



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ | ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Χαρακτηρισμός απομονώσεων του γένους *Penicillium* που προσβάλουν καρπούς εσπεριδοειδών

Δημοσθένης Μπούλιος
επιβλ. καθηγητής Ευάγγελος Βέλλιος

Βόλος
2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ | ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Χαρακτηρισμός απομονώσεων του γένους *Penicillium* που προσβάλλουν καρπούς εσπεριδοειδών

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας
Προπτυχιακή διατριβή
Δημοσθένης Μπούλιος

Ευάγγελος Βέλλιος (Επιβλέπων καθηγητής)
Επίκουρος καθηγητής, Φυτοπαθολογία-Σύγχρονες Μέθοδοι Διαγνωστικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καρκάνης Ανέστης (Μέλος)
Επίκουρος Καθηγητής, Ζιζανιολογία
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παυλή Ουρανία (Μέλος)
Λέκτορας, Γενετική-Βελτίωση φυτών
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, υπό την επίβλεψη του Ε. Βέλλιου, Επίκουρου καθηγητή Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για τις χρήσιμες υποδείξεις του, τα εποικοδομητικά σχόλιά του καθώς και την εμπιστοσύνη του κατά την διεξαγωγή του πειράματος. Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες, στην Dr. Φ. Λολιοπούλου για την βοήθεια, τις συμβουλές αλλά και την επιμελητειακή στήριξη που μου προσέφερε. Ευχαριστώ θερμά τον Α. Καρκάνη , Επίκουρο καθηγητή Ζιζανιολογίας και την Ο. Παυλή, Λέκτορα Γενετικής και Βελτίωσης φυτών για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την οικονομική και ηθική στήριξη που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήταν αμέλεια να μην αναφέρω την σημαντική προσφορά της Αιμιλίας Καφαντάρη στην γραφιστική επιμέλεια της εργασίας αυτής , για την οποία της είμαι ευγνώμων. Το αισθητικό αποτέλεσμα καθώς και η αρτιότητα της επιμέλειας θα ήταν σαφώς υποδεέστερη αν δεν είχα λάβει την βοήθειά της.

Περίληψη

Στην παρούσα ερευνητική εργασία συλλέχθηκαν απομονώσεις του γένους *Penicillium* από εσπεριδοειδή που παρουσίαζαν συμπτώματα κυανής και ελαιόχρωμης σήψης. Οι απομονώσεις έγιναν από σηπτόμενους καρπούς που διατηρούνταν σε οικιακούς ψυκτικούς θαλάμους ή βρίσκονταν στο εμπόριο. Για τον μορφολογικό χαρακτηρισμό τους, ακολουθήθηκαν οι υποδείξεις που αναφέρονταν στις εργασίες των Frisvad and Samson (2004) και Visagie *et al.* (2014). Η πρώτη απομόνωση αναγνωρίστηκε ως ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Penicillium digitatum* που προκαλεί την πράσινη σήψη στα εσπεριδοειδή. Οι υπόλοιπες απομονώσεις χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Οι απομονώσεις της δεύτερης ομάδας ταυτοποιήθηκαν ότι ανήκουν στο είδος *Penicillium italicum*, ενώ η τρίτη, οι απομονώσεις της οποίας παρήγαγαν κορέμια, δεν ταυτοποιήθηκε παρότι μοιραζόταν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά με το *Penicillium ulaiense*. Επίσης παρατηρήθηκαν δομές που ομοιάζουν με εκφυλισμένα κλειστοθήκια, χωρίς εξαρτήματα, σε μια αποικία της τρίτης ομάδας μετά από τρεις μήνες επώασης σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα PGA (potato glucose agar). Τέλος διερευνήθηκε η φύση του μεταχρωματισμού του θρεπτικού υλικού από απομονώσεις του γένους *Penicillium*, και σε μικροσκοπική παρατήρηση βρέθηκαν χρωματισμένες υφές.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	VII
1. Εισαγωγή	
1.1 Το γένος <i>Penicillium</i>	01
1.2 Ταξινόμηση του γένους <i>Penicillium</i>	02
1.3 Σήψεις καρπών από μύκητες του γένους <i>Penicillium</i>	04
1.4 Εύρος ξενιστών	04
1.5 Επιδημιολογία	05
1.6 Συμπτώματα και σημεία	06
1.7 Σκοπός της εργασίας	07
2. Μεθόδοι και Υλικά	
2.1 Συλλογή απομονώσεων	09
2.2 Δοκιμασία βλάστησης	09
2.3 Μορφολογικός χαρακτηρισμός	10
2.4 Τεχνητές μολύνσεις καρπών πορτοκαλιάς	11
3. Αποτελέσματα	
3.1 Δοκιμή βλάστησης	13
3.2 Μορφολογικός χαρακτηρισμός	14
3.3 Τεχνητές μολύνσεις	22
4. Συζήτηση	
4.1 Δοκιμή Βλάστησης	23
4.2 Μορφολογικός Χαρακτηρισμός	23
4.3 Συννήματα	25
4.4 Σκληρώτια-Κλειστοθήκια	27
4.5 Κατασκευές τύπου Corda	30
4.6 Χρωματισμός υφών	31
5. Βιβλιογραφία	33
Παράρτημα	
Πίνακας θρεπτικών υλικών	40
Πίνακας απομονώσεων	41

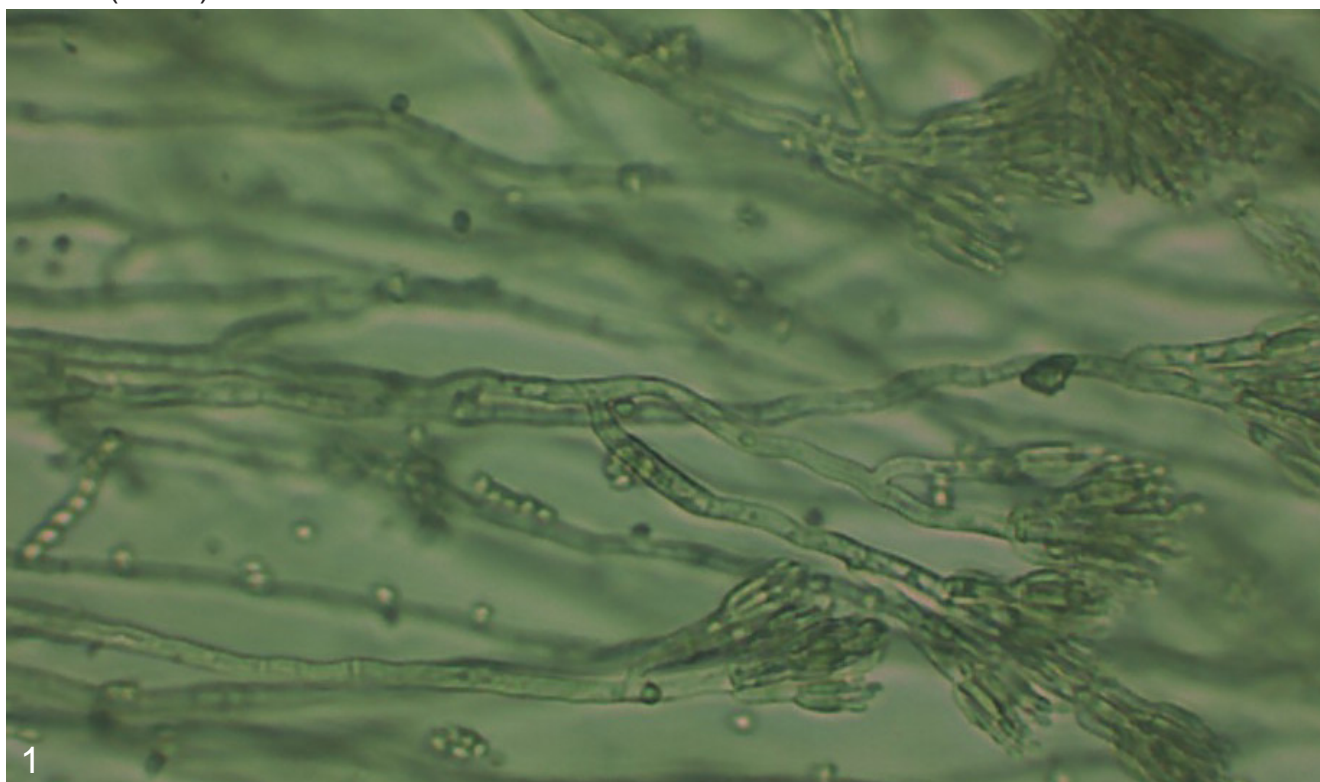
1. Εισαγωγή

1.1 Το γένος *Penicillium*

Οι μύκητες του γένους *Penicillium* συναντώνται πολύ συχνά στην φύση (Agris, 2005) και λειτουργούν ως αποικοδομητές (Panda, 2010; Martínez *et al.*, 2005; Singh and Dwivedi, 1979) αλλά και φυτοπαθογόνοι οργανισμοί (Kim, 2007; Τζάμος, 2007).

Ο Pitt (1979) θεωρεί ότι τα είδη του γένους *Penicillium* έχουν επηρεάσει άμεσα ή έμμεσα κάθε άνθρωπο του 20ου αιώνα, όπως αναφέρουν οι Visagie *et al.* (2014). Το γένος αποτελείται από τουλάχιστον 350 είδη σύμφωνα με μία από τις τελευταίες ταξινομικές προσπάθειες (Visagie *et al.*, 2014), που διαδραματίζουν ρόλο στην βιομηχανία τροφίμων (Hymery, 2014), στην φυτοπροστασία ως ανταγωνιστικοί αλλά και φυτοπαθογόνοι οργανισμοί (Agris, 2005), ενώ χρησιμοποιούνται και στην παραγωγή αντιβιοτικών (Frisvad *et al.*, 2004; Houbraken *et al.* 2012; Bladt, 2013). Η χαρακτηριστική τους ιδιότητα να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες έχει επιπτώσεις στην δημόσια υγεία, ιδίως στις αναπτυσσόμενες χώρες, καθώς ορισμένες από αυτές τις ουσίες είναι τοξικές για τον άνθρωπο (Russell *et al.*, 2004). Οι μύκητες του γένους *Penicillium* παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες στο θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται αλλά και με την μορφή εκκρίματος στην επιφάνεια του μυκηλίου (Frisvad & Samson, 2004).

Το 1809 ο Link εισήγαγε το γένος *Penicillium* (Dhakar *et al.*, 2013) περιλαμβάνοντας τρία είδη σε αυτό, το *P. expansum* Link, *P. glaucum* Link και το *P. candidum* Link (Hawksworth, 1985). Οι χαρακτηριστικές καρποφορίες της ατελούς μορφής του μύκητα αποτέλεσαν την αιτία για το όνομα *Penicillium* που προέρχεται από το λατινικό *Penicillus*, δηλαδή χρωστήρας ή πινέλο (Εικ. 1).



Εικ.1 Χαρακτηριστικοί κονιδιοφόροι του γένους *Penicillium*, όπου διακρίνονται ευχερώς οι απολήξεις των κονιδιοφόρων σε μορφή χρωστήρα.

Η μορφολογία των κονιδιοφόρων αποτελεί βασικό ταξινομικό χαρακτηριστικό που διαχωρίζει το γένος από άλλα των ασκομυκήτων (Ramírez, 1985). Οι κονιδιοφόροι και τα κονίδια χαρακτηρίζονται ως προς την διακλάδωσή τους, το σχήμα των επιμέρους στοιχείων τους καθώς και τον χρωματισμό και την υφή τους.

1.2 Ταξινόμηση του γένους *Penicillium*

Το γένος *Penicillium* κατατάσσεται στους μυκηλιακούς ασκομύκητες. Παλαιότερα η οικογένεια Trichocomaceae συμπεριλάμβανε τα γένη *Penicillium*, *Aspergillus* και *Paelomyces*. Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα η οικογένεια Tricomaceae υποκαθίσταται από τρεις νέες οικογένειες (Houbraken & Samson, 2011), τις Thermoascaceae, Tricocomaceae και την Aspergilaceae στην οποία πλέον συγκαταλέγεται το γένος *Penicillium*.

Το *Penicillium expansum* (Link) Thom είναι ένα από τα πρώτα είδη που περιγράφεται (Link 1808) όπως αναφέρουν οι (Drakhar *et al.*, 2013; Hawksworth, 1985; Samson & Frisvad, 2004; Visagie *et al.*, 2014). Προκαλεί την κυανή σήψη στα μηλοειδή (Agrios, 2005) και παρά το γεγονός ότι θεωρούνταν ευχερώς αναγνωρίσιμο βάσει σταθερών μορφολογικών χαρακτηριστικών, όπως η παραγωγή συννημάτων, τα λεία τοιχώματα των κονιδιοφόρων και κονιδίων του, αποδείχθηκε ότι, τα χαρακτηριστικά αυτά, ενίοτε παρουσιάζουν αποκλίσεις που οφείλονται στις συνθήκες ανάπτυξης (Raper & Thom, 1949; Berny & Hennebert, 1985).

“Η μορφολογία αποτελεί την φυσική αρχιτεκτονική μέσα από την οποία ένας οργανισμός λειτουργεί και προσαρμόζεται στο περιβάλλον” (Visagie *et al.*, 2014, p.344) και βρίσκεται σε σχέση εξάρτησης με τις συνθήκες που επικρατούν κατά την διάρκεια της ανάπτυξής του. Χαρακτηριστική είναι η ποικιλομορφία που παρατηρείται σε είδη *Penicillium* που παράγουν σύνθετα διακλαδισμένους κονιδιοφόρους. Οι Minter *et al.* (1985) αναφέρουν ότι τα είδη αυτά μπορούν να παράγουν απλούς κονιδιοφόρους ή διαφορετικού βαθμού διακλάδωσης καρποφορίες και *vice versa*.

Σε ορισμένα είδη έχουν αναφερθεί δομές που ομοιάζουν με σκληρώτια ή κλειστοθήκια (Frisvad & Samson, 2004). Ο Pitt (1995) υποστηρίζει ότι η παρουσία σκληρωτίων, συνδέεται με την εξέλιξη των ειδών του γένους. Οι ολομορφικοί μύκητες τείνουν να εξελίσσονται σε αναμορφικούς, καθώς η αγενής αναπαραγωγή είναι πιο αποτελεσματική υπό συνθήκες.

Ο όρος σκληρώτια χρησιμοποιείται “ελλείψει καλύτερου όρου” (Pitt, 1995, p.769) και αναφέρεται σε κλειστοθήκια που έχουν εκφυλιστεί και έχουν απολέσει την ιδιότητά τους να παράγουν εξαρτήματα και ασκοσπόρια. Σε άλλες εργασίες χρησιμοποιείται και ο όρος κλειστοθήκια (Visagie *et al.* 2014) καθώς σε ορισμένα είδη έχουν παρατηρηθεί ασκοσπόρια. Η ύπαρξη και η δομή των σκληρωτίων ή κλειστοθηκίων είναι σημαντική για την ταξινόμηση (Pitt, 1995; Visagie *et al.*, 2014). Ο Wehmer (1894) και ο Thom (1910) περιέγραψαν σκληρώτια σε απομονώσεις του είδους *P. italicum* χωρίς όμως να καταφέρουν να βρουν ασκοσπόρια (Frisvad & Samson, 2004). Οι απομονώσεις, αναφέρεται, ότι χάνουν την ικανότητά τους να παράγουν σκληρώτια όταν μεταφερθούν κατ’ επανάληψη (Frisvad & Samson, 2004). Επίσης έχει αναφερθεί η ύπαρξη διαφορετικών συζευκτικών τύπων στο είδος *P. expansum* (Yin *et al.*,

2017) καθώς και ένας γονιδιακός τόπος *mat1* σε απομόνωση *P. digitatum* (Marcet-Houben *et al.*, 2012) που υποδεικνύει ότι πιθανώς ορισμένα είδη του γένους *Penicillium* στο παρελθόν μπορούσαν να αναπαραχθούν εγγενώς (Pitt, 1995).

Σύμφωνα με τους Frisvad και Samson (2004) η ταξινόμηση και ταυτοποίηση των ειδών που ανήκουν στο γένος *Penicillium* αποτελεί πρόκληση καθώς ο μεγάλος αριθμός των συμπεριλαμβανομένων ειδών, η ποικιλομορφία που συναντάται μεταξύ απομονώσεων του ίδιου είδους, δηλαδή η φαινοτυπική πλαστικότητα, σε μακροσκοπικό και μικροσκοπικό επίπεδο, που μπορεί να οφείλεται στην διαφοροποίηση των συνθηκών ανάπτυξης αλλά και σε γενετική ποικιλομορφία σε επίπεδο είδους, καθιστούν την διαδικασία αυτή δυσχερή.

Η απομόνωση του Fleming, η οποία παρήγαγε το γνωστό αντιβιοτικό (Fleming, 1929), το όνομα του οποίου προκύπτει από την ονομασία του γένους *Penicillium* αποτέλεσε η ίδια αντικείμενο λάθος αναγνώρισης καθώς απ' ότι αποδεικνύεται πρόκειται για το είδος *P. rubens* και όχι για το είδος *P. chrysogenum* (Houbraken *et al.*, 2011)

Ήδη από το 1893 ο Biourge εισάγει την έννοια της τήρησης των πρωτοκόλλων παρασκευής θρεπτικών υλικών για την εξάλειψη αποκλίσεων μεταξύ απομονώσεων (Hennebert, 1985).

Η τήρηση των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούνταν για τον χαρακτηρισμό απομονώσεων και αποσκοπούσε στην εξάλειψη ή ελαχιστοποίηση των αποκλίσεων μεταξύ απομονώσεων του ίδιου είδους, από τον Thom (1954) και στην συνέχεια από άλλους ερευνητές (Pitt, 1979; Samson & Pitt, 1985; Okuda, 1994; Okuda *et al.*, 2000) αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα για την δημιουργία ενός κοινού ταξινομικού πλαισίου. Στην ίδια κατεύθυνση, η εισαγωγή φυσιολογικών και βιοχημικών τεχνικών για τον χαρακτηρισμό απομονώσεων, σε συνδυασμό, πάντα, με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά θα συμβάλει στην ταξινόμηση των ειδών του γένους *Penicillium* (Pitt, 1995).

Η σύσταση και ο τρόπος παρασκευής των θρεπτικών υλικών είναι αυστηρά καθορισμένα. Επίσης, κατά την παρασκευή των θρεπτικών υλικών, προστίθεται ένα διάλυμα ιχνοστοιχείων (trace elements solution) (Smith, 1949), που στοχεύει στον καλό χρωματισμό των καρποφοριών, την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Filttenborg *et al.*, 1990) αλλά και την εξάλειψη μη τυπικών κονιδιοφόρων, όπως αναφέρει ο Contantinescu (1989). Η τήρηση των πρωτοκόλλων κατά την παρασκευή θρεπτικών υλικών (standardized working techniques) σε συνδυασμό με συγκεκριμένες θερμοκρασίες επώασης (25, 30 & 35 °C), ελαχιστοποιούν τις φαινοτυπικές αποκλίσεις σε μικροσκοπικό αλλά και μακροσκοπικό επίπεδο (Visagie *et al.*, 2014).

Σε μακροσκοπικό επίπεδο εξετάζεται το μέγεθος της αποικίας, η υφή, το χρώμα της και το ενδεχόμενο ύπαρξης συννημάτων ή κορεμίων, σκληρωτίων ή ασκοκάρπια (Visagie *et al.*, 2014), ενώ σε μικροσκοπικό επίπεδο ο κυρίαρχος τύπος διακλάδωσης των κονιδιοφόρων καθώς και η υφή των τοιχωμάτων τους, το χρώμα τους, το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά των κονιδίων (Minter *et al.*, 1985)

Τα θεμέλια για αυτό, που αργότερα ονομάζεται πολυφασική ταξινόμηση (polyphasic taxonomy) (Samson and Frisvad, 2004; Visagie *et al.*, 2014), τίθενται με την προσθήκη μοριακών τεχνικών για την ταξινόμηση του γένους.

Το 1930 ο Thom σύμφωνα με τους Visagie *et al.* (2014) έκανε την πρώτη επισκόπηση όλων των γνωστών μέχρι τότε ειδών του γένους, περιλαμβάνοντας 200 στο σύνολο. Επιπλέον προσπάθειες ταξινόμησης του γένους επιχειρήθηκαν αργότερα από τους Raper & Thom (1949), Pitt (1979), Pitt *et al.* (2000), με το αριθμό των αποδεκτών ειδών που συνθέτουν το γένος να ποικίλει.

