



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βιολογική αντιμετώπιση αφλατοξινών στο καλαμπόκι με τη χρήση
μη-τοξικογόνων στελεχών του μύκητα *Aspergillus flavus*

Σπυριδούλα Γ. Δημητροπούλου

Επιβλέπων Καθηγητής:

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2023**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βιολογική αντιμετώπιση αφλατοξινών στο καλαμπόκι με τη χρήση
μη-τοξικογόνων στελεχών του μύκητα *Aspergillus flavus*

“Biological control of aflatoxins in maize using non-aflatoxigenic
strains of *Aspergillus flavus*”

Σπυριδούλα Γ. Δημητροπούλου

Εξεταστική Επιτροπή:

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σωτήριος Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αλίκη Τζίμα, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Βιολογική αντιμετώπιση αφλατοξινών στο καλαμπόκι με τη χρήση μη-τοξικογόνων στελεχών του μύκητα *Aspergillus flavus*

ΠΜΣ Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μύκητας *Aspergillus flavus* προσβάλλει τον αραβόσιτο προκαλώντας σήψεις και παραγωγή καρκινογόνων μυκοτοξινών, των αφλατοξινών, με ιδιαίτερα επιβλαβείς συνέπειες στην παραγωγή αγροτικών προϊόντων και ζωοτροφών. Η χρήση χημικών μυκητοκτόνων για τον έλεγχο της μόλυνσης από μυκοτοξίνες στην τροφική αλυσίδα είναι όλο και πιο αμφιλεγόμενη. Ως εκ τούτου, διερευνώνται πιο φιλικές προς το περιβάλλον μέθοδοι. Η επικρατέστερη προσέγγιση για τη βιολογική αντιμετώπιση του *Aspergillus flavus* και των αφλατοξινών που παράγει, είναι η εφαρμογή σκευασμάτων με βάση μη τοξικογόνα στελέχη του ίδιου του μύκητα.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αφλατοξικογόνου ικανότητας 99 ενδημικών απομονώσεων *Aspergillus section Flavi*, που συλλέχθηκαν τα έτη 2014 και 2016 από περιοχές της Θεσσαλίας και Μακεδονίας. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της τοξικογόνου ικανότητας όλων των στελεχών με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC). Οι 36 εκ του συνόλου των απομονώσεων αυτών χαρακτηρίστηκαν ως αφλατοξικογόνες ενώ οι υπόλοιπες 63 αποδείχτηκε ότι δεν παράγουν αφλατοξίνη B1 και χαρακτηρίστηκαν ως μη τοξικογόνες.

Ακολούθως, οι 63 μη τοξικογόνες απομονώσεις *A.flavus* αξιολογήθηκαν, *in vitro*, ως προς την ικανότητά τους να μειώνουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες των τοξικογόνων στελεχών, σε συγκαλλιέργεια με δύο ισχυρά τοξικογόνα στελέχη, BAF47 και AAF24. Ακολούθησε εξαγωγή των αφλατοξινών και ανάλυση με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Παρατηρήθηκε ότι 34 απομονώσεις εκ των 63 μη τοξικογόνων αποδείχθηκαν αρκετά αποτελεσματικές σε συγκαλλιέργεια με το τοξικογόνο στέλεχος AAF24 αφού κατάφεραν να παρεμποδίσουν έως και πλήρως την παραγωγή αφλατοξίνης B1 από το τοξικογόνο στέλεχος. Αντίστοιχα, για το τοξικογόνο στέλεχος BAF47, 13 απομονώσεις εκ των 63 μη τοξικογόνων κατάφεραν να παρεμποδίσουν έως και πλήρως την παραγωγή αφλατοξίνης B1. Συνολικά 38 μη τοξικογόνες απομονώσεις, παρεμπόδισαν έως και πλήρως την παραγωγή αφλατοξινών από τα τοξικογόνα στελέχη AAF24 και BAF47.

Στη συνέχεια, οι αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις *A.flavus*, αξιολογήθηκαν έναντι των παραγόμενων αφλατοξινών των δύο ισχυρά τοξικογόνων στελεχών, AAF24 και BAF47, *in situ*, σε σπόρους καλαμποκιού. Η ποσοτική ανάλυση των παραγόμενων αφλατοξινών διεξήχθη με την ανοσοχημική μέθοδο ELISA. Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων φαίνεται πως όλες οι μη τοξικογόνες απομονώσεις παρεμποδίζουν στατιστικά σημαντικά την παραγωγή αφλατοξινών από τα δύο τοξικογόνα στελέχη AAF24 και BAF47. Τα επίπεδα παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών έφτασαν το 98% συγκριτικά με τον μάρτυρα BAF47 και 96% συγκριτικά με το AAF24. Συνεπώς, η *in vitro* ικανότητα των μη τοξικογόνων απομονώσεων *A.flavus* να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών, επιβεβαιώθηκε και *in situ*, σε σπόρους καλαμποκιού.

Επιπρόσθετα, οι μη τοξικογόνες απομονώσεις *A.flavus* κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (VCGs) με σκοπό τον έλεγχο της προσαρμοστικότητάς τους στο τοπικό περιβάλλον. Βάσει των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν, η κατάταξή τους έγινε σε

23 διακριτές ομάδες βλαστικής συμβατότητας ενώ η πλειοψηφία των απομονώσεων φαίνεται ότι ανήκει κυρίως σε τρεις μεγάλες ομάδες από αυτές.

Τέλος, οι 35 αποτελεσματικότερες μη τοξικογόνες απομονώσεις *A.flavus* εφαρμόστηκαν σε σπάδικες καλαμποκιού, ύστερα από μόλυνση τους με τοξικογόνα στελέχη, σε συνθήκες αγρού. Παρατηρήθηκε ότι τα μη τοξικογόνα στελέχη διέφεραν ως προς την ικανότητά τους να μειώνουν την αφλατοξίνη. 11 από αυτά κατάφεραν να παρεμποδίσουν την παραγωγή αφλατοξινών σε ποσοστά που υπερβαίνουν 94 % φθάνοντας έως και 100 %, σε σχέση με το μάρτυρα.

Εν κατακλείδι, σύμφωνα με τα ευρήματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω, ορισμένα από τα μη τοξικογόνα στελέχη αυτά θα μπορούσαν δυνητικά να αποτελέσουν βιολογικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση του *A.flavus* και των παραγόμενων αφλατοξινών του, στα πλαίσια ενός ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης για την καλλιέργεια του καλαμποκιού στην Ελλάδα.

Επιστημονική Περιοχή: Φυτοπαθολογία

Λέξεις κλειδιά: καλαμπόκι, *Aspergillus flavus*, αφλατοξίνες, μη τοξικογόνα στελέχη, βιολογική αντιμετώπιση, VCGs

Biological control of aflatoxins in maize using non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*

MSc Integrated Plant Protection and Environmental Management

Department of Crop Science

Laboratory of Plant Pathology

ABSTRACT

Aspergillus flavus causes ear and grain molds in maize and produces carcinogenic mycotoxins, aflatoxins, with particularly harmful consequences in the production of agricultural products and animal feed. The use of chemical fungicides to control mycotoxin contamination is increasingly controversial and regulated. More environmentally friendly methods are therefore being explored. The use of atoxigenic *Aspergillus* strains as biological agents, appears to be the most promising available method of reducing aflatoxin accumulation.

In the present study, the aflatoxigenic capacity of 99 endemic *Aspergillus* section *Flavi* isolates, collected in 2014 and 2016 from the regions of Thessaly and Macedonia, was tested. An evaluation of the ability to produce aflatoxins of all strains was initially performed using thin-layer chromatography (TLC). 36 of these isolates were characterized as aflatoxigenic while the remaining 63 were proved to not produce aflatoxin B1 and were therefore characterized as non-toxicogenic.

Subsequently, the 63 non-toxicogenic *A.flavus* isolates were evaluated, *in vitro*, for their ability to reduce the aflatoxin production in co-culture with two highly toxigenic strains, BAF47 and AAF24. The aflatoxin extraction and analysis were carried out using thin layer chromatography (TLC). It was observed that 34 out of the 63 non-toxicogenic isolates were proven to be effective in co-culture with the toxigenic strain AAF24, i.e. they managed to completely inhibit the production of aflatoxin B1, produced by the toxigenic strain. Correspondingly, 13 isolates out of the 63 non-toxicogenic strains were able to completely inhibit the aflatoxin B1 production of the toxigenic strain BAF47. In total, 38 non-toxicogenic isolates were capable of inhibiting, even completely, the aflatoxin production of the toxigenic strains AAF24 and BAF47.

Then, the inhibitory capacity of the most effective atoxigenic *A.flavus* strains was evaluated in maize kernels *in situ*. The produced aflatoxins were quantified using ELISA and it was demonstrated that all the non-toxicogenic isolates inhibited the production of aflatoxins by the two highly toxigenic strains AAF24 and BAF47 statistically significantly. Aflatoxin production inhibition levels reached 98% compared to the control, BAF47, and 96% compared to AAF24. Therefore, the *in vitro* ability of non-toxicogenic *A.flavus* isolates to inhibit aflatoxin production was also confirmed *in situ*, in maize.

In addition, the non-toxicogenic *A.flavus* isolates were clustered into vegetative compatibility groups (VCGs), in order to check their adaptability to the environment conditions. Based on the experimental results, the atoxigenic strains were classified into 23 distinct vegetative compatibility groups while the majority of them appeared to belong mainly to three major groups.

Finally, the competitive ability of 35 non-toxicogenic strains of *A.flavus* on the production of aflatoxins in field experiments, during co-inoculation with an aflatoxigenic isolate in maize kernels, was evaluated. It was demonstrated that non-toxicogenic strains differed in their ability to reduce aflatoxin. 11 of these isolates presented significant reductions in aflatoxin contamination in the range of 94% up to 100%, compared to the control.

In conclusion, according to the above-mentioned findings, some of these non-toxigenic strains could potentially be used as biological agents for the control of *A.flavus* and its produced aflatoxins, as part of an integrated management system for the protection of maize cultivations in Greece.

Scientific area: Plant pathology

Key words: maize, *Aspergillus flavus*, aflatoxins, non-toxigenic isolates, biological control, VCGs

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών από το Μάϊο του 2021 έως και τον Νοέμβριο του 2022, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημητρίου Τσιτσιγιάννη. Εκπονήθηκε στο πλαίσιο της φοίτησής μου στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος», του τμήματος Επιστήμης Φυτικής παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ).

Αρχικά, είμαι ευγνώμων για τη συνεργασία μου με τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη. Τον ευχαριστώ για το ενδιαφέρον και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου μελέτη ως μέλος της επιστημονικής του ομάδας. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Αν. Καθηγητή κ. Σωτήριο Τζάμο και την Επ. Καθηγήτρια κα. Αλίκη Τζίμα, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση της διπλωματικής μου μελέτης.

Απευθύνω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία Βαρβέρη για την καθοδήγηση αλλά και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της διπλωματικής μου μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Ηλιάδη αλλά και όλη την ομάδα του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για τη συμπαράσταση και την ουσιαστική βοήθειά τους μέσω των συμβουλών τους που μου παρείχαν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, για την ανεξάντλητη υπομονή και στήριξη που μου παρέχουν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Ο αραβόσιτος (<i>Zea mays</i>)	1
1.1.1 Καταγωγή και ιστορικά στοιχεία.....	1
1.1.2 Βοτανική ταξινόμηση	5
1.1.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	5
1.1.4 Στάδια ανάπτυξης αραβόσιτου	11
1.1.5 Σύσταση και θρεπτική αξία του καλαμποκιού	14
1.1.6 Στατιστικά στοιχεία	16
1.1.7 Η καλλιέργεια του αραβόσιτου	18
1.1.7.2 Θρέψη	19
1.1.7.3 Άρδευση.....	20
1.1.7.4 Σπορά - Φύτευση.....	21
1.1.7.5 Συγκομιδή	22
1.1.7.6 Αποθήκευση αραβόσιτου	23
1.1.8 Εχθροί και Ασθένειες.....	25
1.1.8.1 Εχθροί	25
1.1.8.2 Ασθένειες.....	26
1.2 Το γένος <i>Aspergillus</i> spp.....	34
1.2.1 Ταξινόμηση και μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Aspergillus</i> sp.....	35
1.2.2 <i>Aspergillus</i> spp. section <i>Flavi</i>	38
1.2.3 <i>Aspergillus flavus</i>	41
1.2.4 Δευτερογενείς μεταβολίτες	44
1.3 Οι Αφλατοξίνες.....	46
1.3.1 Εισαγωγή	46
1.3.2 Βιοσύνθεση Αφλατοξινών	48
1.3.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών.....	51
1.3.3 Επιπτώσεις αφλατοξινών σε ανθρώπους και ζώα	53
1.3.4 Νομοθεσία για προϊόντα μολυσμένα από αφλατοξίνες.....	56
1.4 Έλεγχος του προβλήματος των αφλατοξινών.....	58
1.4.1 Χρήση μη τοξικογόνων στελεχών <i>Aspergillus flavus</i>	59
1.4.2 Βιολογική αντιμετώπιση με χρήση επιφυτικών μικροοργανισμών	65
1.4.2.1 Χρήση μυκητών και ζυμών	66
1.4.2.2 Χρήση βακτηρίων.....	67
1.4.3 Βιοδραστικές ενώσεις από φυτικά εκχυλίσματα	70

1.4.4 Φυσικές μέθοδοι	71
1.4.5 Χημικές μετασυσλεκτικές μέθοδοι	75
1.4.6 Γενετική Μηχανική	77
1.5 Ομάδες βλαστικής Συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups- VCGs)	79
1.5.1 Εισαγωγή	79
1.5.2 Μεταλλαγές Nit ⁻ και κατάταξη σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (VCGs)	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	86
3.1 Υλικά	86
3.2 Μέθοδοι.....	90
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	106
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	121
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	128

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

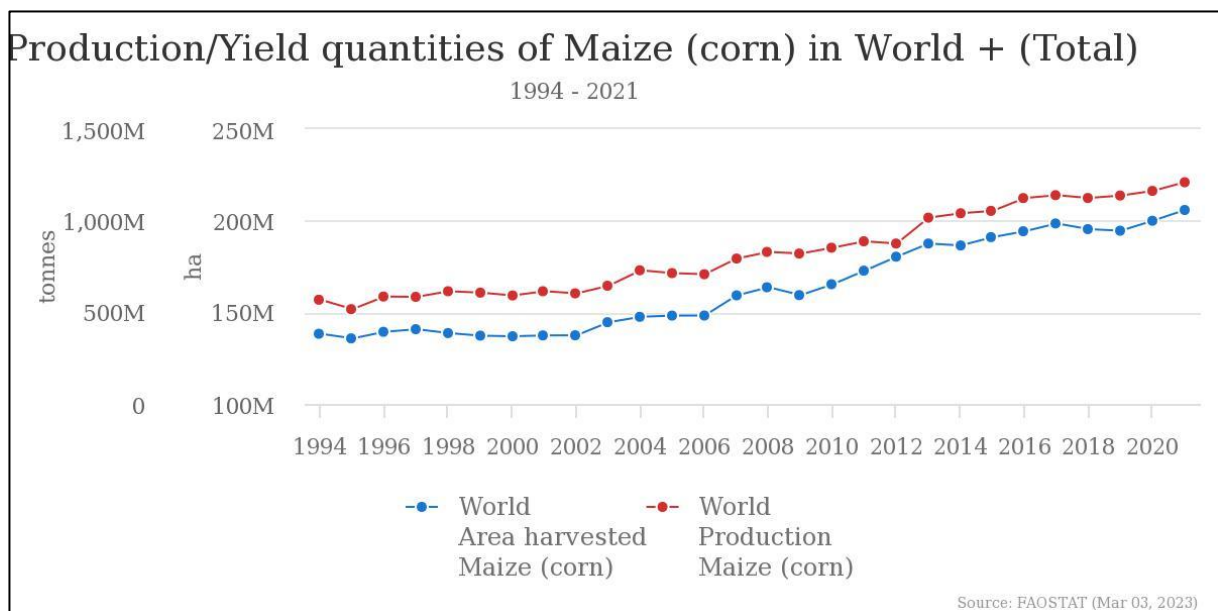
1.1 Ο αραβόσιτος (*Zea mays*)

1.1.1 Καταγωγή και ιστορικά στοιχεία

Ο Αραβόσιτος ή καλαμπόκι είναι σιτηρό της οικογένειας των Ποσειδών (*Poaceae*) ή Αγρωστωδών (*Gramineae*), ανήκει στο γένος *Zea* και στο είδος *Zea mays* L. Παρότι είναι ένα από τα φυτά που έχουν μελετηθεί περισσότερο, ακόμη υπάρχει ασυμφωνία απόψεων μεταξύ των επιστημόνων ως προς την περιοχή προέλευσης του αλλά και την εξελικτική του πορεία. Υπάρχουν διάφορες θεωρίες σχετικά με την καταγωγή του αραβόσιτου. Οι επικρατέστερες υποστηρίζουν ότι το φυτό είναι αμερικανικής προέλευσης και σύμφωνα με την πιο πρόσφατη αρχαιολογική ανακάλυψη πιστοποιείται η παρουσία του στην κοιλάδα της περιοχής Balsas του νοτιοδυτικού Μεξικού, όπου θεωρείται ότι εξημερώθηκε από το υποείδος *teosinte* (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) πριν από 9.000 χρόνια (Mangelsdorf, 1947²). Γενικά, η παραλλακτικότητα του φυτού και η ικανότητά του να προσαρμόζεται και να αναπαράγεται σε μια ευρεία ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών οδήγησε στην υπόθεση ότι ο κεντρικός οικονομικός του ρόλος στην κοινωνικοπολιτισμική ανάπτυξη ήταν η ίδια η βάση της μεταμόρφωσής του από τον άγριο πρόγονό του *Zea mays* ssp. *parviglumis* στο εξημερωμένο καλαμπόκι (Matsuoka et al. 2002³). Από το Μεξικό, η καλλιέργεια του αραβόσιτου διαδόθηκε στην κεντρική και νότια Αμερική όπου και στήριξε μεγάλους πολιτισμούς όπως των Αζτέκων (Μεξικό), των Μάγιας (Γιουκατάν), και των Ίνκας (Περού, Βολιβία, Ισημερινός). Η πρώτη επαφή του Δυτικού κόσμου με τον αραβόσιτο έγινε με τον Κολόμβο στην Κούβα το 1492 και δείγματα από το νέο αυτό φυτικό είδος μεταφέρθηκαν στην Ευρώπη το 1492 ή 1494. Η εισαγωγή του στην καλλιέργεια υπολογίζεται ότι έγινε στις αρχές του 16ου αιώνα, εάν ληφθεί υπόψη ότι ήδη από το 1532 καλλιεργείται στην Ιταλία, και στη συνέχεια εξαπλώθηκε ταχύτατα σε όλη την Ευρώπη, την Αφρική και τη Μέση Ανατολή, φθάνοντας στην Κίνα και στις Φιλιππίνες το 1575. Στην Ελλάδα εισήχθη το 1600 μ.Χ. από τη Βόρεια Αφρική με το όνομά του, «αραβόσιτος», να σημαίνει «σίτος των Αράβων» (Καραμάνος, 2002).

Σήμερα ο αραβόσιτος καλλιεργείται ουσιαστικά σε όλες τις χώρες του κόσμου. Αποτελεί το τρίτο σε σπουδαιότητα σιτηρό στον κόσμο μετά το σιτάρι και το ρύζι. Προσαρμόζεται σε ευρύ φάσμα κλιματολογικών συνθηκών, λόγω των πολλών διαφορετικών τύπων του, οι

οποίοι έχουν βιολογικό κύκλο από 2 έως 11 μήνες. Η καλλιεργούμενη έκταση με καλαμπόκι το 2021 ανήλθε σε 2.492 εκ. στρ. και η παραγωγή σε 1.482 εκ. τόνους σπόρου (FAOSTAT, 2021). Η κορυφαία χώρα παραγωγής αραβοσίτου παγκοσμίως είναι οι ΗΠΑ. Την ίδια στιγμή, η Κίνα, η Βραζιλία και η Αργεντινή αντιπροσωπεύουν πάνω από το 60% της συνολικής παραγωγής στον αναπτυσσόμενο κόσμο, ακολουθούμενες από την Ουκρανία και τη Γαλλία σε ευρωπαϊκό επίπεδο. Ο τύπος αραβοσίτου που καλλιεργείται ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων περιοχών ή χωρών. Ο κίτρινος αραβόσιτος κυριαρχεί επί του παρόντος στη ζώνη καλαμποκιού των ΗΠΑ, στον Καναδά και σε μεγάλο μέρος της Ευρώπης, ενώ στις υπανάπτυκτες χώρες, οι ποικιλίες λευκού καλαμποκιού έχουν μεγαλύτερη ζήτηση καθώς επηρεάζονται από τις πολιτιστικές τους παραδόσεις.



Εικόνα 1: Γραφική απεικόνιση της εξέλιξης της παραγωγής και απόδοσης του καλαμποκιού σε τόνους κατά το χρονικό διάστημα 1994-2021 παγκοσμίως (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>)

Σε παγκόσμιο επίπεδο ο αραβόσιτος καλλιεργείται κυρίως για τον καρπό του και δευτερευόντως για παραγωγή βιομάζας για άμεση κατανάλωση ή ενσίρωση. Ο καρπός χρησιμοποιείται κυρίως ως ζωοτροφή, σε ποσοστό 82%. Μια όμως σημαντική ποσότητα καταναλώνεται από τον άνθρωπο με διάφορους τρόπους (λαχανικό, αλεύρι). Το καλαμπόκι, ως η κύρια πηγή αμύλου, παρέχει πάνω από το 85% του αμύλου που παράγεται σε όλο τον κόσμο (Rapun et al., 2014⁴). Το άμυλο του καλαμποκιού αποτελείται από δύο διαφορετικά πολυμερή γλυκόζης, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Τα δύο αυτά μόρια έχουν διακριτικά χαρακτηριστικά που προσφέρουν ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων. Η λειτουργική ποικιλομορφία

που παρέχεται από τα μόρια αυτά καθιστά το φυσικό και τροποποιημένο άμυλο αραβοσίτου προσαρμόσιμο και πολύτιμο βιομηχανικό πόρο. Με την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας, το άμυλο αραβοσίτου είναι πλέον το κύριο υλικό που χρησιμοποιείται στην παραγωγή βιοαιθανόλης, γιατί μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε απλά σάκχαρα με υδρόλυση και στη συνέχεια να τροφοδοτηθεί στο *Saccharomyces cerevisiae* πριν από τη ζύμωση για την παραγωγή αιθανόλης. Σχεδόν το 70% της παραγωγής αραβοσίτου στις ΗΠΑ χρησιμοποιείται για ζωοτροφές και παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης (βιοκαύσιμα). Αντίθετα, στην ΕΕ, το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή. Επιπλέον, το λάδι των σπόρων καταναλώνεται από τον άνθρωπο και έχει διάφορες χρήσεις στη χημική βιομηχανία. Τα στελέχη αξιοποιούνται ως καύσιμη ύλη, για παρασκευή χαρτιού κλπ. Τέλος, τα υποπροϊόντα του αραβοσίτου αξιοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων και σε πλήθος βιομηχανικών προϊόντων.

Το καλαμπόκι παρουσιάζει μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα και συνεπώς ποικιλομορφία τύπων. Ανάλογα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, τη δομή και τις ιδιότητες του αμύλου του κόκκου κατατάσσεται σε επτά κατηγορίες, σε οδοντοειδής (*Zea mays* var. *indentata*), σκληρόκοκκος (*Zea mays* var. *indurata*), αμυλώδης (*Zea mays* var. *amylacea*), σακχαρώδης (*Zea mays* var. *saccharata*), κηρώδης (*Zea mays* var. *ceratina*), μικρόκοκκος (*Zea mays* var. *evarta*) και επενδεδυμένος (*Zea mays* var. *tunicata*). Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου και την αξιοποίηση της βιοτεχνολογίας δημιουργήθηκαν ειδικά υβρίδια καλαμποκιού με στόχο την ενίσχυση κυρίως ορισμένων ποιοτικών χαρακτηριστικών του σπόρου, που συνδέονται με την παραγωγή εξειδικευμένων προϊόντων. Τέτοιοι τύποι είναι: καλαμπόκι με βελτιωμένη ποιότητα πρωτεΐνης, καλαμπόκι με υψηλή περιεκτικότητα σε λάδι, καλαμπόκι με υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη, κηρώδες καλαμπόκι, γλυκό καλαμπόκι, λευκό καλαμπόκι, pop corn, baby corn, καλαμπόκι για ενσίρωση, καλαμπόκι για κατασκευή πίπας καπνίσματος (ripe corn). Η μηχανοποίηση της γεωργίας και οι γεωπονικές εξελίξεις έχουν οδηγήσει στην προτίμηση των υβριδίων λόγω της ομοιομορφίας και των υψηλών αποδόσεων τους. Είναι πλέον γεγονός ότι η διαδικασία της υβριδικής βελτίωσης και της παραγωγής σπόρων έχει γίνει ιδιαίτερα βιομηχανοποιημένη και συνεπώς η βιομηχανική εκτροφή αραβοσίτου έχει οδηγήσει σε πολύ αυξημένες αποδόσεις. Τα υβρίδια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην παραγωγικότητα του αραβοσίτου, καθώς ενισχύουν την παραγωγή αλλά και μετριάζουν την έλλειψη τροφίμων και τις διατροφικές ανάγκες των αναπτυσσόμενων χωρών.

Στην κατεύθυνση αυτή, το γενετικά τροποποιημένο (GM) για ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα καλαμπόκι (π.χ. καλαμπόκι Bt), που αποτελεί μια παραλλαγή αραβοσίτου που έχει τροποποιηθεί γενετικά για να εκφράζει μία ή περισσότερες πρωτεΐνες από τα βακτήρια, *Bacillus thuringiensis*, έχει γίνει ο κύριος τύπος αραβοσίτου που καλλιεργείται σε πολλές χώρες, όπως στις Ηνωμένες Πολιτείες όπου το 85% της καλλιέργειας είναι πλέον GM. Οι ευρωπαϊκές και αφρικανικές χώρες απαγόρευαν αρχικά την καλλιέργεια του γενετικά τροποποιημένου αραβοσίτου, και παρόλο που εξακολουθεί να είναι ένα πολύ αμφιλεγόμενο θέμα, σιγά σιγά τα οφέλη του καλαμποκιού Bt αρχίζουν να γίνονται αποδεκτά. Μάλιστα, από το 2011, το ανθεκτικό στα ζιζανιοκτόνα GM καλαμπόκι καλλιεργούνταν σε 14 χώρες. Μέχρι το 2012, 26 ποικιλίες ανθεκτικού στα ζιζανιοκτόνα GM καλαμποκιού εγκρίθηκαν για εισαγωγή στην Ευρωπαϊκή Ένωση και το 2012 αναφέρθηκε ότι η Ευρωπαϊκή Ένωση εισήγαγε 30 εκ. τόνους γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών. Ο γενετικά τροποποιημένος αραβοσίτος MON810 καλλιεργήθηκε σε σχεδόν 89.000 εκτάρια σε πέντε ευρωπαϊκές χώρες, ιδιαίτερα σε περιοχές με υψηλά επίπεδα προσβολής από *Ostrinia nubilalis* που επηρεάζει τόσο την ποιότητα όσο και την ποσότητα της συγκομιδής. Η αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε από την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA), δεν υποδεικνύει απρόβλεπτες δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων ή το περιβάλλον που προκύπτει από την καλλιέργεια του καλαμποκιού MON 810 (EFSA, 2022 ⁵).

1.1.2 Βοτανική ταξινόμηση

Ο αραβόσιτος (*Zea mays* L.) ανήκει στην οικογένεια Gramineae ή Poaceae και αποτελεί το μοναδικό είδος του γένους *Zea*. Πιο συγκεκριμένα, η βοτανική ταξινόμηση του αραβόσιτου (*Zea mays* L.) διαμορφώνεται ως εξής:

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Phylum	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Class	Monocotyledonae
Order	Cyperales
Family	Poaceae/ Gramineae
Sub-family	Andropogoneae
Genus	<i>Zea</i> L.
Species	<i>Zea mays</i> L.
Varieties	<i>Zea mays indentata</i> , <i>Zea mays indurata</i> , <i>Zea mays amylacea</i> , <i>Zea mays everta</i> , <i>Zea mays saccharata</i> , <i>Zea mays ceratina</i> , <i>Zea mays tunicata</i>

1.1.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο αραβόσιτος είναι μονοκότυλο, ποώδες, ετήσιο φυτό, μόνικο-δίκλινο, σταυρογονιμοποιούμενο και ανεμόφιλο και παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλία φαινοτύπων από όλα τα σιτηρά. Χάρη σε αυτή την ποικιλομορφία, δίνεται η δυνατότητα συνδυασμού διαφορετικών γενοτύπων για την επιλογή μορφολογικά επιθυμητών φαινοτύπων.

Το **ριζικό σύστημα** του αραβόσιτου είναι θυσσανώδες και μπορεί να εκτείνεται πλευρικά σε περίπου 1,5 μέτρο και έως 2 μέτρα σε βάθος. Διακρίνεται:

1. Στο εμβρυακό ριζικό σύστημα που αποτελείται:

α) από την πρωτογενή εμβρυακή ρίζα και β) τις δευτερογενείς εμβρυακές ρίζες (3-5). Οι καταβολές τους υπάρχουν στο έμβρυο και αναπτύσσονται κατά το φύτευμα. Το εμβρυϊκό ριζικό σύστημα είναι κυρίαρχο κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του φυτού. Δύναται να επιζήσει καθόλη τη διάρκεια της ζωής του φυτού ή καταστρέφεται σε διάστημα έξι εβδομάδων μετά την έναρξη του φυτρώματος (Brouwer, 1966⁶).

2. Στο κύριο (δευτερογενές) ριζικό σύστημα που αποτελείται:

α) από τις μόνιμες ρίζες που εκφύονται μέσα στο έδαφος και β) από τις εναέριες ρίζες. Οι μόνιμες ρίζες αποτελούν τον κύριο όγκο του ριζικού συστήματος και εκφύονται από τους πρώτους κόμβους του στελέχους που βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια του εδάφους και ο κύριος όγκος τους εντοπίζεται στα πρώτα 30-50cm του εδάφους, παρότι δύναται να εισχωρήσουν σε βάθος έως και 2 μέτρα. Οι εναέριες ρίζες εκφύονται από κόμβους του στελέχους πάνω από την επιφάνεια του εδάφους κατά το τελευταίο στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης του φυτού. Ορισμένες εισχωρούν στο έδαφος και συμβάλλουν στη διατροφή και στήριξη του φυτού σε όρθια θέση.

Το **στέλεχος** του αραβοσίτου είναι συμπαγές, κυλινδρικό και αποτελείται από πολυάριθμους κόμβους και μεσογονάτια διαστήματα. Τα μεσογονάτια διαστήματα είναι συνήθως 8-21 και μορφολογικά είναι βραχύτερα και με αυλάκωση κοντά στη βάση του φυτού ενώ είναι ευθύγραμμο και σχεδόν κυλινδρικά προς την κορυφή του φυτού. Σε κάθε κόμβο, εκτός από τον ακραίο, υπάρχει μία καταβολή οφθαλμού, ενώ στους κατώτερους κόμβους βρίσκονται και οι καταβολές των εναέριων ριζών.

Οι **οφθαλμοί** βρίσκονται εναλλάξ στο στέλεχος, στις μασχάλες των φύλλων και στη βάση της αυλάκωσης των μεσογονατίων. Οι οφθαλμοί που βρίσκονται στο μέσο και ανώτερο τμήμα του στελέχους δύναται να εξελιχθούν σε βλαστούς στους οποίους στη συνέχεια θα σχηματιστούν οι σπάδικες, από τους οποίους μόνο ο ένας ή οι δύο ανώτεροι εξελίσσονται σε κανονικούς σπάδικες καθώς οι περισσότεροι εκφυλίζονται. Αντιθέτως οφθαλμοί που βρίσκονται κοντά στη βάση του στελέχους κοντά στην επιφάνεια του εδάφους ή ακριβώς κάτω από αυτή, μπορεί να εξελιχθούν σε νέα στελέχη, γνωστά σαν «αδέλφια» που αναπτύσσουν το δικό τους ριζικό σύστημα. Το αδελφωμα θεωρείται γενικά ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό στο καλαμπόκι και η αφαίρεση των αδελφιών αποτελεί κοινή πρακτική καθώς ανταγωνίζονται το κύριο στέλεχος σε θρεπτικά συστατικά.

Τα **φύλλα** του καλαμποκιού παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση στον αριθμό, το μέγεθος και τον προσανατολισμό τους μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών καλαμποκιού. Τα εύκρατα υβρίδια καλαμποκιού παράγουν κατά μέσο όρο 15 φύλλα και τα τροπικά υβρίδια έως και 48 φύλλα. Έτσι ο αριθμός των φύλλων κυμαίνεται από 9-44, το μήκος τους από 30-150cm και το πλάτος τους από 8-15cm. Τα φύλλα του αραβοσίτου εκφύονται εναλλάξ από τους κόμβους του κυρίου στελέχους και αποτελούνται από τον κολεό και το έλασμα ενώ ενδιάμεσα υπάρχει ένα διαφοροποιημένο τμήμα που ονομάζεται κολάρο. Ο κολεός περιβάλλει στενά το εκάστοτε μεσογονάτιο του στελέχους μέχρι τον επόμενο κόμβο προς τα επάνω. Το έλασμα του φύλλου είναι λογχοειδές, επίμηκες και είναι τραχύ στην επάνω επιφάνεια καθώς φέρει πολλές μικρές τρίχες, ενώ στην κάτω επιφάνεια είναι λείο. Τέλος, σε αντίθεση με τον κολεό, τείνει να απομακρύνεται από το στέλεχος. Σε ορισμένους γενότυπους στο σημείο συνένωσης του κολεού με το έλασμα σχηματίζεται μια μεμβρανώδης εκβλάστηση που ονομάζεται «γλωσσίδιο». Οι νευρώσεις των φύλλων έχουν παράλληλη διάταξη, όπως και σε όλα τα αγρωστώδη. Δεξιά και αριστερά από τη βάση του κεντρικού νεύρου, το έλασμα σχηματίζει τα «ωτία», που είναι δύο μικρές, τριγωνικές, ανοιχτόχρωμες επεκτάσεις, και με μικρότερο πάχος από το υπόλοιπο έλασμα. Επιπροσθέτως, πέρα από τα κύρια φύλλα υπάρχουν και τα βράκτια φύλλα, που εκφύονται από τους κόμβους της βάσης του κάθε σπάδικα και του προσφέρουν μερική ή πλήρη κάλυψη. Τα βράκτια φύλλα διαφέρουν μορφολογικά από τα κύρια φύλλα και ο ρόλος τους είναι να περιβάλλουν και να προστατεύουν τον αναπτυσσόμενο σπάδικα.

Όσον αφορά τα **άνθη** του, ο αραβόσιτος είναι φυτό μονόικο-δικλινές, επομένως στο ίδιο φυτό εντοπίζονται σε ξεχωριστές ταξιανθίες τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά άνθη που αποτελούν τα αναπαραγωγικά του όργανα. Η αρσενική ταξιανθία είναι φόβη με τον κεντρικό της άξονα να αποτελεί προέκταση του κεντρικού βλαστού και βρίσκεται στην κορυφή του κύριου στελέχους, ενώ η θηλυκή ταξιανθία είναι στάχυς και εκφύεται από πλευρικούς κόμβους του στελέχους. Κατά την άνθηση στον αραβόσιτο παρατηρείται το φαινόμενο της πρωτανδρίας, δηλαδή πρώτη εμφανίζεται η αρσενική ταξιανθία (φόβη) και μετά από 7-10 ημέρες εμφανίζονται οι πρώτοι στύλοι της θηλυκής ταξιανθίας (σπάδικας). Εάν και τα άνθη στη νεαρή τους ηλικία μπορεί να είναι ερμαφρόδιτα, στη συνέχεια όμως αποβάλλονται τα αρσενικά όργανα από τα άνθη του σπάδικα και τα θηλυκά από τα άνθη της φόβης, αντίστοιχα.



*Εικόνα 2: Αρσενική (αριστερά) και θηλυκή (δεξιά) ταξιανθία αραβόσιτου
(<https://www.ndsu.edu/pubweb/chiwonlee/plsc211/student%20papers/articles11/A.Shanahan1/>)*

Πιο συγκεκριμένα:

α) **Αρσενική ταξιανθία:** Είναι φόβη με κλώνους που είναι διατεταγμένοι σπειροειδώς γύρω από τον άξονά της (Εικόνα 2). Από κάθε κόμβο των κλώνων εκφύονται σταχύδια συνήθως κατά ζεύγη, που το ένα είναι έμμισχο και το άλλο άμισχο. Κάθε σταχύδιο περιβάλλεται από δύο χνουδωτά ωοειδούς σχήματος λέπυρα και αποτελείται από δύο άνθη από τα οποία το ένα είναι πιο ανεπτυγμένο. Κάθε άνθος περικλείεται από τον χιτώνα και τη λεπίδα και περιέχει 3 στήμονες, δύο μικρές γλωχίνες και ένα υποτυπώδη στύλο. Σύμφωνα με μελέτες, ως συνάρτηση του γονοτύπου του αραβοσίτου προκύπτει ο αριθμός των γυρεοκόκκων, ο οποίος κυμαίνεται από 2 έως 5 εκατομμύρια. Η φόβη είναι εξαιρετικά εύθραυστη στο σημείο ένωσης του ποδίσκου της με το βλαστό λόγω του μήκους της που είναι περίπου 30cm. Η πλήρης ανάπτυξη της αρσενικής ταξιανθίας υποδηλώνει το τέλος της αύξησης του φυτού σε ύψος (Δαλιάνης, 1983).

β) **Θηλυκή ταξιανθία:** είναι στάχης με παχυμένο άξονα και ονομάζεται σπάδικας ή ρόκα (Εικόνα 2). Ο αριθμός των θηλυκών ταξιανθιών ανά φυτό ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του καλαμποκιού και τον γενότυπο. Είναι δυνατόν να υπάρχουν περισσότεροι από έναν σπάδικα (1-3) στο ίδιο φυτό, οι οποίοι αναπτύσσονται σε πλάγιες διακλαδώσεις του κεντρικού στελέχους περίπου στη μέση του βλαστού. Στην περιφέρειά του βρίσκονται σε ζεύγη τα σταχύδια, διατεταγμένα σε σειρές, συνήθως 16-22 κατά μήκος. Κάθε σταχύδιο έχει δύο κοντά λέπυρα και περιλαμβάνει δύο άνθη από τα οποία μόνο το ανώτερο είναι συνήθως γόνιμο.

Κάθε άνθος αποτελείται από τον χιτώνα, τη λεπίδα και τον ύπερο. Ο ύπερος αποτελείται από την ωοθήκη και τον στύλο. Ο στύλος έχει τριχοειδή στίγματα και γι' αυτό έχει χνουδωτή εμφάνιση. Από κάθε σταχύδιο σχηματίζονται μακριές ίνες ιστού γνωστές ως μετάξια. Τα μετάξια καλύπτονται από κοντές τρίχες που χρησιμοποιούνται για τη σύλληψη των γυρεόκοκκων. Ο σπάδικας αποτελείται από την κνήμη, τα βράκτια φύλλα και τον άξονα. Η κνήμη αποτελεί τον μίσχο που συνδέει τον σπάδικα με το κεντρικό στέλεχος και αποτελείται από κόμβους και μεσογονάτια διαστήματα. Ο κύριος σπάδικας του φυτού αναπτύσσεται στον 6 περίπου κόμβο κάτω από τη φόβη, ενώ στους 4 έως 6 κόμβους που βρίσκονται πιο κάτω από αυτόν εμφανίζονται υποτυπώδεις σπάδικες.

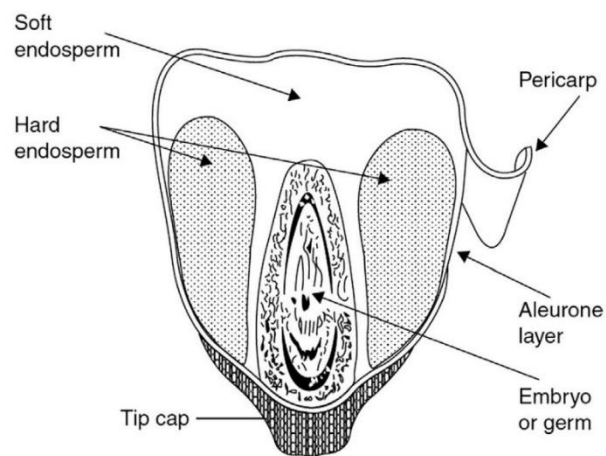
Ο αραβόσιτος είναι φυτό σταυρογονιμοποιούμενο, επομένως η γύρη ενός φυτού σπάνια γονιμοποιεί τους στύλους του ίδιου φυτού. Σε συνθήκες αγρού το 97% ή και περισσότερο των σπόρων ενός σπάδικα γονιμοποιείται με γύρη από άλλα φυτά και σπάνια μπορεί να συμβούν και αυτογονιμοποιήσεις. Τόσο η πρωτανδρική ιδιότητα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

Ο **καρπός** του αραβοσίτου είναι καρύοψη, είναι δηλαδή αδιάρρηκτος ξηρός καρπός, μικρών διαστάσεων, μονόσπερμος, επενδεδυμένος με λεπτό περικάρπιο που συμφύεται με το σπέρμα. Το χρώμα του κόκκου καθορίζεται από τη σύσταση και τον ιστό στον οποίον βρίσκονται οι χρωστικές και οι φαινολικές ενώσεις. Το χρώμα του καρπού μπορεί να είναι λευκό, κόκκινο, μωβ ή καφέ. Το περικάρπιο του πυρήνα μπορεί να είναι άχρωμο, κόκκινο, μωβ ή καφέ. Το μέγεθος και σχήμα του σπόρου ποικίλλει και εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του καλαμποκιού και μπορεί να είναι πεπλατυσμένο, τριγωνικό, ωοειδές, σφαιρικό ή κωνικό. Ο αραβόσιτος κατατάσσεται σε 7 τύπους ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των σπόρων του και πιο συγκεκριμένα σε σκληρό, οδοντωτό, αλευρώδη, σακχαρώδη, κηρώδη, μικρόκοκκο και ενδεδυμένο. Περίπου το μισό (42%) του ξηρού βάρους του φυτού αραβοσίτου προέρχεται από τους εδώδιμους καρπούς ή τις καρύψεις του (Inglett, 1971⁷).

Ο κάθε σπόρος αραβοσίτου αποτελείται από τρία κύρια μέρη: το περικάρπιο (5%-6%), το ενδοσπέρμιο (82%-84%) και το έμβρυο (10%-12%). Το τμήμα με το οποίο συνδέεται ο σπόρος με τον άξονα λέγεται ποδίσκος (1%) (Εικόνα 3). Το περικάρπιο, πλούσιο σε φυτικές ίνες, είναι ένα λεπτό στρώμα μητρικών ιστών που περικλείει ολόκληρο τον σπόρο και αποτελεί το προστατευτικό περίβλημα του σπόρου, παρεμποδίζοντας την είσοδο παθογόνων στο εσωτερικό του. Το ενδοσπέρμιο αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κόκκου και

διακρίνεται σε ένα τμήμα αδιαφανές, με αλευρώδη εμφάνιση (αλευρώδες ενδοσπέρμιο) και ένα τμήμα διαφανές με υαλώδη εμφάνιση (κερατοειδές ή υαλώδες ενδοσπέρμιο). Το κερατοειδές ενδοσπέρμιο περιέχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη σε σχέση με το αλευρώδες. Το εξωτερικό τμήμα των κυττάρων του ενδοσπερμίου αποτελεί την αλευρώνη, που χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη περιεκτικότητά της σε άμυλο και αποτελεί το 8-12% του βάρους του σπόρου. Η συμβολή του ενδοσπερμίου είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του εμβρύου καθώς το τροφοδοτεί με θρεπτικά συστατικά (σάκχαρα και αμινοξέα) μέχρι να αρχίσει η δραστηριοποίηση της ρίζας και η λειτουργία της φωτοσύνθεσης στο νεαρό φυτάριο.

Το έμβρυο είναι το τμήμα του σπόρου φέρει τις καταβολές των πρώτων οργάνων του φυτού και έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και μέταλλα. Βρίσκεται στη μια πλευρά του σπόρου, προς σημείο σύνδεσης με τον άξονα του σπάδικα και αποτελείται από δύο κύρια μέρη, τον εμβρυακό/βλαστικό άξονα και το ασπίδιο. Ο εμβρυακός άξονας αποτελείται από το ριζίδιο και το πτερίδιο από τα οποία θα προκύψουν το υπόγειο και υπέργειο τμήμα του φυτού, αντίστοιχα. Το ριζίδιο περιβάλλεται από την κολεόρριζα και το πτερίδιο περιβάλλεται από το κολεόπτιλο, που αποτελούν το προστατευτικό περίβλημα της αναδυόμενης ρίζας και του αναδυόμενου βλαστού αντίστοιχα. Το ασπίδιο περιβάλλει τον κεντρικό άξονα του εμβρύου, αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του και συνιστά την κοτύλη. Το ασπίδιο είναι πλούσιο σε λάδι (35-40%) και περιέχει πολλές ουσίες που παίζουν σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια του φυτρώματος και της αναπτύξεως.



Εικόνα 3: Ανατομία του κόκκου αραβοσίτου (Wrigley et al., 2004 ⁸⁾)

1.1.4 Στάδια ανάπτυξης αραβόσιτου

Το πρώτο στάδιο του βιολογικού κύκλου περιλαμβάνει τη βλάστηση του σπόρου, το φύτερωμα και την εμφάνιση του νεαρού φυταρίου. Κατά τη σπορά, στο έδαφος ο σπόρος του αραβόσιτου έρχεται σε επαφή με υγρασία, απορροφά νερό και αρχίζει να διογκώνεται. Αρχικά επιμηκύνεται το ριζίδιο και η κολεόρριζα που το περιβάλλει και σε 2-3 ημέρες εξέρχονται από το περικάρπιο, ενώ 1-2 ημέρες αργότερα εξέρχεται το πτερίδιο με το κολεόπτιλο που το περιβάλλει αντίστοιχα. Το ριζίδιο τρυπά στη συνέχεια την κολεόρριζα και επιμηκύνεται ακόμα περισσότερο, ενώ σταδιακά εμφανίζονται και οι υπόλοιπες εμβρυακές ρίζες οι οποίες συμβάλλουν στη στήριξη του νεαρού φυταρίου και στην απορρόφηση νερού και θρεπτικών στοιχείων κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του.

Η έξοδος (ανάδυση) του φυταρίου πάνω από την επιφάνεια του εδάφους γίνεται με επιμήκυνση του κολεόπτιλου και του πρώτου μεσογονατίου διαστήματος. Αυτό επιτυγχάνεται όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και επάρκειας οξυγόνου στο έδαφος είναι ευνοϊκές, ώστε να είναι δυνατές οι απαραίτητες μορφολογικές και χημικές μεταβολές που απαιτούνται για το φύτερωμα του σπόρου. Καθοριστικό ρόλο ως προς την ταχύτητα βλάστησης του σπόρου παίζει η θερμοκρασία. Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης το νεαρό φυτάριο εξέρχεται από την επιφάνεια του εδάφους 6-10 ημέρες μετά τη σπορά. Αντιθέτως σε θερμοκρασίες μικρότερες των 10°C η βλάστηση δεν είναι δυνατή, ενώ ικανοποιητικό και ομοιόμορφο φύτερωμα επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες 16-20°C, όπου η ανάδυση του φυταρίου πραγματοποιείται σε 4-6 ημέρες μετά τη σπορά (Aldrich et al., 1975).

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η αύξηση του ριζικού συστήματος, επιμήκυνση των μεσογονατίων του στελέχους και εμφάνιση και ανάπτυξη των φύλλων. Η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος είναι ταχύτατη και άρρηκτα συνδεδεμένη με την σύσταση, τη δομή, τη θερμοκρασία και την υγρασία του εδάφους. Αντίθετα, για την ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος του φυτού είναι αρχικά απαραίτητος ο σχηματισμός των βλαστικών καταβολών. Έτσι η βλαστική ανάπτυξη διακρίνεται σε δύο περιόδους: α) την περίοδο μέχρι το τέλος του σχηματισμού βλαστικών καταβολών του κορυφαίου μεριστώματος, κατά την οποία θα έχουν αναπτυχθεί 8-10 φύλλα και β) την περίοδο από την διαφοροποίηση του κορυφαίου μεριστώματος από βλαστικό σε αναπαραγωγικό, όπου εμφανίζεται η αρσενική ταξιανθία. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης είναι ο γονότυπος αλλά και η θερμοκρασία και η φωτοπερίοδος. Τα μέγιστα επίπεδα φωτοσύνθεσης και βλαστικής

ανάπτυξης παρατηρούνται όταν στους 30-33°C, με τη φωτοσύνθεση να επηρεάζει την ανάπτυξη του φυτού μόνο κατά την διάρκεια της ημέρας, ενώ ο ρυθμός ανάπτυξης είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας ολόκληρου του εικοσιτετραώρου (Καραμάνος, 2002). Επάρκεια υγρασίας και υψηλές θερμοκρασίες μειώνουν την περίοδο βλαστικής ανάπτυξης.

Με την ολοκλήρωση και της τελευταίας καταβολής φύλλου του κορυφαίου μεριστώματος, αρχίζει το στάδιο της αναπαραγωγικής ανάπτυξης του φυτού με το σχηματισμό δηλαδή των αρσενικών και θηλυκών ταξιανθιών. Η αναπαραγωγική ανάπτυξη του αραβοσίτου αρχικά δεν είναι οπτικά αντιληπτή καθώς ταυτίζεται χρονικά με τη βλαστική ανάπτυξη. Η βλαστική ανάπτυξη ολοκληρώνεται λίγο πριν την έξοδο της φόβης ενώ η αναπαραγωγική φτάνει έως και τα τελευταία στάδια της ζωής του φυτού. Γενικά, η περίοδος από το φύτευμα μέχρι την εμφάνιση της φόβης διακρίνει τους γονότυπους σε πρώιμους ή όψιμους. Από την εμφάνιση της φόβης έως την πλήρη ωρίμανσή της μεσολαβεί διάστημα 10 ημερών, οπότε και ολοκληρώνεται και η βλαστική ανάπτυξη. Κατά την άνθηση του αραβοσίτου η φόβη εμφανίζεται στην κορυφή του φυτού, 7-10 ημέρες πριν από την εμφάνιση των στύλων των θηλυκών ανθέων του σπάδικα. Η άνθηση της φόβης δεν είναι ομοιόμορφη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διάρρηξη των ανθών να απαιτεί ένα χρονικό διάστημα 5-8 ημερών ώστε να επιτευχθεί η επικονίαση και η γονιμοποίηση. Ύστερα από την καταβολή της φόβης, σχηματίζονται πλευρικά οι καταβολές των σπαδικών, στον 6-8 κόμβο κάτω από την φόβη, αλλά για διάστημα 10 ημερών παραμένουν υπανάπτυκτες. Το τελικό μέγεθος του σπάδικα καθορίζεται σε μια περίοδο 10-15 ημερών πριν την εμφάνιση των στύλων (μετάξωμα). Σε συνθήκες έλλειψης νερού ή θρεπτικών συστατικών του εδάφους κατά το διάστημα αυτό μπορεί να επιφέρει μειωμένο μέγεθος σπάδικα ή/και περιορισμένο αριθμό σπόρων σε αυτόν. Ταυτόχρονα οι δυσμενείς συνθήκες μπορεί να επιφέρουν καθυστέρηση της ανάπτυξης του σπάδικα σε σχέση με τη φόβη, με αποτέλεσμα την ατελή επικονίαση λόγω επιβράδυνσης του μεταξώματος (Καραμάνος, 2002).

Κατά τη διάρκεια της άνθησης των θηλυκών ανθέων του σπάδικα, οι στύλοι επιμηκύνονται και εμφανίζονται ως νήματα έξω από τα βράκτεια φύλλα του σπάδικα (στάδιο μεταξώματος). Οι κόκκοι της γύρης πέφτουν από τη φόβη πάνω στα μετάξια των σπαδικών, τα οποία είναι επικαλυμμένα με κολλώδεις τρίχες που αιχμαλωτίζουν τους κόκκους της γύρης. Οι γυρεόκοκκοι προσκολλώνται στο στίγμα, βλαστάνουν αμέσως και η εκβλάστηση εισέρχεται στον στύλο και επιμηκύνεται μεταφέροντας το γενετικό υλικό ως προς την ωοθήκη για να συμβεί γονιμοποίηση. Στο άκρο της εκβλάστησης υπάρχουν ο βλαστικός

πυρήνας και οι δύο σπερματικοί πυρήνες, οι οποίοι εισέρχονται στον εμβρυόσακκο. Ο ένας σπερματικός πυρήνας ενώνεται με το ωοκύτταρο σχηματίζοντας το έμβρυο, το όργανο που τελικά εξελίσσεται στο φυτό επόμενης γενιάς, ενώ ο δεύτερος ενώνεται με τους δύο πολικούς πυρήνες συντήκεται με το κεντρικό κύτταρο του εμβρυϊκού σάκου και δημιουργείται το ενδοσπέρμιο (τριπλοειδές) ο αποθηκευτικός ιστός που θα θρέψει τρέφει το αναπτυσσόμενο δενδρύλλιο μέχρι να μπορέσει να ζήσει ανεξάρτητα.

Ο αραβόσιτος είναι φυτό ανεμόφιλο, και ως εκ τούτου η άφθονη γύρη μεταφέρεται με τη βοήθεια του ανέμου σε μεγάλες αποστάσεις. Δεν απαιτεί επικονίαση με τη μεσολάβηση εντόμων για γονιμοποίηση, κατά συνέπεια η σημασία των εντόμων για την επικονίαση του καλαμποκιού είναι αμελητέα (Aldrich et al., 1975⁹). Η γύρη διασκορπίζεται συνεχώς για μια εβδομάδα ή περισσότερο, απελευθερώνοντας περίπου 10 εκατομμύρια κόκκους γύρης από κάθε φόβη. Η γύρη μπορεί να απελευθερωθεί εύκολα, ως απόκριση σε κραδασμούς ή χαμηλούς ανέμους και να διασκορπιστεί σε μικρές αποστάσεις έως και 30 μέτρων ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, οι οριζόντιοι άνεμοι επιτρέπουν στη γύρη να διασκορπιστεί αρκετές εκατοντάδες μέτρα. Μόλις απελευθερωθεί από τη φόβη, η βιωσιμότητα της γύρης διαρκεί συνήθως για έως και δύο ώρες, ενώ η βιωσιμότητά της διαρκεί περισσότερο σε υψηλά επίπεδα υγρασίας. Ένα μόνο φυτό μπορεί να παράγει έως και 2 εκ. κόκκους γύρης την ημέρα ανάλογα με την ποικιλία. Η επικονίαση στον αραβόσιτο, όπως σε όλα τα ανεμόφιλα φυτά, χαρακτηρίζεται από σπατάλη γύρης και διαρκεί 5-8 ημέρες, με μέγιστη παραγωγή γύρης κατά της 3η ημέρα της άνθησης των ανθέρων. Αν ληφθεί υπόψη ο αριθμός των γυρεοκόκκων σε σχέση με τον αριθμό των στύλων που αναπτύσσει ο σπάδικας, υπολογίζεται ότι αντιστοιχούν περίπου 4.500 γυρεόκοκκοι σε κάθε στύλο. Γενικά, ο χρόνος από την επικονίαση μέχρι την γονιμοποίηση είναι συνάρτηση της ποικιλίας, της θερμοκρασίας, της ατμοσφαιρικής υγρασίας και κυρίως του μήκους του στύλου. Ο χρόνος από την εμφάνιση των στύλων και τη γονιμοποίηση έως την ωρίμανση του σπάδικα κυμαίνεται από 50-63 ημέρες.

