

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία

Μεταπτυχιακή Εργασία

Χαρακτηρισμός στελεχών
βασιδιομυκήτων με χρήση
φασματοσκοπίας FT-IR

Γεώργιος Κ. Μπεκιάρης

Επιβλέπων καθηγητής: Ζερβάκης Γεώργιος

Αθήνα
2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία

Μεταπτυχιακή Εργασία

Χαρακτηρισμός στελεχών
βασιδιομυκήτων με χρήση
φασματοσκοπίας FT-IR

Γεώργιος Κ. Μπεκιάρης

Επιβλέπων καθηγητής: Ζερβάκης Γεώργιος

Μεταπτυχιακή Εργασία

Χαρακτηρισμός στελεχών βασιδιομυκήτων με
χρήση φασματοσκοπίας FT-IR

του φοιτητή Μπεκιάρη Κ. Γεώργιου.

Επιβλέπων καθηγητής: Ζερβάκης Γεώργιος

Τριμελής Επιτροπή:

Γεωργακόπουλος Δημήτριος

Ταραντίλης Πέτρος

Ζερβάκης Γεώργιος

Αθήνα

2011

Περιεχόμενα

Πρόλογος	6
Περίληψη	7
Abstract	8
Εισαγωγή	9
Μύκητες	9
Ιστορική αναδρομή	9
Γενικά στοιχεία	10
Ταξινομική κατάταξη μυκήτων	12
Μορφολογία και κυτταρική δομή των μυκήτων.....	13
Αναπαραγωγή μυκήτων.....	16
Βασιδιομύκητες	17
Γενικά στοιχεία	17
Γενικευμένος βιολογικός κύκλος.....	19
Το γένος <i>Pleurotus</i> (Fr.) P. Kumm.	19
Εισαγωγή	19
Οικονομική σημασία – Εφαρμογές.....	20
Μορφολογία.....	21
Μορφολογικοί χαρακτήρες ειδών του γένους <i>Pleurotus</i>	21
Βιολογικός κύκλος	29
Ταξινομική κατάταξη γένους <i>Pleurotus</i>	31
Μέθοδοι ταξινομικής και ταυτοποίησης μακρομυκήτων	33
Α. Χρήση μορφολογικών, φυσιολογικών ή/και οικολογικών χαρακτήρων.....	33
Β. Χρήση διασταυρώσεων μεταξύ ομοκάρυων απομονώσεων (γενετική συμβατότητα).....	33
Γ. Χρήση πρωτεϊνών/ενζύμων	34
Δ. Χρήση μοριακών μεθοδολογιών	34
Φασματοσκοπία.....	36
Εισαγωγή στη φασματοσκοπία.....	36
Απορρόφηση της ακτινοβολίας	36
Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR).....	37

Γενικά.....	37
Είδη μοριακών δονήσεων.....	38
Πηγές και μεταλλάκτες υπέρυθρης ακτινοβολίας.....	39
Όργανα Υπερύθρου.....	41
Φασματοσκοπία Υπερύθρου-Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR).....	41
Τμήματα ενός οργάνου μετασχηματισμού Fourier.....	42
Διάχυτη ανάκλαση φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (DRIFTS).....	44
Πλεονεκτήματα φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier.....	45
Ερμηνεία φασμάτων.....	46
Εφαρμογές φασματοσκοπίας FT-IR.....	47
Σκοπός.....	49
Υλικά και μέθοδοι.....	50
Βιολογικό υλικό.....	50
Θρεπτικά υλικά.....	56
Παραγωγή καλλιεργείων.....	57
Λήψη και χειρισμός μυκηλίου των καλλιεργείων.....	57
Χειρισμός δειγμάτων και λήψη φασμάτων.....	58
Ανάλυση αποτελεσμάτων.....	59
Πειραματικός σχεδιασμός.....	59
Αποτελέσματα.....	61
Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	105
Βιβλιογραφία.....	112

Πρόλογος

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια «Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας» και «Χημείας» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Ζερβάκη Γεώργιου, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Βιοτεχνολογία και Εφαρμογές στη Γεωπονία» του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Ζερβάκη Γεώργιο, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με τον υπέροχο κόσμο μανιταριών, καθώς και για την υπερπολύτιμη βοήθειά του σε οποιαδήποτε δυσκολία συναντούσα. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Ταραντίλη Πέτρο, για τη βοήθεια του σε ότι αφορούσε τη φασματοσκοπία υπερύθρου και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά και το προσωπικό του εργαστηρίου, την οικογένειά μου που με στήριζαν ψυχικά και οικονομικά κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και πολύ περισσότερο την κοπέλα μου Μαρία, που με άντεχε και με στήριζε σε όλες τις δυσκολίες που συνάντησα κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Περίληψη

Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* (μύκητες, Basidiomycota) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου ότι περιλαμβάνουν είδη τα οποία έχουν αξιοποιηθεί ευρέως στη βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινικών, γεωργικών και δασοκομικών, παραπροϊόντων για την παραγωγή βρώσιμων μανιταριών υψηλής διατροφικής αξίας και φαρμάκων. Παρόλα αυτά, η αναπαραγωγή τους και η επακόλουθη εκμετάλλευσή τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές είναι στενά συνδεδεμένη με την ακριβή ταυτοποίηση των άγριων στελεχών.

Οι παραδοσιακές ταξινομικές προσεγγίσεις είναι συχνά ανεπαρκείς όσον αφορά τη διάκριση ανάμεσα στα στενά συνδεδεμένα είδη *Pleurotus*, ενώ οι μοριακές μέθοδοι απαιτούν υψηλό επίπεδο εμπειρογνωμοσύνης και είναι επίπονες και πολύ δαπανηρές.

Η φασματοσκοπία υπερύθρου ακτινοβολίας - μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για την ταυτοποίηση διαφόρων τύπων βιολογικού υλικού καθώς και για τη διάκριση των βακτηρίων και ζυμομυκήτων. Ωστόσο, η χρήση του ως εργαλείο για τον ταχύτατο, οικονομικό και ακριβή προσδιορισμό της ταυτότητας των μυκήτων και ειδικότερα των μανιταριών έχει διερευνηθεί ελάχιστα.

Στην παρούσα εργασία, αξιολογείται η καταλληλότητα εφαρμογής της φασματοσκοπίας FT-IR για τα περισσότερα είδη του γένους *Pleurotus* σε συνδυασμό με είδη άλλων γενών, διαφορετικές μορφές του αρχικού υλικού και διαφορετικά υποστρώματα.

Abstract

The mushroom genus *Pleurotus* (Fungi, Basidiomycota) is of particular interest since it comprises species that are widely exploited to bioconvert lignocellulosic agricultural and forestry by-products into edible mushrooms of high nutritional and medicinal value. However, their breeding and subsequent exploitation in biotechnological applications is closely associated with exact identification of wild strains. Traditional taxonomy approaches are often inadequate in distinguishing among closely-related *Pleurotus* species, whereas molecular methods require high level of expertise, are rather laborious and expensive.

Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy has been successfully applied for the identification of various types of biological material as well as for the discrimination of bacteria and yeasts. However, its use as a tool for the rapid, cost-effective and accurate determination of the identity of mushroom fungi has been only marginally addressed.

In the present work, pertinent applicability of FT-IR spectroscopy is evaluated for most species of the genus *Pleurotus* in conjunction with species of other genera, different forms of initial material and growth substrates.

Ε ι σ α γ ω γ ή

Μύκητες

Ιστορική αναδρομή

Κατά τον Πανσανία, πριν από περίπου 3500 χρόνια, ο Περσέας κυριαρχημένος από ένα όραμα, σκοτώνει κατά λάθος τον παππού του Ακρίσιο, τον οποίο θα διαδεχόταν στο θρόνο του Άργους. Επιστρέφοντας στο Άργος και ντροπιασμένος από τη φήμη της πράξης του πείθει τον φίλο του Μεγαπένθη (υιό του Πρωτέα) να ανταλλάξουν βασιλεία. Έτσι κατευθυνόμενος προς το νέο του βασίλειο (και ενώ βρισκόταν στην περιοχή που σήμερα βρίσκονται οι αρχαίες Μυκήνες) του έπεσε στο έδαφος η θήκη από το ξίφος του (μύκης στα αρχαία ελληνικά). Θεωρώντας το αυτό ως ιωνό έδωσε το όνομα Μυκήναι στην περιοχή που βρισκόταν. Μια άλλη

εκδοχή του μύθου αναφέρει ότι όντας πολύ διψασμένος έσκυψε και έκοψε ένα μανιτάρι (μύκης στα αρχαία ελληνικά) και αφού το έστυψε ήπιε τους χυμούς του. Έτσι όντας πολύ ευχαριστημένος, αποφάσισε να ονομάσει την περιοχή Μυκήναι.

Η Μυκητολογία αποτελεί τον κλάδο της Μικροβιολογίας ο οποίος ασχολείται με τη μελέτη των μυκήτων.

Με βάση τα απολιθώματα φαίνεται η ύπαρξή τους πριν από 900-570 εκατομμύρια χρόνια (Προτεροζωϊκό αιώνα), ενώ απολιθωμένες υφές που προκαλούσαν από ότι φαίνεται σήψη του ξύλου καθώς και απολιθώματα χυτριομυκήτων εμφανίζονται πριν από 400 εκατομμύρια χρόνια (Δεβόνιο περίοδο). Οι μύκητες είναι γνωστοί στον άνθρωπο από αρχαιοτάτων χρόνων. Οι Αιγύπτιοι τους θεωρούσαν ως το δώρο του Θεού Όσιρις στην ανθρωπότητα, ενώ οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι γιόρταζαν τα Διονύσια πίνοντας άφθονο οίνο. Απεικονίσεις μανιταριών επίσης κοσμούσαν τους τάφους των Φαραώ στην αρχαία Αίγυπτο. Οι αρχαίοι Έλληνες πίστευαν ότι οι τρούφες προέρχονται από τους κεραυνούς του Δία, με τον Πλούταρχο να εξηγεί αυτή τη θεωρία, λέγοντας ότι ο κεραυνός περιέχει γόνιμο ύδωρ το οποίο με τη θερμότητά του διαπερνά το έδαφος και παράγει τις τρούφες κάτω από την επιφάνειά του. Ο Διοσκουρίδης τον 1ο αι. μ.Χ. έκανε διάκριση μεταξύ εδώδιμων και δηλητηριωδών μανιταριών (αποδίδοντας τις δηλητηριώδεις ιδιότητές τους στο περιβάλλον, θεωρία την οποία διατήρησαν για πολλά χρόνια και οι Ρωμαίοι) (Παντίδου, 1990, Ainsworth 1976, Alexopoulos *et al.*, 1996, Ζερβάκης, 2011).

Γενικά στοιχεία

Οι μύκητες αποτελούν ευκαρυωτικούς, ετερότροφους οργανισμούς (αφού φέρουν την τυπική δομή των ευκαρυωτικών κυττάρων ενώ είναι μη φωτοσυνθέτοντες, λόγω έλλειψης χλωροφύλλης), οι οποίοι διαβιούν ή ως παρασιτικοί (βιοτροφικοί), ή ως συμβιωτικοί, είτε ως σαπροτροφικοί οργανισμοί. Είναι χημειοργανότροφοι (με απλές διατροφικές απαιτήσεις), ενώ πολλά είδη αναπτύσσονται σε ακραία περιβάλλοντα χαμηλού pH ή και υψηλών θερμοκρασιών (μέχρι 62 βαθμούς Κελσίου) καθιστώντας τους έτσι πολύ ανθεκτικούς. Εντοπίζονται σε ποικίλα ενδιαιτήματα, σε γλυκά νερά και θάλασσες, αλλά το μεγαλύτερο μέρος τους είναι χερσαίοι (Madigan *et. al.*, 2007).

Αποτελούν τη δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα οργανισμών στη βίοςφαιρα, μετά από τα έντομα, ενώ μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί μόνο 80000 με 120000 είδη μυκήτων (εκ των οποίων μόνο τα 200 έχουν προσδιοριστεί ως ανθρώπινα παθογόνα), από το 1,5 εκατομμύριο είδη που εκτιμάται ότι υπάρχουν. Από αυτά, τα 16000 αντιπροσωπεύουν μακρομύκητες, τα 2000 εκ των οποίων είναι εδώδιμα μανιτάρια και πολύ λιγότερα (30-40) είναι αυτά που καλλιεργούνται για διατροφικούς και βιομηχανικούς σκοπούς. Αυτό καθιστά τους μύκητες μία από τις λιγότερο εξερευνημένες πηγές βιοποικιλότητας στον πλανήτη, καθώς είναι γνωστό ένα ποσοστό μικρότερο του 5% (Carlisle *et al.*, 2001, Keyser *et al.*, 2005, Webster and Weber, 2007, Ζερβάκης, 2011)

Οι μύκητες παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, τόσο επιστημονικό όσο και πρακτικό. Από επιστημονικής πλευράς, η πολύ γρήγορη ανάπτυξη τους καθώς και οι μεγάλες ποσότητες στις οποίες μπορούν να παραχθούν εφόσον χρειαστεί, τους καθιστούν πολύ σημαντικά ερευνητικά εργαλεία για θεμελιώδεις βιολογικές ανακαλύψεις. Επίσης αποτελούν οργανισμούς-μοντέλα για τη μελέτη της δομής και της λειτουργίας των γονιδίων. Μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχησης του γονιδιώματος της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, το 1996, οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι ανάμεσα στα ζώα και στους μύκητες εκτός από αρκετά γονίδια, υπάρχουν και πολλές κοινές κυτταρικές λειτουργίες.

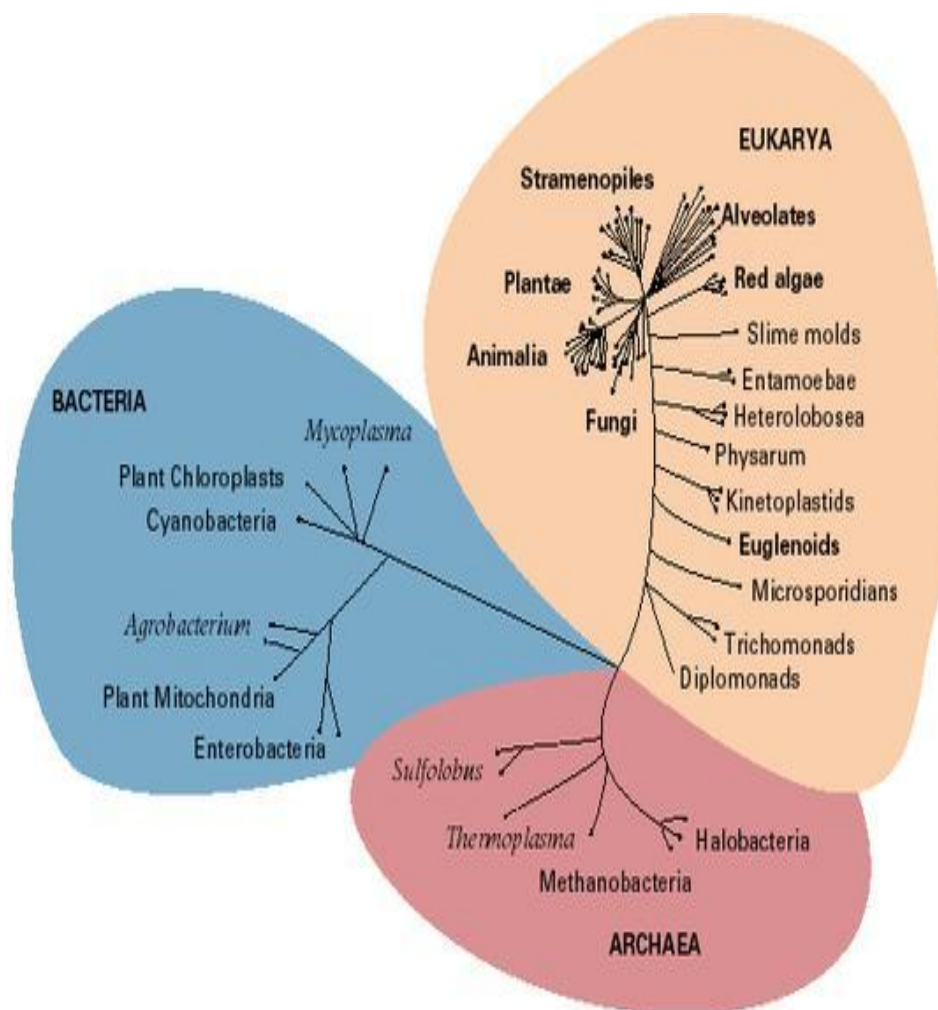
Από οικολογικής πλευράς, σπουδαίος είναι ο ρόλος τους στις συμβιωτικές τους σχέσεις με τα φυτά (μυκόρριζες). Εδώ χρησιμοποιούν τα συστατικά που παράγουν τα φυτά κατά τη φωτοσύνθεση, βοηθώντας τα από την άλλη να απορροφήσουν θρεπτικά από το έδαφος τα οποία δεν απελευθερώνονται εύκολα.

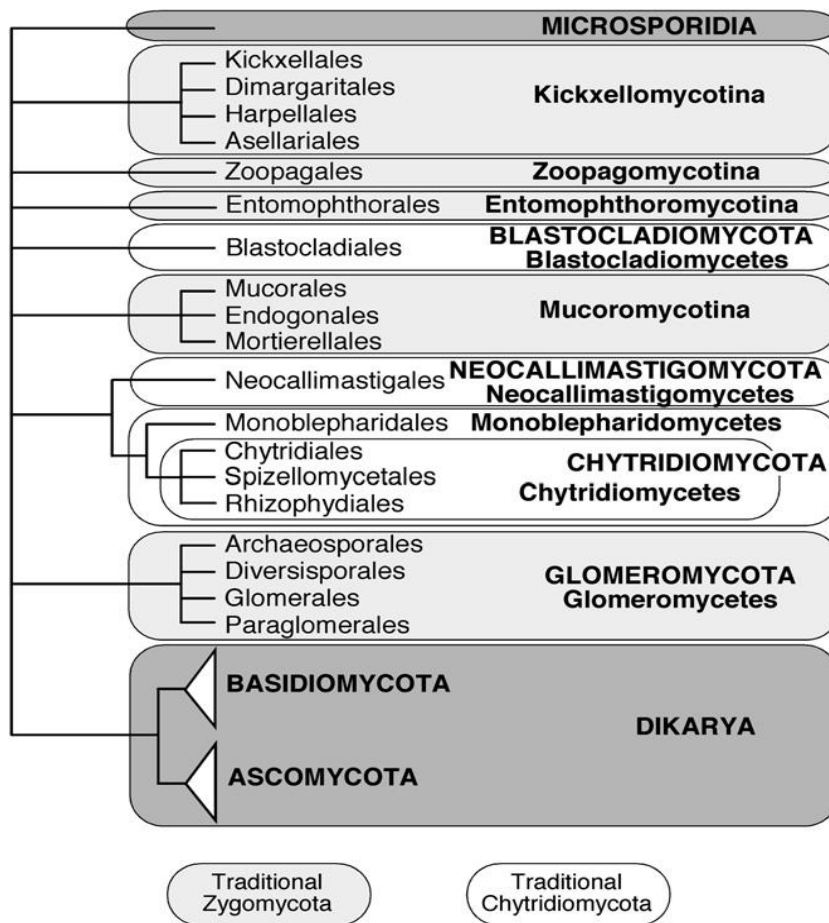
Σημαντική είναι και η συνεισφορά τους στη διατροφή του ανθρώπου, καθώς τα καρποσώματα αρκετών Βασιδιομυκήτων και κάποιων Ασκομυκήτων έχουν υψηλή διατροφική αξία εξαιτίας του χαμηλού ποσοστού λιπαρών και του αρκετά υψηλού ποσοστού πρωτεϊνών. Επίσης σημαντική είναι και η συνεισφορά τους στη βιομηχανία τροφίμων όπου (κυρίως ζύμες) συμμετέχουν σε διαδικασίες ζύμωσης στην αρτοποιία, ζυθοποιία και οινοποιία καθώς και στην ωρίμανση ορισμένων τυριών. Επίσης χρησιμοποιούνται εμπορικά για την παραγωγή ενζύμων, αμινοξέων, αντιβιοτικών, φαρμακευτικών, βιταμινών και συντηρητικών, καθώς και στη βιοαποδόμηση υπολειμμάτων και παραπροϊόντων της γεωργίας και βιομηχανίας.

Τέλος δεν θα πρέπει να παραληφθούν οι αρνητικές επιδράσεις των μυκήτων τόσο ως αιτίες ασθένειας ανθρώπων, ζώων και φυτών, όσο και στην πρόκληση σήψεων και ποιοτικής υποβάθμισης τροφίμων, κτηνοτροφών, ξύλου, δέρματος και άλλων βιομηχανικών ή μη υλικών (Carlisle *et al.*, 2001, Ζερβάκης, 2011).

Ταξινομική κατάταξη μυκήτων

Ενώ παραδοσιακά οι μύκητες θεωρούνταν από τους συστηματικούς βοτανικούς ως υποδιαίρεση των κρυπτογαμικών θαλλόφυτων, συγκαταλέγοντάς τους έτσι στο βασίλειο των φυτών (Plantae), πλέον σήμερα αποτελούν ξεχωριστό βασίλειο (Fungi), όπως φαίνεται και από το φυλογενετικό δέντρο της Ζωής (Εικόνα 1α). Έτσι, σύμφωνα με πιο πρόσφατα σχετικά επιστημονικά δεδομένα (Hibbett *et al.*, 2007) το βασίλειο των Μυκήτων περιλαμβάνει 7 φύλα, 35 τάξεις και 129 γένη (Εικόνα 1β).





Εικόνες 1α και 1β. Φυλογενετικό δέντρο της Ζωής (Madigan *et al.*, 2007) και διάγραμμα-δένδρο που απεικονίζει τις φυλογενετικές σχέσεις εντός του Βασιλείου των Μυκήτων (Hibbett *et al.*, 2007).

Μορφολογία και κυτταρική δομή των μυκήτων

Το βλαστικό σώμα των μυκήτων ονομάζεται θαλλός και μπορεί να είναι είτε μονοκύτταρο (π.χ. πλασμώδια), είτε αποτελούμενο από διακλαδιζόμενα νημάτια (τα οποία ονομάζονται υφές) το σύνολο των οποίων αποτελεί το μυκήλιο. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις δημιουργίας αλυσίδας κυττάρων προερχόμενες από διαδοχικές εκβλαστήσεις, σε μύκητες με μονοκύτταρο θαλλό. Κάποιοι μύκητες επίσης εμφανίζουν το φαινόμενο του διμορφισμού, κατά το οποίο αναπτύσσονται με διαφορετικού τύπου θαλλό σε διαφορετικά υποστρώματα. Αυτό αφορά κυρίως παρασιτικούς μύκητες φυτών, οι οποίοι επάνω στον ξενιστή τους εμφανίζουν

μυκηλιακό θαλλό, ενώ σε θρεπτικά υλικά ο θαλλός τους μπορεί να πάρει τη μορφή ζύμης (π.χ. παθογόνα που προκαλούν τον εξώασκο των πυρηνοκάρπων).

Οι υφές αποτελούν μικροσκοπικά μυκηλιακά νημάτια, διακλαδιζόμενα και κοίλα εσωτερικά (όπου περιέχονται οι πυρήνες, το κυτταρόπλασμα και τα διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια). Μπορεί να είναι συνεχείς χωρίς εγκάρσια διαφράγματα (septa) συνιστώντας έτσι το κοινοκύτταρο μυκήλιο (που αποτελεί χαρακτηριστικό των κατώτερων μυκήτων). Εναλλακτικά μπορεί να είναι πολυκύτταρες, με τα septa να διαχωρίζουν εσωτερικά τις υφές σε τμήματα, σχηματίζοντας έτσι υποτυπώδη κύτταρα (χαρακτηριστικό των ανώτερων μυκήτων).

Εγκάρσια διαφράγματα όμως μπορούν να σχηματιστούν και στους μύκητες με κοινοκύτταρο μυκήλιο σε περιπτώσεις όπου κάποιο τμήμα της υφής πρέπει να αποκοπεί από το υπόλοιπο μυκήλιο. Αυτά τα septa ονομάζονται περιστασιακά και σχετίζονται με έντονες αλλαγές στη συγκέντρωση του κυτταροπλάσματος μεταξύ δύο περιοχών της υφής. Σε αντίθεση όμως με τα κυρίως septa των ανώτερων μυκήτων (τα οποία φέρουν οπή στο κέντρο, απ' όπου ρέει πρωτόπλασμα, υποκυτταρικά οργανίδια και σε ορισμένες περιπτώσεις πυρήνες), στα περιστασιακά septa σχηματίζεται πλήρης δίσκος για απομόνωση του τμήματος της υφής. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως η δόνηση των septa είναι κεντρομόλος, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η κατασκευή του ξεκινά με εναπόθεση τοιχωματικού υλικού από τα τοιχώματα των υφών και συνεχίζεται προς το κέντρο.

Τα τοιχώματα των κυρίως septa των ανώτερων μυκήτων είναι συνήθως ισοπαχή. Πιο συγκεκριμένα στους ασκομύκητες, τους μύκητες της τάξης *Uredinales* των Βασιδιομυκήτων καθώς και σε άλλους μύκητες τα τοιχώματά τους είναι ισοπαχή ή λεπταίνουν προς το κέντρο. Πλησίον του κεντρικού πόρου των ασκομυκήτων υπάρχει το σωματίδιο Woronin, του οποίου αν και ο ακριβής ρόλος δε έχει εξακριβωθεί, θεωρείται ότι είναι ο πωματισμός του πόρου σε περίπτωση ανάγκης απομόνωσης τμήματος των υφών. Στους Βασιδιομύκητες (εκτός *Uredinales*) από την άλλη δεν υπάρχει αυτή η τυπική δομή, αλλά τα τοιχώματα των septa εμφανίζουν μία βαρελοειδή διόγκωση στην περιφέρεια του κεντρικού πόρου και καλύπτονται από μία μεμβρανοειδή κατασκευή (παρενθόσωμα) η οποία φέρει πολυάριθμες οπές, ενώ τα septa στην περίπτωση αυτή καλούνται δολίπορα. Το μέγεθος του κεντρικού πόρου κυμαίνεται από 0,4-1,2 μm ενώ των οπών του παρενθοσώματος από 0.1-0.18 μm

(κάτι τέτοιο καθιστά αδύνατη τη μετακίνηση πυρήνων μέσω των septa των Βασιδιομυκήτων).

Τα κυτταρικά τοιχώματα των υφών των μυκηλιακών μυκήτων περιέχουν χιτίνη (που είναι ένα πολυμερές N-ακετυλογλυκοζαμίνης, και εναποτίθεται σε δέσμες μικροϊνιδίων (Madigan *et al.*, 2007) και διάφορους πολυσακχαρίτες καθώς και πρωτεΐνες, λιπίδια κ.α. (Alexopoulos *et al.*, 1996), ενώ των ανώτερων μυκήτων πιο συγκεκριμένα περιέχουν χιτίνη και μη-κυτταρινικές β-γλυκάνες.

Η αύξηση των υφών συντελείται επάκρια και το υλικό από το οποίο θα δομηθούν οι νέες μεμβράνες προέρχεται απ' το ενδοπλασματικό δίκτυο. Από εκεί μεταφέρεται στα δικτυοσώματα όπου αποκτά δομή ανάλογη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Από τα δικτυοσώματα αποσπάται με τη μορφή κυστιδίων και έτσι μεταφέρεται προς το ακραίο τμήμα των υφών. Στους περισσότερους ανώτερους μύκητες τα κυστίδια τελικά ομαδοποιούνται στη ζώνη επιμήκυνσης και δημιουργούν μια δυναμική δομή (σωματίδιο Spitzenkörper) που αποτελεί τροφοδότη κυστιδίων. Τα κυστίδια τελικά συντήκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη της οποίας τελικά αυξάνει η επιφάνεια. Στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος εμπλέκονται και τα χιτινοσώματα (συνθετάση της χιτίνης) (Alexopoulos *et al.*, 1996, Webster and Weber, 2007, Ζερβάκης, 2011). Στους Ωομύκητες αλλά και σε κάποιους άλλους κατώτερους μύκητες (π.χ. Ζυγομύκητες), οι υφές τους δεν περιέχουν αναγνωρίσιμο Spitzenkörper, ενώ τα κυστίδια είναι λιγότερα και πιο αραιά στο επάκριο τμήμα (Webster and Weber, 2007).

Ο σχηματισμός των αποικιών στους μύκητες ποικίλει και εξαρτάται από το μέσο στο οποίο αναπτύσσονται. Σε όλες τις περιπτώσεις πάντως, η ανάπτυξη των μυκήτων είναι γραμμική. Έτσι σε στερεά υποστρώματα σχηματίζονται κυκλικές αποικίες, οι οποίες αναπτύσσονται ισομερώς και προς τους δύο άξονες (x,y). Σε υγρές όμως καλλιέργειες σχηματίζονται σφαιρικές αποικίες, ως αποτέλεσμα της διακριτής ανάπτυξής τους και προς τους τρεις άξονες (x,y,z).

Οι περισσότεροι μύκητες αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 0-35 βαθμούς Κελσίου, ενώ οι άριστες θερμοκρασίες είναι 20-30 βαθμούς. Παρόλα αυτά υπάρχουν και θερμοφιλα είδη τα οποία αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 20-50 βαθμούς. Σε αντίθεση με τα βακτήρια θέλουν ελαφρά όξινο υπόστρωμα (pH~6). Το φως δεν είναι απαραίτητο για την

ανάπτυξή τους, θέλουν όμως ελάχιστο φως για να σποροποιήσουν (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Αναπαραγωγή μυκήτων

Οι μύκητες κατά τη διαδικασία σχηματισμού αναπαραγωγικών οργάνων διακρίνονται σε ολοκαρπικούς (όταν όλος ο θαλλός τους μετατρέπεται σε αναπαραγωγικό όργανο), και ευκαρπικούς (όταν τμήμα του θαλλού τους μετατρέπεται σε αναπαραγωγικό όργανο, ενώ το υπόλοιπο μέρος συνεχίζει να αναπτύσσεται κανονικά). Έτσι στους ευκαρπικούς μύκητες βλαστική και αναπαραγωγική φάση συνυπάρχουν.

Η αναπαραγωγή των μυκήτων διακρίνεται σε αγενή και εγγενή, με την πλειονότητα των μυκήτων να αναπαράγεται και με τους δύο τρόπους.

Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται με τη βοήθεια αγενών σπορίων, τα οποία σχηματίζονται είτε στο εσωτερικό σποριάγγειων, είτε στην επιφάνεια κονιδιοφόρων. Αυτά όταν απελευθερωθούν και βρεθούν σε πρόσφορο υπόστρωμα, βλαστάνουν και αναπαράγουν το μύκητα. Τα σποριάγγεια σχηματίζονται στο άκρο σποριαγγειοφόρων υφών κατώτερων μυκήτων, ενώ τα αγενή τους σπόρια μπορεί να είναι ή ζωοσπόρια (τα οποία διαθέτουν μαστίγια για αυτόνομη κίνηση) είτε απλανοσπόρια (τα οποία δεν διαθέτουν μηχανισμούς αυτόνομης κίνησης και η διασπορά τους γίνεται παθητικά). Οι κονιδιοφόροι μπορεί να είναι ελεύθεροι ή να βρίσκονται σε ομάδες, σε σποριοδόχεια, πυκνίδια ή ακέρβουλα, ενώ τα σπόρια (κονίδια) που σχηματίζουν δεν διαθέτουν αυτόνομη κίνηση.

Η εγγενής αναπαραγωγή σε γενικές γραμμές πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις οι οποίες είναι η πλασμογαμία, η καρυογαμία και τέλος η μείωση. Οι εγγενείς καρποφορίες αποτελούν χαρακτήρα διάκρισης για αρκετούς ανώτερους μύκητες. Έτσι τα εγγενή (φυλετικά) σπόρια των ασκομυκήτων παράγονται εντός σακοειδών κατασκευών (ασκών) και λέγονται ασκοσπόρια, ενώ οι ασκοί βρίσκονται επάνω ή στο εσωτερικό εγγενών καρποφοριών (αποθήκια, περιθήκια, κλειστοθήκια). Στους Βασιδιομύκητες σχηματίζονται στο άκρο ροπαλοειδών δομών (βασίδια) και λέγονται βασιδιοσπόρια, ενώ τα βασίδια σχηματίζονται στα βασιδιοκάρπια (περισσότερα στους βασιδιομύκητες). Γενικά τα εγγενή σπόρια των μυκήτων είναι ανθεκτικά στην ξηρασία, το ψύχος και σε ορισμένους χημικούς παράγοντες (Madigan *et al.*, 2007).

Βασιδιομύκητες

Γενικά στοιχεία

Το φύλο Basidiomycota περιλαμβάνει περισσότερα από 22.000 είδη μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται σαπροοργανοτροφικά και παρασιτικά (φυτών και ζώων) είδη, είδη που σχηματίζουν μανιτάρια (εδώδιμα ή δηλητηριώδη) καθώς και είδη με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων και τη φαρμακοβιομηχανία (Alexopoulos *et al.*, 1996). Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι πιο εξελιγμένοι μύκητες με σημαντικότερο κοινό χαρακτηριστικό τους το σχηματισμό βασιδίων και βασιδιοσπορίων.

Οι περισσότεροι είναι εδαφογενείς με σπόρια που διασπείρονται με τον άνεμο, αλλά υπάρχουν και μερικοί που αναπτύσσονται μέσα σε νερό. Το μυκήλιο τους έχει πολύ μεγάλη διάρκεια ζωής, ενώ υπάρχουν και μερικοί των οποίων ο θαλλός έχει τη μορφή ζύμης ή είναι διμορφικός (Webster and Weber, 2007).

Ο σχηματισμός κονιδίων και συνεπώς οργάνων αγενούς αναπαραγωγής είναι λιγότερο κοινός στους Βασιδιομύκητες. Τα κονίδια μπορεί να σχηματίζονται σε μονοκάρυο ή δικάρυο μυκήλιο ή και στα δύο, όπως επίσης και σε βασιδιόματα. Μπορεί να συμβάλουν ουσιαστικά στη διάδοση και τη διασπορά του μύκητα ή να συμπληρώνουν την εγγενή αναπαραγωγή. Ανήκουν σε 3 είδη: τα αρθροκονίδια (ή ωΐδια), τα βλαστικά κονίδια και τα γλαμυδοσπόρια (Webster and Weber, 2007).

Τα βασίδια αποτελούν τις δομές εγγενούς αναπαραγωγής των βασιδιομυκήτων. Είναι κύτταρα τα οποία φέρουν σε εξωτερικά στηρίγματα, τα 4 συνήθως σπόρια (μπορεί να είναι και 1 ή 2 ή και πάνω από 4). Ο τύπος των βασιδίων αποτελεί ταξινομικό χαρακτήρα και έτσι ανάλογα με το αν φέρουν ή όχι septa, διακρίνονται σε ολοβασίδια ή ομοβασίδια (μονοκύτταρα) ή φραγμοβασίδια ή ετεροβασίδια (πολυκύτταρα). Τα βασίδια σχηματίζονται στην κατάληξη των υφών του γόνιμου στρώματος και σε βασιδιομύκητες που σχηματίζουν καρποσώματα αναπτύσσονται στην εξωτερική στρώση των ελασμάτων στοιβαγμένα πυκνά επάνω στην επιφάνειά τους. Κατόπιν διογκώνονται και πάνω στο κορυφαίο τμήμα τους σχηματίζονται τα στηρίγματα. Αρχικά τα βασίδια είναι τυπικά διπύρρηνα και περιλαμβάνουν δύο απλοειδείς πυρήνες οι οποίοι είναι συνήθως διαφορετικοί γενετικά. Σε αυτό το κύτταρο γίνεται αρχικά καρυογαμία (προβασίδιο) και αμέσως

μετά ακολουθεί μείωση (μεταβασίδιο) δίνοντας γένεση σε 4 απλοειδείς πυρήνες. Η μείωση λαμβάνει χώρα στο ανώτερο τμήμα του βασιδίου και οι 4 πυρήνες περνάνε μέσω των στηριγμάτων στα βασιδιοσπόρια. Σε ορισμένους μύκητες γίνεται και μια μετα-μειωτική μίτωση, ή στην κορυφή των βασιδίων, ή στη βάση τους ή μέσα στα στηρίγματα, είτε στα νεαρά σπόρια (Webster and Weber, 2007).

Τα βασιδιοσπόρια είναι τα σπόρια εγγενούς αναπαραγωγής. Έχουν μέγεθος 3-20 μm και συνήθως βρίσκονται σε ομάδες των τεσσάρων επάνω σε στηρίγματα στα βασίδια. Τη στιγμή του αποχωρισμού τους από τα βασίδια είναι κοινοκύτταρα, αλλά σε μερικούς βασιδιομύκητες (ετεροβασιδιομύκητες) μπορεί αργότερα να διαχωριστούν με septa. Έχουν ασύμμετρο σχήμα που ποικίλει και επιφάνεια λεία ή με επάρματα και πτυχώσεις. Το χρώμα τους (στοιχείο σημαντικό για την ταξινόμηση) ποικίλει από άχρωμο έως μαύρο και εξαρτάται από τις χρωστικές που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα ή τα κυτταρικά τοιχώματα. Η εμφάνιση των χρωστικών στα τοιχώματα καθυστερεί, πράγμα που εξηγεί την αλλαγή του χρώματος των ελασμάτων ορισμένων μανιταριών κατά την ωρίμανση. Τα βασιδιοσπόρια των περισσότερων βασιδιομυκήτων (με εξαίρεση τους *Gasteromycetes*) είναι βαλιστοσπόρια. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεωρίες σχετικά με το συγκεκριμένο μηχανισμό αποδέσμευσης των σπορίων με κυρίαρχη αυτή του καταπέλτη επιφανειακής τάσης (Ingold, 1939). Κατά τη θεωρία αυτή, λίγο πριν από την απομάκρυνση των βασιδιοσπορίων σχηματίζονται σταγόνες υγρού τόσο στην προσαξονική πλευρά του σπορίου, όσο και στην κορυφή του στηρίγματος στο σημείο επαφής του με το σπόριο. Αυτές οι σταγόνες αυξάνουν σε μέγεθος και οδηγούν στην αποκοπή του σπορίου. Μετά τον αποχωρισμό τους, τα βασιδιοσπόρια μπορούν να διατηρήσουν τη ζωτικότητα τους, παραμένοντας αδρανή εφόσον οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν ευνοούν τη βλάστησή τους, για μήνες ή και μερικά χρόνια. Η βλάστηση τους μπορεί να γίνει ή απευθείας (μέσω σχηματισμού βλαστικού σωλήνα) είτε μέσω σχηματισμού κονιδίων. Κατά τη βλάστηση, πραγματοποιούνται επαναλαμβανόμενες μιτωτικές διαιρέσεις και κατά τα αρχικά στάδια η βλαστική υφή είναι πολυπύρηνη και κοινοκύτταρη. Κατόπιν εγκάρσια septa αρχίζουν να σχηματίζονται μετατρέποντας την κοινοκύτταρη υφή σε πολυκύτταρη με ένα πυρήνα σε κάθε τμήμα, σχηματίζοντας έτσι το μονοκάρυο (ή πρωτογενές) μυκήλιο.

Όπως και τα ασκοσπόρια, έτσι και τα βασιδιοσπόρια είναι το αποτέλεσμα πλασμογαμίας, καρυογαμίας και μείωσης (με τις δύο τελευταίες να λαμβάνουν χώρα

στα βασίδια) σχηματίζοντας συνήθως 4 βασιδιοσπόρια. Αυτός είναι και ο λόγος που πολλοί μελετητές θεωρούν τους βασιδιομύκητες ομόλογους των ασκομυκήτων (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Γενικευμένος βιολογικός κύκλος

- Το μυκήλιο που προέρχεται από τη βλάστηση των βασιδιοσπορίων είναι πρωτογενές (μονοκάρυο), το οποίο αρχικά μπορεί να είναι πολυπύρηνο (με αυτή τη φάση να διαρκεί λίγο). Έτσι αρχικά υπάρχουν απλοειδή μυκήλια δύο συζευκτικών τύπων (αφού οι βασιδιομύκητες είναι ετερόθαλλοι).
- Ακολουθεί σωματογαμία και σχηματισμός δευτερογενούς (δικαρούου) μυκηλίου, από την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο συμβατών μονοκάρυων υφών και τη δημιουργία διπύρηνων κυττάρων.
- Οι δικαρυωτικές υφές σχηματίζουν βασιδιοκάρπια [είτε μανιτάρια είτε κλειστά βασιδιοκάρπια (Gasteromycetes)].
- Ακολουθεί σχηματισμός ολοβασιδίων σε υμένιο και τελικά καρυογαμία, μείωση και σχηματισμός απλών βασιδίων.

Το γένος *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm.

Εισαγωγή

Τα είδη *Pleurotus* στη φύση βρίσκονται συνήθως ως σαπροοργανότροφοι οργανισμοί, ενώ ορισμένα είδη έχει παρατηρηθεί να αναπτύσσονται και ως ασθενή παράσιτα σε φυτά Σκιαδανθών σε εύκρατες περιοχές (Zervakis *et al.* 2001), αναπτυσσόμενοι πάνω σε νεκρούς κορμούς ζωντανών δέντρων, ενώ έχουν την ικανότητα να αποσυνθέτουν φυτικά λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα.

Έχουν το πλεονέκτημα να μπορούν να αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 15-31°C καθώς και να αποικίζουν ένα ευρύ φάσμα γεωργικών και δασικών λιγνινοκυτταρινούχων υπολειμμάτων όπως άχυρα σιτηρών, πριονίδια, παραπροϊόντα καλλιέργειας/εκκοκισμού βάμβακος και πολλά άλλα.

Το γένος *Pleurotus* συμπεριλαμβάνει είδη με κοσμοπολίτικη κατανομή και έτσι εμφανίζονται τόσο σε εύκρατα όσο και σε τροπικά κλίματα. Είδη όπως το *P. ostreatus* (το οποίο καρποφορεί στους 15°C) έχουν καταγραφεί και στις πέντε

ηπείρους, ενώ είδη όπως τα *P. cornucopiae*, *P. tuberregium*, *P. cystidiosus* και *P. eryngii*, κατανέμονται σε εύκρατες ή/και υποτροπικές/τροπικές περιοχές (Zervakis and Balis 1996).

Οικονομική σημασία – Εφαρμογές

Τα είδη *Pleurotus* αποτελούν τα πιο ευρέως καλλιεργούμενα μανιτάρια μετά από τα *Agaricus bisporus*, καθώς παρουσιάζουν οικονομικό και οικολογικό ενδιαφέρον, καθώς και φαρμακευτικές ιδιότητες. Αποτελούν μια καλή διατροφική πηγή ινών και άλλων θρεπτικών συστατικών, ενώ η θρεπτική τους αξία μπορεί να συγκριθεί με αυτή των αυγών, γάλακτος και κρέατος. Περιέχουν μεγάλο αριθμό βιταμινών, αφθονία ουσιώδων αμινοξέων καθώς και αριθμό βιολογικά ενεργών συμπλόκων με θεραπευτικές ιδιότητες. Έτσι έχει παρατηρηθεί ότι βελτιώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα, αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και έχουν αντιμικροβιακή δράση, ενώ επίσης βοηθούν στη μείωση της χοληστερίνης καθώς και την πρόληψη από την υψηλή αρτηριακή πίεση και την αρτηριοσκλήρυνση. Επίσης έχουν την ικανότητα να αποικίζουν και αποδομούν ένα μεγάλο αριθμό λιγνικυτταρινικών υποστρωμάτων και άλλων αποβλήτων, τα οποία παράγονται πρωτογενώς κατά τις αγροτικές δραστηριότητες και την επεξεργασία τροφίμων. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την σχετικά εύκολη παραγωγή των καρποσωμάτων καθώς και το χαμηλό κόστος παραγωγής φαίνεται να συνιστούν και το λόγο της συνεχώς αυξανόμενης καλλιέργειάς του (Cohen *et al.*, 2002, Gregori *et al.*, 2007, Sanchez, 2004, Sanchez, 2010).

Μορφολογία

Σε γενικές γραμμές οι καρποφορίες των *Pleurotus* αναπτύσσονται πάνω σε φυτικά υποστρώματα, χαρακτηρίζονται από έναν πλάγιο-οριζόντιο έως έκκεντρο στύπο που μπορεί να είναι μακρύς, κοντός ή και να απουσιάζει, ενώ δεν σχηματίζουν δακτύλιο και βόλβα. Τα βασιδιόματα απαντώνται σε ομάδες ή μεμονωμένα, ενώ χαρακτηριστικό είναι το σχήμα τους στο είδος *Pleurotus ostreatus* (καθώς και σε άλλα είδη του γένους), που ομοιάζει με αυτό των στρειδιών με την ευρύτερη πλευρά απέναντι από το στύπο (όπως φαίνεται και από την κοινή αγγλική ονομασία τους: "oyster mushrooms"). Το μέγεθός τους ποικίλει τόσο από είδος σε είδος όσο και μέσα στο ίδιο είδος όταν καλλιεργούνται κάτω από διαφορετικές κλιματικές και θρεπτικές συνθήκες και γενικά κυμαίνονται από 2-3cm έως 15-20cm. Το χρώμα τους ποικίλει ιδιαίτερα ακόμα και μέσα στο ίδιο είδος, στοιχείο που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν χρησιμοποιείται ως ταξινομικό γνώρισμα (Rajaratnam *et al.*, 1987, Zervakis and Balis 1996).

Μορφολογικοί χαρακτήρες ειδών του γένους *Pleurotus*

Παρουσιάζονται τα πιο χαρακτηριστικά μορφολογικά γνωρίσματα των *Pleurotus* ειδών/taxa (ή των στελεχών με την ταξινομική κατάταξη με την οποία αρχικά αποκτήθηκαν) που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας (Zervakis and Balis, 1991, Okhuoya and Okogbo, 1991, Hibbett and Thorn, 1994, Zervakis and Balis 1996, Petersen and Hughes 1997, Zervakis, 1998, Isikhuemhen *et al.*, 2000, Menolli *et al.*, 2010, Gargano *et al.*, 2011, Zervakis *et al.* 2001, Zervakis *et al.* 2004):

P. abieticola: Ο πύλος του είναι μεγέθους έως 5,5 cm, επίπεδος, λείος, χρώματος ωχρού έως ωχρού ιώδους στην περιφέρεια και καφέ έως ωχρού καφέ στο κέντρο. Ο στύπος είναι πολύ βραχύς ή απουσιάζει, υπόλευκου χρώματος. Το μυκήλιο είναι λευκό έως ωχρό καφέ σε συσσωματώματα (Εικόνα 2).



