

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ**  
**ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**



**“Ανίχνευση εντόμων και μυκήτων σε  
αμυλούχα τρόφιμα με τη χρήση μοριακών μεθόδων”**

**Κασσαβέτη Πασχαλινή**  
**Βόλος, 2014**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ**  
**ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**  
**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Σπουδών  
Κατεύθυνσης “Σύγχρονη Φυτοπροστασία”

Κασσαβέτη Πασχαλινή

**“Ανίχνευση εντόμων και μυκήτων σε  
αμυλούχα τρόφιμα με τη χρήση μοριακών μεθόδων”**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Χ. Αθανασίου  
Αναπληρωτής Καθηγητής  
Επιβλέπων

Ε. Βέλλιος  
Επίκουρος Καθηγητής  
Μέλος

Ν. Τσιρόπουλος  
Καθηγητής  
Μέλος

Βόλος, 2014



Αφιερωμένη στη μανουλίτσα μου  
που πίστεψε σε εμένα όσο κανείς  
και με στήριξε με το δικό της  
μοναδικό τρόπο..



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, αλλά και στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την καθοδήγηση των κων Χ. Αθανασίου και Ε. Βέλλιου.

Με την ολοκλήρωση της, θα ήθελα καταρχήν να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου Αναπληρωτή Καθηγητή κο Χ. Αθανασίου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου ένα τόσο ενδιαφέρον ερευνητικό θέμα. Η πολύπλευρη υποστήριξη του καθόλη την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου, καθώς και ο χρόνος που αφιέρωσε για την ανάγνωση και διόρθωση της, συντέλεσαν σημαντικά στην επιτυχή συγγραφή και ολοκλήρωσης της.

Θα ήθελα επίσης, να εκφράσω τις πιο θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή κο Ε. Βέλλιο, για το συνεχές και ειλικρινές ενδιαφέρον και την αδιάκοπη καθοδήγηση και υποστήριξη του καθόλη την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος. Το επιστημονικό του υπόβαθρο και οι σημαντικές υποδείξεις και παρατηρήσεις του υπήρξαν καθοριστικά για την επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής μου. Επιπλέον, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εξαιρετική συνεργασία, την επικοινωνία αλλά και την υπομονή που επέδειξε όλο αυτό το χρονικό διάστημα μαζί μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κο Ν. Τσιρόπουλο για το χρόνο που διέθεσε για την ανάγνωση και τη διόρθωση της διατριβής μου, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Δεν θα μπορούσα να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους συναδέλφους, συμφοιτητές και κυρίως φίλους, κο Πεβερέτο Πέτρο-Γεώργιο και κα Παναγιωτάκη Ευαγγελία, για την συνεχή βοήθεια και υποστήριξη τους καθόλη την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στην οικογένεια και τους φίλους μου, για την κατανόηση και την στήριξη που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και για την υπομονή που επέδειξαν μέχρι την ολοκλήρωση των σπουδών μου.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Έντομα αποθηκευμένων προϊόντων.....	10
1.1.1 Γενικά.....	10
1.1.2 Κατηγορίες εντόμων αποθηκών.....	11
1.1.3 Τα κυριότερα είδη εντόμων στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα.....	12
1.1.4 Έντομα που προσβάλλουν τους σπόρους σιτηρών και τα άλευρα.....	14
1.1.4.1 <i>Rhyzopertha dominica</i> , Οικογένεια Bostrychidae.....	14
1.1.4.2 <i>Sitophilus granarius</i> , Οικογένεια Curculionidae.....	16
1.1.4.3 <i>Sitophilus oryzae</i> , Οικογένεια Curculionidae.....	18
1.1.4.4 <i>Sitophilus zeamais</i> , Οικογένεια Curculionidae.....	20
1.1.4.5 <i>Tribolium confusum</i> , Οικογένεια Tenebrionidae.....	22
1.1.4.6 <i>Tribolium castaneum</i> , Οικογένεια Tenebrionidae.....	24
1.1.5 Προβλήματα προκαλούμενα από έντομα αποθηκών.....	25
1.1.5.1 Ζημιές σε προϊόντα προσβεβλημένα από έντομα αποθηκών.....	25
1.1.5.2 Κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία από προϊόντα προσβεβλημένα από έντομα αποθηκών.....	26
1.2 Μυκοτοξικογόνοι μύκητες και μυκοτοξίνες.....	29
1.2.1 Γενικά.....	29
1.2.2 Οι κυριότεροι μύκητες και παραγόμενες μυκοτοξίνες στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα.....	30
1.2.2.1 Αφλατοξίνες.....	32
1.2.2.2 Ωχρατοξίνες.....	33
1.2.2.3 Φουμονισίνες.....	34
1.2.2.4 Τριχοθυκένια.....	36
1.2.2.5 Ζεαραλενόνη.....	37
1.2.3 Κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία από προϊόντα μολυσμένα με μυκοτοξίνες....	38
1.3 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τους ρυπαντές-προσμείξεις στα τρόφιμα.....	40
1.3.1 Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις αφλατοξίνες.....	41
1.3.2 Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για την ωχρατοξίνη Α (OTA).....	41
1.3.3 Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τοξίνες από μύκητες του γένους <i>Fusarium</i> .....	41



1.3.4 Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για νεκρά έντομα και τμήματα αυτών.....	42
1.4 Ανίχνευση εντόμων στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα.....	43
1.4.1 Μέθοδοι ανίχνευσης ολόκληρων εντόμων (ζώντων εντόμων).....	43
1.4.1.1 Μέτρηση του διοξειδίου του άνθρακα, CO <sub>2</sub> (Measurement of carbon dioxide).....	43
1.4.1.2 Μέτρηση του ουρικού οξέος (Measurement of uric acid).....	44
1.4.1.3 Ανάλυση με ακτίνες X (X-ray analysis).....	44
1.4.1.4 Βιοακουστική (Acoustic detection).....	45
1.4.2 Μέθοδοι ανίχνευσης εντόμων και τμημάτων ή υπολειμμάτων τους.....	46
1.4.2.1 Μέθοδος επίπλευσης (Light filth Flotation Method / Cracking Flotation Method).....	46
1.4.2.2 Φασματοσκοπία εγγύς υπερύθρου (Near-Infrared Spectroscopy).....	47
1.4.2.3 Ανοσοενζυμική μέθοδος, Τεστ Elisa (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	48
1.4.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction).....	49
1.5 Ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων και μυκοτοξινών στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα.....	51
1.5.1 Ανοσοενζυμικές μέθοδοι.....	52
1.5.1.1 Τεστ Elisa (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	52
1.5.1.2 Ανοσοχρωματογραφία (Lateral Flow Immunochromatography).....	52
1.5.1.3 Ανοσοδοκιμασία πόλωσης φθορισμού (Fluorescence polarization immunoassay, FPIA).....	53
1.5.2 Χρωματογραφικές τεχνικές.....	54
1.5.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin layer chromatography, TLC).....	54
1.5.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	55
1.5.2.3 Αέρια χρωματογραφία (Gas chromatography, GC).....	55
1.5.3 Φασματοφωμετρία μάζας (Mass Spectroscopy, MS).....	56
1.5.4 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary electrophoresis, CE).....	56
1.5.5 Ηλεκτρονικοί αισθητήρες / Ηλεκτρονικές μύτες (Electronic noses, ENs).....	57
1.5.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction).....	58
1.6 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	59



2. Υλικά και μέθοδοι.....	60
2.1 Ανάπτυξη των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες.....	60
2.2 Εκτροφή των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.....	60
2.3 Απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού.....	61
2.3.1 Απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού φυτών.....	61
2.3.2 Απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού εντόμων.....	63
2.3.3 Απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού αλεύρου σκληρού σίτου επιμολυσμένου τεχνητά με έντομα.....	64
2.3.4 Απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού τυφλών δειγμάτων αλεύρων.....	66
2.4 Υπολογισμός ποσότητας και καθαρότητας γενετικού υλικού.....	66
2.5 Επιλογή εκκινητών για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.....	69
2.5.1 Επιλογή εκκινητών για την ανίχνευση εντόμων αποθηκών.....	69
2.5.2 Επιλογή εκκινητών για την ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων.....	71
2.6 Υπολογισμός της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού.....	72
2.6.1 Υπολογισμός της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για την ανίχνευση εντόμων αποθηκών.....	72
2.6.2 Υπολογισμός της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για την ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων.....	74
2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	75
2.7.1 PCR για την ανίχνευση εντόμων αποθηκών.....	75
2.7.2 PCR για την ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων.....	77
2.8 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αгарόζης.....	79
3. Αποτελέσματα.....	80
3.1 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού με Gradient PCR.....	80
3.1.1 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών.....	80
3.1.1.1 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV.....	80
3.1.1.2 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών COIISG1 / COIISG2.....	82
3.1.1.3 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών COI-SZ-FWD / COI-SZ-REV.....	82
3.1.2 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού με το γενικευμένο ζεύγος	



εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785.....	85
3.1.2.1 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού με το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 για ανίχνευση του <i>Sitophilus oryzae</i> .....	85
3.1.2.2 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού με το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 για ανίχνευση του <i>Sitophilus granarius</i> .....	85
3.1.2.3 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού με το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 για ανίχνευση του <i>Sitophilus zeamais</i> .....	88
3.2 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών εντόμων σε τεχνητά επιμολυσμένα δείγματα αλευριού.....	83
3.2.1 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών εντόμων σε τεχνητά επιμολυσμένα δείγματα αλευριού με τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών.....	90
3.2.1.1 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του <i>Sitophilus oryzae</i> .....	90
3.2.1.2 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του <i>Sitophilus granarius</i> .....	92
3.2.1.3 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του <i>Sitophilus zeamais</i> .....	92
3.2.2 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών εντόμων σε τεχνητά επιμολυσμένα δείγματα αλευριού με το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785.....	95
3.2.2.1 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του <i>Sitophilus oryzae</i> .....	95
3.2.2.2 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του <i>Sitophilus granarius</i> .....	95
3.2.2.3 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του <i>Sitophilus zeamais</i> .....	97
3.3 Μοριακή ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων σε τυφλά δείγματα αλεύρων.....	99
3.3.1 Μοριακή ανίχνευση του <i>Penicillium verrucosum</i> .....	101
3.3.1.1 Μοριακή ανίχνευση του <i>Penicillium verrucosum</i> με το ζεύγος εκκινητών pksCT-Mp-3_for / pksCT-Mp-3_rev.....	101
3.3.1.2 Μοριακή ανίχνευση του <i>Penicillium verrucosum</i> με το ζεύγος εκκινητών otapksPV_for / otapksPV_rev.....	101
3.3.2 Μοριακή ανίχνευση του <i>Aspergillus flavus</i> .....	104
3.3.3 Μοριακή ανίχνευση του <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	105
4. Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	106
Παράρτημα Ι.....	115



Παράρτημα II.....	118
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	129
Ελληνική βιβλιογραφία.....	139



## 1. Εισαγωγή

Ο άνθρωπος από τα πρώτα βήματα του πολιτισμού του, βρέθηκε αντιμέτωπος με πολυάριθμους νοσογόνους παράγοντες, οι οποίοι είτε απειλούσαν την υγεία του και ελάττωναν τους πληθυσμούς του, είτε μείωναν σημαντικά ή και κατέστρεφαν ολοσχερώς τις συγκομιδές του. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα για πολλούς αιώνες να παραμένει ανίσχυρος να προστατεύσει την υγεία του και τη φυτική του παραγωγή, επειδή του έλειπαν τα κατάλληλα για το σκοπό αυτό μέσα.

Επιπλέον, η συνεχής κατά γεωμετρική πρόοδο αύξηση του πληθυσμού της γης, επέβαλε μεταξύ άλλων και την αντιμετώπιση του μεγάλου προβλήματος της διατροφής. Οι μεγάλες ποσότητες προϊόντων που παράγονταν κατά τον συνεχή αγώνα του ανθρώπου για επιβίωση, έπρεπε να αποθηκευτούν, με σκοπό να μεταποιηθούν, να μεταφερθούν ή να καταναλωθούν. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης τους, τα γεωργικά προϊόντα προσβάλλονταν από διαφόρων κατηγοριών εχθρούς και ασθένειες, που πολλές φορές προκαλούσαν σημαντικές ζημιές.

Σήμερα, παρά τις αξιόλογες προόδους της επιστήμης στο βιολογικό και τεχνολογικό τομέα, οι οποίες είχαν σαν αποτέλεσμα τη βελτίωση και αναθεώρηση των εφαρμοζόμενων από τον άνθρωπο μέτρων προστασίας της γεωργίας, οι προκαλούμενες από τους διάφορους εχθρούς και ασθένειες ζημιές στη γεωργική παραγωγή, εξακολουθούν να είναι ιδιαίτερα σημαντικές, και ανέρχονται διεθνώς σε πολλά δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως.

Σύμφωνα με υπολογισμούς του F.A.O. (Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών), οι απώλειες σε έτοιμο προϊόν κατά την αποθήκευση ανέρχονται στο 17% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής (10% από έντομα και 7% περίπου από ακάρεα, τρωκτικά και ασθένειες), οι δε ποσότητες που αναλίσκονται από έντομα στις αποθήκες και τις καλλιέργειες μόνο των σιτηρών, θα μπορούσαν να αποτρέψουν τους λιμούς στις υπό ανάπτυξη χώρες (Sallam 1999).

Γενικότερα, η οικονομική σημασία των βλαπτικών αυτών εχθρών της παραγωγής, προβάλλει πλέον ανάγλυφη παγκοσμίως, εάν ληφθεί υπόψη ότι σήμερα τα 2/3 περίπου του πληθυσμού της γης υποσιτίζεται, ενώ σε πολλές χώρες οι θάνατοι από ασιτία ανέρχονται σε σημαντικό ποσοστό ετησίως (Sallam 1999).

Οι προσπάθειες για να επιλυθούν τα προβλήματα αυτά δεν περιορίζονται μόνο στην εξεύρεση τρόπων αύξησης και καλυτέρευσης της γεωργικής παραγωγής, αλλά επεκτείνονται στους τομείς διακίνησης και αποθήκευσης των παραγομένων



προϊόντων, με σκοπό την μείωση των απωλειών και ζημιών από έντομα και ασθένειες.

Είναι γεγονός ότι ενώ μια καλλιέργεια είναι δυνατό να αντισταθμίσει ζημιές από μια προσβολή (μόνη της ή με κατάλληλες επεμβάσεις), οι απώλειες που σημειώνονται κατά την αποθήκευση του συγκεντρωμένου (έτοιμου πολλές φορές για κατανάλωση) προϊόντος, είναι κυριολεκτικά ανεπανόρθωτες. Έτσι, η προστασία των αποθηκευμένων προϊόντων έχει πολύ μεγαλύτερη σημασία απ' όση μπορεί να νομίζεται.

## **1.1 Έντομα αποθηκευμένων προϊόντων**

### **1.1.1 Γενικά**

Με τον όρο “έντομα αποθηκών” χαρακτηρίζονται τα αρθρόποδα εκείνα που προσβάλλουν εδώδιμα ή μη προϊόντα, που βρίσκονται στη φάση της επεξεργασίας ή της αποθήκευσης τους και που μπορούν να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν σε χώρους που φιλοξενούν τέτοια προϊόντα (Σταμόπουλος 1999, Αθανασίου 2012). Η προσβολή μπορεί να γίνει αποκλειστικά στην αποθήκη, αλλά δεν είναι σπάνιες και οι περιπτώσεις όπου η πρωτογενής προσβολή γίνεται στον αγρό και κατόπιν τα έντομα συνεχίζουν και ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο στο αποθηκευμένο προϊόν (Σταμόπουλος 1999).

Χαρακτηριστικό των εντόμων αποθηκών και γεγονός που τα καθιστά τους πιο επιτυχημένους οργανισμούς από εξελικτική άποψη, είναι το μικρό τους μέγεθος. Δεδομένου του ότι το μέγεθος τους δεν ξεπερνάει τα 5 mm, τα έντομα αποθηκών έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιούν σειρά καταφυγίων για να επιζούν για πολλά χρόνια, αλλά και να αποφεύγουν την άμεση έκθεση σε εντομοκτόνα και φυσικούς εχθρούς. Επίσης, λόγω της προσαρμοστικότητας τους σε ποικίλες κλιματικές συνθήκες έγιναν, τα πιο πολλά από αυτά, παμφάγα και κοσμοπολίτικα, μεταφερόμενα μέσω του διεθνούς εμπορίου με το προϊόν σε όλα τα μέρη του κόσμου (Σταμόπουλος 1999, Αθανασίου 2012).



### 1.1.2 Κατηγορίες εντόμων αποθηκών

Τα περισσότερα από τα επιβλαβή στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα είδη εντόμων, προσβάλλουν χωρίς ιδιαίτερη διάκριση και εκλεκτικότητα όσον αφορά το είδος του προσβαλλόμενου προϊόντος. Τα είδη αυτά ανήκουν στην κατηγορία των πολυφάγων εντόμων όπως είναι το Λεπιδόπτερο *Plodia interpunctella* και τα είδη του γένους *Ephestia* sp. που προσβάλλουν άλευρα, σπόρους δημητριακών, σύκα, σταφίδες, καπνό, κακάο κ.α. (Αθανασίου 2012).

Αντίθετα, άλλα είδη εντόμων εμφανίζουν σχετική εκλεκτικότητα και έχουν εξειδικευμένη συμπεριφορά όσον αφορά την τροφή τους, που στην περίπτωση αυτή είναι περιορισμένη σε ποικιλία αφού προσβάλλουν αποκλειστικά καρπούς ενός συγκεκριμένου είδους ή οικογένειας. Τα είδη αυτά κατατάσσονται στα ολιγοφάγα έντομα, όπως είναι τα Κολεόπτερα της οικογένειας Bruchidae που προσβάλλουν μόνο καρπούς ψυχανθών ή το *Lasioderma serricorne* που προσβάλλει μόνο αποθηκευμένο καπνό (Αθανασίου 2012).

Αν και τα περισσότερα έντομα αποθηκών είναι πολυφάγα, τα πιο πολλά από αυτά μπορεί να επιδεικνύουν, κατά μεγαλύτερο ή μικρότερο ποσοστό, μία προτίμηση για το ένα ή το άλλο γεωργικό προϊόν ή ακόμα και για την κατάσταση του γεωργικού προϊόντος, γεγονός που, εκτός των άλλων, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και το αναπαραγωγικό δυναμικό τους. Συνεπώς, για μία πιο ευχερή και κατανοητή μελέτη των εντόμων αυτών, προβαίνουμε σε μια κατάταξη τους σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα όχι μόνο με το είδος (πολυφάγα/ολιγοφάγα), αλλά και με τη φύση του προϊόντος που προσβάλλουν, χωρίς βέβαια αυτό να σημαίνει απόλυτη διαφοροποίηση (Αθανασίου 2012).

Έτσι, έντομα που προσβάλλουν ακέραιο προϊόν (πχ. σπόρους) και τα οποία τρέφονται και ολοκληρώνουν τον βιολογικό κύκλο τους μέσα σε ένα μόνο σπόρο, όπως το *Sitophilus granarius*, το *Rhyzopertha dominica* και το *Sitotroga cerealella* καλούνται πρωτεύοντα είδη (primary pests), ενώ έντομα που προσβάλλουν προϊόν ήδη προσβεβλημένο ή μηχανικά σπασμένο (πχ. άλευρα) όπως το *Tribolium confusum* και το *Oryzaephilus surinamensis*, καλούνται δευτερεύοντα είδη (secondary pests). Επίσης, υπάρχουν και μυκητοφάγα είδη (fungus feeders), τα οποία είναι έντομα των οικογενειών Mycetophagidae και Cryptophagidae, τα οποία τρέφονται από μύκητες και αποτελούν δείκτες κακής υγιεινής του χώρου και του προϊόντος. Τέλος, έντομα που τρέφονται από αποσυντιθέμενες ύλες ζωικής ή φυτικής προέλευσης, τα οποία



μπορεί να είναι και μυκητοφάγα, καλούνται αποσυνθέτες (scavengers) και ανήκουν κυρίως στην οικογένεια Dermestidae (Αθανασίου 2012).

### 1.1.3 Τα κυριότερα είδη εντόμων στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα

Η ποικιλία των εντόμων που παρατηρούνται στα αποθηκευμένα προϊόντα είναι πολύ μεγάλη, με τα περισσότερα είδη εντόμων να ανήκουν στις τάξεις των Κολεοπτέρων και των Λεπιδοπτέρων. Τα Υμενόπτερα ανήκουν κυρίως στις οικογένειες των παρασίτων, ή πιο ορθά των παρασιτοειδών (π.χ. Ichneumonidae, Braconidae, Pteromalidae), ενώ έντομα άλλων τάξεων, όπως Ημίπτερα, Δίπτερα, Δικτυόπτερα, Ψωκόπτερα κ.ά., που βρίσκονται στους ίδιους χώρους, έχουν πολύ μικρότερη ή μηδαμινή σημασία και δεν έχουν όλα απευθείας σχέση με τα προϊόντα στα οποία παρατηρούνται. Τα κυριότερα είδη εντόμων αποθηκών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Τα κυριότερα είδη εντόμων αποθηκών

Είδος	Κοινό όνομα	Οικογένεια
<b>A. Κολεόπτερα</b>		
<i>Lasioderma serricorne</i>	Σκαθάρι του καπνού	Anobiidae
<i>Stegobium paniceum</i>	Σκαθάρι του φαρμακείου	Anobiidae
<i>Acanthoscelides obtectus</i>	Βρούχος των φασολιών	Bruchidae
<i>Bruchus pisorum</i>	Βρούχος των μπιζελιών	Bruchidae
<i>Bruchus rufimanus</i>	Βρούχος των κουκιών	Bruchidae
<i>Bruchus lentis</i>	Βρούχος της φακής	Bruchidae
<i>Rhyzopertha dominica</i>	Σκαθάρι του ρυζιού	Bostrychidae
<i>Sitophilus granarius</i>	Καλάνδρα του σιταριού	Curculionidae
<i>Sitophilus oryzae</i>	Καλάνδρα του ρυζιού	Curculionidae
<i>Sitophilus zeamais</i>	Καλάνδρα του καλαμποκιού	Curculionidae
<i>Trogoderma granarium</i>	Τρωγόδερμα των σπόρων	Dermestidae
<i>Trogoderma inclusum</i>	Τρωγόδερμα των σπόρων	Dermestidae
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	Ψείρα του σιταριού	Silvanidae



<i>Tribolium confusum</i>	Σκαθάρι των αλεύρων	Tenebrionidae
<i>Tribolium castaneum</i>	Σκαθάρι των αλεύρων	Tenebrionidae
<b>Β. Λεπιδόπτερα</b>		
<i>Ephestia elutella</i>	Σκώρος του καπνού	Pyralidae
<i>Ephestia cautella</i>	Σκώρος των σύκων	Pyralidae
<i>Ephestia kuehniella</i>	Μεσογειακός σκώρος των αλεύρων	Pyralidae
<i>Plodia interpunctella</i>	Κοινό σκουλήκι των αποθηκών	Pyralidae
<i>Pyralis farinalis</i>	Πυραλίδα των αλεύρων	Pyralidae
<i>Sitotroga cerealella</i>	Αλουκίτης των σιτηρών	Gelechiidae
<b>Γ. Δίπτερα</b>		
<i>Piophilidae casei</i>	Σκουλήκι του τυριού	Piophilidae



### 1.1.4 Έντομα που προσβάλλουν τους σπόρους σιτηρών και τα άλευρα

#### 1.1.4.1 *Rhyzopertha dominica*, Οικογένεια Bostrychidae

**Μορφολογία:** Το τέλειο έντομο έχει μήκος 2-3 mm και χρώμα σκούρο καφέ προς μαύρο (Εικ. 1). Το σώμα του είναι λεπτό, κυλινδρικού σχήματος και τα έλυτρα του φέρουν πολυάριθμα μικρά κοιλώματα που καλύπτονται από λεπτές τρίχες. Η κεφαλή του στρέφεται προς τα κάτω και καλύπτεται από το προθώρακα έτσι ώστε δεν είναι ορατή όταν το έντομο παρατηρείται από πάνω. Οι κεραίες του αποτελούνται από 10 τμήματα με τα 3 τελευταία ιδιαίτερα διευρυμένα. Οι προνύμφες είναι λευκές έως κρεμ χρώματος, με καφέ κεφαλή και τρία ζεύγη ποδιών (Koehler and Pereira 1994, Farrell 2009, Johnson 2010).

**Βιολογία:** Τα ακμαία έχουν μακρά διάρκεια ζωής και ζουν έως και 4 μήνες (Sallam 1999, Farrell 2009). Η ωοτοκία αρχίζει περίπου 15 ημέρες μετά την εμφάνιση των ακμαίων και κάτω από ιδανικές συνθήκες, τα θηλυκά γεννούν μέχρι και 500 ωά κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Koehler and Pereira 1994, Sallam 1999, Farrell 2009). Τα ωά εναποτίθενται μεμονωμένα ή σε συστάδες έως περίπου 30, στο εξωτερικό περίβλημα των σπόρων ή ανάμεσα στη σκόνη των προσβεβλημένων σπόρων. Οι προνύμφες αναπτύσσονται στο εσωτερικό του σπόρου (Εικ. 2), περνώντας από 4 προνυμφικά στάδια και ολοκληρώνουν την ανάπτυξη τους σε 27-31 ημέρες στους 28°C και 46 ημέρες στους 25°C. Η νύμφωση λαμβάνει χώρα στο εσωτερικό του σπόρου (Εικ. 3) και διαρκεί 5-6 ημέρες στους 28°C και 8 ημέρες στους 25°C. Τα ακμαία συνήθως παραμένουν στο εσωτερικό του πυρήνα για λίγες ημέρες μετά τη νύμφωση, μέχρις ότου ολοκληρωθεί η σκλήρυνση της επιδερμίδας τους και στην συνέχεια εμφανίζονται μασώντας τις εξωτερικές στιβάδες του περιβλήματος των σπόρων (Farrell 2009). Ο βιολογικός τους κύκλος διαρκεί περίπου 25 ημέρες σε 34°C και 70% σχετική υγρασία (Sallam 1999, Farrell 2009, Johnson 2010).

**Προσβολές:** Θεωρείται πρωτεύον είδος και προσβάλλει μόνο ακέραιους σπόρους δημητριακών και κυρίως το σιτάρι (Εικ. 4), το καλαμπόκι, το ρύζι και το σόργο. Τόσο τα ακμαία, όσο και οι προνύμφες κατατρώγουν το εσωτερικό των πυρήνων, αφήνοντας μόνο τα περιβλήματα των σπόρων και ένα πυκνό στρώμα σκόνης (Εικ. 5) (Johnson 2010). Οι προσβολές του συχνά συνοδεύονται από μια δυσάρεστη οσμή, λόγω της δραστηριότητας των εντόμων και διευκολύνουν την είσοδο δευτερευόντων ειδών, όπως τα σκαθάρια των αλεύρων καθώς και την ανάπτυξη μυκήτων (Sallam 1999). Προσβάλλει επίσης τον καπνό, τα φασόλια, το κακάο, ξηρούς καρπούς,



σπόρους πουλιών, μπισκότα, καρυκεύματα, καθώς και αποξηραμένο κρέας και ψάρια (Koehler and Pereira 1994).



Εικ. 1 Τέλειο του  
*R. dominica*



Εικ. 2 Προνύμφη του  
*R. dominica*



Εικ. 3 Νύμφη του  
*R. dominica*



Εικ. 4 Προσβολή του *R. dominica* σε σιτάρι



Εικ. 5 Σκονισμένοι σπόροι από προσβολή  
του *R. dominica*



#### 1.1.4.2 *Sitophilus granarius*, Οικογένεια Curculionidae

**Μορφολογία:** Το τέλειο έντομο έχει μήκος 3-5 mm και χρώμα καφεκόκκινο (Εικ. 6). Φέρει μακρύ ρύγχος που εκτείνεται προς τα κάτω και καλύπτει περίπου το ένα τέταρτο του μήκους του σώματος του. Ο θώρακας του φέρει επιμήκη κοιλώματα και τα έλυτρα του ραβδώσεις, ενώ δεν έχει μεμβρανοειδείς πτέρυγες και επομένως δεν πετάει. Οι προνύμφες είναι λευκές, σαρκώδεις, ευκέφαλες, άποδες και μήκους 2,5-2,75 mm (Lyon 1991, Jacobs and Calvin 2001, Ellis 2003).

**Βιολογία:** Τα ακμαία ζουν κατά μέσο όρο περίπου επτά έως οκτώ εβδομάδες. Στη διάρκεια αυτής της περιόδου κάθε θηλυκό εναποθέτει 50 έως 200 ωά, διατρυπώντας το σπόρο με το ρύγχος του, ανοίγοντας έτσι μια οπή και αφήνοντας με το άκρο της κοιλίας του (ωοθέτη) ένα ωό σε κάθε σπόρο, σφραγίζοντας στην συνέχεια με ένα ζελατινώδες υγρό (Lyon 1991, Jacobs and Calvin 2001). Ο ημερήσιος ρυθμός γέννησης για τα θηλυκά εξαρτάται από την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και την σκληρότητα των σπόρων, δεδομένου ότι τα θηλυκά χρησιμοποιούν τα στοματικά μόρια του ρύγχους τους για την διάνοιξη της οπής όπου θα εναποθέσουν το ωό (Σταμόπουλος 1999). Οι νεαρές προνύμφες παραμένουν στον σπόρο, κατατρώγοντας το εσωτερικό του, μέχρι τη νύμφωση (Εικ. 7). Οι προνύμφες ολοκληρώνουν την ανάπτυξη τους σε 18 ημέρες και η νύμφη σε 6 ημέρες (Lyon 1991). Ο βιολογικός τους κύκλος διαρκεί 4-6 εβδομάδες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και 3-5 μήνες κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ανάλογα με τη θερμοκρασία. Συμπληρώνει 4-5 γενιές το χρόνο, με άριστες συνθήκες ανάπτυξης θερμοκρασία 30°C περίπου και 70% σχετική υγρασία. Σε θερμοκρασία κατώτερη των 12°C αναστέλλεται η ωοτοκία και η ανάπτυξη της προνύμφης (Σταμόπουλος 1999).

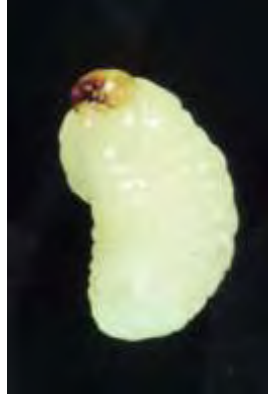
**Προσβολές:** Τόσο το τέλειο, όσο και οι προνύμφες προσβάλλουν τους σπόρους των σιτηρών (σιτάρι, σίκαλη, κριθάρι, καλαμπόκι και σπανιότερα βρώμη) (Εικ. 8) στους αποθηκευτικούς χώρους, όπως επίσης και συμπαγή αμυλούχα προϊόντα (ξηρό ψωμί, φρυγανιές, ζυμαρικά). Μπορούν επίσης να τραφούν και σε αλεύρι, πίτουρα ή πλιγούρι χωρίς όμως να μπορούν να αναπαραχθούν σε αυτά (Σταμόπουλος 1999, Ellis 2003). Γενικά, δεν υπάρχει καμία εξωγενής ένδειξη της προσβολής από τις προνύμφες για περίπου ένα μήνα, μέχρις ότου αυτές μεταμορφωθούν στα ακμαία τα οποία θα διαπεράσουν τρεφόμενα το περίβλημα του σπόρου και θα εμφανιστούν (Εικ. 9) (Anonymous 2005). Τα ακμαία συνήθως συγκεντρώνονται σε αρκετό βάθος μέσα στο προϊόν (μέχρι και 1,5 m) και μόνο στην περίπτωση των ενσაკισμένων



προϊόντων που μένουν αρκετή ώρα στον ήλιο, εξέρχονται στην επιφάνεια (Σταμόπουλος 1999).



Εικ. 6 Τέλειο του *S. granarius*



Εικ. 7 Προνύμφη (αριστερά) και νύμφη (δεξιά) του *S. granarius*



Εικ. 8 Προσβολή του *S. granarius* σε σιτάρι



Εικ. 9 Τέλειο έντομο του *S. granarius*  
που εξέρχεται από προσβεβλημένο σπόρο



#### 1.1.4.3 *Sitophilus oryzae*, Οικογένεια Curculionidae

**Μορφολογία:** Το τέλειο έντομο έχει μήκος 2-3 mm και χρώμα κόκκινο-καφέ έως μαύρο (Εικ. 10) (Koehler 1994). Μορφολογικά μοιάζει με το συγγενές του είδος *S. granarius*, από το οποίο ξεχωρίζει ως προς το ότι φέρει οπίσθιο ζεύγος μεμβρανοειδών πτερύγων, χάρη στις οποίες μπορεί και πετάει, στρογγυλά ή ακανόνιστου σχήματος κοιλώματα στο θώρακα και τέσσερις κοκκινωπές κηλίδες στα έλυτρα. Οι προνύμφες είναι λευκές, σαρκώδεις, κεκαμμένες, ευκέφαλες και άποδες, με μήκος περίπου 2,5 mm (Εικ. 11) (Lyon 1991, Koehler 1994, Jacobs and Calvin 2001, Ellis 2003).

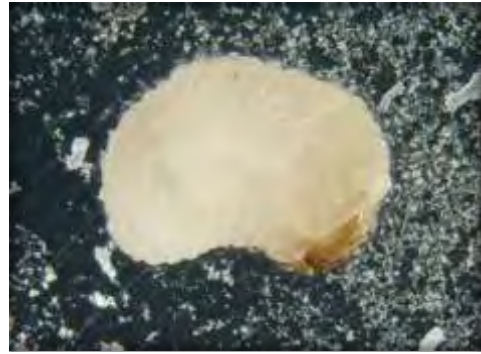
**Βιολογία:** Έχει παρόμοιο βιολογικό κύκλο με αυτόν του *S. granarius*. Τα ακμαία ζουν κατά μέσο όρο περίπου τέσσερις έως πέντε μήνες. Τα θηλυκά γεννούν 300 έως 400 ωά, κατά μέσο όρο 4 την ημέρα και συνήθως εναποθέτουν ένα ωό ανά σπόρο. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου μπορεί να εναποθέσουν και περισσότερα, με αποτέλεσμα να αναπτυχθούν πάνω από μία προνύμφες σε ένα μόνο σπόρο, κυρίως σε δημητριακά με μεγάλους σπόρους, όπως ο αραβόσιτος. Ο πλήρης βιολογικός τους κύκλος διαρκεί 26 έως 32 ημέρες κατά τους ζεστούς καλοκαιρινούς μήνες, αλλά απαιτείται ένα πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την ολοκλήρωση του κατά τη διάρκεια ψυχρότερου καιρού (Lyon 1991, Koehler 1994, Jacobs and Calvin 2001). Οι προνύμφες εκκολάπτονται από τα ωά σε περίπου 3 ημέρες και παραμένουν στον σπόρο για έναν μέσο όρο 18 ημερών. Το στάδιο της νύμφης διαρκεί κατά μέσο όρο 6 ημέρες και τα νεαρά ακμαία παραμένουν στο σπόρο για 3 έως 4 ημέρες μέχρις ότου να δημιουργήσουν μια μικρή, κυκλική οπή (σε αντίθεση με τις μεγάλες, επιμήκεις οπές του *Sitophilus granarius*) και να εμφανιστούν. Αρέσκεται σε θερμό και σχετικά υγρό περιβάλλον και η ανάπτυξή του είναι δυνατή σε θερμοκρασίες από 15,2°C μέχρι 34°C (Koehler 1994).

**Προσβολές:** Προσβάλλει όλους τους σπόρους των δημητριακών (Εικ. 12) και κυρίως το αποθηκευμένο ρύζι και σιτάρι. Είναι περισσότερο κοσμοπολίτικο είδος από το συγγενές του *Sitophilus granarius* και γενικά προσβάλλει τα ίδια προϊόντα με αυτό, όπως επίσης τον αποθηκευμένο βάμβακα, όσπρια και ξηρούς καρπούς (Σταμόπουλος 1999). Λόγω της ικανότητάς του να πετά προσβάλλει και φυτά στον αγρό (Sallam 1999).





Εικ.10 Τέλειο έντομο του *S. oryzae*



Εικ. 11 Προνύμφη του *S. oryzae*



Εικ. 12 Προσβολή του *S. oryzae* σε σπόρους σιταριού (αριστερά) και καλαμποκιού (δεξιά)



#### 1.1.4.4 *Sitophilus zeamais*, Οικογένεια Curculionidae

**Μορφολογία:** Έχει τα ίδια χαρακτηριστικά και τις συνήθειες με το προηγούμενο συγγενές είδος από το οποίο πολύ δύσκολα αναγνωρίζεται. Οι μορφολογικές του διαφορές με το *S. oryzae* περιορίζονται στο ελαφρώς μεγαλύτερο μέγεθος του ακμαίου, που κυμαίνεται στα 3-4 mm και στις τέσσερις κηλίδες που φέρει στα έλυτρα, οι οποίες είναι ελαφρά κοκκινωπές, έως κιτρινωπές (Εικ. 13) (Lyon 1991, Jacobs and Calvin 2001, Farrell 2009, CABI 2010, Anonymous 2013).

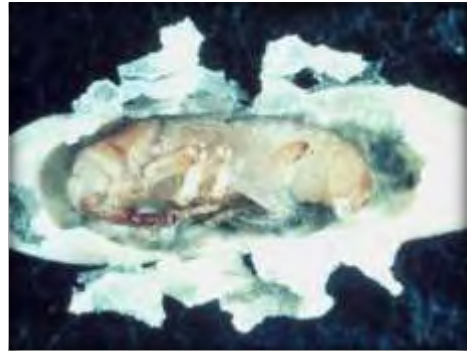
**Βιολογία:** Ο χρόνος που χρειάζεται για την ανάπτυξη του είναι και αυτός σχεδόν πανομοιότυπος με εκείνον του *S. oryzae*, ενώ είναι, κατά περίπου 7 ημέρες, συντομότερος από αυτόν του *S. granarius* υπό παρόμοιες συνθήκες (Farrell 2009). Ο πλήρης βιολογικός του κύκλος σε ιδανικές συνθήκες, με θερμοκρασία 27°C και σχετική υγρασία 69%, διαρκεί κατά μέσο όρο 36 ημέρες, ενώ ξεπερνάει τις 110 ημέρες σε αντίξοες συνθήκες (Farrell 2009, CABI 2010). Κάθε θηλυκό, στη διάρκεια της ζωής του, εναποθέτει έως και 150 ωά, το 50% των οποίων παράγεται κατά τις πρώτες 4 με 5 εβδομάδες (CABI 2010). Τα θηλυκά συνήθως εναποθέτουν ένα ωό ανά σπόρο, υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου μπορεί να εναποθέσουν και περισσότερα. Σπάνια όμως αναπτύσσονται πάνω από μία προνύμφες σε ένα μόνο σπόρο, εξαιτίας του κανιβαλισμού που παρατηρείται (οι μεγαλύτερες προνύμφες τρώνε τις μικρότερες) (Longstaff 1981). Ο ημερήσιος ρυθμός γέννησης για τα θηλυκά είναι 7 ωά την ημέρα και επιτυγχάνεται ιδανικά σε θερμοκρασία 30°C και σχετική υγρασία 75%. Το κατώτερο όριο για την ανάπτυξη από το ωό στο ακμαίο, σε σχετική υγρασία 75%, είναι 15,6°C και το ανώτατο όριο 32,5°C (Farrell 2009).