Επιπροσθέτως, δεδομένου ότι η γύρη μεταφέρεται από τον άνεμο, το καλαμπόκι μπορεί πολύ εύκολα να διασταυρωθεί και να μεταλλαχθεί φυσικά. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται το φαινόμενο της ξενίας κατά την οποία οι δύο φυλές καλαμποκιού συνδυάζονται, με την εκδήλωση της κυριαρχίας των γονιδίων της γύρης (πατρική κυριαρχία). Το φαινόμενο είναι κυρίως αντιληπτό στις περιπτώσεις που οι γονείς διαφέρουν ως προς κάποιο χαρακτηριστικό του ενδοσπερμίου όπως το χρώμα ή η σύστασή του.

Τέλος, ύστερα από τη γονιμοποίηση, ο κόκκος αρχίζει να αναπτύσσεται σχηματίζοντας εσωτερικά ένα γαλακτώδες υγρό πλούσιο σε ζάχαρα το οποίο σταδιακά τις επόμενες 15 ημέρες μετατρέπεται σε άμυλο. Στη συνέχεια, ακολουθεί αφυδάτωση και η σκλήρυνσή του κόκκου. Το καλαμπόκι φθάνει στη φυσιολογική ωριμότητα όταν σχηματίζεται μια ζώνη αποκοπής (μαύρου χρώματος) στον ποδίσκο του κόκκου. Η φυσιολογική ωρίμανση του κόκκου επιτυγχάνεται όταν παύσει η συσσώρευση ξηρού βάρους, με την υγρασία να κυμαίνεται από 29-40 % ενώ ο σπάδικας θεωρείται ώριμος όταν ποσοστό μεγαλύτερο του 75% των κόκκων είναι φυσιολογικά ώριμοι.

1.1.5 Σύσταση και θρεπτική αξία του καλαμποκιού

Από πλευράς σύστασης, ο σπόρος του αραβοσίτου περιέχει κατά μέσο όρο 61% άμυλο, 13,5% νερό, 10% πρωτεΐνη, 6% πεντοζάνες, 4% έλαια, 2,3% κυτταρίνες, 1,4% σάκχαρα, 1,4% ανόργανες ύλες και 0,4% διάφορες άλλες ουσίες. Το άμυλο είναι το πιο άφθονο συστατικό στους σπόρους του αραβοσίτου και χρησιμεύει ως αποτελεσματικό μόριο αποθήκευσης της γλυκόζης. Το άμυλο συσσωρεύεται με τη μορφή πυκνών-αδιάλυτων κόκκων. Αποτελείται από δύο κύρια πολυμερή γλυκόζης, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη . Οι κύριες πρωτεΐνες αποθήκευσης στον αραβόσιτο είναι οι προλαμίνες, που αναφέρονται επίσης ως ζεΐνες. Το 80% της αποθηκευμένης πρωτεΐνης στον αραβόσιτο βρίσκεται στο ενδοσπέρμιο. Τα σάκχαρα κυμαίνονται από 1% έως 3% με τη σακχαρόζη ως κύριο συστατικό και τη μαλτόζη, τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και τη ραφινόζη σε μικρές ποσότητες (Shannon, 2009¹⁰). Τα σάκχαρα αυτά βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στο έμβρυο και μόνο το 25% απαντάται στο ενδοσπέρμιο (Inglett, 1971⁷). Το σύνολο του αμύλου του σπόρου, από την άλλη, βρίσκεται στο ενδοσπέρμιο.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του United States Department of Agriculture (USDA) τα 100 γραμμάρια καλαμποκιού προσφέρουν ενέργεια 365 Kcal, αλλά σε σύγκριση με το ρύζι και το σιτάρι έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη.

Σύμφωνα με το USDA, 100 gr κίτρινου κόκκου καλαμποκιού περιέχουν:

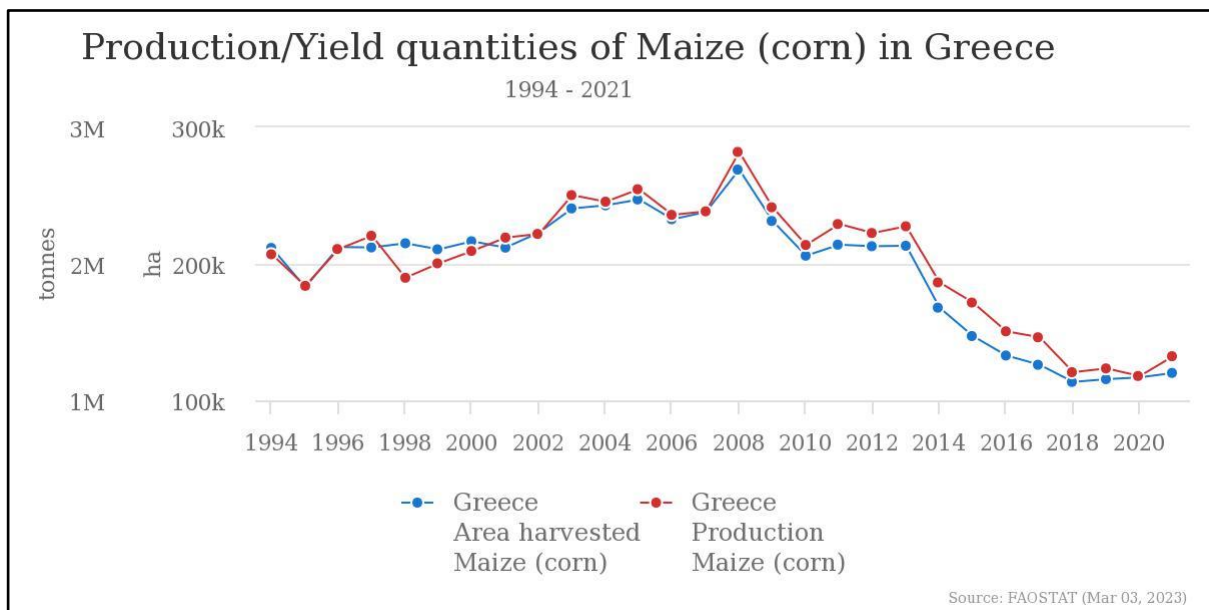
Νερό (g)	10,4
Πρωτεΐνες (g)	9,42
Ολικά λιπίδια (g)	4,74
Υδατάνθρακες (g)	74,26
Φυτικές ίνες (g)	7,3
Σάκχαρα (g)	0,64
Ca (mg)	7
Fe (mg)	2,71
Mg (mg)	127
P (mg)	210
K (mg)	287
Na (mg)	35
Zn (mg)	2,21
Βιταμίνη Β6 (mg)	0,622
Φολικό οξύ (μg)	19
Βιταμίνη Α (μg)	11
Βιταμίνη Ε (mg)	0,49
Νιασίνη (mg)	3,627

Ωστόσο, παρότι το καλαμπόκι παρέχει πολλά θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για τις ανθρώπινες μεταβολικές ανάγκες, οι ποσότητες ορισμένων βασικών θρεπτικών συστατικών είναι ανεπαρκείς για τους καταναλωτές που βασίζονται στον αραβόσιτο ως κύρια πηγή τροφής. Για παράδειγμα, όπως και πολλοί άλλοι σπόροι δημητριακών, το καλαμπόκι στερείται τα απαραίτητα αμινοξέα λυσίνη και τρυπτοφάνη και είναι ανεπαρκείς σε ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), βιταμίνη Β12, και είναι, γενικά, μια φτωχή πηγή ασβεστίου, φυλλικού οξέος και σιδήρου. Η απορρόφηση σιδήρου, ιδιαίτερα ο μη αιμικός σίδηρος που υπάρχει στον αραβόσιτο, μπορεί να ανασταλεί από ορισμένα συστατικά ή τρόφιμα στη διατροφή, όπως τα λαχανικά, το τσάι (π.χ. οξαλικά), ο καφές (π.χ. πολυφαινόλες), τα αυγά

(π.χ. φωσβιτίνη) και το γάλα (π.χ. ασβέστιο). Σε χώρες όπου η αναιμία και η ανεπάρκεια σιδήρου θεωρούνται μέτρια ή σοβαρά προβλήματα δημόσιας υγείας, ο εμπλουτισμός του καλαμποκάλευρου με σίδηρο και άλλες βιταμίνες και μέταλλα έχει χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της πρόσληψης μικροθρεπτικών συστατικών και την πρόληψη της έλλειψης σιδήρου. Επιπλέον, διάφορα υβρίδια καλαμποκιού με αυξημένη περιεκτικότητα σε λυσίνη, έχουν αναπτυχθεί για να ενισχύσουν τις θρεπτικές αξίες της πρωτεΐνης καλαμποκιού (Mertz et al., 1964¹¹; Sodek et al., 1971¹²; Prasanna et al., 2001¹³). Χαρακτηριστική είναι η ανακάλυψη του Quality Protein Maize (QPM), στις αρχές της δεκαετίας του 1960, το οποίο μοιάζει και έχει γεύση σαν κανονικό καλαμπόκι και εξίσου ή υψηλότερη απόδοση, αλλά περιέχει σχεδόν διπλάσια ποσότητα των απαραίτητων αμινοξέων, λυσίνη και τρυπτοφάνη, τα οποία είναι απαραίτητα δομικά στοιχεία πρωτεϊνών στον άνθρωπο και στα μονογαστρικά ζώα όπως τα πουλερικά και οι χοίροι (CIMMYT, 2000). Το QPM έχει καλύτερη ποιότητα πρωτεΐνης από τον κοινό αραβόσιτο επειδή περιέχει διπλάσια ποσότητα λυσίνης και τρυπτοφάνης αλλά καμία αλλαγή στα υπόλοιπα αμινοξέα εκτός από το χαμηλό επίπεδο λευκίνης (Chaudhary et al, 2014¹⁴).

1.1.6 Στατιστικά στοιχεία

Σύμφωνα με πληροφορίες του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, στην Ελλάδα, στα τέλη του 20^{ου} αιώνα από τη συνολική καλλιεργούμενη έκταση των 37.000.000 στρ., ο αραβόσιτος καλλιεργούνταν στα 2.200.000 στρ. και η παραγωγή του κυμαινόταν σε επίπεδο 550.000 τόνων. Σήμερα, η έκταση που καλλιεργείται με καλαμπόκι στη χώρα μας ανέρχεται περίπου σε 1,5 εκατ. στρέμματα. Σύμφωνα όμως με νεότερα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) παρότι παρατηρούνταν μία αυξανόμενη πορεία στην καλλιεργούμενη έκταση και παραγωγή του αραβόσιτου στη χώρα μας έως και το 2008 φθάνοντας τους 2.820.227.35 τόνους, στη συνέχεια εμφανίζεται μία συνεχώς πτωτική τάση φθάνοντας τους 1.322.940 τόνους. Σε Ευρωπαϊκό επίπεδο παρατηρείται αύξηση των καλλιεργούμενων εκτάσεων καθώς και πολλαπλασιασμός της παραγωγής όπου ανέρχεται στους 141.847.696,59 τόνους το 2021 με μέση απόδοση 7,2 τόνοι/εκτάριο.



Εικόνα 4: Γραφική απεικόνιση της εξέλιξης της παραγωγής (σε εκτάρια) και απόδοσης της παραγωγής (σε τόνους) του καλαμποκιού στην Ελλάδα κατά το χρονικό διάστημα 1994-2021 (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>).

Οι κύριες παραγωγές περιοχές στην Ελλάδα είναι κυρίως στη Μακεδονία, τη Θράκη, τη Στερεά και την Πελοπόννησο. Στις μέρες μας, χρησιμοποιούνται αποκλειστικά και μόνο απλά υβρίδια μεγάλου βιολογικού κύκλου (δείκτης FAO 700-800). Με τη δημιουργία βελτιωμένων υψηλοαποδοτικών υβριδίων καλαμποκιού οι ντόπιες ποικιλίες και πληθυσμοί εκτοπίστηκαν στη χώρα μας. Επίσης σχεδόν το σύνολο των νέων βελτιωμένων γενοτύπων που χρησιμοποιούνται είναι πολύ απαιτητικοί σε υγρασία, γονιμότητα εδάφους και σε καλλιεργητικές φροντίδες, γεγονός που έχει μετατοπίσει την καλλιέργειά τους από την παραδοσιακή ζώνη όπου καλλιεργούνταν μέχρι τη δεκαετία 1970 και επεκτάθηκε στα γόνιμα εδάφη. Ως αποτέλεσμα όλων αυτών παρατηρούνται οι συνεχείς αυξομειώσεις της απόδοσης από έτος σε έτος λόγω των κλιματολογικών συνθηκών της χώρας μας (ανομοιόμορφη κατανομή βροχοπτώσεων, παρατεταμένοι καύσωνες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού κ.λπ.).

1.1.7 Η καλλιέργεια του αραβόσιτου

1.1.7.1 Εδαφοκλιματικές συνθήκες

Το καλαμπόκι είναι ένα ετήσιο φυτό C4 που καλλιεργείται καλύτερα σε ζεστά, υγρά κλίματα με υψηλές βροχοπτώσεις (600-1.500 mm) και μεγάλη διάρκεια φωτοπεριόδου. Δεν αναπτύσσεται σε περιοχές με μέση θερμοκρασία θέρους χαμηλότερη από 19°C και μέση θερμοκρασία νύχτας κατά τους θερινούς μήνες χαμηλότερη από 13°C. Το φυτό είναι ευαίσθητο στην ξηρασία, ιδιαίτερα κατά το στάδιο της ανθοφορίας αλλά δύναται προσωρινά να ανεχθεί ξηρικές συνθήκες. Αντιθέτως, ο παγετός μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ολόκληρης της καλλιέργειας και συγκεκριμένα υπολογίζεται ότι για την ανάπτυξή του είναι απαραίτητη μία περίοδος περίπου 120 ημερών χωρίς παγετό. Για το φύτευμα των σπόρων η ελάχιστη θερμοκρασία είναι 10°C και η άριστη γύρω στους 20°C. Η βλαστική ανάπτυξη αυξάνεται σχεδόν γραμμικά με τη θερμοκρασία από τους 15°C ως τους 24-30°C. Παράλληλα, παρά το γεγονός ότι οι ρυθμοί φωτοσύνθεσης και αύξησης μεγιστοποιούνται στους 30-35°C, θερμοκρασίες υψηλότερες των 30°C κατά τη διάρκεια της ημέρας φαίνεται να έχουν ανασταλτική επίδραση στην αύξηση καθώς ταυτόχρονα σχετίζονται με αυξημένες απώλειες νερού λόγω έντονης εξατμισοδιαπνοής. Το καλαμπόκι μπορεί να καλλιεργηθεί σε τροπικές και θερμές εύκρατες ζώνες και κυρίως μεταξύ 40 μοιρών νότια στη Χιλή και Αργεντινή και 58 μοίρες βόρεια στον Καναδά και τη Ρωσία, σε ποικίλα υψόμετρα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι υπάρχουν αρκετά αποδοτικές ποικιλίες και υβρίδια που καλλιεργούνται στα υψίπεδα του Μεξικού και των Άνδεων, φθάνοντας ακόμη και υψόμετρο 3.000 m (Περού, κοιλάδα του Cuzco). Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες που επικρατούν στα μεγάλα υψόμετρα επιβραδύνουν την ανάπτυξη και επιμηκύνουν τον βιολογικό κύκλο του φυτού.

Όσον αφορά τις εδαφικές συνθήκες, το καλαμπόκι προσαρμόζεται σε ποικίλους τύπους εδάφους που κυμαίνονται από άμμο έως βαρύ άργιλο, αλλά οι καλύτερες αποδόσεις απαντώνται σε καλά δομημένα εδάφη με ενδιάμεση υφή (αμμοπηλώδη - αργιλώδη). Συνήθως, το καλαμπόκι καλλιεργείται σε έδαφος ελαφρώς όξινο έως ουδέτερο με pH: 5,5-7. Το ιδανικό έδαφος για τον αραβόσιτο είναι βαθύ, μέσης σύστασης, με καλή στράγγιση και καλή ικανότητα συγκράτησης νερού καθώς συμβάλλει στην ανάπτυξη του εκτεταμένου ριζικού του συστήματος και κατά συνέπεια στον καλύτερο εφοδιασμό του με νερό και ανόργανα στοιχεία. Αντιθέτως, η αύξηση του ριζικού συστήματος αλλά και ολόκληρου του

φυτού, περιορίζεται σημαντικά σε συνεκτικά εδάφη. Το γεγονός αυτό οφείλεται τόσο στη δυσκολία των ριζών του να υπερνικήσουν τη μηχανική αντίσταση των συνεκτικών στρωμάτων του εδάφους, όσο και στη μειωμένη περιεκτικότητα του εδαφικού νερού σε οξυγόνο στα εδάφη αυτά. Επιπλέον, τα αμμώδη εδάφη και αργιλώδη εδάφη παρουσιάζουν αρκετά προβλήματα ως προς την άρδευση, καθώς το πρώτο είναι πολύ ξηρό ενώ το δεύτερο στραγγίζει δύσκολα, καθώς και ελλείψεις των απαραίτητων για την καλλιέργεια καλαμποκιού θρεπτικών συστατικών. Παρόλα αυτά, με την πραγματοποίηση καταλλήλων καλλιεργητικών χειρισμών, είναι εφικτή η καλλιέργεια του αραβοσίτου σε ένα ευρύ φάσμα τύπων εδάφους.

1.1.7.2 Θρέψη

Αν και το καλαμπόκι είναι ένα αρκετά ανθεκτικό φυτό, που διασταυρώνεται συνεχώς και υβριδοποιείται ώστε να προσαρμοστεί σε νέα κλίματα και τις εκάστοτε συνθήκες, έχει ωστόσο υψηλές απαιτήσεις σε ήλιο, έδαφος πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και επαρκή ποσότητα νερού. Η προετοιμασία του εδάφους με βοτάνισμα, ανάδευση και λίπανση είναι γενικά απαραίτητη. Η βασική λίπανση εφαρμόζεται γενικά στο έδαφος πριν από τη φύτευση του καλαμποκιού. Δεδομένου ότι μόνο ο φώσφορος είναι απολύτως απαραίτητος κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της ρίζας, οι παραγωγοί συνήθως τον ενσωματώνουν μαζί με μικρές ποσότητες αζώτου και καλίου στη βασική λίπανση.

Αν και οι απαιτήσεις σε άζωτο είναι διαφορετικές κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του φυτού, το άζωτο είναι απαραίτητο στοιχείο για την καλλιέργεια, καθώς ρυθμίζει τον ρυθμό ανάπτυξης και την απόδοση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η απόδοση του καλαμποκιού ευνοείται από διάφορες πρακτικές όπως η αμειψισπορά λόγω των εξαιρετικά υψηλών ποσοτήτων αζώτου και άλλων θρεπτικών συστατικών που προσλαμβάνει από το έδαφος, τη χρήση λιπασμάτων, κοπριάς ή υπολειμμάτων καλλιεργειών για τον εμπλουτισμό του εδάφους. Το καλαμπόκι καλλιεργείται συνήθως εκ περιτροπής με άλλες καλλιέργειες, συμπεριλαμβανομένων των δημητριακών (συνήθως σιτάρι), της σόγιας και άλλων ψυχανθών. Οι αμειψισπορές καλαμποκιού-σόγιας έχουν δείξει αύξηση απόδοσης περίπου 10% έναντι του καλαμποκιού που καλλιεργείται απουσία αμειψισποράς. Σύμφωνα με το Mississippi State University (<http://extension.msstate.edu/publications/corn-fertilization>), το άζωτο συνίσταται να προστίθεται σε διαφορετικούς χρόνους, ανάλογα με τις ανάγκες των

καλλιεργειών, καθώς έτσι μειώνεται η πιθανότητα απώλειας αζώτου εξαιτίας των βροχοπτώσεων ή υψηλής υγρασίας στην ατμόσφαιρα. Το καλαμπόκι φαίνεται να χρησιμοποιεί λιγότερο από το 10% του αζώτου του πριν αρχίσει η ταχεία βλαστική ανάπτυξη.

Για την εξασφάλιση σταθερά υψηλών αποδόσεων στην καλλιέργεια του καλαμποκιού, σημαντική είναι επίσης η λίπανση με κάλιο. Ωστόσο, μόνο το 25% του K που εφαρμόζεται απορροφάται από τους κόκκους και συνεπώς αφαιρείται κατά τη συγκομιδή ενώ το υπόλοιπο 75% επιστρέφει στο έδαφος μέσω της ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων της καλλιέργειας σε αυτό, επομένως η καλλιέργεια δύναται να μην χρειαστεί επιπλέον καλιούχο λίπανση. Στην περίπτωση όμως που συγκομίζεται ολόκληρο το φυτό (συγκομιδή για ενσίρωση), μπορεί να χρειαστεί να εφαρμοστούν επιπλέον ποσότητες.

1.1.7.3 Άρδευση

Κατά τον υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων νερού για την ορθολογική άρδευση του καλαμποκιού πρέπει να λαμβάνονται υπόψη: ο τύπος εδάφους (διαφορετική ικανότητα συγκράτησης νερού στο έδαφος), οι περιβαλλοντικές συνθήκες και βροχοπτώσεις (επηρεάζουν την ένταση της εξάτμισης και ρυθμίζουν την εισροή νερού που απαιτείται από την άρδευση), η ποικιλία, η ημερομηνία φύτευσης (καλλιέργειες που έχουν σπαρθεί νωρίτερα θα χρειαστούν λιγότερο νερό μέσω άρδευσης) και η αρδευτική μέθοδος (Fang et al, 2019)¹⁵.

Ανάλογα με τη διαθεσιμότητα του νερού άρδευσης, ο γεωργός μπορεί να προχωρήσει σε 3-9 (έως 11 σε ελαφρά εδάφη) ποτίσματα κατά τη διάρκεια μιας καλλιεργητικής περιόδου. Οι ανάγκες των φυτών σε νερό αλλάζουν κατά τη διάρκεια αυτή. Το πρώτο πότισμα πρέπει να γίνει πριν ή αμέσως μετά τη σπορά για να αυξηθεί η περιεκτικότητα του εδάφους σε υγρασία για να πραγματοποιηθεί η επιτυχής βλάστηση των σπόρων. Κατά τα πρώιμα στάδια της βλαστικής ανάπτυξης τα φυτά είναι αρκετά ανθεκτικά στην έλλειψη νερού. Καθώς όμως αναπτύσσουν μεγαλύτερη φυλλική επιφάνεια, οι ανάγκες σε νερό αυξάνονται, φθάνοντας το μέγιστο 40-60 ημέρες μετά τη φύτευση, όταν το υπέργειο μέρος των φυτών έχει πλήρως αναπτυχθεί. Στο στάδιο της ανθοφορίας και το πρώιμο γέμισμα των κόκκων, 60-95 ημέρες μετά τη φύτευση, ο αραβόσιτος φτάνει τελικά στη μέγιστη ζήτηση νερού και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος. Η έλλειψη νερού στο στάδιο αυτό επηρεάζει αρνητικά τη γονιμοποίηση, τον αριθμό των κόκκων ανά στάχυ και κατά συνέπεια την τελική απόδοση του αραβοσίτου. Πιο

συγκεκριμένα, εάν η υγρασία του εδάφους στο διάστημα αυτό παραμείνει στο σημείο μαρασμού για 1-2 ημέρες ή 6-8 ημέρες, η τελική απόδοση μπορεί να μειωθεί έως και 20% και 50%, αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση, 1-3 ποτίσματα επιπλέον καλύπτουν τις ανάγκες του φυτού στο τέλος της βλαστικής περιόδου και της ανθοφορίας, διατηρώντας την υγρασία του εδάφους έως και 60%.

Μια αρδευόμενη καλλιέργεια κατά τη διάρκεια περιόδων ξηρασίας απαιτεί 500-700 κιλά νερού ανά στρ., ενώ για την πλήρη καλλιεργητική περίοδο, η συνολική ποσότητα κυμαίνεται μεταξύ 600 και 900 κιλών νερού ανά στρ.

1.1.7.4 Σπορά - Φύτευση

Η σπορά πραγματοποιείται συνήθως στις αρχές ή στα μέσα της άνοιξης ενώ η συγκομιδή στα τέλη του καλοκαιριού έως και το φθινόπωρο. Οι σειρές καλαμποκιού συνήθως φυτεύονται σε απόσταση 38 έως 96 cm μεταξύ τους, ενώ η απόσταση μεταξύ των σειρών κυμαίνεται μεταξύ 0,6-1m. Η ομοιόμορφη απόσταση σποράς μεταξύ των φυτών μπορεί να αυξήσει την απόδοση και να διευκολύνει τον έλεγχο των ζιζανίων ακόμη και μετά την εμφάνιση των φυτών (Torres, 2012¹⁶). Το βάθος σποράς κυμαίνεται 4-7,5 cm. Η φύτευση σπόρων σε βάθος μικρότερο από 3 cm μπορεί να οδηγήσει σε λιγότερο ευνοϊκή ανάπτυξη και κακή εγκατάσταση των πρώτων κομβικών ριζών. Αντίθετα, η βαθύτερη από τη συνιστάμενη φύτευση, μπορεί να καθυστερήσει σημαντικά το φύτρωμα. Με βάση τα δεδομένα του FAO, ο πληθυσμός των φυτών κυμαίνεται από 20.000 έως 30.000 φυτά ανά εκτάριο (2.000-3.000 φυτά ανά στρ.) για όψιμες ποικιλίες και από 50.000 έως 80.000 ανά εκτάριο (5.000-8.000 ανά στρ.) ή και παραπάνω για πρώιμες ποικιλίες. Άλλα δεδομένα δείχνουν ότι οι ποικιλίες με μεγάλο κύκλο ζωής (700 FAO ή περισσότερο) έχουν συχνά ως μέσο βέλτιστο αριθμό φυτών περίπου 70.000-75.000 φυτά ανά εκτάριο (7.000-7500 φυτά ανά στρ.), ενώ οι πολύ πρώιμες ποικιλίες (FAO 200 ή λιγότερο) μπορούν να δώσουν έως και 90.000-110.000 φυτά ανά εκτάριο (9.000-1.100 φυτά ανά στρ.).

Επιπροσθέτως, σημαντική είναι η κατάλληλη προετοιμασία του εδάφους πριν τη φύτευση, η οποία μπορεί να αρχίσει ήδη από τον προηγούμενο Νοέμβριο, δηλαδή μετά το τέλος της προηγούμενης καλλιεργητικής περιόδου. Αρχικά, απαραίτητος είναι ο καθαρισμός των υπολειμμάτων της προηγούμενης συγκομισμένης καλλιέργειας και η άροση του εδάφους. Η πιο κοινή πρακτική που εφαρμόζεται είναι αυτή του τεμαχισμού των φυτικών

υπολειμμάτων τα οποία στη συνέχεια απλώνονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια του εδάφους. Η διαχείριση των υπολειμμάτων μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη βελτίωση της υφής του εδάφους, τη διατήρηση της υγρασίας και τη μείωση των προσβολών από ασθένειες και έντομα (Culman et al., 2013¹⁷).

1.1.7.5 Συγκομιδή

Ο κύκλος ζωής των περισσότερων ποικιλιών αραβοσίτου από την σπορά έως τη συγκομιδή είναι 100-120 ημέρες. Παρόλα αυτά, ο ακριβής χρόνος συγκομιδής επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως: την ποικιλία, το κλίμα, τις εδαφικές και περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή, αλλά και την τελική χρήση του προϊόντος. Στις μέρες μας, οι παραγωγοί συνήθως συγκομίζουν το καλαμπόκι χρησιμοποιώντας μεγάλες θεριζοαλωνιστικές μηχανές, οι οποίες αφαιρούν ολόκληρο το φυτό και ταυτόχρονα διαχωρίζουν τους σπόρους από την υπόλοιπη βιομάζα.



*Εικόνα 5: Συγκομιδή καλαμποκιού με θεριζοαλωνιστική μηχανή
(<https://www.britannica.com/plant/corn-plant>)*

Ο κύριος δείκτης καθορισμού της συγκομιδής του καρπού είναι το επίπεδο περιεκτικότητας σε υγρασία στον καρπό. Γενικά, συνίσταται ο καρπός που πρόκειται να αποξηρανθεί μετά τη συγκομιδή να συγκομίζεται όταν η περιεκτικότητά του σε υγρασία έχει πέσει τουλάχιστον κάτω από 35% ή ακόμα και 30%, ώστε να επιτευχθεί χαμηλότερο κόστος ξήρανσης. Σε αυτά τα επίπεδα υγρασίας, το καλαμπόκι φτάνει στη μέγιστη περιεκτικότητα ξηρής ουσίας. Αντίθετα, εάν ο καρπός προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση, η συγκομιδή

μπορεί να ξεκινήσει νωρίτερα. Η περίοδος συγκομιδής επηρεάζεται επίσης από τον καιρό, αλλά και τη διαθεσιμότητα και κόστος εργασίας και εξοπλισμού. Επιπλέον, σημαντική είναι η επιθυμητή ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος σύμφωνα με τις ανάγκες τις εκάστοτε αγοράς. Η ποιοτική κατάταξη του καρπού βασίζεται στην καθαρότητα, την ομοιομορφία, το σχήμα και τη σκληρότητα των κόκκων (Watson and Ramstad, 1991¹⁸).

Ο καθορισμός του χρόνου συγκομιδής είναι επίσης πολύ σημαντικός για τον αραβόσιτο που προορίζεται για ζωοτροφή ή για παραγωγή ενέργειας. Για τη μεγιστοποίηση τόσο της απόδοσης όσο και της επιθυμητής ποιότητας του αραβοσίτου που προορίζεται για ενσίρωμα, η συγκομιδή θα πρέπει να πραγματοποιείται όταν η περιεκτικότητα σε ξηρή ουσία ολόκληρου του φυτού είναι μεταξύ 30-38% καθώς τότε η περιεκτικότητα σε άμυλο είναι ικανοποιητική και οι φυτικές ίνες πιο εύπεπτες. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος υπολογισμού της περιεκτικότητας του ενσιρώματος σε υγρασία στον αγρό είναι η δοκιμή ξηράς ουσίας με την χρήση μικροκυμάτων (microwave dry matter test) (Oetzel et al., 1993¹⁹).

Εναλλακτικά, ως δείκτες συγκομιδής μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι μεταχρωματισμοί του φλοιού σε ελαφρώς κίτρινο-καφέ ή/και η ανάπτυξη της γραμμής γάλακτος του κόκκου. Ωστόσο, οι δείκτες αυτοί αποτελούν απλώς μία ένδειξη και η τελική απόφαση για τη συγκομιδή θα πρέπει να βασίζεται στην περιεκτικότητα των φυτών σε ξηρά ουσία. Σε περίπτωση που η συγκομιδή γίνεται νωρίτερα, όταν δηλαδή η ξηρά ουσία είναι κάτω από 30%, συχνά παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις όπως μείωση απόδοσης και απώλειες θρεπτικών συστατικών, χαμηλότερη εναπόθεση αμύλου και αποικοδόμηση πρωτεϊνών. Αντιθέτως, η καθυστερημένη συγκομιδή, με ξηρά ουσία άνω του 35-38%, μπορεί να οδηγήσει επίσης σε μείωση της απόδοσης και της ποιότητας της ενσίρωσης, αύξηση του κινδύνου αναθέρμανσης («άναμμα των σπόρων»), αύξηση της περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες που μειώνει την πεπτικότητα του ενσιρώματος ή ακόμη και σε ανεπιτυχή ζύμωση.

1.1.7.6 Αποθήκευση αραβόσιτου

Με την αποθήκευση του προϊόντος, επιτυγχάνεται η πώλησή του σε συμφέρουσες για τον παραγωγό τιμές ανάλογα με τη ζήτηση της εκάστοτε αγοράς. Παρόλα αυτά, όταν οι συνθήκες αποθήκευσης δεν είναι οι βέλτιστες, ο κίνδυνος της μακροχρόνιας αποθήκευσης είναι υψηλότερος, καθώς μπορεί να ζημιώσει έως και το 80% της απόδοσης. Συνεπώς είναι σημαντική η εφαρμογή πρακτικών για ασφαλέστερη και βέλτιστη αποθήκευση του καλαμποκιού μετασυλλεκτικά.

Αρχικά, για τη μείωση του κινδύνου απωλειών κατά την αποθήκευση, σημαντικό είναι ο χώρος αποθήκευσης να πληροί ορισμένες προδιαγραφές. Οι εσωτερικές επιφάνειες του χώρου αποθήκευσης θα πρέπει να είναι λείες, καθαρές και στεγνές με μόνωση υγρασίας και να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος αερισμός. Το επίπεδο υγρασίας και η θερμοκρασία αποθήκευσης των κόκκων του αραβοσίτου, επηρεάζουν άμεσα τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης. Όταν πρόκειται για μακρά περίοδο αποθήκευσης, οι κόκκοι θα πρέπει να ξηρανθούν περαιτέρω και να φτάσει η περιεκτικότητά τους σε υγρασία έως το 13,5%. Για τους καρπούς που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή και έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε υγρασία, ο παραγωγός δύναται να χρησιμοποιήσει ορισμένα συντηρητικά όπως το προπιονικό οξύ ή μείγμα οξικού και προπιονικού οξέος. Οι ουσίες αυτές δεν επηρεάζουν τη θρεπτική αξία και την ασφάλεια του προϊόντος αλλά το προστατεύουν από παθογόνους μύκητες.

Από τη στιγμή της συγκομιδής, είναι επίσης δυνατή η εφαρμογή φυτοπροστατευτικών προϊόντων με τις ακόλουθες δραστικές ενώσεις: Pirimiphos-methyl, (S) - Methoprene. Εάν είναι απαραίτητο, οι κόκκοι μπορούν να υποστούν επεξεργασία με κατάλληλη και πιστοποιημένη εντομοκτόνο σκόνη. Με αυτόν τον τρόπο, η αποθήκευση μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από ένα χρόνο. Επιπλέον, μια μεγάλη ποικιλία υποκαπνιστικών εντομοκτόνων μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον καρπό καλαμποκιού που αποθηκεύεται σε σωρούς. Ορισμένα από τα πιο σημαντικά ενεργά συστατικά είναι το φωσφίδιο αλουμινίου, το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), το φωσφίδιο μαγνησίου, το βρωμιούχο μεθύλιο και η δελταμεθρίνη.

Σημαντική είναι επίσης η ποιοτική διαλογή των σπόρων πριν την αποθήκευση αφαιρώντας όλους τους μολυσμένους σπόρους και ξένες ύλες που πιθανόν να συγκομίστηκαν μαζί. Συνιστάται επίσης η τοποθέτησή τους σε σάκους και ο τακτός έλεγχος της υγείας και η ποιότητά τους. Όταν η θερμοκρασία στο εσωτερικό του σιλό είναι πάνω από 13-15,5°C, τότε απαιτείται συχνός έλεγχος, μία φορά την εβδομάδα, ενώ όταν η θερμοκρασία είναι κάτω από 13°C, μία φορά κάθε 2 εβδομάδες είναι αρκετό. Σημαντική είναι επίσης και δειγματοληψία λαμβάνοντας αντιπροσωπευτικά δείγματα από τους σωρούς των αποθηκευμένων καρπών και η εξέτασή τους για τυχόν προσβολή ή/και παρουσία εντόμων αλλά και για μολύνσεις παθογόνων ή μυκοτοξινών. Ταυτόχρονα με τη δειγματοληψία, είναι δυνατή η χρήση παγίδων ανίχνευσης για περαιτέρω παρακολούθηση των ειδών και του πληθυσμού των εχθρών του αποθηκευμένου προϊόντος.

1.1.8 Εχθροί και Ασθένειες

Η συμβολή της φυτοπροστασίας στην ανάπτυξη της καλλιέργειας είναι απαραίτητη, καθώς συμβάλλει στην ποσότητα αλλά και την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος. Κατά τη διάρκεια καλλιεργητικής περιόδου, ο αραβόσιτος είναι δυνατό να προσβληθεί από πλήθος ασθενειών και εχθρών, θέτοντας σε κίνδυνο την τελική απόδοση της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, όταν οι προσβολές από εντομολογικούς εχθρούς, μύκητες, βακτήρια ή και άλλους εχθρούς της καλλιέργειας παρατηρούνται στον καρπό, ζημιώνεται άμεσα η παραγωγή του εμπορευματοποιήσιμου είδους. Οι κυριότεροι εχθροί και ασθένειες του αραβόσιτου αναφέρονται παρακάτω.

1.1.8.1 Εχθροί

Όσον αφορά τους εντομολογικούς εχθρούς, στη χώρα μας, το καλαμπόκι προσβάλλεται τόσο κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου αλλά και στο στάδιο της αποθήκευσής του. Τα κυριότερα έντομα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την χώρα μας είναι:

1. Έντομα που προσβάλλουν τα νεαρά φυτά, όπως τα σιδεροσκούληκα (*Agriotes* spp. και *Melanotus* spp.), οι αγρότιδες (*Agrotis* spp.) και οι άλτες (*Chaetocnema aridula*, *Phyllotreta vittula*).
2. Έντομα που προσβάλλουν το ριζικό σύστημα, όπως είναι τα είδη του γένους *Diabrotica* spp. και αφίδες των ριζών (*Anuraphis maidi- radicis*).
3. Έντομα που προσβάλλουν το στέλεχος και τα αναπαραγωγικά όργανα, όπως είναι το πράσινο σκουλήκι (*Heliiothis armigera*), η πυραλίδα του αραβοσίτου (*Ostrinia (Pyrausta) nubilalis*) και το σκουλήκι του καλαμποκιού (*Sesamia nonagrioides*).
4. Έντομα που προσβάλλουν τα φύλλα του καλαμποκιού, όπως είναι ο *Blissus leucopterus*, η αφίδα των φύλλων του αραβοσίτου (*Aphis maydis*) και οι ακρίδες.

1.1.8.2 Ασθένειες

Οι σημαντικότερες ασθένειες στην καλλιέργεια του αραβόσιτου προκαλούνται κυρίως από μύκητες και βακτήρια και περιλαμβάνουν (Θανασουλόπουλος 1995, Κατής 2010):

ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

1. Τήξεις νεαρών φυταρίων (*Pithium* spp., *Stenocarpella maydis*, *Gibberella zeae*, *Fusarium fujikuroi*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium* spp., και *Aspergillus* spp.)

Οι μύκητες αυτοί προσβάλλουν το υπέργειο και υπόγειο τμήμα φυταρίων και ανεπτυγμένων φυτών. Προσβολές μπορούν να προκληθούν τόσο πριν ή κατά τη βλάστηση του σπόρου αλλά και πριν ή μετά την ανάδυση των νεαρών φυτών. Ευνοϊκές συνθήκες προσβολής είναι η υψηλή εδαφική υγρασία και θερμοκρασία μικρότερη των 10°C.



Εικόνα 6: Τήξεις φυταρίων από *Pithium* spp.
(<https://sites.udel.edu/weeklycropupdate/?p=9404>)

2. Σηψιρριζίες (*Pithium* spp., *Stenocarpella maydis*, και *Fusarium fujikuroi*)

Οφείλονται κυρίως στα *Pithium* spp. που προσβάλλουν τις ρίζες του φυτού σε οποιοδήποτε αναπτυξιακό στάδιο, οδηγώντας σε σήψη, με αποτέλεσμα την περιορισμένη ανάπτυξη, ευρωστία και πλάγιασμα των φυτών. Ευνοούνται σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης νερού στο έδαφος (κακώς στραγγιζόμενα εδάφη) και στις χαμηλές θερμοκρασίες.

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

Η σήψη του στελέχους που προκαλείται από τον *Stenocarpella maydis* χαρακτηρίζεται από φαιό χρωματισμό στους κατώτερους κόμβους, ευθραυστότητα του στελέχους και συμπτώματα μάρανσης και τάσης για πλάγιασμα. Το χαρακτηριστικό σημείο της ασθένειας είναι η εμφάνιση κοντά στους κόμβους μαύρων στιγμάτων (πυκνίδια= καρποφορίες του παθογόνου). Ανάλογα συμπτώματα παρουσιάζονται στη σήψη στελέχους από τον *Gibberella zeae* (Εικόνα 7), αλλά χαρακτηριστικά της είναι ο ρόδινος μεταχρωματισμός της εντεριώνης και το λευκό μυκήλιο με μαύρα στίγματα (περιθήκια= καρποφορίες του μύκητα) που εμφανίζονται στο στέλεχος των προσβεβλημένων φυτών σε συνθήκες αυξημένης υγρασίας. Η σήψη του σπάδικα που προκαλείται από τον *Stenocarpella maydis* εκδηλώνεται εξωτερικά με κιτρίνισμα των βρακείων φύλλων, ενώ εσωτερικά αναπτύσσεται λευκό μυκήλιο. Αντίθετα, όταν οι κόκκοι παραμένουν υπανάπτυκτοι, η σήψη στους σπάδικες οφείλεται στον μύκητα *Gibberella zeae*, τα βράκτια φύλλα παίρνουν εξωτερικά ένα κοκκινωπό χρωματισμό, ενώ εσωτερικά αναπτύσσεται λευκό-ρόδινο μυκήλιο.



Εικόνα 7: Σήψη στελέχους από *Gibberella zeae*

(<https://www.grainsa.co.za/fusarium-graminearum-species-complex-on-maize-has-reached-epidemic-proportions>)

4. Μαύρη σήψη στελέχους (*Macrophomina phaseolina*)

Η προσβολή παρουσιάζεται με καστανόφαιο μεταχρωματισμό στους κατώτερους κόμβους, ενώ εσωτερικά του στελέχους παρατηρείται διαλυτοποίηση της εντεριώνης καθώς και πληθώρα μαύρων σκληρωτίων του μύκητα (Εικόνα 8). Σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης των φυτών εμφανίζονται επίσης συμπτώματα πρόωμης ωρίμανσης και η τάση των στελεχών να θραύονται στο ύψος του λαιμού. Ευνοϊκές συνθήκες προσβολής είναι η καλλιέργεια σε ξηρά εδάφη και οι υψηλές θερμοκρασίες.



*Εικόνα 8: Μαύρη σήψη στελέχους από *Macrophomina phaseolina**
(<https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5447502>)

5. Σήψη σπόρων αραβόσιτου (*Fusarium fujikuroi*)

Εμφανίζεται ως διάσπαρτη σήψη σε διάφορους σπόρους του σπάρδικα. Οι προσβεβλημένοι σπόροι εμφανίζουν στην κορυφή τους ανοικτό ρόδινο χρωματισμό, το οποίο σταδιακά εξελίσσεται σε ρόδινο βαμβακώδες μυκήλιο (Εικόνα 9). Οι προσβολές εμφανίζονται σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης του αραβόσιτου. Η εξάπλωση της ασθένειας ευνοείται από ξηροθερμικές συνθήκες.



Εικόνα 9: Σήψη σπόρων από *Fusarium fujikuroi*
(<https://gms.ctahr.hawaii.edu/?aid=1365>)

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

Η προσβολή αρχίζει στη ράχη του σπάδικα όπου εμφανίζεται ένας γκρίζος αποχρωματισμός, τα κύτταρα της εντεριώνης διαλυτοποιούνται ενώ παράλληλα προσβάλλονται οι βάσεις των σπόρων όπου εμφανίζονται οι καρποφορίες του μύκητα με τη μορφή μαύρων σιγμάτων (Εικόνα 10). Το παθογόνο προσβάλλει μόνο φυτά αραβόσιτου ήδη καταπονημένα από διάφορους παράγοντες όπως παγετό ή ξηρασία και συνήθως ανώριμους σπάδικες. Η προσβολή συνήθως γίνεται αντιληπτή ύστερα από τη συγκομιδή.



Εικόνα 10: Σήψη του άξονα του σπάδικα από *Nigrospora oryzae*
(<https://www.flickr.com/photos/cimmyt/4911596056>)

7. Άνθρακας (*Ustilago maydis*)

Κοινός άνθρακας του καλαμποκιού, ο οποίος προσβάλλει κυρίως το σπάδικα και λιγότερα τα λοιπά υπέργεια τμήματα του φυτού, προκαλώντας χαρακτηριστικούς όγκους ποικίλου μεγέθους που περικλείουν τα τελειοσπόρια του μύκητα (Εικόνα 11). Οι μεγάλοι σε μέγεθος όγκοι που αναπτύσσονται στη φόβη ή επάνω από το σπάδικα μπορούν να μειώσουν την γονιμοποίηση του φυτού 30-100% ενώ όγκοι στο στέλεχος μπορούν να προκαλέσουν κάμψη του στελέχους.



*Εικόνα 11: Άνθρακας (*Ustilago maydis*)*
(<https://www.britannica.com/plant/corn-plant>)

8. Ελμινθοσποριάσεις (*Helminthosporium turcicum*, *Helminthosporium carbonum*, *Helminthosporium maydis*.)

Προσβάλλουν τα φύλλα του αραβόσιτου προκαλώντας την εμφάνιση των επιμήκων γκριζοπράσινων-καστανών κηλιδώσεων στα φύλλα με εμφανή όρια, οι οποίες στη συνέχεια μετατρέπονται σε νεκρώσεις (Εικόνα 12). Η μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας που συνεπάγεται μπορεί να δημιουργήσει σημαντικές απώλειες στις καλλιέργειες καλαμποκιού μειώνοντας τις αποδόσεις έως και 50%. Ο υγρός και ζεστός καιρός είναι ευνοϊκός για την ανάπτυξη και την εξάπλωση της ασθένειας στο καλαμπόκι.



Εικόνα 12: Ελμινθοσπορίαση φυτών καλαμποκιού (*Helminthosporium turcicum*)

(https://www.natureinstock.com/search/preview/leaf-blight-helminthosporium-turcicum-affecting-growing-maize-crop/0_11243725.html)

9. Σκωρίαση στα φύλλα (*Puccinia sorghi*)

Ο μύκητας προσβάλλει τα φύλλα καλαμποκιού προκαλώντας κηλίδες οι οποίες εξελίσσονται σε φλύκταινες που στη συνέχεια θα ελευθερώσουν τα ουρεδοσπόρια και τελειοσπόρια του μύκητα (Εικόνα 13). Συνήθως δεν αποτελούν σημαντικές προσβολές επειδή οι προσβολές συνήθως πραγματοποιούνται προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Ευνοούνται από υγρή ατμόσφαιρα, μέτριες θερμοκρασίες και την ευπάθεια του φυτού (από π.χ. υπερβολική αζωτούχο λίπανση).



Εικόνα 13: Σκωρίαση στα φύλλα καλαμποκιού από *Puccinia sorghi*
(<https://www.forestryimages.org/>)

ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

10. Βακτηριακή κηλίδωση των φύλλων (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*)

Η προσβολή χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό κίτρινο-καφέ επιμηκών κηλίδων με ακανόνιστα κυματοειδή περιθώρια στα φύλλα, οι οποίες σταδιακά επεκτείνονται παράλληλα προς το κεντρικό νεύρο. Στη συνέχεια μετατρέπονται σε νεκρώσεις οδηγώντας τελικά στην ξήρανση μεγάλου μέρους του ελάσματος. Συνήθη συμπτώματα των προσβεβλημένων φυτών είναι: καχεξία, νανισμός, μάρανση και αυξημένη θνησιμότητα (Εικόνα 14). Χαρακτηριστική είναι η έξοδος κίτρινου υγρού από τα αγγεία των προσβεβλημένων φύλλων ή του βλαστού που περιέχει βακτηριακά κύτταρα. Επιπλέον, με εγκάρσια τομή στο βλαστό, στις θέσεις των ηθμαγγειωδών δεσμίδων εντοπίζονται μαύρα στίγματα που αποτελούν ένδειξη απόφραξης. Σπάνια είναι επίσης η περίπτωση προσβολής των σπαδικών που δύναται να προκαλέσει κηλίδωση των βρακτείων και τοπική ατροφία των σπόρων του καλαμποκιού. Το παθογόνο αρέσκεται στις ζεστές και υγρές συνθήκες αλλά δεν ανέχεται τα ξηρά κλίματα .



Εικόνα 14: Βακτηριακή κηλίδωση των φύλλων από *Erwinia stewartii*
(<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2018.5356>)

11. Βακτηριακή σήψη στελέχους (*Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*)

Τα συμπτώματα της προσβολής από το βακτήριο εντοπίζονται τόσο σε νεαρά όσο και σε ανεπτυγμένα φυτά αραβοσίτου με τη μορφή αποχρωματισμένης κηλίδας στο λαιμό, η οποία στη συνέχεια εξελίσσεται σε υγρή σήψη εντοπισμένη στο μεσογονάτιο της αρχικής προσβολής. Ως αποτέλεσμα προκαλείται θραύση του στελέχους στο ύψος του λαιμού (Εικόνα 15). Ευνοϊκές συνθήκες μόλυνσης αποτελούν τα υγρά εδάφη και οι υψηλές θερμοκρασίες αέρα.



Εικόνα 15: Βακτηριακή σήψη στελέχους από *Erwinia dissolvens*
(<https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5608103>)

1.2 Το γένος *Aspergillus* spp.

Το γένος *Aspergillus* ανήκει στους Hyphomycetes και περιλαμβάνει τέσσερα υπογένη και 339 είδη (Samson et al., 2014²⁰). Μέλη του γένους αυτού απαντώνται σε ποικίλα περιβάλλοντα παγκοσμίως καθώς έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται σε πολλά και διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα και σε διάφορες κλιματολογικές συνθήκες. Αυτοί οι σαπροφυτικοί νηματοειδείς μύκητες βρίσκονται συνήθως στο έδαφος ή σε οργανικά υπολείμματα και είναι προσαρμοστικοί και ανθεκτικοί στις κυμαινόμενες συνθήκες περιβάλλοντος, αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και σε σχετικά χαμηλή υγρασία. Εκτός όμως από τη σαπροφυτική τους δράση, τα περισσότερα *Aspergillus* spp. παράγουν άφθονους δευτερογενείς μεταβολίτες (Secondary Metabolites - SMs) και ένζυμα, με αποτέλεσμα τη στενή τους σχέση με την ανθρώπινη υγεία, την καθημερινή ζωή και τη βιομηχανική παραγωγή. Τέτοιοι μεταβολίτες είναι οι επιβλαβείς μυκοτοξίνες που παράγονται από τους *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nidulans* (Keller et al., 2005²¹) και τα ανθρώπινα παθογόνα, κυρίως *A. fumigatus* και *A. flavus*, που προκαλούν ασπεργίλλωση (Patterson et al., 2000²²). Ταυτόχρονα όμως υπάρχουν ορισμένα είδη με ιδιαίτερη οικονομική σημασία όπως οι *A. oryzae* (Abe et al., 2006²³) και *A. niger* (Baker, 2006²⁴) καθώς χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες ζυμώσιμων τροφίμων από το 1940, ως πηγή ενζύμων και άλλων χημικών προϊόντων.

Οι πρώτες ιστορικές αναφορές των Ασπεργίλλων έγιναν στην αρχαία Ελλάδα από τον Νίκανδρο τον Κολοφώνιο (185 π.Χ), αλλά και στην Εβραϊκή Βίβλο (Λευιτικό, Κεφ. 13-14), (Raper & Fennel, 1965²⁵), όπου ήταν συνδεδεμένοι συνήθως με την πρόκληση σήψης και αποδόμησης, καθώς επίσης και τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Η πρώτη γνωστή ανθρώπινη εκμετάλλευση του *Aspergillus* για ωφέλιμο σκοπό φαίνεται να πραγματοποιήθηκε στην Κίνα περίπου πριν από 2.000 χρόνια, όπου χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της γεύσης του ρυζιού, της σόγιας και άλλων φυτικών προϊόντων, βοηθώντας έτσι την περαιτέρω ζύμωσή τους από ζύμες και βακτήρια. Στη συνέχεια, παρόμοιες ζυμώσεις τροφίμων υιοθετήθηκαν στην Ινδονησία, την Ιαπωνία, την Κορέα και άλλα μέρη της Ασίας. Το «Koji» είναι η ιαπωνική λέξη που χρησιμοποιείται για να περιγράψει σπόρους που έχουν υποστεί ζύμωση με «μούχλα». Αυτές οι ζυμώσεις είναι πλέον γνωστές ως koji processes και αποτελούν τη βάση σημαντικών εμπορικών διεργασιών στον σύγχρονο κόσμο. Στο koji, ένας νηματοειδής μύκητας εκκρίνει μια ποικιλία ενζύμων καθώς εισβάλλει και αποικοδομεί το

υπόστρωμά του από πρωτεΐνες ή άμυλο σε πεπτίδια και αμινοξέα ή σε απλά σάκχαρα, αντίστοιχα (Baker and Bennett, 2007²⁶).

Η επιστημονική μελέτη των Ασπέργιλλων, όπως και των άλλων μυκήτων, ξεκίνησε μετά την εφεύρεση του μικροσκοπίου. Ο ιταλός βοτανολόγος Pier Antonio Michelli (1679-1737) πραγματοποίησε την πρώτη καταγραφή του γένους *Aspergillus* στο «Nova Plantarum Genera» το 1729 (Raper and Fennell, 1965²⁵). Ο Micheli, ο οποίος ήταν ιερέας, ήταν ο πρώτος που διέκρινε τις χαρακτηριστικές κεφαλές στους κονιδιοφόρους του γένους αυτού. Η μικροσκοπική εικόνα του μύκητα τον παρέπεμψε στο aspergill, ένα εκκλησιαστικό σκεύος που χρησιμοποιείται για το ράντισμα (ραντίζω = aspergere (lat.)) του αγιασμού στη λειτουργία, από το οποίο προήλθε και η τελική ονομασία του μύκητα, *Aspergillus* (Bennett and Klich, 1992²⁷). Ωστόσο, ως ξεχωριστό γένος μυκήτων αντιμετωπίστηκαν από τον Wehmer το 1901 (Amaiike and Keller, 2011²⁸). Ύστερα από την πρώτη σημαντική διατριβή για το γένος αυτό που δημοσιεύτηκε από τους Thom και Church, το 1926, οι μύκητες τους γένους *Aspergillus* αποτελούν μια από τις πιο γνωστές και πιο μελετημένες ομάδες μυκήτων. Το 1965 δημοσιεύτηκε από τους Raper και Fennell η σημαντικότερη εργασία για το μύκητα *Aspergillus*, οι οποίοι δημιούργησαν τον πιο εύχρηστο οδηγό για την ταξινόμηση των ειδών του γένους (Raper and Fennell, 1965²⁵). Η εξάπλωσή τους στο φυσικό περιβάλλον, η ευκολία καλλιέργειάς τους σε εργαστηριακά μέσα και η οικονομική σημασία πολλών από τα είδη τους είχαν ως αποτέλεσμα πολλοί μυκητολόγοι και βιομηχανικοί μικροβιολόγοι να προσελκυσθούν στη μελέτη τους.

1.2.1 Ταξινόμηση και μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους *Aspergillus* sp.