Εικόνα 2,3. Είδη *P. abieticola* και *P. abalonus* αντίστοιχα.

P. abalonus: Αποτελεί υποείδος του είδους *P. cystidiosus* ενώ παρατηρείται σε παρόμοια ενδιαιτήματα με αυτό. Έχει εντοπισθεί στην Ασία. Ο πύλος του είναι μεγέθους 5,5-9 cm, επίπεδος, λείος με λεία χείλη, χρώματος ανοιχτού μπεζ έως ανοιχτού καστανού στην περιφέρεια και μπεζ έως ανοιχτού μπεζ/κατσανού έως ανοιχτού καστανού προς το κέντρο. Ο στύπος είναι 1-2 cm, έκκεντρος έως οριζόντιος, υποκυλινδρικός έως πτερυγίομορφος, χρώματος κρεμώδους έως ανοιχτού καστανού. Απουσία βέλου. Παρουσία συνηματοειδών καρποφοριών. Το μυκήλιο είναι λευκό, κυρίως επιφανειακό με κορέμια. Το ίχνος σπορίων είναι πορτοκαλί-μπεζ έως πορτοκαλί-κίτρινο (Εικόνα 3).

P. australis: Το συγκεκριμένο είδος εμφανίζει παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά με άλλα μέλη του υπογένους *Coremiopleurotus* και έχει καταγραφεί στην Ωκεανία. Διαφέρει από το *P. cystidiosus* ως προς το χρώμα του πύλου του, ο οποίος είναι καφέ χρώματος (Εικόνα 4).



Εικόνα 4,5. Είδη *P. australis* και *P. citrinopileatus* αντίστοιχα.

P. citrinopileatus: Αποτελεί taxon πολύ συγγενές (ή κατά άλλους υποείδος) του *P. cornucopiae* και απαντάται στην Ασία, με κυρίαρχη μορφολογική διαφορά τους το χρώμα του πύλου, το οποίο στο συγκεκριμένο είδος είναι κίτρινο (Εικόνα 5).

P. columbinus: Αποτελεί taxon πολύ συγγενές (ή κατά άλλους υποείδος ή ποικιλία) του *P. ostreatus* και συνήθως εντοπίζεται και σε παρόμοια ενδιαιτήματα με αυτό. Ο πύλος είναι μεγέθους 4-7 cm, επίπεδος έως ελαφρά κυρτός, λείος με λεία χείλη, χρώματος τεφρού έως έντονα τεφρού στην περιφέρεια και έντονα τεφρού έως έντονα καστανού έως σκούρου μπλε-τεφρού προς το κέντρο. Ο στύπος συνήθως απουσιάζει, ενώ όταν υπάρχει είναι 0,5-1 cm, κυρίως οριζόντιος, κυλινδρικός, χρώματος λευκού έως κρεμώδους. Απουσία βέλου και συννηματοειδών καρποφοριών. Το μυκήλιο είναι λευκό έως ανοιχτό τεφρό, βαμβακώδες με άφθονες εναέριες υφές. Μονομιτικό σύστημα υφών. Το ίχνος σπορίων είναι λευκό έως κρεμώδες (Εικόνα 6).



Εικόνα 6,7. Είδη *P. columbinus* και *P. cornucopiae* αντίστοιχα.

P. cornucopiae: Εντοπίζεται σε Ευρώπη και Ασία. Ο πύλος του είναι μεγέθους 4-8 cm, χωνοειδής προς το κέντρο, λείος με λεία χείλη, χρώματος ανοιχτού κίτρινου έως κίτρινου έως έντονα κίτρινου. Ο στύπος του είναι 1,5-2,5 cm, έκκεντρος έως οριζόντιος, κυλινδρικός έως διχτομικός, χρώματος λευκού έως ανοιχτού κίτρινου. Απουσία βέλου και συννηματοειδών καρποφοριών. Το μυκήλιο είναι λευκό έως κρεμώδες, πυκνό, με περιορισμένες εναέριες υφές. Έχει διμιτικό σύστημα υφών. Το ίχνος σπορίων είναι σκούρο πορφυρό έως πορφυρό (Εικόνα 7).

P. cystidiosus: Έχει καταγραφεί στην Αμερική, Ευρώπη (Ελλάδα) και Αφρική (στις δύο τελευταίες ηπείρους και ως *P. fuscosquamulosus*). Ο πύλος του είναι μεγέθους 4,5-7,5 cm, επίπεδος έως ελαφρά κυρτός προς το κέντρο, λείος με λεία έως ελαφρώς κυματοειδή χείλη, χρώματος έντονα κίτρινου έως πορτοκαλί-μπεζ στην περιφέρεια και πορτοκαλί-μπεζ έως μπεζ-καστανό προς το κέντρο. Ο στύπος συνήθως απουσιάζει, ενώ όταν υπάρχει είναι 0,5-1 cm, οριζόντιος, υποκυλινδρικός, χρώματος λευκού έως κρεμώδους. Απουσία βέλου και παρουσία συννηματοειδών καρποφοριών. Το μυκήλιο είναι λευκό, κυρίως επιφανειακό με κορέμια που φέρουν μαύρα αρθροσπόρια. Μονομιτικό σύστημα υφών. Το ίχνος σπορίων είναι λευκό έως κρεμώδες έως πορτοκαλί-μπεζ (Εικόνα 8).



Εικόνα 8,9. Είδη *P. cystidiosus* και *P. djamor* αντίστοιχα.

P. djamor: Απαντάται κυρίως σε τροπικές-υποτροπικές περιοχές και εμφανίζει μια κοσμοπολίτικη βιοκατανομή. Ο πύλος του έχει μέγεθος από 7-10 cm, επίπεδος έως χωνοειδής, λείος, χρώματος ανοιχτού ρόδινου έως ρόδινου. Ο στύπος απουσιάζει ή έχει μέγεθος 1-2 cm, έκκεντρος, χρώματος κρεμώδους έως ανοιχτού ρόδινου. Το ίχνος των σπορίων είναι ρόδινο (Εικόνα 9).

P. dryinus: Απαντάται σε εύκρατα κλίματα και έχει ευρεία γεωγραφική κατανομή. Ο πύλος είναι μεγέθους 8-11 cm, επίπεδος έως ελαφρά ακανόνιστος, αδρός με λεία έως κυματοειδή χείλη, χρώματος έντονα καστανού έως έντονου μπεζ έως ανοιχτού μπεζ. Ο στύπος είναι 3-4,5 cm, κυρίως έκκεντρος, κυλινδρικός, χρώματος λευκού έως κρεμώδους. Παρουσία βέλου που καλύπτει στα αρχικά στάδια μορφογένεσης της καρποφορίας από την περιφέρεια του πύλου μέχρι το ανώτερο μέρος του στίπου και απουσία συννηματοειδών καρποφοριών. Το μυκήλιο είναι

λευκό έως υπόλευκο στην αρχή και κατόπιν καστανό λόγω του σχηματισμού γλαυδοσπορίων, με περιορισμένες εναέριες υφές. Διμιτικό σύστημα υφών. Το ίχνος σπορίων είναι λευκό έως κρεμώδες ανοιχτό κίτρινο (Εικόνα 10).



Εικόνα 10,11. Είδη *P. dryinus* και *P. eryngii* αντίστοιχα.

P. eryngii: Εντοπίζεται σε Νότια Ευρώπη, Βόρεια Αφρική και Ασία, αναπτύσσεται δε πάνω σε υπολείμματα ή σε ζωντανούς ιστούς (ρίζα, υπόγειο τμήμα) Σκιαδανθών φυτών (οικογένεια *Apiaceae*). Είναι πιο ευαίσθητο σε ασθένειες και καλλιεργητικές συνθήκες, ενώ αναπτύσσεται πιο αργά από το *P. ostreatus*. Ο πύλος του είναι μεγέθους 5-8 cm, επίπεδος έως ελαφρά κοίλος, λείος με λεία χείλη, χρώματος ανοιχτού μπεζ έως καστανού με πολυάριθμες μπεζ-καστανές κηλίδες. Ο στύπος είναι 1,5-3,5 cm, έκκεντρος, κυλινδρικός, χρώματος κρεμώδους έως ανοιχτού τεφρού. Απουσία βέλου και συννηματοειδών καρποφοριών. Το μυκήλιο είναι λευκό έως κρεμώδες, όχι ιδιαίτερα πυκνό, με περιορισμένες εναέριες υφές. Μονομιτικό σύστημα υφών. Το ίχνος σπορίων είναι κρεμώδες έως ανοιχτό κίτρινο (Εικόνα 11).

P. flabellatus: Θεωρείται πως ταυτίζεται με το *P. djamor*, ενώ κατά άλλους αποτελεί διακριτό είδος. Ο πύλος είναι μεγέθους 3-7 cm, επίπεδος έως έντονα χωνοειδής προς το κέντρο, λείος με λοβώδη και κυματοειδή χείλη, χρώματος ανοιχτού ρόδινου έως ρόδινου. Ο στύπος είναι 1-3 cm, έκκεντρος, κυλινδρικός, χρώματος λευκού έως κρεμώδους έως ανοιχτού ρόδινου. Απουσία βέλου και συννηματοειδών καρποφοριών. Το μυκήλιο είναι λευκό έως κρεμώδες, πυκνό, με περιορισμένες εναέριες υφές. Μονομιτικό σύστημα υφών. Το ίχνος σπορίων είναι λευκό έως κρεμώδες (Εικόνα 12).



Εικόνα 12,13. Είδη *P. flabellatus* και *P. nebrodensis* αντίστοιχα.

P. nebrodensis: Συγγενές προς το *P. eryngii* είδος που απαντάται στην Ευρώπη. Ο πύλος του έχει μέγεθος 4-15 cm, επίπεδος με ανισωμένη περιφέρεια, λείος με λεία χείλη, χρώματος υπόλευκου έως κρεμώδους. Ο στύπος είναι 1,5-3 cm, κυλινδρικός έως πιο παχύς στη βάση, χρώματος ανοιχτού μπλεζ. Απουσία βέλου. Το μυκήλιο είναι λευκό έως κρεμώδες, όχι ιδιαίτερα πυκνό, με περιορισμένες εναέριες υφές. Μονομιτικό σύστημα υφών (Εικόνα 13).

P. ostreatus: Αποτελεί το τυπικό είδος του γένους και εμφανίζει παγκόσμια βιοκατανομή. Καλλιεργείται κυρίως στις εύκρατες ζώνες. Σχηματίζει καρποφορίες σε σχετικά χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με τα άλλα είδη *Pleurotus*. Ο πύλος του είναι μεγέθους 3-12 cm, επίπεδος έως ελαφρά κυρτός, λείος με λεία έως ελαφρά συνεστραμμένα προς τα κάτω χείλη, χρώματος ανοιχτού μπλεζ έως καστανού ή ανοιχτού κυανότεφρου έως τεφρού. Ο στύπος συνήθως απουσιάζει, ενώ όταν υπάρχει είναι 0,5-2 cm, οριζόντιος έως έκκεντρος, κυλινδρικός, χρώματος λευκού έως κρεμώδους έως ανοιχτού τεφρού έως έντονα τεφρού. Απουσία βέλου και συνηματοειδών καρποφοριών. Το μυκήλιο είναι λευκό έως ανοιχτό τεφρό, βαμβακώδες, με άφθονες εναέριες υφές. Μονομιτικό σύστημα υφών. Το ίχνος σπορίων είναι κρεμώδες έως ανοιχτό τεφρό έως ανοιχτό ρόδινο έως έντονα τεφρό (Εικόνα 14).



Εικόνα 14,15. Είδη *P. ostreatus* και *P. pulmonarius* αντίστοιχα.

P. pulmonarius: Ο πύλος του είναι μεγέθους 6-10 cm, επίπεδος, λείος με λεία έως κυματοειδή χείλη, χρώματος ανοιχτού μπεζ έως μπεζ έως μπεζ-καστανού. Ο στύπος είναι 1,5-3 cm, οριζόντιος έως έκκεντρος, κυλινδρικός, χρώματος λευκού έως κρεμώδους. Απουσία βέλου και συννηματοειδών καρποφοριών. Το μυκήλιο είναι λευκό έως υπόλευκο, βαμβακώδες, με άφθονες εναέριες υφές. Μονομιτικό σύστημα υφών. Το ίχνος σπορίων είναι ανοιχτό μπεζ (Εικόνα 15).

P. sajor-caju: Θεωρείται ως συνώνυμο του *P. pulmonarius*. Το συγκεκριμένο όνομα έχει λανθασμένα χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει πληθυσμούς του *P. pulmonarius* που απαντώνται σε υποτροπικά και τροπικά περιβάλλοντα και απαιτούν σχετικά υψηλές θερμοκρασίες για την ανάπτυξη των καρποφοριών τους (Εικόνα 16).



Εικόνα 16,17. Είδη *P. sajor-caju* και *P. sapidus* αντίστοιχα.

P. sapidus: Ένα ακόμη taxon με αμφίβολη ταξινόμική θέση, το οποίο θεωρείται συγγενές του *P. ostreatus* ή *P. pulmonarius*. Ο πύλος του είναι μεγέθους 3,5-6,5 cm, επίπεδος έως ελαφρά κυρτός, λείος έως ελαφρά χωνοειδής προς το κέντρο με λεία χείλη, χρώματος ανοιχτού ρόδινου-ερυθρου προς την περιφέρεια και ανοιχτού μπεζ έως μπεζ στο κέντρο. Ο στύπος είναι 0,5-3 cm, οριζόντιος έως έκκεντρος, κυλινδρικός, Απουσία βέλου και συννηματοειδών καρποφοριών. Το μυκήλιο είναι λευκό έως υπόλευκο, βαμβακώδες, με άφθονες εναέριες υφές. Μονομικό σύστημα υφών. Το ίχνος σπορίων είναι λευκό έως κρεμώδες έως ανοιχτό πράσινο-κίτρινο (Εικόνα 17).

P. tuberregium: Εντοπίζεται σε τροπικά και υποτροπικά κλίματα, ενώ αποτελεί πολύ κοινό μανιτάρι στην τροπική Αφρική και σε ορισμένες περιοχές της Ωκεανίας. Αποτελεί το μοναδικό είδος *Pleurotus* που χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό σκληρωτίων, τα οποία μπορούν να φτάσουν σε μέγεθος τα 30 cm. Χαρακτηρίζεται από διμυτικό σύστημα υφών. Όπως τα περισσότερα είδη *Pleurotus* σχηματίζει κύτταρα που παράγουν νηματοδοτοξικές ουσίες (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Είδος *P. tuberregium*.

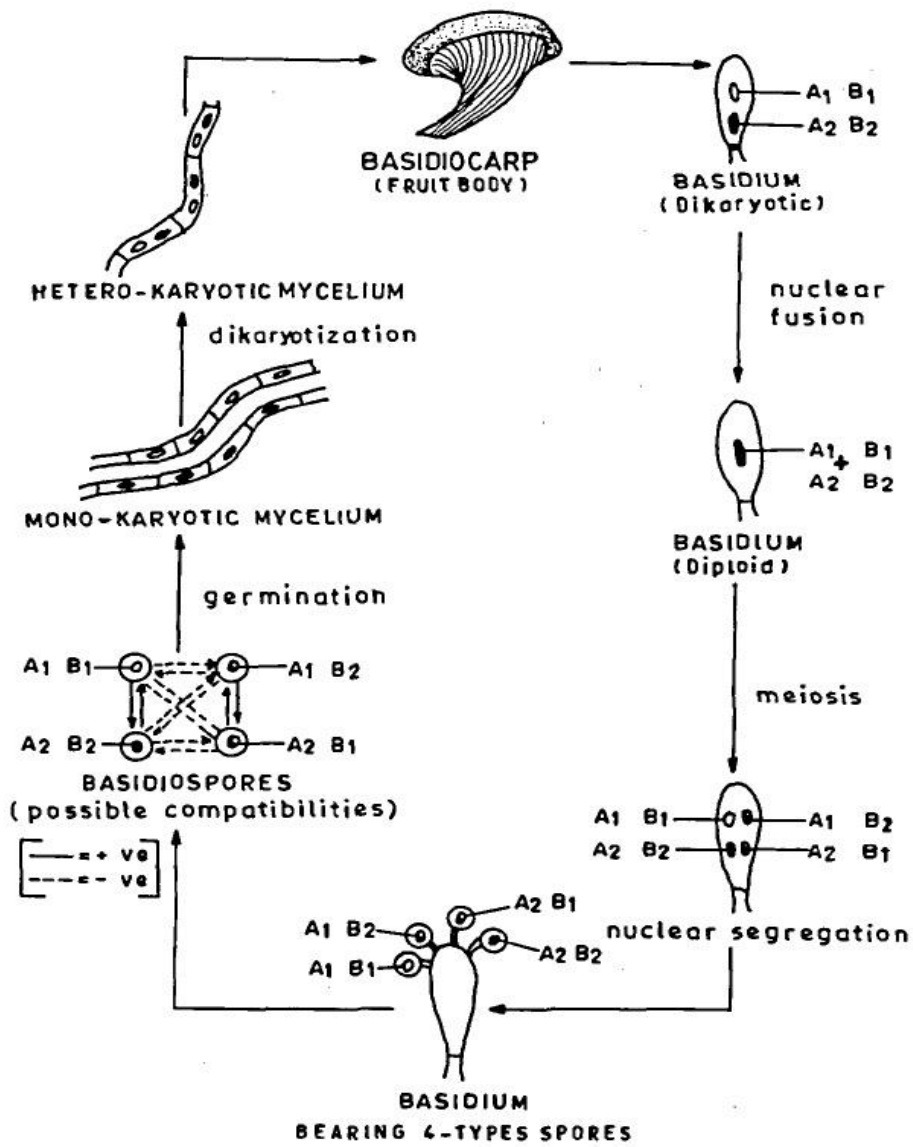
Βιολογικός κύκλος

Εμφανίζει τον τυπικό βιολογικό κύκλο των βασιδιομυκήτων (Εικόνα 19).

Ειδικότερα:

1. Ξεκινά με τη βλάστηση του μονοκύτταρου σπορίου στο κατάλληλο υπόστρωμα, δίνοντας έτσι βλάστηση σε μονοκάρυο-ομοκάρυο μυκήλιο με γενετικά όμοιους πυρήνες (n) και ικανότητα για ανεξάρτητη ανάπτυξη.
2. Όταν δύο συμβατές μονοκαρυωτικές υφές βρεθούν σε μικρή απόσταση, τότε μπορούν να σχηματίσουν γόνιμο δικάρυο μυκήλιο, μέσω σύντηξης των υφών (πλασμογαμίας). Αυτό το δικάρυο μυκήλιο (n+n) φέρει μυκηλιακούς κρίκους (clamps), ενώ κάθε κύτταρο φέρει δύο διαφορετικούς γενετικά πυρήνες (ένα από κάθε μονοκάρυο).
3. Όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, φως και σχετική υγρασία) το επιτρέψουν, το δικάρυο μυκήλιο διαφοροποιείται σε καρποσώματα, στα ελάσματα των οποίων υπάρχουν τα βασίδια.
4. Κατόπιν στα βασίδια πραγματοποιείται αρχικά καρυογαμία, κατά την οποία επέρχεται σύντηξη (2n) του ζεύγους διαφορετικών πυρήνων του κυττάρου.
5. Ακολούθως πραγματοποιείται μείωση και έτσι σχηματίζονται τέσσερις απλοειδείς πυρήνες, οι οποίοι θα μετακινηθούν στα στηρίγματα των βασιδίων και θα σχηματίσουν τελικά τέσσερα νέα βασιδιοσπόρια.
6. Όταν τα καρποσώματα είναι ώριμα, τα βασιδιοσπόρια απελευθερώνονται και ο εγγενής κύκλος αναπαραγωγής ξεκινά από την αρχή.

Εκτός όμως από τον εγγενή κύκλο, υπάρχουν και ορισμένα είδη *Pleurotus* τα οποία εμφανίζουν και κύκλο αγενούς αναπαραγωγής ή με σπόρια που σχηματίζονται επάνω σε μικρές κατασκευές (ύψους 1-10mm) τα συνήμματα (π.χ. *P. cystidiosus*, *P. abalones*, *P. australis*) είτε με γλαμυδοσπόρια (π.χ. *P. dryinus*).



Εικόνα 19. Εγγενής κύκλος αναπαραγωγής των μυκήτων του γένους *Pleurotus* (Rajaratnam *et al.*, 1987).

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).

Ταξινομική κατάταξη γένους Pleurotus

Το γένος *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Elias Magnus Fries το 1821 ως *Agaricus*, φυλή *Pleurotus*, ενώ το 1871 ο Kummer το αναγνώρισε ως γένος. Η πρώτη καταγραφή καλλιέργειας είναι πιθανότητα αυτή του Kaufert (1935) ο οποίος κατέγραφε την καρποφορία και την παραγωγή αγενών σπορίων στο *P. corticatus*.

Η ταξινομική θέση του γένους *Pleurotus* είναι η εξής (www.mycobank.org):

- Βασίλειο: Fungi (Μύκητες)
- Φύλο: Basidiomycota (Βασιδιομύκητες)
- Υποφύλο: Agaricomycotina
- Κλάση: Agaricomycetes
- Υποκλάση: Agaricomycetidae
- Τάξη: Agaricales
- Οικογένεια: Pleurotaceae
- Γένος: *Pleurotus*

Κατά τον Singer (1986) το γένος *Pleurotus* αποτελείται από έξι υποδιαιρέσεις (sections), εντός των οποίων κατανέμονται τα κυριότερα είδη του γένους ως εξής:

- *Lepiotarii* (Fr.) Pilat: *P. dryinus* (Pers. ex Fr.) Kummer
- *Calyptrati* Sing.: *P. calyptratus* (Lindb. in Fr.) Sacc.

- *Pleurotus*: *P. ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer, *P. columbinus* (Quel. apud Bres.) Quel., *P. pulmonarius* (Fr.) Quel., *P. citrinopileatus* Sing., *P. flabellatus* (Berk. & Br.) Sacc., *P. eryngii* (D.C. ex Fr.) Quel., *P. sapidus* (Murr.) Murr., *P. ostreatoroseus* Sing., *P. opuntiae* (Dur. & Lev.) Sacc., *P. cornucopiae* (Paul. ex Fr.) Roll., *P. salignus* (Pers. ex Fr.) Kummer.
- *Coremiopleurotus* (Hilber): *P. cystidiosus* O.K. Miller, *P. abalonus* Han, Chen & Cheng.
- *Lentodiellum* (Murr.) Sing.: *P. sajor-caju* (Fr.) Sing., *P. squarrosulus* (Mont.) Sing.
- *Tuberregium* Sing.: *P. tuberregium* (Fr.) Sing.

Σύμφωνα όμως με νεώτερα ευρήματα, η υποδιαίρεση *Lentodiellum* δεν ανήκει στο γένος *Pleurotus* αλλά αποτελεί διακριτό γένος της οικογένειας Polyporaceae, ενώ τα επίθετα *sajor-caju* και *squarrosulus* ανήκουν σε είδη του γένους *Lentinus* (www.mycobank.org). Επίσης η χρήση ορισμένων ονομάτων ειδών *Pleurotus* που αναφέρονται από τον Singer (1986) έχει στο μεταξύ αμφισβητηθεί ή/και αναθεωρηθεί (όπως θα αναφερθεί στη Συζήτηση της παρούσας εργασίας).

Γενικότερα όμως υπάρχει μια δυσκολία στην ταξινόμηση των ειδών του γένους *Pleurotus*, αφού κάποια είδη μπορεί να εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία όταν αναπτύσσονται κάτω από διαφορετικές π.χ. κλιματικές συνθήκες (π.χ. μεγάλη ποικιλομορφία στο χρώμα). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το χρώμα του είδους *P. ostreatus* το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από λευκό έως σκούρο καφέ ή γκρι. Μια παρόμοια παρατήρηση είχε γίνει και από τον Singh and Rajarathnam (1977) στο είδος *P. eous*, όπου τα καρποσώματα παίρνουν μια ροζ απόχρωση όταν καλλιεργούνται στη σκιά ή στο σκοτάδι και σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (18-20°C), η οποία εξαφανίζεται όταν εκτεθούν στο φως ή σε υψηλές θερμοκρασίες (25-28°C). Έτσι φτωχός φωτισμός, υψηλή θερμοκρασία, υψηλή υγρασία και/ή ανεπαρκής αερισμός μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή καρποσωμάτων με μακρύ στύπο και/ή κυρτούς πέλους με περιθώρια περισσότερο ή λιγότερο κυρτά προς τα μέσα. Επίσης τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά δεν είναι απολύτως αξιόπιστα, καθώς από τις συνθήκες καλλιέργειας μπορεί να επηρεαστεί το μήκος και η διάμετρος των σπορίων (Rajarathnam *et al.*, 1987).

Έτσι στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν αρκούν μόνο η μακροσκοπική παρατήρηση και οι μορφολογικοί χαρακτήρες για να γίνει η ταξινόμηση ενός στελέχους του γένους *Pleurotus*.

Μέθοδοι ταξινομικής και ταυτοποίησης μακρομυκήτων

A. Χρήση μορφολογικών, φυσιολογικών ή/και οικολογικών χαρακτήρων

Εδώ γίνεται χρήση των μορφολογικών χαρακτηριστικών (μακροσκοπικών και μικροσκοπικών) των ειδών, οι οποίοι σε συνδυασμό με επιλεγμένους φυσιολογικούς χαρακτήρες και πληροφορίες σχετικές με συγκεκριμένες οικολογικές παραμέτρους (π.χ. περίοδος εμφάνισης καρποφοριών, επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη συγκεκριμένη περίοδο, τύπος φυτικού υποστρώματος ή είδος φυτού ξενιστή), μπορούν να οδηγήσουν σε ταυτοποίηση του είδους. Λόγω όμως των αδυναμιών ή/και περιορισμών που μπορεί να εμφανίσει η συγκεκριμένη προσέγγιση (οι οποίες αναφέρθηκαν παραπάνω), συνήθως συνδυάζεται με μια ή περισσότερες άλλες μεθοδολογίες προσδιορισμού ειδών.

B. Χρήση διασταυρώσεων μεταξύ ομοκάρυων απομονώσεων (γενετική συμβατότητα)

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 στειρότητας. Συνεπώς, οι μελέτες για τη συμπεριφορά των μυκήτων σε δοκιμές διασταυρώσεων μεταξύ ομοκάρυων απομονώσεων για την παραγωγή δικαρούου μυκηλίου, εκτός από

τη συμβολή τους στη φυλογένεια, είναι πολύτιμες και για την επιβεβαίωση της ορθότητας των υπαρχόντων -μορφολογικά βασισμένων- ταξινομικών ομάδων και σε μύκητες του γένους *Pleurotus* (Moore, 1985, Zervakis and Balis, 1996, Zervakis, 1998, Isikhuemhen *et al.*, 2000, Larraya *et al.*, 2001, Zervakis *et al.*, 2004, Shnyreva *et al.*, 2006).

Γ. Χρήση πρωτεϊνών/ενζύμων

Μια άλλη μέθοδος είναι αυτή της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης πρωτεϊνών/ενζύμων, η οποία βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία και προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες (όπως και άλλα μακρομόρια όπως DNA και RNA). Η ταχύτητα μετακίνησης της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και το συντελεστή τριβής του μέσου ανάλυσης (καθορίζεται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πήκτωμα (συνήθως πολυακρυλαμίδης ή αμύλου), επειδή αυτό λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων κι επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές διαβαθμίσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό μορίων. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελούσε μια πολύ αξιόπιστη μέθοδο για αρκετά χρόνια (Zervakis and Balis, 1992, Zervakis *et al.*, 1994, Zervakis *et al.*, 2001), ενώ τείνει πλέον να αντικατασταθεί από τις πιο σύγχρονες μοριακές μεθόδους.

Δ. Χρήση μοριακών μεθοδολογιών

Επίσης ευρέως διαδεδομένες στην ταυτοποίηση άγνωστων οργανισμών είναι και οι μοριακές μέθοδοι. Ένα παράδειγμα τέτοιας μεθόδου είναι η ανάλυση της αλληλούχησης της εσωτερικά μεταγραφόμενης περιοχής (ITS) του ριβοσωμικού DNA (Isikhuemhen *et al.*, 2000, Zervakis *et al.*, 2004, Ro *et al.*, 2007), κατά την οποία απομονώνεται DNA από τον μύκητα και ενισχύονται με επιλεγμένους εκκινητές ('primers') συγκεκριμένα γονίδια (π.χ. η περιοχή ITS του rRNA μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με τους ITS1 και ITS4 primers, για να ακολουθήσει αλληλούχηση του και προσδιορισμός των ακολουθιών DNA). Μια

άλλη μέθοδος είναι αυτή του πολυμορφισμού περιορισμένου (από ενδονουκλεάσες) μήκους θραυσμάτων DNA (RFLP και PCR-RFLP), κατά την οποία το DNA (ολικό, μιτοχονδριακό, ριβοσωμικό) το οποίο έχει απομονωθεί, κατακερματίζεται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, για την παραγωγή μοριακών δεικτών που βοηθούν στο προσδιορισμό του είδους (Iraçabal *et al.*, 1995, Larraya *et al.*, 1999, Larraya *et al.*, 2000, Bao *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2007, Urbanelli *et al.*, 2007). Παρόμοια με την παραπάνω μέθοδο είναι και αυτή της τυχαίας ενίσχυσης πολυμορφικού DNA (RAPD), με τη διαφορά ότι εδώ χρησιμοποιούνται μικροί primers (των 8-12 νουκλεοτιδίων) που ενισχύουν τυχαία τμήματα του προς μελέτη DNA (Zervakis *et al.*, 2001, Capelari and Fungaro, 2003, Stajic *et al.*, 2005, Ro *et al.*, 2007, Ravash *et al.*, 2010, Khan *et al.*, 2011). Η συγκεκριμένη μέθοδος ανταποκρίνεται καλύτερα κατά τη μελέτη της ενδοειδικής ποικιλομορφίας (Shnyreva and Shtaer, 2006).

Τα τελευταία χρόνια, στους τρόπους ταυτοποίησης των μικροοργανισμών έχει μπει και η φασματοσκοπία η οποία φαίνεται να δίνει ενθαρρυντικά αποτελέσματα και στο πιο πολύπλοκο βασίλειο των μυκήτων. Στο γένος *Pleurotus* οι εργασίες είναι ελάχιστες, και μια από αυτές αφορά τη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας στην ανάλυση πρωτεϊνών του είδους *P. ostreatus* (Matis *et al.*, 2005).

Φασματοσκοπία

Εισαγωγή στη φασματοσκοπία

Η φασματοσκοπία είναι ο τομέας της επιστήμης ο οποίος ασχολείται με την αλληλεπίδραση διαφόρων τύπων ακτινοβολίας με την ύλη. Αρχικά το ενδιαφέρον είχε στραφεί μόνο στη επίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη. Πλέον όμως σήμερα η έννοια της φασματοσκοπίας έχει διευρυνθεί και περιλαμβάνει και φαινόμενα αλληλεπίδρασης της ύλης με άλλες μορφές ενέργειας.

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές στις οποίες χρησιμοποιείται τόσο ορατή όσο και υπεριώδη και υπέρυθη ακτινοβολία, ονομάζονται οπτικές τεχνικές (παρότι τόσο η υπεριώδης όσο και η ορατή ακτινοβολία δεν είναι ορατές από το ανθρώπινο μάτι), λόγω της ομοιότητας των οργάνων που χρησιμοποιούνται και για τις τρεις περιοχές του φάσματος του φωτός καθώς και του κοινού τρόπου με τον οποίο ερμηνεύονται οι αλληλεπιδράσεις τους με την ύλη.

Απορρόφηση της ακτινοβολίας

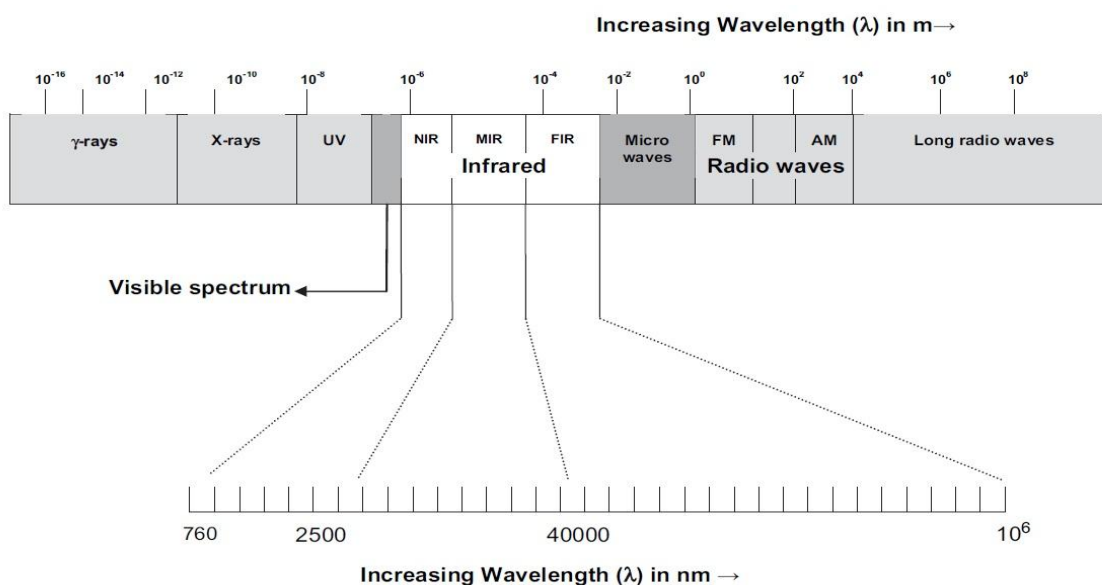
Όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διέρχεται μέσα από ένα στρώμα στερεού, υγρού ή αέριου, είναι δυνατόν να απομακρυνθούν εκλεκτικά με απορρόφηση μερικές συχνότητες ως αποτέλεσμα της μεταφοράς ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας στα άτομα, τα ιόντα ή τα μόρια, τα οποία συνθέτουν το δείγμα. Η απορρόφηση προάγει αυτά τα σωματίδια από τις κανονικές ή βασικές καταστάσεις τους σε μία ή περισσότερες διεγερμένες καταστάσεις υψηλότερης ενέργειας.

Σύμφωνα με τη κβαντική θεωρία, τα άτομα, μόρια ή ιόντα έχουν περιορισμένο αριθμό διακριτών ενεργειακών επιπέδων και έτσι για να απορροφηθεί ακτινοβολία πρέπει το φωτόνιο το οποίο θα προκαλέσει τη διέγερση, να έχει ακριβώς την ενέργεια που αντιστοιχεί στη διαφορά ενεργειών της βασικής και μιας διεγερμένης κατάστασης του σωματιδίου που το απορροφά. Επειδή αυτές οι διαφορές ενεργειών είναι μοναδικές για κάθε σωματίδιο, η μελέτη των συχνοτήτων της απορροφούμενης ακτινοβολίας παρέχει ένα μέσο για το χαρακτηρισμό των συστατικών ενός δείγματος μια ουσίας. Έτσι παρέχονται χαρακτηριστικά φάσματα της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος ή τη συχνότητα για την ουσία.

Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

Γενικά

Η υπέρυθη περιοχή του φάσματος περιλαμβάνει ακτινοβολίες των οποίων οι κυματάρθρωμοι κυμαίνονται από 12800 έως 10 cm^{-1} ή μήκη κύματος που κυμαίνονται από 0.78 έως $1000\text{ }\mu\text{m}^{-1}$ (στη φασματοσκοπία υπέρυθρου προτιμάται η χρήση της κλίμακας κυματάρθρωμων, λόγω της γραμμικής σχέσης της συγκεκριμένης μονάδας με την ενέργεια αλλά και τη συχνότητα) και βρίσκεται μεταξύ του ορατού και του τμήματος των ραδιοσυχνοτήτων. Το φάσμα του υπέρυθρου έτσι χωρίζεται σε τρεις περιοχές: σε εγγύς ($12800 - 4000\text{ cm}^{-1}$), μέσο ($4000 - 200\text{ cm}^{-1}$) και άπω υπέρυθρο ($200 - 10\text{ cm}^{-1}$). Η περισσότερο όμως χρησιμοποιούμενη περιοχή είναι αυτή των $4000 - 600\text{ cm}^{-1}$ (Γράφημα 1).



Γράφημα 1. Απεικόνιση των τριών περιοχών του υπέρυθρου φωτός (Santos *et al.*, 2010).

Όλες σχεδόν οι οργανικές και ανόργανες ουσίες με ομοσθενείς δεσμούς είναι σε θέση να απορροφήσουν ορισμένες συχνότητες στην παραπάνω περιοχή. Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας περιορίζεται στα μόρια στα οποία παρουσιάζονται μικρές ενεργειακές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δονητικών και περιστροφικών καταστάσεων. Έτσι ένα μόριο για να απορροφήσει υπέρυθη ακτινοβολία, πρέπει να υποστεί μεταβολή της διπολικής ροπής του ως αποτέλεσμα της δονητικής ή της περιστροφικής κίνησής του. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο της ακτινοβολίας μπορεί να αλληλεπιδράσει με το

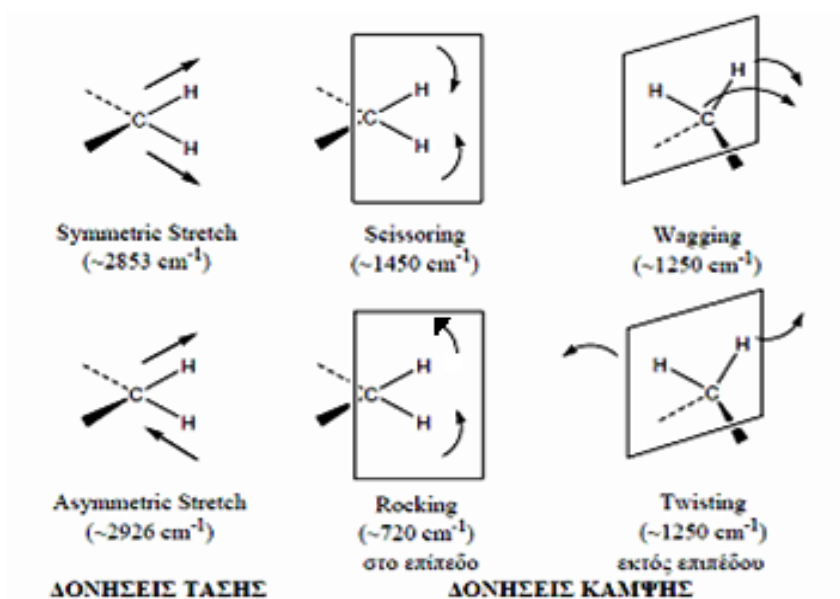
μόριο και να προκαλέσει αλλαγές στο μέγεθος κάποιας εκ των κινήσεών του. Στα ομοπυρηνικά διατομικά όμως μόρια (π.χ. O₂, N₂ κ.α.), όταν αυτά περιστρέφονται ή δονούνται, δεν πραγματοποιείται καθαρή μεταβολή στη διπολική ροπή. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι δεν απορροφούν στη υπέρυθρη περιοχή του φάσματος.

Είδη μοριακών δονήσεων

Οι σχετικές θέσεις των ατόμων σε ένα μόριο δεν είναι απόλυτα καθορισμένες, αλλά μεταβάλλονται συνεχώς ως αποτέλεσμα των διαφορετικών ειδών δονήσεων και περιστροφών γύρω από τους απλούς τους δεσμούς με το μόριο.

Υπάρχουν δύο βασικές μορφές δονήσεων :

- δονήσεις έκτασης ή τάσης (stretching): Χαρακτηρίζονται από μια συνεχή μεταβολή των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων, κατά μήκος του δεσμού τους χωρίς να αλλάζουν κατεύθυνση ή γωνία. Σε αυτές τις δονήσεις διακρίνουμε τις: μεμονωμένες (π.χ. δεσμός O-H, C=O) και τις συζευγμένες (π.χ. η ομάδα του μεθυλενίου =CH₂).
- δονήσεις κάμψης (bending): Χαρακτηρίζονται από αλλαγή στη γωνία μεταξύ δύο δεσμών. Αυτές οι δονήσεις διακρίνονται σε εκείνες που γίνονται εντός του επιπέδου ισορροπίας που σχηματίζεται από τρία άτομα και τους δεσμούς τους [ψαλιδοειδής (scissoring), λικνιζόμενη (rocking)] και εκείνες που γίνονται εκτός του επιπέδου ισορροπίας [παλλόμενη (wagging) ή συστρεφόμενη (twisting)]. (Εικόνα 20)



Εικόνα 20. Βασικές μορφές δονήσεων.

Η πρόβλεψη του αριθμού και των ειδών των δονήσεων, καθώς και του αν αυτές οι δονήσεις οδηγούν σε απορρόφηση, είναι συνήθως δυνατή μόνο στις περιπτώσεις απλών διατομικών και τριατομικών μορίων. Από εκεί και μετά η ανάλυση είναι αρκετά δύσκολη, αν όχι αδύνατη.

Πηγές και μεταλλάκτες υπέρυθρης ακτινοβολίας

Οι πηγές υπέρυθρου αποτελούνται από ένα αδρανές στερεό σώμα, το οποίο όταν θερμανθεί ηλεκτρικά σε μία θερμοκρασία μεταξύ 1500 και 2200 K, έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή συνεχούς ακτινοβολίας που προσεγγίζει αυτή του μέλανος σώματος. Σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, η ένταση μειώνεται ομαλά ώσπου να φτάσει στο 1% περίπου της μέγιστης τιμής της (στα 670 cm^{-1}).

Τέτοιες πηγές υπέρυθρου είναι:

- Πυρακτωτής Nerst: λειτουργεί όταν θερμανθεί σε θερμοκρασίες από 1200 έως 2200 K. Παρουσιάζει όμως υψηλό συντελεστή ηλεκτρικής αντίστασης, πράγμα που συνεπάγεται την ανάγκη εξωτερικής θέρμανσής του σε βαθμό ερυθροπυράκτωσης.
- Πηγή Globar: λειτουργεί όταν θερμανθεί ηλεκτρικά στους 1300 έως 1500 K. Πλεονεκτεί έναντι του Nerst στο ότι παρουσιάζει θετικό συντελεστή ηλεκτρικής αντίστασης, καθώς και στο ότι παρέχει σημαντικά εντονότερη ακτινοβολία σε μήκη κύματος κάτω από τα 5 μm . Όμως απαιτείται ψύξη των ηλεκτρικών επαφών με νερό για να αποφευχθεί η δημιουργία ηλεκτρικού τόξου.
- Πηγή πυρακτωμένου σύρματος: λειτουργεί όταν θερμανθεί με ηλεκτρικό ρεύμα στον 1100 K και πλεονεκτεί έναντι των Globar και Nerst στο ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, αλλά με κάπως μικρότερη ένταση.
- Τόξο υδραργύρου: χρησιμοποιείται για την περιοχή του άπω υπέρυθρου (με μήκος κύματος δηλαδή μεγαλύτερο από 50 μm) καθώς μπορεί να παρέχει ικανοποιητική ισχύς ακτινοβολίας (που δεν παρέχει καμία από τις τρεις προηγούμενες πηγές).
- Λυχνία νήματος βολφραμίου: αποτελεί την καταλληλότερη πηγή για την περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (δηλαδή για τα 4000 έως 12800 cm^{-1}).

- Πηγή laser διοξειδίου του άνθρακα: η πηγή αυτή παράγει μια ζώνη ακτινοβολίας μεταξύ 900 και 1100 cm^{-1} , και είναι χρήσιμη για το ποσοτικό προσδιορισμό πολλών ουσιών ιδιαίτερου ενδιαφέροντος (π.χ. αμμωνία, βενζόλιο, αιθανόλη κ.α.).

Οι μεταλλάκτες υπερύθρου διακρίνονται σε τρεις γενικούς τύπους:

- **Θερμικοί μεταλλάκτες:** η απόκρισή τους βασίζεται στο θερμικό αποτέλεσμα από την απορρόφηση της ακτινοβολίας και χρησιμοποιείται σε όλες τις περιοχές υπερύθρου, εκτός από εκείνες με τα μικρότερα μήκη κύματος. Έτσι η ακτινοβολία απορροφάται από ένα μικρό μέλαν σώμα και μετριέται η προκαλούμενη αύξηση της θερμοκρασίας. Το σημαντικότερο πρόβλημα των συγκεκριμένων μεταλλακτών είναι ο θερμικός θόρυβος από το περιβάλλον που αντιμετωπίζεται με την τοποθέτησή τους σε κενό.
- **Πυροηλεκτρικοί μεταλλάκτες:** κατασκευάζονται από κρυσταλλικούς δίσκους πυροηλεκτρικών υλικών, τα οποία είναι μονωτές με ιδιάζουσες θερμικές και ηλεκτρικές ιδιότητες. Το σημαντικότερο και πιο συχνά χρησιμοποιούμενο πυροηλεκτρικό υλικό που χρησιμοποιείται στη κατασκευή οργάνων ανίχνευσης υπερύθρου είναι η θειική τριγλυκίνη $[(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3\text{H}_2\text{SO}_4]$, η οποία είναι συνήθως δευτεριωμένη ή προκύπτει με μερική αντικατάσταση της γλυκίνης από την αλανίνη. Εμφανίζουν πολύ μικρούς χρόνους απόκρισης, καθιστώντας εφικτή την ανίχνευση θερμοκρασιακών μεταβολών στους χαμηλούς χρόνους που απαιτεί ένα συμβολόμετρο.
- **Φωτοαγώγιμοι μεταλλάκτες:** αποτελούνται από ένα λεπτό φιλμ ημιαγώγιμου υλικού (όπως ο θειούχος μόλυβδος, PbS), τα τελλουρίδια υδραργύρου/καδμίου (HgTe/CdTe) ή το αντιμονίδιο του ινδίου (InSb), που τοποθετείται σε μια μη αγώγιμη υάλινη επιφάνεια. Ο φωτοαγώγιμος μεταλλάκτης θειούχου μόλυβδου είναι ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος για την περιοχή του εγγύς υπερύθρου (10000 έως 333 cm^{-1}), ενώ ο μεταλλάκτης τελλουριδίων υδραργύρου/καδμίου, για την περιοχή του μέσου και άπω υπερύθρου.

