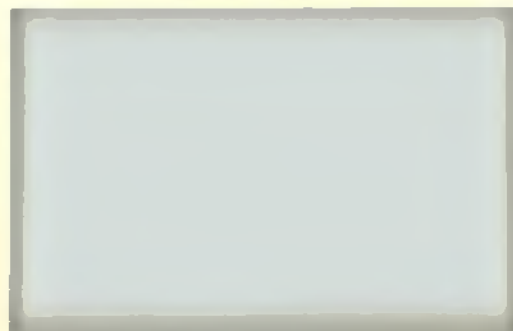


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΙΑ  
ΕΔΩΔΙΜΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΕΙΔΟΥΣ  
*Pleurotus eryngii* (De Candolle: Fries) Quélet

**Μαρία Η. Μπέση**

Πτυχιακή Εργασία



Καλαμάτα, 2005



**Εικόνα 1:** Βασιδιοκάρπιο του είδους *Pleurotus eryngii*, που αναπτύσσεται στη βάση του φυτού *Eryngium*, στο οποίο οφείλει και την ονομασία του.

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Τ Ε Ι ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΤΜΗΜΑ  
ΕΚΔΟΣΕΩΝ & ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΙΑ  
ΕΔΩΔΙΜΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΕΙΔΟΥΣ  
*Pleurotus eryngii* (De Candolle: Fries) Quélet

**Μαρία Η. Μπέση**

Πτυχιακή Εργασία

Επιβλέποντες Καθηγητές: **Δρ. Γεώργιος Ι. Ζερβάκης**  
**Αναστάσιος Ηλιόπουλος**

Καλαμάτα, 2005

## Αντί Προλόγου

Φθάνοντας στο τέλος της πτυχιακής μου εργασίας, νιώθω την υποχρέωση και συγχρόνως την ανάγκη να ευχαριστήσω τους ανθρώπους, οι οποίοι με βοήθησαν κατά το διάστημα της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Αρχικά θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Οικογένειά μου, η οποία με στηρίζει με κάθε δυνατό τρόπο σε κάθε μου επιλογή και είναι δίπλα μου σε κάθε δυσκολία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επιβλέποντά μου Δρ. Γεώργιο Ι. Ζερβάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεξαγάγω την εργασία αυτή στο Ινστιτούτο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας της Καλαμάτας, διαθέτοντάς μου τους εργαστηριακούς χώρους και τον εξοπλισμό του Ινστιτούτου. Του οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την απεριόριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε, όπως και για τη διακριτική και ταυτόχρονα ουσιαστική επίβλεψή του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου Ηλιόπουλο Αναστάσιο για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του.

Οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στη Δρα Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την πραγματικά ανεκτίμητη βοήθειά της, αλλά κυρίως για το ειλικρινές της ενδιαφέρον.

Τους Δρ. Σπυρίδωνα Ντούγια και Δρ. Καβρουλάκη Νεκτάριο για όλες τις φορές που ήταν δίπλα μου όταν χρειάστηκα τη βοήθειά τους (και ήταν πολλές!).

Τη Μένια, τον Τάκη, τη Νεκταρία και την Ηλιάνα για τη βοήθειά τους κατά την εξοικείωσή μου με τον εργαστηριακό χώρο και εξοπλισμό, αλλά και για την ηθική τους στήριξη όλον αυτόν τον καιρό.

Σας ευχαριστώ όλους!

Μαρία Η. Μπέση

## Συντομογραφίες

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
bp	base pairs
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
CM	Complete Medium
dATPs	deoxyadenosine triphosphates
ddH <sub>2</sub> O	διπλά απεσταγμένο νερό
ddNTPs	dideoxyribonucleoside triphosphates
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxyribonucleoside triphosphates
d.w.	dry weight
Na <sub>2</sub> EDTA	Disodium Ethylene diamine tetraacetic acid
EtBr	Ethidium Bromide (3,8-diamino-6-ethyl-phenylphenathridium bromide)
f.w.	fresh weight
IGS	Intergenic Spacer
IPTG	Isopropyl-β-D-galactoside
ITS	Internal Transcribed Spacer
LB	Luria-Bertani
LSU	Large (Ribosomal) Subunit
NaAc	Sodium Acetate
O.D.	Optical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
rDNA	ribosomal DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNase A	Ribonuclease A
rRNA	ribosomal RNA
rpm	revolutions per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
s.l.	<i>sensu lato</i> (με την ευρεία έννοια)
s.s.	<i>sensu stricto</i> (με τη στενή έννοια)
SSU	Small (Ribosomal) Subunit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ.....	I
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	II
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	III
<b>A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>1</b>
ABSTRACT .....	2
<b>B. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>3</b>
<b>1. ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΙΑ.....</b>	<b>3</b>
1.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	3
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ .....	4
1.3 ΦΥΛΟΓΕΝΕΙΑ .....	4
1.4 ΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ .....	5
1.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΙΑΣ .....	7
1.5.1 Μορφολογία.....	7
1.5.2 Θρέψη, φυσιολογία και σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος.....	8
1.5.3 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών .....	9
1.5.4 Διασταυρώσεις.....	9
1.5.5 Μοριακές τεχνικές.....	10
1.5.5.1 Σύγκριση ακολουθιών DNA.....	10
1.5.5.2 Οι πολυγονιδιακές οικογένειες ως μοριακοί δείκτες .....	11
1.5.5.3 Σύγκριση των ακολουθιών του rDNA.....	14
1.5.5.4 Η περιοχή ITS ως μοριακός δείκτης .....	14
1.5.5.5 Άλλες μοριακές μέθοδοι για ταξινομική και φυλογένεια.....	15
1.6 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΙΑΣ.....	15
1.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης .....	15
1.6.2 Εύρεση ακολουθίας βάσεων.....	16
<b>2. ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΔΕΝΤΡΑ.....</b>	<b>18</b>

2.1 ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ .....	18
2.1.1 Το πρότυπο Jukes-Cantor (JC) .....	19
2.1.2 Το πρότυπο Kimura's 2 Parameter model (K2P) .....	19
2.1.3 Το πρότυπο Felsenstein (1981) .....	19
2.1.4 Το πρότυπο Hasegawa, Kishino και Yano (1985) ή HKY85 .....	20
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ .....	20
2.2.1 Η μέθοδος της «Μέγιστης Οικονομικότητας» (Maximum Parsimony) .....	21
2.2.2 Η μέθοδος του «Πιθανότερου Ενδεχόμενου» (Maximum Likelihood) .....	22
2.3 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΔΕΝΤΡΑ .....	23
2.3.1 Γενικά .....	23
2.3.2 Είδη δέντρων .....	23
2.3.3 «Ριζωμένα» (rooted) και «μη ριζωμένα» (unrooted) δέντρα .....	24
2.3.4 Κλάδοι και ταξινόμηση .....	25
<b>3. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>Pleurotus</i>.....</b>	<b>26</b>
3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΒΑΣΙΔΙΟΜΥΚΗΤΩΝ .....	26
3.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΟΜΟΒΑΣΙΔΙΟΜΥΚΗΤΩΝ .....	29
3.3 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Pleurotaceae .....	30
1.3 ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>Pleurotus</i> .....	31
3.4 ΤΟ ΕΙΔΟΣ <i>Pleurotus eryngii</i> .....	34
3.4.1 Γεωγραφική κατανομή .....	34
3.4.2 Ξενιστές .....	35
3.4.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά .....	35
<b>Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>39</b>
1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ .....	39
2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	39
3. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
3.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA του <i>Pleurotus eryngii</i> από καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο.....	42
3.2 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από αποξηραμένη καρποφορία του <i>Pleurotus eryngii</i> .....	43
3.3 Ενίσχυση της περιοχής ITS του γονιδιώματος με τη χρήση της αλσιδωτής αντίδρασης της πολομεράσης.....	43
3.5 Ανάλυση ενισχυμένου DNA σε πηκτική αгарόζης.....	44
3.6 Καθαρισμός ενισχυμένου DNA.....	45

3.7 Ενσωμάτωση (ligation) ενισχυμένου τμήματος χρωμοσωμικού DNA σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης.....	45
3.8 Παρασκευή ικανών κυττάρων (Competent cells) <i>Escherichia coli</i> DH5a .....	45
3.9 Μετασχηματισμός (Transformation) ικανών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> DH5a.....	46
3.10 Επιλογή των κατάλληλων βακτηριακών αποικιών.....	46
3.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού.....	47
3.12 Έλεγχος ένθετου τμήματος DNA .....	47
3.13 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA.....	48
3.14 Εύρεση ακολουθίας νουκλεοτιδίων .....	49
3.15 Ευθυγράμμιση, εύρεση γενετικών αποστάσεων και φυλογενετική ανάλυση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών .....	49
<b>Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>51</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>60</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</b>	<b>67</b>
Πίνακας 2: Γεωγραφική προέλευση και ξενιστές των στελεχών που περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία.....	67
Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας θρεπτικών μέσων και ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	68
Πίνακας 4: Ευθυγράμμιση ακολουθιών.....	69
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ .....</b>	<b>75</b>
Σχήμα 3: Χάρτης του pGEM-T Easy Vector [Promega] και σημεία αναφοράς της ακολουθίας του.....	75
Φωτογραφίες βασιδιοκάρπιων του μύκητα <i>Pleurotus eryngii</i> .....	76
Φωτογραφίες ξενιστών που περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία .....	77



## Α. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μύκητες του είδους *Pleurotus eryngii* (Basidiomycota, Agaricales) απαντώνται στο βόρειο ημισφαίριο και η παρουσία τους σχετίζεται με την ανάπτυξη φυτών, που ανήκουν στις οικογένειες Umbelliferae και Compositae.

Αν και πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί, προκειμένου να διευκρινιστούν οι γενετικές σχέσεις μεταξύ των μελών του συμπλόκου είδους *Pleurotus eryngii*, η συστηματική του μύκητα παραμένει ασαφής.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η γενετική ποικιλομορφία ανάμεσα σε ακολουθίες DNA (περίπου 640 ζευγών βάσεων) των μεταγραφόμενων μεσοδιαστημάτων (ITS 1 και 2) και του 5.8S rDNA γονιδίου, προερχόμενες από 33 απομονώσεις που ανήκουν στο *Pleurotus eryngii* s.l., από διαφορετικούς ξενιστές και τοποθεσίες της Ευρώπης και της Ασίας.

Η φυλογενετική ανάλυση σε σύνολα δεδομένων των προαναφερθέντων ακολουθιών, χρησιμοποιώντας τις μεθόδους του «Πιθανότερου Ενδεχόμενου» (Maximum Likelihood) και της «Μέγιστης Οικονομικότητας» (Maximum Parsimony) αποκάλυψε το διαχωρισμό των στελεχών του *P. eryngii* s.l. σε τρεις κύριες ομάδες, οι οποίες αποτελούνται από το είδος *P. eryngii* s.s. (που περιλαμβάνει τους μύκητες που απομονώθηκαν από τα φυτά-ξενιστές *Eryngium*, *Ferula*, *Thapsia*, *Elaeoselinum*, *Laserpitium* και *Ferulago*), το *P. nebrodensis* (μύκητες οι οποίοι σχετίζονται με το φυτό *Cachrys ferulacea*), και απομονώσεις *Pleurotus*, οι οποίες συνδέονται με το φυτό *Ferula sinkiangensis* από την Ασία. Ως εκ τούτου, τα μοριακά δεδομένα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν την ευδιάκριτη φυλογενετική θέση του *P. nebrodensis*, ενώ μύκητες *Pleurotus* που συνδέονται με τα φυτά των γενών *Eryngium*, *Ferula*, *Thapsia* και *Elaeoselinum* αποτελούν χαρακτηριστικούς εκπροσώπους του *P. eryngii*.

## ABSTRACT

*Pleurotus eryngii* (Basidiomycota, Agaricales) is a fungus of the Northern hemisphere that lives in association with different species of the plant families Umbelliferae and Compositae.

Although numerous studies have been conducted in order to elucidate the genetic relationships among members of the *Pleurotus eryngii* species-complex, the fungus' systematics remains unclear.

In the present study, the genetic variability within approximately 640 bp of DNA sequence from the ribosomal internal transcribed spacers (ITS 1 and ITS 2) and the 5.8S rDNA gene was examined, in 33 isolates belonging to *Pleurotus eryngii* s.l., from diverse sources and locations in Europe and Asia.

Phylogenetic analyses from ITS and 5.8S sequence data sets, using the Maximum Likelihood and the Maximum Parsimony methods, revealed the separation of the *P. eryngii* s.l. strains into three major clusters composed of *P. eryngii* s.s. (comprising fungi isolated from *Eryngium*, *Ferula*, *Thapsia*, *Elaeoselinum*, *Laserpitium* and *Ferulago* host plants), *P. nebrodensis* (fungi associated with *Cachrys ferulacea*), and *Pleurotus* isolates associated with *Ferula sinkiangensis* from Asia. Hence, molecular evidence is hereby provided to support the distinct phylogenetic position of *P. nebrodensis*, whereas *Pleurotus* fungi associated with *Eryngium*, *Ferula*, *Thapsia* and *Elaeoselinum* form typical representatives of the *P. eryngii*.

## **B. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1. ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΙΑ**

#### **1.1 Γενικά**

Οι μύκητες επηρεάζουν σημαντικά διαδικασίες, που λαμβάνουν χώρα τόσο κάτω όσο και πάνω από το έδαφος, συμπεριλαμβανομένης της αποσύνθεσης, της παθογένειας των φυτών, της καταστολής των ασθενειών και της απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων.

Εκτός από τον αναμφισβήτητο ρόλο τους στη λειτουργία του οικοσυστήματος, λίγα είναι γνωστά για την πληθυσμιακή δυναμική των μυκήτων, τη δομή της κοινότητάς τους και τη βιοποικιλότητά τους.

Δυσκολίες στην απομόνωση, την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό του πλήθους των ειδών των μυκήτων, ιδίως σε σύνθετα περιβάλλοντα, παρεμπόδισαν τις προσπάθειες για την πλήρωση αυτού του πληροφοριακού κενού (Kowalchuk, 1999). Ωστόσο η ορθή αναγνώριση των μυκήτων έχει μεγάλη πρακτική σημασία για την παθολογία των φυτών και των ζώων, τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές και τις περιβαλλοντικές μελέτες (Carlile and Watkinson, 1994).

Πολλές από τις πρόσφατες προόδους στην περιγραφή των μυκήτων σε εδαφικά οικοσυστήματα προήλθαν, άλλωστε, από την ανάγκη να εντοπισθούν και να μελετηθούν μοριακά οργανισμοί με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον, όπως παθογόνα γεωργικών καλλιεργειών και ωφέλιμοι οργανισμοί. Τέτοιες μελέτες δεν εμπλουτίζουν απλά το «οπλοστάσιο» των μοριακών τεχνικών, αλλά ακόμα διευρύνουν τη μοριακή βάση δεδομένων για μελλοντικές μελέτες (Kowalchuk, 1999).

## 1.2 Ταξινομική

Ταξινομική καλείται ο κλάδος της βιολογίας, ο οποίος ασχολείται με τη θεωρία και την πρακτική της ταξινόμησης. Η κλασική ταξινομική ασχολείται με τη μορφολογία (συμπεριλαμβανομένης της κυτταρολογίας, της βιοχημείας και της ηθολογίας) και μπορεί να περιλαμβάνει την αξιολόγηση φαινοτυπικών χαρακτήρων με βάση κάποιο σχέδιο σχετικής ταξινομικής σπουδαιότητας ή αξίας. Η αριθμητική ταξινομική δεν ασχολείται με τα παραπάνω, αλλά περιλαμβάνει την αυτοματοποιημένη ανάλυση των δεδομένων, που λαμβάνονται από την παρατήρηση εάν οι οργανισμοί, οι οποίοι συγκρίνονται, έχουν ή όχι κάποιον από τους χαρακτήρες, που περιλαμβάνονται στη σύγκριση. Οι χαρακτήρες αυτοί είναι είτε παρόντες είτε απόντες. Τα στοιχεία τείνουν να τακτοποιηθούν σε σύνολα ή φαινετικές ομάδες, οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να οργανωθούν σε ένα δενδρόγραμμα. Οι σχέσεις μεταξύ των οργανισμών, που μπορούν να αξιολογηθούν με αυτόν τον τρόπο, καλούνται φαινετικές, αν καθορίζονται από τη γενική μορφολογική ομοιότητα μεταξύ των οργανισμών ή κλαδιστικές, αν εξαρτώνται από την ομοιότητα της καταγωγής (Abercrombie *et al.*, 1990).

## 1.3 Φυλογένεια

Η φυλογένεια προσπαθεί να αποκαλύψει την εξελικτική πορεία και την ιστορία των ειδών ή των υψηλότερων ταξινομικών βαθμίδων των οργανισμών. Οι ζωντανοί οργανισμοί συνδέονται με σχέσεις προγόνου – απογόνου. Η φυλογένεια προσδιορίζει τις σχέσεις μεταξύ όλων των ομάδων των οργανισμών, όπως αυτές γίνονται κατανοητές από τις σχέσεις προγόνων – απογόνων.

Στο παρελθόν, οι ταξινομοί ομαδοποίησαν τους οργανισμούς, με βάση τους φαινοτυπικούς τους χαρακτήρες. Σήμερα, οι ακολουθίες του DNA και των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα για την εύρεση της φυλογένειας των οργανισμών. Ωστόσο, μερικές φορές, τα φαινοτυπικά και τα γονοτυπικά στοιχεία τείνουν να πουν την ίδια ιστορία, υπό μια ευρύτερη έννοια (Terefework, 2002).

Σύμφωνα με τον Olsen (2001) τα γονίδια (και τα προϊόντα τους) είναι αρχεία της ίδιας τους της ιστορίας και –έμμεσα- αποτελούν αρχεία της ιστορίας των οργανισμών που τα κατέχουν. Συνεπώς, η μοριακή φυλογένεια μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των σχέσεων μεταξύ των οργανισμών, εάν γίνουν αντιληπτές τόσο οι σχέσεις μεταξύ των γονιδίων όσο και οι σχέσεις των οργανισμών προς τα γονίδια, τα οποία φέρουν (Olsen, 2001).

Η φυλογένεια των μικροοργανισμών εξαρτάται, κατά ένα μεγάλο μέρος, από τις πληροφορίες της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων του DNA, εφόσον η σύνθετη μορφολογία, η συμπεριφορά και τα απολιθώματα δεν είναι διαθέσιμα στην περίπτωση τους.

Ωστόσο, τα φυλογενετικά δέντρα των μικροοργανισμών δεν καταλήγουν απαραίτητα σε διακλαδιζόμενους κλάδους, αλλά συχνά αναπαρίστανται ακριβέστερα από ένα δίκτυο. Αυτό συμβαίνει κυρίως επειδή η εκτενής ανταλλαγή γενετικού υλικού, μεταξύ των ειδών, έχει επηρεάσει την εξέλιξή τους. Η επίλυση αυτού του προβλήματος δεν είναι εύκολος στόχος, όμως όσο περισσότερα στοιχεία συλλέγονται τόσο πιο αξιόπιστα δέντρα και με περισσότερη στατιστική σημασία θα είναι σε θέση να σχεδιαστούν.

Η μοριακή φυλογένεια επιδιώκει να καθορίσει την εξελικτική ιστορία των οργανισμών και προσπαθεί να αποκρυπτογραφήσει το καθολικό «Δέντρο της ζωής», βασισμένο σε μια ιεραρχική ταξινόμηση των οργανισμών, με γνώμονα την πρώτη προγονική μορφή. Στο πλαίσιο του στόχου αυτού γεννιέται ένας νέος τομέας, η **Φυλοπληροφορική** (Phyloinformatics) (Pennisi, 2001).

## 1.4 Ειδογένεση

Ένας από τους μεγαλύτερους γρίφους στη βιολογία είναι με ποιον τρόπο μία συνεχής διαδικασία εξελικτικής αλλαγής μπορεί να παραγάγει τις ιδιαίτερες οντότητες, τις οποίες αναγνωρίζουμε ως διαφορετικά είδη.

Στην **αλλοπατρική ειδογένεση** (allopatric speciation), η αναπαραγωγική απομόνωση προκαλείται από τη γεωγραφική απομόνωση των πληθυσμών, ίσως από φυσικά εμπόδια όπως τα βουνά και τα ποτάμια, έτσι ώστε να αποτρέπεται η ροή γονιδίων (gene flow)<sup>1</sup> μεταξύ τους και να εμφανίζεται γενετική διαφοροποίηση. Συγκεκριμένες μεταλλάξεις γονιδίων μπορούν να επιτρέψουν σε αυτά τα αρχικά είδη να προσαρμοστούν στο νέο τους περιβάλλον, εντούτοις, δεν υφίσταται φυσική επιλογή για μεταλλάξεις που οδηγούν στην αναπαραγωγική

<sup>1</sup> Ροή γονιδίων (gene flow): Η ενσωμάτωση γονιδίων μέσα στη γονιδιακή απόθεμα (gene pool) ενός πληθυσμού από έναν ή περισσότερους άλλους πληθυσμούς (Futuyma, 1986).

απομόνωση, η οποία προκύπτει, αντίθετα, ως συνέπεια της γενετικής απόκλισης σε πολλούς διαφορετικούς γενετικούς τόπους (loci). Αυτή η άποψη της ειδογένεσης είναι επομένως βασισμένη στην παρεμπόδιση της ροής γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών και όχι στη δράση της φυσικής επιλογής.

Η βασική απόδειξη του αλλοπατρικού προτύπου είναι ότι -πέρα από μια γεωγραφική ακτίνα- πολλά είδη παρουσιάζουν μεγάλη γενετική (και φαινοτυπική) ποικιλομορφία, η οποία παρέχει την πρώτη ύλη για τη ειδογένεση. Μερικές φορές αυτή η ποικιλομορφία είναι χωροθετημένη αρκετά ομοιόμορφα στο χώρο, έτσι ώστε οι συχνότητες των αλληλόμορφων γονιδίων να είναι υψηλές σε μια τοποθεσία και έπειτα να φθίνουν βαθμιαία με την αύξηση της απόστασης από την τοποθεσία αυτή. Αυτό είναι γνωστό ως **γενετική κλίση** (cline).

Μια σημαντική μορφή αλλοπατρικής ειδογένεσης περιλαμβάνει την **περιφερειακή απομόνωση** (peripheral isolation). Στην περίπτωση αυτή, τα υποσύνολα πληθυσμού, που βρίσκονται στα όρια της περιοχής, η οποία καταλαμβάνεται από τον κύριο πληθυσμό, μπορούν να καταστούν απομονωμένα και να αρχίσουν να αποκλίνουν γενετικά έως ότου εμφανιστεί αναπαραγωγική απομόνωση. Αυτή η διαδικασία διευκολύνεται από το γεγονός ότι οι περιφερειακοί πληθυσμοί είναι πιθανό να είναι μικροί έτσι ώστε η **τυχαία γενετική απόκλιση** (genetic drift)<sup>2</sup>, καθώς επίσης και οι επιδράσεις της «**αρχής των ιδρυτών**»<sup>3</sup> ("founder effect") και των ενδοδιασταυρώσεων, να ενισχύσουν τη νέα γενετική τους ταυτότητα.

Είναι επίσης δυνατό η ειδογένεση να εμφανίζεται σε γεωγραφικά παρακείμενο, παρά απομονωμένο, πληθυσμό. Αυτό είναι γνωστό ως **παραπατρική ειδογένεση** (parapatric speciation). Τα στοιχεία, που αναφέρονται υπέρ αυτού του τρόπου ειδογένεσης, είναι η ύπαρξη **υβριδικών ζωνών** (hybrid zones) -περιοχών όπου «τα είδη» δεν παρουσιάζουν πλήρη αναπαραγωγική απομόνωση και μπορούν να διασταυρωθούν μεταξύ τους (αν και θα μπορούσαν επίσης να προκύψουν από αλλοπατρικά είδη, τα οποία ανακτούν επαφή μεταξύ τους).

Ένας «παράδοξος» τύπος ειδογένεσης είναι η **συμπατρική ειδογένεση**

<sup>2</sup> Τυχαία γενετική απόκλιση (genetic drift): Τυχαίες αλλαγές στις συχνότητες δύο ή περισσότερων αλληλομόρφων ή γονοτύπων, μέσα σε έναν πληθυσμό (Futuyma, 1986).

<sup>3</sup> «Αρχή των ιδρυτών» ("founder effect"): Οι ιδρυτές (founders) μιας νέας αποικίας φέρουν μόνο ένα απόσπασμα της συνολικής γενετικής ποικιλομορφίας του αρχικού πληθυσμού (Futuyma, 1986) και, επομένως, η επίδραση της τυχαίας γενετικής απόκλισης (genetic drift) και της φυσικής επιλογής μπορεί να αλλάξει ριζικά τη γενετική τους δομή, οδηγώντας ενίοτε στην ειδογένεση (Page and Holmes, 1990).

(sympatric speciation). Σε αυτήν την περίπτωση η αναπαραγωγική απομόνωση πραγματοποιείται μέσα σε έναν ενιαίο πληθυσμό, χωρίς τη βοήθεια του γεωγραφικού διαχωρισμού. Η δύσκολα ερμηνεύσιμη πτυχή αυτής της θεωρίας είναι το πώς εμφανίζεται η γενετική διαφοροποίηση μέσα σε έναν πληθυσμό οργανισμών, που ανταλλάσσουν συνεχώς γονίδια. Αυτό απαιτεί, γενικά, ομάδες ατόμων μέσα στον πληθυσμό, που να χρησιμοποιούν διαφορετικούς φυσικούς πόρους και οι οποίες να μπορούν έπειτα να κρατηθούν μακριά από ανταλλαγές γονιδίων, λόγω φυσικής επιλογής.

Αν και μερικά πολύ συγγενή είδη ζουν μια συγκεκριμένη περίοδο συμπατρικά, αυτό δε σημαίνει ότι εξελίχθηκαν κατ' αυτόν τον τρόπο. Για να αποδειχθεί η ειδογένεση χωρίς γεωγραφική απομόνωση είναι απαραίτητο να υπάρχει ένα ιστορικό επαφής μεταξύ αυτών των ειδών. Αυτό ήταν δύσκολο να γίνει στο παρελθόν, αλλά σήμερα μπορεί να επιτευχθεί μέσω της μοριακής φυλογένειας.

