

**ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ &
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ

«Μοριακή ανάλυση του μύκητα *Leveillula taurica*»

Σπουδαστής: Μαρκάκης Μάριος-Νεκτάριος

Εισηγήτρια: Ταμπακάκη Νατάσα

Ηράκλειο Ιούνιος 2004

Εισαγωγή

Ο μύκητας *Leveillula taurica* ανήκει στην τάξη *Erysiphales* και στην οικογένεια *Erysiphaceae*.(9,-12) Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι μύκητες που προκαλούν τις ασθένειες, οι οποίες είναι γνωστές σαν ωϊδία (1). Οι ασθένειες αυτές προσβάλουν πολλά είδη φυτών και δημιουργούν προβλήματα μεγάλης έκτασης σε φυτά μεγάλης οικονομικής σημασίας, όπως τα σιτηρά, το αμπέλι, τα κολοκυνθοειδή τα πυρηνόκαρπα και πολλά αλλά ανθοκομικά φυτά. Η εργασία αυτή αποσκοπεί στη διερεύνηση των διαφορών, σε μοριακό επίπεδο, μυκήτων που μολύνουν διαφορετικά φυτά, όπως η Αγκινάρα η Γλυκόριζα και η Μελιτζάνα.

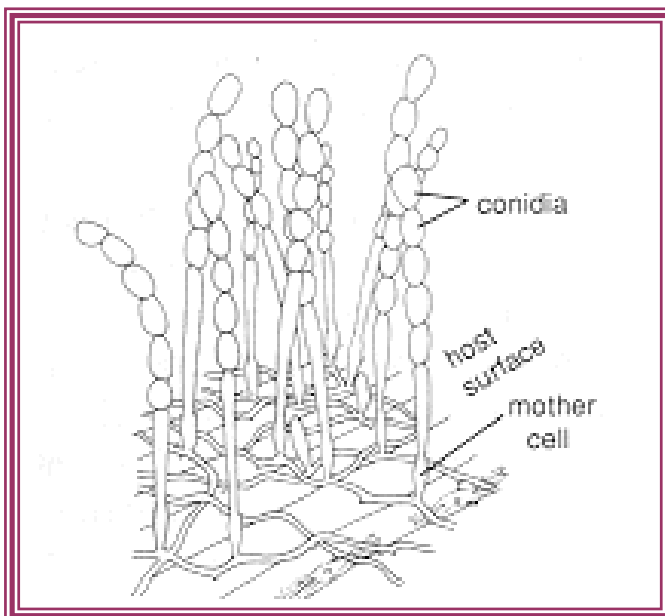
1.1 Οι πρώτες αναφορές

Η πρώτη αναφορά του παθογόνου *Leveillula taurica*, στις Ηνωμένες Πολιτείες, έγινε στον ξενιστή *Diplacus aurantiacus*, το 1906. Ακολούθησαν αναφορές στο *Prosopis chilensis*, *P.juliflora* και *P. glandulosa*, στο Τέξας, το 1945, στον *Hibiscus cannabinus*, στην Φλόριδα, το 1951 και πάλι στο *D. aurantiacus*, στην Καλιφόρνια, το 1977.

Επίσης, ο μύκητας *Leveillula taurica* έχει αναφερθεί σε αρκετές καλλιέργειες, μεγάλης οικονομικής σημασίας, που συμπεριλαμβάνουν: την τομάτα (*Lycopersicum esculentum*), την πιπεριά (*Capsicum annuum*), το κρεμμύδι (*Allium cepa*), το βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*) και το ζιζάνιο *Cyatopsis tetragonoloba* (Correll, Gordon and Elliott 1987, Jones and Thomson 1987).

1.2 Ταξινόμηση

Ο μύκητας *Leveillula taurica* ανήκει στην οικογένεια *Erysiphaceae* της τάξης των



Εικ.1 Μορφολογία του ωιδίου

Erysiphales των Ασκομυκήτων. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν τα γένη

Erysiphe, *Phyllactinia*, *Microsphaera*, *Uncinula*, *Sphaerotheca*, *Podosphaera* και *Leveillula*. Τα γένη αυτά διακρίνονται μεταξύ τους από τους αριθμούς των ασκών σε κάθε κλειστοθήκιο και από την μορφή των εξαρτημάτων που υπάρχουν στα κλειστοθήκια. Οι καρποφορίες της τέλειας μορφής του *L.taurica* σχηματίζει τα κλειστοθήκια. Συχνότερα όμως απαντάται η αγενής μορφή του μύκητα που ονομάζεται *Oidiopsis taurica* (εικ.1)

1.3 Συμπτώματα

Ο μύκητας αυτός προσβάλλει τα πράσινα μέρη του φυτού, αλλά κυρίως τα φύλλα (Εικ 2.) και συνήθως τα ώριμα και πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα. Το χαρακτηριστικό τους σύμπτωμα είναι ο σχηματισμός κιτρινοπράσινων ή πράσινων, ακανόνιστων γωνιωδών κηλίδων αρχικά στην πάνω επιφάνεια του φύλλου, διαμέτρου 10-15mm, ενώ στην κάτω επιφάνεια του ελάσματος εμφανίζεται μια λεπτή, λευκή μέχρι ανοιχτή καστανή αλευρώδης εξάνθηση η οποία είναι η αγενής μορφή του παθογόνου. Η αγενής μορφή του παθογόνου έχει κονιδιοφόρο τύπου *Oidiopsis* και ταξινομείται στους ατελείς μύκητες.(40)



Εικ.2 Συμπτώματα προσβολής από τον μύκητα

Σε πολύ ευνοϊκές για την ασθένεια συνθήκες εμφανίζεται μια υπόλευκη εξάνθηση που αποτελείται από το μυκήλιο, τους κονιδιοφόρους και τα κονίδια του μύκητα και εμφανίζεται μόνο στην κάτω επιφάνεια του ελάσματος. Προοδευτικά οι κηλίδες αυξάνουν σε αριθμό και μέγεθος με αποτέλεσμα συχνά να καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος ή και ολόκληρη την επιφάνεια του προσβεβλημένου οργάνου. Οι κηλίδες συνενώνονται μεταξύ τους με αποτέλεσμα να νεκρώνουν το προσβεβλημένο όργανο και μερικές φορές εμφανίζονται με συγκεντρικούς δακτυλίους. Σε σπάνιες περιπτώσεις προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, εμφανίζονται στην επιφάνεια των προσβεβλημένων οργάνων, πολλά μαύρα στίγματα ανάμεσα στην εξάνθηση και είναι τα μικροσκοπικά μαύρα κλειστοθήκια της εγγενούς μορφής του παθογόνου

1.4 Ξενιστές

Ο μύκητας *L. taurica* (Εικ 3) αποτελεί ένα μοναδικό παθογόνο φυλλώματος, ως προς την ικανότητα του να προσβάλλει μεγάλο αριθμό διαφορετικών φυτικών ειδών. Σύμφωνα με τις δημοσιεύσεις ως το 1986, έχουν αναφερθεί 74 οικογένειες ξενιστών, στις οποίες ανήκουν περίπου 390 γένη και 1000 είδη. Στα μονοκοτυλήδωνα ανήκουν μόνο 3 γένη και 5 είδη. Οι υπόλοιπες οικογένειες ανήκουν στα δικοτυλήδωνα. Ο μεγαλύτερος αριθμός ειδών, τα οποία αποτελούν ξενιστές του *L. taurica* ανήκουν κατά φθίνουσα



Εικ 3. Ηλεκτρονική φωτογραφία του *L. taurica*

σειρά στις οικογένειες: *Compositae* (227 είδη), *Leguminosae* (154 είδη), *Umbdliferae*, *Labiatae*, *Chenopodiaceae*, *Cruciferae*, *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*, *Euphorbiaceae* και *Boraginaceae*.(46,47)

Μεταξύ των δεντρών ξενιστών του μύκητα *L. taurica*, σημαντικότερος είναι η ελιά (*Olea europaea*), επίσης έχει βρεθεί να μολύνει σημαντικές καλλιέργειες σολανωδών, όπως η τομάτα (Palti. 1988). Ο Palti (1971) αναφέρει ότι ο αριθμός των ειδών - ξενιστών στην Ελλάδα, σύμφωνα με τον Hirata (1968) είναι 20.

Πίνακας 1. συνοπτικός πίνακας με ξενιστές του *Leveillula* από διάφορα είδη του. Οι ξενιστές αυτοί είναι από την διεθνής βάση δεδομένων NCBI.

Είδος	Ξενιστής
<i>Leveillula elaeagni</i>	<i>Elaeagnus orientale</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Helianthus sp</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Vicia variabilis</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Medicago sativa</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Medicago sp</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Epilobium sp</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Glaucium oxylobum</i>
<i>Leveillula duriaei</i>	<i>Salvia nemorosa</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Cirsium arvense</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Eringium sp</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Althaea sp</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Caparis spinosa</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Lotus corniculata</i>
<i>Leveillula cylindrospora</i>	<i>Noaea mucronata</i>
<i>Leveillula cylindrospora</i>	<i>Anthochlamys polygoides</i>
<i>Leveillula cylindrospora</i>	<i>salsola kali</i>
<i>Leveillula lanuginosa</i>	<i>Echinophora sibthorpiana</i>
<i>Leveillula lanuginosa</i>	<i>Heracleum persicum</i>
<i>Leveillula lorantii</i>	<i>Lorantus europeus</i>
<i>Leveillula picridis</i>	<i>Picris sp</i>
<i>Leveillula saxaouli</i>	<i>Haloxylon sp</i>
<i>Leveillula simoniani</i>	<i>Thevenotia persica</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Impatiens Length</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Onobrychis viciaefolia</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Mindium sp</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Ononis spinosa</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Euphorbia heterophylla</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Psoralea drupaeca</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Alhagi sp</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Zygophyllum fabago</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Euphorbia petiolata</i>
<i>Leveillula chrozophorae</i>	<i>Chrozophora tinctoria</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Lepidium lotifolium</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Ammodendron connolyi</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Zygophyllum</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Peganum harmala</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Celosia sp</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Haplophyllum perphoratum</i>
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Clematis orientale</i>
<i>Leveillula verbasci</i>	<i>Verbascum sp</i>

1.5 Επιδημιολογία

Οι μολύνσεις γίνονται με κονίδια. Τα κονίδια όταν βλαστήσουν παράγουν βλαστική υφή η οποία σχηματίζει apressorium (Εικ.4) με τα οποία προσκολλάται στο σημείο που ακουμπά την επιφάνεια του φυτικού ιστού.



Εικ 4. Ηλεκτρονική εικόνα από haustorium in *Blumeria graminis*

Από το apressorium αναπτύσσεται το ράμφος που περνά την επιδερμίδα του φυτού και εισέρχεται στα πρώτα κύτταρα. Μέσα στα κύτταρα αναπτύσσονται μυζητήρες (haustoria) με τα οποία το παθογόνο απορροφά τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται χωρίς να τα νεκρώνει. Το

μυκήλιο του παθογόνου δεν διακλαδίζεται στο εσωτερικό του φύλλου, αλλά στην επιφάνεια του.

Ο μύκητας τρέφεται με τη βοήθεια των μυζητήρων κατευθείαν από το

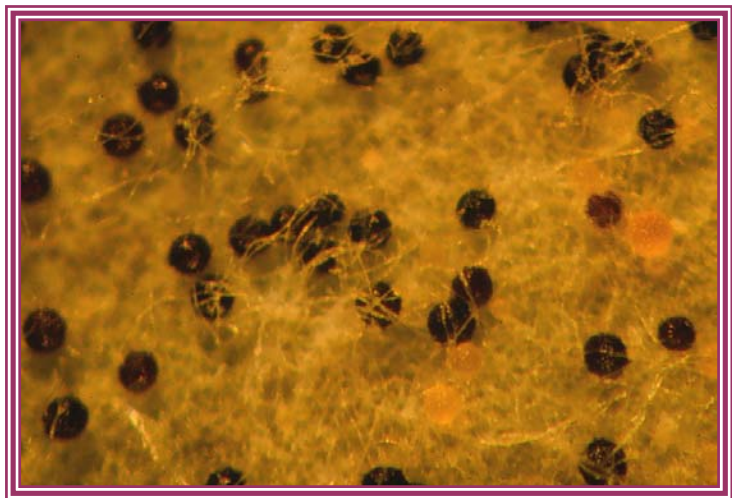
εσωτερικό του ζωντανού φυτικού κυττάρου (ενδοφυτικός παρασιτισμός). Οι βραχείς, λεπτοί διακλαδιζόμενοι κονιδιοφόροι βγαίνουν από τα στομάτια του φύλλου στην κάτω επιφάνεια του



Εικ.5 Ηλεκτρονική φωτογραφία Κλειστοθήκια

ελάσματος σε δέσμες από κάθε στόμα. Στην κορυφή του κάθε βραχίονα

σχηματίζεται ένα μακρύτερο σπόριο διαστάσεων 95x14-20μm. Τα Κλειστοθήκια (Εικ.5, 6) σχηματίζονται εντός του επιφανειακού μυκηλίου του μύκητα. Έχουν διάμετρο 135-200μm και περιέχουν 20-35 ασκούς διαστάσεων 70-110x25-40μm. Ο κάθε ασκός περιέχει 8 υαλώδη κυλινδρικά παπιοειδή ασκοσπόρια διαστάσεων 24-40x12-22μm (19). Επειδή τα κλειστοθήκια σχηματίζονται σπανίως, η επιβίωση του μύκητα γίνεται κυρίως με μυκήλιο και τα κονίδια στα διάφορα καλλιεργούμενα και αυτοφυή φυτά ξενιστές . Αναφέρεται ότι η ασθένεια είναι σοβαρότερη σε καλλιέργειες με μεγάλο φορτίο καρπών ή σε καλλιέργειες που υποφέρουν από έλλειψη νερού. Τα κονίδια των μυκήτων είναι ξηροσπόρια που ελευθερώνονται και μεταφέρονται από τον άνεμο όταν έχει ελάχιστη ταχύτητα 1,14m/sec και αποτελούν τα κύρια μολύσματα εξάπλωσης της ασθένειας σε μικρές όμως αποστάσεις. Η διύγρανση των φυτικών ιστών και η υψηλή σχετική υγρασία επηρεάζουν αρνητικά την απελευθέρωση των κονιδίων, επομένως οι επιδημίες ευνοούνται σε συνθήκες χαμηλής σχετικής υγρασίας (περίπου 52-75%)



Εικ.6 Ηλεκτρονική φωτογραφία από Κλειστοθήκια

και θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 15-25°C. Τα ασκοσπόρια αντίθετα εκτοξεύονται από τα κλειστοθήκια όταν τα τελευταία διαβραχούν. Η άριστη θερμοκρασία για την μόλυνση της τομάτας είναι 25°C. Τα κονίδια είναι δυνατόν να βλαστήσουν σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 10-30°C και σε πολύ χαμηλή σχετική υγρασία 20-30%. Το μολύσμα διατηρείται από την μια καλλιεργητική περίοδο έως την επόμενη στα προσβεβλημένα φυτικά υπολείμματα και σε ζιζάνια ξενιστές με την μορφή μυκηλίου και σπανιότερα με την μορφή κλειστοθηκίων.