Οι τελευταίες ταξινομικές προσπάθειες πολυφασικής ταξινόμησης (Frisvad J.C. & Samson R.A., 2004; Visagie *et al.*, 2014; Visagie, 2016; Visagie *et al.* 2016; Peterson *et al.*, 2004) έχουν οδηγήσει στον χαρακτηρισμό περισσότερων από 350 είδη του γένους *Penicillium*.

1.3 Σήψεις καρπων από μύκητες του γένους *Penicillium*

Οι μετασυλλεκτικές σήψεις μπορούν να προκαλέσουν μεγάλες απώλειες σε συγκομισμένα γεωργικά προϊόντα. Εκτιμάται ό,τι οι απώλειες σε φυλλώδη λαχανικά, κονδύλους και φρούτα μπορούν να αγγίζουν το 50 τοις εκατό της αρχικής παραγωγής στις αναπτυσσόμενες χώρες (Fao, 1989).

Το γένος *Penicillium* προκαλεί μετασυλλεκτικές ασθένειες όπως η πράσινη σήψη των εσπεριδοειδών, η κυανή σήψη των εσπεριδοειδών και η κυανή σήψη των μηλοειδών.

Οι σήψεις που προκαλούν οι μύκητες του γένους θεωρούνται οι πλέον καταστρεπτικές μετασυλλεκτικές ασθένειες φρούτων και λαχανικών (Agrios, 2005).

Οι απώλειες παραγωγής από σήψεις εσπεριδοειδών οφειλόμενες σε είδη του γένους *Penicillium* κατά την μετακίνηση, αποθήκευση και διάθεση των προϊόντων μπορούν φτάσουν το 90% της παραγωγής (Agrios, 2005; Eckert & Eaks, 1989) ή ακόμη και το 100% των συγκομισμένων προϊόντων (Παναγόπουλος, 2007). Η προσβολή παρατηρείται συνήθως στους χώρους αποθήκευσης αλλά αναφέρονται και προσβολές μη συγκομισμένων καρπών (Παναγόπουλος, 2007). Η κυανή και πράσινη σήψη με παθογόνα αίτια, αντίστοιχα, το *P. italicum* ή ενίοτε το *P. ulaiense* Hsieh, Su & Tzean και το *P. digitatum* θεωρούνται οι πιο καταστρεπτικές ασθένειες που προσβάλουν τα εσπεριδοειδή σε μετασυλλεκτικό χρόνο (Palou, 2004).

1.4 Εύρος ξενιστών

Ως νεκροτροφικός οργανισμός το *P. digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc συναντάται πολύ συχνά όπως και άλλα είδη πενικιλίων. Ως φυτοπαθογόνος οργανισμός που προκαλεί μετασυλλεκτικές ασθένειες σε φρούτα φαίνεται να προκύπτει από φυσικές μολύνσεις μόνο στα εσπεριδοειδή, σε αντίθεση με τον μύκητα *P. expansum* που προσβάλει πληθώρα ειδών (Samson & Frisvad, 2004; Drobny *et al.*, 2008). Το εύρος ξενιστών κάθε φυτοπαθογόνου οργανισμού φαίνεται να συνδέεται με το μέγεθος του γονιδιώματος, στην περίπτωση του *P. digitatum*, που προσβαλεί μόνο εσπεριδοειδή, παρατηρείται το μικρότερο γονιδίωμα και σε αυτή του *P. expansum* το μεγαλύτερο (Ballester *et al.*, 2014).

Η κυανή σήψη των εσπεριδοειδών με παθογόνο αίτιο τον σαπροφυτικό (νεκροτροφικό) μύκητα *P. italicum* Wehmer θεωρείται κυρίως ασθένεια που εξελίσσεται σε πιο ψυχρά περιβάλλοντα όπως στους θαλάμους συντήρησης (Plaza *et al.*, 2003). Η γεωγραφική εξάπλωση

των προαναφερθέντων ειδών που προσβάλλουν τα εσπεριδοειδή θεωρείται παγκόσμια και είναι συχνό το φαινόμενο της συνύπαρξης των δύο παθογόνων σε προσβεβλημένους καρπούς εσπεριδοειδών σε μεικτές μολύνσεις (Holmes *et al.* 1994; Palou, 2014).

Το 1993 γίνεται για πρώτη φορά αναφορά στην ασθένεια Whisker Mold των εσπεριδοειδών με παθογόνο αίτιο τον μύκητα *P. ulaiense* H.M. Hsieh, H.J. Su & Tzean από τους Holmes *et al.* (1993) και ακολουθεί την επόμενη χρονιά μία αναθεωρημένη δημοσίευση για την παθογένεια του μύκητα (Holmes *et al.*, 1994). Παρότι ο μύκητας έχει χαρακτηριστεί για πρώτη φορά στην Ταϊβάν (Hsieh *et al.*, 1987), λίγα χρόνια νωρίτερα, και έχει λάβει την ονομασία του από την περιοχή στην οποία βρέθηκε και απομονώθηκε, οι Holmes *et al.* (1994) αμφισβητούν στην αναθεωρημένη δημοσίευσή τους ότι ο μύκητας έχει καταγωγή από την Ταϊβάν καθώς η αναγνώριση έγινε με μία μόνο απομόνωση και η συχνότητα εμφάνισης του δεν διερευνήθηκε. Επιπλέον αναφέρεται από τους ίδιους ότι ο μύκητας απομονώθηκε για πρώτη φορά την ίδια χρονιά στην Καλιφόρνια και πιθανώς προϋπήρχε χωρίς να έχει γίνει αντιληπτός λόγω της συγγένειας και ομοιότητάς του με τον μύκητα *P. italicum* που προκαλεί την κυανή σήψη των εσπεριδοειδών.

Έχουν αναφερθεί και άλλα είδη του γένους που προσβάλλουν τα εσπεριδοειδή όπως το *P. crustosum* (Garcha & Singh, 1976; Arrebolla *et al.*, 2010; Louw & Kirsten, 2015), το *P. fellutatum* Biourge σύμφωνα με τον (Sinha, 1946) όπως αναφέρουν οι Louw και Kirsten (2015) χωρίς όμως να έχει υπάρξει επιβεβαίωση για την παθογένεια του μύκητα, καθώς και το *P. expansum*, το οποίο προσβάλλει ορισμένες ποικιλίες ώριμων ή υπερώριμων πορτοκαλιών και υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Vilanona *et al.*, 2012; Louw & Kirsten, 2015).

1.5 Επιδημιολογία

Η μόλυνση των καρπών πάνω στο δέντρο, που σπανίως παρατηρείται (Παναγόπουλος, 2007), ή σε επόμενα στάδια των μετασυλλεκτικών χειρισμών εκκινεί με την βλάστηση σποριών. Τα σπόρια των *P. digitatum* και *P. italicum* απαιτούν το ερέθισμα πτητικών ουσιών καθώς και την διαθεσιμότητα πηγής άνθρακα για να βλαστήσουν (Eckert *et al.*, 1984; Kavanagh and Wood, 1971). Τα παθογόνα αυτά θεωρείται ότι μπορούν να προσβάλουν μόνο υπό την προϋπόθεση τραύματος του περικαρπίου (Palou 2014), όμως αναφέρεται ότι μπορεί να υπάρξει μόλυνση σε υγιές φρούτο όταν αυτό έρχεται σε επαφή με κάποιο προσβεβλημένο (Agrios, 2005). Αντιθέτως το *P. expansum*, το οποίο δεν φαίνεται να προσβάλει φυσικά τα εσπεριδοειδή, αλλά μόνο υπό συνθήκες (Vilanona *et al.*, 2012; Louw & Kirsten, 2015), προς επίρρωση της άποψης αυτής φαίνεται να μην επηρεάζεται ιδιαίτερω υπό το ερέθισμα αιθέριων ελαίων grapefruit (Stange *et al.*, 2002).

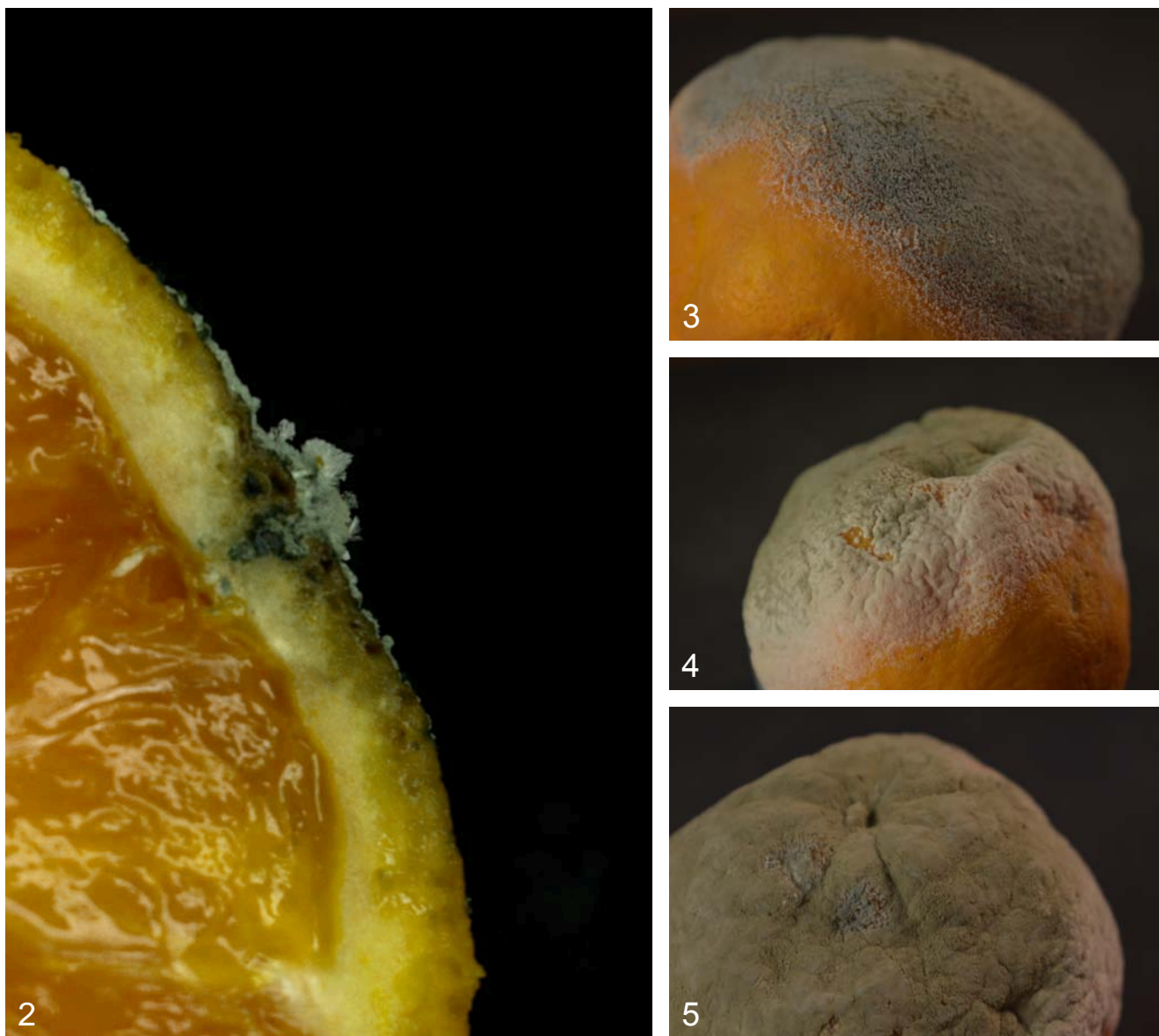
Το optimum θερμοκρασίας ανάπτυξης για τα είδη του γένους *Penicillium* είναι οι 24- 25 °C (Dhakar, 2013; Pitt, 1985). Τα *P. italicum* και *P. digitatum* δύνανται να παράξουν έως δύο δισεκατομμύρια κονίδια προσβάλλοντας ένα μόνο φρούτο μέσα σε τρεις έως πέντε ημέρες (Holmes *et al.*, 1995). Το *P. italicum* αναπτύσσεται ευχερώς σε ψυχρό και στεγνό περιβάλλον ενώ το *P. digitatum* αναπτύσσεται καλύτερα σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας

(Palou 2014). Τα περισσότερα είδη έχουν ως ανώτερο όριο ανάπτυξης τους 30 °C, παρότι ορισμένες απομονώσεις φαίνεται να αναπτύσσονται και σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (Pitt, 1985).

Τα πιο επιθετικά είδη που προσβάλουν καρπούς εσπεριδοειδών είναι τα *P. digitatum* και *P. italicum* (Palou, 2004; Louw and Kirsten, 2015).

1.6 Συμπτώματα και σημεία

Οι προσβεβλημένοι καρποί αρχικά παρουσιάζουν ελαφρώς βυθισμένη υδατώδη κηλίδα στο σημείο της μόλυνσης, όπου στην συνέχεια αναπτύσσεται λευκή εξάνθηση. Καθώς η ασθένεια εξελίσσεται η ωρίμανση των καρποφοριών του παθογόνου δίνει στην εξάνθηση κυανή (εικ. 2, 3) έως και ελαιώχρωμη (εικ. 4, 5) απόχρωση. Η απόχρωση της εξάνθησης οφείλεται στην παρουσία μελανίνης που συμβάλει στην αντοχή του μυκηλίου σε υπεριώδη ακτινοβολία και άλλες αβιοτικές καταπονήσεις.



Εικ.2 Τομή προσβεβλημένου από κυανή σήψη καρπού πορτοκαλιάς, όπου διακρίνεται η ανάπτυξη του μύκητα κάτω από την επιφάνεια του περικαρπίου. Εικ.3 Κυανή σήψη. Εικ.4 Ελαιόχρωμη σήψη. Εικ.5 Καρπός πορτοκαλιάς με συμπτώματα μεικτής προσβολής από μύκητες του γένους *Penicillium*.

Στην περίπτωση της κυανή σήψης το λευκό περιθώριο ανάπτυξης της είναι συνήθως στενό ενώ περιβάλεται από υδατώδη δακτύλιο (Agrios, 2005; Palou, 2014). Το *P. digitatum* δημιουργεί πράσινη ελαιώδη εξάνθηση με φαρυδιά ζώνη ανάπτυξης λευκού χρώματος (Παναγόπουλος, 2007). Πολλές φορές παρατηρείται μικτή μόλυνση (Palou 2014; Παναγόπουλος 2007). Τα πιο επιθετικά είδη που προσβάλουν καρπούς εσπεριδοειδών είναι τα *P. digitatum* και *P. italicum* (Palou, 2004; Louw & Kirsten, 2015). Επίσης Το *P. italicum* αναπτύσσεται στην επιφάνεια του καρπού αλλά και στο ενδοκάρπιο σε αντίθεση με το *P. digitatum* που αναπτύσσεται στην επιφάνεια του περικαρπίου του καρπού.

Το *P. ulaiense* προκαλεί συμπτώματα που ομοιάζουν με το *P. italicum* αλλά ο ρυθμός εξάπλωσης της κηλίδας είναι πολύ πιο αργός και ενίοτε παρατηρούνται συννήματα αρκετές μέρες μετά από την έναρξη της προσβολής. Τα συννήματα ή κορέμια έχουν μέγεθος από 1-7 mm, διάφορα σχήματα και εμφανίζονται σε ομόκεντρους κύκλους, κυκλικές κηλίδες ή αναπτύσσονται ομοιόμορφα σε ολόκληρο τον καρπό (Holmes *et al.*, 1994)

Το *P. italicum*, το *P. digitatum* και το *P. ulaiense* παρατηρούνται σε μεικτές μολύνσεις πάνω στον ίδιο καρπό (Holmes *et al.*, 1994; Palou, 2004; Παναγόπουλος 2007)

1.7 Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία συλλέχθηκαν απομονώσεις του γένους *Penicillium* από καρπούς εσπεριδοειδών με σκοπό τον προσδιορισμό των ειδών που προσβάλουν εσπεριδοειδή σε επίπεδο φαινοτύπου αποικίας και μικροσκοπικώς.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Συλλογή απομονώσεων

Σηπόμενοι καρποί εσπεριδοειδών με τη χαρακτηριστική κυανή ή ελαιόχρωμη εξάνθηση συλλέχθηκαν κατά τους μήνες Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάρτιο του 2018, από οικιακούς θαλάμους συντήρησης και υπαίθριους πωλητές στις περιοχές Βόλος Μαγνησίας, Γάζωρος Σερρών και Θέρμη Θεσσαλονίκης, με την αντιστοιχία που υπάρχει στον σχετικό πίνακα του παραρτήματος (Πίνακας 1).

Οι καρποί εσπεριδοειδών που παρουσίαζαν κυανή ή ελαιόχρωμη εξάνθηση τοποθετούνταν σε πλαστικές σακούλες μίας χρήσης και μεταφέρονταν στο εργαστήριο μέσα σε διάστημα 72 ωρών για να ακολουθήσει η απομόνωση των παθογόνων αιτίων.

Η απομόνωση του παθογόνου γινόταν με την χρήση μυκητολογικής βελόνης και λύχνου Bunsen σύμφωνα με την μέθοδο Streaking που περιγράφει ο Fox (1993). Η βελόνη αποστειρώνονταν στην φλόγα του λύχνου, αφηνόταν να ψυχθεί και αφού ερχόταν σε επαφή με το μυκήλιο που αναπτυσσόταν στο όριο της κηλίδας τοποθετούνταν σε σημείο τρυβλίου με θρεπτικό υλικό PGA (Potato Glucose Agar). Τα κονίδια εναποτέθηκαν στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με ελαφρά οφιοειδή κίνηση. Στην συνέχεια τα τρυβλία επωάζονταν σε θάλαμο ανάπτυξης σε θερμοκρασίας 25 °C. Τις επόμενες 48 ώρες ελέγχονταν η ανάπτυξη του μυκηλίου και μόλις οι υφές του μύκητα ήταν εμφανείς, τμήμα της αποικίας μεταφέρονταν σε σωλήνα PGA με χρήση μυκητολογικής βελόνης υπό ασηπτικές συνθήκες.

Όταν η αποικία αποκτούσε κυανό ή πράσινο χρώμα γινόταν παρασκευάσμα στο μικροσκόπιο ώστε να παρατηρηθούν οι υφές, οι καρποφορίες και τα σπόρια του μύκητα. Το οπτικό μικροσκόπιο, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν Nikon Laborphot-22-EFD3 και η παρατήρηση γινόταν σε μεγέθυνση x200.

2.2 Δοκιμή βλάστησης

Δοκιμές βλάστησης σπορίων έγιναν σε δύο αντιπροσωπευτικές απομονώσεις που παρουσίαζαν διαφορετικό φαινότυπο κατά την καλλιέργειά τους σε PGA αυτές ήταν οι 4.1 και 7.2.1.

Τα αιωρήματα παρασκευάστηκαν από καλλιέργειες σε δοκιμαστικούς σωλήνες ηλικίας 7-10 ημερών με την προσθήκη 10 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού (ddH₂O) υπό ασηπτικές συνθήκες. Στην συνέχεια οι καρποφορίες του μύκητα διαταράχθηκαν και ενίοτε διασπάστηκαν με την βοήθεια αποστειρωμένης μυκητολογικής βελόνης ώστε τα σπόρια τους να απελευθερωθούν στο αιώρημα. Το αιώρημα μεταγγίστηκε μέσα από διπλό στρώμα μουσελίνας σε αποστειρωμένο δοχείο με πώμα, περιεκτικότητας 20 ml, τύπου universal ώστε να συγκρατηθούν τα θραύσματα μυκηλίου. Στην συνέχεια η συγκέντρωση του αιωρήματος προσδιορίστηκε με την βοήθεια αιματοκυττόμετρου τύπου Neubauer και ρυθμίστηκε στην συγκέντρωση 2x10⁶ κονίδια ανά ml.

Τρεις σταγόνες, όγκου 10 μl η κάθε μία, εναποτέθηκαν σε τρυβλία με PGA (10 ml) σε τρεις προσημειωμένες θέσεις. Στην συνέχεια δόθηκε κλίση στο τρυβλίο και το υγρό της κάθε σταγόνας έρευσε έως την απέναντι (κατώτερη) πλευρά του τρυβλίου, χωρίς να συγκλίνουν μεταξύ τους (Pappas, 1982). Η βλαστικότητα των σποριών μετρήθηκε με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου Nikon Laborhot-22-EFD3 με προσαρμοσμένη κάμερα MOTIC BA310. Τουλάχιστον 100 τυχαία σπόρια μετρήθηκαν από κάθε σταγόνα εντός του τρυβλίου για κάθε απομόνωση. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές ανεξάρτητα.