Σε γενετικό επίπεδο, η συμπατρική ειδογένεση συχνά υποτίθεται ότι καθοδηγείται από έναν μικρό αριθμό γονιδίων, που αποκαλούνται ειδογενετικά γονίδια (speciation genes). Σε μερικές περιπτώσεις, φαίνεται ότι πολλά γονίδια παίζουν ρόλο στην αναπαραγωγική απομόνωση. Σε άλλες καταστάσεις εντούτοις, μικρότεροι αριθμοί γονιδίων είναι σε θέση να εκκινήσουν τη διαδικασία της ειδογένεσης. Μία από τις πρώτες και περισσότερο σημαντικές παρατηρήσεις σε αυτό το πλαίσιο είναι ότι τα περισσότερα ειδογενετικά γονίδια πιθανώς βρίσκονται στα φυλετικά χρωμοσώματα. Υπάρχει ένας καλός λόγος για αυτό: τα γονίδια που εδράζονται στα φυλετικά χρωμοσώματα (δηλαδή τα ΧΥ ή WZ) δεν έχουν αλληλόμορφους -όταν πρόκειται για ετερογαμετικούς οργανισμούς- και κατά συνέπεια οι μεταλλάξεις σε αυτά εκφράζονται. Αυτό σημαίνει ότι η εξέλιξη και η αναπαραγωγική απομόνωση είναι δυνατό να προαχθούν γρηγορότερα (Page and Holmes, 1998).

## 1.5 Μέθοδοι ταξινομικής και φυλογένειας

### 1.5.1 Μορφολογία

Οι καρποφορίες των περισσότερων Βασιδιομυκήτων και πολλών Ασκομυκήτων είναι μεγάλες σε μέγεθος και μπορούν εύκολα να αναγνωρισθούν με γυμνό οφθαλμό. Συνεπώς, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, που

διακρίνονται με γυμνό οφθαλμό ή με έναν απλό μεγεθυντικό φακό, έχουν μεγάλη σημασία για την ταυτοποίηση των μυκήτων. Ωστόσο, οι υπόλοιποι μύκητες είναι -στην πλειοψηφία τους- μικροσκοπικοί και η μελέτη της μορφολογίας τους απαιτεί τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου.

Πρόσφατα, στην ταξινομική έχει γίνει χρήση της μορφολογίας και της επιφάνειας των σπορίων των μυκήτων, χαρακτηριστικά, των οποίων όμως η ακριβής παρατήρηση απαιτεί συχνά τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Υπάρχει μία αφθονία μορφολογικών χαρακτηριστικών, που συνδέεται με την εγγενή παραγωγή σπορίων στους μύκητες, εξ' ου η παραδοσιακή προσέγγιση να δίνεται προτεραιότητα, στη μορφολογία των εγγενών σπορίων, για την ταξινόμηση των μυκήτων. Όπου η εγγενής παραγωγή σπορίων είναι απόουσα, υιοθετούνται μορφολογικά χαρακτηριστικά, που συνδέονται με την παραγωγή αγενών σπορίων. Αν οι μύκητες δεν παράγουν σπόρια, τότε υπάρχει σημαντική έλλειψη μορφολογικών πληροφοριών, για την ταξινόμηση. Στην περίπτωση αυτή γίνεται κάποια χρήση της μορφής των σκληρώτιων, ειδικά για τους νηματοειδείς μύκητες (Carlile and Watkinson, 1994).

### 1.5.2 Θρέψη, φυσιολογία και σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος

Τα σημαντικότερα κριτήρια της κατηγορίας αυτής είναι το αν η αύξηση του μύκητα ευνοείται ή περιορίζεται υπό αερόβιες ή μη συνθήκες, αν τα νιτρικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή азώτου, ποια σάκχαρα, λιπαρές ουσίες και γλυκοσίδια προτιμά στο μεταβολισμό του, καθώς και η ανθεκτικότητα ή ευαισθησία σε ένα φάσμα αντιμυκητιακών ουσιών.

Εντούτοις, τα κριτήρια θρέψης και φυσιολογίας, για την ταξινόμηση των μυκήτων, χρησιμοποιούνται σε περιορισμένη κλίμακα.

Τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων έχουν σύνθετη δομή και οι υψηλότερες ταξινομικές βαθμίδες χαρακτηρίζονται με βάση τις διαφορές στη σύνθεσή τους σε πολυσακχαρίτες. Τα τοιχώματα των Ωομυκήτων, παραδείγματος χάρη, περιέχουν κυτταρίνη. Ο αντίστοιχος πολυσακχαρίτης στους περισσότερους άλλους μύκητες είναι η χιτίνη, και η ποσότητα της τελευταίας έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα χρήσιμο χαρακτηριστικό γνώρισμα, στην ταξινόμηση των ζυμών. Τα τοιχώματα όλων των ζυμών, που έχουν υποβληθεί σε υδρόλυση, παράγουν ανάλογα ποσά γλυκόζης και μαννόζης, αλλά τα είδη διαφέρουν μεταξύ τους, λόγω της παρουσίας ή της απουσίας μικρότερων ποσοτήτων άλλων



πολυσακχαριτών, όπως η φουκόζη, η γαλακτόζη, η ραμνόζη και η ξυλόζη. Αυτό αποτελεί ένα ακόμη χαρακτηριστικό γνώρισμα, που έχει χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση (Carlile and Watkinson, 1994).

### 1.5.3 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών

Η μορφή των ζωνώσεων, που προκύπτουν, όταν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ή μεμονωμένα ένζυμα υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση, είναι επίσης χρήσιμη στον καθορισμό των ειδών και των σχέσεων μέσα στα γένη, μετά από ανάλυση και σχεδιασμό δένδρογραμμάτων (Carlile and Watkinson, 1994).

### 1.5.4 Διασταυρώσεις

Η «βιολογική θεωρία του είδους» (Dobzhansky, 1970, Mayr, 1970) έχει εφαρμοσθεί σε διάφορες ομάδες των Βασιδιομυκήτων για τον προσδιορισμό των ειδών, τη διαλεύκανση των συστηματικών σχέσεων μεταξύ διαφορετικών ταξινομικών ομάδων και την εξαγωγή των ακριβέστερων συμπερασμάτων όσον αφορά στις διαδικασίες, που διέπουν την ειδογένεση (speciation) (Hallenberg, 1984, Boidin, 1986, Vilgalys, 1991, Petersen, 1995), αν και η γενικευμένη εφαρμογή της στους μύκητες έχει αποδειχθεί προβληματική σε ορισμένες περιπτώσεις (Parmasto, 1985, Brasier, 1987). Η υιοθέτηση μιας τέτοιας θεωρίας είναι προφανής, εφόσον η δυνατότητα των ατόμων να διασταυρώνονται παρέχει πληροφορίες για τον τύπο του αναπαραγωγικού συστήματος και τη δομή των παραγόντων συμβατότητας (mating type factors) και αποκαλύπτει το βαθμό ανταλλαγής γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών και την ύπαρξη γενετικών φραγμών ή / και φραγμών στείροτητας. Συνεπώς, οι μελέτες για τη συμπεριφορά των μυκήτων σε δοκιμές διασταυρώσεων (mating behaviour), εκτός από τη συμβολή τους στη φυλογένεια, είναι πολύτιμες και για την επιβεβαίωση της ορθότητας των υπάρχοντων -μορφολογικά βασισμένων- ταξινομικών ομάδων (Zervakis and Balis, 1996).

### 1.5.5 Μοριακές τεχνικές

Οι μελέτες που βασίζονται στην καλλιέργεια οργανισμών, συχνά, αποτυγχάνουν να περιγράψουν με ακρίβεια τους πληθυσμούς των μυκήτων, για διάφορους λόγους. Οι λόγοι αυτοί περιλαμβάνουν τη συνύπαρξη διαφορετικών βιολογικών κύκλων, τη διαφορετική βλάστηση των σπορίων, τον τρόπο και ρυθμό ανάπτυξης του μυκηλίου πάνω στο θρεπτικό μέσο, και την έλλειψη αξιόπιστων και ιδιαίτερων χαρακτήρων για μερικές ταξινομικές ομάδες. Τεχνικές της μοριακής βιολογίας και ιδιαίτερα στρατηγικές, που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα και έχουν σαν στόχο τις περιοχές, που κωδικοποιούν το ριβοσωμικό RNA, παρέχουν νέες δυνατότητες για την κατανόηση της φύσης και του ρόλου των μυκήτων στα φυσικά περιβάλλοντα (Kowalchuk, 1999).

#### 1.5.5.1 Σύγκριση ακολουθιών DNA

Από τη δεκαετία του 1970 και έπειτα, αξιοποιήθηκαν σε ευρεία κλίμακα τα στοιχεία, τα οποία προκύπτουν από τη μελέτη των ακολουθιών του DNA. Εντούτοις, η φυλογένεια, που απορρέει από τα μοριακά δεδομένα, αποτελεί ένα αρκετά σύνθετο εγχείρημα. Είναι εμφανές ότι τα μόρια αλλάζουν με την πάροδο του χρόνου και εξελίσσονται μαζί με τον ίδιο τον οργανισμό που τα περιέχει. Ο ρυθμός, με τον οποίο τα μόρια αυτά μεταλλάσσονται, είναι ιδιαίτερα μεταβλητός και εξαρτάται από τον τύπο του γονιδίου, το τμήμα του γονιδίου, την καταγωγή και το χρόνο.

Κατά συνέπεια, η επιλογή μοριακών ακολουθιών, με σκοπό την εξαγωγή συμπεράσματος όσον αφορά στη φυλογένεια, πρέπει να λαμβάνει υπόψη την «ηλικία» της φυλογενετικής διαφοροποίησης, η οποία εξετάζεται, και το ρυθμό εξέλιξης του μορίου. Τα ταχέα εξελισσόμενα μόρια χρησιμοποιούνται καλύτερα για τις πρόσφατες διαφοροποιήσεις και τα βραδέα εξελισσόμενα για τις διαφοροποιήσεις που εμφανίστηκαν πολύ καιρό πριν. Οι μεταλλάξεις διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην καταστροφή των στοιχείων, που αποδεικνύουν ότι κάποιοι οργανισμοί μοιράστηκαν ορισμένους μοριακούς χαρακτήρες, ως αποτέλεσμα της κοινής τους ιστορίας, γεγονός που καθιστά τα ταχέα εξελισσόμενα μόρια ακατάλληλα για τον προσδιορισμό των πολύ παλαιών διαφοροποιήσεων (Collins, 1999).

Στις φυλογενετικές μελέτες, οι διάφορες μεταβλητές έχουν επιπτώσεις στη διακλάδωση ενός φυλογενετικού δέντρου. Αυτές οι μεταβλητές σχετίζονται με την αξιοπιστία της ευθυγράμμισης των ακολουθιών, τις περιοχές του γονιδιώματος που επιλέγονται, τον αριθμό και το εύρος των ειδών που συμπεριλαμβάνονται, τις διαφορές στο ρυθμό εξέλιξης μεταξύ των ειδών, τις διαφορές στη νουκλεοτιδική σύνθεση μεταξύ των ειδών και τις φυλογενετικές μεθόδους που υιοθετούνται (Gurta, 2000).

Ωστόσο, οι ακολουθίες του DNA είναι πολύτιμες, γιατί παρέχουν την πλέον λεπτομερή πληροφόρηση για κάθε οργανισμό –τα δεδομένα για το πώς κάθε λειτουργικό κομμάτι πρέπει να δομείται και να λειτουργεί. Η σύγχρονη βιολογία, σε μεγάλο της ποσοστό, βασίζεται στην ερμηνεία της πληροφορίας, που βρίσκεται μέσα στις ακολουθίες των γονιδίων, και αυτό κυρίως συμβαίνει στις εξελικτικές μελέτες, όπου οι γονιδιακές ακολουθίες αναγνωρίζονται πλέον ως ανεκτίμητο τεκμήριο για την ιστορία της ζωής στη Γη (Page and Holmes, 1998).

#### 1.5.5.2 Οι πολυγονιδιακές οικογένειες ως μοριακοί δείκτες

Πολλά γονίδια εκτός από το να υπάρχουν σαν μοναδικά αντίτυπα, που παράγουν μια πρωτεΐνη, στην πραγματικότητα, αποτελούν μέλη μια ευρύτερης οικογένειας συγγενών γονιδίων. Κάποιες από αυτές τις πολυγονιδιακές οικογένειες (multigene families) βρίσκονται σε μια συγκεκριμένη περιοχή ενός χρωμοσώματος και μπορούν να επαναλαμβάνονται πολλές φορές, ενώ άλλες είναι διασκορπισμένες μέσα στο γονιδίωμα.

Κάποιες πολυγονιδιακές οικογένειες επαναλαμβάνονται πολλές φορές διαδοχικά, έτσι ώστε να περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα γονιδίων με την ίδια λειτουργία. Αυτές είναι γνωστές ως παρατάξεις (tandem arrays). Οι «παρατάξεις» πιθανόν να εξελίχθηκαν επειδή το κύτταρο, που τις περιέχει, απαιτεί μεγάλη ποσότητα από το προϊόν, το οποίο παράγουν. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι και η παράταξη του ριβοσωμικού DNA (rDNA), το οποίο κωδικοποιεί το ριβοσωμικό RNA (rRNA).

Εξαιτίας του κρίσιμου ρόλου των ριβοσωμάτων στη σύνθεση πρωτεϊνών, τα μόρια του rRNA βρίσκονται σε κάθε είδος και, συχνά, σε τεράστιες ποσότητες ανά κύτταρο (καθώς και στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες), αποτελώντας την πλειοψηφία του κυτταρικού RNA (Page and Holmes, 1998).

Οι παρατάξεις του rDNA, οι οποίες βρίσκονται στο πυρηνικό γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών, κωδικοποιούν για τέσσερις τύπους rRNA: το 18S (~1800 bp) (όπου το S σημαίνει τη μονάδα Svedberg<sup>4</sup>), το οποίο συνδέεται με τη μικρή υπομονάδα (small subunit, SSU) των ριβοσωμάτων και τα 28S (~5000 bp), 5.8S (~150 bp) και 5S (~130 bp), τα οποία συνδέονται με τη μεγάλη υπομονάδα (large subunit, LSU) (Fincham *et al.*, 1979). Τα μόρια 18S, 28S και 5.8S του rRNA προέρχονται από τη διαδικασία της ωρίμανσης ενός πρόδρομου μορίου RNA, του 47S rRNA, ενώ το 5S προέρχεται από μια παρακείμενη ακολουθία rDNA. Τέλος, το 5S μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση III, σε αντίθεση με το 47S πρόδρομο μόριο rRNA, το οποίο μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση I (Paule and White, 2000).



**Σχήμα 1:** Μια τυπική παράταξη rDNA Βασιδιομύκητα. Οι κωδικές περιοχές 18S, 5.8S, 28S και 5S (μαύρο χρώμα) διαχωρίζονται με τρεις μη κωδικές περιοχές, τις: ITS 1 και ITS 2 (γκρι χρώμα) και την IGS 1. Οι διαδοχικές παρατάξεις rDNA διαχωρίζονται η μία από την άλλη, πάνω στο χρωμόσωμα, από τη μη κωδική περιοχή IGS 2.

Βασισμένο στο σχήμα: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primer5.gif>

Εκτός από αυτές τις κωδικές ακολουθίες<sup>5</sup>, οι παρατάξεις του rDNA περιέχουν, επίσης, έναν αριθμό ενδιάμεσων ακολουθιών (μεσοδιαστήματα), οι οποίες περιλαμβάνουν τις εντολές, που απαιτούνται για την επεξεργασία του

<sup>4</sup> **Μονάδα Svedberg:** Η μονάδα Svedberg (S) σχετίζεται με το συντελεστή καθίζησης, που χρησιμοποιείται για την υπόδειξη του χρόνου, που απαιτείται από τα μεγάλα μόρια, τα μικρά οργανίδια κ.λπ., για να φθάσουν ένα επίπεδο ισορροπίας, όταν φυγοκεντρώνται μέσα σε νερό, σε θερμοκρασία 20°C. Η μονάδα (S) ορίζεται ως ο συντελεστής καθίζησης για  $1 \cdot 10^{-13}$  sec.

Ο συντελεστής καθίζησης δίνεται από την εξίσωση:

$$S = \frac{dx/dt}{\omega^2 r}$$

όπου  $x$  = η απόσταση του ορίου καθίζησης από το κέντρο περιστροφής (σε cm),  $t$  = ο χρόνος (σε sec) και  $\omega$  = η γωνιακή ταχύτητα (σε  $\text{rad} \cdot \text{sec}^{-1}$ ). Η τιμή S ενός αντικειμένου καλείται αριθμός Svedberg του αντικειμένου αυτού (Abercrombie *et al.*, 1990).

<sup>5</sup> Κωδικές ονομάζονται οι ακολουθίες του DNA οι οποίες είτε κωδικοποιούν πρωτείνες ή μόρια RNA (όπως είναι το rRNA και το tRNA) είτε αποτελούν ρυθμιστικές ακολουθίες (regulatory sequences). Οι μη κωδικές ακολουθίες συναντώνται σε μεγάλο βαθμό στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και πιθανά στερούνται λειτουργικότητας (Page and Holmes, 1998).

μεταγραφόμενου rRNA: τις ITS 1 και ITS 2 (Internal Transcribed Spacer 1 και 2) και τις IGS 1 και IGS 2 (Intergenic Spacer 1 και 2).

Μια ομάδα γονιδίων και μεσοδιαστημάτων μαζί αποτελούν μια μονάδα μεταγραφής rDNA (γιατί βάσει αυτών παράγεται μία απλή μονάδα rRNA) και αυτές οι ομάδες επαναλαμβάνονται διαδοχικά σε πολλά είδη, με κάθε παράταξη rDNA να διαχωρίζεται από μία ακολουθία, την IGS.

Το μέγεθος της παράταξης του rDNA ποικίλει σημαντικά μεταξύ των ταξινομικών ομάδων, από ένα μοναδικό αντίγραφο στο πρώτιστο *Tetrahymena* έως 19300 αντίγραφα στο ερπετό *Amphiuma means*. Περίπου 200 παρατεταγμένα σε σειρά αντίγραφα βρίσκονται στα Χ και Υ χρωμοσώματα της *Drosophila melanogaster*, ενώ στον άνθρωπο υπάρχουν κατά προσέγγιση 300 αντίγραφα σε πέντε χρωμοσώματα.

Τα τμήματα του rDNA είναι αρκετά δημοφιλή ως φυλογενετικά εργαλεία, εντούτοις δεν εξελίσσονται πάντα με απλό τρόπο. Συγκεκριμένα, όταν συγκρίνονται ακολουθίες του rDNA μεταξύ ίδιων ή διαφορετικών ειδών, αποκαλύπτεται το γεγονός ότι, συχνά, υπάρχει ένα υψηλός βαθμός ομοιότητας μεταξύ των ακολουθιών, ωστόσο υπάρχει και σημαντική παραλλακτικότητα μεταξύ τους. Αυτό είναι ασυνήθιστο, επειδή μικρή παραλλακτικότητα εντός των ειδών συνδέεται με μικρή απόκλιση ανάμεσα στα είδη. Αυτό το ασυνήθιστο γεγονός συμβαίνει διότι υπάρχουν γενετικοί μηχανισμοί, ιδιαίτερα όπως αυτοί της ανισοσκελούς χιασματοπίας (unequal crossing-over) και της γονιδιακής μετατροπής (gene conversion), οι οποίοι μεταφέρουν τις ακολουθίες του DNA μεταξύ των γονιδίων, έτσι ώστε να εξελίσσονται παράλληλα. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως **εναρμονισμένη εξέλιξη** (concerted evolution) και είναι μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες των πολυγονιδιακών οικογενειών, αφού αυτό σημαίνει ότι οι μεταλλαγές μπορούν να εξαπλωθούν σε όλα τα μέλη, ακόμα κι αν αυτά ανήκουν σε διαφορετικό χρωμόσωμα.

Παρά το γεγονός ότι η συνδυασμένη εξέλιξη επιτρέπει στα γονίδια να εξελίσσονται παράλληλα, συγχρόνως περιπλέκει τη φυλογενετική ανάλυση των πολυγονιδιακών οικογενειών, διότι καθίσταται δύσκολο να διακρίνει κανείς ποια γονίδια είναι πράγματι ομόλογα, με αποτέλεσμα **ορθόλογα** και **παράλογα**<sup>6</sup> γονίδια να αναμιγνύονται. Επιπλέον, η στιγμή της διαφοροποίησης στην ακολουθία δεν ανταποκρίνεται πλέον στη χρονική στιγμή του τελευταίου

<sup>6</sup> Δύο ομόλογα γονίδια καλούνται ορθόλογα (orthologous genes), αν ο πιο πρόσφατος πρόγονός τους δεν είχε υποστεί γονιδιακό διπλασιασμό (gene duplication). Στην αντίθετη περίπτωση καλούνται παράλογα γονίδια (paralogous genes) (Page and Holmes, 1998).

γονιδιακού διπλασιασμού (gene duplication) ή της ειδογένεσης (speciation), αλλά περισσότερο στη χρονική στιγμή της τελευταίας γονιδιακής μετατροπής ή μιας ανισοσκελούς χιασματυπίας.

Συμπερασματικά, οι περίπλοκες διαδικασίες, οι οποίες διαμορφώνουν την εξέλιξη των πολυγονιδιακών οικογενειών, αποδεικνύουν ότι οι τελευταίες συχνά αποτελούνται περισσότερο από «μωσαϊκά» ακολουθιών, το καθένα με μια διαφορετική φυλογενετική ιστορία, παρά από αυστηρά ομόλογα γονίδια, τα οποία σταδιακά μεταλλάσσονται με το χρόνο (Page and Holmes, 1998).

#### 1.5.5.3 Σύγκριση των ακολουθιών του rDNA

Οι White *et al.* (1990) καινοτόμησαν με τη χρήση των δεικτών rRNA για τη μελέτη των μυκήτων, με την εισαγωγή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), για την ενίσχυση των περιοχών των οπερόνιων του πυρηνικού και του μιτοχondριακού rDNA. Οι προαναφερθέντες ερευνητές συνειδητοποίησαν τη χρησιμότητα τόσο των σχετικά καλά συντηρημένων δεικτών (μικρή υπομονάδα rDNA), για τη φυλογενετική σύγκριση μέσα σε ευρέα ταξινομικά επίπεδα, όσο και των ταχέα εξελισσόμενων δεικτών (ITS), για τη διαφοροποίηση σε μικρή κλίμακα. Οι περιοχές ITS, αν και μεταγράφονται, δεν κωδικοποιούν κάποια λειτουργία και είναι επομένως -σε ένα βαθμό- «ελεύθερες» να συσσωρεύουν ουδέτερες μεταλλάξεις, οι οποίες τις καθιστούν ιδανικό στόχο για τη διάκριση μεταξύ στενά συσχετισμένων οργανισμών (Kowalchuk, 1999).

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι επειδή υπάρχουν ομόλογα γονίδια rDNA στα Archaea, τα βακτήρια και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή ενός δένδρου, που θα συμπεριλαμβάνει όλα τα είδη κυτταρικής μορφής (Page and Holmes, 1998).

#### 1.5.5.4 Η περιοχή ITS ως μοριακός δείκτης

Η ενίσχυση της περιοχής ITS με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης έχει αποτελέσει μια δημοφιλή στρατηγική, για τη φυλογενετική ανάλυση των πολύ συγγενών ειδών και πληθυσμών. Αυτό οφείλεται στην παραγωγή καθολικών εκκινήτων, που εντοπίζονται στις κωδικές περιοχές, που πλαισιώνουν την περιοχή ITS. Τόσο η άμεση εύρεση ακολουθίας όσο και η

κλωνοποίηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση της περιοχής ITS (Muir and Schlötterer, 1999).

#### 1.5.5.5 Άλλες μοριακές μέθοδοι για ταξινομική και φυλογένεια

Η σύγκριση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων δεν είναι το μοναδικό χρήσιμο μοριακό κριτήριο για τη φυλογενετική ανάλυση ή / και για την ταξινομική διάκριση. Άλλες στρατηγικές περιλαμβάνουν τον πολυμορφισμό μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP) των περιοχών ITS ενισχυμένων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, συμπεριλαμβανομένου του διαχωρισμού των τμημάτων με βάση την ακολουθία τους, τον αντίστροφο υβριδισμό μεταφοράς κατά σημείο (reverse dot blot hybridization) και την ενίσχυση των περιοχών του μικροδορυφόρου DNA (microsatellite DNA) μια μέθοδος που χρησιμοποιείται επίσης σε συνδυασμό με την τεχνική του τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD). Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά περίπτωση ο κατά μήκος πολυμορφισμός ενισχυμένων τμημάτων DNA (AFLP) και η χρήση καθολικών εκκινητών, σε συνδυασμό με τον υβριδισμό (cross hybridization) (Kowalchuk, 1999).

### 1.6 Τεχνικές μοριακών μεθόδων ταξινομικής και φυλογένειας

#### 1.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια ιδιαίτερα προσαρμόσιμη τεχνική, για την απομόνωση και ενίσχυση (παραγωγή αντιγράφων) μιας συγκεκριμένης επιθυμητής ακολουθίας DNA (Thain and Hickman, 1995), η οποία αναπτύχθηκε το 1988 από τον Kary Mullis (Cooper, 2000).

Το δίκλωνο DNA διαχωρίζεται αρχικά στις δύο συμπληρωματικές του αλυσίδες, με υποβολή σε θερμοκρασία άνω των 90°C, ενώ δύο ολιγονουκλεοτίδια, οι εκκινητές, που είναι γνωστό ότι υβριδίζουν πάνω από το 5' άκρο της ακολουθίας του DNA, προσκολλώνται σε καθεμία αλυσίδα, μετά την

πτώση της θερμοκρασίας του μίγματος της αντίδρασης. Μια βασική παράμετρος της διαδικασίας είναι ότι η DNA πολυμεράση απαιτεί μια τέτοια μονόκλωνη ακολουθία-εκκινητή για να επεκτείνει ολόκληρη τη συμπληρωματική αλυσίδα με κατεύθυνση 5'→3'.

Η *Taq* πολυμεράση, ένζυμο το οποίο απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, όντας ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες, που περιλαμβάνονται στα πρώτα βήματα της διαδικασίας, επέτρεψε την αυτοματοποίηση της διαδικασίας.