Μοριακοί δείκτες

Η συστηματική κατάταξη των μυκήτων γινόταν, μέχρι λίγα χρόνια πριν μόνο με τη βοήθεια των διαφόρων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους, μορφολογικών και φυσιολογικών ή ακόμα και με διάφορα χημικά συστατικά όπως οι δευτερεύοντες μεταβολίτες. Η πρόσφατη ανάπτυξη όμως της μοριακής βιολογίας άλλαξε τον τρόπο ταξινόμησης. Οι διάφορες μοριακές μέθοδοι που υπάρχουν σήμερα βοήθησαν τον καθορισμό της φυλογενετικής ταξινόμησης των μυκήτων. Η σημαντικότερη από αυτές τις μεθόδους είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) η οποία έκανε την εμφάνιση της στα μέσα της δεκαετίας του 80.(6,7,39) Η PCR έδωσε τη δυνατότητα για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών από πολύ μικρές ποσότητες αρχικού υλικού αλλά και την χρησιμοποίηση σχετικά ακάθαρτων κομματιών DNA. Οι τεχνικές που βασίζονται στην PCR βοήθησαν στον καθορισμό της μοριακής φυλογενετικής μελέτης σε πολλές κατηγορίες μυκήτων

Παρακάτω παρουσιάζονται μερικές από τις νέες μοριακές τεχνικές οι οποίες αναπτύχθηκαν με τη χρησιμοποίηση της μεθόδου PCR για τις φυλογενετικές μελέτες των μυκήτων. Πρωταρχικό σκοπό στις περισσότερες από αυτές τις τεχνικές αποτελεί ο φυλογενετικός και ταξινομικός καθορισμός του μύκητα. Τέτοιες τεχνικές είναι οι Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Μικροδορυφόροι και Internal transcribed Regions (ITS) analysis. Οι τεχνικές αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό των γενετικών μεταβλητών και βοηθούν στην κατανόηση της ποικιλομορφίας του γενετικού υλικού ενός είδους. Η ανατομική και μορφολογική ομοιότητα που εμφανίζουν ορισμένα είδη καθιστά δύσκολη την ταυτοποίηση τους.

Επίσης ο προσδιορισμός του μύκητα με βάση τα συμπτώματα που προκαλεί σε ένα φυτό απαιτεί αρκετό χρόνο.

Τέλος η ανάπτυξη ορισμένων μυκήτων πάνω υπόστρωμα (Bremia, Leveillula, Uncinula, Puccinia, κ.τ.λ.)

Τα όρια πολλών μορφολογικών ειδών επαναπροσδιορίστηκαν με βάση των διάφορων μοριακών δεδομένων και η ταξινόμηση των μυκήτων άλλαξε σημαντικά. Η χρησιμοποίηση νέων μεθόδων της μοριακής βιολογίας παρέχει την δυνατότητα ταυτοποίησης ενός μύκητα γρηγορότερα και λεπτομερώς

να προκαλέσουν απώλεια ή δημιουργία μιας περιοριστικής θέσης(20). Η τεχνική (RFLP) περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1 Πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα
- 2 Διαχωρισμός των τμημάτων του DNA, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτική αгарόζης
- 3 Μεταφορά των τμημάτων DNA σε μεμβράνη .
- 4 Υβριδοποίηση με ραδιενεργά σημασμένο ιχνηλάτη (probe).
- 5 Ανίχνευση των τμημάτων DNA με αυτοραδιογραφία

1.2.4 RAPD

Μοριακός δείκτης βασισμένος στον πολλαπλασιασμό τυχαίων και διαφορετικών τμημάτων DNA χρησιμοποιώντας μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Ο μοριακός αυτός δείκτης βασίζεται στην τεχνική της PCR για τον πολλαπλασιασμό τυχαίων περιοχών ενός γονιδιώματος. Στην τεχνική αυτή ένα μικρό μόριο χρησιμοποιείται ως εκκινιτής (primer). Ο εκκινιτής είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο με μήκος 10 νουκλεοτιδίων (21). Το μικρό μήκος του εκκινιτή επιτρέπει την πρόσδεση του σε πολλές και διάφορες περιοχές του γονιδιώματος με αποτέλεσμα να παράγονται με την PCR διαφορετικά τμήματα DNA, τόσο ως προς το μέγεθος όσο και ως προς την αλληλουχία (26) .Η RAPD είναι ουσιαστικά μια απλή και γρήγορη μέθοδος εντοπισμού της γενετικής ποικιλότητας.

Η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό διαφορών σ' ένα μεγάλο αριθμό ειδών. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι οι συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνεται η PCR πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένες και τυποποιημένες έτσι ώστε τα αποτελέσματα να μην διαφοροποιούνται και να παραμένουν σταθερά.

1.2.5 Ισοένζυμα

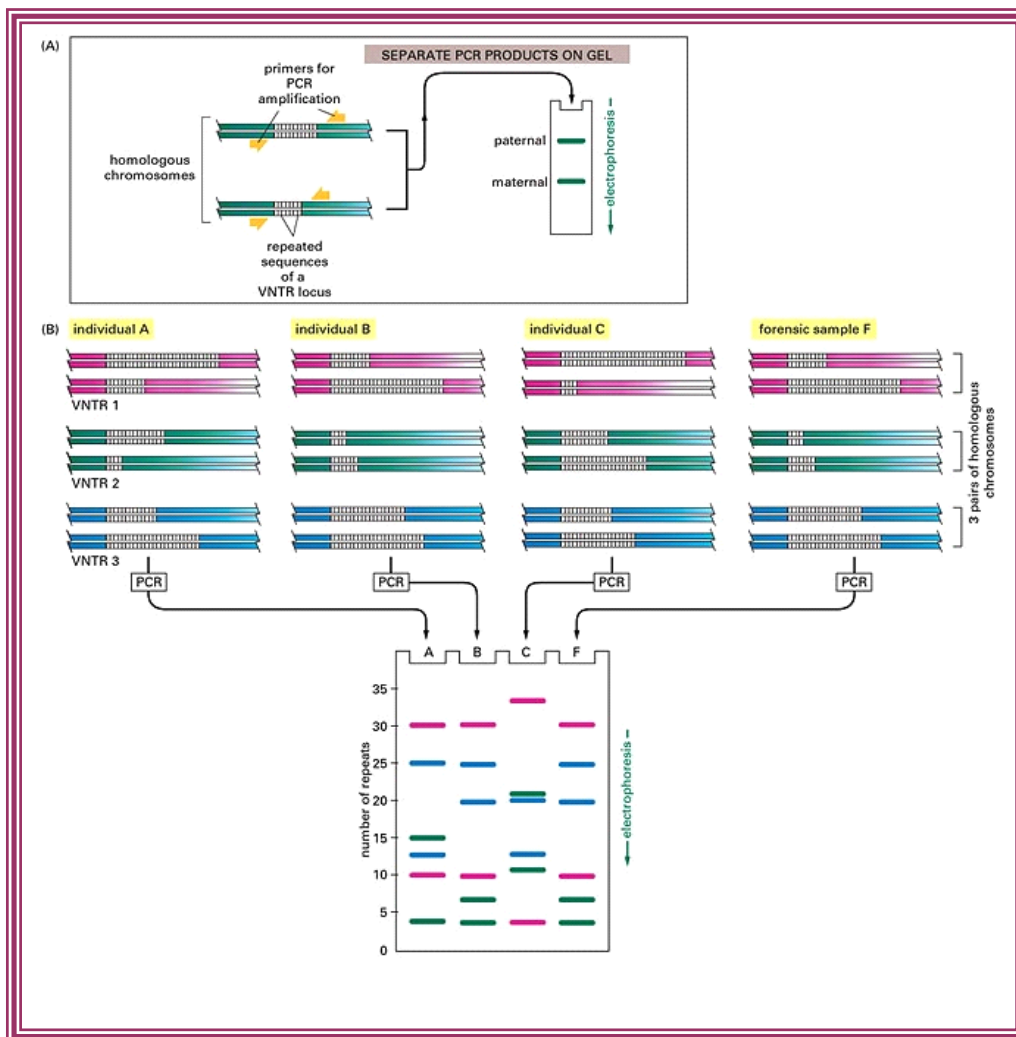
Ένζυμα είναι πρωτεΐνες οι οποίες καταλύουν ένα πλήθος από βιοχημικές αντιδράσεις και ουσιαστικά είναι οι παράγοντες που εκφράζουν τις γενετικές πληροφορίες και δίνουν τον φαινότυπο στον οργανισμό. Η ανάπτυξη τεχνικών ανίχνευσης των ενζύμων όπως η ηλεκτροφόρηση αποκάλυψε τις δυνατότητες που μπορούσε να προσφέρει η μελέτη τους και ειδικά η μελέτη μιας κατηγορίας πρωτεϊνών τα ισοένζυμα, Ισοένζυμα είναι τα ένζυμα που καταλύουν την ίδια βιοχημική αντίδραση, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μοριακό τους τύπο και την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Για το

διαχωρισμό των ενζύμων εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές όπως, ηλεκτροφόρηση, χρωματογραφία και ανοσοαποτύπωση. Μια από τις πιο σημαντικές εφαρμογές ισοενζυμικής ανάλυσης είναι ο προσδιορισμός των φυλογενετικών σχέσεων διάφορων ειδών. Η ισοενζυμική ανάλυση μπορεί να δώσει ενδείξεις ως προς το βαθμό συγγένειας ή και ως προς την ταξινόμηση των ειδών. Το μέτρο της γενετικής απόστασης των ειδών αποτελεί ένδειξη και της ταξινομικής τους απόστασης. Η πρακτική εφαρμογή της τεχνικής αυτής εξαρτάται από τα έξης:

- 1 Τον πολυμορφισμό των ισοενζύμων.
- 2 Το πόσο στενή είναι η σύνδεση με το χαρακτηριστικό .

1.2.6 Μικροδορυφόροι (Microsatellites)

Το DNA έχει την ιδιομορφία να περιέχει περιοχές με επαναλαμβανόμενη αλληλουχία, δυο, τρία, τέσσερα ή και πέντε νουκλεοτίδια. π.χ.