2.3 Ταυτοποίηση ειδών βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών

Για την διενέργεια μορφολογικού χαρακτηρισμού επιλέχθηκαν δέκα απομονώσεις. Η ταυτοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο είδους έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην εργασία των Visagie *et al.* (2014) με ορισμένες τροποποιήσεις. Το αιώρημα παρασκευαζόταν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (ddH₂O) υπό ασυπτικές συνθήκες, με τον τρόπο που αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2.2, χωρίς την προσθήκη απορρυπαντικού παράγοντα Tween80 και άγαρ ή γλυκερόλης, άγαρ και Tween80. Το κάθε τρυβλίο εμβολιαζόταν με τρεις σταγόνες όγκου 2 μl έκαστη και όχι με σταγόνες όγκου 0,5 έως 1 μl όπως αναφέρεται από τους Visagie *et al.* (2014), ενώ η συγκέντρωση του αιωρήματος ήταν καθορισμένη, της τάξης των 2×10^6 κονιδίων ανά ml σε αντίθεση με το απροσδιορίστου συγκέντρωσης πυκνό αιώρημα που προτείνεται.

Για την καλλιέργεια των μυκήτων στο πλαίσιο μορφολογικού χαρακτηρισμού χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά CYA (Czapek Yeast Aytolysate Agar) και MEA (Malt Extract Agar), τα οποία παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται στις εργασίες (Frisvad & Samson, 2004; Visagie *et al.*, 2004) και στον Πίνακα 2 του παραρτήματος. Για την παρασκευή MEA (Malt Extract Agar) χρησιμοποιήθηκε το σκεύασμα της OXOID (CM0059) όπως προτείνεται.

Οι απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ηλικίας 7-10 ημερών και είχαν αναπτυχθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υλικό PGA, στους 25 °C, σε συνθήκες σκότους. Σε εγγύτητα με λύχνο Bunsen, αποστειρωμένο απιονισμένο νερό προστέθηκε στον δοκιμαστικό σωλήνα και με την βοήθεια κεκκαμένης μυκητολογικής βελόνης τα κονίδια απελευθερώθηκαν στο αιώρημα. Το αιώρημα περνούσε μέσα από διπλό στρώμα αποστειρωμένης μουσελίνας μέσα από αποστειρωμένο χωνί που είχε προσαρμοστεί σε αποστειρωμένο δοχείο με πώμα τύπου universal. Η συγκέντρωση ρυθμιζόταν στα 2×10^6 κονίδια ανά ml με την βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου τύπου Neubaouer και τις ακόλουθες απαραίτητες αραιώσεις.

Τα τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα MEA και CYA εμβολιάζονταν με τρεις σταγόνες των 2 μl από αιώρημα κονιδίων και επωάζονταν στους 25 °C στο σκοτάδι. Δύο επιπλέον τρυβλία CYA εμβολιάζονταν για την εξέταση της ανάπτυξης αποικίας σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν το optimum ανάπτυξης των ειδών *Penicillium*, στους 30 °C και 35 °C. Στην συνέχεια τα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν τοποθετούνταν σε σακούλες μίας χρήσης που δεν ήταν αεροστεγώς κλειστές, για να αποφευχθεί η αναστολή της ανάπτυξης (Okuda *et al.*, 2000). Μετά από 7

ημέρες η διάμετρος κάθε αποικίας μετρούνταν με χάρακα. Για τον προσδιορισμό του κυρίαρχου τύπου κονιδιοφόρου της κάθε απομόνωσης, χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υλικό ΜΕΑ εμβολιασμένα με καλλιέργειες που είχαν επωαστεί στους 25 °C για 7-10 ημέρες. Μυκήλιο συλλέχθηκε από τα όρια ανάπτυξης της αποικίας, εκεί όπου φαινόταν να αλλάζει το χρώμα των κονιδιοφόρων, με την βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού. Το τμήμα του μυκηλίου που αποσπάστηκε, ξεπλύθηκε με περίσσεια αιθυλικής αλκοόλης 70% για την απομάκρυνση της πλειονότητας των σπορίων και στη συνέχεια τοποθετήθηκε πάνω σε γυάλινη αποστειρωμένη αντικειμενοφόρο που έφερε μία σταγόνα ddH₂O.

Τα μακροσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά που αξιολογήθηκαν για την ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών είναι το χρώμα της αποικίας, η διάμετρος της αποικίας σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα και σε κάθε θερμοκρασία, η υφή της, ο μεταχρωματισμός του θρεπτικού υποστρώματος, καθώς και τα χαρακτηριστικά της ζώνης ανάπτυξης μυκηλίου, δηλαδή η περιφέρεια της αποικίας. Επίσης αξιολογήθηκαν μικροσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως η διακλάδωση των κονιδιοφόρων (mono-, bi-, tri-, tetraverticillate), το μέγεθος των φιαλιδίων, το μέγεθος και το σχήμα των κονιδίων, η υφή του τοιχώματος των κονιδίων και των κονιδιοφόρων. Για την φωτογράφιση κονιδιοφόρων, κονιδίων καθώς και κάθε άλλης μικροσκοπικής κατασκευής χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο Nikon Labophot-22-EFD3 με προσαρμοσμένη κάμερα MOTIC BA310.

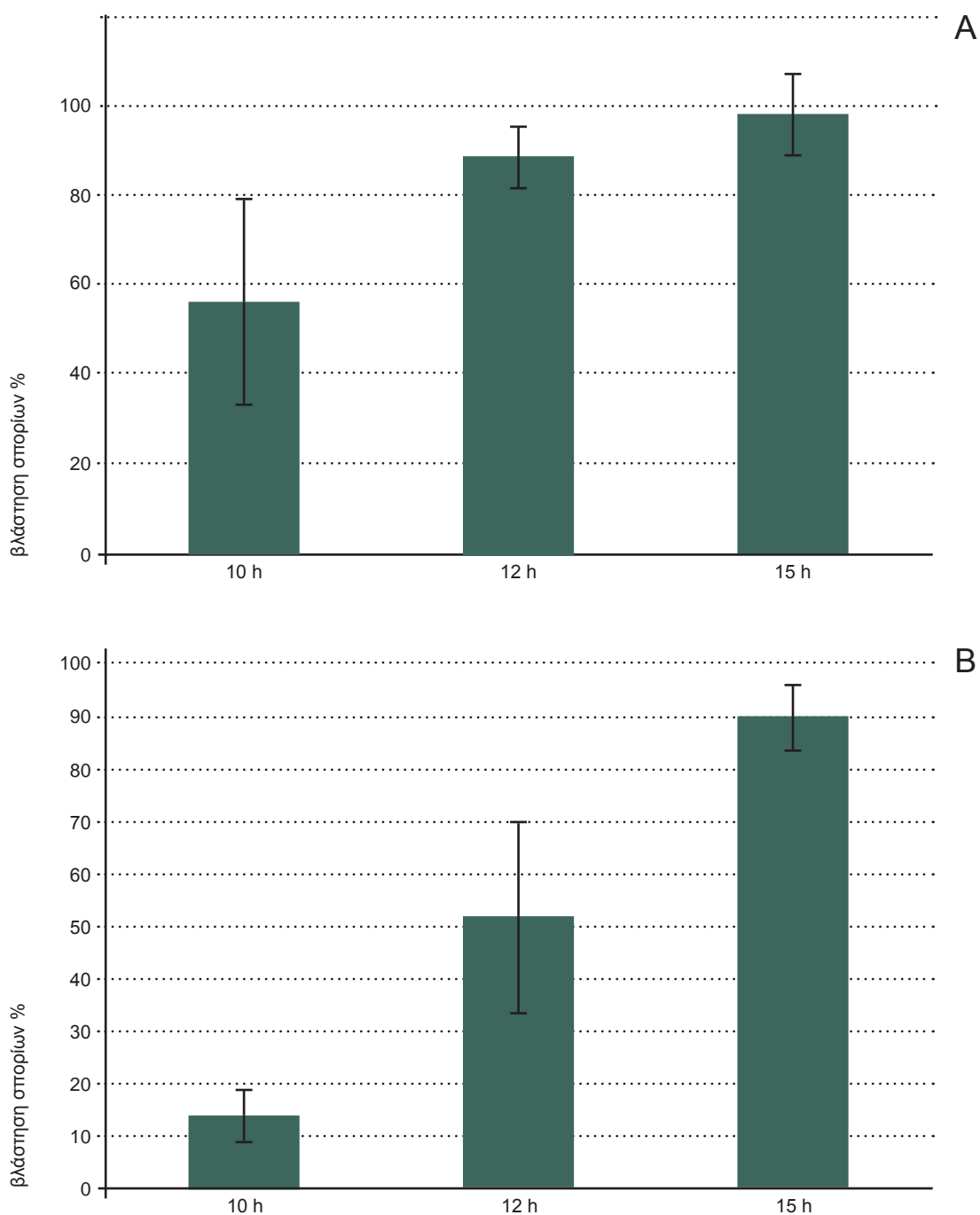
2.4 Τεχνητές μολύνσεις Καρπών Πορτοκαλιάς

Για την παρατήρηση συμπτωμάτων, σημείων και την εξέλιξη της ασθένειας καθώς και την εξακρίβωση της παθογένειας των απομονώσεων, διενεργήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε καρπούς πορτοκαλιάς ποικιλίας Valencia. Το αιώρημα των σπορίων που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, είχε συγκέντρωση 2×10^6 κονίδια ανά ml. Οι καρποί απολυμάνθηκαν εξωτερικά με εμβάπτιση σε υδατικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου συγκέντρωσης 0.5 % για τρία λεπτά. Στην συνέχεια ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό βρύσης. Η κάθε επανάληψη διήρκεσε περίπου 10 δευτερόλεπτα και έπειτα τα πορτοκάλια αφέθηκαν να στεγνώσουν σε εργαστηριακό πάγκο που νωρίτερα είχε απολυμανθεί με αιθυλική αλκοόλη συγκέντρωσης 93%. Στη συνέχεια υπό ασηπτικές συνθήκες το νυστέρι ακουμπούσε στην επιφάνεια των καρποφοριών κάθε καλλιέργειας και έπειτα πάνω στην τομή του καρπού. Με την χρήση αποστειρωμένου νυστεριού έγιναν τομές βάθους 1 mm και μήκους 2 mm στην περιοχή του ισημερινού και ελαφρώς μετατοπισμένες προς τα πάνω. Τρία πορτοκάλια μολύνθηκαν με κάθε απομόνωση και τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες μίας χρήσης οι οποίες κλείστηκαν αεροστεγώς και τοποθετήθηκαν πάνω στην επιφάνεια του εργαστηριακού πάγκου. Οι καρποί εξετάστηκαν ως προς την ύπαρξη συμπτωμάτων και σημείων μετά από επτά, δέκα και δώδεκα ημέρες.

3. Αποτελέσματα

3.1 Βλάστηση σπορίων απομονώσεων *Penicillium*

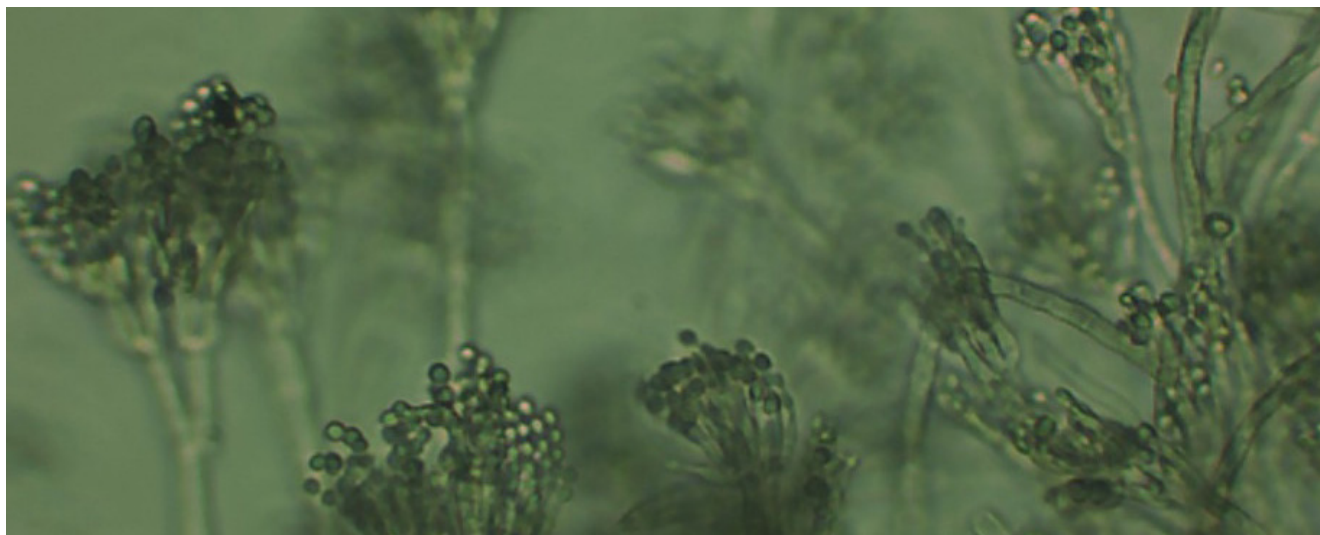
Ως βλαστημένα κονίδια θεωρήθηκαν αυτά των οποίων ο βλαστικός σωλήνας είχε μήκος τουλάχιστον ίσο με το μισό της διαμέτρου τους (Paul *et al.*, 1992). Τα κονίδια της απομόνωσης 4.1 βρέθηκαν να βλαστάνουν σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασίας 25 °C στις 10 ώρες σε ποσοστό 55 τοις εκατό, σε 12 ώρες σε ποσοστό 89 τοις εκατό και σε 15 ώρες σε ποσοστό 98 τοις εκατό (εικόνα Α6). Τα κονίδια της απομόνωσης 7.2.1 βλάστησαν σε ποσοστό 14 τοις εκατό μετά από 10 ώρες επώασης, σε ποσοστό 52 τοις εκατό μετά από 12 ώρες και 89 τοις εκατό μετά από 15 ώρες.



Εικ.6 Ποσοστό βλάστησης σπορίων των απομονώσεων 4.1. (A) και 7.2.1 (B).

3.2 Μορφολογικός χαρακτηρισμό απομονώσεων

Όλες οι απομονώσεις αντιστοιχίστηκαν στο γένος *Penicillium* βάσει μικροσκοπικής παρατήρησης των χαρακτηριστικών κονιδιοφόρων του γένους (εικ. 7).



Εικ.7 Χαρακτηριστικοί κονιδιοφόροι του γένους *Penicillium*.

Τρεις ομάδες με διαφορετικά μεταξύ τους μορφολογικά χαρακτηριστικά ανιχνεύθηκαν στις απομονώσεις που βρέθηκαν να προσβάλλουν καρπούς εσπεριδοειδών λόγω φαινοτυπικών αποκλίσεων κατά την καλλιέργειά τους σε δοκιμαστικούς σωλήνες με PGA και των συμπτωμάτων που προκαλούσαν σε σηπτόμενους καρπούς πορτοκαλιάς.

Για την διενέργεια μορφολογικού χαρακτηρισμού επιλέχθηκαν οχτώ απομονώσεις που προκαλούν κυανή σήψη σε εσπεριδοειδή και μία απομόνωση που προκαλεί ελαιόχρωμη σήψη.

Η απομόνωση 3.1 (εικ. 8, 9), που προκαλεί ελαιόχρωμη σήψη ταυτοποιήθηκε στο είδος *P. digitatum*. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της αποικίας ήταν όμοια με αυτά που περιγράφονται για το είδος (Frisvad & Samsom, 2004).

Η διάμετρος της κάθε αποικίας που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υλικό MEA στην πρώτη επανάληψη κυμάνθηκε από 37 έως 39 mm ενώ στην δεύτερη από 32-33. Σε θρεπτικό υλικό CYA κυμάνθηκε από 26-29 mm στην 1η επανάληψη και από 23-24 mm στην δεύτερη ενώ δεν αναπτύχθηκε στους 30 και 35 °C. Η απομόνωση παρήγαγε συστηματικά ελαιόχρωμες αποικίες βελούδινης υφής χωρίς μεταχρωματισμό στα θρεπτικά υλικά. Στο θρεπτικό υλικό MEA τα όρια της αποικίας δεν ήταν σαφή ενώ στο CYA υπήρχε λευκή ζώνη μυκηλίου πλάτους περίπου 1 mm.

Οι κονιδιοφόροι που εξετάστηκαν συλλέχθηκαν από τα όρια ανάπτυξης αποικίας σε θρεπτικό υλικό MEA που είχε επωαστεί στους 25 °C σε σκοτάδι. Οι κονιδιοφόροι διακλαδίζονταν σε τρία επίπεδα (terverticillate). Τα συνθετικά στοιχεία των κονιδιοφόρων, ήταν χρωσθημένα πυκνά και σχήματος κυλινδρικού. Τα κονίδια είχαν λεία τοιχώματα και σχήμα ωοειδές έως κυλινδρικό πράσινου χρώματος. Οι διαστάσεις των κονιδίων ήταν 2.4-3.6 μm x 3.9-6.6 μm. Τα φιαλίδια είχαν διαστάσεις 2.4-2.7 μm x 11.8-12.8 μm.

Οι απομονώσεις 7.2.1, 8.2 (εικ. 10, 11), 10.1, 11.1, 12.1 συγκρότησαν την πρώτη ομάδα

(Α) με ομοιογενή μορφολογικά χαρακτηριστικά και κατά κανόνα δεν παρήγαγαν κορέμια σε τρυβλία και φρούτα με εξαίρεση την απομόνωση 8.1. Η υφή των αποικιών ήταν εριώδης έως δεσμιώδης στο θρεπτικό υλικό CYA και εριώδης στο θρ. υλικό MEA κυανού έως κυανοπράσινου χρώματος. Όλες οι απομονώσεις παρήγαγαν πορτοκαλί έως σκούρο καστανό μεταχρωματισμό στο CYA εκτός από την 7.2.1. Στο MEA παρατηρήθηκε ενίοτε ασθενής κόκκινη χρώση του θρεπτικού υλικού. Χρυσοπράσινες σταγόνες μικρού μεγέθους εκκρίνονταν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό πάνω στο μυκήλιο στο θρεπτικό υλικό CYA.

Η διάμετρος των απομονώσεων σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό MEA 25 °C και ηλικίας 7 ημερών κυμάνθηκε από 31 έως 49 mm και από 32 έως 39 σε θρεπτικό υλικό CYA 25 °C. Στην θερμοκρασία των 30 βαθμών η διάμετρος ήταν από 8 έως 18 mm με την εξαίρεση της αποικίας 7.2.1 η οποία στην συγκεκριμένη θερμοκρασία σχημάτισε πολύ μικρές αποικίες, μικρότερες του 1 χιλιοστού, οι οποίες όταν επώαστηκαν σε θερμοκρασία 25 °C συνέχισαν την ανάπτυξή τους. Επίσης οι αποικίες 10.2, 11.1, 12.1 σε μία από τις δύο επαναλήψεις δεν σχημάτισαν αποικίες στην θερμοκρασία των 30 °C.