Η πολυμεράση επεκτείνει τις συμπληρωματικές αλυσίδες πέρα από τη θέση υβριδισμού του εκκινητή, ενώ η θερμοκρασία της αντίδρασης έχει μειωθεί, ενώ η -εκ νέου- θέρμανση χωρίζει τα νέα δίκλινα τμήματα DNA. Με την ψύξη της αντίδρασης, οι εκκινητές υβριδίζουν πάλι (τέσσερις θέσεις υβριδισμού είναι τώρα διαθέσιμες). Η πολυμεράση επεκτείνει τις αλυσίδες, αλλά η επέκταση πλέον περιορίζεται στην επιθυμητή ακολουθία (στις δύο από τις τέσσερις αλυσίδες), λόγω των εκκινητών στις αλυσίδες-πρότυπα.

Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται για πολλούς κύκλους, παράγοντας περισσότερα από  $10^6$  δίκλινα μόρια-στόχους, μετά την ολοκλήρωση τριάντα δύο κύκλων. Εάν η διαδικασία ξεκινήσει με ένα μεγάλο αριθμό μορίων-προτύπων, τότε λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται (με μικρότερο κίνδυνο μετάλλαξης), για να παραχθεί η επιθυμητή ποσότητα ενισχυμένου DNA (Thain and Hickman, 1995).

### 1.6.2 Εύρεση ακολουθίας βάσεων (Αλληλούχιση, Sequencing)

Η επικρατέστερη μέθοδος για την αλληλούχιση του DNA είναι μια ενζυμική τεχνική, γνωστή ως διδεοξυ-αλληλούχιση ή μέθοδος Sanger (για να διακρίνεται από τη χημική μέθοδο Maxam / Gilbert). Το DNA προς αλληλούχιση χρησιμοποιείται ως πρότυπο για την *in vitro* σύνθεση από την DNA πολυμεράση (Chantler, 2004).

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs), μόρια, που διαφέρουν από τα δεοξυριβονουκλεοτίδια στο ότι στον 3' άνθρακα είναι συνδεδεμένο ένα άτομο υδρογόνου αντί για μια ομάδα υδροξυλίου. Αυτά τα μόρια σταματούν την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA επειδή δεν είναι σε θέση να διαμορφώσουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο δεοξυριβονουκλεοτίδιο.



Προκειμένου να εκτελεσθεί η αλληλούχιση, ένα δίκλωνο μόριο DNA πρέπει να μετατραπεί σε μονόκλωνο. Αυτό μπορεί να γίνει με μετουσίωση του δίκλωνου DNA με NaOH. Μία αντίδραση Sanger αποτελείται από τα εξής: μια αλυσίδα προς αλληλούχιση (ένας από τους δύο κλώνους του DNA, που μετουσιώθηκε χρησιμοποιώντας NaOH), εκκινητές DNA (ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά για το σκέλος, που πρόκειται να αλληλουχηθεί, και είναι σεσημασμένα ραδιενεργά στα 5' άκρα τους), ένα μίγμα ενός συγκεκριμένου ddNTP (όπως ddATP) μαζί με το κανονικό αντίστοιχο dNTP (dATP σε αυτήν την περίπτωση), και τα άλλα τρία dNTPs (dCTP, dGTP, και dTTP). Η συγκέντρωση των ddATPs πρέπει να αποτελεί το 1% της συγκέντρωσης των dATPs. Η λογική πίσω από αυτήν την αναλογία είναι ότι αφότου προστεθεί η DNA πολυμεράση, η διαδικασία του πολυμερισμού θα ξεκινήσει και θα ολοκληρωθεί, όποτε ένα ddATP ενσωματωθεί στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα. Εάν τα ddATPs αποτελούν μόνο το 1% της συνολικής συγκέντρωσης dATP, τότε θα σχηματιστεί μια ολόκληρη σειρά σεσημασμένων αλυσίδων. Σημειώτεον ότι τα μήκη αυτών των αλυσίδων εξαρτώνται από τη θέση του ddATP σε σχέση με το 5' άκρο.

Αυτή η αντίδραση εκτελείται τέσσερις φορές χρησιμοποιώντας ένα διαφορετικό ddNTP για κάθε αντίδραση. Όταν αυτές οι αντιδράσεις ολοκληρωθούν, εκτελείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Κάθε αντίδραση φορτώνεται σε μια γραμμή της πηκτής σε σύνολο τεσσάρων γραμμών. Η πηκτή αφυδατώνεται και εκτελείται αυτοραδιογραφία, έτσι ώστε μόνο οι ζώνες με τη ραδιενεργό σήμανση στο 5' άκρο να εμφανιστούν. Στην ηλεκτροφόρηση, που προηγήθηκε, τα μικρότερα τμήματα DNA θα μεταναστεύσουν μακρότερα. Επομένως, η κατώτατη ζώνη δείχνει ότι το συγκεκριμένο διδεοξυριβονουκλεοτίδιο προστέθηκε πρώτα στο σεσημασμένο εκκινητή και, επομένως, το αντίστοιχο δεοξυριβονουκλεοτίδιο θα πρέπει να υπήρχε στην αρχική αλυσίδα του DNA προς αλληλούχιση. Με αυτή τη λογική μπορεί να ανακτηθεί ολόκληρη η ακολουθία των δεοξυριβονουκλεοτιδίων του αρχικού τμήματος DNA (Canfield, 1999).

Σήμερα, η παραπάνω διαδικασία είναι συνήθως αυτοματοποιημένη και όλες οι αντιδράσεις εκτελούνται ρομποτικά σε έναν ενιαίο σωλήνα (Chantler, 2004).

## 2. ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΔΕΝΤΡΑ

### 2.1 Πρότυπα εξέλιξης νουκλεοτιδικών ακολουθιών

Κατά μία έννοια, οι ακολουθίες του DNA δεν παρέχουν μεγάλο ποσό πληροφορίας σχετικά με την εξελικτική τους αλλαγή. Κατά τη σύγκριση ομόλογων περιοχών σε δύο ακολουθίες DNA, μπορεί κανείς να παρατηρήσει αν αυτές είναι όμοιες μεταξύ τους ή όχι. Έτσι, για κάθε δεδομένη θέση ο μέγιστος αριθμός αντικαταστάσεων, που μπορούν να παρατηρηθούν, είναι μία. Ωστόσο πολύ περισσότερες ενδιάμεσες αντικαταστάσεις μπορεί να έχουν λάβει χώρα. Στην περίπτωση αυτή χάνεται κάθε «αρχείο» προηγούμενων αντικαταστάσεων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι φαινομενικές αποστάσεις, οι οποίες παρατηρούνται μεταξύ ακολουθιών, πιθανόν να υποτιμούν το πραγματικό ποσό της εξελικτικής αλλαγής που έχει προηγηθεί. Έτσι, έχει καταβληθεί σημαντική ερευνητική προσπάθεια για την ανάπτυξη μεθόδων μετατροπής των φαινομενικών αποστάσεων σε μονάδες μέτρησης της πραγματικής εξελικτικής απόστασης. Αυτές οι τεχνικές καλούνται **μέθοδοι διόρθωσης αποστάσεων** (distance correction methods) και έχουν ως στόχο τη διόρθωση των φαινομενικών αποστάσεων, προσπαθώντας να εκτιμήσουν το ποσό της εξελικτικής αλλαγής που έχει επικαλυφθεί.

Μια σειρά μεθόδων έχει προταθεί, η καθεμία βασισμένη σε μία υπόθεση για τη φύση της μοριακής εξελικτικής διαδικασίας. Οι περισσότερες από τις μεθόδους διόρθωσης αποστάσεων είναι αλληλένδετες, διαφέροντας μόνο στο πόσες παραμέτρους περιλαμβάνουν. Παραδείγματος χάρη, μερικές μέθοδοι είναι δυνατό να επιτρέπουν τη διαφορά στις συχνότητες εμφάνισης των νουκλεοτιδίων. Πιο σύνθετες μέθοδοι μπορεί να επιτρέπουν στους διαφορετικούς τύπους αντικατάστασης να έχουν διαφορετικές πιθανότητες εμφάνισης, ενώ άλλες μπορεί να λαμβάνουν υπόψη τη μεταβολή στο ρυθμό αντικατάστασης μεταξύ των θέσεων.

Καθορίζοντας τις πιθανότητες μιας δεδομένης αντικατάστασης ενός νουκλεοτιδίου και τις αναμενόμενες συχνότητες των τεσσάρων βάσεων, έχει

δημιουργηθεί μία πληθώρα προτύπων. Πέντε από τα πιο διαδεδομένα αυτά πρότυπα περιγράφονται στη συνέχεια (Page and Holmes, 1998).

### 2.1.1 Το πρότυπο Jukes-Cantor (JC)

Το πρότυπο Jukes-Cantor (JC) είναι ένα από τα πρώτα, που προτάθηκαν, και αποτελεί ίσως το απλούστερο πρότυπο, για την εξέλιξη των ακολουθιών. Υποθέτει ότι τα τέσσερα νουκλεοτίδια έχουν ίσες συχνότητες και ότι όλοι οι τύποι αντικαταστάσεων είναι εξίσου πιθανοί (Page and Holmes, 1998).

### 2.1.2 Το πρότυπο Kimura's 2 Parameter model (K2P)

Θα μπορούσε να αναμένει κανείς ότι οι μεταστροφές (transversions)<sup>7</sup> θα έπρεπε να είναι συχνότερες από τις μεταβάσεις (transitions<sup>8</sup>), εφόσον μόνο μία από τις τρεις πιθανές αντικαταστάσεις για κάθε νουκλεοτίδιο συνιστά μετάβαση. Εντούτοις, το αντίστροφο αποτελεί συνήθως τον κανόνα. Οι μεταβάσεις είναι, γενικά, περισσότερο συχνές από τις μεταστροφές. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για το μιτοχονδριακό DNA (Page and Holmes, 1998).

### 2.1.3 Το πρότυπο Felsenstein (1981)

Το πρότυπο Felsenstein (1981) λαμβάνει υπόψη ότι η νουκλεοτιδική σύνθεση μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το τμήμα του DNA και επιτρέπει στις συχνότητες των τεσσάρων νουκλεοτιδίων να είναι διαφορετικές. Πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι το πρότυπο αυτό υποθέτει ότι η συχνότητα κάθε νουκλεοτιδίου είναι περίπου η ίδια σε όλες τις ακολουθίες, που εξετάζονται (Page and Holmes, 1998).

<sup>7</sup> Μεταστροφή (transversion): η μετάλλαξη από πουρίνη σε πυριμιδίνη ή αντίστροφα.

<sup>8</sup> Μετάβαση (transition): η μετάλλαξη από πουρίνη σε πουρίνη ή από πυριμιδίνη σε πυριμιδίνη.

### 2.1.4 Το πρότυπο Hasegawa, Kishino και Yano (1985) ή HKY85

Το πρότυπο HKY85, που προτείνεται από τους Hasegawa, Kishino και Yano (1985), ουσιαστικά συγχωνεύει τα πρότυπα K2P και F81, επιτρέποντας στις μεταβάσεις και τις μεταστροφές να εμφανίζονται σε διαφορετικά ποσοστά και επιτρέποντας στις συχνότητες των βάσεων να ποικίλουν επίσης (Page and Holmes, 1998).

## 2.2 Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης

Η φυλογενετική ανάλυση παρουσιάζει ένα μοναδικό πρόβλημα στη βιολογία, επειδή η εξελικτική ιστορία δεν μπορεί ποτέ να προσδιοριστεί με βεβαιότητα. Ο σκοπός οποιασδήποτε φυλογενετικής ανάλυσης είναι η εκτίμηση των εξελικτικών σχέσεων, μεταξύ ενός συνόλου ομόλογων ταξινομικών μονάδων, οι οποίες μπορούν να είναι οτιδήποτε από μορφολογικά χαρακτηριστικά έως μοριακές ακολουθίες. Το αποτέλεσμα είναι ένα δέντρο, που αποτελείται από «κόμβους» και «κλαδιά», όπου οι τελικοί κόμβοι (ή «φύλλα») αντιστοιχούν στις ταξινομικές μονάδες (taxa) που μελετώνται, ενώ οι εσωτερικοί κόμβοι αντιπροσωπεύουν τις προγονικές ακολουθίες, και τα κλαδιά αντιπροσωπεύουν την τοπολογική σχέση μεταξύ των κόμβων (Gordon, 2003).

Παρότι έχουν αναπτυχθεί πολλές διαφορετικές μέθοδοι για τη διαλεύκανση της φυλογένειας των οργανισμών, είναι δυνατό να θεωρηθούν όλες ως μέλη δύο ευρύτερων κατηγοριών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν εκείνες οι μέθοδοι, που χρησιμοποιούν έναν αλγόριθμο για να δημιουργήσουν άμεσα ένα δέντρο, μέσω μιας σειράς καθορισμένων βημάτων, ενώ στη δεύτερη ανήκουν οι μέθοδοι, που καθορίζουν ένα κριτήριο για μεγιστοποίηση (ή ελαχιστοποίηση) του μεγέθους του δέντρου, και έπειτα χρησιμοποιούν έναν αλγόριθμο, για την αξιολόγηση των πιθανών δέντρων, βασισμένων σε αυτό το κριτήριο (Swofford *et al.*, 1996). Η πρώτη κατηγορία προγραμμάτων λειτουργεί -κατά ένα μεγάλο μέρος- μετατρέποντας την ομοιότητα μεταξύ των ζευγαριών των ακολουθιών σε εξελικτική απόσταση, και έπειτα χρησιμοποιώντας ένα καθορισμένο σύνολο βημάτων, για το σχεδιασμό ενός δέντρου. Αυτές οι μέθοδοι είναι υπολογιστικά πολύ γρήγορες, αλλά πάσχουν από δύο σημαντικά μειονεκτήματα: α) οι εξελικτικές πληροφορίες χάνονται όταν παρατηρείται η γενική ομοιότητα μεταξύ των ακολουθιών, αντί για τα μεμονωμένα γεγονότα μεταλλάξεων (Hendy and

Penny, 1982) και β) είναι δύσκολο να αξιολογηθεί αξιόπιστα η ορθότητα ενός δέντρου, που παράγεται από οποιοδήποτε δεδομένο αλγόριθμο (Swofford *et al.*, 1996).

Αντίθετα, η δεύτερη ομάδα μεθόδων ακολουθεί δύο βήματα. Κατ' αρχήν, καθορίζεται ένα βέλτιστο κριτήριο, το οποίο χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αξίας ενός συγκεκριμένου δέντρου. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται ένας αλγόριθμος για τον υπολογισμό της τιμής αυτής της συνάρτησης για τα διάφορα δέντρα, ψάχνοντας, συγχρόνως, για το καλύτερο δέντρο (αυτό, που μεγιστοποιεί το κριτήριο) (Swofford *et al.*, 1996). Ενώ αυτές οι μέθοδοι είναι ελκυστικές, επειδή υπόσχονται την εύρεση του βέλτιστου δέντρου, σύμφωνα με το εφαρμοσμένο κριτήριο, είναι συνήθως υπολογιστικά αργές ακόμη και για μέτριους αριθμούς ταξινομικών μονάδων, σε ένα τέτοιο σημείο, ώστε το χρονικό διάστημα, που απαιτείται για μια εξαντλητική αναζήτηση, να είναι απαγορευτικό. Εντούτοις, αυτός ο περιορισμός έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πολυάριθμων υπολογιστικών μεθόδων, που προσπαθούν να προσεγγίσουν αξιόπιστα το βέλτιστο δέντρο, μέσα σε ένα λογικό διάστημα υπολογιστικού χρόνου (Gordon, 2003).

### 2.2.1 Η μέθοδος της «Μέγιστης Οικονομικότητας» (Maximum Parsimony)

Η μέθοδος της «Μέγιστης Οικονομικότητας» (Maximum Parsimony) βασίζεται στην εύρεση της απλούστερης λύσης μέσα σε ένα σύνολο δεδομένων. Ουσιαστικά, η μέθοδος αυτή προσπαθεί να δημιουργήσει ένα δέντρο που να ελαχιστοποιεί τον αριθμό των εξελικτικών αλλαγών, που απαιτούνται για να εξηγήσουν τα υπάρχοντα δεδομένα (παραδειγματος χάρη, τις ακολουθίες DNA). Επομένως, το βέλτιστο κριτήριο (που σε αυτήν την περίπτωση ελαχιστοποιείται) είναι το συνολικό μήκος του δέντρου. Το μήκος του δέντρου ορίζεται ως ο αριθμός των μεταλλάξεων, που απαιτούνται για να εξηγήσουν την ύπαρξη των νουκλεοτιδίων σε όλες τις θέσεις, μέσα σε ένα σύνολο ευθυγραμμισμένων ακολουθιών (Swofford *et al.*, 1996).

Οι αλγόριθμοι που ακολουθεί η μέθοδος της «Μέγιστης Οικονομικότητας», αξιολογούν ένα δεδομένο δέντρο, εξετάζοντας χωριστά κάθε στήλη νουκλεοτιδικών χαρακτήρων μέσα σε ένα σύνολο ευθυγραμμισμένων ακολουθιών, αθροίζοντας το μήκος του δέντρου, που απαιτείται για να ερμηνεύσει κάθε έναν από τους χαρακτήρες σε εκείνη την στήλη, και έπειτα αθροίζοντας τα αποτελέσματα για όλες τις στήλες (Saitou, 1996). Για την

αξιολόγηση του μήκους του δέντρου που απαιτείται για κάθε στήλη, προσδιορίζονται οι νουκλεοτιδικοί χαρακτήρες για κάθε εσωτερικό κόμβο και έπειτα εκτιμάται το κόστος για το μήκος κάθε κλάδου (Swofford *et al.*, 1996).

### 2.2.2 Η μέθοδος του «Πιθανότερου Ενδεχόμενου» (Maximum Likelihood)

Η αρχή της μεθόδου του «Πιθανότερου Ενδεχόμενου» προτείνει την υιοθεσία εκείνης της εξήγησης, η οποία καθιστά την υπάρχουσα έκβαση την πλέον αληθοφανή (δηλαδή την πιθανότερη). Αν δίνονται μερικά στοιχεία  $D$  και μια υπόθεση  $H$ , το ενδεχόμενο των στοιχείων αυτών δίνεται από την ισότητα:

$$L_D = P(D|H) \quad (2.1)$$

η όποια εκφράζει τη μαθηματική πιθανότητα της εξασφάλισης του  $D$  με δεδομένο το  $H$ . Στο πλαίσιο της μοριακής φυλογένειας, το  $D$  είναι το σύνολο των συγκρινόμενων ακολουθιών και το  $H$  είναι ένα φυλογενετικό δέντρο. Επομένως το ζητούμενο είναι η εύρεση του ενδεχόμενου λήψης των υπάρχοντων ακολουθιών με δεδομένο ένα συγκεκριμένο δέντρο. Το δέντρο, το οποίο αναπαριστά την πιθανότερη εξελικτική έκβαση, αποτελεί την εκτίμηση της μεθόδου του «Πιθανότερου Ενδεχόμενου» για τη φυλογένεια. Παρότι η ισότητα (2.1) εκφράζεται από άποψη μαθηματικών πιθανοτήτων, είναι σημαντικό να γίνει η διάκριση μεταξύ αυτών και των ενδεχομένων. Οι μαθηματικές πιθανότητες έχουν άθροισμα ίσο με 1, ενώ τα ενδεχόμενα όχι. Λαμβάνοντας υπόψη ένα δέντρο και ένα πρότυπο εξέλιξης ακολουθιών, θα μπορούσε κανείς -σε γενικές γραμμές- να υπολογίσει την πιθανότητα όλων των δυνατών συνόλων στοιχείων. Το ποσό αυτών των πιθανοτήτων θα ήταν ίσο με 1. Εντούτοις, αυτό που έχει σημασία εδώ είναι το ενδεχόμενο ενός μόνο από τα πιθανά σύνολα στοιχείων (δηλαδή το υπάρχον σύνολο στοιχείων). Το ενδεχόμενο αυτό δεν αντιστοιχεί στην πιθανότητα το συγκεκριμένο δέντρο να αποτελεί το πραγματικό δέντρο, αλλά περισσότερο αντιστοιχεί στην πιθανότητα το συγκεκριμένο δέντρο να έχει γίνει η αφορμή για τα υπάρχοντα στοιχεία.

Η μέθοδος του «Πιθανότερου Ενδεχόμενου» είναι μια ελκυστική μέθοδος εξαγωγής φυλογενετικών συμπερασμάτων, δεδομένου ότι μπορεί να ενσωματώσει σαφή πρότυπα εξέλιξης ακολουθιών, ενώ συγχρόνως να επιτρέπει τις στατιστικές δοκιμές εξελικτικών υποθέσεων (Page and Holmes, 1998).

## 2.3 Φυλογενετικά δέντρα

### 2.3.1 Γενικά

Δέντρο είναι μια μαθηματική δομή, που χρησιμοποιείται για να αναπαραστήσει την εξελικτική ιστορία μιας ομάδας ακολουθιών ή οργανισμών. Αυτό το σχέδιο ιστορικών σχέσεων αποτελεί το φυλογενετικό ή εξελικτικό δέντρο. Ένα δέντρο αποτελείται από **κόμβους** (nodes), οι οποίοι συνδέονται με τα **κλαδιά** (branches) ή άκρες. Οι τελικοί κόμβοι, οι οποίοι καλούνται επίσης και **φύλλα** (leaves) ή τελικές ταξινομικές μονάδες, αντιπροσωπεύουν τις ακολουθίες ή τους οργανισμούς στους οποίους αναφέρονται τα συλλεγμένα δεδομένα. Αυτοί οι οργανισμοί μπορεί να είναι είτε υπάρχοντες είτε εκλιπόντες. Οι εσωτερικοί κόμβοι αντιπροσωπεύουν τους υποθετικούς προγόνους. Ο πρόγονος όλων των ακολουθιών, που περιλαμβάνονται στο δέντρο, αποτελεί τη **ρίζα** (root) του δέντρου.

Οι κόμβοι και τα κλαδιά ενός δέντρου είναι δυνατό να συνδέονται με διάφορα είδη πληροφοριών. Παραδειγματος χάρη μερικές μέθοδοι εκτίμησης της φυλογένειας (όπως η μέθοδος της «Μέγιστης Οικονομικότητας») προσπαθούν να αναδομήσουν τους χαρακτήρες κάθε υποθετικού προγόνου. Οι περισσότερες μέθοδοι υπολογίζουν επίσης το ποσό της εξέλιξης, που μεσολαβεί μεταξύ δύο κόμβων, πάνω στο δέντρο, το οποίο μπορεί να αντιπροσωπευθεί από το μήκος των κλαδιών.

Ο αριθμός των διαδοχικών κλαδιών, που ανήκουν σε έναν εσωτερικό κόμβο, αποτελούν το βαθμό του κόμβου αυτού. Εάν ένας κόμβος έχει βαθμό μεγαλύτερο από τρία (δηλαδή έχει έναν πρόγονο και περισσότερους από δύο άμεσους απογόνους) τότε αυτός ο κόμβος αποτελεί μια **πολυτομία** (polytomy). Ένα δέντρο που δεν έχει καμία πολυτομία καλείται πλήρως αποσαφηνισμένο (fully resolved) (Page and Holmes, 1998).

### 2.3.2 Είδη δέντρων

Τα διάφορα είδη δέντρων χρησιμοποιούνται για να απεικονίσουν διαφορετικές απόψεις της φυλογενετικής ιστορίας. Το βασικότερο είδος δέντρων είναι το **κλαδόγραμμα** (cladogram ή n-tree), το οποίο παρουσιάζει απλά το σχετικό πρόσφατο της κοινής καταγωγής και αποτελεί την απλούστερη έκφραση

των εξελικτικών σχέσεων.

Τα **προσθετικά δέντρα** (additive trees) περιέχουν πρόσθετες πληροφορίες, μεταφρασμένες σε μήκος κλαδιών. Το μήκος αυτό αντιστοιχεί σε ιδιότητες των ακολουθιών όπως το ποσό της εξελικτικής αλλαγής. Άλλοι όροι, που χρησιμοποιούνται συνήθως για τα προσθετικά δέντρα, περιλαμβάνουν τα **μετρικά δέντρα** (metric trees) και τα **φυλογράμματα** (phylograms).

Τα **υπερμετρικά δέντρα** (ultrametric trees) ή αλλιώς **δενδρογράμματα** (dendrograms) αποτελούν ένα είδος προσθετικών δέντρων των οποίων οι άκρες είναι ισαπέχουσες από τη ρίζα του. Αυτό το είδος δέντρων χρησιμοποιείται για την απεικόνιση του εξελικτικού χρόνου, που εκφράζεται είτε άμεσα ως έτη είτε έμμεσα ως ποσό απόκλισης των ακολουθιών με τη χρήση ενός «μοριακού χρονόμετρου» (molecular clock).

Τόσο τα προσθετικά όσο και τα υπερμετρικά δέντρα περιέχουν όλες τις πληροφορίες που περιλαμβάνονται και σε ένα κλαδογράμμα. Για κάποια ζητήματα η γνώση του σχετικού πρόσφατου της κοινής καταγωγής είναι επαρκής. Ωστόσο, υπάρχουν άλλα εξελικτικά ζητήματα (όπως ο καθορισμός των σχετικών ρυθμών εξέλιξης), τα οποία απαιτούν τις πρόσθετες πληροφορίες, που περιλαμβάνονται στα «προσθετικά» και τα «μετρικά» δέντρα (Page and Holmes, 1998).

### 2.3.3 «Ριζωμένα» (rooted) και «μη ριζωμένα» (unrooted) δέντρα

Τα κλαδογράμματα και τα προσθετικά δέντρα μπορούν να είναι είτε «**ριζωμένα**» (rooted) είτε «**μη ριζωμένα**» (unrooted). Ένα ριζωμένο δέντρο έχει έναν κύριο κόμβο, ο οποίος θεωρείται ως η ρίζα από την οποία τελικά ξεκινούν όλοι οι άλλοι κόμβοι. Ως εκ τούτου ένα ριζωμένο δέντρο έχει μία κατεύθυνση, η οποία αντιστοιχεί στον εξελικτικό χρόνο: όσο πιο κοντά στη ρίζα του δέντρου βρίσκεται ένας κόμβος, τόσο παλαιότερος είναι χρονικά. Τα ριζωμένα δέντρα επιτρέπουν τον καθορισμό των σχέσεων πρόγονων – απογόνων μεταξύ κόμβων: λαμβάνοντας υπόψη ένα ζευγάρι κόμβων που συνδέονται με ένα κλαδί, ο κόμβος που βρίσκεται πιο κοντά στη ρίζα είναι ο πρόγονος του κόμβου που βρίσκεται πιο μακριά από τη ρίζα (απόγονος).