Η ταξινόμηση και η ταυτοποίηση του *Aspergillus* βασίζεται παραδοσιακά σε φαινοτυπικούς χαρακτήρες αλλά τις τελευταίες δεκαετίες επηρεάστηκε έντονα από τον μοριακό και χημειοταξονομικό χαρακτηρισμό. Αυτή αρχίζει όταν οι Thom και Church, για πρώτη φορά το 1926, δημιούργησαν μία κλείδα που αποτελούταν από 69 είδη χωρισμένα σε 11 ομάδες (Samson et al., 2014²⁰). Το 1965 οι Raper και Fennell (1965) χώρισαν το γένος σε 18 ομάδες. Στη συνέχεια ο Peterson (2008)²⁹ δέχτηκε πέντε υπογένη και 16 sections ενώ πιο πρόσφατα οι Houbraeken et al. (2014)³⁰ και Hubka et al. (2014)³¹ πρότειναν επί του παρόντος τέσσερα υπογένη (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* και *Nidulantes*) και 20 sections. Όσον αφορά στην ταξινόμηση του γένους *Aspergillus*, αυτή προκύπτει ως εξής:

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Class	Eurotiomycetes
Order	Eurotiales
Family	Trichocomaceae
Genus	<i>Aspergillus</i>

Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* spp. απαντώνται στη φύση σε δύο μορφές, ως ατελείς μύκητες *Aspergillus* (anamorphic) οι οποίοι παράγουν αγενή σπόρια (αλυσίδες κονιδίων) και ως τελειομύκητες (teleomorphic) οι οποίοι αναπαράγονται και εγγενώς. Οι τέλειες μορφές *Aspergillus* περιλαμβάνουν τα κλειστοθήκια, τα οποία αποτελούνται από ασκούς που εμπεριέχουν ασκοσπόρια. Όταν οι ασκοί φθάσουν στο στάδιο της ωριμότητας σπάζουν με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των ασκοσπορίων. Γενικά, ο συνηθισμένος τρόπος αναπαραγωγής των *Aspergillus* spp. είναι ο αγενής δηλαδή η κονιδιογένεση, αν και σε πολλά είδη έχει περιγραφεί και εγγενής τρόπος αναπαραγωγής με ασκοσπόρια. Οι Ασπέργγιλοι έχουν ποικίλη μορφολογική και αναπτυξιακή απόκριση και κατά συνέπεια η μορφή των αποικιών του μύκητα είναι άμεσα εξαρτώμενη από διάφορους παράγοντες όπως η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος, η θερμοκρασία, ο φωτισμός αλλά και η ηλικία της καλλιέργειας.

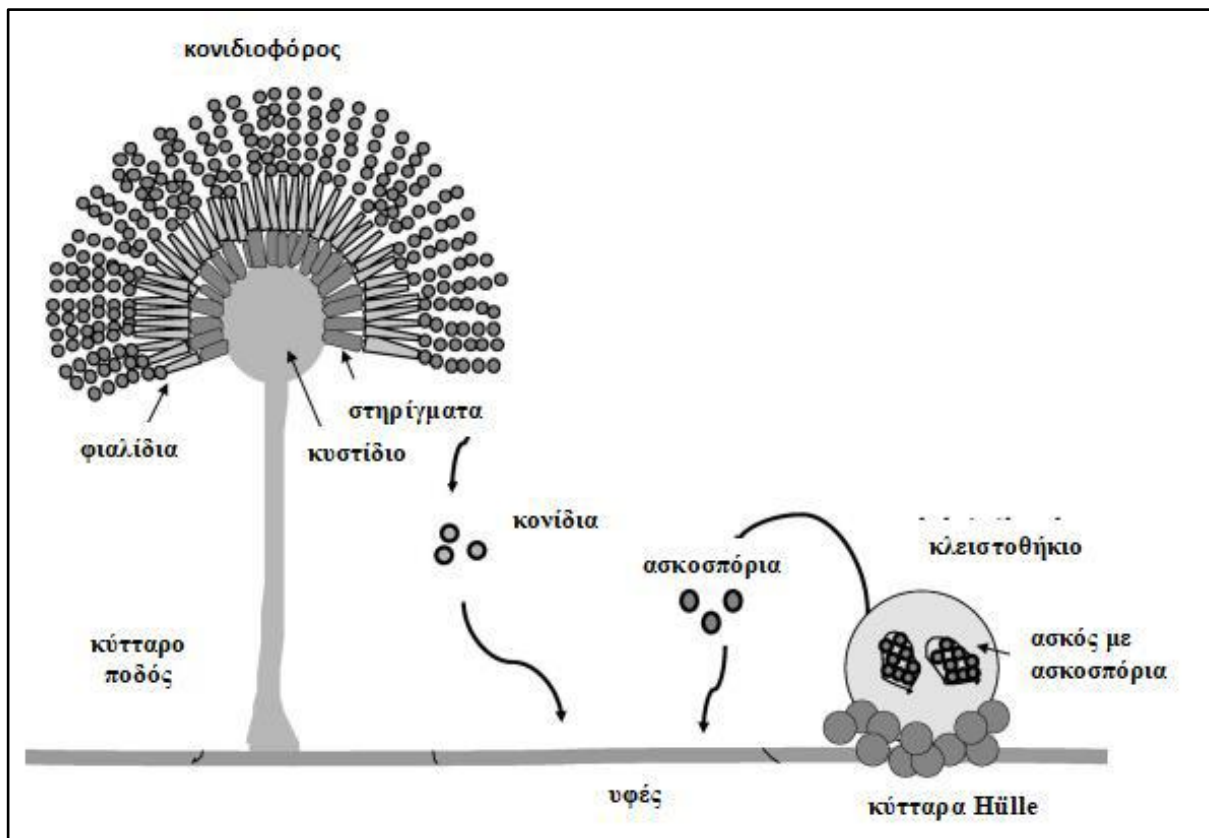
Το μυκήλιο του γένους *Aspergillus* spp. είναι πολυκύτταρο, υαλώδες ή ανοικτού χρώματος και αποτελείται από πλούσιες διακλαδιζόμενες υφές με εγκάρσια χωρίσματα (septa), οι οποίες μπορεί να είναι άχρωμες ή έγχρωμες ή τοπικά έγχρωμες. Επί των υφών βρίσκονται τα κονίδια, τα αγενή δηλαδή σπόρια του μύκητα και το σύνολό τους σχηματίζει τον κονιδιοφόρο, ο οποίος διευρύνεται στην κορυφή του για να σχηματίσει μία στρογγυλεμένη, ελλειπτική δομή (κυστίδιο) σε σχήμα ράβδου. Οι κονιδιοφόροι σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της μυκηλιακής διαφοροποίησης από ορισμένα εξειδικευμένα κύτταρα τα οποία μεγεθύνονται, αναπτύσσουν ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα και σχηματίζουν «foot cells» σε σχήμα «T» ή «L» που παράγουν εκάστοτε έναν μόνο κάθετο κονιδιοφόρο. Στο άκρο και περιμετρικά της κεφαλής υπάρχει μία ή δύο σειρές κυττάρων, των στηρίγματων. Τα στηρίγματα είναι κυλινδρικά και αφού φθάσουν σε ορισμένο μήκος στενεύουν στην άκρη σε ένα σωλήνα που παράγει κονίδια. Ο πυρήνας του στηρίγματος

διαίρειται και ένας από τους θυγατρικούς πυρήνες περνά στον ακραίο σωλήνα και διαχωρίζεται από το στήριγμα. Όταν αυτή η διαδικασία επαναληφθεί παράγονται συνεχώς νέα κονίδια και κατά συνέπεια τα παλαιότερα προωθούνται προς τα επάνω με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία αλυσίδας αποτελούμενης από κονίδια που προέκυψαν από την άκρη του ίδιου στηρίγματος. Τα κονίδια όταν ωριμάσουν διαχωρίζονται τελείως από το μητρικό κύτταρο έχοντας δευτερεύον κυτταρικό τοίχωμα που τους προσδίδει χαρακτηριστικό χρώμα και υφή.

Εκτός από το κονιδιοφόρο, άλλες μορφολογικές δομές χρήσιμες για την ταυτοποίηση περιλαμβάνουν την κλειστοθήκια και τα σκληρώτια. Ορισμένα είδη μυκήτων του γένους *Aspergillus* spp. σχηματίζουν σκληρώτια ή ψευδοσκληρώτια και σε ορισμένες περιπτώσεις αναπαράγονται και εγγενώς παράγοντας ασκοσπόρια, τα οποία απαιτούν μήνες για να ωριμάσουν. Η εγγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται με τη σύζευξη ανθηριδίου και ασκογονίου. Οι σχηματισμοί των ασκοκαρπίων είναι κλειστοθήκια που μπορούν να περιβάλλονται από περιδία ή κύτταρα Hülle, ενώ πολλές φορές ο σεξουαλικός πολλαπλασιασμός ξεκινά από ειδικά ασκογόνα σπειράματα. Τα σκληρώτια είναι σκληρυμένες, σκουρόχρωμες υφικές μάζες που αποτελούνται από πολυεδρικά κύτταρα με παχύ τοίχωμα με εναπόθεση μελανίνης στον εξωτερικό τους φλοιό, που αποκτούν σφαιρικό έως υποσφαιρικό σχήμα όταν ωριμάζουν (Raper and Fennell 1965²⁵; Dyer and O'Gorman 2012³²; Chang et al., 2020³³). Μακροσκοπικά μοιάζουν με κλειστοθηκία αλλά δεν περιέχουν σεξουαλικά σπόρια. Πιστεύεται ότι χρησιμεύουν ως δομές ληθάργου που επιτρέπουν στα είδη να επιβιώσουν σε αντίξοες συνθήκες ανάπτυξης όπως ξηρασία, ψύχος ή ακόμη και σχετικά υψηλές θερμοκρασίες, καθώς περιέχουν γλυκογόνο και αποταμιευτικές ουσίες. Όταν οι συνθήκες είναι πάλι ευνοϊκές μπορούν να βλαστάνουν και να σχηματίσουν νέο μυκήλιο. Το χρώμα τους ποικίλλει από κίτρινο έως καφέ ή μαύρο. Τόσο τα κλειστοθηκία όσο και τα σκληρώτια είναι κλειστά και συνήθως στρογγυλές δομές περίπου στο μέγεθος ενός σπόρου παπαρούνας που μπορεί να είναι τόσο άφθονα ώστε να κυριαρχούν σε μια αποικία (Εικόνα 16).

Ωστόσο, σχετικά λίγα είδη του γένους *Aspergillus* spp. παράγουν κλειστοθήκια και ασκοσπόρια, η ταξινόμηση συνεπώς για την πλειοψηφία των απομονώσεων βασίζεται στα χαρακτηριστικά της αποικίας και στις λεπτομέρειες της μορφολογίας των σχηματισμών που φέρουν τα κονίδια. Το σχήμα, το χρώμα και το μέγεθος των κονιδιοφόρων, των κεφαλών, των

στηριγμάτων και των κονιδίων αποτελούν τα κύρια ταξινομικά χαρακτηριστικά του γένους *Aspergillus*.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση των κύριων μορφολογικών χαρακτηριστικών του γένους *Aspergillus* spp. (Tsitsigiannis et al., 2004³⁴)

1.2.2 *Aspergillus* section *Flavi*

Το *Aspergillus* section *Flavi* περιέχει ιστορικά μερικά από τα πιο σημαντικά είδη του γένους, τα οποία είναι σημαντικά στη βιοτεχνολογία, τα τρόφιμα και την υγεία (Varga et al. 2011³⁵). Φυλογενετικά, το τμήμα *Flavi* χωρίζεται σε οκτώ clades και περιλαμβάνει επί του παρόντος 33 είδη (Frisvad et al., 2019³⁶). Στο section *Flavi* περιλαμβάνονται είδη με κοντύτερους κονιδιοφόρους, τα οποία έχουν κιτρινο-πράσινες κεφαλές και σκουρόχρωμα σκληρώτια. Σε αυτήν κατατάσσονται τα είδη: *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sojae* και *A. tamarii*, τα οποία διαχωρίστηκαν μορφολογικά αν και υπάρχει διαφωνία εάν ορισμένα αντιπροσωπεύουν τελικά διαφορετικά είδη. Οι *Aspergillus oryzae* και *A. sojae* φαίνεται να είναι οι εξημερωμένες μορφές των αφλατοξικογόνων ειδών *A. flavus* και *A. parasiticus*,

αντίστοιχα, και χρησιμοποιούνται εκτενώς στις βιομηχανίες τροφίμων και βιοτεχνολογίας (Houbraken et al., 2014³⁰).

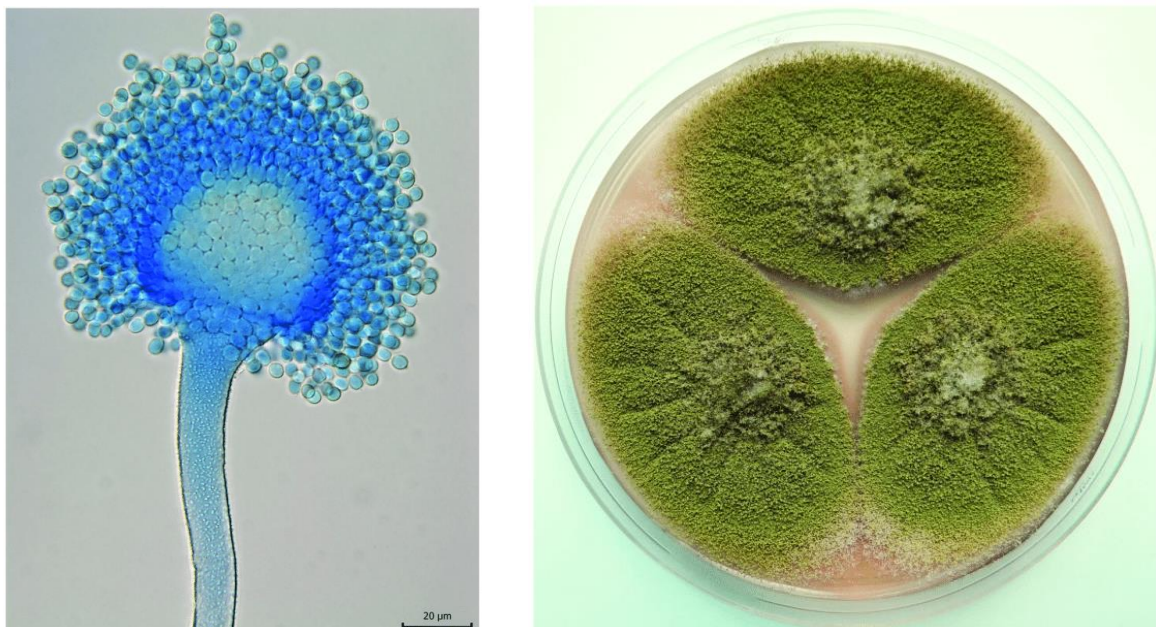
Αρκετά είδη έχουν περιγραφεί στο παρελθόν, τα οποία είχαν αποδοθεί στο section *Flavi* με βάση κυρίως παραδοσιακές μεθόδους όπως μορφολογικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένης της διαμέτρου της αποικίας, του χρώματος και της υφής, του μεγέθους και της υφής των κονιδίων και της δομής κονιδιοφόρου (Klich, 2002³⁷). Ωστόσο, η ταξινόμηση των ειδών μπορεί να είναι δύσκολη λόγω της εκτεταμένης απόκλισης των μορφολογικών χαρακτήρων που παράγονται από ένα υψηλό επίπεδο γενετικής μεταβλητότητας (Kumeda and Asao, 1996³⁸). Παρά την έντονη έρευνα, η ταξινόμηση αυτής της ομάδας μυκήτων εξακολουθεί να είναι εξαιρετικά περίπλοκη. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι αρκετά από τα είδη που έχουν αποδοθεί στο τμήμα *Flavi* δεν μπορούν να διακριθούν με βάση μόνο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά (Pildain et al., 2008³⁹; Frisvad et al., 2019³⁶). Η ταξινόμηση των αφλατοξικογόνων ειδών στο τμήμα *Aspergillus* section *Flavi* δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί και αρκετά νέα είδη (ορισμένα με αφλατοξογόνο δυναμικό) έχουν περιγραφεί από το 2011, όπως το *A. novoparasiticus*, *A. mottae*, *A. transmontanensis*, *A. sergii*, *A. bertholletius*, *A. hancockii*, και *A. korhogoensis* (Gonçalves et al., 2012⁴⁰; Soares et al., 2012⁴¹; Taniwaki et al., 2012⁴²; Pitt et al., 2017⁴³; Carvajal-Campos et al., 2017⁴⁴).

Ένας μεγάλος αριθμός ειδών του τμήματος *Aspergillus* section *Flavi* απαντώνται συχνά στις καλλιέργειες και μερικά από αυτά παράγουν αρκετές μυκοτοξίνες όπως αφλατοξίνες, μεταξύ των οποίων η αφλατοξίνη B1 που είναι από τους πιο τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από μύκητες στη φύση. Οι αφλατοξίνες παράγονται κυρίως από τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus*, τα οποία είναι πολύ διαδεδομένα στο περιβάλλον, έχοντας τεράστια σημασία για την οικονομία πολλών χωρών, καθώς προκαλούν εκτεταμένες αλλοιώσεις σε διάφορες σημαντικές κατηγορίες τροφίμων. Τα δύο αυτά είδη που συχνά συνυπάρχουν, έχουν πολλές μεταξύ τους ομοιότητες και πολύ δύσκολα μπορούν να διακριθούν. Ο Pitt προτείνει η αναγνώριση των δύο ειδών να γίνεται με βάση τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τους, μία πρακτική που εφαρμόζεται σε ευρεία κλίμακα λόγω της υψηλής της ακρίβειας και σαφήνειας.

Ιστορικά, είχε αρχικά αναφερθεί ότι το *A. flavus* παράγει αφλατοξίνη τύπου B και G (Nesbitt et al., 1962⁴⁵; Codner et al., 1963⁴⁶). Αργότερα αναγνωρίστηκε ότι τα στελέχη του *A. flavus* μπορούν να παράγουν μόνο αφλατοξίνη B1 και B2 (Samson & Varga, 2009⁴⁷, Amaike &

Keller, 2011²⁸) και ότι τα στελέχη που παράγουν αφλατοξίνη Β και G ανήκουν το *A. parasiticus*. Παρόλα αυτά πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα στελέχη *A. flavus* μπορούν επίσης να παράγουν αφλατοξίνες τύπου G (Camiletti et al., 2017⁴⁸). Αυτά τα αντιφατικά δεδομένα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης και είναι σημαντικό να καθοριστεί εάν το *A. flavus sensu stricto* μπορεί να παράγει αφλατοξίνες του τύπου G ή όχι.

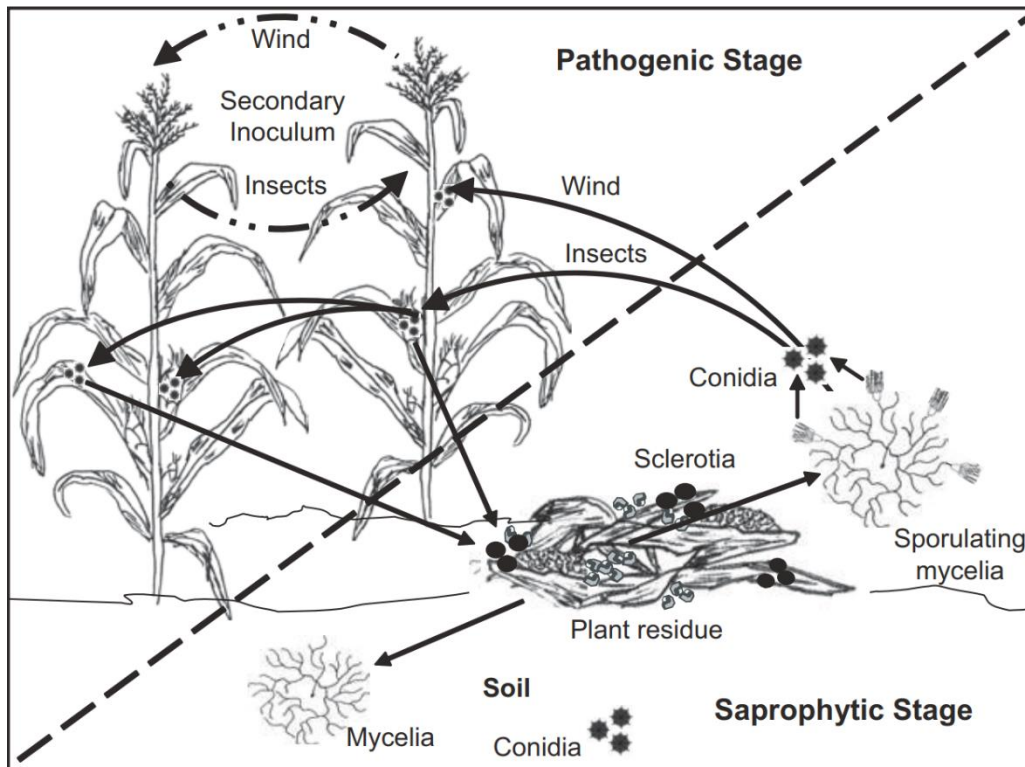
Σε μικροσκοπικό επίπεδο, τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν διαφέρουν σημαντικά στα δύο είδη. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μερικώς διαχωρισμός τους από το χρώμα τους καθώς οι αποικίες του *A. flavus* είναι πρασινο-κίτρινες ή πράσινες (Εικόνα 17), ενώ του *A. parasiticus* είναι σκούρες πράσινες. Το πιο αποτελεσματικό κριτήριο για το διαχωρισμό των *A. flavus* και ο *A. parasiticus* είναι η υφή των κονιδιακών τους τοιχωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα κονίδια του *A. flavus* έχουν σχετικά λεπτά, όχι ιδιαίτερα άγρια τοιχώματα και το σχήμα των κονιδίων ποικίλει από σφαιρικό έως ελλειψοειδές. Αντίθετα, ο *A. parasiticus* παράγει κονίδια με τραχιά ή ακανθώδη υφή, τα οποία έχουν όλα σχεδόν σφαιρική μορφή και σχετικά χοντρά τοιχώματα. Επίσης, σημαντικό στοιχείο διαχωρισμού ήταν τα μήκη των κονιδιοφόρων, αλλά και τα φιαλίδια (sterigmata), τα οποία στον *A. flavus* είναι τυπικά με δυο σειρές και στον *A. parasiticus* σχηματίζονται σε μια μόνο σειρά.



Εικόνα 17: Μικροσκοπική και μακροσκοπική απεικόνιση του *Aspergillus flavus* σε Czapek yeast extract agar (Picková et al., 2021)

1.2.3 *Aspergillus flavus*

Οι μύκητες που ανήκουν στο είδος *Aspergillus flavus* είναι σαπροφυτικοί, το φυσικό τους ενδιαίτημα είναι το έδαφος (Amaiike and Keller, 2011²⁸), και απαντώνται παγκοσμίως, αλλά η ύπαρξή τους είναι πιο κοινή σε υποτροπικά και τροπικά κλίματα. Το *A. flavus* συναντάται κυρίως σε θερμοκρασίες μεταξύ 26°C και 35°C και κυρίως σε γεωγραφικά πλάτη μεταξύ 16° και 35° και σπάνια άνω των 45° (Cotty and Jaime-Garcia, 2007⁴⁹). Το γονιδίωμα του έχει μέγεθος 36.8 Mb και κωδικοποιεί περισσότερα από 12.000 γονίδια (Yu et al., 2004⁵⁰; Cleveland et al., 2009⁵¹). Ο κύκλος ζωής του *A. flavus* αποτελείται από ασεξουαλικά και σεξουαλικά στάδια, αλλά η ανάπτυξη του μύκητα στη φύση παρατηρείται κυρίως στην ανάμορφη κατάστασή του (Ojiambo et al., 2018⁵²). Το *A. flavus* επιβιώνει με τη μορφή σκληρωτίων ή κονιδίων στο έδαφος έως και τρία χρόνια και ως μυκήλιο σε μολυσμένους φυτικούς ιστούς. Τα σκληρώτια διαχειμάζουν στο έδαφος σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (Hedayati et al., 2007⁵³; Yu et al., 2010⁵⁴). Σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, τα σκληρώτια βλαστάνουν δημιουργώντας νέες υφές ή παράγοντας κονιδιοφόρους που φέρουν κονίδια (Raper and Fennell, 1965²⁵; Dyer and O'Gorman, 2012³²), τα οποία διασκορπίζονται στον αέρα όταν το περιβάλλον είναι θερμό και ξηρό και θα μολύνουν εκ νέου μια σειρά από καλλιέργειες. Τα πολυάριθμα κονίδια που παράγουν, τα οποία χαρακτηρίζονται και ως ξηροσπόρια, μεταφέρονται στα σιτηρά και στα φυτά κυρίως μέσω του αέρα και μολύνουν τους εναέριους φυτικούς ιστούς (Hedayati et al., 2007⁵³). Επιπλέον, τραυματισμοί που προκαλούνται από έντομα και πτηνά σε συνδυασμό με ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες ενισχύουν τη δημιουργία αποικιών του μύκητα. Η μόλυνση διαφορετικών καλλιεργειών με *A. flavus* μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα όπως σήψη στάχως αλλά μπορεί επίσης να εμφανιστεί ασυμπτωματικά. Οι κοινοί ξενιστές που δύνανται να μολυνθούν από το *A. flavus* στα προσυλλεκτικά στάδια περιλαμβάνουν αραβόσιτο, φιστίκια, τσίλι, βαμβακόσπορο και ξηρούς καρπούς, ενώ το σιτάρι, το σόργο και το ρύζι είναι πιο ευαίσθητα στα στάδια μετά τη συγκομιδή. Οι ακατάλληλες συνθήκες χειρισμού και αποθήκευσης των καλλιεργειών επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη μόλυνση των καλλιεργειών από *Aspergillus spp.* στο στάδιο μετά τη συγκομιδή (Islam et al., 2018⁵⁵).



Εικόνα 18: Βιολογικός κύκλος του *A.flavus* σε σύστημα καλλιέργειας καλαμποκιού. Παρουσιάζονται τόσο τα σαπροφυτικά όσο και τα παθογόνα στάδια της οικολογίας του μύκητα (Abbas et al., 2009)

Επιπροσθέτως, ο *Aspergillus flavus* είναι ένας βιοσυνθετικά παραγωγικός μύκητας που παράγει πολλές διαφορετικές κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων πολυκετιδίων, ριβοσωμικών και μη ριβοσωματικών πεπτιδίων, τερπενίων και διαφόρων υβριδικών μορίων με μικτή προέλευση (Cary et al., 2018⁵⁶), αλλά σημαντικότερες είναι οι αφλατοξίνες. Οι τελευταίες, οι οποίες είναι τοξικές και καρκινογόνες ουσίες συσσωρεύονται στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Το είδος *A. flavus* μπορεί να προκαλέσει οικονομική καταστροφή λόγω της ικανότητάς του να προσβάλλει αγροτικά προϊόντα, ελαττώνοντας όχι μόνο την ποσότητα αλλά την ποιότητα της παραγωγής (Amaiike and Keller, 2011²⁸). Περιοχές όπως η Αφρική, ιδίως η Κένυα, αλλά και η Ασία, έχουν υποστεί μεγάλες ζημιές σε αγροτικά προϊόντα αλλά ακόμη και ανθρώπινες απώλειες από τον μύκητα αυτό (Yu et al., 2008⁵⁷). Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες, οι οποίες εστιάζουν στην κατανόηση της βιολογίας και οικολογίας του πληθυσμού του μύκητα αυτού καθώς και του δευτερογενούς μεταβολισμού του (Goldman and Osmani, 2007⁵⁸).

Η παθογόνος ικανότητα του μύκητα *A. flavus* σχετίζεται με τη σποριοποίηση, το δευτερογενή μεταβολισμό του, την προσαρμοστικότητα του σε αντίξοες συνθήκες αλλά και

τη συμβολή του στην παρεμπόδιση ενεργοποίησης του αμυντικού συστήματος του ξενιστή. Επιπλέον, στον *A. flavus* υπάρχουν οι οξυλιπίνες, μία ομάδα οξυγονομένων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, οι οποίες επιδρούν στη ρύθμιση της παραγωγής σκληρωτίων και κονιδίων, το δευτερογενή μεταβολισμό αλλά και τις αλληλεπιδράσεις του μύκητα με τον ξενιστή (Tsitsigiannis et al., 2005⁵⁹). Σημαντικοί επίσης παράγοντες που παίζουν ρόλο στην παθογόνο ικανότητα και την επιτυχία αποίκησης του μύκητα στον ξενιστή είναι τα ένζυμα αποικοδόμησης και τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα τα οποία έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή των σπορίων και της αφλατοξίνης (Amaiike and Keller, 2011²⁸). Η προσβολή από το μύκητα και επακόλουθα η μόλυνση από αφλατοξίνες μπορεί να συμβεί τόσο σε προσυλλεκτικό, όσο και σε μετασυλλεκτικό επίπεδο.

Η ποσότητα των παραγόμενων αφλατοξινών ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών απομονώσεων όταν αναπτύσσονται σε ένα μόνο μέσο υπό ελεγχόμενες συνθήκες (Cotty, 1997⁶⁰; Horn and Dorner, 1999⁶¹). Η θερμοκρασία, η υγρασία, το περιβαλλοντικό στρες, η πιθανή μηχανική ζημιά ή τραυματισμός που προκαλείται από εντομολογικές προσβολές ή πουλιά στον ξενιστή και οι πρακτικές μετά τη συγκομιδή όπως οι ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης είναι μερικοί από τους παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, τον αποικισμό ενός ξενιστή από το *A. flavus* και την παραγωγή τοξινών (Amaiike et al., 2011²⁸). Σε συνθήκες αγρού, η υψηλή θερμοκρασία με περίοδο ξηρασίας ευνοεί την παραγωγή αφλατοξινών (Ali et al., 2014⁶²).

Σημαντικές μπορεί να είναι επίσης οι επιπτώσεις στην υγεία καθώς μπορεί να προσβάλλει ζώα αλλά και ανθρώπους, ιδίως αυτούς με μειωμένη ικανότητα ανοσοκαταστολής, μέσω της κατανάλωσης τροφής που έχει προσβληθεί από τον εν λόγω μύκητα, προκαλώντας διεισδυτική Ασπεργίλλωση (Muhlschlegal, 1998⁶³; Sugui et al., 2014⁶⁴). Η ικανότητά του αυτή οφείλεται κυρίως στις καρκινογόνες και μεταλλαξιογόνες ιδιότητες των παραγόμενων αφλατοξινών (Klich, 2007⁶⁵). Η θνησιμότητα από τις μολύνσεις με ασπέργιλλους είναι υψηλή λόγω του περιορισμένου αριθμού αντιμυκητιακών φαρμάκων καθώς και της παρουσίας ανθεκτικών στελεχών στα υπάρχοντα φαρμακευτικά σκευάσματα.

1.2.4 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Ιστορικά, τα φυσικά προϊόντα που παράγονται από μύκητες και βακτήρια είναι μια πλούσια πηγή βιοδραστικών ενώσεων. Από αυτή την άποψη, το βασιλείο των μυκήτων έχει αναγνωριστεί από καιρό ως ο κύριος παραγωγός ενός ευρέος φάσματος δομικά ετερογενών φυσικών προϊόντων, κυρίως με τη μορφή δευτερογενών μεταβολιτών (secondary metabolites - SMs). Οι ενώσεις αυτές αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού διαφόρων ειδών μυκήτων και είναι χημικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που εμπλέκονται στη διαδικασία ανάπτυξης των μικροοργανισμών που τους παράγουν, αλλά δεν είναι απαραίτητες για την επιβίωσή τους. Ωστόσο, εμπλέκονται σε πολλές σημαντικές βιολογικές διεργασίες όπως την πρόσληψη σιδήρου, την επικοινωνία μεταξύ των ειδών και την προστασία από αβιοτικό και βιοτικό στρες (Calvo et al., 2002⁶⁶; Keller et al., 2005²¹). Η λειτουργία των δευτερογενών μεταβολιτών είναι καθοριστικής σημασίας αφού επηρεάζει την οικολογία και κατ' επέκταση την προσαρμογή των μυκήτων (Frisvad et al., 2015⁶⁷, Calvo et al., 2015⁶⁸). Ταυτόχρονα όμως, τα μόρια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο ως παθογόνοι παράγοντες σε ασθένειες του ανθρώπου, των ζώων και των φυτών (Scharf et al., 2014⁶⁹), ως μολυσματικές ουσίες που επηρεάζουν δυσμενώς την ασφάλεια των τροφίμων και των ζωοτροφών (Bhat et al., 2010⁷⁰; Marin et al., 2013⁷¹), και ως μια ποικιλόμορφη πηγή φαρμακευτικών προϊόντων (Aly et al., 2011⁷²).

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από διαφορετικά είδη μυκήτων, που κυρίως ανήκουν στα γένη *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* και *Alternaria* (Miller, 1995⁷³). Η εμφάνιση των μυκοτοξινών μπορεί να αρχίσει από τον αγρό ενώ όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές η βιοσύνθεση και δράση τους συνεχίζεται και μετά τη συγκομιδή, ακόμη και εάν οι συνθήκες αυτές δεν συσχετίζονται άμεσα με τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των μυκήτων (Logrieco et al., 2007⁷⁴). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) κάθε χρόνο περισσότερο από το 25-30% των γεωργικών προϊόντων μολύνονται με μυκοτοξίνες, προκαλώντας σοβαρές απώλειες με σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο τόσο στην αγροτική παραγωγή, τις βιομηχανίες τροφίμων, την κτηνοτροφία και την εθνική και παγκόσμια οικονομία, αλλά και σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων. **Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το 60-80% των καλλιεργειών μολύνονται από μυκοτοξίνες παγκοσμίως (Eskola et al., 2020⁷⁵), γεγονός που ξεπερνά το ποσοστό που δίνει ο FAO.** Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι δυνατόν

να επηρεάσουν την παρουσία μυκοτοξινών στα γεωργικά προϊόντα, κατά συνέπεια η έκταση της μόλυνσης ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική θέση, τις γεωργικές πρακτικές που εφαρμόζονται, την ευαισθησία των προϊόντων στη μόλυνση προσυλλεκτικά αλλά και κατά την αποθήκευση και επεξεργασία. Λόγω των σοβαρών και χρόνιων επιπτώσεών τους στην υγεία, την οικονομία και το εμπόριο, οι μυκοτοξίνες βρίσκονται στο επίκεντρο. Η συνεχής ανίχνευση της παρουσίας μυκοτοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές που καταναλώνονται σε όλο τον κόσμο, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία ενώ παράλληλα εκτιμάται ότι ο αριθμός τους πρόκειται να αυξηθεί. Επομένως, επιτακτική κρίνεται η ανάγκη εύρεσης ασφαλών και αποτελεσματικών μεθόδων αντιμετώπισης των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και διαχείρισης των παραγόμενων από αυτούς μυκοτοξινών, μέσω της βελτίωσης των συνθηκών παραγωγής των γεωργικών προϊόντων (Tsitsigiannis et al., 2012⁷⁶).

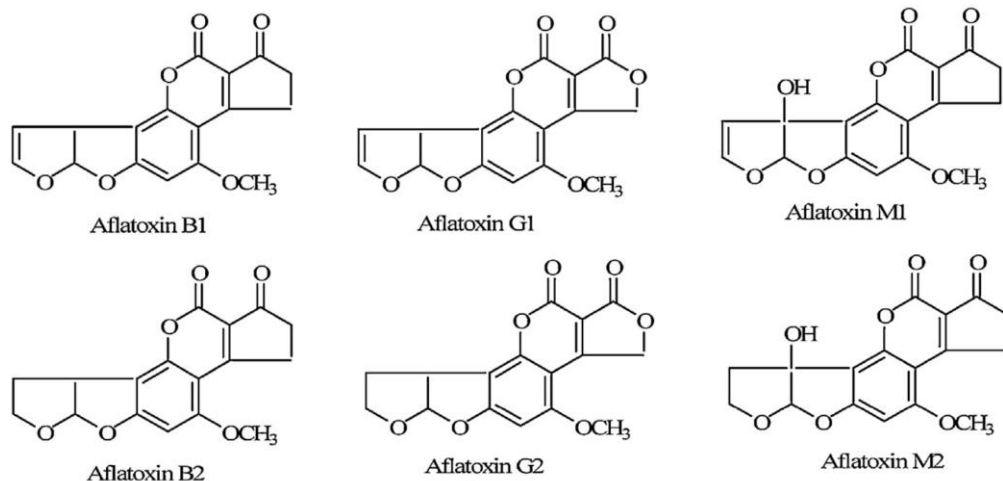
Συγκεκριμένα, οι σπουδαιότεροι τοξικογόνοι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οι αφλατοξίνες, οι οποίες παράγονται κυρίως από είδη του γένους *Aspergillus* spp., οι ωχρατοξίνες, που παράγονται από είδη των γενών *Aspergillus* spp. και *Penicillium* spp., οι φουμονισίνες, που παράγονται από είδη του γένους *Fusarium* spp. αλλά και από τον *A. niger* (Frisvad et al., 2007⁷⁷), οι τριχοθηκίνες και η ζεαραλενόνη που παράγονται επίσης από είδη του γένους *Fusarium* spp. (Jackson et al., 1999⁷⁸).

1.3 Οι Αφλατοξίνες

1.3.1 Εισαγωγή

Οι αφλατοξίνες είναι ίσως οι πιο μελετημένες μυκοτοξίνες και παράγονται από διάφορα είδη του γένους *Aspergillus* αλλά κυρίως από τον *A. flavus* και *A. parasiticus*. Συνολικά 22, 4 και 2 είδη του γένους *Aspergillus* από τα section *Flavi*, *Nidulantes* και *Ochraceorosei*, αντίστοιχα, παράγουν αφλατοξίνες (Pickova et al., 2021⁷⁹). Η ιστορία προέλευσης των αφλατοξινών ξεκίνησε στην Αγγλία το 1962 με έρευνες για τη νόσο Χ, όπου πέθαναν 100.000 γαλοπούλες από μια οξεία νέκρωση του συκωτιού τους ύστερα από κατανάλωση ως ζωοτροφή αραχίδας μολυσμένης με αφλατοξίνες (Blount, 1961⁸⁰; Van der Zijden et al., 1962⁸¹). Ως αποτέλεσμα, απομονώθηκε μια οικογένεια τοξικών μεταβολιτών που ονομάστηκαν αφλατοξίνες (Spensley, 1963⁸²). Το όνομα δόθηκε από το είδος *Aspergillus flavus* (*aspergillus flavus* toxin = αφλατοξίνη). Οι τοξίνες αυτές είναι οξυγονωμένες ετεροκυκλικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που παράγονται ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού. Από χημικής απόψεως είναι παράγωγα δι-φουρανοκουμαρίνης και φέρουν δι-υδροφουρανικά ή τετρα-υδροφουρανικά τμήματα συγχωνευμένα σε ένα υποκατεστημένο τμήμα κουμαρίνης. Περισσότεροι από 18 διαφορετικοί τύποι αφλατοξινών έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα. Τέσσερις είναι οι πιο συχνά απαντώμενες αφλατοξίνες, οι B1, B2, G1 και G2, που ονομάστηκαν βάσει τον μπλε και πράσινο φθορισμό τους, αντίστοιχα, κάτω από την υπεριώδη ακτινοβολία (UV) κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Συγκεκριμένα, οι B1 και B2 παρουσιάζουν μπλε φθορισμό κάτω από υπεριώδες φως στα 425 nm, ενώ οι G1 και G2 πράσινο κάτω από το υπεριώδες φως στα 540 nm (Kuiper-Goodman, 1998⁸³; Kumar et al., 2017⁸⁴). Οι δείκτες 1 και 2 δηλώνουν το σχήμα της χρωματογραφικής κινητικότητας των ενώσεων σε πλάκες TLC. Το είδος *Aspergillus flavus* θεωρείται ο κυρίαρχος παραγωγός αφλατοξινών Β-τύπου (AFB1 και AFB2) (Ehrlich et al., 2007⁸⁵; Taber & Schroeder, 1967⁸⁶), ενώ ο *A. parasiticus*, συνθέτει αφλατοξίνες τύπου Β και G (Yu et al., 2004⁵⁰). Τόσο το *A. flavus* όσο και το *A. parasiticus* μπορούν να παράγουν αφλατοξίνες τύπου Μ, αφλατοξίνη Μ1 (AFM1) και αφλατοξίνη Μ2 (AFM2) (Uka et al., 2019⁸⁷). Οι AFM1 και AFM2 αντιπροσωπεύουν υδροξυλιωμένα ανάλογα των AFB1 και AFB2, αντίστοιχα, που απαντώνται κυρίως σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Diener et al., 1987⁸⁸; Masri et al., 1967⁸⁹). Οι αφλατοξίνες τύπου G διαφέρουν από της Β σε χημικό

επίπεδο καθώς φέρουν έναν 3-γαλακτονικό δακτύλιο αντί ενός κυκλοπεντενονικού δακτυλίου. Επιπλέον, σημαντική είναι η διαφορά μεταξύ B1-G1 και B2-G2 καθώς οι πρώτες φέρουν διπλό δεσμό στον φουρανικό δακτύλιο γεγονός που έχει ουσιαστικό αντίκτυπο στην καρκινογόνο δράση, με τις B1-G1 να είναι ισχυρά καρκινογόνες και τοξικές (Yu et al., 2008⁵⁷) (Εικόνα 19).

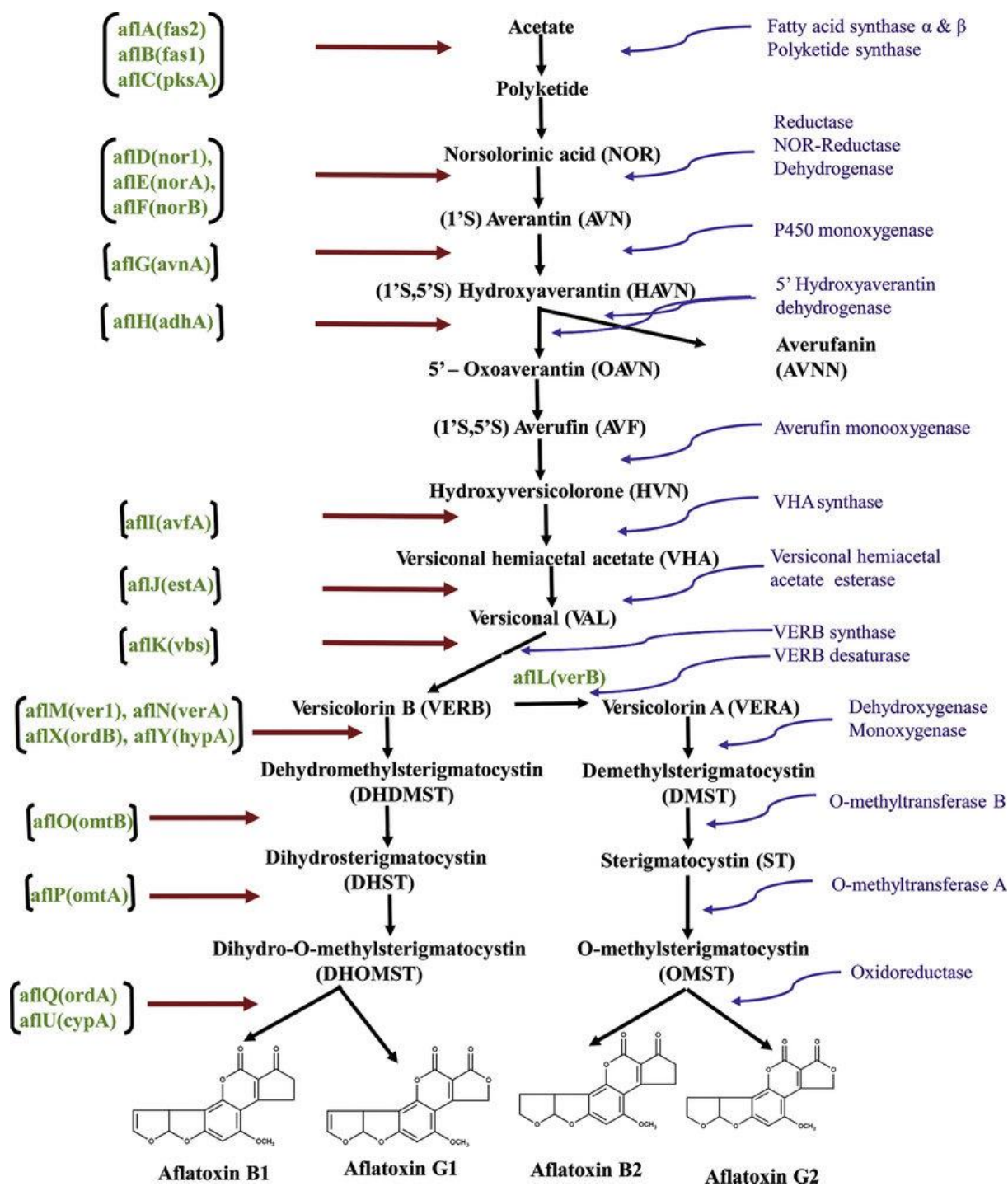


Εικόνα 19: Χημική δομή των αφλατοξινών B1, B2, G1, G2, M1, M2 (Zhang et al., 2014⁹⁰)

Η έγκαιρη ανίχνευση τη αρχικής μόλυνσης από τους μύκητες παίζει βασικό ρόλο στον έλεγχο της μόλυνσης από αφλατοξίνες. Μέρος του προβλήματος ανίχνευσης της παραγωγής αφλατοξίνης είναι η ασυνέπεια της παραγωγής σε διαφορετικά υποστρώματα. Ένα στέλεχος που παράγει χαμηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης σε ένα υπόστρωμα μπορεί να παράγει υψηλές συγκεντρώσεις σε διαφορετικό υπόστρωμα. Παρόλα αυτά έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση της παρουσίας αφλατοξινών, με την εκάστοτε να έχει ένα σύνολο πιθανών περιορισμών ως προς την ακρίβεια ανίχνευσης (Gell and Carbone, 2019⁹¹). Η ανίχνευση των αφλατοξινών *in vitro*, μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους όπως: TLC (Thin Layer Chromatography), HPLC (High-performance liquid chromatography), LC/MS (Liquid chromatography/ Mass spectrometry), NIRS (Near Infrared Spectroscopy), βιοαισθητήρες (biosensors), IA (Immunoaffinity Assay), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), FPIA (Fluorescence Polarisation Immunoassay), CE (Capillary Electrophoresis), HIS (Hyperspectral imaging), electronic nose (Yao et al., 2015⁹²).

διαδικασία (Caceres et al., 2020¹), δημιουργώντας ενδιάμεσα τουλάχιστον 15 χαρακτηρισμένα πρόδρομα μόρια μέχρι το σχηματισμό αφλατοξίνης (Amaiike et al., 2013⁹⁴; Georgianna et al., 2009⁹⁵; Hicks et al., 2002⁹⁶; Yu et al., 2004⁵⁰).

Συγκεκριμένα, η έναρξη της βιοσύνθεσης της AFB1 πραγματοποιείται με τη σύνθεση ενός πολυκετιδίου, της Νορανθρόνης, από 1 μονάδα ακετυλο-CoA και 9 μονάδες μηλονυλο-CoA μέσω μίας συνθετάσης πολυκετιδίων (PKSA). Το νορσολορινικό οξύ (norsolorinic acid-NOR) είναι ο πρώτος σταθερός μεταβολίτης του βιοσυνθετικού μονοπατιού, το οποίο ταυτοποιήθηκε. Το πρώτο γονίδιο που ταυτοποιήθηκε είναι το *afID* (*nor-1*) το οποίο κωδικοποιεί μία κετο-αναγωγή στον *A. parasiticus* για την μετατροπή του NOR σε averantin (AVN). Εξάλειψη του *afID* (*nor-1*) γονιδίου οδηγεί στην απώλεια των αφλατοξινών και των ενδιάμεσων προϊόντων στους μύκητες. Το δεύτερο γονίδιο είναι το *afIM* (*ver-1*), το οποίο κωδικοποιεί μια κετο-αναγωγή, η οποία απαιτείται για τη μετατροπή της versicolorin A (VERA) σε διμεθυλ-στερηγματοκυστίνη (DMST) και της versicolorin B (VERB) σε διμεθυλ-διϋδρο-στερηγματοκυστίνη (DMDHST) στον *A. parasiticus*. Το τρίτο γονίδιο είναι το *afIC* (*pksA*), το οποίο κωδικοποιεί τη συνθάση πολυκετιδίου (PKS), διαγραφή του οποίου προκαλεί διακοπή στην παραγωγή αφλατοξίνης και των ενδιάμεσων προϊόντων. Το γονίδιο της PKS (*afIC*) θεωρείται ως το πιο καθοριστικό γονίδιο για την ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης των αφλατοξινών (Feng & Leonard, 1995⁹⁷). Τα γονίδια αυτά είναι απαραίτητα για τη μετατροπή του οξικού σε νορσολορινικό οξύ (NOR) και φαίνεται πως η δράση τους είναι συνδυαστική (Yu et al., 2008⁵⁷) (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Μονοπάτι βιοσύνθεσης Αφλατοξινών. Παρουσιάζονται σχηματικά τα γονίδια που εμπλέκονται, οι κύριες ενζυμικές αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά την παραγωγή της αφλατοξίνης, οι σταθεροί μεταβολίτες και διάφορες ενδιάμεσες πρόδρομες ουσίες στο μονοπάτι βιοσύνθεσής της (Jayaprakash et al., 2019⁹⁸).

Οι προαναφερθείσες φάσεις παραγωγής αφλατοξίνης ρυθμίζονται από ορισμένους ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Τα ρυθμιστικά γονίδια είναι ενσωματωμένα στο σύμπλεγμα γονιδίων των αφλατοξινών. Έχουν αναγνωριστεί δύο συγκεκριμένοι

μεταγραφικοί ενεργοποιητές, ο *afIR* και ο *afIS* (Yu et al., 2004⁵⁰). Στα *A. flavus*, *A. parasiticus* και *A. nidulans*, οι βιοσυνθετικές οδοί της αφλατοξίνης ρυθμίζονται κυρίως από το γονίδιο *afIR*. Το *afIR* δεσμεύεται σε τουλάχιστον 17 από τα γονίδια του συμπλέγματος γονιδίων της αφλατοξίνης που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης που οδηγεί τελικά σε παραγωγή διαφορετικών αφλατοξινών. Το *afIR* είναι το ένατο γονίδιο του βιοσυνθετικού συμπλέγματος γονιδίων των αφλατοξινών και κωδικοποιεί μια διπυρηνική πρωτεΐνη ψευδαργύρου που δεσμεύει το DNA (μεταγραφικό παράγοντα τύπου Zn(II) 2Cys6)), η οποία ρυθμίζει την έκφραση των περισσότερων από τα λειτουργικά γονίδια στη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης (Fernandes et al., 1998⁹⁹; Woloshuk et al., 1994¹⁰⁰). Ο μεταγραφικός παράγοντας *AfIR* έχει μελετηθεί εκτενώς για τον μηχανισμό ρύθμισης της αφλατοξίνης. Αυτή η ρυθμιστική πρωτεΐνη συνδέεται με το μοτίβο 5'-TCGN5CGA-3' που βρίσκεται στις υποδοχείς πολλών γονιδίων αφλατοξίνης (Yu et al., 1996¹⁰¹, Fernandes et al., 1998⁹⁹). Έχει αποδειχτεί ότι το *afIR* δρα ως ρυθμιστής του συμπλέγματος γονιδίων βιοσύνθεσης των αφλατοξινών στον *A. flavus*, αφού η υπερέκφραση του *afIR* συμβάλλει στην υπερέκφραση αρκετών γονιδίων, αυξάνοντας έτσι την παραγωγή αφλατοξίνης. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι αν και το *afIR* είναι ο κύριος ενεργοποιητής του συμπλέγματος γονιδίων της αφλατοξίνης, αλληλεπιδρά επιπλέον με το *afIS* που παίζει τον ρόλο του ενισχυτή στη ρυθμιστική διαδικασία βιοσύνθεσης. Το *afIS* είναι το 10^ο γονίδιο στο gene cluster βιοσύνθεσης αφλατοξινών, που μοιράζεται παρόμοια διαγονιδιακή περιοχή (737 bp) με το *afIR*. Αν και έχει αποδειχτεί ότι το *afIS* χρειάζεται για τη σύνθεση της αφλατοξίνης, ο ακριβής μηχανισμός δράσης με τον οποίο αυτό το γονίδιο ρυθμίζει τη μεταγραφή του μονοπατιού σύνθεσης της αφλατοξίνης είναι ακόμα υπό διερεύνηση.

1.3.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών

Οι παράγοντες που σχετίζονται με την παραγωγή αφλατοξινών είναι τόσο βιοτικοί όσο και αβιοτικοί, συμπεριλαμβανομένων θρεπτικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Σε προσυλλεκτικό επίπεδο, οι κλιματολογικές συνθήκες, το κατάλληλο υπόστρωμα, τα έντομα και η ευαισθησία του φυτού σε μολύνσεις από τους μύκητες του γένους *Aspergillus* spp. είναι οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η προσβολή και η παραγωγή αφλατοξίνης, σε σχέση πάντα με συνθήκες στρες (ξηρασία, μειωμένη γονιμότητα, ανταγωνισμός με ζιζάνια και άλλους μικροοργανισμούς). Αρχικά, η μόλυνση των φυτών με

αφλατοξίνες είναι αποτέλεσμα της προσβολής της καλλιέργειας από τους μύκητες, η οποία δύναται να λάβει χώρα σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας (καλλιέργεια, συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση, διανομή). Η μόλυνση διαφορετικών καλλιεργειών με *A. flavus* μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα σήψης αλλά είναι δυνατόν επίσης να εμφανιστεί ασυμπτωματικά. Οι κοινοί ξενιστές που μολύνονται από το *A. flavus* στα προ της συγκομιδής στάδια περιλαμβάνουν αραβόσιτο, φιστίκια, τσίλι, βαμβακόσπορο και ξηρούς καρπούς, ενώ το σιτάρι, το σόργο και το ρύζι είναι πιο ευαίσθητα στα στάδια μετά τη συγκομιδή. Παρόλα αυτά, η παρουσία των μυκήτων δεν σηματοδοτεί απαραίτητα την ύπαρξη αφλατοξίνης.

Αβιοτικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η δραστηριότητα του νερού, το pH, ο άνθρακας και το άζωτο έχουν μεγάλη επίδραση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης (Liu et al., 2017¹⁰²). Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία και η δραστηριότητα του νερού ενισχύουν την ανάπτυξη μυκήτων που παράγουν αφλατοξίνες, κυρίως του *A. flavus*, αλλά έχουν επίσης μεγάλη επίδραση στην ενεργοποίηση του συμπλέγματος γονιδίων που παράγει αφλατοξίνες (Abdel-Hadi et al., 2012¹⁰³). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι και οι δύο αυτοί παράγοντες, πιθανόν να επιδρούν στη διαδικασία μεταγραφής των δύο σημαντικών ρυθμιστικών γονιδίων (*afIR* και *afIS*) στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης (Liu et al., 2017¹⁰²). Συγκεκριμένα, η υψηλότερη δραστηριότητα του νερού ευνοεί την καλύτερη ανάπτυξη των μυκήτων και τη σύνθεση τοξινών. Υπολογίζεται ότι η δραστηριότητα νερού περίπου 0,99 aw και θερμοκρασία 29-30°C ευνοούν την παραγωγή αφλατοξίνης. Θερμοκρασίες κάτω από 25°C και πάνω από 37°C δεν ευνοούν την ανάπτυξη και την παραγωγή αφλατοξινών, ενώ τα επίπεδα υγρασίας κάτω από 0,85 aw επιβραδύνουν την ανάπτυξη και την παραγωγή τοξινών ενώ σταματάει εντελώς στα 0,70-0,75aw (Bhatnagar et al., 2006¹⁰⁴). Επιπλέον, η θερμοκρασία καθορίζει την αναλογία των παραγόμενων B και G αφλατοξινών καθώς σε θερμοκρασίες >30°C παράγονται μεγαλύτερα ποσά της AFB1, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες παράγονται μεγαλύτερα ποσά της G (ICMSF, 1996).

