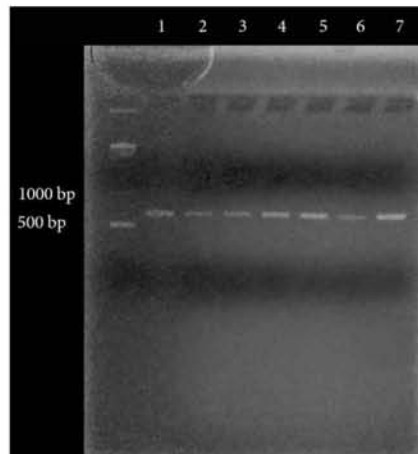




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



**«Προσδιορισμός ειδών του φανερόγαμου παρασίτου κουσκούτα (*Cuscuta* spp)
και καταγραφή αυτοφυών φυτών ξενιστών του σε περιοχές της Κεντρικής
Ελλάδας»**

Ελένη Ανθούλη

ΒΟΛΟΣ 2015

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή Διατριβή

Ελένη Ανθούλη

**«Προσδιορισμός ειδών του φανερόγαμου παρασίτου κουσκούτα (*Cuscuta spp*)
και καταγραφή αυτοφυών φυτών ξενιστών του σε περιοχές της Κεντρικής
Ελλάδας»**

Εξεταστική Επιτροπή

Ε. Βέλλιος
Επίκουρος Καθηγητής
Επιβλέπων

Α. Καρκάνης
Λέκτορας
Μέλος

Ι. Γ. Γούναρης
Καθηγητής
Μέλος

Βόλος 2015

Στη γιαγιά μου Ελένη...

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
1. Εισαγωγή	7
1.1. Περιγραφή της κουσκούτας	8
1.2. Οικονομική σημασία του γένους κουσκούτα	10
1.3. Περιγραφή του βιολογικού κύκλου της κουσκούτα	11
1.4. Μεταφορά θρεπτικών στοιχείων από τον ξενιστή στο παράσιτο	13
1.5. Η κουσκούτα ως επιβλαβές παράσιτο	14
1.6. Λήθαργος των σπόρων κουσκούτας	17
1.7. Εξάπλωση της κουσκούτας	18
1.8. Τρόποι καταπολέμησης της κουσκούτας	18
1.8.1. Χημική καταπολέμηση της κουσκούτας	18
1.8.2. Άλλες μέθοδοι καταπολέμησης	23
1.9. Κριτήρια κατάταξης ειδών στο γένος	23
1.9.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά για τον προσδιορισμό ειδών	25
1.9.2. Μοριακές μέθοδοι διαχωρισμού των ειδών και βιοτύπων του γένους <i>Cuscuta</i> 26	
1.10. Σκοπός της εργασίας	27
2. Υλικά και μέθοδοι	28
2.1. Συλλογή δειγμάτων σπερματόφυτων παράσιτων κουσκούτα	29
2.2. Παρατήρηση μορφολογικών χαρακτήρων άνθους δειγμάτων κουσκούτας	32
2.3. Απομόνωση ολικού DNA από το ολοπαράσιτο φυτό <i>Cuscuta</i> sp.	32
2.4. Επιλεγμένη περιοχή γονιδιώματος κουσκούτας για ενίσχυση και επιλογή εκκινητών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	33
2.5. Βαθμιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Gradient PCR)	34
2.6. Θερμοκρασιακό προφίλ PCR	35
2.7. Οριζόντια ηλεκτροφόρηση	35
2.8. Αλληλούχιση της γονιδιωματικής περιοχής ITS1, 5,8S και ITS2 δειγμάτων κουσκούτας	37
2.9. Ανάλυση και σύγκριση των αλληλουχιών	38
3. Αποτελέσματα	39
3.1. Καταγραφή αυτοφυών φυτών του φανερόγαμου παράσιτου και των ξενιστών του στις ευρύτερες περιοχές της Στερεάς Ελλάδας, Ευβοίας, Μαγνησίας και Λάρισας	40
3.2. Προσδιορισμός ειδών του παρασίτου σε περιοχές της Φθιώτιδας και της Βοιωτίας	59
3.2.1. Ταυτοποίηση των δειγμάτων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ..	59

3.2.2. Μορφολογικοί χαρακτήρες.....	66
3.2.3. Blast ανάλυση των αλληλουχιών των δειγμάτων.....	67
3.3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων με Bioinformatics	68
4. Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	74
4.Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	75
5. Βιβλιογραφία.....	77

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, υπό την επίβλεψη του κ. Ε. Βέλλιου, Επίκουρο καθηγητή φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε θέτοντάς μου το παρόν θέμα. Τον ευχαριστώ πολύ για τις υποδείξεις του και την εμπιστοσύνη του κατά την υλοποίηση του πειράματος αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου διατριβής . Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, στον καθηγητή μου κύριο Α. Καρκάνη, λέκτορα του Εργαστηρίου Ζιζανιολογίας, για την εμπιστοσύνη του, τη στήριξη του και την πολύτιμη βοήθειά του. Ευχαριστώ θερμά τον κύριο Ι.Γ. Γούναρη, καθηγητή μοριακής βιολογίας για τη συμμετοχή του στην τριμελή μου επιτροπή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω όλους όσους με βοήθησαν και συνεργάστηκαν μαζί μου εντός και εκτός του εργαστηρίου, καθώς και τις φίλες μου Νάντια και Εύη για την υποστήριξη τους. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου Χρήστο και Ιωάννα, για την υλική και ηθική τους υποστήριξη κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας υπήρξε η ταυτοποίηση είδους/ειδών του φανερόγαμου παράσιτου κουσκούτα που επικρατούν στην Κεντρική Ελλάδα. Για το λόγο αυτό έγινε συλλογή δειγμάτων κουσκούτας από διάφορες περιοχές των νομού Φθιώτιδας, Βοιωτίας, Μαγνησίας και Λαρίσης κι από πληθώρα ξενιστών του παρασίτου. Αρχικά έγινε καταγραφή των κυριότερων μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών που συλλέχθηκαν και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να γίνει εξαγωγή και καθορισμός του DNA.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), με χρήση των γενικευμένων εκκινητών ITS1/ITS4. Ακολούθως, με κριτήρια την καθαρότητα του DNA και την περιοχή προέλευσης του δείγματος επιλέχθηκαν 2 δείγματα, στα οποία έγινε αλληλούχηση του προϊόντος της PCR. Κατόπιν, τα προϊόντα της αλληλούχησης συγκρίθηκαν με όλες τις γνωστές αλληλουχίες (BLAST ανάλυση) που υπάρχουν στη βάση δεδομένων GenBank.

