

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« Δυναμική ικανότητα παραγωγής μυκοτοξινών από μύκητες που απομονώθηκαν από ιχθυοτροφές»

« Potential of mycotoxins production by fungi isolated from fish feed constituents

Μαββίδου Κωνσταντίνα

ΒΟΛΟΣ, 2016

**« Δυναμική ικανότητα παραγωγής μυκοτοξινών από μύκητες που
απομονώθηκαν από ιχθυοτροφές»**

Διμελής εξεταστική επιτροπή:

1) Ιωάννης Μποζιάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.

2) Ευάγγελος Βέλιος, Επίκουρος καθηγητής, Φυτοπαθολογία- Σύγχρονες Μέθοδοι Διαγνωστικής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Αφιερώνεται,

Στην μνήμη του πολυαγαπημένου μου φίλου,

Μιχάλη Τριανταφύλλου

Ευχαριστίες

Φτάνοντας στο αποτέλεσμα μιας κοπιαστικής και μακροχρόνιας προσπάθειας με την συγγραφή της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην προσπάθεια αυτή.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Μποζιάρη Επιβλέπων την παρούσας μελέτης για τη βοήθεια του, την καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη που έδειξε απέναντί μου κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Ευάγγελο Βέλλιο, μέλους της εξεταστικής επιτροπής, για την αμέριστη βοήθειά του κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Ευαγγελία Παναγιωτάκη και την Δρ Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά τους, καθώς επίσης και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές και την στήριξή τους, τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας.

Τέλος ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ, μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου, θα ήθελα να εκφράσω στους γονείς μου και στην αγαπημένη μου αδερφή , για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

Περίληψη

Με τον όρο ιχθυοτροφές, νοούνται όλα τα είδη ζωντανών ή όχι υλών, βιομηχανικής ή όχι προελεύσεως, που ως τροφές μπορεί να χορηγηθούν σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς ιχθύων. Με την χορήγηση καθορισμένης ημερισίας ποσότητας ιχθυοτροφής επιδιώκεται η κάλυψη των ιχθύων σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά. Ωστόσο, στην κατηγορία αυτή των τροφίμων απαντώνται πολλές φορές βιώσιμα σπόρια μυκήτων. Σημαντικότερη της παρουσίας των μυκήτων στις ιχθυοτροφές είναι η επιμόλυνση αυτών με μυκοτοξίνες, οι οποίες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων. Οι ουσίες αυτές είναι πολύ τοξικές, επικίνδυνες και κάποιες από αυτές καρκινογόνες. Τα τρόφιμα που έχουν προσβληθεί από μυκοτοξίνες, καθίστανται βλαβερά και εγκυμονούν σοβαρούς κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών.

Σύμφωνα με μακροσκοπική παρατήρηση που πραγματοποιήθηκε σε ιχθυοτροφές σε εννέα δείγματα από αυτά, ανιχνεύθηκαν βιώσιμα σπόρια μυκήτων, που πιθανώς να ανήκουν στα γένη *Fusarium*, *Penicillium* και *Aspergillus*. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της δυνητικής ικανότητας παραγωγής μυκοτοξινών από τους μύκητες που ανιχνεύθηκαν.

Ελέγχθηκαν εννιά εμπορικά δείγματα ιχθυοτροφών, τα οποία προέρχονταν από ιχθυάλευρο, καλαμποκάλευρο, άλευρο πουλερικών και ηλιάλευρο. Τρία δείγματα τα οποία προέρχονταν το ένα από ιχθυάλευρο και τα άλλα δύο από καλαμποκάλευρο πιθανώς είχαν μολυνθεί από μύκητες του γένους *Fusarium*. Επίσης άλλα τρία δείγματα τα οποία προέρχονταν το ένα από ηλιάλευρο και τα άλλα δύο από άλευρο πουλερικών, πιθανώς είχαν μολυνθεί από μύκητες του γένους *Penicillium*. Τέλος, τα

επόμενα τρία δείγματα τα οποία προέρχονταν το ένα από ιχθυάλευρο και τα άλλα δύο από ηλιάλευρο, πιθανώς είχαν μολυνθεί από μύκητες του γένους *Aspergillus*.

Στο συγκεκριμένο πείραμα γίνεται έρευνα, στις απομονώσεις των μυκήτων του προηγούμενου πειράματος, με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και την χρήση εξειδικευμένων εκκινήτων με σκοπό να δούμε αν εντοπίζεται:

- στα δείγματα που μολύνθηκαν με μύκητες του γένους *Fusarium*, το γονίδιο που επάγει την παραγωγή φουμονισίνης,
- στα δείγματα που μολύνθηκαν από μύκητες του γένους *Penicillium*, το γονίδιο που επάγει την παραγωγή πατουλίνης.
- στα δείγματα που μολύνθηκαν από μύκητες του γένους *Aspergillus*, το γονίδιο που επάγει την παραγωγή αφατοξίνης.

Στα αποτελέσματα δεν παρουσιάστηκε η δυνητική ικανότητα παραγωγής μυκοτοξινών, διότι σε κανένα από τα εννέα δείγματα δεν ανιχνεύθηκαν τα γονίδια τα οποία επάγουν την παραγωγή μυκοτοξινών.

Λέξεις κλειδιά: Μυκοτοξίνες, Ιχθυοτροφές, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Abstract

Fish feed are all kinds of living or not substances, of industrial or not origin that can be used for feeding aquaculture fish. By supplying fish with daily-fixed quantity of feed covers the needs of fish with energy and nutrients. Fish feed and fish feed constituents can be contaminated with alive fungi and or their spores. The presence of fungi in fish feed is concomitant with the possibility of mycotoxins presence. Mycotoxins are fungal secondary metabolites. These compounds are very toxic, and some of them highly carcinogenic. Food and feed contaminated with mycotoxins are harmful and very dangerous for the health of the consumers and domestic animals.

According to a previous study dealt with macroscopic examination of nine (9) fish-feed constituents samples, viable fungal spores were detected which belonged to genera of *Fusarium*, *Penicillium* and *Aspergillus*. The aim of this study was to determine the mycotoxin producing ability by fungi that were detected in this previous study.

Nine samples of fish feed constituents were sampled in this study, such as, corn meal, poultry meal, fish meal and sunflower meal. Three samples that one of them was isolated from fish meal and the other two which were isolated from corn meal, have been contaminated by fungi of genera *Fusarium*. Moreover, three more samples that one of them was isolated from sunflower meal and the other two were isolated from poultry meal, have been contaminated by fungi of genera *Penicillium*. Finally, the last three samples that one of them was isolated from fish meal and the other two were isolated from sunflower meal, have been contaminated by fungi of genera *Aspergillus*.

In this experiment, polymerase chain reaction (PCR) and specific primers was used to conclude whether or not:

- the *Fusarium* genera that isolated, contain the gene responsible for biosynthesis of fumonisin,
- the *Penicillium* genera that isolated, contain the gene responsible for biosynthesis of patulin
- the *Aspergillus* genera that isolated, contain the gene responsible for biosynthesis of aflatoxin.

Results showed no mycotoxin producing ability since the genes that involves in biosynthesis of mycotoxins weren't detected in none sample.

Key words: Mycotoxins, Fish feed, Polymerase Chain Reaction (PCR)

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Γενικά.....	12
1.2 Μυκοτοξίνες.....	13
1.2.1 Ορισμός των μυκοτοξινών	13
1.2.2 Τοξικότητα μυκοτοξινών.....	13
1.2.3 Κυριότερες μυκοτοξίνες.....	14
1.2.4 Μυκοτοξικώσεις στους ιχθύες.....	15
1.3 Φουμονισίνες.....	17
1.3.1 Γενικά στοιχεία.....	17
1.3.2 Μύκητες που παράγουν φουμονισίνες	17
1.3.3 Κυριότερες φουμονισίνες.....	18
1.3.4 Τοξικότητα φουμονισινών.....	19
1.4 Πατουλίνη.....	20
1.4.1 Γενικά στοιχεία.....	20
1.4.2 Μύκητες που παράγουν πατουλίνη	21
1.4.3 Τοξικές επιδράσεις της πατουλίνης.....	21
1.5 Αφλατοξίνες	22
1.5.1 Γενικά στοιχεία.....	22
1.5.2 Μύκητες που παράγουν αφλατοξίνες	22
1.5.3 Κυριότερες αφλατοξίνες.....	23
1.5.4 Τοξικότητα αφλατοξινών	24
1.6 Αναλυτικές τεχνικές για την απομόνωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα τρόφιμα.	25
1.6.1 Τεχνικές χρωματογραφίας.....	25
1.6.2 Ενζυματικές τεχνικές.....	25
1.6.3 Ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή μυκοτοξινών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	26
1.7 Σκοπός της εργασίας	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
2.1 Δείγματα αλεύρων που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη έρευνα.....	29
2.1.1 Δείγματα αλεύρων που μολύνθηκαν από μύκητες του γένους <i>Fusarium</i>	29
2.1.2 Δείγματα αλεύρων που μολύνθηκαν από μύκητες του γένους <i>Penicillium</i>	29
2.1.3 Δείγματα αλεύρων που μολύνθηκαν από μύκητες του γένους <i>Aspergillus</i>	30
2.2 Εξαγωγή ολικού DNA από τις απομονώσεις των γενών <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> και <i>Aspergillus</i>	30

2.2.1 ΥΛΙΚΑ	31
2.2.2 Μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του ολικού DNA από καλλιέργειες μυκήτων των γενών <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> και <i>Aspergillus</i>	31
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	34
2.3.1 Ταυτοποίηση απομονώσεων του γένους <i>Fusarium</i> στο είδος <i>F.verticillioides</i> με την χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.	36
2.3.2 Έλεγχος των απομονώσεων μυκήτων του γένους <i>Fusarium</i> για την ανίχνευση του γονιδίου <i>fum1</i> με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.	37
2.3.3 Έλεγχος των απομονώσεων μυκήτων του γένους <i>Penicillium</i> για την ανίχνευση του γονιδίου <i>HDI1</i> με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.	38
2.3.4 Έλεγχος των απομονώσεων μυκήτων του γένους <i>Aspergillus</i> για την ανίχνευση του γονιδίου <i>alfR1</i> και <i>alfR2</i> με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.	39
2.3.4.1. Επιλογή πρώτου ζεύγους εκκινητών για την ανίχνευση του γονιδίου της αφλατοξίνης.	39
2.3.4.2 Επιλογή δεύτερου ζεύγους εκκινητών για την ανίχνευση του γονιδίου της αφλατοξίνης.	40
2.4 Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
3.1 Αποτελέσματα συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού DNA απομονώσεων των γενών <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> και <i>Aspergillus</i>	45
3.1.1 Αποτελέσματα συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού DNA απομονώσεων του γένους <i>Fusarium</i>	45
3.1.2 Αποτελέσματα συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού DNA απομονώσεων του γένους <i>Penicillium</i>	45
3.1.3 Συγκέντρωση και καθαρότητα ολικού DNA απομονώσεων του γένους <i>Aspergillus</i>	46
3.2 Κατάταξη απομονώσεων του γένους <i>Fusarium</i> σε επίπεδο είδους (<i>F.verticillioides</i>) με τη χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών <i>Ver1</i> και <i>Ver2</i>	47
3.3 Ανίχνευση του γονιδίου <i>fum1</i> στις απομονώσεις του γένους <i>Fusarium</i> , το οποίο επάγει την παραγωγή φουμονισίνης.	48
3.4 Ανίχνευση του γονιδίου <i>HDI1</i> , στις απομονώσεις του γένους <i>Penicillium</i> , το οποίο επάγει την παραγωγή πατουλίνης	50
3.5 Ανίχνευση του γονιδίου <i>alfR1</i> , στις απομονώσεις του γένους <i>Aspergillus</i> , το οποίο επάγει την παραγωγή αφλατοξίνης	51
3.6 Ανίχνευση του γονιδίου <i>alfR2</i> , στις απομονώσεις του γένους <i>Aspergillus</i> , το οποίο επάγει την παραγωγή αφλατοξίνης	53
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Οι ιχθύες και τα προϊόντα τους αποτελούν πολύ σημαντική πηγή τροφής, τόσο για τα ζώα όσο και για τους ανθρώπους. Έτσι, η αυξανόμενη απαίτησή τους οδήγησε στην γρήγορη ανάπτυξη της ιχθυοκαλλιέργειας (Myhr & Dalmo, 2005). Το κύριο αντικείμενο της διατροφής των ιχθύων είναι να προσφέρει ένα μείγμα συστατικών διατροφικά ισορροπημένο, έτσι ώστε το τελικό προϊόν να εξασφαλίζει, την διατήρηση, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγική διαδικασία, την ποιότητα της σάρκας και την υγεία των ιχθύων, σε ένα αποδεκτό κόστος (NRC, 1993).

Η ποιότητα των προϊόντων τα οποία χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι ένας παρεμπροδιστικός παράγοντας, διότι αυτές οι τροφές αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μυκήτων, οι οποίοι κάτω από ευνοϊκές συνθήκες είναι ικανοί να παράξουν μυκοτοξίνες. Η παραγωγή τέτοιων τοξικών μεταβολίτων μπορεί να συμβεί κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών, μετά την αποθήκευση της συγκομιδής ή κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των ιχθυοτροφών (CAST Council for Agricultural Science and Technology, 2003).

Η χρήση υλικών κυρίως φυτικής προέλευσης στις ιχθυοτροφές, όπως το καλαμπόκι, ενισχύει τόσο το ρίσκο παραγωγής μυκοτοξινών κατά την διάρκεια παρασκευής ιχθυοτροφών, όσο και κατά την διάρκεια αποθήκευσής τους (Spring & Fegan, 2005).

1.2 Μυκοτοξίνες

1.2.1 Ορισμός των μυκοτοξινών

Ο όρος μυκοτοξίνη, προέρχεται από την ελληνική λέξη μύκης και τη λατινική *toxicum*. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από τη χημική σταθερότητα του μορίου τους και τις τοξικές τους επιδράσεις (Bullerman, 2000). Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες μυκηλιακών μυκήτων, οι οποίες επιδρούν στα φυτά, στα ζώα και στους ανθρώπους, με αποτέλεσμα να προκαλούν ασθένειες και τεράστιες οικονομικές απώλειες. (Mohamed, 2010). Δευτερογενείς μεταβολίτες, ονομάζονται διότι δε φαίνεται να είναι απαραίτητες για την φυσιολογική, βιοχημική και αναπαραγωγική δραστηριότητα του κυττάρου (Islam et al 1988). Οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες, οι τριχοθηκίνες, οι φουμονισίνες, οι πατουλίνες, ζερεαλενόνες, είναι από τις τοξίνες με την μεγαλύτερη οικονομική σημασία (Hussein & Jeffrey, 2001).

1.2.2 Τοξικότητα μυκοτοξινών

Για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων των μυκοτοξινών στους διάφορους οργανισμούς χρησιμοποιείται επίσης και ο όρος μυκοτοξίκωση (*mycotoxycosis*). Πιο συγκεκριμένα, μυκοτοξικώσεις ονομάζονται οι τοξικές επιδράσεις των μυκοτοξινών επί συγκεκριμένων οργάνων, όπως το ήπαρ, τα νεφρά και οι πνεύμονες, αλλά και επί συστημάτων, όπως το νευρικό, το ενδοκρινικό και το ανοσολογικό (Chu, 2006).

