



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διδακτορική διατριβή**

Σύγχρονες μέθοδοι ολοκληρωμένης διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού



**Μιχαήλ Δ. Καμινιάρης**

Επιβλέπων Καθηγητής:

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Γεώργιος Καραογλανίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Α.Π.Θ.

**ΑΘΗΝΑ**

**2021**

Πηγή φωτογραφίας εξωφύλλου: <https://www.pngegg.com/en/png-hbvci>

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διδακτορική διατριβή**

Σύγχρονες μέθοδοι ολοκληρωμένης διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια  
του κελυφωτού φιστικιού

“Modern methods of integrated management of aflatoxins in pistachio nuts  
cultivation”

**Μιχαήλ Δ. Καμινιάρης**

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)

Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Γεώργιος Καραογλανίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Α.Π.Θ.

Ουρανία Μενκίσογλου, Καθηγήτρια Α.Π.Θ.

Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ελισάβετ Χατζηβασιλείου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

## Σύγχρονες μέθοδοι ολοκληρωμένης διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

### Περίληψη

Οι αφλατοξίνες (B1, B2, G1, G2) είναι μία κατηγορία μυκοτοξινών οι οποίες παράγονται κυρίως ως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων *Apergillus section Flavi*. Οι μύκητες αυτοί εντοπίζονται στη φύση ως σαπροφυτικοί αλλά και ως παρασιτικοί, ως εκ τούτου ανιχνεύονται σε μεγάλο εύρος φυτικών και ζωικών προϊόντων, τόσο προσυλλεκτικά όσο και μετασυλλεκτικά. Έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε πληθώρα υποστρωμάτων και η διαχείρισή τους δεν αποτελεί απλό διακύβευμα λόγω της σταθερότητάς τους. Παρουσιάζουν έντονη καρκινογόνο, μεταλλαξιογόνο, γονοτοξική, και τερατογόνο δράση προκαλώντας χρόνια ή οξεία τοξικότητα στον άνθρωπο και τα θηλαστικά.

Τα κελυφωτά φιστίκια, που θεωρούνται ένας από τους πιο εύγευστους και διατροφικά άριστους ξηρούς καρπούς, μολύνονται συχνά από τοξικογόνα στελέχη *Aspergillus section Flavi* τα οποία παράγουν αφλατοξίνες. Η μόλυνση από αφλατοξίνες αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αιτίες ποιοτικής και ποσοτικής υποβάθμισης των κελυφωτών φιστικιών παγκοσμίως. Κατά συνέπεια, στην Ευρώπη η ισχύουσα νομοθεσία έχει ορίσει ως ανώτατο επιτρεπτό όριο τα 12 μg/kg αφλατοξίνης B1 και τα 15 μg/kg για το σύνολο των αφλατοξινών στα κελυφωτά φιστίκια που υφίστανται φυσική επεξεργασία και προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε αρχικά, διερεύνηση για την εύρεση κατάλληλων μη τοξικογόνων απομονώσεων *A. flavus*, ενδημικών επιφυτικών ζυμών και βακτηρίων, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες διαχείρισης των αφλατοξινών στην καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών. Απομονώθηκαν 1010 στελέχη μυκήτων *Apergillus section Flavi* από καρπούς φιστικιών από 40 φιστικεώνες στην Αίγινα και στην Φθιώτιδα κατά το διάστημα 2014-2017. Μελετήθηκε η τοξικογόνος ικανότητά τους και η πληθυσμιακή διακύμανση των τοξικογόνων απομονώσεων, η οποία κυμάνθηκε από 42% ως 89% αναλόγως του έτους και της περιοχής. Επιπρόσθετα, 204 απομονώσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (VCGs) με σκοπό την εύρεση κατάλληλων, γενετικά σταθερών, μη τοξικογόνων απομονώσεων για τη βιολογική διαχείριση των αφλατοξινών. Εντοπίστηκαν συνολικά 56 διακριτές ομάδες στην Ελλάδα, και η επικρατέστερη μη τοξικογόνος ομάδα μεταξύ αυτών, είναι ενδημική και στην Ιταλία και σε αυτήν ανήκει και ο μύκητας που περιέχεται στο AF-X1<sup>®</sup>, ένα ήδη εγκεκριμένο βιολογικό σκεύασμα στην Ιταλία για τη διαχείριση των αφλατοξινών στην καλλιέργεια του αραβοσίτου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* και *in situ* πειράματα για την εύρεση μη τοξικογόνων απομονώσεων με ικανότητα να παρεμποδίζουν την ικανότητα παραγωγής αφλατοξινών τοξικογόνων στελεχών, από όπου προέκυψαν απομονώσεις

με ικανότητα 100% παρεμπόδισης. Τέλος, έγινε επιλογή δύο κατάλληλων απομονώσεων οι οποίες εφαρμόστηκαν σε πειράματα μικρής κλίμακας αγρού σε φιστικεόνες στην Αίγινα κατά τη διετία 2017-2018. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως η παρεμπόδιση στη παραγωγή αφλατοξινών κυμάνθηκε από 76,7% έως 99,9%.

Επιπλέον, απομονώθηκαν 292 ενδημικές επιφυτικές απομονώσεις ζυμών και 629 βακτηριακές απομονώσεις (με τις 161 να αξιολογούνται περαιτέρω), από καρπούς κελυφωτού φιστικιού από αγρούς στην Αίγινα (2014-2015) και αξιολογήθηκε η ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και την *in vitro* παραγωγή αφλατοξινών. Οι πιο αποτελεσματικότερες απομονώσεις αξιολογήθηκαν σε *in situ* πειράματα και βρέθηκε ότι 7 απομονώσεις ζυμών και 1 βακτηριακή απομόνωση μπορούσαν να παρεμποδίσουν πλήρως την παραγωγή αφλατοξινών. Ακολούθησε μελέτη της επίδρασης των 7 αποτελεσματικών απομονώσεων ζυμών στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR*, που αποτελεί θετικό ρυθμιστή στη βιοσύνθεση των αφλατοξινών του *A. flavus* και παρατηρήθηκε πιθανή θετική συσχέτιση της εφαρμογής των ζυμών με την έκφραση του *AflR*. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ευαισθησία των αποτελεσματικών ζυμών σε χημικά μυκητοκτόνα σκευάσματα (Octave<sup>®</sup>, Geoxe<sup>®</sup>, Chorus<sup>®</sup>, Scala<sup>®</sup>, Fungazil<sup>®</sup>, Opera New<sup>®</sup>). Σχεδόν όλες οι ζύμες έδειξαν να είναι πολύ ευαίσθητες στα χημικά σκευάσματα που ελέγχθηκαν. Τέλος, επιλέχθηκαν δύο απομονώσεις ζυμών και μία βακτηριακή απομόνωση και αξιολογήθηκαν σε πειράματα μικρής κλίμακας αγρού σε 3 φιστικεόνες στην Αίγινα το 2017 και το 2018, ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών, με τα αποτελέσματα να υποδεικνύουν μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών ως και 100%.

Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η *in vitro* επίδραση 20 μυκητοκτόνων δραστικών ουσιών διαφόρων χημικών ομάδων (SDHIs, QoIs, ανιλοπυριμιδινών, DMIs, τριαζολών, ιμιδαζολών, φαινυλοπυρρολικών, γουανιδινών, δικαρβοξιμιδικών, χλωρονιτρικών, βενζιμιδαζολικών, διθειοκαρβαμικών και δίνιτρο-ανιλινών) ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης την μυκηλιακής ανάπτυξης 10 ισχυρά τοξικογόνων ενδημικών στελεχών *A. flavus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δραστικές ουσίες pyrimethanil, cyprodinil, fludioxonil, prochloraz και imazalil ήταν αποτελεσματικές. Ακολούθησε αξιολόγηση 23 εμπορικών χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων ως προς την *in situ* ικανότητα μείωσης των παραγόμενων αφλατοξινών. Η παρεμπόδιση στην παραγωγή από ορισμένα σκευάσματα αφλατοξινών έφτασε το 100%. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση 3 εμπορικών σκευασμάτων εκ των πιο αποτελεσματικών (Switch<sup>®</sup>, Octave<sup>®</sup> και Scala<sup>®</sup>), σε 3 φιστικεόνες στην Αίγινα, κατά των παραγόμενων αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus* σε σειρά δύο ετών (2017 και 2018), όπου ξανά η παρεμπόδιση έφθασε το 100%.

Ακολούθως, αναπτύχθηκε ένα μηχανιστικό μοντέλο (AFLA-pistachio) με βάση τα μετεωρολογικά δεδομένα και τις προγενέστερες μολύνσεις από αφλατοξίνες σε φιστικεόνες, προκειμένου να προβλεφθεί η ανάπτυξη του *Aspergillus flavus* και η μόλυνση των φιστικιών με αφλατοξίνη B1 σε προσυλλεκτικό επίπεδο. Το μοντέλο βασίστηκε στο μοντέλο AFLA-maize, που έχει δημιουργηθεί αντίστοιχα για την καλλιέργεια του αραβοσίτου, και η εσωτερική βαθμονόμηση

έδειξε ότι το 72,1% των προβλέψεων ήταν σωστές. Στην εξωτερική βαθμονόμηση, το 95,6% των δειγμάτων προβλέφθηκαν σωστά από το μοντέλο.

Τέλος, αναπτύχθηκε ένας ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης B1 σε κελυφωτά φιστίκια, με ακινητοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων αφλατοξίνης B1 σε εκτυπωμένα ηλεκτρόδια χρυσού με χρήση τεχνολογίας σύνθετης εμπέδησης. Το όριο ανίχνευσης αφλατοξίνης B1 για πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα φιστικιού ήταν 0,5 ng/mL και 1 ng/mL, αντίστοιχα. Ο ανοσοαισθητήρας μπόρεσε να προσδιορίσει επιτυχώς τις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 στο εύρος 4,56-50,86 ng/mL σε δείγματα φιστικιών. Η χρωματογραφική ανάλυση που ακολούθησε, αποκάλυψε ότι τα ανώτατα όρια ανίχνευσης του ανοσοαισθητήρα ήταν σε συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 χαμηλότερες από 345 ng/mL. Μελέτες εκλεκτικότητας έναντι της ωχρατοξίνης A και της αφλατοξίνης M1 έδειξαν ότι ο προτεινόμενος ανοσοαισθητήρας για την ανίχνευση της αφλατοξίνης B1, μπόρεσε να κάνει διάκριση μεταξύ των διαφόρων μυκοτοξινών που παράγονται από μύκητες του γένους *Aspergillus*.

Συμπερασματικά, οι προαναφερθείσες ερευνητικές ενότητες αποτελούν μία υποσχόμενη πρόταση ενός σύγχρονου ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης αφλατοξινών στη καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού.

**Επιστημονική περιοχή:** Διαχείριση μυκοτοξινών

**Λέξεις κλειδιά:** Κελυφωτά φιστίκια, Αφλατοξίνες, Βιολογική αντιμετώπιση, Χημική καταπολέμηση, Μοντέλο πρόβλεψης, Βιοαισθητήρας, Ζύμες, Βακτήρια, Μη-τοξικογόνος

## Modern methods of integrated management of aflatoxins in pistachio nuts cultivation

Faculty of Crop Science

Laboratory of Plant Pathology

### Abstract

Aflatoxins (B1, B2, G1, G2) are mycotoxins mainly produced as products of the secondary metabolism of *Apergillus* section *Flavi* fungi. These fungi are found in nature as saprophytes, as well as parasites, therefore they are detected in a wide range of plant and animal products both at pre-harvest and post-harvest level. They have the ability to colonize a variety of substrates and their management is not a simple issue, due to their stability. They have a strong carcinogenic, mutagenic, genotoxic, and teratogenic effect, causing chronic or acute toxicity to humans and mammals.

Pistachios, that are considered to be one of the most delicious and nutritious nuts, are often contaminated by toxigenic *Aspergillus* section *Flavi* strains, which produce aflatoxins. Aflatoxin contamination is one of the most important causes of qualitative and quantitative degradation of pistachios around the world. Consequently, in Europe the current legislation has set a maximum limit of 12 µg/kg of aflatoxin B1 and 15 µg/kg of total aflatoxins in pistachio nuts that are destined to be subjected to physical processing before human consumption.

In the current study, an investigation was conducted aiming to find suitable endemic non-toxicogenic *A. flavus* isolates, epiphytic yeasts and bacteria, in order to be used as biocontrol agents for aflatoxin contamination management in pistachio nuts cultivation. Initially, 1010 *Apergillus* section *Flavi* strains were isolated from pistachio fruits from 40 pistachio orchards in Aegina Island and Fthiotida during the period 2014-2017. Their toxigenic ability and the population variation of the toxigenic isolates were studied, with the percentage of toxigenic strains varying between 42% and 89%, depending on the year and the region. Additionally, 204 isolates were subjected to Vegetative Compatibility Groups analysis (VCGs) in order to find genetically stable non-toxicogenic isolates, suitable to serve as biological agents against aflatoxin contamination. A total of 56 distinct VCGs were identified in Greece, with the main non-toxicogenic group being endemic also in Italy. This group contains the fungus used as active ingredient in AF-X1<sup>®</sup>, an already commercially launched biocontrol agent in Italy against aflatoxin contamination of maize. *In vitro* and *in situ* experiments were performed aiming to find non-toxicogenic isolates able to reduce aflatoxin production, resulting in finding isolates with 100% inhibition ability. Finally, two isolates were selected for application in small-scale field experiments in pistachio orchards in Aegina Island, during the two-year period 2017-2018. The results indicated that the inhibition of aflatoxin production ranged from 76,7% to 99,9%.

Moreover, 292 endemic epiphytic yeasts and 629 bacterial strains (with 161 being further evaluated) were isolated from pistachio orchards in Aegina Island during the period 2014-2015,

and their ability to inhibit the growth and *in vitro* aflatoxin production was assessed. The most effective isolates were also evaluated in *in situ* experiments, where 7 yeast isolates and 1 bacterial strain were found to be able to completely inhibit aflatoxin production. This was followed by a study of the effect of the 7 yeast isolates on the expression of the transcriptional factor *AflR*, which is a positive regulator of aflatoxin biosynthesis of *A. flavus*, with results indicating a possible positive correlation of yeasts' applications and the expression of *AflR*. Moreover, the sensitivity of the 7 effective yeasts to chemical fungicides (Octave<sup>®</sup>, Geoxe<sup>®</sup>, Chorus<sup>®</sup>, Scala<sup>®</sup>, Fungazil<sup>®</sup>, Opera New<sup>®</sup>) was assessed. Almost all yeasts appeared to be very sensitive to the chemicals applied. Finally, two yeast isolates and one bacterial isolate were selected for application in small-scale field experiments in 3 pistachio orchards in Aegina during 2017 and 2018 and evaluation regarding their ability to inhibit aflatoxin production, with results indicating a 100% reduction of aflatoxin production.

Additionally, 20 chemical active substances of different chemical groups (SDHIs, QoIs, anilopyrimidines, DMIs, triazoles, imidazoles, phenylpyrrole, guanidines, dicarboximides, chloronitriles, benzimidazoles, dithiocarbamates and dinitro-anilines) were investigated, regarding their ability to inhibit the *in vitro* mycelial growth of 10 highly toxigenic *A. flavus* endemic strains. Pyrimethanil, cyprodinil, fludioxonil, prochloraz and imazalil were the most effective active substances. This was followed by the evaluation of 23 commercial fungicides regarding their ability to reduce *in situ* aflatoxin production. The inhibition of aflatoxin production by certain fungicides reached 100%. Finally, the 3 most effective commercial products (Switch<sup>®</sup>, Octave<sup>®</sup> and Scala<sup>®</sup>) were evaluated in 3 pistachio orchards in Aegina, against aflatoxin production during a two-year period (2017 and 2018), where again the inhibition reached 100%.

Afterwards, a mechanistic model (AFLA-pistachio) was developed in order to predict aflatoxin contamination of pistachio nuts, based on meteorological data and previous aflatoxin contamination data at pre-harvest level. The model was based on the AFLA-maize model, which was created for maize cultivation. The internal calibration of AFLA-pistachio showed that 72,1% of the predictions were correct. In the external calibration, 95,6% of the samples were correctly predicted by the model.

Finally, an electrochemical immunosensor was developed for the detection of aflatoxin B1 in pistachio nuts, by immobilizing aflatoxin B1 monoclonal antibodies on printed gold electrodes. Impedance was used to quantify aflatoxin B1. The limit of aflatoxin B1 detection for standard solutions and pistachio samples was 0,5 ng/mL and 1 ng/mL, respectively. The immunosensor was able to successfully determine aflatoxin B1 concentrations in the range 4,56-50,86 ng/mL in pistachio samples. Subsequent chromatographic analysis revealed that the immunosensor's upper detection limit was 345 ng/mL of aflatoxin B1. Studies of selectivity for ochratoxin A and aflatoxin M1 indicated that the proposed immunosensor for the detection of aflatoxin B1 was able to differentiate between other mycotoxins produced by fungi of *Aspergillus* genus.

In conclusion, the aforementioned research constitutes a promising proposal for a modern integrated system for aflatoxin management in pistachio nut cultivation.

**Scientific area:** Mycotoxin control

**Keywords:** Pistachios, Aflatoxins, Biological control, Chemical control, Predictive model, Biosensor, Yeasts, Bacteria, Non-toxicogenic



*Στην Μυρτώ, τον Δημήτρη και τον Όθωνα*

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη εστιάζεται στην προσπάθεια αντιμετώπισης του προβλήματος της μόλυνσης των κελυφωτών φιστικιών από αφλατοξίνες. Τα φιστίκια αποτελούν μία παιδική μου ανάμνηση με έντονη γεύση, άρωμα καθώς και χρώμα, και η μελέτη αυτή, υπήρξε για εμένα μία διδακτική και εκπαιδευτική εμπειρία αναζήτησης με σημαντικό ρόλο διαμόρφωσης διερευνητικής νοοτροπίας και κριτικής σκέψης. Η ολοκλήρωσή της αποτελεί επιστέγασμα προσπαθειών, ευχάριστου κόπου και απαντήσεων σε διαρκή ερωτήματα.

Το εργαστηριακό μέρος πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και στο “Department of Sustainable Crop Production” (DI.PRO.VE.S.), του Πανεπιστημίου Università Cattolica del Sacro Cuore, στο παράρτημα της πόλης Piacenza. Τα πειράματα αγρού πραγματοποιήθηκαν σε φιστικεώνες στην Αίγινα και στην ευρύτερη περιοχή της Φθιώτιδας. Η συγγραφή ολοκληρώθηκε στο ησυχαστήριό μου, την Αίγινα, σε πρωτόγνωρες για την εποχή μας συνθήκες, κατά τη διάρκεια της πανδημίας από την νόσο Covid-19.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Γ.Π.Α. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη, για την αμέριστη και αδιάκοπη υποστήριξή του, τις σημαντικότερες συμβουλές και τις υποδείξεις του, αλλά και την ασίγη επιθυμία μεταφοράς της γνώσης και της εμπειρίας του, καθ’ όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της μελέτης, αλλά και κατά τη συγγραφή του κειμένου με σκοπό την αρτιότερη απόδοση των πεπραγμένων. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Γ.Π.Α., Καθηγητή Επαμεινώνδα Παπλωματά, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Α.Π.Θ., Γεώργιο Καραογλανίδη, και την εκλιπούσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α., Πολύμνια Αντωνίου, για την πολύτιμη υποστήριξη, βοήθεια και πλαισίωση, από τη θέση της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της διατριβής μου.

Ιδιαίτερα θερμά ευχαριστώ επίσης την οικογένειά μου, τον πατέρα μου Δημήτριο Καμινιάρη, την εκλιπούσα μητέρα μου Μυρτώ-Αλεξάνδρα Δημακοπούλου-Κοντοσταύλου και τον αδελφό μου Όθωνα-Αλέξανδρο Καμινιάρη-Κοντόσταυλο για τη διαρκή, αμερόληπτη και με αγάπη υποστήριξή τους, αλλά και την κατανόησή τους και τη συμπαράστασή τους. Δίχως τη συνεισφορά τους, η εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής θα ήταν αδύνατη. Ευχαριστώ επίσης θερμά τη θεία μου Χαρίκλεια Δημακοπούλου, τους εκλιπόντες παππούδες μου Γεώργιο και Ειρήνη Δημακοπούλου, αλλά και τον αδελφικό μου φίλο Δημήτριο Δρακόπουλο. Ευχαριστώ ιδιαίτερος ακόμη την Άννα Δούκα, για την αμέριστη κατανόηση, στήριξη και υπομονή της, κατά τη μακρά και απαιτητική διάρκεια της περιόδου συγγραφής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις προπτυχιακές φοιτήτριες, Μαρία Βαρβέρη, Ράνια Ραφτοπούλου και Ιωάννα Δανέλη, καθώς και τις ερευνήτριες Μαρία Γεωργιάδου και Σοφία Μαυρικού για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα θερμά, όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Γ.Π.Α., τους υποψήφιους διδάκτορες και τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές για την άριστη ερευνητική και πανεπιστημιακή συμβίωση όλα αυτά τα χρόνια. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον φίλο Αλέξανδρο Τσιαμαντά για την βοήθειά του στις εφαρμογές των πειραμάτων αγρού στην Αίγινα.

Δεν θα μπορούσα φυσικά να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερος την Καθηγήτρια Paola Battilani, που με δέχθηκε στο Εργαστήριό της, αναλαμβάνοντας ρόλο «δεύτερου επιβλέποντος» για το διάστημα της παραμονής μου στην Ιταλία, αλλά και τους συνεργάτες και πλέον φίλους μου, τον ερευνητή Marco Camardo Leggieri και την τότε υποψήφια διδάκτορα Roberta Palumbo, που συνέβαλαν στο να γίνει η παραμονή μου μία ανεξίτηλη εμπειρία ζωής.

Καταλυτικό ρόλο στην διεκπεραίωση της μελέτης διαδραμάτισε η σημαντική συνεισφορά παραγωγών που με βοήθησαν, παραχωρώντας μου τους φιστικεώνες τους για εφαρμογές και δειγματοληψίες αλλά και καταστρώνοντας μαζί μου το πλάνο υλοποίησης με γνώμονα την βέλτιστη επιλογή φιστικεώνων στο νησί της Αίγινας, και τους ευχαριστώ πραγματικά θερμά. Πιο συγκεκριμένα, ευχαριστώ τους Δημήτρη Κλώνο, Ελένη Κάππου, Νίκο Αλυφαντή, Αννέτα Χιτζανίδου, Βερόνικα Λάππα, Κώστα Πέππα, Βαγγέλη Κάππο, Τάσο Πανταζή, Αθανασία Χατζηπέρη, Henry-Paul Coulon, Χριστίνα και Θεοδώρα Καραπάνου και τον πατέρα Νικόλαο. Θερμές ευχαριστίες εκφράζω επίσης στους Νίκο και Μαρία Κουνάδη του Αγροτικού Συνεταιρισμού Φιστικοπαραγωγών Αίγινας για τη βοήθειά τους στη παροχή δεδομένων μολύνσεως φιστικιών από αφλατοξίνες, κατά την ανάπτυξη του μοντέλου πρόβλεψης. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την φίλη Μαίρη Κουκούλη, πρόεδρο της Οργανωτικής Επιτροπής της Γιορτής Φιστικιού Αίγινας το 2014 (Aegina Fistici Fest), και νυν πρόεδρο της Κοινοφελούς Επιχείρησης του Δήμου Αίγινας (ΚΕΔΑ), για την εμπιστοσύνη και τιμή να μιλήσω στο πλαίσιο της εκδήλωσης για το πρόβλημα των αφλατοξινών στο νησί και τους τρόπους αντιμετώπισής του.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς το Κοινοφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης και το Κληροδότημα Παν. Τριανταφυλλίδη για τις υποτροφίες που μου χορήγησαν, το πρόγραμμα Erasmus+ για τη χρηματοδότηση που μου χορήγησε για τη μετακίνησή μου στην Ιταλία, και την Περιφέρεια Αττικής και την Περιφέρεια Φθιώτιδας για τη κάλυψη του κόστους αμοιβών, μετακινήσεων, αναλωσίμων και αντιδραστηρίων, μέσω προγραμμάτων χρηματοδότησης έρευνας με επιστημονικό υπεύθυνο τον επιβλέποντα μου.

#### **Εργασίες που δημοσιεύθηκαν στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής:**

- Kaminiaris, M.; Tsitsigiannis, D. Pre-harvest management strategies to control aflatoxin contamination in crops. In *Aflatoxins: Biochemistry, Toxicology, Public Health, Policies and Modern Methods of Analysis*; Kintzios, S., Mavrikou, S., Eds.; Analytical Chemistry and Microchemistry; Nova Science Publishers Inc.: New York, NY, USA, 2020.
- Kaminiaris, M. D.; Camardo Leggieri, M.; Tsitsigiannis, D. I.; Battilani, P. AFLA-PISTACHIO: Development of a Mechanistic Model to Predict the Aflatoxin Contamination of Pistachio Nuts. *Toxins* 2020, 12(7), 445. <https://doi.org/10.3390/toxins12070445>
- Kaminiaris, M. D.; Mavrikou, S.; Georgiadou, M.; Paivana, G.; Tsitsigiannis, D. I.; Kintzios, S. An Impedance Based Electrochemical Immunosensor for Aflatoxin B<sub>1</sub> Monitoring in Pistachio Matrices. *Chemosensors* 2020, 8(4), 121. <https://doi.org/10.3390/chemosensors8040121>

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το Γ.Π.Α. και διασταυρώθηκε εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμών του συγγραφέως.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1. Καλλιέργεια κελυφωτών φιστικιών .....	1
1.1.2. Οικονομικά στοιχεία παραγωγής φιστικιών .....	2
1.1.3. Σύσταση και διατροφική αξία φιστικιών .....	4
1.1.4. Βοτανική ταξινόμηση .....	5
1.1.5. Η καλλιέργεια της φιστικιάς .....	8
1.1.6. Συγκομιδή, επεξεργασία και αποθήκευση των φιστικιών .....	10
1.1.7. Εχθροί και ασθένειες της φιστικιάς .....	11
1.1.7.1. Εχθροί της φιστικιάς .....	11
1.1.7.2. Ασθένειες της φιστικιάς .....	14
1.1.7.3. Προσβολή από τους μύκητες του γένους <i>Aspergillus</i> , παραγωγή και διαχείριση αφλατοξινών .....	19
1.1.7.4. Βιολογικός κύκλος και επιδημιολογία του <i>Aspergillus flavus</i> .....	21
1.1.7.5. Βιοσύνθεση αφλατοξινών .....	24
ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	26
Κεφάλαιο 2: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΗ ΤΟΞΙΚΟΓΟΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>A. FLAVUS</i> .....	27
2.1. Περίληψη .....	27
2.2. Εισαγωγή .....	28
2.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας .....	31
2.4. Μεθοδολογία .....	32
2.4.1. Θρεπτικά υλικά .....	32
2.4.2. Μέθοδοι .....	35
2.4.2.1. Δημιουργία συλλογής απομονώσεων <i>Aspergillus section Flavi</i> .....	35
2.4.2.2. Ποσοτικός έλεγχος αφλατοξινών σε φιστικεώνες του Ν. Φθιώτιδας .....	37
2.4.2.3. Διερεύνηση της τοξικογόνου ικανότητας των απομονώσεων <i>Aspergillus section Flavi</i> .....	38
2.4.2.4. Διερεύνηση της <i>in vitro</i> επίδρασης των μη τοξικογόνων απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	39
2.4.2.4.1. Συγκαλλιέργεια τοξικογόνων και μη τοξικογόνων στελεχών <i>A. flavus</i> .....	39
2.4.2.4.2. Εξαγωγή αφλατοξινών και χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος .....	40
2.4.2.5. Διερεύνηση της <i>in situ</i> επίδρασης μη τοξικογόνων στελεχών στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>A. flavus</i> .....	40
2.4.2.6. Ομαδοποίηση απομονώσεων του μύκητα σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups) .....	41
2.4.2.6.1. Ετεροκαρύωση και βιολογική σημασία .....	41

2.4.2.6.2. Ρόλος των μεταλλαγών <i>Nit<sup>-</sup></i> στην κατάταξη σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (VCGs).....	42
2.4.2.6.3. Μεταλλαξιγένεση <i>A. flavus</i> και επιλογή μεταλλαγμένων στελεχών ( <i>Nit<sup>-</sup> mutants</i> ) .....	43
2.4.2.6.4. Δοκιμές συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγμένων στελεχών <i>Nit<sup>-</sup></i> και ομαδοποίηση στελεχών <i>A. flavus</i> σε VCGs .....	46
2.4.2.7. Πειράματα αγρού για την διερεύνηση της ικανότητας παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών από μη τοξικογόνες απομονώσεις <i>A. flavus</i> .....	48
2.4.2.8. Συλλογή μετεωρολογικών δεδομένων των περιοχών Μακρακώμης και Λαμίας .....	49
2.5. Αποτελέσματα.....	50
2.5.1. Ποσοτικός έλεγχος αφλατοξινών σε φιστικεάνες του Ν. Φθιώτιδας .....	50
2.5.2. Αξιολόγηση της τοξικογόνου ικανότητας απομονώσεων <i>Aspergillus section Flavi</i> .....	51
2.5.3. Αξιολόγηση της <i>in vitro</i> επίδρασης των μη τοξικογόνων απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	53
2.5.4. Αξιολόγηση της <i>in situ</i> επίδρασης των μη τοξικογόνων απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	54
2.5.5. Δημιουργία ομάδων βλαστικής συμβατότητας (VCGs) .....	56
2.5.6. Αξιολόγηση της επίδρασης μη τοξικογόνων απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών σε φιστικεάνες.....	59
2.5.7. Συσχέτιση μετεωρολογικών δεδομένων με την παραγωγή αφλατοξινών στα κελυφωτά φιστικά στην ευρύτερη περιοχή του Ν. Φθιώτιδας.....	60
2.6. Συζήτηση - Συμπεράσματα .....	63
Κεφάλαιο 3: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΟΓΟΝΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>A. FLAVUS</i> ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΣΕ ΚΕΛΥΦΩΤΑ ΦΙΣΤΙΚΙΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΝΔΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΦΥΤΙΚΩΝ ΖΥΜΩΝ .....	69
3.1. Περίληψη .....	69
3.2. Εισαγωγή.....	70
3.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας.....	73
3.4. Μεθοδολογία.....	74
3.4.1. Θρεπτικά υλικά .....	74
3.4.2. Μέθοδοι .....	74
3.4.2.1. Δημιουργία συλλογής ενδημικών επιφυτικών ζυμών .....	74
3.4.2.2. Καλλιέργεια επιφυτικών ζυμών και ανταγωνιστικού στελέχους <i>Aspergillus flavus</i> .....	77
3.4.2.3. Διερεύνηση της επίδρασης απομονώσεων ζυμών στην κονιδιογένεση του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	77
3.4.2.3. Διερεύνηση της <i>in vitro</i> επίδρασης των απομονώσεων ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	78
3.4.2.3.1. Συγκαλλιέργεια <i>Aspergillus flavus</i> με απομονώσεις ζυμών .....	78
3.4.2.3.2. Εξαγωγή αφλατοξινών και Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδος.....	78

3.4.2.4. Διερεύνηση της <i>in situ</i> επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	79
3.4.2.4.1. Προετοιμασία καρπών φιστικιών - Απολύμανση .....	79
3.4.2.4.2. Εμβάπτιση καρπών σε αιώρημα με κύτταρα ζυμών .....	79
3.4.2.4.3. Μόλυνση φιστικιών με αιώρημα κονιδίων του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	80
3.4.2.4.4. Μέτρηση των παραγόμενων αφλατοξινών .....	80
3.4.2.5. Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων ζυμών .....	81
3.4.2.5.1. Η σημασία της αλληλούχισης περιοχών του ριβοσωμικού DNA για την ταυτοποίηση ζυμών.....	81
3.4.2.5.2. Εξαγωγή DNA ζυμών και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - Polymerase Chain Reaction (PCR).....	83
3.4.2.5.3. Αλληλούχιση προϊόντων PCR και ανάλυση αποτελεσμάτων.....	83
3.4.2.6. Διερεύνηση της επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	83
3.4.2.6.1. Μόλυνση υγρού θρεπτικού υλικού .....	83
3.4.2.6.2. Συλλογή μυκηλίου, λυοφιλίωση και εξαγωγή RNA.....	84
3.4.2.6.3. Δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA) .....	85
3.4.2.6.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR).....	85
3.4.2.7. Διερεύνηση της επίδρασης μυκητοκτόνων σκευασμάτων στην ανάπτυξη απομονώσεων ζυμών .....	86
3.4.2.8. Πειράματα αγρού για την διερεύνηση της ικανότητας παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών από απομονώσεις ζυμών .....	87
3.5. Αποτελέσματα.....	89
3.5.1. Συλλογή ενδημικών επιφυτικών ζυμών .....	89
3.5.2. Αξιολόγηση της επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην κονιδιογένεση του <i>Aspergillus flavus</i> .....	89
3.5.3. Αξιολόγηση της <i>in vitro</i> επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	91
3.5.4. Αξιολόγηση της <i>in situ</i> επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	97
3.5.5. Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης απομονώσεων ζυμών .....	101
3.5.6. Αξιολόγηση της επίδρασης απομονώσεων ζυμών στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα <i>AflR</i> του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	102
3.5.7. Αξιολόγηση της επίδρασης μυκητοκτόνων σκευασμάτων στην ανάπτυξη απομονώσεων ζυμών .....	103
3.5.8. Αξιολόγηση της επίδρασης απομονώσεων ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών σε φιστικεόνες.....	108
3.6. Συμπεράσματα – Συζήτηση .....	110
Παράρτημα Κεφαλαίου 3.....	117

Κεφάλαιο 4: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>A. FLAVUS</i> ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΣΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΠΙΦΥΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	128
4.1. Περίληψη .....	128
4.2. Εισαγωγή.....	129
4.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας.....	131
4.4. Μεθοδολογία.....	131
4.4.1. Θρεπτικά υλικά .....	131
4.4.2. Μέθοδοι .....	133
4.4.2.1. Δημιουργία συλλογής ενδημικών επιφυτικών βακτηρίων.....	133
4.4.2.2. Επιλογή ανταγωνιστικού στελέχους <i>Aspergillus flavus</i> και βιολογικού υποστρώματος .....	135
4.4.2.3. Διερεύνηση της <i>in vitro</i> επίδρασης βακτηριακών απομονώσεων στην ανάπτυξη και παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	135
4.4.2.3.1. Διερεύνηση ικανότητας δημιουργίας ζώνης παρεμπόδισης.....	135
4.4.2.3.2. Διερεύνηση της <i>in vitro</i> επίδρασης των βακτηριακών απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	136
4.4.2.4. Διερεύνηση της <i>in situ</i> επίδρασης των βακτηριακών απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	138
4.4.2.5. Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων.....	140
4.4.2.5.1. Η σημασία της διάκενης περιοχής του DNA μεταξύ των 16S και 23S rRNA	140
4.4.2.5.2. Εξαγωγή DNA από τις βακτηριακές απομονώσεις.....	141
4.4.2.5.3. Καθαρισμός προϊόντων PCR και αλληλούχιση .....	142
4.4.2.6. Πειράματα αγρού για τη διερεύνηση της ικανότητας παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών από βακτηριακές απομονώσεις.....	142
4.5. Αποτελέσματα.....	143
4.5.1. Συλλογή ενδημικών επιφυτικών βακτηρίων .....	143
4.5.2. Αξιολόγηση της <i>in vitro</i> επίδρασης των βακτηριακών απομονώσεων στην ανάπτυξη του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	145
4.5.3. Αξιολόγηση της <i>in vitro</i> επίδρασης των βακτηριακών απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	147
4.5.4. Αξιολόγηση της <i>in situ</i> επίδρασης των βακτηριακών απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	151
4.5.5. Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης βακτηριακών απομονώσεων .....	156
4.5.6. Αξιολόγηση της επίδρασης βακτηριακής απομόνωσης στην παραγωγή αφλατοξινών σε φιστικέωνες.....	156
4.6. Συμπεράσματα – Συζήτηση .....	158
Κεφάλαιο 5: ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>A. FLAVUS</i> ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΣΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ .....	161

5.1. Περίληψη .....	161
5.2. Εισαγωγή.....	162
5.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας.....	163
5.4. Μεθοδολογία.....	164
5.4.1. Θρεπτικά υλικά .....	164
5.4.2. Μέθοδοι .....	165
5.4.2.1. Απομόνωση στελεχών <i>Aspergillus section Flavi</i> και αξιολόγηση της αφλατοξικογόνου ικανότητάς τους .....	165
5.4.2.2. Μοριακή ταυτοποίηση των απομονώσεων .....	166
5.4.2.3. Μυκητοκτόνες δραστικές ουσίες και εμπορικά μυκητοκτόνα σκευάσματα.....	167
5.4.2.4. <i>In vitro</i> βιοδοκιμές μυκητοτοξικότητας.....	169
5.4.2.5. <i>In situ</i> βιοδοκιμές παρεμπόδισης της ανάπτυξης του <i>A. flavus</i> και της παραγωγής αφλατοξινών .....	170
5.4.2.5.1. <i>In situ</i> βιοδοκιμές παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών .....	170
5.4.2.5.2. Διερεύνηση της ικανότητας παρεμπόδισης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην σοβαρότητα της ασθένειας από τον μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	170
5.4.2.6. Διερεύνηση αποτελεσματικότητας φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων στην παραγωγή αφλατοξινών σε φιστικέωνες.....	171
5.5. Αποτελέσματα.....	172
5.5.1. Μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών του μύκητα και προσδιορισμός της αφλατοξικογόνου ικανότητάς τους.....	172
5.5.2. <i>In vitro</i> βιοδοκιμές μυκητοτοξικότητας.....	173
5.5.3. <i>In situ</i> βιοδοκιμές παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών .....	176
5.5.4. Επίδραση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη σοβαρότητα της ασθένειας από τον μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> .....	177
5.5.5. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων κατά της παραγωγής αφλατοξινών σε φιστικέωνες.....	180
5.6. Συμπεράσματα - Συζήτηση.....	181
Κεφάλαιο 6: AFLA-PISTACHIO: ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ ΑΠΟ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β1 .....	187
6.1. Περίληψη .....	187
6.2. Εισαγωγή.....	188
6.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας.....	193
6.4. Μεθοδολογία.....	194
6.4.1. Συλλογή μετεωρολογικών δεδομένων .....	194
6.4.2. Περιγραφή και υπολογισμός των σταδίων ανάπτυξης της καλλιέργειας.....	194
6.4.3. Δειγματοληψίες και ανάλυση αφλατοξινών .....	194



6.4.4. Δημιουργία μοντέλου πρόβλεψης.....	195
6.4.5. Πιθανότητα μόλυνσης από αφλατοξίνη B1 .....	195
6.4.6. Διενέργεια βαθμονόμησης του μοντέλου .....	196
6.5. Αποτελέσματα.....	197
6.5.1. Συλλογή μετεωρολογικών δεδομένων .....	197
6.5.2. Υπολογισμός των σταδίων ανάπτυξης της καλλιέργειας του κελυφωτού φιστικιού.....	199
6.5.3. Δειγματοληψίες από φιστικεώνες και δεδομένα μολύνσεων από αφλατοξίνες.....	200
6.5.4. Μοντέλο πρόβλεψης .....	200
6.5.5. Πιθανότητες μόλυνσης από αφλατοξίνη B1 .....	201
6.5.6. Βαθμονόμηση μοντέλου .....	202
6.6. Συμπεράσματα - Συζήτηση.....	204
Κεφάλαιο 7: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΑΝΟΣΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ ΑΠΟ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ B1 .....	207
7.1. Περίληψη .....	207
7.2. Εισαγωγή.....	208
7.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας.....	212
7.4. Μεθοδολογία.....	212
7.4.1. Υλικά.....	212
7.4.2. Μετρήσεις εμπέδησης.....	212
7.4.3. Δειγματοληψία.....	213
7.4.4. Εξαγωγή αφλατοξινών και ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξίνης B1 με HPLC ανάλυση .....	213
7.4.5. Ανάπτυξη αισθητήρα .....	215
7.4.5.1. Ακίνητοποίηση αντισώματος.....	215
7.4.5.2. Διαδικασία καταγραφής μετρήσεων εμπέδησης.....	216
7.5. Αποτελέσματα.....	218
7.5.1. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του αντισώματος αφλατοξίνης B1.....	218
7.5.2. Αξιολόγηση της δέσμησης της αφλατοξίνης B1 από το αντίσωμα.....	219
7.5.3. Αξιολόγηση της απόδοσης του αισθητήρα σε πρότυπα διαλύματα αφλατοξίνης B1 ....	221
7.5.4. Αξιολόγηση ανίχνευσης αφλατοξίνης B1 σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα φιστικιών.....	223
7.5.5. Αξιολόγηση διασταυρωτής αντίδρασης του αισθητήρα με ωχρατοξίνη A και αφλατοξίνη M1 .....	225
7.5.6. Επικύρωση απόδοσης αισθητήρα σε φυσικά μολυσμένα δείγματα φιστικιών και συγκριτική ανάλυση με HPLC .....	227
7.6. Συμπεράσματα – Συζήτηση .....	229
Κεφάλαιο 8. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	233
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	234

# Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Καλλιέργεια κελυφωτών φιστικιών

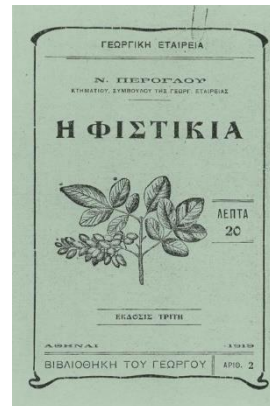
Ο τόπος καταγωγής της φιστικιάς μέχρι το τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα δεν ήταν σαφώς προσδιορισμένος. Στο τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα, Ευρωπαίοι Βοτανικοί επισκεπτόμενοι τη Μέση Ανατολή, είδαν τις εκτεταμένες καλλιέργειες φιστικιάς και αποφάνθηκαν ότι πατρίδα της φιστικιάς ήταν η Συρία, Τουρκία και Μεσοποταμία. Το 1929-1930 όμως, Ρώσοι Βοτανικοί που επισκέφθηκαν την Κεντρική Ασία, βρήκαν τη φιστικιά να φύεται άγρια σε αχανείς εκτάσεις, ορεινές και πεδινές, σχηματίζοντας έναν τύπο δασώδους στέπας σε εδάφη με πτωχή οικολογική σύνθεση. Η περιοχή της άγριας φιστικιάς επεκτείνεται στο Βόρειο Ιράν, Βόρειο Αφγανιστάν, Νότιο Τουρκμενιστάν, Ανατολικό Ουζμπεκιστάν, Τατζικιστάν, μέχρι και στο Κιργιστάν. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η Κεντρική Ασία είναι ο τόπος καταγωγής του άγριου προγόνου της καλλιεργούμενης φιστικιάς.

Ο πρώτος που αναφέρει και περιγράφει τη φιστικιά στην αρχαία ελληνική γραμματεία είναι ο Θεόφραστος ο Ερέσσιος περί τον 4<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ.. Στο έργο του «Περὶ φυτῶν Ἱστορία» δίνει την περιγραφή της φιστικιάς χωρίς να την κατονομάζει ως εξής : *«Ὅπως λένε εκεί (στην Ἰνδική) φύεται ἓνα δένδρο που μοιάζει με την τερέβινθο. Αυτό ως προς τα φύλλα, τους κλάδους και τα ἄλλα χαρακτηριστικά πλην των καρπῶν, οἱ οποίοι εἶναι διαφορετικοί και μοιάζουν με αμύγδαλα. Λένε ὅτι το δένδρο αυτό φύεται και στην Βακτρία. Τα κάρνά του ἔχουν το μέγεθος του αμυγδάλου και μοιάζουν με αμύγδαλα, ἀλλὰ το κέλυφός τους δεν εἶναι ἀδρό και σε γέυση εἶναι ἀνώτερα των αμυγδάλων και γι' αὐτό στον τόπο αὐτό τα προτιμοῦν ἀπὸ τα αμύγδαλα»*. Ο Θεόφραστος ἀπὸ ὅσο εἶναι γνωστό δεν επισκέφθηκε ποτέ στην Ασία και πιθανῶς για τη φιστικιά ἔχει πληροφορίες ἀπὸ επιστήμονες που ἀκολουθήσαν το Μέγα Ἀλέξανδρο στην ἐκστρατεία του. Ο πρώτος που αναφέρει τη λέξη «πιστάκια», εἶναι ο ποιητὴς Νίκανδρος ο Κολοφώνιος (2ος π.Χ. αἰώνας) στο ποίημά του “*Θηριακά*”. Ο Νίκανδρος γράφει και αὐτὸς ὅτι τα «πιστάκια» τα βρίσκουμε στην Ἰνδική και ὅτι μοιάζουν με αμύγδαλα, ἔχουν δε την ιδιότητα να προστατεύουν ἀπὸ νύγματα σκορπιού.

Κατὰ τον 1ο μ.Χ. αἰώνα, ο φαρμακογνώστης, Διοσκορίδης ο Πεδανός αναφέρει στο ἔργο του «Περὶ ὕλης ἰατρικῆς», ὅτι τα φιστίκια παράγονται στη Συρία και ἔχουν φαρμακευτικές ιδιότητες, ἐνῶ ο Πλίνιος γράφει ὅτι περίπου το 30 μ.Χ. η φιστικιά εισηγήθη ἀπὸ τη Συρία στην Ἰταλία ἀπὸ τον Vittelius και την ἴδια χρονιά στην Ἰσπανία ἀπὸ τον Flaccus Rompeius. Τον 2ο μ.Χ. αἰώνα, ο διάσημος Ἕλληνας ἰατρός Γαληνός ἀπὸ την Πέργαμο αναφέρει ὅτι τα πιστάκια που υπάρχουν στη Μεγάλη Ἀλεξάνδρεια, κυρίως ὅμως στη Βέροια της Συρίας, εἶναι χρήσιμα για την ευρωστία του ἥπατος, ἐνῶ στους Δειπνοσοφιστὲς του Ἀθηναίου Ναυκράτιου, περιγράφεται συμπόσιο ὅπου προσφέρονται μεταξύ ἄλλων και φιστίκια, το οποίο περιγράφεται ως λείος, λευκόφαιος, μακρὺς, πράσινος στο εσωτερικό καρπός και ἀν και λιγότερο χυμώδης ἀπὸ τον καρπὸ της κουκουναριάς πιο εὐγεστός ἀπὸ αὐτόν.

Αναφορὲς για την καλλιέργεια της φιστικιάς στην Ελλάδα ἕως τον 19<sup>ο</sup> αἰώνα δεν υπάρχουν. Το 1838 ο Γάλλος φυσιολόγος Bory de Saint Vincent στο βιβλίο του “*La Flore du Peloponnese et des Cyclades*” αναφέρει ὅτι εἶδε φιστικιές στη Φυγαλία και στην Πύλο. Το 1956, φιστικιές παρατηρήθηκαν και στη Ζάκυνθο. Επρόκειτο ὅμως για μεμονωμένα δένδρα και ὄχι ἐντατική καλλιέργεια. Το 1860 ο εἰσαγωγέας της βιομηχανίας της σοκολάτας Δ. Παυλίδης εγκατέστησε το πρώτο οργανωμένο δενδροκομεῖο φιστικιάς στο κτήμα του στο Ψυχικό. Το 1869 ο Ορφανίδης ἄρχισε να πολλαπλασιάζει τη φιστικιά στο Δημόσιο Δενδροκομεῖο. Ο Γεννάδιος, ο οποίος τον διαδέχθηκε το 1882 συνέχισε το ἔργο του.

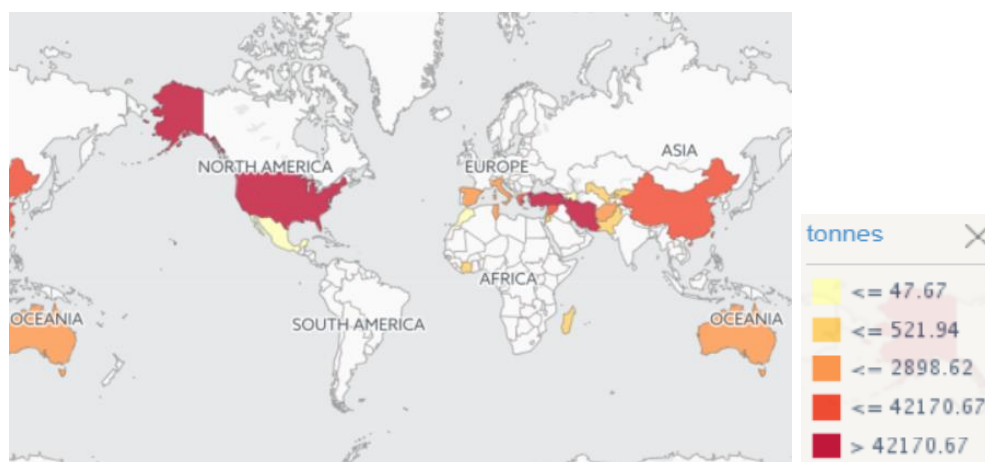
Στο τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα, ο Ν. Περόγλου εγκατέστησε την πρώτη φυτεία φιστικιάς στην Αίγινα. Στο μεγαλύτερο μέρος του κτήματος φύτεψε σπωροφόρα δέντρα και μεταξύ αυτών και φιστικιές. Η γειννίαση με τη θάλασσα και το φτωχό έδαφος δεν ευνόησε την ανάπτυξη των δέντρων, με εξαίρεση τη φιστικιά με την οποία αντικατέστησε τα αποτυχημένα δέντρα. Στον ίδιο, οφείλεται η έκδοση του πρώτου πρακτικού εγχειριδίου για την καλλιέργεια της φιστικιάς (Εικ. 1.1). Στα τέλη της δεκαετίας του 1910, είχαν αρχίσει να φυτεύονται και από άλλους ντόπιους καλλιεργητές μικρές εκτάσεις. Από το 1950, η καλλιέργεια άρχισε να επεκτείνεται στις περιοχές της Βοιωτίας, της Κορινθίας, της Εύβοιας και της Φθιώτιδας και από το 1968 στην κεντρική και βόρεια Ελλάδα (Θεσσαλία, Χαλκιδική, Ροδόπη), στην Κρήτη και στις Κυκλάδες. Το 1994 το “φιστίκι Αιγίνης” εντάχθηκε στα προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης και το 1996 καταγράφηκε ως προϊόν ΠΟΠ στην επίσημη εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όπως και της Φθιώτιδας και των Μεγάρων (Chitzanidis 2010).



**Εικόνα 1.1:** Το πρώτο πρακτικό εγχειρίδιο για την καλλιέργεια της φιστικιάς (<http://pistaches.eu/wp-content/uploads/2014/06/05.jpg>).

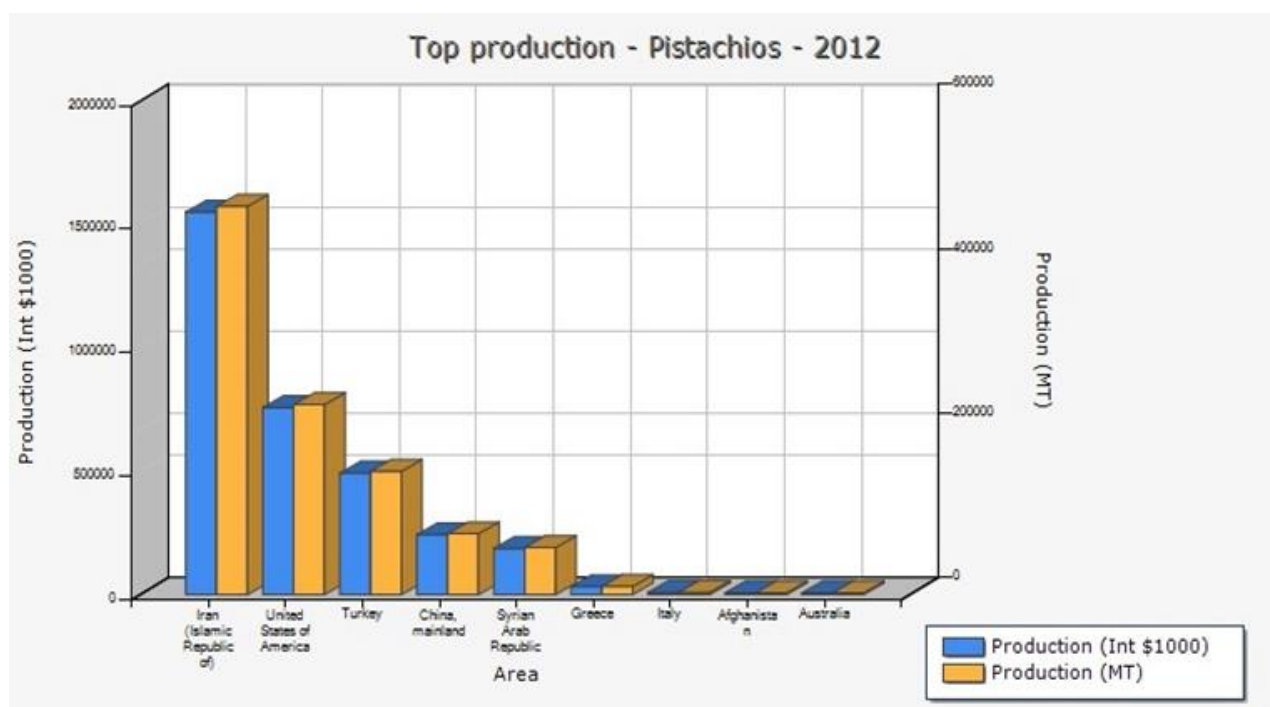
### 1.1.2. Οικονομικά στοιχεία παραγωγής φιστικιών

Οι σημαντικότεροι λόγοι για τους οποίους η καλλιέργεια της φιστικιάς έχει επεκταθεί παγκοσμίως και αποτελεί αντικείμενο διεθνούς ενδιαφέροντος, είναι ότι είναι ένα καρποφόρο δένδρο με μικρές απαιτήσεις ως προς το έδαφος και το κλίμα, ενώ ο καρπός του, το κελυφωτό φιστίκι, θεωρείται ένας από τους πιο εύγευστους καρπούς με υψηλή διατροφική αξία κατατάσσοντάς το ως “super-food”. Σύμφωνα με τον οργανισμό FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database) (στοιχεία 4/8/2014), από το 2006 ως το 2012, η παγκόσμια παραγωγή κελυφωτών φιστικιών αυξήθηκε από 594.257 τόνους σε 1.005.436 τόνους, ένα ποσοστό της τάξης του 69% (Γεωργιάδου 2015). Η προσαρμοστικότητα του δένδρου της φιστικιάς και οι χαμηλές του εδαφοκλιματικές απαιτήσεις έχουν οδηγήσει στην εγκατάστασή του σε εύκρατες και τροπικές περιοχές ανά την υφήλιο (Εικ. 1.2).



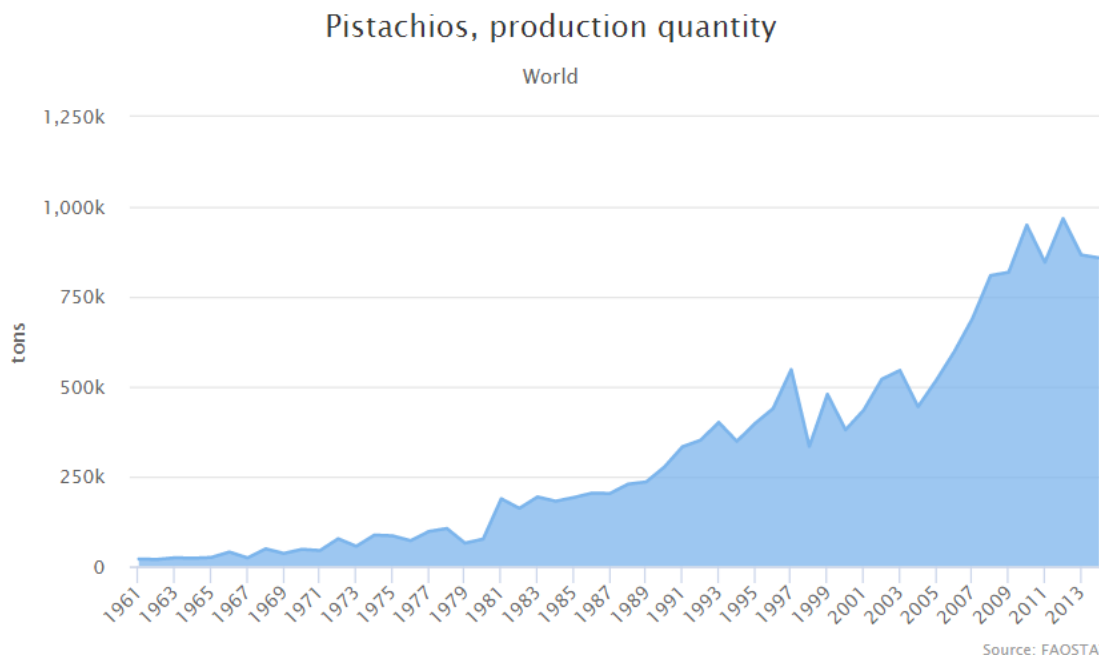
**Εικόνα 1.2:** Σχηματική απεικόνιση της παραγωγής φιστικιών σε τόνους ανά χώρα για το χρονικό διάστημα 1994-2014 (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>).

Για το διάστημα 1994-2019, η Ευρώπη συνέβαλε σε ποσοστό 2% της παγκόσμιας παραγωγής, με κύριο εκπρόσωπο την Ελλάδα (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>). Σύμφωνα με τα στοιχεία του FAOSTAT για το 2012, σχετικά με την παραγωγή κελυφωτού φιστικιού παγκοσμίως, το Ιράν παραδοσιακά κατέχει την 1<sup>η</sup> θέση σε παραγωγή, με ποσοστό άνω του 40% επί του συνόλου. Την 2<sup>η</sup> θέση σε παραγωγή κατέχουν οι Η.Π.Α. (23%) με αλματώδη αύξηση της παραγωγής τους από το 2000 και μετά, δεδομένου ότι οι πρώτες εντατικές καλλιέργειες φιστικιάς φυτεύτηκαν το 1975 στην Καλιφόρνια. Την 3<sup>η</sup> θέση σε παραγωγή, κατέχει η Τουρκία (15%) με σταθερή σχετικά παραγωγή και ακολουθεί η Κίνα (7%) και η Συρία (6%). Η Ελλάδα (περίπου 1%) κατέχει την 6<sup>η</sup> θέση στην παγκόσμια παραγωγή κελυφωτού φιστικιού, μπροστά από την Ιταλία και την Αυστραλία, και την 1<sup>η</sup> στην Ευρώπη (Εικ. 1.3). Για το 2018 που αποτελεί την τελευταία καταγραφή του FAOSTAT (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>), η Ελλάδα έχει καλλιεργήσιμη έκταση με φιστικιές 45.390 στρέμματα, αυξημένη κατά 4% από το 2010 και 8.558 τόνους παραγωγή.



**Εικόνα 1.3:** Διαγραμματική απεικόνιση των φιστικοπαραγωγών χωρών παγκοσμίως με την αντίστοιχη παραγωγή τους (<https://www.agrostrat.gr/sites/default/files/inventory/TOP%20PRODUCTION%202012.jpg>).

Οι μεγάλες απαιτήσεις παγκοσμίως για κελυφωτό φιστίκι, σε συνδυασμό με το γεγονός της εξάπλωσης της καλλιέργειας σε περισσότερες περιοχές οδήγησε στην αλματώδη αύξηση της παραγωγής του κατά το δεύτερο μισό του προηγούμενου αιώνα και τις αρχές του τρέχοντος αιώνα (Εικ. 1.4). Ως αποτέλεσμα, η παγκόσμια παραγωγή φιστικιού αυξήθηκε σημαντικά κατά τα τελευταία 50 χρόνια.



**Εικόνα 1.4:** Γραφική απεικόνιση της εξέλιξης της παραγωγής φιστικιών σε τόνους κατά το χρονικό διάστημα 1961-2013 παγκοσμίως (<http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>).

### 1.1.3. Σύσταση και διατροφική αξία φιστικιών

Η χημική σύσταση των φιστικιών μπορεί να διαφοροποιείται μεταξύ των ποικιλιών και να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής που καλλιεργείται, τη σύσταση του εδάφους και τις καλλιεργητικές πρακτικές (Γεωργιάδου 2015). Ωστόσο, αποδεικνύεται ότι γενικότερα τα φιστίκια έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων φυτικών πρωτεϊνών, διαιτητικών ινών και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό οξύ), και είναι χαμηλά σε κορεσμένα λίπη. Αποτελούν μια εξαιρετική πηγή πολλών βασικών μετάλλων, όπως το μαγνήσιο (Mg), ο σίδηρος (Fe), το ασβέστιο (Ca), ο φώσφορος (P), το κάλιο (K), ο ψευδάργυρος (Zn), ο χαλκός (Cu) και το μαγγάνιο (Mn) (Harris 2013), καθώς και βιταμινών A, B1, B2, B6. Ακόμη, τα κελυφωτά φιστίκια προσφέρουν υψηλό ποσό αντιοξειδωτικών πολυφαινολών (Πίν. 1.1) (Mahmoudi et al. 2014) και είναι, μεταξύ των καρπών με κέλυφος, η μοναδική πηγή καροτενοειδών, συμπεριλαμβανομένων του β-καροτενίου, της λουτεΐνης και της ζεαξανθίνης (Harris 2013).

**Πίνακας 1.1:** Χημική σύσταση φιστικιών και θρεπτική αξία (Ferguson, Kader, et al. 2005).

Συστατικά ανά 100 g ψίχας

Νερό	5,6 g
Πρωτεΐνες	19,6 g
Λίπη	53,2 g
Υδατάνθρακες	19 g
Ίνες	2,2 g
Τέφρα	3 g
Σάκχαρα	6,1 g
Θερμίδες	594
Ακόρεστα/κορεσμένα λιπαρά οξέα	8,1
<b><u>Βιταμίνες</u></b>	
A (I.U.)	230
Θειαμίνη (mg)	0,67
Νιασίνη (mg)	1,4
Βιταμίνη C (mg)	0
<b><u>Ανόργανα στοιχεία (mg)</u></b>	
Ca	131
P	500
Fe	7,3
K	972
Mg	158

Με μικρές διακυμάνσεις σε σχέση με τα προαναφερθέντα δεδομένα, παρουσιάζεται και η σύσταση και θρεπτική αξία των φιστικιών της ποικιλίας «Αιγίνης» (Πίν. 1.2) καθώς είναι η μελετώμενη ποικιλία στη συγκεκριμένη διατρίβη.

**Πίνακας 1.2:** Σύσταση και θρεπτική αξία φιστικιών της ποικιλίας «Αιγίνης» (Καν.1263/96).

Συστατικό ανά 100 g ψίχας

Πρωτεΐνες	19,5 g
Λίπη	53,6 g
Υδατάνθρακες	19,4 g
Θερμίδες	594

#### 1.1.4. Βοτανική ταξινόμηση

Η φιστικά (*Pistacia vera* L.) (Εικ. 1.5) ανήκει στην οικογένεια των Anacardiaceae (Ποντικής 1996). Η συστηματική ταξινόμηση του δένδρου (κατά CRONQUIST, 1981) είναι η εξής:

Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
Συνομοταξία	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
Ομοταξία	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
Υφομοταξία	Ροδιίδες (Rosidae)
Τάξη	Σαπινδώδη (Sapindales)
Οικογένεια	Ανακαρδιοειδή (Anacardiaceae)
Γένος	Πιστακία ( <i>Pistacia</i> )
Διώνυμο	Πιστακία η γνήσια ( <i>Pistacia vera</i> )



**Εικόνα 1.5:** Το δένδρο της φιστικιάς  
([https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/NAS-103\\_Pistacia\\_vera.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/NAS-103_Pistacia_vera.png)).

Το γένος *Pistacia* περιλαμβάνει 11 είδη. Το είδος *Pistacia vera* L. είναι η καλλιεργούμενη ήμερη φιστικιά, ενώ στην Ελλάδα είναι αυτοφυή τα είδη *P. terebinthus* L. (τσικουδιά, κοκορεβιθιά) *P. lentiscus* L. (σχίνος, μαστιχιά Χίου) και *P. mutica* F. et M., το οποίο σήμερα θεωρείται συνώνυμο ή υποείδος του *P. atlantica* Desf. (Med. Cheek List, Flora Europaea). Στην Ελλάδα, καλλιεργείται σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα η ποικιλία "Αιγίνης", ενώ σε πολύ μικρή έκταση καλλιεργείται η "Νυχάτη" και σποραδικά συναντάται η "Φουντουκάτη" (Χιτζανίδου et al. 2004). Από το 1989 δόθηκε στην καλλιέργεια μια νέα ποικιλία, με την ονομασία "Pontikis" (Ποντικής 1996), η καλλιέργεια της οποίας επεκτείνεται τα τελευταία χρόνια κυρίως στη περιοχή της Φθιώτιδας.

Ως υποκείμενα της φιστικιάς χρησιμοποιούνται διάφορα είδη του γένους *Pistacia*. Στην Ελλάδα, η φιστικιά εμβολιάζεται κυρίως σε τσικουδιά (*Pistacia terebinthus* L.), λόγω της καλής της συγγένειας με την ποικιλία, αλλά και της ανθεκτικότητάς της στους φυτοπαθογόνους εδαφογενείς μύκητες του γένους *Phytophthora*. Στις ΗΠΑ, αλλά και σε άλλες χώρες, γίνεται συστηματική έρευνα για τη δημιουργία υποκειμένων με καλές δενδροκομικές ιδιότητες και ανθεκτικότητα σε εδαφογενή παθογόνα και νηματώδεις (Holtz et al. 2005).

Η φιστικιά (*Pistacia vera*) είναι δέντρο δίοικο, πρωτανδρικό και ανεμόφιλο, διότι το θηλυκό άνθος είναι απέταλο, δίχως νεκτάρια και δεν ελκύει τις μέλισσες (Ποντικής 1996). Οι αρσενικές ποικιλίες είναι τα αρσενικά άτομα της *P. vera*, καθώς και οι ποικιλίες "Chico" και "Peters" (Ferguson, Polito, et al. 2005). Στην Ελλάδα, τα αρσενικά δένδρα διακρίνονται σε τέσσερις (Α, Β, Γ, Δ) ή κατ' άλλους τρεις (Α, Β, Γ) τύπους, ανάλογα με το χρόνο έκπτυξης των οφθαλμών (Ποντικής 1996). Τα αρσενικά δένδρα τύπου Α ανθίζουν πρωϊμότερα από τον τύπο Β, ενώ ο τύπος Γ (ή και Δ) θεωρείται ο πιο όψιμος. Ανάλογα με την περιοχή εγκατάστασης του φιστικεώνα, είναι σημαντικό να τηρείται μια αναλογία, όχι μόνο των θηλυκών προς τα αρσενικά, αλλά και μια κατάλληλη αναλογία ανάμεσα στους τύπους των αρσενικών, ώστε να καλύπτονται επαρκώς οι ανάγκες των θηλυκών δένδρων σε γύρη. Παρ' όλα αυτά, η φιστικιά μπορεί να γονιμοποιηθεί και με γύρη άλλων ειδών του γένους *Pistacia*, όπως η τσικουδιά και ο σχίνος, όμως στην περίπτωση αυτή, οι καρποί είναι κατώτερης ποιότητας και εμφανίζουν ελαττώματα, τόσο ως προς τις διαστάσεις και το βάρος (φαινόμενο ξενίας), όσο και ως προς το χρόνο ωρίμανσης, τις συνολικές διαστάσεις και την παρουσία ή μη, σπέρματος (φαινόμενο μεταξενίας). Ένας γενικός κανόνας αναλογίας θηλυκών προς



αρσενικά είναι 10:1. Ανάλογα όμως με την περιοχή καλλιέργειας μπορεί να διαφοροποιείται.

Η φιστικιά είναι ένα φυλλοβόλο δένδρο βραδείας ανάπτυξης. Εισέρχεται σε αξιολογη καρποφορία από το 8<sup>ο</sup>-10<sup>ο</sup> έτος της ηλικίας της και η παραγωγική ζωή της υπολογίζεται σε 100 και πλέον έτη (Μπρουσοβάνας 1980). Το ριζικό σύστημα είναι ισχυρό και μπορεί να φθάσει σε βάθος μέχρι τρία μέτρα και σε πλάτος μέχρι 6-8 μέτρα. Ο κορμός και οι κλάδοι έχουν φλοιό με χρώμα σταχτί-γκρί, που γίνεται σκοτεινότερο με την πάροδο των χρόνων. Τα φύλλα είναι σύνθετα, με περιττό αριθμό φυλλαρίων και φέρονται κατ' εναλλαγή. Η βλάστηση αρχίζει να εκπτύσσεται από τα τέλη του Μαρτίου και η ανάπτυξη της συμπληρώνεται στα τέλη Απριλίου με τα μέσα του Μαΐου. Οι οφθαλμοί διακρίνονται σε βλαστοφόρους και ανθοφόρους. Οι βλαστοφόροι οφθαλμοί βρίσκονται πλάγια ή επάκρια των βλαστών και οι ανθοφόροι πάντοτε πλάγια. Συνήθως ένας ή δύο από τους πλάγιους οφθαλμούς, που βρίσκονται στο κορυφαίο τμήμα της νέας βλάστησης είναι ξυλοφόροι. Οι ανθοφόροι οφθαλμοί εκπτύσσονται την άνοιξη και δίνουν βοτρυώδεις ταξιανθίες με άνθη απέταλα, τα οποία αν γονιμοποιηθούν εξελίσσονται σε καρπούς.

Καρποφορεί σε ξύλο του παρελθόντος έτους, πλάγια, από απλούς ανθοφόρους οφθαλμούς. Ο καρπός είναι δρύπη, με σχήμα επίμηκες ωοειδές και σχηματίζεται σε σύνθετους βότρες. Αποτελείται από το περικάρπιο (φλοιός), το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο (κέλυφος) και το σπέρμα (ψίχα). Το σπέρμα περιβάλλεται από λεπτό φλοιό χρώματος βυσσίνη ή κόκκινο στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς του, το οποίο περικλείει το έμβρυο και τις δύο κοτυληδόνες, τα οποία, ανάλογα με την ποικιλία, το χρώμα είναι υπόλευκο μέχρι πράσινο. Οι καρποί με σπέρμα (γεμάτοι) κατά την ωρίμανση χάνουν το πρασινοκίτρινο χρώμα του φλοιού τους και ανάλογα με την ποικιλία αποκτούν χρώμα κρεμ ή κίτρινο με κόκκινη ή ροζ απόχρωση στο τμήμα που βλέπει ο ήλιος. Ακόμα το περικάρπιο γίνεται μαλακό και ξεκολλάει από το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο εύκολα. Στους γεμάτους καρπούς το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο σχίζεται κατά μήκος της ραφής τους σε ποσοστό, που κυμαίνεται από 20-95%, χαρακτηριστικό που καθορίζει την ποιότητά τους. Το ποσοστό αυτό ποικίλει σημαντικά ανάλογα με την καλλιεργούμενη ποικιλία και τις εδαφοκλιματικές συνθήκες.

Μετά τη γονιμοποίηση και το δέσιμο, ο καρπός αυξάνει σε μέγεθος από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο, ενώ το σπέρμα δεν αναπτύσσεται κατά το διάστημα αυτό. Οι καρποί ανεξάρτητα, αν τελικά είναι γεμάτοι ή όχι, αναπτύσσονται κατά τον ίδιο τρόπο. Μέχρι να αρχίσει η ανάπτυξη του σπέρματος, φέρουν εσωτερικά μόνο τον ομφαλικό μίαντα, που έχει υφή σπόγγου και σχήμα σπειροειδές, στο άκρο του έχει τη σπερματική βλάστη και είναι προσκολλημένο στο εσωτερικό χαλαζιακό άκρο του καρπού. Μέχρι το τέλος Ιουνίου, το ενδοκάρπιο παραμένει μαλακό και ο καρπός είναι ευάλωτος σε προσβολές εντόμων. Από το τέλος Ιουνίου το ενδοκάρπιο γίνεται σκληρό και ο όγκος του σπέρματος αρχίζει να αυξάνεται πολύ γρήγορα, μέχρι να γεμίσει όλο σχεδόν τον εσωτερικό χώρο, οπότε ο ομφαλικός μίαντας πιάνει την κοιλιακή πλευρά του καρπού (Εικ. 1.6). Το σπέρμα φτάνει το τελικό του μέγεθος στα μέσα Αυγούστου.

Οι καρποί με σπέρμα (γεμάτοι) κατά την ωρίμανση χάνουν το πρασινοκίτρινο χρώμα του φλοιού τους και ανάλογα με την ποικιλία αποκτούν χρώμα κρεμ ή κίτρινο με κόκκινη ή ροζ απόχρωση στο τμήμα που εκτίθενται στον ήλιο. Ακόμα, το περικάρπιο γίνεται μαλακό και αποκολλάται εύκολα από το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο. Το χρώμα του φλοιού, ο βαθμός ευκολίας που αποκολλάται από το κέλυφος και η εύκολη απόσπαση των καρπών με ελαφρό τίναγμα από τον ποδίσκο, αποτελούν τα βασικά κριτήρια ωριμότητας και κατά συνέπεια συγκομιδής. Συνήθως οι καρποί δεν ωριμάζουν όλοι μαζί. Οι πρώτοι ώριμοι καρποί εμφανίζονται στις αρχές με τα μέσα Αυγούστου. Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά ποιότητας εκτός από την ανάπτυξη του σπέρματος (ψίχα) είναι το σχίσσιμο του ξυλοποιημένου ενδοκαρπίου κατά μήκος της ραφής. Το *P. vera* είναι το μόνο είδος του γένους *Pistacia* που παρουσιάζει αυτή την ιδιομορφία.



Ένα από τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά του δένδρου είναι η παρενιαυτοφορία κατά την οποία, εναλλάσσονται μία χρονιά με μεγάλη παραγωγή και μία με μικρή ή με ακαρπία. Αν και ο μηχανισμός αυτού του φαινομένου δεν έχει απόλυτα διευκρινιστεί, υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι πρόβλημα ανταγωνισμού υδατανθράκων και ότι ελέγχεται χημικά από ρυθμιστές ανάπτυξης (Ferguson, Polito, et al. 2005). Παρόλα αυτά, υπό συνθήκες εντατικής καλλιέργειας, με κατάλληλη λίπανση και κλάδεμα, το φαινόμενο αυτό μπορεί να περιοριστεί προκειμένου να επιτευχθεί καρποφορία κάθε χρόνο.



**Εικόνα 1.6:** Στάδια ανάπτυξης του σπέρματος του φιστικιού σε επιμήκη (επάνω σειρά) και κάθετη (κάτω σειρά) τομή (Γεωργιάδου 2015).

### 1.1.5. Η καλλιέργεια της φιστικιάς

Η φιστικιά ευδοκμεί καλύτερα σε περιοχές με μακρό, θερμό και ξηρό καλοκαίρι και ήπιους χειμώνες. Ευδοκμεί άριστα σε ζεστό και ξηρό κλίμα που επηρεάζεται από τη θάλασσα. Η υψηλή υγρασία επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη της. Αναπτύσσεται καλά μέχρι το υψόμετρο των 650 μέτρων (Ποντίκης 1996) και δεν θα πρέπει να φυτεύεται σε υψόμετρο άνω των 800 μέτρων, γιατί οι θερμοκρασίες κατά το θέρος δεν είναι επαρκείς για την κανονική ανάπτυξη του σπέρματος. Για την ομαλή διακοπή του ληθάργου τόσο των θηλέων όσο και των αρρένων δένδρων απαιτούνται 1000 ώρες με θερμοκρασία κάτω των 7 °C (Μπρουσοβάνας 1980), ωστόσο παρατηρείται μεγάλη προσαρμοστικότητα ανά περιοχές και τοπικά μικροκλίματα. Η χρονικά ανώμαλη άνθιση μετά από θερμό χειμώνα, επιτείνει το φαινόμενο της πρωτανδρίας που χαρακτηρίζει τη φιστικιά, με αποτέλεσμα να δημιουργείται πρόβλημα στη γονιμοποίηση των ανθέων (Νούσης 1999). Οι ξηροί άνεμοι και ο υγρός και ψυχρός καιρός την άνοιξη, επηρεάζουν αρνητικά τη λειτουργία της επικονίασης και μειώνουν την καρπόδεση. Παράλληλα οι συχνές βροχοπτώσεις κατά το καλοκαίρι και οι υγρές συνθήκες, πριν ή κατά την περίοδο της συγκομιδής ευνοούν την ανάπτυξη ασθενειών και εντομολογικών εχθρών όπως η ψύλλα της φιστικιάς (*Agonoscena pistaciae*) και υποβαθμίζουν την ποσότητα και την ποιότητα των καρπών. Ακόμη, ο υγρός και ο ζεστός καιρός κατά τη βλαστική περίοδο των δένδρων ευνοεί την ανάπτυξη μυκητολογικών ασθενειών.

Το δένδρο, αν και προσαρμόζεται σε ποικιλία εδαφών, προτιμά τα σχετικά βαθιά, καλά αποστραγγιζόμενα, μέσης σύστασης εδάφη, με υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο. Ανέχεται όμως και τα ελαφρώς όξινα, αλκαλικά ή αλατούχα εδάφη. Νόστιμα φιστικία παράγονται σε στραγγερά, ασβεστώδη και με μέση σύσταση εδάφη (Ποντίκης 1996). Οι φιστικιές στην Ελλάδα φυτεύονται συνήθως

κατά ισόπλευρα τρίγωνα ή κατά γραμμές ή σε ορθογώνια παραλληλόγραμμα. Οι αποστάσεις μεταξύ των δένδρων είναι 7x7 m ή 7x6 m ή 6x6 m. Η σχέση αρρένων προς θήλεα πρέπει να είναι 1:7 έως 1:10.

Το κλάδεμα πρέπει να γίνεται αργά τον χειμώνα και πριν από την έκπτυξη των οφθαλμών (Ποντίκης 1996). Γενικά, πρέπει να αποσκοπεί στη διατήρηση του σχήματος της κόμης, στην αφαίρεση των ξερών ή προσβεβλημένων κλάδων και στην ανανέωση του καρποφόρου ξύλου. Επιπρόσθετα, σε συνδυασμό με κατάλληλη λίπανση, οδηγεί στη μείωση της παρεναιτοφορίας, καθώς μελέτες υποστηρίζουν πως το κλάδεμα συνδέεται με την παρεναιτοφορία (Ferguson et al. 1995). Κατά κανόνα, το κλάδεμα της φιστικιάς πρέπει να είναι ελαφρύ, γιατί τα αυστηρά κλαδέματα αυξάνουν το ποσοστό των κλειστών καρπών (Pontikis 1986).

Η φιστικιά (Εικ. 1.7), αν και είναι ανθεκτική στην ξηρασία, δίνει μεγαλύτερη παραγωγή όταν αρδεύεται, ιδίως στην περίοδο ανάπτυξης του σπέρματος, τους καλοκαιρινούς μήνες, ιδιαιτέρως πριν την συγκομιδή για να ανοίξει ο καρπός. Το σύστημα άρδευσης, των διπλών λεκανών ήταν εκείνο που χρησιμοποιούταν κατά το παρελθόν στην καλλιέργεια της φιστικιάς, λόγω της ευαισθησίας του λαιμού σε φυτόφθορες. Το σύστημα αυτό δεν χρησιμοποιείται πλέον, εξαιτίας του υψηλού κόστους της κατασκευής των λεκανών. Στις μέρες μας, σε όλες σχεδόν της περιοχές της Ελλάδας, χρησιμοποιείται η στάγδην άρδευση και η άρδευση με μικρούς εκτοξευτήρες. Όσον αφορά το πότισμα με εκτοξευτήρες, θα πρέπει να δίνεται η απαραίτητη προσοχή ώστε να μην διαβρέχεται ο κορμός του δένδρου για αποφυγή μυκητολογικών προσβολών.

Η λίπανση αποτελεί καθοριστικής σημασίας καλλιεργητική επέμβαση για την παραγωγικότητα των δενδρυλλίων της φιστικιάς, αφού μέσω αυτής επιδιώκεται η συμπλήρωση της φυσικής γονιμότητας του εδάφους του φιστικεώνα, έτσι ώστε τα δένδρα να έχουν στη διάθεσή τους εγκαίρως όλα τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, σε επαρκείς ποσότητες και σε αναλογίες ανταποκρινόμενες στις φυσιολογικές τους ανάγκες. Η διαμόρφωση και εφαρμογή ενός αποτελεσματικού προγράμματος λίπανσης στηρίζεται σε δεδομένα αναφερόμενα στη διάγνωση της τρέχουσας κατάστασης εφοδιασμού των δένδρων σε ανόργανα θρεπτικά στοιχεία (φυλλοδιαγνωστική), στην ανάλυση του εδάφους και στον τρόπο καλλιέργειας. Η λίπανση που επικρατεί σε συστηματικά δενδροκομεία περιλαμβάνει απαραίτητως αζωτούχα λιπάσματα κάθε χρόνο, συνδυαζόμενα ως επί το πλείστον με φωσφοροκαλιούχα, σε ειδικές δε περιπτώσεις και με ελλείποντα ιχνοστοιχεία, όπως ψευδάργυρο ή βόριο. Μολονότι, τα προγράμματα λίπανσης διαφοροποιούνται λίγο ή πολύ από φυτεία σε φυτεία, ή ακόμη και στην ίδια φυτεία, από έτος σε έτος, σε γενικές γραμμές τα στοιχεία N, P και K χορηγούνται σε ίση περίπτωση αναλογία (1:1:1), και μόνο σε περίπτωση που επιζητείται ενίσχυση της βλάστησης δίνεται περισσότερο άζωτο. Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί η σπουδαία και μοναδική επίδραση που ασκεί επί της γονιμότητας του εδάφους, η οργανική ουσία (χούμος) που δημιουργείται με την τακτική προσθήκη χωνεμένης κοπριάς ή χλωρής λίπανσης, χωρίς αυτό να σημαίνει πως δεν είναι εφικτή η παραγωγή και σε φτωχότερα εδάφη. Η ευεργετική επίδραση του χούμου αφορά κατά κύριο λόγο τις φυσικές ιδιότητες του εδάφους (πορώδες, υδατοχωρητικότητα, αερισμός) γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξη και λειτουργία του ριζικού συστήματος των δένδρων και τη δράση των μικροοργανισμών.



**Εικόνα 1.7:** Φιστικεώνας στην Αίγινα  
(φωτογραφικό υλικό από Αγροτικό Συνεταιρισμό Φιστικοπαραγωγών Αίγινας <https://fistikiaegina.gr/online/el/>).

### **1.1.6. Συγκομιδή, επεξεργασία και αποθήκευση των φιστικιών**

Ο χρόνος συγκομιδής των φιστικιών ποικίλει ανάλογα με την περιοχή. Στη χώρα μας αρχίζει από τα μέσα Αυγούστου με μέσα Σεπτέμβρη αναλόγως της περιοχής, και διαρκεί 10-15 ημέρες. Μπορεί να συγκομιστεί άπαξ σε ένα «χέρι» ή σε 2 ή παραπάνω φορές- «χέρια». Ο καρπός συγκομίζεται με ράβδισμα ή τίναγμα των δένδρων ή μηχανικά με δονητές και οι καρποί πέφτουν σε απλωμένα πανιά ή δίχτυα συλλογής ελαιοκάρπων. Στη συνέχεια, οι καρποί υφίστανται άμεση αποφλοιώση με στόχο όσο το δυνατόν την ταχύτερη απομάκρυνση του φλοιού, λόγω του ότι η καθυστερημένη αποφλοιώση οδηγεί σε μαύρισμα του ξυλώδους ενδοκαρπίου, με επακόλουθο την υποβάθμιση της ποιότητάς τους (Kader et al. 1982). Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί ότι η μεγάλη παραμονή του φλοιού αυξάνει τον κίνδυνο προσβολής του σπέρματος από μύκητες (Georgiadiou et al. 2012). Η αποφλοιώση πραγματοποιείται με αυτοματοποιημένα αποφλοιωτικά μηχανήματα, όπου οι καρποί μικρότερης πυκνότητας (άσπερμοι καρποί ή καρποί με υπανάπτυκτο ή φαγωμένο από έντομα σπέρμα) επιπλέουν σε νερό οπότε και απομακρύνονται, ενώ οι φυσιολογικοί καρποί καταβυθίζονται. Πριν το επόμενο στάδιο της ξήρανσης, αν θεωρηθεί ότι το κέλυφος των φιστικιών δεν είναι αρκετά λευκό, τότε αυτό λευκαίνεται με υποθειώδες νάτριο.

Παραδοσιακά η ξήρανση γίνεται με άπλωμα ενός στρώματος φιστικιών πάχους 2-3 εκατοστών στον ήλιο για 3-4 ημέρες. Η φυσική αυτή ξήρανση δε θεωρείται πλέον ορθή πρακτική, καθώς μειονεκτεί στο ότι οι καρποί παραμένουν για πολλές ημέρες κάτω από μη ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και υπάρχει κίνδυνος μόλυνσής τους με αφλατοξίνες. Έτσι, πλέον εφαρμόζεται ξήρανση με μηχανικό τρόπο, σε ξηραντήρια με έκθεση των φιστικιών σε ρεύμα ζεστού και ξηρού αέρα θερμοκρασίας περίπου 65-68 °C για 8-10 ώρες. Στους αποξηραμένους καρπούς, το ποσοστό υγρασίας είναι μικρότερο του 7% (Ferguson, Kader, et al. 2005).

Στη συνέχεια, απαιτείται η αποθήκευση των αποξηραμένων φιστικιών σε αποθήκες- ψυγεία, όπου εφαρμόζονται όλες οι ορθές πρακτικές υγιεινής, με στόχο την αποφυγή περαιτέρω μολύνσεων. Η χαμηλή θερμοκρασία και οι συνθήκες υγιεινής είναι απαραίτητες ώστε να εμποδίζεται η ανάπτυξη των μυκήτων και κυρίως των αφλατοξικογόνων (Olsen 1999, Georgiadiou et al. 2012). Πριν από την μακροχρόνια αποθήκευση, λαμβάνει χώρα απομάκρυνση των κλειστών και ελαττωματικών φιστικιών είτε με το χέρι (για μικρές ποσότητες) είτε μηχανικά, με ειδικά τύμπανα συλλεκτικών βελόνων. Η διαλογή αυτή είναι πολύ

σημαντική καθώς κατά την διάρκεια αυτής απομακρύνονται καρποί που είναι ενδεχομένως προσβεβλημένοι από αφλατοξικογόνα στελέχη του μύκητα που ενδεχομένως οδηγήσουν σε περαιτέρω συσσώρευση αφλατοξινών στο αποθηκευμένο προϊόν. Μπορεί να ακολουθήσει απεντόμωση των φιστικιών με φωσφίνη. Η τελική επεξεργασία των φιστικιών περιλαμβάνει προαιρετικό ψήσιμο για 15 λεπτά στους 70 °C και αλάτισμα με τοποθέτησή τους για 15 λεπτά σε διάλυμα άλμης 5-10% και κιτρικού οξέος (0,5%). Ακολουθεί τέλος, απομάκρυνση της άλμης και ξήρανση σε φούρνο για 20 λεπτά στους 160 °C.

### 1.1.7. Εχθροί και ασθένειες της φιστικιάς

Η φυτοπροστασία κατέχει κεντρικό ρόλο στην καλλιέργεια, διότι επιδρά στην ποσότητα και στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά τη συγκομιδή, αλλά και στο τελικό επεξεργασμένο προϊόν. Δένδρα τα οποία είναι απαλλαγμένα από ασθένειες και εχθρούς, στο πλαίσιο μια ολοκληρωμένης διαχείρισης των γεωργικών πόρων και του περιβάλλοντος, είναι εύρωστα και παράγουν καρπούς υψηλής ποιότητας και ποσότητας. Ειδικότερα, όταν οι προσβολές από μύκητες (σκωρίαση, σепτορίωση, καμαροσπόριο, ασπέργιλλους) ή οι ζημιές από έντομα (παραμορφώσεις, νύγματα, μεταχρωματισμοί) συμβαίνουν τους καρπούς, τότε απαιτείται η άμεση απόρριψή τους πριν το στάδιο της αποθήκευσης του προϊόντος, ώστε να αποφεύγεται η μετασυσπαστική επιμόλυνση και των υπόλοιπων υγιών αποθηκευμένων καρπών.

#### 1.1.7.1. Εχθροί της φιστικιάς

Πρέπει να επισημανθεί η συσχέτιση της μόλυνσης των καρπών με αφλατοξίνη και της προσβολής τους από εντομολογικούς εχθρούς. Σε καρπούς προσβεβλημένους από έντομα βρίσκεται περισσότερη αφλατοξίνη (Bayman et al. 2002). Ακόμη, υπάρχουν ενδείξεις ότι το ευρύτομο λειτουργεί ως φορέας σπορίων του μύκητα ή το νύγμα του αποτελεί πύλη εισόδου για το μύκητα (Τζανακάκης 2003).

Οι ζωικοί εχθροί της φιστικιάς, που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία, είναι τα έντομα, τα ακάρεα, οι νηματώδεις, τα πουλιά και τα τρωκτικά. Στην Ελλάδα από τους εχθρούς αυτούς μόνο τα έντομα αποτελούν σοβαρό πρόβλημα για την καλλιέργεια (Γεωργιάδου 2009). Αρκετά έντομα που είναι παράσιτα των φιστικιών δύνανται να προκαλέσουν επιφανειακή ζημιά (αλλοίωση εξωκαρπίου) στους αναπτυσσόμενους καρπούς. Αν τα έντομα είναι σε θέση να εμβαθύνουν ή να εισάγουν παθογόνους μύκητες, αυτά τα παράσιτα μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στους πυρήνες τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Απολύμανση με μεθυλοβρωμίδιο ή φωσφίνη έχει χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των εντόμων σε συγκομισθέντα φιστικά, αλλά έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα των εντόμων σε αυτά και για αυτό η χρήση αυτών των καπνογόνων καταργείται σταδιακά. Επίσης, για τις συνθήκες παραγωγής κελυφωτού φιστικιού της Ελλάδας η χρήση τους είναι οικονομικά ασύμφορη. Εργαστηριακές δοκιμές κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας φιστικιού δείχνουν ότι πολύ λίγα από τα έντομα επιβιώνουν μετά την ξήρανση του καρπού (Ferguson, Kader, et al. 2005).

Κατά την αρχή της ευαίσθητης περιόδου (τέλη Μαΐου έως μέσα Ιουλίου) εμφανίζεται στη φύση σε μεγάλους πληθυσμούς το ευρύτομο. Συγχρόνως κάνουν την εμφάνισή τους και οι ψύλλες (*A. cisti* και *A. pistaciae*), ενώ συνυπάρχουν με αυτές ο σκολύτης, ο τρωγόκαρπος και ο σκώρος (Πίν. 1.3). Κατά το υπόλοιπο της ευαίσθητης περιόδου (μέσα Ιουλίου έως μέσα Αυγούστου) στη φύση παραμένει σε υπολογίσιμους πληθυσμούς μόνο η ψύλλα *A. pistaciae* και σε λίγες περιοχές και ο σκώρος.



**Πίνακας 1.3:** Εντομολογικοί εχθροί φιστικιάς.

Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία (είδος, οικογένεια)	Ζημιές-βλάβες
Καπνώδης	<i>Carponis tenebrionis</i> , Coleoptera	Δημιουργία στοάς στο λαιμό και στις κεντρικές ρίζες κάτω από το φλοιό.
Σκολύτης	<i>Chaetoptelius vestitus</i> , Coleoptera	Οι οφθαλμοί στους ετήσιους βλαστούς φέρουν οπή. Η οπή αποτελεί είσοδο στοάς μήκους έως και 5 cm, η οποία προχωρά κατά μήκος του κεντρικού άξονα του κλαδίσκου.
Σινόξυλο	<i>Sinoxylon sexdentatum</i> , Coleoptera	Οι λεπτοί κλάδοι φέρουν οπή στο σημείο του γονάτου. Δημιουργία στοάς σε σχήμα δαχτυλιδιού, σε επίπεδο κάθετο προς τον άξονα του κλάδου. Οι προσβεβλημένοι κλάδοι σπάζουν εύκολα.
Τινέα	<i>Teleiodes decorella</i> , Lepidoptera	Τα εκπτυσσόμενα φύλλα είναι δεμένα πολλά μαζί με νήματα και παρουσιάζουν φαγώματα.
Θυρσόστομο	<i>Thyrsostoma guerini</i> , Lepidoptera	Διάβρωση τρυφερών βλαστών και ταξιανθιών, καταστροφή μεσοκαρπίου και μέρους του επικαρπίου.
Ψύλλα	<i>Agonoscena pistaciae</i> , Homoptera	Τα φύλλα καλύπτονται από μελιτώδη ουσία πάνω στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί καπνιά. Σε μικρή προσβολή είναι σε μορφή σταγονιδίων, ενώ σε μεγάλη προσβολή η μελιτώδης ουσία στάζει στο έδαφος (Εικ. 1.8)
Σκόρος	<i>Palumbina guerini</i> , Lepidoptera	Απότομος μαρασμός της ακραίας εκπτυσσόμενης βλάστησης, σε μεμονωμένους κλαδίσκους. Εμφανής οπή στον ακραίο οφθαλμό. Οι καρποί φέρουν ελαφρύ καστανό μεταχρωματισμό με ασαφή όρια κυρίως προς τη βάση. Αργότερα εμφανίζεται μια μικρή οπή στην ένωση με τον ποδίσκο.
Ευρύτομο	<i>Eurytoma plotnikovi</i> , Hymenoptera	Η κορυφή του καρπού γίνεται σκούρα καστανή, ως το ήμισυ του μήκους του. Συχνά παρουσιάζει εναλλασσόμενες ζώνες. (Εικ. 1.9)
Τρωγόκαρπος	<i>Megastigmus pistaciae</i> , Hymenoptera	Οι καρποί δεν ωριμάζουν και δε φέρουν εξωτερικά συμπτώματα. Διακρίνεται οπή διαμέτρου 1

		mm στο μέσο του μήκους του καρπού. Το σπέρμα είναι φαγωμένο και υπάρχουν εμφανή αποχωρήματα εντόμου.
Τζιτζικάκι	<i>Idiocerus stali</i> , Homoptera	Τα φύλλα και οι καρποί καλύπτονται από μελιτώδη ουσία πάνω στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί καπνιά. Συχνά το έλασμα, ο μίσχος και οι καρποί φέρουν νύγματα εντόμων που φαίνονται σαν μελανά στίγματα. Τα νύγματα είναι πολυπληθή στις διακλαδώσεις του βότρυ.
Κοκκοειδή	<i>Aspidiotus nerii</i> , Homoptera <i>Melanaspis</i> sp., Homoptera	Εντοπισμένη νέκρωση στο φλοιό των κλάδων.
Έντομα αποθηκών	<i>Ephestia kuehniella</i> , Lepidoptera <i>Plodia interpunctella</i> , Lepidoptera	Καρποί συχνά ενωμένοι μεταξύ τους με νημάτια. Από τη σχισμή του ενδοκαρπίου φαίνονται τα αποχωρήματα των εντόμων. Το σπέρμα παρουσιάζει φαγώματα και ενδεχομένως την προνύμφη του εντόμου.



**Εικόνα 1.8:** Νύμφες του *Agonoscena pistaciae* και μελιτώματα σε φύλλο φιστικιάς (<https://www.isoclast-meaf.com/crops/pistachio/>).



**Εικόνα 1.9:** Μουμιοποιημένοι καρποί με σπή εξόδου του *Eurytoma plotnikovi* (<http://www.froutonea.gr/gr/poreia-proionton/alla-proionta/tehniko-deltio-fustikia2>).

Εξίσου σημαντικός εντομολογικός εχθρός της φιστικιάς είναι το λεπιδόπτερο *Amyelois transitella* (Εικ. 1.10), το οποίο δε συναντάται στην Ελλάδα αλλά στην Αμερική. Το έντομο *Amyelois transitella* είναι ένα έντομο της οικογένειας Pyralidae. Είναι επιζήμιο, διότι προσβάλλει το εμπορεύσιμο προϊόν, εμπλέκεται σε αυξημένα επίπεδα αφλατοξίνης και θεωρείται ένα φυτοϋγειονομικό ζήτημα σε ορισμένες εξαγωγικές αγορές (Harris 2013). Το *A. transitella* προκαλεί βλάβη στους πυρήνες που οδηγεί σε μόλυνση τόσο από τους μύκητες *Aspergillus flavus* όσο και *A. parasiticus* και σε ανάπτυξη αφλατοξινών. Καθώς τα φιστίκια ωριμάζουν, το κέλυφος, που βρίσκεται μέσα στο σαρκώδη φλοιό, χωρίζει με φυσικό τρόπο. Ο φλοιός γενικά παραμένει ανέπαφος και προστατεύει την εκτεθειμένη επιφάνεια από εισβολή εντόμων, μυκήτων και παθογόνων. Ωστόσο, στο 1-4% των καρπών με κέλυφος, ο φλοιός προσκολλάται στο κέλυφος των καρπών με κέλυφος και όταν το κέλυφος διασπαστεί, ο φλοιός χωρίζει επίσης, εκθέτοντας έτσι τον πυρήνα στο έντονο και πιθανή δευτερογενή μόλυνση από μύκητες του γένους *Aspergillus*. Για το λόγο αυτό οι «πρόωρες» διασπάσεις τείνουν να έχουν υψηλότερα επίπεδα αφλατοξινών. Με κατάλληλες πρακτικές διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών, όπως πρώιμη συγκομιδή και εφαρμογές φυτοπροστατευτικών προϊόντων, οι καλλιεργητές μπορούν να μειώσουν τη μόλυνση σε χαμηλά επίπεδα, γενικά κάτω από 2%. Επειδή η παρουσία ζωντανών λεπιδοπτέρων *A. transitella* σε προϊόντα του εμπορίου δεν είναι αποδεκτή, οι μεταποιητές υποχρεούνται να απολυμαίνουν το προϊόν με καπνισμό με φωσφίνη ή βρωμιούχο μεθύλιο (Harris 2013).



**Εικόνα 1.10:** Navel orangeworm σε καρπό φιστικιάς (<http://ucanr.edu/blogs/bug squad/index.cfm?tagname=pistachio>).

### 1.1.7.2. Ασθένειες της φιστικιάς

Από τους βιοτικούς παράγοντες που προκαλούν ασθένειες στα φυτά μόνο μύκητες έχουν καταγραφεί στις φιστικιές στην Ελλάδα, με μια εξαίρεση, το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*. Η προσβολή από το παθογόνο αυτό χαρακτηρίζεται πολύ σπάνια (Χιτζανίδου 2004). Οι μυκητολογικές ασθένειες της καλλιέργειας παρατίθενται στη συνέχεια στον Πίνακα 1.4.

**Πίνακας 1.4:** Μυκητολογικές ασθένειες φιστικιάς.

Ασθένεια	Παθογόνο αίτιο	Συμπτωματολογία
Σηψιρριζία	<i>Armillaria</i> sp.	Καχεκτική βλάστηση, μικροφυλλία, χλωρωτικά φύλλα, φυλλόπτωση. Νέκρωση μεμονωμένων κλάδων. Το δένδρο φθίνει και ξηραίνεται. Ξηρή σήψη ριζών και παρουσία μυκηλιακών πλακών (Εικ. 1.11)
Φυτόφθορα	<i>Phytophthora</i> sp.	Έκκριση κόμμεως χαμηλά στον κορμό, πάνω από το σημείο εμβολιασμού (κομμίωση), μεταχρωματισμός καμβίου μέχρι το σημείο του εμβολιασμού. Αποπληξία (Εικ. 1.12)
Βερτισιλλίωση	<i>Verticillium dahliae</i>	Χλώρωση φύλλων, ημιπληγία, καστανός μεταχρωματισμός στα αγγεία του σομφού ξύλου (Εικ. 1.13)
Ευτυπίωση	<i>Eutypa lata</i>	Απότομη ξήρανση μεμονωμένων κλάδων κατά το θέρος, παραμονή των ξηρών φύλλων στους κλάδους, σκούρος μεταχρωματισμός ξύλου και φλοιού.
Σήψη ξύλου	<i>Phelinus rimosus</i>	Απότομη ξήρανση κλάδων από Ιούνιο- Αύγουστο, παραμονή φύλλων και καρπών στους κλάδους, σκούρος ερυθροκάστανος μεταχρωματισμός
Σεπτορίωση	<i>Septoria</i> sp.	Πολυάριθμες καστανές κηλίδες στις επιφάνειες των φύλλων (Εικ. 1.14)
Σκωρίαση	<i>Pileolaria terebinthi</i>	Κηλίδες, φλύκταινες στα άνθη, στις ταξιανθίες, στα φύλλα και στους καρπούς
Καμαροσπόριο	<i>Botryosphaeria</i> sp.	Προσβολή όλων των οργάνων του δένδρου, εμφάνιση μαύρων στιγμάτων στο τέλος του θέρους (Εικ. 1.15)
Στιγματομύκωση	<i>Nematospora coryli</i>	Νεκρώσεις και παραμορφώσεις στο εσωτερικό ή και εξωτερικό των κοτυληδόνων (Εικ. 1.16)
Προσβολές από <i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Σκουρόχρωμες κηλίδες στο περικάρπιο, σήψη του σπέρματος, κιτρινοπράσινες καρποφορίες (Εικ. 1.17). Παραγωγή αφλατοξινών.



**Εικόνα 1.11:** Μυκηλιακές πλάκες του *Armillaria* sp. στο λαιμό φιστικιάς. (<http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/>).





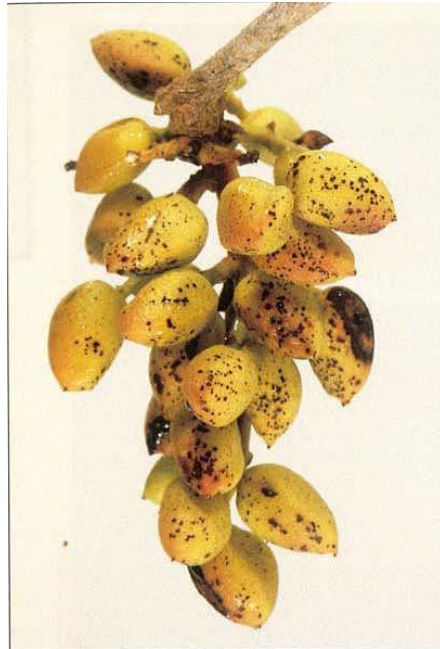
**Εικόνα 1.12:** Προσβολή από *Phytophthora* sp. σε λαιμό φιστικιάς (αριστερά) και κομμίωση (δεξιά) (<http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/>).



**Εικόνα 1.13:** Προσβολή από το μύκητα *Verticillium dahliae* σε ριζικό σύστημα φιστικιάς (αριστερά) και σε αγγεία του ξύλου (δεξιά) (<http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/>).



**Εικόνα 1.14:** Προσβολή σε φύλλωμα φιστικιάς από τον μύκητα *Septoria* sp. (<http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/>).



**Εικόνα 1.15:** Προσβολή κελυφωτού φιστικιού από *Botryosphaeria* sp. (<http://calag.ucanr.edu/Archive/?article=ca.v047n05p16>).



**Εικόνα 1.16:** Στιγματομόκωση σε καρπούς φιστικιάς. (<http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/>).



**Εικόνα 1.17:** Προσβεβλημένοι καρποί φιστικιών από μύκητες του γένους *Aspergillus* (<https://www.foodnavigator.com/Article/2018/04/09/EU-notes-increased-cases-of-aflatoxin-in-pistachios-from-US>).



**Εικόνα 1.18:** Προσβολή από *Alternaria* sp. σε φύλλωμα (αριστερά) και καρπό (δεξιά) φιστικιάς (<http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/>).

Οι μύκητες είναι ικανοί να μολύνουν αναπτυσσόμενα φιστίκια και να προκαλέσουν ζημιά στους φλοιούς και τους πυρήνες. Η μόλυνση από μύκητες συχνά διευκολύνεται από την πρόωρη διάσπαση των φλοιών που οδηγεί σε μολύνσεις από μια σειρά εντόμων τα οποία τρέφονται με τους καρπούς και χρησιμεύουν ως φορείς ασθενειών. Συγκεκριμένα, τα είδη των γενών *Alternaria* (Εικ. 1.18) και *Cladosporium* αποικίζουν τους καρπούς που έχουν διασπαστεί νωρίς. Καθυστέρηση βροχοπτώσεων ευνοεί την δραστηριότητα της *Botryosphaeria dothidea* στους πυρήνες και τους φλοιούς φιστικιών. Η μεγαλύτερη απειλή, όμως, είναι από τον μύκητα *Aspergillus flavus*. Ο κίνδυνος είναι ιδιαίτερα σοβαρός, διότι αυτός ο μύκητας μπορεί να παράγει αφλατοξίνες ως προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού του, υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Υπάρχει στενή σύνδεση της μόλυνσης με την πρόωμη διάσπαση των καρπών που υποδεικνύει ότι μείωση του δυναμικού προβλήματος των αφλατοξινών μπορεί να πραγματοποιηθεί με μείωση της πρόωρης διάσπασης ή με διαλογή των καρπών με κέλυφος που διασπώνται πρόωρα (Georgiadou et al. 2012).



### 1.1.7.3. Προσβολή από τους μύκητες του γένους *Aspergillus*, παραγωγή και διαχείριση αφλατοξινών

Η ευρεία έρευνα που έχει γίνει κατά τα τελευταία χρόνια στην πρόληψη της μόλυνσης από αφλατοξίνες αλλά και στην διαχείριση μολυσμένων δειγμάτων, αποδεικνύει την επιρροή ορισμένων παραμέτρων επί του συμπλόκου μυκοτοξικογόνων μυκήτων-φυτών ξενιστών, που οδηγεί στην παραγωγή αφλατοξινών. Η κλιματική αλλαγή που βρίσκεται σε διαρκή εξέλιξη είναι ένας από τους πιο σημαντικούς τέτοιους παράγοντες (Miraglia et al. 2009, Cotty et al. 2007). Μελέτες σχετικά με την επίδραση της κλιματικής αλλαγής στην παραγωγή αφλατοξινών στις ΗΠΑ, αποδεικνύουν πως οι υψηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος καθώς και η παρατεταμένη περίοδος ξηρασίας, ευνοούν την παραγωγή αφλατοξινών στην καλλιέργεια του καλαμποκιού (Wu et al. 2011). Έως τότε τα υπάρχοντα συστήματα διαχείρισης αφλατοξινών δεν λάμβαναν υπόψιν τους σε αυτό το βαθμό, την κλιματική αλλαγή ως σημαντικό παράγοντα της μόλυνσης από αφλατοξίνες (Abbas et al. 2009). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν περισσότερες μελέτες πάνω στην κλιματική αλλαγή και την μόλυνση από αφλατοξίνες, επιτρέποντας την δημιουργία βελτιωμένων μεθόδων διαχείρισης (Cotty et al. 2007, Torres et al. 2014, Battilani et al. 2016). Αυτό είχε ως συνέπεια, την απόκτηση ποσοτικών αποτελεσμάτων αναφορικά με την σχέση μεταξύ βιοσύνθεσης αφλατοξινών και ενεργότητας νερού, θερμοκρασίας περιβάλλοντος αλλά και επιπέδων διοξειδίου του άνθρακα (Medina et al. 2014).

Προκειμένου να επιτευχθεί η δημιουργία σύγχρονων ολοκληρωμένων συστημάτων διαχείρισης αφλατοξινών, προϋπόθεση αποτελεί η διερεύνηση της ποικιλομορφίας του πληθυσμού των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και της δομής και σύνθεσης του πληθυσμού των μυκήτων *Aspergillus* spp. στους αγρούς παραγωγής (Battilani et al. 2006, Bayman et al. 1993, Jaime-Garcia et al. 2006). Το ποσοστό των τοξικογόνων στελεχών του μύκητα *A. flavus* είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα μόλυνσης από αφλατοξίνες (Egel et al. 1994, Atehnkeng et al. 2008b, Cotty et al. 1999). Το μέγεθος των σκληρωτίων που σχηματίζουν οι μύκητες αυτού του γένους είναι σημαντικός παράγοντας για την μελέτη της δομής του πληθυσμού του μύκητα *A. flavus*. Στελέχη του μύκητα που παράγουν σκληρώτια μικρά σε μέγεθος (<400μm) είναι πιο πιθανόν να παράγουν υψηλότερα ποσά αφλατοξινών, ενώ στελέχη που παράγουν μεγάλα σκληρώτια (>400μm) δεν παράγουν συνήθως αφλατοξίνες ή παράγουν πολύ χαμηλές ποσότητες και χαρακτηρίζονται ως μη τοξικογόνα στελέχη (Cotty 1997). Το 2004, στην Κένυα προκλήθηκε μία εκτεταμένη δηλητηρίαση ανθρώπων από αφλατοξίνες (αφλατοξίκωση) ύστερα από κατανάλωση μολυσμένου καλαμποκιού. 314 άνθρωποι έχασαν τότε τη ζωή τους και έκτοτε, το καλαμπόκι είναι μία από τις κύριες καλλιέργειες που παρουσιάζουν υψηλό ενδιαφέρον ως προς την πιθανή μόλυνση από αφλατοξίνες (Probst et al. 2007). Αντίστοιχα γεγονότα έχουν σημειωθεί και στην Ευρώπη (Gallo et al. 2012). Μετά από αυτή την έξαρση, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της πληθυσμιακής διακύμανσης των στελεχών του μύκητα *Aspergillus* σε διάφορες περιοχές παγκοσμίως, με σκοπό να εξακριβωθεί η αιτία της αφλατοξίκωσης, με τα αποτελέσματα να υποδεικνύουν πως η κύρια αιτία ήταν η ύπαρξη του μύκητα *A. flavus* (Probst et al. 2010, Probst, Callicott, et al. 2012). Εκτός αυτού, μελέτες για την πληθυσμιακή διακύμανση και σύνθεση του μύκητα αλλά και τα ποσά των παραγόμενων αφλατοξινών στην καλλιέργεια του αραβοσίτου, έγιναν έκτοτε και σε άλλες περιοχές, όπως στην Κένυα (Mahuku et al. 2019, Kang'ethe et al. 2017), στην Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό (Kamika et al. 2016), στην Βόρεια Ιταλία (Mauro et al. 2013), στην υποσαχάρια ζώνη της Αφρικής (Probst et al. 2014), στην Ταϊλάνδη (Ehrlich et al. 2007a), καθώς και στην Νιγηρία και την Γκάνα (Perrone et al. 2014). Επιπρόσθετα, δημιουργήθηκαν χάρτες για την καταγραφή του προβλήματος για την καλλιέργεια του αραβοσίτου.

Παρόλα αυτά, εκτός του αραβοσίτου, υπάρχουν και άλλες καλλιέργειες που προσβάλλονται από

τον μύκητα *A. flavus* και τα προϊόντα τους μολύνονται από τις παραγόμενες αφλατοξίνες του. Τα κελυφωτά φιστίκια είναι μια από τις καλλιέργειες αυτές που συχνά μολύνονται από αφλατοξίνες στην Ευρώπη (Georgiadou et al. 2012), στο Ιράν (Cheraghali et al. 2007, Kabirian et al. 2011, Sarhang Pour et al. 2010) και στην Καλιφόρνια των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (Doster et al. 1994). Τα αμύγδαλα επίσης είναι από τις καλλιέργειες που συχνά βρίσκονται μολυσμένες από αφλατοξίνες (Schatzki et al. 2000), καθώς και η αραχίδα (Chala et al. 2013), ο βαμβακόσπορος (Lee et al. 1989, Jaime-Garcia et al. 2003), αλλά και τα σύκα (Farjood et al. 2013). Η διερεύνηση της πληθυσμιακής διακύμανσης των μυκήτων *Aspergillus* για τις καλλιέργειες που μολύνονται από αφλατοξίνες έχει συμβάλει στην εμπειριστατωμένη μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών και στη μελέτη της υφιστάμενης κατάστασης αναφορικά με την δυναμική των μυκήτων αυτών στους αγρούς (Bayman et al. 2002, Cotty 1989, Jamali et al. 2012). Αυτή η έρευνα για την οικολογία, επιδημιολογία και αιτιολογία των μυκοτοξικογόνων μυκήτων προάγει την δημιουργία σύγχρονων μεθόδων και μοντέλων για την διαχείριση αυτών των μυκήτων και των τοξινών τους (Cotty et al. 2006).

Οι μυκοτοξίνες μπορούν να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα σε διάφορα στάδια, όπως το χωράφι, η αποθήκευση και η μεταποίηση. Ο σχηματισμός των αφλατοξινών συνήθως συμβαίνει στο χωράφι σε προσυλλεκτικό στάδιο και αύξηση της συγκέντρωσης παρατηρείται μετασυλλεκτικά κατά την αποθήκευση στα περισσότερα αγροτικά προϊόντα. Συνυπολογίζοντας το γεγονός πως οι μύκητες του γένους *Aspergillus* είναι εδαφογενείς αερομεταφερόμενοι μύκητες, η διαχείρισή τους αφορά κυρίως στην προσυλλεκτική αντιμετώπισή τους (Kaminiaris and Tsitsigiannis 2020). Κατά συνέπεια, η διαχείριση των αφλατοξινών έγκειται κυρίως στην πρόληψη της μόλυνσης από τον μύκητα και την παραγωγή των αφλατοξινών. Εφαρμογές που συμβάλλουν στη πρόληψη και αποφυγή της μόλυνσης είναι η εφαρμογή βιολογικών σκευασμάτων με μη τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus*, με ζύμες και βακτήρια, η χημική αντιμετώπιση με εγκεκριμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και η χρήση μοντέλων πρόβλεψης της μόλυνσης από αφλατοξίνες (Kaminiaris and Tsitsigiannis 2020). Οι υπάρχουσες στρατηγικές για μετασυλλεκτική διαχείριση των αφλατοξινών αφορούν κυρίως στον έλεγχο των συνθηκών αποθήκευσης, τον ορθό καθαρισμό, την αποτοξικοποίηση, την προσρόφηση των τοξινών και την διαλογή, αλλά στην πλειοψηφία τους είναι ακόμα μη οικονομικά βιώσιμες μέθοδοι (Magan et al. 2007, Torres et al. 2014, Zahoor et al. 2014, Pearson et al. 1998, Shakerardekani et al. 2012).

Επιπρόσθετα, η ραγδαία πρόοδος της τεχνολογίας κατά τα τελευταία χρόνια και ιδίως την τελευταία δεκαετία έχουν συμβάλει ιδιαίτερα στη μελέτη και την αντιμετώπιση της μόλυνσης από αφλατοξίνες. Η γενετική και οι μοριακές τεχνικές έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο σε αυτό το τομέα (Ojiambo et al. 2018). Οι ομικές τεχνολογίες (-omics) έχουν συμβάλει ουσιαστικά στη κατανόηση των μηχανισμών που βρίσκονται μεταξύ της αλληλεπίδραση ξενιστή και παθογόνου που τελικά οδηγούν στην παραγωγή αφλατοξινών (Bhatnagar 2012, Bhatnagar et al. 2018). Επιπρόσθετα, έχουν συμβάλει στη κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας του ξενιστή στη μόλυνση από τον *A. flavus* (Fountain et al. 2015, Tiwari et al. 2018). Το μεταγραφικό προφίλ τόσο του αραβοσίτου ως ξενιστή, όσο και του μύκητα έχουν διερευνηθεί κατά την αλληλεπίδραση του παθοσυστήματος αυτού (Dolezal et al. 2014).

Η μοριακή και γενετική έρευνα έχει οδηγήσει στην εύρεση ποικιλιών με ανθεκτικότητα στη μόλυνση από αφλατοξίνες (Williams et al. 2014, Brown et al. 2001, Brown et al. 2016). Συνήθως όμως αυτές δεν έχουν επιθυμητά αγρονομικά χαρακτηριστικά, οπότε δεν αξιοποιούνται στην πράξη (Warburton et al. 2014), όπως έχει αναφερθεί στο παρελθόν για μία αρχαία ποικιλία αραβοσίτου με καταγωγή από το Μεξικό (Ortega-Beltran et al. 2014). Επίσης, η χρήση μοριακών δεικτών όπως SSRs, MpM1 και SNPs, έχει χρησιμοποιηθεί στην αντιμετώπιση των αφλατοξινών, με αξιοποίησής τους, για την ανίχνευση ανθεκτικών

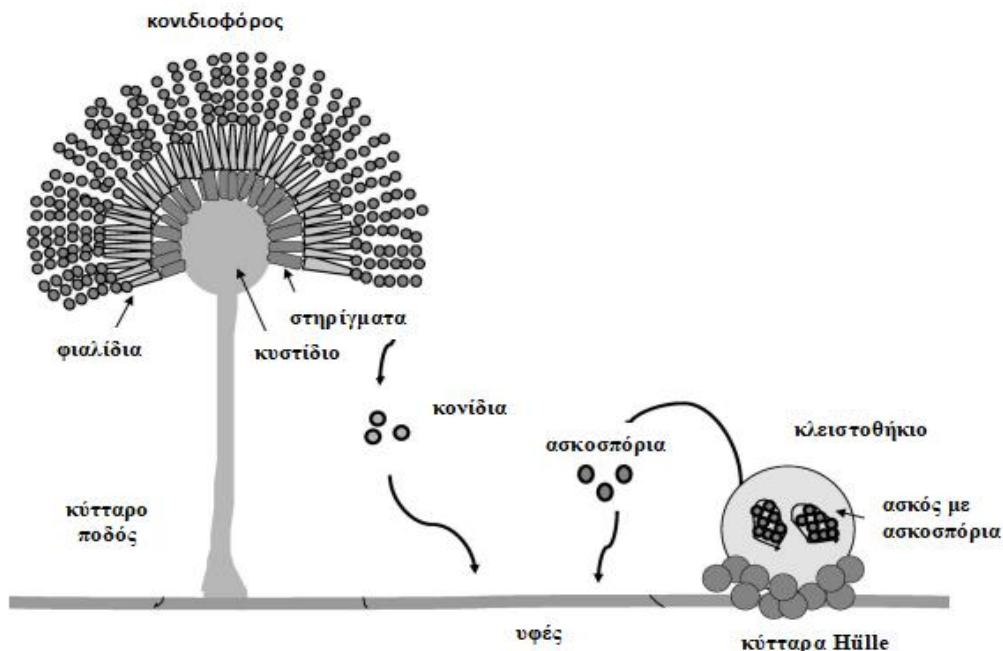
ποικιλιών αραβοσίτου (Mylroie et al. 2013). Έως σήμερα, η χρήση των ομικών τεχνολογιών έχει βοηθήσει στην εύρεση τριών κατηγοριών πρωτεϊνών ανθεκτικότητας (Resistance-associated proteins-RAPs), με τις δύο από αυτές να διαδραματίζουν ρόλο στην ανθεκτικότητα στη μόλυνση από αφλατοξίνες (Chen et al. 2007, Chen et al. 2010, Chen et al. 2012).

Παρόλα αυτά, η συμβατική βελτίωση είναι μια χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί διαγονιδιακές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση των αφλατοξινών (Cary et al. 2011). Αυτές οι προσεγγίσεις στοχεύουν είτε στην υπερέκφραση διαγονιδιακών αντιμυκητιακών γονιδίων του αραβοσίτου που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή πεπτίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα (Rajasekaran et al. 2018, Schubert et al. 2015), είτε στη χρήση μεθόδων βασισμένων σε τροποποιήσεις στο RNA που στοχεύουν κρίσιμα γονίδια για την ανάπτυξη του *A. flavus* και την παραγωγή αφλατοξινών (Majumdar et al. 2017). Τα τελευταία χρόνια οι εξελίξεις στο συγκεκριμένο ζήτημα είναι ταχύτατες και η πρόοδος στο μέλλον αναμένεται σημαντική.

Τέλος, η μόλυνση από αφλατοξίνες έχει επίσης συσχετισθεί με τις πληγές και τα νύγματα εντομολογικών εχθρών των καλλιεργειών (Georgiadou et al. 2012, Campbell et al. 2003). Τα νύγματα των εντόμων μπορούν δυνητικά να αποτελέσουν πηγές εισόδου του μύκητα και να οδηγήσουν σε μόλυνση του προϊόντος από αφλατοξίνες υπό ευνοϊκές συνθήκες για τον σχηματισμό τοξινών. Ολοκληρωμένα μέτρα φυτοπροστασίας που αφορούν και στον έλεγχο εντομολογικών εχθρών συμβάλλουν στην διαχείριση της μόλυνσης από αφλατοξίνες στους αγρούς. Με γνώμονα την ανθρώπινη ασφάλεια, απώτερος σκοπός είναι η παραγωγή ασφαλών τροφίμων, αποφεύγοντας την ποιοτική αλλά και ποσοτική υποβάθμιση του προϊόντος από μυκοτοξίνες.

#### **1.1.7.4. Βιολογικός κύκλος και επιδημιολογία του *Aspergillus flavus***

Το γένος *Aspergillus* αποτελείται από εκατοντάδες είδη μυκήτων που απαντώνται σε ποικίλα περιβάλλοντα και συνθήκες παγκοσμίως. Ορισμένα είδη του μύκητα έχουν την δυνατότητα να παράγουν μυκοτοξίνες ως προϊόντα του δευτερογενούς τους μεταβολισμού. Οι αφλατοξίνες (B1, B2, G1, G2) είναι μία κατηγορία τέτοιων μυκοτοξινών που παράγονται από είδη *Aspergillus* sp. και προσβάλλουν πλήθος γεωργικών προϊόντων. Έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί πάνω από 300 είδη διαφορετικών μυκοτοξινών και αυτός ο αριθμός συνεχώς αυξάνεται λόγω του αυξανόμενου ενδιαφέροντος για παραγωγή τροφίμων απαλλαγμένα από μυκοτοξίνες (Adegoke 2004). Αυτά τα τοξικά μόρια, επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα και την ασφάλεια των παραγόμενων φυτικών και ζωικών προϊόντων. Οι αφλατοξίνες βρίσκονται ανάμεσα στις πιο επικίνδυνες για τον άνθρωπο μυκοτοξίνες και μπορούν να παραχθούν σε πληθώρα γεωργικών προϊόντων τόσο προσυλλεκτικά όσο και μετασυλλεκτικά κατά την αποθήκευση (Cotty et al. 2007). Κατατάσσονται από τον διεθνή οργανισμό για την έρευνα για τον καρκίνο (International Agency for Cancer Research (IARC)) στην κατηγορία επικινδυνότητας νούμερο 1 (Class 1) λόγω των ιδιαίτερα έντονα καρκινογόνων, μεταλλαξιογόνων, τερατογόνων, γονοτοξικών και υπατοτοξικών ιδιοτήτων τους ((IARC) 2002). Μεταξύ των ειδών *Aspergillus* section *Flavi*, ο κύριος αφλατοξικογόνος μύκητας είναι ο μύκητας *Aspergillus flavus* (Klich 2007). Ο εν λόγω μύκητας (Εικ. 1.19) προκαλεί έντονα προβλήματα και θέτει ερωτήματα για την ασφάλεια των τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο ήδη από την δεκαετία του 1960 (Goldbach 1969).



**Εικόνα 1.19:** Σχηματική απεικόνιση των κύριων μορφολογικών χαρακτηριστικών του γένους *Aspergillus* sp. (Tsitsigiannis et al. 2004b).

Οι αφλατοξίνες είναι μεταξύ των πιο τοξικών ουσιών που υπάρχουν φυσικά και η μόλυνσή τους αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά οικονομικά προβλήματα στην πρωτογενή παραγωγή παγκοσμίως (Peterson et al. 2001). Το επίπεδο της μόλυνσης από αφλατοξίνες και ο κίνδυνος αυτού, έχει οδηγήσει σε ευρεία έρευνα κατά τις τελευταίες δεκαετίες για τα περίπλοκα πρότυπα και μονοπάτια παραγωγής τους (Woloshuk et al. 2013, Hell et al. 2011, Cleveland et al. 2003, Adegoke et al. 2013). Ως εκ τούτου, ανώτατα επιτρεπτά όρια έχουν θεσπιστεί για την ύπαρξη επιμολυντών όπως οι αφλατοξίνες για διάφορα τρόφιμα και ζωοτροφές παγκοσμίως αλλά και στην Ευρωπαϊκή Ένωση (E.U. Commission regulation No 1881/2006, τροποποιημένη από την No 165/2010). Παρόλα αυτά, αναλύσεις του δικτύου των εμπορικών εξαγωγών αγροδιατροφικών προϊόντων και των τάσεων του εμπορίου παγκοσμίως δείχνουν ότι θέσπιση ή και τροποποίηση υπαρχόντων κανονισμών σχετικά με τη μόλυνση με αφλατοξίνες, επηρεάζουν σημαντικά τα πρότυπα του διεθνούς εμπορίου (Bui-Klimke et al. 2014, Xiong et al. 2017). Ως αποτέλεσμα, η μόλυνση των διατροφικών προϊόντων από αφλατοξίνες οδηγεί σε εκτεταμένες οικονομικές απώλειες και θέτει σοβαρά ζητήματα ασφάλειας των καταναλωτών. Ο ρόλος των κοινωνικών επιστημών στο θέμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς το πρόβλημα των αφλατοξινών είναι εξαρτώμενο και από την ενημέρωση των καταναλωτών σχετικά με τον κίνδυνο αυτό (Stepman 2018).

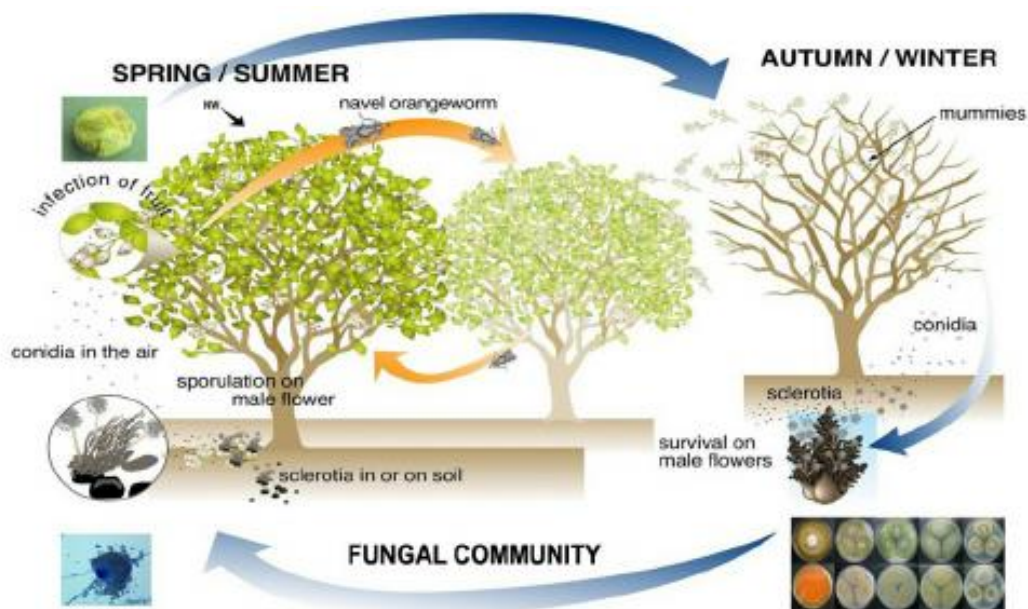
Οι μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* ευθύνονται κυρίως για τη μόλυνση των γεωργικών προϊόντων με αφλατοξίνες. Οι μύκητες του συγκεκριμένου γένους είναι ευρέως διαδεδομένοι, γεγονός που προκύπτει από το ότι τα κονίδια που παράγουν είναι ξηροσπόρια και ως εκ τούτου μεταφέρονται με τον άνεμο και προσβάλλουν τα εναέρια μέρη των φυτών (Hedayati et al. 2007). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι απομονώνονται από διάφορες κλιματικές ζώνες, το οποίο υποδεικνύει τη μεγάλη προσαρμοστικότητά τους σε ποικίλα περιβάλλοντα. Ο *A. flavus* εντοπίζεται συνήθως σε ζεστά και υγρά κλίματα, και μπορεί να επιβιώσει στο έδαφος με τη μορφή σπορίων (κονίδια) ή σκληρωτίων, ενώ στους φυτικούς ιστούς με τη μορφή μυκηλίου (Cotty et al. 2007). Τα σκληρώτια επιβιώνουν έως και τρία χρόνια στο έδαφος υπό αντίξοες συνθήκες (Georgianna et al. 2010, Amaike et al. 2011). Όσον αφορά στην οικολογία του είδους *A.*

*parasiticus*, παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με τον *A. flavus*, ωστόσο παρατηρείται μια διαφοροποίηση στη βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγής αφλατοξινών, η οποία είναι χαμηλότερη.

Από μυκητολογική άποψη, υπάρχουν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στην τοξικογόνο ικανότητα διάφορων στελεχών του ίδιου είδους γεγονός που σχετίζεται με το ότι οι αφλατοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες του μύκητα. Η λειτουργία των δευτερογενών μεταβολιτών είναι καθοριστικής σημασίας αφού επηρεάζει την οικολογία και κατ' επέκταση την προσαρμογή των μυκήτων (Frisvad et al. 2015, Calvo et al. 2015). Επίσης, οι δευτερογενείς μεταβολίτες σπάνια επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων σε συνθήκες εργαστηρίου, ωστόσο, φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην οικολογία τους ως παράγοντες προσαρμογής, όπως προστασία από υπεριώδεις ακτινοβολία ή απωθητικές ουσίες των εχθρών τους. Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η παραγωγή αφλατοξινών είναι πολυάριθμοι. Γενικότερα, επίδραση έχει παρατηρηθεί από τις κλιματολογικές συνθήκες (υγρασία, θερμοκρασία, βροχοπτώσεις), την καταλληλότητα του υποστρώματος ανάπτυξης, την ύπαρξη πληγών και τις συνθήκες αερισμού (Giorni et al. 2008, Giorni et al. 2011). Η μολυσματική ικανότητα αυτού του μύκητα συνδέεται άμεσα με ποικίλους παράγοντες, όπως η σποριοποίηση, ο δευτερογενής μεταβολισμός, η προσαρμοστικότητα σε αντίξοες συνθήκες και η παρεμπόδιση των μορίων σημάτων στο σύστημα άμυνας του ξενιστή. Επιπλέον, στον *A. flavus* υπάρχουν οι οξυλιπίνες, μια ομάδα οξυγονομένων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, οι οποίες ρυθμίζουν την παραγωγή σκληρωτίων και κονιδίων, το δευτερογενή μεταβολισμό και τις αλληλεπιδράσεις μύκητα ξενιστή (Tsitsigiannis et al. 2007, Brodhagen et al. 2008, Tsitsigiannis et al. 2004a, Tsitsigiannis et al. 2004b).

Παράγοντες που παίζουν ρόλο στη μολυσματική ικανότητα του παθογόνου είναι τα ένζυμα αποικοδόμησης και διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή των σπορίων και της αφλατοξίνης. Αυτά σχετίζονται με την επιτυχία αποίκησης στον ξενιστή, αλλά έχουν και ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή σπορίων και αφλατοξινών (Amaike et al. 2011). Ακόμη ένας παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή κονιδίων και σκληρωτίων είναι η πυκνότητα του πληθυσμού. Σε μεγάλη πυκνότητα έχει παρατηρηθεί αύξηση παραγωγής κονιδίων και μείωση παραγωγής αφλατοξίνης. Η προσβολή από το μύκητα και η επακόλουθη μόλυνση με αφλατοξίνη είναι δυνατό να συμβεί πριν ή μετά τη συγκομιδή του εκάστοτε προϊόντος. Οι τραυματισμοί και η μηχανική ζημιά που προκαλούν στο φυτικό ιστό, αποτελούν τα σημεία εισόδου του μύκητα στο προϊόν. Στο κελυφωτό φιστίκι η αυξημένη προσβολή από το μύκητα και η υψηλή συγκέντρωση αφλατοξινών συσχετίζεται και με την παρουσία εντομολογικών προσβολών. Τέλος, μετά τη συγκομιδή η μόλυνση είναι δυνατό να συμβεί όταν υπάρχουν ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης (Cotty 1997). Παρόλα αυτά, η μόλυνση ξεκινάει από τον αγρό στις περισσότερες των περιπτώσεων, όπου και πρέπει να αντιμετωπίζεται (Kaminiaris and Tsitsigiannis 2020), και πιθανόν η συσσώρευση των αφλατοξινών αυξάνεται μετασυλλεκτικά (Εικ. 1.20).

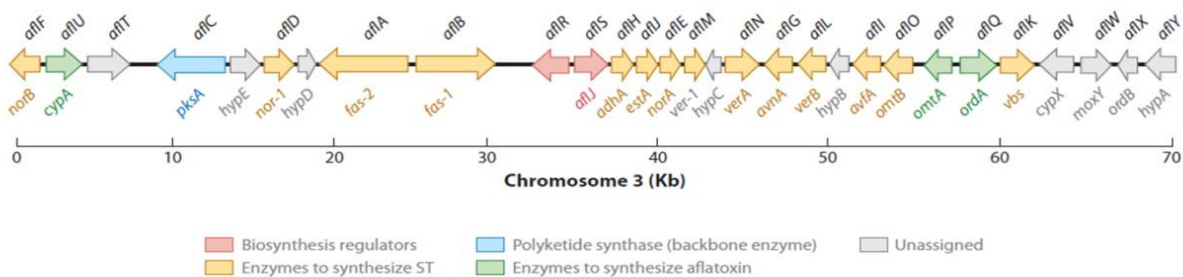




**Εικόνα 1.20:** Κύκλος ασθένειας του μύκητα *Aspergillus flavus* στην καλλιέργεια της φιστικιάς (Shams-Ghahfarokhi et al. 2013).

