

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑΣ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΙ ΑΠΟ
ΑΓΡΟΤΙΚΑ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ»

Σπουδαστής: Δέδες Κωνσταντίνος
Εισηγητές: κ.Μαρκόπουλος Κυριάκος
κ.Ντούγιας Σπυρίδων

Καλαμάτα 2003

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα.....	I
Περίληψη.....	III

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Φυτικής προέλευσης υπολείμματα – βιομηχανικά παραπροϊόντα	1
1.1.1 Υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>	1
1.1.2 Στέμφυλα	3
1.2 Μύκητες	4
1.2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά μυκήτων.....	4
1.2.1.1 Μορφολογία μυκήτων.....	5
1.2.1.2 Είδη σπορίων	7
1.2.2 Βασικές αρχές συστηματικής μυκήτων.....	8
1.3 Γενικές αρχές μοριακής βιολογίας	9
1.3.1 Ένζυμα περιορισμού	9
1.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	9
1.3.3 Υβριδισμός νουκλεικών οξέων	10
1.3.4 Εύρεση αλληλουχίας βάσεων DNA	11
1.4 Γενετικός πολυμορφισμός	11
1.4.1 Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (RFLP)	11
1.4.2 Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD)	12
1.4.3 Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP)	13
1.4.4 Μοριακοί δείκτες βασισμένοι σε απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (SSR) και απλές σε σειρά επαναλήψεις (STR)	13
1.4.5. Ανάλυση ενισχυμένων τμημάτων ριβοσωμικού DNA με ένζυμα περιορισμού (ARDRA)	13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. Μέθοδοι και υλικά	15
2.1 Καλλιέργεια μυκήτων	15
2.2 Απομόνωση-καθαρισμός μυκητιακού γονιδιακού DNA	15
2.2.1 Υλικά	15
2.2.2 Διαλύματα – αντιδραστήρια	15
2.2.3 Διαδικασία	16
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	17
2.3.1 Όργανα – αντιδραστήρια	17
2.3.2 Διαδικασία	18
2.4 Πέψη ενισχυμένων τμημάτων DNA με νουκλεάσες περιορισμού	19
2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή	20
2.5.1 Όργανα και υλικά	20
2.5.2 Διαδικασία	21
2.6 Μικροσκοπική μελέτη μορφολογίας μυκήτων	22

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. Αποτελέσματα–συζήτηση	23
3.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	24
3.2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των μυκητιακών στελεχών FM	24
3.2.1.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FM	24
3.2.1.2 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FM	27
3.2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των μυκητιακών στελεχών FS	29
3.2.2.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FS	29

3.2.2.2 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FS	33
3.3 Μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού των στελεχών FM και FS	36
3.3.1 Μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού των στελεχών FM	38
3.3.2 Μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού των στελεχών FS	42
3.4 Συζήτηση	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	48

Αντί προλόγου

Για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν:

Ευχαριστώ πολύ τον επιβλέπων κ. Ντούγια Σπυρίδωνα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση και διεξαγωγή του πειράματος καθώς και για την βοήθεια και τις γνώσεις που μου μετέδωσε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους υπεύθυνους του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας για τη διάθεση των εργαστηριακών χώρων, όπου και πραγματοποίησα την πτυχιακή μου. Επίσης ευχαριστώ την κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για τις εύστοχες παρατηρήσεις της.

Τέλος, ευχαριστώ τον κ. Μαρκόπουλο Κυριάκο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ και να διεξάγω την παρούσα πτυχιακή εργασία στο Ινστιτούτο Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας, καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι πληθυσμοί μυκήτων που προέρχονται από φυτικά υπολείμματα και αγροτοβιομηχανικά παραπροϊόντα. Στελέχη μυκήτων απομονώθηκαν τόσο από στέμφυλα (στελέχη FS) όσο και από εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριού *Agaricus* (στελέχη FM). Οι απομονώσεις αυτές μελετήθηκαν τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά. Από την μικροσκοπική τους παρατήρηση βρέθηκαν στελέχη που φαίνεται να ανήκουν στην τάξη *Mucorales* και στα γένη *Penicillium* και *Fusarium*, καθώς και σε άλλες κατηγορίες μυκήτων, μη ταυτοποιήσιμων μικροσκοπικά. Για την πλήρη κατηγοριοποίηση των δύο κατηγοριών απομονώσεων πραγματοποιήθηκε μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας με την μέθοδο ARDRA. Τα στελέχη FM κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις φαινοτυπικές και τρεις μικροσκοπικές και φυλογενετικές ομάδες, ενώ οι απομονώσεις FS τοποθετήθηκαν σε έξι φαινοτυπικές και πέντε μικροσκοπικές και φυλογενετικές ομάδες αντίστοιχα, αποκαλύπτοντας ευρύτερη βιοποικιλότητα. Το μεγαλύτερο εύρος της ποικιλομορφίας στην περίπτωση των απομονώσεων FS σε σχέση με τις απομονώσεις FM, φαίνεται να οφείλεται στην αρχική παστερίωση του υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριού *Agaricus*.

Η ύπαρξη επιπλέον φαινοτυπικών κατηγοριών σε σχέση με τον αριθμό των φυλογενετικών ομάδων, μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι μικρές διαφορές σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μπορεί να απεικονίζουν διαφοροποιήσεις που οφείλεται σε περιβαλλοντικές επιδράσεις, χωρίς να υπάρχουν πραγματικές γενετικές διαφορές. Οι φυλογενετικές ομάδες που προέκυψαν από την μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας με την μέθοδο ARDRA κατάταξαν τους απομονωμένους μικρο-οργανισμούς σε κατηγορίες, που αντιστοιχούν σε διακριτά είδη ή γένη. Η θεώρηση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι το 18S rDNA είναι συντηρητικό γονίδιο και η ύπαρξη γενετικού πολυμορφισμού σχετίζεται άμεσα με βαθιές φυλογενετικές, χημειοταξονομικές και μορφολογικές διαφορές. Τέλος επιπλέον φυλογενετική και χημειοταξονομική ανάλυση αυτών θα αποκαλύψει την ακριβή ταξινομική τους θέση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ – ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΑ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ

1.1.1 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΟΥ *Agaricus*

Η καλλιέργεια του μανιταριού *Agaricus* πραγματοποιείται πάνω σε οργανικά υποστρώματα (‘‘κομποστ’’) τα οποία υφίστανται την επίδραση μικροοργανισμών υπό αερόβιες συνθήκες (Chiu *et al.*, 2000). Η ανωτέρω διαδικασία αποβλέπει στα εξής :

- Να δημιουργηθεί ένα υπόστρωμα το οποίο να αποτελείται από κυτταρίνη και λιγνίνη πηγές μη αφομοιώσιμες για την πλειονότητα των οργανισμών.
- Να παραχθούν αυξητικοί παράγοντες από μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στην αερόβια επεξεργασία, όπως οι βιταμίνες βιοτίνη και θειαμίνη καθώς και ορισμένα αμινοξέα.
- Να αποκτήσει το υπόστρωμα φυσικοχημικές ιδιότητες, κατάλληλες για την αύξηση του μανιταριού, όπως δομή, υφή, πορώδες, συνεκτικότητα, pH, περιεκτικότητα σε υγρασία και αμμωνία.

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του *Agaricus* περιέχει κυρίως άχυρο σιτηρών και κοπριά ζώων, καθώς και άλλα υλικά όπως για παράδειγμα άλευρα ψυχανθών, βαμβακόπιτα, μελάσα και αζωτούχα λιπάσματα.

Η προσθήκη του άχυρου στο υπόστρωμα εξασφαλίζει την απαραίτητη ποσότητα λιγνίνης και κυτταρίνης για την καλλιέργεια του μανιταριού. Η ύπαρξη κοπριάς στο υπόστρωμα εξυπηρετεί στο να καλυφθούν οι ανάγκες για άζωτο, καθώς και για άλλες αφομοιώσιμες οργανικές ενώσεις, που είναι απαραίτητες για να αρχίσει η διαδικασία ζυμώσεως του υποστρώματος. Η αναλογία ανάμειξης των υλικών εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε άνθρακα και άζωτο, έτσι ώστε το τελικό μίγμα του υποστρώματος να περιέχει 3-4% άζωτο (N) και η αναλογία άνθρακα προς άζωτο (C/N) να κυμαίνεται μεταξύ 30 και 35 (Sharma *et al.*, 1999; Sharma and Kilpatrick, 2000).

Η προετοιμασία του υποστρώματος για την καλλιέργεια του μανιταριού *Agaricus* περιλαμβάνει δυο φάσεις:

α. Ελεύθερη ζύμωση του υποστρώματος.

Το άχυρο υποβάλλεται σε μια διαδικασία διαβροχής που προηγείται της ζυμώσεως. Το άχυρο απλώνεται και διαβρέχεται μέχρι να αποκτήσει σχετική υγρασία περίπου 70%. Η διάβροχη επαναλαμβάνεται και τα τυχόν στραγγίσματα επαναφέρονται στο σωρό ώστε να μην απολεστεί το άζωτο που περιέχεται. Μετά την προδιαβροχή, το άχυρο αναμιγνύεται με κοπριά πουλερικών, και το μείγμα που προκύπτει μεταφέρεται και διαμορφώνεται σε επιμήκης σωρούς.

Αρχικά αναπτύσσονται μεσόφιλα αερόβια βακτήρια τα οποία καταναλώνουν τα ευδιάλυτα και αφομοιώσιμα συστατικά του υποστρώματος κυρίως σάκχαρα και οργανικά οξέα. Εξαιτίας της οξειδωτικής δραστηριότητας μεσόφιλων μικροοργανισμών ελκύεται θερμότητα, η οποία αυξάνει την θερμοκρασία πάνω από τους 40°C, επικρατώντας θερμοφίλες συνθήκες, οπότε και παύει η δράση των μεσόφιλων βακτηρίων και ενεργοποιούνται θερμοφιλοί μικροοργανισμοί (Adhikary *et al.*, 1992).

Κατά την επικράτηση θερμοφίλων συνθηκών, η θερμοκρασία δεν είναι ομοιόμορφη σε όλη την μάζα του σωρού, αλλά ανάλογα με το καθεστώς αερισμού διαμορφώνονται ζώνες διαφορετικών θερμοκρασιών, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η πραγματοποίηση ομοιόμορφης ζυμώσεως και να απαιτείται αναστροφή του σωρού σε τακτά χρονικά διαστήματα για την πλήρη ζύμωση του υποστρώματος.

Η θερμοφιλή φάση αυτή διαρκεί 7-10 ημέρες (βραχεία φάση) ή 16-30 ημέρες (μακρά φάση), και πραγματοποιούνται συνήθως τρεις αναστροφές για την πλήρη χώνευση του υποστρώματος. Στην διάρκεια της φάσης αυτής έχουμε απώλεια ξηρής ουσίας (υπό μορφή CO₂) και απελευθέρωση αμμωνίας εξαιτίας της αποικοδόμησης αζωτούχων ενώσεων.

β. Παστερίωση

Κατά την παστερίωση πραγματοποιείται θερμική επεξεργασία του υποστρώματος με ατμό, σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 60 – 65°C μέσα σε θαλάμους με σκοπό την θανάτωση του μεγαλύτερου μέρους της μικροχλωρίδας, και την καταστροφή τυχόν παρασίτων και εχθρών του μανιταριού όπως διάφορα έντομα, νηματώδης, μύκητες και ιοί. Επίσης επιταχύνεται η απομάκρυνση της αμμωνίας που έχει απομείνει στο υπόστρωμα (Ζερβάκης, 1998).

Η ωρίμανση του υποστρώματος, πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μεταξύ 48-60°C μέσα στο θάλαμο παστερίωσης. Ο αέρας διαρκώς ανακυκλώνεται και ανανεώνεται

προκείμενου να εξασφαλιστούν ευνοϊκές συνθήκες ωρίμανσης. Προκαλείται δηλαδή μείωση της θερμοκρασίας και αναπλήρωση του καταναλισκόμενου O_2 ενώ ταυτόχρονα απομακρύνεται η περίσσεια του CO_2 . Στις συνθήκες αυτές επικρατούν κυρίως μύκητες αλλά και μερικά βακτήρια που ολοκληρώνουν τη ζύμωση, καταναλώνοντας κυτταρίνη και μετατρέποντας την αμμωνία σε πρωτεϊνικό άζωτο. Η ωρίμανση τερματίζεται με την περαιτέρω μείωση της θερμοκρασίας. Το τελικό υπόστρωμα αποτελείται από σχετική υγρασία 60-70% , pH 7,0-7,5 ολικό άζωτο 1,8-2% (w/w), αμμωνία 0,1% και C/N:16

1.1.2 ΣΤΕΜΦΥΛΑ

Μετά την συλλογή των σταφυλιών οδηγούνται στο οινοποιείο ή σε παραδοσιακά πατητήρια όπου και πραγματοποιείται η σύνθλιψη των σταφυλιών. Με το πέρας της συνθλίψεως διαχωρίζεται ο μούστος (εκχύλισμα σταφυλιών) από τα στερεά υπολείμματα, τα οποία ονομάζονται στέμφυλα. Τα στέμφυλα αποτελούν το 37% του συνολικού βάρους της αρχικής πρώτης ύλης (σταφύλια) και αποτελούνται κύρια από οργανικά οξέα, τανίνες και φλαβονοειδή (Ribireau-Gayon, 2001). Τα στέμφυλα θεωρούνται υποπροϊόντα της οινοποίησης τα οποία έχουν ποικίλες εφαρμογές, σε παραδοσιακές αλλά και σύγχρονες ασχολίες. Επίσης χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην παραγωγή όξους και αποσταγμάτων όπως του τσίπουρου, στην παραγωγή τρυγικών οξέων και ζωοτροφών καθώς και στην παραλαβή χρωστικών ουσιών. Τέλος τα στέμφυλα χρησιμοποιούνται στην λίπανση καλλιεργειών ενισχύοντας φτωχά εδάφη με το πλούσιο οργανικό τους φορτίο.

1.2 ΜΥΚΗΤΕΣ

1.2.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΥΚΗΤΩΝ

Αρχικά οι μύκητες μελετήθηκαν ως τμήμα του Βασιλείου των φυτών. Κύριο χαρακτηριστικό των φυτών είναι η ύπαρξη χρωστικών, ικανών προς δέσμευση της ενέργειας του φωτός (φωτοσύνθεση) και η χρησιμοποίηση του CO₂ της ατμόσφαιρας ως πηγή άνθρακα καθιστώντας τα έτσι ως αυτότροφους οργανισμούς. Αντίθετα οι μύκητες είναι ετερότροφοι μικροοργανισμοί και κατά την ανάπτυξη τους δεν φωτοσυνθέτουν αλλά προσλαμβάνουν οργανικές ουσίες από το εξωτερικό περιβάλλον, αποτελώντας ένα διακριτό βασίλειο (Martin, 1960; Whittaker, 1969; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Αναλυτικότερα το βασίλειο των μυκήτων διαιρείται σε έξι φύλα (www.ncbi.nlm.nih.gov):

- *Ascomycota* (Ασκομύκητες).
- *Basidiomycota* (Βασιδιομύκητες)
- *Chytridiomycota* (συνώνυμο *Mastigomycotina*, Μαστιγομύκητες)
- *Glomeromycota*
- *Microsporidia*
- *Zygomycota* (Ζυγομύκητες)

Οι μύκητες προσλαμβάνουν τον απαραίτητο για την ανάπτυξη τους άνθρακα κυρίως σε μορφή γλυκόζης, σακχαρόζης και μαλτόζης, ενώ χρησιμοποιούν το ίδιο αποδοτικά διάφορες πηγές αζώτου (Nagel *et al.*, 1999).