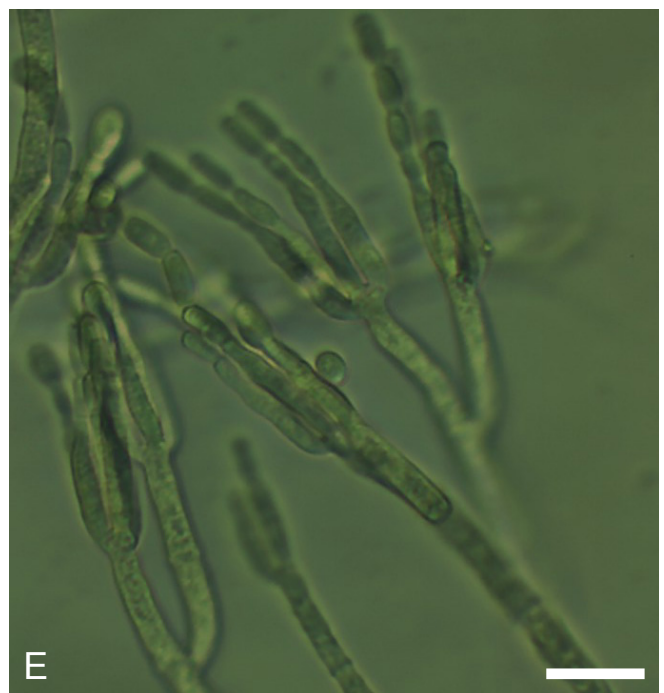
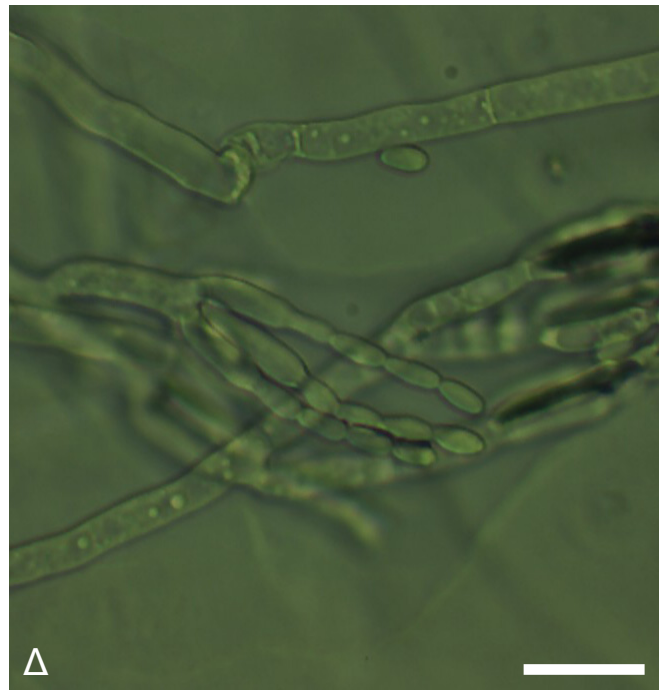
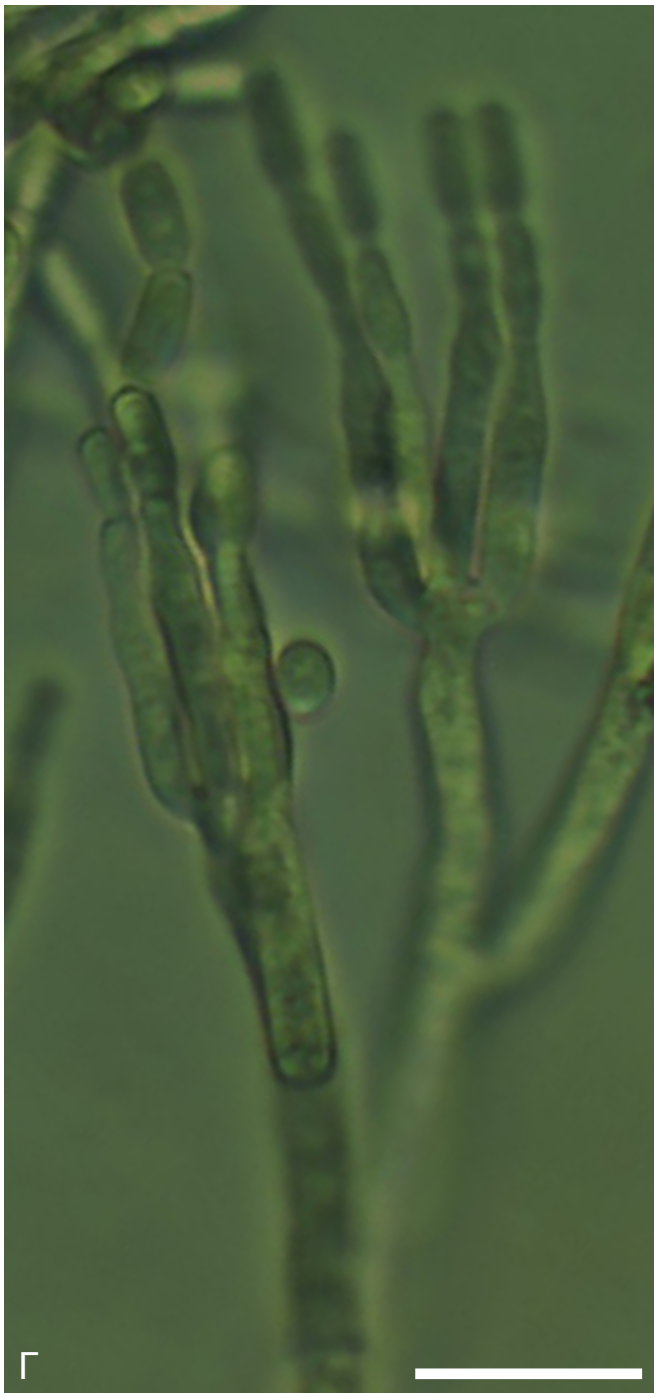
Αυτή η ομάδα απομονώσεων ικανοποιούσε τα κριτήρια για να ταξινομηθούν στο είδος *P. italicum* με εξαίρεση το γεγονός ότι ο μεταχρωματισμός που προκαλούσαν οι περισσότερες εξ' αυτών δεν ήταν συμβατός με την απουσία διαχεόμενων χρωμάτων (diffusible colour) που αναφέρουν οι Frisvad και Samson (2004). Η απομόνωση που δεν παρήγαγε μεταχρωματισμό είχε ανοιχτό κίτρινο προς λευκό χρώμα στην ανάστροφη πλευρά του τρυβλίου, χαρακτηριστικό που επίσης την διαφοροποιεί από την περιγραφή των Frisvad και Samson (2004), που περιλαμβάνει χλωμή έως καστανοκόκκινη απόχρωση στην ανάστροφη πλευρά του τρυβλίου σε καλλιέργειες *P. italicum*.

Οι κονιδιοφόροι των απομονώσεων διακλαδίζονταν σε τρία επίπεδα (terverticillate). Τα κονίδια είχαν διαστάσεις από 2.1-2.2 μm επί 2.2-4.2 μm. Τα φιαλίδια είχαν διαστάσεις 1.8-2.1 μm επί 9.1-10 μm.

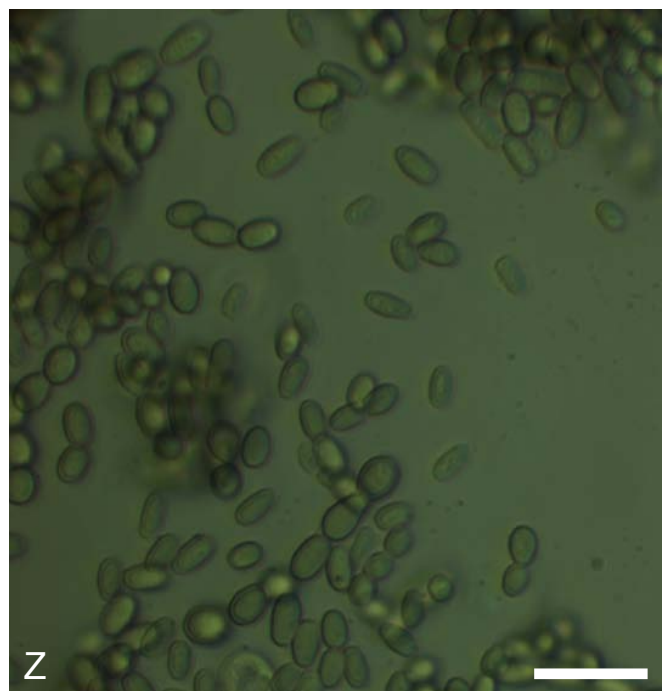
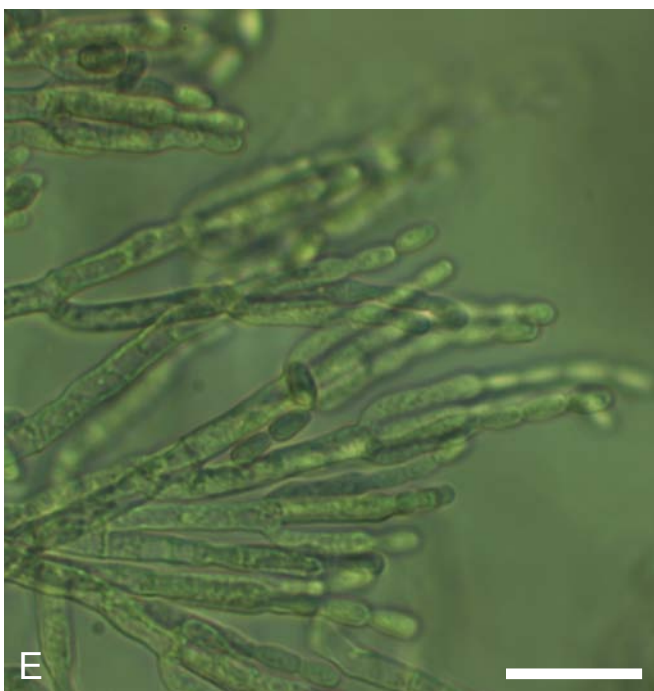
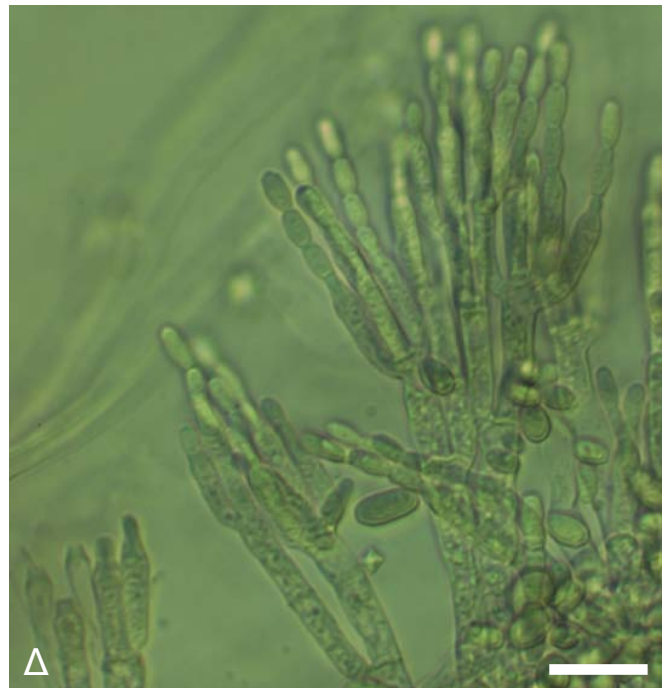
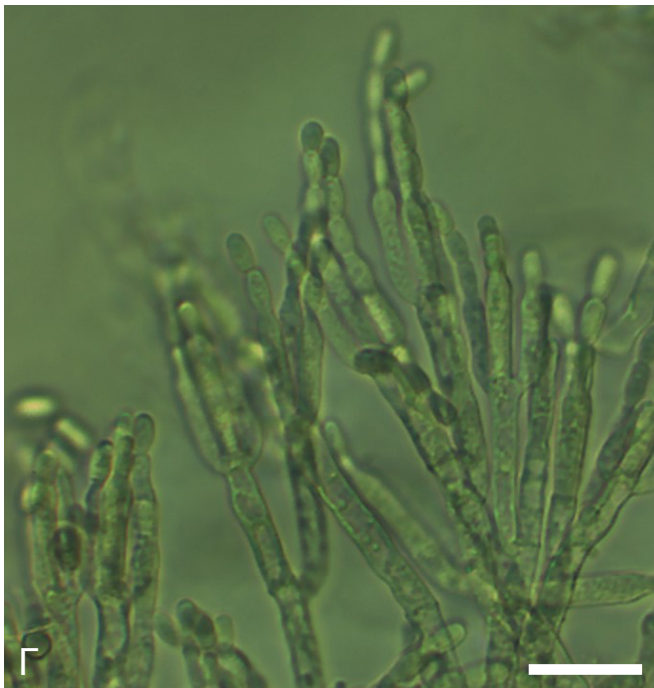
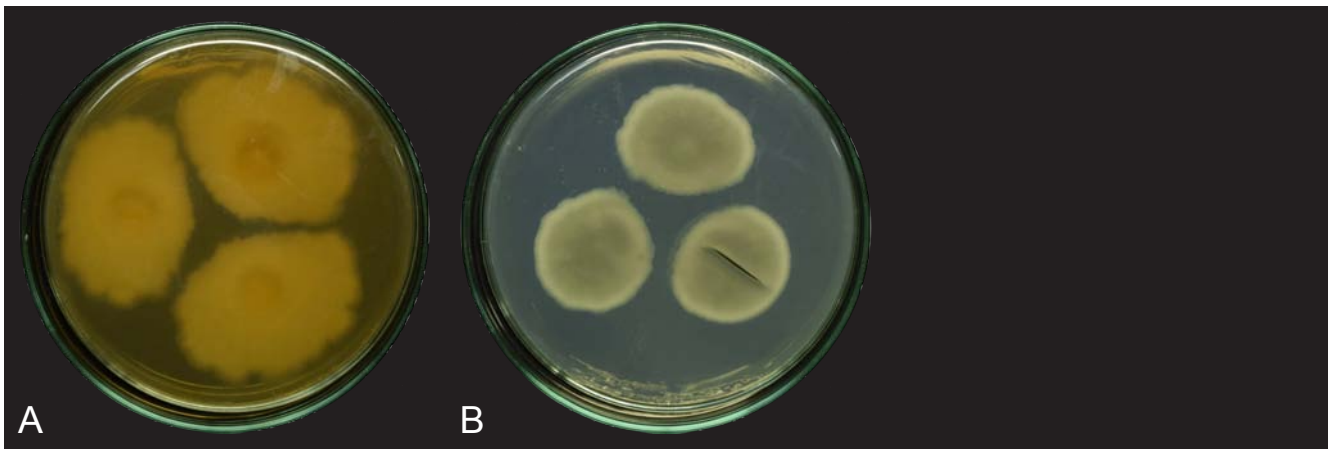
Η ομάδα Β με ομοιογενή μορφολογικά χαρακτηριστικά απαρτίζεται από απομονώσεις οι οποίες μετά από 7 έως 10 ημέρες επώασης στους 25 °C σε θρεπτικό υλικό MEA ξεκινούσαν να σχηματίζουν κορέμια μήκους 1 έως 5 mm που εξείχαν ευδιάκριτα από την υπόλοιπη αποικία. Η ομάδα αυτή αποτελούνταν από τις απομονώσεις 7.1.2, 4.1 (εικ. 12, 13) & 14.2.

Αναφορικά με τις απομονώσεις 4.1 και 14.2 παρατηρήθηκε ότι σχημάτιζαν κορέμια όταν αναπτύσσονταν σε καρπούς πορτοκαλιάς. Οι απομονώσεις, όταν καλλιεργούνταν σε θρεπτικό υλικό MEA, παρουσίαζαν κυανοπράσινη, βελουδινής υφής, αποικία χωρίς ευδιάκριτο περιθώριο ανάπτυξης. Οι αποικίες εμφάνιζαν απόχρωση ελαιώδη στο κέντρο με κυανό περιθώριο ανάπτυξης με την πάροδο των ημερών. Η επιφάνεια της αποικίας έπαιρνε χαρακτήρα κρούστας που διαρρηγνύονταν με την ανάδυση κορεμίων. Τα κορέμια είχαν ποικίλο μέγεθος και σχήμα.

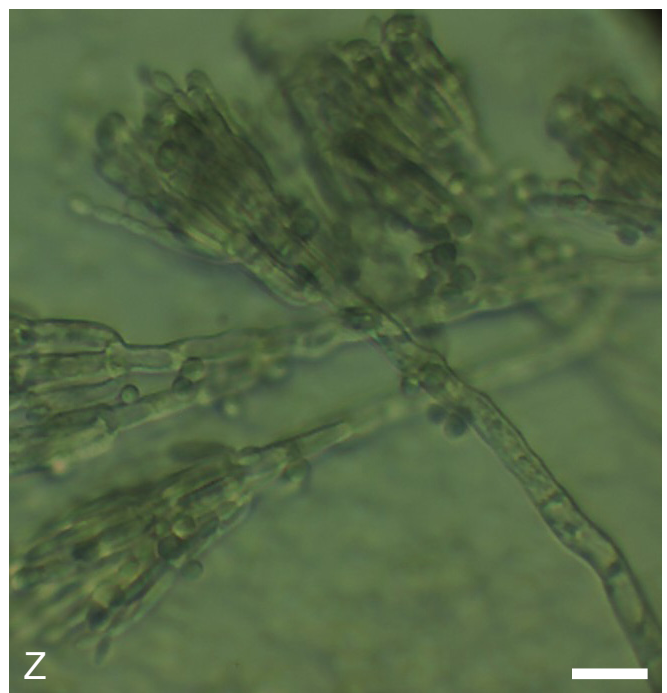
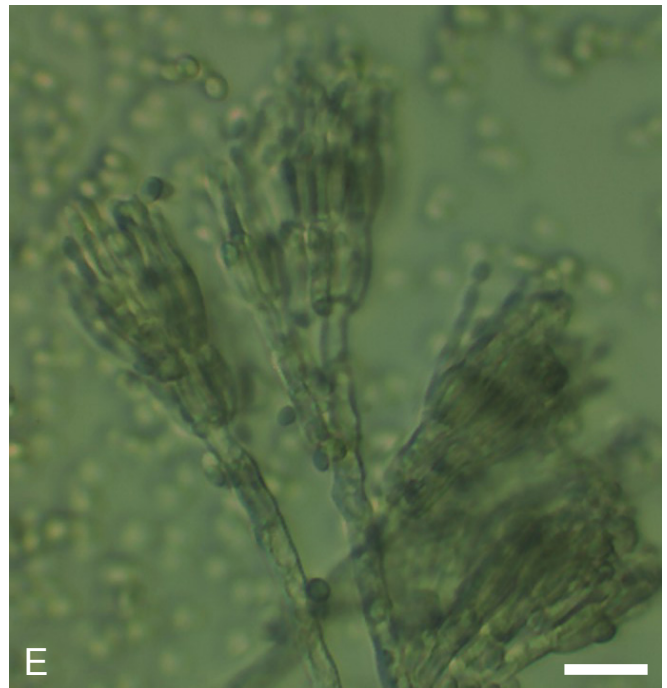
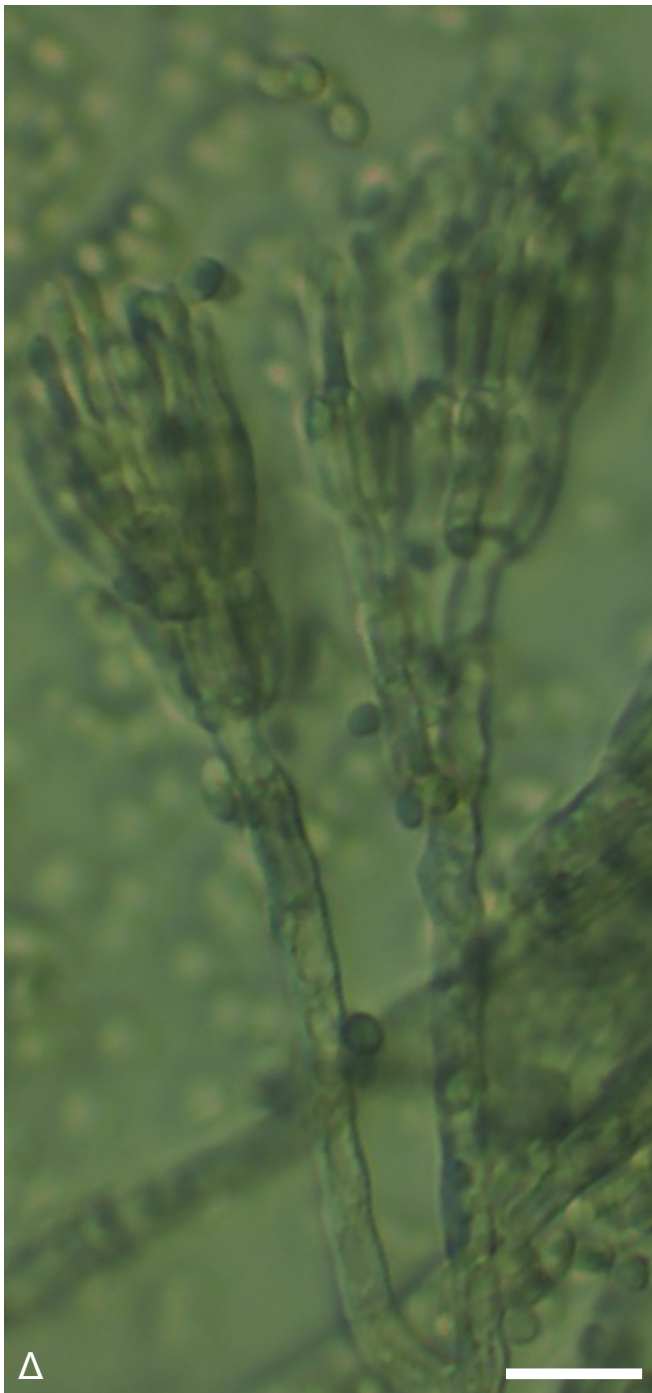
Σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό CYA οι αποικίες είχαν κυανό χρώμα με περιφερειακή λευκή ζώνη μυκηλίου 3 mm περίπου. Ενίοτε η αποικία παρουσίαζε λευκές διογκώσεις στο μυκήλιο που εξελίσσονταν σε κορέμια μικρού μεγέθους. Οι απομονώσεις αυτές παρήγαγαν ελαφρύ πορτοκαλόχρωμο μεταχρωματισμό σε τρυβλία CYA. Καμία δεν παρουσίασε σταγόνες εκκρίματος στην επιφάνεια της αποικίας.