Από τη σύγκριση προέκυψε ότι η συγκεκριμένη περιοχή ITS1-5.8S-ITS2 του γονιδιώματος στο γένος *Cuscuta* είναι κοινή για τα είδη *C.campestris*, *C.pentagona*, *C.australis*, *C.polygonorum* και *C.obtusiflora*. Τα προϊόντα της αλληλούχησης των ελληνικών δειγμάτων ήταν όμοια μεταξύ τους και με την περιοχή των ειδών αυτών. Με κριτήριο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και την αλληλουχία ITS1-5.8S-ITS2 των δειγμάτων βρέθηκε ότι το είδος *C.campestris* επικρατεί στην Κεντρική και Στερεά Ελλάδα.

Με τις μεθόδους βιοπληροφορικής blast και bioedit διαπιστώσαμε πως οι διαφορές στις αλληλουχίες DNA μεταξύ των ειδών είναι ελάχιστες. Αποκλείοντας κάποια από τα είδη κουσκούτα με βάση τις διαφορές στις βάσεις του DNA τους, καθώς και με την μορφολογική παρατήρηση των ανθέων τους οδηγηθήκαμε στα τελικά μας συμπεράσματα.

1.Εισαγωγή

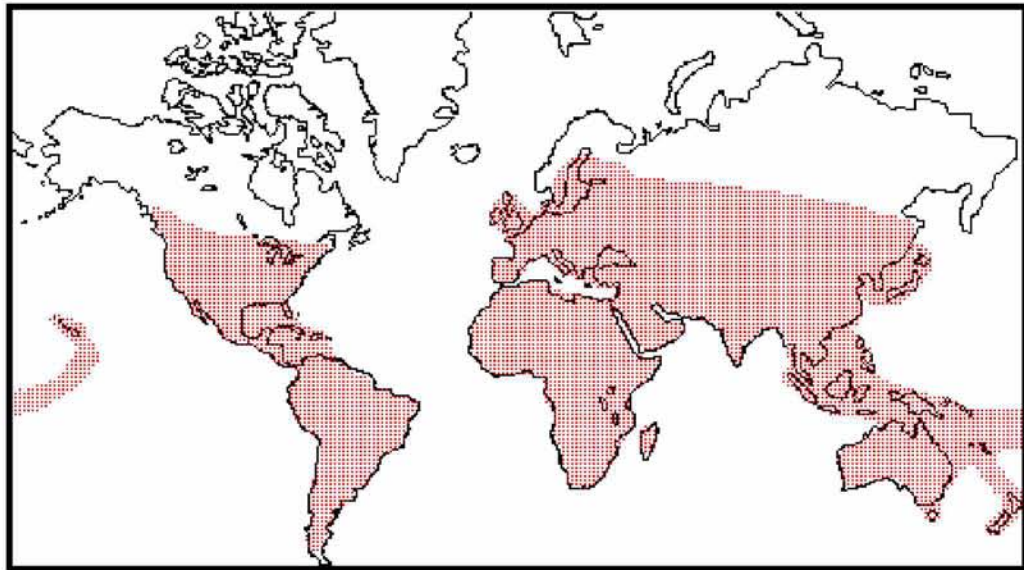
1.1. Περιγραφή της κουσκούτας

Τα παρασιτικά φυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως ολοπαρασιτικά, ημιπαρασιτικά, υποχρεωτικά παράσιτα, ή προαιρετικά παράσιτα (Nickrent D.L. *et al.*, 2004).

Πολλά ανώτερα φυτά μπορούν να ζήσουν αποκλειστικά παρασιτώντας άλλα φυτά οπότε χαρακτηρίζονται ως ολοπαράσιτα και ικανοποιούν όλες τις διατροφικές τους απαιτήσεις από τα φυτά ξενιστές τους (Γεωργόπουλος Σ.Γ., 1984). Όλα τα ολοπαρασιτικά είναι υποχρεωτικά παράσιτα (Ranjian A. *et al.*, 2014). Σε αυτά συμπεριλαμβάνεται η κουσκούτα (*Cuscuta sp.*), (Γεωργόπουλος Σ.Γ., 1984), το οποίο όντας ολοπαράσιτο στερείται χλωροφύλλης, επομένως δεν φωτοσυνθέτει.

Το γένος *Cuscuta*, της οικογένειας των *Convolvulaceae* περιλαμβάνει πάνω από 100 ολοπαρασιτικά είδη. Αυτά είναι πολύ διαδεδομένα ιδίως στα θερμά και εύκρατα κλίματα (Γεωργόπουλος Σ.Γ., 1984; Ray Sahelian M.D., 2014) Το γένος *Cuscuta* αποτελείται από είδη που παρασιτούν τους ιστούς πάνω από το έδαφος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το είδος *C. epithium*, το οποίο είναι ένα καταστροφικό ζιζάνιο που προκαλεί σοβαρές ζημιές στα καλλιεργούμενα φυτά και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει ως αποτέλεσμα ακόμα και την ξήρανση του ξενιστή του (Schwartz R.D. *et al.* 2014). Το είδος αυτό έχει εξαιρετικά ευρύ φάσμα ξενιστών και μπορεί να συνδεθεί με πολλούς ταυτόχρονα (Nickrent D.L. *et al.*, 2010).

Τα φυτά αυτά παρουσιάζουν ευρεία γεωγραφική κατανομή, καθώς ευρύ είναι και το φάσμα των ξενιστών τους, όπως αυτό φαίνεται από την εξάπλωση που προκύπτει και η οποία παρουσιάζεται στον παρακάτω χάρτη (Εικ. 1). Είναι ετήσιες πόες με πολύ λεπτούς (0,2-0,5 mm), επιμήκεις, νηματοειδείς βλαστούς, διακλαδισμένους, κίτρινου, κόκκινου και σπανίως πράσινου χρώματος, από τους οποίους απουσιάζουν ως επί το πλείστον τα φύλλα (Γεωργόπουλος 1992; Ray Sahelian M.D., 2014). Αυτοί τυλίγονται γύρω από τους βλαστούς διαφόρων χλωροφυλλούχων αγγειοσπέρμων φυτών, που αποτελούν ξενιστές τους, σχηματίζοντας ακανόνιστα και περίπλοκα πλέγματα ανάμεσα στα φυτά που προσβάλλουν. Με ειδικούς μυζητήρες απομυζούν νερό και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους (Ranjian A. *et al.*, 2014).