Όργανα Υπερύθρου

Τα όργανα για τη μέτρηση της απορρόφησης υπερύθρου διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

1. Όργανα διασποράς, τα οποία διαθέτουν ένα φράγμα διασποράς της ακτινοβολίας και χρησιμοποιούνται κυρίως σε ποιοτικές μετρήσεις.
2. Πολυπλεκτικά όργανα μετασχηματισμού κατά Fourier, τα οποία χρησιμοποιούνται τόσο για ποιοτικές όσο και για ποσοτικές μετρήσεις.
3. Μη διασπείροντα φωτόμετρα, τα οποία έχουν αναπτυχθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών οργανικών ενώσεων στην ατμόσφαιρα με φασματοσκοπία απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης.

Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του '80, η λειτουργία των περισσότερων οργάνων για τη μέση υπέρυθη περιοχή του φάσματος βασιζόταν στη χρήση φραγμάτων περίθλασης. Από τότε όμως έχουν πραγματοποιηθεί δραματικές αλλαγές και έτσι πλέον η πλειονότητα των οργάνων βασίζεται στο μετασχηματισμό Fourier.

Η φασματοσκοπία υπερύθρου χρησιμοποιείται ευρύτατα, ενώ βρίσκει σημαντική εφαρμογή στον προσδιορισμό της δομής διαφόρων ενώσεων, στην ταυτοποίησή τους καθώς και στην ποσοτική ανάλυση (Πολυσίου, 1989, Χατζηιωάννου, 1990, Skoog, 2002).

Φασματοσκοπία Υπερύθρου-Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Η φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1950, από τους αστρονόμους, προκειμένου να γίνει μελέτη των φασμάτων υπερύθρου των απομακρυσμένων αστερών, με σκοπό να απομονωθούν τα πολύ ασθενή σήματα αυτών των πηγών από τον θόρυβο. Η πρώτη χημική εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier έγινε 10 χρόνια μετά και πραγματοποιήθηκε στην ενεργειακά φτωχή περιοχή του άπω υπέρυθρου. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 εμφανίστηκαν στο εμπόριο όργανα αυτού του τύπου που αποσκοπούσαν στη χημική μελέτη τόσο της άπω υπέρυθρης, όσο και της υπέρυθρης περιοχής.

Όταν τα φασματοφωτόμετρα υπερύθρου - μετασχηματισμού Fourier εμφανίστηκαν για πρώτη φορά στην αγορά, ήταν ογκώδη, υψηλού κόστους και απαιτούσαν συχνές μηχανικές ρυθμίσεις. Έτσι η χρήση τους περιοριζόταν σε ειδικές εφαρμογές όπου τα εξαιρετικά χαρακτηριστικά τους (ταχύτητα, υψηλή σταθερότητα, ευαισθησία και μεγάλη ακρίβεια) ήταν απολύτων απαραίτητα. Σήμερα όμως, τα φασματοφωτόμετρα FT-IR έχουν αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό τα, για πολλά χρόνια, πιο προσιτά όργανα διασποράς ακτινοβολίας, καθώς είναι πλέον πιο μικρά σε μέγεθος, οικονομικά και αξιόπιστα, ενώ επίσης συντηρούνται αρκετά πιο εύκολα.

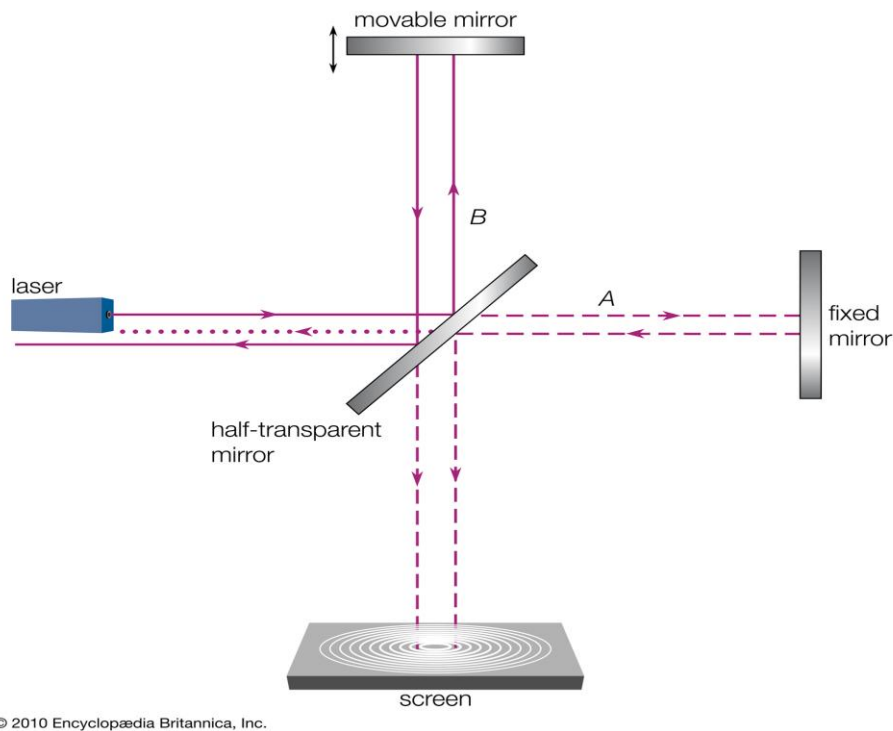
Η κωδικοποίηση επιτυγχάνεται με διαμοιρασμό της ακτινοβολίας της πηγής σε δύο δέσμες, των οποίων το μήκος της οπτικής διαδρομής μπορεί να μεταβάλλεται περιοδικά, για να παραχθεί το συμβολόγραμμα. Στη συνέχεια η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιείται με το μετασχηματισμό Fourier. Η ανάλυση Fourier είναι μια διεργασία κατά την οποία κάθε καμπύλη διαιρείται σε ένα άθροισμα σειρών ημιτονίων και συνημιτονίων, οι οποίες καλούνται σειρές Fourier.

Τμήματα ενός οργάνου μετασχηματισμού Fourier

Το σημαντικότερο τμήμα ενός φασματοφωτόμετρου υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier είναι το συμβολόμετρο το οποίο σχεδιάστηκε από το Albert Michelson το 1891.

Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 21, ένα συμβολόμετρο Michelson αποτελείται από:

1. Την πηγή ακτινοβολίας
2. Το διαχωριστή δέσμης
3. Ένα σταθερό κάτοπτρο
4. Ένα κινητό κάτοπτρο με μηχανισμό κίνησης
5. Τον ανιχνευτή
6. Τον υποδοχέα του δείγματος ανάμεσα στο συμβολόμετρο και τον ανιχνευτή



© 2010 Encyclopædia Britannica, Inc.

Εικόνα 21. Σχεδιάγραμμα συμβολόμετρου Michelson.

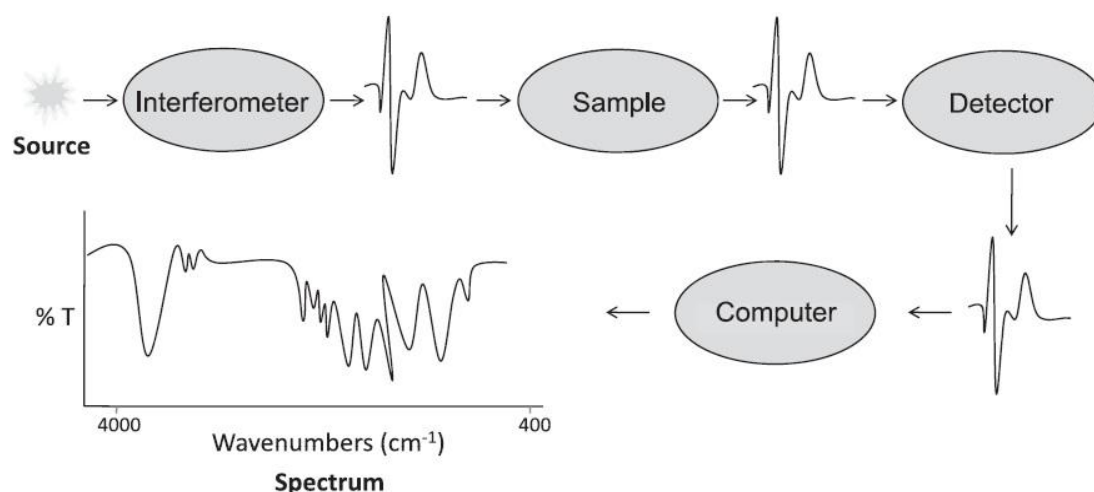
Όταν η φωτεινή δέσμη της πηγής ακτινοβολίας προσπίπτει στο διαχωριστή δέσμης, ένα μέρος της ανακλάται στο κινητό κάτοπτρο και ένα μέρος της μεταδίδεται στο σταθερό κάτοπτρο. Κατόπιν οι ακτίνες που ανακλώνται από τα κάτοπτρα επανέρχονται στο διαχωριστή, στον οποίο το μισό κάθε ακτίνας μεταδίδεται και το υπόλοιπο μισό ανακλάται. Έτσι μια επανενωμένη δέσμη διέρχεται στη διεύθυνση του ανιχνευτή και μια άλλη επανέρχεται πίσω στη πηγή (Γράφημα 2).

Οι διαχωριστές δέσμης κατασκευάζονται από διαφανή υλικά με κατάλληλα επιλεγμένους δείκτες διάθλασης, ώστε περίπου το 50% της ακτινοβολίας να ανακλάται και το υπόλοιπο 50% να τους διαπερνά. Υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι: λεπτά φιλμ από Mylar για την υπέρυθη περιοχή, ή φιλμ γερμανίου που έχουν αποτεθεί σε βρωμιούχο κάλιο για την μέση υπέρυθη περιοχή, ή μια επίστρωση οξειδίου του σιδήρου σε φθοριούχο ασβέστιο για την περιοχή του εγγύς υπέρυθρου.

Ο ανιχνευτής αντιλαμβάνεται την υπέρυθη ακτινοβολία που διέρχεται μέσα από το δείγμα. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι ανιχνευτή είναι αυτοί που χρησιμοποιούν δευτεριωμένη θεϊκή τριγλυκίνη (Deuterated TriGlycine Sulfate, DTGS). Η λειτουργία αυτού του τύπου ανιχνευτών στηρίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας του, που προκαλείται από την πρόσπτωση της υπέρυθρης ακτινοβολίας, η οποία έχει

προηγουμένως διέλθει από το δείγμα. Αποτέλεσμα αυτής της αύξησης θερμοκρασίας είναι η δημιουργία μιας διαφοράς δυναμικού.

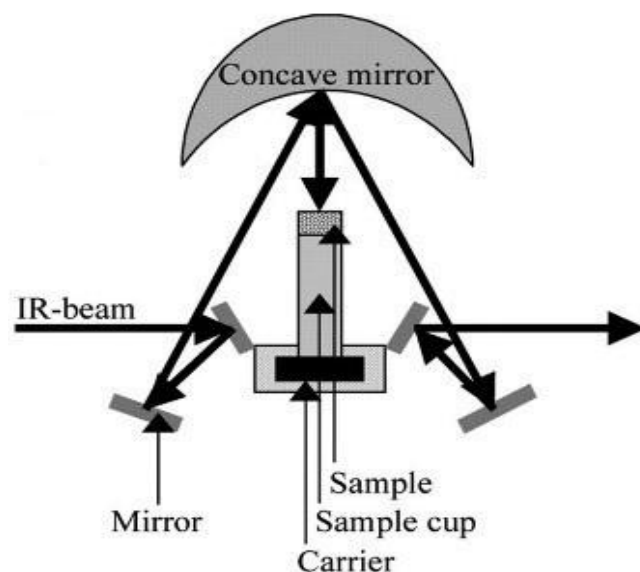
Η επανενωμένη δέσμη, που δημιουργείται τελικά από το διαχωριστή, περνά από το δείγμα, όπου πραγματοποιείται μερική ή ολική απορρόφηση ορισμένων συχνοτήτων της δέσμης. Κατόπιν η δέσμη κινείται προς τον ανιχνευτή όπου προκαλεί μεταβολή της διαφοράς δυναμικού. Τέλος γίνεται μετατροπή του αναλογικού αυτού σήματος σε ψηφιακό και εισέρχεται σε υπολογιστή, όπου με το κατάλληλο λογισμικό λαμβάνεται το συμβολόγραμμα. Αυτό, μετά από μετασχηματισμό κατά Fourier παίρνει τη μορφή του τυπικού φάσματος υπερέθρου μετασχηματισμού Fourier (Πολυσίου, 1989, Χατζηιωάννου, 1990, Skoog, 2002).



Γράφημα 2. Σχηματική απεικόνιση της πορείας της ακτινοβολίας μέσα από τα μέρη ενός φασματοφωτόμετρου (Santos *et al.*, 2010).

Διάχυτη ανάκλαση φασματοσκοπίας υπερέθρου μετασχηματισμού Fourier (DRIFTS)

Αποτελεί πλέον μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για την λήψη φασμάτων από στερεά δείγματα. Αυτό το οφείλει στην μεγάλη ευκολία προετοιμασίας του δείγματος, καθώς δεν απαιτεί προηγούμενη κατεργασία του για την τοποθέτηση του στο μηχάνημα εκτός τις λυοτρίβισης και της τυχόν ανάμειξής του με KBr. Έτσι η τεχνική αυτή είναι απλή και πολύ γρήγορη. Αφού το στερεό δείγμα μετατραπεί σε πολύ ψιλή σκόνη (πούδρα), ελάχιστη ποσότητα τοποθετείται στον ειδικό υποδοχέα (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση οργάνου DRIFTS.

Πλεονεκτήματα φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier

Η συγκεκριμένη τεχνική παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα τα σημαντικότερα των οποίων είναι:

- ικανότητα μέτρησης πολύ ασθενών σημάτων λόγω του ότι αποτελούνται από λίγα μόνο οπτικά στοιχεία, ενώ καμία σχισμή δεν εξασθενεί την ακτινοβολία. Έτσι τα οπτικά τους συστήματα εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ενεργειακή απόδοση σε σχέση με τα όργανα διασποράς
- ο λόγος σήματος προς θόρυβο είναι μεγαλύτερος, κατά τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους σε σχέση με τα καλής ποιότητα φασματοφωτόμετρα διασποράς
- εμφανίζουν υψηλή διακριτική ισχύ ($0,1 \text{ cm}^{-1}$) και συνεπώς μεγάλη ακρίβεια αλλά και επαναληψιμότητα
- όλη η πληροφορία που βρίσκεται στην ακτινοβολία φθάνει συγχρόνως στον ανιχνευτή και έτσι εξασφαλίζεται συλλογή των δεδομένων για ολόκληρο το φάσμα σε ελάχιστο χρόνο, πολλές φορές και λιγότερο του δευτερολέπτου.

(Skoog, 2002)

Ερμηνεία φασμάτων

Σ' ένα υπέρυθρο φάσμα διακρίνονται οι περιοχές:

- των χαρακτηριστικών ομάδων
- του δακτυλικού αποτυπώματος

Η περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων εντοπίζεται σε κυματάριθμους από 4000 έως 1400 cm^{-1} . Σ' αυτή τη περιοχή η απορρόφηση οφείλεται στη δόνηση των διατομικών ομάδων με συχνότητα χαρακτηριστική των μαζών και της σταθεράς δύναμης που τα συνδέει, ενώ επηρεάζονται ελάχιστα από τη δόνηση του υπόλοιπου μορίου.

Η περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος εκτείνεται από τα 1400 έως τα 600 cm^{-1} . Εδώ η απορρόφηση σχετίζεται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου και κάθε άτομο επιδρά στα υπόλοιπα άτομα και στη συνολική δόνηση του μορίου. Η πληροφορία που λαμβάνεται από αυτή την περιοχή είναι μοναδική για κάθε μόριο και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή του κατά τη σύγκρισή του με φάσματα αναφοράς.

Πίνακας 1. Κορυφές απορρόφησης και ερμηνεία τους (Kamnev *et al.*, 1999, Mohacek-Grosev *et al.*, 2001, Naumann *et al.*, 2005 και Salman *et al.*, 2010).

Κυματάριθμος (cm^{-1})	Απόδοση
$\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$	Τάση C=O (Φωσφολιπίδια)
$\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$	Τάση C=O, C=N (Αμίδιο I των πρωτεϊνών)
$\sim 1548 \text{ cm}^{-1}$	Κάμψη N-H (Αμίδιο II των πρωτεϊνών)
$\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$	Κάμψη των τερματικών μεθυλομάδων (-CH ₃) (Λιπίδια)
$\sim 1406 \text{ cm}^{-1}$	
$\sim 1320 \text{ cm}^{-1}$	Τάση C-N (Αμίδιο III των πρωτεϊνών)

~1246 cm ⁻¹	Αντισυμμετρική τάση του PO ₂ ⁻ των φωσφολιπιδίων
~1150 cm ⁻¹	Τάση C-O (Υδατάνθρακες)
~1110 cm ⁻¹	
~1086 cm ⁻¹	Συμμετρική τάση PO ₂ (Νουκλεϊκά οξέα)
~1055 cm ⁻¹	Τάση C-O (Υδατάνθρακες)
~1002 cm ⁻¹	Τάση C-O, C-N
~900 cm ⁻¹ (δεν προσδιορίζεται ακριβώς)	Παραμόρφωση C-H (β-ανωμερές γλουκάνης)
~800 cm ⁻¹ (δεν προσδιορίζεται ακριβώς)	Παραμόρφωση C-H (α-ανωμερές γλουκάνης)

Εφαρμογές φασματοσκοπίας FT-IR

Η φασματοσκοπία FT-IR έχει πλέον αρχίσει να χρησιμοποιείται πάρα πολύ αφού είναι σε θέση να προσδιορίσει και να μετρήσει τις συγκεντρώσεις πολλών χημικών στοιχείων μέσω μέτρησης των φασμάτων τους και με χαμηλό έως μηδενικό κόστος λειτουργίας. Βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς, από τη βαριά βιομηχανία μέχρι τα τρόφιμα και τους μικροοργανισμούς. Ενδεικτικά:

Οι Hofman *et al.* (1996) χρησιμοποίησαν την FT-IR για αποδείξουν την αύξηση της ανθεκτικότητας των επικαλύψεων SiO₂ σε κράματα μετάλλων, όταν αυτές γίνονται σε περιβάλλοντα με υψηλότερη υγρασία, μέσω αύξησης των ομάδων σιλανόλης. Η Coricona *et al.* (2001) επέτυχε τον ποιοτικό προσδιορισμό των υδροκολλοειδών σε τρόφιμα και γλυκά μέσω της φασματοσκοπίας μέσου υπερύθρου. Απέδειξε ότι μπορεί επάξια να αντικαταστήσει τη χρωματογραφία που χρησιμοποιείται για αυτό το σκοπό καθώς η φασματοσκοπία αποτελεί μια ευκολότερη μέθοδο, λόγο του ότι δεν υπάρχει ανάγκη υδρόλυσης των απομονωμένων υδροκολλοειδών για την ταυτοποίησή τους.

Μια άλλη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR είναι η χρήση της στην ταυτοποίηση γύρης (Pappas *et al.*, 2003), γάλακτος (Pappas *et al.*, 2008) καθώς και κρασιού (Tarantilis *et al.*, 2008). Στις συγκεκριμένες εργασίες λήφθηκαν τα φάσματα από γνωστά δείγματα και δημιουργήθηκε μια βάση δεδομένων από αυτά. Κατόπιν εισάγοντας άγνωστα δείγματα στη συγκεκριμένη βάση δεδομένων, πραγματοποιούσαν την ταυτοποίησή τους. Παρόμοια εργασία έχει πραγματοποιηθεί και για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό μοσχαρίσιου κρέατος με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR (Argyri *et al.*, 2010).

Εκτός όμως από τα τρόφιμα και τη βιομηχανία, σημαντική δουλειά έχει γίνει με την φασματοσκοπία FT-IR και σε επίπεδο μικροοργανισμών. Οι Mohacek-Grosec *et al.* (2001) έκαναν διάκριση ασκομυκήτων και βασιδιομυκήτων με βάση την ταυτοποίηση των α- και β- γλουκανών από τα φάσματα που λήφθηκαν από σπόρια και καρποφορίες 70 διαφορετικών ειδών και 37 γενών. Το 2005 οι Naumann *et al.* χρησιμοποίησε την τεχνική για ταυτοποίηση των μυκήτων που προκαλούν αδρομυκώσεις απευθείας από τμήματα αγγείων του ξύλου. Παρόμοιες εργασίες στον τομέα της ταυτοποίησης μυκήτων πραγματοποιήθηκαν και από τους Fischer *et al.* (2005), Liker and Tsror, (2008), Naumann (2008), Salman *et al.* (2010) και Santos *et al.* (2010). Εκτός όμως από την ταυτοποίηση μυκήτων, η φασματοσκοπία FT-IR μπορεί να μας δώσει πληροφορίες και για την ανάπτυξη των υφών και των σπορίων, συμπληρώνοντας έτσι τις μοριακές τεχνικές (Kaminskyj *et al.*, 2007).

Τέλος σημαντική δουλειά έχει γίνει και από τους Kamnev *et al.* (2002, 2005, 2008) σε επίπεδο βακτηρίων, οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση των βαρέων μετάλλων σε διαφορετικά στελέχη ενδοφυτικών και μη ειδών καθώς και τη συμπεριφορά τους σε τέτοιες συνθήκες stress. Επίσης οι Zoumproulou *et al.* (2010); εξέτασαν την αντιμικροβιακή δράση στελεχών *Lactobacillus* καθώς και τη συσσώρευση αντιμικροβιακών ενώσεων σε κύτταρα του βακτηρίου *Salmonella enterica* var. *typhimurium*.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διαπιστώσει την δυνατότητα αξιοποίησης της φασματοσκοπίας υπερύθρου κατά μετασχηματισμό Fourier στην ταυτοποίηση μυκήτων του γένους *Pleurotus*. Έτσι επιχειρήθηκε διάκριση τόσο σε επίπεδο είδους όσο και σε επίπεδο στελέχους, καθώς και διαχωρισμός του γένους *Pleurotus* από άλλα γένη του ίδιου (Βασιδιομύκητες) ή άλλου φύλου (Ασκομύκητες). Επίσης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τη διαπίστωση διαφορών μεταξύ διαφορετικών τύπων δείγματος βιολογικού υλικού (μυκήλιο, βασιδιοσπόρια και βασιδιόματα) καθώς και μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων ανάπτυξης των μυκήτων.

Υ λ ι κ ά κ α ι μ έ θ ο δ ο ι

Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μυκήλια που λήφθηκαν από απομονώσεις δικάρυων στελεχών μυκήτων του γένους *Pleurotus*.

Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν στελέχη από τα παρακάτω είδη/taxa:

- *P. abalonus* Y.H. Han, K.M. Chen & S. Cheng (2 στελέχη)
- *P. abieticola* R.H. Petersen & K.W. Hughes (1 στέλεχος)
- *P. australis* Sacc. (1 στέλεχος)
- *P. calyptratus* (Lindblad ex Fr.) Sacc. (1 στέλεχος)
- *P. citrinopileatus* Singer (1 στέλεχος)
- *P. columbinus* Quéf. (1 στέλεχος)
- *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland (1 στέλεχος)

- *P. cystidiosus* O.K. Mill. (11 στελέχη)
- *P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn (1 στέλεχος)
- *P. dryinus* (Pers.) P. Kumm. (6 στελέχη)
- *P. eryngii* (D.C.) Quél. (22 στελέχη)
- *P. flabellatus* (Berk. & Broome) Sacc. (1 στέλεχος)
- *P. nebrodensis* (Inzenga) Quél. (12 στελέχη)
- *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (9 στελέχη)
- *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. (5 στελέχη)
- *P. sajor-caju* (Fr.) Singer (4 στελέχη)
- *P. sapidus* (Schulzer) Sacc. (1 στέλεχος)
- *P. tuberregium* (Fr.) Singer (2 στελέχη)

τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Κατάλογος στελεχών *Pleurotus* και λοιπών γενών μακρομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

a/a	Είδος	Ξενιστής/ Υπόστρωμα	Γεωγραφική προέλευση	Κωδικός Συλλογής	Συντομογραφία
1	<i>P. abalonus</i>		Japan	LGMACC 39	P.ab.
2	<i>P. abalonus</i>		Japan	LGMACC-PO37	P.ab.
3	<i>P. abieticola</i>			MUCL44554	P.abiet.
4	<i>P. australis</i> ¹	<i>Atherosperma</i> sp.	Australia	D 2245.11	P.aus.
5	<i>P. calyptratus</i>	<i>Populus alba</i>	ex- Czechoslovakia	MUCL 28909	P.cp.
6	<i>P. citrinopileatus</i> ¹		Malaysia	MUCL 28684	P.citrino
7	<i>P. columbinus</i> ¹		Italy	CBS 37351	P.cl.
8	<i>P. cornucopiae</i>		Iran	Saber 660	P.cr.
9	<i>P. cystidiosus</i>		Japan	ASIK 2	P.cs.
10	<i>P. cystidiosus</i>	<i>Populus</i> <i>deltoides</i>	USA	ATCC 28597	P.cs.
11	<i>P. cystidiosus</i>	Mine timbers	South Africa	ATCC 28598	P.cs.
12	<i>P. cystidiosus</i>		China	CBS 80391	P.cs.

13	<i>P. cystidiosus</i> ¹	<i>L. styraciflua</i>	USA	CFMR 6474	P.cs.
14	<i>P. cystidiosus</i>		Thailand	DSM 5335	P.cs.
15	<i>P. cystidiosus</i>		Philippines	FCUP 661	P.cs.
16	<i>P. cystidiosus</i>	<i>Aphananthe aspera</i>	Japan	IFO 31074	P.cs.
17	<i>P. cystidiosus</i> ¹	<i>Ficus carica</i>	Greece	LGAM P50	P.cs.
18	<i>P. cystidiosus</i>	<i>Populus nigra</i>	Greece	LGAM P100	P.cs.
19	<i>P. cystidiosus</i>	<i>Ficus carica</i>	Greece	LGAM P164	P.cs.
20	<i>P. djamor</i> ¹			CAS Y55	P.djamor
21	<i>P. dryinus</i>	<i>Malus sylvestris</i>	ex-Czechoslovakia	CBS 44977	P.dr.
22	<i>P. dryinus</i>	Hardwood	Netherlands	CBS 72483	P.dr.
23	<i>P. dryinus</i>	<i>Malus silvestris</i>	Netherlands	CBS 80485	P.dr.
24	<i>P. dryinus</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	Greece	LGAM P114	P.dr.
25	<i>P. dryinus</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	Greece	LGAM P157	P.dr.
26	<i>P. dryinus</i>	<i>Abies cephalonica</i>	Greece	LGAM P159	P.dr.
27	<i>P. eryngii</i>			ATCC 36047	P.er.
28	<i>P. eryngii</i>			LGMACC 80A	P.er.
29	<i>P. eryngii</i>		France	LGMACC 81	P.er.
30	<i>P. eryngii</i>		France	LGMACC 831101	P.er.
31	<i>P. eryngii</i>		France	LGMACC 831102	P.er.
32	<i>P. eryngii</i>			CAS Y4	P.er.
33	<i>P. eryngii</i>			CAS Y607	P.er.
34	<i>P. eryngii</i> var. <i>eryngii</i> ¹	<i>Eryngium</i> sp.	Greece	LGAM P63	P.er.

35	<i>P. eryngii</i> var. <i>eryngii</i>	<i>Eryngium</i> sp.	Greece	LGAM P64	P.er.
36	<i>P. eryngii</i> var. <i>eryngii</i>	<i>Eryngium</i> sp.	Greece	LGAM P101	P.er.
37	<i>P. eryngii</i> var. <i>eryngii</i>	<i>Eryngium</i> <i>campestre</i>	Italy	UPA 10	P.er.
38	<i>P. eryngii</i> var. <i>eryngii</i>	<i>Eryngium</i> <i>campestre</i>	Italy	UPA 12	P.er.
39	<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	<i>Ferula</i> sp.	Greece	LGAM P66	P.er.
40	<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	<i>Ferula</i> sp.	Greece	LGAM P102	P.er.
41	<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	<i>Ferula</i> sp.	Greece	LGAM P124	P.er.
42	<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	<i>Ferula</i> sp.	Greece	LGAM P125	P.er.
43	<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	<i>Ferula</i> sp.	Greece	LGAM P156	P.er.
44	<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	<i>Ferula</i> sp.	Greece	LGAM P160	P.er.
45	<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	<i>Ferula</i> sp.	Greece	LGAM P169	P.er.
46	<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	<i>Ferula</i> sp.	Italy	LGMACC 841043	P.er.
47	<i>P.eryngii</i> var. <i>thapsiae</i>	<i>Thapsia</i> <i>garganica</i>	Italy	UPA 5	P.er.
48	<i>P.eryngii</i> var. <i>thapsiae</i>	<i>Thapsia</i> <i>garganica</i>	Italy	UPA 27	P.er.
49	<i>P. flabellatus</i> ¹			CAS Y60	P.flab.
50	<i>P. nebrodensis</i>	Εμπορικό στέλεχος	China	LGAM P147	P.nebro

51	<i>P. nebrodensis</i>	<i>Cachrys ferulacea</i>	Greece	LGAM P162	P.nebro
52	<i>P. nebrodensis</i>	<i>Cachrys ferulacea</i>	Greece	LGAM P163	P.nebro
53	<i>P. nebrodensis</i>	<i>Cachrys ferulacea</i>	Greece	LGAM P177	P.nebro
54	<i>P. nebrodensis</i>	<i>Cachrys ferulacea</i>	Greece	LGAM P178	P.nebro
55	<i>P. nebrodensis</i>	<i>Cachrys ferulacea</i>	Italy	UPA 6	P.nebro
56	<i>P. nebrodensis</i>	<i>Cachrys ferulacea</i>	Italy	UPA 8	P.nebro
57	<i>P. nebrodensis</i>	<i>Cachrys ferulacea</i>	Italy	UPA 9	P.nebro
58	<i>P. nebrodensis</i> ¹	<i>Cachrys ferulacea</i>	Italy	UPA 28	P.nebro
59	<i>P. nebrodensis</i>	<i>Cachrys ferulacea</i>	Italy	UPA 32	P.nebro
60	<i>P. nebrodensis</i>		China	CAS Y456	P.nebro
61	<i>P. nebrodensis</i>		China	CAS Y596	P.nebro
62	<i>P. ostreatus</i> ¹		Italy	CBS 29147	P.os.
63	<i>P. ostreatus</i>			CCBAS 443	P.os.
64	<i>P. ostreatus</i> ²	<i>Fagus sylvatica</i>	Greece	LGAM P38	P.os.
65	<i>P. ostreatus</i>	<i>Abies cephalonica</i>	Greece	LGAM P67	P.os.
66	<i>P. ostreatus</i> ²	<i>Abies cephalonica</i>	Greece	LGAM P104	P.os.
67	<i>P. ostreatus</i> ²	<i>Abies cephalonica</i>	Greece	LGAM P105	P.os.
68	<i>P. ostreatus</i> ^{2,3}	<i>Fagus sylvatica</i>	Greece	LGAM P112	P.os.

69	<i>P. ostreatus</i> ^{2,3}	<i>Abies cephalonica</i>	Greece	LGAM P113	P.os.
70	<i>P. ostreatus</i> ^{2,3}	<i>Abies cephalonica</i>	Greece	LGAM P123	P.os.
71	<i>P. ostreatus</i> ^{2,3}	<i>Populus nigra</i>	Greece	LGAM P146	P.os.
72	<i>P. ostreatus</i> ²	<i>Populus nigra</i>	Greece	LGAM P149	P.os.
73	<i>P. ostreatus</i> ^{2,3}	<i>Brachychiton</i>	Greece	LGAM P153	P.os.
74	<i>P. pulmonarius</i> ²	<i>Fagus sylvatica</i>	Greece	LGAM P12	P.pl.
75	<i>P. pulmonarius</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	Greece	LGAM P16	P.pl.
76	<i>P. pulmonarius</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	Greece	LGAM P47	P.pl.
77	<i>P. pulmonarius</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	Greece	LGAM P111	P.pl.
78	<i>P. pulmonarius</i> ¹	<i>Fagus sylvatica</i>	Greece	LGAM P133	P.pl.
79	<i>P. pulmonarius</i>		France	LGMACC 850403	P.pl.
80	<i>P. sajor-caju</i> ¹		India	LGMACC 37	P.sc.
81	<i>P. sajor-caju</i> ¹		Malaisia	MUCL 28683	P.sc.
82	<i>P. sajor-caju</i>		Hong Kong	MUCL 29757	P.sc.
83	<i>P. sajor-caju</i>			CCBAS 666	P.sc.
84	<i>P. sapidus</i>	Hardwood	USA	ATCC 24986	P.sp.
85	<i>P. tuberregium</i>			MBFBC 81	P.tr.
86	<i>P. tuberregium</i> ¹			MUCL 44822	P.tr.
87	<i>Auricularia auricula-judae</i>		Greece	LGAM 466	A.judae
88	<i>Chlorophyllum agaricoides</i>		Greece	LGAM 294	E.agaricoides
89	<i>Dichomitus squalens</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	Greece	LGAM 342	D.squalens

90	<i>Morchella conica</i>	<i>Pinus halepensis</i>	Greece	NAGREF-IK22	M.conica
91	<i>Tyromyces chioneus</i>		Greece	LGAM 454	T.chioneus

1: Αξιολογήθηκε και υποστρώμα CM.

2: Αξιολογήθηκαν και βασιδιοσπόρια.

3: Αξιολογήθηκαν και βασιδιόματα.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν -για λόγους συγκριτικής αξιολόγησης- απομονώσεις και άλλων πέντε ειδών από διαφορετικά γένη, οικογένειες ή/και φύλα:

- *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quéf.
- *Dichomitus squalens* (P. Karst.) D.A. Reid
- *Chlorophyllum agaricoides* (Czern.) Vellinga (syn. *Endoptychum agaricoides*)
- *Morchella conica* Pers.
- *Tyromyces chioneus* (Fr.) P. Karst.

Επιπλέον εκτός από το μυκήλιο που προήλθε από καθαρές καλλιέργειες του μύκητα, εξετάστηκαν συγκριτικά και βασιδιοσπόρια, καθώς και τμήματα από αποξηραμένες καρποφορίες που προέρχονταν από τις Συλλογές Μυκητιακού Υλικού του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ (Συλλογή Δειγμάτων Βασιδιοσπορίων και Συλλογή Αποξηραμένων Δειγμάτων Μακρομυκήτων - Herbarium, αντίστοιχα) των ειδών *P. ostreatus* και *P. pulmonarius*.

Θρεπτικά υλικά

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Potato Dextrose Agar (PDA - Eur. Pharm.) [39g/ 1L]: Χρησιμοποιήθηκε ως το βασικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια όλων των στελεχών που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη.
2. Cellulose Medium (CM): 10 g σκόνη κυτταρίνης χρωματογραφίας (Schleicher & Schüll, Selecta), 0,5 g ασπαραγίνη, 0,5 g εκχύλισμα ζύμης, 0,5 g (NH₄)₂SO₄, 1 g K₃PO₄, 0,5 g KCl, 0,2 g MgSO₄·7H₂O, 0,1 g CaCl₂, 18 g άγαρ (ανά 1L). Χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια επιλεγμένων στελεχών (όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2) ώστε να αξιολογηθούν συγκριτικά τα

αποτελέσματα των αναλύσεων μετά την ανάπτυξη των μυκήτων *Pleurotus* σε δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα και τον έλεγχο τυχόν διαφορών στα παραλαμβανόμενα φάσματα.

Όλα τα υποστρώματα αμέσως μετά την παρασκευή τους τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο και αποστειρώθηκαν στους 121°C για 20 λεπτά. Κατόπιν αφέθηκαν να κρυώσουν και χρησιμοποιήθηκαν για την πλήρωση τρυβλίων (περίπου 15ml ανά τρυβλίο).

Παραγωγή καλλιιεργειών

Και για τα δύο θρεπτικά υλικά ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Εντός του θαλάμου νηματικής ροής έγινε εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού μέσω δισκίου-εμβολίου (που παραλήφθηκε από τη μητρική καλλιέργεια) το οποίο τοποθετήθηκε στο κέντρο του τρυβλίου.
- Από κάθε στέλεχος σχηματίστηκαν τρεις καλλιέργειες (δηλ. τρεις επαναλήψεις).
- Κατόπιν τα εμβολιασμένα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτάδι για περίπου 10-15 ημέρες (μέχρι να καλύψουν τα 2/3 της επιφάνειας του θρεπτικού υλικού στο τρυβλίο).

Λήψη και χειρισμός μυκηλίου των καλλιιεργειών

Μόλις οι υφές κάλυψαν τα 2/3 της επιφάνειας του θρεπτικού υλικού στο τρυβλίο (δηλ. κατά τη φάση της ενεργούς αύξησης τους) έγινε η συγκομιδή του μυκηλίου. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε με πολύ προσοχή ώστε να παραληφθεί μόνο το μυκήλιο και όχι το θρεπτικό υλικό, η παρουσία του οποίου μπορεί να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα στην FT-IR ανάλυση. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε μικροβιακή βελόνα η οποία ήταν λυγισμένη στο άκρο της και μετά από κάθε λήψη ακολουθούσε επιμελής καθαρισμός της. Το μυκήλιο που συγκομίζονταν τοποθετούνταν σε σωλήνες erpendorf . Κατόπιν ακολουθούσε ψύξη των δειγμάτων στους -80°C για 40-50 λεπτά και λυοφυλίωσή τους για 19-20 ώρες, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία. Τέλος τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -20°C μέχρι τη μέτρησή τους.

Για να εκτιμηθεί η τυχόν επίδραση της φύσης του βιολογικού υλικού στα παραλαμβανόμενα φάσματα FT-IR, αναλύθηκαν -επιπλέον των μυκηλιακών δειγμάτων- και δείγματα που παραλήφθηκαν από βασιδιοσπόρια και από αποξηραμένα βασιδιόματα ορισμένων στελεχών τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 2.



Εικόνα 22. Μηχάνημα μέτρησης απορρόφησης υπερύθρου ακτινοβολίας.

Χειρισμός δειγμάτων και λήψη φασμάτων

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Thermo Nicolet 6700 (Εικόνα 22), ενώ το πρόγραμμα λειτουργίας του ήταν το Omnic 7.3. Η μέθοδος που υιοθετήθηκε για τη μέτρηση ήταν η DRIFTS (Diffuse Reflectance Infra-red Fourier Transform).

Πριν από τη λήψη του φάσματος οποιουδήποτε δείγματος έγινε η λήψη του υποβάθρου ("background") με KBr. Έτσι προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα του χώρου σε υγρασία και CO₂, ώστε να αφαιρεθεί αργότερα από το δείγμα μέσω του προγράμματος.

Για να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις των δειγμάτων, έπρεπε πρώτα αυτά να μετατραπούν σε πολύ λεπτή σκόνη (πούδρα). Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε μικρό γουδάκι το οποίο καθαριζόταν επιμελώς πριν από κάθε δείγμα ή επανάληψη του ίδιου δείγματος. Κατόπιν γέμιζε με επαρκή ποσότητα δείγματος ο ειδικός σχετικός υποδοχέας του φασματοφωτόμετρου και ακολούθως λαμβάνονταν τα φάσματα.

Επεξεργασία φασμάτων

Τα φάσματα που λήφθηκαν, επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Omnic 7.3. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του θορύβου του αρχικού φάσματος που προκαλείται από την υγρασία, μέσω της εντολής "automatic smooth", σε κάθε μία από τις τρεις επαναλήψεις και στη συνέχεια βγήκε ο μέσος όρος των τριών. Κατόπιν έγινε διόρθωση της βασικής γραμμής με την εντολή "automatic baseline correct" του προγράμματος. Ακολούθως έγινε εξαγωγή των αποτελεσμάτων σε αρχείο excel.

Σε κάθε περιοχή στην οποία επικεντρωθήκαμε, έγινε αρχικά μια διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct), που είχε ως σκοπό, η κορυφή που θέλαμε να συγκρίνουμε και να αξιολογήσουμε, να κατέβει στη βασική γραμμή ώστε να αποφευχθούν λάθη από τυχόν μετατόπιση ολόκληρου του φάσματος προς τα πάνω ή κάτω λόγω ποσοτικών διαφορών του δείγματος.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα από την επεξεργασία των φασμάτων εξήχθησαν σε αρχείο excel και εισαγωγή των δεδομένων στο πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 19 για τη δημιουργία δένδρογραμμάτων με τη μέθοδο ward και με την ευκλείδεια απόσταση. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι σχεδιασμένη να ελαχιστοποιεί την διακύμανση μέσα σε ομάδες. Δημιουργεί ομάδες με παρόμοιο αριθμό παρατηρήσεων και αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο ομαδοποίησης.

Πειραματικός σχεδιασμός

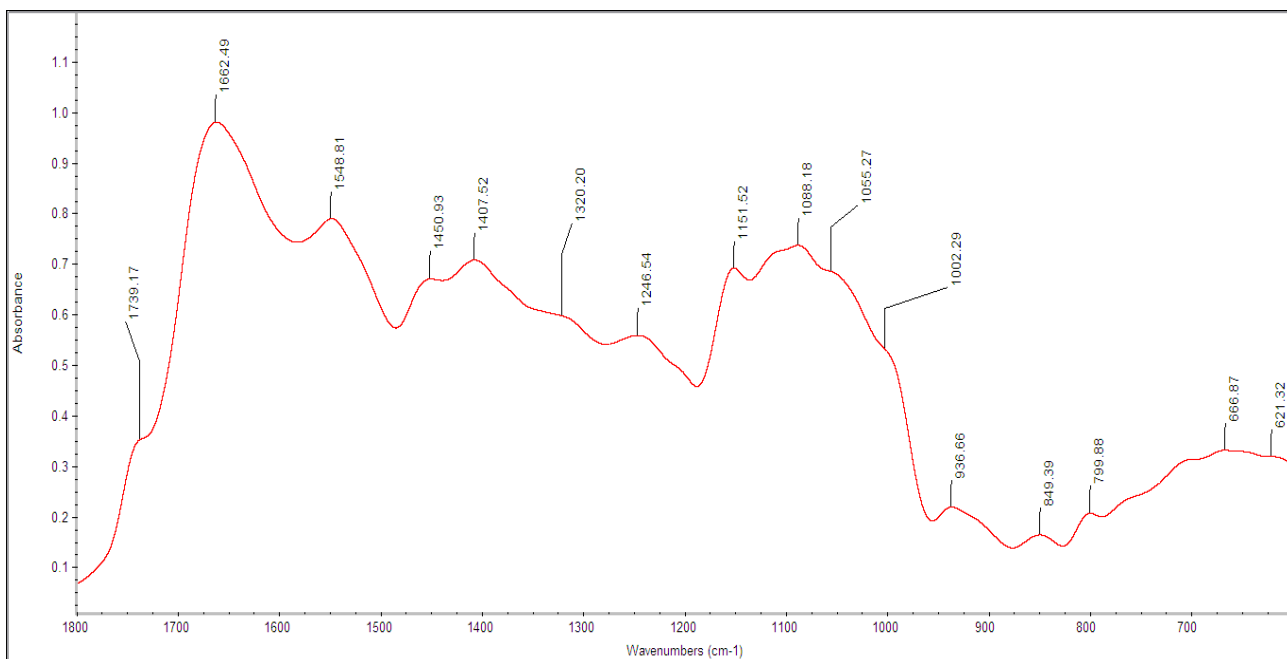
Αρχικά έγινε μια πρώτη εκτίμηση με τη δημιουργία ενός μέσου φάσματος για κάθε είδος το οποίο προέκυπτε από το μέσο όρο των φασμάτων όλων των στελεχών του είδους. Κατόπιν δημιουργήθηκε μία μήτρα δυαδικού συστήματος (όπου δηλώνονταν με '1' η παρουσία κορυφή στο συγκεκριμένο κυματάριθμο και με '0' η απουσία), τόσο για το διαχωρισμό των ειδών *Pleurotus* από τα υπόλοιπα γένη, καθώς και για τη συμπεριφορά των ειδών μεταξύ τους.

Στη συνέχεια, σε επίπεδο στελέχους, ακολουθήθηκε διαδικασία ταυτοποίησης ενός άγνωστου στελέχους, η οποία κατά βήματα οδήγησε σταδιακά στην ορθή ταξινόμησή του. Η προσέγγιση που υιοθετήθηκε ήταν η διαδικασία σταδιακής (βήμα-βήμα, 'stepwise') επιλογής ανάμεσα σε δύο πιθανά ενδεχόμενα (τύπου "βοτανικής κλείδας") και η δημιουργία νέων δενδρογραμμάτων μέχρι την ταυτοποίηση ενός «άγνωστου» δείγματος σε επίπεδο είδους.

Αποτελέσματα

Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη περιοχή των φασμάτων του υπερύθρου, είναι αυτή του μέσου υπερύθρου ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$), και πιο συγκεκριμένα η περιοχή μεταξύ 1800 και 600 cm^{-1} , καθώς εκεί δεν παρατηρούνται τόσο έντονα οι επιδράσεις του νερού και του CO_2 (οι οποίες εμφανίζονται περίπου στα 3300 και 2400 cm^{-1} αντίστοιχα).

Στην παρακάτω Εικόνα 23 παρουσιάζεται ένα τυπικό φάσμα στελέχους του γένους *Pleurotus* με όλες τις δυνατές απορροφήσεις.



Εικόνα 23. Ενδεικτικό φάσμα απορρόφησης στο οποίο απεικονίζονται όλες οι πιθανές κορυφές για είδη του γένους *Pleurotus*.