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί, και αναπτύσσονται με τον καταβολισμό οργανικών μορίων που προέρχονται είτε από ζωντανούς οργανισμούς, παρασιτώντας φυτά ή ζώα, είτε από νεκρά υπολείμματα φυτών ή ζώων. Βάση των τροφικών τους απαιτήσεων και των οικολογικών τους προσαρμογών, οι μύκητες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

1. **Σαπροτροφικούς**, οι οποίοι αναπτύσσονται πάνω σε νεκρή οργανική ύλη αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες της αποσύνθεσης οργανικής ύλης στη φύση. Ειδικότερα, εκκρινόμενα από αυτούς ένζυμα αποικοδομούν πολύπλοκες οργανικές ενώσεις σε απλά οργανικά μόρια και ανόργανα στοιχεία κατάλληλα να απορροφηθούν από τις ρίζες των φυτών και να αναπτυχθεί νέα βλάστηση. Ακόμη με τη δράση τους αυτή

αποφεύγεται η συσσώρευση στο έδαφος των νεκρών υπολειμμάτων που ο όγκος των οποίων θα εμπόδιζε νέα βλάστηση (Chasseur, 1992; Bills *et al.*, 2003).

2. **Βιοτροφικούς ή παρασιτικούς**, οι οποίοι αναπτύσσονται σε βάρος άλλων οργανισμών προκαλώντας τη σταδιακή εξασθένησή τους, ενίοτε και την θανάτωση αυτών (Vilcinskis and Gotz, 1999).
3. **Συμβιωτικούς**, οι οποίοι αναπτύσσουν σχέσεις αμοιβαίας ωφέλειας με μια μεγάλη ποικιλία ανώτερων φυτών. Είναι η λεγόμενη μυκορριζική συμβίωση χάρη στην οποία οι μύκητες ζουν μέσα στο έδαφος ή ενδοφυτικά μεταβολίζοντας υδατάνθρακες που παράγονται από τις ρίζες των δέντρων κατά την φωτοσύνθεση. Πιστεύεται ότι τα μυκορριζικά μυκήλια διευκολύνουν τις ρίζες των δένδρων στην απορρόφηση χρήσιμων αλάτων από το έδαφος παρουσιάζοντας σχέση αμοιβαίας ωφέλειας (Newsham *et al.*, 1995).

Για την ανάπτυξη των περισσότερων μυκήτων η άριστη θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ των 25°C και 30°C (Elkady *et al.*, 1992). Υπάρχουν επίσης θερμόφιλα και ψυχρόφιλα είδη που το θερμοκρασιακό τους άριστο είναι ανώτερο των 45°C (Maheshwari *et al.*, 2000) ή κατώτερο των 15°C αντίστοιχα (DePriest *et al.*, 2000). Όσον αφορά το pH, οι περισσότεροι μύκητες ευνοούνται από ελαφρά όξινες συνθήκες όπου το pH κυμαίνεται μεταξύ 4 και 7 (Nagel *et al.*, 1999). Το φως, παρόλο που δεν είναι απαραίτητο για την βλαστική ανάπτυξη των μυκήτων, είναι συχνά αναγκαίο για το σχηματισμό αγενών και εγγενών καρποφοριών σε πολλά είδη, καθώς και στην απελευθέρωση σπορίων αναπαραγωγής.

1.2.1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΜΥΚΗΤΩΝ

Το σώμα των μυκήτων όπως και άλλων κατώτερων οργανισμών (φύκη, λειχήνες) δεν διαφοροποιείται σε ρίζες, βλαστούς και φύλλα και λέγεται θαλλός.

Ο θαλλός σχηματίζεται από διακλαδιζόμενα νήματα που λέγονται υφές. Ο θαλλός αποτελούμενος από υφές ονομάζεται μυκήλιο. Η διάμετρος των υφών ποικίλει από 1-100 μm. Οι υφές των περισσότερων μυκήτων που σχηματίζουν μυκήλιο χωρίζονται σε κύτταρα με εγκάρσια διαφράγματα που λέγονται σέπτα (septa). Τα σέπτα φέρουν στο μέσο οπή, μέσω της οποίας επικοινωνούν τα πρωτοπλάσματα γειτονικών κυττάρων. Το μυκήλιο που φέρει σέπτα λέγεται πολυκύτταρο και είναι χαρακτηριστικό των λεγόμενων ανώτερων μυκήτων (Ασκομύκητες και Βασιδιομύκητες) (Alexopoulos and Minis, 1979). Το μυκήλιο που δεν

φέρει σέπτα ονομάζεται κοινοκύτταρο και χαρακτηρίζει ομάδες κατώτερων μυκήτων (Ωομύκητες, Ζυγομύκητες) (Alexopoulos and Mims, 1979).

Το μυκήλιο των μυκήτων σχηματίζει επίσης ποικίλες κατασκευές που παίζουν διάφορους ρόλους. Οι κυριότερες από αυτές είναι:

- **Οι πλάκες συγκράτησης ή προσκόλλησης (apressoria):** Είναι κοντές, παχιές υφές, με τις οποίες το μυκήλιο προσκολλάται στην επιφάνεια του ξενιστή, έτσι ώστε να διευκολυνθεί η διάτρηση της εφυμενίδας για την είσοδο στους ιστούς. Η διάτρηση αυτή γίνεται συνήθως με την βοήθεια λεπτής κατασκευής, της διατρητικής υφής ή ράμφους.
- **Οι μυζητήρες (haustoria):** Είναι εξειδικευμένα μυκηλιακά εξαρτήματα, τα οποία ορισμένοι μύκητες, που είναι υποχρεωτικά παρασιτικοί (περονόσποροι, ωΐδια κλπ.) εξαπολύουν εντός των κυττάρων του ξενιστή και αντλούν θρεπτικά στοιχεία.
- **Τα ριζοειδή (rhizoids):** Είναι λεπτές, κοντές, ριζοειδούς μορφής εκφύσεις του μυκηλίου που παρατηρούνται σε ορισμένα είδη Ζυγομυκήτων και χρησιμεύουν για τη στήριξή τους στο υπόστρωμα.
- **Τα στολόνια (stolons):** Είναι εναέριες οριζόντιες υφές, που συνδέουν δυο ριζοειδή.
- **Οι αναστομώσεις (anastomosis):** Είναι γεφυρώσεις των κορυφών δύο υφών, τα τοιχώματα των οποίων διαλύονται στο σημείο επαφής και επέρχεται επικοινωνία μεταξύ του πρωτοπλάσματος τους. Με τις αναστομώσεις υποβοηθείται η καλύτερη εκμετάλλευση του υποστρώματος, η θεραπεία του μυκηλίου σε περιπτώσεις τραυματισμού, η ανταλλαγή πυρήνων και άλλων οργανιδίων.
- **Οι ψευδοϊστοί (pseudotissue):** Είναι σχηματισμοί που συχνά αποκτούν μακροσκοπικές διαστάσεις και χαρακτηρίζονται ως οργανωμένα συμπλέγματα αναστομούμενων υφών. Τέτοιους σχηματισμούς αναπτύσσουν πολλοί Ασκομύκητες και Βασιδιομύκητες τόσο στο βλαστικό όσο και στο αναπαραγωγικό στάδιο του βιολογικού τους κύκλου. Το σύμπλεγμα των υφών που είναι αραιά πλεγμένο, διατηρώντας το αρχικό σχήμα ονομάζεται προσέγγυμα. Αντίθετα ψευδοπαρέγγυμα λέγονται οι υφές που έχουν απολέσει το αρχικό τους σχήμα και την ατομικότητά τους, με συνέπεια τη στενή σύνδεση αυτών.

Διάφορες βλαστικές κατασκευές από ψευδοϊστούς είναι:

- **Τα σκληρώτια (sclerotia):** που συνίστανται από ψευδοπαρέγγυμα εξωτερικά και προσέγγυμα εσωτερικά. Έχουν σχήμα που ποικίλει πολύ αλλά συνήθως είναι 1-2 cm. Σκληρώτια παράγουν πολλοί Ασκομύκητες αλλά και Βασιδιομύκητες με σκοπό τον αποθησαυρισμό θρεπτικών ουσιών και την επιβίωση τους σε αντίξοες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

- **Το στρώμα (stroma):** Είναι προσεγγυματικός ψευδοϊστός προσκολλημένος πάνω στους ιστούς του φυτού-ξενιστή. Πάνω στο στρώμα αναπτύσσονται συνήθως οι καρποφορίες του μύκητα.

- **Τα ριζόμορφα (rhizomorphs):** Είναι μυκηλιακοί σχηματισμοί που μοιάζουν με κορδόνια ή ρίζες φυτών. Ανατομικά μοιάζουν με τα σκληρώτια, αλλά ο ρόλος τους είναι κυρίως η εξάπλωση του μύκητα στο χώρο. Ριζόμορφα κάνουν ορισμένοι Βασιδιομύκητες που προσβάλλουν τις ρίζες δένδρων.

Εκτός από τις βλαστικές κατασκευές, όλες οι εγγενείς καρποφορίες των Ασκομυκήτων και Βασιδιομυκήτων συνίσταται από ψευδοϊστούς.

1.2.1.2 ΕΙΔΗ ΣΠΟΡΙΩΝ

Οι μύκητες μπορούν να αναπαραχθούν είτε από ένα τμήμα του μυκηλίου τους, είτε μέσω των σπορίων που παράγουν (Alexopoulos and Mims, 1979). Τα σπόρια μπορεί να είναι προϊόντα αγενούς γενέσεως (αγενή σπόρια) ή προϊόντα σύζευξης (εγγενή σπόρια).

Τα αγενή σπόρια διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Θαλλοσπόρια: που προέρχονται από την διαμόρφωση ήδη υπάρχοντων τμημάτων του μυκηλίου και διακρίνονται σε:
 - Αρθροσπόρια
 - Βλαστοσπόρια
 - Χλαμυδοσπόρια
2. Κυρίως σπόρια: τα οποία σχηματίζονται μέσα και πάνω σε ειδικές κατασκευές του μυκηλίου και διακρίνονται σε:
 - Σποριαγγειοσπόρια
 - Κονίδια

Τα εγγενή σπόρια διακρίνονται σε:

- α. Ωοσπόρια
- β. Ζυγοσπόρια
- γ. Ασκοσπόρια
- δ. Βασιδιοσπόρια

1.2.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΜΥΚΗΤΩΝ

Στην ταξινομική μελέτη των μυκήτων (Frisvad *et al.*, 1998; Thorp, 1999) συμβάλει η μακροσκοπική καταγραφή της εμφάνισης των μυκητιακών στελεχών όπως του σχήματος, του χρώματος, την απελευθέρωση χρωστικών και η ανύψωση (Rossman *et al.*, 1997). Περαιτέρω μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των μυκήτων (μικροσκόπιο ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο) δίνει πληροφορίες για το σχήμα και το είδος των υφών, τις καρποφορίες, το είδος των σπορίων, αποτελώντας σημαντικό ταξινομικό εργαλείο (Frisvad *et al.*, 1998). Η καλλιέργεια των μυκήτων σε διαφορετικό pH, διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος καθώς και σε διαφορετικές θερμοκρασίες, επίσης συμβάλουν στην κατηγοριοποίηση τους (Friedman, 1997).

Μελέτη του μεταβολισμού τους με την δόκιμη διαφόρων πηγών άνθρακα προσδίδει πολύτιμες πληροφορίες για το μεταβολισμό τους καθώς και τις θρεπτικές διαφορές μεταξύ διακριτών στελεχών (Hawksworth *et al.*, 2003).

Μελέτη ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών ενζύμων και η καταγραφή των διαφορών αυτών μεταξύ των διάφορων μυκήτων συμβάλει στο χαρακτηρισμό των επιμέρους ειδών (Cowan and Steel, 1965; Tablot, 2001).

Μελέτη των κυτταρικών τοιχωμάτων και της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να αποδώσει χρήσιμες ταξινομικές διαφορές μεταξύ των ειδών (Tablot, 2001).

Δοκιμή διαφόρων αντιβιοτικών μας δίνει πληροφορίες χαρακτηριστικές για κάθε μικροοργανισμό καθώς και ταξινομικές διαφορές (Lesova and Sturdikova, 2000).

Τέλος εφαρμογή ανισολογικών μεθόδων (Bowden, 1993; Schmidt, 2000) καθώς και τεχνικών μοριακής βιολογίας όπως η εύρεση της αλληλουχίας του γενετικού υλικού διαφόρων στελεχών (Tavantzis, 2001), ο προσδιορισμός του ποσοστού γουανίνης και κυτοσίνης σε κάθε στέλεχος (De Ley, 1970; Hosny *et al.*, 1997) καθώς και η μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού (Stahl and Tudzynski, 1992; Stahl *et al.*, 1992) συμβάλουν στην πλήρη ταυτοποίηση μικροοργανισμών.

1.3 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

1.3.1 Ένζυμα περιορισμού

Η απομόνωση ενός γονιδίου από το γονιδίωμα διευκολύνεται με την εφαρμογή μιας κατηγορίας βακτηριακών ενζύμων γνωστών ως ενδονουκλεάσες περιορισμού (restriction endonucleases) (Σκούρας, 1993; Χατζόπουλος, 2001).

Τα ένζυμα αυτά παρεμποδίζουν την μεταφορά του DNA ανάμεσα σε ορισμένα στελέχη βακτηρίων καταλύοντας την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σ' ένα νουκλεϊνικό οξύ, προκαλώντας την πέψη του γονιδιακού DNA. Οι νουκλεάσες περιορισμού διαθέτουν μια διακριτή ιδιότητα σε σχέσεις με τις άλλες νουκλεάσες, και συγκεκριμένα προκαλούν πέψη του γονιδιακού DNA σε ειδικές θέσεις που καθορίζονται από την παρουσία μιας βραχείας καθορισμένης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων συνήθως 4 έως 8 βάσεων (θέσεις περιορισμού).

Η δράση διαφορετικών συνδυασμών νουκλεασών περιορισμού αποδίδει κλάσματα διαφορετικού μεγέθους κατά την εφαρμογή των ενζύμων σε μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Η χρήση των νουκλεασών περιορισμού σε συνδυασμό με τον διαχωρισμό κλασμάτων DNA με την τεχνική της ηλεκτροφόρισης οδήγησε στην κατασκευή φυσικών χαρτών μικρών περιοχών DNA. Συγκρίνοντας και χαρτογραφώντας τα μεγέθη των κλασμάτων αυτών καθώς και τις θέσεις τους, δημιουργείται ένας φυσικός χάρτης μιας συγκεκριμένης περιοχής DNA ο οποίος ονομάζεται χάρτης περιορισμού. Ένας τέτοιος χάρτης DNA, περιγράφει μια αλληλουχία DNA, χαρτογραφώντας τις διάφορες θέσεις περιορισμού.

Ένας χάρτης περιορισμού εξαρτάται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του αντίστοιχου DNA, αποκαλύπτοντας διαφορές ακόμα και μεταξύ συγγενικών μορίων DNA. Εντούτοις, ο οριστικός χάρτης ενός μορίου DNA οριοθετείται με την εύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων.

1.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Σημαντική ώθηση στην τεχνολογία του DNA προσέδωσε η εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) η οποία διεκπεραιώνεται ολοκληρωτικά *in vitro* χωρίς να απαιτείται η παρουσία κυττάρων. Με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), μια ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να αναπαραχθεί σε

μεγάλες ποσότητες γρήγορα και εκλεκτικά από οποιοδήποτε δείγμα DNA που την περιέχει (Σκούρας, 1993; Χατζόπουλος, 2001).

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στη χρησιμοποίηση της DNA πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό ενός εκμαγείου DNA σε επανειλημμένους κύκλους αντιγραφής. Το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία που επιδιώκεται να αντιγράψει, από ολιγονουκλεοτίδια που δρουν ως εκκινητές τα οποία υβριδίζονται με την αρχή και το τέλος του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA. Υπό την καθοδήγηση των εκκινητών, η DNA πολυμεράση παράγει πολλά αντίγραφα της επιλεγμένης αλληλουχίας. Η τεχνική PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη, μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, επανξάνοντάς το τόσο πολύ ώστε να μπορεί να εμφανιστεί με κατάλληλη χρώση μετά από διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή.