Εικόνα 1. Γεωγραφική εξάπλωση ειδών του γένους *Cuscuta* (Nickrent D.L., 2011)

Σε σπάνιες περιπτώσεις πάνω στους νηματώδης βλαστούς της κουσκούτας υπάρχουν πολύ μικρά εκφυλισμένα φύλλα, που περιέχουν πολύ μικρή ποσότητα χλωροφύλλης. Αυτό συμβαίνει επειδή η κουσκούτα μπορεί να παρουσιάσει μια μικρή αλλά ασήμαντη φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε περιβάλλον με υψηλή περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα. Σε ακόμα πιο σπάνιες περιπτώσεις, η δραστηριότητα αυτή μπορεί να γίνει αξιόλογη (Γεωργόπουλος Σ.Γ., 1992).

Τα φύλλα της κουσκούτας, όταν αυτά υπάρχουν είναι λεπτά και δυσδιάκριτα. Από τις μασχάλες τους βγαίνουν πλάγιοι βλαστοί και άνθη (Λόλας Π.Χ., 2007).

Τα άνθη έχουν μικρό μέγεθος (1-7 mm), σχήμα ακτινόμορφο και χρώμα λευκό, κίτρινο ή κόκκινο (ρόδινα). Είναι διατεταγμένα σε ταξιανθία κατά στάχτες, καθώς αποτελείται από πολλά άνθη μαζί (8-12) σε σωρούς σφαιρικούς. Η κατασκευή του άνθους χρησιμεύει πολύ στην ταξινόμηση – διάκριση των ειδών κουσκούτας (Λόλας Π.Χ., 2007). Οι καρποί είναι μικροσκοπικές κάψες ή ράγες, σφαιρικού σχήματος και καφέ χρώματος και περικλείουν 1-4 μικρά σπέρματα (Λόλας Π.Χ., 2007; Runyon J.B., 2009).

Ο σπόρος της είναι στρογγυλός- ωοειδής, μικρού μεγέθους (2mm) και κίτρινου, καφέ – μαύρου χρώματος (Λόλας Π.Χ., 2007).

1.2.Οικονομική σημασία του γένους κουσκούτα

Στη λατινική γλώσσα, *Cuscuta* σημαίνει τρέμω. Ωστόσο κάποιοι θεωρούν ότι το όνομα του ολοπαράσιτου είναι Αραβικής προέλευσης, και βγαίνει από τη λέξη "Kushkut." (Burnham R.J., 2012).

Με έρευνες που έχουν γίνει έχει διαπιστωθεί ότι τα φυτά αυτά περιέχουν ουσίες δηλητήρια και αποτελούν την τρίτη μεγαλύτερη κατηγορία των δηλητηρίων που είναι γνωστά σε όλο τον κόσμο. Αποτελούν επίσης την κύρια αιτία των οικονομικών απωλειών στον κλάδο της κτηνοτροφίας από την έλευση του πολιτισμού. Για το λόγο αυτό έχει διερευνηθεί ο ρόλος τους διεξοδικότερα, για την εξακρίβωση των τοξικών συστατικών (Bhatia H. *et al.*, 2014).



Εικόνα 2. Κουσκούτα σε ηλιοτρόπιο (προσφορά κ.Α.Καρκάνη)

Επιπλέον το είδος *Cuscuta reflexa* είναι βότανο με αντισπασμωδική, αιμοδυναμική, στερεοειδογόνο, αντιυπερτασική, μυοχαλαρωτική, καρδιοτονωτική, αντι-ική, αντιβακτηριακή, αντιοξειδωτική, χολινεργική και διουρητική δράση. Πολλά χημικά συστατικά έχουν απομονωθεί από το *C. reflexa* όπως κουσκουτίνη, β-σιτοστερόλη, στιγμαστερόλη, καμπερόλη, δουλσιτόλη, μυρικετίνη, κερκετίνη, κουμαρίνη και ολεανολικό οξύ με σκοπό τη φαρμακευτική χρήση τους (Patel S. *et al.*, 2012). Η χρήση και οι δυνατότητες που μπορεί να προσφέρουν κι άλλα είδη του γένους κουσκούτα δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως ακόμα και χρειάζεται να γίνει πολύ έρευνα ακόμα για την εξακρίβωση των τοξικών συστατικών, με σκοπό τη μελλοντική τους χρήση (Bhatia H. *et al.* 2014).

1.3. Περιγραφή του βιολογικού κύκλου της κουσκούτα

Η κουσκούτα είναι ένα παρασιτικό φυτό (στελέχους) (Εικ. 2), των οποίων οι σπόροι όταν πέσουν στο έδαφος έχουν τη δυνατότητα να παραμείνουν αδρανείς, ώσπου να βρεθεί σε κοντινή απόσταση ο υποψήφιος ξενιστής και οι συνθήκες να είναι ευνοϊκές (Scott. P., 2008). Κάθε φυτό κουσκούτας έχει την ικανότητα να παράγει αρκετές χιλιάδες σπόρους, εκ των οποίων εντός ενός έτους μόνο το 5% περίπου βλασταίνει. Το υπόλοιπο 95% μπορεί να παραμείνει σε λανθάνουσα κατάσταση (λήθαργο), στο έδαφος για περισσότερο από 20 χρόνια, ανάλογα με το είδος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (www.ipm.ucdavis.edu)

Χρησιμοποιώντας τους πόρους που διαθέτει το ενδοσπέρμιο, ο σπόρος είναι σε θέση να βλαστήσει. Μόλις συμβεί αυτό, το βλαστίδιο έχει 6 ημέρες για να βρει και να δημιουργήσει μια σύνδεση με το φυτό ξενιστή του πριν εξαντληθούν οι αποθησαυριστικές ουσίες (Scott. P., 2008).

Οι βλαστοί αναπτύσσονται προς τα έξω, μέχρι να φθάσουν σε ένα φυτό ξενιστή όπου αγκιστρώνονται. Τα νεαρά στελέχη του παρασίτου μπορεί να φτάσουν μέχρι και 6 cm (2,4 ίντσες) (Runyon J.B. *et al.*, 2009).