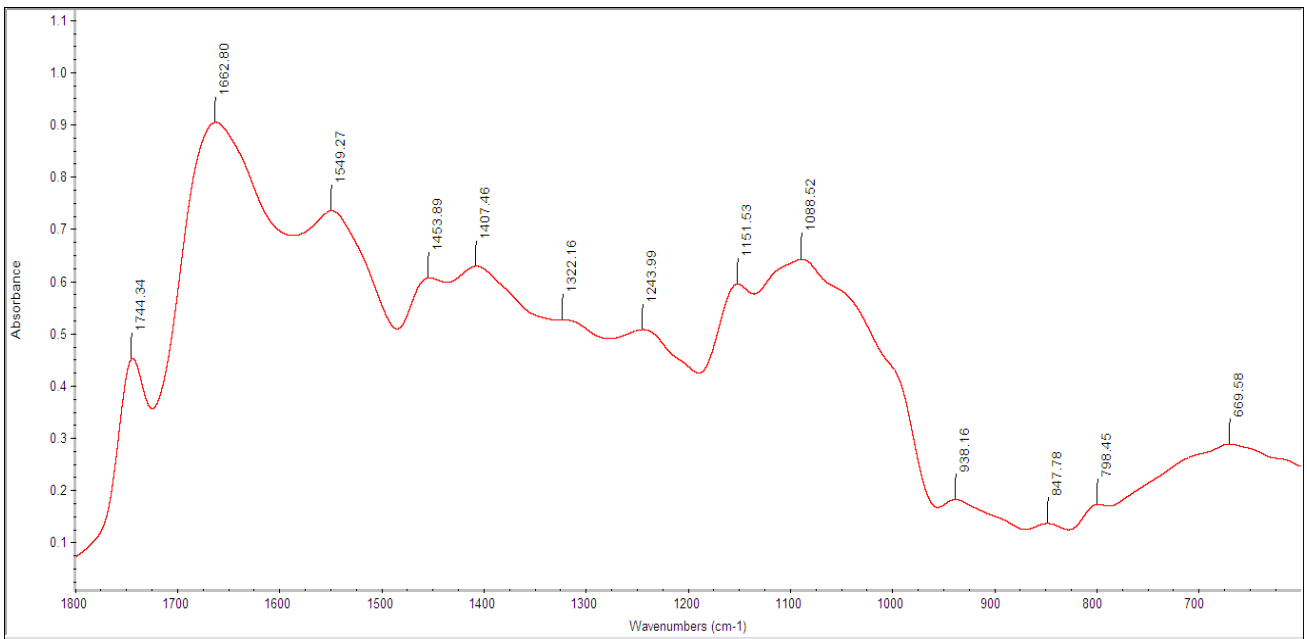
Διευκρινίζεται πως η Εικόνα 23 δεν αποτελεί πραγματικό φάσμα κάποιου στελέχους, αλλά έχει δημιουργηθεί "συγκεντρωτικά" από όλα τα στελέχη *Pleurotus* που αναλύθηκαν για τη διευκόλυνση της επεξήγησης των επιμέρους κορυφών. Έτσι όλες οι απορροφήσεις που φαίνονται στην Εικόνα 23 ερμηνεύονται στον Πίνακα 1, σύμφωνα με δεδομένα των Kamnev *et al.* (1999), Mohacek-Grosev *et al.* (2001), Naumann *et al.* (2005) και Salman *et al.* (2010).

Σύγκριση μεταξύ ειδών

Αρχικά θα παρουσιαστούν τα φάσματα απορρόφησης για κάθε είδος *Pleurotus* ξεχωριστά καθώς και για ορισμένα άλλα γένη τα οποία ανήκουν σε βασιδιομύκητες και ασκομύκητες. Κατόπιν θα επιχειρηθεί η αξιοποίηση των φασμάτων για σκοπούς ταυτοποίησης, αρχικά μεταξύ διαφορετικών γενών και κατόπιν μεταξύ των διαφόρων ειδών *Pleurotus*.

I) *Pleurotus abalonus*

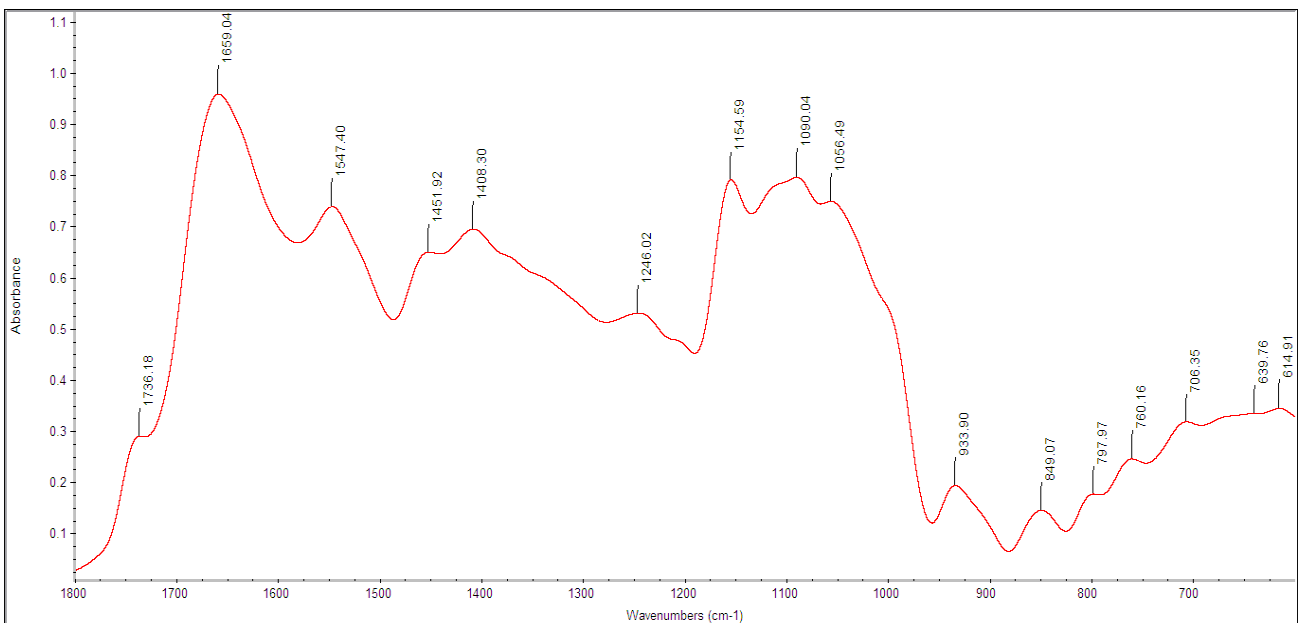
Παρατηρείται πως το συγκεκριμένο είδος έχει παρουσιάσει απορροφήσεις σχεδόν σε όλες τις δυνατές περιοχές του φάσματος. Έτσι εμφανίζει έντονη απορρόφηση στην περιοχή των εστέρων των φωσφολιπιδίων (1744 cm^{-1}), ενώ απουσιάζει η κορυφή των 1055 cm^{-1} .



Εικόνα 24. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. abalonus*.

II) *Pleurotus abieticola*

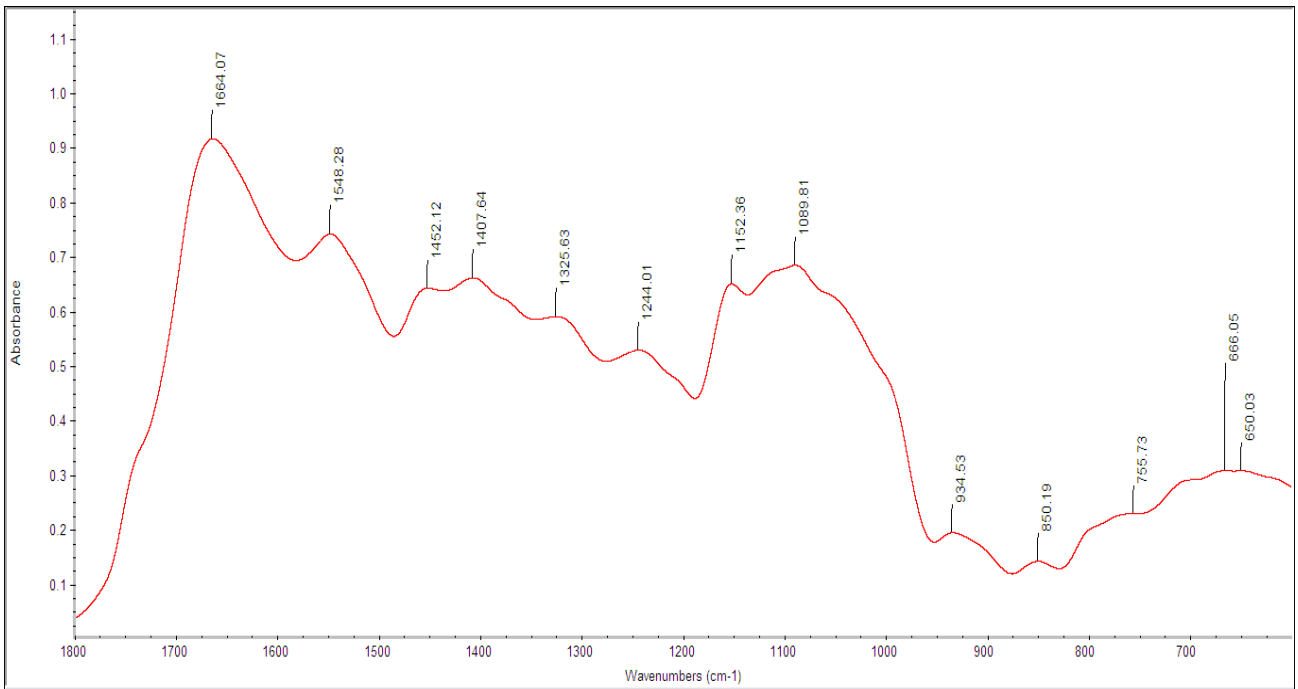
Παρατηρείται μια ασθενής απορρόφηση στην περιοχή των εστέρων των φωσφολιπιδίων (1736 cm^{-1}), ενώ απουσιάζει η απορρόφηση στην περιοχή του αμιδίου III (1320 cm^{-1}). Επίσης εμφανίζει έντονη απορρόφηση στα 1154 cm^{-1} .



Εικόνα 25. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. abieticola*.

III) *Pleurotus australis*

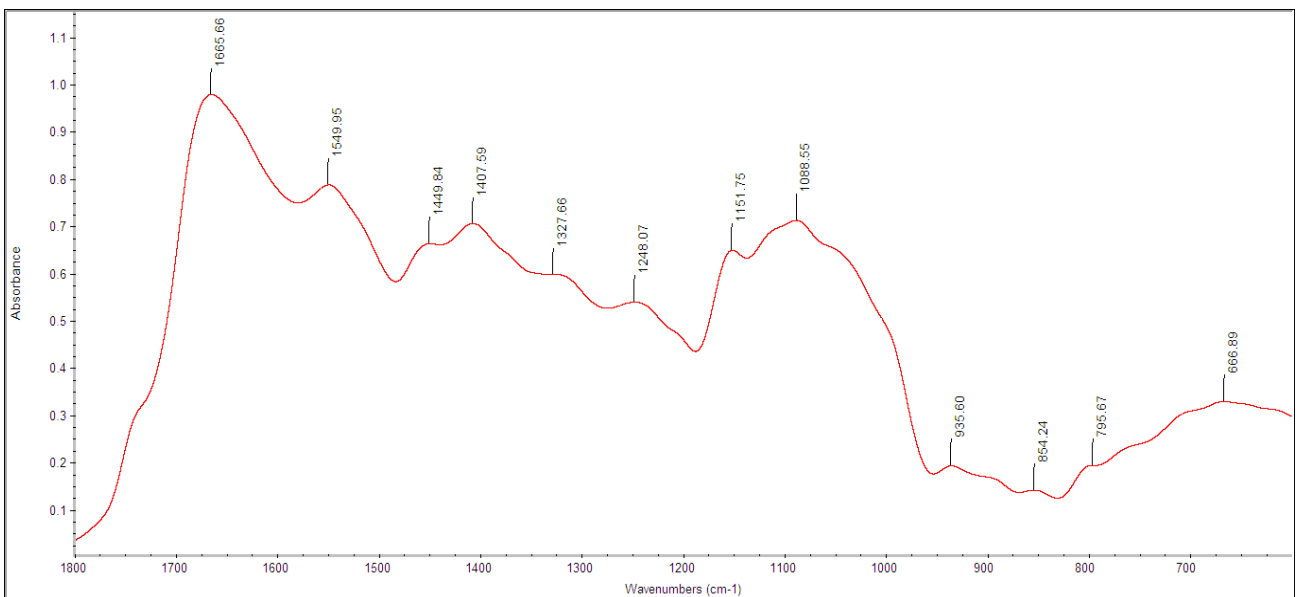
Στο *P. australis* φαίνεται εμφανώς ότι απουσιάζει η απορρόφηση στην περιοχή των φωσφολιπιδίων (1740 cm^{-1}) καθώς και στην περιοχή των υδατανθράκων (1055 cm^{-1}).



Εικόνα 26. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. australis*.

IV) *Pleurotus calypttratus*

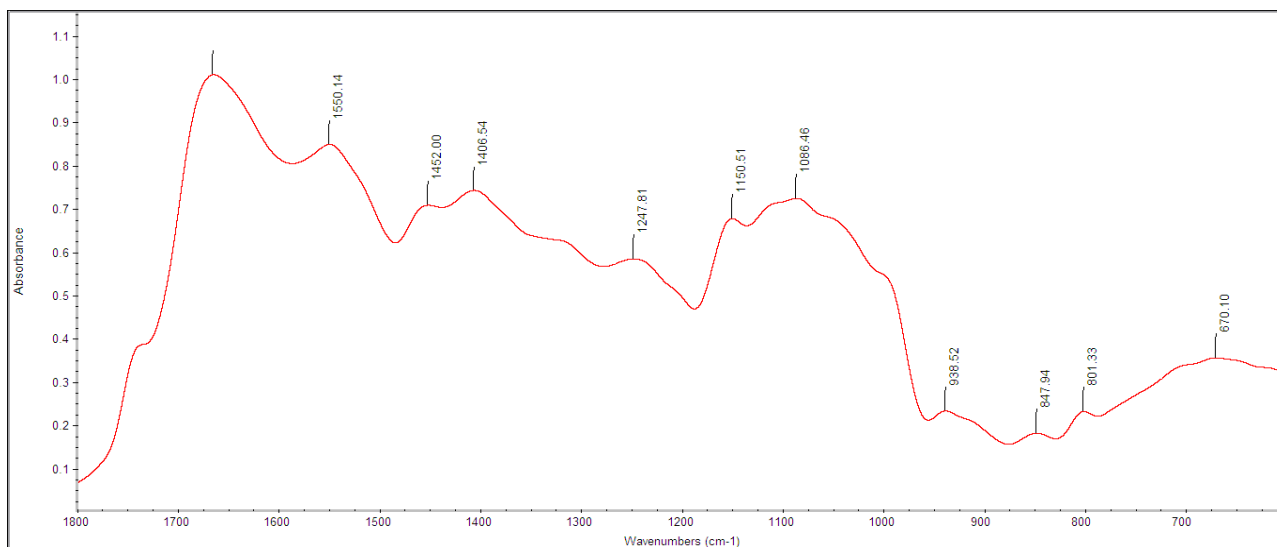
Και εδώ ομοίως με το *P. australis* απουσιάζουν οι απορροφήσεις στις περιοχές φωσφολιπιδίων και υδατανθράκων (1740 και 1055 cm^{-1} αντίστοιχα).



Εικόνα 27. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. calypttratus*.

V) *Pleurotus citrinopileatus*

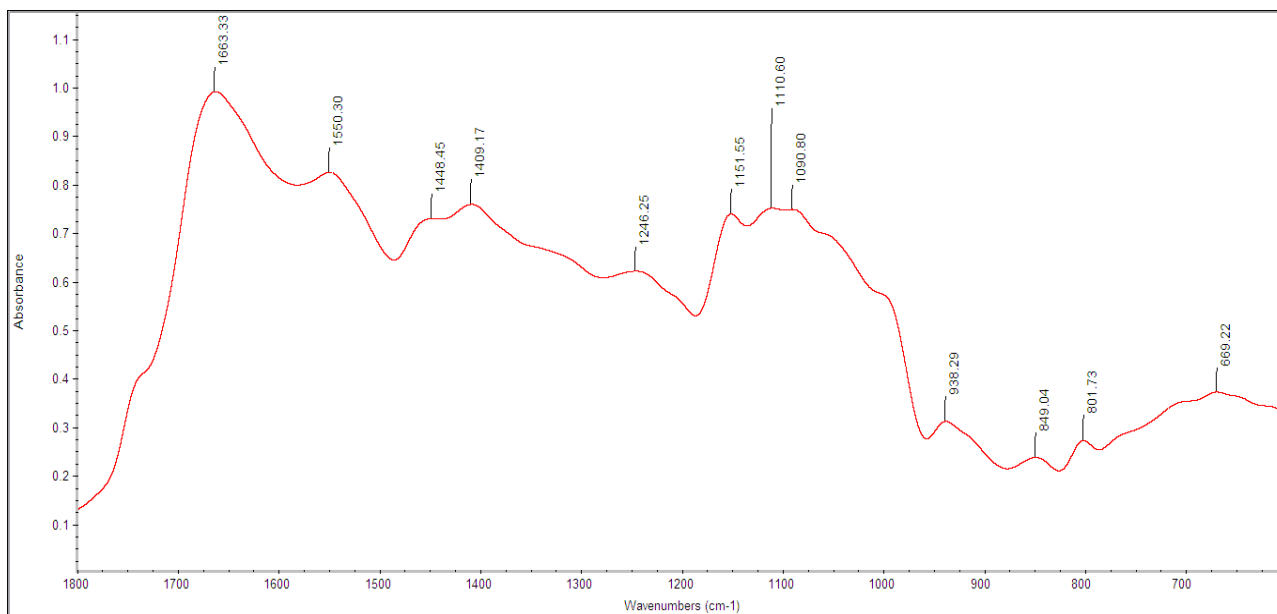
Σε αυτό το είδος παρατηρείται μια έντονη απορρόφηση στην περιοχή του αμιδίου I των πρωτεϊνών, ενώ παρατηρείται και απουσία κορυφών στις περιοχές των φωσφολιπιδίων (1740 cm^{-1}), αμιδίου III (1320 cm^{-1}) και υδατανθράκων (1055 cm^{-1}).



Εικόνα 28. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. citrinopileatus*.

VI) *Pleurotus columbinus*

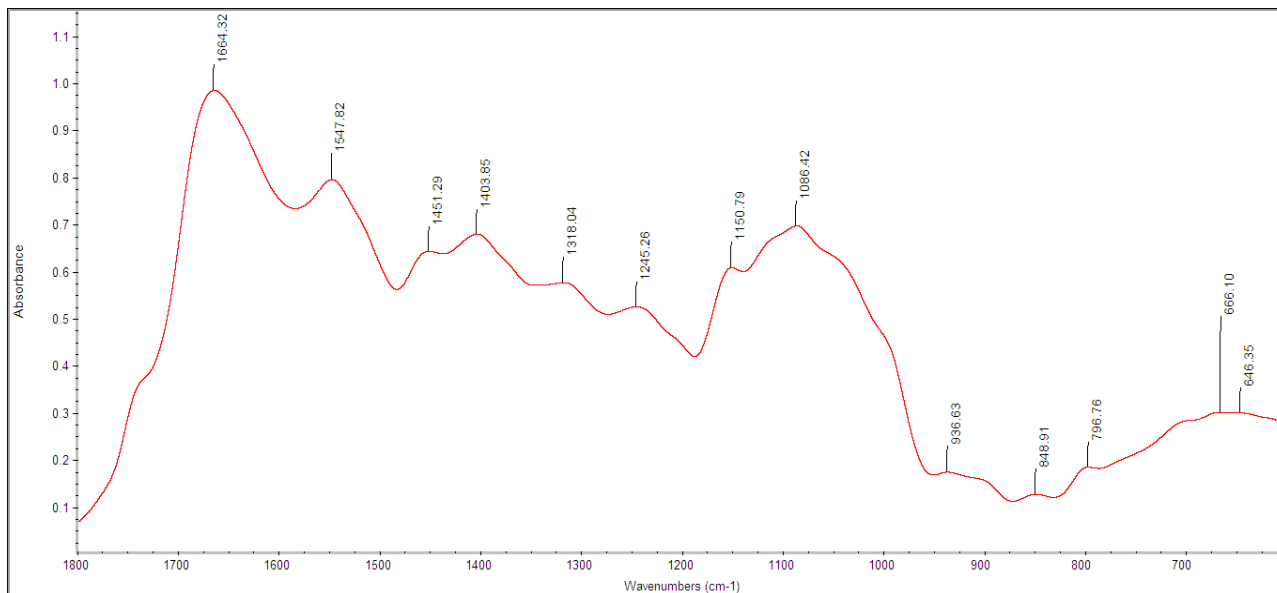
Εμφανίζει μία επιπλέον κορυφή στα 1110 cm^{-1} . Το υπόλοιπο φάσμα είναι όμοιο με εκείνο του *P. citrinopileatus*.



Εικόνα 29. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. columbinus*.

VII) *Pleurotus cornucopiae*

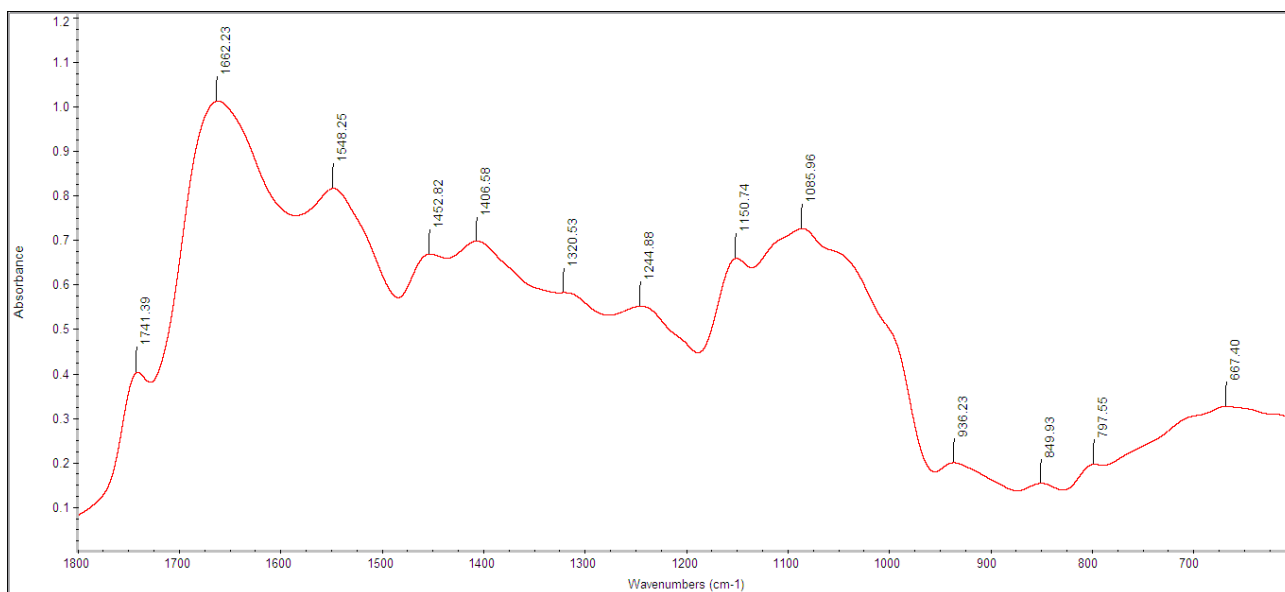
Και εδώ απουσιάζουν οι απορροφήσεις στις περιοχές των φωσφολιπιδίων και υδατανθράκων, αλλά σε αντίθεση με τα προηγούμενα υπάρχει απορρόφηση στην περιοχή του αμιδίου III (1320 cm^{-1}).



Εικόνα 30. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. cornucopiae*.

VIII) *Pleurotus cystidiosus*

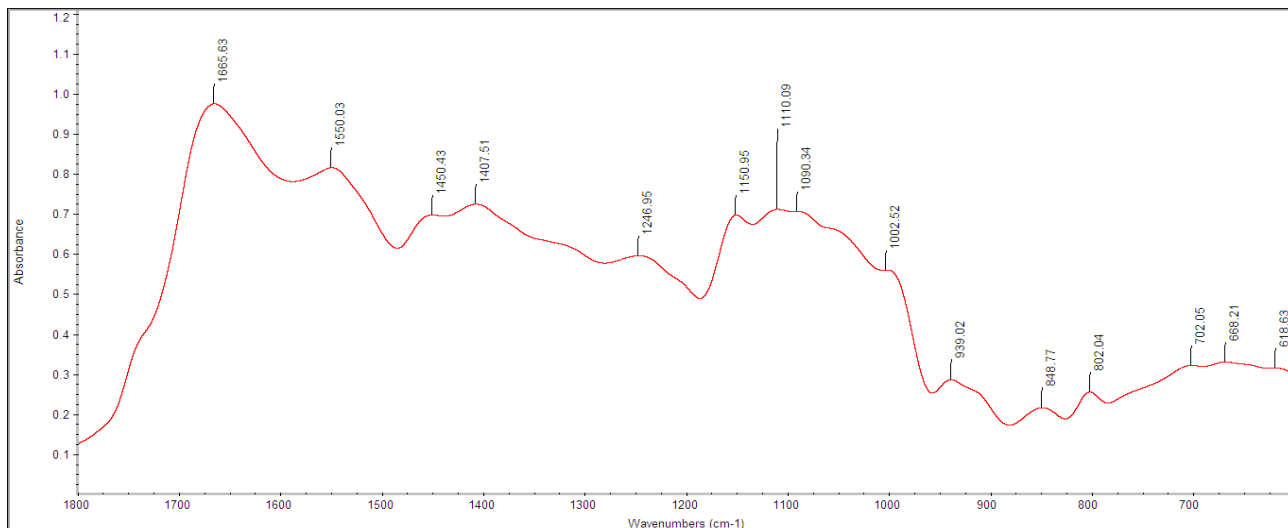
Στο *P. cystidiosus* παρατηρείται μια ασθενής απορρόφηση στην περιοχή των φωσφολιπιδίων και των πρωτεϊνών του αμιδίου III, καθώς και απουσία απορρόφησης στην περιοχή των υδατανθράκων (1055 cm^{-1}).



Εικόνα 31. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. cystidiosus*.

IX) *Pleurotus djamor*

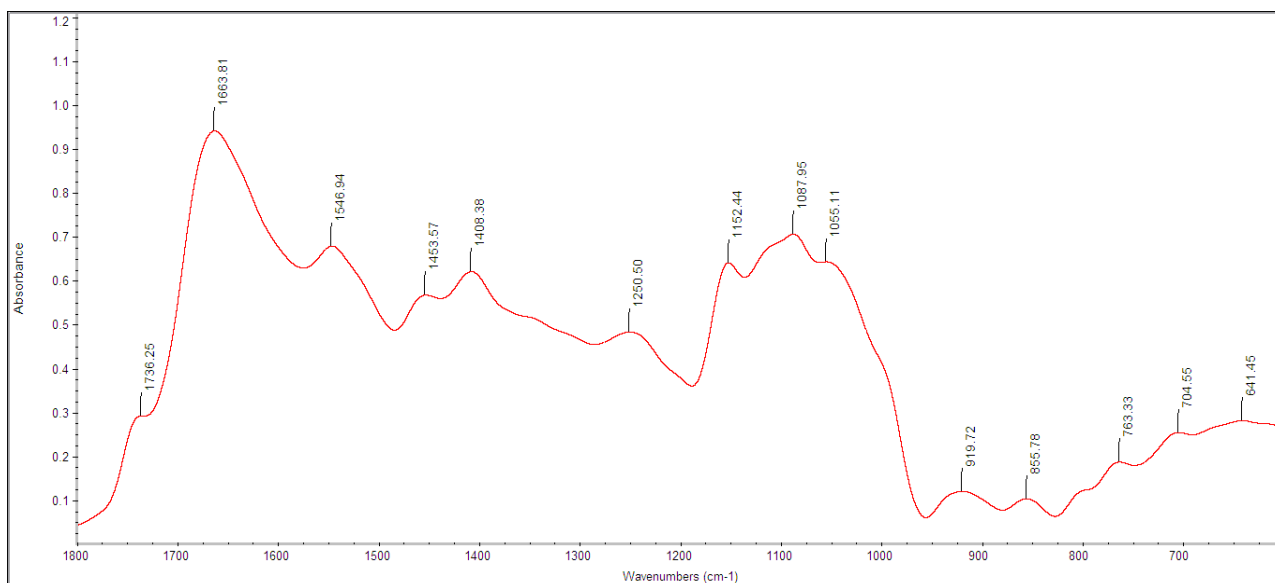
Διακρίνεται η ύπαρξη δύο κορυφών που δεν καταγράφονται σε άλλα *Pleurotus*, δηλ. αυτές των 1110 cm^{-1} και 1002 cm^{-1} αντίστοιχα, οι οποίες φαίνεται να διαχωρίζουν το είδος αυτό από τα υπόλοιπα.



Εικόνα 32. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. djamor*.

X) *Pleurotus dryinus*

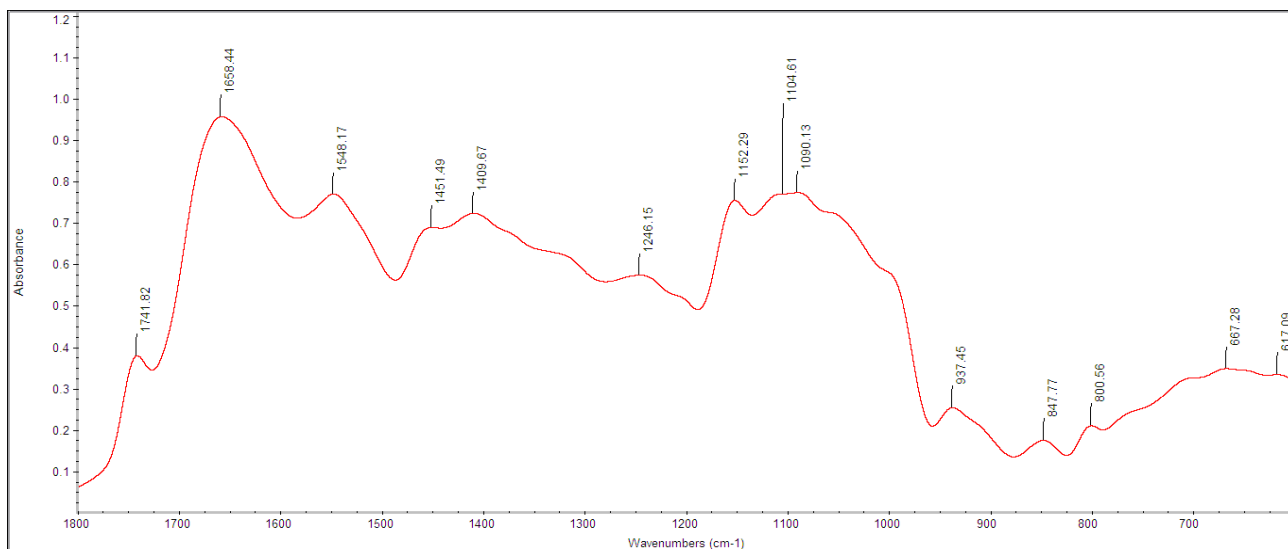
Στο συγκεκριμένο είδος διακρίνεται μια ασθενής απορρόφηση στις περιοχές των φωσφολιπιδίων και των υδατανθράκων (1736 και 1055 cm^{-1} αντίστοιχα) και μια ισχυρή απορρόφηση στα 1152 cm^{-1} , ενώ απουσιάζει η κορυφή στην περιοχή των πρωτεϊνών του αμιδίου III.



Εικόνα 33. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. dryinus*.

XI) *Pleurotus eryngii*

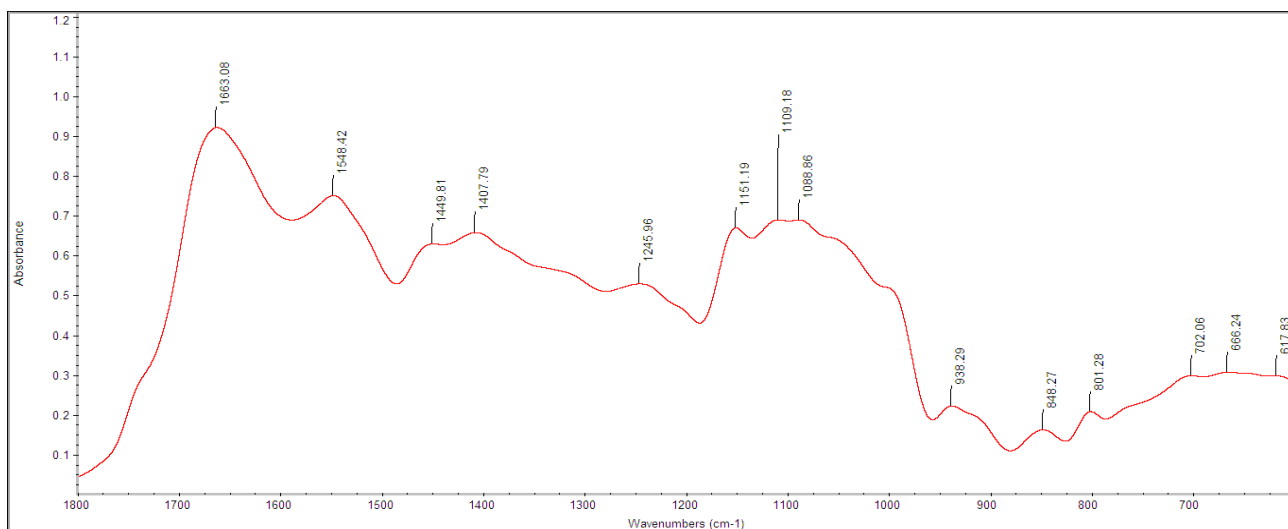
Στο *P. eryngii* παρατηρείται μια ασθενής απορρόφηση στα 1104 cm^{-1} η οποία όπως και στις περιπτώσεις των *P. djamor* και *P. columbinus* τα διαχωρίζει από τα υπόλοιπα. Επίσης απουσιάζουν οι κορυφές των 1320 και 1055 cm^{-1} .



Εικόνα 35. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. eryngii*.

XII) *Pleurotus flabellatus*

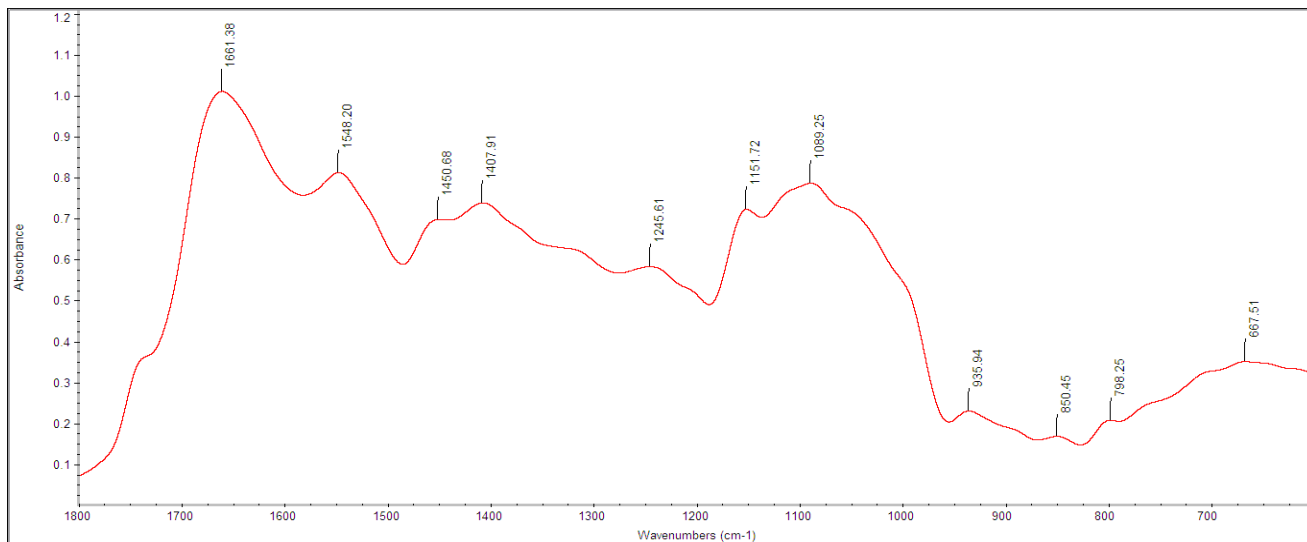
Και εδώ παρατηρείται απορρόφηση στα 1109 cm^{-1} , ενώ σε αντίθεση με το *P. eryngii* (και κατά ομοιότητα με το *P. djamor*) απουσιάζει η απορρόφηση στα 1740 cm^{-1} .



Εικόνα 36. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. flabellatus*.

XIII) *Pleurotus nebrodensis*

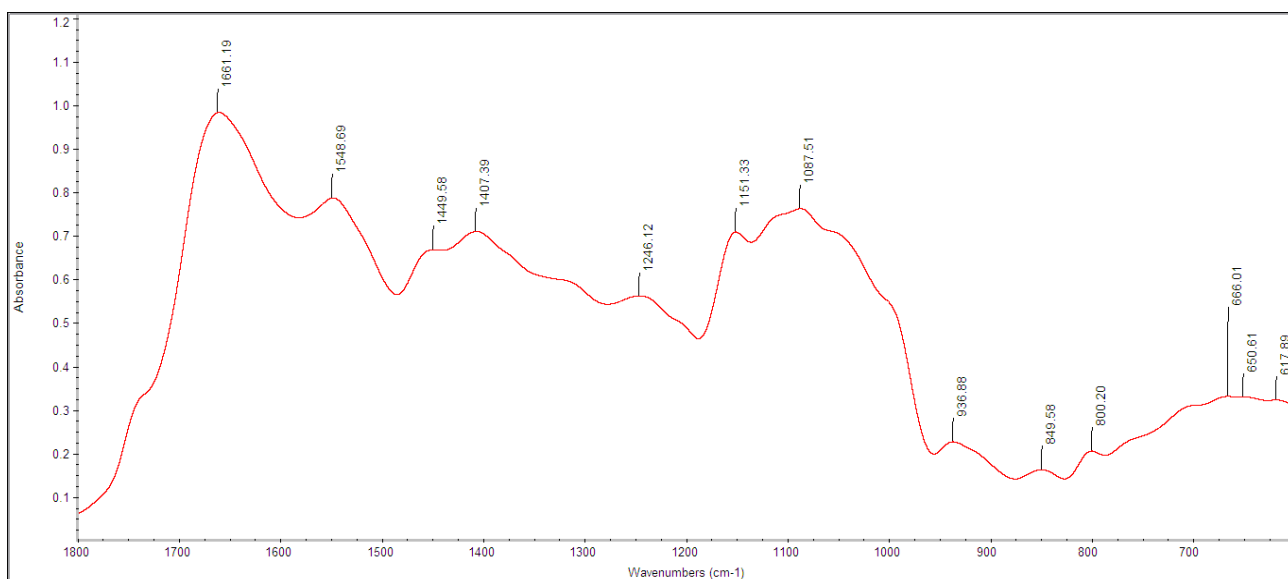
Το συγκεκριμένο είδος δεν εμφανίζει απορρόφηση στα 1740 και 1110 cm^{-1} (όπως το συγγενές είδος *P. eryngii*).



Εικόνα 37. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. nebrodensis*.

XIV) *Pleurotus ostreatus*

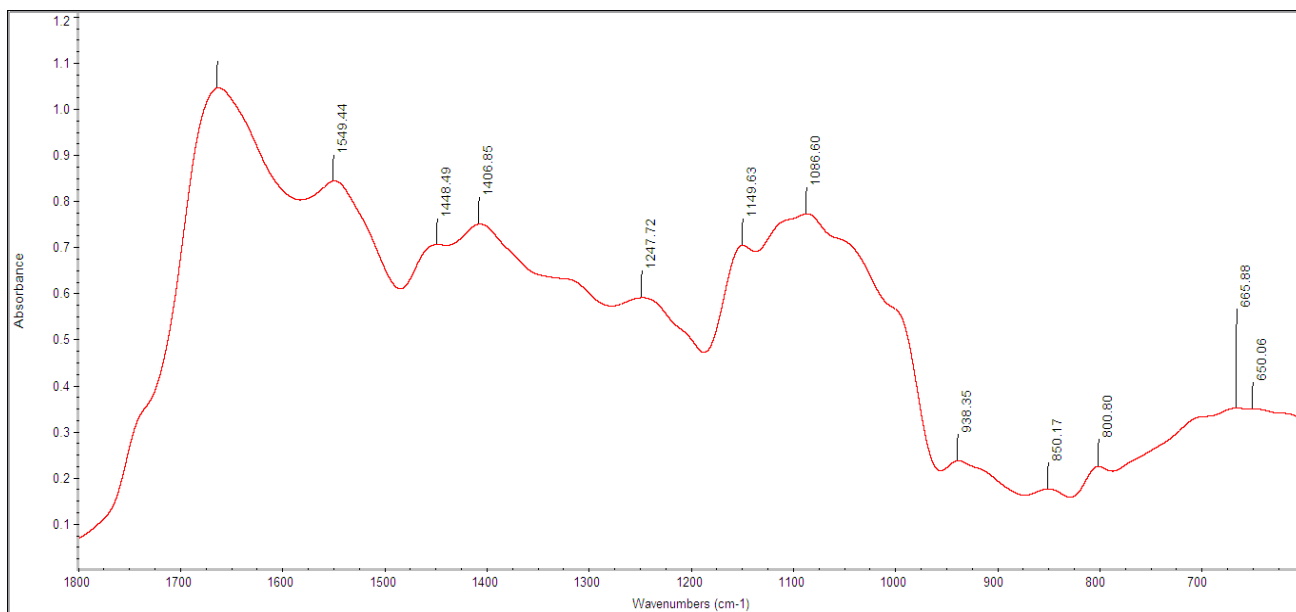
Στο *P. ostreatus* παρατηρείται η απουσία απορρόφησης στις περιοχές των φωσφολιπιδίων, αμιδίου III και υδατανθράκων (1740, 1320 και 1055 cm^{-1} αντίστοιχα) και μία σχετικά έντονη απορρόφηση στα 1152 cm^{-1} .



Εικόνα 38. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. ostreatus*.

XV) *Pleurotus pulmonarius*

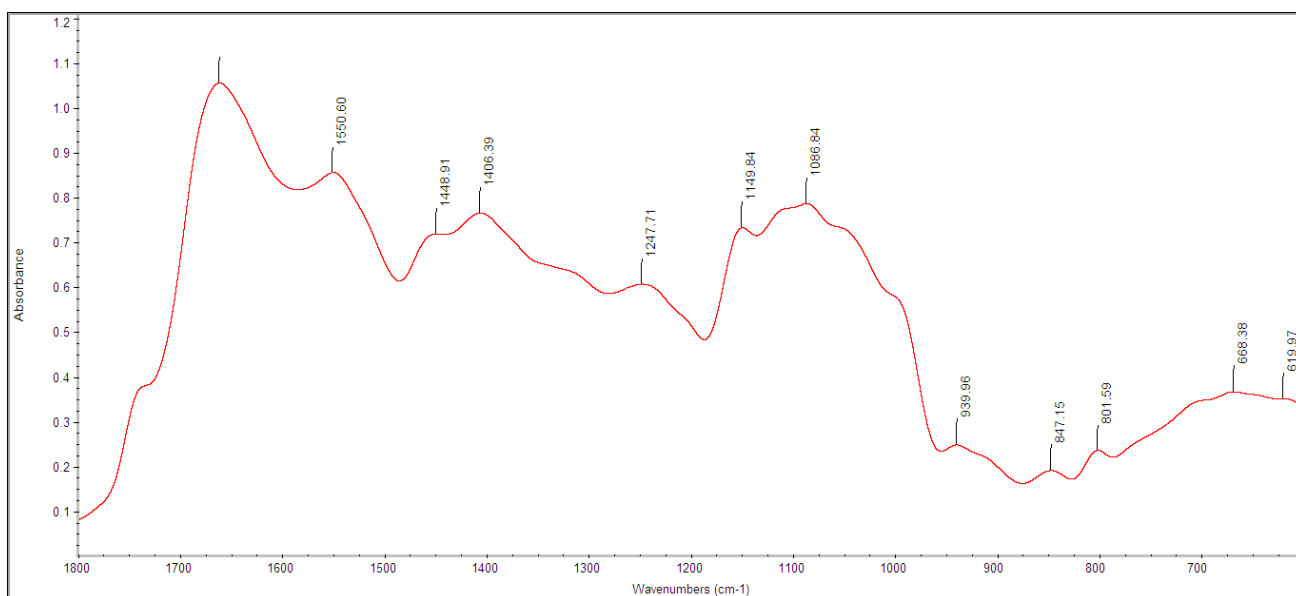
Παρατηρείται φάσμα με μεγάλη ομοιότητα με εκείνο του *P. ostreatus*.



Εικόνα 39. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. pulmonarius*.

XVI) *Pleurotus sajor-caju*

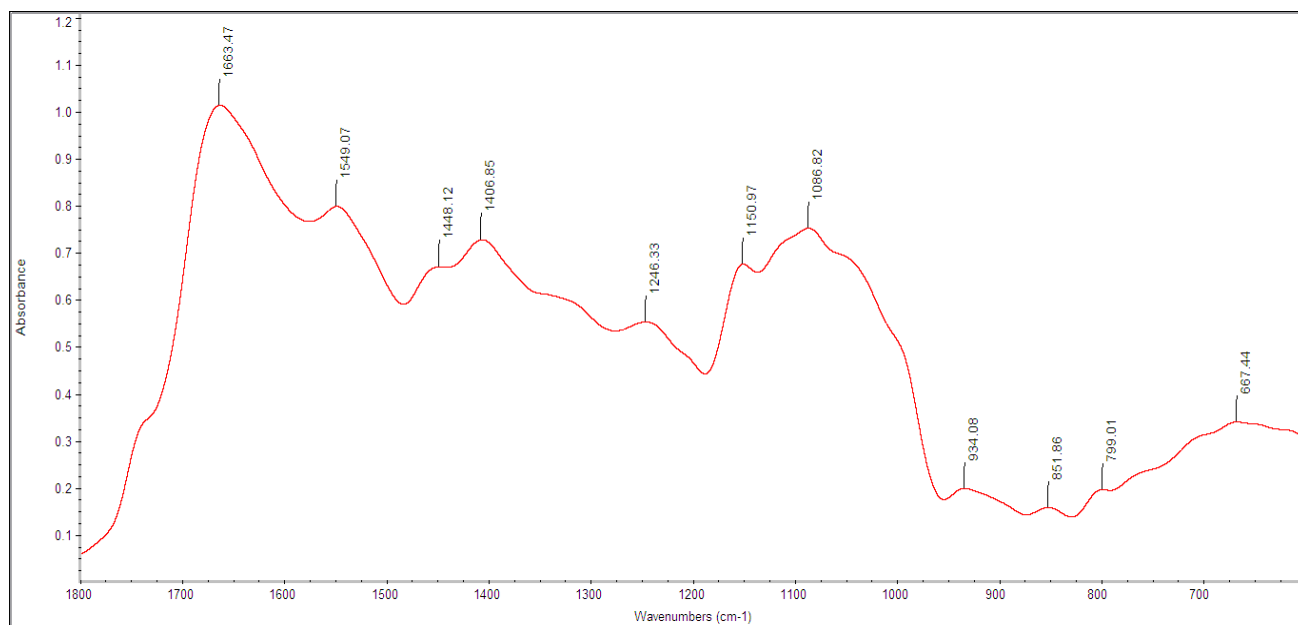
Παρατηρείται σημαντική ομοιότητα με τα φάσματα των δύο προηγούμενων ειδών και ειδικότερα με το *P. pulmonarius*.