#### 1.1.7.5. Βιοσύνθεση αφλατοξινών

Η βιοσύνθεση των αφλατοξινών περιγράφεται από μία πολύπλοκη πορεία που περιλαμβάνει τουλάχιστον 15 ενδιάμεσες ενώσεις, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί με τη χρήση μεταλλαγμένων στελεχών, αναστολέων ενζύμων και ραδιενεργά επισημασμένων πρόδρομων ενώσεων (Gruber-Dorninger et al. 2019, Kerry 2000). Από τα 4 βασικότερα είδη αφλατοξινών, εκείνη που έχει μελετηθεί εκτενέστερα είναι η αφλατοξίνη Β1 (AFB1) λόγω των μεγάλων οικονομικών επιπτώσεων που προκαλεί στην πρωτογενή παραγωγή. Η διευκρίνιση και κατανόηση του μονοπατιού βιοσύνθεσης της AFB1 βασίζεται κυρίως στις ενζυμικές και γενετικές αναλύσεις που έχουν γίνει, ιδιαίτερα από το 1992 και ύστερα, οπότε απομονώθηκε και περιγράφηκε το πρώτο γονίδιο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεσή της (Moyné et al. 2001, Lee et al. 2003). Συνολικά εκτιμάται ότι υπάρχουν 27 ενζυματικά στάδια στη βιοσύνθεση της AFB1 και 29 γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθετη αυτή διαδικασία, ενώ έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί 17 γονίδια που καταλύουν 12 ενζυματικά στάδια στη βιοσυνθετική πορεία της AFB1. Η βιοσυνθετική διαδικασία ξεκινά με την ένωση εννέα ακετυλικών μονάδων μαλόνυλο-συνένζυμου Α (malonyl-CoA) με ένα μόριο ακέτυλο-συνενζύμου Α (acetyl CoA), προς σχηματισμό αρχικά ασταθών ενώσεων και στη συνέχεια του πρώτου σταθερού μορίου, του νορσολορινικού οξέος (norsolorinic acid), αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο της πολυκετιδικής συνθετάσης (polyketide synthase). Τα γονίδια *aflA*, *aflB* (συνθάσες του λιπαρού οξέως) και *aflC* (συνθάση του πολυκετιδίου) απαιτούνται για τη σύνθεση του νορσολορινικού οξέως από όπου σχηματίζεται η στεριγματοκυστίνη και στη συνέχεια η αφλατοξίνη (Amaike et al. 2011) (Εικ. 1.21).



**Εικόνα 1.21:** Δέσμη γονιδίων αφλατοξίνης στο μύκητα *A. flavus* που αποτελείται από 30 περίπου διαφορετικά γονίδια (Amaiike et al. 2011).

Η πλήρης αλληλούχιση του *Aspergillus flavus* έχει υπολογισθεί στα 36,8 Mb και αποτελείται από περίπου 12.000 λειτουργικά γονίδια, αρκετά από τα οποία συσχετίζονται με τον δευτερογενή μεταβολισμό. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών βρίσκονται σε δέσμες, οι οποίες περιέχουν ενζυμικά γονίδια και παράγοντες μεταγραφής. Η παραγωγή της αφλατοξίνης συνδέεται με μια δέσμη γονιδίων κοντά στην τελομερική περιοχή του χρωμοσώματος 3 του *Aspergillus flavus*. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο *aflS* ενεργοποιεί το μηχανισμό της ρύθμισης. Συνεπώς, η απενεργοποίηση του γονιδίου *aflS* έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία παραγωγής αφλατοξίνης. Αξιοσημείωτη είναι η παρουσία του γονιδίου *aflR*, το οποίο ενεργοποιεί τον μηχανισμό της μετάφρασης. Η διαγραφή του γονιδίου *aflR* οδηγεί στην απώλεια έκφρασης των γονιδίων του μονοπατιού βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης και στη διακοπή παραγωγής της. Πράγμα που σημαίνει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο είναι απαραίτητο για τη μεταγραφική ενεργοποίηση των περισσοτέρων, αν όχι όλων, των γονιδίων που ελέγχουν τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης (Teniola et al. 2005).

## ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Λαμβάνοντας υπόψιν τα προαναφερθέντα στοιχεία, καθώς και την ανάγκη για βιώσιμες οικονομικά λύσεις στο πρόβλημα των αφλατοξινών, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης πραγματοποιείται μία προσπάθεια δημιουργίας ενός σύγχρονου ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού στην Ελλάδα. Οι κύριοι πυλώνες αυτού του συστήματος διαχείρισης, κρίνεται ότι θα πρέπει να είναι οι εξής:

- Βιολογική διαχείριση των αφλατοξικογόνων μυκήτων με χρήση μη τοξικογόνων στελεχών του μύκητα *A. flavus*, ενδημικών επιφυτικών ζυμών και βακτηρίων.
- Χημική αντιμετώπιση με εφαρμογή εγκεκριμένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων με συνθετικές δραστικές ουσίες.
- Χρήση σύγχρονων μοντέλων πρόβλεψης της μόλυνσης των φιστικιών από αφλατοξίνες.
- Δημιουργία και αξιοποίηση καινοτόμων τεχνικών για τον προσδιορισμό και ανίχνευση μολυσμένων δειγμάτων από αφλατοξίνες, όπως οι αισθητήρες.

## Κεφάλαιο 2: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΗ ΤΟΞΙΚΟΓΟΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *A. FLAVUS*

### 2.1. Περίληψη

Η μόλυνση από αφλατοξίνες αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αιτίες ποιοτικής και ποσοτικής υποβάθμισης των κελυφωτών φιστικιών παγκοσμίως. Καθώς η βιολογική αντιμετώπιση είναι επιτακτική στα σύγχρονα συστήματα διαχείρισης αφλατοξινών, επικρατέστερος τρόπος βιολογικής αντιμετώπισης των μυκήτων *Aspergillus* sp. και των αφλατοξινών που παράγουν, είναι η εφαρμογή μη τοξικογόνων στελεχών *A. flavus*. Στην παρούσα ερευνητική ενότητα πραγματοποιήθηκε διερεύνηση κατάλληλων ενδημικών απομονώσεων *A. flavus* με απώτερο σκοπό τη χρήση τους ως βιολογικούς παράγοντες στην αντιμετώπιση των αφλατοξινών στη καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν 1010 απομονώσεις μυκήτων *Aspergillus* section *Flavi* από καρπούς φιστικιών από 40 φιστικεώνες στην Αίγινα και στη Φθιώτιδα για το διάστημα 2014-2017. Μελετήθηκε η τοξικογόνος ικανότητά τους και η πληθυσμιακή διακύμανση των τοξικογόνων απομονώσεων, η οποία κυμάνθηκε από 42% ως 89% αναλόγως του έτους και της περιοχής. Οι μη τοξικογόνες απομονώσεις αξιολογήθηκαν για την *in vitro* ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών 2 ενδημικών ισχυρά τοξικογόνων στελεχών *A. flavus*, και βρέθηκαν σχεδόν 90 αποτελεσματικές απομονώσεις. Στη συνέχεια οι 41 αποτελεσματικές που είχαν απομονωθεί από την Αίγινα, αξιολογήθηκαν σε *in situ* πειράματα επί καρπών κελυφωτών φιστικιών με τη χρήση ELISA. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως όλες παρεμπόδισαν την παραγωγή αφλατοξινών κατά τουλάχιστον 70% συγκριτικά με το μάρτυρα. Επίσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση αφλατοξινών σε δείγματα από 20 φιστικεώνες στη Φθιώτιδα και ακολούθησε συσχέτιση των αποτελεσμάτων με μετεωρολογικά δεδομένα της περιοχής. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι δεν παρουσιάστηκε μόλυνση από αφλατοξίνες και ότι πιθανόν σε αυτό διαδραματίζουν ρόλο οι θερινές βροχοπτώσεις. Επιπρόσθετα, 204 απομονώσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (VCGs) με σκοπό την εύρεση σταθερών κατάλληλων μη τοξικογόνων απομονώσεων για την βιολογική αντιμετώπιση των αφλατοξινών. Εντοπίστηκαν συνολικά 56 διακριτές ομάδες στην Ελλάδα. Διαπιστώθηκε επίσης, ότι η επικρατέστερη μη τοξικογόνος ομάδα είναι ενδημική και στην Ιταλία και μάλιστα σε αυτήν ανήκει και ο μύκητας που περιέχεται σε ένα ήδη εγκεκριμένο βιολογικό σκεύασμα στην Ιταλία, το AF-X1<sup>®</sup>. Τέλος έγινε επιλογή δύο κατάλληλων απομονώσεων οι οποίες εφαρμόστηκαν σε πειράματα μικρής κλίμακας αγρού στην Αίγινα κατά τη διετία 2017-2018. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων των φιστικιών με ELISA, προέκυψε πως η παρεμπόδιση στη παραγωγή αφλατοξινών κυμάνθηκε από 76,7% έως 99,9%. Η μία απομόνωση που ανήκει στην μεγαλύτερη μη τοξικογόνο ομάδα βλαστικής ικανότητας που ταυτίζεται με αυτήν του AF-X1<sup>®</sup> κρίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει μελλοντικά, ένα ισχυρό εργαλείο για τη βιολογική αντιμετώπιση των αφλατοξινών στη καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών στην Ελλάδα.

## 2.2. Εισαγωγή

Σύμφωνα με στοιχεία του διεθνούς οργανισμού τροφίμων και γεωργίας (FAO), υπολογίζεται πως πάνω από 25% της ετήσιας παραγωγής αγροτικών προϊόντων μολύνεται από μυκοτοξίνες (Medeiros et al. 2012). Ένας από τους πιο αποτελεσματικούς, οικονομικά βιώσιμους, τρόπους διαχείρισής τους είναι η προσυλλεκτική βιολογική αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων σε επίπεδο αγρού (Udomkun et al. 2017). Κοινωνικοί αλλά και επιστημονικοί λόγοι, οδηγούν στην όλο και πιο διαδεδομένη εφαρμογή βιολογικών σκευασμάτων στην πρωτογενή παραγωγή (Mota et al. 2017). Η αντίληψη πως τα χημικά μυκητοκτόνα είναι επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία, σε συνδυασμό με την αγοραστική απαίτηση για τρόφιμα απαλλαγμένα από συνθετικά/χημικά μυκητοκτόνα, οδήγησαν με την πάροδο των ετών στη δημιουργία βιολογικών σκευασμάτων για χρήση στην αγροτική παραγωγή. Η σχετικά περιορισμένη έρευνα πάνω στην αποτελεσματικότητα των χημικών μυκητοκτόνων κατά των φυτοπαθογόνων αφλατοξικογόνων μυκήτων, αλλά και η δημιουργία ανθεκτικότητας, λόγω της μη ορθής/αλόγιστης εφαρμογής των χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ώθησε περαιτέρω την έρευνα προς εναλλακτικές μεθόδους διαχείρισης των μυκοτοξικογόνων μυκήτων, με απώτερο σκοπό την παραγωγή ασφαλών τροφίμων (Nguyen et al. 2017).

Σε αυτά τα πλαίσια, η βιολογική αντιμετώπιση με χρήση μικροοργανισμών ανταγωνιστών όπως μη τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus*, επιφυτικές ζύμες αλλά και βακτήρια έχει αναπτυχθεί ως μια αποτελεσματική εναλλακτική μέθοδος για τη διαχείριση μυκοτοξικογόνων μυκήτων και των τοξινών που παράγουν (Tsitsigiannis et al. 2012, Yin et al. 2008). Είναι ευρέως αποδεκτό ότι ένα αποτελεσματικό βιολογικό σκεύασμα θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από ορισμένα στοιχεία. Η αποτελεσματικότητα τέτοιων προϊόντων εξαρτάται από την έρευνα που έχει διεξαχθεί ως προς τη βιολογία και οικολογία του μελετώμενου μικροοργανισμού αλλά και τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή από την οποία έχει απομονωθεί και ως εκ τούτου τις περιβαλλοντικές συνθήκες στην περιοχή που θα εφαρμοστεί. Τα κύρια χαρακτηριστικά του ιδανικού μικροοργανισμού ανταγωνιστή είναι τα εξής: γενετική σταθερότητα, αποτελεσματικότητα σε μικρές συγκεντρώσεις αλλά και σε ευρύ φάσμα φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών σε διάφορες καλλιέργειες, ικανότητα επιβίωσης σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες, ανάπτυξη σε απλά υποστρώματα, έλλειψη παθογόνου ικανότητας κατά των φυτών, των ανθρώπων και των οργανισμών μη-στόχων όπως οι μέλισσες (Ortega-Beltran et al. 2018) και τέλος, ανθεκτικότητα στα ευρέως εφαρμοζόμενα χημικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα, καθώς και συμβατότητα με άλλα φυσικά και χημικά σκευάσματα που εφαρμόζονται στα πλαίσια της φυτοπροστασίας (Spadaro et al. 2004).

Οι απομονώσεις του μύκητα *A. flavus* ποικίλουν ως προς την ικανότητά τους να παράγουν αφλατοξίνες. Απομονώσεις που παράγουν τουλάχιστον μία από τις τέσσερις αφλατοξίνες σε οποιοδήποτε επίπεδο, χαρακτηρίζονται ως τοξικογόνες. Ενώ απομονώσεις που δεν παράγουν καθόλου αφλατοξίνες λόγω σημειακής μετάλλαξης ή και απουσίας ολόκληρου γονιδίου του μονοπατιού βιοσύνθεσης των αφλατοξινών χαρακτηρίζονται ως μη τοξικογόνες (Wei et al. 2014). Μερικά μη τοξικογόνα στελέχη χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών από τα τοξικογόνα στελέχη όταν συγκαλλιεργούνται ή συνυπάρχουν στη φύση (Probst et al. 2011, Lyn et al. 2009, Dörner 2009). Αυτός ο συγκεκριμένος μηχανισμός βασίζεται στον βιολογικό ανταγωνισμό και αποκλεισμό των τοξικογόνων στελεχών από τα μη τοξικογόνα στελέχη (Cotty 2006, Cotty et al. 1993). Ερευνητές έχουν απομονώσει και ταυτοποιήσει παγκοσμίως μη τοξικογόνα στελέχη του μύκητα από διάφορες καλλιέργειες, που έχουν την ικανότητα να μειώνουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες από τα τοξικογόνα στελέχη σε συνθήκες εργαστηρίου *in vitro* (Mostafa et al. 2013, Bandyopadhyay et al. 2005, Patel et al. 2014). Ως αποτέλεσμα, ερευνητές έχουν επιβεβαιώσει τα εργαστηριακά αποτελέσματα, σε πραγματικές συνθήκες αγρού, αποδεικνύοντας

στατιστικά σημαντική μείωση αφλατοξινών σε επίπεδο έως και 100% επί του μάρτυρα από την εφαρμογή των μη τοξικογόνων στελεχών (Brown et al. 1991, Cotty 1990, Atehnkeng et al. 2008a, Abbas et al. 2006, Cotty 1994).

Εκτός από την αποτελεσματικότητα των προς μελέτη μη τοξικογόνων απομονώσεων, ένας επιπλέον παράγοντας που πρέπει να διερευνάται πριν την περαιτέρω εμπορευματοποίησή τους ως προϊόντα βιολογικής αντιμετώπισης αφλατοξινών, είναι η προσαρμογή τους στο τοπικό μικροκλίμα και βιοθέση (niche) όπου πρόκειται να εφαρμοστούν. Είναι ύψιστης σημασίας να είναι καλά προσαρμοσμένα τα στελέχη του μύκητα, στην περιοχή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες που θα εφαρμοστούν (Ehrlich 2014). Σε αντίθεση περίπτωση, η αποτελεσματικότητά τους καθώς και η επιβίωσή τους στη συγκεκριμένη βιοθέση είναι εξαιρετικά αμφίβολη. Εν κατακλείδι, οι απομονώσεις του μύκητα πρέπει να είναι ενδημικές στο περιβάλλον όπου θα εφαρμοστούν, δηλαδή να είναι απομονωμένες από αυτή την περιοχή για να είναι προσαρμοσμένες.

Για τον προαναφερθέντα λόγο, είναι ιδιαίτερος σημαντικό να διερευνάται η δομή και η σύνθεση του πληθυσμού του μύκητα *A. flavus* όπου πρόκειται να εφαρμοστεί ο βιολογικός παράγοντας. Για την διερεύνηση αυτή, ικανός αριθμός ενδημικών απομονώσεων του μύκητα πρέπει να υποβάλλεται σε μελέτη ομάδων βλαστικής συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups-VCGs) (Donner et al. 2010). Οι ομάδες αυτές είναι διακριτές ομάδες, που διαχωρίζονται βάσει της ικανότητας των απομονώσεων που τις απαρτίζουν, να σχηματίζουν αγνή γενετικό ανασυνδυασμό μόνο μεταξύ τους και όχι με απομονώσεις άλλων ομάδων. Ο ανασυνδυασμός αυτός συντελείται μέσω σύντηξης μυκηλίων και μεταφοράς γενετικού υλικού, που οδηγεί στον σχηματισμό ετεροκαρού (Bayman et al. 1991b). Η βλαστική συμβατότητα ελέγχεται πρακτικά από πολλαπλά σημεία του γενετικού υλικού (loci) και τα ετεροκάρυα μπορούν να σχηματιστούν μόνο μεταξύ απομονώσεων με πανομοιότυπους αλληλόμορφους (Leslie 1993). Ως αποτέλεσμα, τοξικογόνες απομονώσεις μπορούν να διαχωριστούν από τις μη τοξικογόνες, και ο αριθμός των μελών της κάθε ομάδας βλαστικής συμβατότητας υποδεικνύει το πόσο καλά προσαρμοσμένη είναι η ομάδα αυτή στο προς μελέτη τοπικό περιβάλλον (Ehrlich et al. 2007b, Hua et al. 2012). Ομάδες που απαρτίζονται από μεγάλο αριθμό απομονώσεων, είναι πιο πιθανόν να είναι προσαρμοσμένες σε αυτό το περιβάλλον, ενώ ομάδες με μικρό αριθμό μελών-απομονώσεων ή ομάδες που απαρτίζονται από μία απομόνωση δεν είναι κυρίαρχες.

Η διερεύνηση της πληθυσμιακής διακύμανσης με τη χρήση των VCGs, είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο προκειμένου να επιλεγεί η κατάλληλη απομόνωση που θα χρησιμοποιηθεί ως βιολογικός παράγοντας μεταξύ των αποτελεσματικών απομονώσεων στην παρεμπόδιση παραγωγής αφλατοξινών (Mehl et al. 2012). Οι κατάλληλες απομονώσεις θα πρέπει να είναι καλά κατανοημένες στην περιοχή που μελετάται και να μην μπορούν να ανασυνδυαστούν με απομονώσεις (για παράδειγμα τοξικογόνες), που θα οδηγήσει στο να απωλέσουν την ικανότητα παρεμπόδισης της παραγωγής αφλατοξινών των τοξικογόνων απομονώσεων. Τέτοιες μελέτες έχουν ήδη διεξαχθεί σε πολλές περιοχές παγκοσμίως, όπως για παράδειγμα στις ΗΠΑ, στην Ιταλία και στην Νιγηρία για την καλλιέργεια του αραβοσίτου (Mauro et al. 2013, Mehl et al. 2010, Atehnkeng et al. 2015), στην Αργεντινή για την καλλιέργεια της αραχίδας (Alaniz Zanon et al. 2013), στο Ιράν για την καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών (Houshyarfard et al. 2014). Η στοχευμένη αυτή έρευνα έχει οδηγήσει στην κατάλληλη εμπορευματοποίηση μη τοξικογόνων απομονώσεων του μύκητα *A. flavus* ως βιολογικούς παράγοντες παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών. Ένας από τους πρωτοπόρους του τομέα είναι ο καθηγητής P. J. Cotty, που παρουσίασε το πρώτο εμπορικό σκεύασμα μη τοξικογόνου *A. flavus*, το AF36® στις ΗΠΑ. Με την πάροδο του χρόνου, αντίστοιχες ενέργειες έλαβαν μέρος και σε άλλες χώρες όπως στην Ιταλία με το σκεύασμα AF-X1® για την διαχείριση των αφλατοξινών



στο καλαμπόκι (Mauro et al. 2018). Η αποτελεσματικότητα των σκευασμάτων αυτών έχει διερευνηθεί σε πλήθος καλλιέργειών, όπως το AF36<sup>®</sup>, στην καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών, με ιδιαίτερος επωφελή αποτελέσματα για την παραγωγή του φιστικιού (Doster et al. 2014). Άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι η ομάδα βλαστικής συμβατότητας που ανήκει η απομόνωση/δραστική ουσία του AF36<sup>®</sup>, είναι επίσης ενδημική και στο Μεξικό, που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η άδεια χρήσης του συγκεκριμένου σκευάσματος, πιθανόν να μπορεί να επεκταθεί και για χρήση σε άλλες χώρες (Ortega-Beltran et al. 2016).

Η εφαρμογή τέτοιων εμπορικών προϊόντων είναι απλή και με χαμηλό κόστος. Καθώς η εφαρμογή εναιωρήματος κονιδίων του μύκητα μεγάλου όγκου, δεν είναι πάντα συμβατή με τις επιταγές των σύγχρονων αγρονομικών πρακτικών σε περιοχές που παρατηρείται μόλυνση των καλλιεργειών από αφλατοξίνες, η ανάγκη για εναλλακτικές μεθόδους διαχείρισης κατέστη επιτακτική αξιοποιώντας σύγχρονες μεθόδους σύστασης και τυποποίησης των προϊόντων αυτών. Αποστειρωμένοι σπόροι σιταριού ή σόγιας χρησιμοποιούνται πλέον συνήθως ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μη τοξικογόνου στελέχους που έχει επενδυθεί επί αυτών. Έτσι επιτυγχάνεται ταχεία ανάπτυξη και σποριογένεση του μύκητα. Οι σπόροι αυτοί εφαρμόζονται στην επιφάνεια του εδάφους της καλλιέργειας με προβλήματα μόλυνσης από αφλατοξίνες (Daigle et al. 1995). Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι απαιτεί μικρές ποσότητες κονιδίων του μύκητα και το γεγονός πως ευνοείται η επιβίωση του μύκητα επί των σπόρων, τόσο στην αποθήκευση του προϊόντος, όσο και μετά την εφαρμογή στον αγρό, σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες (Bock et al. 1999). Η επιβίωση των κονιδίων του μύκητα είναι πολύ σημαντική για την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής του προϊόντος. Εκτός από το AF36<sup>®</sup> και το AF-X1<sup>®</sup>, άλλα αντίστοιχα σκευάσματα έχουν δημιουργηθεί και προωθηθεί στην αγορά παγκοσμίως, όπως το Afla-Guard<sup>®</sup> από την Syngenta και το Afla-Safe<sup>®</sup> από το Διεθνές Ινστιτούτο Τροπικής Γεωργίας (International Institute of Tropical Agriculture-ΙΙΤΑ). Η αποτελεσματικότητά τους βεβαιώνει την ύπαρξη αποτελεσματικών εργαλείων για την αντιμετώπιση ζητημάτων δημόσιας υγείας όπως οι αφλατοξίνες.

Πρόσφατα έχουν προκύψει επιστημονικά δεδομένα από μακροχρόνιες έρευνες σχετικά με την εφαρμογή τέτοιων σκευασμάτων σε περιοχές όπως η υποσαχάρια Αφρική που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα ενός τέτοιου σκευάσματος σε βάθος χρόνου δεκαετίας (Bandyopadhyay et al. 2019). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν πως δεν πρόκειται για μια τόσο αποτελεσματική και οικονομικά βιώσιμη λύση στο πρόβλημα των αφλατοξινών στις περιπτώσεις μικρού κλήρου στην Αφρική (Pitt 2019). Παρόλα αυτά, φαίνεται πως η μακροχρόνια εφαρμογή μη τοξικογόνων στελεχών όντως οδηγεί σε αποκλεισμό των τοξικογόνων στελεχών στον αγρό (Weaver et al. 2019). Ένα επιπλέον θετικό πρόσημο που προσδίδεται από την εφαρμογή τέτοιων μεθόδων είναι ότι έχει παρατηρηθεί ένα παράπλευρο αποτέλεσμα. Τα μη τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus* που εφαρμόζονται ως βιολογικοί παράγοντες έναντι των τοξικογόνων στελεχών, έχει αναφερθεί ότι μειώνουν επίσης την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium verticillioides* στην καλλιέργεια του αραβοσίτου, αλλά μπορούν να μειώνουν και την παραγωγή φουμονισινών που παράγονται από τον ίδιο τοξικογόνο μύκητα (Reis et al. 2020). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί πως το εμπορικό σκεύασμα Afla-Safe SN01, είναι ικανό να μειώνει την παραγωγή αφλατοξινών σε περισσότερες από μία καλλιέργειες όπως αυτές του αραβοσίτου και της αραχίδας στην Σενεγάλη (Senghor et al. 2020).

Καθώς τα αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της εφαρμογής των μη τοξικογόνων στελεχών ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης αφλατοξινών, η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται με ενδημικές απομονώσεις σε όλο και πιο πολλές χώρες που αντιμετωπίζουν το πρόβλημα των αφλατοξινών σε διάφορες καλλιέργειες, με πρόσφατο το παράδειγμα της εύρεσης κατάλληλων μη τοξικογόνων απομονώσεων στην Σερβία (Savic et al. 2020). Καθώς το πρόβλημα των αφλατοξινών παραμένει υπαρκτό σε πολλές χώρες και

καλλιέργειες (Njoroge 2018), μεταξύ αυτών και η καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών στην Ελλάδα (Georgiadou et al. 2012), διερευνάται η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των μυκήτων *A. flavus* αλλά και η τοξικογόνος ικανότητα διαφόρων απομονώσεων με σκοπό την εύρεση κατάλληλων μη τοξικογόνων απομονώσεων για χρήση ως βιολογικών παραγόντων σε πολλές χώρες όπως η Γκάνα και η Κένυα (Okoth et al. 2018, Agbetiameh et al. 2019).

### 2.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας

Οι δύο κύριες φιστικοπαραγωγές περιοχές της Ελλάδος είναι η Αίγινα και η Φθιώτιδα. Στο πλαίσιο της παρούσας ενότητας διεξήχθη μια έρευνα για την εύρεση κατάλληλων μη τοξικογόνων απομονώσεων *A. flavus* για τη βιολογική αντιμετώπιση των αφλατοξινών σε αυτές τις δύο περιοχές, τα πειράματα που διεξήχθησαν ήταν τα ακόλουθα.

Οι επιμέρους σκοποί της έρευνας για τους 20 επιλεγμένους φιστικεώνες της ευρύτερης περιοχής της Αίγινας και τους 3 πειραματικούς φιστικεώνες, για την περίοδο 2014 – 2018, ήταν:

- Η δημιουργία συλλογής περίπου 800 απομονώσεων μυκήτων *Aspergillus section Flavi* κατά το στάδιο της συγκομιδής, περί τα τέλη Αυγούστου, από τους επιλεγμένους φιστικεώνες, για τρία συναπτά έτη, 2014-2016.
- Η διερεύνηση της τοξικογόνου ικανότητας των απομονωθέντων στελεχών με τη χρήση TLC και στη συνέχεια η εκτίμηση της πληθυσμιακής διακύμανσης και της γεωγραφικής εξάπλωσης των μυκήτων.
- Διερεύνηση της *in vitro* επίδρασης των μη τοξικογόνων απομονώσεων του μύκητα στην παραγωγή αφλατοξινών ενός ισχυρά τοξικογόνου ενδημικού στελέχους *A. flavus* σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα με χρήση TLC.
- Αξιολόγηση της *in situ* επίδρασης των αποτελεσματικών απομονώσεων που προέκυψαν από την προηγούμενη αξιολόγηση, στην παραγωγή αφλατοξινών από το ίδιο τοξικογόνο στέλεχος, σε καρπούς κελυφωτών φιστικιών με χρήση ELISA.
- Η ομαδοποίηση σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας VCGs 150 στελεχών *A. flavus*, τοξικογόνων και μη τοξικογόνων, απομονωθέντων κατά το διάστημα 2014-2017 από τους φιστικεώνες στην Αίγινα.
- Αξιολόγηση 2 εκ των αποτελεσματικότερων μη τοξικογόνων απομονώσεων του μύκητα σε 3 φιστικεώνες στην Αίγινα, κατά των παραγόμενων αφλατοξινών του μύκητα *A. flavus* το 2017 και το 2018.

Για τους 20 επιλεγμένους φιστικεώνες της ευρύτερης περιοχής του Ν. Φθιώτιδας για το έτος 2017, οι επιμέρους σκοποί της έρευνας ήταν:

- Η ποσοτικοποίηση των αφλατοξινών στους επιλεγμένους φιστικεώνες του Ν. Φθιώτιδας με τη χρήση ELISA.
- Η δημιουργία συλλογής περίπου 200 απομονώσεων *Aspergillus section Flavi* από τους προς μελέτη φιστικεώνες.
- Ο χαρακτηρισμός των απομονώσεων των μυκήτων, ως προς την αφλατοξικογόνο ικανότητά τους με τη χρήση TLC.
- Η εύρεση αποτελεσματικών, μη τοξικογόνων στελεχών *A. flavus* ως προς την παραγωγή αφλατοξινών, βάσει *in vitro* πειραμάτων ανταγωνισμού σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα και ανάλυση με τη χρήση TLC.



- Η ομαδοποίηση των προαναφερθέντων αποτελεσματικών στελεχών *A. flavus*, καθώς και ορισμένων τοξικογόνων απομονώσεων σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας VCGs.
- Η συσχέτιση των μετεωρολογικών δεδομένων (θερμοκρασία, σχετική υγρασία και βροχόπτωση) με την ποσότητα των παραγόμενων αφλατοξινών στο Ν. Φθιώτιδας, για το διάστημα 2016-2017.

## 2.4. Μεθοδολογία

### 2.4.1. Θρεπτικά υλικά

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση των πειραμάτων της συγκεκριμένης ερευνητικής ενότητας περιγράφονται παρακάτω.

#### DRBC: Dichloran Rose Bengal

Πεπτόνη (CondaLab)	5 g
Γλυκόζη	1 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ )	1 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,5 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Χρωστική Rose Bengal	25 mg L <sup>-1</sup>
Άγαρ	20 g

Αποστείρωση στους 120 °C για 20 λεπτά και μετά από σταθεροποίηση στους 50 °C, προσθήκη 2 αντιβιοτικών/παρεμποδιστών στις εξής συγκεντρώσεις 2 mg L<sup>-1</sup> dichloran και 100 mg L<sup>-1</sup> chloramphenicol.

#### 5:2: Low nutrient medium

Χυμός V-8	50 mL
Απεσταγμένο νερό	950 mL
pH	6
Άγαρ	20 g

#### CCA: Coconut Agar

Συσκευασμένο γάλα καρύδας	250 mL
Απεσταγμένο νερό	750 mL
pH	6,9
Άγαρ	20 g

#### MEA: Malt Extract Agar

Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Εκχύλισμα βύνης (CondaLab)	10 g
pH	5,5
Άγαρ	20 g

### PDA: Potato dextrose agar

Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Εκχύλισμα πατάτας	200 mL
Δεξτρόζη	20 g
Άγαρ	20 g

### SEL Agar: Selection medium for auxotrophic mutant generation

Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Σουκρόζη (Duchefa Biochem)	30 g
Νιτρικό νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ )	3 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0,5 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,5 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,5 g
Χλωριούχο κάλιο ( $\text{KCl}$ )	0,5 g
Χλωρικό κάλιο ( $\text{KClO}_3$ )	0,5 g
Χρωστική Rose Bengal	25 $\text{mg L}^{-1}$
pH	7
Άγαρ	20 g

### A&M διάλυμα μικροστοιχείων

Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Δεκαένυδρο τετραβορικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )	0,7 g
Τετραένυδρο επταμολυβδαινικό αμμώνιο ( $\text{NH}_4$ ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0,5 g
Εξαένυδρος θειικός τρισθενής σίδηρος ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	10 g
Πενταένυδρος θειικός χαλκός (II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0,3 g
Ένυδρο θειικό μαγγάνιο (II) ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	0,11 g
Επταένυδρος θειικός ψευδάργυρος ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	17,6 g
pH	2

### MIT: Secondary selection medium

Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Σουκρόζη (Duchefa Biochem)	30g
Νιτρικό νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ )	3 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0,5 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,5 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,5 g
Χλωρικό κάλιο ( $\text{KClO}_3$ )	0,5 g
A&M διάλυμα μικροστοιχείων	1 mL
pH	6,5
Άγαρ	20 g

#### Hypoxanthine Agar (HYP): Phenotyping media

Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Σουκρόζη (Duchefa Biochem)	50 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	2 g
A&M διάλυμα μικροστοιχείων	1 mL
Υποξανθίνη	200 mg
pH	5,5
Άγαρ	20 g

#### NIT Agar: Nitrite Agar

Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Σουκρόζη (Duchefa Biochem)	50 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $KH_2PO_4$ )	1 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	2 g
A&M διάλυμα μικροστοιχείων	1 mL
Νιτρώδες νάτριο ( $NaNO_2$ )	0,69 g
pH	5,5
Άγαρ	20 g

#### Starch Agar: Complementation media

Απεσταγμένο νερό	1000 ml
Υδατοδιαλυτό άμυλο αραβοσίτου (Merck)	20 g
Νιτρικό νάτριο ( $NaNO_3$ )	3 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $KH_2PO_4$ )	0,5 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ )	0,5 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,5 g
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	0,5 g
Δεξτρόζη	36 g
A&M διάλυμα μικροστοιχείων	1 mL
pH	6
Άγαρ	20 g

#### CZA: Czapek Dox Agar

Απεσταγμένο νερό	1000 ml
Σουκρόζη (Duchefa Biochem)	30 g
Νιτρικό νάτριο ( $NaNO_3$ )	3 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $KH_2PO_4$ )	0,5 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ )	0,5 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,5 g
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	0,5 g
A&M διάλυμα μικροστοιχείων	1 mL
pH	6
Άγαρ	20 g

Η αποστείρωση όλων των θρεπτικών υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης υπό συνθήκες θερμοκρασίας 121 °C και πίεσεως 1,2 atm για 20 λεπτά.

## 2.4.2. Μέθοδοι

### 2.4.2.1. Δημιουργία συλλογής απομονώσεων *Aspergillus section Flavi*

Στα πλαίσια της δημιουργίας της συλλογής των απομονώσεων των μυκήτων, έγινε συλλογή φιστικιών από 20 φιστικεώνες στην Αίγινα τα έτη 2014, 2015 και 2016 (Εικ. 2.1) και από 21 φιστικεώνες στην ευρύτερη περιοχή της Φθιώτιδας το 2017 (Εικ. 2.2). Η συλλογή πραγματοποιήθηκε στο στάδιο της συγκομιδής των καρπών, περί τα τέλη Αυγούστου έως αρχές Σεπτεμβρίου, στην ημερομηνία συγκομιδής για τον εκάστοτε φιστικεώνα. Τα φιστίκια μεταφέρθηκαν με φορητό ψυγείο απευθείας στο εργαστήριο, όπου έγινε η απομόνωση των μυκήτων.



**Εικόνα 2.1:** Φιστικεώνες στην Αίγινα από όπου πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και συλλογή φιστικιών για τα έτη 2014-2016.



**Εικόνα 2.2:** Φιστικεώνες στην ευρύτερη περιοχή του Ν. Φθιώτιδας από όπου πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και συλλογή φιστικιών το 2017.



Η απομόνωση των μυκήτων πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα DRBC. Τα φιστίκια από κάθε αγρό, αρχικά αποστειρώθηκαν επιφανειακά με εμβάπτιση σε υποχλωριώδες νάτριο 0,05% (υδατικό διάλυμα 10% εμπορικού διαλύματος χλωρίνης) για 3 λεπτά και στη συνέχεια σε 70% αιθανόλη για 1 λεπτό. Τέλος, ακολούθησε έκπλυση σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και τοποθέτηση υπό ασηπτικές συνθήκες στα τρυβλία με το τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε επώαση των τρυβλίων για 4-6 ημέρες σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με σταθερή θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 10 ωρών. Μετά το πέρας των 4-6 ημερών και εφόσον είχε αναπτυχθεί από τους καρπούς απομόνωση του μύκητα *Aspergillus section Flavi* (Εικ. 2.3), η καλλιέργεια μεταφερόταν με γραμμική διασπορά (streaking) με τη χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου και υπό ασηπτικές συνθήκες σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα 5:2. Στη συνέχεια, ακολουθούσαν 3 διαδοχικές σειρές καθαρισμού των στελεχών σε υπόστρωμα 5:2, προκειμένου να ληφθεί καθαρή μονόσπορη καλλιέργεια του στελέχους και να αποθηκευτεί σε αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα 25% γλυκερόλης στους -80 °C για μακροχρόνια διατήρηση.



**Εικόνα 2.3:** Καρποί φιστικιών σε υπόστρωμα DRBC μετά από 5 ημέρες επώαση. Στελέχη *Aspergillus section Flavi* και *Aspergillus section Nigri* έχουν αναπτυχθεί επί των καρπών.

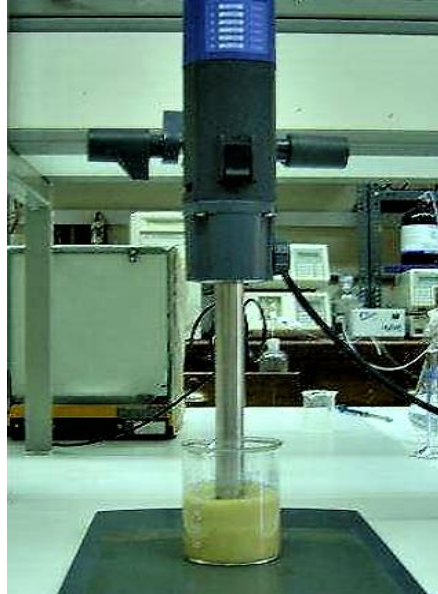
Μεταξύ κάθε διαδοχής σειράς καθαρισμού σε 5:2, μεσολαβούσε διάστημα επώασης δύο ημερών σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με σταθερή θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδου 10 ωρών. Απομονώθηκαν συνολικά 770 στελέχη από τους φιστικεώνες στην Αίγινα κατά το διάστημα 2014-2016 και 240 στελέχη από τους φιστικεώνες στην ευρύτερη περιοχή του Ν. Φθιώτιδας το 2017.

#### **2.4.2.2. Ποσοτικός έλεγχος αφλατοξινών σε φιστικεώνες του Ν. Φθιώτιδας**

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός έλεγχος αφλατοξινών, τα φιστίκια κονιορτοποιήθηκαν και ομογενοποιήθηκαν πριν την εκχύλιση των αφλατοξινών. Πριν την εκτέλεση της διαδικασίας τα φιστίκια τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε καταψύκτη στους -20 °C, ώστε να διευκολυνθεί η κονιορτοποίησή τους και η καλή ανάμειξη του δείγματος με το διαλύτη για την βέλτιστη δυνατή εξαγωγή αφλατοξινών. Την επόμενη ημέρα, κονιορτοποιήθηκαν σε μπλέντερ και ζυγίστηκαν 20 g από κάθε δείγμα για εξαγωγή ολικών αφλατοξινών. Σε αποστειρωμένο γυάλινο ποτήρι ζέσεως, τοποθετήθηκαν 20 g κονιορτοποιημένων φιστικιών από κάθε δείγμα μαζί με 100 mL διαλύματος μεθανόλης 70% (70



μεθανόλη:30 απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό). Στη συνέχεια, με τη βοήθεια μηχανήματος Ultra Turrax (T25 basic IKA- Werke), έγινε ομογενοποίηση για 3 λεπτά, (Εικ. 2.4). Τέλος, ακολούθησε διήθηση των δειγμάτων με χρήση διηθητικού χαρτιού Whatman No. 1 και χρήση γυάλινης χοάνης, ώστε να γίνει η συλλογή του διηθήματος. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.



**Εικόνα 2.4:** Μηχάνημα Ultra Turrax το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην ομογενοποίηση των δειγμάτων.

Μετά την εξαγωγή των ολικών αφλατοξινών ακολούθησε η μέτρηση των αφλατοξινών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την χρήση ELISA AgraQuant® Aflatoxin Test Kit 4-40 ppb της εταιρείας Romer labs. Ακολούθησε προσαρμογή του pH των δειγμάτων σύμφωνα με το Test Kit ανάλυσης. Τέλος, για ανάγνωση των αποτελεσμάτων, η πλάκα με τα δείγματα τοποθετήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (ELx800 της εταιρείας BioTek) για ELISA plates και η μέτρηση έγινε με φίλτρο 450 nm σε συνδυασμό με διαφορετικό φίλτρο 630 nm.

#### **2.4.2.3. Διερεύνηση της τοξικογόνου ικανότητας των απομονώσεων *Aspergillus section Flavi***

Η ποιοτική αξιολόγηση της τοξικογόνου ικανότητας των 1.010 απομονώσεων που προέκυψαν από τη δημιουργία της συλλογής, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), ύστερα από επώαση των απομονώσεων σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα CCA (Lin et al. 1976). Τα τρυβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα εμβολιάστηκαν με ποσότητα σπορίων του κάθε στελέχους που διατηρείτο διάλυμα 25% γλυκερόλης στους -80 °C. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 28 °C και υπό συνθήκες σκότους για 12 ημέρες. Μετά το πέρας της περιόδου επώασης και την πλήρη κάλυψη του τρυβλίου με το μύκητα, κόπηκαν με φελλοτρυπητήρα και αφαιρέθηκαν 10 δισκία θρεπτικού υποστρώματος διαμέτρου 9 mm, με τον ήδη αναπτυγμένο μύκητα επί αυτών. Τα δισκία μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο τύπου Falcon που περιείχαν 5 mL χλωροφόρμιο έκαστο, όπου και παρέμειναν μέχρι την επόμενη ημέρα σε συνθήκες δωματίου. Την επόμενη ημέρα, αφού αφαιρέθηκαν τα δισκία από τα σωληνάρια, το διάλυμα που παρέμεινε μέσα σε αυτά φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 5.000 στροφές, σε

φυγόκεντρο Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments). Στη συνέχεια, η υπερκείμενη φάση απορρίφθηκε και η υποκείμενη φάση τοποθετήθηκε σε νέο όμοιο σωληνάριο, όπου και παρέμεινε για 2 ημέρες σε απαγωγό εστία προκειμένου να εξατμιστεί πλήρως ο οργανικός διαλύτης (χλωροφόρμιο).

Ακολούθησε προετοιμασία της πλάκας TLC, όπου σημειώθηκαν με τη χρήση χάρακα και μολυβιού, οι αποστάσεις της λευκής πλάκας καθώς και οι θέσεις των δειγμάτων οι οποίες απείχαν μεταξύ τους 1 cm. Σε κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  χλωροφορμίου και καλή ανάδευση. Με τη χρήση μικροπιπέτας, έγινε τοποθέτηση σταγόνας όγκου 10  $\mu\text{L}$  από το κάθε δείγμα στις αντίστοιχες θέσεις φόρτωσης στην πλάκα TLC. Αφού τοποθετήθηκαν όλα τα δείγματα στο TLC plate, αυτό μεταφέρθηκε μέσα στο γυάλινο δοχείο χρωματογραφίας, το οποίο περιείχε μείγμα χρωματογράφησης αποτελούμενο από 96 mL διαιθυλαιθέρα, 3 mL μεθανόλη και 1 mL απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Το δοχείο κλείστηκε αεροστεγώς με γυάλινο καπάκι, τοποθετώντας βαζελίνη στα σημεία επαφής του δοχείου και της γυάλινης πλάκας, με στόχο την αποφυγή εξάτμισης των οργανικών διαλυτών. Η πλάκα TLC αφέθηκε στο δοχείο για περίπου 40-60 min, μέχρι το διάλυμα να φθάσει σε απόσταση 13 cm από τη γραμμή που τοποθετήθηκαν αρχικά τα δείγματα. Τέλος, η πλάκα TLC αφαιρέθηκε και αφέθηκε για 5 λεπτά στην απαγωγό εστία, ώστε να εξατμιστούν οι διαλύτες και να στεγνώσει. Στη συνέχεια, έγινε παρατήρηση των αποτελεσμάτων της TLC σε συνθήκες σκότους και με τη χρήση λάμπας υπέρυθρου-UV (450 nm).

#### **2.4.2.4. Διερεύνηση της *in vitro* επίδρασης των μη τοξικογόνων απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus***

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δύο ενδημικά στελέχη του μύκητα *A. flavus*. Πρόκειται για τα A.f.Σ.20.1 και A.f.18.4, δύο ισχυρά τοξικογόνα στελέχη που απομονώθηκαν στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής ενότητας, το πρώτο από την περιοχή Μάκρης-Μακρακώμης και το δεύτερο από την Αίγινα το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί μάλιστα και σε άλλες ερευνητικές ενότητες της μελέτης. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 119 μη τοξικογόνες απομονώσεις από την περιοχή του Ν. Φθιώτιδας και 240 μη τοξικογόνες απομονώσεις από την Αίγινα. Οι μη τοξικογόνες απομονώσεις αξιολογήθηκαν σε συγκαλλιέργεια, ως προς την ικανότητά τους να μειώνουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες των τοξικογόνων στελεχών. Οι μη τοξικογόνες απομονώσεις κάθε περιοχής αξιολογήθηκαν έναντι των τοξικογόνων της αντίστοιχης περιοχής.

##### **2.4.2.4.1 Συγκαλλιέργεια τοξικογόνων και μη τοξικογόνων στελεχών *A. flavus***

Τα δύο τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* καθώς και όλα τα μη τοξικογόνα στελέχη εμβολιάστηκαν και αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα PDA για πέντε ημέρες σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με σταθερή θερμοκρασία 28 °C και φωτοπερίοδο 10 ωρών. Ακολούθησε συλλογή των κονιδίων όλων των στελεχών σε σωληνάριο Eppendorf με 1 mL δις απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Οι συγκεντρώσεις τους μετρήθηκαν με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου. Για κάθε μη τοξικογόνο στέλεχος προστέθηκε υδατικό αιώρημα των κονιδίων του συγκέντρωσης  $10^6$  κονίδια/mL, μαζί με υδατικό αιώρημα των κονιδίων του τοξικογόνου στελέχους της ίδια περιοχής προέλευσης σε συγκέντρωση  $10^6$  κονίδια/mL, σε 10 mL τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα CCA (0,7% άγαρ) που διατηρείτο σε σταθερή θερμοκρασία 50 °C σε υδατόλουτρο. Το μείγμα αναδεύτηκε επαρκώς και τοποθετήθηκε σε τρυβλίο με 15 mL ήδη στρωμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα CCA (2% άγαρ). Για τη δημιουργία του μάρτυρα ακολουθήθηκε αντίστοιχη διαδικασία, με τη διαφορά ότι στα 10 mL CCA 0,7% άγαρ, έγινε προσθήκη μόνο κονιδίων του καθενός από τα δύο τοξικογόνα στελέχη *A. flavus* με τελική συγκέντρωση  $10^6$  κονίδια/mL.

Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις του πειράματος, δηλαδή των 119 μη τοξικογόνων απομονώσεων από την περιοχή του Ν. Φθιώτιδας με το τοξικογόνο στέλεχος A.f.Σ.20.1 και 240 μη τοξικογόνων απομονώσεων από την Αίγινα με το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 28°C και υπό συνθήκες σκότους για 12 ημέρες.

#### **2.4.2.4.2. Εξαγωγή αφλατοξινών και χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος**

Μετά το πέρας της περιόδου επώασης των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε εξαγωγή των αφλατοξινών και ανάλυση με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography- TLC). Η εξαγωγή των ολικών αφλατοξινών και η ανάλυσή τους για κάθε τρυβλίο πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.2.3. Με βάση τα αποτελέσματα χρωματογραφίας στις πλάκες TLC, προέκυψαν οι αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις που προκάλεσαν μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος της αντίστοιχης τοποθεσίας.

#### **2.4.2.5. Διερεύνηση της *in situ* επίδρασης μη τοξικογόνων στελεχών στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *A. flavus***

Από την προηγούμενη ενότητα προέκυψαν ορισμένες αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις από τον Ν. Φθιώτιδας και την Αίγινα. Στην παρούσα μελέτη, οι αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις που προέκυψαν κατά την *in vitro* αξιολόγηση και προέρχονταν από την Αίγινα, αξιολογήθηκαν έναντι των παραγόμενων αφλατοξινών του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε καρπούς κελυφωτών φιστικιών *in situ*.

Για αυτό το σκοπό, αποφλοιωμένοι και αποκολλημένοι από το κέλυφος καρποί φιστικιών της ποικιλίας Αιγίνης χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα. Τα φιστίκια αρχικά αποστειρώθηκαν επιφανειακά με εμβάπτιση σε υποχλωριώδες νάτριο (υδατικό διάλυμα 10% διαθέσιμου εμπορικού χλωρίου) για 11 λεπτά και στη συνέχεια σε 70% αιθανόλη για 6 λεπτά, και τέλος ακολούθησε έκπλυση σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, τα φιστίκια τυλίχτηκαν σε αποστειρωμένα φύλλα χαρτιού Whatman μέχρι να στεγνώσουν πλήρως. Ακολούθως, τοποθετήθηκαν 35 mL αποστειρωμένο απιονισμένο νερό τροποποιημένο με 0,01% Tween20® σε αποστειρωμένες Erlenmeyer Flasks 250 mL και εμβολιάστηκαν με  $10^6$  κονίδια mL<sup>-1</sup> του τοξικογόνου στελέχους και  $10^6$  κονίδια mL<sup>-1</sup> του κάθε μη τοξικογόνου στελέχους. 30 καρποί φιστικιών τοποθετήθηκαν σε κάθε Erlenmeyer Flask και κάθε εναιώρημα επώαστηκε για 30 λεπτά στους 28 °C σε περιστροφικό επωαστήρα στις 150 στροφές το λεπτό (RPM) σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος τα φιστίκια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία. Από τους 30 καρπούς, 8 μεταφέρθηκαν σε καθένα από τα 3 τρυβλία που αποτέλεσαν τις 3 επαναλήψεις του πειράματος. Τα τρυβλία περιείχαν 2 στρώσεις αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού Whatman No 1, που διαβράχθηκαν με 1 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και σκεύος όπου τοποθετήθηκαν 2 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού, για διατήρηση υψηλής υγρασίας κατά την επώαση. Τα τρυβλία με τα φιστίκια επώαστηκαν για 7 ημέρες σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 28 °C και υπό συνθήκες σκότους. Για τη δημιουργία του μάρτυρα, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία χωρίς την προσθήκη κονιδίων μη τοξικογόνου στελέχους, οπότε έγινε μόλυνση μόνο με το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4.

Μετά το πέρας της επώασης των 7 ημερών, 24 καρποί που αντιστοιχούσαν στο σύνολο των 3 επαναλήψεων κάθε εφαρμογής μη τοξικογόνου στελέχους ομογενοποιήθηκαν και οι αφλατοξίνες εκχυλίστηκαν με ανάμιξη σε μεθανόλη 70% για 3 λεπτά χρησιμοποιώντας αναμικτήρα υψηλής ταχύτητας (Ultra Turax T 25 Basic IKA, Werke 6.500- 24.000 σ.α.λ.), όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.4.2.2. Στη συνέχεια διεξήχθη ανάλυση των παραχθέντων αφλατοξινών με τη μέθοδο ELISA με χρήση ποσοτικού

κιτ προσδιορισμού Elisa AgraQuand® συνολικής αφλατοξίνης 4/40  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Romer Labs) (LOD = 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), όπως περιγράφεται επίσης στην παράγραφο 2.4.2.2. Η απορρόφηση μετρήθηκε χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης ELx800 από την BioTek. Τα δείγματα που υπερέβαιναν το όριο ανίχνευσης του κιτ, τα 40  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , αραιώθηκαν κατάλληλα για να φθάσουν μια τιμή εντός του ορίου ανίχνευσης (4-40  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

#### **2.4.2.6. Ομαδοποίηση απομονώσεων του μύκητα σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups)**

Από τα προηγούμενα πειράματα ανταγωνισμού τόσο *in vitro*, όσο και *in situ*, προέκυψαν ορισμένες μη τοξικογόνες απομονώσεις του μύκητα που ήταν αποτελεσματικές ως προς την ικανότητα μείωσης των παραγόμενων αφλατοξινών από τα τοξικογόνα στελέχη. Στα πλαίσια του παρόντος κεφαλαίου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ομαδοποίησης συγκεκριμένου αριθμού απομονώσεων προκειμένου να επιλεγεί η κατάλληλη ή κατάλληλες που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών.

##### **2.4.2.6.1. Ετεροκαρύωση και βιολογική σημασία**

Μια ιδιαίτερα σημαντική πτυχή των αλληλεπιδράσεων, που κυμαίνονται από τη συμβίωση μέχρι τον παρασιτισμό μεταξύ ευκαρυωτικών οργανισμών, είναι η ικανότητα για αναγνώριση του ετέρου (Frey-Klett et al. 2011, Leeder et al. 2011). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του τρόπου ζωής των υφομυκήτων είναι η ικανότητά τους να υποβάλλονται σε συντήξεις ή αλλιώς αναστομώσεις των υφών εντός των αποικιών τους, ώστε να σχηματίζουν μυκηλιακά δίκτυα, τα οποία θεωρείται ότι διασφαλίζουν την αποτελεσματική μεταφορά θρεπτικών στοιχείων και την κοινή χρήση των πόρων (Fleißner 2012). Η διαδικασία αναστόμωσης των βλαστικών υφών με σκοπό τη δημιουργία βιώσιμων ετεροκαρύων είναι δυνατό να συμβεί και μεταξύ γενετικά διαφορετικών αποικιών μυκήτων παρά το γεγονός αυτό όμως, δε συμβαίνει μεταξύ των αποικιών με όλους τους δυνατούς γονότυπους.

Είναι ακόμη γνωστό ότι κατά την επαφή διαφορετικών στελεχών ενός μύκητα, ο σχηματισμός βιώσιμων ετεροκαρύων παρεμποδίζεται σε πολλές περιπτώσεις από τη λειτουργία συστημάτων ασυμβατότητας (Caten et al. 1966, Heale 1966). Επιπροσθέτως, είναι γενικά αποδεκτό ότι ο σχηματισμός βιώσιμων ετεροκαρύων μεταξύ δύο γενετικά διαφορετικών στελεχών ενός μύκητα είναι επιτρεπτός μόνον εφόσον αυτά δεν διαφέρουν γενετικά σε ένα σύνολο γονιδίων που ελέγχουν την ετεροκαρύωση. Η βλαστική συμβατότητα όπως έχει προαναφερθεί, ελέγχεται πρακτικά από τόπους πολλαπλής βλαστικής ασυμβατότητας (*het*) και τα ετεροκάρυα μπορούν να σχηματιστούν μόνο μεταξύ στελεχών με ταυτόσημα αλληλόμορφα (Leslie 1993). Σε περίπτωση λοιπόν που δύο στελέχη διαφέρουν ως προς γονίδια που ελέγχουν την ετεροκαρύωση, προκύπτει η ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα η οποία καταλήγει στην καταστροφή των ετεροκαρυωτικών κυττάρων μέσω μιας πορείας προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Glass et al. 2000, Saupé et al. 2000, Hutchison et al. 2012).

Η ετεροκαρύωση είναι συχνά απαντώμενη στην άγρια φύση και είναι μια σημαντική πηγή ευελιξίας και επιβίωσης για τους φυσικούς πληθυσμούς των ομόθαλλων ασκομυκήτων αλλά και των ατελών μυκήτων (Caten et al. 1966). Πολλές είναι οι θεωρίες που έχουν διατυπωθεί για την εξήγηση της ετεροκαρυωτικής συμβατότητας ή ασυμβατότητας, οι περισσότερες όμως ενδείξεις συνηγορούν υπέρ της θεωρίας του μηχανισμού αναγνώρισης, η οποία είναι και η επικρατέστερη σήμερα (Hutchison et al. 2012). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι πολυμορφισμοί στα γονίδια της ετεροκαρύωσης, διατηρούνται λόγω επιλογής, καθώς ο μη σχηματισμός ετεροκαρύων μετά από αναγνώριση της γενετικής ταυτότητας προσδίδει πλεονεκτήματα στους μύκητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στο οποίο η ετεροκαρυωτική συμβατότητα επιφέρει

επιλεκτικό πλεονέκτημα στους μύκητες, είναι η παραγωγή αφλατοξινών στους Ασπέργιλλους. Η παραγωγή αφλατοξινών είναι σημαντικά υψηλότερη σε συμβατές ετεροκαρυωτικές “διασταυρώσεις” και χαμηλότερη σε ασύμβατες. Επομένως, τα μυκηλιακά δίκτυα που σχηματίζονται από συντήξεις μεταξύ συμβατών υφών προσφέρουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα (Wicklowsky et al. 2007).

#### **2.4.2.6.2. Ρόλος των μεταλλαγών *Nit<sup>-</sup>* στην κατάταξη σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (VCGs)**

Μια κατηγορία μεταλλαγών που πληρεί τα απαιτούμενα κριτήρια για την επιλογή και τον διαχωρισμό των VCGs είναι οι μεταλλαγές *Nit<sup>-</sup>* (nitrate non-utilizing) στο βιοχημικό μονοπάτι αφομοίωσης των νιτρικών ιόντων (Puhalla et al. 1985). Οι μεταλλαγές αυτές χαρακτηρίζονται από το σπουδαίο πρακτικό πλεονέκτημα, ότι η επιλογή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί σχετικά εύκολα σε θρεπτικά υλικά εμπλουτισμένα με τοξικά χλωρικά ιόντα, καθώς είναι ανθεκτικές σε αυτά. Η επιλογή βασίζεται στο γεγονός ότι η μετάλλαξη σε ένα αριθμό γονιδίων μπορεί να καταργήσει την αναγωγή των νιτρικών αλάτων (Cove 1976). Το πλεονέκτημα των nitrate non-utilizing μεταλλαγών, είναι ότι η φαινοτυπική τους κατάταξη σε 3 συμπληρωματικές κλάσεις (*niaD*, *cnx* και *nirA*) είναι γρήγορη και απλή διαδικασία, καθώς βασίζεται στην αξιολόγηση της σχετικής δυνατότητας αύξησης των μεταλλαγμένων στελεχών σε θρεπτικά υλικά με νιτρικά ιόντα, νιτρώδη ιόντα ή υποξανθίνη/ινοσίνη ως μοναδικές πηγές αζώτου (Correll et al. 1987). Οι *Nit<sup>-</sup>* μεταλλάξεις διακρίνονται από την αδυναμία ανάπτυξης τους σε θρεπτικό υλικό Chapek-Dox Agar, το οποίο διαθέτει νιτρικά άλατα ως μοναδική πηγή αζώτου (Bayman et al. 1991b). Οι μεταλλάξεις που επηρεάζονται σε διαφορετικούς τόπους μπορούν να αλληλοσυμπληρώνονται όταν συνυπάρχουν, με τη ζώνη ανάπτυξης να παρομοιάζει σε πλούσια ανάπτυξη μυκηλίου άγριου τύπου ή/και σκληρωτίων (Bayman et al. 1991b).

Όσον αφορά στην κλάση *niaD*, οι μεταλλαγές αυτές αδυνατούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό με νιτρικά ιόντα ως μοναδική πηγή αζώτου, αλλά αναπτύσσονται φυσιολογικά τόσο στα νιτρώδη ιόντα όσο και την υποξανθίνη (Cove 1976). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις στερούνται του δομικού γονιδίου, που κωδικοποιεί την αποπρωτεΐνη και τη νιτρική αναγωγή. Κατά συνέπεια, τα μεταλλαγμένα *niaD* στελέχη, δύνανται να αναπτύσσονται κανονικά στα τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα Hypoxanthine Agar (HYP) και Nitrite Agar (NIT) (Πίν. 2.1) (Cotty 1994, Picot et al. 2018).

Οι μεταλλαγές *nirA*, αντιστοιχούν σε ένα ρυθμιστικό γονίδιο που είναι ειδικό για το μονοπάτι αφομοίωσης των νιτρικών ιόντων για αυτό και δεν αναπτύσσονται ούτε στα νιτρικά ούτε τα νιτρώδη ιόντα, αναπτύσσονται όμως κανονικά στην υποξανθίνη (Cove 1976). Κατά συνέπεια, τα μεταλλαγμένα *nirA* στελέχη, δεν δύνανται να αναπτύσσονται στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα Nitrite Agar (NIT) αλλά δύνανται να αναπτύσσονται στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα Hypoxanthine Agar (HYP) (Πίν. 2.1) (Cotty 1994, Picot et al. 2018).



**Πίνακας 2.1:** Ανάπτυξη των τριών τύπων μεταλλαγμένων στελεχών (*niaD*, *nirA*, *cnx*) στα τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα CZA (Chapek-Dox Agar), NIT (Nitrite Agar) και HYP (Hydroxanthine Agar). Με θετικό πρόσημο υποδηλώνεται η δυνατότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους στο εκάστοτε θρεπτικό υλικό και με αρνητικό πρόσημο η αδυναμία αντίστοιχα.

		Τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα		
		CZA	NIT	HYP
Μεταλλαγμένα στελέχη	<i>niaD</i>	-	+	+
	<i>nirA</i>	-	-	+
	<i>cnx</i>	-	+	-

Τέλος, τα μεταλλαγμένα στελέχη *cnx*, αδυνατούν να αναπτυχθούν στα νιτρικά ιόντα ή την υποξανθίνη, αναπτύσσονται όμως παρόμοια με τον φυσικό τρόπο στα νιτρώδη ιόντα (Cove 1976). Κατά αντιστοιχία, τα μεταλλαγμένα στελέχη *cnx*, αναπτύσσονται στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα Nitrite Agar (NIT), αλλά δεν δύνανται να αναπτύσσονται στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα Hydroxanthine Agar (HYP) (Πίν. 2.1) (Cotty 1994, Picot et al. 2018). Οι *cnx* μεταλλάξεις αντιστοιχούν σε 5 διαφορετικά συντηρημένα γονίδια που σχετίζονται με τη σύνθεση ενός συμπαραγόντα με μολυβδαίνιο (μολυβδοπετερίνη), ο οποίος απαιτείται για τις ενεργότητες νιτρικής αναγωγής και αφυδρογονάσης της ξανθίνης.

Η συμπληρωματικότητα μεταξύ των μεταλλαγμένων στελεχών είναι εφικτή και εμφανής στο τρυβλίο ανάπτυξης (Starch Agar), μεταξύ είτε μιας *niaD* και μιας *cnx* μετάλλαξης, είτε μεταξύ μιας *nirA* και μιας *cnx* μετάλλαξης (Cotty 1994, Grubisha et al. 2015). Η συμβατότητα διακρίνεται από την εμφάνιση μιας ζώνης αποτελούμενης από πυκνή ανάπτυξη των υφών των εκάστοτε μεταλλαγών, αλλά και από την εμφάνιση σκληρωτίων (Bayman et al. 1991b). Παρόλο που μπορεί να βρίσκονται στο ίδιο VCG, δύο μεταλλαγμένα στελέχη του ίδιου τύπου, δεν θα εμφανίσουν τη ζώνη συμβατότητας, καθώς οι μεταλλάξεις οι οποίες διαθέτουν, βρίσκονται στους ίδιους τόπους. Βέβαια, παρότι μία μετάλλαξη *niaD* με μια *cnx* διαθέτουν μεταλλάξεις σε διαφορετικούς τόπους και θεωρητικά θα έπρεπε να σχηματίσουν ζώνη συμβατότητας μεταξύ τους, αυτό δε συμβαίνει σε περίπτωση που οι δύο αυτές μεταλλάξεις δεν προέρχονται από την ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας.

Για πολλούς μύκητες οι ομάδες VCGs έχουν συσχετιστεί με το εύρος ξενιστών, την τοποθεσία, την ικανότητα διασταύρωσης, τους πολυμορφισμούς ενζύμων και νουκλεϊκών οξέων, την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών αλλά και με τη μορφολογία τους (Bayman et al. 1991b, Bayman et al. 1993, Puhalla et al. 1985, Grubisha et al. 2009, Jacobson et al. 1990, Horn et al. 1996). Η κατάταξη στελεχών μυκήτων σε VCGs είναι ένα εύχρηστο εργαλείο για την πληθυσμιακή ανάλυση των μυκήτων (Mauro et al. 2013). Από τη μέθοδο αυτή έχει προκύψει ένα σημαντικό συμπέρασμα, ότι εφόσον οι VCGs είναι μεταξύ τους ασύμβατες, τα στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες βλαστικής συμβατότητας είναι γενετικά απομονωμένα και, συνεπώς, ανήκουν σε διακριτές γενετικές ομάδες εντός του είδους, οι οποίες μπορεί να διαφέρουν σε χαρακτηριστικά της φυσιολογίας τους και της παθογένειάς τους (Leslie 1993).

#### 2.4.2.6.3. Μεταλλαξιγένεση *A. flavus* και επιλογή μεταλλαγμένων στελεχών (*Nit<sup>-</sup>* mutants)

Για τη δημιουργία των μεταλλάξεων και των *Nit<sup>-</sup>* μεταλλαγμένων στελεχών (nitrate non utilizing mutants) επιλέχθηκαν συνολικά 204 απομονώσεις του μύκητα *A. flavus*. Πιο συγκεκριμένα, από την Αίγινα



για το 2014 επιλέχθηκαν 38 απομονώσεις (28 μη τοξικογόνες και 10 τοξικογόνες), για το 2015 39 απομονώσεις (32 μη τοξικογόνες και 7 τοξικογόνες), για το 2016 15 απομονώσεις (5 μη τοξικογόνες και 10 τοξικογόνες) και για το 2017 55 απομονώσεις (44 μη τοξικογόνες και 11 τοξικογόνες). Οι επιπλέον απομονώσεις για το έτος 2017 απομονώθηκαν για τους σκοπούς της συγκεκριμένης παραγράφου αποκλειστικά όπως περιγράφεται προηγουμένως (Παράγραφος 2.4.2.1.) και η τοξικογόνος τους ικανότητα ελέγχθηκε όπως περιγράφεται επίσης προηγουμένως (Παράγραφος 2.4.2.3). Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν 51 απομονώσεις από την ευρύτερη περιοχή του Ν. Φθιώτιδας που απομονώθηκαν το 2017. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν και 6 επιπλέον μη τοξικογόνες απομονώσεις *A. flavus* που ανήκουν στη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Γ.Π.Α. και προέρχονται από προγενέστερα πειράματα σε κελυφωτά φιστίκια (Γεωργιάδου 2015). Οι 5 προέρχονται από τη Φθιώτιδα και η μία από τα Μέγαρα Αττικής. Συγκεντρωτικά για όλες τις χρονιές, 109 μη τοξικογόνες απομονώσεις χρησιμοποιήθηκαν από την Αίγινα και 38 τοξικογόνες απομονώσεις. Από την περιοχή της Φθιώτιδας χρησιμοποιήθηκαν 50 μη τοξικογόνες απομονώσεις και 6 τοξικογόνες και τέλος από την περιοχή των Μεγάρων χρησιμοποιήθηκε μία απομόνωση. Η επιλογή των στελεχών έγινε με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε η αναλογία τοξικογόνων προς μη τοξικογόνων να είναι περίπου 3:1.

Οι 204 απομονώσεις υποβλήθηκαν σε δύο διαδοχικούς καθαρισμούς με διασπορά εναιωρήματος κονιδίων σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα 5:2, ύστερα από πέντε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο νερό, με σκοπό τη λήψη μονόσπορης αποικίας. Η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με σταθερή θερμοκρασία 31 °C και υπό συνθήκες σκότους για δύο ημέρες. Μετά τους δύο διαδοχικούς καθαρισμούς, ένα δισκίο διαμέτρου 6 mm με μια μονή αποικία ανεπτυγμένη επί αυτού, μεταφερόταν με τη χρήση Spectrum™ TransferTube™ Tube (Spectrum™ 190195) στο κέντρο τρυβλίου με θρεπτικό υπόστρωμα 5:2 και επωαζόταν στις ίδιες συνθήκες για 5 ημέρες. Μετά τις 5 ημέρες επώασης, τα στελέχη αποθηκεύονταν με μεταφορά 3 δισκίων θρεπτικού υποστρώματος με αναπτυσσόμενη καλλιέργεια επ' αυτών, σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf που περιείχαν 1 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού. Τα αποθηκευμένα στελέχη διατηρούνταν σε ψυγείο στους 4 °C.

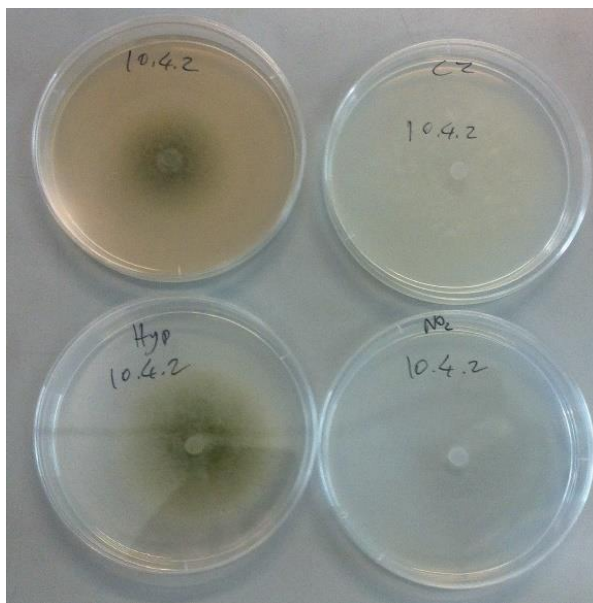
Για τη δημιουργία των μεταλλαγών στα 204 στελέχη, χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα SEL Agar (selection medium for auxotrophic mutant generation). Αρχικά δημιουργήθηκε, βοθρίο διαμέτρου 6 mm στο κέντρο του τρυβλίου με τη χρήση αποστειρωμένου TransferTube™ Tube. Για κάθε ένα από τα 204 στελέχη πραγματοποιήθηκαν 15 επαναλήψεις για λήψη επαρκούς αριθμού μεταλλαγμένων στελεχών από κάθε στέλεχος *A. flavus*. Σε κάθε τρυβλίο πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μικροπιπέτας έγχυση 15 μL εναιωρήματος κονιδίων από κάθε αποθηκευμένη απομόνωση στο κέντρο του κάθε βοθρίου. Τα τρυβλία επωάστηκαν σε συνθήκες σκότους, θερμοκρασίας 31 °C, και σχετικής υγρασίας άνω του 80%, για 7-12 ημέρες, μέχρι την εμφάνιση ανθεκτικών απομονώσεων στα χλωρικά άλατα. Η επιλογή των μεταλλαγμένων τμημάτων του μύκητα ήταν ένα από τα πιο κρίσιμα στάδια. Τα αναπτυσσόμενα τμήματα που παρουσιάζουν μετάλλαξη, αναπτύσσονται διαφορετικά μορφολογικά, είναι δύσκολα στον οπτικό εντοπισμό λόγω του ότι παρουσιάζουν εικόνα «ιστού αράχνης» (Εικ. 2.5). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως δεν παρουσίασαν όλα τα στελέχη τον ίδιο ρυθμό δημιουργίας μεταλλάξεων. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάστηκαν στελέχη με 0/15 τρυβλία με ύπαρξη μεταλλάξεων αλλά και στελέχη με 15/15 τρυβλία όπου δημιουργήθηκαν μεταλλαγές. Ωστόσο, η αναλογία μεταξύ των τριών τύπων μεταλλαγμένων στελεχών ήταν περίπου 80:15:5 (80 *niaD*: 15 *nirA*: 5 *cpx*) γεγονός που είναι σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενες αντίστοιχες μελέτες (Horn et al. 1995, Bayman et al. 1991a).



**Εικόνα 2.5:** Κοντινή λήψη της κάτω όψης του κέντρου τρυβλίου με θρεπτικό υπόστρωμα SEL Agar μετά από 8 ημέρες επώασης, με αναπτυσσόμενη καλλιέργεια στελεχούς *A. flavus* από το κέντρο του βοθρίου. Τα δύο κυκλωμένα τμήματα (δεξιά και πάνω) αποτελούν σημεία ενός νέου αυξοτροφικού μεταλλαγμένου στελεχούς που έχει δημιουργηθεί.

Μετά τη δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών, τμήμα θρεπτικού υλικού από το άκρο της αποικίας του αναπτυσσόμενου μεταλλαγμένου στελεχούς (Εικ. 2.5, κυκλωμένα τμήματα), μεταφερόταν με τη χρήση αποστειρωμένου TransferTube™ Tube σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MIT Agar (mutant culture and phenotyping media) για τον καθαρισμό της μεταλλαγμένης αποικίας και την αποφυγή επιμόλυνσης από μη μεταλλαγμένο τμήμα αποικίας. Τα τρυβλία με το MIT Agar επωάζονταν για 3 ημέρες στις ίδιες προαναφερθείσες συνθήκες. Μετά το πέρας της επώασης, μεταφέρονταν 3 δισκία θρεπτικού υποστρώματος από το άκρο της αναπτυσσόμενης καλλιέργειας με το τμήμα του μεταλλαγμένου στελεχούς ανεπτυγμένο επ' αυτού, σε σωληνάρια Eppendorf που περιείχαν 1 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού με τη χρήση αποστειρωμένου TransferTube™ Tube, με σκοπό την αποθήκευση των μεταλλαγμένων στελεχών σε ψυγείο στους 4 °C. Αποθηκεύθηκαν όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη που προέκυψαν και για όσες απομονώσεις δεν προέκυψαν τουλάχιστον δέκα μεταλλαγμένα στελέχη, η διαδικασία επαναλήφθηκε προκειμένου να προκύψουν τουλάχιστον δέκα μεταλλαγμένα στελέχη προς αποθήκευση και μετέπειτα χρήση.

Στη συνέχεια, τα αποθηκευμένα μεταλλαγμένα στελέχη χαρακτηρίστηκαν και ομαδοποιήθηκαν στους τρεις τύπους, *niaD*, *cnx* και *nirA*. Ο χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με δοκιμές αύξησης (growth assays) του μύκητα σε τρία διαφορετικά υποστρώματα, CZA για επιβεβαίωση της αδυναμίας ανάπτυξης, καθώς μη μεταλλαγμένα στελέχη αναπτύσσονται κανονικά σε CZA, MIT και HYP για το διαχωρισμό στις τρεις ομάδες. Κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος μεταφέρθηκε σε τέσσερα συνολικά θρεπτικά υποστρώματα με τη χρήση TransferTube™ Tube, στα τρία προαναφερθέντα για τον διαχωρισμό και σε 5:2 για μετέπειτα αποθήκευση (Εικ. 2.6). Τα τρυβλία επωάστηκαν σε συνθήκες σκότους, θερμοκρασίας 25 °C και σχετικής υγρασίας άνω του 80% για 5 ημέρες. Με τη συγκριτική αξιολόγηση της δυνατότητας ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών στις δύο διαφορετικές πηγές αζώτου (Πίν. 2.1) κατέστη δυνατή η κατάταξή τους στις τρεις συμπληρωματικές κλάσεις των μεταλλαγών *Nit*<sup>-</sup> (Picot et al. 2018).



**Εικόνα 2.6:** Μεταλλαγμένο στέλεχος A.f.M.10.4.2 σε 5:2 (πάνω αριστερά), CZA (πάνω δεξιά), HYP (κάτω αριστερά) και NIT (κάτω δεξιά) μετά από 5 ημέρες επώασης. Η αδυναμία ανάπτυξης σε CZA («υφή ιστού αράχνης»), επιβεβαιώνει το γεγονός πως πρόκειται για μεταλλαγμένο στέλεχος και ο συνδυασμός της ανάπτυξης σε HYP και της αδυναμίας ανάπτυξης σε NIT, υποδηλώνει πως πρόκειται για ένα μεταλλαγμένο στέλεχος *nirA* (Πίν. 2.1).

Κατόπιν του χαρακτηρισμού των μεταλλαγμένων στελεχών, ακολούθησε αποθήκευση 3 μεταλλαγμένων στελεχών για κάθε απομόνωση του μύκητα από την αναπτυσσόμενη καλλιέργεια στο θρεπτικό υπόστρωμα 5:2, πιο συγκεκριμένα ενός από την κάθε κλάση (*niaD*, *cnx* και *nirA*), με την χρήση TransferTube™ Tube σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf που περιείχαν 1 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού, όπως έχει περιγραφεί και προηγουμένως. Η αποθήκευσή τους έγινε σε ψυγείο στους 4 °C. Για όσα στελέχη δεν κατέστη δυνατόν να αποκτηθούν και οι τρεις τύποι στελεχών, αποθηκεύτηκαν οι δύο αποκτηθέντες και στις περιπτώσεις που δεν υπήρχαν ούτε δύο, η διαδικασία επαναλήφθηκε προκειμένου να αποκτηθούν τουλάχιστον δύο διαφορετικού τύπου μεταλλαγμένα στελέχη.

#### **2.4.2.6.4. Δοκιμές συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγμένων στελεχών *Nit*<sup>-</sup> και ομαδοποίηση στελεχών *A. flavus* σε VCGs**

Οι δοκιμές συμπληρωματικότητας (complementation tests) μεταξύ των μεταλλαγμένων στελεχών *Nit*<sup>-</sup> πραγματοποιήθηκαν στο θρεπτικό υλικό Starch Agar (Cotty et al. 2003). Για τη διεξαγωγή των συγκεκριμένων δοκιμών αρχικά δημιουργήθηκαν τρία βοηθία διαμέτρου 6mm με τη χρήση δις αποστειρωμένου TransferTube™ Tube στο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα βοηθία δημιουργήθηκαν έτσι ώστε να απέχουν μεταξύ τους 2-3 cm και να δημιουργούν ένα ισόπλευρο τρίγωνο, του οποίου το κέντρο ήταν το κέντρο του τρυβλίου.

Στη συνέχεια, έγινε έγχυση ποσότητας 15 μL με χρήση μικροπιπέτας από το αποθηκευμένο κονιδιακό εναιώρημα ενός *niaD* ή ενός *nirA* μεταλλαγμένου στελέχους της ίδιας απομόνωσης στο 1<sup>ο</sup> βοηθίο. Στο 2<sup>ο</sup> βοηθίο έγινε έγχυση της ίδιας ποσότητας εναιωρήματος κονιδίων ενός *cnx* μεταλλαγμένου στελέχους της ίδιας απομόνωσης. Αυτά τα δύο βοηθία αποτελούσαν το ζεύγος tester copy του πειράματος το οποίο και λειτουργούσε ως θετικός μάρτυρας, αφού επρόκειτο για δύο διαφορετικής κλάσης

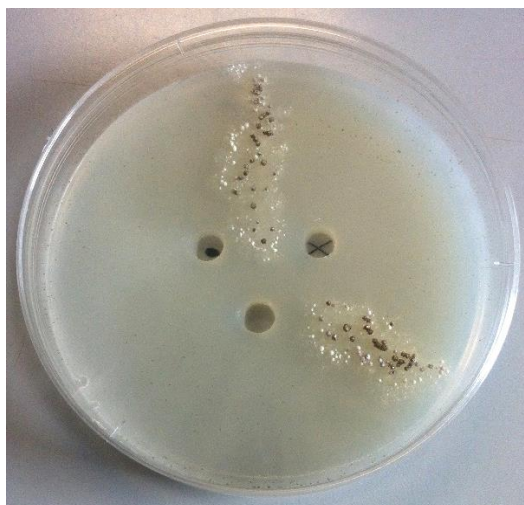
μεταλλαγμένα στελέχη της ίδιας απομόνωσης και αναμενόταν να δώσουν θετικό αποτέλεσμα στις δοκιμές συμπληρωματικότητας (Εικ. 2.7).



**Εικόνα 2.7:** Θετικός μάρτυρας του πειράματος μετά από 7 ημέρες επώαση του τρυβλίου με θρεπτικό υπόστρωμα Starch Agar. Έχει πραγματοποιηθεί τοποθέτηση ενός ζεύγους μεταλλαγμένων στελεχών tester copy της ίδιας απομόνωσης του μύκητα στα δύο πάνω βοθρία. Μεταξύ τους δημιουργείται εμφανής θετική ζώνη συμπληρωματικότητας.

Στο 3<sup>ο</sup> βοθρίο έγινε έγχυση ίσης ποσότητας κονιδιακού εναιωρήματος ενός μεταλλαγμένου στελέχους της προς μελέτη απομόνωσης, με την οποία επρόκειτο να γίνει έλεγχος συμβατότητας με την απομόνωση του tester pair. Η κλάση στην οποία ανήκε το μεταλλαγμένο στέλεχος της προς μελέτη απομόνωσης δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα και δεν ελήφθη υπόψιν, κατά συνέπεια έγινε τυχαία επιλογή.

Μετά τη μόλυνση τα τρυβλία με το Starch Agar, επώαστηκαν σε συνθήκες σκότους, θερμοκρασίας 31 °C και σχετικής υγρασίας άνω του 80% για 15 ημέρες. Ο έλεγχος για την πιθανή δημιουργία ετεροκαρύων γινόταν κάθε τρεις ημέρες από την 3<sup>η</sup> ημέρα και μετά. Το ζεύγος tester copy κάθε απομόνωσης υπεβλήθη σε δοκιμή συμπληρωματικότητας με ένα τουλάχιστον μεταλλαγμένο στέλεχος κάθε μιας απομόνωσης εκ των 204 προς μελέτη. Το θετικό αποτέλεσμα και η δημιουργία ετεροκαρύου ήταν οπτικά εμφανής λόγω της ιδιαίτερα χαρακτηριστικής του μορφολογίας και των σχηματιζόμενων σκληρωτίων στο σημείο δημιουργίας της ζώνης συμπληρωματικότητας (Εικ. 2.8).



**Εικόνα 2.8:** Τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Starch Agar μετά από 7 ημέρες επώαση. Στα δύο πάνω βοθρία έχει τοποθετηθεί το ζεύγος tester copy μίας απομόνωσης και παρατηρείται ύπαρξη ζώνης συμπληρωματικότητας ως θετικός μάρτυρας. Στο κάτω βοθρίο έχει τοποθετηθεί ένα μεταλλαγμένο στέλεχος, μιας προς μελέτη απομόνωσης και παρατηρείται δημιουργία ζώνης συμπληρωματικότητας μεταξύ των δύο, κάτω δεξιά. Κατά συνέπεια οι δύο απομονώσεις ανήκουν στο ίδιο VCG.

Με αυτό τον τρόπο και αφού η δυνατότητα δημιουργίας ζώνης συμπληρωματικότητας είχε διερευνηθεί μεταξύ όλων των προς διερεύνηση απομονώσεων *A. flavus*, προέκυψε η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας VCGs. Μεταλλαγμένα στελέχη μεταξύ των οποίων δημιουργήθηκε ζώνη συμπληρωματικότητας κατατάσσονταν στην ίδια ομάδα.

#### **2.4.2.7. Πειράματα αγρού για την διερεύνηση της ικανότητας παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών από μη τοξικογόνες απομονώσεις *A. flavus***

Με βάση τα αποτελέσματα της *in situ* παρεμπόδισης της παραγωγής αφλατοξινών, 2 μη τοξικογόνες απομονώσεις *A. flavus* επιλέχθηκαν προκειμένου να εφαρμοστούν σε φιστικεώνες στην Αίγινα, με απώτερο σκοπό τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητάς του στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών σε συνθήκες αγρού. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για τις απομονώσεις A.f.41.30 και A.f.113.31, αμφότερες απομονωμένες από φιστικεώνες στην Αίγινα το 2014. Επιλέχθηκαν για δύο κύριους λόγους. Ο πρώτος είναι πως κατά τη διάρκεια των *in situ* πειραμάτων παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών μείωσαν 88% και 86% αντίστοιχα τις παραγόμενες αφλατοξίνες. Ο δεύτερος λόγος είναι ότι βάσει των αποτελεσμάτων κατηγοριοποίησης σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας, αυτές οι δύο απομονώσεις είναι η κάθε μια, μέλος δύο εκ των πολυπληθέστερων ομάδων μη τοξικογόνων στελεχών. Μάλιστα οι δύο αυτές ομάδες εντοπίστηκαν τόσο στην Αίγινα, όσο και στην ευρύτερη περιοχή της Φθιώτιδας, και η μία από τις δύο και στα Μέγαρα, γεγονός που υποδεικνύει την ευρεία προσαρμογή τους σε φιστικεώνες σε όλες τις μελετώμενες περιοχές. Καθώς αυτή η φυσική προσαρμογή αποδεικνύεται από τον αριθμό των απομονώσεων εντός μιας ομάδας βλαστικής συμβατότητας, όσο πολυπληθέστερη είναι η ομάδα, τόσο πιο προσαρμοσμένα είναι τα μέλη της στη συγκεκριμένη βιοθέση (niche) και κατά συνέπεια τόσο καταλληλότερα θεωρούνται για εφαρμογή ως βιολογικοί παράγοντες.

Η μελέτη διεξήχθη σε ένα σύνολο 3 φιστικεώνων στην Αίγινα. Ένας από αυτούς χρησιμοποιήθηκε και τα δύο χρόνια (φιστικεώνας Α). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ένας άλλος διαφορετικός φιστικεώνας για



κάθε έτος (φιστικεώνες Β και Γ). Πρακτικά επιλέχθηκαν 2 φιστικεώνες για εφαρμογή στο νησί της Αίγινας για το 2017 και 2 φιστικεώνες για το 2018. Στον φιστικεώνα Α, που χρησιμοποιήθηκε και τα δύο χρόνια, η εφαρμογή των μη τοξικογόνων στελεχών ακολουθήθηκε από εφαρμογή, 24 ώρες αργότερα, ενός εξαιρετικά τοξικογόνου στελέχους *A. flavus* απομονωμένο από φιστικεώνα από το νησί (στέλεχος A.f.18.4, που χρησιμοποιείται επίσης σε άλλα πειράματα της παρούσας μελέτης). Ως αποτέλεσμα, για αυτό το φιστικεώνα, η μόλυνση με τον αφλατοξικογόνο μύκητα προκλήθηκε τεχνητά. Στην περίπτωση των άλλων δύο φιστικεώνων (έναν για κάθε έτος), παρατηρήθηκε ένα ιστορικό μόλυνσης από αφλατοξίνες, με βάση τα αρχεία των παραγωγών ως προς την μόλυνση από αφλατοξίνες και για αυτό το λόγο επιλέχθηκαν με βάση την υπόθεση πως το φυσικό μόλυσμα θα έχει διατηρηθεί στον φιστικεώνα και θα προκαλέσει νέες φυσικές μολύνσεις. Κατά συνέπεια, δεν εφαρμόστηκε στέλεχος του μύκητα και η μόλυνση εμφανίστηκε φυσικά.

5 δένδρα φιστικιάς επιλέχθηκαν σε τυχαίες θέσεις σε κάθε φιστικεώνα για την εφαρμογή κάθε μη τοξικογόνου στελέχους. Τα μη τοξικογόνα στελέχη εφαρμόστηκαν στο στάδιο της πρώιμης ωριμότητας των φιστικιών, στα μέσα έως τέλη Ιουνίου. Για τη δημιουργία του μολύσματος, τα στελέχη καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA σε θερμοκρασία 28 °C και φωτοπερίοδου 10 ωρών. Στη συνέχεια με τη βοήθεια αποστειρωμένης ξύλινης οδοντογλυφίδας έγινε συλλογή των κονιδίων τους και τοποθέτησή τους σε σωληνάρια Eppendorf με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Η εφαρμογή έγινε με ψεκάσμο εναιωρήματος κονιδίων με συγκέντρωση προσαρμοσμένη 10<sup>4</sup> κονίδια mL<sup>-1</sup> τροποποιημένο με 0,01% Tween20®. Ο μάρτυρας στο φιστικεώνα Α (επίσης 5 δένδρα) ψεκάστηκε με αντίστοιχο υδατικό εναιώρημα κονιδίων του τοξικογόνου στελέχους του μύκητα, 24 ώρες μετά την εφαρμογή των μη τοξικογόνων στελεχών. Ο μάρτυρας στους φιστικεώνες Β και Γ δεν είχε καμία εφαρμογή, ούτε μη τοξικογόνου, ούτε του τοξικογόνου στελέχους του μύκητα. Η συγκομιδή των φιστικιών που χρησιμοποιήθηκαν στο τρέχον πείραμα διεξήχθη σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Ευρωπαϊκής Ένωσης που ορίζει τις μεθόδους και τους κανόνες δειγματοληψίας, στα τέλη Αυγούστου, όταν τα φιστίκια φθάνουν την πλήρη ωρίμανσή τους. Τα φιστίκια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών χρησιμοποιώντας ένα φορητό ψυγείο. Η εκχύλιση διεξήχθη με τη χρήση 70% μεθανόλης και ανάλυση των αφλατοξινών με Elisa Kit ανίχνευσης αφλατοξινών, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως στη παράγραφο 2.4.2.2. και διεξήχθησαν δύο επαναλήψεις της ανάλυσεως.

#### **2.4.2.8. Συλλογή μετεωρολογικών δεδομένων των περιοχών Μακρακώμης και Λαμίας**

Με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασης των περιβαλλοντολογικών συνθηκών στα επίπεδα των αφλατοξινών στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού, έγινε συγκέντρωση διαφόρων κλιματολογικών παραμέτρων, από τον μήνα Αύγουστο του 2016 έως και το μήνα Σεπτέμβριο του 2017 για την περιοχή της Μακρακώμης και αντίστοιχα για το ίδιο χρονικό διάστημα για την περιοχή της Λαμίας. Το διάστημα συλλογής των μετεωρολογικών δεδομένων αφορά στην περίοδο από την συγκομιδή της προηγούμενης χρονιάς, έως και τη συγκομιδή της προς μελέτη χρονιάς, δηλαδή ολόκληρη την καλλιεργητική περίοδο. Η επιλογή των δύο μετεωρολογικών σταθμών έγινε με γνώμονα την μικρότερη δυνατή απόσταση από τους αγρούς. Η συλλογή των μετεωρολογικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε από τον ιστότοπο [www.meteo.gr](http://www.meteo.gr) και τα μετεωρολογικά δεδομένα που συλλέχθηκαν ήταν η μέση ημερήσια θερμοκρασία (°C), η μέγιστη ημερήσια θερμοκρασία (°C), η ελάχιστη ημερήσια θερμοκρασία (°C) και η ημερήσια βροχόπτωση (mm).

Η συλλογή των μετεωρολογικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε μόνο για την περιοχή της Φθιώτιδας και όχι της Αίγινας, για την παρούσα μελέτη. Για την περιοχή της Αίγινας πραγματοποιήθηκε



αντίστοιχη μελέτη, στο πλαίσιο της δημιουργίας ενός μοντέλου πρόβλεψης της μόλυνσης των κελυφωτών φιστικιών από αφλατοξίνες (Κεφάλαιο 6). Τα μετεωρολογικά δεδομένα από την περιοχή του νομού Φθιώτιδας, δεν κατέστη δυνατόν να αξιοποιηθούν στο πλαίσιο του Κεφαλαίου 6, λόγω της απουσίας μολυσμένων δειγμάτων φιστικιών με αφλατοξίνες στην περιοχή κατά τις μελετώμενες περιόδους.

## 2.5. Αποτελέσματα

### 2.5.1. Ποσοτικός έλεγχος αφλατοξινών σε φιστικεόνες του Ν. Φθιώτιδας

Με στόχο τη διερεύνηση του επιπέδου μόλυνσης των φιστικιών από αφλατοξίνες στους 20 επιλεγμένους αγρούς του Ν. Φθιώτιδας, έγινε ποσοτικοποίηση των παραγόμενων αφλατοξινών με τη μέθοδο ELISA. Από τα αποτελέσματα, είναι εμφανές πως τα φιστίκια των αγρών που μελετήθηκαν είναι ασφαλή για κατανάλωση καθώς είναι απαλλαγμένα από αφλατοξίνες, όπως φαίνεται και πιο αναλυτικά στον Πίνακα 2.2.

**Πίνακας 2.2:** Αποτελέσματα αναλύσεων αφλατοξινών για τα φιστίκια από τους 20 φιστικεόνες στην ευρύτερη περιοχή του Ν. Φθιώτιδας. Τα δείγματα συνοδεύονται από τυπική απόκλιση και τυπικό σφάλμα. Γραμμές που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Φιστικεόνες	Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα
1	0,89	a	0,13	0,09
2	1,35	abc	0,37	0,26
3	1,94	abcd	0,95	0,67
4	0,89	a	0,27	0,19
5	1,05	a	0,28	0,2
6	2,41	abcd	1,02	0,72
7	1,05	a	0,28	0,18
8	1,43	abc	0,81	0,58
9	3,4	d	1,13	0,8
10	1,24	ab	0,44	0,31
11	2,51	abcd	0,96	0,68
12	1,91	abcd	0,57	0,4
13	1,95	abcd	0,42	0,3
14	1,79	abcd	0,58	0,41
15	1,85	abcd	0,42	0,3
16	0,81	a	0,14	0,1
17	1,6	abc	0,85	0,6
18	3,08	cd	1,13	0,8
19	2,3	abcd	1,84	1,3
20	2,88	bcd	1,41	1

Βάσει των κανονισμών που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση, το ανώτατο επιτρεπτό όριο των συνολικών αφλατοξινών είναι τα 15  $\mu\text{g/kg}$ , για τα φιστίκια που πρόκειται να υποστούν διαλογή ή

άλλη φυσική επεξεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα. Συμπερασματικά, η ποσότητα των συνολικών αφλατοξινών στους φιστικεώνες του Ν. Φθιώτιδας, βρίσκεται εντός επιτρεπτών ορίων, καθώς κανένα από τα δείγματα δεν ξεπέρασε τα 4 μg/kg συνολικών αφλατοξινών.

### 2.5.2. Αξιολόγηση της τοξικογόνου ικανότητας απομονώσεων *Aspergillus section Flavi*

Στην παρούσα παράγραφο διερευνήθηκε η τοξικογόνος ικανότητα 1010 απομονώσεων *Aspergillus section Flavi* που απομονώθηκαν από 20 φιστικεώνες στην Αίγινα κατά το διάστημα 2014-2016 και 20 φιστικεώνες από την ευρύτερη περιοχή του Ν. Φθιώτιδας το 2017. 240 απομονώσεις προέρχονταν από το Ν. Φθιώτιδας και 770 από την Αίγινα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου TLC (Εικ. 2.9) ο πληθυσμός των απομονώσεων παρουσίασε ποικιλομορφία ως προς την ικανότητα παραγωγής αφλατοξινών. Επιπρόσθετα, μεταξύ των τοξικογόνων απομονώσεων κάποιες παρήγαγαν μόνο αφλατοξίνη B1, ενώ άλλες παρήγαγαν αφλατοξίνη B1 και αφλατοξίνη G1 (Εικ. 2.9).



**Εικόνα 2.9:** Ενδεικτικά αποτελέσματα χρωματογραφίας TLC. Κάθε φθορίζουσα ζώνη υποδεικνύει την παραγωγή αφλατοξίνης. Οι πάνω ζώνες αφορούν την παραγωγή αφλατοξίνης B1 και οι κάτω ζώνες αφορούν την παραγωγή αφλατοξίνης G1. Κάθετα παρουσιάζονται οι διαφορετικές απομονώσεις.

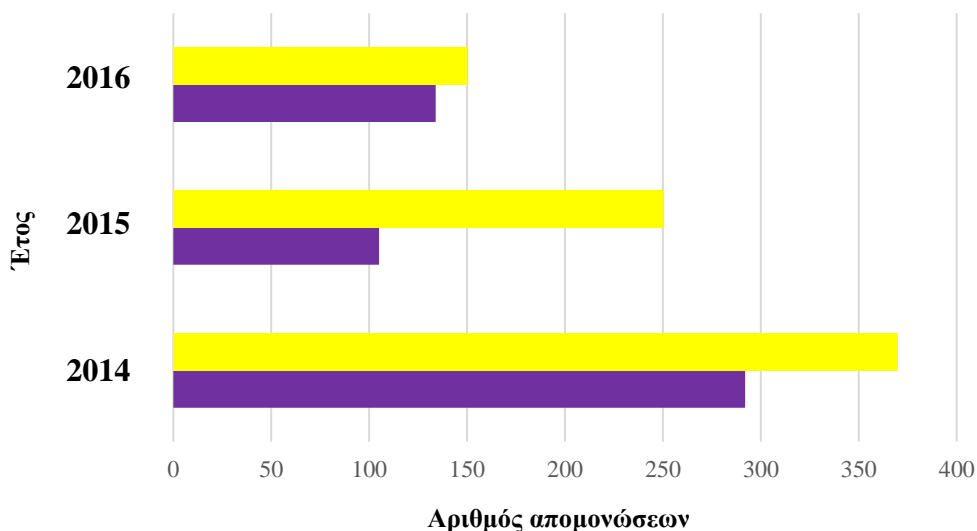
Για τις 240 απομονώσεις του 2017 από την Φθιώτιδα, που αξιολογήθηκαν ως προς τη μυκοτοξικογόνο ικανότητά τους, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι 119 απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως τοξικογόνες, ενώ 121 απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως μη τοξικογόνες (Διάγρ. 2.1). Από αυτό, προκύπτει ότι περίπου το 50% των απομονώσεων μπορεί να παράξει αφλατοξίνες.



**Διάγραμμα 2.1:** Αναλογία των απομονώσεων από την περιοχή της Φθιώτιδας με βάση την τοξικογόνο ικανότητά τους, σε τοξικογόνες και μη τοξικογόνες

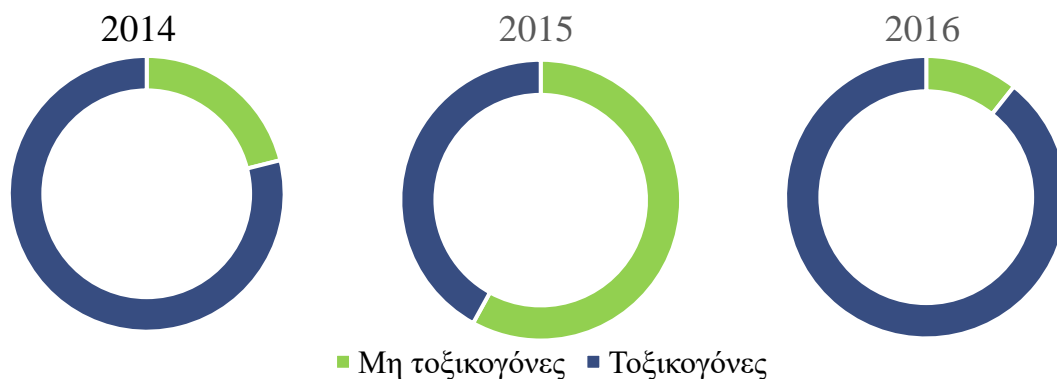
Όσον αφορά στις απομονώσεις από την Αίγινα, η σύνθεση του πληθυσμού των τοξικογόνων απομονώσεων διέφερε σημαντικά μεταξύ των ετών για το διάστημα 2014-2016. 370 απομονώσεις αξιολογήθηκαν για το 2014, 250 για το 2015 και 150 για το 2016. Στους 20 προς μελέτη φιστικεώνες, το 2014 βρέθηκε ποσοστό τοξικογόνων στελεχών 79%, δηλαδή 292 απομονώσεις και ποσοστό μη

τοξικογόνων απομονώσεων 21%, δηλαδή 78 απομονώσεις (Διάγρ. 2.2). Το 2015 αντίστοιχα βρέθηκε ποσοστό τοξικογόνων στελεχών 42%, δηλαδή 105 απομονώσεις και ποσοστό μη τοξικογόνων απομονώσεων 48% δηλαδή 145 απομονώσεις (Διάγρ. 2.2). Τέλος για το 2016 βρέθηκε ποσοστό τοξικογόνων απομονώσεων 89%, δηλαδή 134 απομονώσεις και ποσοστό μη τοξικογόνων απομονώσεων 11% δηλαδή 16 απομονώσεις (Διάγρ. 2.2).



**Διάγραμμα 2.2:** Αριθμός συνολικών απομονώσεων αλλά και τοξικογόνων απομονώσεων για κάθε έτος 2014-2016 στους 20 φιστικεώνες στην Αίγινα. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός απομονώσεων και με μωβ χρώμα ο αριθμός των τοξικογόνων απομονώσεων.

Η πληθυσμιακή διακύμανση μεταξύ τοξικογόνων και μη τοξικογόνων απομονώσεων δεν ακολούθησε κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο κατά τα τρία χρόνια που μελετήθηκε. Το 2016 ήταν η χρονιά με τα περισσότερα τοξικογόνα στελέχη και το χαμηλότερο ποσοστό μη τοξικογόνων στελεχών (Διάγρ. 2.2-2.3). Το 2014 είχε τον υψηλότερο αριθμό τοξικογόνων στελεχών αλλά παρόλα αυτά, όχι και το υψηλότερο ποσοστό τοξικογόνων στελεχών. Το 2015, η εικόνα όσον αφορά την αναλογία μεταξύ τοξικογόνων και μη τοξικογόνων στελεχών ήταν διαφορετική από το 2014 και το 2016 που παρουσίασαν παρόμοιο μοτίβο (Διάγρ. 2.3). Για το 2015 παρατηρήθηκε μια αναλογία μεταξύ των τοξικογόνων και μη τοξικογόνων στελεχών που παρομοιάζει περισσότερο με την εικόνα για το 2017 στην περιοχή της Φθιώτιδας (Διάγρ. 2.1 και 2.3).

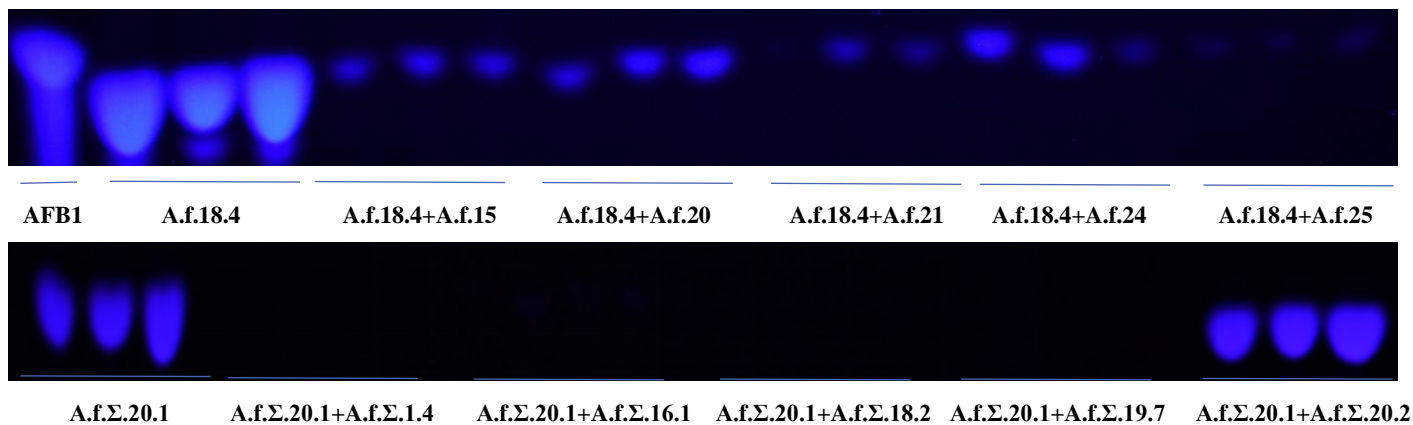


**Διάγραμμα 2.3:** Αναλογία μεταξύ τοξικογόνων και μη τοξικογόνων στελεχών για τα έτη 2014-2016 στην Αίγινα.

Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται σαφώς ότι υπάρχουν έντονες διαφοροποιήσεις μεταξύ των ετών ως προς την πληθυσμιακή σύνθεση και διακύμανση των μυκήτων *Aspergillus section Flavi* με βάση την τοξικογόνο ικανότητά τους.

### 2.5.3. Αξιολόγηση της *in vitro* επίδρασης των μη τοξικογόνων απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus*

Προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των μη τοξικογόνων απομονώσεων να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών του ισχυρά τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 και του ισχυρά τοξικογόνου στελέχους A.f.Σ.20.1 πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των ολικών αφλατοξινών για τις μεικτές μολύνσεις του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 με τα 240 μη τοξικογόνα στελέχη που προέκυψαν από την Αίγινα και τις μεικτές μολύνσεις του A.f.Σ.20.1 με τα 121 μη τοξικογόνα στελέχη από την Φθιώτιδα. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση με χρωματογραφία TLC. Από τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας διαπιστώθηκε πως αρκετές μη τοξικογόνες απομονώσεις είχαν την δυνατότητα να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών από το αντίστοιχο τοξικογόνο στέλεχος (Εικ. 2.10).



**Εικόνα 2.10:** Ενδεικτική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC. Οι μπλε φθορίζουσες μπάντες υποδεικνύουν την παραγωγή αφλατοξίνης. Πάνω απεικονίζεται από αριστερά προς τα δεξιά, το πρότυπο διάλυμα αφλατοξίνης B1 (AFB1) και στη συνέχεια το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 από την Αίγινα και ακόλουθα συγκαλλιέργειές του με μη τοξικογόνες απομονώσεις από την Αίγινα σε τρεις επαναλήψεις. Κάτω αντίστοιχα παρουσιάζεται το τοξικογόνο στέλεχος A.f.Σ.20.1 και στη συνέχεια συγκαλλιέργειές του με μη τοξικογόνες απομονώσεις από τη Φθιώτιδα.

Πιο συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι για τη Φθιώτιδα, περίπου το 30% των μη τοξικογόνων απομονώσεων, δηλαδή 40 εκ των 121 απομονώσεων κατάφεραν να παρεμποδίσουν πλήρως την παραγωγή αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος. Αντίστοιχα για την Αίγινα, 41 απομονώσεις εκ των 240 μη τοξικογόνων κατάφεραν να παρεμποδίσουν πλήρως την παραγωγή αφλατοξινών, δηλαδή το 17,1% των απομονώσεων. 57 επιπλέον απομονώσεις παρεμπόδισαν σε ένα ποσοστό έως 50% την παραγωγή αφλατοξινών. Από την *in vitro* διερεύνηση προέκυψε πως 81 μη τοξικογόνες απομονώσεις συνολικά, παρεμπόδισαν πλήρως την παραγωγή αφλατοξινών από τα τοξικογόνα στελέχη.

#### **2.5.4. Αξιολόγηση της *in situ* επίδρασης των μη τοξικογόνων απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus***

Στο συγκεκριμένο πείραμα οι 41 προαναφερθείσες αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις από την Αίγινα, αξιολογήθηκαν ως προς την *in situ* ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες από το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 σε καρπούς φιστικιών. Η ανάλυση των αφλατοξινών πραγματοποιήθηκε με Elisa AgraQuand® 4/40  $\mu\text{g kg}^{-1}$  και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο πίνακα 2.3.

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων φαίνεται πως όλες οι μη τοξικογόνες απομονώσεις παρεμποδίζουν στατιστικά σημαντικά την παραγωγή αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος (Πίν. 2.3). Όλες οι μη τοξικογόνες απομονώσεις μείωσαν την παραγωγή αφλατοξινών σε επίπεδο άνω του 70% συγκριτικά με το μάρτυρα. Η παραγωγή αφλατοξινών του μάρτυρα ήταν 18.736,84  $\mu\text{g/kg}$  ολικών αφλατοξινών. Η αποτελεσματικότερη μη τοξικογόνος απομόνωση (A.f.118) μείωσε την παραγωγή αφλατοξινών σε επίπεδο που άγγιξε το 92% του μάρτυρα, επιτρέποντας παραγωγή 1.567,36  $\mu\text{g/kg}$ . Η πλειοψηφία των απομονώσεων μείωσε τις παραγόμενες αφλατοξίνες σε επίπεδο άνω του 80% του μάρτυρα, εκτός από μία, την απομόνωση A.f.249 που μείωσε κατά 70% τις παραγόμενες αφλατοξίνες αλλά ακόμα και αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το μάρτυρα (Πίν. 2.3). Η *in vitro* ικανότητα των μη τοξικογόνων απομονώσεων να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών, επιβεβαιώθηκε και *in situ*, σε καρπούς φιστικιών.

**Πίνακας 2.3:** Αξιολόγηση 41 μη τοξικογόνων απομονώσεων κατά των παραγόμενων αφλατοξινών σε καλυφωτά φιστίκια. Παρουσιάζονται τα παραχθέντα  $\mu\text{g kg}^{-1}$  αφλατοξινών, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου και η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις μη τοξικογόνες απομονώσεις καθώς και η στατιστική ανάλυση μεταξύ των εφαρμογών. Ως μάρτυρας παρουσιάζεται η εφαρμογή μόνο του μύκητα A.f.18.4. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

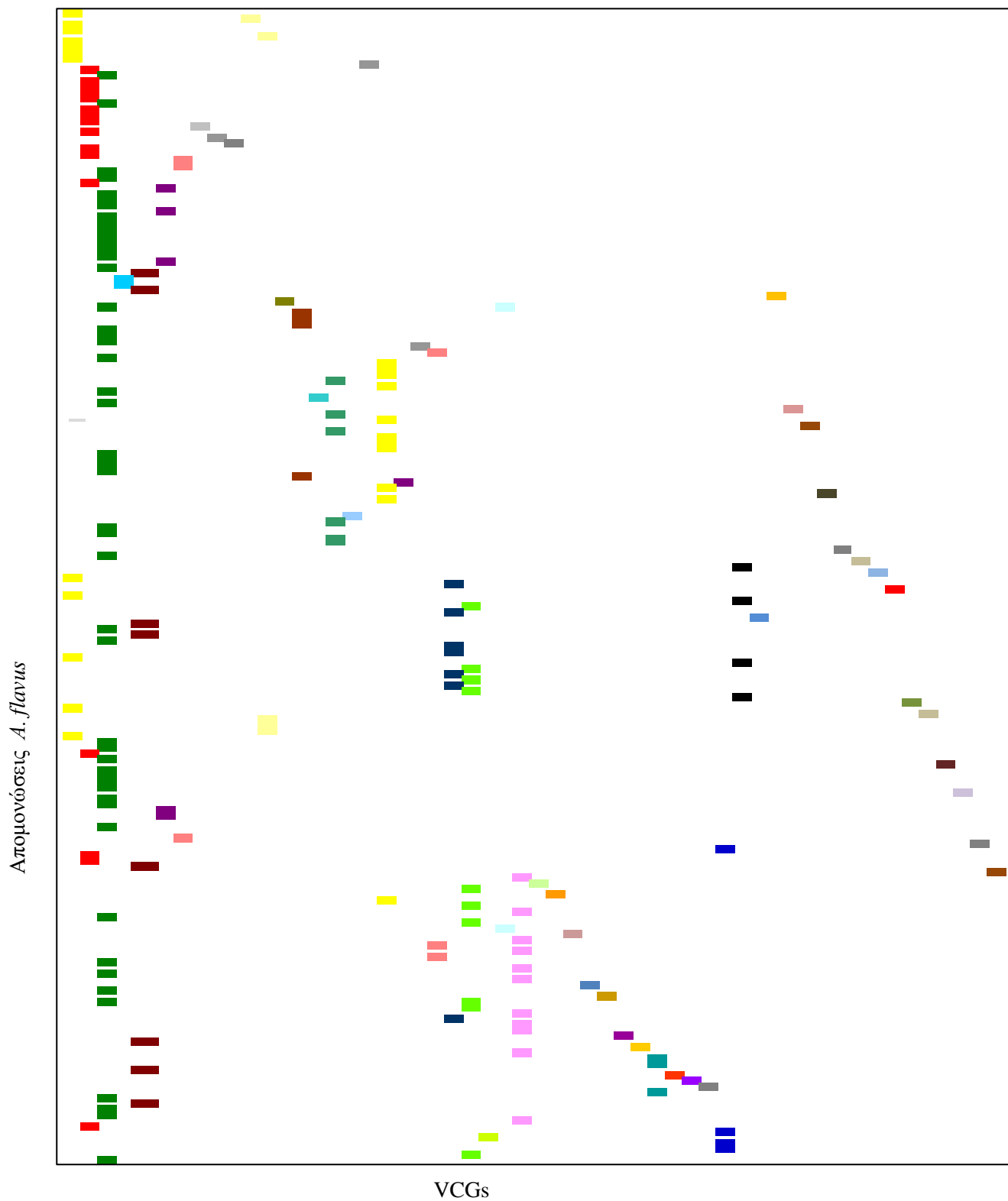
Εφαρμογή	Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g/kg}$ )	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση %	
A.f.18.4	18.736,84	a	4.832,14	3.416,84	-
A.f.2+A.f.18.4	2.493,21	c	1.693,95	1.197,81	86,7
A.f.13+A.f.18.4	3.618,14	bc	1.575,32	1.113,92	80,7
A.f.37+A.f.18.4	3.577,25	bc	1.304,17	922,19	80,9
A.f.40+A.f.18.4	3.059,53	bc	2.076,36	1.468,21	83,7
A.f.41.30+A.f.18.4	2.291,18	c	2,94	2,08	87,8
A.f.48+A.f.18.4	3.042,75	bc	1.428,01	1.009,75	83,8
A.f.98+A.f.18.4	3.021,92	bc	1.113,84	787,6	83,9
A.f.106.12+A.f.18.4	3.575,58	bc	2.011,15	1.422,1	80,9
A.f.109+A.f.18.4	3.379,73	bc	659,51	466,34	82
A.f.110+A.f.18.4	2.949,26	bc	1.940,32	1.372,01	84,3
A.f.113.31+A.f.18.4	2.650,41	bc	1.684,46	1.191,1	85,9
A.f.118+A.f.18.4	1.567,36	c	602,45	426	91,6
A.f.120+A.f.18.4	3.567,31	bc	1.358,25	960,43	81
A.f.122+A.f.18.4	1.990,69	c	1.054,39	745,56	89,4
A.f.123+A.f.18.4	1.886,23	c	1.182,61	836,23	89,9
A.f.140.2+A.f.18.4	2.075,41	c	1.096,59	775,41	88,9
A.f.141+A.f.18.4	3.429,52	bc	2.114,54	1.495,21	81,7
A.f.143+A.f.18.4	2.840,12	bc	920,69	651,03	84,8
A.f.153+A.f.18.4	2.807,52	bc	492,42	348,2	85
A.f.162+A.f.18.4	2.184,44	c	838,81	593,13	88,3
A.f.163+A.f.18.4	2.310,1	c	1.260,02	890,97	87,7
A.f.182+A.f.18.4	1.668,26	c	591,51	418,26	91,1
A.f.188+A.f.18.4	3.677,01	bc	1.999,23	1.413,67	80,4
A.f.195+A.f.18.4	2.709,31	bc	1.157,00	818,12	85,5
A.f.204+A.f.18.4	3.687,21	bc	1.750,11	1.237,51	80,3
A.f.210.5+A.f.18.4	3.159,81	bc	481,41	340,41	83,1
A.f.213+A.f.18.4	3.386,08	bc	1.501,32	1.061,59	81,9
A.f.223+A.f.18.4	3.330,93	bc	2.083,24	1.473,07	82,2
A.f.231+A.f.18.4	3.565,35	bc	1.414,49	1.000,19	81
A.f.235+A.f.18.4	3.401,83	bc	887,64	627,65	81,8
A.f.240+A.f.18.4	2.236,94	c	712,63	503,9	88,1
A.f.241.1+A.f.18.4	3.985,66	bc	1.507,23	1.065,77	78,7
A.f.244+A.f.18.4	1.655,12	c	1.548,44	1.094,91	91,2
A.f.247+A.f.18.4	1.601,62	c	685,75	484,89	91,5
A.f.249+A.f.18.4	5.600,76	b	1.065,5	753,42	70,1
A.f.250.2+A.f.18.4	2.472,06	c	1.191,2	842,31	86,8
A.f.Θ.12+A.f.18.4	3.549,18	bc	672,75	475,71	81,1
A.f.Θ.17+A.f.18.4	3.352,47	bc	1.185,99	838,63	82,1
A.f.Θ.23+A.f.18.4	2.818,42	bc	944,96	668,19	85
A.f.Θ.24+A.f.18.4	1.803,33	c	853,24	603,33	90,4
A.f.Θ.28+A.f.18.4	3.166,64	bc	362,74	256,5	83,1



### 2.5.5. Δημιουργία ομάδων βλαστικής συμβατότητας (VCGs)

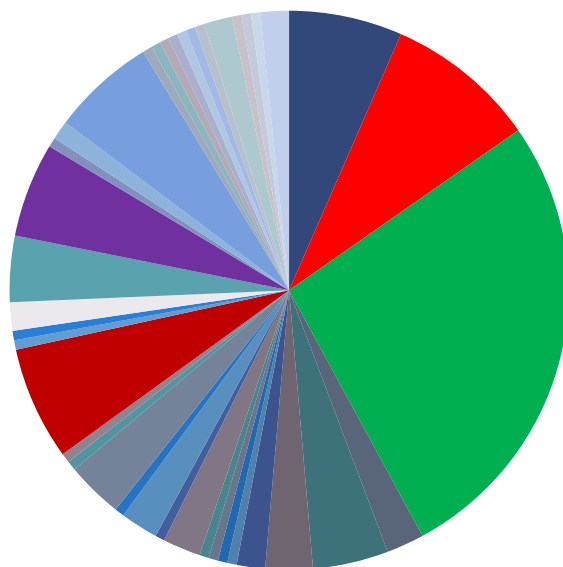
Για την κατάταξη των 204 απομονώσεων *Aspergillus section Flavi*, σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας πραγματοποιήθηκαν δοκιμές συμπληρωματικότητας όπως περιγράφηκε προηγουμένως στην παράγραφο 2.4.2.6.4, με χρήση των δημιουργηθέντων ζευγών tester copies για κάθε απομόνωση. Από τα αποτελέσματα των δοκιμών προέκυψε πως η ομαδοποίηση των απομονώσεων έγινε σε 56 ομάδες βλαστικής συμβατότητας (Εικ. 2.11). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όπως αναμενόταν, οι απομονώσεις χωρίστηκαν σε ομάδες με τοξικογόνες απομονώσεις και σε ομάδες με μη τοξικογόνες απομονώσεις, καθώς δεν είναι δυνατή η ύπαρξη απομονώσεων με διαφορετικό προφίλ παραγωγής αφλατοξινών στην ίδια ομάδα, λόγω των χαρακτηριστικών αλληλομόρφων που εντοπίζονται στις διαφορετικές ομάδες. Μη τοξικογόνες απομονώσεις δεν δύνανται να είναι στην ίδια ομάδα με τοξικογόνες απομονώσεις.

37 εκ των 56 ομάδων που δημιουργήθηκαν αποτελούνταν από μία μοναδική μεμονωμένη απομόνωση και κατά συνέπεια πρόκειται για ομάδες, των οποίων τα μέλη δεν φαίνεται να είναι προσαρμοσμένα στους φυσικούς στην Ελλάδα. 11 εκ των 37 μονομελών ομάδων εντοπίστηκαν στην ευρύτερη περιοχή της Φθιώτιδας και 26 μονομελείς ομάδες βρέθηκαν στην περιοχή της Αίγινας. Από τις 11 ομάδες της περιοχής της Φθιώτιδας, οι 10 μονομελείς ήταν μη τοξικογόνες και η μία μόνο ήταν τοξικογόνος. Αντίστοιχα για την περιοχή της Αίγινας, 17 μονομελείς ομάδες ήταν μη τοξικογόνες και 9 ομάδες τοξικογόνες.



**Εικόνα 2.11:** Χάρτης διασποράς των 204 απομονώσεων του μύκητα στις 56 ομάδες βλαστικής συμβατότητας. Κάθετα και με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται οι διακριτές ομάδες VCGs και οριζόντια οι απομονώσεις του μύκητα.

Οι 6 εκ των 19 υπόλοιπων ομάδων ήταν τοξικογόνες και μάλιστα σχετικά ολιγομελείς, με αριθμό απομονώσεων από 2 έως και 12 ανά ομάδα. Από αυτές τις 6 ομάδες, οι 4 εντοπίστηκαν και στις δύο μελετώμενες περιοχές ενώ δύο εντοπίστηκαν μόνο στην Αίγινα αλλά ήταν μικρότερες, απαρτιζόμενες από 3 και 4 απομονώσεις αντίστοιχα. 13 υπολειπόμενες πολυμελείς ομάδες ήταν μη τοξικογόνες. Εξ αυτών, εντοπίστηκε μια με 11 απομονώσεις μόνο στη Φθιώτιδα και 4 ομάδες μόνο στην Αίγινα. Οι 8 υπόλοιπες ομάδες εντοπίστηκαν και στην Αίγινα και στην Φθιώτιδα. Πολυπληθέστερη μεταξύ αυτών των μη τοξικογόνων πολυμελών ομάδων ήταν μια ομάδα με 51 απομονώσεις από Αίγινα, Φθιώτιδα αλλά και Μέγαρο. Μάλιστα πρόκειται για μια ομάδα τόσο μεγάλη που αποτελείται από το ένα τέταρτο των συνολικά μελετώμενων απομονώσεων (τοξικογόνων και μη τοξικογόνων) (Διάγρ. 2.4) και το 32% των μη τοξικογόνων απομονώσεων που αξιολογήθηκαν. Επίσης εντοπίστηκε στην Αίγινα και στη Φθιώτιδα μια ακόμα σχετικά πολυπληθής ομάδα απαρτιζόμενη από 16 απομονώσεις. Και στις δύο αυτές ομάδες ανήκε πλήθος απομονώσεων με σημαντική ικανότητα μείωσης των παραγόμενων αφλατοξινών.



**Διάγραμμα 2.4:** Πίτα ταξινόμησης απομονώσεων με τα μερίδια εκ του συνόλου που αποτελούν κάθε ομάδα βλαστικής συμβατότητας. Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται οι διακριτές ομάδες βλαστικής συμβατότητας. Με πράσινο και κόκκινο χρώμα στα δεξιά απεικονίζονται οι 2 επικρατέστερες ομάδες μη τοξικογόνων απομονώσεων.

Ιδιαίτερα αξιοσημείωτο είναι το αποτέλεσμα που εξήχθη κατά την εκπόνηση μέρους των πειραμάτων αυτής της ερευνητικής ενότητας στο Πανεπιστήμιο Università Cattolica del Sacro Cuore της Piacenza υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας P. Battilani. Διαπιστώθηκε πως η ομάδα των 51 απομονώσεων, η οποία περιέχει και απομονώσεις που αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικές στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών (Παράγραφος 2.5.4) είναι ενδημική και στην Ιταλία. Εκτός αυτού, είναι και η ομάδα στην οποία ανήκει η απομόνωση που αποτελεί τη δραστική ουσία του βιολογικού σκευάσματος AF-X1<sup>®</sup> που χρησιμοποιείται στην Ιταλία για την αντιμετώπιση των αφλατοξινών στον αραβόσιτο. Θετικό για την βιολογική αντιμετώπιση των αφλατοξινών στην Ελλάδα κρίνεται το γεγονός ότι αυτή η ομάδα είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένη στις κλιματικές συνθήκες της Ελλάδας, που αποδεικνύεται από το μεγάλο αριθμό αλλά και ποσοστό απομονώσεων που βρέθηκαν να ανήκουν σε αυτήν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης.

## 2.5.6. Αξιολόγηση της επίδρασης μη τοξικογόνων απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών σε φιστικεώνες

Με κριτήριο τα αποτελέσματα της διερεύνησης της *in situ* παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών σε καρπούς κελυφωτών φιστικιών από μη τοξικογόνες απομονώσεις, όπως προαναφέρθηκε βρέθηκαν 41 αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις (Παράγραφος 2.5.4.). Στη συνέχεια, βάσει των αποτελεσμάτων ομαδοποίησης σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας προέκυψε ότι πολλές από αυτές τις απομονώσεις ανήκουν στις δύο κύριες και επικρατέστερες ομάδες μη τοξικογόνων απομονώσεων (Παράγραφος 2.5.5.). Κατά συνέπεια επελέγησαν δυο απομονώσεις, μία από κάθε ομάδα για περαιτέρω αξιολόγηση. Κριτήριο για την επιλογή αποτέλεσε η αποτελεσματικότητα στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών. Πρόκειται για τις απομονώσεις A.f.41.30 και A.f.113.31, απομονωμένες και οι δύο από φιστικεώνες στην Αίγινα το 2014. Οι δύο επιλεγείσες απομονώσεις προκάλεσαν μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών κατά 88% και 86% αντίστοιχα (Παράγραφος 2.5.4.). Για την υλοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε και το ισχυρά αφλατοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 που έχει επαναχρησιμοποιηθεί στη παρούσα μελέτη και τα πειράματα διεξήχθησαν σε 3 φιστικεώνες.

Στους μάρτυρες στο φιστικεώνα Α έγιναν τεχνητές μολύνσεις με το ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4, και στους μάρτυρες στους φιστικεώνες Β και Γ πραγματοποιήθηκαν φυσικές μολύνσεις από πληθυσμούς τοξικογόνων στελεχών του μύκητα που προϋπήρχαν στους αγρούς αυτούς. Από τα αποτελέσματα αναλύσεως των καρπών για τη μόλυνση από αφλατοξίνες προκύπτει πως οι τεχνητές μολύνσεις κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα τόσο για το 2017, όσο και το 2018 με 1.477,62 και 2.928,60  $\mu\text{g kg}^{-1}$  αντίστοιχα για τον φιστικεώνα Α. Στον αντίποδα, οι φυσικές μολύνσεις στους φιστικεώνες Β και Γ υποδεικνύουν την ύπαρξη υψηλών φυσικών μολύσεων σε επίπεδο 1.114,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  για τον φιστικεώνα Β για το έτος 2017, αλλά χαμηλών σε επίπεδο 20,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  για τον φιστικεώνα Γ για το 2018, που είναι ελαφρώς πάνω από το ανώτατο επιτρεπτό όριο για την καλλιέργεια των φιστικιών (Πίν. 2.4).

**Πίνακας 2.4:** Αποτελέσματα αναλύσεων αφλατοξινών και παρεμπόδισης στη παραγωγή αφλατοξινών από τις δύο μη τοξικογόνες απομονώσεις A.f.41.30 και A.f.113.31, στους 3 πειραματικούς φιστικεώνες (Α,Β,Γ) για τα έτη 2017 και 2018. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

		Εφαρμογή	Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση %
2017	Φιστικεώνας Α	Μάρτυρας	1.477,62	a	93,8	-
		A.f.41.30	3,72	b	0,67	99,7
		A.f.113.31	89,88	b	0,79	93,9
	Φιστικεώνας Β	Μάρτυρας	1.114,3	a	69,7	-
		A.f.41.30	4,81	c	1,25	99,6
		A.f.113.31	249,59	b	94,86	76,7
2018	Φιστικεώνας Α	Μάρτυρας	2.928,6	a	130,18	-
		A.f.41.30	2,14	b	1,33	99,9
		A.f.113.31	2,23	b	0,23	99,9
	Φιστικεώνας Γ	Μάρτυρας	20,8	a	6,13	-
		A.f.41.30	2,05	b	2,05	90,1
		A.f.113.31	3,96	b	0,55	80,9

Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως όλες οι εφαρμογές των μη τοξικογόνων στελεχών και στους τρεις φιστικεώνες για τα δύο χρόνια, μείωσαν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τον μάρτυρα την παραγωγή αφλατοξινών (Πίν. 2.4). Η μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών κυμάνθηκε από 76,7% έως 99,9%. Η επί τοις εκατό παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών για τον φιστικεώνα Α, όπου εφαρμόστηκε τεχνητή μόλυνση του μάρτυρα ήταν 99,7% και 93,9% για τις δύο μη τοξικογόνες απομονώσεις το 2017 και 99,9% και 99,9% για το 2018 αντίστοιχα (Πίν. 2.4), γεγονός που αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα των δυο απομονώσεων να παρεμποδίζουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες σε συνθήκες αγρού, αγγίζοντας την πλήρη παρεμπόδιση. Όσον αφορά στην περίπτωση των φιστικεώνων με φυσικές μολύνσεις, η ικανότητα των απομονώσεων να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών ήταν 99,6% και 76,7% για το 2017 (φιστικεώνας Β) και για τον φιστικεώνα Γ, σε επίπεδα 90,1% και 80,9% κατά το 2018 (Πίν. 2.4). Η απομόνωση Α.φ.41.30 που ανήκει στη επικρατέστερη ομάδα βλαστικής συμβατότητας (51 απομονώσεις), φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική σε συνθήκες αγρού από την απομόνωση Α.φ.113.31 που ανήκει στη δεύτερη κατά μέγεθος επικρατέστερη ομάδα (16 απομονώσεις). Η αποτελεσματικότητα της πρώτης απομόνωσης κυμάνθηκε από 90%-100% και η αποτελεσματικότητα της δεύτερης κυμάνθηκε από 77%-100%.

Συμπερασματικά, από την διερεύνηση της ικανότητας των δύο μη τοξικογόνων απομονώσεων *A. flavus* (Α.φ.41.30 και Α.φ.113.31) που απομονώθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης από φιστικεώνες στην Αίγινα, να μειώνουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες σε συνθήκες αγρού, προκύπτει η αποτελεσματικότητα των εν λόγω ενδημικών απομονώσεων. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, κρίνεται πως θα μπορούσαν μελλοντικά να αποτελέσουν βιολογικό παράγοντα διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού σε πλαίσιο ολοκληρωμένων συστημάτων διαχείρισης αφλατοξινών.

### **2.5.7. Συσχέτιση μετεωρολογικών δεδομένων με την παραγωγή αφλατοξινών στα κελυφωτά φιστίκια στην ευρύτερη περιοχή του Ν. Φθιώτιδας**

Με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασης των περιβαλλοντολογικών συνθηκών στα επίπεδα των αφλατοξινών στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού, έγινε συγκέντρωση διαφόρων κλιματολογικών παραμέτρων, από τον μήνα Αύγουστο του 2016 έως και το μήνα Σεπτέμβριο του 2017 για την περιοχή της Μακρακώμης (Πίν. 2.5) και αντίστοιχα για το ίδιο χρονικό διάστημα για την περιοχή της Λαμίας (Πίν. 2.6). Το διάστημα συλλογής των μετεωρολογικών δεδομένων αφορά την περίοδο από την συγκομιδή της προηγούμενης χρονιάς, έως και τη συγκομιδή της μελετώμενης χρονιάς, δηλαδή ολόκληρη την καλλιεργητική περίοδο. Η επιλογή των δύο μετεωρολογικών σταθμών έγινε με γνώμονα την μικρότερη δυνατή απόσταση από τους αγρούς.

**Πίνακας 2.5:** Μετεωρολογικά δεδομένα για την περιοχή της Μακρακώμης για την περίοδο 2016-2017. Ως  $T_{max}$  παρουσιάζεται η μέγιστη μηνιαία θερμοκρασία, ως  $T_{min}$  η αντίστοιχη ελάχιστη μηνιαία, ως  $T_{mean}$  η αντίστοιχη μέση μηνιαία και ως Υετός τα χιλιοστά βροχόπτωσης μηνιαίως.

Μήνας/Έτος	$T_{max}$ (°C)	$T_{min}$ (°C)	$T_{mean}$ (°C)	Υετός (mm)
Αύγουστος 2016	36,7	12,8	25	35,2
Σεπτέμβριος 2016	34,2	9,7	20,9	60,6
Οκτώβριος 2016	31,6	5,6	16,3	119,2
Νοέμβριος 2016	25,8	1,5	11,8	72,4
Δεκέμβριος 2016	19,6	-4,1	5,4	20,2
Ιανουάριος 2017	16,2	-8,9	3,3	109
Φεβρουάριος 2017	21,8	-2,5	9,2	46,2
Μάρτιος 2017	26,1	1,4	12	16,4
Απρίλιος 2017	28,2	2,9	14,3	30,2
Μάιος 2017	36,2	7,2	19,5	78,4
Ιούνιος 2017	42,7	11,4	23,9	110,8
Ιούλιος 2017	41,7	14,6	26,2	35,4
Αύγουστος 2017	38,6	13,2	25,6	14,2
Σεπτέμβριος 2017	39,4	9,4	22,9	95,6



**Πίνακας 2.6:** Μετεωρολογικά δεδομένα για την περιοχή της Λαμίας για την περίοδο 2016-2017. Ως  $T_{max}$  παρουσιάζεται η μέγιστη μηνιαία θερμοκρασία, ως  $T_{min}$  η αντίστοιχη ελάχιστη μηνιαία, ως  $T_{mean}$  η αντίστοιχη μέση μηνιαία και ως Υετός τα χιλιοστά βροχόπτωσης μηνιαίως.

