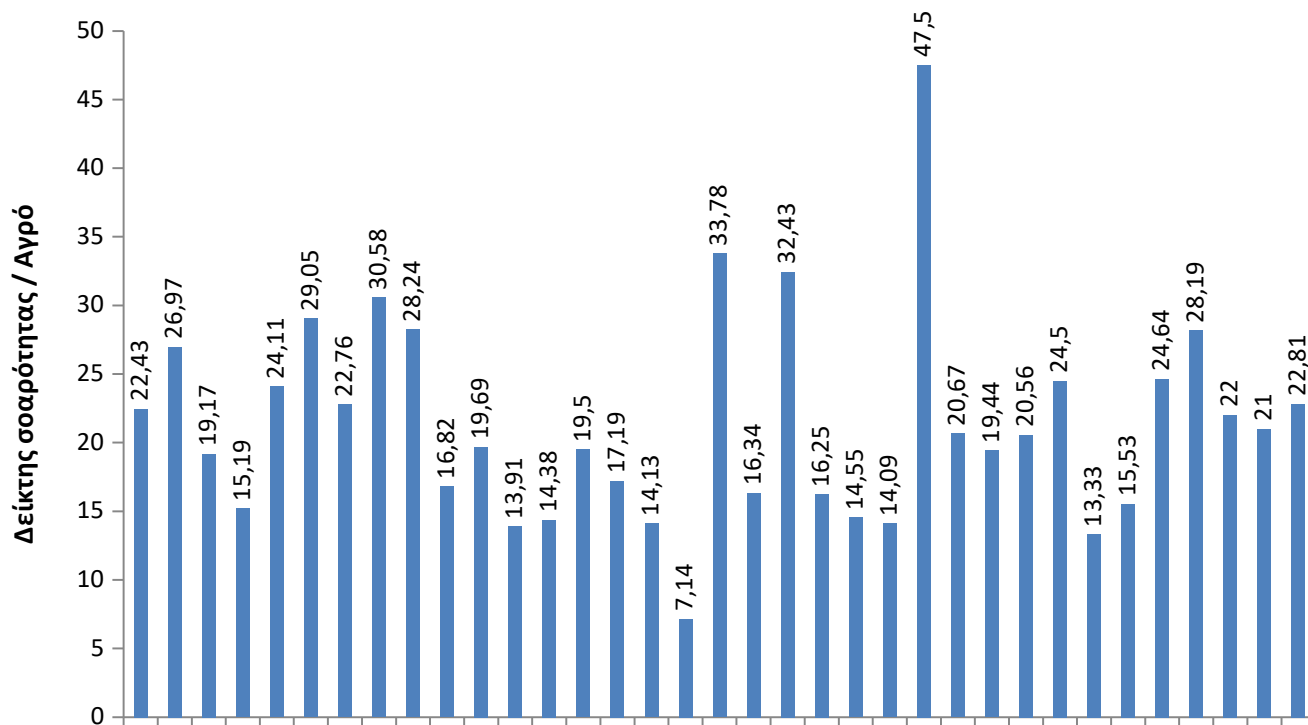
Εικόνα 62. Ποσοστό της μέσης έντασης ανά αγρό της ασθενειας της σήψης των σπαδικών από τους μυκητες *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. στη Θεσσαλία.

4.2 Αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθένειας σε αγρούς αραβοσίτου στην Ελλάδα

Για την αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθένειας στους επιλεγμένους αγρούς 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.

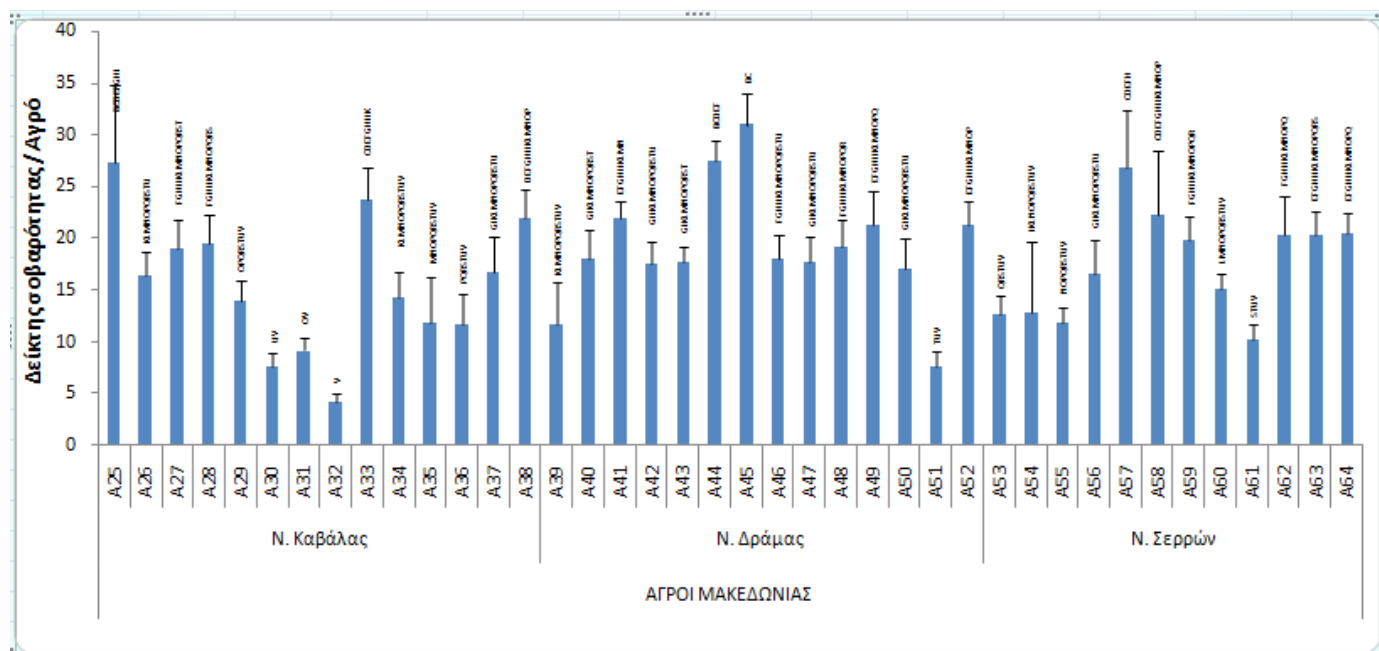
Στη Θεσσαλία, στο Ν. Καρδίτσας στους αγρούς 3-10 η σοβαρότητα της ασθένειας κυμάνθηκε από 15-30% (δηλαδή κατά μέσο όρο το 4-34% των σπόρων του κάθε μολυσμένου σπάδικα παρουσίαζε εμφανή συμπτώματα σήψεων ανά αγρό), Ν. Βοιωτίας στους αγρούς 1-2 η

σοβαρότητα της ασθένειας κυμάνθηκε από 22-27%, στο Ν. Τρικάλων στους αγρούς 11-18 η σοβαρότητα της ασθένειας κυμάνθηκε από 7-34%, στο Ν. Λάρισας στους αγρούς 19-24 και 65-70 η σοβαρότητα της ασθένειας κυμάνθηκε από 13-47,5 % και τέλος, στο Ν. Μαγνησίας στους αγρούς 71-75 η σοβαρότητα της ασθένειας κυμάνθηκε από 21-28%.



Εικόνα 63. Μέτρηση της σοβαρότητας της ασθένειας. Προσδιορισμός το ποσοστό των μολυσμένων σπόρων με συμπτώματα σήψεων από *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. ως προς το συνολικό αριθμό σπόρων κάθε σπάδικα ανά αγρό στην Θεσσαλία. Σε κάθε μέτρηση σημειώνεται το τυπικό σφάλμα. Οι μεσοί όροι με στατιστικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με την δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0,05$)

Όσον αφορά τη σοβαρότητα της ασθένειας στους αγρούς της Μακεδονίας τα αποτελέσματα έδειξαν στο Ν. Καβάλας στους αγρούς 25-38 η σοβαρότητα της ασθένειας κυμάνθηκε από 7-27%, στο Ν. Σερρών στους αγρούς 53-64 η σοβαρότητα κυμάνθηκε από 11-27%, ενώ στο Ν. Δράμας στους αγρούς 39-52 η σοβαρότητα κυμάνθηκε από 4-31%.



Εικόνα 64. Μέτρηση της σοβαρότητας της ασθένειας. Προσδιορισμός το ποσοστό των μολυσμένων σπόρων με συμπτώματα σήψεων από *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. ως προς το συνολικό αριθμό σπόρων κάθε σπάδικα ανά αγρό στην Μακεδονία. Σε κάθε μέτρηση σημειώνεται το τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι με στατιστικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με την δοκιμασία κατά Duncan ($p < 0,05$)

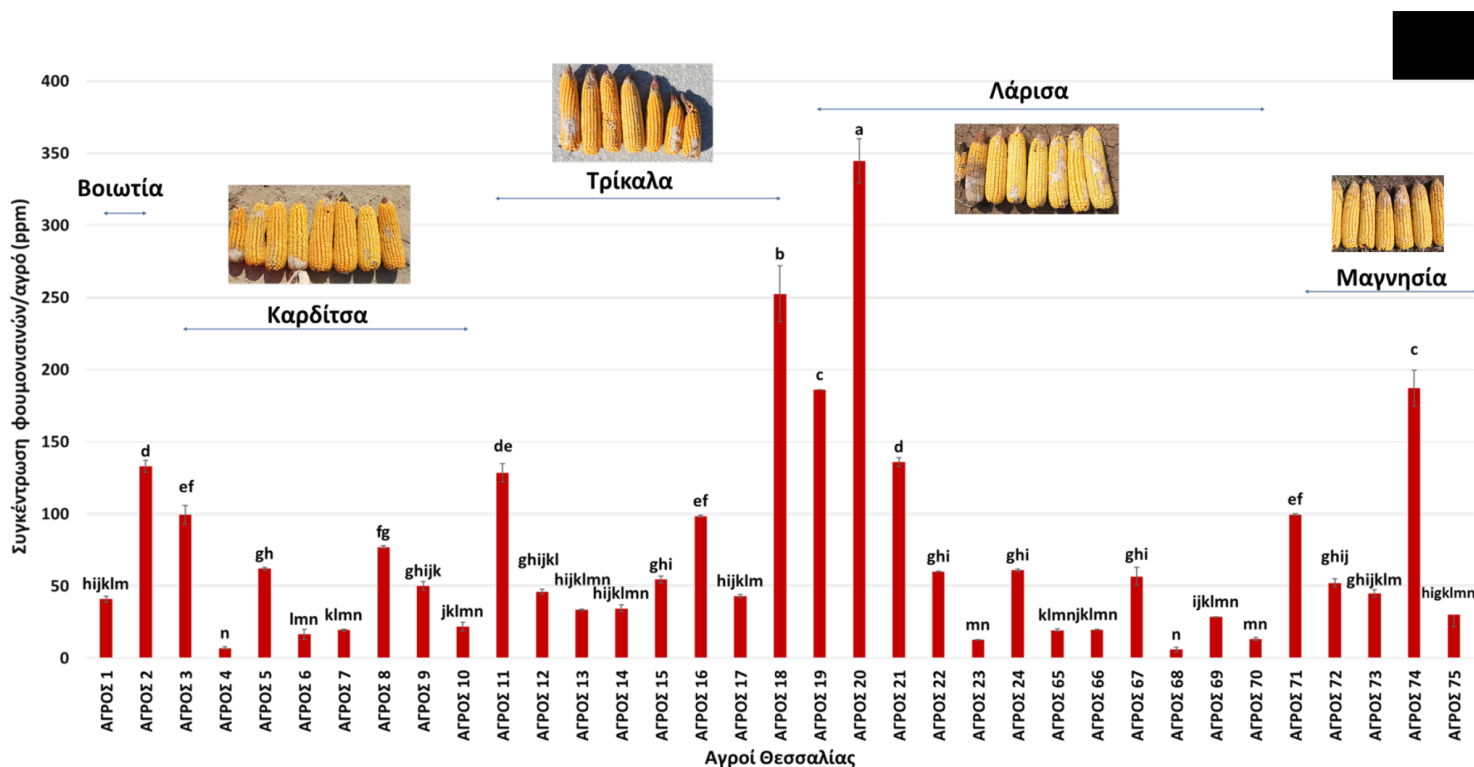
Με βάση της παρατηρήσεις μας, η ένταση και η σοβαρότητα της ασθένειας φάνηκε να επηρεάζεται από τον συνδυασμό εντομολογικών και μυκητολογικών προσβολών, καθώς οι προσβολές και το ποσοστό εξανθήσης ήταν σε εξάρση.

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

Για να έχουμε αντιπροσωπευτικά δείγματα και ακρίβεια στον προσδιορισμό των μυκοτοξινών στον κάθε αγρό ξεχωριστά οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τον ευρωπαϊκό κανονισμό Νο 401/2006. Η ευρωπαϊκή νομοθεσία έχει θεσπίσει ένα επιτρεπτό όριο «ανοχής» της παρουσίας των φουμονισινών FB1, FB2 και FB3 στα τρόφιμα που θα χρησιμοποιηθούν για ανθρώπινη ή ζωική κατανάλωση (0,2 - 4 ppm (μg/gr) για τους ανθρώπους και 5-100 ppm για τα ζώα). Τα επιτρεπτά όρια των αφλατοξινών στο καλαμπόκι που προορίζεται για ζωοτροφές είναι 5-20 ppb για την αφλατοξίνη B1(αναλόγως την χρήση της ζωοτροφής) ενώ 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.

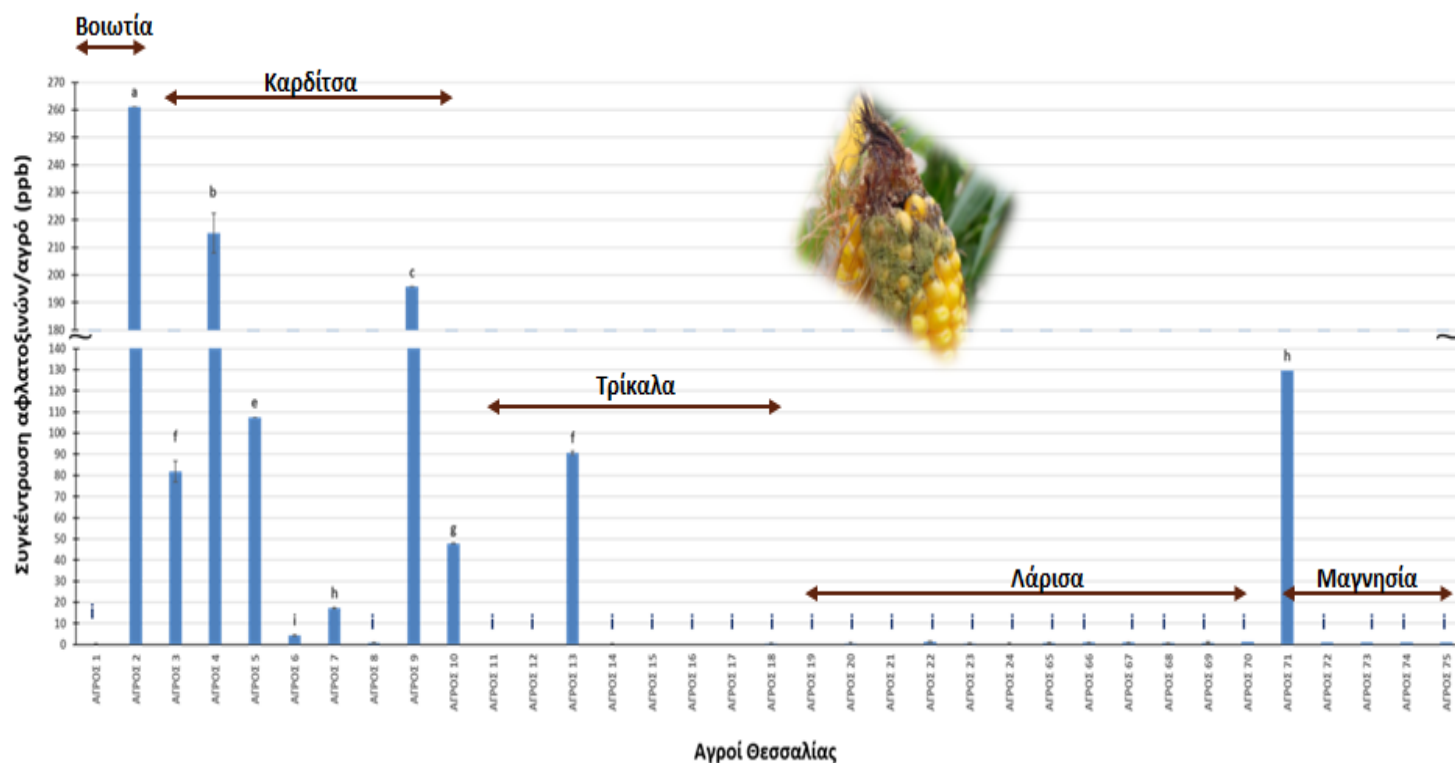
Για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών, 100gr σπόρων κονιορτοποιήθηκαν και η εκχύλιση των φουμονισινών και των αφλατοξινών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο kit ανάλυσης Agra Quant® ELISA Fumonisin (0,25-5 ppm) και Agra Quant® ELISA Aflatoxin (4-40 ppb) της Romer Labs.