Εικόνα 40. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. sajor-caju*.

XVII) *Pleurotus sapidus*

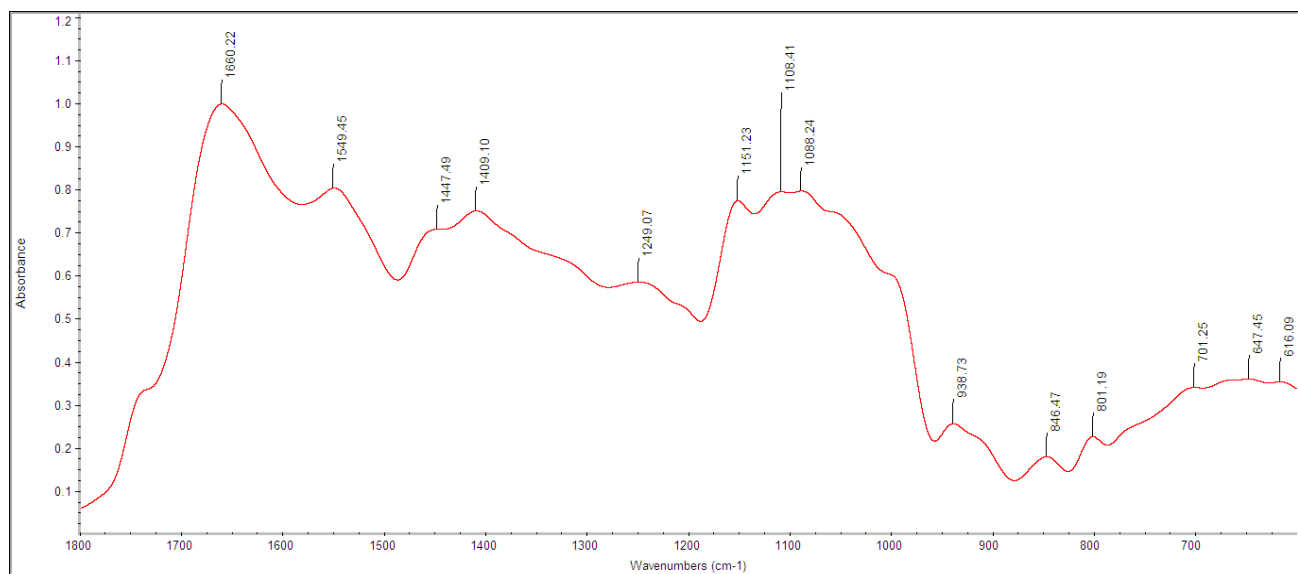
Παραλήφθηκε παρόμοιο φάσμα με εκείνο των προηγούμενων τριών ειδών.



Εικόνα 41. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. sapidus*.

XVIII) *Pleurotus tuberregium*

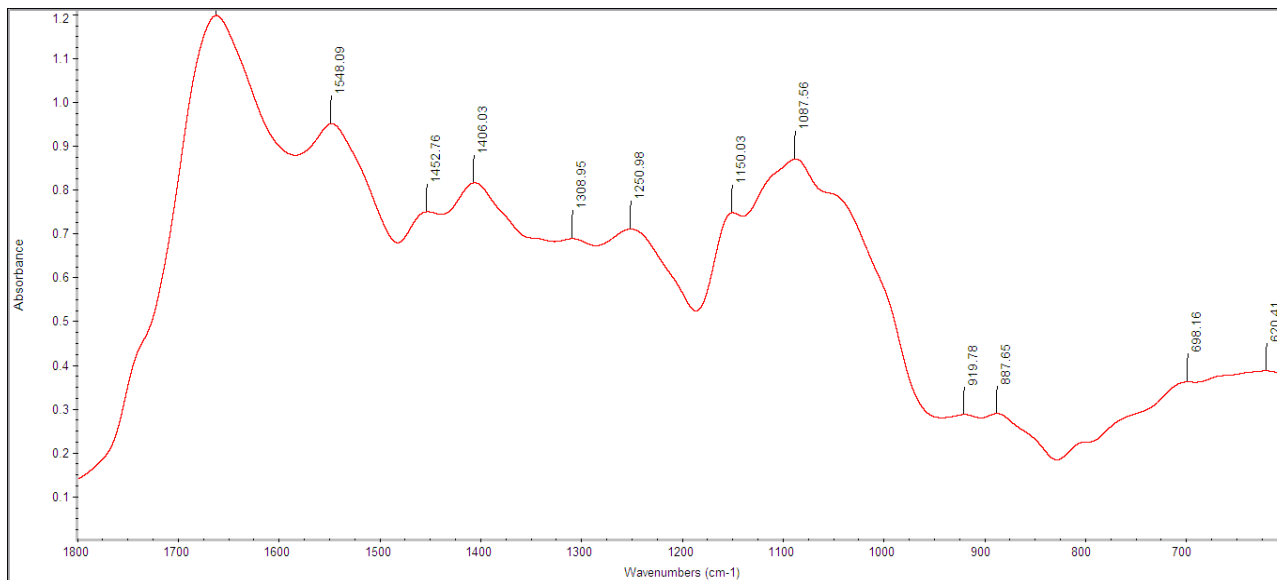
Παρατηρείται παρουσία κορυφής στα 1108 cm⁻¹ και απουσία κορυφών στις περιοχές των φωσφολιπιδίων, αμιδίου III των πρωτεϊνών, και υδατανθράκων (στα 1740, 1320 και 1055 cm⁻¹ αντίστοιχα).



Εικόνα 42. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *P. tuberregium*.

XIX) *Auricularia auricula-judae*

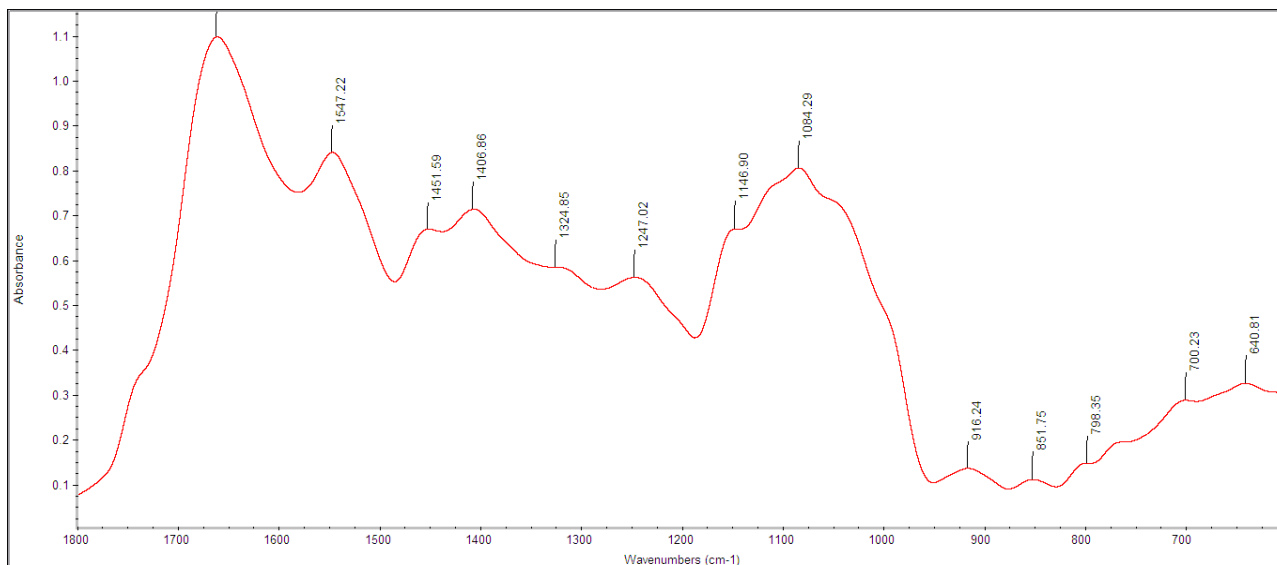
Στο συγκεκριμένο γένος παρατηρείται μία μετατόπιση της κορυφής του αμιδίου III των πρωτεϊνών στα 1308 cm^{-1} , καθώς και μία πολύ πιο έντονη απορρόφηση στα 1250 cm^{-1} σχέση με τα είδη *Pleurotus*.



Εικόνα 43. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *A. auricula-judae*.

XX) *Dichomitus squalens*

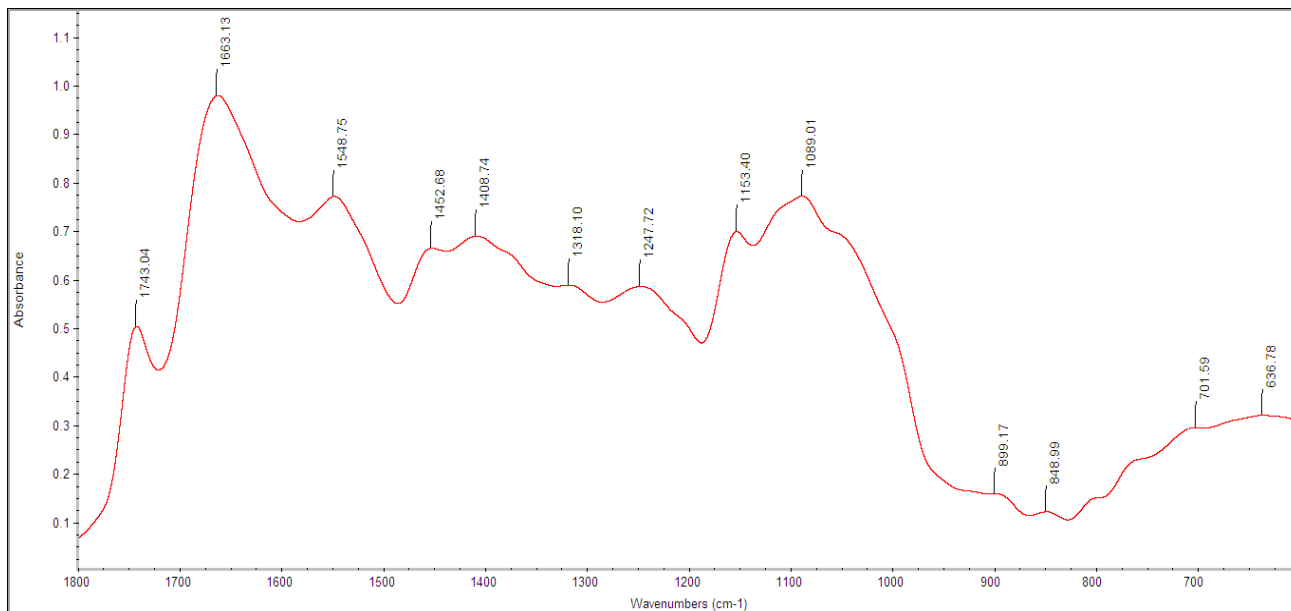
Εδώ παρατηρούνται ορισμένες μετατοπίσεις κορυφών και αρκετά ασθενείς απορροφήσεις στις περιοχές των υδατανθράκων (1146 cm^{-1}) και νουκλεϊκών οξέων (1084 cm^{-1}) σε σχέση με τα είδη *Pleurotus*.



Εικόνα 44. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *D. squalens*.

XXI) *Chlorophyllum agaricoides*

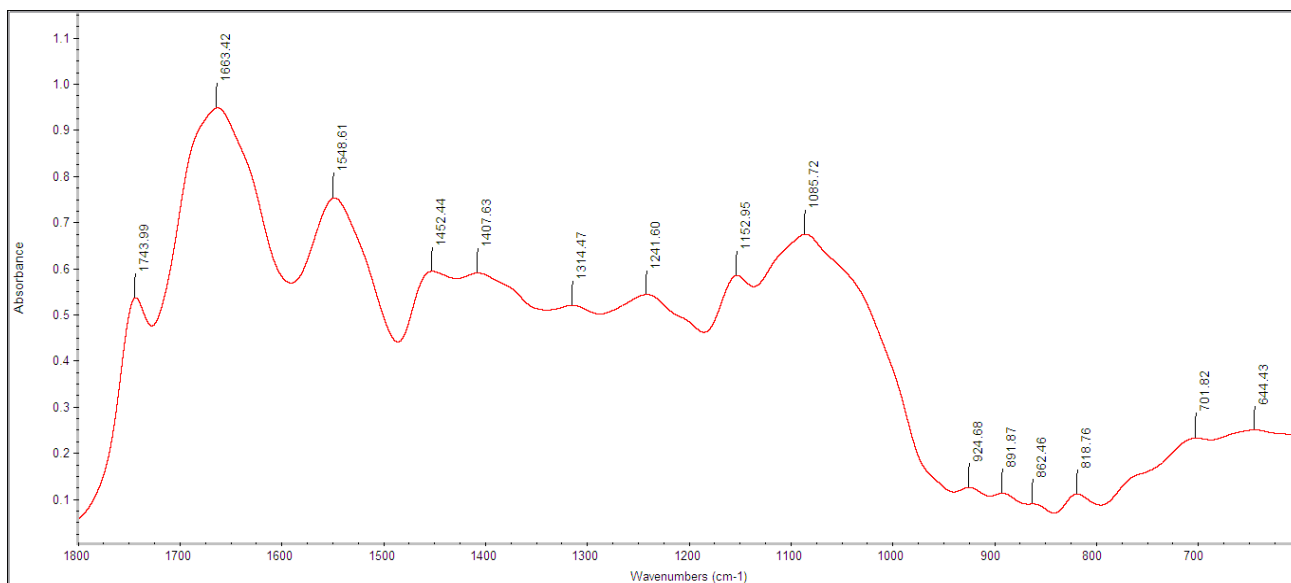
Στο *C. agaricoides* εμφανίζονται όλες οι τυπικές κορυφές των *Pleurotus*, ενώ διαφοροποιούνται από αυτά σε μετατοπίσεις κορυφών στις περιοχές των β- και α- ανωμερών (899 και 848 cm^{-1} αντίστοιχα).



Εικόνα 45. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *C. agaricoides*.

XXII) *Morchella conica*

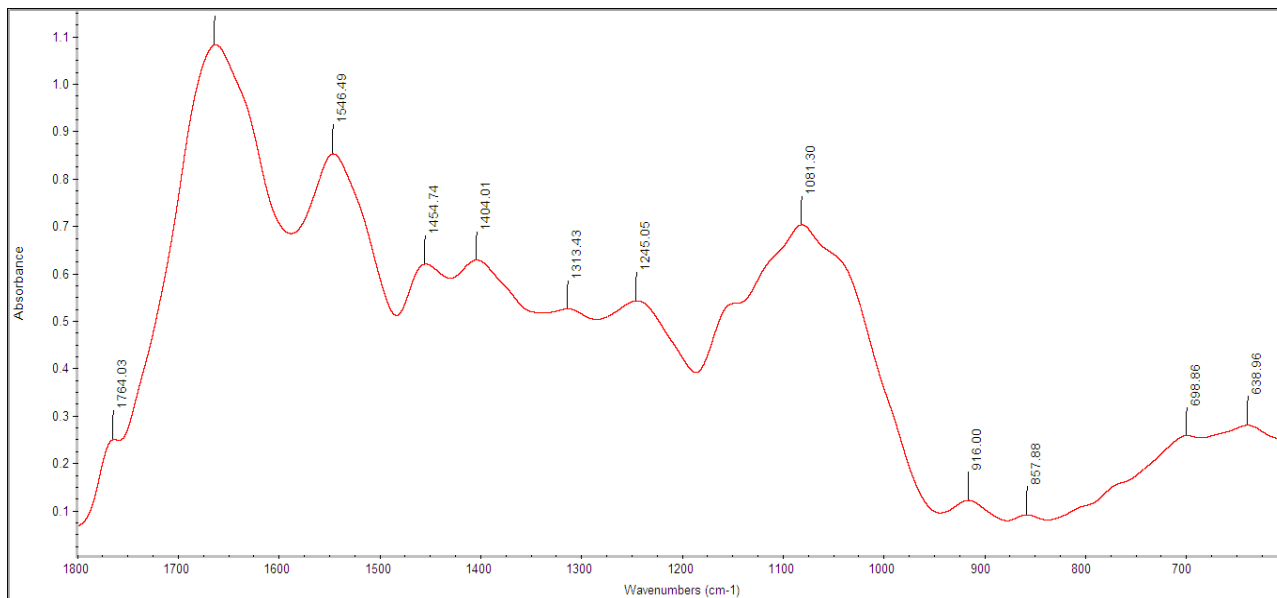
Εδώ παρατηρείται μια γενική διαφοροποίηση στο συνολικό φάσμα, ενώ χαρακτηριστική είναι η έντονη δραστηριότητα στην περιοχή κάτω από τα 1000 cm^{-1} .



Εικόνα 46. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *M. conica*.

XXIII) *Tyromyces chioneus*

Χαρακτηριστική στο συγκεκριμένο είδος είναι η μετατόπιση κορυφής στην περιοχή των φωσφολιπιδίων και του αμιδίου III των πρωτεϊνών (στα 1764 και 1313 cm^{-1}).



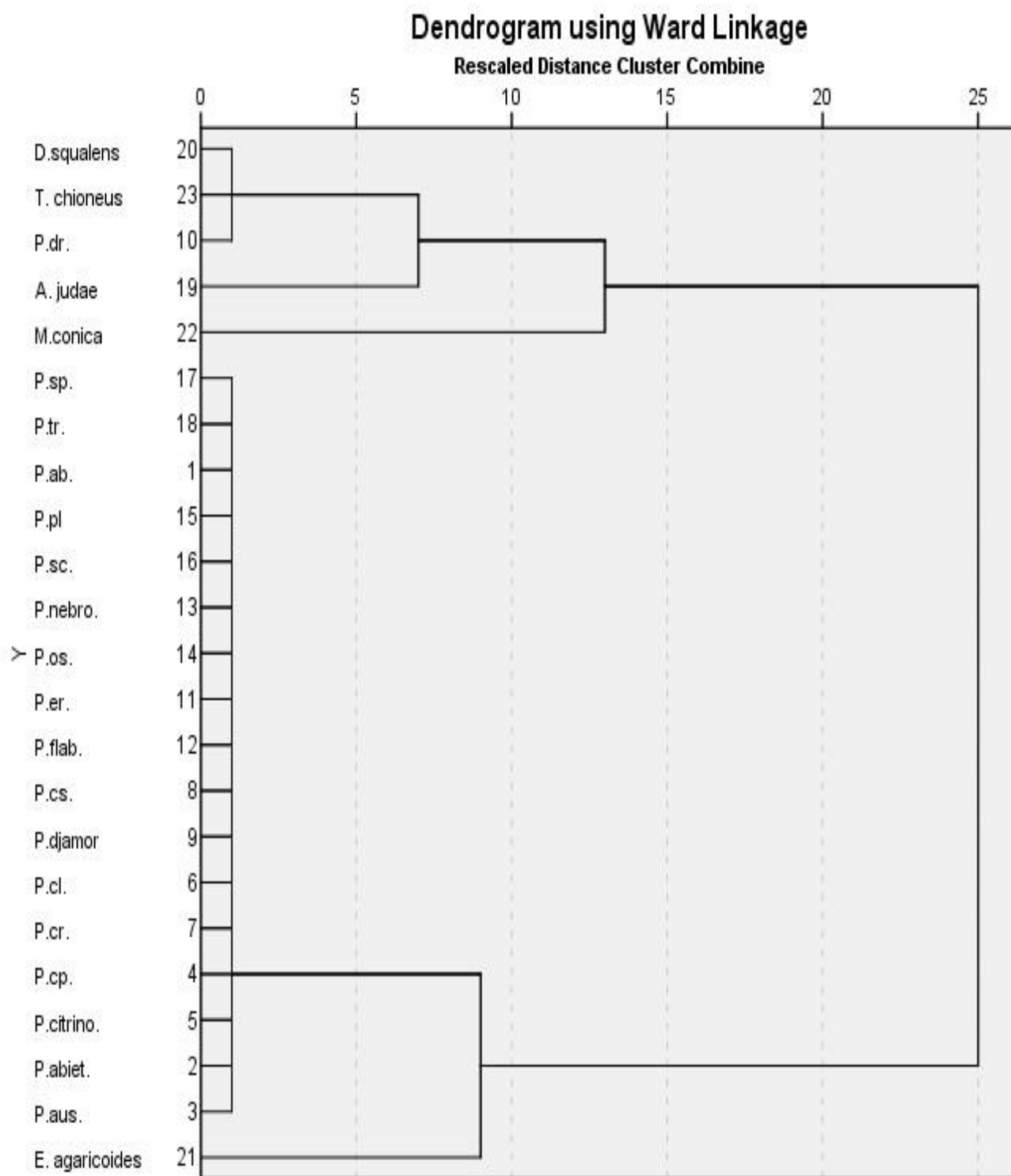
Εικόνα 47. Αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης του *T. chioneus*.

Μετά από αυτή την πρώτη ανάλυση των φασμάτων των ειδών μακρομυκήτων που μελετήθηκαν δημιουργήθηκε ο Πίνακας 3, που περιελάμβανε το σύνολο των κορυφών απορρόφησης ανά είδος. Στη συνέχεια σχηματίστηκε μια μήτρα δυαδικού συστήματος "0" και "1" (το "0" δηλώνει την απουσία κορυφής για το συγκεκριμένο είδος και το "1" την ύπαρξη κορυφής απορρόφησης στον συγκεκριμένο κυματάριθμο, Πίνακας 4), τα δεδομένα της οποίας εισήχθησαν στο πρόγραμμα SPSS για τη δημιουργία δενδρογραμμάτων.

Από το δενδρογράμμα που προκύπτει (Εικόνα 48) φαίνεται ότι η περιοχή 924-862 cm^{-1} (περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος), διαχωρίζει σωστά τα είδη του γένους *Pleurotus* από τα υπόλοιπα γένη, με μόνη εξαίρεση το *P. dryinus* και το *C. agaricoides*.

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικοί κυματάρθρωμοι (cm⁻¹) που αντιστοιχούν σε διακριτές κορυφές απορρόφησης των ειδών *Pleurotus* καθώς και ειδών από άλλα γένη μακρομυκήτων (με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται κορυφές που δεν ανιχνεύονται σε είδη *Pleurotus*, παρά μόνο σε άλλα γένη).

Επωνυμία πρωτότυπου	P.ab.	P.abiet.	P.aus.	P.sp.	P.citrino.	P.d.	P.cr.	P.cs.	P.diamor	P.dr.	P.er.	P.fibb.	P.nebro.	P.os.	P.pl.	P.sc.	P.sp.	P.tr.	A.aur-jud	D.squel.	E.ager.	M.conic.
759 (755-763)	706								702	705		702						702				
799 (795-802)	796	796	796	796	801	802	197	798	802		801	801	796	800	801	802	799	801		798		819
850 (846-855)	848	849	850	854	848	849	849	850	849	856	848	848	850	850	850	847	852	846		852	849	862
860																			868			862
887																						
895																			920	916	899	892
919										920												925
936 (933-939)	938	934	935	936	939	938	937	936	939		937	938	936	937	938	940	934	939				
1003									1003													
1055,6																						
1055-										1055												
1056	1056																					
1088																						
1085-																						
1090	1089	1090	1090	1089	1086	1091	1086	1086	1090	1088	1090	1089	1089	1088	1087	1087	1087	1088	1088	1084	1089	1086
1107																						
1104-																						
1110						1111			1110		1105	1109						1100				
1152																						
1149-																						
1154-	1152	1155	1152	1152	1151	1152	1151	1151	1151	1152	1152	1151	1152	1151	1150	1150	1151	1151	1150	1147	1153	1153
1246																						
1243-																						
1250	1244	1246	1244	1248	1248	1246	1245	1245	1247	1251	1246	1246	1246	1246	1248	1248	1246	1249	1251	1247	1248	1242
1308																			1309			1314
1320																						
1316-																						
1327	1322		1326	1328			1318	1321												1325	1318	
1407																						
1403-	1407	1408	1408	1408	1407	1409	1404	1407	1408	1408	1410	1408	1408	1407	1407	1406	1407	1409	1406	1407	1409	1408
1451																						
1447-																						
1453)	1454	1452	1452	1450	1452	1448	1451	1453	1450	1454	1451	1150	1451	1450	1448	1449	1448	1447	14503	1452	1453	1452
1548																						
1546-																						
1550	1549	1547	1548	1550	1550	1550	1548	1548	1550	1547	1548	1548	1548	1549	1549	1551	1549	1549	1548	1547	1549	1549
1662																						
1658-																						
1665)	1663	1659	1664	1666	1665	1663	1664	1662	1666	1664	1658	1663	1661	1661	1663	1662	1663	1660	1663	1662	1663	1663
1740																						
1744)	1744	1736						1741		1736	1742											1743

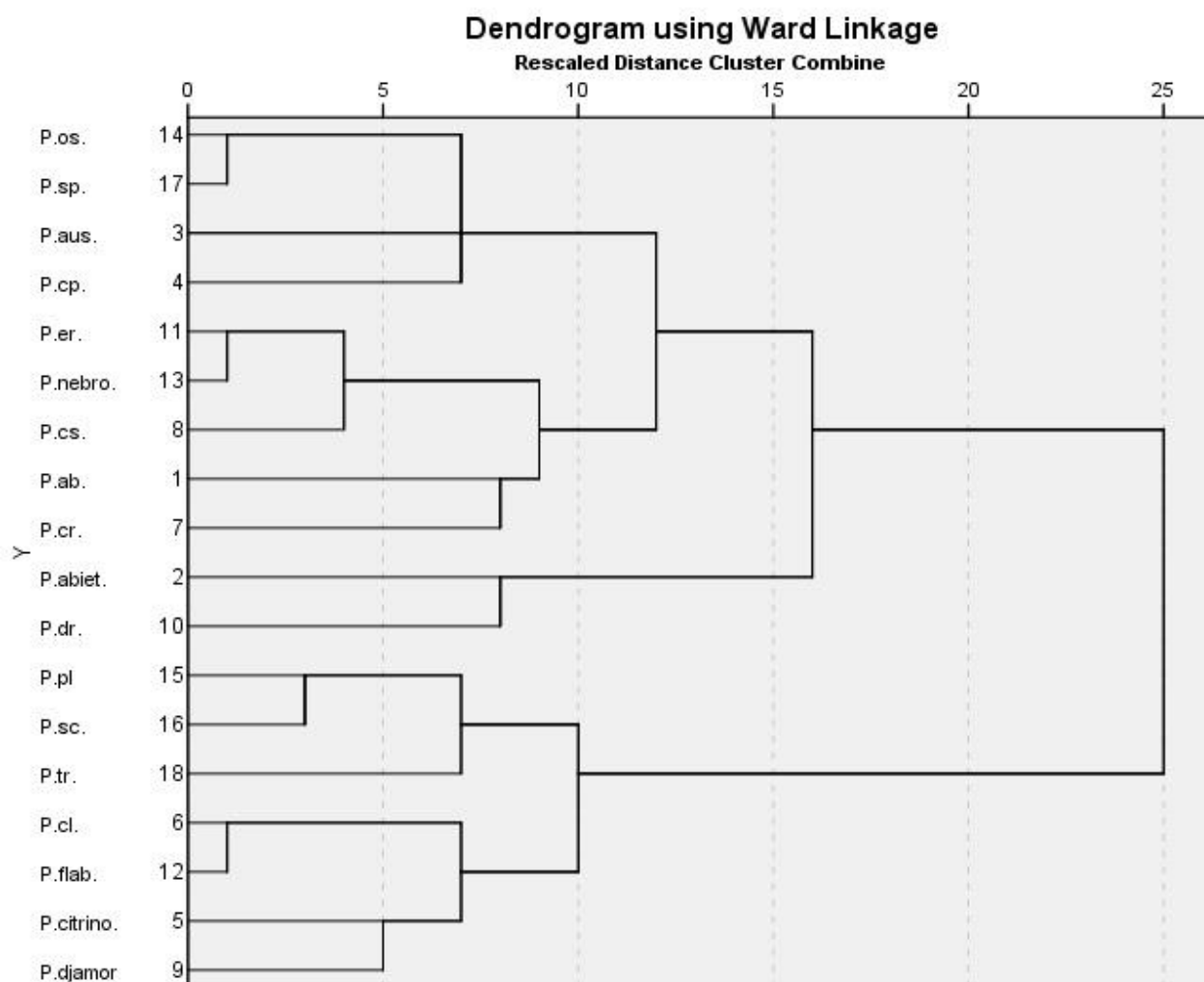


Εικόνα 48. Δενδρόγραμμα ειδών του γένους *Pleurotus* και ειδών από τα λοιπά γένη που εξετάστηκαν, η οποία προέκυψε από την επεξεργασία των φασμάτων FT-IR στην περιοχή $924-862\text{ cm}^{-1}$.

Πίνακας 4. Μήτρα δυαδικού συστήματος που δημιουργήθηκε από τα διαφορετικά είδη *Pleurotus* και τα άλλα γένη των μακρομυκήτων (όπου το "0" δηλώνει την απουσία κορυφής για το συγκεκριμένο είδος και το "1" την ύπαρξη κορυφής απορρόφησης στον συγκεκριμένο κυματάριθμο).

ΚΥΜΑΤΑΡΙΘΜΟΣ	P.ab.	P.abiet.	P.aus.	P.cp.	P.citrino.	P.d.	P.cr.	P.cs.	P.diamor	P.dr.	P.er.	P.flab.	P.nebro.	P.os.	P.pl	P.sc.	P.sp.	P.tr.	A. judae	D.squalens	E. agrarioides	M. conica	T. chioneus
665-670	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
698-702	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
702-706	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
755-759	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
759-763	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
795-803	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
818	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
846-852	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
852-858	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
862	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
887	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
891	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
899	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
916-920	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
924	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
933-937	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
937-941	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
1002	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1054-1057	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1081-1086	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1086-1091	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
1104-1108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1108-1112	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1146-1150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
1150-1154	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
1241-1246	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
1246-1251	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
1308-1314	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
1318-1322	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1324-1328	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1402-1406	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
1406-1410	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
1447-1450	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
1450-1454	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
1546-1550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1658-1662	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
1662-1666	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
1736-1740	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1740-1744	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1764	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Αφού επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των υπολοίπων ειδών (πλην *Pleurotus*) από τα είδη του γένους *Pleurotus*, αφαιρέθηκαν από τη μήτρα δυαδικού συστήματος τα λοιπά γένη. Έτσι τα δεδομένα που αφορούσαν πλέον μόνο τα είδη *Pleurotus* εισήχθησαν ξανά στο SPSS και δημιουργήθηκε ένα νέο δενδρόγραμμα (Εικόνα 49), αυτή τη φορά για όλη την περιοχή ενδιαφέροντος, δηλαδή από τα 1800 έως τα 600 cm^{-1} .



Εικόνα 49. Δενδρόγραμμα διαφορετικών ειδών *Pleurotus* που προέκυψε από την επεξεργασία των φασμάτων FT-IR στην περιοχή 1800 - 600 cm^{-1} .

Εκτός όμως από τα δενδρογράμματα για το διαχωρισμό ειδών και γενών, χρήσιμη κρίθηκε και η δημιουργία μιας μήτρας ποσοστών ομοιότητας για τα διαφορετικά γένη και είδη του γένους *Pleurotus*, για την περιοχή μεταξύ 1800 και 600 cm^{-1} . Για τη δημιουργία του σχετικού Πίνακα, σχηματίστηκε αρχικά (με τη βοήθεια του omnic 7.3) μια βάση δεδομένων με τα φάσματα κάθε είδους του γένους *Pleurotus* καθώς και των διαφορετικών γενών και

κατόπιν πραγματοποιήθηκε σύγκριση του φάσματος κάθε είδους με αυτή τη βάση δεδομένων. Τα ποσοστά ομοιότητας στη συνέχεια εισήχθησαν σε πίνακα που παρατίθεται παρακάτω (Πίνακας 5). Κατά αυτόν τον τρόπο διαπιστώνεται η μοναδικότητα των φασμάτων για κάθε ένα είδος. Επίσης αντικατοπτρίζονται σε αρκετά μεγάλο ποσοστό και οι βαθμοί συγγένειας των διαφόρων ειδών. Η μοναδικότητα αυτή των φασμάτων για κάθε είδος αναδεικνύει την FT-IR ως μια επιπλέον κατάλληλη μέθοδο για ταξινομική κατάταξη των μακρομυκήτων.

Πίνακας 5. Μήτρα ποσοστών ομοιότητας, η οποία προέκυψε από τη σύγκριση κάθε είδους *Pleurotus* ή άλλου γένους, με τη βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε.

A. judae	100	97.01	87.97	85.15	87.51	89.29	95.18	96.8	94.2	93.42	96.78	94.5	92.31	95.27	89.25	93.02	96.03	95.33	95.84	94.83	96.56	90.77	91.7
D. squarrosus	97.01	100	90.03	84.95	89.93	94.15	96.75	97.26	96.22	95.71	98.09	96.7	94.53	97.37	94.11	96.14	98.19	98.09	97.93	97.44	98.14	95.62	91.38
E. agaricoides	87.97	90.03	100	90	97.23	90.02	88.72	89.7	91.17	89.5	91.04	95.33	85.08	91.97	94.11	85.83	92.9	90.75	88.98	92.1	91.3	89.96	74.15
M. conica	85.15	84.95	90	100	91.65	78.92	83.55	83.19	85.19	80.83	85.98	89.83	78.35	82.71	84.34	79	85.53	82.7	81.83	83.68	83.13	78.62	80.93
P. ab.	87.51	89.93	97.23	91.65	100	89.24	89.78	90.87	94.18	91.6	92.18	97.5	88.13	91.25	95.55	87.96	93.55	91.69	90.89	93.62	92.08	91.01	74.26
P. abiet.	89.29	94.15	90.02	78.92	89.24	100	94.57	93.65	93.94	95.72	93.14	94.55	93.68	97.08	97.4	95.73	96.71	97.19	94.69	95.58	95.56	97.72	80.2
P. aus.	95.18	96.75	88.72	83.55	89.78	94.57	100	98.56	97.93	97.85	98.23	96.27	97.38	95.85	94.95	97.67	98.28	98.31	98.19	97.49	98.21	96.33	87.59
P. cp.	96.8	97.26	89.7	83.19	90.87	93.65	98.56	100	98.35	97.67	99.15	97.28	96.59	97.01	94.37	96.91	98.33	98.44	98.93	96.15	99.41	95.93	87.6
P. citrinus	94.2	96.22	91.17	85.19	94.18	93.94	97.93	98.35	100	98.91	98.27	98.53	98.29	95.77	96.98	97.88	98.5	98.57	99.09	99.29	98.52	97.52	84.04
P. cl.	93.42	95.71	89.5	80.83	91.6	95.72	97.85	97.67	98.91	100	97.01	96.96	99.16	96.16	97.34	98.99	98.43	99.08	99.06	99.18	98.25	98.88	82.63
P. cr.	96.78	98.09	91.04	85.98	92.18	93.14	98.23	99.15	98.27	97.01	100	97.96	96.09	96.26	94.54	96.66	98.71	98.31	98.7	98.3	98.92	95.71	90.1
P. cs.	94.5	96.7	95.33	89.83	97.5	94.55	96.27	97.28	98.53	96.96	97.96	100	94.88	96.77	97.7	95.34	98.66	97.83	97.46	98.48	98.04	96.32	84.24
P. djiamor	92.31	94.53	85.08	78.35	88.13	93.68	97.38	96.59	98.29	99.16	96.09	94.88	100	94.04	94.96	99.47	96.58	97.97	98.53	98.11	96.73	97.74	83.47
P. dr.	95.27	97.37	91.97	82.71	91.25	97.08	95.85	97.01	95.77	96.16	96.26	96.77	94.04	100	95.67	95.45	97.94	97.78	96.77	96.92	98.32	96.29	84.94
P. er.	89.25	94.11	94.11	84.34	95.55	97.4	94.95	94.37	96.98	97.34	94.54	97.7	94.96	95.67	100	95.76	97.6	97.5	95.98	97.66	96.04	98.53	77.56
P. flab.	93.02	96.14	85.83	79	87.96	95.73	97.67	96.91	97.88	98.99	96.66	95.34	99.47	95.45	95.76	100	97.51	98.84	98.84	98.41	97.28	98.55	85.75
P. nebro.	96.03	98.19	92.9	85.54	93.55	96.71	98.28	98.83	98.5	98.43	98.71	98.66	96.58	97.94	97.6	97.51	100	99.57	98.99	99.1	99.36	97.99	86.56
P. os.	95.33	98.09	90.75	82.7	91.69	97.19	98.31	98.44	98.57	99.08	98.31	97.83	97.97	97.78	97.5	98.84	99.57	100	99.48	99.41	99.25	98.96	86.54
P. pl.	95.84	97.93	88.98	81.83	90.89	94.69	98.19	98.93	99.09	99.06	98.7	97.46	98.53	96.77	95.98	98.84	98.99	99.48	100	99.45	99.25	98.1	87.01
P. sc.	94.83	97.44	92.1	83.68	93.62	95.58	97.49	98.15	99.29	99.18	98.3	98.48	98.11	96.92	97.66	98.41	99.1	99.41	99.45	100	98.93	98.75	84.58
P. sp.	96.56	98.14	91.3	83.13	92.08	95.56	98.21	99.41	98.52	98.25	98.92	98.04	96.73	98.32	96.04	97.28	99.36	99.25	99.25	98.93	100	97.38	86.74
P. tr.	90.77	95.62	89.96	78.62	91.01	97.72	96.33	95.93	97.52	98.88	95.71	96.32	97.74	96.29	98.53	98.55	97.99	98.96	98.1	96.75	97.38	100	80.76
T. chioneus	91.7	91.38	74.15	80.93	74.26	80.2	87.59	87.6	84.04	82.63	90.1	84.24	83.47	84.94	77.56	85.75	86.56	86.54	87.1	84.58	86.74	80.76	100

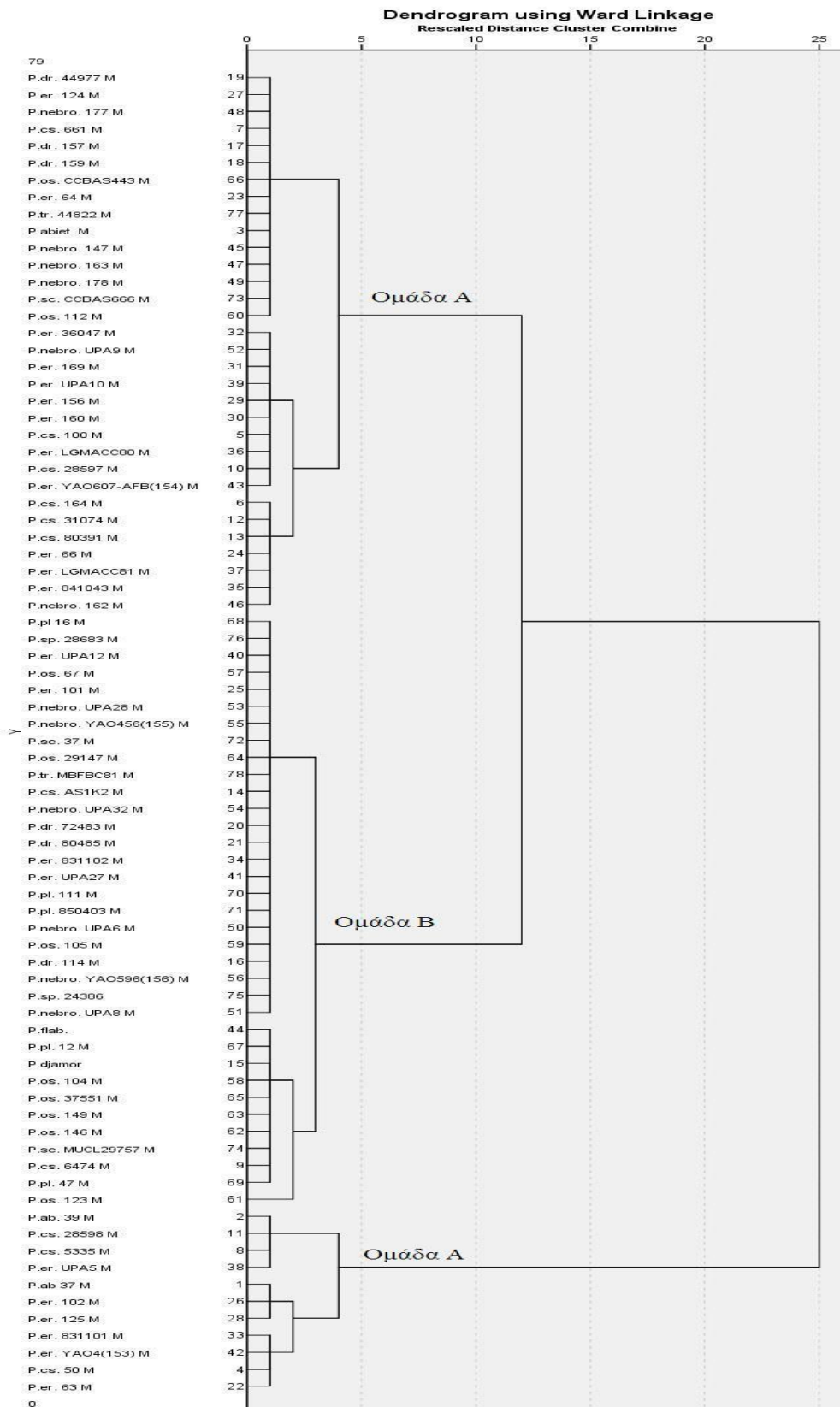
Συγκρίσεις μεταξύ στελεχών του γένους *Pleurotus*

Σε αυτό το τμήμα της παρούσας μελέτης έχει γίνει προσπάθεια διαχωρισμού μεταξύ των διαφόρων στελεχών, σε ομάδες με βάση το βαθμό συγγένειας. Η προσέγγιση που υιοθετήθηκε ήταν η διαδικασία σταδιακής (βήμα-βήμα, 'stepwise') επιλογής ανάμεσα σε δύο πιθανά ενδεχόμενα (τύπου "βοτανικής κλείδας") και η δημιουργία νέων δενδρογραμμάτων μέχρι την ταυτοποίηση ενός «άγνωστου» δείγματος σε επίπεδο είδους.

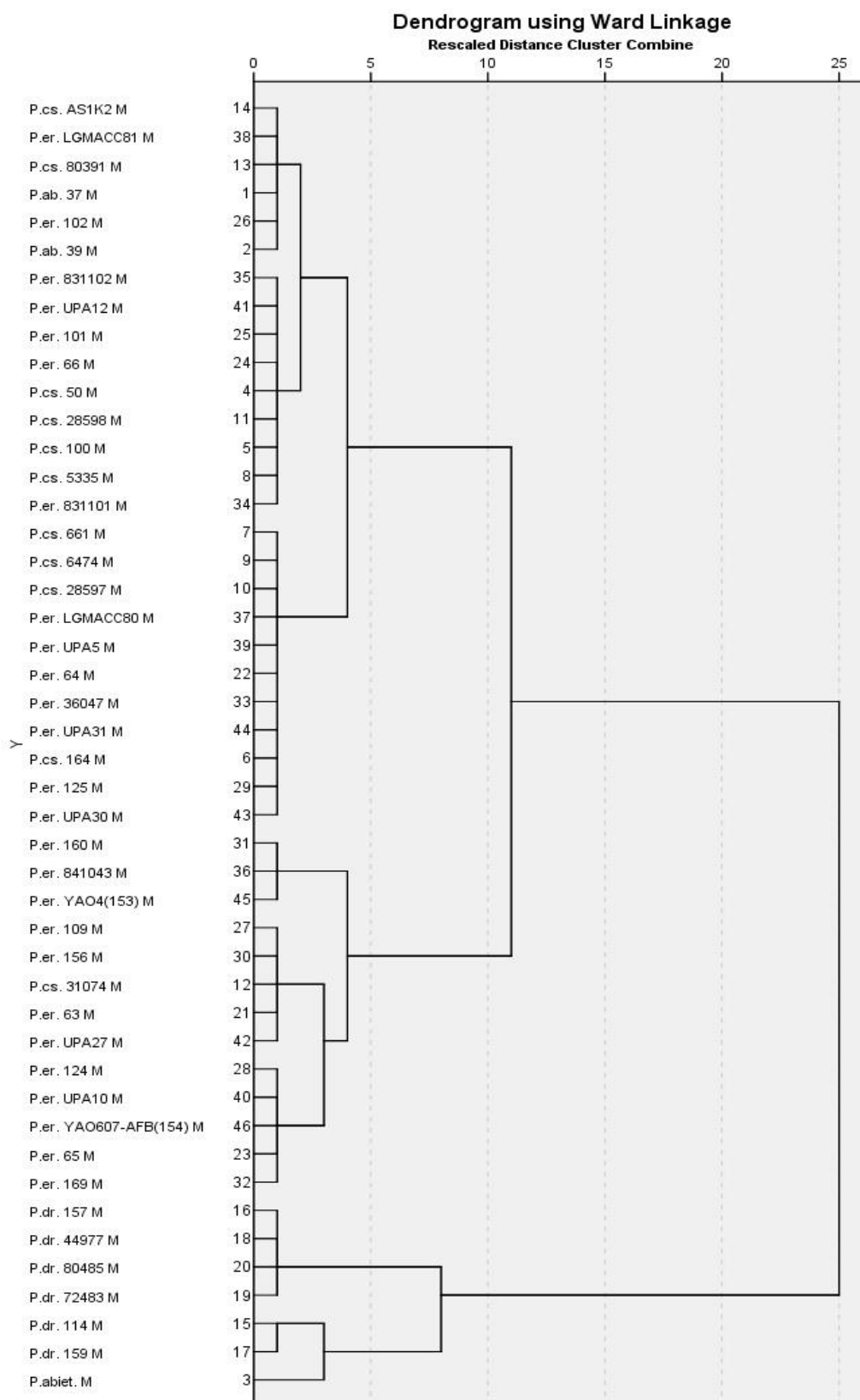
Ως πρώτο βήμα αποφασίστηκε ο διαχωρισμός των στελεχών σε δύο ομάδες με βάση την ύπαρξη απορρόφησης σε κάποια χαρακτηριστική για το γένος *Pleurotus* περιοχή. Η περιοχή που επιλέχτηκε ήταν τα $\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$, δηλαδή η περιοχή των φωσφολιπιδίων. Αυτό έγινε με σκοπό τον σταδιακό περιορισμό του πολύ μεγάλου αριθμού των στελεχών που υπήρχαν και τη διευκόλυνση της σχετικής επεξεργασίας. Ο συγκεκριμένος διαχωρισμός είναι ορατός και από το δενδρόγραμμα που προκύπτει (Εικόνα 50), στο οποίο σε ένα μεγάλο ενιαίο κλάδο ομαδοποιούνται τα στελέχη που δεν εμφανίζουν τη συγκεκριμένη κορυφή (ενώ όλα τα υπόλοιπα είναι στελέχη τα οποία την εμφανίζουν). Υπάρχουν όμως και ορισμένες εξαιρέσεις στελεχών που δεν ομαδοποιούνται με την πλειονότητα των στελεχών του είδους και έτσι τοποθετούνται σε "λάθος" ομάδες. Κάτι τέτοιο είναι πάντως αναμενόμενο αφού τα όρια εμφάνισης της κορυφής και απεικόνισής της πάνω στο φάσμα είναι συχνά δυσδιάκριτα (ειδικά μεταξύ συγγενών ειδών), συνεπώς μία ελαφρά ποσοτική αύξηση μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση τέτοιων εξαιρέσεων.