Μήνας/Έτος	$T_{max}$ (°C)	$T_{min}$ (°C)	$T_{mean}$ (°C)	Υετός (mm)
Αύγουστος 2016	35,9	18,9	26,9	49,4
Σεπτέμβριος 2016	32,8	14,1	22,6	53,6
Οκτώβριος 2016	32,6	9,8	17,9	6
Νοέμβριος 2016	25,2	2,8	13,5	52,8
Δεκέμβριος 2016	18,2	-0,8	7,7	6,2
Ιανουάριος 2017	14,1	-6,1	4,7	0,6
Φεβρουάριος 2017	22,4	2,1	10,2	44,6
Μάρτιος 2017	24,7	6,6	13,5	37,2
Απρίλιος 2017	26,7	7,3	16	35,8
Μάιος 2017	35,8	11,6	20,9	76,6
Ιούνιος 2017	43,6	15,4	25,7	81,2
Ιούλιος 2017	42,4	17,2	27,9	29,6
Αύγουστος 2017	37,8	16,6	27,9	18
Σεπτέμβριος 2017	36,3	14,1	24	30,4

Όπως παρατηρείται στους Πίνακες 2.5 και 2.6, το χειμώνα του 2016 το ύψος της βροχόπτωσης ήταν σημαντικά υψηλό για την περιοχή της Μακρακώμης και ιδιαίτερα κατά τον Οκτώβριο του 2016 (υψηλότερο Υ του έτους) αλλά και τον Ιανουάριο του 2017 και τον Ιούνιο 2017 που σημειώθηκαν και τα μεγαλύτερα ύψη μέσα στο επιλεγμένο χρονικό διάστημα μελέτης. Στην περιοχή της Λαμίας το ύψος της βροχόπτωσης σημειώθηκε αυξημένο κατά τους ανοιξιάτικους και θερινούς κυρίως μήνες όπως για παράδειγμα το Μάιο και Ιούνιο. Γενικότερα, στην περιοχή της Λαμίας σημειώθηκαν λιγότερες βροχοπτώσεις. Όσον αφορά στην θερμοκρασία, οι μέσες θερμοκρασίες που συγκεντρώθηκαν ήταν αρκετά υψηλές κατά το θέρος και των δύο ετών 2016 και 2017, ιδίως για την περιοχή της Λαμίας. Οι θερμοκρασίες των χειμώνων και των δύο περιοχών κυμάνθηκαν σε φυσιολογικές θερμοκρασίες και όχι ιδιαίτερα χαμηλές.

Το φαινόμενο των υψηλών βροχοπτώσεων ιδιαίτερα στην περιοχή της Μακρακώμης, αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό μετεωρολογικό δεδομένο για τη συγκεκριμένη μελέτη, καθώς η υγρασία φαίνεται να μην ευνοεί την ανάπτυξη των τοξικογόνων μυκήτων του γένους *Aspergillus section Flavi*, με αποτέλεσμα το μειωμένο ποσοστό αφλατοξινών στην καλλιέργεια φιστικιάς στις δεδομένες περιοχές, όπως αυτό παρατηρήθηκε (Παράγραφος 2.5.1.)

Για την ακριβέστερη συσχέτιση των περιβαλλοντικών συνθηκών που επηρεάζουν την ανάπτυξη της ασθένειας και την παραγωγή αφλατοξινών στα κελυφωτά φιστίκια σε προσυλλεκτικό επίπεδο είναι αναγκαία η επανάληψη της παρατήρησης και συσχέτισης των μετεωρολογικών δεδομένων με τα ποσοστά των αφλατοξινών και στο μέλλον έτσι ώστε, να υπάρξει μια πιο εμπεριστατωμένη και ολοκληρωμένη

αξιολόγηση. Μελλοντική αξιολόγηση του μοντέλου του Κεφαλαίου 6 της παρούσας μελέτης (AFLA-ristachio), θα πρέπει να πραγματοποιηθεί και στην περιοχή της Φθιώτιδας.

## 2.6. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Ένας από τους κύριους πυλώνες των σύγχρονων ολοκληρωμένων συστημάτων διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών (IPM) είναι η βιολογική διαχείριση. Σε μια εποχή που η ορθή διαχείριση της τεχνολογίας στον τομέα της πρωτογενούς παραγωγής αποτελούν μονόδρομο για τη διατήρηση της αειφόρου ανάπτυξης και παραγωγής, η βέλτιστη αξιοποίησή της κρίνεται επιτακτική (Kumar et al. 2020, Barrera 2020). Καθώς οι καινοτόμες τεχνολογίες γίνονται όλο και πιο προσιτές στους παραγωγούς και οι διεθνείς οργανισμοί ωθούν προς την υιοθέτηση βιώσιμων πρακτικών (Adenle et al. 2019), η αντίληψη των παραγωγών για τους γεωργικούς κινδύνους και την εφαρμογή ορθών γεωργικών πρακτικών αλλάζει (Duong et al. 2019).

Η βιολογική αντιμετώπιση των επιβλαβών μικροοργανισμών στοχεύει στη διατήρηση της αειφορίας, της βιοποικιλότητας και στη μείωση των χημικών εισροών στην τροφική αλυσίδα και κατά τα τελευταία χρόνια βρίσκει ευρεία εφαρμογή γενικά στην φυτοπροστασία αλλά ειδικότερα στη διαχείριση μυκοτοξικογόνων μυκήτων (Tsitsigiannis et al. 2012). Εδώ και τρεις δεκαετίες, ο πιο διαδεδομένος τρόπος βιολογικής διαχείρισης των αφλατοξικογόνων μυκήτων αλλά και των αφλατοξινών που παράγουν και αποτελούν τις πιο επικίνδυνες φυσικά παραγόμενες μυκοτοξίνες, είναι η εφαρμογή μη τοξικογόνων απομονώσεων του μύκητα *Aspergillus flavus* (Cotty 1990). Η δυνατότητα ορισμένων μη τοξικογόνων απομονώσεων του μύκητα να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών από τις τοξικογόνες απομονώσεις, τις καθιστά εξαιρετικούς βιολογικούς παράγοντες διαχείρισης του προβλήματος (Cotty et al. 1993, Brown et al. 1991). Πρόκειται για μια μέθοδο της οποίας η διαρκώς ανερχόμενη εφαρμογή (Mauro et al. 2018, Savic et al. 2020) αποδεικνύει την αποτελεσματικότητά της και την ωφελιμότητά της. Παρά το γεγονός ότι κατά το παρελθόν έχουν υπάρξει επικριτές της μεθόδου διατυπώνοντας προβληματισμό για τη διατάραξη της ισορροπίας της βιοποικιλότητας και την επίπτωση σε οργανισμούς μη στόχους όπως οι μέλισσες, τέτοιες υποθέσεις έχουν καταρριφθεί από μελέτες που επιβεβαιώνουν πως δεν υπάρχει επίπτωση στο πληθυσμό των μελισσών καθώς ο βιολογικός παράγοντας δεν εντοπίζεται στα άνθη (Ortega-Beltran et al. 2018).

Η καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών είναι μεταξύ αυτών που προσβάλλονται από του μύκητες *Aspergillus section Flavi* καθώς και των αφλατοξινών που παράγονται προσυλλεκτικά και η συσσώρευσή τους μπορεί να αυξηθεί μετασυλλεκτικά (Georgiadiou et al. 2012). Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής ενότητας της διδακτορικής διατριβής διεξήχθη μελέτη για την εύρεση κατάλληλων ενδημικών απομονώσεων *Aspergillus flavus* από φιστικεόνες στην Ελλάδα με απώτερο σκοπό τη χρήση τους στη βιολογική αντιμετώπιση των αφλατοξινών στην καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτό, η μελέτη στόχευσε στις δύο κύριες περιοχές παραγωγής φιστικιού στην Ελλάδα, την Αίγινα και την Φθιώτιδα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις μυκήτων *Aspergillus section Flavi* από καρπούς φιστικιών από τις προαναφερθείσες περιοχές. Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η τοξικογόνος ικανότητά τους έτσι ώστε να μελετηθεί η πληθυσμιακή διακύμανση των μυκήτων και η σύνθεση του πληθυσμού. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως για τη Φθιώτιδα το 2017 το ποσοστό των τοξικογόνων απομονώσεων κυμάνθηκε περί το 50% του συνόλου και για την Αίγινα τα ποσοστά για την τριετία 2014-2016 ήταν 79%, 42%, 89%, με τα αντίστοιχα των μη τοξικογόνων να είναι 21%, 58% και 11%.

Τα προαναφερθέντα στοιχεία δεν συνάδουν απόλυτα με αποτελέσματα άλλων μελετών της διασποράς τοξικογόνων στελεχών του μύκητα και της πληθυσμιακής σύνθεσης των μυκήτων *Aspergillus*

section *Flavi*. Σύμφωνα με μελέτες στην καλλιέργεια του αραβοσίτου, το ποσοστό τοξικογόνων στελεχών που παράγει μεγάλο μεγέθους σκληρότητα και κατά συνέπεια δεν παράγει υψηλά ποσά αφλατοξινών (Cotty 1988, Cotty 1989), δεν ξεπερνά το 10% του συνόλου των απομονωμένων στελεχών (Atehnkeng et al. 2008b). Σε αντίστοιχες μελέτες για τον αραβόσιτο στη Νιγηρία και στη Γκάνα, το ποσοστό των τοξικογόνων στελεχών δεν ξεπερνά το 19% (Perrone et al. 2014). Αντίστοιχα δεδομένα από την Κένυα, υποδεικνύουν πως το ποσοστό των τοξικογόνων στελεχών *Aspergillus* section *Flavi* στις καλλιέργειες του αραβοσίτου και της αραχίδα είναι 45,9% (Okun et al. 2015). Ωστόσο σε παλαιότερες μελέτες, αποκλειστικά για τον αραβόσιτο στην Κένυα, φαίνεται ότι το ποσοστό των τοξικογόνων στελεχών έχει εντοπιστεί υψηλότερο από αυτό των μη τοξικογόνων στελεχών (Okoth et al. 2012). Στον αραβόσιτο στην Νιγηρία, έχει επίσης αναφερθεί ότι το 32% των μυκήτων *Aspergillus* section *Flavi* μπορούν να παράγουν αφλατοξίνες (Donner et al. 2009). Στον αραβόσιτο στην Αμερική τα αντίστοιχα ποσοστά έχουν αναφερθεί πολύ υψηλότερα, περί το 84% (Abbas et al. 2004).

Μετά την έξαρση της μόλυνσης από αφλατοξίνες στον αραβόσιτο στην Ευρώπη την περίοδο 2003-2004 (Perrone et al. 2004), ο αραβόσιτος αποτέλεσε και για την Ευρώπη, πέραν της Αμερικής και της Αφρικής (Probst et al. 2007), μια καλλιέργεια με ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με τη μόλυνση από αφλατοξίνες. Ως εκ τούτου, η πλειοψηφία των ερευνητικών δεδομένων για το πρόβλημα των αφλατοξινών, αφορά τη καλλιέργεια του αραβοσίτου. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και δεδομένα για την πληθυσμιακή διακύμανση και τη σύνθεση του πληθυσμού των μυκήτων *Aspergillus* section *Flavi* στη καλλιέργεια της φιστικιάς. Αυτά αφορούν κυρίως την περιοχή της Καλιφόρνια των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (Ortega-Beltran et al. 2019, Hua et al. 2012) και το Ιράν (Rahimi et al. 2008, Jamali et al. 2012, Fani et al. 2014, Jamali et al. 2013). Πιο συγκεκριμένα τα ποσοστά τοξικογόνων στελεχών *Aspergillus* section *Flavi* που έχουν αναφερθεί στο Ιράν, κυμαίνονται από 30% (Rahimi et al. 2008) έως περί το 60%, αναλυτικότερα 59% (Jamali et al. 2012) και 62,5% (Fani et al. 2014). Στην Καλιφόρνια, το 23% των απομονώσεων μπορούσαν να παράγουν αφλατοξίνη B1 (Hua et al. 2012).

Από τα προαναφερθέντα δεδομένα παρατηρείται η έντονη διακύμανση της πληθυσμιακής σύνθεσης των μυκήτων *Aspergillus* section *Flavi*, με βάση την καλλιέργεια, την τοποθεσία και τη χρονολογία. Ως εκ τούτου, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει κάποιο σαφές πρότυπο που να προκύπτει από την παρακολούθηση και μελέτη της σύνθεσης. Παρόλα αυτά, είναι σαφές από τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής ενότητας, ότι το ποσοστό των τοξικογόνων απομονώσεων στη Φθιώτιδα για το 2017 και στην Αίγινα το 2015, κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα που συμπίπτουν με αντίστοιχα που έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Αυτό το γεγονός, πιθανόν να σχετίζεται σε σημαντικό βαθμό με τις θερινές βροχοπτώσεις που παρατηρήθηκαν το 2015 (κεφάλαιο 6). Αντίθετα, στην Αίγινα τα έτη 2014 και 2016 ήταν πολύ υψηλότερα από αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει πως υπό ευνοϊκές συνθήκες για την παραγωγή αφλατοξινών, δυνητικά μπορεί να υπάρξει σημαντική μόλυνση, καθώς τα τοξικογόνα στελέχη υπάρχουν φυσικά σε υψηλό ποσοστό στους φιστικεώνες στην Αίγινα. Επομένως, η περιοχή της Αίγινας θα μπορούσε να θεωρηθεί μια περιοχή υψηλής επικινδυνότητας ως προς τη μόλυνση από αφλατοξίνες, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την αναφορά μολύνσεων κατά το παρελθόν (Georgiadou et al. 2012).

Στη συνέχεια της παρούσας ερευνητικής ενότητας, διερευνήθηκε το επίπεδο μόλυνσης από αφλατοξίνες σε 20 φιστικεώνες στην περιοχή της Φθιώτιδας για την καλλιεργητική περίοδο 2016-2017. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε πως δεν υπήρξε μόλυνση από αφλατοξίνες στα προς εξέταση δείγματα φιστικιών. Εν συνεχεία, συσχετίστηκαν τα μετεωρολογικά δεδομένα της ευρύτερης περιοχής του Ν. Φθιώτιδας (περιοχής Μάκρης-Μακρακώμης και περιοχής Λαμίας) με τα δεδομένα μολύνσεων από

αφλατοξίνες. Παρατηρήθηκαν υψηλά ποσά νετού για την περιοχή κατά τους ανοιξιάτικους και θερινούς μήνες, γεγονός που πιθανόν να μην ευνοεί την ανάπτυξη των τοξικογόνων στελεχών του μύκητα στην περιοχή και κατ' επέκταση να παρατηρείται ποσοστό τοξικογόνων στελεχών περί το 50% εκ του συνόλου, αλλά και απουσία μολύνσεων από αφλατοξίνες στα δείγματα φιστικιών από τους 20 φιστικεώνες της περιοχής.

Το επόμενο στάδιο της παρούσας ερευνητικής ενότητας αφορούσε στην εύρεση μη τοξικογόνων απομονώσεων με δυνατότητα παρεμπόδισης της παραγωγής αφλατοξινών, όπως αυτό ορίζεται σαν διαδικασία σε αντίστοιχα πρωτόκολλα για την εύρεση βιολογικών παραγόντων αντιμετώπισης (Moral et al. 2020). Αρχικά διερευνήθηκε η *in vitro* παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών σε θρεπτικό υπόστρωμα CCA με τη χρήση χρωματογραφίας TLC, 240 απομονώσεων από την Αίγινα και 121 από την Φθιώτιδα. 41 από αυτές από την Αίγινα, δηλαδή ποσοστό 17,1% και 47 από τη Φθιώτιδα, δηλαδή ποσοστό 38,9% κατάφεραν να μειώσουν την παραγωγή αφλατοξινών κατά σχεδόν 100% συγκριτικά με το μάρτυρα που αποτελείτο από ένα τοξικογόνο ενδημικό στέλεχος της εκάστοτε περιοχής. Το ποσοστό μη τοξικογόνων στελεχών που βρέθηκαν ικανά να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών *in vitro* ήταν υψηλότερο στη Φθιώτιδα από ότι στην Αίγινα, γεγονός που πιθανόν να σχετίζεται και με τα χαμηλά επίπεδα μολύνσεων των φιστικιών στη Φθιώτιδα από αφλατοξίνες. Τα ποσοστά είναι αντίστοιχα άλλων μελετών για την εύρεση αποτελεσματικών απομονώσεων (Cotty et al. 1994).

Στη συνέχεια, αφού βρέθηκαν αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις σε εργαστηριακό επίπεδο *in vitro*, ακολούθησε αξιολόγηση σε εργαστηριακά πειράματα επί καρπών φιστικιών. Σκοπός ήταν η συσχέτιση των *in vitro* και *in situ* αποτελεσμάτων παρεμπόδισης, προκειμένου να βρεθούν αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις με δυνατότητα εφαρμογής ως βιολογικοί παράγοντες (Probst and Cotty 2012). Χρησιμοποιήθηκαν 41 αποτελεσματικές απομονώσεις από την Αίγινα σε μεικτές μολύνσεις σε καρπούς φιστικιών με ένα ενδημικό ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος απομονωμένο από φιστικεώνα στην Αίγινα. Η ανάλυση διεξήχθη με τη μέθοδο ELISA και τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι όλες οι αξιολογηθείσες απομονώσεις μείωσαν στατιστικά σημαντικά με το μάρτυρα το επίπεδο των παραγόμενων αφλατοξινών. Η μείωση κυμάνθηκε από 70% έως περίπου 92%. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε πλήρη συμφωνία ως προς τα ποσοστά παρεμπόδισης με άλλες παρεμφερείς μελέτες μείωσης παραγωγής αφλατοξινών (Atehnkeng et al. 2008a, Probst et al. 2011), όπου η παρεμπόδιση κυμάνθηκε μεταξύ 70% και 100%.

Κατόπιν της *in situ* διερεύνησης της επίδρασης των μη τοξικογόνων απομονώσεων στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών, ακολούθησε μελέτη με σκοπό την ομαδοποίηση των απομονώσεων σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας. Η μελέτη αυτή κρίνεται απαραίτητη για την εύρεση της κατάλληλης ή των κατάλληλων μη τοξικογόνων απομονώσεων που προορίζονται για να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως βιολογικοί παράγοντες διαχείρισης του προβλήματος των αφλατοξινών, καθώς επιβεβαιώνει τη σταθερότητα του βιολογικού παράγοντα στο περιβάλλον και την ευρεία φυσική διασπορά του (Bayman et al. 1993). Για την υλοποίηση αυτού του τμήματος της ερευνητικής ενότητας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 204 απομονώσεις, αριθμός που κρίνεται ικανός για να δώσει μια αντιπροσωπευτική εικόνα της υφιστάμενης κατάστασης ως προς τη διασπορά των απομονώσεων σε διακριτές ομάδες βλαστικής ικανότητας (Bayman et al. 1991b, Mauro et al. 2013). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 109 μη τοξικογόνες απομονώσεις και 38 τοξικογόνες απομονώσεις από την Αίγινα. Από την περιοχή της Φθιώτιδας χρησιμοποιήθηκαν 50 μη τοξικογόνες απομονώσεις και 6 τοξικογόνες και τέλος από την περιοχή των Μεγάρων χρησιμοποιήθηκε μια μη τοξικογόνος απομόνωση. Συνολικά δηλαδή, 160 μη τοξικογόνες απομονώσεις και 44 τοξικογόνες. Από τα αποτελέσματα ομαδοποίησης των 204 απομονώσεων προέκυψε πως αυτές χωρίζονται σε 56

διακριτές ομάδες βλαστικής συμβατότητας. Κατά το παρελθόν ορισμένοι ερευνητές έχουν υποστηρίξει πως είναι δυνατή η συνύπαρξη τοξικογόνων και μη τοξικογόνων απομονώσεων στην ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας (Novas et al. 2002, Barros et al. 2006). Παρόλα αυτά, η πλειοψηφία της ερευνητικής κοινότητας συμφωνεί πως αυτό δεν είναι δυνατόν (Bayman et al. 1993, Horn et al. 1996, Pildain et al. 2004). Στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι αυτό πράγματι δεν είναι δυνατόν, καθώς καμία τοξικογόνος απομόνωση δεν βρέθηκε να συνυπάρχει στην ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας με μη τοξικογόνες απομονώσεις.

Η δημιουργία 56 ομάδων στην παρούσα μελέτη, συμφωνεί με αντίστοιχα ερευνητικά αποτελέσματα από τη Βόρειο Ιταλία για τον αραβόσιτο, που υποδεικνύουν την ομαδοποίηση απομονώσεων και εκεί σε 56 ομάδες (Mauro et al. 2013). Για την καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού στο Ιράν, σε μελέτες σχετικά με την ομαδοποίηση απομονώσεων του μύκητα σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας, έχει προκύψει διαχωρισμός σε 36 VCGs (Houshyarfard et al. 2014). Αντίστοιχα δεδομένα για τον αραβόσιτο στην Αφρική, υποδεικνύουν την δημιουργία 25 ομάδων βλαστικής συμβατότητας από 35 απομονώσεις (Atehnkeng et al. 2015). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, 40 μη τοξικογόνες και 16 τοξικογόνες ομάδες δημιουργήθηκαν συνολικά. Από αυτές, 27 και 10 αντίστοιχα απαρτίζονταν από μια μοναδική απομόνωση. Δηλαδή 37 εκ των 56 ομάδων που δημιουργήθηκαν, αποτελούνταν από μία μοναδική μεμονωμένη απομόνωση (single-member groups) και κατά συνέπεια πρόκειται για ομάδες, των οποίων τα μέλη φαίνεται να μην είναι καλά προσαρμοσμένα στους φιστικεώνες στην Ελλάδα. Οι 11 από αυτές εντοπίστηκαν στη Φθιώτιδα και οι 26 στην Αίγινα.

Πλην των μονομελών ομάδων, εντοπίστηκαν και 19 ομάδες οι οποίες απαρτίζονταν από τουλάχιστον δύο απομονώσεις. Οι 6 από αυτές ήταν τοξικογόνες ομάδες και απαρτίζονταν από 2-12 απομονώσεις. Οι 4 εξ αυτών εντοπίστηκαν και στις δύο μελετώμενες περιοχές, ενώ δύο εντοπίστηκαν μόνο στην Αίγινα αλλά ήταν μικρότερες, απαρτιζόμενες από 3 και 4 απομονώσεις αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες 13 πολυμελείς ομάδες ήταν μη τοξικογόνες. Εξ αυτών, εντοπίστηκε μια με 11 απομονώσεις μόνο στη Φθιώτιδα και 4 ομάδες μόνο στην Αίγινα. Οι 8 υπόλοιπες ομάδες εντοπίστηκαν και στην Αίγινα και στην Φθιώτιδα. Πολυπληθέστερη μεταξύ αυτών των μη τοξικογόνων πολυμελών ομάδων ήταν μια ομάδα με 51 απομονώσεις από Αίγινα, Φθιώτιδα αλλά και Μέγαρο. Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως οι ομάδες σε όλες τις μελετώμενες περιοχές της Ελλάδος συσχετίζονται σε ένα σημαντικό βαθμό. Παρά την ύπαρξη αρκετών μονομελών ομάδων και στη Φθιώτιδα και στην Αίγινα, με υπερδιπλάσιες να εντοπίζονται στην Αίγινα, πολλές από τις ομάδες που αποτελούνται από παραπάνω από μία απομόνωση, εντοπίζονται σε διάφορες περιοχές. Το συγκεκριμένο στοιχείο δεν μοιάζει σαν ένα παράδοξο γεγονός, καθώς σε μελέτες στην Αφρική, έχουν εντοπιστεί σε απόσταση μεγαλύτερη των 400 χιλιομέτρων, απομονώσεις που ανήκουν στην ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας (Atehnkeng et al. 2015).

Το ενδιαφέρον στοιχείο που προκύπτει από τα περιγραφόμενα αποτελέσματα, είναι ότι καταγράφηκαν δύο μεγάλες ομάδες μη τοξικογόνων απομονώσεων που εντοπίστηκαν είτε και στις τρεις περιοχές, είτε στις δύο. Η πρώτη περιέχει 51 απομονώσεις και η δεύτερη 16 απομονώσεις αντίστοιχα. Η πρώτη μάλιστα περιέχει το 32% των συνολικών μη τοξικογόνων απομονώσεων. Και στις δύο ομάδες εντοπίστηκαν αρκετές απομονώσεις που κατά την *in vitro* και *in situ* διερεύνηση μείωσης των παραγόμενων αφλατοξινών, παρουσίασαν υψηλή παρεμπόδιση, της τάξεως του 90%. Αυτό είναι ένα ιδιαίτερος ενθαρρυντικό αποτέλεσμα ως προς τη βιολογική αντιμετώπιση των αφλατοξινών με χρήση ενδημικών μη τοξικογόνων απομονώσεων.

Ένα ακόμη ιδιαίτερα σημαντικό αποτέλεσμα που απορρέει από την συγκεκριμένη μελέτη είναι πως το στέλεχος *A. flavus* που περιέχεται στο εμπορικό βιολογικό σκεύασμα AF-X1® που διαθέτει άδεια



κυκλοφορίας στην Ιταλία για την αντιμετώπιση των αφλατοξινών στον αραβόσιτο, ανήκει στην πολυπληθέστερη ενδημική Ελληνική ομάδα βλαστικής συμβατότητας η οποία περιέχει το 32% των μη τοξικογόνων Ελληνικών απομονώσεων. Παρατηρείται λοιπόν μια συσχέτιση του πληθυσμού των μη τοξικογόνων στελεχών στην Ελλάδα και στην Ιταλία. Καθώς η συγκεκριμένη ομάδα φαίνεται να είναι η καλύτερα προσαρμοσμένη ομάδα στην Ελλάδα, δίνονται ελπίδες ότι μελλοντικά πιθανόν αυτό το σκεύασμα θα μπορούσε να εφαρμοστεί και στην Ελλάδα, ύστερα από απαιτούμενα πειράματα και κατάλληλη τροποποίηση της άδειας κυκλοφορίας του. Ένα τέτοιο γεγονός δεν είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται. Αντίστοιχο είναι το παράδειγμα του εμπορικού σκευάσματος AF36® με άδεια στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, του οποίου η ομάδα βλαστικής συμβατότητας εντοπίστηκε ως ενδημική και στο Μεξικό (Ortega-Beltran et al. 2016). Καθώς στην εν λόγω μελέτη είχαν χρησιμοποιηθεί πάνω από 3500 απομονώσεις *A. flavus*, δεν μπορεί να εξαχθεί ένα τόσο ισχυρό αποτέλεσμα από την παρούσα μελέτη, ωστόσο μπορεί να διατυπωθεί το συμπέρασμα πως παρουσιάζονται σοβαρές ενδείξεις για την πιθανή μελλοντική σύνδεση Ελλάδας και Ιταλίας όσον αφορά στην εφαρμογή του συγκεκριμένου βιολογικού σκευάσματος ή άλλου που να περιέχει απομόνωση του μύκητα από την ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας.

Τέλος, σχετικά με την εφαρμογή μη τοξικογόνων στελεχών *Aspergillus flavus* σε αγρούς για την διαχείριση των παραγόμενων αφλατοξινών, έχουν αναφερθεί διάφοροι τρόποι εφαρμογής. Τέτοια παραδείγματα είναι ο καολινίτης, οι σπόροι αραβοσίτου και άλευρα σιτηρών (Daigle et al. 1995). Στη συνέχεια και με την πάροδο των ετών, αξιοποιήθηκαν οι αδρανοποιημένοι σπόροι σιτηρών για την εφαρμογή μη τοξικογόνων στελεχών σε επίπεδο αγρού στην επιφάνεια του εδάφους (Bock et al. 1999, Arizona Cotton Research and Protection Council 2012). Παρόλα αυτά, έχει αξιολογηθεί και ο ψεκασμός εναιωρήματος κονιδίων του μη τοξικογόνου στελέχους, αλλά τα αποτελέσματα παρεμπόδισης δεν ήταν τόσο υψηλά όσο στην εφαρμογή με σπόρους σιτηρών στο έδαφος (Dorner 2009). Επίσης, έχουν αξιολογηθεί και νέοι καινοτόμοι τρόποι τυποποίησης τέτοιων βιολογικών παραγόντων με τη χρήση βιοπλαστικών, με σκοπό την επίλυση προβλημάτων εφαρμογής που απορρέουν από την ποικιλομορφία των μετεωρολογικών συνθηκών στον εκάστοτε τόπο εφαρμογής (Abbas et al. 2017).

Το τελευταίο στάδιο της παρούσας ερευνητικής ενότητας αφορούσε στην αξιολόγηση δύο μη τοξικογόνων απομονώσεων *A. flavus*, μία από τη κάθε μία μεγάλη ομάδα βλαστικής συμβατότητας, σε τρεις φιστικεάνες στην Αίγινα, ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών. Η Αίγινα είναι μια περιοχή με ξηροθερμικό κατά βάση κλίμα, όπου η καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών είναι είτε ξηρική, είτε λαμβάνουν χώρα ένα έως τρία ποτίσματα κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Επιπρόσθετα, η Αίγινα είναι μια περιοχή με γενικά χαμηλές βροχοπτώσεις και τα εδάφη είναι σε πολλές περιπτώσεις φιστικεώνων αμμώδη. Συνήθως η τελευταία, ή και μοναδική άρδευση λαμβάνει χώρα λίγες ημέρες πριν τη συγκομιδή (από αρχές μέχρι τα μέσα Αυγούστου) για να ευνοηθεί το άνοιγμα του κελύφους των φιστικιών, το οποίο θεωρείται επιθυμητό χαρακτηριστικό για το τελικό προϊόν. Καθώς η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα με τη χρήση σπόρων σιτηρών στην επιφάνεια του εδάφους, είναι μία τεχνική η οποία απαιτεί υψηλή υγρασία στο έδαφος, προκειμένου να μπορέσει να αναπτυχθεί ο μύκητας-βιολογικός παράγοντας επί των σπόρων των σιτηρών, δεν ήταν δυνατόν να εφαρμοστεί η συγκεκριμένη τεχνική στην Αίγινα. Για αυτό το λόγο επελέγη η μέθοδος του ψεκασμού εναιωρήματος κονιδίων των μη τοξικογόνων στελεχών στους πειραματικούς φιστικεάνες. Η εφαρμογή έγινε περί τα μέσα έως τέλη Ιουνίου, όπως γίνεται και στα αντίστοιχα εμπορικά σκευάσματα.

Οι δύο μη τοξικογόνες απομονώσεις εφαρμόστηκαν σε συνολικά τρεις φιστικεάνες, δύο κάθε έτος, για τα δύο έτη 2017 και 2018 στην Αίγινα. Στον ένα φιστικεώνα για κάθε έτος εφαρμόστηκαν και τεχνητές μολύνσεις με ένα ενδημικό ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος και η παρεμπόδιση στην παραγωγή των



αφλατοξινών από τα δύο μη τοξικογόνα στελέχη κυμάνθηκε από 93,9% έως 99,9% του μάρτυρα. Στους άλλους δύο φιστικεώνες, έναν για κάθε έτος, για τη δημιουργία του μάρτυρα δεν έγιναν τεχνητές μολύνσεις, παρά μόνο φυσικές επιμολύνσεις από αφλατοξίνες. Σε αυτές τις περιπτώσεις η παρεμπόδιση κυμάνθηκε από 76,7% έως 99,6% του μάρτυρα, καθώς στον έναν φιστικεώνα οι φυσικές μολύνσεις δεν ήταν οι αναμενόμενα υψηλές. Η παρεμπόδιση που προκάλεσε και τα δύο έτη, το μη τοξικογόνο στέλεχος A.f.41.30 από την ομάδα βλαστικής συμβατότητας με το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που έχει να εντοπίζεται και στην Ιταλία όπως το AF-X1<sup>®</sup>, δεν βρέθηκε ποθενά χαμηλότερη από 90%. Στον αντίποδα, η απομόνωση A.f.113.31 που ανήκει στη δεύτερη σε μέγεθος ομάδα βλαστικής συμβατότητας, δεν παρουσιάστηκε τόσο αποτελεσματική, με παρεμποδισεις 76,7%, 80,9%, 93,9% και 99,9%. Ωστόσο και οι δύο απομονώσεις ήταν αποτελεσματικές στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών στα μικρής κλίμακας πειράματα αγρού, που κατόπιν την διερεύνησης της κατάταξής τους σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας, βρέθηκε πως ανήκουν στις δύο επικρατέστερες μη τοξικογόνες ομάδες στην Ελλάδα.

Αποτελέσματα άλλων ερευνών σχετικά με τη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών από την εφαρμογή μη τοξικογόνων απομονώσεων *A. flavus* σε συνθήκες αγρού υποδεικνύουν μείωση των αφλατοξινών στον αραβόσιτο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής σε επίπεδο 80-95% (Brown et al. 1991) και 37%-86% από την εφαρμογή μεμονωμένων στελεχών καθώς και 65%-94% από την εφαρμογή μείγματος μη τοξικογόνων στελεχών (Abbas et al. 2006). Έχει επίσης αναφερθεί μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών κατά 92,3% στον αραβόσιτο στην Ιταλία (Mauro et al. 2018) αλλά και κατά 67%-95% στον αραβόσιτο στην Αφρική ύστερα από εφαρμογή μείγματος μη τοξικογόνων απομονώσεων (Atehnkeng et al. 2014). Όσον αφορά στη καλλιέργεια της φιστικιάς, έχει αναφερθεί στη Καλιφόρνια των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής μείωση αφλατοξινών κατά 20%-45% (Doster et al. 2014) αλλά και κατά 80% (Ortega-Beltran et al. 2019).

Με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης κρίνονται πολύ σημαντικά για τη βιολογική αντιμετώπιση των αφλατοξινών στην Ελλάδα. Οι παρεμποδισεις που επιτεύχθηκαν από την εφαρμογή μη τοξικογόνων στελεχών είναι αντίστοιχες και πιθανόν υψηλότερες από αντίστοιχες που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή κυρίως της απομόνωσης A.f.41.30 είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για την εμπορευματοποίηση και την αξιοποίησή της σε σύγχρονα ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού στην Ελλάδα.

## Κεφάλαιο 3: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΟΓΟΝΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *A. FLAVUS* ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΣΕ ΚΕΛΥΦΩΤΑ ΦΙΣΤΙΚΙΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΝΔΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΦΥΤΙΚΩΝ ΖΥΜΩΝ

### 3.1. Περίληψη

Τα κελυφωτά φιστίκια θεωρούνται ένας από τους πιο εύγευστους και διατροφικά άριστους ξηρούς καρπούς λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε ακόρεστα λιπαρά, μέταλλα, φυτικές πρωτεΐνες και αντιοξειδωτικές πολυφαινόλες. Ωστόσο, οι καρποί συχνά μολύνονται από τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *Aspergillus flavus*, τα οποία παράγουν αφλατοξίνες. Πρόκειται για την πιο σημαντική ομάδα μυκοτοξινών με βάση την τοξικότητά τους, αλλά και την οικονομική ζημία που προκαλούν, εφόσον κάθε χρόνο πολλά προϊόντα δε φθάνουν στο εμπόριο ή ανακαλούνται εξαιτίας μόλυνσής τους από αυτές. Η αντιμετώπιση του μύκητα *A. flavus* είναι ιδιαίτερα δύσκολη, λόγω της μεγάλης του ικανότητας να αναπτύσσεται σε ποικιλία υποστρωμάτων και της ευρείας διάδοσής του. Επιπλέον, στη χώρα μας μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν εγκεκριμένα μυκητοκτόνα σκευάσματα που να καταπολεμούν αποτελεσματικά το μύκητα και τις παραγόμενες αφλατοξίνες. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η δημιουργία μιας συλλογής ενδημικών επιφυτικών απομονώσεων ζυμών από κελυφωτά φιστίκια, με απώτερο στόχο την εύρεση αποτελεσματικών απομονώσεων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης των αφλατοξινών στα πλαίσια ενός προγράμματος ολοκληρωμένης διαχείρισής τους. Αρχικά, συλλέχθηκαν 292 ενδημικές επιφυτικές απομονώσεις ζυμών από καρπούς κελυφωτού φιστικιού από φιστικεώνες στην Αίγινα. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η ικανότητα των απομονωθέντων ζυμών να παρεμποδίζουν την κονιδιογένεση και την *in vitro* παραγωγή αφλατοξινών ενός ενδημικού, ισχυρά τοξικογόνου στελέχους *A. flavus*. Οι 40 πιο αποτελεσματικές απομονώσεις ζυμών που βρέθηκαν με τη μέθοδο TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας) να παρεμποδίζουν πλήρως την παραγωγή αφλατοξινών του μυκοτοξικογόνου μύκητα *in vitro*, ελέγχθηκαν για την ίδια ικανότητά τους σε πειράματα *in situ* σε καρπούς κελυφωτού φιστικιού με τη μέθοδο ELISA. Παρατηρήθηκε ότι 7 απομονώσεις ζυμών μπορούσαν να παρεμποδίσουν σχεδόν ολοκληρωτικά την παραγωγή αφλατοξινών. Ακολούθησε μελέτη της επίδρασης των 7 αποτελεσματικών απομονώσεων ζυμών στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR*, που αποτελεί θετικό ρυθμιστή στη βιοσύνθεση των αφλατοξινών του *A. flavus*. Τα αποτελέσματα της Real-time PCR έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα κάποιων στελεχών ζυμών εξ αυτών που εξετάστηκαν πιθανώς συνδέεται με την επίδρασή τους στην έκφραση του *AflR*. Τέλος, διερευνήθηκε η ευαισθησία των αποτελεσματικών ζυμών σε χημικά μυκητοκτόνα σκευάσματα (Octave<sup>®</sup>, Geoxe<sup>®</sup>, Chorus<sup>®</sup>, Scala<sup>®</sup>, Fungazil<sup>®</sup>, Opera New<sup>®</sup>) που έχουν βρεθεί σε άλλες ερευνητικές ενότητες της παρούσας διατριβής (Κεφάλαιο 5) αποτελεσματικά για την αντιμετώπιση του *A. flavus* και των παραγόμενων αφλατοξινών του. Με βάση τα αποτελέσματα, σχεδόν όλες οι ζύμες έδειξαν να είναι πολύ ευαίσθητες στα χημικά σκευάσματα που ελέγχθηκαν. Εξαιρέση αποτέλεσαν δύο ζύμες, εκ των οποίων η μία έδειξε μέτρια ευαισθησία στο Octave<sup>®</sup> και στο Chorus<sup>®</sup>, ενώ η άλλη έδειξε μέτρια ευαισθησία μόνο στο Chorus<sup>®</sup>. Τέλος, επιλέχθηκαν δύο απομονώσεις ζυμών και αξιολογήθηκαν σε πειράματα μικρής κλίμακας αγρού σε 3 φιστικεώνες στην Αίγινα το 2017 και το 2018, ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών, με τα αποτελέσματα να υποδεικνύουν μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών ως και 100%. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για τη χρήση ζυμών ως βιολογικών παραγόντων ενάντια των αφλατοξινών από τον μύκητα *A. flavus*.

### 3.2. Εισαγωγή

Οι φυτικοί ιστοί αποτελούν ένα σημαντικό βιότοπο επιφυτικών και ενδοφυτικών μικροοργανισμών, οι οποίοι προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, αλλά και τα προστατεύουν (Wilson 1989). Τα βακτήρια, οι ζύμες και οι μυκηλιακοί μύκητες εγκαθίστανται και αναπτύσσονται πληθυσμούς στη φυλλόσφαιρα και τους καρπούς. Οι πιθανές πηγές προέλευσης των αποικιστών αυτών είναι το έδαφος, οι καρποί, ο αέρας, οι οφθαλμοί και οι διαχειμάζοντες βλαστοί. Μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών κυρίως βακτήρια και ζύμες έχουν απομονωθεί από τις φυτικές επιφάνειες και έχει διαπιστωθεί η ανταγωνιστική τους ικανότητα κατά διαφόρων παθογόνων (Aragas 1996). Οι μικροοργανισμοί αυτοί θα πρέπει να συγκεντρώνουν ορισμένα χαρακτηριστικά με πρωταρχικό την αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου. Θα πρέπει επίσης να επιβιώνουν σε αντίξοες για αυτούς περιβαλλοντικές συνθήκες, να πολλαπλασιάζονται επί των ιστών του φυτού, να είναι γενετικά σταθεροί, αποτελεσματικοί σε χαμηλές συγκεντρώσεις, να μην είναι απαιτητικοί σε θρεπτικά στοιχεία, να είναι δραστικοί σε πλήθος παθογόνων σε διάφορους ξενιστές, να μπορούν να αναπτυχθούν σε φθινό υλικό καλλιέργειας, να είναι σε μορφή εύκολα αποθηκεύσιμη και εφαρμόσιμη, να μην παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες τοξικούς για τον άνθρωπο, να είναι ανθεκτικοί σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, να είναι συμβατοί με άλλα χημικά και φυσικά μέσα και να μην είναι παθογόνοι για τα φυτά και τον άνθρωπο (Wilson et al. 1989). Επισημαίνεται ότι οι απομονώσεις είναι πολύ καλύτερο να συλλέγονται από αγρούς και οπωρώνες εγκαταλειμμένους ή εκείνους που δεν έχουν υποστεί χημικές επεμβάσεις. Σε αυτήν την περίπτωση οι φυσικά απαντώμενοι πληθυσμοί δεν έχουν διαταραχθεί και κατά συνέπεια ο αριθμός των πιθανών ανταγωνιστών θα είναι μεγαλύτερος.

Σαπροφυτικές ζύμες όπως η *Candida krusei* και η *Pichia anomala* έχουν δείξει ότι είναι πολλά υποσχόμενοι βιολογικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση των μολύνσεων από αφλατοξίνες (Yin et al. 2008). Αυτά τα στελέχη ζυμών έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του *Aspergillus* και την παραγωγή τοξινών του σε συνθήκες εργαστηρίου (Hua et al. 1999, Masoud et al. 2006). Οι ζύμες έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών όπως οι μύκητες *Botrytis cinerea* και *Aspergillus carbonarius* (Pretschner et al. 2018, Cordero-Bueso et al. 2017). Είναι μικροοργανισμοί φιλικοί προς το περιβάλλον, μη επιβλαβείς στον άνθρωπο, παρόλο που έχουν βρεθεί ζύμες που παράγουν ορισμένες τοξίνες (El-Banna et al. 2011). Οι ζύμες καλλιεργούνται εύκολα καθώς αναπτύσσονται γρήγορα και απαντώνται σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ζύμες που ανήκουν στα γένη *Candida*, *Saccharomyces* και *Rhodotorula* έχουν χρησιμοποιηθεί στην μετασυλλεκτική αντιμετώπιση προσβολών φρούτων από μύκητες (Liu et al. 2013). Ο τρόπος δράσης τους, είναι κατά κύριο λόγο ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία ενάντια των παθογόνων και ο αποκλεισμός από τον βιότοπο. Οι ζύμες ανταγωνιστές συνήθως απομονώνονται από την επιφάνεια της φυλλόσφαιρας, την επιφάνεια των καρπών αλλά και το έδαφος (Rouhani et al. 2018). Πρέπει να είναι ενδημικές, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι ο φυσικός πληθυσμός τους πρέπει να είναι τόσο υψηλός ώστε να μπορεί να ελέγξει τις μολύνσεις από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς που συμβαίνουν φυσικά.

Οι ζύμες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση μυκοτοξικογόνων μυκήτων που παράγουν ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) και αφλατοξίνη Β1 (ΑFB1). Ζύμες απομονωμένες από την Ελλάδα και την Αφρική, που ανήκουν στα γένη *Aureobasidium* και *Pichia* αντίστοιχα, έχουν την ικανότητα να ελέγχουν την αύξηση και την παραγωγή ΟΤΑ των μυκήτων *Aspergillus carbonarius* και *Aspergillus ochraceus* (Dimakopoulou et al. 2008, Masoud et al. 2006, Tryfinopoulou et al 2019, Tryfinopoulou et al 2020). Ζύμες των γενών αυτών, έχει αναφερθεί επίσης πως έχουν την ικανότητα να μειώνουν την *in vitro* παραγωγή ΟΤΑ και από άλλους ωχρατοξικογόνους μύκητες όπως ο μύκητας *Penicillium verrucosum* (Petersson et al. 1998).

Όσον αφορά στην βιολογική αντιμετώπιση αφλατοξικογόνων μυκήτων με την χρήση ζυμών, οι

πρώτες προσπάθειες για την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του μύκητα *A. flavus* και ζυμών, έγιναν στη δεκαετία του 1990 (Hua et al. 1999). Μια απομόνωση *Pichia guilliermondii* βρέθηκε να είναι αποτελεσματική επίσης στον έλεγχο των αφλατοξινών σε μετασυλλεκτικό επίπεδο σε αποθηκευμένους σπόρους σόγιας σε διάφορες συνθήκες σχετικής υγρασίας (Paster et al. 1993). Αυτός ο τύπος ανταγωνιστικής δραστηριότητας ελέγχθηκε περαιτέρω με τη χρήση συστήματος φθορίζοντων ανιχνευτών και επιβεβαιώθηκε η ανταγωνιστική ικανότητα της ζύμης (Hua et al. 2011). Οι ζύμες του γένους *Pichia* δύνανται να παράγουν ένζυμα όπως οι εξω-χιτινάσες και οι β-1,3-γλουκανάσες που παρουσιάζουν αντιμυκητιακή δραστηριότητα κατά του *A. flavus* (Tayel et al. 2013, Hua 2013). Σε άλλες έρευνες, ζύμες που ανήκουν στο γένος *Pseudozyma* και απομονώθηκαν από καρπούς φιστικιών και φύλλα, κατάφεραν να επιτύχουν έως και κατά 90% παρεμπόδιση στην παραγωγή των αφλατοξινών από τοξικογόνα στελέχη *in vitro* (Afsah-Hejri 2013).

Επιπρόσθετα, αποτελέσματα *in vitro* ερευνών υποδεικνύουν ότι ο τρόπος δράσης των ζυμών κατά την διαδικασία αλληλεπίδρασης και παρεμπόδισης της παραγωγής αφλατοξινών μπορεί να διαφέρει. Μια ζύμη *Rhodococcus erythropolis* έχει αναφερθεί να βιοαπαδομεί την αφλατοξίνη B1 (Alberts et al. 2006), ενώ άλλοι μηχανισμοί όπως η αποτοξικοποίηση ή η προσρόφιση μπορούν να επιτευχθούν με εφαρμογή των ζυμών του γένους *Saccharomyces* (Pfliegler et al. 2015, Pizzolitto et al. 2012). Οι ζύμες του γένους *Pichia*, παράγουν επίσης πτητικές ενώσεις (2-phenylethanol) που μπορούν είτε να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα *A. flavus*, είτε να επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων του βιοσυνθετικού μονοπατιού των αφλατοξινών όπως η ομάδα των γονιδίων MYST, που αποτελούν ρυθμιστές της παραγωγής αφλατοξινών (Hua et al. 2014). Άλλοι πιθανοί βιολογικοί παράγοντες για την διαχείριση των αφλατοξινών είναι οι ζύμες του γένους *Kluyveromyces*. Εφαρμογή ζυμών του γένους *Kluyveromyces* έχει παρατηρηθεί να προκαλεί μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών σε ποικίλες συνθήκες ενεργότητας του νερού (La Penna et al. 2004).

Είναι αξιοσημείωτο ότι προβιοτικά στελέχη του *S. cerevisiae* δεσμεύουν αποτελεσματικά την αφλατοξίνη B1 (AFB1) (Pizzolitto et al. 2012, Bueno et al. 2007), επιβιώνουν σε συνθήκες του γαστρεντερικού συστήματος και βελτιώνουν τη ζύμωση της τροφής (Dogi et al. 2011). Η αποτοξικοποίηση με ζωντανές ζύμες έχει επίσης μελετηθεί σε αρουραίους που τράφηκαν με ζωοτροφές που είχαν μολυνθεί με αφλατοξίνες, μειώνοντας σημαντικά τις τοξικές επιδράσεις (Gonzalez Pereyra et al. 2014). Η εφαρμογή του *S. cerevisiae* είναι επίσης πολλά υποσχόμενη ως στρατηγική για τη μείωση της μόλυνσης με AFB1 κατά την αποθήκευση τροφίμων. Για παράδειγμα, ανιχνεύθηκε έως και 55-74% μείωση της αρχικής ανιχνεύσιμης περιεκτικότητας σε τοξίνες μετά από επτά ημέρες επώασης σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αποθηκευμένα φιστίκια υπό εργαστηριακές συνθήκες (Prado et al. 2011).

Επιπρόσθετα, η μείωση της AFB<sub>1</sub> που παράγει την αφλατοξίνη M1 (AFM1) στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι επίσης δυνατή με απορρόφιση από πολυσακχαρίτες του *S. cerevisiae* (Corassin et al. 2013). Και η *Pichia manshurica* εκτός της *Saccharomyces cerevisiae*, φαίνεται να έχει την ικανότητα να δεσμεύει τις αφλατοξίνες (Deepak et al. 2015). Η 2-φαινυλαιθανόλη (2-PE) που παράγεται από τη *Pichia anomala*, έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζει τη βλάστηση των κονιδίων και τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης B1 (AFB1) που παράγει ο *A. flavus* (Hua et al. 2014). Ορισμένα γονίδια βιοσύνθεσης αφλατοξίνης όπως το *aflC* (συνθετάση πολυκετιδίου, πρώιμο γονίδιο στη βιοσύνθεση αφλατοξίνης), *aflR* (ρυθμιστής στην πορεία βιοσύνθεσης αφλατοξίνης), *aflS* (ενισχυτής μεταγραφής), *aflO* (Ο-μεθυλοτρανσφεράση Β), και *aflK* (συνθετάση βερικολορίνης Β) που υποεκφράστηκαν κατά περισσότερο από 10.000 φορές μετά από εφαρμογή με 2-PE σε συγκέντρωση 2 μL/mL και δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή AFB1 σε καλλιέργειες *A. flavus*. Επιπλέον, το 2-PE άλλαξε το πρότυπο έκφρασης ορισμένων γονιδίων τροποποίησης της χρωματίνης

(*MYST1*, *MYST2*, *MYST3*, *gcn5*, *hdaA*, *rpdA*), που επηρέασαν αρνητικά την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα (Hua et al. 2014).

Καθώς οι προαναφερθείσες εργαστηριακές έρευνες έδιναν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, αυτά έπρεπε να επιβεβαιωθούν και σε πραγματικές συνθήκες αγρού. Για το λόγο αυτό, ερευνητές πραγματοποίησαν εφαρμογή υδατικού διαλύματος κυττάρων ζύμης σε φιστικεώνες και αμυγδαλεώνες, με αποτέλεσμα τη μείωση της κονιδιογένεσης του αφλατοξικογόνου μύκητα κατά 80%. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πως ορισμένες ζύμες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες έναντι της παραγωγής αφλατοξινών, σε ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης αφλατοξινών (Hua 2002). Επίσης, ερευνητές από τη Μαλαισία, πρότειναν την ταυτόχρονη εφαρμογή μείγματος αποτελούμενο από ζύμες και βακτήρια, με σκοπό να αυξηθεί η αντιμυκητιακή δραστηριότητα και ως αποτέλεσμα και η παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών (Sheikh-Ali et al. 2014).

Ως αποτέλεσμα, κατά την διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, προϊόντα βιολογικής αντιμετώπισης με δραστική ουσία ζύμες, προωθήθηκαν στην αγορά των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Τέτοια παραδείγματα είναι το Botector® που περιέχει τη ζύμη *Auroeobasidium pullulans* από την Bio-ferm GmbH και το Nexy® που περιέχει τη ζύμη *Candida oleophila* από την BIONEXT sprl. Τέτοιες ενέργειες ενισχύουν την μείωση εισροών συνθετικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην τροφική αλυσίδα. Παρόλα αυτά, δυστυχώς, δεν υπάρχει ακόμα εγκεκριμένο εμπορικό προϊόν που να περιέχει ζύμη για την αντιμετώπιση των αφλατοξινών. Τέλος, η αλληλεπίδραση μεταξύ των αφλατοξικογόνων μυκήτων, των ζυμών και των χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι ένας παράγοντας που θα πρέπει να διερευνάται διεξοδικά (Arendrup 2014). Λαμβάνοντας υπόψιν το ευρύ φάσμα διεξαχθείσας έρευνας στο ζήτημα, μελλοντικές προοπτικές εγείρονται σχετικά με τη βιολογική διαχείριση των αφλατοξικογόνων μυκήτων που προσβάλλουν τις καλλιέργειες και των αφλατοξινών τους που παράγονται προσυλλεκτικά.

### 3.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας

Η παρουσία μυκοτοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές προκαλεί σημαντική ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση των προϊόντων. Οι αφλατοξίνες αποτελούν την κύρια κατηγορία μυκοτοξινών που μολύνουν μεταξύ άλλων τα κελυφωτά φιστίκια. Η βιολογική διαχείριση του προβλήματος είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η δημιουργία μιας συλλογής ενδημικών απομονώσεων επιφυτικών ζυμών, με στόχο την εύρεση κατάλληλων στελεχών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες κατά του αφλατοξικογόνου μύκητα *Aspergillus flavus* και των παραγόμενων αφλατοξινών του.

Αναλυτικά, οι επιμέρους σκοποί της μελέτης ήταν:

- Δημιουργία συλλογής ενδημικών επιφυτικών ζυμών από φιστικεώνες της Αίγινας, με στόχο την εφαρμογή τους σε κελυφωτά φιστίκια ως βιολογικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση των αφλατοξινών.
- Διερεύνηση της επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην κονιδιογένεση ενός ενδημικού ισχυρά τοξικογόνου στελέχους *A. flavus*.
- Διερεύνηση της *in vitro* επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών του ισχυρά τοξικογόνου στελέχους *A. flavus* σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα με χρήση TLC.
- Αξιολόγηση της *in situ* επίδρασης των αποτελεσματικότερων απομονώσεων, στην παραγωγή αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος σε καρπούς κελυφωτών φιστικιών με χρήση ELISA.
- Μοριακή ταυτοποίηση των πιο αποτελεσματικών απομονώσεων των ζυμών ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης της παραγωγής αφλατοξινών από ένα ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος *A. flavus*.
- Έλεγχος της επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR* απαραίτητου για την παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *A. flavus*.
- Αξιολόγηση της *in vitro* ευαισθησίας των πιο αποτελεσματικών επιφυτικών ζυμών σε χημικά μυκητοκτόνα σκευάσματα που έχουν βρεθεί αποτελεσματικά στην καταπολέμηση του ισχυρά τοξικογόνου στελέχους *A. flavus*.
- Αξιολόγηση 2 εκ των αποτελεσματικότερων ζυμών σε 3 φιστικεώνες στην Αίγινα, κατά των παραγόμενων αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus* σε σειρά δύο ετών (2017 και 2018).



### 3.4. Μεθοδολογία

#### 3.4.1. Θρεπτικά υλικά

##### Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (Potato Dextrose Agar (PDA))

Για την παρασκευή 1 L θρεπτικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν:

Εκχύλισμα πατάτας	200 mL
Δεξτρόζη	20 g
Άγαρ	20 g
Δις απεσταγμένο νερό	1000 mL

##### Yeast Malt Agar (YMA)

Για την παρασκευή 1 L θρεπτικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν :

Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract) (CondaLab)	3 g
Εκχύλισμα βύνης (Malt extract) (CondaLab)	3 g
Πεπτόνη (Peptone) (CondaLab)	5 g
Δεξτρόζη (Dextrose)	10 g
Δις απεσταγμένο νερό	1000 mL
Άγαρ	15 g

##### Yeast Malt (YM)

Για την παρασκευή 1 L θρεπτικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια υλικά και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με εκείνη της παρασκευής YMA, χωρίς όμως να γίνει προσθήκη Άγαρ.

##### Coconut Cream Agar (CCA)

Συσκευασμένο γάλα καρύδας	250 mL
Δις απεσταγμένο νερό	750 mL

Μετά την ανάμειξη των υλικών, το pH ρυθμίστηκε στο 6,9 και ακολούθησε προσθήκη 20 g Άγαρ.

##### Coconut Cream (CC)

Για την παρασκευή 1 L θρεπτικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια υλικά και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με εκείνη της παρασκευής CCA, χωρίς όμως να γίνει προσθήκη Άγαρ.

Όλα τα θρεπτικά υλικά αποστειρώθηκαν σε κλίβανο στους 121 °C για 20 λεπτά.

#### 3.4.2. Μέθοδοι

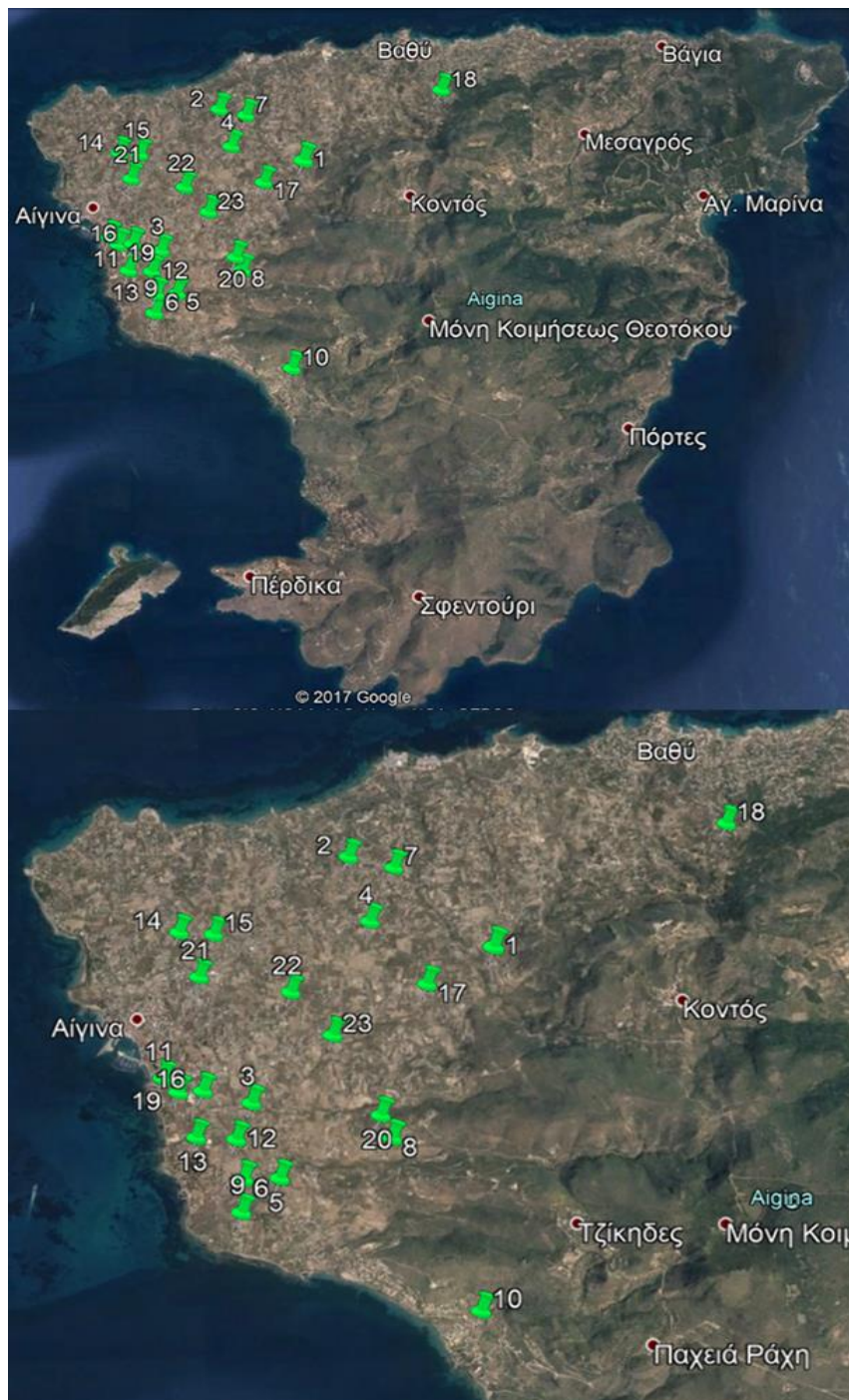
##### 3.4.2.1. Δημιουργία συλλογής ενδημικών επιφυτικών ζυμών

Στο στάδιο της συγκομιδής των φιστικιών (τέλος Αυγούστου για την περιοχή της Αίγινας) έγινε δειγματοληψία και συλλέχθηκαν καρποί φιστικιών από 20 φιστικεώνες στο νησί (Εικ. 3.1). Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο με φορητό ψυγείο προκειμένου να γίνουν οι απομονώσεις των επιφυτικών ζυμών. Για το σκοπό αυτό, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη όγκου 500 mL σε 100 mL δις

απιονισμένο νερό με προσθήκη 0,05% επιφανειοδραστικού παράγοντα Tween80® και 30 g κελυφωτά φιστίκια και αναδεύτηκαν για 30 min σε επωαστικό αναδευόμενο θάλαμο με συνθήκες θερμοκρασίας 25 °C και σε ταχύτητα ανάδευσης 150 RPM.

Στη συνέχεια, απλώνονταν 100  $\mu$ L από το πυκνό αιώρημα καθώς και από διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις έως  $10^{-3}$  σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα YMA, στο οποίο είχε γίνει προσθήκη αντιβιοτικών (στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη και χλωραμφενικόλη σε συγκεντρώσεις 20  $\mu$ g, 100  $\mu$ g και 20  $\mu$ g ανά 1000 mL αντιστοίχως). Τα τρυβλία επώαστηκαν σε συνθήκες 25 °C και φωτοπεριόδου 12 ωρών. Μετά από 24-48 ώρες επώασης είχαν αναπτυχθεί αποικίες ποικίλων ζυμών. Από αυτές τις αποικίες επιλέχθηκαν τυχαία απομονώσεις με εμφανείς μακροσκοπικές διαφορές και ακολούθησε γραμμική διασπορά (streaking) στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα και επώαση σε σκοτεινό θάλαμο 25 °C για ανάπτυξη των ζυμών. Μετά από μία ημέρα, ακολούθησε δεύτερη γραμμική διασπορά, ώστε για το κάθε στέλεχος ζύμης να ληφθεί καθαρή καλλιέργεια.

Ακολούθησε διαδικασία αποθήκευσης, με σκοπό τη διατήρηση των συγκεκριμένων απομονώσεων ζυμών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Πιο συγκεκριμένα, σε αποστειρωμένα σωληνάκια Eppendorf (1,5 mL) που περιείχαν 35% αποστειρωμένο διάλυμα γλυκερόλης σε δις απιονισμένο νερό, προστέθηκαν καθαρές καλλιέργειες στελεχών ζυμών κατευθείαν από τα τρυβλία, με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καλή ανάδευση των σωληναρίων Eppendorf, εμβάπτισή τους σε υγρό άζωτο (-196 °C) και αποθήκευση στους -80 °C.



**Εικόνα 3.1:** Χάρτης απεικόνισης των φιστικεώνων από όπου πραγματοποιήθηκαν οι απομονώσεις για την δημιουργία της συλλογής των ζυμών. Πάνω παρουσιάζεται όλο το νησί της Αίγινας και κάτω σε μεγέθυνση ο χάρτης.

### 3.4.2.2. Καλλιέργεια επιφυτικών ζυμών και ανταγωνιστικού στελέχους *Aspergillus flavus*

Η μεταφορά για την επανακαλλιέργεια των στελεχών των ζυμών από τα σωληνάρια Eppendorf που φυλάσσονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  έγινε με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου υπό ασηπτικές συνθήκες και με γραμμική διασπορά σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα YMA υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής. Ακολουθούσε επώαση σε σκοτεινό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας  $25^{\circ}\text{C}$  για 24-48 ώρες.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ένα ενδημικό στέλεχος του μυκοτοξικογόνου μύκητα *Aspergillus flavus*. Πρόκειται για το στέλεχος A.f.18.4 που είναι απομόνωση από φιστικέωνα στο νησί της Αίγινας. Απομονώθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και χρησιμοποιήθηκε και σε άλλες ερευνητικές ενότητες. Επιλέχθηκε λόγω της υψηλά τοξικογόνου ικανότητάς του που έχει επιβεβαιωθεί στη παρούσα διδακτορική διατριβή (Κεφάλαιο 5, Παράγραφος 5.5.1.). Η μεταφορά του στελέχους αυτού γινόταν από σωληνάρια Eppendorf που φυλάσσονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA σε θάλαμο νηματικής ροής και υπό ασηπτικές συνθήκες. Η μεταφορά γινόταν με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου στο κέντρο του τρυβλίου (point inoculation). Στη συνέχεια, τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επώαστικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας  $28^{\circ}\text{C}$  και φωτοπεριόδου 12 ωρών, όπου και παρέμεναν για 5-7 ημέρες μέχρι την ικανοποιητική ανάπτυξη και σποριοποίηση του μύκητα.

### 3.4.2.3. Διερεύνηση της επίδρασης απομονώσεων ζυμών στην κονιδιογένεση του μύκητα *Aspergillus flavus*

Για τη διερεύνηση της επίδρασης των στελεχών των ζυμών στην κονιδιογένεση του στελέχους A.f.18.4 *A. flavus*, έγινε συγκαλλιέργειά τους σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα YMA. Μετά την καλλιέργεια του στελέχους A.f.18.4 του μύκητα *A. flavus* και των στελεχών των ζυμών σε τρυβλία με PDA και YMA αντίστοιχα, ακολούθησε η συλλογή των κονιδίων και των κυττάρων ζύμης αντίστοιχα, σε σωληνάρια Eppendorf με 1 mL δις απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Αφού μετρήθηκε η συγκέντρωση των κονιδίων του αφλατοξικογόνου μύκητα και των κυττάρων των ζυμών αντίστοιχα, με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου, ρυθμίστηκε η τελική συγκέντρωση ώστε να είναι  $10^6$  κονίδια/mL και  $10^6$  cfu/mL αντίστοιχα σε 10 mL YMA. Μετά από καλή ανάδευση, τα 10 mL του θρεπτικού υλικού εγχύθηκαν σε τρυβλία με 15 mL ήδη στερεό υλικό YMA. Για τη δημιουργία του μάρτυρα, ακολούθηθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι στο τρυβλίο έγινε εμβολιασμός μόνο με το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 σε συγκέντρωση  $10^6$  κονίδια/mL. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις του πειράματος. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε θάλαμο φωτοπεριόδου 12 ωρών και θερμοκρασίας  $28^{\circ}\text{C}$  για 5 ημέρες.

Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της παραγωγής κονιδίων του τοξικογόνου στελέχους. Για τη μέτρηση των κονιδίων, συλλέχθηκαν με φελλοτρυπητήρα και ανατομική βελόνα 8 δισκία διαμέτρου 0,4 cm από κάθε τρυβλίο (συνολικής επιφάνειας  $1\text{ cm}^2$ , ώστε οι μετρήσεις να εκφραστούν σε αριθμό κονιδίων/ $\text{cm}^2$ ), ομογενοποιήθηκαν μέσα σε 1 mL δις απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό με τη χρήση pestles και μετρήθηκαν τα κονίδια ανά mL με χρήση αιματοκυτταρομέτρου. Σκοπός ήταν να βρεθεί η επί τοις εκατό παρεμπόδιση στην παραγωγή κονιδίων του τοξικογόνου στελέχους.

### 3.4.2.3. Διερεύνηση της *in vitro* επίδρασης των απομονώσεων ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus*

Οι 292 απομονώσεις ζυμών της δημιουργηθείσας συλλογής εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να μειώνουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες από ένα ενδημικό ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος *Aspergillus flavus*. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω.

#### 3.4.2.3.1. Συγκαλλιέργεια *Aspergillus flavus* με απομονώσεις ζυμών

Μετά την ανάπτυξη του στελέχους A.f.18.4 του *A. flavus* σε τρυβλία με PDA και των στελεχών των ζυμών σε τρυβλία με YMA, ακολούθησε συλλογή των κονιδίων και των κυττάρων των ζυμών αντίστοιχα σε σωληνάρια Eppendorf με 1 mL δις απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Οι συγκεντρώσεις τους μετρήθηκαν με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου. Για κάθε στέλεχος ζύμης προστέθηκαν σε 10 mL CCA (0,7% Agar) θερμοκρασίας περίπου 35-40 °C, αιώρημα των κυττάρων του και αιώρημα των κονιδίων του στελέχους του *A. flavus* ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση  $10^6$  cfu/mL και  $10^6$  κονίδια/mL. Μετά από καλή ανάδευση, τα 10 mL CCA στρώθηκαν σε τρυβλίο με 15 mL ήδη στρωμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα CCA (2% Άγαρ). Για τη δημιουργία του μάρτυρα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι στα 10 mL CCA έγινε μόνο προσθήκη κονιδίων του στελέχους A.f.18.4 *A. flavus* με τελική συγκέντρωση  $10^6$  κονίδια/mL. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις του πειράματος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το υλικό CCA επιλέχθηκε λόγω της ικανότητας του να προάγει την παραγωγή αφλατοξίνης των μυκήτων *Aspergillus*. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε σκοτεινό θάλαμο στους 28 °C για 15 ημέρες ώστε η παραγωγή αφλατοξινών να φθάσει σε υψηλά επίπεδα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή αφλατοξινών από το θρεπτικό υπόστρωμα και τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδος (Thin Layer Chromatography (TLC)).

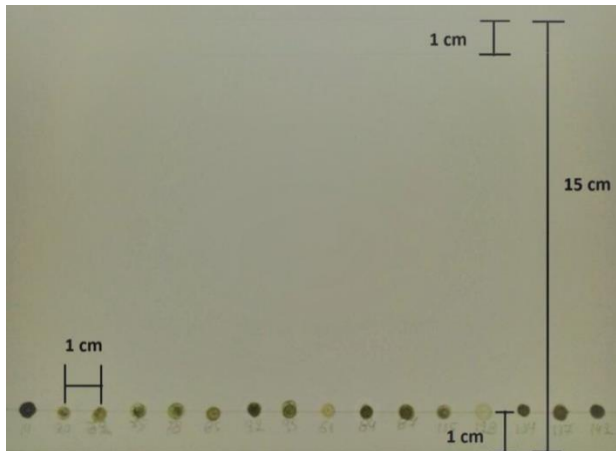
#### 3.4.2.3.2. Εξαγωγή αφλατοξινών και Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδος

Με φελλοτροπητήρα διαμέτρου 0,9 cm, κόπηκαν 10 δισκία από κάθε τρυβλίο και τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά σωληνάρια τύπου Falcon όγκου 50 mL. Έπειτα, μέσα σε απαγωγό εστία, προστέθηκαν 5 mL χλωροφορμίου σε κάθε Falcon. Τα δείγματα παρέμειναν για ένα βράδυ στην απαγωγό εστία. Την επόμενη μέρα, αφού έγινε καλή ανάδευση των δειγμάτων (vortex), το χλωροφόρμιο μεταφέρθηκε σε καινούρια σωληνάρια τύπου Falcon ύστερα από αφαίρεση των δισκίων. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 5.000 RPM σε φυγόκεντρο τύπου Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments). Στη συνέχεια, η υγρή φάση από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε γυάλινα βάζακια τύπου McCartney κατόπιν αφαίρεσης σπορίων και λοιπών υπολειμμάτων, και αυτά αφέθηκαν στην απαγωγό εστία για 1-2 ημέρες έως ότου εξατμιστεί ο οργανικός διαλύτης.

Ακολούθησε προετοιμασία του TLC plate, όπου σημειώθηκαν με τη χρήση χάρακα και μολυβιού, οι αποστάσεις της λευκής πλάκας καθώς και οι θέσεις των δειγμάτων οι οποίες απείχαν μεταξύ τους 1 cm (Εικ. 3.2). Σε κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 100  $\mu$ L χλωροφορμίου και ακολούθησε καλή ανάδευση. Με τη χρήση μικροπιπέτας, έγινε τοποθέτηση σταγόνας όγκου 10  $\mu$ L από το κάθε δείγμα στις αντίστοιχες θέσεις φόρτωσης στην πλάκα TLC. Αφού τοποθετήθηκαν όλα τα δείγματα στο TLC plate, αυτό μεταφέρθηκε μέσα στο γυάλινο δοχείο χρωματογραφίας, το οποίο περιείχε μείγμα χρωματογραφίας αποτελούμενο από 96 mL διαιθυλαιθέρα, 3 mL μεθανόλη και 1 mL απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Το δοχείο κλείστηκε αεροστεγώς με γυάλινο καπάκι, τοποθετώντας βαζελίνη στα σημεία επαφής του δοχείου και της γυάλινης πλάκας, με στόχο την αποφυγή εξάτμισης των οργανικών διαλυτών. Η πλάκα TLC αφέθηκε στο δοχείο για



περίπου 40-60 λεπτά, μέχρι το διάλυμα να φθάσει σε απόσταση 13 cm από τη γραμμή που τοποθετήθηκαν αρχικά τα δείγματα (Εικ. 3.3). Τέλος, η πλάκα TLC αφαιρέθηκε και αφέθηκε για 5 λεπτά στην απαγωγό εστία, ώστε να εξατμιστούν οι διαλύτες και να στεγνώσει. Στη συνέχεια, έγινε παρατήρηση των αποτελεσμάτων της TLC σε συνθήκες σκότους και με τη χρήση λάμπας υπέρυθρου-UV (450 nm).



Εικόνα 3.2: Καθορισμός αποστάσεων σε TLC plate.



Εικόνα 3.3: Χρωματογραφία TLC σε εξέλιξη.

#### 3.4.2.4. Διερεύνηση της *in situ* επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus*

Από τον προηγούμενο έλεγχο προέκυψαν ορισμένες αποτελεσματικές απομονώσεις ζυμών, οι οποίες και επιλέχθηκαν για περαιτέρω ποσοτική διερεύνηση της μείωσης παραγωγής αφλατοξινών σε καρπούς κελυφωτών φιστικιών με την παρακάτω διαδικασία. Η διαδικασία αξιολόγησής τους περιγράφεται παρακάτω.

##### 3.4.2.4.1. Προετοιμασία καρπών φιστικιών - Απολύμανση

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε επιφανειακή απολύμανση των σπερμάτων των κελυφωτών φιστικιών υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι καρποί τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο τούλι και στη συνέχεια εμβάπτιση σε αποστειρωμένο ποτήρι ζέσεως με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη εμπορίου) 10% (10 mL χλωρίνη:90 mL απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό) και ανακινούνταν για 11 λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε νέο ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό για 3 λεπτά ώστε να ξεπλυθούν. Έπειτα, μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με 70% διάλυμα αιθανόλης (70 mL αιθανόλη:30 mL απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό) όπου ανακινούνταν επί 6 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έκπλυση εκ νέου, με εμβάπτισή τους σε αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό για 3 λεπτά και τοποθέτηση σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί για να στεγνώσουν.

##### 3.4.2.4.2. Εμβάπτιση καρπών σε αιώρημα με κύτταρα ζυμών

Μετά την καλλιέργεια των στελεχών των ζυμών σε YMA, πραγματοποιήθηκε συλλογή των κυττάρων τους σε σωληνάρια Eppendorf με 1 mL δις αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό και μέτρηση των συγκεντρώσεων με χρήση αιματοκυτταρόμετρου. Στη συνέχεια, σε κωνικές φιάλες με 100 mL δις απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό με επιφανειοδραστικό παράγοντα Tween20® (σε συγκέντρωση



0,01%), έγινε προσθήκη του αιωρήματος με τα κύτταρα της κάθε ζύμης μέχρι τελικής συγκέντρωσης  $10^6$  cfu/mL. 30 επιφανειακά απολυμασμένοι καρποί τοποθετήθηκαν σε κάθε κωνική φιάλη και μεταφέρθηκαν σε ανακινητή (orbital) όπου και αφέθηκαν για 30 λεπτά σε 120 RPM στους 25 °C.

Με τη χρήση αποστειρωμένης μεταλλικής λαβίδας, οι καρποί τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία, που περιείχαν δύο στρώσεις αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού και ένα αποστειρωμένο καπάκι από Falcon. Έγινε προσθήκη 2 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού στο καπάκι του Falcon και 1 mL στην επιφάνεια του χαρτιού για εξασφάλιση 100% σχετικής υγρασίας (Εικ. 3.4). Για κάθε διαφορετικό στέλεχος ζύμης, πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις σε 3 ξεχωριστά τρυβλία, που περιείχαν 8 καρπούς ανά τρυβλίο.



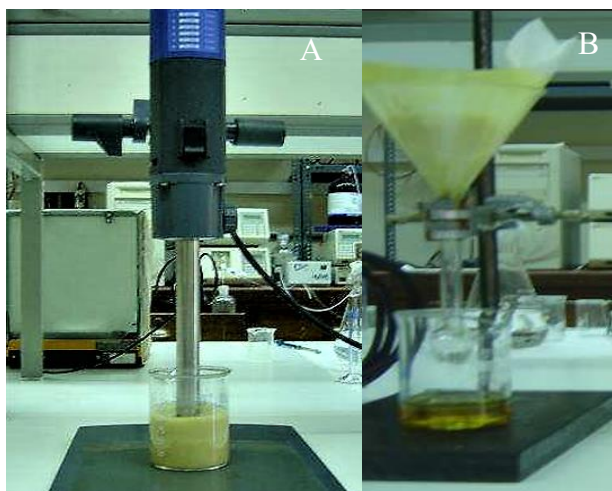
Εικόνα 3.4: Γυάλινο τρυβλίο Petri με καρπούς κελυφωτών φιστικιών πριν τη μεικτή μόλυνση.

#### 3.4.2.4.3. Μόλυνση φιστικιών με αιώρημα κονιδίων του μύκητα *Aspergillus flavus*

Μετά από 24 ώρες, έγινε μόλυνση με το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 που είχε ήδη αναπτυχθεί σε PDA. Με τη χρήση αιματοκυτταρομέτρου μετρήθηκαν τα κονίδια και δημιουργήθηκε αιώρημα κονιδίων τελικής συγκέντρωσης  $10^6$  κονιδίων/mL. Για την παρασκευή του αιωρήματος χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο διάλυμα δις απιονισμένου νερού με 0,01% Tween20<sup>®</sup>. Με τη βοήθεια μικροπιπέτας έγινε σημειακή μόλυνση σε κάθε καρπό φιστικιού με 10  $\mu$ L αιωρήματος κονιδίων. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν για επώαση 7 ημερών σε σκοτεινό θάλαμο με 28 °C. Πρέπει να σημειωθεί ότι ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν 3 τρυβλία, που είχε γίνει επέμβαση στους καρπούς μόνο σε νερό, δίχως κάποιο στέλεχος ζύμης, και μόλυνση με το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4.

#### 3.4.2.4.4. Μέτρηση των παραγόμενων αφλατοξινών

7 ημέρες μετά τη μόλυνση οι καρποί τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε καταψύκτη στους -20 °C, ώστε να διευκολυνθεί η κονιορτοποίησή τους. Την επόμενη ημέρα, τα σπέρματα από κάθε επέμβαση κονιορτοποιήθηκαν σε μπλέντερ και ζυγίστηκαν 20 g από κάθε επέμβαση τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για εξαγωγή ολικών αφλατοξινών. Σε αποστειρωμένο γυάλινο ποτήρι ζέσεως, τοποθετήθηκαν 20 g κονιορτοποιημένων σπερμάτων από κάθε επέμβαση μαζί με 100 mL διαλύματος μεθανόλης 70% (70 μεθανόλη:30 απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό). Στη συνέχεια, με τη χρήση μηχανήματος Ultra Turrax (T25 basic IKA- Werke), έγινε ομογενοποίηση για 3 λεπτά (Εικ. 3.5A). Ακολούθησε διήθηση των δειγμάτων με χρήση διηθητικού χαρτιού Whatman No. 1 και χρήση γυάλινης χοάνης και έγινε συλλογή του διηθήματος (Εικ. 3.5B). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν άμεσα στους -20 °C.



**Εικόνα 3.5 (A,B):** (A) Μηχάνημα Ultra Turrax το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην ομογενοποίηση των δειγμάτων (αριστερά) και (B) μέθοδος διήθησης με εκχυλιστικές χωάνες για λήψη διηθημάτων (δεξιά).

Η μέτρηση της επίδρασης των ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών στους καρπούς φιστικιών έγινε με χρήση AgraQuant<sup>®</sup> Total Aflatoxin Assay (4-40 ppb) Test kit της εταιρείας Romer Labs. Σε όλα τα δείγματα έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις σε σωληνάρια Eppendorf που περιείχαν διάλυμα μεθανόλης 70% και ακολούθησε καλή ανάδευση για 3 λεπτά. Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν γιατί η αρχική περιεκτικότητα των δειγμάτων σε αφλατοξίνες ήταν πολύ υψηλή (>40 ppb) καθιστώντας αδύνατη την ανάλυση με το συγκεκριμένο kit ανάλυσης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τις οδηγίες του Test kit που χρησιμοποιήθηκε. Τέλος, για ανάγνωση των αποτελεσμάτων, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο (ELx800 της εταιρείας BioTek) για ELISA plates και η μέτρηση έγινε με φίλτρο 450 nm σε συνδυασμό με διαφορικό φίλτρο 630 nm.

#### **3.4.2.5. Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων ζυμών**

Από τις αξιολογηθείσες απομονώσεις ζυμών προέκυψε πως υπήρχαν ορισμένες ιδιαίτερα αποτελεσματικές στην παρεμπόδιση παραγωγής αφλατοξινών. Για αυτές τις απομονώσεις πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση με μοριακές τεχνικές προκειμένου να βρεθεί το γένος και το είδος στο οποίο ανήκουν, με την παρακάτω διαδικασία.

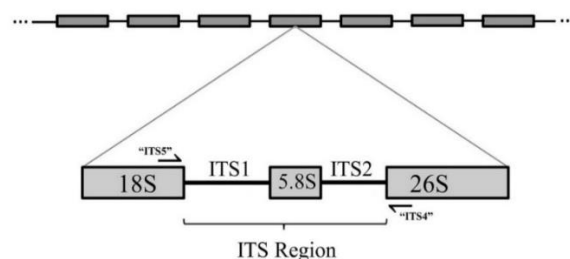
##### **3.4.2.5.1. Η σημασία της αλληλούχισης περιοχών του ριβοσωμικού DNA για την ταυτοποίηση ζυμών**

Το ριβοσωμικό DNA (rDNA) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως κατά τα τελευταία χρόνια, ως γενετικός τύπος σε αναλύσεις αλληλούχισης, για να αποσαφηνίσει φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ζυμών. Αυτό οφείλεται σε δυο βασικές του ιδιότητες: (α) τα ριβοσώματα βρίσκονται σε όλους τους κυτταρικούς οργανισμούς και φαίνεται να μοιράζονται μια κοινή προέλευση, παρέχοντας μια εξελικτική ιστορία κοινή για όλους τους οργανισμούς, (β) μερικές περιοχές του ριβοσωμικού DNA είναι πολύ συντηρημένες και μπορούν να αξιοποιηθούν ως σημεία αναφοράς για τη στοίχιση λιγότερο συντηρημένων περιοχών που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση εξελικτικών σχέσεων (Li 1997, Kurtzman and Blanz 1998). Στους

ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το ριβοσωμικό DNA οργανώνεται στη μεγάλη (25S έως 28S και 5.8S) και την μικρή (18S) υπομονάδα, που είναι διατεταγμένες σε σειρά στο χρωμόσωμα σε 100 έως 200 επαναλήψεις. Τα διαστήματα που παρεμβάλλονται μεταξύ της μικρής και της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, δηλαδή τα εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα (Internal Transcribed Spacers (ITS)) και τα μη μεταγραφόμενα διαστήματα (Non-Transcribed Spacers (NTS)) μεταξύ των ριβοσωμικών γονιδίων περιέχονται στις επαναλήψεις. Οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες των γονιδίων rDNA μαζί με τα εσωτερικά διαστήματα έχουν ερευνηθεί ως προς το βαθμό της φυλογενετικής πληροφορίας που παρέχουν και η χρήση τους είναι ευρεία στην εξέταση πιθανών σχέσεων μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών (White et al. 1990, James et al. 1994).

Πιο συγκεκριμένα, η D1/D2 περιοχή του 26S rDNA γονιδίου παρουσιάζει ικανή ποικιλομορφία, ώστε να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μεταξύ ασκομυκήτων (Kurtzman and Robnett 1998, Kurtzman et al. 2003) και βασιδιομυκήτων (Fell et al. 2000, Scorzetti et al. 2002). Η περιοχή αυτή έχει ουσιαστικά χρησιμοποιηθεί για όλα τα γνωστά είδη ζυμών. Κάποιες νουκλεοτιδικές διαφορές τοποθετούνται επίσης στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (18S), όμως συνήθως δεν επαρκούν για το διαχωρισμό στενά συγγενικών ειδών (James et al. 1994, Cai et al. 1996, James et al. 1997, Naumov et al. 2000, Daniel et al. 2003). Τα εσωτερικά μεταγραφόμενα (ITS1 και ITS2) και τα μη μεταγραφόμενα (NTS) διαστήματα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού μεταξύ των ειδών αλλά και μέσα στο ίδιο είδος. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός των εσωτερικά μεταγραφόμενων ITS περιοχών (μη κωδικές και με μεγάλη παραλλακτικότητα) και του 5.8S rDNA γονιδίου (κωδική ακολουθία και αρκετά συντηρημένη) (Εικ. 3.6) είναι χρήσιμος στην εκτίμηση κοντινών φυλογενετικών σχέσεων των μυκήτων αφού επιδεικνύουν μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ των ειδών, από ότι τα 18S και 26S rDNA γονίδια (White et al. 1990, Cai et al. 1996).

Η συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση ειδών, τα οποία δεν διαχωρίζονται βάσει των D1/D2 ακολουθιών τους. Η ITS 1-5.8S-ITS2 περιοχή έχει πλέον προσδιορισθεί για τα περισσότερα είδη ζυμών και χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίησή τους (James et al. 1996, Heras-Vazquez et al. 2003, Nisiotou et al. 2005, Nisiotou et al. 2007, Oda et al. 1997). Μερικά ακόμη γονίδια έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ζυμών, όπως ο παράγοντας επιμήκυνσης της μετάφρασης 1-α (EFl-α), η ακτίνη-1, η RNA πολυμεράση II, η αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, η β-τουμπουλίνη και η οξειδάση II του κυτοχρώματος c (Daniel et al. 2003, Kurtzman et al. 2003, Belloch et al. 2000, Daniel et al. 2001). Η πολυγονιδιακή ανάλυση αλληλούχησης μοιάζει να είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για το διαχωρισμό των ζυμών. Η εφαρμογή της μεθόδου παρέχει μια πιο ολοκληρωμένη περιγραφή ενός είδους, σε αντίθεση με την ανάλυση μεμονωμένων γονιδίων. Συμπερασματικά, η ανάλυση αλληλούχησης αποτελεί την πλέον αποτελεσματική μέθοδο για την ταυτοποίηση και εκτίμηση των φυλογενετικών σχέσεων των ζυμών.



**Εικόνα 3.6:** Ενίσχυση της 5.8S ITS περιοχής του ριβοσωμικού DNA με το ζεύγος εκκινητών ITS5 και ITS4. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131185.s001>).

### 3.4.2.5.2. Εξαγωγή DNA ζυμών και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction (PCR))

Η εξαγωγή του DNA των ζυμών προς μοριακή ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση του NucleoSpin® Microbial DNA Kit της MACHEREY-NAGEL, σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας. Για την προετοιμασία του δείγματος αναπτύχθηκε η κάθε αποτελεσματική ζύμη σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα YMA σε σκοτεινό θάλαμο στους 25 °C για 48 ώρες. Έπειτα, έγινε συλλογή περίπου 40 mg κυττάρων ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του DNA. Το εξαχθέν DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για την ενίσχυση της ενδοριβωσωμικής περιοχής. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 50 µL και περιείχε 20-50 ng γενομικού DNA της κάθε ζύμης, 1 mM από κάθε εκκινητή, 0,02 mM από κάθε dNTP, PCR Rxn buffer (Invitrogen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) και 1,5 units DNA polymerase (Invitrogen, Taq DNA Polymerase). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *ITS 5* (5'-3': GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) και *ITS 4* (5'-3': TCCTCCGCTTATTGATATGC) που ενισχύουν την *ITS I* περιοχή μεταξύ των 18S και 5.8S rDNAs, το 5.8S rDNA, την *ITS II* περιοχή, και ένα τμήμα του 28S rDNA. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε θερμοκυκλοποιητής Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler και ακολουθήθηκε το εξής πρόγραμμα. Αρχική αποδιάταξη για 50 sec στους 94 °C, ακολουθούμενη από 40 κύκλους αποδιάταξης του DNA (denaturation) στους 94 °C για 35 sec, προσαρμογής εκκινητών στο μονόκλωνο πλέον DNA (annealing) στους 55 °C για 40 sec, επιμήκυνσης εκκινητών (extension) στους 72 °C για 1 min και μία τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 7 min.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1% σε TAE. Πραγματοποιήθηκε και δεύτερη PCR με στόχο τη λήψη περισσότερου προϊόντος. Τα προϊόντα από τις δυο PCR συγκεντρώθηκαν μαζί στο ίδιο φιαλίδιο για κάθε στέλεχος. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των PCR προϊόντων. Ο καθαρισμός (purification) έγινε με στήλες για DNA, RNA and protein purification της MACHEREY-NAGEL (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Columns) και QIAquick PCR Purification Kit της QIAGEN και το καθαρισμένο προϊόν αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

### 3.4.2.5.3. Αλληλούχιση προϊόντων PCR και ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR στάλθηκαν για αλληλούχιση του ενισχυμένου τμήματος του γονιδιώματος στην εταιρεία CEMIA. Κατόπιν, με χρήση του προγράμματος FinchTV και του ιστοτόπου <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> διενεργήθηκε BLAST ανάλυση των αλληλουχιών με σκοπό την ταυτοποίηση των απομονώσεων των ζυμών.

### 3.4.2.6. Διερεύνηση της επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus*

Στη παρούσα παράγραφο, αναλύεται η πραγματοποίηση διερεύνησης της επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus*, με χρήση Real-time PCR.

#### 3.4.2.6.1. Μόλυνση υγρού θρεπτικού υλικού

Το στέλεχος *A. flavus* A.f.18.4 καλλιεργήθηκε σε PDA για 5 ημέρες, ενώ τα στελέχη των ζυμών καλλιεργήθηκαν σε YMA για δύο ημέρες για τη προετοιμασία του μολύσματος. Στη συνέχεια,

πραγματοποιήθηκε συλλογή των κονιδίων του αφλατοξικογόνου μύκητα και των κυττάρων των ζυμών και δημιουργήθηκαν αιωρήματα σε σωληνάρια Eppendorf, με δις αποιονισμένο και αποστειρωμένο νερό και 0,01% επιφανειοδραστικό παράγοντα Tween20®. Για τη μέτρηση των κονιδίων και των κυττάρων των ζυμών αντίστοιχα χρησιμοποιήθηκε αιματοκυτταρόμετρο. Η μόλυνση έγινε σε θρεπτικό υλικό CC. Σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες, τοποθετήθηκαν 180 mL θρεπτικού υλικού. Η κάθε κωνική φιάλη εμβολιάστηκε με κύτταρα ενός στελέχους ζύμης, έτσι ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων στο αιώρημα να είναι 10<sup>6</sup> cfu/mL. Ο εμβολιασμός με το τοξικογόνο στέλεχος του *A. flavus* έγινε έτσι ώστε στο τελικό αιώρημα η συγκέντρωση κονιδίων να είναι 10<sup>7</sup> κονίδια/mL υλικού για κάθε κωνική φιάλη με CC. Ακολούθησε καλή ανάδευση της κάθε κωνικής φιάλης και το περιεχόμενό της μοιράστηκε τοποθετώντας 20 mL ανά τρυβλίο. Για τη δημιουργία του μάρτυρα, σε μία κωνική φιάλη έγινε εμβολιασμός μόνο με το στέλεχος A.f.18.4 του *A. flavus*. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για την κάθε χρονική στιγμή συλλογής μυκηλίου που θα ακολουθούσε. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο όπου παρέμειναν σε συνθήκες σκότους και σε θερμοκρασία 28 °C.

### 3.4.2.6.2. Συλλογή μυκηλίου, λυοφιλίωση και εξαγωγή RNA

Ακολούθησε συλλογή του μυκηλίου του μύκητα *A. flavus* στις 48, 72 και 96 ώρες μετά τη μόλυνση. Για κάθε χρονική στιγμή, έγινε συλλογή μυκηλίου από 3 επαναλήψεις της κάθε επέμβασης της μόλυνσης, με τη βοήθεια μεταλλικής σπάτουλας. Το συλλεχθέν μυκήλιο τοποθετήθηκε ανάμεσα σε διηθητικά χαρτιά και πιέστηκε, με στόχο την απομάκρυνση περισσειας του υγρού θρεπτικού υποστρώματος. Το μυκήλιο τοποθετήθηκε μέσα σε φιαλίδιο Eppendorf και καλύφθηκε με parafilm. Έπειτα, το φιαλίδιο τοποθετήθηκε άμεσα σε υγρό άζωτο για άμεση ψύξη και αποφυγή καταστροφής του RNA. Στην συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λυοφιλιωτή (Freeze Dryer Lyophilizer FD-18-MR της εταιρείας LABFREEZ INSTRUMENTS) για 12 ώρες και ακολούθησε άμεση αποθήκευση στους -80 °C.

Στη συνέχεια έγινε εξαγωγή του RNA από το μύκητα *Aspergillus flavus*. Η εξαγωγή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Trizol της εταιρείας Molecular Research Center και σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο:

- Κονιορτοποίηση του λυοφιλιωμένου μυκηλίου, με τη βοήθεια δύο αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων.
- Τοποθέτηση περίπου 100 mg κονιορτοποιημένου μυκηλίου σε φιαλίδιο Eppendorf.
- Προσθήκη 1 mL Trizol, ανάδευση για 15 sec με στόχο την καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων και την απελευθέρωση RNA και DNA από τον πυρήνα, και vortex.
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 200 μL χλωροφορμίου για μετουσίωση των πρωτεϊνών και vortex για 30 sec.
- Επώαση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση σε 13000 RPM, στους 4 °C για 15 λεπτά.
- Μεταφορά της υπερκείμενης φάσης σε νέο αποστειρωμένο Eppendorf φιαλίδιο.
- Προσθήκη ίσης ποσότητας φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1).
- Ανάδευση.
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση σε 12000 RPM, στους 4 °C για 15 λεπτά.
- Μεταφορά της υπερκείμενης φάσης σε νέο αποστειρωμένο Eppendorf φιαλίδιο και προσθήκη 500 μL ισοπροπανόλης, για κατακρήμνιση του RNA.



- Ανάμειξη και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση σε 12000 RPM, στους 4 °C για 15 λεπτά.
- Απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης.
- Ξέπλυμα του pellet με προσθήκη 500  $\mu$ L 70% αιθανόλης.
- Φυγοκέντρηση σε 12000 RPM, στους 4 °C για 10 λεπτά.
- Απομάκρυνση της αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό. Ό,τι προέκυψε απομακρύνθηκε και το pellet αφέθηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επαναίωση του pellet σε διάλυμα που περιείχε 5  $\mu$ L (X10 buffer+ MgCl<sub>2</sub>) και 1  $\mu$ L DNase.
- Τοποθέτηση του δείγματος για 10 min σε υδατόλουτρο στους 37 °C.
- Προσθήκη 1  $\mu$ L 50 mM EDTA.
- Τοποθέτηση του δείγματος για 15 min σε υδατόλουτρο στους 75 °C.
- Αποθήκευση στους -80 °C.

### 3.4.2.6.3. Δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Πριν την δημιουργία του cDNA, προηγήθηκε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA (ng/ $\mu$ l) με τη χρήση Nanodrop. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) TAKARA για αντίστροφη μεταγραφή. Λαμβάνοντας υπόψιν, ότι έως και 500 ng του ολικού RNA μπορούν να υποστούν αντίστροφη μεταγραφή σε 10  $\mu$ l του μείγματος της αντίδρασης, ακολούθησαν κατάλληλες αραιώσεις του RNA του κάθε δείγματος.

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2  $\mu$ l 5 $\times$ PrimeScript™ Buffer (for Real Time), 0,5  $\mu$ L PrimeScript™ RT Enzyme Mix I και 0,5  $\mu$ L Oligo dT Primer (50  $\mu$ M) καθώς και 7  $\mu$ L από το κατάλληλα αραιωμένο RNA. Τελικά τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή για :

- 15 min στους 37 °C (αντίστροφη μεταγραφή)
- 5 sec στους 85 °C (αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης με θερμότητα)

### 3.4.2.6.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR)

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε Real-time PCR προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των ζυμών στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR* που σχετίζεται με την παραγωγή αφλατοξινών στο μύκητα *Aspergillus flavus*. Η Real-time PCR αντίδραση έγινε σε θερμοκυκλοποιητή StepOne™ Real-Time PCR System χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντιδραστήρια (KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, Kapa Biosystems). Για την εκτέλεση της αντίδρασης αυτής χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς η  $\beta$ -τουμπουλίνη που θεωρείται συστατικό γονίδιο (housekeeping gene-HKG), το οποίο εμπλέκεται σε βασικές διαδικασίες για την επιβίωση των κυττάρων και εκφράζεται σε σταθερό και μη ρυθμιζόμενο επίπεδο. Συγκεκριμένα, οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζονται από ετεροδιμερή  $\alpha$ , $\beta$ -τουμπουλίνης και αποτελούν μια από τις κύριες δομές του κυτταροσκελετού και διαδραματίζουν σημαντικό οργανωτικό και λειτουργικό ρόλο σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Rebouças et al. 2013). Για το γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *TUB-F* (5'-3': GTCCGGTGCTGGTAACAACACT) και *TUB-R* (5'-3': GGAGGTGGAGTTTCCAATGA) (Abdel-Hadi et al. 2010, Abdel-Hadi et al. 2011, Houshyarfard et al. 2014). Για την εξέταση της έκφρασης του *AflR* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *AflR-F* (5'-3': CCGGGATAGCTGTACGAGTTG) και *AflR-R* (5'-3': GAGCACAGGCCGGTTTCTC) (Lohmar et al. 2016, Zhang et al. 2013). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις.



Σε κάθε Real-time PCR Tube τοποθετήθηκαν 9 μl που περιείχαν 5 μl SYBR Green, 0,2 μl ROX low, 1,25 μl Primer F, 1,25 μl Primer R, 1,3 μl HPLC νερό και 1 μl cDNA από το εκάστοτε δείγμα. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 μl. Οι συνθήκες των αντιδράσεων Real-time PCR ήταν οι παρακάτω:

- Ενεργοποίηση της KAPA SYBR<sup>®</sup>DNA Polymerase στους 95 °C για 3 min για ένα κύκλο.
- Αποδιάταξη του cDNA για 3 sec στους 95 °C και στη συνέχεια υβριδισμός και επέκταση για 30 sec στους 60 °C για 40 κύκλους.
- Στον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης μετά από 15 sec στους 95 °C και 1 min στους 60 °C πραγματοποιήθηκε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας κατά 0,3 °C κάθε 15 sec μέχρι τους 95 °C προκειμένου να διαχωριστούν τα πιθανά διμερή που σχηματίζουν οι εκκινητές.

Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου τουμπουλίνη στα ίδια δείγματα, και εκφράστηκαν σε σχέση με τα κανονικοποιημένα επίπεδα μεταγραφής του ίδιου γονιδίου στο μάρτυρα. Για την επεξεργασία αυτή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος  $R = 2^{-\Delta Ct}$  (Livak et al. 2001).

### **3.4.2.7. Διερεύνηση της επίδρασης μυκητοκτόνων σκευασμάτων στην ανάπτυξη απομονώσεων ζυμών**

Δεδομένου ότι σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση δυνατότητας εφαρμογής ανταγωνιστικών ζυμών στο πλαίσιο ενός προγράμματος ολοκληρωμένης αντιμετώπισης του αφλατοξικογόνου μύκητα *Aspergillus flavus* στα κελυφωτά φιστίκια, και ότι σε ένα τέτοιο πρόγραμμα μπορεί να γίνεται και χρήση μυκητοκτόνων, κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η *in vitro* ικανότητα των αποτελεσματικών ζυμών να επιβιώνουν αλλά και να πολλαπλασιάζονται παρουσία μυκητοκτόνων, διαφόρων χημικών ομάδων που βρέθηκαν αποτελεσματικές στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

Διερευνήθηκε και καταγράφηκε η ικανότητα πολλαπλασιασμού 6 εκ των 7 αποτελεσματικών απομονώσεων, καθώς μετά την μοριακή τους ταυτοποίηση θεωρήθηκε ότι 2 εξ αυτών που προέρχονταν από τον ίδιο αγρό, αποτελούν απομονώσεις του ίδιου στελέχους.

Για το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκαν μυκητοκτόνα, των οποίων οι δραστικές ουσίες ανήκουν στις ομάδες των ιμιδαζολών, των φαινυλοπυρρολικών, των ανιλοπυριμιδών, των τριαζολών και των QoI παρεμποδιστών. Τα ιμιδαζολικά, τα φαινυλοπυρρολικά και οι ανιλοπυριμιδίνες ήταν οι χημικές ομάδες με τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη μείωση της ανάπτυξης του *A. flavus* και τη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών στην παρούσα διατριβή (Κεφάλαιο 5). Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα μυκητοκτόνα σκευάσματα Octave<sup>®</sup>, Geoxe<sup>®</sup>, Chorus<sup>®</sup>, Scala<sup>®</sup>, Fungazil<sup>®</sup>, Opera New<sup>®</sup> που προέκυψαν ως αποτελεσματικά. Χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υλικό YM και η καταμέτρηση των κυττάρων κάθε ζύμης έγινε με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου. Για τις επεμβάσεις με κάθε χημικό σκεύασμα χρησιμοποιήθηκαν το 50%, το 100%, το 150% και το 200% της αντίστοιχης συνιστώμενης δόσης.

Σε κάθε συγκέντρωση αντιστοιχούσε μία κωνική φιάλη με 30 mL υγρού θρεπτικού υλικού YM, η οποία εμβολιάστηκε με αιώρημα κυττάρων ζύμης, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση κυττάρων σε κάθε κωνική να είναι  $10^5$  κύτταρα ζύμης/mL. Για τη δημιουργία μαρτύρων, έγινε επέμβαση μόνο με κύτταρα του αντίστοιχου στελέχους ζύμης, χωρίς προσθήκη μυκητοκτόνου. Για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Οι επεμβάσεις και οι μάρτυρες επώασθησαν για 24 ώρες σε περιστροφικό αναδευτήρα orbital στις 150 RPM με συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 25 °C. Ακολούθησε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου.

Ειδικότερα, έγιναν εφαρμογές με:

- Octave® 46 WP της BASF με 46,1% β/β prochloraz: 0,3 g/L, 0,6 g/L, 0,9 g/L και 0,12 g/L που αντιστοιχούν σε 134,15 ppm, 268,3 ppm, 402,45 ppm και 536,6 ppm συγκέντρωση της δραστικής ουσίας prochloraz.
- Geoxe® 50 WG της Syngenta με 50% β/β fludioxonil: 0,5 g/L, 1 g/L, 1,5 g/L και 2 g/L που αντιστοιχούν σε 237,5 ppm, 475 ppm, 712,5 ppm και 950 ppm συγκέντρωση της δραστικής ουσίας fludioxonil.
- Chorus® 50 WG της Syngenta με 50% β/β cyprodinil: 0,25 g/L, 0,5 g/L, 0,75 g/L και 1 g/L που αντιστοιχούν σε 123,75 ppm, 247,5 ppm, 371,25 ppm και 495 ppm συγκέντρωση της δραστικής ουσίας cyprodinil.
- Scala® 40 SC της BASF με 40% β/ο pyrimethanil: 0,75 mL/L, 1,5 mL/L, 2,25 mL/L και 3 mL/L που αντιστοιχούν σε 292,5 ppm, 585 ppm, 877,5 ppm και 1170 ppm συγκέντρωση της δραστικής ουσίας pyrimethanil.
- Fungazil® 500 EC της JANSSEN PMP με 50% β/ο imazalil: 0,1 mL/L, 0,2 mL/L, 0,3 mL/L και 0,4 mL/L που αντιστοιχούν σε 475 ppm, 950 ppm, 1425 ppm και 1900 ppm συγκέντρωση της δραστικής ουσίας imazalil.
- Opera new® 8,5/6,25 SE της BASF με 8,5% β/β pyraclostrobin & 6.25% β/β epoxiconazole: 2,5 mL/L, 5 mL/L, 7,5 mL/L και 10 mL/L που αντιστοιχούν σε 2071,875 ppm, 4143,75 ppm, 6215,625 ppm και 8287,5 ppm συγκέντρωση της δραστικής ουσίας pyraclostrobin και 143,75 ppm, 287,5 ppm, 431,25 ppm και 575 ppm συγκέντρωση της δραστικής ουσίας epoxiconazole.

### **3.4.2.8. Πειράματα αγρού για την διερεύνηση της ικανότητας παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών από απομονώσεις ζυμών**

Με βάση τα αποτελέσματα της παρεμπόδισης της παραγωγής αφλατοξινών σε εργαστηριακό επίπεδο, δύο από τα πιο αποτελεσματικά στελέχη ζυμών στην μείωση παραγόμενων αφλατοξινών επελέγησαν για περαιτέρω αξιολόγηση σε πειράματα αγρού. Η μελέτη διεξήχθη σε σύνολο τριών φιστικεώνων στην Αίγινα, σε σειρά δύο ετών. Ένας από αυτούς χρησιμοποιήθηκε και τα δύο χρόνια (φιστικεώνας Α). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν δύο ακόμη φιστικεώνας (φιστικεώνας Β και Γ) ένας για κάθε έτος. Πρακτικά, επιλέχθηκαν 2 φιστικεώνας για εφαρμογή στο νησί της Αίγινας για το 2017 και 2 φιστικεώνας για το 2018. Πρόκειται για τους φιστικεώνας όπου πραγματοποιήθηκαν και τα υπόλοιπα πειράματα αγρού της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Στο φιστικεώνα Α, που χρησιμοποιήθηκε και στα δύο χρόνια, η εφαρμογή των δύο ζυμών ως βιολογικών παραγόντων μείωσης παραγωγής αφλατοξινών ακολουθήθηκε από εφαρμογή, 24 ώρες αργότερα, ενός εξαιρετικά τοξικογόνου στελέχους *A. flavus* απομονωμένο από φιστικεώνα από το νησί, το στέλεχος A.f.18.4, που χρησιμοποιείται επίσης σε άλλα πειράματα της παρούσας μελέτης. Ως αποτέλεσμα, για αυτό το φιστικεώνα, η μόλυνση με τον *A. flavus* και την παραγωγή αφλατοξινών προκλήθηκε μηχανικά. Στην περίπτωση των άλλων δύο φιστικεώνων (ένα για κάθε έτος), παρατηρήθηκε ένα ιστορικό μόλυνσης από αφλατοξίνες, με βάση τα αρχεία των παραγωγών ως προς την μόλυνση από αφλατοξίνες και για αυτό το λόγο επιλέχθηκαν με βάση την υπόθεση πως το φυσικό μόλυσμα θα έχει διατηρηθεί στον φιστικεώνα και θα προκαλέσει νέες φυσικές μολύνσεις. Κατά συνέπεια, δεν εφαρμόστηκε τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα και η μόλυνση εμφανίστηκε φυσικά, με βάση την προαναφερθείσα υπόθεση, οδηγώντας πράγματι σε μελλοντική μόλυνση και περαιτέρω συσσώρευση

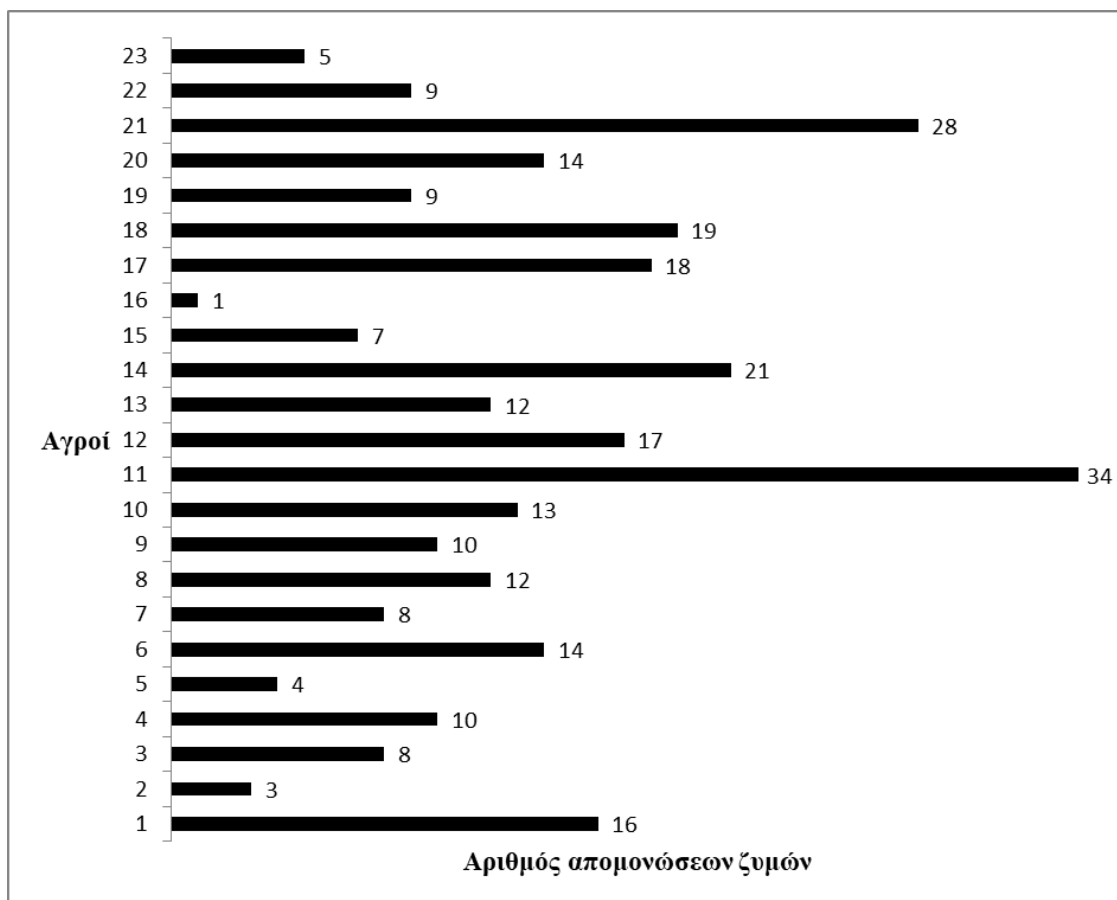
αφλατοξινών.

Οι δύο ζύμες που επιλέχθηκαν για αξιολόγηση βάσει αποτελεσματικότητας στα *in vitro* και *in situ* πειράματα του παρόντος κεφαλαίου είναι οι απομονώσεις X18 και 19AA3, πρόκειται όπως αναφέρεται και στα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου για μια ζύμη *Aureobasidium pullulans* και μια ζύμη *Meyerozyma carribica*. Εφαρμόστηκε υδατικό αιώρημα κυττάρων ζύμης σε συγκέντρωση  $10^6$  cfu/mL, τροποποιημένο με 0,01% Tween20<sup>®</sup>. 5 δένδρα φιστικιάς επιλέχθηκαν σε τυχαίες θέσεις σε κάθε φιστικεώνα για την εφαρμογή του κάθε στελέχους ζύμης. Η εφαρμογή έγινε στο στάδιο της πρώιμης ωριμότητας των φιστικιών, περί στα μέσα Ιουνίου. Ο μάρτυρας στο φιστικεώνα Α (επίσης 5 δένδρα) ψεκάστηκε με υδατικό εναιώρημα κονιδίων του τοξικογόνου στελέχους του μύκητα που είχε επιλεγθεί, 24 ώρες μετά την εφαρμογή των βιολογικών παραγόντων. Η συγκέντρωση των κονιδιακών εναιωρημάτων ρυθμίστηκε σε  $10^4$  κονίδια ανά mL και το εναιώρημα τροποποιήθηκε με 0,01% Tween20<sup>®</sup>. Ο μάρτυρας στους φιστικεώνες Β και Γ δεν είχε καμία τεχνητή μόλυνση-εφαρμογή. Η συγκομιδή των φιστικιών που χρησιμοποιήθηκαν στο τρέχον πείραμα διεξήχθη σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στα τέλη Αυγούστου, όταν τα φιστίκια φθάνουν την πλήρη ωρίμανσή τους για την περιοχή αυτή. Τα φιστίκια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου της Αθήνας χρησιμοποιώντας φορητό ψυγείο. Η εκχύλιση και ανάλυση των αφλατοξινών διεξήχθη όπως έχει περιγραφεί ξανά προηγουμένως με την χρήση ELISA Kit και η ανάλυση διεξήχθη εις διπλούν.

### 3.5. Αποτελέσματα

#### 3.5.1. Συλλογή ενδημικών επιφυτικών ζυμών

Η συλλογή των επιφυτικών ζυμών πραγματοποιήθηκε από φιστικεώνες στο νησί της Αίγινας το καλοκαίρι του 2014 στο στάδιο της συγκομιδής των φιστικιών, περί τα τέλη Αυγούστου. Η συλλογή αποτελείται από 292 απομονώσεις ζυμών. Στο Διάγραμμα 3.1, παρουσιάζονται οι αγροί προέλευσης, καθώς και πόσες απομονώσεις ζυμών προέκυψαν από τον κάθε αγρό.



Διάγραμμα 3.1: Αριθμός απομονώσεων ζυμών ανά φιστικεώνα (αγρό).

#### 3.5.2. Αξιολόγηση της επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην κονιδιογένεση του *Aspergillus flavus*

Παρατηρήθηκε ότι το 29,5 % των απομονώσεων των ζυμών που ελέγχθηκαν έχει την ικανότητα να αυξάνει την κονιδιογένεση του ισχυρά τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4. Ενώ, μόνο το 10,6% των απομονώσεων των ζυμών μπορεί να μειώσει σχετικά αποτελεσματικά (>60%) την κονιδιογένεση του A.f.18.4. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι καμία απομόνωση ζύμης δεν κατάφερε να παρεμποδίσει πλήρως την κονιδιογένεση του στελέχους A.f.18.4. Πιο συγκεκριμένα, η πιο αποτελεσματική ζύμη (K7) μείωσε την κονιδιογένεση κατά 81,7%. Καμία αποτελεσματική ζύμη (>60% παρεμπόδιση κονιδιογένεσης) δεν προήλθε από 12 αγρούς εκ των 23.

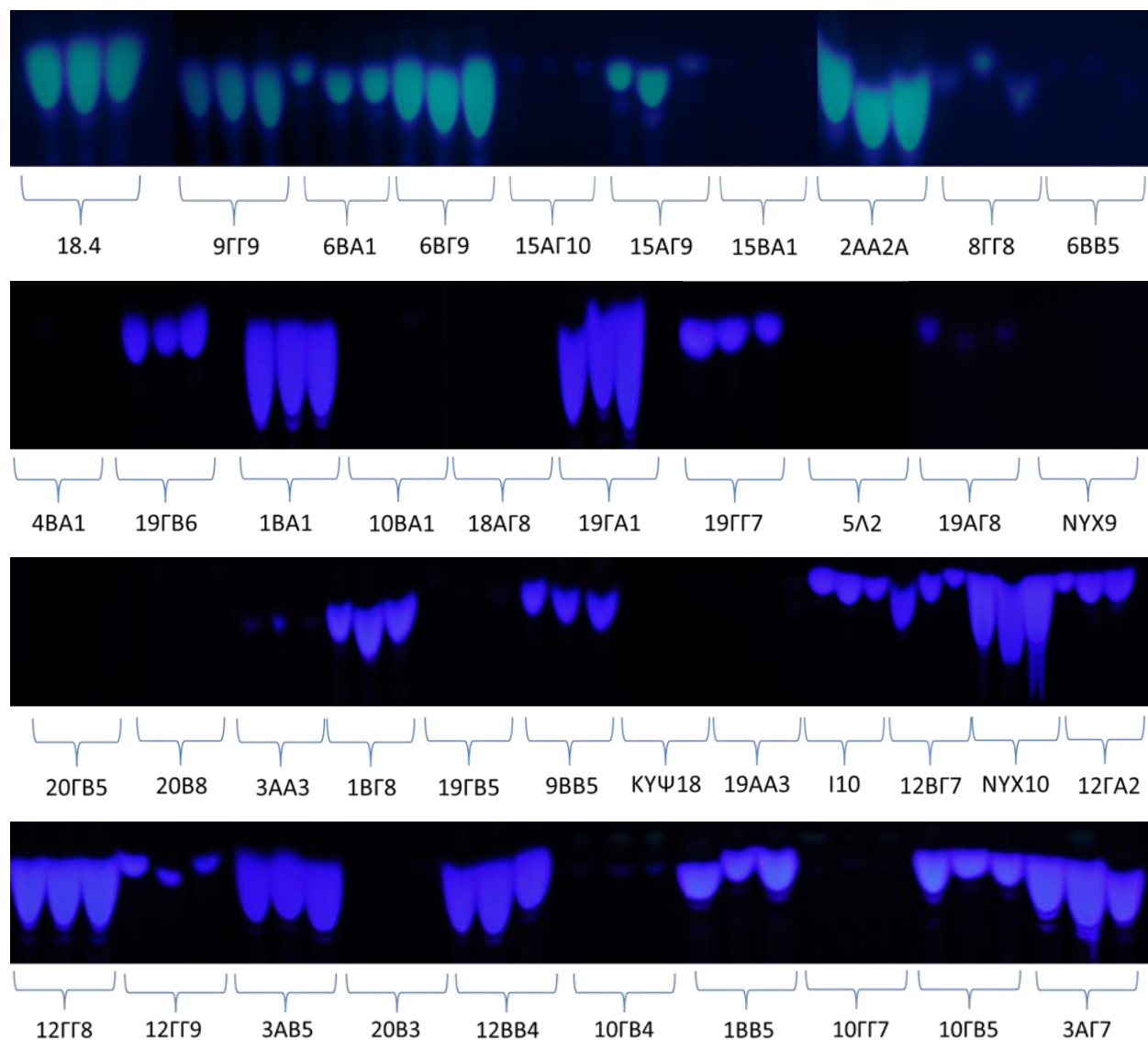
**Πίνακας 3.1:** Ποσοστά παρεμπόδισης κονιδιογένεσης και αγρός προέλευσης για τις αποτελεσματικές ζύμες με παρεμπόδιση υψηλότερη του 60% συγκριτικά με το μάρτυρα.

Α/Α	Αγρός προέλευσης	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %
1	1	1ΓΓ8	73,85
2	6	6Λ9	60,25
3	7	7ΑΑ2	81,44
4	7	7ΓΑ11	61,6
5	10	10ΑΒ4	64,32
6	10	10ΒΑ6	64,04
7	11	11ΑΑ3	73,29
8	11	Χ18	64,78
9	12	12ΒΒ4	67,41
10	12	12ΒΓ7	61,33
11	14	15ΑΓ7	65,38
12	14	15ΓΑ1	69,46
13	14	15ΓΑ2	63,22
14	14	15ΓΒ3	65,7
15	20	Κ7	81,72
16	20	Κ13	74,46
17	20	Κ15	61,29
18	20	Κ23	74,46
19	20	Κ26	68,54
20	21	Π7	78,82
21	21	Π21	72,52
22	21	Π23	64,41
23	21	Π29	77,92
24	21	Π30	80,18
25	22	Ι8	67,41
26	22	Ι9	60,08
27	23	ΝΥΧ3	64,19
28	23	ΝΥΧ9	78,24
29	23	ΝΥΧ10	71,91

Επίσης, όπως φαίνεται από τους πίνακες Π3.1-Π3.20 του παραρτήματος του κεφαλαίου, οι επιδράσεις στην κονιδιογένεση του A.f.18.4 ορισμένων ζυμών προερχόμενων από τους ίδιους αγρούς, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι 29 αποτελεσματικότερες απομονώσεις ζυμών που παρουσίασαν υψηλά ποσοστά παρεμπόδισης της κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4. Οι απομονώσεις αυτές παρουσίασαν τιμές παρεμπόδισης που έφθασε το 81,7%, αλλά η πλειοψηφία των τιμών παρεμπόδισης αυτών κυμάνθηκε μεταξύ 60% και 75%. Οι αγροί 14, 20, και 21 έδωσαν τις 14 από τις 29 αυτές ζύμες, δηλαδή 48% των αποτελεσματικών απομονώσεων προέρχονται από αυτούς τους 3 αγρούς.

### 3.5.3. Αξιολόγηση της *in vitro* επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus*

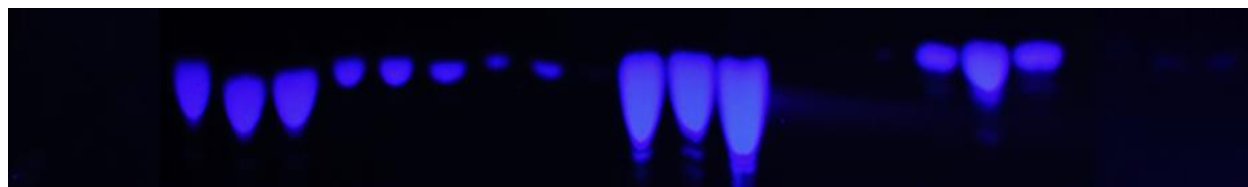
Προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των απομονώσεων της συλλογής των ζυμών να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών του ισχυρά τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα. Πιο συγκεκριμένα, η αξιολόγηση έγινε έπειτα από μεικτές μολύνσεις των απομονώσεων των ζυμών και του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4, τα οποία αναπτύσσονταν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα CCA, για 15 ημέρες. Ακολούθησε ανάλυση με TLC, στην οποία ελέγχθηκε η παρουσία αφλατοξινών και κυρίως της αφλατοξίνης B1. Η οπτικοποίηση των πλακών TLC έγινε υπό UV φως, όπου η παρουσία αφλατοξίνης διακρίνεται με έντονο μπλε φθορίζον χρώμα. Για κάθε δείγμα έγιναν 3 επαναλήψεις και στο σύνολο των 292 απομονώσεων ζυμών της συλλογής, οι 40 (περίπου το 13,7 %) έδειξαν να παρεμποδίζουν πλήρως ή σε υψηλό βαθμό τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα (Εικ. 3.7).







K17    П29    X21    X20    П22    K23    X18    K22    X32    П23



П18    X13    П10    X14    K15    П3    П36    K6



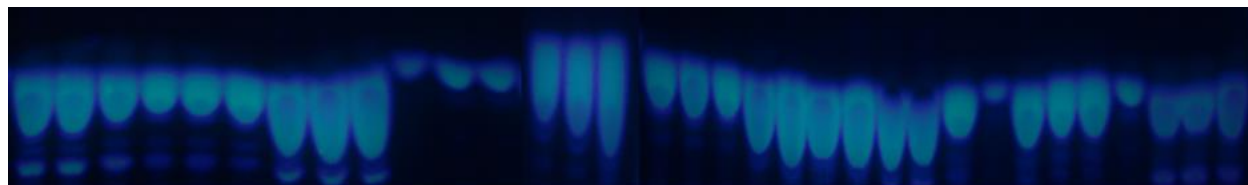
П7    П30    X8    X9    K16    П6    K9    X2    П36    П5    K21



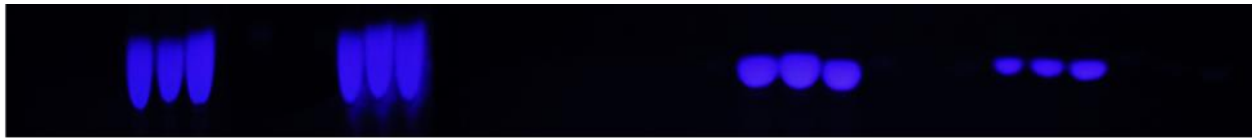
П24    П26    П28    10AГ8    7BA1    X5    K8    X6    K13    П41



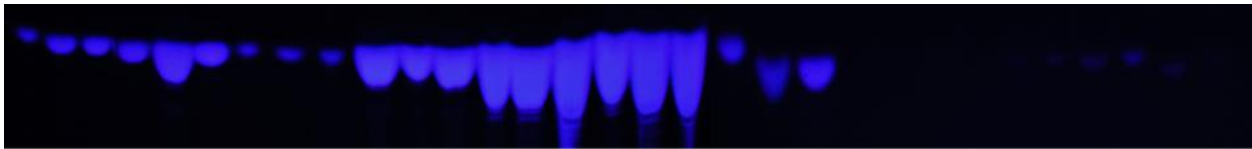
12ГA1    K26    KYΨ2    KYΨ13    18BГ9    11ГB4    12ГГ7    8BB6    11ГB5    18AB4



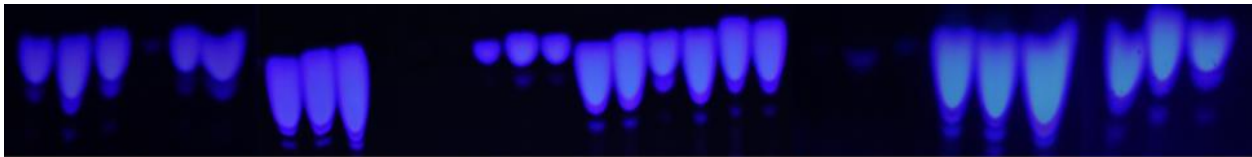
5BB11    12ГB5    12BB6    9BA2    12BA3    3AB4    9BA3    19AA2    12BГ9    15BГ8    12BГ8



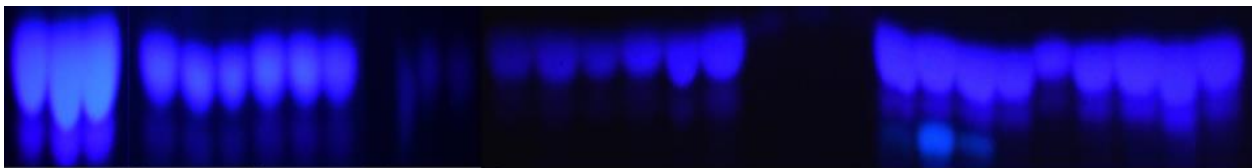
11AA3 16BГ6 16BB5 1ГB5 11ГГ8 12BB5 10BA3 11ГA2 18AГ9 18AB5



10AB4 11ГB6 11AA2 16BГ8 8BA1 8BA2 6ГA1 18AA3 6ГB6 18BB6



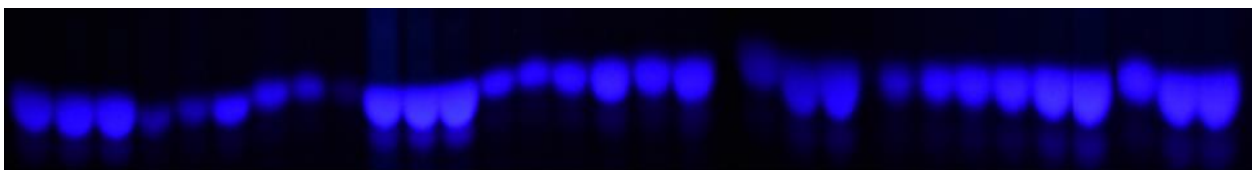
18BA2 18BA3 15ГГ7 9BГ7 4BB5 4BГ9 7AB5 18AB6 18AГ7 18BA1



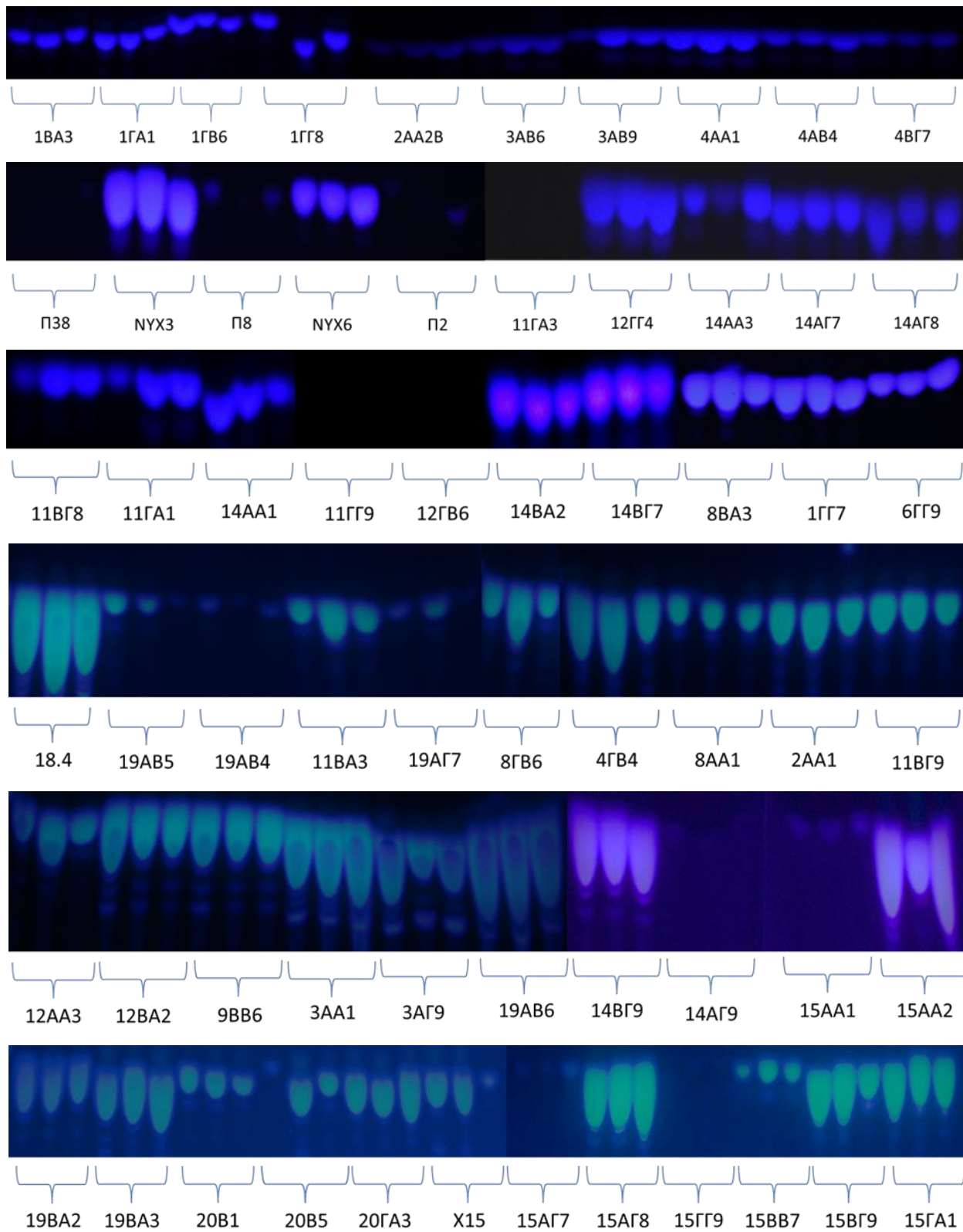
6BГ8 6A9 7AA3 7AГ8 8BГ8 8ГA3B 11AГ8 9BB4 9BГ8 9BГ9

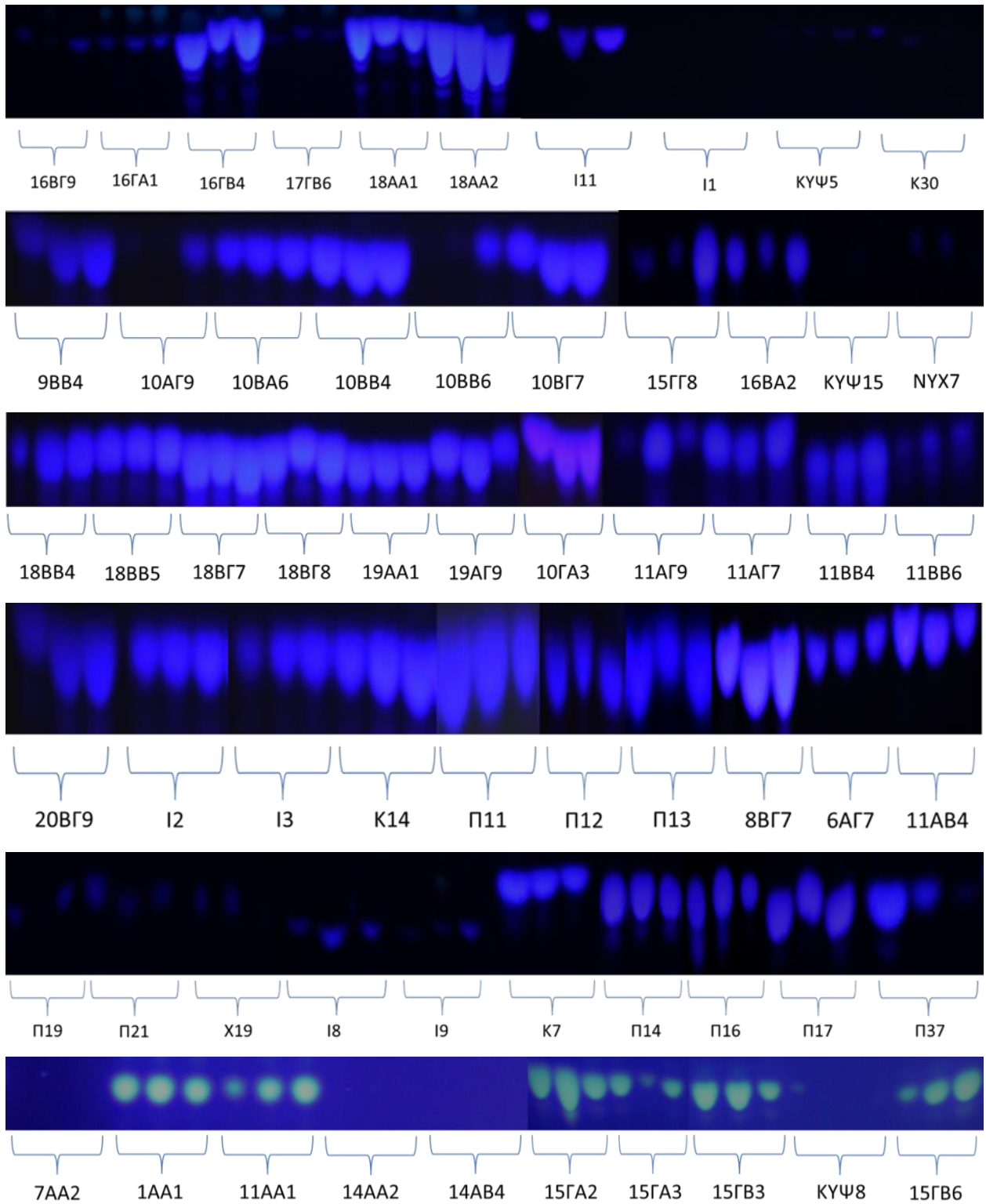


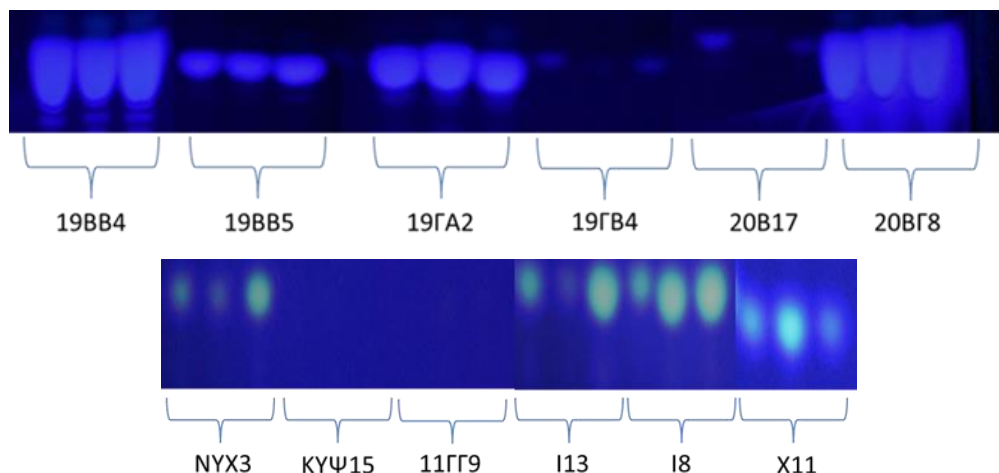
15AB6 14BГ8B 15AA3 6BГ7 4AГ8 7ГA11 4AA2 14BB4 15AB4 4ГГ7



5A12 5A13 6AB4 6AГ8 6AГ9 6BB4 7BB5 7ГГ9 8BB4 8BB5

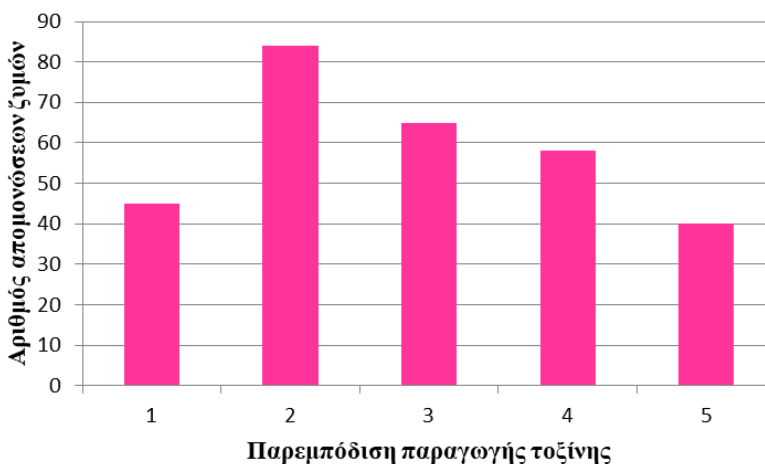






**Εικόνα 3.7:** Χρωματογραφία TLC για την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των 292 απομονώσεων ζυμών ως προς την παρεμπόδιση αφλατοξίνης B1 του αφλατοξικογόνου στελέχους A.f.18.4, σε θρεπτικό υπόστρωμα CCA. Ως 18.4 παρουσιάζεται ο μάρτυρας και στη συνέχεια οι συγκαλλιέργειες του μύκητα και της κάθε ζύμης.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αποτελεί ποιοτική και ημιποσοτική μέθοδο ανάλυσης, διότι μέσω αυτής δε μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια η ποσότητα των παραγόμενων αφλατοξινών. Παρακάτω ακολουθεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το παραπάνω πείραμα, η οποία έγινε δημιουργώντας μία αριθμητική κλίμακα (1-5), όπου συγκρίνεται η ένταση της ζώνης TLC μεταξύ όλων των δειγμάτων (Διάγρ. 3.2). Η αριθμητική κλίμακα ορίστηκε από το 1 έως το 5, με το 1 να δηλώνει αύξηση της παραγωγής τοξίνης από 0-33%, το 2 να δηλώνει παρεμπόδιση της παραγωγής τοξίνης από 0-33%, το 3 παρεμπόδιση από 33-66%, το 4 παρεμπόδιση από 66-99% και το 5 να δηλώνει πλήρη παρεμπόδιση (100%) συγκριτικά με το μάρτυρα A.f.18.4. Οι απομονώσεις που φαίνεται να παρεμποδίζουν πλήρως την παραγωγή αφλατοξινών είναι οι KYΨ8, KYΨ15, KYΨ18, 3AA1, 4BA1, 5Λ2, 7AA2, 9BG7, 10BA1, 10ΓΓ7, 11AA3, 11AG8, 11GA2, 11GA3, 11GB4, 11ΓΓ8, 11ΓΓ9, X8, X18, 12BB5, 12GB6, 12ΓΓ7, 14AA2, 14AB4, 14AG9, 15ΓΓ9, 18AA3, 18AB5, 18AG8, 18BG9, 19AA3, 19AB6, 20B3, 20B8, 20GB5, K17, Π18, Π38, I1, NYX9.