Ορισμένες μυκοτοξίνες μπορεί να προκαλέσουν οξεία τοξικότητα (*acute toxicity*), άλλες μπορεί να προκαλέσουν χρόνια τοξικότητα (*chronic toxicity*), ενώ υπάρχουν και μυκοτοξίνες που μπορεί να προκαλέσουν συνδυασμό των δυο. Ο άνθρωπος μπορεί να επιβαρυνθεί με μυκοτοξίνες, από μολυσμένη με μύκητες τροφή ή μέσω της

τροφικής αλυσίδας, δηλαδή από προϊόντα που παράγονται από ζώα, (αυγά, κρέας, γάλα), τα οποία έχουν εκτραφεί από ζωοτροφές, οι οποίες ήταν μολυσμένες με μύκητες (Frisvad et al, 2007).

1.2.3 Κυριότερες μυκοτοξίνες

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι κυριότερες μυκοτοξίνες και οι αντίστοιχοι μυκοτοξιγόνοι μύκητες, καθώς και τα προϊόντα με συχνές μολύνσεις (Brera et al., 2008).

Πίνακας 1. Σημαντικότερες μυκοτοξίνες με τους αντίστοιχους μυκοτοξικογόνους μύκητες και ενδεικτικά προϊόντα με συχνές μολύνσεις (Brera et al., 2008).

Μυκοτοξίνες	Είδη μυκήτων	Υποστρώματα
Φουμονισίνες	<i>Fusarium vertisillioides</i>	Αραβόσιτος, σόργο, ρύζι
Πατουλίνη	<i>Penicillium patulum</i> , <i>Penicillium urticae</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, χυμοί φρούτων, σιτάρι, φασόλια
Αφλατοξίνες	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Φιστίκια, Βαμβακόσπορος, δημητριακά, σύκα, φουντούκια, σόργο, γάλα
Ωχρατοξίνες	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Φασόλια, δημητριακά, καφές, ζωοτροφές, προϊόντα αμπέλου
Τριχοθηκίνες	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Fusarium graminearum</i>	Αραβόσιτος, ζωοτροφές, δημητριακά
Ζεαραλενόνη	<i>Fusarium graminearum</i>	Αραβόσιτος, ζωοτροφές, δημητριακά
Κιτρινίνη	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Κριθάρι, αραβόσιτος, ρύζι, φουντούκια, μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, χυμοί φρούτων

1.2.4 Μυκοτοξικώσεις στους ιχθύες

Η σημαντικότητα των μυκοτοξινών στις ιχθυοκαλλιέργειες εμφανίστηκε για πρώτη φορά την δεκαετία του '60 με ξεσπάσματα αφλατοξικώσεων σε ιριδιζουσες πέστροφες στις ΗΠΑ. Η αφλατοξίκωση προκλήθηκε από μολυσμένα βαμβακέλαια που αποτελούσαν σιτηρέσιο για τις πέστροφες και είχε ως σύμπτωμα καταστροφή του συκωτιού των ιχθύων (Halver 1969).

Η ευαισθησία των ψαριών στις αφλατοξικώσεις φαίνεται να εξαρτάται από την ηλικία και το είδος των ιχθύων. Τα νεαρά ιχθύδια της ιριδιζουσας πέστροφας (*Onchorhynchus mykiss*) και του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) είναι πιο ευαίσθητα από τους ενήλικους ιχθύες, όπως επίσης και τα γατάψαρα (*Ictalurus punctatus*) είναι πιο ανθεκτικά στις αφλατοξικώσεις από ότι η πέστροφα και το λαβράκι (Manning, 2001, Tuan et al., 2003, El-Sayed & Khalil, 2009). Αυτές οι διαφορές ανάμεσα στα είδη μπορούν να αποδοθούν στην ικανότητα που έχει το κάθε είδος να μεταβολίζει τις αφλατοξίνες στο συκώτι (Mgethe et al., 1993).

Οι αρνητικές επιδράσεις στους ιχθύες, οι οποίοι μολύνθηκαν με την αφλατοξίνη B1, αφορούν κυρίως στην μείωση τη ανάπτυξή τους. Διάφορες μελέτες έδειξαν μείωση της ανάπτυξης σε γατόψαρα στα οποία ανιχνεύθηκε η αφλατοξίνη B1 σε επίπεδα 10ppm (Jantorai & Lovell, 1990) και σε τιλάπιες (*Oreochromis niloticus*) στις οποίες ανιχνεύθηκε η αφλατοξίνη B1 σε επίπεδα 0,1ppm (El Banna et al., 1992). Πρόσθετες επιπτώσεις των αυξημένων επιπέδων αφλατοξίνης B1 στα 100ppm περιλαμβάνουν σοβαρή ηπατική νέκρωση σε τιλάπιες (Tuan et al., 2002) και ανοσοκαταστολή στον κοινό κυπρίνο (*Cyprinus carpio*) (Sahoo & Mukherjee, 2001). Επιπλέον, αναφέρθηκαν 17% θνησιμότητες σε τιλάπιες, οι τροφές των οποίων περιείχαν αφλατοξίνη B1 σε επίπεδα 0,2ppm (El-Banna et al., 1992). Στις γαρίδες η

αφλατοξίνη B1, μπορεί να προκαλέσει μείωση της ανάπτυξης, χαμηλή πεπτικότητα, φυσιολογικές ταραχές και ιστολογικές αλλαγές στο ήπαρ (Bintvihok et al., 2003).

Η φουμονισίνη B1 έχει βρεθεί σε κόκκους καλαμποκιού, το οποίο αποτελεί κύριο συστατικό των ιχθυοτροφών των ιχθύων των θερμών νερών. Πιθανώς το μεγαλύτερο ποσοστό των κόκκων καλαμποκιού περιείχε τουλάχιστον 1mg/kg φουμονισίνη B1, αλλά σε μερικές περιπτώσεις το ποσοστό αυτό μπορεί να είναι πολύ υψηλότερο προκαλώντας προβλήματα στα ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας (Norred, 1993). Έρευνα έδειξε ότι γατόψαρα (*Ictalurus punctatus*) μικρής ηλικίας (1-2gr) τα οποία κατανάλωσαν τροφές που περιείχαν 20ppm φουμονισίνη B1 παρουσίασαν απώλεια βάρους, σε αντίθεση με τα γατόψαρα μεγαλύτερης ηλικίας (31gr), τα οποία κατανάλωσαν τροφές που περιείχαν 80ppm φουμονισίνης B1, χωρίς να επηρεαστεί η ανάπτυξή τους (Lumertdacha et al., 1995). Σε άλλη έρευνα, αυξημένη θνησιμότητα παρατηρήθηκε σε γατόψαρα (*Ictalurus punctatus*), η τροφή των οποίων περιείχε φουμονισίνη B1 σε επίπεδα 240ppm (Li et al., 1994). Οι τιλάπιες (*Oreochromis niloticus*) φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικές στην παρουσία φουμονισινών στις τροφές τους (Tuan et al., 2003)

Η ωχρατοξίνη A είναι μια πολύ σημαντική μυκοτοξίνη, διότι μολύνει τους φαγώσιμους ιστούς των που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε με γατόψαρα έδειξε ότι η ωχρατοξίνη A συσσωρεύεται στο συκώτι και στους μυϊκούς ιστούς των ιχθύων και προκαλεί καταστροφή του συκωτιού (Doster et al., 1972). Στην ιριδίζουζα πέστροφα (*Onchorhynchus mykiss*) τα συμπτώματα της ωχρατοξίκωσης περιλαμβάνουν νέκρωση του ήπατος, πρησμένα νεφρά και υψηλή θνησιμότητα (Hendricks, 1994).

Έρευνα που διεξήχθη επίσης με γατόψαρα, έδειξε ότι η παρουσία της τοξίνης T-2 στις τροφές, σε επίπεδα 2mg/kg, προκαλούσε θνησιμότητα στα ψάρια (Manning et al., 2003).

Η δεοξυνιβαλελόνη, η οποία ανιχνεύθηκε κυρίως σε καλαμποκάλευρο και σιτάλευρο σε επίπεδα 15-17,5 mg/kg προκαλούσε μείωση της ανάπτυξης σε γατόψαρα (*Ictalurus punctatus*), ενώ σε επίπεδα 20mg/kg παρουσιάστηκαν συμπτώματα άρνησης για τροφή στις πέστροφες (*Salmo gairdneri*) (Woodward et al., 1983).

1.3 Φουμονισίνες

1.3.1 Γενικά στοιχεία

Οι φουμονισίνες είναι πολύ σημαντικές μυκοτοξίνες, που αποτελούν αντικείμενο έρευνας από 1980 και μετά. Οι φουμονισίνες παράγονται από είδη του γένους *Fusarium* (Seifert et al, 2003; Frisvad et al, 2007).

1.3.2 Μύκητες που παράγουν φουμονισίνες

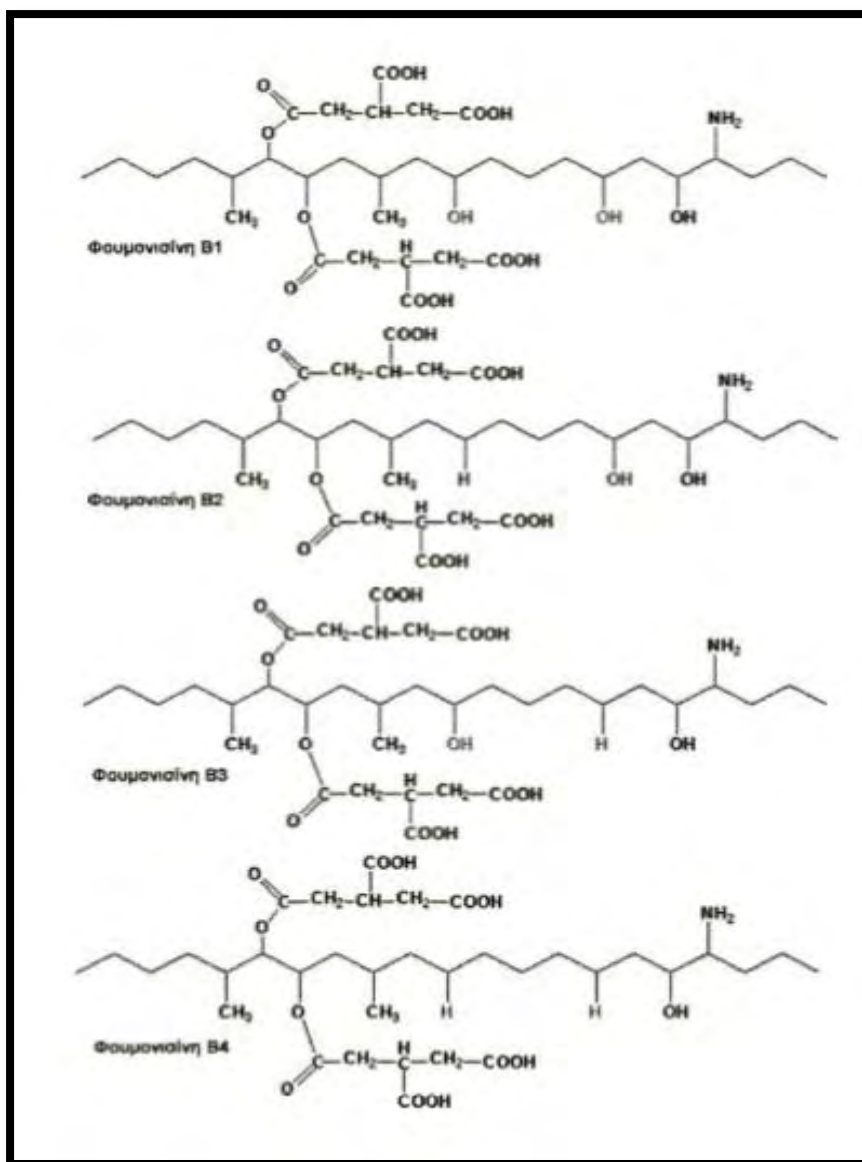
Τα σημαντικότερα είδη *Fusarium* που παράγουν μυκοτοξίνες είναι τα *Fusarium verticillioides* και *Fusarium proliferatum* (Seifert et al, 2003; Frisvad et al, 2007), κυρίως σε καλλιέργειες καλαμποκιού. Άλλα είδη που παράγουν φουμονισίνες, είναι και τα *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. thapsinum*, *F. anthophilum* και *F. dlamini*, που προσβάλλουν το σόργο, το ρύζι και το κεχρί (Frisvad et al, 2007).

Επιπλέον, στελέχη του είδους *Aiternaria alternata f. sp. lycopersici*, έχει βρεθεί ότι παράγουν φουμονισίνες, αλλά και μυκοτοξίνες με παρόμοια χημική δομή και

τοξικές ιδιότητες με τις φουμονισίνες (Chen et al., 1992; Mirocha et al., 1992; Abbas et al., 1995; Chu, 2006).

1.3.3 Κυριότερες φουμονισίνες

Η σημαντικότερη φουμονισίνη από τοξικολογική άποψη, είναι η φουμονισίνη B1 (FB1), η οποία και απομονώθηκε πρώτη, ενώ στη συνέχεια απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τουλάχιστον 11 χημικά συγγενείς ενώσεις (B2, B3, B4, C1, C4, A2) της φουμονισίνης B1 (Chu, 2006). Από αυτές, οι φουμονισίνες B1, B2 και B3 ανιχνεύονται συχνότερα στα τρόφιμα (Krska et al., 2007).



Εικόνα 1. Χημική δομή κυριότερων φουμονισινών (από Marin et al., 2013).

1.3.4 Τοξικότητα φουμονισινών

Σχετικά με τις τοξικές επιδράσεις των φουμονισινών στον άνθρωπο, αυτές δεν έχουν μέχρι σήμερα αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, η κατανάλωση φουμονισίνης έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση καρκίνου του οισοφάγου σε πληθυσμούς διάφορων περιοχών όπως της Αφρικής, της Κεντρικής Αμερικής, της Ασίας, της Νότιας Καρολίνα και των Η.Π.Α. Επίσης, επειδή η φουμονισίνη B1 μειώνει την πρόσληψη

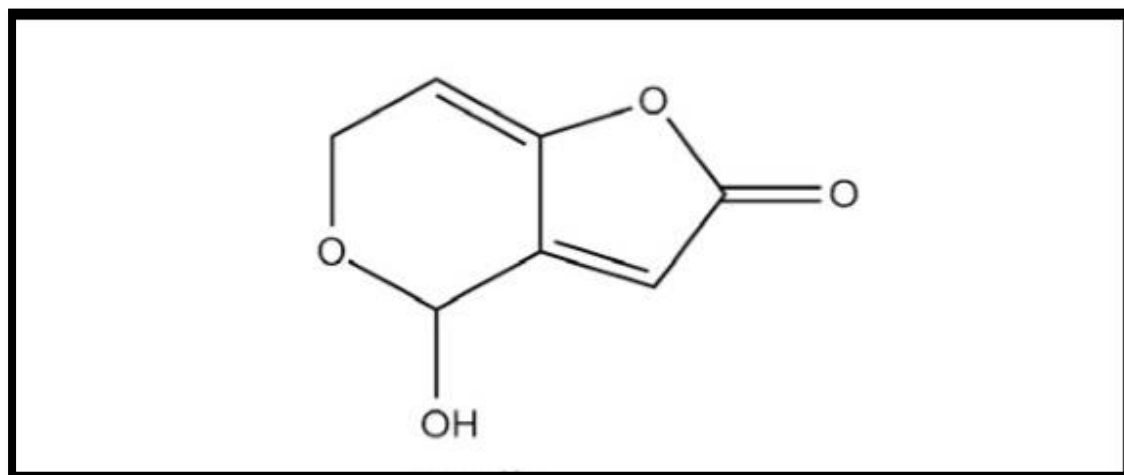
φολικού οξέος σε διάφορα κύτταρα, η κατανάλωση της φουμονισίνης έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται σε ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα των ανθρώπινων εμβρύων.