Οι πρακτικές που εφαρμόζονται σε μετασυλλεκτικό επίπεδο είναι εξίσου σημαντικοί παράγοντες στην ανάπτυξη, τον αποικισμό του ξενιστή από το *A. flavus* και την παραγωγή τοξινών (Amaiike et al., 2011²⁸). Οι ακατάλληλες συνθήκες χειρισμού και αποθήκευσης των καλλιεργειών μετασυλλεκτικά επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη μόλυνση από *Aspergillus spp.* Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ότι το 2020, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), αναφέρθηκαν υψηλά επίπεδα μόλυνσης από αφλατοξίνες

σε φιστίκια, ρύζι, ξηρούς καρπούς (φουντούκια και αμύγδαλα), μπαχαρικά και αποξηραμένα σύκα, όπου ανιχνεύτηκαν συγκεντρώσεις έως και 1000 µg/kg. Η υψηλή αυτή συγκέντρωση αποδόθηκε κυρίως στις κακές πρακτικές διαχείρισης τροφίμων κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19 και έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη πρόσληψη μολυσμένων με αφλατοξίνες τροφών από ζώα και ανθρώπους.

Τέλος, είναι γεγονός ότι η μόλυνση από αφλατοξίνες είναι πιο διαδεδομένη στην Ασία και την Αφρική, όπου οι κλιματικές συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη αφλατοξινογόνων στελεχών τόσο σε συνθήκες αγρού όσο και κατά την αποθήκευση των προϊόντων. Παρόλα αυτά, λόγω της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής που βρίσκεται σε διαρκή εξέλιξη, η μόλυνση με αφλατοξίνες είναι μια αναδυόμενη απειλή σε περιοχές που προηγουμένως θεωρούνταν απαλλαγμένες (Miraglia et al., 2009¹⁰⁵; Cotty et al., 2007⁴⁹). Γενικά, οι τοξίνες παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τους μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* όταν η θερμοκρασία είναι μεταξύ 24 και 35°C και σχηματίζονται σε πολλά προϊόντα όταν η περιεκτικότητά τους σε υγρασία υπερβαίνει το 7% (10% σε συνθήκες αερισμού) (Williams et al., 2004¹⁰⁶). Οι συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας κατά την ξηρασία στο χωράφι και η υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία λίγο πριν τη συγκομιδή και κατά την αποθήκευση είναι οι πρωταρχικές συνθήκες για την παραγωγή αφλατοξίνης. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στις ΗΠΑ σχετικά με την επίδραση της κλιματικής αλλαγής στην παραγωγή αφλατοξινών στην καλλιέργεια του καλαμποκιού, απέδειξαν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με παρατεταμένες περιόδους ξηρασίας, ευνοούν την παραγωγή αφλατοξινών (Mitchell et al., 2016¹⁰⁷). Επίσης πρόσφατα, υπήρξαν μερικές αναφορές αφλατοξίνης σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης (Jallow et al, 2021¹⁰⁸) ενώ ανιχνεύονται ολοένα και περισσότερο σε ορισμένες περιοχές της Ιταλίας και της Νότιας Ευρώπης σε ποσότητες που δεν έχουν παρατηρηθεί στο παρελθόν (Moretti et al., 2019¹⁰⁹).

1.3.3 Επιπτώσεις αφλατοξινών σε ανθρώπους και ζώα

Τοξικολογικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά τοξικές ενώσεις που έχουν ηπατοτοξικές, μεταλλαξιογόνες, τερατογόνες, ανοσοκατασταλτικές, νεφροτοξικές και κυτταροτοξικές επιδράσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα (Benkerroum, 2020¹¹⁰; Hua et al., 2021¹¹¹). Οι φυσικά απαντώμενες αφλατοξίνες (AFB1, AFB2, AFG1 και AFG2) κατατάσσονται στην Ομάδα 1 «καρκινογόνες για τον άνθρωπο» ουσίες από

τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Cancer Research - IARC). Επιπλέον, η αφλατοξίνη B1 συνδέεται με το DNA και μεταβάλλει τη δομή του, προκαλώντας γονιδιοτοξικότητα (Santini et al., 2013 ¹¹²). Η αφλατοξίνη M1 και M2, που είναι παράγωγα της αφλατοξίνης B1 και B2, αντίστοιχα, έχουν βρεθεί στα ούρα και το γάλα ζώων (Admasu et al., 2021 ¹¹³).

Ωστόσο, η επίδραση των αφλατοξινών, καθώς και άλλων μυκοτοξινών γενικότερα, στην ανθρώπινη υγεία εξαρτάται πάντα από τις τοξικολογικές ιδιότητες του εκάστοτε παράγοντα, την ευαισθησία του καταναλωτή, τη διάρκεια έκθεσης αλλά και την παρουσία άλλων ρύπων με τους οποίους θα μπορούσε να υπάρξει συνεργιστική δράση.

Οι πιο σοβαρές και χρόνιες ασθένειες που προκαλούνται από αφλατοξίνες τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, αναφέρονται πιο συγκεκριμένα παρακάτω:

I. Ασπεργίλλωση

Η ασπεργίλλωση είναι μια πνευμονική λοίμωξη που προκαλείται από τα είδη *Aspergillus* σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Προκαλείται από είκοσι διαφορετικά είδη *Aspergillus*, αλλά κυρίως τα *A. fumigatus* και *A. flavus* αποτελούν τις κύριες αιτίες της ασπεργίλλωσης τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Από τους κυριότερους τύπους ασπεργίλλωσης είναι η αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση (ABPA), το ασπεργίλλωμα και η διηθητική ασπεργίλλωση (IA). Οι περισσότερες περιπτώσεις λοίμωξης από ασπεργίλλωση στον άνθρωπο προκαλούνται από υπερβολική εισπνοή σπορίων *Aspergillus*, ενώ δευτερευόντως από τη μετάδοση σπορίων μέσω μολυσμένων πληγών, καθώς και μέσω του καπνίσματος μολυσμένων φυτών καπνού ή μαριχουάνας. Διάφορα ζώα όπως τα κουνέλια, τα κοτόπουλα, οι γαλοπούλες και οι χήνες μολύνονται επίσης από την ασπεργίλλωση. Στα ζώα, οι ασπεργιλλώσεις προσβάλλουν πρωτίστως το αναπνευστικό σύστημα και στη συνέχεια μετατρέπονται σε γενικευμένες μολύνσεις. Παγκοσμίως, η ασπεργίλλωση κατατάσσεται στη λίστα με τις τέσσερις κορυφαίες ασθένειες που προκαλούν θάνατο σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Αν και ο *A. flavus* δεν αποτελεί το πιο συχνό αίτιο ασπεργίλλωσης, οι σπάνιες περιπτώσεις μόλυνσης μπορεί να είναι πολύ σοβαρές. Στη Βόρεια Αμερική, περίπου το 65% της ασπεργίλλωσης στα παιδιά προκαλείται από το *A. flavus*. Πρόσφατα, έχει επίσης αναφερθεί μια ασθένεια κορωνοϊού που σχετίζεται με πνευμονική ασπεργίλλωση καθώς αυξάνει τη σοβαρότητα του κορωνοϊού σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Συνολικά, έχουν

αναφερθεί 20 περιπτώσεις πνευμονικής ασπεργίλλωσης παγκοσμίως που σχετίζονται με τη νόσο του κορωνοϊού (CAPA) (Marr et al., 2021 ¹¹⁴).

II. Αφλατοξίκωση

Η αφλατοξίκωση είναι η δηλητηρίαση που σχετίζεται με την εκτεταμένη κατανάλωση μεσαίας έως υψηλής δόσης αφλατοξίνης μέσω της τροφής. Σημαντικός αριθμός κρουσμάτων αφλατοξίκωσης είχε αναφερθεί στην Ινδία και την Κένυα το 1974 και το 1981, αντίστοιχα. Το 2004, στην Κένυα προκλήθηκε μία εκτεταμένη δηλητηρίαση ανθρώπων από αφλατοξίνες ύστερα από κατανάλωση μολυσμένου καλαμποκιού όπου 314 άνθρωποι έχασαν τότε τη ζωή τους. Έκτοτε, το καλαμπόκι αποτελεί μία από τις κύριες καλλιέργειες που παρουσιάζουν υψηλό ενδιαφέρον ως προς την πιθανή μόλυνση του από αφλατοξίνες (Probst et al., 2007¹¹⁵). Αντίστοιχα γεγονότα έχουν σημειωθεί και στην Ευρώπη (Gallo et al., 2012¹¹⁶). Κατά συνέπεια ύστερα από την έξαρση αυτή, άρχισε να πραγματοποιείται συστηματική έρευνα της πληθυσμιακής διακύμανσης των στελεχών του μύκητα *Aspergillus* σε διάφορες περιοχές παγκοσμίως, με σκοπό να εξακριβωθεί η αιτία της. Όπως αποδείχτηκε η κύρια αιτία ήταν η ύπαρξη του μύκητα *A. flavus* στα μολυσμένα τρόφιμα (Probst et al. 2010 ¹¹⁷). Η αφλατοξίκωση εμφανίζεται με δύο μορφές, αυτή της έντονης μορφής ενδοτοξίνωσης όπου υπάρχει άμεση βλάβη του ήπατος και επέρχεται ακόμα και θάνατος, και αυτή της χρόνιας έκθεσης με εκδήλωση διαφόρων συμπτωμάτων σε ανθρώπους και ζώα. Η χρόνια αφλατοξίκωση μπορεί να προκαλέσει καρκίνο του ήπατος, καρκίνωμα ανθρώπινων ηπατικών κυττάρων, καθυστερημένη ανάπτυξη, μειωμένη ανοσία και κίρρωση του ήπατος. Η οξεία αφλατοξίκωση περιλαμβάνει υψηλό πυρετό, έμετο, ηπατική ανεπάρκεια, οίδημα ποδιών και ίκτερο με υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας σε σύγκριση με τη χρόνια αφλατοξίκωση (Dhanasekaran et al, 2011 ¹¹⁸). Η ακριβής συγκέντρωση της αφλατοξίνης που προκαλεί αφλατοξίκωση δεν έχει επιβεβαιωθεί ωστόσο, εκτιμάται ότι γενικά 1000 µg/kg συγκέντρωσης αφλατοξίνης στα τρόφιμα μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα αφλατοξίνης στον άνθρωπο ενώ στην περίπτωση των ζώων, μια ανεκτή ποσότητα είναι 50-300 µg/kg.

III. Καρκίνος

Οι αφλατοξίνες αναφέρονται ως καρκινογόνες ουσίες της Ομάδας 1 και η μακροχρόνια έκθεσή τους μπορεί να προκαλέσει καρκίνο των νεφρών, του ήπατος, του πνεύμονα ή του

παχέος εντέρου τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Ένας αριθμός επιδημιολογικών ερευνών έχει δείξει ότι σε πολλές περιοχές παγκοσμίως (Κίνα, Κένυα, Ν.Αφρική κ.α.), η κύρια μορφή καρκίνου του ήπατος γνωστός ως ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σχετίζεται με την αφλατοξίνη Β1, ενώ περίπου το 4,6-28,2% του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε όλο τον κόσμο αναφέρεται ότι προκαλείται από την κατανάλωση αφλατοξίνης (Chandra, 2021¹¹⁹). Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) αποτελεί την αιτία του 75-85% των περιπτώσεων καρκίνου του ήπατος παγκοσμίως. Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι η κατανάλωση 20-120 μg/kg αφλατοξίνης Β1 κάθε ημέρα για ένα διάστημα 1 έως 3 εβδομάδων μπορεί να είναι επικίνδυνη. Ωστόσο, η έκταση της τοξικότητας της αφλατοξίνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ανοσία του ξενιστή.

1.3.4 Νομοθεσία για προϊόντα μολυσμένα από αφλατοξίνες

Στις μέρες μας, περίπου 4,5 δις. του παγκόσμιου πληθυσμού υπόκεινται σε μόλυνση από αφλατοξίνες. Η θέσπιση κανονισμών, η πρόληψη της μόλυνσης πριν και μετά τη συγκομιδή, η απολύμανση και η αποτοξικοποίηση έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της ανθρώπινης διατροφικής έκθεσης στην αφλατοξίνη. Λόγω του κινδύνου για την υγεία που προκαλείται, σε αρκετές χώρες και γεωγραφικές περιοχές έχουν επιβληθεί μέγιστα επιτρεπτά όρια (Maximum Permissible Limits (MPL)) σχετικά με την ανεκτή συγκέντρωση ανίχνευσης αφλατοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Σε μια προσπάθεια συνεπώς να ελαχιστοποιηθεί η ανθρώπινη έκθεση, ρυθμιστικοί φορείς όπως ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) έχουν θέσει αυστηρά όρια στα επιτρεπόμενα επίπεδα αφλατοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Ο FDA έθεσε τα επιτρεπόμενα επίπεδα στα 20 μg/kg (ppb) για τις αφλατοξίνες σε τρόφιμα για ανθρώπινη κατανάλωση, ενώ η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θέσει ακόμη αυστηρότερα όρια των 4 μg/kg (ppb) (EC, No 1881/2006 [European Commission, 2006]; CPG Sec. 683.100 [FDA, 2019]).

Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης με τα θεσπισμένα όρια, η ευρωπαϊκή νομοθεσία χαρακτηρίζει τα τρόφιμα αυτά ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση. Κατά συνέπεια οι μολύνσεις που προκαλούνται από τον *A. flavus* μπορούν να ζημιώσουν σημαντικά τόσο σε οικονομικό όσο και σε γεωργική επίπεδο, καθώς η μόλυνση ακόμη και μικρής ποσότητας σιτηρών ή σπόρων στο χωράφι μπορεί να οδηγήσει στην απόρριψη ολόκληρου του φορτίου της συγκομιδής κατά την αποθήκευση ή και την επεξεργασία. Στις ΗΠΑ, οι ετήσιες

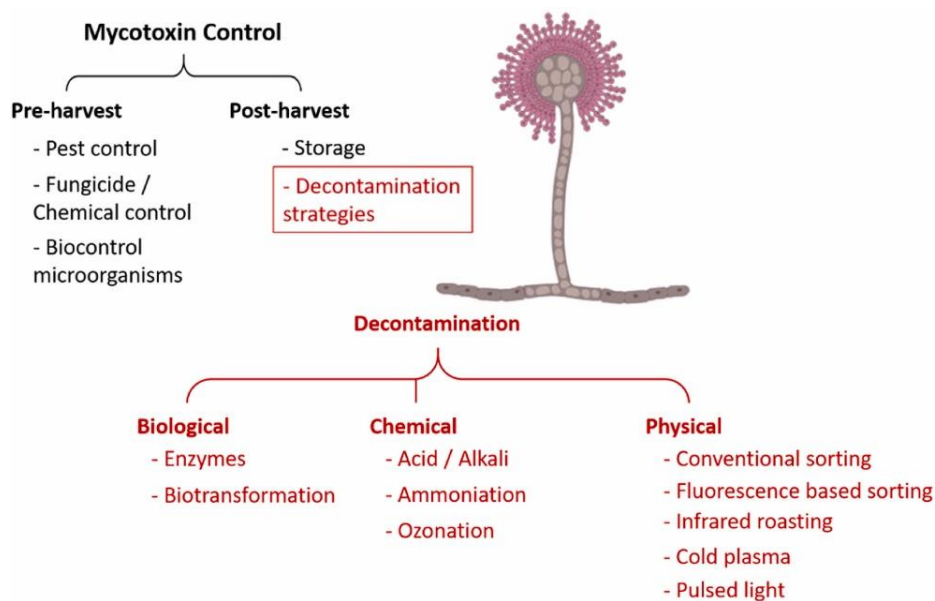
οικονομικές απώλειες λόγω της μόλυνσης των καλλιεργειών με αφλατοξίνες πριν και μετά τη συγκομιδή (π.χ. καλαμπόκι, βαμβακόσπορος, φιστίκια, ξηροί καρποί κ.λπ.) υπολογίζονται σε εκατοντάδες εκ. δολάρια (Robens et al., 2003¹²⁰). Επίσης σύμφωνα με προβλέψεις που συμπεριλαμβάνουν αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες λόγω της κλιματικής αλλαγής, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε σημαντικές αυξήσεις στη μόλυνση από αφλατοξίνες στον αραβόσιτο, με αποτέλεσμα τις εκτιμώμενες απώλειες μόνο για τη βιομηχανία καλαμποκιού των ΗΠΑ να κυμαίνονται μεταξύ 50 εκ. και 1,7 δις δολαρίων ετησίως (Mitchell et al., 2016¹⁰⁷).

Τέλος, η έκθεση των ανθρώπων και των οικόσιτων ζώων σε αφλατοξίνες είναι περιορισμένη στις ΗΠΑ και την ΕΕ, όπου έχουν θεσπιστεί και εφαρμόζονται κανονισμοί που περιορίζουν την ποσότητα της αφλατοξίνης σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Ωστόσο, στις αναπτυσσόμενες χώρες, ειδικά στην Αφρική, οι κανονισμοί για την αφλατοξίνη στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές είτε δεν υπάρχουν είτε δεν επιβάλλονται, επειδή μεγάλο μέρος της γεωργικής παραγωγής δεν εισέρχεται ποτέ μέσω των επίσημων καναλιών εμπορίου, αλλά κινείται μέσω των τοπικών αγορών (Bandyopadhyay et al., 2007¹²¹). Αυτή η έλλειψη νομοθετικής ρύθμισης οδηγεί συχνά σε περιστατικά σοβαρών δηλητηριάσεων από αφλατοξίνες, όπως αποδεικνύεται με το ξέσπασμα της οξείας αφλατοξίκωσης από μολυσμένο αραβόσιτο στην Κένυα, που οδήγησε σε αρκετούς ανθρώπινους θανάτους (Lewis et al., 2005¹²²).

Κατά συνέπεια, σε πιο παγκόσμιο επίπεδο, οι κανονισμοί για τις αφλατοξίνες επηρεάζουν τα εμπορικά πρότυπα μολυσμένων με αφλατοξίνες προϊόντων παγκοσμίως (Wu and Guclu, 2012¹²³), με την πιθανότητα τα τρόφιμα υψηλότερης ποιότητας να διοχετεύονται σε έθνη με αυστηρότερα πρότυπα και περισσότερα μολυσμένα με αφλατοξίνες τρόφιμα έθνη με πιο ανεκτικά ή και καθόλου πρότυπα. Ταυτόχρονα, τα πρότυπα αυτά μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα των προϊόντων που παραμένουν στις χώρες εξαγωγής και αποστέλλονται σε χώρες εισαγωγής (Wu et al., 2013¹²⁴).

1.4 Έλεγχος του προβλήματος των αφλατοξινών

Τα τελευταία χρόνια έχουν εντατικοποιηθεί οι έρευνες που εστιάζουν στον έλεγχο των αφλατοξινών που κατ' επέκταση σημαίνει μείωση του κινδύνου για την υγεία από την εμφάνιση αφλατοξινών σε τρόφιμα. Έχοντας τη δυνατότητα να μολύνουν μια σειρά από κοινά τρόφιμα και ζωοτροφές καθώς μπορούν να εισέλθουν σε οποιοδήποτε στάδιο της τροφικής αλυσίδας, οι αφλατοξίνες αποτελούν μια συνεχή πρόκληση για την ασφάλεια των τροφίμων παγκοσμίως. Επιπλέον, παράγοντες όπως καιρικές συνθήκες και η παγκοσμιοποίηση των εμπορικών ροών, καθώς και η κλιματική αλλαγή, οδηγούν στην απροσδόκητη εμφάνιση αφλατοξινών σε ασυνήθιστα προϊόντα. Ο σχηματισμός των αφλατοξινών συνήθως συμβαίνει προσυλλεκτικά στο χωράφι, ύστερα από την προσβολή και την ανάπτυξη του *A. flavus* ενώ επιπλέον αύξηση της συγκέντρωσης και συσσώρευση αφλατοξινών παρατηρείται μετασυλλεκτικά κατά την αποθήκευση των αγροτικών προϊόντων. Ταυτόχρονα, λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι οι μύκητες του γένους *Aspergillus* είναι εδαφογενείς και αερομεταφερόμενοι, συνεπάγεται ότι η διαχείρισή τους αφορά κυρίως την προσυλλεκτική αντιμετώπισή τους. Συνεπώς η πρόληψη με στόχο την αποφυγή της αρχικής μόλυνσης είναι ο ιδανικός τρόπος διαχείρισης των αφλατοξινών που κατά συνέπεια αποτρέπει την είσοδό τους στην τροφική αλυσίδα (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Σύγχρονες προσεγγίσεις στην αντιμετώπιση της μόλυνσης από μυκοτοξίνες (Marshall et al., 2020¹²⁵).

Στα πλαίσια ενός ολοκληρωμένου συστήματος αντιμετώπισης, για την πρόληψη και αποφυγή της μόλυνσης αρχικά έχουν προταθεί μια σειρά από στρατηγικές που βασίζονται σε ορθές γεωργικές πρακτικές, όπως η αμειψισπορά, το σωστό κλάδεμα, η ορθολογική άρδευση και λίπανση, που αποσκοπούν στην ευρωστία του φυτού και στην αποφυγή συνθηκών που ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα. Επιπροσθέτως, ως πρακτική μείωσης των σπορίων του μύκητα έχει προταθεί η απομάκρυνση των φυτικών υπολειμμάτων, είτε η βαθειά ενσωμάτωσή τους στο έδαφος (Abbas et al., 2009¹²⁶). Συνιστάται επίσης η έγκαιρη συγκομιδή των καρπών, ώστε να αποτραπεί η αύξηση του πληθυσμού του μύκητα κατά το στάδιο της ωρίμανσης του καρπού (Tsitsigiannis et al., 2012⁷⁶) αλλά και ιδιαίτερη μεταχείριση κατά τη συγκομιδή επίσης, ώστε να μην έρχονται σε επαφή οι συγκομισμένοι καρποί με το έδαφος. Επιπλέον, η φυτοπροστασία παίζει καθοριστικό ρόλο καθώς έχει αποδειχτεί ότι οι προσβεβλημένοι από έντομα καρποί εμφανίζουν συχνότερα υψηλή συγκέντρωση αφλατοξίνης (Georgiadou et al., 2012¹²⁷). Οι αποτελεσματικότερες ωστόσο πρακτικές βασίζονται στην εφαρμογή βιολογικών σκευασμάτων με μη τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus*, με ζύμες και βακτήρια, η χημική αντιμετώπιση αλλά και η χρήση μοντέλων πρόβλεψης της μόλυνσης από αφλατοξίνες (Battilani et al., 2013¹²⁸; Kaminiaris et al., 2020¹²⁹).

1.4.1 Χρήση μη τοξικογόνων στελεχών *Aspergillus flavus*

Η πιο διαδεδομένη βιολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη αντιμετώπιση των αφλατοξινών σε συνθήκες πεδίου είναι η χρήση ενδημικών μη αφλατοξικογόνων στελεχών *Aspergillus flavus* καθώς έχει αποδειχτεί εξαιρετικά επιτυχημένη, οικονομικά αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένα στελέχη μυκήτων που θεωρούνται μη αφλατοξικογόνα, έχουν πολύ περιορισμένη ικανότητα να παράγουν αυτές τις τοξίνες ή δεν τις παράγουν καθόλου και έχουν την ικανότητα να αλληλοεπιδρούν με τοξικογόνα στελέχη όταν αναπτύσσονται στο ίδιο υπόστρωμα και να επάγουν τη μείωση της βιοσύνθεσης αφλατοξινών. Με βάση τη μορφολογία, τα στελέχη του *A. flavus* μπορούν να χωριστούν στους μορφότυπους L και S. Τα στελέχη που ανήκουν στον μορφότυπο S παράγουν πολλά μικρά σκληρώτια (μέση διάμετρος <400 μ), λίγα κονίδια και μια σταθερά υψηλή ποσότητα αφλατοξινών. Αντίθετα, ο μορφότυπος L μπορεί να παράξει λιγότερα, μεγαλύτερα σκληρώτια (μέση διάμετρος >400 μ), πολλά κονίδια και μεταβλητή

ποσότητα αφλατοξίνης ενώ υπάρχουν επίσης γονότυποι μορφότυπου L που δεν είναι ικανοί να παράξουν καθόλου αφλατοξίνες, μη αφλατοξικογόνα στελέχη, λόγω ορισμένων γενετικών μεταλλάξεων όπως αναστροφών, διαγραφών ή μεταλλάξεων σε ένα τουλάχιστον από τα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των αφλατοξινών. Η έλλειψη της αφλατοξογόνου ικανότητας των στελεχών αυτών έχει συγκεκριμένα συσχετιστεί με την απουσία γονοτυπικών πληροφοριών που εμπλέκονται στη βιοσυνθετική οδό αφλατοξινών, ειδικά το ρυθμιστικό γονίδιο της οδού (*afIR*) και τα δομικά γονίδια *afIO* και *afIQ*. Ορισμένα μη τοξικογόνα στελέχη χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών από τα τοξικογόνα στελέχη όταν συγκαλλιεργούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα ή συνυπάρχουν στη φύση (Mauro et al., 2015¹³⁰; Lyn et al., 2009¹³¹; Dorner, 2009¹³²).

Ο μηχανισμός που διέπει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τοξικογόνων και μη στελεχών όταν συνυπάρχουν σε ένα υπόστρωμα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Εργαστηριακές μελέτες υποδηλώνουν ότι η αναστολή της παραγωγής αφλατοξίνης συμβαίνει όταν οι υφές του αφλατοξογόνου στελέχους αλληλεπιδρούν φυσικά με αυτές του μη τοξικογόνου στελέχους κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μόλυνσης (Huang et al., 2011¹³³). Έτσι τα εφαρμοσμένα μη τοξικογόνα στελέχη μπορεί να ανταγωνίζονται τα τοξικογόνα κατά τη διάρκεια της ταυτόχρονης μόλυνσης στην καλλιέργεια, παρεμβαίνοντας κατά συνέπεια στη μόλυνση με αφλατοξίνες. Τα μη τοξικογόνα στελέχη έχουν αποδειχτεί εξαιρετικά αποτελεσματικά στη μείωση της μόλυνσης πριν από τη συγκομιδή μέσω του ανταγωνιστικού αποκλεισμού των αφλατοξικογόνων στελεχών από θρεπτικά συστατικά στο πεδίο μόλυνσης (Cotty and Bayman, 1993¹³⁴; Damann, 2015¹³⁵; Hruska et al., 2014¹³⁶). Για ορισμένα μη τοξιγονικά στελέχη, ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός που προκύπτει από τον ταχύτερο πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη του ανταγωνιστικού μη αφλατοξογόνου στελέχους μπορεί να είναι επαρκής για να εξηγήσει τη μείωση της αφλατοξίνης κατά τη διάρκεια της ταυτόχρονης μόλυνσης (Chang και Hua, 2007¹³⁷), ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί σημαντικά μεγαλύτερη μείωση της αφλατοξίνης κατά τη διάρκεια της ταυτόχρονης μόλυνσης από ό,τι προβλέπεται μόνο από τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό. Εναλλακτικά, έχει προταθεί ότι η αναστολή της μόλυνσης/παραγωγής από αφλατοξίνες θα μπορούσε να οφείλεται σε στενή φυσική εγγύτητα μεταξύ των ανταγωνιστικών στελεχών που μπορεί να εκκινήσει ένα σήμα που προκαλεί τη ρύθμιση ή την αναστολή της σύνθεσης της αφλατοξίνης στο αφλατοξογόνο στέλεχος από το μη αφλατοξογόνο στέλεχος (Huang et al., 2011¹³³). Επίσης, η

παρεμπόδιση αυτή μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική ικανότητα μεταξύ των απομονώσεων να χρησιμοποιούν θρεπτικούς πόρους (Mehl and Cotty, 2013¹³⁸). Σύμφωνα με τους Wicklow et al. (2003)¹³⁹ ο φυσικός αποκλεισμός και ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά θα μπορούσε να οφείλεται στην αδυναμία των ανταγωνιστικών απομονώσεων να σχηματίσουν ένα συνεργηστικό μυκηλιακό δίκτυο λόγω βλαστικής ασυμβατότητας. Μεταγενέστερη εργασία έδειξε ότι η ισχύς των αντιδράσεων VCG μεταξύ απομονώσεων που ανήκουν στο ίδιο VCG συσχετίστηκε αρνητικά με τη μείωση της παραγωγής αφλατοξίνης (Wicklow and Horn, 2007¹⁴⁰). Τέλος, σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, προτάθηκε ότι υπό ορισμένες συνθήκες τα μη τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν τη μόλυνση πριν και μετά τη συγκομιδή μέσω της αποδόμησης των αφλατοξινών, σε υποστρώματα όπου η αφλατοξίνη αποτελεί την μοναδική πηγή άνθρακα (Maxwell et al., 2021¹⁴¹). Παρόλα αυτά, τα ένζυμα που δύναται να συμβάλλουν στη διαδικασία της αποδόμησης καθώς και τα παραγόμενα υποπροϊόντα δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί. Όλοι αυτοί οι δυναμικοί μηχανισμοί έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν και να μειώνουν τα επίπεδα αφλατοξινών σε τοξικογόνα στελέχη, επηρεάζοντας έτσι την ανάπτυξή τους ή την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης και επομένως τη συσσώρευσή τους στα τρόφιμα. Είναι γεγονός ότι απαιτείται περισσότερη έρευνα σχετικά με τους διάφορους προσαρμοστικούς παράγοντες που σχετίζονται με τη μικροβιακή κυριαρχία στα οικοσυστήματα γενικότερα, ώστε να ενισχυθεί περαιτέρω η κατανόηση του ανταγωνιστικού αποκλεισμού στο *Aspergillus section Flavi*.

Ο επιτυχής βιολογικός έλεγχος μέσω μη τοξικογόνων στελεχών απαιτεί την παρουσία υψηλής αναλογίας μη τοξικογόνων στελεχών στο χωράφι, σε σύγκριση με τα τοξικογόνα στελέχη (Okun et al., 2015¹⁴²). Επιπλέον, είναι σημαντικό ότι η εφαρμογή προϊόντων βιοελέγχου στον αγρό δεν αυξάνει τη συνολική ποσότητα του *A. flavus* στην καλλιέργεια ενώ η συχνότητα εμφάνισης του εφαρμοζόμενου μη τοξικογόνου στελέχους έχει αντίστροφη σχέση με τη συσσώρευση αφλατοξίνης (Cotty and Bayman, 1993¹³⁴). Για τη χρήση μη τοξικογόνων στελεχών ως παραγόντες βιοελέγχου απαιτεί ο έγκαιρος χαρακτηρισμός τους, για την αξιολόγηση της σταθερότητας, της προσαρμογής και της αποτελεσματικότητάς τους κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί η επιβίωση και η αποτελεσματικότητά τους έναντι των τοξικογόνων στελεχών, ένα ακόμη σημαντικός παράγοντας είναι η προσαρμογή τους στο τοπικό μικροκλίμα και βιοθήση (niche) όπου πρόκειται να εφαρμοστούν. Συνεπώς τα μη τοξικογόνα στελέχη είναι απαραίτητο να

είναι ενδημικά στο περιβάλλον όπου θα εφαρμοστούν, δηλαδή πρέπει να αποτελούν απομονώσεις προερχόμενες από αυτή την περιοχή ώστε να είναι καλά προσαρμοσμένες στις τοπικές συνθήκες. Η σταθερότητα των στελεχών *A. flavus* που χρησιμοποιούνται στη βιολογική αντιμετώπιση είναι το κλειδί για τη συνεχή αποτελεσματικότητά τους. Επομένως, η πιθανή επίδραση του γενετικού ανασυνδυασμού σε αυτά τα στελέχη είναι ένας σημαντικός ερευνητικός τομέας. Γενικά τα τοξικογόνα και μη τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* μπορούν να υποδιαιβηθούν γενετικά λόγω της βλαστικής ασυμβατότητάς τους (Bayman and Cotty, 1991¹⁴³). Ο διαχωρισμός αυτός πραγματοποιείται βάσει της ικανότητας των απομονώσεων που τις απαρτίζουν, να σχηματίζουν αγενή γενετικό ανασυνδυασμό μόνο μεταξύ τους και όχι με απομονώσεις άλλων ομάδων. Στους παθογόνους μύκητες των φυτών, αυτές οι ομάδες γνωστές ως ομάδες βλαστικής συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups- VCGs) συχνά συσχετίζονται με μορφολογικά χαρακτηριστικά και παθογένεια (Puhalla, 1985¹⁴⁴). Ο εντοπισμός διαφορών στην τοξικογόνο ικανότητα και τη γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών *A. flavus* μέσω κατάταξης σε VCGs μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση της δυναμικής του πληθυσμού και να παρέχει σημαντικές πληροφορίες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του βιοελέγχου (Pildain et al., 2004¹⁴⁵). Συνεπώς, οι πληροφορίες σχετικά με την ποικιλομορφία των VCGs διασφαλίζουν ότι οι παράγοντες βιοελέγχου που εφαρμόζονται στο πεδίο θα είναι γενετικά παρόμοιοι με τους τοπικούς πληθυσμούς του *A. flavus* και ως εκ τούτου θα περιορίζουν την πιθανότητα οποιουδήποτε σεξουαλικού ανασυνδυασμού, εάν συμβεί στη φύση.

Η χρήση μη τοξικογόνων στελεχών του γένους *Aspergillus* κατά των αφλατοξικογόνων στελεχών έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στον έλεγχο της παραγωγής αφλατοξινών στο χωράφι, η οποία εν τέλει επιδρά και στη μόλυνση από αφλατοξίνες σε συνθήκες αποθήκευσης. Στην Αριζόνα των ΗΠΑ, το στέλεχος AF36 καταγράφηκε ως ο πρώτος βιολογικός παράγοντας αντιμετώπισης της μόλυνσης από αφλατοξίνες που κυκλοφόρησε εμπορικά, σε βαμβακόσπορο (Cotty and Bayman, 1993¹³⁴). Η αδυναμία βιοσύνθεσης αφλατοξινών του στελέχους αυτού οφείλεται σε μια μοναδική μετάλλαξη στο γονίδιο *rksA* (*afIC*) του μονοπατιού βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης, αποτρέποντας έτσι τη σύνθεση οποιωνδήποτε ενδιάμεσων ενώσεων που συμβάλλουν στην παραγωγή αφλατοξίνης (Ehrlich and Cotty, 2004¹⁴⁶). Αυτός ο παράγοντας βιοελέγχου έδειξε επίσης ικανοποιητικά αποτελέσματα έναντι των τοξικογόνων στελεχών του *A. flavus* που παράγουν αφλατοξίνες στο καλαμπόκι. Άλλα στελέχη, όπως το στέλεχος NRRL21882 του *A. flavus* και το στέλεχος

NRRL21369 του *A. parasiticus*, που εφαρμόζονται σε συνθήκες αγρού βρέθηκε ότι είναι πολύ αποτελεσματικά στα φιστίκια έναντι της μόλυνσης από αφλατοξίνες, τόσο στα προσυλλεκτικά όσο και στα μετασυλλεκτικά στάδια. Το στέλεχος NRRL21882 του *A. flavus* είναι επίσης διαθέσιμο στο εμπόριο ως βιολογικό φυτοπροστατευτικό σκεύασμα, που ονομάζεται afla-Guard® (Dorner and Lamb, 2006¹⁴⁷). Η αιτία του μη αφλατοξικογόνου φαινοτύπου του στελέχους αυτού είναι η πλήρης απουσία του συμπλέγματος αφλατοξινών (Chang et al., 2005¹⁴⁸). Έκτοτε το σκεύασμα αυτό έχει δοκιμαστεί σε πλήθος καλλιεργειών και σε άλλες χώρες. Για παράδειγμα, στην Τουρκία δοκιμάστηκε για την πρόληψη της μόλυνσης με αφλατοξίνες στα φιστίκια (Lankor et al., 2019¹⁴⁹) και σύμφωνα με μια μελέτη στη Βραζιλία με τη χρήση του παρατηρήθηκε ταυτόχρονη μείωση της μόλυνσης από *Fusarium verticillioides* και φουμονισίνης στον αραβόσιτο (Reis et al., 2020¹⁵⁰). Επιπλέον, στην Ιταλία, το βιολογικό φυτοπροστατευτικό σκεύασμα (AF-X1®) αναπτύχθηκε για την προστασία των κτηνοτροφικών καλλιεργειών καλαμποκιού (Mauro et al., 2018¹⁵¹). Το στέλεχος που χρησιμοποιείται για την ιταλική σύνθεση βιολογικού φυτοπροστατευτικού σκευάσματος (A2085), είναι παρόμοιο με το NRRL 21882 όσον αφορά την έλλειψη του συμπλέγματος γονιδίων αφλατοξίνης (Mauro et al., 2015¹³⁰). Ένα άλλο βιολογικός παράγοντας στέλεχος που φέρεται να είναι επιτυχημένο στη μείωση της αφλατοξίνης στον αραβόσιτο για χρήση στη Σερβία είναι το MyToolBox MAf01 από το οποίο απουσιάζουν γονίδια του συμπλέγματος της αφλατοξίνης από το *aflT* έως το *aflN* (Savić et al., 2020¹⁵²).

Όλες οι συνθέσεις βιολογικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων που αναφέρονται παραπάνω αποτελούνται από ένα μόνο μη αφλατοξογόνο στέλεχος παρόλα αυτά υπάρχουν πλέον σύνθετα εμπορικά σκευάσματα βιοελέγχου που περιλαμβάνουν περισσότερα από ένα μη αφλατοξιγονικά στελέχη. Έχει προταθεί ότι σε σύγκριση με μεμονωμένα στελέχη, πολλαπλά μη τοξικογόνα στελέχη *A. flavus* θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μια συνεργιστική δράση που θα οδηγούσε σε μεγαλύτερη μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνες υπό συνθήκες αγρού (Bandyopadhyay and Cardwell, 2003; ¹⁵³ Mehl et al., 2012¹⁵⁴). Το πρώτο σύνθετο βιολογικό φυτοπροστατευτικό σκεύασμα που δημιουργήθηκε για χρήση στην Αφρική είναι ένα μείγμα τεσσάρων ενδημικών μη αφλατοξικογόνων στελεχών *A. flavus* που ονομάζεται Aflasafe® (Εικόνα 23). Τα τέσσερα διαφορετικά μη αφλατοξικογόνα στελέχη που εμπεριέχει, προέρχονται από διαφορετικά VCGs και οι μη αφλατοξοκογόνοι φαινότυποι τους οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις ή έλλειψη γονιδίων του συμπλέγματος της αφλατοξίνης (Atehnkeng et al., 2014¹⁵⁵). Το AflaSafe® αποτελεί πλέον μια εμπορική

ονομασία στην οποία περιλαμβάνονται πολλά σύνθετα σκευάσματα και έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε καλαμπόκι και φιστίκια στην υποσαχάρια Αφρική για περισσότερα από 13 έθνη, με ποσοστό μείωσης της μόλυνσης από αφλατοξίνες 80-99% (Peles et al., 2021¹⁵⁶). Επίσης, στο Τέξας, μια σύνθεση τεσσάρων μη αφλατοξιγονικών στελεχών έχει προωθηθεί ως αποτελεσματική σύνθεση βιολογικού φυτοπροστατευτικού σκευάσματος για το καλαμπόκι που ονομάζεται FourSure® (Shenge et al., 2017¹⁵⁷).



*Εικόνα 23: Βιολογικό φυτοπροστατευτικό σκεύασμα Aflasafe® αποτελούμενο από μείγμα τεσσάρων ενδημικών μη αφλατοξιγονών στελεχών *A. flavus* (<https://aflasafe.com/multimedia/photos/>)*

Πλέον η χρήση των μη τοξικογόνων στελεχών έναντι τοξικογόνων στελεχών ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης έχει εφαρμοστεί για σχεδόν δύο δεκαετίες (Okun et al., 2015¹⁴²) σε διάφορα μέρη του κόσμου. Η εφαρμογή τέτοιων εμπορικών προϊόντων είναι απλή και με χαμηλό κόστος. Σύμφωνα με τις πιο σύγχρονες μεθόδους τυποποίησης για τη διασπορά των μη τοξικογόνων στελεχών στον αγρό χρησιμοποιούνται συνήθως ως υπόστρωμα θερμικά επεξεργασμένοι σπόροι σιταριού, κριθαριού ή σόγιας που έχουν χάσει τη βλαστικότητα τους και οι οποίοι αφού αποστειρωθούν επενδύονται με σπόρια των μη τοξικογόνων στελεχών. Οι σπόροι έπειτα διασκορπίζονται χύδην στην επιφάνεια του εδάφους της καλλιέργειας και έχοντας εξασφαλίσει υψηλή υγρασία, από βροχοπτώσεις ή νερό άρδευσης, ενυδατώνονται επιτρέποντας στο μύκητα να αναπτυχθεί ταχύτατα επάνω στη βιομάζα τους και να σποριοποιήσει. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι απαιτεί μικρές ποσότητες κονιδίων του μύκητα και παράλληλα ευνοείται η επιβίωση του μύκητα επί των σπόρων κατά την αποθήκευση του προϊόντος αλλά και μετά την εφαρμογή στον αγρό, σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες (Bock and Cotty, 1999¹⁵⁸). Πρόσφατες

μελέτες διερεύνησαν κατά πόσον η επικάλυψη σπόρων με βιοπλαστικό που περιέχει τα μη τοξικογόνα στελέχη μπορεί να είναι μια χρήσιμη τεχνολογία για την εφαρμογή τους σε καλλιέργειες αραβοσίτου (Accinelli et al., 2018¹⁵⁹). Πριν από τη φύτευση, οι σπόροι αραβοσίτου επικαλύπτονται με λεπτό υμένιο χρησιμοποιώντας ένα βιοπλαστικό με βάση το άμυλο που είχε προηγουμένως συνδυαστεί με σπόρια των μη τοξικογόνων απομονώσεων ενώ επιπλέον μπορεί να προστεθούν χημικά φυτοφάρμακα (εντομοκτόνα ή μυκητοκτόνα) στον πολτό επικάλυψης για πρόσθετη προστασία των σπόρων στο έδαφος. Επιπλέον, σύμφωνα με μακροχρόνιες μελέτες έχει αποδειχτεί η μακροχρόνια αποτελεσματικότητα τέτοιων σκευασμάτων σε διάφορες περιοχές σε βάθος χρόνου μετά το έτος εφαρμογής τους (Abbas et al., 2017¹⁶⁰; Bandyopadhyay et al., 2019¹⁶¹; Doster et al., 2014¹⁶²; Weaver and Abbas, 2019¹⁶³). Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να φανούν τόσο χρονικά όσο και οικονομικά προσοδοφόρα για τους καλλιεργητές καθώς η ετήσια σύσταση επανεφαρμογής δεν κρίνεται απαραίτητη, και επομένως μπορούν να περιμένουν τουλάχιστον ένα χρόνο μεταξύ των εφαρμογών των σκευασμάτων αυτών.

1.4.2 Βιολογική αντιμετώπιση με χρήση επιφυτικών μικροοργανισμών

Η βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών με τη χρήση μικροοργανισμών που εμφανίζονται στη φύση έχει γίνει μια εναλλακτική λύση στη χρήση χημικών μυκητοκτόνων. Μέχρι στιγμής έχει διαπιστωθεί η ανταγωνιστική ικανότητα μιας πληθώρας μικροοργανισμών, κυρίως βακτηρίων και ζυμών, απομονωμένων από φυτικές επιφάνειες, κατά διαφόρων παθογόνων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιολογικών παραγόντων με τα παθογόνα φαίνεται να διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη φυσική διαδικασία του βιοελέγχου, αν και οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται είναι ακόμη σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν την ικανότητα να αποτρέψουν τη μόλυνση και τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου είτε άμεσα με ανταγωνισμό, μυκοπαρασιτισμό ή αντιβίωση ή έμμεσα προκαλώντας την ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών (Bailey et al., 2006¹⁶⁴). Παρόλα αυτά για να χαρακτηριστούν ως αποτελεσματικοί βιολογικοί παράγοντες οι μικροοργανισμοί αυτοί θα πρέπει να συγκεντρώνουν ορισμένα χαρακτηριστικά. Σημαντικά είναι: η επιβίωση σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες, ο πολλαπλασιασμός επί των ιστών του φυτού, η γενετική σταθερότητα, η αποτελεσματικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, να είναι δραστικοί σε πλήθος παθογόνων και ξενιστών, να μπορούν να αναπτυχθούν σε

διάφορα απλά υποστρώματα, να είναι σε μορφή εύκολα αποθηκεύσιμη και χορηγήσιμη, η έλλειψη παθογόνου ικανότητας κατά των φυτών, των ανθρώπων και των οργανισμών μη-στόχων (Ortega-Beltran et al., 2018¹⁶⁵), να είναι ανθεκτικοί και συμβατοί με άλλα εφαρμοζόμενα φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

Η χρήση βιολογικών παραγόντων και βιοδιεγερτικών για τον έλεγχο του *A. flavus* αποτελεί προϋπόθεση για τη δημιουργία ενός Συστήματος Ολοκληρωμένης Διαχείρισης Παρασίτων (Integrated Pest Management - IPM) προκειμένου να προστατεύονται τα φυτά και τα σχετικά προϊόντα που είναι ευαίσθητα σε μόλυνση από αφλατοξίνες. Εάν και υπάρχουν διάφορα παραδείγματα μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται σε πειραματικές δοκιμές κατά αφλατοξικογόνων μυκήτων και καταδεικνύουν τη δυνατότητα τέτοιων οργανισμών για εμπορική χρήση ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου, δεν υπάρχουν ακόμη βακτηριακά στελέχη ή απομονώσεις μυκήτων που να διατίθενται στο εμπόριο ως βιολογικά σκευάσματα εξειδικευμένα για τον έλεγχο των αφλατοξινών. Σχετικές μελέτες για την αξιολόγηση διαφόρων εμπορικών σκευασμάτων (Botector®, Mycostop®, Serenade Max®, Trianum®, Vacciplant® και Zeolite®) έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν (Lagogianni and Tsitsigiannis, 2019¹⁶⁶). Η περαιτέρω αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας αυτών των βιολογικών παραγόντων είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη ενός μελλοντικού συστήματος IPM φιλικού και βιώσιμου για το περιβάλλον.

1.4.2.1 Χρήση μυκήτων και ζυμών

✓ *Trichoderma* spp.

Οι σαπροφυτικοί μύκητες *Trichoderma* spp. θεωρούνται αποτελεσματικοί παράγοντες βιοελέγχου κατά πολλών ειδών μυκήτων. Τα πιο αποτελεσματικά είδη του *Trichoderma* έναντι των αφλατοξινών είναι το *T. harzianum* και το *T. viridae*, με το ποσοστό παρεμπόδισης παραγωγής των αφλατοξινών να είναι μεγαλύτερο από 80% (Mostafa et al., 2013¹⁶⁷). Δύο ακόμα είδη, το *T. longibrachiatum* και το *T. auroviride*, μείωσαν επίσης τα επίπεδα αφλατοξίνης τόσο στο χωράφι, όσο και στο θερμοκήπιο, σε ποσοστό 50%. Έχει επίσης αναφερθεί η μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνες στην αραχίδα και το γλυκό καλαμπόκι, από *Trichoderma* spp., έως και 57% και 65%, αντίστοιχα (Ren et al., 2020¹⁶⁸).

✓ *Penicillium* spp.

Έχει αποδειχτεί ότι το είδος *Penicillium chrysogenum* και συγκεκριμένα το στελέχος RP42C παράγει μια πρωτεΐνη που καταστέλλει την ανάπτυξη των τοξικογόνων στελεχών *Aspergillus*. Ομοίως, το *P. nalgioense* θεωρείται ένας κοινός παράγοντας βιολογικής αντιμετώπισης κατά πολλών φυτών και παθογόνων μυκήτων, καθώς και των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από αυτά (Ren et al., 2020¹⁶⁸).

✓ Ζύμες

Διάφορα στελέχη ζυμομυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των στελεχών *Debaryomyces hansenii* BCS003, *D. Hansenii*, *Pichia anomala*, *Candida maltose*, *Saccharomyces cerevisiae* RC008, *Aureobasidium pullulans* και *Saccharomyces cerevisiae* RC008, δείχνουν σημαντική επίδραση στην παραγωγή αφλατοξινών καθώς και η ανάπτυξη των *Aspergillus* spp. (Ren et al., 2020¹⁶⁸). Τα ποσοστά παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών κυμαίνονται για την AFB1 από 15-100% και για την AFM1 από 60-90,3%, γεγονός που εξαρτάται από τα στελέχη των ζυμομυκήτων που εφαρμόστηκαν (Peles et al., 2021¹⁵⁶).

Τέλος, άλλοι πιθανοί βιολογικοί παράγοντες για την διαχείριση των αφλατοξινών είναι οι ζύμες του γένους *Kluyveromyces*. Έχει παρατηρηθεί ότι η εφαρμογή των ζυμών του γένους *Kluyveromyces*, προκαλεί μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών σε ποικίλες συνθήκες ενεργότητας του νερού (La Penna et al., 2004¹⁶⁹). Επιπλέον, σε μετασυλλεκτικό επίπεδο έχει αποδειχτεί ότι τα συμπληρώματα ζύμης (π.χ. *Pichia kudriavzevii* και *Kluyveromyces marxianus*) είναι ικανά να αποτοξικοποιήσουν και να μειώσουν τα επίπεδα AFM1 στο γάλα, γεγονός που βελτιώνει τις επιδόσεις των γαλακτοπαραγωγών βοοειδών (Intanoo et al., 2020¹⁷⁰).

1.4.2.2 Χρήση βακτηρίων

Διάφορα βακτηριακά είδη έχουν δείξει επιτυχή αναστολή της παραγωγής αφλατοξίνης *in vitro*, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των ειδών *Aspergillus*. Τέτοια είναι διαφορετικά είδη *Lactobacilli*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* και *Bacillus*.

✓ *Bacillus* spp.

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Bacillus* αναγνωρίζονται ως ωφέλιμα φυτικά είδη στη γεωργία λόγω της υψηλής ανταγωνιστικής δραστηριότητας έναντι φυτοπαθογόνων οργανισμών, της ικανότητας ενίσχυσης της ανάπτυξης των φυτών και βελτίωσης της ποιότητας του εδάφους (Shafi et al., 2017¹⁷¹). Κατά συνέπεια, αποτελούν τα πιο μελετημένα ωφέλιμα βακτήρια, για την αντιμετώπιση των αφλατοξινών. Συγκεκριμένα, το *Bacillus megaterium* έχει καταφέρει να παρεμποδίσει την παραγωγή αφλατοξινών σε broth medium κατά 100% (Kong et al., 2014¹⁷²). Μια άλλη μελέτη κατέδειξε την ικανότητα του *Bacillus subtilis* να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus* έως και 92% και την παραγωγή αφλατοξινών έως και 100% (Siahmoshteh et al., 2018¹⁷³). Στα αποτελεσματικότερα είδη *Bacillus* έναντι της μόλυνσης από αφλατοξίνες περιλαμβάνονται τα *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. cereus*, *B. mycoides* και *B. pumilus* (Ren et al., 2020¹⁶⁸).

✓ *Pseudomonas* spp.

Πειραματικά έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότητα του *Pseudomonas fluorescens* έναντι αφλατοξινών, παρουσιάζοντας 99,4% αναστολή παραγωγής της αφλατοξίνης B1 από το *A. flavus* (Yang et al., 2017¹⁷⁴). Επίσης διάφορα στελέχη *P. chlororaphis* που απομονώθηκαν από το έδαφος καλλιέργειας αραβοσίτου φαίνεται να μείωσαν την ανάπτυξη του *A. flavus* κατά 100% (Ren et al., 2020). Μια ακόμη μελέτη που διεξήχθη χρησιμοποιώντας το στέλεχος *P. protegens* AS15, που έχει απομονωθεί από κόκκους ρυζιού, έδειξε αναστολή της παραγωγής των αφλατοξινών έως και 82,9%, καθώς και μείωση της ανάπτυξης του *A. flavus* έως και 68,3% (Mannaa et al., 2017¹⁷⁵). Πολλά ακόμη στελέχη *Pseudomonas* έχουν δείξει επιτυχή αναστολή της μόλυνσης από αφλατοξίνες και της ανάπτυξη του *A. flavus* σε διάφορα υλικά (Ren et al., 2020¹⁶⁸). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι τα *P. aeruginosa* και *P. stutzeri*, έχουν επίσης ανασταλτικές επιδράσεις στην παραγωγή αφλατοξινών μετασυσλεκτικά ή στην απομάκρυνση τους από το γάλα στους 4°C (Peles et al., 2021¹⁵⁶). Τέλος, η αποτελεσματικότητα του *Pseudomonas stutzeri* επιβεβαιώθηκε επίσης σε μία πρόσφατη μελέτη (Gong et al., 2022¹⁷⁶), γεγονός που το καθιστά υποσχόμενο βιολογικό παράγοντα σε περαιτέρω εφαρμογές.

✓ *Lactobacillus* spp.

Τα *Lactobacillus*, γνωστά και ως βακτήρια γαλακτικού οξέος (lactic acid bacteria - LAB), είναι η ομάδα βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ μέσω ζύμωσης. Αυτά τα βακτήρια χρησιμοποιούνται ευρέως στην τεχνολογία τροφίμων. Ορισμένα είδη, όπως το *L. delbrueckii* subsp. *Lactis*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paraplantarum*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. pentosus* και *L. casei* βρέθηκε να έχουν παρεμποδιστική δράση έναντι της παραγωγής αφλατοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές (Møller et al., 2021¹⁷⁷; Linares-Morales et al., 2018¹⁷⁸). Συγκεκριμένα, το *L. plantarum* αποδείχθηκε ότι είναι ο πιο αποτελεσματικός βιολογικός παράγοντας της ομάδας αυτής κατά των αφλατοξικογόνων μυκητών (Ahlberg et al., 2017¹⁷⁹). Η ικανότητα παρεμπόδισης των στελεχών βακτηρίων γαλακτικού οξέος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το pH, τη θερμοκρασία, τον χρόνο επώασης, καθώς και τις εγγενείς ιδιότητες του εκάστοτε στελέχους. Τα ποσοστά παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών κυμαίνονται για την AFB1 από 16,3-98% και για την AFM1 από 5,6-99,9% (Peles et al., 2021¹⁵⁶).

Η αποδόμηση των αφλατοξινών από προβιοτικά βακτήρια σε λιγότερο ή ακόμα και μη τοξικά προϊόντα έχει αποδειχθεί ότι είναι μια αποτελεσματική, ασφαλής, φθηνή και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος αποτοξικοποίησης με ποσοστό που φτάνει περίπου 19–95% για AFB1 και 12- 100% για AFM1 (Afshar et al., 2020¹⁸⁰).

✓ *Streptomyces* sp.

Μερικά από τα είδη *Streptomyces*, συμπεριλαμβανομένων των *S. yanglinensis*, *S. anulatus*, *S. alboflavus* και *S. roseolus*, έδειξαν πολύ καλά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκαν έναντι αφλατοξικογόνων μυκήτων ως βιολογικοί παράγοντες. Ένα στέλεχος *Streptomyces* μπόρεσε με επιτυχία να αναστείλει πλήρως την ανάπτυξη και την παραγωγή κονιδίων του *Aspergillus flavus*. Ομοίως, το στέλεχος ASBV-1 μείωσε την παραγωγή αφλατοξινών στην αραχίδα (Ren et al., 2020¹⁶⁸).

✓ Άλλα βακτηριακά είδη

Το βακτηριακό στέλεχος *Serratia marcescens* JPP1, είναι ένα ενδοφυτικό ωφέλιμο βακτήριο που λαμβάνεται από το κέλυφος των φιστικιών, το οποίο καταφέρνει να μειώσει την παραγωγή αφλατοξινών έως και 98%, καθώς και αναστέλλει την ανάπτυξη του *A. parasiticus* έως και 95%. Επίσης οι πτητικές ουσίες που παράγονται από τα *Enterobacter* spp.