**Προσβολές:** Το *Sitophilus zeamais* μπορεί να αναπτυχθεί σε μια σειρά από αποθηκευμένα δημητριακά. Συνήθως συνδέεται με το καλαμπόκι και το ρύζι στα τροπικά κλίματα και σε μικρότερο βαθμό με άλλα ακατέργαστα ή κατεργασμένα σιτηρά, όπως το σιτάρι, η βρώμη, το κριθάρι, το σόργο και η σίκαλη. Όπως και στα συγγενή του είδη, δεν υπάρχει καμία εξωγενής ένδειξη της προσβολής από τις προνύμφες για περίπου ένα μήνα, μέχρις ότου αυτές νυμφωθούν (Εικ. 14) και μεταμορφωθούν στα ακμαία. Προσβάλλει προϊόντα με μεγαλύτερο εύρος περιεκτικότητας σε υγρασία από ότι το *S. oryzae* και έχει βρεθεί να προσβάλλει ακόμα και φρούτα, όπως τα μήλα, κατά την αποθήκευση. Λόγω της ικανότητας του να πετά προσβάλλει και φυτά στον αγρό, κυρίως καλαμπόκι (Εικ. 15), όπου το ποσοστό υγρασίας του μπορεί να υπερβαίνει το 20% (Farrell 2009).





Εικ.13 Τέλειο έντομο του *S. zeamais*



Εικ. 14 Νύμφη του *S. zeamais*



Εικ. 15 Προσβολή του *S. zeamais* σε σπόρους καλαμποκιού (αριστερά) και σπάδικα (δεξιά)



#### 1.1.4.5 *Tribolium confusum*, Οικογένεια Tenebrionidae

**Μορφολογία:** Το τέλειο έντομο έχει μήκος 3-4 mm και χρώμα γυαλιστερό ερυθρό έως καστανό (Εικ. 16). Το σώμα του είναι λεπτό, πεπλατυσμένο και επίπεδο και τα έλυτρα του φέρουν κατά μήκος επιμήκεις ραβδώσεις (Calvin 1990, Lyon 1991, Day 2011). Οι κεραίες του είναι ροπαλοειδείς, με άρθρα που αυξάνονται σταδιακά σε μέγεθος από τη βάση προς την κορυφή, καταλήγοντας σε τέσσερα διευρυμένα τμήματα (Calvin 1990, Lyon 1991, Baldwin and Fasulo 2003, Day 2011). Οι προνύμφες έχουν μήκος 5-6 mm, χρώμα κιτρινόλευκο και καλύπτονται από πυλωρικά τριχίδια (Εικ. 17). Φέρουν καφέ κεφαλή, τρία ζεύγη ποδιών και δύο αιχμηρές και διχαλωτές προεξοχές στο τελευταίο κοιλιακό τμήμα (Lyon 1991, Baldwin and Fasulo 2003).

**Βιολογία:** Τα ακμαία έχουν μακρά διάρκεια ζωής και σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν να ζήσουν έως και 3 χρόνια (Lyon 1991, Sallam 1999, Farrell 2009). Τα θηλυκά γεννούν συνολικά 300 έως 400 ωά, τα οποία τοποθετούν στο αλεύρι ή ανάμεσα στους σπασμένους σπόρους και στη συνέχεια τα καλύπτουν με μια κολλώδη έκκριση (Calvin 1990, Lyon 1991, Farrell 2009). Ο ημερήσιος ρυθμός γέννησης για τα θηλυκά είναι 2 έως 3 ωά την ημέρα, κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 5-8 μηνών (Lyon 1991, Farrell 2009). Οι προνύμφες εκκολάπτονται από τα ωά μέσα σε 5 έως 12 ημέρες σε θερμοκρασίες μεταξύ 15°C και 40°C. Η προνυμφική ανάπτυξη ολοκληρώνεται σε 22 έως και περισσότερες από 100 ημέρες, ανάλογα με την ποσότητα και την καταλληλότητα της τροφής, την υγρασία και τη θερμοκρασία (Calvin 1990, Lyon 1991, Σταμόπουλος 1999). Το στάδιο της νύμφης (Εικ. 18) διαρκεί περίπου 8 ημέρες (Lyon 1991). Ο πλήρης βιολογικός τους κύκλος διαρκεί περίπου 6 εβδομάδες και συμπληρώνει 3-5 γενιές σε θερμοκρασίες μεταξύ 32°C και 35°C και σχετική υγρασία 70% (Calvin 1990, Σταμόπουλος 1999, Farrell 2009).

**Προσβολές:** Θεωρείται δευτερεύον είδος στα αποθηκευμένα δημητριακά και τόσο τα τέλεια, όσο και οι προνύμφες, προσβάλλουν σπασμένους σπόρους σιτηρών (Εικ. 19) και επεξεργασμένα προϊόντα όπως αλεύρι (Εικ. 20), σιμιγδάλι, πίτουρα, σουσάμι, φρυγανιές κ.α. Αποτελεί το πιο κοινό και πιο ζημιογόνο έντομο των αλευρόμυλων (Lyon 1991). Οι ζημιές που προκαλεί δεν περιορίζονται μόνο στην διατροφή του, αλλά εστιάζονται κυρίως στην μόλυνση που προκαλεί λόγω της παραγωγής τοξινών (κινόνες), οι οποίες προσδίδουν στα προϊόντα στα οποία βρίσκεται έντονη οσμή και γεύση μούχλας (Calvin 1990, Lyon 1991).





Εικ. 16 Τέλειο του *T. confusum*



Εικ. 17 Προνύμφη του  
*T. confusum*



Εικ. 18 Νύμφη του  
*T. confusum*



Εικ. 19 Προσβολή του *T. confusum*  
σε σιτάρι



Εικ. 20 Προσβολή του *T. confusum* σε  
αλεύρι



#### 1.1.4.6 *Tribolium castaneum*, Οικογένεια Tenebrionidae

**Μορφολογία:** Έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με το προηγούμενο συγγενές είδος από το οποίο πολύ δύσκολα αναγνωρίζεται. Οι μορφολογικές του διαφορές με το *T. confusum* (Εικ. 21) εντοπίζονται κυρίως στο σχήμα των κεραιών, οι οποίες στο *T. castaneum* αυξάνονται απότομα σε μέγεθος από τη βάση προς την κορυφή, καταλήγοντας σε τρία εντόνως διευρυμένα τμήματα (Calvin 1990, Lyon 1991, Sallam 1999, Σταμόπουλος 1999, Day 2011). Επιπλέον, σε αντίθεση με το *T. confusum*, ο θώρακας του *T. castaneum* έχει καμπύλες πλευρές, το πιλίδιο δεν υπερβαίνει πλευρικά το χείλος του οφθαλμού και η κεφαλή είναι πλήρως ορατή όταν το έντομο παρατηρείται από πάνω (Lyon 1991, Σταμόπουλος 1999, Baldwin and Fasulo 2003). Επίσης, στο *T. castaneum* το πρόνωτο είναι ευρύτερο στο μέσον, σε σύγκριση με το *T. confusum* όπου το πρόνωτο είναι ευρύτερο στο εμπρόσθιο τμήμα του (Calvin 1990).

**Βιολογία:** Έχει παρόμοιο βιολογικό κύκλο με αυτόν του *T. confusum* με μόνη διαφορά ότι σε θερμοκρασίες μεταξύ 25°C και 30°C έχει μικρότερη διάρκεια ζωής, γύρω στο ένα έτος (Calvin 1990, Sallam 1999).

**Προσβολές:** Προσβάλλει τα ίδια προϊόντα με το *T. confusum* (Εικ. 22) και μαζί αποτελούν τα πιο συνηθισμένα δευτερογενή είδη εντόμων όλων των φυτικών προϊόντων. Σε ευνοϊκά περιβάλλοντα (π.χ. αλευρόμυλοι) μπορεί να συνυπάρχει με το *T. confusum*, αλλά μόνο σε χαμηλή πυκνότητα πληθυσμού. Όταν ο αριθμός τους ξεπεράσει ορισμένα όρια, τότε το ένα εκτοπίζει το άλλο, με τελικό αποτέλεσμα να συναντάται τελικά μόνο το ένα είδος και κυρίως το *T. castaneum* όταν πρόκειται για τροπικά κλίματα (Sallam 1999, Σταμόπουλος 1999).



Εικ. 21 Μορφολογικές διαφορές του *T. castaneum* (αριστερά) και του *T. confusum* (δεξιά)



Εικ. 22 Προσβολή του *T. castaneum* σε αλεύρι (αριστερά) και σε σιτάρι (δεξιά)





### 1.1.5 Προβλήματα προκαλούμενα από έντομα αποθηκών

#### 1.1.5.1 Ζημιές σε προϊόντα προσβεβλημένα από έντομα αποθηκών

Τα έντομα αποθηκών προκαλούν ζημιές στα αποθηκευμένα προϊόντα κυρίως μέσω της άμεσης σίτισής τους, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα μία δραματική ποσοτική υποβάθμιση των προϊόντων. Τα τέλεια και οι προνύμφες των κολεοπτέρων και οι προνύμφες των λεπιδοπτέρων μπορούν, σε σύντομο χρονικό διάστημα, να καταναλώσουν προϊόν βάρους έως πολλαπλάσιου του βάρους τους. Η απόδοση μπορεί να μειωθεί άμεσα από την κατανάλωση του σπόρου ή έμμεσα με την αύξηση του αριθμού των προσβεβλημένων σπόρων που διαχωρίζονται κατά το αλώνισμα. Οι προσβεβλημένοι σπόροι μπορούν να χάσουν μέχρι και 25% του βάρους τους από την διατροφή των προνυμφών και είναι επιρρεπείς σε θραύση κατά την συγκομιδή, έτσι ώστε η συνολική απόδοση σε βαριές προσβολές μπορεί να μειωθεί κατά 15% έως και 20% (Sallam 1999, Σταμόπουλος 1999).

Πέραν των ποσοτικών ζημιών, οι προσβολές των αποθηκευμένων προϊόντων από έντομα οδηγούν και σε σημαντική ποιοτική υποβάθμιση των σπόρων που προορίζονται για άλεση και επεξεργασία. Τα περισσότερα είδη τρέφονται με το ενδοσπέρμιο των σπόρων προκαλώντας απώλεια απαραίτητων αμινοξέων, όπως μεθειονίνη, ισολευκίνη και λυσίνη καθώς και σημαντική μείωση των περιεχόμενων συνολικών λιπιδίων, φωσφολιπιδίων, γαλακτολιπιδίων και πολικών και μη πολικών λιπιδίων. Επιπλέον, στους προσβεβλημένους σπόρους παρατηρείται σημαντική μείωση του περιεχόμενου αμύλου και αυξημένη συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων και υπεροξειδίων. Ποιοτική υποβάθμιση, επίσης, παρατηρείται και στους σπόρους που προορίζονται ως πολλαπλασιαστικό υλικό, οι οποίοι παρουσιάζουν μειωμένη βλαστική ικανότητα, γεγονός που τους καθιστά ακατάλληλους για σπορά και μειώνει τη βιωσιμότητά τους (Sallam 1999).

Εκτός από την άμεση κατανάλωση, τα έντομα αποθηκών μπορούν να προκαλέσουν υποβάθμιση των προϊόντων και με την ίδια την ύπαρξη τους σε αυτά. Η παρουσία εντόμων ή διαφόρων τμημάτων τους (τρίχες, πόδια, πτέρυγες, εκδύματα) σε προϊόντα που, είτε βρίσκονται στο στάδιο της επεξεργασίας, είτε φτάνουν στην κατανάλωση, οδηγεί σε μη επιθυμητά εμπορικά προϊόντα. Επιπλέον, το διεθνές εμπόριο τροφίμων περιορίζεται, με τεράστιες οικονομικές επιπτώσεις, λόγω της ακούσιας εισαγωγής “εντόμων καραντίνας”, τα οποία είναι σε θέση να αυξήσουν



δραστικά τους πληθυσμούς τους μέσα σε ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (Αθανασίου 2012).

Σημαντικό πρόβλημα της δραστηριότητας των εντόμων αποθηκών είναι και η αλλοίωση που προκαλείται στα αποθηκευμένα προϊόντα. Πολλές φορές τα έντομα μολύνουν περισσότερες ποσότητες προϊόντων από όσες καταναλώνουν, μέσω των αποχωρημάτων τους που παραμένουν σε αυτά και των ποσοτήτων ουρικού οξέος που παράγουν, το οποίο προκαλεί τάγγισμα των προϊόντων. Επιπλέον, εκκρίνουν λιπίδια που έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών και μπορούν να προκαλέσουν αποχρωματισμό των εμπορευμάτων. Η συγκέντρωση των εντόμων σε μεγάλους αριθμούς σε ορισμένα σημεία του προϊόντος μειώνει τη ροή του αέρα μέσα από το προϊόν και παρεμποδίζει τον σωστό αερισμό του, με αποτέλεσμα της αύξηση της υγρασίας. Η υψηλή υγρασία σε συνδυασμό με την έντονη μεταβολική δραστηριότητα που παρατηρείται εκεί, προκαλεί μια τοπική αύξηση της θερμοκρασίας με αποτέλεσμα τη δημιουργία των λεγόμενων θερμών κηλίδων (hot spots) και το “άναμμα” των προϊόντων. Οι κηλίδες αυτές ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων στους ήδη προσβεβλημένους σπόρους οδηγώντας σε μεγαλύτερη υποβάθμιση των προϊόντων (Σταμόπουλος 1999).

#### 1.1.5.2 Κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία από προϊόντα προσβεβλημένα από έντομα αποθηκών

Η πιο συχνή επίπτωση στην υγεία των καταναλωτών, από προϊόντα που έχουν προσβληθεί από έντομα αποθηκών, είναι η εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων και δερματοπαθειών. Οι αλλεργίες μπορούν να εμφανιστούν μέσω επαφής, εισπνοής ή κατάποσης ολόκληρων των εντόμων, των τεμαχιδίων, των εκδυσμάτων, των αποχωρημάτων ή/και των εκκριμάτων τους. Η παρουσία πολύ μεγάλου αριθμού εκδυσμάτων ή τριχών π.χ., των προνυμφών της οικογένειας Dermestidae μπορεί να προκαλέσει μηχανικό ερεθισμό στο δέρμα και τους οφθαλμούς, συχνά με χρόνια και αθροιστική δράση, ο οποίος εκδηλώνεται με έντονο ερεθισμό του δέρματος και κνησμό. Παράλληλα εμφανίζεται ξηρός και συνεχής βήχας, ενώ ακόμη μπορεί να εκδηλωθεί κακοδιαθεσία, ζαλάδα, κούραση και ελαφρές λύσεις που εντοπίζονται κυρίως στο δέρμα της έξω γωνίας των ματιών (Σταμόπουλος 1999). Αλλεργικά φαινόμενα μπορούν επίσης να εμφανιστούν όταν σωματικά τμήματα νεκρών εντόμων, που εν τω μεταξύ έχουν κονιορτοποιηθεί, εισέλθουν στον οργανισμό μέσω



της αναπνευστικής οδού. Σε αυτές τις περιπτώσεις προκαλείται δύσπνοια και ερεθισμός στο ανώτερο αναπνευστικό που εκδηλώνεται με ρινίτιδες, αντιδράσεις αναφυλαξίας και άσθματος. Τέτοιες αλλεργίες έχουν αναφερθεί από ψείρες του σιταριού, είδη της οικογένειας Dermestidae, βρούχους, κ.λπ. Ακόμα και να μην είναι εμφανή στο χώρο, τα τεμαχίδια των εντόμων υπάρχουν στον αέρα και τα τρόφιμα και λανθασμένα θεωρούνται ως “σκόνη”. Ακόμα και η επεξεργασία των τεμαχιδίων (π.χ. θέρμανση, μαγείρεμα) δεν τα αδρανοποιεί. Τα νεκρά (επεξεργασμένα) έντομα συχνά είναι πιο ένοχα από τα ζωντανά, λόγω των ιδιοτήτων των υγρών του σώματος και των άλλων υλικών που απελευθερώνονται στο προϊόν (Sallam 1999, Αθανασίου 2012).

Εκείνες όμως οι αλλεργίες που είναι και οι περισσότερες σοβαρές είναι αυτές που προέρχονται από εισαγωγή αλλεργιογόνου (σωματικά μόρια εντόμων) στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της τροφικής οδού. Η κατάποση ολοκλήρων εντόμων ή τμημάτων τους σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει προβλήματα πεπτικής φύσεως που συνήθως εκδηλώνονται με δυσπεψία, εμετούς, ναυτίες, διάρροιες κ.λπ. Το όξινο και αναερόβιο περιβάλλον του πεπτικού μας συστήματος, βέβαια, καταστρέφει τα έντομα, αλλά δεν μπορεί να πέψει τη χιτίνη του εξωσκελετού τους (Αθανασίου 2012). Τέτοιες περιπτώσεις παρουσιάζονται από την κατάποση σωματικών τμημάτων εντόμων του γένους *Trogoderma*, το οποίο προκαλεί ελκώδεις κολίτιδες και κοιλιακή άλγη (Scarabiasis). Επίσης, η κατάποση ζωντανών προνυμφών διπτέρων προκαλεί μυΐαση στο έντερο (Intestinal Myiasis) και ο ψευδοπαρασιτισμός από προνύμφες του *Tenebrio molitor* προκαλεί εντερική μυκητίαση (Canthariasis). Οι καταστάσεις αυτές εκδηλώνονται με έντονο στομαχικό πόνο, διάρροια (συχνά με αίμα), εμετό, δυσφορία, κρίσεις επιληψίας σε παιδιά και σπασμούς (Σταμόπουλος 1999).

Πολλά είδη εντόμων που προσβάλλουν τα τρόφιμα παράγουν τοξίνες, για την άμυνα και την οριοθέτηση των ενδιατημάτων τους, γνωστές και ως κινόνες. Ιδιαίτερα τα είδη της οικογένειας Tenebrionidae (*Tribolium* sp., *Alphitobius* sp., *Latheticus* sp., *Gnathocerus* sp., *Palorus* sp.) παράγουν κινόνες σε εντυπωσιακές ποσότητες (στα τρόφιμα, κάθε άτομο της οικογένειας Tenebrionidae μπορεί να παράγει μέχρι και 400 µg κινόνες) (Σταμόπουλος 1999, Αθανασίου 2012). Οι κινόνες προκαλούν στον ανθρώπινο οργανισμό δερματίτιδες, φλύκταινες, κύστες, ερυθρήματα, ερεθισμούς στα μάτια, μείωση όρασης κτλ. Επίσης, συνδέονται με καρκινογενέσεις, και σήμερα κατατάσσονται στις τοξικές ουσίες “ευρέος φάσματος”. Χαρακτηριστικό της τοξικότητας τους αποτελεί το γεγονός ότι αντιδρούν ταχύτατα με ορισμένες



ουσίες στα τρόφιμα, όπως οι πρωτεΐνες, καθιστώντας πολλές φορές δύσκολη ακόμα και την ανίχνευση τους (Αθανασίου 2012).

Τα περισσότερα είδη εντόμων που προσβάλλουν τα τρόφιμα αποτελούν φορείς σπορίων και μυκηλίων μυκήτων, οι οποίοι παράγουν τοξίνες, γνωστές ως μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες παράγονται από μύκητες, οι οποίοι εμφανίζονται ως δευτερογενείς προσβολές σε ήδη προσβεβλημένα από έντομα τρόφιμα και εγκαθίστανται κυρίως σε περιοχές έντονης εντομολογικής προσβολής. Ακόμα και να μην υπάρχουν σπόρια, η προσβολή από έντομα (π.χ. οπές σε σπόρους) διευκολύνει την είσοδο των μυκήτων στα τρόφιμα. Η μεταφορά των μυκοτοξινών μπορεί να γίνει τόσο με τα τέλεια ή τις προνύμφες, όσο και με τα εκδύματα ή/και τα αποχωρήματα των εντόμων. Εκτός από τις μυκοτοξίνες τα έντομα μπορούν να μεταφέρουν και άλλες τοξίνες, πολλές από τις οποίες είναι φυσικές και περιέχονται στα τρόφιμα (π.χ. αλκαλοειδή). Τα είδη των γενών *Aspergillus* και *Fusarium* παράγουν αφλατοξίνες, οι οποίες είναι από τα πιο γνωστά “φυσικά” αίτια καρκινογένεσεων του πεπτικού συστήματος (ήπαρ κ.α.). Σε πολλές περιπτώσεις έχει καταγραφεί και χρόνια έκθεση σε μυκοτοξίνες, μέσω της τροφής, που δεν διασπώνται τελικά στο ήπαρ. Ο ιός HBV (Ηπατίτιδα Β) με ταυτόχρονη παρουσία αφλατοξίνης έχει αποδειχθεί ότι έχει συνεργιστική δράση στην ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος (Αθανασίου 2012).

Επιπλέον, ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα που μπορεί επίσης να εμφανιστούν σε προϊόντα τα οποία προορίζονται για κατανάλωση, είναι η προσβολή τους από έντομα αποθηκών τα οποία είναι φορείς ασθενειών. Τα έντομα αποθηκών μεταφέρουν βακτήρια όπως *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*, *Mycobacterium tuberculosis* κ.α. Ως “συνήθεις ύποπτοι” θεωρούνται κυρίως τα δίπτερα, τα οποία μπορούν να φέρουν από 1 έως 6 εκατομμύρια βακτήρια, τα οποία φιλοξενούν με έμμονο τρόπο και τα μεταδίδουν από τα στοματικά τους μόρια ή τα αποχωρήματα τους. Ακόμα και έντομα που δεν σχετίζονται με τα αποθηκευμένα προϊόντα, όπως τα μυρμήγκια ή και οι κατσαρίδες μπορούν να μεταφέρουν βακτήρια στα τρόφιμα, λόγω του ότι μετακινούνται σε μεγάλες αποστάσεις, συχνά πιο εύκολα από ότι τα έντομα αποθηκών. Επίσης, τα έντομα αποθηκών είναι φορείς ιών, όπως της πολιομυελίτιδας, της ηπατίτιδας, της εγκεφαλίτιδας, του Κίτρινου πυρετού, των ιών Coxsackie κ.α. Τέλος, τα έντομα αποθηκών έχει βρεθεί ότι αποτελούν ενδιάμεσους ξενιστές παθογενών πρωτοζώων (*Entamoeba histolytica*, *Trichomonas hominis*, *Toxoplasma gondii*) αλλά και παρασιτικών ελμίνθων, τόσο κεστωδών (*Echinococcus granulosus*, *Taenia solium*,



*Taenia saginata*) όσο και νηματωδών (*Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*) (Αθανασίου 2012).

## 1.2 Μυκοτοξικογόνοι μύκητες και μυκοτοξίνες

### 1.2.1. Γενικά

Με τον όρο μυκοτοξίνες χαρακτηρίζονται οι τοξικές ουσίες (τοξίνες) που σχηματίζονται και εκκρίνονται από τους μύκητες. Αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων και παράγονται συνήθως κατά το τελευταίο στάδιο της ανάπτυξής τους (λογαριθμική και στατική φάση ανάπτυξης), πάντα μετά από τη διαδικασία του σχηματισμού των σπορίων τους. Οι μυκοτοξίνες, μετά τον σχηματισμό τους, είτε απεκκρίνονται μέσα στο υλικό που αναπτύσσεται ο μύκητας, είτε κατακρατούνται στο εσωτερικό του κυττάρου των μυκήτων και ελευθερώνονται μετά τη θράυση του μυκηλίου (Meronuck, 1995, Bennett and Klich 2003).




Οι μυκοτοξίνες είναι από τις σπουδαιότερες και πιο συχνά ευρισκόμενες τοξίνες σε εισαγόμενα και εγχώρια γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα. Βρίσκονται σε προϊόντα τόσο ζωικής όσο και φυτικής προέλευσης. Θεωρούνται γενικά επικίνδυνες ενώσεις που παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων, οι οποίοι αναπτύσσονται σε προϊόντα αγροτικών καλλιεργειών είτε πριν τη συγκομιδή, είτε κατά την αποθήκευσή τους σε γεωργικές εγκαταστάσεις και παραμένουν δραστικές για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά την καταστροφή των μυκήτων από τους οποίους προήλθαν. Η εμφάνισή τους στα τρόφιμα έχει αναγνωριστεί ως απειλή για την υγεία τόσο του ανθρώπου όσο και των ζώων, είτε αυτή προέρχεται από την άμεση μόλυνση των φυτικών ιστών, είτε από προϊόντα που έχουν παραχθεί από αυτά, είτε από την μεταφορά των μυκοτοξινών και των μεταβολιτών τους στους ζωικούς ιστούς (Miller 1994).







Πίνακας 2. Οι κύριοι μυκοτοξικογόνοι μύκητες και οι παραγόμενες μυκοτοξίνες

Κύριες κατηγορίες μυκοτοξικογόνων μυκήτων	Είδη μυκήτων	Μυκοτοξίνες
<b>Aspergillus</b> 	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i> <i>A. pseudotamarii</i>	Αφλατοξίνες (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> )
	<i>A. ochraceus</i> <i>A. carbonarius</i> <i>A. alliaceus</i> <i>A. auricomus</i> <i>A. glaucus</i> <i>A. melleus</i> <i>A. niger</i>	Ωχρατοξίνες (Ωχρατοξίνη A)
	<i>A. clavatus</i> <i>A. terreus</i>	Πατουλίνη
	<i>A. flavus</i> <i>A. versicolor</i>	Κυκλοπιαζονικό οξύ (CPA)
<b>Fusarium</b> 	<i>F. verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. nygamai</i>	Φουμονισίνες (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> ) Φουσαρικό οξύ
	<i>F. graminearum</i> <i>F. avenaceum</i> <i>F. culmorum</i>	Τριχοθυκένια τύπου A T-2 τοξίνη HT-2 τοξίνη Διακετοξυσκιρπενόλη (DAS)
	<i>F. poae</i> <i>F. equiseti</i> <i>F. crookwellense</i> <i>F. acuminatum</i> <i>F. sambucinum</i> <i>F. sporotrichioides</i>	Τριχοθυκένια τύπου B Νιβαλενόλη Δεσοξυνιβαλενόλη (DON) Φουζαρενόνη-x
	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. equiseti</i> <i>F. crookwellense</i>	Ζεαραλενόνη (ZON)
<b>Penicillium</b> 	<i>P. verrucosum</i>	Ωχρατοξίνες (Ωχρατοξίνη A)
	<i>P. citrinum</i> <i>P. verrucosum</i>	Κιτρινίνη
	<i>P. roqueforti</i>	Ροκεφορτίνη Πενιτρέμιο A Τοξίνη PR
	<i>P. cyclopium</i> <i>P. camemberti</i>	Κυκλοπιαζονικό οξύ (CPA) Πενιτρέμιο A
	<i>P. expansum</i> <i>P. claviforme</i> <i>P. roqueforti</i>	Πατουλίνη



#### 1.2.2.1 Αφλατοξίνες

Οι αφλατοξίνες αποτελούν μία ομάδα από τις τοξικότερες και πιο επικίνδυνες ουσίες που βρίσκονται στη φύση. Ήταν οι πρώτες μυκοτοξίνες που προσδιορίστηκαν και θεωρήθηκαν ως πιθανός κίνδυνος για την υγεία των ανθρώπων. Σήμερα, έχουν λάβει τη μεγαλύτερη προσοχή από οποιεσδήποτε άλλες μυκοτοξίνες λόγω της καταδεδειγμένης ισχυρής καρκινογόνου επίδρασής τους και των οξέων τοξικολογικών αποτελεσμάτων τους στους ανθρώπους. Παράγονται από είδη του γένους *Aspergillus* και κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* (Bennett and Klich 2003).

Χαρακτηριστική φυσικοχημική ιδιότητα των αφλατοξινών είναι ο έντονος φθορισμός των διαλυμάτων τους, υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Από την ιδιότητα αυτή προκύπτει το γράμμα που χαρακτηρίζει τις αφλατοξίνες B και G. Έτσι οι αφλατοξίνες B ( $B_1$ ,  $B_2$ ) χαρακτηρίζονται από έντονο κυανό (B: blue) φθορισμό, ενώ οι αφλατοξίνες G ( $G_1$ ,  $G_2$ ) από έντονο πράσινο (G: green) φθορισμό. Οι αφλατοξίνες  $M_1$  και  $M_2$  είναι μεταβολίτες των αφλατοξινών  $B_1$  και  $B_2$  και βρίσκονται στο γάλα (M: milk) ανθρώπων και θηλαστικών ζώων που έχουν τραφεί με τροφές μολυσμένες με αφλατοξίνες (Bennett and Klich 2003, Πετρωτός 2010). Ο *Aspergillus flavus* παράγει τις αφλατοξίνες  $B_1$  και  $B_2$ , ενώ ο *Aspergillus parasiticus* τις αφλατοξίνες  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  και  $G_2$  (Merounek 1995).

Οι αφλατοξίνες ανιχνεύονται στον αραβόσιτο, τα φιστίκια, το βαμβακόσπορο, τα καρύδια, τα αμύγδαλα, και άλλους καρπούς με κέλυφος. Επίσης, πολλές φορές εμφανίζονται και στο γάλα, το τυρί, τα αυγά και τα προϊόντα κρέατος λόγω της κατανάλωσης από τα ζώα ζωοτροφών μολυσμένων με αφλατοξίνες. Εντούτοις, τα προϊόντα με τον υψηλότερο κίνδυνο προσβολής από μύκητες του γένους *Aspergillus* είναι ο αραβόσιτος (*Aspergillus ear rot*) (Εικ. 23), τα φιστίκια (yellow mold) (Εικ. 24) και ο βαμβακόσπορος (Schmale and Munkvold 2014).



Εικ. 23 Προσβολή του *A. flavus* σε καλαμπόκι



Εικ. 24 Προσβολή του *A. flavus* σε φιστίκια



#### 1.2.2.2 Ωχρατοξίνες

Η ωχρατοξίνη Α ανακαλύφθηκε αρχικά ως μεταβολίτης του μύκητα *Aspergillus ochraceus* το 1965, στα πλαίσια μίας μελέτης μεγάλης κλίμακας για την ανακάλυψη νέων μυκοτοξινών. Μετέπειτα, η ωχρατοξίνη Α απομονώθηκε από ένα εμπορικό δείγμα αραβόσιτου στις ΗΠΑ και αναγνωρίστηκε ως ισχυρή νεφροτοξίνη. Σήμερα, είναι πλέον γνωστό ότι οι ωχρατοξίνες είναι μεταβολίτες διαφορετικών ειδών μυκήτων του γένους *Aspergillus*, όπως οι: *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus melleus* και *Aspergillus niger* (Bennett and Klich 2003). Επίσης, αρχικές έρευνες ενέπλεκαν το είδος *Penicillium viridicatum* με την παραγωγή ωχρατοξινών, μια άποψη η οποία επικράτησε για περισσότερο από μια δεκαετία. Τελικά έγινε σαφές ότι από το γένος *Penicillium* μόνο το είδος *Penicillium verrucosum* παράγει ωχρατοξίνη (Pitt 2000, Bennett and Klich 2003).

Οι ωχρατοξίνες χωρίζονται σε τρία είδη, την ωχρατοξίνη Α, Β, και C. Από όλες τις τοξίνες που παράγουν οι μύκητες τους γένους *Aspergillus*, μόνο η ωχρατοξίνη Α είναι τόσο σημαντική όσο οι αφλατοξίνες. Δομικά, οι τρεις τοξίνες διαφέρουν ελαφρώς μεταξύ τους, εντούτοις, αυτές οι διαφορές έχουν μεγάλη σημασία στη τοξικότητα της κάθε μιας από αυτές. Η ωχρατοξίνη Α (OTA) είναι και η πιο συχνά απαντώμενη, αλλά και η πιο τοξική από τις τρεις. Αντικατάσταση του χλωρίου με ένα άτομο υδρογόνου μας δίνει την ωχρατοξίνη Β (OTB), η οποία είναι κατά 10-20 φορές λιγότερο τοξική από την Α. Περαιτέρω δομικές αλλαγές παράγουν την ωχρατοξίνη C (OTC), η οποία δεν φαίνεται να έχει τοξική δράση (Schmale and Munkvold 2014).

Η ωχρατοξίνη Α έχει ανιχνευθεί σε δημητριακά (βρώμη, σίκαλη, σιτάρι, κριθάρι) (Εικ. 25), στους κόκκους του καφέ, σε καρύδια και σύκα. Κύρια αιτία της μόλυνσης των δημητριακών με ωχρατοξίνη είναι ο μύκητας *Penicillium verrucosum*, ο οποίος είναι κοινός σε εύκρατα κλίματα. Επίσης, σταφύλια (Εικ. 26), σταφίδες, ακόμα και οίνοι μπορούν να μολυνθούν με ωχρατοξίνες που παράγονται από το μύκητα *Aspergillus carbonarius*, ο οποίος προκαλεί στα σταφύλια μια ασθένεια γνωστή ως μαύρη μούχλα (black mold) (Bennett and Klich 2003, Schmale and Munkvold 2014).





Εικ. 25 Προσβολή του *P. verrucosum* σε σίκαλη



Εικ. 26 Προσβολή του *A. carbonarius* σε σταφύλια

### 1.2.2.3 Φουμονισίνες

Οι φουμονισίνες αποτελούν μία ομάδα μυκοτοξινών οι οποίες παράγονται από είδη του γένους *Fusarium* και κυρίως από τους μύκητες *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium nygamai*. Οι φουμονισίνες ανακαλύφθηκαν και χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του '80, ως αποτέλεσμα των μελετών για τα αίτια του ανθρώπινου καρκίνου του οισοφάγου στην Αφρική, σε συνδυασμό με την εμφάνιση της λευκοεγκεφαλομαλάκιας των ιπποειδών και το πνευμονικό οίδημα των χοίρων στις ΗΠΑ (Miller 1994, Pitt 2000, Schmale and Munkvold 2014).

Υπάρχουν τουλάχιστον 28 διαφορετικές μορφές των φουμονισινών, που χαρακτηρίζονται αντίστοιχα ως σειρά A, σειρά B, σειρά C και σειρά P (Schmale and Munkvold 2014). Η φουμονισίνη B<sub>1</sub> είναι η πιο κοινή και οικονομικά σημαντική μορφή και ακολουθείται από τις φουμονισίνες B<sub>2</sub> και B<sub>3</sub> (Miller 1994, Schmale and Munkvold 2014).

Ο αραβόσιτος είναι η κύρια καλλιέργεια που μολύνεται από φουμονισίνες και από όλες τις μυκοτοξίνες που αναπτύσσονται σε αυτόν, οι φουμονισίνες αποτελούν τις πιο κοινές και συχνά εμφανιζόμενες. Κύριες αιτίες της μόλυνσης του αραβόσιτου με φουμονισίνες είναι οι μύκητες *Fusarium verticillioides* και *Fusarium proliferatum* οι οποίοι προκαλούν μια ασθένεια γνωστή ως *Fusarium ear rot* (Εικ. 27). Οι φουμονισίνες μπορούν επίσης να μολύνουν και τα σιτηρά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων ή ζωοτροφών. Η μόλυνση αυξάνεται εάν οι πυρήνες έχουν υποστεί φυσική βλάβη, κυρίως από έντομα. Η ανάπτυξη των μυκήτων και η παραγωγή των φουμονισινών στα σιτηρά παύουν όταν αυτά ξηραίνονται με υγρασία



κάτω του 19% περίπου, αλλά οι φουμονισίνες παραμένουν άθικτες και οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν και να παράγουν επιπλέον φουμονισίνες κατά την αποθήκευση, αν δεν διατηρηθούν κατάλληλες συνθήκες. Φουμονισίνες μπορεί να βρεθούν και σε μερικές άλλες καλλιέργειες, τυπικά σε χαμηλά επίπεδα, αλλά η οικονομική τους σημασία εντοπίζεται κυρίως στον αραβόσιτο (Schmale and Munkvold 2014).



Εικ. 27 Προσβολή του *F. verticillioides* σε καλαμπόκι



#### 1.2.2.4 Τριχοθυκένια

Τα τριχοθυκένια είναι η μεγαλύτερη ομάδα μυκοτοξινών που είναι γνωστή μέχρι σήμερα και αποτελούνται από περισσότερες από 150 χημικά συγγενείς ενώσεις που παράγονται από διάφορα είδη του γένους *Fusarium* (Bennett and Klich 2003, Schmale and Munkvold 2014).

Τα τριχοθυκένια, αναλόγως της δομής τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες, τύπου Α και τύπου Β. Τα τριχοθυκένια τύπου Α περιλαμβάνουν την T-2 τοξίνη, την HT-2 τοξίνη και την διακετοξυσκιρπενόλη (DAS), ενώ τα τριχοθυκένια τύπου Β περιλαμβάνουν την νιβαλενόλη, την δεσοξυνιβαλενόλη (DON) και την φουζαρενόνη-χ (Bennett and Klich 2003).

Η πιο σημαντική από τις μυκοτοξίνες της ομάδας των τριχοθυκενίων είναι η δεσοξυνιβαλενόλη (DON). Αν και παρουσιάζει μικρότερη τοξικότητα σε σχέση με πολλές άλλες μυκοτοξίνες της ομάδας, είναι η πιο διαδεδομένη και αποτελεί τον πιο κοινό μολυσματικό παράγοντα του σιταριού, του κριθαριού, του αραβόσιτου, της βρώμης και της σίκαλης. Πολλές φορές μάλιστα ονομάζεται και vomitoxin (τοξίνη που προκαλεί εμετό) λόγω των επιβλαβών συνεπειών της στο πεπτικό σύστημα των ζώων (Bennett and Klich 2003, Schmale and Munkvold 2014). Μια άλλη εξίσου σημαντική μυκοτοξίνη, ενδημική στην Ευρώπη, είναι η T-2 τοξίνη η οποία μπορεί μολύνει μικρούς κόκκους. Η T-2 τοξίνη προκαλεί μια θανατηφόρα ασθένεια του ανθρώπου, γνωστή ως τοξική διατροφική αλευκία (alimentary toxic aleukia, ATA) και έχει ενοχοποιηθεί ως παράγοντας του θεωρούμενου χημικού πολέμου “κίτρινη βροχή” στη Νοτιοανατολική Ασία (Schmale and Munkvold 2014).