Στη Θεσσαλία, τα αποτελέσματα έδειξαν ένα ευρύ φάσμα τιμών, με τις φουμονισίνες να κυμαίνονται από 6 έως και 345 ppm και για τις αφλατοξίνες από 0 ως και 261 ppb. Πιο συγκεκριμένα, στο Ν. Βιωτίας στους αγρούς 1-2 οι τιμές φουμονισινών κυμάνθηκαν από 41-133 ppm, στο Ν. Καρδίτσας στους αγρούς 3-10 οι τιμές φουμονισινών κυμάνθηκαν από 7-100 ppm, στο Ν. Τρικάλων στους αγρούς 11-18 οι τιμές φουμονισινών κυμάνθηκαν από 34-253 ppm, στο Ν. Λάρισας στους αγρούς 19-24 και 65-70 οι τιμές φουμονισινών κυμάνθηκαν από 6 -345 ppm και στο Ν. Μαγνησίας στους αγρούς 71-75 οι τιμές φουμονισινών κυμάνθηκαν από 30-187 ppm.



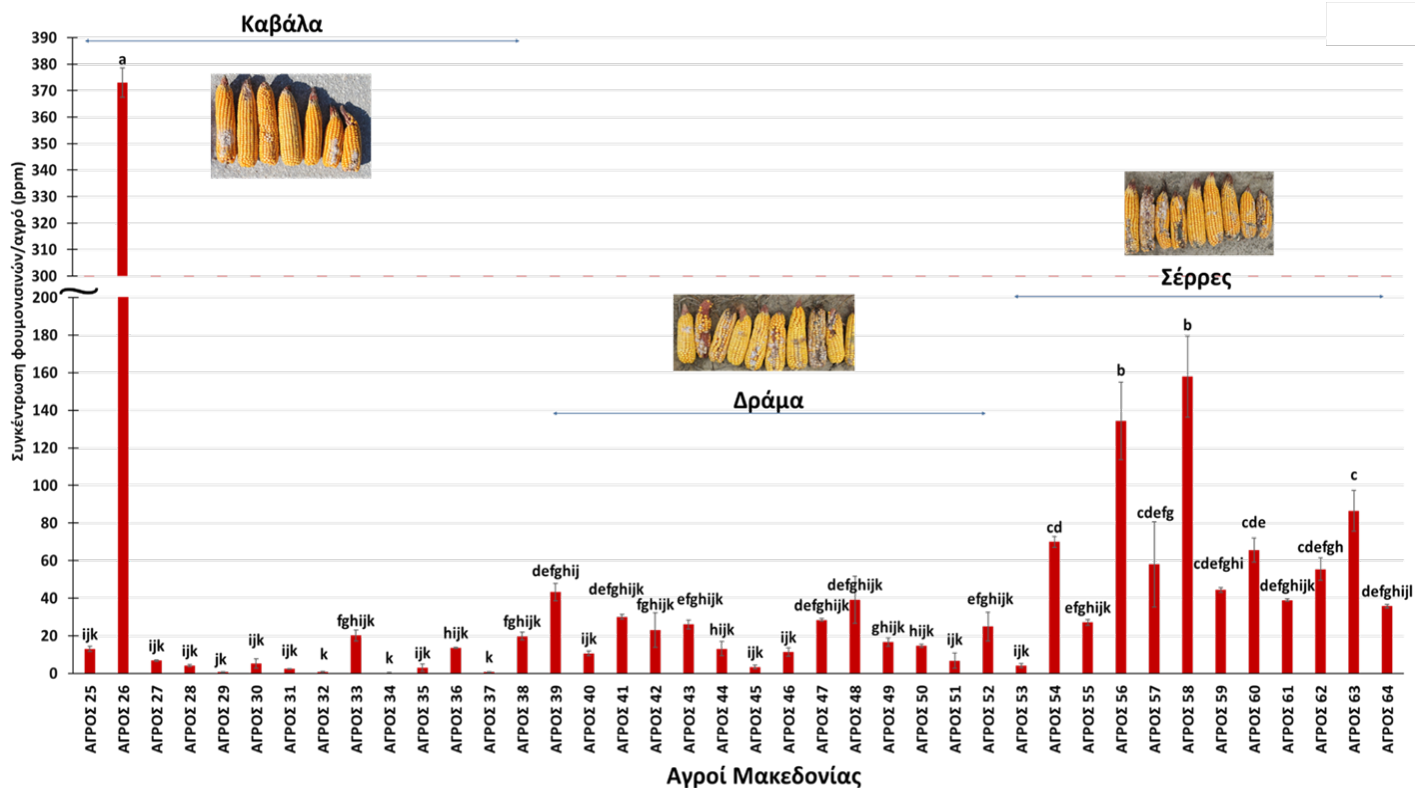
Εικόνα 65. Μέτρηση φουμονισινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού στην περιοχή της Θεσσαλίας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με την δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0,05$)

Όσον αφορά τις αφλατοξίνες οι μέσες τιμές διακυμάνθηκαν στο Ν. Βοιωτίας από 0-261 ppb, στο Ν. Καρδίτσας από 1-215 ppb, στο Ν. Τρικάλων από 0-91 ppb, στο Ν. Λάρισας από 0-1 ppb και στο Ν. Μαγνησίας από 1-130 ppb.



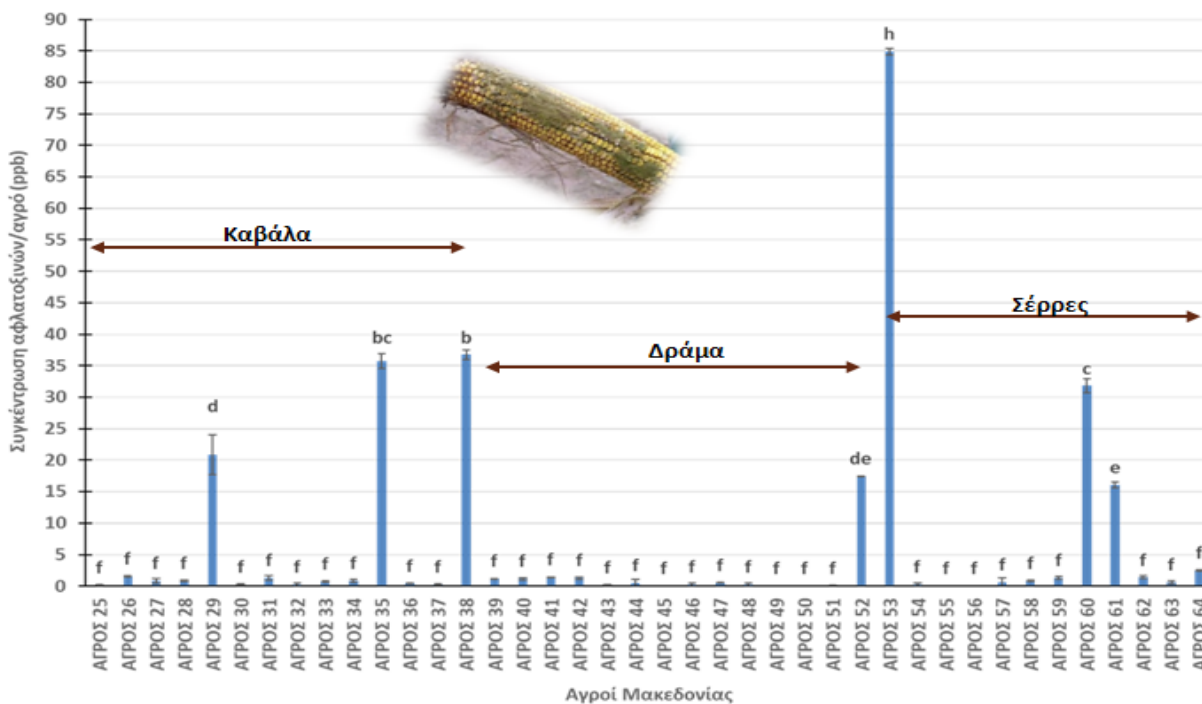
Εικόνα 66. Μέτρηση αφλατοξινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού στην περιοχή της Θεσσαλίας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με την δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0,05$)

Στη Μακεδονία, τα αποτελέσματα των τιμών των φουμονισινών είχαν μεγάλη διακύμανση ανά αγρό κυμάνθηκαν από 0 έως και 373 ppm και των αφλατοξινών από 0 έως και 85 ppb. Πιο συγκεκριμένα στο Ν. Καβάλας στους αγρούς 25-38 οι μέσες τιμές φουμονισινών κυμάνθηκαν από 0-373 ppm, στο Νομό Σερρών στους αγρούς 53-64 οι μέσες τιμές φουμονισινών κυμάνθηκαν από 4-158 ppm και στο Ν. Δράμας στους αγρούς 39-52 οι μέσες τιμές φουμονισινών κυμάνθηκαν από 3-43 ppm ανά αγρό.



Εικόνα 67. Μέτρηση φουμονισών σε καλλιέργειες καλαμποκιού στην περιοχή της Μακεδονίας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με την δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0,05$).

Όσον αφορά τις αφλατοξίνες οι τιμές κυμάνθηκαν στο Ν. Καβάλας από 0-37 ppb, στο Ν. Σερρών από 0-85 ppb και στο Ν. Δράμας από 0-17 ppb.



Εικόνα 68. Μέτρηση αφλατοξινών σε καλλιέργειες καλαμποκιού στην περιοχή της Μακεδονίας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με την δοκιμασία κατά Duncan ($P < 0,05$).

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

Σε τριβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) πραγματοποιήθηκε μεταφορά σπόρων καλαμποκιού από τους συλλεχθέντες σπάδικες. Τα τριβλία επώαστηκαν για 5 ημέρες σε θερμοκρασία 28°C με στόχο την ανάπτυξη μυκήτων των γενών *Fusarium* και *Aspergillus* spp.. Ακολούθησε περαιτέρω καθαρισμός σε υλικά DRBC και V8 5-2 και επιλογή μονόσπορων αποικιών.

Ο αριθμός των απομονώσεων από την περιοχή της Θεσσαλίας ανήλθε σε 346 για το γένος *Fusarium* spp. και 111 για την ομάδα *Aspergillus* section *Flavi* και section *Nigri*. Για τη Μακεδονία οι αντίστοιχες απομονώσεις ανήλθαν σε 425 για το γένος *Fusarium* spp. και 168 για την ομάδα *Aspergillus* section *Flavi* και section *Nigri*. Ως αποτέλεσμα των παρατηρήσεων έγινε διαχωρισμός των απομονώσεων ώστε να είναι δυνατή η επιλογή στελεχών με μορφολογική διαφοροποίηση τα οποία εξετάστηκαν στη συνέχεια σε μοριακό επίπεδο.

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

Οι μονόσπορες απομονώσεις φουζαρίων και ασπεργγίλων από το καλαμπόκι καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA και έπειτα από 5-6 ημέρες έγινε η μικροσκοπική και μακροσκοπική τους παρατήρηση. Παρατηρήθηκαν πολλές μορφολογικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφορών απομονώσεων *Fusarium* spp με την παρουσία διαφορών ερυθρών χρωστικών η την παρουσία διαφορετικής μυκηλιακής ανάπτυξης της αποικίας.

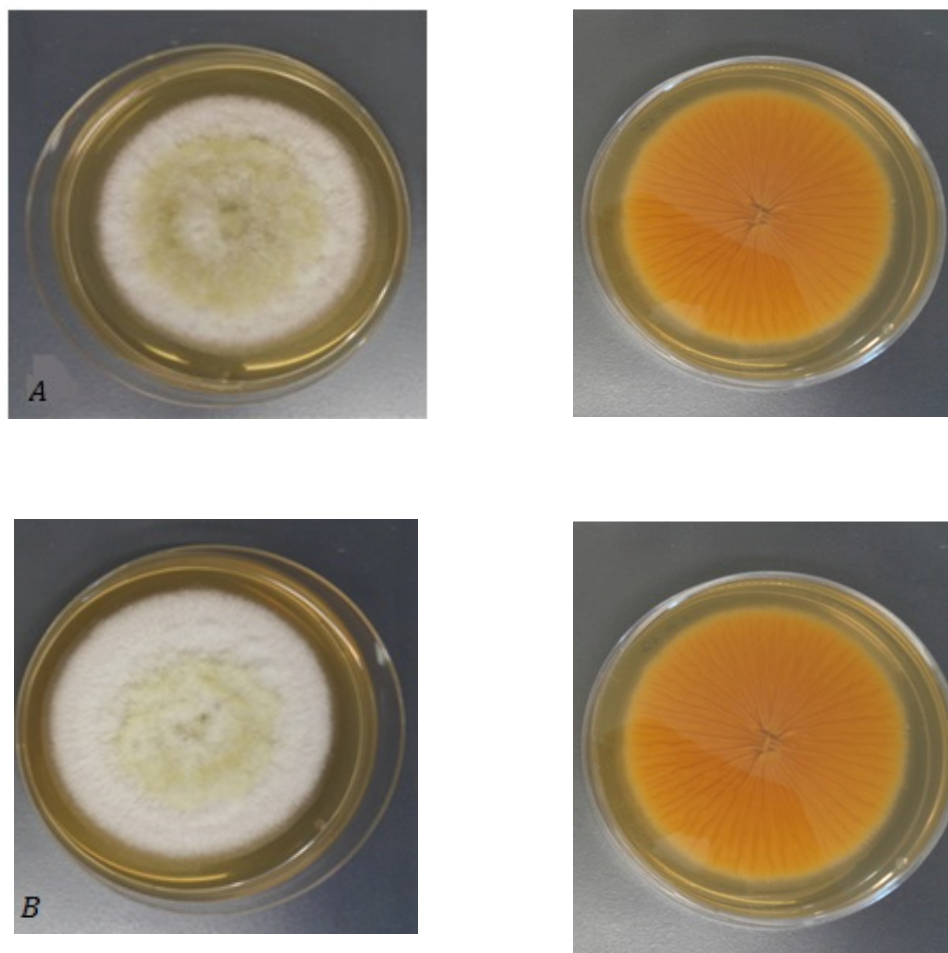
Τα στελέχη του γένους *Aspergillus* spp. ανέπτυξαν χαρακτηριστικό πράσινο μυκήλιο. Βασικό κριτήριο για το διαχωρισμό των *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι η υφή των κονιδιακών τους τοιχωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα κονίδια του *A. flavus* είχαν σχετικά λεπτά και ομαλά τοιχώματα ενώ το σχήμα των κονιδίων ποικίλει από σφαιρικό έως ελλειψοειδές. Αντίθετα, τα κονίδια του *A. parasiticus* ήταν με τραχιά ή ακανθώδη υφή, τα οποία είχαν όλα σχεδόν σφαιρική μορφή και σχετικά παχιά τοιχώματα. Ο *A. flavus* σε πολλές περιπτώσεις σχημάτιζε σκληρώτια αφού αφέθηκαν για περισσότερες από 7 ημέρες σε κατάλληλες συνθήκες, ενώ ο *A. parasiticus* ανέπτυξε πράσινο μυκήλιο με την διαφορά ότι είχε μια ανοιχτόχρωμη περιφερειακή ζώνη.

Λόγω της ιδιαιτερότητας της ομάδας των *Flavi* να παράγουν αφλατοξίνες, ήταν αναγκαίος ο διαχωρισμός των ειδών σε τοξικογόνα και μη-τοξικογόνα είδη ή στελέχη. Ο παραπάνω διαχωρισμός, παράλληλα με τον προσδιορισμό του είδους επιτυγχάνεται με τη χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων, εκμεταλλευόμενοι ορισμένες βιοχημικές αντιδράσεις (π.χ. αλλαγή χρώματος της αποικίας) των ειδών της ομάδας με συστατικά του υποστρώματος (Vries et al., 2007). Τέτοια εκλεκτικά υποστρώματα, τα οποία ευρέως χρησιμοποιούνται είναι: το *Aspergillus flavus* and *parasiticus* differentiation agar (AFPA). Ο διαχωρισμός βασίζεται στην ανάπτυξη πορτοκαλί χρώματος στις αποικίες των προαναφερόμενων ειδών, ο οποίος είναι εμφανής στο κάτω μέρος του τριβλίου ανάπτυξης (Pitt et al., 1983).