**Διάγραμμα 3.2:** Αριθμός απομονώσεων ζυμών που παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξίνης με βάση αριθμητική κλίμακα 1-5 (1: 0%, 2: 0-33%, 3: 33-66%, 4: 66-99%, 5: 100%) για το στέλεχος A.f.18.4 του μύκητα *A. flavus*.



### 3.5.4. Αξιολόγηση της *in situ* επίδρασης των απομονώσεων των ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus*

Στο συγκεκριμένο πείραμα, οι 40 αποτελεσματικές απομονώσεις ζυμών που βρέθηκαν να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών από το στέλεχος A.f.18.4, χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικοί παράγοντες για να διερευνηθεί η ικανότητά τους να μειώνουν εξίσου της παραγωγή αφλατοξινών σε καρπούς κελυφωτού φιστικιού. Τα αποτελέσματα προέκυψαν μετά από δοκιμή και μέτρηση με τη μέθοδο ELISA. Το πείραμα εκτελέστηκε σε δύο φάσεις, αρχικά με 31 ζύμες και στην συνέχεια 9 ζύμες να ελέγχονται σε κάθε πείραμα αντίστοιχα. Για κάθε δείγμα έγιναν 3 επαναλήψεις. Για τη δημιουργία θετικού μάρτυρα έγινε επέμβαση μόνο με το στέλεχος A.f.18.4 σε κάθε πείραμα (Εικ. 3.8).



A.f.18.4 (Μάρτυρας)



X18



19AA3

**Εικόνα 3.8:** Ενδεικτικές φωτογραφίες των μεικτών μολύνσεων με τις απομονώσεις ζυμών (X18 και 19AA3) και το στέλεχος A.f.18.4 (μάρτυρας) σε τρυβλία με καρπούς κελυφωτού φιστικιού μετά από 7 ημέρες επώασης στους 28 °C. Ο μάρτυρας παρουσιάζεται ως 18.4 και είναι φιστίκια μολυσμένα μόνο με το στέλεχος A.f.18.4.



Στη συνέχεια, και με κριτήριο την ανάπτυξη του μυκηλίου και την κονιδιογένεση επάνω στους καρπούς των φιστικιών δημιουργήθηκε μία αριθμητική κλίμακα (1-5), όπου συγκρίνεται η σοβαρότητα της ασθένειας μεταξύ όλων των δειγμάτων (Πίν. 3.2). Η αριθμητική κλίμακα ορίστηκε από το 1 έως το 5, με το 1 να δηλώνει σοβαρότητα της ασθένειας 0-20%, το 2 20-40%, το 3 40-60%, το 4 60-80% και το 5 80-100% αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.2:** Ο δείκτης σοβαρότητας της ασθένειας που αντιστοιχεί σε κάθε εφαρμογή με βάση την αριθμητική κλίμακα 1-5 (1: 0-20%, 2: 20-40%, 3: 40-60%, 4: 60-80%, 5: 80-100%).

Εφαρμογές	Δείκτης σοβαρότητας ασθένειας
<b>A.f.18.4</b>	5
A.f.18.4 + ΚΥΨ15	5
A.f.18.4 + ΚΥΨ18	4
A.f.18.4 + 3ΑΑ1	3
A.f.18.4 + 4ΒΑ1	4
A.f.18.4 + 5Λ2	4
A.f.18.4 + 7ΑΑ2	3
A.f.18.4 + 9ΒΓ7	3
A.f.18.4 + 10ΒΑ1	3
A.f.18.4 + 10ΓΓ7	4
A.f.18.4 + 11ΑΑ3	4
A.f.18.4 + 11ΓΑ2	2
A.f.18.4 + 11ΓΑ3	3
A.f.18.4 + 11ΓΒ4	4
A.f.18.4 + 11ΓΓ8	2
A.f.18.4 + 11ΓΓ9	3
A.f.18.4 + Χ8	1
A.f.18.4 + Χ18	2
A.f.18.4 + 12ΒΒ5	4
A.f.18.4 + 12ΓΒ6	3
A.f.18.4 + 12ΓΓ7	5
A.f.18.4 + 14ΑΓ9	4
A.f.18.4 + 15ΓΓ9	3
A.f.18.4 + 18ΑΑ3	4
A.f.18.4 + 18ΑΒ5	4
A.f.18.4 + 18ΒΓ9	4
A.f.18.4 + 19ΑΑ3	2
A.f.18.4 + 20Β3	4
A.f.18.4 + 20Β8	3
A.f.18.4 + 20ΓΒ5	2
A.f.18.4 + Π18	4
A.f.18.4 + ΝΥΧ9	4
A.f.18.4 + ΚΥΨ8	3
A.f.18.4 + 11ΑΓ8	5
A.f.18.4 + 14ΑΑ2	5
A.f.18.4 + 14ΑΒ4	5
A.f.18.4 + 18ΑΓ8	3

A.f.18.4 + 19AB6	2
A.f.18.4 + Π38	3
A.f.18.4 + K17	4
A.f.18.4 + Π1	3

Στην πρώτη φάση του πειράματος που αφορούσε στην αξιολόγηση των 31 απομονώσεων ζυμών, όλες οι διερευνηθείσες απομονώσεις ζυμών κατάφεραν να μειώσουν στατιστικά σημαντικά τις παραγόμενες αφλατοξίνες (Πίν. 3.3Α). Στην δεύτερη φάση του πειράματος μόνο 2 απομονώσεις ζυμών κατάφεραν να μειώσουν στατιστικά σημαντικά τις παραγόμενες αφλατοξίνες (Πίν. 3.3Β). Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί πως στο δεύτερο σκέλος του τρέχοντος πειράματος, ο μάρτυρας δεν παρήγαγε αντίστοιχα υψηλή ποσότητα αφλατοξινών, όπως στο πρώτο.

Ως πιο αποτελεσματικές κρίθηκαν 7 απομονώσεις ζυμών δηλαδή περίπου μία στις έξι εκ των αξιολογηθέντων, οι οποίες πέτυχαν σχεδόν πλήρη παρεμπόδιση, μεγαλύτερη από 97%, χωρίς να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Οι ζύμες αυτές ήταν οι X8, X18, 12ΓΒ6, 15ΓΓ9, 19ΑΑ3, Π38 και Π1 (Πίν. 3.3Α και 3.3Β). Επίσης, πολλές απομονώσεις κατάφεραν να παρεμποδίσουν της παραγωγή αφλατοξινών πάνω από 90%. Υπήρξαν ζύμες όπως οι 12ΓΒ6 και 19ΑΑ3 που παρεμπόδισαν πλήρως (100%) της παραγωγή αφλατοξινών. Αντίθετα, οι απομονώσεις των ζυμών ΚΥΨ8, 14ΑΑ2 και 18ΒΓ9, όχι απλά δεν παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών από το στέλεχος A.f.18.4 σε συγκαλλιέργεια σε καρπούς φιστικιών, αλλά την αυξάνουν παρουσιάζοντας αρνητική παρεμπόδιση (Πίν. 3.3Α και 3.3Β). Αποτέλεσμα αντίθετο από τα δεδομένα στο τεχνητό υπόστρωμα CCA, όπου είχαν εμφανίσει πλήρη παρεμπόδιση της παραγόμενων αφλατοξινών.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων διερεύνησης παρεμπόδισης κονιδιογένεσης και μείωσης παραγωγής παραγόμενων αφλατοξινών, παρατηρείται ότι εκ των 40 απομονώσεων ζυμών που βρέθηκαν αποτελεσματικές στην παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών από το στέλεχος A.f.18.4 σε *in vitro* πειράματα, μόνο οι 6 (7ΑΑ2, 11ΑΑ3, X18, 19ΑΒ6, 20Β8, ΝΥΧ9) έδειξαν παρεμποδιστική ικανότητα εναντίον της κονιδιογένεσης του A.f.18.4. Αντίθετα, το 85% αυτών των απομονώσεων των ζυμών (34 απομονώσεις) έδειξαν να αυξάνουν την κονιδιογένεση του στελέχους A.f.18.4.

Από τις 7 απομονώσεις ζυμών που εμφανίστηκαν ως οι πιο αποτελεσματικές στην παρεμπόδιση παραγωγής αφλατοξινών από το στέλεχος A.f.18.4 και στα *in situ* πειράματα στους καρπούς κελυφωτού φιστικιού, μόνο μία ζύμη και συγκεκριμένα η X18 φάνηκε να παρεμποδίζει την κονιδιογένεση του A.f.18.4 και μάλιστα σε ένα σχετικά ικανοποιητικό ποσοστό της τάξεως του 64,8%. Όμως, όλες οι υπόλοιπες απομονώσεις ζυμών αύξησαν σε πολύ μεγάλα ποσοστά την κονιδιογένεση, από 261,2% (X8) έως και 1.602,7% (Π38).

**Πίνακας 3.3Α:** Αξιολόγηση 31 ζυμών κατά των παραγόμενων αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος σε κελυφωτά φιστίκια. Παρουσιάζονται τα παραχθέντα  $\mu\text{g kg}^{-1}$  αφλατοξινών, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου και η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες καθώς και η στατιστική ανάλυση μεταξύ των εφαρμογών. Ως μάρτυρας παρουσιάζεται η εφαρμογή μόνο του μύκητα A.f.18.4. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Εφαρμογή	Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση %
A.f.18.4	31.734,92	b	9.524,62	6.734,92	-
A.f.18.4 + 12ΓΒ6	13,68	j	0,45	0,32	100
A.f.18.4 + 19ΑΑ3	59,9	j	9,27	6,56	100
A.f.18.4 + Χ8	406,82	j	52,39	37,05	99
A.f.18.4 + 15ΓΓ9	483,72	j	400,85	283,44	98
A.f.18.4 + Χ18	916,5	j	591,85	418,5	97
A.f.18.4 + 11ΓΑ3	1.353,36	bcd	2.885,24	2.040,18	96
A.f.18.4 + 18ΑΒ5	1.671,7	hij	334,44	236,49	95
A.f.18.4 + 10ΒΑ1	2.032,3	hij	817,84	578,3	94
A.f.18.4 + 9ΒΓ7	2.053,84	hij	1.464,79	1.035,76	94
A.f.18.4 + 20ΓΒ5	2.061,4	hij	1.165,36	824,04	94
A.f.18.4 + 3ΑΑ1	2.103,12	hij	362,21	256,12	93
A.f.18.4 + ΚΥΨ18	2.628,5	hij	1.233,9	872,5	92
A.f.18.4 + 11ΓΓ9	2.675	hij	954,59	675	92
A.f.18.4 + 11ΓΓ8	3.551,29	ghij	1.169,96	827,29	89
A.f.18.4 + 7ΑΑ2	5.152,82	fghij	646,55	457,18	84
A.f.18.4 + ΝΥΧ9	5.181,72	fghij	411,78	291,17	84
A.f.18.4 + 4ΒΑ1	7.251,17	fghij	677,17	478,83	77
A.f.18.4 + 11ΑΑ3	8.733,69	fghij	1.112,01	786,31	72
A.f.18.4 + 5Λ2	10.845,91	efghi	1.479,14	1.045,91	66
A.f.18.4 + 20Β8	10.972,95	efgh	533,23	377,05	65
A.f.18.4 + 10ΓΓ7	11.002,95	efgh	575,66	407,05	65
A.f.18.4 + Π18	12.985	efg	1.661,7	1.175	59
A.f.18.4 + 12ΒΒ5	14.460,26	def	3.153,33	2.229,74	54
A.f.18.4 + 18ΑΑ3	18.523,32	cde	10.715,04	7.576,68	42
A.f.18.4 + ΚΥΨ15	19.935,34	cde	3.002,79	2.123,29	37
A.f.18.4 + 20Β3	23.105,37	bcd	4.287,58	3.031,78	27
A.f.18.4 + 11ΓΒ4	23.449,82	ij	614,28	434,36	26
A.f.18.4 + 14ΑΓ9	23.830,17	bcd	4.281,2	3.027,26	25
A.f.18.4 + 11ΓΑ2	25.874,85	bc	4412,56	3.120,15	18
A.f.18.4 + 12ΓΓ7	31.480,67	b	10.138,96	7169,33	1
A.f.18.4 + 18ΒΓ9	42.955,77	a	16.966,53	11.997,15	-35

**Πίνακας 3.3B:** Αξιολόγηση 9 ζυμών κατά των παραγόμενων αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος σε κελυφωτά φιστίκια. Παρουσιάζονται τα παραχθέντα  $\mu\text{g kg}^{-1}$  αφλατοξινών, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου και η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες καθώς και η στατιστική ανάλυση μεταξύ των εφαρμογών. Ως μάρτυρας παρουσιάζεται η εφαρμογή μόνο του μύκητα A.f.18.4. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Εφαρμογή	Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση %
A.f.18.4	773,73	ab	90,83	64,23	-
A.f.18.4 + Π38	13,19	b	1,57	1,11	98
A.f.18.4 + Π1	13,52	b	1,02	0,72	98
A.f.18.4 + Π1ΑΓ8	225,83	ab	11,91	8,42	71
A.f.18.4 + Κ17	232,9	ab	28,89	20,43	70
A.f.18.4 + 14ΑΒ4	383,62	ab	43,66	30,87	50
A.f.18.4 + 19ΑΒ6	447,48	ab	68,60	48,51	42
A..18.4 + 18ΑΓ8	694,55	ab	79,65	56,32	10
A.f.18.4 + 14ΑΑ2	1.452,36	a	219,37	155,12	-88
A.f.18.4 + ΚΥΨ8	2.528,63	a	337,90	238,93	-227

### 3.5.5. Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης απομονώσεων ζυμών

Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, καθώς και BLAST ανάλυση που έγινε με χρήση του προγράμματος FinchTV και του ιστοτόπου <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, των 7 αποτελεσματικότερων απομονώσεων ζυμών. Στον πίνακα 3.4 φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της αλληλούχισης. Από τα αποτελέσματα αποδεικνύεται πως από τις 7 αποτελεσματικές απομονώσεις των ζυμών, οι δύο ανήκουν στο είδος *Aureobasidium pullulans* και μάλιστα προέρχονται από τον ίδιο αγρό και οι 5 ανήκουν στο είδος *Meyerozyma caribbica*. Οι 5 αυτές ζύμες προέρχονται από διαφορετικούς φιστικεάνους απομόνωσης, γεγονός που υποδεικνύει την προσαρμογή του γένους, αλλά και του είδους στους αγρούς στην Αίγινα.

**Πίνακας 3.4:** Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης των 7 αποτελεσματικών απομονώσεων ζυμών.

Απομόνωση	Αποτελέσματα αλληλούχισης	Ποσοστά ταυτοποίησης
X8	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100 %
12ΓΒ6	<i>Meyerozyma caribbica</i>	90 %
19ΑΑ3	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100 %
15ΓΓ9	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100 %
Π1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100 %
X18	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100 %
Π38	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100 %

Με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, οι αποτελεσματικές απομονώσεις ζυμών ανήκουν σε δύο διαφορετικά είδη. Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν αναφορικά με τα είδη *Pichia*, ορισμένα από αυτά

σχηματίζουν το συνένζυμο Q-9, και αυτά άλλαξαν ταξινόμηση οδηγώντας στη δημιουργία 5 νέων γενών (Kurtzman et al. 2010). Ένα από αυτά είναι το *Meyerozyma* που περιλαμβάνει τα παλιά είδη *Pichia caribbica* και *Pichia guilliermondii*, που πλέον ονομάζονται *Meyerozyma caribbica* και *Meyerozyma guilliermondii* αντίστοιχα. Με βάση αυτό, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι 5 από τις 7 αποτελεσματικές απομονώσεις ζυμών που βρέθηκαν, και ανήκουν στο είδος *Meyerozyma caribbica* ουσιαστικά αποτελούν είδη του γένους *Pichia* σύμφωνα με την παλαιότερη ονοματολογία.

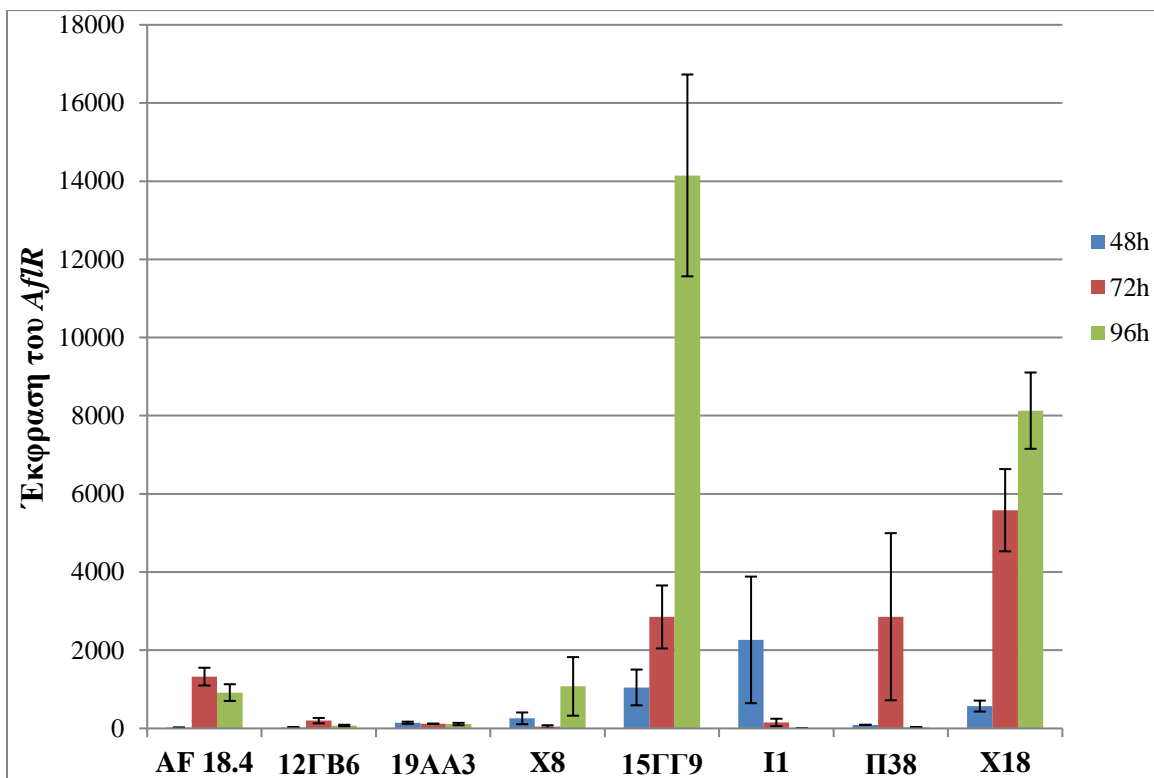
### 3.5.6. Αξιολόγηση της επίδρασης απομονώσεων ζυμών στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR* του μύκητα *Aspergillus flavus*

Ο μεταγραφικός παράγοντας *AflR* όπως έχει προαναφερθεί, ρυθμίζει την παραγωγή αφλατοξινών στον μύκητα *A. flavus*. Στη παρούσα ενότητα, διερευνήθηκε ο ρόλος και η επίδραση των απομονώσεων των ζυμών που χαρακτηρίστηκαν ως αποτελεσματικές βάσει των προηγούμενων αποτελεσμάτων έναντι της παραγωγής αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια, στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα, με τη χρήση της μεθόδου της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR). Στον πίνακα 3.24 παρουσιάζεται η έκφραση του *AflR*, για τον μάρτυρα και τις εφαρμογές με τις ζύμες, στις 48, 72 και 96 ώρες μετά τη μόλυνση.

**Πίνακας 3.24:** Η έκφραση του *AflR* σε επεμβάσεις με τα αποτελεσματικά στελέχη ζυμών και το A.f.18.4 σε θρεπτικό υλικό CC.

Επεμβάσεις	Έκφραση του <i>AflR</i>		
	48 h	72 h	96 h
A.f.18.4	19,11	1.325,47	916,75
12GB6 + A.f.18.4	24,57	199,11	72,51
19AA3 + A.f.18.4	144,7	119,17	111,52
X8 + A.f.18.4	257,8	49,06	1.075,44
15ΓΓ9 + A.f.18.4	1.048,68	2.851,64	14.147,76
Π1 + A.f.18.4	2.264,73	151,26	2,14
Π38 + A.f.18.4	91,24	2.857,73	27,08
X18 + A.f.18.4	571,42	5.582,43	8.129,42

Στο θρεπτικό υλικό Coconut Cream (CC), το στέλεχος της ζύμης 12GB6 72 και 96 ώρες μετά τη μόλυνση προκάλεσε σημαντική μείωση της έκφρασης του γονιδίου *AflR* σε σχέση με το μάρτυρα. Ανάλογη εικόνα υπήρχε και για τα στελέχη ζυμών 19AA3 και Π1 όσον αφορά τη σημαντική μείωση της έκφρασης του *AflR* στις 72 και 96 ώρες μετά τη μόλυνση, σε σύγκριση με το μάρτυρα (Διάγρ. 3.3). Όσον αφορά στην επίδραση του στελέχους της ζύμης X8 στην έκφραση του *AflR*, 72 ώρες μετά τη μόλυνση παρατηρείται σημαντική μείωση της έκφρασής του. Στις 96 ώρες μετά τη μόλυνση, εμφανίζεται μία πολύ μικρή, σχεδόν αμελητέα αύξηση της έκφρασης του *AflR* σε σχέση με το μάρτυρα. Παρόμοια εικόνα εμφανίζεται μεταξύ των επιδράσεων των στελεχών των ζυμών 15ΓΓ9 και X18, όπου ο μεταγραφικός παράγοντας *AflR* μοιάζει να υπερεκφράζεται κατά πολύ σε σχέση με το μάρτυρα και στις τρεις χρονικές στιγμές μετά τη μόλυνση που έγινε έλεγχος (Διάγρ. 3.3). Τέλος, μία διαφορετική επίδραση στην έκφραση του *AflR* φαίνεται να έχει το στέλεχος της ζύμης Π38, το οποίο προκαλεί υπερέκφραση του γονιδίου 72 ώρες μετά τη μόλυνση, ενώ 96 ώρες μετά τη μόλυνση προκαλεί σημαντική μείωση της έκφρασής του.



Διάγραμμα 3.3: Επίδραση των απομονώσεων των ζυμών στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR*.

### 3.5.7. Αξιολόγηση της επίδρασης μυκητοκτόνων σκευασμάτων στην ανάπτυξη απομονώσεων ζυμών

Η ευαισθησία των 6 από τις αποτελεσματικές απομονώσεις ζυμών (12ΓΒ6, 15ΓΓ9, 19ΑΑ3, ΙΙ, Π38, X18) στα χημικά σκευάσματα μυκητοκτόνων (Octave<sup>®</sup>, Geoxe<sup>®</sup>, Chorus<sup>®</sup>, Scala<sup>®</sup>, Fungazil<sup>®</sup>, Opera new<sup>®</sup>), μελετήθηκε βάσει της αναπτύξεως των ζυμών σε 4 διαφορετικές δόσεις των μυκητοκτόνων (50%, 100%, 150% και 200% της συνιστώμενης δόσης σύμφωνα με την ετικέτα του φαρμάκου για την πιο παρεμφερή καλλιέργεια), σε σχέση με εκείνη στο μάρτυρα και σε υγρό θρεπτικό υλικό ΥΜ.

Από τον Πίνακα 3.25, παρατηρείται ότι το χημικό σκεύασμα Geoxe<sup>®</sup> με δραστική ουσία το fludioxonil, ανεξαρτήτως της δόσης προκάλεσε λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων σε όλες τις απομονώσεις ζυμών. Επιπλέον, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα χημικά σκευάσματα Scala<sup>®</sup> και Fungazil<sup>®</sup>, με δραστικές ουσίες (δ.ο.) pyrimethanil και imazalil αντίστοιχα, προκαλούν σχεδόν πλήρη παρεμπόδιση στην ανάπτυξη όλων των ζυμών από τη μικρότερη δόση που εφαρμόστηκε.

Αναφορικά με τις ζύμες *M. carribica*, η ζύμη 12ΓΒ6, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.5 αλλά και στο Διάγραμμα 3.4, παρεμποδίστηκε λιγότερο από το χημικό σκεύασμα Octave<sup>®</sup> (δ.ο. prochloraz που ανήκει στις ιμιδαζόλες) σε σχέση με τα υπόλοιπα χημικά σκευάσματα. Ωστόσο, ακόμη και το Octave<sup>®</sup> παρεμπόδισε σε πολύ μεγάλο ποσοστό την παραγωγή κυττάρων (91%) από τη μικρότερη κιάλας δόση (50% της συνιστώμενης δόσης). Πρέπει να σημειωθεί ότι σχεδόν πλήρη παρεμπόδιση από τη μικρότερη δόση έδειξε και το χημικό σκεύασμα Opera New<sup>®</sup>, πέραν των Scala<sup>®</sup> και Fungazil<sup>®</sup>, με ποσοστό παρεμπόδισης 99,8%.



Η ανάπτυξη της ζύμης 15ΓΓ9, φαίνεται να παρεμποδίζεται σε μικρότερο βαθμό από το χημικό σκεύασμα Opera New® (δ.ο. pyraclostrobin και eroxiconazole, των ομάδων QoI παρεμποδιστών και τριαζολών), όπου παρατηρούνται μεγάλες διαφορές σε σχέση με τις παρεμποδίσεις στα υπόλοιπα χημικά σκευάσματα (Διάγρ. 3.5). Παρ' όλα αυτά, το ποσοστό παρεμπόδισης που σημειώνεται στη συνιστώμενη δόση είναι αρκετά αξιόλογο (73,9%).

Η ζύμη 19AA3 επηρεάζεται λιγότερο από το χημικό σκεύασμα Octave® (δ.ο. prochloraz) με σημαντική διαφορά από ότι επηρεάζεται από τα υπόλοιπα χημικά σκευάσματα. Για παράδειγμα, το ίδιο ποσοστό παρεμπόδισης προκαλεί το 200% της συνιστώμενης δόσης του Octave® και η συνιστώμενη δόση του Chorus® (δ.ο. cyprodinil), ενώ τα υπόλοιπα σκευάσματα προκαλούν σχεδόν πλήρη παρεμπόδιση ακόμα και στο 50% της συνιστώμενης δόσης (Διάγρ. 3.6).

Στην ανάπτυξη και της ζύμης Π1, λιγότερο φαίνεται να επιδρά το χημικό σκεύασμα Octave® (δ.ο. prochloraz) με αρκετά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα άλλα χημικά σκευάσματα (Διάγρ. 3.7), όμως και αυτό εμφανίζει πολύ μεγάλη παρεμπόδιση της παραγωγής των κυττάρων της ζύμης (89,6%) από το 50% της συνιστώμενης δόσης. Εκτός των Scala® και Fungazil®, και το Opera New® δείχνει να έχει την ικανότητα πλήρους παρεμπόδισης σε όλες τις δόσεις για τη ζύμη Π1.

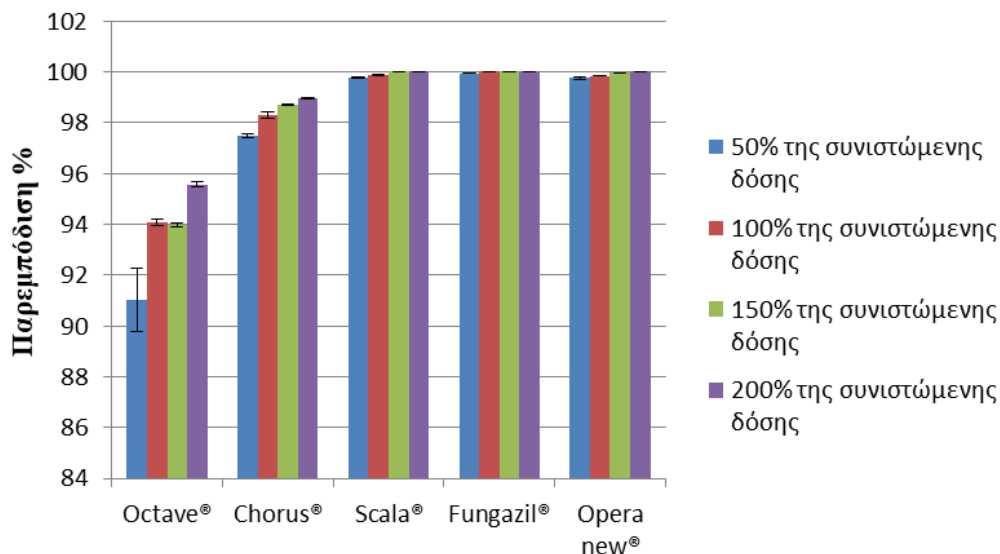
Η ζύμη Π38, φαίνεται να είναι εκείνη που επηρεάζεται λιγότερο από τα χημικά σκευάσματα που εξετάστηκαν, όπως παρατηρείται από τον πίνακα 3.5. Λιγότερο, με μεγάλη διαφορά, φαίνεται να παρεμποδίζεται από το χημικό σκεύασμα Octave® (Διάγρ. 3.8). Συγκεκριμένα, παρατηρείται παρεμπόδιση 67,9% στη συνιστώμενη δόση, ενώ η παρεμπόδιση δεν ξεπερνά το 90,1% ακόμα και στη μεγαλύτερη δόση. Και για το χημικό σκεύασμα Chorus®, η παρεμπόδιση είναι σε αρκετά χαμηλά επίπεδα σε σύγκριση με τις άλλες ζύμες, με μοναδική εξαίρεση τη X18. Ειδικότερα, στη συνιστώμενη δόση εμφανίζεται παρεμπόδιση της ανάπτυξης της ζύμης 78,5%, ενώ σχεδόν πλήρη παρεμπόδιση παρατηρείται μόνο στο διπλάσιο της συνιστώμενης δόσης.

Η ζύμη X18 (*A. pullulans*) επηρεάζεται σημαντικά λιγότερο από το χημικό σκεύασμα Chorus® (δ.ο. cyprodinil), σε σχέση με τα άλλα σκευάσματα. Στη συνιστώμενη δόση εμφανίζεται 79,8% παρεμπόδιση της παραγωγής κυττάρων της ζύμης, η οποία δεν είναι καθόλου αμελητέα. Εκτός των μυκητοκτόνων σκευασμάτων Scala® και Fungazil®, και το Octave® εμφάνισε πλήρη παρεμπόδιση της ανάπτυξης της ζύμης στη συνιστώμενη δόση (Διάγρ. 3.9).

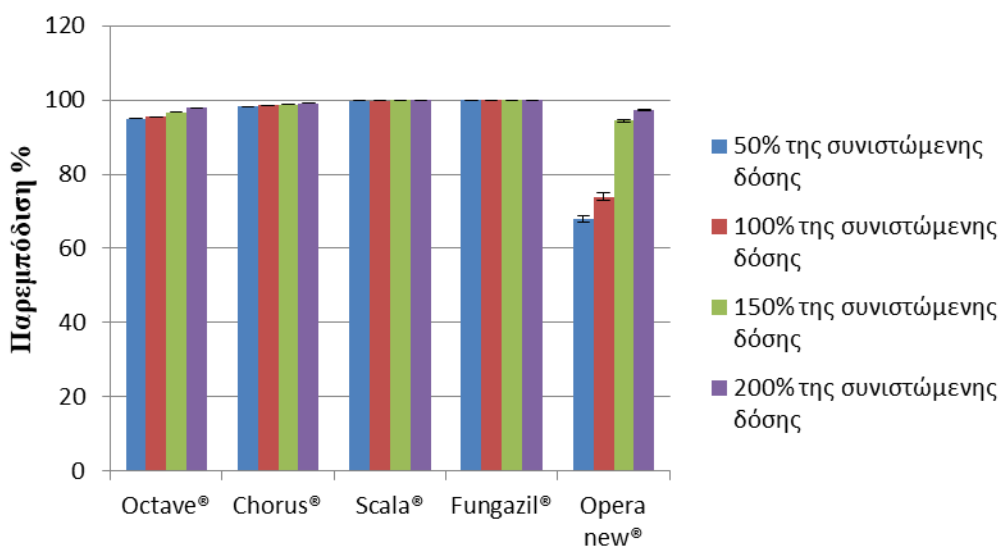
Τέλος, παρατηρείται ότι παρότι κάποιες εκ των ζυμών ανήκουν στο ίδιο γένος δεν επηρεάστηκαν κατά τον ίδιο ή παρόμοιο τρόπο από τα χημικά σκευάσματα που εξετάστηκαν. Συνολικά παρατηρείται επίσης ότι σκευάσματα που περιέχουν την ιμιδαζόλη imazalil και την ανιλοπυριμιδίνη pyrimethanil παρεμποδίζουν ιδιαίτερα την ανάπτυξη όλων των ζυμών που αξιολογήθηκαν, σε ποσοστό άνω του 98%, από τις χαμηλότερες κιάλας δόσεις.

**Πίνακας 3.5:** Παρεμπόδιση επί τοις εκατό της παραγωγής κυττάρων της κάθε ζύμης για κάθε δόση του αντίστοιχου χημικού σκευάσματος.

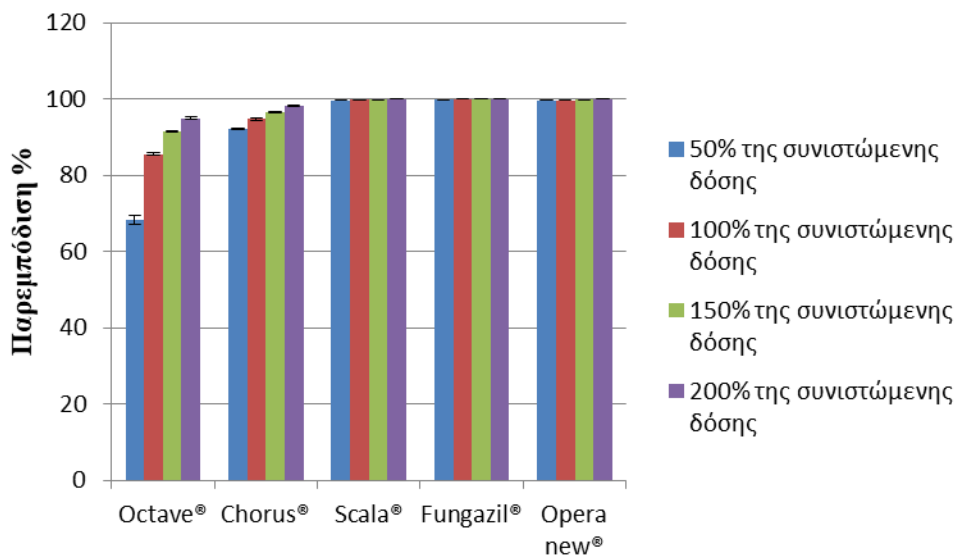
Απομονώσεις ζυμών	12ΓΒ6	15ΓΓ9	19ΑΑ3	Π1	Π38	Χ18
<b>Σκευάσματα</b>						
<b>Octave®</b>						
0,3 g/ L	91	95	68,3	89,6	32,8	93,8
0,6 g/ L	94,1	95,4	85,6	91,8	67,9	100
0,9 g/ L	94	96,7	91,5	93	87,3	100
0,12 g/ L	95,6	97,8	94,9	94,4	90,1	100
<b>Geoxe®</b>						
0,5 g/ L	Λύση κυτταρικών τοιχωμάτων					
1 g/ L	Λύση κυτταρικών τοιχωμάτων					
1,5 g/ L	Λύση κυτταρικών τοιχωμάτων					
2 g/ L	Λύση κυτταρικών τοιχωμάτων					
<b>Chorus®</b>						
0,25 g/ L	97,5	98,3	92,2	98,7	63,1	40,5
0,5 g/ L	98,3	98,6	94,8	98,8	78,5	79,8
0,75 g/ L	98,7	98,8	96,4	98,9	88,7	95,5
1 g/ L	99,0	99,1	98,2	99,3	99,4	100
<b>Scala®</b>						
0,75 mL/ L	99,8	99,8	99,6	99,6	98,5	100
1,5 mL/ L	99,9	99,8	99,7	99,7	100	100
2,25 mL/ L	100	100	99,8	99,9	100	100
3 mL/ L	100	100	100	100	100	100
<b>Fungazil®</b>						
0,1 mL/ L	99,9	99,9	99,8	99,9	100	100
0,2 mL/ L	100	100	100	100	100	100
0,3 mL/ L	100	100	100	100	100	100
0,4 mL/ L	100	100	100	100	100	100
<b>Opera new®</b>						
2,5 mL/ L	99,8	67,9	99,6	99,7	98,8	85,8
5 mL/ L	99,8	73,9	99,7	99,8	99,3	91
7,5 mL/ L	100	94,3	99,8	99,9	99,5	100
10 mL/ L	100	97,2	99,9	100	100	100



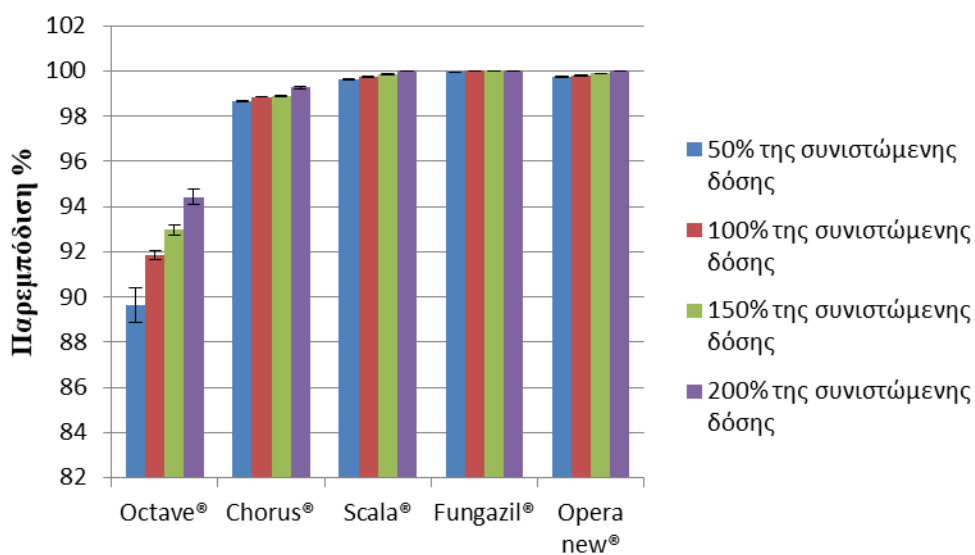
**Διάγραμμα 3.4:** Επίδραση των χημικών σκευασμάτων, στην ανάπτυξη της ζύμης **12GB6** (*Meyerozyma caribbica*) σε ΥΜ. Παρουσιάζεται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό της παραγωγής κυττάρων της ζύμης για τις 4 δόσεις κάθε χημικού σκευάσματος.



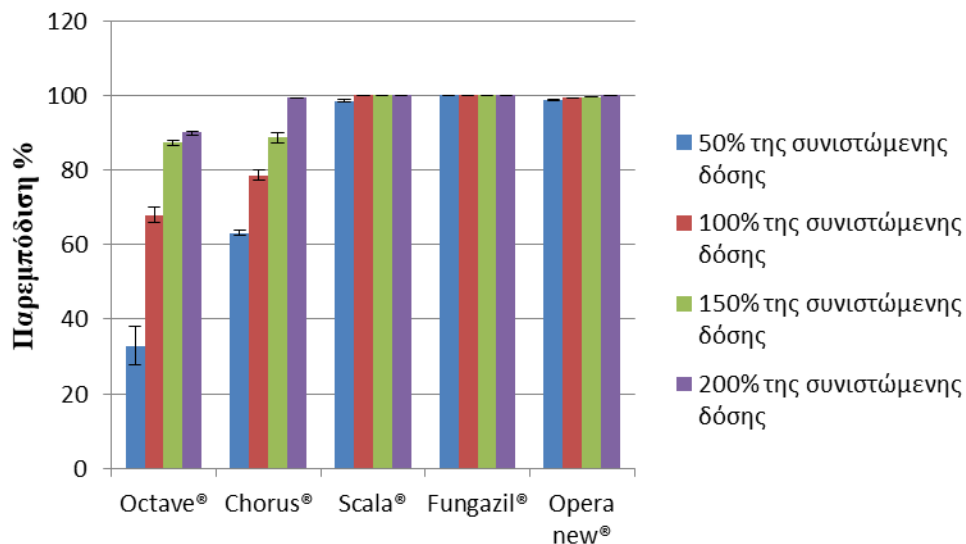
**Διάγραμμα 3.5:** Επίδραση της δόσεως των χημικών σκευασμάτων στην ανάπτυξη της ζύμης **15GT9** (*Meyerozyma caribbica*) σε ΥΜ. Παρουσιάζεται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό της παραγωγής κυττάρων της ζύμης για τις 4 δόσεις κάθε χημικού σκευάσματος.



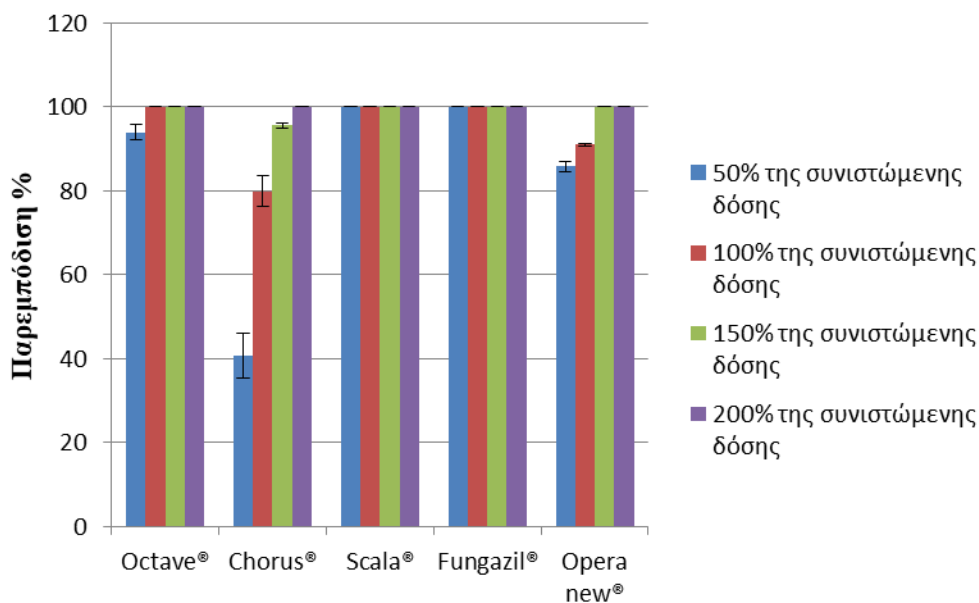
**Διάγραμμα 3.6:** Επίδραση της δόσεως των χημικών σκευασμάτων στην ανάπτυξη της ζύμης **19AA3** (*Meyerozyma caribbica*) σε ΥΜ. Παρουσιάζεται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό της παραγωγής κυττάρων της ζύμης για τις 4 δόσεις κάθε χημικού σκευάσματος.



**Διάγραμμα 3.7:** Επίδραση της δόσεως των χημικών σκευασμάτων στην ανάπτυξη της ζύμης **II** (*Meyerozyma caribbica*) σε ΥΜ. Παρουσιάζεται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό της παραγωγής κυττάρων της ζύμης για τις 4 δόσεις κάθε χημικού σκευάσματος.



**Διάγραμμα 3.8:** Επίδραση της δόσεως των χημικών σκευασμάτων στην ανάπτυξη της ζύμης *P38* (*Meyerozyma caribbica*) σε ΥΜ. Παρουσιάζεται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό της παραγωγής κυττάρων της ζύμης για τις 4 δόσεις κάθε χημικού σκευάσματος.



**Διάγραμμα 3.9:** Επίδραση της δόσεως των χημικών σκευασμάτων στην ανάπτυξη της ζύμης *X18* (*Aureobasidium pullulans*) σε ΥΜ. Παρουσιάζεται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό της παραγωγής κυττάρων της ζύμης για τις 4 δόσεις κάθε χημικού σκευάσματος.

### 3.5.8. Αξιολόγηση της επίδρασης απομονώσεων ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών σε φιστικεόνες

Με γνώμονα τα αποτελέσματα της *in situ* διερεύνησης μείωσης παραγωγής αφλατοξινών σε καρπούς κελυφωτών φιστικιών από τις απομονώσεις των ζυμών, όπως προαναφέρθηκε βρέθηκαν 7

ιδιαίτερα αποτελεσματικές απομονώσεις ζυμών (Παράγραφος 3.5.4.). Στη συνέχεια, βάσει των αποτελεσμάτων της μοριακής ταυτοποίησης, βρέθηκε πως αυτές οι 7 ζύμες ανήκουν βασικά σε δύο είδη, *Meyerozyma carribica* και *Aureobasidium pullulans* (Παράγραφος 3.5.5.). Κατά συνέπεια, επελέγη μία από το κάθε είδος μεταξύ των ζυμών αυτών και αυτές οι δύο, αξιολογήθηκαν σε συνθήκες αγρού σε φιστικεώνες στην Αίγινα ως προς την ικανότητα μείωσης των παραγόμενων αφλατοξινών, από το ισχυρά αφλατοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 που έχει επαναχρησιμοποιηθεί στη παρούσα μελέτη αλλά και από φυσικές μολύνσεις, σε συνθήκες αγρού. Πρόκειται για τις ζύμες X18 (*A. pullulans*) και 19AA3 (*M. carribica*).

Οι μάρτυρες στο φιστικεώνα Α ήταν τεχνητές μολύνσεις με το ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4, και οι μάρτυρες στους φιστικεώνες Β και Γ είναι φυσικές μολύνσεις από πληθυσμούς τοξικογόνων στελεχών του μύκητα που προϋπήρχαν στους αγρούς αυτούς. Από τα αποτελέσματα αναλύσεως των καρπών για τη μόλυνση με αφλατοξίνες προκύπτει πως οι τεχνητές μολύνσεις κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα τόσο για το 2017, όσο και το 2018 με 1.477,62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  και 2.928,60  $\mu\text{g kg}^{-1}$  αντίστοιχα για τον φιστικεώνα Α. Στον αντίποδα, οι φυσικές μολύνσεις στους φιστικεώνες Β και Γ υποδεικνύουν την ύπαρξη υψηλών φυσικών μολύσεων σε επίπεδο 1114,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  για τον φιστικεώνα Β για το έτος 2017, αλλά χαμηλών σε επίπεδο 20,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  για τον φιστικεώνα Γ για το 2018, που είναι ελαφρώς πάνω από το ανώτατο επιτρεπτό όριο για την καλλιέργεια των φιστικιών (Πίν. 3.6).

Η εφαρμογή του αιωρήματος των απομονώσεων των ζυμών με ψεκάσμο, προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών, τόσο στην περίπτωση των φυσικών, όσο και των τεχνητών μολύνσεων και τις δύο χρονιές (Πίν. 3.6), σε επίπεδο άνω του 85% του μάρτυρα.

**Πίνακας 3.6:** Αποτελέσματα αναλύσεων αφλατοξινών και παρεμπόδισης στη παραγωγή αφλατοξινών από τις δύο ζύμες X18 και 19AA3, στους 3 πειραματικούς φιστικεώνες (Α,Β,Γ) για τα έτη 2017 και 2018. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

		Εφαρμογή	Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση %
2017	Φιστικεώνας Α	Μάρτυρας	1.477,62	a	69,7	-
		X18	2,74	b	1,79	99,9
		19AA3	4,5	b	0,14	99,7
	Φιστικεώνας Β	Μάρτυρας	1.114,3	a	93,8	-
		X18	3,56	b	0,77	99,7
		19AA3	7,33	b	1,38	99,3
2018	Φιστικεώνας Α	Μάρτυρας	2.928,6	a	130,18	-
		X18	3,25	b	1,23	99,9
		19AA3	1,99	b	0,78	99,9
	Φιστικεώνας Γ	Μάρτυρας	20,8	a	6,13	-
		X18	2,91	b	2,17	86
		19AA3	1,95	b	1,95	90,6

Η επί τοις εκατό παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών για τον φιστικεώνα Α, όπου εφαρμόστηκε τεχνητή μόλυνση του μάρτυρα ήταν 99,9% και 99,7% για τις δύο ζύμες το 2017 και 99,9% και 99,9% για το 2018 αντίστοιχα (Πίν. 3.26), γεγονός που αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα των ζυμών



X18 και 19AA3 να παρεμποδίζουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες σε συνθήκες αγρού, αγγίζοντας την πλήρη παρεμπόδιση. Όσον αφορά στην περίπτωση των φιστικιών με φυσικές μολύνσεις, η ικανότητα των απομονώσεων των ζυμών να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών κυμάνθηκε σε ποσοστό 99,7 και 99,3% για το 2017 (φιστικιών Β), ενώ χαμηλότερη ήταν στον φιστικιών Γ, σε επίπεδα 86% και 90,6% για το 2018 (Πίν. 3.26). Η συγκριτικά με τις υπόλοιπες, χαμηλότερη παρεμπόδιση, στον φιστικιών Γ που έφτασε στο 86%, πιθανότατα οφείλεται σε ελλειπή διαβροχή και κάλυψη των καρπών και του φυλλώματος από τον βιολογικό παράγοντα ή και σε απορροή του ψεκαστικού υγρού. Οι υπόλοιπες παρεμποδίσεις που υπερβαίνουν το 99% κρίνονται ιδιαίτεως υψηλές και η εφαρμογή των απομονώσεων και των δύο ζυμών, κρίνεται αποτελεσματική στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών. Παρόλα αυτά, η παρεμπόδιση 86%, παραμένει στατιστικά σημαντική συγκριτικά με το μάρτυρα και είναι και αυτή υψηλή υποδεικνύοντας αποτελεσματικότητα της απομόνωσης της ζύμης X18.

Συμπερασματικά, από την διερεύνηση της ικανότητας των δύο ζυμών X18 (*A. pullulans*) και 19AA3 (*M. carribica*) που απομονώθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης από φιστικιών στην Αίγινα να μειώνουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες σε συνθήκες αγρού, προκύπτει η αποτελεσματικότητα των εν λόγω ενδημικών απομονώσεων. Βάσει των αποτελεσμάτων, κρίνεται πως, θα μπορούσαν μελλοντικά πιθανόν να αποτελέσουν βιολογικό παράγοντα διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού στο πλαίσιο ολοκληρωμένων συστημάτων διαχείρισης αφλατοξινών.

### 3.6. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Το αντικείμενο έρευνας της παρούσας μελέτης είχε ως στόχο την εύρεση ενδημικών επιφυτικών ζυμών ως βιολογικών παραγόντων που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε ένα ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης των αφλατοξινών που παράγει ο μύκητας *A. flavus* στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού. Στη συγκεκριμένη μελέτη, αξιολογήθηκε η ικανότητα των ενδημικών επιφυτικών απομονώσεων ως προς την παρεμπόδιση της κονιδιογένεσης του μύκητα και της βιοσύνθεσης αφλατοξινών τόσο σε *in vitro* και σε *in situ* πειράματα αλλά και σε πειράματα αγρού σε φιστικιών, καθώς και η επίδραση τους στην έκφραση ενός μεταγραφικού παράγοντα που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των αφλατοξινών. Τέλος, ελέγχθηκε η δυνατότητα των ζυμών να αποτελέσουν μέρος ενός προγράμματος ολοκληρωμένης αντιμετώπισης που θα περιέχει και χημική αντιμετώπιση του μύκητα *Aspergillus flavus* και των παραγόμενων αφλατοξινών του.

Από τα πειράματα που έγιναν για να ελεγχθεί η επίδραση της συλλογής των 292 απομονώσεων ζυμών από αγρούς της Αίγινας στην κονιδιογένεση του εξαιρετικά αφλατοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 του *A. flavus*, παρατηρήθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ζυμών, περίπου το 70%, είχε την ικανότητα να παρεμποδίζει την κονιδιογένεση του τοξικογόνου στελέχους. Ωστόσο το ποσοστό των απομονώσεων ζυμών που πέτυχε μία αξιόλογη μείωση της κονιδιογένεσης, άνω του 60% σε σχέση με το μάρτυρα A.f.18.4 ήταν αρκετά μικρό, της τάξεως του 10,6%. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι αρκετές απομονώσεις που προέρχονταν από τους ίδιους αγρούς είχαν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την κονιδιογένεση στον ίδιο βαθμό. Με βάση αυτό, θα μπορούσε να γίνει η υπόθεση ότι πιθανόν αυτές οι απομονώσεις να αποτελούν απομονώσεις των ίδιων στελεχών ζυμών. Επιπλέον, σύμφωνα με τη σύγκριση που έγινε μεταξύ της ικανότητας παρεμπόδισης της κονιδιογένεσης και της παραγωγής αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η μείωση της κονιδιογένεσης του μύκητα δεν σχετίζεται με την παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών. Είναι εμφανές ότι η πλειοψηφία των απομονώσεων ζυμών που προκαλούν παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών στο στέλεχος A.f.18.4, προκαλούν και αύξηση της κονιδιογένεσης του *in vitro*.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το στέλεχος της *Pichia anomala* WRL-076, που έχει βρεθεί αποτελεσματικό στην παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών, μπορεί να μειώσει και την κονιδιογένεση του *A. flavus* σε καρπούς κελυφωτών φιστικιών με πληγές (Hua 2006). Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε ότι για κάθε καρπό προκλήθηκε κατά μέσο όρο μείωση της κονιδιογένεσης 77%, ενώ ο αριθμός των κονιδίων *A. flavus* που υπήρχε στον φιστικεώνα μειώθηκε κατά 96%. Η ικανότητα βιολογικής αντιμετώπισης ενός άλλου συγκεκριμένου στελέχους της *Pichia anomala* ελέγχθηκε ενάντια στην κονιδιογένεση του *A. flavus* σε άνθη φιστικιάς και φύλλα αμυγδαλιάς και παρατηρήθηκε μείωση 60%-80% στα φυτικά δείγματα που ήταν ψεκασμένα με τη συγκεκριμένη ζύμη (Saremi et al. 2009). Ακόμη, σύμφωνα με αποτελέσματα άλλων μελετών, 5 διαφορετικά είδη ζυμών που απομονώθηκαν από καρπούς και φύλλα φιστικιάς, ελέγχθηκαν ως προς την παρεμπόδιση της κονιδιογένεσης του *A. flavus in vitro* και έδειξαν να παρεμποδίζουν την κονιδιογένεση του μύκητα σε ποσοστό 62-85% (Afsah-Hejri 2013). Αξίζει να επισημανθεί ότι οι ζύμες αυτές έδειξαν και παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξίνης B1 σε ποσοστό 82,6%-99,9% και μάλιστα τα αποτελέσματα αυτά έρχονταν σε συμφωνία με εκείνα της παρεμπόδισης της κονιδιογένεσης. Παρατηρείται λοιπόν, ότι τα αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες δεν είναι όμοια με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου κατά πλειοψηφία οι αποτελεσματικές ζύμες ως προς την παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών, προκαλούσαν αύξηση της κονιδιογένεσης του *A. flavus in vitro*. Παρόλα αυτά, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η παρεμπόδιση της κονιδιογένεσης ενός μόνο τοξικογόνου στελέχους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση της κάθε ζύμης είναι πιθανόν να είναι διαφορετική στην κονιδιογένεση και στην παραγωγή αφλατοξινών.

Όσον αφορά στην επίδραση των 292 απομονώσεων των ζυμών στην παραγωγή αφλατοξινών από το στέλεχος A.f.18.4, παρατηρήθηκε ότι ένα ικανοποιητικό ποσοστό ζυμών (13,6%) ήταν ικανό να προκαλέσει πλήρη παρεμπόδιση *in vitro*. Από την άλλη, οι ζύμες που έδειξαν πλήρη παρεμπόδιση στην παραγωγή αφλατοξίνης, στα *in situ* πειράματα που έγιναν σε καρπούς κελυφωτού φιστικιού έδωσαν διαφορετικά αποτελέσματα. Θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η διαφορά αυτή οφείλεται στην έλλειψη ικανότητας όλων των απομονώσεων ζυμών να αναπτύσσονται το ίδιο στον καρπό του κελυφωτού φιστικιού, αλλά και στην επίδραση χαρακτηριστικών του σπέρματος που πιθανόν να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της ζύμης και του μύκητα *A. flavus*. Ειδικότερα, μόνο 7 εκ των 40 απομονώσεων ζυμών προκάλεσαν σχεδόν πλήρη παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών του στελέχους του *A. flavus*. Ορισμένες ζύμες μάλιστα όχι μόνο δεν προκάλεσαν παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών, αλλά προκάλεσαν αύξησή της. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα μίας άλλης έρευνας, όπου καταγράφηκε διέγερση της βιοσύνθεσης αφλατοξινών του *A. flavus* από τη ζύμη *Hyphopichia burtonii* (Cuero et al. 1987).

Το *Aureobasidium pullulans* είναι ένα σαπροφυτικό είδος ζύμης που απαντάται σε διάφορα περιβάλλοντα όπως και πολλά είδη ζυμών. Παραδείγματα τέτοιων, είναι τα φύλλα των καλλιεργούμενων φυτών (Grube et al. 2011), οι κόκκοι δημητριακών (Wachowska et al. 2013), τα φρούτα (Tournas et al. 2009), τα τρόφιμα (Berghofer et al. 2003) και οι ζωοτροφές (Olstrope et al. 2010). Το είδος χαρακτηρίζεται από υψηλή μορφολογική παραλλακτικότητα. Μορφολογικά τα στελέχη του *A. pullulans* έχουν διαιρεθεί σε 6 ομάδες με διαφορετικά μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά (Zalar et al. 2008). Το *A. pullulans* είναι γνωστό για τη βιοτεχνολογική του σημασία ως παραγωγός του βιοαποικοδομήσιμου εξωκυτταρικού πολυσακχαρίτη (*EPS*) πουλλουλάνης (poly-alpha-1,6-maltotriose) που χρησιμοποιείται στην παραγωγή τροφίμων (Donot et al. 2012, Kuan-Chen et al. 2011). Το βιοτεχνολογικό δυναμικό του *A. pullulans* συνδέεται επίσης με την υψηλή ενζυματική του δραστηριότητα. Ανάλογα με τη θερμοκρασία, τον τύπο της ζύμωσης, την πηγή άνθρακα, το pH και τη διαθεσιμότητα νερού, οι απομονώσεις του *A. pullulans* παράγουν ενδογλυκανάση, ξυλανάση, β-γλυκοσιδάση (Leite et al. 2008), πολυγαλακτουρονάσες (Stratilová et al.

2006), αμυλάση (Li et al. 2007, Manitchotpisit et al. 2011), χιτινάσες (ενδοχιτινάση, χιτοβιοσιδάση) και β-1,3-γλυκανάση που παράγεται σε καλλιέργεια της ζύμης και σε πληγές μήλων (Castoria et al. 2001).

Τα ένζυμα που παράγονται από το *A. pullulans* εμπλέκονται και στον τρόπο δράσης αυτού του μικροοργανισμού και παίζουν ρόλο-κλειδί στη βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών, καταστέλλοντας την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων. Το *A. pullulans* έχει βρεθεί να είναι αποτελεσματικό ενάντια του *Botrytis cinerea*, του *Penicillium expansum*, του *Rhizopus stolonifer* και του *Aspergillus niger* σε επιτραπέζιες ποικιλίες σταφυλιών (Castoria et al. 2001), και ενάντια του ωχρατοξικογόνου μύκητα *Aspergillus carbonarius* σε επιτραπέζιες ποικιλίες σταφυλιών και στη φράουλα (Castoria et al. 2001, Lima et al. 1997, De Felice et al. 2008, De Curtis et al. 2012), ενάντια του *B. cinerea* και του *P. expansum* σε μήλα (Castoria et al. 2001, Ippolito et al. 2000, Mounir et al. 2007) και έναντι 3 ειδών του γένους *Monilinia* σε φρούτα οπωροφόρων δέντρων (Mari et al. 2012). Σε άλλη μελέτη έχει παρατηρηθεί για πρώτη φορά ότι 3 στελέχη του *A. pullulans* ήταν αποτελεσματικοί βιολογικοί παράγοντες τόσο για τη μείωση της σοβαρότητας των σήψεων από *Aspergillus* sp. σε αμπελώνες όσο και για τη μείωση της συσσώρευσης ωχρατοξίνης Α (OTA) σε οινοποιήσιμες ποικιλίες σταφυλιών (De Felice et al. 2008). Με βάση αυτό, τα στελέχη αυτά έδειξαν να αποικοδομούν την OTA (De Felice et al. 2008, De Curtis et al. 2012). Επιπλέον, το στέλεχος LS30 του *A. pullulans* μείωσε σημαντικά το ωίδιο σε κριθάρι υπό συνθήκες αγρού (De Curtis et al. 2012).

Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι η ζύμωση που προκαλείται από ζύμες μετασυλλεκτικά κατά την αποθήκευση του αραβοσίτου, πιθανόν να μειώνει τη μόλυνση από αφλατοξίνες (Hayo 2018). Όσον αφορά στο μηχανισμό πίσω από την βιολογική αντιμετώπιση αφλατοξικογόνων μυκήτων, ζύμες που έχουν βρεθεί αποτελεσματικές έναντι του *A. flavus* και των αφλατοξινών που παράγει, λειτουργούν ως παρεμποδιστές μέσω της οργανικών πτητικών μορίων (Jaibangyang et al. 2020). Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός λειτουργίας κάθε απομόνωσης διαφέρει και χρήζει διερεύνησης.

Η *Meyerozyma caribbica* βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματική ως βιολογικός παράγοντας εναντίον του φυτοπαθογόνου *Colletotrichum gloeosporioides* στο μάνγκο, παρουσιάζοντας ανταγωνιστικούς μηχανισμούς δράσης όπως ο ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά στοιχεία, η παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων, ο παρασιτισμός και ο σχηματισμός βιοφίλμ μέσω διακυτταρικής επικοινωνίας (quorum sensing) (Bautista-Rosales et al. 2013). Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι η ζύμη *Meyerozyma caribbica* παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium expansum* στα μήλα (Cao et al. 2013) καθώς και ότι προκαλεί αποικοδόμηση της παραγόμενης πατουλίνης, που αποδείχθηκε ότι οφείλεται στη δράση ενζύμων (Zheng et al. 2016). Σύμφωνα με άλλες παλαιότερες μελέτες, οι ζύμες *Meyerozyma caribbica* (με ατελή μορφή *Candida fermentati*) και *Meyerozyma guilliermondii* (με ατελή μορφή *Candida guilliermondii*) ανήκουν στον ίδιο κλάδο και συμπεριφέρονται παρόμοια (Vaughan-Martini et al. 2005). Η *Candida guilliermondii* είναι ζύμη που ανήκει στους ασκομύκητες και είναι ευρέως εξαπλωμένη στο φυσικό περιβάλλον (Papon et al. 2013). Ως ανταγωνιστική ζύμη, έχει δείξει μεγάλη αποτελεσματικότητα σε διάφορες μετασυλλεκτικές ασθένειες, όπως στο *Penicillium digitatum* στα γκρέιπφρουτ (Mcguire 1994), στη σήψη από μύκητες του γένους *Rhizopus* στα ροδάκινα (Fan et al. 1999) και στο μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά τομάτας (Saligkarias et al. 2002). Σε μελέτη σχετικά με την μόλυνση από πατουλίνη, διαπιστώθηκε ότι η *C. guilliermondii* μπορεί να μειώσει την παραγωγή της πατουλίνης (Chen et al. 2017). Η αποικοδόμηση της πατουλίνης από την ζύμη *C. guilliermondii* εξαρτάται από τη βιωσιμότητα των κυττάρων ζύμης. Η Ε-ασκουλαδιόλη ήταν το κύριο προϊόν αποικοδόμησης της πατουλίνης. Ειδικότερα, μια αφυδρογονάση βραχείας αλυσίδας προωθήθηκε σημαντικά από την πατουλίνη και στα επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA, υποδηλώνοντας τη σημασία της για να καταστεί δυνατή η βιοαποικοδόμηση της πατουλίνης από την *C.*

*guilliermondii*. Επιπρόσθετα, η *Meyerozyma guilliermondii* έδειξε ανταγωνιστική ικανότητα ενάντια στην ανάπτυξη του *Aspergillus flavus*, σε αποθηκευμένα φασόλια σόγιας. Επιπλέον, το θειολεϊκό οξύ, που παράγει η ζύμη *Meyerozyma guilliermondii* Ppf9 έδειξε σημαντική παρεμποδιστική δράση στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα *Magnaporthe oryzae* (Zhao et al. 2010).

Οι ζύμες μπορούν να παράγουν μεταβολίτες που έχουν σημαντική κατασταλτική επίδραση στην έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των μυκοτοξινών ή/και την αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων μυκήτων. Η κύρια πτητική ουσία που παράγεται από την *Pichia anomala*, η 2-φαινυλαιθανόλη (2-PE), ανέστειλε τη βλάστηση των σπορίων και τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης B1 (AFB1) που παράγει ο *A. flavus*. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα γονίδια βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης όπως το *aflC* (συνθετάση πολυκετιδίου, πρώιμο γονίδιο στην βιοσυνθετική οδό), το *aflR* (θετικός ρυθμιστής της βιοσυνθετικής οδού), το *aflS* (ενισχυτής μεταγραφής), το *aflO* (Ο-μεθυλοτρανσφεράση Β) και το *aflK* (συνθετάση βερικολορίνης Β) μειώθηκαν κατά περισσότερο από 10.000 φορές μετά από εφαρμογή με το 2-PE (Hua et al. 2014). Η μεταγραφική ανάλυση (transcriptional analysis) είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για να αποφασιστεί κατά πόσον η αναστολή της βιοσύνθεσης τοξινών είναι υπεύθυνη για τη μείωση των επιπέδων τοξινών. Για παράδειγμα, εκτός από την προσρόφηση των μυκοτοξινών, το *Debaryomyces hansenii* ήταν σε θέση και να αναστείλει τη βιοσύνθεση της ΟΤΑ του *Aspergillus westerdijkiae* στο επίπεδο της μεταγραφής (Gil-Serna et al. 2011). Επιπρόσθετα, ένα στέλεχος του *S. cerevisiae* που απομονώθηκε από κρασί βρέθηκε να μειώνει την ανάπτυξη των *A. carbonarius* και *A. ochraceus* καθώς και την παραγωγή ΟΤΑ μέσω καταστολής του βιοσυνθετικού γονιδίου *pks* (πολυκετιδική συνθάση) (Cubaiu et al. 2012).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα, διερευνήθηκε η επίδραση των 7 αποτελεσματικών απομονώσεων ζυμών στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *AflR* που αποτελεί θετικό ρυθμιστή στη βιοσυνθετική οδό των αφλατοξινών του *Aspergillus flavus*. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα στελέχη των ζυμών 12ΓΒ6, 19ΑΑ3 και Π, τα οποία ανήκουν στο είδος *Meyerozyma caribbica*, έδειξαν να προκαλούν σημαντική μείωση της έκφρασης του *AflR* 72 και 96 ώρες μετά τη μόλυνση και άρα θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αποτελεσματικότητά τους πιθανότατα οφείλεται στην επίδρασή τους στην έκφραση του *AflR*. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος της ζύμης X8 (*Aureobasidium pullulans*) προκαλεί σημαντική μείωση της έκφρασης του *AflR* σε σχέση με το μάρτυρα A.f.18.4 72 ώρες μετά τη μόλυνση, ενώ στις 96 ώρες μετά τη μόλυνση δεν υπήρξε κάποια σημαντική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα. Σύμφωνα με αυτό θα μπορούσε να διατυπωθεί ότι η αποτελεσματικότητα του X8 συνδέεται σε ένα βαθμό, πιθανώς όμως όχι αποκλειστικά, με την επίδρασή του στην έκφραση του *AflR*. Ωστόσο για τις υπόλοιπες ζύμες που ελέγχθηκαν (15ΓΤ9, Π38, X18), δε φάνηκε να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ της αποτελεσματικότητάς τους και της επίδρασής τους στην έκφραση του γονιδίου *AflR*, οπότε και θα μπορούσαν δρουν με ένα διαφορετικό τρόπο, χωρίς να εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αφλατοξινών, όπως με βιοαποικοδόμηση των τοξινών ή και απορρόφηση των αφλατοξινών από τα κυτταρικά τοιχώματά τους.

Η βιοαποικοδόμηση είναι ένα από τα πιο υποσχόμενα χαρακτηριστικά των ζυμών που εφαρμόζονται στη διαχείριση των μυκοτοξινών. Δυνατότητες αποικοδόμησης της DON έδειξαν στελέχη των *S. cerevisiae*, *Geotrichum fermentans*, *Kluyveromyces marxianus* και *Metschnikowia pulcherrima* τα οποία ελέγχθηκαν σε αλεύρι σίτου και σε σύνθετες ζωοτροφές μολυσμένες με μυκοτοξίνες (Repečkienė et al. 2013). Σε άλλες μελέτες, οι μαύρες ζύμες *Exophiala spinifera* και *Rhinoctadiella atrovirens* βρέθηκαν να αναπτύσσονται σε φουμονισίνη B1 (FB<sub>1</sub>) ως μοναδική πηγή άνθρακα και να παράγουν ένζυμα που μεταβολίζουν την FB<sub>1</sub> (Blackwell et al. 1999). Επιπλέον, η βιοαποικοδόμηση της ΟΤΑ από ζυμομύκητες έχει συνδεθεί με αρκετά στελέχη του *S. cerevisiae* (Angioni et al. 2007), καθώς και με μερικές ζύμες



διαφορετικών γενών, όπως *Hanseniaspora* (με ατελή μορφή *Kloeckera*), *Trichosporon*, *Rhodotorula* και *Cryptococcus spp.* (Angioni et al. 2007, Schatzmayr et al. 2003). Ζύμες των γενών *Trichosporon*, *Rhodotorula* και *Cryptococcus spp.* ήταν σε θέση να σπάσουν τον αμιδικό δεσμό του μορίου της ΟΤΑ και να απελευθερωθεί μη τοξική ωχρατοξίνη α (ΟΤα) (Schatzmayr et al. 2003). Το διμορφικό είδος *Trichosporon mycotoxinivorans* ονομάστηκε έτσι λόγω της αξιοσημείωτης ικανότητάς του να προκαλεί αποικοδόμηση της ΟΤΑ και της ζεαραλενόλης (ZEA) (Molnar et al. 2004). Η ΟΤΑ επίσης αποικοδομήθηκε με επιτυχία από τον διμορφικό μύκητα *Aureobasidium pullulans* σε χυμό σταφυλιών και κρασί, και πάλι μέσω της υδρόλυσης του αμιδικού δεσμού (De Felice et al. 2008). Ακόμη, ένα στέλεχος του ζυμομύκητα *Phaffia rhodozyma* που παράγει ασταξανθίνη ήταν επίσης ικανό να προκαλέσει αποικοδόμηση της ΟΤΑ κατά 90% και μετατροπή της σε ΟΤα. Η αποικοδόμηση της ΟΤΑ παρατηρήθηκε επίσης από τη ζύμη *Xanthophyllum dendrorhous* (Péteri et al. 2007). Αρκετά είδη ζυμών έχουν ήδη ερευνηθεί σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις τους με την πατουλίνη και τους μύκητες που την παράγουν. Μερικά στελέχη της *Pichia caribbica* παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και τη βλάστηση των σπορίων του *Penicillium expansum* μετά τη συγκομιδή, ενώ διασπών και την παραγόμενη πατουλίνη. *In vitro* πειράματα έδειξαν ότι η *P. caribbica* διασπά την πατουλίνη άμεσα (Cao et al. 2013). Αρκετά άλλα είδη ζυμών περιλαμβανομένων των *M. pulcherrima*, *P. ohmeri*, *Rhodosporidium kratochvilovae*, *S. cerevisiae* και *Sporobolomyces roseus* έχουν επίσης εξετασθεί για την ικανότητά τους να διασπών την πατουλίνη (Coelho et al. 2008, Castoria et al. 2011, Reddy et al. 2011, Ianiri et al. 2013). Επιπλέον, ένα στέλεχος της *R. kratochvilovae* (ζύμη που ανήκει στους βασιδιομύκητες) ήταν ικανό να μετατρέπει την πατουλίνη στο λιγότερο τοξικό δεσοξυπατουλινικό οξύ (DPA) (Castoria et al. 2011). Η ικανότητα της αποικοδόμησης της πατουλίνης ελέγχθηκε για στελέχη του *S. cerevisiae* απομονωμένα από μηλίτη, και παρατηρήθηκε ότι κάτω από συνθήκες ζύμωσης, η ζύμη αποικοδομούσε τη μυκοτοξίνη (Moss et al. 2002). Έχει βρεθεί επίσης πως ένα στέλεχος *P. ohmeri* και ένα στέλεχος του *S. cerevisiae* ήταν ικανά να αποτοξικοποιούν την πατουλίνη με μεγάλη αποτελεσματικότητα τόσο σε θρεπτικό υπόστρωμα όσο και σε χυμό μήλου σε ποσοστό μεγαλύτερο του 99% (Coelho et al. 2008). Από την άλλη, δύο στελέχη *M. pulcherrima* ελέγχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με πατουλίνη, και τα κύτταρα των ζυμών αποικοδόμησαν τη μυκοτοξίνη μέσα σε 48-72 ώρες, η πατουλίνη δεν απορροφήθηκε από τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών και δεν επηρέασε την ανάπτυξη της ζύμης (Reddy et al. 2011). Η ζύμη *T. mycotoxinivorans* βρέθηκε να αποτοξικοποιεί τη ZEA, καθώς ανοίγει το μακροκυκλικό δακτύλιο της ZEA στην ομάδα κετονών στη θέση C6' απελευθερώνοντας έτσι το μη-οιστρογονικό προϊόν ZOM-1 (Vekiru et al. 2010).

Τα κυτταρικά τοιχώματα αρκετών ζυμών επιτρέπουν στα κύτταρα να απορροφούν ένα μεγάλο εύρος ουσιών από το περιβάλλον. Ζωντανά κύτταρα, απενεργοποιημένα κύτταρα και προϊόντα με κυτταρικά τοιχώματα προβιοτικών ζυμών χαρακτηρίζονται από υψηλή απορροφητική ικανότητα και μειώνουν τη διαθεσιμότητα των τοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Τα είδη ζυμών ποικίλουν πολύ ως προς τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και την απορροφητική του ικανότητα. Οι β-D-γλυκάνες (Yiannikouris et al. 2006), οι γλυκομαννάνες (Raju et al. 2002) και μανναν-ολιγοσακχαρίτες συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων (Oguz et al. 2004) έδειξαν να είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση των μυκοτοξινών. Η αποικοδόμηση της τοξίνης μοιάζει να απαιτεί περισσότερο τη δομική ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων (Bueno et al. 2007) και τα μη ζωντανά κύτταρα (για παράδειγμα απενεργοποιημένα με θερμότητα ή οξύ) να είναι γενικά πιο αποτελεσματικά ως προς την απορροφητική ικανότητα (Nunez et al. 2008, Shetty et al. 2007). Η απομάκρυνση της τοξίνης έχει δείξει ότι είναι μια πολύ ταχεία διαδικασία και η δέσμευση φθάνει σε κορεσμό σχετικά γρήγορα (Shetty et al. 2007). Το ποσό της απομακρυσμένης τοξίνης εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση της τοξίνης αλλά και του μικροοργανισμού και από τη συνολική ποσότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων (Gonzalez Pereyra et al. 2014). Είναι

αξιοσημείωτο ότι προβιοτικά στελέχη του *S. cerevisiae* δεσμεύουν αποτελεσματικά την πιο καρκινογόνο αφλατοξίνη B1 (AFB1) (Pizzolitto et al. 2012, Pizzolitto et al. 2013, Bueno et al. 2007). Η εφαρμογή του *S. cerevisiae* είναι επίσης μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη μείωση της μόλυνσης με AFB1 κατά την αποθήκευση τροφίμων. Υπάρχουν παραδείγματα μείωσης έως και κατά 55%-74% της ανιχνεύσιμης περιεκτικότητας σε τοξίνες μετά από επτά ημέρες επώασης σε μια μελέτη που διεξήχθη με αποθηκευμένα φιστίκια υπό εργαστηριακές συνθήκες (Prado et al. 2011).

Η μείωση της αφλατοξίνης M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) σε γαλακτοκομικά προϊόντα είναι επίσης δυνατή με προσρόφηση σε πολυσακχαρίτες του *S. cerevisiae* (Corassin et al. 2013). Οι ικανότητες δέσμευσης αφλατοξίνης των ζυμομυκήτων και των προϊόντων ζυμομυκήτων έχουν συνοψιστεί εκτενώς κατά το παρελθόν (Oliveira et al. 2013). Τα στελέχη *S. cerevisiae* και *S. bayanus* απομονωμένα από οίνο έδειξαν επίσης ότι προσροφούν την OTA σε χυμό σταφυλιών και φρούτων και σε υγρή καλλιέργεια (Bejaoui et al. 2004, Bizaj et al. 2016, Cecchini et al. 2006, Moruno et al. 2005, Petruzzi et al. 2014, Piotrowska et al. 2013). Από το κρασί, έως και 70% της OTA αφαιρέθηκε με προσρόφηση από τη ζύμη και ένα σημαντικό ποσοστό της απομακρυνόμενης τοξίνης ανιχνεύθηκε σε καθιζήματα ζύμης (Cecchini et al. 2006). Αρκετά άλλα είδη ζυμομυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των *Candida spp.*, *Cryptococcus laurentii*, *Kloeckera spp.*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe* και *Torulasporea delbrueckii* (Cecchini et al. 2006, Var et al. 2009) έχουν επίσης δοκιμαστεί για την ικανότητά τους να απομακρύνουν την OTA, η οποία έγκειται σαφώς στο είδος και το στέλεχος. Επιπρόσθετα, τα προϊόντα κυτταρικού τοιχώματος ζυμομυκήτων ήταν επίσης αποτελεσματικά στην προσρόφηση ZEA (Pereyra et al. 2013). Η περιεκτικότητα σε β-D-γλυκάνη και η τρισδιάστατη διάταξή της στο κυτταρικό τοίχωμα ήταν ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρέασε την προσρόφηση ZEA (Yiannikouris et al. 2004).

Σύμφωνα με το πείραμα που έγινε για να ελεγχθεί η ευαισθησία των αποτελεσματικών απομονώσεων ζυμών στα χημικά σκευάσματα μυκητοκτόνων, που έχουν βρεθεί αποτελεσματικά για το ίδιο αφλατοξικογόνο στέλεχος, σχεδόν όλες οι ζύμες ήταν εξαιρετικά ευαίσθητες στα χημικά σκευάσματα, ακόμα και όταν εφαρμοζόταν μόνο το 50% της συνιστώμενης δόσης για το καθένα από αυτά. Εξαιρετική αποτέλεσαν δύο ζύμες, εκ των οποίων η μία παρατηρήθηκε να είναι μέτρια ευαίσθητη στο Octave<sup>®</sup> και στο Chorus<sup>®</sup>, ενώ η άλλη ήταν μέτρια ευαίσθητη μόνο στο Chorus<sup>®</sup>. Συνεπώς, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι όλες οι ζύμες που βρέθηκαν αποτελεσματικές σε αυτή τη μελέτη, θα μπορούσαν να ενταχθούν σε ένα πρόγραμμα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης που περιλαμβάνονται τα χημικά σκευάσματα Geoxe<sup>®</sup> (με δ.ο. fludioxonil), Scala<sup>®</sup> (με δ.ο. pyrimethanil), Fungazil<sup>®</sup> (με δ.ο. imazalil), Opera New<sup>®</sup> (με δ.ο. pyraclostrobin και prochloraz), αλλά δε θα πρέπει να εφαρμόζονται ταυτόχρονα ή σε μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ των εφαρμογών των σκευασμάτων και των ζυμών.

Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την επίδραση μυκητοκτόνων επί επιφυτικών ζυμών έγιναν κυρίως σε σταφύλια και χλοοτάπητες. Έχει αποδειχθεί ότι οι επεμβάσεις με μυκητοκτόνα σε σταφύλια (συμπεριλαμβανομένου του Switch<sup>®</sup> με δ.ο. fludioxonil και cyprodinil) είχαν ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της πυκνότητας της ζύμης (Comitini et al. 2008). Παρόμοιες έρευνες σε χλοοτάπητες έδειξαν ότι ανιχνεύθηκαν ίσες ή μειωμένες ποσότητες ζυμών στη φυλλόσφαιρα χλοοτάπητων, όπου είχε γίνει επέμβαση με μυκητοκτόνα, σε σχέση με το μάρτυρα όπου δεν είχε γίνει καμία επέμβαση (Buck et al. 2002). Αυτά τα αποτελέσματα βρίσκονται σε έντονη αντίθεση με αποτελέσματα άλλων μελετών (Čadež et al. 2010), που έδειξαν ότι βρέθηκαν μεγαλύτεροι πληθυσμοί ζυμών στα σταφύλια που είχε γίνει επέμβαση με μυκητοκτόνα (iprodione, pyrimethanil, cyprodinil μαζί με fludioxonil) από ότι στο μάρτυρα. Θεωρήθηκε ότι αυτό το φαινόμενο οφείλεται στο γεγονός ότι τα χημικά σκευάσματα, εκτός των δραστικών ουσιών περιέχουν και άλλες χημικές ουσίες ως πρόσθετα, οι οποίες αποτέλεσαν πηγή ενέργειας για τις ζύμες.



Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι ζύμες που είχαν απομονωθεί από φράουλες ήταν 10 φορές λιγότερο ευαίσθητες στα μυκητοκτόνα Signum (με δ.ο. boscalid και pyraclostrobin) και Switch® (με δ.ο. fludioxonil και cyprodinil) από ότι τα παθογόνα, τα οποία στοχεύουν τα μυκητοκτόνα αυτά, τον *B. cinerea* και το *C. acutatum* (Debode et al. 2013). Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι κάθε ζύμη που άνηκε σε διαφορετικό είδος παρουσίασε διαφορετική ευαισθησία για το Signum®, ενώ στο Switch® εμφάνισαν όλες σχεδόν την ίδια ευαισθησία. Συνοπτικά, είναι δύσκολο να συγκριθούν τα αποτελέσματα από διαφορετικές μελέτες, λόγω διαφορετικών ξενιστών, μεθόδων δειγματοληψίας, διαδικασιών που ακολουθήθηκαν και μέσων καλλιέργειας (Fonseca et al. 2006).

Συμπερασματικά, θα πρέπει να αναφερθεί πως οι ζύμες και η ζύμωσή τους αποτελούν διαχρονικά ένα πεδίο έρευνας που βρίσκει εφαρμογή στη φυτοπροστασία αλλά και σε ολόκληρο τον αγροδιατροφικό τομέα παραγωγής (Adebo et al. 2018). Ζύμες ποικίλων γενών και ειδών, συμπεριλαμβανομένης της ζύμης *Aureobasidium pullulans*, απομόνωση της οποίας βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη παρούσα ενότητα της μελέτης, έχουν αξιολογηθεί και χρησιμοποιηθεί ευρέως κατά φυτοπαθολόγων μυκήτων και μυκοτοξικογόνων μυκήτων (Dimakouroulou et al. 2008, Freimoser et al. 2019, Mwakinyali et al. 2019), με τα αποτελέσματα να είναι ιδιαίτερος θετικά ακόμα και σε συνθήκες αγρού έναντι των μύκητα *A. flavus* και των αφλατοξινών που παράγουν στην καλλιέργεια του αραβοσίτου (Lagogianni et al. 2019). Η βιολογική αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων αφορά τόσο προσυλλεκτικά στάδια (Dimakouroulou et al. 2008), όσο και μετασυλλεκτικά στάδια (Kasfi et al. 2018).

Η παρούσα μελέτη οδήγησε στην εύρεση αποτελεσματικών ενδημικών επιφυτικών ζυμών ενάντια του αφλατοξικογόνου μύκητα *Aspergillus flavus* και των αφλατοξινών που παράγει στα κελυφωτά φιστίκια. Οι αποτελεσματικές αυτές ζύμες έδειξαν αξιοσημείωτη ικανότητα παρεμπόδισης των παραγόμενων αφλατοξινών τόσο *in vitro* όσο και *in situ* σε καρπούς κελυφωτού φιστικιού. Η αποτελεσματικότητά τους επιβεβαιώθηκε σε πειράματα αγρού μικρής κλίμακας. Κατόπιν εξακρίβωσης του ακριβούς τρόπου δράσης των συγκεκριμένων ζυμών, αλλά και πειραμάτων για να διερευνηθεί εάν και κατά πόσο επηρεάζεται η ποιότητα των κελυφωτών φιστικιών στα οποία έχει γίνει επέμβαση, αυτές οι απομονώσεις ζυμών θα μπορούσαν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες διαχείρισης, σε ένα καταρτισμένο ολοκληρωμένο σύστημα αντιμετώπισης των αφλατοξινών στην καλλιέργεια.

### Παράρτημα Κεφαλαίου 3

**Πίνακας Π3.1:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών των αγρών 1 και 2 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης της κονιδιογένεσης από το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Η στατιστική ανάλυση έγινε και για τους δύο αγρούς και οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p<0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
1	1AA1	-11,16	f
	1BA3	42,85	kl
	1BA1	13,83	gh
	1BB5	44,82	kl
	1BΓ8	25	ghik
	1ΓΑ1	10,52	fgh
	1ΓΒ5	52,63	lm
	1ΓΒ6	27,45	hik
	1ΓΓ7	19,88	ghi
	<b>1ΓΓ8</b>	<b>73,85</b>	<b>m</b>
	ΚΥΨ2	4,37	fg
	ΚΥΨ5	-743,51	b
	ΚΥΨ8	-127,09	c
	ΚΥΨ13	-69,84	e
	ΚΥΨ15	-863,3	a
ΚΥΨ18	-101,03	d	
2	2AA1	50,86	l
	2AA2A	36,99	ikl
	2AA2B	24,85	ghik

**Πίνακας Π3.2:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 3 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p<0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
3	3AA1	-27,83	a
	3AA3	7,58	b
	3AB4	40,26	cd
	3AB5	56,87	f
	3AB6	29,91	c
	3AB9	45,53	de
	3ΑΓ7	45,08	de
	3ΑΓ9	53,12	ef

**Πίνακας Π3.3:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών των αγρών 4 και 5 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
4	4AA1	1,65	d
	4AA2	45,33	fg
	4AB4	32,04	ef
	4ΑΓ8	28,32	e
	4BA1	-173,19	b
	4BB5	46,77	g
	4BΓ4	35,26	efg
	4BΓ7	48,76	g
	4BΓ9	35,35	efg
4ΓΓ7	37,86	efg	
5	5BB11	-28,12	c
	5Λ2	-312,79	a
	5Λ12	-32,9	c
	5Λ13	41,88	efg

**Πίνακας Π3.4:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 6 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
6	6AB4	-58,16	b
	6ΑΓ7	28,75	ef
	6ΑΓ8	-531,94	a
	6ΑΓ9	7,6	d
	6BA1	32,36	f
	6BB4	16,02	def
	6BB5	12,71	de
	6BΓ7	15,6	def
	6BΓ8	-45,08	bc
	6BΓ9	57,86	g
	6ΓΑ1	-35,29	c
	6ΓΒ6	12,41	de
	6ΓΓ9	30,06	f
<b>6Λ9</b>	<b>60,25</b>	<b>g</b>	

**Πίνακας Π3.5:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 7 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
7	7AA2	<b>81,44</b>	<b>f</b>
	7AA3	57,85	e
	7AB5	54,91	de
	7ΑΓ8	38,03	b
	7BA1	49,01	cd
	7BB5	-22,22	a
	<b>7ΓΑ11</b>	<b>61,6</b>	<b>e</b>
	7ΓΓ9	41,04	bc

**Πίνακας Π3.6:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 8 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
8	8AA1	38,15	e
	8BA1	50,58	f
	8BA2	50	f
	8BA3	49,17	f
	8BB4	18,71	d
	8BB5	25,73	d
	8BB6	-18,71	b
	8ΒΓ7	-37,42	a
	8ΒΓ8	28,07	d
	8ΓΑ3B	1,1	c
	8ΓΒ6	20,87	d
	8ΓΓ8	42,77	ef

**Πίνακας Π3.7:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 9 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
9	9BA1	48,76	e
	9BA2	26,96	c
	9BA3	47,05	e
	9BB4	51,6	e
	9BB5	53,57	ef
	9BB6	59,19	f
	9BG7	-100	a
	9BG8	35,44	d
	9BG9	51,69	e
9GT9	15,38	b	

**Πίνακας Π3.8:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 10 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
10	<b>10AB4</b>	<b>64,32</b>	<b>g</b>
	10AG8	4,09	d
	10AG9	33,91	ef
	10BA1	-250,23	a
	10BA3	57,43	fg
	<b>10BA6</b>	<b>64,04</b>	<b>g</b>
	10BB4	28,51	e
	10BB6	44,28	efg
	10BG7	23,66	de
	10GA3	59,37	g
	10GB4	55,98	fg
	10GB5	-80,41	c
	10GT7	-124,74	b

**Πίνακας Π3.9:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 11 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
11	11AA1	-69,28	fg
	11AA2	-50,32	fgh
	<b>11AA3</b>	<b>73,29</b>	<b>o</b>
	11AB4	53,3	mno
	11AG9	14,37	kl
	11AG7	15,03	kl
	11AG8	-705,34	a
	11BA3	-74,56	ef
	11BB4	-5,33	ijk
	11BB6	-41,33	gh
	11BG8	23,75	klm
	11BG9	10,43	jkl
	11GA1	-734,1	a
	11GA2	-19,72	hij
	11GA3	-77,93	ef
	11GB4	-707,33	a
	11GB5	-106,3	e
	11GB6	33,98	lmn
	11GG8	-184,88	d
	11GG9	-306,97	b
	X2	-31,86	hi
	X5	13,18	kl
	X6	18,13	kl
	X8	-261,16	c
	X9	21,97	klm
	X11	20,32	kl
	X13	35,16	lmn
	X14	18,68	kl
	X15	19,23	kl
	<b>X18</b>	<b>64,78</b>	<b>no</b>
	X19	30,76	lm
	X20	8,79	jkl
X21	28,57	lm	
X32	13,73	kl	



**Πίνακας Π3.10:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 12 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
12	12AA3	53,57	fg
	12BA2	51,51	fg
	12BA3	50,89	fg
	<b>12BB4</b>	<b>67,41</b>	<b>g</b>
	12BB5	-32,11	e
	12BB6	-739,69	b
	<b>12BΓ7</b>	<b>61,33</b>	<b>fg</b>
	12BΓ8	52,5	fg
	12BΓ9	35	fg
	12ΓΑ1	28,26	f
	12ΓΑ2	28,75	f
	12ΓΒ5	-747,22	b
	12ΓΒ6	-341,44	d
	12ΓΓ4	-458,55	c
	12ΓΓ7	-858,71	a
	12ΓΓ8	-9,21	e
12ΓΓ9	-6,45	e	

**Πίνακας Π3.11:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 13 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
13	14AA1	-250	d
	14AA2	-629	a
	14AA3	-419,25	c
	14AB4	-237,5	d
	14ΑΓ7	-527,06	b
	14ΑΓ8	-406,87	c
	14ΑΓ9	-528,44	b
	14ΒΑ2	-99,3	e
	14ΒΒ4	54,33	f
	14ΒΓ7	15,46	f
	14ΒΓ8Β	8,67	f
	14ΒΓ9	18,23	f

**Πίνακας Π3.12:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 14 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
14	15AA1	24,86	efg
	15AA2	30,63	efgh
	15AA3	35,55	fgh
	15AB4	20	def
	15AB6	1,33	cd
	<b>15ΑΓ7</b>	<b>65,38</b>	<b>jk</b>
	15ΑΓ8	51,44	hijk
	15ΑΓ9	-4,88	c
	15ΑΓ10	35,83	fgh
	15BA1	43,35	ghi
	15BB7	43,2	ghi
	15BΓ8	20,44	def
	15BΓ9	9,94	cde
	<b>15ΓΑ1</b>	<b>69,46</b>	<b>k</b>
	<b>15ΓΑ2</b>	<b>63,22</b>	<b>ijk</b>
	15ΓΑ3	59,91	ijk
	<b>15ΓΒ3</b>	<b>65,7</b>	<b>jk</b>
	15ΓΒ6	33,05	fgh
	15ΓΓ7	-510,68	b
15ΓΓ8	45,86	hij	
15ΓΓ9	-554,65	a	

**Πίνακας Π3.13:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών των αγρών 15 και 16 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
15	16BA2	24,56	b
	16BB5	51,46	de
	16BΓ6	46,19	d
	16BΓ8	57,3	e
	16BΓ9	18,71	b
	16ΓΑ1	-43,58	a
	16ΓΒ4	38,88	c
16	17ΓΒ6	33,52	c

**Πίνακας Π3.14:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 17 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p<0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
17	18AA1	10,52	fg
	18AA2	-37,9	de
	18AA3	-766,97	b
	18AB4	-1,3	fg
	18AB5	-158,72	c
	18AB6	23,39	ghi
	18ΑΓ7	50,82	ij
	18ΑΓ8	-1.004,16	a
	18ΑΓ9	50,57	ij
	18BA1	-16,99	ef
	18BA2	10,52	fg
	18BA3	54,64	j
	18BB4	18,3	gh
	18BB5	-62,09	d
	18BB6	43,14	hij
	18ΒΓ7	16,33	gh
	18ΒΓ8	-784,79	b
18ΒΓ9	-3,66	fg	

**Πίνακας Π3.15:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 18 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p<0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
18	19AA1	-1260,36	b
	19AA2	-853,91	c
	19AA3	-1.447,09	a
	19AB4	52,94	e
	19AB5	56,69	e
	19AB6	35,26	e
	19ΑΓ7	53,57	e
	19ΑΓ8	48,92	e
	19ΑΓ9	53,57	e
	19BA2	50	e
	19BA3	45,29	e
	19BB4	-10,68	d
	19BB5	45,08	e
	19ΓΑ1	41,78	e

	19ΓΑ2	47,32	e
	19ΓΒ4	34,82	e
	19ΓΒ5	39,73	e
	19ΓΒ6	37,5	e
	19ΓΓ7	32,14	e

**Πίνακας Π3.16:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 19 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p<0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
19	20Β1	55,98	e
	20Β3	-95,41	b
	20Β5	51,78	e
	20Β8	14,22	d
	20Β17	55,17	e
	20ΒΓ8	47,39	e
	20ΒΓ9	-9,24	c
	20ΓΑ3	41,02	e
	20ΓΒ5	-487,02	a

**Πίνακας Π3.17:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 20 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p<0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
20	K6	-979,27	a
	<b>K7</b>	<b>81,72</b>	<b>f</b>
	K8	50	ef
	K9	59,13	ef
	<b>K13</b>	<b>74,46</b>	<b>ef</b>
	K14	43,01	e
	<b>K15</b>	<b>61,29</b>	<b>ef</b>
	K16	-728,82	c
	K17	-803,22	b
	K21	48,38	ef
	K22	-628,11	d
	<b>K23</b>	<b>74,46</b>	<b>ef</b>
	<b>K26</b>	<b>68,54</b>	<b>ef</b>
	K30	48,65	ef

**Πίνακας Π3.18:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 21 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
21	Π2	15,76	fghi
	Π3	-1.098,19	b
	Π5	36,93	ghiklmn
	Π6	50,38	hiklmn
	<b>Π7</b>	<b>78,82</b>	<b>n</b>
	Π8	55,85	iklmn
	Π10	32,69	ghikl
	Π11	-1.062,16	b
	Π12	35	ghiklm
	Π13	-844,7	d
	Π14	-0,9	fg
	Π16	31,53	ghikl
	Π17	-941,47	c
	Π18	-413,51	e
	Π19	9,9	fgh
	<b>Π21</b>	<b>72,52</b>	<b>lmn</b>
	Π22	21,92	fghik
	<b>Π23</b>	<b>64,41</b>	<b>klmn</b>
	Π24	45	hiklmn
	Π26	39,23	ghiklmn
	Π28	30,38	ghikl
<b>Π29</b>	<b>77,92</b>	<b>mn</b>	
<b>Π30</b>	<b>80,18</b>	<b>n</b>	
Π35	42,79	ghiklmn	
Π36	-21,15	f	
Π37	-964,51	c	
Π38	-1.602,7	a	
Π41	30,63	ghikl	

**Πίνακας Π3.19:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 22 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
22	I1	-1.066,66	a
	I2	32,58	cd
	I3	56,69	cd
	<b>I8</b>	<b>67,41</b>	<b>cd</b>
	<b>I9</b>	<b>60,08</b>	<b>cd</b>
	I10	23,48	c
	I11	-150,69	b
	I13	65,71	cd
	I18	69,37	d

**Πίνακας Π3.20:** Αξιολόγηση απομονώσεων ζυμών του αγρού 23 ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 σε ΥΜΑ. Παρουσιάζονται η παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα από τις ζύμες στις συγκαλλιέργειες και η στατιστική τους ανάλυση. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

Αγρός	Απομόνωση ζύμης	Παρεμπόδιση %	Στατιστική ανάλυση
23	<b>NYX3</b>	<b>64,19</b>	<b>c</b>
	NYX6	-449,61	b
	NYX7	-754,16	a
	<b>NYX9</b>	<b>78,24</b>	<b>c</b>
	<b>NYX10</b>	<b>71,91</b>	<b>c</b>



## **Κεφάλαιο 4: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *A. FLAVUS* ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΣΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΠΙΦΥΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ**

### **4.1. Περίληψη**

Οι μύκητες *Aspergillus section Flavi* ως σαπρόφυτα και παράσιτα, προσβάλλουν την καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών, όπως και πληθώρα άλλων προϊόντων, σε διάφορα στάδια της καλλιεργητικής διαδικασίας τόσο σε προσυλλεκτικό όσο και σε μετασυλλεκτικό επίπεδο, προκαλώντας τόσο άμεσα προβλήματα όπως η σήψη του καρπού όσο και έμμεσα όπως η παραγωγή αφλατοξινών. Οι αφλατοξίνες είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού του μύκητα με καρκινογόνο, μεταλλαξιογόνο και τερατογόνο δράση και προκαλούν χρόνια ή οξεία τοξικότητα στον άνθρωπο και τα θηλαστικά. Η αντιμετώπιση αυτών των μυκήτων καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη διότι προσαρμόζονται σε πληθώρα υποστρωμάτων και μικροκλιμάτων και είναι ευρέως διαδεδομένοι. Στη φύση υπάρχουν μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να μειώνουν την παραγωγή αφλατοξινών στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Έτσι, σε αρκετές χώρες του πλανήτη γίνεται προσπάθεια εύρεσης μεθόδων βιολογικής διαχείρισης με ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Σκοπός της παρούσας ερευνητικής ενότητας, ήταν η δημιουργία μιας συλλογής ενδημικών επιφυτικών βακτηρίων, με απώτερο στόχο την εύρεση κατάλληλων απομονώσεων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης του προβλήματος στα πλαίσια ενός ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης των αφλατοξινών. Αρχικά απομονώθηκαν 629 επιφυτικά ενδημικά στελέχη βακτηρίων σε τρυβλία με διάφορα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα, από καρπούς κελυφωτών φιστικιών από φιστικεώνες της Αίγινας, σε ποικίλα αναπτυξιακά στάδια της καλλιέργειας, τα έτη 2014 και 2015. Καμία από τις βακτηριακές απομονώσεις δεν κατάφερε να δημιουργήσει ζώνη παρεμπόδισης σε στερεό τεχνητό θρεπτικό σε συγκαλλιέργεια με ένα ενδημικό ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος *A. flavus*. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η ικανότητα 161 εκ των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών σε συγκαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και έγινε ανάλυση με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Στην υγρή συγκαλλιέργεια μύκητα και βακτηρίου, 79 απομονώσεις, έδειξαν να μειώνουν σημαντικά την παραγωγή αφλατοξινών. Στη συνέχεια, ακολούθησε πείραμα ανταγωνισμού σε σπόρους καλαμποκιού, όπου χρησιμοποιήθηκαν τα 75 πιο αποτελεσματικά βακτήρια ως βιολογικοί παράγοντες παρεμπόδισης των παραγόμενων αφλατοξινών από το ίδιο ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος *A. flavus*. Παρατηρήθηκε ότι ένα βακτήριο που με βάση τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης, αναγνωρίστηκε ως *Pantoea agglomerans*, μείωσε ολοκληρωτικά την παραγωγή αφλατοξινών ενώ άλλα 6 την παρεμπόδισαν σημαντικά. Τέλος, ακολούθησε διερεύνηση της ικανότητας της πιο αποτελεσματικής απομόνωσης, να μειώνει τις παραγόμενες αφλατοξίνες σε συνθήκες αγρού σε φιστικεώνες στην Αίγινα τα έτη 2017 και 2018. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με Elisa Test Kit. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την παρεμποδιστική ικανότητα της απομόνωσης με τα επίπεδα παρεμπόδισης να φθάνουν ως και το 100% του μάρτυρα.

## 4.2. Εισαγωγή

Τα βακτήρια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη διαχείριση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών που παράγουν μυκοτοξίνες, όπως και οι ζύμες και τα μη τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus* (Zhao et al. 2014). Ο τρόπος δράσης των βακτηρίων κατά των μυκοτοξικογόνων μυκήτων έχει επίσης διερευνηθεί. Οι πιο κοινοί τρόποι δράσης είναι ο υπερπαρασιτισμός, ο ανταγωνισμός, η παραγωγή αντιβιοτικών, η παραγωγή λυτικών ενζύμων και η επαγωγή τοπικής ή διασυστηματικής ανθεκτικότητας. Ορισμένα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* μπορούν να παράγουν γαλακτικό οξύ (lactic acid bacteria-LAB). Τα LAB είναι θετικά κατά Gram βακτήρια που παράγουν ουσίες όπως λιπαρά και οργανικά οξέα που παρουσιάζουν αντιμυκητιακές ιδιότητες κατά φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Gajbhiye et al. 2016). Καθώς η αποσαφήνιση του τρόπου δράσης των βιολογικών παραγόντων είναι σημαντική για την κατάρτιση στοχευμένων σύγχρονων συστημάτων διαχείρισης ασθενειών των καλλιεργειών, η έρευνα για τη διερεύνηση τέτοιων μηχανισμών συνεχώς αυξάνεται. Εμπορικά προϊόντα με δραστική ουσία βακτήρια των γενών *Agrobacterium*, *Bacillus* και *Pseudomonas* έχουν ήδη αξιολογηθεί και κατηγοριοποιηθεί ως προς τον τρόπο δράσης τους κατά φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Junaid et al. 2013). Επιπρόσθετα, LAB βακτήρια και ζύμες των γενών *Saccharomyces* και *Candida* έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης αφλατοξινών καθώς παρουσιάζουν ιδιότητες δέσμευσης των τοξινών (Guan et al. 2011).

Τα βακτήρια μπορούν να απομονωθούν είτε από το έδαφος της καλλιέργειας, είτε από τις ρίζες, είτε από το υπέργειο μέρος της καλλιέργειας όπως η φυλλόσφαιρα. Σε ιδανικές συνθήκες, τα βακτήρια που απομονώνονται και ελέγχονται ως προς την ικανότητα αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων, θα πρέπει να είναι αποτελεσματικά κατά πλήθους μικροοργανισμών. Τα βακτήρια που ελέγχουν την ανάπτυξη των μυκήτων και συγχρόνως άλλων εχθρών όπως οι νηματώδεις, φαίνεται να είναι πολύ σημαντικά εργαλεία στα πλαίσια ολιστικής φυτοπροστασίας. Η αποτελεσματικότητα σε αυτές τις περιπτώσεις, επηρεάζεται σημαντικά από τη μέθοδο απομόνωσης (Mota et al. 2017). Το έδαφος της ριζόσφαιρας φαίνεται να είναι ο επικρατέστερος βιότοπος για απομόνωση βακτηρίων με ικανότητα αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων. Επίσης, τα ενδοφυτικά βακτήρια, έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο μετασυλλεκτικών ασθενειών όπως η σήψη των κάστανων από τον μύκητα *Penicillium expansum* (Linling et al. 2015).

Βακτήρια έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη διαχείριση μυκοτοξικογόνων μυκήτων και των μυκοτοξινών που παράγουν. Απομονώσεις *Bacillus subtilis* έχουν εφαρμοστεί για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης μυκήτων *Aspergillus* section *Nigri* (*A. carbonarius* και *A. ochraceus*) και για την αποδόμηση της παραγόμενης ωχρατοξίνης Α. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, επετεύχθη παρεμπόδιση της ανάπτυξης και λύση των μυκηλιακών υφών. Ο *Bacillus subtilis* μπόρεσε επίσης να προσροφήσει και να αποδομήσει την ΟΤΑ (Shi et al. 2013). Παρόλα αυτά, δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν το ίδιο μόριο ευθύνεται και για τις δύο δράσεις. Εδαφογενή βακτήρια, που έχουν απομονωθεί, μπορούν επίσης να προκαλέσουν μείωση της παραγωγής αφλατοξινών (Shams-Ghahfarokhi et al. 2013, Gonzalez Pereyra et al. 2018, Palumbo et al. 2007). Επιπρόσθετα, επιστημονικές έρευνες έχουν υποδείξει ότι βακτήρια που σχετίζονται με τη ζύμωση των τροφίμων, έχουν επίσης την ικανότητα να δρουν κατά των αφλατοξικογόνων μυκήτων *A. parasiticus*, προκαλώντας έως και κατά 90% μείωση της ανάπτυξης του μύκητα και έως και κατά 70% μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών (Kim 2007).

Επίσης, σημαντική έρευνα έχει διεξαχθεί όσον αφορά στην απομόνωση και εφαρμογή λακτοβακίλλων του γένους *Lactobacillus* με σκοπό τη βιολογική διαχείριση των αφλατοξινών που μολύνουν καλλιέργειες και θηλαστικά (Khanafari et al. 2007, Darsanaki et al. 2014, Jebali et al. 2015). Καλλιέργειες από τις οποίες έχουν απομονωθεί βακτήρια, όχι μόνο προβιοτικά, είναι η φιστικιά (Farzaneh

et al. 2012, Farzaneh et al. 2016, Siahmoshteh et al. 2017), η αραχίδα (Anjaiah et al. 2006, Mickler et al. 1995), αλλά και η καρυδιά (Palumbo et al. 2006). Στελέχη του βακτηρίου *Bacillus subtilis* έχουν απομονωθεί κυρίως από δένδρως καλλιέργειες, και ορισμένες απομονώσεις παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά παρεμπόδισης έναντι της παραγωγής αφλατοξινών. Παρόλα αυτά, η ανάγκη εμπορευματοποίησης σκευασμάτων με βακτήρια, ώθησε στη διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων αγρού. Εφαρμογές αγρού με βακτήρια του γένους *Pseudomonas* οδήγησαν σε μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών έως και κατά 100%, θέτοντας μελλοντικές προσδοκίες για την βιολογική αντιμετώπιση των αφλατοξινών με τη χρήση βακτηρίων (Misaghi et al. 1995).

Ακόμη, η πρόοδος στις μοριακές τεχνικές, επέτρεψε τη διερεύνηση των συγκεκριμένων μηχανισμών πίσω από τον τρόπο δράσης και την αποτελεσματικότητα των βακτηριακών απομονώσεων. Μελέτες για την αλληλεπίδραση των βακτηρίων και των φυτών ξενιστών, υποδεικνύουν ότι η επαγόμενη διασυστηματική ανοχή (Induced Systemic Resistance-ISR) μπορεί να προκληθεί ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης (Choudhary et al. 2009). Με τη χρήση μοριακών τεχνικών κατέστη δυνατόν επίσης, να διερευνηθεί ο τρόπος δράσης ενδοφυτικών βακτηρίων όπως το *Serratia marcescens* και να προσδιοριστεί η αντι-αφλατοξικογόνος ικανότητά τους, η οποία βασίζεται κυρίως σε χιτινολυτικές ιδιότητες (Wang et al. 2013). Για τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών είναι απαραίτητη η μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (*aflR*). Με σύγχρονες μοριακές τεχνικές όπως η Real-time PCR, επιτράπη η διερεύνηση της έκφρασης του *aflR*, κατά τη συγκαλλιέργεια βακτηριακών απομονώσεων και τοξικογόνων στελεχών του μύκητα *A. flavus* (Jermnak et al. 2013, Al-Saad et al. 2016).

Στην αγορά των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, έχουν ήδη προωθηθεί σκευάσματα που περιέχουν βακτήρια ως δραστική ουσία, για την αντιμετώπιση ασθενειών των φυτών. Τέτοια παραδείγματα είναι το Serifel® που περιέχει το βακτήριο *Bacillus amyloliquefaciens* (BASF) και το Serenade Max® που περιέχει το βακτήριο *Bacillus subtilis* (BASF). Παρά την ευρεία έρευνα για την ικανότητα αντιμετώπισης των αφλατοξικογόνων μυκήτων και των αφλατοξινών που παράγουν, με τη χρήση βακτηρίων, δεν υπάρχει διαθέσιμο στην αγορά κάποιο προϊόν που να περιέχει βακτήριο για τη διαχείριση αυτών των μυκήτων. Παρατηρείται λοιπόν ένα πεδίο δράσης με χώρο για δημιουργία και τυποποίηση τέτοιων σκευασμάτων που θα εφαρμόζονται σε ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης αφλατοξινών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη μείωση χημικών εισροών στην παραγωγή τροφίμων και στην τροφική αλυσίδα, καθώς και να συνεισφέρει στην παραγωγή ασφαλών τροφίμων, απαλλαγμένων από αφλατοξίνες.

### 4.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας

Τα κελυφωτά φιστίκια όπως και πληθώρα άλλων τροφίμων και ζωοτροφών όπως έχει προαναφερθεί, μολύνονται από αφλατοξίνες που παράγονται κυρίως από το μύκητα *Aspergillus flavus*. Καθώς δεν υφίστανται πολλές αποτελεσματικές μέθοδοι αντιμετώπισης του προβλήματος, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η δημιουργία μιας συλλογής ενδημικών επιφυτικών βακτηρίων, με απώτερο στόχο την εύρεση κατάλληλων απομονώσεων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης του προβλήματος στο πλαίσιο ενός ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης.

Αναλυτικότερα οι στόχοι της ερευνητικής ενότητας είναι:

- Η δημιουργία μιας συλλογής ενδημικών επιφυτικών βακτηρίων από φιστικεώνες της νήσου Αίγινας, με στόχο τη χρησιμοποίησή τους ως βιολογικούς παράγοντες για την καταπολέμηση του προβλήματος των αφλατοξινών στα κελυφωτά φιστίκια.
- Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των προαναφερθέντων απομονώσεων *in vitro* ως προς την παρεμπόδιση ανάπτυξης της αποικίας του μυκοτοξικογόνου μύκητα *A. flavus* και των παραγόμενων αφλατοξινών.
- Αξιολόγηση των αποτελεσματικότερων βακτηριακών απομονώσεων σε σπόρους καλαμποκιού ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης στη παραγωγή αφλατοξινών.
- Ταυτοποίηση των πιο αποτελεσματικών, ως προς την παρεμπόδιση, βακτηρίων με τη χρήση μοριακών τεχνικών.
- Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της πιο αποτελεσματικής βακτηριακής απομόνωσης από τα *in vitro* και *in situ* πειράματα, στην ικανότητα παρεμπόδισης της παραγωγής αφλατοξινών σε συνθήκες αγρού, σε φιστικεώνες στην Αίγινα.

### 4.4. Μεθοδολογία

#### 4.4.1. Θρεπτικά υλικά

Για τους σκοπούς της παρούσας ερευνητικής ενότητας χρησιμοποιήθηκαν τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση και ανάπτυξη των βακτηριακών απομονώσεων, αλλά και τεχνητά υποστρώματα για την ανάπτυξη των στελεχών μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτά είναι τα εξής:

##### Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (P.D.A.)

Εκχύλισμα πατάτας	200 mL
Δεξτρόζη	20 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Άγαρ	20 g

##### B-523

Σουκρόζη (Duchefa Biochem)	10 g
Καζεΐνη (Fluka Biochemica)	8 g
Εκχύλισμα ζύμης (CondaLab)	4 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ )	2 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	3 g

Άγαρ	15 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL
pH	6,9

#### King's B

Πεπτόνη (CondaLab)	20 g
Γλυκερόλη	10 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ )	1,5 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	1,5 g
Άγαρ	20 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL
pH	7,2

#### NAG

Nutrient Broth (Chembiotin)	8 g
Γλυκερόλη	20 g
Άγαρ	20 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL

#### NG

Nutrient Broth (Chembiotin)	8 g
Γλυκερόλη	20 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL

#### Yeast Extract Sucrose Broth (YES)

Εκχύλισμα ζύμης (CondaLab)	10 g
Σουκρόζη (Duchefa Biochem)	200 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL
pH	6,5

#### Malt Extract Broth (MEB)

Εκχύλισμα βύνης (CondaLab)	37 g
Πεπτόνη (CondaLab)	3 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL

Η αποστείρωση των θρεπτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας έγινε υπό συνθήκες θερμοκρασίας 121 °C, σε κλίβανο αποστείρωσης, επί 15 λεπτά, για τα υποστρώματα που περιέχουν σάκχαρα, βιταμίνες, ενώ για αυτά που δεν περιέχουν αυτές τις ουσίες επί 20 λεπτά.



## 4.4.2. Μέθοδοι

### 4.4.2.1. Δημιουργία συλλογής ενδημικών επιφυτικών βακτηρίων

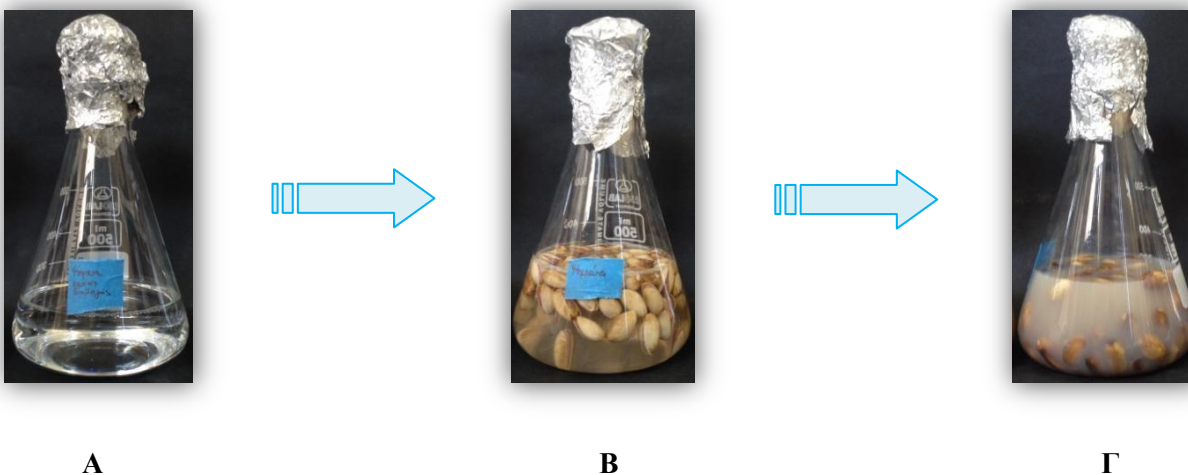
Η απομόνωση βακτηρίων από τους καρπούς φιστικιάς πραγματοποιήθηκε σε ποικίλα στάδια της καλλιεργητικής περιόδου έτσι ώστε να υπάρχει πληθυσμιακή διακύμανση. Αρχικά, απομονώθηκαν βακτήρια από κελυφωτά φιστίκια ύστερα από ευγενική προμήθεια φιστικιών από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό της Αίγινας. Τα συγκεκριμένα δείγματα συλλέχθηκαν κατά το Μάρτιο (2015) από φιστίκια που είχαν υποστεί επεξεργασία όπως τη διαδικασία ψησίματος και ήταν αλατισμένα, από φιστίκια που είχαν υποστεί την διαδικασία ψησίματος και ήταν ανάλατα και από φιστίκια που ήταν άψητα. Επίσης, ακολούθησε δειγματοληψία από φιστικεώνες της Αίγινας κατά τους μήνες Ιούνιο και Αύγουστο του 2014 και 2015 και στη συνέχεια έγινε απομόνωση των βακτηρίων από τους καρπούς, στο εργαστήριο. Η δειγματοληψία από τους φιστικεώνες έγινε συλλέγοντας αντιπροσωπευτικό αριθμό καρπών από πολλά και διαφορετικά σημεία στον εκάστοτε αγρό. Στην Εικόνα 4.1 φαίνεται η τοποθεσία του κάθε φιστικεώνα από όπου πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία.



Εικόνα 4.1: Αγροί από όπου έγινε συλλογή βακτηριακών απομονώσεων στην Αίγινα.

Η διαδικασία της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη των 500 mL που περιείχε 200 mL δις απιονισμένο νερό και 0,05% επιφανειοδραστικό παράγοντα Tween 80®, αφού τοποθετήθηκαν 100 γραμμάρια κελυφωτά φιστίκια και ακολούθησε ανάδευση για 30 λεπτά σε επωαστικό θάλαμο που επικρατούσαν συνθήκες θερμοκρασίας 27 °C και ταχύτητα ανάδευσης 180 RPM. (Εικ. 4.2).





**Εικόνα 4.2:** **A:** Κωνική φιάλη με νερό και Tween80®, **B:** Κωνική φιάλη με νερό, Tween80® και 100 g κελυφωτά φιστίκια, και **Γ:** Κωνική φιάλη με νερό, Tween80® και 100 g κελυφωτά φιστίκια έπειτα από μισή ώρα ανακίνηση.

Στη συνέχεια, ακολουθούσε γραμμική διασπορά 100  $\mu\text{L}$  από το πυκνό αιώρημα σε τρυβλία α) με θρεπτικό υπόστρωμα King's B (εκλεκτικό υλικό για την απομόνωση των φθοριζουσών ψευδομονάδων), β) με θρεπτικό υπόστρωμα B-523 για βακτήρια κυρίως του γένους *Bacillus* sp. και γ) με θρεπτικό υπόστρωμα NAG. Σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν έγινε εμπλουτισμός με κυκλοεξαμίδη, σε συγκέντρωση 250 mg/L προς αποφυγή επιμολύνσεων από μύκητες. Μετά από 24-48 ώρες στα τρυβλία είχαν αναπτυχθεί αποικίες βακτηρίων (Εικ. 4.3). Από αυτές τις αποικίες επελέγησαν τυχαία ορισμένες διαφορετικού χρώματος και μορφολογίας. Ακολουθούσε γραμμική διασπορά (streaking) στο αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύχθηκαν με τα προαναφερθέντα αντιβιοτικά και εκ νέου επώαση. Μετά από διάστημα μιας ημέρας ακολουθούσε δεύτερη γραμμική διασπορά προκειμένου το κάθε βακτήριο να ληφθεί σε καθαρή καλλιέργεια (Εικ. 4.4).



**Εικόνα 4.3:** Τρυβλίο με 100 $\mu\text{L}$  πυκνού αιωρήματος βακτηρίων έπειτα από 24 ώρες επώαση.

Διαδικασία  
γραμμικής  
διασποράς



**Εικόνα 4.4:** Τρυβλίο με καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η διαδικασία της αποθήκευσης με σκοπό τη διατήρηση των συγκεκριμένων βακτηριακών απομονώσεων για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αναλυτικότερα, σε

αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (1,5 mL) που περιείχαν αποστειρωμένο διάλυμα 60% γλυκερόλης (60 γλυκερόλη:40 νερό) προστέθηκε καθαρή καλλιέργεια βακτηρίων κατευθείαν από τα τρυβλία, με την βοήθεια αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου υπό ασηπτικές συνθήκες. Ακολούθησε καλή ανάδευση των σωληναρίων Eppendorf, εμφύσηση σε υγρό άζωτο για άμεση ψύξη των απομονώσεων και τοποθέτησή τους σε βαθιά κατάψυξη -80°C για διατήρηση.

#### **4.4.2.2. Επιλογή ανταγωνιστικού στελέχους *Aspergillus flavus* και βιολογικού υποστρώματος**

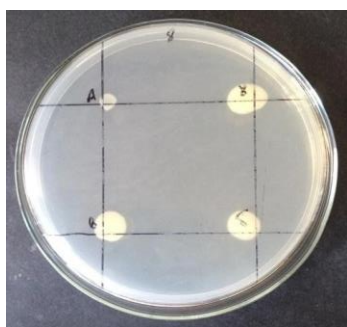
Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ένα άγριο ενδημικό στέλεχος του μυκοτοξικογόνου μύκητα *A. flavus*. Η ονομασία του είναι A.f.18.4 και είναι ελληνική απομόνωση από φιστικέωνα από την περιοχή της Αίγινας. Έχει χρησιμοποιεί και σε άλλες ερευνητικές ενότητες της παρούσας μελέτης. Αξίζει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο στέλεχος του μύκητα είναι εξαιρετικά αφλατοξικογόνο βάσει διερεύνησης μυκοτοξικογόνου ικανότητας με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας στα πειράματα, ένα ενδημικό μη τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα *Aspergillus flavus* που ονομάζεται A.f.17.2, επίσης απομονωμένο στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης από φιστικέωνα στην Αίγινα. Τα στελέχη αυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό PDA για 6 ημέρες στους 28°C. Επιπλέον, στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε σπόρους καλαμποκιού έγινε σε ελληνικό υβρίδιο καλαμποκιού και συγκεκριμένα το υβρίδιο N9, το οποίο προμηθεύτηκε το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας από την εταιρεία «Σπύρου».

#### **4.4.2.3. Διερεύνηση της *in vitro* επίδρασης βακτηριακών απομονώσεων στην ανάπτυξη και παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus***

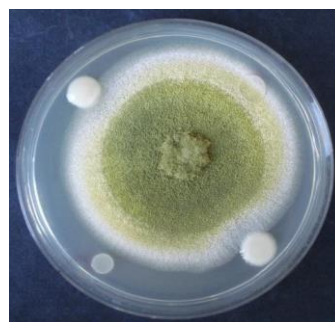
Η αξιολόγηση των βακτηρίων που απομονώθηκαν έγινε αρχικά με έλεγχο δημιουργίας ζώνης παρεμπόδισης. Ακολούθησε πείραμα σε υγρή συγκαλλιέργεια μύκητα και βακτηρίου για την εύρεση αποτελεσματικών στελεχών ως προς τη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών. Τέλος, τα αποτελεσματικά βακτήρια που προέκυψαν από το προηγούμενο πείραμα εφαρμόστηκαν ως βιολογικοί παράγοντες σε σπόρους καλαμποκιού μαζί με αιώρημα του αφλατοξικογόνου μύκητα με σκοπό την εύρεση ικανών απομονώσεων που παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών.

##### **4.4.2.3.1. Διερεύνηση ικανότητας δημιουργίας ζώνης παρεμπόδισης**

Σε τρυβλία με τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα NAG τοποθετήθηκαν σε 4 σημεία με σημειακή μόλυνση με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας 4 βακτηριακές απομονώσεις ανά τρυβλίο (Εικ. 4.5). Μετά από 48 ώρες τοποθετήθηκε στο κέντρο του τρυβλίου αιώρημα του στελέχους του μύκητα A.f.18.4 σε ποσότητα 10  $\mu$ L και συγκέντρωση 10<sup>6</sup> κονίδια/mL, που είχε προηγουμένως καλλιεργηθεί σε PDA. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 28 °C και ελεγχόμενης φωτοπεριόδου 12 ωρών, και έπειτα από πέντε ημέρες επώασης, ελέγχθηκαν για τυχόν ύπαρξη ζώνης παρεμπόδισης (Εικ 4.6). Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκαν όλα τα βακτήρια της συλλογής για έλεγχο ύπαρξης ζώνης παρεμπόδισης.



**Εικόνα 4.5:** Τρυβλίο με καθαρή καλλιέργεια 4 βακτηρίων μετά από 48 ώρες επώαση.



**Εικόνα 4.6:** Τρυβλίο με 4 καλλιέργειες βακτηρίου και μία του μύκητα, 5 ημέρες μετά την τοποθέτηση του αιωρήματος.

#### 4.4.2.3.2. Διερεύνηση της *in vitro* επίδρασης των βακτηριακών απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus*

Από τη συλλογή των επιφυτικών ενδημικών βακτηρίων επιλέχθηκαν τυχαία 161 βακτήρια από όλους τους αγρούς που πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία, για αξιολόγηση σε περαιτέρω πειράματα συγκαλλιέργειας. Τα βήματα της διαδικασίας παρουσιάζονται παρακάτω.

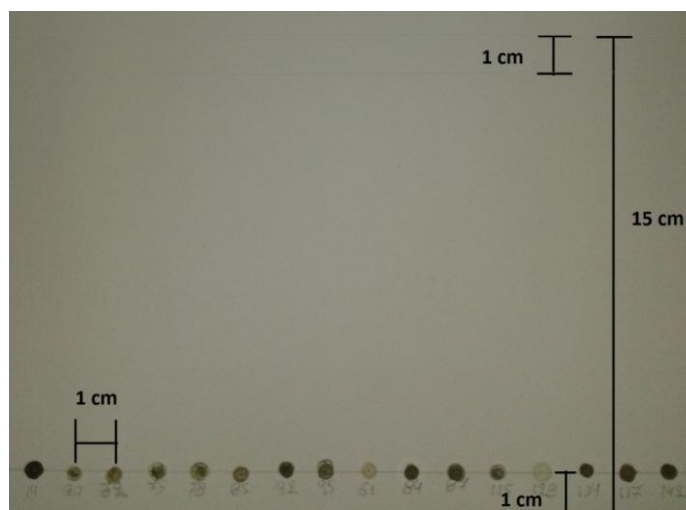
Αρχικά, από τα σωληνάρια Eppendorf όπου διατηρούνταν τα βακτήρια στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , λήφθηκε βακτηριακό αιώρημα με αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο και μεταφέρθηκε σε σωληνάρια τύπου Falcon (όγκου 15 mL) που περιείχαν 3 mL υγρό θρεπτικό υλικό NG. Ακολούθησε, τοποθέτηση των σωληναρίων Falcon σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση σε θερμοκρασία  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  για περίπου 6-7 ώρες μέχρι ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων ανά mL του εκάστοτε βακτηρίου να φτάσει περίπου  $10^8\text{ cfu/mL}$ . Η μέτρηση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε με UV-VIS φασματοφωτόμετρο στα 660 nm. Όταν η οπτική πυκνότητα (Optical Density) ήταν 0,2 τότε η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων/mL ήταν περίπου  $10^8\text{ cfu/mL}$ , όπως υπολογίστηκε σύμφωνα με την αντίστοιχη καμπύλη. Στη συνέχεια, έγινε προετοιμασία του αιωρήματος κονιδίων των μυκήτων (τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 και μη τοξικογόνο στέλεχος A.f.17.2) με συγκέντρωση  $10^6\text{ κονίδια/mL}$ . Τα στελέχη αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό PDA για 6 ημέρες στους  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  και ακολουθούσε η συλλογή των κονιδίων. Ακολούθησε προετοιμασία αποστειρωμένων γυάλινων κωνικών φιαλών όγκου 50 mL που περιείχαν υγρό θρεπτικό υλικό Malt Extract Broth και 10% Yeast Extract Sucrose Broth (25 mL συνολικά).