1.3.3 Υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων

Στην μοριακή βιολογία είναι σημαντικό να εντοπιστεί το χρωμόσωμα από το οποίο προήλθε ένα γονίδιο, η ακριβή του θέση στο χρωμόσωμα αυτό, καθώς και να συγκριθεί με παρόμοια γονίδια. Έχει βρεθεί από τους Watson και Crick, ότι ένας κλώνος DNA μπορεί να ζευγαρώσει εκλεκτικά με έναν δεύτερο κλώνο, με συμπληρωματική αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Οι δυο κλώνοι μιας διπλής έλικας DNA συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου που αποδιατάσσονται με θέρμανση του DNA σε θερμοκρασίες πάνω από 90°C ή με έκθεση του σε διαλύματα με ακραίες τιμές pH. Οι παραπάνω επιδράσεις διαχωρίζουν τους δυο έλικες χωρίς να διασπούν τους ομοιοπολικούς δεσμούς που συνδέουν τα νουκλεοτίδια μεταξύ τους. Αν η όλη διαδικασία αναστραφεί, οι συμπληρωματικοί κλώνοι θα ανασχηματίσουν εύκολα διπλές έλικες. Αυτό το φαινόμενο αποκαλείται αναδιάταξη ή υβριδισμός και προκύπτει από τον επανασχηματισμό των δεσμών υδρογόνου (Χατζόπουλος, 2001).

Η αναζήτηση ενός γονιδίου μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας βάσεων με την τεχνική του υβριδισμού προϋποθέτει την ύπαρξη ενός ειδικού νουκλεϊκού οξέος που αποκαλείται ανιχνευτής. Ένας DNA ανιχνευτής είναι ένα βραχύ, μονόκλωνο μόριο DNA (ολιγονουκλεοτίδιο), με μήκος που κυμαίνεται συνήθως από 10 έως 1000 νουκλεοτίδια, το οποίο χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις υβριδισμού για την ανίχνευση οποιασδήποτε

αλληλουχίας μορίων νουκλεϊνικών οξέων με συμπληρωματική αλληλουχία. Οι ανιχνευτές οποιασδήποτε αλληλουχίας μπορούν να συντεθούν εργαστηριακά με μη ενζυμικές μεθόδους.

Ο υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων αποτελεί ένα σημαντικό ταξινομικό εργαλείο στην συστηματική ανάλυση ειδών μικροοργανισμών (Vanechoutte, 1996). DNA – DNA υβριδισμός χρησιμοποιείται ευρύτατα σε περιπτώσεις που το ποσοστό G+C δυο μικροοργανισμών είναι συγγενικό. Στην περίπτωση που κατά τον υβριδισμό, η ομοιότητα των γονιδιωμάτων δυο μικροοργανισμών είναι μικρότερη από 25% τότε οι δυο αυτοί μικροοργανισμοί ανήκουν σε διακριτά είδη ή και γένη (Goodfellow and Minnikin, 1985).

Γενικά, μικροοργανισμοί παρόμοιας γενετικής συγγένειας παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά υβριδοποίησης, σε αντίθεση με φυλογενετικά διακριτούς μικροοργανισμούς που εμφανίζουν χαμηλά ποσοστά υβριδοποίησης.

1.3.4 Εύρεση αλληλουχίας βάσεων DNA

Ο καθορισμός της αλληλουχίας βάσεων οποιουδήποτε καθαρού κλάσματος DNA πραγματοποιείται με την δράση της DNA πολυμεράσης, που επιτρέπει την *in vitro* αντιγραφή τμημάτων του υπό ανάλυση κλάσματος DNA, κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα αντίγραφα του DNA να τερματίζονται σ'ένα καθορισμένο νουκλεοτίδιο (Χατζόπουλος, 2001).

Η μέθοδος αυτή οδηγεί στο σχηματισμό ενός συνόλου διαφορετικών αντιγράφων DNA που σταματούν σε κάθε θέση μέσα στο αρχικό DNA και διαφέρουν σε μήκος κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Τα αντίγραφα του DNA μπορεί να διαχωριστούν με βάση το μήκος τους με ηλεκροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και να καθοριστεί η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του αρχικού DNA από τη σειρά των αντιγράφων DNA στην πηκτή.

1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ

1.4.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA (RFLP)

Ο πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA στη μοριακή βιολογία βασίζεται σε δυο τεχνικές, στη πέψη του DNA από νουκλεάσες περιορισμού και στη μεταφορά του DNA σε φίλτρα που υβριδίζονται με ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA. Τα ένζυμα περιορισμού κόβουν το DNA των οργανισμών σε διακριτά τμήματα. Το πρότυπο των

πολυμορφικών ζωνών εμφανίζεται μετά από υβριδισμό με τον ανιχνευτή ραδιενεργά επισημασμένο ή χημικά τροποποιημένο.

Οι δείκτες RFLP μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εκτίμηση της ποικιλομορφίας μικροοργανισμών (Vanechoutte, 1996: Logan, 1994). Η μεθοδολογία βασίζεται στον πολυμορφισμό των μοριακών δεικτών. Ο πολυμορφισμός μεταξύ ειδών είναι εύκολο να φανεί σε διάφορους συνδυασμούς ανιχνευτή και ενζύμου περιορισμού, είναι δύσκολο όμως να βρεθεί πολυμορφισμός μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους, όπου πρέπει να πραγματοποιηθούν αρκετοί συνδυασμοί ανιχνευτή και ενζύμου περιορισμού για να βρεθεί κάποια διαφοροποίηση.

1.4.2 ΤΥΧΑΙΟ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΟ DNA (RAPD)

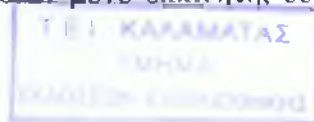
Η μέθοδος του τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA βασίζεται στην ανάπτυξη των μοριακών δεικτών με την χρήση τυχαίων εκκινητών, κυρίως δεκαμερών, κατά την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) παρουσία ενός μορίου εκκινητή ανά αντίδραση (Vanechoutte, 1996: Χατζόπουλος, 2001). Τα αντιγραφόμενα τμήματα του DNA δημιουργούνται σε περιοχές του γονιδίου που υβριδίζει ο εκκινητής με κατάλληλο προσανατολισμό και μέγεθος έως 3000 βάσεις.

Ένας εκκινητής έχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία αλλά η αλληλουχία αυτή είναι τυχαία. Έτσι, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός εκκινητών RAPD με συγκεκριμένες αλληλουχίες. Ο εκκινητής έχει την δυνατότητα να υβριδίζει εκατοντάδες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα, όμως για να εμφανιστεί ενίσχυση των συγκεκριμένων τμημάτων κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, θα πρέπει ο εκκινητής να υβριδίζει σε δυο θέσεις στις αντίθετες αλυσίδες του DNA μέσα σε ένα φάσμα 100–3.000 βάσεις. Ο κύκλος πολυμερισμού επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα την λογαριθμική ενίσχυση της συγκέντρωσης ενός συγκεκριμένου μέρους του γονιδιώματος. Τα προϊόντα του πολυμερισμού διαχωρίζονται σε ηλεκροφόρηση σε αгарόζη ή πολυακρυλαμίδης και γίνονται ορατά με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου ή φθορίζουσων ουσιών. Ο πολυμορφισμός μεταξύ των οργανισμών εκδηλώνεται με τις διαφορές που εμφανίζονται στο μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων του DNA κατά την ηλεκροφόρηση.

Η μέθοδος απομόνωσης του DNA, η συγκέντρωση του καθώς και οι συνθήκες κατά την αντίδραση του PCR πρέπει να παραμένουν σταθερές. Τα διαφορετικά αλληλόμορφα διαχωρίζονται από την παρουσία ή απουσία ενός προϊόντος συγκεκριμένου μεγέθους, με

αποτέλεσμα να καταμετρηθούν πολλαπλές γενετικές θέσεις κατά την τέλεση της αντιδράσεως πολυμερισμού με την προϋπόθεση βέβαια ότι τα ενισχυμένα τμήματα είναι διακριτά

Οι συνθήκες της αντιδράσεως πολυμερισμού πρέπει να είναι οι κατάλληλες για να εμφανιστούν πολλαπλές ζώνες χρησιμοποιώντας έναν μόνο εκκινητή, οδηγώντας σε άμεση εκτίμηση πολλών γενετικών τόπων.



1.4.3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ (AFLP)

Ο πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP) βοήθα στον εντοπισμό της γενετικής ποικιλομορφίας και βιοποικιλομορφίας (Vaneechoutte, 1996: Lin *et al.*, 1996). Η μέθοδος AFLP βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά την πέψη του DNA με νουκλεασες περιορισμού από ένα σύνολο τμημάτων DNA του γονιδιώματος. Έτσι ταυτοποιούνται ανάλογα με το μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων με ηλεκτροφόριση σε πηκτή. Η μεθοδολογία AFLP επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών τμημάτων DNA σε μια μόνο αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερασής.

1.4.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΙ ΣΕ ΑΠΛΕΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ (SSR) ΚΑΙ ΑΠΛΕΣ ΣΕ ΣΕΙΡΑ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ (STR)

Οι μέθοδοι αυτοί αναφέρονται κυρίως σε (συνηχείς) επαναλήψεις απλών αλληλουχιών. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό σε πολλά γονιδιώματα. Οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται με την ενίσχυση γνωστών γενετικών τόπων με συγκεκριμένους εκκινητές, συμπληρωματικούς των αλληλουχιών εκατέρωθεν των ακρών τους. Τα ενισχυμένα τμήματα παρουσιάζουν διαφορετικό μέγεθος λόγω των διαφορών των επαναλήψεων απλών αλληλουχιών (Χατζόπουλος, 2001).

1.4.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΜΕ ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (ARDRA)

Αρχικά πραγματοποιείται ενίσχυση των εξειδικευμένων συντηρητικών γονιδίων 16S rDNA και 18S rDNA. Η ενίσχυση των εξειδικευμένων αυτών γονιδίων πραγματοποιείται με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια – εκκινητές που υβριδίζονται σε συγκεκριμένες θέσεις των ριβοσωμικών αυτών γονιδίων, για μια ευρύτατη κατηγορία μικροοργανισμών (Jang *et al.*, 2002: Leeflang *et*

al., 2002: Chen and Song, 2002). Στη συνέχεια τα ενισχυμένα αυτά τμήματα υπόκεινται σε ανάλυση του γενετικού τους πολυμορφισμού με την χρήση ενός ή και περισσότερων ενδονουκλεασών περιορισμού, όπου τα ενισχυμένα τμήματα πέπτονται με την χρήση κατάλληλου ενζύμου (Jang *et al.*, 2002: Vaneechoutte *et al.*, 1995: Dees and Ghiorse, 2001).

Η μέθοδος ARDRA έχει αποδειχτεί, μέσα από την εφαρμογή της σε διάφορα είδη μυκήτων και βακτηρίων ότι είναι μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών (Ciapini *et al.*, 2002). Επίσης βοηθάει στο να ξεχωρίζει των ρόλο τους στην οικολογική και κλινική σημασία των ειδών (Segonds *et al.*, 2003: Urzi *et al.*, 2001). Η μέθοδος ARDRA είναι λιγότερο επιρρεπής σε προβλήματα μόλυνσης σε σχέση με άλλες τεχνικές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1 Καλλιέργεια Μυκήτων

Η καλλιέργεια των μυκήτων πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα potato dextrose agar (PDA) συγκέντρωσης 3,9 (w/v). Η αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος έλαβε μέρος στους 121⁰C, υπό πίεση 1,1bar, για 20min. Η ανακαλλιέργεια των μυκητιακών στελεχών πραγματοποιείτο μηνιαίως, τοποθετώντας τα τρυβλία Petri στους 24⁰C. Αποθήκευση των μυκήτων πραγματοποιήθηκε σε βιδωτούς αποστειρωμένους σωλήνες, που περιείχαν 10ml 3,9 (w/v) PDA. Με την ολοκλήρωση της αποίκησης του υποστρώματος από τα μυκητιακά στελέχη στους 24⁰C, οι σωλήνες τοποθετούνταν στους 8⁰C (ψυγείο).

2.2 Απομόνωση - Καθαρισμός μυκητιακού γονιδιακού DNA

2.2.1 Υλικά

1. Γουδί και γουδοχέρι (αποστειρωμένα).
2. Μικρές σπάτουλες.
3. Αποστειρωμένα ρύγχη (tips) και πιπέτες.
4. Σωλήνες φυγοκέντρισης (tubes) των 30ml.
5. Δυο υδατόλουτρα ρυθμισμένα στους 65⁰C και 37⁰C αντίστοιχα.
6. Σωλήνες φυγοκέντρισης των 1,5ml (Eppendorfs)
7. Φυγόκεντρος (Biofuge 28RS Heraeus instruments).
8. Μικρο-φυγόκεντρος (Biofuge pico, Heraeus instruments).

2.2.2 Διαλύματα – Αντιδραστήρια

1. Υγρό άζωτο (liquid nitrogen).

2. Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (διάλυμα λύσης DNA) pH 7,2 (DNA extraction buffer-lysis buffer):
 - 50mM Tris-HCl
 - 50mM EDTA
 - 3% (w/v) SDS
 - 0,15M NaCl
3. Φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1, v/v/v), (LIFE TECHNOLOGIES)
4. 3M Οξικό νάτριο (CH_3COONa), pH = 4,8.
5. Ισοπροπανόλη, $[\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3]$
6. 70% (v/v) αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)
7. RNάση (10μM)
8. Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H_2O
9. Χλωροφόρμιο (CHCl_3)
10. 100% (v/v) αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)
11. TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA: pH=8).

2.2.3 Διαδικασία

Αρχικά μεταφέρεται μυκηλιακός ιστός των προς ανάλυση μικροοργανισμών, από το τριβλίο στο γουδί με την βοήθεια αποστειρωμένης σπάτουλας. Προστίθεται υγρό άζωτο και το δείγμα λειοτριβείται στο παγωμένο γουδί μέχρι το μυκήλιο να αποκτήσει την μορφή σκόνης. Η μυκηλιακή σκόνη μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρισης των 30ml και αναγράφεται ο κωδικός του δείγματος. Προστίθεται 2ml του διαλύματος λύσης (lysis buffer) με σκοπό τη λύση των κυττάρων και την απελευθέρωση του γονιδιακού DNA. Το δείγμα τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 65°C για 15min, με σκοπό την διευκόλυνση της λύσης των κυττάρων. Προστίθεται 2ml φαινόλης: χλωροφόρμιο: ισοαμυλικής αλκοόλης, (25:24:1, v/v/v) και το δείγμα ανακινείται ισχυρά έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η απενεργοποίηση των ενζύμων και ο καθαρισμός της υδατικής φάσης από τις πρωτεΐνες. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 8.000 rpm για 10 min και το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε καινούργιους σωλήνες φυγοκέντρισης. Η υδατική φάση εκχειλίζεται εκ νέου με ίση ποσότητα χλωροφορμίου με σκοπό την απομάκρυνση τυχών πρωτεϊνών καθώς και υπολειμμάτων φαινόλης. Το δείγμα μας κατόπιν ανακινείται και φυγοκεντρείται στις 8.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο που προκύπτει διαιρείται και διοχετεύεται σε αποστειρωμένους μικροσωλήνες φυγοκέντρισης (eppendorfs). Το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 0,6 όγκων (vol) παγωμένης ισοπροπανόλης και 0,1 όγκων (vol) οξικού νατρίου 3M (pH = 4,8).

Κατόπιν τα δείγματα μας τοποθετούνται στους -20°C για 1h. Με το πέρας της μιας ώρας, τα δείγματα φυγοκεντρούνται εκ νέου στις 13.000 gpm για 20 min. Η ισοπροπανόλη απομακρύνεται και το DNA εκπλένεται με 0,5 ml αιθανόλης (70%, v/v). Τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν και το DNA αναδιαλύεται σε 0,5ml ύδατος.