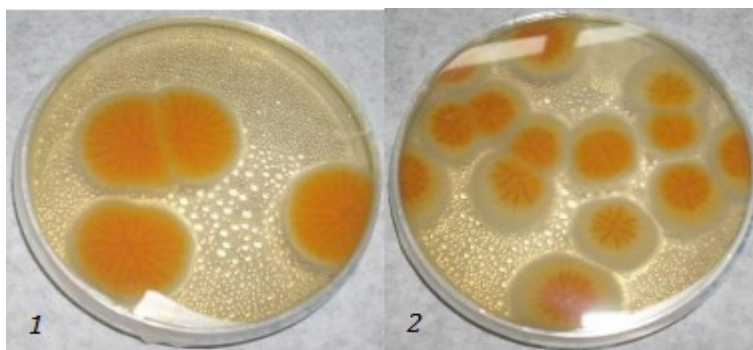
Ο κιτρικός σίδηρος (ferric ammonium citrate) αποτελεί βασικό συστατικό του θρεπτικού υλικού και στην παρουσία του οφείλεται η εμφάνιση χαρακτηριστικών ακτινωτών αποικιών χρώματος καφέ-πορτοκαλί των μυκήτων *A. parasiticus* και *A. flavus* που παρατηρούνται στη ανεστραμμένη όψη τους. Τα είδη των μυκήτων της ομάδας *A. flavus* παράγουν ασπεργιλλικό και νεο-ασπεργιλλικό οξύ, τα οποία αντιδρώντας με τα ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}) σχηματίζουν ένα σύμπλοκο 3 μορίων ασπεργιλλικού οξέος με ιόντα σιδήρου. Πιθανή πηγή λάθους αποτελεί ο μύκητας *A. niger*, όμως η χρώση των ανεστραμμένων αποικιών του είναι υποκίτρινη και μετά από 48 ώρες επώασης αρχίζει η παραγωγή μαύρων κονιδίων που τον διαχωρίζει από τα είδη *A. parasiticus* και *A. flavus*. Ο *A. oryzae* που χρησιμοποιείται στη ζύμωση προϊόντων που προέρχονται από την

Άπω Ανατολή και ο *A. tamarii* είναι σπάνιοι, ενώ ο *A. ochraceus* αναπτύσσεται αργά σε θρεπτικό υλικό AFPA και χρωματίζεται μετά από τρεις ημέρες. Κατά συνέπεια μετά την επώαση στους 30°C για 42-48 h, οι χαρακτηριστικές αποικίες αποδίδονται στα τοξικογόνα είδη των *A. parasiticus* και *A. flavus*.

Με την μέθοδο αυτή 147 στελέχη πράσινοι ασπέργιλλοι ελέγχθηκαν που είχαν απομονωθεί από τους αγρούς την κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας και αποδείχτηκε να ανήκουν στα τοξικογόνα είδη *A. parasiticus* και *A. flavus*.

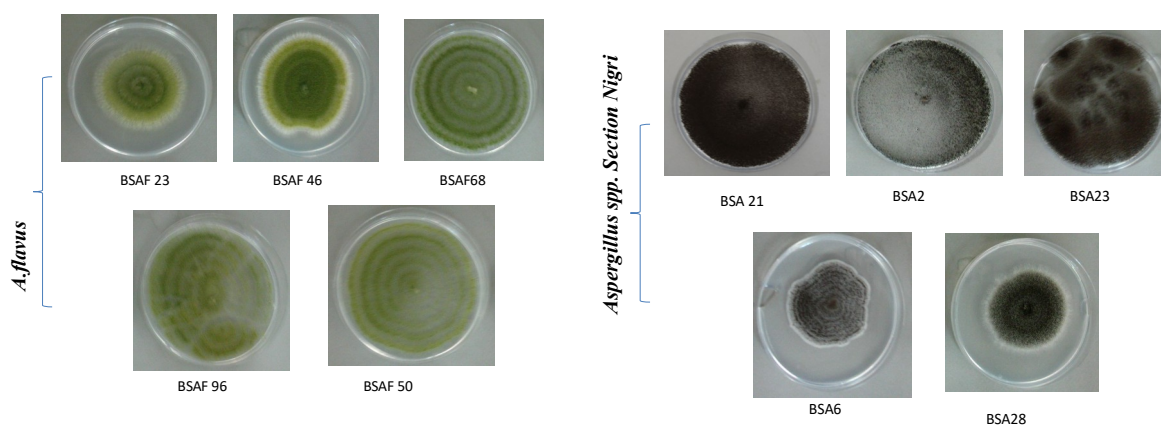


Εικόνα 69. Καλλιέργειες απομονώσεων *A. flavus* σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα AFPA A)BSAF70 και B)BSAF 101 το πάνω μέρος και το κάτω μέρος της αποικίας με το σχηματισμό της χαρακτηριστικής χρώσης.

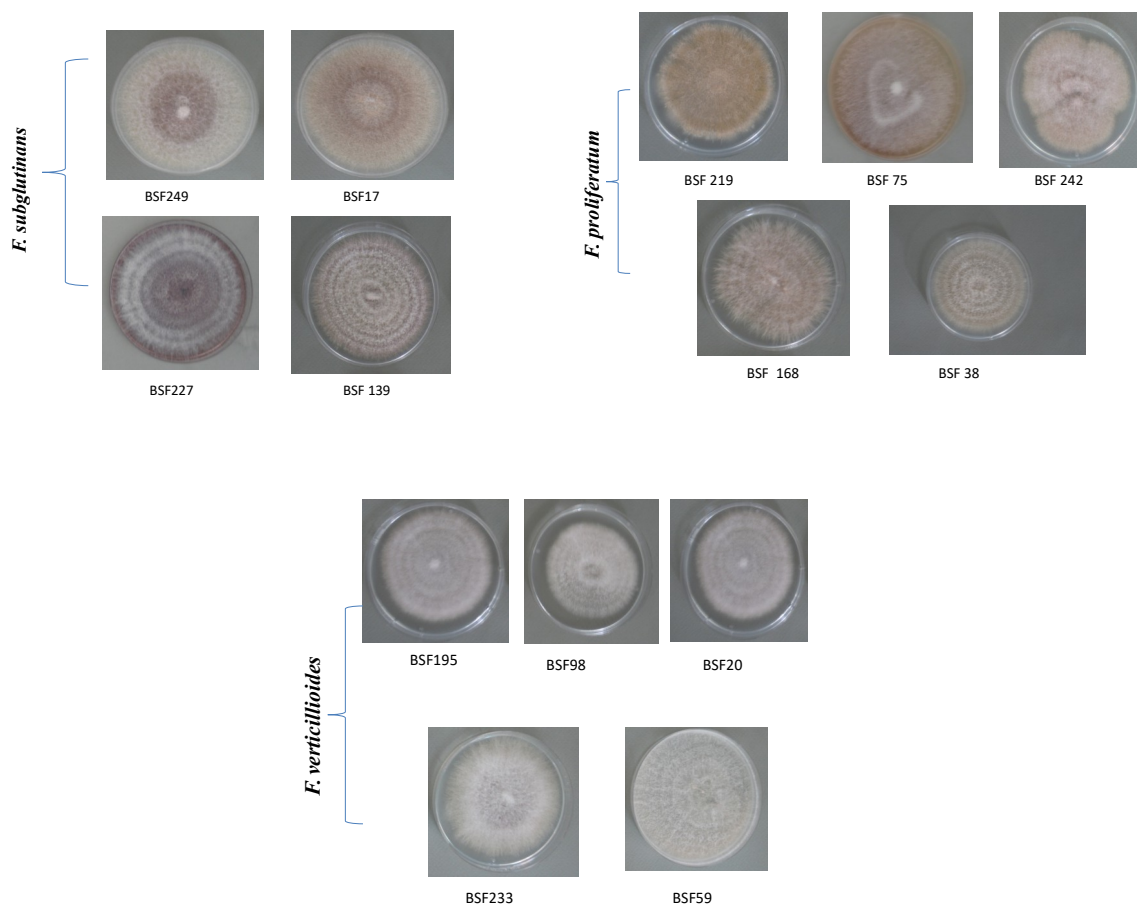


Εικόνα 70. Ακτινωτές αποικίες αφλατοξικόγονων στελεχών *A. flavus* 1) BSAF45 και 2) BSAF123 σε θρεπτικό υλικό AFPA.

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.



Εικόνα 71. Ανάπτυξη ελληνικών στελεχών *Aspergillus* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA

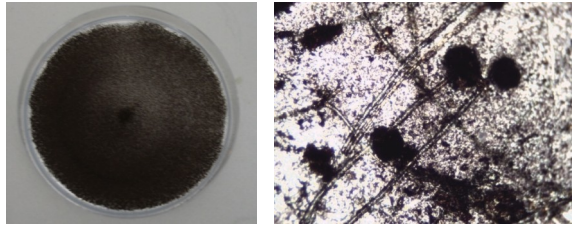


Εικόνα 72. Ανάπτυξη ελληνικών στελεχών *Fusarium* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA

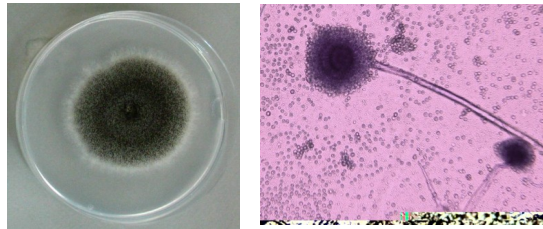
Βάση της μοριακής ανάλυσης τα στελέχη που προσδιορίστηκαν ως *F. subglutinans* παρουσιάζουν πιο ερυθρό και υδαρές μυκήλιο. Τα στελέχη που προσδιορίστηκαν ως *F. verticillioides* εμφάνισαν λευκό μυκήλιο αλλά μεταχρωμάτισαν το θρεπτικό υπόστρωμα σε ερυθρό στις περισσότερες περιπτώσεις. Ανάλογη είναι και η εικόνα σε στελέχη που βάση της μοριακής ανάλυσης προσδιορίστηκαν ως *F. proliferatum* με τη διαφορά ότι η κάτω πλευρά των τριβλίων παρουσίασε σχεδόν μελανό κέντρο ενώ παράλληλα το μυκήλιο είναι πιο πυκνό.

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. Στους Ασπεργίλλους η διαφοροποίηση δεν ήταν τόσο σημαντική μεταξύ των στελεχών σε μικροσκοπικό επίπεδο, ενώ εν γένει είναι πολύ δύσκολος ο διαχωρισμός των φουζαρίων και των ασπεργίλλων σε επίπεδο είδους μόνο με μικροσκοπική παρατήρηση.

Aspergillus spp. Section Nigri

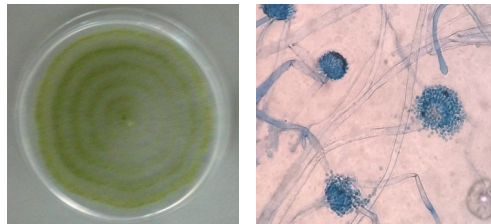


BSA 21



BSA28

A. flavus

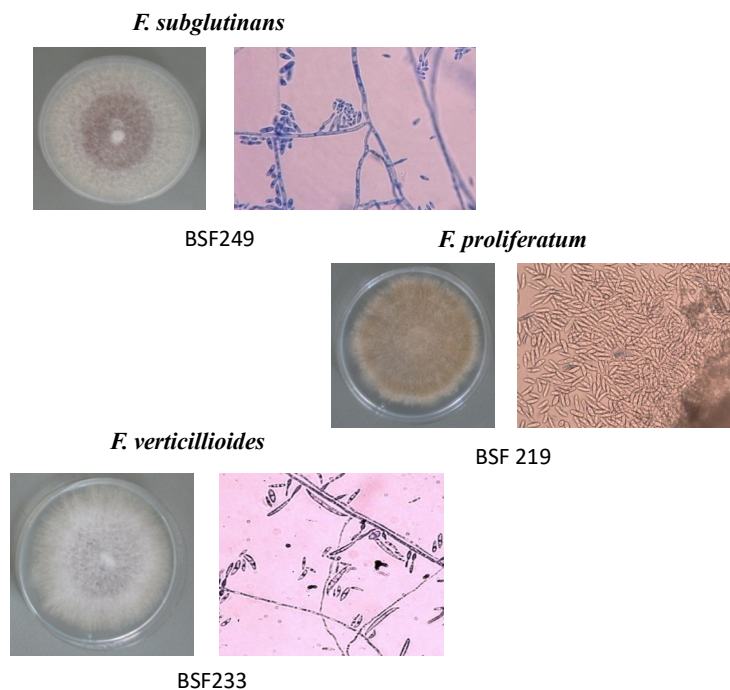


BSAF 50



BSAF 23

Εικόνα 73. Κονίδια διαφόρων στελεχών ελληνικών απομονώσεων *Aspergillus spp.* σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA



Εικόνα 74. Μακροκονίδια και μικροκονίδια διαφόρων στελεχών ελληνικών απομονώσεων *Fusarium* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA.

4.6 Πληθυσμιακή διακύμανση μυκήτων του γένους *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. σε καλλιέργειες αραβοσίτου στην Θεσσαλία και Μακεδονία.

Τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους αγρούς, αναπτύχθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα PDA με σκοπό να γίνει συλλογή των κονιδίων και να τοποθετηθούν σε κρυοφιαλίδια με glycerol stock για τη διατήρησή τους στη βαθιά κατάψυξη (-80°C). Πραγματοποιήθηκε μοριακή ταυτοποίηση επιλεγμένων απομονώσεων με μορφολογικές διαφοροποιήσεις ώστε να επιβεβαιωθεί το είδος των μυκοτοξικογόνων μυκήτων. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν 113 στελέχη από την Θεσσαλία και 114 στελέχη από τη Μακεδονία και έγινε η εξαγωγή του γενωματικού DNA. Στη συνέχεια, ακολούθησε PCR ανάλυση, όπου με τη χρήση του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (*EF*) έγινε η ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο είδους. Πιο συγκεκριμένα, 227 στελέχη φουζαρίων αλληλουχήθηκαν με βάση το γενετικό τόπο του μεταφραστικού παράγοντα (*EF*) και 127 στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως *Fusarium verticillioides*, 75 ως *Fusarium proliferatum* και 25 ως *Fusarium subglutinans*. Όσον αφορά τους μύκητες του γένους *Aspergillus* spp. επιλέχθηκαν 36 εκ των οποίων ήταν μαύροι ασπέργιλλοι και αλληλουχήθηκαν με βάση το γονίδιο της καλμοντουλίνης. Στην παρούσα εργασία, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των πολλαπλασιασμένων με PCR

δειγμάτων DNA πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία *CEMIA*, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της μεθόδου Sanger, και λήφθηκαν τα ανάλογα χρωματογραφήματα.



Εικόνα 75. Χρωματογράφημα του στελέχους BSF24, στο οποίο είχε ενισχυθεί το γονίδιο του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (*EF*).

Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων του National Centre for Biotechnology Information (NCBI) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST και έτσι ολοκληρώθηκε η μοριακή ταυτοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο είδους.

Fusarium verticillioides isolate Fus_005 translation elongation factor 1-alpha (TEF1-alpha) gene, partial cds
Sequence ID: [MH498632.1](#) Length: 706 Number of Matches: 1

Range 1: 52 to 685 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

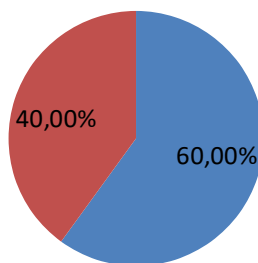
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1171 bits(634)	0.0	634/634(100%)	0/634(0%)	Plus/Plus
Query 1	TCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCTTGACGATGAGCTTATCGGCCATCGTAAA	60		
Sbjct 52	TCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCTTGACGATGAGCTTATCGGCCATCGTAAA	111		
Query 61	CCCGGCCAAGACCTGGCGGGGGATTCTCAAAGAAAACATACTGATATCGCTTCACAGAC	120		
Sbjct 112	CCCGGCCAAGACCTGGCGGGGGATTCTCAAAGAAAACATACTGATATCGCTTCACAGAC	171		
Query 121	CGGTCACCTTGATCTACCAAGTGGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAA	180		
Sbjct 172	CGGTCACCTTGATCTACCAAGTGGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAA	231		
Query 181	GGTTAGTCACCTTTCTCTATCGCGCTTCTTGCCCATCGATCCCCCTACGACTCG	240		
Sbjct 232	GGTTAGTCACCTTTCTCTATCGCGCTTCTTGCCCATCGATCCCCCTACGACTCG	291		
Query 241	AAACGTACCCGCTACCCGCTCGAGCCCAAAAATTTGCGATACGACCGTAATTTTTTCT	300		
Sbjct 292	AAACGTACCCGCTACCCGCTCGAGCCCAAAAATTTGCGATACGACCGTAATTTTTTCT	351		
Query 301	GGTGGGGCATTTACCCGCGCACTCGAGCGGCGCTTCTGCCCCCTCCCATTCACAAACC	360		
Sbjct 352	GGTGGGGCATTTACCCGCGCACTCGAGCGGCGCTTCTGCCCCCTCCCATTCACAAACC	411		
Query 361	TCACTGAGCTCATCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATCCGACAATAGGAAGCCGCT	420		
Sbjct 412	TCACTGAGCTCATCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATCCGACAATAGGAAGCCGCT	471		
Query 421	GAGCTCGGTAAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGT	480		
Sbjct 472	GAGCTCGGTAAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGT	531		
Query 481	GAGCGTGGTATCACCATCGATATCGCTCTCTGGAAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTC	540		
Sbjct 532	GAGCGTGGTATCACCATCGATATCGCTCTCTGGAAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTC	591		
Query 541	ACCGTCATTGGTATGTTGTGCTCTTACTCCGTTCTATATCTCTATTACTAACACATCA	600		
Sbjct 592	ACCGTCATTGGTATGTTGTGCTCTTACTCCGTTCTATATCTCTATTACTAACACATCA	651		
Query 601	CATAGACGCTCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAG	634		
Sbjct 652	CATAGACGCTCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAG	685		

Εικόνα 76. Απεικόνιση της BLAST ανάλυσης του στελέχους BSF24 με την χρήση νουκλεοτιδικής βάσης δεδομένων του (NCBI).