1.4 Πατουλίνη

1.4.1 Γενικά στοιχεία

Η πατουλίνη, είναι μυκοτοξίνη που παράγεται από είδη των γενών *Aspergillus* και *Penicillium*. Είναι τοξική τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Chu, 2006).

Η πατουλίνη απομονώθηκε το 1943 από τα είδη *Penicillium griseofulvum* και *Penicillium expansum* από τον Biskinshaw και τους συνεργάτες του (Puel et al. 2010). Παγκοσμίως αναφέρεται κυρίως σε μήλα, ροδάκινα, σταφύλια, αχλάδια, σιτηρά και ελιές, αλλά και στα προϊόντα μεταποίησής τους (Brera et al., 2008). Έχει αποδειχτεί πως η πατουλίνη παραμένει σταθερή στο χυμό μήλων, σταφυλιών και στα ξηρά σιτηρά, ενώ αντίθετα αποδομείται σε υγρά δημητριακά και στις διαδικασίες ζύμωσης για την παραγωγή κρασιού και μηλίτη (Speijers, 2004).



Εικόνα 2. Χημική δομή πατουλίνης (από Marin et al., 2013).

1.4.2 Μύκητες που παράγουν πατουλίνη

Το σημαντικότερο είδος που παράγει πατουλίνη είναι το *Penicillium expansum*, το οποίο προσβάλλει κυρίως τα μηλοειδή και παράγει μυκοτοξίνη στους χυμούς μήλων και άλλων φρούτων, καθώς και το μηλίτη (Chu, 2006).

Επίσης έχει βρεθεί ότι και το είδος *Penicillium griseofulvum* παράγει πατουλίνη σε τεχνητό θρεπτικό υλικό, όπως πιθανόν και σε σιτηρά και προϊόντα δημητριακών (Frisvad et al, 2007).

Ένα άλλο είδος που παράγει πατουλίνη και απαντάται περιστασιακά σε καλλιέργειες ρυζιού, είναι και το *Penicillium dipodomycicola*. Άλλα είδη που παράγουν πατουλίνη υπό εργαστηριακές συνθήκες, είναι και τα *P. concentricum*, *Pe. clavigerum*, *P. coprobiwn*, *P. formosanum*, *P. glandicola*, *P. vulpinum*, *P. novae-zeelandiae*, *P. marinum*, *P. melinii*, *Aspergillus clavatus*, *A. terreus*, *A. longivesica* και *A. giganteus* (Lopez-Diaz and Flannigan, 1997). Το θερμοανθεκτικό είδος *Byssochlamys nivea*, που συχνά απομονώνεται στα τρόφιμα, έχει διαπιστωθεί να παράγει επίσης πατουλίνη (Tournas, 1994).

1.4.3 Τοξικές επιδράσεις της πατουλίνης

Οι τοξικές επιδράσεις της πατουλίνης στον άνθρωπο δεν έχουν ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί (Frisvad et al., 2004; Frisvad et al., 2007). Ωστόσο, εργασίες με κύτταρα τρωκτικών και ανθρώπινα λεμφοκύτταρα έδειξαν μεταλλαξιγόνο ικανότητα (Puel et al., 2010).

1.5 Αφλατοξίνες

1.5.1 Γενικά στοιχεία

Οι αφλατοξίνες απομονώθηκαν και προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά, από το μύκητα *Aspergillus flavus*, από όπου προέρχεται η ονομασία τους. (*A-spergillus flavus* : aflatoxin), ο οποίος εντοπίστηκε σε ζωοτροφές (peanut meal) , οι οποίες προκάλεσαν τον θάνατο σε περισσότερες από 100.000 γαλοπούλες (Sergant et al, 1961).

Οι αφλατοξίνες είναι χημικά σύμπλοκα δι-υδροφουρανοφουρανικών (dihydrofuranofuran) και τετρα-υδροφουρανικών (tetrahydrofuran) ενώσεων με υποκαταστάτη κουμαρίνη (coumarin). Τουλάχιστον 16 διαφορετικά χημικά συγγενή μόρια αφλατοξινών έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί (Goldblatt, 1969).

Παραγωγή αφλατοξινών μπορεί να προκληθεί σε ένα μεγάλο εύρος θρεπτικών υποστρωμάτων. Στην πραγματικότητα, αφλατοξικογόνοι μύκητες όπως ο *A. flavus*, μπορεί να αναπτυχθούν σε συνθήκες αποθήκευσης με υψηλή θερμοκρασία και σχετική υγρασία, σχεδόν σε οποιοδήποτε αγροτικό προϊόν (Bullerman, 2000).

1.5.2 Μύκητες που παράγουν αφλατοξίνες

Οι αφλατοξίνες παράγονται από μύκητες του γένους *Aspergillus* που ανήκουν στην υποομάδα Flavi. Η υποομάδα αυτή, αποτελείται από δύο υποομάδες ειδών. Η πρώτη υποομάδα περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τα αφλατοξικόγονα είδη *A. arachidicola*, *A. flavus*, *A. minisclerotium*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis* και *A. toxicarius*. Η άλλη υποομάδα περιλαμβάνει είδη τα οποία δεν παράγουν αφλατοξίνες μεταξύ των οποίων

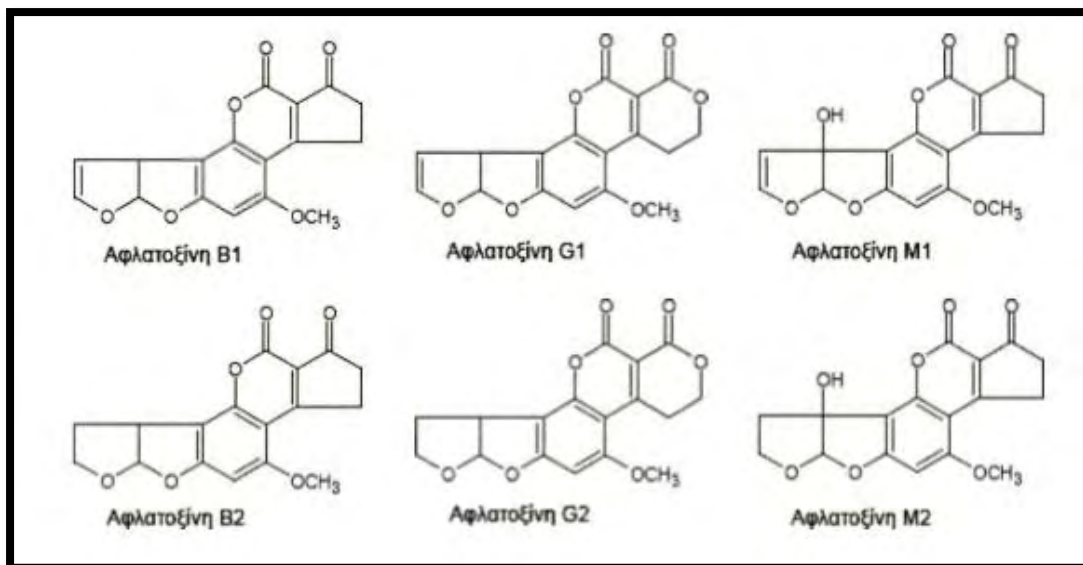
είναι τα *A. avenaceus*, *A. caelatus*, *A. lanosus*, *A. leporis*, *A. oryzae*, *A. sojae*, και *A. tamaris* (Samson et al., 2006).

Ωστόσο, τα κυριότερα είδη που παράγουν αφλατοξίνες είναι το *A. flavus*, το οποίο είναι το πιο κοινό μολυσματικό στέλεχος που εντοπίζεται στον αγρό και το *A. parasiticus* (Peterson et al., 2001).

1.5.3 Κυριότερες αφλατοξίνες

Οι κυριότερες αφλατοξίνες είναι οι B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) και G2 (AFG2). Ο χαρακτηρισμός των αφλατοξινών ως B και G προέρχεται από το φθορισμό (fluorescence), που παράγουν τα μόρια αυτά υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (ultraviolet light). Έτσι στις B αφλατοξίνες προκαλείται μπλε (Blue) φθορισμός, ενώ στις G αφλατοξίνες προκαλείται πράσινος (Green) (D'Mello and MacDonald, 1997). Δύο άλλες σημαντικές αφλατοξίνες είναι και η M1 (AFM1) και M2 (AFM2), οι οποίες είναι υδρολυμένες μεταβολίτες των AFB1 και AFB2 αντίστοιχα, που εντοπίζεται στο γάλα των ζώων αλλά και του ανθρώπου, μετά από κατανάλωση τροφών μολυσμένων με αφλατοξίνες (Moss, 2002). Το *A. flavus* παράγει τις αφλατοξίνες B1 και B2, ενώ το *A. parasiticus* παράγει τις αφλατοξίνες B1, B2, G1 και G2 (D'Mello and MacDonald, 1997).

Η αφλατοξίνη B1 είναι η πλέον τοξική από τις αφλατοξίνες και μια από τις πιο τοξικές φυσικές ενώσεις. Επίσης είναι και η κυριότερη αφλατοξίνη που παράγεται από τοξικά στελέχη (Squire, 1981). Ακολουθούν κατά σειρά τοξικότητας η AFG1, η AFB2, η AFG2, η AFM1 και η AFM2.(Chu, 2002).



Εικόνα 3. Χημική δομή κυριότερων αφλατοξινών (από Marin et al., 2003).

1.5.4 Τοξικότητα αφλατοξινών

Το όργανο που προσβάλλεται περισσότερο από τις αφλατοξίνες είναι το ήπαρ, με εμφάνιση ηπατικών νεκρώσεων (κίρρωσεων) και πρόκληση ηπατικής ανεπάρκειας. Εκτός από την οξεία τοξικότητα με τη μορφή ηπατοτοξικότητας, οι αφλατοξίνες μπορεί να επιφέρουν επίσης και ηπατική καρκινογένεση (Eaton and Groopman, 1994), ενώ μπορεί να προκαλέσουν τοξικές επιδράσεις και σε άλλα όργανα και συστήματα, όπως είναι το αναπνευστικό σύστημα (Heinonen et al., 1996; Massey, 1996; Kelly et al., 1997). Άλλο χαρακτηριστικό σύμπτωμα των αφλατοξικώσεων, είναι και η διόγκωση του χοληδόχου πόρου και των λεμφαδένων (Chu, 2006).

1.6 Αναλυτικές τεχνικές για την απομόνωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα τρόφιμα.

1.6.1 Τεχνικές χρωματογραφίας

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) είναι η πρώτη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μυκοτοξινών. Λόγω της απλότητάς της είναι ευρέως διαδεδομένη και με αυτήν την τεχνική μπορούν να διαχωριστούν σχεδόν όλες οι μυκοτοξίνες. Μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι, τα διαφορά παράγωγα των μυκοτοξινών δύσκολα διαχωρίζονται, καθώς και ότι η μέθοδος έχει μικρή επαναληψιμότητα και επομένως χαμηλή ακρίβεια (Nesheim, 1973).

Αναλυτικές τεχνικές όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HLPC) καθώς και η αέριος χρωματογραφία (GC), δίνουν περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα με πολύ καλή επαναληψιμότητα. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αφλατοξινών, φουμονισινών, οχρατοξινών, καθώς και για τις πατουλίνη και κιτρινίνη (Pons et al., 1980). Η αέριος χρωματογραφία (GC) χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της δεοξυनिβαλενόλης, της πατουλίνης και των φουμονισινών (Scott, 1989). Η φασματοσκοπία μάζας (MS) εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών μυκοτοξινών (Cappioli et al., 1990).

1.6.2 Ενζυματικές τεχνικές

Μια ακόμα πολλά υποσχόμενη τεχνική είναι η ενζυματική ανοσοδιάγνωση (enzyme linked immunoassay, ELISA), που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών μυκοτοξινών. Οι ενζυματικές ανοσοδιαγνωστικές τεχνικές είναι πολύ χρήσιμες σε μελέτες που αφορούν τον τρόπο

με τον οποίο μεταβολίζονται οι μυκοτοξίνες στα ζώα καθώς και την δυσκολία που εμφανίζουν διάφορα βιολογικά συστήματα για την απομάκρυνση των μυκοτοξινών από το σύστημά τους (Notermans & Huevelman, 1985).

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

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

Οι διαγνωστικές μέθοδοι που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι ακριβής, διότι η ταυτοποίηση των ειδών βασίζεται σε γενοτυπικές διαφορές. Επίσης, είναι υψηλά ευπαθής, αφού εντοπίζουν τα DNA κύτταρα στόχους σε σύνθετα μείγματα ακόμη και όταν το μυκήλιο δεν είναι πλέον ζωτικό ((Yoder and Christianson 1997; Patino et al. 2004).

Η βιοσύνθεση φουμονισίνης ξεκινάει με την σύνθεση ενός πολυκετιδίου (Proctor et al., 1999). Η ανίχνευση του γονιδίου *fum1*, το οποίο ενπλέκεται στον σχηματισμό φουμονισίνης, μπορεί να επιτευχθεί με την μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης

πολυμεράσης, διότι έχουν σχεδιαστεί εξειδικευμένοι εκκινητές που υβριδίζουν στα άκρα του (Bluhm et al., 2004).

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

Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης της πατουλίνης πραγματοποιείται σε δέκα στάδια και ξεκινάει και αυτή επίσης με την σύνθεση ενός πολυκετιδίου (Murphy et al., 1974). Έχουν σχεδιαστεί εξειδικευμένοι εκκινητές για τον εντοπισμό του γονιδίου HDI, γονίδιο που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της πατουλίνης (Russel & Paterson, 2006).

1.7 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλευτικών Προϊόντων και Τροφίμων και στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στην Ελλάδα δεν έχει δημοσιευθεί έρευνα αναφορικά με την ανίχνευση μυκήτων και μυκοτοξινών σε ιχθυοτροφές.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν εννέα δείγματα ιχθυοτροφών τα οποία προέρχονταν από καλαμποκάλευρο, ηλιάλευρο, ιχθυάλευρο και άλευρο πουλερικών με σκοπό να προσδιοριστεί η μυκοτοξικογόνος ικανότητα των απομονωθέντων

μυκήτων με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή μυκοτοξινών).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα αλεύρων που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη έρευνα.

2.1.1 Δείγματα αλεύρων που μολύνθηκαν από μύκητες του γένους *Fusarium*.

- Ο κωδικός F1 χρησιμοποιήθηκε για το αραιωμένο DNA που εξήχθη από την απομόνωση DK-22α, από καλαμποκάλευρο, που πιθανότατα έχει μολυνθεί με μύκητα του γένους *Fusarium*.
- Ο κωδικός F2 χρησιμοποιήθηκε για το αραιωμένο DNA που εξήχθη από την απομόνωση DK-13α, από καλαμποκάλευρο, που πιθανότατα έχει μολυνθεί με μύκητα του γένους *Fusarium*.
- Ο κωδικός F3 χρησιμοποιήθηκε για το αραιωμένο DNA που εξήχθη από την απομόνωση DI21, από ιχθυάλευρο, που πιθανότατα έχει μολυνθεί με μύκητα του γένους *Fusarium*.

2.1.2 Δείγματα αλεύρων που μολύνθηκαν από μύκητες του γένους *Penicillium*.

- Ο κωδικός P1 χρησιμοποιήθηκε για το αραιωμένο DNA που εξήχθη από την απομόνωση G114, από άλευρο πουλερικών, που πιθανότατα έχει μολυνθεί με μύκητα του γένους *Penicillium*.

