

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Aspergillus* ΣΕ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Νικολέτα Τσαγκάρη, Λουκάς Κανέτης, Ιάκωβος Παντελίδης, Δημήτρης Τσάλτας
Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας
και Επιστήμης Τροφίμων, 3603 Λεμεσός, Κύπρος

Είναι γνωστό ότι είδη των ασκομυκήτων του γένους *Aspergillus* είναι υπεύθυνα για την πρόκληση της μαύρης σήψης σε καρπούς αμπελιού αλλά και την παραγωγή υψηλών επιπέδων της μυκοτοξίνης ωχρατοξίνης Α (ΟΤΑ) σε αμπελοοινικά προϊόντα, η οποία έχει συνδεθεί με καρκινογόνες, νεφροτοξικές, τερατογόνες και ενδεχομένως νευροτοξικές ιδιότητες. Παρότι η χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων για την αντιμετώπιση προσβολών στο αμπέλι από μύκητες του γένους *Aspergillus* δεν αποτελεί συνήθη τακτική, η πιθανότητα χρησιμοποίησης τους σε περιπτώσεις έντονων προσβολών για την αποφυγή υψηλών επιπέδων ΟΤΑ στο τελικό προϊόν δεν πρέπει να αποκλείεται. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της προσαρμογής σε μυκητοκτόνες ουσίες, απομονώσεων φυσικού πληθυσμού του *Aspergillus* Άθροισμα *Nigri* από κυπριακούς αμπελώνες, στα επίπεδα ανθεκτικότητας, στην επιθετικότητα τους και στην παραγωγή ΟΤΑ. Για το λόγο αυτό συλλέχθηκαν εξήντα απομονώσεις του γένους *Aspergillus* από τρεις διαφορετικούς αμπελώνες της επαρχίας Λεμεσού και υπολογίσθηκαν με τη χρήση της μεθόδου Spiral Gradient Dilution οι βασικές τους ευαισθησίες στις μυκητοκτόνες ουσίες cyprodinil, fludioxonil, penconazole, thiabendazole (TBZ), που ανήκουν σε ομάδες με διαφορετικό τρόπο δράσης αλλά και στο σκεύασμα Switch[®], το οποίο αποτελεί μίγμα των δραστικών ουσιών cyprodinil και fludioxonil. Μέσω διαδοχικών εκθέσεων μίγματος κονιδίων των αρχικών απομονώσεων σε καθένα από τα προαναφερόμενα μυκητοκτόνα για διάρκεια τεσσάρων γενεών, ακολουθήθηκε διαδικασία επιλογής στελεχών του γένους *Aspergillus* με χαμηλότερα επίπεδα ευαισθησίας και υπολογίστηκε το επίπεδο ανθεκτικότητας τους. Κατά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής διαπιστώθηκε το φαινόμενο πολλαπλής ανθεκτικότητας στην πλειονότητα των επιλεγμένων στελεχών, πλην των απομονώσεων που είχαν αρχικά επιλεγεί στη δραστική ουσία penconazole. Επίσης έγινε μελέτη της ημερήσιας ανάπτυξης των επιλεγμένων στελεχών του μύκητα, όπου παρατηρήθηκε ότι η μυκηλιακή ανάπτυξη των προσαρμοσμένων στελεχών παρέμεινε στατιστικώς σταθερή ανεξαρτήτως της παρουσίας μυκητοκτόνου ουσίας, με εξαίρεση την

περίπτωση της δραστικής ουσίας penconazole, όπου παρουσία της παρατηρήθηκε μικρότερος ρυθμός ανάπτυξης σε σχέση με τον μάρτυρα. Επιπλέον, με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης έγινε χαρακτηρισμός των προσαρμοσμένων στελεχών ως προς την ικανότητα τους να παράγουν ΟΤΑ. Μόνο δύο από τα είκοσι τρία στελέχη που εξετάστηκαν παρουσίασαν την ικανότητα αυτή. Επίσης παρατηρήθηκε ότι το ένα από τα δυο στελέχη παρουσίασε αύξηση της παραγωγής ΟΤΑ παρουσία της μυκητοκτόνου ουσίας TBZ, εν αντιθέσει με το δεύτερο στέλεχος που έδειξε αντίθετη συμπεριφορά. Τέλος έγινε μοριακή ταυτοποίηση ενός τμήματος των προσαρμοσμένων στελεχών με βάση την αλληλουχία μέρους του γονιδίου της *καλμοδουλίνης* και βρέθηκε ότι 90% των στελεχών ανήκε στο είδος *A. tubigenis*, ενώ το υπόλοιπο 10% στο είδος *A. niger*.

ADAPTATION OF *Aspergillus* ISOLATES TO FUNGICIDES

Nikoleta Tsangari, Loukas Kanetis, Iakovos Pantelidis, Dimitris Tsaltas

*Department of Agricultural Sciences, Biotechnology and Food Science, Cyprus
University of Technology, 3603 Limassol, Cyprus*

It is known that ascomycetous species of the genus *Aspergillus* are the causal agents of grape black rot and food spoilage in a number of products. Besides their phytopathological importance, black aspergilli (*Aspergillus* section *Nigri*) are also important as ochratoxin A (OTA) producing organisms which contaminate several agricultural products including grape derived products, coffee and cocoa. OTA is a mycotoxin that has been associated with carcinogenic, nephrotoxic, teratogenic and potentially neurotoxic properties. Despite the fact that fungicide usage for the management of *Aspergillus* infestations of vines is not a standard agricultural practice, their potential usage in extreme situations, in order to avoid high levels of OTA in the final product should not be excluded. Thus, in the present study the adaptation effects of natural isolates of *Aspergillus* Section *Nigri* from Cyprus vineyards to fungicides, in terms of resistance level, aggression and OTA production were studied. Sixty isolates of the genus *Aspergillus* from three different vineyards in the municipality of Limassol were collected and their sensitivities to cyprodinil, fludioxonil, penconazole, thiabendazole (TBZ), belonging to groups with different mode of action and the formulated product Switch[®], a mixture of cyprodinil and fludioxonil were calculated using the Spiral Gradient Dilution method. Through successive exposures of an initial spore suspension mixture of the wild-type isolates in each of the aforementioned fungicides, strains with lower sensitivities were obtained and their resistance levels were calculated. It was found that the majority of the adapted strains showed multiple-resistance, except those that were originally selected to penconazole. The daily mycelial growth rates of adapted strains was also examined *in vitro* and showed that the mycelial growth of adapted strains was not statistically different regardless the presence of fungicides, except in the case of penconazole, where in its presence growth rates were lower than in untreated Petri dishes. Furthermore, the ability of the adapted strains to produce OTA was tested using high pressure liquid chromatography and it was found that 2 out of the 23 strains tested were mycotoxigenic. More specifically, one of the strains showed

increased OTA production in the presence of TBZ, where the other strain produced decreased levels of the toxin. Finally, molecular identification was performed for selection of the adapted strains by sequencing of a portion of the calmodulin gene and it was found that 90% of isolates belonged to the *A. tubigenensis* species, while 10% were identified as *A. niger*.