Το φυτό της κουσκούτα, όντας ολοπαρασιτικό φυτό, εξαρτάται από τον ξενιστή του εξ' ολοκλήρου. Γι' αυτό το λόγο έχει αναπτύξει εξειδικευμένα όργανα, τα οποία διεισδύουν με ειδικά όργανα στο φυτό ξενιστή τους και ονομάζονται μυζητήρες (haustoria). Ένας μυζητήρας (Εικ. 3), είναι μία τροποποιημένη ρίζα, η οποία εξασφαλίζει σύνδεση με το αγγειακό σύστημα του ξενιστή και εξάγει από αυτόν νερό και θρεπτικά (www.sciencechannel.com).

Μετά την σύνδεση με τον ξενιστή της μέσω των μυζητήρων της, η κουσκούτα περιλείσσεται γύρω από αυτόν όλο και περισσότερο, δημιουργώντας επιπλέον μυζητήρες. Η διαδικασία του παρασιτισμού ξεκινά από προσκόλληση του παρασίτου στην επιφάνεια υποδοχής, που ακολουθείται από τις προσπάθειες διείσδυσης με υφών. Στην περίπτωση επιτυχούς παρασιτισμού, τα όργανα αυτά συνδέουν τον αγγειακό ιστό του παρασίτου με εκείνον του ξενιστή (Bleischwitz M. *et al.*, 2010).

Το μοριακό και αναπτυξιακό υπόβαθρο του παρασιτισμού από τα φυτά είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστο (Ranjana A. *et al.*, 2014). Παρόλα αυτά οι μυζητήρες και ο τρόπος δράσης τους ανοίγουν το δρόμο για την εξέταση και τη διερεύνηση της μετατόπισης μιας ποικιλίας μορίων και μακρομορίων από τον ξενιστή στο παράσιτο (Aly R., 2013).



Εικόνα 3. Βλαστός φυτού κουσκούτα στον οποίο φαίνονται οι μυζητήρες που έχει αναπτύξει.

Οι μυζητήρες της κουσκούτας διαπερνούν την επιδερμίδα και το παρέγχυμα του ξενιστή και τελικά συνδέονται στα αγγεία φλοιού και στα αγγεία ξύλου. Όταν έχει ξεκινήσει ο παρασιτισμός στα σημεία σύνδεσης, η κουσκούτα σχηματίζει ταξιανθίες, που στη συνέχεια- κατά το τέλος του βιολογικού κύκλου μετατρέπονται σε καρπούς και πέφτουν στο έδαφος (Costea M. *et al.* 2005).

Επίσης δεν είναι πλήρως γνωστός ο τρόπος με τον οποίο τα φυτά αυτά επιλέγουν τους ξενιστές τους. (Nickrent D.L. and Musselman LJ, 2004). Μελέτες έδειξαν ότι η κουσκούτα εντοπίζει και επιλέγει, ή αποφεύγει κάποια φυτά ως ξενιστές μέσω απωθητικών ουσιών και στη συνέχεια προσανατολίζεται στην κατεύθυνση του ξενιστή που τελικά παρασιτεί. Το φως μπορεί επίσης να αποτελέσει παράγοντα καθορισμού της περιοχής σύνδεσης (Runyon J.B., 2009).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το είδος *Cuscuta europaea* επιλέγει βλαστούς στην καλύτερη κατάσταση. Οι επιστήμονες ακόμα δεν είναι σε θέση να ορίσουν πώς και γιατί επιλέγονται διαφορετικά φυτά ως ξενιστές, γιατί ορισμένα φυτά ευνοούνται, και ακόμα γιατί μερικά αποφεύγονται εντελώς (Nickrent D.L. *et al.*, 2004).

Τα ερευνητικά δεδομένα επίσης, δείχνουν ότι το είδος *Cuscuta campestris* είναι σε θέση να επιλέξει τον ξενιστή του με βάση του κατά πόσο μπορεί να συνδεθεί μαζί του και την ποσότητα των θρεπτικών συστατικών που είναι διαθέσιμα να απομυζήσουν (Costea M. *et al.*, 2005).



Εικόνα 4. Κουσκούτα σε μηδική (προσφορά του κ.Α.Καρκάνη)

Συνεπώς ο τρόπος σύνδεσης των δύο φυτών είναι ένα κομβικό σημείο του κύκλου ζωής του παρασίτου (Runyon J.B. *et al.*, 2009). Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί επιπλέον ότι οι βλαστοί της κουσκούτας προτιμούν να περιελίσσονται (Εικ. 4) σε βλαστούς φυτών με έντονο πράσινο χρώμα, πράγμα που δηλώνει τη σπουδαιότητα του φυτοχρώματος στην επιλογή ξενιστή της (Runyon J.B. *et al.*, 2009).

1.4. Μεταφορά θρεπτικών στοιχείων από τον ξενιστή στο παράσιτο

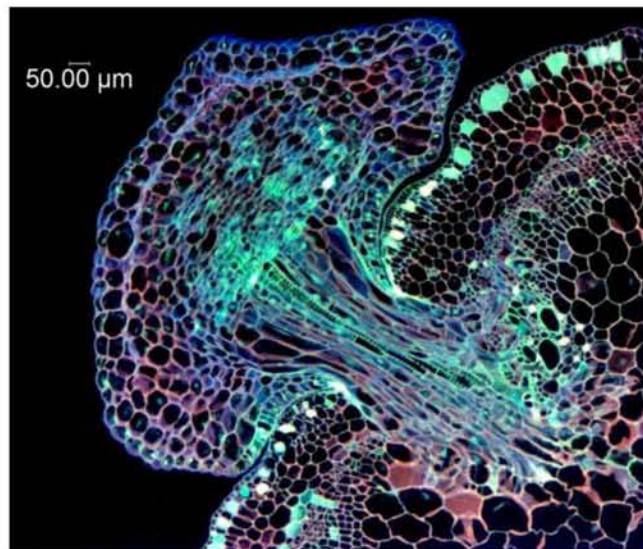
Φυτά του γένους *Cuscuta* φαίνεται να φιλτράρουν κατά κάποιο τρόπο τις ουσίες που απορροφούν με τους μυζητήρες τους από το φυτό ξενιστή (Costea M. *et al.*, 2005). Το παράσιτο έχει την ικανότητα επίσης να μεταβιβάζει βιοχημικά μηνύματα στον ξενιστή (Runyon J.B. *et al.*, 2009) και κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των μυζητήρων, ξενιστές και κουσκούτα αναπτύσσουν μια σύνδεση πολύ ιδιαίτερη. Συνδέονται μεταξύ τους με πλασμοδέσμες δημιουργώντας ένα διάδρομο μεταφοράς των βασικών ουσιών από τον ξενιστή στο παράσιτο. Κύτταρα του αγγειακού συστήματος υφίστανται μια αξιοσημείωτη διαφοροποίηση (Dörr I., 1972) ενώ τα παρεγχυματικά κύτταρα των μυζητήρων διαφοροποιούνται σε αγγεία φλοιού ή ξύλου που τελικά σχηματίζουν συνδέσεις μεταξύ *Cuscuta* και ξενιστή (Heintz W., 1989). Τότε η κουσκούτα αποκτά όλα τα θρεπτικά συστατικά από τον ξενιστή μέσω των μυζητήρων και η φωτοσύνθεση μειώνεται σε ένα ελάχιστο επίπεδο. Αυτό υποστηρίζεται επίσης από την έλλειψη πραγματικών φύλλων στα είδη *Cuscuta* (Ranjan A *et al.*, 2014). Τα θρεπτικά συστατικά, διαλυμένες ουσίες και μακρομόρια μεταφέρονται στο παράσιτο από τον ξενιστή μέσω συμπλαστικών και αποπλαστικών μονοπατιών (Birschwilks M. *et al.*, 2005).