- Ο κωδικός P2 χρησιμοποιήθηκε για το αραιωμένο DNA που εξήχθη από την απομόνωση DG21, από άλευρο πουλερικών, που πιθανότατα έχει μολυνθεί με μύκητα του γένους *Penicillium*.
- Ο κωδικός P3 χρησιμοποιήθηκε για το αραιωμένο DNA που εξήχθη από την απομόνωση DH-13α, από καλαμποκάλευρο, που πιθανότατα έχει μολυνθεί με μύκητα του γένους *Penicillium*.

2.1.3 Δείγματα αλεύρων που μολύνθηκαν από μύκητες του γένους *Aspergillus*.

- Ο κωδικός A1 χρησιμοποιήθηκε για το αραιωμένο DNA που εξήχθη από την απομόνωση H12α, από ηλιάλευρο, που πιθανότατα έχει μολυνθεί με μύκητα του γένους *Aspergillus*.
- Ο κωδικός A2 χρησιμοποιήθηκε για το αραιωμένο DNA που εξήχθη από την απομόνωση DI-21α, από ιχθυάλευρο, που πιθανότατα έχει μολυνθεί με μύκητα του γένους *Aspergillus*.
- Ο κωδικός A3 χρησιμοποιήθηκε για το αραιωμένο DNA που εξήχθη από την απομόνωση DH-11α, από ηλιάλευρο, που πιθανότατα έχει μολυνθεί με μύκητα του γένους *Aspergillus*.

2.2 Εξαγωγή ολικού DNA από τις απομονώσεις των γενών *Fusarium*, *Penicillium* και *Aspergillus*.

Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή ολικού DNA από τρεις απομονώσεις του γένους *Fusarium*, από τρεις απομονώσεις του γένους *Penicillium* και από τρεις απομονώσεις του γένους *Aspergillus* με την ίδια διαδικασία, η οποία περιγράφεται παρακάτω.

2.2.1 ΥΛΙΚΑ

Για το DNA extraction τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- ❖ NaCl συγκέντρωσης 5M
- ❖ Disodium Ethylenediaminetetraacetate 2 H₂O (EDTA) συγκέντρωσης 0,5 M
- ❖ Tris HCl συγκέντρωσης 2M
- ❖ Extraction buffer: CTAB Isolation Buffer
- ❖ PVP 25
- ❖ Φαινόλη
- ❖ Χλωροφόρμιο
- ❖ Αιθυλική αλκοόλη 95% που διατηρείται στους -20°C
- ❖ Αιθυλική αλκοόλη 70% που διατηρείται στους -20°C
- ❖ DEPC - treated water (υπερκάθαρο νερό) που διατηρείται στους -20°C

2.2.2 Μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του ολικού DNA από καλλιέργειες μυκήτων των γενών *Fusarium*, *Penicillium* και *Aspergillus*.

Για να λάβει μέρος, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, έπρεπε να πραγματοποιηθεί η εξαγωγή του ολικού DNA (DNA extraction) από τις καλλιέργειες μυκήτων των γενών *Fusarium*, *Penicillium* και *Aspergillus*. Το πρωτόκολλο του DNA extraction που χρησιμοποιήθηκε είναι μια τροποποίηση των Doyle & Doyle 1990.

Είναι μια διαδικασία εξαγωγής με βάση τα CTAB στην οποία χρησιμοποιείται το NaCl για την απομάκρυνση των πολυσακχαριδίων και το PVP 25 για την απομάκρυνση των πολυφαινόλων κατά την διαδικασία καθαρισμού του DNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το κάθε γένος μύκητα ξεχωριστά περιγράφεται παρακάτω:

- ❖ Αρχικά η καλλιέργεια του μύκητα μεταφέρθηκε σε δοχείο φυγοκέντρησης χωρητικότητας 50ml και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4.500 rpm (στροφές) σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ Στην συνέχεια έγινε απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 40 ml αποστειρωμένου νερού.
- ❖ Έπειτα πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 4500 rpm για 10 λεπτά.
- ❖ Απόρριψη του υπερκείμενου και τοποθέτηση του μυκηλίου σε αποστειρωμένο χαρτί έτσι ώστε να στεγνώσει.
- ❖ Τοποθέτηση του μυκηλίου σε αποστειρωμένο σωληνίσκο τύπου erpendorf χωρητικότητας 2ml με σκοπό το τελικό βάρος του να είναι 220-230 mgr.
- ❖ Προσθήκη 200 μl CTAB buffer, αφού προηγήθηκε η ομογενοποίησή του
- ❖ Προσθήκη 25mgr PVP 25 και έπειτα ομογενοποίηση
- ❖ Εκ νέου προσθήκη 200μl CTAB buffer με ακόμα μία ομογενοποίηση (σταδιακή προσθήκη, έτσι ώστε να δημιουργηθεί γαλάκτωμα)
- ❖ Έπειτα θέρμανση του μίγματος στους 60°C για 25 λεπτά
- ❖ Στην συνέχεια ισχυρή ανάδευση του φιαλιδίου και τοποθέτηση στον πάγο
- ❖ Προσθήκη φαινόλης και χλωροφόρμιου (200 μl φαινόλης και 200 μl χλωροφόρμιου) και ελαφριά ανάδευση
- ❖ Τοποθέτηση του μίγματος στην φυγόκεντρο στις 13.000 rpm για 15 λεπτά

- ❖ Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης πραγματοποιήθηκε απόρριψη του ίζηματος και μεταφορά του υπερκείμενου (όγκου περίπου 400 μl από το κάθε μείγμα) σε νέο σωληνίσκο και τοποθέτηση σε πάγο.
- ❖ Στον νέο σωληνίσκο έγινε επίσης προσθήκη 200μl NaCl (5M) και το μίγμα αναδεύτηκε ελαφρά
- ❖ Επιπλέον προσθήκη 800μl ΕΤΟΗ 95% (-20°C) και εκ νέου ελαφρά ανάδευση του μίγματος
- ❖ Έπειτα, τοποθέτηση του μίγματος στους -20°C για 1 ώρα
- ❖ Μετά την πάροδο της μίας ώρας πραγματοποίηση εκ νέου φυγοκέντρησης στις 13.000 rpm για 10 λεπτά
- ❖ Στην συνέχεια απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 1ml ΕΤΟΗ 70% (-20° C), έτσι ώστε το ίζημα να είναι καθαρό.
- ❖ Έπειτα, εκ νέου φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 5 λεπτά
- ❖ Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απομάκρυνση του υπερκείμενου και παραμονή του ιζημάτος σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό στεγνώσει
- ❖ Τέλος, διάλυση με υπερκάθαρο νερό περίπου 100μl ανάλογα με τον μέγεθος του ιζημάτος.

Το πρωτόκολλο αυτό του DNA extraction ακολουθήθηκε για όλες τις απομονώσεις των γενών *Fusarium*, *Penicillium* και *Aspergillus*. Η μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση του NanoDrop σπεκτροφωτόμετρου.

Στο αρχικό διάλυμα DNA με βάση τη συγκέντρωση που μετρήθηκε, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις, οι οποίες θα χρησιμοποιούνταν για την PCR, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 20ng/μl. Το αρχικό διάλυμα DNA όπως και οι αραιώσεις διατηρήθηκαν στους -20°C.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης βασίζεται στην αρχή ότι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι σύνθεσης DNA ενισχύουν τα ελάχιστα τμήματα DNA σε μεγάλες ποσότητες (αντίγραφα) με την χρήση εξειδικευμένων εκκινητών (Seidman 2011). Στο συγκεκριμένο πείραμα η χρήση της PCR έγινε για την ανίχνευση στις απομονώσεις του γένους *Fusarium* του γονιδίου *fum1*, γονίδιο που επάγει την παραγωγή φουμονισίνης και για την κατάταξη των απομονώσεων αυτών στο είδος *F.verticillioides*, το οποίο είναι το κατεξοχήν είδος που παράγει φουμονισίνη. Επίσης με την χρήση της PCR έγινε έλεγχος στις απομονώσεις μυκήτων του γένους *Penicillium* για την ανίχνευση του γονιδίου *HDI1*, γονίδιο που επάγει την παραγωγή πατουλίνης. Η PCR χρησιμοποιήθηκε και για την ανίχνευση, στις απομονώσεις μυκήτων του γένους *Aspergillus*, του γονιδίου *alfR1*, γονίδιο που επάγει την παραγωγή αφλατοξίνης. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος της Nested PCR στα προϊόντα της PCR που προέκυψαν από τις απομονώσεις μυκήτων του γένους *Aspergillus*, για την ανίχνευση του γονιδίου *alfR2*, γονίδιο που επίσης επάγει την παραγωγή αφλατοξίνης.

Το ολικό DNA που εξείχθη από κάθε μία από τις απομονώσεις των γενών *Fusarium*, *Penicillium* και *Aspergillus* χρησιμοποιήθηκε για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η αντίδραση ήταν τελικού όγκου 25 μl. Σε κωνικά φιαλίδια PCR των 200 μl τοποθετήθηκαν:

- ❖ 12,5 μl Taq 2X Master Mix (New England Biolabs),
- ❖ 1.25 μl από κάθε εκκινητή (forward/reverse), ανάλογα με τις απομονώσεις του εκάστοτε γένους, όπως περιγράφεται παρακάτω
- ❖ 5 μl υπερκάθαρο νερό και

❖ 5 μl DNA συγκέντρωσης 20ng/μl.

Επίσης χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε α) DNA από τον μύκητα *Botrytis cinerae* ο οποίος απομονώθηκε στο εργαστήριο της φυτοπαθολογίας και β) μία αντίδραση που περιείχε υπερκάθαρο νερό. Επίσης στον έλεγχο για την ανίχνευση του γονιδίου *fum1* στις απομονώσεις μυκήτων του γένους *Fusarium* χρησιμοποιήθηκε και ο θετικός μάρτυρας F10, ο οποίος ήταν DNA το οποίο απομονώθηκε, στο εργαστήριο της φυτοπαθολογίας, από μύκητα που βρέθηκε σε σπόρους *pop corn* και στο οποίο ανιχνεύθηκε το γονίδιο της φουμονισίνης.

Το θερμοκρασιακό προφίλ της PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών περιγράφεται στα επόμενα κεφάλαια. Κατά την διαδικασία της PCR, στο πρώτο βήμα η αύξηση της θερμοκρασίας βοηθά την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA. Στη συνέχεια η μείωση της ευνοεί την πρόσδεση των εκκινητών στα όρια της προς ενίσχυσης αλληλουχίας DNA (Υβριδισμός). Στο επόμενο βήμα η Taq πολυμεράση να τοποθετεί στις κατάλληλες θέσεις τα ολιγονουκλεοτίδια που έχουν προστεθεί στο διάλυμα επιμηκύνοντας τις νέες αλυσίδες (Επιμήκυνση). Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι έχουν ως σκοπό την δημιουργία πολλών αντιγράφων ενός γονιδίου το οποίο θέλουμε να ανιχνευθεί (Mullis and Falona, 1987).

Μετά το τέλος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης τα δείγματα παρέμειναν στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης.

2.3.1 Ταυτοποίηση απομονώσεων του γένους *Fusarium* στο είδος *F.verticillioides* με την χρήση εξιδικευμένων εκκινητών.

Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές Ver1 και Ver2 που σχεδιάστηκαν και περιγράφηκαν από τους Mule et al. (2004). Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την κατάταξη των απομονώσεων των μυκήτων του γένους *Fusarium* στο είδος *F.verticillioides*. Οι εκκινητές παρήχθησαν από την εταιρεία Sigma Aldrich.

Πίνακας 2. Ζεύγος εκκινητών Ver1 και Ver2, αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων.

Είδος μύκητα που ανιχνεύεται	Ζεύγος Εκκινητών	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>F.verticillioides</i>	Ver 1	5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3'	578
	Ver 2	5'- AATTGGCCATTGGTATTATATATC TA-3'	

Πίνακας 3. Θερμοκρασιακό προφίλ της PCR για το ζεύγος εκκινητών Ver 1/2.

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Διαδικασία
1	95°C	5 min	
35	94°C	50 sec	Αποδιάταξη
	56°C	50 sec	Υβριδισμός

	72°C	1 min	Επιμύκηση
1	72°C	1 min	Τελική ενίσχυση

2.3.2 Έλεγχος των απομονώσεων μυκήτων του γένους *Fusarium* για την ανίχνευση του γονιδίου *fum1* με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών *fum1/fum2* σχεδιάστηκε και περιγράφηκε από τους Bluhm et al., (2004). Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την ανίχνευση του γονιδίου *fum1*, που επάγει την παραγωγή φουμονισίνης, στις απομονώσεις του μυκήτων του γένους *Fusarium*. Οι εκκινητές παρήχθησαν από την εταιρεία Sigma Aldrich.

Πίνακας 4. Ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών, αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων.

Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Μέγεθος προϊόντος (bp)
Fum1	5'-CCATCACAGTGGGACACAGT-3'	183
Fum2	5'-CGTATCGTCAGCATGATGTAGC-3'	

Πίνακας 5. Θερμοκρασιακό προφίλ της PCR για το ζεύγος εκκινητών *Fum1/ Fum2*.

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Στάδιο αντίδρασης
1	94°C	4 min	

35	94°C	1 min	Αποδιάταξη
	58°C	1 min	Υβριδισμός
	72°C	1 min	Επιμήκυνση
1	72°C	10 min	Τελική ενίσχυση

2.3.3 Έλεγχος των απομονώσεων μυκήτων του γένους *Penicillium* για την ανίχνευση του γονιδίου HDI1 με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών HDI1/2 που σχεδιάστηκε και περιγράφηκε από τους Russel et al. (2006). Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την ανίχνευση του γονιδίου HDI1, που επάγει την παραγωγή φουμονισίνης, στις απομονώσεις του μυκήτων του γένους *Penicillium*. Οι εκκινητές παρήχθησαν από την εταιρεία Sigma Aldrich.

Πίνακας 6. Ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών IDH1 και IDH2, αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων.

Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Μέγεθος προϊόντος (bp)
IDH1	5'-CAATGTGTCGTA CTGTGCCC-3'	600
IDH2	5'-ACCTTCAGTCGCTGTTCCCTC-3'	

Πίνακας 7. Θερμοκρασιακό προφίλ της PCR για το ζεύγος εκκινητών IDH1 και IDH2.

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Στάδιο αντίδρασης
1	94°C	3 min	
30	94°C	1 min	Αποδιάταξη
	52°C	1 min	Υβριδισμός
	68°C	1 min	Επιμήκυνση
1	68°C	5 min	Τελική ενίσχυση

2.3.4 Έλεγχος των απομονώσεων μυκήτων του γένους *Aspergillus* για την ανίχνευση του γονιδίου *alfR1* και *alfR2* με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών, με σκοπό την ανίχνευση των γονιδίων *alfR1* και *alfR2*, στις απομονώσεις των μυκήτων του γένους *Aspergillus*, γονίδια που επάγουν την παραγωγή αφλατοξίνης. Οι εκκινητές παρήχθησαν από την εταιρεία Sigma Aldrich.

2.3.4.1. Επιλογή πρώτου ζεύγους εκκινητών για την ανίχνευση του γονιδίου της αφλατοξίνης.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών *alfR1* (forward/reverse) για την ανίχνευση του γονιδίου *alfR1*. Το ζεύγος εκκινητών σχεδιάστηκε και περιγράφηκε από τους Manonmani et al., (2004).

Πίνακας 8. Ζεύγος εξειδικευμένων εκκινητών *alfR1* (forward/ reverse), αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων.

Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Μέγεθος προϊόντος (bp)
alfr1 forward	5'-AACCGCATCCACAATCTCAT-3'	798
alfR1 reverse	5'-AGTGCAGTTCGCTCAGAACA-3'	

Πίνακας 9. Θερμοκρασιακό προφίλ της PCR για το ζεύγος εκκινητών *alfR1* (forward/reverse).

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Στάδιο αντίδρασης
1	95°C	10 min	
30	94°C	18 sec	Αποδιάταξη
	50°C	27 sec	Υβριδισμός
	72°C	1min 25 sec	Επιμήκυνση
1	72°C	10min	Τελική ενίσχυση

2.3.4.2 Επιλογή δεύτερου ζεύγους εκκινητών για την ανίχνευση του γονιδίου της αφλατοξίνης.

Το αραιωμένο προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με την χρήση του ζεύγους εκκινητών *alfR1*, χρησιμοποιείται ως πρότυπο για την διεξαγωγή της δεύτερης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Nested PCR) για την ανίχνευση του γονιδίου

alfR2 στις απομονώσεις μυκήτων του γένους *Aspergillus*. Η Nested PCR πραγματοποιείται με την χρήση ενός δεύτερου ζεύγους εκκινητών για την ανίχνευση του γονιδίου alfR2, το οποίο σχεδιάστηκε και περιγράφηκε από τους Manonmani et al. (2004).

Πίνακας 10. Ζεύγος εξειδικευμένων εκκινητών alfR2 (forward/ reverse), αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων.

Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Μέγεθος προϊόντος (bp)
alfR2 forward	5'-ACGACCATGCTCAGCAAGTA-3'	400
alfR2 reverse	5'-GCACCCTGTCTTCCCTAACA-3'	

Πίνακας 11. Θερμοκρασιακό προφίλ της PCR για το ζεύγος εκκινητών alfR2 (forward/reverse).

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Στάδιο αντίδρασης
1	95°C	10 min	
30	94°C	18 sec	Αποδιάταξη
	50°C	27 sec	Υβριδισμός
	72°C	1min 25 sec	Επιμήκυνση
1	72°C	10min	Τελική ενίσχυση

2.4 Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης

Τα προϊόντα τα οποία προέκυψαν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ελέγχθηκαν με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης πήκτωματος αγαρόζης (Sambrook et al. 1989).

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση είναι ήταν τα εξής:

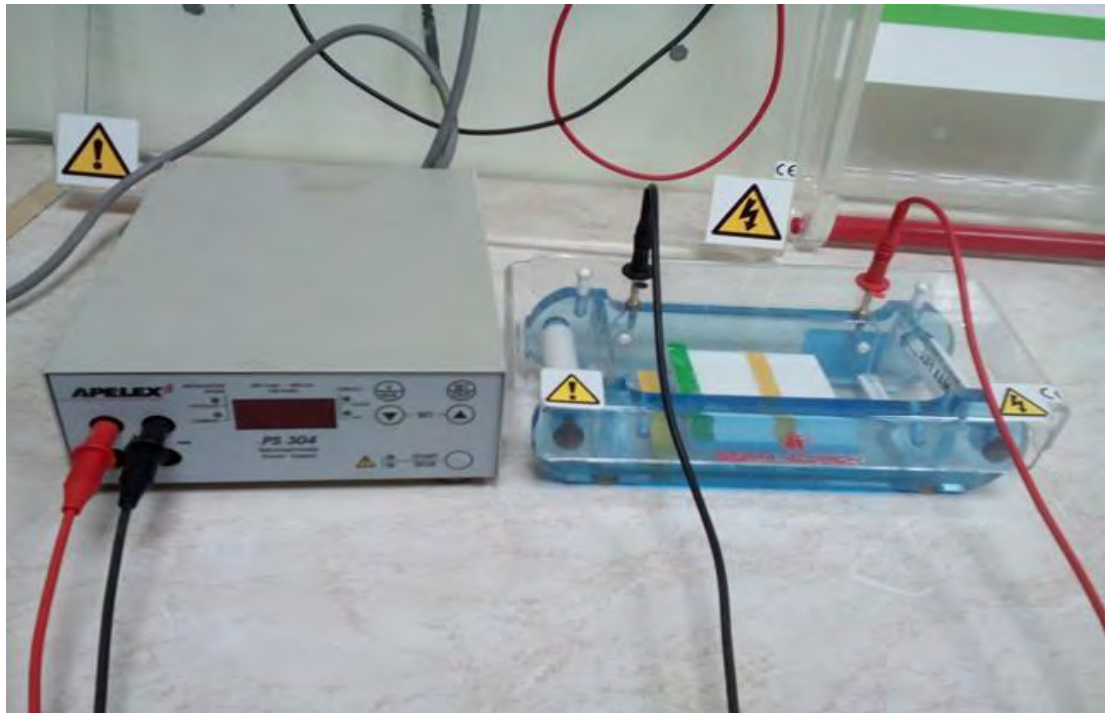
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10X) (Tris/Borate/EDTA)
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1X) το οποίο προέκυψε ύστερα από αραιώση 1:10 του αρχικού TBE
- ❖ Σκόνη αγαρόζης
- ❖ TAE buffer (διάλυμα φόρτωσης)
- ❖ PCR μάρτυρας: Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα του Low Molecular Weight (LMW) DNA Ladder
- ❖ Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου 1% το οποίο προκύπτει με τη διάλυση 0,02gr βρωμιούχου αιθιδίου σε 2 ml απιονισμένου νερού
- ❖ Απιονισμένο νερο

Για το gel αγαρόζης χρειάστηκαν 40ml TBE 10X και 0,6gr σκόνης αγαρόζης. Τα δύο αυτά υλικά τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη και στην συνέχεια στον φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 2 λεπτά. Όταν άρχισε η δημιουργία φουσκαλών στο μίγμα σταματούσε η λειτουργία του φούρνου και πραγματοποιούνταν ανακίνηση του μίγματος. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές. Στην συνέχεια η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε κάτω από νερό, με σκοπό να κρυώσει. Έπειτα, το περιεχόμενο της φιάλης, τοποθετήθηκε με αργές κινήσεις στο plate αγαρόζης, για την αποφυγή

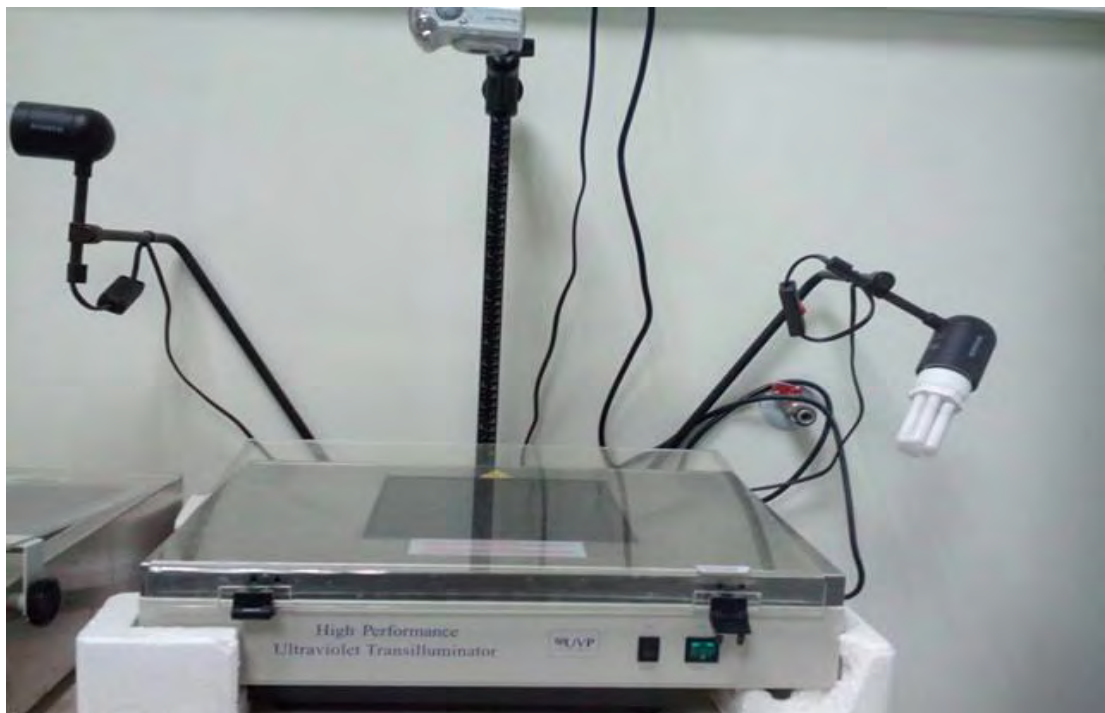
δημιουργίας φουσκαλών. Το μίγμα παρέμεινε στο plate αγαρόζης για 30 λεπτά, με σκοπό να σταθεροποιηθεί.

Μετά την πάροδο των 30 λεπτών πραγματοποιείται τοποθέτηση του gel στο μπάνιο ηλεκτροφόρησης και προσθήκη 2,5L TBE 1X. Η πλήρωση του κάθε βοθρίου πραγματοποιείται με μίγμα που προκύπτει από την ανάμειξη 6 μl από το κάθε προϊόν της PCR και 4 μl διαλύματος φόρτωσης (buffer). Στο πρώτο βοθρίο πραγματοποιήθηκε τοποθέτηση του μάρτυρα LMW DNA Ladder. Το δεύτερο βοθρίο παρέμενε κενό. Στο τρίτο βοθρίο τοποθετούνταν ο θετικός μάρτυρας και στα υπόλοιπα βοθρία τα δείγματα με την σειρά. Όπου δεν υπήρχε θετικός μάρτυρας τα δείγματα τοποθετούνταν από το τρίτο βοθρίο και μετά. Στο προτελευταίο βοθρίο τοποθετούνταν ο αρνητικός μάρτυρας *Botrytis cinerea*. Στο τελευταίο βοθρίο τοποθετούνταν το υπερκάθαρο νερό. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για 1 ώρα και 45 λεπτά, με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 200 V

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το gel τοποθετήθηκε σε δοχείο που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X. Έπειτα προστέθηκαν 4μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου και το δοχείο παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Μετά την πάροδο των 45 λεπτών το gel επλύθηκε και τοποθετήθηκε στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβλίας UV (312 nm) με σκοπό να παρατηρηθεί.



Εικόνα 4. Οριζόντια ηλεκτροφόρηση όπου πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.



Εικόνα 5. Τράπεζα ακτινοβολίας UV (312nm), όπου έγινε η τοποθέτηση των πηγμάτων αгарόξης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού DNA απομονώσεων των γενών *Fusarium*, *Penicillium* και *Aspergillus*.

3.1.1 Αποτελέσματα συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού DNA απομονώσεων του γένους *Fusarium*.

Η μέτρηση της καθαρότητας και της συγκέντρωσης του ολικού DNA για τις απομονώσεις του γένους *Fusarium* πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του NanoDrop σπεκτροφωτομέτρου. Οι τιμές καθαρότητας του DNA οι οποίες γίνονται αποδεκτές είναι 1,81-2 (Sambrook et al., 1989).

Πίνακας 12. Συγκέντρωση και καθαρότητα ολικού DNA απομονώσεων του γένους *Fusarium*.

Κωδικός Δείγματος DNA	Κωδικός απομόνωσης	Συγκέντρωση (ng/mL)	Καθαρότητα
F1	DK-22 ^a	7,4	1,75
F2	DK-13 ^a	59,8	1,94
F3	DI21	170,4	1,98

3.1.2 Αποτελέσματα συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού DNA απομονώσεων του γένους *Penicillium*.

Η μέτρηση της καθαρότητας και της συγκέντρωσης του ολικού DNA για τις απομονώσεις του γένους *Penicillium* πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του

NanoDrop σπεκτροφωτομέτρου. Οι τιμές καθαρότητας του DNA οι οποίες γίνονται αποδεκτές είναι 1,81-2 (Sambrook et al., 1989).

Πίνακας 13. Συγκέντρωση και καθαρότητα ολικού DNA απομονώσεων του γένους *Penicillium*.

Κωδικός Δείγματος DNA	Κωδικός απομόνωσης	Συγκέντρωση (ng/mL)	Καθαρότητα
P1	G114	225,3	1,98
P2	DG21	187,6	1,91
P3	DH-13 ^a	82,9	1,84

3.1.3 Συγκέντρωση και καθαρότητα ολικού DNA απομονώσεων του γένους *Aspergillus*.

Η μέτρηση της καθαρότητας και της συγκέντρωσης του ολικού DNA για τις απομονώσεις του γένους *Aspergillus* πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του NanoDrop σπεκτροφωτομέτρου. Οι τιμές καθαρότητας του DNA οι οποίες γίνονται αποδεκτές είναι 1,81-2 (Sambrook et al., 1989).

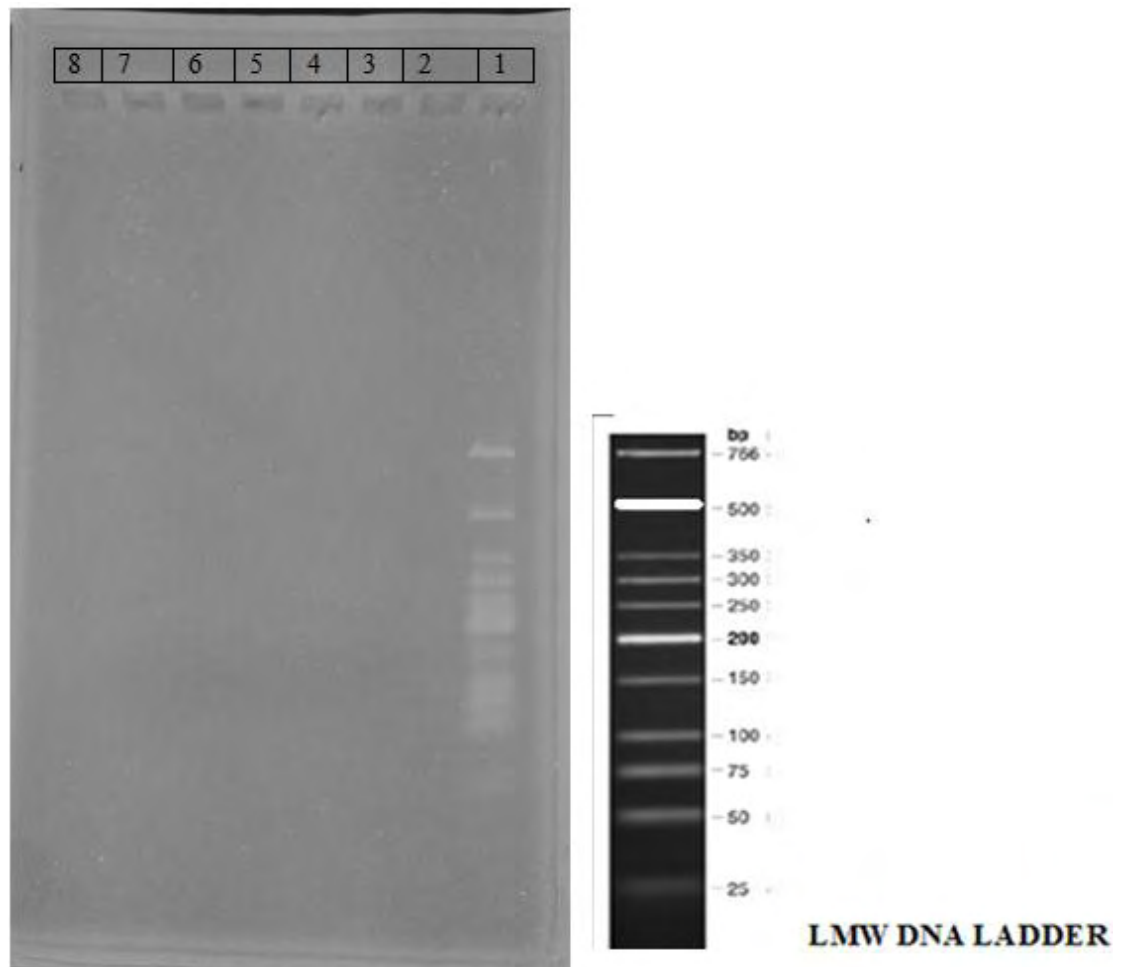
Πίνακας 14. Συγκέντρωση και καθαρότητα ολικού DNA απομονώσεων του γένους *Aspergillus*.