Παράλληλα έγινε αξιολόγηση στην πληθυσμιακή διακύμανση των φουζαρίων σε κάθε νομό της Θεσσαλίας και την Μακεδονίας με καταμέτρηση των ειδών και προσδιορισμό του ποσοστού εμφάνισης κάθε είδους ανά νομό. Το είδος το οποίο κυριαρχεί σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι *F. verticillioides* και ακολουθεί το *F. proliferatum*, εννοώ τα υπόλοιπα είδη φουζαρίων παρουσιάζονται σε μικρότερα ποσοστά στους νομούς της Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας.

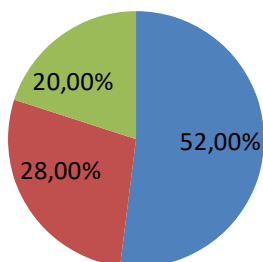
ΝΟΜΟΣ ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ

■ *Fusarium verticillioides* ■ *Fusarium proliferatum*



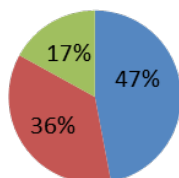
ΝΟΜΟΣ ΤΡΙΚΑΛΩΝ

■ *Fusarium verticillioides* ■ *Fusarium proliferatum* ■ *Fusarium subglutinans*



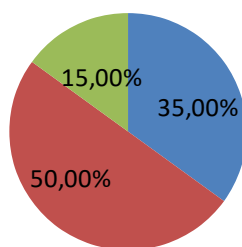
ΝΟΜΟΣ ΛΑΡΙΣΑΣ

■ *Fusarium verticillioides* ■ *Fusarium proliferatum* ■ *Fusarium subglutinans*



ΝΟΜΟΣ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ

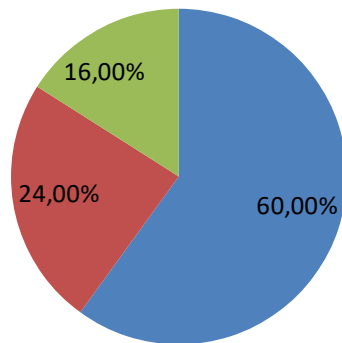
■ *Fusarium verticillioides* ■ *Fusarium proliferatum* ■ *Fusarium subglutinans*



Εικόνα 77. Πληθυσμιακή διακύμανση *Fusarium* spp από την περιοχή της Θεσσαλίας.

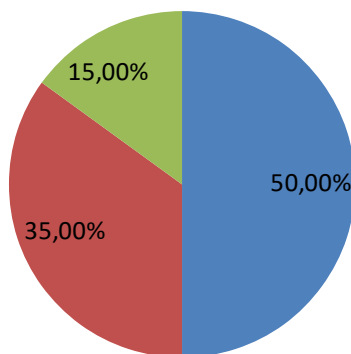
ΝΟΜΟΣ ΚΑΒΑΛΑΣ

■ *Fusarium verticillioides* ■ *Fusarium proliferatum* ■ *Fusarium subglutinans*



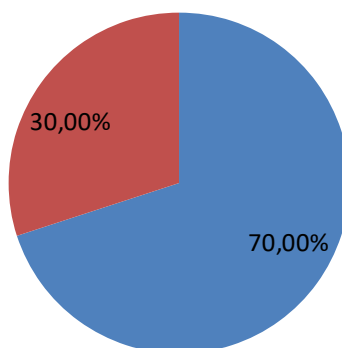
ΝΟΜΟΣ ΔΡΑΜΑΣ

■ *Fusarium verticillioides* ■ *Fusarium proliferatum* ■ *Fusarium subglutinans*



ΝΟΜΟΣ ΣΕΡΡΩΝ

■ *Fusarium verticillioides* ■ *Fusarium proliferatum*



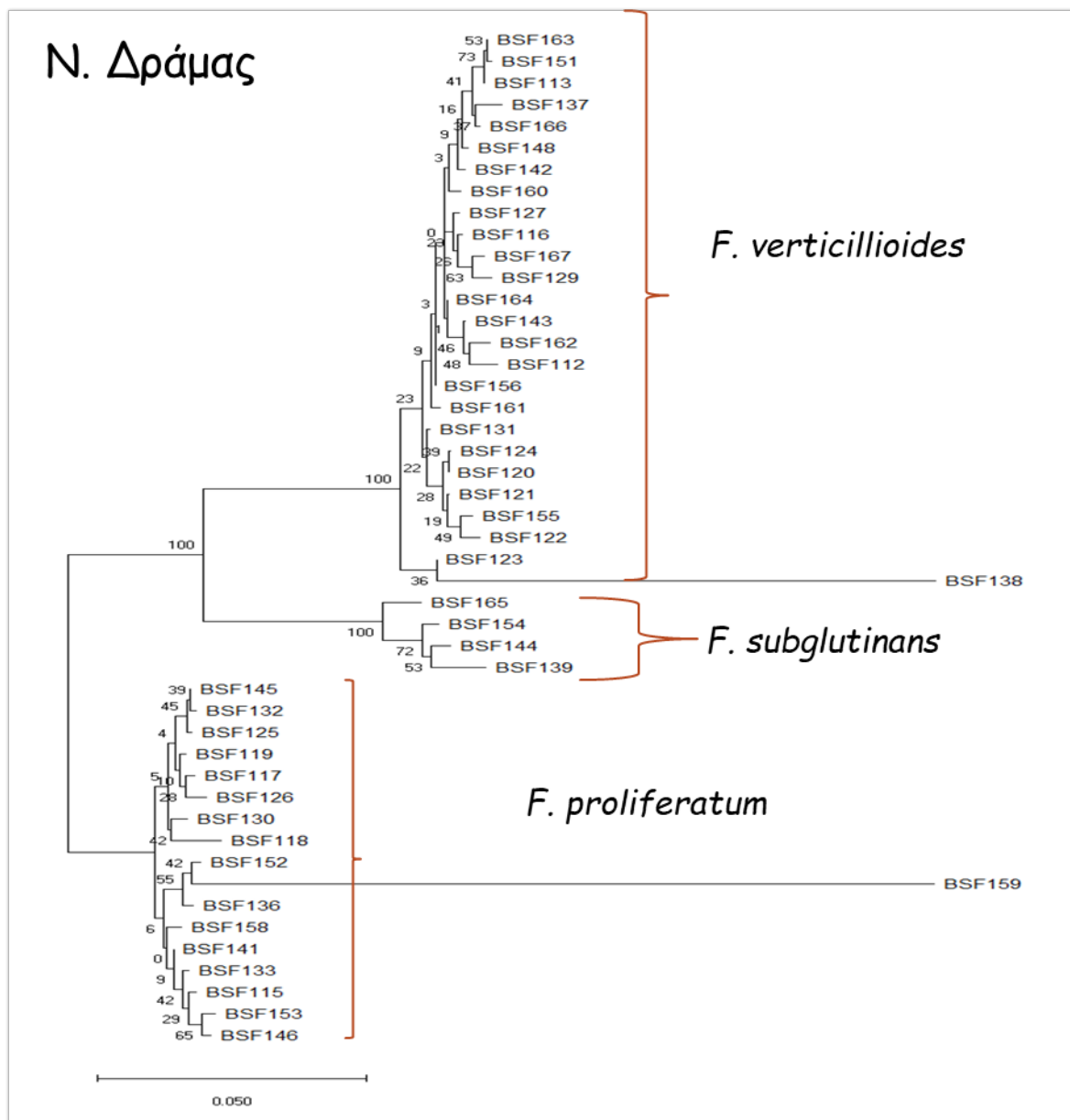
Εικόνα 78. Πληθυσμιακή διακύμανση *Fusarium* spp. από την περιοχή της Μακεδονίας.

NOMOS	Αριθμός απομονώσεων (γένος <i>Fusarium</i> spp.)	Αριθμός απομονώσεων /ειδος
N. ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	3	<i>Fusarium verticillioides</i> (3) <i>Fusarium proliferatum</i> (2)
N. ΤΡΙΚΑΛΩΝ	18	<i>Fusarium verticillioides</i> (13) <i>Fusarium proliferatum</i> (4) <i>Fusarium subglutinans</i> (1)
N. ΛΑΡΙΣΑΣ	74	<i>Fusarium verticillioides</i> (39) <i>Fusarium proliferatum</i> (28) <i>Fusarium subglutinans</i> (7)
N. ΚΑΒΑΛΑΣ	38	<i>Fusarium verticillioides</i> (25) <i>Fusarium proliferatum</i> (12) <i>Fusarium subglutinans</i> (1)
N. ΔΡΑΜΑΣ	45	<i>Fusarium verticillioides</i> (26) <i>Fusarium proliferatum</i> (17) <i>Fusarium subglutinans</i> (4)
N. ΣΕΡΡΩΝ	16	<i>Fusarium verticillioides</i> (12) <i>Fusarium proliferatum</i> (4)
N. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	21	<i>Fusarium verticillioides</i> (9) <i>Fusarium proliferatum</i> (10) <i>Fusarium subglutinans</i> (2)

Πίνακας 2. Μοριακή ταυτοποίηση επιλεγμένων στελεχών *Fusarium* spp από επιλεγμένους αγρούς και προσδιορισμός των ειδών τους

NOMOS	Αριθμός απομονώσεων (γένος <i>Aspergillus</i> spp.)	Αριθμός απομονώσεων /ειδος
N. ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	24	<i>Aspergillus</i> spp.section <i>Flavi</i> (23) <i>Aspergillus</i> spp. section <i>Nigri</i> (1)
N. ΤΡΙΚΑΛΩΝ	8	<i>Aspergillus</i> spp. section <i>Flavi</i> (8)
N. ΛΑΡΙΣΑΣ	31	<i>Aspergillus</i> spp. section <i>Flavi</i> (30) <i>Aspergillus</i> spp. section <i>Nigri</i> (1)
N. ΚΑΒΑΛΑΣ	31	<i>Aspergillus</i> spp. section <i>Flavi</i> (20) <i>Aspergillus</i> spp. section <i>Nigri</i> (11)
N. ΔΡΑΜΑΣ	31	<i>Aspergillus</i> spp. section <i>Flavi</i> (20) <i>Aspergillus</i> spp. section <i>Nigri</i> (11)
N. ΣΕΡΡΩΝ	40	<i>Aspergillus</i> spp. Section <i>Flavi</i> (34) <i>Aspergillus</i> spp. section <i>Nigri</i> (6)
N. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	18	<i>Aspergillus</i> spp. section <i>Flavi</i> (12) <i>Aspergillus</i> spp. section <i>Nigri</i> (6)

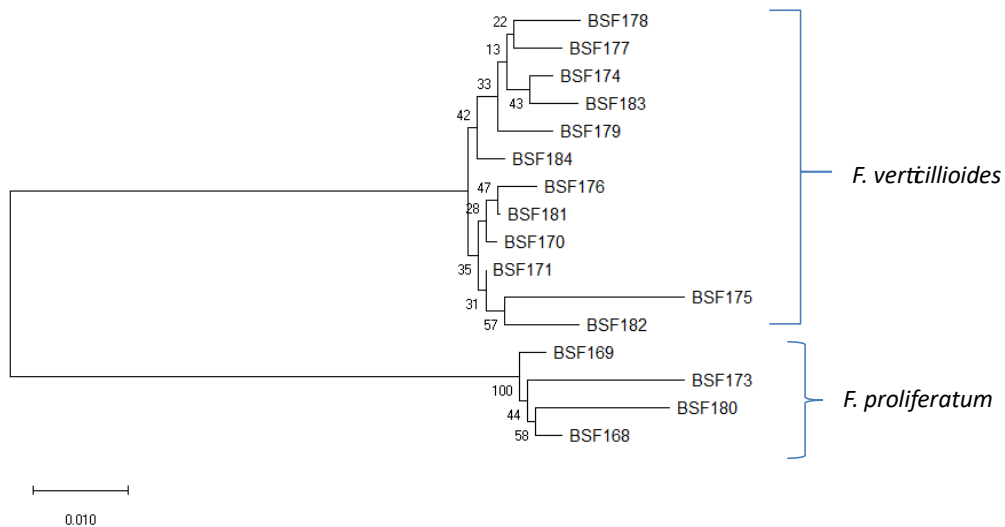
Πίνακας 3. Μορφολογική και μοριακή ταυτοποίηση επιλεγμένων στελεχών *Aspergillus* spp. από τους επιλεγμένους αγρούς.



Εικόνα 80. Φυλογενετικό δένδρο διαφορων απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium proliferatum* από καλαμπόκια του Ν. Δράμας, με βάση τη χρήση του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (*EF*). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) και η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στην γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Το δεύτερο φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται επίσης με βάση της χρήσης του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) και αναφέρεται σε στελέχη που απομονώθηκαν από από καλαμπόκια του Νομού Σερρών. Τα στελέχη χωρίστηκαν σε δυο μεγάλες ομάδες αυτή του *Fusarium verticillioides* και *Fusarium proliferatum*.

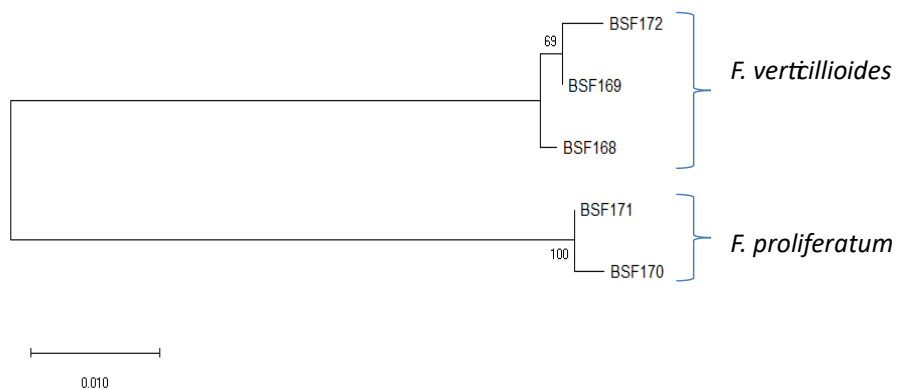
N. ΣΕΡΡΩΝ



Εικόνα 81. Φυλογενετικό δένδρο διαφορών απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* από καλαμπόκια του Ν. Σερρών με τη χρήση του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) και η τιμή 0,01 αντιστοιχεί στην γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων .

Το τρίτο φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται επίσης με βάση της χρήσης του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) και αναφέρεται σε στελέχη που απομονώθηκαν από από καλαμπόκια του Νομού Καρδίτσας. Τα στελέχη χωρίστηκαν σε δυο ομάδες αυτή του *Fusarium verticillioides* και *Fusarium proliferatum*.

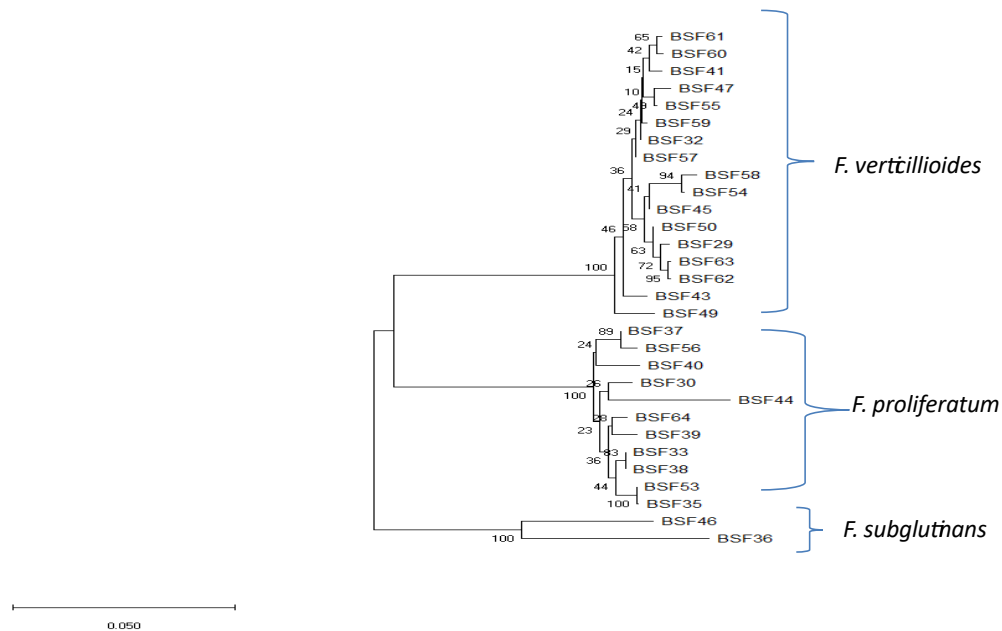
N. ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ



Εικόνα 82. Φυλογενετικό δένδρο διαφορών απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* από καλαμπόκια του Ν. Καρδίτσας με τη χρήση του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) και η τιμή 0,01 αντιστοιχεί στην γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Το τέταρτο φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται επίσης με βάση της χρήσης του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) και αναφέρεται σε στελέχη που απομονώθηκαν από από καλαμπόκια του Νομού Λάρισσας. Τα στελέχη χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες αυτή του *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans*.