Τα μη ριζωμένα δέντρα στερούνται ρίζας, πράγμα που σημαίνει ότι δε διευκρινίζουν τις εξελικτικές σχέσεις με τον ίδιο τρόπο και δεν επιτρέπουν τη συζήτηση περί προγόνων και απογόνων. Επιπλέον, οι παρακείμενες ακολουθίες,



που περιλαμβάνονται σε ένα μη ριζωμένο δέντρο, δεν είναι απαραίτητο να είναι πολύ συγγενικές εξελικτικά (Page and Holmes, 1998).

#### 2.3.4 Κλάδοι και ταξινόμηση

Η φυλογένεια αποτελεί τη βάση της ταξινόμησης των οργανισμών. Η κλαδιστική ταξινόμηση αναγνωρίζει μόνο **μονοφυλετικές ομάδες ή κλάδους**. Μία μονοφυλετική ομάδα περιλαμβάνει όλους τους απογόνους μιας προγονικής ταξινομικής μονάδας, ενώ μία μη μονοφυλετική ομάδα παραλείπει μερικούς από τους απογόνους αυτούς. Οι μη μονοφυλετικές ομάδες διακρίνονται σε **παραφυλετικές και πολυφυλετικές**.

Οι παραφυλετικές ομάδες περιλαμβάνουν ταξινομικές μονάδες, οι οποίες μοιράζονται κοινούς προγονικούς χαρακτήρες (πλησιομορφία, *plesiomorphy*). Κατ' αυτόν τον τρόπο, αποκλείουν άλλες ταξινομικές μονάδες, οι οποίες -αν και έχουν κοινούς προγονικούς χαρακτήρες με τις προαναφερθείσες πλησιομορφικές μονάδες- διαφέρουν στο ότι κάποιος από τους χαρακτήρες αυτούς έχει διαφοροποιηθεί σημαντικά μόνο σε αυτές (αυταπομορφία, *autapomorphy*). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ομάδα των ερπετών, η οποία αποκλείει τα πτηνά εξαιτίας της σύγχρονης τους ανατομίας και ηθολογίας, παρά το γεγονός ότι οι κροκόδειλοι είναι γενετικά πιο συγγενικοί με τα πτηνά από ό,τι με τα άλλα ερπετά.

Οι πολυφυλετικές ομάδες αποτελούν σύνολα ταξινομικών μονάδων, τα οποία έχουν λανθασμένα τοποθετηθεί στην ίδια κατηγορία, με βάση συγκλίνοντες αλλά όχι κοινούς στην καταγωγή χαρακτήρες. Συνεπώς, αν και οι ταξινομικές μονάδες, που αποτελούν μια πολυφυλετική ομάδα, είναι εντυπωσιακά παρόμοιες, ωστόσο έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα από διαφορετικούς προγόνους (Page and Holmes, 1998).

### 3. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ

#### *Pleurotus*

##### 3.1 Γενικά περί Βασιδιομυκήτων

Το Φύλο των Βασιδιομυκήτων (Basidiomycota) περιλαμβάνει περίπου 22000 καταγεγραμμένα είδη (δηλαδή το 35% των γνωστών ειδών των μυκήτων) (Taylor *et al.*, 2004) και αποτελεί μια μεγάλη και ετερογενή ταξινομική κατηγορία, στην οποία ανήκουν τα γνωστά μανιτάρια. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι ο κοινός πρόγονος όλων των Βασιδιομυκήτων έζησε πριν τουλάχιστον 500 εκατομμύρια χρόνια και ίσως πριν ένα δισεκατομμύριο χρόνια (Taylor *et al.*, 2004).

Οι Βασιδιομύκητες χαρακτηρίζονται, κυρίως, από την παραγωγή εγγενών σπορίων (βασιδιοσπόρια) πάνω σε εξειδικευμένα μικροσκοπικά γαμετάγγεια, που ονομάζονται βασιδία. Τα βασιδιοσπόρια είναι απλοειδή και στα περισσότερα είδη καλούνται βαλλιστοσπόρια, λόγω της ιδιότητάς τους να εκτινάσσονται βίαια, χάρις σε έναν ειδικό μηχανισμό απελευθέρωσης. Σχηματίζονται, συνήθως, ανά τέσσερα σε κάθε βασιδίο στην κορυφή αποφύσεων, οι οποίες ονομάζονται στηρίγματα, έπειτα από μια διαδικασία καρυογαμίας και μείωσης.

Τα κυτταρικά τοιχώματα των Βασιδιομυκήτων αποτελούνται από χιτίνη και γλυκάνες.

Η αγενής αναπαραγωγή στους Βασιδιομύκητες επιτυγχάνεται με εκβλάστηση, κατάτμηση του μυκηλίου και με παραγωγή κονιδίων, αρθροσπορίων και ωιδιοσπορίων.

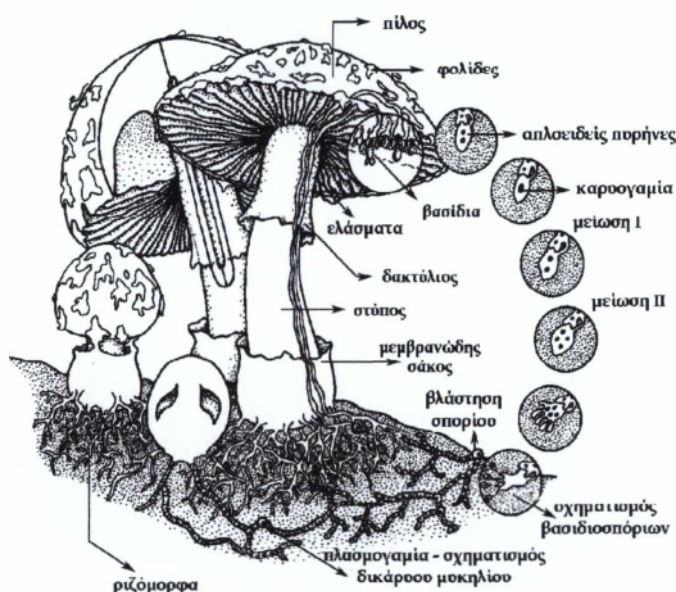
Οι περισσότεροι Βασιδιομύκητες είναι ετεροθαλικοί, το οποίο σημαίνει πως για την επιτυχή σύζευξη δύο μυκηλίων απαιτείται να διαφέρουν οι αλληλόμορφοι στο ένα (διπολικός ετεροθαλλισμός) ή στα δύο γονίδια (τετραπολικός ετεροθαλλισμός), που ελέγχουν το μηχανισμό της εγγενούς αναπαραγωγής. Οι υπόλοιποι είναι ομοθαλικοί ή δευτερευόντως ομοθαλικοί, άρα συνήθως δεν απαιτείται σύζευξη με άλλο συμβατό μυκήλιο για την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου.

Το μυκήλιο των περισσότερων ετεροθαλλικών Βασιδιομυκήτων διέρχεται από τρία διαφορετικά στάδια εξέλιξης, πριν ο μύκητας ολοκληρώσει το βιολογικό του κύκλο. Το πρωτογενές μυκήλιο ή **ομοκάρυο** (όπως πολλές φορές αποκαλείται, λόγω του ότι όλοι οι πυρήνες, που περιέχει, είναι όμοιοι) σχηματίζεται με τη βλάστηση του βασιδιοσπόριου. Συνήθως περιέχει ένα μόνο πυρήνα ανά κύτταρο και η διάρκεια ζωής του είναι σχετικά περιορισμένη. Όταν έλθουν σε επαφή δύο συμβατά (δηλαδή αντιθέτου συζευκτικού τύπου) ομοκάρυα μυκήλια, τότε αυτά αναστομώνονται, δηλαδή στο σημείο επαφής τους διαλύονται τα κυτταρικά τοιχώματα και επιτυγχάνεται η επικοινωνία μεταξύ των δύο πρωτοπλαστών. Ακολούθως, σχηματίζεται το δευτερογενές ή **ετεροκάρυο** μυκήλιο ως αποτέλεσμα της πλασμογαμίας, δηλαδή της σύντηξης των υφών των δύο μυκήτων. Το νέο ετεροκάρυο ή δικάρυο μυκήλιο περιέχει συνήθως δύο διαφορετικούς πυρήνες (προερχόμενοι ο καθένας από διαφορετικό ομοκάρυο μυκήλιο), μέσω μιας διαδικασίας συζυγών διαιρέσεων των πυρήνων και μετακίνησης των θυγατρικών πυρήνων στα νέα κύτταρα, τα οποία προκύπτουν (Ζερβάκης, 1998). Η ύπαρξη δύο διαφορετικών πυρήνων σε κάθε κύτταρο του μυκηλίου εξασφαλίζεται -σε πολλά είδη- με τη βοήθεια ειδικών χαρακτηριστικών κατασκευών (συναντώνται αποκλειστικά στους Βασιδιομύκητες), που σχηματίζονται πάνω στις υφές, στα σημεία όπου δημιουργούνται τα σέπτα (septa, διαφράγματα), και ονομάζονται **κρίκοι** (clamp connections). Όσον αφορά στα σέπτα, στους Βασιδιομύκητες έχουν μια ιδιαίτερη μορφολογία αφού διαθέτουν έναν κεντρικό πόρο-άνοιγμα, ο οποίος -σε πολλά είδη- έχει διογκωμένα άκρα (**δολίπορο σέπτο**) και περιβάλλεται από μία συνήθως διάτρητη ημισφαιρική μεμβράνη, που ονομάζεται **παρενθόσωμα**, η διαμόρφωση της οποίας είναι χρήσιμη για τη διάκριση των κύριων ομάδων μεταξύ των Υμενομυκήτων (Taylor *et al.*, 2004). Όταν ο μύκητας φθάσει στο κατάλληλο μορφογενετικό στάδιο, και σε συνδυασμό με την ύπαρξη ευνοϊκών περιβαλλοντικών συνθηκών, το τριτογενές πλέον μυκήλιο σχηματίζει οργανωμένους και εξειδικευμένους ψευδοϊστούς: αρχικά μια μικρή συμπαγή μάζα ψευδοϊστού (καταβολή της καρποφορίας), η οποία εξελίσσεται σύντομα σε ώριμη καρποφορία (βασιδιοκάρπιο ή βασιδιώμα) ολοκληρώνοντας τον εγγενή κύκλο αναπαραγωγής του Βασιδιομύκητα.

**Βασιδιοκάρπια** σχηματίζουν οι περισσότεροι Βασιδιομύκητες. Το μέγεθός τους μπορεί να φθάσει το 1,5 m σε διάμετρο, το βάρος τους να ξεπεράσει τα 2,5 kg, ενώ η υφή τους μπορεί να είναι σαρκώδης, ξυλώδης, ζελατινώδης, σπογγώδης, φελλώδης κλπ. Η συνηθισμένη μορφή της καρποφορίας αποτελείται

κατά βάση από τον **πίλο** και το **στίπο**. Στα περισσότερα είδη Βασιδιομυκήτων, το γόνιμο στρώμα ή υμένιο (το οποίο αποτελείται από ελάσματα σε ακτινωτή διάταξη ή μικρούς πόρους ή ακίδες ή διάφορες άλλες κατασκευές) βρίσκεται στην κάτω επιφάνεια του πύλου. Στην κάτω επιφάνεια του πύλου βρίσκεται το γόνιμο στρώμα ή υμένιο, το οποίο αποτελείται από ελάσματα σε ακτινωτή διάταξη ή μικρούς πόρους ή ακίδες ή διάφορες άλλες κατασκευές.

Το **υμένιο** μπορεί να είναι εκτεθειμένο από τα αρχικά στάδια σχηματισμού του βασιδιοκάρπου ή μόνο όταν το τελευταίο ωριμάσει. Μπορεί ακόμα να



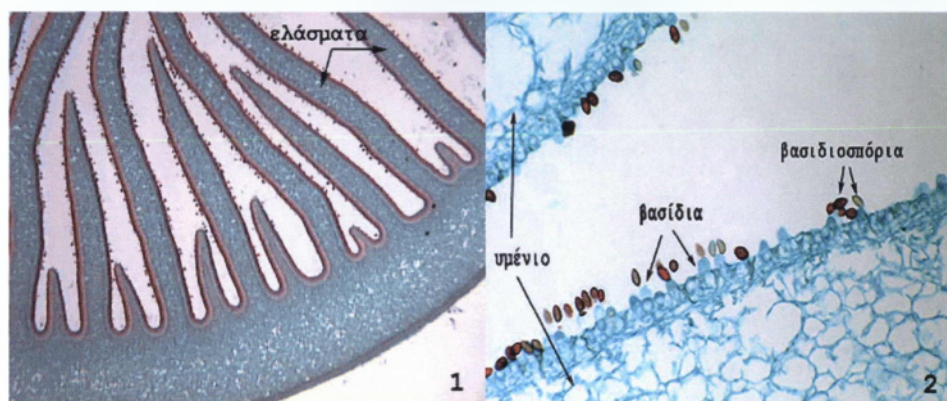
**Εικόνα 2:** Απεικόνιση βασιδιοκάρπου και συνοπτική περιγραφή του βιολογικού κύκλου ενός τοπικού βασιδιομύκητα.

Τροποποιημένη εικόνα, βασισμένη στην: <http://www.ustboniface.mb.ca/cusb/biologie/diversit%E9/figures/fig016.gif>

παραμένει καλυμμένο μέχρι την αποσύνθεση της καρποφορίας ή τη θραύση της από εξωγενείς παράγοντες, όπως έντομα ή μικρά ζώα. Η δομή και η θέση του υμενίου πάνω στις καρποφορίες χρησιμοποιείται για τη διάκριση των Βασιδιομυκήτων σε Τάξεις και Οικογένειες.

Πάνω στην επιφάνεια του υμενίου σχηματίζονται τα **βασίδια**, καθώς και στείρα κύτταρα, που ονομάζονται βασιδιόλες και κυστιδία. Τα βασίδια έχουν συνήθως ροπαλοειδές σχήμα και είναι μονοκύτταρα (**ολοβασίδια**). Ωστόσο υπάρχουν και βασίδια που διαιρούνται σε τέσσερα επιμέρους κύτταρα με διαμήκη ή εγκάρσια διαφράγματα (**φραγμοβασίδια**).

Τα **βασιδιοσπόρια** είναι γενικά μονοκύτταρα, απλοειδή και συνήθως περιέχουν έναν μόνο πυρήνα, εκτός από περιπτώσεις κατά τις οποίες σχηματίζονται δύο βασιδιοσπόρια, λόγω μιτωτικής διαίρεσης στα αρχικά στάδια. Παρουσιάζουν διάφορα μεγέθη, σχήματα, χρώματα και μορφές, που αποτελούν σημαντικά ταξινομικά γνωρίσματα (Ζερβάκης, 1998).



Εικόνα 3: Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο. Αριστερά απεικονίζονται τα ελάσματα, ενώ δεξιά είναι ορατά σε μεγαλύτερη μεγέθυνση: ο ψευδοϊστός των ελασμάτων, τα βασίδια και τα βασιδιοσπόρια.

Τροποποιημένες εικόνες, βασισμένες στις: 1: <http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/images/mushgill.gif>, 2: [http://botit.botany.wisc.edu/images/130/Fungi/Basidiomycota/Images/Fleshy\\_Basidiomycota/Mushroom\\_Basidia\\_Basidiospores/Gills\\_detail\\_MC.jpg](http://botit.botany.wisc.edu/images/130/Fungi/Basidiomycota/Images/Fleshy_Basidiomycota/Mushroom_Basidia_Basidiospores/Gills_detail_MC.jpg)

Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα ερευνητικά ευρήματα, που βασίζονται σε μοριακούς χαρακτήρες και ιδιαίτερα στην ανάλυση της ακολουθίας του ριβοσωμικού DNA, οι Βασιδιομύκητες διαχωρίζονται σε τρεις μεγάλες ταξινομικές ομάδες: Hymenomycetes, Ustilaginomycetes και Urediniomycetes (Ζερβάκης, 1998, Taylor *et al.*, 2004).

### 3.2 Συστηματική Ομοβασιδιομυκήτων

Η συστηματική των Ομοβασιδιομυκήτων (Homobasidiomycetes) έχει εξαρτηθεί -κατά ένα μεγάλο μέρος- από τη μορφολογία, δηλαδή από τους μακροσκοπικούς χαρακτήρες (μέγεθος πύλου, σχήμα, σύσταση, μορφή, χρώμα, χαρακτηριστικά γνωρίσματα επιφάνειας, περιφέρεια, πάχος κλπ., μέγεθος ελασμάτων, πυκνότητα, πάχος, βαθμός που αυτά συντρέχουν στο στίβο, χρώμα,

αναστομώσεις κλπ., μέγεθος στίπου, σχήμα, πάχος, σχετική θέση, χαρακτηριστικά επιφάνειας, χρώμα κλπ., σύσταση σάρκας, χρώμα, μυρωδιά, γεύση κλπ.), τους μικροσκοπικούς χαρακτήρες (βασιδιοσπόρια, βασιδία, κυστίδια, δομή του συστήματος υφών, υποϋμένιο, επιδερμίδα κλπ.) και τις μυκηλιακές αποικίες (σύσταση, μέγεθος, χρώμα, περιφέρεια, μορφή, παρουσία ή απουσία χρωστικών ουσιών, παρουσία ή απουσία μηχανισμών παγίδευσης νηματωδών, παρουσία ή απουσία αγενών καρποφοριών, παρουσία ή απουσία κρίκων κλπ.).

Επιπλέον, τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα, που αφορούν στη φυσιολογία και την οικολογία, είναι πολύτιμα για τη διάκριση πολύ συγγενικών οργανισμών, παραδείγματος χάρη ιστοχημικές αντιδράσεις με χημικά αντιδραστήρια, παραγωγή ενζύμων και χρωστικών ουσιών, ρυθμός αύξησης μυκηλίου, ξενιστής ή υπόστρωμα, τρόπος εμφάνισης καρποφοριών και βιότοπος, σχέσεις με άλλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, γεωγραφική κατανομή κ.λπ. (Zervakis, 2004).

### 3.3 Η οικογένεια Pleurotaceae

Πρόσφατες φυλογενετικές αναλύσεις (Thorn *et al.*, 2000), βασισμένες στη μερική ακολουθία του 25S rDNA γονιδίου, επιβεβαιώνουν την ύπαρξη της οικογένειας Pleurotaceae, η οποία είχε προταθεί και στο παρελθόν (Kuehner, 1980, Thorn and Barron, 1984, 1986).

Η οικογένεια Pleurotaceae ανήκει στην τάξη Agaricales και αποτελείται από τα γένη *Pleurotus* και *Hohembuehelia*, κοινό χαρακτηριστικό των οποίων αποτελεί η παγίδευση και κατανάλωση ζωντανών νηματωδών (νηματοδοφαγία) (Thorn *et al.*, 2000). Ανάμεσα στους μύκητες της τάξης Agaricales, η νηματοδοφαγία αποτελεί χαρακτηριστικό μόνο της οικογένειας Pleurotaceae (Barron and Dierkes, 1977, Thorn and Barron, 1984, 1986, Barron and Thorn, 1987, Hibbert and Thorn, 1994). Και τα δύο γένη της οικογένειας σχηματίζουν «πλευρωτοειδή» βασιδιοκάρπια, δηλαδή έχουν ελάσματα, υποκεντρικό ή πλευρικό στίπο και είναι πλευρικά προσαρτημένα και άμισχα (Thorn *et al.*, 2000).

### 1.3 Το γένος *Pleurotus*

Οι μύκητες του γένους *Pleurotus* (Jacquin: Fries) Kummer (Pleurotaceae, Agaricales) είναι τετραπολικοί ετεροθαλικοί. Τα δικάρυα μυκήλια παράγουν εδώδιμες αναπαραγωγικές κατασκευές (βασιδιώματα ή βασιδιοκάρπια), στις οποίες περιλαμβάνονται σημαντικά είδη εδώδιμων και φαρμακευτικών μανιταριών, που ζουν συνήθως ως σαπροτροφικοί οργανισμοί, πάνω σε νεκρά υπολείμματα ξυλείας και φυτών. Η μοναδική ομάδα αυτού του γένους, που αναπτύσσεται σε άμεση σχέση με ζωντανά φυτά, είναι αυτή του *Pleurotus eryngii* s.l. (Zervakis et al., 2001). Τα είδη του γένους *Pleurotus* κατατάσσονται στη φυσιολογική ομάδα των μυκήτων «λευκής σήψης» (“white-rot fungi”), δηλαδή μυκήτων ικανών να διασπών σε μεγάλο βαθμό τα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα, προκειμένου να «αποκτήσουν πρόσβαση» σε πολυσακχαρίτες, οι οποίοι παραμένουν εγκλωβισμένοι μέσα σε σύμπλοκα λιγνίνης – υδατανθράκων, για να εκμεταλλευθούν μια πηγή ενέργειας όχι άμεσα προσβάσιμη σε άλλους οργανισμούς (Jeffries, 1990). Τέτοιοι μύκητες κατέχουν την πρόσθετη και ιδιαίτερη δυνατότητα για εκλεκτική απολιγνινοποίηση (Mayson and Verachtert, 1991) με το να συνθέτουν τα κατάλληλα υδρολυτικά (κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες) και οξειδωτικά (λιγνινολυτικά) εξωκυτταρικά ένζυμα, που απαιτούνται για την αποδόμηση σημαντικών συστατικών του υποστρώματος σε -χαμηλού μοριακού βάρους- ενώσεις (Kirk and Farrell, 1987).

Η καλλιέργεια των *Pleurotus* (κυρίως των *P. ostreatus*, *P. eryngii*, και *P. pulmonarius* σε εύκρατες περιοχές και των *P. djamor*, *P. cystidiosus* και *P. tuberregium* σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές) είναι μια οικονομικά σημαντική αγροβιομηχανική δραστηριότητα, που εφαρμόζεται σε ένα μεγάλο εύρος λιγνινοκυτταρινούχων υπολειμμάτων. Η παραγωγή μανιταριών του γένους *Pleurotus* αντιστοιχεί σε περισσότερο από το 25% του παγκοσμίου συνόλου, πλησιάζοντας το ένα εκατομμύριο τόνους ετήσια (Chang, 1996, Kues and Liu, 2000). Η καλλιέργειά τους είναι μια σχετικά απλή διαδικασία, που απαιτεί τη θερμική παστερίωση του υποστρώματος, αλλά χωρίς να έχει προηγηθεί κομποστοποίηση ή προ-επεξεργασία των αρχικών υλικών. Επιπλέον, η επώαση και η καρποφορία δεν απαιτούν απαραίτητα δαπανηρή υποδομή, παρουσιάζουν δε λίγες δυσκολίες όσον αφορά στα παράσιτα και τις ασθένειες και δε χρειάζονται την προσθήκη υλικού επικάλυψης όπως η καλλιέργεια του λευκού

μανιταριού *Agaricus bisporus* (Zervakis, 2004). Το κύριο συστατικό, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του υποστρώματος των *Pleurotus*, είναι συνήθως το άχυρο σίτου, τεμαχισμένο, βρεγμένο με νερό και εμπλουτισμένο με υλικά πλούσια σε άζωτο (παραδείγματος χάρη, σπόροι και άλευρα, που προέρχονται από καλλιέργειες ψυχανθών). Εντούτοις, υπάρχει μία συνεχώς αναπτυσσόμενη και παγκόσμια τάση εκμετάλλευσης των λιγνινοκυτταρινολυτικών ενζύμων των *Pleurotus* για την αξιοποίηση μιας μεγάλης ποικιλίας γεωργικών και δασικών απορριμμάτων (παραδείγματος χάρη φλοιοί, πριονίδι, στελέχη καλαμποκιού, υπολείμματα κοκκοφοινίκων, άχυρα ορυζώνων, παραπροϊόντα παραλαβής ζάχαρης από ζαχαροκάλαμα, υπολείμματα βαμβακιού, υπολείμματα ελαιοποίησης, φλούδες εσπεριδοειδών, στέμφυλα κλπ.) ως εναλλακτικά υποστρώματα, για την καλλιέργεια των οστρακόμορφων μανιταριών (Nikolini *et al.*, 1987, Philippousis *et al.*, 2001, Ragunathan *et al.*, 1996, Silanikove *et al.*, 1988, Thomas *et al.*, 1998, Zervakis and Balis, 1992, Zervakis *et al.*, 1996, Zervakis *et al.*, 2001).

Τα βασιδιώματα των *Pleurotus* έχουν αξιόλογες οργανοληπτικές ιδιότητες (μοναδική γεύση και αρωματικές ιδιότητες) και είναι πλούσια σε υδατάνθρακες (3-28% f.w.), διαιτητικές ίνες (3-32% d.w.), πρωτεΐνες (1,0-30% d.w.), βασικά αμινοξέα (ιδίως αλανίνη, γλουταμινικό οξύ, και γλουταμίνη: 25-35% d.w.), βιταμίνες (C, A, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, D, και νιασίνη), μέταλλα (K, P, Mg, Ca, Na, Fe, Se, Zn, Cu, Mn) και λιπίδια (3-5% d.w.) (Gunde-Cimerman, 1999).

Ακόμα, τα *Pleurotus* είναι υποσχόμενα ως φαρμακευτικά μανιτάρια, λόγω της δράσης τους εναντίον διαφόρων χρόνιων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της υπέρτασης, του διαβήτη και του καρκίνου (Kues and Liu, 2000, Wasser, 2002, Wasser and Weis, 1999). Παραδείγματος χάρη, το *P. ostreatus* παράγει λοβαστατίνη (lovastatin), η οποία μειώνει το επίπεδο της χοληστερόλης και παρουσιάζει, επίσης, δραστηριότητα κατά της ογκογένεσης, έναντι των ιών, των βακτηρίων, καθώς και ανοσορυθμιστική δραστηριότητα (Wasser, 2002, Wasser and Weis, 1999a, Wasser and Weis, 1999b): μερικά βιοενεργά μόρια έχουν ανιχνευθεί στα μανιτάρια αυτά, ιδίως πολυσακχαρίτες (παραδείγματος χάρη, β-D-γλυκάνες ετερογενών μοριακών βαρών), που χρησιμοποιούνται ως αποτελεσματικά αντικαρκινικά και ανοσοδιεγερτικά φάρμακα, λεκτίνες και γλυκοπεπτιδία, που χρησιμοποιούνται ως ουσίες κατά της ογκογένεσης κλπ.