Εφόσον η συγκέντρωση του μύκητα ήταν  $10^6\text{ κονίδια/mL}$ , και του βακτηρίου  $10^6\text{ βακτηριακά κύτταρα/mL}$  αντίστοιχα, ύστερα από τις κατάλληλες αραιώσεις, έγινε τοποθέτηση ποσότητας 100  $\mu\text{L}$ , με τη χρήση πιπέτας, από το κάθε αιώρημα στις κωνικές φιάλες. Σε μία κωνική φιάλη τοποθετήθηκε μόνο το θρεπτικό υλικό και σε άλλη μία ένα μη τοξικογόνο στέλεχος του *A. flavus* (στέλεχος A.f.17.2) έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το τοξικογόνο στέλεχος του *Aspergillus flavus* A.f.18.4. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο, όπου και παρέμειναν για 15 ημέρες, σε συνθήκες  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  και ανάδευσης στις 180 RPM.

Μετά το πέρας των 15 ημερών, ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία για τη διερεύνηση της μείωσης της παραγόμενων αφλατοξινών. Αρχικά, έγινε τοποθέτηση του περιεχομένου των κωνικών φιαλών σε σωληνάρια τύπου Falcon όγκου 50 mL. Ακολούθησε τοποθέτηση 5 mL χλωροφορμίου και ανάδευση για 10 λεπτά. Ακολούθησε, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά και τοποθέτηση της υποκείμενης φάσης σε νέο σωληνάριο τύπου Falcon. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε 2 φορές για τον καθαρισμό της υγρής φάσης και τη λήψη του οργανικού διαλύτη. Στη συνέχεια τα σωληνάρια τύπου Falcon αφέθηκαν σε απαγωγό εστία

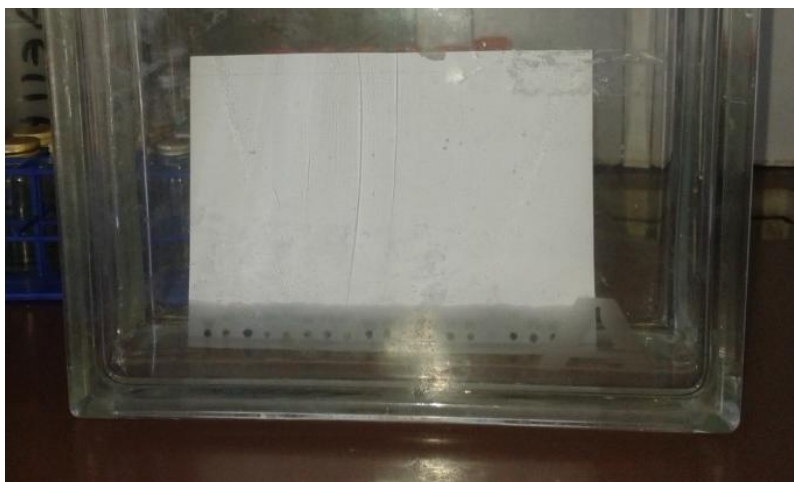
μέχρι να εξατμιστεί το χλωροφόρμιο. Έγινε ανάλυση των μεταβολιτών της συγκαλλιέργειας με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

Η χρωματογραφία διεξήχθη ως εξής. Αρχικά έγινε προετοιμασία των πλακών TLC. Στην πλάκα TLC, ορίστηκαν οι θέσεις έγχυσης των ποσοτήτων του κάθε δείγματος όπως και οι αποστάσεις (Εικ 4.7).



**Εικόνα 4.7:** Καθορισμός αποστάσεων σε πλάκα TLC

Αφού είχε εξατμιστεί ο οργανικός διαλύτης σε όλα τα σωληνάρια τύπου Falcon, σε κάθε σωληνάριο προστέθηκε ποσότητα 500  $\mu\text{L}$  χλωροφορμίου και ανακινήθηκαν καλά με τη χρήση συσκευής vortex. Στη θέση της πλάκας που ορίστηκε ότι αντιστοιχεί το κάθε δείγμα, τοποθετήθηκαν 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος από τα αντίστοιχα σωληνάρια τύπου Falcon. Έπειτα, η πλάκα TLC τοποθετήθηκε μέσα σε γυάλινο δοχείο χρωματογραφίας, το οποίο περιείχε 96 mL διαιθυλαιθέρα, 3 mL μεθανόλη και 1 mL αποστειρωμένο νερό και για μία ώρα περίπου πραγματοποιήθηκε η χρωματογράφιση του μείγματος των οργανικών διαλυτών στην πλάκα TLC (Εικ. 4.8). Τέλος, η πλάκα TLC μετά την πλήρη ανάπτυξή της αφαιρέθηκε από το δοχείο χρωματογραφίας και αφέθηκε για 5 λεπτά στην απαγωγό εστία προκειμένου να εξατμιστούν οι διαλύτες. Σε συνθήκες σκότους και με τη χρήση λάμπας UV, έγινε η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της χρωματογραφίας.



**Εικόνα 4.8:** Φωτογραφία κατά τη διαδικασία χρωματογράφησης των δειγμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

#### **4.4.2.4. Διερεύνηση της *in situ* επίδρασης των βακτηριακών απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus***

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια που βρέθηκαν να είναι αποτελεσματικά στη μείωση των αφλατοξινών από το προηγούμενο πείραμα, ως βιολογικοί παράγοντες με στόχο τη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών σε σπόρους καλαμποκιού. Οι σπόροι καλαμποκιού χρησιμοποιούνται ευρέως σε τέτοια πειράματα γιατί είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στη μόλυνση από τον *A. flavus* αλλά και στην παραγωγή αφλατοξινών καθώς και στην ανίχνευση των μυκοτοξινών με χρήση TLC. Κελυφωτά φιστίκια δεν ήταν δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σε αυτά τα πειράματα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των καρπών σε λιπαρά οξέα, τα οποία παρεμποδίζουν σημαντικά την ανάπτυξη εκχυλισμάτων τους σε TLC. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται ακολούθως.

Αρχικά, έγινε προετοιμασία των βακτηρίων. Από τα σωληνάρια Eppendorf που διατηρούνταν οι βακτηριακές απομονώσεις στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ελήφθη αποικία με αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο υπό ασηπτικές συνθήκες και μεταφέρθηκε σε σωληνάρια τύπου Falcon των 15 mL που περιείχαν 3 mL υγρό θρεπτικό υλικό NG. Ακολούθησε τοποθέτηση των σωληναρίων Falcon σε επωαστικό θάλαμο ανάδευσης με θερμοκρασία  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  για περίπου 5 ώρες μέχρι ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων/mL του εκάστοτε βακτηρίου να φτάσει  $10^6$  cfu/mL.

Στη συνέχεια, έγινε προετοιμασία των μυκήτων για την παρούσα ερευνητική ενότητα. Για την δημιουργία του μολύσματος των μυκήτων έγινε προετοιμασία του αιωρήματος των κονιδίων των μυκήτων (τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 και μη τοξικογόνο στέλεχος A.f.17.2) σε συγκέντρωση  $10^6$  κονίδια/mL, ύστερα από τις κατάλληλες αραιώσεις. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό PDA για 6 ημέρες στους  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Για τη μόλυνση σπόρων καλαμποκιού αρχικά έγινε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων καλαμποκιού με εμβάπτιση σε 10% διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη εμπορίου) για 10 λεπτά, ακολούθησε έκπλυση με αποστειρωμένο νερό, και εμβάπτιση σε διάλυμα 70% αιθανόλης για 3 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έκπλυση με αποστειρωμένο νερό. Όταν τα βακτήρια έφτασαν στην επιθυμητή



συγκέντρωση  $10^6$  cfu/mL, δημιουργήθηκε αιώρημα που περιείχε 30 mL νερό με 0,05% Tween80® και 100  $\mu$ L από το πυκνό αιώρημα βακτηρίων και χρησιμοποιήθηκε για να επενδύσει τους σπόρους καλαμποκιού. Ύστερα, οι σπόροι χωρίστηκαν σε τριαντάδες μέσα σε σωληνάρια τύπου Falcon που περιείχαν το παραπάνω αιώρημα και αφέθηκαν για μισή ώρα σε ανάδευση (200 RPM). Με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας οι σπόροι καλαμποκιού, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία, που περιείχαν διπλή στρώση διηθητικού χαρτιού που είχε αποστειρωθεί προηγουμένως και δοχείο με 2 mL αποστειρωμένου νερού για εξασφάλιση περίπου 100% σχετικής υγρασίας. Επιπλέον, προστέθηκε 1 mL αποστειρωμένου νερού στην επιφάνεια του χαρτιού. Οι σπόροι που επιλέχθηκαν ήταν όμοιοι σε βάρος και σχήμα (Εικ. 4.9).

Μετά το πέρας 24 ωρών, ακολούθησε μόλυνση με τα στελέχη του μύκητα που προαναφέρθηκαν. Για κάθε στέλεχος, δημιουργήθηκε αιώρημα κονιδίων  $10^6$  κονίδια ανά mL και στην συνέχεια κάθε σπόρος καλαμποκιού μολύνθηκε με ποσότητα 10  $\mu$ L με το τοξικογόνο στέλεχος και αντιστοίχως με το μη-τοξικογόνο στέλεχος. Μετά από διάστημα 15 ημερών και αφού τα τρυβλία επώαστηκαν στους 28° C και σε συνθήκες σκότους, οι σπόροι από τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια τύπου Falcon. Στη συνέχεια, έγινε κονιορτοποίηση των σπόρων καλαμποκιού σε μπλέντερ και 3 g καρπού τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια τύπου Falcon (50 mL). Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 5mL 0,01% Tween80® και ακολούθησε ανάδευση για 1 λεπτό. Ακολούθησε προσθήκη 5 mL ακετόνης και ανάδευση για 10 λεπτά στις 150 RPM. Στη συνέχεια προσθήκη 5 mL χλωροφορμίου, ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 150 RPM, σε φυγόκεντρο τύπου Sorval και τέλος ακολούθησε παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Κατόπιν, έγινε διήθηση περνώντας τα δείγματα από διηθητικό χαρτί χρησιμοποιώντας γυάλινες αποστειρωμένες χοάνες και συλλέγοντας το διήθημα σε καινούρια σωληνάρια τύπου Falcon. Ακολούθησε ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα σε συσκευή vortex και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3.000 RPM. Τέλος, έγινε συλλογή της υποκείμενης φάσης σε σωληνάρια τύπου Falcon και παραμονή τους σε απαγωγό εστία για 2-3 ημέρες μέχρι να εξατμιστούν πλήρως για να ακολουθήσει χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

Η διαδικασία χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας που ακολούθησε είχε ως εξής. Αρχικά έγινε τοποθέτηση 50  $\mu$ L μεθανόλης στα σωληνάρια τύπου Falcon και καλή ανάδευση. Στη θέση του TLC plate που αντιστοιχεί το κάθε δείγμα, γινόταν τοποθέτηση 10  $\mu$ L διαλύματος από τα αντίστοιχα σωληνάρια τύπου Falcon. Ακολούθησε τοποθέτηση των πλακών TLC στο γυάλινο δοχείο χρωματογραφίας, το οποίο περιείχε μείγμα αποτελούμενο 96 mL διαιθυλαιθέρα, 3 mL μεθανόλη και 1 mL αποστειρωμένο νερό. Μετά από μία ώρα ανάπτυξης περίπου, η πλάκα TLC αφαιρέθηκε από το γυάλινο δοχείο χρωματογραφίας. Τέλος, σε συνθήκες σκότους και με τη χρήση λάμπας UV, έγινε παρατήρηση της πλάκας TLC.



**Εικόνα 4.9:** Σπόροι καλαμποκιού μολυσμένοι με αιώρημα κονιδίων του μύκητα *A. flavus* σε τρυβλία.

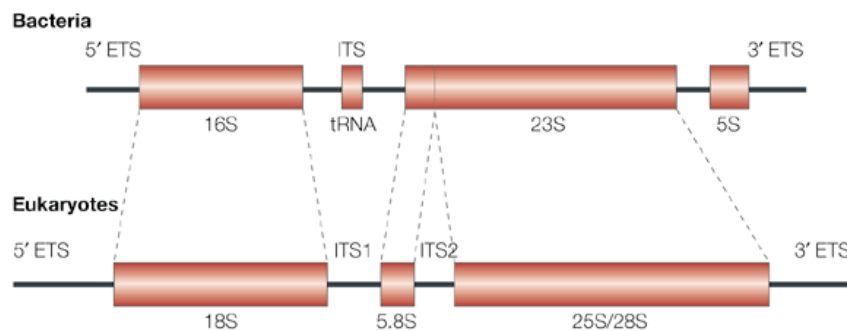


#### 4.4.2.5. Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων

Η μορφολογική ταυτοποίηση των βακτηρίων μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους. Αρχικά, μπορεί να γίνει μελετώντας τα μορφολογικά χαρακτηριστικά έπειτα από χρώση Gram ή τα χαρακτηριστικά καλλιέργειας τους, όπως για παράδειγμα την ανάπτυξη τους σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και τη μορφολογία των αποικιών. Επίσης, μπορούν να διερευνηθούν οι μεταβολικές ιδιότητες των βακτηρίων όπως η διάσπαση των υποστρωμάτων, η παραγωγή ενζύμων κ.ά. ή μέσω ελέγχου διαφόρων αντιγονικών παραγόντων. Ωστόσο, η πιο αξιόπιστη μέθοδος που χρησιμοποιείται πλέον, είναι η ανίχνευση χαρακτηριστικών αλληλουχιών στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών με μοριακές τεχνικές, ή και ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος. Αναλυτικότερα, οι ταξινομικές διακρίσεις μεταξύ των βακτηρίων πραγματοποιούνται συνήθως με ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του 16S ριβοσωμικού RNA.

##### 4.4.2.5.1. Η σημασία της διάκενης περιοχής του DNA μεταξύ των 16S και 23S rRNA

Στην πολύπλοκη διαδικασία της πρωτεϊνσύνθεσης, κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν τα ριβοσώματα τα οποία συντονίζουν τη δράση του μεταφορικού RNA (tRNA), του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) και των πρωτεϊνών. Το ριβόσωμα των προκαρυωτικών οργανισμών είναι ένα σωματίο ριβονουκλεοπρωτεϊνης με συντελεστή καταβύθισης 70S. Με την σειρά του το σωματίο αυτό διαχωρίζεται σε μια μεγάλη υπομονάδα 50S και σε μια μικρή υπομονάδα 30S. Η υπομονάδα 30S περιέχει ένα μόριο 16S ριβοσωμικού RNA και 21 διαφορετικές πρωτεΐνες. Η υπομονάδα 50S περιέχει δύο μόρια RNA, ένα 23S και ένα 5S και 34 διαφορετικές πρωτεΐνες. Τα μόρια 5S, 16S, 23S παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των ριβοσωμάτων αφού ουσιαστικά καθορίζουν τη δομή τους. Επιπλέον, τα rRNA γονίδια είναι άκρως απαραίτητα για την επιβίωση όλων των οργανισμών και είναι πολύ συντηρημένα στους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Κατά συνέπεια, μέσω των 16S μπορεί πλέον να προσδιοριστεί το είδος, το γένος όπως επίσης η οικογένεια ενός βακτηρίου. Πλέον υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες όσον αφορά τον προσδιορισμό των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της ενδοριβοσωμικής περιοχής ανάμεσα στα 16S και 23S και έχει παρατηρηθεί σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών στο μέγεθος αλλά και στην ακολουθία βάσεων της συγκεκριμένης περιοχής. Ωστόσο, για να διαφοροποιηθεί η συγκεκριμένη ενδοριβοσωμική περιοχή απαιτείται να γίνει η ενίσχυση των αντιγράφων της με PCR, διαδικασία που εξαρτάται από τις υψηλά συντηρημένες περιοχές στον παράπλευρο τερματισμό του 16S και 23R rRNA γονιδίου (Εικ. 4.10). Οι διάκενες αυτές περιοχές (spacer regions) παρουσιάζουν υψηλό βαθμό διαφοροποίησης τόσο στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία όσο και στο μέγεθος αυτών, μεταξύ των ειδών και γενών. Για τον σκοπό αυτό, υπάρχουν "καθολικοί" εκκινητές (universal primers) οι οποίοι, μέσω της PCR, ενισχύουν τη διάκενη περιοχή μεταξύ των 16S και 23S rRNA γονιδίων.



**Εικόνα 4.10:** Η συντηρημένη δομή των rRNA

([http://www.nature.com/nrm/journal/v2/n7/fig\\_tab/nrm0701\\_514a\\_F2.html](http://www.nature.com/nrm/journal/v2/n7/fig_tab/nrm0701_514a_F2.html)).

#### 4.4.2.5.2. Εξαγωγή DNA από τις βακτηριακές απομονώσεις

Για την προετοιμασία βακτηριακών απομονώσεων για την εξαγωγή DNA έγινε ενεργοποίηση των βακτηρίων που φυλάσσονταν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα NAG. Ακολούθησε ανάπτυξη των βακτηρίων για 24 ώρες στους  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια λήψη μονής αποικίας και μεταφορά της σε σωληνάριο τύπου Falcon (15 mL) που περιείχαν 3 mL υγρό θρεπτικό υλικό NG. Ύστερα, έγινε τοποθέτηση των σωληναρίων τύπου Falcon σε αναδευτήρα με σταθερή θερμοκρασία  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες.

Για την απομόνωση του DNA, σε σωληνάριο Eppendorf προστέθηκε 1,5 mL από την υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου που επωαζόταν 24 ώρες στους  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά, αφαίρεση του υπερκείμενου και συλλογή του σχηματιζόμενου βακτηριακού ιζήματος (pellet). Στη συνέχεια έγινε επαναιωρηματοποίηση του pellet σε 300  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένο νερό. Ακολούθησε βράσιμο των δειγμάτων για 10 λεπτά στους  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια έντονη ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα. Τέλος, έγινε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 RPM και μεταφορά της υπερκείμενης φάσης σε νέο σωληνάριο Eppendorf και αποθήκευση στους  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) που ακολούθησε, χρησιμοποιήθηκε το DNA που είχε εξαχθεί και η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση της ενδοριβοσωμικής περιοχής ήταν η ακόλουθη.

DNA	2 $\mu\text{L}$
Εκκινητής 27F	2 $\mu\text{L}$
Εκκινητής 1492R	2 $\mu\text{L}$
dNTPs	2 $\mu\text{L}$
Buffer (INVITROGEN)	5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (INVITROGEN)	1,5 $\mu\text{L}$
Taq πολυμεράση	0,5 $\mu\text{L}$
Νερό	35 $\mu\text{L}$

Οι συνθήκες της αντίδρασης που πραγματοποιήθηκε ήταν οι παρακάτω.

	Χρόνος	Θερμοκρασία $^{\circ}\text{C}$
<b>Βήμα 1</b>	3 min	94
	30 sec	94
<b>Βήμα 2</b>	30 sec	55
	1,5 min	72
<b>Βήμα 3</b>	5	72
<b>Βήμα 4</b>	$\infty$	4

Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% και το προϊόν της PCR έχει μέγεθος περίπου 1.500 ζευγών βάσεων (1,5 kb) και ενισχύεται με τους παρακάτω εκκινητές.

Εκκινητές

27F

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

1492R

TACGGYTACCTTGTTAGGACTT

#### 4.4.2.5.3. Καθαρισμός προϊόντων PCR και αλληλούχιση

Ο καθαρισμός έγινε με το PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε αρχικά με τη μεταφορά του PCR προϊόντος σε νέο σωληνάριο Eppendorf και προσθήκη 4 φορές επί τον όγκο του PCR προϊόντος, Binding Buffer (B2). Ακολούθησε μεταφορά του περιεχομένου του σωληναρίου Eppendorf σε στήλη και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 RPM. Έγινε απόρριψη της υγρής φάσης και στη συνέχεια προσθήκη 650 µL Wash buffer και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 RPM. Απόρριψη της υγρής φάσης εκ νέου και επανατοποθέτηση της στήλης στο ίδιο σωληνάριο Eppendorf και φυγοκέντρηση για 2-3 λεπτά στις 13.000 RPM και μετά απόρριψη της υγρής φάσης. Τοποθετήθηκαν οι στήλες στο τελικό σωληνάριο Eppendorf και προστέθηκαν 30 µL Elution Buffer στην στήλη. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό για έκλυση και έπειτα φυγοκέντρηση για 2 λεπτά και κατόπιν αυτού τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Τα δείγματα που διατηρούνταν στην κατάψυξη, στάλθηκαν σε εξωτερικό εργαστήριο αναλύσεων (CEMIA) προκειμένου να αλληλουχισθούν. Η αλληλουχία που ελήφθη, υποβλήθηκε σε Blast ανάλυση στη βάση δεδομένων NCBI προκειμένου να προσδιοριστεί η επί τοις εκατό ταυτοποίηση των προς διερεύνηση απομονώσεων με απομονώσεις που έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων.

#### 4.4.2.6. Πειράματα αγρού για τη διερεύνηση της ικανότητας παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών από βακτηριακές απομονώσεις

Με βάση τα αποτελέσματα της παρεμπόδισης της παραγωγής αφλατοξινών σε εργαστηριακό επίπεδο, το πιο αποτελεσματικό βακτήριο στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών επιλέχθηκε για περαιτέρω αξιολόγηση σε πειράματα αγρού. Η μελέτη διεξήχθη σε ένα σύνολο 3 φιστικιώνων στην Αίγινα. Ένας από αυτούς χρησιμοποιήθηκε και τα δύο χρόνια (φιστικεώνας Α), μαζί με έναν άλλο διαφορετικό φιστικεώνα για κάθε έτος (φιστικεώνας Β και Γ). Πρακτικά επιλέχθηκαν 2 φιστικεώνας για εφαρμογή στο νησί της Αίγινας για το 2017 και 2 φιστικεώνας για το 2018. Πρόκειται για τους φιστικεώνας όπου πραγματοποιήθηκαν και τα υπόλοιπα πειράματα αγρού της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Στον φιστικεώνα Α, που χρησιμοποιήθηκε και στα δύο χρόνια, η εφαρμογή του βακτηρίου ως βιολογικού παράγοντα μείωσης της παραγωγής αφλατοξινών ακολουθήθηκε από εφαρμογή, 24 ώρες αργότερα, ενός εξαιρετικά τοξικογόνου στελέχους *A. flavus* απομονωμένο από φιστικεώνα από το νησί (στέλεχος A.f.18.4, που χρησιμοποιείται επίσης σε άλλα πειράματα της παρούσας μελέτης). Ως αποτέλεσμα, για αυτό το φιστικεώνα, η μόλυνση από αφλατοξίνες προκλήθηκε μηχανικά. Στην περίπτωση των άλλων δύο φιστικιώνων (έναν για κάθε έτος), παρατηρήθηκε ένα ιστορικό μόλυνσης από αφλατοξίνες, με βάση τα αρχεία των παραγωγών ως προς την μόλυνση από αφλατοξίνες και για αυτό το λόγο επιλέχθηκαν με βάση την υπόθεση πως το φυσικό μόλυσμα θα έχει διατηρηθεί στον φιστικεώνα και θα προκαλέσει νέες φυσικές μολύνσεις. Κατά συνέπεια, δεν εφαρμόστηκε τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα και η μόλυνση εμφανίστηκε φυσικά, με βάση την προαναφερθείσα υπόθεση, οδηγώντας πράγματι σε μελλοντική μόλυνση και περαιτέρω συσσώρευση αφλατοξινών.

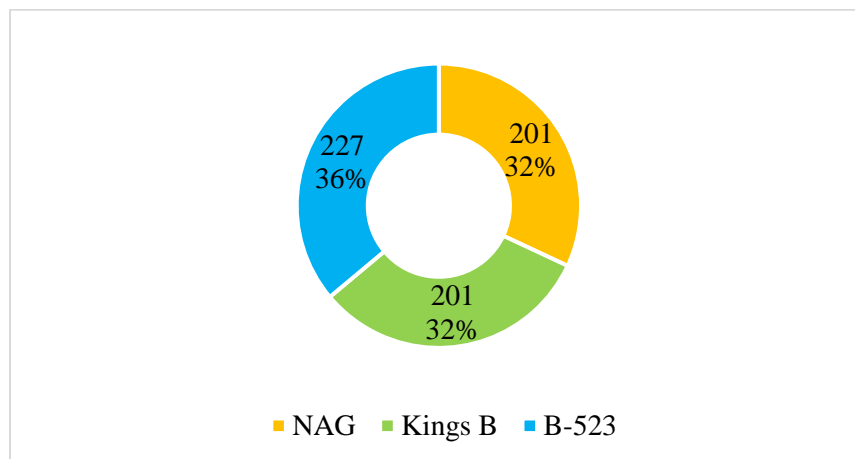
Ως βιολογικό σκεύασμα χρησιμοποιήθηκε υδατικό αιώρημα (τροποποιημένο με 0,01% Tween20®) βακτηριακών κυττάρων συγκέντρωσης  $10^6$  cfu/mL. 5 δένδρα φιστικιάς επιλέχθηκαν σε τυχαίες θέσεις σε κάθε φιστικεώνα για την εφαρμογή του βακτηριακού στελέχους. Η εφαρμογή έγινε στο στάδιο της πρώιμης ωριμότητας των φιστικιών, γύρω στα μέσα Ιουνίου. Ο μάρτυρας στο φιστικεώνα Α (επίσης 5 δένδρα) ψεκάστηκε με υδατικό εναιώρημα κονιδίων του τοξικογόνου στελέχους του μύκητα που είχε επιλεχθεί, 24 ώρες μετά την εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα. Η συγκέντρωση των κονιδιακών εναιωρημάτων ρυθμίστηκε σε  $10^4$  κονίδια ανά mL και στο εναιώρημα τροποποιήθηκε με 0,01% Tween20®. Ο μάρτυρας στους φιστικεώνες Β και Γ δεν είχε καμία τεχνητή μόλυνση-εφαρμογή. Η συγκομιδή των φιστικιών που χρησιμοποιήθηκαν, διεξήχθη σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στα τέλη Αυγούστου, όταν τα φιστίκια φθάνουν την πλήρη ωρίμανσή τους για την περιοχή αυτή. Τα φιστίκια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου της Αθήνας χρησιμοποιώντας ένα φορητό ψυγείο. Η εκχύλιση και ανάλυση των αφλατοξινών διεξήχθη όπως έχει περιγραφεί ξανά προηγουμένως με τη χρήση ELISA Kit και η ανάλυση διεξήχθη εις διπλούν.

## 4.5. Αποτελέσματα

### 4.5.1. Συλλογή ενδημικών επιφυτικών βακτηρίων

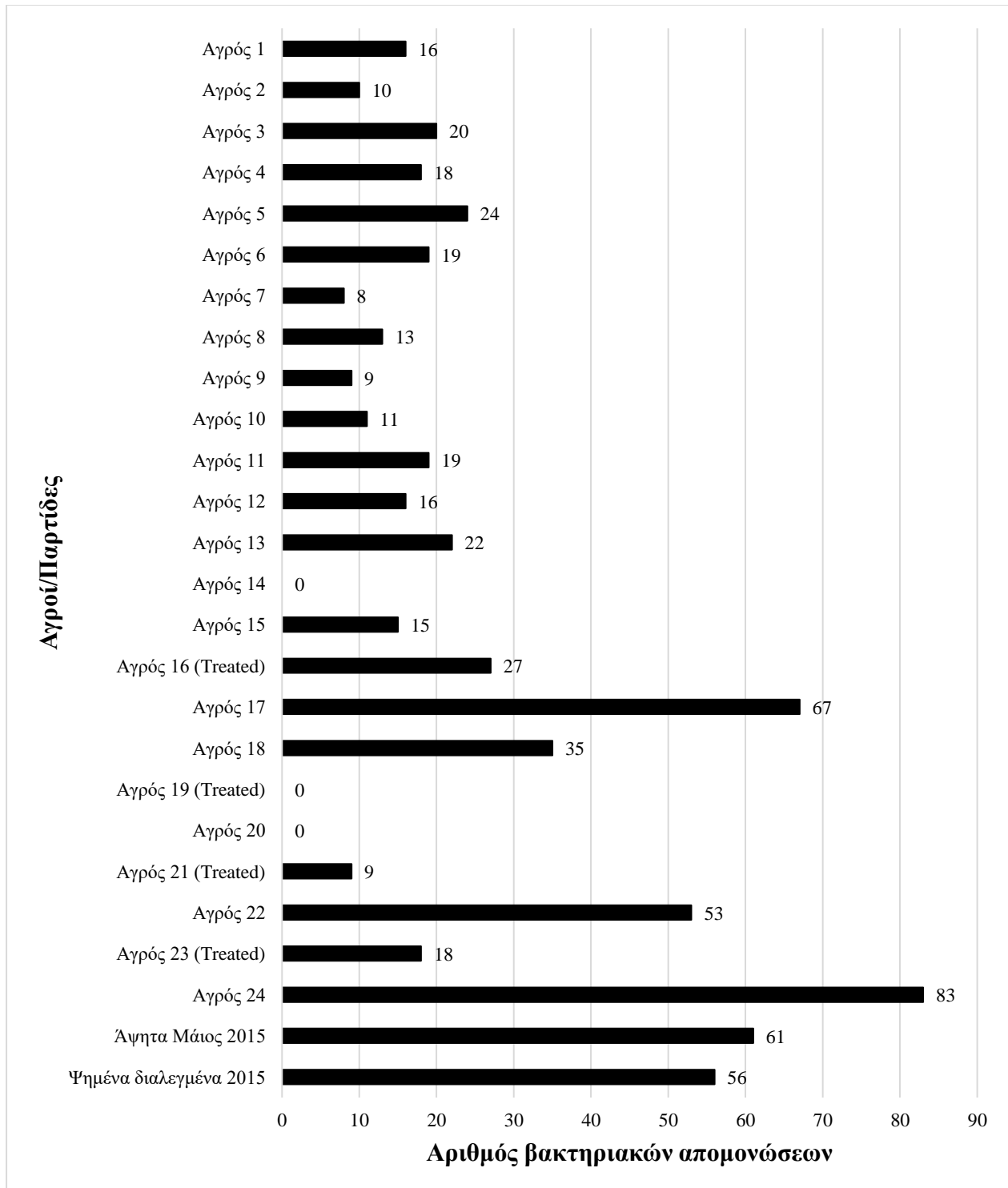
Η συλλογή των επιφυτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε από φιστικεώνες στο νησί της Αίγινας. Επιλέχθηκαν 3 εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (Kings B, NAG, B-523), έτσι ώστε να εξασφαλιστεί παραλλακτικότητα μεταξύ των βακτηριακών απομονώσεων που θα προκύψουν. Η συλλογή επιφυτικών βακτηρίων αποτελείται από 629 βακτήρια. Στη συγκεκριμένη συλλογή υπάρχουν βακτήρια από αγρούς όπως επίσης και από καρπούς που ευγενικά χορηγήθηκαν από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό της Αίγινας. Επιπλέον, μερικές βακτηριακές απομονώσεις προήλθαν από πειραματικούς αγρούς όπου είχε γίνει εφαρμογή μη τοξικογόνων στελεχών με ψεκάσμο (Treated), με σκοπό τον έλεγχο για ενδεχόμενη ύπαρξη ανταγωνισμού με τα τοξικογόνα στελέχη.

Στο Διάγραμμα 4.1 παρουσιάζεται το ποσοστό των βακτηρίων που απομονώθηκαν στο καθένα από τα 3 εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Αναλυτικότερα, 201 βακτήρια προήλθαν από το υλικό NAG, 201 από το υλικό Kings B και 227 από το θρεπτικό υλικό B-523.



**Διάγραμμα 4.1:** Αριθμός και ποσοστό βακτηριακών απομονώσεων ανάλογα με το θρεπτικό υλικό απομόνωσης.

Στη συνέχεια, στο Διάγραμμα 4.2, παρουσιάζονται οι αγροί ή παρτίδες προέλευσης καθώς και πόσα βακτήρια προέκυψαν από τον κάθε αγρό ή παρτίδα.

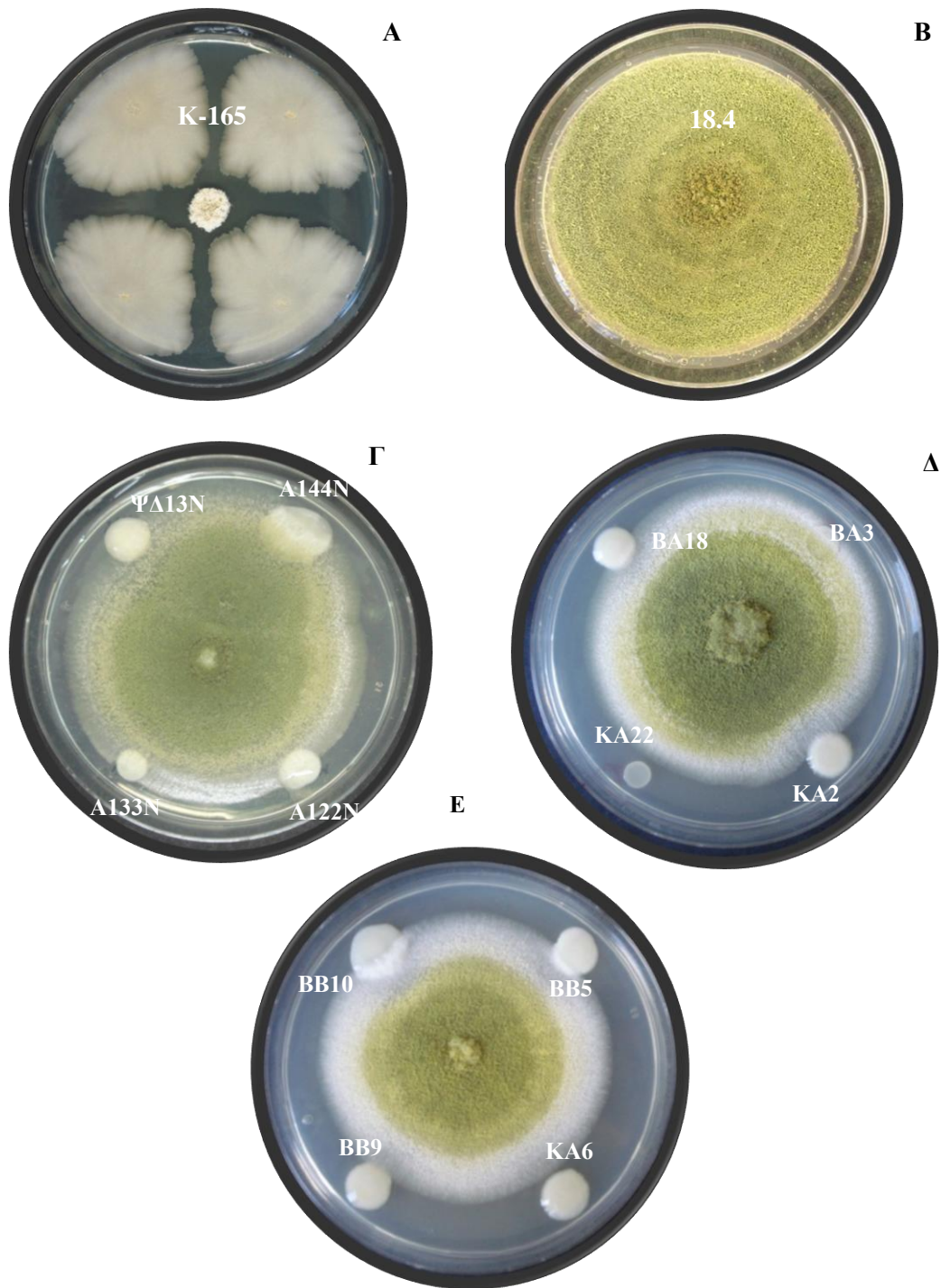


**Διάγραμμα 4.2:** Αριθμός βακτηριακών απομονώσεων ανά Αγρό/Παρτίδα.

#### 4.5.2. Αξιολόγηση της *in vitro* επίδρασης των βακτηριακών απομονώσεων στην ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus flavus*

Ελέγχθηκαν 629 επιφυτικά ενδημικά βακτήρια ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του αφλατοξικογόνου μύκητα *A. flavus* (στέλεχος A.f.18.4, απομόνωση από φιστίκια), ωστόσο κανένα βακτήριο δεν δημιούργησε πλήρη ζώνη παρεμπόδισης γύρω από το σημείο όπου αναπτυσσόταν ο μύκητας (Εικ. 4.11Γ, Δ, Ε). Κάποια βακτήρια παρεμπόδισαν την κονιδιογένεση του μύκητα (Εικ. 4.11Δ, Ε), ενώ η απομόνωση ΚΑ2 δημιούργησε μια μικρή ζώνη παρεμπόδισης (Εικ. 4.11Δ). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν υπάρχει απαραίτητως συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής αφλατοξινών. Για παράδειγμα, ένας βιολογικός παράγοντας μπορεί να μειώσει την παραγωγή αφλατοξινών αλλά όχι την ανάπτυξη του μύκητα αλλά και το αντίστροφο. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο K-165 που δίνει εξαιρετικά αποτελέσματα όσον αφορά στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα (Εικ. 4.11Α). Ωστόσο, το βακτηριακό στέλεχος K-165 ενώ παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα δεν μειώνει καθόλου την παραγωγή αφλατοξινών σε σπόρους καλαμποκιού. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 χωρίς την παρουσία βακτηρίου (Εικ. 4.11Β).

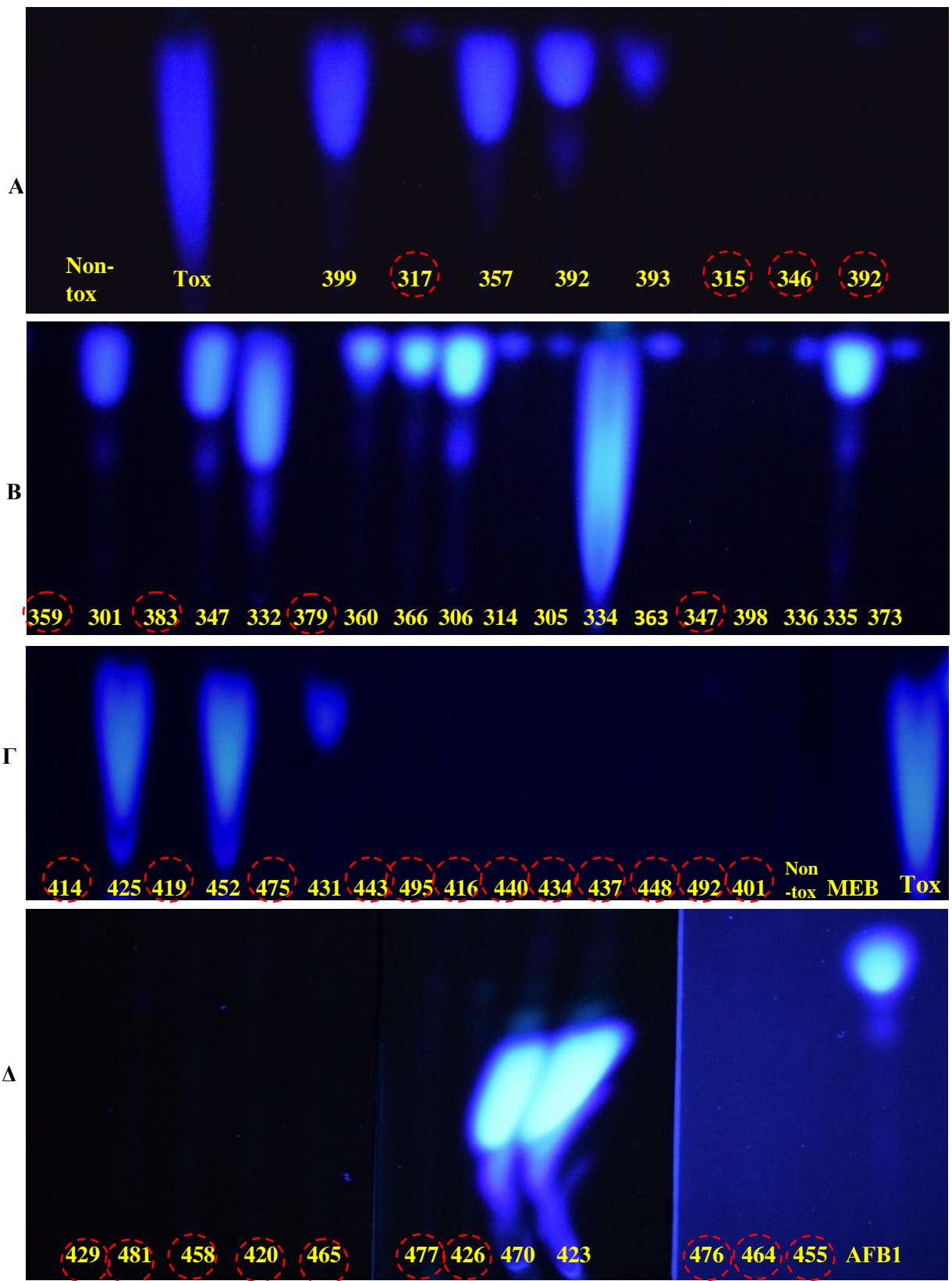




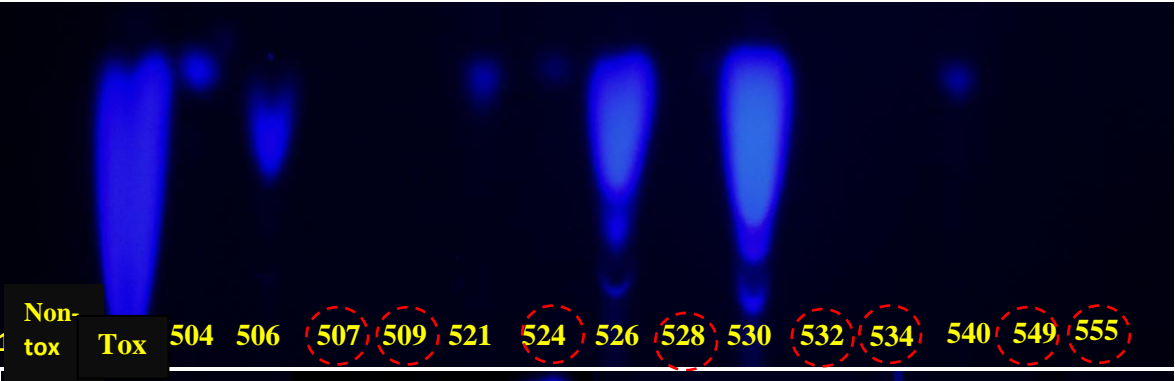
**Εικόνα 4.13:** Α: K-165, θετικός μάρτυρας, Β: στέλεχος A.f.18.4 αρνητικός μάρτυρας, Γ, Δ, Ε: 4 επιφυτικά βακτήρια ανά εικόνα και στο κέντρο το στέλεχος A.f.18.4 του μύκητα.

#### **4.5.3. Αξιολόγηση της *in vitro* επίδρασης των βακτηριακών απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus***

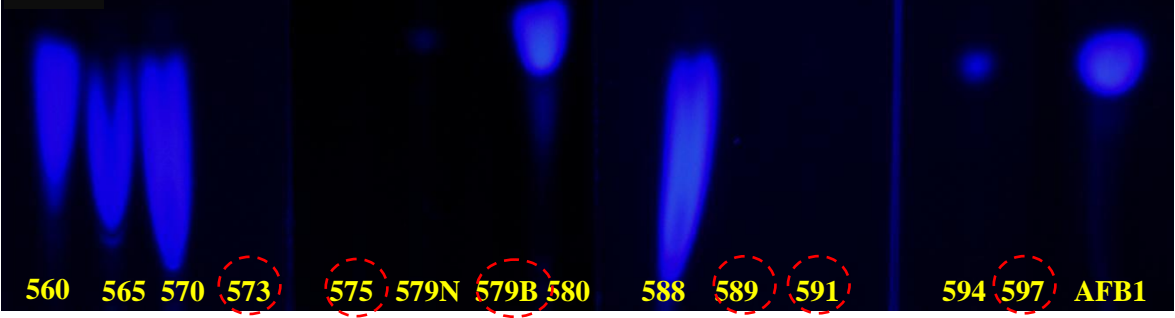
Προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα των βακτηριακών απομονώσεων ως προς τον ανταγωνισμό τους με το τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα A.f.18.4 πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα *in vitro*. Αναλυτικότερα, η αξιολόγηση έγινε έπειτα από μεικτές συγκαλλιέργειες των βακτηρίων και του τοξικογόνου στελέχους, τα οποία αναπτύσσονταν σε υγρή συγκαλλιέργεια MEB + 10% YES, για 15 ημέρες. Ακολούθησε ανάλυση με TLC, στην οποία ελέγχθηκε η παρουσία αφλατοξίνης. Από τα 629 βακτήρια που περιείχε η συλλογή ελέγχθηκαν με την συγκεκριμένη μέθοδο τα 161 και 79 αυτά παρουσίασαν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση των αφλατοξινών (Εικ. 4.12). Η επιλογή των 161 πραγματοποιήθηκε με κριτήριο και γνώμονα τις μακροσκοπικές διαφορές επί των τρυβλίων ανάπτυξης.



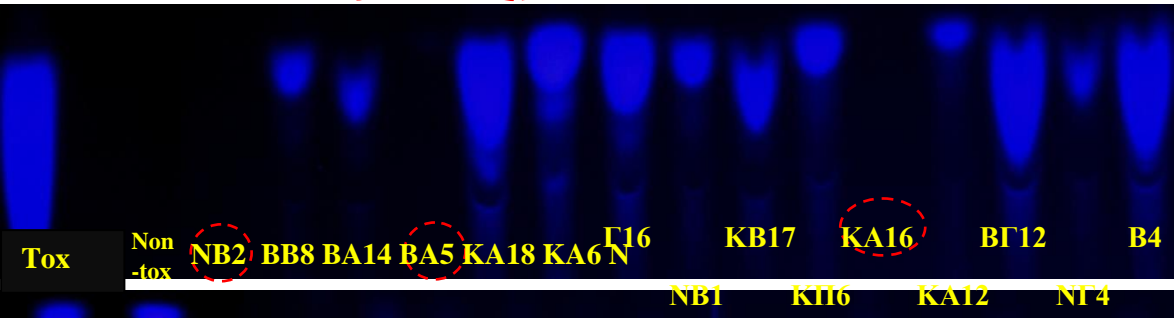
E



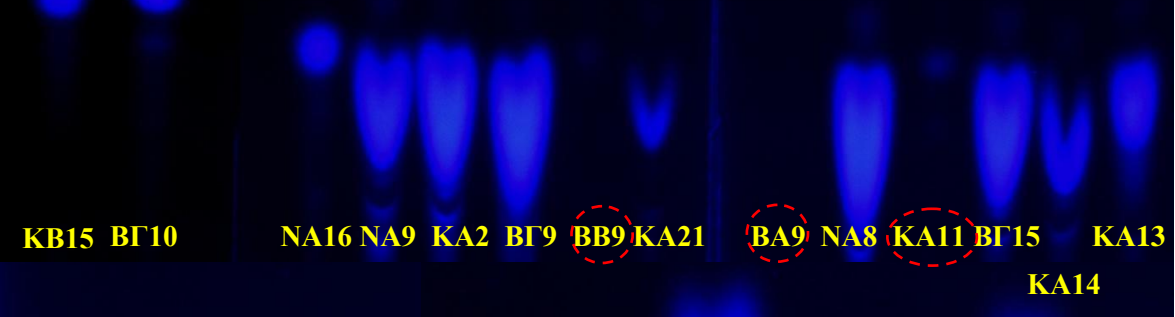
Z



H



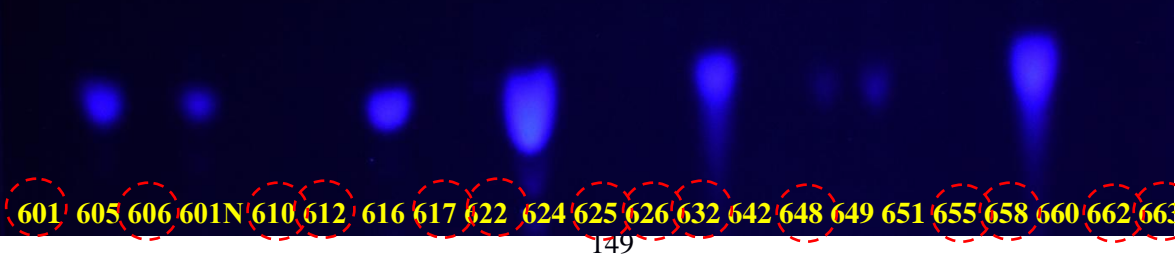
Θ



I



K

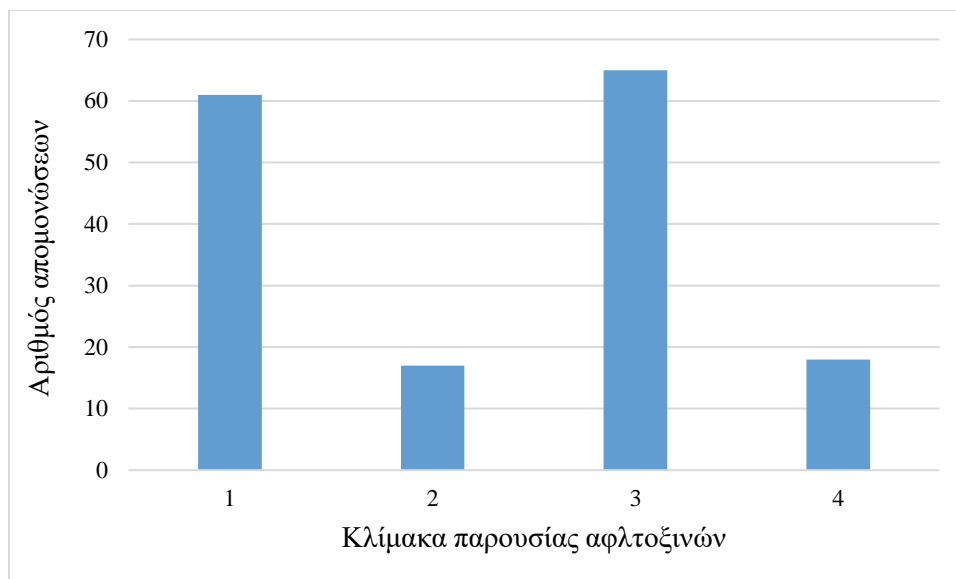




**Εικόνα 4.12Α-4.12Μ:** Αποτελέσματα δοκιμής σε πλάκες TLC για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των 161 βακτηριακών απομονώσεων ως προς την παρεμπόδιση στην παραγωγή αφλατοξινών σε υγρή συγκαλλιέργεια. Ως tox παρουσιάζεται ο θετικός μάρτυρας που είναι το τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα, χωρίς βακτηριακό στέλεχος και ως not-tox ο αρνητικός μάρτυρας που είναι το μη τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα. Οι υπόλοιπες θέσεις αφορούν σε μεικτές μολύνσεις τοξικογόνου μύκητα και απομονώσεων βακτηρίου. Με κόκκινο δακτύλιο περιβάλλονται τα ονόματα των αποτελεσματικών βακτηριακών απομονώσεων που μειώνουν την παραγωγή αφλατοξινών.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αποτελεί ποιοτική και ημιποσοτική μέθοδο ανάλυσης και δεν μπορεί να ποσοτικοποιήσει με ακρίβεια τις παραγόμενες μυκοτοξίνες. Παρακάτω ακολουθεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το παραπάνω πείραμα η οποία έγινε δημιουργώντας μια αριθμητική κλίμακα (1-4) όπου συγκρίνεται η ένταση της κάθε ζώνης των TLC μεταξύ όλων των δειγμάτων. Η αριθμητική κλίμακα ορίστηκε από το 1 έως το 4, με το 1 να δηλώνει πλήρη απουσία αφλατοξινών (0%), το 2 να δηλώνει παρουσία αφλατοξινών από 1%-35%, το 3 από 35%-70%, και το 4 να δηλώνει έντονη παρουσία (100%) συγκριτικά με το μάρτυρα (Διάγρ. 4.3). Η πλειοψηφία των βακτηριακών απομονώσεων προκάλεσε μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών σε ποσοστό 30-65% όπως παρουσιάζεται από τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Δευτερευόντως, παρατηρήθηκε πως βάσει της κλίμακας, η δεύτερη μεγαλύτερη ομάδα απομονώσεων σε αριθμό, προκάλεσε μείωση των αφλατοξινών σε ποσοστό σχεδόν 100%. Λίγες βακτηριακές απομονώσεις δεν προκάλεσαν καμία μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών (παρεμπόδιση 0%) και ακόμα λιγότερες προκάλεσαν μείωση σε επίπεδο 65-100%.





**Διάγραμμα 4.3:** Αριθμός βακτηριακών απομονώσεων που μειώνουν την παραγωγή αφλατοξινών από το στέλεχος A.f.18.4 του μύκητα *A. flavus*, σε καθεμία από τις τέσσερις κατηγορίες της αριθμητικής κλίμακας 1-4 (1: 0% παρουσία αφλατοξινών, 2: 1-35% παρουσία αφλατοξινών, 3: 36-70% παρουσία αφλατοξινών, 4: 71-100% παρουσία αφλατοξινών).

#### 4.5.4. Αξιολόγηση της *in situ* επίδρασης των βακτηριακών απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus*

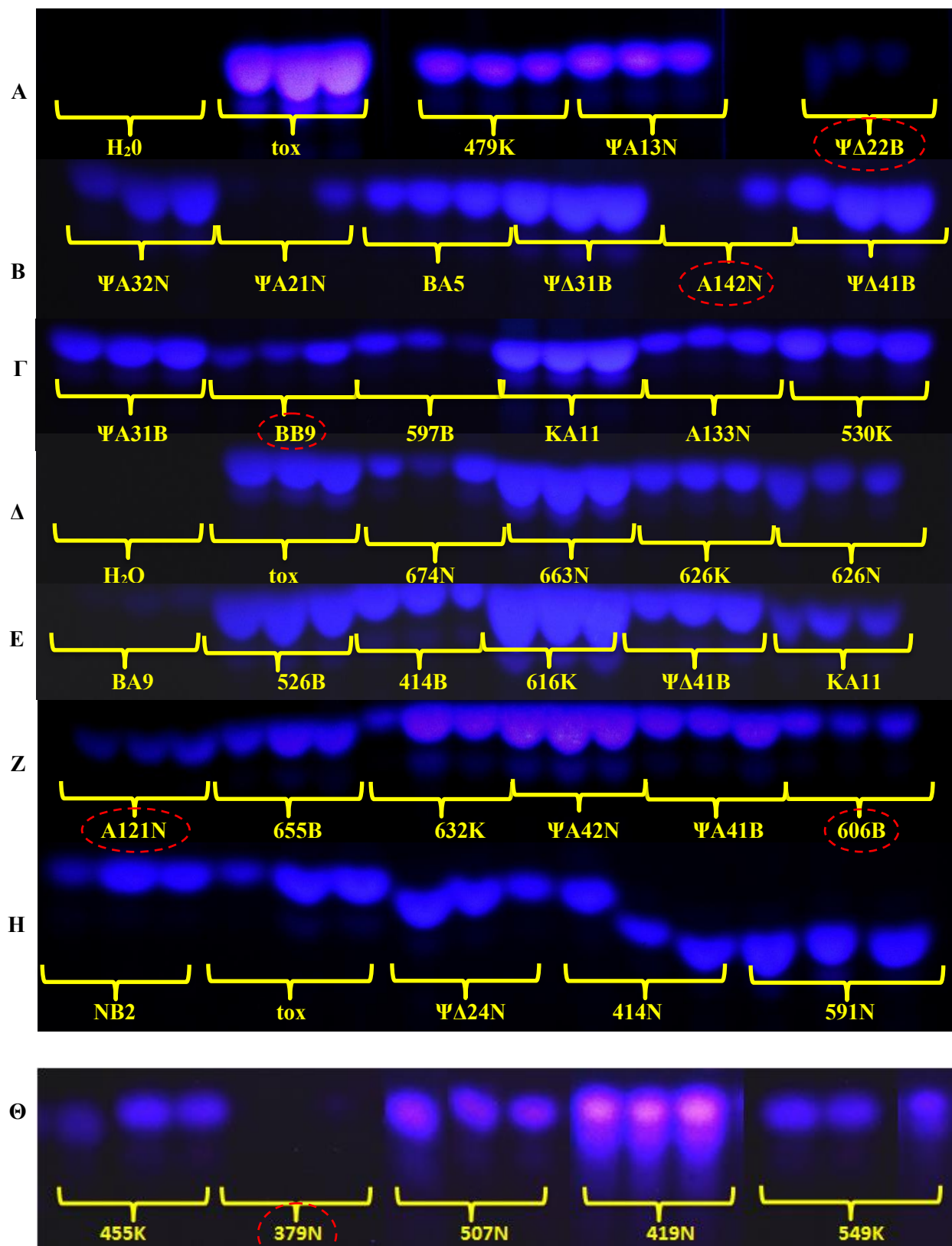
Στο συγκεκριμένο πείραμα, τα 79 αποτελεσματικά βακτήρια που προέκυψαν από τα προηγούμενα πειράματα αξιολόγησης, χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικοί παράγοντες προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητά τους να μειώνουν εξίσου την παραγωγή αφλατοξινών και σε σπόρους καλαμποκιού. Τα αποτελέσματα προέκυψαν έπειτα από δοκιμή χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) στην οποία ελέγχθηκε η παρουσία αφλατοξινών σε σπόρους καλαμποκιού μετά από μόλυνσή τους με το τοξικογόνο στέλεχος 18.4 του μύκητα *A. flavus* (Εικ. 4.13). Στο σύνολο των 79 βακτηρίων, βάσει της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, ένα παρουσίασε 100% παρεμπόδιση στην παραγωγή αφλατοξινών, ενώ 6 μείωσαν σημαντικά τις παραγόμενες αφλατοξίνες από το τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα (Εικ. 4.14).

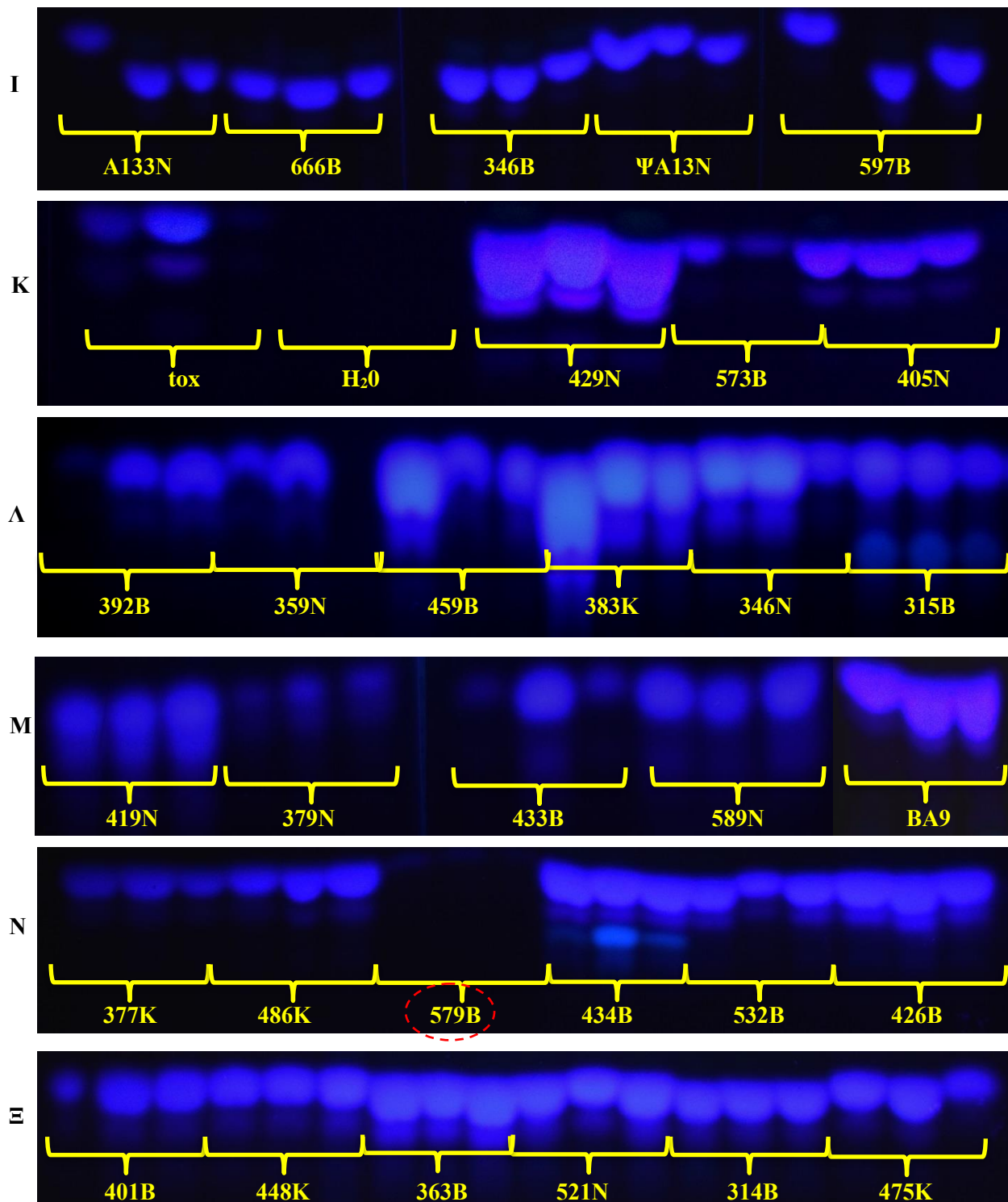


Όσον αφορά στην παρεμπόδιση της κονιδιογένεσης του στελέχους του μύκητα, η βακτηριακή απομόνωση 379N δεν παρεμποδίζει μόνο τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης αλλά και την ανάπτυξη του μύκητα στους σπόρους καλαμποκιού. Η βακτηριακή απομόνωση 579B που παρεμποδίζει πλήρως την βιοσύνθεση αφλατοξινών δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του μύκητα. Οι υπόλοιπες βακτηριακές απομονώσεις που είναι αποτελεσματικές ως προς την παρεμπόδιση βιοσύνθεσης αφλατοξινών, επιτρέπουν στον μύκητα να αναπτυχθεί.



**Εικόνα 4.13:** Συγκαλλιέργεια βακτηριακών απομονώσεων και τοξικογόνου στελέχους του μύκητα σε σπόρους καλαμποκιού ύστερα από 6 ημέρες επώασης. Στην πρώτη φωτογραφία απεικονίζεται ο θετικός μάρτυρας (A.f.18.4) που είναι σπόροι καλαμποκιού μολυσμένοι μόνο από το τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα και ακολουθούν φωτογραφίες μεικτών μολύνσεων με το τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα και απομονώσεις βακτηρίων.





**Εικόνα 4.14:** Ενδεικτική χρωματογραφία TLC της αξιολόγησης της επίδρασης βακτηριακών απομονώσεων στην παρεμπόδιση παραγωγής αφλατοξινών μετά από μόλυνση με το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 του μύκητα *A. flavus*. Ως tox παρουσιάζεται ο θετικός μάρτυρας που είναι το στέλεχος του μύκητα χωρίς βακτηριακό στέλεχος, και ως H<sub>2</sub>O παρουσιάζεται ο αρνητικός μάρτυρας που είναι σκέτο νερό.

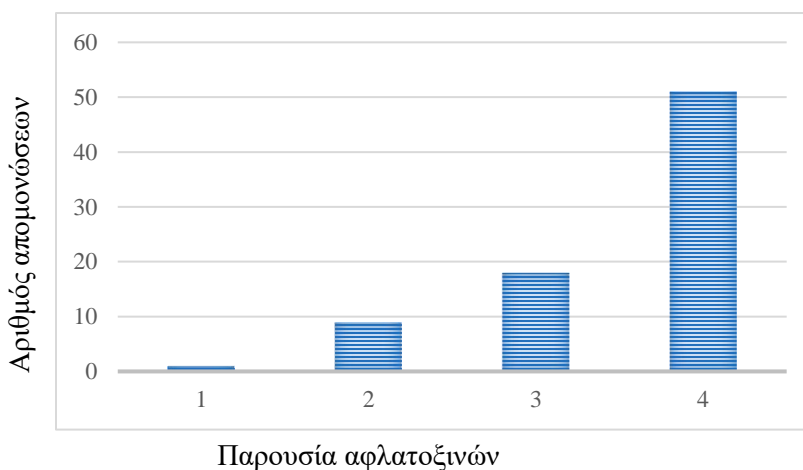


Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται οι 7 αποτελεσματικότερες βακτηριακές απομονώσεις και η περιοχή/παρτίδα από όπου απομονώθηκαν. Επιπρόσθετα, φαίνεται το αντίστοιχο υλικό στο οποίο απομονώθηκε το κάθε βακτήριο, τα χαρακτηριστικά της μορφολογίας κάθε αποικίας, καθώς και η παρεμπόδιση % που προκάλεσε στην παραγωγή αφλατοξινών.

**Πίνακας 4.1:** Χαρακτηριστικά των 7 αποτελεσματικότερων βακτηριακών απομονώσεων.

Απομόνωση	Υλικό	Χρώμα αποικίας	Αγρός/Παρτίδα	Παρεμπόδιση %
579B	B-523	Υποκίτρινο	Αγρός 18	100%
A121N	NAG	Υποκίτρινο	Άψητα Μάιος 2015	75%
ΨΔ22B	B-523	Λευκό	Ψημένα διαλεγμένα Μάιος 2015	80%
A142N	NAG	Υπόλευκο	Άψητα Μάιος 2015	90%
379N	NAG	Λευκό	Αγρός 22	95%
BB9	B-523	Κίτρινο	Αγρός 3	75%
606B	B-523	Λευκό	Αγρός 1	70%

Στο Διάγραμμα 4.4 παρουσιάζεται η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το παραπάνω πείραμα, η οποία έγινε δημιουργώντας μια αριθμητική κλίμακα (1-4) όπου συγκρίνεται η ένταση της κάθε ζώνης μεταξύ όλων των δειγμάτων. Η αριθμητική κλίμακα ορίστηκε από το 1 έως το 4, με το 1 να δηλώνει πλήρη απουσία αφλατοξινών (0%), το 2 να δηλώνει παρουσία αφλατοξινών σε ποσοστό 1%-35% σε σχέση με τον μάρτυρα, το 3 από 35%-70% αντίστοιχα, και το 4 να δηλώνει έντονη παρουσία (100%) συγκριτικά με το μάρτυρα.



**Διάγραμμα 4.4:** Αριθμός βακτηριακών απομονώσεων που παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών με βάση αριθμητική κλίμακα από το 1-4 (1: 0% παρουσία αφλατοξινών, 2: 1-35% παρουσία αφλατοξινών, 3: 36-70% παρουσία αφλατοξινών, 4: 71-100% παρουσία αφλατοξινών).

#### 4.5.5. Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης βακτηριακών απομονώσεων

Παρακάτω, στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης καθώς και η BLAST ανάλυση που έγινε με το πρόγραμμα Finch TV για τις 7 αποτελεσματικές βακτηριακές απομονώσεις.

**Πίνακας 4.2:** Αποτελέσματα ταυτοποίησης με βάση την αλληλούχιση προϊόντων PCR για καθεμία από τις 7 αποτελεσματικές βακτηριακές απομονώσεις κατά της παραγωγής αφλατοξινών.

Απομόνωση	Αποτελέσματα ταυτοποίησης
A142N	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 100%
579B	<i>Pantoea agglomerans</i> 100%
379N	<i>Pantoea agglomerans</i> 100%
606B	<i>Pantoea agglomerans</i> 100%
A121N	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 100%
BB9	<i>Enterobacter cloacae</i> ή <i>Leclercia adecarboxylata</i> 100%
ΨΔ22B	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 100%

Με βάση τα αποτελέσματα ταυτοποίησης, τρεις από τις επτά απομονώσεις χαρακτηρίζονται ως *Pantoea agglomerans* με ποσοστό ταυτοποίησης 100%, άλλες τρεις απομονώσεις χαρακτηρίζονται ως *Klebsiella pneumoniae* με ποσοστό 100%, και μία απομόνωση χαρακτηρίζεται ως *Enterobacter cloacae* ή *Leclercia adecarboxylata*. Συνολικά, οι έξι από τις επτά αποτελεσματικές απομονώσεις ανήκουν στα δύο κύρια γένη βακτηρίων, *Pantoea* και *Klebsiella*.

#### 4.5.6. Αξιολόγηση της επίδρασης βακτηριακής απομόνωσης στην παραγωγή αφλατοξινών σε φιστικέωνες

Με βάση τα αποτελέσματα παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών σε σπόρους καλαμποκιού σε συνθήκες εργαστηρίου προέκυψε πως επτά απομονώσεις ήταν οι πιο αποτελεσματικές στην μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών σε εργαστηριακές συνθήκες (Παράγραφος 4.5.4.). Οι επτά αυτές απομονώσεις αλληλουχίστηκαν, και μεταξύ αυτών, η αποτελεσματικότερη φαίνεται να είναι η απομόνωση 579B που βάσει της μοριακής ταυτοποίησης χαρακτηρίστηκε ως *Pantoea agglomerans*. Κατά συνέπεια, αυτή η απομόνωση επιλέχθηκε για περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητάς της να μειώνει την παραγωγή αφλατοξινών, από το ισχυρά αφλατοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 που έχει επαναχρησιμοποιηθεί στη παρούσα μελέτη, σε συνθήκες αγρού.

Όπως έχει προαναφερθεί στη παράγραφο 4.4.2.6., οι μάρτυρες στο φιστικέωνα Α είναι τεχνητές μολύνσεις με το ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4, και οι μάρτυρες στους φιστικέωνες Β και Γ είναι φυσικές μολύνσεις από πληθυσμούς τοξικογόνων στελεχών του μύκητα που προϋπήρχαν στους αγρούς αυτούς. Από τα αποτελέσματα αναλύσεως των καρπών για την μόλυνση από αφλατοξίνες προκύπτει πως οι τεχνητές μολύνσεις κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα τόσο για το 2017, όσο και το 2018, με 1.477,62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  και 2.928,60  $\mu\text{g kg}^{-1}$  αντίστοιχα για τον φιστικέωνα Α. Στον αντίποδα, οι φυσικές μολύνσεις στους φιστικέωνες Β και Γ υποδεικνύουν την ύπαρξη υψηλών φυσικών μολύνσεων σε επίπεδο 1.114,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  για τον φιστικέωνα Β για το έτος 2017, αλλά χαμηλών σε επίπεδο 20,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  για τον φιστικέωνα Γ για το

2018, που είναι ελαφρώς πάνω από το ανώτατο επιτρεπτό όριο για την καλλιέργεια των φιστικιών (Πίν. 4.3).

**Πίνακας 4.3:** Αποτελέσματα αναλύσεων αφλατοξινών και παρεμπόδισης στη παραγωγή αφλατοξινών στους 3 πειραματικούς φιστικεώνες (Α,Β,Γ) για τα έτη 2017 και 2018. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ( $p < 0,05$ ).

		Εφαρμογή	Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση %
2017	Φιστικεώνας Α	Μάρτυρας	1.477,62	a	69,70	-
		579B	48,41	b	1,77	99,5
	Φιστικεώνας Β	Μάρτυρας	1.114,3	a	93,8	-
		579B	4,33	b	1,37	99,6
2018	Φιστικεώνας Α	Μάρτυρας	2.928,6	a	130,18	-
		579B	1,45	b	0,54	100
	Φιστικεώνας Γ	Μάρτυρας	20,8	a	6,13	-
		579B	2,44	b	1,5	88,3

Η εφαρμογή του αιωρήματος των κυττάρων της βακτηριακής απομόνωσης με ψεκασμό, προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών, τόσο στην περίπτωση των φυσικών, όσο και των τεχνητών μολύνσεων και τις δύο χρονιές (Πίν. 4.3). Η επί τοις εκατό παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών για τον φιστικεώνα Α, όπου εφαρμόστηκε τεχνητή μόλυνση του μάρτυρα κυμάνθηκε στο 99,5% το 2017 (Πίν. 4.3), γεγονός που αποδεικνύει την ικανότητα της βακτηριακής απομόνωσης 579B να παρεμποδίζει την παραγωγή αφλατοξινών σε συνθήκες αγρού. Όσον αφορά στην περίπτωση των φιστικεώνων με φυσικές μολύνσεις, η ικανότητα της βακτηριακής απομόνωσης να παρεμποδίζει την παραγωγή αφλατοξινών κυμάνθηκε στο 99,6% για το 2017 (φιστικεώνας Β) και 88,3% για το 2018 (φιστικεώνας Γ) (Πίν. 4.3). Η συγκριτικά χαμηλότερη με τις υπόλοιπες παρεμπόδιση στον φιστικεώνα Γ που έφτασε στο 88,3% πιθανόν να οφείλεται σε μη επιτυχημένη εφαρμογή της βακτηριακής απομόνωσης, λόγω ελλειπούς διαβροχής του φυλλώματος και των ταξικαρπιών, ή εκκύση του ψεκαστικού υγρού. Οι υπόλοιπες παρεμποδίσσεις που υπερβαίνουν το 99,5% κρίνονται ιδιαίτερος υψηλές και η εφαρμογή της βακτηριακής απομόνωσης κρίνεται αποτελεσματική στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, η παρεμπόδιση 88,3% παραμένει στατιστικά σημαντική συγκριτικά με το μάρτυρα και είναι και αυτή υψηλή υποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα της βακτηριακής απομόνωσης.

Συμπερασματικά, από τη διερεύνηση της ικανότητας της βακτηριακής απομόνωσης 579B (*Pantoea agglomerans*) που απομονώθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης από φιστικεώνα στην Αίγινα, να μειώνει τις παραγόμενες αφλατοξίνες σε συνθήκες αγρού, προκύπτει η αποτελεσματικότητα της εν λόγω ενδημικής απομόνωσης. Βάσει των αποτελεσμάτων, κρίνεται πως θα μπορούσε μελλοντικά πιθανόν να αποτελέσει βιολογικό παράγοντα διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού σε πλαίσιο ολοκληρωμένων συστημάτων διαχείρισης αφλατοξινών.



#### 4.6. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Οι μυκοτοξίνες και ειδικότερα οι αφλατοξίνες, αποτελούν αντικείμενο πολύχρονων ερευνών σε παγκόσμια κλίμακα, διότι είναι μία από τις μεγαλύτερες απειλές τόσο για την ασφάλεια όσο και για την ποιότητα των τροφίμων, όπως επίσης και για την υγεία του διατρεφόμενου πληθυσμού. Όπως προαναφέρθηκε, ορισμένα γένη μυκήτων όπως *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* έχουν την ικανότητα να παράγουν τους συγκεκριμένους ιδιαίτερα τοξικούς, καρκινογόνους και μεταλλαξιογόνους δευτερογενείς μεταβολίτες. Τα μολυσμένα τρόφιμα αλλά και οι ζωοτροφές προκαλούν οξεία ή χρόνια τοξικότητα στους ανθρώπους και στα ζώα (Probst et al. 2007). Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό FAO αλλά και με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) κάθε χρόνο το 25-30% των γεωργικών προϊόντων μολύνεται με μυκοτοξίνες σε παγκόσμιο επίπεδο, γεγονός που έχει αντίκτυπο τόσο στην οικονομία όσον αφορά στον αγροτικό τομέα αλλά και γενικότερα στην παγκόσμια οικονομία όσο και στην βιομηχανία τροφίμων. Ωστόσο, οι σοβαρότερες επιπτώσεις αφορούν στον άνθρωπο και τα ζώα. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι μυκοτοξίνες κατά το παρελθόν έχουν καταλάβει την πρώτη θέση (ποσοστό 44%) ως αιτία απόρριψης εισαγωγών διαφόρων προϊόντων στην Ε.Ε. σύμφωνα με τον οργανισμό RASFF (EU Rapid Alert System For Food and Feed).

Το αντικείμενο έρευνας της παρούσας εργασίας είχε ως στόχο την εύρεση αποτελεσματικών τρόπων βιολογικής αντιμετώπισης με τη χρήση επιφυτικών ενδημικών βακτηρίων που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε ένα ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης των αφλατοξινών που παράγουν οι μύκητες του γένους *Aspergillus* στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού, που τα τελευταία χρόνια κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος στις παγκόσμιες αγορές. Γενικά, η ανταγωνιστική ικανότητα βακτηριακών απομονώσεων έχει διερευνηθεί εδώ και αρκετές δεκαετίες, με τα αποτελέσματα να είναι ιδιαίτερος ενθαρρυντικά (Kerry 2000). Χρησιμοποιούνται ευρέως και για τη διαχείριση φυτοπαθογόνων μυκήτων που είναι επιζήμιοι στην πρωτογενή παραγωγή, είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω της παραγωγής μυκοτοξινών, τόσο προσυλλεκτικά (Siahmoshteh et al. 2017), όσο και μετασυλλεκτικά (Lorenzini et al. 2020). Στην συγκεκριμένη μελέτη αξιολογήθηκε η ικανότητα επιφυτικών ενδημικών απομονώσεων ως προς την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα και της βιοσύνθεσης των αφλατοξινών τόσο *in vitro* και *in situ*, όσο και σε συνθήκες αγρού.

Καθώς η συλλογή των επιφυτικών ενδημικών βακτηρίων που δημιουργήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, περιείχε 629 βακτήρια στο σύνολο, έπρεπε να διερευνηθεί η ικανότητα παρεμπόδισης ενός μεγάλου αριθμού απομονώσεων, προκειμένου να βρεθούν οι κατάλληλες ή η κατάλληλη απομόνωση με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Αρχικά, ελέγχθηκε αν κάποιο από αυτά τα βακτηριακά στελέχη, έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα σε τρυβλία. Ωστόσο, κανένα από τα παραπάνω επιφυτικά βακτήρια δεν ήταν ικανό να σχηματίσει ζώνη παρεμπόδισης. Αυτό το γεγονός ίσως οφείλεται στον έντονο ανταγωνισμό από το μύκητα για το θρεπτικό υπόστρωμα. Ωστόσο έχουν αναφερθεί βακτήρια όπως τα *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* κ.ά. που έχουν απομονωθεί από καρπούς αμυγδάλων και είναι ικανά στο δημιουργούν ζώνη παρεμπόδισης γύρω από το μύκητα (Palumbo et al. 2006). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω έκκρισης πεπτιδίων κατά του μύκητα από τα βακτήρια του γένους *Bacillus* είτε μέσω της παραγωγής αντιβιοτικών ουσιών από το γένος *Pseudomonas* (Lee et al. 2003, Moyné et al. 2001).

Όσον αφορά στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης της μυκηλιακής μάζας σε υγρή συγκαλλιέργεια MEB + 10% YES τα περισσότερα βακτήρια μείωσαν την ανάπτυξη του μύκητα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στον ανταγωνισμό για θρεπτικό υλικό ή στην έκκριση αντιβιοτικών ουσιών ή άλλων ενζύμων. Παρόλα αυτά, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να εξακριβωθεί ο μηχανισμός δράσης των

αποτελεσματικότερων βακτηρίων. Σύμφωνα με στοιχεία άλλων ερευνών (Palumbo et al. 2006), σημαντικό ρόλο παίζει και το υλικό στο οποίο αναπτύσσεται η συγκαλλιέργεια, με ιδανικότερο να είναι το Potato Dextrose Broth (PDB) καθώς καθυστερεί την ανάπτυξη του μύκητα ενώ ακατάλληλο είναι το υλικό YES διότι μετά από επτά ημέρες η μυκηλιακή μάζα είναι πλούσια και υπερσχύει του βακτηρίου.

Είναι γνωστό ότι η παρεμπόδιση της παραγωγής μυκοτοξινών δεν έχει πάντα άμεση σχέση με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα (Amaike et al. 2011). Ωστόσο, στο συγκεκριμένο πείραμα, από τα 79 βακτήρια που ήταν αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των αφλατοξινών σε υγρή συγκαλλιέργεια, τα 60 ήταν ικανά να παρεμποδίσουν και την ανάπτυξη της μυκηλιακής μάζας (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Μείωση της παραγωγής των αφλατοξινών έχει παρατηρηθεί με τον ίδιο τρόπο, από βακτηριακά στελέχη *Bacillus* sp. όπως επίσης και από πολλά άλλα είδη βακτηρίων όπως *Rhodococcus erythropolis* (Farzaneh et al. 2016, Teniola et al. 2005).

Μετά την τεχνητή μόλυνση των σπόρων καλαμποκιού με το τοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 του μύκητα *A. flavus*, παρατηρήθηκαν αρκετές διαφορές ως προς την ικανότητα των βακτηριακών απομονώσεων να παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών όσον αφορά στα αποτελέσματα του πειράματος της *in vitro* συγκαλλιέργειας. Από τα 79 βακτήρια που παρεμπόδιζαν πλήρως τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών, όταν καλλιεργήθηκαν σε συγκαλλιέργεια με το μύκητα, μόνο 1 από αυτά κατάφερε να μειώσει πλήρως τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών, μετά από τεχνητή μόλυνση σπόρων καλαμποκιού ενώ άλλα 6 βακτήρια την μείωσαν σε ποσοστό 70-95%. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα παλαιότερων παρεμφερών μελετών σχετικά με την αποτελεσματικότητα διαφόρων βακτηριακών απομονώσεων έναντι του μύκητα *A. flavus* (Dorner 2004). Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται πως από συλλογή 892 βακτηριακών απομονώσεων, μόλις 6 μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη του *A. flavus* σε σπόρους βαμβακιού (Dorner 2004). Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, αν και πολλά στελέχη ήταν πολύ αποτελεσματικά ως προς τη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών αλλά και την ανάπτυξη του μύκητα κάτω από εργαστηριακές συνθήκες, δεν έδειξαν τα ίδια αποτελέσματα σε συνθήκες αγρού, κυρίως λόγω της δυσκολίας εφαρμογής των βακτηριακών κυττάρων στους εκάστοτε αγρούς και υπό πραγματικές καλλιεργητικές συνθήκες (Yin et al. 2008).

Με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, 7 αποτελεσματικά βακτήρια ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς. Αναλυτικότερα τα 3 από αυτά ανήκουν στο είδος *Pantoea agglomerans*, 3 στο *Klebsiella pneumoniae* και ένα στο *Enterobacter cloacae*. Το βακτήριο *K. pneumoniae* έχει αναφερθεί να παρουσιάζει παρεμποδιστικές ιδιότητες, μειώνοντας κατά 83% την παρουσία του μύκητα *Rhizoctonia solani* σε φυτά τομάτας. Αυτό συμβαίνει διότι από το βακτήριο αυτό εκκρίνονται αντιβιοτικά λιποπεπτίδια, IAA αλλά και σιδηροφόροι (Abdeljalil et al. 2016). Επίσης βακτηριακά στελέχη του γένους *Klebsiella* διαλυτοποιούν ανόργανα φωσφορικά άλατα, παράγουν IAA, με αποτέλεσμα να έχουν θετική επίδραση στο ριζικό σύστημα και κατ' επέκταση στην ομαλή ανάπτυξη του φυτού (Ahemad et al. 2011, Yue et al. 2007).

Όσον αφορά στο είδος *P. agglomerans*, πρόκειται για ένα βακτηριακό είδος που έχει μελετηθεί ενδελεχώς λόγω των ποικίλων χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων του (Dutkiewicz et al. 2016). Έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς κατά το παρελθόν ως βιολογικός παράγοντας διαχείρισης μετασυλλεκτικών σήψεων που προκαλούνται από τους μύκητες *Monilia laxa* και *Rhizopus stolonifer* (Bonaterra et al. 2003). Ιδιαίτερα πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα απομονώσεων του εν λόγω βακτηριακού είδους κατά μυκήτων που προκαλούν προσυλλεκτικές και μετασυλλεκτικές σήψεις καρπών και ανήκουν στα γένη *Monilinia* και *Monilia* και ταυτόχρονα διερευνούν τους πιθανούς μηχανισμούς πίσω από την παρεμποδιστική του ικανότητα (Lahlali et al. 2020).

Παρόλο που πολλά είδη βακτηρίων έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διαχείριση μυκοτοξικογόνων μυκήτων και των παραγόμενων μυκοτοξινών τους (Chulze et al. 2014), αξίζει να σημειωθεί πως πολλές φορές είναι απαραίτητη η βελτίωση ενός βιολογικού παράγοντα με βάση μια βακτηριακή απομόνωση προκειμένου να αυξηθεί η σταθερότητά του στο περιβάλλον και κατά συνέπεια και η αποτελεσματικότητά του (Teixido et al. 2005). Όσον αφορά στη διαχείριση μυκοτοξικογόνων μυκήτων αλλά και των μυκοτοξινών που παράγουν, η αποτελεσματικότητα εφαρμογής βακτηριακών απομονώσεων *Pantoea agglomerans* έχει διερευνηθεί στη περίπτωση των μήλων και της πατουλίνης που παράγει ο μύκητας *Penicillium expansum*, με τα αποτελέσματα να υποδεικνύουν τόσο μείωση της ανάπτυξης του μύκητα αλλά και μείωση της παραγωγής πατουλίνης (Morales et al. 2008). Επιπρόσθετα, αναφορικά με τις σήψεις που προκαλεί μετασυλλεκτικά ο μύκητας *A. flavus* σε καρπούς αποθηκευμένων λεμονιών, η εφαρμογή βακτηρίων για διαχείριση του προβλήματος, έχει υποδείξει πως η πλειοψηφία των αποτελεσματικών βακτηρίων, έναντι στη σήψη, ανήκουν στο είδος *Pantoea agglomerans* (Kotan et al. 2009).

Συμπερασματικά, η παρούσα ερευνητική εργασία οδήγησε στην εύρεση αποτελεσματικών ενδημικών επιφυτικών βακτηρίων κατά του μυκοτοξικογόνου μύκητα *A. flavus*. Τα συγκεκριμένα βακτήρια εμφάνισαν σημαντικά υψηλή ικανότητα παρεμπόδισης της παραγωγής αφλατοξινών, τόσο σε υγρή συγκαλλιέργεια όσο και πειράματα σε σπόρους αραβοσίτου. Για να αξιολογηθεί περαιτέρω η αποτελεσματικότητα των συγκεκριμένων ενδημικών απομονώσεων και ιδιαίτερα της πιο αποτελεσματικής απομόνωσης, ως προς την ικανότητα μείωσης των παραγόμενων αφλατοξινών, θα πρέπει ενδεχομένως να γίνει αξιολόγηση σε μεγαλύτερο αριθμό φιστικέων και ανάλυση των δειγμάτων με ακριβέστερες μεθόδους όπως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Επιπλέον, για την εύρεση του βέλτιστου τρόπου εφαρμογής της βακτηριακής απομόνωσης 579B ως παράγοντα βιολογικής αντιμετώπισης πρέπει να βρεθεί ο τρόπος δράσης του συγκεκριμένου βακτηρίου. Πιθανοί τρόποι δράσης είναι η παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ο ανταγωνισμός για χώρο και για θρεπτικό υλικό, ο παρασιτισμός και η επαγωγή της αντοχής, με πτητικές οργανικές ενώσεις (volatile organic compounds (VOCs)) ή με επαγωγή του αμυντικού συστήματος του ξενιστή.

Τέλος, καθώς η γεωργία και τα έξυπνα και ολοκληρωμένα συστήματα γεωργικής παραγωγής στρέφονται ολοένα και πιο πολύ στους βιολογικούς αλλά και οικονομικότερους τρόπους αντιμετώπισης των ασθενειών, κρίνεται αναγκαίο να δοθεί μια λύση ασφαλής για τους καταναλωτές και οικονομικά συμφέρουσα για τους παραγωγούς στο πρόβλημα των αφλατοξινών στη καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού. Είναι γεγονός, ότι η μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών έχει απασχολήσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών παγκοσμίως, διότι η εύρεση μίας καινοτόμου και βιώσιμης λύσης καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη αφού οι παράγοντες που εμπλέκονται στην διαδικασία είναι πολύπλευροι.

## Κεφάλαιο 5: ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *A. FLAVUS* ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΣΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ

### 5.1. Περίληψη

Οι αφλατοξίνες που παράγει ο μύκητας *Aspergillus flavus* είναι μία από τις σημαντικότερες αιτίες ποσοτικής και ποιοτικής υποβάθμισης των κελυφωτών φιστικιών, τα οποία θεωρούνται ένας από τους ωφελιμότερους ξηρούς καρπούς. Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής ενότητας διερευνήθηκε αρχικά η *in vitro* επίδραση 20 μυκητοκτόνων δραστικών ουσιών των ομάδων SDHIs, QoIs, ανιλοπυριμιδινών, DMIs, τριαζολών, ιμιδαζολών, φαινυλοπυρρολικών, γουανιδινών, δικαρβοξυμιδικών, χλωρονιτρικών, βενζιμιδαζολικών, διθειοκαρβαμικών και δίνιτρο-ανιλινών ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης την μυκηλιακής ανάπτυξης 10 ισχυρά τοξικογόνων ενδημικών στελεχών *A. flavus* που ταυτοποιήθηκαν μοριακά. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ως πιο αποτελεσματικές τις δραστικές ουσίες που ανήκουν στις ομάδες των ανιλοπυριμιδινών, φαινυλοπυρρολικών και ιμιδαζολών. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για τις δραστικές ουσίες pyrimethanil, cyprodinil, fludioxonil, prochloraz και imazalil. Στη συνέχεια, έγινε επιλογή 23 εμπορικών χημικών φυτοπροσταυτικών σκευασμάτων με βάση κυρίως τις 20 επιλεγμένες δραστικές ουσίες, προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των σκευασμάτων αυτών να μειώνουν τις *in situ* παραγόμενες αφλατοξίνες από ένα ενδημικό ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος σε καρπούς φιστικιών. Η παρεμπόδιση στην παραγωγή αφλατοξινών από ορισμένα σκευάσματα έφτασε το 100% συγκριτικά με το μάρτυρα, ενώ πολλά σκευάσματα παρεμπόδισαν άνω του 80% την παραγωγή αφλατοξινών. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση 3 εμπορικών σκευασμάτων εκ των πιο αποτελεσματικών (Switch<sup>®</sup>, Octave<sup>®</sup> και Scala<sup>®</sup>), σε 3 φιστικεώνες στην Αίγινα, κατά των παραγόμενων αφλατοξινών του *A. flavus* σε σειρά δύο ετών (2017 και 2018), όπου και πάλι η παρεμπόδιση κυμάνθηκε άνω του 80%, αγγίζοντας το 100% σε πολλές περιπτώσεις.

## 5.2. Εισαγωγή

Η χημική αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών, αποτέλεσε έναν από τους κύριους πυλώνες της φυτοπροστασίας από την αρχή της εντατικοποίησης της αγροτικής παραγωγής κατά τον 20<sup>ο</sup> αιώνα και ύστερα, με σκοπό την μείωση οικονομικών απωλειών για τους παραγωγούς. Παρόλα αυτά, η ιδιαιτέρως εκτεταμένη εφαρμογή συνθετικών-χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων, κατέστησε αναγκαία την εξεύρεση νέων προοπτικών στο πλαίσιο της αειφόρου γεωργίας και βιώσιμης παραγωγής. Μολονότι προέκυψαν νέες εναλλακτικές μέθοδοι για τη διαχείριση των ασθενειών των φυτών, όπως η βιολογική αντιμετώπιση, η χημική καταπολέμηση παραμένει ένα ιδιαιτέρως χρήσιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση των μυκήτων που προσβάλλουν τις καλλιέργειες. Πρόκειται για ένα οικονομικά αποδοτικό μέτρο διαχείρισης, εάν εφαρμόζεται στο σωστό αναπτυξιακό στάδιο της καλλιέργειας. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα που περιέχουν χημικά μόρια ως δραστικές ουσίες, χρησιμοποιούνται ευρέως παγκοσμίως για τον έλεγχο σημαντικών και ζημιογόνων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών όπως μύκητες των γενών *Fusarium*, *Monilia*, αλλά και περonosπόρους και οΐδια (De Curtis et al. 2011, Thomidis et al. 2009).

Οι πρώτες προσπάθειες να αντιμετωπιστούν οι αφλατοξικογόνοι μύκητες του γένους *Aspergillus* με χημικό τρόπο σε προσυλλεκτικό στάδιο, έγιναν κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 (Bean et al. 1983, Mixon et al. 1984, Schmitt et al. 1988). Στη συνέχεια και με την πάροδο των ετών διερευνήθηκε η επίδραση χημικών δραστικών ουσιών και εμπορικών σκευασμάτων στην ανάπτυξη των μυκήτων *Aspergillus* και το σχηματισμό κονιδίων αλλά και το σχηματισμό μυκηλιακών κατασκευών και μυκηλιακών χρωστικών (Wheeler et al. 1995, Doukas et al. 2012, Bayman et al. 1990). Η ευαισθησία και η ανθεκτικότητα των μυκήτων σε χημικές δραστικές ουσίες δεν μελετάται πιθανόν πλέον στον ίδιο βαθμό, καθώς τα εγκεκριμένα εμπορικά σκευάσματα με χημικές δραστικές ουσίες μειώνονται αισθητά σε Ευρωπαϊκό επίπεδο, με σκοπό τη μείωση των χημικών εισροών στην τροφική αλυσίδα (Santos et al. 2011, Suberu 2004). Σύμφωνα με έρευνες για ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης αφλατοξινών για την καλλιέργεια του αραβοσίτου, μυκητοκτόνες δραστικές ουσίες όπως azoxystrobin, pyraclostrobin, propiconazole και trifloxystrobin είναι αποτελεσματικές στην μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών (Abbas et al. 2009). Είναι επίσης αποδεδειγμένο πως οι παρεμποδιστές της αναπνευστικής αλυσίδας, κυρίως αυτοί του συμπλόκου 2 και του συμπλόκου 3, όπως οι δραστικές ουσίες boscalid, pyraclostrobin, kresoxim-methyl και azoxystrobin έχουν παρεμποδιστική δράση κατά των μυκήτων *A. flavus* και *A. parasiticus* και των αφλατοξινών που παράγουν (Kim et al. 2014, Sakuda et al. 2014). Επιπρόσθετα, φυτοπροστατευτικά προϊόντα όπως τα Switch<sup>®</sup> και Geoxe<sup>®</sup> της Syngenta που περιέχουν δραστικές ουσίες όπως fludioxonil και cyprodinil, μειώνουν σημαντικά τις σήψεις που προκαλούνται από τους μύκητες *Aspergillus* αλλά και την παραγωγή αφλατοξινών έως και κατά 83% σε σπόρους καλαμποκιού (Lagogianni et al. 2018).

Αζόλες όπως οι τριαζόλες έχουν επίσης αξιολογηθεί ως προς την ικανότητά τους να μειώνουν τις αφλατοξίνες που παράγονται από τα γένη μυκήτων *Aspergillus* (Espinell-Ingroff et al. 2002, Brenneman et al. 1993). Ακόμη, δραστικές ουσίες όπως οι carbendazim και propiconazole έχουν αξιολογηθεί ως προς τη μείωση των αφλατοξινών στην καλλιέργεια του ρυζιού στην Ινδία με εντυπωσιακά αποτελέσματα (Reddy et al. 2009). Τριαζόλες και βενζιμιδαζολικά έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των παραγόμενων μυκοτοξινών από μύκητες του γένους *Fusarium* όπως η 3-ADON (D'Mello et al. 1998). Περαιτέρω έρευνα στις ανιλοπυριμιδίνες και τις φαινυλοπυρόλες υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα των fludioxonil και pyrimethanil έναντι απομονώσεων του μύκητα *Penicillium digitatum* (Kanetis et al. 2008), ενώ παράλληλα άλλες έρευνες επισημαίνουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας των μυκήτων *Aspergillus*, απομονωμένους από την καλλιέργεια της αραχίδας, στη δραστική ουσία pyrimethanil (Liu et al. 2014). Επίσης έχει αναφερθεί ότι μύκητες του γένους *Aspergillus* απομονωμένοι από σκόνη πιπεριάς, μπορούν να αντιμετωπιστούν



επιτυχώς με εφαρμογή δραστικών ουσιών όπως cyprodinil, fludioxonil και mancozeb προκειμένου να μειωθεί η παραγωγή αφλατοξινών τους (Santos et al. 2011).

Ο μύκητας *A. fumigatus* που αποτελεί σημαντικό ανθρωποπαθογόνο μικροοργανισμό, προκαλεί ασπεργιλλίωση στον άνθρωπο, όπως και οι μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus*. Από έρευνες ανθεκτικότητας, έχει διαπιστωθεί η δημιουργία ανθεκτικότητας απομονώσεων του μύκητα σε τριαζόλες που εφαρμόζονται στην πρωτογενή παραγωγή, σε διάφορα στάδια της γεωργικής πρακτικής αλλά και στην ανθρώπινη ιατρική (Chowdhary et al. 2012, Chowdhary et al. 2013, Lago et al. 2014, Snelders et al. 2012). Ως εκ τούτου, η επιλογή των κατάλληλων μυκητοκτόνων καθίσταται περίπλοκο ζήτημα. Η περιπλοκότητα του ζητήματος εντείνεται λόγω του γεγονότος ότι η ανάπτυξη των μυκήτων *Aspergillus* δεν συσχετίζεται απαραίτητα με την παραγωγή μυκοτοξινών, καθώς μυκητοκτόνα που μειώνουν την ανάπτυξη των μυκήτων όπως τα ιμιδαζολικά, έχει παρατηρηθεί πως μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή μυκοτοξινών που παράγονται από μύκητες του γένους *Penicillium* (Schmidt-Heydt et al. 2013). Επιπρόσθετα, υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα που συσχετίζουν την χαμηλή παραγωγή αφλατοξινών με την ανθεκτικότητα στις φαινολοπυρόλες όπως το fludioxonil (Markoglou et al. 2008), ενώ στον αντίποδα, η υψηλή παραγωγή αφλατοξινών έχει συσχετισθεί με την ανθεκτικότητα στις ανιλοπιριμιδίνες όπως το cyprodinil (Markoglou et al. 2011).

Λόγω των προαναφερθέντων δεδομένων, η έρευνα γύρω από τη χημική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών θα πρέπει να είναι στοχευμένη σε καλλιέργειες και μικροοργανισμούς απομονωμένους από τις εν λόγω καλλιέργειες, αλλά και τα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα που μελετώνται θα πρέπει να αξιολογούνται σε πραγματικές συνθήκες αγρού. Τέτοια έρευνα μπορεί να αναδείξει καινοτόμες προσεγγίσεις για την χημική αντιμετώπιση των αφλατοξινών (Lagogianni et al. 2018, Formenti et al. 2012). Η ανάγκη για παρόμοιες προσεγγίσεις γίνεται επιτακτική λόγω της έλλειψης εγκεκριμένων χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων για την αντιμετώπιση των αφλατοξινών. Υπάρχοντα προϊόντα μπορεί να είναι αποτελεσματικά στη διαχείριση των μυκήτων του γένους *Aspergillus* και των αφλατοξινών που παράγουν, και αυτό είναι ένα πεδίο έρευνας με υποσχόμενες προοπτικές. Σε κάθε περίπτωση, η χημική αντιμετώπιση θα πρέπει να ενσωματώνεται σε ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης αφλατοξινών.

### 5.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας

Καθώς το πρόβλημα των αφλατοξινών στην καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών είναι υπαρκτό, η παρούσα ερευνητική ενότητα είχε στόχο τη διερεύνηση ύπαρξης χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων με ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των αφλατοξικογόνων μυκήτων *A. flavus* αλλά και την παραγωγή αφλατοξινών. Πιο συγκεκριμένα οι επιμέρους στόχοι της παρούσας ενότητας ήταν οι εξής:

- Επιλογή 20 δραστικών ουσιών προκειμένου να διερευνηθεί η *in vitro* ανθεκτικότητα/ευαισθησία 10 ενδημικών ισχυρά τοξικογόνων απομονώσεων του μύκητα *Aspergillus flavus* σε τρυβλίο, που απομονώθηκαν από φιστικεώνες στην Αίγινα στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.
- Επιλογή 23 εμπορικών χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων με βάση κυρίως τις 20 επιλεγμένες δραστικές ουσίες, προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των σκευασμάτων αυτών να μειώνουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες από ένα ενδημικό ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος πάνω σε καρπούς φιστικιών σε συνθήκες εργαστηρίου.
- Αξιολόγηση 3 αποτελεσματικών εμπορικών σκευασμάτων σε 3 φιστικεώνες στην Αίγινα, κατά των παραγόμενων αφλατοξινών του μύκητα *A. flavus* σε σειρά δύο ετών (2017 και 2018).



## 5.4. Μεθοδολογία

### 5.4.1. Θρεπτικά υλικά

Για τους σκοπούς της παρούσας ερευνητικής ενότητας χρησιμοποιήθηκαν τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση και ανάπτυξη των απομονώσεων του μύκητα. Αυτά ήταν τα εξής:

#### Dichloran Rose Bengal (DRBC)

Πεπτόνη (CondaLab)	5 g
Γλυκόζη	1 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ )	1 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,5 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Χρωστική Rose Bengal	$25 \text{ mg L}^{-1}$
Άγαρ	20 g

Αποστείρωση στους  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  για 20 λεπτά και μετά από σταθεροποίηση στους  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , προσθήκη 2 αντιβιοτικών στις εξής συγκεντρώσεις  $2 \text{ mg L}^{-1}$  dichloran και  $100 \text{ mg L}^{-1}$  chloramphenicol.

#### 5:2 Low nutrient medium

Χυμός V-8	50 mL
Απεσταγμένο νερό	950 mL
pH	6
Άγαρ	20 g

Αποστείρωση στους  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  για 20 λεπτά.

#### Coconut cream Agar (CCA)

Γάλα καρύδας	250 mL
Απεσταγμένο νερό	750 mL
pH	6,9
Άγαρ	20 g

Αποστείρωση στους  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  για 20 λεπτά.

#### Malt Extract Agar (MEA)

Έτοιμη σκόνη προς διάλυση σε απεσταγμένο νερό, της εταιρείας LAB M Ltd.

Αποστείρωση στους  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  για 20 λεπτά.

#### Czapek Dox Agar (CZA)

Νιτρικό νάτριο ( $NaNO_3$ )	2 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ )	1 g
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	0,5 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,5 g
Επταένυδρος θειικός σίδηρος ( $FeSO_4$ )	0,1 g

Σακχαρόζη	30 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL
Άγαρ	15 g

Αποστείρωση στους 120 °C για 20 λεπτά.

#### Water-Agar (WA)

Άγαρ	20 g
Απεσταγμένο νερό	1000 mL

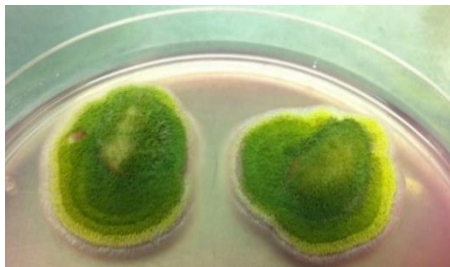
Αποστείρωση στους 120 °C για 20 λεπτά.

### 5.4.2. Μέθοδοι

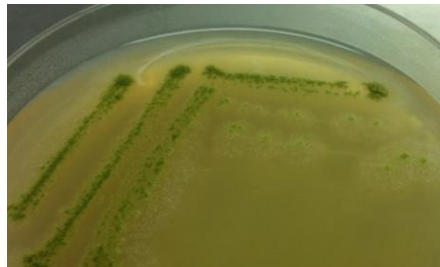
#### 5.4.2.1. Απομόνωση στελεχών *Aspergillus section Flavi* και αξιολόγηση της αφλατοξικογόνου ικανότητάς τους

Κατά το έτος 2014, πραγματοποιήθηκε συλλογή καρπών φιστικιών στο στάδιο της συγκομιδής από φιστικεώνες στην Αίγινα, που χρονικά συμβαίνει περίπου στο τέλος Αυγούστου σε αυτή την περιοχή. Η δειγματοληψία έγκειται στα πλαίσια του Κεφαλαίου 2 της παρούσας διατριβής. Από 10 φιστικεώνες εκ του συνόλου, επιλέχθηκε ένα ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος από κάθε φιστικεώνα, προκειμένου να υπάρξει ποικιλομορφία της σύνθεσης της ομάδας των 10 απομονώσεων και να έχουν απομονωθεί από διαφορετικές περιοχές και φιστικεώνες.

Η απομόνωση έγινε σε τρυβλία με τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα DRBC. Τα φιστίκια από κάθε αγρό, αρχικά αποστειρώθηκαν επιφανειακά με εμβάπτιση σε υποχλωριώδες νάτριο 0,05% (υδατικό διάλυμα 10% εμπορικού διαλύματος χλωρίνης) για 3 λεπτά και στη συνέχεια σε 70% αιθανόλη για 1 λεπτά. Τέλος, ακολούθησε έκπλυση σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και τοποθέτηση υπό ασηπτικές συνθήκες στα τρυβλία με το τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε επώαση των τρυβλίων για 4-6 ημέρες σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με σταθερή θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 10 ωρών. Μετά το πέρας των 4-6 ημερών και εφόσον είχαν αναπτυχθεί από τους καρπούς απομονώσεις *Aspergillus section Flavi* (Εικ. 5.1), η καλλιέργεια μεταφερόταν με γραμμική διασπορά (streaking) με την χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου και υπό ασηπτικές συνθήκες σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα 5:2. Στη συνέχεια, ακολουθούσαν 3 διαδοχικές σειρές καθαρισμού των στελεχών σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα 5:2 (Εικ. 5.2), προκειμένου να ληφθεί καθαρή μονόσπορη καλλιέργεια του στελέχους και να αποθηκευτεί σε αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα 25% γλυκερόλης στους -80°C για μακροχρόνια διατήρηση. Μεταξύ κάθε διαδοχής σειράς καθαρισμού σε 5:2 μεσολαβούσε διάστημα επώασης δύο ημερών σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με σταθερή θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 10 ωρών.



**Εικόνα 5.1:** Καρποί φιστικιών σε υπόστρωμα DRBC μετά από 5 ημέρες επώαση. Στελέχη *Aspergillus section Flavi* έχουν αναπτυχθεί επί των καρπών.



**Εικόνα 5.2:** Γραμμική διασπορά των μυκήτων *Aspergillus section Flavi* σε υπόστρωμα 5:2 μετά από 2 ημέρες επώαση.

Η αφλατοξικογόνο ικανότητα των απομονώσεων αξιολογήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) όπως έχει περιγραφεί και στα προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διατριβής. Τα στελέχη επώασθηκαν σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα CCA για 15 ημέρες στους 28 °C, με σχετική υγρασία άνω του 80% και συνθήκες σκότους. Η εκχύλιση αφλατοξινών διεξήχθη χρησιμοποιώντας 5 mL χλωροφόρμιο και η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας σύστημα διαλύτη συνολικού όγκου 100 mL που περιείχε 96 mL διαιθυλαιθέρα, 3 mL μεθανόλης και 1 mL νερό. Οι πλάκες TLC εμφανίστηκαν υπό υπεριώδες φως (254 nm). Οι πλάκες TLC (TLC Silica gel 60, 20x20 cm) που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από τη Merck και το χλωροφόρμιο και ο διαιθυλαιθέρας αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich.

#### 5.4.2.2. Μοριακή ταυτοποίηση των απομονώσεων

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μοριακή ταυτοποίηση των δέκα στελεχών *Aspergillus section Flavi* και να επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται για είδη *A. flavus*, αυτά υποβλήθηκαν σε μοριακή ανάλυση. Μυκήλιο από κάθε απομόνωση/στέλεχος του μύκητα, συλλέχθηκε με απόξεση της επιφάνειας μιας καλλιέργειας δύο ημερών που αναπτυσσόταν σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα MEA, στους 28 °C σε συνθήκες σκότους. Για την εξαγωγή του DNA, τα μυκηλία τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf 1,5 mL και αυτά τοποθετήθηκαν σε φιάλη υγρού αζώτου και στη συνέχεια λυοφιλώθηκαν. Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 100 mg λυοφιλωμένου μυκηλίου από κάθε απομόνωση.

Η εξαγωγή του DNA πραγματοποιήθηκε με ένα ήδη δημοσιευμένο πρωτόκολλο (Lee et al. 1990). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) διεξήχθη σε αντίδραση όγκου 50  $\mu$ l που περιείχε 20 ng μυκηλιακού γονιδιωματικού DNA, 0,2  $\mu$ M από έκαστο εκκινητή, 0,2 mM εκάστου dNTP, ρυθμιστικού διαλύματος 10xPCR Rxn (Invitrogen), 0,075 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) και 2,5 μονάδες DNA πολυμεράσης (Invitrogen, Taq DNA πολυμεράση). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση (CL1 5'-3': GARTWCAAGGAGGCCTTCTC και CL2 5'-3': TTTTGCATCATGAGTTGGAC), ενισχύουν το γονίδιο καλμοδουλίνης. Η PCR διεξήχθη με τους ακόλουθους κύκλους χρόνου-θερμοκρασίας: προθέρμανση για 2 λεπτά στους 94 °C, ακολουθούμενη από 40 κύκλους μετουσίωσης στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, ανόπτηση στους 57 °C για 30 δευτερόλεπτα, επέκταση στους 72 °C για 1 λεπτό και τελική επέκταση στους 72 °C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Μετά την ηλεκτροφόρηση σε 1% ηλεκτροφόρηση σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTris-acetate-EDTA (TAE), τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό αλληλουχίας στην εταιρεία CEMIA και οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε BLAST ανάλυση (NCBI) προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ταυτοποίησή τους με *A. flavus*.

### 5.4.2.3. Μυκητοκτόνες δραστικές ουσίες και εμπορικά μυκητοκτόνα σκευάσματα

Οι δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* βιοδοκιμές ήταν καθαρές και τεχνικής ποιότητας (pure-technical grade). Για τις ανάγκες της παρούσας ερευνητικής ενότητας επιλέχθηκαν είκοσι χημικές δραστικές ουσίες και χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* δοκιμές μυκητοτοξικότητας σε διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως για τέτοιες μελέτες (Πίν. 5.1). Το boscalid επιλέχθηκε από τους παρεμποδιστές της ηλεκτρικής αφυδρογόνωσης στο σύμπλοκο II στην αναπνευστική αλυσίδα (Succinate-dehydrogenase inhibitors (SDHIs)) και πιο συγκεκριμένα από την υποομάδα των πυριδινο-καρβοξαμιδικών (pyridine-carboxamides). Επίσης από την ίδια ομάδα των SDHIs, επιλέχθηκε το fluopyram που ανήκει στην υποομάδα των πυραμιδών (pyridinyl-ethyl-benzamides). Το kresoxim-methyl επιλέχθηκε από την ομάδα παρεμποδιστών QoI (Quinone outside Inhibitors) του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας και πιο συγκεκριμένα στο κυτόχρωμα bc1, στη θέση Qo. Το pyrimethanil και το cyprodinil επιλέχθηκαν από την ομάδα των ανιλοπυριμιδινών (anilino-pyrimidines (A.P.)). Επόμενη ομάδα ήταν αυτή των παρεμποδιστών απομεθυλίωσης (DeMethylation Inhibitors (DMIs)). Πολυπληθής υποομάδα αυτής, είναι οι τριαζόλες (triazoles) από την οποία επιλέχθηκαν οι δραστικές ουσίες flusilazole, propiconazole, tebuconazole, eproconazole cyproconazol και difenoconazole. Άλλη υποομάδα των DMIs είναι οι μιδαζόλες, από τις οποίες επιλέχθηκαν οι δραστικές ουσίες prochloraz και imazalil. Από την ομάδα των φαινυλοπυρρολικών (Pheny-Pyrroles (P.P.)) επιλέχθηκε το fludioxonil. Το dodine επιλέχθηκε από τις γουανιδίνες (guanidines). Το iprodione επιλέχθηκε από τα δικαρβοξιμιδικά (dicarboximides). Το chlorothalonil επιλέχθηκε από τα χλωρονιτρικά (chloronitriles) ή αλλιώς φθαλονιτρικά (phthalonitriles), το thiophanate-methyl επιλέχθηκε από τα βενζιμιδαζολικά (Methyl Benzimidazole Carbamates (M.B.C.)), ενώ το mancozeb επιλέχθηκε από την ομάδα των διθειοκαρβαμικών (dithiocarbamates). Το fluazinam επιλέχθηκε από τις δίνιτρο-ανιλίνες (2,6-dinitro-anilines). Η κατηγοριοποίηση των χημικών δραστικών ουσιών έγινε κατά FRAC (FRAC © Code List 2020).

Οι δραστικές ουσίες cyprodinil, fludioxonil, difenoconazole και propiconazole προσφέρθηκαν ευγενικά από την Syngenta Hellas A.E.B.E., το flusilazole χορηγήθηκε από την DuPont Hellas S.A., ενώ το fluazinam προσφέρθηκε ευγενικά από τη Nufarm. Το tebuconazole αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich. Οι δραστικές ουσίες mancozeb, thiophanate-methyl, boscalid, pyrimethanil και kresoxim-methyl αγοράστηκαν από την Fluka Analytical. Οι υπόλοιπες δραστικές ουσίες ανήκαν στην συλλογή δραστικών ουσιών του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

**Πίνακας 5.1:** Οι 20 δραστικές ουσίες που αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα και οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν.

Δραστικές ουσίες	Συγκεντρώσεις (μg mL <sup>-1</sup> )				
	0,1	10	50		
boscalid	0,1	10	50		
chlorothalonil	0,05	0,1	0,5	1	5
cyproconazole	0,05	0,1	0,5	1	5
cyprodinil	0,01	0,1	1	10	50
difenoconazole	0,01	0,1	1		
dodine	0,05	0,1	0,5	1	5
epoxiconazole	0,05	0,1	0,5	1	5
fluazinam	0,05	0,1	0,5	1	5
fludioxonil	0,1	1	10	50	
fluopyram	0,05	0,1	0,5	1	5
flusilazole	0,01	0,05	0,1		
imazalil	0,05	0,1	0,5	1	5
iprodione	0,05	0,1	0,5	1	5
kresoxym-methyl	0,1	0,5	1		
mancozeb	0,1	0,5	1		
prochloraz	0,05	0,1	0,5	1	5
propiconazole	0,1	1	5		
pyrimethanil	0,01	0,1	1		
tebuconazole	0,05	0,1	0,5	1	5
thiophanate-methyl	1	5	25		

Τα εμπορικά μυκητοκτόνα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προσφέρθηκαν από τις Syngenta Hellas A.E.B.E., Hellafarm, BASF Hellas S.A., DuPont Hellas S.A., ΆΛΦΑ Γεωργικά Εφόδια, Agrology Paraeconomidou S.A. και BAYER Hellas. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 23 εμπορικά προϊόντα. Τα μυκητοκτόνα εμπορικά σκευάσματα (M1-M23) παρατίθενται στον Πίνακα 5.2 με τις αντίστοιχες περιεκτικότητές τους σε δραστικές ουσίες και τη δόση που εφαρμόστηκε στα πειράματα αξιολόγησης μείωσης των παραγόμενων αφλατοξινών σε καρπούς φιστικιών *in situ*.

**Πίνακας 5.2:** Τα 23 εμπορικά σκευάσματα (M1-M23) που αξιολογήθηκαν στη παρούσα μελέτη, με την αντίστοιχη περιεκτικότητά τους σε δραστική ουσία και η δόση που εφαρμόστηκε.

Μυκητοκτόνα	Εμπορικό όνομα	Δραστική ουσία	Δόση
M1	Armure <sup>®</sup> 15/15 EC	15% propiconazole + 15% difenoconazole	1 mL L <sup>-1</sup>
M2	Bumper <sup>®</sup> 25 EC	25% propiconazole	0,3 mL L <sup>-1</sup>
M3	Chorus <sup>®</sup> 50 WG	50% cyprodinil	5 g L <sup>-1</sup>
M4	Comet <sup>®</sup> 20 EC	20% pyraclostrobin	12,5 mL L <sup>-1</sup>
M5	Daconil <sup>®</sup> 500 SC	50% chlorothalonil	2,5 mL L <sup>-1</sup>
M6	Epok <sup>®</sup> 600 EC	40% fluazinam + 19,36% metalaxyl-M	0,4 mL L <sup>-1</sup>
M7	Fungazil <sup>®</sup> 500 EC	50% imazalil	2 mL L <sup>-1</sup>
M8	Geoxe <sup>®</sup> 50 WG	50% fludioxonil	1 g L <sup>-1</sup>
M9	Luna exp. <sup>®</sup> 400 SC	20% fluopyram + 20% tebuconazole	0,5 mL L <sup>-1</sup>
M10	Mystic <sup>®</sup> 25 EC	25% tebuconazole	1 mL L <sup>-1</sup>
M11	Nativo <sup>®</sup> 75 WG	50% tebuconazole + 25% trifloxystrobin	0,16 g L <sup>-1</sup>
M12	Octave <sup>®</sup> 46 WP	46,1% prochloraz	0,6 mL L <sup>-1</sup>
M13	Ohayo <sup>®</sup> 50 SC	50% fluazinam	1,5 mL L <sup>-1</sup>
M14	Opera <sup>®</sup> 8,5/6,25 SE	8,5% pyraclostrobin + 6,25% epoxiconazole	5 mL L <sup>-1</sup>
M15	Ortiva Opti <sup>®</sup> 8/40 SC	8% azoxystrobin + 40% chlorothalonil	2,5 mL L <sup>-1</sup>
M16	Ortiva <sup>®</sup> 25 SC	25% azoxystrobin	1,6 mL L <sup>-1</sup>
M17	Punch <sup>®</sup> 40 EC	40% flusilazole	1 mL L <sup>-1</sup>
M18	Quadris <sup>®</sup> 25 SC	25% azoxystrobin	1 mL L <sup>-1</sup>
M19	Scala <sup>®</sup> 40 SC	40% pyrimethanil	1,5 mL L <sup>-1</sup>
M20	Score <sup>®</sup> 25 EC	25% difenoconazole	2 mL L <sup>-1</sup>
M21	Spyrale <sup>®</sup> 10/37,5 EC	37,5% fenpropidin + 10% difenoconazole	4 mL L <sup>-1</sup>
M22	Switch <sup>®</sup> 25/37,5 WG	37,5% cyprodinil + 25% fludioxonil	1 g L <sup>-1</sup>
M23	Thiraphox <sup>®</sup> 40 WG	80% thiram	3 g L <sup>-1</sup>

#### 5.4.2.4. *In vitro* βιοδοκιμές μυκητοτοξικότητας

Η ευαισθησία των απομονωμένων στελεχών *A. flavus* έναντι μυκητοκτόνων δραστικών ουσιών προσδιορίστηκε με βάση τις τιμές EC<sub>50</sub>. Οι τιμές EC<sub>50</sub> για κάθε δραστική ουσία και για κάθε απομόνωση του μύκητα υπολογίστηκαν με βάση τη σχετική παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης για την κάθε συγκέντρωση του κάθε μυκητοκτόνου. Οι υπολογισμοί διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας το Statgraphics<sup>®</sup>. Οι μετρήσεις παρεμπόδισης πραγματοποιήθηκαν σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα Czapek-Dox (CZA) τροποποιημένο με κάθε δραστική ουσία στις ανάλογες συγκεντρώσεις. Έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε δραστική ουσία και για κάθε συγκέντρωση, ενώ εφαρμόστηκαν τουλάχιστον 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις από κάθε δραστική ουσία (Πίν. 5.1). Τμήματα μυκηλίου 3x3 mm από τη περιφέρεια μίας αναπτυσσόμενης



καλλιέργειας κάθε στελέχους σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα Water-Agar (WA) χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο και μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε κάθε τρυβλίο με CZA και την αντίστοιχη συγκέντρωση μυκητοκτόνου. Οι καλλιέργειες επώστηκαν στους 28 °C για 5 ημέρες και η διάμετρος της αποικίας μετρήθηκε ημερησίως και εκφράστηκε ως ποσοστό της διαμέτρου του μάρτυρα, που ήταν τρυβλίο χωρίς την προσθήκη μυκητοκτόνου που επέτρεπε την ανεμπόδιστη ανάπτυξη του στελέχους του μύκητα.

#### **5.4.2.5. *In situ* βιοδοκιμές παρεμπόδισης της ανάπτυξης του *A. flavus* και της παραγωγής αφλατοξινών**

Στη συγκεκριμένη ενότητα διερευνήθηκε η ικανότητα ορισμένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα *A. flavus* επί τεχνητώς μολυσμένων καρπών φιστικιών με βάση μια κλίμακα ορισμού της σοβαρότητας της ασθένειας. Επίσης, διερευνήθηκε η ικανότητα αυτών των σκευασμάτων να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών επί καρπών φιστικιών *in situ*.

##### **5.4.2.5.1. *In situ* βιοδοκιμές παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών**

Αποφλοιωμένοι και αποκολλημένοι από το κέλυφος καρποί φιστικιών της ποικιλίας Αιγίνης χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα. Τα φιστίκια αρχικά αποστειρώθηκαν επιφανειακά με εμβάπτιση σε υποχλωριώδες νάτριο 0,05% (υδατικό διάλυμα 10% διαθέσιμου εμπορικού χλωρίου) για 11 λεπτά και στη συνέχεια σε 70% αιθανόλη για 6 λεπτά, και τέλος έγινε έκπλυση σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, τα φιστίκια τυλίχτηκαν σε αποστειρωμένα φύλλα χαρτιού Whatman No 1 μέχρι να στεγνώσουν πλήρως. Υδατικό διάλυμα από κάθε μυκητοκτόνο προϊόν παρασκευάστηκε σε 35 mL αποστειρωμένο απιονισμένο νερό χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες κωνικές φιάλες 250 mL. Τα μυκητοκτόνα που εφαρμόστηκαν και οι συγκεντρώσεις τους παρατίθενται στον Πίνακα 5.2. Δέκα καρποί φιστικιών επώστηκαν σε κάθε εναιώρημα μυκητοκτόνου για 30 λεπτά στους 28 °C σε περιστροφικό επωαστήριο στις 150 RPM και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία. Μετά από 24 ώρες, τα φιστίκια εμβολιάστηκαν-μολύνθηκαν τεχνητά με 10 μl κονιδιακού αιωρήματος του ενδημικού ισχυρά τοξικογόνου στελέχους A.f.18.4 ( $10^4$  κονιδίων mL<sup>-1</sup>) *Aspergillus flavus* που περιείχε 0,01% Tween20®. Τα εμβολιασμένα φιστίκια επώστηκαν στους 28°C για 7 ημέρες σε συνθήκες σκότους και 100% σχετική υγρασία. Το πείραμα επαναλήφθηκε εις τριπλούν. Μετά από 7 ημέρες, 30 πυρήνες φιστικιού που αντιστοιχούν σε όλες τις 3 επαναλήψεις κάθε μυκητοκτόνου σκευάσματος M1-M23 ομογενοποιήθηκαν και οι αφλατοξίνες εκχυλίστηκαν με ανάμιξη σε μεθανόλη 70% για 3 λεπτά χρησιμοποιώντας έναν αναμικτήρα υψηλής ταχύτητας (Ultra Turax T25 Basic IKA, Werke 6500-24.000 RPM.). Το εκχύλισμα εκλούστηκε μέσω αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού και συλλέχθηκε στη συνέχεια σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Falcon. Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη χρήση ενός ποσοτικού kit προσδιορισμού Elisa AgraQuand® συνολικών αφλατοξινών 4/40 μg kg<sup>-1</sup> (Romer Labs) (LOD=4 μg kg<sup>-1</sup>). Η απορρόφηση μετρήθηκε χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης ELx800 από την BioTek. Τα δείγματα που υπερέβαιναν το όριο ανίχνευσης των 40 μg kg<sup>-1</sup>, αραιώθηκαν κατάλληλα για να φθάσουν μια τιμή εντός του ορίου ανίχνευσης (4-40 μg kg<sup>-1</sup>).

##### **5.4.2.5.2. Διερεύνηση της ικανότητας παρεμπόδισης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην σοβαρότητα της ασθένειας από τον μύκητα *Aspergillus flavus***

Στο πλαίσιο των τεχνητών μολύνσεων που πραγματοποιήθηκαν στην προηγούμενη ενότητα 5.4.2.5.1., τα τεχνητώς μολυσμένα φιστίκια, παρατηρήθηκαν πριν την ομογενοποίηση και εκχύλιση τοξινών. Βάσει των οπτικών αποτελεσμάτων δημιουργήθηκε κλίμακα 1-5 με σκοπό τον προσδιορισμό της

σοβαρότητας της ασθένειας επί των καρπών των φιστικιών. Η κλίμακα ορίστηκε ως εξής, 1 = 0-20%, 2 = 20-40%, 3 = 40-60%, 4 = 60-80 %, 5 = 80-100% καρποί φιστικιών πλήρως αποικισμένοι από *A. flavus* και καλυμμένοι από τον αναπτυγμένο μύκητα. Η κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από τροποποίηση μίας ήδη υπάρχουσας κλίμακας για την αξιολόγηση της σοβαρότητας της ασθένειας που προκαλείται από φυτοπαθογόνους μύκητες (Bhat et al 2013). Η κλίμακα δημιουργήθηκε προκειμένου να συσχετιστούν τα αποτελέσματα μείωσης παραγωγής αφλατοξινών με τη μείωση ανάπτυξης του μύκητα και αποικισμού των φιστικιών. Η κάθε εφαρμογή μετρήθηκε θεωρώντας ως 3 διαφορετικές επαναλήψεις το κάθε ένα από τα τρυβλία.

#### **5.4.2.6. Διερεύνηση αποτελεσματικότητας φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων στην παραγωγή αφλατοξινών σε φιστικεώνες**

Με βάση τα αποτελέσματα της *in situ* παρεμπόδισης της παραγωγής αφλατοξινών, 3 εμπορικά σκευάσματα επιλέχθηκαν προκειμένου να εφαρμοστούν σε φιστικεώνες στην Αίγινα, με απώτερο σκοπό τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητάς τους στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών σε συνθήκες αγρού. Το Octave® 46 WP (46,1% prochloraz), το Scala® 40 SC (40% pyrimethanil) και το Switch® 25/37,5 WG (37,5% cyprodinil+25% fludioxonil) επιλέχθηκαν μετά από παρεμπόδιση 90%, 100% και 86% αντίστοιχα στη παραγωγή αφλατοξινών κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών δοκιμών σε καρπούς φιστικιών αλλά και πολύ υψηλή αποτελεσματικότητα των δραστικών ουσιών που περιέχουν, κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων μυκητοτοξικότητας *in vitro*, με τιμές  $EC_{50}$  κάτω από 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Η μελέτη διεξήχθη σε σύνολο τριών φιστικεώνων στην Αίγινα. Ένας από αυτούς χρησιμοποιήθηκε και τα δύο χρόνια (φιστικεώνας Α). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ένας ακόμη διαφορετικός φιστικεώνας για κάθε έτος (φιστικεώνας Β και Γ). Πρακτικά επιλέχθηκαν δύο φιστικεώνες για εφαρμογή στο νησί της Αίγινας για το 2017 και δύο φιστικεώνες για το 2018. Στον φιστικεώνα Α, που χρησιμοποιήθηκε και στα δύο χρόνια, η εφαρμογή των μυκητοκτόνων σκευασμάτων ακολουθήθηκε από εφαρμογή, 24 ώρες αργότερα, ενός εξαιρετικά τοξικογόνου στελέχους *A. flavus* απομονωμένου από φιστικεώνα από το νησί (στέλεχος A.f.18.4, που χρησιμοποιείται επίσης σε άλλα πειράματα της παρούσας μελέτης). Ως αποτέλεσμα, για αυτό το φιστικεώνα, η μόλυνση από αφλατοξίνες προκλήθηκε μηχανικά. Στην περίπτωση των άλλων δύο φιστικεώνων (Β, Γ) (ένα για κάθε έτος), αξιολογήθηκε το ιστορικό μόλυνσης από αφλατοξίνες, με βάση τα αρχεία των παραγωγών ως προς τη μόλυνση από αφλατοξίνες και για αυτό το λόγο επιλέχθηκαν με βάση την υπόθεση πως το φυσικό μόλυσμα θα έχει διατηρηθεί στον φιστικεώνα και θα προκαλέσει νέες φυσικές μολύνσεις. Κατά συνέπεια, δεν εφαρμόστηκε στέλεχος του μύκητα και η μόλυνση εμφανίστηκε φυσικά, με βάση την προαναφερθείσα υπόθεση, οδηγώντας πράγματι σε μελλοντική μόλυνση και περαιτέρω συσσώρευση αφλατοξινών.

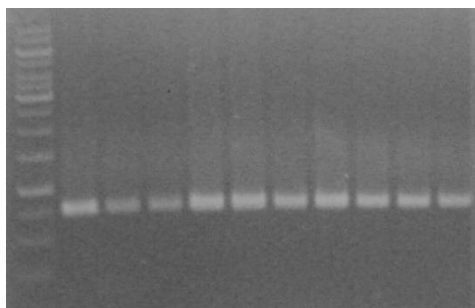
5 δένδρα φιστικιάς επιλέχθηκαν σε τυχαίες θέσεις σε κάθε φιστικεώνα για την εφαρμογή κάθε μυκητοκτόνου προϊόντος. Τα μυκητοκτόνα σκευάσματα εφαρμόστηκαν στο στάδιο της πρώιμης ωριμότητας των φιστικιών, περί στα μέσα Ιουνίου. Η δόση προσαρμόστηκε με βάση τη συνιστώμενη δόση που αναγράφεται στην ετικέτα κάθε προϊόντος σε παρεμφερείς καλλιέργειες. Ο μάρτυρας στο φιστικεώνα Α (επίσης 5 δένδρα) ψεκάστηκε με υδατικό εναιώρημα κονιδίων του τοξικογόνου στελέχους του μύκητα, 24 ώρες μετά την εφαρμογή του φυτοπροστατευτικού προϊόντος. Η συγκέντρωση των κονιδιακών αιωρημάτων ρυθμίστηκε σε  $10^4$  κονίδια  $\text{mL}^{-1}$  και τροποποιήθηκε με 0,01% Tween20®. Ο μάρτυρας στους φιστικεώνας Β και Γ δεν είχε καμία εφαρμογή, ούτε μυκητοκτόνου, ούτε του τοξικογόνου στελέχους του μύκητα. Η συγκομιδή των φιστικιών που χρησιμοποιήθηκαν στο τρέχον πείραμα διεξήχθη σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Ευρωπαϊκής Ένωσης που ορίζει τις μεθόδους και τους κανόνες

δειγματοληψίας, στα τέλη Αυγούστου, όταν τα φιστίκια φθάνουν την πλήρη ωρίμανσή τους. Τα φιστίκια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών χρησιμοποιώντας ένα φορητό ψυγείο. Η εκχύλιση και ανάλυση των αφλατοξινών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως στην παράγραφο *in situ* βιοδοκιμών και η ανάλυση διεξήχθη εις διπλούν.

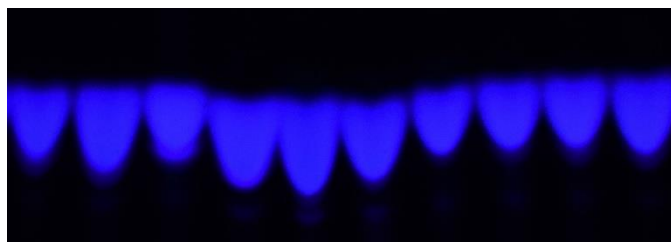
## 5.5. Αποτελέσματα

### 5.5.1. Μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών του μύκητα και προσδιορισμός της αφλατοξικογόνου ικανότητάς τους

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR έδειξαν ότι ένα τμήμα μεγέθους περίπου 700 ζευγών βάσεων ενισχύθηκε (Εικ. 5.3). Όσον αφορά στην αξιολόγηση της τοξικογόνου ικανότητας, η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC, έδειξε πως οι δέκα απομονώσεις του μύκητα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο, είναι ισχυρά τοξικογόνες (Εικ. 5.4). Η BLAST ανάλυση της αλληλουχίας που προέκυψε από την αλληλούχιση του ενισχυμένου τμήματος με την χρήση PCR, επιβεβαίωσε πως και οι δέκα απομονώσεις χαρακτηρίζονται ως *Aspergillus flavus* με ποσοστό ταυτοποίησης άνω του 97% (Πίν. 5.3). Κατά συνέπεια, μπορεί να διατυπωθεί πως πρόκειται πράγματι για στελέχη *Aspergillus flavus*.