Σε κάθε δείγμα, προστίθενται 10μl RNase συγκέντρωσης 10μM και τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 min. Τα δείγματα εκχειλίζονται με ίση ποσότητα φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης, (25:24:1, v/v/v) με σκοπό την απενεργοποίηση και απομάκρυνση της RNάσης. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στις 8.000gpm για 10 min. Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε καινούργιους αποστειρωμένους μικροσωλήνες φυγοκέντρισης (erppendorfs) και εκχειλίζονται εκ νέου με ίση ποσότητα χλωροφορμίου, απομακρύνοντας τυχόν υπολείμματα φαινόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 8.000gpm για 10min, συλλέγοντας το υπερκείμενο. Το DNA κατακρηνίζεται με προσθήκη 2,5 όγκων (vol) παγωμένης αιθανόλης 100% (v/v) και πραγματοποιείται τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20°C για 1h. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000gpm για 20min, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το DNA εκπλένεται με 0,5ml 70% (v/v) αιθανόλης, το οποίο φυγοκεντρείται στις 13.000gpm για 15min. Στο στάδιο αυτό το υπερκείμενο απομακρύνεται και το DNA αναδιαλύεται σε 0,2ml TE. Τέλος τα δείγματα (DNA) αποθηκεύονται στους -20°C .

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.3.1 Όργανα - Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένοι σωλήνες φυγοκέντρισης των 1,5ml (erppendorfs).
- Αυτόματες μικροπιπέτες.
- Αποστειρωμένοι σωλήνες αντιδράσεως πολυμερισμού 0,2ml (P.C.R tube).
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών.
- Στατό.
- Μηχανή P.C.R (PROGENE, TECHNE LTD, CAMBRIDLE, UK).
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H_2O .
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα (10x PCR buffer) (δημιουργεί άριστες συνθήκες για τη δράση του ένζυμου πολυμεράση)
- 50 mM MgCl_2 (δρα ως καταλύτης της ενζυμικής αντίδρασης πολυμερισμού).

- 40 mM διαλύματος δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), 10 mM έκαστο δεοξυνουκλεοτίδιο (40 mM dNTPs: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP).
- Εκκινητές:
50μM FU-For [5'-TTA GCA TGG AAT AAT (AG) (AG)A ATA GGA -3']
50μM FU-Rev [5'- ATT GCA ATG C(CT)C TAT CCC CA -3']
- DyNazyme II DNA πολυμεράση, 2U/μl, Finnzyme OY, Finland.

2.3.2 Διαδικασία

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι ποσότητες αντιδραστηρίων:

- 40μl αποστειρωμένο υπερκάθαρο H₂O
- 5μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα (10x PCR buffer).
- 2μl MgCl₂ (50 mM)
- 1μl διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)
- 0,5μl εκκινητή FU-For [5'-TTA GCA TGG AAT AAT (AG) (AG)A ATA GGA - 3']
- 0,5μl εκκινητή FU-Rev [5'- ATT GCA ATG C(CT)C TAT CCC CA -3']
- 0,5μl ενζύμου πολυμεράσης.
- 0,5μl DNA (≈ 50 ng).

Προς διευκόλυνση, πραγματοποιήθηκε παρασκευή διαλύματος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Master-mix, 6 δειγμάτων). Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού χρησιμοποιήθηκαν εξαπλάσιες ποσότητες όλων των παραπάνω αντιδραστηρίων εκτός από το DNA των δειγμάτων που προστέθηκε σε κάθε σωλήνα αντιδράσεως πολυμερισμού (0,2ml P.C.R tube) ξεχωριστά. Σε κάθε αντίδραση πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκε παρασκευή 'τυφλού δείγματος-μαρτύρα' όπου ακολουθείται η άνωθι πορεία εκτός της εισαγωγής του DNA.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες θήκες του μηχανήματος πολυμερισμού (PROGENE, TECHNE LTD, CAMBRIDGE, UK). Οι συνθήκες υπό τις οποίες έλαβε χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι οι ακόλουθες:

- 1.Σταδιο: 2min στους 94⁰C (αποδιάταξη DNA)
- 2.Σταδιο: 35 κύκλους όπου ο κάθε κύκλος αποτελείται από:
 - 30sec στους 94⁰C (αποδιάταξη DNA)
 - 30sec στους 49⁰C (υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινητών)
 - 1min στους 72⁰C (δράση πολυμεράσης)
- 3.Σταδιο: 10min στους 72⁰C (δράση πολυμεράσης – προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων)

Με το πέρας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20⁰C για περαιτέρω ανάλυση.

2.4 Πέψη ενισχυμένων τμημάτων DNA με νουκλεάσες περιορισμού

Τα προς πέψη δείγματα παρασκευάσθηκαν με την προσθήκη των ακόλουθων ουσιών – ενζύμων.

- 25,5μl ενισχυμένου τμήματος DNA (προϊόν PCR, 780bp, μερική ενίσχυση του γονιδίου 18S rDNA).
- 3μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος H (10x Buffer H, TaKaRa, SHUZO CO, LTD, Shiga, Japan).
- 1,5μl *Sau* 3A I (10U/μl) ή 1,5μl *Hinf* I (8U/μl)

Για την αρχική επιλογή των νουκλεασών περιορισμού χρησιμοποιήθηκαν 15U ανά πέψη δείγματος για κάθε ένα από τα ένζυμα *Mse* I, *Hind* III, *Bam* H I, *Pst* I, *Kpn* I και *Xho* I.

Η πέψη των ενισχυμένων τμημάτων πραγματοποιήθηκε με την παραμονή του ανώτερου μίγματος σε υδατόλουτρο στους 37⁰C για 3 h. Μετά το πέρας της πέψης, τα δείγματα (30μl) αναμείχθηκαν με 5μl διαλύματος φορτώσεως και ηλεκτροφορήθηκαν σε 1,5 % (w/v) πηκτή αγαρόζης με ταχύτητα 5V/cm. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της πέψης χρωματίσθηκαν παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (0,5mg/l) και αποχρωματίστηκαν σε αραιό διάλυμα θειικού μαγνησίου (1μM), και φωτογραφήθηκαν κάτω από υπεριώδες φως.

2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή

2.5.1 Όργανα και υλικά

- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης: Ηλεκτροφορητικό δοχείο, υποδοχέας πηκτής αγαρόζης, χτένες δημιουργίας πηγαδιών, (HORIZON 58, LIFE TECHNOLOGIES, GIBCO BRL) και (BIO-RAD, SUB-CELL GT, Italy).
- Τροφοδοτικό: (Power PAC 300, BIO-RAD, USA).
- Συσκευή υπεριώδους φωτός: (Consort TFX-20M).
- Αυτόματες μικροπιπέτες: (GILSON, FRANCE)
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών.
- Κωνικές φιάλες.
- Ογκομετρικοί κύλινδροι.
- Ζυγό: KERN 572-35 (Kern & Sohn GmbH, Germany).
- Φούρνος μικροκυμάτων.
- Σύστημα φωτογράφησης πηκτών αγαρόζης: (KODAK, MDS 290, EASTMAN KODAK COMPANY Rochester, USA).
- Αγαρόζη, (Electrophoresis Grade Agarose, Life Technologies GIBCO BTL UK.).
- 50x TAE pH=8: (242gr Tris-HCl, 57,1ml π. CH₃COOH και 0,5M EDTA).
- 1x TAE (20ml 50x TAE σε 1 l απιονισμένο νερού).
- Διάλυμα φορτώσεως (loading dye), χρωστική.
 - 144gr (20M) γλυκίνη 0,25% (w/v) Bromophenol blue
 - 30,25 gr/l (0,25M)Tris 0,25% (w/v) cyanol
 - 1%w/v SDS 40 % (w/v) sucrose
- Διάλυμα θειικού μαγνησίου 1mM MgSO₄
- 5mg/ml αρχικού διαλύματος, 0,5mg/l τελική συγκέντρωση (CH₃CH₂Br).
- 4μl δείκτη μοριακών μεγεθών DNA (DNA ladder)
 - 100bp (80ng/ml, EZ Load, CAT. NO 170-8353, BIO-RAD)
 - 100bp (130ng/μl αρχική συγκέντρωση, 110 ng/μl τελική συγκέντρωση παρουσία διαλύματος φορτώσεως, 3407A, TaKaRa, SHUZO CO, LTD, Shiga, Japan).

2.5.2 Διαδικασία

Επιλέγεται συσκευή ηλεκτροφόρησης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί καθώς και ο υποδοχέας της πηκτής, χωρητικότητας 50ml για την Horizon 58 και 200 ml για την BIO-RAD SUB-CELL GT. Το γονιδιακό DNA των μικροοργανισμών και τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ηλεκτοφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) ενώ τα προϊόντα της πέψης των ενισχυμένων τμημάτων με νουκλεάσες περιορισμού αναλύονται σε 1,5% (w/v) πηκτή αγαρόζης.

Παρασκευάζεται πηκτή 50ml (1% w/v σε αγαρόζη) και 200ml (1,5 % w/v σε αγαρόζη) αντίστοιχα. Το παρασκεύασμα τοποθετείται στον φούρνο μικροκυμάτων έως ότου πραγματοποιηθεί πλήρη διάλυση της αγαρόζης. Το διάλυμα αφαιρείται να κρυώσει και να αποκτήσει θερμοκρασία ίση με 50°C.

Τοποθετείται ο υποδοχέας σε οριζόντια θέση (χωρίς κλήση), σφραγίζονται οι ανοιχτές πλευρές του και εφαρμόζεται η ειδική χτένα στην κατάλληλη θέση. Το περιεχόμενο της κωνικής, εισάγεται στον υποδοχέα και απομακρύνονται τυχόν φυσαλίδες. Η πηκτή αγαρόζης σταθεροποιείται και η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TAE ώστε να καλυφθεί πλήρως η πηκτή. Η χτένα απομακρύνεται και εισάγονται στις σχηματιζόμενες θέσεις 'πηγάδια' τα δείγματα του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν.

Στην συνέχεια προετοιμάζονται τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση με μίξη 8μl ενισχυμένου τμήματος DNA, με 5μl διαλύματος φόρτωσης. Στα προϊόντα της πέψης με νουκλεάσες περιορισμού πραγματοποιείται ανάμιξη 30μl δείγματος με 5μl διαλύματος φορτώσεως.

Τα δείγματα μαζί με μάρτυρα και δείκτη μοριακών μεγεθών DNA (100bp Ladder), τοποθετούνται προσεκτικά με μικροπιπέτα σε κάθε μια από τις θέσεις ηλεκτροφόρησης ('πηγάδια'). Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται υπό σταθερή τάση 5V/cm. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5mg/l βρωμιούχου αιθιδίου (CH₃CH₂Br) για 30 ή 50 min ανάλογα με την περιεκτικότητα της πηκτής αγαρόζης (για 1% w/v και για 1,5 % w/v αντίστοιχα) και αποχρωματίζεται σε διάλυμα θεικού μαγνησίου.

Τα δείγματα φωτογραφίζονται κάτω από υπεριώδες φως, παρουσία ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (KODAK, MDS 290, EASTMAN KODAK COMPANY Rochester, USA).

2.6 Μικροσκοπική μελέτη μορφολογίας μυκήτων

Η μορφολογική ανάλυση των μυκητιακών στελεχών πραγματοποιήθηκε με την χρησιμοποίηση του ZEISS μικροσκοπίου, στο οποίο είχε προσαρμοστεί ψηφιακό σύστημα φωτογράφισης (Kodak, MDS290, EASTMAN, KODAK COMPANY, Rochester, USA), υποστηριζόμενο από το απαραίτητο λογισμικό (KODAK). Κατάλληλη ποσότητα μυκηλιακού ιστού αναδιαλύθηκε σε 10ml φυσιολογικού ορού (0.85 w/v NaCl), πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος το αιώρημα αναλύθηκε κάτω από το ZEISS μικροσκόπιο, χρησιμοποιώντας κατάλληλη μεγέθυνση (x40).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρχικά απομονώθηκαν μυκηλιακά στελέχη από δυο γεωργικά–αγροβιομηχανικά υπολείμματα με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, χρησιμοποιώντας ποικίλα ημικλεκτικά υποστρώματα (Ινστιτούτο Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας). Με βάση τα θρεπτικά υποστρώματα που απομονώθηκαν και το είδος του υλικού που αναλύθηκε έχουμε τις ακόλουθες μυκητιακές απομονώσεις:

Ονομασία απομόνωσης	Ημικλεκτικό θρεπτικό υλικό	Προέλευση μικροοργανισμού
FM-1	Enumeration medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-2	Enumeration medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-3	Benlate based-medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-4	Benlate based-medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-5	Benlate based-medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-6	Water agar	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-7	Water agar	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-8	Water agar	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-9	Water agar	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-10	Cellulose based-medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-11	Cellulose based-medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-12	Cellulose based-medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-13	Cellulose based-medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-14	Cellulose based-medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-15	Soil extract agar	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-16	Soil extract agar	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-17	Soil extract agar	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-18	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-19	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-20	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-21	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-22	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-23	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-24	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-25	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-26	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-27	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-28	Fusarium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-29	Pythium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-30	Pythium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-31	Pythium based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-32	Phytophthora based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-33	Phytophthora based medium	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-34	Potato Dextrose Agar (PDA)	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-35	Potato Dextrose Agar (PDA)	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-36	Potato Dextrose Agar (PDA)	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-37	Potato Dextrose Agar (PDA)	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-38	Potato Dextrose Agar (PDA)	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>
FM-39	Potato Dextrose Agar (PDA)	υπόστρωμα μανιταριού <i>Agaricus</i>

Ονομασία απομόνωσης	Ημικλεκτικό θρεπτικό υλικό	Προέλευση μικροοργανισμού
FS-3	Fusarium based medium	Στέμφυλα
FS-26	Enumeration based medium	Στέμφυλα
FS-27	Enumeration based medium	Στέμφυλα
FS-28	Enumeration based medium	Στέμφυλα
FS-31	Benlate based medium	Στέμφυλα
FS-33	Benlate based medium	Στέμφυλα
FS-34	Benlate based medium	Στέμφυλα
FS-35	Soil extract agar	Στέμφυλα
FS-36	Soil extract agar	Στέμφυλα
FS-37	Soil extract agar	Στέμφυλα
FS-40	Phytophthora based medium	Στέμφυλα
FS-41	Phytophthora based medium	Στέμφυλα
FS-42	Phytophthora based medium	Στέμφυλα
FS-43	Phytophthora based medium	Στέμφυλα
FS-44	Phytophthora based medium	Στέμφυλα
FS-57	Basal medium	Στέμφυλα
FS-58	Basal medium	Στέμφυλα
FS-59	Basal medium	Στέμφυλα

3.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

3.2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των μυκητιακών στελεχών FM

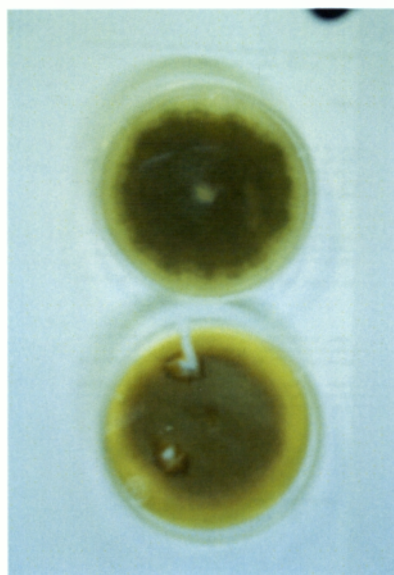
3.2.1.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FM

Με βάση την εμφάνιση των μυκητιακών στελεχών απομονωμένων από υπόστρωμα μανιταριού *Agaricus* (FM) σε τριβλίο Petri (μακροσκοπική μελέτη) καταγράφηκε το χρώμα και η μορφολογία σε νεαρές και ώριμες μυκητιακές απομονώσεις. Έτσι παρατηρήθηκαν απομονώσεις των ακόλουθων κατηγοριών:

Κατηγορία 1

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα μυκητιακά στελέχη FM-1, FM-2, FM-3, FM-6, FM-7, FM-9, FM-10, FM-11, FM-13, FM-16, FM-18, FM-19, FM-24, FM-25, FM-26, FM-27, FM-28, FM-29, FM-30, FM-32, FM-33, FM-35, FM-36, FM-37, FM-38 και FM-39 (26 στελέχη). Τα κύρια μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των στελεχών αυτών είναι τα ακόλουθα:

Απομονώσεις καφέ χρώματος περιφερειακά και άσπρου χρώματος εσωτερικά. Η εξωτερική υφή των απομονώσεων αυτών ήταν ελαφρώς χνουδωτή (Φωτογραφία 1).