Εκτός από την ανθρώπινη κατανάλωση, τα είδη του γένους *Pleurotus* έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή καλής ποιότητας ζωτροφής με τον εμπλουτισμό των αρχικών υπολειμμάτων με πρωτεΐνη, μέσω της αύξησης του



μυκηλίου και, ταυτόχρονα, τη βελτίωση της πεπτικότητας με την επιλεκτική αποδόμηση λιγνίνης και ημικιτταρίνης και διατηρώντας την κυτταρίνη αρκετά άθικτη ως πηγή ενέργειας για τα μηρυκαστικά (Masaphy *et al.*, 1993, Tripathi and Yadav, 1992). Κατ' αυτόν τον τρόπο, διαφορετικοί τύποι υπολειμμάτων (όπως άχυρο σίτου, στελέχη βαμβακιού, κλπ.) έχουν αξιοποιηθεί και καταστεί κατάλληλοι για ζωοτροφή (Hadar *et al.*, 1992, Jalk *et al.*, 1996).

Μία από τις πλέον ενδιαφέρουσες εφαρμογές των *Pleurotus* σχετίζεται με την εκμετάλλευση του μοναδικού λιγνινολυτικού συστήματός τους ως εργαλείου για τη βιομετατροπή – βιοδιάσπαση των βιομηχανικών αποβλήτων, και των υδατικών αποβλήτων, που προκύπτουν από τις αγρο-δασσοκομικές δραστηριότητες. Τρεις λιγνινολυτικές οικογένειες ενζύμων έχουν χαρακτηριστεί: η υπεροξειδάση εξαρτώμενη από την παρουσία μαγγανίου, η «ευπροσάρμοστη» υπεροξειδάση (versatile peroxidase), και η λακκάση (Cohen *et al.*, 2002, Hatakka, 1994).

Ως εκ τούτου, οι μύκητες του γένους *Pleurotus* έχουν επιτυχώς χρησιμοποιηθεί για τη βιοδιάσπαση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) (Bezalel *et al.*, 1996), τη βιοαποκατάσταση των εδαφών που ρυπαίνονται με PAHs (Baldrian *et al.*, 2000, Bogan *et al.*, 1999), την ανοργανοποίηση του DDT (Pointing, 2001), τον αποχρωματισμό των ρυπαντών πλούσιων σε χρωστικές ουσίες από την κλωστοϋφαντουργία και άλλες βιομηχανίες (McMullan *et al.*, 2001), τη βιοδιάσπαση της ατραζίνης (Masaphy *et al.*, 1993), την αποτοξικοποίηση των αγροβιομηχανικών αποβλήτων (Aggelis *et al.*, 2002), τη βιοδιάσπαση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (Amitai *et al.*, 1998), τη βελτίωση εδαφών, μέσω της εκμετάλλευσης του εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών (Eggen, 1999), κλπ.

Η συστηματική του γένους *Pleurotus* υπήρξε ιδιαίτερα αμφιλεγόμενη στο παρελθόν, ειδικά όσον αφορά στις σχέσεις μεταξύ των ακολούθων «πραγματικών» ή μη ταξινομικών ομάδων είτε στελεχών τα οποία ταυτοποιούνταν με λανθασμένη εφαρμογή ταξινομικών ονομάτων: *Pleurotus ostreatus* (Jacquin: Fries) Kummer, *P. columbinus* (Quélet) Quélet, *P. pulmonarius* (Fries) Quélet, *P. sapidus* (Schulzer) Saccardo (Anderson *et al.*, 1973, Eger *et al.*, 1979, Hilber, 1982), *P. citrinopileatus* Singer, *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland (Hilber, 1982, Ohira, 1990), *P. cystidiosus* Miller, *Pleurotus abalonus* Han, Chen *et al.* Cheng και *P. smithii* Guzmán (Guzman *et al.*, 1991, Han *et al.*, 1974, Jong and

Peng, 1975), το σύμπλοκο είδος *P. eryngii* (De Candolle: Fries) Quélet. (Boisselier-Dubayle, 1983, Bresinsky *et al.*, 1987, Hilber, 1982, Joly *et al.*, 1990) και διαφόρων άλλων. Αυτές οι ταξινομικές ασάφειες προέκυψαν λόγω αρχικά λανθασμένων αναγνωρίσεων, απουσίας τυποποίησης των ειδών, σημαντικής επιρροής ασκούμενης από το περιβάλλον και τον ξενιστή στη μορφολογία των περισσότερων ταξινομικών ομάδων, περιορισμένης ύπαρξης αντικειμενικών φυσιολογικών χαρακτήρων και έλλειψης καταλλήλων μελετών γενετικής ή σωματικής συμβατότητας. Η πλήρης εκμετάλλευση των τελευταίων δεν έχει επιτευχθεί ακόμα, δεδομένου ότι απαιτεί τη ακριβή γνώση της γεωγραφικής κατανομής του κάθε πληθυσμού και της λεπτομερούς κατανόησης των μηχανισμών της ειδογένεσης μέσα σε αυτήν την συγκεκριμένη ομάδα μυκήτων (Zervakis, 2004).

### 3.4 Το είδος *Pleurotus eryngii*

#### 3.4.1 Γεωγραφική κατανομή

Η γεωγραφική κατανομή του μύκητα *Pleurotus eryngii* (De Candolle: Fries) Quélet εντοπίζεται μέσα σε μια αρκετά σαφώς καθορισμένη περιοχή μεταξύ περίπου 30-50° N (μεταξύ της Β. Γαλλίας, της Ν. Γερμανίας, της Πολωνίας, της Ν. Ρωσίας και της Μεσογειακής παράκτιας ζώνης της Αφρικής, του Ιράν και του Αφγανιστάν), δυτικά προς τις ατλαντικές ακτές της Γαλλίας και του Μαρόκου, και πιο ανατολικά προς τα δυτικά όντορα της Ινδίας και της Κίνας. Πιο συγκεκριμένα για την Ευρώπη, στη Γαλλία: στην κοιλάδα του Λίγηρα, του Σερ, του Σαόν και του Ροδανού, στις Άλπεις, τη Νοτιοδυτική ακτή και την Κορσική. Στην Ιταλία: από τις Άλπεις και κατά μήκος των Απεννίνων Ορέων μέχρι την Αίτνα και τα Όρη Νεμπρόντι (Σικελία), καθώς επίσης και στην υπόλοιπη Σικελία και τη Σαρδηνία. Για την υπόλοιπη Ευρώπη: στην ηπειρωτική Ελλάδα, την Κρήτη και τα νησιά του Αιγαίου, στην Ισπανία, την Κροατία, τη Σλοβακία, την Ουγγαρία την Τσεχία, τη Σλοβακία, σε αρκετές Δημοκρατίες της πρώην ΕΣΣΔ κ.ά. (Zervakis and Balis, 1996).

### 3.4.2 Ξενιστές

Το είδος *Pleurotus eryngii* απαντάται στο βόρειο ημισφαίριο ως σαπροτροφικός και ενίοτε ως προαιρετικά βιοτροφικός οργανισμός σε φυτά της οικογένειας *Umbelliferae* (*Apiaceae*, Σκιαδανθή) (*Eryngium campestre* L., *E. maritimum* L., *E. alpinum* L., *E. planum* L., *E. maroccanum*, *Ferula communis* L., *Ferulago galbanifera* Koch [συν. *Ferulago campestris* (Besser) Grecescu] *Cachrys ferulacea* L. (συν. *Frangos ferulacea* Lindley), *Laserpitium latifolium* L., *L. siler* L., *L. gallicum* L., *Diplotaenia cachrydifolia*, *D. damavandica*, *Elaeoselinum asclepium* L., *Oporanax chironium* L.(Koch.), *Peucedanum* spp. L.). Έχει επίσης αναφερθεί και σε φυτά της οικογένειας *Compositae* (Σύνθετα) (*Scorzonera villosa*, *Tragopogon porrifolius* L.). Εμφανίζεται συνήθως μέσα σε ομάδες, από το φθινόπωρο μέχρι τα τέλη της άνοιξης (Zervakis and Balis, 1996).

### 3.4.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο πύλος της καρποφορίας του είδους *Pleurotus eryngii* είναι αρχικά πεπλατυσμένος έως ελαφρά κυρτός, ομαλός, κυκλικός και συνήθως οστρακόμορφος, χρώματος θερμού φαιού προς υποκίτρινο έως ανοικτό μπεζ (15/11E προς 12/5E προς 11/3C), με μερικά διάσπαρτα στίγματα ανοικτού καστανού χρώματος (15/9C). Κατά την ωρίμανση έχει μέγεθος 4 – 12,5 cm, είναι κυρίως επίπεδος και κυκλικός, ομαλός, ξηρός, χρώματος θερμού καστανού προς ανοικτό μπεζ προς μπεζ-καστανό (15/11E προς 11/3C προς 13/6E), καλυμμένος με πολυάριθμες μπεζ-καστανές έως ανοικτές καστανές φολίδες (13/6E σε 15/9C), με ομαλή ή ελαφρά οδοντωτή και συστρεμμένη περίμετρο.

Το κάτω τμήμα του πύλου αποτελείται από λεπτά ελάσματα, ευρέα, όχι ιδιαίτερα πυκνά, συντρέχοντα στην κορυφή του στίπου, άρτια, χωρίς αναστομώσεις, χρώματος κρεμ προς υπόλευκο προς ανοικτό μπεζ-πορτοκαλί (10/3C προς 10/2B προς 10/7I).

Ο στίπος έχει μέγεθος 1,5 – 3,5 cm x 0,5 – 2,5 cm, είναι κεντρικός και σπάνια υποκεντρικός, συνήθως κυλινδρικός, συμπαγής, με χνούδι κυρίως γύρω από τη βάση του, χρώματος κρεμ προς υπόλευκο (10/3C σε 10/2B).

Η σάρκα της καρποφορίας είναι συμπαγής, αλλά μερικές φορές ελαστική, με χρώμα λευκό προς κρεμ. Έχει ήπια μυρωδιά, παρεμφερή με αυτήν του άνηθου. Η γεύση της είναι απαλή και ευδιάκριτα ευχάριστη (Zervakis and Balis, 1996).

Έτσι, το *Pleurotus eryngii* θεωρείται ως μακράν το πλέον εύγευστο από τα οστρακόμορφα μανιτάρια και δίκαια κατέχει τον τίτλο του Βασιλιά των οστρακόμορφων μανιταριών (King Oyster) (Stamets, 2000).

Τα βασιδιοσπόρια έχουν μέγεθος  $8,0 - 13,0 \mu\text{m} \times 3,5 - 6,0 \mu\text{m}$  (μέσος όρος μεγέθους  $10,43 \pm 1,54 \mu\text{m} \times 4,70 \pm 0,68 \mu\text{m}$ ), είναι κυλινδρικά, με λεπτά τοιχώματα, με μικρό και ευρύ κορυφαίο άνοιγμα (apiculus), με περιεχόμενο συνήθως κίτρινου χρώματος. Το ίχνος ή αποτόπωμα των σπορίων (αποξηραμένα) έχει χρώμα κρεμ προς ανοικτό κίτρινο προς ανοικτό καστανό (10/3C στο 9/11 15/9C).

Τα βασίδια έχουν διαστάσεις  $30 - 52 \mu\text{m} \times 7,1 - 8,8 \mu\text{m}$  και είναι κυλινδρικά, με λεπτά τοιχώματα.

Τα στηρίγματα έχουν μήκος  $4,4 \mu\text{m}$ . Κυστιδία στον στίβο εμφανίζονται σπάνια, συνήθως στο ανώτερο μισό του, κυρίως σαν χνούδι. Χειλοκυστίδια σπάνια. Πλευροκυστίδια απόντα. Το σύστημα των υφών είναι μονομιτικό. Η επιδερμίδα του πύλου έχει εύρος  $260 - 420 \mu\text{m}$ , με ακανόνιστες και περιπλεγμένες παραγωγικές υφές.

Το σύστημα υφών (σάρκα, trama) του πύλου αποτελείται από στενά διατεταγμένες υφές διαμέτρου  $4,1 - 5,5 \mu\text{m}$ .

Το σύστημα υφών των ελασμάτων αποτελείται από ακανόνιστες και διακλαδισμένες υφές διαμέτρου  $3,9 - 5,4 \mu\text{m}$ .

Τέλος, το σύστημα υφών του στίπου, αποτελείται από ακανόνιστες και περιπλεγμένες υφές διαμέτρου  $4,6 - 8,5 \mu\text{m}$ .

Όλες οι παραγωγικές υφές έχουν λεπτά τοιχώματα, με κρίκους. Το υποϋμένιο διαμορφώνεται από κύτταρα στενά διατεταγμένα, με λεπτά τοιχώματα, κοντά και πλατιά. Τα βασιδιοσπόρια, τα βασίδια και το σύστημα υφών (με περιστασιακή την παρουσία ελαιοφόρων υφών) είναι υαλώδη σε ΚΟΗ και στο αντιδραστήριο Melzer.

Οι χρωστικές ουσίες είναι απούσες στις μυκηλιακές καλλιέργειες.

Οι δικάρυες αποικίες, συνήθως, παρουσιάζουν ένα ελαφρά βυθισμένο εναέριο μυκήλιο, λίγο πολύ με ζωνώσεις και ακτινωτό, με ομαλή περίμετρο, λευκού χρώματος προς κρεμ (έως 10/3C). Οι υφές σχηματίζονται από κύτταρα με λεπτά τοιχώματα και με άφθονους κρίκους.

Η παραγωγή μικροσταγονιδίων είναι περιστασιακή και λαμβάνει χώρα αποκλειστικά στα κοντά εκκριτικά στηρίγματα, που βρίσκονται πάνω στις εναέριες υφές, και έχει ως σκοπό την παγίδευση των νηματωδών (Zervakis and Balis, 1996).

Όσον αφορά στη Συστηματική του είδους *Pleurotus eryngii*, το λευκό προς καστανό χρώμα του πύλου με τις πολυάριθμες διασκορπισμένες μπεζ φολίδες, ο άρτια αναπτυγμένος κεντρικός ή ελαφρά υποκεντρικός στίπος, τα σχετικά μεγάλα βασιδιοσπόρια, η μορφολογία της μυκηλιακής αποικίας και η μεγάλη περίοδος επώασης πριν την καρποφορία, *in vitro*, αξιολογήθηκαν ως τα κύρια χαρακτηριστικά γνωρίσματα του μύκητα (Zervakis and Balis, 1996, Zervakis *et al.*, 2001, Zervakis 2004).

Προηγούμενες μελέτες γύρω από το σύμπλοκο είδος *Pleurotus eryngii*, βασισμένες σε μορφολογικά στοιχεία και στοιχεία αναπαραγωγικής συμβατότητας, έφθασαν στο συμπέρασμα ότι το είδος αυτό θα μπορούσε να διαιρεθεί σε τρεις κύριες ποικιλίες με βάση την «προτίμηση» στον ξενιστή: *Pleurotus eryngii* var. *eryngii*, *P. eryngii* var. *ferulae*, και *P. eryngii* var. *nebrodensis* (Hilber, 1982, Zervakis and Balis, 1996). Εντούτοις, το γεγονός ότι οι διασταυρώσεις μεταξύ πληθυσμών συνδεμένων με τον ξενιστή οδήγησαν σε σχετικά χαμηλή δια-συμβατότητα (συμβατότητα μεταξύ των επιμέρους ομάδων) σε συνδυασμό με τις μικρές ανατομικές διαφορές και τα υψηλά επίπεδα φαινετικών ομοιοτήτων μέσα στην ομάδα των *P. eryngii* (Iraçabal *et al.*, 1995, Zervakis and Balis, 1996, Zervakis *et al.*, 1994) δικαιολόγησε την ανάγκη για μια λεπτομερή δειγματοληψία στελεχών *Pleurotus* από μια ευρεία ποικιλία φυτών-ξενιστών και γεωγραφικών προελεύσεων. Η εφαρμογή μιας προσέγγισης μορφολογικών χαρακτήρων και οικολογικών χαρακτηριστικών γνωρισμάτων σε συνδυασμό με ισοενζυμικές και PCR - RAPD αναλύσεις έδωσε κάποιες απαντήσεις σε αυτήν την περιπλεγμένη κατάσταση (Venturella *et al.*, 2000, Venturella *et al.*, 2002, Zervakis *et al.*, 2001). Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ταξινόμηση των στελεχών *Pleurotus eryngii* s.l. σε πέντε ομάδες σύμφωνα με την «προτίμηση» στον ξενιστή: απομονώσεις, που αναπτύσσονται σε σχέση με το φυτό *Cachrys ferulacea*, παρουσίασαν αυξημένες γενετικές αποστάσεις με όλους τους άλλους πληθυσμούς, και συνεπώς αντιπροσωπεύουν ένα ευδιάκριτο είδος, το *P. nebrodensis* (Inzenga) Quélet. Ωστόσο όλοι οι άλλοι οικότυποι, ομαδοποιούνται μέσα σε ένα μεγαλύτερο σύμπλεγμα (*P. eryngii* s.s.) το οποίο θα μπορούσε να υποδιαιρεθεί σε τέσσερις ομάδες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε έναν από τους υπόλοιπους ξενιστές, και ως εκ τούτου αποτελούν ταξινομικές ομάδες στο επίπεδο της ποικιλίας: *P. eryngii* var. *eryngii* (για τον ξενιστή *Eryngium* spp.), *P. eryngii* var. *ferulae* (για τον ξενιστή *Ferula communis*), *P. eryngii* var. *thapsiae* (για τον ξενιστή *Thapsia garganica*) και *P. eryngii* var. *elaeoselini* (για τον

ξενιστή *Elaeoselinum asclepium* subsp. *asclepium*). Όλοι οι μεσογειακοί πληθυσμοί του *Pleurotus*, που αναπτύσσονται σε σχέση με φυτά της οικογένειας των Σταυρανθών (*Umbelliferae*), φαίνονται να διαφοροποιήθηκαν πρόσφατα, μέσω μιας εξελικτικής διαδικασίας, βασισμένης τόσο σε εγγενείς αναπαραγωγικούς φραγμούς όσο και σε εξωγενείς οικο-γεωγραφικούς παράγοντες (Zervakis *et al.*, 2001).

Όπως γίνεται αντιληπτό παραμένουν ακόμη ασάφειες, σχετικά με την ταξινόμηση εντός του συμπλόκου είδους *Pleurotus eryngii*.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η συμβολή στη δημιουργία της ακριβούς εικόνας των ταξινομικών σχέσεων μεταξύ των μελών του *Pleurotus eryngii* s.l., καθώς και η διαλεύκανση των ασαφειών στη συστηματική του συμπλόκου είδους. Για το σκοπό αυτό κρίθηκε σκόπιμη η εφαρμογή μοριακών κριτηρίων, τα οποία είναι απαλλαγμένα από την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων και επομένως είναι δυνατό να δώσουν αντικειμενικότερες και πιο αξιόπιστες απαντήσεις στα προαναφερθέντα ζητήματα.

## Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 33 στελέχη του είδους *Pleurotus eryngii sensu lato* και ενός στελέχους του *Pleurotus cystidiosus*. Λεπτομέρειες σχετικά με τη γεωγραφική προέλευση και τα φυτά-ξενιστές για το κάθε στέλεχος παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 του πρώτου παραρτήματος. Τα στελέχη αυτά ήταν διαθέσιμα ως καθαρές καλλιέργειες (μυκήλιο) ή ως αποξηραμένα δείγματα.

### 2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (BUFFER)

#### PDA

Σε διάλυμα PDB 2,4% w/v προστέθηκε άγαρ 1,7% w/v και το θρεπτικό διάλυμα που προέκυψε αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο, όπως παραπάνω. Μετά την αποστείρωση μοιράστηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί.

#### LB

Αναμιχθηκαν καζεΐνη 1% w/v, εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) 0,5% w/v και NaCl 1% w/v, σε απιονισμένο νερό. Το διάλυμα μοιράστηκε ανά 10 ml σε φιαλίδια universal και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο για 20 min (121°C, 1,1 atm).

#### LB άγαρ

Σε κωνική φιάλη αναμιχθηκαν καζεΐνη 1% w/v, εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) 0,5% w/v, NaCl 1% w/v και άγαρ 1,7% w/v, σε απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αποστειρώθηκε για 20 min (121°C, 1,1 atm). Μετά την αποστείρωση το

θρεπτικό μοιράστηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί.

#### **LB άγαρ/ αμπικιλίνη**

Παρασκευάστηκε διάλυμα LB άγαρ, το οποίο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο, όπως παραπάνω. Μετά την αποστείρωση και πώση της θερμοκρασίας του θρεπτικού διαλύματος και πριν την τοποθέτησή του σε τρυβλία Petri, προστέθηκε ασηπτικά σε αυτό αμπικιλίνη 0,1 mg/ml θρεπτικού διαλύματος.

#### **Fungal DNA Extraction Buffer**

Παρασκευάστηκε διάλυμα λύσης κυττάρων (Fungal DNA Extraction Buffer) με ανάμιξη 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 3% w/v SDS και 0,1 mg/ml πρωτεΐνάσης K (Proteinase K). Ακολούθησε αποστείρωση του διαλύματος, για 20 min, στους 121°C και 1,1 atm.

#### **CTAB Extraction Buffer (<http://www.dumru.mc.duke.edu/Herbarium.html>)**

Παρασκευάστηκε διάλυμα λύσης κυττάρων αποξηραμένων ιστών, CTAB Extraction Buffer, αναμιγνύοντας 1% w/v CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA και 0,7 M NaCl και αποστειρώνοντας όπως αναφέρεται παραπάνω.

#### **TAE Buffer 50X (Sambrook and Russell, 2001)**

Αναμιχθηκαν 242 gr Tris, 100 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA και 50,6 ml CH<sub>3</sub>COOH, σε τελικό όγκο διαλύματος 1000 ml.

#### **STET Buffer**

Για την παρασκευή διαλύματος λύσης βακτηριακών κυττάρων (STET Buffer) αναμιχθηκαν 8% w/v σακχαρόζης, 5% v/v Triton X 100, 50 mM Tris-HCl pH 8 και 50 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8. Το διάλυμα αποστειρώθηκε με τη χρήση μικροβιολογικού φίλτρου 0,2 μm.



**Loading Buffer (Sambrook and Russell, 2001)**

Παρασκευάστηκε διάλυμα φόρτωσης πηκτής αγαρόζης με την ανάμιξη 0,25% w/v κυανού της βρομοφαινόλης (bromophenol blue) και 40% w/v σακχαρόζης.

**Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 1% w/v**

1% w/v αγαρόζης διαλύθηκε μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X και το μίγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι πλήρους ομογενοποίησης. Όταν το διάλυμα έφθασε σε θερμοκρασία 50 - 60°C τοποθετήθηκε σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε έως ότου να στερεοποιηθεί.

**X-Gal 2% w/v (Sambrook and Russell, 2001)**

Διαλύθηκαν 20 mg X-Gal σε 1 ml διαλύτη dimethyl formamide. Το διάλυμα που προέκυψε αποστειρώθηκε με τη χρήση μικροβιολογικού φίλτρου 0,2 μm.

**IPTG 100 mM (Sambrook and Russell, 2001)**

0,2 gr IPTG διαλύθηκαν σε ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 1 ml. Το διάλυμα αποστειρώθηκε με τη χρήση μικροβιολογικού φίλτρου 0,2 μm.

### 3. ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA του *Pleurotus eryngii* από καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο.

Με τη βοήθεια αποστειρωμένης λεπίδας αφαιρέθηκε μυκήλιο από καλλιέργεια του μύκητα *P. eryngii* σε τρυβλίο Petri και μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες μέσα σε φιαλίδιο erpendorf. Ακολούθησε εμβάπτιση του φιαλιδίου σε υγρό άζωτο και έκθλιψη του μυκηλίου με τη χρήση αποστειρωμένης ράβδου. Στο δείγμα προστέθηκαν 500 - 700 μl διαλύματος λύσης κυττάρων (Fungal DNA Extraction Buffer), το μίγμα αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 65°C, για 60 min, με ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια, προστέθηκε ίσος όγκος Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol 25:24:1 v/v και το περιεχόμενο του φιαλιδίου αναδεύτηκε ισχυρά. Μετά από φυγοκέντρηση για 10 min, στις 13000 rpm, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο, ενώ η στερεή μέση φάση και το υποκείμενο διάλυμα απορρίφθηκαν. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 13000 rpm, αφού είχε προηγηθεί προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου και ισχυρή ανάδευση. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο και προστέθηκε σε αυτό ίσος όγκος ισοπροπανόλης και 1/10 του όγκου διαλύματος NaAc. Μετά από ελαφρά ανάδευση, το δείγμα αφέθηκε στους -20°C, για 18 hr, ώστε να γίνει κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 min, στις 13000 rpm. Μετά την απομάκρυνση της υγρής φάσης, προστέθηκαν 400 μl αιθυλικής αλκοόλης 70% v/v και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min, στις 13000 rpm. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα της αιθυλικής αλκοόλης και το δείγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι πλήρους εξάτμισης της τελευταίας. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 200 μl ddH<sub>2</sub>O, προσθήκη 2 μl ριβονουκλεάσης A (10 mg/ml), και το δείγμα αφέθηκε στο υδατόλουτρο, στους 37°C, για 30 min. Μετά από καθαρισμό με Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol 25:24:1 v/v και χλωροφόρμιο και αφού προστέθηκαν ισοπροπανόλη και διάλυμα NaAc όπως περιγράφεται παραπάνω, τα δείγματα αφέθηκαν για κατακρήμνιση του DNA στους -20°C για 18 hr. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για

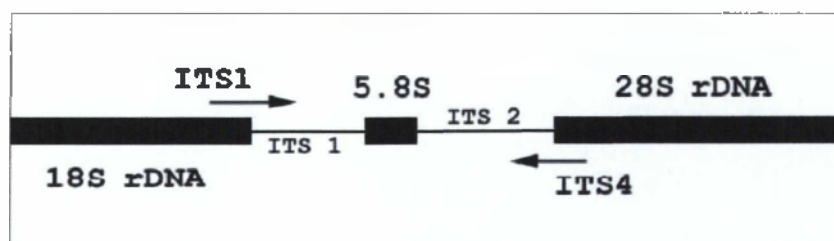
10 min, στις 13000 rpm, καθαρισμός με 70% v/v αιθυλική αλκοόλη, εξάτμιση της τελευταίας και επαναδιάλυση των δειγμάτων σε 50 μl αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C.

### 3.2 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από αποξηραμένη καρποφορία του *Pleurotus eryngii*.

Τμήμα της καρποφορίας του μύκητα (περίπου 10 mg) τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο γουδί από πορσελάνη και σε αυτό προστέθηκε υγρό άζωτο, για την έκθλιψη του δείγματος. Κατόπιν, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτήν της απομόνωσης χρωμοσωμικού DNA από καλλιέργεια του μύκητα σε στερεό θρεπτικό μέσο, με μοναδική διαφορά τη χρήση CTAB Extraction Buffer στη θέση του Fungal DNA Extraction Buffer.