Η κύρια αιτία της μόλυνσης των σιτηρών και του αραβοσίτου με δεσοξυνιβαλενόλη είναι ο μύκητας *Fusarium graminearum* (σεξουαλικό στάδιο *Gibberella zeae*). Ο μύκητας προκαλεί στο σιτάρι και το κριθάρι μια ασθένεια γνωστή ως *Fusarium head blight* (Εικ. 28) και στον αραβόσιτο μια ασθένεια γνωστή ως *Gibberella ear rot* (Εικ. 29) (Pitt 2000, Bennett and Klich 2003, Schmale and Munkvold 2014).





Εικ. 28 Προσβολή του *G. zeae* σε σιτάρι



Εικ. 29 Προσβολή του *G. zeae* σε καλαμπόκι

#### 1.2.2.5 Ζεαραλενόνη

Η ζεαραλενόνη (ZON) είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης του γένους *Fusarium* με ισχυρή οιστρογόνο δράση. Κατηγοριοποιείται ως μη στεροειδές οιστρογόνο, μυκο-οιστρογόνο ή φυτο-οιστρογόνο. Βιοσυντίθεται από τους μύκητες *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti* και *Fusarium crookwellense*, οι οποίοι μολύνουν τον αραβόσιτο και τους καρπούς των δημητριακών (Bennett and Klich 2003).

Η μόλυνση με ζεαραλενόνη είναι οικονομικά σημαντική για τις καλλιέργειες του αραβόσιτου, του κριθαριού και του σιταριού, με κύρια αιτία της μόλυνσης τον μύκητα *Fusarium graminearum*. Συγκέντρωση ζεαραλενόνης της τάξεως του 1 ppm στην καθημερινή διατροφή, οδηγεί σε υπερ-οιστρογονικό σύνδρομο στους χοίρους, ενώ ακόμη υψηλότερες συγκεντρώσεις έχουν ενοχοποιηθεί για αποβολές και άλλα προβλήματα στην αναπαραγωγή τόσο των χοίρων, όσο των προβάτων και των αγελάδων. Ωστόσο, εκτενείς επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταλήξει ότι δεν υπάρχει τοξικότητα στους ανθρώπους (Pitt 2000, Bennett and Klich 2003, Schmale and Munkvold 2014).



### 1.2.3 Κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία από προϊόντα μολυσμένα με μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξίνες μπορούν να εμφανιστούν στην τροφική αλυσίδα ως συνέπεια της μυκητιακής προσβολής, είτε με την άμεση κατανάλωση μολυσμένων φυτικών ιστών ή προϊόντων που έχουν παραχθεί από αυτά, είτε με τη κατανάλωση ζωικών ιστών στους οποίους έχουν μεταφερθεί. Αποτελούν εξαιρετικά επικίνδυνες ενώσεις, που παραμένουν δραστικές για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά την καταστροφή των μυκήτων από τους οποίους προήλθαν. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι αντιστέκονται πολύ στην αποσύνθεση και στην πέψη, με αποτέλεσμα να παραμένουν στην τροφική αλυσίδα, κυρίως στο κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Επιπλέον, επειδή πολλές από αυτές είναι θερμοανθεκτικές, δεν καταστρέφονται σε συνήθεις συνθήκες θερμικής κατεργασίας των τροφίμων.

Η πλειοψηφία των μυκοτοξινών συντίθενται με απλές βιοσυνθετικές αντιδράσεις μικρών μορίων. Το αποτέλεσμα είναι ότι κάθε μία από αυτές έχει διαφορετικό εύρος τοξικών, οξείων και χρόνιων επιδράσεων, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) (Anonymous 2014). Η δράση τους στους ζώντες οργανισμούς και κυρίως στον άνθρωπο, είναι ηπατοτοξική, νεφροτοξική, αιμοτοξική, νευροτοξική, δερματοτοξική και πολλές έχουν καρκινογόνες ή οιστρογόνες ιδιότητες. Μερικές φορές έχουν και αντιβιοτική δράση κατά των μικροβίων και καταστρέφουν την μικροβιακή χλωρίδα π.χ. η πενικιλίνη είναι η μυκοτοξίνη του μύκητα *Penicillium chrysogenum* (δηλαδή της χλωραμφενικόλης) (Bennett and Klich 2003).

Ένα πρόβλημα που δεν έχει μελετηθεί αρκετά είναι η δράση, λόγω ενδεχόμενης συνεργίας, δυο μυκοτοξινών που υπάρχουν μαζί στην ίδια τροφή. Πιθανώς οι μυκοτοξίνες που υπάρχουν σε μη τοξικές ποσότητες στις τροφές όταν είναι μόνες τους, να γίνονται τοξικές όταν δρουν μαζί όπως συμβαίνει με πολλά αντιβιοτικά (Bennett and Klich 2003, Πετρωτός 2010).

Οι συγκεντρώσεις των μυκοτοξινών οι οποίες είναι σημαντικές για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων, μετριοούνται συνήθως σε  $\mu\text{g/kg}$  τροφής (ppb).



Πίνακας 3. Η επίδραση των κυριότερων μυκοτοξινών στην υγεία του ανθρώπου

Μυκοτοξίνη	Επίδραση στην υγεία του ανθρώπου
<b>Αφλατοξίνες</b>	Καρκινογόνος δράση, τερατογόνος δράση, ηπατοτοξικότητα (ασθένειες του ήπατος, οξεία ηπατίτιδα), αιμορραγίες (εντέρου, νεφρών), ανοσοκαταστολή, μείωση ανάπτυξης
<b>Ωχρατοξίνες</b>	Καρκινογόνος δράση, τερατογόνος δράση, ήπια ηπατοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα, μείωση ανάπτυξης, ανοσοκαταστολή
<b>Φουμονισίνες</b>	Καρκινογόνος δράση, ηπατοτοξικότητα, πνευμονικό οίδημα, νεφροτοξικότητα, ανοσοκαταστολή
<b>Τριχοθυκένια</b>	Πεπτικές διαταραχές (έμετος, διάρροια, άρνηση τροφής), μειωμένη αύξηση σωματικού βάρους, αιμορραγίες (στομάχου, καρδιάς, εντέρου, πνεύμονα, ουροδόχου κύστης, νεφρών), στοματικές αλλοιώσεις, δερματίτιδες, διαταραχές του αίματος, στειρότητα, εκφυλισμός του μυελού των οστών, αργή ανάπτυξη, ανοσοκαταστολή
<b>Ζεαραλενόνη</b>	Οιστρογόνος δράση, πρόπτωση του κόλπου, διεύρυνση της μήτρας, διεύρυνση των μαστικών αδένων, ατροφία των όρχεων και των ωοθηκών, στειρότητα, αποβολές



### 1.3 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τους ρυπαντές-προσμείξεις στα τρόφιμα

Οι βασικές κοινοτικές διαδικασίες σχετικά με τους ρυπαντές-προσμείξεις (contaminants) στα τρόφιμα αναφέρονται στον Κανονισμό του Συμβουλίου (ΕΟΚ) αριθ. 315/93 της 8ης Φεβρουαρίου 1993, ο οποίος αποτελεί και τον κανονισμό πλαίσιο. Ως “πρόσμειξη” νοείται οποιαδήποτε ουσία δεν προστίθεται σκοπίμως στο τρόφιμο αλλά περιέχεται όμως σε αυτό ως αποτέλεσμα της παραγωγής, της παρασκευής, της μεταποίησης, της προετοιμασίας, της επεξεργασίας, της πρώτης και της δεύτερης συσκευασίας, της μεταφοράς ή αποθήκευσης του εν λόγω τροφίμου ή ως αποτέλεσμα της μόλυνσης από το περιβάλλον. Οι ξένες ύλες, όπως για παράδειγμα, υπολείμματα εντόμων, τρίχες ζώων και άλλα, δεν καλύπτονται από τον ορισμό αυτό. Η διάθεση στην αγορά τροφίμων τα οποία περιέχουν πρόσμειξη σε ποσό μη αποδεκτό, όσον αφορά τη δημόσια υγεία, και ιδιαιτέρως από τοξικολογική άποψη, απαγορεύεται. Η περιεκτικότητα σε προσμείξεις πρέπει να διατηρείται σε επίπεδα όσο το δυνατόν χαμηλότερα, τα οποία μπορούν να επιτευχθούν εύλογα μέσω της εφαρμογής ορθών πρακτικών (Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων 2011).

Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) έχει καθορίσει τις μέγιστες τιμές ανοχής για ορισμένες προσμείξεις, με σκοπό τη μείωση της παρουσίας των προσμείξεων αυτών σε ορισμένα τρόφιμα στα κατώτερα ευλόγως εφικτά επίπεδα με την εφαρμογή ορθών μεθόδων παραγωγής ή γεωργικών πρακτικών. Ο στόχος είναι να επιτευχθεί υψηλό επίπεδο προστασίας της δημόσιας υγείας, ιδίως των ευάλωτων ομάδων του πληθυσμού, όπως παιδιά, άτομα που πάσχουν από αλλεργίες κ.τ.λ. (Επίσημη ιστοσελίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2010).

Από 01.03.2007, ισχύει ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 για τον καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα όπως είναι οι μυκοτοξίνες, τα νιτρικά, τα βαρέα μέταλλα, οι διοξίνες και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Ο παραπάνω Κανονισμός τροποποιήθηκε από τους παρακάτω Κανονισμούς:

- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1126/2007 της 28ης Σεπτεμβρίου 2007
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 565/2008 της 18ης Ιουνίου 2008
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 629/2008 της 2ης Ιουλίου 2008
- Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 105/2010 της 5ης Φεβρουαρίου 2010
- Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 165/2010 της 26 Φεβρουαρίου 2010

Ο παρών κανονισμός καθορίζει τις μέγιστες ποσότητες των αφλατοξινών, της ωχρατοξίνης Α, και τοξινών που παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium*. Τα



μέγιστα αυτά επιτρεπτά επίπεδα αφορούν το βρώσιμο τμήμα των τροφίμων και ισχύουν επίσης για τρόφιμα σύνθετα ή μεταποιημένα, αποξηραμένα ή αραιωμένα, ενδεχομένως με τη χρήση ενός παράγοντα συμπύκνωσης ή αραιώσης ή λαμβάνοντας υπόψη τις σχετικές αναλογίες των συστατικών στο σύνθετο προϊόν (Επίσημη ιστοσελίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2010, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006).

### **1.3.1 Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις αφλατοξίνες**

Ο παρών κανονισμός καθορίζει τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα της εν λόγω ουσίας για τρόφιμα όπως τα αράπικα φιστίκια, τους ξηρούς καρπούς με κέλυφος, τα ξηρά φρούτα, τον αραβόσιτο και το ρύζι. Το ανεκτό όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης (ΑΟΕΠ) για την αφλατοξίνη B<sub>1</sub> είναι 2 μg/kg σ.β. και για το άθροισμα των αφλατοξινών B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub> είναι 4 μg/kg σ.β. Ο κανονισμός επιτρέπει υψηλότερες περιεκτικότητες σε αφλατοξίνες για τα εν λόγω προϊόντα, εφόσον αυτά δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων (Επίσημη ιστοσελίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2010, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006).

### **1.3.2 Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για την ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ)**

Ο παρών κανονισμός καθορίζει τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα της εν λόγω ουσίας για τα δημητριακά και τα προϊόντα δημητριακών, τις σταφίδες, τον φρυγμένο καφέ, τον οίνο, το χυμό σταφυλιού, τα καρυκεύματα, τη γλυκόριζα και τις παιδικές τροφές. Το ανεκτό όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης (ΑΟΕΠ) ωχρατοξίνης Α είναι 120 ng/kg σ.β (Επίσημη ιστοσελίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2010, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006).

### **1.3.3. Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τοξίνες από μύκητες του γένους *Fusarium***

Η Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων (ΕΕΤ) εξέδωσε 6 γνωμοδοτήσεις στις οποίες καθορίζει το ανεκτό όριο ημερήσιας πρόσληψης (ΑΟΗΠ) για τις εν λόγω τοξίνες. Καθορίζει ένα ΑΟΗΠ για τη δεσοξυνιβαλενόλη ίσο με 1 g/kg σ.β., ένα προσωρινό ΑΟΗΠ για τη ζεαραλενόνη ίσο με 0,2 g/kg σ.β., ένα ΑΟΗΠ για τις φουμοσίνες ίσο με 2 μg/kg σ.β., ένα προσωρινό ΑΟΗΠ για τη νιβαλενόλη ίσο με 0,7 g/kg σ.β., ένα



συνδυασμένο προσωρινό ΑΟΗΠ για τις τοξίνες T-2 και HT-2 ίσο με 0,06 g/kg σ.β. και μια γνωμοδότηση για τα τριχοθυκένια ως ομάδα (Επίσημη ιστοσελίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2010, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006).

#### **1.3.4 Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για νεκρά έντομα και τμήματα αυτών**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 για τον καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα, δεν αναγνωρίζει τα έντομα ή τα τμήματα αυτών ως ρυπαντές ή προσμείξεις των τροφίμων. Ο μόνος Κανονισμός της Ευρωπαϊκής Ένωσης που αναφέρεται στην παρουσία εντόμων στα τρόφιμα είναι ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της επιτροπής της 19ης Απριλίου 2000 περί των διαδικασιών ανάληψης σιτηρών από τους οργανισμούς παρέμβασης, καθώς και των αναλυτικών μεθόδων για τον καθορισμό της ποιότητας. Ο παρών κανονισμός καθορίζει τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για ξένες προσμείξεις όπως νεκρά έντομα και τμήματα αυτών, ακαθαρσίες και έλντρα, στα διακινούμενα σιτηρά (σκληρός και μαλακός σίτος, κριθή, αραβόσιτος και σόργο) και επιδεικνύει μηδενική ανοχή στην παρουσία οποιασδήποτε από τις παραπάνω ξένες προσμείξεις (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 824/2000).



## 1.4 Ανίχνευση εντόμων στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων έχει έρθει αντιμέτωπη με την ανάγκη διαβεβαίωσης των καταναλωτών ότι τα αποδεκτά πρότυπα ασφαλείας που αφορούν στις μεθόδους παραγωγής και επεξεργασίας των τροφίμων αλλά και στον τομέα των απαιτούμενων ελέγχων, εφαρμόζονται. Αυτά τα πρότυπα, καλύπτοντας ολόκληρη την τροφική αλυσίδα, διασφαλίζουν σε υψηλό επίπεδο την υγεία των καταναλωτών και συμβάλλουν αποφασιστικά και υπεύθυνα στην παραγωγή ασφαλών τροφίμων (Trematerra and Catalano 2010, Trematerra *et al.* 2011).

Ως εκ τούτου, η απαίτηση για τον αποκλεισμό των αρθροπόδων από τα τρόφιμα έχει γίνει επιτακτική ανάγκη, όχι μόνο λόγω της κατανοητής αίσθησης απέχθειας που δημιουργεί η παρουσία τους, αλλά κυρίως λόγω των κινδύνων που ενέχει η κατανάλωση τους με την τροφή, για την υγεία των καταναλωτών. Στο πλαίσιο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση της παρουσίας των εντόμων τόσο στα προϊόντα της πρωτογενούς παραγωγής, όσο και στα βιομηχανικά προϊόντα. Αυτές οι μέθοδοι παρέχουν την δυνατότητα ανίχνευσης όχι μόνο των εντόμων που προσβάλλουν τα διατροφικά προϊόντα, αλλά και τμημάτων αυτών (τρίχες, πόδια, πτέρυγες, εκδύματα, ωά, αποχωρήματα) που έχουν παραμείνει στα τρόφιμα ως υπολείμματα (Trematerra and Catalano 2010, Trematerra *et al.* 2011).

Οι κυριότερες μέθοδοι ανίχνευσης εντόμων στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα αναλύονται παρακάτω.

### 1.4.1 Μέθοδοι ανίχνευσης ολόκληρων εντόμων (ζώντων εντόμων)

#### 1.4.1.1 Μέτρηση του διοξειδίου του άνθρακα, CO<sub>2</sub> (Measurement of carbon dioxide)

Ένα από τα υποπροϊόντα της αναπνοής των εντόμων είναι το διοξείδιο του άνθρακα. Η μέτρηση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα από ένα δείγμα σιτηρών μπορεί να ανιχνεύσει τα έντομα που βρίσκονται τόσο εντός, όσο και εκτός των σπόρων και να δώσει μια ένδειξη του επιπέδου της μόλυνσης (Wilkin *et al.* 1994, Anonymous 2000).

Με τη μέθοδο αυτή, ανιχνεύεται η ποσότητα του CO<sub>2</sub> που εκλύεται από την αναπνοή των εντόμων, με φασματοσκοπία υπέρυθρης απορρόφησης. Με την βοήθεια



σύγχρονου εξοπλισμού προσφέρεται η δυνατότητα μέτρησης μικρών αυξήσεων των εκπομπών του CO<sub>2</sub> πάνω από το φυσικό επίπεδο της ατμοσφαιρικής συγκέντρωσης στα 300 ppm. Η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και είναι εφαρμόσιμη σε όλα τα στάδια των εντόμων (Semple 1992). Μειονέκτημα της όμως αποτελεί το γεγονός ότι είναι δύσκολο να λειτουργήσει με αξιοπιστία στο σιτάρι που έχει μία περιεκτικότητα υγρασίας περίπου 15% ή περισσότερο, καθώς το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται από το σιτάρι μπορεί να καλύψει την προσβολή (Wilkin *et al.* 1994).

#### 1.4.1.2 Μέτρηση του ουρικού οξέος (Measurement of uric acid)

Το ουρικό οξύ είναι ένα άλλο υποπροϊόν του μεταβολισμού των εντόμων που μπορεί να ανιχνευθεί σε ένα δείγμα σιτηρών. Με τη μέθοδο αυτή, το ουρικό οξύ που βρίσκεται σε ένα δείγμα σιτηρών εκχυλίζεται από ένα υδατικό ή αλκαλικό διάλυμα και στη συνέχεια διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά του εκχυλίσματος με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Wehling and Wetzel 1983).

Ωστόσο, η μέθοδος αυτή απαιτεί ακριβό εξοπλισμό και τα αποτελέσματα της δεν δίνουν απαραίτητα μια ένδειξη της τρέχουσας μόλυνσης. Το ουρικό οξύ είναι μια σχετικά σταθερή ένωση και μπορεί να συσσωρευτεί σε ένα δείγμα κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου που προηγείται της ανάλυσης. Επίσης, το ουρικό οξύ που ανιχνεύεται στα σιτηρά μπορεί να έχει παραχθεί από αβλαβή έντομα που δεν έχουν άμεση σχέση με το αποθηκευμένο προϊόν (Semple 1992, Wilkin *et al.* 1994).

#### 1.4.1.3 Ανάλυση με ακτίνες X (X-ray analysis)

Η χρήση των ακτίνων X είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως ως μέσο για τον έλεγχο των εσωτερικών προσβολών των σιτηρών. Οι υπάρχουσες τεχνικές ακτίνων X, με χρήση ακτινογραφίας ή ψηφιακής απεικόνισης σε πραγματικό χρόνο, επιτρέπουν την ανίχνευση όλων των σταδίων, εκτός των ωών, με τη μέτρηση της περιοχής που καταλαμβάνεται από το έντομο. Στην συνέχεια, είναι επίσης δυνατή και η ακριβής ταξινόμηση με βάση την ορατή μορφολογία του εντόμου (Dogan *et al.* 2010).

Ωστόσο, ο εξοπλισμός που απαιτείται είναι εξαιρετικά ακριβός και η μέθοδος είναι σχετικά αργή (περίπου 30 λεπτά/δείγμα), ενώ λειτουργεί μόνο με πολύ μικρά



δείγματα των σιτηρών (Wilkin *et al.* 1994). Επιπλέον, οι ακτινογραφίες είναι πολλές φορές δύσκολο να ερμηνευθούν και η διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών εντόμων είναι αδύνατη (Semple 1992).

#### 1.4.1.4 Βιοακουστική (Acoustic detection)

Η βιοακουστική είναι μία μέθοδος που αποσκοπεί στον έγκαιρο εντοπισμό εντόμων μέσα στους σωρούς των αποθηκευμένων σιτηρών, βασιζόμενη στην αρχή ότι κάθε έντομο παράγει ένα ηχητικό σήμα κατά την κίνηση και το μεταβολισμό του (Wilkin *et al.* 1994). Το σήμα αυτό είναι μοναδικό για κάθε έντομο και αποτελεί ένα είδος “ηχητικής ταυτότητας” μέσω της οποίας μπορεί να γίνει όχι μόνο αναγνώριση του εντόμου, αλλά ταυτοποίηση του σταδίου ανάπτυξης του και εκτίμηση του πληθυσμού του. Ο εντοπισμός του εντόμου γίνεται με ειδικούς ακουστικούς αισθητήρες ανίχνευσης (sensors), οι οποίοι εισέρχονται μέσα στο προϊόν (σωρό). Αυτές οι ακουστικές εκπομπές εισάγονται στον υπολογιστή ο οποίος κάνοντας χρήση στατιστικών μεθόδων αποφασίζει αν μέσα στο προϊόν υπάρχει το έντομο ή όχι (Semple 1992).

Η μέθοδος αυτή παρέχει μια άμεση απάντηση, σχετικά με το εάν υπάρχουν ενεργές μορφές εντόμων μέσα στο αποθηκευμένο προϊόν και επίσης παρέχει το πλεονέκτημα της μη καταστροφής των δειγμάτων (Semple 1992). Παρόλα αυτά αδυνατεί να ανιχνεύσει ακίνητες μορφές των εντόμων, όπως οι νύμφες και τα ωά, ή έντομα μικρότερου μεγέθους. Επιπλέον, παρουσιάζει αδυναμία ως προς την απομόνωση και τον διαχωρισμό των ηχητικών σημάτων των εντόμων από τους υπόλοιπους θορύβους του περιβάλλοντος. Ομοίως, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση νεκρών εντόμων ή τεμαχιδίων εντόμων σε επεξεργασμένα προϊόντα, για τους ίδιους λόγους (Semple 1992, Anonymous 2000).



## 1.4.2 Μέθοδοι ανίχνευσης εντόμων και τμημάτων ή υπολειμμάτων τους

### 1.4.2.1 Μέθοδος επίπλευσης (Light filth Flotation Method / Cracking Flotation Method)

Η μέθοδος της επίπλευσης έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση των ξένων σωματιδίων μικρού μεγέθους και βάρους (light filth) που μολύνουν τα τρόφιμα, όπως έντομα, υπολείμματα ή/και τμήματα εντόμων και τον διαχωρισμό τους από τα υπόλοιπα συστατικά των τροφίμων. Η μέθοδος στηρίζεται στην διαφορά των επιφανειακών ιδιοτήτων των συστατικών των τροφίμων. Η επιφάνεια των ξένων σωματιδίων είναι λιπόφιλη, έτσι όταν το προς εξέταση τρόφιμο αναμιγνύεται με ένα μείγμα νερού και ελαίου, στο υδατικό διάλυμα που προκύπτει τα ξένα σωματίδια δεσμεύονται στην ελαιώδη φάση και επιπλέουν στην επιφάνεια με τα έλαια. Οι φυτικοί ιστοί και τα περισσότερα συστατικά των τροφίμων, από την άλλη, είναι σε μεγάλο βαθμό υδρόφιλα και παραμένουν στην υδατική φάση. Η βαρύτητα βοηθά περαιτέρω αυτή τη διαδικασία και τα μεγαλύτερα σωματίδια βυθίζονται. Στην συνέχεια η ελαιώδης φάση απομακρύνεται, διηθείται, συλλέγεται σε διηθητικό χαρτί και εξετάζεται με μικροσκόπιο για να προσδιοριστεί τόσο η ποσότητα, όσο και το είδος των ξένων σωματιδίων (FDA Office of Regulatory Affairs 2003, Dogan *et al.* 2010).

Αρχικά, η μέθοδος της επίπλευσης έβρισκε εφαρμογή μόνο στα άλευρα (Light filth Flotation Method) (Trematerra *et al.* 2011). Στην συνέχεια, έγινε εφικτή η ανίχνευση εντόμων και σε ολόκληρους κόκκους σιτηρών (Cracking Flotation Method). Στην περίπτωση αυτή οι κόκκοι των σιτηρών αλέθονται μέχρι να φτάσουν σε μέγεθος περίπου το 1,5 mm και να μπορέσουν τα έντομα που προσβάλλουν τους πυρήνες των κόκκων να ελευθερωθούν. Στη συνέχεια, οι αλεσμένοι κόκκοι αναμιγνύονται με ένα διάλυμα αλκοόλης και ελαίου, έτσι ώστε τα λιπόφιλα τμήματα των εντόμων να επιπλεύσουν στην επιφάνεια (Rajendran 2005, Dogan *et al.* 2010).

Η μέθοδος της επίπλευσης εξασφαλίζει μεγάλη ακρίβεια σε σύγκριση με άλλες διαθέσιμες μεθόδους και εκτός από τον πραγματικό αριθμό των εντόμων, παρέχει και το πλεονέκτημα της ανίχνευσης διαφόρων βιολογικών σταδίων που βρίσκονται στο υπό εξέταση δείγμα. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ένα επίπεδο ανίχνευσης προνυμφών της τάξεως του 95-97% (Perez-Mendoza *et al.* 2003, Perez-Mendoza *et al.* 2005, Rajendran 2005). Μειονέκτημα της όμως αποτελεί το γεγονός ότι πρόκειται για μια εξαιρετικά επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία που απαιτεί ακριβό εξοπλισμό.



Επίσης, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλές κατηγορίες επεξεργασμένων προϊόντων και ακόμα, δεν ανιχνεύει τα μη λιπόφιλα τμήματα των εντόμων (Perez-Mendoza *et al.* 2003, Bhuvaneswari *et al.* 2011).

#### 1.4.2.2 Φασματοσκοπία εγγύς υπερύθρου (Near-Infrared Spectroscopy)

Η φασματοσκοπία εγγύς υπερύθρου είναι μια μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της σύστασης ή των ιδιοτήτων πρώτων υλών ή προϊόντων, σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος αυτή αξιοποιεί την εγγύς υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, που ενεργειακά βρίσκεται μεταξύ του ορατού φάσματος και του υπερύθρου (από τα 800 έως τα 2500 nm). Η ακτινοβολία απορροφάται επιλεκτικά από υλικά του δείγματος που περιέχουν δεσμούς C-H (οργανικά υλικά), O-H (συμπεριλαμβανομένου του νερού), N-H (πρωτεΐνες), Si-H κλπ. Έτσι, τα υλικά αυτά χαρακτηρίζονται από χρώμα αόρατο για το ανθρώπινο μάτι, αλλά μετρήσιμο από ειδικά φωτόμετρα NIR. Τα σύγχρονα φωτόμετρα καταγράφουν την απορρόφηση συναρτήσει της συχνότητας του φωτός, την ψηφιοποιούν και την αποθηκεύουν ως μονοσήμαντη καταγραφή του υλικού. Η ακτινοβολία NIR απορροφάται ελάχιστα από τον αέρα και τα ανόργανα άνυδρα υλικά. Για τον λόγο αυτό, η συλλογή των φασμάτων μπορεί να γίνει εξ αποστάσεως, μέσω οπτικών ινών, ή με το δείγμα συσκευασμένο σε διαφανές γυάλινο δοχείο (Ανώνυμος 2001, Bhuvaneswari *et al.* 2011).

Το φάσμα ενός δείγματος μπορεί να χαρακτηρίζεται από πολλές ταινίες απορρόφησης οι οποίες εμφανίζονται σε συχνότητες που αντιστοιχούν στο είδος και το χημικό περιβάλλον των χημικών δεσμών που υπάρχουν στο δείγμα και έχουν ένταση που συναρτάται με την συγκέντρωσή τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά των υλικών του δείγματος αναλύονται σε ποιοτική ή ημιποσοτική πληροφορία με την εφαρμογή χημειομετρικών αλγορίθμων (Ανώνυμος 2001, Bhuvaneswari *et al.* 2011).

Η εγγύς υπέρυθρη ακτινοβολία μπορεί να διεισδύσει σε μεγαλύτερο βάθος σε ένα δείγμα υλικού και ως εκ τούτου είναι πολύ χρήσιμη για την εξέταση χύδην υλικών απαιτώντας μικρή ή καθόλου προετοιμασία του δείγματος. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή παρέχει την δυνατότητα συλλογής, με απλό και αυτοματοποιημένο τρόπο, φασμάτων υψηλής πιστότητας του μεταφερόμενου υλικού, υπολογισμού του μέσου όρου τους ανά τακτά χρονικά διαστήματα (τα οποία ανάλογα με την φύση του υλικού είναι συνήθως 30'' έως 2 λεπτά), επιτρέποντας τη συνεχή παρακολούθηση των διεργασιών



και εφαρμογής ειδικών αλγορίθμων χημειομετρίας για να παρέχει στον χρήστη γνωμάτευση σε πραγματικό χρόνο (Ανώνυμος 2001). Παρόλα αυτά, υστερεί τόσο σε ακρίβεια, όσο και σε ευαισθησία σχέση με την μέθοδο της επίπλευσης (Perez-Mendoza *et al.* 2003, Perez-Mendoza *et al.* 2005).

#### 1.4.2.3 Ανοσοενζυμική μέθοδος, Τεστ Elisa (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Η Elisa είναι μία μορφή ανοσοενζυμικής δοκιμής, η οποία βασίζεται στην μέθοδο της ανοσοπροσροφητικής ανάλυσης στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου, με σκοπό την ανίχνευση μίας ουσίας, συνήθως ενός αντιγόνου, σε ένα υγρό δείγμα. Η υλοποίηση μίας τέτοιας δοκιμής προϋποθέτει τουλάχιστον ένα αντίσωμα με εξειδίκευση σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Στην ανοσοενζυμική δοκιμή Elisa για την ανίχνευση εντόμων και τμημάτων ή υπολειμμάτων αυτών, χρησιμοποιούνται αντισώματα που μπορούν να δεσμεύονται ειδικά με την πρωτεΐνη των μυών των εντόμων, μυοσίνη, η οποία είναι κοινή σε όλα τα έντομα (Quinn *et al.* 1992).

Η δοκιμή Elisa διεξάγεται σε πλαστικές πλάκες που αποτελούνται από σειρές πολλαπλών κοιλοτήτων (πηγαδάκια). Σε πρώτο στάδιο, ένα δείγμα τροφίμου αναμιγνύεται με ένα υγρό εκχύλισης ώστε να διαλυτοποιηθεί κάθε τμήμα εντόμου που είναι παρόν και στη συνέχεια ένα κλάσμα αυτού του δείγματος χρησιμοποιείται στη δοκιμή. Έπειτα προστίθενται τα πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού τα οποία συνδέονται επιλεκτικά με την μυοσίνη, όπου αυτή υπάρχει, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα. Στην συνέχεια, ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο, προστίθεται στα πηγαδάκια. Αυτό το δεύτερο αντίσωμα δεσμεύεται επίσης επιλεκτικά με την μυοσίνη των εντόμων, όπου υπάρχει. Ανάμεσα σε κάθε στάδιο, η πλάκα πλένεται με ένα ήπιο διάλυμα απορρυπαντικού ώστε να απομακρυνθούν τυχόν πρωτεΐνες ή αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν. Μετά το τελικό στάδιο πλύσης, προστίθεται στην πλάκα ένα ενζυματικό υπόστρωμα για να παράγει ένα ορατό σήμα, το οποίο υποδεικνύει την ποσότητα της μυοσίνης στο δείγμα. Το σήμα αυτό είναι η αλλαγή χρώματος του υποστρώματος. Η ποσότητα του χρώματος στα πηγάδια μετράται με μια χρωματομετρική συσκευή ανάγνωσης Elisa και τα δεδομένα μπορούν είτε να εκτυπωθούν άμεσα ή να αποθηκευθούν για περαιτέρω ανάλυση και χειρισμό (Kitto *et al.* 1992, Brader *et al.* 2002).

Η ανοσοενζυμική δοκιμή Elisa είναι μία μέθοδος εξαιρετικά ακριβής και γρήγορη. Συγκεκριμένα, ο χρόνος που απαιτείται για την εκχύλιση και τον ποσοτικό



προσδιορισμό ενός δείγματος είναι λιγότερος από 1 ώρα (Brader *et al.* 2002). Επιπλέον, λόγω της μεγάλης εκλεκτικότητας της, παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσης ακόμα και των μικρότερων τμημάτων εντόμων που βρίσκονται στα αποθηκευμένα προϊόντα και μπορεί να δώσει μια πολύ πιο αξιόπιστη πρόβλεψη των κρυφών μολύνσεων. Ιδιαίτερης σημασίας, επίσης, είναι το γεγονός ότι μπορεί να εφαρμοστεί εξίσου καλά τόσο σε ολοκλήρους κόκκους σιτηρών, όσο και σε αλεσμένα υλικά (Kitto *et al.* 1992). Επιπρόσθετα, είναι σε θέση να ανιχνεύσει την πλειονότητα των εντόμων αποθηκών και τα αποτελέσματα είναι ανάλογα με το βάρος του κάθε εντόμου (Quinn *et al.* 1992, Brader *et al.* 2002). Μειονέκτημα, βέβαια, της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι δεν είναι σε θέση να καθορίσει ποια είναι τα είδη των εντόμων που ανιχνεύονται, ούτε και να ξεχωρίσει τα είδη της μυοσίνης, σε περιπτώσεις που η μυοσίνη μπορεί να προέρχεται από άλλα είδη όπως π.χ. τα τρωκτικά (Brader *et al.* 2002).

#### 1.4.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος με την οποία αντιγράφεται *in vitro*, κατά εκατομμύρια φορές, ένα τμήμα γονιδιακού δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) οποιασδήποτε προέλευσης. Πρόκειται δηλαδή για μια ενζυμική μέθοδο σύνθεσης γονιδιακού DNA (Coen 2009).

Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να ανιχνευτεί η παρουσία συγκεκριμένης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων ενός γονιδιακού τμήματος κάποιου εντόμου σε ένα βιολογικό δείγμα. Πρέπει, ωστόσο να είναι γνωστή η υπό διερεύνηση αλληλουχία, ώστε να σχεδιαστούν δύο συνθετικά DNA ολιγονουκλεοτίδια, το καθένα από τα οποία θα είναι συμπληρωματικό προς τα άκρα της αλληλουχίας της κάθε μίας από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά θα δράσουν ως εκκινητές (primers) και θα πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.

Ένας πλήρης κύκλος μιας αντίδρασης PCR περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
2. Πρόσδεση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
3. Επιμήκυνση των εκκινητών και σύνθεση DNA (extension)



Σε μια τυπική αντίδραση, οι δύο έλικες του υπό διερεύνηση DNA αποδιατάσσονται με μεταβολή της θερμοκρασίας. Αν η αλληλουχία υπάρχει, οι εκκινητές συνδέονται με την έλικα του DNA, ένας σε κάθε άκρο, καθώς βρίσκουν τις συμπληρωματικές βάσεις τους. Με τη χρησιμοποίηση του ενζύμου DNA-πολυμεράση και σχετική αφθονία νουκλεοτιδίων αρχίζει η σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων και στις δύο έλικες του DNA, με επέκταση της αλληλουχίας των εκκινητών. Όταν η σύνθεση ολοκληρωθεί, πάλι με μεταβολή της θερμοκρασίας, οι νεοσχηματισθείσες έλικες αποδεσμεύονται από την αρχική τους μήτρα. Με επανάληψη του κύκλου μεταβολών της θερμοκρασίας, το νέο DNA χρησιμεύει ως μήτρα για την προσκόλληση άλλων εκκινητών και τη σύνθεση νέων αλυσίδων. Με τον τρόπο αυτό η αρχική ποσότητα του DNA αυξάνει εκθετικά με κάθε επανάληψη του κύκλου.

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικές συσκευές που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cycler) και εναλλάσσουν τη θερμοκρασία βάσει προγραμματισμού. Η επιτυχία της αντίδρασης πιστοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση ενός μικρού κλάσματος προϊόντος της αντίδρασης σε πηκτική αгарόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αν και σαν μέθοδος είναι ακριβή, δίνει το πλεονέκτημα της πολύ μεγάλης ευαισθησίας αλλά και της ταχύτητας. Θεωρητικά, ένα μόνο μόριο DNA στο υπό διερεύνηση υλικό, ακόμα και DNA πολύ κακής ποιότητας (σπασμένο ή ακάθαρτο), αρκεί για να θετικοποιηθεί η δοκιμασία. Ωστόσο, αυτό είναι και το μειονέκτημα της μεθόδου, καθώς η παρουσία στο βιολογικό υλικό ελάχιστης ποσότητας προσμείξεων αρκεί για να δώσει η δοκιμασία ψευδές αποτέλεσμα (Mohini and Deshpande 2010).



### 1.5 Ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων και μυκοτοξινών στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.4, τις τελευταίες δεκαετίες έχει γίνει επιτακτική ανάγκη της παγκόσμιας βιομηχανίας τροφίμων, η διαβεβαίωση των καταναλωτών ότι τα τρόφιμα που καταναλώνουν είναι ασφαλή και ότι η παραγωγή ή η επεξεργασία τους έχει γίνει ακολουθώντας τα αποδεκτά πρότυπα ασφαλείας (Trematerra and Catalano 2010, Trematerra *et al.* 2011).

Γίνεται λοιπόν εύκολα κατανοητό ότι, η εφαρμογή των απαιτούμενων ελέγχων για την ανίχνευση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον, λαμβάνοντας υπόψη τις συνέπειες που επιφέρει στην υγεία των καταναλωτών η ύπαρξή τους στα προϊόντα τόσο της πρωτογενούς παραγωγής, όσο και στα βιομηχανικά προϊόντα. Όταν οι έλεγχοι διεξάγονται με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωση των προϊόντων με τα θεσμοθετημένα μέγιστα επιτρεπτά όρια, είναι ζωτικής σημασίας το τελικό αποτέλεσμα να εκφράζει την πραγματική τιμή ώστε οι μέθοδοι ανάλυσης να είναι ακριβείς, αξιόπιστες και επικυρωμένες (Gilbert and Anklam 2002). Η παρουσία στα τρόφιμα ενός αναγνωρισμένου μύκητα που παράγει τοξίνες, δεν σημαίνει απαραίτητα και την παραγωγή των τοξινών, διότι εμπλέκονται πολλοί παράγοντες στο σχηματισμό τους. Αντίστοιχα, η απουσία κάθε ορατού μυκηλίου (μούχλας) δεν εγγυάται και την απουσία τοξινών (Πετρωτός 2010).