1.5. Η κουσκούτα ως επιβλαβές παράσιτο

Τα είδη *Cuscuta* spp. δε διαθέτουν ριζικό σύστημα, παρά μόνο νηματοειδή στελέχη που συνδέονται με τον ξενιστή του με μυζητήρες (Εικ. 5). Ο παρασιτισμός από είδη *Cuscuta* spp. μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές απώλειες στην παραγωγή των καλλιεργούμενων ειδών και αναφέρονται ως επιβλαβή ζιζάνια (Costea M. *et al.*, 2006).

Στην Ελλάδα η κουσκούτα είναι σοβαρό πρόβλημα στη μηδική, τα ζαχαρότευτλα και σε μερικές περιπτώσεις και σε καπνοσπορεία (Λόλας Π.Χ. 2007).

Στη συνέχεια παρατίθενται τρεις πίνακες με καλλιέργειες που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στο ολοπαράσιτο κουσκούτα (Πίν. 1, 2 &3).



Εικόνα 5. Σημείο σύνδεσης παρασίτου-ξενιστή με μυζητήρα (Costea M., 2012)

Η κουσκούτα είναι από τα φυτά που έχουν αναπτύξει σημαντικούς, ειδικούς προσαρμοστικούς μηχανισμούς ώστε να μπορούν να επιβιώσουν για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, πριν τη σύνδεσή τους με τον ξενιστή (Costea M. *et al.*, 2006). Η κουσκούτα χαρακτηρίζεται ως μη εξειδικευμένο παράσιτο· κάθε είδος κουσκούτας φυτρώνει μόνο του και παρασιτεί σε πολλά φυτά-ξενιστές (Λόλας Π.Χ. 2007).

Το κύριο μέσο διασποράς του παρασίτου σε παγκόσμιο επίπεδο είναι ο μολυσμένος σπόρος κτηνοτροφικών φυτών (Costea M. *et al.* 2006). Η προσαρμοστικότητα των ειδών του γένους

Cuscuta στους ξενιστές της είναι ένας παράγοντας που τη βοηθά να επιβιώσει στις περιοχές που διασπείρεται με αποτέλεσμα η εξάπλωσή της να είναι πλέον σε παγκόσμιο επίπεδο (Εικ. 6). Για παράδειγμα, γνωρίζουμε από μελέτη που έγινε στην Ινδία ότι το εύρος ξενιστών του είδους *Cuscuta chinensis* ανέρχεται στο σύνολο των 49 ειδών. Από αυτά το 32,6% είναι βότανα, 34,6% θάμνοι, 26,5% αναρριχώμενα και 6,12% μικρά δέντρα. Για το είδος *C. Reflexa* το 55% των ξενιστών είναι θάμνοι, 5% αναρριχώμενα και 40% δέντρα. Και τα δύο είδη κουσκούτας παρασιτούν τα *Integrifolia Holopetelea*, *Cassia occidentalis*, *Acasia nilotica*, *Ipomoea fistulosa*, *Capparis spinosa* (Patel, J. N. and Patel N. K., 2010). Αυτό δείχνει ότι για τα είδη κουσκούτας που μελετήθηκαν υπάρχει ένας κοινός παρονομαστής, ο παράγοντας περιβάλλον, στο οποίο τα είδη αυτά κατάφεραν να προσαρμοστούν.

Πίνακας 1. Ευαίσθητα είδη καλλιεργούμενων φυτών στο φανερόγαμο παράσιτο κουσκούτα (Lanini W.T. and Kogan M., 2005)

Ταξινόμηση	Λατινικό Όνομα	Κοινό Όνομα
Μονοκοτυλήδονα	<i>Allium cepa</i>	Κρεμμύδι
	<i>Allium sativum</i>	Σκόρδο
Δικοτυλίδια	<i>Asparagus officinalis</i>	Σπαράγγι
	<i>Beta vulgaris</i>	Ζαχαρότευτλο
	<i>Capsicum annuum</i>	Πιπέρι
	<i>Carthamus tinctorius</i>	Ατρακτιλίδα
	<i>Citrus spp.</i>	Εσπεριδοειδή
	<i>Cucumis melo</i>	Πεπόνι
	<i>Cucumis sativus</i>	Αγγούρι
	<i>Daucus carota</i>	Καρότο
	<i>Ipomoea batatas</i>	Γλυκοπατάτα
	<i>Lycopersicon Esculentum</i>	Ντομάτα
	<i>Solanum melongena</i>	Μελιτζάνα
	<i>Solanum tuberosum</i>	Πατάτα
	<i>Punica granatum</i>	Ρόδι

Πίνακας 2. Ευαίσθητα είδη ζιζανίων στο φανερόγαμο παράσιτο *Cuscuta* (Lanini W.T. and Kogan M., 2005)

Ταξινόμηση	Λατινικό Όνομα	Κοινό Όνομα
Μονοκοτυλήδονα	<i>Solanum nigrum</i>	Στύφνος
	<i>Portulaca oleracea</i>	Αντράκλα
	<i>Amaranthus blitoides</i>	Αμάραντος
Δικοτυλήδονα	<i>Bilderdykia convolvulus</i>	Άγριο μαύρο σιτάρι
	<i>Convolvulus arvensis</i>	Περικοκλάδα
	<i>Salsola tragus</i>	Ρώσικο γαϊδουράγκαθο
	<i>Chenopodium album</i>	Λουβουδιά