### 3.3 Ενίσχυση της περιοχής ITS του γονιδιώματος με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') και ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990), των οποίων οι θέσεις υβριδισμού εντοπίζονται στο άκρο του 18S γονιδίου του rDNA για τον πρώτο και στο άκρο του 28S γονιδίου για το δεύτερο αντίστοιχα, δίνοντας τη δυνατότητα ενίσχυσης ενός μικρού τμήματος των δύο προαναφερθέντων γονιδίων όπως και ολόκληρων των μη κωδικών περιοχών



Σχήμα 2: Απεικόνιση των θέσεων υβριδισμού των εκκινητών ITS1 και ITS4 πάνω στο γονιδίωμα. Βασισμένο στο σχήμα: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primer3.gif>

ITS1 και ITS2, καθώς και του 5,8S γονιδίου του rDNA (σχήμα 2).

Σε φιαλίδιο 0,25 ml, με χαμηλή ικανότητα δέσμευσης DNA, αναμίχθηκαν 5 μl DyNAzyme EXT Buffer 10X [Finnzymes], 20 pmol από κάθε εκκινητή (ITS1 και ITS4), 0,2 mM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο [Promega], 50 ng DNA, 1 U DNA πολυμεράση DyNAzyme EXT [Finnzymes] και αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O, μέχρι τελικού όγκου αντίδρασης 50 μl.

### Συνθήκες της αντίδρασης

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν αρχικά σε θερμοκρασία 95°C για χρονικό διάστημα 5 min, κατά το οποίο έγινε το αρχικό άνοιγμα της διπλής έλικας του DNA. Ακολούθησαν 40 κύκλοι αποτελούμενοι από ένα πρώτο βήμα στους 94°C για 30 sec με σκοπό το άνοιγμα της έλικας του DNA, ένα δεύτερο τους 55°C για 30 sec κατά το οποίο πραγματοποιήθηκε ο υβριδισμός καθενός από τους δύο εκκινητές στην αντίστοιχη θέση πάνω στο DNA και ένα τελευταίο βήμα στους 72°C για 30 sec κατά το οποίο έγινε η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων από την DNA πολυμεράση. Στο τέλος των 40 κύκλων τα δείγματα υποβλήθηκαν σε θερμοκρασία 72°C για 10 min για την τελική επέκταση (πολυμερισμό) των αλυσίδων.

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (Peltier Thermal Cycler, MJ Research).

### **3.4 Προσθήκη dATPs στα άκρα του ενισχυμένου τμήματος DNA**

Στο προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης προστέθηκαν 0,2 mM dATPs [Promega] και 0,2 U DNA πολυμεράσης DyNAzyme EXT [Finnzymes].

Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε θερμοκρασία 72° C για 30 min.

### **3.5 Ανάλυση ενισχυμένου DNA σε πηκτή αγαρόζης**

8 μl ενισχυμένου τμήματος DNA αναμίχθηκαν με 2 μl διαλύματος φόρτωσης πηκτής (Loading Buffer 6X) και φορτώθηκαν σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 1% w/v. Μαζί με τα δείγματα φορτώθηκε και δείκτης μοριακών

βαρών (marker) λ *HindIII*. Τα δείγματα έτρεξαν στα 90 mV για 1 hr και στη συνέχεια η πηκτή εμβαπτίστηκε σε υδατικό διάλυμα βρομιούχου αιθιδίου 0,5 μg/ml, όπου και παρέμεινε για 30-45 min. Εκπλύθηκε από την περίσσεια βρομιούχου αιθιδίου παραμένοντας σε διάλυμα MgCl<sub>2</sub> 10 mM για 5 min. Η παρατήρηση έγινε με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας 257 nm. Η λήψη εικόνας έγινε με τη φωτογραφική μηχανή Kodak DC290, ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Kodak 1D (έκδοση 3.5.4).

### 3.6 Καθαρισμός ενισχυμένου DNA

Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης απαλλάχθηκε από την περίσσεια εκκινητών, το MgCl<sub>2</sub>, τα περιττά δεοξυριβονουκλεοτίδια και τα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης, με τη βοήθεια του QIAquick Spin Kit [QIAGEN]. Ακολουθήθηκαν επακριβώς τα βήματα του σχετικού πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρίας.

### 3.7 Ενσωμάτωση (ligation) ενισχυμένου τμήματος χρωμοσωμικού DNA σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης

Μέσα σε φιαλίδιο χωρητικότητας 0,25 ml, με χαμηλή ικανότητα δέσμευσης DNA, αναμίχθηκαν 50 ng ενισχυμένου τμήματος DNA, 20 ng πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy [Promega], 5 μl Buffer 2X [Promega], 3 Weiss U T4 DNA λιγάση [Promega] και ddH<sub>2</sub>O, μέχρι τελικού όγκου 10 μl. Το φιαλίδιο με το δείγμα αφήθηκε για 18 hr στους 4°C.

### 3.8 Παρασκευή ικανών κυττάρων (Competent cells) *Escherichia coli* DH5a

Παρασκευάστηκαν βακτηριακά κύτταρα, ικανά να ενσωματώσουν στο κυτόπλασμα τους πλασμιδιακούς φορείς κλωνοποίησης. Από στερεή καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *Escherichia coli* DH5a εμβολιάστηκαν 10 ml LB θρεπτικού μέσου. Η καλλιέργεια αφήθηκε για 18 hr, στους 37°C, υπό ανάδευση στις 150 rpm, για την αποφυγή αναερόβιων συνθηκών. Κατόπιν, εμβολιάστηκαν 200 ml LB θρεπτικού διαλύματος με 2 ml από την παραπάνω καλλιέργεια. Τα

κύτταρα επωάστηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες, έως ότου η τιμή της οπτικής απορρόφησης (O.D.) της καλλιέργειας, στα 600 nm, να κυμαίνεται μεταξύ 0,2 και 0,4. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε πάγο και φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 6000 rpm, στους 4°C, μετά από μεταφορά της σε αποστειρωμένα φιαλίδια φυγοκέντρου. Το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνθηκε και η βιομάζα του βακτηρίου επαναδιαλύθηκε σε 50 ml διαλύματος 0,1 M MgCl<sub>2</sub>. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις προαναφερθείσες συνθήκες. Μετά την απομάκρυνση της υπερκείμενης υγρής φάσης, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 25 ml διαλύματος 0,1 M CaCl<sub>2</sub> και έπειτα από παραμονή 20 min σε πάγο, φυγοκεντρήθηκε όπως παραπάνω. Η τελική επαναδιάλυση του ιζήματος έγινε σε 10 ml διαλύματος 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Εν συνεχεία, στο διάλυμα προστέθηκε ποσότητα γλυκερόλης, ώστε η τελευταία να αποτελεί το 20% του τελικού όγκου του διαλύματος και το προκύπτον διάλυμα μοιράστηκε ανά 200 µl σε αποστειρωμένα φιαλίδια erpendorf. Τα φιαλίδια εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο μέχρι να ψυχθούν ομοιόμορφα και αποθηκεύθηκαν στους -80°C.

### 3.9 Μετασχηματισμός (Transformation) ικανών κυττάρων *Escherichia coli* DH5a

Τα ικανά κύτταρα αφέθηκαν να ξεπαγώσουν μέσα σε πάγο. Από αυτά χρησιμοποιήθηκαν 100 µl για κάθε δείγμα. Μετά από προσθήκη 5 µl προϊόντος λιγοποίησης τμήματος χρωμοσωμικού DNA με τον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy vector [Promega], κάθε δείγμα αφέθηκε εκ νέου στον πάγο. Μετά την πάροδο 30 min, μεταφέρθηκε άμεσα στο υδατόλουτρο, στους 42°C, για 1 min. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε και πάλι στον πάγο, όπου και προστέθηκαν σε αυτό 200 µl LB θρεπτικού διαλύματος. Το δείγμα επωάστηκε για 1 hr και 30 min σε υδατόλουτρο, στους 37°C. Κατόπιν, προστέθηκαν 50 µl X-Gal 100 mM και 10 µl IPTG 2% w/v και το δείγμα απλώθηκε σε τρυβλίο LB άγαρ με αμπικιλίνη 0,1 mg/ml, με τη χρήση πιπέττας Pasteur. Το τρυβλίο αφέθηκε στους 37°C, για 18 hr.

### 3.10 Επιλογή των κατάλληλων βακτηριακών αποικιών.

Η επιλογή των κατάλληλων αποικιών έγινε με βάση το χρώμα τους. Επιλέχθηκαν οι λευκές μοναδιαίες αποικίες, οι οποίες αποτελούνταν από

κύτταρα μετασχηματισμένα με ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα. Το λευκό χρώμα οφείλεται στο γεγονός ότι τα επιτυχώς μετασχηματισμένα βακτήρια δεν είναι σε θέση να μεταβολίσουν το χρωμογόνο υπόστρωμα X-Gal, λόγω απενεργοποίησης του γονιδίου, που κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, από το ένθετο τμήμα DNA.

### 3.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού (Plasmid mini preparation - boiling method)

10 ml LB θρεπτικού διαλύματος με αμπικιλίνη 0,1 mg/ml διαλύματος εμβολιάστηκαν με κύτταρα από μοναδιαία αποικία επιτυχώς μετασχηματισμένων βακτηρίων *Escherichia coli* DH5a. Η καλλιέργεια επωάσθηκε στους 37°C υπό ανάδευση, για 18 hr. 1,5 ml της παραπάνω καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε μέσα σε φιαλίδιο erpendorf στις 13000 rpm, για 1 min. Το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνθηκε, αφήνοντας το ίζημα (βιομάζα του βακτηρίου) όσο το δυνατό καθαρότερο. Ακολούθησε μια ακόμη πλήρωση του φιαλιδίου με υγρό από την καλλιέργεια και φυγοκέντρηση, όπως παραπάνω, με σκοπό τη λήψη μεγαλύτερης ποσότητας βιομάζας. Στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκαν 150 μl STET Buffer και 2 μl λυσοζύμης (10 mg/ml) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση, μέχρι ομογενοποίησης του διαλύματος. Το δείγμα εμβαπτίσθηκε σε νερό σε θερμοκρασία βρασμού, για 45 sec και αμέσως μετά φυγοκεντρήθηκε για 20 min στις 13000 rpm. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο και σε αυτό προστέθηκαν 180 μl ισοπροπανόλης. Μετά από ελαφρά ανακίνηση, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm. Η υγρή φάση απομακρύνθηκε και, στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των νουκλεϊκών οξέων, προσθέτοντας στο δείγμα 400 μl αιθυλικής αλκοόλης 70% v/v και φυγοκεντρώντας για 10 min στις 13000 rpm. Το δείγμα αφήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι πλήρους εξάτμισης της αιθυλικής αλκοόλης, και στη συνέχεια επαναδιαλύθηκε σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O.

### 3.12 Έλεγχος ένθετου τμήματος DNA

Ο φορέας pGEM-T Easy Vector [Promega] διαθέτει δύο θέσεις αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης περιορισμού *EcoRI*, μέσα στην πολυδύναμη

περιοχή κλωνοποίησης (Παράρτημα II). Η πέψη με το παραπάνω ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση του ένθετου τμήματος DNA από το φορέα. Ο έλεγχος του μεγέθους του ένθετου τμήματος γίνεται με διαχωρισμό των προϊόντων της πέψης, με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης. Τα παραπάνω προϊόντα παρουσιάζονται ως δύο (ή περισσότερες, σε περίπτωση που το ένθετο τμήμα DNA διαθέτει μία ή περισσότερες θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου *EcoRI*) ζωνώσεις μέσα σε πηκτική αγαρόζης. Η εξακρίβωση του μεγέθους του ένθετου γίνεται με την ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση ενός δείκτη μοριακών βαρών.

#### α. Πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRI*

Σε φιαλίδιο erpendorf αναμίχθηκαν, 2 μl Buffer 10x (ρυθμιστικό διάλυμα για το ένζυμο *EcoRI*), 5 U ενδονουκλεάσης περιορισμού *EcoRI*, 1 μl RNase A (10 mg/ml), 5 μl πλασμιδιακού DNA και ddH<sub>2</sub>O, έως τελικού όγκου 20 μl, και το δείγμα επωάστηκε για τουλάχιστον 2 hr, στους 37° C, μέσα σε υδατόλουτρο.

#### β. Ανάλυση προϊόντος πέψης σε πηκτική αγαρόζης

Σε πηκτική αγαρόζης 1% w/v, καλυμμένης με TAE Buffer 1X, μέσα σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, «φορτώθηκαν» 10 μl προϊόντος πέψης αναμεμιγμένα με 2 μl διαλύματος φόρτωσης πηκτής (Loading buffer 6X). Το δείγμα «έτρεξε» στα 90 mV, για 1 hr. Στη συνέχεια, η πηκτική εμβαπτίστηκε σε διάλυμα βρομιούχου αιθιδίου 0,5 mg/ml, όπου παρέμεινε για 30-45 min. Απαλλάχθηκε από την περίσσεια βρομιούχου αιθιδίου παραμένοντας για 5 min σε υδατικό διάλυμα MgCl<sub>2</sub> συγκέντρωσης 10 mM και παρατηρήθηκε κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV) 257 nm. Η λήψη εικόνας έγινε με τη φωτογραφική μηχανή Kodak DC290, ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Kodak 1D (έκδοση 3.5.4).

### 3.13 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA

2 μl RNase A (10 mg/ml) προστέθηκαν σε κάθε δείγμα πλασμιδιακού DNA και το τελευταίο παρέμεινε για 1 hr, στους 37° C, με σκοπό την υδρόλυση του



RNA. Ο καθαρισμός έγινε με τη χρήση του QIAquick Spin Kit [Qiagen]. Ακολουθήθηκαν επακριβώς τα βήματα του σχετικού πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρίας.

### 3.14 Εύρεση ακολουθίας νουκλεοτιδίων (Αλληλούχηση, Sequencing)

Η εύρεση της ακολουθίας νουκλεοτιδίων των κλωνοποιημένων τμημάτων χρωμοσωμικού DNA πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Ηρακλείου, με τη χρήση αυτόματου αναλυτή νουκλεϊκών ακολουθιών (LI-COR LongRead IR2 4200). Χρησιμοποιήθηκαν οι ραδιενεργά σσημασμένοι εκκινητές SP6 (5'-TAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3') και T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3').

### 3.15 Ευθυγράμμιση, εύρεση γενετικών αποστάσεων και φυλογενετική ανάλυση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών

Η ευθυγράμμιση των ακολουθιών έγινε με το χέρι και η εισαγωγή κενών έγινε για τη βελτιστοποίηση των ομοιοτήτων μεταξύ των ακολουθιών.

Ο υπολογισμός των γενετικών αποστάσεων και οι κλαδιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού πακέτου PHYLIP (Felsenstein, 1984), έκδοση 3.62.

Συγκεκριμένα, ο πίνακας των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των ακολουθιών έγινε με τη χρήση του προγράμματος DNADIST (PHYLIP, έκδοση 3.62), με βάση το πρότυπο F84, το οποίο ενσωματώνει διαφορετικά ποσοστά μεταβάσεων και μεταστροφών, αλλά ακόμη επιτρέπει στα τέσσερα νουκλεοτίδια να εμφανίζονται με διαφορετικές συχνότητες.

Οι μέθοδοι της «Μέγιστης Οικονομικότητας» (Maximum Parsimony) και του «Πιθανότερου Ενδεχόμενου» (Maximum Likelihood) εφαρμόστηκαν σε 500 σύνολα δεδομένων (επαναλήψεις) τα οποία υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος «αυτοδύναμης ανάλυσης» (bootstrap analysis) SEQBOOT (PHYLIP, έκδοση 3.62).

Για τον υπολογισμό του «Πιθανότερου Ενδεχόμενου» χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα DNAML (κατά Felsenstein και Churchill, 1996) (PHYLIP, έκδοση 3.62). Οι παράμετροι (ρυθμίσεις) του προγράμματος, που διατηρήθηκαν για την

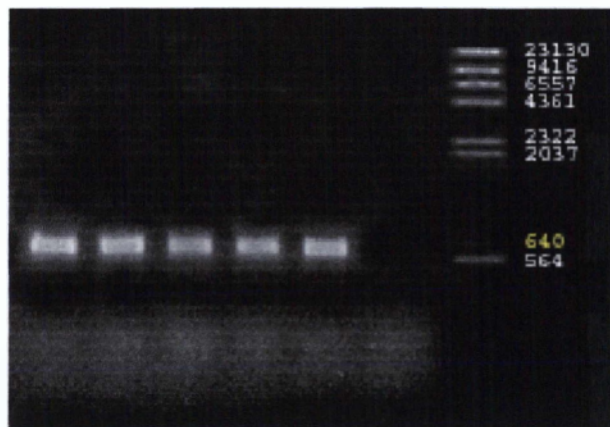
ανάλυση είναι οι ακόλουθες: πραγματοποιήθηκε έρευνα για το βέλτιστο δέντρο, δεν πραγματοποιήθηκε επιπλέον τυχαιοποίηση στη σειρά επεξεργασίας των ακολουθιών, ο λόγος μεταβάσεων/ μεταστροφών ορίσθηκε ίσος με 2, χρησιμοποιήθηκαν οι εμπειρικές συχνότητες εμφάνισης των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (όπως αυτές προτείνονται από το πρόγραμμα) και έγιναν αναδιατάξεις στους κλάδους του δέντρου (global rearrangements) για την απόκτηση του βέλτιστου δέντρου. Για τις υπόλοιπες παραμέτρους της ανάλυσης, διατηρήθηκαν οι ήδη υπάρχουσες ρυθμίσεις του προγράμματος.

Για τον υπολογισμό της «Μέγιστης Οικονομικότητας» (Eck and Dayhoff, 1966, Kluge and Farris, 1969) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα DNAPARS (PHYLP, έκδοση 3.62). Διατηρήθηκαν οι ήδη υπάρχουσες παράμετροι του προγράμματος, δηλαδή πραγματοποιήθηκε έρευνα για το βέλτιστο δέντρο, δεν πραγματοποιήθηκε επιπλέον τυχαιοποίηση στη σειρά επεξεργασίας των ακολουθιών, χρησιμοποιήθηκε ο κοινός αλγόριθμος της Μέγιστης Οικονομικότητας [δεν έγινε περιορισμός βημάτων με το να ορισθεί μια περιοριστική τιμή (threshold value)] και λήφθηκαν υπόψη όλες οι μεταλλάξεις (όχι μόνο οι μεταστροφές).

Ο υπολογισμός του συναινετικού δέντρου (consensus tree) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος CONSENSE (PHYLP, έκδοση 3.62) με βάση το διευρυμένο κανόνα της πλειοψηφίας (Extended Majority Rule). Το τελικό δέντρο σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα DRAWGRAM (PHYLP, έκδοση 3.62), ενώ η τελική επεξεργασία του έγινε με το πρόγραμμα TreeView έκδοση 1.6.6 (Page, 1996).

## Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, με τη χρήση των εκκινητών ITS1 και ITS4, παρατηρήθηκαν, κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία, ως μία μοναδική ζώνωση, σε πηκτή αγαρόζης, έπειτα από χρώση με βρομιούχο αιθίδιο. Το μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων ήταν περίπου 650 bp για όλες τις απομονώσεις.



**Εικόνα 4:** Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, όπως φαίνονται σε ζωνώσεις, μέσα σε πηκτή αγαρόζης. Από αριστερά προς δεξιά: δείγματα 1-5, τυφλό δείγμα και μάρτυρας μοριακών βαρών λ *Hind*III/ *Eco*RI.

Τα παραπάνω προϊόντα ενσωματώθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy Vector [Promega] και κλωνοποιήθηκαν σε κύτταρα *Escherichia coli* DH5a. Τα μετασχηματισμένα -με ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα- κύτταρα αναγνωρίστηκαν με επιλογή χρώματος, μετά από καλλιέργεια σε τρυβλία με LB και αμπικιλίνη, X-Gal και IPTG. Πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις πλασμιδιακού DNA και εύρεση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας των δειγμάτων με τη χρήση αυτόματου αναλυτή νουκλεϊκών ακολουθιών.

Η αλληλούχηση των δειγμάτων παρήγαγε πλήρως αναγνώσιμα ηλεκτροφερογράμματα για όλες τις απομονώσεις, μεγέθους 622 - 641 νουκλεοτιδίων.



Εικόνα 5: Τα προϊόντα της πέψης του ανασυνδυσασμένου πλασμιδίου με το ένζυμο *EcoRI*. Οι ζωνώσεις μοριακού βάρους περίπου 3000 bp αντιπροσωπεύουν το πλασμίδιο μετά από πέψη, ενώ οι ζωνώσεις των περίπου 300 bp και 20 bp αντιπροσωπεύουν το ένθετο τμήμα DNA. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το ένθετο τμήμα διαθέτει δύο συντηρημένες θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου *EcoRI*: μία πρώτη θέση πάνω στο 5.8S γονίδιο και μία δεύτερη πάνω στο 18S γονίδιο.

Προηγούμενες μελέτες γύρω από το σύμπλοκο είδος *Pleurotus eryngii*, βασισμένες σε μορφολογικά στοιχεία και στοιχεία αναπαραγωγικής συμβατότητας, διαχώρισαν το είδος σε τρεις κύριες ποικιλίες με βάση την «προτίμηση» στον ξενιστή: *Pleurotus eryngii* var. *eryngii*, *P. eryngii* var. *ferulae*, και *P. eryngii* var. *nebrodensis* (Hilber, 1982, Bresinsky *et al.*, 1987). Τα αποτελέσματα μελέτης βασιζόμενης στην εφαρμογή μοριακών τεχνικών RAPD-PCR και χρήσης ισοενζύμων (Zervakis *et al.*, 2001) παρουσίασαν το διαχωρισμό των στελεχών *Pleurotus eryngii* s.l. σε πέντε ομάδες σύμφωνα με την «προτίμηση» στον ξενιστή (οικότυποι): στελέχη, που αναπτύσσονται σε σχέση με το φυτό *Cachrys ferulacea*, παρουσίασαν αυξημένες γενετικές αποστάσεις με όλους τους άλλους πληθυσμούς και συνεπώς αντιπροσωπεύουν ένα ευδιάκριτο είδος, το *P. nebrodensis* (Inzenga) Quélet, ενώ όλοι οι άλλοι οικότυποι ομαδοποιούνται μέσα σε ένα μεγαλύτερο σύμπλεγμα (*P. eryngii* s.s.), το οποίο θα μπορούσε να υποδιαιρεθεί σε τέσσερις ποικιλίες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε έναν από τους υπόλοιπους ξενιστές: *P. eryngii* var. *eryngii* (για τον ξενιστή *Eryngium* spp.), *P. eryngii* var. *ferulae* (για τον ξενιστή *Ferula communis*), *P. eryngii* var. *thapsiae* (για τον ξενιστή *Thapsia garganica*) (Venturella *et al.*, 2002) και *P. eryngii* var. *elaeoselini* (για τον ξενιστή *Elaeoselinum asclepium* subsp. *asclepium*) (Venturella *et al.*, 2000).

Άλλοι ερευνητές (Urbanelli *et al.*, 2002) στηριζόμενοι σε μοριακούς δείκτες (Ισοενζυμικές μελέτες και αναλύσεις PCR-Fingerprinting) υποστηρίζουν ότι οι ποικιλίες *P. eryngii* var. *eryngii* και var. *ferulae* πρέπει να αποτελούν δύο διαφορετικά είδη, τα: *P. eryngii* και *P. ferulae*.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν 33 στελέχη του είδους *Pleurotus eryngii*, με την ευρεία έννοια, καθώς και ενός στελέχους του είδους *Pleurotus cystidiosus* (LGAM P 50) η ακολουθία του οποίου χρησιμοποιήθηκε για τις συγκρίσεις, ως ακολουθία αναφοράς (outgroup). Οι ακολουθίες των παραπάνω στελεχών παρατίθενται στον Πίνακα 4 (Παράρτημα Ι).

Ο πίνακας των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των προαναφερθέντων στελεχών υπολογίστηκε με βάση το πρότυπο F84 (Πίνακας 1). Σύμφωνα με αυτόν:

Το εύρος των αποστάσεων μεταξύ των στελεχών του *P. eryngii* s.s. είναι ίσο με 0,000007 - 0,014279, ενώ οι αποστάσεις μεταξύ των μελών των επιμέρους ομάδων (σύμφωνα με τον ξενιστή) κυμαίνεται από 0,003145 έως 0,007873 για όσα στελέχη απομονώθηκαν από το *Laserpitium* [HIK 123 (Σλοβενία), HIK 124 (Ιταλία) και HIK 126 (Ιταλία)], από 0,004707 έως 0,011040 για τις απομονώσεις του *Elaeoselinum* [HIK 122 (Ιταλία: Σικελία), UPA 30 (Ιταλία: Σικελία) και HIK 121 (Ισπανία)], από 0,004721 έως 0,009493 για την ομάδα του ξενιστή *Thapsia* [UPA 5 (Ιταλία: Σικελία), HIK 120 (Ισπανία) και HIK 151 (Ισπανία)] και από 0,003145 έως 0,007888 για την ομάδα του ξενιστή *Ferula* [LGAM P 102 (Ελλάδα), LGAM P 109 (Ελλάδα) και HIK 130 (Ισραήλ)]. Η γενετική απόσταση ανάμεσα στις δύο απομονώσεις του φυτού *Eryngium* [LGAM P 63 (Ελλάδα) και UPA 10 (Ιταλία)] είναι ίση με 0,003145.