**Εικόνα 5.3:** Ενισχυμένο τμήμα του γονιδίου του καλμοντουλίνης για τα 10 στελέχη του μύκητα.



**Εικόνα 5.4:** Χρωματογραφία TLC για τα δέκα στελέχη του μύκητα. Μπλε παρουσιάζεται η ζώνη της αφλατοξίνης B1 για το κάθε στέλεχος.

**Πίνακας 5.3:** Αποτελέσματα ταυτοποίησης για τις 10 απομονώσεις, ύστερα από Blast ανάλυση.

Απομόνωση	Αποτελέσματα ταυτοποίησης	
A.f.3.11	<i>Aspergillus flavus</i>	99%
A.f.4.12	<i>Aspergillus flavus</i>	99%
A.f.5.19	<i>Aspergillus flavus</i>	99%
A.f.6.4	<i>Aspergillus flavus</i>	100%
A.f.8.2	<i>Aspergillus flavus</i>	97%
A.f.9.8	<i>Aspergillus flavus</i>	99%
A.f.13.12	<i>Aspergillus flavus</i>	99%
A.f.15.25	<i>Aspergillus flavus</i>	99%
A.f.17.3	<i>Aspergillus flavus</i>	100%
A.f.18.4	<i>Aspergillus flavus</i>	99%

### 5.5.2. *In vitro* βιοδοκιμές μυκητοτοξικότητας

Οι είκοσι δραστικές ουσίες που αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την μυκηλιακή ανάπτυξη των δέκα στελεχών *A. flavus*, παρουσίασαν ποικιλομορφία αποτελεσματικότητας (Πίν. 5.4). Οι δοκιμές μυκητοτοξικότητας έδειξαν αυξημένη ανθεκτικότητα όλων των απομονώσεων του μύκητα στις δραστικές ουσίες boscalid, cyproconazole, dodine, fluopyram, iprodione, mancozeb και thiophanate-methyl με τιμές  $EC_{50}$  πάνω από  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Οι προαναφερθείσες δραστικές ουσίες χαρακτηρίζονται ως μη αποτελεσματικές για τον έλεγχο της μυκηλιακής ανάπτυξης των απομονώσεων του *A. flavus* που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Στις περιπτώσεις των δραστικών ουσιών difenoconazole, kresoxim-methyl και propiconazole ορισμένες απομονώσεις παρουσιάστηκαν ως ανθεκτικές με τιμές  $EC_{50}$  να φθάνουν τιμές είτε πολύ είτε λίγο πάνω από  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ενώ άλλες απομονώσεις ήταν ευαίσθητες. Η ευαισθησία του πληθυσμού του *A. flavus* σε αυτές τις δραστικές ουσίες δεν ακολούθησε ένα συγκεκριμένο πρότυπο, με αποτέλεσμα η ανθεκτικότητα να είναι μεταβλητή και οι δραστικές ουσίες να χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης σχετικά με την ικανότητά τους να ελέγχουν την μυκηλιακή ανάπτυξη του *A. flavus*. Ως αποτέλεσμα αυτές οι δραστικές ουσίες δεν μπορούν να χαρακτηριστούν άμεσα ως αποτελεσματικές για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης.

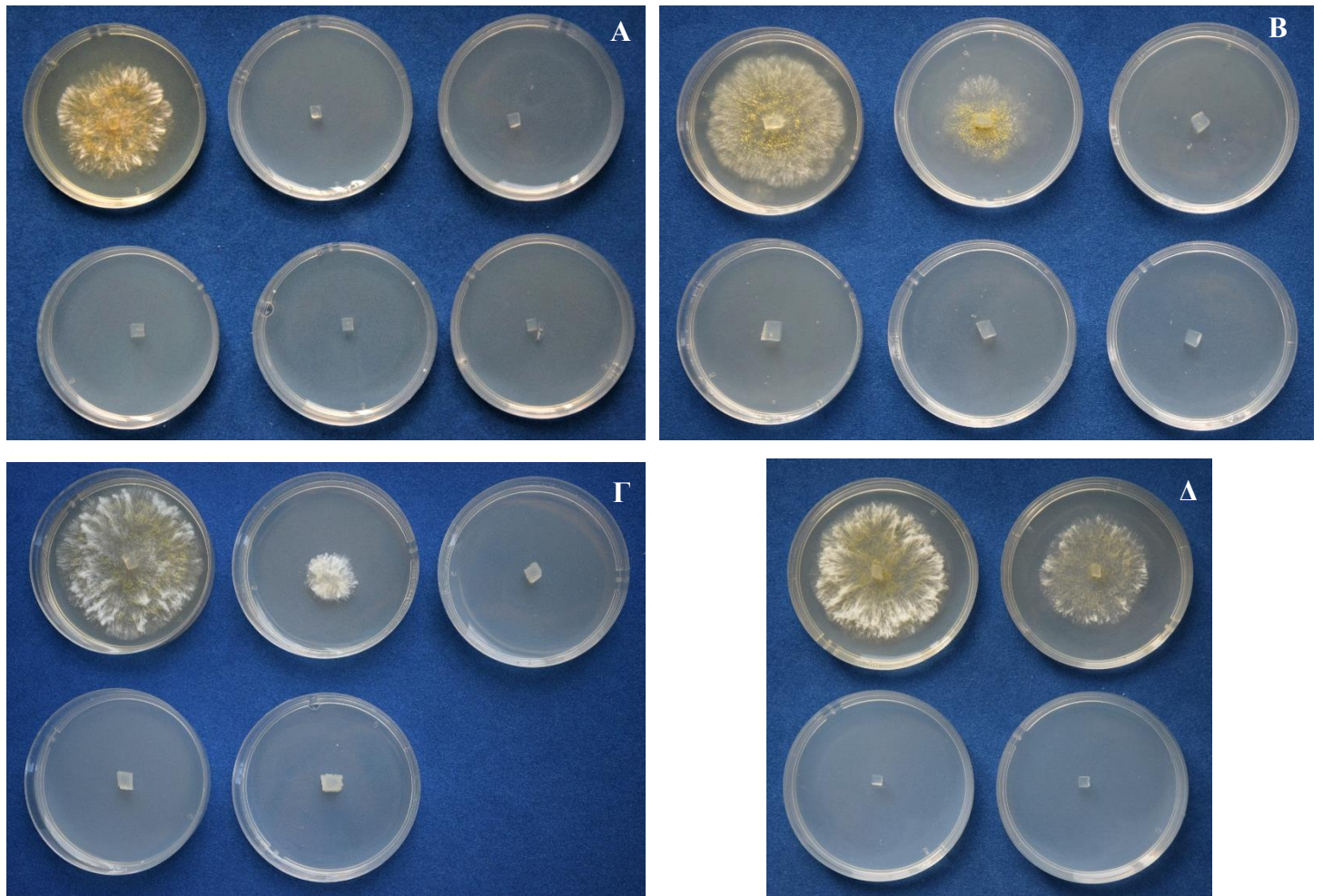
Οι δραστικές ουσίες chlorothalonil, epoxiconazole, fluazinam και tebuconazole παρουσίασαν τιμές  $EC_{50}$  κάτω από  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , αλλά πάνω από  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , κατά συνέπεια θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως μετρίως αποτελεσματικές. Ελαφρώς αποτελεσματικότερο κρίνεται το imazalil, του οποίου οι τιμές  $EC_{50}$  στις δέκα απομονώσεις του μύκητα, ήταν είτε κάτω από  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , είτε ελαφρώς πάνω από  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  για κάποιες απομονώσεις, άρα γενικά περί το  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Τέλος, οι δραστικές ουσίες cyprodinil (Εικ. 5.5Α), flusilazole, prochloraz (Εικ. 5.5Β), fludioxonil (Εικ. 5.5Γ), και το pyrimethanil (Εικ. 5.5Δ) ήταν οι αποτελεσματικότερες δραστικές ουσίες, μεταξύ αυτών που αξιολογήθηκαν, έναντι της μυκηλιακής ανάπτυξης των απομονώσεων του *A. flavus*, με τιμές  $EC_{50}$  χαμηλότερες από  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Πίν. 5.4). Μπορούν να χαρακτηριστούν ως πολύ αποτελεσματικές και η πιθανή χρήση τους στα ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης του *A. flavus* και των αφλατοξινών του πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Συμπερασματικά, δραστικές ουσίες που ανήκουν στις φαινυλοπυρρολικές, ιμιδαζόλες, τριαζόλες και ανιλοπυριμιδίνες φαίνεται να είναι οι πιο αποτελεσματικές για τον έλεγχο της ανάπτυξης του *A. flavus*, μεταξύ των ομάδων που διερευνήθηκαν στην παρούσα έρευνα. Η δραστική ουσία flusilazole παρόλη την αποτελεσματικότητά της, δεν έχει πλέον έγκριση και δεν κυκλοφορεί σε εμπορικό σκεύασμα στην Ελλάδα. Κατά συνέπεια, οι δραστικές ουσίες cyprodinil, fludioxonil, prochloraz και το pyrimethanil επελέγησαν με σκοπό τα εμπορικά σκευάσματα που τις περιέχουν (M12, M19, M22), να αξιολογηθούν και σε πειράματα αγρού, κατόπιν επιβεβαίωσης της αποτελεσματικότητάς τους βάσει των αποτελεσμάτων της *in situ* αξιολόγησης που ακολούθησε.

**Πίνακας 5.4:** Τιμές EC<sub>50</sub> (μg mL<sup>-1</sup>) για τις 10 τοξικογόνες απομονώσεις του μύκητα στις 20 δραστικές ουσίες. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται τα 10 στελέχη *Aspergillus flavus* και στον κάθετο οι 20 δραστικές ουσίες.

<i>A. flavus</i>	A.f.3.11	A.f.4.12	A.f.5.19	A.f.6.4	A.f.8.2	A.f.9.8	A.f.13.12	A.f.15.25	A.f.17.3	A.f.18.4
<b>Δραστικές ουσίες</b>										
boscalid	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
chlorothalonil	0,2838	0,1844	0,2322	0,1097	0,1105	0,2553	0,3924	0,3226	0,119	0,1802
cyproconazole	4,8565	3,8309	>5	>5	4,2822	>5	4,9216	>5	>5	3,9305
cyprodinil	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,011
difenoconazole	0,7497	0,7601	>1	>1	0,5691	>1	>1	0,5425	>1	0,6693
dodine	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
epoxiconazole	0,402	0,2673	0,2431	0,2262	0,2415	0,2549	0,491	0,3517	0,4741	0,4243
fluazinam	0,1443	0,1593	0,1717	0,1597	0,139	0,1753	0,1817	0,1752	0,2059	0,162
fludioxonil	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
fluopyram	>5	4,5345	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	4,7503
flusilazole	0,0168	0,0197	0,0189	0,0148	0,0188	0,0229	0,0186	0,0168	0,0507	0,0188
imazalil	0,1036	0,0855	0,1039	0,1021	0,0807	0,1084	0,093	0,0966	0,2324	0,1066
iprodione	2,259	1,7381	2,2401	1,8	2,1112	2,276	2,2532	2,416	2,8728	1,6489
kresoxim-methyl	1,6245	<0,1	>5	2,4238	<0,1	2,1231	2,2004	<0,1	3,65	<0,1
mancozeb	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
prochloraz	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,0592	<0,05
propiconazole	0,3168	0,5385	0,7117	0,5187	0,7691	0,6351	0,3436	1,0502	0,6467	1,0808
pyrimethanil	0,0156	0,0165	0,0156	0,0146	0,0134	0,0131	0,0156	0,0167	0,0156	0,0164
tebuconazole	0,374	0,3119	0,5486	0,3295	0,6796	0,3101	0,3126	0,2675	0,8104	0,3897
thiophanate-methyl	>25	>25	>25	>25	>25	>25	24,5813	>25	>25	>25





**Εικόνα 5.5 (Α-Δ):** Α. Το στέλεχος A.f.9.8 σε θρεπτικό υλικό CZA τροποποιημένο με τη δραστική ουσία cyprodinil στις συγκεντρώσεις 0,01, 0,1, 1, 10 και 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  μετά από 4 ημέρες επώασης. Πάνω αριστερά παρουσιάζεται ο μάρτυρας (CZA χωρίς δραστική ουσία) και στη συνέχεια από αριστερά προς τα δεξιά και από επάνω προς τα κάτω οι 5 συγκεντρώσεις. Β. Το στέλεχος A.f.17.3 σε θρεπτικό υλικό CZA τροποποιημένο με τη δραστική ουσία prochloraz στις συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,5, 1 και 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  μετά από 4 ημέρες επώασης. Πάνω αριστερά παρουσιάζεται ο μάρτυρας (CZA χωρίς δραστική ουσία) και στη συνέχεια από αριστερά προς τα δεξιά και από επάνω προς τα κάτω οι 5 συγκεντρώσεις. Γ. Το στέλεχος A.f.18.4 σε θρεπτικό υλικό CZA τροποποιημένο με τη δραστική ουσία fludioxonil στις συγκεντρώσεις 0,1, 1, 10 και 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  μετά από 4 ημέρες επώασης. Πάνω αριστερά παρουσιάζεται ο μάρτυρας (CZA χωρίς δραστική ουσία) και στη συνέχεια από αριστερά προς τα δεξιά και από επάνω προς τα κάτω οι 4 συγκεντρώσεις. Δ. Το στέλεχος A.f.13.12 σε θρεπτικό υλικό CZA τροποποιημένο με τη δραστική ουσία pyrimethanil στις συγκεντρώσεις 0,01, 0,1 και 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  μετά από 4 ημέρες επώασης. Πάνω αριστερά παρουσιάζεται ο μάρτυρας (CZA χωρίς δραστική ουσία) και στη συνέχεια από αριστερά προς τα δεξιά και από επάνω προς τα κάτω οι 3 συγκεντρώσεις.



### 5.5.3. *In situ* βιοδοκιμές παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών

Η παραγωγή αφλατοξινών σε καρπούς φιστικιών στο εργαστήριο μετρήθηκε και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5. Λόγω των δυσκολιών που παρουσιάστηκαν ως προς την διαθεσιμότητα των μυκητοκτόνων σκευασμάτων, το πείραμα υλοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Κατά συνέπεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δύο επιμέρους πειραμάτων με ξεχωριστό μάρτυρα (Πίν. 5.5).

**Πίνακας 5.5:** Οι αφλατοξίνες που παράχθηκαν από τους μάρτυρες (Α.φ.18.4) και στα φιστικά που εφαρμόστηκαν τα μυκητοκτόνα σκευάσματα (M1-M23) σε συνδυασμό με το τοξικογόνο στέλεχος. Συνοδεύονται από την τυπική απόκλιση και το τυπικό σφάλμα της εφαρμογής και το αντίστοιχο ποσοστό παρεμπόδισης στην παραγωγή αφλατοξινών ως προς το μάρτυρα του εκάστοτε επιμέρους πειράματος. Οι γραμμές που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα, διαφέρουν στατιστικά ( $P \leq 0,05$ ) σύμφωνα με το τεστ Least Significant Difference (LSD).

	Σκευάσματα	Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση %	
	Μάρτυρας	14.641,99	a	964,47	681,99	-
<b>M1</b>	Armure <sup>®</sup> 15/15 EC	10.929,54	b	1.006,69	711,84	25
<b>M2</b>	Bumper <sup>®</sup> 25 EC	9.542,41	bc	4.135,66	2.924,35	35
<b>M3</b>	Chorus <sup>®</sup> 50 WG	2.955,7	efg	2.671,99	1.889,38	<b>80</b>
<b>M4</b>	Comet <sup>®</sup> 20 EC	3.976,82	def	1.941,84	1.373,09	73
<b>M8</b>	Geoxe <sup>®</sup> 50 WG	4.191,63	def	73,08	51,67	71
<b>M12</b>	Octave <sup>®</sup> 46 WP	1.508,54	fg	480,91	340,05	<b>90</b>
<b>M14</b>	Opera <sup>®</sup> 8,5/6,25 SE	2.068,29	fg	1.235,08	873,33	<b>86</b>
<b>M17</b>	Punch <sup>®</sup> 40 EC	467,33	g	398,09	281,49	<b>97</b>
<b>M19</b>	Scala <sup>®</sup> 40 SC	2,5	g	1,95	1,38	<b>100</b>
<b>M20</b>	Score <sup>®</sup> 25 EC	6.129,27	cde	248,83	175,95	58
<b>M21</b>	Spyrale <sup>®</sup> 10/37,5 EC	7.719,64	bc	1.754,21	1.240,42	47
<b>M22</b>	Switch <sup>®</sup> 25/37,5 WG	2.031,81	fg	1.220,92	863,32	<b>86</b>
<b>M23</b>	Thiraphox <sup>®</sup> 40 WG	6.760,81	cd	867,68	613,54	54

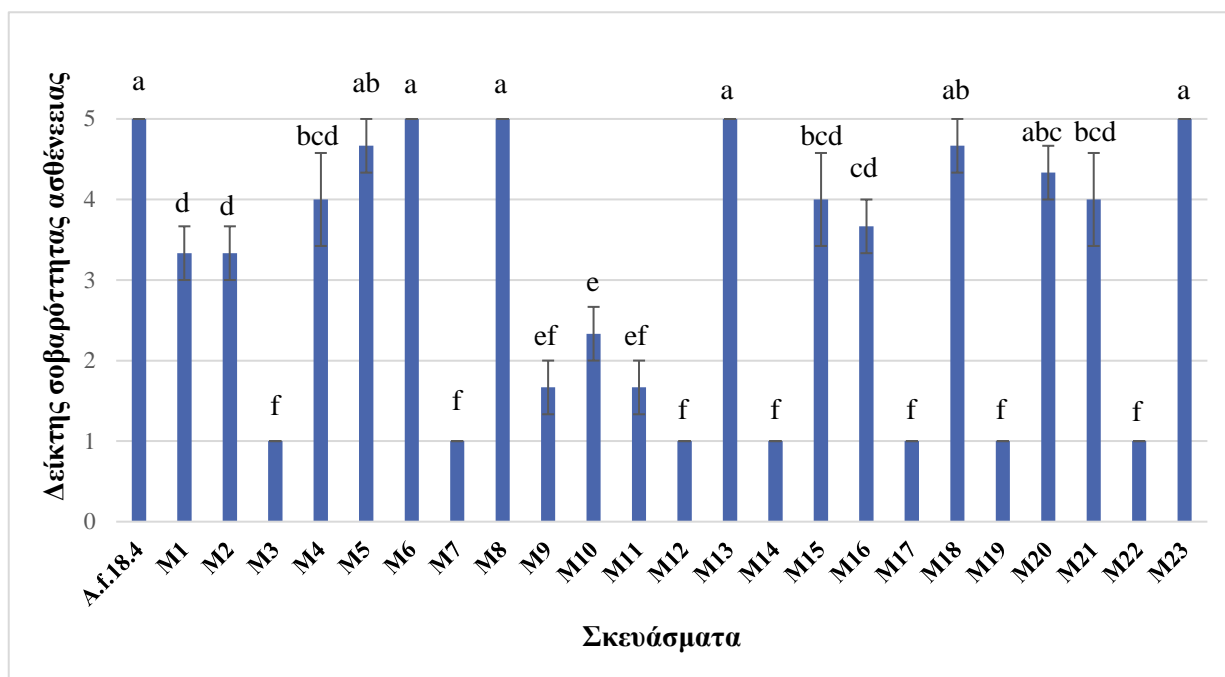
	Σκευάσματα	Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση %	
	Μάρτυρας	19.060,8	a	2.256,94	1.595,9	-
<b>M5</b>	Daconil <sup>®</sup> 500 SC	5.135,53	b	577,09	408,06	73
<b>M6</b>	Epok <sup>®</sup> 600 EC	17.655,74	a	1.873,93	1.325,07	7
<b>M7</b>	Fungazil <sup>®</sup> 500 EC	11,84	c	14,53	10,27	<b>100</b>
<b>M9</b>	Luna exp. <sup>®</sup> 400 SC	237,02	c	145,76	103,07	<b>99</b>
<b>M10</b>	Mystic <sup>®</sup> 25 EC	19,84	c	0,33	0,23	<b>100</b>
<b>M11</b>	Nativo <sup>®</sup> 75 WG	557,96	c	336,37	237,85	<b>97</b>
<b>M13</b>	Ohayo <sup>®</sup> 50 SC	5.677,13	b	824,94	583,32	70
<b>M15</b>	Ortiva Opti <sup>®</sup> 8/40 SC	20,84	c	3,76	2,66	<b>100</b>
<b>M16</b>	Ortiva <sup>®</sup> 25 SC	19,69	c	6,79	4,8	<b>100</b>
<b>M18</b>	Quadris <sup>®</sup> 25 SC	21,46	c	23,27	16,45	<b>100</b>

Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *A. flavus* A.f.18.4 όπως και σε άλλες ενότητες του παρόντος κεφαλαίου. Η αξιολόγηση για το πρώτο σκέλος του πειράματος έδειξε ότι όλα τα μυκητοκτόνα εμπορικά σκευάσματα αναστέλλουν σε κάποιο βαθμό τις αφλατοξίνες που παράγονται από το τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα. Ο μάρτυρας παρήγαγε 14.641,99  $\mu\text{g kg}^{-1}$  αφλατοξινών που επιβεβαιώνει την υψηλή τοξικογόνο ικανότητά του. Τα σκευάσματα M1 και M2 δε σημείωσαν ιδιαίτερα υψηλή παρεμπόδιση, παρεμποδίζοντας 25% και 35% τις παραγόμενες αφλατοξίνες από τον μάρτυρα και ως εκ τούτου δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ιδιαιτέρως αποτελεσματικά. Μέτρια παρεμπόδιση από 40% έως 80% στην παραγωγή των αφλατοξινών, προκάλεσε η εφαρμογή με τα σκευάσματα M4, M8, M20, M21, M23 με ποσοστά 73%, 71%, 58%, 47% και 54% αντίστοιχα. Τα σκευάσματα M3, M12, M14, M17, M19 και M22 σημείωσαν παρεμπόδιση άνω του 80% που χαρακτηρίζεται υψηλή και μπορούν να θεωρηθούν αποτελεσματικά στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, με ποσοστά 80%, 90%, 86%, 97%, 100% και 86% αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως όλα τα σκευάσματα μείωσαν στατιστικά σημαντικά την παραγωγή αφλατοξινών.

Όσον αφορά στο δεύτερο στέλεχος, ο μάρτυρας παρήγαγε 19.060,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  αφλατοξινών που αποτελεί επίσης υψηλή συγκέντρωση. Και σε αυτή τη περίπτωση, όλα τα αξιολογηθέντα σκευάσματα μείωσαν στατιστικά σημαντικά την παραγωγή αφλατοξινών σε σχέση με το μάρτυρα, εκτός από ένα, το M6. Πιο συγκεκριμένα, τα M5 και M13 παρουσιάστηκαν μετρίως αποτελεσματικά με ποσοστά παρεμπόδισης κάτω του 80%, δηλαδή 73% και 70% αντίστοιχα. Τα σκευάσματα M7, M9, M10, M11, M15, M16 και M18, σημείωσαν παρεμπόδιση υψηλότερη του 80% με ποσοστά 100%, 99%, 100%, 97%, 100%, 100% και 100% αντίστοιχα και μπορούν να χαρακτηριστούν ως ιδιαίτερα αποτελεσματικά έναντι των παραγόμενων αφλατοξινών. Από τα αποτελέσματα συνολικά, φαίνεται πως οι ανιλοπυριμιδίνες, κάποιες τριαζόλες, τα ιμιδαζολικά και τα φαινυλοπυρρολικά είναι πιο αποτελεσματικά για τη διαχείριση των παραγόμενων αφλατοξινών.

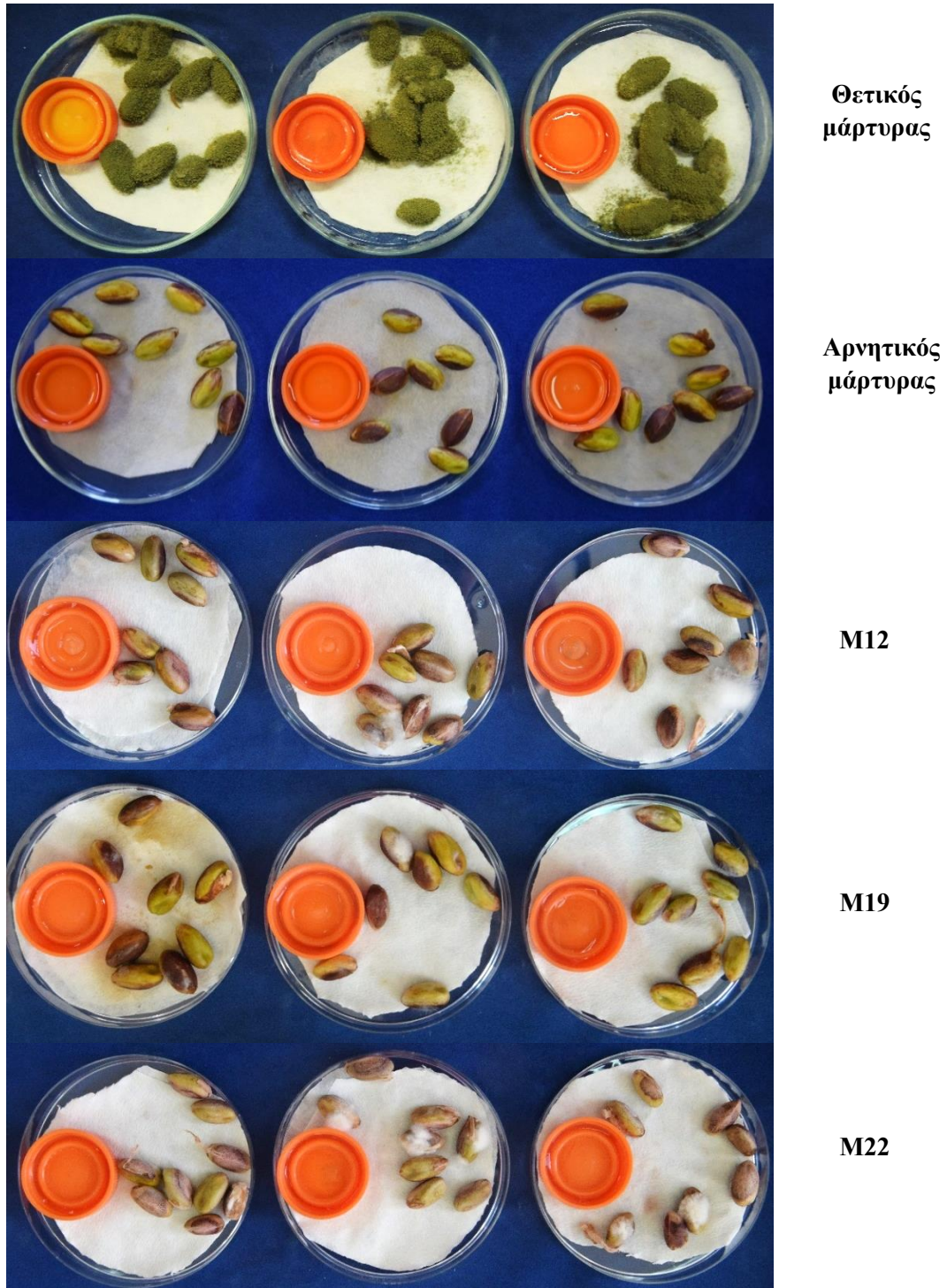
#### **5.5.4. Επίδραση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη σοβαρότητα της ασθένειας από τον μύκητα *Aspergillus flavus***

Η κλίμακα 1-5 που δημιουργήθηκε, είχε σκοπό τον προσδιορισμό της σοβαρότητας της ασθένειας επί των καρπών των φιστικιών. Όπως προαναφέρθηκε, η κλίμακα ορίστηκε ως εξής, 1=0-20%, 2=20-40%, 3=40-60%, 4=60-80%, 5=80-100% καρποί φιστικιών πλήρως αποικισμένοι από *A. flavus* και καλυμμένοι από τον αναπτυγμένο μύκητα. Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι αρκετά σκευάσματα, όπως τα M5, M6, M8, M13, M18, M20 και M23 δεν κατάφεραν να μειώσουν στατιστικά την σοβαρότητα της ασθένειας σε σχέση με το μάρτυρα. Τα σκευάσματα M1, M2, M4, M15, M16, M21 κατάφεραν να μειώσουν εν μέρει την σοβαρότητα της ασθένειας, με δείκτη ασθένειας μικρότερο του 5 αλλά μεγαλύτερο του 3. Ακόμα πιο αποτελεσματικά ήταν τα σκευάσματα M9, M10, M11 που μείωσαν την σοβαρότητα της ασθένειας κάτω από 3 αλλά πάνω από 1. Τα πιο αποτελεσματικά από τα αξιολογηθέντα σκευάσματα ήταν τα M3, M7, M12, M14, M17, M19 και M22 που κατάφεραν να μειώσουν την σοβαρότητα της ασθένειας στο επίπεδο του δείκτη 1 (0-20%). Τα πιο αποτελεσματικά σκευάσματα περιέχουν δραστικές ουσίες που ανήκουν στις ομάδες των ανιλοπυριμιδινών, των ιμιδαζολών, των φαινυλοπυρρολικών αλλά και των τριαζολών.



**Διάγραμμα 5.1:** Δείκτης σοβαρότητας ασθένειας για τον μάρτυρα (A.f.18.4) και τις εφαρμογές των 23 σκευασμάτων M1-M23. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα, διαφέρουν στατιστικά ( $P \leq 0,05$ ) σύμφωνα με το τεστ Least Significant Difference (LSD). Οι κάθετες μπάρες υποδεικνύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου κάθε εφαρμογής.

Από τα αποτελέσματα καθίσταται σαφές και επιβεβαιώνεται το συμπέρασμα των προηγούμενων ενοτήτων του παρόντος κεφαλαίου, πως οι αξιολογηθείσες ανιλοπυριμιδίνες, μιδαζόλες, τα φαινυλοπυρρολικά αλλά και κάποιες τριαζόλες μπορούν να παρεμποδίζουν επιτυχώς τόσο την μυκηλιακή ανάπτυξη του τοξικογόνου μύκητα που μελετήθηκε, όσο και την παραγωγή αφλατοξινών από το στέλεχος αυτό. Παρόλα αυτά, χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Για αυτό το λόγο, σκευάσματα των οποίων οι δραστικές ουσίες τους ανήκουν σε αυτές τις ομάδες, επελέγησαν για περαιτέρω διερεύνηση αποτελεσματικότητας στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών σε συνθήκες αγρού. Τα σκευάσματα M12, M19 και M22 που χρησιμοποιήθηκαν και στη συνέχεια στα πειράματα αγρού, κατάφεραν να μειώσουν τη σοβαρότητα της ασθένειας κατά 80-100% στη παρούσα ενότητα (Εικ. 5.6).



Θετικός  
μάρτυρας

Αρνητικός  
μάρτυρας

M12

M19

M22

**Εικόνα 5.6:** Φιστίκια τεχνητώς μολυσμένα με το αφλατοξικογόνο στέλεχος A.f.18.4 μετά από 7 ημέρες επώασης. Παρουσιάζονται 3 επαναλήψεις της κάθε εφαρμογής (οριζόντια). Από πάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται: ο θετικός μάρτυρας (μόνο το στέλεχος A.f.18.4), ο αρνητικός μάρτυρας (μόνο απιονισμένο αποστειρωμένο νερό), το σκεύασμα M12 με το στέλεχος A.f.18.4, το σκεύασμα M19 με το στέλεχος A.f.18.4 και τέλος το σκεύασμα M22 με το στέλεχος A.f.18.4.

### 5.5.5. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων κατά της παραγωγής αφλατοξινών σε φιστικεώνες

Οι διετείς δοκιμές αγρού, που διεξήχθησαν σε φιστικεώνες στο νησί της Αίγινας, επιβεβαιώνουν τα *in vitro* και *in situ* αποτελέσματα της τρέχουσας μελέτης. Και τα τρία εμπορικά μυκητοκτόνα M12, M19 και M22 κατόρθωσαν να παρουσιάσουν στατιστικά σημαντική μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών, πάνω από 85% του μάρτυρα, φθάνοντας σε έως και κατά 99,9% παρεμπόδιση παραγωγής αφλατοξινών και στους τρεις φιστικεώνες (Πίν. 5.6). Για το 2017, το επίπεδο μόλυνσης αφλατοξινών του μάρτυρα ήταν 1.477,62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  συνολικών αφλατοξινών για τον φιστικεώνα όπου εφαρμόστηκε το τοξικογόνο στέλεχος *A. flavus* (φιστικεώνας Α) και 1.114,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  συνολικών αφλατοξινών λόγω φυσικής μόλυνσης από τα ενδημικά τοξικογόνα στελέχη που έχουν ήδη προσαρμοστεί στον φιστικεώνα (φιστικεώνας Β). Αντίστοιχα για το 2018 ο μάρτυρας κυμάνθηκε στα 2.928,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (φιστικεώνας Α) και 20,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (φιστικεώνας Γ).

**Πίνακας 5.6:** Αποτελέσματα της παρεμποδιστικής δράσης των μυκητοκτόνων σκευασμάτων M12, M19 και M22 στη συνολική παραγωγή αφλατοξινών. Οι συνολικές αφλατοξίνες μετρώνται και παρουσιάζονται σε  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , συνοδευόμενες από την τυπική απόκλιση και το τυπικό σφάλμα για κάθε μέτρηση. Οι γραμμές που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα είναι σημαντικά διαφορετικές ( $P \leq 0,05$ ) σύμφωνα με τη δοκιμή Least Significant Difference (LSD).

		2017				2018					
		Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπό- διση %	Αφλατοξίνες ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπό- διση %		
Φιστικεώνας Α	Μάρτυρας	1.477,62	a	98,56	69,7	-	2.928,6	a	260,36	130,18	-
	M12	4,43	b	1,4	0,99	99,7	2,58	b	1,39	0,98	99,9
	M19	3,67	b	0,17	0,12	99,8	3,15	b	0,73	0,51	99,9
	M22	1,6	b	0,42	0,3	99,9	2,74	b	0,55	0,39	99,9
Φιστικεώνας Β	Μάρτυρας	1.114,3	a	132,65	93,8	-					
	M12	3,69	c	0,62	0,44	99,7					
	M19	4,62	c	1,54	1,09	99,6					
	M22	147,52	b	147,56	104,34	85,9					
Φιστικεώνας Γ	Μάρτυρας					20,8	a	10,61	6,13	-	
	M12					2,38	b	3,37	2,38	88,5	
	M19					2,3	b	1,87	1,32	89	
	M22					1,86	b	2,63	1,86	91,1	



Το 2017 η φυσική μόλυνση ήταν ιδιαίτερα υψηλή στον φιστικεώνα Β, αλλά το 2018 η φυσική μόλυνση ήταν πολύ χαμηλή στον φιστικεώνα Γ. Στον φιστικεώνα Α η μηχανική μόλυνση ήταν επιτυχής και στα δύο χρόνια και οδήγησε σε υψηλή συσσώρευση αφλατοξινών τόσο το 2017 όσο και το 2018. Σε κάθε περίπτωση, και τα τρία εμπορικά μυκητοκτόνα προϊόντα που εφαρμόστηκαν, μείωσαν στατιστικά σημαντικά τις παραγόμενες αφλατοξίνες και τις δύο χρονιές και στους δύο φιστικεώνες, εκτός από την εφαρμογή του M22 στον φιστικεώνα Β το 2017, σε επίπεδο πάνω από 99% του μάρτυρα. Η μέτρηση αφλατοξινών έδειξε μόλυνση αφλατοξινών κάτω από το νόμιμο όριο των 15  $\mu\text{g kg}^{-1}$  εκτός της προαναφερθείσας εξαίρεσης. Αναφορικά με αυτή την εξαίρεση (M22), η πιθανότητα μερικούς απορροής του παράγοντα που εφαρμόστηκε ή ακόμη και ανεπαρκούς διαβροχής του φυλλώματος και των ταξικαρπιών από το ψεκαστικό υγρό που εφαρμόστηκε οδήγησε σε λιγότερο αποτελεσματική μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών, συγκεκριμένα στο 85,9% του μάρτυρα. Ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, η μείωση των αφλατοξινών ήταν στατιστικά σημαντική και τα αποτελέσματα στους φιστικεώνες Α και Γ, δείχνουν ότι η εφαρμογή του M22 στο φιστικεώνα Β επηρεάστηκε πιθανώς από κάποια εξωτερική παράμετρο.

## 5.6. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Παρά το γεγονός ότι τα σύγχρονα συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών (IPM) προσανατολίζονται συνήθως σε καινοτόμες μεθόδους για τον έλεγχο παθογόνων των φυτών, στο πλαίσιο της γεωργίας ακριβείας, ο χημικός έλεγχος παραμένει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο και ένας σταθερός πυλώνας των IPMs (Masiello et al. 2019, Mixon et al. 1984, Edlayne et al. 2009). Απόρροια της ύπαρξης μυκοτοξικογόνων μυκήτων είναι η μόλυνση των τροφίμων και των ζωοτροφών από μυκοτοξίνες, η οποία αποτελεί μια από τις κύριες απειλές για την ασφάλεια των τροφίμων που οδηγούν σε σοβαρή απώλεια της ετήσιας παραγωγής καλλιεργειών σύμφωνα με τη στατιστική βάση δεδομένων του Διεθνούς Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAOSTAT). Οι αφλατοξίνες είναι οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες όσον αφορά την τοξικότητά τους και η συσσώρευση αφλατοξινών στις καλλιέργειες αυξάνεται ενδεχομένως λόγω και της αλλαγής του κλίματος αλλά και των γεωργικών πρακτικών που εφαρμόζονται (Battilani et al. 2012). Για αυτό το λόγο, η εφαρμογή χημικών μυκητοκτόνων για τη διαχείριση των μυκοτοξινών διερευνάται ακόμα και σήμερα (Giorni et al. 2019).

Η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι πολύ αυστηρή όσον αφορά την παρουσία επιμολυντών στα τρόφιμα, όπως οι αφλατοξίνες. Συνεπώς, οι αποτελεσματικές μέθοδοι για τον έλεγχο της μόλυνσης από αφλατοξίνες είναι πολύ σημαντικές στις στρατηγικές IPM (Abbas et al. 2009). Στην τρέχουσα μελέτη αξιολογήθηκαν 20 μυκητοκτόνες δραστικές ουσίες για την ικανότητά τους να μειώνουν τη μυκηλιακή ανάπτυξη 10 ενδημικών ισχυρά τοξικογόνων απομονώσεων του *A. flavus*. Τα περισσότερα από τα μυκητοκτόνα που αξιολογήθηκαν σε αυτή την έρευνα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο διαφόρων φυτοπαθογόνων σε ποικίλες καλλιέργειες.

Από τις αξιολογηθείσες δραστικές ουσίες, το boscalid δεν ανέστειλε την μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα, αποτέλεσμα που είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες αξιολόγησης ανθεκτικότητας στελεχών του *A. flavus* που είχαν απομονωθεί από αραβόσιτο (Lagogianni et al. 2018). Στην εν λόγω μελέτη, το boscalid δεν μείωσε σημαντικά τις αφλατοξίνες που παράχθηκαν από τον *A. flavus*. Στη παρούσα μελέτη, η δραστική ουσία fluopyram, που επίσης ανήκει στην ομάδα των SDHIs, δεν ήταν αποτελεσματική στη μείωση της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα. Κατά συνέπεια, οι δύο αυτές δραστικές ουσίες δεν επιλέχθηκαν για περαιτέρω αξιολόγηση. Παρόλα αυτά, σε μελέτες διερεύνησης/ανθεκτικότητας της δραστικής ουσίας



fluopyram έναντι του μύκητα *Botrytis cinerea*, η δραστική ουσία ήταν αποτελεσματική, επιτυγχάνοντας τιμές EC<sub>50</sub> που κυμαίνονταν από 0,03 έως 0,29 μg mL<sup>-1</sup>. Η διοκαρβοξυμιδική δραστική ουσία iprodione έχει επίσης διερευνηθεί ως προς την επίδρασή της στους μυκοτοξικογόνους μύκητες (αφλατοξικογόνους και ωχρατοξικογόνους) (Munimbazi et al. 1997, Hasan 1993), αλλά δεν υπάρχουν σχετικά εμπορικά μυκητοκτόνα προϊόντα στην αγορά της Ελλάδας. Επομένως παρά το γεγονός πως οι τιμές EC<sub>50</sub> του iprodione στα πλαίσια της τρέχουσας μελέτης, δεν κυμάνθησαν ούτε πολύ υψηλά, ούτε πολύ χαμηλά (1,6478-2,8728 μg mL<sup>-1</sup>), δεν επιλέχθηκε για περαιτέρω αξιολόγηση κατά των παραγόμενων αφλατοξινών.

Οι αζόλες είναι μυκητοκτόνα φάρμακα με αποτελεσματικότητα έναντι ενός ευρέος φάσματος οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών. Τα ιμιδαζόλια και οι τριαζόλες αποτελούν τις δύο κύριες ομάδες DMIs. Αντιπροσωπευτικές δραστικές ουσίες αυτών των ομάδων είναι οι tebuconazole, prochloraz, diniconazole. Η τριαζόλη diniconazole έχει τη δυνατότητα να μειώνει την παραγωγή αφλατοξινών στην καλλιέργεια φιστικιών υπό ορισμένες συνθήκες αρδεύσεως (Brenneman et al. 1993). Η ιμιδαζόλη prochloraz και η τριαζόλη tebuconazole μπορούν να ελέγξουν έως 95% τις αφλατοξίνες και τις φουμονισίνες που παράγονται από τους μύκητες *Aspergillus flavus* και *Fusarium verticillioides* αντίστοιχα (Formenti et al. 2012), γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα της τρέχουσας μελέτης όπου το M12 που περιέχει prochloraz μείωσε περισσότερο από 99% τις παραγόμενες αφλατοξίνες αλλά και τα *in situ* πειράματα όπου μείωσε κατά 90% τις αφλατοξίνες που παρήγαγε ο *A. flavus* σε καρπούς φιστικιών.

Οι τριαζόλες και ειδικά οι δραστικές ουσίες cyproconazole και tebuconazole σε συνδυασμό με την ιμιδαζόλη prochloraz έχουν χρησιμοποιηθεί κατά μυκοτοξικογόνων μυκήτων που παράγουν δεοξυνιβαλενόλη (DON) με ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα (Haidukowski et al. 2005). Επιπρόσθετα, οι αζόλες έχουν χρησιμοποιηθεί κατά το πρόσφατο παρελθόν κατά της ανάπτυξης του μύκητα *Aspergillus flavus* και των αφλατοξινών B1 και B2 που παράγει στη καλλιέργεια του αραβοσίτου (Mateo et al. 2017). Στη συγκεκριμένη μελέτη είχε αποδειχθεί πως η δραστική ουσία prochloraz ήταν αποτελεσματικότερη συγκριτικά με το tebuconazole και το tebuconazole σε μείγμα με το prochloraz. Αυτή η σύγκριση έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διδακτορικής διατριβής, όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα του prochloraz στις *in vitro* δοκιμές. Επίσης, η δραστική ουσία eproconazole έχει χρησιμοποιηθεί όπως και η τριαζόλη metconazole για τη διαχείριση της μόλυνσης των σιτηρών από τη μυκοτοξίνη δεοξυνιβαλενόλη με θετικά αποτελέσματα, γεγονός που επιβεβαιώνει την αποτελεσματική δράση του eproconazole και στην παρούσα διατριβή (Duan et al. 2018).

Επιπλέον, οι τριαζόλες που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη κατά τις *in vitro* δοκιμές, παρουσίασαν υψηλή παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα, φθάνοντας σε χαμηλές τιμές EC<sub>50</sub> κάτω από 0,1 μg mL<sup>-1</sup>. Επιπρόσθετα, σε άλλη έρευνα, η επίδραση του difenoconazole σε άλλους μυκοτοξικογόνους μύκητες, έδειξε μείωση της μυκοτοξίνης 3-ADON που παράγεται από είδη του γένους *Fusarium* (D'Mello et al. 1998). Παρόλα αυτά, το πρότυπο παρεμπόδισης στην τρέχουσα μελέτη δεν ήταν σαφές, λόγω του γεγονότος ότι μερικά στελέχη παρουσίασαν σχετική ανθεκτικότητα με υψηλές τιμές EC<sub>50</sub>. Τα 9 μυκητοκτόνα σκευάσματα που αξιολογήθηκαν και περιείχαν τριαζόλες (M1, M2, M9, M10, M11, M14, M17, M20, M21) είτε σε μείγμα με άλλες δραστικές ουσίες, είτε όχι, προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών σε επίπεδο 25%-100% σε σχέση με τον μάρτυρα. Κάποια από αυτά ήταν αποτελεσματικά, ενώ άλλα όχι στον ίδιο βαθμό. Παρά την αποτελεσματικότητα ορισμένων τριαζολών έναντι της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα και των παραγόμενων αφλατοξινών, ούτε και οι τριαζόλες επιλέχθηκαν για διερεύνηση σε πειράματα αγρού για την τρέχουσα μελέτη λόγω της μεγάλης πιθανότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Price et al. 2015).

Η δραστική ουσία mancozeb που χρησιμοποιήθηκε επίσης στην παρούσα μελέτη, είναι μη συστηματικό μέλος της ομάδας των διθειοκαρβαμιδικών που έχουν ένα ευρύ φάσμα στόχων. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας, το mancozeb δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό στον έλεγχο της μυκηλιακής ανάπτυξης, με τιμές  $EC_{50}$  κυμαινόμενες μεταξύ 1,2374 και 3,1534  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Από την άλλη πλευρά, το μυκητοκτόνο προϊόν M23 που περιέχει τη διθειοκαρβαμιδική δραστική ουσία thiram προκάλεσε μείωση των παραχθέντων αφλατοξινών κατά 54%. Αυτό έρχεται να υποστηρίξει σχετική έρευνα που δείχνει την ανασταλτική δράση ενός άλλου εμπορικού προϊόντος (Bentex-T) που περιέχει benomyl και thiram, το οποίο αναστέλλει κατά 60-65% την μυκηλιακή ανάπτυξη του *A. flavus* (Suberu 2004). Εν τούτοις, στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως η δραστική ουσία mancozeb έχει αξιολογηθεί κατά ωχρατοξικογόνων μυκήτων του γένους *Aspergillus* με θετικά αποτελέσματα ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης (Mateo et al. 2011).

Σε προηγούμενες μελέτες άλλων ερευνητών, έχει διερευνηθεί η συσχέτιση της ανθεκτικότητας στις ομάδες των ανιλινοπυριμιδινών και των φαινυλοπυρρολικών, με την ικανότητα παρεμπόδισης της μυκηλιακής ανάπτυξης και της παραγωγής μυκοτοξινών που παράγονται από μύκητες του γένους *Aspergillus*, υποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα των cyprodinil, fludioxonil και pyrimethanil (Malandrakis et al. 2013, Markoglou et al. 2011, Markoglou et al. 2008, Doukas et al. 2012, Dimakopoulou et al. 2008). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά που προέκυψαν από την τρέχουσα μελέτη. Το cyprodinil, το fludioxonil και το pyrimethanil παρέμειναν αποτελεσματικά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι τιμές  $EC_{50}$  βρέθηκαν να κυμαίνονται από  $<0,1-0,011 \mu\text{g mL}^{-1}$  για το cyprodinil, κάτω από  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  για το fludioxonil και  $0,0131-0,0167 \mu\text{g mL}^{-1}$  για το pyrimethanil. Τα *in situ* πειράματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν έντονα τα *in vitro* αποτελέσματα, καθώς τα M3, M8, M19 και M22 μυκητοκτόνα σκευάσματα εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση στην παραγωγή αφλατοξινών σε επίπεδο 80%, 71%, 100% και 86% αντιστοίχως, κατατάσσοντάς τα μεταξύ των πλέον αποτελεσματικών μυκητοκτόνων προϊόντων που αξιολογήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζονται έντονα από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αγρού μικρής κλίμακας της παρούσας μελέτης, όπου το M19 που περιέχει pyrimethanil και το M22 που περιέχει fludioxonil και cyprodinil μείωσαν 85%-99,9% τις παραγόμενες αφλατοξίνες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η αποτελεσματικότητα του εμπορικού σκευάσματος M22 κατά ωχρατοξικογόνων μυκήτων έχει αξιολογηθεί και στην Ισπανία κατά το παρελθόν με ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα για την διαχείριση των ωχρατοξινών (Garcia-Cela et al. 2011).

Όσον αφορά στα βενζιμιδαζολικά, δραστικές ουσίες που ανήκουν σε αυτά, όπως το thiophanate-methyl και χρησιμοποιούνται στις στρατηγικές χημικού ελέγχου των παθογόνων φυτών όπως η *Monilinia fruticola*, έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα που οδηγεί πιθανόν σε διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των απομονώσεων μυκήτων (Fan et al. 2014). Το thiophanate-methyl παρουσιάζεται στην παρούσα έρευνα ως μη αποτελεσματικό έναντι της μυκηλιακής ανάπτυξης των στελεχών *A. flavus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική ενότητα, με το επίπεδο ανθεκτικότητας να ποικίλει μεταξύ των στελεχών που αξιολογήθηκαν. Οι τιμές  $EC_{50}$  κυμάνθηκαν άνω των  $24,5813 \mu\text{g mL}^{-1}$  για την συγκεκριμένη δραστική ουσία. Το διαφορετικό πρότυπο ανθεκτικότητας των απομονωθέντων στελεχών που παρουσιάζεται σε αυτή τη μελέτη επαληθεύει την ακαταλληλότητα του thiophanate-methyl για χρήση σε στρατηγικές ολοκληρωμένης διαχείρισης για μόλυνση από αφλατοξίνες στη καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη δεν συμφωνούν με τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του thiophanate-methyl έναντι των *A. flavus* και *A. niger* που απομονώθηκαν από σάπια ροδάκινα από την Ελλάδα (Thomidis et al. 2009). Στην εν λόγω μελέτη είχαν αξιολογηθεί επίσης σκευάσματα που περιέχουν τις δραστικές ουσίες iprodione και tebuconazole, με το tebuconazole να παρεμποδίζει αποτελεσματικά την μυκηλιακή ανάπτυξη μυκήτων του γένους *Aspergillus*, είτε *A. flavus* είτε

*A. niger*, ενώ η δραστική ουσία iprodione δεν κατάφερε να παρεμποδίσει πλήρως την ανάπτυξη των μυκήτων *Aspergillus*. Ωστόσο, εκείνα τα αποτελέσματα δεν μπορούν να συγκριθούν άμεσα με αυτά της παρούσας μελέτης, λόγω του γεγονότος ότι η μυκοτοξικογόνος ικανότητα των στελεχών που απομονώθηκαν από τα ροδάκινα δεν διερευνήθηκε, ενώ τα 10 στελέχη που απομονώθηκαν από τα φιστίκια και χρησιμοποιήθηκαν ήταν εξαιρετικά αφλατοξικογόνα.

Όσον αφορά στην εφαρμογή SDHIs, οι SDHIs έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον έλεγχο φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως μυκήτων του γένους *Colletotrichum* και τον μύκητα *Botrytis cinerea* (Ishii et al. 2016, Veloukas et al. 2012). Το boscalid και το kresoxim-methyl που ανήκει στην ομάδα των QoI έχουν επίσης αξιολογηθεί για την αποτελεσματικότητά τους έναντι αφλατοξικογόνων μυκήτων του γένους *Aspergillus* (Sakuda et al. 2014, Kim et al. 2014). SDHIs όπως το boscalid και το φαινυλοπυρρολικό fludioxonil έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο μυκήτων των ειδών *Fusarium* που παράγουν φουμονισίνες αλλά και του μύκητα *A. flavus* (Masiello et al. 2019). Οι δοκιμές απέδειξαν ότι οι SDHIs ήταν πολύ αποτελεσματικές στη μείωση της μόλυνσης από το μύκητα *Fusarium*. Σε 5 και 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  boscalid και kresoxim-methyl αντιστοίχως, η μυκηλιακή ανάπτυξη του *A. flavus* βρέθηκε να αναστέλλεται πάνω από 80% σε σχέση με τον μάρτυρα (Masiello et al. 2019). Από την άλλη πλευρά, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, το boscalid παρουσίασε τιμές  $\text{EC}_{50}$  άνω των 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  και το kresoxim-methyl μεταξύ 0,0114 και άνω των 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι παρόλο που οι δύο αυτές δραστικές ουσίες φαίνεται να είναι αποτελεσματικές έναντι άλλων μυκοτοξικογόνων μυκήτων σε άλλες καλλιέργειες, στη μελέτη αυτή δεν ήταν αποτελεσματικές στον έλεγχο της μυκηλιακής ανάπτυξης των αφλατοξικογόνων στελεχών που αξιολογήθηκαν.

Η δραστική ουσία chlorothalonil, παρά την αποτελεσματικότητά της στις δοκιμές μυκητοτοξικότητας της παρούσας μελέτης, αλλά και προγενεστέρων (Malandrakis et al. 2013, Markoglou et al. 2008, Markoglou et al. 2011) δεν έχει πλέον έγκριση κυκλοφορίας στην Ελλάδα και ως εκ τούτου, δεν χρησιμοποιήθηκε σε περαιτέρω διερεύνηση. Ομοίως, όσον αφορά στη δραστική ουσία flusilazole, παρόλη την αποτελεσματικότητά της, δεν έχει πλέον έγκριση και δεν κυκλοφορεί σε εμπορικό σκεύασμα στην Ελλάδα. Αξιολογήθηκε όμως το σκεύασμα M17 που έχει αποσυρθεί πλέον, αλλά μόνο *in situ* και όχι σε συνθήκες αγρού. Επίσης, σχετικά με τη δραστική ουσία dodine που ανήκει στις γουανιδίνες, αυτή έχει χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν σε πειράματα διαχείρισης του μύκητα *A. flavus* και των αφλατοξινών που παράγει, χωρίς να είναι πάντα αποτελεσματική στη διαχείριση των αφλατοξινών (Santos et al. 2011). Στη παρούσα μελέτη, δεν παρουσιάστηκε τόσο αποτελεσματική, γεγονός που αντικρούει την προηγούμενη μελέτη.

Τέλος, η δραστική ουσία fluazinam, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο πληθώρας παθογόνων σε ποικίλες καλλιέργειες με μεγάλη αποτελεσματικότητα (Chen et al. 2018). Επίσης έχει αξιολογηθεί κατά ωχρατοξικογόνων μυκήτων του γένους *Aspergillus* και των ωχρατοξινών που παράγουν (Arfaoui et al. 2019, Visconti et al. 2008). Παρά την αποτελεσματικότητά της έναντι ωχρατοξικογόνων μυκήτων, στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν μετρίως αποτελεσματική στον έλεγχο των αφλατοξικογόνων μυκήτων *Aspergillus* ( $\text{EC}_{50}$  μεταξύ 0,1-1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) και το εμπορικό σκεύασμα M13 δεν κατάφερε να μειώσει πάνω από 70% του μάρτυρα τις παραγόμενες αφλατοξίνες στα κελυφωτά φιστίκια.

Είναι αποδεδειγμένο ότι η σποριογένεση των μυκήτων επηρεάζει άμεσα την παραγωγή αφλατοξινών (Konac et al. 2018). Παρόλα αυτά, η παραγωγή αφλατοξινών μπορεί να συμβεί και στο μυκήλιο, όπως επιβεβαιώνεται από αποτελέσματα μελετών που υποδεικνύουν την εξαγωγή μυκοτοξινών από τη μυκηλιακή μάζα. Για το λόγο αυτό, κατά τη διάρκεια εκτεταμένης έρευνας της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων κατά των αφλατοξικογόνων μυκήτων, θα πρέπει να ελέγχεται η αποτελεσματικότητα

των δραστικών ουσιών, τόσο έναντι της σποριοποίησης όσο και της μυκηλιακής ανάπτυξης. Αυτό υποστηρίζεται επίσης από πρόσφατα στοιχεία που αποδεικνύουν τη δυνατότητα εκχύλισης αφλατοξίνης από μύκηλο του *A. flavus* (Gell et al. 2019). Στην παρούσα έρευνα, διεξήχθη προκαταρκτική έρευνα για την αποτελεσματικότητα των SDHIs και QoI, με την αξιολόγηση του boscalid και του kresoxim-methyl κατά της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα, χωρίς ανασταλτικά αποτελέσματα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι θα πρέπει πιθανόν να επικεντρωθεί περαιτέρω έρευνα στην ανασταλτική ικανότητα αυτών των δραστικών ουσιών επί της σποριοποίησης των μυκήτων και την μείωση της παραγωγής αφλατοξινών με εφαρμογή εμπορικών σκευασμάτων.

Αξιοσημείωτη είναι η αναφορά στην σύγκριση των αποτελεσμάτων της μείωσης παραγωγής αφλατοξινών σε καρπούς φιστικιών *in situ* με την επίδραση των εφαρμοσμένων σκευασμάτων στη σοβαρότητα της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας. Για τα σκευάσματα M3, M7, M12, M14, M17, M19 και M22 παρατηρείται μια συσχέτιση της παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα και κατά συνέπεια και της σοβαρότητας της ασθένειας. Πιο συγκεκριμένα, προκάλεσαν μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών σε ποσοστό άνω του 80% του μάρτυρα και μείωσαν τη σοβαρότητα της ασθένειας στο 0-20%. Τα σκευάσματα αυτά περιέχουν τις δραστικές ουσίες cyprodinil, imazalil, prochloraz, pyraclostrobin+epoxiconazole, flusilazole, pyrimethanil και cyprodinil+fludioxonil αντίστοιχα. Οι δραστικές ουσίες αυτές ανήκουν στις ομάδες των ανιλοπυριμιδίων, των τριαζολών, των φαινυλοπυρρολικών, των ιμιδαζολών και ένα σκεύασμα περιείχε σε μείγμα και έναν QoI παρεμποδιστή. Από τη σύγκριση αυτή, επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της συσχέτισης *in situ* βιοδοκιμών παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών και *in vitro* δοκιμών μυκητοτοξικότητας. Η υπόθεση πως οι ανιλοπυριμιδίνες, οι ιμιδαζόλες και τα φαινυλοπυρρολικά είναι οι καταλληλότερες ομάδες για την χημική αντιμετώπιση του μύκητα *A. flavus* και των αφλατοξινών που παράγει στα κελυφωτά φιστίκια επιβεβαιώθηκε τόσο από τα *in situ* πειράματα της μελέτης (παρεμπόδιση παραγωγής αφλατοξινών και μείωση σοβαρότητας ασθένειας), όσο από τα πειράματα αγρού μικρής κλίμακας που ακολούθησαν.

Στην ομάδα των τριαζολών ανήκαν δραστικές ουσίες, των οποίων τα σκευάσματα (M1, M2) δεν κατάφεραν να παρεμποδίσουν την παραγωγή αφλατοξινών πάνω από 35% και αντίστοιχα δεν μπόρεσαν να παρεμποδίσουν την σοβαρότητα της ασθένειας κάτω από τον δείκτη 3 (40-60%). Τα M10, M11 που περιείχαν τριαζόλες, μείωσαν 100% και 87% τη παραγωγή αφλατοξινών αλλά δεν μείωσαν σε επίπεδο κάτω από 20% την σοβαρότητα της ασθένειας. Από αυτά τα δεδομένα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η ομάδα των τριαζολών περιέχει δραστικές ουσίες που μπορούν είτε να μειώνουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες, είτε την σοβαρότητα της ασθένειας από τον μύκητα, αλλά όχι και τα δύο μαζί ταυτόχρονα. Κατά συνέπεια, δεν θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ιδανική ομάδα για το σκοπό της μελέτης.

Τα σκευάσματα M4, M5, M6, M13, M20, M21, M23 δεν κατάφεραν να μειώσουν την παραγωγή αφλατοξινών πάνω από 73% και η επίδραση στη σοβαρότητα της ασθένειας στις εφαρμογές των σκευασμάτων αυτών κυμάνθηκε μεταξύ δείκτη 4-5, δηλαδή από 60%-100%, το οποίο σημαίνει παρεμπόδιση στη σοβαρότητα της ασθένειας έως 40% του μάρτυρα. Για αυτό τον λόγο κρίθηκαν ακατάλληλα για τον χημικό έλεγχο του μύκητα και των αφλατοξινών που παράγει. Οι δραστικές ουσίες των σκευασμάτων αυτών ανήκαν στις ομάδες των QoI παρεμποδιστών, των χλωρονιτρικών, των δίνιτρο-ανιλίων, των τριαζολών, των πιπεριδινών και των διθειοκαρβαμιδικών.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός πως το σκεύασμα M8 που περιέχει fludioxonil (φαινυλοπυρρολικό) παρεμπόδισε κατά 71% τις παραγόμενες αφλατοξίνες και δεν παρεμπόδισε καθόλου τη σοβαρότητα της ασθένειας (δείκτης 5, με ποσοστό 80-100% παρατηρούμενης σοβαρότητας ασθένειας). Ενώ το fludioxonil σε μείγμα με την ανιλοπυριμιδίνη cyprodinil (M22 σκεύασμα), παρεμπόδισε κατά 86%

τις παραγόμενες αφλατοξίνες και πλήρως τη σοβαρότητα της ασθένειας (δείκτης 1, με ποσοστό παρατηρούμενης σοβαρότητας 0-20%). Το φαινυλοπυρρολικό fludioxonil, δηλαδή, έδρασε καλύτερα σε μείγμα με την ανιλοπυριμιδίνη cyprodinil, παρά μόνο του.

Τα μυκητοκτόνα σκευάσματα M9, M15, M16, M18 παρεμπόδισαν την παραγωγή αφλατοξινών σε ποσοστό άνω του 99% του μάρτυρα, ωστόσο δεν κατάφεραν να μειώσουν την σοβαρότητα της ασθένειας κάτω από 50%. Οι δραστικές ουσίες των σκευασμάτων αυτών ανήκουν στις ομάδες των πυραμιδών, των χλωρονιτρικών, των τριαζολών και των QoI παρεμποδιστών και ενώ ήταν πολύ αποτελεσματικά σκευάσματα στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών, δεν ήταν αποτελεσματικά στη παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα.

Συγκεντρωτικά, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι δραστικές ουσίες που ανήκουν στις ομάδες των ανιλοπυριμιδών, των ιμιδαζολών και των φαινυλοπυρρολικών, ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικές στον έλεγχο της ανάπτυξης του μύκητα τόσο στις βιοδοκιμές τρυβλίου, όσο και στις τεχνητές μολύνσεις σε καρπούς φιστικιών *in situ*. Επίσης, τα σκευάσματα που περιείχαν δραστικές ουσίες των ομάδων αυτών, ήταν ιδιαίτέρως αποτελεσματικά και στα πειράματα αγρού.

Η μελέτη αυτή επέτρεψε την απόκτηση χρήσιμων πληροφοριών σχετικά με την ευαισθησία/ανθεκτικότητα των ενδημικών αφλατοξικογόνων στελεχών του *A. flavus*, που απομονώθηκαν από ελληνικά φιστίκια από το νησί της Αίγινας, σε ένα ευρύ φάσμα συνθετικών χημικών μυκητοκτόνων. Στην μελέτη αυτή έχουν διερευνηθεί οι διαφορές συμπεριφοράς των πληθυσμών μυκήτων έναντι κάθε συγκεκριμένης δραστικής ουσίας που αξιολογήθηκε, υποδεικνύοντας πιθανή ανθεκτικότητα μερικών στελεχών, αλλά τα αποτελέσματα θα πρέπει να επιβεβαιωθούν με μεγαλύτερο αριθμό στελεχών για να δώσουν ένα πιο εμπεριστατωμένο συμπέρασμα. Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε η αποτελεσματικότητα των δραστικών ουσιών pyrimethanil, cyprodinil (ανιλοπυριμιδίνες), prochloraz (ιμιδαζόλη) και fludioxonil (φαινυλοπυρρόλη), καθώς και εμπορικών σκευασμάτων που τις περιέχουν, έναντι της ανάπτυξης του μύκητα *A. flavus* και των αφλατοξινών που παράγει στα κελυφωτά φιστίκια και θα πρέπει να αξιοποιηθούν πλήρως στην μελλοντική ανάπτυξη στρατηγικών IPM για τον έλεγχο των αφλατοξινών στην καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικιών.



## **Κεφάλαιο 6: AFLA-PISTACHIO: ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΚΕΛΥΦΩΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ ΑΠΟ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β1**

Το συγκεκριμένο κεφάλαιο δημοσιεύθηκε στο περιοδικό *Toxins* (2020), με τίτλο: *M. D. Kaminiaris, M. Camardo Leggieri, D. I. Tsitsigiannis, and P. Battilani, AFLA-PISTACHIO: Development of a mechanistic model to predict the aflatoxin contamination of pistachio nuts*, 12 (7):445. doi: 10.3390/toxins12070445.

### **6.1. Περίληψη**

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, τα υψηλά ποσοστά μόλυνσης με αφλατοξίνη Β1 (AFB1) στα φιστίκια έχει αναφερθεί ως ένα σημαντικό πρόβλημα παγκοσμίως. Στην Ευρώπη η ισχύουσα νομοθεσία έχει ορίσει ως ανώτατο επιτρεπτό όριο τα 12 µg/kg AFB1 και τα 15 µg/kg για το σύνολο των αφλατοξινών στα κελυφωτά φιστίκια που υφίστανται φυσική επεξεργασία και προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Ο στόχος της τρέχουσας εργασίας ήταν να αναπτυχθεί ένα μηχανιστικό μοντέλο με βάση τα μετεωρολογικά δεδομένα, προκειμένου να προβλέψει την ανάπτυξη του *A. flavus* και τη μόλυνση των φιστικιών με AFB1 σε προσυλλεκτικό επίπεδο και σε καθημερινή βάση από το δέσιμο των καρπών μέχρι και τη συγκομιδή. Τα βήματα που πραγματοποιήθηκαν ήταν τα εξής: i) η δημιουργία ενός μοντέλου που περιγράφει το κύκλο ανάπτυξης της καλλιέργειας των φιστικιών, ii) η ανάπτυξη ενός πρωτοτύπου μοντέλου, με το όνομα AFLA-pistachio, (μεταφορά μοντέλου από το AFLA-maize), iii) η συλλογή μετεωρολογικών και δεδομένων μόλυνσης με AFB1 από φιστικεώνες στην Αίγινα, iv) η εφαρμογή του μοντέλου και επεξεργασία μιας συνάρτησης πιθανοτήτων για να εκτιμηθεί η πιθανότητα υπέρβασης του νόμιμου ανώτατου ορίου, και τέλος v) η διενέργεια μιας προκαταρκτικής βαθμονόμησης του μοντέλου. Η εσωτερική βαθμονόμηση του AFLA-pistachio έδειξε ότι το 72,1% των προβλέψεων ήταν σωστές. Στην εξωτερική βαθμονόμηση, με ένα ανεξάρτητο πακέτο δεδομένων αποτελούμενο από σύνολο δεδομένων για μία τριετία, το 95,6% των δειγμάτων προβλέφθηκαν σωστά από το μοντέλο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το AFLA-pistachio φαίνεται να είναι ένα αξιόπιστο εργαλείο για την παρακολούθηση της δυναμικής του κινδύνου μόλυνσης των φιστικιών από AFB1 κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου των φιστικιών μέχρι την συγκομιδή.



## 6.2. Εισαγωγή

Στα γεωργικά συστήματα εν γένει, απώτερος στόχος παραμένει η παραγωγή τροφίμων υψηλής ποιότητας και ποσότητας. Σε αυτό το πλαίσιο οι παραγωγοί θα πρέπει να υποστηρίζονται από εργαλεία που αναπτύσσονται από την πρόοδο της επιστήμης, ενώ θα πρέπει να εφαρμόζουν και ορθές γεωργικές πρακτικές. Οι τελευταίες θα πρέπει να εφαρμόζονται ανεξάρτητα από το μέγεθος και τη τοποθεσία της μονάδας γεωργικής παραγωγής. Τα συστήματα διαχείρισης επιβλαβών μικροοργανισμών (IPM) των καλλιέργειών που εφαρμόζονται μπορούν να μειώσουν την παραγωγή αφλατοξινών, είτε άμεσα με μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών από τα προϊόντα που εφαρμόζονται (Sakuda et al. 2014), είτε έμμεσα μειώνοντας τα νύγματα των εντόμων που επιτρέπουν στους αφλατοξικογόνους μύκητες να εισέλθουν και να αποικίσουν το φυτικό ιστό στον οποίο θα παραχθούν αφλατοξίνες (Abbas et al. 2009). Η εφαρμογή ζιζανιοκτόνων είναι μια άλλη παράμετρος που επηρεάζει την μόλυνση από αφλατοξίνες. Οι μύκητες *Aspergillus* θεωρούνται αερομεταφερόμενα εδαφογενή παθογόνα, μάλλον, παρά μύκητες εισβολείς στις καλλιέργειες. Κατ' επέκταση, στρατηγικές που μειώνουν την πιθανότητα επιβίωσης του μύκητα στα ζιζάνια κοντά στην καλλιέργεια, μειώνουν επίσης τη πιθανότητα μόλυνσης από αφλατοξίνες (Abbas et al. 2009).

Επιπρόσθετα, καθώς οι υποδομές και οι οικονομικοί πόροι είναι περιορισμένοι, η μόλυνση από αφλατοξίνες είναι πολύ πιθανόν να αυξάνεται δεδομένης της ξηρασίας και του θερμοκρασιακού στρες. Καθώς η θερμοκρασία ανεβαίνει, η συσσώρευση των αφλατοξινών αυξάνεται. Επειδή τίποτα δεν μπορεί να γίνει για τη διαχείριση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, τα συστήματα άρδευσης θα πρέπει να ρυθμίζονται έτσι ώστε η μόλυνση από αφλατοξίνες να ελέγχεται και από το αρδευτικό σύστημα (Abbas et al. 2009, Alaniz Zanon et al. 2013). Επίσης, η επαρκής λίπανση μπορεί να βοηθήσει τα φυτά να αντιμετωπίσουν την μόλυνση από αφλατοξίνες. Εύρωστα φυτά είναι λιγότερο πιθανόν να μολυνθούν από αφλατοξίνες, ενώ φυτά με ελλειπή λίπανση και όχι τόσο εύρωστα, είναι πιο πιθανόν να μολυνθούν από αφλατοξίνες. Έτσι λοιπόν θα πρέπει να εφαρμόζονται λιπάσματα και να ελέγχονται οι χημικές ουσίες του εδάφους, όπως το pH και ο οργανικός άνθρακας του εδάφους. Η ενημέρωση των παραγωγών και η υιοθέτηση των ορθών γεωργικών πρακτικών και των τεχνολογιών, φαίνεται να είναι πολύ σημαντική για τη διαχείριση των αφλατοξινών (Parimi et al. 2018).

Η ορθή επιλογή ποικιλίας ή υβριδίου για την κάθε καλλιέργεια είναι επίσης ύψιστης σημασίας. Διαφορετικές ποικιλίες ή υβρίδια, χαρακτηρίζονται και από διαφορετικά αγρονομικά χαρακτηριστικά, όπως αποδοτικότητα, ευαισθησία ή ανθεκτικότητα σε αβιοτικούς παράγοντες (θερμοκρασία, επάρκεια νερού κ.ά.) αλλά και βιοτικούς παράγοντες όπως εχθρούς και μυκητολογικές, βακτηριολογικές και ιολογικές ασθένειες. Σε αυτό το πλαίσιο, έχει διερευνηθεί η ευαισθησία ή ανθεκτικότητα ή ανεκτικότητα ποικιλιών και υβριδίων διαφόρων καλλιέργειών στη μόλυνση από μυκοτοξίνες (Afolabi et al. 2007, Battilani et al. 2004). Κατά αντιστοιχία, έχει διερευνηθεί και η ανθεκτικότητα στη μόλυνση από μύκητες του γένους *Aspergillus* (Chen et al. 2006, Jalali et al. 2011, Windham et al. 2007). Ομοίως, έχει διερευνηθεί και η ανθεκτικότητα ποικιλιών και υβριδίων στην μόλυνση από αφλατοξίνες, σε διάφορες καλλιέργειες όπως τα κελυφωτά φιστίκια, το καλαμπόκι και η αραχίδα (Cary et al. 2011, Moghadam et al. 2010, Rahmianna et al. 2015, Waliyar et al. 2016). Η επιλογή ποικιλιών με ανθεκτικότητα ή ανεκτικότητα στην μόλυνση από αφλατοξίνες μπορεί να συνεισφέρει στην διαχείριση του προβλήματος. Παρόλα αυτά, η επιλογή αυτή πρέπει να βασίζεται σε ενδελεχή έρευνα και ως προς άλλα αγρονομικά χαρακτηριστικά και την ικανότητα προσαρμογής στο τοπικό μικροκλίμα της περιοχής, όπου θα εγκατασταθεί η καλλιέργεια.

Επιπρόσθετα, οι αγρονομικοί χειρισμοί που αποσκοπούν στη μείωση του μολύσματος του *Aspergillus* στα υπολείμματα της καλλιέργειας, είναι ιδιαίτερος αποτελεσματικοί στη διαχείριση των μυκοτοξινών. Η εδαφοκατεργασία, επηρεάζει άμεσα την πληθυσμιακή σύνθεση των μικροοργανισμών στο

έδαφος (Ahmad et al. 2008). Ο πληθυσμός του μύκητα *Aspergillus* που προκαλεί μόλυνση της επιφάνειας των σπόρων, ανήκει σε αυτούς που επηρεάζονται από την εδαφοκατεργασία. Έχει παρατηρηθεί χαμηλότερος ρυθμός μόλυνσης από το μύκητα, υπό συνθήκες συμβατικής εδαφοκατεργασίας, σε σχέση με μη εφαρμογή εδαφοκατεργασίας (Suproniene et al. 2011). Η εδαφοκατεργασία σε συνδυασμό με την άρδευση, μπορεί να επηρεάσει τη μόλυνση από αφλατοξίνες ιδιαίτερα στο καλαμπόκι. Σύμφωνα με πιο σύγχρονες μελέτες, σχετικά με τη μακροχρόνια απουσία εδαφοκατεργασίας, εκτός από την τοποθεσία της καλλιέργειας, η εδαφοκατεργασία είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη δομή και σύνθεση του πληθυσμού των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Sharma-Poudyal et al. 2017). Υψηλότερη μόλυνση από αφλατοξίνες έχει παρατηρηθεί μετά από εδαφοκατεργασία και έλλειψη άρδευσης (Payne et al. 1986).

Η εξέλιξη της επιστήμης και η ανάγκη για εξεύρεση χειρισμών χαμηλού κόστους στον γεωργικό τομέα, ώθησε προς τη δημιουργία της αντίληψης ότι η διαχείριση των ασθενειών των φυτών θα πρέπει να έγκειται κυρίως στην πρόβλεψη, την ανίχνευση και την λελογισμένη εφαρμογή φυτοπροστατευτικών προϊόντων και αγρονομικών πρακτικών, παρά στους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς που δεν μπορούν να αποτρέψουν την ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση των προϊόντων που έχει ήδη πιθανόν συμβεί προσυλλεκτικά. Στο πλαίσιο αυτής της αντίληψης, έχουν δημιουργηθεί μοντέλα πρόγνωσης της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων μυκήτων αλλά και της μόλυνσης των αγροτικών προϊόντων από μυκοτοξίνες (Klem et al. 2007). Τα μοντέλα αυτά κατατάσσονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα μηχανιστικά μοντέλα και τα εμπειρικά μοντέλα (Battilani 2016). Τα μοντέλα των δύο τύπων διαφέρουν ως προς την περιπλοκότητα των δεδομένων που δέχονται ως «είσοδο» (input) και την βαθμονόμηση του μοντέλου. Μοντέλα πρόβλεψης έχουν ήδη αναπτυχθεί σε διάφορες καλλιέργειες για τη μόλυνση από μυκοτοξίνες όπως τη μόλυνση του καλαμποκιού από αφλατοξίνες (Battilani et al. 2015a).

Πρακτικά, για τη δημιουργία ενός τέτοιου μοντέλου, απαιτούνται δύο υπομοντέλα. Αρχικά το υπομοντέλο για την καλλιέργεια που υπολογίζει τα αναπτυξιακά στάδια της καλλιέργειας, συνήθως από την ανθοφορία έως και την συγκομιδή. Δευτερευόντως, το υπομοντέλο που περιγράφει την οικολογία του παθογόνου μύκητα βάσει χαρακτηριστικών όπως η σποριογένεση, η βλαστικότητα των σπορίων κ.ά. (Abbas et al. 2009, Battilani et al. 2013, Aldars-García et al. 2017b). Στα τέλη της δεκαετίας του 1990, η γεωστατιστική ανάλυση εισήλθε σαν όρος στην επιδημιολογία και διαχείριση των ασθενειών των φυτών (Nelson et al. 1999). Κατά τη διάρκεια των πρώτων προσπαθειών να δημιουργηθούν μοντέλα πρόβλεψης για την ανάπτυξη των μυκήτων *Aspergillus*, η γεωστατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανίχνευση της πληθυσμιακής σύνθεσης των τοξικογόνων στελεχών εντός των πληθυσμών *Aspergillus* σε συγκεκριμένες περιοχές για την καλλιέργεια του βαμβακιού (Orum et al. 1999).

Προκειμένου να δημιουργηθούν τα δεδομένα που εισάγονται στα σύγχρονα μοντέλα, συλλέγονται ημερήσια ή ακόμα και ωριαία μετεωρολογικά δεδομένα για την μελετώμενη περιοχή, όπως η θερμοκρασία περιβάλλοντος, η σχετική υγρασία, η ενεργότητα του νερού στην φυλλόσφαιρα αλλά και η βροχόπτωση. Μελέτες σχετικά με τον ρυθμό αύξησης του μύκητα *A. flavus* και τον ρυθμό παραγωγής αφλατοξινών με τέτοιες περιβαλλοντικές παραμέτρους, υποδεικνύουν την ύπαρξη στενής συσχέτισης και αλληλεπίδρασης. Η θερμοκρασία φαίνεται να παίζει κύριο ρόλο στην ανάπτυξη και δραστηριότητα του μύκητα *A. flavus*, καθώς και στην παραγωγή αφλατοξινών (Giorni et al. 2008, Giorni et al. 2011, Giorni et al. 2012, Gallo et al. 2016, Aldars-García et al. 2015). Η επάρκεια νερού είναι επίσης ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή μυκοτοξινών (Battilani et al. 2008, Marín et al. 2012, Hill et al. 1983). Η επίδραση της υπερϊώδους ακτινοβολίας στην παραγωγή αφλατοξινών από τον αφλατοξικογόνο μύκητα *A. parasiticus* έχει επίσης διερευνηθεί (García-Cela et al. 2015).

Η έκφραση γονιδίων του βιοσυνθετικού μονοπατιού των αφλατοξινών όπως τα γονίδια *aflR*, *aflD*, *aflP* κ.ά. ρυθμίζεται σε σημαντικό βαθμό από παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η ενεργότητα του νερού. Οι βιοχημικοί μηχανισμοί που ελέγχουν την έκφραση τέτοιων γονιδίων οδηγώντας σε παραγωγή αφλατοξινών έχουν επίσης διερευνηθεί (Abdel-Hadi et al. 2012). Η ενεργότητα του νερού επηρεάζει ιδιαίτερος την έκφραση του γονιδίου *aflD* (Abdel-Hadi et al. 2010), ενώ η θερμοκρασία επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων *omt* (Lozano-Ojalvo et al. 2013) αλλά και *aflR* (O'Brian et al. 2007) που παίζουν κύριο ρόλο στη βιοσύνθεση των αφλατοξινών. Η συγκέντρωση των κονιδίων του μύκητα θεωρείται εξίσου σημαντικός παράγοντας στην εφαρμογή μοντέλων πρόβλεψης μόλυνσης από αφλατοξίνες (Aldars-García et al. 2017a). Έχει αποδειχθεί και ότι η μειωμένη παραγωγή αφλατοξινών συνδέεται με την μειωμένη ανάπτυξη του μύκητα στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αλλά και με την καθυστερημένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των αφλατοξινών (Zhang, Scharfenstein, et al. 2015).

Σχετικά με την προσυλλεκτική συσσώρευση αφλατοξινών στις περισσότερες καλλιέργειες, ο χρόνος συγκομιδής είναι από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την μόλυνση (Wesolek et al. 2014). Για αυτό το λόγο, κατά την κατάρτιση σύγχρονων μοντέλων πρόβλεψης, θα πρέπει να συλλέγονται δεδομένα πραγματικών μολύνσεων από αφλατοξίνες που να συνοδεύονται από τις ημερομηνίες συγκομιδής προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ορθή λειτουργία του μοντέλου. Η «έξοδος» του μοντέλου, δηλαδή το αποτέλεσμα, εκφράζεται ως ένας δείκτης. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται μια λογιστική εξίσωση προκειμένου να ταξινομηθούν τα δείγματα σύμφωνα με το εκάστοτε ανώτατο επιτρεπτό όριο μόλυνσης από αφλατοξίνες, αναλόγως με το δείκτη που δόθηκε από το μοντέλο για κάθε ημερομηνία συγκομιδής (Wesolek et al. 2016, Battilani et al. 2013). Ως αποτέλεσμα προκύπτει το ρίσκο μόλυνσης από αφλατοξίνες, που υποδεικνύει έμμεσα τον ορθό χρόνο συγκομιδής προκειμένου να αποφευχθεί η συσσώρευση αφλατοξινών, αλλά και την εφαρμογή φυτοπροστατευτικών προϊόντων, εάν αυτό επιτρέπεται και συμβάλλει στην αποφυγή της μόλυνσης. Τέτοια μοντέλα, μπορούν να δώσουν γεωστατιστικούς χάρτες επικινδυνότητας για τη μόλυνση από μυκοτοξίνες (Susca et al. 2016, Adetuniji et al. 2014). Τα μοντέλα πρόβλεψης και οι γεωστατιστικοί χάρτες επικινδυνότητας, αποτελούν πλέον ιδιαίτερα χρήσιμα εργαλεία στην κατάρτιση σύγχρονων ολοκληρωμένων συστημάτων διαχείρισης αφλατοξινών.

Τέλος, τα συστήματα υποστήριξης λήψεως αποφάσεων (Decision Support Systems-DSS) που αναπτύσσονται στις μέρες μας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τα μοντέλα πρόβλεψης. Τα DDS χρησιμοποιούνται για να υποδείξουν τον ορθό χρόνο εφαρμογής φυτοπροστατευτικών προϊόντων ή και γεωργικών πρακτικών όπως εφαρμογή βιολογικών ή χημικών σκευασμάτων για τη διαχείριση ασθενειών των φυτών (González-Domínguez et al. 2018). DDS χρησιμοποιούνται στη διαχείριση των μυκοτοξινών, λαμβάνοντας υπόψιν παράγοντες όπως η περιοχή, τα φυτικά είδη, το επίπεδο ανθεκτικότητας της καλλιέργειας σε εχθρούς και ασθένειες, τις προηγούμενες καλλιέργειες στην περιοχή, την λίπανση καθώς και την εδαφοκατεργασία (Rossi et al. 2014). Η χρήση των DDS σε συνδυασμό με την εφαρμογή μοντέλων πρόβλεψης και την αξιοποίηση γεωστατιστικών χαρτών επικινδυνότητας, μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλότερο κέρδος για τους παραγωγούς και στην καθιέρωση αγροτικών πρακτικών φιλικών προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο, μειώνοντας την εισροή χημικών στην πρωτογενή παραγωγή και κατά συνέπεια και στην τροφική αλυσίδα.

Η καλλιέργεια της φιστικιάς (*Pistacia vera* L.), η οποία είναι ένα δίοικο δέντρο που επικονιάζεται από τον άνεμο, είναι μια σημαντική καλλιέργεια η οποία δίνει ιδιαίτερα θρεπτικούς καρπούς. Καλλιεργείται σε πολλές περιοχές του κόσμου, κάτω από διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες, αλλά ειδικά σε υποτροπικές και εύκρατες ζώνες (Elloumi et al. 2013). Το ζεστό καλοκαίρι και οι ήπιοι χειμώνες προτιμώνται για την επίτευξη της βέλτιστης απόδοσης της καλλιέργειας και υψηλής ποιότητας του

προϊόντος. Είναι γνωστό ότι για να επιτευχθεί υψηλή απόδοση, απαιτούνται συγκεκριμένες μονάδες ψύχους κατά τους χειμερινούς μήνες, πιο συγκεκριμένα από τις αρχές Οκτωβρίου έως τα τέλη Μαρτίου (Afshari et al. 2009, Guo et al. 2014), έτσι ώστε να επιτευχθούν εν συνεχεία οι απαιτήσεις θερμότητας από τον Απρίλιο έως τη συγκομιδή (Kebour et al. 2013).

Υπάρχουν αρκετά μοντέλα για την ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης ψύξης, όπως το Δυναμικό Μοντέλο (Dynamic Model) με μέτρηση σε Chill Portions (CP), το οποίο αναπτύχθηκε αρχικά για ζεστούς χειμώνες και βασίζεται στην υπόθεση ότι η συσσώρευση ψύχους κατά τη διάρκεια του χειμώνα προκύπτει από μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια, στα οποία ένα ενδιάμεσο προϊόν σχηματίζεται αρχικά σε μια διαδικασία που προωθείται από ψυχρές θερμοκρασίες. Οι θερμές θερμοκρασίες μπορούν να καταστρέψουν αυτό το ενδιάμεσο προϊόν. Μόλις συσσωρευτεί μια συγκεκριμένη ποσότητα αυτού του ενδιάμεσου προϊόντος, μετατρέπεται απευθείας σε ένα τμήμα ψύξης, το οποίο πλέον συσσωρεύεται (Luedeling et al. 2011). Επιπλέον υπάρχει, το μοντέλο Chilling Hours (CH) που καθοδηγείται από το μοντέλο Crossa-Raynaud και το μοντέλο Utah [Utah Chill Units (UCU)] (Luedeling et al. 2011). Το μοντέλο Chilling Hours (CH) είναι η παλαιότερη διαθέσιμη μέθοδος, για την ποσοτικοποίηση του χειμερινού ψύχους και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως ακόμα και σήμερα. Βάσει αυτού του μοντέλου, θεωρείται ότι όλες οι ώρες με θερμοκρασίες μεταξύ 0 και 7,2°C είναι εξίσου αποτελεσματικές για τη συσσώρευση ψύχους και προσμετρώνται ισάξια για την συσσώρευση ωρών ψύχους (Luedeling et al. 2011). Κατ' επέκταση, αντίστοιχα μοντέλα για τη συσσώρευση θερμών μονάδων έχουν χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή των σταδίων ανάπτυξης των καλλιέργειας, όπως το Growth Degree Days (GDD) (Zhang, Ranford, et al. 2015, McMaster et al. 1997). Η βασική εξίσωση που χρησιμοποιείται και περιγράφει το μοντέλο είναι η εξής  $GDD = [(T_{Max} + T_{Min}) / 2] - T_{Base}$ , όπου το  $T_{Max}$  και το  $T_{Min}$  είναι η ημερήσια μέγιστη και ελάχιστη θερμοκρασία αέρα, αντίστοιχα, και το  $T_{Base}$  είναι η βασική θερμοκρασία, που αναφέρεται επίσης ως θερμοκρασιακό κατώφλι (McMaster et al. 1997).

Οι περίοδοι από την ανθοφορία έως το δέσιμο του καρπού και το στάδιο ωρίμανσης, και πιο συγκεκριμένα το άνοιγμα του περικαρπίου, θεωρούνται τα πιο ευαίσθητα στάδια ανάπτυξης της καλλιέργειας του φιστικιού για τη μόλυνση από τον *A. flavus* και τις αφλατοξίνες που παράγει προσυλλεκτικά. Κατά την περίοδο από την άνθηση έως και το δέσιμο των καρπών, ο μύκητας μπορεί να εισέλθει διαμέσου του σχηματιζόμενου καρπού και να αποικίσει το εσωτερικό τμήμα, καθώς το κέλυφος δεν έχει ακόμα σχηματιστεί. Επιπλέον, ο διαχωρισμός και το άνοιγμα του περικαρπίου και του κελύφους (shell split) κατά το στάδιο ωρίμανσης του φιστικιού θεωρείται ένα πολύ ευαίσθητο στάδιο (Sommer et al. 1986). Στην καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού, το φυσικό «early split» που συμβαίνει σε πολλές καλλιεργούμενες ποικιλίες, σε συνδυασμό με καθυστερημένη συγκομιδή μπορεί να οδηγήσει επίσης σε υψηλά επίπεδα συσσώρευσης αφλατοξινών λόγω ευνοϊκών συνθηκών για μόλυνση από *A. flavus* μέσω του ανοιχτού περικαρπίου και κελύφους, ειδικά στις ποικιλίες που εμφανίζουν έντονο σχίσσιμο του περικαρπίου. Επίσης, στην καλλιέργεια της αραχίδας, η μόλυνση από αφλατοξίνες αυξάνεται στατιστικά σημαντικά καθώς καθυστερεί η συγκομιδή (Canavar et al. 2013). Πρόσθετες επίσης μελέτες συσχετίζουν τα υψηλά επίπεδα αφλατοξινών με νύγματα εντόμων και χτυπήματα στους καρπούς (Doster et al. 1995, Doster et al. 1999).

Όπως προαναφέρθηκε, ο χρόνος συγκομιδής θεωρείται μια πολύ κρίσιμη παράμετρος για προϊόντα υψηλής ποιότητας απαλλαγμένα από αφλατοξίνες (Cotty 1991, Panahi et al. 2011). Η συσσώρευση των αφλατοξινών αυξάνεται καθώς καθυστερεί η συγκομιδή. Ένας απλός τρόπος να κρατηθεί το επίπεδο αφλατοξινών χαμηλό είναι να γίνει η συγκομιδή στο σωστό χρονικό σημείο που δύναται να υποδεικνύεται από τα κατάλληλα DSS που υποστηρίζονται από μηχανιστικά μοντέλα. Η περιεκτικότητα σε υγρασία και



η ενεργότητα του νερού ( $a_w$ ) των ξηρών καρπών διαφοροποιούνται ανάλογα με τη στιγμή της συγκομιδής. Η περιεκτικότητα σε υγρασία στο τελικό προϊόν είναι συνήθως μεταξύ 32 και 38% (Aktas et al. 2007), ενώ προσυλλεκτικά παραμένει πολύ υψηλή μέχρι τη συγκομιδή, περίπου 0,99 (Mahoney et al. 2014). Μετά τη συγκομιδή, η μηχανική αποφλοιώση, που σκοπεύει στο να διαχωρίσει το μαλακό περικάρπιο από το κέλυφος λαμβάνει χώρα σε ειδικούς αποφλοιωτές (Georgiadiou et al. 2012). Αυτό είναι ζωτικής σημασίας, προκειμένου να αποφευχθεί η οξείδωση του περικαρπίου και, κατά συνέπεια, το μαύρισμα και η αποσύνθεση των φιστικιών. Μετά την αποφλοιώση, ακολουθεί άμεση ξήρανση για την επίτευξη περιεκτικότητας σε υγρασία στα φιστίκια περίπου 12-13%. Όσον αφορά στην ενεργότητα του νερού, απαιτείται μικρότερη ή ίση του 0,82 για βραχυπρόθεσμη αποθήκευση και 0,7 ή χαμηλότερα για μακροχρόνια αποθήκευση (Aktas et al. 2007, Beauchat 1978). Η ξήρανση μπορεί να επιτευχθεί είτε μηχανικά σε στεγνωτήρες θερμού αέρα (65-70°C για περίπου 8-10 ώρες) ή κάτω από τον ήλιο, απλώνοντας τα φιστίκια σε ένα λεπτό στρώμα πάχους 2-3 cm για περίπου 2-3 ημέρες. Η άμεση ξήρανση με στεγνωτήρες θερμού αέρα έχει ύψιστη σημασία για να αποφευχθεί η παραγωγή ή αύξηση των αφλατοξινών λόγω ευνοϊκών συνθηκών κατά την υπαίθρια ξήρανση.

Έχουν θεσπιστεί ανώτατα επιτρεπτά όρια για τη μέγιστη περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες σε πολλά γεωργικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων και των φιστικιών, από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Κανονισμός ΕΕ 1881/2006 της ΕΕ, όπως τροποποιήθηκε με τον 165/2010), προκειμένου να αποφευχθεί η έκθεση των καταναλωτών σε τέτοιου είδους επιμολυντές. Επομένως, τα προϊόντα που δεν πληρούν τις προϋποθέσεις αυτές είναι ακατάλληλα για την αγορά, γεγονός που προφανώς θα έχει σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο στον παραγωγό. Η σημασία του οικονομικού αντίκτυπου της εμφάνισης αφλατοξινών στα γεωργικά προϊόντα υποδεικνύεται έντονα από την ανάλυση του δικτύου στις εμπορικές εξαγωγές και στα παγκόσμια πρότυπα συναλλαγών, σε σχέση με την εκάστοτε νομοθεσία της κάθε χώρας αναφορικά με τα ανώτατα επιτρεπτά όρια μόλυνσης από αφλατοξίνες (Bui-Klimke et al. 2014, Xiong et al. 2017). Όσον αφορά σε μετασυλλεκτικό επίπεδο, εάν εφαρμοστούν ορθές γεωργικές πρακτικές σχετικά με την συγκομιδή και την αποθήκευση, αυτές μπορούν να εγγηθούν ότι δεν θα αυξηθούν οι πιθανόν ήδη υπάρχουσες αφλατοξίνες.

Τις τελευταίες δεκαετίες, η έρευνα επικεντρώθηκε στην πρόληψη της μόλυνσης των φιστικιών από αφλατοξίνες με χρήση βιολογικών ή χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων προσυλλεκτικά (Yin et al. 2008, Lagogianni et al. 2018, Tsitsigiannis et al. 2012, Doster et al. 2014). Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν διαθέσιμα μοντέλα πρόβλεψης για την υποστήριξη των αποφάσεων των παραγωγών κατά τη διαχείριση των καλλιεργειών κελυφωτών φιστικιών. Τα μοντέλα πρόβλεψης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης εχθρών (IPM), στο πλαίσιο της βιώσιμης και αειφόρου παραγωγής καλλιεργειών, και αρκετά παραδείγματα είναι διαθέσιμα για τη διαχείριση πλήθους μυκοτοξινών, όπως για τη μόλυνση των σταφυλιών από ωχρατοξίνη Α (OTA) (Battilani et al. 2015b), για τη μόλυνση του αραβοσίτου από φουμονισίνες (Maiorano et al. 2009), για τη μόλυνση της αραχίδας από αφλατοξίνες (Chauhan et al. 2010) αλλά και τη μόλυνση του σιταριού από δεοξυνιβαλενόλη (Liu et al. 2018, Váňová et al. 2009, Fels-Klerx et al. 2010).

### 6.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, το μοντέλο που αποτέλεσε βάση από τη βιβλιογραφία είναι το AFLA-maize, ένα μηχανιστικό μοντέλο για την πρόβλεψη της ανάπτυξης του *A. flavus* και του κινδύνου μόλυνσης του αραβοσίτου από AFB1 (Battilani et al. 2013, Battilani et al. 2015a). Βασίζεται σε 2 υπομοντέλα, το ένα για την περιγραφή της φαινολογίας της καλλιέργειας ξενιστή και το άλλο για τον κύκλο μόλυνσης από τον μύκητα *A. flavus* και τις παραγόμενες αφλατοξίνες. Η λογική πίσω από την παρούσα μελέτη ήταν να μεταφερθούν οι διαθέσιμες γνώσεις, που προορίζονται ως το προγνωστικό μοντέλο αραβοσίτου, *A. flavus* και αφλατοξινών, σε ένα διαφορετικό παθοσύστημα, αυτό της καλλιέργειας του κελυφωτού φιστικιού και του *A. flavus*. Τελικός σκοπός ήταν να δημιουργηθεί ένα μηχανιστικό μοντέλο πρόβλεψης της μόλυνσης των φιστικιών από αφλατοξίνες. Βάση αποτέλεσαν τα μετεωρολογικά δεδομένα για την περιοχή της Αίγινας και δεδομένα μόλυνσεων από αφλατοξίνες για φιστικεώνες στην Αίγινα. Χρησιμοποιήθηκε το ήδη υπάρχον υπομοντέλο για τον μύκητα που αποτέλεσε πυλώνα του μοντέλου AFLA-maize, βάσει της υπόθεσης πως πρόκειται για τον ίδιο φυτοπαθογόνο αφλατοξικογόνο μύκητα.

Συγκεκριμένα, οι επιμέρους στόχοι αυτής της μελέτης ήταν:

- Η δημιουργία ενός μοντέλου που περιγράφει το κύκλο ανάπτυξης της καλλιέργειας των φιστικιών, καθορίζοντας το ευαίσθητο στάδιο ανάπτυξης του φιστικιού για τη μόλυνση από *A. flavus* ώστε να συνδυαστεί με το υπομοντέλο του κύκλου μόλυνσης του μύκητα.
- Η ανάπτυξη ενός πρωτότυπου μοντέλου, με το όνομα AFLA-pistachio, (μεταφορά μοντέλου από το AFLA-maize).
- Η συλλογή μετεωρολογικών δεδομένων και δεδομένων μόλυνσης με AFB1 από φιστικεώνες στην Αίγινα.
- Η εφαρμογή του μοντέλου και επεξεργασία μιας συνάρτησης πιθανοτήτων για να εκτιμηθεί η πιθανότητα υπέρβασης του νόμιμου ανώτατου ορίου.
- Η διενέργεια μιας προκαταρκτικής βαθμονόμησης του μοντέλου.



## 6.4. Μεθοδολογία

### 6.4.1. Συλλογή μετεωρολογικών δεδομένων

Τα ημερήσια μετεωρολογικά δεδομένα της θερμοκρασίας του αέρα (T, °C) και της βροχόπτωσης (R, mm) συλλέχθηκαν από την ιστοσελίδα [www.meteo.gr](http://www.meteo.gr), υποστηριζόμενη από το Εθνικό Αστεροσκοπείο Αθηνών, για το νησί της Αίγινας, μια περιοχή με πολύ υψηλή παραγωγή ΠΟΠ φιστικιών στην Ελλάδα. Τα ημερήσια δεδομένα σχετικής υγρασίας (RH, %) συλλέχθηκαν από την Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία. Το νησί βρίσκεται κοντά στην Αθήνα, στο νομό Αττικής, στην περιοχή του Πειραιά, στον Σαρωνικό Κόλπο. Οι γεωγραφικές συντεταγμένες της πόλης της Αίγινας, η πρωτεύουσα του νησιού, είναι 37°44'51.42" και 23°25'44.97". Η περίοδος αναφοράς ήταν τα έτη 2014-2019.

### 6.4.2. Περιγραφή και υπολογισμός των σταδίων ανάπτυξης της καλλιέργειας

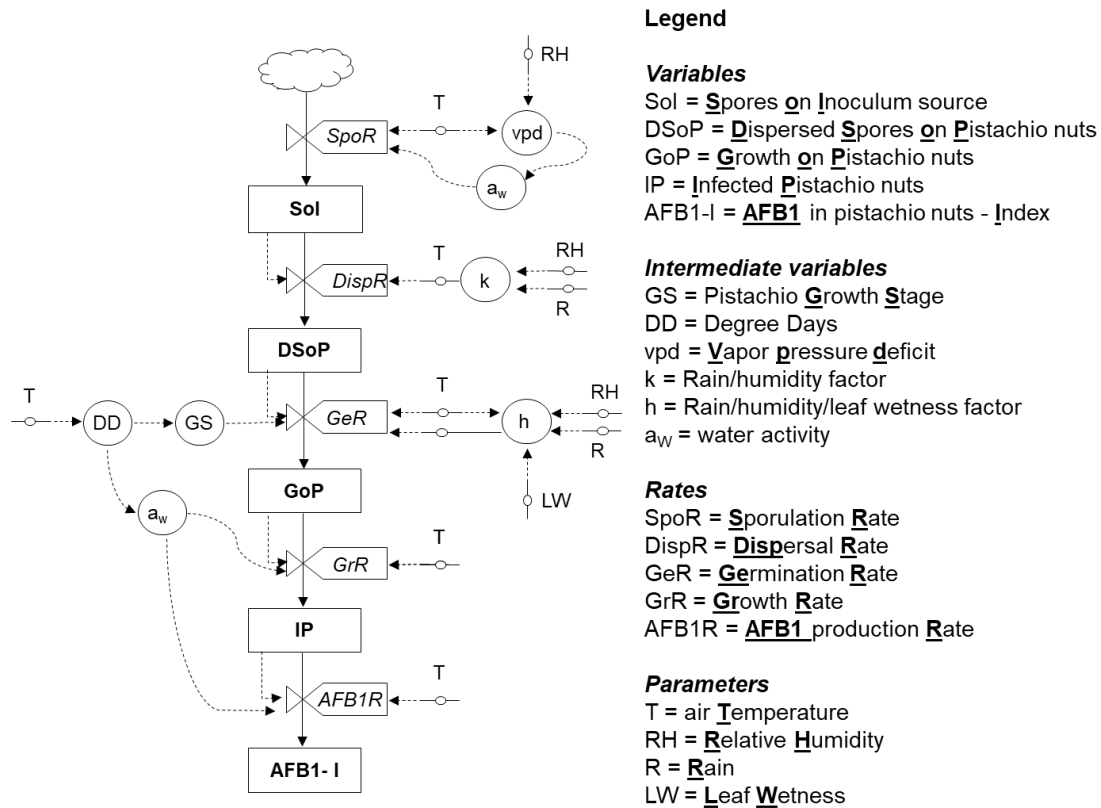
Οι ώρες ψύχους που απαιτούνται για το διαχωρισμό των οφθαλμών στην καλλιέργεια της φιστικιάς υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο Crossa-Raynaud (Eloumi et al. 2013), το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μοντέλο, για τον υπολογισμό των σταδίων ανάπτυξης στη φιστικιά. Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από την 1<sup>η</sup> Οκτωβρίου έως την 31<sup>η</sup> Μαρτίου για τις περιόδους 2013-2014, 2014-2015 και 2015-2016. Ένα πολύ σημαντικό σημείο κατά τη χρήση αυτού του μοντέλου για την περιγραφή και την πρόβλεψη της φαινολογίας της καλλιέργειας είναι ο ορισμός του ορίου θερμοκρασίας για τα φιστίκια, θέτοντας ως κατώφλι τους 7 °C. Κατά συνέπεια, απαιτείται θερμοκρασία κάτω των 7 °C κατά τη διάρκεια του χειμώνα για διακοπή του αδράνειας για τις περισσότερες ποικιλίες φιστικιάς (Rahemi et al. 2009, Kuden et al. 1995). Στη συνέχεια, η περίοδος ψύχους ακολουθείται από θερμή περίοδο που καλύπτει τις απαιτήσεις θερμότητας από τον Απρίλιο έως τη συγκομιδή (Kebour et al. 2013). Οι βαθμομέρες ανάπτυξης (GDD) υπολογίστηκαν για κάθε στάδιο ανάπτυξης του φιστικιού (McMaster et al. 1997). Αναλυτικά, για να προκύψουν οι βαθμομέρες GDD, από τη μέση θερμοκρασία κάθε ημέρας πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του θερμοκρασιακού κατωφλιού των 7 °C, και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πρόσθεση της τιμής αυτής στο αντίστοιχο της προηγούμενης ημέρας προκειμένου να υπολογιστεί για όλο το διάστημα. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία από τον Απρίλιο μέχρι τη συγκομιδή (Rahemi et al. 2009, Kuden et al. 1995).

### 6.4.3. Δειγματοληψίες και ανάλυση αφλατοξινών

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα Ευρωπαϊκά πρωτόκολλα δειγματοληψίας (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Επιτροπής) από τη Συνεταιρισμό Φιστικοπαραγωγών της Αίγινας, από το 2014 έως το 2019. Όλα τα φιστίκια αρχικά αποφλοιώθηκαν και ξηράνθηκαν σωστά. Ο προσδιορισμός της μόλυνσης από αφλατοξίνη Β1 (AFB1) πραγματοποιήθηκε από εξουσιοδοτημένα εργαστήρια ανάλυσης που δραστηριοποιούνται σε θέματα ασφάλειας τροφίμων, όπως η ανάλυση αφλατοξινών, συγκεκριμένα από τα AgroLab RDS, SkyLab Med και Tsakalidis. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή φθορισμού χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της μόλυνσης από αφλατοξίνες και το όριο ανίχνευσης ήταν (LOD) ήταν 0,1 μg/kg, σύμφωνα με τα πιστοποιημένα εξωτερικά εργαστήρια που διεξήγαγαν την ανάλυση. Τα δεδομένα που προέκυψαν χωρίστηκαν σε δύο διαφορετικά σύνολα δεδομένων, για να χρησιμοποιηθούν αρχικά τη διερεύνηση της πιθανότητας μόλυνσης AFB1 και δευτερευόντως για τη βαθμονόμηση του μοντέλου. Ο διαχωρισμός έγινε ως εξής, 43 δείγματα συλλέχθηκαν από το 2014 έως το 2016, και αποτέλεσαν το πρώτο σύνολο δεδομένων και 87 δείγματα από το 2017 έως το 2019, που αποτέλεσαν το δεύτερο σύνολο δεδομένων αντίστοιχα.

#### 6.4.4. Δημιουργία μοντέλου πρόβλεψης

Το διάγραμμα σχέσης αναπτύχθηκε και προσαρμόστηκε με βάση ένα ήδη υπάρχον διάγραμμα (Battilani et al. 2013) και ονομάστηκε AFLA-pistachio (Διάγρ. 6.1). Το διάγραμμα σχέσης οργανώθηκε σύμφωνα με τις αρχές της «ανάλυσης συστημάτων» (Leffelaar 1993). Η ανάπτυξη και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του μύκητα αντιπροσωπεύονται από κουτιά, που ορίζονται ως μεταβλητές της κατάστασης. Η ροή από τη μία κατάσταση στην ακόλουθη καθοδηγείται από σταθερές και παραμέτρους ή ενδιάμεσες μεταβλητές, ενώ βασίζεται στα περιβαλλοντικά δεδομένα. Οι μεταβλητές αντιπροσωπεύονται από «βαλβίδες», που περιγράφονται από μαθηματικές συναρτήσεις. Οι μεταβλητές που λειτουργούν στο μοντέλο πρόβλεψης συνδέονται τελικά σε ένα μαθηματικό πλαίσιο για τον υπολογισμό της τελικής εξόδου του μοντέλου, δηλαδή του αθροιστικού δείκτη AFB1 (AFB1-Index (AFB1-I)). Το AFLA-pistachio που προκύπτει είναι ένα μηχανιστικό μοντέλο πρόβλεψης βάσει περιβαλλοντικών δεδομένων. Αυτά τα μετεωρολογικά δεδομένα (T, R και RH) ήταν τα δεδομένα εισόδου, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την πρόβλεψη της φαινολογίας της καλλιέργειας όσο και της συμπεριφοράς του μύκητα *A. flavus*. Το διάγραμμα σχέσης 6.1 περιγράφεται αναλυτικά στη παράγραφο 6.5.4.



Διάγραμμα 6.1: Διάγραμμα σχέσης του προγνωστικού μοντέλου για ανάπτυξη του *Aspergillus flavus* και την παραγωγή αφλατοξίνης B1 σε φιστίκια.

#### 6.4.5. Πιθανότητα μόλυνσης από αφλατοξίνη B1

Το AFB1-I που υπολογίστηκε με βάση τα μετεωρολογικά δεδομένα για το κάθε έτος, συσχετίστηκε με τη μόλυνση από AFB1 που εντοπίστηκε στα σχετικά δείγματα φιστικιών, για το σύνολο δεδομένων 1 (2014-2016) (Battilani et al. 2013). Τα δεδομένα μόλυνσης από AFB1 στα φιστίκια κατά τη συγκομιδή

χωρίστηκαν σε δύο ομάδες με βάση το κατώφλι των 12 µg/kg, που είναι το ανώτατο επιτρεπτό όριο για τα φιστικά που πρόκειται να υποβληθούν σε διαλογή ή άλλη φυσική επεξεργασία, πριν από την ανθρώπινη κατανάλωση (Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 165/2010 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής με την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006). Μια δυαδική λογιστική παλινδρόμηση αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας ως εξαρτημένη μεταβλητή τη μόλυνση των δειγμάτων με AFB1 και ως ανεξάρτητη μεταβλητή τον δείκτη AFB1-I που δημιουργήθηκε ως έξοδος του AFLA-pistachio (Battilani et al. 2013). Αυτή η προσέγγιση εκτιμά την πιθανότητα ενός συμβάντος, εν προκειμένω της μόλυνσης από AFB1, σε επίπεδο κάτω ή πάνω από το νόμιμο όριο, δηλαδή σε δυαδικά δεδομένα, με βάση μια ανεξάρτητη μεταβλητή που είναι ο δείκτης που δίνεται από το μοντέλο στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Η πιθανότητα (P) μπορεί να κυμαίνεται από 0 έως 1. Το συμβάν θεωρείται ότι συμβαίνει όταν  $P > 0,5$ , ενώ δεν συμβαίνει όταν  $P \leq 0,5$ . Η λογιστική παλινδρόμηση που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων της λογιστικής εξίσωσης  $P = 1 / (1 + \exp^{-(c+b*AFB1-I)})$  (Πίν. 6.1, b και c) πραγματοποιήθηκε με το IBM SPSS Statistics (έκδοση 25.0).

**Πίνακας 6.1:** Παράμετροι (b και c) και στατιστικά στοιχεία της λογιστικής παλινδρόμησης που εφαρμόστηκε για την πρόβλεψη της πιθανότητας μόλυνσης δειγμάτων φιστικών άνω των 12 µg αφλατοξίνης B1 ανά kg ξηρών καρπών, ως συνάρτηση της εξόδου του προγνωστικού μοντέλου (AFB1-I). Η πιθανότητα  $P = 0,5$  αντιστοιχεί σε  $AFB1-I = 1.153$ . Το  $AFB1-I < 1.153$  αντιστοιχούσε σε  $P < 0,5$  και για τα σχετικά δείγματα φιστικιού, το μοντέλο προέβλεπε μόλυνση μικρότερη από 12 µg/Kg (0: μη μολυσμένη), αντίθετα τα  $AFB1-I \geq 1.153$  δείγματα θεωρήθηκαν μολυσμένα (1: μόλυνση άνω των 12 µg/kg)

	<i>Parameters</i>	<i>S.E.<sup>a</sup></i>	<i>Wald<sup>b</sup></i>	<i>df</i>	<i>Probability<sup>c</sup></i>	<i>Exp (b)<sup>d</sup></i>
<i>b</i>	0,004	0,002	3,141	1	0,076	1,004
<i>c</i>	-5,131	2,595	3,911	1	0,048	0,006

<sup>a</sup> Συνάρτηση:  $P = 1 / (1 + \exp^{-(c+b*AFB1-I)})$

<sup>b</sup> Wald statistic: Καθορισμός του αν κάθε μεταβλητή του μοντέλου πρέπει να διατηρηθεί ή να αφαιρεθεί.

<sup>c</sup> Πιθανότητα της παραμέτρου.

<sup>d</sup> Exp (b): ο παράγοντας που αυξάνεται κατά την πιθανότητα, όταν μια ανεξάρτητη μεταβλητή, αλλάζει κατά μία μονάδα.

#### 6.4.6. Διενέργεια βαθμονόμησης του μοντέλου

Για να επιβεβαιωθεί η ικανότητα του μοντέλου AFLA-pistachio να προβλέψει με ακρίβεια την μόλυνση των φιστικών από AFB1, οι εκτιμώμενες υπολογιζόμενες πιθανότητες συγκρίθηκαν με τα δεδομένα μόλυνσης αφλατοξινών ως μέτρο της καλής προσαρμογής των προβλέψεων. Η απόδοση της πρόβλεψης αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας και τα δύο σύνολα δεδομένων μολύνσεων, το σύνολο δεδομένων 1 ως δεδομένα εισόδου για την εκτίμηση της παραμέτρου της λογιστικής παλινδρόμησης (εσωτερική βαθμονόμηση) και του ανεξάρτητου συνόλου δεδομένων 2 (έτη 2017-2019) ως εξωτερική επικύρωση (Paul et al. 2004).

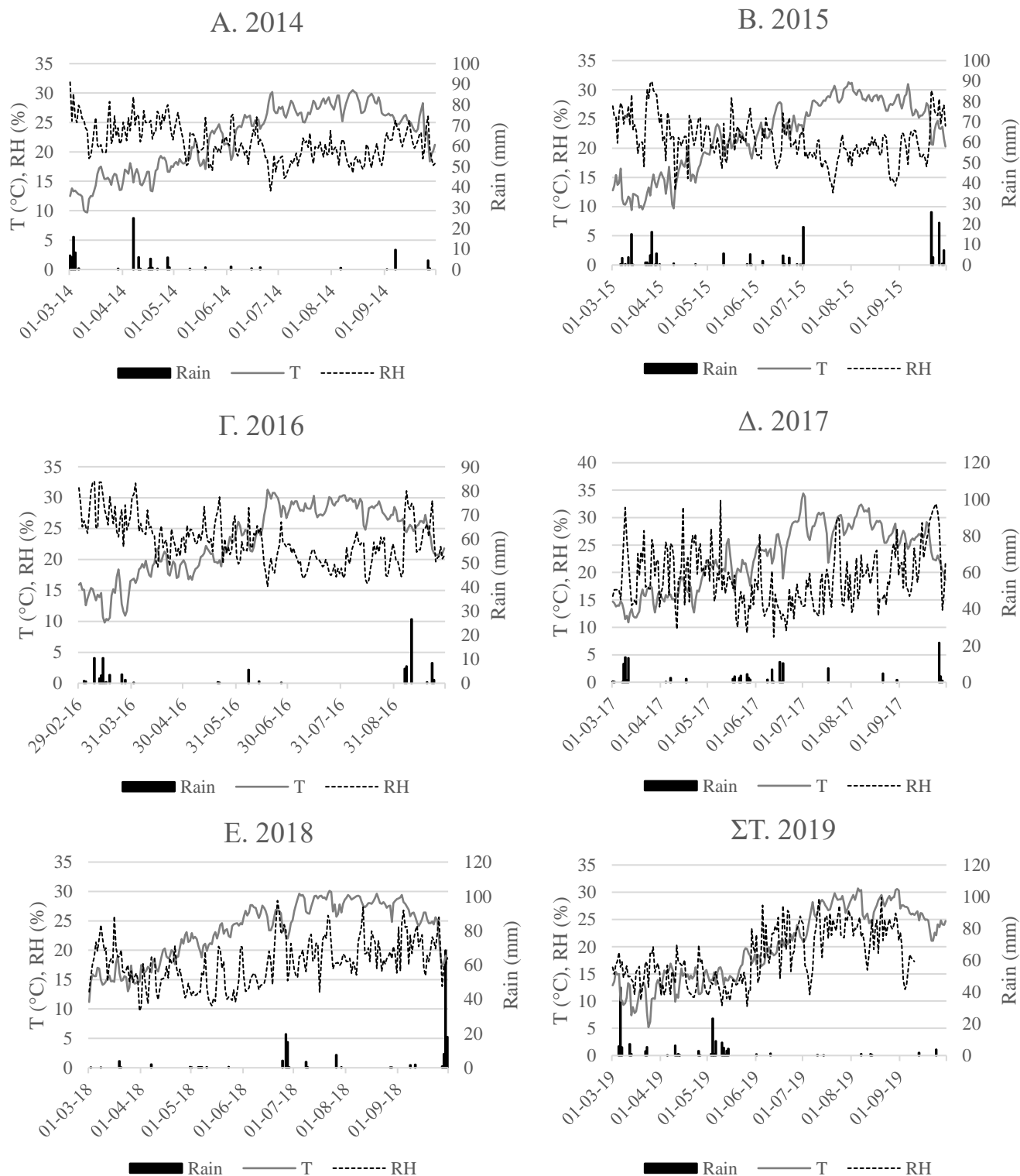
## 6.5. Αποτελέσματα

### 6.5.1. Συλλογή μετεωρολογικών δεδομένων

Τα μετεωρολογικά δεδομένα που συλλέχθηκαν ήταν η ημερήσια μέση θερμοκρασία ( $T$ , °C), η μέγιστη ημερήσια θερμοκρασία ( $T_{\max}$ , °C), η ελάχιστη ημερήσια θερμοκρασία ( $T_{\min}$ , °C), η ημερήσια σχετική υγρασία (RH, %) και η ημερήσια βροχόπτωση ( $R$ , mm) από την 1η Ιανουαρίου έως τις 31 Δεκεμβρίου για τα έτη 2014-2019 (Διάγρ. 6.2). Τα μετεωρολογικά δεδομένα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των σταδίων ανάπτυξης των φιστικιών (2014-2016) και για την ανάπτυξη και τη βαθμονόμηση του μοντέλου πρόγνωσης AFLA-pistachio (2017-2019).

Από το Διάγραμμα 6.2 φαίνεται πως η μέση ημερήσια θερμοκρασία κυμάνθηκε σε πιο υψηλά επίπεδα το 2017, ενώ το 2018 παρουσιάστηκαν οι χαμηλότερες μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες, σε επίπεδο κάτω των 30 °C. Σχετικά με τη βροχόπτωση για το διάστημα 2014-2019, φαίνεται πως το 2014 που είχε και τις υψηλότερες μολύνσεις από αφλατοξίνες, είχε την χαμηλότερη βροχόπτωση από την Άνοιξη έως και την συγκομιδή, δηλαδή από τον Απρίλιο και κατά τους θερινούς μήνες. Παρόλο που παρατηρήθηκαν βροχοπτώσεις, αυτές ήταν πολύ μικρής ποσότητας, κάτω των 2 mm. Το 2015 παρατηρήθηκαν υψηλές για την εποχή βροχοπτώσεις κατά τον Ιούλιο και αντίστοιχα για το 2018 τον Ιούνιο. Για το 2019, όπως και για το 2014, δεν παρατηρήθηκαν υψηλές βροχοπτώσεις κατά τους ανοιξιάτικους και θερινούς μήνες, από τον Μάιο μέχρι και την συγκομιδή.

Όσον αφορά στη σχετική υγρασία, το 2018 ήταν η χρονιά με την υψηλότερη ελάχιστη μέση ημερήσια σχετική υγρασία μεταξύ των υπό μελέτη ετών. Τα έτη 2018 και 2019 παρατηρείται μια ανάλογη αύξηση της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας, ενώ τα υπόλοιπα 4 έτη, παρατηρείται αντιστρόφως ανάλογη πορεία, δηλαδή από τα μέσα Ιουνίου έως και τις αρχές Σεπτεμβρίου παρατηρείται μια μείωση της σχετικής υγρασίας, κατά την άνοδο της θερμοκρασίας. Για τα έτη 2018 και 2019 θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα πως επικρατεί ένα μοτίβο πιο τροπικού κλίματος, με υψηλή σχετική υγρασία κατά τους θερινούς μήνες. Κατά την περίοδο της συγκομιδής, περί τα τέλη Αυγούστου έως αρχές Σεπτεμβρίου, οι πιο θερμές χρονιές ήταν το 2014, το 2018 και το 2019. Τέλος, όσον αφορά στις θερμοκρασίες κατά την αρχή της Άνοιξης, για το έτος 2014 παρατηρείται έντονη αύξηση της μέσης ημερήσιας θερμοκρασίας από τα μέσα Μαρτίου, γεγονός που δεν παρατηρείται σε άλλα έτη χωρίς την ύπαρξη μεταπτώσεων.



**Διάγραμμα 6.2:** Μετεωρολογικά δεδομένα για την Αίγινα, όσον αφορά στην βροχόπτωση (rain), μέση ημερήσια θερμοκρασία (T) και μέση ημερήσια σχετική υγρασία (RH) για τα έτη 2014-2019 στα διαγράμματα Α-ΣΤ αντίστοιχα.

### 6.5.2. Υπολογισμός των σταδίων ανάπτυξης της καλλιέργειας του κελυφωτού φιστικιού

Το νησί της Αίγινας έχει ζεστό και ξηρό κλίμα, όπου η ελάχιστη ημερήσια θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του χειμώνα είναι υψηλότερη από 7 °C, οπότε θεωρητικά δεν υπάρχει συσσώρευση ψύχους. Ως αποτέλεσμα, τα μετεωρολογικά δεδομένα που συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της συσσώρευσης ψύχους με βάση το μοντέλο Chilling Hours (CH) που αξιοποιεί το μοντέλο Crossa-Raynaud, αποδείχθηκε ότι δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν με το συγκεκριμένο μοντέλο για την περιοχή της Αίγινας, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας του χειμώνα. Το μοντέλο Growth degree days (GDD) εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των σταδίων ανάπτυξης της καλλιέργειας. Οι βαθμομέρες GDD υπολογίστηκαν για όλα τα κρίσιμα στάδια ανάπτυξης της καλλιέργειας, με βάση τις παρατηρήσεις στους φιστικεώνες για τα έτη 2014, 2015 και το 2016 (Πίν. 6.2).

**Πίνακας 6.2:** Οι βαθμομέρες GDD για την περίοδο 2014-2016 και το τυπικό σφάλμα ( $\pm$  ημέρες) για κάθε αναπτυξιακό στάδιο της καλλιέργειας των κελυφωτών φιστικιών.

Αναπτυξιακό στάδιο	Περίοδοι	2014	2015	2016	Μέσος Όρος GDD
Άνθηση	15-30 Απριλίου	771 $\pm$ 2,1	579 $\pm$ 2	836 $\pm$ 2,4	729 $\pm$ 5
Γονιμοποίηση	1-10 Μαΐου	912 $\pm$ 1,2	735 $\pm$ 1,9	987 $\pm$ 1,4	878 $\pm$ 4,7
Καρπόδεση	11-20 Μαΐου	1.036 $\pm$ 1,6	877 $\pm$ 1,8	1.114 $\pm$ 1,8	1.009 $\pm$ 4,5
Ωρίμανση	25 Ιουλίου-4 Αυγούστου	2.411 $\pm$ 3	2235 $\pm$ 3,3	2.563 $\pm$ 3,1	2.403 $\pm$ 6,3
Σχίσσιμο καρπών (Split shell)	5-19 Αυγούστου	2.690 $\pm$ 4	2527 $\pm$ 4	2.852 $\pm$ 4	2.690 $\pm$ 6,8
Συγκομιδή	20 Αυγούστου-3 Σεπτεμβρίου	3.013 $\pm$ 4	2845 $\pm$ 3,9	3.167 $\pm$ 3,8	3.008 $\pm$ 6,7

Και για τα τρία χρόνια, ο υπολογισμός GDD έδειξε ότι η ανθοφορία εμφανίζεται μετά από τουλάχιστον 579 GDD και κυμαίνεται έως 836 GDD με μέση ημερήσια θερμοκρασία σε αυτήν την περίοδο 17,9 °C (μέσος όρος τριών ετών). Το 2015 είχε τις χαμηλότερες θερμοκρασίες, ενώ το 2014 και το 2015 ήταν θερμότερα χρόνια. Κατά συνέπεια, όλα τα στάδια ανάπτυξης το 2015 σημειώθηκαν αργότερα από το 2014 και το 2016. Η γονιμοποίηση των ανθέων τοποθετείται στις 878 βαθμομέρες GDD, η καρπόδεση τοποθετείται περίπου στις 1.009 βαθμομέρες GDD, η ωρίμανση των καρπών στις 2.403 βαθμομέρες GDD και το φυσικό σχίσσιμο του περικαρπίου στις 2.690 βαθμομέρες GDD για την διερευνηθείσα περίοδο. Η συγκομιδή πραγματοποιήθηκε περίπου 3.000 GDD, για την τρέχουσα τοποθεσία που ερευνήθηκε, συγκεκριμένα 3.013 GDD, 2.845 GDD και 3.167 GDD για τα έτη 2014, 2015 και 2016 αντίστοιχα. Η ύπαρξη μικρού χρονικού διαστήματος μεταξύ των GDDs οδηγεί στο αποτέλεσμα ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των ετών που μελετήθηκε συνέβη μέσα σε ένα μικρό πλαίσιο, γεγονός που υποδεικνύει ότι το μοντέλο που δημιουργήθηκε είναι ικανό να περιγράψει επιτυχώς τα αναπτυξιακά στάδια της καλλιέργειας, με μια μικρή απόκλιση.



### 6.5.3. Δειγματοληψίες από φιστικεόνες και δεδομένα μόλυνσεων από αφλατοξίνες

29 δείγματα φιστικιών αναλύθηκαν για μόλυνση από αφλατοξίνη B1 το 2014, 11 το 2015, 3 το 2016, 54 το 2017, 20 το 2018 και 13 δείγματα το 2019. Το 2014, η μόλυνση από αφλατοξίνη B1 κυμάνθηκε από 0,2 µg/kg έως τα 180 µg/kg (μέσος όρος 22 µg/kg) και το 2015 από 0,1 µg/kg έως 73 µg/kg (μέσος όρος 18 µg/kg). Τα δεδομένα για τα επίπεδα μόλυνσης παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 6.3. Τα δεδομένα μόλυνσης από κάθε δείγμα φιστικεάνα συγκρίθηκαν με την πρόβλεψη του μοντέλου για το συγκεκριμένο μετεωρολογικό σταθμό που βρίσκεται στο νησί της Αίγινας (περιοχή Λυκείου) και το αντίστοιχο έτος. Το ποσοστό δειγμάτων που υπερβαίνει το ανώτατο επιτρεπτό όριο μόλυνσης από αφλατοξίνη B1 που ορίστηκε στα 12 µg/kg ήταν 40% για το 2014, 31% για το 2015, 2% για το 2017 και κανένα δείγμα δεν υπερβή το ανώτατο επιτρεπτό όριο το 2016, 2018 και 2019.

**Πίνακας 6.3:** Δεδομένα που συσχετίζονται με το AFB<sub>1</sub>-I: Ο δείκτης συσσώρευσης της αφλατοξίνης B1 μεταφρασμένος ως έξοδος (Output) από το μοντέλο πρόβλεψης AFLA-pistachio και η μόλυνση δειγμάτων φιστικιών με αφλατοξίνη B1 (µg/kg) από φιστικεόνες στην Αίγινα για τις χρονιές 2014-2016 που αποτελούν το σύνολο δεδομένων 1 (Data set 1) και 2017-2019 που αποτελούν το σύνολο δεδομένων 2 (Data set 2).

Έτος	AFB <sub>1</sub> -I			AFB <sub>1</sub>					
	Μέσος όρος	Ελάχιστο	Μέγιστο	Τυπικό σφάλμα	Αριθμός δειγμάτων	Μέσος όρος	Ελάχιστο	Μέγιστο	Τυπικό σφάλμα
Data set 1									
2014	1014	890	1.203	144,5	29	22	0,2	180	39,3
2015	1043	927	1.257	122,2	11	18	0,1	73	26,1
2016	879	879	879	0	3	n/a	≤LOD <sup>a</sup>	≤LOD	n/a
Data set 2									
2017	900	857	1.390	127,9	54	1	≤LOD	20	2,96
2018	850	837	1.103	58	20	n/a	≤LOD	≤LOD	n/a
2019	349	349	349	0	13	n/a	≤LOD	0,5	n/a

a: Limit of Detection (LOD). Αναφέρεται στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέτρησης αφλατοξινών.

n/a: μη εφαρμόσιμο (not applicable)

### 6.5.4. Μοντέλο πρόβλεψης

Το διάγραμμα σχέσης (Διάγρ. 6.1), που περιγράφει τον κύκλο μόλυνσης του *A. flavus* στο φιστίκι, ξεκινά με την πηγή του μολύσματος, που δεν προσδιορίζεται ποσοτικά στο μοντέλο. Τα παραγόμενα σπόρια (SoI) διασκορπίζονται (DispR) και φτάνουν σε δέσμες φιστικιών (DSoP). Η ροή των σπορίων περιγράφεται με ρυθμό διασποράς (DispR). Όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι κατάλληλες, τα σπόρια βλαστάνουν,

ο μύκητας μπορεί να αναπτυχθεί (GoP) και να μολύνει (IP) ξηρούς καρπούς σύμφωνα με το ρυθμό βλάστησης και ανάπτυξης (αντίστοιχα, GeR και GrR). Εάν το φιστίκι βρίσκεται σε ένα ευαίσθητο στάδιο ανάπτυξης (GS), από την ανθοφορία έως το φαινόμενο του σχισίματος των καρπών (split shell), η ανάπτυξη μυκήτων συνεχίζεται στα φιστίκια, καθώς και στην παραγωγή AFB1 (AFB1-I), που ρυθμίζεται από το ρυθμό παραγωγής αφλατοξίνης (AF) (AFB1R).

Ο αθροιστικός δείκτης της αφλατοξίνης B1 (AFB1) AFB1-I, που αποτελεί έξοδο του μοντέλου AFLA-pistachio, υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας μετεωρολογικά δεδομένα ως είσοδο, από την άνθηση έως τη συγκομιδή καλλιεργειών (Πίν. 6.3). Για τα εξεταζόμενα έτη (2014-2016), το AFB1-I κυμάνθηκε μεταξύ 890 (ελάχιστη τιμή υπολογισμένη το 2014) και 1.257 (μέγιστη τιμή υπολογισμένη το 2015). Η μέση τιμή AFB1-I ήταν 1.014, 1.043 και 879 αντίστοιχα για τα έτη 2014, 2015 και 2016.

### 6.5.5. Πιθανότητες μόλυνσης από αφλατοξίνη B1

Σύμφωνα με τη λογιστική παλινδρόμηση, με βάση με το σύνολο δεδομένων 1, χρησιμοποιώντας το AFB1-I που υπολογίστηκε από το μοντέλο πρόβλεψης ως ανεξάρτητη μεταβλητή (Πίν. 6.1), η πιθανότητα  $P=0,5$  αντιστοιχούσε στο  $AFB1-I=1.153$ . Συγκρίνοντας τα προβλεπόμενα μη μολυσμένα δείγματα με τα παρατηρούμενα δεδομένα για την εσωτερική βαθμονόμηση, που προορίζονται για κάθε δείγμα αγρού που συλλέχθηκε κατά την τριετή περίοδο 2014-2016 (συνολικά 43 δείγματα) (Πίν. 6.4), το 55,8% της πρόβλεψης ήταν σωστό (πρόβλεψη 0 και παρατήρηση 0) ενώ το 16,3% ήταν ψευδώς αρνητικές προβλέψεις (πρόβλεψη 0 και παρατήρηση 1). Όσον αφορά στην πρόβλεψη μολυσμένων δειγμάτων, το 16,3% προβλέφθηκε σωστά (πρόβλεψη 1 και παρατήρηση 1) και το 11,6% υπερεκτιμήθηκε (πρόβλεψη 1 και παρατήρηση 0). Η συνολική ακρίβεια του μοντέλου ήταν 72,1% ( $55,8\%+16,3\%$ ). Η ακρίβεια αναφέρεται στο ποσοστό μεμονωμένων δειγμάτων ανά έτος, για τα οποία το μοντέλο υποδηλώνει τον πιθανό κίνδυνο μόλυνσης. Η ευαισθησία του μοντέλου υποδεικνύεται μέσω του ποσοστού των σωστά προβλεπόμενων δειγμάτων. Όσο υψηλότερος είναι ο αριθμός των ορθώς προβλεπόμενων δειγμάτων, τόσο υψηλότερη είναι η ευαισθησία του μοντέλου.

**Πίνακας 6.4:** Πίνακας πρόβλεψης που συνοψίζει τη σύγκριση μεταξύ προβλέψεων μοντέλου και παρατηρούμενων δεδομένων (σύνολο δεδομένων 1: 2014-2016, σύνολο δεδομένων 2: 2017-2019). Τα δεδομένα σχετικά με τη μόλυνση από αφλατοξίνες ταξινομήθηκαν σε σχέση με το όριο των 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (0:  $<12$  και 1:  $\geq 12$ ). Οι πιθανότητες  $\geq 0,5$  εξετάστηκαν για μολυσμένα δείγματα. Τα γκριζα κελιά αντιπροσωπεύουν σωστές προβλέψεις (%). Η μόλυνση υποεκτιμήθηκε όταν η πρόβλεψη είναι 0 και η παρατηρούμενη τιμή είναι 1, ενώ με την πρόβλεψη 1 και την παρατηρούμενη τιμή 0, τα δείγματα υπερεκτιμήθηκαν.