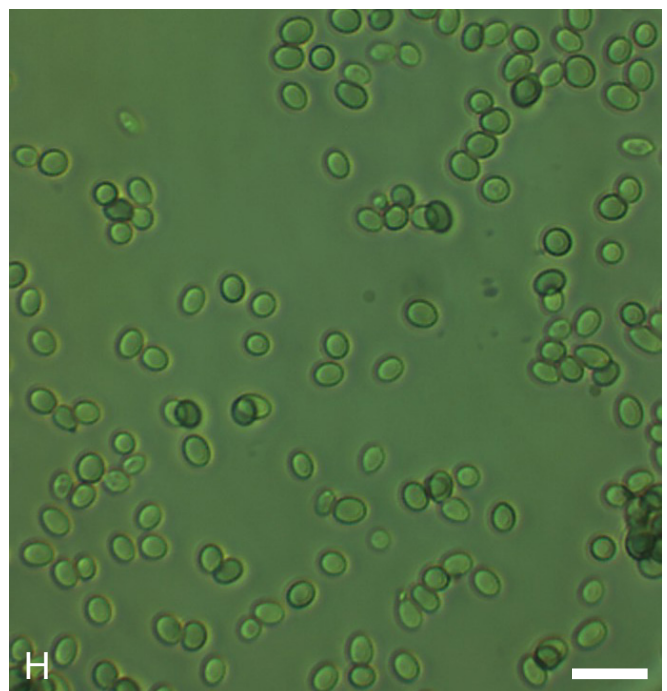
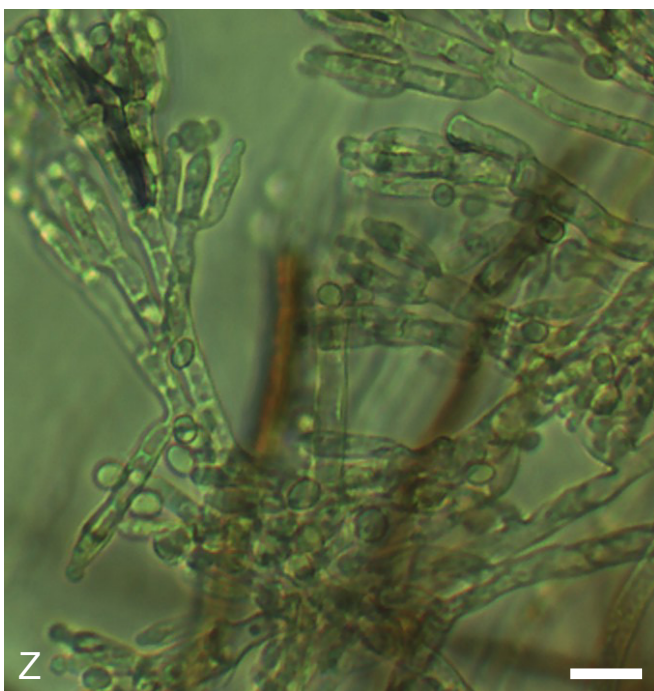
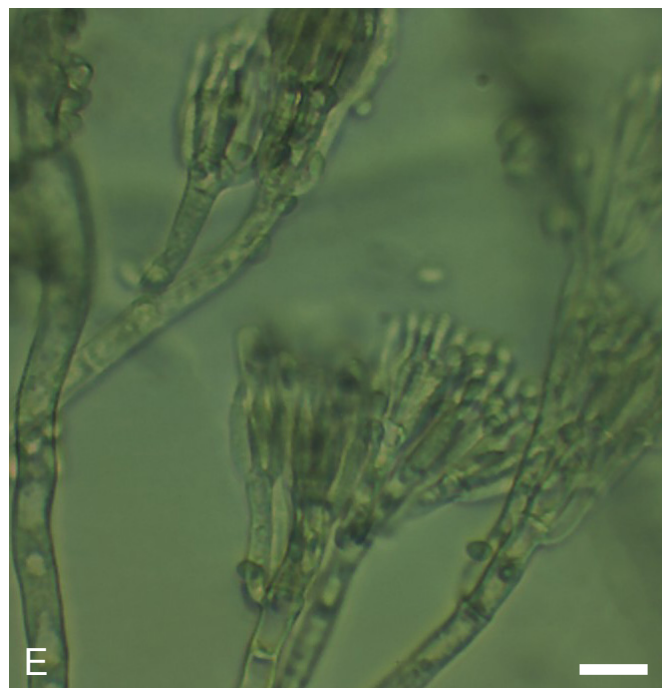
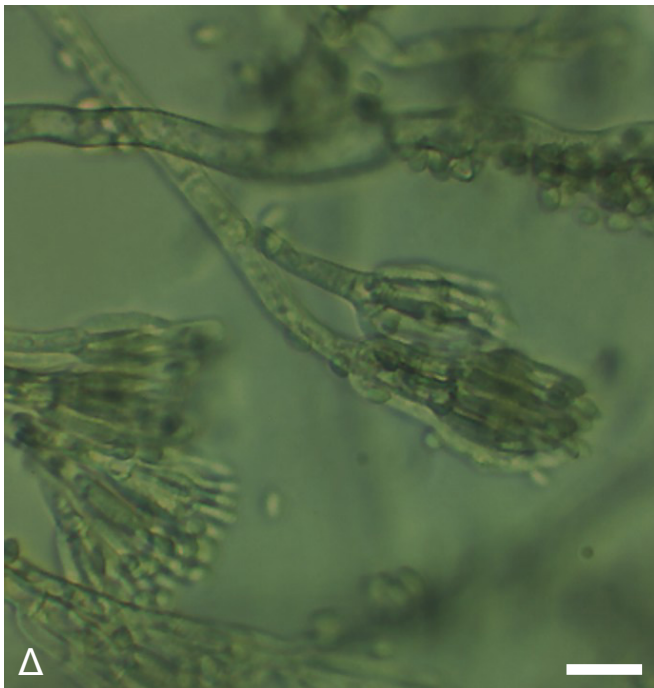
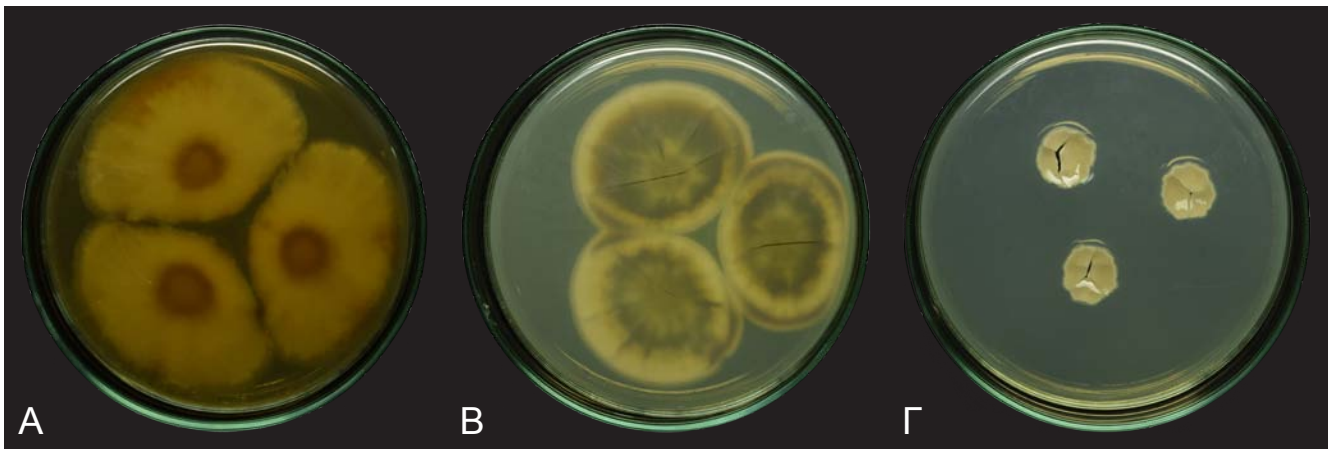
Εικ.8 *Penicillium* sp. Αποικίες ηλικίας 7 ημερών Α. MEA 25 °C, Β. CYA 25 °C
 Γ., Δ., Ε. Κονιδιοφόροι. Λευκή γραμμή = 10 μm.



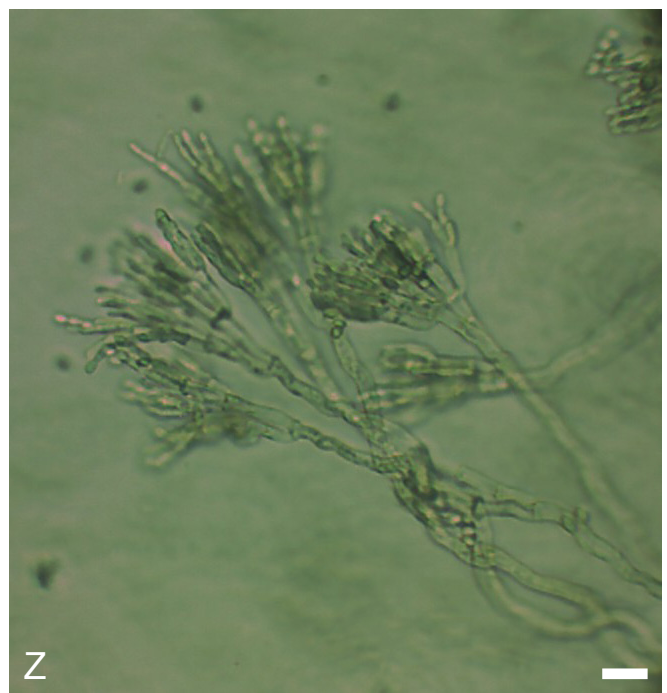
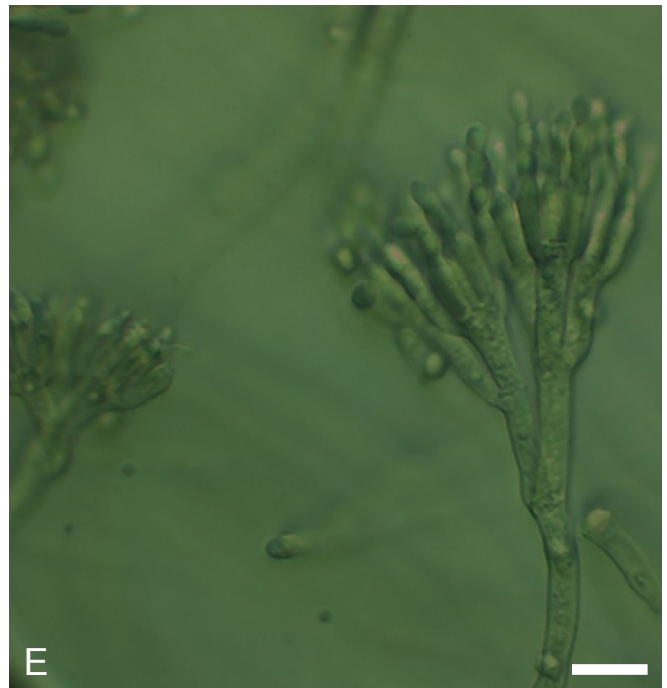
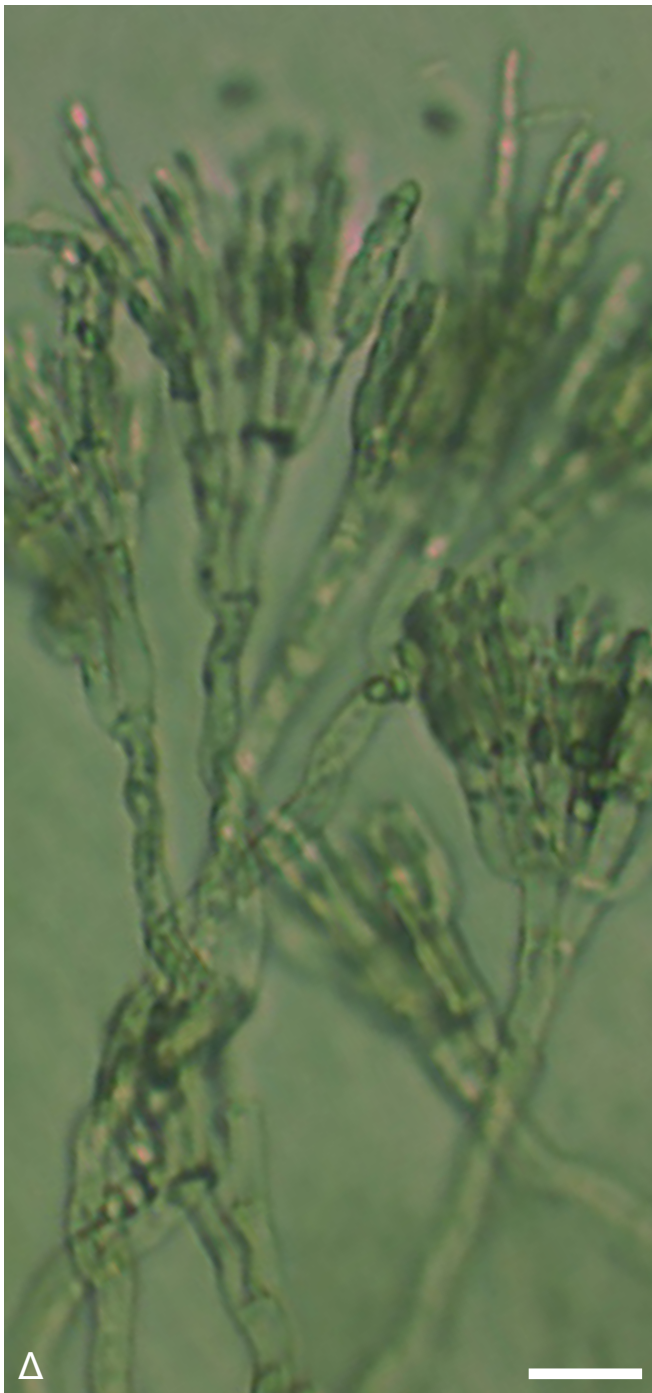
Εικ.9 *Penicillium* sp. Ανάστροφη όψη αποικιών ηλικίας 7 ημερών Α. ΜΕΑ 25 °C, Β. CΥΑ 25 °C
 Γ., Δ., Ε. Κονιδιοφόροι, Ζ. Κονίδια. Λευκή γραμμή = 10 μm.



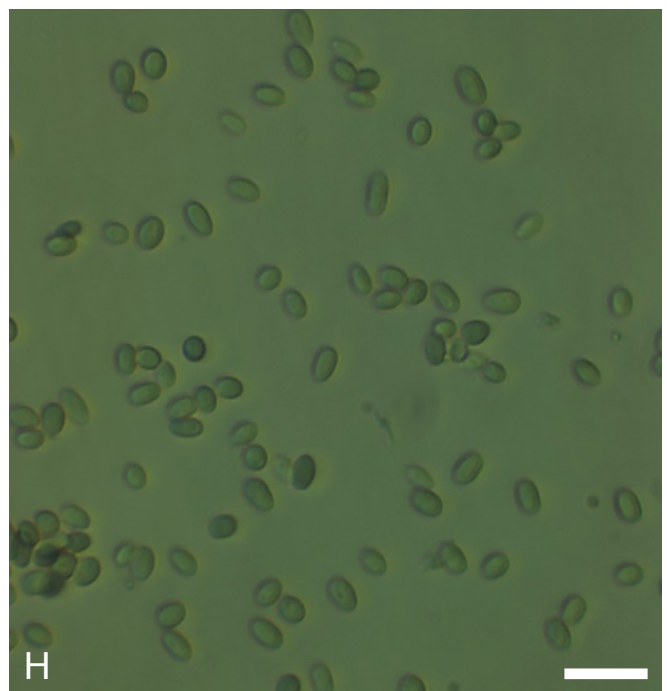
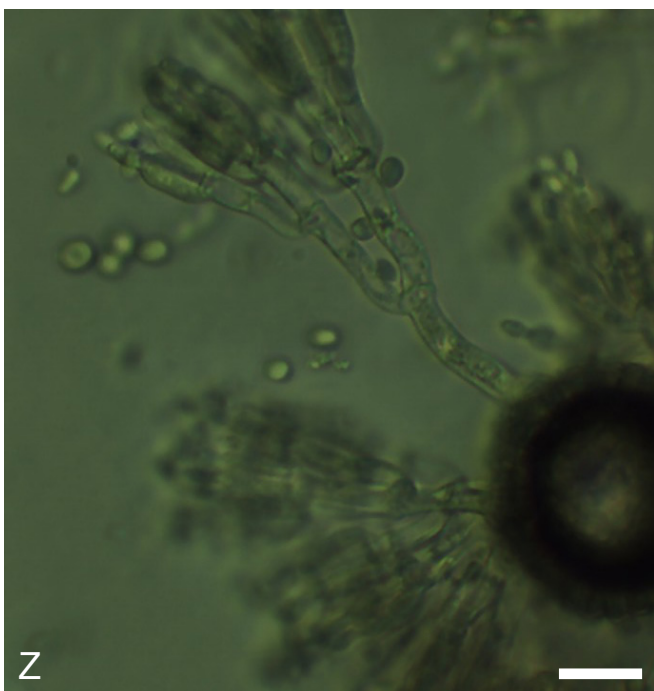
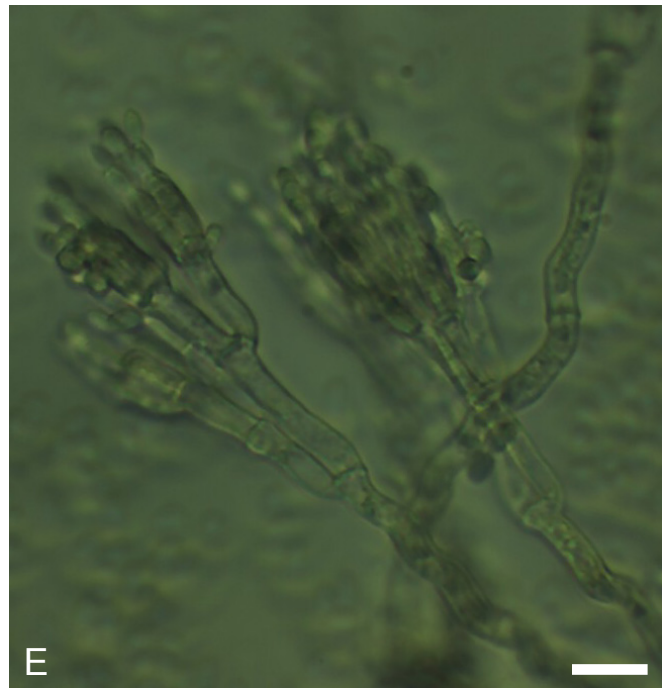
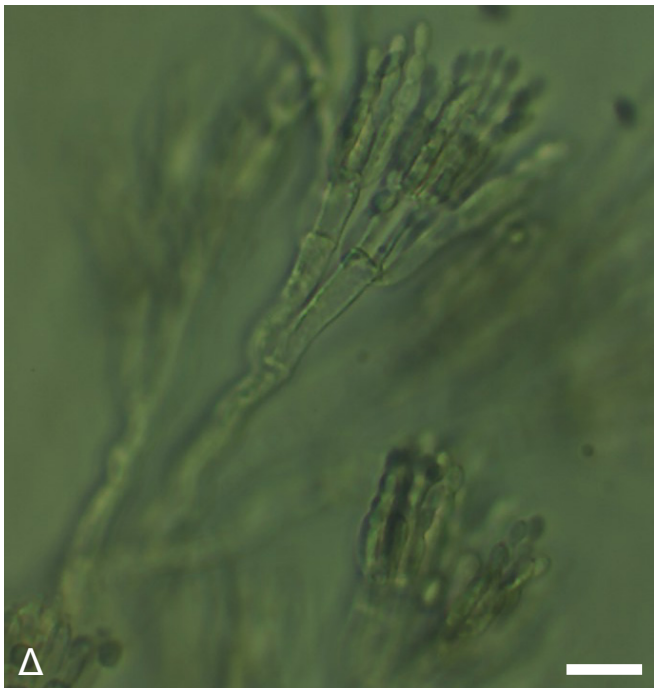
Εικ.10 *Penicillium spp.* Αποικίες ηλικίας 7 ημερών Α. MEA 25 °C, Β. CYA 25 °C, Γ. CYA 30 °C
 Δ., Ε., Ζ. Κονιδιοφόροι. Λευκή γραμμή = 10 μm.