Ανάμεσα στις επιμέρους ομάδες του *P. eryngii* s.s. οι αποστάσεις έχουν ως εξής:

Για το *Laserpitium*, οι μικρότερες αποστάσεις εμφανίζονται στη σύγκριση των απομονώσεων αυτού με τις αντίστοιχες απομονώσεις του *Eryngium* (0,001569 - 0,007888), ενώ ακολουθούν οι αποστάσεις με τις απομονώσεις από το φυτό *Thapsia* (0,003145 - 0,0007902: μικρότερες αποστάσεις σημειώνονται κατά τη σύγκριση με τις απομονώσεις από το φυτό *T. villosa*, ενώ μεγαλύτερες με την απομόνωση του *T. garganica*), με τις απομονώσεις του ξενιστή *Ferula* (0,001569 - 0,009493: τα μέλη της ομάδας του *Laserpitium* παρουσιάζουν μικρότερη απόσταση με το HIK 130 που έχει απομονωθεί από το φυτό *Ferula tingitana*) και τέλος με στελέχη που απομονώθηκαν από το φυτό *Elaeoselinum* (0,004721 - 0,012645: οι

Πίνακας 1: Γενετικές αποστάσεις κατά Felsenstein (F84) μεταξύ των στελεχών του *P. eryngii*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33			
1. LGAM P 30																																				
2. LGAM P 63	0,187781																																			
3. LGAM P 101	0,187520	0,009565																																		
4. LGAM P 109	0,190166	0,003145	0,012775																																	
5. LGM 031101	0,188113	0,000007	0,009565	0,003145																																
6. LGM 050604	0,188966	0,022868	0,016303	0,026165	0,022868																															
7. CBS 10082	0,194490	0,006312	0,016043	0,009493	0,006312	0,027871																														
8. UPA 5	0,190166	0,003145	0,012775	0,000007	0,003145	0,026165	0,009493																													
9. UPA 10	0,192249	0,003145	0,012775	0,006297	0,003145	0,026179	0,009493	0,006297																												
10. UPA 28	0,183929	0,012688	0,006341	0,015913	0,012703	0,017865	0,019181	0,015913	0,015913																											
11. UPA 30	0,191627	0,007873	0,017634	0,011054	0,007888	0,031197	0,014279	0,011054	0,011069	0,029728																										
12. HIK 120	0,191844	0,004707	0,014380	0,004721	0,004721	0,027828	0,011083	0,004721	0,007888	0,017489																										
13. HIK 123	0,190109	0,001569	0,011185	0,004721	0,001569	0,024545	0,007917	0,004721	0,004721	0,034308	0,009464	0,006297																								
14. HIK 124	0,190051	0,004721	0,011185	0,004721	0,004721	0,024545	0,011098	0,004721	0,007888	0,034308	0,012645	0,006297	0,003145																							
15. HIK 125	0,183847	0,019123	0,012761	0,022391	0,019152	0,024473	0,025702	0,022391	0,022391	0,009464	0,027235	0,023967	0,020771	0,020737																						
16. HIK 127	0,187491	0,015956	0,009565	0,019210	0,015983	0,019571	0,022506	0,019210	0,019210	0,009493	0,024688	0,020800	0,017590	0,017590	0,015898																					
17. HIK 130	0,188113	0,000007	0,009565	0,003145	0,000007	0,022868	0,006312	0,003145	0,003145	0,012703	0,007888	0,004721	0,001569	0,004721	0,019152	0,015985																				
18. HIK 132	0,173885	0,016433	0,009480	0,019745	0,016433	0,008105	0,021451	0,019745	0,019745	0,013079	0,023099	0,019745	0,018111	0,018111	0,019716	0,014771	0,016433																			
19. HIK 133	0,177962	0,021408	0,014828	0,024777	0,021436	0,009739	0,024820	0,024777	0,024791	0,018024	0,028117	0,024733	0,023099	0,023099	0,024704	0,019745	0,021436	0,004837																		
20. HIK 135	0,187781	0,000007	0,009565	0,003145	0,000007	0,022868	0,006312	0,003145	0,003145	0,012668	0,007873	0,004707	0,001569	0,004721	0,019123	0,015956	0,000007	0,016433	0,021408																	
21. HIK 136	0,187781	0,000007	0,009565	0,003145	0,000007	0,022868	0,006312	0,003145	0,003145	0,012668	0,007859	0,004707	0,001569	0,004721	0,019123	0,015956	0,000007	0,016433	0,021408	0,000007																
22. HIK 137	0,188026	0,014322	0,007946	0,017547	0,014337	0,019542	0,020844	0,017547	0,017561	0,004721	0,022391	0,019137	0,015942	0,015942	0,011083	0,011083	0,014337	0,014756	0,019716	0,014322	0,014322	0,014322														
23. HIK 138	0,192451	0,019166	0,012232	0,022391	0,019166	0,024473	0,025702	0,02391	0,02391	0,012674	0,027249	0,024010	0,020800	0,020800	0,019094	0,015898	0,019166	0,019716	0,024748	0,019166	0,019137	0,014264														
24. HIK 139	0,188113	0,000007	0,009565	0,003145	0,000007	0,022868	0,006312	0,003145	0,003145	0,012703	0,007873	0,004721	0,001569	0,004721	0,019152	0,015985	0,000007	0,016433	0,021436	0,000007	0,000007	0,014337	0,019137													
25. HIK 151	0,192321	0,004736	0,011213	0,007902	0,004736	0,022854	0,011112	0,007902	0,007902	0,014366	0,012703	0,009493	0,003145	0,003145	0,020844	0,017662	0,004736	0,018067	0,023085	0,004736	0,004736	0,016000	0,020844	0,004736												
26. HIK 152	0,193680	0,022391	0,015942	0,023630	0,022391	0,027799	0,028970	0,023630	0,023644	0,015869	0,030503	0,027264	0,024039	0,024039	0,022319	0,019121	0,022391	0,023041	0,028102	0,022391	0,022362	0,017475	0,003145	0,022362	0,024097											
27. LGM 8 20001	0,196702	0,004736	0,014424	0,007902	0,004736	0,024502	0,011112	0,007902	0,007902	0,017576	0,012688	0,009493	0,006326	0,009507	0,024083	0,020887	0,004736	0,019759	0,024791	0,004736	0,004736	0,019224	0,024083	0,004736	0,007917	0,027336										
28. HIK 121	0,189184	0,003145	0,012775	0,003145	0,003145	0,026165	0,009493	0,003145	0,006297	0,015884	0,011040	0,004707	0,004721	0,004721	0,022347	0,019181	0,003145	0,019745	0,024733	0,003145	0,003145	0,017518	0,022391	0,003145	0,007902	0,023630	0,007902									
29. HIK 122	0,191844	0,004707	0,014380	0,004721	0,004721	0,027828	0,011083	0,004721	0,007888	0,017489	0,009464	0,003145	0,006297	0,006297	0,023967	0,020800	0,004721	0,019745	0,024733	0,004707	0,004707	0,019137	0,024010	0,004721	0,009493	0,027264	0,009493	0,004707								
30. HIK 126	0,191802	0,003145	0,012775	0,006297	0,003145	0,026179	0,009493	0,006297	0,006297	0,015884	0,011040	0,007873	0,004721	0,007873	0,022362	0,019181	0,003145	0,019745	0,024748	0,003145	0,003145	0,017512	0,022391	0,003145	0,007902	0,023644	0,007902	0,006283	0,007873							
31. HIK 131	0,197955	0,021379	0,014799	0,024748	0,021408	0,009734	0,024654	0,024748	0,024748	0,017995	0,028073	0,024704	0,023070	0,023056	0,024661	0,019746	0,021408	0,004837	0,006456	0,021379	0,021379	0,019687	0,024704	0,021408	0,023056	0,028059	0,024762	0,024704	0,024704	0,024704						
32. HIK 134	0,182358	0,015956	0,009880	0,019210	0,015983	0,019571	0,022506	0,019210	0,019210	0,004312	0,024054	0,020800	0,017590	0,017590	0,006326	0,012732	0,015985	0,016419	0,021193	0,015956	0,015956	0,015927	0,015985	0,017634	0,019152	0,014283	0,019181	0,020800	0,019181	0,021364						
33. LGAM P 102	0,196355	0,004721	0,014409	0,007888	0,004721	0,027828	0,011098	0,007888	0,007888	0,017547	0,012674	0,009478	0,006312	0,009493	0,024039	0,020858	0,004721	0,021408	0,026454	0,004721	0,004721	0,019195	0,024039	0,004721	0,009493	0,027307	0,007902	0,007888	0,009478	0,007888	0,026411	0,020858				
34. UPA 6	0,189299	0,017576	0,011170	0,020800	0,017576	0,022796	0,024097	0,020800	0,020800	0,007902	0,023688	0,023420	0,019210	0,019195	0,007917	0,014317	0,017576	0,019672	0,024690	0,017576	0,017576	0,009507	0,017503	0,017576	0,020800	0,020728	0,019195	0,020800	0,024220	0,020800	0,024647	0,004750	0,019181			

απομονώσεις του *Laserpitium* εμφανίζονται να έχουν μικρότερες αποστάσεις με το ΗΙΚ 121 που απομονώθηκε από το *Elaeoselinum gummiferum* από ο,τι με τις απομονώσεις από το *Elaeoselinum asclepium* subsp. *asclepium*).

Για την ομάδα του *Elaeoselinum*, οι μικρότερες γενετικές αποστάσεις παρουσιάζονται στη σύγκριση των απομονώσεων αυτού με τις απομονώσεις του *Eryngium* (0,003145 - 0,011069), ενώ ακολουθούν οι αποστάσεις με την ομάδα του ξενιστή *Thapsia* (0,003145 - 0,012703). Μεγαλύτερο εύρος αποστάσεων εμφανίζεται κατά τη σύγκριση με τα στελέχη που αναπτύσσονται σε σχέση με το φυτό *Ferula* (0,003145 - 0,012674: μέγιστη απόσταση προκύπτει κατά τη σύγκριση των στελεχών LGAM P 102 και UPA 30).

Για την ομάδα του φυτού *Ferula*: μικρότερο εύρος αποστάσεων παρατηρείται στη σύγκριση με απομονώσεις από τον ξενιστή *Eryngium* (0,000007 - 0,007888), ενώ ελαφρά μεγαλύτερο είναι το εύρος των αποστάσεων με τα μέλη της ομάδας του ξενιστή *Thapsia* (0,000007 - 0,009493: ελάχιστη απόσταση σημειώνεται ανάμεσα στο LGAM P 109 και το UPA 5, το οποίο έχει απομονωθεί από το είδος *Thapsia garganica*).

Τέλος, τα μέλη της ομάδας του *Eryngium* παρουσιάζουν αποστάσεις από 0,003145 έως 0,007902 στη σύγκρισή τους με τα μέλη της ομάδας του φυτού *Thapsia*.

Οι αποστάσεις ανάμεσα στα μέλη της ομάδας του *P. eryngii* s.s. και τα αντίστοιχα μέλη των υπολοίπων ομάδων κυμαίνονται από 0,019137 έως 0,030503 (μέγιστη απόσταση με το στέλεχος UPA 30) για την ομάδα της Ασιατικής *Ferula* (*Ferula sinkiangensis*), από 0,012688 έως 0,027235 (ελάχιστη απόσταση με το LGAM P 63 και μέγιστη απόσταση με το UPA 30) για την ομάδα του φυτού *Cachrys* [ΗΙΚ 125 (Ελλάδα), ΗΙΚ 127 (Αρμενία), ΗΙΚ 134 (Ιταλία, Αίτνα), ΗΙΚ 137 (Ιράν), UPA 6 (Ιταλία: Σικελία) και UPA 28 (Ιταλία: Σικελία)], από 0,013079 έως 0,028117 (ελάχιστη απόσταση με το LGAM P 63 και μέγιστη απόσταση με το UPA 30) για την ομάδα του *Ferulago*, ενώ αν στην τελευταία ομάδα προστεθεί και το στέλεχος LGMACC 850404 (Ουγγαρία), τότε η μέγιστη απόσταση αυξάνεται σε 0,0031197.

Τα μέλη της ομάδας του *Cachrys* παρουσιάζουν μεταξύ τους γενετικές αποστάσεις εύρους 0,004721 - 0,015898, ενώ με τις υπόλοιπες ομάδες παρουσιάζουν αποστάσεις εύρους 0,013079 - 0,024704 για την ομάδα του *Ferulago* και 0,019716 - 0,028102 για την Ασιατική *Ferula*.

Οι απομονώσεις από τον ξενιστή *Ferulago* [ΗΙΚ 131 (Ιταλία), ΗΙΚ 132 (Σλοβενία) και ΗΙΚ 133 (Ιταλία)] παρουσιάζουν μεταξύ τους αποστάσεις από

0,004837 έως 0,006456, ενώ αν στην ομάδα προστεθεί και το στέλεχος LGMACC 850404 τότε η μέγιστη απόσταση αυξάνεται στο 0,009739.

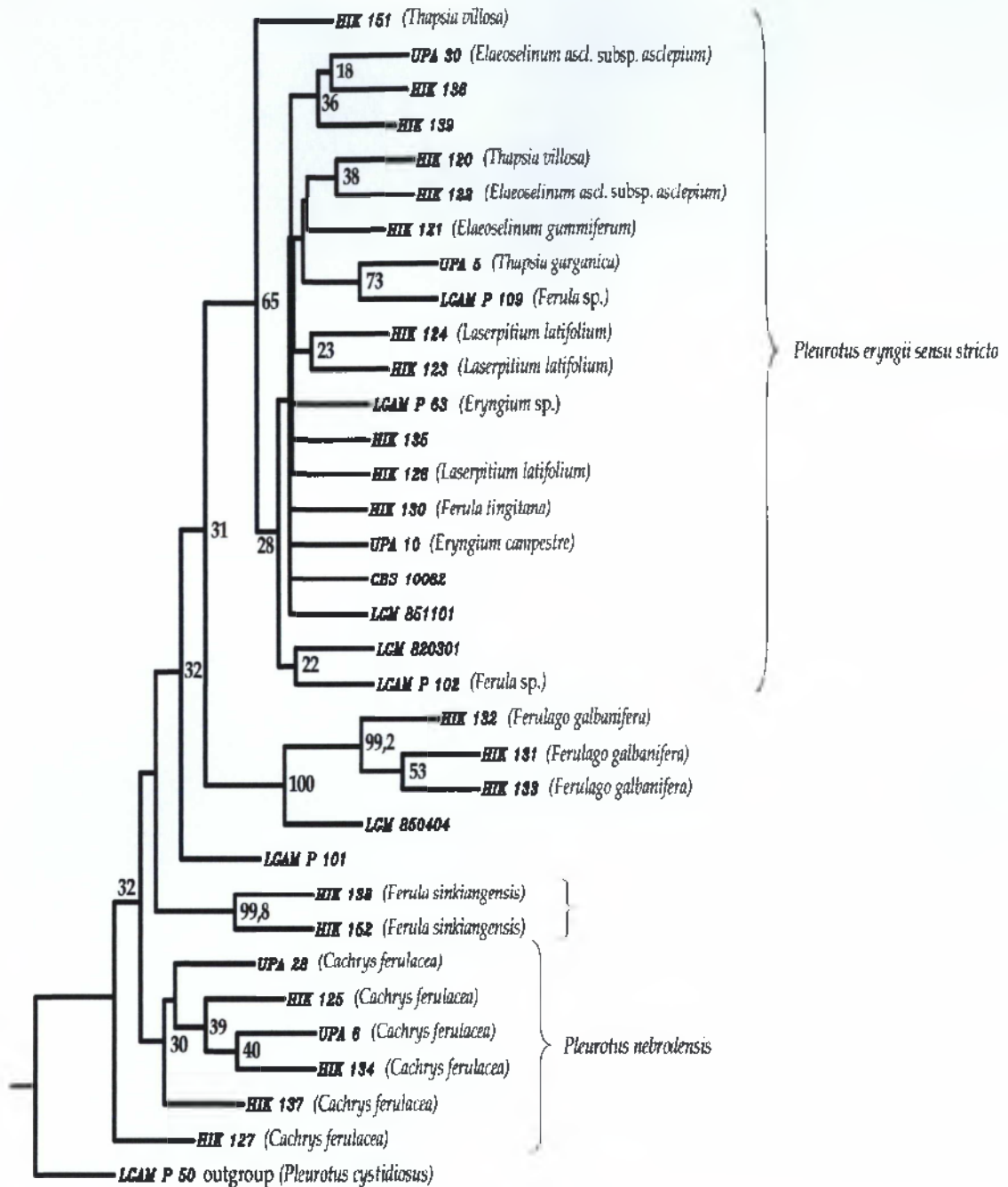
Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση (Δενδρογράμματα 1 και 2) και τον πίνακα γενετικών αποστάσεων (Πίνακας 1) μεταξύ των παραπάνω στελεχών είναι δυνατό να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το *Pleurotus eryngii* (με τη στενή έννοια), στην παρούσα εργασία αποτελείται από στελέχη, τα οποία αναπτύσσονται σε σχέση με τα φυτά-ξενιστές: *Eryngium* spp., *Ferula communis*, *Ferula tingitana*, *Elaeoselinum asclepium* subsp. *asclepium*, *Elaeoselinum gummiiferum*, *Thapsia garganica*, *Thapsia villosa* και *Laserpitium latifolium* της οικογένειας *Umbelliferae*.

Στελέχη, τα οποία αναπτύσσονται σε σχέση με τους υπόλοιπους ξενιστές που περιλαμβάνονται στη μελέτη, δηλαδή τους: *Cachrys ferulacea*, *Ferulago galbanifera* και *Ferula sinkiangensis* αποτελούν μέλη της ευρύτερης ομάδας του *Pleurotus eryngii*. Συγκεκριμένα, τα στελέχη τα οποία αναπτύσσονται σε σχέση με φυτά του είδους *Cachrys ferulacea* σχηματίζουν ένα διακριτό κλάδο (Δενδρογράμματα 1 και 2). Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με τις αυξημένες γενετικές αποστάσεις της ομάδας αυτής με τις υπόλοιπες ομάδες (*P. eryngii* s.s., ομάδα του *Ferulago galbanifera* και του *Ferula sinkiangensis*) επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες (Venturella et al., 2000, Zervakis et al., 2001, Venturella et al., 2002), οι οποίες πρότειναν τη δημιουργία του διακριτού είδους *Pleurotus nebrodensis* σε αντίθεση με τη διατήρηση της υφιστάμενης ποικιλίας *P. eryngii* var. *nebrodensis*.

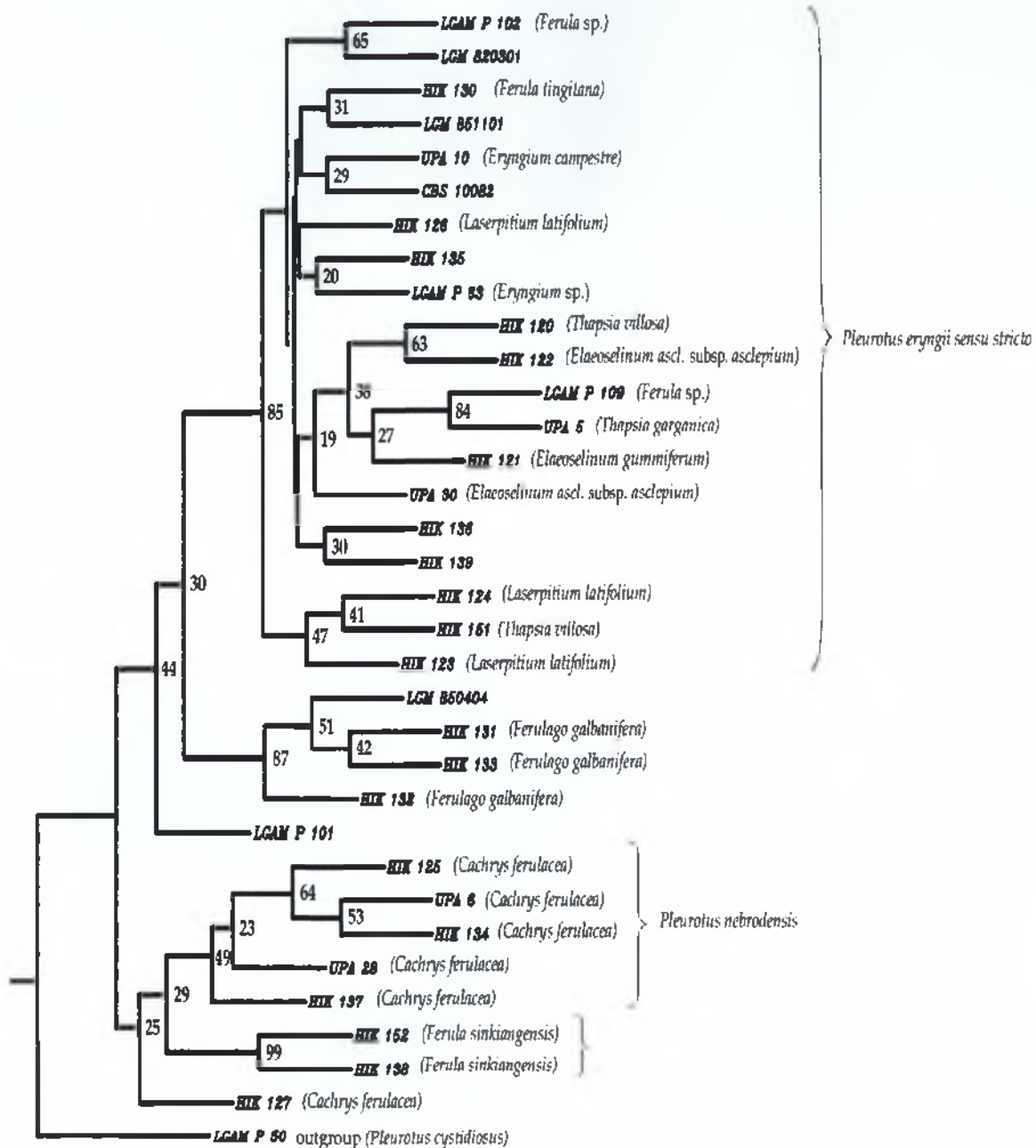
Στελέχη, τα οποία αναπτύσσονται σε σχέση με φυτά του είδους *Ferulago galbanifera* σχηματίζουν ένα διακριτό κλάδο αρκετά απομακρυσμένο από τον κλάδο του *Pleurotus eryngii* s.s., αλλά κυρίως απομακρυσμένο και από τον κλάδο του *Pleurotus nebrodensis*. Πολύ μεγάλη σχετική συγγένεια παρουσιάζεται ανάμεσα στα παραπάνω στελέχη και το LGMACC 850404, που έχει απομονωθεί από ξενιστή ο οποίος δε μας έχει γίνει γνωστός.

Τέλος, τα δύο στελέχη που αναπτύσσονται πάνω στο φυτό *Ferula sinkiangensis* (Ασιατική *Ferula*) σχηματίζουν έναν ξεχωριστό κλάδο, με μεγάλο στατιστικό ποσοστό (99 - 99,8%).





Δενδρόγραμμα 1: Δέντρο που προέκυψε από τη φυλογενετική ανάλυση, με βάση το κριτήριο της «Μέγιστης Οικονομικότητας» (Maximum Parsimony). Οι τιμές οι οποίες βρίσκονται σε κάθε κόμβο δηλώνουν το στατιστικό -επί τοις εκατό- ποσοστό (bootstrap value) της ομάδας που ορίζεται από τον κόμβο αυτό (σε 500 επαναλήψεις), ενώ μέσα στις παρενθέσεις δίνεται ο ξενιστής (όπου αυτός έχει γνωστοποιηθεί) για κάθε στέλεχος του *Pleurotus eryngii s.l.*, που περιλαμβάνεται στην παρούσα εργασία.



Δενδρόγραμμα 2: Δέντρο βασισμένο στο κριτήριο του «Πιθανότερου Ενδεχόμενου» (Maximum Likelihood). Όπως και στο Δενδρόγραμμα 1, οι τιμές οι οποίες βρίσκονται σε κάθε κόμβο δηλώνουν το στατιστικό -επί τοις εκατό- ποσοστό (bootstrap value) της ομάδας που ορίζεται από τον κόμβο αυτό (σε 500 επαναλήψεις), ενώ μέσα στις παρενθέσεις αναφέρεται ο ξενιτής για κάθε στέλεχος.

Τα στοιχεία που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη δεν επιτρέπουν τη συζήτηση σχετικά με τις προτεινόμενες ποικιλίες (*P. eryngii* var. *eryngii*, var. *ferulae*, var. *thapsiae*, var. *elaeoselini*). Ωστόσο γίνεται αντιληπτό ότι στελέχη που αναπτύσσονται πάνω σε φυτά των ειδών *Eryngium campestre* και *Ferula communis* και που θεωρούνται από πολλούς ερευνητές ως διακριτές ποικιλίες, δεν είναι δυνατό να συνιστούν διαφορετικά είδη, όπως προτείνεται από τους Urbanelli *et al.* (2002). Αντίθετα, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης κατατάσσουν τις απομονώσεις από τα προαναφερθέντα φυτά στην ομάδα του *Pleurotus eryngii* s.s..

Όπως αποκαλύπτεται από τη φυλογενετική ανάλυση, δεν υπάρχει ιδιαίτερος συσχετισμός των διαφόρων οικοτόπων του συμπλόκου είδους με τη γεωγραφική τους προέλευση. Ωστόσο, υπάρχει στενός συσχετισμός με τον ξενιστή πάνω στον οποίο αναπτύσσεται καθένας από αυτούς. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την ύπαρξη μιας συμπατρικής εξελικτικής διαδικασίας μέσα στο σύμπλεγμα του *Pleurotus eryngii*, βασισμένης, όχι σε γεωγραφικούς φραγμούς, αλλά σε οικολογικούς παράγοντες που πιθανόν να σχετίζονται με τη φύση της σχέσης ξενιστή και μύκητα, αλλά και με παράγοντες που συνδέονται με το είδος και τη φύση του ξενιστή.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abercrombie, M., Hickman, M., Johnson, M. L., and Thain, M. (1990). The Penguin Dictionary of Biology. 8<sup>th</sup> Edition. Penguin Books.
- Aggelis, G., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G., and Zervakis, G., (2002). Bioremediation of the liquid wastes produced from the post-harvested debittering treatment of green olives through the use of white rot fungi: correlation of enzyme activities with pollution parameters. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59: 353-360.
- Amitai, G., Adani, R., Sod Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D., and Hadar, Y. (1998). Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEES Lett*, 438: 195-200.
- Anderson, N., Wang, S. S., and Schwandt, J. W. (1973). The *Pleurotus ostreatus-sapidus* species complex. *Mycologia*, 65: 28-35.
- Baldrian, P., Wiesche, C., Gabriel, J., Nerud, F., and Zadrazil, F. (2000). Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2471-2478.
- Barron, G. L., and Dierkes, Y. (1977). Nematophagous fungi: *Hohembuehelia*, the perfect state of *Nematoctonus*. *Can J Bot*, 55: 3954-3062.
- Barron, G. L., and Thorn, R. G. (1987). Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Can J Bot*, 64: 774-778.
- Began, B. W., Lamar, R. T., Burgos, W. D., and Tien, M. (1999). Extent of humification of anthracene, flouranthene and benzo[α]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Lett Appl Microbiol*, 28: 250-254.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu P. L., Freeman, J. P., and Cerniglia, C. E. (1996). Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol*, 62: 2547-2553.
- Boidin, J. (1986). Intercompatibility and the species concept in the saprobic Basidiomycotina. *Mycotaxon*, 26: 319-336.

