



Όνομα φοιτητή: Μαρία Λαζαρή

Αριθμός φοιτητικής ταυτότητας: 2010618887

Αριθμός ταυτότητας: 939587

Επιβλέπων: Δρ. Ιάκωβος Παντελίδης

Τίτλος πτυχιακής μελέτης: «Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων μαύρων ασπεργίλλων από κυπριακούς αμπελώνες και προσδιορισμός της τοξικογόνου ικανότητας τους»

Περίληψη

Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* του αθροίσματος *Nigri* (μαύροι ασπέργιλλοι) προκαλούν υποβάθμιση των αμπελοοινικών προϊόντων λόγω τις ικανότητας τους να παράγουν Ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ). Το είδος *Aspergillus carbonarius* έχει χαρακτηριστεί ως το πιο τοξικογόνο μεταξύ των μαύρων ασπέργιλλων. Πολλές χώρες της Μεσογειακής λεκάνης έχουν αναφέρει την επιμόλυνση των κρασιών και άλλων αμπελοοινικών προϊόντων με ΟΤΑ και έχουν επιχειρήσει να χαρακτηρίσουν ως προς το είδος και ως προς την τοξικογόνο ικανότητα τους ασπέργιλλους που μολύνουν τα οινοποιήσιμα σταφύλια. Αναφορικά με την Κύπρο, δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τους πληθυσμούς των μαύρων ασπέργιλλων που επιμολύνουν τους κυπριακούς αμπελώνες. Σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε μοριακή ταυτοποίηση του πληθυσμού των μαύρων ασπεργίλλων που απομονώθηκαν την καλλιεργητική περίοδο του 2011 από σταφύλια των ποικιλιών Cabernet sauvignon (Άγιος Αμβρόσιος) και Μαραθεύτικο (Πάχνα) και ακολούθως προσδιορισμός της τοξικογόνου ικανότητας των απομονώσεων αυτών. Για τη μοριακή ταυτοποίηση αρχικά έγινε απομόνωση γενομικού DNA από τους μύκητες, και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR στα δείγματα DNA με εξειδικευμένους εκκινητές που ενισχύουν το γονίδιο της καλμοδουλίνης του οποίου η αλληλουχία χρησιμοποιείται για την κατάταξη των μαύρων ασπέργιλλων σε επίπεδο είδους. Ακολούθησαν αντιδράσεις αλληλούχισης και ανάλυση των αλληλουχιών με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST. Για το χαρακτηρισμό της τοξικογόνου ικανότητας των απομονώσεων αρχικά έγινε καλλιέργεια τους σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα ενώ στη συνέχεια τρεις κυλινδρικοί δίσκοι της καλλιέργειας αφαιρέθηκαν με τη χρήση διακορευτή και τοποθετήθηκαν σε μεθανόλη για την εκχύλιση της ΟΤΑ. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση της ΟΤΑ με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC). Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε ότι το κυρίαρχο είδος μαύρων ασπέργιλλων στους κυπριακούς αμπελώνες είναι ο *A. tubingensis* (96%) ενώ σε μικρότερο ποσοστό εντοπίστηκε και ο *A. niger* (4%). Επίσης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τη σύνθεση του πληθυσμού μεταξύ των δύο ποικιλιών που εξετάστηκαν. Όμως, η σύνθεση του πληθυσμού των μαύρων ασπέργιλλων

διέφερε στους κυπριακούς αμπελώνες σε σχέση με τους αμπελώνες στις υπόλοιπες χώρες τις Μεσογειακής λεκάνης (επικρατεί ο *A. carbonarius*). Επίσης, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της τοξικογόνου ικανότητας των απομονώσεων ήταν σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται ότι ένα ποσοστό των ειδών *A. tubingensis* και *A. niger* έχουν τοξικογόνο ικανότητα. Με τα μέχρι στιγμής δεδομένα φαίνεται ότι ο κίνδυνος επιμόλυνσης με είδη όπως *A. carbonarius* είναι χαμηλός. Για να μπορέσουν να εξαχθούν πιο γενικευμένα συμπεράσματα πρέπει να πραγματοποιηθούν διευρυμένες δειγματοληψίες από όλες τις περιοχές αμπελοκαλλιέργειας της Κύπρου και να χαρακτηριστούν οι απομονώσεις ως προς το είδος και την παραγωγή ΟΤΑ.

Title: “Molecular identification and Ochratoxin A production by black aspergilli isolated from Cyprus vineyards”

Abstract

The black aspergilli (*Aspergillus* Section *Nigri*) are an important group of species in food mycology. Many black aspergilli species can produce Ochratoxin A (OTA). The main source of ochratoxin A (OTA) in the wine food chain is the infection of grapes by black aspergilli in the field. OTA-producing black aspergilli include principally *Aspergillus carbonarius*, followed by *A. niger* and possibly *A. tubingensis*. OTA was detected in wine for the first time in 1996. Thereafter, several surveys have been conducted, mainly in Europe, on the occurrence of the toxin in wine and related products, showing it as a problem mainly for Southern Europe. Many studies have been performed to characterize the OTA-producing species infecting grapes in the Mediterranean countries. On the contrary, no data is available for black aspergilli populations infecting grapes in Cyprus. In this study, molecular identification was performed for a collection of black aspergilli isolated during 2011 from grapes of the varieties Cabernet sauvignon (Agios Amvrosios, Limassol) and Maratheftiko (Pachna, Limassol) and then the isolates were analyzed for OTA production. For the molecular identification, genomic DNA was isolated from the fungi and was used in PCR reaction for the amplification of the *calmodulin* gene (the sequence of *calmodulin* is used for the classification of black aspergilli at the species level). PCR products were then labeled for sequencing analysis and used for capillary electrophoresis. The sequences obtained were analysed and compared with sequences of the GenBank database using the BLAST algorithm. For the OTA production by the isolates initially the fungi were grown on culture media and three agar plugs were taken from the culture and vortexed with methanol. The extracts were then analysed by HPLC. The results of this study showed that *A. tubingensis* was the dominant species of black aspergilli isolated from Cyprus vineyards (96%) whereas *A. niger* was detected to a

lesser extend (4%). The results showed that there are no significant differences with regard to the isolation frequency of ochratoxinogenic fungi in the two grape varieties tested. On the contrary, the population composition was different in Cypriot vineyards compared to the other countries of the Mediterranean basin (*A. carbonarius* is the dominant species). Additionally, the results for OTA production were consistent with the literature indicating that only a proportion of *A. tubingensis* (21%) and *A. niger* (33%) isolates are able to produce the toxin. The data available so far show that the risk of contamination of grapes with the high ochratoxigenic species (such as *A. carbonarius*) is relatively low.