Εικ.11 *Penicillium* spp. Ανάστροφη όψη αποικιών ηλικίας 7 ημερών Α. MEA 25 °C, Β. CYA 25 °C, Γ. CYA 30 °C
 Δ., Ε., Ζ. Κονιδιοφόροι, Η. Κονίδια. Λευκή γραμμή = 10 μm.



Εικ.12 *Penicillium* sp. Αποικίες ηλικίας 7 ημερών Α. MEA 25 °C, Β. CYA 25 °C, Γ. CYA 30 °C
 Δ., Ε., Ζ. Κονιδιοφόροι. Λευκή γραμμή = 10 μm.



Εικ.13 *Penicillium* sp. Ανάστροφη όψη αποικιών ηλικίας 7 ημερών Α. MEA 25 °C, Β. CYA 25 °C, Γ. CYA 30 °C
 Δ., Ε., Ζ. Κονidioφόροι, Η. Κονίδια. Λευκή γραμμή = 10 μm.

3.3 Τεχνητές μολύνσεις σε καρπούς *C.sinensis* var. *Valencia*

Οι τεχνητές μολύνσεις καρπών πορτοκαλιάς *Citrus cinensis* var. *Valencia* έγιναν ώστε να διαπιστωθεί η παθογόνος ικανότητα των απομονώσεων αυτών καθώς και να γίνει η παρατήρηση των συμπτωμάτων που προκαλούσαν (εικόνα 14, 15). Όλες οι απομονώσεις αποδείχθηκαν ικανές να προσβάλουν τα πορτοκάλια με εξαίρεση την 9.1 που απομονώθηκε από μωμιοποιημένο μανταρίνι. Η απομόνωση 4.1 που απομονώθηκε από πορτοκάλι εμφάνισε σημεία που προσομοίαζαν αυτά που προκαλεί το *P. ulaiense* σε καρπούς εσπεριδοειδών, ήτοι κορέμια ή συννήματα, μήκους 1 έως 7 mm που εξέχουν από την επιφάνεια της εξάνθησης και αποτελούνται από λευκό στέλεχος και κυανοπράσινη κεφαλή με γόνιμους κονιδιοφόρους (Holmes & Ekert, 1994).



14

Εικ.14 Σημεία και συμπτώματα κυανής σήψης σε καρπό πορτοκαλιάς. Απομόνωση 7.1.2.



15

Εικ.15 Συννήματα σε καρπό πορτοκαλιάς που προέκυψαν από τεχνητή μόλυνση. Απομόνωση 14.2.

4. Συζήτηση

4.1 Δοκιμή Βλάστηση σπορίων

Ο χρόνος βλάστησης των σπορίων των απομονώσεων 4.1 κ 7.2.1 ελέγχθηκε μετά από 10, 12 και 15 ώρες επώασης στους 25 °C σε θρεπτικό υπόστρωμα PGA και συνθήκες απουσίας φωτός. Οι συνθήκες δεν διασφαλιζόνταν κατά την εξέταση των τρυβλίων στο οπτικό μικροσκόπιο.

Η απομόνωση 4.1 βλάστησε σε μεγαλύτερο ποσοστό μετά από 10, 12 και 15 ώρες σε σχέση με την απομόνωση 7.2.1 και γενικά η τυπική απόκλιση (standard deviation) είχε μικρότερες τιμές συνεπώς η κατανομή της ήταν πιο ομοιογενής.

Η ανομοιογένεια της κατανομής της 7.2.1 θα μπορούσε να εξηγηθεί από παράγοντες που δεν εξετάστηκαν, όπως η όχι αυστηρά καθορισμένη σύνθεση του θρεπτικού υλικού PGA, το pH του θρεπτικού υλικού ή ακόμα και ο εκφυλισμός της απομόνωσης.

Ο χρόνος βλάστησης σπορίων ενός είδους θα μπορούσε να αποτελεί ταξινομικό κριτήριο στο πλαίσιο της πολυφασικής ταξινόμησης, και συνεπώς θα ήταν ενδιαφέρον να αξιολογηθεί περαιτέρω σε επόμενη ερευνητική εργασία.

4.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά απομονώσεων

Οι απομονώσεις που συλλέχθηκαν αρχικά θεωρήθηκε ότι ανήκουν στα είδη *P. italicum* και *P. digitatum* τα είδη που θεωρούνταν μέχρι πρότινος ότι προσβάλουν τα εσπεριδοειδή (Agrios, 2005; Παναγόπουλος, 2007). Οι Frisvad και Samson (2004) αναφέρουν ότι τα είδη του γένους *Penicillium* που απομονώνονται από εσπεριδοειδή κατά πάσα πιθανότητα ανήκουν σε ένα από τα είδη *P. italicum*, *P. ulaiense* και *P. digitatum*, χωρίς όμως να υπάρχει αναφορά για την παρουσία του *P. ulaiense* στην Ελλάδα. Η φαινοτυπική ποικιλομορφία που παρουσίαζαν οι απομονώσεις σε μακροσκοπικό επίπεδο όταν αναπτύσσονταν σε σωλήνες PGA αποτέλεσε την αφορμή για περαιτέρω βιβλιογραφική έρευνα στην οποία διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν και άλλα είδη που μπορούν να προσβάλουν εσπεριδοειδή είτε μολύνοντας φυσικά είτε ως οπορτουριστικά παθογόνα (Louw & Kirsten, 2015)

Η απομόνωση 3.1 με χαρακτηριστικό ελαιόχρωμο μυκήλιο ταυτοποιήθηκε ότι ανήκει στο είδος *P. digitatum*. Η ελαιόχρωμη απόχρωση της αποικίας σε θρεπτικά υλικά PGA, CYA και MEA, σε συνδυασμό με τους χαρακτηριστικούς ευμεγέθεις κονιδιοφόρους, την αποτυχία να αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 30 °C και την ικανότητα να προσβάλει καρπούς εσπεριδοειδών στηρίζουν την ένταξη της συγκεκριμένης απομόνωσης σε αυτό το είδος.

Το εύρος της μέγιστης διαμέτρου αποικίας που έχει επωαστεί σε θρεπτικό υλικό MEA στους 25 °C για το είδος *P. digitatum* κυμαίνεται από 26 έως 54 mm (Frisvad & Samson, 2004), ενώ για αποικίες σε αντίστοιχες συνθήκες που έχουν επωαστεί σε θρεπτικό υλικό CYA είναι από 24 έως 37 mm με ακραίες τιμές 15 και 55 mm. Η διάμετρος της κάθε αποικίας που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υλικό MEA στην πρώτη επανάληψη κυμάνθηκε από 37 έως 39 mm

ενώ στην δεύτερη από 32 έως 33 mm. Σε θρεπτικό υλικό CYA κυμάνθηκε από 26-29 mm στην 1η επανάληψη και από 23-24 mm στην δεύτερη ενώ δεν αναπτύχθηκε στους 30 και 35 °C. Συνεπώς οι τιμές που παρατηρήθηκαν στις δύο επαναλήψεις συμφωνούν με τα δεδομένα που αναφέρουν οι Frisvad και Samson (2004).

Οι κονιδιοφόροι ήταν κυρίως διακλαδισμένοι σε τρία επίπεδα αλλά παρατηρήθηκαν και κονιδιοφόροι πιο απλής δομής. Οι διαστάσεις των κονιδίων και φιαλιδίων απέκλιναν ελαφρώς από αυτές που αναφέρονται (Frisvad & Samson, 2004) για το είδος. Τα κονίδια και φιαλίδια που μετρήθηκαν από φωτογραφίες της απομόνωσης 3.1 ήταν τα πλέον ευμεγέθη σε σχέση με εκείνα που παρήγαγαν οι απομονώσεις των άλλων ομάδων. Οι διαστάσεις των κονιδίων ήταν 2.4-3.6 μm επί 3.9-6.6 μm, και ενίοτε ήταν μικρότερες από τα όρια που αναφέρονται για τα κονίδια [2.8-6 μm επί 6-9 μm] του είδους (Frisvad & Samson, 2004), χωρίς να τα ξεπερνούν. Τα φιαλίδια είχαν διαστάσεις 2,4-2,7 μm επί 11.8-12.8 μm. Οι διαστάσεις που αναφέρονται στην εργασία των Frisvad και Samson (2004) ήταν ελαφρώς διαφορετικές ως προς το μέγεθος της μικρής διάστασης [2.8 έως 6 μm] ενώ η μεγάλη διάστασή των φιαλιδίων βρισκόταν εντός των ορίων που αναφέρονται [10-17 μm] (Frisvad & Samson, 2004). Οι διαστάσεις που αναφέρονται στην εργασία των Frisvad και Samson (2004) ήταν ελαφρώς διαφορετικές ως προς το μέγεθος της μικρής διάστασης [2.8 έως 6 μm] ενώ η μεγάλη διάστασή των φιαλιδίων βρισκόταν εντός των ορίων που αναφέρονται [10-17 μm] (Frisvad & Samson, 2004).

Η δεύτερη ομάδα παρουσίαζε έντονη εριώδη κυανόλευκη ανάπτυξη κατά την απομόνωση σε θρεπτικό υλικό PGA και ενίοτε πορτοκαλί έως ερυθρό μεταχρωματισμό του υλικού. Τα χαρακτηριστικά σε επίπεδο φαινότυπου αποικίας στα θρεπτικά υλικά CYA και MEA παρουσίασαν σχετική συνέπεια. Η εριώδης έως δεσμιώδης υφή των αποικιών, η κυανή απόχρωσή της καθώς και τα όρια ανάπτυξης που παρατηρήθηκαν [MEA 25 °C: 31-49; CYA 25 °C: 32-39; CYA 35 °C: 0-18] φαίνεται να συμφωνούν σε γενικές γραμμές με τα αποτελέσματα και την περιγραφή που παραθέτουν οι Samson και Frisvad (2004) [MEA 25 °C: 22-47 mm; CYA 25 °C: 26-50 mm; CYA 30 °C: 0-12 mm] με μικρές αποκλίσεις. Βασική διαφοροποίηση από την περιγραφή τους, αποτέλεσε ο ερυθρός έως καστανός μεταχρωματισμός στα θρεπτικά υλικά. Ο μεταχρωματισμός παρουσίαζε την εικόνα διαχεόμενου χρώματος και όχι απόχρωση της ανάστροφης πλευράς της αποικίας. Αναφέρεται για το *P. italicum* ότι έχει ερυθρή έως καστανή ανάστροφη πλευρά (Frisvad and Samson) αλλά επίσης αναφέρεται ότι δεν παράγει διαχεόμενο χρώμα, όπως παρατηρήθηκε στις συγκεκριμένες απομονώσεις.

Οι λείοι, διακλαδιζόμενοι σε τρία επίπεδα (terverticillate) κονιδιοφόροι και τα ατρακτοειδή έως κυλινδρικά κονίδια, επίσης αντιστοιχούσαν στην περιγραφή του είδους. Οι διαστάσεις των κονιδίων ήταν 2.1-2.2 μm επί 2.2-4.2 μm και συμφωνούσαν με τις διαστάσεις που παρατίθενται από τους Frisvad και Samson (2004) και οι οποίες κυμαίνονται από 2.2-3.5 επί 3.5-5 μm. Τα φιαλίδια είχαν διαστάσεις 1.8-2.1 μm επί 9.1-10 μm. Οι διαστάσεις των φιαλιδίων του είδους που αναφέρονται από τους Frisvad και Samson (2004) είναι 2.5-4.5 μm έως 8-15 μm. Η μικρή διάσταση των φιαλιδίων αποκλίνει, όντας μικρότερη αλλά η μεγάλη διάσταση βρίσκεται μέσα στο εύρος τιμών που αναφέρονται.

Η τελευταία ομάδα απομονώσεων που απαρτίζεται από τις απομονώσεις 4.1, 7.1.2 και 14.2, και η οποία βρέθηκε να προκαλεί κυανή σήψη σε καρπούς εσπεριδοειδών διαχωρίστηκε από την προηγούμενη λόγω της ικανότητάς της να παράγει συννήματα σε καρπούς και σε *in vitro* συνθήκες. Επίσης εμφάνιζε ιδιότυπο μοτίβο ανάπτυξης σε τρυβλία PGA. Σε σωλήνες PGA παρατηρήθηκαν αρχικά μικρά συννήματα με κυανή κεφαλή και λευκό στέλεχος που αναπτυσσόταν στα όρια του θρεπτικού υλικού. Το εύρος ανάπτυξης των αποικιών κατά την διεξαγωγή του μορφολογικού χαρακτηρισμού [MEA 25 °C: 32-44 mm; CYA 25 °C: 28-40 CYA 30 °C: 07-14 mm] αντιστοιχούσαν σε αυτά που παραθέτουν οι Frisvad και Samson (2004) για το *P. italicum* [MEA 25 °C: 22-47 mm; CYA 25 °C: 26-50 mm; CYA 30 °C: 0-12 mm;] με μικρή απόκλιση στην θερμοκρασία των 30 °C. Η παρουσία συννημάτων σε σωλήνες PGA, αρχικά, και αργότερα σε καρπούς πορτοκαλιού που είχαν μολυνθεί σε δοκιμαστικές τεχνητές μολύνσεις, παραπέμπει στην περιγραφή των Holmes *et al.* (1994) για το *P. ulaiense*, όμως τα όρια ανάπτυξης απέχουν από αυτά που αναφέρονται από τους Frisvad and Samson (2004) και είναι για το CYA 13-26 mm στους 25 °C 0 mm, στους 30 °C και 13-23 mm για το MEA. Επίσης οι απομονώσεις αυτής της ομάδας ήταν ικανές να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία 30 °C σε αντίθεση με το *P. ulaiense* το οποίο, όπως φαίνεται από το εύρος ανάπτυξης του είδους σε διάφορα θρεπτικά υλικά και θερμοκρασίες, δεν αναπτύσσεται στους 30 °C (Frisvad & Samson, 2004).

Οι κονιδιοφόροι, όπως και σε απομονώσεις των προηγούμενων ομάδων, ήταν κατά κύριο λόγο διακλαδισμένοι σε τρία επίπεδα (terverticillate). Τα συνθετικά στοιχεία των κονιδιοφόρων όμως παρουσίαζαν την διαθλασμένη εικόνα στην οποία πιθανώς αναφέρονται οι Frisvad and Samson (2004) στην περιγραφή τους για το είδος *P. ulaiense*, με την αγγλική λέξη "Sinoid". Οι διαστάσεις των κονιδίων ήταν 2.1-2.4 μm επί 2.4-4.8 μm ενώ αυτές των φιαλιδίων ήταν 2.1-2.4 μm επί 7.3-7.6 μm. Τα κονίδια ήταν αντίστοιχα με αυτά του *P. italicum* (2.2-3.5 μm επί 3.5-5 μm) ή και ελαφρώς μικρότερα ενώ σε σχέση με αυτά του *P. ulaiense* (2.2-3.5 μm επί 4.5-9.5 μm) αρκετά μικρότερα από κονίδια του είδους αυτού με τις μέγιστες διαστάσεις (3.5 μm επί 9.5 μm). Τα φιαλίδια επίσης είναι μικρότερα από αυτά του *P. italicum* (2.5-4.5 μm επί 8-15 μm) ή από αυτά του *P. ulaiense* που αναφέρεται ότι έχουν διαστάσεις (3-4 μm επί 9-15 μm).

4.3 Συννήματα ή κορέμια

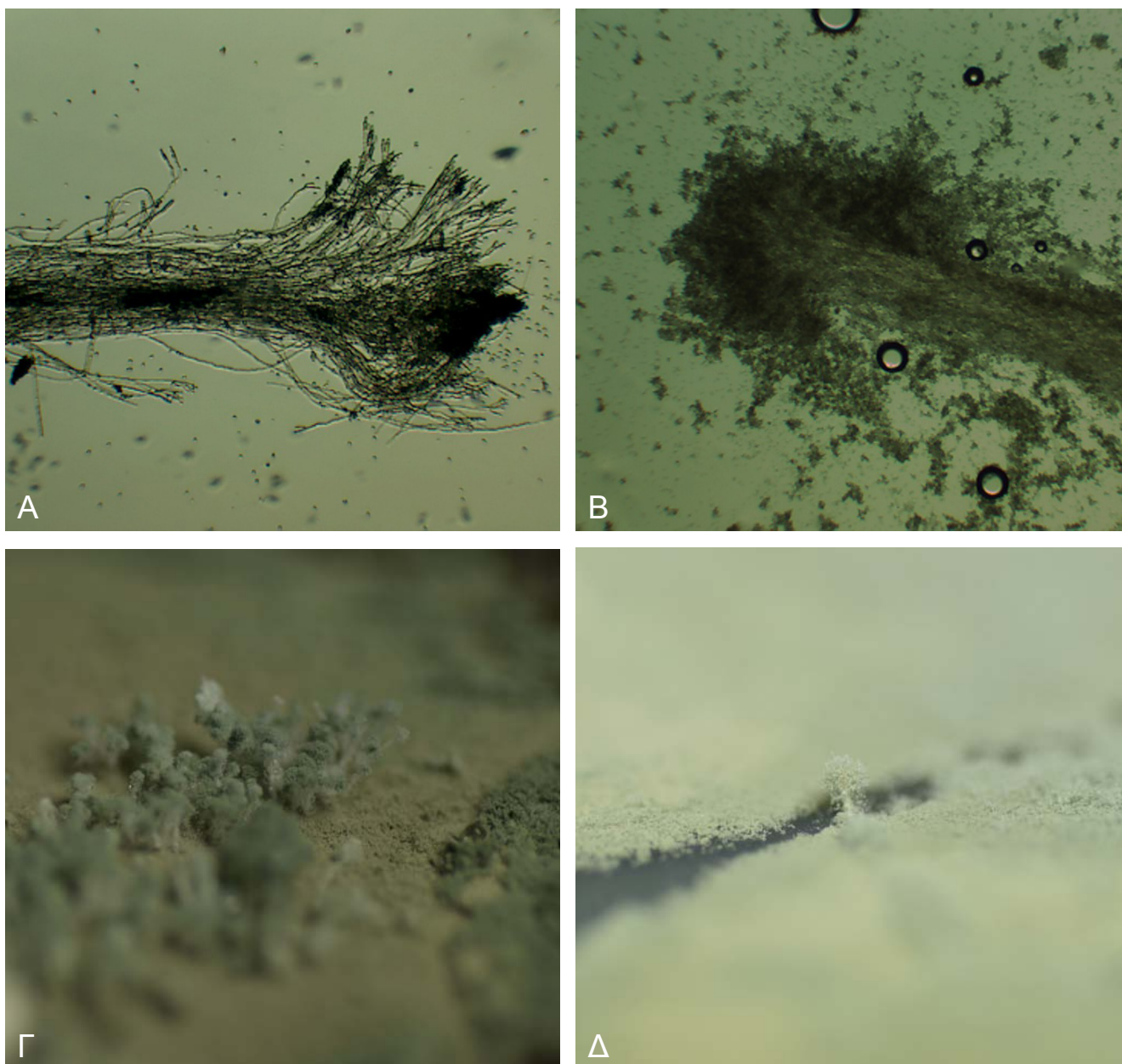
Οι όροι σύννημα και κορέμιο έχουν καταλήξει να έχουν την ίδια σημασία στην περιγραφή του γένους *Penicillium* (Seifer & Samson, 1985). Διάφορα είδη του γένους σχηματίζουν συννήματα, όπως το *P. expansum* (Frisvad & Samson, 2004). Το *P. italicum* αναφέρεται ότι δεν παράγει συννήματα στην εργασία των Frisvad και Samson (2004), παρόλα αυτά σε άλλο σημείο αυτής της εργασίας όπου παραθέτουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους, αναφέρεται περιστασιακά η ύπαρξη συννημάτων, χωρίς να συνοδεύεται από περιγραφή των χαρακτηριστικών τους.