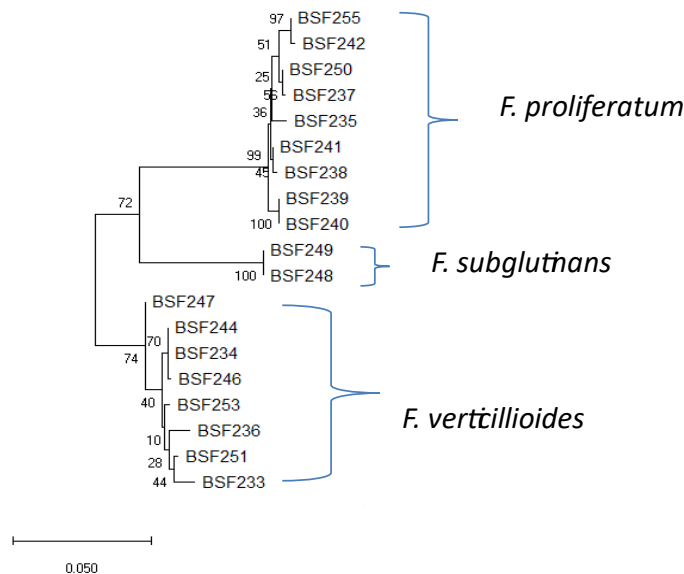
Ν. ΛΑΡΙΣΣΑΣ 1



Εικόνα 83. Φυλογενετικό δένδρο διαφόρων απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans*. από καλαμπόκια του Ν. Λάρισσας με τη χρήση του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) και η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στην γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Το πέμπτο φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται επίσης με βάση της χρήσης του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) και αναφέρεται σε στελέχη που απομονώθηκαν από από καλαμπόκια του Νομού Ν. Μαγνησίας. Τα στελέχη χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες αυτή του *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans*.

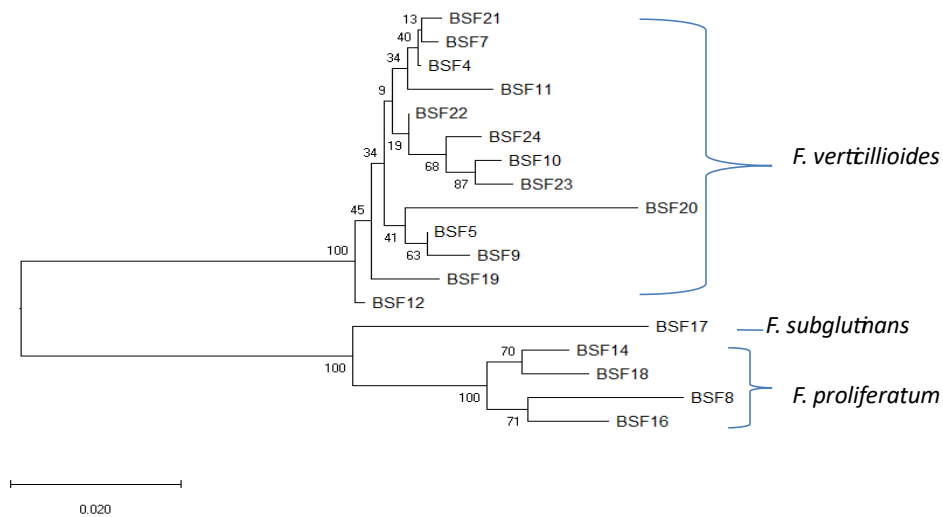
N. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ



Εικόνα 84. Φυλογενετικό δένδρο διαφορών απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans*. από καλαμπόκια του Ν. Μαγνησίας με τη χρήση του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) και η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στην γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

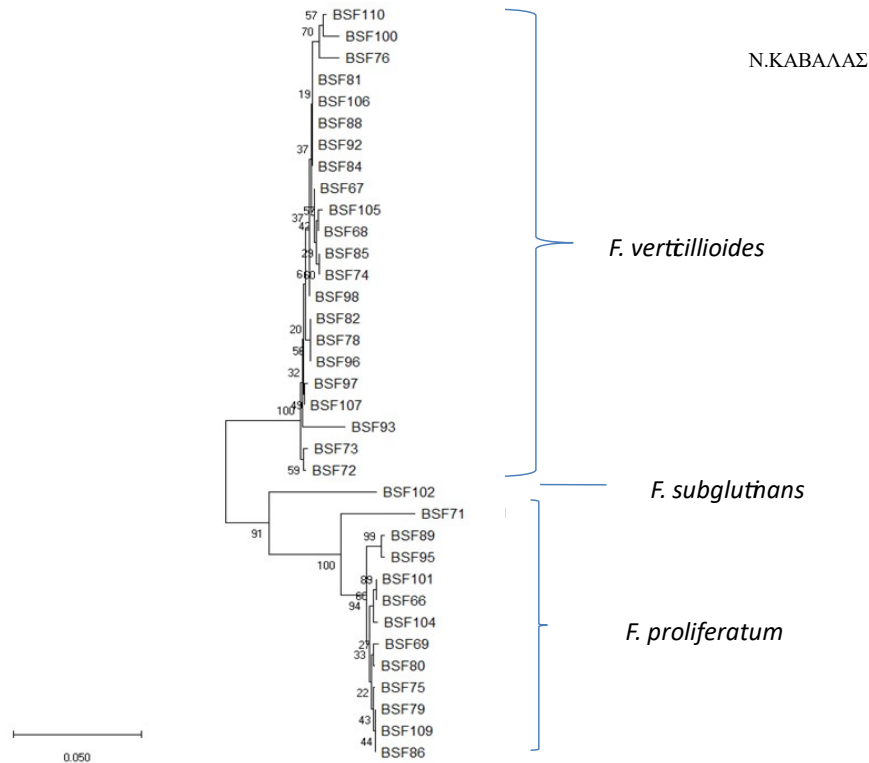
Το έκτο φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται επίσης με βάση της χρήσης του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) και αναφέρεται σε στελέχη που απομονώθηκαν από καλαμπόκια του Νομού Τρικάλων. Τα στελέχη χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες αυτή του *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans*.

Ν.ΤΡΙΚΑΛΩΝ



Εικόνα 85. Φυλογενετικό δένδρο διαφορών απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans*. από καλαμπόκια του Ν. Τρικάλων με τη χρήση του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) και η τιμή 0,02 αντιστοιχεί στην γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

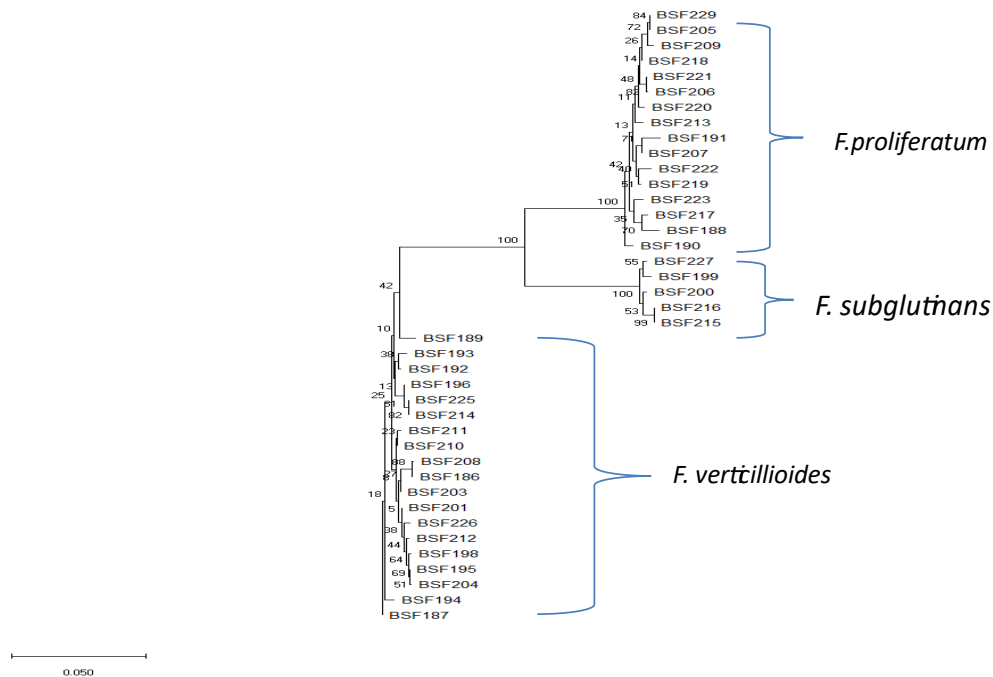
Το έβδομο φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται επίσης με βάση της χρήσης του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) και αναφέρεται σε στελέχη που απομονώθηκαν από καλαμπόκια του Ν. Καβάλας. Τα στελέχη χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες αυτή του *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans*.



Εικόνα 86. Φυλογενετικό δένδρο διαφορών απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans*, από καλαμπόκια του Ν. Καβάλας με τη χρήση του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) και η τιμή 0,02 αντιστοιχεί στην γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Το όγδοο φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται επίσης με βάση της χρήσης του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) και αναφέρεται σε στελέχη που απομονώθηκαν από καλαμπόκια του Ν. Λάρισας. Τα στελέχη χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες αυτή του *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans*.

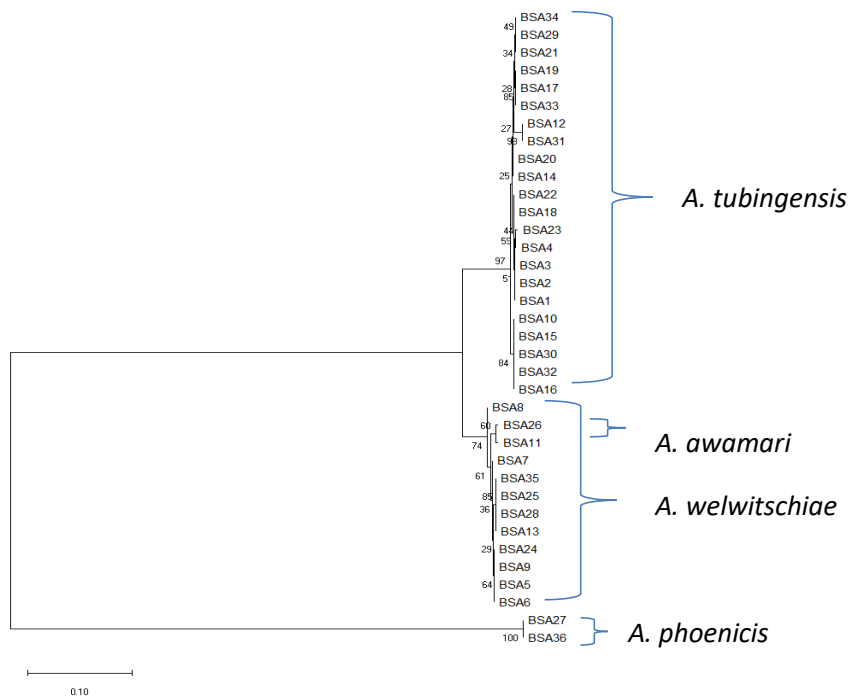
Ν.ΛΑΡΙΣΑΣ 2



Εικόνα 87. Φυλογενετικό δένδρο διαφορών απομονώσεων *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans*. από καλαμπόκια του Ν. Λάρισας με τη χρήση του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) και η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στην γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

Το ένατο φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται με βάση το γονίδιο της καλμοντουλίνης (*CAM*) και αναφέρεται σε στελέχη του γένους *Aspergillus* spp. section *Nigri* που απομονώθηκαν από καλαμπόκια της Βόρειας και κεντρικής Ελλάδας. Στην ταξινόμηση αυτή παρουσιάζετε μικρός διαχωρισμός.

Aspergillus section *Nigri*



Εικόνα 88. Φυλογενετικό δένδρο διαφορών απομονώσεων Ασπεργίλλων από καλαμπόκια της κεντρικής και βόρειας Ελλάδας με βάση τον γενετικό τόπο της καλμοντουλίνης (*CAM*). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (100 επαναλήψεις) και η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στην γονιδιακή απόσταση μεταξύ των εξετασθέντων απομονώσεων.

4.8 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

διαφορών κλιματολογικών παραμέτρων των τριών τελευταίων χρόνων από διάφορες περιοχές της Θεσσαλίας και της Μακεδονίας κατά τους μήνες Ιούνιο – Ιούλιο – Αύγουστο από 2014-2016.

ΜΗΝΑΣ/ΕΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	T max °C	T min °C	T mean °C	Υετός
Ιούνιος 2014	N. Καβάλας	36,7	11,6	22,7	69
	N. Δράμας	36,4	10,7	22,2	97,2
	N. Σερρών	36,1	12,6	23,5	74,2
Ιούλιος 2014	N. Καβάλας	32,8	15,8	24,8	25,6
	N. Δράμας	33,1	14,4	24,4	37
	N. Σερρών	34,6	17,1	25,4	70
Αύγουστος 2014	N. Καβάλας	35,2	15,6	25,3	117,6
	N. Δράμας	35,7	14,2	25,7	60
	N. Σερρών	37,6	16,2	26,1	24,4
Σεπτέμβριος 2014	N. Καβάλας	29,1	8,5	20,7	62
	N. Δράμας	30,1	6,2	20,4	57,9
	N. Σερρών	31,1	8,9	20,2	77
Ιούνιος 2015	N. Καβάλας	26,9	17,4	22,1	31
	N. Δράμας	27	16,6	21,8	53
	N. Σερρών	30,8	16,4	23,6	96
Ιούλιος 2015	N. Καβάλας	30,8	19,9	25	14
	N. Δράμας	32,7	19,2	26	12
	N. Σερρών	36,1	19,1	27,5	4
Αύγουστος 2015	N. Καβάλας	31,6	20,3	26	28
	N. Δράμας	33,2	20,5	26	0
	N. Σερρών	35,4	19	27,2	43
Σεπτέμβριος 2015	N. Καβάλας	27,3	18,2	22,7	90
	N. Δράμας	28,6	18,4	23,5	134
	N. Σερρών	31,3	17,2	24	78
Ιούνιος 2016	N. Καβάλας	29,4	19,1	24,2	16
	N. Δράμας	30,4	18,3	24,3	14
	N. Σερρών	33,3	17,6	25,4	36
Ιούλιος 2016	N. Καβάλας	31	20,7	25,8	0
	N. Δράμας	32,9	19,9	27,7	2
	N. Σερρών	35,6	19,9	27	7
Αύγουστος 2016	N. Καβάλας	31,5	20,1	25,2	
	N. Δράμας	33,3	20,2	26	
	N. Σερρών	35,6	19,1	27,35	11
Σεπτέμβριος 2016	N. Καβάλας	26,8	16,1	21,4	13
	N. Δράμας	28	15,8	21,8	4
	N. Σερρών	29,7	14,6	22,1	45

Πίνακας 4. Μετεωρολογικά δεδομένα θερμοκρασίας και υετού για τους μήνες Ιούνιο – Σεπτέμβριο των ετών 2014-2016 για της περιοχές των Σερρών, της Δράμας και της Καβάλας όπου πραγματοποιηθήκαν δειγματοληψίες καλαμποκιού.