- Boisselier-Dubayle, M-C. (1983). Taxonomic significance of enzyme polymorphism among isolates of *Pleurotus* (Basidiomycetes) from Umbellifers. *Trans Br Mycol Soc*, 81: 121-127.
- Brasier, C. M. (1987). The dynamics of fungal speciation. *in* *Evolutionary Biology of the Fungi* (ed. Rayner, A. D. M., Brasier, C. M. and Moore, D.), pp. 231-238. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Bresinsky, A., Fischer, M., Meixner, B., and Paulus, W. (1987). Speciation in *Pleurotus*. *Mycologia*, 79: 234-245.
- Canfield, E. (1999). Sanger Method for DNA Sequencing. Davidson College, Department of Biology,  
<http://www.bio.davidson.edu/courses/Bio111/seq.html>.
- Carlile, M. J., and Watkinson, S. C. (1994). *The Fungi*. Academic Press, London.
- Chang, S. T. (1996). Mushroom research and development—equality and mutual benefit. *In*: Royse D.J., ed. *Mushroom biology and mushroom products*. Pennsylvania: PennState University Press: 1-10.
- Chantler, P. (2004). Recombinant DNA  
[http://www.rvc.ac.uk/review/DNA\\_1/Index.cfm](http://www.rvc.ac.uk/review/DNA_1/Index.cfm)
- Cohen, R., Persky, L., and Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58: 582-594.
- Collins, A. G. (1999). Molecules and evolutionary history. *in*: Springer, D., and Scotchmoor, J. (editors).
- Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*, Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Dobzhansky, T. (1970). *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University Press, New York.
- Eger, G., Li, S. F., and Leal-Lara, H. (1979). Contribution to the discussion on the species concept in the *Pleurotus ostreatus* complex. *Mycologia*, 71: 577-588.
- Eggen, T. (1999). Application of fungal substrate from commercial mushroom production - *Pleurotus ostreatus* - for bioremediation of creosote contaminated soil. *Int Biodeter Biodegr*, 44: 117-126.
- Ζερβάκης, Γ. Ι. (1998). Εισαγωγή στη μυκητολογία και στοιχεία καλλιέργειας εδώδιμων μανιταριών. Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, Καλαμάτα.
- Fincham, J. R. S., Day, P. R., and Radford, A. (1979). *Fungal genetics*. 4<sup>th</sup> Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Futuyma, D. J. (1986). *Evolutionary Biology*. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Gordon, M. (2003). *Methods of Phylogenetic Analysis: New Improvements on Old Methods*. Biochem 218, Final Project.
- Gunde-Cimerman, N. (1999). Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P Karst. (Agaricales s.l. Basidiomycetes). *Int J Med Mushroom*, 1: 69-80.
- Gupta, R. S. (2000). The phylogeny of Proteobacteria: relationships to other Eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 367-402.
- Guzman, G., Bandala, V. M., and Montoya, L. (1991). A comparative study of teleomorphs and anamorphs of *Pleurotus cystidiosus* and *Pleurotus smithii*. *Mycol Res*, 95: 1264-1269.
- Hadar, Y., Kerem, Z., Gorodecki, B., and Ardon, O. (1992). Utilization of lignocellulosic waste by the edible mushroom *Pleurotus*. *Biodegradation*, 3: 189-205.
- Hallenberg, N. (1984). Compatibility between species of Corticiaceae s.l. (Basidiomycotina) from Europe and North America. *Mycotaxon*, 21: 335-338.
- Han, Y. H., Chen, K. M., and Cheng, S. (1974). Characteristics and cultivation of a new *Pleurotus* in Taiwan. *Mushroom Sci*, 9: 167-174.
- Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microb Rev*, 13: 125-135.
- Hendy, M. D., and Penny, D. (1982). Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Mathematical Biosciences*, 59: 277-290.
- Hibbert, D. S., and Thorn, R. G. (1994). Nematode trapping in *Pleurotus tuberregium*. *Mycologia*, 86: 696-699.
- Hilber, O. (1982). Die Gattung *Pleurotus* (Fr.) Kummer unter besonderer Berücksichtigung des *Pleurotus eryngii*-Formenkomplexes, In *Bibliotheca Mycologica* 87. J. Cramer: Vaduz.
- Iraçabal, B., Zervakis, G., and Labarere, J. (1995). Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology-UK*, 141: 1479-1490.
- Jalc, D., Nerud, F., Zitnan, R., and Siroka, E. (1996). The effect of white-rot basidiomycetes on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. *Folia Microbiol*, 41: 73-75.
- Jeffries, T. W. (1990). Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation*, 1: 163-176.

- Joly, P., Cailleux, R., and Cerceau, M-T. (1990). La stérilité male pathologique, élément de la co-adaptation entre populations de champignons et de plantes-hotes: modèle des Pleurotes des Ombellifères. *Bull Soc Bot Fr*, 137: 71-85.
- Jong, S. C., and Peng, J. G. (1975). Identity and cultivation of a new commercial mushroom in Taiwan. *Mycologia*, 67: 1235-1238.
- Kirk, T. K., and Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol*, 41: 465-505.
- Kowalchuk, G. A. (1999). New perspectives towards analysing fungal communities in terrestrial environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 247-251.
- Kuehner, R. (1980). Les Hyménomycètes agaricoïdes. Numero special *Bull Soc Linn Lyon*, 49: 1-1027.
- Kües, U., and Liu, Y. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54: 141-152.
- Masaphy S, Levanon D, Vaya J, and Henis Y. (1993). Isolation and characterization of a novel atrazine metabolite produced by the fungus *Pleurotus pulmonarius*, 2-chloro-4-ethylamino-6-(1-hydroxyisopropyl)amino-1,3,5-triazine. *Appl Environ Microbiol*, 59: 4342-4346.
- Mayr, E. (1970). *Populations, Species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Mayson, E., and Verachtert, H. (1991). Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 36: 421-424.
- McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Banat, I. M., Majchant, R., and Smyth, W. E. (2001). Microbial decolorization and degradation of textile dyes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56: 81-87.
- Muir, G., and Schlötterer, C. (1999). Limitations to the phylogenetic use of ITS sequences in closely related species and populations - a case study in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.  
<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Nicolini, L., Hunolstein von, C., and Carilli, A. (1987). Solid state fermentation of orange peel and grape stalks by *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe aegerita* and *Armillariella mellea*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 26: 95-98.
- Ohira, I. (1990). A revision of the taxonomic status of *Pleurotus citrinopileatus*. *Rep Tottori Mycol Inst*, 28: 143-150.

- Olsen, G. J. (2001). The history of life. *Nature Genetics*, 28: 197 – 198.
- Page, R. D. M. (1996). TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biological Sciences*, 12: 357-358.
- Page, R. D. M., and Holmes, E. C. (1998). *Molecular Evolution – A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science Ltd.
- Parmasto, E. (1985). The species concept in Hymenochaetaceae (Fungi, Hymenomycetes). *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, 94: 369-380.
- Paule, M. R., and White, R. J. (2000). Transcription by RNA Polymerases I and III. *Nucleic Acids Research*, 28 (6): 1283-1298.
- Pennisi, E (2001). Preparing the ground for a Modern “tree of life”. *Science*, 293: 1979-1980.
- Petersen, R. H. (1995). There's more to a mushroom than meets the eye: mating studies in the Agaricales. *Mycologia*, 87: 1-17.
- Philippoussis, A., Zervakis, G., and Diamantopoulou, E. (2001). Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World J Microbiol Biotechnol*, 17: 191-200.
- Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 20-33.
- Ragunathan, R., Gurusamy, R., Palaniswamy, M., and Swaminathan, K. (1996). Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. *Food Chem*, 55: 139-144.
- Saitu, N. (1996). Reconstruction of gene trees from sequence data. *Methods in Enzymology*, 266: 427-449.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning – A Laboratory Guide*. 3<sup>rd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Silanikove, N., Danai, O., and Levanon, D. (1988). Composted cotton straw silage as a substrate for *Pleurotus* spp. cultivation. *Biol Wastes*, 25: 219-226.
- Stamets, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. 3<sup>rd</sup> Edition. Ten Speed Press, Berkeley Toronto.
- Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J., and Hillis, D. M. (1996). Phylogenetic Inference. *In Molecular systematics*, 2<sup>nd</sup> edition, chap. 5, pp. 407-514. Sinauer and Associates, Sunderland, Massachusetts.



- Taylor, J. W., Spatafora, J., O'Donnell, K., Lutzoni, F., James, T., Hibbert, D. S., Geiser, D., Bruns, T. D., Blackwell, M., (2004). The fungi. pp. 171-194 *In* Cracraft, J., Donoghue, M. J. (2004). *Assembling the tree of life*. Oxford University Press.
- Terefework, Z. (2002). Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. <http://ethesis.Helsinki.fi/maa/skemi/vk/terefework>.
- Thain, M., and Hickman, M. (1995). *The Penguin Dictionary of Biology*. New Edition. Penguin Books.
- Thomas, G. V., Prabhu, S. R., Reeny, M. Z., and Bopaiah, B. M. (1998). Evaluation of lignocellulosic biomass from coconut palm as substrate for cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *World J Microbiol Biotech*, 14: 879-882.
- Thorn, G. R., and Barron, G. L. (1984). Carnivorous mushrooms. *Science*, 224: 76-78.
- Thorn, G. R., and Barron, G. L. (1986). *Nematotoxon* and the tribe Resupinateae in Ontario, Canada. *Mycotaxon*, 25: 321-453.
- Thorn, G. R., Moncalvo, J.-M., Reddy, C. A., and Vilgalys, R. (2000). Phylogenetic analyses and the distribution of nematophagy support a monophyletic Pleurotaceae within the polyphyletic pleurotoid-lentinoid fungi. *Mycologia*, 92 (2): 241-252.
- Tripathi, J. P., and Yadav, J. S. (1992). Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw into animal feed by *Pleurotus ostreatus* – a pilot effort. *Animal Feed Sci Technol*, 37: 59-72.
- Urbanelli, S., Fanelli, C., Fabbri, A. A., Della Rosa, V., Maddau, L., Marras, F., and Reverberi, M. (2002). Molecular genetic analysis of two taxa of the *Pleurotus eryngii* complex: *P. eryngii* (DC.Fr.) Quèl. var. *eryngii* and *P. eryngii* (DC.Fr.) Quèl. var. *ferulae*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75: 125-136.
- Venturella, G., Zervakis, G., and La Rocca, S. (2000). *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini* var. nov. from Sicily. *Mycotaxon*, 76: 419-427.
- Venturella, G., Zervakis, G., and Saitta A., (2002). *Pleurotus eryngii* var. *thapsiae* var. nov. from Sicily. *Mycotaxon*, 81: 69-74.
- Vilgalys, R. (1991). Speciation and species concepts in the *Collybia dryophila* complex. *Mycologia*, 83: 758-773.
- Wasser, S. E. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60: 258-274.

- Wasser, S. E., and Weis, A. L. (1999a). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycete mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol*, 19: 65-96.
- Wasser, S. E., and Weis, A. L. (1999b). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycete mushrooms: current perspectives (review). *Int J Med Mushr*, 1: 31-62.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, of Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., Academic Press, Inc., New York.
- Zervakis, G. I. (2004). Molecular systematics, evolution and speciation in higher fungi: the oyster-mushroom genus *Pleurotus*. In *Plant Genome: Biodiversity and Evolution*, Vol. 2A: Lower Groups, pp. 99-128. Edited by A.K. Sharma *et al.* Science Publishers, Inc., USA.
- Zervakis, G., and Balis, C. (1992). Comparative study on the cultural characters of *Pleurotus* species under the influence of different substrates and fruiting temperatures. *Micol Neotropical Appl*, 5: 39-47.
- Zervakis, G., and Balis, C. (1996). A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycol. Res.*, 100 (6): 717-731.
- Zervakis, G., Sourdís, J., and Balis, C. (1994). Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycol Res*, 98: 329-341.
- Zervakis, G., Venturella, G., and Papadopoulou, K. (2001). Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiology*, 147: 3183-3194.
- Zervakis, G., Yiatras, P., and Balis, C. (1996). Edible mushrooms from olive mill wastes. *Int Biodeter Biodegrad*, 38: 237-243.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### (Πίνακες)

**Πίνακας 2:** Γεωγραφική προέλευση και ξενιστές των στελεχών που περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία

Όνομασία στελέχους	Προέλευση	Ξενιστής
HIK 120	Ισπανία (Salamanca)	<i>Thapsia villosa</i>
HIK 121	Ισπανία (Salamanca)	<i>Elaeoselinum gummiferum</i>
HIK 122	Ιταλία (Σικελία, Ficuzza)	<i>Elaeoselinum ascl. subsp. asclepium</i>
HIK 123	Σλοβενία	<i>Laserpitium latifolium</i>
HIK 124	Βόρεια Ιταλία	<i>Laserpitium latifolium</i>
HIK 125	Ελλάδα (Κολλήνη)	<i>Cachrys ferulacea</i>
HIK 126	Ιταλία (Rovereto)	<i>Laserpitium latifolium</i>
HIK 127	Αρμενία	<i>Cachrys ferulacea</i>
HIK 130	Ισραήλ (Judean Mt)	<i>Ferula tingitana</i>
HIK 131	Ιταλία	<i>Ferulago galbanifera</i>
HIK 132	Σλοβενία (Pomjan)	<i>Ferulago galbanifera</i>
HIK 133	Ιταλία (Udine)	<i>Ferulago galbanifera</i>
HIK 134	Ιταλία (Σικελία, Αίτνα)	<i>Cachrys ferulacea</i>
HIK 135	Ιράν	
HIK 136	Ιράν	
HIK 137	Ιράν	<i>Cachrys ferulacea</i>
HIK 138	Ιράν	<i>Ferula sinkiangensis</i>
HIK 139	Ιράν	
HIK 151	Ισπανία (Girona)	<i>Thapsia villosa</i>
HIK 152	Κίνα	<i>Ferula sinkiangensis</i>
CBS 10082	πρώην Τσεχοσλοβακία	
LGAM P 63	Ελλάδα (Κρήτη)	<i>Eryngium sp.</i>
LGAM P 101	Ελλάδα (Ανδρος)	
LGAM P 102	Ελλάδα (Ανδρος)	<i>Ferula sp.</i>
LGAM P 109	Ελλάδα (Άγιος Ευστράτιος)	<i>Ferula sp.</i>
LGM 820301	Γαλλία	
LGM 850404	Ουγγαρία	
LGM 851101	Γαλλία	
UPA 5	Ιταλία (Σικελία, Madonie Mt)	<i>Thapsia garganica</i>
UPA 6	Ιταλία (Σικελία, Madonie Mt)	<i>Cachrys ferulacea</i>
UPA 10	Ιταλία (Apulia)	<i>Eryngium campestre</i>
UPA 28	Ιταλία (Σικελία, Madonie Mt)	<i>Cachrys ferulacea</i>
UPA 30	Ιταλία (Σικελία, Mussomeli)	<i>Elaeoselinum ascl. subsp. asclepium</i>
LGAM P 50 ( <i>P.cystidiosus</i> )	Ελλάδα (Σαλαμίνα)	<i>Ficus carica</i>

**Πίνακας 3:** Συγκεντρωτικός πίνακας θρεπτικών μέσων και ρυθμιστικών διαλυμάτων

<b>PDA</b>	PDB [Scharlau] 2,4% w/v, agar 1,7 w/v
<b>LB</b>	Casein [Life Technologies] 1% w/v, Yeast Extract [Scharlau] 0,5% w/v, NaCl [Riedel-deHaen] 1% w/v
<b>LB άγαρ</b>	Casein [Life Technologies] 1% w/v, Yeast Extract [Scharlau] 0,5% w/v, NaCl [Riedel-deHaen] 1% w/v, agar 1,7% w/v
<b>NaAc 3 M, pH 5</b>	CH <sub>3</sub> COONa [Merck] 3 M, CH <sub>3</sub> COOH [Merck] για ρύθμιση του pH στο 5
<b>Fungal DNA Extraction Buffer</b>	Tris [Merck] - HCl [Scharlau] 50 mM pH 8, Na <sub>2</sub> EDTA [Scharlau] 50 mM, SDS [BDH] 3% w/v, Proteinase K [Sigma] 0,1 mg/ml
<b>CTAB Extraction Buffer</b>	CTAB [Sigma] 1% w/v, Tris [Merck] - HCl [Scharlau] 50 mM pH 8, Na <sub>2</sub> EDTA [Scharlau] 10 mM, NaCl [Riedel-deHaen] 0,7 M
<b>TAE Buffer 50X</b>	Tris [Merck] 24,2% w/v, Na <sub>2</sub> EDTA [Scharlau] 100 ml/1 0,5 M, CH <sub>3</sub> COOH [Merck] 57,1 ml/1
<b>STET Buffer</b>	Sucrose [Sigma] 8% w/v, Triton X 100 [BDH] 5% v/v, Tris [Merck] - HCl [Scharlau] 50 mM pH 8, Na <sub>2</sub> EDTA [Scharlau] 50 mM pH 8
<b>Loading Buffer</b>	Bromophenol blue [] 0,25% w/v, σακχαρόζη [Sigma] 40% v/v
<b>X-Gal 2% w/v</b>	X-Gal [Merck] 20 mg/ml διαλύματος σε διαλύτη: dimethyl formamide [Sigma]
<b>IPTG 100 mM</b>	IPTG [Merck] 100 mM σε ddH <sub>2</sub> O, αποστείρωση με μικροβιολογικό φίλτρο 0,2 μm
<b>RNase A (ποκνό διάλυμα)</b>	10 mg/ml
<b>Phenol/chloroform/isoamyl alcohol</b>	25:24:1 v/v [Life Technologies]
<b>Αμπικιλίνη (ποκνό διάλυμα)</b>	Ampicillin [Sigma] 100 mg/ml διαλύματος, αποστείρωση με μικροβιολογικό φίλτρο 0,2 μm



	20	*	140	*	160	*		
LSAM_F_50	: CTC	TCAGTCA	GAAT	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
LSAM_F_63	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
LSAM_F_101	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
LSAM_F_109	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
LSM_851101	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
LSM_850404	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
CBS_10082	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
UFA_5	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
UFA_10	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
UFA_28	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
UFA_30	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_120	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_123	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_124	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_125	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_127	: CTC	TCAGTCA	GAAT	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_130	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_132	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_133	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_135	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_136	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_137	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_138	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_139	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_151	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_152	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
LSM_820301	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_121	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_122	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_126	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_131	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
HIK_134	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
LSAM_F_102	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
UFA_6	: CTC	ANGTC	GTAA	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG
	CTC	TCAGTCA	GAAT	GACTTGGT	TGGCTGGGA	TGTAAAC	CTCTCGG	TG











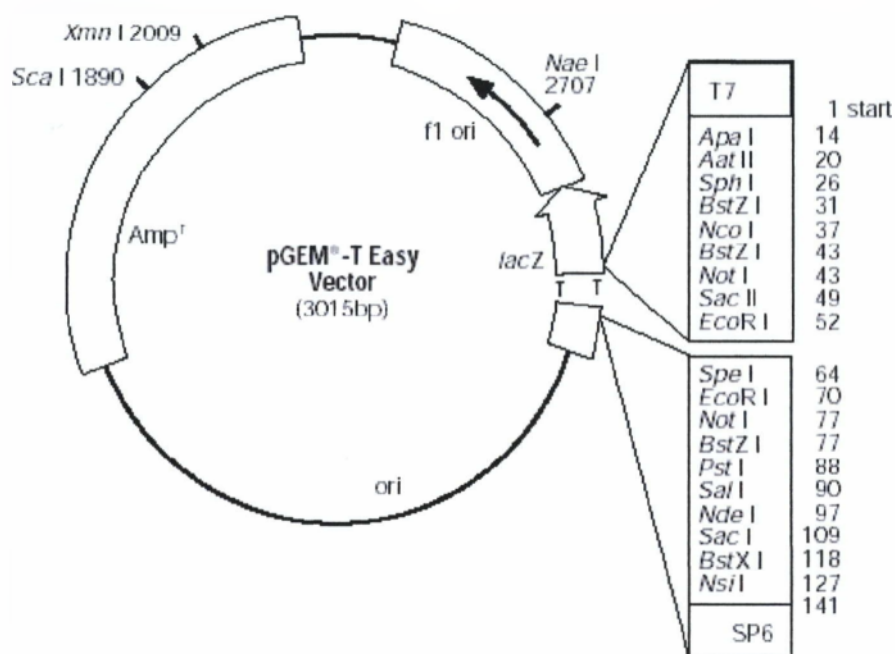
```

        600          620          640          660          680
LSAM_P_50 : AAGTCCAGCTTCTAACCGTCCGTTTCAAGACAAATGACTTGAATAITGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 655
LSAM_P_63 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
LSAM_P_101 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 633
LSAM_P_109 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 637
LSM_B51101 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 637
LSM_B50404 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAATTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 631
CBS_10082 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 636
UEA_5 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 637
UEA_10 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 637
UEA_28 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
UEA_30 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 639
HIK_120 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_123 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_124 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_125 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_127 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 639
HIK_130 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 637
HIK_132 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAATTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 622
HIK_133 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAATTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 623
HIK_135 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_136 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 639
HIK_137 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 637
HIK_138 : GTCTAGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 637
HIK_139 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_151 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAATTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_152 : GTCTAGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 637
LSM_B20301 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAATTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_121 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_122 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_126 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
HIK_131 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAATTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 623
HIK_134 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 637
LSAM_P_102 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAITTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 638
UEA_6 : GTCTGGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAAATTTGAGAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA : 639
gtcT gGCTTCTAACCGTCCg caAgG CAa TTTGACAAITTGACCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGGTGAACTTAA

```

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ (Σχήματα/ εικόνες)

**Σχήμα 3:** Χάρτης του pGEM-T Easy Vector [Promega] και σημεία αναφοράς της ακολουθίας του



Θέση εκκίνησης της μεταγραφής από την T7 RNA πολυμεράση	1
Πολυδύναμη περιοχή κλωνοποίησης	10-128
Προαγωγέας της SP6 RNA πολυμεράσης (-17 έως +3)	139-158
Θέση εκκίνησης της μεταγραφής από την SP6 RNA πολυμεράση	141
Κωδικόνιο έναρξης του <i>lacZ</i> οπερόνιου	180
Χειριστής του <i>lacZ</i> οπερόνιου	200-216
Κωδική περιοχή της β-λακταμάσης	1337-2197
Ακολουθίες του <i>lacZ</i> οπερόνιου	2836-2996, 166-395
Προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης (-17 έως +3)	2999-3

## Φωτογραφίες βασιδιοκάρπιων του μύκητα *Pleurotus eryngii*



Εικόνα 6: *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*



Εικόνα 7: Καλλιέργεια *Pleurotus eryngii*



Εικόνα 8: *Pleurotus eryngii*

---

Εικόνα 6: [http://www.naturamediterraneo.com/forume/topic.asp?TOPIC\\_ID=3199](http://www.naturamediterraneo.com/forume/topic.asp?TOPIC_ID=3199)

Εικόνα 7: [http://www.world-mushroom.com/eryngii/sg\\_ery03.jpg](http://www.world-mushroom.com/eryngii/sg_ery03.jpg)

Εικόνα 8: [http://images.google.com.gr/images?q=tbn:vExtS8-J3okJ:www.micologia.net/albums/album1032/pleurotus\\_eryngii\\_var\\_ferul.thumb.jpg](http://images.google.com.gr/images?q=tbn:vExtS8-J3okJ:www.micologia.net/albums/album1032/pleurotus_eryngii_var_ferul.thumb.jpg)

## Φωτογραφίες ξενιστών που περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία



Εικόνα 9: *Eryngium campestre*



Εικόνα 10: *Thapsia villosa*



Εικόνα 11: *Elaeoselinum ascl. subsp. asclepium*

---

Εικόνα 9: [http://galenos.misto.cz/\\_MAIL\\_/eryngium\\_campestre02.jpg](http://galenos.misto.cz/_MAIL_/eryngium_campestre02.jpg)

Εικόνα 10: 1: <http://waste.ideal.es/fotos/thapsiavillosa1.jpg>, 2: [http://waste.ideal.es/fotos/thapsia\\_villosa2.jpg](http://waste.ideal.es/fotos/thapsia_villosa2.jpg), 3: <http://waste.ideal.es/fotos/thapsiavillosa21.jpg>, 4: <http://waste.ideal.es/fotos/thapsiavillosa7.jpg>

Εικόνα 11: [http://www.uib.es/depart/dba/botanica/herbari/generes/Elaeoselinum/asclepium%20subsp.%20asclepium/Elaeoselinumasclepium\(gram\)\\_f\\_s.jpg](http://www.uib.es/depart/dba/botanica/herbari/generes/Elaeoselinum/asclepium%20subsp.%20asclepium/Elaeoselinumasclepium(gram)_f_s.jpg)



**Εικόνα 12:** *Cachrys ferulacea*



**Εικόνα 13:** *Laserpitium latifolium*



**Εικόνα 14:** *Ferula communis* (φωτογραφία 1)  
και *Ferula tingitana* (φωτογραφία 2)

---

Εικόνα 12: [http://nlonghitano.infinito.it/Flora%20Apistica/immagini/110\\_7\\_Cachrys\\_ferulacea.JPG](http://nlonghitano.infinito.it/Flora%20Apistica/immagini/110_7_Cachrys_ferulacea.JPG)

Εικόνα 13: <http://perso.wanadoo.fr/daniel.musy/Laserpitium-latifolium.jpg>

Εικόνα 14: 1: [http://www.uni-essen.de/botanik/Exkursionen/Ferula\\_communis.jpg](http://www.uni-essen.de/botanik/Exkursionen/Ferula_communis.jpg), 2: [http://www.bethchatto.co.uk/plant%20portraits%20f/tr\\_ferula%20tingitana%20cedric%20morris'.jpg](http://www.bethchatto.co.uk/plant%20portraits%20f/tr_ferula%20tingitana%20cedric%20morris'.jpg)



**Εικόνα 15:** *Ferulago galbanifera*



**Εικόνα 16:** *Thapsia garganica*

---

Εικόνα 15: <http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/mavica/all/2000/01978.jpg>

Εικόνα 16: [http://www.uib.es/depart/dba/botanica/herbari/generes/Thapsia/garganica/Thapsia\\_garganica\\_d\\_sp.jpg](http://www.uib.es/depart/dba/botanica/herbari/generes/Thapsia/garganica/Thapsia_garganica_d_sp.jpg)