Θα πρέπει επίσης εδώ να επισημανθεί ότι στη συγκεκριμένη διαδικασία δεν συμπεριλήφθηκαν ορισμένα είδη που αντιπροσωπεύονταν από ένα μόνο στέλεχος, καθώς η έλλειψη περισσοτέρων του ενός στελεχών δημιουργούσε πρόβλημα σε αρκετές περιπτώσεις στη δημιουργία των δενδρογραμμάτων. Τα συγκεκριμένα είδη μελετήθηκαν μόνο στα πλαίσια της προσέγγισης που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα των Αποτελεσμάτων.

Έτσι δημιουργήθηκαν δύο μεγάλες ομάδες στελεχών, με βάση την ύπαρξη ή όχι κορυφής στη συγκεκριμένη περιοχή ($\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$). Στην πρώτη (Α') ομάδα (παρουσία κορυφής) ανήκουν τα στελέχη των ειδών: *P. abalonus*, *P. abieticola*, *P. cystidiosus*, *P. dryinus* και *P. eryngii*. Στην δεύτερη (Β') ομάδα (απουσία κορυφής) ανήκουν τα στελέχη των ειδών: *P. djamor*, *P. flabellatus*, *P. nebrodensis*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. sapidus*, *P. tuberregium*.



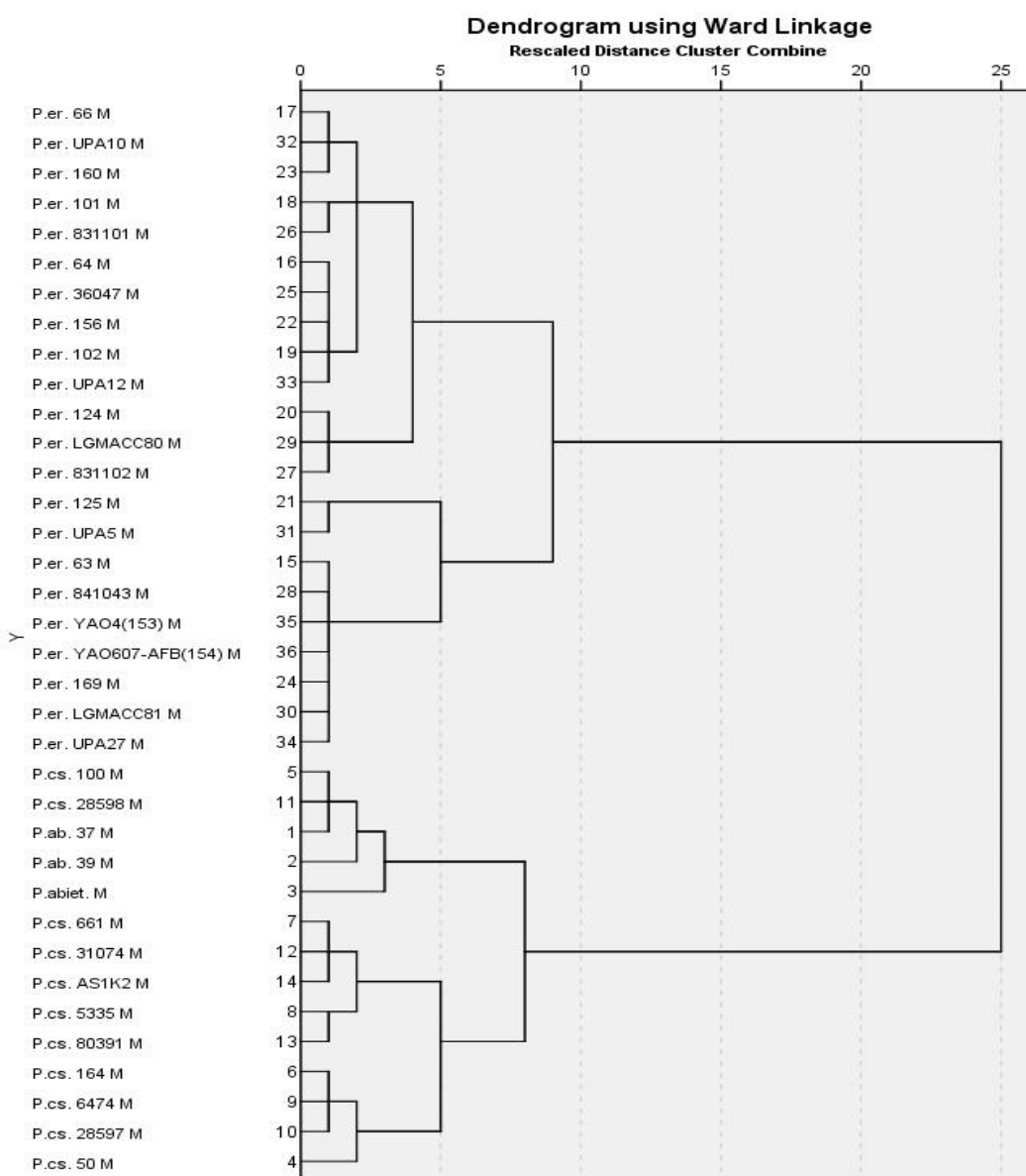
Εικόνα 50. Δενδρόγραμμα που προέκυψε από την επεξεργασία των FT-IR δεδομένων στην περιοχή των $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ επιτρέποντας τον διαχωρισμό του συνόλου των στελεχών *Pleurotus* σε δύο ομάδες.



Εικόνα 51. Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τον διαχωρισμό του είδους *P. dryinus* από τα *P. abalonus*, *P. abieticola*, *P. cystidiosus* και *P. eryngii* μετά από επεξεργασία των δεδομένων FT-IR στην περιοχή $770 - 750 \text{ cm}^{-1}$.

Α' Ομάδα

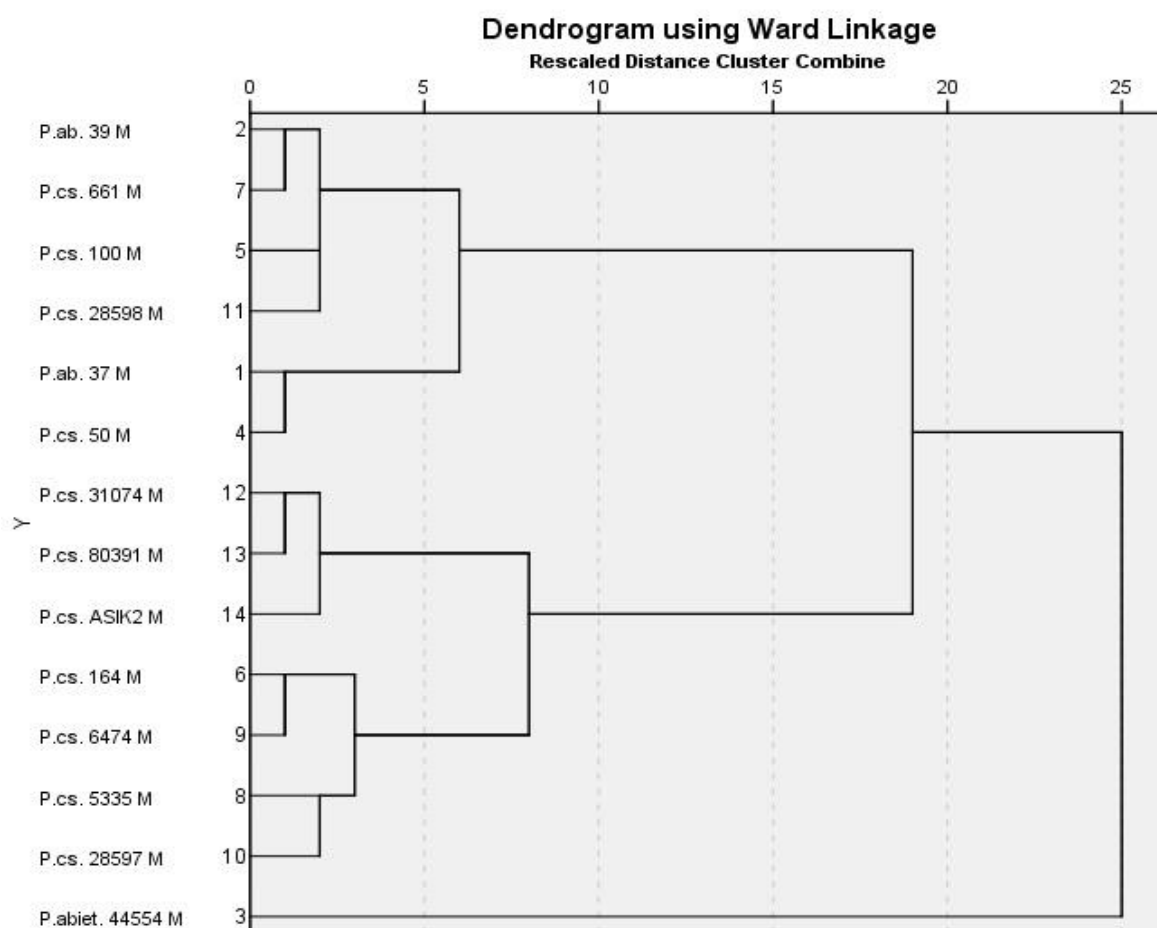
Ξεκινώντας από την Α' Ομάδα, αρχικά μελετήθηκε η περιοχή μεταξύ 770 και 750 cm^{-1} (περιοχή αποτυπώματος, πιθανότατα α-ανωμερούς). Σε αυτήν την περιοχή διαχωρίστηκαν σε έναν κλάδο τα στελέχη του *P. dryinus* (Εικόνα 51). Σύμφωνα λοιπόν με την προσέγγιση που υιοθετήθηκε, εάν κάποιο υπό διερεύνηση ("άγνωστο") στέλεχος καταταγεί εντός του γκρουπ ('cluster') του *P. dryinus*, τότε ανήκει στο εν λόγω είδος. Εάν όχι, τότε ανήκει σε κάποιο από τα υπόλοιπα είδη της συγκεκριμένης Ομάδας, συνεπώς η διαδικασία συνεχίζεται με το επόμενο βήμα.



Εικόνα 52. Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τον διαχωρισμό του είδους *P. eryngii* από τα *P. abalonus*, *P. abieticola* και *P. cystidiosus* μετά από επεξεργασία των δεδομένων FT-IR στην περιοχή 1125 - 1068 cm^{-1} .

Εφόσον το *P. dryinus* διαχωρίστηκε από τα υπόλοιπα είδη, τα στελέχη του αποσύρονται από την περαιτέρω στατιστική επεξεργασία, η οποία συνεχίζεται με τα στελέχη από τα υπόλοιπα τέσσερα είδη στην περιοχή από τα 1128 μέχρι τα 1068 cm^{-1} (περιοχή των νουκλεϊκών οξέων). Στη συγκεκριμένη περιοχή παρατηρείται διαχωρισμός του *P. eryngii* σε ξεχωριστό γκρουπ (Εικόνα 52). Όμοια και εδώ, εάν το άγνωστο στέλεχος ανήκει στο είδος *P. eryngii* τότε θα αποτελέσει μέρος του συγκεκριμένου κλάδου, διαφορετικά ανήκει σε κάποιο από τα εναπομείναντα τρία taxa.

Τέλος, τον διαχωρισμό των *P. dryinus* και *P. eryngii* από τα υπόλοιπα είδη, μελετήθηκε και η περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος μεταξύ 710 και 695 cm^{-1} , προκειμένου να διαχωριστούν μεταξύ τους και τα υπόλοιπα τρία είδη. Στη συγκεκριμένη περιοχή το *P. abieticola* ομαδοποιείται σε ένα ξεχωριστό κλάδο (Εικόνα 53), ενώ τα *P. abalonus* και *P. cystidiosus* ομαδοποιούνται μαζί (καθώς τα δύο αυτά taxa θεωρούνται φυλογενετικά συγγενή, Zervakis *et al.* 2004).

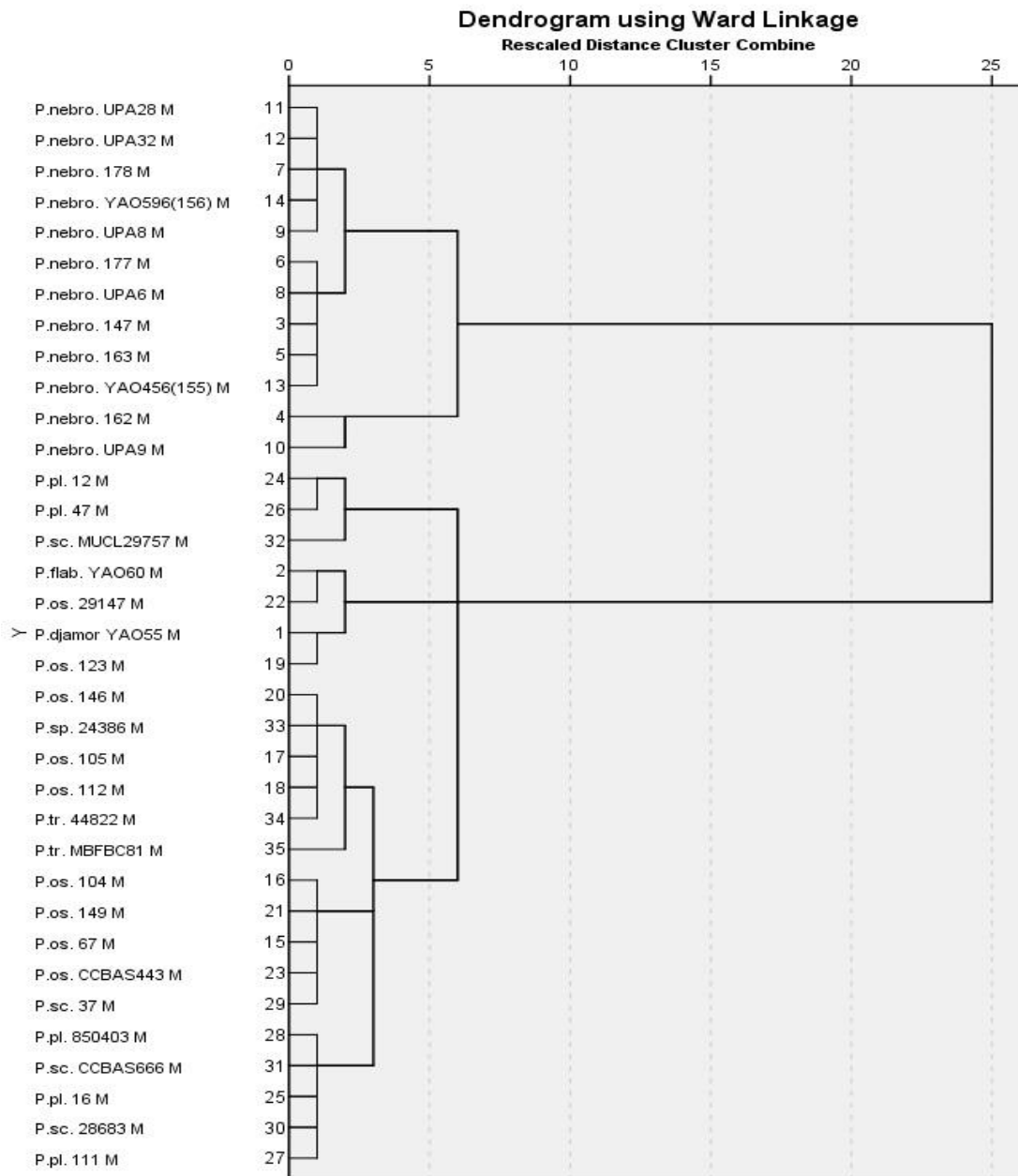


Εικόνα 53. Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τον διαχωρισμό του είδους *P. abieticola* από τα *P. abalonus* και *P. cystidiosus* μετά από επεξεργασία των δεδομένων FT-IR στην περιοχή 710 - 695 cm^{-1} .

Β' Ομάδα

Ανάλογη διαδικασία με την προηγούμενη υιοθετήθηκε και για τα taxa της Β' Ομάδας, ώστε αυτά να διαχωριστούν με βάση τη διαφορετική απορρόφηση που εμφανίζουν σε επιλεγμένες περιοχές του φάσματος.

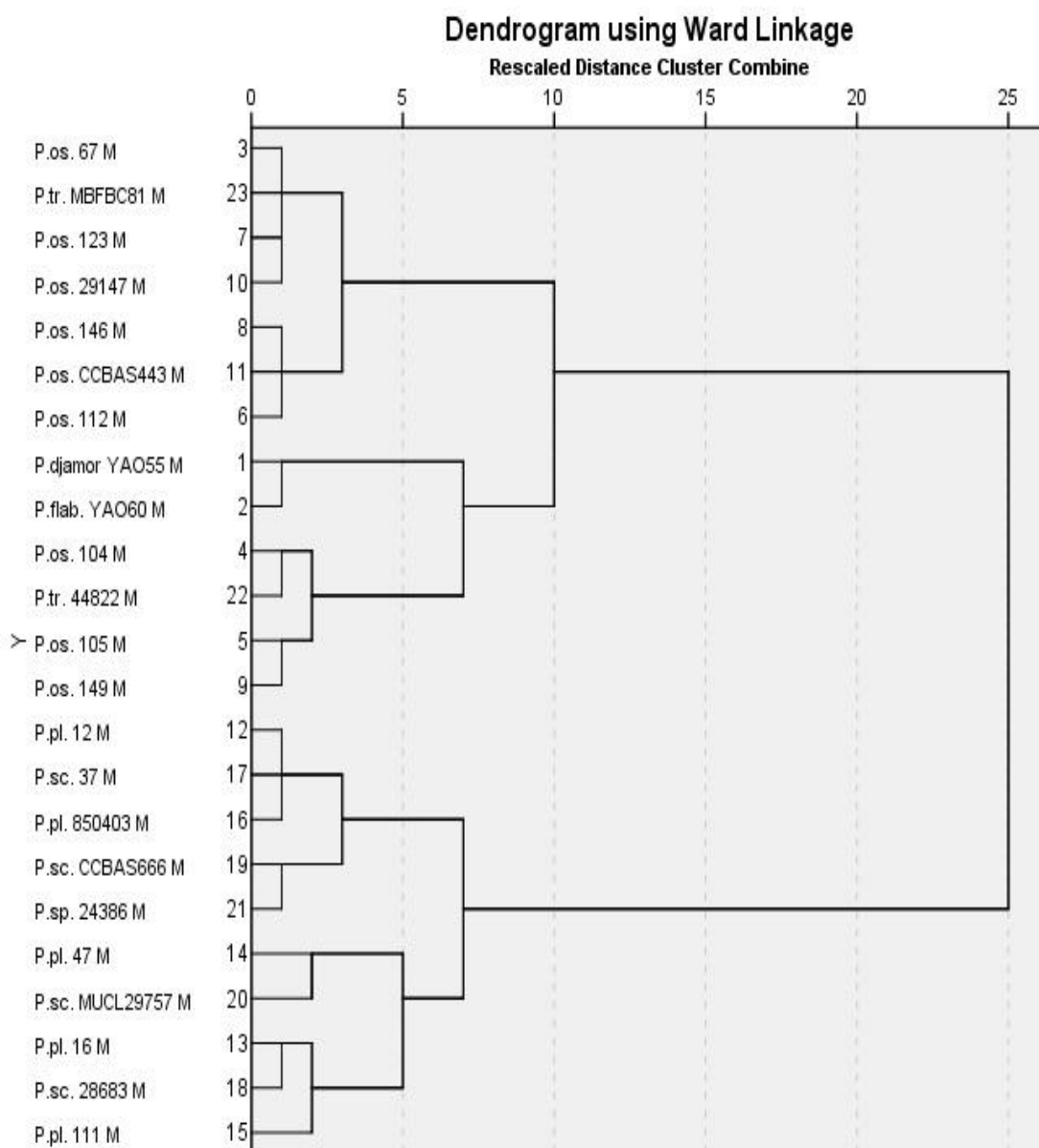
Έτσι, ξεκινώντας αρχικά από ολόκληρη την περιοχή ενδιαφέροντος ($1800-600\text{ cm}^{-1}$), διαχωρίστηκε το *Pleurotus nebrodensis* από τα υπόλοιπα taxa της Β' Ομάδας (Εικόνα 54).



Εικόνα 54. Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τον διαχωρισμό του είδους *P. nebrodensis* από τα *P. djamor*, *P. flabellatus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. sapidus* και *P. tuberregium* μετά από επεξεργασία των δεδομένων FT-IR στην περιοχή $1800-600\text{ cm}^{-1}$.

Όπως λοιπόν φαίνεται και από το παραπάνω δενδρόγραμμα, το *P. nebrodensis* διαχωρίζεται πλήρως από τα υπόλοιπα είδη εμφανίζοντας έντονη διαφοροποίηση, καθώς η διάκριση του επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας το συνολικό εύρος του φάσματος και όχι κάποια επιμέρους περιοχή του.

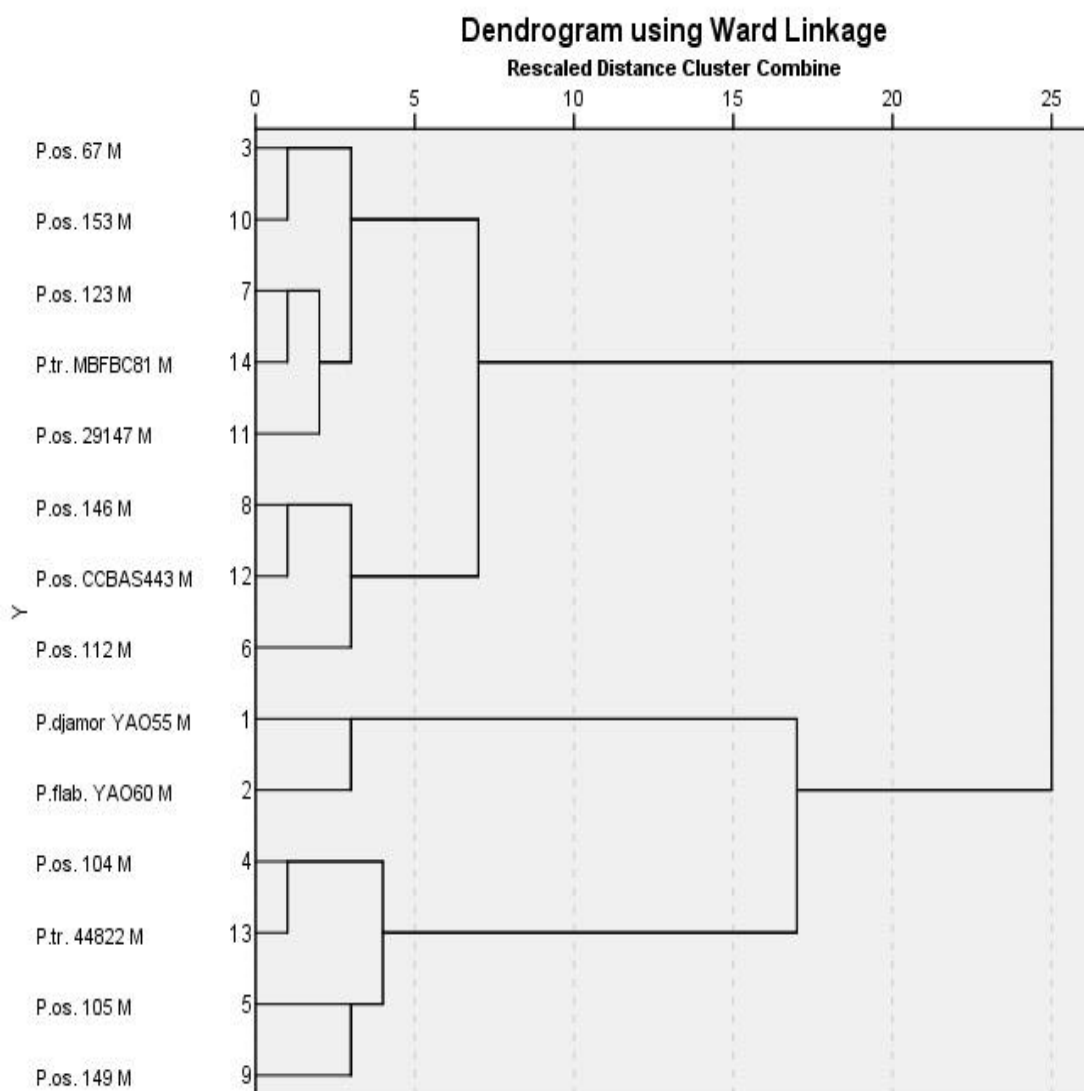
Στη συνέχεια, και αφού απομακρύνθηκαν τα στελέχη *P. nebrodensis* από την περαιτέρω ανάλυση, μελετήθηκε η περιοχή του φάσματος από τα 710 έως τα 695 cm^{-1} (δηλ. τμήμα του δακτυλικού αποτυπώματος).



Εικόνα 55. Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τον διαχωρισμό των ειδών *P. pulmonarius*, *P. sjoer-caju* και *P. sapidus* από τα *P. ostreatus*, *P. djamor*, *P. flabellatus* και *P. tuberregium* μετά από επεξεργασία των δεδομένων FT-IR στην περιοχή 710-695 cm^{-1} .

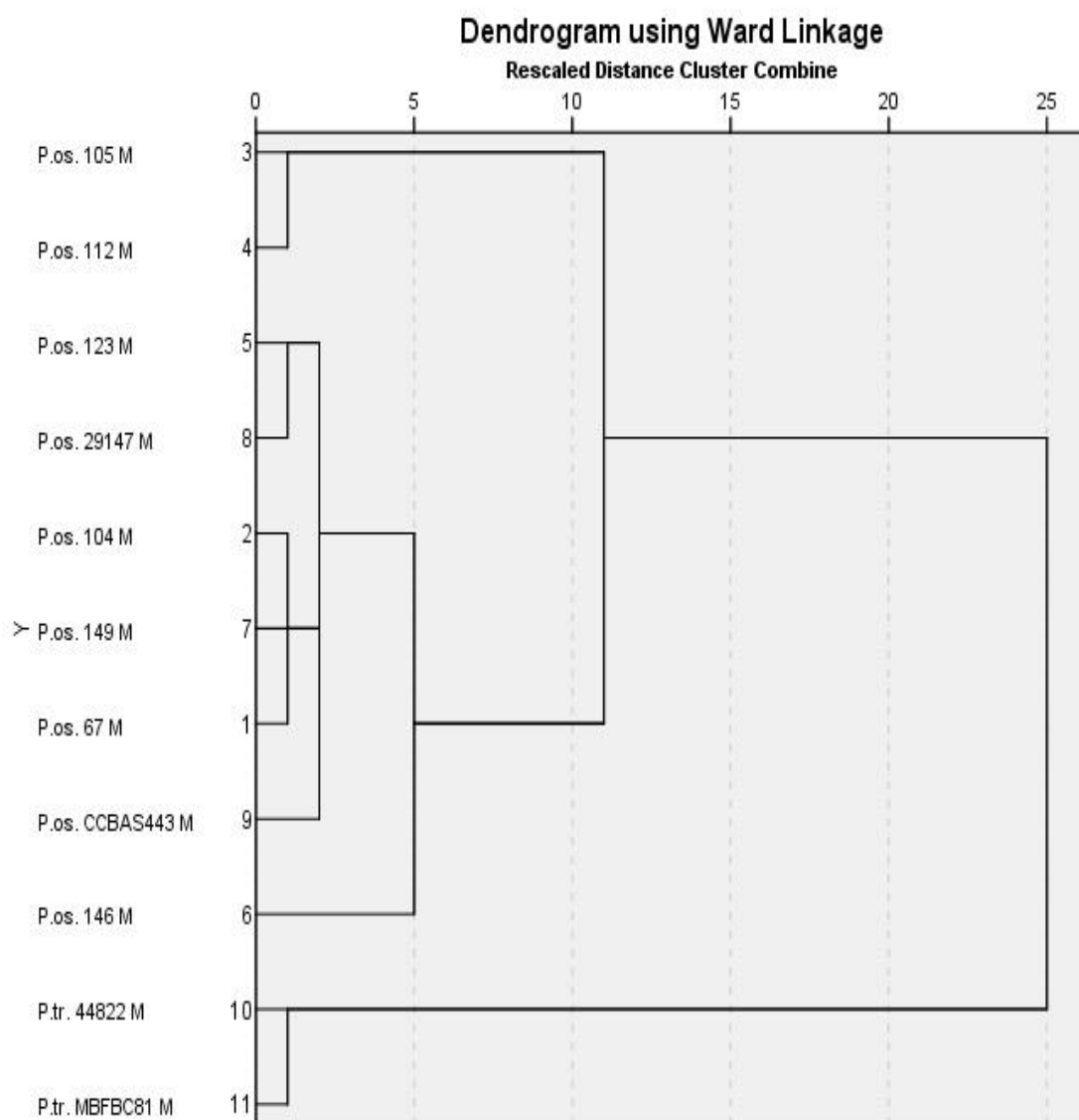
Έτσι έγινε δυνατή η ένταξη στελεχών των ειδών *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus sajor-caju* και *Pleurotus sapidus* στο ίδιο γκρουπ και παράλληλα ο διαχωρισμός τους από τα υπόλοιπα είδη *Pleurotus* (Εικόνα 55), το οποίο συνάδει με την κοινή ταξινομική τους θέση και τη μεγάλη απόσταση τους από τα άλλα taxa.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ξανά η ίδια περιοχή ($710-695\text{ cm}^{-1}$) αφού πρώτα αφαιρέθηκαν τα είδη που είχαν προηγουμένως διαχωριστεί από την Ομάδα Β', δηλ. τα *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus pulmonarius*, *P. sajor-caju* και *Pleurotus sapidus*. Από το δενδρόγραμμα που προέκυψε (Εικόνα 56) διαχωρίστηκαν το *Pleurotus djamor* και *P. flabellatus* σε ένα ξεχωριστό cluster.



Εικόνα 56. Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τον διαχωρισμό των ειδών *P. djamor* και *P. flabellatus* από τα *P. ostreatus* και *P. tuberregium* μετά από επεξεργασία των δεδομένων FT-IR στην περιοχή $710-695\text{ cm}^{-1}$.

Τέλος μελετήθηκε η περιοχή του φάσματος $950-650\text{ cm}^{-1}$, αλλά αφού πρώτα αφαιρέθηκαν όλα τα είδη που είχαν ήδη διαχωριστεί. Έτσι προέκυψε νέο δενδρόγραμμα (Εικόνα 57) στο οποίο εμφανίζεται καθαρά ο διαχωρισμός του *P. ostreatus* από το *P. tuberregium*.



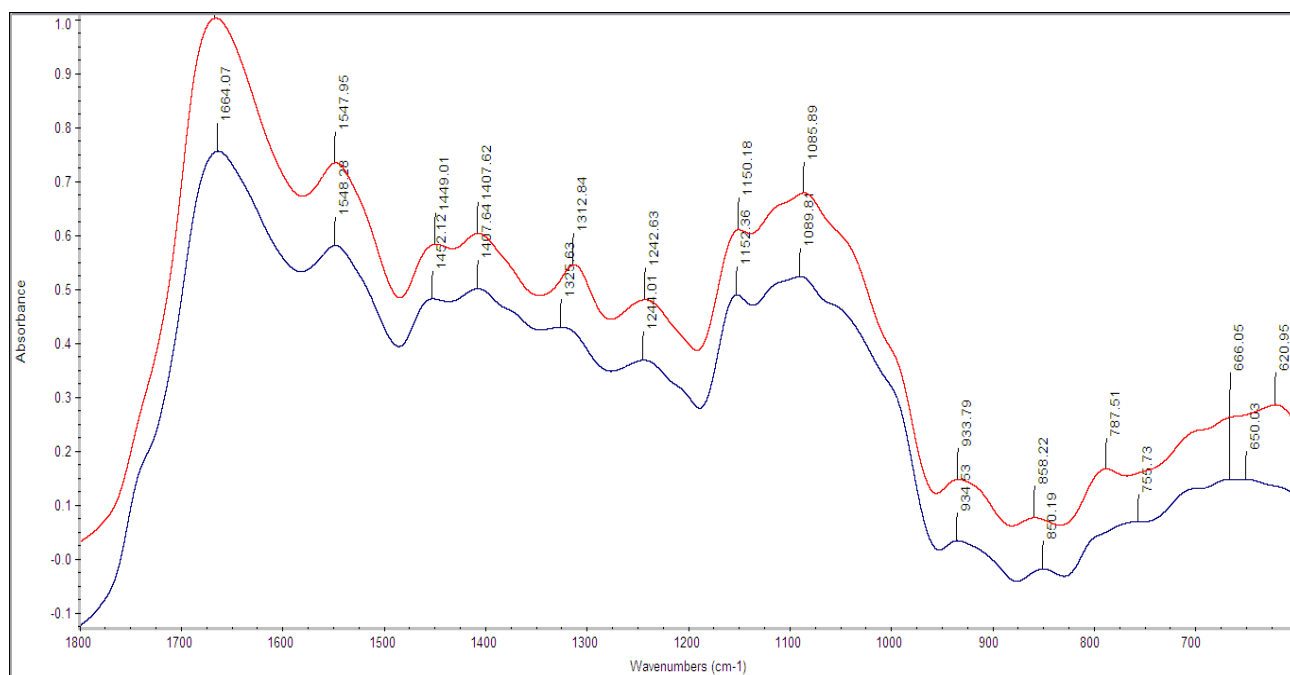
Εικόνα 57. Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τον διαχωρισμό των ειδών *P. ostreatus* και *P. tuberregium* μετά από επεξεργασία των δεδομένων FT-IR στην περιοχή $950-650\text{ cm}^{-1}$.

Συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων καλλιέργειας

Εκτός από τις μετρήσεις που έγιναν για τη μελέτη των διαφορών στα φάσματα απορρόφησης μεταξύ διαφόρων στελεχών, ειδών και γενών μακρομυκήτων, εξετάστηκε και το κατά πόσον η σύσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα της ανάλυσης FT-IR. Έτσι εκτός από το PDA (Potato Dextrose Agar), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή μυκηλίου από όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν στα πλαίσια της ταξινομικής μελέτης, έγινε χρήση CM (Cellulose Medium) και WA (Water Agar) προκειμένου να εντοπισθούν διαφορές στα φάσματα απορρόφησης μεταξύ των διαφορετικών υλικών. Δυστυχώς στην προσπάθεια ανάπτυξης των μυκήτων σε στερεό WA δεν κατέστη δυνατή η συγκομιδή μυκηλίου, καθώς οι υφές αναπτύσσονταν πολύ αραιά (και συνεπώς δεν παραγόταν επαρκής ποσότητα μυκηλίου για την πραγματοποίηση της μέτρησης) και στο μεγαλύτερο μέρος τους εντός του μέσου καλλιέργειας (γεγονός που παρεμπόδιζε την παραλαβή καθαρού μυκηλίου, απαραίτητου για τη μέτρηση). Έτσι πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις μόνο για το CM, και οι διαφορές που ανιχνεύτηκαν μεταξύ των δύο υλικών (PDA και CM) για το ίδιο στέλεχος κάθε φορά, παρατίθενται παρακάτω.

Pleurotus australis (στέλεχος D2245.11)

Στο συγκεκριμένο στέλεχος παρατηρείται μια αρκετά έντονη διαφορά σε ποσοτικό επίπεδο κατά την ανάπτυξή στα δύο διαφορετικά υλικά.

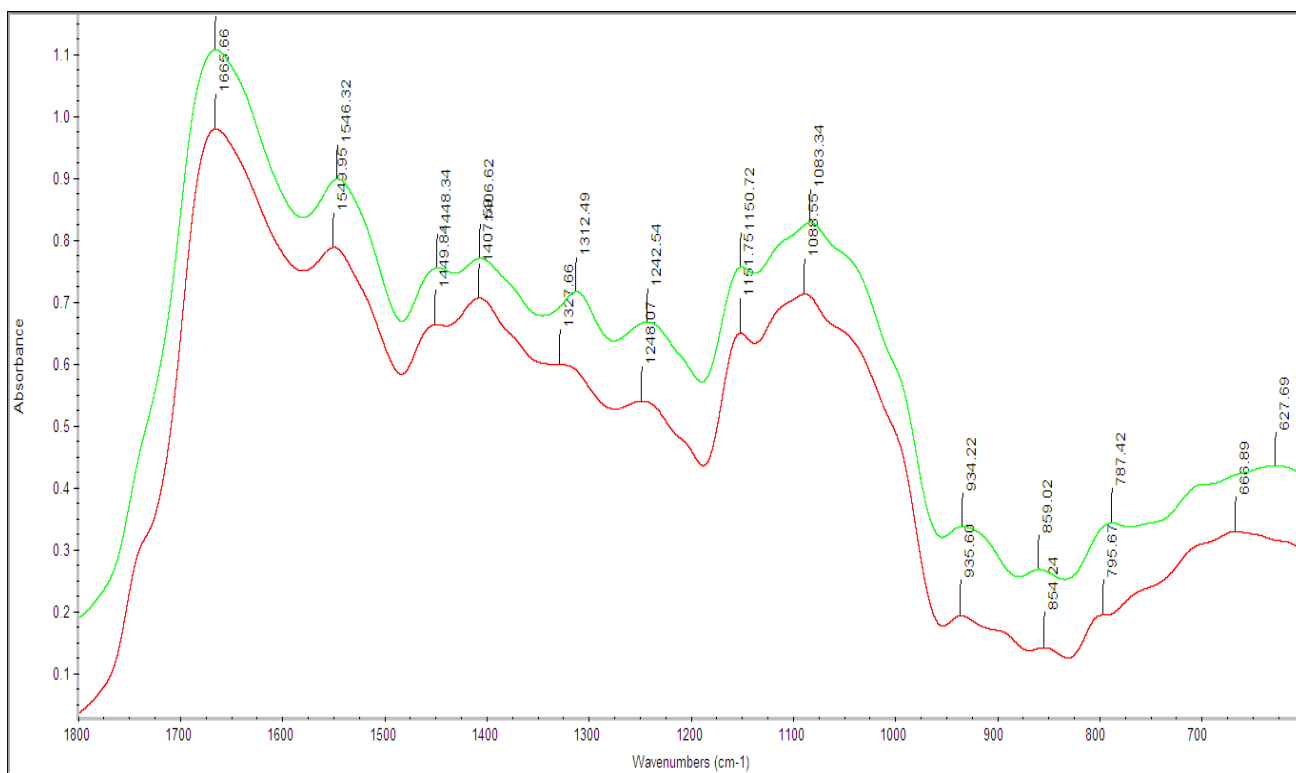


Εικόνα 58. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. australis* (στέλεχος D2245.11) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (μπλέ) και CM (κόκκινη).

Έτσι στο CM παρατηρείται μια πιο έντονη απορρόφηση στα 1312 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στην περιοχή του αμιδίου III των πρωτεϊνών, κορυφή η οποία έχει μετατοπισθεί σε σχέση με το PDA από τα 1325 cm^{-1} . Επίσης παρατηρούνται και ορισμένες μετατοπίσεις κορυφών στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος, (κάτω από τα 800 cm^{-1}).

Pleurotus calyptratus (MUCL 28909)

Μεταξύ των δύο διαφορετικών υλικών και σε αυτή τη περίπτωση παρατηρείται μια μετατόπιση κορυφής από τα 1327 cm^{-1} του PDA στα 1312 cm^{-1} του CM, ενώ και εδώ η απορρόφηση στην περίπτωση του CM είναι πολύ πιο έντονη. Σε αντίθεση όμως με το *P. australis*, όλο το υπόλοιπο φάσμα είναι σχεδόν όμοιο.



Εικόνα 59. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. calyptratus* (MUCL 28909) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (κόκκινη) και CM (πράσινη).

Pleurotus citrinopileatus (MUCL 28684)

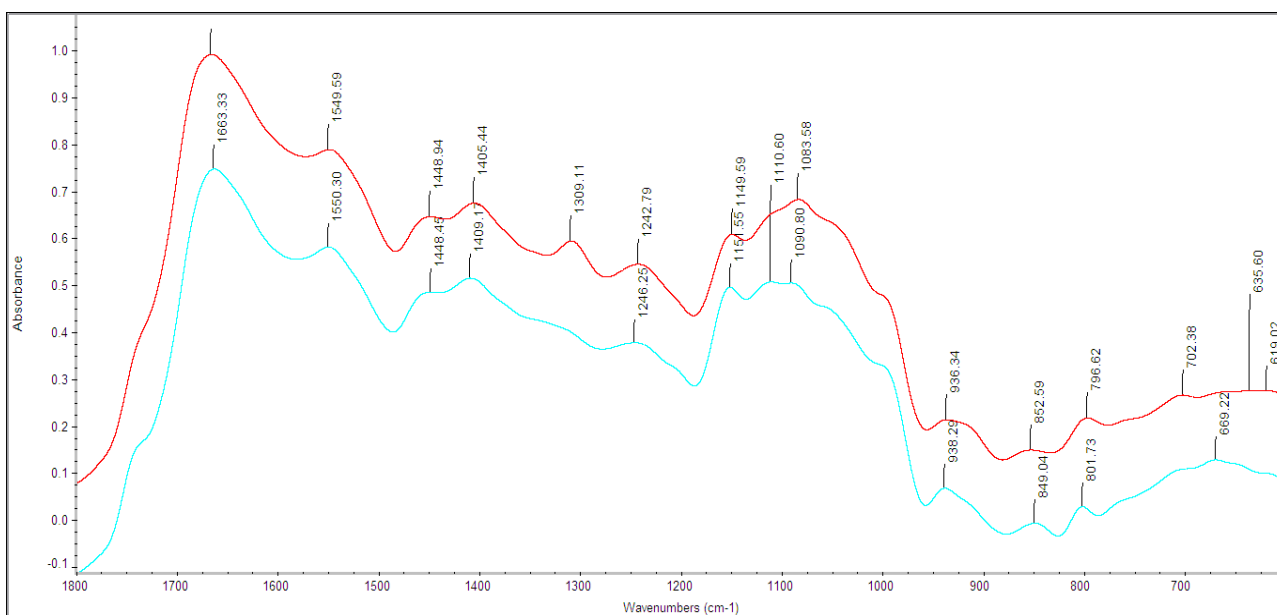
Στο στέλεχος *P. citrinopileatus* που εξετάστηκε δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη διαφορά μεταξύ των φασμάτων που παραλήφθηκαν από τα δύο θρεπτικά μέσα ανάπτυξης.



Εικόνα 60. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. citrinopileatus* (MUCL 28684) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (μωβ) και CM (κόκκινη).

Pleurotus columbinus (CBS 37351)

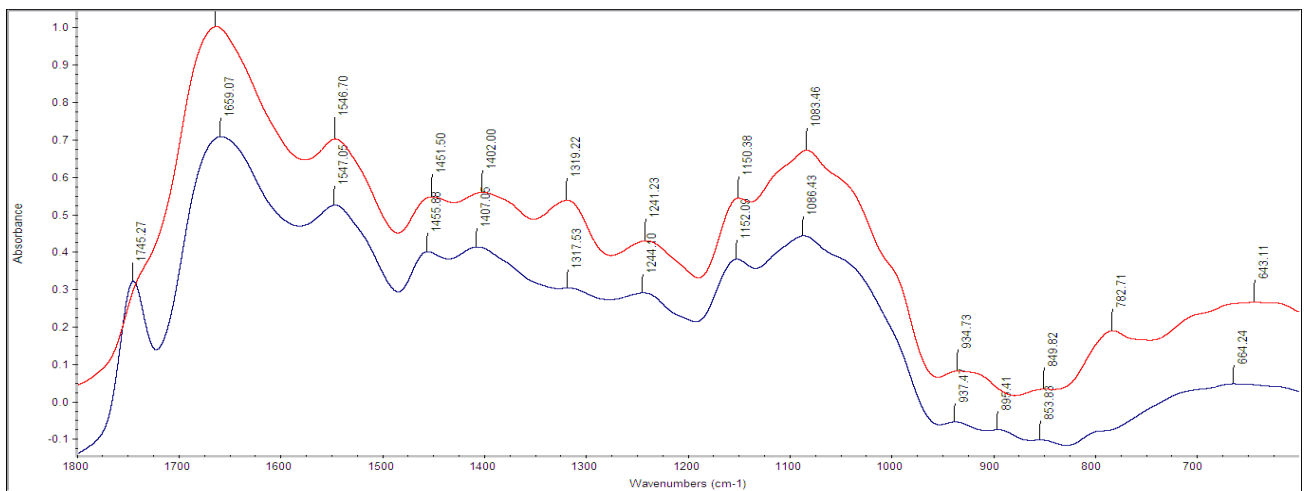
Στο συγκεκριμένο στέλεχος οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο θρεπτικών μέσων ανάπτυξης ήταν αρκετά μεγάλες. Στο στέλεχος που αναπτύχθηκε σε CM απουσιάζει η κορυφή στα 1110 cm⁻¹, ενώ υπάρχει μια κορυφή στην περιοχή του αμιδίου III των πρωτεϊνών (1309 cm⁻¹), η οποία απουσίαζε σε αυτό που αναπτύχθηκε σε PDA.



Εικόνα 61. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. columbinus* (CBS 37351) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (γαλάζια) και CM (κόκκινη).