ΜΗΝΑΣ/ΕΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	T max °C	T min °C	T mean °C	Υετός
Ιούνιος 2014	N. Βοιωτίας	29,7	17,1	23,4	27
	N. Καρδίτσας	38,9	11,8	25,3	39,8
	N. Τρικάλων	38,5	13,3	25,9	57,2
	N. Λάρισας	32	17	24,5	25
	N. Μαγνησίας	29	17,1	23	28
Ιούλιος 2014	N. Βοιωτίας	31	20	25,5	10
	N. Καρδίτσας	36,4	15	25,7	4,6
	N. Τρικάλων	36,8	16,2	26,5	11,2
	N. Λάρισας	33,6	19,1	26,3	16
	N. Μαγνησίας	31,9	20,2	26	11
Αύγουστος 2014	N. Βοιωτίας	32	20,5	26	17
	N. Καρδίτσας	38,3	14,2	26,2	8,8
	N. Τρικάλων	39,6	16,3	27,9	6
	N. Λάρισας	34,6	19,2	26,9	8
	N. Μαγνησίας	32,4	20,7	26,5	16
Σεπτέμβριος 2014	N. Βοιωτίας	27	17	22	47
	N. Καρδίτσας	32,9	7,5	20,2	100,4
	N. Τρικάλων	34,7	11,3	23	41,4
	N. Λάρισας	28,1	15,9	22	70
	N. Μαγνησίας	27,2	17,1	22,1	48
Ιούνιος 2015	N. Βοιωτίας	30	16,4	23,2	90
	N. Καρδίτσας	26,4	13,6	20	37
	N. Τρικάλων	26	13	19,5	35
	N. Λάρισας	30,2	16,6	23,4	95
	N. Μαγνησίας	27,9	17,6	22,7	86
Ιούλιος 2015	N. Βοιωτίας	32,1	20,2	26,1	3
	N. Καρδίτσας	32,4	17,9	25,1	33
	N. Τρικάλων	32	17	24,5	30
	N. Λάρισας	34,6	19,2	26,9	6
	N. Μαγνησίας	32,2	20	26,1	3
Αύγουστος 2015	N. Βοιωτίας	32,3	20,6	26,4	7
	N. Καρδίτσας	30,4	16,7	23,5	69
	N. Τρικάλων	31	16,9	23,9	60
	N. Λάρισας	33,5	18,7	26,1	70
	N. Μαγνησίας	32	20,6	26,3	9
Σεπτέμβριος 2015	N. Βοιωτίας	28,5	18,5	23,5	149

	N. Καρδίτσας	26,5	15,1	20,8	112
	N. Τρικάλων	26	14,7	20,3	100
	N. Λάρισας	30,3	17,6	23,9	73
	N. Μαγνησίας	28,1	18,4	23,2	150
Ιούνιος 2016	N. Βοιωτίας	30,4	18,9	24,6	22
	N. Καρδίτσας	29,5	15,7	22,6	17
	N. Τρικάλων	29	14,7	21,8	18
	N. Λάρισας	33,1	17,8	25,4	10
	N. Μαγνησίας	30	18	24	24
Ιούλιος 2016	N. Βοιωτίας	32	20,5	26,2	10
	N. Καρδίτσας	31,3	17,5	24,4	15
	N. Τρικάλων	31	18	24,5	16
	N. Λάρισας	34,3	20	27,1	2
	N. Μαγνησίας	32	20,5	26,2	10
Αύγουστος 2016	N. Βοιωτίας	31	21	26	2
	N. Καρδίτσας	28,7	17	22,8	64
	N. Τρικάλων	28,9	19	23,9	68
	N. Λάρισας	33,5	19	26,2	7
	N. Μαγνησίας	31,6	20,5	26	1
Σεπτέμβριος 2016	N. Βοιωτίας	27,4	17,4	22,4	6
	N. Καρδίτσας	23,6	13,2	18,4	129
	N. Τρικάλων	24	13,5	18,7	124
	N. Λάρισας	27,7	15,4	21,5	121
	N. Μαγνησίας	27	17,5	22,2	4

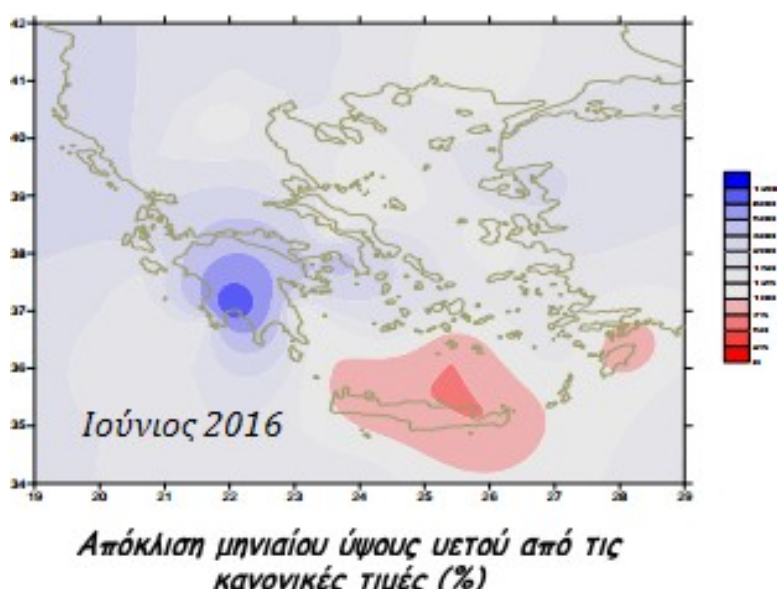
Πίνακας 5. Μετεωρολογικά δεδομένα θερμοκρασίας και υετού για τους μήνες Ιούνιο – Σεπτέμβριο των ετών 2014-2016 για της περιοχές της Λάρισας, των Τρικάλων, της Καρδίτσας της Βοιωτίας και της Μαγνησίας των όπου πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες καλαμποκιού.

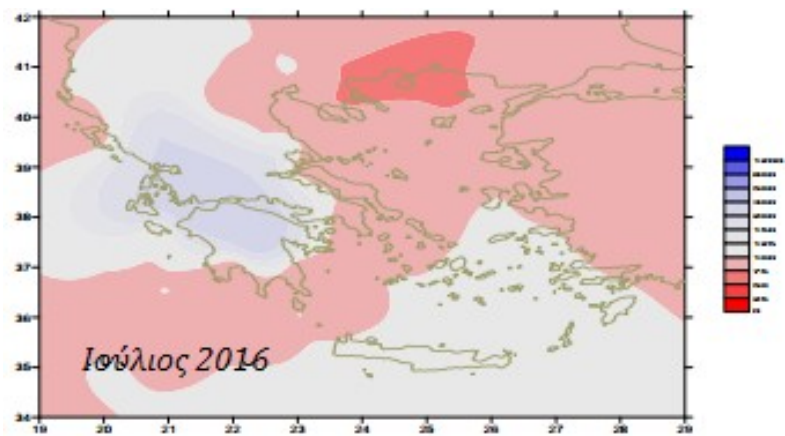
Οι βροχές και η αυξημένη υγρασία είναι σημαντικοί παράγοντες που ευνοούν τις μολύνσεις από τους μύκητες του γένους *Fusarium* spp. στο στάδιο του μεταξώματος κατά την διάρκεια της γονιμοποίησης του σπάδικα του καλαμποκιού. Τα ποσοστά υετού που σημειώθηκαν τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο του 2016 στην Βόρεια και Κεντρική Ελλάδα ήταν χαμηλότερα από τις κανονικές τιμές. Η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε κοντά σε κανονικές τιμές.

Ο Αύγουστος του 2016 παρουσίασε χαμηλή σχετική υγρασία στην Μακεδονία και αυξημένες βροχές σε ορισμένες περιοχές της Θεσσαλίας. Τα πόσα υετού ήταν κάτω από τα κανονικά όρια και η μέση θερμοκρασία ήταν περίπου 28 που ευνοεί την οικολογία των παθογόνων μυκήτων *Aspergillus* spp και *Fusarium* spp αντίστοιχα.

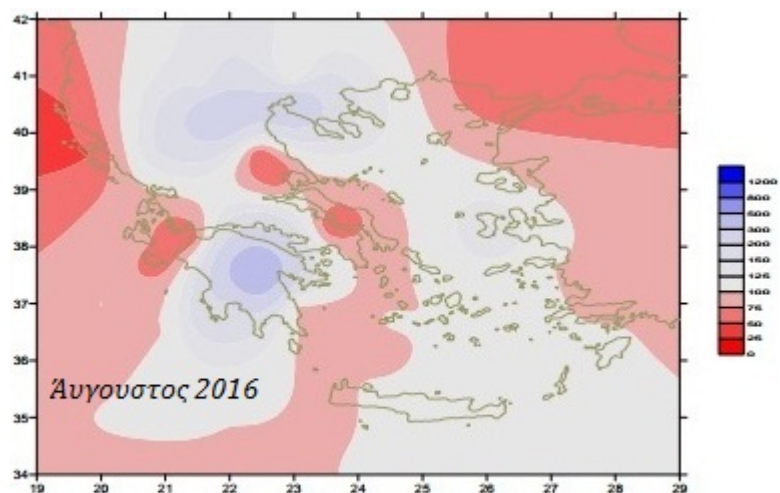
Όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες οι θερμοκρασίες που επικρατούσαν το Σεπτέμβρη του 2016 όπου ήταν ο μήνας συγκομιδής των σπαδικών καλαμποκιού από την περιοχή της Μακεδονίας και Θεσσαλίας διέφεραν κατά 3-4 βαθμούς από της προηγούμενες χρονιές που ήταν πιο χαμηλές. Ο Σεπτέμβρης καταχωρήθηκε στους καταστροφικούς μήνες κυρίως λόγω της ισχυρής κακοκαιρίας της περιόδου 6-10/9/2016 που επηρέασε το μεγαλύτερο μέρος της χώρας. Τα πολύ έντονα φαινόμενα -βροχές, καταιγίδες, σίφωνες και θυελλώδεις άνεμοι- προκάλεσαν μεγάλες καταστροφές σε πολλές περιοχές της Θεσσαλίας και Μακεδονίας. Τα ποσά υετού που σημειώθηκαν ήταν αρκετά πάνω από τα κανονικά επίπεδα στην κεντρική και βόρεια Ελλάδα. Τα δεδομένα συλλεχτήκαν από την Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία.

Οι βροχοπτώσεις το μήνα Σεπτέμβριο φαίνεται να ευνόησαν την ανάπτυξη σήψεων από *Fusarium* spp. όπως παρατηρήθηκε και στα πειράματα της μελέτης το 2016 όπου οι μολύνσεις ήταν εκτεταμένες στους σπάδικες σε αντίθεση όμως με τα επίπεδα φουμονισινών που ήταν χαμηλά.

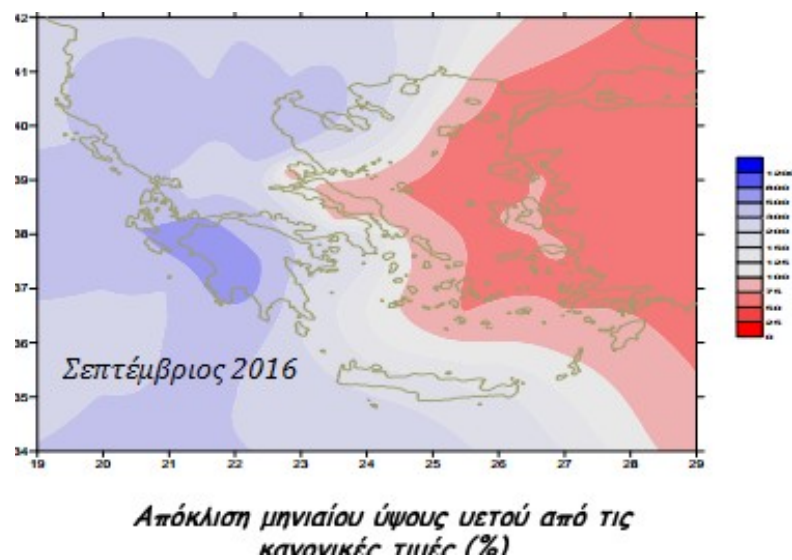




Απόκλιση μηνιαίου ύψους υετού από τις κανονικές τιμές (%)



Απόκλιση μηνιαίου ύψους υετού από τις κανονικές τιμές (%)



Εικόνα 89. Μετεωρολογικοί χάρτες της Ελλάδος για τους θερινούς μήνες του 2016.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρπός του αραβοσίτου (καλαμπόκι) αποτελεί βασική πηγή της ανθρώπινης και ζωικής διατροφής σε πολλές χώρες. Ειδικότερα, το αλεύρι του αραβοσίτου χρησιμοποιείται για την παρασκευή ψωμιού και για διάφορα αρτοποιήματα και προϊόντα ζαχαροπλαστικής. Το άμυλο του αραβοσίτου (κορν φλάουρ ή άνθος αραβοσίτου) χρησιμοποιείται στη ζαχαροπλαστική, στη βιομηχανία παιδικών τροφών, στην παρασκευή αλλαντικών, στη ζυθοποιία και στην παραγωγή ζαχάρων (αμυλοσιρόπι) και διάφορων αμυλούχων και ζαχαρούχων προϊόντων. Το αραβοσιτέλαιο επίσης χρησιμοποιείται στη διατροφή (Δαλιάνης, 1983).

Ο αραβόσιτος συγκαταλέγεται στις πιο σημαντικές καλλιέργειες στην Ελλάδα καθώς πολλές εκτάσεις κάθε χρόνο χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια του. Για τον λόγο αυτό όλο και περισσότερες έρευνες έχουν στραφεί ως προς την μελέτη της καλλιέργειας καθώς και των παθογόνων που την προσβάλλουν. Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες έχουν εστιάσει σε δυο συγκεκριμένα παθογόνα τους μύκητες του γένους *Aspergillus* και *Fusarium spp.* καθώς επιφέρουν σημαντική υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος λόγω σήψεων των σπαδικών και προσβολών των ριζών και του λαιμού των φυτών που προκαλούν.

Η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα όσον αφορά τα συγκεκριμένα παθογόνα άρχισε να εντείνεται λόγω των μυκοτοξινών που παράγουν. Οι μυκοτοξίνες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων και έχουν ανιχνευθεί σε πολλά γεωργικά προϊόντα όπου έχουν εντοπιστεί τοξικογόνοι μύκητες (CAST, 2003). Η παρουσία τους στα τρόφιμα σε υψηλά επίπεδα μπορεί να επιφέρει τοξικές επιδράσεις οι οποίες μπορεί να είναι οξείες ή χρόνιες όπως μεταλλάξεις, τερατογενέσεις, γενετικές ανωμαλίες, νευροτοξικότητα ή ακόμα και θάνατο.

Η καταπολέμηση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων καθώς και των μυκοτοξινών που παραγουν είναι πολύ δύσκολη στην καλλιέργεια του αραβόσιτου διότι δεν υπάρχουν εγκεκριμένα φάρμακα για την αντιμετώπισή τους. Η αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Fusarium spp.* στηρίζεται κατά κύριο λόγο στην εφαρμογή προληπτικών μέτρων τα οποία προλαμβάνουν την εμφάνισή τους στην καλλιέργεια. Στο παρελθόν έχει γίνει ανίχνευση κρουσμάτων με πολύ υψηλό επίπεδο μυκοτοξινών (άνω των επιτρεπτών ορίων που έχουν θεσπιστεί από την Ε.Ε.) και συγκεκριμένα σε ζωοτροφές που προερχόντουσαν από ελληνικές καλλιέργειες, γι' αυτόν τον λόγο κρίθηκε αναγκαία η μελέτη της υφιστάμενης κατάστασης στην καλλιέργεια του αραβοσίτου σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Για αυτόν τον λόγο, στις αρχές Σεπτεμβρίου του 2016, εντοπίστηκαν και επιλέχθηκαν οι κατάλληλοι πειραματικοί αγροί αραβοσίτου, οι οποίοι θα συμμετείχαν στον προσδιορισμό της έντασης των συμπτωμάτων σήψεων σπαδικών και στις δειγματοληψίες και στη μελέτη ως προς τη σήψη σπαδικά από *Fusarium spp.* και *Aspergillus spp.* και ως προς την ύπαρξη μυκοτοξινών στο καλαμπόκι. Προσδιορίστηκαν 75 αγροί καλαμποκιού της κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας. Τα ποσοστά σήψεων των σπαδικών σε όλους τους αγρούς ήταν πολύ υψηλά τόσο στην Κεντρική Ελλάδα τόσο και στην Βόρεια Ελλάδα με τα ποσοστά να κυμαίνονται από 2 % (π.χ. αγρός 32

στην περιοχή της Καβάλας) έως και 100% (π.χ. αγρός 45 στον νομό της Δράμας). Τον Σεπτεμβρίου του 2016 τα ποσοστά σήψεων των σπαδικών σε όλους τους αγρούς ήταν πολύ υψηλά, ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι οι εντομολογικές προσβολές ήταν σε έξαρση όπου αυτό επηρεάζει σημαντικά την ένταση της ασθeneias. Οι εντομολογικές προσβολές όπως πυραλίδα, σεζάμια, πράσινο σκουλήκι κ.α είχαν ως αποτέλεσμα η εξανθήση των μυκήτων να εξαπλώνεται σε μεγαλύτερο μέρος του σπαδικά. Παρόμοια κατάσταση είχε παρατηρηθεί και τον Σεπτέμβριο του 2014 σε προηγούμενη μελέτη στους ίδιους αγρούς με την ένταση να κυμαίνεται από 0-100% καθώς παρατηρήθηκαν έντονες εντομολογικές προσβολές (Α. Γκατζούνη, 2016).

Στην συνέχεια έγινε η αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθeneias στους επιλεγμένους αγρούς όπου προσδιορίστηκε το ποσοστό των μολυσμένων σπόρων με συμπτώματα σήψεων από *Fusarium* και *Aspergillus spp.* ως προς το συνολικό αριθμό σπόρων κάθε σπάδικα ανά αγρό. Και εδώ είχαμε έντονη διακύμανση στους αγρούς της Μακεδονίας να κυμαίνεται από 4,2 % (αγρός 32 στον νομό Καβάλας) έως και 31% (αγρός 45 στον νομό Δράμας) ενώ στη Θεσσαλία τα επίπεδα σοβαρότητας κυμάνθηκαν από 7,1% στον αγρό 17 στον νομό Τρικάλων έως 47% (στον αγρό 24 νομό Λάρισσας) με μέσο όρο 20,1% πολύ χαμηλότερο σε σχέση με την μελέτη που έγινε το 2014 που ο μέσος όρος ήταν 45% (Α. Γκατζούνη, 2016). Τα επίπεδα σοβαρότητας ήταν αναμενόμενα γιατί έχουν παρατηρηθεί παρόμοιες καταστάσεις και σε άλλες μεσογειακές χώρες όπως στην βόρεια Ιταλία το Σεπτέμβριο του 2012 που ήταν 30% (Logrecio et al. 2012).