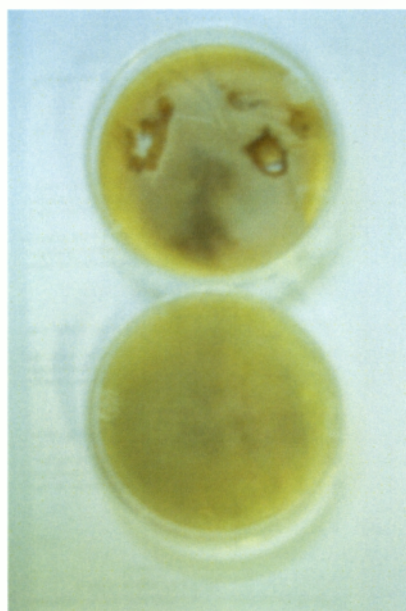
Φωτογραφία 1. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των στελεχών της Κατηγορίας 1.

Κατηγορία 2

Στην κατηγορία αυτή ανήκει το μυκητιακό στέλεχος FM-5. Τα κύρια χαρακτηριστικά του στελέχους αυτού είναι τα ακόλουθα:

Οι νεαρές καλλιέργειες εμφανίζουν λευκό χρώμα, το οποίο μεταβάλλεται σε ανοιχτό καφέ στα ώριμα μυκήλια. Η εξωτερική υφή επίσης είναι έντονα χνουδωτή.

Ομοιάζει με την *Κατηγορία 1*.

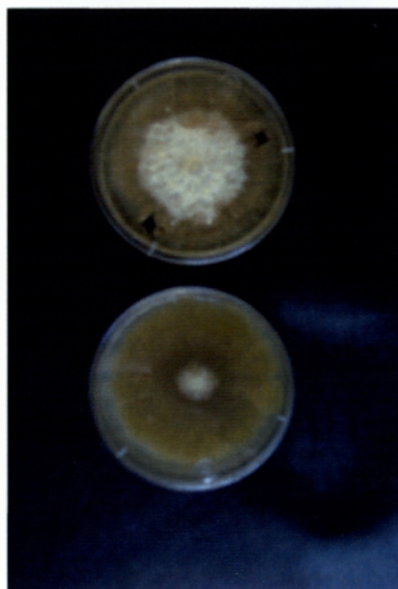


Φωτογραφία 2. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της μυκητιακής απομονώσεως FM-5.

Κατηγορία 3

Ανήκουν τα μυκητιακά στελέχη FM-8, FM-17, FM-23 και FM-31 (4 στελέχη), παρουσιάζοντας τα κάτωθι φαινοτυπικά χαρακτηριστικά:

Καλλιέργειες καφέ χρώματος περιφερειακά και άσπρου χρώματος εσωτερικά. Η εσωτερική άσπρη ζώνη δημιουργεί μια ανώμαλη (μη λεία) υπερυψωμένη διαμόρφωση.

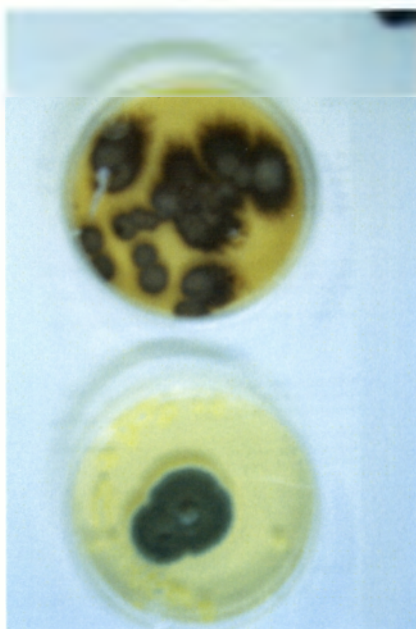


Φωτογραφία 3. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των στελεχών της Κατηγορίας 3.

Κατηγορία 4 (α και β)

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα στελέχη FM-12, FM-22 και FM-34 (υποομάδα 4α), καθώς και τα στελέχη FM-14, FM-15, FM-20 και FM-21 (υποομάδα 4β). Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι τα ακόλουθα:

Νεαρές καλλιέργειες πράσινου χρώματος με μικρή εξωτερική ζώνη λευκού χρώματος, μεταβαλλόμενες σε ανθρακί με ύπαρξη ακτινωτών διαμορφώσεων-χαρακωμάτων στην περίπτωση των ώριμων μυκητιακών καλλιεργειών.



Φωτογραφία 4. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των στελεχών της Κατηγορίας 4.

3.2.1.2 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FM

Με βάση την μικροσκοπική μελέτη της μορφολογίας των μυκητιακών απομονώσεων FM παρατηρήθηκαν οι κάτωθι ομάδες:

Ομάδα μικροσκοπικής παρατήρησης 1

Τα μυκητιακά στελέχη των φαινοτυπικών ομάδων 1, 2 και 3, παρουσίαζαν την ίδια εικόνα κατά την μικροσκοπική τους μελέτη, η οποία και περιγράφεται από την κάτωθι φωτογραφία:

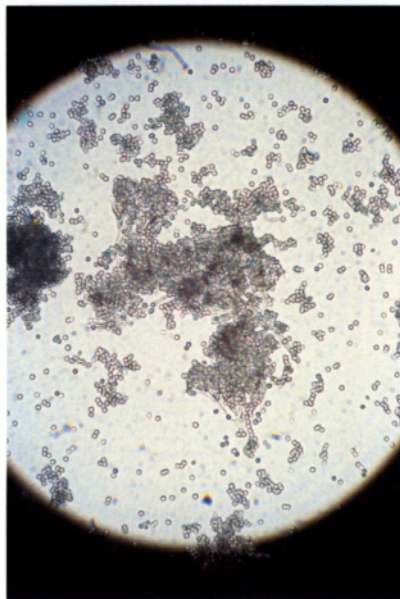


Φωτογραφία 5. Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των στελεχών της Ομάδας 1.

Τα μέλη της ομάδος αυτής παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ζυγομυκήτων και κυρίως της τάξεως *Mucorales*, με σφαιρικές διογκώσεις ως σποριαγγειοφόρο, που περιέχουν πληθώρα σπορίων.

Ομάδα μικροσκοπικής παρατήρησης 2

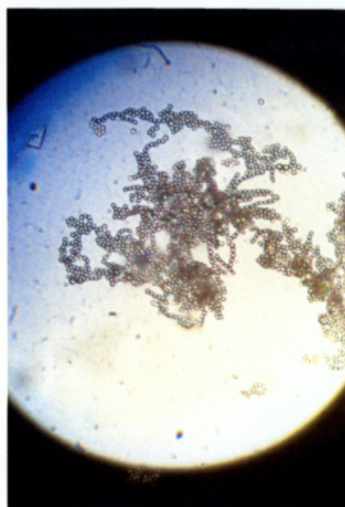
Τα μέλη της ομάδος αυτής ανήκουν στην φαινοτυπική κατηγορία 4 ,περιλαμβάνοντας τις απομονώσεις FM-12-22-34, και παρουσιάζει χαρακτηριστικά του γένους *Penicilium*, όπως αποτυπώνονται στην Φωτογραφία 6.



Φωτογραφία 6. Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των στελεχών της ομάδας 4.

Ομάδα μικροσκοπικής παρατήρησης 3

Τα μέλη της ομάδος αυτής ανήκουν στην φαινοτυπική κατηγορία 4, περιλαμβάνοντας τις απομονώσεις FM-14-15-20-21, όπως φαίνεται στην Φωτογραφία 7.



Φωτογραφία 7. Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των στελεχών της ομάδας 3.

3.2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των μυκητιακών στελεχών FS

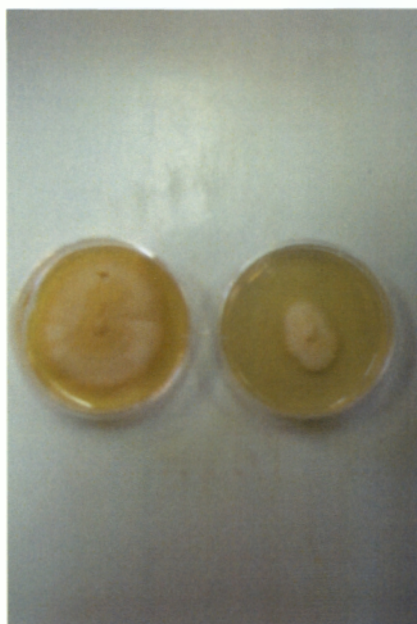
3.2.2.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FS

Με βάση την εμφάνιση των μυκητιακών στελεχών απομονωμένων από στέμφυλα (FS) σε τριβλίο Petri (μακροσκοπική μελέτη) καταγράφηκε το χρώμα και η μορφολογία σε νεαρές και ώριμες μυκητιακές απομονώσεις. Έτσι παρατηρήθηκαν απομονώσεις των ακόλουθων κατηγοριών:

Κατηγορία 1

Στην κατηγορία αυτή ανήκει το μυκητιακό στέλεχος FS-27. Τα κύρια μακροσκοπικά χαρακτηριστικά αυτού είναι τα ακόλουθα:

Λευκό με ομόκεντρους κύκλους. Το μυκήλιο αυτού δεν απλώνεται εύκολα, ενώ η υφή του είναι γλοιώδης. Σε γερασμένες καλλιέργειες το χρώμα του άγαρ μεταβάλλεται σε κίτρινο-υποκίτρινο.

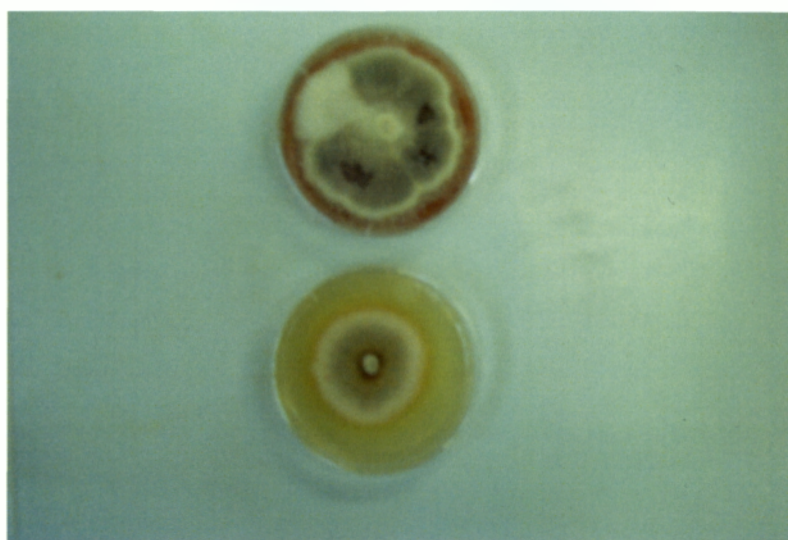


Φωτογραφία 8. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του στελέχους της Κατηγορίας 1.

Κατηγορία 2

Στην κατηγορία αυτή ανήκει η μυκητιακή απομόνωση FS-31. Τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αυτού είναι τα εξής:

Οι νεαρές απομονώσεις είναι λευκού χρώματος με έγχρωμο εσωτερικό, ενώ οι γερασμένες καλλιέργειες παρουσιάζουν αγριωπή υφή, χρωματίζοντας το άγαρ βυσσινή.

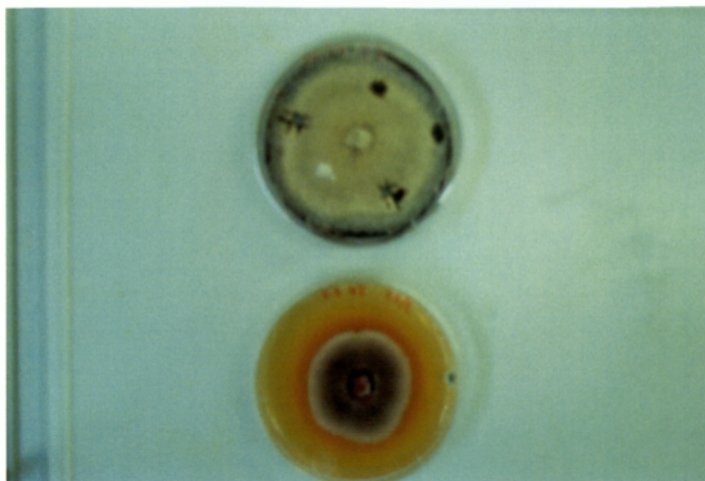


Φωτογραφία 9. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της απομόνωσης FS-31.

Κατηγορία 3

Ανήκουν οι απομονώσεις FS-3, FS-42 και FS-59. Τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αυτών είναι τα ακόλουθα:

Οι νεαρές απομονώσεις είναι λευκού χρώματος με χνουδωτή υφή και βυσσινί σημεία χωρίς να χρωματίζουν το άγαρ, σε αντίθεση με τις γερασμένες καλλιέργειες που χρωματίζουν το άγαρ έντονα μώβ.

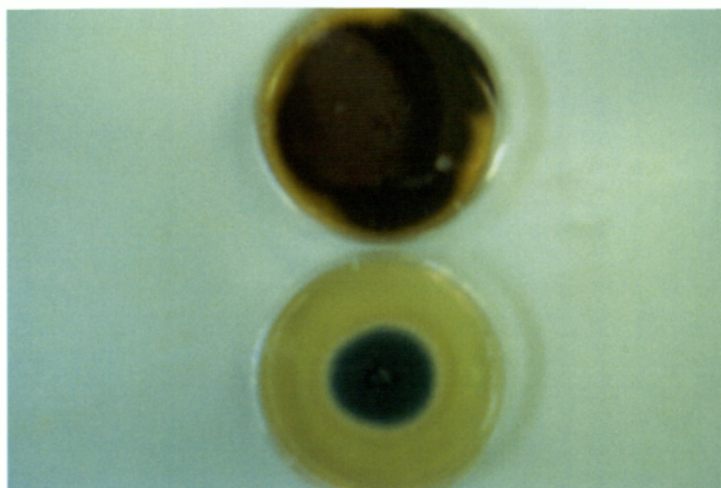


Φωτογραφία 10. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FS-3, FS-42 και FS-59.

Κατηγορία 4

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα μυκητιακά στελέχη FS-26, FS-28, FS-33, FS-35, FS-36, FS-40, FS-41, FS-43, FS-44 και FS-58 (10 στελέχη). Τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των στελεχών αυτών είναι τα ακόλουθα:

Νεαρές απομονώσεις πράσινου χρώματος με γερασμένες καλλιέργειες ανθρακί χρώματος.

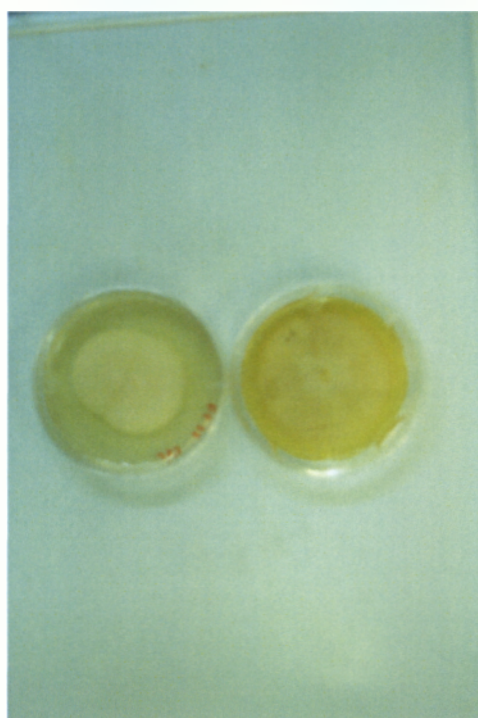


Φωτογραφία 11. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των στελεχών της *Κατηγορίας 4*.

Κατηγορία 5

Ανήκει η απομόνωση FS-57. Τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του είναι τα εξής:

Οι νεαρές απομονώσεις είναι λευκές έχοντας λεπτά ινίδια στην επιφάνεια τους, ενώ οι γερασμένες καλλιέργειες είναι λευκές κρεμώδεις.