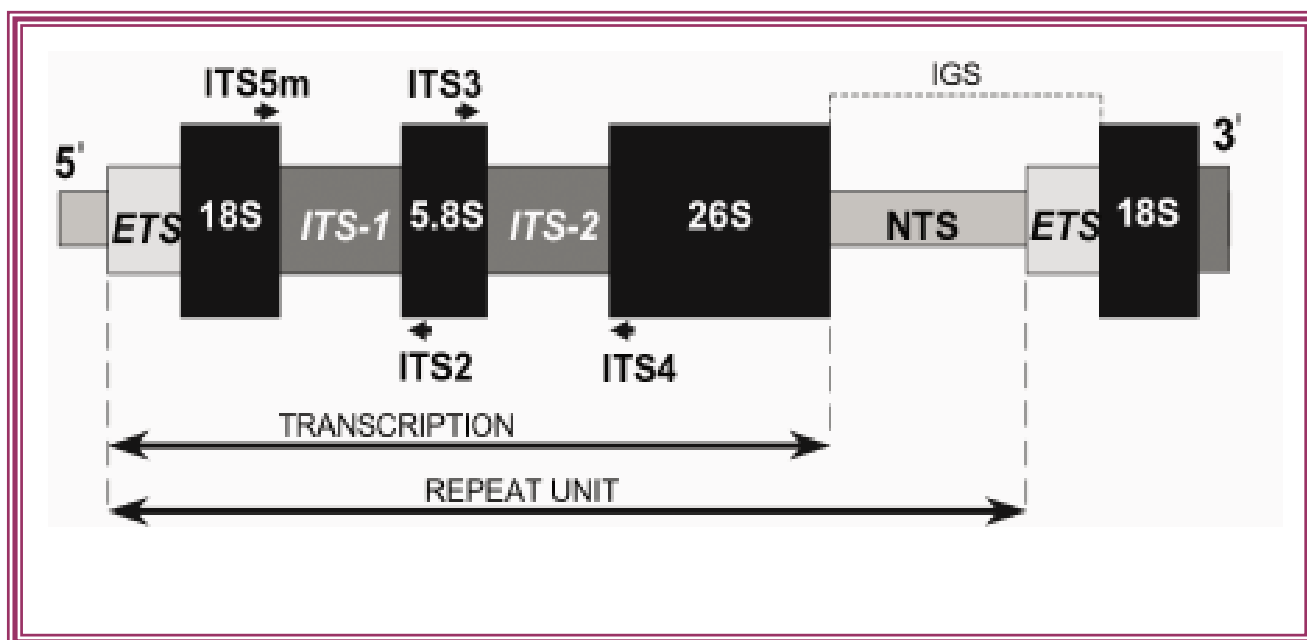


Εικ.8 Περιγραφή μιας ανάλυσης με μικροδορυφόρους

GTGTGTGTGTGTGT..... (GT_n). Οι περιοχές αυτές ονομάζονται μικροδορυφόροι (microsatellites) ή VNTRs (variable number of tandem repeats).(36,48) Ο αριθμός n είναι ανάλογος του οργανισμού και μπορεί να διαφέρει από είδος σε είδος ακόμα και από οργανισμό σε οργανισμό. Η τεχνική των μικροδορυφόρων χρησιμοποιείται στις μέρες μας για την πιστοποίηση συγγένειας σε ανθρώπους και ζώα με επιτυχία μεγαλύτεροι του 98%. (εικ.8) Έναν περιορισμό που έχει η μέθοδος αυτή είναι ότι χρειάζεται να υπάρχει πρωταρχικά ανάλυση παρομοίων οργανισμών για την ταυτοποίηση και εύρεση μικροδορυφόρων στο γονιδίωμα

1.2.7 Internal Transcribed Spacers

Τα ITS (internal transcribed spacers) (Εικ.9) αποτελούν μη κωδικοποιούμενες περιοχές του DNA τα οποία διαχωρίζουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα 28S, 5.8S και 18S του ριβοσωμικού RNA (rRNA). (3,4,14) Τα συγκεκριμένα αυτά γονίδια παρουσιάζουν την ιδιότητα να διατηρούνται άθικτα σε όλα τα τάξα του είδους και γι' αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως στην μοριακή ταξινόμηση των μυκήτων ενώ στο επίπεδο του είδους τα ITS χρησιμοποιούνται για φυλογενετικές μελέτες αφού συχνά διαφέρουν ανάλογα με το είδος. Η διαφοροποίηση αυτή των ITS αποδείχθηκε πολύ χρήσιμη για τον διαχωρισμό ειδών που ήταν δύσκολος ο προσδιορισμός τους. Τα



Εικ 9. Περιοχή ITS-1 & ITS-2

ριβοσωμικά RNA γονίδια εμφανίζονται σαν επαναλαμβανόμενες μονάδες διευθετημένες σε διπλές σειρές οι οποίες εντοπίζονται σε χρωμοσωμικές περιοχές γνωστές σαν περιοχές οργάνων πυρήνισκων nucleolar

organizing regions (NORs) Κάθε επαναλαμβανόμενη μονάδα αποτελείται από μια κωδικοποιούμενη περιοχή (η οποία περιλαμβάνει τα γονίδια 18S 5,8S και 28S) ένα εξωτερικό διάστημα ETS και μια μη κωδικοποιούμενη περιοχή NETS στην μια και στην άλλη άκρη. Μέσα στην κωδικοποιούμενη περιοχή στη μια και στην άλλη άκρη του 5,8S rRNA βρίσκονται οι ITS περιοχές οι οποίες ονομάζονται ITS1 και ITS2 (5,22,30,31,42,57,59) Το μήκος και η αλληλουχία των βάσεων της περιοχής ITS μέσα στο rDNA πιστεύεται πως μπορεί και μεταλλάσσεται πολύ γρήγορα και επομένως ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό. Οι εκκινητές PCR που δεσμεύονται σε συντηρημένες περιοχές οριοθετώντας τα ITS και επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό τους. Το σχετικά μικρό μέγεθος των περιοχών ITS και ο υψηλός αριθμός αντιγραφών του rDNA καθιστά τις περιοχές αυτές χρήσιμες για εξελικτικές και φυλογενετικές όπως και για βιογεωγραφικές μελέτες .

Η αλληλουχία των περιοχών ITS έχει μελετηθεί και παλαιότερα σαν μια χρήσιμη παράμετρος της γενετικής ποικιλότητας στο μύκητα *L. taurica* .

Η ταυτοποίηση του μύκητα *L. Taurica* με τις συνήθεις μεθόδους παρουσιάζει τις εξής δυσκολίες:

- Συχνά το γονίδιο ή τα γονίδια που θέλουμε να διακρίνουμε δεν εκδηλώνεται με ξεκάθαρο φαινότυπο ή εκδηλώνεται καθυστερημένα στην διάρκεια ανάπτυξης του μύκητα
- Προκαλούνται ανεπιθύμητες αλλαγές στον φαινότυπο λόγω εξωτερικών συνθηκών
- Παρατηρούνται σημαντικές δυσκολίες στην μακροσκοπική παρατήρηση του μύκητα και στην σύγκριση αποτελεσμάτων

Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι:

- Ο μύκητας *L. Taurica* είναι υποχρεωτικό παράσιτο άρα είναι ακόμα πιο δύσκολο η καλλιέργεια μεγάλης ποσότητας από τον μύκητα

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στο να καθοριστεί αν οι απομονώσεις του μύκητα από διαφορετικούς ξενιστές είναι όμοιες η διαφορετικές . Γι αυτόν ακριβώς το λόγο η χρησιμοποίηση των ITS περιοχών μπορεί να θεωρηθεί σαν την καλύτερη λύση σε αυτήν εδώ την μελέτη αφού η μοριακή αναγνώριση του *Leveillula taurica* πραγματοποιείται εύκολα με τη βοήθεια τους

Υλικά και μέθοδοι

2.1 Πηγές μυκήτων

Ο μύκητας *Leveillula taurica* απομονώθηκε από φυτά μελιτζάνας, αγκινάρας, πιπεριάς, οξαλίδας και γλυκόριζας. Σπόρια του μύκητα καλλιεργήθηκαν σε κοτυληδόνες αγγουριού, επειδή ως υποχρεωτικό παράσιτο δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε συνήθη θρεπτικά υποστρώματα.

2.2 Διαδικασία ανάπτυξης και απολύμανσης κοτυληδόνων

Οι σπόροι αγγουριών τοποθετήθηκαν σε σκοτεινούς θαλάμους σε θερμοκρασία 25 °C και σχετική υγρασία 100% για 24 ώρες έτσι ώστε να διευκολυνθεί η ανάπτυξη. Τα φυτά αγγουριάς αναπτύχθηκαν σε ένα θάλαμο ανάπτυξης σε θερμοκρασία 25 °C ± 1 °C και 12/12 ώρες φωτοπερίοδο. Κοτυληδόνες πέντε (5) ημερών συλλέχθηκαν στη συνέχεια και αποστειρώθηκαν σε απαγωγό εστία (laminar flow). Για την αποστείρωση τους χρησιμοποιήθηκε υποχλωριώδες νάτριο σε συγκέντρωση 1:10. Οι κοτυληδόνες επωάζονται για 2 λεπτά στο υποχλωριώδες νάτριο και ακολούθως ξεπλένονται με απιονισμένο νερό δυο φορές. Εν συνεχεία, οι κοτυληδόνες αφήνονται να στεγνώσουν σε απορροφητικό αποστειρωμένο χαρτί και τοποθετούνται σε πιάτα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα (Molot *et al.*, 1990)

Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος αποτελείται από 0.1 g Citric acid (αντιοξειδωτικό), 0.1 g ασκορβικό οξύ (αντιοξειδωτικό), 0.001 g ινδολοβουτυρικό οξύ (παραγωγό αυξήνης), 1 ml κανομυκίνη (αντιβιοτικό) και 15 g άγαρ σε 1 λίτρο νερού. (Molot *et al.*, 1990).

3.3 Εμβολιασμός και επώαση κοτυληδόνων

Ο μύκητας *L. taurica* συλλέχθηκε από πέντε ξενιστές: αγκινάρα, πιπεριά, οξαλίδα, Μελιτζάνα και γλυκόριζα. Κοτυληδόνες των αγγουριών εμβολιάστηκαν για πρώτη φορά με άμεση επαφή με μολυσμένα φύλλα, ενώ δοκιμάστηκαν ακόμα εμβολιασμοί με πινέλα και βελόνες οι οποίοι έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το μόλυσμα επαναεμβολιάστηκε σε



Εικ.10 κοτυληδόνες γλυκόριζας σε υποστόμια

καινούριες (καθαρές)

κοτυληδόνες, έτσι ώστε να μπορέσουμε να το διατηρήσουμε. Μετά από τον εμβολιασμό, οι κοτυληδόνες επώαστηκαν σε ένα θάλαμο αύξησης σε θερμοκρασία $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ και 12/12 ώρες φωτοπερίοδο. Η ανάπτυξη του μύκητα πάνω στις κοτυληδόνες αγγουριάς χρειάστηκαν περίπου 15/25 μέρες. Οι προσπάθειες καλλιέργειας του μύκητα *L. taurica* με ξενιστή την γλυκόριζα σε φύλλα από γλυκόριζα (Εικ.10) δεν απέδωσαν ακόμα και μετά από 45 μέρες ανάπτυξης στον θάλαμο.

2.4 Συλλογή κονιδίων

Μετά από 15-25 μέρες στον θάλαμο ανάπτυξης, ο πληθυσμός των κονιδίων πάνω στις κοτυληδόνες αγγουριάς ήταν αρκετός ώστε να γίνει είτε νέα επιμόλυνση για την αύξηση του ή ικανοποιητικός ώστε να προχωρήσουμε στην συλλογή των κονιδίων. Στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήσαμε :

- 1 Τρυβλία
- 2 Αποστειρωμένο νερό
- 3 Αποστειρωμένα πινέλα (ζωγραφικής νούμερο 1 ή 2)
- 4 Δοκιμαστικούς σωλήνες 1.5 ml
- 5 Παραφινέλαιο για να εμποδίσουμε τα κονίδια να επικαθίσουν στα τοιχώματα των τρυβλίων

Τα κονίδια συλλέχθηκαν με πινέλο από τις κοτυληδόνες έτσι ώστε να μην αποκολληθεί φυτικός ιστός. Από κάθε ξενιστή συλλέχθηκαν 4 περίπου σπόρια σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 8000 rpm για 3 λεπτά. για απομάκρυνση του νερού και αποθήκευση στους - 80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για εκχύλιση DNA .

2.5 Εκχύλιση DNA από τα κονίδια

Η εκχύλιση του DNA από σπόρια που είχαν διατηρηθεί στους -80°C πραγματοποιήθηκε με την παρακάτω διαδικασία:

- 1 Προσθήκη 100μl απιονισμένου νερού σε δοκιμαστικούς σωλήνες με σπόρια βάρους 10mg που περιέχουν περίπου 1000 σπόρια
- 2 Για το σπάσιμο των μεμβρανών τα μεταφέραμε για 5 λεπτά στον φούρνο μικροκυμάτων στα 800w
- 3 Φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 5 λεπτά
- 4 Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα

2.6 Πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας του DNA

Μια από τις πλέον επαναστατικές μεθόδους της μοριακής βιοτεχνολογίας είναι και η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction ή PCR. Ανακαλύφθηκε το 1984 από τον Karry Mullis,(835) Ο ίδιος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel γι' αυτή του την ανακάλυψη μερικά χρόνια αργότερα, το 1993. Η αντίδραση PCR επιτυγχάνει τον ενζυματικό πολλαπλασιασμό ορισμένων τμημάτων του DNA μέσα από επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης και διαχωρισμού του DNA σε μονόκλωνες αλυσίδες και στην συνέχεια τον πολυμερισμό τους.



Εικ. 11 Συσσκευή PCR

Η διαδικασία της τεχνικής εφαρμόζεται με την χρήση ειδικής συσκευής PCR (Εικόνα 11) και αποτελείται από επιμέρους στάδια που έχουν

ως τελικό στόχο την αναπαραγωγή τμημάτων ενός αρχέτυπου μορίου DNA. Θεωρητικά η παρουσία ενός και μόνο αρχέτυπου μορίου DNA είναι αρκετή για να επιτευχθεί η αντιγραφή αυτή (Εικ.12). Τα στάδια αυτά μπορούμε επιγραμματικά να τα προσδιορίσουμε ως εξής:

1^ο Στάδιο: Απομόνωση γενωμικού DNA από τα άτομα που πρόκειται να αναλυθούν.