Επομένως, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων και τεχνικών οι οποίες θα παρέχουν την δυνατότητα, όχι μόνο ανίχνευσης των μυκήτων που αναπτύσσονται και των μυκοτοξινών που παράγονται στα διατροφικά προϊόντα, αλλά και ποσοτικοποίησης τους (Abedi-Tizaki *et al.* 2012). Επιπλέον, το γεγονός ότι οι μυκοτοξίνες είναι τοξικές σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις απαιτεί ευαίσθητες και αξιόπιστες μεθόδους για την ανίχνευσή τους. Τέλος, εξαιτίας των διαφορετικών δομών της κάθε μυκοτοξίνης δεν υπάρχει μόνο μία τεχνική για την ανίχνευση όλων των μυκοτοξινών, αλλά αναπτύσσεται διαφορετική τεχνική ανάλογα με την κάθε μυκοτοξίνη και τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της (Πετρωτός 2010).

Οι κυριότερες μέθοδοι ανίχνευσης μυκοτοξινών στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα αναλύονται παρακάτω.



### 1.5.1 Ανοσοενζυμικές μέθοδοι

#### 1.5.1.1 Τεστ Elisa (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η Elisa είναι μία μορφή ανοσοενζυμικής δοκιμής, η οποία βασίζεται στην μέθοδο της ανοσοπροσροφητικής ανάλυσης στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου, με σκοπό την ανίχνευση μίας ουσίας, συνήθως ενός αντιγόνου, σε ένα υγρό δείγμα. Για την διεξαγωγή μίας ανοσοενζυμικής δοκιμής Elisa για την ανίχνευση μυκοτοξινών, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη αντισωμάτων, μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών, με εξειδίκευση ως προς την αναγνώριση και την δέσμευση σε συγκεκριμένες μυκοτοξίνες (Pascale 2009, Abedi-Tizaki *et al.* 2012). Η μέθοδος της Elisa περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 1.4.2.3.

Η ανοσοενζυμική δοκιμή Elisa προσφέρεται για ποιοτική, ημι-ποσοτική και ποσοτική ανάλυση των κυριότερων γνωστών μυκοτοξινών. Η χρήση της επιτρέπει την ποσοτική ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων μέσα σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα και με χαμηλό κόστος (Rai *et al.* 2012). Παρέχει επίσης το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτεί διαδικασίες καθαρισμού ή στάδια εμπλουτισμού και το εκχύλισμα που περιέχει την μυκοτοξίνη αναλύεται άμεσα. Αν και συχνά στερείται ακρίβειας σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και τα αποτελέσματα της περιορίζονται μόνο στην εξεταζόμενη περιοχή, χαρακτηρίζεται από ευκολία λειτουργίας και ευαισθησία. Ωστόσο, η παρεμβολή του μυκηλίου του μύκητα ή η παρουσία δομικώς σχετιζομένων μυκοτοξινών μπορεί να επηρεάσει τη σύνδεση με το αντίσωμα, οδηγώντας σε λάθη στις ποσοτικές μετρήσεις των μυκοτοξινών (Pascale 2009).

#### 1.5.1.2 Ανοσοχρωματογραφία (Lateral Flow Immunochromatography)

Η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος είναι γνωστή και ως γρήγορο τεστ πλευρικής ροής. Οι ανοσοχρωματογραφικές δοκιμασίες πραγματοποιούνται σε απλές συσκευές οι οποίες έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν την παρουσία ή την απουσία ενός στόχου στο υπό ανάλυση δείγμα, χωρίς την ανάγκη ύπαρξης εξειδικευμένου και ακριβού εξοπλισμού (Pascale 2009).

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ύπαρξη ενός υποστρώματος (χαρτί, νιτροκυτταρίνη ή ειδικό πολυμερές) το οποίο έχει την ικανότητα να μεταφέρει το βιολογικό υγρό με φυσικό τρόπο χρησιμοποιώντας την αρχή της διάχυσης. Σε ένα σημείο του



υποστρώματος βρίσκεται το αντιδραστήριο, το οποίο περιέχει αντισώματα ειδικά για την υπό ανίχνευση μυκοτοξίνη συζευγμένα με το χρωμοφόρο. Εάν το δείγμα είναι θετικό τα αντισώματα που είναι συζευγμένα με το χρωμοφόρο ενώνονται με την μυκοτοξίνη. Το σύμπλεγμα μυκοτοξίνης και αντισωμάτων συζευγμένων με το χρωμοφόρο, ρέει στην υπόλοιπη επιφάνεια του υποστρώματος. Μετά από λίγο όταν περισσότερα μόρια του διαλύματος διαβρέχουν την μεμβράνη του υποστρώματος, τα μόρια συσσωρεύονται και καθώς το πορώδες διαβρέχεται η περιοχή αλλάζει χρώμα (Rai *et al.* 2012).

#### 1.5.1.3 Ανοσοδοκιμασία πόλωσης φθορισμού (Fluorescence polarization immunoassay, FPIA)

Η ανοσοδοκιμασία πόλωσης φθορισμού είναι μια ομοιογενής μέθοδος που δεν απαιτεί στάδια διαχωρισμού ή καθαρισμού του δείγματος. Βασίζεται στην αύξηση της πόλωσης του φθορισμού ενός επισημασμένου με φθορίζουσα χρωστική αντιγόνου (ιχνηθέτη), όταν δεσμεύεται από ένα εξειδικευμένο αντίσωμα. Αν το υπό εξέταση δείγμα περιέχει το αντιγόνο (μυκοτοξίνη) ως αναλυόμενη ουσία, τότε αυτή θα ανταγωνιστεί τον ιχνηθέτη για τη σύνδεση με το αντίσωμα και το σήμα της πόλωσης θα μειωθεί (Smith and Eremin 2008, Rai *et al.* 2012).

Η αρχή του ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου είναι ότι μία φθορίζουσα χρωστική μπορεί να διεγερθεί από το επίπεδο πολωμένο φως στο κατάλληλο μήκος κύματος. Κατά κανόνα, ένα μικρό μόριο όταν βρίσκεται σε ένα διάλυμα, περιστρέφεται ταχύτερα από ένα μεγαλύτερο μόριο. Ο ρυθμός περιστροφής μπορεί να εκτιμηθεί μετρώντας την ένταση του φωτός στο οριζόντιο και κατακόρυφο επίπεδο. Γενικά, ο χρόνος που χρειάζεται ένα μόριο για να περιστραφεί μέσω μιας δεδομένης γωνίας αποτελεί ένδειξη του μεγέθους του. Όταν ένα μικρό μόριο που περιστρέφεται με ταχύτητα δεσμεύεται σε ένα μεγαλύτερο μόριο, ο ρυθμός περιστροφής μειώνεται και η μείωση αυτή μετρείται (Nielsen *et al.* 2000).

Λόγω της πρωτογενούς αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος, η αντίδραση χαρακτηρίζεται από ταχύτητα και απλότητα, γεγονός που κάνει εύκολο τον αυτοματισμό της και την καθιστά κατάλληλη για υψηλή απόδοση ελέγχου (Nielsen *et al.* 2000, Smith and Eremin 2008). Παρόλα αυτά, όταν στη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα δημητριακών παρατηρήθηκε μειωμένη ακρίβεια και ευαισθησία (Pascale 2009).



### 1.5.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

Η χρωματογραφία είναι η πιο διαδεδομένη εργαστηριακή τεχνική που προσφέρεται για την ανίχνευση και την ανάλυση των μυκοτοξινών. Χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των χρησιμοποιούμενων χρωματογραφικών τεχνικών είναι η διανομή των διαφόρων συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μίας κινητής και μιας στατικής φάσης. Η κινητή φάση είναι ένα υγρό (διαλύτης) ή ένα αέριο και η στατική φάση ένα στερεό ή υγρό υλικό προσρόφησης. Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος οφείλεται στο διαφορετικό χρόνο παραμονής του κάθε συστατικού στις δύο φάσεις, κάτι που με τη σειρά του εξαρτάται από τη συγγένεια των χημικών ουσιών με τις δύο φάσεις. Όσα συστατικά είναι πολύ διαλυτά στην κινητή φάση και προσροφώνται λίγο από την στατική φάση κινούνται γρηγορότερα, ενώ όσα προσροφώνται ισχυρά κινούνται πιο αργά. Το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός τους (Ettre 1993).

Οι χρωματογραφικές τεχνικές ταξινομούνται με βάση το μηχανισμό του διαχωρισμού και την πειραματική διαδικασία και είναι οι ακόλουθες.

#### 1.5.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin layer chromatography, TLC)

Η πιο παραδοσιακή και δημοφιλής μέθοδος για την ανίχνευση των μυκοτοξινών είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, διότι αναλύει μεγάλο αριθμό δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της είναι η χρήση μικρών πλακών, γυάλινων ή αλουμινένιων, επιστρωμένων με μια λεπτή στοιβάδα στατικής φάσης. Η στατική φάση είναι συνήθως οξείδιο του πυριτίου ή λιγότερο συχνά οξείδιο του αργιλίου (Berny 2005).

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, με την ιδιαίτερα υψηλή διαχωριστική της ικανότητα, χρησιμοποιείται κυρίως για ποιοτική ανάλυση μη πτητικών ενώσεων εξαιτίας της συντομίας και της απλότητάς της. Χρησιμοποιείται όμως ακόμη και για ποσοτική και ημι-ποσοτική ανάλυση των μυκοτοξινών, καθώς έχει χαμηλό κόστος λειτουργίας και παρέχει ευκολία στην ταυτοποίηση των ενώσεων-στόχων με τη χρήση ακτινοβολίας UV-Vis (Rai *et al.* 2012). Ωστόσο, κύρια προϋπόθεση για την ανάλυση οποιασδήποτε ουσίας με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι η προετοιμασία των δειγμάτων και ο προηγούμενος καθαρισμός τους (Πετρωτός 2010).



#### 1.5.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η πιο σύγχρονη μέθοδος ανίχνευσης των μυκοτοξινών βασίζεται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, η οποία αποτελεί εξέλιξη της χρωματογραφίας στήλης. Χαρακτηριστικό της γνώρισμα είναι η δυνατότητα αξιοποίησης διάφορων υλικών προσρόφησης (συνηθέστερα οξείδιο του πυριτίου και αλουμίνα), ανάλογα με τη φυσική και χημική δομή της μυκοτοξίνης (Rai *et al.* 2012).

Κατ' αυτήν, σε μία κάθετα τοποθετημένη στήλη, γεμάτη με κατάλληλο για τον επιθυμητό διαχωρισμό προσροφητικό υλικό, τοποθετείται το δείγμα και ακολουθεί έκλουση. Μία αντλία πιέζει τον διαλύτη προς την στήλη, με πιέσεις τάξεως μερικών χιλιάδων psi και στην συνέχεια το έκλουσμα περνά μέσα από ανιχνευτή, ο οποίος μετρά συνεχώς είτε τον δείκτη διαθλάσεως του υγρού, είτε την ειδική απορρόφηση (φασματοφωτόμετρο), είτε άλλο χαρακτηριστικό με άλλη διάταξη (φθορισμόμετρο, φασματοφωτόμετρο μάζας, αγωγιμόμετρο) το οποίο παρέχει ένα σήμα σε ένα καταγραφικό. Το καταγραφικό καταγράφει το σήμα (είτε απευθείας, είτε μέσω υπολογιστή) με τη μορφή εικόνας (Körpen *et al.* 2010).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων ουσιών ποικίλης προέλευσης. Λόγω της υψηλής πίεσης που ασκείται κατά την εφαρμογή, παρέχει το πλεονέκτημα του ταχύτατου διαχωρισμού και εξαιτίας της χρήσης λεπτόκοκκων υλικών προσρόφησης, προσφέρει μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού και μεγάλου βαθμού ομοιομορφία (Rai *et al.* 2012). Επίσης, μπορεί και να αυτοματοποιηθεί γεγονός το οποίο της προσφέρει ένα προβάδισμα σε σχέση με την TLC και την Elisa (Πετρωτός 2010).

#### 1.5.2.3 Αέρια χρωματογραφία (Gas chromatography, GC)

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά για την ανάλυση δειγμάτων τροφίμων. Επιτρέπει τον διαχωρισμό αερίων μιγμάτων με μια διαδοχική σειρά που αποκαθίστανται μεταξύ μιας αέριας κινητής φάσης και μιας υγρής ή στερεής στατικής φάσης που περιέχεται μέσα σε στήλη. Τα συστατικά του δείγματος, αφού διαχωριστούν, οδηγούνται στην συνέχεια σε έναν ανιχνευτή ο οποίος στέλνει ένα σήμα σε ένα καταγραφικό ανάλογα με την ένταση ανίχνευσης.



Με την αέρια χρωματογραφία δεν διαχωρίζονται μόνο ουσίες που είναι αέρια στην φυσική τους κατάσταση, αλλά οποιαδήποτε πτητική ουσία μπορεί να μετατραπεί σε αέριο με την άνοδο της θερμοκρασίας (υπό την προϋπόθεση πως η άνοδος της θερμοκρασίας δεν προκαλεί καταστροφή της ουσίας). Επίσης, με την αέρια χρωματογραφία παρέχεται η δυνατότητα ανάλυσης ακόμα και μη πτητικών ενώσεων, όπως είναι οι περισσότερες μυκοτοξίνες, εφόσον όμως προηγουμένως αυτές μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα με κατάλληλη αντίδραση (συνήθως πολυφλουοροακυλίωση). Η τεχνική αυτή πετυχαίνει πάρα πολύ καλούς διαχωρισμούς, ενώ η ικανότητα ανίχνευσης των αναλυόμενων συστατικών είναι πολύ μεγάλη. Η μετατροπή όμως των μη πτητικών ενώσεων σε άλλες ενώσεις (παράγωγα) και ο μεταγενέστερος διαχωρισμός τους αυξάνει όχι μόνο τον χρόνο ανάλυσης, αλλά και το σφάλμα της ανάλυσης (Πετρωτός 2010, Rai *et al.* 2012).

### **1.5.3 Φασματοφωμετρία μάζας (Mass Spectroscopy, MS)**

Η φασματοφωμετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων και στοιχείων. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης (Breci 2014).

Χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση μυκοτοξινών σε διατροφικά προϊόντα λόγω της υψηλής ακρίβειας και της αναλυτικής εξειδίκευσης που προσφέρει (Rai *et al.* 2012). Συνήθως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ή η αέρια χρωματογραφία (Di Mavungu 2009, Bullerman and Bianchini 2011). Οι περιοριστικοί παράγοντες στη χρήση της ως εργαλείο ανάλυσης είναι το υψηλό κόστος του εξοπλισμού, οι περίπλοκες εργαστηριακές απαιτήσεις και οι περιορισμοί στον τύπο των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην απομόνωση και το διαχωρισμό (Πετρωτός 2010).

### **1.5.4 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary electrophoresis, CE)**

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση αποτελεί την πλέον αυτοματοποιημένη και εξελιγμένη ηλεκτροφορητική τεχνική για την ανίχνευση και τον διαχωρισμό των μυκοτοξινών. Χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλες δυνατότητες αναλυτικού



διαχωρισμού, οι οποίες υπερτερούν ακόμη και έναντι καθιερωμένων χρωματογραφικών μεθόδων, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Rai *et al.* 2012).

Η βασική αρχή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης είναι η χρησιμοποίηση ενός τριχοειδούς σωλήνα από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου ως μέσο μεταφοράς. Ο σωλήνας μπορεί να είναι κενός ή να περιέχει κατάλληλο ηλεκτροφορητικό υλικό (πολυακρυλαμίδιο). Τα άκρα του τοποθετούνται σε δοχεία ηλεκτρολυτών που περιέχουν ηλεκτρόδια. Ένα τροφοδοτικό μηχάνημα παρέχει διαφορά δυναμικού στην περιοχή για να προκαλέσει μετακίνηση των μορίων. Μετά το διαχωρισμό, ο οποίος λαμβάνει χώρα μέσα στον τριχοειδή σωλήνα, τα κλάσματα ανιχνεύονται με οπτικό ανιχνευτή και οι πληροφορίες συλλέγονται από ηλεκτρονικό υπολογιστή υπό μορφή κορυφών σε ηλεκτροφόρημα (Böhs *et al.* 1995).

Η μέθοδος της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης προσφέρει το πλεονέκτημα των γρήγορων, ποσοτικών και επαναλήψιμων διαχωρισμών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευαισθησία. Επίσης, παρέχει την δυνατότητα αυτοματοποιημένης χρήσης για ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων (Rai *et al.* 2012).

#### **1.5.5 Ηλεκτρονικοί αισθητήρες / Ηλεκτρονικές μύτες (Electronic noses, ENs)**

Η ηλεκτρονική μύτη είναι μία ταχεία αναλυτική μέθοδος που παρέχει ποιοτικά και ημι-ποσοτικά αποτελέσματα και χρησιμοποιείται ευρέως και επιτυχώς στον έλεγχο της ποιότητας των τροφίμων. Αποτελείται από μια σειρά από μη-ειδικούς χημικούς ανιχνευτές που αλληλεπιδρούν με διαφορετικές πτητικές ενώσεις και παρέχουν σήματα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά ως δακτυλικό αποτύπωμα των πτητικών μορίων που προέρχονται από τα δείγματα που αναλύονται. Μετά την λήψη του δακτυλικού αποτυπώματος, καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός ή/και η ποσοτικοποίηση των πτητικών μορίων (οσμών) μέσω ενός συστήματος αναγνώρισης προτύπων (Campagnoli *et al.* 2011).

Η εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης επιτρέπει την αξιολόγηση των ποιοτικών αλλαγών στα σιτηρά και την αναγνώριση της παρουσίας μυκήτων ή/και μυκοτοξινών. Η μέθοδος προσφέρει επίσης την ικανότητα διάκρισης μεταξύ μη μολυσμένων δειγμάτων και δειγμάτων που έχουν μολυνθεί από διαφορετικά είδη ή διαφορετικά στελέχη μυκοτοξικογόνων μυκήτων, μέσω της ανάλυσης των παραγόμενων πτητικών δευτερογενών μεταβολιτών (Campagnoli *et al.* 2011, Rai *et al.* 2012).



### 1.5.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction)

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μία μέθοδος η οποία επιτρέπει την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro*, με τη χρήση κατάλληλων ενζύμων. Πρόκειται δηλαδή για μια ενζυμική μέθοδο σύνθεσης γονιδιακού DNA (Coen 2009). Με τη μέθοδο της PCR μια συγκεκριμένη περιοχή ενός γονιδιακού τμήματος, οποιασδήποτε προέλευσης, είναι δυνατό να ανιχνευθεί και να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία ώστε να σχεδιαστούν τα συνθετικά DNA ολιγονουκλεοτίδια τα οποία θα δράσουν ως εκκινητές (primers) και θα καθορίσουν τα άκρα του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (Paterson 2006). Η μέθοδος της PCR περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 1.4.2.4.

Η χρήση της PCR έφερε επανάσταση στον τομέα της ανίχνευσης των μυκοτοξινών. Με τη μέθοδο αυτή και τις ποικίλες εφαρμογές της (Reverse Transcription PCR, Nested PCR, AFPL assay, RAPD, Real Time PCR) κατέστη δυνατή η απομόνωση και η σύγκριση της γονιδιωματικής αλληλουχίας του DNA των μυκοτοξικογόνων μυκήτων. Το γεγονός αυτό, επέτρεψε όχι μόνο την αναγνώριση των ειδών που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των μυκοτοξινών, αλλά επίσης και τον καθορισμό των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση των μυκοτοξινών (Abedi-Tizaki *et al.* 2012, Rai *et al.* 2012). Παρόλα αυτά η PCR από μόνη της δεν αποτελεί μέθοδο ανίχνευσης των μυκοτοξινών. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι η PCR επιτρέπει την ανίχνευση γονιδίων που βρίσκονται σε ένα δείγμα, χωρίς όμως να καθορίζει εάν τα εν λόγω γονίδια εκφράζονται ή όχι (Paterson 2006).

Η PCR αν και σαν μέθοδος είναι ακριβή, προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών μεθόδων ανίχνευσης δεδομένου ότι παρέχει ταυτόχρονα εξαιρετική ευαισθησία και ταχύτητα. Επιπλέον, δεν απαιτεί την προηγούμενη καλλιέργεια των μυκήτων (Shapira *et al.* 1996, Paterson 2006). Θεωρητικά, ένα και μόνο μόριο DNA στο υπό διερεύνηση δείγμα, ακόμα και κακής ποιότητας ή ακάθαρτο, είναι αρκετό. Ωστόσο, αυτό αποτελεί και το μεγάλο μειονέκτημα της μεθόδου, καθώς η παρουσία στο δείγμα έστω και ελάχιστης ποσότητας προσμείξεων (ξένου DNA) αρκεί για να δώσει η δοκιμασία ψευδές αποτέλεσμα (Mohini and Deshpande 2010).



### **1.6. Σκοπός της παρούσας μελέτης**

Με βάση τα όσα έχουν αναφερθεί παραπάνω, ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση μεθόδων που σχετίζονται με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση εντόμων και μυκήτων σε αμυλούχα προϊόντα. Συγκεκριμένα, η εργασία αυτή στοχεύει:

1. Στη διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης των μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση εντόμων και μυκήτων σε επίπεδο είδους.
2. Στην δημιουργία μιας μεθόδου που θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ευρύ κύκλο περιπτώσεων, καθώς και σε διάφορα προϊόντα.
3. Στη διερεύνηση της ευαισθησίας στην ανίχνευση των μεθόδων που αναπτύχθηκαν.



## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Ανάπτυξη των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες

Η ανάπτυξη των υγιών φυτών σκληρού και μαλακού σίτου, σίκαλης, βρώμης, κριθαριού καθώς και αραβόσιτου που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, πραγματοποιήθηκε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο του εργαστηρίου της Φυτοπαθολογίας, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Για την διασφάλιση της ύπαρξης καθαρού γενετικού υλικού, χωρίς ξένες προσμίξεις (π.χ. λόγω προσβολής από έντομα ή μύκητες), λήφθηκαν σπόροι των παραπάνω φυτών από το εργαστήριο Γεωργίας και Εφαρμοσμένης Φυσιολογίας Φυτών, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, οι οποίοι φυτεύτηκαν σε πειραματικές γλάστρες και αναπτύχθηκαν σε καλά φωτιζόμενο και αεριζόμενο χώρο. Τα φυτά διατηρήθηκαν μέχρι το στάδιο των δύο πραγματικών φύλλων, όπου και κόπηκαν για αποθήκευση στην κατάψυξη, στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

### 2.2 Εκτροφή των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες

Η εκτροφή των εντόμων *S. oryzae*, *S. granarius*, *S. zeamais*, *R. dominica*, *T. castaneum* και *T. confusum* που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί ή/και αρνητικοί μάρτυρες στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκε η διατήρηση καθαρών εκτροφών των εντόμων σε συνθήκες περιβάλλοντος. Από τις εκτροφές αυτές συλλέχθηκαν ζωντανά, ακμαία έντομα του κάθε είδους, τα οποία διατηρήθηκαν για τους σκοπούς του πειράματος στην κατάψυξη, στους -20°C.



## 2.3 Απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού

### 2.3.1 Απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού φυτών

Η απομόνωση του ολικού DNA των υγιών φυτών σκληρού και μαλακού σίτου, σίκαλης, βρώμης, κριθαριού καθώς και καλαμποκιού που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, βασίστηκε στις μεθόδους που περιγράφονται από τους Doyle and Doyle (1990) και Lodhi *et al.* (1994).

Αρχικά, 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος CTAB Isolation buffer (2% Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB: Sigma H-5882), 1.4 M NaCl, 0.2% 2-mercaptoethanol, 0.02 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0) τοποθετήθηκαν σε McCartney universal bottles (Chapman) των 28 ml και προθερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο (Mettler) στους 60°C για 30 min. Στην συνέχεια, περίπου 1 gr φυτικού ιστού τοποθετήθηκε σε προψυγμένο γουδί και λειοτριβήθηκε με την προσθήκη υγρού αζώτου (N<sub>2</sub>) μέχρις ότου να αποκτήσει την μορφή σκόνης. Έπειτα, ο αλεσμένος φυτικός ιστός προστέθηκε στο McCartney universal bottle με τα θερμασμένα 4 ml του ρυθμιστικού διαλύματος CTAB Isolation buffer, μαζί με 50 mg polyvinylpyrrolidone (PVPP) (Sigma-Aldrich) και αφού το διάλυμα αναστράφηκε και αναμίχθηκε μέχρι ομογενοποίησης, επώαστηκε στους 60°C για 25 min. Μετά την θέρμανση, το διάλυμα διαχωρίστηκε σε ποσότητες των 500 μl, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε tubes των 2 ml (Eppendorf). Ακολούθησε καθαρισμός του διαλύματος με μίγμα φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1, v:v) [προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1, v:v) με το διάλυμα (δηλ. 250 μl φαινόλη και 250 μl χλωροφόρμιο), ελαφριά ανάδευση με αναστροφή ώστε να δημιουργηθεί γαλάκτωμα, φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 5 min (Eppendorf Centrifuge 5417R) και μεταφορά του υπερκείμενου (υδατική φάση, 500 μl) σε νέο tube των 2 ml]. Στην υδατική φάση που παραλήφθηκε προστέθηκε μισός όγκος (0.5 vol.) χλωριούχου νατρίου (NaCl) 5 M (δηλ. 250 μl), το διάλυμα αναδεύτηκε ελαφριά και στην συνέχεια προστέθηκαν δύο όγκοι (2 vol.) παγωμένης (-20°C) αιθανόλης 95% (EtOH) (Riedel-de Haën) (δηλ. 1 ml), το διάλυμα αναδεύτηκε ξανά ώστε να καθιζάνουν τα νουκλεϊκά οξέα και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη, στους -20°C για 1 h. Μετά την έξοδο από την κατάψυξη, ακολούθησε φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 13000 rpm για 10 min, απομάκρυνση του υπερκείμενου (υδατική φάση) και διατήρηση του ιζήματος (pellet). Εν συνεχεία, το ίζημα πλύθηκε με παγωμένη (-20°C) αιθανόλη 70% (EtOH)



[προσθήκη 1 ml EtOH 70%, φυγοκέντρωση στα 13000 rpm για 5 min, απομάκρυνση της EtOH και διατήρηση του ιζήματος] και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστούν τελείως και τα υπολείμματα της EtOH. Κατόπιν, το ίζημα διαλύθηκε σε 100 µl αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό (DEPC-treated water) (Invitrogen) και επώαστηκε με 1 µl RNase A (50µg/ml) (Marcherey) σε θερμοκλωβό (Bioline) στους 37°C για 30 min. Μετα το τέλος της πέψης, ακολούθησε καθαρισμός του διαλύματος με μίγμα φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1, v:v) όπως περιγράφηκε προηγουμένως [προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1, v:v) με το διάλυμα (δηλ. 50 µl φαινόλη και 50 µl χλωροφόρμιο), ελαφριά ανάδευση με αναστροφή ώστε να δημιουργηθεί γαλάκτωμα, φυγοκέντρωση στα 13000 rpm για 5 min και μεταφορά του υπερκείμενου (υδατική φάση, 100 µl) σε νέο tube των 2 ml]. Ο καθαρισμός επαναλήφθηκε για ακόμα μία φορά και στη συνέχεια το DNA στο διάλυμα κατακρημνίστηκε με προσθήκη 1/10 όγκου (0.1 vol.) οξικού νατρίου (NaAc) 3 M, pH 5.5 (δηλ. 10 µl) και δυνάμηση όγκων (2.5 vol.) παγωμένης (-20°C) αιθανόλης 100% (EtOH) (δηλ. 250 µl), ανάδευση και παραμονή στην κατάψυξη, στους -20°C για 1-1<sup>1/2</sup> h. Μετά την έξοδο από την κατάψυξη, ακολούθησε φυγοκέντρωση του διαλύματος στα 13000 rpm για 10 min, απομάκρυνση του υπερκείμενου και διατήρηση του ιζήματος. Έπειτα, το ίζημα πλύθηκε δύο φορές με παγωμένη (-20°C) αιθανόλη 70% (EtOH) και μία φορά παγωμένη (-20°C) αιθανόλη 100% αιθανόλη (EtOH), όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τέλος, το ίζημα που προέκυψε από τις πλύσεις επαναδιαλύθηκε σε 100 µl αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό (DEPC-treated water) και το δείγμα αποθηκεύθηκε στην κατάψυξη, στους -20°C.



### 2.3.2 Απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού εντόμων

Η απομόνωση του ολικού DNA των εντόμων *S. oryzae*, *S. granarius*, *S. zeamais*, *R. dominica*, *T. castaneum* και *T. confusum* που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί αλλά και ως αρνητικοί μάρτυρες (αναλόγως της περίπτωσης) στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, βασίστηκε στο ίδιο πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω (Doyle and Doyle 1990, Lodhi *et al.* 1994), με ορισμένες όμως τροποποιήσεις που επέτρεψαν τον ευκολότερο χειρισμό του υλικού.

Αρχικά, ζυγίστηκαν 10 έντομα από κάθε είδος και καταγράφηκε το βάρος τους, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4). Στην συνέχεια, τα 10 έντομα κάθε είδους τοποθετήθηκαν σε προψυγμένο tube των 2 ml (Eppendorf). και λειοτριβήθηκαν με την προσθήκη υγρού αζώτου (N<sub>2</sub>) μέχρι να αποκτήσουν την μορφή ομογενοποιημένης σκόνης. Έπειτα, στον αλεσμένο ιστό προστέθηκαν 600μl θερμασμένου ρυθμιστικού διαλύματος CTAB Isolation buffer (2% Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB: Sigma H-5882), 1.4 M NaCl, 0.2% 2-mercaptoethanol, 0.02 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0), μαζί με 10 mg polyvinylpyrrolidone (PVPP) (Sigma-Aldrich) και αφού το διάλυμα αναστράφηκε και αναμίχθηκε μέχρι ομογενοποίησης, επώαστηκε στους 60°C για 25 min. Μετά την θέρμανση, το διάλυμα δεν διαχωρίστηκε περαιτέρω και το υπόλοιπο πρωτόκολλο ακολουθήθηκε ακριβώς όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Πίνακας 4. Βάρη εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες

Είδος εντόμου	Βάρος 10 εντόμων
<i>Sitophilus oryzae</i>	0.033g
<i>Sitophilus granarius</i>	0.036g
<i>Sitophilus zeamais</i>	0.034g
<i>Rhyzopertha dominica</i>	0.025
<i>Tribolium castaneum</i>	0.027
<i>Tribolium confusum</i>	0.028



### 2.3.3 Απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού αλεύρου σκληρού σίτου επιμολυσμένου τεχνητά με έντομα

Η απομόνωση του ολικού DNA των τεχνητά επιμολυσμένων, με έντομα *S. oryzae*, *S. granarius* και *S. zeamais*, δειγμάτων αλευριού πραγματοποιήθηκε επίσης βασισμένη στο πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.3.1 (Doyle and Doyle 1990, Lodhi *et al.* 1994), με ορισμένες όμως τροποποιήσεις που σκοπό είχαν την διευκόλυνση χειρισμού του υλικού και τον αποτελεσματικότερο καθαρισμό του.

Αρχικά, ζυγίστηκε 1gr καθαρού αλευριού σκληρού σίτου. Στην συνέχεια, υπολογίστηκε το βάρος των εντομών κάθε είδους που αντιστοιχεί σε κάθε ένα από τα ποσοστά της τεχνητής μόλυνσης του 1gr καθαρού αλευριού (5, 1, 0.5, 0.1 και 0.05% w/w) και ζυγίστηκαν έντομα στα αντίστοιχα βάρη (Πίνακας 5). Έπειτα, τα δείγματα του 1gr καθαρού αλευριού μαζί με τα έντομα που αντιστοιχούσαν σε κάθε ποσοστό τοποθετήθηκαν σε προψυγμένο γουδί και λειοτριβήθηκαν με την προσθήκη υγρού αζώτου (N<sub>2</sub>) μέχρι να αποκτήσουν την μορφή ομογενοποιημένης σκόνης. Εν συνεχεία, 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος CTAB Isolation buffer (2% Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB: Sigma H-5882), 1.4 M NaCl, 0.2% 2-mercaptoethanol, 0.02 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0) που είχαν προθερμανθεί στους 60°C για 30 min και 50 mg polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (Sigma-Aldrich), προστέθηκαν μαζί με το αλεσμένο δείγμα σε McCartney universal bottles και αφού το διάλυμα αναστράφηκε και αναμίχθηκε μέχρι ομογενοποίησης, επώαστηκε στους 60°C για 25 min. Μετά την θέρμανση, το διάλυμα διαχωρίστηκε σε 10 επιμέρους ποσότητες των 500 µl, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε tubes των 2 ml (Eppendorf). Ακολούθησε καθαρισμός του διαλύματος με μίγμα φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1, v:v) [προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1, v:v) με το διάλυμα (δηλ. 250 µl φαινόλη και 250 µl χλωροφόρμιο), ελαφριά ανάδευση με αναστροφή ώστε να δημιουργηθεί γαλάκτωμα, φυγοκέντρωση στα 13000 rpm για 5 min (Eppendorf Centrifuge 5417R) και μεταφορά του υπερκείμενου (υδατική φάση, 500 µl) σε νέο tube των 2 ml]. Στην υδατική φάση που παραλήφθηκε προστέθηκε μισός όγκος (0.5 vol.) χλωριούχου νατρίου (NaCl) 5 M (δηλ. 250 µl), το διάλυμα αναδεύτηκε ελαφριά και στην συνέχεια προστέθηκαν δύο όγκοι (2 vol.) παγωμένης (-20°C) αιθανόλης 95% (EtOH) (Riedel-de Haën) (δηλ. 1 ml), το διάλυμα αναδεύτηκε ξανά ώστε να καθιζάνουν τα νουκλεϊκά οξέα και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη, στους -20°C για 1 h. Μετά την έξοδο από την κατάψυξη, ακολούθησε φυγοκέντρωση του διαλύματος στα 13000 rpm για 10 min, απομάκρυνση του υπερκείμενου (υδατική φάση) και



διατήρηση του ιζήματος (pellet). Εν συνεχεία, το ίζημα πλύθηκε με παγωμένη (-20°C) αιθανόλη 70% (EtOH) [προσθήκη 1 ml EtOH 70%, φυγοκέντρωση στα 13000 rpm για 5 min, απομάκρυνση της EtOH και διατήρηση του ιζήματος] και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστούν τελείως και τα υπολείμματα της EtOH. Κατόπιν, το ίζημα διαλύθηκε σε 100 µl αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό (DEPC-treated water) (Invitrogen) και τα 10 επιμέρους υποδείγματα ενώθηκαν σε 1, το οποίο μεταφέρθηκε σε νέο tube των 2 ml (Eppendorf). Ακολούθησε επώαση του δείγματος με 10 µl RNase A (50µg/ml) (Marcherey) και 2.5 µl proteinase K (1µl /400 µl) σε θερμοκλωβό (Bioline) στους 50°C για 2h, ώστε να απομακρυνθούν από το γενετικό υλικό όσο το δυνατόν περισσότερες πρωτεΐνες εξαιτίας του αλεύρου. Μετα το τέλος της πέψης, το υπόλοιπο πρωτόκολλο ακολουθήθηκε χωρίς καμία επιπλέον τροποποίηση, ακριβώς όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.3.1.

Πίνακας 5. Βάρη εντόμων που αντιστοιχούν σε καθένα ποσοστό μόλυνσης

Είδος εντόμου	Ποσοστό μόλυνσης σε 1g αλευριού	Βάρος εντόμων που αντιστοιχεί στο ποσοστό
<i>Sitophilus oryzae</i>	5% w/w	0.05g
	1% w/w	0.01g
<i>Sitophilus granarius</i>	0.5% w/w	0.005g
<i>Sitophilus zeamais</i>	0.1% w/w	0.001g
	0.05% w/w	0.0005g



#### 2.3.4 Απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού τυφλών δειγμάτων αλεύρων

Η απομόνωση του ολικού DNA των τυφλών δειγμάτων αλεύρων (αλεύρι πολύσπορο, αλεύρι ολικής άλεσης και αλεύρι μαλακού σίτου) πραγματοποιήθηκε επίσης βασισμένη στο πρωτόκολλο των Doyle and Doyle (1990) και Lodhi *et al.* (1994).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.3.1, με μοναδική τροποποίηση το ότι στο στάδιο της επώασης με την RNase A (50μg/ml) (Marcherey) πραγματοποιήθηκε και μια επιπλέον επώαση με 2.5 μl proteinase K (1μl /400 μl) σε θερμοκλωβό (Bioline) στους 50°C για 2h συνολικά, ώστε να απομακρυνθούν από το γενετικό υλικό όσο το δυνατόν περισσότερες πρωτεΐνες εξαιτίας του αλεύρου.

#### 2.4 Υπολογισμός ποσότητας και καθαρότητας γενετικού υλικού

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του ολικού DNA, υπολογίστηκε η ποσότητα και η καθαρότητα του βάσει της απορρόφησης του σε μήκος κύματος 260 και 280 nm στο φασματοφωτόμετρο (Uvikon 922). Απορρόφηση στα 260nm ( $OD_{260}$ ) ίση με τη μονάδα αντιστοιχεί σε 50ng/μl διπλής έλικας DNA. Για την μέτρηση της ποσότητας του ολικού DNA των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε αραίωση των δειγμάτων 1/20 (λήψη 5μl από το δείγμα και προσθήκη 95μl αποστειρωμένου-απιονισμένου νερού (DEPC-treated water)) και μέτρηση της απορρόφησης των υδατικών διαλυμάτων στα 260nm ( $A_{260}$ ), στο φασματοφωτόμετρο. Συνεπώς, η συγκέντρωση των υδατικών διαλυμάτων δίνεται από την σχέση  $C_{υδ. \delta/τος} (ng/μl) = 50 * A_{260}$  ή . Αντιστοίχως, η συγκέντρωση των δειγμάτων δίνεται από την σχέση  $C_{δείγματος} (ng/μl) = 50 * 20 * A_{260} = 1000 * A_{260}$ . Η καθαρότητα των δειγμάτων προκύπτει από το λόγο  $A_{260}/A_{280}$  και οι αποδεκτές τιμές καθαρότητας του ολικού DNA είναι μεταξύ 1.8 και 2.0 (Sambrook and Russell 2001).

Η ποσότητα και η καθαρότητα του ολικού DNA των υγιών φυτών, των εντόμων και των τεχνητά επιμολυσμένων δειγμάτων αλευριού παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6).