Πίνακας 3. Ευαίσθητα είδη καλλωπιστικών φυτών στο φανερόγαμο παράσιτο *Cuscuta* (Lanini W.T. and Kogan M., 2005)

Ταξινόμηση	Λατινικό Όνομα	Κοινό Όνομα
Μονοκοτυλήδονα	<i>Impatiens</i> spp.	Impatiens
	<i>Chrysanthemum</i> spp.	Χρυσάνθεμο
	<i>Ipomoea</i> spp.	Περικοκλάδα
Δικοτυλήδονα	<i>Satureja hortensis</i>	Καλοκαιρινό θρούμπι
	<i>Coleus blumei</i>	Κολεός
	<i>Geranium</i> spp.	Γεράνι
	<i>Campsis radicans</i>	Τρομπέτα αμπέλου
	<i>Parthenocissus quinquefolia</i>	Virginia-αναρριχητικό φυτό
	<i>Hedera helix</i>	Αγγλικός κισσός
	<i>Dahlia merckii</i>	Ντάλια
	<i>Petunia inflata</i>	Πετούνια
	<i>Foeniculum vulgare</i>	Μάραθος
	<i>Mentha</i> spp.	Μέντα
<i>Origanum majorana</i>	Ματζουράνα	
<i>Catharanthus roseus</i>	Μυρτιά	

Στους ξενιστές της κουσκούτας συμπεριλαμβάνονται φυτά κηπευτικών καλλιεργειών, λαχανικά, όσπρια, μηδική, ζαχαρότευτλα, κρεμμύδια, πλατύφυλλα ζιζάνια, και λιγότερο συχνά ξυλώδη φυτά, χόρτα και δημητριακά, σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Νότιο Χορασάν. Τα παρασιτισμένα φυτά εμφανίζουν περιορισμένη ανάπτυξη, έλλειψη σθένους και χλώρωση που έχει ως αποτέλεσμα την κακή ανάπτυξη των καρπών τους. (Ghous K. *et al.*, 2013). Σοβαρές ζημιές έχουν αναφερθεί παγκοσμίως στην πατάτα, το καρότο, τα ζαχαρότευτλα, το ρεβίθι, το μύρτιλλο, το βατόμουρο και τα εσπεριδοειδή (Runyon J.B. *et al.*, 2009), με σοβαρές απώλειες στην ποιότητα και την ποσότητα των καλλιεργούμενων φυτών ξενιστών (Aly R., 2013).



Εικόνα 6. Έντονη προσβολή κουσκούτας σε αγρό (προσφορά του κ.Α.Καρκάνη)

1.6. Λήθαργος των σπόρων κουσκούτας

Ο λήθαργος των σπόρων μπορεί να είναι πρωτογενής ή δευτερογενής. Ο πρωτογενής λήθαργος οφείλεται σε συνθήκες που αφορούν το έμβρυο, ενώ ο δευτερογενής αφορά την κατάσταση του περιβλήματος του σπόρου, όταν αυτός έχει αποσπαστεί από το φυτό και οφείλεται σε δυσμενείς εξωτερικές συνθήκες (Silvertown J., 1999).

Τα σπέρματα της κουσκούτας που έχουν λήθαργο περιβλημάτων στο εργαστήριο μπορεί να ξεπεραστεί με επίδραση οξέων. Η βλάστηση τους στη φύση είναι ακόμη και σήμερα θέμα υπό εξέταση, δεδομένου ότι δεν είναι ακόμη πλήρως διασαφηνισμένος ο τρόπος που αυτή γίνεται. Παρόλα αυτά γνωρίζουμε πως τα σπέρματα δε βλαστάνουν στη φύση όταν βρεθούν βαθειά μέσα στο έδαφος. Συγκεκριμένα το βάθος δεν πρέπει να είναι πάνω από 3-4 mm (Γεωργόπουλος Σ.Γ., 1992).

Σχετικές έρευνες έδειξαν ότι σπόροι με πρωτογενή λήθαργο μπορούν να βλαστήσουν ξανά με τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε περίπτωση όμως που οι περιβαλλοντικές συνθήκες σε μια συγκεκριμένη εποχή του χρόνου δεν είναι κατάλληλες τόσο για τη βλάστηση των σπόρων όσο και για την συμπλήρωση του κύκλου ζωής του φυτού, τότε μπορεί οι σπόροι να πέσουν σε λήθαργο ξανά. Επομένως αποφεύγεται η βλάστηση σε ένα περιβάλλον που μπορεί να ευνοεί τη βλάστηση του σπόρου αλλά όχι και την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του φυτού (Jayasuriya K.M. *et al.* 2008).

Ακόμη εργαστηριακές μελέτες έδειξαν ότι ο πρωτογενής λήθαργος μπορεί να ξεπεραστεί με την αναμόχλευση των σπόρων. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η βλάστηση ήταν αμελητέα στους 10 ° C ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 30 ° C, καθώς και ότι δεν επηρεάστηκε από το φως. Αποθήκευση σπόρων του είδους *Cuscuta campestris* για 12 χρόνια είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια του πρωτογενή ληθάργου, που επέτρεψε τη βλάστηση όλων των σπόρων που είχαν παραμείνει ακόμη βιώσιμοι (Runyon J.B. *et al.* 2009).

1.7. Εξάπλωση της κουσκούτας

Όπως πολλά ζιζάνια, έτσι και το φυτό κουσκούτα εξαπλώθηκε με τη βοήθεια του ανθρώπου, μέσω της ανάπτυξης του εμπορίου στο μεγαλύτερο μέρος της υφελίου, καθιστώντας τη το πιο διαδεδομένο παράσιτο του κόσμου. Σημαντική πηγή μόλυνσης κουσκούτας είναι τα φυτώρια. Οι σπόροι του παράσιτου εισέρχονται ως προσμείξεις των σπόρων των καλλιεργειών (Costea M. *et al.*, 2005).

Με την εξάπλωσή του σε όλο τον κόσμο, εκτός από τις συνέπειες του παρασιτισμού στα φυτά ξενιστές του, διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο και στην εξάπλωση σημαντικών ασθενειών που προκαλούνται από ιούς (Ghous K. *et al.* 2013).