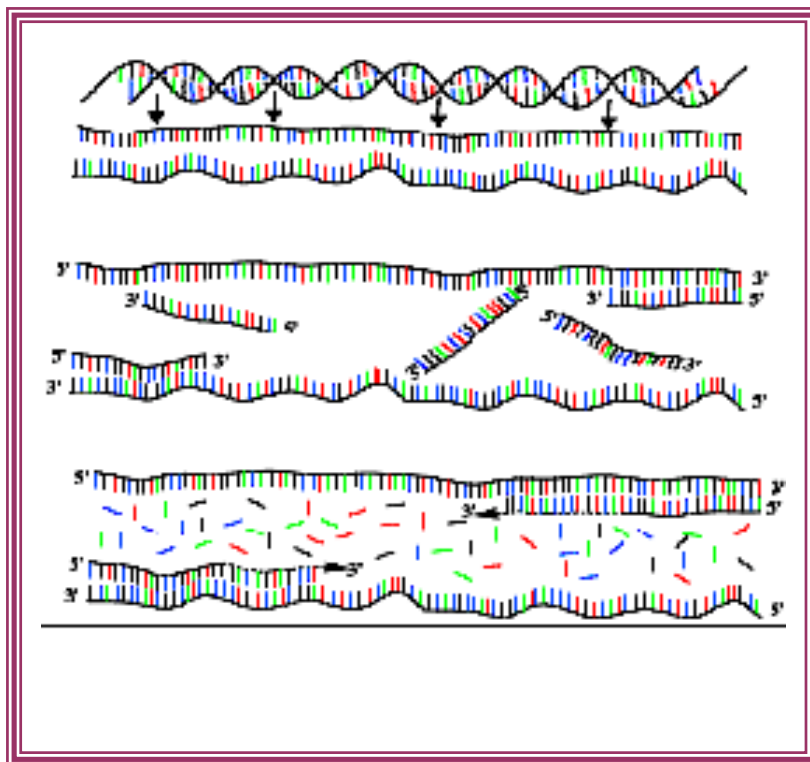
2^ο Στάδιο: Σχεδίαση και καθορισμός των συνθηκών της αντίδρασης PCR για τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA τα οποία μας ενδιαφέρουν από τα συγκεκριμένα άτομα.

3^ο Στάδιο: Εκτέλεση της αντίδρασης PCR σε κατάλληλη συσκευή, ενζύμου.

4^ο Στάδιο: Έλεγχος και ταυτοποίηση του ή των αναμενόμενων προϊόντων της PCR. Διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης με την μέθοδο της ηλεκτροφόρισης και καθορισμός της ποικιλομορφίας της αντίδρασης.

Τα συστατικά της αντίδρασης που χρησιμοποιήσαμε είναι:

- Αρχέτυπο DNA όγκου από 5 έως 1 μl
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια, 2,5mM dNTPS (ATP, GTP, CTP, TTP), 2 μl
- Εκκινητές ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3') και ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTA ACAAGG-3'). 1 μl από κάθε εκκινιτή συγκέντρωσης 10 μM
- Ρυθμιστικό διάλυμα της Taq πολυμεράσης 10X 5 μl
- Ποσότητα Taq πολυμεράσης (ένζυμο) 0,5 μl
- Ποσότητα νερού H₂O 35,5 μl



Εικ. 12 πολλαπλασιασμός του DNA με την μέθοδο της PCR

Τελικός όγκος αντίδρασης

50μl

Η αντίδραση περιλάμβανε 35 κύκλους.

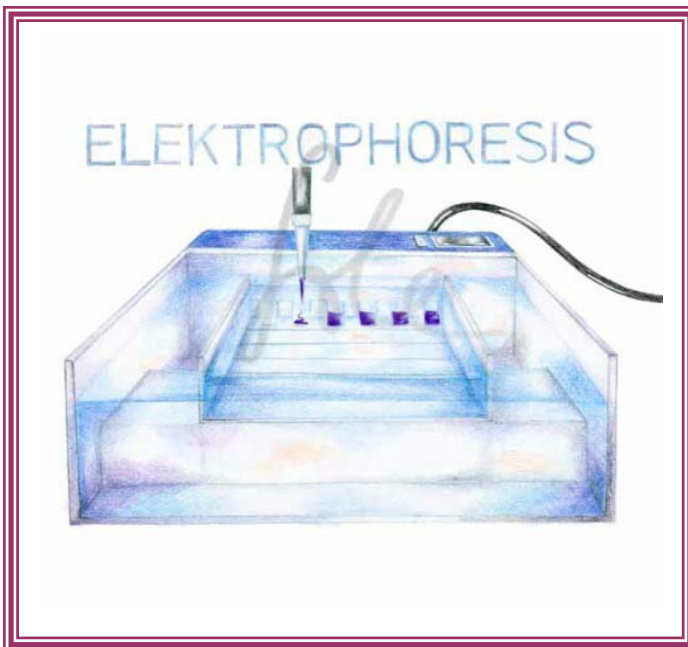
Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ήταν:

1. 94°c 3min
2. 94°c 30 sec.
3. 50°c 45 sec.
4. 72°c 1,5 min
5. 72°c 5 min
6. 4°c hold

Τα βήματα από 2 έως 4 επαναλήφθηκαν 35 φορές πριν προχωρήσουμε στα βήματα 5 και 6

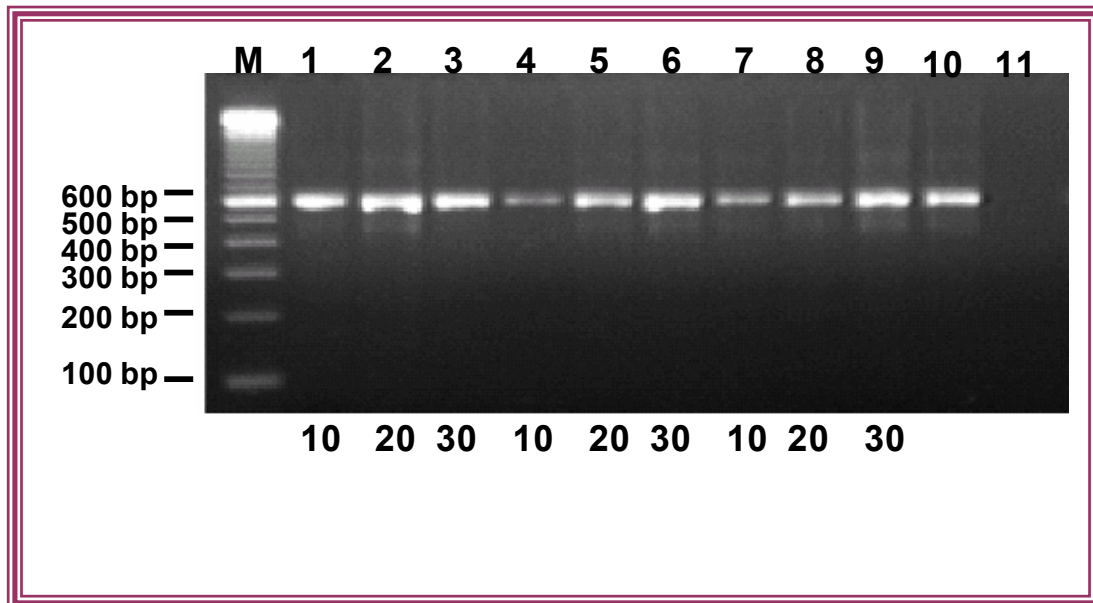
2.6 Ηλεκτροφόριση DNA

Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν μόρια DNA, RNA και πρωτεϊνών με κριτήριο το μήκος τους. Χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στο διαχωρισμό τμημάτων DNA που έχουν προκύψει μετά από επεξεργασία με



Εικ. 13 Σχεδιάγραμμα ηλεκτροφόρισης

περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα δείγματα DNA τοποθετούνται σε ένα πηγάδι (Εικ 13) που έχει δημιουργηθεί στο ένα άκρο του πηκτωμάτος αγαρόζης και καλύπτονται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πηκτής εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους. Η τάση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των διαφόρων θραυσμάτων DNA προς το θετικό πόλο, καθώς αποτελούνται από νουκλεοτίδια που είναι αρνητικά φορτισμένα. Η ταχύτητα μετακίνησης ενός θραύσματος εξαρτάται από το μέγεθός του έτσι τα μεγάλα θραύσματα κινούνται αργότερα από τα μικρά, με αποτέλεσμα να μπορούν να



διακριθούν

μεταξύ

Εικ. 14 Αναμενόμενη εικόνα, με μέγεθος βάσεων περίπου στις 600bp

τους(25).

Το δείγμα DNA ηλεκτροφορήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης σε 120 V για 45 λεπτά η σύσταση του πηκτώματος ήταν 130 ml TBE (Tris-Borate-EDTA) 1,3 g agar. Το δείγμα αυτό μπήκε 2 λεπτά στο φούρνο μικροκυμάτων και τέλος προσθέσαμε 130 μl

2.7 Η μέθοδος κλωνοποίησης DNA

Τα βασικά βήματα κλωνοποίησης ενός μορίου DNA είναι:

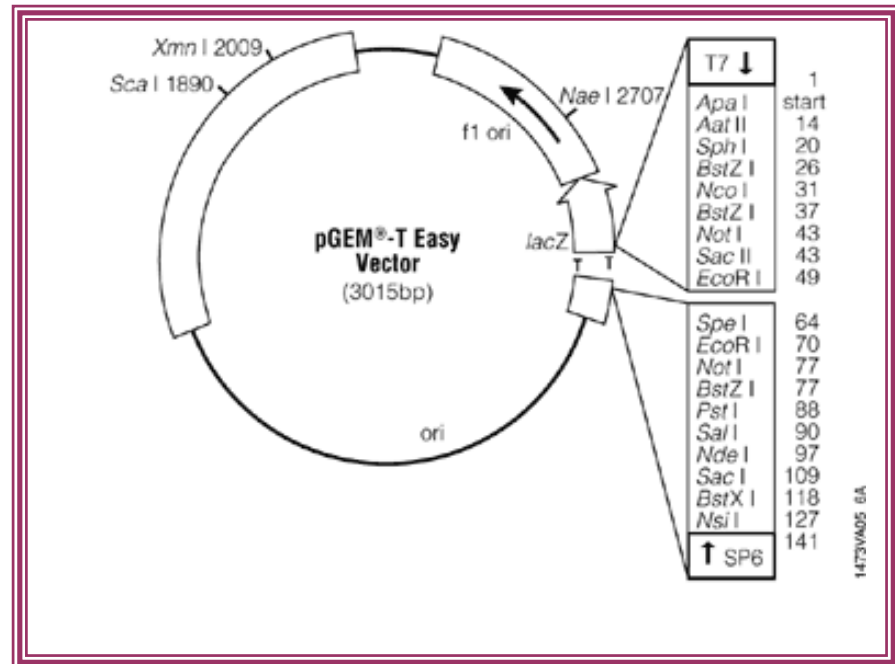
1. Εκχύλιση DNA από ένα οργανισμό που φέρει το υπό μελέτη μόριο. πολλαπλασιασμός τμημάτων με PCR και χρήση κατάλληλων εκκινητών.
2. Σύνδεση των δύο (πλασμίδιο και γραμμοποιημένο μόριο DNA) με την βοήθεια ειδικού ενζύμου (DNA λιγάση). Το νεοδημιουργηθέν μόριο ονομάζεται ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
3. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μεταφέρονται σε βακτήρια με την διαδικασία του θερμικού σοκ ή άλλης τεχνικής.
4. Τα βακτήρια επιστρώνονται σε κατάλληλο στερεό ή υγρό θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας για να επιλεγθούν εκείνα που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Όλες οι αποικίες, οι οποίες βρίσκονται σε ένα τρυβλίο ονομάζονται γονιδιακή βιβλιοθήκη.

5. Τέλος η βιβλιοθήκη αυτή σαρώνεται για να ταυτοποιηθούν οι αποικίες αυτές που φέρουν το υπό μελέτη μόριο.

2.7.1 Διαδικασία υποκλωνοποίησης μορίων DNA

Οι συνήθεις διαδικασίες υποκλωνοποίησης σε πλασμιδιακούς φορείς περιλαμβάνουν τη συνένωση δύο τμημάτων DNA με συμβατά άκρα, με τη βοήθεια της DNA λιγάση.