Πίνακας 6. Ποσότητα και καθαρότητα του ολικού DNA των υλικών του πειράματος

Είδος	Ποσότητα DNA (ng/μl)	Καθαρότητα
<b>Υγιή φυτά</b>	Σκληρός σίτος	365 ng/μl
	Μαλακός σίτος	62.9 ng/μl
	Σίκαλη	52.6 ng/μl
	Βρώμη	178 ng/μl
	Κριθάρι	112.5 ng/μl
	Καλαμπόκι	129 ng/μl
<b>Έντομα</b>	<i>Sitophilus oryzae</i>	76.8 ng/μl
	<i>Sitophilus granarius</i>	71.2 ng/μl
	<i>Sitophilus zeamais</i>	69.7 ng/μl
	<i>Rhyzopertha dominica</i>	57.9 ng/μl
	<i>Tribolium castaneum</i>	63.5 ng/μl
	<i>Tribolium confusum</i>	72.6 ng/μl
<b>Τεχνητή Μόλυνση με <i>Sitophilus oryzae</i></b>	1g αλεύρι και 5% w/w <i>S. oryzae</i>	50.4 ng/μl
	1g αλεύρι και 1% w/w <i>S. oryzae</i>	45.6 ng/μl
	1g αλεύρι και 0.5% w/w <i>S. oryzae</i>	48.3 ng/μl
	1g αλεύρι και 0.1% w/w <i>S. oryzae</i>	47.6 ng/μl
	1g αλεύρι και 0.05% w/w <i>S. oryzae</i>	41.3 ng/μl
<b>Τεχνητή Μόλυνση με <i>Sitophilus</i></b>	1g αλεύρι και 5% w/w <i>S. granarius</i>	44.7 ng/μl
	1g αλεύρι και 1% w/w <i>S. granarius</i>	42.1 ng/μl



<i>granarius</i>	1g αλεύρι και 0.5% w/w <i>S. granarius</i>	39.7 ng/μl	1.89
	1g αλεύρι και 0.1% w/w <i>S. granarius</i>	47.3 ng/μl	1.92
	1g αλεύρι και 0.05% w/w <i>S. granarius</i>	49.6 ng/μl	1.87
<b>Τεχνητή Μόλυνση με <i>Sitophilus</i> <i>zeamais</i></b>	1g αλεύρι και 5% w/w <i>S. zeamais</i>	49.8 ng/μl	1.86
	1g αλεύρι και 1% w/w <i>S. zeamais</i>	44.6 ng/μl	2
	1g αλεύρι και 0.5% w/w <i>S. zeamais</i>	40.1 ng/μl	1.92
	1g αλεύρι και 0.1% w/w <i>S. zeamais</i>	50.1 ng/μl	1.9
	1g αλεύρι και 0.05% w/w <i>S. zeamais</i>	45.2 ng/μl	1.76
<b>Τυφλά Δείγματα αλεύρων</b>	Αλεύρι πολύσπορο	48.1 ng/μl	1.81
	Αλεύρι ολικής άλεσης	48.7 ng/μl	1.86
	Αλεύρι μαλακού σίτου	49.4 ng/μl	1.94



## 2.5 Επιλογή εκκινητών για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

### 2.5.1 Επιλογή εκκινητών για την ανίχνευση εντόμων αποθηκών

Η επιλογή των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης έγινε βάση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας σχετικά με την μοριακή ανίχνευση των εντόμων αποθηκών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV, COIISG1 / COIISG2 και COI-SZ-FWD / COI-SZ-REV, τα οποία ανιχνεύουν τα έντομα *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius* και *Sitophilus zeamais*, αντίστοιχα (Obrepalska-Stepłowska *et al.* 2008, Corrêa *et al.* 2013). Τα ζεύγη εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV και COI-SZ-FWD / COI-SZ-REV ανιχνεύουν και ενισχύουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) της υπομονάδας I της Οξειδάσης του κυτοχρώματος C (COI ή MT-COI) (Corrêa *et al.* 2013), ενώ το ζεύγος COIISG1 / COIISG2 ανιχνεύει και ενισχύει μία συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) της υπομονάδας II της Οξειδάσης του κυτοχρώματος C (COII ή MT-COII) (Obrepalska-Stepłowska *et al.* 2008).

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 (alias A-tLeu) / TK-N-3785 (alias B-tLys) (Liu and Beckenbach 1992, Simon *et al.*, 1994) το οποίο, βάση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, είναι ικανό να ανιχνεύσει οποιοδήποτε είδος εντόμου και έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα για την ανίχνευση και τον γενετικό προσδιορισμό ατόμων από πέντε διαφορετικές τάξεις εντόμων (Simon *et al.* 1994). Το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 (alias A-tLeu) / TK-N-3785 (alias B-tLys) ανιχνεύει και ενισχύει ολόκληρη την περιοχή κωδικοποίησης του γονιδίου COII (υπομονάδα II της Οξειδάσης του κυτοχρώματος C). Συγκεκριμένα, ο εκκινητής TL2-J-3037 ανιχνεύει και ενισχύει την περιοχή κωδικοποίησης tRNA<sup>Leu</sup>, ενώ ο εκκινητής TK-N-3785 ανιχνεύει και ενισχύει την περιοχή κωδικοποίησης tRNA<sup>Lys</sup> (Simon *et al.* 1994, Jenkins *et al.* 2002, Robe *et al.* 2005).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύει το κάθε ζεύγος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7).



Πίνακας 7. Ζεύγη εκκινητών, αλληλουχίες και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων

Είδος εντόμου που ανιχνεύεται	Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>Sitophilus oryzae</i>	COI-SO- FWD	AGTTTGCTAATTCGGGCAGA	950
	COI-SO- REV	ACTCCGGTTAATCCTCCAAT	
<i>Sitophilus granarius</i>	COIISG1	TGATAACCGAACACCAATTCCC	125
	COIISG2	TTAGACGACCAGGTGTTCCGTC	
<i>Sitophilus oryzae</i>	COI-SO- FWD	AGTTTGCTAATTCGGGCAGA	950
	COI-SO- REV	ACTCCGGTTAATCCTCCAAT	
Όλα τα είδη εντόμων (universal)	TL2-J- 3037	ATGGCAGATTAGTGCAATGG	684
	TK-N-3785	GTTTAAGAGACCAGTACTTG	



### 2.5.2 Επιλογή εκκινητών για την ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων

Η επιλογή των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης έγινε βάση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας σχετικά με την μοριακή ανίχνευση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών pksCT-Mp-3\_for / pksCT-Mp-3\_rev, otapksPV\_for / otapksPV\_rev, FLAVIQ1 / FLAVIQ2 και FLAVIQ1 / PARQ2, τα οποία ανιχνεύουν τους μύκητες *Penicillium verrucosum* (1<sup>ο</sup> και 2<sup>ο</sup> ζεύγος), *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*, αντίστοιχα (Schmidt-Heydt *et al.* 2008, Sardiñas *et al.* 2011). Τα ζεύγη εκκινητών pksCT-Mp-3\_for / pksCT-Mp-3\_rev και otapksPV\_for / otapksPV\_rev ανιχνεύουν και ενισχύουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του γονιδίου της συνθάσης του πολυκετιδίου της ωχρατοξίνης A, που παράγεται από τον μύκητα *Penicillium verrucosum* (Schmidt-Heydt *et al.* 2008). Τα ζεύγη εκκινητών FLAVIQ1 / FLAVIQ2 και FLAVIQ1 / PARQ2 σχεδιάστηκαν βασισμένα στην αλληλούχιση της μη μεταγραφόμενης περιοχής ITS2 του ριβοσωμικού DNA των μυκήτων *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*, αντίστοιχα (Sardiñas *et al.* 2011). Οι αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύει το κάθε ζεύγος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Ζεύγη εκκινητών, αλληλουχίες και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων

Είδος μύκητα που ανιχνεύεται	Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>Penicillium verrucosum</i>	pksCT-Mp-3_for	CCAAGCGGCGGACAGTG	616
	pksCT-Mp-3_rev	TGCAGCAGGGGAAGTAGG	
<i>Penicillium verrucosum</i>	otapksPV_for	CCGCAGGAAGGATCACGAAGAA	415
	otapksPV_rev	TCCTACTTCCCCTGCTGCAAATCA	
<i>Aspergillus flavus</i>	FLAVIQ1	GTCGTCCCCCTCTCCGG	100
	FLAVIQ2	CTGGAAAAAGATTGATTTGCG	
<i>Aspergillus parasiticus</i>	FLAVIQ1	GTCGTCCCCCTCTCCGG	100
	PARQ2	GAAAAAATGGTTGTTTTGCG	



## 2.6 Υπολογισμός της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού

### 2.6.1 Υπολογισμός της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για την ανίχνευση εντόμων αποθηκών

Για τον υπολογισμό της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού (θερμοκρασία κατά την διάρκεια της οποίας οι εκκινητές υβριδίζουν με το DNA στόχο, annealing temperature), για το κάθε ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των εντόμων αποθηκών, χρησιμοποιήθηκε ο εμπειρικός τύπος του  $T_m$ ,  $T_m$  (melting temperature) =  $2 (A + T) + 4 (C + G)$ . Οι PCR όμως που πραγματοποιήθηκαν με τις θερμοκρασίες υβριδισμού που προέκυψαν από τον τύπο αυτό για κάθε ζεύγος εκκινητών, δεν έδωσαν κανένα αποτέλεσμα, ούτε καν για τους θετικούς μάρτυρες.

Για τον λόγο αυτό, για την εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το κάθε ζεύγος εκκινητών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της βαθμιαίας PCR (Gradient PCR). Η βαθμιαία PCR είναι μια τεχνική που επιτρέπει την αξιολόγηση έως και 12 διαφορετικών θερμοκρασιών υβριδισμού σε μία μόνο αντίδραση. Σε θερμοκυκλοποιητή (Mastercycler gradient, Eppendorf) τοποθετήθηκαν στην σειρά 12 PCR tubes, που περιείχαν ολικό DNA των εντόμων *S. oryzae*, *S. granarius* και *S. zeamais*, ανά περίπτωση. Χρησιμοποιώντας τη λειτουργία διαβάθμισης της θερμοκρασίας, τέθηκε ως κεντρική θερμοκρασία αυτή των 50°C με διαβάθμιση της θερμοκρασίας κατά 10°C εκατέρωθεν, για τα ζεύγη εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV και COI-SZ-FWD / COI-SZ-REV, ενώ για το ζεύγος εκκινητών COIISG1 / COIISG2 τέθηκε ως κεντρική θερμοκρασία αυτή των 65°C με διαβάθμιση της θερμοκρασίας κατά 5°C εκατέρωθεν.

Η μέθοδος της βαθμιαίας PCR, χρησιμοποιήθηκε επίσης και για την εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785. Στην περίπτωση του συγκεκριμένου ζεύγους εκκινητών, πέραν του γεγονότος ότι ο εμπειρικός τύπος του  $T_m$  (melting temperature) δεν δούλεψε, η υπάρχουσα βιβλιογραφία παρείχε πλήθος διαφορετικών θερμοκρασιών υβριδισμού, αναλόγως του είδους του εντόμου που ανιχνεύονταν κάθε φορά. Επιπλέον, δεν υπήρχε καθόλου δημοσιευμένη βιβλιογραφία που να αναφέρει ανίχνευση εντόμων αποθηκών με το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών. Για τον λόγο αυτό, κρίθηκε ασφαλέστερο να χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος, θέτοντας ως κεντρική θερμοκρασία αυτή των 46°C και διαβάθμιση της θερμοκρασίας κατά 5°C εκατέρωθεν.



Οι συνθήκες της βαθμιαίας PCR για το κάθε ζεύγος εκκινητών και οι θερμοκρασίες ανά θέση φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 9 και Πίνακας 10).

Πίνακας 9. Συνθήκες της βαθμιαίας PCR ανά ζεύγος εκκινητών

Ζεύγη εκκινητών	Στάδιο αντίδρασης	Θερμοκρασία		Διάρκεια
<b>COI-SO-FWD</b> <b>COI-SO-REV</b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	94 °C		5 min
	Υβριδισμός	30 κύκλοι	94 °C	1 min
			50 °C G = 10 °C	1 min
			68 °C	1 min
	Διπλασιασμός	68 °C		4 min
<b>COHSG1</b> <b>COHSG2</b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	94 °C		5 min
	Υβριδισμός	30 κύκλοι	94 °C	1 min
			65 °C G = 5 °C	1 min
			68 °C	1 min
	Διπλασιασμός	68 °C		4 min
<b>COI-SZ-FWD</b> <b>COI-SZ-REV</b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	94 °C		5 min
	Υβριδισμός	30 κύκλοι	94 °C	1 min
			50 °C G = 10 °C	1 min
			68 °C	1 min
	Διπλασιασμός	68 °C		4 min



<b>TL2-J-3037</b> <b>TK-N-3785</b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	94 °C		5 min
	Υβριδισμός	30 κύκλοι	94 °C	1 min
			46 °C G = 5 °C	1 min
			68 °C	1 min
	Διπλασιασμός	68 °C		4 min

Πίνακας 10. Θερμοκρασίες της βαθμιαίας PCR ανά θέση

T = 50 °C      G = 10 °C		T = 65 °C      G = 5 °C		T = 46 °C      G = 5 °C	
1 = 40.7 °C	2 = 40.7 °C	1 = 59.9 °C	2 = 59.9 °C	1= 41,5 °C	2= 41,5 °C
3 = 41.7 °C	4 = 43.5 °C	3 = 60.4 °C	4 = 61.3 °C	3= 41,9 °C	4= 42,7 °C
5 = 45.9 °C	6 = 48.7 °C	5 = 62.4 °C	6 = 63.8 °C	5= 43,9 °C	6= 45,3 °C
7 = 51.6 °C	8 = 54.4 °C	7 = 65.2 °C	8 = 66.6 °C	7= 46,7 °C	8= 48,1 °C
9 = 56.9 °C	10 = 58.9 °C	9 = 67.9 °C	10 = 68.9 °C	9= 49,3 °C	10= 50,3 °C
11 = 60.1 °C	12 = 60.3 °C	11 = 69.5 °C	12 = 69.7 °C	11= 51 °C	12= 51,1 °C

## 2.6.2 Υπολογισμός της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για την ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων

Στην περίπτωση της ανίχνευσης των μυκοτοξικογόνων μυκήτων, λόγω της μη ύπαρξης ολικού DNA των προς ανίχνευση μυκήτων, δεν κατέστη δυνατό να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της βαθμιαίας PCR. Οπότε, για τον υπολογισμό της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το κάθε ζεύγος εκκινητών, κρίθηκε ασφαλέστερο να χρησιμοποιηθούν οι ίδιες θερμοκρασίες που χρησιμοποίησαν στα πειράματα τους οι Schmidt-Heydt *et al.* (2008) και Sardiñas *et al.* (2011). Οι θερμοκρασίες υβριδισμού για το κάθε ζεύγος εκκινητών φαίνονται στον Πίνακα 12.



## 2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

### 2.7.1 PCR για την ανίχνευση εντόμων αποθηκών

Σε κάθε μία από τις PCR που πραγματοποιήθηκαν, εκτός του ολικού DNA των τεχνητά επιμολυσμένων, με έντομα *S. oryzae*, *S. granarius* και *S. zeamais*, δειγμάτων αλευριού, συμπεριλαμβάνονταν και θετικοί μάρτυρες οι οποίοι αποτελούνταν από ολικό DNA των αντίστοιχων εντόμων, αρνητικοί μάρτυρες οι οποίοι αποτελούνταν από ολικό DNA υγιών φυτών (σκληρός και μαλακός σίτος, σίκαλη, βρώμη, κριθάρι και καλαμπόκι) ή ολικό DNA άλλων ειδών εντόμων (*R. dominica*, *T. castaneum* και *T. confusum*), καθώς και ένας επιπλέον αρνητικός μάρτυρας χωρίς καθόλου DNA.

Όλες οι PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50  $\mu$ l, με βασικά συστατικά της κάθε αντίδρασης τα εξής: 5  $\mu$ l 10x PCR buffer (Standard Taq Reaction Buffer, New England Biolabs, NEB), 5  $\mu$ l 2mM dNTPS (Invitrogen), 1  $\mu$ l από κάθε εκκινητή (20pmol/ $\mu$ l, Sigma), 36.5 $\mu$ l DEPC-treated water (Invitrogen), 0.5  $\mu$ l Taq polymerase 5000 u/ml (New England Biolabs, NEB) και 1  $\mu$ l ολικού DNA, σε PCR tubes όγκου 0.2 ml (Eppendorf). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή (Mastercycler gradient, Eppendorf) και το πρόγραμμα της κάθε αντίδρασης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Συνθήκες της PCR ανά ζεύγος εκκινητών

Ζεύγη εκκινητών	Στάδιο αντίδρασης	Θερμοκρασία		Διάρκεια
<b>COI-SO-FWD</b> <b>COI-SO-REV</b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	94 °C		5 min
	Υβριδισμός	30 κύκλοι	94 °C	1 min
			45 °C	1 min
			68 °C	1 min
	Διπλασιασμός	68 °C		4 min
<b>COIISG1</b>	Hot start	80 °C		40 sec



<b>COISG2</b>	Αποδιάταξη	94 °C		5 min
	Υβριδισμός	35 κύκλοι	94 °C	1 min
			62 °C	1 min
			68 °C	1 min
	Διπλασιασμός	68 °C		4 min
<b>COI-SZ-FWD COI-SZ-REV</b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	94 °C		5 min
	Υβριδισμός	30 κύκλοι	94 °C	1 min
			55 °C	1 min
			68 °C	1 min
	Διπλασιασμός	68 °C		4 min
<b>TL2-J-3037 TK-N-3785 για ανίχνευση του <i>S. oryzae</i></b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	94 °C		5 min
	Υβριδισμός	30 κύκλοι	94 °C	1 min
			41 °C	1 min
			68 °C	1 min
	Διπλασιασμός	68 °C		4 min
<b>TL2-J-3037 TK-N-3785 για ανίχνευση του <i>S. zeamais</i></b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	94 °C		5 min
	Υβριδισμός	30 κύκλοι	94 °C	1 min
			42 °C	1 min
			68 °C	1 min
	Διπλασιασμός	68 °C		4 min



### 2.7.2 PCR για την ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων

Σε κάθε μία από τις PCR που πραγματοποιήθηκαν, εκτός του ολικού DNA των διαφόρων δειγμάτων αλευριού, συμπεριλαμβάνονταν και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς καθόλου DNA.

Όλες οι PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50  $\mu$ l, με βασικά συστατικά της κάθε αντίδρασης τα εξής: 5  $\mu$ l 10x PCR buffer (Standard Taq Reaction Buffer, New England Biolabs, NEB), 5  $\mu$ l 2mM dNTPS (Invitrogen), 1  $\mu$ l από κάθε εκκινητή (20pmol/ $\mu$ l, Sigma), 36.5 $\mu$ l DEPC-treated water (Invitrogen), 0.5  $\mu$ l Taq polymerase 5000 u/ml (New England Biolabs, NEB) και 1  $\mu$ l ολικού DNA, σε PCR tubes όγκου 0.2 ml (Eppendorf). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή (Mastercycler gradient, Eppendorf) και το πρόγραμμα της κάθε αντίδρασης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Συνθήκες της PCR ανά ζεύγος εκκινητών

Ζεύγη εκκινητών	Στάδιο αντίδρασης	Θερμοκρασία		Διάρκεια
<b>pksCT-Mp-3_for</b> <b>pksCT-Mp-3_rev</b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	95 °C		3 min
	Υβριδισμός	35 κύκλοι	95 °C	30 sec
			55 °C	40 sec
			72 °C	1.5 min
	Διπλασιασμός	72 °C		3 min
<b>otapksPV_for</b> <b>otapksPV_rev</b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	95 °C		3 min
	Υβριδισμός	35 κύκλοι	95 °C	30 sec
			55 °C	40 sec
			68 °C	1.5 min



	Διπλασιασμός	68 °C		3 min
<b>FLAVIQ1 FLAVIQ2</b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	95 °C		4.5 min
	Υβριδισμός	24 κύκλοι	95 °C	30 sec
			60 °C	20 sec
			68 °C	35 sec
	Διπλασιασμός	68 °C		3 min
<b>FLAVIQ1 PARQ2</b>	Hot start	80 °C		40 sec
	Αποδιάταξη	95 °C		5 min
	Υβριδισμός	25 κύκλοι	95 °C	30 sec
			70 °C	30 sec
			68 °C	30 sec
	Διπλασιασμός	68 °C		5 min



## 2.8 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης

Τα προϊόντα των PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.2%, 1.5% ή 2% αναλόγως του αναμενόμενου μεγέθους του παραγόμενου προϊόντος, σε 60 ml ή 300 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x (10.8 g Tris base, 5.5 g Boric acid, 4 ml 0.5 M EDTA pH=8,0) με τη χρήση συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (horizontal electrophoresis mini and big unit, Sigma-Aldrich). Από κάθε προϊόν της PCR λήφθηκαν 6  $\mu$ l, τα οποία αναμείχθηκαν με 4  $\mu$ l Gel Loading Buffer (0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 15% Ficoll (Type 4000), DEPC-treated water) και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα βοθρία της πηκτής. Ως δείκτες μοριακού βάρους των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκαν, αναλόγως του αναμενόμενου μεγέθους του παραγόμενου προϊόντος οι 1 kb DNA ladder (New England Biolabs, NEB) και Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs, NEB) σε ποσότητα 10  $\mu$ l. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 3 lt ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x, σταθερή τάση 180 V και διήρκεσε 2 h. Μετα το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (1,6  $\mu$ g/ml) (Sigma) για 1 h και κατόπιν ξεπλύθηκε με τρεχούμενο νερό. Τέλος, για να γίνουν ορατά τα τμήματα του DNA, ακολούθησε έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (312 nm) και φωτογράφιση της πηκτής.



### 3. Αποτελέσματα

### 3.1 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού με Gradient PCR

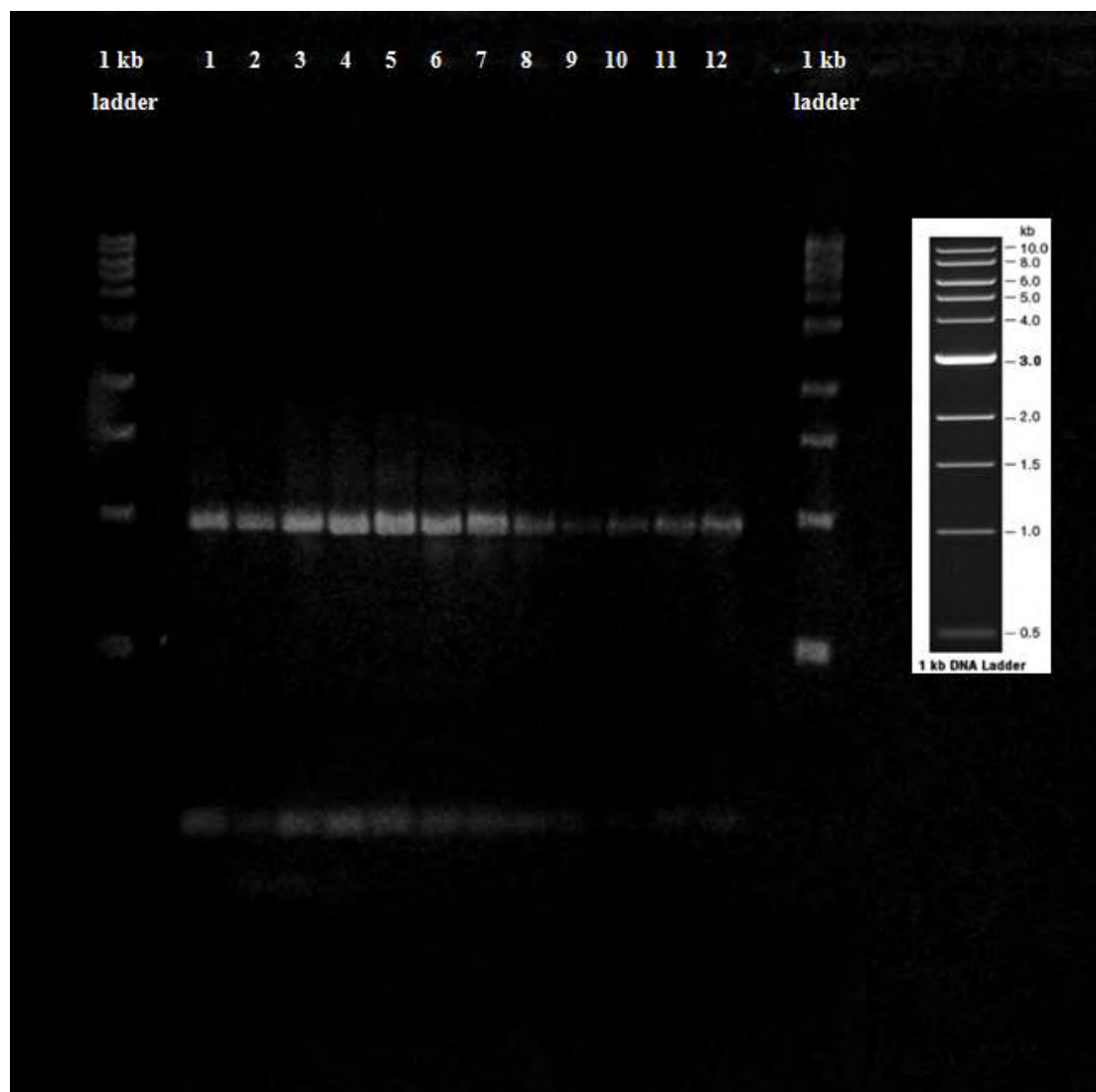
Στα πλαίσια του πειράματος, για την εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το κάθε ζεύγος εκκινητών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της βαθμιαίας PCR. Με την μέθοδο αυτή και αφού προηγήθηκε καθαρισμός και απομόνωση του ολικού DNA των υπό εξέταση εντόμων (*S. oryzae*, *S. granarius* και *S. zeamais*), πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές βαθμιαίες PCR, με τις οποίες αξιολογήθηκαν 12 διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού σε κάθε αντίδραση, με σκοπό την εύρεση της καταλληλότερης για το κάθε ζεύγος εκκινητών.

### 3.1.1 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών

### 3.1.1.1 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV

Με την χρήση της μεθόδου της βαθμιαίας PCR, το ζεύγος εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV κατάφερε να ανιχνεύσει και να ενισχύσει το ολικό DNA του εντόμου *S. oryzae* σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών υβριδισμού που τέθηκαν κατά την διαδικασία διαβάθμισης της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, το δείγμα με το ολικό DNA του *S. oryzae* είχε θετική αντίδραση και στις 12 διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού που εξετάστηκαν. Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 30), όλα τα προϊόντα της αντίδρασης είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 950 bp. Ωστόσο, σαν καταλληλότερη θερμοκρασία υβριδισμού για το ζεύγος εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV επελέγη αυτή των 45 °C, διότι από όλες τις ζώνες που αποκαλύφθηκαν στα 950 bp στην πηκτή αγαρόζης μετά τη χρώση, αυτές που αντιστοιχούσαν στις θερμοκρασίες 43.5 °C (θέση 4) και 45.9 °C (θέση 5) ήταν οι πιο χαρακτηριστικές (μεγάλες και φωτεινές).





Εικ. 30 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της Gradient PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV σε πηκτική αгарόζης 1.2%.

**Ladder:** 1kb DNA ladder, **1:** T= 40.7 °C, **2:** T= 40.7 °C, **3:** T= 41.7 °C, **4:** T= 43.5 °C, **5:** T= 45.9 °C, **6:** T= 48.7 °C, **7:** T= 51.6 °C, **8:** T= 54.4 °C, **9:** T= 56.9 °C, **10:** T= 58.9 °C, **11:** T= 60.1 °C, **12:** T= 60.3 °C



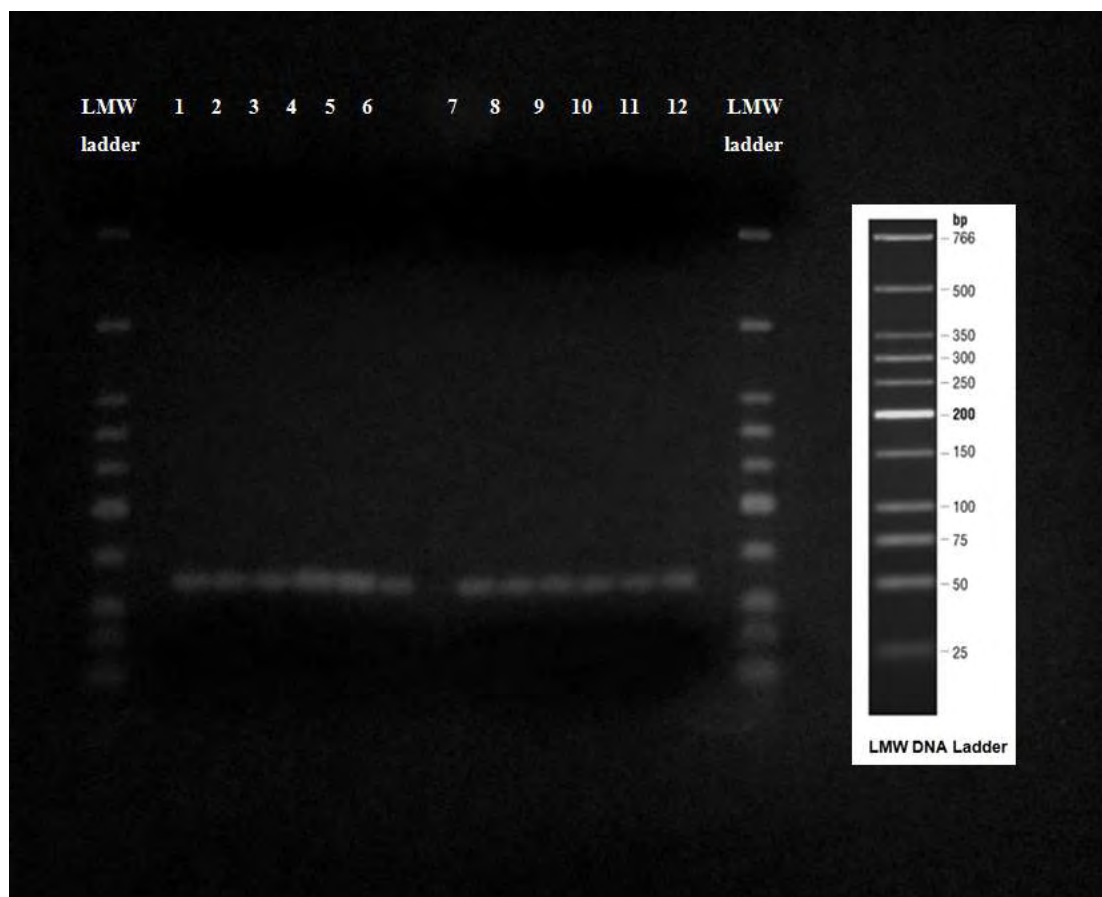
### 3.1.1.2 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών COIISG1 / COIISG2

Με την χρήση της μεθόδου της βαθμιαίας PCR, το ζεύγος εκκινητών COIISG1 / COIISG2 κατάφερε να ανιχνεύσει και να ενισχύσει το ολικό DNA του εντόμου *S. granarius* σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών υβριδισμού που τέθηκαν κατά την διαδικασία διαβάθμισης της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, το δείγμα με το ολικό DNA του *S. granarius* είχε θετική αντίδραση και στις 12 διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού που εξετάστηκαν. Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 31), όλα τα προϊόντα της αντίδρασης είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 125 bp. Ωστόσο, σαν καταλληλότερη θερμοκρασία υβριδισμού για το ζεύγος εκκινητών COIISG1 / COIISG2 επελέγη αυτή των 62 °C, διότι από όλες τις ζώνες που αποκαλύφθηκαν στα 125 bp στην πηκτή αγαρόζης μετά τη χρώση, αυτές που αντιστοιχούσαν στις θερμοκρασίες 61.3 °C (θέση 4) και 62.4 °C (θέση 5) ήταν οι πιο χαρακτηριστικές (μεγάλες και φωτεινές).

### 3.1.1.3 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών COI-SZ-FWD / COI-SZ-REV

Με την χρήση της μεθόδου της βαθμιαίας PCR, το ζεύγος εκκινητών COI-SZ-FWD / COI-SZ-REV κατάφερε να ανιχνεύσει και να ενισχύσει το ολικό DNA του εντόμου *S. zeamais* σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών υβριδισμού που τέθηκαν κατά την διαδικασία διαβάθμισης της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, το δείγμα με το ολικό DNA του *S. zeamais* είχε θετική αντίδραση και στις 12 διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού που εξετάστηκαν. Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 32), όλα τα προϊόντα της αντίδρασης είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 950 bp. Ωστόσο, σαν καταλληλότερη θερμοκρασία υβριδισμού για το ζεύγος εκκινητών COI-SZ-FWD / COI-SZ-REV επελέγη αυτή των 55 °C, διότι από όλες τις ζώνες που αποκαλύφθηκαν στα 950 bp στην πηκτή αγαρόζης μετά τη χρώση, αυτή που αντιστοιχούσε στην θερμοκρασία 54.4 °C (θέση 8) ήταν η πιο χαρακτηριστική (μεγάλη και φωτεινή).

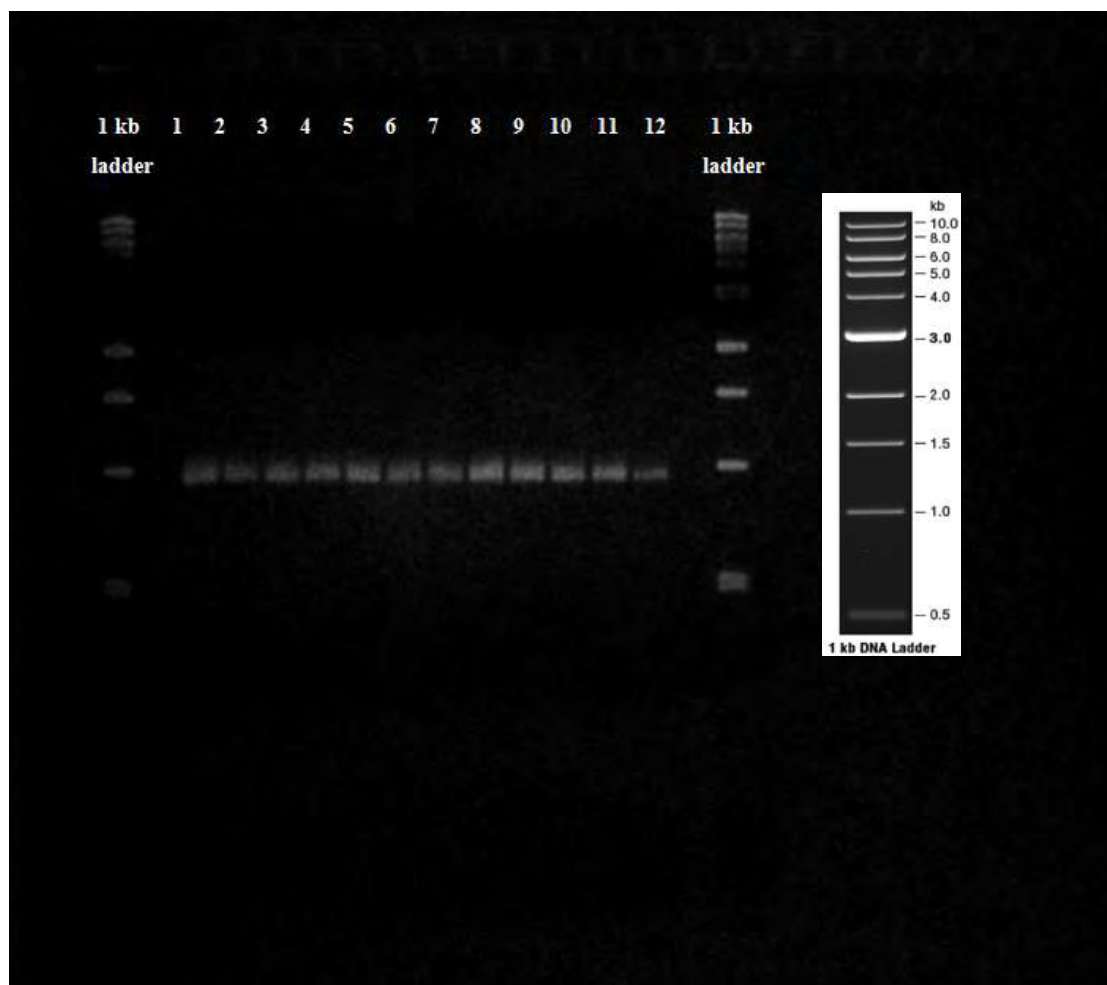




Εικ. 31 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της Gradient PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών COIISG1 / COIISG2 σε πηκτική αгарόζης 2%.

**Ladder:** LMW DNA ladder, **1:** T= 59.9 °C, **2:** T= 59.9 °C, **3:** T= 60.4 °C, **4:** T= 61.3 °C, **5:** T= 62.4 °C, **6:** T= 63.8 °C, **7:** T= 65.2 °C, **8:** T= 66.6 °C, **9:** T= 67.9 °C, **10:** T= 68.9 °C, **11:** T= 69.5 °C, **12:** T= 69.7 °C





Εικ. 32 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της Gradient PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών COI-SZ-FWD / COI-SZ-REV σε πηκτική αгарόζης 1.2%.