1.8. Τρόποι καταπολέμησης της κουσκούτας

1.8.1. Χημική καταπολέμηση της κουσκούτας

Σε αρκετές περιπτώσεις μεταφυτρωτικά αλλά και πριν την εμφάνιση του παρασίτου χρησιμοποιούνται ορισμένα ζιζανιοκτόνα για την αντιμετώπιση του προβλήματος. Στο Μεξικό, πρόσφατα πραγματοποιήθηκε μια έρευνα που αφορά την καταπολέμηση της κουσκούτας με χρήση χημικών μέσων. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας (Πίν. 4).

Πίνακας 4. Χημικός έλεγχος του παρασίτου κουσκούτα στις καλλιέργειες της μηδικής, του τριφυλλιού, της ντομάτας και της πατάτας (Ashigh J. and. Marquez E. Esther 2010).

Δραστική Ουσία	Μηδική (ποσότητα/ στρέμμα)	Τριφύλλι (ποσότητα/ στρέμμα)	Ντομάτα (ποσότητα/ στρέμμα)	Πατάτα (ποσότητα/ στρέμμα)	Παρατηρήσεις
Pronamide	Προφυτρωτικά (1,36-1,8 g/στρ)	Προφυτρωτικά (1,36-1,8 g/στρ)	-	-	Οι απαιτούμενες ποσότητες του σκευάσματος με δραστική ουσία pronamide που χρησιμοποιούνται, εξαρτώνται από τον τύπο της άρδευσης. Υπερβολικές ποσότητες νερού άρδευσης μετά από εφαρμογή ζιζανιοκτόνου μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την ζιζανιοκτόνο δράση.
Trifluralin	Προφυτρωτικά (0,47-1,89 l/στρ)	-	Προφυτρωτικά (0,47-0,94 l/στρ)	Προφυτρωτικά (0,47-0,94 l/στρ)	Για το βέλτιστο έλεγχο της κουσκούτας θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη

					προτεινόμενη δόση. Λόγω των χαμηλών συνιστώμενων ποσοτήτων στην τομάτα και στην πατάτα, το ζιζανιοκτόνο μπορεί να ελέγξει μερικώς το παρασίτου.
Pendimethalin	Προφυτρωτικά (1,1-4,4 l/στρ)	-	Προφυτρωτικά (0,71-1,42 l/στρ)	Προφυτρωτικά (0,71-1,42 l/στρ)	Για το βέλτιστο έλεγχο του παρασίτου, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συνιστώμενη δόση.
Glyphosate	Μεταφυτρωτικά (1,89 l/στρ.)	-	-	-	Ευρεία εφαρμογή συνιστάται μόνο σε τριφύλλι.
DCPA	-	-	Προφυτρωτικά (2,72-6,35 g/στρ)	-	Τα φυτά τομάτας πρέπει να έχουν εγκατασταθεί στον αγρό (μεταφύτευση) πριν από την εφαρμογή. Για το βέλτιστο έλεγχο της

					κουσκούτας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συνιστώμενη δόση.
Imazamox	Μεταφυτρωτικά (112-168 g/στρ)	Μεταφυτρωτικά (140 g/στρ)	-	-	Καταστέλλεται η κουσκούτα πριν την σύνδεσή της στο φυτό ξενιστή. Για τον καλύτερο δυνατό έλεγχο του παρασίτου, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συνιστώμενη δόση.
Imazethapyr	Μεταφυτρωτικά (84-168 g/στρ)	Μεταφυτρωτικά (84-168 g/στρ)	-	-	Νευρώνει την κουσκούτα πριν την προσάρτησή της στο φυτό ξενιστή. Για καλύτερα αποτελέσματα, μαζί με το σκεύασμα που περιέχει την imazethapyr θα πρέπει να εφαρμόζεται και

					συμπύκνωμα μεθυλιωμένου σπορέλαιου. Για το βέλτιστο έλεγχο του παρασίτου, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συνιστώμενη δόση.
Paraquat	Μεταφυτρωτικά (358,4g/στρ)	Μεταφυτρωτικά (364-672 g/στρ)	-	-	Είναι περιορισμένης χρήσης και εφαρμόζεται μεταξύ άλλων σκευασμάτων – πριν από την ανάπτυξη της κουσκούτας. Εφαρμόζεται μεταξύ των κοπών της καλλιέργειας.
pelargonic acid	Μεταφυτρωτικά (Variable, 3-7%)	Μεταφυτρωτικά (Variable, 3-7%)	-	-	Εφαρμόζεται μεταξύ των κοπών και πριν την εκ νέου ανάπτυξη των φυτών ξενιστών, για τη νεύρωση του παρασίτου.

1.8.2. Άλλες μέθοδοι καταπολέμησης

Η καταπολέμηση της κουσκούτας είναι αρκετά δύσκολη, γι' αυτό και είναι σημαντικό να εφαρμόζονται συγκεκριμένα καλλιεργητικά μέτρα. Αυτά είναι: η τετραετής αμειψισπορά, η καταστροφή ζιζανίων που είναι προσβεβλημένα από την κουσκούτα, η αποφυγή βοσκής ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα μεταφοράς σπόρων κουσκούτας και η χημική καταπολέμηση (προ- ή μετά-φυτρωτικά) του παρασίτου.

Το πιο αποτελεσματικό μέσο ελέγχου είναι η εξασφάλιση υγιεινούς πολλαπλασιαστικού υλικού (σπόρων κυρίως) (Dawson J.H. *et al.* 1994). Παρόλα αυτά, κλειδί για την αποτελεσματικότητα ελέγχου του παρασίτου είναι η κατανόηση της βιολογίας του. Στόχος αποτελεί η ανάπτυξη μεθόδων καταπολέμησης μέσα από την κατανόηση της λειτουργίας του μηχανισμού της κουσκούτας, την κατανόηση της δράσης των μυζητήρων της και από όλη τη γνώση που υπάρχει σχετικά με τη μετατόπιση των siRNAs, mRNAs, ιών, σακχάρων και πρωτεϊνών από την πύλη υποδοχής σε παρασιτικά (Aly R., 2013).

Τέλος έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα του παρασίτου σε ζιζανιοκτόνα, με αποτέλεσμα οι σπόροι κουσκούτας να φυτρώνουν κανονικά την άνοιξη (Nickrent D.L. and Musselwan L.J. 2004).