Επειδή η αλληλουχία του προϊόντος PCR δεν ήταν γνωστή, δεν μπορούσε να γίνει πέψη με κάποιο



περιοριστικό ένζυμο γι' αυτό

Εικ 15. ο φορέας pGEM-T-Easy και οι θέσεις αποκοπής από διάφορα ένζυμα

επιλέχθηκε ο φορέας pGEM-T-Easy, (Εικ.15) ο οποίος είναι γραμμοποιημένος και τα άκρα του έχουν ένα T από κάθε πλευρά ώστε να είναι δυνατή η ένθεση τμήματος DNA το οποίο έχει παραχθεί με την PCR. Η χρήση του ενζύμου Taq DNA polymerase προσθέτει στα άκρα του PCR προϊόντος ένα A, διευκολύνοντας έτσι την σύνδεση με γραμμοποιημένους φορείς που έχουν T στα άκρα τους

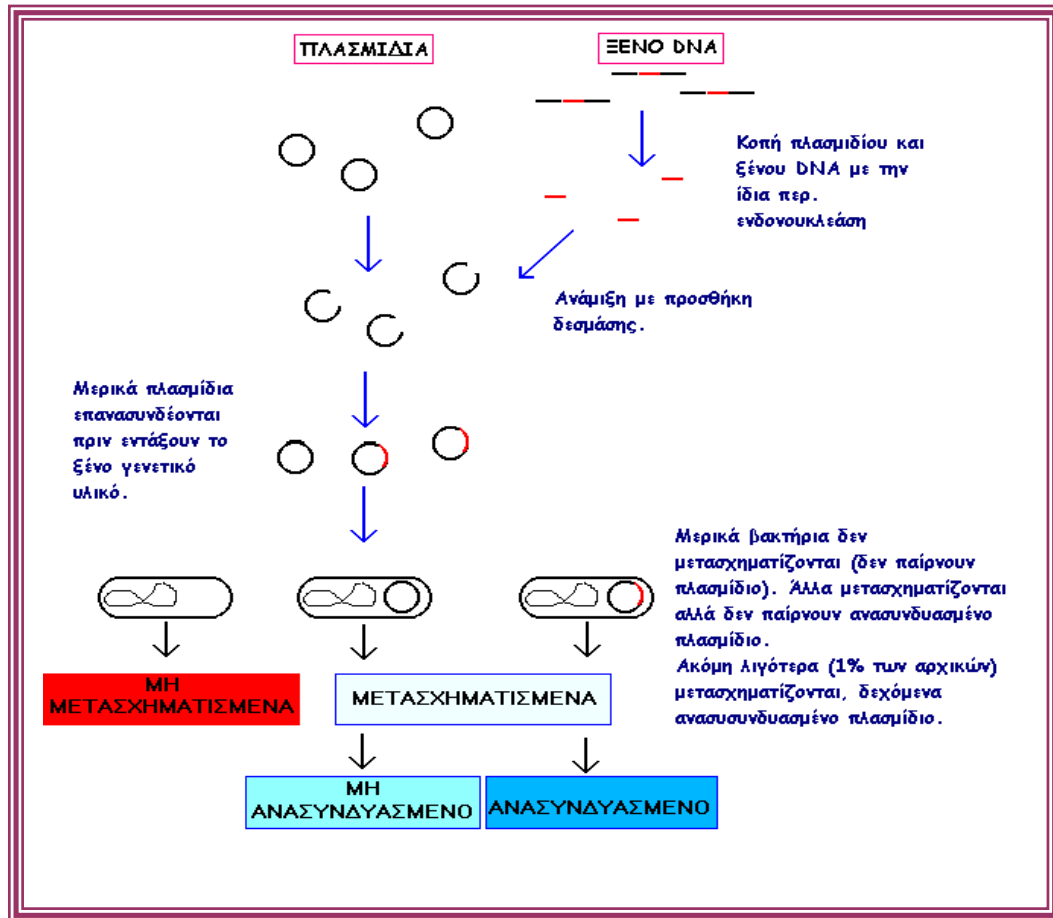
2.7.2 Εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στα κύτταρα του e.coli πραγματοποιείται με διάφορες τεχνικές, μια από αυτές είναι το θερμικό σοκ (Heat shock) όπου τα κύτταρα δέκτες επωάζονται σε διάλυμα που περιέχει ιόντα K⁺, το οποίο θερμαίνεται απότομα στους 40 °C. Το σοκ αυτό αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης για το πλασμίδιο με αποτέλεσμα αρκετά από τα κύτταρα δέκτες να δέχονται το πλασμίδιο. Η τεχνική αυτή είναι αποτελεσματική για βακτήρια όπως το e.coli.

2.7.3 Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών κλώνων γίνεται με δύο τρόπους:

α) Με χρωματική επιλογή που βασίζεται στην ενεργότητα της γαλακτοσιδάσης, (Εικ16)



Εικ.16 περιγραφή της διαδικασίας Ταυτοποίησης ανασυνδυασμένων κλώνων

β) Ή με απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα,

2.7.4 Ταυτοποίηση των αποικιών που φέρουν το υπό μελέτη μόριο

Ένας κοινός γενετικός δείκτης για τον εντοπισμό των βακτηρίων που έχουν δεχτεί ένα πλασμίδιο-φορέα είναι ένα γονίδιο του πλασμιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ένα αντιβιοτικό. Έτσι στα βακτήρια στα οποία εισάγεται το πλασμίδιο, «εισάγεται» και η ιδιότητα να επιβιώνουν παρουσία αντιβιοτικού. Από την καλλιέργεια, λοιπόν, όλων των βακτηρίων στα οποία έγινε μετασχηματισμός, όσα επιβιώνουν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχουν αντιβιοτικό είναι εκείνα στα οποία η εισαγωγή του πλασμιδίου ήταν επιτυχής.

Έτσι εντοπίζονται τα βακτήρια τα οποία μετασχηματίστηκαν και όχι εκείνα τα οποία έλαβαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Για τον εντοπισμό αυτών των βακτηρίων απαιτείται η απομόνωση πλασμιδικού DNA από κάθε

2.8 Αλληλούχιση DNA

Το 1975 ο Sanger και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν δύο επαναστατικές μεθόδους (ενζυμική και χημική) για την εύρεση της αλληλουχίας ενός γονιδίου. Από τις μεθόδους αυτές χρησιμοποιήσαμε την αυτοματοποιημένη, ενζυμική μέθοδο, που μας επιτρέπει τη γρήγορη αλληλούχιση των δειγμάτων μας (Εικ.17). Η αλληλούχιση των δειγμάτων έγινε στο Ι.Τ.Ε. (Ινστιτούτο Τεχνολογία και Έρευνα)

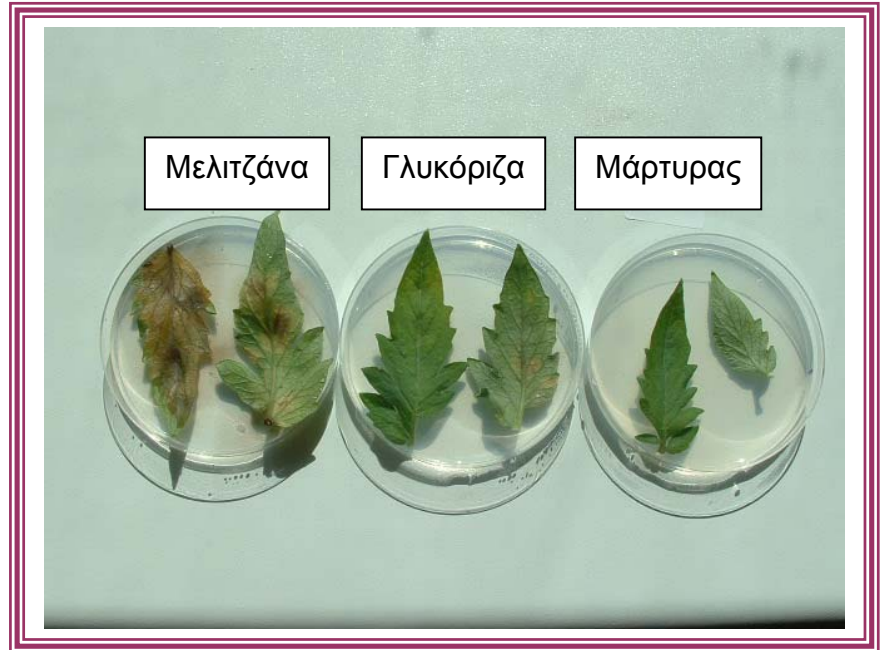


Εικ.17 Αυτόματο μηχάνημα *sequence*, όπου είναι δυνατό να αναλύση 450000 χιλιάδες βάσεις ανά ημέρα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα ελέγχου διασταυρωτής μόλυνσης (cross infectivity)

Ο έλεγχος διασταυρωτής μόλυνσης (cross infectivity test) εφαρμόστηκε για να ελέγξουμε αν οι απομονώσεις του μύκητα *L. taurica* από διαφορετικούς ξενιστές, όπως η μελιτζάνα (*Solanum melongena*) η γλυκόριζα και η αγκινάρα (*Cynara scolymus.*), μπορούν να προσβάλουν φύλλα τομάτας (*Lycopersicon esculentum*)



Εικ.18 Τεστ έλεγχου διασταυρωτής μόλυνσης

Τα φύλλα τομάτας αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα αγαρόζης σε θερμοκρασία $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12/12 ώρες φωτοπερίοδο. Μετά από ένα μήνα παρατηρήσεων συμπεράναμε ότι, ο μύκητας ο οποίος προήλθε από την μελιτζάνα και την γλυκόριζα προσέβαλε τα φύλλα τομάτας με μεγαλύτερο ποσοστό απ ότι αυτός ο οποίος προήλθε από την μελιτζάνα (Εικ 18), ενώ ο μύκητας με ξενιστή την αγκινάρα δεν έδειξε να προσβάλει τα φύλλα τομάτας σε αυτές τις συνθήκες.

3.2 Αποτελέσματα αλληλούχισης

Τα αποτελέσματα που πήραμε μετά από την αλληλούχιση αυτοματοποιημένη μέθοδο παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες..

Για τα δείγματα της Αγκινάρας πήραμε την ακόλουθη αλληλουχία :

```
1 GTTGGGWGCT CTCCCATATG GTCGACCTGC AGGCGGCCGC GAATTCACCTA
51 GTGATTGGAA GTAAAAGTCG TAACAAGGTT TCCGTAGGTG AACCTGCGGA
101 AGGATCATTA CAGAGCGTGA AGACCTCGGC CCCTCCACAG CGCAAGCTGG
151 TGCGAGGGAC ACATGCCGGG GTCGACCCTC CCACCCGTGT CACTCGTTT
201 CCTGTTGCTT TGGCAGGCCG ACTGCCTAGC GGTCTCTGG CTCTCGGGCT
251 GGAGTGCGCC TGCCAGAGAC TATTCAACTC GTGTTCTGGA TGAAGTCTGA
301 GCAATCAAGC AATAAAAATG AATAAGTTAA AACTTTC AACGGATCTC
351 TTGGCTCTGG CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA AGTAATGTGA
401 ATTGCAGAA TTAGTGAATC ATCGAATCTT TGAACGCACA TTGCGCCCCCT
451 GGGTACTCCT AGGGGCATGC CTGTTCGAGC GTCATAACAA CCCGTCGAGC
501 CGACTAGGCT TGGTCTTGGG GCTCGCCCCG GTTTGGCGCG GCGGCTCTTA
551 AACGCAGTGG CGGTGCCGGT GGTGCTTTCC GCGTAGTCAC ATTTCTCGCG
601 CGAGGGCAGA ATCCGGACCC AGCCAGCAAC CACAAAGTCC GCGGCGCTCT
651 GGGGGCGACT TTTGTACTTC TTCTGGTTGA CCTCGAATCA GGTAGGGATA
701 CCCGCTGAAC TTAAGCATAT CAATAAGCGG AGGAAATCGA ATTCCC CGCG
751 CCGCCATGGC GCGGGGSAG CATGCGACGT CGGGCCAAT TCGCYTTATA
```

ITS2, η περιοχή ανάμεσα είναι η 5,8s του ριβοσωματικού RNA ενώ τα υπόλοιπα περιοχές αν μεσα στο ITS1,ITS2 και στις περιοριστικές θέσεις των ένζυμων που χρησιμοποιήθηκαν

Για τα δείγματα της οξαλίδας πήραμε τα ακόλουθα :

```
1 TCTcCCATaT gGTCGaCCTG CAGGCGGCCG CGAATTcACT AGTGATTGGA
51 AGTAAAAGTC GTAACAAGGT TTCCGTAGTG AaCCTGCGGA AGGATCATTA
101 CAGaGCGTGA AGACCTCGGC CCCTCCACAG CGCAaSKGTG CGAGGgACAC
151 ATgCCGGGGT CGACCCTCCC ACCCGTGTG ACTCGTCTCC TgTTGCTTTG
201 GCAGGCCGAC TGCCCTAGCGG TCCTCTGGCT CTCGGGCTGG AGTGCGCCTG
251 CCAGAGACTA TTCAACTCGT GTTCTGGATG AAGTCTGAGC AATCAAGCAA
301 TAAAAATGAA TAAGTTAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGCTCTGGCA
351 TCGATGAAGA ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAATTT
401 AGTGAATCAT CGAATCTTTG AACGCACATT GCGCCCCTGG GTAGTCTCTAG
451 GGGCATGCCT GTTCGAGCGT CATAACAACC CGTCGAGCCG ACTAGGCTTG
501 GTCTTGGGGC TCGCCCGCAT TTGGCGCGGC GGCTCTTAAA CGCAGTGCCG
551 GTGCCGGTGG TGCTTTCCGC GTAGTCACAT TTCTCGCGCG AGGGCAGAAaT
601 CCGGACCCAG CCAGCAACCA CAAAGTCCGC AGCGCTCTGS GCGACTTTT
651 GTACTTCTTC TGGTTGACCT CGAATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACTTA
701 AGCATATCAA TAAGCGGAGG AAATCGAATT CCCGCGGCCG CCATGGCGGC
751 GGaAGCATGC GACGTCGGGC CCAATTCGc cTAtaGTNNN NNNNaTWW
```

Για τα δείγματα της πιπεριάς πήραμε τα ακόλουθα :

```
1 CCCATATGGT CgACCTGCAG GCGGcCgcGA ATTCAGTAGT GATTGGAAGT
51 AAAAgTcGTA ACAAGGTTTC CGTAGTGAAC CTGCGGAAGG ATCATTACAG
101 AGCGTGAAGA CCTCGGCCCC TCCACAGCGC AAgTGTGcGA GGGACACATG
151 CCGGGGTCGA CCctCCCACC CGTGTGCGACT CGtCTCctGT tgcTTTGGCA
201 GGCCGACTGC CTAGCGGTCC TCTGGCTCTC GGGCTGGAGT GCGCCTGCCA
251 GAGACTATtC AACTcGTGTT CTGGATGAAG TCTGAGCAAT CAAGCAATAA
301 AAATGAATAA GTTAAAACTT TCAACAACGG ATCTcTTGGC TCTGGCATCG
351 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTTAGT
401 GAATCATCGA ATCTTTGAAC GCACATTGCG CCCCTGGGTA CTCCTAGGGG
451 CATGCCTGTT CGAGCGTCAT AACCAACCCGT CGAGCCGACT AGGTTGGTCT
501 TGGGGCTCGC CCGCATTTGG CGCGGCGGCT CTTAAACGCA GTGCGGTGCC
551 GGTGGTGCTT TCCGCGTAGT CACATTTcTC GCGCGAGGGC AGAAtCCGGA
601 CCCaGCCAGC AACCACAAAG TCCGcAGCGC TCTGGGGCGa CTTTTGTACT
651 TCTTCTGGTT GACCTCGAAT CAGGTAGGGA TACCCGCTGA ACTTAAGCAT
701 ATCAATAAGC GGAGGAAATC GAATTCCC GC GCGcCATG GCGCgGAGCA
751 TGCGACGTCG GGCCCAATTC GCCCTATAGT GAGTCNNaTY WW
```