**Ladder:** 1kb DNA ladder, **1:** T= 40.7 °C, **2:** T= 40.7 °C, **3:** T= 41.7 °C, **4:** T= 43.5 °C, **5:** T= 45.9 °C, **6:** T= 48.7 °C, **7:** T= 51.6 °C, **8:** T= 54.4 °C, **9:** T= 56.9 °C, **10:** T= 58.9 °C, **11:** T= 60.1 °C, **12:** T= 60.3 °C



### 3.1.2 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού με το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785

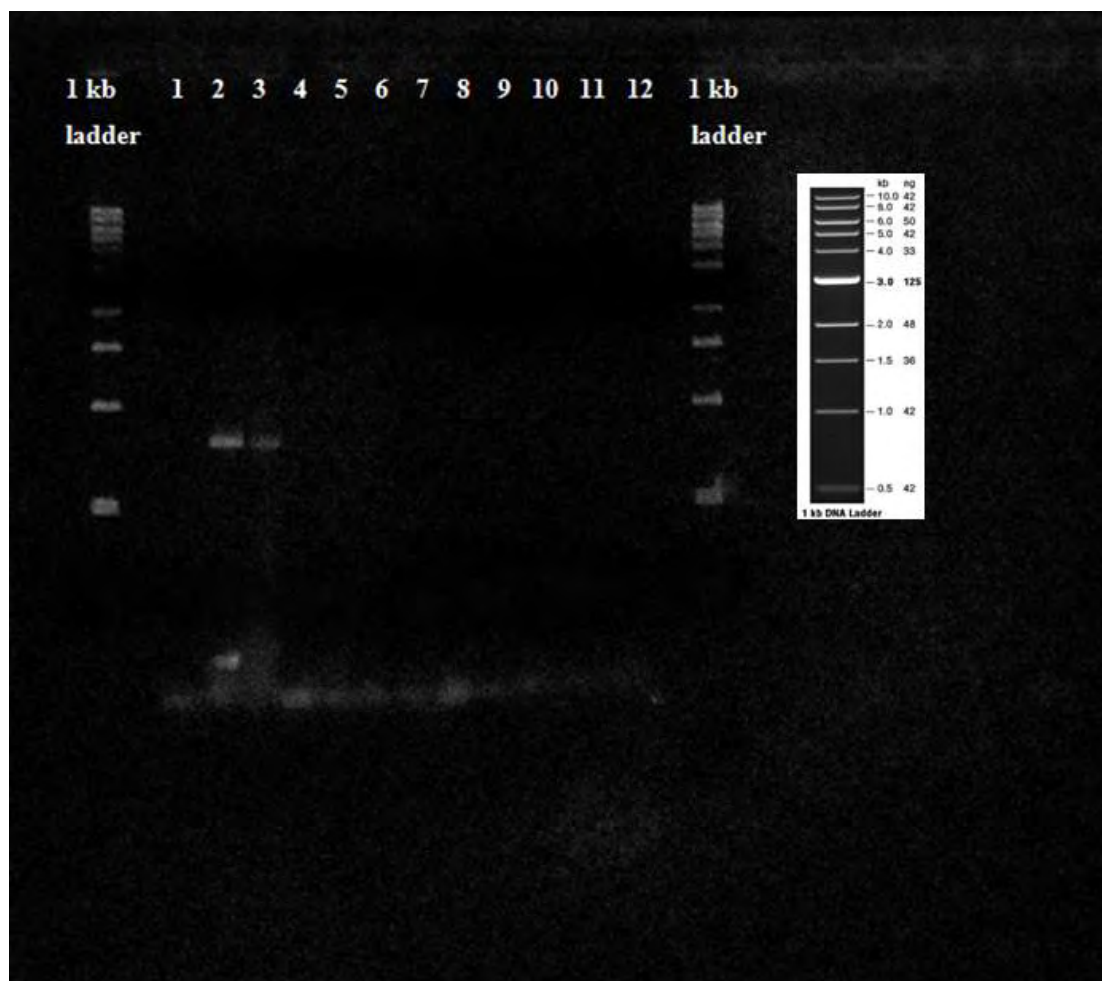
#### 3.1.2.1 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού με το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 για ανίχνευση του *Sitophilus oryzae*

Με την χρήση της μεθόδου της βαθμιαίας PCR, το ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 δεν κατάφερε να ανιχνεύσει και να ενισχύσει το ολικό DNA του εντόμου *S. oryzae* σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών υβριδισμού που τέθηκαν κατά την διαδικασία διαβάθμισης της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, το δείγμα με το ολικό DNA του *S. oryzae* είχε θετική αντίδραση μόνο σε 2 από τις 12 διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού που εξετάστηκαν. Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 33), τα δύο προϊόντα της αντίδρασης είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 684 bp. Οπότε, σαν καταλληλότερη θερμοκρασία υβριδισμού για την ανίχνευση του *S. oryzae* με το ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 επελέγη αυτή των 41 °C διότι, παρά το γεγονός ότι στην πηκτή αγαρόζης μετά τη χρώση αποκαλύφθηκαν δύο ζώνες στα 684 bp, αυτή που αντιστοιχούσε στην θερμοκρασία 41.5 °C (θέση 2) ήταν πιο χαρακτηριστική (μεγάλη και φωτεινή) σε σχέση με αυτή που αντιστοιχούσε στην θερμοκρασία 41.9 °C (θέση 3).

#### 3.1.2.2 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού με το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 για ανίχνευση του *Sitophilus granarius*

Με την χρήση της μεθόδου της βαθμιαίας PCR, το ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 δεν κατάφερε να ανιχνεύσει και να ενισχύσει το ολικό DNA του εντόμου *S. granarius* στο εύρος των θερμοκρασιών υβριδισμού που τέθηκαν κατά την διαδικασία διαβάθμισης της θερμοκρασίας. Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 34), το δείγμα με το ολικό DNA του *S. granarius* δεν είχε θετική αντίδραση σε καμία από τις 12 διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού που εξετάστηκαν.

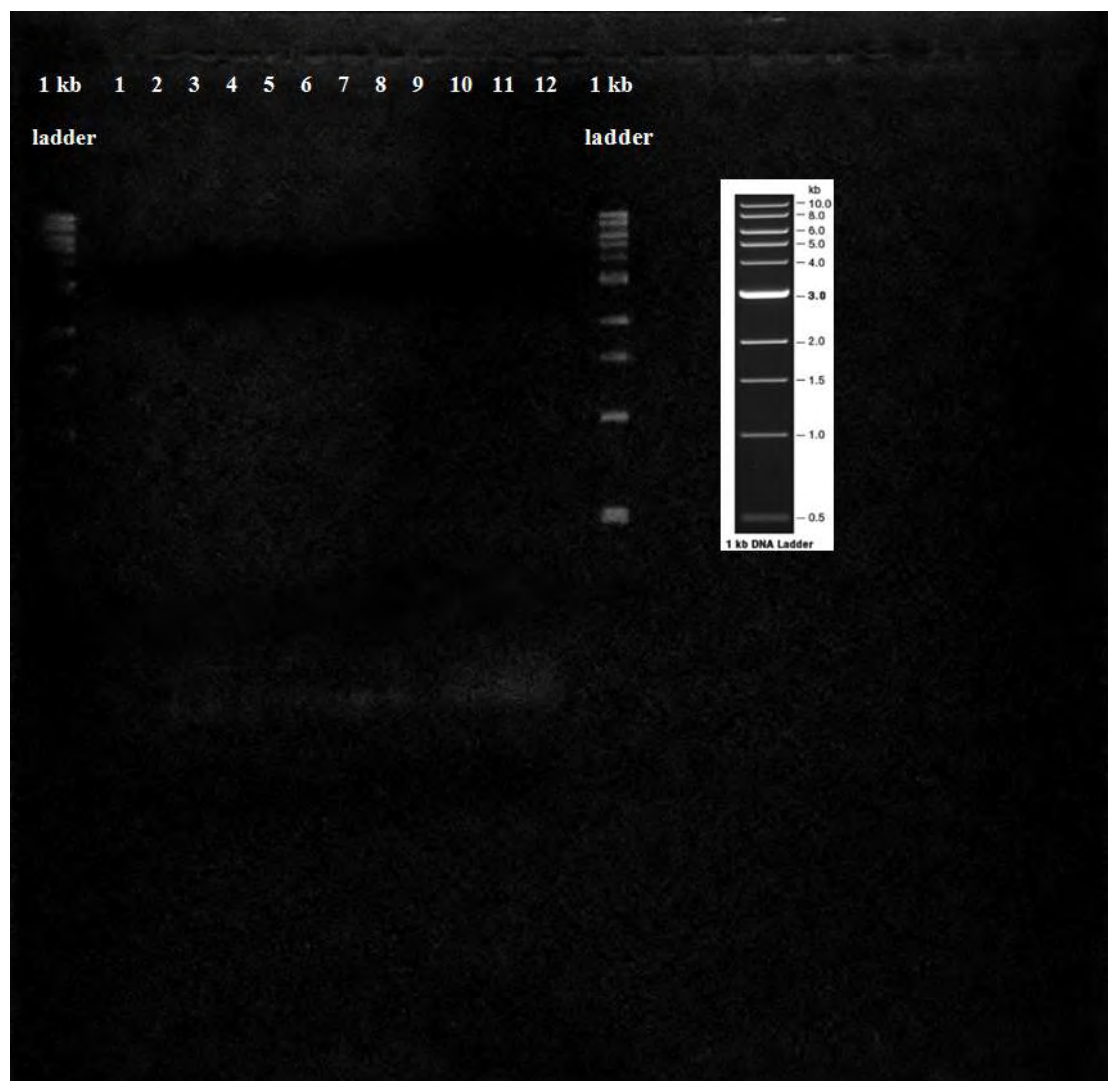




Εικ. 33 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της Gradient PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785, για ανίχνευση του *S. oryzae*, σε πηκτική αгарόζης 1.2%.

**Ladder:** 1kb DNA ladder, **1:** T= 41.5 °C, **2:** T= 41.5 °C, **3:** T= 41.9 °C, **4:** T= 42.7 °C, **5:** T= 43.9 °C, **6:** T= 45.3 °C, **7:** T= 46.7 °C, **8:** T= 48.1 °C, **9:** T= 49.3 °C, **10:** T= 50.3 °C, **11:** T= 51 °C, **12:** T= 51.1 °C





Εικ. 34 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της Gradient PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785, για ανίχνευση του *S. granarius*, σε πηκτική αγαρόζης 1.2%.

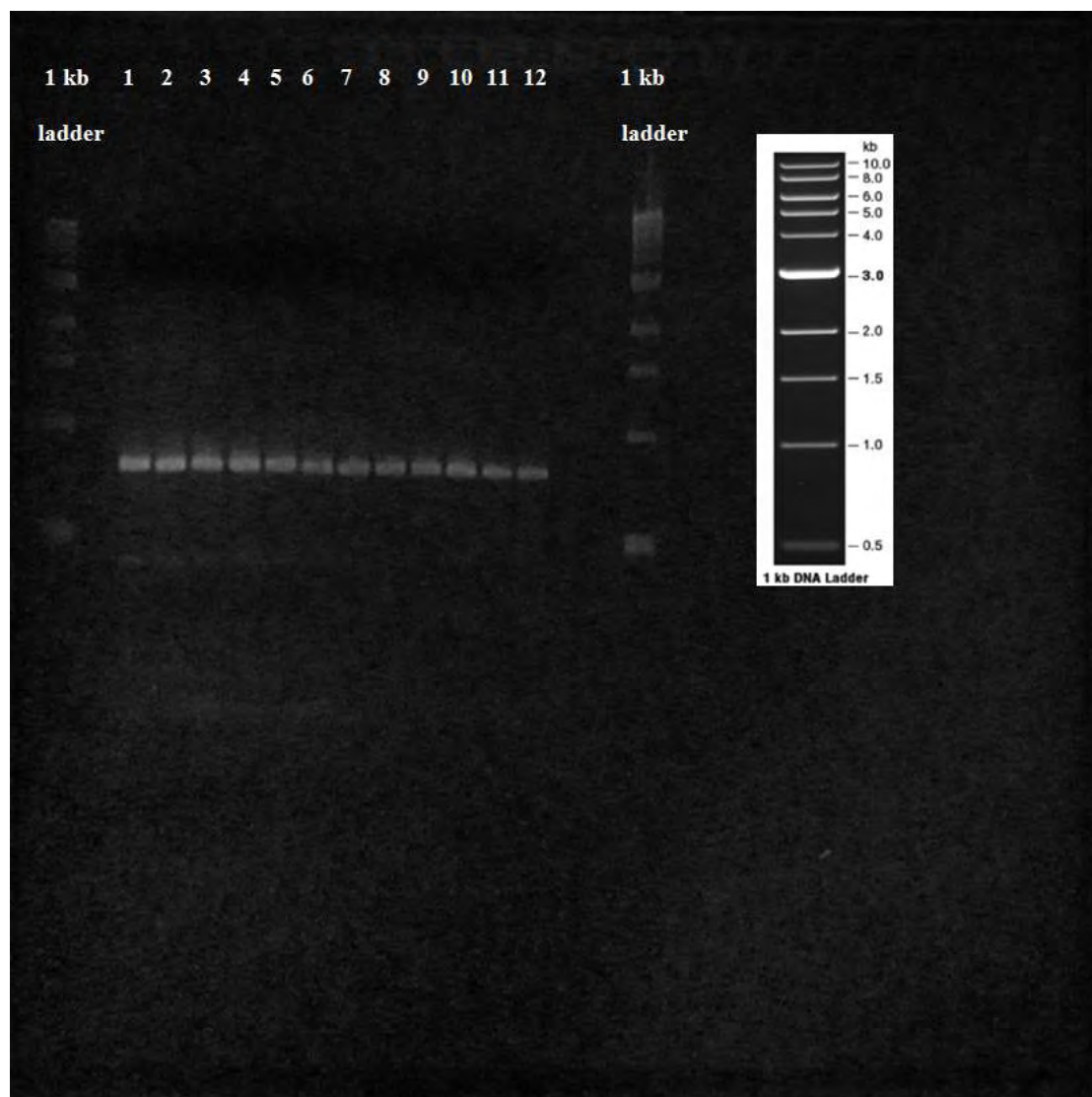
**Ladder:** 1kb DNA ladder, **1:** T= 41.5 °C, **2:** T= 41.5 °C, **3:** T= 41.9 °C, **4:** T= 42.7 °C, **5:** T= 43.9 °C, **6:** T= 45.3 °C, **7:** T= 46.7 °C, **8:** T= 48.1 °C, **9:** T= 49.3 °C, **10:** T= 50.3 °C, **11:** T= 51 °C, **12:** T= 51.1 °C



### 3.1.2.3 Εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού με το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 για ανίχνευση του *Sitophilus zeamais*

Με την χρήση της μεθόδου της βαθμιαίας PCR, το ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 κατάφερε να ανιχνεύσει και να ενισχύσει το ολικό DNA του εντόμου *S. zeamais* σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών υβριδισμού που τέθηκαν κατά την διαδικασία διαβάθμισης της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, το δείγμα με το ολικό DNA του *S. zeamais* είχε θετική αντίδραση και στις 12 διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού που εξετάστηκαν. Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 35), όλα τα προϊόντα της αντίδρασης είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 684 bp. Ωστόσο, σαν καταλληλότερη θερμοκρασία υβριδισμού για την ανίχνευση του *S. zeamais* με το ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 επελέγη αυτή των 42 °C, διότι από όλες τις ζώνες που αποκαλύφθηκαν στα 684 bp στην πηκτή αγαρόζης μετά τη χρώση, αυτές που αντιστοιχούσαν στις θερμοκρασίες από 41.5 °C μέχρι και 42.7 °C (θέσεις 1 μέχρι 4) ήταν οι πιο χαρακτηριστικές (μεγάλες και φωτεινές).





Εικ. 35 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της Gradient PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785, για ανίχνευση του *S. zeamais*, σε πηκτική αгарόζη 1.2%.

**Ladder:** 1kb DNA ladder, **1:** T= 41.5 °C, **2:** T= 41.5 °C, **3:** T= 41.9 °C, **4:** T= 42.7 °C, **5:** T= 43.9 °C, **6:** T= 45.3 °C, **7:** T= 46.7 °C, **8:** T= 48.1 °C, **9:** T= 49.3 °C, **10:** T= 50.3 °C, **11:** T= 51 °C, **12:** T= 51.1 °C



### **3.2 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών εντόμων σε τεχνητά επιμολυσμένα δείγματα αλευριού**

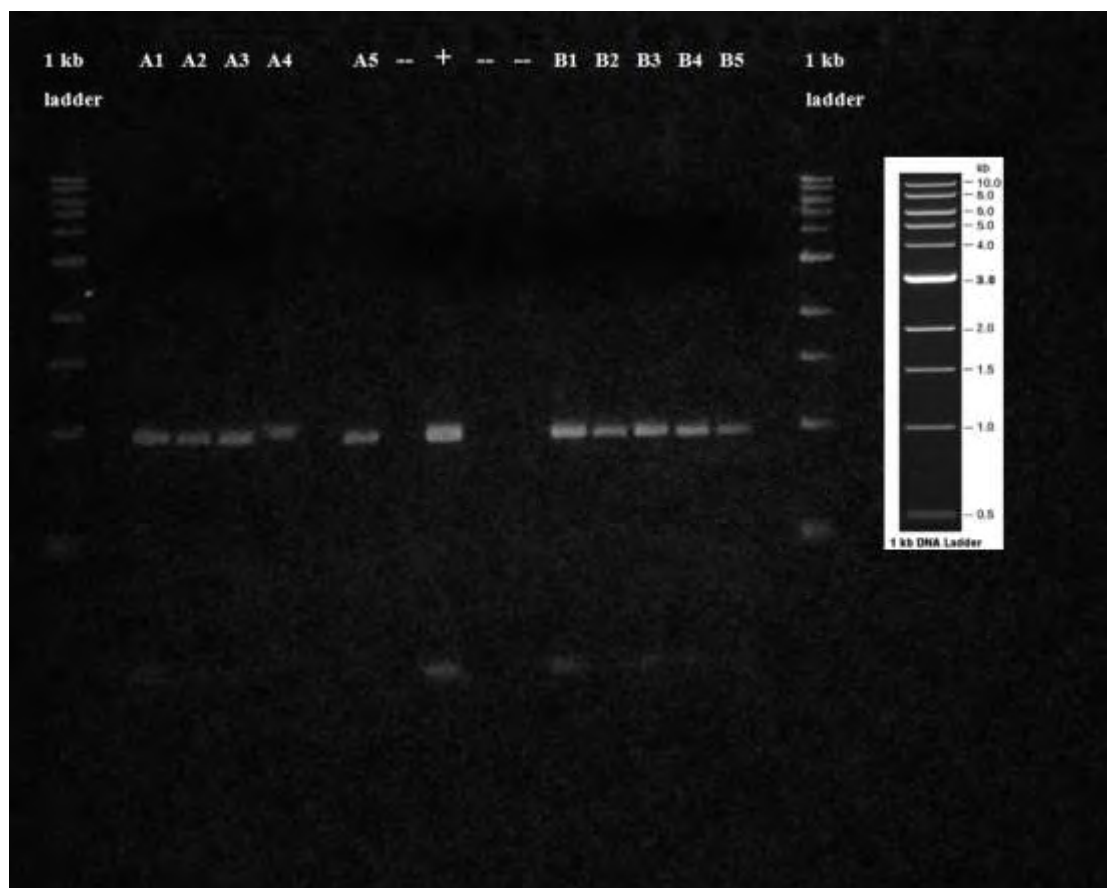
Για τους σκοπούς του πειράματος, πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε δείγματα καθαρού αλευριού σκληρού σίτου βάρους 1 gr, με έντομα *S. oryzae*, *S. granarius* και *S. zeamais* σε ποσοστά 5, 1, 0.5, 0.1 και 0.05% w/w. Ακολούθησε καθαρισμός και απομόνωση του ολικού DNA των μολυσμένων δειγμάτων και πραγματοποίηση διαδοχικών PCR για κάθε είδος εντόμου με σκοπό, εκτός από την ανίχνευση του εντόμου μέσα στο μολυσμένο αλεύρι, τον έλεγχο της εξειδίκευσης των εκκινητών και τον έλεγχο της ευαισθησίας της PCR, ως μέθοδο ανίχνευσης.

#### **3.2.1 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών εντόμων σε τεχνητά επιμολυσμένα δείγματα αλευριού με τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών**

##### **3.2.1.1 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του *Sitophilus oryzae***

Με την χρήση του ζεύγους εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV, το DNA του εντόμου *S. oryzae* ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα αλευριού που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, από τα 5 διαφορετικά ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων (5, 1, 0.5, 0.1 και 0.05% w/w) και στις 2 επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν, τα δείγματα που εξετάστηκαν είχαν όλα θετική αντίδραση και διαπιστώθηκε σε αυτά η παρουσία του DNA του *S. oryzae* (Εικ. 36). Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση, όλα τα προϊόντα της αντίδρασης είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 950 bp. Κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, εκτός από τα προς ανάλυση δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς την παρουσία DNA, ένας θετικός μάρτυρας με ολικό DNA από *S. oryzae*, ένας δεύτερος αρνητικός μάρτυρας υγιούς φυτού σκληρού σίτου καθώς και ένας αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *R. dominica*. Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες στα 950 bp στην πηκτή αγαρόζης μετά τη χρώση, σε αντίθεση με τον θετικό μάρτυρα που αποκαλύφθηκαν οι αναμενόμενες ζώνες στην πηκτή. Το ζεύγος εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV ήταν ικανό να πολλαπλασιάσει το DNA του *S. oryzae* σε όλα τα ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων και στις 2 επαναλήψεις του πειράματος.





Εικ. 36 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών COI-SO-FWD / COI-SO-REV σε πηκτική αгарόζης 1.2%.

**Ladder:** 1kb DNA ladder, **A<sub>1</sub>:** 5% *S. oryzae* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>2</sub>:** 1% *S. oryzae* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>3</sub>:** 0.5% *S. oryzae* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>4</sub>:** 0.1% *S. oryzae* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>5</sub>:** 0.05% *S. oryzae* (1<sup>η</sup> επανάληψη), (-): No DNA, (+): DNA *S. oryzae*, (-): DNA υγιούς φυτού σκληρού σίτου, (-): DNA *R. dominica*, **B<sub>1</sub>:** 5% *S. oryzae* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>2</sub>:** 1% *S. oryzae* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>3</sub>:** 0.5% *S. oryzae* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>4</sub>:** 0.1% *S. oryzae* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>5</sub>:** 0.05% *S. oryzae* (2<sup>η</sup> επανάληψη).



### 3.2.1.2 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του *Sitophilus granarius*

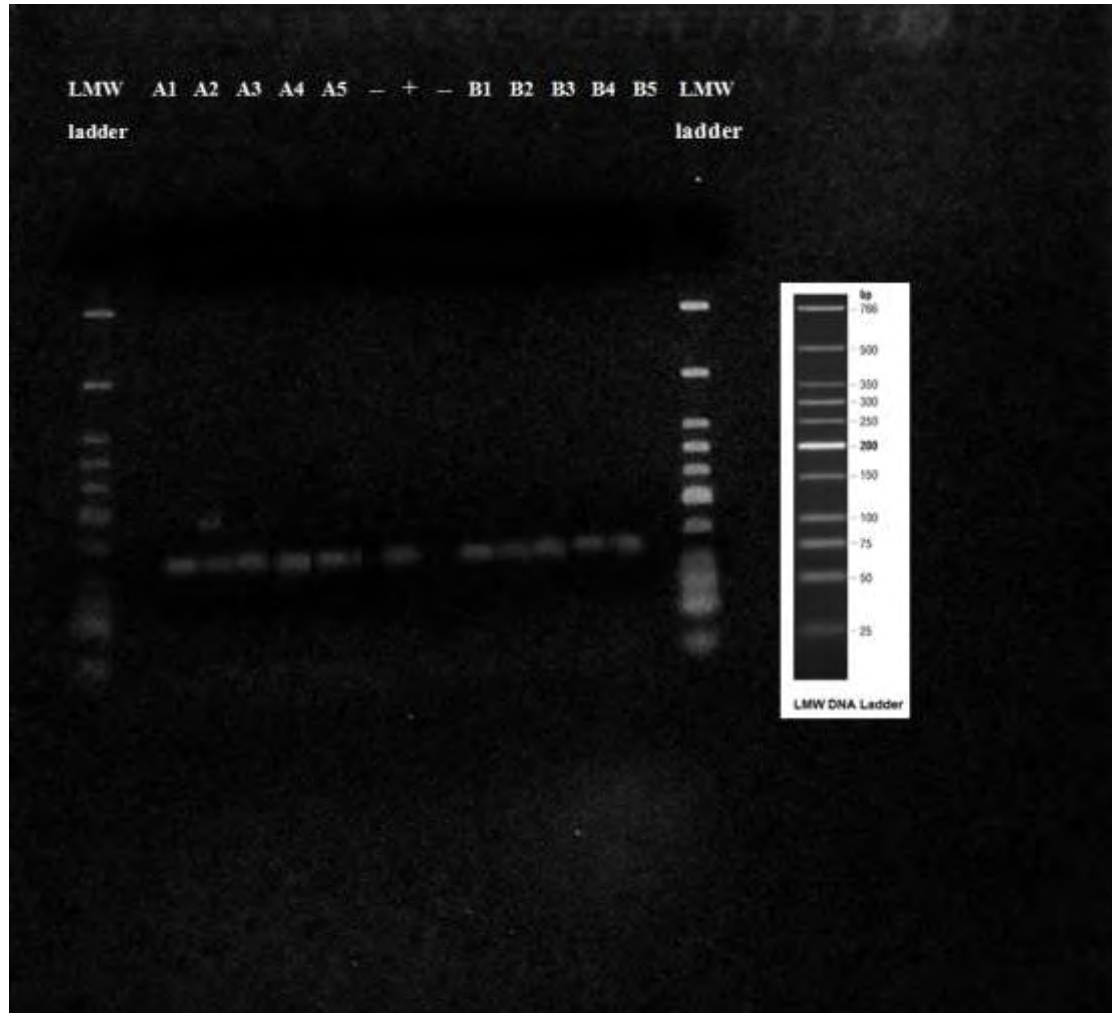
Με την χρήση του ζεύγους εκκινητών COIISG1 / COIISG2, το DNA του εντόμου *S. granarius* ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα αλευριού που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, από τα 5 διαφορετικά ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων (5, 1, 0.5, 0.1 και 0.05% w/w) και στις 2 επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν, τα δείγματα που εξετάστηκαν είχαν όλα θετική αντίδραση και διαπιστώθηκε σε αυτά η παρουσία του DNA του *S. granarius* (Εικ. 37). Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση, όλα τα προϊόντα της αντίδρασης είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 125 bp. Κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, εκτός από τα προς ανάλυση δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς την παρουσία DNA, ένας θετικός μάρτυρας με ολικό DNA από *S. granarius* καθώς και ένας δεύτερος αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *T. castaneum*. Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες στα 125 bp στην πηκτή αγαρόζης μετά τη χρώση, σε αντίθεση με τον θετικό μάρτυρα που αποκαλύφθηκαν οι αναμενόμενες ζώνες στην πηκτή. Το ζεύγος εκκινητών COIISG1 / COIISG2 ήταν ικανό να πολλαπλασιάσει το DNA του *S. granarius* σε όλα τα ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων και στις 2 επαναλήψεις του πειράματος.

### 3.2.1.3 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του *Sitophilus zeamais*

Με την χρήση του ζεύγους εκκινητών COI-SZ-FWD / COI-SZ-REV, το DNA του εντόμου *S. zeamais* ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα αλευριού που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, από τα 5 διαφορετικά ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων (5, 1, 0.5, 0.1 και 0.05% w/w) και στις 2 επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν, τα δείγματα που εξετάστηκαν είχαν όλα θετική αντίδραση και διαπιστώθηκε σε αυτά η παρουσία του DNA του *S. zeamais* (Εικ. 38). Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση, όλα τα προϊόντα της αντίδρασης είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 950 bp. Κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, εκτός από τα προς ανάλυση δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς την παρουσία DNA, ένας θετικός μάρτυρας με ολικό DNA από *S. zeamais* καθώς και ένας επιπλέον αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *T. cofusum*. Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες στα 950 bp στην πηκτή αγαρόζης μετά τη χρώση, σε αντίθεση με τον θετικό μάρτυρα που αποκαλύφθηκαν οι αναμενόμενες ζώνες στην πηκτή. Το ζεύγος εκκινητών COI-SZ-



FWD / COI-SZ-REV ήταν ικανό να πολλαπλασιάσει το DNA του *S. zeamais* σε όλα τα ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων και στις 2 επαναλήψεις του πειράματος.



Εικ. 37 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών COIISG1 / COIISG2 σε πηκτική αгарόζης 2%.

**Ladder:** LMW DNA ladder, **A<sub>1</sub>:** 5% *S. granarius* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>2</sub>:** 1% *S. granarius* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>3</sub>:** 0.5% *S. granarius* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>4</sub>:** 0.1% *S. granarius* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>5</sub>:** 0.05% *S. granarius* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **(-):** No DNA, **(+):** DNA *S. granarius*, **(-):** DNA *T. castaneum*, **B<sub>1</sub>:** 5% *S. granarius* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>2</sub>:** 1% *S. granarius* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>3</sub>:** 0.5% *S. granarius* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>4</sub>:** 0.1% *S. granarius* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>5</sub>:** 0.05% *S. granarius* (2<sup>η</sup> επανάληψη).





Εικ. 38 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών COI-SZ-FWD / COI-SZ-REV σε πηκτική αгарόζης 1.2%.

**Ladder:** 1kb DNA ladder, **A<sub>1</sub>:** 0.05% *S. zeamais* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>2</sub>:** 0.1% *S. zeamais* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>3</sub>:** 0.5% *S. zeamais* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>4</sub>:** 1% *S. zeamais* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **A<sub>5</sub>:** 5% *S. zeamais* (1<sup>η</sup> επανάληψη), **(-):** No DNA, **(+):** DNA *S. zeamais*, **(-):** DNA *T. confusum*, **B<sub>1</sub>:** 5% *S. zeamais* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>2</sub>:** 1% *S. zeamais* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>3</sub>:** 0.5% *S. zeamais* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>4</sub>:** 0.1% *S. zeamais* (2<sup>η</sup> επανάληψη), **B<sub>5</sub>:** 0.05% *S. zeamais* (2<sup>η</sup> επανάληψη).



### 3.2.2 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών εντόμων σε τεχνητά επιμολυσμένα δείγματα αλευριού με το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785

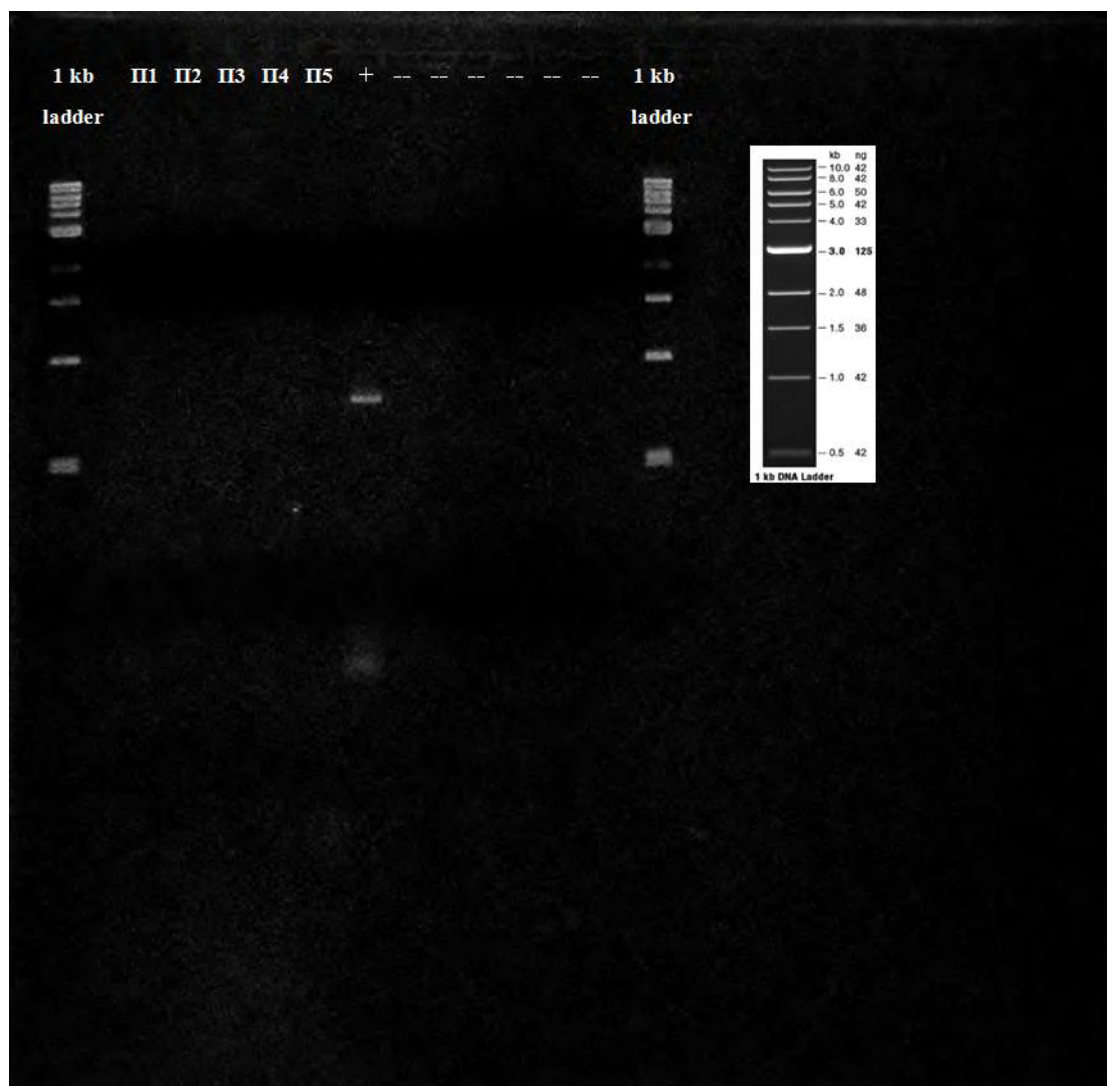
#### 3.2.2.1 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του *Sitophilus oryzae*

Με την χρήση του ζεύγους εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785, το DNA του εντόμου *S. oryzae* δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα αλευριού που χρησιμοποιήθηκαν, παρά μόνο στον θετικό μάρτυρα. Συγκεκριμένα, από τα 5 διαφορετικά ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων (5, 1, 0.5, 0.1 και 0.05% w/w) τα δείγματα που εξετάστηκαν δεν είχαν πουθενά θετική αντίδραση (Εικ. 39). Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση, το μόνο προϊόν της αντίδρασης ήταν ο θετικός μάρτυρας, ο οποίος είχε το επιθυμητό μέγεθος των 684 bp. Κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, εκτός από τα προς ανάλυση δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν και ένας θετικός μάρτυρας με ολικό DNA από *S. oryzae*, ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς την παρουσία DNA, ένας δεύτερος αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *S. granarius*, ένας αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *R. dominica*, ένας αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *O. surinamensis*, ένας αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *T. confusum* καθώς και ένας αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *T. castaneum*. Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες στα 684 bp στην πηκτή. Το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 παρουσίασε ιδιαίτερα μειωμένη ευαισθησία, καθώς δεν κατάφερε να ανιχνεύσει το DNA του *S. oryzae* σε κανένα από τα ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων, αλλά και έλλειψη εξειδίκευσης, καθώς δεν μπόρεσε να ανιχνεύσει ούτε τα υπόλοιπα έντομα αποθηκών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

#### 3.2.2.2 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του *Sitophilus granarius*

Δεδομένου του ότι το ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 δεν κατάφερε να ανιχνεύσει και να ενισχύσει το ολικό DNA του εντόμου *S. granarius* σε καμία θερμοκρασία από το εύρος των θερμοκρασιών υβριδισμού που εξετάστηκαν, δεν κατέστη δυνατό να πραγματοποιηθεί στην συνέχεια PCR για την ανίχνευση των διαφορετικών ποσοστών του *S. granarius* στα δείγματα αλευριού.





Εικ. 39 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785, για ανίχνευση του *S. oryzae*, σε πηκτή αγαρόζης 1.2%.

**Ladder:** 1kb DNA ladder, **Π<sub>1</sub>:** 0.05% *S. oryzae*, **Π<sub>2</sub>:** 0.1% *S. oryzae*, **Π<sub>3</sub>:** 0.5% *S. oryzae*, **Π<sub>4</sub>:** 1% *S. oryzae*, **Π<sub>5</sub>:** 5% *S. oryzae*, **(+):** DNA *S. oryzae*, **(-):** No DNA, **(-):** DNA *S. granarius*, **(-):** DNA *R. dominica*, **(-):** DNA *O. surinamensis*, **(-):** DNA *T. confusum*, **(-):** DNA *T. castaneum*.



### 3.2.2.3 Μοριακή ανίχνευση διαφορετικών ποσοστών του *Sitophilus zeamais*

Με την χρήση του ζεύγους εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785, το DNA του εντόμου *S. zeamais* δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα αλευριού που χρησιμοποιήθηκαν, παρά μόνο στον θετικό μάρτυρα. Συγκεκριμένα, από τα 5 διαφορετικά ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων (5, 1, 0.5, 0.1 και 0.05% w/w) τα δείγματα που εξετάστηκαν δεν είχαν πουθενά θετική αντίδραση. Κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, εκτός από τα προς ανάλυση δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς την παρουσία DNA, ένας δεύτερος αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *S. granarius*, ένας θετικός μάρτυρας με ολικό DNA από *S. zeamais*, ένας αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *S. oryzae*, ένας αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *T. confusum* καθώς και ένας αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA από *T. castaneum*. Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 40), τα μόνα προϊόντα της αντίδρασης ήταν ο θετικός μάρτυρας, καθώς και ο μάρτυρας με το ολικό DNA του *S. oryzae* οι οποίοι είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 684 bp. Στους υπόλοιπους αρνητικούς μάρτυρες δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες στα 684 bp στην πηκτή. Το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 παρουσίασε ιδιαίτερα μειωμένη ευαισθησία, καθώς δεν κατάφερε να ανιχνεύσει το DNA του *S. zeamais* σε κανένα από τα ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων, αλλά και έλλειψη εξειδίκευσης, καθώς δεν μπόρεσε να ανιχνεύσει ούτε τα υπόλοιπα έντομα αποθηκών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.





Εικ. 40 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR με χρήση του ζεύγους εκκινήτων TL2-J-3037 / TK-N-3785, για ανίχνευση του *S. zeamais*, σε πηκτή αгарόζης 1.2%.

**Ladder:** 1kb DNA ladder, **Π<sub>1</sub>:** 5% *S. zeamais*, **Π<sub>2</sub>:** 1% *S. zeamais*, **Π<sub>3</sub>:** 0.5% *S. zeamais*, **Π<sub>4</sub>:** 0.1% *S. zeamais*, **Π<sub>5</sub>:** 0.05% *S. zeamais*, (-): No DNA, (-): DNA *S. granarius*, (+): DNA *S. zeamais*, (-): DNA *S. oryzae*, (-): DNA *T. confusum*, (-): DNA *T. castaneum*.