αποδείχτηκε ότι μπορούν να αναστείλουν πλήρως την ανάπτυξη του *Aspergillus flavus* αλλά και τη μόλυνση με αφλατοξίνες σε διάφορες μελέτες (Gong et al., 2019¹⁸¹; Dong et al., 2020¹⁸²). Ένα άλλο βακτηριακό είδος, το *Nannocystis exedens*, μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη τόσο του *A. parasiticus* όσο και του *A. flavus*. Κατά τη διάρκεια μιας μελέτης, 171 διαφορετικά βακτηριακά απομονωμένα στελέχη, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Pseudomonas*, *Delftia acidovorans*, *D. acidovorans*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *B. pyrrocinia*, *Ralstonia raucula*, βρέθηκαν να είναι αποτελεσματικοί βιολογικοί παράγοντες κατά του *A. flavus* (Ren et al., 2020¹⁶⁸).

1.4.3 Βιοδραστικές ενώσεις από φυτικά εκχυλίσματα

Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν άλλη μια κατηγορία με ανασταλτική δράση έναντι των τοξικογόνων μυκήτων και των μεταβολιτών σε προσυλλεκτικό και μετασυλλεκτικό επίπεδο, που έχουν διερευνηθεί κυρίως *in vitro* τα τελευταία 10 χρόνια (Loi et al., 2020¹⁸³). Έχουν διερευνηθεί για την αποτελεσματικότητά τους διότι παρουσιάζουν το πλεονεκτήματα ότι βιοδιασπώνται, και κατά συνέπεια μπορούν να αξιοποιηθούν ως οικολογικός τρόπος αντιμετώπισης διαφόρων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών σε προγράμματα ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας. Τα φυσικά αυτά προϊόντα περιλαμβάνουν και τα αιθέρια έλαια όπως επίσης και τα συστατικά τους (Prakash et al., 2015¹⁸⁴). Τα αιθέρια έλαια προκύπτουν από περισσότερα από 17.000 είδη αρωματικών φυτών, που ανήκουν στις οικογένειες Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Zingiberaceae και Asteraceae (Regnault-Roger et al., 2011¹⁸⁵). Τα αιθέρια έλαια (EOs) είναι πτητικά μείγματα οργανικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των τερπενίων και τερπενοειδών και αρωματικών συστατικών που λαμβάνονται από φυτικό υλικό με φυσικά μέσα, όπως η απόσταξη με ατμό. Έχουν επιδείξει αντιοξειδωτικές, αντιμυκητιακές και αντιβακτηριακές δυνατότητες και ιδιότητες συντήρησης τροφίμων καθώς και χαμηλή τοξικότητα ενώ ορισμένα έχουν αναφερθεί ως αναστολείς της μυκητιακής ανάπτυξης και της παραγωγής μυκοτοξινών στα είδη *Aspergillus*. Οι Císaroná et al. (2016)¹⁸⁶ ανέφεραν ότι 15 δοκιμασμένα αιθέρια έλαια αποδείχτηκαν αποτελεσματικά στη μείωση της ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξινών έναντι τριών στελεχών *A. flavus* και *A. parasiticus*, με το *A. flavus* να παρουσιάζει την υψηλότερη ευαισθησία. Σε μία άλλη μελέτη (García-Díaz et al., 2020¹⁸⁷) δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητα των αιθέριων ελαίων *Satureja montana* και *Origanum virens* για τον έλεγχο της ανάπτυξης του *A. flavus* και της

παραγωγής αφλατοξινών. Αν και τα δύο αιθέρια έλαια καθυστέρησαν την ανάπτυξη του *A. flavus*, μόνο το αιθέριο έλαιο *S. montana* ήταν σε θέση να επηρεάσει σημαντικά την παραγωγή αφλατοξίνης. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα έντεκα αιθέριων ελαίων κατά του *A. flavus* διερευνήθηκε σε σπόρους αραβοσίτου (Xiang et al., 2020¹⁸⁸). Η κανέλα, η ρίγανη, το λεμονόχορτο και τα σύνθετα μείγματά τους κατάφεραν να αναστείλουν την ανάπτυξη των μυκήτων, να μειώσουν την παραγωγή αφλατοξίνης αλλά επηρέασαν επίσης και τον αποικισμό του *A. flavus* στους κόκκους του αραβοσίτου. Επιπλέον, σε πρόσφατες μελέτες, η σύνθεση και η βιολογική δράση διαφόρων αιθέριων ελαίων (Chelaghema et al., 2022¹⁸⁹; Miri et al., 2023¹⁹⁰) έχουν διερευνηθεί σε σχέση με την αντιμυκητιακή δράση και την ικανότητα αναστολής της παραγωγής αφλατοξινών από τα *Aspergillus* spp.

1.4.4 Φυσικές μέθοδοι

Παρόλα αυτά πολλές φορές η εφαρμογή αποκλειστικά στρατηγικών πρόληψης, δεν αρκεί και οι αφλατοξίνες δύναται να καταλήξουν στην τροφική αλυσίδα δεδομένου ότι απαντώνται σε ένα πλήθος συνθηκών παγκοσμίως και οι συνεχώς μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες αποκλείουν την αυστηρή εξάλειψη τους. Διαφορετικές φυσικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της μόλυνσης από αφλατοξίνες μετασυλλεκτικά σε διαφορετικά προϊόντα διατροφής. Οι υπάρχουσες στρατηγικές βασίζονται κυρίως στον έλεγχο των συνθηκών αποθήκευσης, εστιάζοντας στον ορθό καθαρισμό, τη διαλογή αλλά και μεθόδους αποτοξικοποίησης ή προσρόφησης των τοξινών. Τέτοιες μέθοδοι εάν και έχουν αναφερθεί ότι είναι αποτελεσματικές στη μείωση της μυκοτοξίνης στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, παραμένουν ωστόσο στην πλειοψηφία τους μη βιώσιμες οικονομικά.

✓ Διαλογή

Τις περισσότερες φορές, οι μολυσμένοι με αφλατοξίνη σπόροι σπάνε ή καταστρέφονται, γεγονός που οδηγεί σε ανομοιογενή μόλυνση ολόκληρου του όγκου του αποθηκευμένου προϊόντος. Οι σπασμένοι και κατεστραμμένοι πυρήνες συνήθως περιέχουν το μεγαλύτερο μέρος της μόλυνσης από μυκοτοξίνες. Η μόλυνση από αφλατοξίνες είναι συνήθως ετερογενής, κατά συνέπεια ο διαχωρισμός των κατεστραμμένων πυρήνων μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά τη μόλυνση (Kabak et al., 2006¹⁹¹). Έτσι, διαχωρίζονται και απορρίπτονται

οι καρποί με φυσιολογικά ελαττώματα ή και ζημιές από παθογόνα και παράσιτα. Για τον διαχωρισμό αυτό χρησιμοποιούνται από τα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα ειδικές μηχανές διαλογής με παράμετρο το βάρος και το μέγεθος των σωματιδίων. Στη δεκαετία του 1960 καθιερώθηκε ως μέθοδος η οπτική διαλογή. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι να κατευθύνει ρεύματα κόκκων κατά μήκος μιας σειράς οπτικών αισθητήρων. Συγκεκριμένα, όταν ανιχνευτεί ένας κόκκος διαφορετικού χρώματος, η μαγνητική βαλβίδα ανοίγει και ένα λεπτό ρεύμα πεπιεσμένου αέρα αφαιρεί τους κόκκους (Karlinsky et al., 2016¹⁹²). Λόγω της υψηλότερης απόδοσης, αυτή η μέθοδος εξακολουθεί να χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα. Η διαλογή αποτελεί τη μοναδική επιτρεπτή, από την ευρωπαϊκή νομοθεσία, διαδικασία για τη μείωση της συγκέντρωσης αφλατοξίνης σε περίπτωση υπέρβασης του ανώτατου επιτρεπτού ορίου.

✓ Ξεφλούδισμα

Τα εξωτερικά στρώματα των κόκκων αφαιρούνται με τεχνικές αποφλοιώσης, οι οποίες στο παρελθόν αποτελούνταν από ένα απαραίτητο στάδιο επεξεργασίας πριν από την άλεση. Προϋπόθεση για την επιτυχή εξάλειψη της περιεκτικότητας σε αφλατοξίνες αποτελεί ο περιορισμός του αποικισμού από μύκητες που τις παράγουν στα επιφανειακά στρώματα των κόκκων. Έχει αποδειχτεί ότι αφαιρώντας τα εξωτερικά στρώματα του κόκκου αφαιρούνται μπορούν να αφαιρεθούν έως και το 93% των αφλατοξινών στον αραβόσιτο (Siwela et al., 2005¹⁹³).

✓ Υγρή άλεση

Η υγρή άλεση του καλαμποκιού έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του κόκκου σε φύτρο, άμυλο και γλουτένη. Οι μυκοτοξίνες συσσωρεύονται στα διάφορα κλάσματα που προκύπτουν, εκτός από το κλάσμα αμύλου στο οποίο όλες οι μυκοτοξίνες εντοπίζονται κάτω από τα επίπεδα ανησυχίας. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των αφλατοξινών μπορούν να προσδιοριστούν στο κλάσμα των ινών (28-38%), στο κλάσμα γλουτένης (11-17%), στο φύτρο (6-11%) και μόνο το 1% στο άμυλο (Bennett and Anderson, 1978¹⁹⁴). Έως και 40-50% των αφλατοξινών θα μπορούσαν να απομακρυνθούν από τον αραβόσιτο στο διάλυμα με την υγρή άλεση.

✓ Ξηρή άλεση

Η πρόσθετη ξηρή άλεση οδηγεί στη μείωση της συγκέντρωσης αφλατοξίνης στον αραβόσιτο. Η ξηρή άλεση του κόκκου αραβοσίτου οδηγεί σε συγκέντρωση μυκοτοξινών στο βλαστικό κλάσμα του κόκκου δηλαδή στα φύτρα και το πίτουρο (Bullerman and Bianchini, 2007¹⁹⁵).

✓ Θερμική επεξεργασία

Ο συνδυασμός χρόνου και θερμοκρασίας παραμένει αναμφίβολα μια από τις πιο σημαντικές παρεμβάσεις με τις οποίες η βιομηχανική επεξεργασία μπορεί να μειώσει την περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες σε ένα τελικό προϊόν διατροφής. Παρόλα αυτά, οι περισσότερες μυκοτοξίνες είναι πολύ σταθερά χημικά και θερμικά μόρια επομένως η συμβατική επεξεργασία τροφίμων με θερμοκρασίες έως 80-120°C έχει μικρή επίδραση στις περισσότερες μυκοτοξίνες. Θερμοκρασίες πάνω από 160°C έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικές στην καταστροφή της AFB1 (Raters and Matissek, 2008¹⁹⁶).

Διάφορες θερμικές επεξεργασίες μπορούν να υποβαθμίσουν τη συγκέντρωση της αφλατοξίνης κατά 9% έως 100%, ανάλογα με τη θεραπεία που χρησιμοποιείται και το προϊόν στο οποίο εφαρμόζεται η επεξεργασία. Έχει αποδειχθεί ότι όταν διάφορα φρούτα κλιβανίζονται στους 120°C για 30 λεπτά, αυτό μπορεί να αποικοδομήσει τη συγκέντρωση της αφλατοξίνης από 9-39%, ενώ όταν τα φιστίκια αποστειρωθούν σε κλίβανο σε 1,5 atm για 90 λεπτά, αυτό μπορεί να αποικοδομήσει τις αφλατοξίνες έως και 100%.

✓ Ακτινοβολία

Η ακτινοβολία είναι μια προσέγγιση για την απομάκρυνση των μυκοτοξινών σε βιομηχανική κλίμακα. Τόσο οι μη ιονίζουσες (ηλιακή, UV, μικροκύματα) όσο και οι ιονίζουσες (γάμα) ακτινοβολίες μπορούν να μειώσουν ή να εξαλείψουν παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά εν μέρει και τις μυκοτοξίνες στα τρόφιμα. Η κατεργασία με υπεριώδη ακτινοβολία και ιονισμό έχει ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα, καθώς και τη μείωση της βλάστησης, η οποία τελικά καταστέλλει την ανάπτυξη του μύκητα, με αποτέλεσμα τον έλεγχο της μόλυνσης από αφλατοξίνες στα τρόφιμα και η αύξηση της διάρκειας ζωής των τροφίμων. Σε μελέτες κυτταροκαλλιέργειας, η αυξημένη εκπομπή UV-A έχει αποδειχθεί ότι μειώνει ή ακόμη και καταστέλλει την επαγόμενη από αφλατοξίνες κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα HepG2 (Stanley et al., 2020¹⁹⁷). Η φωτοαποικοδόμηση των

αφλατοξινών στα δημητριακά έχει βρεθεί ότι μειώνει τα επίπεδα τοξινών κατά περίπου 40 % μετά από 3 ώρες και έως και 75 % μετά από 30 ώρες άμεσου ηλιακού φωτός (Herzallah et al., 2008¹⁹⁸). Σε άλλες μελέτες, όπου η ακτινοβολία γάμμα έχει χρησιμοποιηθεί στο καλαμπόκι, τα φιστίκια και το ρύζι, στα 10 kGy προκάλεσε μείωση αφλατοξινών φτάνοντας το 590-88% (Ghanem et al., 2008¹⁹⁹). Παρόλα αυτά, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία στα 15 kGy, αποδείχθηκε μόνο 11-21% μείωση της αφλατοξίνης (Di Stefano et al., 2014²⁰⁰).

✓ Ψυχρό πλάσμα

Εκτός από τις θερμικές επεξεργασίες, η επεξεργασία με ψυχρό πλάσμα, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την αποικοδόμηση των αφλατοξινών έως και 95% σε διαφορετικούς σπόρους και ξηρούς καρπούς. Το ψυχρό πλάσμα έχει ισχυρά αντιμικροβιακά αποτελέσματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποστείρωση εύθραυστων ή ευαίσθητων στη θερμοκρασία επιφανειών, όπως τα τρόφιμα. Η αφλατοξίνη στο καλαμπόκι αποικοδομήθηκε κατά 62% και 82% σε 1 και 10 λεπτά θεραπείας, αντίστοιχα (Shi et al., 2017²⁰¹). Μια πρόσφατη ανασκόπηση σχετικά με τη χρήση του ψυχρού πλάσματος έδειξε την αποτελεσματική αναστολή στην ανάπτυξη μυκήτων και την παραγωγή τοξινών χωρίς να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα του ελαίου στο φιστίκι (Lin et al., 2022²⁰²).

✓ Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία

Λόγω της θερμοσταθερότητας των αφλατοξινών, έχει εφαρμοστεί η χρήση των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (pulsed electric fields - PEF) για την αποτελεσματική αποδόμησή τους. Έχει αποδειχτεί ότι τα επίπεδα AFB1 και αφλατοξινών γενικότερα έχουν μειωθεί κατά 77% και 97% αντίστοιχα με τη μέθοδο αυτή, λαμβάνοντας υπόψιν το συνδυασμό διαφορετικών παραμέτρων όπως η τάση εξόδου, το πλάτος παλμού και το pH. Η θεραπεία με PEF έχει χρησιμοποιηθεί για την αδρανοποίηση του *Aspergillus parasiticus* και την αποσύνθεση της αφλατοξίνης με θετικά αποτελέσματα για τη διατήρηση των σπόρων σουσαμιού και των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Τα επίπεδα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2, έχουν μειωθεί κατά 86,9%, 98,7%, 94,7% και, 92,7%, αντίστοιχα (Gavahian et al., 2022²⁰³).

1.4.5 Χημικές μετασυνθετικές μέθοδοι

Πολλές μελέτες έχουν αξιολογήσει διάφορες μεθόδους χημικής επεξεργασίας τροφίμων ως προς την καταλληλότητά τους να καταστρέφουν ή να αδρανοποιούν τις μυκοτοξίνες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χημική επεξεργασία με σκοπό την αποτοξικοποίηση ή την απολύμανση δεν επιτρέπεται εντός της ΕΕ για προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη διατροφή. Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία (Commission Regulation (EU) 2015/786) (Commission, 2015), μια διαδικασία αποτοξικοποίησης μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε προϊόντα που προορίζονται για ζωοτροφές. Οι διαδικασίες απολύμανσης δεν πρέπει να οδηγούν σε κίνδυνο την υγεία των ζώων, τη δημόσια ή περιβαλλοντική υγεία, ούτε να αλλοιώνουν δυσμενώς τα χαρακτηριστικά των ζωοτροφών. Η εφαρμογή μεθόδων αποτοξικοποίησης μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο μετά από επιστημονική αξιολόγηση από την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) και διαπίστωση ότι η διαδικασία συμμορφώνεται με τα προκαθορισμένα κριτήρια αποδοχής. Πριν εγκριθεί μια νέα τεχνική απολύμανσης από μυκοτοξίνες, πρέπει να προσδιοριστεί η χημική ταυτότητα και η τοξικότητα των προϊόντων της αντίδρασης. Είναι επίσης σημαντικό η εφαρμογή αυτή να μην αλλοιώνει τη διατροφική ποιότητα, την υφή ή τη γεύση των τροφίμων. Οι χημικές μέθοδοι μετά τη συγκομιδή για την μείωση των αφλατοξινών βασίζονται στην εφαρμογή χημικών παραγόντων, π.χ. προσροφητικά, οξέα και βάσεις. Οι χημικοί παράγοντες για την αποτοξικοποίηση των μυκοτοξινών μπορούν να εφαρμοστούν με ανάμειξη, υποκαπνισμό ή εμβάπτιση στα προϊόντα.

✓ Προσροφητικά

Έχει αποδειχτεί ότι η τοξικότητα των αφλατοξινών έχει μειωθεί με τη χρήση ενώσεων που μειώνουν τη γαστρεντερική τους απορρόφησή. Οι εφαρμογές αυτές, μετά την κατανάλωση, περιλαμβάνουν τη χρήση προσροφητικών ουσιών που δεσμεύουν τις αφλατοξίνες στον οργανισμό και έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (Bhat et al., 2022²⁰⁴). Η χρήση προσροφητικών μπορεί να αυξήσει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων, μειώνοντας την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Διάφορες ανόργανες ενώσεις, καθώς και τα προϊόντα τους, όπως ο μπεντονίτης, ο καολίνης, ο ζεόλιθος, ο ενεργός άνθρακας και τα πυριτικά, αναφέρονται επίσης ως επιτυχημένοι παράγοντες αποτοξικοποίησης των αφλατοξινών (Kang et al., 2016²⁰⁵; Kong et al., 2014¹⁷²). Έχει αποδειχτεί ότι όταν τα

προσοφητικά αυτά περιλαμβάνονται στη διατροφή των κοτόπουλων, κατά τη διάρκεια της πέψης, οι τοξίνες προσκολλώνται σε αυτά και ως εκ τούτου, εμποδίζουν την ανάμιξη τοξινών στο αίμα και αργότερα απομακρύνονται από το σώμα. Τα προσροφητικά με βάση τον άργιλο έχουν προταθεί για χρήση ως νέα τεχνική για την αφαίρεση αφλατοξινών από μολυσμένα υγρά. Η επίδραση του μπεντονίτη στη μείωση του AFB1 στο γάλα έχει αποδειχθεί από διάφορες μελέτες (Javanmardi et al., 2022 ²⁰⁶).

✓ Οξέα

Μία άλλη μέθοδος μείωσης των αφλατοξινών είναι η εφαρμογή ισχυρών οξέων. Οι περισσότερες από τις γνωστές μυκοτοξίνες είναι ανθεκτικές στα «αδύναμα» οξέα (Müller, 1983 ²⁰⁷). Ωστόσο, η επεξεργασία των αφλατοξινών με ισχυρά οξέα έχει αποδειχθεί αποτελεσματική για τη μετατροπή των AFB1 και AFG1 στις ημιακεταλικές μορφές τους (Ciegler and Peterson, 1968 ²⁰⁸). Η θεραπεία με HCl, μειώνει τα επίπεδα AFB1 κατά 19% εντός 24 ωρών (Doyle et al., 1982 ²⁰⁹). Διάφορα οργανικά και ανόργανα οξέα, μεταξύ των οποίων το κιτρικό οξύ, γαλακτικό οξύ, τρυγικό οξύ, προπιονικό οξύ και υδροχλωρικό οξύ, έχουν δείξει καλά αποτελέσματα στον έλεγχο των αφλατοξινών.

✓ Βάσεις

Οι αφλατοξίνες είναι ασταθείς υπό αλκαλικές συνθήκες (Kiermeier and Ruffer, 1974 ²¹⁰). Η αποδόμηση των αφλατοξινών με χρήση αμμωνίας έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε εργαστηριακά πειράματα καθώς και σε πειράματα πεδίου, μειώνοντας τη συγκέντρωση αφλατοξινών κατά περισσότερο από 99%. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την πίεση, την υγρασία, τη διάρκεια και το υπόστρωμα (Weng et al., 1994 ²¹¹).

✓ Όζον

Το όζον (O₃) είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό που έχει πολλές χρήσεις στη βιομηχανία τροφίμων (Marshall et al., 2020 ¹²⁵). Έχει έγκριση από WHO, FDA και FAO για χρήση ως αντιμικροβιακός παράγοντας για την επεξεργασία, αποθήκευση και επεξεργασία τροφίμων σε αέριες και υδατικές φάσεις (FDA, 2001). Θεωρείται ότι το όζον αντιδρά με τον διπλό δεσμό C8-C9 του δακτυλίου φουρανίου της αφλατοξίνης, προκαλώντας το σχηματισμό πρωτογενών

οζονιδίων που ακολουθείται από αναδιάταξη σε παράγωγα όπως αλδεΐδες, κετόνες και οργανικά οξέα (Proctor et al. 2004 ²¹²). Αρκετές μελέτες έχουν επίσης δείξει την επιτυχή χρήση νανοσωματιδίων όζοντος για τη μείωση της περιεκτικότητας σε αφλατοξίνες (Sipos et al., 2021 ²¹³). Μελέτες έχουν δείξει ότι το όζον είναι ικανό να αποικοδομεί τις αφλατοξίνες σε διάφορα προϊόντα (Dwarakanath et al., 1968 ²¹⁴) και σε υδατικά διαλύματα (Maeba et al. 1988 ²¹⁵). Η εφαρμογή του όζοντος για την απολύμανση με αφλατοξίνες περιορίζεται σε ορισμένα τρόφιμα, ενώ η αποτελεσματικότητα της αποτοξίνωσης φαίνεται να αυξάνεται με το χρόνο και τη συγκέντρωση του όζοντος (Akbas and Ozdemir, 2006 ²¹⁶).

Όλες αυτές οι μέθοδοι ελέγχου των αφλατοξινών στα τρόφιμα έχουν ένα ευρύ φάσμα αποτελεσματικότητας, αλλά καμία από αυτές δεν εξαλείφει πλήρως τον κίνδυνο τοξικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξινών, ούτε τις αρνητικές επιπτώσεις της κατάποσης χαμηλών δόσεων για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η επεξεργασία τροφίμων μπορεί να μειώσει την έκθεση σε μυκοτοξίνες καταστρέφοντας ή εξαλείφοντας τις μυκοτοξίνες, μετατρέποντάς τις σε λιγότερο τοξικά παράγωγα, προσροφώντας μυκοτοξίνες σε στερεές επιφάνειες ή μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους.

1.4.6 Γενετική Μηχανική

Επιπρόσθετα, η ραγδαία πρόοδος της τεχνολογίας τα τελευταία χρόνια και ιδιαίτερα η γενετική και οι μοριακές τεχνικές έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μελέτη και την αντιμετώπιση της μόλυνσης από αφλατοξίνες. Διάφορες ομικές τεχνολογίες (-omics) έχουν συμβάλει ουσιαστικά στη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παθογόνου, που έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή αφλατοξινών και ιδιαίτερα στις σχέσεις *A. flavus*-αραβόσιτου (Soni et al., 2020 ²¹⁷; Bhatnagar et al., 2018 ²¹⁸). Έχει εντοπιστεί μια πληθώρα πρωτεϊνών και γονιδίων με γνωστές ή υποθετικές λειτουργίες που έχουν συμβάλει και στη κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας του ξενιστή στη μόλυνση από τον *A. flavus* (Tiwari et al., 2018). Το γεγονός αυτό άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών μοριακής αναπαραγωγής (breeding) σε αυτόν τον τομέα.

Η εξέλιξη της μοριακής και γενετικής έρευνας έχει οδηγήσει στην εύρεση ποικιλιών με ανθεκτικότητα στη μόλυνση από αφλατοξίνες (Williams et al., 2015 ²¹⁹, Brown et al., 1999 ²²⁰,

2016 ²²¹). Ωστόσο, η φυσική αντοχή του αραβοσίτου στη μόλυνση με αφλατοξίνες είναι πολυγονιδιακό χαρακτηριστικό και, ως εκ τούτου, πρέπει να εντοπιστούν δείκτες για να διευκολυνθεί η μεταφορά των χαρακτηριστικών ανθεκτικότητας για τη δημιουργία βιώσιμων ποικιλιών με επιθυμητά αγρονομικά χαρακτηριστικά, ώστε να αξιοποιηθούν σε πρακτικό επίπεδο. Συνεπώς, στις μέρες μας οι περισσότερες έρευνες επικεντρώνονται στην ανάπτυξη διαγονιδιακών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση των αφλατοξινών. Οι προσεγγίσεις αυτές στοχεύουν είτε στην υπερέκφραση διαγονιδιακών αντιμυκητιακών γονιδίων του αραβοσίτου που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή πεπτίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα (Cary et al., 2011 ²²²; Rajasekaran et al., 2018 ²²³), είτε στη χρήση μεθόδων βασισμένων σε τροποποιήσεις στο RNA που στοχεύουν κρίσιμα γονίδια για την ανάπτυξη του *A. flavus* αλλά και δομικά γονίδια του μονοπατιού βιοσύνθεσης αφλατοξινών. Έχουν αναπτυχθεί διαγονιδιακά φυτά αραβοσίτου απαλλαγμένα από αφλατοξίνη, αξιοποιώντας τεχνολογίες γενετικής μηχανικής, που χρησιμοποιούν ως μέθοδο τη σίγηση γονιδίων του *A. flavus* που επάγονται από τον ξενιστή (Raruang et al., 2020 ²²⁴; Masanga et al., 2015 ²²⁵).

1.5 Ομάδες βλαστικής Συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups- VCGs)

1.5.1 Εισαγωγή

Η γενετική παραλλακτικότητα σε νηματοειδείς μύκητες που δεν έχουν σεξουαλικό στάδιο προκαλούνται είτε από γονιδιακή μετάλλαξη, είτε σύντηξη υφών και μιτωτικό ανασυνδυασμό (Carlile, 1987²²⁶). Γενετικός ανασυνδυασμός χωρίς σεξουαλική αναπαραγωγή παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στον *Aspergillus nidulans* κατά τον παρασεξουαλικό του κύκλο που ξεκινά με το σχηματισμό του ετεροκαρύου. Όταν οι υφές δύο γενετικά συμβατών απομονώσεων συγχωνεύονται, θα σχηματιστεί ένα ετεροκαρυωτικό μυκήλιο, που περιέχει δύο γενετικά διακριτούς πυρήνες. Οι δύο αυτοί διακριτοί απλοειδείς πυρήνες στη συνέχεια μπορεί να συντηχθούν μέσα στο ετεροκάρυον, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ετερόζυγου διπλοειδούς πυρήνα. Κατά τη διάρκεια των διαιρέσεων του διπλοειδούς πυρήνα, ο μιτωτικός ανασυνδυασμός και η μιτωτική μη διάζευξη (επαναλαμβανόμενη απώλεια ολόκληρων χρωμοσωμάτων) μπορεί να προκύψουν για να δημιουργήσουν ανασυνδυασμένους απλοειδείς πυρήνες που περιέχουν νέους αλληλικούς συνδυασμούς (Strom and Bushley, 2016²²⁷; Pontecorvo, 1956²²⁸).

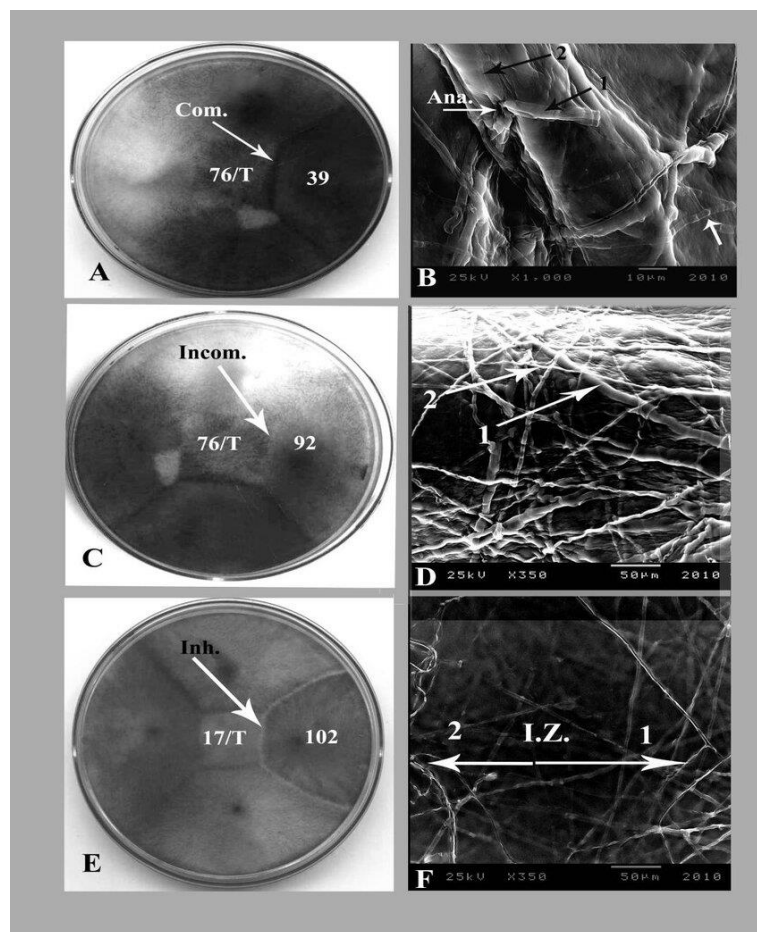
Η ετεροκαρύωση είναι συχνά απαντώμενη στην άγρια φύση καθώς αποτελεί μια σημαντική πηγή ευελιξίας για τους φυσικούς πληθυσμούς των ομόθαλλων ασκομυκήτων αλλά και των ατελών μυκήτων καθώς τους επιφέρει επιλεκτικό πλεονέκτημα (Caten and Jinks, 1966²²⁹). Αν και ο παρασεξουαλικός κύκλος είναι πράγματι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την αύξηση της ποικιλομορφίας του γονότυπου σε ασεξουαλικούς μύκητες, ο σχηματισμός του ετεροκαρύου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που εξαρτάται κυρίως από την ικανότητα των απομονώσεων ζευγαρώματος να κάνουν υφική αναστόμωση. Αντίθετα, η βιωσιμότητα του ετεροκάρυου εξαρτάται από τη φυσιολογική συμπληρωματικότητα μεταξύ δύο γενετικά διαφορετικών απομονώσεων του μύκητα και από έναν συγκεκριμένο γενετικό έλεγχο που εκτελείται από γονίδια *het* (για ασυμβατότητα ετεροκαρύου) ή *vic* (για βλαστική ασυμβατότητα). Είναι ευρέως γνωστό ότι η βλαστική ασυμβατότητα είναι ένα σύστημα αυτο-ή μη-αναγνώρισης και ρυθμίζεται από πολλαπλούς μη συνδεδεμένους τρόπους ασυμβατότητας ετεροκαρίων -loci (*het*) (Leslie, 1993²³⁰) που κυμαίνονται σε αριθμό μεταξύ

των μελετημένων ειδών (Saure et al., 2000²³¹). Η βλαστική ασυμβατότητα θεωρείται ότι έχει εξελιχθεί ως τρόπος περιορισμού της μετάδοσης επιβλαβών ιών και πλασμιδίων ή παρασιτικών πυρήνων (Caten, 1972²³²; Biella et al. 2002²³³; Hartl et al., 1975²³⁴). Η βλαστική ασυμβατότητα περιορίζει τη σύντηξη υφών και την επακόλουθη γονιδιακή ροή μεταξύ ατόμων που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες βλαστικής συμβατότητας (VCGs) (Leslie, 1993²³⁰). Απομονώσεις εντός του ίδιου VCG σχηματίζουν σταθερές συντήσεις βλαστικών υφών, ενώ η σύντηξη υφών μεταξύ απομονώσεων διαφορετικών VCGs συνήθως οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Glass and Dementhon, 2006²³⁵).

Τα απομονωμένα στελέχη που θα κατανεμηθούν στην ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας (VCG) έχουν συνήθως πανομοιότυπα αλληλόμορφα στους τόπους πολλαπλής βλαστικής ασυμβατότητας (*het loci*) και συνεπώς δύνανται να σχηματίσουν βιώσιμα ετεροκάρυα. Αντίθετα, η εμφάνιση γονιδιακών μεταλλάξεων σε έναν ή περισσότερους τόπους *het* έχει ως αποτέλεσμα τα απομονωμένα στελέχη να διαφέρουν ως προς γονίδια που ελέγχουν την ετεροκαρύωση, με αποτέλεσμα να προκύπτει η ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα. Τα ετεροκαρυωτικά κύτταρα θα καταστραφούν γρήγορα και συνεπώς τα απομονωμένα στελέχη θα εκχωρηθούν σε διακριτά VCGs (Leslie, 1993²³⁰; Hutchison et al., 2012²³⁶).

Με βάση αυτά, συμπεραίνεται ότι όλα τα μέλη ενός VCG ενός ασεξουαλικού μύκητα είναι πανομοιότυπα σε όλους τους τόπους (*loci*), οι οποίοι πιθανώς να προκύπτουν από κοινή καταγωγή. Έτσι, κάθε VCG μπορεί συχνά να θεωρηθεί ως μια κλωνική γενεαλογία, απομονωμένη από τα άλλα VCG (Grubisha and Cotty, 2010²³⁷). Τα μέλη διαφορετικών VCG θεωρείται ότι διαφέρουν σε αρκετά φυσιολογικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την παθογένεια. Επομένως, η παραγωγή αφλατοξίνης είναι πιο παρόμοια εντός των VCGs παρά μεταξύ των διαφορετικών VCGs, με ορισμένα VCG να αποτελούνται μόνο από μη τοξικογόνα μέλη (Bayman and Cotty, 1993¹³⁴). Κατά συνέπεια οι τοξικογόνες απομονώσεις μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από τις μη τοξικογόνες ενώ ταυτόχρονα ο αριθμός των μελών της κάθε ομάδας υποδεικνύει την προσαρμογή της στο τοπικό περιβάλλον. Δηλαδή, οι ομάδες που απαρτίζονται από μεγαλύτερο αριθμό μελών-απομονώσεων, είναι κυρίαρχες και πιθανόν καλύτερα προσαρμοσμένες στο ως προς μελέτη το περιβάλλον (Ehrlich et al. 2007²³⁸; Hua et al., 2012²³⁹). Η ανάλυση VCG αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό των πληθυσμών μυκήτων.

Οι δοκιμές βλαστικής συμβατότητας έχουν αποσαφηνίσει τις γενετικές σχέσεις σε πολλά είδη μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων αρκετών *Aspergilli*. Ο *Aspergillus flavus* θεωρείται ετεροθαλικός μύκητας δηλαδή, κάθε άτομο περιέχει έναν από τους δύο τύπους ζευγαρώματος, MAT1-1 ή MAT1-2, σε έναν μόνο τόπο και οι πληθυσμοί του είναι ικανοί για κλωνικό, δηλαδή, βλαστικό πολλαπλασιασμό και σεξουαλική αναπαραγωγή (Moore et al., 2009²⁴⁰; Olarte et al., 2012²⁴¹; Horn et al., 2009²⁴², 2016²⁴³). Δώδεκα υποτιθέμενοι τόποι *het* έχουν εντοπιστεί στο *A. flavus* και στις περισσότερες περιπτώσεις τα αλληλόμορφα πρέπει να είναι πανομοιότυπα σε όλους τους τόπους *het* για να συμβούν σταθερές συντήξεις υφών (Monacell, 2014²⁴⁴). Τα στελέχη που είναι σεξουαλικά συμβατά είναι αντίθετου τύπου ζευγαρώματος και ανήκουν σε διαφορετικά VCGs. Όπως πολλοί νηματοειδείς μύκητες, οι πληθυσμοί του *A. flavus* είναι πολύ διαφορετικοί όσον αφορά τον αριθμό των VCG, οι οποίοι ποικίλλουν σημαντικά, έτσι μερικά VCG περιλαμβάνουν περισσότερες απομονώσεις ενώ πολλά VCG περιέχουν πολύ μικρό αριθμό απομονώσεων (Bayman and Cotty 1991¹⁴³; Barros et al., 2006²⁴⁵). Επιπλέον, οι πληθυσμοί του *A. flavus* εμφανίζουν σημαντική γενετική, μορφολογική και χημειοτυπική ποικιλομορφία μεταξύ των ομάδων βλαστικής συμβατότητας (Olarte et al., 2012²⁴¹; Moore et al., 2013²⁴⁶), γεγονός που δείχνει ότι η ασυμβατότητα των ετεροκαρύων δεν αποτελεί εμπόδιο στη γενετική ανταλλαγή και ανασυνδυασμό. Επιπλέον, οι πληθυσμοί του *A. flavus* είναι δυναμικοί, δηλαδή το κυρίαρχο VCG σε μια περιοχή μπορεί να διαφέρει από έτος σε έτος (Bayman and Cotty, 1991¹⁴³). Έτσι, αν και είναι σαφές ότι τα διακριτά VCG είναι κλωνικές γενεαλογίες, τα άτομα εντός των VCGs είναι πιθανό να συνεχίσουν να συσσωρεύουν γενετικές μεταλλάξεις (Grubisha and Cotty, 2010²³⁷). Αυτές οι συσσωρευμένες μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν ποικίλους φαινοτύπους, όπως διαφορές στον αριθμό και το μέγεθος των σκληρωτίων αλλά και διαφορές στην παραγωγή τοξινών σε ένα VCG, οδηγώντας στο σχηματισμό νέων VCGs. Αυτή είναι μια σημαντική παρατήρηση καθώς η αύξηση της ποικιλομορφίας των VCGs στους πληθυσμούς των αγρών αναμένεται να αυξήσει τις ευκαιρίες γενετικού ανασυνδυασμού στο *A. flavus*, ιδιαίτερα σε κρίσιμες περιοχές όπως το cluster γονιδίων αφλατοξίνης, αποδίδοντας δυνητικά διαφορετικά προφίλ τοξινών και μια σειρά συγκεντρώσεων αφλατοξίνης (Molo et al., 2022²⁴⁷). Η ικανότητα αυτών των νέων γονότυπων να παράγουν μυκοτοξίνες και η ανταγωνιστικότητά τους χρήζουν προσεκτικής αξιολόγησης.



Εικόνα 24: Φωτογραφίες δοκιμών βλαστικής συμβατότητας ορισμένων απομονώσεων *Pyricularia grisea* σε τρυβλία Petri και απεικόνιση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Arafa et al., 2013²⁴⁸)

1.5.2 Μεταλλαγές Nit⁻ και κατάταξη σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (VCGs)

Όσον αφορά την τοξικογόνο ικανότητα των στελεχών, εντοπίζονται διαφορές μεταξύ των στελεχών του ίδιου είδους, ωστόσο, τα επίπεδα αφλατοξίνης είναι σταθερά εντός των βλαστικά συμβατών ομάδων (vegetative compatibility groups - VCGs) και γι' αυτό το λόγο, η ταυτοποίηση των μη τοξικογόνων VCGs είναι απαραίτητη στην ανάπτυξη παραγόντων βιολογικού ελέγχου (Donner et al., 2010²⁴⁹). Σε αντίθεση με ορισμένους μύκητες, τα στελέχη *Aspergillus* δεν παράγουν σαφείς ενδείξεις αναστόμωσης ή ανταγωνισμού όταν συναντώνται, επομένως απαιτούνται δείκτες για να αποδειχθεί η βλαστική συμβατότητα. Για την επιλογή και τον διαχωρισμό των VCGs στο *A.flavus* πραγματοποιούνται αναλύσεις βλαστικής συμβατότητας (Vegetative Compatibility Analyses - VCAs). Στις VCAs συνήθως χρησιμοποιείται μια κατηγορία μεταλλαγών που πληρεί τα απαιτούμενα κριτήρια είναι οι μεταλλαγές Nit⁻ (nitrate non-utilizing) στο βιοχημικό μονοπάτι αφομοίωσης των νιτρικών

ιόντων (Ruhalla, 1985²⁵⁰). Οι μεταλλαγές αυτές αποτελούν μία ευρέως εφαρμοσμένη μέθοδο καθώς η φαινοτυπική τους κατάταξη σε 3 συμπληρωματικές κλάσεις (*niaD*, *cnx* και *nirA*) τους μπορεί να πραγματοποιηθεί σχετικά εύκολα σε θρεπτικά υποστρώματα με νιτρικά ιόντα, νιτρώδη ιόντα ή υποξανθίνη/ινοσίνη ως μοναδικές πηγές αζώτου (Correll et al., 1987²⁵¹). Οι Nit⁻ μεταλλάξεις διακρίνονται από την αδυναμία ανάπτυξης τους σε θρεπτικό υλικό με νιτρικά άλατα ως μοναδική πηγή αζώτου, όπως το Chapek-Dox Agar (Bayman et al., 1991²⁵²). Οι μεταλλάξεις χαρακτηρίστηκαν σε κλάσεις σύμφωνα με τις αποκρίσεις ανάπτυξης τους σε θρεπτικά μέσα τροποποιημένα με διάφορες μοναδικές πηγές αζώτου.

Όσον αφορά στην κλάση *niaD*, οι μεταλλαγές αυτές αδυνατούν να χρησιμοποιήσουν τα νιτρικά ως πηγή αζώτου και κατά συνέπεια να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει νιτρικά ιόντα ως μοναδική πηγή αζώτου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις στερούνται του δομικού γονιδίου, που κωδικοποιεί τη νιτρική αναγωγή. Αναπτύσσονται, ωστόσο, φυσιολογικά τόσο σε θρεπτικό υλικό με νιτρώδη ιόντα όσο και υποξανθίνη (Cove, 1976²⁵³). Κατά συνέπεια, τα μεταλλαγμένα *niaD* στελέχη, δύνανται να αναπτύσσονται κανονικά στα τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα Hydroxanthine Agar (HYP) και Nitrite Agar (NIT) (Cotty, 1994²⁵⁴).

Οι μεταλλαγές *nirA*, αντιστοιχούν σε ένα ρυθμιστικό γονίδιο που μεσολαβεί στο μονοπάτι αφομοίωσης των νιτρικών ιόντων για αυτό και δεν αναπτύσσονται ούτε στα νιτρικά ούτε τα νιτρώδη ιόντα, αναπτύσσονται όμως κανονικά στην υποξανθίνη (Cove, 1976²⁵⁵). 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 Hydroxanthine Agar (HYP) (Cotty, 1994²⁵⁴).

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 1976²⁵⁵). 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) (Cotty, 1994²⁵⁴). Οι *cnx* μεταλλαγές αντιστοιχούν σε 5 διαφορετικά συντηρημένα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση ενός συμπαράγοντα που περιέχει μολυβδαίνιο (μολυβδοπερίνη), ο οποίος είναι απαραίτητος για τη δράση της νιτρικής αναγωγής και αφυδρογονάσης της ξανθίνης (MacDonald and Cove, 1974²⁵⁶; Scazzocchio, 1974²⁵⁷).

Η αντιστοίχιση των στελεχών σε ένα από τα VCG βασίζεται στη συμπληρωματική ικανότητα μεταξύ των μεταλλαγών τύπου *niaD* και *cnx*, είτε *nirA* και *cnx*. Η συμπληρωματικότητα αυτή εμφανής στο τρυβλίο ανάπτυξης με θρεπτικό υπόστρωμα Starch Agar, καθώς εμφανίζεται μια ζώνη αποτελούμενη από πυκνή ανάπτυξη των υφών των εκάστοτε μεταλλαγών, αλλά και από την εμφάνιση σκληρωτίων (Bayman et al., 1991²⁵²). Δύο μεταλλαγμένα στελέχη του ίδιου τύπου, παρότι μπορεί να βρίσκονται στο ίδιο VCG, δεν θα εμφανίσουν τη ζώνη συμβατότητας, καθώς οι μεταλλάξεις οι οποίες διαθέτουν βρίσκονται στους ίδιους τόπους. Επιπλέον, δύο μεταλλάξεις που δεν προέρχονται από το ίδιο VCG, δε σχηματίζουν ζώνη συμβατότητας μεταξύ τους, ακόμη και εάν είναι δύο συμπληρωματικών τύπων όπως μια *niaD* με μια *cnx* και διαθέτουν δηλαδή μεταλλάξεις σε διαφορετικούς τόπους.

Μελέτες για διάφορους μύκητες έχουν συσχετίσει τις ομάδες VCGs με διάφορα χαρακτηριστικά όπως 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., 1991¹⁴³; Bayman et al., 1993¹³⁴, Puhalla et al., 1985¹⁴⁴; Horn et al., 1996²⁵⁸). Η κατάταξη στελεχών μυκήτων σε VCGs έχει αποδειχθεί ως ένα εύχρηστο εργαλείο για την πληθυσμιακή ανάλυση των μη τοξικογόνων μυκήτων (Mauro et al., 2013²⁵⁹).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αρχικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της τοξικογόνου ικανότητας 99 ενδημικών απομονώσεων *Aspergillus flavus* που προέρχονται από τις ευρύτερες περιοχές της Μακεδονίας και Θεσσαλίας. Η διερεύνηση της τοξικογόνου ικανότητας των απομονωθέντων στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC).

Ένας δεύτερος σκοπός, ήταν η διερεύνηση της *in vitro* επίδρασης των μη τοξικογόνων απομονώσεων του μύκητα στην παραγωγή αφλατοξινών δύο επιλεγμένων ισχυρά τοξικογόνων ενδημικών στελεχών *A. flavus* σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα. Τα αποτελέσματα του ανταγωνισμού ελέγχθηκαν με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Ακόμη πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της *in situ* επίδρασης των αποτελεσματικών απομονώσεων που προέκυψαν από την προηγούμενη αξιολόγηση, στην παραγωγή αφλατοξινών από τα ίδια δύο ισχυρά τοξικογόνα στελέχη, σε καρπούς καλαμποκιού με χρήση ELISA.

Ένας ακόμη στόχος της παρούσας μελέτης, ήταν ο έλεγχος της βλαστικής συμβατότητας των μη τοξικογόνων στελεχών και κατ'επέκταση η δημιουργία ομάδων βλαστικής συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups - VCGs). Απώτερος σκοπός της ενότητας αυτής ήταν η εύρεση ενδημικών μη τοξικογόνων στελεχών, οι οποίες παρεμποδίζουν πλήρως ή σε υψηλό βαθμό, τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών, ενώ παράλληλα παρουσιάζουν υψηλή προσαρμοστικότητα στο τοπικό περιβάλλον.

Τέλος, αξιολογήθηκε η ικανότητα παρεμπόδισης των αποτελεσματικότερων μη τοξικογόνων απομονώσεων του μύκητα σε καλλιέργεια καλαμποκιού στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, κατά των παραγόμενων αφλατοξινών του μύκητα *A. flavus*. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ELISA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

PDA: Potato dextrose agar

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

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

SEL Agar: Selection medium for auxotrophic mutant generation

Απεσταγμένο νερό	1000 ml
Σουκρόζη (Duchefa Biochem)	30 g
Νιτρικό νάτριο (NaNO_3)	3 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4)	0,5 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4)	0,5 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	0,5 g
Χλωρικό κάλιο (KClO_3)	0,5 g

Χρωστική Rose Bengal	25 mg L ⁻¹
pH	7
Άγαρ	20 g

A&M διάλυμα μικροστοιχείων

Απεσταγμένο νερό	1000 ml
Δεκαένυδρο τετραβορικό νάτριο (Na ₂ B ₄ O ₇ *10H ₂ O)	0,7 g
Τετραένυδρο επταμολυβδαινικό αμμώνιο (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O)	0,5 g
Εξαένυδρος θειικός τρισθενής σίδηρος (Fe ₂ (SO ₄) ₃ *6H ₂ O)	10 g
Πενταένυδρος θειικός χαλκός (II) (CuSO ₄ *5H ₂ O)	0,3 g
Ένυδρο θειικό μαγγάνιο (II) (MnSO ₄ *H ₂ O)	0,11 g
Επταένυδρος θειικός ψευδάργυρος (ZnSO ₄ *7H ₂ O)	17,6 g
pH	2

MIT: Secondary selection medium

Απεσταγμένο νερό	1000 ml
Σουκρόζη (Duchefa Biochem)	30g
Νιτρικό νάτριο (NaNO ₃)	3 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο (K ₂ HPO ₄)	0,5 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH ₂ PO ₄)	0,5 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO ₄ 7H ₂ O)	0,5 g
Χλωρικό κάλιο (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 7H ₂ O)	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 ₂ PO ₄)	1 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO ₄ 7H ₂ O)	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 ₂ PO ₄)	0,5 g
Διβασικό φωσφορικό κάλιο (K ₂ HPO ₄)	0,5 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO ₄ 7H ₂ O)	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 ₂ PO ₄)	0,5 g

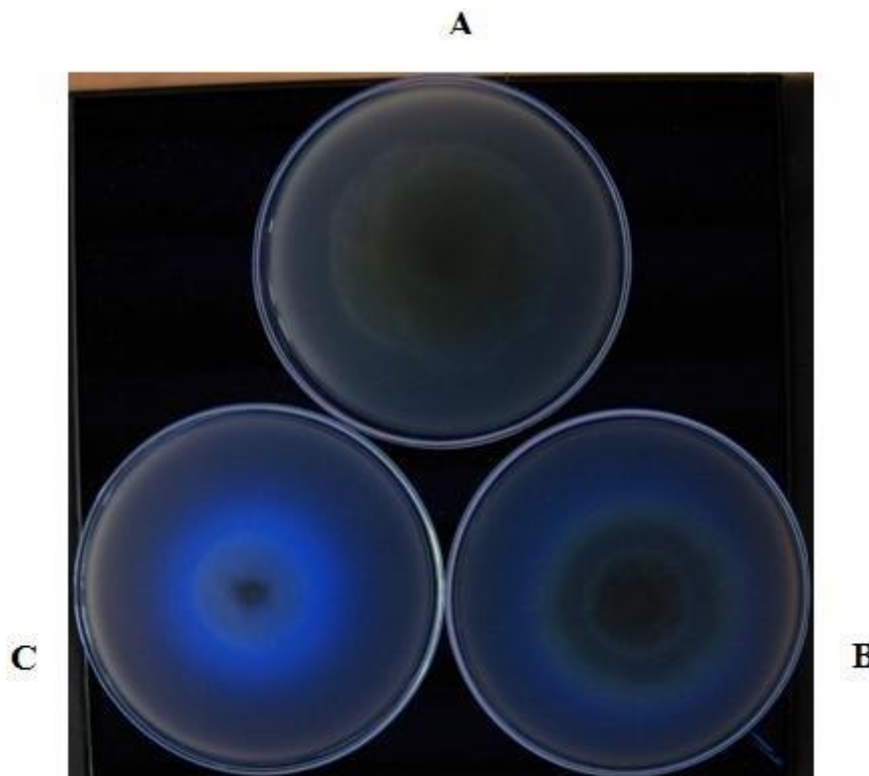
Διβασικό φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4)	0,5 g
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,5 g
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	0,5 g
A&M διάλυμα μικροστοιχείων	1 ml
pH	6
Άγαρ	20 g

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

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Αξιολόγηση της τοξικογόνου ικανότητας των απομονώσεων *Aspergillus flavus* με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC)

Οι απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ανακτήθηκαν προηγουμένως από καλαμπόκια που συλλέχθηκαν από τις ευρύτερες περιοχές τις Μακεδονίας και Θεσσαλίας τα έτη 2014 και 2016. Τα απομονωμένα στελέχη είχαν προηγουμένως ταυτοποιηθεί ως *A. flavus* και βρίσκονταν αποθηκευμένα σε φιαλίδια Eppendorf, υπό μορφή εναιωρήματος κονιδίων, με 25% διάλυμα γλυκερόλης στους -80°C στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η αρχική αξιολόγηση της τοξικογόνου ικανότητας των 99 απομονώσεων, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), ύστερα από την επώασή τους σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα Coconut-Agar (CCA), που επάγει την παραγωγή αφλατοξινών (Lin et al., 1976²⁶⁰, Sourabie et al., 2012²⁶¹) (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Χαρακτηριστικός φθωρισμός (σε φως UV) γύρω από τις αποικίες των τοξικογόνων στελεχών *Aspergillus flavus* (B και C) σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα Coconut-Agar (CCA) (Sourabie et al., 2012).

Τα τρυβλία με το CCA εμβολιάστηκαν με ποσότητα του εναιωρήματος κονιδίων του κάθε αποθηκευμένου στελέχους. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία επωάστηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 28 °C και υπό συνθήκες σκότους για 12 ημέρες.

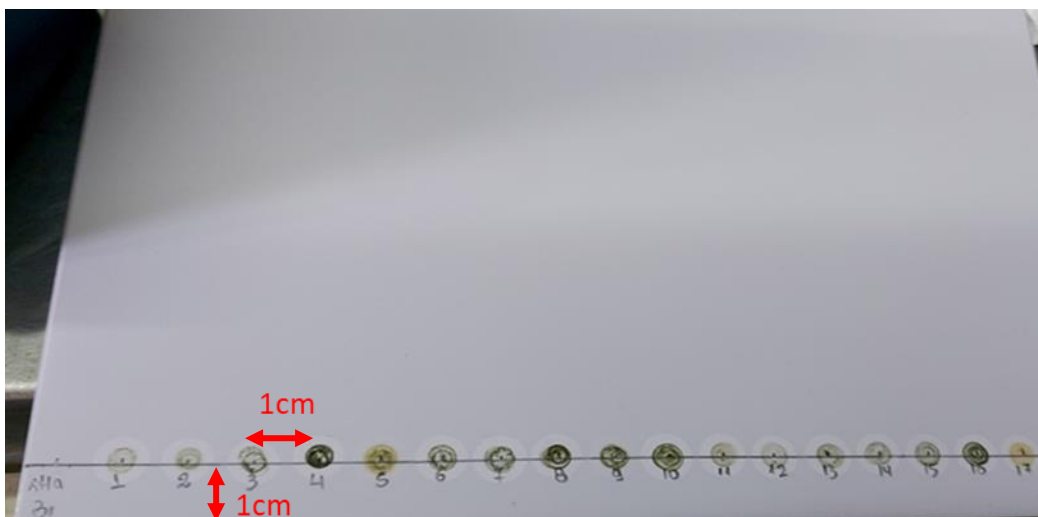
Για την εξαγωγή των αφλατοξινών από την καλλιέργειας του μύκητα έγινε χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν:

- Ύστερα από το πέρας της περιόδου επώσεως και την πλήρη κάλυψη του θρεπτικού υποστρώματος με το μύκητα, κόπηκαν με φελλοτρυπητήρα διαμέτρου 9 mm 10 δισκία θρεπτικού υποστρώματος από κάθε τρυβλίο και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια τύπου Falcon που περιείχαν 5 mL χλωροφόρμιο, όπου και παρέμειναν έως την επόμενη ημέρα σε συνθήκες δωματίου. Την επόμενη ημέρα, τα δισκία αφαιρέθηκαν και το διάλυμα που παρέμεινε μέσα στα σωληνάρια, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 5.000 στροφές, σε φυγόκεντρο Sorvall RC- 5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments). Το φυγοκεντρηθέν διάλυμα παρέμεινε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και αμέσως μετά η υπερκείμενη φάση του απορρίφθηκε ενώ η υποκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο τύπου Falcon, όπου και παρέμεινε μέσα σε απαγωγό εστία για τις επόμενες 1 με 2 ημέρες ώστε να εξατμιστεί πλήρως ο οργανικός διαλύτης (χλωροφόρμιο).
- Στη συνέχεια έγινε η προετοιμασία της πλάκας TLC, όπου σημειώθηκαν με τη χρήση χάρακα και μολυβιού, οι αποστάσεις και οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων ανά 1 cm.
- Όταν ο οργανικός διαλύτης είχε πλήρως εξατμιστεί, έγινε εκ νέου προσθήκη 100 μL χλωροφορμίου σε κάθε Falcon και έγινε καλή ανακίνηση του κάθε δείγματος με συσκευή Vortex.
- Με τη χρήση μικροπιπέτας, τοποθετήθηκε από το κάθε δείγμα σταγόνα όγκου 10 μL στην αντίστοιχη θέση φόρτωσης που είχε οριστεί πάνω στην πλάκα TLC (Εικόνα 26).
- Ακολούθως η πλάκα TLC, μεταφέρθηκε μέσα στο γυάλινο δοχείο χρωματογραφίας, το οποίο περιείχε το μείγμα χρωματογράφησης που αποτελείται από 96 mL διαιθυλαιθέρα, 3 mL μεθανόλη και 1 mL απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Το δοχείο κλείστηκε αεροστεγώς με γυάλινο καπάκι ενώ για την αποφυγή εξάτμισης των οργανικών διαλυτών τοποθετήθηκε βαζελίνη στα σημεία επαφής του δοχείου και της

γυάλινης πλάκας, με στόχο την αποφυγή εξάτμισης των οργανικών διαλυτών. Η πλάκα TLC παρέμεινε στο δοχείο για περίπου 40-60min, μέχρι το διάλυμα να φθάσει σε απόσταση 13 cm από τη γραμμή τοποθέτησης των δειγμάτων.