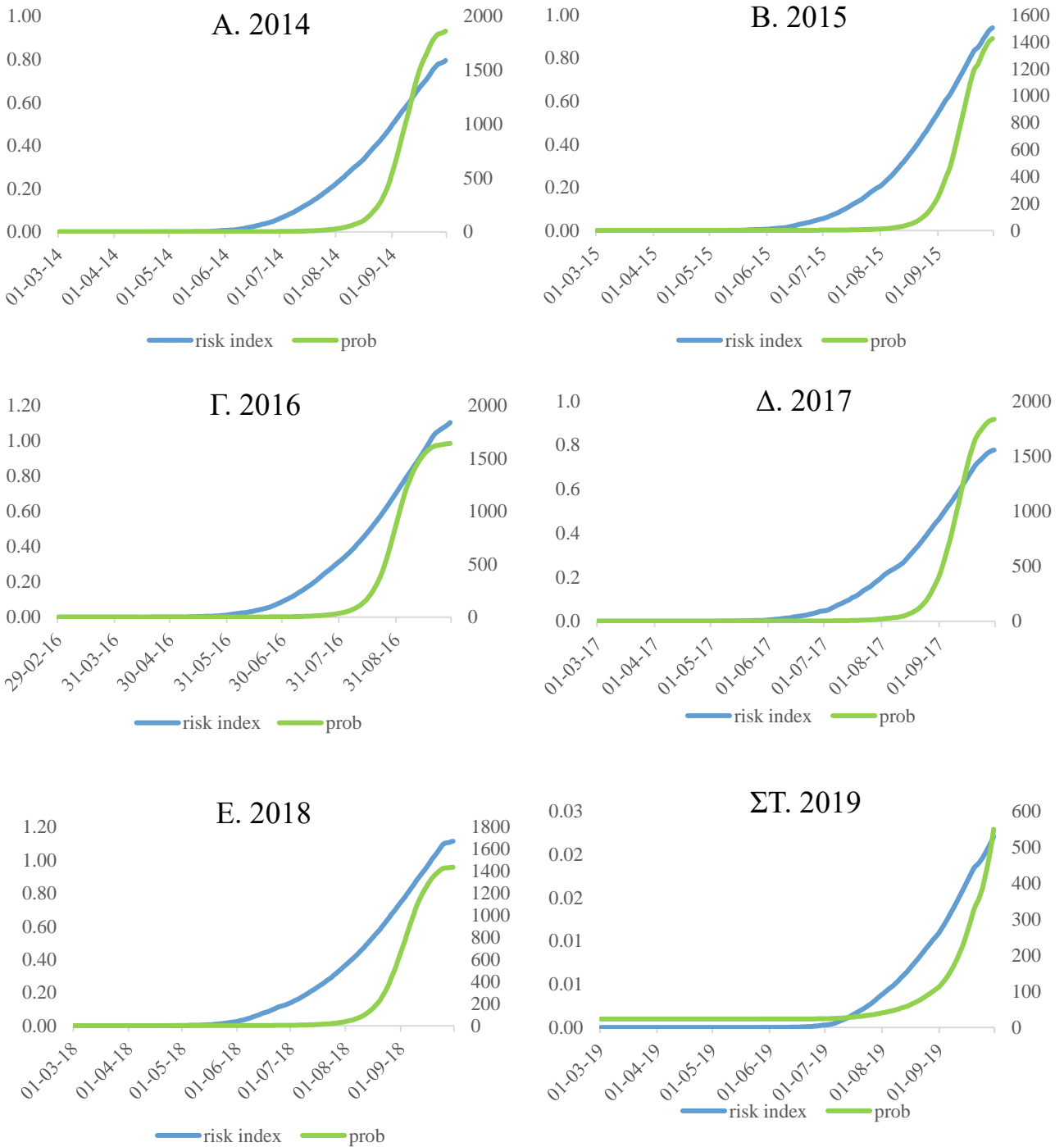
		Σύνολο δεδομένων 1		Σύνολο δεδομένων 2	
		Πρόβλεψη			
		0	1	0	1
Παρατήρηση	0	55,8	11,6	95,6	3,3
	1	16,3	16,3	1,1	0,0

Στο Διάγραμμα 6.3 παρουσιάζεται η σύγκριση του αθροιστικού δείκτη συσσώρευσης αφλατοξίνης B1 με την πιθανότητα μόλυνσης από αφλατοξίνη B1 για τα προς μελέτη έτη 2014-2019. Βάσει των

αποτελεσμάτων φαίνεται ότι το 2019 ήταν η χρονιά με τον χαμηλότερο δείκτη αλλά και την χαμηλότερη πιθανότητα μόλυνσης από αφλατοξίνη B1 κατά το τέλος Αυγούστου έως και τις αρχές Σεπτεμβρίου που αποτελεί την περίοδο συγκομιδής, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την απουσία μολυσμένων δειγμάτων (Πίν. 6.3). Κατά τα έτη 2016, 2017 και 2018 επίσης δεν παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές μολύνσεων από αφλατοξίνη B1 (Πίν. 6.3) και αυτό επιβεβαιώνεται και από την χαμηλή πιθανότητα κάτω του 0,5 κατά το στάδιο της συγκομιδής (Διάγρ. 6.3 Γ, Δ, Ε). Για το έτος 2015 κατά το οποίο σημειώθηκαν οι υψηλές μολύνσεις από αφλατοξίνη B1 (Πίν. 6.3) άνω του ανώτατου επιτρεπτού ορίου, όπως και για το 2014, παρατηρείται πως η πιθανότητα είναι μεγαλύτερη του 0,5 κατά την περίοδο τη συγκομιδής, οπότε ο αθροιστικός δείκτης που μεταφράστηκε σε πιθανότητα, αντικατοπτρίζει την υφιστάμενη κατάσταση ως προς τις μολύνσεις από αφλατοξίνη B1.

#### **6.5.6. Βαθμονόμηση μοντέλου**

Στο σύνολο δεδομένων 2 που αφορά στα έτη 2017-2019 (Πίν. 6.4), το 98,9% των δειγμάτων ταξινομήθηκαν ως μη μολυσμένα (περιεκτικότητα AFB1 στους καρπούς φιστικιού μικρότερο από 12 μg/kg) και το υπόλοιπο 1,1% ταξινομήθηκε ως μολυσμένο. Σύμφωνα με την εξίσωση πιθανοτήτων που αναπτύχθηκε, το 96,7% των δειγμάτων προβλεπόταν ότι δεν ήταν μολυσμένα και 3,3% ότι ήταν μολυσμένα. Ο πίνακας πρόβλεψης (Πίν. 6.4) δείχνει ότι το 95,6% των δειγμάτων ταξινομήθηκαν ως μη μολυσμένα (προβλέπονταν 0 και παρατηρήθηκαν 0) και κανένα ως μολυσμένο (προβλεπόμενη 1 και παρατηρήθηκε 1). Σχεδόν το 3% των δειγμάτων φιστικιού ήταν υπερεκτιμημένο (προβλεπόμενο 1 και παρατηρήθηκε 0) και μόνο 1,1% των δειγμάτων υποεκτιμήθηκε (προβλεπόμενο 0 και παρατηρήθηκε 1). Η συνολική ακρίβεια των προβλέψεων με το σύνολο δεδομένων 2, που δεν χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της εξίσωσης πιθανοτήτων, αλλά χρησιμοποιήθηκε ως ανεξάρτητο σύνολο για την βαθμονόμηση του μοντέλου ήταν 95,6%.



**Διάγραμμα 6.3:** Δείκτης risk index (model output) που αποτελεί την έξοδο του μοντέλου και αφορά τον αθροιστικό δείκτη συσσώρευσης αφλατοξίνης B1 προσυλλεκτικά έως και την συγκομιδή και πιθανότητα μόλυνσης των φιστικιών από αφλατοξίνες (prob) βάσει του δείκτη index για τα έτη 2014-2019, Α-ΣΤ αντίστοιχα.

## 6.6. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Τα μοντέλα πρόβλεψης είναι πλέον σήμερα πολύ χρήσιμα εργαλεία που υποστηρίζουν τη σύγχρονη γεωργία και τα συστήματα IPM, για τη διαχείριση παθογόνων των φυτών καθώς και των μυκοτοξινών που παράγουν (Klem et al. 2007). Τα φιστίκια είναι ένα από τα τρόφιμα που έχουν αναφερθεί μολυσμένα από αφλατοξίνες (Georgiadou et al. 2012) και τα μετεωρολογικά δεδομένα και τα στοιχεία μόλυνσης υποδηλώνουν ότι η λεκάνη της Μεσογείου είναι μια περιοχή που είναι πολύ επιρρεπής σε μόλυνση από αφλατοξίνες. Η κλιματική αλλαγή επηρεάζει σημαντικά την κατανομή της μεταβλητότητας και των ακραίων θερμοκρασιών αλλά και τα πρότυπα υετού με σημαντικά υψηλότερη συχνότητα εξαιρετικά δυσμενών ετών για πολλές καλλιέργειες. Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντικό να οργανωθεί ένα σύστημα πρόβλεψης για τον κίνδυνο μόλυνσης των φιστικιών από αφλατοξίνες, όπως έχει τονιστεί πρόσφατα στη καλλιέργεια του αραβοσίτου (Battilani et al. 2013), ειδικά σε σενάρια αλλαγής του κλίματος. Έτσι, τα τελευταία χρόνια, η έρευνα επικεντρώνεται στην διαχείριση του προβλήματος προσυλλεκτικά, καθώς είναι η περίοδος καλλιέργειας που είναι κρίσιμη για να καθοριστεί «εάν» θα μολυνθεί το τελικό προϊόν από μυκοτοξίνη και «πόσο υψηλή» θα είναι κατά τη συγκομιδή (Battilani 2016). Ως αποτέλεσμα, η υποστήριξη των παραγωγών μέσω προγνωστικών μοντέλων, είναι ο απώτερος στόχος των συστημάτων της νέας γενιάς προκειμένου να υποστηρίξει τα γεωργικά συστήματα.

Παρά το γεγονός ότι η καλλιέργεια φιστικιών θεωρείται μικρή καλλιέργεια στην Ελλάδα, καθώς και σε πολλές άλλες περιοχές του κόσμου, η σημασία της καλλιέργειας τονίζεται από την υψηλή προστιθέμενη αξία του προϊόντος για τους παραγωγούς. Ωστόσο, οι παραγωγοί φιστικιών αντιμετωπίζουν συχνά το πρόβλημα μόλυνσης από αφλατοξίνες. Ως αποτέλεσμα, αυτό το πρόβλημα όχι μόνο οδηγεί σε αβεβαιότητα στην αντίληψη των καταναλωτών για την κατανάλωση ασφαλών φιστικιών, αλλά δημιουργεί επιπλέον κόστος παραγωγής και πιθανή απώλεια εισοδήματος για παραγωγούς, διανομείς και άλλους σχετιζόμενους.

Στο πλαίσιο της τρέχουσας μελέτης διερευνήθηκε η φαινολογία της καλλιέργειας φιστικιών. Είναι μια καλλιέργεια που δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στη διεθνή βιβλιογραφία και η έλλειψη καταγεγραμμένων δεδομένων επιβάλλει την ανάγκη έρευνας σχετικά με τη φαινολογία της. Η προσέγγιση των βαθμομερών ανάπτυξης, που περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Russelle et al. 1984, Gavilán 2005), επιλέχθηκε για να περιγραφεί η φαινολογία του δέντρου στην τρέχουσα μελέτη, χρησιμοποιώντας επιτόπιες παρατηρήσεις σε συνδυασμό με μετεωρολογικά δεδομένα. Αναπτύχθηκε ένα μοντέλο για τη φαινολογία της καλλιέργειας, και λειτούργησε αρκετά καλά για αρκετά συνεχόμενα χρόνια για το νησί της Αίγινας, με μεσοδιάστημα απόκλισης 1,4-4 ημερών τα πρώτα 2 χρόνια και λίγο ευρύτερο το τρίτο έτος (4-6,8 ημέρες). Επομένως, η φαινολογία της καλλιέργειας του φιστικιού μπορεί να προβλεφθεί κατάλληλα μέσω αυτής της προσέγγισης, ως υποστήριξη για το μοντέλο πρόβλεψης.

Η ποικιλία του φιστικιού Αιγίνης, που καλλιεργείται ευρέως στην Ελλάδα, φαίνεται να προσαρμόζεται καλύτερα στην υψηλότερη θερμοκρασία κατά του χειμερινούς μήνες και στη χαμηλότερη συσσώρευση ψύχους, σε σύγκριση με άλλες ποικιλίες φιστικιών όπως η Kalle-Ghuchi και η Τυνησιακή ποικιλία Mateur (Rahemi et al. 2009, Salhi et al. 2014). Επιπρόσθετα, σχετικά με τις απαιτήσεις ψύχους των φιστικιών στην Κεντρική Κοιλιά της Καλιφόρνια, έχει σημειωθεί ότι τα δένδρα δεν προσαρμόζονται σε τόσο υψηλή χειμερινή θερμοκρασία όπως αυτή επικρατεί στην Ελλάδα (Pope et al. 2014).

Στην παρούσα εργασία, το μοντέλο που αναπτύχθηκε για τη περιγραφή της φαινολογίας της καλλιέργειας συνδυάστηκε με ένα ήδη υπάρχον μοντέλο για την πρόβλεψη του κινδύνου μόλυνσης από *A. flavus* στον αραβόσιτο με σκοπό την υπόδειξη της πιθανότητας να υπάρξει μόλυνση από αφλατοξίνες πάνω

από το ανώτατο επιτρεπτό όριο (Battilani et al. 2013). Συγκεκριμένα, η ακρίβεια του μοντέλου AFLA-pistachio που δημιουργήθηκε (Kaminiaris, Camardo Leggieri, et al. 2020), ήταν 72,1% στην εσωτερική βαθμονόμηση, με 16,3% υποεκτιμήσεων και 11,6% υπερεκτιμήσεων. Αυτά τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με τις προγνωστικές επιδόσεις μοντέλων σε άλλα παθοσυστήματα όπως το *Fusarium* spp στο σιτάρι (Liu et al. 2018) και *A. flavus* στον αραβόσιτο (Battilani et al. 2013, Chauhan, Tatnell, et al. 2015).

Η απόδοση του μοντέλου υπερβαίνει την ακρίβεια του 95% ορθώς ταξινομημένων δειγμάτων στην εξωτερική βαθμονόμηση, με 3,3% των δειγμάτων φυσικιών να υπερεκτιμούνται και μόνο το 1,1% των δειγμάτων να υποεκτιμώνται. Αυτό το αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα σημαντικό, λαμβάνοντας υπόψη ότι το AFLA-pistachio είναι ένα μηχανιστικό μοντέλο που χρησιμοποιεί ως είσοδο μόνο μετεωρολογικά δεδομένα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι πρέπει να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων που έχουν μολυνθεί πάνω από το νόμιμο όριο, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η υψηλή αποτελεσματικότητα του ανεπτυγμένου μοντέλου.

Οι τιμές AFB1-I που δόθηκαν από το μοντέλο ποικίλουν κατά τη διάρκεια των ετών, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο δείκτης είναι ευαίσθητος στις αλλαγές καιρικών συνθηκών. Το μοντέλο παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές AFB1-I, συγκεκριμένα 1.014 και 1.043, τα έτη 2014 και 2015 αντίστοιχα, ενώ το 2016, το AFB1-I ήταν 879. Το 2016 ήταν η θερμότερη χρονιά μεταξύ των τριών του συνόλου δεδομένων 1. Από την άλλη πλευρά, τα δεδομένα για την περίοδο 2017-2019, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ως σύνολο δεδομένων 2, για την εξωτερική βαθμονόμηση που αφορά σε σύγκριση μεταξύ μοντέλων προβλέψεων και πραγματικών παρατηρήσεων μόλυνσης AF, οδήγησαν σε χαμηλότερες τιμές AFB1-I, που κυμαίνονταν από 349-900. Το 2019 ήταν το πιο κρύο έτος μεταξύ των 6 ετών που μελετήθηκαν και είχε επίσης τη χαμηλότερη τιμή AFB1-I (AFB1-I=349). Με βάση αυτούς τους αριθμούς, είναι σαφές ότι η παράμετρος του θερμότερου έτους από μόνη της δεν αρκεί για να οδηγήσει στην υποστήριξη της υπόθεσης του υψηλού κινδύνου μόλυνσης από αφλατοξίνες. Ως εκ τούτου, το προγνωστικό μοντέλο επιβεβαιώνει τη σημασία ένταξης του σε ολοκληρωμένα συστήματα για την υποστήριξη της πρόβλεψης κινδύνου και της διαχείρισης του προβλήματος.

Το όριο για την ταξινόμηση των δειγμάτων ορίζεται στα 12 μg/kg AFB1, το οποίο είναι το ανώτατο επιτρεπτό όριο για τα φυσίκια που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε με βάση ένα σύνολο δεδομένων 3 ετών μόλυνσης, η απόδοση του μοντέλου AFLA-pistachio (95,6%) θεωρείται υψηλή, σε σύγκριση με άλλα υπάρχοντα μοντέλα για πρόβλεψη μόλυνσης από μυκοτοξίνες, όπως το AFLA-maize με ακρίβεια 73% (Battilani et al. 2013) ή ένα άλλο μοντέλο για την πρόβλεψη της μόλυνσης του σιταριού από δεοξυनिβαλενόλης με ακρίβεια 84% (Rossi et al. 2003). Είναι αποδεδειγμένο ότι διάφοροι παράγοντες, όπως η ποικιλία της καλλιέργειας και τα χαρακτηριστικά της, μπορούν να επηρεάσουν τη μόλυνση από αφλατοξίνες (Abbas et al. 2004). Στην παρούσα έρευνα, τέτοιοι παράγοντες δεν ελήφθησαν υπόψη και δεν συμπεριλήφθηκαν στη δημιουργία του μοντέλου επειδή η ποικιλία ήταν κοινή σε όλους τους φυσικεώνες που αξιολογήθηκαν. Αν και το φυσικά υπάρχον μόλυσμα του *A. flavus* σε κάθε φυσικεώνα μπορεί να ποικίλλει, αυτός ο παράγοντας δεν ελήφθη υπόψη ούτε συμπεριλήφθηκε στο μοντέλο ανάπτυξης. Αυτό συμβαίνει επειδή η παρουσία του μολύσματος *A. flavus* στον αγρό αποτελεί εγγύηση ότι δυνητικά η μόλυνση είναι εφικτή, καθώς και λόγω της δυσκολίας στην εκτίμησή του στον εκάστοτε φυσικεώνα. Επιπλέον, είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι οι γεωργικές πρακτικές μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ανάπτυξη μυκήτων και τη συσσώρευση μυκοτοξίνης στις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συμπλόκου ξενιστή-παθογόνου-περιβάλλοντος, όπως αναφέρεται για τον αραβόσιτο (Blandino et al. 2009) και για το σιτάρι (Champeil et al. 2004). Μια ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ όλων των γεωργικών πρακτικών που εφαρμόζονται, μπορεί να καταστήσει



πολύ δύσκολη την κατανόηση των επιπτώσεων κάθε λειτουργίας και ακόμη πιο δύσκολη τη μοντελοποίηση με μαθηματικές συναρτήσεις προκειμένου να συμπεριληφθεί σε ένα μηχανιστικό μοντέλο (Battilani 2016). Στην πραγματικότητα, στο πιο μελετημένο παθοσύστημα που σχετίζεται με τη μόλυνση από μυκοτοξίνες, δηλαδή το *Fusarium head blight* στα σιτηρά, «αγρονομικά προγράμματα» ή «πίνακες τεχνικών ανάπτυξης» αναφέρονται ως κάτι περισσότερο από μεμονωμένες δράσεις, έτσι ώστε να εξηγηθεί ο κίνδυνος της μόλυνσης (Blandino et al. 2017, Schöneberg et al. 2016). Αντιθέτως, στην καλλιέργεια του αραβοσίτου έχουν χρησιμοποιηθεί προσεγγίσεις εμπειρικού τύπου (Camardo Leggieri et al. 2015).

Ανάλογα με τα αγρονομικά χαρακτηριστικά κάθε ποικιλίας που καλλιεργείται, το φαινόμενο του πρόωρου ανοίγματος (early split) των καρπών φιστικιού μπορεί να ελεγχθεί μέχρι ένα ορισμένο επίπεδο, με εφαρμογή ορθών γεωργικών πρακτικών όπως η κατάλληλη άρδευση. Μετά το φυσικό άνοιγμα που συμβαίνει στο κέλυφος, κατά τη διάρκεια της φάσης ωρίμανσης των καρπών, η καλλιέργεια εισέρχεται σε μια ευαίσθητη περίοδο κατά την οποία οι καρποί είναι πιο επιρρεπείς σε μόλυνση από αφλατοξίνη. Καθώς το μοντέλο παρέχει μια καθημερινή πρόβλεψη, φαίνεται σαφώς ότι η ημερομηνία συγκομιδής είναι ένας κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει τη μόλυνση των φιστικιών από αφλατοξίνες. Το μοντέλο προβλέπει μια κατάσταση υψηλού κινδύνου και ως εκ τούτου επισημαίνει τον κατάλληλο χρόνο συγκομιδής, μια πολύ χρήσιμη υπόδειξη για τους παραγωγούς. Αυτό μπορεί να μειώσει τη μόλυνση με αφλατοξίνες στα φιστίκια κατά τα προσυλλεκτικά στάδια της καλλιέργειας και επίσης να δώσει ενδείξεις για τις παρτίδες με τον υψηλότερο κίνδυνο μόλυνσης λόγω της πρόβλεψης στον συγκεκριμένο φιστικεώνα, που χρήζουν ακριβέστερες και διεξοδικότερης διαχείρισης μετά τη συγκομιδή.

Καθώς πλέον ένας τέτοιος τύπος στήριξης γίνεται πιο προσιτός στους παραγωγούς τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο, η εφαρμογή αγρονομικών πρακτικών και φυτοπροστατευτικών προϊόντων μπορεί να καθοδηγηθεί από μοντέλα πρόβλεψης. Αυτή η καθοδήγηση μπορεί να επιτευχθεί με συστήματα υποστήριξης λήψης αποφάσεων (DSS) που εκμεταλλεύονται την χρήση προγνωστικών μοντέλων και παρέχουν στους παραγωγούς πολύτιμες πληροφορίες (González-Domínguez et al. 2018). Το μοντέλο που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη μπορεί μελλοντικά να αποτελέσει τον πυρήνα ενός DSS, με στόχο τη βελτίωση της καλλιέργειας φιστικιών και τη μείωση της εισροής χημικών στην παραγωγή τροφικής αλυσίδας. Αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο, στο ευρύτερο πλαίσιο των IPM, και είναι θεμελιώδες για τη διασφάλιση της γεωργικής παραγωγής, διατηρώντας παράλληλα την οικονομική και περιβαλλοντική βιωσιμότητα (Ehler 2006, Barzman et al. 2015).

Σύμφωνα με τις γνώσεις βάσει της έως τώρα διαθέσιμης διεθνούς βιβλιογραφίας, αυτή είναι η πρώτη προσπάθεια μεταφοράς ενός τέτοιου μηχανιστικού μοντέλου από μια καλλιέργεια σε μια άλλη που μοιράζεται προβλήματα που προκαλούνται από έναν κοινό μύκητα. Είναι ένα πολύ επιτυχημένο αποτέλεσμα και μπορεί να οδηγήσει, στο μέλλον, στη σύνδεση αυτού του μοντέλου με περισσότερες καλλιέργειες. Αυτό θεωρείται ισχυρό πλεονέκτημα για την πρόληψη της μόλυνσης των καλλιεργειών και των τροφίμων από αφλατοξίνες. Μπορεί ωστόσο και από μόνο του να αποτελέσει ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των παραγωγών φιστικιών, με σκοπό την αποφυγή της μόλυνσης των κελυφωτών φιστικιών από αφλατοξίνες. Επομένως, το μέλλον είναι λαμπρό και ελπιδοφόρο όσον αφορά στην πρακτική εφαρμογή μοντέλων πρόβλεψης πριν από τη συγκομιδή, ειδικά σε περιοχές με υψηλό δυνητικό κίνδυνο μόλυνσης από αφλατοξίνες.

## Κεφάλαιο 7: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΑΝΟΣΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ ΑΠΟ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β1

Το συγκεκριμένο κεφάλαιο δημοσιεύθηκε στο περιοδικό *Chemosensors* (2020), με τίτλο: *M. D. Kaminiaris, S. Mavriku, M. Georgiadou, G. Paivana, D. I. Tsitsigiannis and S. Kintzios, An impedance based electrochemical immunosensor for Aflatoxin B<sub>1</sub> monitoring in pistachio matrices*, 8 (4): 121, doi: 10.3390/chemosensors8040121.

### 7.1. Περίληψη

Οι αφλατοξίνες, όπως έχει προαναφερθεί, είναι εξαιρετικά τοξικοί δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων που συχνά μολύνουν τρόφιμα και ζωοτροφές. Η ταχεία ανίχνευση των αφλατοξινών κρίνεται πολλές φορές επιτακτική. Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής ενότητας, αναπτύχθηκε ένας ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης Β1 (AFB1), ο οποίος κατασκευάστηκε με ακινητοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων AFB1 σε ένα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού, τροποποιημένο με καρβο-μεθυλοδεξτράνη και με το σχηματισμό δραστικών λειτουργικών εστέρων με καρβοξυλικές ομάδες μέσω της αντίδρασης Ν-υδροξυ-σουκινιμιδίου (NHS) και 1-αιθυλο-3(διμεθυλαμινοπροπυλο)-καρβοδιιμιδίου (EDC) για τη δημιουργία μίας ηλεκτροχημικής διεπιφανειακής μοντελοποίησης βιομοριακής αναγνώρισης. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αφλατοξίνης Β1 χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία σύνθετης εμπέδησης. Το όριο ανίχνευσης της AFB1 για πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα φιστικιού ήταν 0,5 ng/mL και 1 ng/mL, αντίστοιχα. Ο ανοσοαισθητήρας μπόρεσε να προσδιορίσει επιτυχώς τις συγκεντρώσεις AFB1 στο εύρος 4,56-50,86 ng/mL σε άγνωστα δείγματα φιστικιών. Η χρωματογραφική ανάλυση που ακολούθησε, αποκάλυψε ότι τα ανώτατα όρια ανίχνευσης του ανοσοαισθητήρα ήταν σε συγκεντρώσεις AFB1 χαμηλότερες από 345 ng/mL. Μελέτες εκλεκτικότητας έναντι της ωχρατοξίνης Α και της αφλατοξίνης Μ1 έδειξαν ότι ο προτεινόμενος ανοσοαισθητήρας για την ανίχνευση της AFB1, μπόρεσε να κάνει διάκριση μεταξύ των διαφόρων μυκοτοξινών που παράγονται από μύκητες του γένους *Aspergillus*. Η νέα αυτή προσέγγιση του ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα έχει τη δυνατότητα ταχείας εξέτασης δειγμάτων σε φορητή και μίας χρήσης μορφή, συμβάλλοντας στην αποτελεσματική πρόληψη και έλεγχο της μόλυνσης των φιστικιών από AFB1.

## 7.2. Εισαγωγή

Το γένος μυκήτων *Aspergillus*, όπως έχει προαναφερθεί, είναι ένα γένος που αποτελείται από πολλά διαφορετικά είδη που δύνανται να αναπτύσσονται σε διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες και περιοχές παγκοσμίως. Ορισμένα είδη *Aspergillus* έχουν την ικανότητα να παράγουν αφλατοξίνες ως δευτερογενείς μεταβολίτες, πιο συγκεκριμένα 4 διαφορετικές αφλατοξίνες (B1, B2, G1 και G2). Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά τοξικές μυκοτοξίνες και κατηγοριοποιούνται μεταξύ των πιο επικίνδυνων φυσικών μορίων για τον άνθρωπο και τα ζώα. Μπορούν να μολύνουν πολλά γεωργικά προϊόντα τόσο σε επίπεδο προ της συγκομιδής, όσο και σε επίπεδο μετά τη συγκομιδή. Ο αριθμός των απομονωμένων και χαρακτηρισμένων μυκοτοξινών σήμερα υπερβαίνει τους 300 και η έρευνα για αυτές συνεχίζεται, υποδεικνύοντας τη σοβαρότητα τέτοιων μορίων για την ανθρώπινη υγεία (Adegoke 2004). Η τοξικότητα των αφλατοξινών οφείλεται βασικά στις καρκινογόνες, τερατογόνες, μεταλλαξιογόνες, γονοτοξικές και ηπατοτοξικές ιδιότητές τους. Αυτά τα τοξικά μόρια μπορούν να επηρεάσουν άμεσα και έμμεσα την ποσότητα, την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων και των ζωοτροφών. Οι αφλατοξίνες ταξινομούνται από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), στα πιο επικίνδυνα μόρια (Κλάση 1) (IARC 2002). Λόγω του κινδύνου μόλυνσης από αφλατοξίνες, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θέσει ανώτατα επιτρεπτά όρια για τις αφλατοξίνες σε πολλά τρόφιμα και ζωοτροφές [Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής, όπως τροποποιήθηκε με τον 165/2010].

Τα φιστίκια ανήκουν σε μία κατηγορία προϊόντων που είναι επιρρεπή σε μολύνσεις από αφλατοξίνες των μυκήτων *Aspergillus section Flavi*. Φιστίκια μολυσμένα με αφλατοξίνες έχουν εντοπιστεί σε μεγάλο εύρος περιοχών διαφορετικών ηπειρών, υποδεικνύοντας τη σοβαρότητα της μόλυνσης από αφλατοξίνες. Στην Ευρώπη, έχει αναφερθεί μόλυνση των κελυφωτών φιστικιών από αφλατοξίνες στην Ελλάδα (Georgiadou et al. 2012), όπως επίσης και στο Ιράν (Cheraghali et al. 2007, Kabirian et al. 2011), αλλά και στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ (Doster et al. 1994). Για τα φιστίκια, το ανώτατο επιτρεπτό όριο που έχει θεσπιστεί από την Ε.Ε. για την μόλυνση από αφλατοξίνες είναι 15 μg/kg συνολικών αφλατοξινών και 12 μg/kg αφλατοξίνης B1, όταν προορίζονται για υποβολή σε φυσική επεξεργασία ή διαλογή, πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο. Σε σύγχρονες ολοκληρωμένες στρατηγικές διαχείρισης αφλατοξινών σε προσυλλεκτικό επίπεδο, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι για την αποφυγή της μόλυνσης των τροφίμων από αφλατοξίνες, όπως η βιολογική αντιμετώπιση με εφαρμογή μη τοξικογόνων στελεχών του *A. flavus*, επιφυτικές ζύμες και βακτήρια στον αγρό, η χημική αντιμετώπιση, τα μοντέλα πρόβλεψης και ποικίλες νέες τεχνικές απεικόνισης και ανίχνευσης (Kaminiaris and Tsitsigiannis 2020). Η ανάγκη για παραγωγή ασφαλών τροφίμων, απαλλαγμένων από αφλατοξίνες, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων για τη διαχείριση των αφλατοξινών (Battilani 2016). Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται πριν από τη συγκομιδή και στοχεύουν στον έλεγχο της μόλυνσης και της συσσώρευσης από αφλατοξίνες φαίνεται να είναι οικονομικά αποδοτικότερες και πιο αξιόπιστες από την μετασυλλεκτική διαχείριση (Adegoke et al. 2013).

Στο πλαίσιο της πρόληψης της μόλυνσης από μυκοτοξίνες, έχουν αναπτυχθεί πολλές καινοτόμες τεχνικές για την ανίχνευση των μυκοτοξινών. Για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών και εν γένει των μυκοτοξινών, έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) (Vosough et al. 2010), της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) (Caputo et al. 2007), αλλά και φασματοσκοπικές μέθοδοι Fourier Transform Infrared (FT-IR) σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους (Valasi et al. 2020). Αν και αυτές οι τεχνικές παρέχουν εξαιρετική ευαισθησία, απαιτούν εξειδικευμένους χειριστές, εξοπλισμό υψηλού κόστους και σημαντική προεπεξεργασία δείγματος (Sapsford et al. 2006, Piermarini et al. 2007). Αξιόπιστες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί με τη χρήση της νανοτεχνολογίας και εντάσσονται όλο και περισσότερο στη διαχείριση των μυκοτοξινών.

Η χρήση των νανοσωματιδίων στην ανίχνευση και αντιμετώπιση των αφλατοξινών (Davarani et al. 2018), στην ανίχνευση της δεοξυνιβαλενόλης (DON) και στην ανίχνευση της ωχρατοξίνης Α (OTA) φαίνεται να είναι ένα ιδιαίτερος χρήσιμο εργαλείο. Ήδη ανεπτυγμένες μέθοδοι όπως οι AI-Nb-IPCR και Anti-idiotypic Nb-based ELISA προσφέρουν υψηλή ευαισθησία, εκλεκτικότητα και σταθερότητα (He et al. 2018). Πρόσφατα, μελετώνται και αναπτύσσονται νέες μέθοδοι ανίχνευσης ποιοτικών και ποσοτικών μεθόδων, πέραν των ενζυμικών και ανοσοπροσοφητικών δοκιμών (ELISA) (Uruson et al. 2015), όπως οι δοκιμές πλευρικής ροής (LFA) (Song et al. 2014) για την ενίσχυση της ακρίβειας και του εύρους των δοκιμών ανίχνευσης μυκοτοξινών.

Η σοβαρότητα της υφιστάμενης κατάστασης σχετικά με τη μόλυνση από μυκοτοξίνες σε τρόφιμα και ζωοτροφές επισημαίνεται από τον αριθμό των ειδοποιήσεων για προϊόντα μολυσμένα με μυκοτοξίνες από το Ευρωπαϊκό Σύστημα Ταχείας Ειδοποίησης για Τροφές και Ζωοτροφές (RASFF Portal). Από το 1981-2017, οι αφλατοξίνες ήταν η πιο συχνά αναφερόμενη κατηγορία κινδύνου στο RASFF, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 21% όλων των κοινοποιήσεων (Cunha et al. 2018). Επιπλέον, στο RASFF υπήρξαν περί τις 300 ειδοποιήσεις κατά το 2020 για μολυσμένα προϊόντα από μυκοτοξίνες, που αφορούσαν είτε απόρριψη κατά την μετακίνηση σε διακρατικά σύνορα, είτε ως προειδοποιήσεις, ενώ πάνω από 250 από αυτές αναφέρονται σε προϊόντα μολυσμένα με αφλατοξίνες.

Επιπρόσθετα, νέες τεχνολογίες όπως αυτή των βιοαισθητήρων έχουν ήδη βρει εφαρμογή στην ανίχνευση των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Mosiello et al. 2011) αλλά και μυκοτοξινών όπως οι αφλατοξίνες (Mavrikou et al. 2017) και οι ωχρατοξίνες όπως η ωχρατοξίνη Α (OTA) στα τρόφιμα (Mavrikou et al. 2018), αλλά και στην ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε αγροδιατροφικά προϊόντα (Apostolou et al. 2019). Έχουν επίσης αναφερθεί αισθητήρες για την ανίχνευση της μόλυνσης από αφλατοξίνες (Jia et al. 2019, Wang et al. 2020), και ειδικά της αφλατοξίνης Β1 στα φιστίκια και το ρύζι (Sabet et al. 2017). Ένας ηλεκτροχημικός πιεζοηλεκτρικός αισθητήρας έχει αναφερθεί για την ανίχνευση της μόλυνσης φιστικιών από αφλατοξίνες (Chauhan, Solanki, et al. 2015), ενώ έχουν επίσης περιγραφεί ανοσοαισθητήρες που χρησιμοποιούν νανοσωματίδια (Bhardwaj et al. 2020, Wang et al. 2016).

Υπάρχουν πολλοί τύποι βιοαισθητήρων, όπως οπτικοί βιοαισθητήρες (Chemiluminescence-based biosensors and Fluorescence-based biosensors), βιοαισθητήρες πτητικών ουσιών (Electric nose system), ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες και βιοαισθητήρες ανίχνευσης μάζας (Ray et al. 2017). Καινοτόμες τεχνικές με χρήση μεθόδων όπως οι μικροσυστοιχίες πλευρικής ροής (Lateral flow microarrays-LFM) και βιοαισθητήρες βασισμένοι σε χρήση βιοφωτονίων έχουν επίσης δημιουργηθεί (Martinelli et al. 2015) και εισαχθεί επιτυχώς στην διάγνωση της μόλυνσης από OTA (Zhang et al. 2018). Καθώς τέτοια τεχνολογικά εργαλεία γίνονται όλο και πιο προσβάσιμα, αναπτύχθηκαν επίσης βιομιμητικοί αισθητήρες με σύνδεση με κινητά τηλέφωνα smartphone για την ανίχνευση της μόλυνσης από αφλατοξίνες (Sergeyeva et al. 2019). Οι βιοαισθητήρες αναμένεται να παίξουν σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση των μυκοτοξινών στο μέλλον, καθώς προσφέρουν γρήγορη, αξιόπιστη και επιτόπια εξέταση των φυτικών δειγμάτων. Ωστόσο, υπάρχει έλλειψη έρευνας για ανοσοαισθητήρες για ανίχνευση αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια.

Η πρόοδος επίσης στις μοριακές και οπτικές τεχνικές και μεθόδους, έχει επιτρέψει την ανίχνευση των μυκοτοξινών και με την χρήση του ουδέτερου ερυθρού φωτός, καθώς επίσης και του φωτός στο φάσμα του ορατού. Καινοτόμες τεχνικές τύπου LAMP έχουν αναφερθεί ως ένας εύκολος τρόπος γρήγορης διάγνωσης που επιτρέπει ανίχνευση των αφλατοξικογόνων μυκήτων *Aspergillus section Flavi* (Niessen et al. 2018). Επίσης, η ανίχνευση με χρήση φωτός στο φάσμα του ορατού, σε συνθήκες φωτός ημέρας, επιτρέπει γρήγορη παρατήρηση των αποτελεσμάτων. Εκτός από τέτοιες σύγχρονες τεχνικές, έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι ανίχνευσης όπως τα γρήγορα τεστ ανίχνευσης (strip tests) για την ανίχνευση

μυκοτοξινών (Shim et al. 2007). Τα strip tests είναι ταινίες που μεταχρωματίζονται ύστερα από επαφή με εκχύλισμα από φυτικά δείγματα, ανάλογα με το επίπεδο της συγκέντρωσης των μυκοτοξινών που περιέχονται στο δείγμα. Αποτελούν ένα γρήγορο, φιλικό προς τον χρήστη και χαμηλού κόστους εργαλείο για την προκαταρκτική επιτόπια εξέταση δειγμάτων σε επίπεδο αγρού, πριν την εργαστηριακή ανάλυση των δειγμάτων. Strip tests βασισμένα στη πλευρική ροή έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση διαφόρων μυκοτοξινών όπως οι αφλατοξίνες και οι φουμονισίνες (Krska et al. 2009).

Ένας βιοαισθητήρας που βασίζεται σε αντισώματα μπορεί να οριστεί ως ανοσοαισθητήρας. Οι ανοσοαισθητήρες είναι αναλυτικά όργανα ικανά να εκτελούν τον προσδιορισμό της αναλυόμενης ουσίας με απλούστερο και ταχύτερο τρόπο έναντι των συμβατικών αναλυτικών τεχνικών υψηλής επικάλυψης. Οι αντιδράσεις μεταξύ αναλυτών, βοηθητικών αντιδραστηρίων και μορίων αντισωμάτων (Ab) λαμβάνουν χώρα στη διεπαφή, εν προκειμένω ένα ηλεκτρόδιο, ή σε ένα πολυμερές υποστήριγμα που είναι στενά συνδεδεμένο με τη διεπαφή, αποφεύγοντας έτσι, περαιτέρω απώλειες λόγω των διαφόρων αντιδράσεων οξειδοαναγωγής που εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του δείκτη και του ηλεκτροδίου (Adányi et al. 2007, Bučko et al. 2012). Τα βιοχημικά αντιδραστήρια (Abs, σύμπλοκα με αδρανείς πρωτεΐνες κ.λπ.) συνδέονται στη διεπαφή για να αποφευχθεί η έκπλυσή τους κατά τη διάρκεια της επώασης με το δείγμα και τις εκπλύσεις που ακολουθούν. Ο προσανατολισμός του αντισώματος στην ακινητοποιημένη επιφάνεια μπορεί να βελτιώσει την αναλυτική απόδοση του ανοσοαισθητήρα. Έχουν προταθεί αρκετές μέθοδοι για την ορθά προσανατολισμένη ακινητοποίηση αντισωμάτων. Μια παραδοσιακή στρατηγική είναι η αντίδραση αντισωμάτων αμινομάδων με επιφάνειες από καρβοξυλομάδες που ενεργοποιούνται μέσω παραγόντων σύζευξης όπως το σύμπλοκο του N-υδροξυ-σουκινιμιδίου (NHS) και 1-αιθυλο-3(διμεθυλαμινοπροπυλο)-καρβοδιιμιδίου (EDC). Ωστόσο, έχει πλέον διαπιστωθεί ότι η ακινητοποίηση χρησιμοποιώντας αυτήν τη στρατηγική οδηγεί σε τυχαίο προσανατολισμό των μορίων Ab (Vashist et al. 2011). Μία από τις απλούστερες και ευκολότερες στρατηγικές για προσανατολισμένη ακινητοποίηση Ab είναι η αξιοποίηση μίας λειτουργικής αμινικής ομάδας στην επιφάνεια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την τροποποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου με μια μήτρα καρβο-μεθυλοδεξτράνης (CM-δεξτράνη). Η χρήση αυτού του πολυμερούς προσφέρει αρκετά σημαντικές ιδιότητες στην επιφάνεια του αισθητήρα, όπως το υδρόφιλο περιβάλλον, που είναι σημαντικό για τις περισσότερες βιομοριακές αλληλεπιδράσεις με βάση το διάλυμα, και μια καθορισμένη χημική βάση για ομοιοπολική πρόσδεση βιομορίων. Οι αρνητικά φορτισμένες καρβοξυλικές ομάδες επιτρέπουν την ηλεκτροστατική συγκέντρωση θετικά φορτισμένων μορίων από το διάλυμα, οδηγώντας στην αποτελεσματική ακινητοποίηση (Yu et al. 2015).

Η ηλεκτροχημική ανίχνευση προσφέρει ένα σημαντικό πλεονέκτημα στη μέτρηση του σήματος που προκύπτει από την αλληλεπίδραση χρυσού ή αργύρου σε έγχρωμα, θολά και αυξημένου ιξώδους διαλύματα, χρησιμοποιώντας ελάχιστο όγκο δείγματος και συμβατικά όργανα. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, πολλοί ευαίσθητοι ηλεκτροχημικοί ανοσοαισθητήρες έχουν κατασκευαστεί για την ανίχνευση της αφλατοξίνης B1 με εύρος ανίχνευσης 0,03-0,15 ng/mL (Jin et al. 2009, Tan et al. 2009, Xu et al. 2013, Zhang et al. 2016, Gurban et al. 2017). Επίσης, έχει αναφερθεί σχετικά πρόσφατα, η δημιουργία ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα, για την ανίχνευση μολυσμένων φιστικιών από αφλατοξίνες, με χρήση της αξιολόγησης της έκφρασης του γονιδίου *aflD*, που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των αφλατοξινών (Sedighi-Khavidak et al. 2017). Αν και υπάρχουν πολλές ηλεκτροχημικές τεχνικές, οι περισσότεροι από τους βιοαισθητήρες που βασίζονται σε συγγενείς αλληλεπιδράσεις χρησιμοποιούν ως μέσο ανίχνευσης, βολταμετρικές και εμπεδημετρικές συσκευές. Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι για τον χαρακτηρισμό των διαφόρων σταδίων κατασκευής βιοαισθητήρων, από ηλεκτροχημικές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της ηλεκτροχημικής κυκλικής βολταμετρίας και της



εμπέδησης (Narayanan et al. 2015, Kim et al. 2012), έως και της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (Canbaz et al. 2014), αλλά και του συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) (Pan et al. 2017).

Η ηλεκτροχημική φασματοσκοπία σύνθετης αντίστασης (EIS) αποτελεί μια ισχυρή μέθοδο για τη διερεύνηση ηλεκτροχημικών συστημάτων και διαδικασιών. Ένα μόνο πείραμα μπορεί να συμβάλει στον προσδιορισμό διαφόρων παραμέτρων (Dhillon et al. 2017). Η EIS εφαρμόζει εναλλασσόμενο ρεύμα σε ένα φάσμα συχνοτήτων προκειμένου να εκτιμήσει τα φασματικά χαρακτηριστικά της ηλεκτρικής σύνθετης αντίστασης και θεωρείται ως μία μη επεμβατική μέθοδος για τον χαρακτηρισμό των ηλεκτρικών ιδιοτήτων πολλών αντικειμένων, ακόμα και βιολογικών ιστών *in vivo* (Paivana et al. 2017). Αυτή η τεχνική αξιολογεί τις μακροσκοπικές διηλεκτρικές σταθερές από τις μετρήσεις τάσης μεταξύ ζευγών ηλεκτροδίων που τοποθετούνται στην επιφάνεια ενός αντικειμένου ως απόκριση στο εφαρμοζόμενο ρεύμα (Bonmassar et al. 2010). Η EIS είναι μια μέθοδος υψηλής ακρίβειας που δεν διαταράσσει σημαντικά το σύστημα από την κατάσταση λειτουργίας του. Μπορεί επίσης να εφαρμοστεί για τον χαρακτηρισμό των μαζικών ιδιοτήτων των διεπαφών του συστήματος. Οι ανωμαλίες στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου παίζουν σημαντικό ρόλο στις ηλεκτροχημικές αποκρίσεις του. Αυτές οι ανωμαλίες μπορούν να προκληθούν από διάφορους παράγοντες, όπως χημική ετερογένεια, ετερογένεια επιπέδου βασικής ακμής, τραχύτητα της επιφάνειας που αντιστοιχεί σε γεωμετρικές ανωμαλίες, ανομοιογένεια ατομικής κλίμακας και άλλα. Προκειμένου να γίνει αντιληπτή η πολυπλοκότητα που προκύπτει από μη φυσιολογικές διεπαφές, για παράδειγμα, πορώδεις, τραχιές και μερικώς ενεργές διεπαφές, η χρήση μοντέλων είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για να εξηγηθεί η επίδραση της διαταραχής του ηλεκτροδίου στην ηλεκτροχημική απόκριση (Dhillon et al. 2017).

Εν κατακλείδι, ο εμπεδημετρικός ανοσοαισθητήρας αποτελεί μια ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση της αντίδρασης μεταξύ αντιγόνου και αντισωμάτων. Στους εμπεδημετρικούς ανοσοαισθητήρες, το πιο σημαντικό βήμα είναι η ακινητοποίηση των βιομορίων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, λόγω της ανάγκης ύπαρξης μιας σταθερής, αναπαραγωγίσιμης και επιλεκτικής παραγωγής σημάτων του βιοαισθητήρα. Τα αντιγόνα και τα αντισώματα συνδέονται μεταξύ τους οδηγώντας στη δημιουργία ενός ανοσοσυμπλόκου καθώς και στην επικάλυψη του ηλεκτροδίου με ένα στρώμα αποκλεισμού, και ως αποτέλεσμα, η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταβάλλεται. Μετά τη σύνδεση των αντιγόνων στα αντισώματα, η πρόσβαση των ανιχνευτών οξειδοαναγωγής εμποδίζεται σε υψηλότερο βαθμό από ότι κατά την απουσία αντιγόνων (Bahadir et al. 2016).



### 7.3. Σκοπός ερευνητικής ενότητας

Στη παρούσα ερευνητική ενότητα, ο τελικός σκοπός ήταν να αναπτυχθεί ένας εμπεδημετρικός ανοσοαισθητήρας ηλεκτροχημικής σύνθετης αντίστασης που βασίζεται στην ακινητοποίηση του αντισώματος AFB1 σε εκτυπωμένα ηλεκτρόδια χρυσού για την ακριβή ανάλυση της διαλογής των δειγμάτων φιστικιών. Για το σκοπό αυτό, οι επιμέρους σκοποί ήταν οι εξής:

- Η ακινητοποίηση του αντισώματος της AFB1 σε ένα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού, τροποποιημένο με καρβο-μεθυλοδεξτράνη μέσω της αντίδρασης των αμινομάδων του αντισώματος με καρβοξυλομάδες της επιφάνειας στήριξης που ενεργοποιήθηκαν από τους παράγοντες σύζευξης N-υδροξυ-σουκινιμίδιο (NHS) και 1-αιθυλο-3(διμεθυλαμινοπροπυλο)-καρβοδιμίδιο (EDC).
- Η αξιολόγηση του ανοσοαισθητήρα με διάφορες συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων AFB1 αλλά και σε δείγματα φιστικιού.
- Η πραγματοποίηση μελετών επιλεκτικότητας έναντι άλλων μυκοτοξινών (OTA και AFM1) καθώς και μελέτες επικύρωσης με άγνωστα δείγματα.

Όλα τα προαναφερθέντα πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την δημιουργία ενός σύγχρονου και καινοτόμου ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα, ως ένα ευαίσθητο και γρήγορο εργαλείο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αφλατοξίνης B1 σε δείγματα κελυφωτών φιστικιών.

### 7.4. Μεθοδολογία

#### 7.4.1. Υλικά

Η ακινητοποίηση του αντισώματος αφλατοξίνης B1 στα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια χρυσού πραγματοποιήθηκε με χρήση N-υδροξυ-σουκινιμιδίου (NHS, 98%), 1-αιθυλο-3(διμεθυλαμινοπροπυλο)-καρβοδιμίδιου (EDC, >99%) και άλατος νατρίου καρβομεθυλοδεξτράνης (CM-δεξτράνης). Τα πρότυπα διαλύματα δημιουργήθηκαν με τη χρήση καθαρής αφλατοξίνης B1 (AFB1) από το μύκητα *A. flavus*. Τα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια χρυσού που χρησιμοποιήθηκαν (DRP-250AT) είναι της εταιρείας Metrohm DropSens, S.L. (Εικ. 7.1). Τα ηλεκτρόδια αυτά (SPE) ενσωματώνουν μια διαμόρφωση τριών ηλεκτροδίων, που αποτελείται από ένα χρυσό (Au) ηλεκτρόδιο στρογγυλού σχήματος με διάμετρο 4 mm, ένα αντίθετο ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς αργύρου. Τα αποτελέσματα του ανοσοαισθητήρα διασταυρώθηκαν με αποτελέσματα ανάλυσης HPLC, η οποία πραγματοποιήθηκε με χρήση στηλών ανοσοσυγγένειας AflaCLEAN για τις αφλατοξίνες B1, B2, G1 και G2 της εταιρείας LCTech GmbH. Αντίσωμα αφλατοξίνης B1 (0,5 mg/mL) χρησιμοποιήθηκε ακινητοποιημένο στα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια. Για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε Milli-Q καθαρισμένο νερό Millipore (18,2 MΩ cm).



**Εικόνα 7.1:** Εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού (SPE).

#### 7.4.2. Μετρήσεις εμπέδησης

Στη βιβλιογραφία, η εμπέδηση περιγράφεται ως μια σύνθετη τιμή που εξαρτάται από τη συχνότητα και περιλαμβάνει την αντίσταση και τη χωρητικότητα. Το πραγματικό μέρος συνδέεται με τις οδούς

αντίστασης στους ιστούς, ενώ το φανταστικό μέρος συνδέεται με δομές μεμβράνης ως χωρητικές οδούς. Το πραγματικό μέρος φαίνεται να έχει μεγάλες τιμές στο εύρος χαμηλών συχνοτήτων, ωστόσο, σε υψηλότερες συχνότητες, το φανταστικό μέρος υπερισχύει (Dean et al. 2008). Για τη διαδικασία της μέτρησης, ένα σήμα διέγερσης που εξαρτάται από τη συχνότητα, εφαρμόζεται σε ένα συγκεκριμένο σύστημα προκειμένου να μετρηθεί η απόκριση (Paivana, Apostolou, et al. 2019, Paivana, Mavrikou, et al. 2019). Μαθηματικά, η εμπέδηση ( $Z$ ) υπολογίζεται διαιρώντας την τάση που μετράται ( $V$ ) με ένα ισχόν σήμα ( $I$ ), όπως περιγράφεται στην παρακάτω εξίσωση:

$$Z = V(\omega) / I(\omega) = R + jX$$

όπου,  $j = \sqrt{-1}$ , και το  $\omega$  περιγράφει τη συχνότητα. Το πραγματικό μέρος ( $R$ ) του σύνθετου αριθμού αντιπροσωπεύει ως επί το πλείστον την αντίσταση, ενώ το φανταστικό μέρος ( $X$ ) αντιπροσωπεύει την χωρητικότητα. Οι παρακάτω εξισώσεις καθορίζουν τον υπολογισμό του μεγέθους και της γωνίας φάσης αντίστοιχα:

$$|Z| = \sqrt{(R)^2 + (X)^2}$$

$$\theta = \arctan(X / R)$$

### 7.4.3. Δειγματοληψία

Στο πλαίσιο της τρέχουσας μελέτης, συλλέχθηκαν δείγματα φιστικιών από φιστικεώνες που βρίσκονται στο νησί της Αίγινας. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από όλες τις κύριες παραγωγικές περιοχές παραγωγής του φιστικιού του νησιού. Ο συνολικός αριθμός δειγμάτων που συλλέχθηκε ήταν εννέα, και η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο στάδιο της συγκομιδής, στο τέλος Αυγούστου 2018. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό κανονισμό σχετικά με τις μεθόδους δειγματοληψίας [κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Επιτροπής]. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε φορητό ψυγείο και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο για περαιτέρω ανάλυση. Μετά από ανάλυση αφλατοξινών, και τα εννέα φυσικά μολυσμένα δείγματα βρέθηκαν μολυσμένα με αφλατοξίνη Β1 και επιλέχθηκε η χρήση τους για περαιτέρω αναλύσεις.

### 7.4.4. Εξαγωγή αφλατοξινών και ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξίνης Β1 με HPLC ανάλυση

Αναλύθηκαν συνολικά εννέα αποξηραμένα δείγματα φιστικιών από διαφορετικούς φιστικεώνες και η συγκέντρωση αφλατοξίνης Β1 μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται λεπτομερώς από τους (Georgiadiou et al. 2012) με ορισμένες τροποποιήσεις. Οι καρποί φιστικιού κάθε δείγματος αλέστηκαν χρησιμοποιώντας έναν εργαστηριακό μύλο (Tekmar A-10, IKA-Labor Technik Janke & Kunkel GmbH & Co) και 20 γραμμάρια από το κάθε δείγμα υποβλήθηκαν σε εκχύλιση αφλατοξινών χρησιμοποιώντας 100 mL 70 μεθανόλη:30 νερό. Στη συνέχεια ακολούθησε ομογενοποίηση σε μπλέντερ υψηλής ταχύτητας (Ultra Turax T25 basic IKA, Werke 6500-24000 rpm) για 5 λεπτά. Το εκχύλισμα του κάθε δείγματος διηθήθηκε μέσω αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού Whatman και συλλέχθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Falcon. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση χρησιμοποιώντας τον χημικό ανοσοαισθητήρα που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία.

Για την ανάλυση αφλατοξίνης των δειγμάτων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο HPLC, ένα δείγμα 14 mL του προαναφερθέντος διαλύματος εκχυλίσματος προστέθηκε σε 86 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS (pH: 7,2) και διήλθε μέσω χαρτιού φίλτρου (Whatman No. 1, διαμέτρου 110 mm) και ένα φίλτρο μεμβράνης

(Υδρόφιλο φίλτρο μεμβράνης πολυπροπυλενίου GH Polypro 47 mm 0,2 mm, Gelman Laboratory) υπό πίεση για απομάκρυνση της υπολειμματικής θολότητας. 50 mL του διηθημένου εκχυλίσματος πέρασαν αργά μέσω στήλης ανοσοσυγγένειας (AflaClean, 3 mL widebore, LC Tech Germany) υπό κενό σε Vacuum - Pressure Station (Air Cadet, Baman Co., USA) με μέγιστο ρυθμό ροής 2 mL ανά λεπτό, και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε τριπλή έκλουση με καθαρή μεθανόλη για HPLC και το δείγμα συλλέχθηκε σε σωληνάριο. Το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι την πλήρη αφύγρανση υπό ρεύμα αζώτου και αποθηκεύτηκε σε ψυγείο στο σκοτάδι μέχρι να αναλυθεί. Το ξηρό τμήμα επαναδιαλυτοποιήθηκε εκ νέου με 0,5 mL των διαλυτών κινητής φάσης και εγχύθηκε σε HPLC.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αφλατοξίνης B1 πραγματοποιήθηκε από ένα σύστημα HPLC αντίστροφης φάσης που ήταν εφοδιασμένο με αντλία και σύστημα έγχυσης JASCO PU 980 (JASCO, Easton, MD, USA) με όγκο έγχυσης 100  $\mu$ L, στήλη ODS Hypersyl (4,6 $\times$ 250 mm, μέγεθος σωματιδίων 5  $\mu$ m, Thermo Scientific), φωτοχημικό αντιδραστήρα (LCTech) για παραγωγοποίηση μετά τη στήλη, και ανιχνευτή φθορισμού JASCO FP-920 που υποστηρίζεται από το λογισμικό Clarity Lite. Ισοκρατικό μείγμα νερού: μεθανόλης: ακετονιτριλίου (6:2:2) με ρυθμό ροής 1 mL ανά λεπτό χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση. Οι διαλύτες της κινητής φάσης διηθήθηκαν μέσω φίλτρων μεμβράνης 0,2 mm και απαερώθηκαν με χρήση μιας γραμμής μονάδας απαέρωσης κενού πολλαπλών καναλιών (VWR, Model 2004) πριν από την αντλία της HPLC. Η αφλατοξίνη B1 ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε με ανίχνευση φθορισμού με διέγερση σε μήκος κύματος 360 nm και εκπομπή σε μήκος κύματος 435 nm. Η ποσότητα AFB1 προσδιορίστηκε από την αντίστοιχη καμπύλη βαθμονόμησης που δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας διάφορα διαλύματα βαθμονόμησης συγκεντρώσεων 20-150  $\mu$ g/kg και στη συνέχεια ελέγχθηκε για γραμμικότητα ( $R^2 > 0,99$ ). Οι τιμές ανάκτησης της μεθόδου προήλθαν από τεχνητά μολυσμένους καρπούς φιστικιών που περιείχαν 2, 4 και 8  $\mu$ g/kg αφλατοξίνης B1. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν.

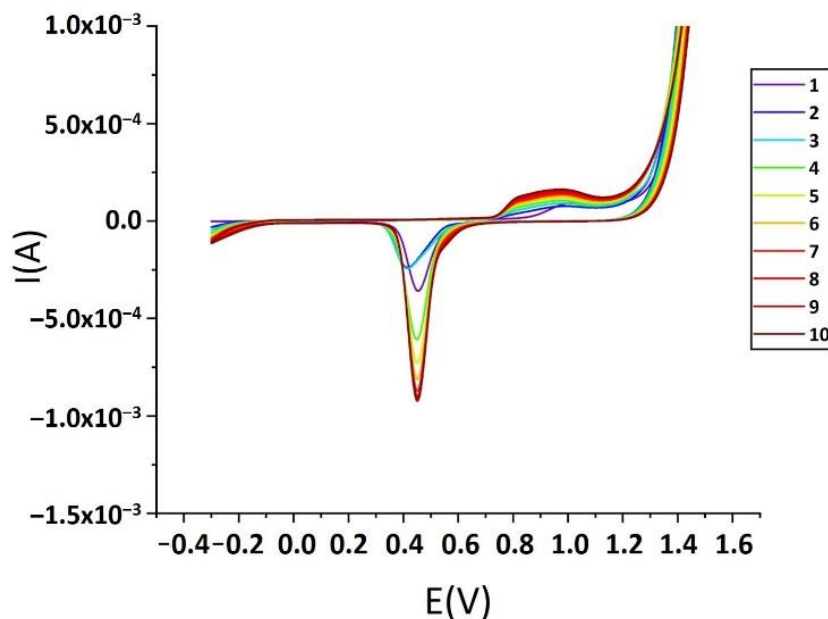
Για τη δημιουργία των τεχνητά μολυσμένων με αφλατοξίνη B1 δειγμάτων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Με βάσει τα αποτελέσματα της HPLC ανάλυσης, επιλέχθηκε ένα δείγμα που παρουσίασε τη χαμηλότερη μόλυνση από αφλατοξίνες, πιο συγκεκριμένα κάτω από το ανώτατο επιτρεπτό όριο, και θεωρήθηκε ως μη μολυσμένο. Η εξαγωγή και η ανάλυση των αφλατοξινών των αφλατοξινών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται προηγουμένως στην παρούσα παράγραφο 7.4.4. Για το δείγμα που επιλέχθηκε, η επαναδιαλυτοποίηση του ξηρού εκλούσματος ύστερα από την αφύγρανση με τη χρήση αζώτου, πραγματοποιήθηκε με ποσότητα 0,5 mL πρότυπου διαλύματος καθαρής αφλατοξίνης B1 με συγκεντρώσεις 0, 0,5, 1, 5, 10, 50 και 100 ng/mL. Το αρχικό διάλυμα αφλατοξίνης B1 δημιουργήθηκε με διαλυτοποίηση εμπορικά διαθέσιμης καθαρής αφλατοξίνης από τον μύκητα *A. flavus* σε μεθανόλη. Η καθαρή αφλατοξίνη (κωδικός A6636-1 mg) αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Στα τελικά διαλύματα αφλατοξίνης B1, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος με pH 5,6 (acetate buffer), σε αναλογία 1:1 με μεθανόλη, με απώτερο σκοπό τον περιορισμό της επίδρασης του διαλύτη στην τελική ανάλυση.

### 7.4.5. Ανάπτυξη αισθητήρα

Σε αυτό το σημείο περιγράφεται η δομή και η ανάπτυξη του αισθητήρα, η οποία αρχικά περιλαμβάνει την ακινητοποίηση του αντισώματος στο ηλεκτρόδιο πριν διενεργηθούν οι μετρήσεις.

#### 7.4.5.1. Ακινητοποίηση αντισώματος

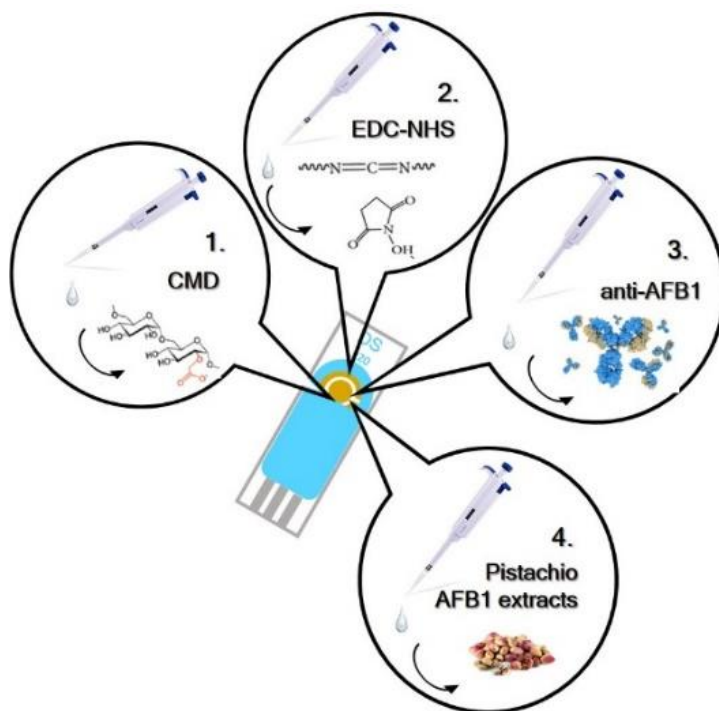
Αρχικά, το εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο υποβλήθηκε σε ηλεκτροχημική επεξεργασία με διάλυμα 0,5 M  $H_2SO_4$  με την εφαρμογή 10 κύκλων κυκλικής βολταμετρίας μεταξύ -1 και +1,5 V, με ρυθμό σάρωσης 100 mV/s για να ληφθούν τα χαρακτηριστικά βολταγράμματα της καθαρής επιφάνειας του ηλεκτροδίου (Διάγρ. 7.1). Το ηλεκτρόδιο στη συνέχεια ξεπλύθηκε δύο φορές με 100  $\mu L$  διπλά απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού κάθε φορά και τελικά ξηράνθηκε σε συνθήκες δωματίου. Στη συνέχεια, το ηλεκτρόδιο καλύφθηκε με 30  $\mu L$  διαλύματος CM-δεξτράνης (50 mg ανά mL σε νερό) και αποθηκεύτηκε στους 4 °C, όπου και επώαστηκε κατά τη διάρκεια της νύχτας.



Διάγραμμα 7.1: Βολταγράμματα των δέκα κύκλων καθαρισμού του ηλεκτροδίου (SPE).

Για την ακινητοποίηση του αντισώματος, χρησιμοποιήθηκαν με την ακόλουθη σειρά CM-δεξτράνη, EDC ως παράγοντας σύζευξης και NHS ως ενεργοποιητής (Bhardwaj et al. 2016). Την επόμενη μέρα, 10  $\mu L$  μείγματος EDC-NHS 1:1 (0,4 M EDC και 0,1 M NHS παρασκευασμένο σε απεσταγμένο νερό) τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου το οποίο διατηρήθηκε υπό υγρές συνθήκες σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά τουλάχιστον, επιτρέποντας να προχωρήσει η αντίδραση. Μετά από κάθε βήμα, η επιφάνεια του ηλεκτροδίου εκπλύθηκε καλά με άφθονη ποσότητα νερού για την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου υλικού. Στη συνέχεια, 10  $\mu L$  του διαλύματος του αντισώματος της αφλατοξίνης B1 σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος τοποθετήθηκαν πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και μετά πραγματοποιήθηκε επώαση σε υγρό θάλαμο για μία ώρα στους 25 °C. Το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος ήταν ρυθμισμένο να έχει pH 5,6, και είχε δημιουργηθεί από 0,1 M οξικό οξύ και 0,1 M οξικό νάτριο. Μετά την επώαση, το ηλεκτρόδιο εκπλύθηκε ξανά με νερό για να απομακρυνθούν τα αδέσμευτα αντισώματα.

Τέλος, οι θέσεις που δεν αντέδρασαν καλύφθηκαν με 1 M αιθανολαμίνη (ethanolamine) ύστερα από επώαση 15 λεπτών, και το ηλεκτρόδιο αποθηκεύτηκε στους 4 °C για περαιτέρω χρήση. Την ημέρα των μετρήσεων της εμπέδησης, τα πρότυπα διαλύματα αφλατοξίνης B1 και τα δείγματα φιστικιών επώαστηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια τα ηλεκτρόδια ξεπλύθηκαν και πάλι με νερό. Η Εικόνα 7.2 απεικονίζει τα διαδοχικά στάδια της ακινητοποίησης του αντισώματος στο ηλεκτρόδιο.

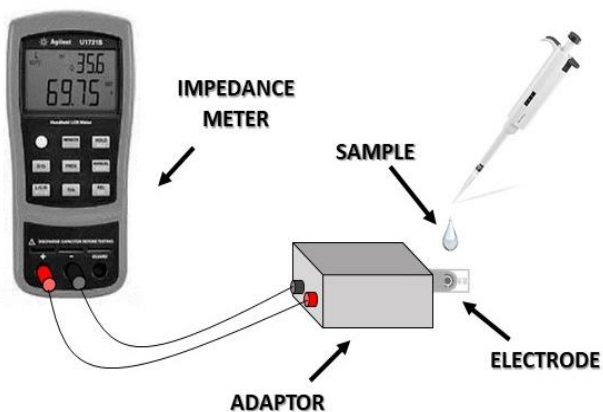


Εικόνα 7.2: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων ακινητοποίησης του αντισώματος στο ηλεκτρόδιο του αισθητήρα.

#### 7.4.5.2. Διαδικασία καταγραφής μετρήσεων εμπέδησης

Για κάθε στάδιο της πειραματικής διαδικασίας και της ανάλυσης των δειγμάτων, το ηλεκτρόδιο που περιείχε το προς δοκιμή δείγμα τοποθετήθηκε σε προσαρμογέα DRP-DSC79314 (DropSens, Oviedo Asturias, Ισπανία) που μπορεί να συνδεθεί με το μετρητή εμπέδησης. Στη συνέχεια, 40  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος pH 5,6 προστέθηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου πριν ξεκινήσει η καταγραφή των μετρήσεων εμπέδησης. Λόγω της συμβατότητας της συσκευής και της δομής του αισθητήρα, το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο του συστήματος δεν συνδέθηκε. Ελήφθησαν υπόψη μόνο οι μετρήσεις του ηλεκτροδίου αναφοράς. Οι μετρήσεις εμπέδησης διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας έναν φορητό μετρητή LCR U1733C (Εικ. 7.3) από την Keysight Technologies (Santa Rosa, CA, USA), σύμφωνα με την ικανότητα του οργάνου, και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές συχνότητες (1 KHz, 10 KHz και 100 KHz) για την άμεση εξαγωγή αποτελεσμάτων βάσει των διαφορετικών συχνοτήτων εμπέδησης που εφαρμόστηκαν. Το βέλτιστο διάστημα καταγραφής του οργάνου είναι μία μέτρηση ανά δευτερόλεπτο και κάθε μέτρηση είχε διάρκεια 3 λεπτά, επομένως οι συνολικές τιμές που λήφθηκαν για κάθε εκτέλεση ήταν 180 με συχνότητα μέτρησης 1 Hz. Τα καταγεγραμμένα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως ο μέσος όρος των απόλυτων τιμών εμπέδησης ( $|Z|$  ( $\Omega$ )) που λήφθηκαν κατά τη μέτρηση των 180

δευτερολέπτων λόγω της απλότητας της συσκευής. Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (LOD) υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της απόκρισης της καμπύλης και την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης. Πιο συγκεκριμένα, η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:  $LOD = 3,3x$  (τυπική απόκλιση και κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης).



A



B

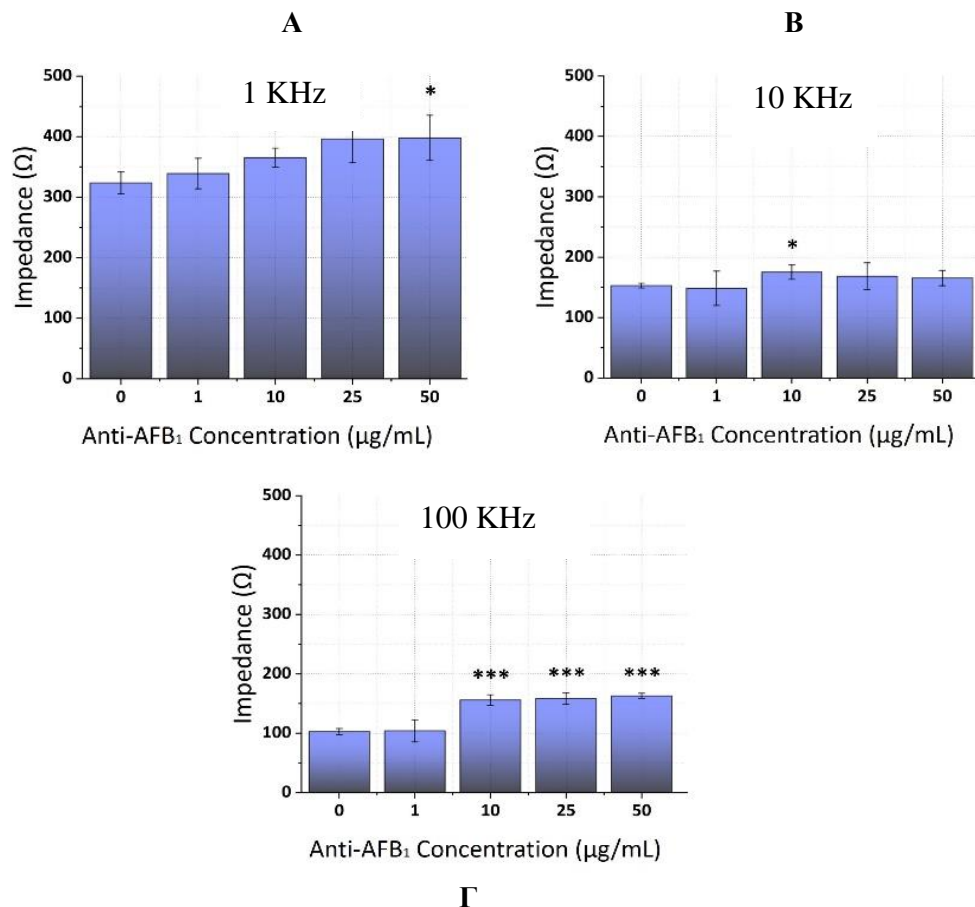
**Εικόνα 7.3:** A: Σχηματική απεικόνιση της δομής του αισθητήρα και B: Πραγματική απεικόνιση της δομής του αισθητήρα.



## 7.5. Αποτελέσματα

### 7.5.1. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του αντισώματος αφλατοξίνης B1

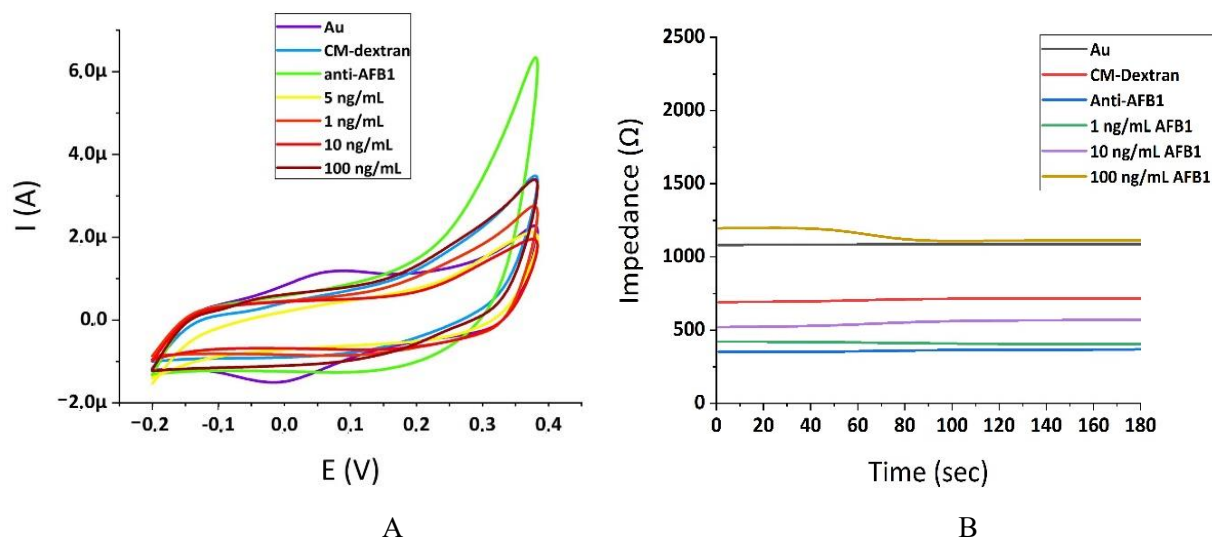
Η συγκέντρωση αφλατοξίνης B1 5 ng/mL επιλέχθηκε για τις μελέτες βελτιστοποίησης αντισωμάτων, καθώς παρατηρείται εντός του γραμμικού εύρους πολλών διαφορετικών εμπέδησιμετρικών αισθητήρων που βασίζονται σε μετρήσεις της αντίστασης (Evtugyn et al. 2014, Badea et al. 2016, Srivastava et al. 2014). Κατά την έκθεση σε 5 ng/mL αφλατοξίνης B1 (AFB1), ο ανοσοαισθητήρας σύνθετης αντίστασης επέδειξε ισχυρή απόκριση κατά την αύξηση των συγκεντρώσεων του μονοκλωνικού αντισώματος αφλατοξίνης B1 που εκφράστηκαν από μια σημαντική αύξηση στις μέσες τιμές εμπέδησης. Αυτή η απόκριση έφτασε σε ένα μέγιστο επίπεδο σε συγκεντρώσεις του αντισώματος που ήταν υψηλότερες από 10  $\mu\text{g/mL}$  σε όλες τις συχνότητες που εφαρμόστηκαν (1, 10, και 100 KHz) (Διάγρ. 7.2). Επιπλέον, η απόκριση του μάρτυρα ήταν εντελώς διαφορετική από την απόκριση που καταγράφηκε κατά την προσθήκη του διαλύματος AFB1 στον ανοσοαισθητήρα.



**Διάγραμμα 7.2:** Διαγραμματική απεικόνιση των μετρήσεων εμπέδησης εκφρασμένες ως μέσοι όροι, στις διάφορες συγκεντρώσεις αντισώματος αφλατοξίνης B1, σε τρεις διαφορετικές συχνότητες, **A:** 1 KHz, **B:** 10 KHz, και **Γ:** 100 KHz. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντισώματος αφλατοξίνης B1 και στον κάθετο η εμπέδηση. Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση two-tailed t-test, οι μετρήσεις  $p^* < 0,05$ ,  $p^{***} < 0,001$  διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τον μάρτυρα.

### 7.5.2. Αξιολόγηση της δέσμευσης της αφλατοξίνης B1 από το αντίσωμα

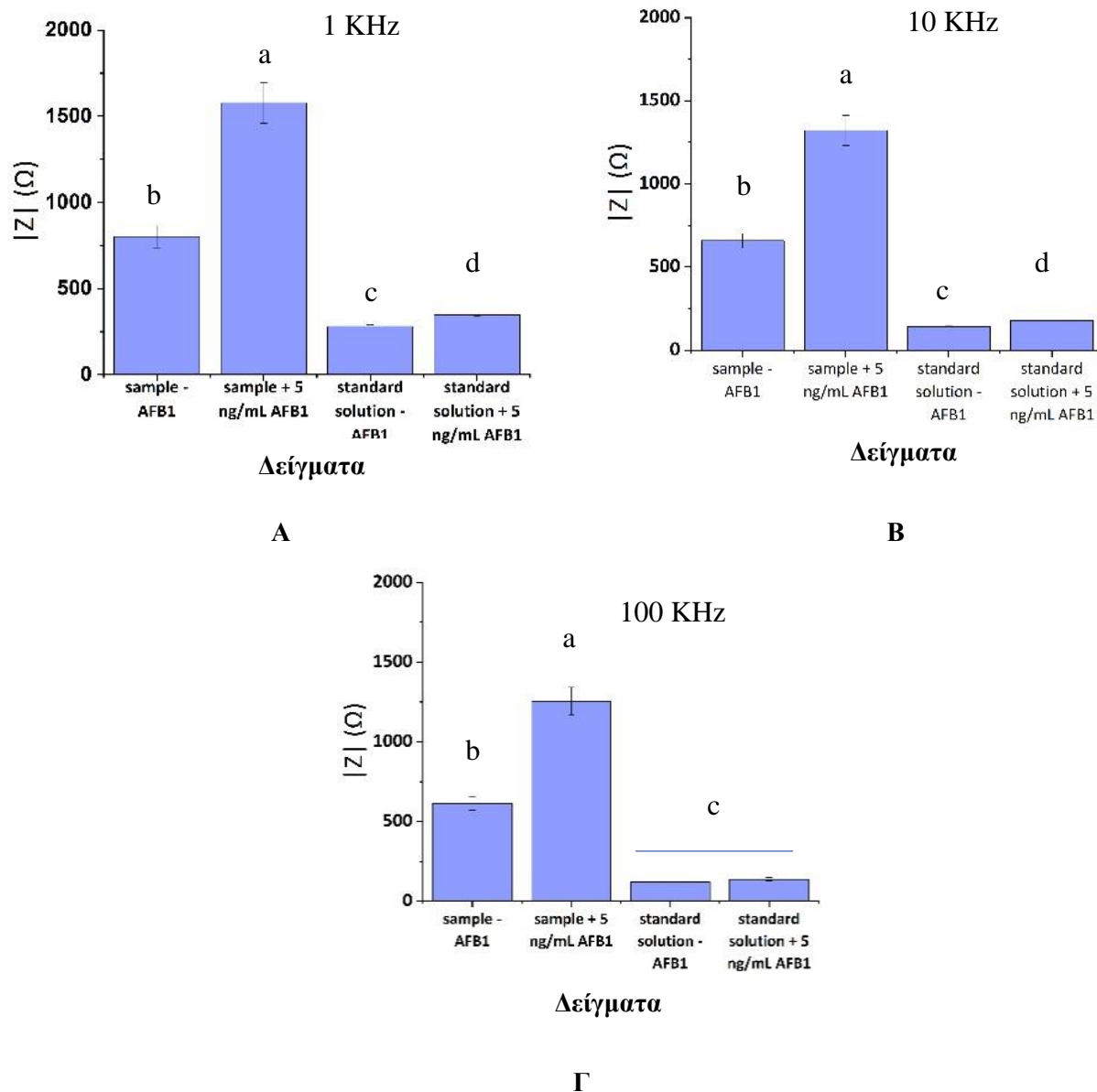
Αρχικά, η διερεύνηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κυκλικής βολταμετρίας για την παρακολούθηση των διαφόρων σταδίων του ανοσοαισθητήρα στην επιφάνεια ηλεκτροδίου χρυσού. Τα βολταγράμματα καταγράφηκαν μετά από όλα τα στάδια της τροποποίησης του ηλεκτροδίου και μετά την προσθήκη των διαφόρων συγκεντρώσεων αφλατοξίνης B1. Στο Διάγραμμα 7.3Α παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταγράμματα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος (pH 5,6) ενός καθαρού ηλεκτροδίου χρυσού (Au), μετά από τροποποίηση με την CM-δεξτράνη, μετά από ενεργοποίηση με το αντίσωμα της αφλατοξίνης B1 (anti-AFB1) και τέλος, μετά από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (1, 5, 10, και 100 ng/mL). Τα πειράματα κυκλικής βολταμετρίας πραγματοποιήθηκαν μεταξύ  $-0,2$  και  $+0,4$  V, με ρυθμό σάρωσης 100 mV/s. Βάσει των αποτελεσμάτων, παρατηρείται πως παρουσιάζεται σημαντική επίδραση στην εμπέδηση από την προσθήκη κάθε ουσίας σε κάθε βήμα της λειτουργίας του ηλεκτροδίου. Η τροποποίηση του ηλεκτροδίου με αντίσωμα αφλατοξίνης B1 οδηγεί σε αύξηση στις μετρήσεις των αποτελεσμάτων συγκριτικά με τις μετρήσεις του απλού ηλεκτροδίου χρυσού καθώς και του ηλεκτροδίου μετά την εφαρμογή της CM-δεξτράνης. Ωστόσο, όταν έλαβε χώρα η ανοσοχημική αντίδραση με τα μόρια αφλατοξίνης B1, παρατηρήθηκε μείωση της απόκρισης. Καθώς οι συγκεντρώσεις αφλατοξίνης αυξάνονταν, οι αποκρίσεις καταγράφηκαν σημαντικά αυξημένες. Αυτά τα πρότυπα ήταν σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων εμπέδησης (Διάγρ. 7.3B).



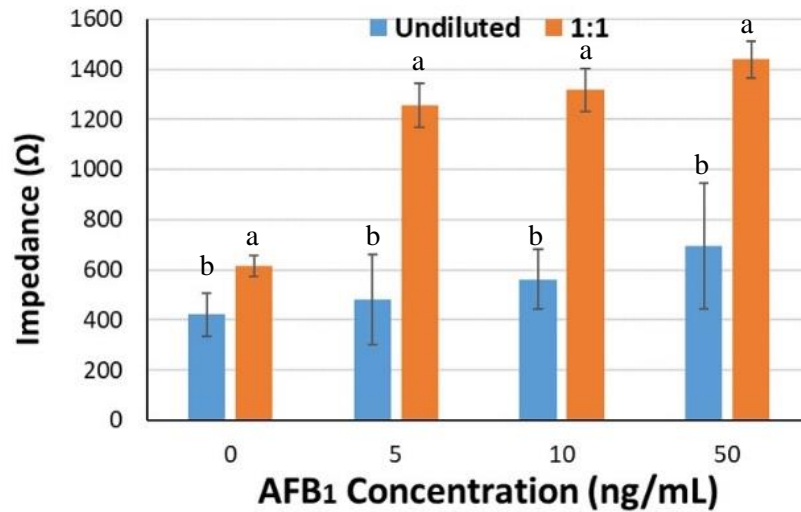
**Διάγραμμα 7.3:** **A:** Κυκλικά βολταγράμματα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος (pH 5,6) με ρυθμό σάρωσης 0,1 V/s, μετά από κάθε στάδιο τροποποίησης του ηλεκτροδίου, και **B:** Μετρήσεις εμπέδησης μετά από κάθε στάδιο τροποποίησης του ηλεκτροδίου.

Πραγματοποιήθηκε επίσης, διερεύνηση της επίδρασης των αναλυτών καθώς και του δείγματος στα χαρακτηριστικά απόδοσης του αισθητήρα. Στο Διάγραμμα 7.4 (Α-Γ) απεικονίζονται τα αποτελέσματα του μέσου μεγέθους εμπέδησης των αντίστοιχων πειραμάτων ελέγχου σε πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα και εκχυλίσματα φιστικιών ύστερα από εξαγωγή αφλατοξινών, με και χωρίς την προσθήκη 5 ng/mL αφλατοξίνης B1 για τις τρεις υπό δοκιμή συχνότητες (1, 10 και 100 KHz). Από τα αποτελέσματα, είναι προφανές ότι τα συστατικά των εκχυλισμάτων φιστικιού αύξησαν το παρατηρούμενο μέγεθος εμπέδησης παρουσιάζοντας ένα ανομοιόμορφο μοτίβο, κάτι που πιθανώς οφειλόταν στην προσρόφηση τους στην

επικάλυψη με βάση το πολυμερές της δεξτράνης. Φυσικά, το συγκεκριμένο αποτέλεσμα αποτελεί μελλοντικό ζήτημα προς διερεύνηση. Επιπλέον, το Διάγραμμα 7.5 απεικονίζει τα αποτελέσματα του βιοαισθητήρα στην ανάλυση δειγμάτων ύστερα από αραιώση 1:1, όπου θα μπορούσαν να αποκτηθούν αποτελέσματα με καλύτερη ευαισθησία. Ωστόσο, με γνώμονα και απώτερο σκοπό την δημιουργία ενός αισθητήρα ικανού να ανιχνεύει χαμηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 σε εμπορικά δείγματα φιστικιών, με απευθείας χρήση του εκχυλίσματος εξαγωγής αφλατοξινών, αποφασίστηκε να διατηρηθεί συγκέντρωση χωρίς αραιώση του δείγματος.



**Διάγραμμα 7.4:** Μετρήσεις εμπέδησης δειγμάτων (sample) και πρότυπων διαλυμάτων (standard solutions), με και χωρίς την προσθήκη 5 ng/mL αφλατοξίνης B1, σε τρεις διαφορετικές συχνότητες: Α: 1 KHz, Β: 10 KHz, και Γ: 100 KHz. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $p < 0,05$ ).

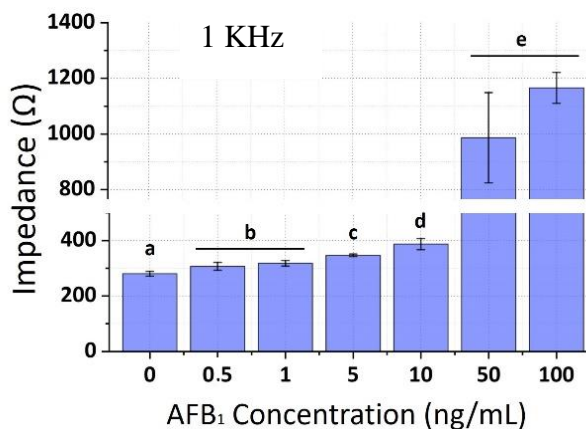


**Διάγραμμα 7.5:** Μετρήσεις εμπέδησης δειγμάτων με 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (AFB1 0, 5, 10, και 50 ng/mL), χωρίς αραιώση (undiluted) και ύστερα από αραιώση 1:1. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $p < 0,05$ ).

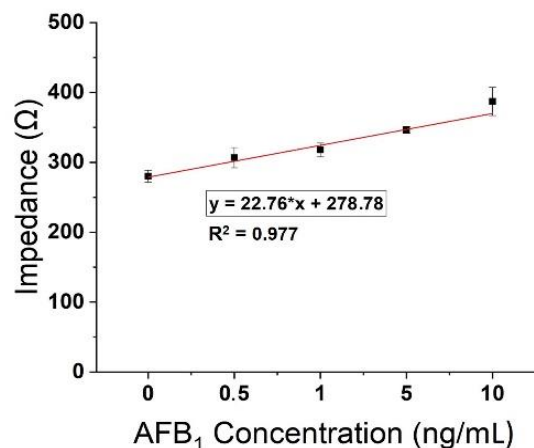
### 7.5.3. Αξιολόγηση της απόδοσης του αισθητήρα σε πρότυπα διαλύματα αφλατοξίνης B1

Οι καμπύλες βαθμονόμησης των πρότυπων διαλυμάτων αφλατοξίνης B1 σχεδιάστηκαν για συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,5-100 ng/mL αφλατοξίνης B1 για τις τρεις συχνότητες που διερευνήθηκαν (1, 10 και 100 KHz), όπως απεικονίζεται στα Διαγράμματα 7.6-7.8 αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε μια απόκριση εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση ανάλογη της αύξησης των συγκεντρώσεων της αφλατοξίνης B1. Η γραμμικότητα παρατηρήθηκε έντονα στο εύρος των 0,5-10 ng/mL σε όλες τις προς διερεύνηση συχνότητες, με τον συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  της καμπύλης να κυμαίνεται μεταξύ 0,88 και 0,93. Όλες οι μετρήσεις παρουσίασαν αποτελέσματα με στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα με την μηδενική συγκέντρωση αφλατοξίνης B1 (Διάγρ. 7.6-7.8).

Ο βιοαισθητήρας ήταν επίσης σε θέση να ανιχνεύσει και υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (50 και 100 ng/mL). Ωστόσο, καθώς η συχνότητα αυξανόταν, ήταν εμφανής μια ελαφρά μείωση στις τιμές της εμπέδησης. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά αναπαραγωγίμα, με μέση διακύμανση 4,14% σε όλες σχεδόν τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν (στα 50 ng/mL η μέση τυπική απόκλιση ήταν 16,26%). Ο ανοσοαισθητήρας μπόρεσε να ανιχνεύσει επιτυχώς τις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 έως και 0,5 ng/mL. Ο Πίνακας 7.1 παρουσιάζει λεπτομερώς τις παραμέτρους που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή των καμπυλών γραμμικής προσαρμογής.

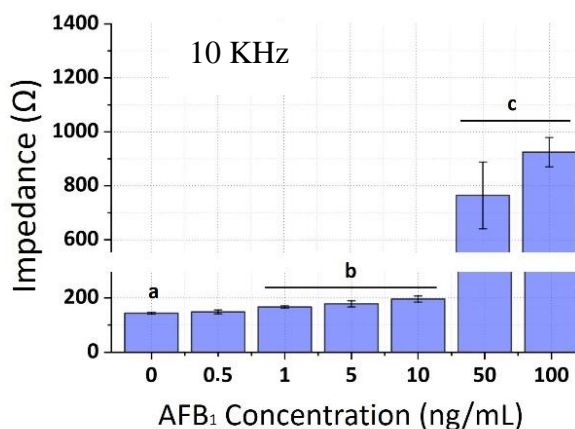


A

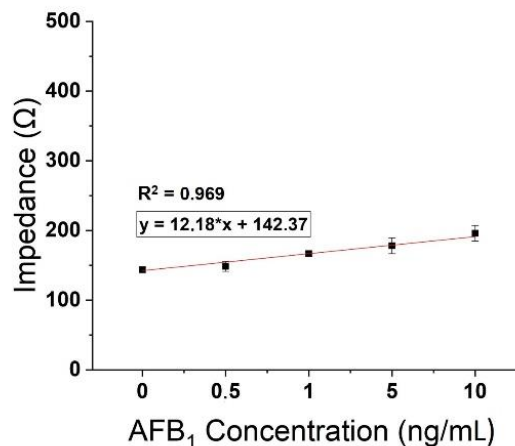


B

**Διάγραμμα 7.6:** **A:** Μέσοι όροι τιμών εμπέδησης από τις μετρήσεις με τις διάφορες τιμές αφλατοξίνης B1 0-100 ng/mL, στη συχνότητα 1 KHz. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $p < 0,05$ ). **B:** Γραμμικότητα της καμπύλης των τιμών των μέσων όρων εμπέδησης για τις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (0–10 ng/mL), στη συχνότητα 1 KHz.

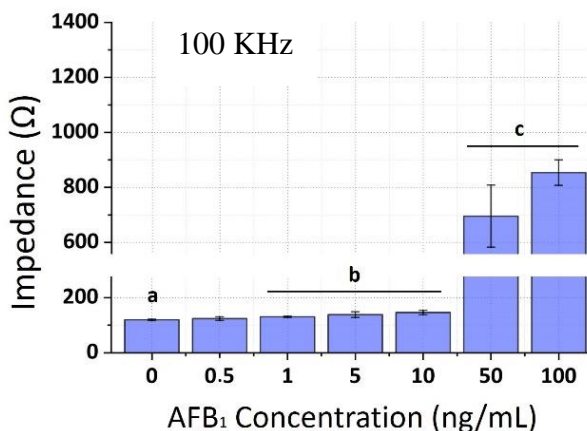


A

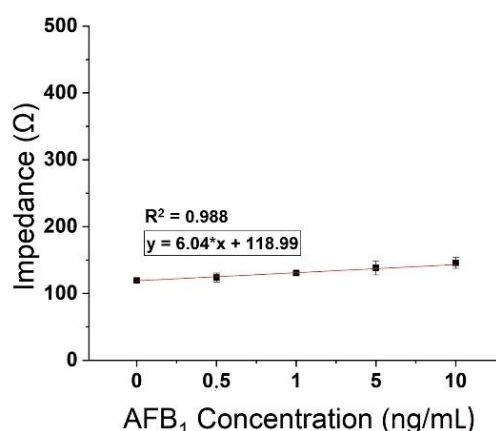


B

**Διάγραμμα 7.7:** **A:** Μέσοι όροι τιμών εμπέδησης από τις μετρήσεις με τις διάφορες τιμές αφλατοξίνης B1 0-100 ng/mL, στη συχνότητα 10 KHz. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $p < 0,05$ ). **B:** Γραμμικότητα της καμπύλης των τιμών των μέσων όρων εμπέδησης για τις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (0–10 ng/mL), στη συχνότητα 10 KHz.



**A**



**B**

**Διάγραμμα 7.8:** **A:** Μέσοι όροι τιμών εμπέδησης από τις μετρήσεις με τις διάφορες τιμές αφλατοξίνης B1 0-100 ng/mL, στη συχνότητα 100 KHz. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $p < 0,05$ ). **B:** Γραμμικότητα της καμπύλης των τιμών των μέσων όρων εμπέδησης για τις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (0–10 ng/mL), στη συχνότητα 100 KHz.

**Πίνακας 7.1:** Παράμετροι προσαρμογής της καμπύλης των τιμών της μέσης εμπέδησης για συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (1–100 ng/mL) που δοκιμάστηκαν σε τρεις διαφορετικές συχνότητες (1 KHz, 10 KHz, 100 KHz).

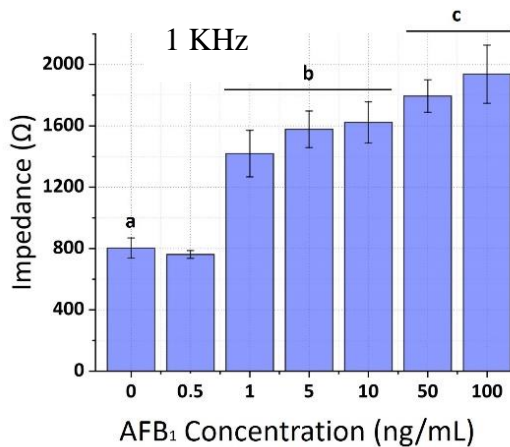
Παράμετροι	Συχνότητα		
	1 KHz	10 KHz	100 KHz
Equation	$y = a*x + b$		
Intercept	$278,7762 \pm 5,11754$	$142,37224 \pm 2,0011$	$118,99124 \pm 0,64571$
Slope	$22,75792 \pm 2,00724$	$12,18314 \pm 1,23977$	$6,03978 \pm 0,38331$
Residual Sum of Squares	1,33578	1,06943	0,21553
Pearson's r	0,98853	0,98482	0,99401
R-Square (COD)	0,97719	0,96987	0,98806
Adj. R-Square	0,96959	0,95983	0,98408

#### 7.5.4. Αξιολόγηση ανίχνευσης αφλατοξίνης B1 σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα φιστικιών

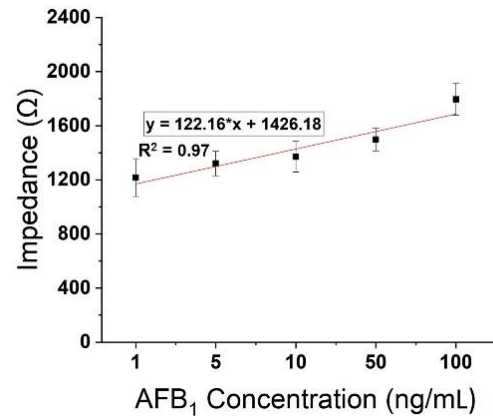
Οι καμπύλες βαθμονόμησης αφλατοξίνης B1 σχεδιάστηκαν με βάση τις ίδιες συγκεντρώσεις σε δείγματα φιστικιών τεχνητά μολυσμένα για τις τρεις συχνότητες (1, 10 και 100 KHz) όπως απεικονίζεται στα Διαγράμματα 7.9-7.11, αντίστοιχα. Μια εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση απόκριση παρατηρήθηκε και πάλι κατά την αύξηση των συγκεντρώσεων της αφλατοξίνης B1, με γραμμικό εύρος μεταξύ 1–100 ng/mL σε όλες τις συχνότητες που δοκιμάστηκαν ( $R^2$  κυμαινόμενο μεταξύ 0,88-0,96). Οι μετρήσεις σε κάθε συγκέντρωση αφλατοξίνης B1, υψηλότερη από 0,5 ng/mL ήταν διακριτές και παρουσίασαν διαφορές στατιστικά σημαντικές σε σχέση με το μάρτυρα. Με την αύξηση της συχνότητας, παρατηρήθηκε και πάλι μια μικρή μείωση στις μέσες τιμές εμπέδησης. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά αναπαραγωγίμα ξανά, με



μέση διακύμανση 7,28% σε όλες τις συγκεντρώσεις και ο αισθητήρας μπόρεσε να ανιχνεύσει επιτυχώς τις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 έως 1 ng/mL. Ο Πίνακας 7.2 παρουσιάζει, λεπτομερώς, τις παραμέτρους προσαρμογής των καμπυλών. Σε σύγκριση με τις καμπύλες που λαμβάνονται από τις κανονικοποιημένες τιμές της μέσης εμπέδησης, για συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων αφλατοξίνης B1 (Διάγρ. 7.6-7.8) η ελάχιστη συκέντρωση γραμμικού εύρους έχει αυξηθεί σε 1 ng/mL αφλατοξίνης B1, υποδεικνύοντας την επίδραση του υποστρώματος στο αποτέλεσμα της μέτρησης.

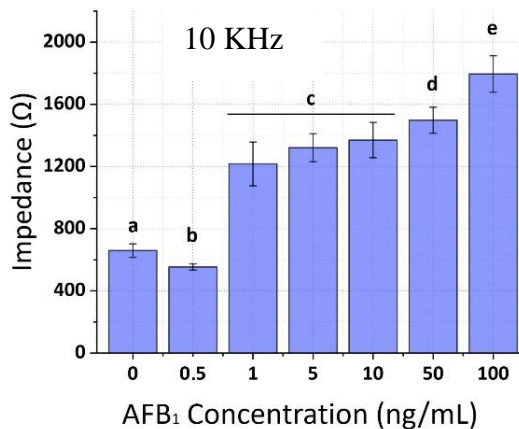


**A**

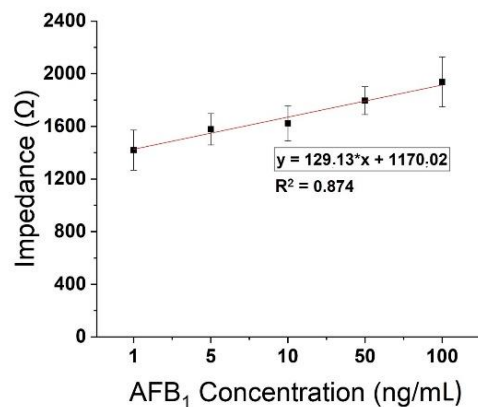


**B**

**Διάγραμμα 7.9:** **A:** Μέσοι όροι τιμών εμπέδησης από τις μετρήσεις με τις διάφορες τιμές αφλατοξίνης B1 0-100 ng/mL σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα φιστικιών, στη συχνότητα 1 KHz. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $p < 0,05$ ). **B:** Γραμμικότητα της καμπύλης των τιμών των μέσων όρων εμπέδησης για τις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (1–100 ng/mL), στη συχνότητα 1 KHz.

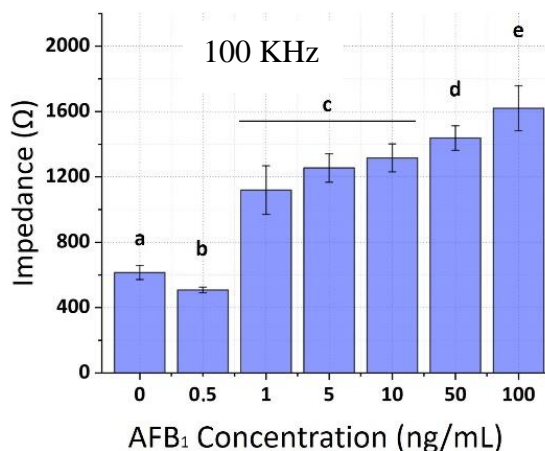


**A**

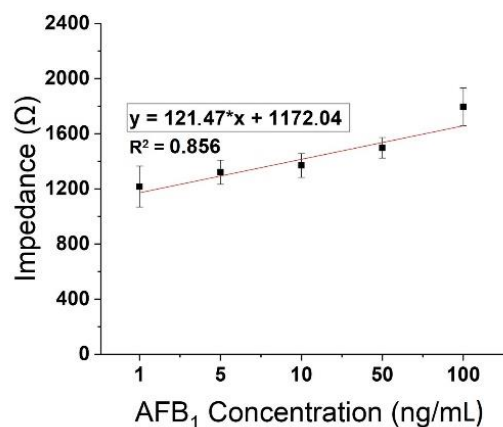


**B**

**Διάγραμμα 7.10:** **A:** Μέσοι όροι τιμών εμπέδησης από τις μετρήσεις με τις διάφορες τιμές αφλατοξίνης B1 0-100 ng/mL σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα φιστικιών, στη συχνότητα 10 KHz. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $p < 0,05$ ). **B:** Γραμμικότητα της καμπύλης των τιμών των μέσων όρων εμπέδησης για τις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (1–100 ng/mL), στη συχνότητα 10 KHz.



**A**



**B**

**Διάγραμμα 7.11: A:** Μέσοι όροι τιμών εμπέδησης από τις μετρήσεις με τις διάφορες τιμές αφλατοξίνης B1 0-100 ng/mL σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα φυσικών, στη συχνότητα 100 KHz. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $p < 0,05$ ). **B:** Γραμμικότητα της καμπύλης των τιμών των μέσων όρων εμπέδησης για τις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (1–100 ng/mL), στη συχνότητα 100 KHz.

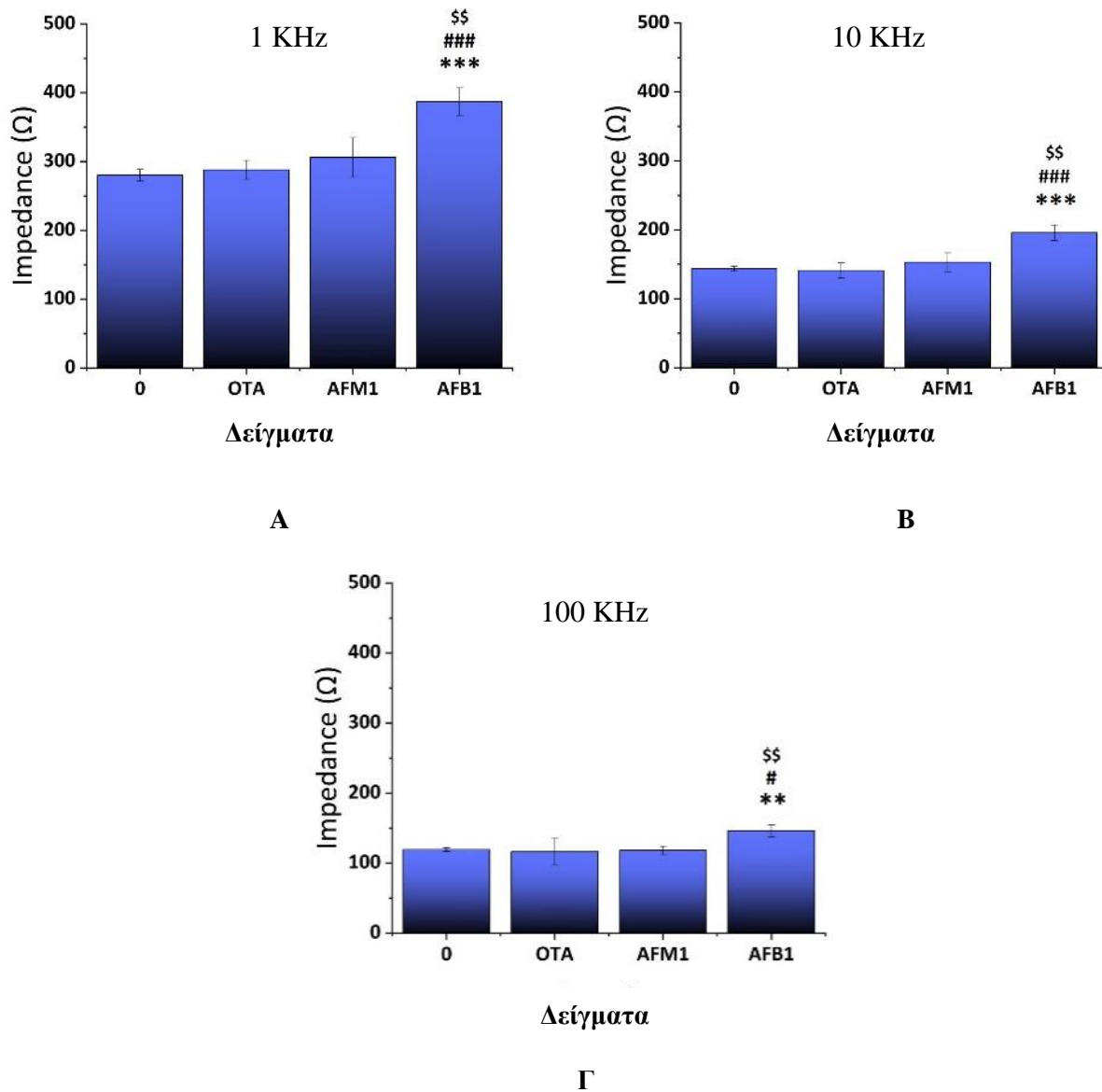
**Πίνακας 7.2:** Παράμετροι προσαρμογής της καμπύλης των τιμών της μέσης εμπέδησης για συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 (1–100 ng/mL) τεχνητών μολύνσεων που δοκιμάστηκαν σε τρεις διαφορετικές συχνότητες (1 KHz, 10 KHz, 100 KHz).

Παράμετροι	Συχνότητα		
	1 KHz	10 KHz	100 KHz
Equation	$y = a*x + b$		
Intercept	1426,17661 ± 28,67199	1170,02373 ± 70,33988	1172,04268 ± 68,85931
Slope	122,15645 ± 12,3458	129,12579 ± 28,25998	121,46873 ± 28,72731
Residual Sum of Squares	0,20243	1,79272	1,71928
Pearson's r	0,98502	0,93507	0,92537
R-Square (COD)	0,97027	0,87436	0,85631
Adj. R-Square	0,96036	0,83248	0,80842

### 7.5.5. Αξιολόγηση διασταυρωτής αντίδρασης του αισθητήρα με ωχρατοξίνη A και αφλατοξίνη M1

Στη παρούσα ενότητα πραγματοποιήθηκαν μελέτες διασταυρωτής αντίδρασης προκειμένου να αξιολογηθεί η περαιτέρω απόδοση του ανοσοαισθητήρα και να προσδιοριστεί η πιθανή επίδραση άλλων μυκοτοξινών στα αποτελέσματα του αισθητήρα. Η εκλεκτικότητα του ανεπτυγμένου αισθητήρα αξιολογήθηκε με εφαρμογή πρότυπων διαλυμάτων ωχρατοξίνης A (OTA) σε συγκέντρωση 10 ng/mL, αφλατοξίνης M1 (AFM1) σε συγκέντρωση 10 ng/mL και αφλατοξίνης B1 (AFB1) σε συγκέντρωση 10

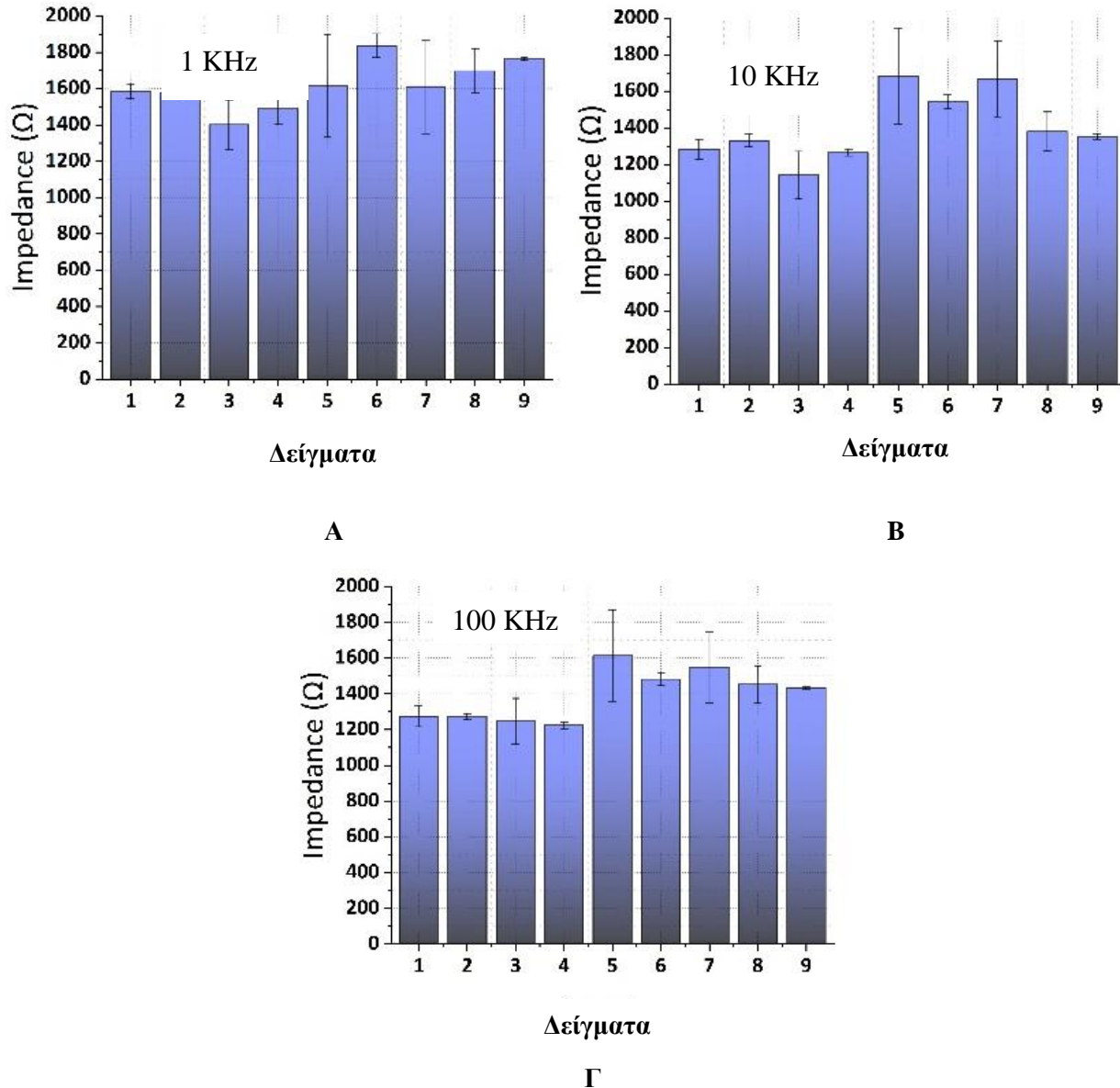
ng/mL. Οι OTA και AFM1 προκάλεσαν μικρές αλλαγές στο μέγεθος της εμπέδησης συγκριτικά με το μάρτυρα, που δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Διάγρ. 7.12). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι η αφλατοξίνη B1 σε συγκέντρωση 10 ng/mL προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη εμπέδηση, σε σχέση τόσο με τον μάρτυρα, όσο και με τις OTA και AFM1.



**Διάγραμμα 7.12:** Αποτελέσματα μετρήσεων εμπέδησης για πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0 και 10 ng/mL, OTA, AFM1, και AFB1, σε τρεις συχνότητες, **A:** 1 KHz, **B:** 10 KHz, και **Γ:** 100 KHz. Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση two-tailed t-test, οι μετρήσεις  $p^{**}<0,01$  και  $p^{***}<0,001$  διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τον μάρτυρα, οι μετρήσεις  $p^{\#}<0,05$  και  $p^{\#\#\#}<0,001$  διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από την OTA, και οι  $p^{\$\$}<0,01$  διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από την AFM1.

### 7.5.6. Επικύρωση απόδοσης αισθητήρα σε φυσικά μολυσμένα δείγματα φιστικιών και συγκριτική ανάλυση με HPLC

Τα δείγματα φιστικιών που είχαν συλλεχθεί, αναλύθηκαν με το βιοαισθητήρα και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με δεδομένα από την ανάλυση HPLC. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 7.13 αντιπροσωπεύουν τις μετρήσεις που έγιναν για εννέα (9) διαφορετικά δείγματα φιστικιών άγνωστων συγκεντρώσεων AFB1 στις τρεις συχνότητες που δοκιμάστηκαν, όπως προηγουμένως. Μετά την ανάλυση δεδομένων, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα 5 και 7 παρουσίασαν υψηλή μεταβλητότητα σε όλες τις συχνότητες με μέσες τυπικές αποκλίσεις κυμαινόμενες μεταξύ 12,3-17,59%.



Διάγραμμα 7.13: Μετρήσεις εμπέδησης για τα 9 δείγματα φιστικιών στις συχνότητες **A:** 1 KHz, **B:** 10 KHz, και **Γ:** 100 KHz.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων με HPLC, κατά την οποία, τέσσερα δείγματα φυσικιών βρέθηκαν μολυσμένα με υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα 3, 4, 5 και, 7 ανιχνεύθηκαν πάνω από 345 ng/mL αφλατοξίνης B1. Από την άλλη πλευρά, ορισμένα από αυτά, δηλαδή τα δείγματα 3 και 4, τα οποία έδωσαν τις χαμηλότερες μέσες τιμές εμπέδησης σε όλες τις συχνότητες που δοκιμάστηκαν, βρέθηκαν να είναι μολυσμένα με υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 κατά την HPLC ανάλυση. Ωστόσο, τα δείγματα 5 και 7 έδωσαν αρκετά μεταβλητές μετρήσεις, όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, και βρέθηκαν και αυτά με υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 κατά την HPLC ανάλυση. Από αυτά τα ευρήματα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι δείγματα με συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 υψηλότερες από 345 ng/mL δεν βρίσκονται εντός των ανώτερων ορίων ανίχνευσης του ανοσοαισθητήρα, και δεν μπορούν να ανιχνευθούν από αυτόν με ακρίβεια.

Ο Πίνακας 7.3 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των μετρήσεων της HPLC ανάλυσης, συγκριτικά με τα αντίστοιχα του ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα, καθώς και το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα (SE) και τυπική απόκλιση (RSD%). Το μέσο σχετικό σφάλμα βρέθηκε να είναι εντός αποδεκτών επιπέδων έως  $\pm 12\%$  για όλα τα δείγματα, εκτός από το δείγμα 6 (25,45%) στη μέθοδο HPLC, πιθανώς λόγω εσφαλμένης προεπεξεργασίας του δείγματος. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, προκειμένου να αξιολογηθεί η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια των μετρήσεων του ανοσοαισθητήρα.

Η ανάλυση συσχέτισης των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις τρεις συχνότητες που δοκιμάστηκαν με τον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα HPLC ήταν 0,49, 0,48 και 0,47 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 των δειγμάτων 3, 4, 5 και 7 δεν μπορούσαν να ανιχνευθούν, καθώς ήταν σχετικά υψηλές, επομένως, εκτός του εύρους του ορίου ανίχνευσης του αισθητήρα. Η επανάληψη της ανάλυσης συσχέτισης χωρίς να ληφθούν υπόψη τα προαναφερθέντα δείγματα, έδωσε ένα εντελώς διαφορετικό μοτίβο. Πιο συγκεκριμένα, τα υπόλοιπα δείγματα παρουσίασαν συντελεστή συσχέτισης που ήταν υψηλότερος από 0,99, δείχνοντας μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων.

**Πίνακας 7.3:** Συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 συνοδευόμενες από τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (RSD%) σε δείγματα φιστικιών όπως μετρήθηκαν με τον ανοσοαισθητήρα και HPLC (n=3, μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα (SD)).

Δείγμα	Μέθοδος ανίχνευσης							
	Αφλατοξίνη B1 (ng/mL) ± SE							
	Ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας						HPLC	
	1 KHz	RSD%	10 KHz	RSD%	100 KHz	RSD%		RSD%
1	5,02 ± 0,02	2,42	4,85 ± 0,04	4,13	5,08 ± 0,05	4,63	4,95 ± 0,1	2,02
2	4,99 ± 0,01	0,92	5,04 ± 0,02	2,47	5,07 ± 0,01	1,20	4,56 ± 0,1	2,19
3	0,99 ± 0,10	0,38	0,94 ± 0,11	1,22	0,97 ± 0,13	0,32	413,68 ± 35,5	8,57
4	1,05 ± 0,06	7,18	1,04 ± 0,014	7,81	1,09 ± 0,015	7,26	348,76 ± 16,4	4,69
5	99,5 ± 0,18	5,57	93,71 ± 0,16	1,41	99,55 ± 0,16	1,50	345,00 ± 5,1	1,47
6	51,2 ± 0,03	17,59	51,47 ± 0,03	15,52	51,54 ± 0,02	15,74	50,68 ± 12,9	25,41
7	99,3 ± 0,16	16,01	92,89 ± 0,12	12,31	95,58 ± 0,13	12,84	705,92 ± 50,7	7,18
8	35,48 ± 0,07	9,75	34,52 ± 0,08	11,39	37,88 ± 0,07	10,22	38,69 ± 5,0	12,80
9	32,76 ± 0,01	3,48	30,05 ± 0,01	2,54	33,21 ± 0,01	2,41	30,50 ± 0,2	0,51

## 7.6. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει την ανάπτυξη ενός ευαίσθητου ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης B1 (Kaminiaris, Mavrikou, et al. 2020). Η προτεινόμενη τεχνική ανοσοαισθητήρα με βάση τη σύνθετη αντίσταση είναι σχετικά απλή, εξοικονομεί χρόνο και δεν απαιτεί ακριβό εξοπλισμό και εκτεταμένη προετοιμασία δείγματος. Το αντίσωμα της αφλατοξίνης B1 ακινητοποιήθηκε στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου ενεργοποιώντας τις ομάδες καρβοξυλικού οξέος στην επιφάνεια με τη χρήση παραγόντων σύζευξης μετά από τροποποίηση με καρβο-μεθυλοδεξτράνη. Με βάση τις εκθέσεις της Ευρωπαϊκής Επιτροπής σχετικά με τον έλεγχο της μόλυνσης από αφλατοξίνες στα φιστικά, το ανώτατο επιτρεπτό όριο για την αφλατοξίνη B1 είναι 12 ng/mL. Η προτεινόμενη δομή αισθητήρα με βάση την σύνθετη αντίσταση μπόρεσε να ανιχνεύσει τις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 έως και 0,5 ng/mL και 1 ng/mL για πρότυπα διαλύματα και δείγματα φιστικιών αντίστοιχα.



Ο προτεινόμενος ανοσοαισθητήρας παρουσίασε ικανοποιητική ευαισθησία αναφορικά με το χαμηλό όριο ανίχνευσης, κάτω από τα μέγιστα επιτρεπτά όρια που έχουν οριστεί για τα κελυφωτά φιστικάκια. Κατά συνέπεια, μπορεί να αποτελέσει ένα κατάλληλο εργαλείο για χρήση σε τρέχουσες αναλύσεις δειγμάτων φιστικών για ανίχνευση μόλυνσης από αφλατοξίνη B1, ως εναλλακτική λύση χαμηλού κόστους και αυξημένης ταχύτητας συγκριτικά με χρονοβόρες και υψηλού κόστους αναλυτικές μεθοδολογίες. Η μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε ήταν σχετικά απλή χωρίς να απαιτείται εκτεταμένος καθαρισμός δείγματος ή προεπεξεργασία όπως στην προετοιμασία του δείγματος για ανάλυση HPLC. Παρόλα αυτά, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, αποδεικνύεται ότι ο συγκεκριμένος αισθητήρας που δημιουργήθηκε, επέτρεψε την ανίχνευση αφλατοξίνης B1, σε συγκέντρωση έως και 1 ng/mL.

Ο ανοσοαισθητήρας παρουσίασε γραμμικότητα που είναι συγκρίσιμη με συμβατικές μεθόδους, όπως η ELISA, και το όριο ανίχνευσής του είναι κατάλληλο για επιτόπια παρακολούθηση της μόλυνσης των φιστικών. Ενώ το όριο ανίχνευσης για τα περισσότερα από τα εμπορικά διαθέσιμα ELISA kit, ορίζεται στα 2 ή στα 4 ng/mL (Sun et al. 2015), αρκετοί νέοι ανοσοαισθητήρες, επιτυγχάνουν όριο ανίχνευσης περίπου 1,1 ng/mL και όριο ποσοτικού προσδιορισμού περίπου 2,5 ng/mL (Pereira et al. 2020).

Η γραμμικότητα που παρατηρήθηκε στο εύρος 0,5-10 ng/mL αφλατοξίνης B1 σε πρότυπα διαλύματα και δείγματα φιστικών, στις μετρήσεις από τον βιοαισθητήρα, που αναφέρθηκαν στην τρέχουσα μελέτη έδωσε αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σύγκριση με αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για άλλους ηλεκτροχημικούς ανοσοαισθητήρες με βάση τη εμπέδηση (Πίν. 7.4). Τέτοιου είδους σχήματα ανίχνευσης δεν απαιτούν εξελιγμένη λειτουργικότητα ηλεκτροδίων. Επιπλέον, άλλοι τύποι ηλεκτροχημικών ανοσοαισθητήρων, που χρησιμοποιούν πολύ πιο περίπλοκες δομές όπως οξειδίο γραφενίου ή νανοσωματίδια χρυσού, τα οποία δημιουργούν φαραδαϊκό ρεύμα κατά την οξείδωση ή την μείωσή τους, ή αξιοποιούν στρατηγικές ενίσχυσης σήματος, συγκριτικά με τον ανοσοαισθητήρα που δημιουργήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, μπορούν να παρέχουν εύρος γραμμικότητας μεταξύ 0,00001-31 ng/mL (Zhang et al. 2016, Narayanan et al. 2015, Evtugyn et al. 2014). Αυτό το εύρος είναι σημαντικά χαμηλότερο από αυτό που επιτυγχάνεται με τον ανοσοαισθητήρα που παρουσιάζεται στην παρούσα μελέτη. Καθώς όμως ο χρόνος είναι μια πολύ βασική παράμετρος στα σύγχρονα συστήματα ανίχνευσης και διαχείρισης αφλατοξινών, το όριο ανίχνευσης που επιτυγχάνεται με τον ανοσοαισθητήρα που παρουσιάζεται στην τρέχουσα εργασία, κρίνεται ικανοποιητικό, και επιπρόσθετα επιτρέπει την αποφυγή μεγάλου αριθμού βημάτων καθαρισμού. Ως εκ τούτου, μπορεί να θεωρηθεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης για τον έλεγχο της αφλατοξινών, και συγκεκριμένα αφλατοξίνης B1 στην καλλιέργεια των κελυφωτών φιστικών, προσφέροντας έγκαιρη και επιτόπια ανίχνευση μολυσμένων δειγμάτων. Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι προφανές ότι αρκεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε από τις τρεις δοκιμασμένες συχνότητες (1 KHz, 10 KHz, 100 KHz) για την ανίχνευση μολυσμένων φιστικών από αφλατοξίνη B1.

Επιπρόσθετα, λόγω της απλότητας της μεθοδολογίας, ο προτεινόμενος ανοσοαισθητήρας μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση περαιτέρω περιβαλλοντικών ρύπων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η προτεινόμενη μέθοδος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1, λόγω των αντιφατικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τον βιοαισθητήρα για τα δείγματα 4 (348,76 ng/mL) και 5 (345 ng/mL), παρόλο που και τα δύο περιείχαν σχεδόν την ίδια συγκέντρωση αφλατοξίνης B1, όπως επιβεβαιώνεται από την ανάλυση HPLC. Επομένως, υπάρχει μεγάλο περιθώριο βελτίωσης των ορίων ανίχνευσης καθώς και του εύρους γραμμικότητας. Προς το παρόν, με τη χρήση του αισθητήρα μπορούν να ανιχνευθούν μόνο συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 που κυμαίνονται μεταξύ 1-100 ng/mL.

**Πίνακας 7.4:** Σύγκριση των αναλυτικών χαρακτηριστικών του προτεινόμενου ανοσοαισθητήρα με βάση την εμπέδηση, συγκριτικά με άλλους ηλεκτροχημικούς ανοσοαισθητήρες εμπέδησης για αφλατοξίνες.

Τύπος ανίχνευσης	Μετατροπείς/ Ηλεκτρόδια	Σχήμα ανίχνευσης	Όριο ανίχνευσης (ng/mL)	Εύρος γραμμικότητας (ng/mL)	Αναφορά
Άμεση εμπέδηση	Glassy carbon/polyNeutral Red/Polycarboxylated thiacalix, arene A	AFB <sub>1</sub> aptamer immobilized covalently on the electrode	0,015	0,03–31	(Evtugyn et al. 2014)
Άμεση φαραδαϊκή εμπέδηση	Graphene Oxide/Gold electrodes	Anti-AFB <sub>1</sub> Ab immobilized covalently on the electrode	0,23	0,5–5	(Srivastava et al. 2014)
Άμεση μη φαραδαϊκή εμπέδηση	Nanocomposite of reduced graphene oxide with polypyrrole and pyrrolepropylic acid	Anti-AFB <sub>1</sub> Ab immobilized covalently on the sensor	0,00001	0,00001–0,01	(Wang et al. 2015)
Άμεση μη φαραδαϊκή εμπέδηση	Platinum electrodes modified with polyaniline and polystyrene sulphonic acid	Anti-AFB <sub>1</sub> Ab electrostatically attached on the electrodes	100	-	(Owino et al. 2007)
Άμεση φαραδαϊκή εμπέδηση	Gold electrodes modified with bovine serum albumin	Anti-AFB <sub>1</sub> Ab immobilized covalently on the sensor	0,5	1–20	(Badea et al. 2016)
Άμεση εμπέδηση	Gold electrodes modified with carbomethyl-dextran	Anti-AFB <sub>1</sub> Ab immobilized covalently on Au electrodes	0,5 (Πρότυπα διαλύματα)	0,5–10 (Πρότυπα διαλύματα)	<b>Παρούσα μελέτη</b>

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των συγκεντρώσεων αφλατοξίνης B1 σε άγνωστα δείγματα φιστικιών και ο αισθητήρας είχε ικανοποιητική επιλεκτικότητα έναντι της ωχρατοξίνης A και αφλατοξίνης M1. Περαιτέρω εργασίες βελτίωσης για τον ανοσοαισθητήρα όχι μόνο θα καθορίσουν την εφαρμογή του για την ανίχνευση αφλατοξίνης B1, αλλά θα είναι επίσης χρήσιμες στην κατανόηση του μηχανισμού και της ηλεκτροχημικής διεπιφανειακής μοντελοποίησης της βιομοριακής αναγνώρισης του ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα. Μια τέτοια μελλοντική έρευνα θα στοχεύει στη βελτίωση της ευαισθησίας, καθώς και στην επίτευξη ενός πολύ χαμηλότερου ορίου ανίχνευσης, προκειμένου να εφαρμοστεί και αξιοποιηθεί ο αισθητήρας στην ασφάλεια των τροφίμων και την παρακολούθηση της ποιότητας σε σχετικά με την παρουσία μυκοτοξινών.

Ακόμη, το σύστημα απαιτεί εκτεταμένη μελέτη, σε ότι αφορά την ακινητοποίηση του αντισώματος, για εφαρμογές σε πραγματικό χρόνο σε αγρούς. Διάφορες συσκευές, όπως μετρητές LCR και αναλυτές σύνθετης αντίστασης, έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με εμπεδημετρικούς ανοσοαισθητήρες για ανίχνευση. Παρόλο που παρέχουν πολλά οφέλη, όπως χαμηλό κόστος και υψηλή ευαισθησία, η διαδικασία μέτρησης είναι χρονοβόρα, δύσκολη για αυτόνομες μετρήσεις και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ευρύ φάσμα συχνοτήτων (Prodromidis 2007). Οι σύγχρονες τάσεις οδηγούν στη ζήτηση για επιτόπια ταυτόχρονη

ημι-ποσοτικοποίηση πολλών διαφορετικών μυκοτοξινών στα τρόφιμα (Xu et al. 2018). Προκειμένου να επιτευχθεί ένα πολύ χαμηλότερο όριο αντίχνευσης, μελλοντικά θα μπορούσε να διερευνηθεί η βελτιστοποίηση των αναλυτικών συνθηκών του ανοσοαισθητήρα, όπως pH, θερμοκρασία, χρόνος επώασης και χρήση διαφορετικών παραγόντων αποκλεισμού, αλλά και η επιλεκτικότητα του αισθητήρα, χρησιμοποιώντας και άλλες μυκοτοξίνες. Ορισμένες κατασκευαστικές πτυχές, όπως η συγκέντρωση CM-δεξτράνης και το πάχος του στρώματος αυτής, θα μπορούσαν επίσης να βελτιστοποιηθούν (Shynkarenko et al. 2015). Ο ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας που δημιουργήθηκε στην παρούσα ερευνητική ενότητα, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, έρχεται να ενισχύσει το ευρύ φάσμα της έρευνας που έχει διεξαχθεί στον τομέα της εφαρμογής ηλεκτροχημικών ανοσοαισθητήρων για τον προσδιορισμό και τον έλεγχο των μυκοτοξινών (Gurban et al. 2017, Evtugyn et al. 2019).

## Κεφάλαιο 8. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρουσία αφλατοξινών στα τρόφιμα, αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Η διαχείριση των αφλατοξινών είναι ένα περίπλοκο ζήτημα και θα πρέπει να αντιμετωπίζεται πολύπλευρα. Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, με βάση τις κύριες στρατηγικές διαχείρισης αφλατοξινών που κρίνεται ότι είναι η βιολογική αντιμετώπιση με χρήση μη τοξικογόνων στελεχών του μύκητα *A. flavus*, ενδημικών επιφυτικών ζυμών και βακτηρίων, η χημική αντιμετώπιση με χρήση εγκεκριμένων φυτοπροστατευτικών χημικών προϊόντων, η εφαρμογή μοντέλων για την πρόβλεψη της μόλυνσης από αφλατοξίνες με σκοπό την αποφυγή της μόλυνσης, αλλά και η χρήση σύγχρονων καινοτόμων μεθόδων και εργαλείων για την έγκαιρη ανίχνευση μολυσμένων δειγμάτων όπως οι βιοαισθητήρες, δημιουργήθηκε και προτείνεται ένα ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης αφλατοξινών για την καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού. Όλες οι προαναφερθείσες στρατηγικές μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στην διαχείριση αφλατοξινών σε προσυλλεκτικό στάδιο. Η μελλοντική ενσωμάτωση των τεχνικών και μεθόδων αυτών, σε σύγχρονα συστήματα διαχείρισης και υποβοήθησης λήψης αποφάσεων (Decision Support Systems (DSSs)) είναι ιδιαίτερα σημαντική για την παραγωγή ασφαλών προϊόντων, απαλλαγμένων από αφλατοξίνες. Από την παρούσα μελέτη προκύπτει μια πρόταση ενός ολοκληρωμένου προσυλλεκτικού συστήματος διαχείρισης αφλατοξινών για την καλλιέργεια του κελυφωτού φιστικιού, σκοπεύοντας στην αποφυγή της μόλυνσης των φιστικιών από αφλατοξίνες.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (IARC), International Agency for Research on Cancer. 2002. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 100F.
- Abbas, H. K., C. Accinelli, and W. T. Shier. 2017. "Biological control of aflatoxin contamination in U.S. crops and the use of bioplastic formulations of *Aspergillus flavus* biocontrol strains to optimize application strategies." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* no. 65 (33):7081-7087. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01452.
- Abbas, H. K., J. R. Wilkinson, R. M. Zablotowicz, C. Accinelli, C. A. Abel, H. A. Bruns, and M. A. Weaver. 2009. "Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn." *Toxin Reviews* no. 28 (2-3):142-153. doi: 10.1080/15569540903081590.
- Abbas, H. K., R. M. Zablotowicz, H. A. Bruns, and C. A. Abel. 2006. "Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates." *Biocontrol Science and Technology* no. 16 (5):437-449. doi: 10.1080/09583150500532477.
- Abbas, H. K., R. M. Zablotowicz, and M. A. Locke. 2004. "Spatial variability of *Aspergillus flavus* soil populations under different crops and corn grain colonization and aflatoxins." *Canadian Journal of Botany* no. 82:1768-1775. doi: 10.1139/B04-131.
- Abdel-Hadi, A., D. Carter, and N. Magan. 2010. "Temporal monitoring of the *nor-1 (aflD)* gene of *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin B1 production during storage of peanuts under different water activity levels." *Journal of Applied Microbiology* no. 109:1914-1922. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04820.x.
- Abdel-Hadi, A., D. Carter, and N. Magan. 2011. "Discrimination between aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* strains from Egyptian peanuts using molecular and analytical techniques." *World Mycotoxin Journal* no. 4 (1):69-77.
- Abdel-Hadi, A., M. Schmidt-Heydt, R. Parra, R. Geisen, and N. Magan. 2012. "A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*." *Journal of The Royal Society Interface* no. 9:757-767. doi: 10.1098/rsif.2011.0482.
- Abdeljalil, N. O. B., J. Vallance, J. Gerbore, E. Bruez, and G. Martins. 2016. "Biocontrol of *Rhizoctonia* Root Rot in tomato and enhancement of plant growth using Rhizobacteria naturally associated to tomato." *Journal of Plant Pathology & Microbiology* no. 7 (356). doi: 10.4172/2157-7471.1000356.
- Adányi, N., I. A. Levkovets, S. Rodriguez-Gil, A. Ronald, M. Váradi, and I. Szendro. 2007. "Development of immunosensor based on OWLS technique for determining Aflatoxin B1 and Ochratoxin A." *Biosensors and Bioelectronics* no. 22 (797-802).
- Adebo, O. A., P. B. Njobeh, A. S. Adeboye, J. A. Adebiyi, S. S. Sobowale, O. M. Ogundele, and E. Kayitesi. 2018. "Advances in fermentation technology for novel food products." In *Innovations in technologies for fermented food and beverage industries, food microbiology and food safety*, edited by S. K. Panda and P. H. Shetty. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature.