### 3.3 Μοριακή ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων σε τυφλά δείγματα αλεύρων

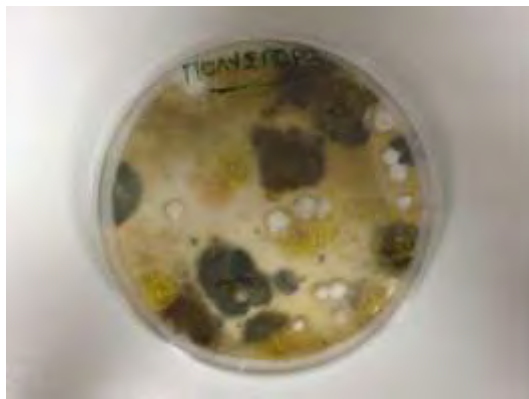
Στα πλαίσια του πειράματος, λήφθηκαν τυχαία δείγματα βάρους 100 gr, από τρία διαφορετικά είδη αλεύρων: αλεύρι πολύσπορο, αλεύρι ολικής άλεσης και αλεύρι μαλακού σίτου. Από το κάθε δείγμα, μία ποσότητα 10 gr αραιώθηκε με διαλύτη [Maximum Recovery Diluent, MRD: 1g Bacteriological Peptone (L37), 8.5g Sodium Chloride, Deionised water, pH 7.0] (Εικ. 41) και τοποθετήθηκε σε τρυβλία Petri, σε θρεπτικό υπόστρωμα DG18 [Dichloran 18% glycerol agar: 10g Glucose, 5g Peptone, 1g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 220g Glycerol, A.R., 15g Agar, 2mg Dichloran (0.2% w/v in ethanol, 1ml), 100mg Chloramphenicol, 1lt Distilled water], με σκοπό τον έλεγχο τυχόν βλάστησης σπορίων. Μετα την επιβεβαίωση της βλάστησης των σπορίων (Εικ. 42, 43, 44) δεν ακολούθησε περαιτέρω έλεγχος πέραν του μακροσκοπικού.

Εν συνεχεία, από το κάθε δείγμα αλεύρων λήφθηκε μία ποσότητα 1 gr και ακολούθησε καθαρισμός και απομόνωση του ολικού DNA των δειγμάτων, χωρίς καμία προηγούμενη προεργασία. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές PCR για κάθε είδος μυκοτοξικογόνου μύκητα, με σκοπό τον έλεγχο της ανίχνευσης του μύκητα μέσα στα τυφλά δείγματα των αλεύρων.



Εικ. 41 Δείγματα αλεύρων αραιωμένα με διαλύτη

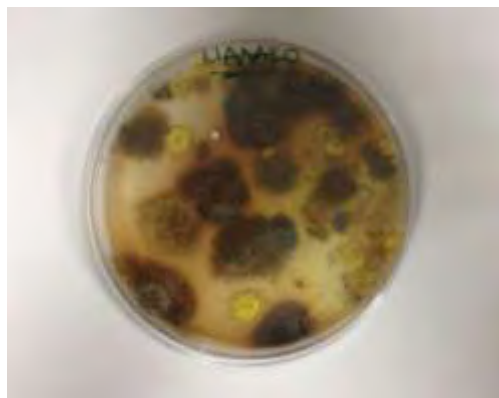




Εικ. 42 Βλάστηση σπορίων σε αραιωμένο με  
διαλύτη δείγμα πολύσπορου αλευριού



Εικ. 43 Βλάστηση σπορίων σε αραιωμένο με  
διαλύτη δείγμα αλευριού ολικής άλεσης



Εικ. 44 Βλάστηση σπορίων σε αραιωμένο  
με διαλύτη δείγμα μαλακού αλευριού



### 3.3.1 Μοριακή ανίχνευση του *Penicillium verrucosum*

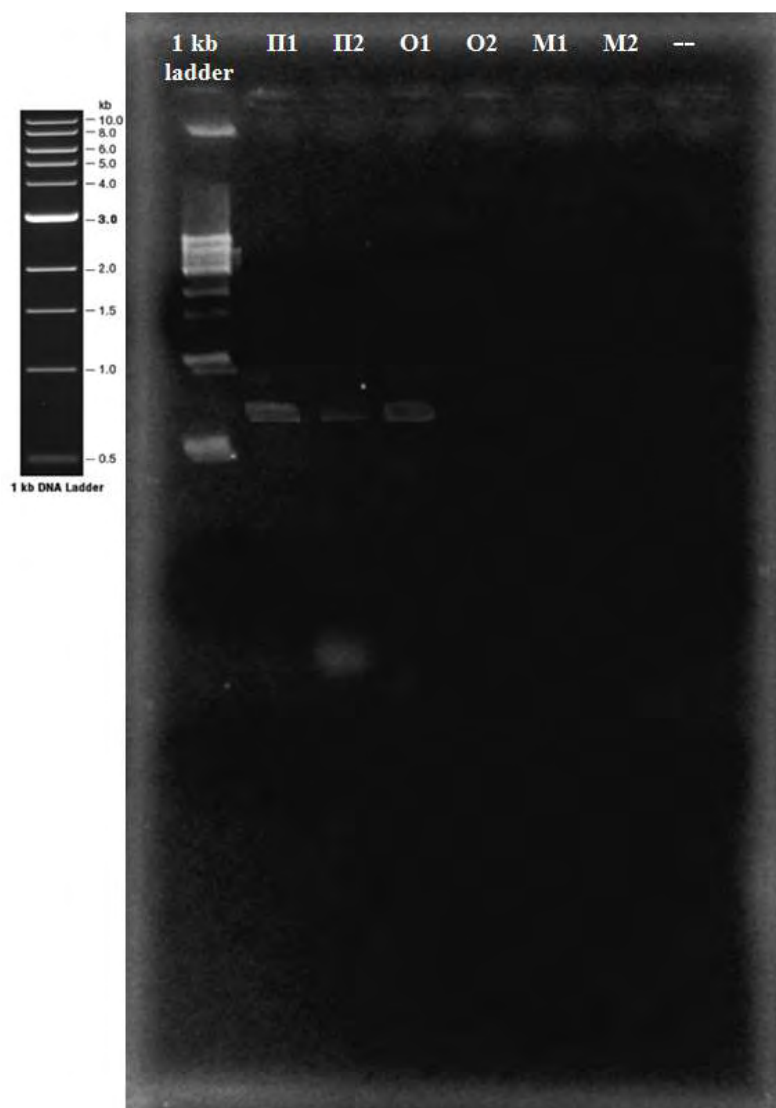
#### 3.3.1.1 Μοριακή ανίχνευση του *Penicillium verrucosum* με το ζεύγος εκκινητών pksCT-Mp-3\_for / pksCT-Mp-3\_rev

Με την χρήση του ζεύγους εκκινητών pksCT-Mp-3\_for / pksCT-Mp-3\_rev, το DNA του *P. verrucosum* ανιχνεύτηκε επιτυχώς σε δύο από τα τρία δείγματα αλεύρων που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, το πολύσπορο αλεύρι είχε θετική αντίδραση και στις δύο επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν, το αλεύρι ολικής άλεσης είχε θετική αντίδραση μόνο στη μία από τις δύο επαναλήψεις, ενώ το αλεύρι μαλακού σίτου δεν είχε θετική αντίδραση σε καμία από τις δύο επαναλήψεις. Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 45), όλα τα προϊόντα της αντίδρασης είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 616 bp. Κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, εκτός από τα προς ανάλυση δείγματα, χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA υγιούς φυτού μαλακού σίτου. Στον αρνητικό μάρτυρα δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες στα 616 bp στην πηκτή αγαρόζης μετά τη χρώση.

#### 3.3.1.2 Μοριακή ανίχνευση του *Penicillium verrucosum* με το ζεύγος εκκινητών otapksPV\_for / otapksPV\_rev

Με την χρήση του ζεύγους εκκινητών otapksPV\_for / otapksPV\_rev, το DNA του *P. verrucosum* ανιχνεύτηκε επιτυχώς σε δύο από τα τρία δείγματα αλεύρων που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, το πολύσπορο αλεύρι είχε θετική αντίδραση στη μία από τις δύο επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν, το αλεύρι ολικής άλεσης είχε επίσης θετική αντίδραση μόνο στη μία από τις δύο επαναλήψεις, ενώ το αλεύρι μαλακού σίτου δεν είχε θετική αντίδραση σε καμία από τις δύο επαναλήψεις. Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 46), όλα τα προϊόντα της αντίδρασης είχαν το επιθυμητό μέγεθος των 415 bp. Κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, εκτός από τα προς ανάλυση δείγματα, χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας με ολικό DNA υγιούς φυτού κριθαριού. Στον αρνητικό μάρτυρα δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες στα 415 bp στην πηκτή αγαρόζης μετά τη χρώση.

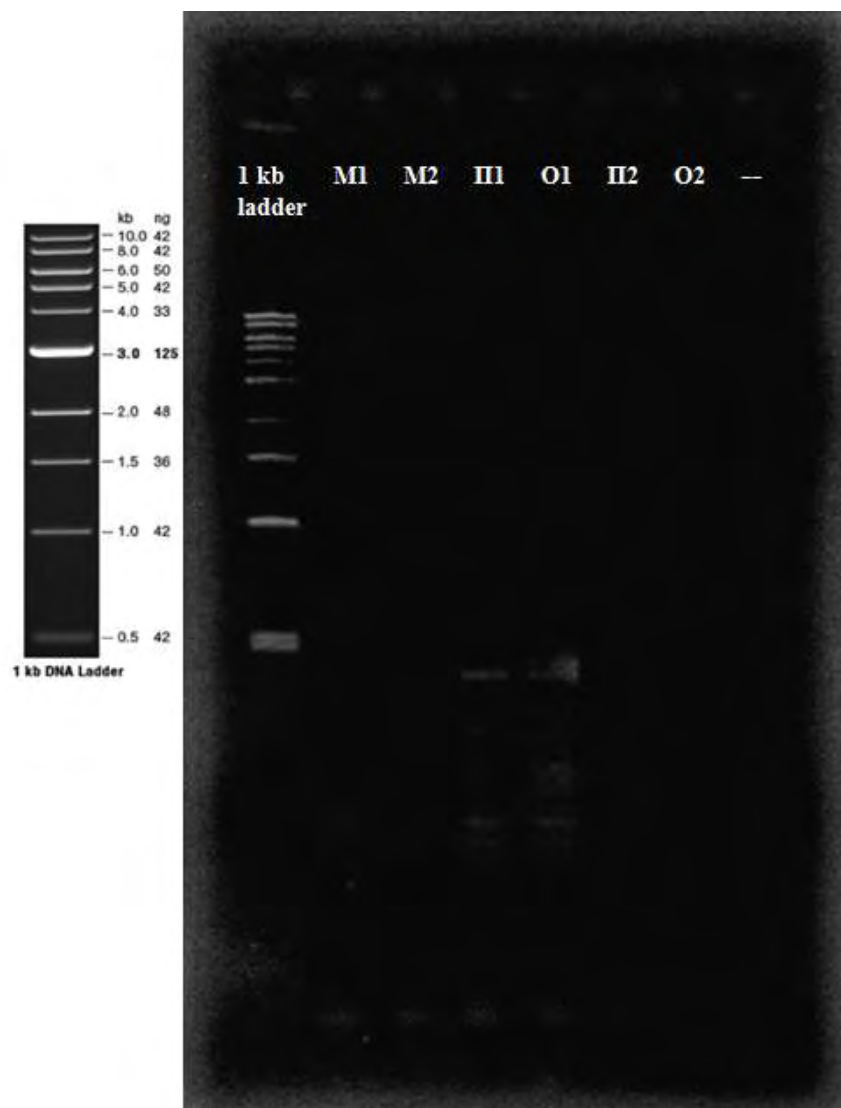




Εικ. 45 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών pksCT-Mp-3\_for / pksCT-Mp-3\_rev σε πηκτική αгарόζης 1.5%.

**Ladder:** 1kb DNA ladder, **Π<sub>1</sub>:** Αλεύρι πολύσπορο (1<sup>η</sup> επανάληψη), **Π<sub>2</sub>:** Αλεύρι πολύσπορο (2<sup>η</sup> επανάληψη), **O<sub>1</sub>:** Αλεύρι ολικής άλεσης (1<sup>η</sup> επανάληψη), **O<sub>2</sub>:** Αλεύρι ολικής άλεσης (2<sup>η</sup> επανάληψη), **M<sub>1</sub>:** Αλεύρι μαλακό (1<sup>η</sup> επανάληψη), **M<sub>2</sub>:** Αλεύρι μαλακό (2<sup>η</sup> επανάληψη), **(-):** DNA υγιούς φυτού μαλακού σίτου





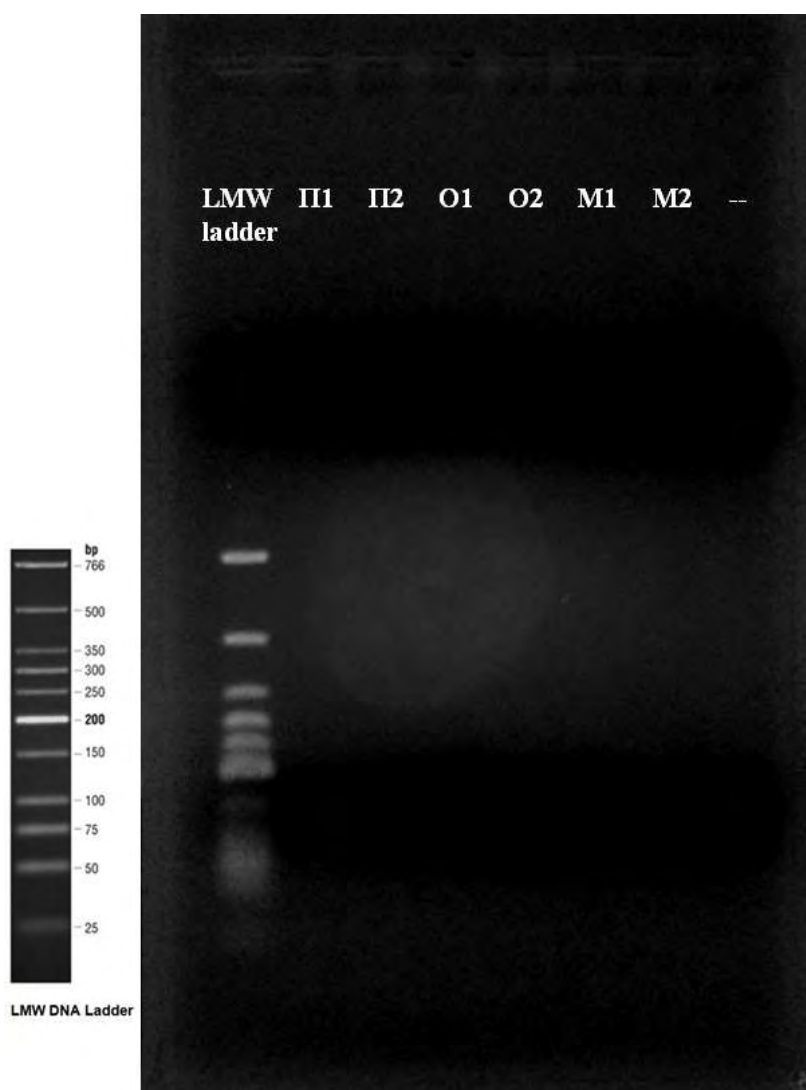
Εικ. 46 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών otapksPV\_for / otapksPV\_rev σε πηκτική αгарόζης 1.5%.

**Ladder:** 1kb DNA ladder, **M<sub>1</sub>:** Αλεύρι μαλακό (1<sup>η</sup> επανάληψη), **M<sub>2</sub>:** Αλεύρι μαλακό (2<sup>η</sup> επανάληψη), **Π<sub>1</sub>:** Αλεύρι πολύσπορο (1<sup>η</sup> επανάληψη), **O<sub>1</sub>:** Αλεύρι ολικής άλεσης (1<sup>η</sup> επανάληψη), **Π<sub>2</sub>:** Αλεύρι πολύσπορο (2<sup>η</sup> επανάληψη), **O<sub>2</sub>:** Αλεύρι ολικής άλεσης (2<sup>η</sup> επανάληψη), **(-):** DNA υγιούς φυτού κριθαριού



### 3.3.2 Μοριακή ανίχνευση του *Aspergillus flavus*

Με την χρήση του ζεύγους εκκινητών FLAVIQ1 / FLAVIQ2, το DNA του *A. flavus* δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα τρία δείγματα αλεύρων που χρησιμοποιήθηκαν και σε καμία από τις δύο επαναλήψεις. Όπως φαίνεται και στην πηκτική αγαρόζη μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 47), τόσο στα δείγματα, όσο και στον αρνητικό μάρτυρα (υγιές φυτό βρώμης) που χρησιμοποιήθηκε, δεν αποκαλύφθηκαν οι αναμενόμενες ζώνες στα 100 bp



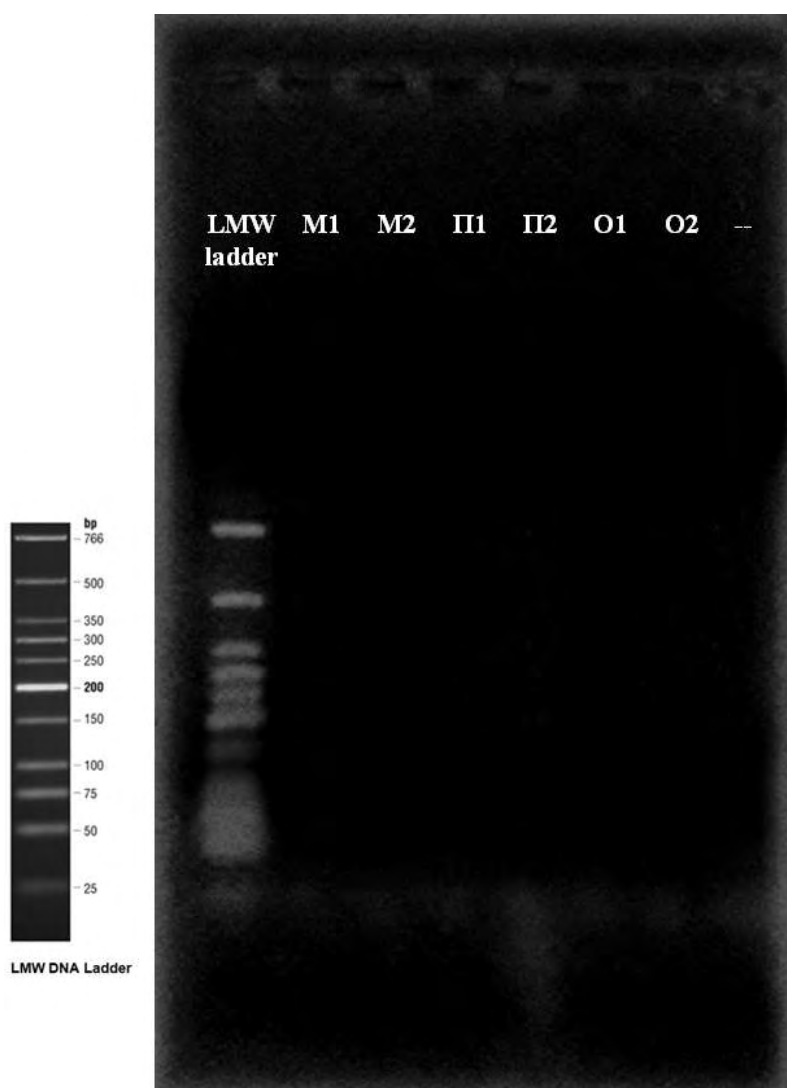
Εικ. 47 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών FLAVIQ1 / FLAVIQ2 σε πηκτική αγαρόζης 2%.

**Ladder:** LMW DNA ladder, **Π<sub>1</sub>:** Αλεύρι πολύσπορο (1<sup>η</sup> επανάληψη), **Π<sub>2</sub>:** Αλεύρι πολύσπορο (2<sup>η</sup> επανάληψη), **O<sub>1</sub>:** Αλεύρι ολικής άλεσης (1<sup>η</sup> επανάληψη), **O<sub>2</sub>:** Αλεύρι ολικής άλεσης (2<sup>η</sup> επανάληψη), **M<sub>1</sub>:** Αλεύρι μαλακό (1<sup>η</sup> επανάληψη), **M<sub>2</sub>:** Αλεύρι μαλακό (2<sup>η</sup> επανάληψη), **(-):** DNA υγιούς φυτού βρώμης



### 3.3.3 Μοριακή ανίχνευση του *Aspergillus parasiticus*

Με την χρήση του ζεύγους εκκινητών FLAVIQ1 / PARQ2, το DNA του *A. parasiticus* δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα τρία δείγματα αλεύρων που χρησιμοποιήθηκαν και σε καμία από τις δύο επαναλήψεις. Όπως φαίνεται και στην πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικ. 48), τόσο στα δείγματα, όσο και στον αρνητικό μάρτυρα (υγιές φυτό σίκαλης) που χρησιμοποιήθηκε, δεν αποκαλύφθηκαν οι αναμενόμενες ζώνες στα 100 bp



Εικ. 48 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών FLAVIQ1 / PARQ2 σε πηκτή αγαρόζης 2%.

**Ladder:** LMW DNA ladder, **M<sub>1</sub>:** Αλεύρι μαλακό (1<sup>η</sup> επανάληψη), **M<sub>2</sub>:** Αλεύρι μαλακό (2<sup>η</sup> επανάληψη), **Π<sub>1</sub>:** Αλεύρι πολύσπορο (1<sup>η</sup> επανάληψη), **Π<sub>2</sub>:** Αλεύρι πολύσπορο (2<sup>η</sup> επανάληψη), **Ο<sub>1</sub>:** Αλεύρι ολικής άλεσης (1<sup>η</sup> επανάληψη), **Ο<sub>2</sub>:** Αλεύρι ολικής άλεσης (2<sup>η</sup> επανάληψη), **(-):** DNA υγιούς φυτού σίκαλης



#### 4. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Με βάση τα έως τώρα δεδομένα, όλες οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση τόσο των εντόμων αποθηκών, όσο και των μυκοτοξινών στα διάφορα διατροφικά προϊόντα έχουν μειονεκτήματα που δεν επιτρέπουν την ευρεία χρήση τους. Η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ως μεθόδου ανίχνευσης, παρέχει το συγκριτικό πλεονέκτημα της πολύ μεγάλης ευαισθησίας αλλά και της ταχύτητας, παραμέτρων ιδιαίτερα σημαντικών όταν πρόκειται για την διεξαγωγή ελέγχων, τόσο σε ερευνητικό, όσο και βιομηχανικό επίπεδο. Αν και αποτελεί γεγονός ότι πρόκειται για μια εξαιρετικά επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία που απαιτεί ακριβό εξοπλισμό, παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης του υπό διερεύνηση DNA σε πολλές κατηγορίες προϊόντων, επεξεργασμένων ή μη. Επιπλέον, όσον αφορά στα έντομα αποθηκών, επιτρέπει την ανίχνευση τους σε όποιο βιολογικό στάδιο και αν βρίσκονται, καθώς επίσης και την ανίχνευση των τμημάτων ή/και των υπολειμμάτων τους. Ωστόσο, αυτό αποτελεί και μειονέκτημα της μεθόδου, καθώς δεν παρέχει πληροφορίες, σχετικά με το εάν υπάρχουν ενεργές μορφές εντόμων στο υπό εξέταση δείγμα. Στον τομέα της ανίχνευσης των μυκοτοξινών, η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης έφερε επανάσταση, διότι κατέστη δυνατή όχι μόνο η αναγνώριση των ειδών των μυκήτων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των μυκοτοξινών, αλλά επίσης καθόρισε και τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη παραγωγή των μυκοτοξινών. Παρόλα αυτά, όπως και κάθε άλλη μέθοδος, παρουσιάζει και μειονεκτήματα τα οποία είναι ικανά να αντισταθμίσουν την, κατά τα άλλα, εμφανή της υπεροχή. Λόγω της εκτεταμένης προηγούμενης επεξεργασίας που απαιτούν τα υπό εξέταση δείγματα (απομόνωση και καθαρισμός γενετικού υλικού, υπολογισμός ποσότητας και καθαρότητας γενετικού υλικού, κ.α.), δεν είναι πρακτικά δυνατή η διαχείριση μεγάλου όγκου δειγμάτων. Επιπλέον, η όλη επεξεργασία που προηγείται της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ενέχει τον κίνδυνο μόλυνσης των δειγμάτων, γεγονός που αποτελεί και το μεγάλο μειονέκτημα της μεθόδου, καθώς η παρουσία στο δείγμα έστω και ελάχιστης ποσότητας προσμείξεων (ξένου DNA) αρκεί για να δώσει η δοκιμασία ψευδές αποτέλεσμα.

Στη παρούσα μελέτη, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των εντόμων *S. oryzae*, *S. granarius* και *S. zeamais* σε δείγματα αλεύρων που είχαν μολυνθεί τεχνητά, σε ποσοστά 5, 1, 0.5, 0.1 και 0.05% w/w (βάση του πειράματος που πραγματοποίησαν οι Balasubramanian *et al.* 2007) καθώς επίσης



και για την ανίχνευση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων *P. verrucosum*, *A. flavus* και *A. parasiticus* σε τυφλά δείγμα αλεύρων.

Τα αποτελέσματα του πειράματος όσον αφορά στα έντομα αποθηκών, έδειξαν αυξημένη ευαισθησία της μεθόδου. Συγκεκριμένα, τα ζεύγη εκκινητών των Obrepalska-Steplowska *et al.* (2008) και Corrêa *et al.* (2013) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης κατάφεραν να ανιχνεύσουν τις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του μιτοχονδριακού DNA και των τριών εντόμων, σε όλα τα υπό διερεύνηση δείγματα και στις δύο επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν. Από τα πέντε διαφορετικά ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων που εξετάστηκαν, είχαν όλα θετική αντίδραση καθώς επίσης και το επιθυμητό μέγεθος.

Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, η μέθοδος των Doyle and Doyle (1990) και Lodhi *et al.* (1994) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον καθαρισμό του γενετικού υλικού τόσο των εντόμων, όσο και των μιγμάτων εντόμων-αλευριού (μετά από τις απαραίτητες τροποποιήσεις που έγιναν για τον ευκολότερο χειρισμό του υλικού), ήταν εξαιρετικά αποτελεσματική και λειτουργική, παρά το γεγονός ότι προοριζόταν για φυτικά υλικά. Η μέθοδος επέτρεψε την απομόνωση του DNA από τον συνδυασμό δύο βιολογικών υλικών, εκ των οποίων το ένα ήταν 100 έως 2000 φορές περισσότερο από το άλλο. Οι απομονώσεις του ολικού DNA είχαν τιμές καθαρότητας ανάμεσα στα αποδεκτά όρια που είχαν θέσει οι Sambrook and Russell (2001) και η ποσότητα του ολικού DNA ήταν επαρκής για την διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Αντίθετα, τόσο οι Obrepalska-Steplowska *et al.* (2008) και Corrêa *et al.* (2013) που ασχολήθηκαν με τα έντομα του γένους *Sitophilus* στα πειράματα τους, όσο και οι Balasubramanian *et al.* (2007) που ασχολήθηκαν με τα έντομα του γένους *Tribolium*, χρησιμοποίησαν έτοιμα εμπορικά συστήματα αντιδραστηρίων (kit) για την απομόνωση και τον καθαρισμό του γενετικού υλικού των δειγμάτων τους. Επιπλέον, οι Balasubramanian *et al.* (2007) για την απομόνωση του ολικού DNA από τις καθαρές καλλιέργειες των εντόμων καθώς και από τα άλευρα, ακολούθησαν την μέθοδο της υψηλής εκχύλισης με άλατα (high salt extraction method) των Aljanabi and Martinez (1997) έτσι ώστε να απομακρύνουν από το υλικό τους τα υψηλά επίπεδα των πολυσακχαριτών, τα οποία αναστέλλουν την δραστηριότητα της Taq πολυμεράσης και παρεμποδίζουν την αποτελεσματική διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Σε κάθε περίπτωση πάντως αξίζει να σημειωθεί ότι η διεθνής βιβλιογραφία σπανίως



αναφέρεται στις τιμές καθαρότητας των απομονώσεων του γενετικού υλικού, γεγονός αξιοπερίεργο δεδομένου ότι η καθαρότητα του ολικού DNA που θα χρησιμοποιηθεί στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι υψίστης σημασίας για την ανεμπόδιστη διεξαγωγή της μεθόδου και εγγυάται αδιαμφισβήτητα αποτελέσματα.

Τα ζεύγη εκκινητών των Obrepalska-Steplowska *et al.* (2008) και Corrêa *et al.* (2013) που χρησιμοποιήθηκαν, παρουσίασαν υψηλή εξειδίκευση ως προς την ανίχνευση των εντόμων του γένους *Sitophilus*. Συγκεκριμένα, κατάφεραν να ανιχνεύσουν και να ενισχύσουν μόνο τις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων μιτοχονδριακού DNA του συγκεκριμένου εντόμου για το οποίο είχαν σχεδιαστεί. Αυτό επαληθεύτηκε και από τις πηκτές αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση, καθώς σε κανέναν από τους αρνητικούς μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μία από τις διαδοχικές PCR (No DNA, υγιές φυτό σκληρού σίτου, *R. dominica*, *T. confusum* και *T. castaneum*) δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες στην πηκτή. Επιπρόσθετα, όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα, οι εκκινητές εκτός από υψηλή εξειδίκευση παρουσίασαν και αυξημένη ευαισθησία, καθώς κατάφεραν να ανιχνεύσουν το DNA των προς ανίχνευση εντόμων ακόμα και στα πιο μικρά ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων που πραγματοποιήθηκαν. Αντίθετα, οι Balasubramanian *et al.* (2007) σε παρόμοιο πείραμα τους, όπου πραγματοποίησαν τεχνητές μολύνσεις σε δείγματα αλευριού από μύλο και σε συσκευασμένο αλεύρι, βάρους 200 mg, με έντομα *T. confusum* και *T. castaneum* σε ποσοστά 1, 0.5, 0.25, 0.1 και 0.05% w/w, δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν τα έντομα σε ποσοστά χαμηλότερα του 1%. Αυτή η αποτυχία της ανίχνευσης μπορεί να οφείλεται είτε σε μειωμένη εξειδίκευση και ευαισθησία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, είτε σε αδυναμία της μεθόδου απομόνωσης του DNA να απομονώσει γενετικό υλικό από ένα συνδυασμό δύο βιολογικών υλικών με τόσο μεγάλη διαφορά μάζας. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποίησαν οι Balasubramanian *et al.* (2007) ήταν το αποτέλεσμα μιας διαδικασίας ελέγχου 50 διαφορετικών εκκινητών που συνδυάστηκαν μεταξύ τους με 58 τρόπους, με στόχο την δημιουργία εξειδικευμένων εκκινητών για την ανίχνευση εντόμων. Από αυτούς τους συνδυασμούς, το ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε για την ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 1-άλφα παράγοντα επιμήκυνσης (elongation factor 1-alpha), χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του *T. castaneum*, ενώ το ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε για την ενίσχυση του εσωνίου της β-τουμπουλίνης (beta-tubulin intron), χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του *T. confusum*. Ωστόσο, τα αποτελέσματα του πειράματος των Balasubramanian *et al.* (2007) έδειξαν υψηλή



εξειδίκευση των εκκινητών ως προς την ανίχνευση του ολικού DNA των εντόμων, με 100% επαναληψιμότητα της διαδικασίας, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αποτυχία της ανίχνευσης πιθανόν να οφείλεται στην μεθόδου απομόνωσης του DNA που χρησιμοποίησαν.

Σε αντίθεση με τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών των Obrepalska-Steplowska *et al.* (2008) και Corrêa *et al.* (2013), το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 των Liu and Beckenbach (1992) και Simon *et al.* (1994) που χρησιμοποιήθηκε, δεν κατάφερε να ανιχνεύσει αποτελεσματικά όλα τα είδη του γένους *Sitophilus* που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα κατάφερε να ανιχνεύσει και να ενισχύσει μόνο τις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων μιτοχονδριακού DNA των ειδών *S. oryzae* και *S. zeamais*, αλλά όχι του *S. granarius*. Επιπλέον, δεν κατάφερε να ανιχνεύσει ούτε το DNA των υπολοίπων εντόμων αποθηκών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (*R. dominica*, *T. confusum*, *T. castaneum*, *O. surinamensis*). Εκτός από έλλειψη εξειδίκευσης ως προς την ανίχνευση, το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών παρουσίασε και ιδιαίτερα μειωμένη ευαισθησία, καθώς δεν κατάφερε να ανιχνεύσει το DNA των προς ανίχνευση εντόμων σε κανένα από τα ποσοστά των τεχνητών μολύνσεων που πραγματοποιήθηκαν, παρά μόνο στους θετικούς μάρτυρες. Αυτή η αποτυχία του γενικευμένου ζεύγους εκκινητών να ανιχνεύσει όλα τα είδη του γένους *Sitophilus* μπορεί να δικαιολογηθεί βάση του γεγονότος ότι ο σχεδιασμός τους αποσκοπούσε στην αλληλούχιση των μιτοχονδριακών γονιδίων εντόμων από την πλειονότητα των τάξεων και στην μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ ταξινομικά διαφορετικών ειδών και όχι στην εξειδικευμένη ανίχνευση κάποιου είδους εντόμου. Το γενικευμένο ζεύγος εκκινητών TL2-J-3037 / TK-N-3785 έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα για την ανίχνευση και τον γενετικό προσδιορισμό ατόμων από πέντε διαφορετικές τάξεις εντόμων (Simon *et al.* 1994), όχι όμως και εντόμων που ανήκουν στην Τάξη Κολεόπτερα, όπως τα είδη του γένους *Sitophilus*. Η περιοχή ανίχνευσης του στο μιτοχονδριακό DNA αποτελείται από ολόκληρη την περιοχή κωδικοποίησης του γονιδίου COII (υπομονάδα II της Οξειδάσης του κυτοχρώματος C), οπότε θεωρητικά τουλάχιστον, είναι ικανό να ανιχνεύσει οποιοδήποτε είδος εντόμου (Simon *et al.* 1994). Στην πραγματικότητα όμως, οι διαφορές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα του κάθε διαφορετικού είδους εντόμου, δεν επιτρέπει την καθολική χρήση του συγκεκριμένου ζεύγους εκκινητών.

Όπως φάνηκε κατά την διεξαγωγή του πειράματος, η εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού για το κάθε ζεύγος εκκινητών, αποτελεί καταλυτικό



παράγοντα για την σωστή διεξαγωγή της μεθόδου της PCR. Προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με θερμοκρασίες βασισμένες στον τύπο  $T_m$  (melting temperature) =  $2(A + T) + 4(C + G)$  δεν έδωσαν αποτελέσματα, ούτε καν για τους θετικούς μάρτυρες. Όπως προκύπτει λοιπόν, η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού του εκκινητή διαφέρει από την υπολογισμένη  $T_m$  τιμή, ακόμη και όταν οι δύο εκκινητές έχουν την ίδια  $T_m$ . Έτσι, η θερμοκρασία υβριδισμού του εκκινητή είναι συνήθως 5°C μικρότερη από την υπολογισμένη  $T_m$ . Εάν η θερμοκρασία υβριδισμού είναι πολύ υψηλή οι εκκινητές και ο στόχος DNA παραμένουν διαχωρισμένα (δεν υπάρχει υβριδισμός). Αντίθετα αν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή τότε οι εκκινητές υβριδίζουν με DNA αλληλουχίες χωρίς να υπάρχει 100% ομολογία μεταξύ τους. Σαν αποτέλεσμα, μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, υπάρχουν προϊόντα που έχουν πολλαπλασιαστεί και δεν αντιστοιχούν στον επιθυμητό στόχο DNA.

Τα αποτελέσματα του πειράματος όσον αφορά στην ανίχνευση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων *P. verrucosum*, *A. flavus* και *A. parasiticus* στα τυφλά δείγματα αλεύρων, ήταν τόσο θετικά όσο και αρνητικά.

Συγκεκριμένα, τα δύο ζεύγη εκκινητών των Schmidt-Heydt *et al.* (2008) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης κατάφεραν να ανιχνεύσουν τις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του γονιδίου της συνθάσης του πολυκετιδίου της ωχρατοξίνης A που παράγεται από τον μύκητα *Penicillium verrucosum*, σε δύο από τα τρία υπό διερεύνηση δείγματα. Από τα τρία διαφορετικά είδη αλεύρων που εξετάστηκαν, το πολύσπορο αλεύρι, με χρήση του 1<sup>ου</sup> ζεύγους εκκινητών, είχε θετική αντίδραση και στις δύο επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν, ενώ με χρήση του 2<sup>ου</sup> ζεύγους εκκινητών, είχε θετική αντίδραση μόνο στη μία από τις δύο επαναλήψεις. Το αλεύρι ολικής άλεσης είχε θετική αντίδραση μόνο στη μία από τις δύο επαναλήψεις, με χρήση τόσο του 1<sup>ου</sup> όσο και του 2<sup>ου</sup> ζεύγους εκκινητών, ενώ το αλεύρι μαλακού σίτου δεν είχε θετική αντίδραση με κανένα ζεύγος εκκινητών.

Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, και στην περίπτωση των μυκήτων η μέθοδος των Doyle and Doyle (1990) και Lodhi *et al.* (1994) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον καθαρισμό του γενετικού υλικού, ήταν αποτελεσματική. Η μέθοδος επέτρεψε την απομόνωση του DNA από τα λιγοστά σπόρια του μύκητα, δεδομένου ότι δεν υπήρχε καμία εμφανής μόλυνση ή ανάπτυξη μυκηλίου σε κανένα από τα δείγματα των αλεύρων μέχρι την στιγμή που χρησιμοποιήθηκαν. Οι



απομονώσεις του ολικού DNA είχαν και σε αυτή την περίπτωση τιμές καθαρότητας ανάμεσα στα αποδεκτά όρια που είχαν θέσει οι Sambrook and Russell (2001) και η ποσότητα του ολικού DNA ήταν επαρκής για την διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Παρόμοιο πρωτόκολλο με αυτό των Doyle and Doyle (1990) και Lodhi *et al.* (1994) χρησιμοποίησαν και οι Schmidt-Heydt *et al.* (2008) για την απομόνωση του DNA στο πείραμα τους, συγκεκριμένα αυτό των Yelton *et al.* (1984). Και με την χρήση αυτής της μεθόδου απομόνωσης ολικού DNA η ανίχνευση του *P. verrucosum* από τους Schmidt-Heydt *et al.* (2008) στα υπό εξέταση δείγματα τους ήταν επιτυχής, με μόνη ουσιαστική διαφορά ότι ο μύκητας είχε προηγουμένως εμβολιαστεί στα δείγματα αλεύρων που εξετάστηκαν. Αντίθετα, στο δικό μας πείραμα τα δείγματα αλεύρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τυφλά και άρα, δεν υπήρχε η δυνατότητα να γνωρίζουμε εάν τα σπόρια του μύκητα υπήρχαν ή όχι. Το μόνο διαθέσιμο δεδομένο ήταν η ανάπτυξη μυκηλίου κατά την ασηπτική καλλιέργεια των αραιωμένων με διαλύτη δειγμάτων αλεύρων.