Pleurotus cystidiosus (LGAM P50)

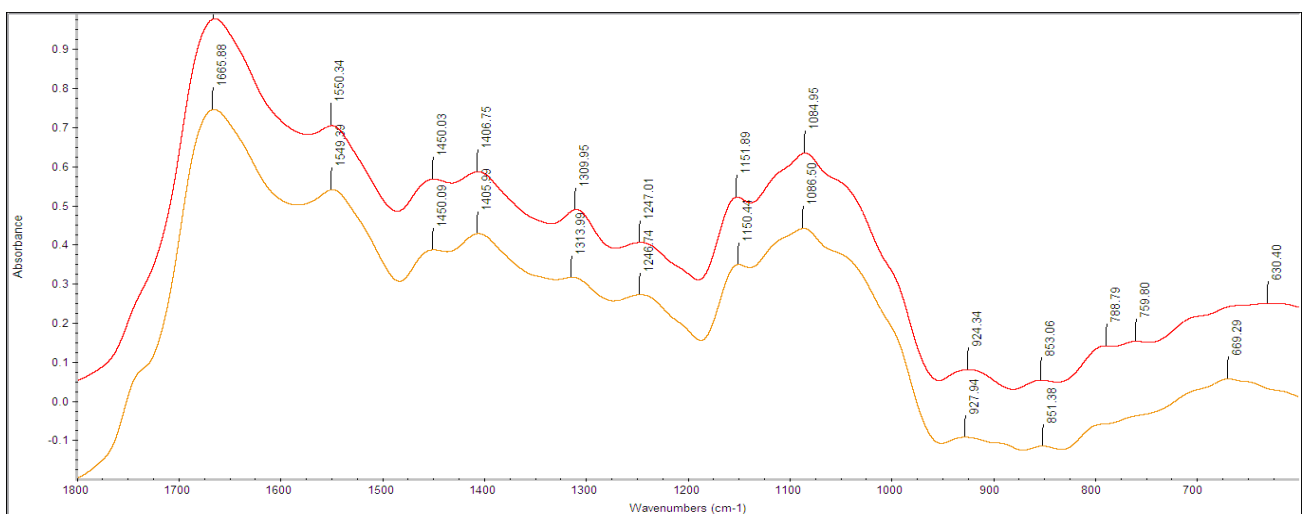
Σε αυτό το στέλεχος παρατηρείται, όπως και στα προηγούμενα, μια ποσοτική διαφορά στην περιοχή του αμιδίου III των πρωτεϊνών (1317 cm^{-1}), ενώ στο φάσμα που λήφθηκε από το στέλεχος που αναπτύχθηκε σε CM, απουσιάζει η κορυφή στην περιοχή των φωσφολιπιδίων (1745 cm^{-1}). Διαφορές παρατηρούνται και στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος (κάτω από 900 cm^{-1}).



Εικόνα 62. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. cystidiosus* (LGAM P50) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (μπλε) και CM (κόκκινη).

Pleurotus cystidiosus (CFMR 6474)

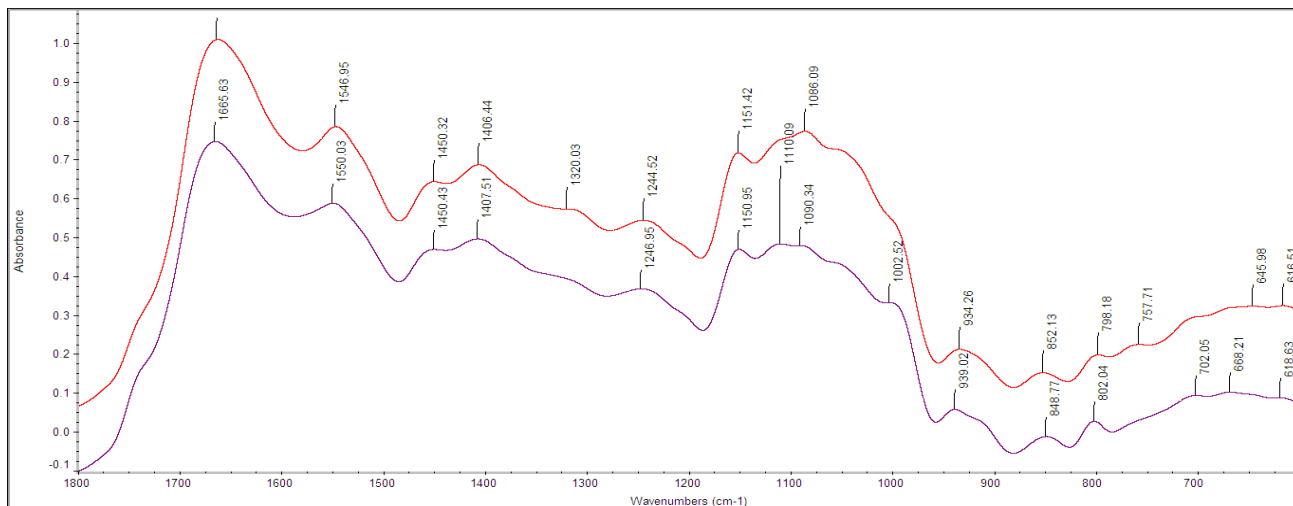
Σε αντίθεση με το παραπάνω συγγενές στέλεχος, εδώ οι διαφορές δεν είναι μεγάλες και εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή κάτω από τα 800 cm^{-1} και σε μια μικρή ποσοτική διαφορά στις περιοχές των 1740 cm^{-1} και 1313 cm^{-1} .



Εικόνα 63. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. cystidiosus* (CFMR 6474) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (κίτρινη) και CM (κόκκινη).

Pleurotus djamor (CAS Y55)

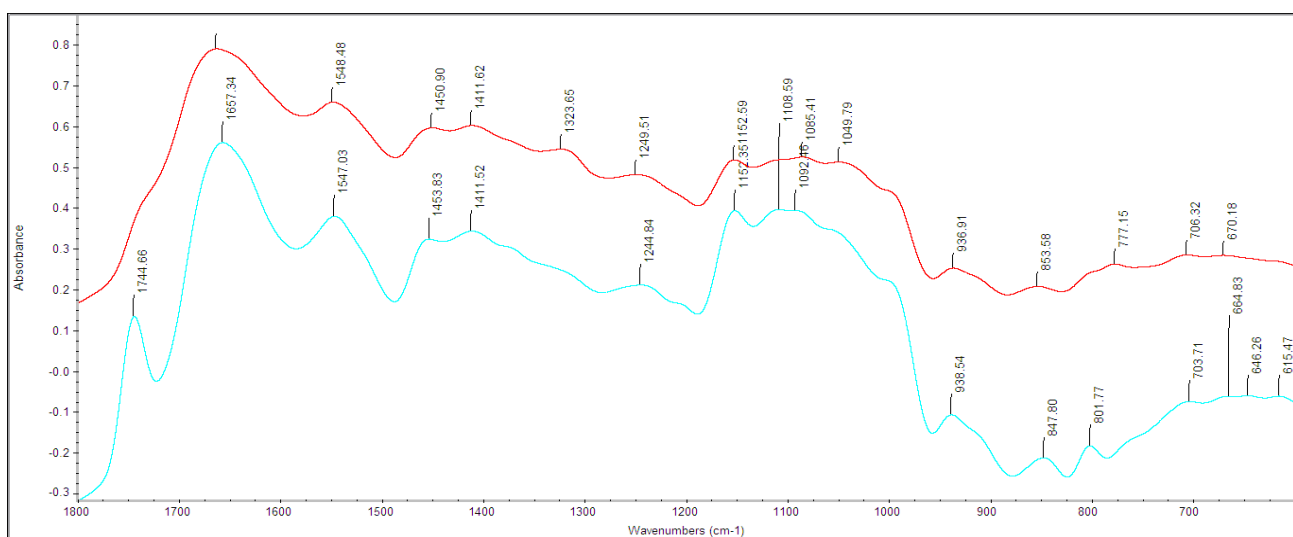
Και εδώ οι διαφορές μεταξύ των δύο υλικών είναι αρκετά μεγάλες, καθώς στο στελέχος που αναπτύχθηκε σε CM απουσιάζουν οι δύο κορυφές στα 1110 cm^{-1} και 1002 cm^{-1} , ενώ παρουσιάζεται απορρόφηση στην περιοχή του αμιδίου III των πρωτεϊνών (1320 cm^{-1}).



Εικόνα 64. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. djamor* (CAS Y55) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (μωβ) και CM (κόκκινη). Φάσματα απορρόφησης *P. djamor*.

Pleurotus eryngii (LGAM P63)

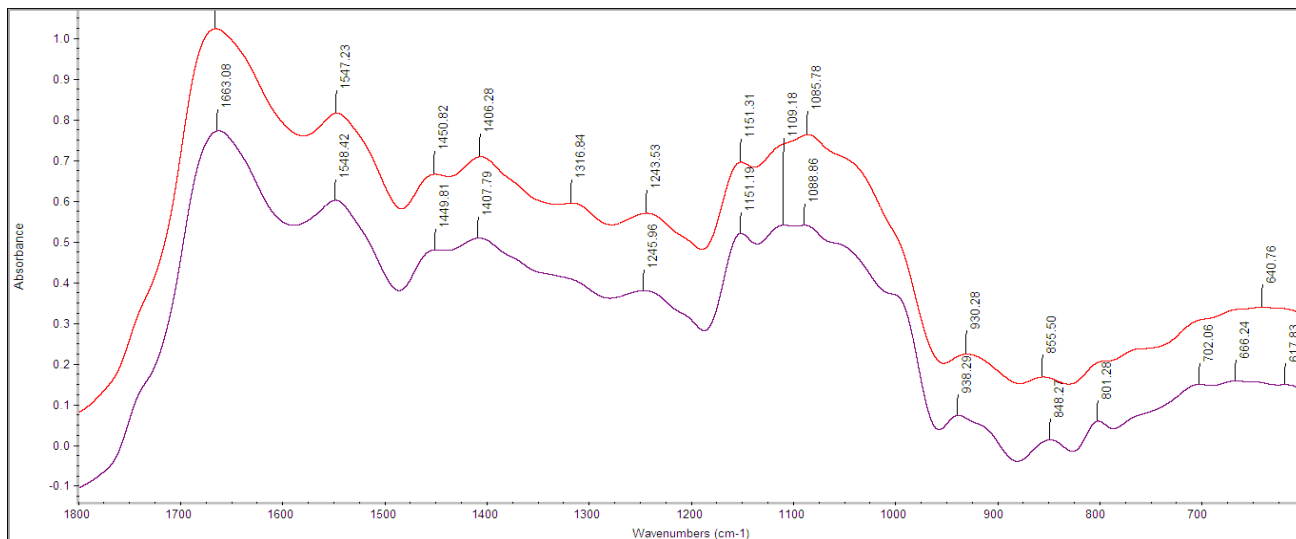
Ομοίως και εδώ οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο θρεπτικών μέσων είναι μεγάλες. Στο φάσμα του στελέχους που αναπτύχθηκε σε CM, απουσιάζουν οι κορυφές στα 1744 και 1108 cm^{-1} , ενώ έχουν εμφανιστεί κορυφές στα 1323 και 1049 cm^{-1} .



Εικόνα 65. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. eryngii* (LGAM P63) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (γαλάζια) και CM (κόκκινη).

Pleurotus flabellatus (CAS Y60)

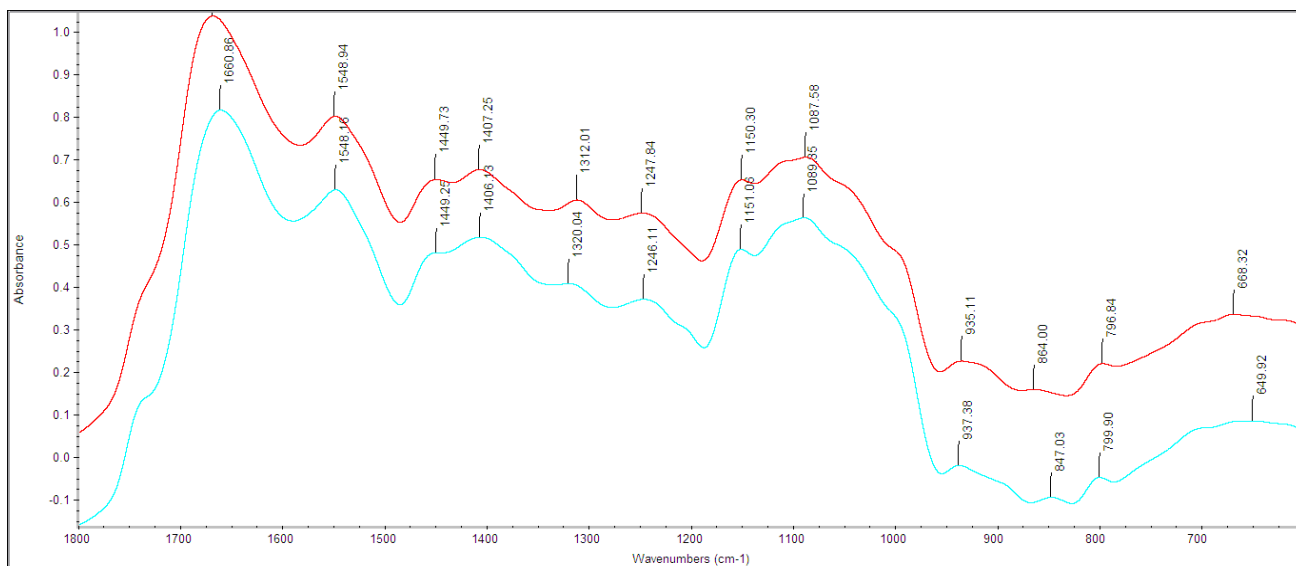
Και εδώ, όπως με το πολύ συγγενές είδος *P. djamor*, στο φάσμα του CM απουσιάζει η κορυφή των 1109 cm^{-1} , ενώ εμφανίζει κορυφή απορρόφησης στα 1316 cm^{-1} (περιοχή αμιδίου III).



Εικόνα 66. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. flabellatus* (CAS Y60) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (μωβ) και CM (κόκκινη).

Pleurotus nebrodensis (UPA 28)

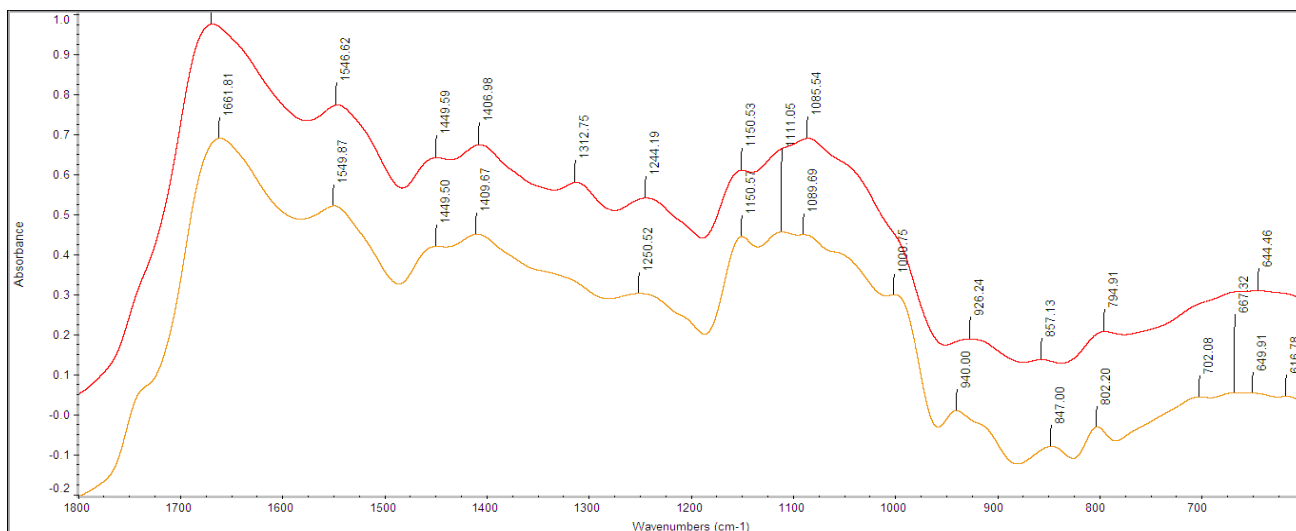
Στο συγκεκριμένο στέλεχος οι διαφορές στα φάσματα απορρόφησης μεταξύ των δύο υλικών είναι ελάχιστες και περιορίζονται μόνο σε ορισμένες μετατοπίσεις κορυφών στα 1680 και 847 cm^{-1} .



Εικόνα 67. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. nebrodensis* (UPA 28) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (γαλάζια) και CM (κόκκινη).

Pleurotus ostreatus (CBS 29147)

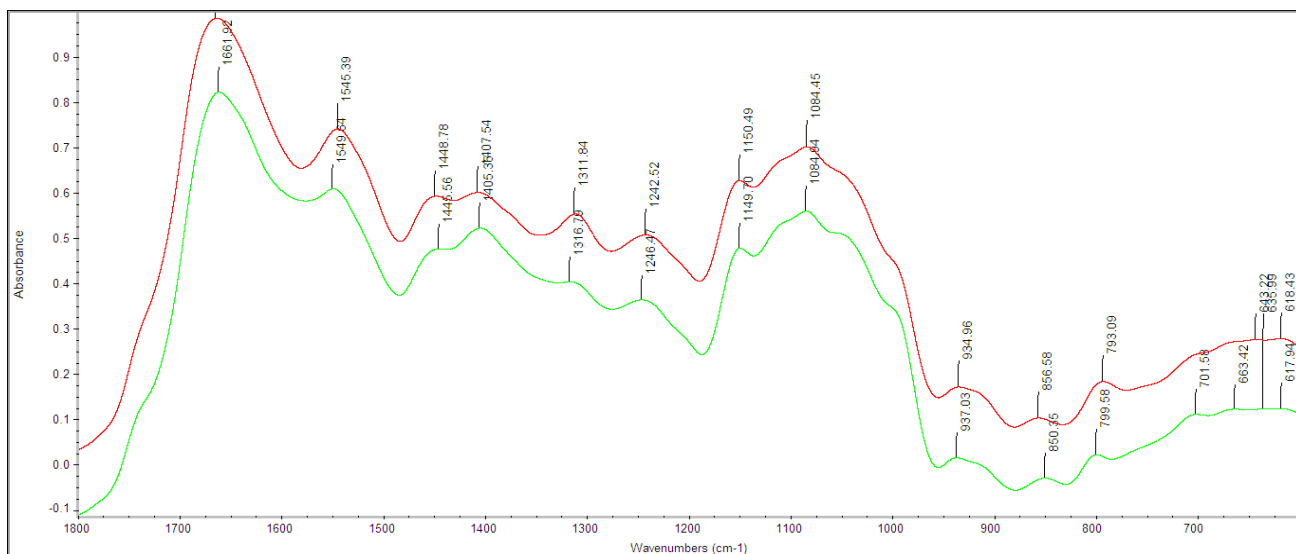
Στο στέλεχος *P. ostreatus* οι διαφορές στα φάσματα απορρόφησης που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο υλικών ήταν χαρακτηριστικές. Οι σημαντικότερες αφορούν στην απουσία κορυφής στα 1110 και 1000 cm^{-1} και στην παρουσία κορυφής στην περιοχή του αμιδίου III (1312 cm^{-1}) στο CM σε σχέση με το PDA.



Εικόνα 68. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. ostreatus* (CBS 29147) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (κίτρινη) και CM (κόκκινη).

Pleurotus pulmonarius (LGAM P133)

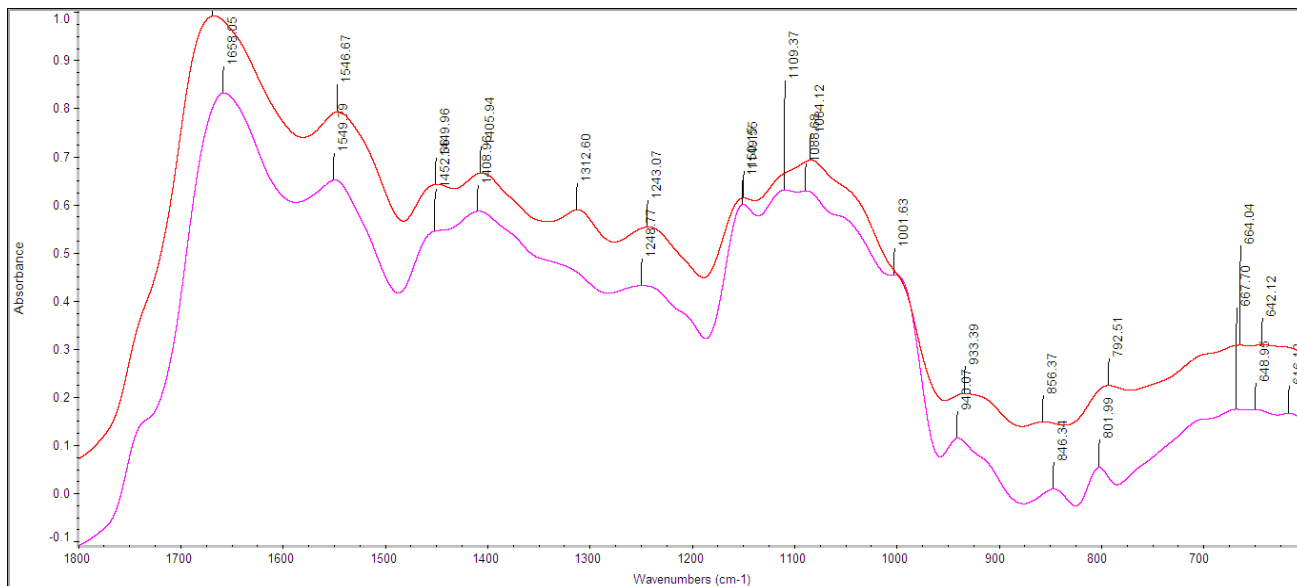
Στο συγκεκριμένο στέλεχος δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στο φάσμα απορρόφησης, με εξαίρεση μικρές διαφοροποιήσεις σε περιοχές κάτω από τα 800 cm^{-1} .



Εικόνα 69. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. pulmonarius* (LGAM P133) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (πράσινη) και CM (κόκκινη).

Pleurotus sajor-caju (LGMACC 37)

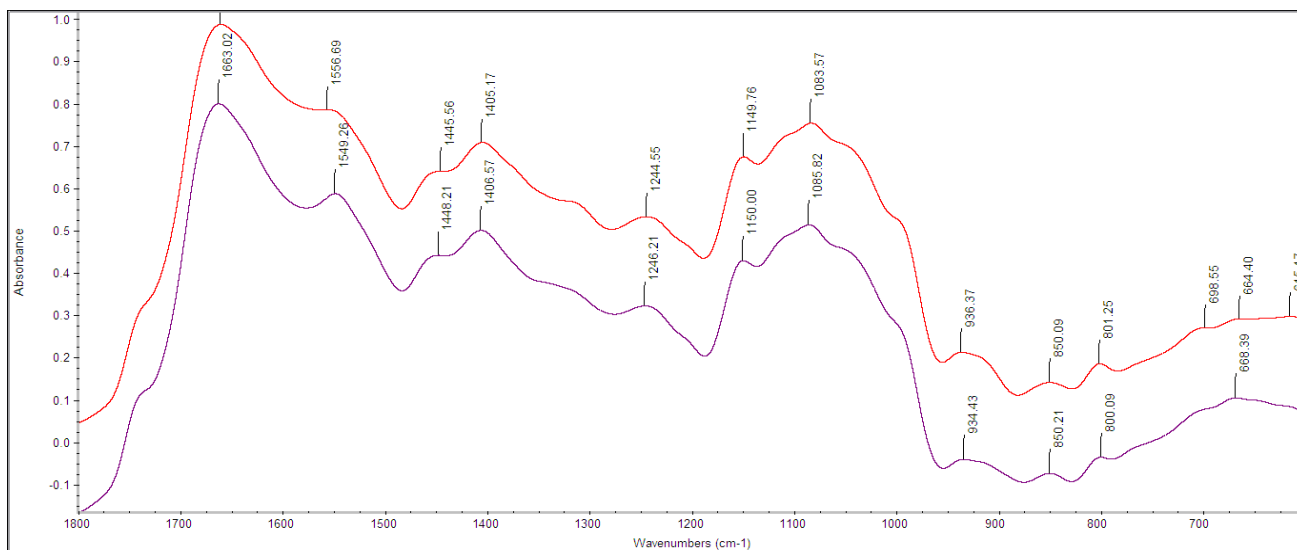
Και εδώ παρουσιάζεται μια εικόνα παρόμοια με το στέλεχος *P. ostreatus* CBS 29147, με την απουσία δύο κορυφών (1109 και 1001 cm^{-1}) και την παρουσία μιας άλλης (1312 cm^{-1}) στο φάσμα του CM σε σχέση με εκείνο του PDA.



Εικόνα 70. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. sajor-caju* (LGMACC 37) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (μωβ) και CM (κόκκινη).

Pleurotus sajor-caju (MUCL 28683)

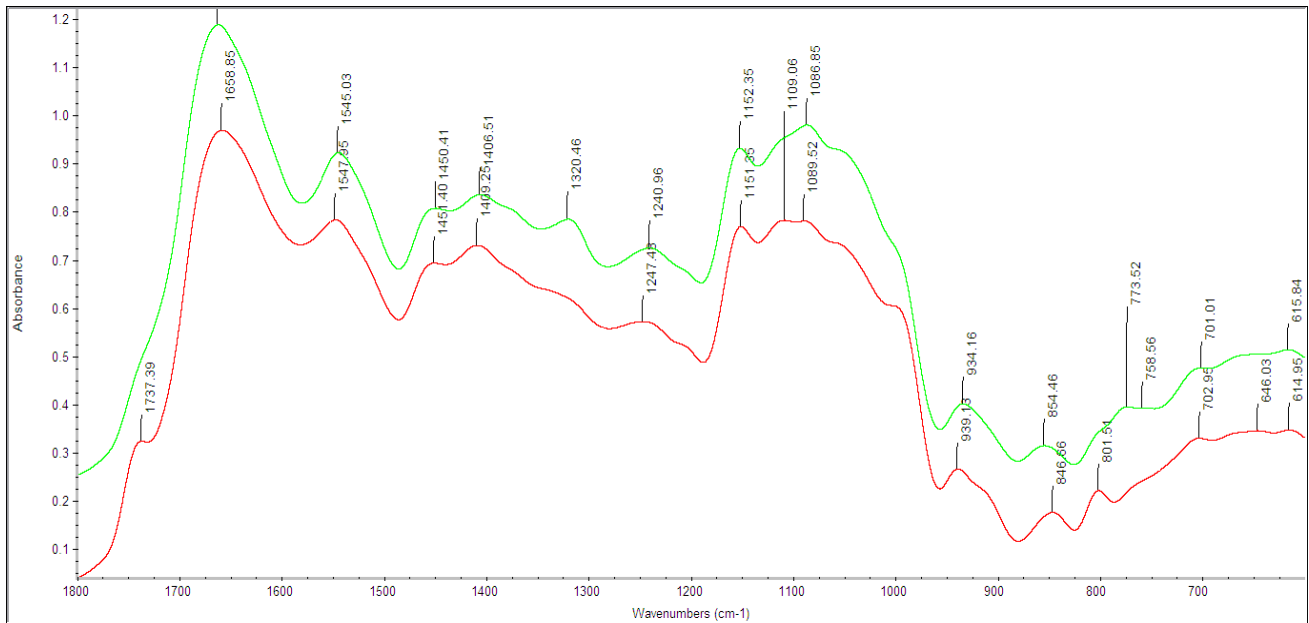
Και εδώ, ομοίως με το *P. pulmonarius*, δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφορές στα δύο φάσματα, με εξαίρεση τη ζώνη κάτω από τα 700 cm^{-1} .



Εικόνα 71. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. sajor-caju* (MUCL 28683) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (μωβ) και CM (κόκκινη).

Pleurotus tuberregium (MUCL 44822)

Στο συγκεκριμένο στέλεχος, όπως συνέβη και στο *P. eryngii*, απουσιάζουν από το φάσμα του CM οι κορυφές στα 1737 και 1109 cm^{-1} , οι οποίες σχετίζονται με τις περιοχές των φωσφολιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων αντίστοιχα, ενώ εμφανίζεται μια κορυφή στα 1320 cm^{-1} (περιοχή του αμιδίου III), φαινόμενο που έχει άλλωστε παρατηρηθεί στην πλειοψηφία των στελεχών που εξετάστηκαν.



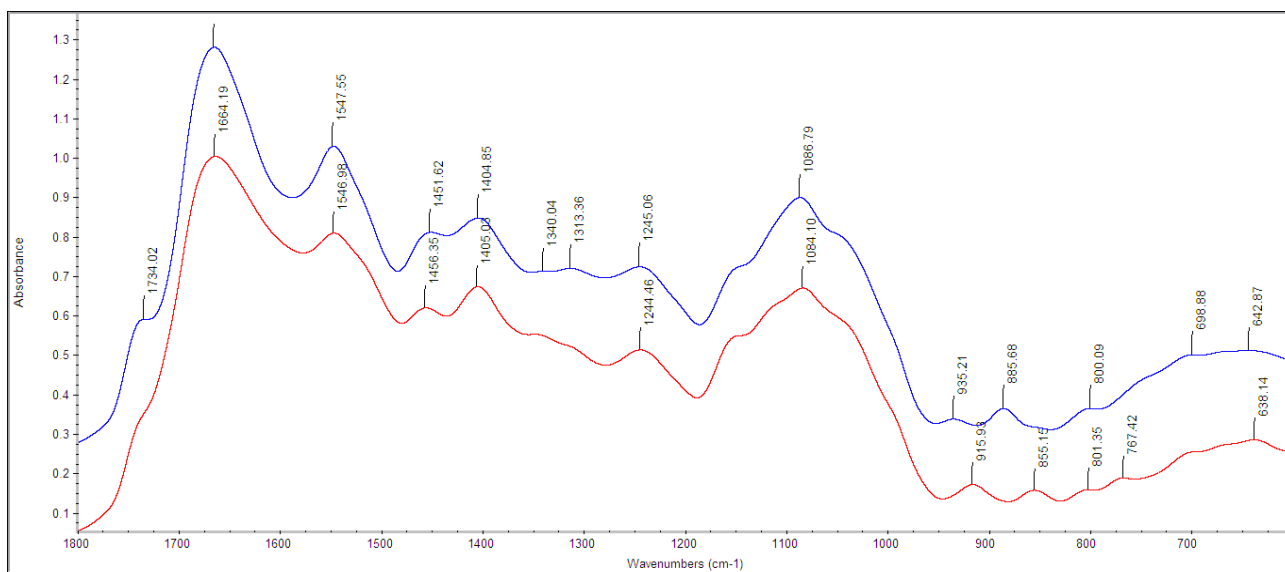
Εικόνα 72. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. tuberregium* (MUCL 44822) που καταγράφηκαν μετά από την ανάπτυξη του μύκητα σε PDA (κόκκινη) και CM (πράσινη).

Συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών τύπων βιολογικού υλικού από στελέχη *Pleurotus*

Στο τελευταίο τμήμα των αναλύσεων εξετάστηκε η επίδραση που μπορεί να έχει στα παραλαμβανόμενα φάσματα ο τύπος του βιολογικού υλικού δειγμάτων *Pleurotus* που αναλύεται. Εκτός από μυκήλιο προερχόμενο από καθαρές καλλιέργειες του μύκητα, εξετάστηκαν συγκριτικά και βασιδιοσπόρια, καθώς και τμήματα από αποξηραμένες καρποφορίες που προέρχονταν από τις Συλλογές Μυκητιακού Υλικού του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ (Συλλογή Δειγμάτων Βασιδιοσπορίων και Συλλογή Αποξηραμένων Δειγμάτων Μακρομυκήτων - Herbarium, αντίστοιχα) και ανήκουν στα είδη *P. ostreatus* και *P. pulmonarius*.

Pleurotus ostreatus (LGAM P38)

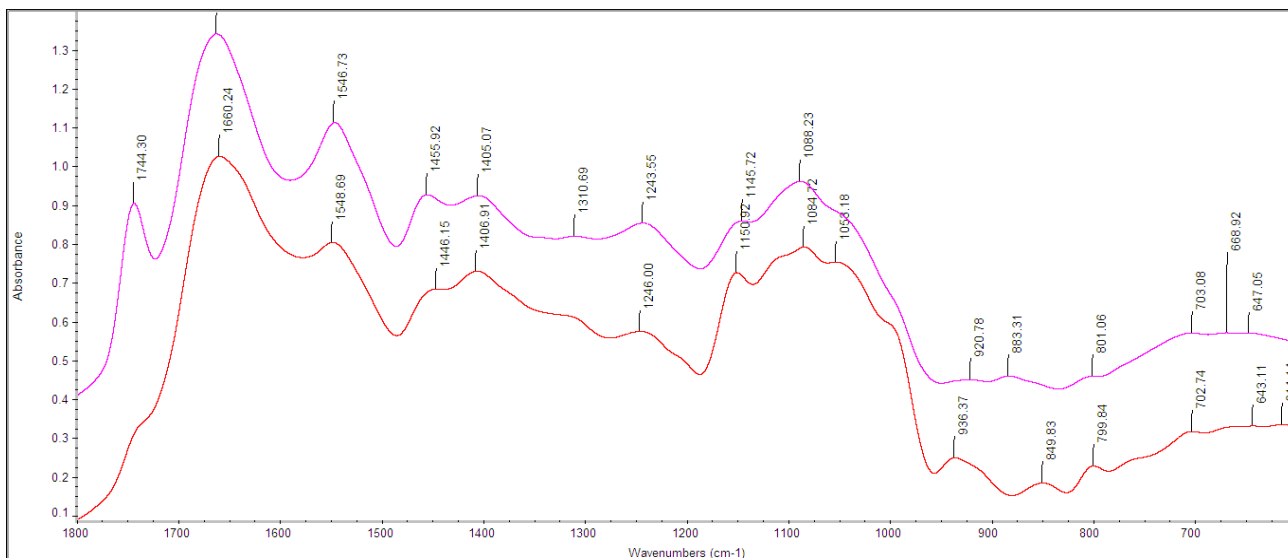
Παρατηρείται ότι, ενώ το μυκήλιο των στελεχών *P. ostreatus* δεν παρουσιάζεται απορρόφηση στα 1740 cm^{-1} , όταν αναλυθούν βασιδιοσπόρια τότε εμφανίζεται μια κορυφή στην περιοχή των φωσφολιπιδίων (1734 cm^{-1}). Επιπλέον, παρατηρείται μια διπλή κορυφή στην περιοχή του αμιδίου III των πρωτεϊνών (1340 και 1313 cm^{-1}), καθώς και μια μετατόπιση των κορυφών του α - και β - ανωμερούς.



Εικόνα 73. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. ostreatus* (LGAM P38) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση δειγμάτων μυκηλίου (κόκκινη) και βασιδιοσπορίων (μπλε).

Pleurotus ostreatus ((LGAM P104)

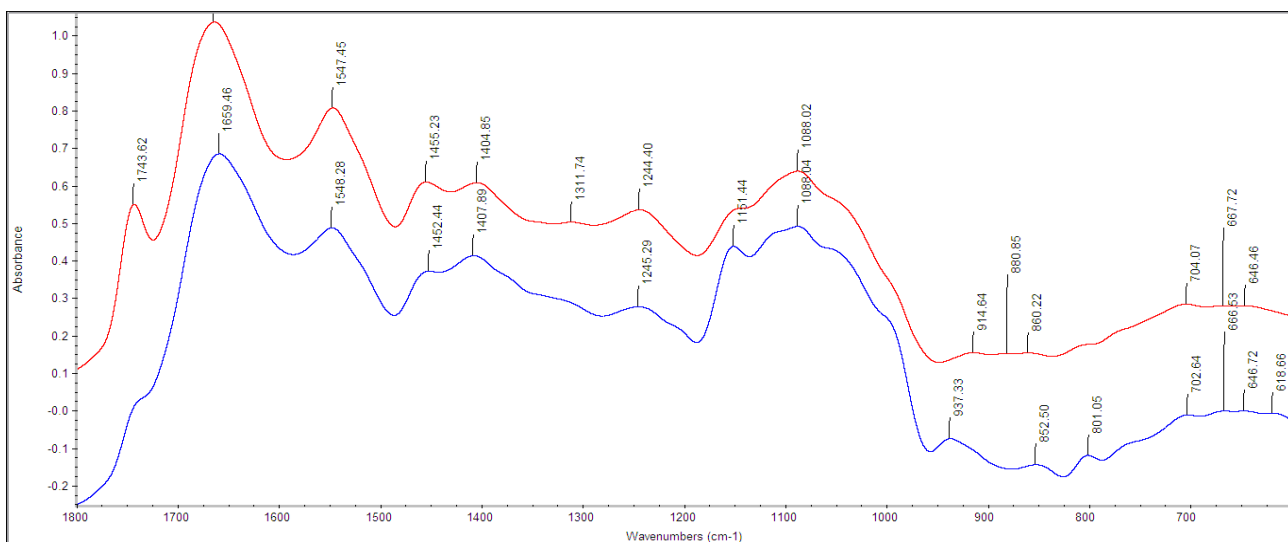
Και για αυτό το στέλεχος, στα βασιδιοσπόρια υπάρχει απορρόφηση στις περιοχές των φωσφολιπιδίων και του αμιδίου III (1744 και 1310 cm^{-1}), ενώ απουσιάζει η κορυφή στα 1053 cm^{-1} (περιοχή υδατανθράκων και σακχάρων).



Εικόνα 74. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. ostreatus* (LGAM P104) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση δειγμάτων μυκηλίου (κόκκινη) και βασιδιοσπορίων (μωβ).

Pleurotus ostreatus (LGAM P105)

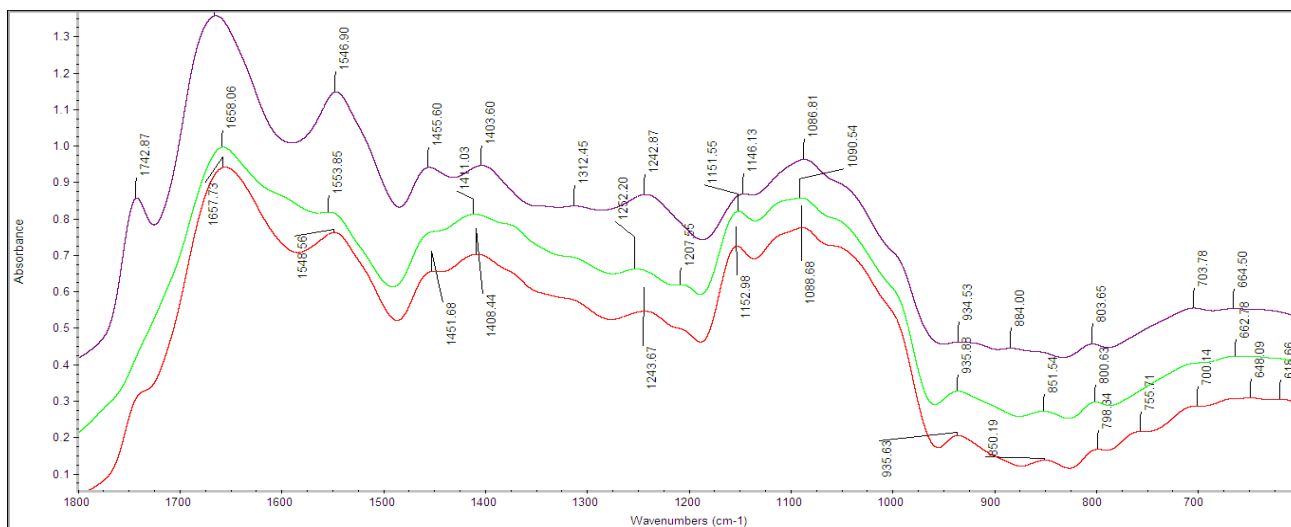
Παρόμοια περίπτωση με το στέλεχος *P. ostreatus* LGAM P104, με τη διαφορά ότι από το φάσμα των βασιδιοσπορίων απουσιάζει και η κορυφή των 1151 cm^{-1} (τάση C-O των υδατανθράκων).



Εικόνα 75. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. ostreatus* (LGAM P104) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση δειγμάτων μυκηλίου (μπλε) και βασιδιοσπορίων (μπλε).

Pleurotus ostreatus (LGAM P112)

Στο συγκεκριμένο στέλεχος έχει γίνει σύγκριση και των τριών τύπων βιολογικού υλικού. Παρατηρείται πως η σχέση μεταξύ μυκηλίου και βασιδιοσπορίων είναι ακριβώς ίδια με αυτή που εμφανίζει το *P. ostreatus* LGAM P104.



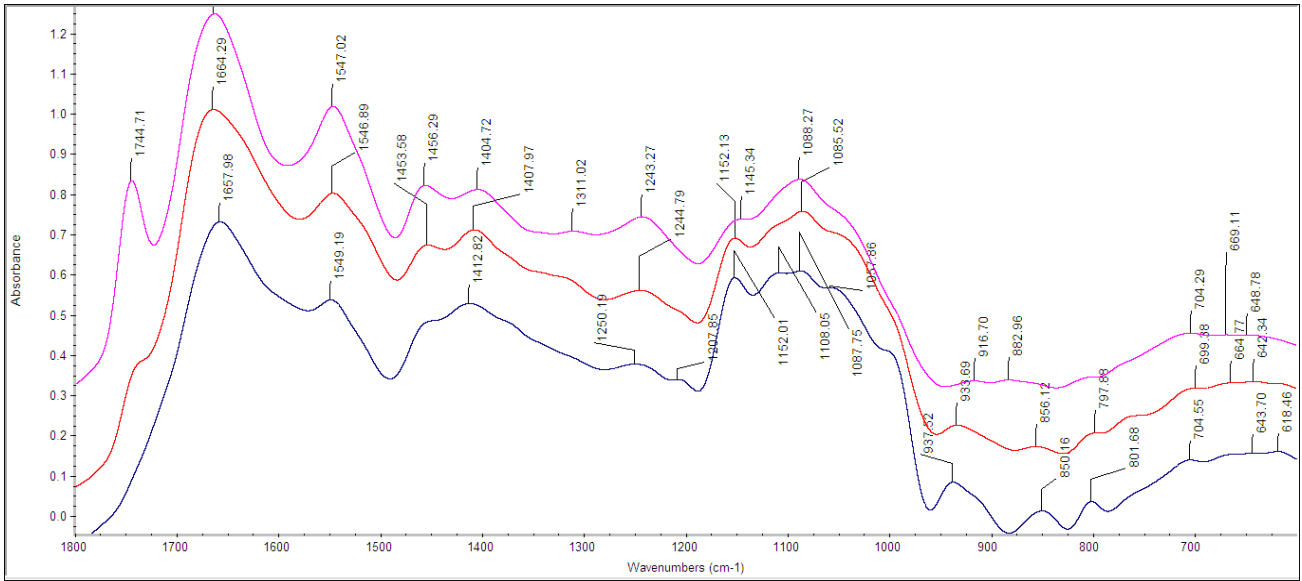
Εικόνα 76. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. ostreatus* (LGAM P104) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση δειγμάτων μυκηλίου (κόκκινη), καρποφοριών (πράσινη) και βασιδιοσπορίων (μωβ).

Σε αντιδιαστολή, το φάσμα που προέρχεται από την καρποφορία του μύκητα εμφανίζει μία επιπλέον μοναδική κορυφή σε σχέση με εκείνο του μυκηλίου στα 1207 cm^{-1} , κορυφή που δεν έχει παρατηρηθεί σε καμία άλλη περίπτωση. Επίσης παρατηρείται απουσία κορυφής στην περιοχή των λιπιδίων (1455 cm^{-1}).

Κατά τους Kamnev et al. (1999) αυτή η κορυφή φαίνεται να αντικατοπτρίζει και εδώ την αντισυμμετρική τάση του PO_2^- των φωσφολιπιδίων όπως συμβαίνει και στα 1246 περίπου cm^{-1} , το οποίο συνεπάγεται την ύπαρξη διπλής κορυφής για την περιοχή αυτή.

Pleurotus ostreatus (LGAM P113)

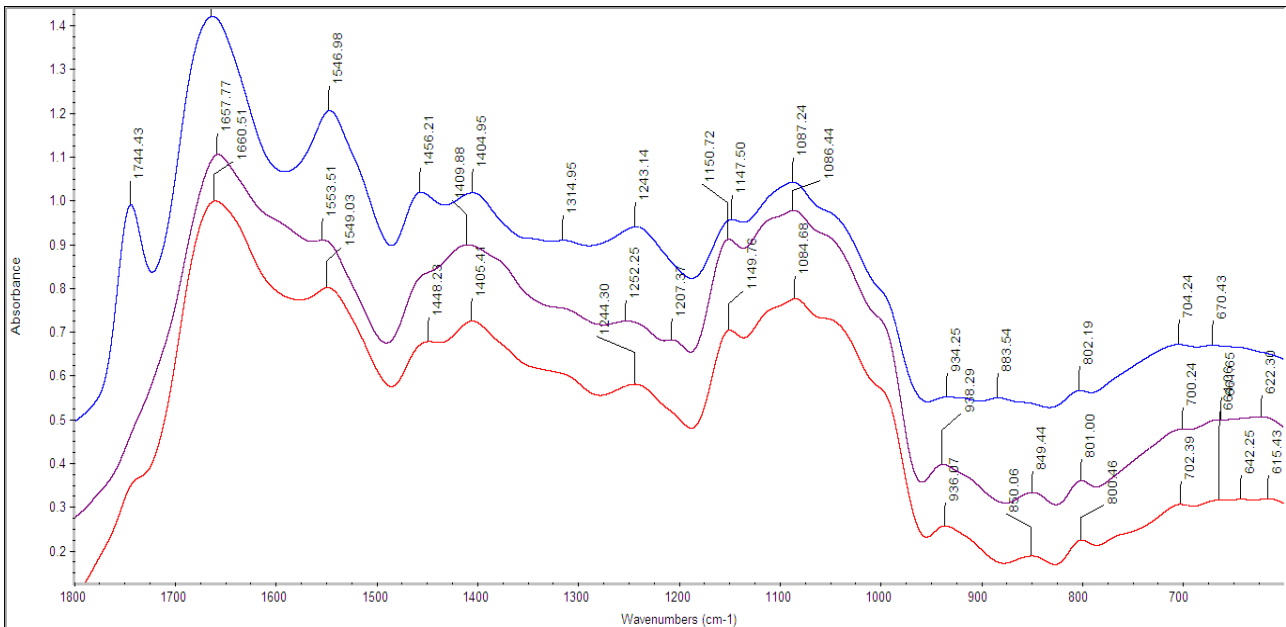
Και στη συγκεκριμένη περίπτωση έχουν παραληφθεί φάσματα και από τους τρεις τύπους βιολογικού υλικού οι οποίοι εμφανίζουν τις ίδιες διαφορές ανάμεσα σε μύκηλο και βασιδιοσπόρια. Στην περίπτωση όμως των καρποφοριών, εκτός από τη διπλή κορυφή που παρατηρείται στα $1200\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$, εμφανίζονται και δύο επιπλέον κορυφές στα 1108 και 1087 cm^{-1} σε σχέση με το φάσμα που παραλαμβάνεται από το μύκηλο.