- Η πλάκα TLC αφαιρέθηκε και αφέθηκε για 5min στην απαγωγό εστία, έως να εξατμιστούν οι διαλύτες και να στεγνώσει. Τέλος, έγινε παρατήρηση των αποτελεσμάτων της TLC σε συνθήκες σκότους και με τη χρήση λάμπας υπεριώθρου φωτός - UV (450 nm).

Οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν εξ'ολοκλήρου μέσα στην απαγωγό εστίας και με την τήρηση των κανόνων ασφαλείας.



Εικόνα 26: Καθορισμός θέσεων και τοποθέτηση των δειγμάτων στο TLC plate.

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

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δύο αφλατοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus*. Πρόκειται για τα AAF24 και BAF47, δύο ισχυρά τοξικογόνα στελέχη που απομονώθηκαν το πρώτο από την Καρδίτσα και το δεύτερο από την περιοχή Λασπόλουτρα της Δράμας. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 63 μη τοξικογόνες απομονώσεις που προέκυψαν από την ανάλυση της προηγούμενης παραγράφου. Οι μη τοξικογόνες απομονώσεις αξιολογήθηκαν σε συγκαλλιέργεια, ως προς την ικανότητά τους να μειώνουν τις παραγόμενες αφλατοξίνες των δύο τοξικογόνων στελεχών.

Τα δύο τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* καθώς και όλα τα μη τοξικογόνα στελέχη εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) και επώαστηκαν για 5 ημέρες σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με σταθερή θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 10 ωρών.

Ακολούθησε συλλογή των κονιδίων όλων των στελεχών σε φιαλίδια Eppendorf που περιέχουν 1.400 μ L δις απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Οι συγκεντρώσεις τους μετρήθηκαν με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου. Για κάθε μη τοξικογόνο στέλεχος προστέθηκε υδατικό αιώρημα κονιδίων του, συγκέντρωσης 10^6 κονίδια/mL, μαζί με υδατικό αιώρημα κονιδίων του καθενός από τα 2 τοξικογόνα στελέχη (AAF24 και BAF47) σε συγκέντρωση 10^6 κονίδια/mL, σε 10 mL τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα CCA (0,7% άγαρ) που διατηρείτο σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 55 °C. Ύστερα από ανάδευση το μείγμα 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 των κονιδίων του καθενός από τα δύο τοξικογόνα στελέχη *A. flavus* με τελική συγκέντρωση 10^6 κονίδια/mL.

Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε μη τοξικογόνο στέλεχος για τα δύο πειράματα, δηλαδή των 63 μη τοξικογόνων απομονώσεων με το τοξικογόνο στέλεχος AAF24 και των 63 μη τοξικογόνων απομονώσεων με το τοξικογόνο στέλεχος BAF47. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 28°C και υπό συνθήκες σκότους για 12 ημέρες.

Μετά το πέρας της περιόδου επώασης των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε έλεγχος της παραγωγής των αφλατοξινών σε ποιοτικό επίπεδο 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 προηγουμένως. Με βάση τα αποτελέσματα χρωματογραφίας στις πλάκες TLC, προέκυψαν οι αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις που προκάλεσαν σημαντική μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών από τα δύο τοξικογόνα στελέχη.

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

Από την προηγούμενη ενότητα κατά την *in vitro* αξιολόγηση προέκυψαν ορισμένες αποτελεσματικές ενδημικές μη τοξικογόνες απομονώσεις. Οι αποτελεσματικές αυτές απομονώσεις αξιολογήθηκαν σε πειράματα έναντι των παραγόμενων αφλατοξινών των δύο ισχυρά τοξικογόνων στελεχών AAF24 και BAF47, σε σπόρους καλαμποκιού *in situ*.

Για αυτό το σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα καθαροί σπόροι καλαμποκιού, οι οποίοι αρχικά αποστειρώθηκαν επιφανειακά για 11 λεπτά με εμβάπτιση σε υποχλωριώδες νάτριο (υδατικό διάλυμα 10% διαθέσιμου εμπορικού χλωρίου) και στη συνέχεια σε 70% αιθανόλης για 6 λεπτά, και τέλος ακολούθησε έκπλυση με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (Εικόνα 27). Ύστερα, τα καλαμπόκια τυλίχτηκαν σε αποστειρωμένα φύλλα χαρτιού Whatman μέχρι να στεγνώσουν πλήρως. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες φιάλες Erlenmeyer 250 mL μαζί με 35 mL αποστειρωμένο απιονισμένο νερό τροποποιημένο με 0,01% Tween20® όπου εμβολιάστηκαν με 10^6 κονίδια/mL του κάθε τοξικογόνου στελέχους και 10^6 κονίδια/mL του κάθε μη τοξικογόνου στελέχους (Εικόνα 28). 30 σπόροι καλαμποκιού τοποθετήθηκαν σε κάθε φιάλη Erlenmeyer και επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 28 °C σε περιστροφικό επωαστήρα στις 150 στροφές το λεπτό (RPM).



Εικόνα 27: Επιφανειακή αποστείρωση σπόρων καλαμποκιού σε υποχλωριώδες νάτριο, στη συνέχεια σε 70% αιθανόλης και έκπτυση με νερό.

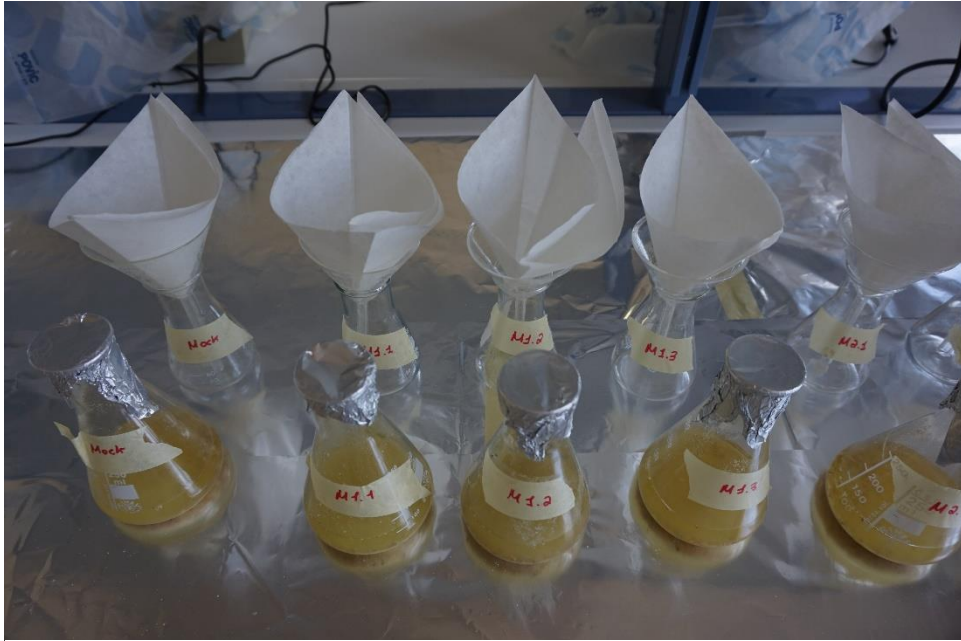


Εικόνα 28: Εμβολιασμός σπόρων με μίγμα κονιδίων σε φιάλες Erlenmeyer μαζί με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό τροποποιημένο με 0,01% Tween20®.

Τέλος, οι σπόροι του καλαμποκιού τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία. Από τους 30 σπόρους, 10 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 πλαστικό μικρό σκεύος όπου τοποθετήθηκαν 2 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού, για διατήρηση υψηλής υγρασίας κατά την επώαση. Τα τρυβλία με τα καλαμπόκια στη συνέχεια επώαστηκαν για 7 ημέρες σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 28 °C και υπό συνθήκες σκότους. Για τη δημιουργία των δύο μαρτύρων, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία χωρίς την προσθήκη κονιδίων μη τοξικογόνου στελέχους, οπότε έγινε μόλυνση μόνο με τα δύο τοξικογόνα στελέχη AAF24 και BAF47 ξεχωριστά.

Μετά τις 7 ημέρες επώασης, οι 30 καρποί που αντιστοιχούσαν στο σύνολο των 3 επαναλήψεων κάθε εφαρμογής μη τοξικογόνου στελέχους και οι μάρτυρες κονιορτοποιήθηκαν και ομογενοποιήθηκαν. Πριν την εκχύλιση των αφλατοξινών, τα καλαμπόκια συλλέχθηκαν από τα τρυβλία σε σωληνάρια Falcon και τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε καταψύκτη στους -20°C, ώστε να διευκολυνθεί η κονιορτοποίησή τους και η καλή ανάμιξη του δείγματος με το διαλύτη για την βέλτιστη δυνατή εξαγωγή αφλατοξινών.

Την επόμενη ημέρα, κονιορτοποιήθηκαν σε μύλο και ζυγίστηκαν 5g από κάθε δείγμα για εξαγωγή ολικών αφλατοξινών. Σε αποστειρωμένες Erlenmeyer Flasks 100 mL, τοποθετήθηκαν 5g κονιορτοποιημένων καλαμποκιών από κάθε δείγμα μαζί με 25mL διαλύματος μεθανόλης 70% (70 μεθανόλη: 30 απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό). Στη συνέχεια, σε περιστροφικό επωαστήρα στις 150 στροφές το λεπτό (RPM) σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιήθηκε η ομογενοποίηση τους για 3 λεπτά. Τέλος, ακολούθησε διήθηση των δειγμάτων με χρήση διηθητικού χαρτιού Whatman No. 1 και χρήση γυάλινης χοάνης, ώστε να γίνει η συλλογή του διηθήματος (Εικόνα 29). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.



Εικόνα 29: Διήθηση των δειγμάτων των κονιορτοποιημένων καλαμποκιών σε διάλυμα μεθανόλης για εξαγωγή ολικών αφλατοξινών.

Η ανάλυση των παραχθέντων αφλατοξινών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA με χρήση ποσοτικού κιτ προσδιορισμού ELISA AgraQuant® Aflatoxin Test Kit 4-40 ppb της εταιρείας Romer labs. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η προσαρμογή του pH των δειγμάτων με τη χρήση ειδικών πεχαμετρικών χαρτιών ώστε να κυμαίνεται μεταξύ στο εύρος που ορίζει το πρωτόκολλο και έπειτα ακολουθήθηκαν τα βήματα με βάση τις οδηγίες του kit. 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.

3.2.4 Ομαδοποίηση απομονώσεων του μύκητα σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups)

Από τα πειράματα ανταγωνισμού τόσο *in vitro*, όσο και *in situ*, προέκυψαν ορισμένες μη τοξικογόνες απομονώσεις του μύκητα που κατάφεραν να μειώσουν αποτελεσματικά τις παραγόμενες αφλατοξίνες από τα δύο ισχυρά τοξικογόνα στελέχη. Στο παρόν κεφάλαιο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ομαδοποίησης των απομονώσεων σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (VCGs) με σκοπό να επιλεγθεί η κατάλληλη ή οι κατάλληλες απομονώσεις που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια του καλαμποκιού.

3.2.5 Μεταλλαξογένεση και επιλογή των απομονώσεων *Aspergillus flavus* σε θρεπτικό υπόστρωμα SEL για παραγωγή αυξοτροφικών μεταλλάξεων (Nit⁻ mutants)

Για τη δημιουργία των μεταλλάξεων Nit⁻ (nitrate non utilizing mutants), χρησιμοποιήθηκαν οι 63 μη τοξικογόνες απομονώσεις από τη συλλογή καθώς και το ισχυρά τοξικογόνο στέλεχος BAF47 που αναφέρθηκε προηγουμένως. Οι απομονώσεις αντλήθηκαν από τα αποθηκευμένα φιαλίδια erpendorf (stock) της συλλογής και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε SEL agar υπόστρωμα (selection medium for auxotrophic mutant generation). Αρχικά, στα τρυβλία με SEL δημιουργήθηκε με τη χρήση αποστειρωμένου φελλοτρυπητήρα ένα κεντρικό βοθρίο διαμέτρου περίπου 0,5 cm. Έπειτα, με χρήση μικροπιπέττας έγινε έγχυση 15 μl εναιωρήματος κονιδίων της κάθε απομόνωσης μέσα στο κάθε βοθρίο. Τα εμβολιασμένα τρυβλία επώαστηκαν σε συνθήκες σκότους, θερμοκρασίας 30°C, 80% σχετικής υγρασίας, για περίπου 1-3 βδομάδες, μέχρι τη εμφάνιση ανθεκτικών απομονώσεων στα χλωρικά άλατα.

Με χρήση αποστειρωμένου φελλοτρυπητήρα, λήφθηκε από το SEL agar υπόστρωμα από το άκρο της αποικίας κάθε τμήμα που αναγνωρίστηκε ως πιθανή nit⁻ μεταλλάξεις και μεταφέρθηκε σε τρυβλίο με υπόστρωμα MIT agar (mutant culture and phenotyping media) με σκοπό την περαιτέρω ανάπτυξή τους. Η διάκριση των πιθανών μεταλλάξεων έγινε οπτικά μέσω μορφολογικών χαρακτηριστικών, καθώς παρουσιάζουν εικόνα «ιστού αράχνης». Τα

τρυβλία με MIT agar επώαστηκαν για 3 μέρες σε συνθήκες σκότους, θερμοκρασίας 30°C και 80% σχετικής υγρασίας.

3.2.6 Χαρακτηρισμός μεταλλαγών Nit⁻ των μυκήτων

Οι πιθανές μεταλλάξεις Nit⁻ που καλλιεργήθηκαν προηγουμένως στο MIT agar, στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν βάσει δοκιμών αύξησης (growth assays) του μύκητα σε τρία διαφορετικά υποστρώματα. Αρχικά, δοκιμάστηκαν σε υπόστρωμα Chapek-Dox-Agar (CZA) για επιβεβαίωση της αδυναμίας ανάπτυξης τους καθώς οι μεταλλάξεις Nit⁻ διακρίνονται από την αδυναμία ανάπτυξης τους στο συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό, το οποίο διαθέτει νιτρικά άλατα ως μοναδική πηγή αζώτου (Bayman & Cotty, 1991²⁵²).

Στη συνέχεια, κατατάχθηκαν στους εξής 3 τύπους μεταλλάξεων: *niaD*, *cnx*, *nirA* με δοκιμές αύξησης του μύκητα σε στερεά υποστρώματα, με μοναδικές πηγές αζώτου τα νιτρώδη ιόντα (Nitrate agar - NIT) στη μια περίπτωση και την υποξανθίνη (Hydroxanthine agar - HYP) στην άλλη. Συγκεκριμένα, ένα τμήμα μυκηλίου-agar από υπόστρωμα MIT του εκάστοτε μεταλλαγμένου στελέχους αποκόπηκε και μεταφέρθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα με τη χρήση TransferTube™, υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε συνθήκες σκότους, θερμοκρασίας 25°C και σχετικής υγρασίας άνω του 80% για 5 ημέρες. Ύστερα από την περίοδο επώασης, πραγματοποιήθηκε η κατάταξή των μεταλλαγών Nit⁻ στις τρεις συμπληρωματικές κλάσεις με συγκριτική αξιολόγηση της δυνατότητας ανάπτυξης τους στις δύο διαφορετικές πηγές αζώτου (Picot et al., 2017²⁶²).

3.2.7 Καλλιέργεια και αποθήκευση μεταλλαγών Nit⁻

Στη συνέχεια, ακολούθησε η αποθήκευση των κλάσεων (*niaD*, *cnx* και *nirA*) των μεταλλαγμένων στελεχών που προέκυψαν για κάθε απομόνωση του μύκητα από την αναπτυσσόμενη καλλιέργεια στο θρεπτικό υπόστρωμα V8 juice agar (V8) με σκοπό την σποριοποίηση και τη μετέπειτα αποθήκευσή τους. Πιο συγκεκριμένα, μεταφέρθηκε τμήμα από το υλικό MIT agar, με την χρήση TransferTube™ σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf που περιείχαν 1 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού, όπως έχει περιγραφεί και προηγουμένως. Έπειτα τα κονιδιακά εναιωρήματα αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο στους 4°C για μελλοντική χρήση.

3.2.8 Δοκιμές συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών Nit^- των μυκήτων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα - ομαδοποίηση στελεχών σε VCGs

Ο έλεγχος συμβατότητας έγινε μεταξύ των 63 μη τοξικογόνων στελεχών αλλά και του ισχυρά τοξικογόνου στελέχους, BAF47, που επελέγησαν για δοκιμές συμπληρωματικότητας. Οι δοκιμές συμπληρωματικότητας (complementation tests) μεταξύ των μεταλλαγών Nit^- πραγματοποιήθηκαν στο θρεπτικό υλικό Starch agar (Cotty & Taylor, 2003²⁶³). Αρχικά, σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Starch-agar, δημιουργήθηκαν βοθρία διαμέτρου 0,5cm με τη χρήση δις αποστειρωμένων TransferTube™, με απόσταση μεταξύ τους περίπου 2-3cm δημιουργώντας ένα ισόπλευρο τρίγωνο στο κέντρο του τριβλίου. Στη συνέχεια, με τη χρήση μικροπιπέτας έγινε στο 1^ο βοθρίο έγχυση ποσότητας 15 μl από το κονιδιακό εναιώρημα μιας *niaD* ή *nirA* μετάλλαξης ενός στελέχους και στο 2^ο βοθρίο έγινε έγχυση της ίδιας ποσότητας μιας *cnx* μετάλλαξης του ίδιου στελέχους. Τα δύο αυτά βοθρία αποτελούσαν το tester copy pair του πειράματος το οποίο και λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας καθώς αποτελούν μεταλλαγμένα στελέχη της ίδιας απομόνωσης αλλά διαφορετικής κλάσης και αναμένεται να δώσουν θετικό αποτέλεσμα στις δοκιμές συμπληρωματικότητας. Έπειτα, στο 3^ο βοθρίο, έγινε έγχυση ίδιας ποσότητας κονιδιακού εναιωρήματος του μεταλλαγμένου στελέχους του οποίου επρόκειτο να γίνει έλεγχος συμβατότητας με το στέλεχος του tester pair. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε ένα από τα 63 μη τοξικογόνα στελέχη αλλά και για το τοξικογόνο στέλεχος, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς με τα tester pairs που είχαν προκύψει.



Εικόνα 30: Τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Starch Agar. Στα δύο πάνω βοθρία κάθε τριβλίου έχει τοποθετηθεί το ζεύγος tester cory μίας απομόνωσης και παρατηρείται ύπαρξη ζώνης συμπληρωματικότητας ως θετικός μάρτυρας. Στο κάτω βοθρίο έχει τοποθετηθεί ένα μεταλλαγμένο στέλεχος, μιας προς μελέτη απομόνωσης. Στα δύο πάνω τριβλία δεν παρατηρείται δημιουργία ζώνης συμπληρωματικότητας μεταξύ των δύο διαφορετικών απομονώσεων, κατά συνέπεια δεν ανήκουν στο ίδιο VCG. Αντίθετα στα δύο κάτω τρυβλία παρατηρείται δημιουργία ζώνης συμπληρωματικότητας, επομένως οι δύο απομονώσεις ανήκουν στο ίδιο VCG.

Τα κονιδιακά εναιωρήματα των μεταλλάξεων αντλήθηκαν από το αποθηκευμένο stock που δημιουργήθηκε προηγουμένως, για όλα τα στελέχη και όλους τους τύπους μετάλλαξης τους. Στη συνέχεια, 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 3 ημέρες. Η δημιουργία ετεροκαρύου ήταν οπτικά εμφανής λόγω της χαρακτηριστικής μορφολογίας της ζώνης συμπληρωματικότητας πάνω στην οποία σχηματίζονταν σκληρώτια. Κατά συνέπεια, τα μεταλλαγμένα στελέχη μεταξύ των οποίων δημιουργήθηκε ζώνη συμπληρωματικότητας κατατάχθηκαν στην ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας, με αποτέλεσμα την ομαδοποίηση όλων των προς εξέταση απομονώσεων *A. flavus* σε VCGs (Εικόνα 30).

3.2.9 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, 35 μη τοξικογόνες απομονώσεις *A. flavus* επιλέχθηκαν προκειμένου να εφαρμοστούν σε φυτά καλαμποκιού, με σκοπό τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητάς τους στη μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών του ισχυρά αφλατοξικογόνου στελέχους BAF47 σε συνθήκες αγρού. Οι συγκεκριμένες απομονώσεις επιλέχθηκαν καθώς κατά τη διάρκεια των *in situ* πειραμάτων κατάφεραν να παρεμποδίσουν την παραγωγή αφλατοξινών σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα σε σχέση με τον μάρτυρα και επιπλέον βάσει των αποτελεσμάτων κατηγοριοποίησης σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας, η πλειοψηφία των απομονώσεων αυτών ανήκουν στις πολυπληθέστερες ομάδες μη τοξικογόνων στελεχών, γεγονός που υποδεικνύει την ευρεία προσαρμογή τους στις μελετώμενες περιοχές.

Η μελέτη διεξήχθη σε έναν αγρό 100 τ.μ. στο χώρο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε αρχικά η προετοιμασία του αγρού με κατάλληλες καλλιεργητικές τεχνικές (φρεζάρισμα, ισοπέδωση, εγκατάσταση αρδευτικού συστήματος, προφυτρωτική ζιζανιοκτονία), ακολούθησε η σπορά του καλαμποκιού σε 15 σειρές αποτελούμενες από περίπου 20 φυτά/σειρά και αποστάσεις σποράς 14cm, ενώ εφαρμόστηκε η κατάλληλη λίπανση και ζιζανιοκτονία καθόλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Η μόλυνση με τον αφλατοξικογόνο μύκητα και η εφαρμογή μη τοξικογόνων στελεχών προκλήθηκε τεχνητά, με χρήση σύριγγας. Συγκεκριμένα, κάθε μη

τοξικογόνο στέχος εφαρμόστηκε σε 6 φυτά αραβοσίτου που επιλέχθηκαν κατά τη δημιουργία του τυχαιοποιημένου πειραματικού σχεδίου του αγρού. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο στάδιο της πρώιμης ωρίμανσης των σπαδίκων, στα μέσα Ιουλίου.

Για τη δημιουργία του μολύσματος, τα μη τοξικογόνα στελέχη και το τοξικογόνο BAF47, καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες σε ικανοποιητικό αριθμό τρυβλίων με θρεπτικό υπόστρωμα PDA σε θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 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 τροποποιημένο με 0,01% Tween20®. Ως αποτέλεσμα, δημιουργήθηκε εναιώρημα (μίγματος) κονιδίων συγκέντρωσης 10^6 κονίδια/ ml^{-1} του κάθε μη τοξικογόνου στελέχους με το BAF47 αντίστοιχα. Κατά την διαδικασία της μόλυνσης, πραγματοποιήθηκε, με χρήση σύριγγας, έγχυση 5ml εναιωρήματος ανά σπάδικα, περίπου 2-3 ml στην κορυφή του σπάδικα και το υπόλοιπο σε διάφορα σημεία του σπάδικα περιφερειακά, τρυπώντας τα βράκτια φύλλα (Εικόνα 31 α,β). Τα φυτά που χαρακτηρίστηκαν ως μάρτυρες εμβολιάστηκαν με αντίστοιχο εναιώρημα κονιδίων μόνο του τοξικογόνου στελέχους BAF47.



Εικόνα 31α,β: Εμβολιασμός των σπαδίκων με εναιώρημα (μίγμα) κονιδίων, με χρήση σύριγγας.



Εικόνα 32: Συγκομιδή κατά την ξήρανση των σπαδίκων.

Η συγκομιδή των σπαδίκων των καλαμποκιών διεξήχθη σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Ευρωπαϊκής Ένωσης που ορίζει τις μεθόδους και τους κανόνες δειγματοληψίας, στα τέλη Σεπτεμβρίου, όταν είχε πλέον επέλθει η ξήρανση των σπαδίκων και φυτικών στελεχών (Εικόνα 32). Κατά τη συγκομιδή δημιουργήθηκαν ομαδοποιήσεις (rools) σπαδίκων ανά δύο φυτά, δηλαδή 3 rools/ επέμβαση.

Τα καλαμπόκια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου της Αθήνας, όπου και αποθηκεύτηκαν για ένα σύντομο χρονικό διάστημα στους 4°C για την περαιτέρω ανάπτυξη του μύκητα. Έπειτα,

πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση των σπόρων από τους σπάδικες με τη χρήση ειδικού μηχανήματος του Εργαστηρίου Γεωργίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ακολούθησε η κονιορτοποίηση και ομογενοποίησή τους. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση με τη χρήση 70% μεθανόλης και η ανάλυση των αφλατοξινών με τη μέθοδο ELISA με χρήση ποσοτικού κιτ προσδιορισμού ELISA AgraQuant® Aflatoxin Test Kit 4-40 ppb, όπως περιεγράφηκαν στις οδηγίες του kit.



α.



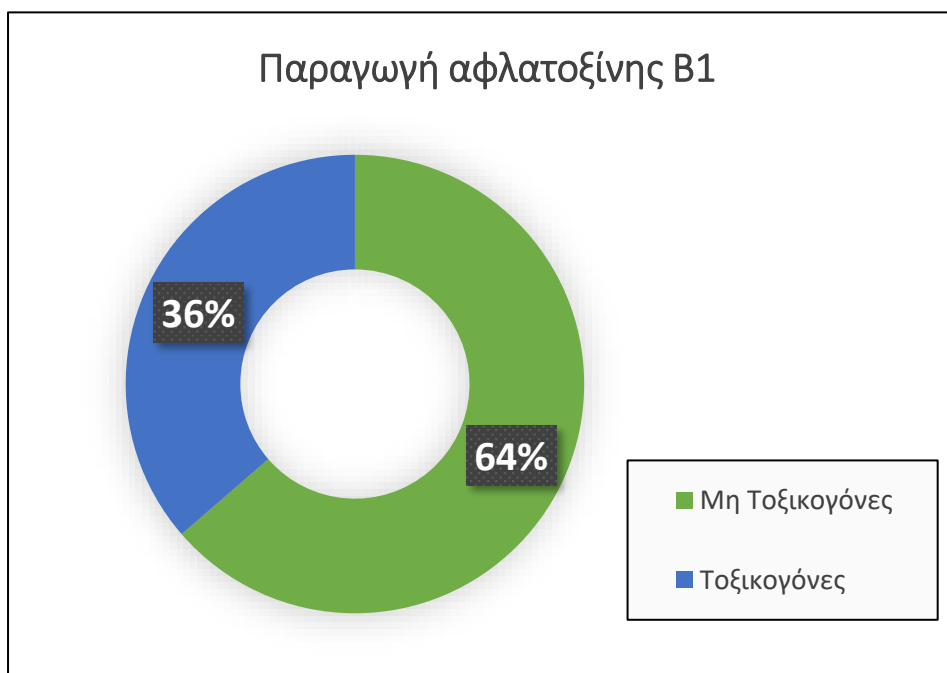
β.

Εικόνα 33α,β.: Ενδεικτικές φωτογραφίες των συγκομισμένων σπαδικών όπου φαίνεται η εξάνθηση του μύκητα *A. flavus* ύστερα από την τεχνητή μόλυνση στον αγρό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Έλεγχος της τοξικογόνου ικανότητας των απομονώσεων του μύκητα *Aspergillus flavus*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου TLC ο πληθυσμός των απομονώσεων παρουσίασε ποικιλομορφία ως προς την ικανότητα παραγωγής αφλατοξινών. Συγκεκριμένα, για τις 99 απομονώσεις, που αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να παράγουν αφλατοξίνη Β1, τα αποτελέσματα (Πίνακας 1.), υποδεικνύουν ότι 36 απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως τοξικογόνες, ενώ 63 απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως μη τοξικογόνες. Από αυτό, προκύπτει ότι περίπου το 36,4% των απομονώσεων μπορεί να παράξει αφλατοξίνη Β1 (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Αναλογία των απομονώσεων από βάση την τοξικογόνο ικανότητά τους, σε τοξικογόνες και μη τοξικογόνες.

Επιπλέον, η σύνθεση του πληθυσμού των τοξικογόνων απομονώσεων διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ετών. Από τις 37 απομονώσεις που αξιολογήθηκαν για το 2014, μόνο οι 8 αποδείχτηκαν τοξικογόνες σύμφωνα με τα αποτελέσματα της TLC. Αντίθετα, το 2016 είχε υψηλότερο αριθμό τοξικογόνων στελεχών με ποσοστό 45,2%, δηλαδή 28 από τις 62 απομονώσεις ήταν τοξικογόνες.

Έτος απομόνωσης	Περιοχή απομόνωσης	Στέλεχος	ΤΟΧ/-
2014	LARISSA	AAF1	-
	KARDITSA	AAF2	ΤΟΧ
	SERRES	AAF3	-
	KARDITSA	AAF4	-
	KARDITSA	AAF5	ΤΟΧ
	SERRES	AAF6	ΤΟΧ
	KARDITSA	AAF7	-
	DRAMA	AAF8	-
	KAVALA	AAF9	ΤΟΧ
	KAVALA	AAF10	-
	SERRES	AAF11	-
	KARDITSA	AAF12	-
	SERRES	AAF13	-
	DRAMA	AAF14	-
	TRIKALA	AAF15	-
	KARDITSA	AAF17	-
	KARDITSA	AAF18	ΤΟΧ
	KARDITSA	AAF19	ΤΟΧ
	TRIKALA	AAF20	ΤΟΧ
	TRIKALA	AAF21	-
	SERRES	AAF22	-
	SERRES	AAF23	-
	KARDITSA	AAF24	ΤΟΧ
	SERRES	AAF25	-
	LARISSA	AAF26	-
	KAVALA	AAF27	-
	KAVALA	AAF28	-
	KAVALA	AAF29	-
	SERRES	AAF30	-
	SERRES	AAF31	-
	SERRES	AAF32	-
	SERRES	AAF33	-
	SERRES	AAF34	-
	SERRES	AAF35	-
	SERRES	AAF36	-
	SERRES	AAF37	-
	KAVALA	AAF38	-

Πίνακας 1α.

2016	KARDITSA (Mirina)	BAF2	-
	KARDITSA (Mirina)	BAF3	-
	KARDITSA (Agiopigi)	BAF4	-
	KARDITSA (Agiopigi)	BAF5	-
	KARDITSA (Agiopigi)	BAF6	TOX
	KARDITSA (Agiopigi)	BAF7	TOX
	KARDITSA (Agiopigi)	BAF8	TOX
	KARDITSA (Agiopigi)	BAF9	-
	KARDITSA (Kallifonio)	BAF10	-
	KARDITSA (Zaimi)	BAF11	-
	KARDITSA (Zaimi)	BAF12	-
	KARDITSA (Kallifonio)	BAF13	-
	TRIKALA (Loggos)	BAF14	TOX
	TRIKALA	BAF15	TOX
	KARDITSA (Kallifonio)	BAF16	TOX
	TRIKALA (Kalabaka)	BAF17	-
	LARISSA (Pyrgetos)	BAF18	-
	TRIKALA	BAF19	TOX
	LARISSA (Pyrgetos)	BAF20	TOX
	LARISSA (Pyrgetos)	BAF21	-
	LARISSA (Pyrgetos)	BAF22	-
	LARISSA (Pyrgetos)	BAF23	-
	LARISSA (Pyrgetos)	BAF24	-
	KAVALA (N.Karia-Nestos)	BAF25	-
	LARISSA (Pyrgetos)	BAF26	-
	KAVALA (N.Karia-Nestos)	BAF27	-
	KAVALA (Karies)	BAF28	TOX
	KAVALA (Karies)	BAF29	-
	KAVALA (Karies)	BAF30	-
	KAVALA (Karies)	BAF31	TOX
	LARISSA (Pyrgetos)	BAF32	TOX
	KAVALA (Karies)	BAF33	TOX
	KAVALA (Karies)	BAF34	TOX
	DRAMA (Kalamonas)	BAF37	-
	DRAMA (Kalamonas)	BAF38	-
	DRAMA (Laspouloutra)	BAF40	-
	DRAMA (Laspouloutra)	BAF41	-
	DRAMA (Nerofraktes)	BAF43	TOX
	SERRES (Kato Kamila)	BAF44	TOX
	DRAMA (Mikrokabos)	BAF45	TOX
	SERRES (Dimitritsi)	BAF46	-
	DRAMA (Laspouloutra)	BAF47	TOX
	KAVALA (Mousteni)	BAF50	TOX
	SERRES (Skoutari)	BAF51	-
	SERRES (Kato Kamila)	BAF52	-
	VOLOS (Aidini)	BAF54	TOX
	SERRES (Dimitritsi)	BAF55	-
	SERRES (Anagennisi)	BAF56	TOX
	SERRES (Valtero)	BAF57	-
	SERRES (Valtero)	BAF58	-
	SERRES (Valtero)	BAF59	TOX
	SERRES (Valtero)	BAF60	TOX
	SERRES (Skotousa)	BAF61	TOX

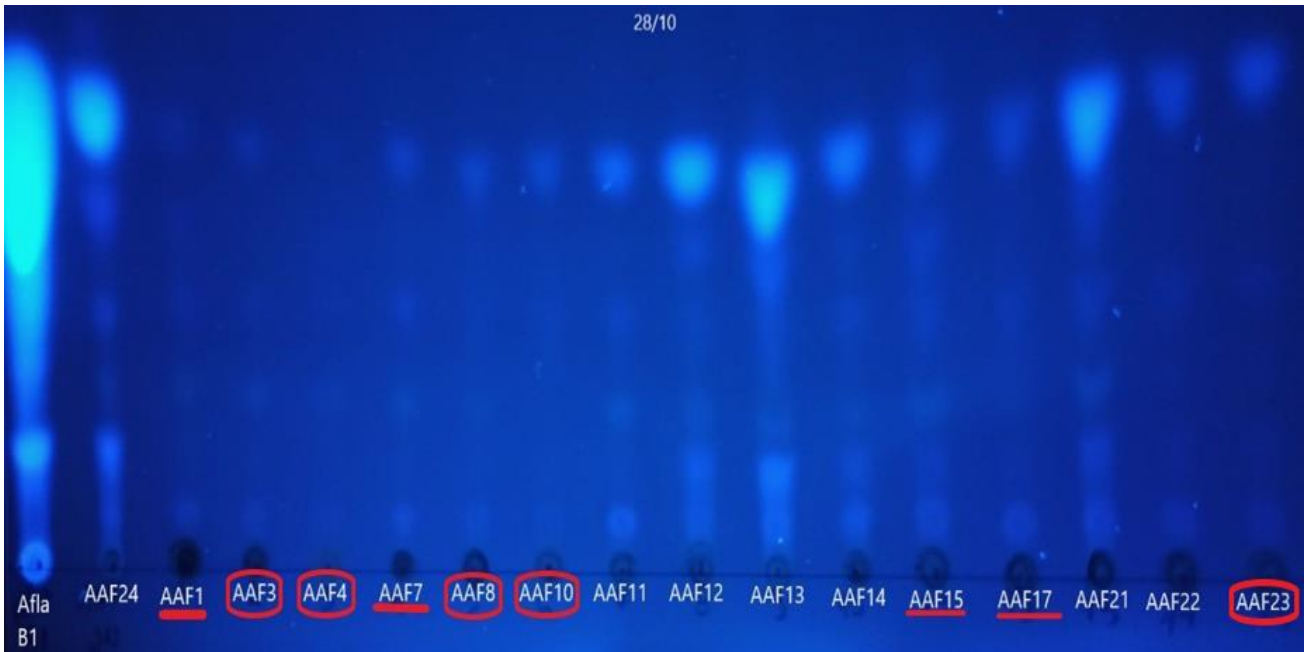
Πίνακας 1β.

Πίνακας 1α,β.: Παρουσιάζεται η αξιολόγηση των 99 απομονώσεων *A.flavus* βάσει της τοξικογόνου ικανότητάς τους (TOX/ -) αλλά και το έτος και περιοχή απομόνωσης και ονομασία του εκάστοτε στελέχους.

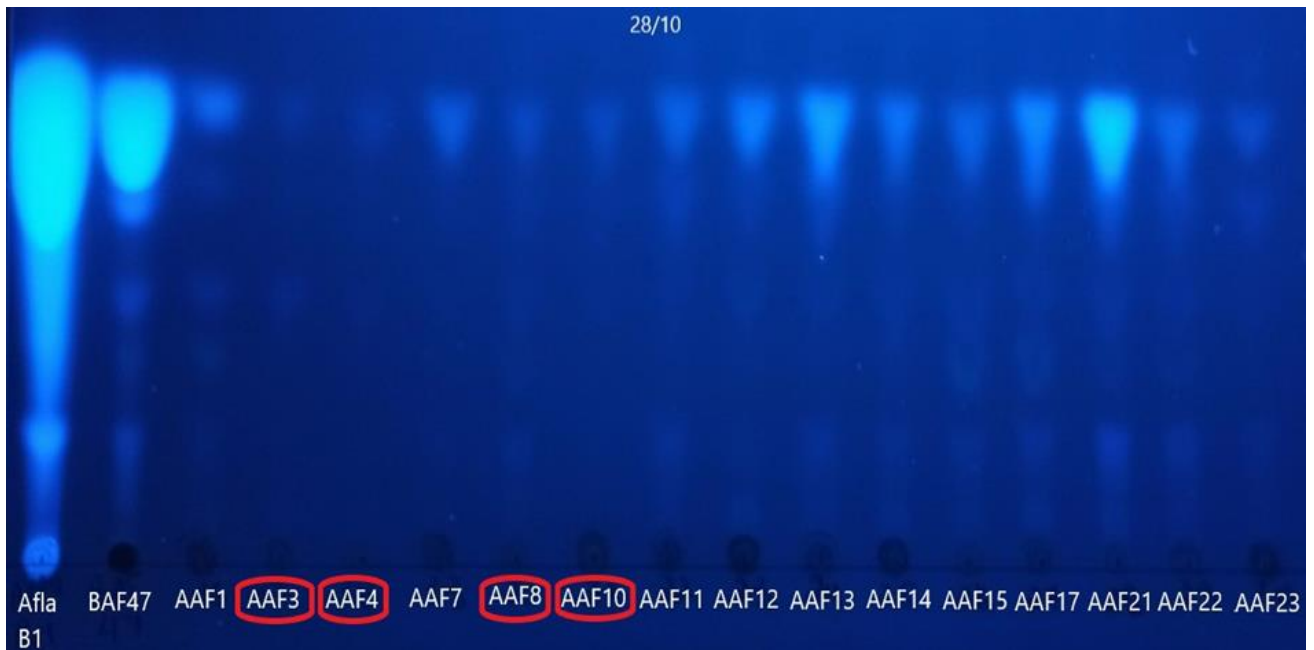
4.2 Αξιολόγηση της *in vitro* επίδρασης των μη τοξικογόνων απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών του μύκητα *Aspergillus flavus*

Προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των μη τοξικογόνων απομονώσεων να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών δύο ισχυρά τοξικογόνων στελεχών, AAF24 και BAF47, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα συγκαλλιέργειας σε CCA και ακολούθησε εξαγωγή των αφλατοξινών και ανάλυση με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Από τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας διαπιστώθηκε πως αρκετές μη τοξικογόνες απομονώσεις είχαν τη δυνατότητα να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών από το κάθε τοξικογόνο στέλεχος.

Παρατηρήθηκε ότι 34 εκ των 63, δηλαδή το 53,97% των μη τοξικογόνων απομονώσεων αποδείχθηκαν αρκετά αποτελεσματικές καθώς κατάφεραν να παρεμποδίσουν έως και πλήρως την παραγωγή αφλατοξίνης B1, σε συγκαλλιέργεια με το τοξικογόνο στέλεχος AAF24. Αντίστοιχα για το τοξικογόνο στέλεχος **BAF47, 13** απομονώσεις εκ των 63 μη τοξικογόνων κατάφεραν να παρεμποδίσουν έως και πλήρως την παραγωγή αφλατοξίνης B1, δηλαδή το **20,63%** των απομονώσεων. Από το σύνολο των 63 μη τοξικογόνων απομονώσεων, οι **38 (~60%)** έδειξαν να παρεμποδίζουν πλήρως ή σε υψηλό βαθμό τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών από τα δύο ισχυρά τοξικογόνα στελέχη AAF24 και BAF47. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) (Εικόνα 14).

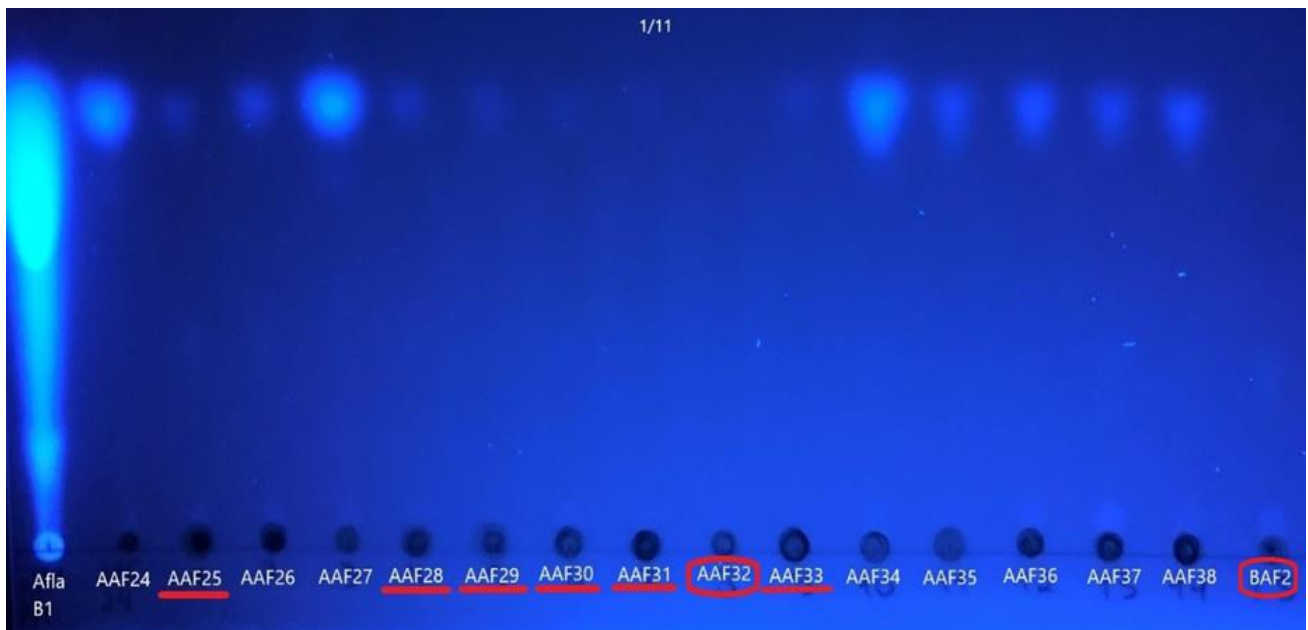


Εικόνα 34 α

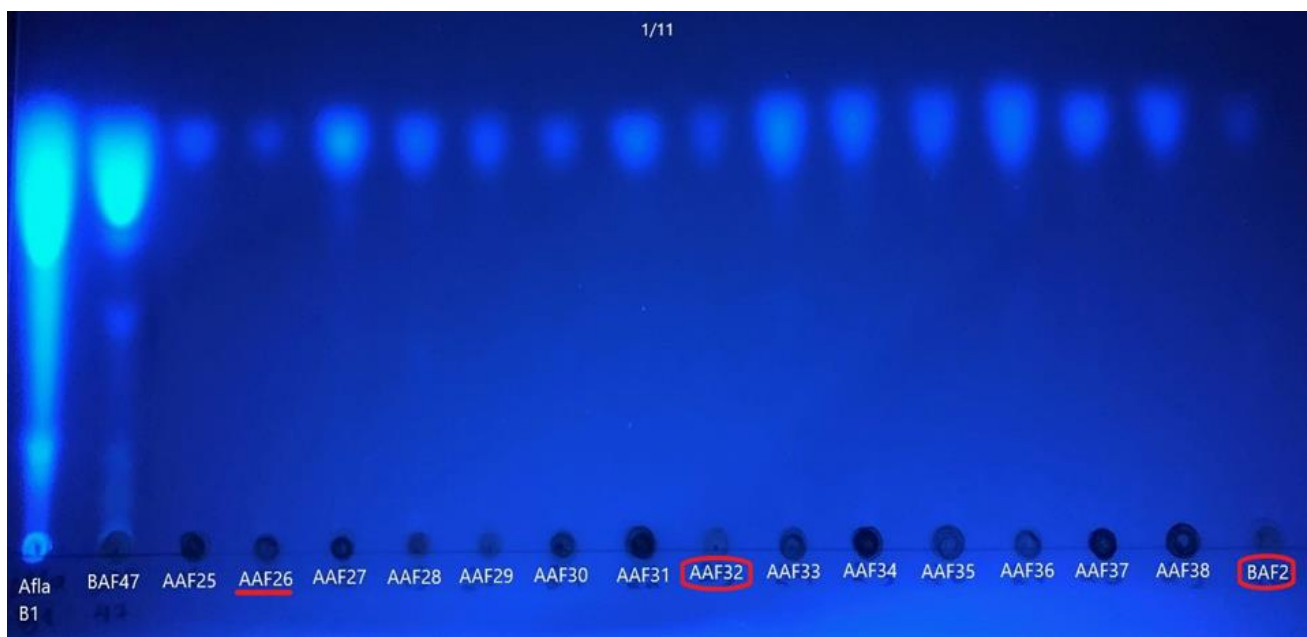


Εικόνα 34 β

Εικόνα 34 α,β: Αποτελέσματα χρωματογραφίας TLC. Κάθε φθορίζουσα ζώνη υποδεικνύει την παραγωγή αφλατοξίνης B1. Κάθετα παρουσιάζονται αρχικά η καθαρή αφλατοξίνη B1 (μάρτυρας), οι διαφορετικές μη-τοξικογόνες απομονώσεις σε συγκαλλιέργεια με το τοξικογόνο στέλεχος AAF24 (επάνω) και το BAF47 (κάτω).

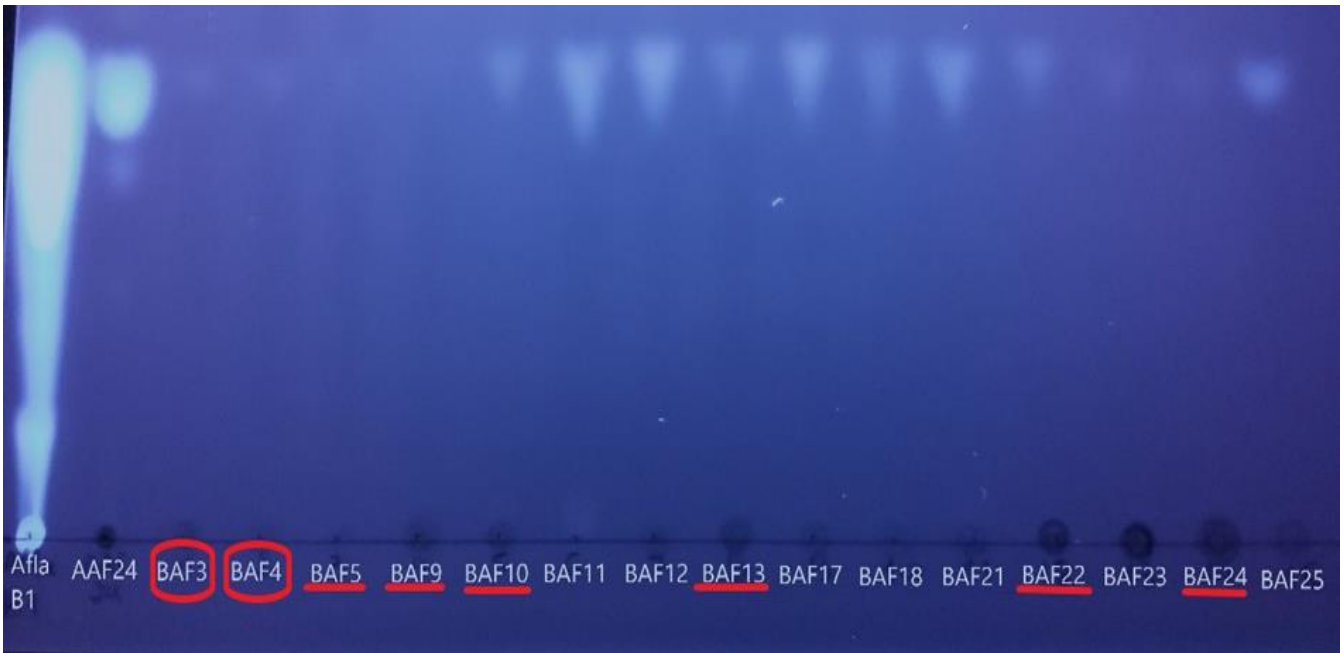


Εικόνα 34 γ

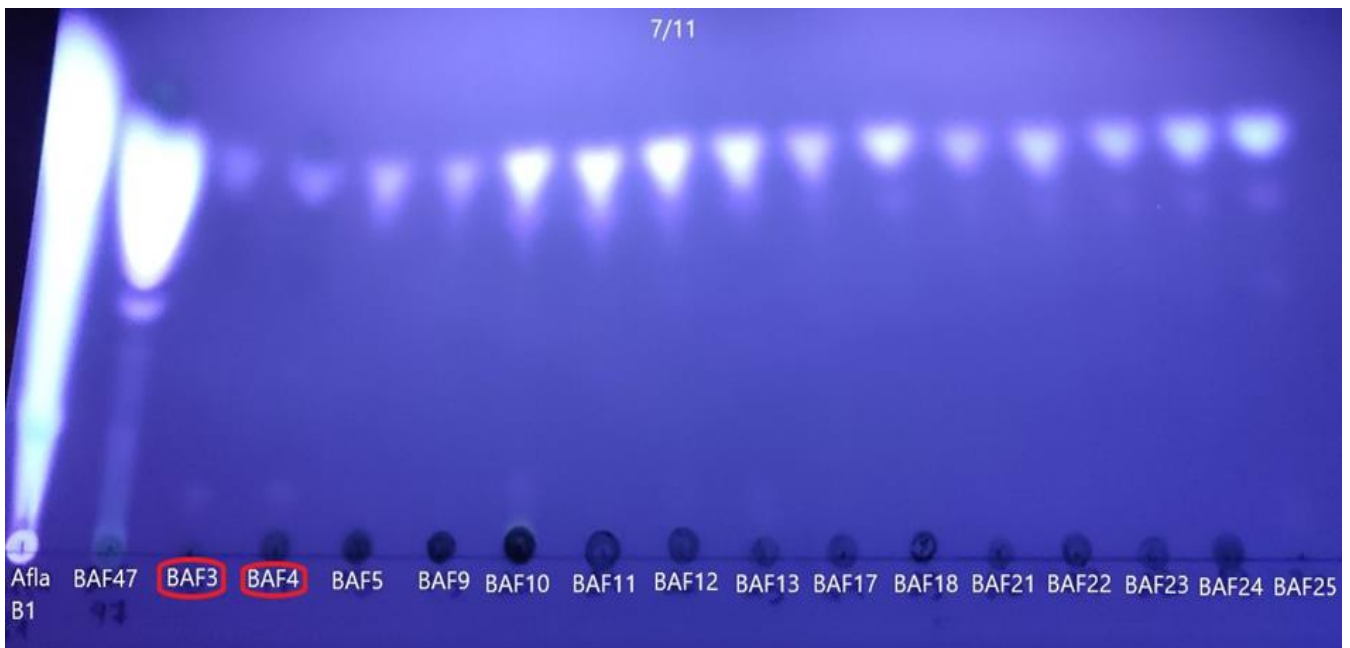


Εικόνα 34 δ

Εικόνα 34 γ,δ: Αποτελέσματα χρωματογραφίας TLC. Κάθε φθορίζουσα ζώνη υποδεικνύει την παραγωγή αφλατοξίνης B1. Κάθετα παρουσιάζονται αρχικά η καθαρή αφλατοξίνη B1 (μάρτυρας), οι διαφορετικές μη-τοξικογόνες απομονώσεις σε συγκαλλιέργεια με το τοξικογόνο στέλεχος AAF24 (επάνω) και το BAF47 (κάτω).