Απ' όλα τα παραπάνω οδηγούμαστε με ασφάλεια στο συμπέρασμα ότι τα ζεύγη εκκινητών των Schmidt-Heydt *et al.* (2008) παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση ως προς την ανίχνευση του *P. verrucosum*, καθώς επίσης και αυξημένη ευαισθησία. Αυτό επαληθεύτηκε και από την πηκτή αγαρόζης μετά από την οριζόντια ηλεκτροφόρηση, καθώς δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες στους αρνητικούς μάρτυρες (υγιές φυτό μαλακού σίτου και υγιές φυτό κριθαριού) που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μία από τις PCR.

Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι η ανίχνευση του *P. verrucosum* στα υπό εξέταση δείγματα δεν σημαίνει απαραίτητα και την ύπαρξη της ωχρατοξίνης A σε αυτά. Η ανίχνευση ενός μυκοτοξικογόνου μύκητα σε ένα δείγμα τροφίμου, ή πιο ορθά, η ανίχνευση ενός γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τη παραγωγή μιας μυκοτοξίνης, δεν καθορίζει απαραίτητα και την βιοσύνθεση της μυκοτοξίνης. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι η μέθοδος της PCR επιτρέπει την ανίχνευση γονιδίων που βρίσκονται σε ένα δείγμα, χωρίς όμως να καθορίζει και εάν τα εν λόγω γονίδια εκφράζονται ή όχι (Paterson 2006). Δεδομένου ότι ο μύκητας *P. verrucosum* μπορεί να βρεθεί αποκλειστικά σε δημητριακά και προϊόντα δημητριακών οι Lund και Frisvad (2003) υποστηρίζουν ότι η παρουσία και μόνο του *P. verrucosum* υποδεικνύει και την παρουσία της ωχρατοξίνης A. Σύμφωνα με τους παραπάνω, μια προσβολή άνω του 7% των σπόρων σε ένα δείγμα υποδεικνύει μόλυνση από ωχρατοξίνη A. Αντίθετα, σύμφωνα με τους Lindblad *et al.* (2004), μία προσβολή με *P. verrucosum* άνω του



103 cfu/g υποδεικνύει υψηλή πιθανότητα βιοσύνθεσης της ωχρατοξίνης A. Για το λόγο αυτό, οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ανίχνευσης θα πρέπει να μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την παρουσία και το επίπεδο της μόλυνσης από τον *P. verrucosum*, αλλά ταυτόχρονα να είναι και σε θέση να προσδιορίζουν την παραγωγή ή όχι, της ωχρατοξίνης A

Όσον αφορά στην ανίχνευση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων *A. flavus* και *A. parasiticus*, τα αποτελέσματα δεν ήταν θετικά. Συγκεκριμένα, τα δύο ζεύγη εκκινητών των Sardiñas *et al.* (2011) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν τις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων της μη μεταγραφόμενης περιοχής ITS2 του ριβοσωμικού DNA των αντίστοιχων μυκήτων. Από τα τρία διαφορετικά είδη αλεύρων που εξετάστηκαν και με τα δύο ζεύγη εκκινητών, κανένα δεν είχε θετική αντίδραση και σε καμία από τις δύο επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι απομονώσεις του ολικού DNA των τυφλών δειγμάτων αλεύρων είχαν τιμές καθαρότητας ανάμεσα στα αποδεκτά όρια που είχαν θέσει οι Sambrook and Russell (2001). Παρόμοιες τιμές καθαρότητας (μεταξύ 1,6 και 1,9) είχαν και τα δείγματα αλεύρων που χρησιμοποίησαν οι Sardiñas *et al.* (2011), παρόλο που οι ίδιοι επέλεξαν έτοιμα εμπορικά συστήματα αντιδραστηρίων (kit) για την απομόνωση και τον καθαρισμό του γενετικού υλικού των δειγμάτων τους. Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω σχετικά με την μέθοδο απομόνωσης και καθαρισμού του γενετικού υλικού και λαμβάνοντας υπ' όψιν και τα προηγούμενα θετικά αποτελέσματα της ανίχνευσης του *P. verrucosum*, μπορούμε με ασφάλεια να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι η αποτυχία ανίχνευσης των μυκήτων *A. flavus* και *A. parasiticus* στα υπό εξέταση δείγματα δεν οφείλεται σε αποτυχία της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού του γενετικού υλικού. Το πιο προφανές συμπέρασμα είναι ότι τα δείγματα αλεύρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρά από σπόρια των μυκήτων, ή λογικότερα, η συγκέντρωση των περιεχόμενων σπορίων δεν ήταν αρκετά μεγάλη ώστε να επιτρέψει την ανίχνευση των μυκήτων. Οι Sardiñas *et al.* (2011) κατάφεραν να ανιχνεύσουν επιτυχώς τους μύκητες στα δείγματα αλεύρων που εξέτασαν, έχοντας όμως προηγουμένως εμβολιάσει τα δείγματα τους με υψηλές συγκεντρώσεις σπορίων. Το γεγονός αυτό από μόνο του, δεν επιτρέπει την αμφισβήτηση της εξειδίκευσης των εκκινητών που σχεδίασαν και χρησιμοποίησαν, παρόλο που στη δημοσίευσή τους δεν υπήρχαν φωτογραφίες από πηκτές αгарόζης



που να αποδεικνύουν την επιτυχία της ανίχνευσης των *A. flavus* και *A. parasiticus* με την μέθοδο της PCR.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ως μέθοδος ελέγχου της ασφάλειας των παραγόμενων τροφίμων, φαίνεται ιδιαίτερα ευαίσθητη και αξιόπιστη και θα μπορούσε να αποτελέσει ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο της παγκόσμιας βιομηχανίας τροφίμων. Επιπλέον, οι νέες προσεγγίσεις σε σχέση με την κλασική PCR (quantitative PCR, real time PCR) βοηθούν στο να ξεπεραστεί και η βασική αδυναμία της παραδοσιακής PCR, η οποία ανιχνεύει την παρουσία ή απουσία του DNA στόχου μην μπορώντας όμως να δώσει ποσοτικά αποτελέσματα. Με την εφαρμογή της ποσοτικής PCR (quantitative PCR, q-PCR), εκτός της ανίχνευσης του DNA σε ένα δείγμα, επιτρέπεται και ο υπολογισμός του αριθμού των αντιγράφων που υπάρχουν στο δείγμα αυτό, ενώ με την PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR, RT-PCR) παρέχεται το πλεονέκτημα ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA προσδιορίζεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, σε σχέση με την κλασική PCR όπου το προϊόν της αντίδρασης ανιχνεύεται στο τέλος. Ως εκ τούτου, με την ύπαρξη μιας αξιόπιστης και επικυρωμένης μεθόδου ελέγχου είναι δυνατή η παραγωγή ποιοτικών και ασφαλών τροφίμων, που θα διασφαλίζουν στο ακέραιο την υγεία των καταναλωτών.

Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι προς την κατεύθυνση αυτή πρέπει να στραφεί και η ευρωπαϊκή νομοθεσία, ώστε να επιτευχθεί ένα υψηλό επίπεδο προστασίας της δημόσιας υγείας των καταναλωτών. Στο πλαίσιο αυτό, η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) έχει καθορίσει μέγιστες τιμές ανοχής για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα (όπως οι μυκοτοξίνες), με σκοπό τη μείωση της παρουσίας των προσμείξεων αυτών στα κατώτερα ευλόγως εφικτά επίπεδα. Έκπληξη βέβαια προκαλεί το γεγονός ότι ενώ ως “πρόσμειξη” νοείται οποιαδήποτε ουσία δεν προστίθεται σκοπίμως στα τρόφιμα αλλά περιέχεται όμως σε αυτά ως αποτέλεσμα της παραγωγικής διαδικασίας επιμολύνοντας τα, τα έντομα ή τα τμήματα αυτών δεν αναγνωρίζονται ως ρυπαντές ή προσμείξεις των τροφίμων. Αντίθετη λογική φαίνεται πως έχουν οι ΗΠΑ καθώς ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA ή USFDA) που είναι αρμόδιος για την προστασία και την προαγωγή της δημόσιας υγείας, έχει ορίσει τα Food Defect Action Levels (επίπεδα δράσης σχετικά με τα ελαττωματικά τρόφιμα). Τα Food Defect Action Levels ορίζουν τα αποδεκτά επίπεδα των φυσικών ή αναπόφευκτων ελαττωμάτων στα τρόφιμα, κάτω από τα οποία δεν παρουσιάζεται κίνδυνος για την υγεία για των καταναλωτών. Τα τμήματα ή υπολείμματα εντόμων



αναγνωρίζονται ως ρυπαντές των τροφίμων και ορίζονται για αυτά μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα ανά είδος τροφίμου. Για παράδειγμα, ορίζεται ότι ένα μέσο επίπεδο μόλυνσης κάτω των 150 τεμαχίων εντόμων ανά 100 γραμμάρια αλευριού, δεν ενέχει κινδύνους για την υγεία. Στο πλαίσιο αυτό, η Ευρωπαϊκή Ένωση θα πρέπει να αντιληφθεί ότι η επίδειξη μηδενικής ανοχής στην παρουσία των εντόμων στα τρόφιμα είναι ουτοπική και ουδεμία σχέση έχει με την πραγματικότητα. Δεδομένου των καταδεδειγμένων κινδύνων που ενέχει η κατανάλωση εντόμων για την δημόσια υγεία, η ύπαρξη νομοθεσίας που θα καθορίζει μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για την παρουσία τους στα τρόφιμα είναι επιτακτική. Μόνο με αυτό τον τρόπο η παραγωγική διαδικασία θα μπορέσει να εναρμονιστεί με την ρύθμιση και την εποπτεία της ασφάλειας των τροφίμων.



**Παράρτημα Ι (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006)**

	Σκληρός σίτος	Μαλακός σίτος	Κριθή	Αραβόσιτος	Σόργο
A. Μέγιστη περιεκτικότητα σε υγρασία	14,5 %	14,5 %	14,5 %	13,5 %	13,5 %
B. Μέγιστο ποσοστό στοιχείων που δεν αποτελούν βασικά σιτηρά άριστης ποιότητας, εκ των οποίων κατ' ανώτατο όριο:	12 %	12 %	12 %	12 %	12 %
1. Θραυσμένοι σπόροι	6 %	5 %	5 %	5 %	5 %
2. Ξένες προσμείξεις που αποτελούνται από σπόρους εκ των οποίων:	5 %	7 %	12 %	5 %	5 %
▪ συρρικνωμένοι σπόροι				---	---
▪ άλλα σιτηρά	3 %		5 %	---	---
▪ σπόροι που έχουν προσβληθεί από παράσιτα					
▪ σπόροι με αποχρωματισμένο φύτρο			---	---	---
▪ σπόροι που έχουν προσβληθεί από τη θέρμανση της ξηράνσεως	0,50 %	0,50 %	3 %	0,50 %	0,50 %
3. Σπόροι που έχουν προσβληθεί από έντομα ή/και φουζάριο εκ των οποίων:	5 %	---	---	---	---



	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ σπόροι που έχουν προσβληθεί από φουζάριο</li> </ul>	1,5 %	---	---	---	---
	4. Σπόροι που έχουν βλαστήσει	4 %	4 %	6 %	6 %	6 %
	5. Διάφορες ξένες προσμείξεις (Schwarzbesatz) εκ των οποίων:					
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ σπόροι ζιζανίων:</li> <li>- βλαβεροί</li> <li>- άλλοι</li> </ul>	0,10 %	0,10 %	0,10 %	0,10 %	0,10 %
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ χαλασμένοι σπόροι:</li> <li>- χαλασμένοι σπόροι που θερμάνθηκαν αφ' εαυτών και με απότομη θέρμανση</li> <li>- άλλοι</li> </ul>	0,05 %	0,05 %			
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ακαθαρσίες</li> <li>■ έλυτρα</li> <li>■ αίρα</li> <li>■ σπόροι με δαυλίτη</li> <li>■ νεκρά έντομα και τμήματα αυτών</li> </ul>	0,05 %	0,05 %	---	---	---
	Γ. Μέγιστο ποσοστό αλευρωδών κόκκων, έστω μερικώς	27 %	---	---	---	---
	Δ. Μέγιστη περιεκτικότητα σε τανίνη <sup>(1)</sup>	---	---	---	---	1 %
	Ε. Ελάχιστο ειδικό βάρος(kg/hl)	78	73	62	71	---
ΣΤ.	Ελάχιστο ποσοστό πρωτεϊνών <sup>(1)</sup> :					



<ul style="list-style-type: none"> <li>■ περίοδος εμπορίας 2000/01</li> <li>■ περίοδος εμπορίας 2001/02</li> <li>■ περίοδος εμπορίας 2002/03 και ακόλουθες</li> </ul>		11,5 %	10 %	---	---	---
Z. Ελάχιστος χρόνος πτώσης σε δευτερόλεπτα (Hagberg)		220	220			
H. Ελάχιστη τιμή του δείκτη Zeleny (ml)		---	22	---	---	---
(1) Σε % ξηράς ουσίας						



**Παράρτημα II (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006)**

1. Αφλατοξίνες	$B_1$	Άθροισμα της αφλατοξίνης $B_1, B_2, G_1$ και $G_2$	$M_1$
Τρόφιμα	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg)		
1.1 Τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και άλλοι ελαιοσποροι, που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα με εξαίρεση: - τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και τους άλλους ελαιοσπορους για σύνθλιψη για την παραγωγή εξευγενισμένου φυτικού ελαίου	8,0	15,0	---
1.2 Αμύγδαλα, φιστίκια και πυρήνες βερίκοκων που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	12,0	15,0	---
1.3 Φουντούκια και καρύδια Βραζιλίας, που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	8,0	15,0	
1.4 Ακρόδρυα, εκτός από τα ακρόδρυα που αναφέρονται στα σημεία 1.2 και 1.3, που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	5,0	10,0	---
1.5 Τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και οι άλλοι ελαιοσποροι και τα επεξεργασμένα προϊόντα αυτών που προορίζονται για την άμεση	2,0	4,0	---



	κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα, με εξαίρεση: - τα ακατέργαστα φυτικά έλαια που προορίζονται για εξευγενισμό - τα εξευγενισμένα φυτικά έλαια			
1.6	Αμύγδαλα, φυστίκια και πυρήνες βερίκοκων, προοριζόμενοι για την άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	8,0	10,0	---
1.7	Φουντούκια και καρύδια Βραζιλίας, προοριζόμενα για την άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	5,0	10,0	
1.8	Ακρόδρυα, εκτός από τα ακρόδρυα που αναφέρονται στα σημεία 1.6 και 1.7, και μεταποιημένα προϊόντα αυτών, που προορίζονται για την άμεση ανθρώπινη κατανάλωση ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	2,0	4,0	---
1.9	Ξηρά φρούτα που υφίστανται κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα.	5,0	10,0	---
1.10	Ξηρά φρούτα και μεταποιημένα προϊόντα τους που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα.	2,0	4,0	---
1.11	Όλα τα δημητριακά και όλα τα παράγωγα προϊόντα αυτών, συμπεριλαμβανομένων των μεταποιημένων προϊόντων δημητριακών, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται στα σημεία 1.12, 1.15 και 1.17	2,0	4,0	---
1.12	Ο αραβόσιτος και το ρύζι που υπόκεινται σε	5,0	10,0	---



	διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα.			
1.13	Νωπό γάλα, γάλα που υφίσταται θερμική επεξεργασία και γάλα για την παρασκευή προϊόντων με βάση το γάλα	---	---	0,050
1.14	<p>Τα εξής είδη καρυκευμάτων:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Capsicum spp</i> (αποξηραμένοι καρποί, ολόκληροι ή αλεσμένοι, συμπεριλαμβανομένου του τσίλι, του τσίλι σε σκόνη, του καγιέν και της πάπρικας)</li> <li>- <i>Piper spp</i> (καρποί, συμπεριλαμβανομένου του λευκού και του μαύρου πιπεριού)</li> <li>- <i>Myristica fragrans</i> (μοσχοκάρυδο)</li> <li>- <i>Zingiber officinale</i> (ζιγγίβερη)</li> <li>- <i>Curcuma longa</i> (κούρκουμα)</li> </ul> <p>Μείγμα καρυκευμάτων που περιέχει ένα ή περισσότερα από τα προαναφερόμενα καρυκεύματα</p>	5,0	10,0	
1.15	Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	0,10	---	---
1.16	Παρασκευάσματα για βρέφη και παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος για βρέφη και του γάλακτος δεύτερης βρεφικής ηλικίας			0,025
1.17	Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη	0,10	---	0,025



<b>2. Ωχρατοξίνη Α</b>	
<b>Τρόφιμα</b>	<b>Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)</b>
2.1 Μη μεταποιημένα δημητριακά	5,0
2.2 Όλα τα προϊόντα που παράγονται από μη μεταποιημένα δημητριακά, συμπεριλαμβανομένων των μεταποιημένων προϊόντων με βάση τα δημητριακά και των δημητριακών που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται στα σημεία 2.9 και 2.10	3,0
2.3 Σταφίδες (κορινθιακή, ξανθή σταφίδα και σουλτανίνα)	10,0
2.4 Φρυγμένοι κόκκοι καφέ και φρυγμένος και αλεσμένος καφές, εξαιρουμένου του διαλυτού καφέ	5,0
2.5 Διαλυτός καφές (στιγμιαίος καφές)	10,0
2.6 Οίνοι (συμπεριλαμβανομένων των αφρωδών οίνων, εξαιρουμένων των οίνων λικέρ και των οίνων με αλκοολικό τίτλο όχι μικρότερο του 15 % vol) και ποτά που προέρχονται από ζύμωση φρούτων	2,0
2.7 Αρωματισμένοι οίνοι, αρωματισμένα ποτά με βάση τον οίνο και αρωματισμένα κοκτέιλ αμπελοοινικών προϊόντων	2,0
2.8 Χυμός σταφυλιών, συμπυκνωμένος χυμός σταφυλιών, όπως αυτός ανασυστάθηκε, νέκταρ σταφυλιών, γλεύκος σταφυλιών και συμπυκνωμένος γλεύκος σταφυλιών όπως αυτός ανασυστάθηκε, οι οποίοι προορίζονται	2,0



	για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο
2.9	Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά 0,50
2.10	Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη 0,50
2.11.	<p>Καρυκεύματα:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Capsicum spp.</i> (αποξηραμένοι καρποί, ολόκληροι ή αλεσμένοι, συμπεριλαμβανομένου του τσίλι, του τσίλι σε σκόνη, του καγιέν και της πάπρικας)</li> <li>- <i>Piper spp.</i> (καρποί, συμπεριλαμβανομένου του λευκού και του μαύρου πιπεριού)</li> <li>- <i>Myristica fragrans</i> (μοσχοκάρυδο)</li> <li>- <i>Zingiber officinale</i> (ζιγγίβερη)</li> <li>- <i>Curcuma longa</i> (κούρκουμα)</li> </ul> <p>Μείγμα μπαχαρικών που περιέχει ένα ή περισσότερα από τα προαναφερόμενα μπαχαρικά</p> <p>30 µg/kg από την 1.7.2010 έως τις 30.6.2012 15 µg/kg από την 1.7.2012</p>
2.12	<p>Γλυκύρριζα (<i>Glycyrrhiza glabra</i>, <i>Glycyrrhiza inflata</i> και άλλα είδη)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ρίζα γλυκύρριζας, συστατικό για φυτικό αφέψημα 20 µg/kg</li> <li>- Εκχύλισμα γλυκύρριζας, για χρήση στα τρόφιμα ιδίως στα ποτά και στη ζαχαροπλαστική 80 µg/kg</li> </ul>



<b>3. Δεσοξυνιβαλενόλη</b>	
<b>Τρόφιμα</b>	<b>Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg)</b>
3.1 Μη μεταποιημένα δημητριακά εκτός του σκληρού σίτου, της βρώμης και του αραβοσίτου	1250
3.2 Μη μεταποιημένος σκληρός σίτος και βρώμη	1750
3.3 Μη μεταποιημένος αραβόσιτος, εξαιρουμένου του μη μεταποιημένου αραβόσιτου που προορίζεται προς επεξεργασία με υγρή άλεση	1750
3.4 Δημητριακά που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, άλευρα δημητριακών, πίτουρα και φύτρα ως τελικό προϊόν που διατίθεται στην αγορά για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται στα σημεία 3.7, 3.8 και 3.9	750
3.5 Ζυμαρικά (ξηρά)	750
3.6 Ψωμί (συμπεριλαμβανομένων των μικρών αρτοσκευασμάτων), τσουρέκια, μπισκότα, σνακ δημητριακών και δημητριακά για πρωινό	500
3.7 Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	200
3.8 Κλάσματα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων > 500 μικρόμετρα που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1103 13 ή 1103 20 40 και άλλα προϊόντα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων > 500 μικρόμετρα που δεν χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1904 10 10	750



3.9	<p>Κλάσματα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων &lt; 500 μικρόμετρα που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1102 20 και άλλα προϊόντα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων &lt; 500 μικρομόρια που δεν χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1904 10 10</p>	1250
-----	--	------



<b>4      Ζεαραλενόνη</b>	
<b>Τρόφιμα</b>	<b>Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)</b>
4.1    Μη μεταποιημένα δημητριακά, εκτός του αραβοσίτου	100
4.2    Μη μεταποιημένος αραβόσιτος, εξαιρουμένου του μη μεταποιημένου αραβόσιτου που προορίζεται προς επεξεργασία με υγρή άλεση	350
4.3    Δημητριακά που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, άλευρα δημητριακών, πίτουρα και φύτρα ως τελικό προϊόν που διατίθεται στην αγορά για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται στα σημεία 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 και 4.10	75
4.4    Ραφινρισμένο αραβοσιτέλαιο	400
4.5    Ψωμί (συμπεριλαμβανομένων των μικρών αρτοσκευασμάτων), τσουρέκια, μπισκότα, σνακ δημητριακών και δημητριακά για πρωινό, εξαιρουμένων των σνακ αραβοσίτου και των δημητριακών για πρωινό με βάση τον αραβόσιτο	50
4.6    Αραβόσιτος που προορίζεται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, σνακ αραβοσίτου και δημητριακά για πρωινό με βάση τον αραβόσιτο	100
4.7    Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά (εξαιρουμένων των μεταποιημένων τροφίμων με βάση τον αραβόσιτο) και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	20
4.8    Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τον	20



	αραβόσιτο για βρέφη και μικρά παιδιά	
4.9	Κλάσματα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων > 500 μικρόμετρα που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1103 13 ή 1103 20 40 και άλλα προϊόντα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων > 500 μικρόμετρα που δεν χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1904 10 10	200
4.10	Κλάσματα αλεσμάτων αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων < 500 μικρομόρια που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1102 20 και άλλα προϊόντα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων < 500 μικρομόρια που δεν χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1904 10 10	300



5 Φουμονισίνες	άθροισμα της B1 και B2
Τρόφιμα	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)
5.1 Μη μεταποιημένος αραβόσιτος, εξαιρουμένου του μη μεταποιημένου αραβόσιτου που προορίζεται για επεξεργασία με υγρή άλεση	4000
5.2 Αραβόσιτος που προορίζεται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται στα σημεία 5.3 και 5.4	1000
5.3 Δημητριακά για πρωινό με βάση τον αραβόσιτο και σνακ με βάση τον αραβόσιτο	800
5.4 Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τον αραβόσιτο και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	200
5.5 Κλάσματα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων > 500 µικρόμετρα που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 110313 ή 1103 2040 και άλλα προϊόντα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων > 500 µικρόμετρα που δεν χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 19041010	1400
5.6 Κλάσματα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων < 500 µικρόμετρα που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1102 20 και άλλα προϊόντα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων < 500 µικρόμετρα που δεν χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1904 10 10	2000



<b>6</b>	<b>Τοξίνη T-2 και HT-217</b>	<b>Άθροισμα της τοξίνης T-2 και HT-2</b>
	<b>Τρόφιμα</b>	<b>Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)</b>
6.1	Μη μεταποιημένα δημητριακά και προϊόντα με βάση τα δημητριακά	



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **Ξενόγλωση βιβλιογραφία**

Abedi-Tizaki, M., Askari, A., Paknezhad, H. and M. R. Abedi. 2012. Rapid Detection Methods for Analysis of Fungi and Mycotoxins in Agriculture Products. *Research Journal of Recent Sciences*, 1: 90-98.

Aljanabi, S. M. and I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.

Anonymous, 2000. Technical Information Memorandum No. 27. Stored-product pest monitoring methods. Armed Forces Pest Management Board.

Anonymous, 2014. Mycotoxins. (Online), [mycotoxins.info.net](http://mycotoxins.info.net). (Available at [http://www.mycotoxins.info/myco\\_info/myco\\_info.html](http://www.mycotoxins.info/myco_info/myco_info.html))

Anonymous. 2005. Rice Weevil and Granary Weevil. (Online), Iowa Insect Information Notes, Department of Entomology, Iowa State University. (Available at <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/iin/ricewee.html>)

Anonymous. 2013. Maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky. (Online), Canadian Grain Commission, Government of Canada. (Available at <http://www.grainscanada.gc.ca/storage-entrepose/pip-irp/mw-cr-eng.htm>)

Balasubramanian, A., Jayas, D. S., Fernando, W. G. D., Li, G., and N. D. G. White. 2007. Sensitivity analysis of DNA fingerprinting technique for detecting insect fragments in wheat flour. *Canadian Biosystems Engineering* 49: 4.1-4.5.

Baldwin R. and T. R. Fasulo. 2003. Confused Flour Beetle, *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae) and Red Flour Beetle,



*Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae). Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. (Also available at <http://edis.ifas.ufl.edu/in566>)

Bennett, J. W. and M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3): 497-516.

Berny, P. J. 2005. Mycotoxin Analysis by TLC. *Encyclopedia of Chromatography*, Second Edition, 230:1091-1093.

Bhuvaneswari, K., Fields, P. G., White N. D. G., Sarkar, A. K., Singh, C. B., and D. S. Jayas. 2011. Image analysis for detecting insect fragments in semolina. *Journal of Stored Products Research*, 47(1): 20-24.

Böhs, B., Seidel, V. and W. Lindner. 1995. Analysis of selected mycotoxins by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 41: 631-637.

Brader, B., Lee, R. C., Plarre, R., Burkholder, W., Barrie-Kitto, G., Kao, C., Polston, L., Dorneanu, E., Szabo, I., Mead, B., Rouse, B., Sullins, D. and R. Denning. 2002. A comparison of screening methods for insect contamination in wheat. *Journal of Stored Products Research* 38, 75-86.

Breci, L. 2014. Introduction to Mass Spectrometry. (Online), Department of Chemistry and Biochemistry, University of Arizona. (Available at <http://www.chem.arizona.edu/massspec/>)

Bullerman, L. B. and A. Bianchini. 2011. The Microbiology of Cereals and Cereal Products: Variety of media and methods available for detection and enumeration of molds in cereal products. *Food Quality & Safety magazine*, Wiley.



CABI. 2010. *Sitophilus zeamais* (maize weevil) datasheet. Crop Protection Compendium, 2010 Edition. CAB International Publishing. Wallingford, UK.

Calvin, D. 1990. Confused Flour Beetle and Red Flour Beetle. College of Agricultural Sciences, Department of Entomology, Pennsylvania State University. (Also available at <http://ento.psu.edu/extension/factsheets/flour-beetle>)

Campagnoli, A., Cheli, F., Polidori, C., Zaninelli, M., Zecca, O., Savoini, G., Pinotti, L. and V. Dell'Orto. 2011. Use of the Electronic Nose as a Screening Tool for the Recognition of Durum Wheat Naturally Contaminated by Deoxynivalenol: A Preliminary Approach. *Sensors*, 11: 4899-4916.

Coen, D. M. 2009. The Polymerase Chain Reaction. *Current Protocols in Molecular Biology*. 88:15.0.1-15.0.3.

Corrêa, A. S., Orlando de Oliveira, L., Braga, L. S. and R. N. C. Guedes. 2013. Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. *Insect Science*, 20: 763-770.

Day, A. 2011. Confused Flour Beetle - Coleoptera: Tenebrionidae, *Tribolium confusum*. Virginia Cooperative Extension, Department of Entomology, Virginia Tech, Virginia State University. (Also available at <http://pubs.ext.vt.edu/3104/3104/3104-1577.html>)

Di Mavungu, J. D., Monbaliu, S., Scippo, M. L., Maghuin-Rogister, G., Schneider, Y. J., Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., Van Peteghem, C. and S. De Saeger. 2009. LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26: 885-95.

Dogan, H., Subramanyam, B. and J. R. Pedersen. 2010. Analysis for extraneous matter, pp. 351-365. In Nielsen, S. S. (ed.), *Food Analysis*, Fourth Edition. Springer, New York.



Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.

Ellis, T. 2003. Grain and Bean Weevils. (Online), Michigan State University Extension. (Available at [http://www.msue.msu.edu/objects/content\\_revision/download.cfm/revision\\_id.496037/workspace\\_id.-4/01500524.html/](http://www.msue.msu.edu/objects/content_revision/download.cfm/revision_id.496037/workspace_id.-4/01500524.html/))

Ettre, L. S. 1993. Nomenclature for Chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 65: 819-872.

Farrell, J. 2009. Diagnostic Methods for Lesser grain borer *Rhyzopertha dominica*. PaDIL - Plant Biosecurity Toolbox.

Farrell, J. 2009. Diagnostic Methods for Maize weevil *Sitophilus zeamais*. PaDIL - Plant Biosecurity Toolbox.

Farrell, J. 2009. Diagnostic Methods for Rust-red flour beetle and Confused flour beetle, *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum*. PaDIL - Plant Biosecurity Toolbox.

FDA Office of Regulatory Affairs. 2003. ORA Laboratory Manual, Volume IV, Section 4-Laboratory Training: Microanalytical and Filth Analysis. U.S. Food and Drug Administration. (Also available at <http://www.fda.gov/ScienceResearch/FieldScience/LaboratoryManual/default.htm>)

Gilbert, J. and E. Anklam. 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21: 468-486.

Jacobs, S. and D. Calvin. 2001. Weevils on Stored Grain. College of Agricultural Sciences, Department of Entomology, Pennsylvania State University. (Also available at <http://ento.psu.edu/extension/factsheets/weevils-on-stored-grain>)



Jenkins, T. M., Dean, R. E. and B. T. Forschler. 2002. DNA technology, interstate commerce, and the likely origin of Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) infestation in Atlanta, Georgia. *Journal of Economic Entomology*, 95: 381-389.

Johnson, D. 2010. Insect Pests of Stored Grain: Lesser Grain Borer. University of Kentucky, College of Agriculture, Food and Environment, Department of Entomology. (Also available at <http://www2.ca.uky.edu/entomology/entfacts/ef137.asp>)

Kitto, G. B., Quinn, F. A. and W. E. Burkholder. 1992. Development of immunoassays for quantitative detection of insects in stored products. In: Highley, E., Wright, E. J., Banks, H. J. and B. R. Champ (Eds.), *Stored Product Protection: Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection*. CAB International, Wallingford, 1994, pp. 415-420.

Koehler P. G. and R. M. Pereira. 1994. Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera, Bostrichidae). Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. (Also available at <http://edis.ifas.ufl.edu/ig117>)

Koehler, P. G. 1994. Rice Weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. (Also available at <http://edis.ifas.ufl.edu/ig120>)

Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. and I. Nehls. 2010. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1595-1612.

Lindblad, M., Johnsson, P., Jonsson, N., Lindqvist, R., and M. Olsen. 2004. Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 609-616.



Liu, H. and A. T. Beckenbach. 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 41-52.

Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F. and B. I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1): 6-13.

Longstaff, B. C. 1981. Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): A critical review. *Protection Ecology*, 2: 83-130.

Lund, F. and J. C. Frisvad. 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 1117-1123.

Lyon, W. F. 1991. Confused and Red Flour Beetles. (Online), Extension Fact Sheet, Department of Entomology, Ohio State University.

Lyon, W. F. 1991. Granary and Rice Weevils. (Online), Extension Fact Sheet, Department of Entomology, Ohio State University. (Available at <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/2000/2088.html>)

Meronuck, R. 1995. Stored Product Management: Mycotoxins. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, 15(3): 111-118.

Miller, J. D. 1994. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-product Protection*, 2: 971-977.

Mohini, J. and J. D. Deshpande. 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 1:81-97.



Nielsen, K., Lin, M., Gall, D. and M. Jolley. 2000. Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods*, 22: 71-6.

Obrepalska-Stepłowska, A., Nowaczyk, K., Holysz, M., Gawlak, M., and J. Nawrot. 2008. Molecular techniques for the detection of granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) in wheat and flour. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(10): 1179-1188.

Pascale, M.N. 2009. Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Proceedings for Natural Sciences published by Matica Srpska Novi Sad*, 117: 15-25.

Paterson, R. R. M. 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41: 1467-1474.

Perez-Mendoza, J., Throne, J. E., Dowell, F. E. and J. E. Baker. 2003. Detection of insect fragments in wheat flour by near infrared spectroscopy. *Journal of Stored Products Research* 39: 305-312.

Perez-Mendoza, J., Throne, J. E., Maghirang, E. B., Dowell, F. E. and J. E. Baker. 2005. Insect fragments in flour: relationship to lesser grain borer (Coleoptera: Bostrichidae) infestation level in wheat and rapid detection using near-infrared spectroscopy. *Journal of Economic Entomology*, 98(6): 2282-2291.

Pitt, J. I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56: 184-192.

Quinn, F. A., Burkholder, W. and G. B. Kitto. 1992. Immunological technique for measuring insect contamination of grain. *Journal of Economic Entomology* 85, 1463-1470.



Rai, M. K., Bonde, S. R., Ingle, A. P. and A. K. Gade. 2012. Mycotoxin: rapid detection, differentiation and safety. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 3: 22-34.

Rajendran, S. 2005. Detection of insect infestation in stored foods, pp. 163-232. In Taylor, S. (ed.), *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 49, Elsevier Academic Press.

Robe, L. J., Valente, V. L. S., Budnik M., and É. L. S. Loreto. 2005. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 623-640.

Sallam, M. N. 1999. *Insect Damage: Post-harvest Operations*. International Centre of Insect Physiology and Ecology (ICIPE), Nairobi, Kenya.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, Ma T. and Patiño, B. 2011. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 145 (1): 121-125.

Schmale, D. G. and G. P. Munkvold. 2014. *Mycotoxins in Crops: A Threat to Human and Domestic Animal Health*. (Online), The American Phytopathological Society. (Available at <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Mycotoxins/Pages/default.aspx>)

Schmidt-Heydt, M., Richter, W., Michulec, M., Buttinger, G. and R. Geisen. 2008. Comprehensive molecular system to study the presence, growth and ochratoxin A biosynthesis of *Penicillium verrucosum* in wheat. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(8): 989-996.



Semple, R. L. 1992. Inspection and detection methods for storage insect pests. In: Towards Integrated Commodity and Pest Management in Grain Storage: A Training Manual for Application in Humid Tropical Storage Systems. RegNet Publications. (Also available at <http://www.fao.org/docrep/x5048e/x5048e00.htm>)

Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A. and R. Salomon. 1996. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3270-3273.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 652-701.

Smith, D. S. and S. A. Eremin. 2008. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391: 1499-1507.

Trematerra P., Stejskal, V. and J. Hubert. 2011. The monitoring of semolina contamination by insect fragments using the light filth method in an Italian mill. *Food Control*, 22(7): 1021-1026.

Trematerra, P. and S. Catalano. 2010. Contribution of the light filth methods to the Integrated Pest Management of a flour mill. 10<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection, Estoril, Portugal, *Julius-Kühn-Archiv*, vol. 425, p.589-595.

Wehling, R. L. and D. L. Wetzel. 1983. High-performance liquid chromatographic determination of low level uric acid in grains and cereal products as a measure of insect infestation. *Journal of Chromatography A*, 269: 191-197.

Wilkin, D. R., Catchpole, D. and S. Catchpole. 1994. The detection of insects in grain during transit - an assessment of the problem and the development of a practical



solution. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-product Protection, 1: 463-469.

Yelton, M. M., Hamer, J. E. and W. E. Timberlake. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81: 1470-1474.



## Ελληνική βιβλιογραφία

Αθανασίου, Χ. Γ. 2012. Έντομα αποθηκών. Πανεπιστημιακές Παραδόσεις, Βόλος.

Αθανασίου, Χ. Γ. 2012. Πόσο επικίνδυνα είναι τα έντομα για τη δημόσια υγεία. Πανεπιστημιακές Παραδόσεις, Βόλος.

Ανώνυμος, 2001. Τεχνικό Δελτίο ΤΔ002.01: Ποσοτικός χαρακτηρισμός υλικών στην γραμμή παραγωγής: Βιομηχανική εφαρμογή φασματοσκοπίας εγγύς υπερύθρου. Εργαστήριο Φασματοσκοπικών Εφαρμογών, Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. (Διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://www.eie.gr/nhrf/institutes/tpci/researchteams/mspc/mspc-asl-gr.html>)

Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων, 2011. Κοινοτική Νομοθεσία, Ρυπαντές τροφίμων. (Online), [efet.gr](http://www.efet.gr). (Διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση [http://www.efet.gr/portal/page/portal/efetnew/legislations/sociable\\_legislations/contaminants](http://www.efet.gr/portal/page/portal/efetnew/legislations/sociable_legislations/contaminants))

Επίσημη ιστοσελίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2010. Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για ορισμένες ουσίες που επιμολύνουν τα τρόφιμα. (Online), [europa.eu](http://europa.eu). (Διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση [http://europa.eu/legislation\\_summaries/food\\_safety/contamination\\_environmental\\_factors/121290\\_el.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/121290_el.htm))

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1831/2003 της επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2003 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004 της επιτροπής της 19ης Απριλίου 2004 περί των διαδικασιών ανάληψης σιτηρών από τους οργανισμούς παρέμβασης, καθώς και των αναλυτικών μεθόδων για τον καθορισμό της ποιότητας.



Πετρωτός, Κ. 2010. Ανάπτυξη Ταχείας Μεθόδου Ανάλυσης Επικίνδυνων Μυκοτοξινών σε Ξηρούς Καρπούς. Εργαστήριο Μηχανικής Μεταποίησης Αγροτικών Προϊόντων, Τμήμα Μηχανικής Βιοσυστημάτων, ΓΕΩΝΑΤΣ Ε.Π.Ε., Λάρισα.

Σταμόπουλος, Δ. Κ. 1999. Έντομα αποθηκών, μεγάλων καλλιεργειών και λαχανικών. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.