ITS2, η περιοχή ανάμεσα είναι η 5,8s του ριβοσωματικού RNA ενώ τα υπόλοιπα περιοχές αν που χρησιμοποιήθηκαν

Τέλος για τα δείγματα της Μελιτζάνας είχαμε τα εξής:

```
1 GYTGGGAGCT CTCCCATATG GTCGACCTGC AGGCGGCCGC GAATTCACTA
51 GTGATTGGAA GTAAAAGTCG TAACAAGGTT TCCGTAGGTG AACCTGCGGA
101 AGGATCATTA CAGAGCGTGA AGACCTCGGC CCCTCCACAG CGCAAGCTGG
151 TGCGAGGGAC ACATGCCGGG GTCGACCCTC CCACCCGTGT CACTCGTCT
201 CCTGTTGCTT TGGCAGGCCG ACTGCCTAGC GGTCCCTCTGG CTCTCGGGCT
251 GGAGTGCGCC TGCCAGAGAC TATTCAACTC GTGTTCTGGA TGAAGTCTGA
301 GCAATCAAGC AATAAAAATG AATAAGTTAA AACTTTCAAC AACGGATCTC
351 TTGGCTCTGG CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA AGTAATGTGA
401 ATTGCAGAAAT TTAGTGAATC ATCGAATCTT TGAACGCACA TTGCGCCCCCT
451 GGGTACTCCT AGGGGCATGC CTGTTTCGAGC GTCATAACAA CCCGTCGAGC
501 CGACTAGGCT TGGTCTTGGG GCTCGCCC GC ATTTGGCGCG GCGGCTCTTG
551 AACGCAGTGG CGGTGCCGGT GGTGCTTTCC GCGTAGTCAC ATTTCTCGCG
601 CGAGGGCAGA ATCCGGACCC AGCCAGCAAC CACAAAGTCC GCAGCGCTCT
651 GCGGGGCGAC TTTTGTACTT CTTCTGGTTG ACCTCGAATC AGGTAGGGAT
701 ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGAAATCG AATTCGCCG
751 GCCGCCATGG CGCCGGGGAG CATGCGACGT CGGGCCAAT TCGCCYTATA
```

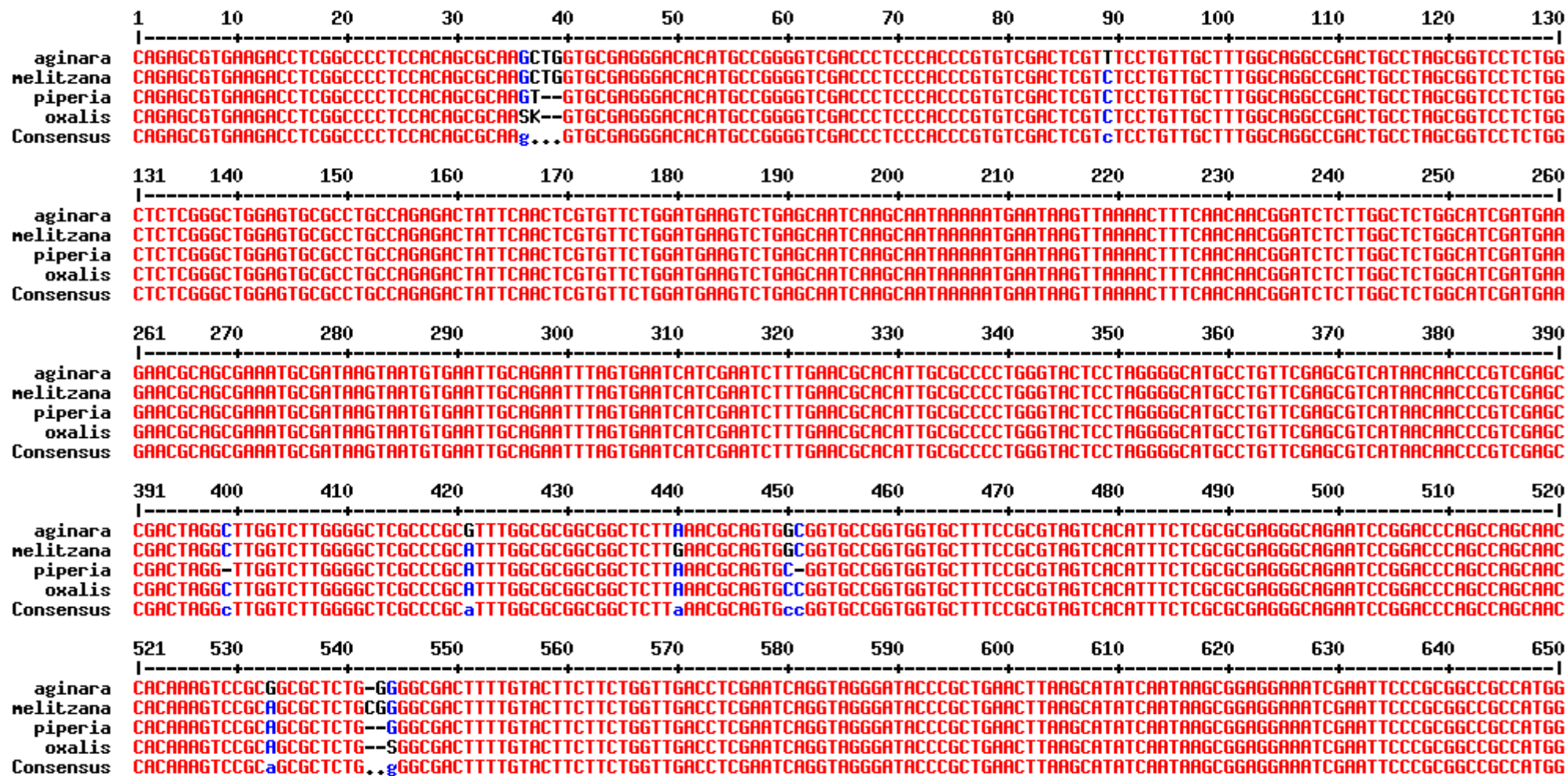
ITS2, η περιοχή ανάμεσα είναι η 5,8s του ριβοσωματικού RNA ενώ τα υπόλοιπα περιοχές ανάμεσα στο ITS1,ITS2 και στις περιοριστικές θέσεις των ένζυμων που χρησιμοποιήθηκαν

3.6 Οι περιοχές ITS 1 & ITS 2 και οι διαφορές που παρουσιάζουν

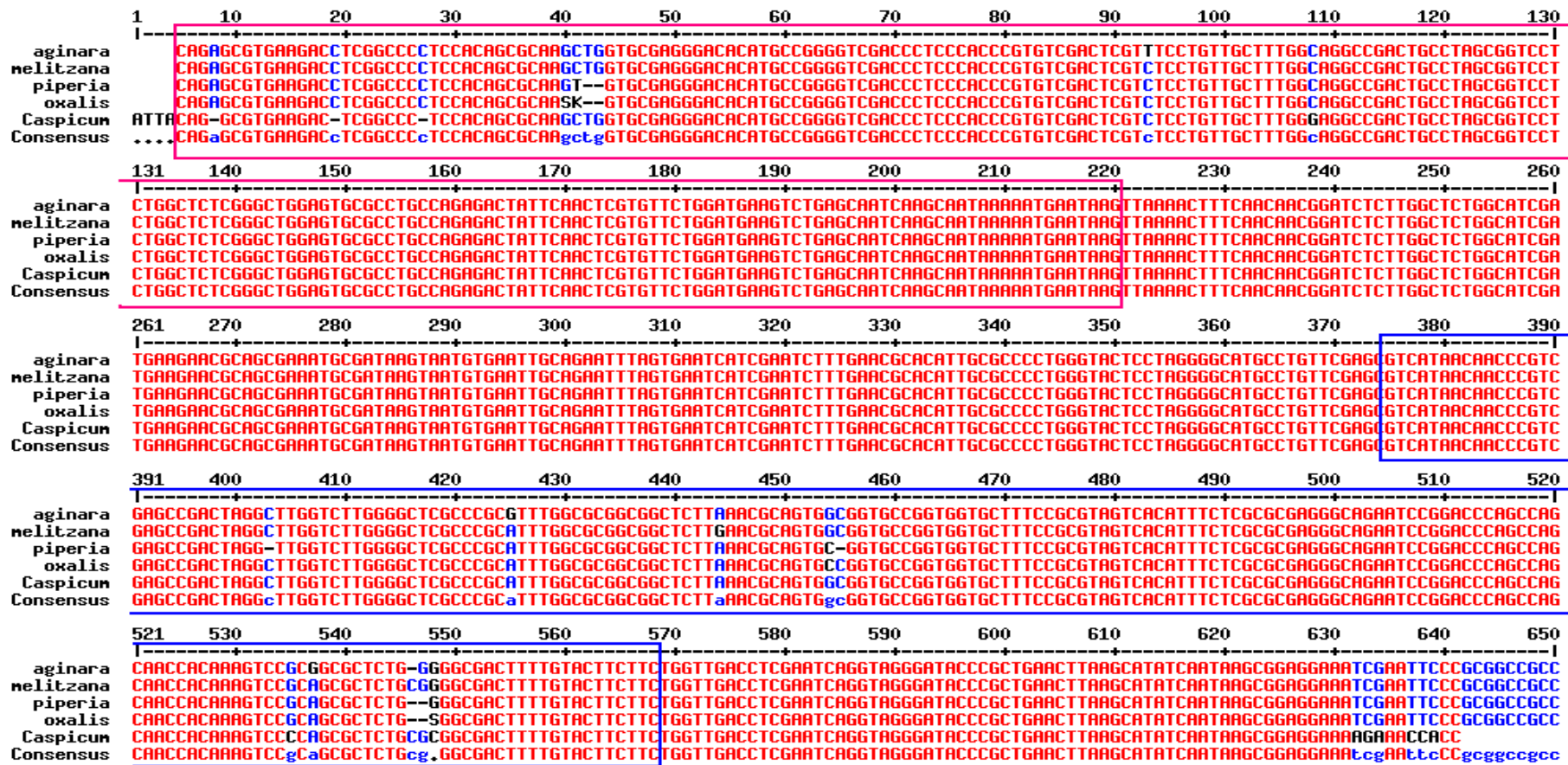
Παρακάτω αναλύονται οι περιοχές των ITS 1 & ITS 2 , για να βρούμε τις περιοχές αυτές χρησιμοποιούμε μια γνωστή αλληλουχία από την βάση δεδομένων NCBI όπου με βάση αυτήν κατηγοριοποιούμε τα όρια των περιοχών αυτών

Οι διαφορές αυτές αφορούν είτε απώλεια μιας βάσεως όπως π.χ. στην 36 μέχρι 36 βάση έχουμε για την οξαλίδα απώλεια βάσης είτε αντικατάσταση

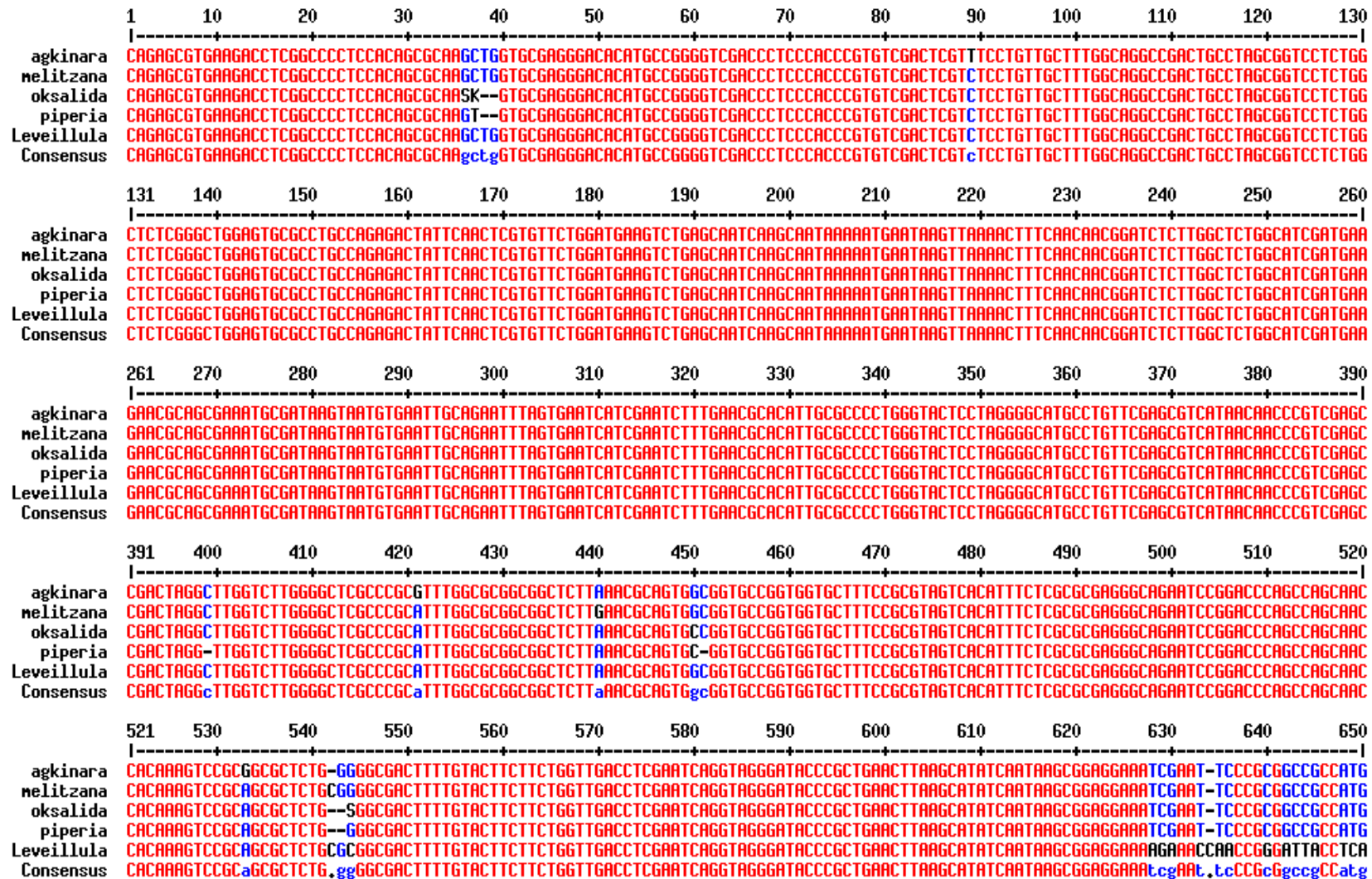
όπως στην περίπτωση της αγκινάρας στην 421 όπου έχουμε αντικατάσταση το G (που είναι για τα υπόλοιπα φυτά) με A, σε περιοχές που για κάποιο λόγο δεν ήταν δυνατό να διαβαστούν το μηχάνημα ανάγνωσης έχει πρόσθεση γράμματα όπως K ή S.(εικ. 23-25)