Στις κυανές σήψεις των εσπεριδοειδών θεωρείται ότι βασικό κριτήριο για τον διαχωρισμό των ειδών *P. italicum* και *P. ulaiense* αποτελεί ο σχηματισμός συννημάτων στον προσβεβλημένο

καρπό (Holmes *et al.* 1994) παρότι αναφέρεται ότι ενίοτε μπορούν να παρατηρηθούν συννήματα και σε απομονώσεις του *P. italicum* (Frisvad & Samson, 2004).

Αρχικά εκτιμήθηκε ότι οι απομονώσεις που συγκροτούσαν την ομάδα Β. πιθανόν ανήκουν στο είδος *P. ulaiense*. Ομως ο ρυθμός ανάπτυξης των απομονώσεων που παρήγαγαν κορέμια δεν αντιστοιχεί με το εύρος τιμών που αναφέρεται από τους Frisvad και Samson (2004) για το *P. ulaiense* και επιπλέον παρατηρήθηκε ανάπτυξη στους 30°C, πράγμα που δεν αναφέρεται για το *P. ulaiense*. Επίσης οι απομονώσεις αυτές είχαν χαρακτηριστικά που δεν αντιστοιχούσαν σε εκείνα των ειδών που αναφέρονται ότι παράγουν συννήματα, στην ίδια εργασία (*P. coprobium*, *P. coprophilum*, *P. expansum*, *P. formosanum*, *P. grandicola*, *P. hirsutum*, *P. hordei*, *P. tulipae*) και μεταξύ των οποίων μόνο το *P. expansum* έχει αναφερθεί ότι προσβάλλει εσπεριδοειδή.

Τα κορέμια που παρατηρήθηκαν είχαν λευκό στέλεχος και κυανή κεφαλή (εικ. 16) με γόνιμους κονιδιοφόρους, και ενίοτε εκφύονταν από υφές κάτω από την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού και έξω από τα όρια ανάπτυξης της αποικίας .

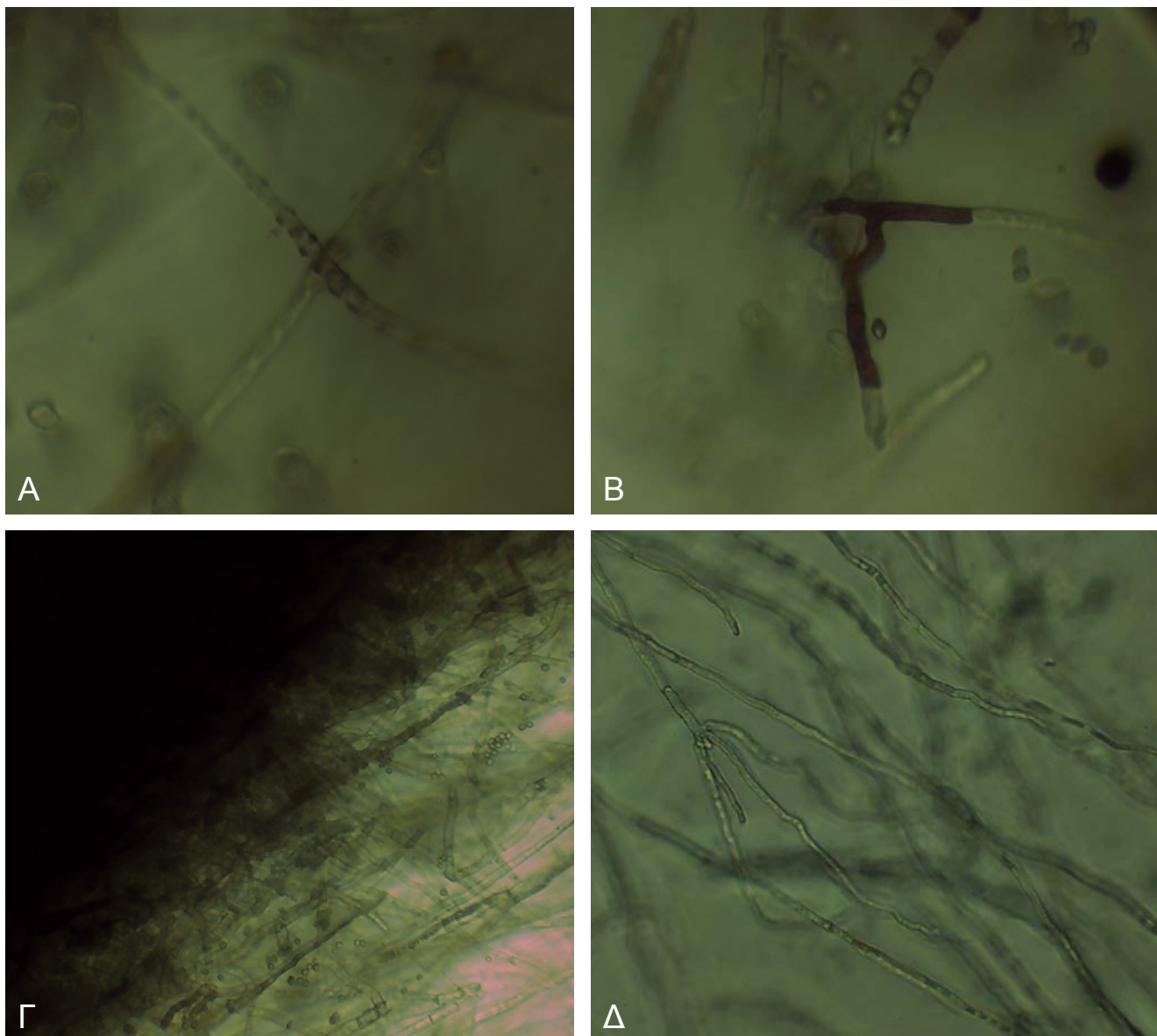


Εικ.16 Α., Β. Μικροσκοπική παρατήρηση συννημάτων του γένους *Penicillium*. Γ. Συννήματα του γένους *Penicillium* σε θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ. Δ. Μονήρες σύννημα σε θρεπτικό υπόστρωμα CYA.

4.4 Μεταχρωματισμός και χρωματισμός υφών

Ο μεταχρωματισμός του θρεπτικού υλικού σχετίζεται με την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Samson & Frisvad, 2004; Larsen *et al.*, 2005).

Επιμήκεις τομές σε θρεπτικό υλικό CYA και MEA που παρουσίαζαν μεταχρωματισμό έδειξαν ότι το χρώμα φαίνεται να συγκεντρώνεται, αν όχι να περιορίζεται, στις υφές που βρίσκονται εντός του θρεπτικού υλικού, είτε καλύπτοντας την επιφάνειά του είτε με την μορφή αποθέσεων επί της επιφανείας τους (εικ. 17). Ο μεταχρωματισμός που συνοδεύει την ανάπτυξη μίας αποικίας είναι σημαντικό χαρακτηριστικό (Samson & Frisvad, 2004) για την ταξινόμηση του γένους *Penicillium*, όχι όμως καθοριστικό. Η απόδοση ταξινομικού χαρακτήρα στην ικανότητα ενός είδους να παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες θα πρέπει να γίνεται με προσοχή (Pitt, 1985) καθώς η ικανότητα παραγωγής μεταβολιτών ενός είδους και πόσο μάλλον μίας απομόνωσης μπορεί να επηρεαστεί από αβιοτικούς παράγοντες όπως το φως, το pH, τα διαθέσιμα θρεπτικά (Brakhage, 2013) αλλά και από την μεταφορά γονιδίων (horizontal gene transfer) από είδος σε είδος (Slot & Rocas, 2011). Επίσης αναφέρεται ότι τα είδη του γένους *Penicillium*, δεν



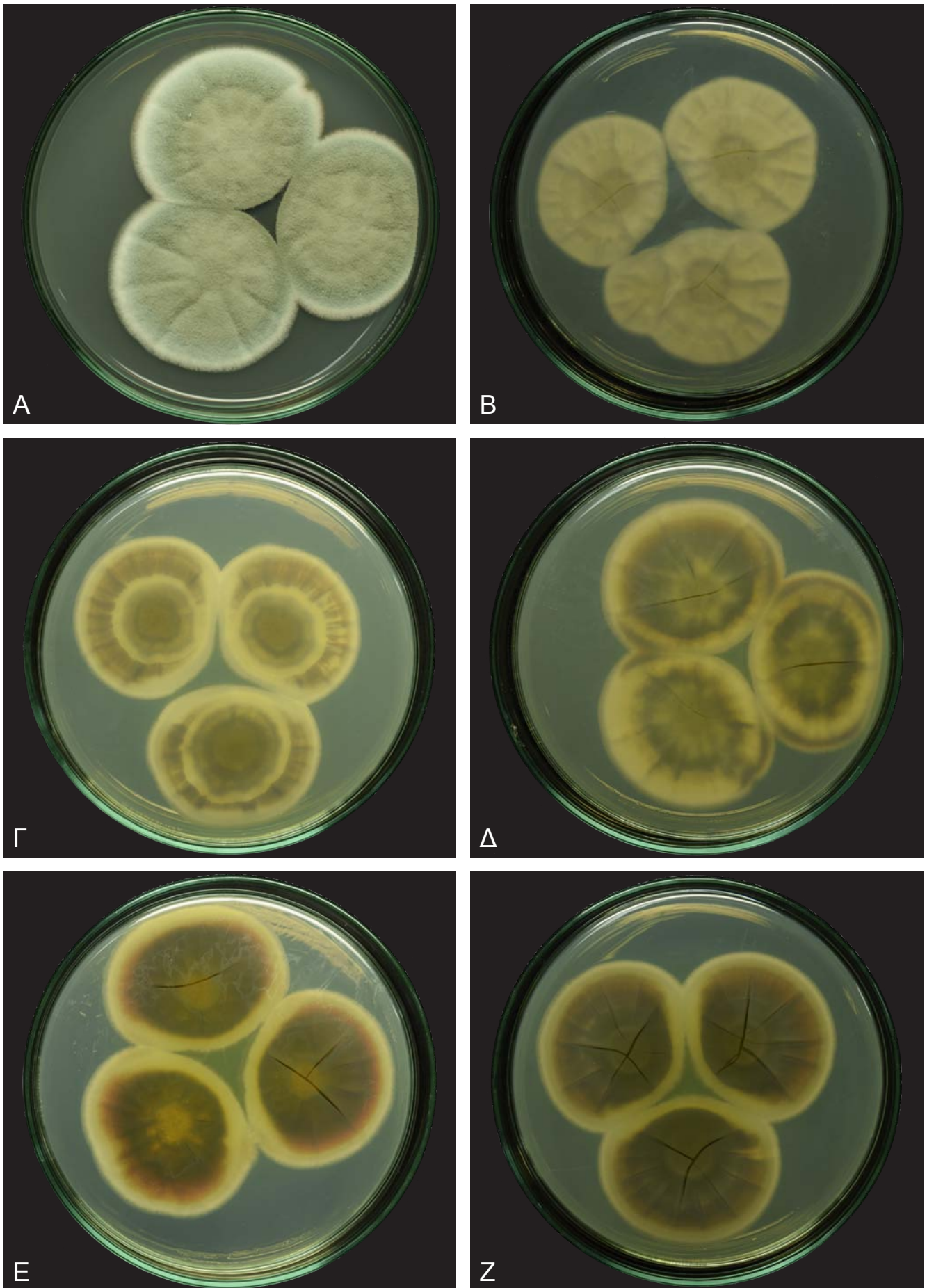
Εικ.17 *Penicillium italicum*. Μικροσκοπική παρατήρηση υφών που αναπτύσσονται εντός του θρεπτικού υποστρώματος CYA (25 °C)
Α. Ερυθρές αποθέσεις επί του μυκηλίου, Β. Ερυθρός χρωματισμός υφής, Γ. Ανώτερη στοιβάδα θρεπτικού υλικού ερυθρές και διαυγείς υφές, Δ. Κατώτερη στοιβάδα θρεπτικού υλικού με διαυγείς υφές.

παράγουν πάντα μεταχρωματισμό στην ανάστροφη του τρυβλίου, γεγονός που οφείλεται στο ότι είναι ευκαριωτικοί οργανισμοί και δύνανται να ρυθμίσουν την παραγωγή μεταβολιτών και ενζύμων, μέσα από την έκφραση γονιδίων, συνεπώς η απουσία μεταχρωματισμού δεν σημαίνει αυτόματα και την αδυναμία της απομόνωσης να τον παράξει υπό άλλες συνθήκες (Pitt, 1985).

Περαιτέρω έρευνας χρήζει το ενδεχόμενο οι χρωματισμένες υφές να δίνουν την εικόνα του μεταχρωματισμού του θρεπτικού υλικού. Αν διαφορετική πυκνότητα κόκκινου μεταχρωματισμού επί των υφών μπορεί να δώσει διαφορετική απόχρωση στην κάτω επιφάνεια του θρεπτικού υλικού, το οποίο δεν είναι άχρωμο, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη σημασία ώστε να μην υπάρχουν ασαφείς περιγραφές των ειδών. Παρασκευάσματα από την απομόνωση 8.1, έδειξαν ότι οι υφές χρωματίζονταν κόκκινες ή έμοιαζαν να στιγματίζονται από κόκκινες αποθέσεις σε ορισμένο βάθος και στα δύο θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν (CYA & MEA) σε θερμοκρασία επώασης 25 °C (εικ. 18). Η απόχρωση του θρεπτικού στην περίπτωση του CYA ήταν καστανή έως ερυθρή ενώ στο MEA ήταν κόκκινη. Ο μεταχρωματισμός δεν παρουσιάζει ομοιογένεια στην ανάστροφη πλευρά του τρυβλίου, αλλά περιοχές ή ζώνες με διαφορετικούς χρωματικούς χαρακτήρες ή διαβαθμίσεις (εικ. 19).



Εικ.18 *Penicillium italicum*. Μακροσκοπική παρατήρηση τομέα αποικίας όπου διακρίνεται σκούρος μεταχρωματισμός στην άνω στοιβάδα του θρεπτικού υποστρώματος.



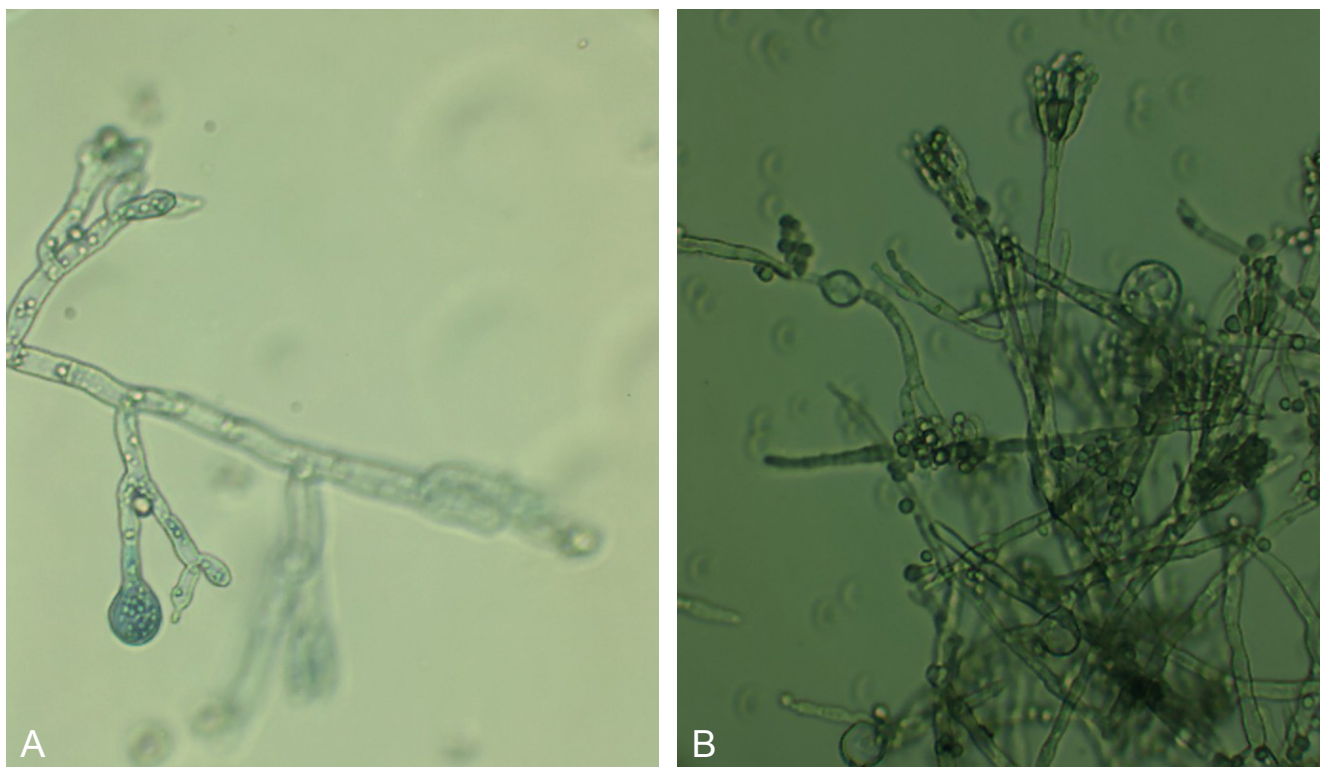
Εικ.19 *Penicillium italicum*. Αποικίες ηλικίας 7 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα CYA (25 °C) Α. Ανάπτυξη αποικίας, Β., Γ., Δ., Ε., Ζ. Ανάστροφη όψη όπου διακρίνεται ο διαφορετικής έντασης μεταχρωματισμός του θρεπτικού υλικού.

4.5 Το Φαινόμενο Corda

Ο Biourge μελετώντας το *P. fieherim* παρατήρησε διογκώσεις στο πρώτο και ενίοτε δεύτερο κονίδιο της αλυσίδας ενώ αργότερα ο Thom (1930) παρατήρησε παρόμοιες διογκώσεις μελετώντας απομονώσεις του *P. brevi-compadum* (Raper and Thom, 1949) το οποίο αναφέρθηκε ως φαινόμενο Corda.

Στην παρούσα εργασία ενίοτε παρατηρήθηκαν διογκώσεις στα άκρα των κονιδιοφόρων, δηλαδή στα φιαλίδια παρατηρήθηκαν σε απομονώσεις που είχαν επωαστεί σε θρεπτικά υλικά PGA και CYA (εικ. 20 A, B). Πιθανώς αυτές οι διογκώσεις αντιστοιχούν στο φαινόμενο Corda (Corda's phenomenon) που αναφέρεται στις εργασίες των Biourge (1923) και Thom (1930) σύμφωνα με τον Hennebert (1985). Αντίστοιχες διογκώσεις είχε παρατηρήσει και ο Dierckx όταν χρησιμοποίησε μία ελαφρώς όξινη βακτηριολογική πεπτόνη που περιείχε γλυκόζη, γλυκερόλη και , άγαρ και ζελατίνη ως πηκτικούς παράγοντες για τον μορφολογικό χαρακτηρισμό ειδών του γένους *Penicillium* (Hennebert, 1985).