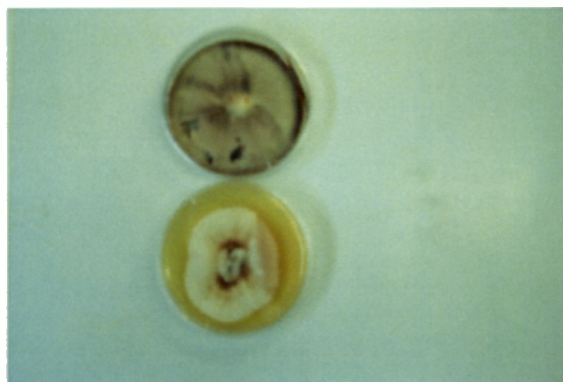


Φωτογραφία 12. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του στελέχους FS-57.

Κατηγορία 6

Ανήκουν οι απομονώσεις FS-34 και FS-37. Τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αυτών είναι τα ακόλουθα:

Οι νεαρές απομονώσεις είναι λευκού χρώματος, χνουδωτές με βυσσινί σημεία, με τις γερασμένες καλλιέργειες να χρωματίζουν το άγαρ έντονα μώβ.



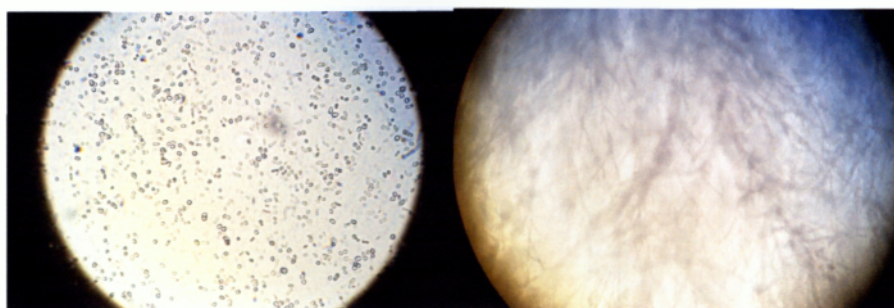
Φωτογραφία 13. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FS-34 και FS-37.

3.2.2.2 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FS

Με βάση την μικροσκοπική μελέτη της μορφολογίας των μυκητιακών απομονώσεων FS παρατηρήθηκαν οι ακόλουθες ομάδες:

Ομάδα μικροσκοπικής παρατήρησης I

Ανήκει το μυκητιακό στέλεχος FS-27, όπου μικροσκοπικά περιγράφεται ακολούθως:

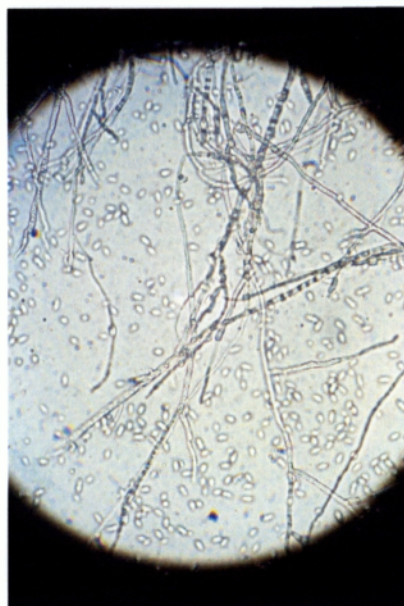


Φωτογραφία 14. Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του στελέχους FS-27.

(αριστερά, φωτογραφία με μικροσκόπιο, δεξιά, φωτογραφία με στερεοσκόπιο)

Ομάδα μικροσκοπικής παρατήρησης 2

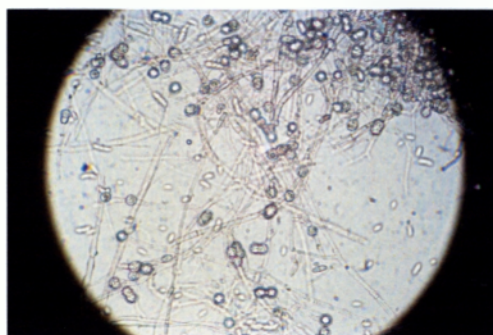
Ανήκουν τα στελέχη FS-31, FS-34 και FS-37 τα οποία μικροσκοπικά εμφανίζονται στην Φωτογραφία 15.



Φωτογραφία 15. Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων FS-31, FS-34 και FS-37.

Ομάδα μικροσκοπικής παρατήρησης 3.

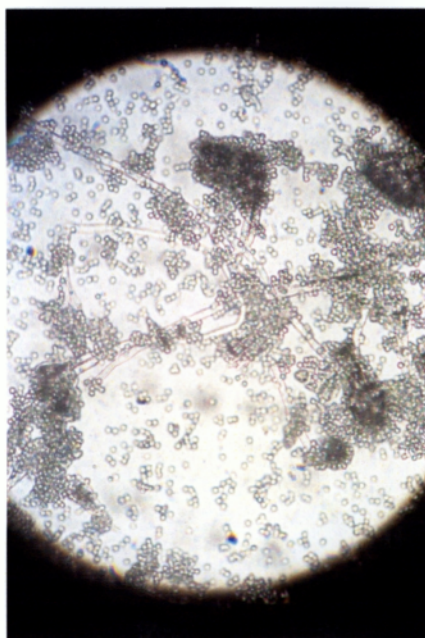
Η μικροσκοπική αυτή ομάδα περιλαμβάνει τις απομονώσεις FS-3, FS-42 και FS-59, οι οποίες μικροσκοπικά απεικονίζονται στην Φωτογραφία 16.



Φωτογραφία 16. Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των στελεχών FS-3, FS-42 και FS-59.

Ομάδα μικροσκοπικής παρατήρησης 4.

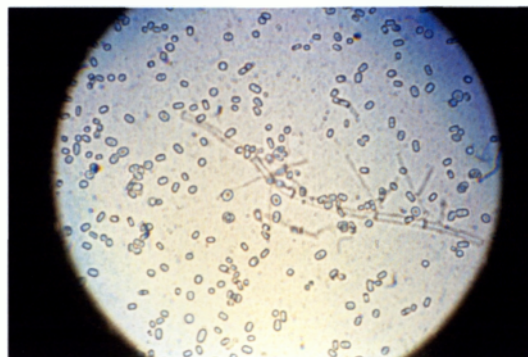
Στην μικροσκοπική αυτή ομάδα περιλαμβάνονται οι απομονώσεις FS-26, FS-28, FS-33, FS-35, FS-36, FS-40, FS-41, FS-43 και FS-58, οι οποίες μικροσκοπικά απεικονίζονται στην Φωτογραφία 17.



Φωτογραφία 17. Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των στελεχών της ομάδας 7.

Ομάδα μικροσκοπικής παρατήρησης 5

Ανήκει το στέλεχος FS-57, όπου μικροσκοπικά περιγράφονται ακολούθως:

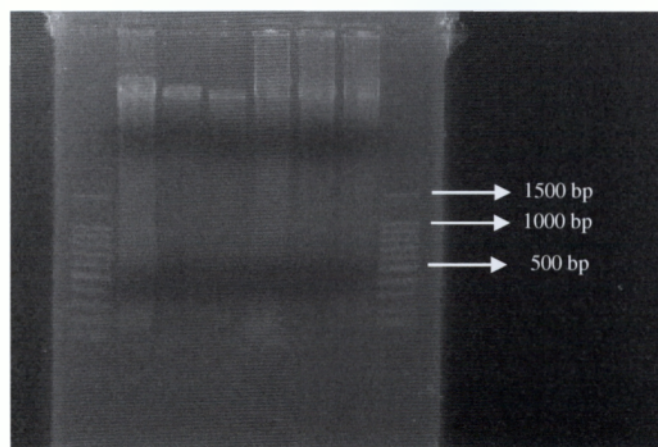


Φωτογραφία 18. Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά της απομόνωσης FS-57.

3.3 Μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού των στελεχών FM και FS

Αρχικά απομονώθηκε γονιδιακό DNA από τα μυκητιακά στελέχη όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.

Το μέγεθος και η καθαρότητα του γονιδιακού DNA των μυκητιακών στελεχών των δυο προελεύσεων (FM, FS) δίδεται από την κάτωθι φωτογραφία (Φωτογραφία 19):

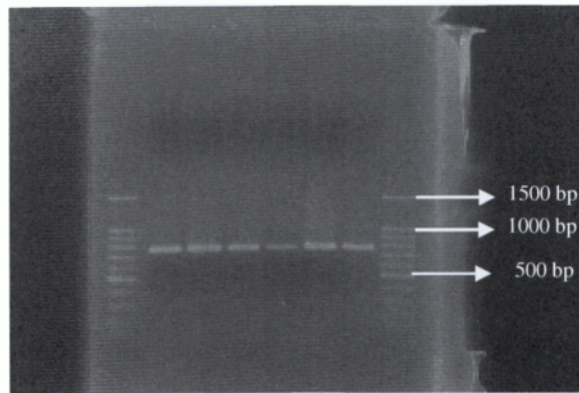


Φωτογραφία 19: Απομόνωση γονιδιακού DNA από μυκητιακά στελέχη FM και FS.

(αριστερά προς δεξιά: *100bp DNA ladder*, *FS-3*, *FS-34*, *FS-57*, *FM-6*, *FM-15*, *FM-17*, *100bp DNA ladder*)

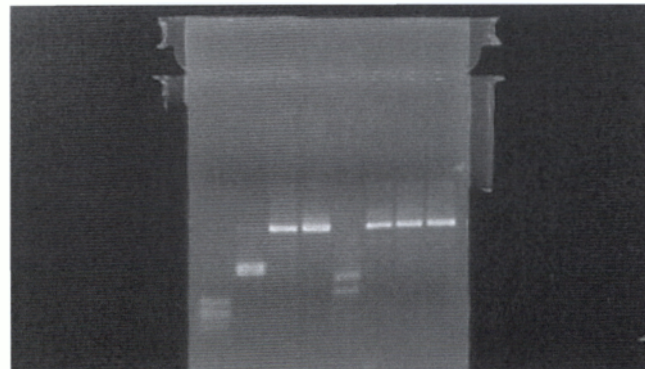
Όπως παρατηρείται το απομονωμένο γονιδιακό DNA για τις δυο κατηγορίες στελεχών ήταν μεγαλομοριακό, μεγέθους περίπου 20Kb, η δε καθαρότητα του κυμαινόταν από ικανοποιητική ως άριστη με A_{260nm}/A_{280nm} από 1,5 έως 1,8.

Για την μελέτη του γονιδιακού πολυμορφισμού πραγματοποιήθηκε ενίσχυση μερικού τμήματος του γονιδίου 18S rDNA (περίπου 780bp). Το μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου αυτού για τις δυο κατηγορίες μυκητιακών απομονώσεων (FM, FS) παρουσιάζονται στην φωτογραφία 20:



Φωτογραφία 20: Ενίσχυση μερικού τμήματος του γονιδίου 18S rDNA των μυκητιακών στελεχών FM και FS μετά την πραγμάτωση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.
(αριστερά προς δεξιά: 100bp DNA ladder, FS-3, FS-34, FS-57, FM-6, FM-15, FM-17, 100bp DNA ladder)

Προς διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας των μυκητιακών στελεχών, πραγματοποιήθηκε επιλογή κατάλληλων νουκλεασών περιορισμού, οι οποίες ήταν ικανές να προβούν στην πέψη των άνωθεν ενισχυμένων τμημάτων. Τα ένζυμα περιορισμού που δοκιμάστηκαν για τον σκοπό αυτόν είναι τα *Mse* I, *Hinf* I, *Xho* I, *Kpn* I, *Sau3A* I, *Hind* III, *Bam* I και *Pst* I (Φωτογραφία 21).



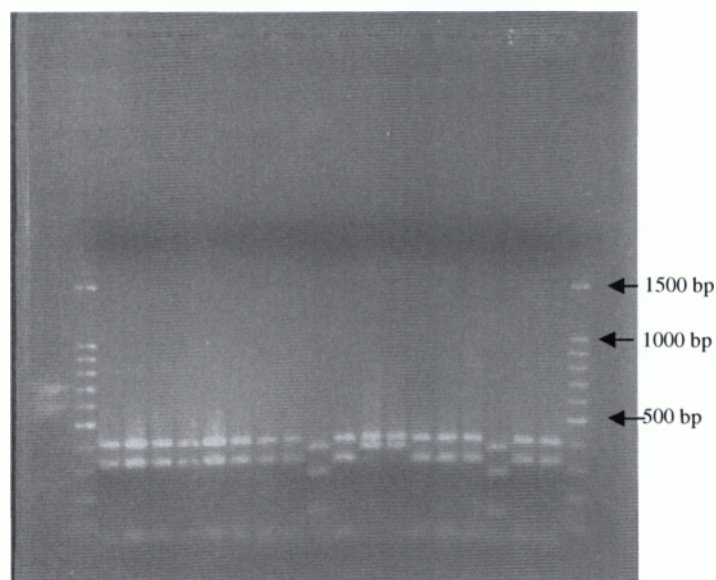
Φωτογραφία 21: Πέψη ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου 18S rDNA των μυκητιακών στελεχών FM και FS με την χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού.
αριστερά προς δεξιά: πέψη με *Mse* I, *Hinf* I, *Xho* I, *Kpn* I, *Sau3A* I, *Hind* III, *Bam* I και *Pst* I.

Η πέψη των ενισχυμένων αυτών τμημάτων ήταν εφικτή με την χρησιμοποίηση των νουκλεασών περιορισμού *Mse* I, *Hinf* I και *Sau3A* I. Επιλέχτηκε τυχαία η χρησιμοποίηση των

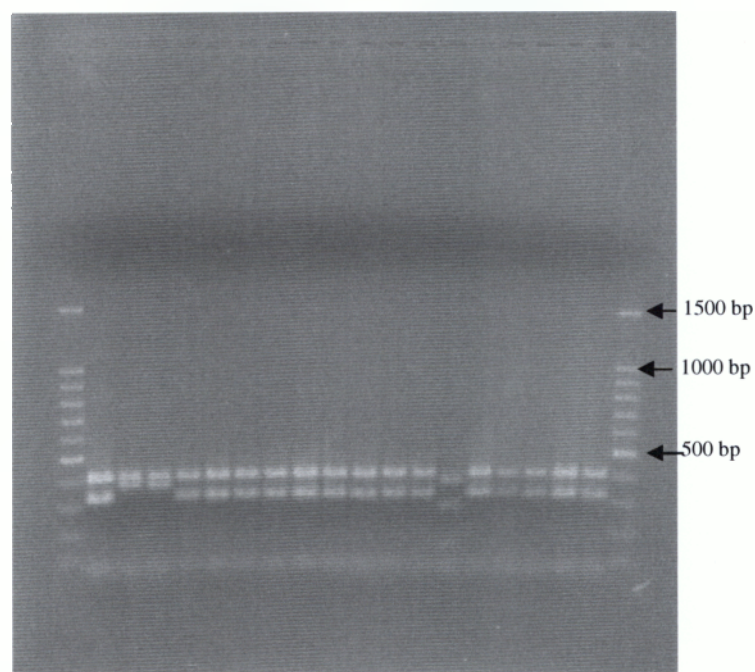
ενζύμων *Hinf* I και *Sau3A* I για την μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού όλων των μυκητιακών στελεχών.