Τα αποτελέσματα από της μετρήσεις των μυκοτοξινών , φουμονισών και αφλατοξινών ανά αγρό έδειξαν ένα ευρύ φάσμα τιμών, με φουμονισίνες να κυμαίνονται από 0 έως και 373 ppm (mg/kg) ανά αγρό και για της αφλατοξίνες από 0 έως και 261 ppb (mg/tn) ανά αγρό στο σύνολο των 75 εξετασθέντων αγρών. Στην Θεσσαλία η συγκέντρωση των φουμονισίνων κυμαινόταν από 6 ppm/ αγρό (πχ αγρός 68 στον νομό Λάρισσας) έως 345 ppm/ αγρό (πχ αγρός 20 στον νομό Λάρισσας) με πολύ μεγάλο ποσοστό των σπαδικών να παρουσιάζουν συμπτώματα όπως ‘strbursting’ και ελαφρύς κοκκίνισμα των σπόρων. Όσον αφορά της αφλατοξίνες η συγκέντρωση ήταν μικρότερη από 5 ppb/αγρό στους περισσότερους αγρούς ενώ έφτασε έως και 261 ppb/αγρό (πχ αγρός 2 στον νομό Καρδίτσας).

Στη Μακεδονία τα ποσοστά φουμονισίνων ήταν πολύ χαμηλά σε σχέση με τους αγρούς της Θεσσαλίας, κυμάνθηκαν από 0 ppm/ αγρό (πχ αγρός 34 νομός Δράμας) έως 373 ppm/ αγρό (πχ αγρός 26 στον νομό Καβάλας). Τα ποσοστά αφλατοξινών στην Μακεδονία ήταν χαμηλότερα από της Θεσσαλίας το εύρος των τιμών κυμαινόταν από 0 ppb/αγρό (πχ αγρός 32 νομός Δράμας) έως 85 ppb/αγρό (πχ αγρός 53 νομός Σερρών). Αντίστοιχες εικόνες έχουμε και στην προηγούμενη μελέτη που έγινε το 2014 με ελάχιστες διαφορές στα ποσοστά φουμονισινών και αφλατοξινών. Συγκριτικά με το 2014 το 2016 οι φουμονισίνες ξεπέρασαν τα 373 ppm (mg/kg) ανά αγρό ενώ το 2014 έφτασε μόλις στα 100 ppm (mg/kg) ανά αγρό. Οι αφλατοξίνες στη μελέτη αυτή έφτασαν έως 261 ppb ενώ το 2014 δεν ξεπερνούσε τα 150 ppb. (Α. Γκατζούνη, 2016). Αντίστοιχες εικόνες μυκοτοξινών έχουμε και σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου όπου το 68% των εξετασθέντων δειγμάτων καλαμποκιού ήταν θετικά σε φουμονισίνες και το 40% ήταν άνω από τα επιτρεπτά όρια που έχουν θεσπιστεί από τη Ε.Ε. (Griessler et al., 2010). Η διαφοροποίηση των

τιμών των τοξινών που παρατηρήθηκε σε 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 ξηρασίες που προηγήθηκαν της περιόδου των δειγματοληψιών είχαν ως αποτέλεσμα τα υψηλά ποσοστά αφλατοξινών και σε συνδυασμό με την υγρασία και την κακοκαιρία που επικρατούσε τον μήνα Σεπτέμβρη είναι δικαιολογημένη η αύξηση της ποσότητας βιοσύνθεσης αφλατοξινών σε επιλεγμένες περιοχές. Οι καλές κλιματικές συνθήκες τους μήνες Ιούνιο – Σεπτέμβρη σε συνδυασμό με την υγρασία που επικρατούσε δικαιολογημένα έχουμε μερική αύξηση βιοσύνθεσης φουμονισίνων.

Στη συνέχεια ακλούθησε απομόνωση των μυκήτων από τους συλλεχθέντες σπάδικες ώστε να προσδιοριστούν τα είδη τους. Οι απομονώσεις οδήγησαν στην δημιουργία συλλογής 1050 μυκήτων του γένους *Fusarium* spp. και *Aspergillus* spp. μιας συλλογής που δημιουργείται για δεύτερη φορά στην Ελλάδα από καλλιέργεια αραβοσιτού και αποτελεί συνέχεια της συλλογής που έγινε το 2014. Αρχικά οι μύκητες αυτοί διαχωρίστηκαν βάση των μορφολογικών χαρακτηριστικών μακροσκοπικά και μικροσκοπικά και στην συνέχεια ακλούθησε ο διαχωρισμός τους με μοριακούς μεθόδους. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν 120 στελέχη από την Θεσσαλία και 120 στελέχη από τη Μακεδονία και έγινε η εξαγωγή του γενωματικού DNA. Στη συνέχεια, ακολούθησε PCR ανάλυση, όπου με τη χρήση του γονιδίου του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) έγινε η ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο είδους όσον αφορά το γένος *Fusarium* spp. Για τους μυκητες του γένους *Aspergillus* spp. (O' Donnell et al., 1998c ; Czembor et al., 2015). Χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της καλμοντουλίνης CAM εννοώ θα μπορούσε να γίνει και με το γονίδιο της ριβοσωμικής εσωτερικά μεταγραφόμενης περιοχής ITS οπού χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για το διαχωρισμό των ασπεργγίων (O' Donnell et al., 2000). Σε μελέτες κυρίως αυτά είναι τα γονίδια που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των ειδών. Σε πολλές περιπτώσεις όμως γίνεται χρήση και της τουμπουλίνης β- tub, κυρίως για τον διαχωρισμό των φουζαριών, ενώ σε πολλές φορές γίνεται χρήση δυο και τριών γονιδίων ταυτόχρονα ώστε να βρεθούν τυχόν διαφοροποιήσεις και να γίνουν περαιτέρω συσχετισμοί μεταξύ των ειδών (Watanabe et al., 2011; Balajee et al., 2009) .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης των στελεχών παρατηρήθηκε ότι στην Θεσσαλία και στις περιοχές της Μακεδονίας επικρατούν ιδιαίτερα τα μυκοτοξικογόνα είδη *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* καθώς και *Fusarium subglutinans*. Συγκεκριμένα στην περιοχή της Θεσσαλίας δεν υπήρχε ιδιαίτερη παραλλακτικότητα στην πληθυσμιακή διακύμανση του κάθε νομού. Όπως αποδείχτηκε μετά από την BLAST ανάλυση όλων των στελεχών τα μοναδικά είδη που επικρατούσαν ήταν *Fusarium verticillioides* να κυριαρχεί σε κάθε νομό το *Fusarium proliferatum* να ακολουθεί και σε πολύ μικρό ποσοστό το *Fusarium subglutinans*. Όσον αφορά τις απομονώσεις ασπεργγίων υπερείχε του *A. flavus* αλλά υπήρξαν και απομονώσεις σε μικρότερο ποσοστό του *A.niger*, *A. awamori*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*. Γεγονός αναμενόμενο από προηγούμενες μελέτες πάνω στην καλλιέργεια του καλαμποκιού. Το 2014 σε προηγούμενη έρευνα στους ίδιους πειραματικούς αγρούς υπήρχε

μεγαλύτερη παραλλακτικότητα στην πληθυσμιακή διακύμανση των στελεχών καθώς υπήρχαν περισσότερα μη τοξικογόνα είδη. Για αυτόν τον λόγο ίσως παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά φουμονισίνης σε σχέση με το 2014.

Τα είδη που ταυτοποιήθηκαν μοριακά στην συνέχεια εξετάστηκαν με το πρόγραμμα MEGA X ώστε να γίνει η φυλογενετική τους ανάλυση. Στη Θεσσαλία και συγκεκριμένα στο νομό Μαγνησίας τα 20 δείγματα χωρίζονται σε 3 κατηγορίες του *Fusarium verticillioides* με ποσοστό 35% του *Fusarium proliferatum* με 50 % και του *Fusarium subglutinans* με 15 %. Τα 21 στελέχη που εξετάστηκαν από τον νομό Τρικάλων διαχωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες *Fusarium verticillioides* με ποσοστό 52% του *Fusarium proliferatum* με 28 % και του *Fusarium subglutinans* με 20 %. Στον νομό Λάρισας οι 74 απομονώσεις χωρίστηκαν και πάλι σε 3 κατηγορίες *Fusarium verticillioides* με ποσοστό 47% του *Fusarium proliferatum* με 36 % και του *Fusarium subglutinans* με 17 %. Ανάλογη ήταν και η διακλάδωση των 3 στελεχών στον νομό Καρδίτσας. Στους Ασπεργίλλους που απομονώθηκαν από τον νομό Θεσσαλίας υπήρξε γενετικός διαχωρισμός των μαύρων ασπεργίλλων με μικρές γενετικές αποστάσεις .

Στη Μακεδονία πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία χωρίς να διακρίνεται ιδιαίτερη παραλλακτικότητα σε σχέση με την Θεσσαλία, συνεχίζουν να επικρατούν τα είδη *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* καθώς και *Fusarium subglutinans*. Πιο συγκεκριμένα στον νομό Δράμας οι 50 απομονώσεις χωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες όπου *Fusarium verticillioides* με ποσοστό 50 % του *Fusarium proliferatum* με 35 % και του *Fusarium subglutinans* με 15 %. Τα 17 δείγματα που απομονώθηκαν από αγρούς του νομού Σερρών χωρίστηκαν μόνο σε δυο κατηγορίες σε *Fusarium verticillioides* με ποσοστό 70 % του *Fusarium proliferatum* με 30 %. Στον νομό Καβάλας τα 38 στελέχη διαχωρίστηκαν και πάλι σε 3 κατηγορίες όπου *Fusarium verticillioides* με ποσοστό 60 % του *Fusarium proliferatum* με 24 % και του *Fusarium subglutinans* με 16 %. Η μελέτη συγγένειας των ειδών που έγινε στον κάθε νομό με το γονίδιο αναφοράς του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης (EF) αποδείχτηκε ότι το *Fusarium proliferatum* με το *Fusarium subglutinans* ομαδοποιούνται μεταξύ τους και απέχουν από το *Fusarium verticillioides*. Τα είδη *Fusarium proliferatum* και *Fusarium verticillioides* είναι υπεύθυνα για τα υψηλά ποσοστά φουμονισίνων που βρεθήκαν, είναι υπεύθυνα για την παραγωγή πολλών άλλων μυκοτοξινών όπως ζεαραλενόνες, τριχοθηκίνες κ.α. Τέλος η μελέτη των μαύρων ασπεργίλλων δεν έδειξε πολύ μεγάλη γονιδιακή απόσταση μεταξύ τους, πράγμα αναμενόμενο αφού το *A. niger* με το *A. tubingensis* και *A. welwitschiae* είναι συγγενικά είδη. Στην Ελλάδα, όπως και σε πολλές άλλες χώρες έχουν γίνει πολλές μελέτες αναφορικά με την παραγωγή μυκοτοξινών από είδη του γένους *Aspergillus* που ανήκουν στο άθροισμα *Nigri*. Η κύρια μυκοτοξίνη που απασχολεί τους ερευνητές είναι η ωχρατοξίνη Α. Η διαφορά των αποτελεσμάτων μπορεί ως ένα βαθμό να αιτιολογηθεί από τη δυσκολία της ταυτοποίησης και την ομοιότητα των μορφολογικών χαρακτηριστικών ανάμεσα στα είδη *A. tubingensis* και *A. niger*. Πολλοί ερευνητές ταυτοποιούν τα είδη με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, πράγμα που ορισμένες φορές οδηγεί σε λανθασμένα αποτελέσματα χωρίς την επιβεβαίωσή τους από μια μοριακή μέθοδο. Επίσης, οι διαφορές στις μεθόδους και τεχνικές προετοιμασίας των

δειγμάτων (θεραπετικά υποστρώματα, θερμοκρασίες και συνθήκες ανάπτυξης μυκήτων) στο εργαστήριο μπορεί να συμβάλλουν στην καταγραφή διαφορετικών αποτελεσμάτων. Όσο αφορά το είδος *A. tubingensis* καταγράφηκε τρίτο σε συχνότητα σε παραγωγή ΟΤΑ παράγοντας χαμηλές συγκεντρώσεις της μυκοτοξίνης. Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν συγκριθήκαν με κατάλληλες αλληλουχίες αναφοράς από την βάση δεδομένων του NCBI.

Η καταγραφή της παραγωγής των μυκοτοξινών από τους μυκοτοξικογόνους μυκητες του γένους *Aspergillus* και *Fusarium* spp. από αγρούς της Ελλάδας δημιουργεί προβληματισμό λόγω των αρνητικών επιδράσεων που επιφέρουν στην υγεία και κυρίως λόγω της σύνδεσης τους με διάφορους καρκίνους που έχουν καταγράψει σε ανθρώπους και ζώα. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει ανώτατα όρια ανίχνευσης για της αφλατοξίνες και για της φουμονισίνες που στην παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι σε ορισμένες περιοχές έχουν υπερβεί τα όρια. Οι κλιματικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε αγρό μπορεί να διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό ακόμα και μέσα σε μια χώρα. Στην παρούσα εργασία κατεγράφησαν ακριβή μετεωρολογικά δεδομένα που όπως αποδείχθηκε αποτελούν ένα σημαντικό κριτήριο στην ανάλυση και αιτιολογία των αποτελεσμάτων. Το ίδιο έγινε και το 2014 σε προηγούμενη μελέτη που έγινε στους ίδιους πειραματικούς αγρούς. Η άμεση σύνδεση ορισμένων παραγόντων όπως οι μετεωρολογικές συνθήκες, με την ανάπτυξη των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και της παραγωγής μυκοτοξινών από αυτούς, υποδηλώνουν την σημαντικότητα της λεπτομερούς καταγραφής τους σε παρόμοιες μελλοντικές εργασίες. Η καλύτερη κατανόηση των παραπάνω παραγόντων, θα οδηγήσει στην αποτελεσματικότερη καταπολέμηση της ασθένειας και κατ' επέκταση στην μείωση του κινδύνου από μυκοτοξίνες.

Επίσης πρέπει να τονιστεί ότι η συγκομιδή καλαμποκιού από διάφορους αγρούς που παρουσιάζουν σημαντική διακύμανση προσβολών από μύκητες καθώς και επιμολύνσεις από μυκοτοξίνες μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της ανίχνευσης μυκοτοξινών κάτω από τα επιτρεπτά όρια λόγω ανάμιξης των σπόρων. Η ανίχνευση μυκήτων και μάλιστα μυκήτων ικανών να παράγουν μυκοτοξίνες σε αυτή την ομάδα τροφίμων υπογραμμίζει την αναγκαιότητα της αξιοποίησης, της υπάρχουσας γνώσης και τεχνολογίας με σκοπό το σχεδιασμό και την εφαρμογή, ολοκληρωμένων προγραμμάτων παραγωγής που θα διασφαλίζουν την ποιότητα του καλαμποκιού και θα προστατεύουν τους καταναλωτές από την έκθεση σε τοξικές ουσίες.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbas, H.K., Wilkinson, J.R., Zablotowics, R.M., Accinelli, C., Abel, C.A., Bruns, H.A., Weaver, Ma. 2009. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews* 28:142-153.
2. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3), 403-410.
3. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389–3402.
4. Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D.M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*. 80:189-201.
5. Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Schurz Rogers, H., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L.F., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Slutsker, L. and the Aflatoxin Investigative Group. 2005. Case control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environmental Health Perspectives*. 113,1779–1783.
6. Bennett, J.W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus* In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press, Japan. 1-18.
7. Bennett, J.W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16, 497–516.
8. Bennett, J.W., Lee, L.S. 1979. Mycotoxins-their biosynthesis in fungi: aflatoxins and other bisfuranoids. *J. Food Prot.* 10: 805-809.
9. Benson, D., 2008. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 36: 25-30.
10. Bilgrami, K.S., Ranjan, K.S., Sinha, A.K. 1992. Impact of crop damage on occurrence of *Aspergillus flavus* and aflatoxin in rainy-season maize (*Zea mays*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 62: 704–709.
11. Bordin, K., Rosim, R.E., Neeff, D.V., Rottinghaus, G.E., Oliveira, C.A.F. 2014. Assessment of dietary intake of fumonisin B1 in São Paulo, Brazil. *Food Chemistry* 155: 174-178
12. Bowden, R.L., Leslie, J.F. 1999. Sexual recombination in *Gibberella zeae*. *Phytopathology*. 89: 182-188.
13. Brennan, J.M., Fagan, B., Van Maanen, A., Cooke, B.M., Doohan, F.M. 2003. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 577–587.
14. Burgess, L.W., Summerell, B.A., Backhouse, D., Benyon, F., Levic, J. 1997. Biodiversity and population studies in *Fusarium*. *Sydowia* (Special issue March 30, 1997). 1-11.

15. Bullerman, L.B., Bianchini, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*. 119:140–146.
16. Bottalico, A., 1998. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxins profiles, in Europe. *J. Plant Pathol.* 80:85–103
17. Chulze, S.N., Etcheverry, M.G., Lecumberry, S.E., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M., Ramirez, M.L., Pascale, M., Rodriguez, M.I. 1999. Fumonisin production on irradiated corn kernels: effect of inoculum size. *Journal of Food Protection*. 62: 814-817.
18. Chulze, S.N., Ramírez, M.L., Torres, A., Leslie, J.F. 2000. Genetic variation in *Fusarium* Section *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 5312-5315.
19. Clements, M. J., Kleinschmidt, C. E., Maragos, C. M., Pataky, J. K., and White, D. G. 2003. Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of corn. *Plant Disease* 87: 147-153.
20. Covarelli, L., Stifano, S., Beccari, G., Raggi, L., Lattanzio, V.M.T., Albertini, E. 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology*. 31: 17-24
21. Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids*. 16:10881–10890.
22. Demain, A.L., and Fang, A. 2000. The natural functions of secondary metabolites, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 69: 1-39.
23. Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Gordon, T.R. 2000. *Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium subglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America. *Mycological Research*. 104: 865-872.
24. Dalcero, A., Torres, A., Etcheverry, M., Chulze, S., and Varsavsky, E. 1997. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. *Food Addit. Contam.* 14:11–14.
25. Doko, M.B., Rapior, S., Visconti, A., Schjoth, J.E. 1995. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 429-434.
26. Doohan, F.M., Parry, D.W., Jenkinson, P., Nicholson, P. 1998. The use of species-specific PCR-based assays to analyse *Fusarium* ear blight of wheat. *Plant Pathology*. 47: 197–205.
27. Dutton, M.F. 1988. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 52: 274-295.
28. D’Mello, J.P.F., Mac Donald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*. 69: 155–166.