- Adegoke, G. O., and P. Letuma. 2013. *Strategies for the prevention and reduction of mycotoxins in developing countries*: InTech.
- Adegoke, G.O. 2004. *Understanding Food Microbiology*. 2nd ed. Ibadan, Nigeria: Alleluia Ventures.
- Adenle, A. A., K. Wedig, and H. Azadi. 2019. "Sustainable agriculture and food security in Africa: The role of innovative technologies and international organizations." *Technology in Society* no. 58 (101143).
- Adetuniji, M. C., O. O. Atanda, C. N. Ezekiel, A. O. Dipeolu, S. V. A. Uzochukwu, J. Oyedepo, and C. A. Chilaka. 2014. "Distribution of mycotoxins and risk assessment of maize consumers in five agroecological zones of Nigeria." *European Food Research and Technology* no. 239 (2):287-296. doi: 10.1007/s00217-014-2221-0.
- Afolabi, C. G., P. S. Ojiambo, E. J. A. Ekpo, A. Menkir, and R. Bandyopadhyay. 2007. "Evaluation of maize inbred lines for resistance to *Fusarium* ear rot and fumonisin accumulation in grain in tropical Africa." *Plant Disease* no. 91 (3):279-286. doi: 10.1094/PDIS-91-3-0279.
- Afsah-Hejri, L. 2013. "Saprophytic yeasts: Effective biocontrol agents against *Aspergillus flavus*." *International Food Research Journal* no. 20 (6):3403-3409.
- Afshari, H., A. Tajabadipour, H. Hokmabadi, and M. Mohamadi moghadam. 2009. "Determining the chilling requirements of four pistachio cultivars in Semnan province (Iran)." *African Journal of Agricultural Research* no. 4 (2):55-59.
- Agbetiameh, D., A. Ortega-Beltran, R. T. Awuah, J. Atehnkeng, Md-Sajedul Islam, K. A. Callicott, P. J. Cotty, and R. Bandyopadhyay. 2019. "Potential of atoxigenic *Aspergillus flavus* Vegetative Compatibility Groups associated with maize and groundnut in Ghana as biocontrol agents for aflatoxin management." *Frontiers in Microbiology* no. 10 (2069). doi: 10.3389/fmicb.2019.02069.
- Ahemad, M., and M. S. Khan. 2011. "Effects of insecticides on plant-growth-promoting activities of phosphate solubilizing rhizobacterium *Klebsiella* sp. strain PS19." *Pesticide Biochemistry and Physiology* no. 100 (1):51-56.
- Ahmad, I., and S. Iram. 2008. "Effect of zero and conventional tillage on the soil mycoflora of rice-wheat cropping system." *Archives of Phytopathology and Plant Protection* no. 41 (1):67-74. doi: 10.1080/03235400600662335.
- Aktas, T., and R. Polat. 2007. "Changes in the drying characteristics and water activity values of selected pistachio cultivars during hot air drying." *Journal of Food Process Engineering* no. 30 607-624.
- Al-Saad, L. A., A. I. Al-Badran, S. A. Al-Jumayli, N. Magan, and A. Rodríguez. 2016. "Impact of bacterial biocontrol agents on aflatoxin biosynthetic genes, *aflD* and *aflR* expression, and phenotypic aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* under different environmental and nutritional regimes." *International Journal of Food Microbiology* no. 217:123-129. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.016.
- Alaniz Zanon, M. S., M. L. Chiotta, G. Giaj-Merlera, G. Barros, and S. Chulze. 2013. "Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts." *International Journal of Food Microbiology* no. 162:220-225. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.017.



- Alberts, J. F., Y. Engelbrecht, P. S. Steyn, W. H. Holzapfel, and W. H. van Zyl. 2006. "Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures." *International Journal of Food Microbiology* no. 109:121-126. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.019.
- Aldars-García, L., A. J. Ramos, V. Sanchis, and S. Marín. 2015. "An attempt to model the probability of growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* under non-isothermal conditions in pistachio nuts." *Food Microbiology* no. 51:117-129. doi: 10.1016/j.fm.2015.05.013.
- Aldars-García, L., V. Sanchis, A. J. Ramos, and S. Marín. 2017a. "Single vs multiple-spore inoculum effect on growth kinetic parameters and modeled probabilities of growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* on pistachio extract agar." *International Journal of Food Microbiology* no. 243 28–35. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.026.
- Aldars-García, L., V. Sanchis, A. J. Ramos, and S. Marín. 2017b. "Time-course of germination, initiation of mycelium proliferation and probability of visible growth and detectable AFB1 production of an isolate of *Aspergillus flavus* on pistachio extract agar." *Food Microbiology* no. 64:104-111.
- Amaiike, S., and N. P. Keller. 2011. "*Aspergillus flavus*." *Annual Review of Phytopathology* no. 49:107-133.
- Angioni, A., P. Caboni, A. Garau, A. Farris, D. Orro, M. Budroni, and P. Cabras. 2007. "In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* no. 55 (5):2043-2048.
- Anjaiah, V., R. P. Thakur, and N. Koedam. 2006. "Evaluation of bacteria and *Trichoderma* for biocontrol of pre-harvest seed infection by *Aspergillus flavus* in groundnut." *Biocontrol Science and Technology* no. 16 (4):431-436.
- Apostolou, T., S. Mavrikou, N.-K. Denaxa, G. Paivana, P. A. Roussos, and S. Kintzios. 2019. "Assessment of cypermethrin residues in tobacco by a bioelectric recognition assay (BERA) Neuroblastoma Cell-Based Biosensor." *Chemosensors* no. 7 (58). doi: 10.3390/chemosensors7040058.
- Arendrup, M. C. 2014. "Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*." *Clinical Microbiology and Infection* no. 20 (6):42-48. doi: 10.1111/1469-0691.12513.
- Arfaoui, M., J. Vallance, E. Bruez, A. Rezgui, I. Melki, S. Chebil, N. Sadfi-Zouaoui, and P. Rey. 2019. "Isolation, identification and in vitro characterization of grapevine rhizobacteria to control ochratoxigenic *Aspergillus* spp. on grapes." *Biological Control* no. 129:201-211.
- Arizona Cotton Research and Protection Council, Phoenix Arizona. 2012. *Aspergillus flavus* AF36. edited by Fungicide and Rodenticide USA Federal Insecticide. USA.
- Arras, G. 1996. "Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits." *Postharvest Biology and Technology* no. 8 (3):191-198.
- Atehnkeng, J., M. Donner, P. S. Ojiambo, B. Ikotun, J. Augusto, P. J. Cotty, and R. Bandyopadhyay. 2015. "Environmental distribution and genetic diversity of vegetative compatibility groups determine biocontrol strategies to mitigate aflatoxin contamination of maize by *Aspergillus flavus*." *Microbial Biotechnology* no. 9 (1):75-88. doi: 10.1111/1751-7915.12324.
- Atehnkeng, J., P. S. Ojiambo, P. J. Cotty, and R. Bandyopadhyay. 2014. "Field efficacy of a mixture of atoxigenic *Aspergillus flavus* Link: Fr vegetative compatibility groups in preventing aflatoxin

- contamination in maize (*Zea mays* L.)." *Biological Control* no. 72:62-70. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.02.009.
- Atehnkeng, J., P. S. Ojiambo, M. Donner, T. Ikotun, R. A. Sikora, P. J. Cotty, and R. Bandyopadhyay. 2008b. "Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria." *International Journal of Food Microbiology* no. 122:74-84.
- Atehnkeng, J., P. S. Ojiambo, T. Ikotun, R. A. Sikora, P. J. Cotty, and R. Bandyopadhyay. 2008a. "Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize." *Food Additives and Contaminants* no. 25 (10):1264–1271. doi: 10.1080/02652030802112635.
- Badea, M., L. Floroian, P. Restani, and M. Moga. 2016. "Simple surface functionalization strategy for immunosensing detection of aflatoxin B1." *International Journal of Electrochemical Science* no. 11:6719-6734. doi: 10.20964/2016.08.21.
- Bahadir, E. B., and M. K. Sezgintürk. 2016. "A review on impedimetric biosensors." *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* no. 44:248-262. doi: 10.3109/21691401.2014.942456.
- Bandyopadhyay, R., J. Atehnkeng, A. Ortega-Beltran, A. Akande, T. D. O. Falade, and P. J. Cotty. 2019. "“Ground-Truthing” efficacy of biological control for aflatoxin mitigation in farmers’ fields in Nigeria: From field trials to commercial usage, a 10-year study." *Frontiers in Microbiology* no. 10:2528. doi: 10.3389/fmicb.2019.02528.
- Bandyopadhyay, R., S. Kiewnick, J. Atehnkeng, M. Donner, P. J. Cotty, and K. Hell. 2005. Biological control of aflatoxin contamination in maize in Africa. In *Conference on International Agricultural Research for Development*. Stuttgart-Hohenheim.
- Barrera, J. F. 2020. "Introduction: Beyond IPM." In *Beyond IPM: Introduction to the Theory of Holistic Pest Management. Sustainability in Plant and Crop Protection*. Cham, Switzerland: Springer.
- Barros, G., M. L. Chiotta, A. Torres, and S. Chulze. 2006. "Genetic diversity in *Aspergillus parasiticus* population from the peanut agroecosystem in Argentina." *Letters in Applied Microbiology* no. 42:560-566.
- Barzman, M., P. Bärberi, A. Nicholas, E. Birch, P. Boonekamp, S. Dachbrodt-Saaydeh, B. Graf, B. Hommel, J. E. Jensen, J. Kiss, P. Kudsk, J. R. Lamichhane, A. Messéan, A.-C. Moonen, A. Ratnadass, P. Ricci, J.-L. Sarah, and M. Sattin. 2015. "Eight principles of integrated pest management." *Agronomy for Sustainable Development* no. 35:1199–1215. doi: 10.1007/s13593-015-0327-9.
- Battilani, P. 2016. "Recent advances in modeling the risk of mycotoxin contamination in crops." *Current Opinion in Food Science* no. 11:10-15. doi: 10.1016/j.cofs.2016.08.009.
- Battilani, P., C. Barbano, S. Marin, V. Sanchis, Z. Kozakiewicz, and N. Magan. 2006. "Mapping of *Aspergillus* Section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis." *International Journal of Food Microbiology* no. 111:S72-S82. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.014.

- Battilani, P., and M. Camardo Leggieri. 2015a. "Predictive modelling of aflatoxin contamination to support maize chain management." *World Mycotoxin Journal* no. 8 (2):161-170. doi: 10.3920/WMJ2014.1740.
- Battilani, P., and M. Camardo Leggieri. 2015b. "OTA-Grapes: A mechanistic model to predict Ochratoxin A risk in grapes, a step beyond the systems approach." *Toxins* no. 7:3012-3029. doi: 10.3390/toxins7083012.
- Battilani, P., M. Camardo Leggieri, V. Rossi, and P. Giorni. 2013. "AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 contamination in maize." *Computers and Electronics in Agriculture* no. 94:38–46. doi: 10.1016/j.compag.2013.03.005.
- Battilani, P., A. Logrieco, P. Giorni, G. Cozzi, T. Bertuzzi, and A. Pietri. 2004. "Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy." *Journal of the Science of Food and Agriculture* no. 84:1736–1740. doi: 10.1002/jsfa.1875.
- Battilani, P., A. Pietri, C. Barbano, A. Scandolara, T. Bertuzzi, and A. Marocco. 2008. "Logistic regression modeling of cropping systems to predict fumonisin contamination in maize." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* no. 56:10433–10438. doi: 10.1021/jf801809d.
- Battilani, P., V. Rossi, P. Giorni, A. Pietri, A. Gualla, H. J. Van der Fels-Klerx, C. J. H. Booij, A. Moretti, A. Logrieco, F. Miglietta, P. Toscano, M. Miraglia, B. De Santis, and C. Brera. 2012. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. edited by EFSA Supporting Publications EFSA Scientific Report.
- Battilani, P., P. Toscano, H. J. Van der Fels-Klerx, A. Moretti, M. Camardo Leggieri, C. Brera, A. Rortais, T. Goumperis, and T. Robinson. 2016. "Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change." *Scientific Reports* no. 6 (24328). doi: 10.1038/srep24328
- Bautista-Rosales, P. U., M. Calderon-Santoyo, R. Servín-Villegas, N. A. Ochoa-Álvarez, and J. A. Ragazzo-Sánchez. 2013. "Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes." *Biological Control* no. 65 (3):293-301.
- Bayman, P., J. L. Baker, and N. E. Mahoney. 2002. "*Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations." *Mycopathologia* no. 155 (3):161-169.
- Bayman, P., and P. J. Cotty. 1990. "Triadimenol stimulates aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in vitro." *Mycological Research* no. 94 (8):1023-1025.
- Bayman, P., and P. J. Cotty. 1991a. "Improved media for selecting nitrate-nonutilizing mutants in *Aspergillus flavus*." *Mycologia* no. 83 (3):311-316. doi: 10.1080/00275514.1991.12026015.
- Bayman, P., and P. J. Cotty. 1991b. "Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field." *Canadian Journal of Botany* no. 69 (8):1707-1711. doi: 10.1139/b91-216.
- Bayman, P., and P. J. Cotty. 1993. "Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: Association with aflatoxin production and morphology." *Canadian Journal of Botany* no. 71 (1):23-31. doi: 10.1139/b93-003.

- Bean, G. A., and A. Southall. 1983. "Effect of Pyridazinone herbicides on growth and aflatoxin release by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*." *Applied And Environmental Microbiology*:503-505.
- Beauchat, L. R. 1978. "Relationship of water activity to moisture content in tree nuts." *Journal of Food Science* no. 43:754-758.
- Bejaoui, H., F. Mathieu, P. Taillandier, and A. Lebrihi. 2004. "Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains." *Journal of Applied Microbiology* no. 97 (5):1038-1044.
- Belloch, C., A. Querol, M. D. García, and E. Barrio. 2000. "Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* no. 50 (1):405-416.
- Berghofer, L. K., A. D. Hocking, D. Miskelly, and E. Jansson. 2003. "Microbiology of wheat and flour milling in Australia." *International Journal of Food Microbiology* no. 85:137-149.
- Bhardwaj, H., C. Singh, M. kumar Pandey, and G. Sumana. 2016. "Star shaped zinc sulphide quantum dots self-assembled monolayers: Preparation and applications in food toxin detection." *Sensors and Actuators B: Chemical* no. 231:624–633.
- Bhardwaj, H., G. Sumana, and C. A. Marquette. 2020. "A label-free ultrasensitive microfluidic surface Plasmon resonance biosensor for Aflatoxin B1 detection using nanoparticles integrated gold chip." *Food Chemistry* no. 307 (125530). doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125530.
- Bhat, H. A., K. Ahmad, R. A. Ahanger, N. A. Qazi, N. A. Dar, and S. A. Ganie. 2013. " Status and symptomatology of Alternaria leaf blight (*Alternaria alternata*) of Gerbera (*Gerbera jamsonii*) in Kashmir valley." *African Journal of Agricultural Research* no 8(9): 819-823. doi: 10.5897/AJAR12.1766
- Bhatnagar, D. 2012. The "omics" approach for solving the pre-harvest aflatoxin contamination problem: understanding the genomics and metabolomics of the fungus and proteomics of the affected corn crop. In *Biotechnology Summit*, edited by F. Fernández-Luqueño, F. López-Valdez and S. Lozano-Muñiz. Mérida, Yucatán, Mexico.
- Bhatnagar, D., K. Rajasekaran, M. Gilbert, J. W. Cary, and N. Magan. 2018. "Advances in molecular and genomic research to safeguard food and feed supply from aflatoxin contamination." *World Mycotoxin Journal* no. 11 (1):47-72. doi: 10.3920/WMJ2017.2283.
- Bizaj, E., J. Mavri, F. Čuš, and A. Raspor. 2016. "Removal of ochratoxin A in *Saccharomyces cerevisiae* liquid cultures." *South African Journal of Enology and Viticulture* no. 30 (2):151-155.
- Blackwell, B. A., J. T. Gilliam, M. E. Savard, J. David Miller, and J. P. Duvick. 1999. "Oxidative deamination of hydrolyzed fumonisin B1 (AP1) by cultures of *Exophiala spinifera*." *Natural Toxins* no. 7 (1):31-38.
- Blandino, M., A. Reyneri, F. Vanara, M. Pascale, M. Haidukowski, and C. Campagna. 2009. "Management of fumonisin contamination in maize kernels through the timing of insecticide application against the European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübner." *Food Additives and Contaminants* no. 26:1501-1514. doi: 10.1080/02652030903207243.

- Blandino, M., V. Scarpino, M. Sulyok, R. Krska, and A. Reyneri. 2017. "Effect of agronomic programmes with different susceptibility to deoxynivalenol risk on emerging contamination in winter wheat." *European Journal of Agronomy* no. 85:12-24.
- Bock, C. H., and P. J. Cotty. 1999. "Wheat seed colonized with atoxigenic *Aspergillus flavus*: Characterization and production of a biopesticide for aflatoxin control." *Biocontrol Science and Technology* no. 9:529-543.
- Bonaterra, A., M. Mari, L. Casalini, and E. Montesinosa. 2003. "Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism." *International Journal of Food Microbiology* no. 84:93-104.
- Bonmassar, G., S. Iwaki, G. Goldmakher, L. M. Angelone, J. W. Belliveau, and M. H. Lev. 2010. "On the Measurement of Electrical Impedance Spectroscopy (EIS) of the Human Head." *International Journal of Bioelectromagnetism* no. 12:32-46.
- Brenneman, T. B., D. M. Wilson, and R. W. Beaver. 1993. "Effects of Diniconazole on *Aspergillus* populations and aflatoxin formation in peanut under irrigated and nonirrigated conditions." *Plant Disease* no. 77:608-612. doi: 10.1094/PD-77-0608.
- Brodhagen, M., D. I. Tsitsigiannis, E. Hornung, C. Goebel, I. Feussner, and N. P. Keller. 2008. "Reciprocal oxylipin-mediated cross-talk in the *Aspergillus*-seed pathosystem." *Molecular Microbiology* no. 67 (2):378-391. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06045.x.
- Brown, R. L., Z. Y. Chen, A. Menkir, T. E. Cleveland, K. Cardwell, J. Kling, and D. G. White. 2001. "Resistance to aflatoxin accumulation in kernels of maize inbreds selected for ear rot resistance in West and Central Africa." *Journal of Food Protection* no. 64 (3):396-400.
- Brown, R. L., P. J. Cotty, and T. E. Cleveland. 1991. "Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*." *Journal of Food Protection* no. 54 (8):623-626.
- Brown, R. L., W. P. Williams, G. L. Windham, A. Menkir, and Z. Y. Chen. 2016. "Evaluation of African-bred maize germplasm lines for resistance to aflatoxin accumulation." *Agronomy* no. 6 (2):24. doi: 10.3390/agronomy6020024.
- Buck, J. W., and L. L. Burpee. 2002. "The effects of fungicides on the phylloplane yeast populations of creeping bentgrass." *Canadian Journal of Microbiology* no. 48 (6):522-529.
- Bučko, M., M. Mislovičová, J. Nahálka, A. Vikartovská, J. Šefčovičová, J. Katrlík, J. Tkáč, P. Gemeiner, I. Lacík, and V. Štefuca. 2012. "Immobilization in biotechnology and biorecognition: From macro- to nanoscale systems." *Chemical papers* no. 66:983-998.
- Bueno, D. J., C. H. Casale, R. P. Pizzolitto, M. A. Salvano, and G. Oliver. 2007. "Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model." *Journal of Food Protection* no. 70 (9):2148-2154.
- Bui-Klimke, T. R., H. Guclu, T. W. Kensler, J.-M. Yuan, and F. Wu. 2014. "Aflatoxin regulations and global pistachio trade: Insights from social network analysis." *PLoS ONE* no. 9 (3):92149. doi: 10.1371/journal.pone.0092149.
- Čadež, N., J. Zupan, and P. Raspor. 2010. "The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries." *FEMS Yeast Research* no. 10 (5):619-630. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00635.x.



- Cai, J., I. N. Roberts, and M. D. Collins. 1996. "Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* no. 46 (2):542-549.
- Calvo, A. M., and J. W. Cary. 2015. "Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology." *Frontiers in Microbiology* no. 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00062.
- Camardo Leggieri, M., T. Bertuzzi, A. Pietri, and P. Battilani. 2015. "Mycotoxin occurrence in maize produced in Northern Italy over the years 2009-2011: focus on the role of crop related factors." *Phytopathologia Mediterranea* no. 54 (2):212-221.
- Campbell, B. C., R. J. Molyneux, and T. F. Schatzki. 2003. "Current research on reducing pre- and post-harvest aflatoxin contamination of U.S. almond, pistachio, and walnut." *Journal of Toxicology: Toxin reviews* no. 22 (2-3):225-266. doi: 10.1081/TXR-120024093.
- Canavar, Ö., and M. Ali Kaynak. 2013. "Prevention of pre-harvest aflatoxin production and the effect of different harvest times on peanut (*Arachis hypogaea* L.) fatty acids." *Food Additives and Contaminants: Part A* no. 30 (10):1807-1818. doi: 10.1080/19440049.2013.818720.
- Canbaz, M. Ç., and M. K. Sezgintürk. 2014. "Fabrication of a highly sensitive disposable immunosensor based on indium tin oxide substrates for cancer biomarker detection." *Analytical Biochemistry* no. 446:9-18. doi: 10.1016/j.ab.2013.10.014.
- Cao, J., H. Zhang, Q. Yang, and R. Ren. 2013. "Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples." *International Journal of Food Microbiology* no. 162 (2):167-173.
- Caputo, D., G. De Cesare, C. Fanelli, A. Nascetti, A. Ricelli, and R. Scipinotti. 2007. "Innovative Detection System of Ochratoxin A by Thin Film Photodiodes." *Sensors* no. 7:1317-1322.
- Cary, J. W., K. Rajasekaran, R. L. Brown, M. Luo, Z.-Y. Chen, and D. Bhatnagar. 2011. "Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed." *Toxins* no. 3:678-696. doi: 10.3390/toxins3060678.
- Castoria, R., F. De Curtis, G. Lima, L. Caputo, S. Pacifico, and V. De Cicco. 2001. "*Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action." *Postharvest Biology and Technology* no. 22 (1):7-17.
- Castoria, R., L. Mannina, R. Durán-Patrón, F. Maffei, A. P. Sobolev, D. V. De Felice, and S. A. Wright. 2011. "Conversion of the mycotoxin patulin to the less toxic desoxypatulinic acid by the biocontrol yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* strain LS11." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* no. 59 (21):11571-11578.
- Caten, C. E., and J. L. Jinks. 1966. "Heterokaryosis: its significance in wild homothallic ascomycetes and fungi imperfecti." *Transactions of the British Mycological Society* no. 49:81-93.
- Cecchini, F., M. Morassut, E. G. Moruno, and R. Di Stefano. 2006. "Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must." *Food Microbiology* no. 23 (5):411-417.
- Chala, A., A. Mohammed, A. Ayalew, and H. Skinnies. 2013. "Natural occurrence of aflatoxins in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) from eastern Ethiopia." *Food Control* no. 30:602-605. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.08.023.



- Champeil, A., J.-F. Fourbet, T. Doré, and L. Rossignol. 2004. "Influence of cropping system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat." *Crop Protection* no. 23 (6):531-537. doi: 10.1016/j.cropro.2003.10.011.hal-01361990.
- Chauhan, R., P. R. Solanki, J. Singh, I. Mukherjee, T. Basu, and B. D. Malhotra. 2015. "A novel electrochemical piezoelectric label free immunosensor for Aflatoxin B1 detection in groundnut." *Food Control* no. 52:60-70.
- Chauhan, Y. S., G. C. Wright, R. C. N. Rachaputi, D. Holzworth, A. Broome, S. Krosch, and M. J. Robertson. 2010. "Application of a model to assess aflatoxin risk in peanuts." *Journal of Agricultural Science* no. 148:341-351. doi: 10.1017/S002185961000002X.
- Chauhan, Y., J. Tatnell, S. Krosch, J. Karanja, B. Gnonlonfin, I. Wanjuki, J. Wainaina, and J. Harvey. 2015. "An improved simulation model to predict pre-harvest aflatoxin risk in maize." *Field Crops Research* no. 178:91-99. doi: 10.1016/j.fcr.2015.03.024.
- Chen, Y. L., X. W. Mao, J. X. Wang, L. Y. Wu, M. G. Zhou, and Y.-P. Hou. 2018. "Activity of the dinitroaniline fungicide fluazinam against *Bipolaris maydis*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* no. 148:8-15. doi: 10.1016/j.pestbp.2018.03.005.
- Chen, Y., H.-M. Peng, X. Wang, B.-Q. Li, M.-Y. Long, and S.-P. Tian. 2017. "Biodegradation mechanisms of patulin in *Candida guilliermondii*: An itraq-based proteomic analysis." *Toxins* no. 9 (2):48. doi: 10.3390/toxins9020048.
- Chen, Z.-Y., R. L. Brown, K. E. Damann, and T. E. Cleveland. 2007. "Identification of maize kernel endosperm proteins associated with resistance to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*." *Phytopathology* no. 97:1094-1103.
- Chen, Z.-Y., R. L. Brown, K. E. Damann, and T. E. Cleveland. 2010. "PR10 expression in maize and its effect on host resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production." *Molecular Plant Pathology* no. 11:69-81.
- Chen, Z.-Y., R. L. Brown, A. Menkir, and T. E. Cleveland. 2012. "Identification of resistance-associated proteins in closely-related maize lines varying in aflatoxin accumulation." *Molecular Breeding* no. 30:53-68.
- Chen, Z.-Y., R. L. Brown, K. Rajasekaran, K. E. Damann, and T. E. Cleveland. 2006. "Identification of a maize kernel pathogenesis-related protein and evidence for its involvement in resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production." *Phytopathology* no. 96 (1):87-95. doi: 10.1094/PHYTO-96-0087.
- Cheraghali, A. M., H. Yazdanpanah, N. Doraki, G. Abouhossain, M. Hassibi, S. Ali-abadi, M. Aliakbarpoor, M. Amirahmadi, A. Askarian, N. Fallah, T. Hashemi, M. Jalali, N. Kalantari, E. Khodadadi, B. Maddah, R. Mohit, M. Mohseny, Z. Phaghihy, A. Rahmani, L. Setoodeh, E. Soleimany, and F. Zamanian. 2007. "Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts." *Food and Chemical Toxicology* no. 45:812-816. doi: 10.1016/j.fct.2006.10.026.
- Chitzanidis, A. 2010. From Asia to Aigina: The story of the pistachio tree. Paper read at XIV GREMPA, Meeting on Pistachios and Almonds.

- Choudhary, D. K., and B. N. Johri. 2009. "Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR)." *Microbiological Research* no. 164:493-513. doi: 10.1016/j.micres.2008.08.007.
- Chowdhary, A., S. Kathuria, J. Xu, and J. F. Meis. 2013. "Emergence of Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural Azole use creates an increasing threat to human health." *PLoS Pathogens* no. 9 (10):e1003633. doi: 10.1371/journal.ppat.1003633.
- Chowdhary, A., S. Kathuria, J. Xu, C. Sharma, G. Sundar, P. Kumar Singh, S. N. Gaur, F. Hagen, C. H. Klaassen, and J. F. Meis. 2012. "Clonal Expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India." *PLoS ONE* no. 7 (12):e52871. doi: 10.1371/journal.pone.0052871.
- Chulze, S. N., J. M. Palazzini, A. M. Torres, G. Barros, M. L. Ponsone, R. Geisen, M. Schmidt-Heydt, and J. Köhle. 2014. "Biological control as a strategy to reduce the impact of mycotoxins in peanuts, grapes and cereals in Argentina." *Food Additives & Contaminants* no. Part A. doi: 10.1080/19440049.2014.984245.
- Cleveland, T. E., P. F. Dowd, A. E. Desjardins, D. Bhatnagar, and P. J. Cotty. 2003. "United States Department of Agriculture-agricultural research service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops." *Pest Management Science* no. 59 629-642. doi: 10.1002/ps.724.
- Coelho, A., M. Celli, E. Sataque Ono, F. Hoffmann, F. Pagnocca, S. Garcia, and E. Hirooka. 2008. "Patulin biodegradation using *Pichia ohmeri* and *Saccharomyces cerevisiae*." *World Mycotoxin Journal* no. 1 (3):325-331.
- Comitini, F., and M. Ciani. 2008. "Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes." *Annals of Microbiology* no. 58 (3):489-493.
- Corassin, C. H., F. Bovo, R. E. Rosim, and C. A. F. Oliveira. 2013. "Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk." *Food Control* no. 31 (1):80-83.
- Cordero-Bueso, G., N. Mangieri, D. Maghradze, R. Foschino, F. Valdetara, J. M. Cantoral, and I. Vigentini. 2017. "Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens." *Frontiers in Microbiology* no. 8:2025. doi: 10.3389/fmicb.2017.02025.
- Correll, J. C., C. J. R. Klittich, and J. F. Leslie. 1987. "Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests." *Phytopathology* no. 77:1640-1646.
- Cotty, P. J. 1988. "Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: influence of pH." *Physiology and Biochemistry* no. 78:1250-1253.
- Cotty, P. J. 1989. "Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton." *Postharvest Pathology and Mycotoxins* no. 79 (7):808-814.
- Cotty, P. J. 1990. "Effect of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on aflatoxin contamination of developing cottonseed." *Plant Disease* no. 74:223-235.
- Cotty, P. J. 1991. "Effect of harvest date on aflatoxin contamination of cottonseed." *Plant Disease* no. 75 (3):312-314.

- Cotty, P. J. 1994. "Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed." *Phytopathology* no. 84 (11):1270-1277. doi: 10.1094/Phyto-84-1270.
- Cotty, P. J. 1997. "Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States." *Mycological Research* no. 101 (6):698-704.
- Cotty, P. J. 2006. *Biocompetitive exclusion of toxigenic fungi, The Mycotoxin Factbook food and feed topics*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Cotty, P. J., and P. Bayman. 1993. "Competitive exclusion of a toxigenic strain of *Aspergillus flavus* by an atoxigenic strain." *Phytopathology* no. 83 (12):1283-1287. doi: 10.1094/Phyto-83-1283.
- Cotty, P. J., and D. Bhatnagar. 1994. "Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzyme." *Applied and Environmental Microbiology*:2248-2251.
- Cotty, P. J., and K. F. Cardwell. 1999. "Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*." *Applied and environmental microbiology* no. 65 (5):2264-2266.
- Cotty, P. J., and R. Jaime-Garcia. 2007. "Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination." *International Journal of Food Microbiology* no. 119:109-115. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.060.
- Cotty, P. J., and J. E. Mellon. 2006. "Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination." *Mycotoxin Research* no. 22 (2):110-117.
- Cotty, P. J., and D. R. Taylor. 2003. Influence of complementation medium composition on vegetative compatibility analyses of *Aspergillus flavus*. Paper read at Proceedings of the American Phytopathological Society Annual Meeting.
- Cove, D. J. 1976. "Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: The selection and characterization of chlorate resistant mutants." *Heredity* no. 36 (2):191-203.
- Cubaiu, L., H. Abbas, A. D. Dobson, M. Budroni, and Q. Migheli. 2012. "A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin a biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*." *Toxins* no. 4 (12):1468-1481.
- Cuero, R. G., J. E. Smith, and J. Lacey. 1987. "Stimulation by *Hyphopichia burtonii* and *Bacillus amyloliquefaciens* of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains." *Applied and Environmental Microbiology* no. 53 (5):1142-1146.
- Cunha, S. C., S. V. M. Sá, and J. O. Fernandes. 2018. "Multiple mycotoxin analysis in nut products: Occurrence and risk characterization." *Food and Chemical Toxicology* no. 114:260-269.
- D'Mello, J. P. F., A. M. C. Macdonald, D. Postel, W. T. P. Dijkma, A. Dujardin, and C. M. Placinta. 1998. "Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens." *European Journal of Plant Pathology* no. 104:741-751.
- Daigle, D. J., and P. J. Cotty. 1995. "Formulating Atoxigenic *Aspergillus flavus* for field release." *Biocontrol Science and Technology* no. 5:175-184.

- Daniel, H. M., and W. Meyer. 2003. "Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts." *International Journal of Food Microbiology* no. 86 (1):61-78.
- Daniel, H. M., T. C. Sorrell, and W. Meyer. 2001. "Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* no. 51 (4):1593-1606.
- Darsanaki, R. K., M. H. Kolavani, M. Mohammad Doost Chakoosari, S. Ebadi Shalkeh, and A. Tajehmiri. 2014. "Biological control of aflatoxin B1 by probiotic bacteria." *Trends in Life Sciences* no. 3 (1).
- Davarani, F. H., M. Ashrafizadeh, R. S. Riseh, E. Ghasemipour Afshar, H. Mohammadi, S. Hamid Razavi, A. Mandegary, and R. Mohammadinejad. 2018. "Antifungal nanoparticles reduce aflatoxin contamination in pistachio." *Pistachio and Health Journal* no. 1 (2):26-33.
- De Curtis, F. , V. De Cicco, M. Haidukowski, M. Pascale, S. Somma, and A. Moretti. 2011. "Effects of agrochemical treatments on the occurrence of *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of maize in Southern Italy." *Field Crops Research* no. 123:161–169. doi: 10.1016/j.fcr.2011.05.012.
- De Curtis, F., D. V. De Felice, G. Ianiri, V. De Cicco, and R. Castoria. 2012. "Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape." *International Journal of Food Microbiology* no. 159 (1):17-24.
- De Felice, D. V., M. Solfrizzo, F. De Curtis, G. Lima, A. Visconti, and R. Castoria. 2008. "Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes." *Phytopathology* no. 98 (12):1261-1270.
- Dean, D. A., T. Ramanathan, D. Machado, and R. Sundararajan. 2008. "Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues." *Journal of Electrostatics* no. 66:165-177. doi: 10.1016/j.elstat.2007.11.005.
- Debode, J., W. Hemelrijck, P. Creemers, and M. Maes. 2013. "Effect of fungicides on epiphytic yeasts associated with strawberry." *Microbiology Open* no. 2 (3):482-491.
- Deepak, M. B., S. P. Jhanvi, and K. A. AnuAppaiah. 2015. "Aflatoxin binding and detoxification by non-saccharomyces yeast a new vista for decontamination." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* no. 4 (5):310-317.
- Dhillon, S., and K. Rama. 2017. "Theory for electrochemical impedance spectroscopy of heterogeneous electrode with distributed capacitance and charge transfer resistance." *Journal of Chemical Sciences* no. 129:1277-1292.
- Dimakopoulou, M., S. E. Tjamos, P. P. Antoniou, A. Pietri, P. Battilani, N. Avramidis, E. A. Markakis, and E. C. Tjamos. 2008. "Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece." *Biological Control* no. 46:158–165. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.04.015.
- Dogi, C. A., R. Armando, R. Ludueña, A. De Moreno de LeBlanc, C. A. R. Rosa, A. Dalcero, and L. Cavaglieri. 2011. "*Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation." *Food Additives & Contaminants: Part A* no. 28 (12):1705-1711.

- Dolezal, A. L., X. Shu, G. R. O'Brien, D. M. Nielsen, C. P. Woloshuk, R. S. Boston, and G. A. Payne. 2014. "Aspergillus flavus infection induces transcriptional and physical changes in developing maize kernels." *Frontiers in Microbiology* no. 5 (384). doi: 10.3389/fmicb.2014.00384.
- Donner, M., J. Atehnkeng, R. A. Sikora, R. Bandyopadhyay, and P. J. Cotty. 2009. "Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria." *Soil Biology & Biochemistry* no. 41:37-44.
- Donner, M., J. Atehnkeng, R. A. Sikora, R. Bandyopadhyay, and P. J. Cotty. 2010. "Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria." *Food Additives & Contaminants* no. 27:576-590.
- Donot, F., A. Fontana, J. C. Baccou, and S. Schorr-Galindo. 2012. "Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction." *Carbohydrate Polymers* no. 87 (2):951-962.
- Dorner, J. W. 2004. "Biological control of aflatoxin contamination of crops." *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* no. 23 (2-3):425-450.
- Dorner, J. W. 2009. "Biological control of aflatoxin contamination in corn using a nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus*." *Journal of Food Protection* no. 72 (4):801-804.
- Doster, M. A., P. J. Cotty, and T. J. Michailides. 2014. "Evaluation of the atoxigenic *Aspergillus flavus* strain AF36 in pistachio orchards." *Plant Disease* no. 98 (7):948-956. doi: 10.1094/PDIS-10-13-1053-RE.
- Doster, M. A., and T. J. Michailides. 1994. "*Aspergillus* molds and aflatoxins in pistachio nuts in California." *Phytopathology* no. 84 (6):583-590. doi: 10.1094/Phyto-84-583.
- Doster, M. A., and T. J. Michailides. 1995. "The relationship between date of hull splitting and decay of pistachio nuts by *Aspergillus* species." *Plant Disease* no. 79 (8):766-769. doi: 10.1094/PD-79-0766.
- Doster, M. A., and T. J. Michailides. 1999. "Relationship between shell discoloration of pistachio nuts and incidence of fungal decay and insect infestation." *Plant Disease* no. 83:259-264.
- Doukas, E. G., A. N. Markoglou, J. G. Vontas, and B. N. Ziogas. 2012. "Effect of DMI-resistance mechanisms on cross-resistance patterns, fitness parameters and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* spore." *Fungal Genetics and Biology* no. 49 792-801. doi: 10.1016/j.fgb.2012.07.008.
- Duan, Y., X. Xiao, T. Li, W. Chen, J. Wang, B. A. Fraaije, and M. Zhou. 2018. "Impact of epoxiconazole on *Fusarium* head blight control, grain yield and deoxynivalenol accumulation in wheat." *Pesticide Biochemistry and Physiology* no. 152:138-147.
- Duong, T. T., T. Brewer, J. Luck, and K. Zander. 2019. "A global review of farmers' perceptions of agricultural risks and risk management strategies." *Agriculture* no. 9 (10). doi: 10.3390/agriculture9010010.
- Dutkiewicz, J., B. Mackiewicz, M. Kinga Lemieszek, M. Golec, C. Skórska, A. Góra-Florek, and J. Milanowski. 2016. "*Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good." *Annals of Agricultural and Environmental Medicine Part II - Deleterious effects: Dustborne endotoxins and allergens - focus on grain dust, other agricultural dusts and wood dust* no. 23 (1):6-29.



- Edlayne, G., A. Simone, and J. D. Felicio. 2009. "Chemical and biological approaches for mycotoxin control: A Review." *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture* no. 1 (2):155-161.
- Egel, D. S., P. J. Cotty, and K. S. Elias. 1994. "Relationships among isolates of *Aspergillus* section *Flavi* that vary in aflatoxin production." *Phytopathology* no. 84:906-912.
- Ehler, L. E. 2006. "Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM." *Pest Management Science* no. 62 (9):787-789. doi: 10.1002/ps.1247.
- Ehrlich, K. C. 2014. "Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations." *Food Microbiology* no. 5:1-9. doi: 10.3389/fmicb.2014.00050.
- Ehrlich, K. C., K. Kobbeman, B. G. Montalbano, and P. J. Cotty. 2007a. "Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand." *International Journal of Food Microbiology* no. 114 153–159. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.007.
- Ehrlich, K. C., B. G. Montalbano, and P. J. Cotty. 2007b. "Analysis of single nucleotide polymorphisms in three genes shows evidence for genetic isolation of certain *Aspergillus flavus* vegetative compatibility groups." *Federation of European Microbiological Societies* no. 268:231–236. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00588.x.
- El-Banna, A. A., M. A. El-Sahn, and M. G. Shehata. 2011. "Yeasts producing killer toxins: An overview." *Alexandria Journal of Food Science and Technology* no. 8 (2):41-53
- Elloumi, O., M. Ghrab, H. Kessentini, and M. Ben Mimoun. 2013. "Chilling accumulation effects on performance of pistachio trees cv. Mateur in dry and warm area climate." *Scientia Horticulturae* no. 159:80-87. doi: 10.1016/j.scienta.2013.05.004.
- Espinel-Ingroff, A., A. Fothergill, J. Peter, M. G. Rinaldi, and T. J. Walsh. 2002. "Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study." *Journal of Clinical Microbiology* no. 40 (9):3204–3208. doi: 10.1128/JCM.40.9.3204–3208.2002.
- Evtugyn, G., and T. Hianik. 2019. "Electrochemical immuno- and aptasensors for mycotoxin determination." *Chemosensors* no. 7 (10).
- Evtugyn, G., A. Porfireva, V. Stepanova, R. Sitdikov, I. Stoikov, D. Nikolelis, and T. Hianik. 2014. "Electrochemical aptasensor based on polycarboxylic macrocycle modified with neutral red for aflatoxin B1 detection." *Electroanalysis* no. 26 (2100).
- Fan, J., Y. Luo, T. J. Michailides, and L. Guo. 2014. "Simultaneous quantification of alleles E198A and H6Y in the  $\beta$ -tubulin gene conferring benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* using a duplex real-time (TaqMan) PCR." *Pest Management Science* no. 70:245-251.
- Fan, Q., S. Tian, Y. Xu, Y. Wang, and A. Jiang. 1999. "Biological control of *Rhizopus* rot of peach fruits by *Candida guilliermondii*." *Acta Botanica Sinica* no. 42 (10):1033-1038.
- Fani, S. R., M. Moradi, C. Probst, H. R. Zamanizadeh, M. Mirabolfathy, M. Haidukowski, and A. F. Logrieco. 2014. "A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio orchards of Iran." *European Journal of Plant Pathology* no. 140:631-642. doi: 10.1007/s10658-014-0499-1.



- Farjood, E., and Z. Banihashemi. 2013. "Incidence of *Aspergillus* species and mycotoxins in dried figs in southern Iran." *Iranian Journal of Plant Pathology* no. 48 (4):183-189.
- Farzaneh, M., Z.-Q. Shi, M. Ahmadzadeh, L.-B. Hu, and A. Ghassempour. 2016. "Inhibition of the *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 contamination on pistachio nut by Fengycin and Surfactin-producing *Bacillus subtilis* UTBSP1." *Plant Pathology Journal* no. 32 (3):209-215. doi: 10.5423/PPJ.OA.11.2015.0250.
- Farzaneh, M., Z.-Q. Shi, A. Ghassempour, N. Sedaghat, M. Ahmadzadeh, M. Mirabolfathy, and M. Javan-Nikkhah. 2012. "Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran." *Food Control* no. 23 100-106. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.06.018.
- Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti, and A. Stazzell-Tallman. 2000. "Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* no. 50 (3):1351-1371.
- Fels-Klerx, H. J. Van Der, S. L. G. E. Burgers, and C. J. H. Booij. 2010. "Descriptive modelling to predict deoxynivalenol in winter wheat in the Netherlands." *Food Additives and Contaminants* no. 27 (5):636-643. doi: 10.1080/19440040903571762.
- Ferguson, L., A. Kader, and J. Thompson. 2005. Harvesting, transporting, processing and grading. In *Pistachio production manual*, edited by Fruit & Nut Research Information Center University of California. Davis, CA, USA.
- Ferguson, L., J. Maranto, and R. Beede. 1995. "Mechanical topping mitigates alternate bearing of "Kerman" pistachios (*Pistacia vera*, L.)." *HortScience* no. 30 (7):1369-1372.
- Ferguson, L., V. Polito, and C. Kallsen. 2005. The pistachio tree; botany and physiology and factors that affect yield. In *Pistachio production manual*, edited by Fruit & Nut Research Information Center University of California. Davis, CA, USA.
- Fleißner, A. 2012. "Hyphal fusion." In *Morphogenesis and pathogenicity in fungi*, edited by J. Pérez-Martín and A. Di Pietro, 43-59. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Fonseca, A., and J. Inacio. 2006. "Phylloplane yeasts." In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts. The Yeast Handbook*, edited by C. Rosa and G. Peter. Berlin: Springer.
- Formenti, S., N. Magan, A. Pietri, and P. Battilani. 2012. "In vitro impact on growth, fumonisins and aflatoxins production by *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus flavus* using anti-fungal compounds and a biological control agent." *Phytopathologia Mediterranea* no. 51 (1):247-256.
- Fountain, J. C., P. Khera, L. Yang, S. N. Nayak, B. T. Scully, R. D. Leef, Z. Y. Chen, R. C. Kemerait, R. K. Varshney, and B. Guo. 2015. "Resistance to *Aspergillus flavus* in maize and peanut: Molecular biology, breeding, environmental stress, and future perspectives." *The Crop Journal* no. 3 (3):229-237. doi: 10.1016/j.cj.2015.02.003.
- Freimoser, F. M., M. P. Rueda-Mejia, B. Tilocca, and Q. Migheli. 2019. "Biocontrol yeasts: mechanisms and applications." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* no. 35 (154). doi: 10.1007/s11274-019-2728-4.

- Frey-Klett, P., P. Burlinson, A. Deveau, M. Barret, M. Tarkka, and A. Sarniguet. 2011. "Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* no. 75:583-609.
- Frisvad, J. C., and T. O. Larsen. 2015. "Chemodiversity in the genus *Aspergillus*." *Applied Microbiology and Biotechnology* no. 99:7859-7877. doi: 10.1007/s00253-015-6839-z.
- Gajbhiye, M. H., and B. P. Kapadnis. 2016. "Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants." *Biocontrol Science and Technology* no. 26 (11):1451-1470. doi: 10.1080/09583157.2016.1213793.
- Gallo, A., M. Solfrizzo, F. Epifani, G. Panzarini, and G. Perrone. 2016. "Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium." *International Journal of Food Microbiology* no. 217:162-169. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.026.
- Gallo, A., G. Stea, P. Battilani, A. F. Logrieco, and G. Perrone. 2012. "Molecular characterization of an *Aspergillus flavus* population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy." *Phytopathologia Mediterranea* no. 51 (1):198-206.
- García-Cela, E., A. J. Ramos, V. Sanchis, and S. Marin. 2011. "Ochratoxigenic moulds and effectiveness of grape field antifungals in a climatic change scenario." *Journal of the Science of Food and Agriculture* no. 92 (7):1455-1461. doi: 10.1002/jsfa.4726.
- García-Cela, E., S. Marin, V. Sanchis, A. Crespo-Sempere, and A. J. Ramos. 2015. "Effect of ultraviolet radiation A and B on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus parasiticus* in grape and pistachio media." *Fungal Biology* no. 119:67-78. doi: 10.1016/j.funbio.2014.11.004.
- Gavilán, R. G. 2005. "The use of climatic parameters and indices in vegetation distribution. A case study in the Spanish Sistema Central." *International Journal of Biometeorology* no. 50 (2):111-120. doi: 10.1007/s00484-005-0271-5.
- Gell, R. M., and I. Carbone. 2019. "HPLC quantitation of aflatoxin B1 from fungal mycelium culture." *Journal of Microbiological Methods* no. 158 14-17. doi: 10.1016/j.mimet.2019.01.008.
- Georgiadou, M., A. Dimou, and S. Yanniotis. 2012. "Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study." *Food Control* no. 26 580-586. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.02.014.
- Georgianna, D. R., N. D. Fedorova, J. L. Burroughs, A. L. Dolezal, J. W. Bok, S. Horowitz-Brown, C. P. Woloshuk, J. Yu, N. P. Keller, and G. A. Payne. 2010. "Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters." *Molecular Plant Pathology* no. 11 (2):213-226.
- Gil-Serna, J., B. Patiño, L. Cortés, M. T. González-Jaén, and C. Vázquez. 2011. "Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244." *International Journal of Food Microbiology* no. 151 (1):113-118.
- Giorni, P., P. Battilani, and N. Magan. 2008. "Effect of solute, matric potential and temperature on *in vitro* growth and sporulation of strains from a new population of *Aspergillus flavus* isolated in Italy." *Fungal Ecology* no. 1 (2-3):102-106.

- Giorni, P., M. Camardo Leggieri, N. Magan, and P. Battilani. 2012. "Comparison of temperature and moisture requirements for sporulation of *Aspergillus flavus* sclerotia on natural and artificial substrates." *Fungal Biology* no. 116:637-642. doi: 10.1016/j.funbio.2012.03.003.
- Giorni, P., N. Magan, A. Pietri, and P. Battilani. 2011. "Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: influence of ecological factors and nutritional substrates " *World Mycotoxin Journal* no. 4 (4):425-432. doi: 10.3920/WMJ2011.1300.
- Giorni, P., U. Rolla, M. Romani, A. Mulazzi, and T. Bertuzzi. 2019. "Efficacy of azoxystrobin on mycotoxins and related fungi in Italian paddy rice." *Toxins* no. 11 (310). doi: 10.3390/toxins11060310.
- Glass, N. L., D. J. Jacobson, and P. K. T. Shiu. 2000. "The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi." *Annual Review of Genetics* no. 34:165-186.
- Goldbach, W. 1969. *Aflatoxin: Scientific background, control, and implications*, Academic Press.
- González-Domínguez, E., S. Legler, G. Fedele, M. Si Ammour, T. Caffi, and V. Rossi. 2018. Helping farmers in timing the application of biocontrol agents in viticulture. In *Biological and integrated control of plant pathogens: IOBC-WPRS Bulletin*.
- Gonzalez Pereyra, M. L. , M. P. Martínez, G. Petroselli, R. Erra Balsells, and L. R. Cavaglieri. 2018. "Antifungal and aflatoxin-reducing activity of extracellular compounds produced by soil *Bacillus* strains with potential application in agriculture." *Food Control* no. 85 392-399. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.10.020.
- Gonzalez Pereyra, M. L., C. Dogi, A. Torres Lisa, P. Wittouck, M. Ortíz, F. Escobar, G. Bagnis, R. Yaciuk, L. Poloni, A. Torres, A. M. Dalcerro, and L. R. Cavaglieri. 2014. "Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* RC016: a 60-day subchronic oral toxicity study in rats." *Journal of Applied Microbiology* no. 117 (3):824-833.
- Grube, M., F. Schmid, and G. Berg. 2011. "Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine." *Fungal biology* no. 115 (10):978-986.
- Gruber-Dorninger, C., T. Jenkins, and G. Schatzmayr. 2019. "Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey." *Toxins* no. 11 (375). doi: 10.3390/toxins11070375.
- Grubisha, L. C., and P. J . Cotty. 2009. "Twenty-four microsatellite markers for the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*." *Molecular Ecology Resources* no. 9:264-267. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02378.x.
- Grubisha, L. C., and P. J. Cotty. 2015. "Genetic analysis of the *Aspergillus flavus* vegetative compatibility group to which a biological control agent that limits aflatoxin contamination in U.S. crops belongs." *Applied and Environmental Microbiology* no. 81:5889 –5899. doi: 10.1128/AEM.00738-15.
- Guan, S., T. Zhou, Y. Yin, M. Xie, Z. Ruan, and J. C. Young. 2011. "Microbial strategies to control aflatoxins in food and feed." *World Mycotoxin Journal* no. 4 (4):413-424. doi: 10.3920/WMJ2011.1290.
- Guo, L., J. Dai, S. Ranjitkar, H. Yu, J. Xu, and E. Luedeling. 2014. "Chilling and heat requirements for flowering in temperate fruit trees." *International Journal of Biometeorology* no. 58:1195-1206. doi: 10.1007/s00484-013-0714-3.

- Gurban, A. M., P. Epure, F. Oancea, and M. Doni. 2017. "Achievements and prospects in electrochemical-based biosensing platforms for aflatoxin M1 detection in milk and dairy products." *Sensors* no. 17 (2951). doi: 10.3390/s17122951.
- Haidukowski, M., M. Pascale, G. Perrone, D. Pancaldi, C. Campagna, and A. Visconti. 2005. "Effect of fungicides on the development of *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*." *Journal of the Science of Food and Agriculture* no. 85:191–198. doi: 10.1002/jsfa.1965.
- Harris, L. J. 2013. "Improving the safety and quality of nuts." In *Food Science, Technology and Nutrition*, edited by L. Harris. U.K.: Woodhead Publishing Inc.
- Hasan, H. A. H. 1993. "Fungicide inhibition of aflatoxins, diacetoxyscirpenol and zearalenone production." *Folia Microbiologica* no. 38 (4):295-298.
- Hayo, E. 2018. *Attitudes to feed fermentation for aflatoxin management in maize in Kenya - Investigating aflatoxin reduction by yeast-fermentation*, Department of Molecular Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- He, T., J. Zhu, Y. Nie, R. Hu, T. Wang, P. Li, Q. Zhang, and Y. Yang. 2018. "Nanobody technology for mycotoxin detection: Current status and prospects." *Toxins* no. 10 (180):1-19. doi: 10.3390/toxins10050180.
- Heale, J. B. 1966. "Heterokaryon synthesis and morphogenesis in *Verticillium*." *Journal of General Microbiology* no. 45:419-427.
- Hedayati, M. T., A. C. Pasqualotto, P. A. Warn, P. Bowyer, and D. W. Denning. 2007. "*Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer." *Microbiology* no. 153:1677–1692.
- Hell, K., and C. Mutegi. 2011. "Aflatoxin control and prevention strategies in key crops of Sub-Saharan Africa." *African Journal of Microbiology Research* no. 5 (5):459-466. doi: 10.5897/AJMR10.009.
- Heras-Vazquez, L., F. Javier, L. Mingorance-Cazorla, J. M. Clemente-Jimenez, and F. Rodriguez-Vico. 2003. "Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two internal transcribed spacers." *FEMS Yeast Research* no. 3 (1):3-9.
- Hill, R. A., P. D. Blankenship, R. J. Cole, and T. H. Sanders. 1983. "Effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development." *Applied and Environmental Microbiology* no. 45 (2):628-633.
- Holtz, B., L. Ferguson, D. Parfitt, G. Allen, and R. Radoicich. 2005. Rootstock production and budding. In *Pistachio production manual*, edited by Fruit & Nut Research Information Center University of California. Davis, CA, USA.
- Horn, B. W., and R. L. Greene. 1995. "Vegetative compatibility within populations of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii* from a peanut field." *Mycologia* no. 87 (3):324-332.
- Horn, B. W., R. L. Greene, V. S. Sobolev, J. W. Dorner, J. H. Powell, and R. C. Lyton. 1996. "Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*." *Mycologia* no. 88 (4):574-587. doi: 10.1080/00275514.1996.12026688.

- Houshyarfard, M., H. Rouhani, M. Falahati-Rastegar, S. Malekzadeh-Shafaroudi, E. Mehdikhani-Moghaddam, and C. Probst. 2014. "Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* from pistachio soils in Iran " *Journal of Plant Protection Research* no. 54 (4):354-362.
- Hua, S. S. T. 2002. "Potential use of saprophytic yeasts to control *Aspergillus flavus* in almond and pistachio orchards." *Acta Horticulturae* no. 591:527-530.
- Hua, S. S. T. 2006. "Progress in prevention of aflatoxin contamination in food by preharvest application of a yeast strain, *Pichia anomala* WRL-076." In *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions*, 322-326.
- Hua, S. S. T. 2013. "Biocontrol of *Aspergillus flavus* by *Pichia anomala*." In *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Formatex.
- Hua, S. S. T., J. L. Baker, and M. Flores-Espiritu. 1999. "Interactions of saprophytic yeasts with a *nor* mutant of *Aspergillus flavus*." *Applied and Environmental Microbiology* no. 65 (6):2738-2740.
- Hua, S. S. T., J. J. Beck, S. B. L. Sarreal, and W. Gee. 2014. "The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*." *Mycotoxin Research* no. 30:71-78. doi: 10.1007/s12550-014-0189-z.
- Hua, S. S. T., M. T. Brandl, B. Hernlem, J. G. Eng, and S. B. L. Sarreal. 2011. "Fluorescent viability stains to probe the metabolic status of aflatoxigenic fungus in dual culture of *Aspergillus flavus* and *Pichia anomala*." *Mycopathologia* no. 171:133-138. doi: 10.1007/s11046-010-9352-z.
- Hua, S. S. T., C. E. McAlpin, P.-K. Chang, and S. B. L. Sarreal. 2012. "Characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates from pistachio " *Mycotoxin Research* no. 28:67-75. doi: 10.1007/s12550-011-0117-4.
- Hutchison, E. A., J. A. Bueche, and N. L. Glass. 2012. "Diversification of a protein kinase cascade: IME-2 is involved in nonself recognition and programmed cell death in *Neurospora crassa*." *Genetics* no. 192:467-482.
- Ianiri, G., A. Idnurm, S. A. Wright, R. Durán-Patrón, L. Mannina, R. Ferracane, and R. Castoria. 2013. "Searching for genes responsible for patulin degradation in a biocontrol yeast provides insight into the basis for resistance to this mycotoxin." *Applied and Environmental Microbiology* no. 79 (9):3101-3115.
- IARC. 2002. "Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene." *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, no. 82:1-556.
- Ippolito, A., A. El Ghaouth, C. L. Wilson, and M. Wisniewski. 2000. "Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses." *Postharvest Biology and Technology* no. 19 (3):265-272.
- Ishii, H., F. Zhen, M. Hu, X. Lib, and G. Schnabelb. 2016. "Efficacy of SDHI fungicides, including benzovindiflupyr, against *Colletotrichum* species." *Pest Management Science* no. 72 (10):1844-1853. doi: 10.1002/ps.4216.
- Jacobson, D. J., and T. R. Gordon. 1990. "Further investigations of vegetative compatibility within *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*." *Canadian Journal of Botany* no. 68 (1):245-248.



- Jaibangyang, S., R. Nasanit, and S. Limtong. 2020. "Biological control of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* by volatile organic compound-producing antagonistic yeasts." *BioControl*. doi: 10.1007/s10526-020-09996-9.
- Jaime-Garcia, R., and P. J. Cotty. 2003. "Aflatoxin contamination of commercial cottonseed in South Texas." *Phytopathology* no. 93:1190-1200.
- Jaime-Garcia, R., and P. J. Cotty. 2006. "Spatial distribution of *Aspergillus flavus* and its toxigenic strains on commercial cottonseed from south Texas and its relationship to aflatoxin contamination." *Plant Pathology* no. 55:358–366. doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01358.x.
- Jalali, L., H. Afshari, M. Mohammadi Moghadam, G. H. Laey, and A. Sadeghi. 2011. "Study on some of pistachio cultivars' contamination of Khorasan-e-Razavi Province to *Aspergillus flavus*." *International Journal of Nuts and Related Sciences* no. 2 (2):17-20.
- Jamali, M., M.-A. Ebrahimi, M. Karimipour, M. Shams-Ghahfarokhi, N. Dinparast-Djadid, S. Kalantar, Y. Pilehvar-Soltanahmadi, A. Amani, and M. Razzaghi-Abyaneh. 2012. "An insight into the distribution, genetic diversity, and mycotoxin production of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of pistachio orchards." *Folia Microbiologica* no. 57:27–36. doi: 10.1007/s12223-011-0090-5.
- Jamali, M., M. Karimipour, M. Shams-Ghahfarokhi, A. Amani, and M. Razzaghi-Abyaneh. 2013. "Expression of aflatoxin genes *aflO* (*omtB*) and *aflQ* (*ordA*) differentiates levels of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains from soils of pistachio orchards." *Research in Microbiology* no. 164:293-299.
- James, S. A., J. Cai, I. N. Roberts, and M. D. Collins. 1997. "A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: Description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* no. 47 (2):453-460.
- James, S. A., M. D. Collins, and I. N. Roberts. 1994. "Genetic interrelationship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequences." *Yeast* no. 10 (7):871-881.
- James, S. A., M. D. Collins, and I. N. Roberts. 1996. "Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* no. 46 (1):189-194.
- Jebali, R., S. Abbes, J. B. Salah-Abbes, R. B. Younes, Z. Haous, and R. Oueslati. 2015. "Ability of *Lactobacillus plantarum* MON03 to mitigate aflatoxins (B1 and M1) immunotoxicities in mice." *Journal of Immunotoxicology* no. 12 (3):290–299. doi: 10.3109/1547691X.2014.973622.
- Jermnak, U., A. Chinaphuti, A. Poapolathep, R. Kawai, H. Nagasawa, and S. Sakuda. 2013. "Prevention of aflatoxin contamination by a soil bacterium of *Stenotrophomonas* sp. that produces aflatoxin production inhibitors." *Microbiology* no. 159:902–912 doi: 10.1099/mic.0.065813-0.
- Jia, Y., G. Zhou, P. Liu, Z. Li, and B. Yu. 2019. "Recent development of aptamer sensors for the quantification of aflatoxin B1." *Applied Sciences* no. 9 (2364). doi: 10.3390/app9112364.



- Jin, X., X. Jin, X. Liu, L. Chen, J. Jiang, G. Shen, and R. Yu. 2009. "Biocatalyzed deposition amplification for detection of aflatoxin B1 based on quartz crystal microbalance." *Analytica Chimica Acta* no. 645:92-97.
- Junaid, J. M., N. A. Dar, T. A. Bhat, A. H. Bhat, and M. A. Bhat. 2013. "Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens." *International Journal of Modern Plant and Animal Sciences* no. 1 (2):39-57.
- Kabirian, H. R., H. Afshari, M. Mohammadi Moghadam, and H. Hokmabadi. 2011. "Evaluation of pistachio contamination to *Aspergillus flavus* in Semnan Province." *International Journal of Nuts and Related Sciences* no. 2 (3):1-6.
- Kader, A. A., C. M. Heint, J. M. Labavitch, and H. L. Rae. 1982. "Studies related to the description and evaluation of pistachio nut quality." *Journal of American Society for HortScience* no. 107 (5):812-816.
- Kamika, I., Koto-te-Nyiwa Ngbolua, and M. Tekere. 2016. "Occurrence of aflatoxin contamination in maize throughout the supply chain in the Democratic Republic of Congo." *Food Control* no. 69 292-296. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.014.
- Kaminiaris, M. D., M. Camardo Leggieri, D. I. Tsitsigiannis, and P. Battilani. 2020. "AFLA-PISTACHIO: Development of a mechanistic model to predict the aflatoxin contamination of pistachio nuts." *Toxins* no. 12 (7):445. doi: 10.3390/toxins12070445.
- Kaminiaris, M. D., S. Mavrikou, M. Georgiadou, G. Paivana, D. I. Tsitsigiannis, and S. Kintzios. 2020. "An impedance based electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 monitoring in pistachio matrices." *Chemosensors* no. 8 (4):121. doi: 10.3390/chemosensors8040121.
- Kaminiaris, M., and D. Tsitsigiannis. 2020. "Pre-harvest management strategies to control aflatoxin contamination in crops." In *Aflatoxins: Biochemistry, toxicology, public health, policies and modern methods of analysis*, edited by S. Kintzios and S. Mavrikou. Nova.
- Kanetis, L., H. Förster, C. A. Jones, K. A. Borkovich, and J. E. Adaskaveg. 2008. "Characterization of Genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*." *Phytopathology* no. 98 (2):205-214. doi: 10.1094/PHYTO-98-2-0205.
- Kang'ethe, E. K., A. J. Sirma, G. Murithi, C. K. Mburugu-Mosoti, E. O. Ouko, H. J. Korhonen, G. J. Nduhiu, J. K. Mungatu, V. Joutsjoki, E. Lindfors, and S. Ramo. 2017. "Occurrence of mycotoxins in food, feed, and milk in two counties from different agroecological zones and with historical outbreak of aflatoxins and fumonisins poisonings in Kenya." *Food Quality and Safety* no. 1 (3):161-169. doi: 10.1093/fqsafe/fyx018.
- Kasfi, K., P. Taheri, B. Jafarpour, and S. Tarighi. 2018. "Characterization of antagonistic microorganisms against *Aspergillus* spp. from grapevine leaf and berry surfaces." *Journal of Plant Pathology* no. 100 (2). doi: 10.1007/s42161-018-0042-x.
- Kebour, D., K. Mekademi, and A. Boutekrabt. 2013. "Test of a study of phenology of pistachio fruit (*Pistacia vera* L.) in the orchard TIGHENNIF (W. Mascara, Algeria)." *Journal of current research in science* no. 1 (4):185-191.

- Kerry, B. R. 2000. "Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes." *Annual Review of Phytopathology* no. 38 (1):423-441.
- Khanafari, A., H. Soudi, M. Miraboufathi, and R. Karami-Osboo. 2007. "An *in vitro* investigation of aflatoxin B1 biological control by *Lactobacillus Plantarum*." *Pakistan Journal of Biological Sciences* no. 10 (15):2553-2556. doi: 10.3923/pjbs.2007.2553.2556.
- Kim, B. K., J. Li, J. E. Im, K. S. Ahn, T. S. Park, S. I. Cho, Y. R. Kim, and W. Y. Lee. 2012. "Impedometric estrogen biosensor based on estrogen receptor alpha-immobilized gold electrode." *Journal of Electroanalytical Chemistry* no. 671:106-111. doi: 10.1016/j.jelechem.2012.02.022.
- Kim, J.-G. 2007. *Anti-aflatoxigenic activity of some bacteria related with fermentation*. 2 vols. Vol. 1, *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: Formatex.
- Kim, J. H., N. Mahoney, K. L. Chan, B. C. Campbell, R. P. Haffand, and L. H. Stanker. 2014. "Use of benzo analogs to enhance antimycotic activity of kresoxim methyl for control of aflatoxigenic fungal pathogens." *Food Microbiology* no. 5:1-12. doi: 10.3389/fmicb.2014.00087.
- Klem, K., M. Váňová, J. Hajšlová, K. Lancová, and M. Sehnalová. 2007. "A neural network model for prediction of deoxynivalenol content in wheat grain based on weather data and preceding crop." *Plant, Soil and Environment* no. 53 (10):421-429.
- Klich, M. A. 2007. "*Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin." *Molecular Plant Pathology* no. 8 (6):713-722. doi: 10.1111/J.1364-3703.2007.00436.X.
- Kotan, R., N. Dikbas, and H. Bostan. 2009. "Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits." *African Journal of Biotechnology* no. 8 (2):209-214.
- Kovac, T., B. Šarkanj, B. Crevar, M. Kovac, A. Loncaric, I. Strelec, C. N. Ezekiel, M. Sulyok, and R. Krska. 2018. "*Aspergillus flavus* NRRL 3251 growth, oxidative status, and aflatoxins production ability *in vitro* under different illumination regimes." *Toxins* no. 10 (528):1-14. doi: 10.3390/toxins10120528.
- Krska, R., and A. Molinelli. 2009. "Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* no. 393:67-71. doi: 10.1007/s00216-008-2424-y.
- Kuan-Chen, C., A. Demirci, and J. M. Catchmark. 2011. "Evaluation of medium composition and fermentation parameters on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*." *Food Science and Technology International* no. 17 (2). doi: 10.1177/1082013210368719.
- Kuden, A. B., N. Kaska, E. Tanriver, B. E. Ak, and H. Tekin. 1995. "Determining the chilling requirements and growing degree hours of some pistachio nut cultivars and regions." *Acta horticulturae* no. 419:85-90.
- Kumar, N. G., B. Ammagarahalli, and H. R. Gopalkrishna. 2020. "Soil fauna and sustainable agriculture." In *Innovative Pest Management approaches for the 21st century, harnessing automated unmanned technologies*, edited by A. K. Chakravarthy. Singapore: Springer.
- Kurtzman, C. P., and P. A. Blanz. 1998. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 4th Edn. ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

- Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett. 1998. "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences." *Antonie van Leeuwenhoek* no. 73 (4):331-371.
- Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett. 2003. "Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses." *FEMS Yeast Research* no. 3 (4):417-432.
- Kurtzman, C. P., and M. Suzuki. 2010. "Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*." *Mycoscience* no. 51 (1):2-14.
- La Penna, M., A. Nesci, and M. Etcheverry. 2004. "In vitro studies on the potential for biological control on *Aspergillus* section *Flavi* by *Kluyveromyces* spp." *Letters in Applied Microbiology* no. 38:257–264. doi: 10.1111/j.1472-765X.2003.01467.x.
- Lago, M., A. Aguiar, A. Natário, C. Fernandes, M. Faria, and E. Pinto. 2014. "Does fungicide application in vineyards induce resistance to medical azoles in *Aspergillus* species?" *Environmental Monitoring and Assessment* no. 186:5581–5593. doi: 10.1007/s10661-014-3804-8.
- Lagogianni, C. S., and D. I. Tsitsigiannis. 2018. "Effective chemical management for prevention of aflatoxins in maize." *Phytopathologia Mediterranea* no. 57 (1):186–197. doi: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-22492.
- Lagogianni, C. S., and D. I. Tsitsigiannis. 2019. "Effective biopesticides and biostimulants to reduce aflatoxins in maize fields." *Frontiers in Microbiology* no. 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.02645.
- Lahlali, R., W. Aksissou, N. Lyouf, S. Ezrari, A. Blenzar, A. Tahiri, S. Ennahli, J. Hrutić, D. MacLean, and S. Amiri. 2020. "Biocontrol activity and putative mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* (SF14 and SP10), *Alcaligenes faecalis* ACBC1, and *Pantoea agglomerans* ACBP1 against brown rot disease of fruit." *Microbial Pathogenesis* no. 139. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103914.
- Lee, B. S., and J. W. Taylor. 1990. "Isolation of DNA from fungal mycelia and single spore." In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. S. Sninsky and T. J. White, 282-287. San Diego: Academic Press.
- Lee, J. Y., S. S. Moon, and B. K. Hwang. 2003. "Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16." *Applied and Environmental Microbiology* no. 69 (4):2023-2031.
- Lee, L. S., M. A. Klich, P. J. Cotty, and H. J. Jr. Zeringue. 1989. "Aflatoxin in Arizona cottonseed: Increase in toxin formation during field drying of bolls." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* no. 18:416-420.
- Leeder, A. C., J. Palma-Guerrero, and N. L. Glass. 2011. "The social network: deciphering fungal language." *Nature Reviews Microbiology* no. 9:440-451.
- Leffelaar, P. A. 1993. "Basic elements of dynamic simulation." In *On Systems Analysis and Simulation of Ecological Processes with Examples in CSMP and FORTRAN*, 11-27.
- Leite, R. S. R., H. F. Alves-Prado, H. Cabral, F. C. Pagnocca, E. Gomes, and R. Da-Silva. 2008. "Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus*

- aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes." *Enzyme and Microbial Technology* no. 43 (6):391-395.
- Leslie, J. F. 1993. "Fungal vegetative compatibility." *Annual Review of Phytopathology* no. 31:127-150.
- Li, H., Z. Chi, X. Wang, and C. Ma. 2007. "Amylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d." *Journal of Ocean University of China (English Edition)* no. 6 (1):60-65.
- Li, W. 1997. *Molecular evolution*. Edited by Sinauer Associates Incorporated.
- Lima, G., A. Ippolito, F. Nigro, and M. Salerno. 1997. "Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots." *Postharvest Biology and Technology* no. 10 (2):169-178.
- Lin, M. T., and J. C. Dianese. 1976. "A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp." *Phytopathology* no. 66:1466-1469.
- Linling, L., C. Hua, H. Juan, Y. Honghui, C. Xiaoling, and C. Shuiyuan. 2015. "Biological control of postharvest diseases of chestnut fruit by microbial antagonists-endophytic bacteria CE3." *Journal of Pure and Applied Microbiology* no. 9 (1):57-67.
- Liu, C., V. Manstretta, V. Rossi, and H. J. van der Fels-Klerx. 2018. "Comparison of three modelling approaches for predicting deoxynivalenol contamination in winter wheat." *Toxins* no. 10 (267):1-15. doi: 10.3390/toxins10070267.
- Liu, J., Y. Sui, M. Wisniewski, S. Droby, and Y. Liu. 2013. "Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit." *International Journal of Food Microbiology* no. 167 153–160. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004.
- Liu, Y., Z. Liu, M. S. Hamada, Y. N. Yin, and Z. H. Ma. 2014. "Characterization of laboratory pyrimethanil-resistant mutants of *Aspergillus flavus* from groundnut in China." *Crop Protection* no. 60:5-8. doi: 10.1016/j.cropro.2014.02.004.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method." *Methods* no. 25 (4):402-408.
- Lohmar, J. M., P. Y. Harris-Coward, J. W. Cary, S. Dhingra, and A. M. Calvo. 2016. "rtfA, a putative RNA-Pol II transcription elongation factor gene, is necessary for normal morphological and chemical development in *Aspergillus flavus*." *Applied Microbiology and Biotechnology* no. 100 (11):5029-5041.
- Lorenzini, M., and G. Zapparoli. 2020. "Epiphytic bacteria from withered grapes and their antagonistic effects on grape-rotting fungi." *International Journal of Food Microbiology* no. 319.
- Lozano-Ojalvo, D., A. Rodríguez, V. Bernáldez, J. J. Córdoba, and M. Rodríguez. 2013. "Influence of temperature and substrate conditions on the *omt-1* gene expression of *Aspergillus parasiticus* in relation to its aflatoxin production." *International Journal of Food Microbiology* no. 166:263-269. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.011.
- Luedeling, E., and P. H. Brown. 2011. "A global analysis of the comparability of winter chill models for fruit and nut trees." *International Journal of Biometeorology* no. 55:411-421. doi: 10.1007/s00484-010-0352-y.

- Lyn, M. E., H. K. Abbas, R. M. Zablotowicz, and B. J. Johnson. 2009. "Delivery systems for biological control agents to manage aflatoxin contamination of pre-harvest maize." *Food Additives and Contaminants* no. 26 (3):381–387. doi: 10.1080/02652030802441521.
- Magan, N., and D. Aldred. 2007. "Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain." *International Journal of Food Microbiology* no. 119 131–139. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034.
- Mahmoudi, R., R. Norian, F. Katiraei, M. R. Pajohi-Alamoti, and S. J. Emami. 2014. "Occurrence of aflatoxin B1 in pistachio nuts during various preparing processes: Tracing from Iran." *Mycology Research* no. 1 (1):1-5.
- Mahoney, N. E., W. S. Gee, B. S. Higbee, and J. J. Beck. 2014. "Ex situ volatile survey of ground almond and pistachio hulls for emission of spiroketals: Analysis of hull fatty acid composition, water content, and water activity." *Phytochemistry Letters* no. 7:225-230. doi: 10.1016/j.phytol.2013.03.004.
- Mahuku, G., H. S. Nzioki, C. Mutegi, F. Kanampiu, C. Narrod, and D. Makumbi. 2019. "Pre-harvest management is a critical practice for minimizing aflatoxin contamination of maize." *Food Control* no. 96 219-226. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.08.032.
- Maiorano, A., A. Reyneri, A. Magni, and C. Ramponi. 2009. "A decision tool for evaluating the agronomic risk of exposure to fumonisins of different maize crop management systems in Italy." *Agricultural Systems* no. 102:17-23. doi: 10.1016/j.agsy.2009.06.003.
- Majumdar, R., K. Rajasekaran, and J. W. Cary. 2017. "RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: Concepts and considerations." *Frontiers in Plant Science* no. 8 (200).
- Malandrakis, A. A., K. N. Vattis, E. G. Doukas, and A. N. Markoglou. 2013. "Effect of phenylpyrrole-resistance on fitness parameters and ochratoxin production in *Aspergillus carbonarius*." *International Journal of Food Microbiology* no. 165:287-294. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.019.
- Manitchotpisit, P., C. D. Skory, T. D. Leathers, P. Lotrakul, D. E. Eveleigh, S. Prasongsuk, and H. Punnapayak. 2011. "α-Amylase activity during pullulan production and α-amylase gene analyses of *Aureobasidium pullulans*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* no. 38:1211-1218.
- Mari, M., C. Martini, M. Guidarelli, and F. Neri. 2012. "Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains." *Biological Control* no. 60 (2):132-140.
- Marín, S., A. J. Ramos, and V. Sanchis. 2012. "Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts." *Food Microbiology* no. 32:378-388. doi: 10.1016/j.fm.2012.07.018.
- Markoglou, A. N., E. G. Doukas, and A. A. Malandrakis. 2011. "Effect of anilinopyrimidine resistance on aflatoxin production and fitness parameters in *Aspergillus parasiticus* Speare." *International Journal of Food Microbiology* no. 146 130-136. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.009.

- Markoglou, A. N., E. G. Doukas, and B. N. Ziogas. 2008. "Phenylpyrrole-resistance and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* Speare." *International Journal of Food Microbiology* no. 127 268-275. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.020.
- Martinelli, F., R. Scalenghe, S. Davino, S. Panno, G. Scuderi, P. Ruisi, P. Villa, D. Stroppiana, M. Boschetti, L. R. Goulart, C. E. Davis, and A. M. Dandekar. 2015. "Advanced methods of plant disease detection. A review." *Agronomy for Sustainable Development* no. 35 (1):1-25. doi: 10.1007/s13593-014-0246-1.
- Masiello, M., S. Somma, V. Ghionna, A. F. Logrieco, and A. Moretti. 2019. "*In vitro* and in field response of different fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* species causing ear rot disease of maize." *Toxins* no. 11 (11). doi: 10.3390/toxins11010011.
- Masoud, W., and C. Høj Kaltoft. 2006. "The effects of yeasts involved in the fermentation of coffee arabica in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*." *International Journal of Food Microbiology* no. 106 229-234. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.015.
- Mateo, E. M., J. V. Gómez, J. V. Gimeno-Adelantado, D. Romera, R. Mateo-Castro, and M. Jiménez. 2017. "Assessment of azole fungicides as a tool to control growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 and B2 production in maize." *Food Additives & Contaminants: Part A*. doi: 10.1080/19440049.2017.1310400.
- Mateo, E. M., F. M. Valle-Algarra, R. Mateo-Castro, and M. Jiménez. 2011. "Impact of non-selective fungicides on the growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius* in barley-based medium." *Food Additives & Contaminants: Part A* no. 28 (1):86-97. doi: 10.1080/19440049.2010.529621.
- Mauro, A., P. Battilani, K. A. Callicott, P. Giorni, A. Pietri, and P. J. Cotty. 2013. "Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy." *International Journal of Food Microbiology* no. 162 1-7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.021.
- Mauro, A., E. Garcia-Cela, A. Pietri, P. J. Cotty, and P. Battilani. 2018. "Biological control products for aflatoxin prevention in Italy: Commercial field evaluation of atoxigenic *Aspergillus flavus* active ingredients." *Toxins* no. 10 (30):1-14. doi: 10.3390/toxins10010030.
- Mavrikou, S., E. Flampouri, D. Iconomou, and S. Kintzios. 2017. "Development of a cellular biosensor for the detection of aflatoxin B1, based on the interaction of membrane engineered Vero cells with anti-AFB1 antibodies on the surface of gold nanoparticle screen printed electrodes." *Food Control* no. 73 (Part A):64-70. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.002.
- Mavrikou, S., and S. Kintzios. 2018. "Biosensor-based approaches for detecting ochratoxin A and 2,4,6-trichloroanisole in beverages." *Beverages* no. 4 (24). doi: 10.3390/beverages4010024.
- Mcguire, R. G. 1994. "Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grapefruits." *Biological Control* no. 4 (1):1-7.
- McMaster, G. S., and W. W. Wilhelm. 1997. "Growing degree-days: one equation, two interpretations." *Agricultural and Forest Meteorology* no. 87 291-300.



- Medeiros, F. H. Vasconcelos de, S. J. Martins, T. D. Zucchi, I. S. de Melo, L. R. Batista, and J. da Cruz Machado. 2012. "Biological control of mycotoxin-producing molds." *Science and Agrotechnology* no. 36 (5):483-497.
- Medina, A., A. Rodriguez, and N. Magan. 2014. "Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production." *Food Microbiology* no. 5 (348):1-7. doi: 10.3389/fmicb.2014.00348.
- Mehl, H. L., and P. J. Cotty. 2010. "Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection." *Phytopathology* no. 100:150-159. doi: 10.1094/PHYTO-100-2-0150.
- Mehl, H. L., R. Jaime, K. A. Callicott, C. Probst, N. P. Garber, A. Ortega-Beltran, L. C. Grubisha, and P. J. Cotty. 2012. "*Aspergillus flavus* diversity on crops and in the environment can be exploited to reduce aflatoxin exposure and improve health." *Annals of the New York Academy of Sciences* no. 1273:7-17. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06800.x.
- Mickler, C. J., K. L. Bowen, and J. W. Kloepper. 1995. "Evaluation of selected geocarposphere bacteria for biological control of *Aspergillus flavus* in peanut." *Plant and Soil* no. 175:291-299.
- Miraglia, M., H. J. P. Marvin, G. A. Kleter, P. Battilani, C. Brera, E. Coni, F. Cubadda, L. Croci, B. De Santis, S. Dekkers, L. Filippi, R. W. A. Hutjes, M. Y. Noordam, M. Pisante, G. Piva, A. Prandini, L. Toti, G. J. van den Born, and A. Vespermann. 2009. "Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe." *Food and Chemical Toxicology* no. 47:1009-1021. doi: 10.1016/j.fct.2009.02.005.
- Misaghi, I. J., P. J. Cotty, and D. M. Decianne. 1995. "Bacterial antagonists of *Aspergillus flavus*." *Biocontrol Science and Technology* no. 5:387-392. doi: 10.1080/09583159550039846.
- Mixon, A. C., D. K. Bell, and D. M. Wilson. 1984. "Effect of chemical and biological agents on the incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of peanut seed." *Phytopathology* no. 74 (12):1440-1444.
- Moghadam, M. M., and H. Hokmabadi. 2010. "Study on the effect of pistachio testa on the reduction of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production in kernels of different pistachio cultivars." *Australian Journal of Crop Science* no. 4 (9):744-749.
- Molnar, O., G. Schatzmayr, E. Fuchs, and H. Prillinger. 2004. "*Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins." *Systematic and Applied Microbiology* no. 27 (6):661-671.
- Moral, J., M. T. Garcia-Lopez, B. X. Camiletti, R. Jaime, T. J. Michailides, R. Bandyopadhyay, and A. Ortega-Beltran. 2020. "Present status and perspective on the future use of aflatoxin biocontrol products." *Agronomy* no. 10 (491). doi: 10.3390/agronomy10040491.
- Morales, H., V. Sanchis, J. Usall, A. J. Ramos, and S. Marín. 2008. "Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples." *International Journal of Food Microbiology* no. 122:61-67. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.056.

- Moruno, E. G., C. Sanlorenzo, B. Boccaccino, and R. Di Stefano. 2005. "Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine." *American Journal of Enology and Viticulture* no. 56 (1):73-76.
- Mosiello, L., and I. Lamberti. 2011. "Biosensors for aflatoxins detection." In *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control*, edited by Dr. Irineo Torres-Pacheco. InTech.
- Moss, M. O., and M. T. Long. 2002. "Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Food Additives & Contaminants* no. 19 (4):387-399.
- Mostafa, A. A., A. N. Al-Rahmah, A. Abdel-Megeed, S. R. Sayed, and A. A. Hatamleh. 2013. "Antagonistic activities of some fungal strains against the toxigenic *Aspergillus flavus* isolate and its aflatoxins productivity." *Journal of Pure and Applied Microbiology* no. 7:169-178.
- Mota, M. S., C. Bauer Gomes, I. T. Souza Júnior, and A. Bittencourt Moura. 2017. "Bacterial selection for biological control of plant disease: Criterion determination and validation." *Brazilian Journal of Microbiology* no. 48:62-70. doi: 10.1016/j.bjm.2016.09.003.
- Mounir, R., A. Durieux, E. Bodo, C. Allard, J.-P. Simon, E.-H. Achbani, S. El-Jaafari, A. Douira, and M.-H. Jijakli. 2007. "Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*." *Biotechnology Letters* no. 29 (4):553-559. doi: 10.1007/s10529-006-9269-2.
- Moyne, A. L., R. Shelby, T. E. Cleveland, and S. Tuzun. 2001. "Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*." *Journal of Applied Microbiology* no. 90 (4):622-629.
- Munimbazi, C., J. Saxena, T. W.-Y. J. Tsai, and L. B. Bullerman. 1997. "Inhibition of production of cyclopiazonic acid and Ochratoxin a by the fungicide iprodione." *Journal of Food Protection* no. 60 (7):849-852.
- Mwakinyali, S. E., X. Ding, Z. Ming, W. Tong, Q. Zhang, and Peiwu. 2019. "Recent development of aflatoxin contamination biocontrol in agricultural products." *Biological Control* no. 128:31-39. doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.09.012.
- Mylroie, J. E., M. L. Warburton, and J. R. Wilkinson. 2013. "Development of a gene-based marker correlated to reduced aflatoxin accumulation in maize." *Euphytica* no. 194:431-441.
- Narayanan, J., M. K. Sharma, S. Ponmariappan, M. Shaik, and S. Upadhyay. 2015. "Electrochemical immunosensor for botulinum neurotoxin type-E using covalently ordered graphene nanosheets modified electrodes and gold nanoparticles-enzyme conjugate." *Biosensors and Bioelectronics* no. 69 (249-256). doi: 10.1016/j.bios.2015.02.039.
- Naumov, G. I., S. A. James, E. S. Naumova, E. J. Louis, and I. N. Roberts. 2000. "Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* no. 50 (5):1931-1942.
- Nelson, M. R., T. V. Orum, R. Jaime-Garcia, and A. Nadeem. 1999. "Applications of Geographic Information Systems and geostatistics in plant disease epidemiology and management." *Plant Disease* no. 83 (4):308-319. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.4.308.

- Nguyen, P.-A., C. Strub, A. Fontana, and S. Schorr-Galindo. 2017. "Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol." *Biological Control* no. 104 10-27. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.10.004.
- Niessen, L., J. Bechtner, S. Fodil, M. H. Taniwaki, and R. F. Vogel. 2018. "LAMP-based group specific detection of aflatoxin producers within *Aspergillus* section *Flavi* in food raw materials, spices, and dried fruit using neutral red for visible-light signal detection." *International Journal of Food Microbiology* no. 266:241–250. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.013.
- Nisiotou, A. A., and G. R. Gibson. 2005. "Isolation of culturable yeasts from market wines and evaluation of the 5·8S-ITS rDNA sequence analysis for identification purposes." *Letters in Applied Microbiology* no. 41 (6):454-463.
- Nisiotou, A. A., and G. J. E. Nychas. 2007. "Yeast populations residing on healthy or *Botrytis*-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece." *Applied and Environmental Microbiology* no. 73 (8): 2765-2768.
- Njoroge, S. M. C. 2018. "A critical review of aflatoxin contamination of peanuts in Malawi and Zambia: The past, present, and future." *Plant Disease* no. 102 (12):2394-2406. doi: 10.1094/PDIS-02-18-0266-FE.
- Novas, M. V., and D. Cabral. 2002. "Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina." *Plant Disease* no. 86:215-219.
- Nunez, Y. P., E. Pueyo, A. V. Carrascosa, and A. J. Martínez-Rodríguez. 2008. "Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of ochratoxin A in a wine model system." *Journal of Food Protection* no. 71 (7):1496-1499.
- O'Brian, G. R., D. R. Georgianna, J. R. Wilkinson, J. Yu, H. K. Abbas, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, W. Nierman, and G. A. Payne. 2007. "The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis." *Mycologia* no. 99 (2):232-239.
- Oda, Y., M. Yabuki, K. Tonomura, and M. Fukunaga. 1997. "A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S-28S rRNA spacer regions." *Yeast* no. 13 (13):1243-1250.
- Oguz, H., and S. S. Parlat. 2004. "Effects of dietary mannanoligosaccharide on performance of Japanese quail affected by aflatoxicosis." *South African Journal of Animal Science* no. 34 (3):144-148.
- Ojiambo, P. S, P. Battilani, J. W. Cary, B. H. Blum, and I. Carbone. 2018. "Cultural and genetic approaches to manage aflatoxin contamination: Recent insights provide opportunities for improved control." *Phytopathology* no. 108 (9):1024-1037. doi: 10.1094/PHYTO-04-18-0134-RVW.
- Okoth, S., M. De Boevre, A. Vidal, J. Diana Di Mavungu, S. Landschoot, M. Kyallo, J. Njuguna, J. Harvey, and S. De Saeger. 2018. "Genetic and toxigenic variability within *Aspergillus flavus* population isolated from maize in two diverse environments in Kenya." *Frontiers in Microbiology* no. 9:57. doi: 10.3389/fmicb.2018.00057.
- Okoth, S., B. Nyongesa, V. Ayugi, E. Kang'ethe, H. Korhonen, and V. Joutsjoki. 2012. "Toxigenic potential of *Aspergillus* species occurring on maize kernels from two agro-ecological zones in Kenya." *Toxins* no. 4:991-1007. doi: 10.3390/toxins4110991.

- Okun, D. O., F. M. Khamis, G. M. Muluvi, J. J. Ngeranwa, F. O. Ombura, M. O. Yongo, and E. U. Kenya. 2015. "Distribution of indigenous strains of atoxigenic and toxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize and peanuts agro-ecological zones of Kenya." *Agriculture and Food Security* no. 4 (14). doi: 10.1186/s40066-015-0033-5.
- Oliveira, C. A. F., F. Bovo, C. H. Corassin, A. V. Jager, and K. R. Reddy. 2013. "Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in foodstuffs." In *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*. InTech.
- Olsen, M. 1999. Prevention of aflatoxins in pistachio. In *Mycotoxin Prevention and Decontamination. MYC-CONF/99/6d*.
- Olstrop, M., J. Borling, J. Schnurer, and V. Passoth. 2010. "*Pichia anomala* yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions." *Animal Feed Science and Technology* no. 156:37-46.
- Ortega-Beltran, A., L. C. Grubisha, K. A. Callicott, and P. J. Cotty. 2016. "The vegetative compatibility group to which the US biocontrol agent *Aspergillus flavus* AF36 belongs is also endemic to Mexico." *Journal of Applied Microbiology* no. 120:986-998. doi: 10.1111/jam.13047.
- Ortega-Beltran, A., M. D. J. Guerrero-Herrera, A. Ortega-Corona, V. A. Vidal-Martinez, and P. J. Cotty. 2014. "Susceptibility to aflatoxin contamination among maize landraces from Mexico." *Journal of Food Protection* no. 77 (9):1554-1562. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-474.
- Ortega-Beltran, A., J. Moral, A. Picot, R. D. Puckett, P. J. Cotty, and T. J. Michailides. 2019. "Atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates endemic to almond, fig and pistachio orchards in California with potential to reduce aflatoxin contamination in these crops." *Plant Disease* no. 103:905-912. doi: 10.1094/PDIS-08-18-1333-RE.
- Ortega-Beltran, A., J. Moral, R. D. Puckett, D. P. Morgan, P. J. Cotty, and T. J. Michailides. 2018. "Fungal communities associated with almond throughout crop development: Implications for aflatoxin biocontrol management in California." *PLoS ONE* no. 13 (6):e0199127. doi: 10.1371/journal.pone.0199127.
- Orum, T. V., D. M. Bigelow, P. J. Cotty, and M. R. Nelson. 1999. "Using predictions based on geostatistics to monitor trends in *Aspergillus flavus* strain composition." *Phytopathology* no. 89 (9):761-769. doi: 10.1094/PHTO.1999.89.9.761.
- Owino, J. H. O., A. Ignaszak, A. Al-Ahmed, P. Baker, and H. Alemu. 2007. "Modelling of the impedimetric responses of an aflatoxin B1 immunosensor prepared on an electrosynthetic polyaniline platform." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* no. 388:1069-1074.
- Paivana, G., T. Apostolou, G. Kaltsas, and S. Kintzios. 2017. "Study of the dopamine effect into cell solutions by impedance analysis." *Journal of Physics*, 123 no. 012010 (Conference Series). doi: 10.1088/1742-6596/931/1/012010.
- Paivana, G., T. Apostolou, S. Mavrikou, D. Barmpakos, G. Kaltsas, and S. Kintzios. 2019. "Impedance study of dopamine effects after application on 2D and 3D neuroblastoma cell cultures developed on a 3D-printed well." *Chemosensors* no. 7 (6).

- Paivana, G., S. Mavrikou, G. Kaltsas, and S. Kintzios. 2019. "bioelectrical analysis of various cancer cell types immobilized in 3D matrix and cultured in 3D-printed well." *Biosensors* no. 9 (136).
- Palumbo, J. D., J. L. Baker, and N. E. Mahoney. 2006. "Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds." *Microbial Ecology* no. 52:45–52. doi: 10.1007/s00248-006-9096-y.
- Palumbo, J. D., T. L. O’Keeffe, and H. K. Abbas. 2007. "Isolation of maize soil and rhizosphere bacteria with antagonistic activity against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*." *Journal of Food Protection* no. 70 (7):1615–1621.
- Pan, M., S. Li, J. Wang, W. Sheng, and S. Wang. 2017. "Development and validation of a reproducible and label-free surface plasmon resonance immunosensor for enrofloxacin detection in animal-derived foods." *Sensors* no. 17 (1984). doi: 10.3390/s17091984.
- Panahi, B., and M. Khezri. 2011. "Effect of harvesting time on nut quality of pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars." *Scientia Horticulturae* no. 129:730-734. doi: 10.1016/j.scienta.2011.05.029.
- Papon, N., V. Savini, A. Lanoue, A. J. Simkin, J. Crèche, N. Giglioli-Guivarc’h, and A. A. Sibirny. 2013. "*Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics." *Current Genetics* no. 59 (3):73-90.
- Parimi, V., V. Krishna, K. Kotamraju, and H. K. Sudini. 2018. "On-farm demonstrations with a set of good agricultural practices (GAPs) proved cost-effective in reducing pre-harvest aflatoxin contamination in groundnut." *Agronomy* no. 8 (10). doi: 10.3390/agronomy8020010.
- Paster, N., S. Droby, E. Chalutz, M. Menasherov, R. Nitzan, and C. L. Wilson. 1993. "Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans." *Mycological Research* no. 97 (10):1201-1206
- Patel, T. K., R. Anand, A. Prasad Singh, J. Shankar, and B. N. Tiwary. 2014. "Evaluation of aflatoxin B1 biosynthesis in *A. flavus* isolates from Central India and identification of atoxigenic isolates." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* no. 19:1105-1113 doi: 10.1007/s12257-014-0464-z.
- Paul, P. A., and G. P. Munkvold. 2004. "A model-based approach to preplanting risk assessment for gray leaf spot of maize." *Phytopathology* no. 94:1350-1357.
- Payne, G. A., D. K. Cassel, and C. R. Adkins. 1986. "Reduction of aflatoxin contamination in corn by irrigation and tillage." *Phytopathology* no. 76 (7):679-684. doi: 10.1094/Phyto-76-679.
- Pearson, T. C., and T. F. Schatzki. 1998. "Machine vision system for automated detection of aflatoxin-contaminated pistachios." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* no. 46:2248-2252.
- Pereira, C. S., S. C. Cunha, and J. O. Fernandes. 2020. "Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test kit for determination of aflatoxin B1 in corn feed and comparison with Liquid-Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method." *Food Analytical Methods* no. 13:1806–1816. doi: 10.1007/s12161-020-01805-4.
- Pereyra, C. M., L. R. Cavaglieri, S. M. Chiacchiera, and A. Dalcerro. 2013. "The corn influence on the adsorption levels of aflatoxin B1 and zearalenone by yeast cell wall." *Journal of Applied Microbiology* no. 114 (3):655-662.



- Perrone, G., A. Gallo, and A. F. Logrieco. 2004. "Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk." *Frontiers in Microbiology* no. 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00377.
- Perrone, G., M. Haidukowski, G. Stea, F. Epifani, R. Bandyopadhyay, J. F. Leslie, and A. Logrieco. 2014. "Population structure and aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi* from maize in Nigeria and Ghana." *Food Microbiology* no. 41 52-59. doi: 10.1016/j.fm.2013.12.005.
- Péteri, Z., J. Téren, C. Vágvölgyi, and J. Varga. 2007. "Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts." *Food microbiology* no. 24 (3):205-210.
- Peterson, S. W., Y. Ito, B. W. Horn, and T. Goto. 2001. "*Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*." *Mycologia* no. 93 (4):689-703.
- Petersson, S., M. Wittrup Hansen, K. Axberg, K. Hult, and J. Schnurer. 1998. "Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Mycological Research* no. 102 (8):1003-1008
- Petruzzi, L., A. Bevilacqua, A. Baiano, L. Beneduce, M. R. Corbo, and M. Sinigaglia. 2014. "Study of *Saccharomyces cerevisiae* W13 as a functional starter for the removal of ochratoxin A." *Food Control* no. 35 (1):373-377.
- Pfliegler, W. P., T. Pusztahelyi, and I. Pócsi. 2015. "Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts." *Journal of Basic Microbiology* no. 55 (7):805-818. doi: 10.1002/jobm.201400833.
- Picot, A., M. Doster, Md-Sajedul Islam, K. Callicott, A. Ortega-Beltran, P. Cotty, and T. Michailides. 2018. "Distribution and incidence of atoxigenic *Aspergillus flavus* VCG in tree crop orchards in California: A strategy for identifying potential antagonists, the example of almonds." *International Journal of Food Microbiology* no. 265:55-64. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.023.
- Piermarini, S., L. Micheli, N. H. S. Ammida, G. Palleschi, and D. Moscone. 2007. "Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B1 detection." *Biosensors and Bioelectronics* no. 22:1434-1440.
- Pildain, M. B., G. Vaamonde, and D. Cabral. 2004. "Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production." *International Journal of Food Microbiology* no. 93:31-40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.007.
- Piotrowska, M., A. Nowak, and A. Czyzowska. 2013. "Removal of ochratoxin A by wine *Saccharomyces cerevisiae* strains." *European Food Research and Technology* no. 236 (3):441-447.
- Pitt, J. 2019. "The pros and cons of using biocontrol by competitive exclusion as a means for reducing aflatoxin in maize in Africa." *World Mycotoxin Journal* no. 12 (2):103-112. doi: 10.3920/WMJ2018.2410.
- Pizzolitto, R. P., M. R. Armando, M. Combina, L. R. Cavaglieri, A. M. Dalcero, and M. A. Salvano. 2012. "Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B1 adsorption ability for use in poultry feedstuffs." *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* no. 47 (10):933-941. doi: 10.1080/03601234.2012.706558.



- Pizzolitto, R. P., M. R. Armando, M. A. Salvano, A. M. Dalcerro, and C. A. Rosa. 2013. "Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* as an antiaflatoxicogenic agent in broiler feedstuffs." *Poultry Science* no. 92 (6):1655-1663.
- Pontikis, C. A. 1986. "Pontikis' pistachio." *HortScience* no. 21 (4):1074.
- Pope, K. S., P. H. Brown, V. Dose, D. Da Silva, and T. M. DeJong. 2014. "Yield potential analysis to model dormancy requirements in pistachio." *Acta Horticulturae* no. 1028 103-106.
- Prado, G., J. E. Madeira, V. A. Morais, M. S. Oliveira, R. A. Souza, J. M. Peluzio, I. J. Godoy, J. F. Silva, and R. S. Pimenta. 2011. "Reduction of aflatoxin B1 in stored peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Food Protection* no. 74 (6):1003-1006.
- Pretscher, J., T. Fischkal, S. Branscheidt, L. Jäger, S. Kahl, M. Schlander, E. Thines, and H. Claus. 2018. "Yeasts from different habitats and their potential as biocontrol agents." *Fermentation* no. 4 (31). doi: 10.3390/fermentation4020031.
- Price, C. L., J. E. Parker, A. G. S. Warrilow, D. E. Kelly, and S. L. Kelly. 2015. "Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens." *Pest Management Science* no. 71:1054-1058. doi: 10.1002/ps.4029.
- Probst, C., R. Bandyopadhyay, and P. J. Cotty. 2014. "Diversity of aflatoxin-producing fungi and their impact on food safety in sub-Saharan Africa." *International Journal of Food Microbiology* no. 174:113-122. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.010.
- Probst, C., R. Bandyopadhyay, L. E. Price, and P. J. Cotty. 2011. "Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya." *Plant Disease* no. 95 (2):212-218. doi: 10.1094/PDIS-06-10-0438.
- Probst, C., K. A. Callicott, and P. J. Cotty. 2012. "Deadly strains of Kenyan *Aspergillus* are distinct from other aflatoxin producers." *European Journal of Plant Pathology* no. 132 (3):419-429. doi: 10.1007/s10658-011-9887-y.
- Probst, C., and P. J. Cotty. 2012. "Relationships between *in vivo* and *in vitro* aflatoxin production: Reliable prediction of fungal ability to contaminate maize with aflatoxins." *Fungal Biology* no. 116:503-510. doi: 10.1016/j.funbio.2012.02.001.
- Probst, C., H. Njapau, and P. J. Cotty. 2007. "Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the causal agent." *Applied and Environmental Microbiology* no. 73 (8):2762-2764. doi: 10.1128/AEM.02370-06.
- Probst, C., F. Schulthess, and P. J. Cotty. 2010. "Impact of *Aspergillus* section *Flavi* community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*)." *Journal of Applied Microbiology* no. 108 600-610. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04458.x.
- Prodromidis, M. 2007. "Impedimetric biosensors and immunosensors." *Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry* no. 8:69-71.
- Puhalla, J. E., and P. T. Spieth. 1985. "A comparison of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikoroii* (*Fusarium moniliforme*)." *Experimental Mycology* no. 9 (39-47).

- Rahemi, M., and Z. Pakkish. 2009. "Determination of chilling and heat requirements of pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars." *Agricultural Sciences in China* no. 8 (7):803-807. doi: 10.1016/S1671-2927(08)60281-3.
- Rahimi, P., B. Sharifnabi, and M. Bahar. 2008. "Detection of aflatoxin in *Aspergillus* species isolated from pistachio in Iran." *Phytopathology* no. 156:15-20. doi: 10.1111/j.1439-0434.2007.01312.x.
- Rahmianna, A. A., J. Purnomo, and E. Yusnawan. 2015. "Assessment of groundnut varietal tolerant to aflatoxin contamination in Indonesia." *Procedia Food Science* no. 3:330-339. doi: 10.1016/j.profoo.2015.01.036.
- Rajasekaran, K., R. J. Saylor, C. M. Sickler, R. Majumdar, J. Jaynes, and J. W. Cary. 2018. "Control of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in transgenic maize kernels expressing a tachyplestin-derived synthetic peptide, AGM182." *Plant Science* no. 270:150-156.
- Raju, M. V. L. N., and G. Devegowda. 2002. "Esterified-glucomannan in broiler chicken diets-contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: Evaluation of its binding ability (*in vitro*) and efficacy as immunomodulator." *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* no. 15 (7):1051-1056.
- Ray, M., A. Ray, S. Dash, A. Mishra, K. Gopinath Achary, S. Nayak, and S. Singh. 2017. "Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors." *Biosensors and Bioelectronics* no. 87:708-723. doi: 10.1016/j.bios.2016.09.032.
- Rebouças, E. de L., J. J. do N. Costa, M. J. Passos, J. R. de S. Passos, R. van den Hurk, and J. R. V. Silva. 2013. "Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues." *Brazilian Archives of Biology and Technology* no. 56 (1):143-154.
- Reddy, K. R. N., C. S. Reddy, and K. Muralidharan. 2009. "Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice." *Pesticide Biochemistry and Physiology* no. 93:53-57. doi: 10.1016/j.pestbp.2008.11.002.
- Reddy, K. R. N., D. Spadaro, M. L. Gullino, and A. Garibaldi. 2011. "Potential of two *Metschnikowia pulcherrima* (yeast) strains for *in vitro* biodegradation of patulin." *Journal of Food Protection* no. 74 (1):154-156.
- Reis, T. A., T. D. Oliveira, P. Zorzete, P. Faria, and B. Corrêa. 2020. "A non-toxigenic *Aspergillus flavus* strain prevents the spreading of *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize." *Toxicon* no. 181:6-8. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.04.091.
- Ren, X., Q. Zhang, W. Zhang, J. Mao, and P. Li. 2020. "Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: Inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors." *Toxins* no. 12 (24). doi: 10.3390/toxins12010024.
- Repećkienė, J., L. Levinskaitė, A. Paškevičius, and V. Raudonienė. 2013. "Toxin-producing fungi on feed grains and application of yeasts for their detoxification." *Polish Journal of Veterinary Sciences* no. 16 (2):391-393.
- Rossi, V., S. Giosuè, E. Patteri, F. Spanna, and A. Del Vecchio. 2003. "A model estimating the risk of *Fusarium* head blight on wheat." *Bulletin EPPO* no. 33 (3):421-425. doi: 10.1111/j.1365-2338.2003.00667.x.

- Rossi, V., F. Salinari, S. Poni, T. Caffi, and T. Bettati. 2014. "Addressing the implementation problem in agricultural decision support systems: The example of vite.net." *Computers and Electronics in Agriculture* no. 100 88–99. doi: 10.1016/j.compag.2013.10.011.
- Rouhani, M., M. Moradi, M. T. Hamed-Mosavian, and S. Reza Fani. 2018. "Efficacy of saprophytic yeasts on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production." *Pistachio and Health Journal* no. 1 (1):26-30. doi: 10.22123/PHJ.2017.54297.
- Russelle, M. P., W. W. Wilhelm, R. A. Olson, and J. F. Power. 1984. "Growth analysis based on degree days." *Crop Science* no. 24 (1):28-32. doi: 10.2135/cropsci1984.0011183X002400010007x.
- Sabet, F., H. Khabbaz, M. Hosseini, M. Dadmehr, and M. Reza Ganjali. 2017. "FRET-based aptamer biosensor for selective and sensitive detection of Aflatoxin B1 in peanut and rice." *Food Chemistry* no. 220:527-532. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.004.
- Sakuda, S., D. F. Prabowo, K. Takagi, K. Shiomi, M. Mori, S. Ōmura, and H. Nagasawa. 2014. "Inhibitory effects of respiration inhibitors on aflatoxin production." *Toxins* no. 6:1193-1200. doi: 10.3390/toxins6041193.
- Salhi, H., M. Ben Mimoun, and M. Ghrab. 2014. "Chilling and heat requirements for flowering of the main pistachio Tunisian cultivar 'Mateur'." *Acta horticulturae* no. 1028 (ISHS):117-122.
- Saligkarias, I. D., F. T. Gravanis, and H. A. Epton. 2002. "Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II. A study on mode of action." *Biological Control* no. 25 (2):151-161.
- Santos, L., S. Marín, V. Sanchis, and A. J. Ramos. 2011. "In vitro effect of some fungicides on growth and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from Capsicum powder." *Food Additives and Contaminants* no. 28 (1):98-106. doi: 10.1080/19440049.2010.529622.
- Sapsford, K. E., C. R. Taitt, S. Fertig, M. H. Moore, M. E. Lassman, C. M. Maragos, and L. C. Shriver-Lake. 2006. "Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor." *Biosensors and Bioelectronics* no. 21:2298-2305. doi: 10.1016/j.bios.2005.10.021.
- Saremi, H., M. Okhovvat, and H. Saremi. 2009. "Control managements of *Aspergillus flavus* a main aflatoxin producers and soil borne fungi on pistachio in Kerman." *Iranian Food Science and Technology Research Journal* no. 3 (2).
- Sarhang Pour, R., M. Rasti, H. Zighamian, and A. Daraei Garmakhani. 2010. "Occurrence of aflatoxins in pistachio nuts in Esfahan Province of Iran." *Journal of Food Safety* no. 30:330-340. doi: 10.1111/j.1745-4565.2009.00210.x.
- Saupé, S., C. Clavé, M. Sabourin, and J. Bégueret. 2000. "Characterization of hch, the *Podospora anserina* homolog of the het-c heterokaryon incompatibility gene of *Neurospora crassa*." *Current Genetics* no. 38:39-47.
- Savic, Z., T. Dudaš, M. Loc, M. Grahovac, D. Budakov, I. Jajic, S. Krstovic, T. Baroševic, R. Krska, M. Sulyok, V. Stojšin, M. Petreš, A. Stankov, J. Vukotic, and F. Bagi. 2020. "Biological control of aflatoxin in maize grown in Serbia." *Toxins* no. 12:162. doi: 10.3390/toxins12030162.

- Schatzki, T. F., and M. S. Ong. 2000. "Distribution of Aflatoxin in Almonds. 2. Distribution in Almonds with Heavy Insect Damage." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* no. 48:489-492. doi: 10.1021/jf990369b.
- Schatzmayr, G., D. Heidler, E. Fuchs, S. Nitsch, M. Mohnl, M. Täubel, and E. M. Binder. 2003. "Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A." *Mycotoxin Research* no. 19 (2):124-128.
- Schmidt-Heydt, M., D. Stoll, and R. Geisen. 2013. "Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species." *International Journal of Food Microbiology* no. 166:407-412. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.019.
- Schmitt, H. J., E. M. Bernard, J. Andrade, F. Edwards, B. Schmitt, and D. Armstrong. 1988. "MIC and fungicidal activity of Terbinafine against clinical isolates of *Aspergillus* spp." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* no. 32 (5):780-781.
- Schöneberg, T., C. Martin, F. E. Wettstein, T. D. Bucheli, F. Mascher, M. Bertossa, T. Musa, B. Keller, and S. Vogelgsang. 2016. "*Fusarium* and mycotoxin spectra in Swiss barley are affected by various cropping techniques." *Food Additives and Contaminants* no. 33 (10):1608-1619.
- Schubert, M., M. Houdelet, K.-H. Kogel, R. Fischer, S. Schillberg, and G. No'ike. 2015. "Thanatin confers partial resistance against aflatoxigenic fungi in maize (*Zea mays*)." *Transgenic Research* no. 24: 885-895.
- Scorzetti, G., J. W. Fell, A. Fonseca, and A. Statzell-Tallman. 2002. "Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions." *FEMS Yeast Research* no. 2 (4):495-517.
- Sedighi-Khavidak, S., M. Mazloum-Ardakani, M. R. Khorasgani, G. Emtiazi, and L. Hosseinzadeh. 2017. "Detection of *aflD* gene in contaminated pistachio with *Aspergillus flavus* by DNA based electrochemical biosensor." *International Journal of Food Properties* no. 20 (S1):119-130. doi: 10.1080/10942912.2017.1291675.
- Senghor, L. A., A. Ortega-Beltran, J. Atehnkeng, K. A. Callicott, P. J. Cotty, and R. Bandyopadhyay. 2020. "The atoxigenic biocontrol product Aflasafe SN01 is a valuable tool to mitigate aflatoxin contamination of both maize and groundnut cultivated in Senegal." *Plant Disease* no. 104:510-520. doi: 10.1094/PDIS-03-19-0575-RE.
- Sergeyeva, T., D. Yarynka, E. Piletska, R. Linnik, O. Zaporozhets, O. Brovko, S. Piletsky, and A. El'skaya. 2019. "Development of a smartphone-based biomimetic sensor for aflatoxin B1 detection using molecularly imprinted polymer membranes." *Talanta* no. 201:204-210. doi: 10.1016/j.talanta.2019.04.016.
- Shakerardekani, A., R. Karim, and F. Mirdamadiha. 2012. "The effect of sorting on aflatoxin reduction of pistachio nuts." *Journal of Food, Agriculture & Environment* no. 10 (1):459-461.
- Shams-Ghahfarokhi, M., S. Kalantari, and M. Razzaghi-Abyaneh. 2013. "Terrestrial bacteria from agricultural soils: Versatile weapons against aflatoxigenic fungi." In *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*, edited by Mehdi Razzaghi-Abyaneh.

- Sharma-Poudyal, D., D. Schlatter, C. Yin, S. Hulbert, and T. Paulitz. 2017. "Long-term no-till: A major driver of fungal communities in dryland wheat cropping systems." *PLoS ONE* no. 12 (9):e0184611. doi: 10.1371/journal.pone.0184611.
- Sheikh-Ali, S. I., A. Ahmad, S.-H. Mohd-Setapar, Z. A. Zakaria, N. Abdul-Talib, A. K. Khamis, and Md Enamul Hoque. 2014. "The potential hazards of *Aspergillus* sp. in foods and feeds, and the role of biological treatment: A review." *Journal of Microbiology* no. 52 (10):807-818. doi: 10.1007/s12275-014-4294-7.
- Shetty, P. H., B. Hald, and L. Jespersen. 2007. "Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods." *International Journal of Food Microbiology* no. 113 (1):41-46.
- Shi, L., Z. Liang, J. Li, J. Hao, Y. Xu, K. Huang, J. Tian, X. He, and W. Xu. 2013. "Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW 14." *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi: 10.1002/jsfa.6507.
- Shim, W.-B., Z.-Y. Yang, J.-S. Kim, J.-Y. Kim, S.-J. Kang, G.-J. Woo, Y.-C. Chung, S. A. Eremin, and D.-H. Chung. 2007. "Development of immunochromatography strip-test using nanocolloidal gold-antibody probe for the rapid detection of aflatoxin B1 in grain and feed samples." *Journal of Microbiology and Biotechnology* no. 17 (10):1629–1637.
- Shynkarenko, O. V., and S. A. Kravchenko. 2015. "Surface plasmon resonance sensors: Methods of surface functionalization and sensitivity enhancement." *Theoretical and Experimental Chemistry* no. 51:273-292. doi: 10.1007/s11237-015-9427-5.
- Siahmoshteh, F., I. Siciliano, H. Banani, Z. Hamidi-Esfahani, M. Razzaghi-Abyaneh, M. L. Gullino, and D. Spadaro. 2017. "Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production on pistachio." *International Journal of Food Microbiology* no. 254:47-53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.011.
- Snelders, E., S. M. T. Camps, A. Karawajczyk, G. Schaftenaar, G. H. J. Kema, H. A. van der Lee, C. H. Klaassen, W. J. G. Melchers, and P. E. Verweij. 2012. "Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*." *PLoS ONE* no. 7 (3):e31801. doi: 10.1371/journal.pone.0031801.
- Sommer, N. F., J. R. Buchanan, and R. J. Fortlage. 1986. "Relation of early splitting and tattering of pistachio nuts to aflatoxin in the orchard." *Phytopathology* no. 76 (Postharvest Pathology and Mycotoxins):692-694.
- Song, S., N. Liu, Z. Zhao, E. Njumbe Ediage, S. Wu, C. Sun, S. De Saeger, and A. Wu. 2014. "Multiplex lateral flow immunoassay for mycotoxin determination." *Analytical Chemistry* no. 86:4995-5001. doi: 10.1021/ac500540z.
- Spadaro, D., and M. L. Gullino. 2004. "State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases." *International Journal of Food Microbiology* no. 91:185-194. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00380-5.
- Srivastava, S., M. D. Ali, S. Umrao, U. K. Parashar, A. Srivastava, G. Sumana, B. D. Malhotra, S. S. Pandey, and S. Hayase. 2014. "Graphene oxide-based biosensor for food toxin detection." *Applied Biochemistry and Biotechnology* no. 174 (960).



- Stepman, F. 2018. "Scaling-up the impact of aflatoxin research in Africa. The role of social sciences." *Toxins* no. 10 (136). doi: 10.3390/toxins10040136.
- Stratilová, E., M. Džúrová, E. Breierová, and J. Omelková. 2006. "Production and biochemical characterization of polygalacturonases produced by *Aureobasidium pullulans* from forest soil." *Annals of Microbiology* no. 56.
- Suberu, H. 2004. "Preliminary studies of inhibitions in *Aspergillus flavus* with extracts of two lichens and Bentex-T fungicide." *African Journal of Biotechnology* no. 3 (9):468-472.
- Sun, D. D., X. Gu, J. G. Li, T. Yao, and Y. C. Dong. 2015. "Quality evaluation of five commercial enzyme linked immunosorbent assay kits for detecting aflatoxin B1 in feedstuffs." *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* no. 28:691-696. doi: 10.5713/ajas.14.0868.
- Suproniene, S., A. Mankeviciene, G. Kadziene, D. Feiziene, V. Feiza, R. Semaskiene, and Z. Dabkevicius. 2011. "The effect of different tillage-fertilization practices on the mycoflora of wheat grains." *Agricultural and Food Science* no. 20:315-326.
- Susca, A., R. H. Proctor, M. Morelli, M. Haidukowski, A. Gallo, A. F. Logrieco, and A. Moretti. 2016. "Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. Welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins." *Frontiers in Microbiology* no. 7 (1412). doi: 10.3389/fmicb.2016.01412.
- Tan, Y., X. Chu, G. L. Shen, and R. Q. Yu. 2009. "A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice." *Analytical Biochemistry* no. 387:82-86.
- Tayel, A. A., W. F. El-Tras, S. H. Moussaa, and M. A. El-Agamy. 2013. "Antifungal action of *Pichia anomala* against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and its application as a feed supplement." *Journal of the Science of Food and Agriculture* no. 93:3259-3263. doi: 10.1002/jsfa.6169.
- Teixido, N., T. Cañamás, J. Usall, R. Torres, N. Magan, and I. Viñas. 2005. "Accumulation of the compatible solutes, glycinebetaine and ectoine, in osmotic stress adaptation and heat shock cross-protection in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2." *Letters in Applied Microbiology* no. 41:248-252.
- Teniola, O. D., P. A. Addo, I. M. Brost, P. Färber, K. D. Jany, J. F. Alberts, and W. H. Holzapfel. 2005. "Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorivans* sp. nov. DSM44556T." *International Journal of Food Microbiology* no. 105 (2):111-117.
- Thomidis, T., T. Michailides, and E. Exadaktylou. 2009. "Contribution of pathogens to peach fruit rot in Northern Greece and their sensitivity to iprodione, carbendazim, thiophanate-methyl and tebuconazole fungicides." *Journal of Phytopathology* no. 157:194-200. doi: 10.1111/j.1439-0434.2008.01469.x.
- Tiwari, S., and J. Shankar. 2018. "Integrated proteome and HPLC analysis revealed quercetin-mediated inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*." *3 Biotech* no. 8 (47).
- Torres, A. M., G. G. Barros, S. A. Palacios, S. N. Chulze, and P. Battilani. 2014. "Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination." *Food Research International* no. 62:11-19. doi: 10.1016/j.foodres.2014.02.023.



- Tournas, V. H., and S. U. Memon. 2009. "Internal contamination and spoilage of harvested apples by patulin-producing and other toxigenic fungi." *International Journal of Food Microbiology* no. 133 (1):206-209.
- Tryfinopoulou, P., L. Fengou, and E. Z. Panagou. 2019. "Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula mucilaginosa* on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius*." *LWT Food Science and Technology* no. 105: 66-78. doi: 10.1016/j.lwt.2019.01.050.
- Tryfinopoulou, P., A. Chourdaki, G.-J. E. Nychas, and E. Z. Panagou. 2020. "Competitive yeast action against *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production." *International Journal of Food Microbiology* no. 317 (108460) doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108460
- Tsitsigiannis, D. I., M. Dimakopoulou, P. P. Antoniou, and E. C. Tjamos. 2012. "Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops." *Phytopathologia Mediterranea* no. 51 (1):158-174. doi: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-9497.
- Tsitsigiannis, D. I., T. M. Kowieski, R. Zarnowski, and N. P. Keller. 2004b. "Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*." *Eukaryotic Cell* no. 3 (6):1398-1411. doi: 10.1128/EC.3.6.1398-1411.2004.
- Tsitsigiannis, D. I., R. Zarnowski, and N. P. Keller. 2004a. "The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*." *The Journal of Biological Chemistry* no. 279 (12):11344-11353. doi: 10.1074/jbc.M310840200.
- Tsitsigiannis, D., and N. Keller. 2007. "Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals." *Trends in Microbiology* no. 15 (3):109-118 doi: 10.1016/j.tim.2007.01.005.
- Udomkun, P., A. Nimo Wiredu, M. Nagle, J. Müller, B. Vanlauwe, and R. Bandyopadhyay. 2017. "Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application - A review." *Food Control* no. 76:127-138. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.01.008.
- Urusov, A. E., A. V. Zherdev, A. V. Petrakova, E. G. Sadykhov, O. V. Koroleva, and B. B. Dzantiev. 2015. "Rapid multiple immunoenzyme assay of mycotoxins." *Toxins* no. 7:238-254. doi: 10.3390/toxins7020238.
- Valasi, L., M. Georgiadou, P. A. Tarantilis, S. Yanniotis, and C. S. Pappas. 2020. "Rapid screening on aflatoxins' presence in *Pistacia vera* nuts using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and chemometrics." *Journal of Food Science and Technology*. doi: 10.1007/s13197-020-04549-5.
- Váňová, M., K. Klem, P. Matušinský, and M. Trnka. 2009. "Prediction model for deoxynivalenol in wheat grain based on weather conditions." *Plant Protection Science* no. 45 (S33-S37). doi: 10.17221/2834-PPS.
- Var, I., Z. Erginkaya, and B. Kabak. 2009. "Reduction of ochratoxin A levels in white wine by yeast treatments." *Journal of the Institute of Brewing* no. 115 (1):30-34.
- Vashist, S. K., C. K. Dixit, B. D. MacCraith, and R. O'Kennedy. 2011. "Effect of antibody immobilization strategies on the analytical performance of a surface plasmon resonance-based immunoassay." *The Analyst* no. 136:4431-4436. doi: 10.1039/c1an15325k.

- Vaughan-Martini, A., C. P. Kurtzman, S. A. Meyer, and E. B. O'Neill. 2005. "Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov." *FEMS Yeast Research* no. 5 (4-5):463-469.
- Vekiru, E., C. Hametner, R. Mitterbauer, J. Rechthaler, G. Adam, G. Schatzmayr, and R. Schuhmacher. 2010. "Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a novel nonestrogenic metabolite." *Applied and Environmental Microbiology* no. 76 (7):2353-2359.
- Veloukas, T., and G. S. Karaoglanidis. 2012. "Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity." *Pest Management Science* no. 68:858-864. doi: 10.1002/ps.3241.
- Visconti, A., G. Perrone, G. Cozzi, and M. Solfrizzo. 2008. "Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain." *Food Additives and Contaminants* no. 25 (2):193-202.
- Vosough, M., M. Bayat, and A. Salemi. 2010. "Matrix-free analysis of aflatoxins in pistachio nuts using parallel factor modeling of liquid chromatography diode-array detection data." *Analytica Chimica Acta* no. 663:11-18. doi: 10.1016/j.aca.2010.01.039.
- Wachowska, U., K. Kucharska, M. Jędrzycka, and N. Łobik. 2013. "Microorganisms as biological control agents against *Fusarium* pathogens in winter wheat." *Polish Journal of Environmental Studies* no. 22 (2).
- Waliyar, F., K. Vijay Krishna Kumar, M. Diallo, A. Traore, U. N. Mangala, H. D. Upadhyaya, and H. Sudini. 2016. "Resistance to pre-harvest aflatoxin contamination in ICRISAT's groundnut mini core collection." *European Journal of Plant Pathology* no. 145:901-913. doi: 10.1007/s10658-016-0879-9.
- Wang, C., and Q. Zhao. 2020. "A reagentless electrochemical sensor for aflatoxin B1 with sensitive signal-on responses using aptamer with methylene blue label at specific internal thymine." *Biosensors and Bioelectronics* no. 167 (112478).
- Wang, D., W. Hu, Y. Xiong, Y. Xu, and C. Li. 2015. "Multifunctionalized reduced graphene oxide-doped polypyrrole/pyrrolepropyic acid nanocomposite impedimetric immunosensor to ultra-sensitively detect small molecular aflatoxin B1." *Biosensors and Bioelectronics* no. 63 (185).
- Wang, K., P.-S. Yan, L.-X. Cao, Q.-L. Ding, C. Shao, and T.-F. Zhao. 2013. "Potential of chitinolytic *Serratia marcescens* strain JPP1 for biological control of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin." *BioMed Research International* (7):397142. doi: 10.1155/2013/397142.
- Wang, X., R. Niessner, D. Tang, and D. Knopp. 2016. "Nanoparticle-based immunosensors and immunoassays for aflatoxins." *Analytica Chimica Acta* no. 17:10-23. doi: 10.1016/j.aca.2016.01.048.
- Warburton, M. L., and W. P. Williams. 2014. "Aflatoxin resistance in maize: What have we learned lately?" *Advances in Botany* no. 352831.
- Weaver, M. A., and H. K. Abbas. 2019. "Field displacement of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* strains through repeated biological control applications." *Frontiers in Microbiology* no. 10:1788. doi: 10.3389/fmicb.2019.01788.

- Wei, D., L. Zhou, J. Nimal Selvaraj, C. Zhang, F. Xing, Y. Zhao, Y. Wang, and Y. Liu. 2014. "Molecular characterization of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates collected in China." *Journal of Microbiology* no. 52 (7):559-565. doi: 10.1007/s12275-014-3629-8.
- Wesolek, N., A. Ramirez-Martinez, and A. C. Roudot. 2014. "Mathematical approach for sampling plan performance assessment for aflatoxin B1 in pistachios." *Food Research International* no. 62:448-455. doi: 10.1016/j.foodres.2014.03.024.
- Wesolek, N., and A. C. Roudot. 2016. "Assessing aflatoxin B1 distribution and variability in pistachios: Validation of a Monte Carlo modeling method and comparison to the Codex method." *Food Control* no. 59:553-560. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.034.
- Wheeler, M. H., and M. A. Klich. 1995. "The effects of tricyclazole, pyroquilon, phthalide, and related fungicides on the production of conidial wall pigments by *Penicillium* and *Aspergillus* species." *Pesticide Biochemistry and Physiology* no. 52 (2):125-136. doi: 10.1006/pest.1995.1037.
- White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, 315-322. New York: Academic Press.
- Wicklow, D. T., and B. W. Horn. 2007. "Association between vegetative compatibility and aflatoxin production by *Aspergillus* species during intraspecific competition." *Mycoscience* no. 48:267-273.
- Williams, W. P., M. D. Krakowsky, B. T. Scully, R. L. Brown, A. Menkir, M. L. Warburton, and G. L. Windham. 2014. "Identifying and developing maize germplasm with resistance to accumulation of aflatoxins." *World Mycotoxin Journal* no. 8 (2):193-209. doi: 10.3920/WMJ2014.1751.
- Wilson, C. L. 1989. "Managing the microflora of harvested fruits and vegetables to enhanced resistance." *Phytopathology* no. 79:1387-1390.
- Wilson, C. L., and M. E. Wisniewski. 1989. "Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology." *Annual Review of Phytopathology* no. 27 (1):425-441.
- Windham, G. L., and W. P. Williams. 2007. "A comparison of inoculation techniques for inducing aflatoxin contamination and *Aspergillus flavus* kernel infection on corn hybrids in the field." *Phytoparasitica* no. 35 (3):244-252.
- Woloshuk, C. P., and W.-B. Shim. 2013. "Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge." *Microbiological Reviews* no. 37:94-109. doi: 10.1111/1574-6976.12009.
- Wu, F., D. Bhatnagar, T. Bui-Klimke, I. Carbone, R. Hellmich, G. Munkvold, P. Paul, G. Payne, and E. Takle. 2011. "Climate change impacts on mycotoxin risks in US maize." *World Mycotoxin Journal* no. 4 (1):79-93. doi: 10.3920/WMJ2010.1246.
- Xiong, B., and J. Beghin. 2017. "Does European aflatoxin regulation hurt groundnut exporters from Africa?" In *Nontariff Measures and International Trade*, edited by J. C. Beghin, 287-307. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Xu, X., X. Liu, Y. Li, and Y. Ying. 2013. "A simple and rapid optical biosensor for detection of aflatoxin B1 based on competitive dispersion of gold nanorods." *Biosensors and Bioelectronics* no. 47:361-367.

- Xu, Y., Y. Y. Gong, and M. N. Routledge. 2018. "Aflatoxin exposure assessed by aflatoxin albumin adduct biomarker in populations from six African countries." *World Mycotoxin Journal* no. 11:411-419. doi: 10.3920/WMJ2017.2284.
- Yiannikouris, A., G. André, L. Poughon, J. François, C. G. Dussap, G. Jeminet, and J. P. Jouany. 2006. "Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with  $\beta$ -D-glucans." *Biomacromolecules* no. 7 (4):1147-1155.
- Yiannikouris, A., J. Francois, L. Poughon, C. G. Dussap, G. Bertin, G. Jeminet, and J. P. Jouany. 2004. "Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall." *Journal of Food Protection* no. 67 (6):1195-1200.
- Yin, Y.-N., L.-Y. Yan, J.-H. Jiang, and Z.-H. Ma. 2008. "Biological control of aflatoxin contamination of crops." *Journal of Zhejiang University Science B* no. 9 (10):787-792. doi: 10.1631/jzus.B0860003.
- Yu, Q., Q. Wang, B. Li, Q. Lin, and Y. Duan. 2015. "Technological development of antibody immobilization for optical immunoassays: Progress and prospects." *Critical Reviews in Analytical Chemistry* no. 45:62-75. doi: 10.1080/10408347.2014.881249.
- Yue, H., W. Mo, C. Li, Y. Zheng, and H. Li. 2007. "The salt stress relief and growth promotion effect of Rs-5 on cotton." *Plant and Soil* no. 297 (1-2):139-145.
- Zahoor, M., and F. A. Khan. 2014. "Adsorption of aflatoxin B1 on magnetic carbon nanocomposites prepared from bagasse." *Arabian Journal of Chemistry*. doi: 10.1016/j.arabjc.2014.08.025.
- Zalar, P., C. Gostinčar, G. S. De Hoo, V. Uršič, M. Sudhadham, and N. Gunde-Cimerman. 2008. "Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties." *Studies in Mycology* no. 61:21-38.
- Zhang, G., C. Zhu, Y. Huang, J. Yan, and A. Chen. 2018. "A lateral flow strip based aptasensor for detection of ochratoxin A in corn samples." *Molecules* no. 23 (291):1-12. doi: 10.3390/molecules23020291.
- Zhang, H. L., L. N. Zhang, J. W. He, K. Jiang, H. Lou, and X. J. Meng. 2013. "Inhibition of recombinant chicken cystatin on expression of aflatoxin biosynthesis genes on peanut." *Advanced Materials Research* no. 815:350-357.
- Zhang, H., L. L. Scharfenstein, C. Carter-Wientjes, P.-K. Chang, D. Zhang, X. Meng, and J. Yu. 2015. "Lack of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* is associated with reduced fungal growth and delayed expression of aflatoxin pathway genes." *World Mycotoxin Journal* no. 8 (3):335-340. doi: 10.3920/WMJ2014.1758.
- Zhang, J., T. Ranford, and C. Taylor. 2015. "Heat model for pistachio bloom and harvest." *Scientia Horticulturae* no. 186:47-53. doi: 10.1016/j.scienta.2015.02.005.
- Zhang, X., C. R. Li, W. C. Wang, J. Xue, Y. L. Huang, X. X. Yang, and J. F. Qiu. 2016. "A novel electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B1 in corn using single-walled carbon nanotubes/chitosan." *Food Chemistry* no. 192:197-202.
- Zhao, J., Y. Mou, T. Shan, Y. Li, L. Zhou, M. Wang, and J. Wang. 2010. "Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*." *Molecules* no. 15 (11):7961-7970.

- Zhao, Y., J. Nimal Selvaraj, F. Xing, L. Zhou, Y. Wang, H. Song, X. Tan, L. Sun, L. Sangare, Y. Minnie Elodie Folly, and Y. Liu. 2014. "Antagonistic action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*." *PLoS ONE* no. 9 (3):e92486. doi: 10.1371/journal.pone.0092486.
- Zheng, X., Q. Yang, H. Zhang, J. Cao, X. Zhang, and M. T. Apaliya. 2016. "The possible mechanisms involved in degradation of patulin by *Pichia caribbica*." *Toxins* no. 8 (10):289.
- Γεωργιάδου, Ν. Μ. 2009. *Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστικά, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.*
- Γεωργιάδου, Ν. Μ. 2015. *Μελέτη φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών κελυφωτών φιστικών με στόχο την μείωση αφλατοξίνης, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.*
- Μπρουσοβάνας, Ν. 1980. *Η φιστικά. Λάρισα: Εκδόσεις Σ. Κλαπάκης.*
- Νούσης, Ι. 1999. *Νέα Δενδροκομία. Τόμος Β΄-Ειδική. Θεσσαλονίκη: Καλλιεργητής.*
- Ποντίκης, Κ. Α. 1996. *Ειδική Δενδροκομία. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλης.*
- Τζανακάκης, Μ. Ε., and Β. Ι. Κατσόγιαννος. 2003. *Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Αθήνα: Εκδόσεις Αγρότυπος.*
- Χιτζανίδου, Α., Π. Α. Μουρίκης, and Κ. Δ. Χολέβας. 2004. *Ασθένειες και Εντομολογικοί εχθροί της φιστικής στην Ελλάδα. Κηφισιά, Αθήνα: Εκδόσεις Μ.Φ.Ι.*