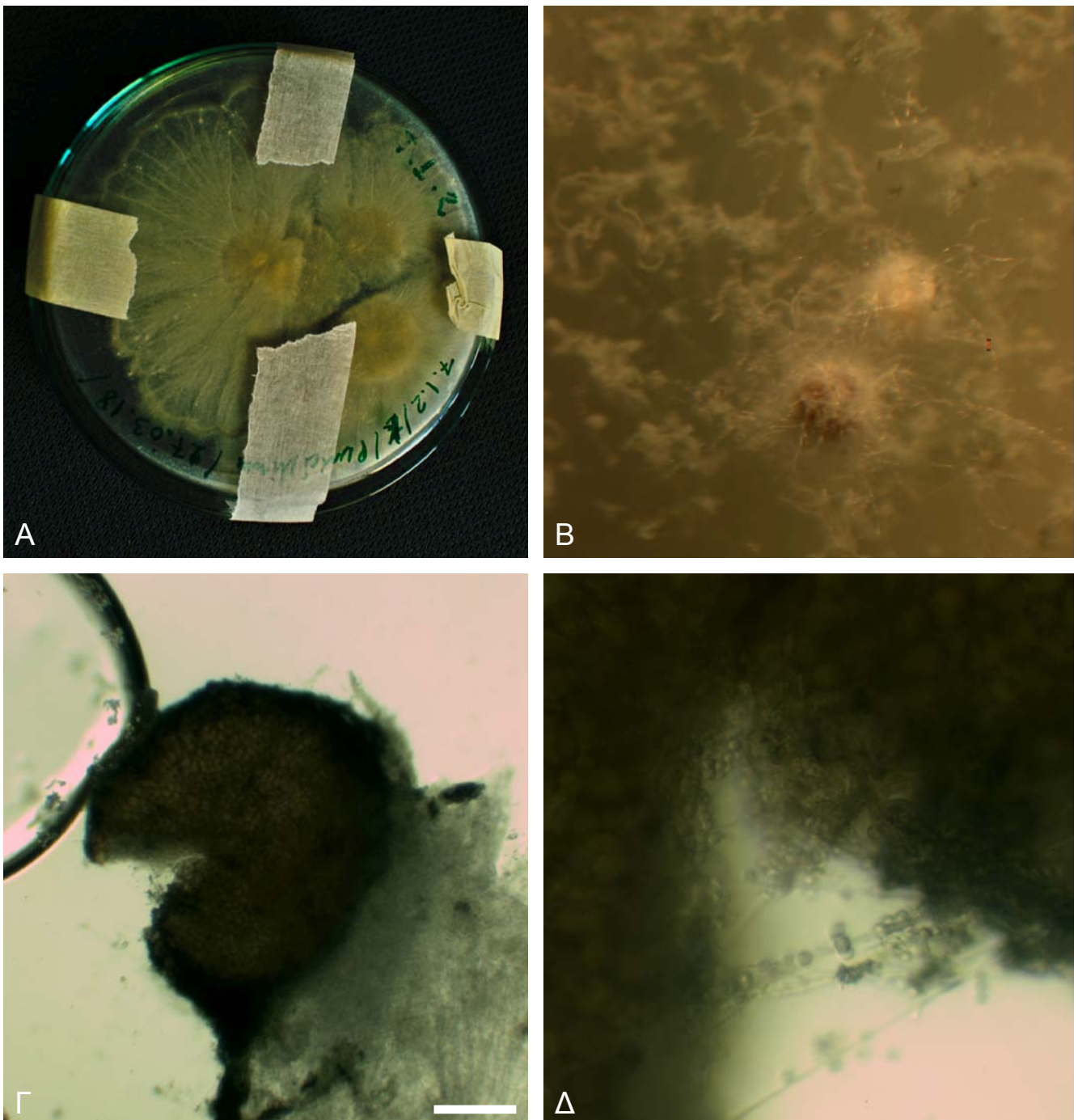
Οι διογκώσεις αυτές παρατηρήθηκαν σε αποικίες που είχαν επωαστεί σε θρεπτικό υλικό PGA και αντιστοιχούν στο είδος *P. digitatum* αλλά και σε δύο απομονώσεις της ομάδας B (7.1.2 & 4.1) οι οποίες είχαν επωαστεί σε θρεπτικό υλικό CYA και θερμοκρασία 25 °C. Επίσης, παρατηρήθηκαν αντίστοιχες διογκώσεις σε κονιδιοφόρους που αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 30 °C. Οι αποικίες που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες άνω των 28 °C δεν παρουσίαζαν συνεπή φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σε συμφωνία με αυτό που αναφέρει ο Pitt (1985). Θα ήταν ενδιαφέρον, σε επόμενη ερευνητική εργασία, να μελετηθεί η σύνδεση των διογκώσεων που παρατηρήθηκαν με παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης, όπως η υψηλή θερμοκρασία και το pH του θρεπτικού υποστρώματος.



Εικ.20 Α. *Penicillium digitatum*. Μικροσκοπική παρατήρηση διόγκωσης φιαλιδίου. Β. *Penicillium* sp. Μικροσκοπική παρατήρηση διογκώσεων σε απολήξεις κονιδιοφόρων αποικίας που έχει επωαστεί σε θρεπτικό υπόστρωμα CYA (25 °C).

4.6 Σκληρώτια / Κλειστοθήκια

Σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό PGA και εμβολιασμένο με την απομόνωση της τρίτης ομάδας, 7.1.2 παρατηρήθηκαν δομές που ομοιάζαν με κλειστοθήκια χωρίς εξατρήματα απόχρωσης λευκής έως ανοιχτής καστανής, διαστάσεων από 400 έως 420 μm , περιβαλλόμενα από την εξάνθηση της απομόνωσης μετά από τρεις μήνες επώασης στους 25 °C με ένα παρεμβαλλόμενο διάστημα, διάρκειας μίας βδομάδας, επώασης στους 4 °C (εικ. 21). Από τα είδη του γένους *Penicillium* που προσβάλλουν εσπεριδοειδή μόνο το *P. italicum* έχει αναφερθεί ότι παράγει άχρωμα έως ανοιχτά καστανά διαστάσεων 200-500 μm (Raper & Thom, 1949).



Εικ.21 Α. Λευκά στίγματα σε αποικία *Penicillium* sp (απομόνωση 7.1.2) σε PGA που έχει επωαστεί για διάστημα 3 μηνών στους 25 °C. Β. Κλειστοθήκια ανοιχτού καστανού και λευκού χρώματος αντίστοιχα (απομόνωση 7.1.2). Γ. Μικροσκοπική παρατήρηση εκφυλισμένου κλειστοθηκίου που έχει διαρρηχθεί. Δ. Μικροσκοπική παρατήρηση ρήγματος εκφυλισμένου κλειστοθηκίου (απομόνωση 7.1.2). Λευκή μπάρα = 100 μm .

5. Βιβλιογραφία

Ελληνική

Παναγόπουλος, Χ.Γ. (2007). *Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου*. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα

Τζάμος Κ.Ε. (2007). *Φυτοπαθολογία*. Εκδόσεις σταμούλη Α.Ε., Αθήνα

Διεθνής

Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press, San diego

Arrebolla, E., Sivakumar, D., and Korsten, L. (2010). Effect of volatile compounds produced by Bacillus strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control* **53**:122-128.

Ballester, A.R., Marcet-Houbem, M., Levin, E., Sela, N., Selma-Lazaro, C., Carmona, L., Wisniewski, M., Droby, S., Gonzalez-Candelas, L. and Gabaldón, T. (2015) Genome, transcriptome, and functional analyses of *Penicillium expansum* provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity. *Molecular Plant Microbe Interactions* **28**: 232–248.

Berny, J.F., and Henneber, G.L. (1990) Variants of *Penicillium expansum*: an analysis of cultural and microscopic characters as taxonomic criteria. In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. R.A., Samson & J.I., Pitt Eds. Plenum Press, USA, New York, pp.49-66.

Bladt, T.T., Frisvad, J.C., Knudsen, P.B. and Larsen, O.T. (2013) Anticancer and anti fungal components from *aspergillus penicillium* and other filamentous fungi. *Molecules* **18**:11338-11376.

Brakhage, A.A. (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews* **11**: 21-32.

Constantinescu, O. (1989) Standardization In *Penicillium* Identification. In *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. Samson R.A., & Pitt J.I. Eds. NATO ASI Series, Baarn, Netherlands, pp. 17-26.

Dhakar, K., Sharma, A. and Pandey A. (2013) Cold, pH and salt tolerant *Penicillium* spp. inhabit the high altitude soils in Himalaya, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **30**: 1315-1324.

Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H. (1980). *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, London

Droby, S., Eick, A., Macarisin, D., Cohen, L., Rafael, G., Stange, R., McColum, G., Dudai, N., Nasser, A., Wisniewski, M. and R. Shapira, R. (2008) Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biology and Technology* **49** :386–396.

Eckert, J.W., Ratanyake, M., Gutter, Y. (1984). Volatiles from wounded citrus fruit stimulate germination of *Penicillium digitatum* conidia. *Phytopathology* **74**:783.

Eckert, J.W., Eaks, I., (1989). Post harvest disorders and diseases of citrus fruits. In *The citrus industry*. W. Reuther, E Calavan & G. Carman Eds. University of California Press, USA, Berkeley, pp.179–260.

FAO. (1989). Prevention of post-harvest food losses: food, vegetables and root crops a training manual [Online]. Available at <<http://www.fao.org/docrep/T0073E/T0073E01.htm#1.%20Introduction> > [Accessed 26 September 2018]

Filtborg, O., Frisvad, J.C. and Thrane, U. (1990). The Significance of Yeast Extract Composition on Metabolite Production in *Penicillium*. In *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. R.A. Samson & J.I. Pitt Eds. NATO ASI Series, USA, Boston, pp. 433-444.

Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of B.influenzae. *The British Journal of experimental pathology*,**10**: 226-236.

Fox, R.T.V. (1993) *Principles of diagnostic techniques in plant pathology*. International Mycological Institute, Surrey, UK

Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology* **49**: 1-174.

Garcha, H. S., and Singh, V. (1976). *Penicillium crustosum*, a new pathogen of *Citrus reticulata* (mandarin) from India. *Plant Disease Repository* **60**:252-254.

Hawksworth, D.L., (1985) The typification and citation of the generic name *Penicillium*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. R.A. Samson & J.I. Pitt. Eds. Plenum Press, USA, New York, pp. 3-4.

Hennebert, G.L. (1985) Dierckx Contribution to the genus *Penicillium*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* Samson R.A. & Pitt. J.I. Eds. Plenum Press, USA, New York, pp. 9-21.

Holmes, G.J., Eckert, J.W., (1993). A new post harvest disease of citrus in California caused by *Penicillium ulaiense*. *Plant disease* **77**:537.

Holmes, G.J., Eckert, J.W., (1994). Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of citrus fruit. *Phytopathology* **84**:719-727.

Holmes, G.J., and Eckert, J.W. and Pitt J.I. (1995) Relative fitness of imazalil-resistant and -sensitive biotypes of *Penicillium digitatum* . *Plant diseases* **79**:1068-1073.

Houbraken, J., and Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology* **70**:1–51.

Houbraken, J., Frisvad, J.C. and Samson R.A. (2012). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens* . *IMA Fungus* **2**:87-95.

Hymery, N., Vasseur, V., Cotton, M., Mounier, J., Jany, J.L., Barbier, G. and Coton E. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese :A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**: 437-456.

Hsieh, G.J., Eckert, J.W. and Pitt, J.I. (1987) The genus *Penicillium* in Taiwan. Two new taxa of synnematosus *Penicillium*. *Transactions of the Mycological Society of Republic of China*. **2**:157-168.

Kim, W.K., Sang, H.K. and Woo, S.K., (2007) Six species of *penicillium* associated with blue mold of grape. *Microbiology*. **35**:180-185.

Larsen, T.O., Smedsgaard, J., Nielsen, F.K., Hansen, M.E. and Frisvad J.C. (2005) Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Products Reports*. **22**:672-695.

Link, H.F. (1809). Observationes in Ordines plantarum naturales. Dissertatio 1ma. *Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin* **3**: 3–42.

Louw, P.J. and Kirsten, L. (2017) Pathogenicity and Host Susceptibility of *Penicillium* spp. on Citrus. *Plant Disease* **99**:21-30.

Marcet-Houben, M., Ballester A.M., de la Fuente, B., Eleonora Harries, Jose F Marcos, González-Candelas, L. and Gabaldón, T. (2012) Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. *BMC Genomics* **13**:646.

Martínez, T.A., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A. and del Rio, J.C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* **8**:195-204.

Minter, D.W. and Hawksworth, D.L. (1985) Descriptive terminology of the conidiogenous structures in *Aspergillus* and *Penicillium*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. R.A. Samson & J.I. Pitt. Eds. Plenum Press, USA, New York, pp. 71-88.

Palou, L. (2014) *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). In *Post harvest Decay: control strategies*. S. Bautista-Baños (Eds). Academic press, pp.45-102

Pappas A.C., 1982. Inadequate control of grey mould on cyclamen by dicarboximide fungicides in Greece. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz- Journal of Plant Diseases and Protection* **89**: 52-8.

Paul, G.C., Kent, C.A. and Thomas, C.R. (1992) Viability testing and characterisation of germination of fungal spores by automatic image analysis. *Biotechnology and Bioengineering*. **42**:11-23.

Peterson, S.W., Bayer E.M. and Wicklow, D.T. (2004) *Penicillium thiersii*, *Penicillium angulare* and *Penicillium decaturense*, new species isolated from wood-decay fungi in North America and their phylogenetic placement from multilocus DNA sequence analysis. *Mycologia* **96**:1280-1293.

Pitt, J.I. (1979) The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic press, London

Pitt, J.I. (1985) Media and incubation conditions for *Penicillium* and *Aspergillus* taxonomy. In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* R.A. Samson & J.I. Pitt Eds. Plenum Press, USA, New York, pp.93-103.

Pitt, J.I. (1985) Inherent problems in *Penicillium* taxonomy. In *Advances in Penicillium*

and *Aspergillus Systematics*. R.A., Samson & J.I., Pitt Eds. Plenum Press, New York, pp.155-161

Pitt, J.I. (1995) Phylogeny in the genus *Penicillium*: a morphologist Perspective. *Canadian Journal of Botany* **73**: 768-777.

Pitt, J.I., Samson, R.A. and Frisvad, J.C. (2000), List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. in *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. R.A. Samson & J.I. Pitt Eds. Harwood Academic Publishers. Netherlands, Amsterdam, pp. 9-46

Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2009) *Fungi and food spoilage*, Springer Dordrecht Heidelberg, New York

Plaza, P., Usall, J., Teixidó, N., and Vinãs, I. (2003). Effect of water activity and temperature on germination and growth of *penicillium digitatum*, *p.italicum* and *geotrichum auranti* . *Journal of applied Microbiology* **94**:549-554.

Ramírez C. (1985). The *Penicillus*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* R.A. Samson & J.I. Pitt. Eds. Plenum Press, USA, New York, pp. 65-69

Raper, K.B. and Thom, C. (1949) *A manual of penicillia*. The Williams & Wilkin Company, Baltimore

Russell R., Paterson M., Venâncio A., and Lima N. (2004) Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health . *Research in Microbiology* **155**: 507–513.

Okuda, T. (1994). Variation in colony characteristics of *Penicillium* strains resulting from minor variations in culture conditions. *Mycologia* **86**: 259–262.

Okuda, T., Klich, M.A., Seifert, K.A. and Ando, K. (2000). Media and incubation effect on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. In *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. R.A. Samson & J.I. Pitt Eds. Harwood Academic Publishers, Netherland, Amsterdam, pp. 83–99

Samson R.A. and Pitt J.I. (1985). General recommendations. In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. R.A Samson & J.I. Pitt. Eds. Plenum Press, USA, New York, pp. 455–460

Seifer, K.A. and Samson, R.A. (1985). The genus *coremium* and the synnematus *Penicillia*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. R.A Samson & J.I. Pitt. Eds. Plenum Press, USA, New York, pp. 143-154

Singh V.P. and Dwivedi, R.S. (1979) Microbial decomposition of leaf litter of Terminalia in a tropical forest biome : Biochemical changes during decomposition. *Proceedings of the Indian national science academy*. **45**: 154-162.

Slot J.C. and Rocas A. (2011). Horizontal Transfer of a Large and Highly Toxic Secondary Metabolic Gene Cluster between Fungi. *Current Biology* **21**:134-139.

Smith, G. (1949) The effect of adding trace elements to Czapek-Dox medium. *Transactions of the British Mycological Society*. **32**: 280-283.

Stange, R.R., Midland, S.L., Sims, J. and McCollum, T.G. (2002). Differential effects of citrus peel extracts on growth of *Penicillium digitatum* , *P. italicum*, and *P. expansum*. *Physio-*

logical and Molecular Plant Pathology **61**: 303– 311.

Thom, C. (1910). Cultural studies of species of *Penicillium*. *Bulletin of the Bureau of Animal Industry United States Department of Agriculture* **118**: 1-109.

Thom, C. (1954). The evolution of species concepts in *Aspergillus* and *Penicillium*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **60**: 24–34.

Vilanova, L., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Jauset, A. M. and Teixidó, N. (2012) Infection capacities in the orange-pathogen relationship: compatible (*Penicillium digitatum*) and incompatible (*Penicillium expansum*) interactions. *Food Microbiology* **29**:56-66.

Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaasen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, G., Varga, J., Yaguchi, T. and Samson, R.A. (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* **78**: 343-371.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Rodrigues, C., Pereira, C., Silva, Dijksterhuis, J.; Seifert, K. A., Jacobs, K. and Samson, R. A. (2016). Five new species of *Penicillium*. *Persoonia* **36**: 247–280.

Visagie, C. M., Seifert, K. A., Houbraken, J., Samson, R. A. & Jacobs, K. (2016) A phylogenetic revision of *Penicillium* sect. *Exilicaulis*, including nine new species from fynbos in South Africa. *IMA Fungus* **7**: 75–117.

Wehmer, C. (1894). Eine neue Sklerotiebildende *Penicillium* species (*P. italicum*). Hedwigia. *Organ für Kryptogamenkunde* **33**: 211-214.

Yin, G., Zhang, Y., Pennerman, K.K., Wu, G., Hua, S.S.T, Yu, J., Jurick II W.M., Guo, A. and Bennett J.W. (2017). Characterization of blue mold *Penicillium* species isolated from stored fruits using multiple highly conserved loci. *Journal of Fungi* **3**:12.

Παράρτημα

Πίνακας 1

Είδος καρπού	Γεωγραφική προέλευση	Αρχική φαινολογική κατάσταση	Ονομασία απομόνωσης
Μανταρίνι	Βόλος	Ελαιόχρωμη σήψη	1.1
Πορτοκάλι	Βόλος	Ελαιόχρωμη σήψη	2.1
Πορτοκάλι Merlin	Βόλος	Ελαιόχρωμη σήψη	3.1
Πορτοκάλι	Θεσσαλονίκη	Κυανή σήψη	4.1
Λεμόνι	Θεσσαλονίκη	Ελαιόχρωμη σήψη	5.1
Λεμόνι	Γάζωρος Σερρών	Ελαιόχρωμη σήψη	6.1
Πορτοκάλι	Βόλος	Ελαιόχρωμη σήψη, κυανή σήψη με δύο κηλίδες διαφορετικής απόχρωσης	7. 1.1, 7.1.2, 7.2.1
Πορτοκάλι	Βόλος	Κυανή σήψη	8.1
Μανταρίνι	Βόλος	Μουμιοποιημένος καρπός	9.1
Πορτοκάλι	Βόλος	Ελαιόχρωμη σήψη & κυανή σήψη	10.1
Λεμόνι	Θεσσαλονίκη	Κυανή σήψη	11.1
Λεμόνι	Θεσσαλονίκη	Κυανή σήψη	12.1
Πορτοκάλι	Βόλος	Ελαιόχρωμη σήψη	13.1
Λεμόνι	Βόλος	Ελαιόχρωμη σήψη & κυανή σήψη	14.1,14.2
Πορτοκάλι	Θεσσαλονίκη	Ελαιόχρωμη σήψη	15.1
Πορτοκάλι	Βόλος	Ελαιόχρωμη σήψη	16.1

Πίνακας 2

1. PGA (Potato Glucose Agar)

Potato	200 g
Agar	15 g
Glucose Monohydrate	16,5 g
dH ₂ O	1000 ml

2. MEA (Malt Extract Agar)

Malt extract agar (Oxoid)	50 g
Trace elements Solution	1 ml
dH ₂ O	1000 ml

3. CYA (Czapek Yeast Autolysate agar)

Czapek concentrate)	10 ml
Sucrose	30 g
Yeast extract (Difco)	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Trace elements solution	1 ml
Agar	20 g
dH ₂ O	1000 ml

4. Czapek Concentrate *

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
dH ₂ O	100 ml

5. Trace Elements Solution *

CuSO ₄ .5H ₂ O	0.5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1g

*(Store at 4–10 °C)