Εικ 23 Αλληλουχίες στα ITS1 και ITS2 του μύκητα *Leveillula taurica* με τους 4 διαφορετικούς ξενιστές που μελετήσαμε. Διάφορες παρατηρούνται είτε στην αλλαγή της βάσης είτε απουσία μιας ή περισσοτέρων βάσεων.



Εικ 24 Περιοχές ITS 1 (σε κόκκινο πλαίσιο) και ITS 2 (σε μπλε πλαίσιο). Δίφορες μεταξύ των διαφορετικών αλληλουχιών παρατηρούνται μόνο στο ITS 1 και ITS 2 η περιοχή του 5,8s του ριβοσωματικού RNA παραμένει κοινή.



Εικ. 25 Διάφορες μεταξύ του μύκητα *Leveillula taurica* από τους 4 διαφορετικούς ξενιστές και *Leveillula elaeagni* με ξενιστή *Elaeagnus angustifolia*. οι διαφορές που παρατηρούνται είναι ελάχιστες κύριος στην μελιτζάνα .

3.7 Διαφορές μεταξύ γνωστών ξενιστών

α) οι διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ του μύκητα *Leveillula taurica* που εξάγαμε από τα φυτά της μελιτζάνας και του μύκητα *Elaeagnus angustifolia* από το φυτό, *Elaeagnus angustifolia* από την διεθνή βάση δεδομένων NCBI (Εικ26-28) (National Center of Biotechnology Information) είναι ελάχιστες και εντοπίζονται μόνο στην περιοχή του ITS2

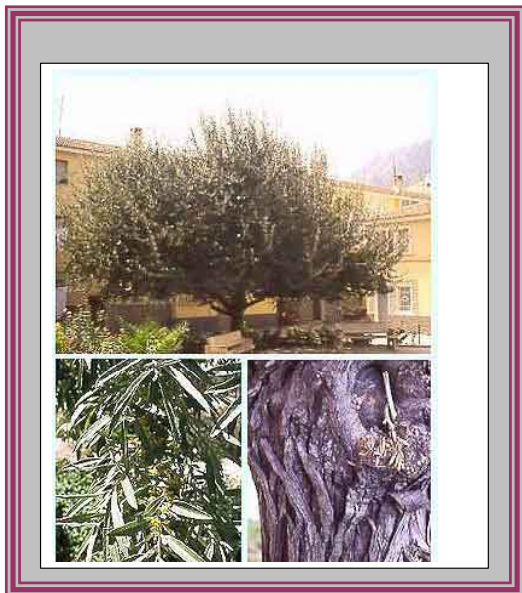
Διαφορές μεταξύ του μύκητα της μελιτζάνας και της Πιπεριάς παρατηρούνται στην περιοχή του ITS1 ως προσθήκη της βάσης A & C στις θέσης 4 ,15 και 23 (Εικ.29). Αντιθέτως στην περιοχή του ITS2 παρατηρείτε η παρουσία του G αντί του A & C στις θέσεις 444,535 και 549(Εικ 30-31)

β) Ομοίως με τον μύκητα από την πιπεριά και *clematis orientale* (Εικ.33) παρατηρούνται ελάχιστες διαφορές όπως αυτή στην βάση 37-39 στο ITS 1(Εικ.32) και 450 και 552-544 στο ITS 2 (εικ 34-35).

Οι διαφορές του μύκητα της πιπεριάς με αυτού από την βάση δεδομένων NCBI με ξενιστή την πιπεριά φαίνονται παρακάτω (εικ 36-37)

γ) Διαφορές μεταξύ δυο ζιζανίων όπως αυτό της γλυκόριζας και της οξαλίδας όπως φαίνονται στην διεθνή βάση δεδομένων NCBI (εικ 38-42)

δ) Διαφορές μεταξύ του μύκητα της αγκινάρας και του λωττού ενός κηποτεχνικού φυτού ,οι περισσότερες διαφορές παρατηρούνται στην περιοχή του ITS 2.(εικ. 43-46)



	521	530	540	550
	-----+-----+-----+-----			
nelitzana	GCTCGCCCGCATTGGCGCGGGCGGCTCTTGAACI			
Leveillula_elaeagni	GCTCGCCCGCATTGGCGCGGGCGGCTCTTAAACI			
Consensus	GCTCGCCCGCATTGGCGCGGGCGGCTCTTAAACI			

Εικ.27-28 περιοχή ITS2

	651	660	670
	-----+-----+-----		
nelitzana	GCGGGGCGACTTTTGTACTTC		
Leveillula_elaeagni	GCGGGGCGACTTTTGTACTTC		
Consensus	GCGGGGCGACTTTTGTACTTC		

	1	10	20
	-----+-----+-----		
nelitzana	CAGAGCGTGAAGACTCGGCCCTCI		
Caspicum-annuum	CAG-GCGTGAAGAC-TCGGCC-TCI		
Consensus	CAG.GCGTGAAGAC.TCGGCC.TCI		

Εικ 29 Περιοχή ITS1

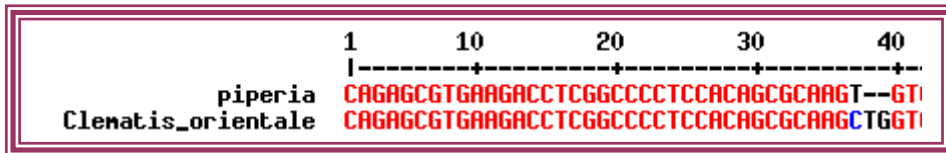


Εικ 30.caspicum annum

	391	400	410	420	430	440
	-----+-----+-----+-----+-----					
nelitzana	GAGCCGACTAGGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCCGCATTGGCGCGGGCGGCTCTTGA					
Caspicum-annuum	GAGCCGACTAGGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCCGCATTGGCGCGGGCGGCTCTTAA					
Consensus	GAGCCGACTAGGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCCGCATTGGCGCGGGCGGCTCTTAA					

Εικ 31-32 Περιοχές ITS 2

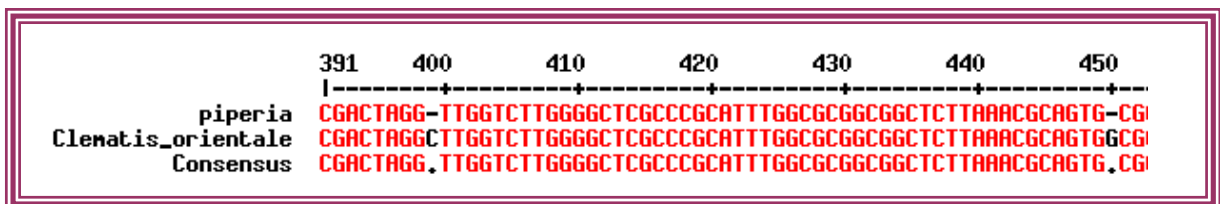
	521	530	540	550
	-----+-----+-----+-----			
nelitzana	CAACCACAAGTCCGAGCGCTCTGCGGGGCE			
Caspicum-annuum	CAACCACAAGTCCCGAGCGCTCTGCGGGGCE			
Consensus	CAACCACAAGTCCCGAGCGCTCTGCGGGGCE			



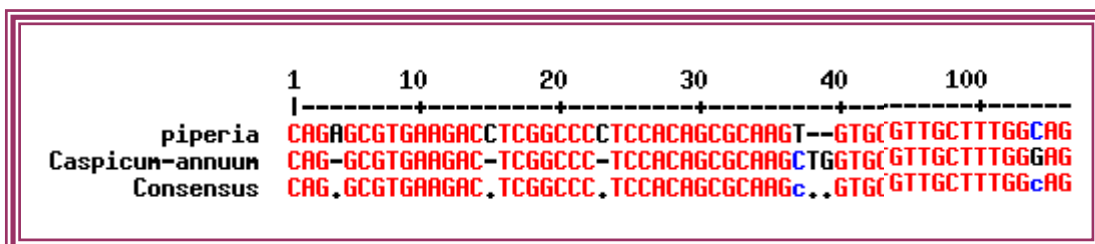
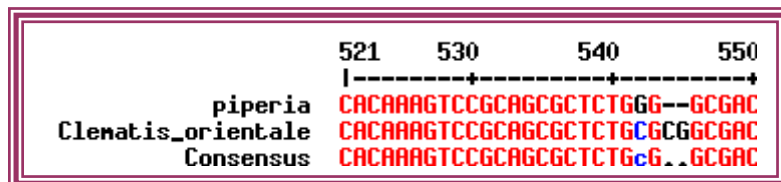
Εικ.33 Περιοχή ITS 1



Εικ.34 Clematis orientale



Εικ.35-36 περιοχές ITS 2



Εικ.37 Περιοχή ITS 1

	521	530	540	550
	-----+-----+-----+-----			
<i>piperia</i>	CACAAAGTCCGCAGCGCTCTGGG--GCGACTTTTC			
<i>Caspicum-annuum</i>	CACAAAGTCCGCAGCGCTCTGCGCGGCGACTTTTC			
Consensus	CACAAAGTCCGCAGCGCTCTGcG..GCGACTTTTC			

Εικ 38 περιοχή ITS 2

	1	10	20	30	40
	-----+-----+-----+-----+-----				
<i>oxalis</i>	CAGAGCGTGAAGACCTCGGCCCTCCACAGCGCAA--SKGTG				
<i>Glycyrrhiza-glabra</i>	CAGAGCGTGAAGACCTCGGCCCTCCACAGCGCAAGCTGGTG				
Consensus	CAGAGCGTGAAGACCTCGGCCCTCCACAGCGCAA..sgGTG				

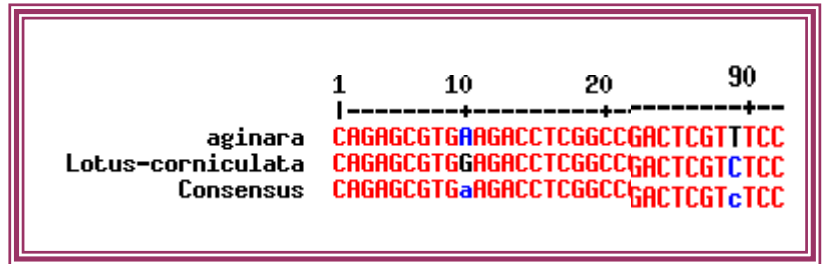


Εικ.39-40 Περιοχή ITS 1 επάνω, δεξιά
Glycyrrhiza glabra

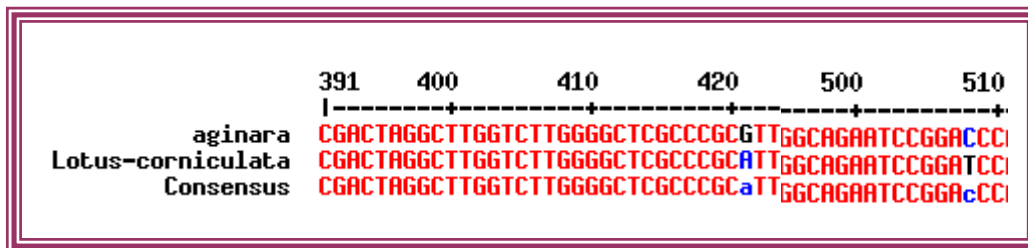
	391	400	410	420	430	440	450
	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
<i>oxalis</i>	CGACTAGGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCCGCATTTGGCGCGGCGGCTCTTAAACGCAGTGCCG						
<i>Glycyrrhiza-glabra</i>	CGACTAGGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCCGCATTTGGCGCGGCGGCTCTTAAACGCAGTGGCG						
Consensus	CGACTAGGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCCGCATTTGGCGCGGCGGCTCTTAAACGCAGTGcCG						