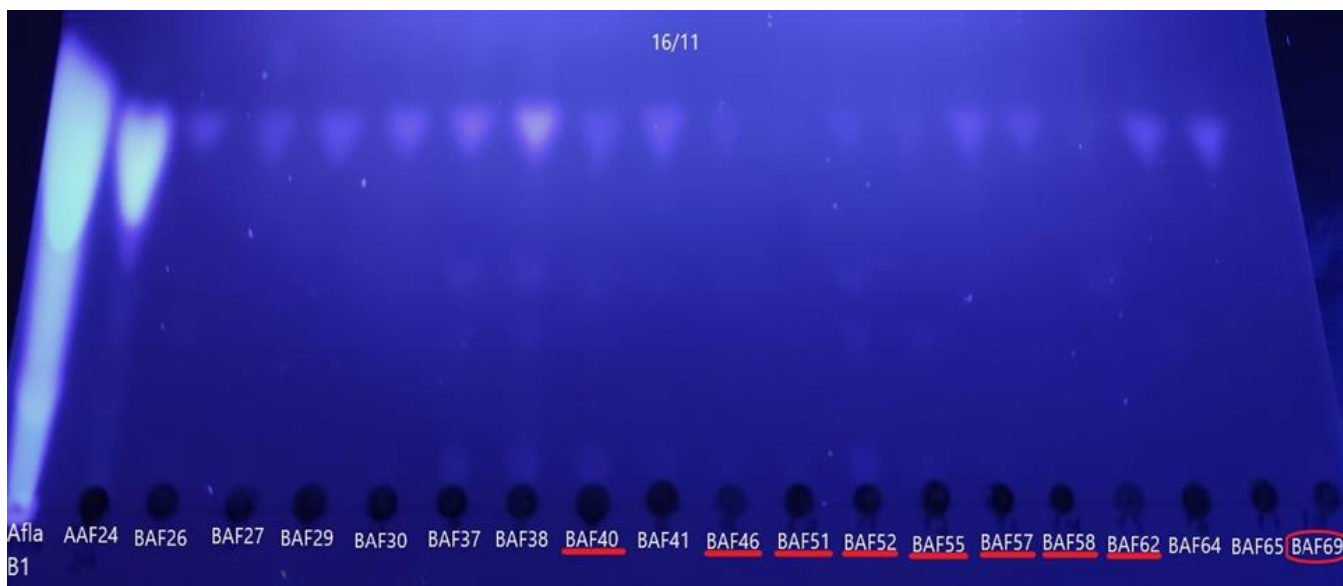


Εικόνα 34 ε

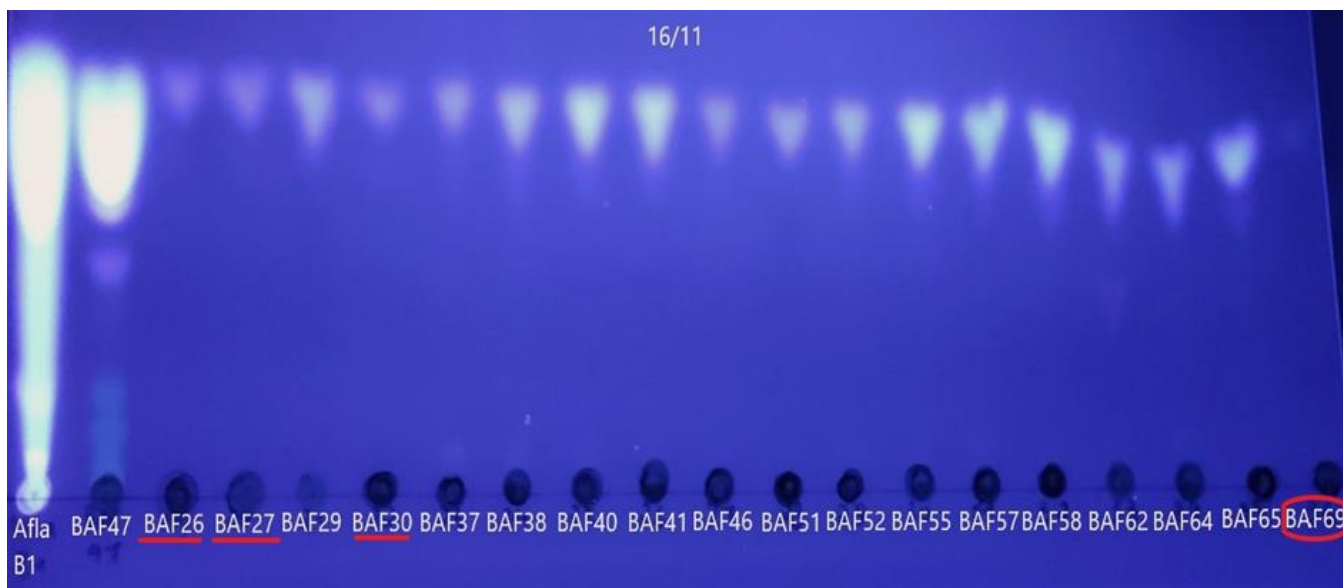


Εικόνα 34 στ

Εικόνα 34 ε,στ: Αποτελέσματα χρωματογραφίας TLC. Κάθε φθορίζουσα ζώνη υποδεικνύει την παραγωγή αφλατοξίνης B1. Κάθετα παρουσιάζονται αρχικά η καθαρή αφλατοξίνη B1 (μάρτυρας), οι διαφορετικές μη-τοξικογόνες απομονώσεις σε συγκαλλιέργεια με το τοξικογόνο στέλεχος AAF24 (επάνω) και το BAF47 (κάτω).



Εικόνα 34 ζ

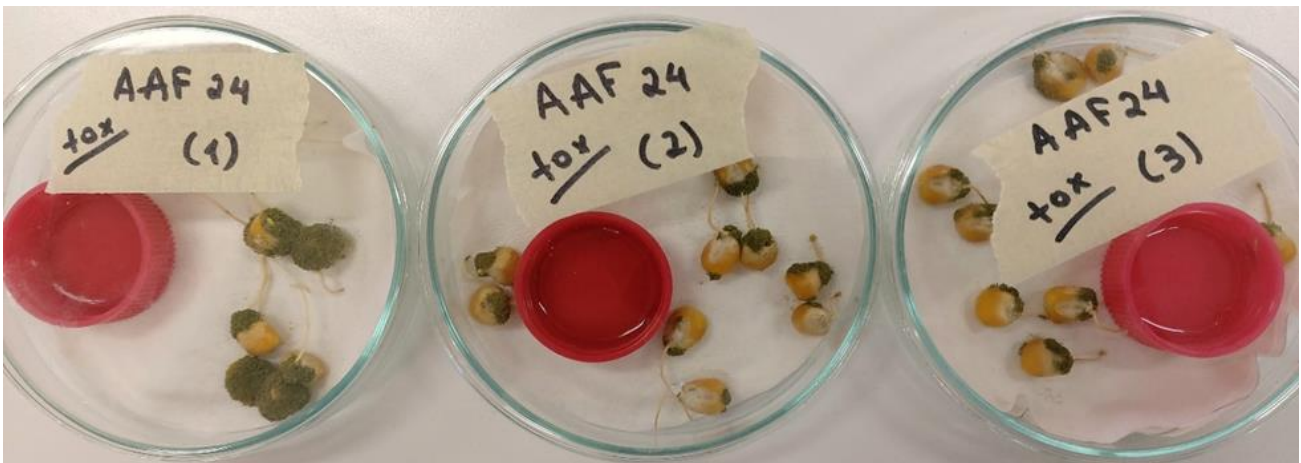


Εικόνα 34 η

Εικόνα 34 ζ,η: Αποτελέσματα χρωματογραφίας TLC. Κάθε φθορίζουσα ζώνη υποδεικνύει την παραγωγή αφλατοξίνης B1. Κάθετα παρουσιάζονται αρχικά η καθαρή αφλατοξίνη B1 (μάρτυρας), οι διαφορετικές μη-τοξικογόνες απομονώσεις σε συγκαλλιέργεια με το τοξικογόνο στέλεχος AAF24 (επάνω) και το BAF47 (κάτω).

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

Οι αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις που προέκυψαν κατά την *in vitro* αξιολόγηση σε θρεπτικό υπόστρωμα, αξιολογήθηκαν έναντι των παραγόμενων αφλατοξινών των δύο ισχυρά τοξικογόνων στελεχών AAF24 και BAF47, σε σπόρους καλαμποκιού *in situ*. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας, 32 μη τοξικογόνες απομονώσεις δοκιμάστηκαν στους σπόρους σε εφαρμογές μαζί με το τοξικογόνο στέλεχος AAF24, ενώ 13 με το BAF47. Η ανάλυση των παραχθέντων αφλατοξινών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA με χρήση ποσοτικού κιτ προσδιορισμού ELISA AgraQuant® Aflatoxin Test Kit 4-40 ppb και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες.



Εικόνα 35: Ενδεικτικά παρουσιάζονται οι 3 επαναλήψεις όπου έχει γίνει εφαρμογή μόνο του τοξικογόνου στελέχους AAF24, μετά την περίοδο επώασης 7 ημερών.

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων φαίνεται πως όλες οι μη τοξικογόνες απομονώσεις παρεμποδίζουν στατιστικά σημαντικά την παραγωγή αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος, σε ποσοστά έως και άνω του 98%, σε σχέση με τους μάρτυρες. Η παραγωγή των ολικών αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος AAF24, που αποτέλεσε το μάρτυρα των πειραμάτων ήταν 22.016,89 (μg/kg) για το πρώτο πείραμα (Πίνακας 2α) και 27.412,89 (μg/kg) για το δεύτερο πείραμα (Πίνακας 2β), ενώ του μάρτυρα BAF47 ήταν 30.712,02 (μg/kg). Η μη τοξικογόνος απομόνωση AAF10 μείωσε την παραγωγή αφλατοξινών του μάρτυρα AAF24 σε επίπεδο που άγγιξε το 96,2% και η BAF3 ήταν η αποτελεσματικότερη

για τον μάρτυρα BAF47, φθάνοντας ποσοστά μείωσης της τάξης του 98,7%. Παράλληλα, η BAF2 φάνηκε να είναι η αποτελεσματικότερη απομόνωση στην παρεμπόδιση παραγωγής αφλατοξινών και των δύο τοξικογόνων στελεχών. Συνεπώς, η *in vitro* ικανότητα των μη τοξικογόνων απομονώσεων να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών, επιβεβαιώθηκε για αρκετά στελέχη και *in situ*, σε σπόρους καλαμποκιού.

Πίνακας 2α,β.: Αξιολόγηση των μη τοξικογόνων απομονώσεων κατά των παραγόμενων αφλατοξινών σε σπόρους καλαμποκιού. Παρουσιάζονται τα παραχθέντα $\mu\text{g}/\text{kg}$ αφλατοξινών, 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 του τοξικογόνου στελέχους AAF24. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ($p < 0,05$).

Εφαρμογές	Αφλατοξίνη ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση (%)
AAF24	27412.89	h	1465.75	846.25	
AAF3+AAF24	1689.05	abc	50.80	29.33	93.84
AAF4+AAF24	2925.01	cd	372.05	214.80	89.33
AAF7+AAF24	8854.80	g	1520.62	877.93	67.70
AAF8+AAF24	2746.00	cd	347.13	200.42	89.98
AAF10+AAF24	1053.53	a	158.93	91.76	96.16
AAF15+AAF24	5144.82	e	573.10	330.88	81.23
AAF17+AAF24	4750.86	e	326.76	188.65	82.67
AAF25+AAF24	4940.16	e	59.04	34.09	81.98
AAF28+AAF24	1938.86	abc	361.54	208.73	92.93
AAF29+AAF24	5582.73	e	600.92	346.94	79.63
AAF30+AAF24	7299.88	f	389.92	225.12	73.37
AAF31+AAF24	3261.01	d	103.13	59.54	88.10
AAF32+AAF24	2610.72	bcd	216.17	124.81	90.48
AAF33+AAF24	5550.07	e	0.00	0.00	79.75
BAF2+AAF24	1038.90	a	305.64	176.46	96.21
BAF3+AAF24	1473.84	ab	84.44	48.75	94.62

Πίνακας 2α

Εφαρμογές	Αφλατοξίνη (μg/ kg)		Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση (%)
AAF24	22016.89	i	1318.26	761.10	
BAF4+AAF24	1973.10	a	40.33	23.29	91.04
BAF5+AAF24	4352.07	abcde	0.00	0.00	80.23
BAF9+AAF24	5931.87	cdefg	147.26	85.02	73.06
BAF10+AAF24	2449.46	a	83.79	48.38	88.87
BAF13+AAF24	2193.24	a	65.45	37.79	90.04
BAF22+AAF24	4963.45	bcdef	48.13	27.79	77.46
BAF24+AAF24	6933.11	fgh	0.00	0.00	68.51
BAF40+AAF24	4461.18	abcdef	223.86	129.25	79.74
BAF46+AAF24	5067.83	bcdef	0.00	0.00	76.98
BAF51+AAF24	7708.68	gh	138.29	79.84	64.99
BAF52+AAF24	7629.89	gh	1194.17	689.45	65.35
BAF55+AAF24	6387.37	efgh	175.83	101.52	70.99
BAF57+AAF24	3573.49	abc	4971.26	2870.16	83.77
BAF58+AAF24	6287.45	defgh	505.95	292.11	71.44
BAF62+AAF24	8474.30	h	0.00	0.00	61.51
BAF69+AAF24	7812.76	gh	285.48	164.82	64.51
AAF17+AAF24	3890.00	abcd	323.25	186.63	82.33
AAF25+AAF24	4428.57	abcde	36.73	21.20	79.89
AAF28+AAF24	2587.95	ab	10.55	6.09	88.25

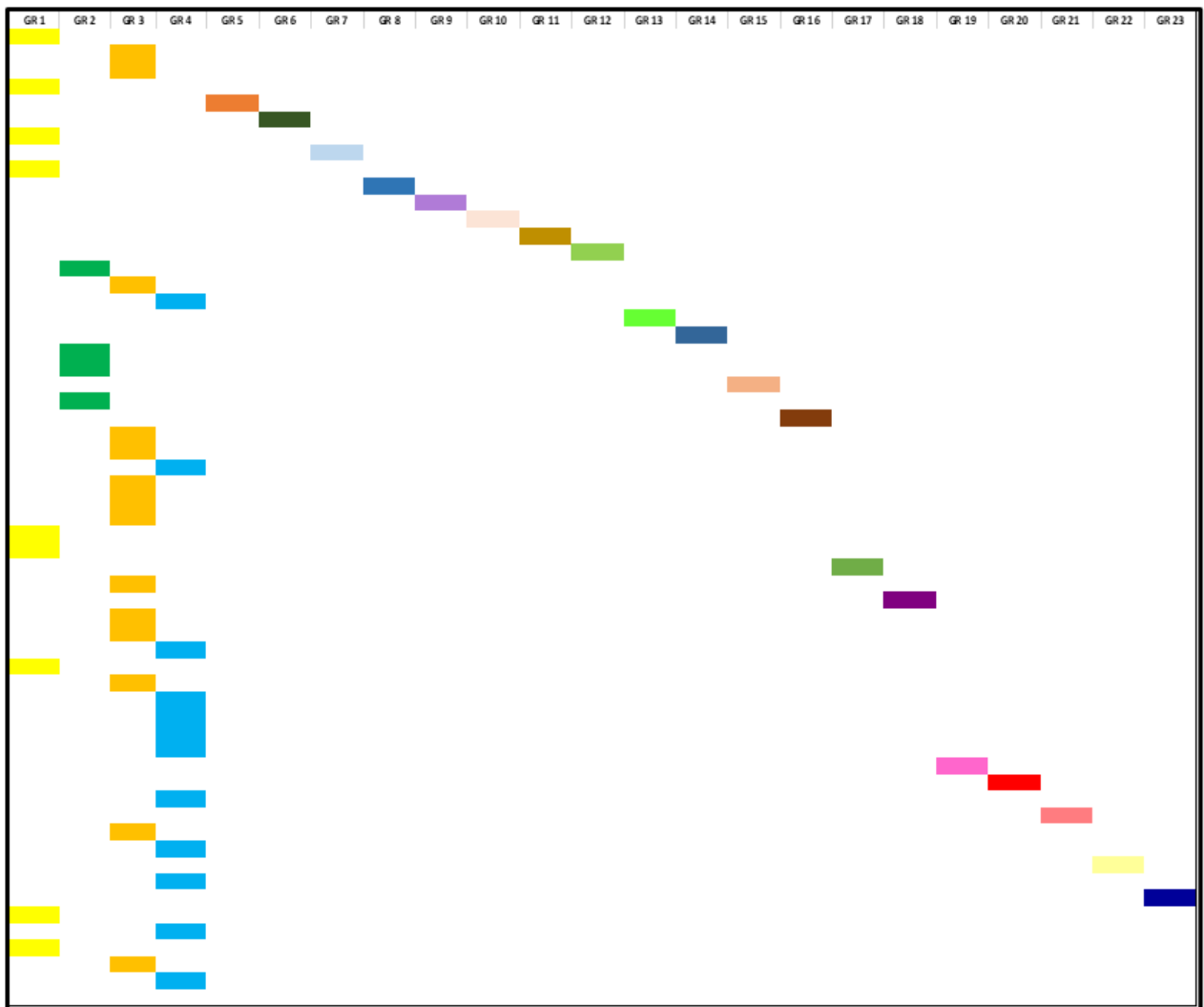
Πίνακας 26

Πίνακας 3.: Αξιολόγηση των μη τοξικογόνων απομονώσεων κατά των παραγόμενων αφλατοξινών σε σπόρους καλαμποκιού. Παρουσιάζονται τα παραχθέντα μg/kg αφλατοξινών, 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 του τοξικογόνου στελέχους BAF47. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ($p < 0,05$).

Εφαρμογές	Αφλατοξίνη (μg/ kg)		Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση (%)
BAF47	30712.02	h	683.52	394.63	
AAF3+BAF47	799.16	a	60.60	34.99	97.40
AAF4+BAF47	2941.29	c	72.00	41.57	90.42
AAF8+BAF47	2019.45	b	69.37	40.05	93.42
AAF10+BAF47	3742.94	d	73.13	42.22	87.81
AAF26+BAF47	961.34	a	116.80	67.43	96.87
AAF32+BAF47	1007.05	a	132.86	76.71	96.72
BAF2+BAF47	454.41	a	52.68	30.41	98.52
BAF3+BAF47	390.53	a	66.42	38.35	98.73
BAF4+BAF47	440.96	a	0.00	0.00	98.56
BAF26+BAF47	6393.34	e	740.72	427.65	79.18
BAF27+BAF47	10905.26	g	258.58	149.29	64.49
BAF30+BAF47	9147.56	f	166.29	96.01	70.22
BAF69+BAF47	4221.47	d	97.87	56.51	86.25

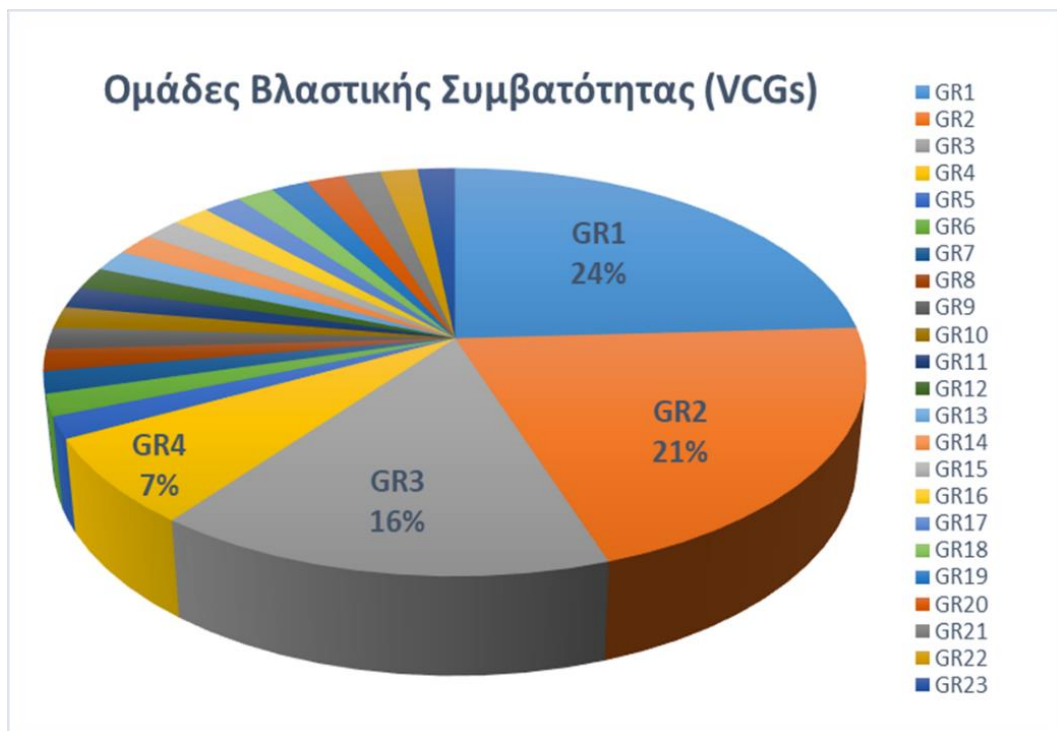
4. 4. Δημιουργία ομάδων βλαστικής συμβατότητας (VCGs)

Για την κατάταξη των επιλεγμένων απομονώσεων *Aspergillus section Flavi*, σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας (VCGs) πραγματοποιήθηκαν δοκιμές συμπληρωματικότητας όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως η ομαδοποίηση των απομονώσεων έγινε σε 24 ομάδες βλαστικής συμβατότητας. Όπως ήταν αναμενόμενο, η τοξικογόνος απομόνωση, BAF47, που δοκιμάστηκε άνηκε σε διακριτή ομάδα από αυτές των μη τοξικογόνων απομονώσεων, καθώς είναι γεγονός ότι δεν είναι δυνατή η ύπαρξη απομονώσεων με διαφορετικό προφίλ παραγωγής αφλατοξινών στην ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας. Κατά συνέπεια, οι μη τοξικογόνες απομονώσεις δεν δύνανται να είναι στην ίδια ομάδα με τοξικογόνες απομονώσεις.



Εικόνα 36: Χάρτης διασποράς των μη τοξικογόνων απομονώσεων του *A.flavus* στις 23 ομάδες βλαστικής συμβατότητας. Κάθετα και με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται οι διακριτές ομάδες VCGs και οριζόντια οι διαφορετικές απομονώσεις του μύκητα. Η κάθε χρωματισμένη ζώνη αντιστοιχεί σε διαφορετικό στέλεχος *A.flavus*.

Οι 19 εκ των 23 ομάδων, με μη τοξικογόνα στελέχη, που δημιουργήθηκαν αποτελούνταν από μία μοναδική μεμονωμένη απομόνωση (single groups) και κατά συνέπεια πρόκειται για ομάδες, των οποίων τα μέλη δεν φαίνεται να είναι προσαρμοσμένα στις καλλιέργειες καλαμποκιού στην Ελλάδα. Ως single groups, χαρακτηρίστηκαν οι ομάδες οι οποίες αποτελούνται από ένα και μόνο στέλεχος λόγω της ασυμβατότητας που έδειξαν σε συγκαλλιέργεια τους με οποιοδήποτε άλλο στέλεχος. Ωστόσο, η ομαδοποίηση των υπόλοιπων μη τοξικογόνων στελεχών έγινε σε 4 κύριες ομάδες, που περιλαμβάνουν περισσότερες από μία απομονώσεις, οι οποίες προέρχονται από διάφορες περιοχές τόσο της Μακεδονίας όσο και της Θεσσαλίας. Επομένως, βάσει της κατάταξης αυτής, η πλειοψηφία των μη τοξικογόνων απομονώσεων (~68% του συνόλου των μη τοξικογόνων απομονώσεων), φαίνεται ότι παρουσιάζουν υψηλή προσαρμοστικότητα στο ευρύτερο τοπικό περιβάλλον της χώρας. Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, θετικό για την βιολογική αντιμετώπιση αξιολογείται το γεγονός ότι οι περισσότερες απομονώσεις που αποδείχθηκαν αποτελεσματικότερες (παρεμπόδιση παραγωγής αφλατοξινών >90%) στα πειράματα *in situ* προηγουμένως, κατηγοριοποιήθηκαν στις 4 κύριες ομάδες VCG, οι οποίες είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένες στις τοπικές κλιματικές συνθήκες, όπως αποδεικνύεται από το μεγαλύτερο αριθμό απομονώσεων που βρέθηκαν να ανήκουν σε αυτές.



Διάγραμμα 2: Τα ποσοστά απομονώσεων εκ του συνόλου που ανήκουν σε κάθε ομάδα βλαστικής συμβατότητας. Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται οι 23 διακριτές ομάδες βλαστικής συμβατότητας.

4.5. Αξιολόγηση της επίδρασης μη τοξικογόνων απομονώσεων στην παραγωγή αφλατοξινών σε καλαμπόκι σε συνθήκες αγρού

Από τα αποτελέσματα αναλύσεως των καλαμποκιών που συλλέχθηκαν από τον αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη μόλυνση από αφλατοξίνες, προκύπτει πως στα φυτά του μάρτυρα (τοξικογόνο στέλεχος BAF47) οι τεχνητές μολύνσεις κυμάνθηκαν σε αρκετά υψηλά επίπεδα με $889,33 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Αντιθέτως, σε συνθήκες αγρού, η αποτελεσματικότητα των εφαρμοσμένων μη τοξικογόνων στελεχών *A.flavus* στην παρεμπόδιση παραγωγής αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος BAF47 παρουσίασε μια ευρεία παραλλακτικότητα. Τα ποσοστά παρεμπόδισης των αφλατοξινών από τα μη τοξικογόνα στελέχη κυμάνθηκαν από 38-100%, σε σχέση με το μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, 11 από τα 35 μη τοξικογόνα στελέχη που δοκιμάστηκαν στην πειραματική διαδικασία κατάφεραν να παρεμποδίσουν έως και πλήρως τη βιοσύνθεση αφλατοξινών από το τοξικογόνο στέλεχος, σε ποσοστά που υπερβαίνουν το 94.16 % φθάνοντας έως και 100 %. Βάσει των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων (Πίνακας 4), κρίνεται πως θα μπορούσαν μελλοντικά, ύστερα από περαιτέρω μελέτες, να αποτελέσουν πιθανούς βιολογικούς παράγοντες διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια του καλαμποκιού σε πλαίσιο ολοκληρωμένων συστημάτων διαχείρισης αφλατοξινών.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα αναλύσεων αφλατοξινών για τους σπάδικες καλαμποκιού που μολύνθηκαν τεχνητά στον αγρό του ΓΠΑ. Τα δείγματα συνοδεύονται από τυπική απόκλιση και τυπικό σφάλμα. Γραμμές που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή κατά Duncan ($p < 0,05$).

Εφαρμογές	Αφλατοξίνες mg/kg		Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Παρεμπόδιση (%)
BAF47	889.33	f	138.50	79.96	
AAF3+BAF47	230.20	abcde	109.87	63.44	74.11
AAF4+BAF47	0.00	a	143.38	82.78	100.00
AAF7+BAF47	460.71	de	88.71	51.22	48.20
AAF8+BAF47	452.82	cde	237.19	136.94	49.08
AAF10+BAF47	182.02	abcd	265.40	153.23	79.53
AAF15+BAF47	396.54	bcde	186.19	107.49	55.41
AAF17+BAF47	459.45	de	373.35	215.56	48.34
AAF25+BAF47	31.13	ab	247.94	143.15	96.50
AAF26+BAF47	372.71	abcde	254.29	146.81	58.09
AAF28+BAF47	47.49	abc	100.50	58.02	94.66
AAF29+BAF47	275.46	abcde	96.17	55.52	69.03
AAF30+BAF47	47.66	abc	180.04	103.94	94.64
AAF31+BAF47	0.00	a	97.62	56.36	100.00
AAF32+BAF47	17.87	ab	226.56	130.80	97.99
BAF2+BAF47	331.09	abcde	314.70	181.69	62.77
BAF3+BAF47	176.19	abcde	119.37	68.92	80.19
BAF4+BAF47	188.40	abcde	134.61	77.72	78.82
BAF5+BAF47	0.00	a	216.70	125.11	100.00
BAF51+BAF47	31.59	ab	273.88	158.13	96.45
BAF9+BAF47	327.94	abcde	376.82	217.56	63.13
BAF10+BAF47	442.32	de	129.68	74.87	50.26
BAF13+BAF47	312.79	abcde	55.55	32.07	64.83
BAF22+BAF47	0.00	a	0.00	0.00	100.00
BAF24+BAF47	51.95	abc	159.37	92.01	94.16
BAF26+BAF47	374.31	abcde	192.18	110.96	57.91
BAF27+BAF47	546.20	def	157.26	90.79	38.58
BAF30+BAF47	335.76	abcde	473.02	273.10	62.25
BAF40+BAF47	0.00	a	69.50	40.12	100.00
BAF46+BAF47	166.58	abcd	67.86	39.18	81.27
BAF52+BAF47	543.76	e	243.03	140.31	38.86
BAF55+BAF47	538.18	e	235.28	135.84	39.49
BAF57+BAF47	489.86	e	244.80	141.34	44.92
BAF58+BAF47	313.60	abce	253.64	146.44	64.74
BAF62+BAF47	418.17	cde	384.33	221.89	52.98
BAF69+BAF47	272.33	abdce	121.78	70.31	69.38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι αφλατοξίνες αποτελούν μια παγκόσμια ανησυχία τόσο για τη δημόσια υγεία όσο και την οικονομία, καθώς είναι υπεύθυνες για σημαντικά προβλήματα υγείας και οικονομικές απώλειες που επηρεάζουν τους καταναλωτές και τους αγρότες σε όλο τον κόσμο. Παρά τις μεθόδους πρόληψης και τους αυστηρούς κανονισμούς, οι μυκοτοξίνες που προέρχονται από είδη του γένους *Aspergillus* εξακολουθούν να υπάρχουν στις ζωοτροφές και την τροφική αλυσίδα, γεγονός που δικαιολογεί τη συνεχή παρακολούθηση των αφλατοξινών και την ενημέρωση της εκτίμησης κινδύνου. Η θέσπιση κανονισμών, η πρόληψη της μόλυνσης πριν και μετά τη συγκομιδή, η απολύμανση και η αποτοξικοποίηση έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της ανθρώπινης διατροφικής έκθεσης στην αφλατοξίνη. Ωστόσο, οι παγκόσμιες κλιματικές αλλαγές προκάλεσαν τη συχνότερη εμφάνιση του είδους *A. flavus* και σε περιοχές που γενικά χαρακτηρίζονται από τον χαμηλό κίνδυνο μόλυνσης (Medina et al., 2014 ²⁶⁴).

Την περασμένη δεκαετία, πολλές περιπτώσεις επομόλυνσης τροφίμων με αφλατοξίνες παγκοσμίως αύξησαν την ευαισθητοποίηση σχετικά με τη σημασία του καθορισμού αποτελεσματικών στρατηγικών εστιασμένων στην πρόληψη με την ανάπτυξη σκευασμάτων με μη αφλατοξικογόνα στελέχη (Battilani et al., 2016 ²⁶⁵). Η εφαρμογή μη αφλατοξιγονικών στελεχών *A. flavus* για την πρόληψη της εισαγωγής των αφλατοξινών στην τροφική αλυσίδα, είναι ο πιο διαδεδομένος τρόπος βιολογικής διαχείρισης των αφλατοξικογόνων μυκήτων αλλά και των αφλατοξινών που παράγουν, εδώ και τρεις δεκαετίες (Cotty, 1990 ²⁶⁶). Η ικανότητα ορισμένων μη τοξικογόνων απομονώσεων του μύκητα να παρεμποδίζουν την παραγωγή αφλατοξινών από τις τοξικογόνες απομονώσεις, τις καθιστά εξαιρετικούς βιολογικούς παράγοντες διαχείρισης του προβλήματος. Η διαδικασία επιλογής μη τοξικογόνων απομονώσεων του *A. flavus* για χρήση ως βιολογικούς παράγοντες θα πρέπει να ακολουθεί μια σειρά από καλά καθιερωμένα στάδια που κυμαίνονται από την επιλογή φυσικών και καλά προσαρμοσμένων απομονώσεων, το γενετικό προσδιορισμό των αιτιών για την αδυναμία τους να παράγουν τοξίνες, και την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να υπερτερούν των παραγόμενων αφλατοξινών υπό ελεγχόμενες και επιτόπιες συνθήκες. Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι τα μη αφλατοξικογόνα στελέχη μείωσαν τις συγκεντρώσεις AF σε καλλιέργειες που εφαρμόστηκαν κατά περισσότερο από 80% τόσο σε συνθήκες αγρού όσο και σε συνθήκες αποθήκευσης (Savic et al., 2020¹⁵²; Lewis et al., 2019²⁶⁷; Bandyopadhyay et al., 2016 ²⁶⁸; Atehnkeng et al., 2014 ²⁶⁹). Προϊόντα βιολογικής αντιμετώπισης που στοχεύουν

στη μείωση της μόλυνσης και στη χρήση ενδημικών, καλά προσαρμοσμένων, μη αφλατοξιγονικών γονότυπων του *A. flavus* ως δραστικών συστατικών έχουν καταχωριστεί ήδη για χρήση ή βρίσκονται υπό ανάπτυξη σε διάφορες περιοχές παγκοσμίως (Atehnkeng et al., 2014 ²⁶⁹; Chulze et al., 2015 ²⁷⁰; Cotty, 2006 ²⁷¹; Mauro et al., 2013 ²⁵⁹).

Το αντικείμενο έρευνας της παρούσας μελέτης είχε ως βασικό στόχο την εύρεση ενδημικών μη τοξικογόνων στελεχών *Aspergillus flavus*, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν βιολογικούς παράγοντες αντιμετώπισης των αφλατοξινών, στα πλαίσια ενός ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης των αφλατοξινών που παράγουν οι μύκητες του ίδιου είδους, στην καλλιέργεια του αραβόσιτου. Με βάση τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης παρατηρείται η έντονη διακύμανση της πληθυσμιακής σύνθεσης των μυκήτων *Aspergillus section Flavi* όσον αφορά το αφλατοξικογόνο δυναμικό τους, με βάση την τοποθεσία και τη χρονολογία απομόνωσης. Συγκεκριμένα, για τα 99 στελέχη που απομονώθηκαν από ευρύτερες περιοχές της Μακεδονίας και Θεσσαλίας κατά τα έτη 2014 και 2016 τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι 36 απομονώσεις (36,4%) χαρακτηρίστηκαν ως τοξικογόνες, ενώ 63 απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως μη τοξικογόνες (63,6%).

Το επόμενο στάδιο της παρούσας ερευνητικής ενότητας αφορούσε την 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 ²⁷²). Αρχικά διερευνήθηκε η *in vitro* παρεμπόδιση της παραγωγής αφλατοξινών σε θρεπτικό υπόστρωμα CCA με τη χρήση χρωματογραφίας TLC. 34 εκ των 63 μη τοξικογόνων στελεχών, που εξετάστηκαν σε συγκαλλιέργεια με 2 ισχυρά τοξικογόνα στελέχη, δηλαδή το 53,97% των μη τοξικογόνων απομονώσεων κατάφεραν να μειώσουν την παραγωγή αφλατοξινών κατά σχεδόν 100% συγκριτικά με το μάρτυρα. Τα ποσοστά είναι αντίστοιχα άλλων μελετών για την εύρεση αποτελεσματικών απομονώσεων (Cotty et al., 1994 ²⁵⁴).

Στη συνέχεια, αφού βρέθηκαν αποτελεσματικές μη τοξικογόνες απομονώσεις σε εργαστηριακό επίπεδο *in vitro*, ακολούθησε αξιολόγηση σε εργαστηριακά πειράματα επί κόκκων καλαμποκιού. 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 ²⁷³). 32 μη τοξικογόνες απομονώσεις δοκιμάστηκαν στους σπόρους σε μικτές μολύνσεις με το τοξικογόνο στέλεχος AAF24, ενώ 13 με το BAF47. 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 61,5% έως περίπου 98%. Τα επίπεδα μείωσης της αφλατοξίνης ήταν σε συμφωνία με αυτά που ανιχνεύθηκαν σε άλλες παρεμφερείς μελέτες που εξετάστηκαν μη τοξικογόνα απομονωμένα στελέχη *A. flavus* ενδημικά στις Ηνωμένες Πολιτείες (Cotty and Bayman, 1993¹³⁴; Ortega-Beltran et al., 2019²⁷⁴), Νιγηρία (Atehnkeng et al., 2008²⁷⁵), Κένυα (Probst et al., 2011²⁷⁶), Γκάνα (Agbetiameh et al., 2019²⁷⁷) Ιταλία (Mauro et al., 2015¹³⁰) και Κίνα (Zhou et al., 2015²⁷⁸), όπου σε εργαστηριακές δοκιμές σε καλαμπόκι, η παρεμπόδιση κυμάνθηκε μεταξύ 70% και 100% σε σύγκριση με τους σπόρους που εμβολιάστηκαν μόνο με τις αφλατοξικογόνες απομονώσεις.

Εκτός από την εύρεση αποτελεσματικών στελεχών ως προς την αντιμετώπιση των αφλατοξινών, επιτακτική ήταν η ανάγκη ελέγχου της προσαρμοστικότητας αυτών των στελεχών στο τοπικό περιβάλλον. Οι πιθανοί μελλοντικοί παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης θα πρέπει να προέρχονται από ενδημικά στελέχη του Ελληνικού χώρου, καθώς η χρήση ενός μη ενδημικού στελέχους, ή ενός με περιορισμένη κατανομή στην περιοχή, μπορεί να εμποδίσει την ικανότητά του να προσαρμοστεί και να επιβιώσει (Grubisha and Cotty, 2015²⁷⁹; Lewis et al., 2019²⁶⁷). Τα σκευάσματα βιολογικής αντιμετώπισης που διατίθενται στο εμπόριο, που περιέχουν μη τοξικογόνα στελέχη ενδημικά σε περιοχές-στόχους, έχουν περισσότερες πιθανότητες να είναι πιο αποτελεσματικά λόγω της προσαρμογής τους στο περιβάλλον, το σύστημα καλλιέργειας, τις κλιματικές και εδαφικές συνθήκες (Atehnkeng et al., 2016²⁸⁰; Mehl et al., 2012¹⁵⁴) αλλά και λόγω υψηλότερης ικανότητας ανταγωνισμού έναντι άλλων ενδημικών μικροοργανισμών. Επίσης, οι ενδημικοί μύκητες ως ενεργά συστατικά προϊόντων επιτρέπουν ταχύτερη αδειοδότηση από τις αρμόδιες ρυθμιστικές αρχές σε σύγκριση με τους εισαγόμενους (Mehl et al., 2012). Ένα σημαντικό κριτήριο κατά την επιλογή μη τοξικογόνου στελέχους για την ανάπτυξη ενός προϊόντος βιολογικής αντιμετώπισης είναι ότι κάθε υποψήφιο προϊόν απομόνωσης πρέπει να ανήκει σε ένα ευρέως κατανεμημένο VCG που αποτελείται μόνο από μη τοξικογόνα μέλη (Grubisha et al., 2015²⁷⁹; Mauro et al., 2015¹³⁰).

Για την υλοποίηση αυτού του τμήματος της ερευνητικής ενότητας χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των 63 μη τοξικογόνων απομονώσεων καθώς και το τοξικογόνο στέλεχος BAF47. Από τα αποτελέσματα ομαδοποίησης των 64 απομονώσεων προέκυψε πως αυτές χωρίζονται σε 24 διακριτές ομάδες βλαστικής συμβατότητας. Στην παρούσα μελέτη αποδείχτηκε, όπως

ήταν αναμενόμενο, ότι η τοξικογόνος απομόνωση που εξετάστηκε δεν συνυπάρχει στην ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας με καμία από τις μη τοξικογόνες απομονώσεις. Η δημιουργία 24 ομάδων στην παρούσα μελέτη, που συμφωνεί με αντίστοιχα ερευνητικά αποτελέσματα για τον αραβόσιτο στην Αφρική, υποδεικνύουν τη δημιουργία 25 ομάδων βλαστικής συμβατότητας από 35 απομονώσεις (Atehnkeng et al., 2016 ²⁸⁰). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, 23 μη τοξικογόνες και 1 τοξικογόνος ομάδα δημιουργήθηκαν συνολικά. Από αυτές, οι 19, 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 αγρούς στην Ελλάδα. Πλην των μονομελών ομάδων, εντοπίστηκαν και 4 ομάδες οι οποίες απαρτίζονταν από τουλάχιστον δύο απομονώσεις. Η πλειοψηφία των μη τοξικογόνων στελεχών που απομονώθηκαν από τις ευρύτερες περιοχές της Θεσσαλίας και Μακεδονίας, περίπου το 68% του συνόλου των μη τοξικογόνων απομονώσεων, ανήκουν στις πολυπληθέστερες αυτές 4 ομάδες. Παρά την ύπαρξη αρκετών single-member groups, πολλές από τις ομάδες που αποτελούνται από παραπάνω από μία απομόνωση, εντοπίζονται σε διάφορες περιοχές, γεγονός που συμπίπτει και με τα ευρήματα μελετών που διεξήχθησαν στην Αφρική, όπου απομονώσεις που ανήκουν στην ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας έχουν εντοπιστεί σε απόσταση μεγαλύτερη των 400 χιλιομέτρων μεταξύ τους (Atehnkeng et al., 2016 ²⁸¹). Και στις 4 κυρίαρχες 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 ιδιαιτέρως ενθαρρυντικό αποτέλεσμα ως προς τη βιολογική αντιμετώπιση των αφλατοξινών με χρήση ενδημικών μη τοξικογόνων απομονώσεων.

Το τελευταίο στάδιο της παρούσας ερευνητικής ενότητας αφορούσε στην αξιολόγηση των 35 μη τοξικογόνων απομονώσεων *A. flavus*, σε αγρό καλαμποκιού στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης παραγωγής αφλατοξινών. Για αυτό το λόγο επελέχθηκε η μέθοδος του εμβολιασμού εναιωρήματος κονιδίων των μη τοξικογόνων στελεχών στον πειραματικό αγρό. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο στάδιο της πρώιμης ωρίμανσης των σπαδικών, στα μέσα Ιουλίου. Στον πειραματικό αγρό όπου εφαρμόστηκαν οι τεχνητές μολύνσεις, η παρεμπόδιση στην παραγωγή των αφλατοξινών των 11 από τα 35 μη τοξικογόνα στελέχη που εφαρμόστηκαν κυμάνθηκε από 94,19% έως 100% του μάρτυρα.

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., 1991²⁸²) και 37%-86% από την εφαρμογή μεμονωμένων στελεχών καθώς και 65%-94% από την εφαρμογή μείγματος μη τοξικογόνων στελεχών (Abbas et al., 2006²⁸³). Έχει επίσης αναφερθεί μείωση των παραγόμενων αφλατοξινών κατά 92,3% στον αραβόσιτο στην Ιταλία (Mauro et al., 2018¹⁵¹) αλλά και κατά 67%-95% στον αραβόσιτο στην Αφρική ύστερα από εφαρμογή μείγματος μη τοξικογόνων απομονώσεων (Atehnkeng et al., 2014²⁶⁹). Μία πρόσφατη μελέτη στη Σερβία (Savić et al., 2020¹⁵²) απέδειξε ότι εφαρμογή αυτού του βιολογικού παράγοντα μείωσε τα επίπεδα αφλατοξίνης στους σπάδικες αραβοσίτου κατά 51–83%.

Με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία, οι παρεμποδίσσεις που επιτεύχθηκαν από την εφαρμογή μη τοξικογόνων στελεχών είναι ανάλογες με αντίστοιχες που έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι ιδιαίτερος ενθαρρυντικά για τη βιολογική αντιμετώπιση των αφλατοξινών και κατά συνέπεια την εμπορευματοποίηση και την αξιοποίησή τους σε σύγχρονα ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης αφλατοξινών στην καλλιέργεια του αραβοσίτου στην Ελλάδα.

Παρόλα αυτά υπάρχει η αναγκαιότητα, να γίνουν πειράματα σε μεγαλύτερη κλίμακα, καθώς απαιτείται αξιολόγηση των ικανοτήτων παραγωγής αφλατοξίνης μεγάλου αριθμού απομονώσεων του *A. flavus* και κατηγοριοποίησης των απομονώσεων αυτών σε ομάδες βλαστικής συμβατότητας, για την εξακρίβωση της προσαρμοστικής ικανότητάς τους στον Ελλαδικό χώρο. Είναι γεγονός ότι, η προσαρμογή σε ολόκληρη την περιοχή των μη τοξικογόνων VCG μπορεί να ταυτοποιηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια εξετάζοντας αρκετές χιλιάδες απομονώσεις *A. flavus* που σχετίζονται με πολλαπλές καλλιέργειες και συλλέγονται σε αρκετές εκατοντάδες τοποθεσίες σε μια χώρα/περιοχή στόχο (Agbetiamah et al., 2019²⁷⁷; Ortega-Beltran et al., 2019²⁷⁴). Με στόχο την κατάταξη των ενδημικών, αποτελεσματικών ως προς τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών, μη τοξικογόνων στελεχών *Aspergillus flavus* σε VCGs, αναγκαία κρίνονται περαιτέρω πειράματα, τα οποία μπορούν να δώσουν μια συνολική εικόνα για το ποια είναι τα επικρατέστερα αυτών στην Ελλάδα.

Επιπλέον, η κλασική επιλογή παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης για τον έλεγχο των ασθενειών των φυτών έχει δώσει έμφαση στη χρήση μεμονωμένων μη τοξικογόνων στελεχών (Ojiambo και Scherm, 2006²⁸⁴). Ωστόσο, λόγω της μεταβλητότητας στις

περιβαλλοντικές θέσεις, η χρήση μείγματος πολλαπλών μη αφλατοξικογόνων στελεχών είναι πιθανό να παρέχει μια πιο οικολογικά ορθή προσέγγιση για τη βιολογική αντιμετώπιση (Xu et al., 2011²⁸⁵). Έχει προταθεί ότι σε σύγκριση με μεμονωμένα στελέχη, πολλαπλά μη τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* θα μπορούσαν να παρουσιάσουν μια συνεργιστική δράση που θα οδηγούσε σε μεγαλύτερη μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνες υπό συνθήκες πεδίου. Διάφοροι λόγοι μπορούν να εξηγήσουν την υψηλότερη αποτελεσματικότητα ενός μείγματος στελεχών σε σύγκριση με μεμονωμένα στελέχη. Στο *A. flavus*, τα VCGs ποικίλλουν ως προς την ικανότητά τους να αποικίζουν και να διασπείρονται, να εισβάλλουν βαθιά στους ιστούς του ξениστή ενώ η ικανότητα αποικισμού δε συνάδει πάντα με την ικανότητα σποριοποίησης των στελεχών (Mehl and Cotty, 2010²⁸⁶). Επιπλέον, τα VCGs διαφέρουν ως προς την προσαρμογή σε διαφορετικές καλλιέργειες, περιβάλλοντα και γεωργικές πρακτικές (Mehl and Cotty, 2013¹³⁸). Ως εκ τούτου, η μεγαλύτερη ποικιλομορφία των εφαρμοσμένων VCGs θα οδηγήσει σε μια ποικιλόμορφη και δυναμικά πιο σταθερή κοινότητα με μεγαλύτερη ανταγωνιστική ικανότητα, η οποία είναι πιο ανθεκτική στις αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια ή μεταξύ των καλλιεργητικών περιόδων. Έτσι, οι τροποποιημένες κοινότητες *Aspergillus* με πολλαπλά μη τοξικογόνα VCGs αναμένεται να έχουν μεγαλύτερη σταθερότητα από αυτές που σχηματίζονται με μεμονωμένα VCGs (Probst et al., 2011²⁷⁶; Mehl et al., 2012¹⁵⁴). Η μεγαλύτερη σταθερότητα και ανθεκτικότητα πολλαπλών μη τοξικογόνων VCGs με την πάροδο των ετών θα προσφέρει τελικά μακροπρόθεσμες μειώσεις στη μόλυνση από αφλατοξίνες. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους καλλιεργητές μικρής κλίμακας που ενδέχεται να μην έχουν τους απαραίτητους πόρους για να εφαρμόζουν περιοδικά προϊόντα βιολογικής αντιμετώπισης στα χωράφια τους. Τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνών υποδεικνύουν ότι η συνδυασμένη χρήση κατάλληλων, καλά προσαρμοσμένων απομονώσεων μη τοξικογόνων στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικά VCG ως βιολογικοί παράγοντες, εκτοπίζει αποτελεσματικά τα αφλατοξικογόνα στελέχη, περιορίζοντας τη μόλυνση από αφλατοξίνες (Bandyopadhyay et al., 2019²⁸⁷; Agbetiameh et al., 2019²⁷⁷; Atehnkeng et al., 2014²⁶⁹).

Επιπροσθέτως, τα μη τοξικογόνα στελέχη *A. flavus* που χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί παράγοντες συχνά αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως «ατοξιγόνα» (Bandyopadhyay et al., 2016²⁶⁸; Grubisha and Cotty, 2015²⁷⁹; Mauro et al., 2018¹⁵¹; Ortega-Beltran et al., 2016²⁸⁸; Weaver and Abbas, 2019¹⁶³). Παρόλα αυτά η ανικανότητά τους να παράγουν αφλατοξίνες δεν σημαίνει απαραίτητα ότι οι μη αφλατοξικογόνοι μύκητες δεν είναι ικανοί να παράγουν

άλλες μυκοτοξίνες (Kagot et al., 2019²⁸⁹). Συχνά, υποστηρίζεται ότι οποιεσδήποτε άλλες μυκοτοξίνες που παράγονται από ένα μη αφλατοξογόνο στέλεχος δεν αξίζει να ληφθούν υπόψη, δεδομένης της συντριπτικής σοβαρότητας των αφλατοξινών ωστόσο δεν έχει εξεταστεί ευρέως το ενδεχόμενο συσσωρευτικών ή συνεργιστικών επιδράσεων των φαινομενικά λιγότερο σοβαρών μυκοτοξινών. Για παράδειγμα, μια αθροιστική επίδραση θα μπορούσε να προκύψει από την εφαρμογή άφθονης ποσότητας ενός μη αφλατοξικογόνου στελέχους *A.flavus* που παράγει ωστόσο χαμηλά επίπεδα κυκλοπιαζονικού οξέως - CPA (King et al., 2011²⁹⁰). Είναι άγνωστο εάν τα μη αφλατοξικογόνα στελέχη που έχουν δοκιμαστεί ή χρησιμοποιούνται σε σκευάσματα βιολογικής καταπολέμησης παγκοσμίως, έχουν επίσης εξεταστεί ως προς τη δυνατότητά τους να παράγουν μυκοτοξίνες πέρα από τις αφλατοξίνες και το CPA (Moore, 2022²⁹¹). Οι Uka et al. (2019²⁹²) εξέτασαν πάνω από 50 στελέχη *A. flavus* για την παραγωγή 50 τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών και κανένα από τα στελέχη δεν ήταν ατοξιγονικό. Στην πραγματικότητα, πολύ λίγα στελέχη δεν είχαν την παραγωγή όλων των τοξικών μεταβολιτών εκτός από ένα ή δύο. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να διερευνήσουμε τις λιγότερο ισχυρές μυκοτοξίνες που μπορούν να παράγουν αυτοί οι μύκητες καθώς και τις πιθανές συνεργιστικές ή προσθετικές επιδράσεις τους και ταυτόχρονα να αναζητήσουμε στελέχη που παράγουν όσο το δυνατόν λιγότερους τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. Caceres, I.; Al Khoury, A.; El Khoury, R.; Lorber, S.; P. Oswald, I.; El Khoury, A.; Atoui, A.; Puel, O.; Bailly, J.-D., Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review. *Toxins* **2020**, *12* (3), 150.
2. Mangelsdorf, P. C., The Origin and Evolution of Maize. *In Advances in Genetics*, Demerec, M., Ed. Academic Press: 1947; Vol. 1, pp 161-207.
3. Matsuoka, Y.; Vigouroux, Y.; Goodman, M.; G, J.; Buckler, E.; Doebley, J., A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 6080-4.
4. Ranum, P.; Peña-Rosas, J. P.; Garcia-Casal, M. N., Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2014**, *1312*, 105-12.
5. European Food Safety Authority (EFSA), Álvarez, F.; Martín Camargo, A.; Messéan, A.; Lenzi, P.; Streissl, F., Assessment of the 2020 post-market environmental monitoring report on the cultivation of genetically modified maize MON 810 in the EU. *EFSA Journal* **2022**, *20* (7), e07406.
6. Friend, D.; Milthorpe, F.; Ivins, J., The growth of cereals and grasses. *Butterworths, London* **1966**, 358.
7. Inglett, G. In Corn proteins related to grain processing and nutritional value of products, *Abstracts of papers of the American Chemical Society*, Amer. Chemical Soc. 1155 Sixteenth Street, NW, Washington, DC 20036: **1971**; pp 33-&.
8. Wrigley, C. W.; Corke, H.; Walker, C. E., *Encyclopedia of grain science*. Academic Press.: 2004.
9. Aldrich, S. R.; Scott, W. O.; Leng, E. R., Modern corn production. *Modern corn production*. **1975**, (2. ed.).
10. Shannon, J. C.; Garwood, D. L.; Boyer, C. D., Chapter 3 - Genetics and Physiology of Starch Development. In *Starch (Third Edition)*, BeMiller, J.; Whistler, R., Eds. Academic Press: San Diego, 2009; pp 23-82.
11. Mertz, E. T.; Bates, L. S.; Nelson, O. E., Mutant Gene That Changes Protein Composition and Increases Lysine Content of Maize Endosperm. *Science* **1964**, *145* (3629), 279-280.
12. Sodek, L.; Wilson, C. M., Incorporation of leucine-14C and lysine-14C into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1970**, *140* (1), 29-38.
13. Prasanna, B. M.; Vasal, S. K.; Kassahun, B.; Singh, N. N., Quality protein maize. *Current Science* **2001**, *81* (10), 1308-1319.
14. Chaudhary, D.; Kumar, S.; Yadav, O., Nutritive value of maize: Improvements, applications and constraints. *Maize: Nutrition dynamics and novel uses* **2014**, 3-17.
15. Fang, J.; Su, Y., Effects of Soils and Irrigation Volume on Maize Yield, Irrigation Water Productivity, and Nitrogen Uptake. *Scientific Reports* **2019**, *9* (1), 7740.
16. Torres, G. M., *Precision planting of maize (Zea mays L.)*. Oklahoma State University: **2012**.
17. Culman, S. W.; Snapp, S. S.; Green, J. M.; Gentry, L. E., Short- and Long-Term Labile Soil Carbon and Nitrogen Dynamics Reflect Management and Predict Corn Agronomic Performance. *Agronomy Journal* **2013**, *105* (2), 493-502.

18. Watson, S. A., Structure and composition. *Corn: Chemistry and technology*. **1987**, 53-82.
19. Oetzel, G.; Villalba, F.; Goodger, W.; Nordlund, K. J., A comparison of on-farm methods for estimating the dry matter content of feed ingredients. *Journal of Dairy Science* **1993**, *76* (1), 293-299.
20. Samson, R. A.; Visagie, C. M.; Houbraeken, J.; Hong, S. B.; Hubka, V.; Klaassen, C. H. W.; Perrone, G.; Seifert, K. A.; Susca, A.; Tanney, J. B.; Varga, J.; Kocsubé, S.; Szigeti, G.; Yaguchi, T.; Frisvad, J. C., Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* **2014**, *78* (1), 141-173.
21. Keller, N. P.; Turner, G.; Bennett, J. W., Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* **2005**, *3* (12), 937-947.
22. Patterson, L. H.; McKeown, S. R., AQ4N: a new approach to hypoxia-activated cancer chemotherapy. *British Journal of Cancer* **2000**, *83* (12), 1589-1593.
23. Abe, K.; Gomi, K.; Hasegawa, F.; Machida, M., Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia* **2006**, *162* (3), 143-153.
24. Baker, S. E., *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Medical Mycology* **2006**, *44* (Supplement_1), S17-S21.
25. Raper, K. B.; Fennell, D. I., The genus *Aspergillus*. *The genus Aspergillus* **1965**.
26. Baker, S. E.; Bennett, J. W., An overview of the genus *Aspergillus*. *The Aspergilli: Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods* **2007**, 3-13.
27. Bennett, J. W.; Klich, M. A., *Aspergillus: biology and industrial applications*. Boston: Butterworth-Heinemann **1992**.
28. Amaike, S.; Keller, N. P., *Aspergillus flavus*. *Annual review of phytopathology* **2011**, *49*, 107-133.
29. Peterson, S. W., Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* **2008**, *100* (2), 205-26.
30. Houbraeken, J.; de Vries, R. P.; Samson, R. A., Chapter Four - Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. In *Advances in Applied Microbiology*, Sariaslani, S.; Gadd, G. M., Eds. Academic Press: **2014**; Vol. 86, pp 199-249.
31. Hubka, V.; Lyskova, P.; Frisvad, J. C.; Peterson, S. W.; Skorepova, M.; Kolarik, M., *Aspergillus pragensis* sp. nov. discovered during molecular reidentification of clinical isolates belonging to *Aspergillus* section *Candidi*. *Sabouraudia* **2014**, *52* (6), 565-576.
32. Dyer, P. S.; O'Gorman, C. M., Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS microbiology reviews* **2012**, *36* (1), 165-92.
33. Chang, P.-K.; Cary, J. W.; Lebar, M. D., Biosynthesis of conidial and sclerotial pigments in *Aspergillus* species. *Applied microbiology and biotechnology* **2020**, *104*, 2277-2286.
34. Tsitsigiannis, D. I.; Kowieski, T. M.; Zarnowski, R.; Keller, N. P., Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **2004**, *3* (6), 1398-1411.
35. Varga, J.; Frisvad, J. C.; Kocsubé, S.; Brankovics, B.; Tóth, B.; Szigeti, G.; Samson, R. A., New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* **2011**, *69* (1), 1-17.
36. Frisvad, J. C.; Hubka, V.; Ezekiel, C. N.; Hong, S. B.; Nováková, A.; Chen, A. J.; Arzanlou, M.; Larsen, T. O.; Sklenář, F.; Mahakarnchanakul, W.; Samson, R. A.; Houbraeken, J., Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology* **2019**, *93* (1), 1-63.