Κωδικός Δείγματος DNA	Κωδικός απομόνωσης	Συγκέντρωση (ng/mL)	Καθαρότητα
A1	H12 ^a	152,6	1,96
A2	DI-21 ^a	62,7	1,82
A3	DH-11 ^a	200,9	1,99

Όπως γίνεται αντιληπτό από τους παραπάνω πίνακες, η καθαρότητα του DNA, που εξήχθη από τις απομονώσεις των γενών *Fusarium*, *Penicillium* και *Aspergillus* κυμαινόταν μέσα στα αποδεκτά όρια, εκτός από μία απομόνωση του δείγματος F1, όπου η συγκέντρωσή του ήταν 1,75. Στο σύνολο το DNA που εξήχθη από τις απομονώσεις ήταν πολύ καλής ποιότητας.

3.2 Κατάταξη απομονώσεων του γένους *Fusarium* σε επίπεδο είδους (*F.verticillioides*) με τη χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών Ver1 και Ver2.

Για να πραγματοποιηθεί η κατάταξη των απομονώσεων του γένους *Fusarium* στο είδος *F.verticillioides* ο αναμενόμενος αριθμός βάσεων που πρέπει να προκύψει από τα αποτελέσματα της PCR, κατά την παρατήρηση του πήγματος αγαρόζης στην τράπεζα ακτινοβολίας UV πρέπει να είναι 578bp. Ωστόσο, όπως φαίνεται στην εικόνα 6 δεν εμφανίζονται ζώνες στην αναμενόμενη περιοχή, οπότε καμία από τις τρεις αυτές απομονώσεις δεν εντάσσονται στο είδος *F.verticillioides*. Επίσης, δεν εμφανίζονται ζώνες στους αρνητικούς μάρτυρες, οπότε δεν υπήρξε κάποιου είδους επιμόλυνση.

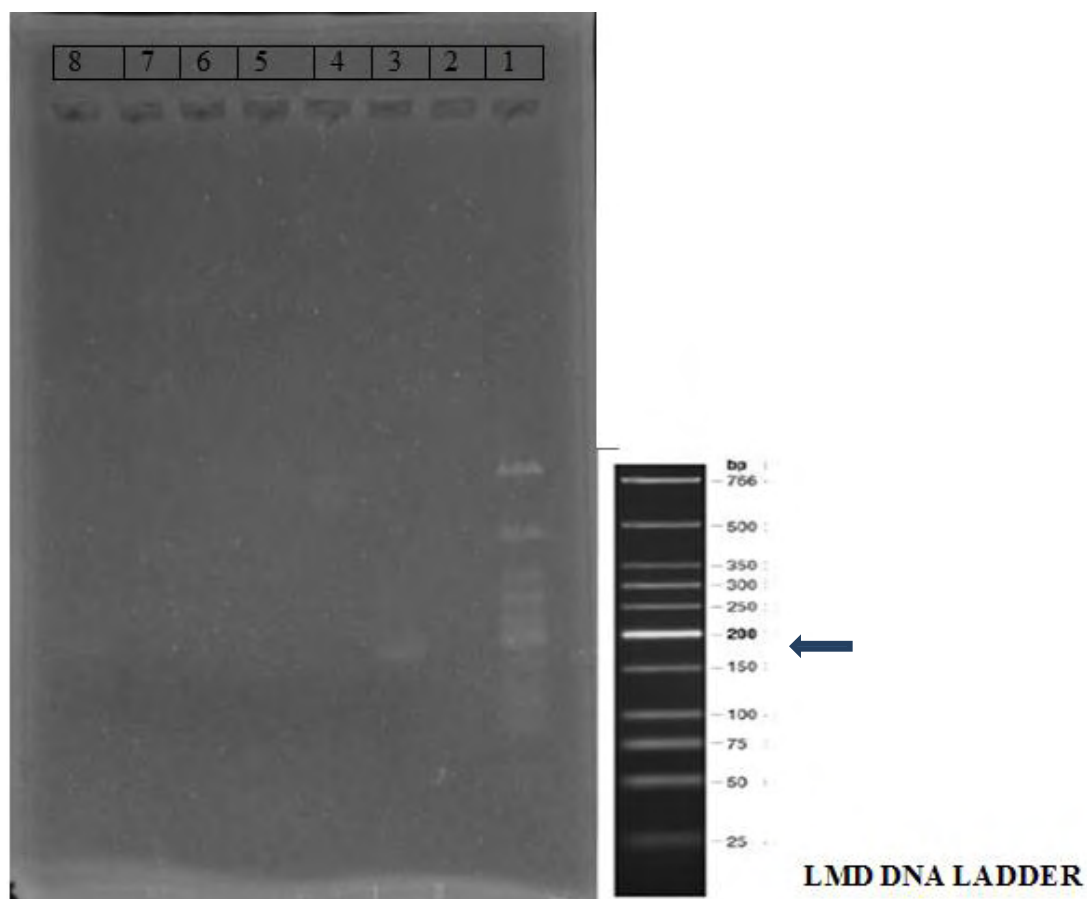


Εικόνα 6 . Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πήγμα αγαρόζης, με την χρήση εκκινητών Ver 1 και Ver2. **Θέση 1η :** LMW DNA Ladder, **Θέση 2η :** κενή, **Θέση 3η :** F1 , **Θέση 4η :** F2, **Θέση 5η :** F3, **Θέση 6η :** Αρνητικός μάρτυρας (*Botrytis cinerea*), **Θέση 7η :** Αρνητικός μάρτυρας (υπερκάθαρο νερό) **Θέση 8η :** κενή

3.3 Ανίχνευση του γονιδίου *fum1* στις απομονώσεις του γένους *Fusarium*, το οποίο επάγει την παραγωγή φουμονισίνης.

Για να επιβεβαιωθεί αν το γονίδιο *fum1* ανιχνεύεται στις απομονώσεις του γένους *Fusarium* ο αναμενόμενος αριθμός βάσεων που πρέπει να προκύψει από τα αποτελέσματα της PCR, κατά την παρατήρηση του πηγματος αγαρόζης στην τράπεζα

ακτινοβολίας UV πρέπει να είναι 183bp. Ωστόσο, όπως φαίνεται στην εικόνα 7, δεν εμφανίζονται ζώνες στην αναμενόμενη περιοχή, οπότε το γονίδιο *fum1* δεν ανιχνεύεται σε καμία από τις τρεις απομονώσεις. Επίσης εμφανίζεται ζώνη στο θετικό μάρτυρα F10 οπότε σημαίνει ότι η PCR ήταν επιτυχής. Τέλος δεν εμφανίζονται ζώνες στους αρνητικούς μάρτυρες, οπότε δεν υπήρξε κάποιου είδους επιμόλυνση.



Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πήγμα αγαρόζης, με την χρήση εκκινητών *Fum 1* και *Fum 2*. **Θέση 1^η** : LMW DNA Ladder, **Θέση 2^η** : κενή, **Θέση 3^η** : Θετικός μάρτυρας F10, **Θέση 4^η** : F1, **Θέση 5^η** : F2, **Θέση 6^η** : F3, **Θέση 7^η** : Αρνητικός μάρτυρας (*Botrytis cinerea*), **Θέση 8^η** : Αρνητικός μάρτυρας (υπερκάθαρο νερό).

3.4 Ανίχνευση του γονιδίου HDI1, στις απομονώσεις του γένους *Penicillium*, το οποίο επάγει την παραγωγή πατουλίνης .

Για να επιβεβαιωθεί αν το γονίδιο HDI1 ανιχνεύεται στις απομονώσεις του γένους *Penicillium*, ο αναμενόμενος αριθμός βάσεων που πρέπει να προκύψει από τα αποτελέσματα της PCR, κατά την παρατήρηση του πηγματος αγαρόζης στην τράπεζα ακτινοβολίας UV πρέπει να είναι 600bp. Ωστόσο, όπως φαίνεται στην εικόνα 8, δεν εμφανίζονται ζώνες στην αναμενόμενη περιοχή, οπότε το γονίδιο HDI1 δεν ανιχνεύεται σε καμία από τις τρεις απομονώσεις. Επίσης, δεν εμφανίζονται ζώνες στους αρνητικούς μάρτυρες, οπότε δεν υπήρξε κάποιου είδους επιμόλυνση.

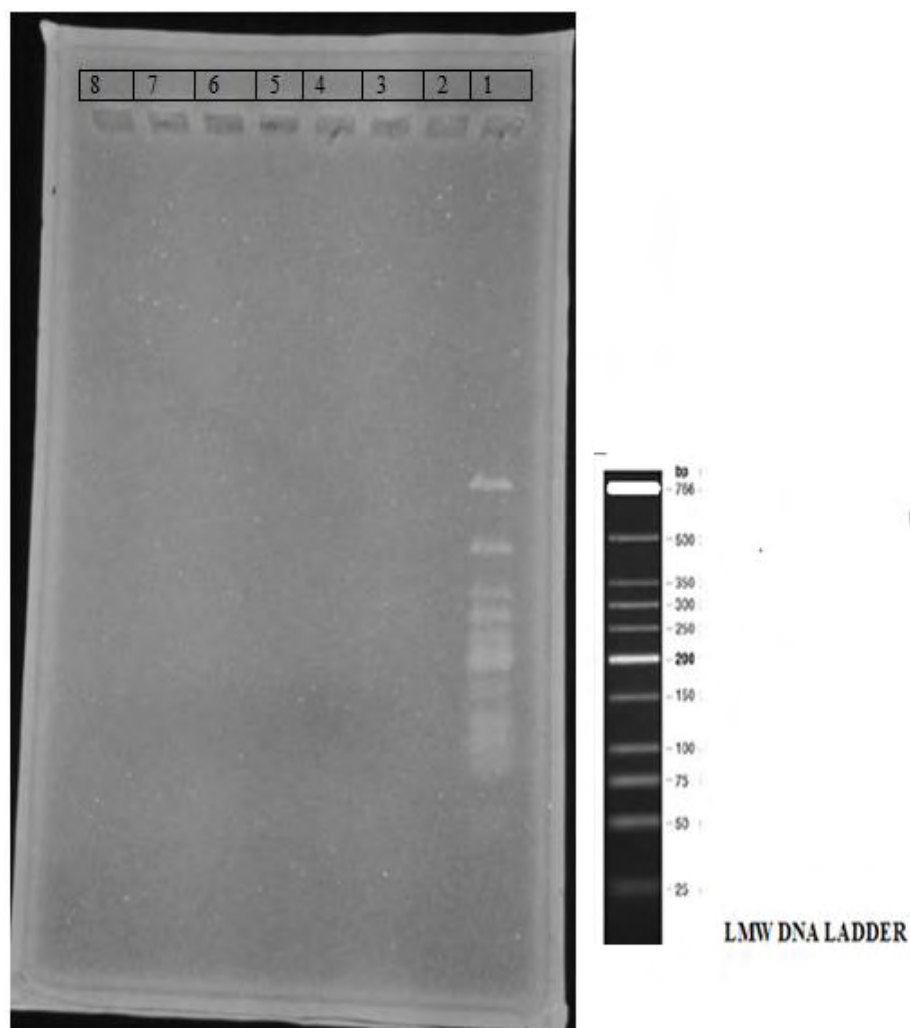


Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πήγμα αγαρόζης, με την χρήση εκκινητών 41 και 42. **Θέση 1^η** : LMW DNA Ladder, **Θέση 2^η** : κενή, **Θέση 3^η** : P1, **Θέση 4^η** : P2, **Θέση 5^η** : P3, **Θέση 6^η** : Αρνητικός μάρτυρας (*Botrytis cinerea*), **Θέση 7^η** : Αρνητικός μάρτυρας (υπερκάθαρο νερό), **Θέση 8^η** : κενή.

3.5 Ανίχνευση του γονιδίου *alfR1*, στις απομονώσεις του γένους *Aspergillus*, το οποίο επάγει την παραγωγή αφλατοξίνης .

Για να επιβεβαιωθεί αν το γονίδιο *alfR1* ανιχνεύεται στις απομονώσεις του γένους *Aspergillus*, ο αναμενόμενος αριθμός βάσεων που πρέπει να προκύψει από τα

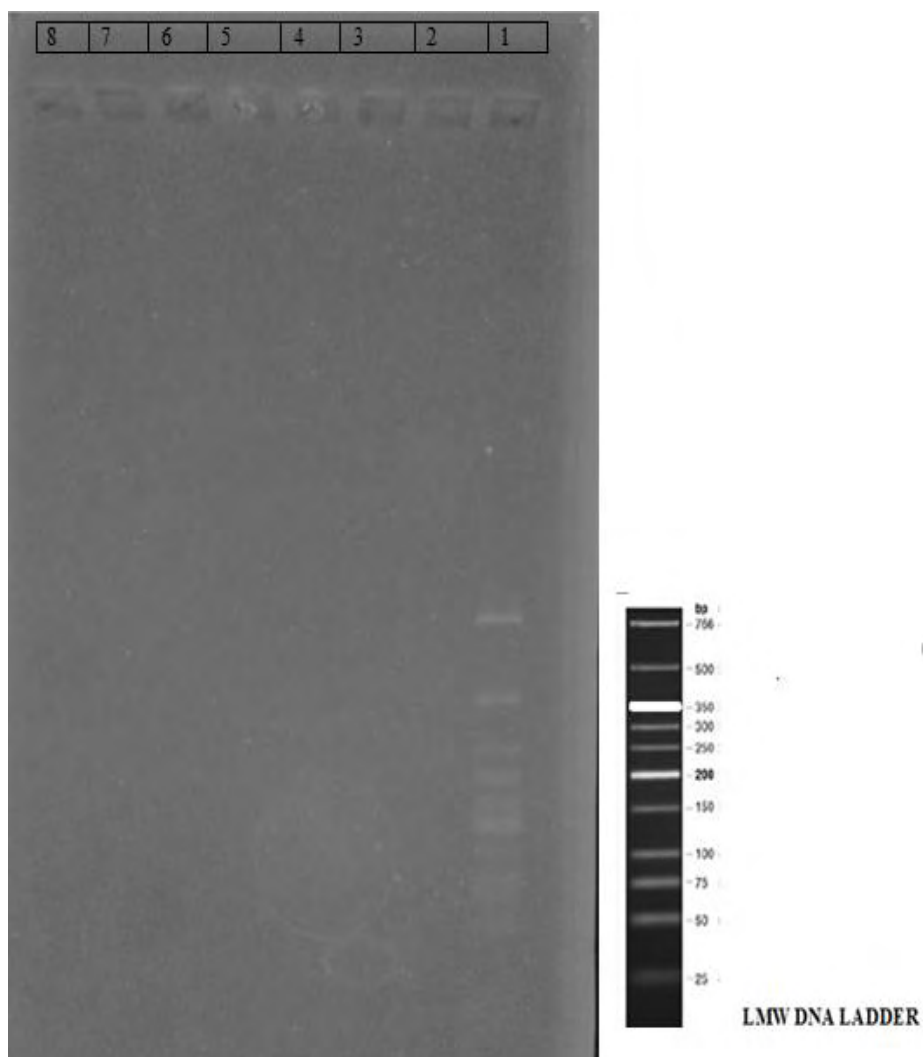
αποτελέσματα της PCR, κατά την παρατήρηση του πηγματος αγαρόζης στην τράπεζα ακτινοβολίας UV πρέπει να είναι 798bp. Ωστόσο, όπως φαίνεται στην εικόνα 9, δεν εμφανίζονται ζώνες στην αναμενόμενη περιοχή, οπότε το γονίδιο *alfR1* δεν ανιχνεύεται σε καμία από τις τρεις απομονώσεις. Επίσης, δεν εμφανίζονται ζώνες στους αρνητικούς μάρτυρες, οπότε δεν υπήρξε κάποιου είδους επιμόλυνση.



Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πηγμα αγαρόζης, με την χρήση εκκινητών *alfR1* (forward/reverse). **Θέση 1^η** : LMW DNA Ladder, **Θέση 2^η** : κενή, **Θέση 3^η** : A1, **Θέση 4^η** : A2, **Θέση 5^η** : A3, **Θέση 6^η** : Αρνητικός μάρτυρας (*Botrytis cinerea*), **Θέση 7^η** : Αρνητικός μάρτυρας (υπερκάθαρο νερό), **Θέση 8^η** : κενή.

3.6 Ανίχνευση του γονιδίου *alfR2*, στις απομονώσεις του γένους *Aspergillus*, το οποίο επάγει την παραγωγή αφλατοξίνης .

Για να επιβεβαιωθεί αν το γονίδιο *alf2* ανιχνεύεται στις απομονώσεις του γένους *Aspergillus*, ο αναμενόμενος αριθμός βάσεων που πρέπει να προκύψει από τα αποτελέσματα της PCR, κατά την παρατήρηση του πηγματος αγαρόζης στην τράπεζα ακτινοβολίας UV πρέπει να είναι 400bp. Ωστόσο, όπως φαίνεται στην εικόνα 10, δεν εμφανίζονται ζώνες στην αναμενόμενη περιοχή, οπότε το γονίδιο *alfR2* δεν ανιχνεύεται σε καμία από τις τρεις απομονώσεις. Επίσης, δεν εμφανίζονται ζώνες στους αρνητικούς μάρτυρες, οπότε δεν υπήρξε κάποιου είδους επιμόλυνση.



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πήγμα αγαρόζης, με την χρήση εκκινητών *alfR2* (forward/reverse). **Θέση 1^η** : LMW DNA Ladder, **Θέση 2^η** : κενή, **Θέση 3^η** : As1, **Θέση 4^η** : As2, **Θέση 5^η** : As3, **Θέση 6^η** : Αρνητικός μάρτυρας (*Botrytis cinerea*), **Θέση 7^η** : Αρνητικός μάρτυρας (υπερκάθαρο νερό), **Θέση 8^η** : κενή.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές, οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω, τα άλευρα τα οποία είναι πιο ευπαθή στις μυκοτοξίνες είναι το καλαμποκάλευρο και το άλευρο πουλερικών. Επίσης, τα κυριότερα είδη μυκήτων τα οποία ανιχνεύονται στο καλαμποκάλευρο είναι τα *F.verticillioides* και *A.flavus*, ενώ στα άλευρα πουλερικών είναι τα *A.flavus* και *A.parasiticus*. Τέλος, οι κυριότερες μυκοτοξίνες που απαντώνται στα άλευρα είναι οι αφλατοξίνη B1, η φουμονισίνη B1, η ωχρατοξίνη A αλλά και η ζερεαλενόνη, δεοξυνιβαλενόνη και η τοξίνη T-2.

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Αγγλία χρησιμοποίησε την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και στην συνέχεια την ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης με σκοπό την ταυτοποίηση ειδών του γένους *Brettanomyces*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος αυτή είναι μια γρήγορη και χαμηλού κόστους διαδικασία, η οποία δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα για την ταυτοποίηση των ειδών στόχων (Hulin et al., 2014).

Μελέτη που διεξήχθη στην Ιταλία έλεγξε την ικανότητα παραγωγής φουμονισίνης σε κόκκους καλαμποκιού. Οι μύκητες που απομονώθηκαν άνηκαν στο είδος *F.verticillioides* και ελέγχθηκαν για την ανίχνευση του γονιδίου *fum1*, που επάγει την παραγωγή φουμονισίνης, με την χρήση εξιδικευμένων εκκινήτων. Ο έλεγχος για την παραγωγή φουμονισίνης πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο LC-MS/MS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το γονίδιο *fum1* ανιχνεύθηκε σε 25 απομονώσεις και από αυτές οι 20 παρήγαγαν φουμονισίνη (Covarelli et al., 2012).

Σύμφωνα με έρευνα που διεξήχθη στην Αργεντινή, παρατηρήθηκε η παραγωγή μυκοτοξινών σε καλαμποκάλευρο. Τα κυρίαρχα είδη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν το *A. flavus* και το *F. verticillioides*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μερικά από

τα δείγματα που εξετάστηκαν, παρήγαγαν τις αφλατοξίνη B1, την φουμονισίνη B1, τη ζεαραλενόνη και την δεοξυνιβαλενόλη. Η δυνητική παραγωγή της φουμονισίνης B1 και της αφλατοξίνης B1, εξετάστηκε με την μέθοδο HPLC. Η παραγωγή της ζεαραλενόνης εξετάστηκε με την μέθοδο ELIZA, ενώ της δεοξυνιβαλενόλης με την μέθοδο GC (Gonzalez Pereyra et al., 2007).

Τα αποτελέσματα μελέτης που πραγματοποιήθηκε σε προϊόντα σιτηρών και πιο συγκεκριμένα σε αλεύρι, καλαμπόκι και ρύζι έδειξαν ότι παρήγαγαν την ωχρατοξίνη A. Τα δείγματα που προέρχονταν από τα συγκεκριμένα σιτηρά εξετάστηκαν για την δυνητική ικανότητα παραγωγής μυκοτοξινών με την χρήση της μεθόδου HPLC και αποδείχθηκε ότι το 70% των δειγμάτων από αλεύρι, το 50% των δειγμάτων ρυζιού και το 63% των δειγμάτων καλαμποκιού βρέθηκαν θετικά στην ωχρατοξίνη A (Vega et al., 2008).

Μελέτη ενός χρόνου η οποία διεξήχθη στο Ιράν εξέτασε 450 δείγματα που προέρχονταν από δέκα τύπους ζωοτροφών, οι οποίες περιελάμβαναν μεταξύ των άλλων σπόρους καλαμποκιού, ενσίρωμα καλαμποκιού κ.α. Τα πιο κυρίαρχα είδη τα οποία απομονώθηκαν με τη μέθοδο της επίστρωσης μετά από αραίωση άνηκαν στα γένη *Aspergillus* (56%), *Mucor* (17%), *Penicillium* (15%), *Fusarium* (6%), *Cladosporium* (2%). Από το γένος *Aspergillus* τρία είδη ταυτοποιήθηκαν με την μεγαλύτερη συχνότητα να έχει το είδος *Aspergillus flavus*. Σε όλα τα δείγματα τα τοξικογόνα είδη (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) υπερίσχυσαν με ποσοστό 57% έναντι των μη τοξικογόνων ειδών με ποσοστό 33% (Khosravi et al., 2008).

Τα αποτελέσματα έρευνας, η οποία πραγματοποιήθηκε στην επαρχία Μπουένος Άιρες της Αργεντινής, σε 35 δείγματα από άλευρο πουλερικών, η μυκοτολογική ανάλυση σε τρυβλία Petri, έδειξε την παρουσία πέντε γενών μυκήτων (*Aspergillus*,

Penicillium, *Fusarium*, *Cladosporium* και *Eurotium*). Από τις συνολικές απομονώσεις, 91 από αυτές άνηκαν στο γένος *Aspergillus* εκ των οποίων οι 90 στο είδος *A. flavus* και η μία στο είδος *A. parasiticus*. Σε 57 από τις 91 απομονώσεις ανιχνεύθηκε, με χρήση της μεθόδου HPLC η παραγωγή αφλατοξίνης B1 σε ποσοστά που κυμαίνονταν μεταξύ 0.05μg/kg έως 27,7μg/kg (Astroreca et al., 2011).

Στελέχη του *A. flavus* ελέγχθηκαν για την παραγωγή αφλατοξινών, σε έρευνα που διεξήχθη στην επαρχία Cordoba της Αργεντινής, σε 180 δείγματα που προέρχονταν από άλευρο πουλερικών και τα οποία συλλέχθηκαν τα έτη 1996-1997 από διάφορα εργοστάσια της περιοχής. Τα κυρίαρχα είδη του γένους *Aspergillus* ήταν το *Aspergillus flavus* και το *A. parasiticus*. Επίσης ανιχνεύθηκαν και στελέχη του γένους *Penicillium*. Παραγωγή αφλατοξινών ανιχνεύθηκε σε 21 από τα 45 στελέχη του *A. flavus*, με την χρήση της μεθόδου TLC. Από αυτά το 24% των απομονώσεων παράγαγε αφλατοξίνη B1 και αφλατοξίνη B2 σε ποσοστά 181-14545 μg/kg και 6-3640μg/kg αντίστοιχα. Μόνο 10 στελέχη παράγαγαν αφλατοξίνη B1 σε ποσοστά 10-920μg/kg (Magnoli et al., 1998).

Επίσης, σε παρόμοια μελέτη στην ίδια περιοχή και τα ίδια έτη, συλλέχθηκαν 300 δείγματα από άλευρο πουλερικών, από 5 διαφορετικά εργοστάσια. Και σε αυτήν την έρευνα ανιχνεύθηκε η αφλατοξίνη B1 με την χρήση της μεθόδου TLC, αλλά σε χαμηλότερα ποσοστά σε σχέση με την προηγούμενη έρευνα. Το 1996, μια μικρή ποσότητα δειγμάτων περιείχαν τις αφλατοξίνες G1 και G2. Επίσης, κάποια από τα δείγματα είχαν μολυνθεί με ζεαραλενόνη και δεοξυνιβαλενόλη (Dalcero et al., 1997).

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Ιράκ, εξέτασε 45 δείγματα τα οποίοι προέρχονταν από άλευρο πουλερικών και είχε ως σκοπό την πιθανή παρουσία μυκοτοξινών. Οι μύκητες οι οποίοι υπήρχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό άνηκαν στο

γένος *Aspergillus*. Στα αποτελέσματα παρουσιάστηκε η δυνητική παραγωγή φουμονισινών, αφλατοξινών, ωχρατοξινών και της τοξίνης T-2 (Shareef, 2009).

Πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη το 2014 στη Αργεντινή εξέτασε την παρουσία μυκοτοξινών και μυκοτοξικογόνων μυκήτων, με την μέθοδο ELIZA, σε 49 δείγματα, που προέρχονταν από άλευρο πουλερικών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα 44 από τα δείγματα ήταν μολυσμένα με αφλατοξίνες, δεοξυνιβαλενόλη και ωχρατοξίνη A. Επίσης 42 από τα δείγματα ήταν μολυσμένα με ζεαραλενόνη και 38 δείγματα με την τοξίνη T-2 (Greco et al., 2014).

Οι μελέτες για την παρουσία μυκοτοξιογόνων ειδών μυκήτων και μυκοτοξινών στις ιχθυοτροφές είναι ελάχιστες και οι κυριότερες μυκοτοξίνες που απαντώνται είναι η αφλατοξίνη B1, η φουμονισίνη B1 και η ωχρατοξίνη A. Αυτό φαίνεται και σε μελέτη που διεξήγαγαν οι Alinezhad et al., όπου εξετάστηκε η παρουσία μυκήτων και της αφλατοξίνης B1 σε pellets πέστροφας του είδους *Oncorhynchus mykiss* και σε συστατικά τροφών τα οποία προορίζονται για πέστροφες (γλουτένη, ιχθυάλευρο, αλεύρι σίτου και σογιάλευρο). Ταυτοποιήθηκαν 109 απομονώσεις μυκήτων από τις οποίες το μεγαλύτερο ποσοστό άνηκε στο γένος *Aspergillus* (57%), ακλουθούσε το γένος *Penicillium* (12,84%). Το είδος με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ήταν το *A. flavus*, το οποίο απομονώθηκε τόσο από όλα τα συστατικά τροφών όσο και από τα pellets. Ανάμεσα στις 37 απομονώσεις του είδους *A. flavus*, με την χρήση της μεθόδου HPLC, φάνηκε ότι οι 19 παρήγαγαν την αφλατοξίνη B1 σε διαφορετικές τιμές τοξικότητας, οι οποίες κυμαίνονταν από 1,83μg/kg έως 67,35μg/kg. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μόλυνση των ιχθυοτροφών της πέστροφας με αφλατοξίνη είναι υψηλότερη από τα αποδεκτά επίπεδα και αποτελεί έναν πολύ ριψοκίνδυνο παράγοντα για τις ιχθυοκαλλιέργειες (Alinezhad et al., 2011).

Επίσης, σε έρευνα που διεξήχθη σε δείγματα ιχθυοτροφών στο Ρίο ντε Τζανέιρο, είχε ως σκοπό να προσδιορίσει τα είδη μυκήτων από τα γένη *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, καθώς και την μόλυνση των δειγμάτων με τις μυκοτοξίνες FB1, AFB1 και OTA. Συνολικά εξετάστηκαν 60 δείγματα ιχθυοτροφών που προορίζονταν για τιλάπιες. Για την απομόνωση των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της επιφανειακής επίστρωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανάμεσα στα τοξικογόνα γένη το επικρατέστερο ήταν το *Aspergillus* (68%), ακολουθούμενο από είδη του γένους *Penicillium* (60%). Στην συνέχεια με την μέθοδο TLC, παρατηρήθηκε ότι το 98% των δειγμάτων ήταν μολυσμένα με την φουμονισίνη B1, το 55% ήταν μολυσμένο με την αφλατοξίνη B1 και το 3,3% των δειγμάτων ήταν μολυσμένο με την ωχρατοξίνη A (Barbosa et al., 2013).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκριμένης έρευνας σε κανένα από τα δείγματα των ιχθυοτροφών που εξετάστηκαν με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, δεν ανιχνεύθηκε κάποιο γονίδιο το οποίο να επάγει την παραγωγή μυκοτοξινών. Πιο συγκεκριμένα:

- στις τρεις απομονώσεις του γένους *Fusarium*, οι οποίες προέρχονταν από καλαμποκάλευρο και ιχθυάλευρο, δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο *fum1*, το οποίο επάγει την παραγωγή φουμονισίνης
- στις ίδιες απομονώσεις επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την κατάταξη στο είδος *F.verticillioides*, που είναι το κατεξοχήν είδος που παράγει φουμονισίνη, ωστόσο τα ποτελέσματα δεν ήταν θετικά,
- στις τρεις απομονώσεις του γένους *Penicillium*, οι οποίες προέρχονταν από άλευρο πουλερικών και ηλιάλευρο, δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο *IDH1*, το οποίο επάγει την παραγωγή πατουλίνης,
- τέλος, στις τρεις απομονώσεις του γένους *Aspergillus*, οι οποίες προέρχονταν από ιχθυάλευρο και ηλιάλευρο και ελέγχθηκαν επιπλέον και με την χρήση της μεθόδου της Nested PCR, , δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο *alfR1* ή το γονίδιο *alfR2*, το οποίο εμπλέκεται στην παραγωγή αφλατοξίνης.