29. D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., Mac Donald, A.M.C. 1999. *Fusarium* mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*. 80: 183–205.
30. Eaton, D.L., Groopman, J.D. 1994. *The Toxicology of Aflatoxins, Human Health Veterinary and Agricultural Significance*. Academic Press. 1-544.
31. European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA Journal*. 446: 1–127.
32. European Food Safety Authority (EFSA). 2011a. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal* 9, 2197:1-124.
33. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies. An approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4):783 -191
34. Food and Agriculture Organization (FAO). 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food and Nutrition Paper*. 81: 1728–3264.
35. Flores-Gallegos, A.C., Veana-Hernandez, F., Michel-Michel, M., Lara-Victoriano, F. and Rodríguez-Herrera R. 2016. Molecular Evolution of *Aspergillus*. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering Aspergillus System Properties and Applications*. 41-51.
36. Frisvad, J. C. 1995. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in storage. *Stored-grain ecosystems*. 251-288.
37. Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., and Thrane, U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(23): 9727-9732.
38. Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N.H.H., Simonsson, M. 2008. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for downstream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *J. Microbiol. Methods*. 73: 33–40.
39. Frobisch, R., Bradley, B., Wagner, D., Long-Bradley, P. and Hairston, H. 1986. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Prot.* 49: 781-785.
40. Geiser, D.M. 2003. Practical molecular taxonomy of fungi. In: Lange L and Tkacz J (eds) *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Medicine and Agriculture*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands.
41. Geiser, D.M., Juba, J.H., Wang, B. and Jeffers, S.N. 2001. *Fusarium hostae* sp nov., a relative of *F. redolens* with a *Gibberella* teleomorph. *Mycologia*. 93: 670–678

42. Geiser, D.M., Jimenez-Gasco, M.M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A., O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology. 110: 473–479.
43. Leslie, G.A., Logrieco, J.F., Lu, A., Lysøe G., Ma, E., McCormick, L., et al. 2013. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. Phytopathology. 103: 400-408.
44. Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R., Kriek, N.P.J. 1988. Fumonisin — Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Applied and Environmental Microbiology. 54: 1806–1811.
45. Gelderblom, W. C., Abel, S., Smuts, C. M., Marnewick, J., Marasas, W. F., Lemmer, E. R., Ramljak, D. 2001. Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: Mechanisms related to cancer initiation and promotion. Environmental Health Perspectives. 109: 291–300.
46. Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. and Samson, R.A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*, Studies in Mycology, 59: 1-10.
47. Gibson, L., Benson, G. 2002. Origin, History, and Uses of Corn (*Zea mays*) Iowa State University. University Press.
48. Goryacheva, I. Y., Saeger, S. D., Eremin, S. A., and Peteghem, C. V. 2007. Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening: A review. Food additives and contaminants. 24(10):1169-1183.
49. Gourama, H. and Bullerman, L.B.1995. *A.flavus* and *A.parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds. J. Food Prot. 58: 1395- 1404.
50. Herrman, J.L. and Walker, R. 2007. Risk analysis of mycotoxins by the joint FAO/WHO expert Committee on food additives (JECFA). Food Nutrition and Agriculture.
51. Horn, B.W. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: a review. Food Additives & Contaminants. 24:1088–1101.
52. Ichinoe, M., Kurata, H., Sugiura, Y., and Ueno, Y. 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. Appl. Environ. Microbiol. 46:1364–1369.
53. ILSI. International Life Science Institute. 2006. Maíz y Nutrición. Serie de Informes Especiales, Volumen II.
54. Jurgenson, J. E., Bowden, R. L., Zeller, K. A., Leslie, J. F., Alexander, N. J., and Plattner, R. D. 2002. A genetic map of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). Genetics 160:1452-1460.

55. Jurgenson, J. E., Zeller K. A., and Leslie J. F. 2002. Anexpanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). Applied and Environmental Microbiology. 68: 1972-1979.
56. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food WHO Food Additives Series 47. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>
57. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) .2008. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additives Series 59. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v59je01.pdf>
58. Kamphuis, H.J., Van der Horst, M.I., Samson, R.A., Rombouts, F.M., Notermans, S. 1992. Mycological condition of maize products. International Journal of Food Microbiology. 16: 237- 245.
59. Keller, S.E., Sullivan ,T.M., Chirtel, S. 1997. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 19: 305–309.
60. 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.
61. King, S. B., and Scott, G. E. 1981. Genotypic differences in maize (*Zea mays*) to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology 71: 1245-1247.
62. Klich, M.A., and Pitt, J.I. 1988. *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*, North Ryde, N.S.W.: CSIRO Division of Food Science and Technology. 1-116.
63. Klich, M.A. and Pitt J.I. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A.parasiticus* and other closely related species. T. Brit. Mycol. Soc. 91:99-108.
64. Klemsdal, S., Rahjoo, V., Zad, J., Nikkhah J., Gohari, M., Okhovvat, M., Bihmata, R., Razzaghian, J. 2008. Morphological and molecular indetification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. Journal of Plant Pathology. 90:463-468.
65. Kralj Cigić, I.,and Prosen, H. 2009. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. International Journal of Molecular Sciences, 10: 62-115.
66. Kurzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C.W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. J. Microb.53:147-158.
67. Larkin, M., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0 Bioinformatics Application Note. 23: 2947-48.
68. Leslie, J.F. 1995. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. Canadian Journal of Botany 73 (Suppl. 1): 282-291.

69. Leslie, J.F., Marasas, W.F., Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Stockenström, S., Thiel, P.G. 1986. Duckling toxicity and the production of fumonisin and moniliformin by isolates in the A and E mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). Applied and Environmental Microbiology. 62: 1182–1187.
70. Leslie, J.F., Zeller, K.A., Whole, M., Summerell, B.A. 2004. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. European Journal of Plant Pathology. 110: 611-618.
71. Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa.
72. Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F., Peterson, R.E., Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W. 1976b. Aflatoxin contamination, fluorescence, and insect damage in corn infected with *Aspergillus flavus* before harvest. Cereal Chemistry. 53: 505–512.
73. Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F., Homer, E.S. 1980. Aflatoxin contamination of preharvest corn: role of *Aspergillus flavus* inoculum and insect damage. Cereal Chemistry 57, 255–7.
74. Logrieco, A., Mule, 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.
75. Lopez-Garcia, R., Park, D.L., Phillips, T.D. 1999. Integrated mycotoxin management systems. Tunis, Tunisia: Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, <http://www.fao.org/docrep/x2100t/x2100t07.htm>.
76. Munkvold, G.P., 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. Eur. J. Plant Pathol. 109: 705–713.
77. Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Rabie, C.J., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. 1986. Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola*. Mycologia. 78: 242-247.
78. Martins, H. M., Marques, M., Almeida, I., Guerra, M., Bernardo, F. 2008b. Mycotoxins in feedstuffs in Portugal: an overview. Mycotoxin Research 24(1): 19-23.
79. Marín, S., Companys, E., Sanchis, V., Ramos, A.J. 1998a. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. Mycological Research. 120: 959–964
80. Melcion, D., Cahagnier, B., Bakan, B., and Richard-Molard, D. 1998. Influence of temperature on fumonisin B1 production on maize grain by *Fusarium proliferatum*. Sci. Aliment. 18:301–311.
81. Miller, J. D., R. Grennhalgh, Y. Wang, and M. Lu. 1991. Trichothecene chemo types of three *Fusarium* species. Mycologia. 83:121–130.

82. Miller, J. D. 1994. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals, p. 19–36. In J. D. Miller and H. L. Trenholm (ed.), *Mycotoxins in grain: compound other than aflatoxin*. Eagen Press, St. Paul, Minn.
83. Miller, J.D. 2000. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environmental Health Perspectives*. 109: 321–324.
84. Miller, J.D. 1994. Epidemiology of *Fusarium* diseases of cereals. In: Miller J.D., Trenholm H.L. (eds) *Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxins*. Eagon Press, St. Paul, MN, USA: 19-36.
85. Mirete, S., Patino, B., Vazquez, C., Jimenez, M., Hinojo, M.J., Soldevilla, C., Gonzalez Jaen, M.T. 2003. Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species, *International Journal of Food Microbiology*. 89: 213–221.
86. Mirete, S., Vazquez, M.G., Jurado, M., Gonzalez- Jaen, M.T. 2004. 138 Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1a sequence analyses, *European Journal of Plant Pathology*. 110: 515–523.
87. Mulè, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology*. 110 :495-502
88. Mullis, K.B., Falluna, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335 -350.
89. Muriuki, G.K., Siboe, G.M. 1995. Maize flour contaminated with toxigenic fungi and mycotoxins in Kenya. *African Journal of Health Sciences*. 2: 236–241.
90. Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M. 2006. Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science*. 71 (5): R51-R65.
91. Niessen, L., 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food Microbiol*. 119: 38–46.
92. O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C., Aoki, T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet. Biol*. 41: 600–623.
93. O'Donnell, K., 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0 : A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol*. 110: 473-479.
94. O' Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca* – *Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92: 919 - 938.
95. O'Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B. K. and 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.

96. O'Donnell, K., et al., 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex : detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 41: 61-78.
97. O'Donnell, K., Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetic Evolution*. 7: 103-116
98. O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90: 465-493.
99. O'Donnell, K., Sarver, B.A.J., Brandt, M., Chang, D.C., Noble-Wang, J., Park, B.J., Sutton, D.A., Benjamin, L., Lindsley, M., Padhye A., Geiser, D.M., Wardnd, T.J., Cigelnik, E. 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic Fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 2235-2248.
100. O'Donnell, K., Cigelnik, E., and Nirenberg, H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493.
101. O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T. and Cigelnik, E. 2000a. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 41: 61–78.
102. O'Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B.K. and Casper, H.H. 2000b. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 7905–7910.
103. Odiemah, M., Manninger, I. 1994. Inheritance of resistance to *Fusarium* ear rot in maize. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 17: 91–99.
104. Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small-grain cereals – a review. *Plant Pathology*. 44: 207–238.
105. Pitt, J.I. 1993. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *J. Food Prot.* 56:265-269.
106. Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, A. R. 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research*. 51: 61 – 99.
107. Proctor, R., Plattner, R.D., Brown, D.W., Seo, J.A., Lee, Y.W. 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycological Research*. 108: 815-822.
108. Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Hohn, T.M. 1999. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology*. 38: 237–249.

109. Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*. 78: 21–37
110. Pomeranz, Y., Bechter, D.B., Sauer, D.B., Seitz, L.M. 1990. *Fusarium* headblight (scab) in cereal grains. *Advances in Cereal Science and Technology*. 10: 373–433
111. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), 2012. Annual Reports 2012. European Commission http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/rasff_publications_en.htm.
112. Reid, L.M., Hamilton, R.I. 1996. Screening maize for resistance to *Gibberella* ear rot. *Agriculture and Agri-Food Canada Technical Bulletin* 1996-5E.
113. Ribeiro, S.A.L., Cavalcanti, M.A.Q., Fernandes, M.J.S., Lima, D.M.M. 2003. Filamentous fungi isolated from corn-derived products. *Rev. Brazilian Botany* 26: 223–229.
114. Richardson, K.E., Hagler, W.M., Mirocha, C.J., (1985). Production of zearalenone, a–zearalenol and b–zearalenol by *Fusarium spp.* in rice culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33: 862–866.
115. Roberts, A. T. , Cordier, J -L., Gram, L., Tompkin, B. R., Pitt, I . J., Gorris, M. L. G., Swanson, J. K. M. 2005. Cereals and cereal products In *Micro-Organisms in Foods* 6: 392-439.
116. Raper, K.B. and Fennell, D. 1965. The genus *Aspergillus*, MD: Williams and Wilkins. 1-686.
117. Robinson, R.K., Batt, C.A. and Patel, P.D. 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, , pp. 1-2372.
118. Ryu, J. C., Yang, J. S., Song, Y. S., Kwon, O. S., Park, J., and Chang, I.M. 1996. Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 with gas chromatography/mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 13:333–341.
119. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor – Joining method, a new method for reconstructing Phylogenetic trees. *Molecular and Biology Evolution*. 16: 218 -233.
120. Samson, A. R., Hong, S–B., Frisvad, C. J., 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus* *Medical Mycology* 2006. 44: 133-148.
121. Scott, P. M. 1995. Mycotoxin methodology. *Food Additives & Contaminants*. 12: 395-403
122. Scott, P. M. 2012. Recent research on fumonisins: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29:242-248
123. Schütt, F. 2001. Moniliformin production of *Fusarium* species under defined conditions. Ph.D. Thesis, Technical University of Berlin. Germany: 135-137.
124. Sekiyama, B.L., Alessandra Braga Ribeiro, A.B., Paulo André Machinski, P.A., Miguel Machinski Junior, M. 2005. Aflatoxins, Ochratoxin, A and Zearalenone in maize – basec food products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36: 289-294.

- 125.Sharma, R. 2012. Pathogenecity of *Aspergillus niger* in plants. Cibtech journal of microbiology. 1: 47-51.
- 126.Snyder, W.C. and Hansen, H.N. 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. American Journal of Botany. 32: 657–666.
- 127.Srobarova, A., Moretti, A., Ferracane, R., Ritieni, A., Logerico, A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species of *Liseola* section in pre-harvest ear rot, and associated mycotoxins in Slovakia. European Journal of Plant Pathology. 108: 299-306.
- 128.Summerell, B.A., Salleh, B. and Leslie, J.F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Disease. 87: 117–128.
- 129.Susca, A., Stea, G., Mulè, G., and Perrone, G. 2007. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. Food Additives and Contaminants. 24:1154-1160.
- 130.Sutton, J.C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology, 4: 195–209
- 131.Szécsi ,A., Bartok T. 1995. Trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* from corn in Hungary. Mycotoxin Research. 11: 85–92
- 132.Sweeney, M. J., and Dobson A. D. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. International journal of food microbiology, 43: 141-158.
- 133.Tendulkar, S., Gupra, A., Chattoo, B., 2003. A simple protocol for isolation of fungal DNA. Biotechnology Letters. 25 :1941-1944.
- 134.Tekauz, A., McCallum, B., Gilbert, J. 2000. Review: *Fusarium* head blight of barley in western Canada. Canadian Journal of Plant Pathology. 22: 9–16
- 135.Torres, A.M., Reynoso, M.M., Rojo, F.G., Ramirez, M.L., Chilze, S.N. 2001. *Fusarium* species (section *Liseola*) and its mycotoxins in maize harvested in northern Argentina. Food additives and Contaminants. 18: 836–843
- 136.Turner, N. W., Subrahmanyam, S., and Piletsky, S. A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. Analytica chimica acta. 632: 168-180.
- 137.Varga, J., Zsuzsanna Hamari, B. T., and József Téren, J. 2000. Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. 397.
- 138.Varga, J., Juhász, Á., Kevei, F., and Kozakiewicz, Z. 2004. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. European Journal of Plant Pathology. 110: 627-640.

- 139.Varga, E., Wiesenberger, G., Hametner, C., Ward, T. J., Dong, Y., Schöfbeck, D., and Krska, R. 2015. New tricks of an old enemy: isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. *Environmental microbiology*. 17: 2588-2600.
- 140.Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*. 69: 57–80.
- 141.Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2000. The effect of fungal competition on colonisation of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology*. 59: 59–66.
- 142.Vigier, B., Reid, L.M., Seifert, K.A., Stewart, D.W., Hamilton, R.I. 1997. Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 19: 60–65.
- 143.Yoshizawa, T., Yamashita, A., and Luo, Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 1626-1629.

Ελληνική βιβλιογραφία

1. Γεωργιάδη, Μ. 2009. Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών σε κελυφωτά φυστίκια. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
2. Γιαννάκης, Ι. 1998. Μυκοτοξίνες στα τρόφιμα – Κίνδυνοι και Τρόποι Αντιμετώπισης, Υγιεινή και Ασφάλεια Τροφίμων. 8:13-18.
3. Δαλιάνης, Κ. 1983. *Ανοιξιότικα Σιτηρά*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη. 15-234.
4. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 «για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες, οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα».
5. Καραμάνος, Α. 1999. Τα σιτηρά των θερμών κλιμάτων: Αραβόσιτος, σόργο, ρύζι, κεχρί. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Παπαζήση. 21-197.
6. Παπακώστα-Τασοπούλου, Δ. 2008. *Ειδική Γεωργία Ι - Τεύχος Α Σιτηρά Χειμερινά-Εαρινά*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία. 183-274.
7. Τζαμος, Ε., 2007. Γενική Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα – Πειραιάς.