37. Klich, M. A., *Identification of common Aspergillus species*. CBS: 2002.
38. Kumeda, Y.; Asao, T., Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology* **1996**, *62* (8), 2947-2952.
39. Pildain, M. B.; Frisvad, J. C.; Vaamonde, G.; Cabral, D.; Varga, J.; Samson, R. A., Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2008**, *58* (3), 725-735.
40. Gonçalves, S. S.; Stchigel, A. M.; Cano, J. F.; Godoy-Martinez, P. C.; Colombo, A. L.; Guarro, J., *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. *Food research international* **2012**, *50* (2), 152-160.
41. Soares, C.; Rodrigues, P.; Peterson, S. W.; Lima, N.; Venâncio, A., Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia* **2012**, *104* (3), 682-697.
42. Taniwaki, M. H.; Pitt, J. I.; Iamanaka, B. T.; Sartori, D.; Copetti, M. V.; Balajee, A.; Fungaro, M. H. P.; Frisvad, J. C., *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. **2012**, : e42480
43. Pitt, J. I.; Lange, L.; Lacey, A. E.; Vuong, D.; Midgley, D. J.; Greenfield, P.; Bradbury, M. I.; Lacey, E.; Busk, P. K.; Pilgaard, B., *Aspergillus hancockii* sp. nov., a biosynthetically talented fungus endemic to southeastern Australian soils. *PLoS One* **2017**, *12* (4), e0170254.
44. Carvajal-Campos, A.; Manizan, A. L.; Tadrist, S.; Akaki, D. K.; Koffi-Nevry, R.; Moore, G. G.; Fapohunda, S. O.; Bailly, S.; Montet, D.; P. Oswald, I., *Aspergillus korhogoensis*, a novel aflatoxin producing species from the Côte d'Ivoire. *Toxins* **2017**, *9* (11), 353.
45. Nesbitt, B. F.; O'Kelly, J.; Sargeant, K.; Sheridan, A. N., *Aspergillus flavus* and turkey X disease: toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature, London* **1962**, *195*, 1062-1063.
46. Codner, R.; Sargeant, K.; Yeo, R., Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. *Biotechnology and Bioengineering* **1963**, *5* (3), 185-192.
47. Samson, R.; Varga, J., What is a species in *Aspergillus*? *Medical mycology* **2009**, *47* (sup1), S13-S20.
48. Camiletti, B. X.; Torrico, A. K.; Maurino, M. F.; Cristos, D.; Magnoli, C.; Lucini, E. I.; Pecci, M., Fungal screening and aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi* isolated from pre-harvest maize ears grown in two Argentine regions. *Crop protection* **2017**, *92*, 41-48.
49. Cotty, P. J.; Jaime-Garcia, R., Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International journal of food microbiology* **2007**, *119* (1-2), 109-115.
50. Yu, J.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T. E., Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS letters* **2004**, *564* (1-2), 126-130.
51. Cleveland, T. E.; Yu, J.; Fedorova, N.; Bhatnagar, D.; Payne, G. A.; Nierman, W. C.; Bennett, J. W., Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in biotechnology* **2009**, *27* (3), 151-157.
52. Ojiambo, P. S.; Battilani, P.; Cary, J. W.; Blum, B. H.; Carbone, I., Cultural and genetic approaches to manage aflatoxin contamination: Recent insights provide opportunities for improved control. *Phytopathology* **2018**, *108* (9), 1024-1037.
53. Hedayati, M.; Pasqualotto, A.; Warn, P.; Bowyer, P.; Denning, D., *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* **2007**, *153* (6), 1677-1692.

54. Yu, J.; Nierman, W. C.; Bennett, J. W.; Cleveland, T. E.; Bhatnagar, D.; Campbell, B. C.; Dean, R. A.; Payne, G., Genetics and Genomics of *Aspergillus flavus*. *Progress in mycology* **2010**, 51-73.
55. Islam, M.-S.; Callicott, K. A.; Mutegei, C.; Bandyopadhyay, R.; Cotty, P. J., *Aspergillus flavus* resident in Kenya: High genetic diversity in an ancient population primarily shaped by clonal reproduction and mutation-driven evolution. *Fungal Ecology* **2018**, 35, 20-33.
56. Cary, J. W.; Gilbert, M. K.; Lebar, M. D.; Majumdar, R.; Calvo, A. M., *Aspergillus flavus* secondary metabolites: more than just aflatoxins. *Food Safety* **2018**, 6 (1), 7-32.
57. Yu, J.; Payne, G. A.; Nierman, W. C.; Machida, M.; Bennett, J. W.; Campbell, B. C.; Robens, J. F.; Bhatnagar, D.; Dean, R. A.; Cleveland, T. E., *Aspergillus flavus* genomics as a tool for studying the mechanism of aflatoxin formation. *Food Addit. Contam.* **2008**, 25 (9), 1152-1157.
58. Goldman, G. H.; Osmani, S. A., *The Aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods*. CRC press: **2007**.
59. Tsitsigiannis, D. I.; Kowieski, T. M.; Zarnowski, R.; Keller, N. P., Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **2005**, 151 (6), 1809-1821.
60. Cotty, P. J., Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycological Research* **1997**, 101 (6), 698-704.
61. Horn, B.; Dorner, J., Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology* **1999**, 65 (4), 1444-1449.
62. Ali, S. W.; Afzaal, S., Aflatoxins in Pakistani Foods: A serious threat to food safety. *Journal of hygienic engineering and design* **2014**, 9, 20-5.
63. Muhlschlegel, F.; Fonzi, W.; Hoyer, L.; Payne, T.; Poulet, F.; Clevenger, J.; Latge, J.; Calera, J.; Beauvais, A.; Paris, M. M., Molecular mechanisms of virulence in fungus-host interactions for *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Medical Mycology* **1998**, 36, 238-248.
64. Sugui, J. A.; Peterson, S. W.; Figat, A.; Hansen, B.; Samson, R. A.; Mellado, E.; Cuenca-Estrella, M.; Kwon-Chung, K. J., Genetic relatedness versus biological compatibility between *Aspergillus fumigatus* and related species. *Journal of Clinical Microbiology* **2014**, 52 (10), 3707-3721.
65. Klich, M. A., *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology* **2007**, 8 (6), 713-722.
66. Calvo, A. M.; Wilson, R. A.; Bok, J. W.; Keller, N. P., Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2002**, 66 (3), 447-459.
67. Frisvad, J. C.; Larsen, T. O.; Biotechnology, Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2015**, 99, 7859-7877.
68. Calvo, A. M.; Cary, J. W., Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Frontiers in Microbiology* **2015**, 6, 62.
69. Scharf, D. H.; Heinekamp, T.; Brakhage, A. A., Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLoS pathogens* **2014**, 10 (1), e1003859.

70. Bhat, R.; Rai, R. V.; Karim, A. A., Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive reviews in Food Science And Food Safety* **2010**, *9* (1), 57-81.
71. Marin, S.; Ramos, A.; Cano-Sancho, G.; Sanchis, V., Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, *60*, 218-237.
72. Aly, A. H.; Debbab, A.; Proksch, P., Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Diversity* **2011**, *50*, 3-19.
73. Miller, J. D., Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Journal of Stored Products Research* **1995**, *31* (1), 1-16.
74. Logrieco, A.; Moretti, A.; Perrone, G.; Mulè, G., Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with Fusarium ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape. *International Journal of Food Microbiology* **2007**, *119* (1-2), 11-16.
75. Eskola, M.; Kos, G.; Elliott, C. T.; Hajšlová, J.; Mayar, S.; Krska, R., Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2020**, *60* (16), 2773-2789.
76. Tsitsigiannis, D. I.; Dimakopoulou, M.; Antoniou, P. P.; Tjamos, E. C., Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathologia Mediterranea* **2012**, 158-174.
77. Frisvad, J. C.; Smedsgaard, J.; Samson, R. A.; Larsen, T. O.; Thrane, U., Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55* (23), 9727-9732.
78. Jackson, L. S.; Bullerman, L. B., Effect of processing on Fusarium mycotoxins. *Impact of Processing on Food Safety* **1999**, 243-261.
79. Pickova, D.; Ostry, V.; Toman, J.; Malir, F., Aflatoxins: History, significant milestones, recent data on their toxicity and ways to mitigation. *Toxins* **2021**, *13* (6), 399.
80. Blount, W., Turkey" X" disease. *J Br Turkey Fed* **1961**, *9*, 52-77.
81. Van der Zijden, A.; Koelensmid, W. B.; Boldingh, J.; Barrett, C.; Ord, W.; Philp, J., *Aspergillus flavus* and Turkey X disease: isolation in crystalline form of a toxin responsible for Turkey X disease. *Nature, London* **1962**, *195*, 1060-1062.
82. Spensley, P. J., Aflatoxin, the active principle in turkey'X'disease. *Endeavour* **1963**, *22*, 75-79.
83. Kuiper-Goodman, T., Food safety: mycotoxins and phycotoxins in perspective. Mycotoxins and phycotoxins—developments in chemistry, toxicology and food safety. *Alaken Inc., Fort Collins, Colo* **1998**, 25-48.
84. Kumar, P.; Mahato, D. K.; Kamle, M.; Mohanta, T. K.; Kang, S. G., Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology* **2017**, *7*, 2170.
85. Ehrlich, K. C.; Kobbeman, K.; Montalbano, B. G.; Cotty, P. J., Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology* **2007**, *114* (2), 153-159.
86. Taber, R. A.; Schroeder, H. W., Aflatoxin-producing potential of isolates of the *Aspergillus flavus-oryzae* group from peanuts (*Arachis hypogaea*). *Applied Microbiology*. **1967**, *15* (1), 140-144.
87. Uka, V.; Moore, G. G.; Arroyo-Manzanares, N.; Nebija, D.; De Saeger, S.; Diana Di Mavungu, J., Secondary metabolite dereplication and phylogenetic analysis identify various

emerging mycotoxins and reveal the high intra-species diversity in *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*, 667.

88. Diener, U. L.; Cole, R. J.; Sanders, T. H.; Payne, G. A.; Lee, L. S.; Klich, M. A., Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* **1987**, *25* (1), 249-270.

89. Masri, M.; Lundin, R.; Page, J.; Garcia, V. C., Crystalline aflatoxin M 1 from urine and milk. *Nature* **1967**, *215*, 753-755.

90. Zhang, X.; Kuča, K.; Dohnal, V.; Dohnalová, L.; Wu, Q.; Wu, C., Military potential of biological toxins. *Journal of Applied Biomedicine* **2014**, *12* (2), 63-77.

91. Gell, R. M.; Carbone, I., HPLC quantitation of aflatoxin B1 from fungal mycelium culture. *Journal of Microbiological Methods* **2019**, *158*, 14-17.

92. Yao, H.; Hruska, Z.; Di Mavungu, J. D., Developments in detection and determination of aflatoxins. *World Mycotoxin Journal* **2015**, *8* (2), 181-191.

93. Kjærboelling, I.; Vesth, T.; Frisvad, J. C.; Nybo, J. L.; Theobald, S.; Kildgaard, S.; Petersen, T. I.; Kuo, A.; Sato, A.; Lyhne, E. K., A comparative genomics study of 23 *Aspergillus* species from section *Flavi*. *Nature communications* **2020**, *11* (1), 1106.

94. Amaike, S.; Affeldt, K. J.; Keller, N. P., Genetics, biosynthesis, and regulation of aflatoxins and other *Aspergillus flavus* secondary metabolites. *Agricultural Applications* **2013**, 59-74.

95. Georgianna, D. R.; Fedorova, N. D.; Burroughs, J. L.; Dolezal, A. L.; Bok, J. W.; Horowitz-Brown, S.; Woloshuk, C. P.; Yu, J.; Keller, N. P.; Payne, G. A., Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. *Molecular Plant Pathology* **2010**, *11* (2), 213-226.

96. Hicks, J. K.; Shimizu, K.; Keller, N. P., Genetics and biosynthesis of aflatoxins and sterigmatocystin *Agricultural Applications*. Springer Berlin Heidelberg. **2002**, 55-69.

97. Feng, G. H.; Leonard, T. J., Characterization of the polyketide synthase gene (pksl1) required for aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Bacteriology* **1995**, *177* (21), 6246-6254.

98. Jayaprakash, A.; Thanmalagan, R.; Roy, A.; Arunachalam, A.; Lakshmi, P.T.V., Strategies to Understand *Aspergillus flavus* Resistance Mechanism in *Arachis hypogaea* L. *Current Plant Biology* **2019**, *20*, 100123.

99. Fernandes, M.; Keller, N. P.; Adams, T. H., Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfIR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Molecular Microbiology* **1998**, *28* (6), 1355-1365.

100. Woloshuk, C.; Foutz, K.; Brewer, J.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.; Payne, G., Molecular characterization of *afIR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **1994**, *60* (7), 2408-2414.

101. Yu, J.-H.; Butchko, R. A.; Fernandes, M.; Keller, N. P.; Leonard, T. J.; Adams, T. H., Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *afIR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Current Genetics* **1996**, *29*, 549-555.

102. Liu, X.; Guan, X.; Xing, F.; Lv, C.; Dai, X.; Liu, Y., Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. *Food Control* **2017**, *82*, 325-332.

103. Abdel-Hadi, A.; Schmidt-Heydt, M.; Parra, R.; Geisen, R.; Magan, N., 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* **2012**, *9* (69), 757-767.
104. Bhatnagar, D.; Cary, J. W.; Ehrlich, K.; Yu, J.; Cleveland, T. E., Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* **2006**, *162* (3), 155-166.
105. Miraglia, M.; Marvin, H.; Kleter, G.; Battilani, P.; Brera, C.; Coni, E.; Cubadda, F.; Croci, L.; De Santis, B.; Dekkers, S., Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* **2009**, *47* (5), 1009-1021.
106. Williams, J. H.; Phillips, T. D.; Jolly, P. E.; Stiles, J. K.; Jolly, C. M.; Aggarwal, D., Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, *80* (5), 1106-1122.
107. Mitchell, N. J.; Bowers, E.; Hurburgh, C.; Wu, F., Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2016**, *33* (3), 540-550.
108. Jallow, A.; Xie, H.; Tang, X.; Qi, Z.; Li, P., Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety* **2021**, *20* (3), 2332-2381.
109. Moretti, A.; Pascale, M.; Logrieco, A. F., Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends in Food Science & Technology* **2019**, *84*, 38-40.
110. Benkerroum, N., Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. *International Journal Of Environmental Research and Public Health* **2020**, *17* (2), 423.
111. Hua, Z.; Liu, R.; Chen, Y.; Liu, G.; Li, C.; Song, Y.; Cao, Z.; Li, W.; Li, W.; Lu, C., Contamination of aflatoxins induces severe hepatotoxicity through multiple mechanisms. *Frontiers in Pharmacology* **2021**, 2144.
112. Santini, A.; Ritieni, A., Aflatoxins: risk, exposure and remediation. *Aflatoxins-recent advances and future prospects* **2013**, 343-376.
113. Admasu, F. T.; Melak, A.; Demissie, B.; Yenew, C.; Habtie, M. L.; Bekele, T. T.; Feyesa, T. O.; Chanie, E. S.; G/Medhin, M. T.; Malik, T., Occurrence and associated factors of aflatoxin M1 in raw cow milk in South Gondar Zone, North West Ethiopia, 2020. *Food Science & Nutrition* **2021**, *9* (11), 6286-6293.
114. Marr, K. A.; Platt, A.; Tornheim, J. A.; Zhang, S. X.; Datta, K.; Cardozo, C.; Garcia-Vidal, C., Aspergillosis complicating severe coronavirus disease. *Emerging infectious diseases* **2021**, *27* (1), 18.
115. Probst, C.; Njapau, H.; Cotty, P. J., Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73* (8), 2762-2764.
116. Gallo, A.; Stea, G.; Battilani, P.; Logrieco, A. F.; Perrone, G., Molecular characterization of an *Aspergillus flavus* population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* **2012**, 198-206.

117. Probst, C.; Schulthess, F.; Cotty, P. J., Impact of *Aspergillus* section *Flavi* community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). *Journal of Applied Microbiology* **2010**, *108* (2), 600-610.
118. Dhanasekaran, D.; Shanmugapriya, S.; Thajuddin, N.; Panneerselvam, A., Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology* **2011**, *10* (22717), 221-254.
119. Chandra, P., Aflatoxins: Food Safety, Human Health Hazards and Their Prevention. In *Aflatoxins-Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks*, IntechOpen: **2021**.
120. Robens, J.; Cardwell, K., The Costs of Mycotoxin Management to the USA: Management of Aflatoxins in the United States. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* **2003**, *22* (2-3), 139-152.
121. Bandyopadhyay, R.; Kumar, M.; Leslie, J. F., Relative severity of aflatoxin contamination of cereal crops in West Africa. *Food additives and contaminants* **2007**, *24* (10), 1109-1114.
122. Lewis, L.; Onsongo, M.; Njapau, H.; Schurz-Rogers, H.; Lubber, G.; Kieszak, S.; Nyamongo, J.; Backer, L.; Dahiye, A. M.; Misore, A., Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental health perspectives* **2005**, *113* (12), 1763-1767.
123. Wu, F.; Guclu, H., Aflatoxin regulations in a network of global maize trade. **2012**.
124. Wu, F.; Stacy, S. L.; Kensler, T. W., Global Risk Assessment of Aflatoxins in Maize and Peanuts: Are Regulatory Standards Adequately Protective? *Toxicological Sciences* **2013**, *135* (1), 251-259.
125. Marshall, H.; Meneely, J. P.; Quinn, B.; Zhao, Y.; Bourke, P.; Gilmore, B. F.; Zhang, G.; Elliott, C. T., Novel decontamination approaches and their potential application for post-harvest aflatoxin control. *Trends in Food Science & Technology* **2020**, *106*, 489-496.
126. Abbas, H.; Wilkinson, J.; Zablotowicz, R.; Accinelli, C.; Abel, C.; Bruns, H.; Weaver, M., Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin reviews* **2009**, *28* (2-3), 142-153.
127. Georgiadou, M.; Dimou, A.; Yanniotis, S., Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food control* **2012**, *26* (2), 580-586.
128. Battilani, P.; Leggieri, M. C.; Rossi, V.; Giorni, P., AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 contamination in maize. *Computers and Electronics in Agriculture* **2013**, *94*, 38-46.
129. 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.
130. Mauro, A.; Battilani, P.; Cotty, P. J., Atoxigenic *Aspergillus flavus* endemic to Italy for biocontrol of aflatoxins in maize. *BioControl* **2015**, *60*, 125-134.
131. Lyn, M.; Abbas, H.; Zablotowicz, R.; Johnson, B., Delivery systems for biological control agents to manage aflatoxin contamination of pre-harvest maize. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2009**, *26* (3), 381-387.
132. Dorner, J. W., Biological control of aflatoxin contamination in corn using a nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection* **2009**, *72* (4), 801-804.

133. Huang, C.; Jha, A.; Sweany, R.; DeRobertis, C.; Damann Jr, K. E., Intraspecific aflatoxin inhibition in *Aspergillus flavus* is thigmoregulated, independent of vegetative compatibility group and is strain dependent. *PLoS One* **2011**, *6* (8), e23470.
134. Bayman, P.; Cotty, P. J., Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Canadian Journal of Botany* **1993**, *71* (1), 23-31.
135. Damann Jr, K. J., Atoxigenic *Aspergillus flavus* biological control of aflatoxin contamination: what is the mechanism? *World Mycotoxin Journal* **2015**, *8* (2), 235-244.
136. Hruska, Z.; Rajasekaran, K.; Yao, H.; Kincaid, R.; Darlington, D.; Brown, R. L.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T., Co-inoculation of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* to study fungal invasion, colonization, and competition in maize kernels. *Frontiers in Microbiology* **2014**, *5*, 122.
137. Chang, P.-K.; Hua, S.-S. T., Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* TX9-8 competitively prevents aflatoxin accumulation by *A. flavus* isolates of large and small sclerotial morphotypes. *International Journal of Food Microbiology* **2007**, *114* (3), 275-279.
138. Mehl, H.; Cotty, P. J., Influence of plant host species on intraspecific competition during infection by *Aspergillus flavus*. *Plant Pathology* **2013**, *62* (6), 1310-1318.
139. Wicklow, D. T.; Bobell, J. R.; Palmquist, D. E., Effect of intraspecific competition by *Aspergillus flavus* on aflatoxin formation in suspended disc culture. *Mycological research* **2003**, *107* (5), 617-623.
140. Wicklow, D. T.; Horn, B. W., Association between vegetative compatibility and aflatoxin production by *Aspergillus* species during intraspecific competition. *Mycoscience* **2007**, *48* (5), 267-273.
141. Maxwell, L. A.; Callicott, K. A.; Bandyopadhyay, R.; Mehl, H. L.; Orbach, M. J.; Cotty, P. J., Degradation of aflatoxins B1 by atoxigenic *Aspergillus flavus* biocontrol agents. *Plant Disease* **2021**, *105* (9), 2343-2350.
142. Okun, D. O.; Khamis, F. M.; Muluvi, G. M.; Ngeranwa, J. J.; Ombura, F. O.; Yongo, M. O.; Kenya, E. U., Distribution of indigenous strains of atoxigenic and toxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize and peanuts agro-ecological zones of Kenya. *Agriculture & Food Security* **2015**, *4*, 1-10.
143. Bayman, P.; Cotty, P. J., Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. *Canadian Journal of Botany* **1991**, *69* (8), 1707-1711.
144. Puhalla, J. E., Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*. **1985**, *63* (2), 179-183.
145. Pildain, M. B.; Vaamonde, G.; Cabral, D., Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology* **2004**, *93* (1), 31-40.
146. Ehrlich, K. C.; Cotty, P. J., An isolate of *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *Applied Microbiology and biotechnology* **2004**, *65*, 473-478.
147. Dorner, J.; Lamb, M., Development and commercial use of afla-Guard®, an aflatoxin biocontrol agent. *Mycotoxin Research* **2006**, *22*, 33-38.

148. Chang, P.-K.; Horn, B. W.; Dorner, J. W., Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology* **2005**, *42* (11), 914-923.
149. Lavkor, I.; Arioglu, H.; İsil, V.; Oztemiz, S., Biological control of aflatoxigenic fungi on peanut: For the pre-harvest approach. *Turkish Journal Of Field Crops* **2019**, *24* (1), 21-27.
150. Reis, T. A.; Oliveira, T. D.; Zorzete, P.; Faria, P.; Corrêa, B., A non-toxicogenic *Aspergillus flavus* strain prevents the spreading of *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology* **2020**, *181*, 6-8.
151. Mauro, A.; Garcia-Cela, E.; Pietri, A.; Cotty, P. J.; Battilani, P., Biological control products for aflatoxin prevention in Italy: Commercial field evaluation of atoxigenic *Aspergillus flavus* active ingredients. *Toxins* **2018**, *10* (1), 30.
152. Savić, Z.; Dudaš, T.; Loc, M.; Grahovac, M.; Budakov, D.; Jajić, I.; Krstović, S.; Barošević, T.; Krska, R.; Sulyok, M., Biological control of aflatoxin in maize grown in Serbia. *Toxins* **2020**, *12* (3), 162.
153. Bandyopadhyay, R.; Cardwell, K. F., Species of *Trichoderma* and *Aspergillus* as biological control agents against plant diseases in Africa. In *Biological control in IPM Systems in Africa*, CABI Publishing Wallingford UK: 2003; pp 193-206.
154. Mehl, H. L.; Jaime, R.; Callicott, K. A.; Probst, C.; Garber, N. P.; Ortega-Beltran, A.; Grubisha, L. C.; Cotty, P. J., *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* **2012**, *1273* (1), 7-17.
155. Atehnkeng, J.; Ojiambo, P.; Cotty, P.; Bandyopadhyay, R., 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* **2014**, *72*, 62-70.
156. Peles, F.; Sipos, P.; Kovács, S.; Győri, Z.; Pócsi, I.; Pusztahelyi, T., Biological control and mitigation of aflatoxin contamination in commodities. *Toxins* **2021**, *13* (2), 104.
157. Shenge, K. C.; Mehl, H. L.; Cotty, P. J. In *Interactions among active ingredients of a multi-isolate aflatoxin biocontrol product*, 2017 APS Annual Meeting, APSNET: 2017.
158. Bock, C.; Cotty, P. J., Wheat seed colonized with atoxigenic *Aspergillus flavus*: characterization and production of a biopesticide for aflatoxin control. *Biocontrol Science and Technology* **1999**, *9* (4), 529-543.
159. Accinelli, C.; Abbas, H. K.; Little, N. S.; Kotowicz, J. K.; Shier, W. T., Biological control of aflatoxin production in corn using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* administered as a bioplastic-based seed coating. *Crop Protection* **2018**, *107*, 87-92.
160. Abbas, H. K.; Accinelli, C.; Shier, W. T., Biological control of aflatoxin contamination in US crops and the use of bioplastic formulations of *Aspergillus flavus* biocontrol strains to optimize application strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65* (33), 7081-7087.
161. Bandyopadhyay, R.; Atehnkeng, J.; Ortega-Beltran, A.; Akande, A.; Falade, T. D.; Cotty, P. J., "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* **2019**, *10*, 2528.
162. Doster, M. A.; Cotty, P. J.; Michailides, T. J., Evaluation of the atoxigenic *Aspergillus flavus* strain AF36 in pistachio orchards. *Plant Disease* **2014**, *98* (7), 948-956.

163. Weaver, M. A.; Abbas, H. K., Field displacement of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* strains through repeated biological control applications. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*, 1788.
164. Bailey, B.; Bae, H.; Strem, M.; Roberts, D.; Thomas, S.; Crozier, J.; Samuels, G.; Choi, I.-Y.; Holmes, K., Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* **2006**, *224*, 1449-1464.
165. Ortega-Beltran, A.; Moral, J.; Puckett, R. D.; Morgan, D. P.; Cotty, P. J.; Michailides, T. J., Fungal communities associated with almond throughout crop development: Implications for aflatoxin biocontrol management in California. **2018**, *13* (6), e0199127.
166. Lagogianni, C. S.; Tsitsigiannis, D. I., Effective biopesticides and biostimulants to reduce aflatoxins in maize fields. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*, 2645.
167. Mostafa, A. A.; Al-Rahmah, A. N.; Abdel-Megeed, A.; Sayed, S. R.; Hatamleh, A. A., Antagonistic activities of some fungal strains against the toxigenic *Aspergillus flavus* isolate and its aflatoxins productivity. *J. Pure Appl. Microbiol* **2013**, *7*, 169-178.
168. Ren, X.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Mao, J.; Li, P., Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: Inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors. *Toxins* **2020**, *12* (1), 24.
169. La Penna, M.; Nesci, A.; Etcheverry, M., In vitro studies on the potential for biological control on *Aspergillus* section *Flavi* by *Kluyveromyces* spp. *Letters in Applied Microbiology* **2004**, *38* (4), 257-264.
170. Intanoo, M.; Kongkeitkajorn, M. B.; Suriyasathaporn, W.; Phasuk, Y.; Bernard, J. K.; Pattarajinda, V., Effect of supplemental *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii* on aflatoxin M1 excretion in milk of lactating dairy cows. *Animals* **2020**, *10* (4), 709.
171. Shafi, J.; Tian, H.; Ji, M., Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2017**, *31* (3), 446-459.
172. Kong, Q.; Chi, C.; Yu, J.; Shan, S.; Li, Q.; Li, Q.; Guan, B.; Nierman, W. C.; Bennett, J. W., The inhibitory effect of *Bacillus megaterium* on aflatoxin and cyclopiazonic acid biosynthetic pathway gene expression in *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, *98*, 5161-5172.
173. Siahmoshteh, F.; Hamidi-Esfahani, Z.; Spadaro, D.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Razzaghi-Abyaneh, M., Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* **2018**, *89*, 300-307.
174. Yang, X.; Zhang, Q.; Chen, Z.-Y.; Liu, H.; Li, P., Investigation of *Pseudomonas fluorescens* strain 3JW1 on preventing and reducing aflatoxin contaminations in peanuts. *PLoS One* **2017**, *12* (6), e0178810.
175. Manna, M.; Oh, J. Y.; Kim, K. D., Biocontrol activity of volatile-producing *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas protegens* against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production on stored rice grains. *Mycobiology* **2017**, *45* (3), 213-219.
176. Gong, A.-D.; Lei, Y.-Y.; He, W.-J.; Liao, Y.-C.; Ma, L.; Zhang, T.-T.; Zhang, J.-B., The Inhibitory effect of *Pseudomonas stutzeri* YM6 on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxins Production by the Production of Volatile Dimethyl Trisulfide. *Toxins* **2022**, *14* (11), 788.
177. Møller, C. O. D. A.; Freire, L.; Rosim, R. E.; Margalho, L. P.; Balthazar, C. F.; Franco, L. T.; Sant'Ana, A. D. S.; Corassin, C. H.; Rattray, F. P.; Oliveira, C. A. F. D., Effect of lactic acid bacteria

strains on the growth and aflatoxin production potential of *Aspergillus parasiticus*, and their ability to bind aflatoxin B1, ochratoxin A, and zearalenone in vitro. *Frontiers in Microbiology* **2021**, *12*, 655386.

178. Linares-Morales, J. R.; Gutiérrez-Méndez, N.; Rivera-Chavira, B. E.; Pérez-Vega, S. B.; Nevárez-Moorillón, G. V., Biocontrol processes in fruits and fresh produce, the use of lactic acid bacteria as a sustainable option. *Frontiers in Sustainable Food Systems* **2018**, *2*, 50.

179. Ahlberg, S.; Joutsjoki, V.; Laurikkala, S.; Varmanen, P.; Korhonen, H., *Aspergillus flavus* growth inhibition by Lactobacillus strains isolated from traditional fermented Kenyan milk and maize products. *Archives of Microbiology* **2017**, *199*, 457-464.

180. Afshar, P.; Shokrzadeh, M.; Raeisi, S. N.; Ghorbani-HasanSaraei, A.; Nasiraii, L. R., Aflatoxins biotransformation strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **2020**, *178*, 50-58.

181. Gong, A.-D.; Dong, F.-Y.; Hu, M.-J.; Kong, X.-W.; Wei, F.-F.; Gong, S.-J.; Zhang, Y.-M.; Zhang, J.-B.; Wu, A.-B.; Liao, Y.-C., Antifungal activity of volatile emitted from *Enterobacter asburiae* Vt-7 against *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage. *Food Control* **2019**, *106*, 106718.

182. Dong, X.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Yue, X.; Zhang, L.; Chen, X.; Zhang, W.; Chen, L.; Li, P., Inhibitory effect of *Enterobacter cloacae* 3J1EC on *Aspergillus flavus* 3.4408 growth and aflatoxin production. *World Mycotoxin Journal* **2020**, *13* (2), 259-266.

183. Loi, M.; Paciolla, C.; Logrieco, A. F.; Mulè, G., Plant Bioactive Compounds in Pre- and Postharvest Management for Aflatoxins Reduction. *Frontiers in Microbiology* **2020**, *11*.

184. Prakash, B.; Kedia, A.; Mishra, P. K.; Dubey, N., Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—Potentials and challenges. *Food control* **2015**, *47*, 381-391.

185. Regnault-Roger, C.; Vincent, C.; Arnason, J. T., Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology* **2012**, *57*, 405-424.

186. Císarová, M.; Tančinová, D.; Medo, J.; Kačániová, M., The *in vitro* effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **2016**, *51* (10), 668-674.

187. García-Díaz, M.; Gil-Serna, J.; Patiño, B.; García-Cela, E.; Magan, N.; Medina, Á., Assessment of the effect of *Satureja montana* and *Origanum virens* essential oils on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production at different water activities. *Toxins* **2020**, *12* (3), 142.

188. Xiang, F.; Zhao, Q.; Zhao, K.; Pei, H.; Tao, F., The efficacy of composite essential oils against aflatoxigenic fungus *Aspergillus flavus* in maize. *Toxins* **2020**, *12* (9), 562.

189. Chelaghema, A.; Durand, N.; Servent, A.; Mamouni, M.; Poucheret, P.; Schorr-Galindo, S.; Fontana, A.; Strub, C., Antifungal and antimycotoxic activities of 3 essential oils against 3 mycotoxinogenic fungi. *Archives of Microbiology* **2022**, *204* (8), 504.

190. Miri, Y. B.; Benabdallah, A.; Taoudiat, A.; Mahdid, M.; Djenane, D.; Tacer-Caba, Z.; Topkaya, C.; Simal-Gandara, J., Potential of essential oils for protection of Couscous against *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 contamination. *Food Control* **2023**, *145*, 109474.

191. Kabak, B.; Dobson, A. D.; Var, I. I., Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science And Nutrition* **2006**, *46* (8), 593-619.

192. Karlovsky, P.; Suman, M.; Berthiller, F.; De Meester, J.; Eisenbrand, G.; Perrin, I.; Oswald, I. P.; Speijers, G.; Chiodini, A.; Recker, T., Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin research* **2016**, *32*, 179-205.
193. Siwela, A. H.; Siwela, M.; Matindi, G.; Dube, S.; Nziramasanga, N., Decontamination of aflatoxin-contaminated maize by dehulling. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2005**, *85* (15), 2535-2538.
194. Bennett, G. A.; Anderson, R. A., Distribution of aflatoxin and/or zearalenone in wet-milled corn products: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1978**, *26* (5), 1055-1060.
195. Bullerman, L. B.; Bianchini, A., Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology* **2007**, *119* (1-2), 140-146.
196. Raters, M.; Matissek, R., Thermal stability of aflatoxin B 1 and ochratoxin A. *Mycotoxin research* **2008**, *24*, 130-134.
197. Stanley, J.; Patras, A.; Pendyala, B.; Vergne, M. J.; Bansode, R. R., Performance of a UV-A LED system for degradation of aflatoxins B1 and M1 in pure water: kinetics and cytotoxicity study. *Scientific Reports* **2020**, *10* (1), 1-12.
198. Herzallah, S.; Alshawabkeh, K.; Fataftah, A. A., Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight, γ -radiation, and microwave heating. *Journal of Applied Poultry Research* **2008**, *17* (4), 515-521.
199. Ghanem, I.; Orfi, M.; Shamma, M., Effect of gamma radiation on the inactivation of aflatoxin B1 in food and feed crops. *Brazilian Journal of Microbiology* **2008**, *39*, 787-791.
200. Di Stefano, V.; Pitonzo, R.; Cicero, N.; D'Oca, M. C., Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2014**, *31* (12), 2034-2039.
201. Shi, H.; Illeleji, K.; Stroshine, R. L.; Keener, K.; Jensen, J. L., Reduction of Aflatoxin in Corn by High Voltage Atmospheric Cold Plasma. *Food and Bioprocess Technology* **2017**, *10* (6), 1042-1052.
202. Lin, C.-M.; Patel, A. K.; Chiu, Y.-C.; Hou, C.-Y.; Kuo, C.-H.; Dong, C.-D.; Chen, H.-L., The application of novel rotary plasma jets to inhibit the aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* and the spoilage fungus, *Aspergillus niger* on peanuts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2022**, *78*, 102994.
203. Gavahian, M.; Sheu, S. C.; Magnani, M.; Mousavi Khaneghah, A., Emerging technologies for mycotoxins removal from foods: Recent advances, roles in sustainable food consumption, and strategies for industrial applications. *Journal of Food Processing and Preservation* **2022**, *46* (10), e15922.
204. Bhat, Z. R.; Hakeem, K. R., Removal and Detoxification of Aflatoxins. In *Aflatoxins in Food: A Recent Perspective*, Springer: 2022; pp 195-205.
205. Kang, F.; Ge, Y.; Hu, X.; Goikavi, C.; Waigi, M. G.; Gao, Y.; Ling, W., Understanding the sorption mechanisms of aflatoxin B1 to kaolinite, illite, and smectite clays via a comparative computational study. *Journal of hazardous materials* **2016**, *320*, 80-87.
206. Javanmardi, F.; Khodaei, D.; Sheidaei, Z.; Bashiry, M.; Nayebzadeh, K.; Vasseghian, Y.; Mousavi Khaneghah, A., Decontamination of Aflatoxins in Edible Oils: A Comprehensive Review. *Food Reviews International* **2022**, *38* (7), 1410-1426.

207. Muller, H., A survey of methods of decontaminating mycotoxins. I. Physical methods. *Anim. Res. Develop* **1983**, *18*, 70-96.
208. Ciegler, A.; Peterson, R., Aflatoxin detoxification: hydroxydihydro-aflatoxin B. *Applied microbiology* **1968**, *16* (4), 665.
209. Doyle, M.; Applebaum, R.; Brackett, R.; Marth, E., Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *Journal of Food Protection* **1982**, *45* (10), 964-971.
210. Kiermeier, F.; Ruffer, L., Influence of aflatoxin B 1 on the phosphatases in vitro. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1974**, *156*, 65-71.
211. Weng, C. Y.; Martinez, A. J.; Park, D. L., Efficacy and permanency of ammonia treatment in reducing aflatoxin levels in corn. *Food Additives & Contaminants* **1994**, *11* (6), 649-658.
212. Proctor, A.; Ahmedna*, M.; Kumar, J.; Goktepe, I., Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food additives and contaminants* **2004**, *21* (8), 786-793.
213. Sipos, P.; Peles, F.; Brassó, D. L.; Béri, B.; Pusztahelyi, T.; Pócsi, I.; Gyóri, Z., Physical and chemical methods for reduction in aflatoxin content of feed and food. *Toxins* **2021**, *13* (3), 204.
214. Dwarakanath, C.; Rayner, E.; Mann, G.; Dollear, F., Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1968**, *45* (2), 93-95.
215. Maeba, H. I.; Takamoto, Y. U.; Kamimura, M. I.; Miura, T. O., Destruction and detoxification of aflatoxins with ozone. *Journal of Food Science* **1988**, *53* (2), 667-668.
216. Akbas, M. Y.; Ozdemir, M., Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006**, *86* (13), 2099-2104.
217. Soni, P.; Gangurde, S. S.; Ortega-Beltran, A.; Kumar, R.; Parmar, S.; Sudini, H. K.; Lei, Y.; Ni, X.; Huai, D.; Fountain, J. C.; Njoroge, S.; Mahuku, G.; Radhakrishnan, T.; Zhuang, W.; Guo, B.; Liao, B.; Singam, P.; Pandey, M. K.; Bandyopadhyay, R.; Varshney, R. K., Functional Biology and Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions for Aflatoxin Contamination in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) and Maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Microbiology* **2020**, *11*.
218. Bhatnagar, D.; Rajasekaran, K.; Gilbert, M.; Cary, J.; Magan, N., Advances in molecular and genomic research to safeguard food and feed supply from aflatoxin contamination. *World Mycotoxin Journal* **2018**, *11* (1), 47-72.
219. Williams, W.; Krakowsky, M.; Scully, B.; Brown, R.; Menkir, A.; Warburton, M.; Windham, G., Identifying and developing maize germplasm with resistance to accumulation of aflatoxins. *World Mycotoxin Journal* **2015**, *8* (2), 193-209.
220. Brown, R.; Chen, Z.-Y.; Cleveland, T.; Russin, J., Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* **1999**, *89* (2), 113-117.
221. Brown, R. L.; Williams, W. P.; Windham, G. L.; Menkir, A.; Chen, Z.-Y., Evaluation of African-bred maize germplasm lines for resistance to aflatoxin accumulation. *Agronomy* **2016**, *6* (2), 24.
222. Cary, J. W.; Rajasekaran, K.; Brown, R. L.; Luo, M.; Chen, Z.-Y.; Bhatnagar, D., Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxins* **2011**, *3* (6), 678-696.

223. Rajasekaran, K.; Sayler, R. J.; Sickler, C. M.; Majumdar, R.; Jaynes, J. M.; Cary, J. W., Control of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in transgenic maize kernels expressing a tachyplestin-derived synthetic peptide, AGM182. *Plant Science* **2018**, *270*, 150-156.
224. Raruang, Y.; Omolehin, O.; Hu, D.; Wei, Q.; Han, Z.-Q.; Rajasekaran, K.; Cary, J. W.; Wang, K.; Chen, Z.-Y., Host induced gene silencing targeting *Aspergillus flavus* aflM reduced aflatoxin contamination in transgenic maize under field conditions. *Frontiers in microbiology* **2020**, *11*, 754.
225. Masanga, J. O.; Matheka, J. M.; Omer, R. A.; Ommeh, S. C.; Monda, E. O.; Alakonya, A. E., Downregulation of transcription factor aflR in *Aspergillus flavus* confers reduction to aflatoxin accumulation in transgenic maize with alteration of host plant architecture. *Plant Cell Reports* **2015**, *34*, 1379-1387.
226. Carlile, M., Genetic exchange and gene flow: their promotion and prevention. *Evolutionary Biology of the Fungi* **1987**, 203-214.
227. Strom, N. B.; Bushley, K. E., Two genomes are better than one: history, genetics, and biotechnological applications of fungal heterokaryons. *Fungal Biology and Biotechnology* **2016**, *3* (1), 1-14.
228. Pontecorvo, G., The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology* **1956**, *10* (1), 393-400.
229. Caten, C.; Jinks, J., Heterokaryosis: its significance in wild homothallic ascomycetes and fungi imperfecti. *Transactions of the British Mycological Society* **1966**, *49* (1), 81-93.
230. Leslie, J. F., Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* **1993**, *31* (1), 127-150.
231. Saupe, S. J.; Clavé, C.; Bégueret, J., Vegetative incompatibility in filamentous fungi: *Podospora* and *Neurospora* provide some clues. *Current Opinion in Microbiology* **2000**, *3* (6), 608-612.
232. Caten, C., Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Microbiology* **1972**, *72* (2), 221-229.
233. Biella, S.; Smith, M. L.; Aist, J. R.; Cortesi, P.; Milgroom, M. G., Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **2002**, *269* (1506), 2269-2276.
234. Hartl, D. L.; Dempster, E. R.; Brown, S. W., Adaptive significance of vegetative incompatibility in *Neurospora crassa*. *Genetics* **1975**, *81* (3), 553-569.
235. Glass, N. L.; Dementhon, K., Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* **2006**, *9* (6), 553-558.
236. Hutchison, E.; Glass, N.; Witzany, G., Biocommunication of Fungi. **2012**.
237. Grubisha, L. C.; Cotty, P. J., Genetic isolation among sympatric vegetative compatibility groups of the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Molecular Ecology* **2010**, *19* (2), 269-280.
238. Ehrlich, K. C.; Montalbano, B. G.; Cotty, P. J., Analysis of single nucleotide polymorphisms in three genes shows evidence for genetic isolation of certain *Aspergillus flavus* vegetative compatibility groups. *FEMS Microbiology Letters* **2007**, *268* (2), 231-236.

239. Hua, S. S. T.; McAlpin, C. E.; Chang, P.-K.; Sarreal, S. B. L., Characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates from pistachio. *Mycotoxin Research* **2012**, *28*, 67-75.
240. Moore, G. G.; Singh, R.; Horn, B. W.; Carbone, I., Recombination and lineage-specific gene loss in the aflatoxin gene cluster of *Aspergillus flavus*. *Molecular Ecology* **2009**, *18* (23), 4870-4887.
241. Olarte, R. A.; Horn, B. W.; Dorner, J. W.; Monacell, J. T.; Singh, R.; Stone, E. A.; Carbone, I., Effect of sexual recombination on population diversity in aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and evidence for cryptic heterokaryosis. *Molecular Ecology* **2012**, *21* (6), 1453-1476.
242. Horn, B. W.; Moore, G. G.; Carbone, I., Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia* **2009**, *101* (3), 423-429.
243. Horn, B. W.; Gell, R. M.; Singh, R.; Sorensen, R. B.; Carbone, I., Sexual reproduction in *Aspergillus flavus* sclerotia: acquisition of novel alleles from soil populations and uniparental mitochondrial inheritance. *PLoS one* **2016**, *11* (1), e0146169.
244. Monacell, J. T., Identification of Heterokaryon Incompatibility Genes in *Aspergillus* using Array Comparative Genome Hybridization and Whole Genome Sequencing. Doctoral dissertation, North Carolina State University **2014**.
245. Barros, G.; Torres, A.; Rodriguez, M.; Chulze, S., Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. *Soil Biology and Biochemistry* **2006**, *38* (1), 145-152.
246. Moore, G. G.; Elliott, J. L.; Singh, R.; Horn, B. W.; Dorner, J. W.; Stone, E. A.; Chulze, S. N.; Barros, G. G.; Naik, M. K.; Wright, G. C., Sexuality generates diversity in the aflatoxin gene cluster: evidence on a global scale. *PLoS pathogens* **2013**, *9* (8), e1003574.
247. Molo, M. S.; White, J. B.; Cornish, V.; Gell, R. M.; Baars, O.; Singh, R.; Carbone, M. A.; Isakeit, T.; Wise, K. A.; Woloshuk, C. P., Asymmetrical lineage introgression and recombination in populations of *Aspergillus flavus*: Implications for biological control. *Plos one* **2022**, *17* (10), e0276556.
248. Arafa, R.; Emeran, A.; Mashaal, S., Vegetative Compatibility Groups of physiological races of *Pyricularia grisea* in Egypt. *Egyptian Journal of Agricultural Research* **2013**, *91*, 2013.
249. Donner, M.; Atehnkeng, J.; Sikora, R.; Bandyopadhyay, R.; Cotty, P., Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria. *Food Additives and Contaminants* **2010**, *27* (5), 576-590.
250. Puhalla, J. E., Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* **1985**, *63* (2), 179-183.
251. Correll, J.; Klittich, C.; Leslie, J., Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* **1987**, *77* (12), 1640-1646.
252. Bayman, P.; Cotty, P. J., Improved media for selecting nitrate-nonutilizing mutants in *Aspergillus flavus*. *Mycologia* **1991**, *83* (3), 311-316.
253. Cove, D., Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterisation of chlorate resistant mutants. *Heredity* **1976**, *36* (2), 191-203.
254. Cotty, P. J., Comparison of four media for the isolation of *Aspergillus flavus* group fungi. *Mycopathologia* **1994**, *125*, 157-162.
255. Cove, D. J., Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG* **1976**, *146* (2), 147-159.

256. Macdonald, D. W.; Cove, D. J., Studies on Temperature-Sensitive Mutants Affecting the Assimilatory Nitrate Reductase of *Aspergillus nidulans*. *European Journal of Biochemistry* **1974**, *47* (1), 107-110.
257. Scazzocchio, C., The genetic determination of molybdoflavoenzymes in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the Less Common Metals* **1974**, *36* (1-2), 461-464.
258. Horn, B.; Greene, R.; Sobolev, V.; Dorner, J.; Powell, J.; Layton, R., Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. *Mycologia* **1996**, *88* (4), 574-587.
259. Mauro, A.; Battilani, P.; Callicott, K. A.; Giorni, P.; Pietri, A.; Cotty, P. J., Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* **2013**, *162* (1), 1-7.
260. Lin, M.; Dianese, J., A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* **1976**, *66* (12), 1466-1469.
261. Sourabie, P.; Nikiema, P.; Barro, N.; Savadogo, A., Aflatoxigenic potential of *Aspergillus* spp. isolated from groundnut seeds, in Burkina Faso, West Africa. *African Journal of Microbiology Research* **2012**, *6*, 2603-2609.
262. Picot, A.; Doster, M.; Islam, M.-S.; Callicott, K.; Ortega-Beltran, A.; Cotty, P.; Michailides, T., 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* **2017**, 265.
263. Cotty, P.; Taylor, D., Influence of complementation medium composition on vegetative compatibility analyses of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* **2003**, *93*, S18.
264. Medina, A.; Rodriguez, A.; Magan, N., Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in microbiology* **2014**, *5*, 348.
265. Battilani, P.; Toscano, P.; der Fels-Klerx, V.; Moretti, A.; Camardo Leggieri, M.; Brera, C.; Rortais, A.; Goumperis, T.; Robinson, T., Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific reports* **2016**, *6* (1), 1-7.
266. Cotty, P., Effect of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on aflatoxin contamination of developing cottonseed. *Plant disease* **1990**, *74* (3), 233-235.
267. Lewis, M. H.; Carbone, I.; Luis, J. M.; Payne, G. A.; Bowen, K. L.; Hagan, A. K.; Kemerait, R.; Heiniger, R.; Ojiambo, P. S., Biocontrol strains differentially shift the genetic structure of indigenous soil populations of *Aspergillus flavus*. *Frontiers in microbiology* **2019**, *10*, 1738.
268. Bandyopadhyay, R.; Ortega-Beltran, A.; Akande, A.; Mutegi, C.; Atehnkeng, J.; Kaptoge, L.; Senghor, A.; Adhikari, B.; Cotty, P., Biological control of aflatoxins in Africa: current status and potential challenges in the face of climate change. *World Mycotoxin Journal* **2016**, *9* (5), 771-789.
269. Atehnkeng, J.; Ojiambo, P.; Cotty, P.; Bandyopadhyay, R., 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* **2014**, *72*, 62-70.
270. Chulze, S. N.; Palazzini, J. M.; Torres, A. M.; Barros, G.; Ponsone, M. L.; Geisen, R.; Schmidt-Heydt, M.; Köhl, J., Biological control as a strategy to reduce the impact of mycotoxins in peanuts, grapes and cereals in Argentina. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2015**, *32* (4), 471-479.

271. Cotty, P., Biocompetitive exclusion of toxigenic fungi. *The Mycotoxin Factbook* **2006**, 179-197.
272. Moral, J.; Garcia-Lopez, M. T.; Camiletti, B. X.; Jaime, R.; Michailides, T. J.; Bandyopadhyay, R.; Ortega-Beltran, A., Present status and perspective on the future use of aflatoxin biocontrol products. *Agronomy* **2020**, *10* (4), 491.
273. Probst, C.; Cotty, P. J., Relationships between in vivo and in vitro aflatoxin production: reliable prediction of fungal ability to contaminate maize with aflatoxins. *Fungal Biology* **2012**, *116* (4), 503-510.
274. Ortega-Beltran, A.; Moral, J.; Picot, A.; Puckett, R. D.; Cotty, P. J.; Michailides, T. J., Atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates endemic to almond, fig, and pistachio orchards in California with potential to reduce aflatoxin contamination in these crops. *Plant Disease* **2019**, *103* (5), 905-912.
275. Atehnkeng, J.; Ojiambo, P.; Ikotun, T.; Sikora, R.; Cotty, P.; Bandyopadhyay, R., Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food additives and Contaminants* **2008**, *25* (10), 1264-1271.
276. Probst, C.; Bandyopadhyay, R.; Price, L.; Cotty, P., Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya. *Plant Disease* **2011**, *95* (2), 212-218.
277. Agbetiameh, D.; Ortega-Beltran, A.; Awuah, R. T.; Atehnkeng, J.; Islam, M.-S.; Callicott, K. A.; Cotty, P. J.; Bandyopadhyay, R., Potential of atoxigenic *Aspergillus flavus* vegetative compatibility groups associated with maize and groundnut in Ghana as biocontrol agents for aflatoxin management. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*, 2069.
278. Zhou, L.; Wei, D.-D.; Selvaraj, J. N.; Shang, B.; Zhang, C.-S.; Xing, F.-G.; Zhao, Y.-J.; Wang, Y.; Liu, Y., A strain of *Aspergillus flavus* from China shows potential as a biocontrol agent for aflatoxin contamination. *Biocontrol Science and Technology* **2015**, *25* (5), 583-592.
279. Grubisha, L. C.; Cotty, P. J., 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* **2015**, *81* (17), 5889-5899.
280. Atehnkeng, J.; Donner, M.; Ojiambo, P. S.; Ikotun, B.; Augusto, J.; Cotty, P. J.; Bandyopadhyay, R., Environmental distribution and genetic diversity of vegetative compatibility groups determine biocontrol strategies to mitigate aflatoxin contamination of maize by *Aspergillus flavus*. *Microbial Biotechnology* **2016**, *9* (1), 75-88.
281. Atehnkeng, J.; Donner, M.; Ojiambo, P. S.; Ikotun, B.; Augusto, J.; Cotty, P. J.; Bandyopadhyay, R., Environmental distribution and genetic diversity of vegetative compatibility groups determine biocontrol strategies to mitigate aflatoxin contamination of maize by *Aspergillus flavus*. *Microb Biotechnol* **2016**, *9* (1), 75-88.
282. Brown, R. L.; Cotty, P. J.; Cleveland, T. E., Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection* **1991**, *54* (8), 623-626.
283. Abbas, H. K.; Zablotowicz, R. M.; Bruns, H. A.; Abel, C. A., Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology* **2006**, *16* (5), 437-449.
284. Ojiambo, P.; Scherm, H., Biological and application-oriented factors influencing plant disease suppression by biological control: a meta-analytical review. *Phytopathology* **2006**, *96* (11), 1168-1174.

285. Xu, X.-M.; Jeffries, P.; Pautasso, M.; Jeger, M. J., A numerical study of combined use of two biocontrol agents with different biocontrol mechanisms in controlling foliar pathogens. *Phytopathology* **2011**, *101* (9), 1032-1044.
286. Mehl, H.; Cotty, P., Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology* **2010**, *100* (2), 150-159.
287. Bandyopadhyay, R.; Atehnkeng, J.; Ortega-Beltran, A.; Akande, A.; Falade, T. D. O.; Cotty, P. J., "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* **2019**, *10*.
288. Ortega-Beltran, A.; Grubisha, L.; Callicott, K.; Cotty, P., The vegetative compatibility group to which the US biocontrol agent *Aspergillus flavus* AF36 belongs is also endemic to Mexico. *Journal of Applied Microbiology* **2016**, *120* (4), 986-998.
289. Kagot, V.; Okoth, S.; De Boevre, M.; De Saeger, S., Biocontrol of *Aspergillus* and *Fusarium* Mycotoxins in Africa: Benefits and Limitations. *Toxins* **2019**, *11* (2), 109.
290. King, E. D.; Bassi Jr, A. B.; Ross, D. C.; Druebbisch, B., An industry perspective on the use of "atoxigenic" strains of *Aspergillus flavus* as biological control agents and the significance of cyclopiazonic acid. *Toxin Reviews* **2011**, *30* (2-3), 33-41.
291. Moore, G. G., Practical considerations will ensure the continued success of pre-harvest biocontrol using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* strains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2022**, *62* (15), 4208-4225.
292. Uka, V.; Moore, G. G.; Arroyo-Manzanares, N.; Nebija, D.; De Saeger, S.; Diana Di Mavungu, J., Secondary metabolite dereplication and phylogenetic analysis identify various emerging mycotoxins and reveal the high intra-species diversity in *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*, 667.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Καραμάνος, Α., *Τα σιτηρά των θερμών κλιμάτων: Αραβόσιτος, σόργο, ρύζι, κεχρί*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Παπαζήση. **1999**, 21-197.
- Δαλιάνης, Κ., *Ανοιξιάτικα Σιτηρά*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη. **1983**, 15-234
- Παπακώστα-Τασοπούλου, Δ., *Ειδική Γεωργία Ι - Τεύχος Α Σιτηρά Χειμερινά-Εαρινά*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία. **2008**, 183-274.