3.3.1 Μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού των στελεχών FM

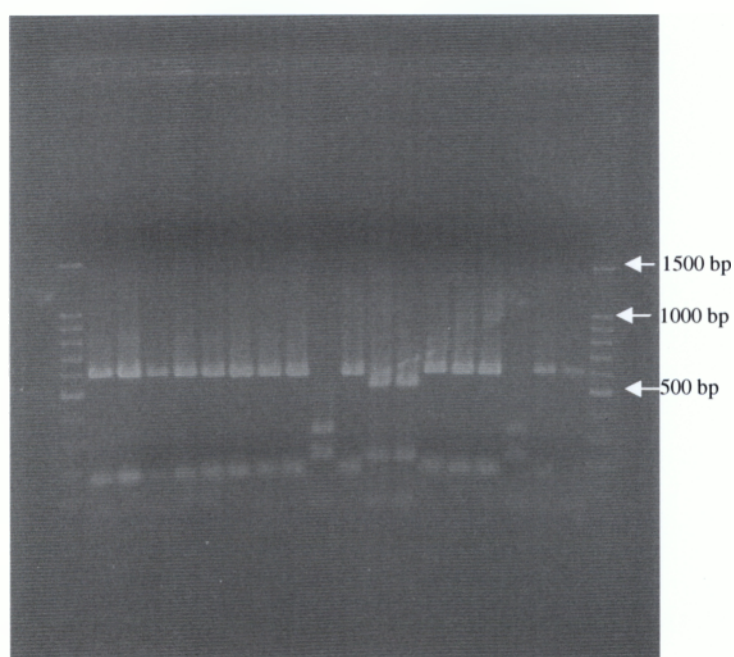
Η πέψη ενισχυμένων τμημάτων των απομονώσεων FM (ενίσχυση μερικού τμήματος του γονιδίου 18S rDNA) με τα ένζυμα περιορισμού *Hinf* I και *Sau3A* I παρουσιάζονται στις ακόλουθες φωτογραφίες:



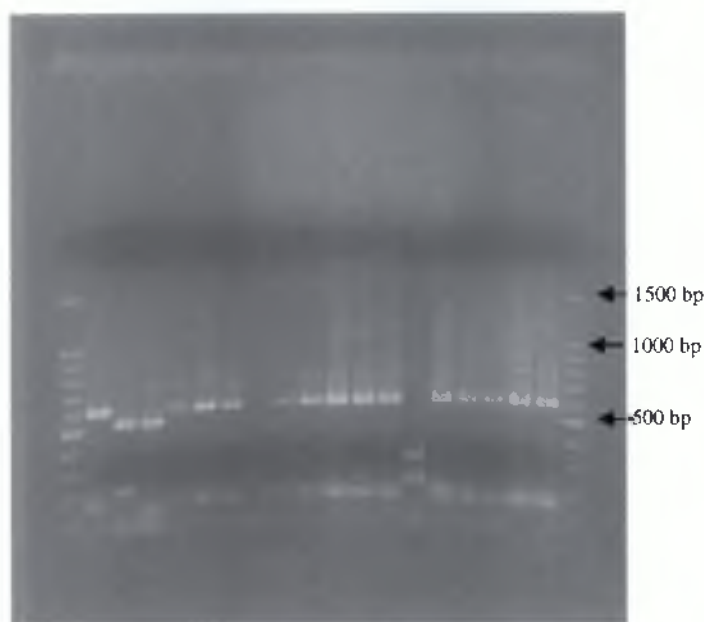
Φωτογραφία 22: Πέψη ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου 18S rDNA των μυκητιακών στελεχών FM-1, -2, -3, -4, -5, -6, -9, -11, -12, -13, -14, -15, -17, -18, -19, -22, -23, -24 (αριστερά προς δεξιά) με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I.



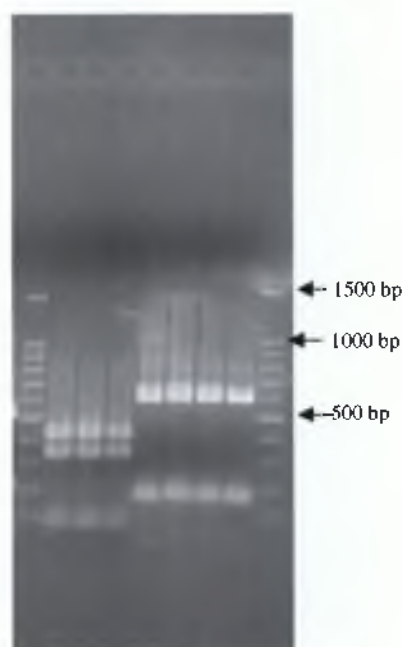
Φωτογραφία 23: Πέψη ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου 18S rDNA των μυκητιακών στελεχών FM-16, -20, -21, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -36, -37, -38, -39 (αριστερά προς δεξιά) με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I.



Φωτογραφία 24: Πέψη ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου 18S rDNA των μυκητιακών στελεχών FM-1, -2, -3, -4, -5, -6, -9, -11, -12, -13, -14, -15, -17, -18, -19, -22, -23, -24 (αριστερά προς δεξιά) με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Sau3A* I.



Φωτογραφία 25: Πέψη ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου 18S rDNA των μυκητιακών στελεχών FM-16, -20, -21, -25, -26, -27, (κενό), -29, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -36, -37, -38, -39 (αριστερά προς δεξιά) με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Sau3A* I.



Φωτογραφία 26: Πέψη ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου 18S rDNA των μυκητιακών στελεχών FM-7, -8, -10 (αριστερά προς δεξιά) με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I (γραμμές 2, 3 και 4), ενώ η πέψη των ενισχυμένων τμημάτων των στελεχών FM-7, -8, -10 και -28 με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Sau3A* I, απεικονίζονται στις γραμμές 5, 6, 7 και 8.

Η πέψη ενισχυμένων τμημάτων (ενίσχυση μερικού τμήματος του γονιδίου 18S rDNA) με τα ένζυμα περιορισμού *Hinf* I και *Sau3A* I των απομονωμένων FM, συντέλεσε στην αποκάλυψη τριών γενετικών ομάδων πολυμορφισμού:

Η πρώτη ομάδα πολυμορφισμού περιλαμβάνει τις απομονώσεις εκείνες οι οποίες σχημάτιζαν δυο τμήματα μεγέθους 420 και 380 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος Α') κατά την πέψη των ενισχυμένων τμημάτων τους με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I, ενώ η πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Sau3A* I οδήγησε στη καταγραφή δυο τμημάτων μεγέθους 520 και 220 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος Ι').

Η δεύτερη ομάδα πολυμορφισμού αποτελείτο από στελέχη που σχημάτιζαν τρία τμήματα μεγέθους 380, 280 και 120 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος Β') κατά την πέψη των ενισχυμένων τμημάτων με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I, ενώ η πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Sau3A* I οδήγησε στη καταγραφή δυο τμημάτων μεγέθους 320 και 220 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος ΙΙ').

Η τρίτη ομάδα πολυμορφισμού αποτελείτο από το συνδυασμό δύο γενοτύπων, ο πρώτος από τους οποίους περιλαμβάνει τρία τμήματα μεγέθους 420, 310 και 70 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος C') κατά την πέψη των ενισχυμένων τμημάτων με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I, ενώ η πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Sau3A* I οδήγησε στη καταγραφή δυο τμημάτων μεγέθους 600 και 180 bp αποτελώντας τον δεύτερο γενότυπο (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος ΙΙΙ').

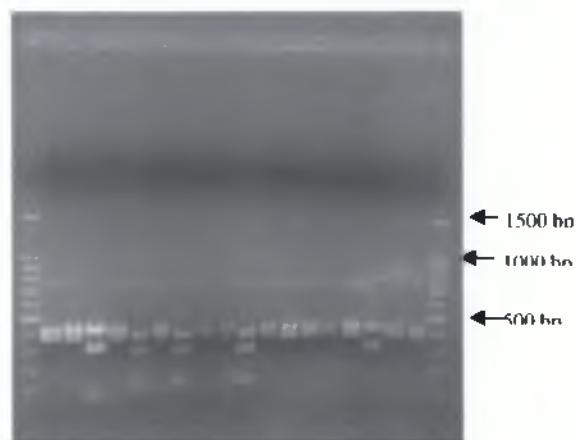
Η κατάταξη των μυκητιακών απομονώσεων FM με βάση τον γενετικό πολυμορφισμό τους παρουσιάζεται στον κάτωθι πίνακα:

Πίνακας 2. Γενετικός πολυμορφισμός των απομονώσεων FM

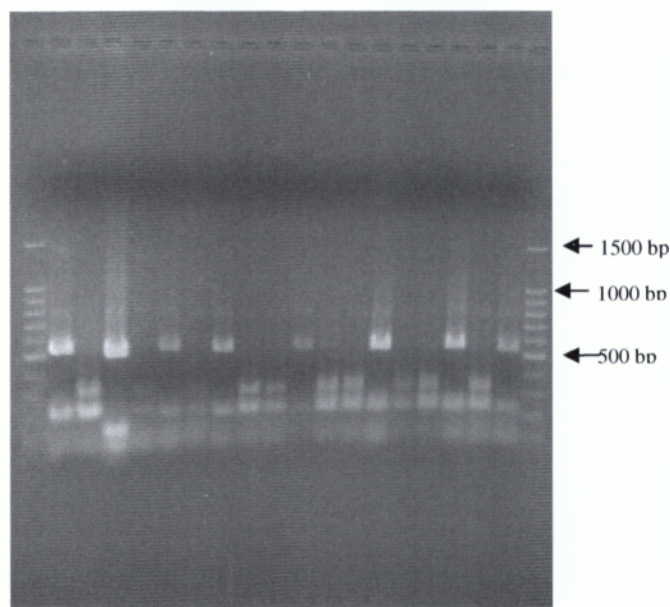
Στελέχη FM	Γενότυπος ' <i>Hinf</i> I' (πέψη με το ένζυμο περιορισμού <i>Hinf</i> I)	Γενότυπος ' <i>Sau3A</i> I' (πέψη με το ένζυμο περιορισμού <i>Sau3A</i> I)	Συνδυασμός γενοτύπων
FM-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -13, -16, -17, -18, -19, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -33, -35, -36, -37, -38, -39	'γενότυπος C' (420, 310 και 70 bp)	'γενότυπος ΙΙΙ' (600 και 180 bp)	(C-ΙΙΙ)
FM-14, -15, -20, -21	'γενότυπος Α' (420 και 380 bp)	'γενότυπος Ι' (520 και 220 bp)	(Α-Ι)
FM-12, -22, -34	'γενότυπος Β' (380, 280 και 120 bp)	'γενότυπος ΙΙ' (320 και 220 bp)	(Β-ΙΙ)

3.3.2 Μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού των στελεχών FS

Η πέψη ενισχυμένων τμημάτων των απομονώσεων FS (ενίσχυση μερικού τμήματος του γονιδίου 18S rDNA) με τα ένζυμα περιορισμού *Hinf* I και *Sau3A* I παρουσιάζονται στις ακόλουθες φωτογραφίες:



Φωτογραφία 27: Πέψη ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου 18S rDNA των μυκητιακών στελεχών FS-3, -26, -27, -28, -31, -33, -34, -35, -36, -37, -40, -41, -42, -43, -44, -57, -58, -59 (αριστερά προς δεξιά) με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I.



Φωτογραφία 28: Πέψη ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου 18S rDNA των μυκητιακών στελεχών FS-3, -26, -27, -28, -31, -33, -34, -35, -36, -37, -40, -41, -42, -43, -44, -57, -58, -59 (αριστερά προς δεξιά) με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Sau3A* I.

Η πέψη ενισχυμένων τμημάτων (ενίσχυση μερικού τμήματος του γονιδίου 18S rDNA) των απομονωμένων FS με τα ένζυμα περιορισμού *Hinf* I και *Sau3A* I, συντέλεσε στην αποκάλυψη πέντε γενετικών ομάδων πολυμορφισμού:

Η πρώτη ομάδα πολυμορφισμού αποτελείτο από συνδυασμό δύο γενότυπων όπου ο ένας σχημάτιζε δυο τμήματα μεγέθους 420 και 380 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος D') κατά την πέψη των ενισχυμένων τμημάτων με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I ενώ η πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Sau3A* I οδήγησε στη καταγραφή δυο τμημάτων μεγέθους 320 και 220 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος IV').

Η δεύτερη ομάδα πολυμορφισμού αποτελείτο από ένα γενότυπο που σχημάτιζε τρία τμήματα μεγέθους 380, 280 και 120 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος E') κατά την πέψη των ενισχυμένων τμημάτων με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I ενώ η πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Sau3A* I οδήγησε στη καταγραφή δυο τμημάτων μεγέθους 520 και 220 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος V').

Στην τρίτη ομάδα, ο ένας γενότυπος αποτελείτο από τρία τμήματα μεγέθους 420, 310 και 70 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος F') που προήλθαν από την πέψη των ενισχυμένων τμημάτων με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I ενώ η πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Sau3A* I οδήγησε στη καταγραφή δυο τμημάτων μεγέθους 520 και 220 bp (γενότυπος 'V').

Ο ένας γενότυπος της τέταρτης ομάδας πολυμορφισμού αποτελείτο από τρία τμήματα μεγέθους 420, 310 και 70 bp (γενότυπος 'F') που προήλθαν μετά από την πέψη των ενισχυμένων τμημάτων με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I ενώ η πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Sau3A* I οδήγησε στη καταγραφή τριών τμημάτων μεγέθους 500, 150 και 220 bp (για λόγους ευκολίας ο γενότυπος αυτός θα ονομάζεται 'γενότυπος VI').

Η πέμπτη ομάδα πολυμορφισμού αποτελείτο από ένα γενότυπο δυο τμημάτων μεγέθους 420 και 380 bp (γενότυπος 'D') που σχηματίστηκαν κατά την πέψη των ενισχυμένων αυτών τμημάτων με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf* I ενώ η πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Sau3A* I οδήγησε στη καταγραφή δυο τμημάτων μεγέθους 520 και 220 bp (γενότυπος 'V').

Η κατάταξη των μυκητιακών απομονώσεων FS με βάση τον γενετικό πολυμορφισμό τους παρουσιάζεται στον κάτωθι πίνακα:

Πίνακας 3. Γενετικός πολυμορφισμός των απομονώσεων FS.

Στελέχη FS	Γενότυπος ' <i>Hinf</i> I' (πέψη με το ένζυμο περιορισμού <i>Hinf</i> I)	Γενότυπος ' <i>Sau</i> 3A I' (πέψη με το ένζυμο περιορισμού <i>Sau</i> 3A I)	Συνδυασμός γενοτύπων
FS-26, -28, -33, -35, -36, -40, -41, -43, -44, -58	'γενότυπος D' (420 και 380 bp)	'γενότυπος IV' (320 και 220 bp)	(D-IV)
FS-3, -42, -59	'γενότυπος D' (420 και 380 bp)	'γενότυπος V' (520 και 220 bp)	(D-V)
FS-31, -34, -37	'γενότυπος E' (380, 280 και 120 bp)	'γενότυπος V' (520 και 220 bp)	(E-V)
FS-57	'γενότυπος F' (420, 310 και 70 bp)	'γενότυπος V' (520 και 220 bp)	(F-V)
FS-27	'γενότυπος F' (420, 310 και 70 bp)	'γενότυπος VI' (500, 150 και 50 bp)	(F-VI)

3.4 Συζήτηση

Βάση των φαινοτυπικών και μικροσκοπικών χαρακτηριστικών, τα στελέχη FM κατατάσσονται σε τέσσερις και τρεις κατηγορίες αντίστοιχα, ενώ στηριζόμενοι σε γενετικά χαρακτηριστικά οι απομονώσεις αυτές εντάσσονται σε τρεις φυλογενετικές ομάδες. Η ύπαρξη επιπλέον φαινοτυπικών κατηγοριών σε σχέση με τον αριθμό των φυλογενετικών ομάδων, μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι μικρές διαφορές σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μπορεί να απεικονίζουν διαφοροποιήσεις που οφείλεται σε περιβαλλοντικές επιδράσεις, χωρίς να υπάρχουν πραγματικές γενετικές διαφορές. Οι φυλογενετικές ομάδες που προέκυψαν από την μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας με την μέθοδο ARDRA κατάταξαν τους απομονωμένους μικρο-οργανισμούς σε κατηγορίες, που αντιστοιχούν σε διακριτά είδη ή γένη. Η θεώρηση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι το 18S rDNA είναι συντηρητικό γονίδιο και η ύπαρξη γενετικού πολυμορφισμού σχετίζεται άμεσα με βαθιές φυλογενετικές, χημειοταξονομικές και μορφολογικές διαφορές. Τέλος επιπλέον φυλογενετική και χημειοταξονομική ανάλυση αυτών θα αποκαλύψει την ακριβή ταξινομική τους θέση.