Εικόνα 77. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. ostreatus* (LGAM P113) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση δειγμάτων μυκηλίου (κόκκινη), καρποφοριών (μπλε) και βασιδιοσπορίων (μωβ).

Pleurotus ostreatus (LGAM P123)

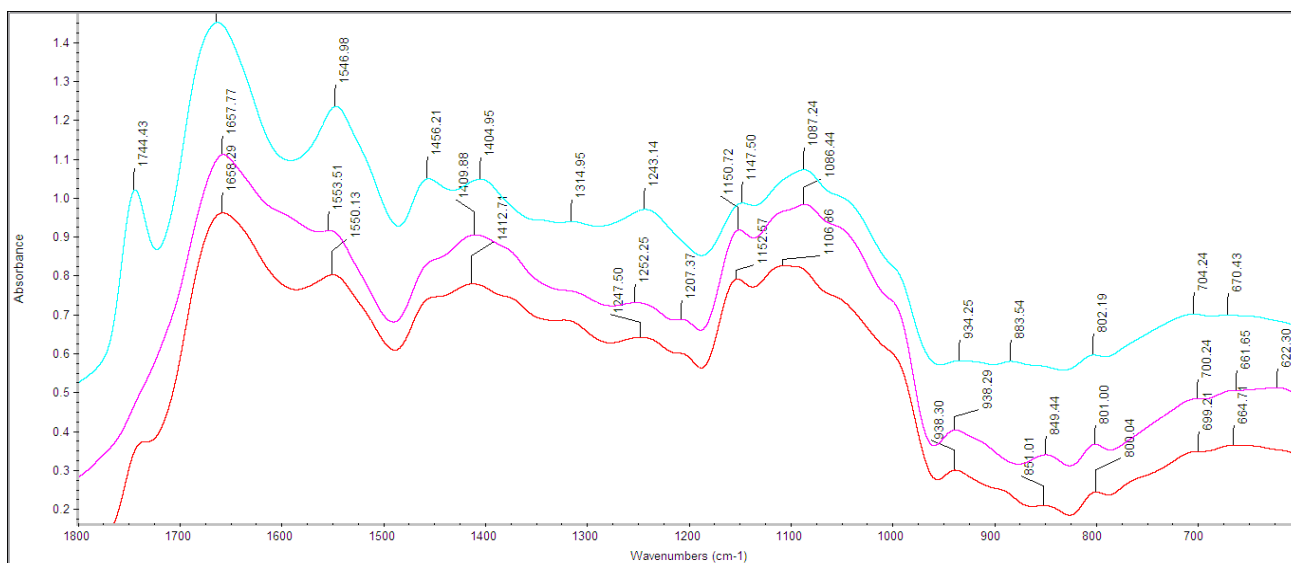
Στο συγκεκριμένο στέλεχος παρατηρείται ακριβώς ίδια συμπεριφορά ως προς τις απορροφήσεις με το στέλεχος *P. ostreatus* LGAM P112, τόσο μεταξύ βασιδιοσπορίων και μυκηλίου, όσο και μεταξύ μυκηλίου και καρποσώματος.



Εικόνα 78. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. ostreatus* (LGAM P123) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση δειγμάτων μυκηλίου (κόκκινη), καρποφοριών (μωβ) και βασιδιοσπορίων (μπλε).

Pleurotus ostreatus (LGAM P146)

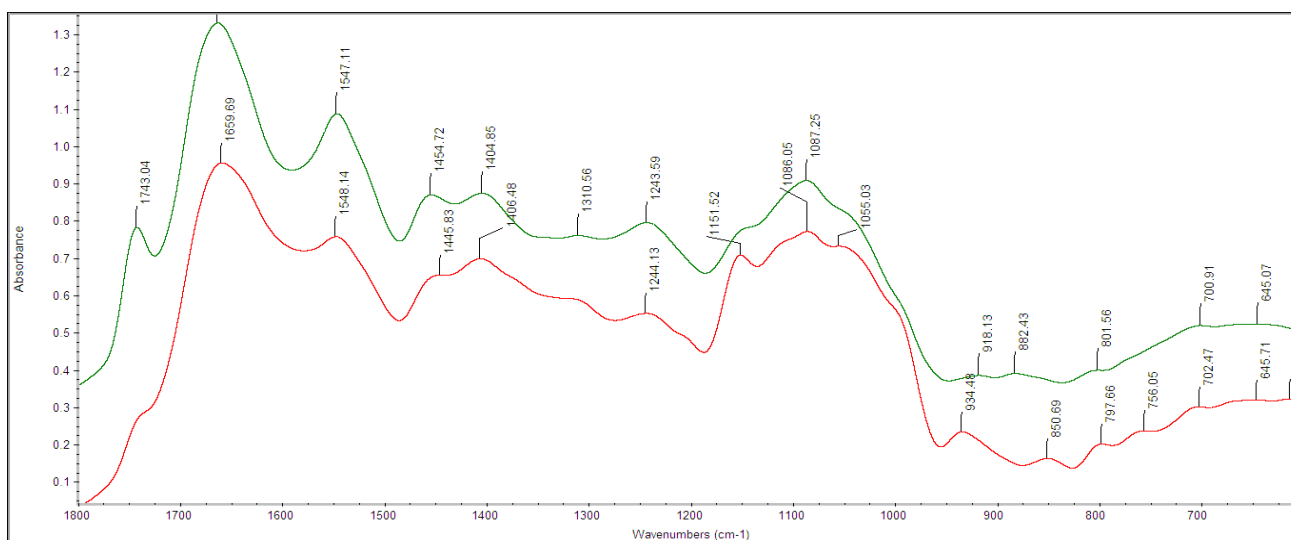
Παρατηρείται ακριβώς ίδια εικόνα με εκείνη του στελέχους *P. ostreatus* LGAM P123.



Εικόνα 79. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. ostreatus* (LGAM P146) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση δειγμάτων μυκηλίου (κόκκινη), καρποφοριών (μωβ) και βασιδιοσπορίων (γαλάζια).

Pleurotus ostreatus (LGAM P149)

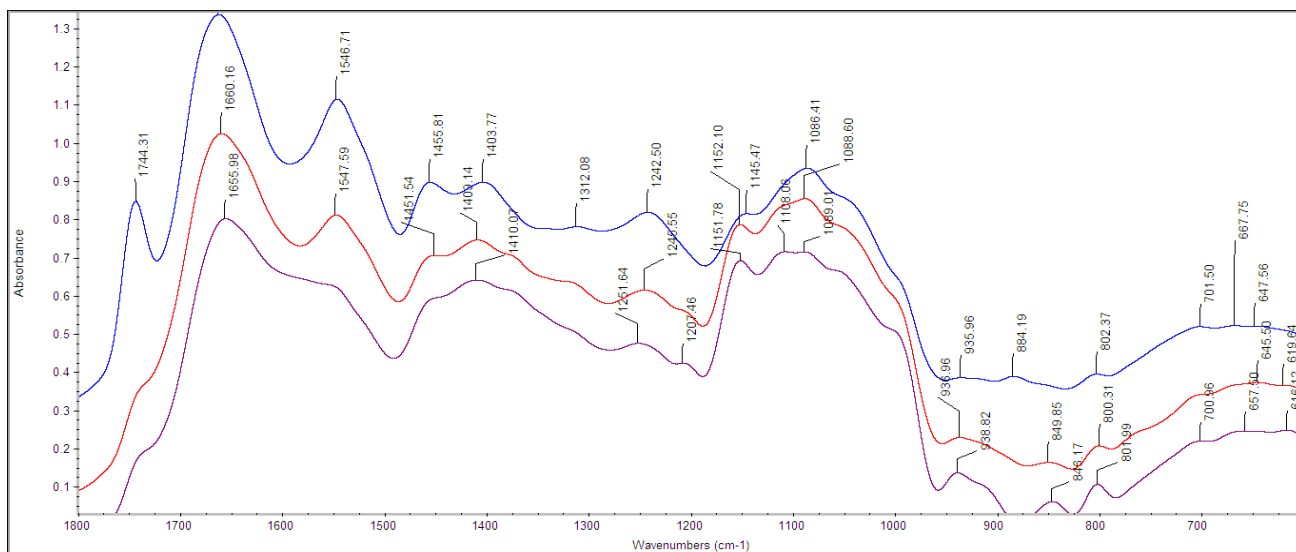
Στο συγκεκριμένο στέλεχος υπήρχαν διαθέσιμοι μόνο δύο τύποι βιολογικού υλικού και δεν παρατηρήθηκε κάτι διαφορετικό σε σχέση με ότι είχε παρατηρηθεί σε ανάλογες συγκρίσεις στα προηγούμενα στελέχη.



Εικόνα 80. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. ostreatus* (LGAM P149) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση δειγμάτων μυκηλίου (κόκκινη) και βασιδιοσπορίων (πράσινη).

Pleurotus ostreatus (LGAM P153)

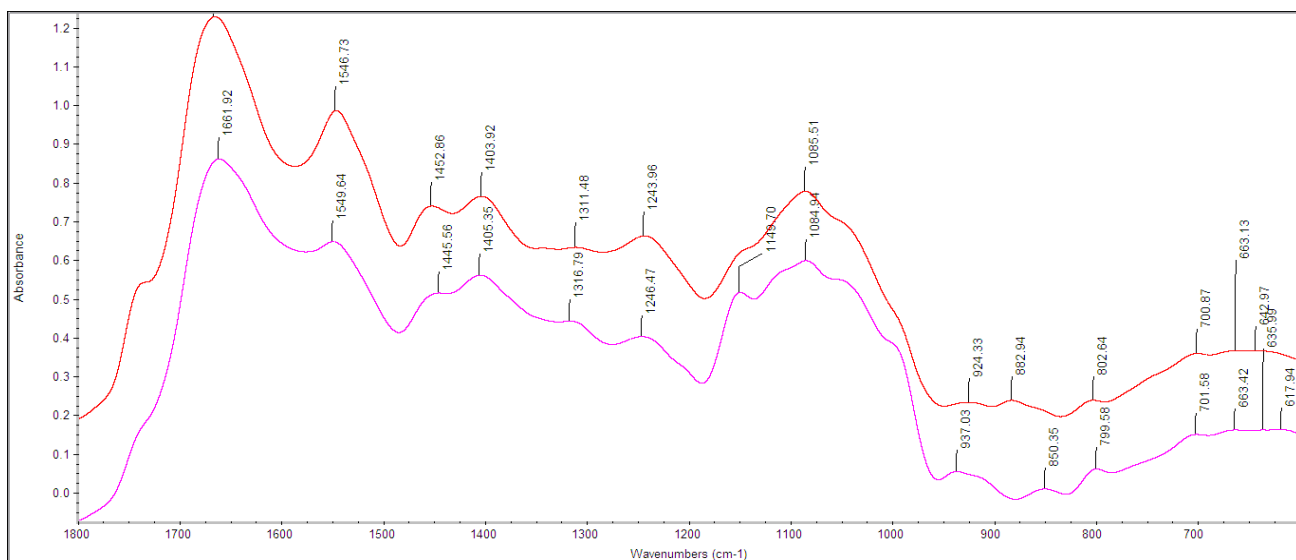
Παρατηρήθηκε ακριβώς ίδια εικόνα με εκείνη του στελέχους *P. ostreatus* LGAM P113 και για τους τρεις τύπους βιολογικού υλικού.



Εικόνα 81. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. ostreatus* (LGAM P153) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση δειγμάτων μυκηλίου (μωβ), καρποφοριών (κόκκινη) και βασιδιοσπορίων (μπλε).

Pleurotus pulmonarius (LGAM P133)

Στο συγκεκριμένο είδος και σε αντίθεση με ότι είχε παρατηρηθεί για το *P. ostreatus*, δεν σημειώνεται κάποια ανάλογη διαφορά.



Εικόνα 82. Φάσματα απορρόφησης του είδους *P. pulmonarius* (LGAM P133) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση δειγμάτων μυκηλίου (μωβ) και βασιδιοσπορίων (κόκκινη).

Έτσι οι απορροφήσεις των διαφορετικών ιστών του συγκεκριμένου στελέχους, δεν δείχνουν να επηρεάζονται από τον τύπο του βιολογικού υλικού, με μοναδική εξαίρεση ίσως την απορρόφηση που σημειώνεται στην περιοχή των υδατανθράκων (1149 cm^{-1}) στα φάσματα που προέρχονται από ανάλυση μυκηλίου, η οποία απουσιάζει από το φάσμα που παραλαμβάνεται από τα βασιδιοσπόρια.

Σ υ ζ ή τ η σ η -

Σ υ μ π ε ρ ά σ μ α τ α

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου φωτός μετασχηματισμού κατά Fourier (FT-IR), όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, έχει ήδη αρχίσει να χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση μικροοργανισμών, αφού εκτός από το πολύ χαμηλό κόστος, την μεγάλη ταχύτητα και την ευκολία χειρισμού, προσφέρει και πολύ μεγάλη αξιοπιστία.

Η FT-IR έχει εφαρμοσθεί αρκετά στον τομέα των βακτηρίων. Οι Kamnev *et al.* (2002, 2005, 2006) την έχουν χρησιμοποιήσει για την μελέτη της αντίδρασης και το χαρακτηρισμό των μεταβολικών αλλαγών σε στελέχη του γένους *Azospirillum*, ενώ οι Haag *et al.* (1996) για την ταυτοποίηση ακτινομυκήτων σε επίπεδο είδους και υποείδους. Τέλος οι Contzen *et al.* (2011) με τη βοήθεια της FT-IR πραγματοποίησαν διάκριση δύο στελεχών *Corynebacterium* που προκαλούν λεμφαδενίτιδα στα αγριογούρουνα.

Εκτός όμως από τα βακτήρια, η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αξιοποιηθεί και για εφαρμογές στους μύκητες. Ένα παράδειγμα τέτοιας εργασίας είναι αυτή των Fischer *et al.* (2006), οι οποίοι χρησιμοποίησαν την FT-IR για διαχωρισμό αεροδιασπειρόμενων μυκήτων των γενών *Aspergillus* και *Penicillium*. Έτσι αξιοποιώντας τα φάσματα απορρόφησης των κονιδίων από 29 διαφορετικά στελέχη, 10 διαφορετικών ειδών, κατάφεραν να πετύχουν διάκριση σε επίπεδο γένους, είδους αλλά και στελέχους εντός των ίδιων ειδών. Οι Mohacek-Grosov *et al.* (2001) αξιοποίησαν τη συγκεκριμένη μέθοδο για τη διάκριση διαφορετικών τύπων γλουκανών, επιτυγχάνοντας έτσι το διαχωρισμό σε επίπεδο γένους και είδους, για περισσότερα από 70 διαφορετικά είδη που άνηκαν σε 37 διαφορετικά γένη Ασκομυκήτων και Βασιδιομυκήτων. Οι Naumann *et al.* (2005) χρησιμοποίησαν την FT-IR για τον εντοπισμό και ταυτοποίηση δύο ειδών μυκήτων τα οποία προκαλούν σήψη του ξύλου στα φυτά. Μετρώντας τα φάσματα απορρόφησης τόσο από την επιφάνεια, όσο και απευθείας από τα αγγεία του ξύλου απέδειξαν την καταλληλότητα της συγκεκριμένης μεθόδου στην αναγνώριση των μυκήτων που προκαλούν σήψη του ξύλου, ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι Linker *et al.* (2008) χρησιμοποίησαν την FT-IR εξοπλισμένη με ATR (Attenuated Total Reflection) ως εργαλείο πέντε πολύ συχνά εμφανιζόμενων εδαφο-διασπειρόμενων μυκήτων που προκαλούν ζημίες στις αγροτικές καλλιέργειες. Με τον ίδιο τρόπο οι Zotti *et al.* (2008) επαλήθευσαν την παρουσία μυκήτων σε εννέα διαφορετικούς τύπους χαρτιού του 18^{ου} αιώνα, ταυτοποιώντας 15 διαφορετικά είδη (εκ των οποίων τα 14 ανήκαν στους μυκηλιακούς μύκητες και το ένα ανήκε στις ζύμες). Όμοια και οι Salman *et al.* (2010) με την χρήση της FTIR-ATR κατάφεραν, μελετώντας διαφορετικές περιοχές του φάσματος απορρόφησης μυκήτων που προκαλούσαν ασθένειες σε φυτά, να επιτύχουν διαχωρισμό σε επίπεδο γένους.

Όπως και για τους μυκηλιακούς μύκητες που αναφέρθηκαν παραπάνω, έτσι και για τις ζύμες η FT-IR αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο στην ταξινομική. Οι Essendoubi *et al.* (2005) χρησιμοποίησαν την FT-IR για την ταυτοποίηση και διάκριση 57 στελεχών (από 6 διαφορετικά είδη) του γένους *Candida*, τα οποία συγκεντρώθηκαν από νοσηλευόμενους ασθενείς, με απόλυτη επιτυχία. Οι Sandt *et al.* (2003) απέδειξαν την αξιοπιστία της συγκεκριμένης τεχνικής συγκρίνοντας αποτελέσματα που πήραν από 79 στελέχη *Candida albicans*, με αυτά που πήραν για τα ίδια στελέχη μέσω RAPD's. Διαπίστωσαν ότι η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μια

εξαιρετικά γρήγορη, αξιόπιστη και με πολύ χαμηλό κόστος μέθοδο για την ταυτοποίηση κλινικών ζυμών. Τέλος οι Kummerle *et al.* (1998) δημιούργησαν μια βάση δεδομένων από φάσματα απορρόφησης ζυμών τα οποία προηγουμένως είχαν ταυτοποιήσει με τη χρήση μορφολογικών χαρακτήρων και μοριακών μεθοδολογιών. Στη συνέχεια τη χρησιμοποίησαν για την ταυτοποίηση άγνωστων στελεχών, τα οποία παράλληλα ταυτοποίησαν και με τις κλασσικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι περισσότερο από το 97% των αγνώστων στελεχών αναγνωρίστηκαν σωστά από την FT-IR.

Στη συγκεκριμένη εργασία αξιολογήθηκε η δυνατότητα της συγκεκριμένης φασματοσκοπικής μεθόδου τόσο στη διάκριση του γένους *Pleurotus* από άλλα γένη βασιδιομυκήτων αλλά και ασκομυκήτων, όσο και στη διάκριση των στελεχών *Pleurotus* σε επίπεδο είδους αλλά και στελέχους. Τα συμπεράσματα που εξάχθηκαν είναι πολύ ενθαρρυντικά για τη αξιοποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου στην ταξινόμηση ακόμα και ενός τόσο σύνθετου - "δύσκολου" γένους, όπως είναι το *Pleurotus*, και θα συνοψισθούν και θα αναλυθούν παρακάτω.

Η FT-IR μέθοδος φαίνεται να επιτυγχάνει την ορθή ταξινομική κατάταξη ενός άγνωστου στελέχους *Pleurotus*. Έτσι αρχικά είναι απολύτως εμφανής ο διαχωρισμός του από άλλα γένη στο δενδρόγραμμα που έγινε για την περιοχή $924-862\text{ cm}^{-1}$, αφού τα διαφορετικά γένη συγκεντρώθηκαν σε ένα ξεχωριστό κλάδο. Εκτός όμως από αυτό, στον Πίνακα 3, φαίνεται καθαρά η ύπαρξη κορυφών απορρόφησης ($818, 850, 887, 895, 1308\text{ cm}^{-1}$), οι οποίες δεν παρατηρούνται καθόλου στα *Pleurotus*. Επίσης στην περιοχή $1800-600\text{ cm}^{-1}$ τα διάφορα είδη *Pleurotus* διαχωρίζονται πολύ ικανοποιητικά, ενώ σε πολλές περιπτώσεις η θέση τους στο δενδρόγραμμα σχετίζεται με το βαθμό συγγένειας τους με βάση βιβλιογραφικά στοιχεία τα οποία και θα αναλυθούν παρακάτω (π.χ. *P. cystidiosus* με *P. abalonus*, *P. ostreatus* με *P. sapidus*, *P. eryngii* με *P. nebrodensis*, καθώς και *P. pulmonarius* με *P. sajor-caju*).

Κατόπιν ακολουθεί η ομαδοποίηση του αγνώστου στελέχους σε μία εκ των δύο μεγάλων ομάδων στελεχών στα $1800-1700\text{ cm}^{-1}$ για την ευκολότερη μελέτη του. Στην πρώτη ομάδα τα *P. dryinus* διαχωρίζονται στα $770-750\text{ cm}^{-1}$, τα *P. eryngii* στα $1125-1068\text{ cm}^{-1}$, ενώ τα *P. cystidiosus*, *P. abalonus* και *P. abieticola* στα $710-695\text{ cm}^{-1}$. Στη δεύτερη ομάδα αντίστοιχα, αν ανήκει στα *P. nebrodensis* τότε θα διαχωριστεί στα $1800-600\text{ cm}^{-1}$. Αν δεν ανήκει σε αυτό τότε στην περιοχή $710-695\text{ cm}^{-1}$ του

φάσματος θα διαχωριστούν τα *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju* και *P. sapidus*. Πρέπει εδώ να αναφερθεί ότι για τα τέσσερα είδη που ήταν ιδιαίτερα δύσκολο να εντοπισθεί μια περιοχή του φάσματος η οποία να μπορεί να διαχωρίζει σε ικανοποιητικό βαθμό. Κάτι τέτοιο επετεύχθη κατά τον επανέλεγχο των ήδη χρησιμοποιημένων περιοχών, αφού πρώτα είχαν αφαιρεθεί όλα τα προηγούμενα στελέχη. Έτσι εφόσον το άγνωστο στέλεχος δεν ομαδοποιηθεί σε κανένα από τα παραπάνω, τότε επιστρέφοντας στην περιοχή $710-695\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος θα διαχωριστούν μερικώς τα *P. djamor/ P. flabellatus*, ενώ στην περιοχή $950-650\text{ cm}^{-1}$ θα διαχωριστούν τα *P. tuberrregium* από τα *P. ostreatus*.

Είναι αξιοσημείωτο ότι ενώ μέχρι τώρα, σχεδόν σε καμία προηγούμενη σχετική δημοσιευμένη εργασία (Kamnev *et al.*, 2008, Naumann, 2008, Pappas *et al.*, 2008 κ.α.) δεν γινόταν αναφορά στην αξιοποίηση της περιοχής απορρόφησης κάτω από 800 cm^{-1} , στην περίπτωση του γένους *Pleurotus* φαίνεται πως παρέχει σημαντικές ταξινομικές πληροφορίες.

Εκτός όμως από την καθαρά ταξινομική αξία της συγκεκριμένης μεθόδου, θα ήταν σκόπιμο να επικεντρωθεί κανείς και στη συμπεριφορά ορισμένων ειδών του γένους *Pleurotus*, των οποίων οι σχέσεις δεν είναι απολύτως ξεκαθαρισμένες (και για αυτό γίνεται αναφορά σε ενδεικτικές περιπτώσεις). Σύμφωνα με σχετικές εργασίες (Zervakis *et al.* 2001, Ravash *et al.* 2010, Rodriguez-Estrada *et al.*, 2010) το *P. nebrodensis* αν και συγγενές με το *P. eryngii* αποτελεί ξεχωριστό είδος. Έτσι ενώ στο δενδρόγραμμα των ειδών *Pleurotus* που παραλήφθηκε από το συνολικό φάσμα ($1800-600\text{ cm}^{-1}$) και τα δύο να μεν ομαδοποιούνται σε ένα διακριτό από τα υπόλοιπα είδη *Pleurotus* γκρουπ λόγω της σχετικά μεγαλύτερης συγγένειας τους, στη συνέχεια όμως επιτυγχάνεται καθαρά ο διαχωρισμός τους με τη χρήση φάσματος FT-IR στην περιοχή των φωσφολιπιδίων ($1800-1700\text{ cm}^{-1}$) όταν εισαχθούν στην ανάλυση όλα τα στελέχη [πράγμα απολύτως δικαιολογημένο καθώς το ένα χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη απορρόφησης (*P. eryngii*) ενώ το άλλο όχι (*P. nebrodensis*)]. Στη συνέχεια τα επιμέρους στελέχη που αναλύθηκαν και από τα δύο είδη ομαδοποιήθηκαν απόλυτα μεταξύ τους στα $1125-1068\text{ cm}^{-1}$ (*P. eryngii*) και στα $1800-600\text{ cm}^{-1}$ (*P. nebrodensis*).

Ένα άλλο σημείο ενδιαφέροντος αποτελεί η σύγκριση *P. ostreatus* και *P. pulmonarius*, που απαρτίζουν άλλο ένα πολύ δύσκολο προς διάκριση ζεύγος ειδών *Pleurotus*. Από το δενδρόγραμμα που προκύπτει από την ανάλυση των σχετικών

στελεχών στα 710-695 cm^{-1} (περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος), φαίνεται ότι τα *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju* και *P. sapidus* διαχωρίζονται πλήρως σε σχέση με το *P. ostreatus*. Σχετικά με τα δύο πρώτα παρατηρείται μια γενική ομαδοποίησή τους στην ίδια περιοχή, πράγμα το οποίο φαίνεται να συμβαδίζει με τη διαπίστωση των Zervakis *et al.* (1994, 1996) πως το *P. sajor-caju* αποτελεί ένα λανθασμένα εφαρμοσμένο όνομα που χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει πληθυσμούς του *P. pulmonarius* οι οποίοι έχουν απομονωθεί από την Ασία. Όσον αφορά στο *P. sapidus* έχει δείχτεί πως χρησιμοποιείται για να ταυτοποιηθούν στελέχη που δείχνουν μορφολογικά -ελαφρώς- διαφοροποιημένα από τα *P. ostreatus* ή *P. pulmonarius*. Όμως η εφαρμογή βιοχημικών ή μοριακών μεθοδολογιών έχει τεκμηριώσει πως ανήκουν σε ένα από αυτά τα δύο είδη (Iraçabal *et al.* 1995, Zervakis *et al.* 1994, 1996). Η προσέγγιση με την ανάλυση των φασμάτων FT-IR που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία επιβεβαίωσε τα βιβλιογραφικά δεδομένα και απέδειξε την καταλληλότητα της για διαχωρισμό στελεχών *Pleurotus* σε επίπεδο είδους ή χαμηλότερα.

Μεγάλο ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το υπογένος *Coremiopleurotus*, και ειδικότερα τα είδη *P. australis*, *P. abalonus* και *P. cystidiosus*. Σύμφωνα με τους Zervakis *et al.* (2004), το *P. australis* διαχωρίζεται ευκρινώς από τα υπόλοιπα δύο, κάτι το οποίο φαίνεται και στην παρούσα εργασία από το σχετικό δενδρόγραμμα των ειδών, σύμφωνα με το οποίο κατατάσσονται σε απομακρυσμένα γκρουπ ('clusters'). Επίσης κατά τους Zervakis *et al.* (2004) τα άλλα δύο είδη -δηλ. τα *P. cystidiosus* και *P. abalonus*- είναι μεν φυλογενετικά διακριτά αλλά θεωρούνται συγγενή καθώς εμφανίζουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά και -υπό προϋποθέσεις- δυνατότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού (Zervakis 1998). Κάτι τέτοιο φαίνεται και στην παρούσα μελέτη από το δενδρόγραμμα που προέκυψε κατά την ανάλυση του φάσματος στην περιοχή 710-695 cm^{-1} .

Αναφορά αξίζει να γίνει και στο ζεύγος *P. djamor* και *P. flabellatus*. Τα είδη αυτά είναι συγγενή και αυτό αποδεικνύεται και από την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου, με την οποία ομαδοποιούνται σε ένα ξεχωριστό γκρουπ στο δενδρόγραμμα της δεύτερης ομάδας στελεχών και στην περιοχή 710-695 cm^{-1} . Επίσης, τα είδη *P. tuberregium* και *P. abieticola* ως απομακρυσμένα όσον αφορά στη συγγένεια τους από τα υπόλοιπα είδη, ομαδοποιούνται μόνα τους τόσο σε επίπεδο είδους όσο και σε επίπεδο στελέχους. Τέλος, η μέθοδος δεν κατάφερε να ομαδοποιήσει τα πολύ συγγενικά είδη *P. columbinus*- *P. ostreatus* και *P. cornucopiae*- *P. citrinopileatus*,

πράγμα το οποίο μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη περισσοτέρων τους ενός στελεχών για τα τρία από τα τέσσερα είδη. Έτσι θα πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο, ώστε να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα.

Εκτός όμως από την διαπίστωση της καταλληλότητας της συγκεκριμένης τεχνικής στην ταξινόμηση των μυκήτων του γένους *Pleurotus*, χρήσιμα συμπεράσματα αποκομίσθηκαν σχετικά με την επίδραση διαφορετικών υποστρωμάτων καλλιέργειας στα φάσματα απορρόφησης των διαφόρων ειδών. Έτσι από τη σύγκριση μεταξύ των φασμάτων που παραλήφθηκαν για 15 στελέχη *Pleurotus*, συμπεραίνεται ότι τα περισσότερα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε PDA, ή δεν εμφάνιζαν την κορυφή περίπου στα 1320 cm^{-1} (αμίδιο III των πρωτεϊνών) είτε η απορρόφηση δεν ήταν τόσο έντονη στον κυματάρημο αυτό. Σε κάθε περίπτωση όμως, όταν τα ίδια στελέχη αναπτύχθηκαν σε CM παρατηρήθηκε μια έντονη απορρόφηση στη περιοχή αυτή. Εξαίρεση σε αυτή τη παρατήρηση αποτελεί το είδος *P. citrinopileatus*. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις, διαφορές εμφανίστηκαν και ως προς τις κορυφές των 1740 και 1110 cm^{-1} περίπου (εστέρες φωσφολιπιδίων και νουκλεϊκά οξέα αντίστοιχα), οι οποίες απουσίαζαν στα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε CM.

Τέλος διερευνήθηκε και η επίδραση των διαφορετικών τύπων βιολογικού υλικού στις απορροφήσεις του εκάστοτε είδους. Επικεντρώνοντας έτσι το ενδιαφέρον στα αποτελέσματα που παραλήφθηκαν για το *P. ostreatus* (καθώς υπήρχαν διαθέσιμα βασιδιοσπόρια και καρποφορίες από ένα σχετικά μεγάλο αριθμό στελεχών), παρατηρείται ότι όντως σημειώνεται διαφοροποίηση στις απορροφήσεις μεταξύ των διαφορετικών τύπων υλικού, τουλάχιστον όσον αφορά στο συγκεκριμένο είδος. Μια γενική παρατήρηση μπορεί να γίνει για την ύπαρξη απορρόφησης στην περιοχή της ισχυρής τάσης $\text{C}=\text{O}$ των φωσφολιπιδίων (περίπου 1740 cm^{-1}) και του αμιδίου III των πρωτεϊνών (περίπου 1312 cm^{-1}) για τα βασιδιοσπόρια όλων των στελεχών, κάτι που δεν εμφανίζεται σε καμία περίπτωση στα φάσματα των μυκηλίων. Επίσης χαρακτηριστική είναι η ύπαρξη στα καρποσώματα, διπλής κορυφής στην περιοχή της αντισυμμετρικής τάσης του PO_2^- (περίπου 1207 cm^{-1}) καθώς επίσης και η απουσία κορυφής στην περιοχή των λιπιδίων (περίπου 1450 cm^{-1}).

Συμπερασματικά, από την παρούσα εργασία γίνεται εμφανές ότι η φασματοσκοπία υπερύθρου - μετασχηματισμού Fourier μπορεί να αποτελέσει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των μυκήτων και ειδικότερα αυτών του γένους *Pleurotus*, των οποίων η διάκριση καθίσταται δύσκολη ακόμα και με τις κατά πολύ ακριβότερες αλλά και χρονοβόρες μοριακές μεθοδολογίες, αφού κατάφερε να επιτύχει πλήρη διάκριση των ειδών *Pleurotus* τόσο σε επίπεδο γένους όσο και σε επίπεδο είδους. Επίσης παρείχε πολύ χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά τη χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων καλλιέργειας, αποδεικνύοντας την λήψη διαφορετικών φασμάτων απορρόφησης. Τέλος διαπιστώθηκε η απουσία επίδρασης των διαφορετικών ιστών στα φάσματα απορρόφησης. Έτσι συνδυάζοντας επίσης την εύκολη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος, το πολύ χαμηλό κόστος, την ταχύτατη ανάλυση αλλά και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, φαίνεται να αποτελεί, ή αυτόνομα είτε σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους, μια εξαιρετική μέθοδο ταυτοποίησης μυκήτων.

Β ι β λ ι ο γ ρ α φ ί α

1. Abercrombie, M., Hickman, M., Johnson, M. L., Thain, M. (1990). The penguin dictionary of biology. 8th Edition. *Penguin Books*, USA.
2. Ainsworth, G. C. (1976). Introduction to the history of mycology. Cambridge, London, New York, Melbourne. *Cambridge University Press*: 359 p.
3. Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Backwell, M. (1979). Introductory mycology. *Wiley*: New York: 870 p, 4th edition.
4. Bao, D., Ishihara, H., Mori, N., Kitamoto, Y. (2004). Phylogenetic analysis of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) based on restriction fragment length polymorphisms of the 5- portion of 26S rDNA. *Journal of Wood Science* 50: 169–176.

5. Boidin, J. (1986). Intercompatibility and the species concept in the saprobic Basidiomycotina. *Mycotaxon* 26: 319-336.
6. Brasier, C. M. (1987). The dynamics of fungal speciation. *in* evolutionary biology of the fungi (ed. Rayner, A. D. M., Brasier, C. M., Moore, D.), pp. 231-238. *Cambridge University Press*, Cambridge, U.K.
7. Capelari M., Fungaro M.H. 2003. Determination of biological species and analysis of genetic variability by RAPD of isolates of *Pleurotus* subgenus *Coremiopleurotus*. *Mycological Research* 107 (9): 1050-1054.
8. Carlisle, M. J., Watkinson, S. C., Gooday, G. W. (2001). *The Fungi*. San Diego: *Academic Press*: 630 p. 2nd edition.
9. Cohen, R., Persky, L., Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 582–594.
10. Contzen, M., Sting, R., Blazey, B., Rau, J. (2011). *Corynebacterium ulcerans* from diseased wild Boars. *Zoonoses and Public Health*, 58: 479–488.
11. Copikova, J., Synytsya, A., Cerna, M., Kaasova, J., Novotna, M. (2001). Application of FT-IR spectroscopy in detection of food hydrocolloids in confectionery jellies and food supplements. *Czech Journal of Food Science* 19: 51–56.
12. Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., Dott, W. (2006). FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* 64: 63-77.
13. Gargano, M.L., Saitta, A., Zervakis, G.I., Venturella, G. (2011). Building the jigsaw puzzle of the critically endangered *Pleurotus nebrodensis*: historical collection sites and an emended description. *Mycotaxon* 115: 107-114.
14. Gregori, A., Svagelj, M., Pohleven, J. (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology* 45 (3): 238 – 249.
15. Hallenberg, N. (1984). Compatibility between species of *Corticaceae* S. L. (Basidiomycotina) from Europe and North America. *Mycotaxon* 21: 335-338.
16. Hibbett, D.S., Thorn, R.G. (1994). Nematode-trapping in *Pleurotus tuberregium*. *Mycologia* 86(5): 696-699.

17. Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Lumbsch, H.T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.-J., Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.
18. Hofman, R.; Westheim, J. G. F.; Pouwel, I.; Fransen, T. (1996). Gellings, P. J. FTIR and XPS studies on corrosion-resistant SiO₂ coatings as a function of the humidity during deposition. *Surface and Interface Analysis* 24: 1–6.
19. Ingold, C. (1939). Spore discharge in land plants. Oxford: *Oxford University Press*.
20. Iraçabal, B., Zervakis, G., Labarère, J. (1995). Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction length polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology* 141: 1479–1490.
21. Isikhuemhen, O.S., Moncalvo, J.M., Nerud, F., Vilgalys, R. (2000). Mating compatibility and phylogeography in *Pleurotus tuberregium*. *Mycological Research* 104(6): 732-737.
22. Kaminskyj, S.G.W., Gough, K.M., Isenor, M., Jilkine, K., Szeghalmi, A.V., Rodriguez, R.J., Redman, R.S., Schmidt, R. (2007). FTIR spectromicroscopy of saprotrophic and endophyte fungi: growth under optimal and stressed conditions. *Canadian Light Source* 112, Activity Report.
23. Kamnev, A.A., Antonyuk, L.P., Tugarova, A.V., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Gardiner, P.H.E. (2002). Fourier transform infrared spectroscopic characterisation of heavy metal-induced metabolic changes in the plant-

- associated soil bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7. *Journal of Molecular Structure* 610: 127–131.
24. Kamnev, A.A., Tugarova, A.V., Antonyuk, L.P., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Gardiner, P.H.E. (2005) Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: comparison of endophytic and nonendophytic strains of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Trace Elements and Electrolytes* 19: 91–95.
 25. Kamnev, A.A., Sadovnikova, J.A., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Antonyuk, L.P. (2008). Responses of *Azospirillum brasilense* to nitrogen deficiency and to wheat lectin: a diffuse reflectance infrared fourier transform (DRIFT) spectroscopic study. *Microbial Ecology* 56: 615–624.
 26. Kaufert, F. (1935). The production of asexual spores by *Pleurotus corticatus*, *Mycologia*, 27: 333.
 27. Keyser, F., Bienz, K., Eckert J. (2005). *Medical Microbiology*. New York: 724.
 28. Khan, S.M., Nawaz, A., Malik, W., Javed, N., Yasmin, T., ur Rehman, M., Qayyum, A., Iqbal, Q., Ahmad, T., Khan, A.A. (2011). Morphological and molecular characterization of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). *African Journal of Biotechnology* 10 (14): 2638-2643.
 29. Larraya, L., Peñas, M. M., Pérez, G., Santos, C., Ritter, E., Pisabarro, A. G., Ramírez. L. (1999). Identification of incompatibility alleles and characterisation of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics* 34: 486-493.
 30. Larraya, L. M., Pérez, G., Iribarren, I., Blanco, J. A., Alfonso, M., Pisabarro, A. G., Ramírez. L. (2001). Relationship between monokaryotic growth rate and mating type in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3385-3390.
 31. Larraya, L. M., Pérez, G., Ritter, E., M., Pisabarro, A. G., Ramírez. L. (2000). Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5290-5300.
 32. Linker, R., Tsrer, L. (2008). Discrimination of soil-borne fungi using fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Society for Applied Spectroscopy* 62(3): 302-305.
 33. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2007). Βιολογία των Μικροοργανισμών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Τόμος Ι: 630. 10^η έκδοση.

34. Martínez-Carrera, D. (1998). Oyster mushrooms. McGraw-Hill *Yearbook of Science & Technology* 1999. Ed.: M. D. Licker. McGraw-Hill, Inc., New York. pp. 242-245.
35. Matis, M., Zakelj-Mavric, M., Peter-Katalinic, J. (2005). Mass spectrometry and database search in the analysis of proteins from the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Proteomics* 5: 67-75.
36. Menolli Jr, N., Asai, T., Capelari, M., Paccola-Meirelles, L.D. (2010). Morphological and molecular identification of four Brazilian commercial isolates of *Pleurotus* spp. and cultivation on corncob. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57(2): 397-408.
37. Mohacek-Grosev, V., Bozac, R., Puppels, G.J., 2001. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 57 (14): 2815 – 2829.
38. Moore, R. T. (1985). Mating type factors in *Pleurotus cystidiosus*. *Transactions of the British Mycological Society* 85: 354–358.
39. Naumann A., Navarro-Gonzalez M., Peddireddi S., Kóes U., Polle A.(2005). Fourier transform infrared microscopy and imaging: detection of fungi in wood. *Fungal Genetics and Biology* 42: 829-835.
40. Naumann, A. (2009). A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neural network analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. *Analyst* 134: 1215–1223.
41. Okhuoya, J.A. and Okogbo, F.O. (1991). Cultivation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr) Sing on various farm wastes. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 71: 1-3.
42. Pappas, C.S., Tarantilis P.A., Harizanis, P.C., Polusiou M.G. (2003) New method for pollen identification by FT-IR spectroscopy. *Society for Applied Spectroscopy*, 57(1): 23-27.
43. Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Moschopoulou, E., Moatsou, G., Kandarakis, I., Polissiou, M.G. (2008). Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry* 106: 1271–1277.
44. Parmasto, E. (1985). The species concept in Hymenochaetaceae (Fungi, Hymenomycetes). *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* 94: 369-380.

45. Peláez F, Martínez MJ, Martínez AT (1995). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin biodegradation. *Mycological Research* 99: 37-42.
46. Petersen, R. H. (1995). There's more to a mushroom than meets the eye: mating studies in the Agaricales. *Mycologia* 87: 1-17.
47. Petersen, R.H. and Hughes, K.W. (1997). A new species of *Pleurotus*. *Mycologia*, 89(1): 173-180.
48. Rajarathnam, S. , Bano, Z., Miles, P. G.(1987). *Pleurotus* mushrooms. Part I A. morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation'. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 26(2): 157 — 223.
49. Ravash, R., Shiran, B., Alavi, A.-A., Bayat, F., Rajaei, S., Zervakis, G.I. (2010). Genetic variability and molecular phylogeny of *Pleurotus eryngii* species-complex isolates from Iran, and notes on the systematics of Asiatic populations. *Mycological Progress* 9: 181–194.
50. Ro, H., Kim, S. S., Ryu, J. S., Jeon, C., Lee, T. S., Lee, H. (2007). Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting, and physiological characteristics. *Mycological Research* 111: 710-715.
51. Rodriguez-Estrada, A.E., Jimenez-Gasco, M.M., Royse, D.J. (2010). *Pleurotus eryngii* species complex: sequence analysis and phylogeny based on partial *EF1* alpha and *RPB2* genes. *Fungal Biology* 114: 421-428.
52. Salman A., Tsrer L., Pomerantz A., Moreh R., Mordechai S., Huleihel M. (2010) FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. *Spectroscopy* 24: 261–267.
53. Sánchez, C. (2004). Modern aspects of mushrooms culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:756–762.
54. Sanchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1321-1337.
55. Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2010) Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterisation of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology* 161: 168-175.

56. Shnyreva, A.V., Shtaer, O.V. (2006) Differentiation of closely related oyster fungi *Pleurotus pulmonarius* and *P. ostreatus* by mating and molecular markers. *Genetika* 42:667–674.
57. Singer, R. (1986). The Agaricales in modern taxonomy. Koenigstein: *Koeltz Scientific Books*, 4th ed.
58. Singh, N. S., Rajarathnam, S. (1977). *Pleurotus eous* (Berk.) Sacc: a new cultivated mushroom. *Current Science* 46: 617.
59. Skoog, D. A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (2002). Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, (μτφ. Μ. Καραγιάννης, Κ. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης). *Εκδόσεις Κωσταράκης*. Αθήνα :984 p., 5th ed.
60. Stajic, M., Sikorski, J., Wasser, S.P., Nevo, E. (2005). Genetic similarity and taxonomic relationships within the genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes) determined by RAPD analysis. *Mycotaxon* 93: 247-255.
61. Tarantilis P.A., Troianou V.E., Pappas C.S., Kotseridis Y.S., Polissiou M.G. (2008) Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 111: 192-196.
62. Urbanelli, S., Della Rosa, V., Punelli, F., Porretta, D., Reverberi, M., Fabbri, A.A., Fanelli, C. (2007). DNA-fingerprinting (AFLP and RFLP) for genotypic identification in species of the *Pleurotus eryngii* complex. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 592–600.
63. Vilgalys, R. (1991). Speciation and species concepts in the *Collybia dryophila* complex. *Mycologia* 83: 758-773.
64. Webster, J. and Weber, R.W.S. (2007). Introduction to fungi. Cambridge: *Cambridge University Press*: 850 p., 3rd. edition.
65. Yang, Z.H., Huang, J.X., Yao, Y.J. (2007). Autoscreening of restriction endonucleases for PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Identification of Fungal Species, with *Pleurotus* spp. as an Example. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7947-7958.
66. Zervakis, G., Balis, C. (1991). *Pleurotus* species of Greece: An evaluation of their morphological and physiological characteristics. In *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Vol. 13, pp. 537-544. Edited by M. Maher. A. Balkema, Rotterdam.

67. Zervakis, G., Balis, C. (1996). A pluralistic approach on the study of *Pleurotus* species, with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Research* 100: 717-731.
68. Zervakis, G., Labarère, J. (1992). Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. *Journal of General Microbiology* 138: 635-645.
69. Zervakis, G.I., Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R. (2004). Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology-SGM* 150: 715-726.
70. Zervakis, G., Sourdis, J., Balis, C. (1994). Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycological Research* 98, 329-341.
71. Zervakis, G., Venturella, G., Papadopoulou, K. (2001). Genetic polymorphism and taxonomic relationships of the *Pleurotus eryngii* species-complex as resolved through the analysis of random amplified DNA patterns, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiology-SGM* 147: 3183-3194.
72. Zoumpopoulou, G., Papadimitriou, K., Polissiou, M.G., Tarantilis, P.A. Tsakalidou, E. (2010). Detection of changes in the cellular composition of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in the presence of antimicrobial compound(s) of *Lactobacillus* strains using Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology* 144: 202–207.
73. Ζερβάκης, Γ.Ι. (2011). Εισαγωγή στη Μυκητολογία. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας. Αθήνα, σελ. 112.
74. Παντίδου, Μ.Ε. Μανιτάρια από τα ελληνικά δάση. Μουσείο Γουλανδρή φυσικής ιστορίας. Κηφισιά, σελ. 197.
75. Πολυσίου Μ. Γ., (1989). Μαθήματα οργανικής στερεοχημείας και ενόργανη ανάλυση GC, UV - Vis, IR, NMR. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.
76. Χατζηϊωάννου, Θ.Π., Κουπάρη, Μ.Α. (1990). Ενόργανη ανάλυση. Πανεπιστήμιο Αθηνών (Εκδόσεις Δ. Μαυρομμάτη). Αθήνα.
77. Χριστιάς Χ. (1999). Μυκητολογία. Αγρότυπος: Αθήνα, σελ. 208.