Ωστόσο, η απομόνωση και η ύπαρξη μυκοτοξικογόνων ειδών μυκήτων στα τρόφιμα και τις τροφές, δεν συνοδεύεται απαραίτητα και από την ύπαρξη μυκοτοξινών. Σύμφωνα με την ανάπτυξη τεχνικών, οι οποίες είναι ακριβής και ευπαθείς, για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των μυκοτοξινών, οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι ποικίλοι παράγοντες (φυσικοί, χημικοί, βιολογικοί) δρουν

ανεξάρτητα επηρεάζοντας τις αποικίες των μυκήτων, ή/και την παραγωγή μυκοτοξινών (D’Mello & Mac Donald, 1997).

Επίσης στις τροφές, οι οποίες εξετάζονται για την παρουσία μυκοτοξινών, η αντίχνευση κάποιου γονιδίου, δεν είναι αρκετή για να προσδιορίσει την μόλυνση (Thompson & Wannemacher, 1986):

- το γονίδιο για την παραγωγή κάποιας μυκοτοξίνης μπορεί να υπάρχει, αλλά να μην εκφράζεται,
- αλλά και στην περίπτωση που αυτό εκφράζεται, μπορεί οι συνθήκες να μην είναι κατάλληλες ώστε να επιτρέπουν την παραγωγή μυκοτοξινών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas H.K., Tanaka T., Shier, W.T. (1995). Biological activities of synthetic analogues of *Aiternaria alternata* toxin (AAL) and fumonisin in plant and mammalian cells. *Phytochemistry* 40, 1681-1689.
- Alinezhad S., Tolouee M., Kamalzadeh A., Motalebi A.A., Nazer, M., Yasemi M., Shams-Ghahfarokhi M., Toloue, R., Razzaghi-Abyaneh M. (2011). Mycobiota and Aflatoxin B1 Contamination of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Feed with Emphasis to *Aspergillus* Section *Flavi*. *Iranian Journal of Fisheries* 10, 363-374.
- Astroreca A.L., Dalcero A.M., Fernandes Pinto V., Vaamonde G. (2011). A Survey of Distribution and Toxigenicity of *Aspergillus* Section *Flavi* in Poultry Feeds. *International Journal of Food Microbiology* 146, 38-43.
- Barbosa S.T., Pereya M.C., Soleiro A.C., Dias O.E., Oliveira A.A., Keller M.K., Silva P.P., Cavaglieri R.L., Rosa A.C. (2013). Mycobiota and Mycotoxins Present in Finished Fish Feed from Farms in the Rio De Janeiro State, Brazil. *International Aquatic Research*, 5: 3.
- Bintvihok A., Ponpornpisit A., Tangtrongpiros J., Panichkriangkrai W., Rattanapanee R., Doi K., Kumagai S. (2003). Aflotoxin contamination in Shrimp feed and effects of aflotoxin addition to feed on shrimp production. *J. Food Prot.* 66, 882-885.
- Bluhm B.H., Flaherty J.E., Cousin M.A., Woloshuk C.P. (2004). Multiplex

polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection* 65, 1955–1961.

Brera C., DeSantis B., Debegnac, F., Miraglia M., (2008). Mycotoxins. In *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier B.V. 364-420.

Bullerman L.B. (2000). Mycotoxins. In: Robinson, R.K. (Ed in Chief), Baft, C.A. and Patel, P.D. (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, London, UK. 1512-1519.

Cappielli A.; Famiglini G.; Tirillini B. (1995). Determination of aflatoxins in peanut meal by LC/MS with particle-beam interface. *Chromatographia* 40, 411-416.

CAST (Council for Agricultural Science and Technology) (2003). *Myxotoxins: Risks in Plants, Animals and Human Systems*. Task Force Report No. 139, Ames.

Cavaglieri L.R. (2007). Fungi and Selected Mycotoxins from Pre- and Postfermented Corn Silage. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

Chen J., Mirocha C.J., Xie W., Hogge L., Olson D. (1992). Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Aiternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3928-3931.

Chu F.S. (2006). Mycotoxins and alimentary mycotoxicoses. In: Riemann, H.P., Cliver, D.O. (Eds). *Foodbome Infections and Intoxications - Third Edition*. Academic Press, New York, NY. 583-661.

Covarelli, L., Stifano, S., Beccari, G., Raggi, L. Lattanzio, V.M.T., Albertini, E.

(2012). Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology* 31 (1), 17-24

D' Mello J.P.F., MacDonald A.M.C., (1997). Mycotoxins. *Anim. Feed Sci.*

Techonl. 69, 155-166.

Dalcerro A., Magnoli C., Chiacchiera S., Palacios G., Reynoso M. (1996).

Mycoflora and Incidence of Aflatoxin B1, Zearalenone and Deoxynivalenol in Poultry Feeds in Argentina. Kluwer Academic Publishers, *Mycopathologia* 137, 179–184.

Doster R., Sinnhuber R., Wales J., (1972). Acute intraperitoneal toxicity of ochratoxin

A and B in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Food Cosmet. Toxicol.* 10, 85–92.

Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*

12, 13-15.

Eaton D.L., Groopman J.D. (1994). *The Toxicology of Aflatoxins - Human Health,*

Veterinary and Agricultural Significance. Academic Press, New York, NY.

El-Banna R., Tebeb H.M., Fakhry F.M. (1992). Performance and tissue residues of

tilapias fed dietary aflatoxin. *Vet. Med. J.* 40, 17-23.

El-Sayed Y. S., Khalil R. H. (2009). Toxicity, biochemical effects and residue of

aflatoxin B1 in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). Food and Chemical Toxicology 47, 1606 – 1609.

Frisvad J.C., Thrane U., Samson R.A. (2007). Mycotoxin producers. In: Dijksterhuis, J. and Samson, R.A. (Eds). Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food. Taylor and Francis Group, LLC, CRC Press 135-159.

Goldblatt L.A. (1969). Aflatoxin - Scientific Background, Control and Implications. Academic Press, New York, NY.

Gonzalez Pereyra M.L., Alonso V.A., Sager R., Morlaco M.B., Magnoli, C.E., Astoreca A.L., Rosa C.A.R., Chiacchiera S.M., Dalcero, A.M., Greco M.V., Franchi M.L., Golba S.L.R., Pardo A.G., Pose G.N. (2014). Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Poultry Feed for Food-Producing Animals. Hindawi Publishing Corporation, The Scientific World Journal.

Greco, M.V., Franchi, M.L., Golba, S.L.R., Pardo, A.G., Pose, G.N. (2014). Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Poultry Feed for Food-Producing Animals. Hindawi Publishing Corporation, The Scientific World Journal.

Halver J. (1969). Aflatoxicosis and trout hepatoma. In Aflatoxin: Scientific Background, Control, and Implications, edited by L. A. Goldblatt. New York: Academic Press. pp. 265–306.

Heinonen J. T., Fisher R., Brendel K., Eaton D.L. (1996). Determination of aflatoxin B1 biotransformation and binding to hepatic macromolecules in human precision liver slices. Toxicology and Applied Pharmacology 136, 1-7.

- Hendricks J.D. (1994). Carcinogenicity of aflatoxins in nonmammalian organisms.
- In: Eaton, D.L., Groopman, J.D. (Eds.), *Toxicology of Aflatoxins: Human Health, veterinary, and Agricultural Significance*. Academic Press, San Diego. Pp. 103-136.
- Hulin M., Harisson E., Startford M., Wheals A.E. (2014). Rapid Identification of the Genus *Dekkera/Brettanomyces*, the *Dekkera* Subgroup and all Individual Species. *International Journal of food Microbiology* 187, 7-14.
- Hussein S. H., Jeffrey M. B. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. School of Veterinary Medicine, University of Nevada-Reno, Mail Stop 202 , Reno, NV 89557 , USA 167, 101-134.
- Islam Z., Nagase M.; Ota A.; Ueda S.; Yoshizawa T.; Sakato N. (1988). A structure–function relationship of T-2 toxin and its metabolites in inducing thymic apoptosis in vivo in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1492–1497.
- Jantrarotai W., Lovell R. (1990). Subchronic Toxicity of Dietary Aflatoxin B1 to Channel Catfish. *Journal of Aquatic animal Health*, 4: 248-254.
- Kelly J.D., Eaton D.L., Guengerich F.P., Coulombe R.A. (1997). Aflatoxin B1 activation in human lung. *Toxicology and Applied Pharmacology* 144, 88-95.
- Khosravi A.R., Dakhili M., Shokri H. (2008). A Mycological Survey on Feed Ingredients and Mixed Animal Feed in Ghom Province, Iran. *University of Tehran, Iran, Pakistan Journal of Nutrition* 1, 31-34.

Krska R., Welziga E., Boudra H. (2007). Analysis of Fusarium toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137, 241–264. Cambridge Woodhead Publishing 5-31.

Li M.H., Raverty S.A., Robinson E.H. (1994). Effects of dietary mycotoxins produced by the mold *Fusarium moniliforme* on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) J. *World Aquacult. Soc.* 25(4), 512-516.

Lodhi M.A., Ye G.N., Weeden N.F., Reisch B.I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12, 6–13.

Lopez-Diaz T.M., Flannigan B. (1997). Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. *International Journal of Food Microbiology* 35, 129-136.

Lumlertdacha S., Lovell R. T., Shelby R. A., Lenz S. D., Kemppainen B. W. (1995). Growth, Hematology and Histopathology of Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Fed Toxins from *Fusarium moniliforme*. *Aquaculture* 130: 201–218.

Magnoli C., Dalcero A.M., Chiacchiera S.M., Miazzo R., M.A. Saenz M.A. (1998). Enumeration and Identification of *Aspergillus* Group and *Penicillium* Species in Poultry Feeds from Argentina. *Kluwer Academic Publishers, Mycopathologia* 142, 27–32.

Manning B.B. (2001). Mycotoxins in fish feeds. In *Nutrition and Fish Health*. Lim, C.

& Webster, C.D. Eds). Food Products Press. New York. pp 365 .

Manning B., Menghe L., Robinson E., Gaunt P., Camus A., Rottinghaus G. (2003).

Response of Channel catfish to Diets Containing T-2 Toxin. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3:229-238.

Manonmani H.K., Anand S., Chandrashekar A., Rati E.R. (2005). Detection

of aflatoxicogenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry* 40, 2859-2864.

Massey T.E. (1996). Cellular and molecular targets in pulmonary chemical

carcinogenesis — studies with aflatoxin B₁. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 74, 621—628.

Mirocha C.J., Gilchrist D.G., Shier W.T., Abbas H.K., Wen, Y., Vesonder R.F.

(1992). AAL toxins, fumonisins (biology and chemistry) and host- specificity concepts. *Mycopathologia* 117, 47—56.

Mohamed E.Z. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of*

Saudi Chemical Society. Medical laboratory sciences Dept.. Collage of Applied Medical Sciences, Al-Kharj University, Saudi Arabia 15,129-144.

Moss M.O. (2002). Mycotoxin review - 1. *Aspergillus and Penicillium. Mycologist*

16, 116-119.

Mulle G., Susca A., Moretti A. (2004). A species-specific PCR assay based on the

- calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 495-502.
- Mullis K.B., Fallana F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335 -350.
- Murphy G., Vogel G., Krippahl G., Lynen F., (1974). Patulin Biosynthesis: The Role of Mixed-Function Oxidases in the Hydroxylation of m-Cresol. *European Journal of Biochemistry* 49, 443-455.
- Myhr A., Dalmo R. (2005). Is There a Need for Risk Governance of Genetic Engineering in Aquaculture? *Aquaculture*, 250:542-554.
- Nesheim S. (1973). Analysis of ochratoxin A and B and their esters in barley, using partition and thin-layer chromatography. II. Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 56, 822-826. 21.
- Ngethe S., Horsberg T.E., Mitem, E., Ingebrigtsen K. (1993). Species differences in hepatic concentration of orally administered 3H AFB1 between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 114, 355–358.
- NRC (1993). *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy. Washington, DC.
- Norred W. (1993). Fumonisins-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 3: 309-328.

- Notermans S., Huevelman C.J. (1985). Immunological detection of moulds in food by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): preparation of antigens. *Int. J. Food Microbiol.* 2, 247–258.
- Patino B., Mirete S., Gonzalez-Jaen T., Mule G., Rodriguez T.M., Vazquez C. (2004). PCR detection assay of Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *J. Food Prot.* 6, 1278–1283.
- Peterson S.W., Ito Y., Horn B.W. , Goto T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93, 689–703.
- Pons W.A.; Lee L. S.; Stoloff L. (1980). Revised method for aflatoxins in cottonseed products and comparison of thin layer and high performance liquid chromatography determinative steps: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63, 899-906.
- Proctor R.H., Desjardins A.E., Plattner R.D., Hohn T.M. (1999). A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology* 38, 237–249.
- Puel O., Galtier P., Oswald I., (2010). Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* (2), 613-631.
- Russel R., Paterson M., Venancio A., Lima N. (2006). A Practical Approach for Indetifications Based on Mycotoxin Characters of *Penicillium*. *Mycol. Res.* 23, 155-159.

- Sahoo P.K., Mukherjee S.C. (2001). Immunosuppressive effects of aflatoxin B1 in Indian major carp (*Labeo rohita*). *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 24, 143-149.
- Sambrook G., Fritsch A.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second edition.
- Samson A. R. , Hong S–B., Frisvad C. J., (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus* *Medical Mycology* 2006, 44, 133-148.
- Sargeant K., O’Kelly J., Carnaghan R.B.A., Allcroft R. (1961). The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Veterinary Record* 73, 1219–1222.
- Scott P., M.; Lombaert G., A.; Pellaers P. (1989). Application of capillary gas chromatography to a survey of wheat for five trichothecenes. *Food. Add. Contam.* 6, 489-495.
- Seidman A.L., (2011). Εργαστηριακοί υπολογισμοί στις βιολογικές επιστήμες. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
- Seifert K.A., Aoki T., Baayen R.P., Brayford D., Burgess L.W., Chulze S., Gams W., Geiser D., de Gruyter J., Leslie J.F., Logrieco A., Marasas W.F.O., Nirenberg H.I., O’Donnell K., Rheeder J.P., Samuels G.J., Summerell B.A., Thrane U., Waalwijk C. (2003). The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research* 107, 643-644.
- Shareef A.M. (2009). *Molds and Mycotoxins in Poultry Feeds from Farms of*

- Potential Mycotoxicosis. Department of Veterinary public Health, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Iraq 1, 17-25.
- Southern E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503–517.
- Speijers G., (2004). Patulin. In *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, N. Magan & M. Olsen. Woodhead Publishing Ltd. 339-352.
- Spring F., Fegan D. (2005). Mycotoxins- a Raising Threat to Aquaculture. *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Proceedings of Alltech's 21st annual Symposium, Lexington*, pp 323-331.
- Tournas V. (1994). Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. *Critical Reviews in Microbiology* 20, 243-263.
- Tuan N.A., Grizzle J.M., Lovell R.T., Manning B.B., Rottinghaus G.E. (2002). Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B1. *Aquaculture*. 212, 311-319.
- Tuan N.A., Manning B.B., Lovell R.T., Rottinghaus G.E. (2003). Responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing different concentrations of moniliformin of fumonisin B1) *Aquaculture*. 217, 515-528.
- Vega M., Munoz K., Sepulveda C., Aranda M., Campos V., Villegas R., Villaroel O. (2009). Solid-phase Extraction and HPLC Determination of Ochratoxin A in Cereals Products on Chilean Markets. *Food Control* 20,631-634.

Woodward B., Young L.G., Lun A.K. (1983). Vomitoxin in diets for rainbow trout

(*Salmo gairdneri*) Aquaculture 35:93–101.

Yoder W.T., Christianson L.M. (1997). Species-specific primers resolve members of

Fusarium section Fusarium. Fungal Genet. Biol. 23, 68–80.