Συνδυάζοντας φαινοτυπικά, μικροσκοπικά και φυλογενετικά χαρακτηριστικά οι απομονώσεις FM τοποθετούνται σε πέντε διακριτές ταξινομικές ομάδες, οι οποίες παρουσιάζονται ακολούθως:

Στέλεχος	Χαρακτηριστικά στελέχους			
	Φαινοτυπικά	Μικροσκοπικά	Φυλογενετικά	Ταξινόμηση
FM-1, -2, -3, -6, -7, -9, -10, -11, -13, -16, -18, -19, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -32, -33, -35, -36, -37, -38, -39	Ομάδα 1	Ομάδα 1	Ομάδα [C-III]	1η κατηγορία
FM-5	Ομάδα 2	Ομάδα 1	Ομάδα [C-III]	2η κατηγορία
FM-8, -17, -23, -31	Ομάδα 3	Ομάδα 1	Ομάδα [C-III]	3η κατηγορία
FM-12, -22, -34	Ομάδα 4	Ομάδα 2	Ομάδα [B-II]	4η κατηγορία
FM-14, -15, -20, -21	Ομάδα 4	Ομάδα 3	Ομάδα [A-I]	5η κατηγορία

Μία πρώτη προσπάθεια ταξινόμησης όσο το δυνατόν περισσότερων μυκητιακών απομονώσεων FM, στηρίχτηκε στην περιγραφή των φαινοτυπικών και μικροσκοπικών χαρακτηριστικών των στελεχών αυτών.

Τα μέλη της πρώτης μικροσκοπικής ομάδος παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ζυγομυκήτων και κυρίως της τάξεως *Mucorales*, με σφαιρικές διογκώσεις ως σποριαγγειοφόρο, που περιέχουν πληθώρα σπορίων. Η πρόβλεψη αυτή ενισχύεται από την φαινοτυπική περιγραφή όπου τα στελέχη είχαν καφέ χρώμα, χαρακτηριστικό των μελών της τάξεως αυτής.

Τα μέλη της δεύτερης μικροσκοπικής ομάδος παρουσιάζουν χαρακτηριστικά του γένους *Penicillium* (αποτυπώνονται στην Φωτογραφία 6), όπου παρατηρείται μυκήλιο έντονο αναπτυγμένο και διακλαδισμένο (κονιδιοφόροι). Επίσης το πράσινο χρώμα του μυκηλίου ενισχύει την θεώρηση αυτή.

Βάση των φαινοτυπικών και μικροσκοπικών χαρακτηριστικών, τα στελέχη FS κατατάσσονται σε έξι και πέντε κατηγορίες αντίστοιχα, ενώ στηριζόμενοι σε γενετικά χαρακτηριστικά οι απομονώσεις αυτές εντάσσονται σε πέντε φυλογενετικές ομάδες. Η ύπαρξη επιπλέον φαινοτυπικών κατηγοριών σε σχέση με τον αριθμό των φυλογενετικών ομάδων, μπορεί να αποδοθεί σε περιβαλλοντικές επιδράσεις, χωρίς να υπάρχουν πραγματικές γενετικές διαφορές. Οι φυλογενετικές ομάδες που προέκυψαν από την μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας με την μέθοδο ARDRA κατάταξαν τους απομονωμένους μικρο-οργανισμούς σε κατηγορίες, που αντιστοιχούν σε διακριτά είδη ή γένη. Επιπλέον φυλογενετική και χημειοταξονομική ανάλυση αυτών θα αποκαλύψει την ακριβή ταξινομική τους θέση.

Συνδυάζοντας φαινοτυπικά, μικροσκοπικά και φυλογενετικά χαρακτηριστικά οι απομονώσεις FS τοποθετούνται σε έξι διακριτές ταξινομικές ομάδες, οι οποίες παρουσιάζονται ακολούθως:

Στέλεχος	Χαρακτηριστικά στελέχους			
	Φαινοτυπικά	Μικροσκοπικά	Φυλογενετικά	Ταξινόμηση
FS-27	Ομάδα 1	Ομάδα 1	Ομάδα [F-VI]	1η κατηγορία
FS-31	Ομάδα 2	Ομάδα 2	Ομάδα [E-V]	2η κατηγορία
FS-3, -42, -59	Ομάδα 3	Ομάδα 3	Ομάδα [D-V]	3η κατηγορία
FS-26, -28, -33, -35, -36, -40, -41, -43, -44, -58	Ομάδα 4	Ομάδα 4	Ομάδα [D-IV]	4η κατηγορία
FS-57	Ομάδα 5	Ομάδα 5	Ομάδα [F-V]	5η κατηγορία
FS-34, -37	Ομάδα 6	Ομάδα 2	Ομάδα [E-V]	6η κατηγορία

Παρατηρείται ότι η δεύτερη και έκτη ταξινομική ομάδα διαφέρουν μόνο φαινοτυπικά, ενώ οι υπόλοιπες έξι διαφοροποιούνται πλήρως τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά και φυλογενετικά.

Εντούτοις, μία πρώτη προσπάθεια ταξινόμησης όσο το δυνατόν περισσοτέρων μυκητιακών απομονώσεων FS στηρίχτηκε στην περιγραφή των φαινοτυπικών και μικροσκοπικών χαρακτηριστικών των στελεχών αυτών.

Τα μέλη των φαινοτυπικών ομάδων 2, 3 και 6, παρουσιάζουν μακροσκοπικά χαρακτηριστικά του γένους *Fusarium* όπου χρωματίζουν το άγαρ βυσσινί, εντούτοις διαφοροποιούνται φυλογενετικά και μικροσκοπικά μεταξύ τους.

Τα μέλη της τέταρτης φαινοτυπικής ομάδας παρουσιάζουν χαρακτηριστικά του γένους *Penicillium* όπου παρατηρείται μυκήλιο έντονα αναπτυγμένο και διακλαδισμένο. Επίσης το πράσινο χρώμα του μυκηλίου ενισχύει την θεώρηση αυτή.

Επιπλέον ταξινόμηση των μυκητιακών απομονώσεων FS μπορεί να πραγματοποιηθεί με την εύρεση της αλληλουχίας των βάσεων του γονιδίου 18S rDNA ενός μόνου στελέχους από κάθε ταξινομική ομάδα, που θα μας δίδει πολύτιμες πληροφορίες για την συστηματική κατάταξη των μυκητιακών αυτών στελεχών. Επίσης μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας του τμήματος DNA μεταξύ της μικρής και μεγάλης ριβοσωμικής υποομάδας (IGS) ή πραγματοποίηση πειραμάτων υβριδισμού είναι δυνατό να βοηθήσει στην συστηματική κατάταξη των μυκητιακών αυτών στελεχών.

Τέλος, η εύρεση μεγαλύτερης ποικιλομορφίας στην περίπτωση των απομονώσεων FS σε σχέση με τις απομονώσεις FM, μπορεί να αποδοθεί στην αρχική παστερίωση του υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριού *Agaricus*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adhikary R.K., Barua P. and Bordoloi D.N. (1992) 'Influence of microbial pretreatment on degradation of mushroom nutrient substrate', *International Biodeterioration & Biodegradation*, **30** (4), 233-241.
- Alexopoulos C.J. and Mims C.W. (1979) 'Introductory Mycology', (3rd ed.), Wiley, NY.
- Alexopoulos C., Mims C. and Blackwell M. (1996) 'Introductory mycology', Wiley & Sons, New York.
- Bills G.F., Christensen M., Powell M. and Thorn G. (2003) 'Saprophytic soil fungi, In: Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Fungi, G.M. Mueller and G.F. Bills (eds.), University of Chicago Press, Chicago.
- Bowden, G.H.W. (1993) 'Serological Identification', pp 429-462. *In Handbook of New Bacterial Systematics* (M. Goodfellow and A. G. O'Donnell eds), Academic Press, London.
- Chasseur C. (1992) 'Studies on populations dynamic of saprophytic fungi grown on fagus-sylvatica litter, in 2 forests surrounding mons (Belgium)-substratum share between species of successional groups', *Belgian Journal of Botany*, **125** (1), 16-28.
- Chen Z.G. and Song W.B. (2002) 'Characterization and identification of the *Diophrys* species (Protozoa, Ciliophora, Hypotrichida) based on RAPD fingerprinting and ARDRA riboprinting', *European Journal of Protistology*, **38** (4), 383-391.
- Ciapini A., Dei R. and Sacco C. (2002) 'Phenotypic and genotypic characterisation of *Aeromonas* isolates', *Annual Microbiology*, **52** (3), 339-352.
- Chiu S.W., Law S.C., Ching M.L., Cheung K.W. and Chen M.J. (2000) 'Themes for mushroom exploitation in the 21st century: Sustainability, waste management, and conservation', *Journal of General and Applied Microbiology*, **46** (6), 269-282.

- Cowan S.T. and Steel K.L. (1965) 'Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria', Cambridge University Press, London.
- Dees P.M. and Ghiorse W.C. (2001) 'Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA', *FEMS Microbiology Ecology*, **35** (2), 207-216.
- De Ley J. (1970) 'Re-examination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic' *Journal of Bacteriology*, **101**, 738-754.
- DePriest P.T., Ivanova N.V., Fahselt D., et al. (2000) 'Sequences of psychrophilic fungi amplified from glacier-preserved ascolichens' *Canadian Journal of Botany*, **78** (11), 1450-1459.
- Demoulin V. (1974) 'The origin of *Ascomycetes* and *Basidiomycetes*. The case for a red algal ancestry', *Botany Reviews*, **40**, 315-345.
- Drucker D.B. and Tavakkol A. (1985) 'Chromatographic analysis of the volatile end products of Gram-positive bacteria' pp. 301-316. *In* Chemical Methods in Bacterial Systematics (M. Goodfellow and D.E. Minnikin, eds), Academic Press, London.
- Elkady I.A., Elmaraghy S.S.M. and Mostafa E. (1992) 'Contribution of the mesophilic fungi of different spices in Egypt', *Mycopathologia*, **120** (2), 93-101.
- Faure D. and Deschamps A.M. (1991) 'The effect of bacterial inoculation on the initiation of composting of grape pulps', *Bioresource Technology*, **37** (3), 235-238.
- Friedman M. (1997) 'Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review', *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45** (5), 1523-1540.
- Frisvad J.C., Bridge P.D., and Arora D. K. (1998) 'Chemical Fungal Taxonomy', Culinary and Hospitality Industry Publications Services.

- Goodfellow M. and O'Donnell A.G. (1993) 'Roots of bacterial systematics' pp. 3-54. *In* Handbook of New Bacterial Systematics (Goodfellow M. and O'Donnell A.G., eds), Academic Press, London.
- Hawksworth D.L., Kirsop B.E., Jong S.C., Pitt J.I., Samson R.A. and Tubaki K. (2003) 'Filamentous Fungi', Cambridge University Press.
- Hosny M., deBarros J.P.P., Pearson V. et al. (1997) 'Base composition of DNA from glomalean fungi: High amounts of methylated cytosine', *Fungal Genetics and Biology*, **22** (2), 103-111.
- Jang J., Kim B., Lee J., Kim J., Jeong G. and Han H.G. (2002) 'Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis', *FEMS Microbiology Letters*, **212** (1), 29-34.
- Kerstens K. and De Ley J. (1975) 'Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns', *Journal of General Microbiology*, **87**, 333-342.
- Leeftang P., Smit E., Glandorf D.C.M., van Hannen E.J. and Wernars K., (2002) 'Effects of *Pseudomonas putida* WCS358r and its genetically modified phenazine producing derivative on the *Fusarium* population in a field experiment, as determined by 18S rDNA analysis', *Soil Biology & Biochemistry*, **34** (7), 1021-1025.
- Lesova K. and Sturdikova, M. (2000) 'Antifungal metabolites produced by micromycetes', *Chem Listy*, **94** (1), 21-27.
- Lin J-J., Kuo J. and Ma J. (1996) 'A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria', *Nucleic Acids Research*, **24**, 3649-3650.
- Logan N.L. (1994) 'Bacterial Systematics', Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Maheshwari R., Bharadwaj G. and Bhat M.K. (2000) 'Thermophilic fungi: their physiology and enzymes', *Microbiology and Molecular Biology Research*, **64** (3), 461.

Martin G.W. (1960) 'The systematic position of the Myxomycetes', *Mycologia*, **52**, 119-129.

Nagel F.J., Oostra J., Tramper J., et al. (1999) 'Improved model system for solid-substrate fermentation: effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate', *Process Biochemistry*, **35** (1-2), 69-75.

Newsham K.K., Watkinson A.R., West H.M. and Fitter A.H. (1995) 'Symbiotic fungi Determine Plant Community Structure - Changes in A Lichen-Rich Community Induced by Fungicide Application', *Functional Ecology*, **9** (3), 442-447.

Owen R.J. and Pitcher D. (1985) 'Current methods for DNA', pp. 67-94. *In* Chemical Methods in Bacterial Systematics (M. Goodfellow and D. E. Minnikin, eds) Academic Press, London.

Paavanen-Huhtala S., Avikainen H. and Yli-Mattila T. (2000) 'Development of strain-specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control', *European Journal of Plant Pathology*, **106** (2), 187-198.

Ribireau-Gayon P. (2001) 'Handbook of Enology', John Wiley & Sons.

Rossman A.Y., Tuloss R.E., O'Dell T.E. and Thorn R.G. (1997) 'Protocols for an all taxa biodiversity inventory of fungi in a Costa Rican conservation area, Parkway Publishers, Boone, NC.

Schmidt O. (2000) 'Molecular methods for the characterization and identification of the dry rot fungus *Serpula lacrymans*', *Holzforschung*, **54** (3), 221-228.

Segonds C., Paute S. and Chabanon G. (2003) 'Use of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Ralstonia* and *Pandora* species: Interest in determination of the respiratory bacterial flora in patients with cystic fibrosis', *Journal of Clinical Microbiology*, **41** (7), 3415-3418.

Sharma H.S. and Kilpatrick M. (2000) 'Mushroom (*Agaricus bisporus*) compost quality factors for predicting potential yield of fruiting bodies', *Canadian Journal of Microbiology*, **46** (6), 515-519.

Sharma H.S.S., Furlan A. and Lyons G. (1999) 'Comparative assessment of chelated spent mushroom substrates as casing material for the production of *Agaricus bisporus*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, **52** (3), 366-372.

Stahl U. and Tudzynski P. (1992) 'Molecular Biology of Filamentous Fungi: Proceedings of the Embo-Workshop, Berlin, VCH Publishing.

Stahl U., Tudzynski P. and Stahl U. (1992) 'Molecular Biology in Filamentous Fungi', John Wiley & Sons.

Talbot N. (2001) 'Molecular & Cellular Biology of Filamentous Fungi: A Practical Approach' Oxford University Press.

Tavantzis S. M. (2001) 'DsRNA Genetic Elements: Concepts & Applications in Agriculture, Forestry & Medicine.

Thorn R.G. (1997) 'The fungi in soil, In: Modern Soil Microbiology, J.D. van Elsas, J.T. Trevors and E.M.H. Wellington (eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 63-128.

Thorn, R.G., (1999) 'Soil fungi. In: Handbook of Soil Science, M.E. Sumner (ed.), CRC Press.

Urzi C., Brusetti L. and Salamone P. (2001) 'Biodiversity of *Geodermatophilaceae* isolated from altered stones and monuments in the Mediterranean basin', *Environmental Microbiology*, **3** (7), 471-479.

Vaneechoutte M., Dijkshoorn L., Tjernberg I., Elaichouni A., Devos P., Claeys G. and Verschraegen G. (1995) 'Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified Ribosomal DNA restriction analysis', *Journal of Clinical Microbiology*, **33** (1), 11-15.

Vaneechoutte, M. (1996) 'DNA fingerprinting techniques for microorganisms-a proposal for classification and nomenclature', *Molecular Biotechnology*, **6**, 115-142.

Vilcinskas A. and Gotz P. (1999) 'Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system', *Advances in Parasitology*, **43**, 267-313.

Whittaker R.H. (1969) 'New Concepts of Kingdoms of Organisms', *Science*, **163**, 150-160.

Ζερβακης Γ.Ι. (1998) 'Εισαγωγή στη Μυκητολογία και στοιχεία καλλιέργειας εδώδιμων μανιταριών'.

Σκούρας Ζ. (1993) 'Μόρια και Γονίδια', *Art of Text*, Θεσσαλονίκη.

Χατζόπουλος Η. (2001) 'Βιοτεχνολογία Φυτών', *Έμβρυο*, Αθήνα.

www.ncbi.nlm.nih.gov