Εικ.41-42 Περιοχές ITS 2

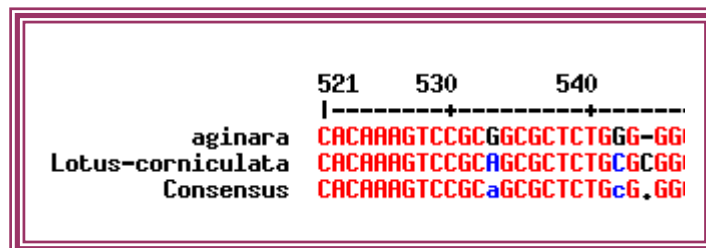
	521	530	540	550
	-----+-----+-----+-----			
<i>oxalis</i>	CACAAAGTCCGCAGCGCTCTGSG--GCGACT			
<i>Glycyrrhiza-glabra</i>	CACAAAGTCCGCAGCGCTCTGCGCGGCGACT			
Consensus	CACAAAGTCCGCAGCGCTCTGcG..GCGACT			



Εικ.43-44 Αριστερά Lotus corniculata
ένα ανθοκομικό φυτό ,επάνω περιοχή
ITS 1



Εικ. 45-46 Περιοχές ITS 2



5.Συζήτηση

Η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών RDNA :ITS 1 και ITS 2 των υπό μελέτη μυκήτων με ξενιστές Μελιτζάνα , Πιπεριά , Οξαλίδα και Αγκινάρα έδειξε σχετικά υψηλή ομολογία με μύκητες που έχουν ήδη αναλυθεί και δημοσιευθεί στην διεθνής βάση δεδομένων NCBI (National Center of Biotechnology Information) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Ωστόσο τα ίδια τα δείγματα είναι δεν είναι ομόλογα αλλά πολύ αλλά λίγο., όπως και ο μύκητας με ξενιστή την πιπεριά από την βάση δεδομένων δεν είναι απόλυτα ομόλογη με τον μύκητα με ξενιστή την πιπεριά που είχαμε εμείς Διάφορα φυτά επιλέχτηκαν για να γίνει σύγκριση με τις αλληλουχίες που πήραμε, για το λόγο ότι είτε είναι σημαντικής καλλιεργητικής και οικονομικής σημασίας (πιπεριά, ελιά), είτε είναι αυτά που έδωσαν το μεγαλύτερο βαθμό(score) ομολογίας στη NCBI. Ακόμα παρατηρείτε ότι οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρούνται στην περιοχή του ITS 2 και καμία , όπως ήταν αναμενόμενο στην περιοχή του 5.8s , που είναι περιοχή μεταγραφόμενη και υψηλής σημασίας για τα φυτά.

Τα αποτελέσματα ελέγχου διασταυρωτής μόλυνσης μας έδειξαν ότι μετά από ένα μήνα παρατηρήσεων, ο μύκητας ο οποίος προήλθε από την μελιτζάνα και την γλυκόριζα προσέβαλε τα φύλλα τομάτας με μεγαλύτερο ποσοστό απ ότι αυτός ο οποίος προήλθε από την μελιτζάνα, ενώ ο μύκητας με ξενιστή την αγκινάρα δεν έδειξε να προσβάλει τα φύλλα τομάτας στις συνθήκες καλλιέργειας των φυλών

Ωστόσο θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα θα πρέπει να συνεχιστεί και να ταυτοποιηθούν όσο γίνεται περισσότεροι μύκητες ακόμα και αυτοί που αποτύχαμε να αναλύσουμε λόγω τεχνικών προβλημάτων (μύκητας με ξενιστή γλυκόριζα) για να γίνει όσο το δυνατό πληρέστερη η γνώση πάνω στο ωίδιο, που αποτελεί μια από τις κύριες απειλές για τα καλλιεργούμενα είδη.

Βιβλιογραφία

1. Amano (Hirata), K. (1986) Host range and geographic distribution of the powdery mildew fungi. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
2. Appel, D.J. and Gordon, T.R. (1995) Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Experimental Mycology* 19, 120-128.
3. Baldwin, B.G. (1993) Molecular phylogenetics of *Calcydenia* (*Compositae*) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: Chromosomal and morphological evolution reexamined. *Ann. J. Bot.* 80(2): 222-238.
4. Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. and Donoghue, M.J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82: 247-277.
5. Balesdent, M.N., Jedryczka, M., Jain, L., Mendes-Pereira, E., Bertrand, J. and Rouxel, T. (1998). Conidia as a substrate for internal transcribed spacer-based PCR identification of components of the *Leptosphaeria maculans* species complex. *Phytopathology* 88: 1210-1217.
6. Bernier, L., Hamelin, R.C, and Ouellette, G.B. (1994) Comparison of ribosomal DNA length and restriction site polymorphisms in *Gremmeniella* and *Ascocalyx* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1279-1286.

7. Boyd, M.L, and Carris, L.M. (1997) Molecular relationships among varieties of the *Tilletia fusca* (*T. bromi*) complex and related species. *Mycological Research* 101, 269-277.
8. Brandt M.E., Padhye A.A., Mayer L.W, Holloway B.P. (1998) Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and TaqMan automated detection in molecular identification of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* ;36:2057-62.
9. Braun, U. (1980) The genus *Leveillula* – A preliminary study. *Nova Hedwigia* 32: 565-583.
10. Braun, U. (1984) Taxonomic notes on some powdery mildews. III. *Mycotaxon* 19: 369-374.
11. Braun, U. (1987) A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Beiheft zur Nova Hedwigia* 89: 1-700.
12. Braun, U. (1995) The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe. Gustav Fischer Verlag, Jena.
13. Braun, U. (1999) Some critical notes on the classification and the generic concept of the Erysiphaceae. *Schlechtendalia* 3: 48-54.
14. Braun, U. & Takamatsu, S. (2000) Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysipheae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystoteceae) inferred from rDNA ITS sequences – Some taxonomic consequences. *Schlechtendalia* 4: 1-33.
15. Burns, T.D., Fogel, R. and Taylor, J.W. (1990) Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia* 82, 175-184.
16. Burns, T.D., White, T.J. and Taylor, J.W. (1991) Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22, 525-564.
17. Bunyard, B.A, Nicholson, M.S. and Royse, D.J. (1994) A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Fungal Genetics and Biology* 20, 243-253.

18. Buscot, F., Wipf, D., Battista, C.D., Munch, J.C., Botton, B. and Martin, E (1996) DNA polymorphism in morels: PCR-RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycological Research* 100, 415-427.
19. Clerk, G.C. & E.N. Ayesu-Offei. (1967) Conidia and conidial germination in *Leveillula taurica* (Lév.) Arn. *Ann. Bot.*, N.S. 31: 749-754.
20. Chen, W. (1992) Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of the three heterothallic *Pythium* species. *Phytopathology* 82, 1467-1472.
21. Cooke, D.E.L., Kennedy, D.M., Guy, D.C., Russell, J., Unkles, S.E and Duncan, J.M. (1996) Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycological Research* 100, 297-303.
22. Dubouzet, J.G. and Shinoda, K. (1999) Relationships among old and New world *Alliums* according to ITS DNA sequence analysis. *Theor. Appl. Genet.* 98: 422-433.
23. Durrieu, G. & Rostam, S. (1984, 1985) Spécificité parasitaire et systématique de quelques *Leveillula* (Erysiphaceae). *Cryptogam. Mycology* 5: 279-292.
24. Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N. and Alabouvette, C. (1996) Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DAN for the identification of *Fusarium* species. *Mycological Research* 101, 179-187.
25. Erland, S. (1995) Abundance of *Tylospora fibrillose* ectomycorrhizas in a South Swedish spruce forest measured by RFLP analysis of the PCR-amplified rDNA ITS region. *Mycological Research* 99, 1425-1428.

26. Geljuta, V. P. (1979) Do sistematiki i posirennija rodu *Leveillula* Arnaud v URSS. *Ukranski Botaniski Zhurnal* 36: 48-52.
27. Geljuta, V. P. & Simonjan, S. A. (1987) O roli anamorphnoj stadii v opredelenii strukury rodu *Leveillula* Arnaud (Erysiphaceae). *Biologicheskikh Zhurnal Armenii* 40: 20-26.
28. Goodwin, P.H, and Annis, S.L. (1991) Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2482-2486.
29. Guillemaud, T., Raymond, M., Callot, G., Cleyet-Marel, J.C. and Fernandez, D. (1996) Variability of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA of a truffle species (*Tuber aestivum*). *Mycological Research* 100, 547-550.
30. Harrington, T.C. and Wingfield, B.D. (1995) A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia* 89, 258-288.
31. Hershkovitz, M.A. and Zimmer, E.A. (1996) Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. *Nucleic Acid Research*. 24: 2857-2867.
32. Hershkovitz, M.A., Zimmer, E.A. and Hahn, W.J. (1999) Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematics. In: P.M. Hollingsworth, R.M. Bateman and R.J. Gornall eds. *Molecular systematics and plant evolution*. Taylor & Francis, London pp.268-326.
33. Hirata, K. (1966) Host range and geographical distribution of the powdery mildews. *Fac. Agric. Niigata Univ.*
34. Hseu, R.S., Wang, H.H., Wang, H.F. and Moncalvo, J.M. (1996) Differentiation and grouping of isolates of the *Genoderma Lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1354-1363.

35. Jeng, R.S., Dumas, M., Liu, F.H., Wang, C.L. and Hubbes, M. (1997) DNA analysis of *Cylindrocodium floridanum* isolates from selected forest nurseries. *Mycological Research* 101, 285-291.
36. Jungehulsing, U. and Tudzynski, P. (1997) Analysis of genetic diversity in *Claviceps purpurea* by RAPD markers. *Mycological Research* 101, 1-6.
37. Khodaparast, S.A., Takamatsu, S. and Hedjaroude, G. (2001) Phylogenetic structure of the genus *Leveillula* (*Erysiphales: Erysiphaceae*) inferred from the nucleotide sequences of the rDNA ITS region with special reference to the *L. taurica* species complex. *Mycological Research* 105 (8): 990-918.
38. Leal, S.C.M., Bertioli, D.J., Butt, T.M., Carder, J.H., Burrows, P.R. and Peberdy, J.F. (1997) Amplification and restriction endonuclease digestion of the *Pr 1* gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. *Mycological Research* 101, 257-265.
39. Michelmore, R.W. and Hulbert, S. H. (1987) Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 25, 383-404.
40. Molot, P.M., Leroux, J.P., Diop-Bruckler, M. (1990) *Leveillula taurica* (Lév.) Arn. cultures axéniques, biologie et spécificité parasitaire. *Agronomie* 10: 551-559.
41. Moncalvo, J.M., Wang, H.H. and Hseu, R.S. (1995) Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87, 223-238.
42. Mori, Y., Sato, Y. & Takamatsu, S. (2000) Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* 92: 74-93.

43. Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.
44. Mullis, K.B, Faloona, F.A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263-273.
45. Palti, J. (1966) Timing of powdery mildew control on pepper. *Hassadeh*, 46: 979-981.
46. Palti, J. (1971) Biological characteristics, distribution and control of *Leveillula taurica* (Lév.) Arn. *Phytopathology medit.* 10, 139-153.
47. Palti, J. (1988) The *Leveillula* mildews. *Botanical Review* 54: 423-535. The New York Botanical Garden.
48. Pei, M.H., Whelan, M.J., Halford, N.G. and Royle, D.J. (1997) Distinction between stem- and leaf-infecting forms of *Melampsora* rust on *Salix viminalis* using RAPD markers. *Mycological Research* 101, 7-10.
49. Rostam, S. (1983) Biologie, écologie, systématique de quelques *Leveillula*. Thesis. University Paul Sabatier, Toulouse, France.
50. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of *B-globin* genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
51. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

52. Salmon, E. S. (1900) Monograph of the Erysiphaceae. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 9: 1-292.
53. Salmon, E. S. (1906) On *Oidiopsis taurica* Lév., an endophytic member of Erysiphaceae. *Ann. Bot.* 20: 187-200.
54. Sappal, N.P., Jeng, R.S., Hubbes, M. and Liu, F. (1995) Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species. *Genome* 38, 419-425.
55. Simonjan, S. A. & Geljuta, V. P. (1987) Novye taksony v rode *Leveillula* Arnaud (Erysiphaceae). *Biologicheskikh Zhurnal Armenii* 42: 480-482.
56. Simonjan, S. A. & Geljuta, V. P. (1989) Novyi vid mucnisto-rosjanogo griba iz roda *Leveillula* Arnaud na Kleome. *Biologicheskikh Zhurnal Armenii* 2(5): 480-482.
57. Suh, Y., Thien, L.B., Reeve, H.E. and Zimmer, E.A. (1993) Molecular evolution and phylogenetic implications of ribosomal DNA in Winteraceae. *Am. J. Bot.* 80: 1042-1055.
58. Takamatsu, S. (1998) PCR Applications in Fungal Phylogeny. *Laboratory of plant pathology, Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu 514, Japan* 7, 125-142.
59. Waalwijk, C., de Koning, J.R.A., Baayen, R.P. and Gams, W. (1996a) Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia* 88, 361-368.
60. Waalwijk, C., de Koning, J.R.A., Baayen, R.P. and Gams, W. (1996b) Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* sections *Liseola* and *Elegans*. *Sydowia* 48, 90-104.
61. Welsh, J. and McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18, 7213-7218.

62. White, T.J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sinnsky, J.J. and White, T.J. (eds) *PCR protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 315-322.
63. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.L., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.