1.9. Κριτήρια κατάταξης ειδών στο γένος

Το γένος *Cuscuta* αποτελείται από είδη της οικογένειας των *Cuscutaceae* (Hajimehdipour H *et al.*, 2012). Χαρακτηρίζονται ως κοσμοπολίτικο γένος, αλλά με την πλειοψηφία των ειδών να βρίσκονται στην Αμερική (Bleischwitz M. *et al.*, 2010).

Σε μια προσπάθεια παγκόσμιας κλίμακας για τον προσδιορισμό και την κατάταξη των ειδών του γένους *Cuscuta* έγιναν μελέτες της μορφολογίας των σπόρων της *Cuscuta* (από μελέτη της Αιγύπτου) χρησιμοποιώντας οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Οι μακρο- και μικρομορφολογικοί χαρακτήρες, συμπεριλαμβανομένου του σχήματος των σπόρων, το χρώμα, το μέγεθος και το σχήμα των επιδερμικών κυττάρων βοήθησαν στην προσπάθεια της κατάταξης και κατηγοριοποίησης των ειδών (Abdel Khalik K.N., 2006).

Αν και σχετικά λίγα είδη προσβάλλουν καλλιέργειες θεωρούνται επιβλαβή ζιζάνια ή χωροκατακτητικά φυτά (Εικ. 7). Παρόλα αυτά πολλά είδη του γένους *Cuscuta* είναι απειλούμενα ή ακόμα και υπό εξαφάνιση (Bleischwitz M. *et al.*, 2010) – (Πίν. 5).



Εικόνα 7. Προσβολή αγρού από κουσκούτα (Πρσφορά κ. Α. Καρκάνη)

Πίνακας 5. Αναφορά των σημαντικότερων ειδών κουσκούτα με βάση τη σπουδαιότητα των ξενιστών που προσβάλλουν.

Είδος	Γεωγραφική Εξάπλωση	Παρατηρήσεις
<i>C. pentagona</i> (<i>C. campestris</i>)	Παγκοσμίως	Τα πιο σημαντικό είδος του γένους <i>Cuscuta</i> . Προσβάλλει ένα ευρύ φάσμα ειδών, λαχανικά, φρούτα, καλλωπιστικά και ξυλώδη φυτά. Έχει αναφερθεί ως ζιζάνιο σε 25 καλλιέργειες σε 55 χώρες
<i>C. epithymum</i>	Παγκοσμίως	Αποτελεί σοβαρό πρόβλημα ζιζανίων στην Ευρώπη και την Ασία, σε τριφύλλια, κτηνοτροφικά και άλλα όσπρια και καρότο.
<i>C. europaea</i>	Ευρώπη και Βόρεια Αμερική	Είναι σοβαρότατο πρόβλημα στην Ευρώπη.

		Πρώτη φορά έκανε την εμφάνισή της στην Αμερική
<i>C. gronovii</i>	Βόρεια Αμερική	Είδος που βρίσκεται συνήθως σε υγρούς τόπους και κατά μήκος των υδατορευμάτων. Διαθέτει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών όμως προσβάλλει ιδιαίτερα τα μύρτιλλα.
<i>C. indecora</i>	Βόρεια και Νότια Αμερική	Προσβάλλει ιδιαίτερα τη μηδική.
<i>C. planiflora</i>	Ασία, Ευρώπη και Βόρεια Αμερική	Ευρύ φάσμα ξενιστών με προτίμηση στη μηδική και στα τριφύλλια.
<i>C. reflexa</i>	Ασία	Προσβάλλει κυρίως τα πολυετή ξυλώδη είδη.
<i>C. suaveolens</i>	Προέρχεται από τη Νότια Αμερική και τείνει να εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο	Κυρίως προσβάλλει τη μηδική.

1.9.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά για τον προσδιορισμό ειδών

Για τον χαρακτηρισμό ειδών του γένους *Cuscuta*, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ανθέων είναι αυτά που χρησιμοποιούνται κυρίως. Εργασίες των Costea M. *et al.* (2008, 2009 & 2011), Michael A.R. *et al.* (2011) και Barath K. (2009) περιγράφουν αναλυτικά τη μορφολογία και την ανατομία των ανθέων. Συγκεκριμένα περιγράφουν το χρώμα, τη διάμετρο και το σχήμα των μίσχων και της ανθοταξίας, το βαθμό επικάλυψης, το χρώμα και το μήκος του κάλυκα, τον αριθμό των σεπάλων, τη μορφή της στεφάνης και της κάψας. Τα είδη του γένους *Cuscuta* διαφέρουν κυρίως στη μορφολογία του κάλυκα, της στεφάνης καθώς και στο βαθμό επικάλυψης της κάψας από τη στεφάνη.

Στο είδος *C.campestris* ο κάλυκας είναι ωσειδής με αμβλείς καταλήξεις. διαθέτει ωσειδή, με αμβλείς καταλήξεις κάλυκα. Η στεφάνη είναι λευκή, λογχοειδής, οξεία και συχνά κυρτή και η κάψα επικαλύπτεται από τη στεφάνη στο μισό με ένα τέταρτο της επιφάνειά της (Barath K., 2009). Στο είδος *C.pentagona* ο κάλυκας έχει ελαφρύ πράσινο χρώμα, είναι σχήματος έως τριγωνικό-ωσειδή. Η στεφάνη είναι λευκή, τριγωνική ή ωσειδής-τριγωνική και επικαλύπτει ελαφρώς την κάψα (Burnham R. J., 2013). Στο είδος *C.obtusiflora* ο κάλυκας έχει σχήμα ρηχό κυπελλοειδές, στεφάνη σε σχήμα καμπάνας με βάσεις, οι οποίες είναι επιμήκεις, στρογγυλεμένες που επικαλύπτουν την κάψα (Costea M. & Stefanovic, 2009). Στο είδος *C.australis* ο κάλυκας είναι κυπελλοειδής και η στεφάνη έχει σχήμα καμπάνας χρώμα λευκό ή κρεμ και κάψα που δεν επικαλύπτεται από τη στεφάνη (Jonhson R.W., 1992). Το είδος *C.polygonorum* φέρει κάλυκα ωσειδή-επιμήκη, στεφάνη τριγωνική-ωσειδή ή οξεία και στρογγυλή κάψα με επικάλυψη στη βάση της από τη στεφάνη (Britton Nathaniel Lord & Brown Addison, 1896).

1.9.2. Μοριακές μέθοδοι διαχωρισμού των ειδών και βιοτύπων του γένους *Cuscuta*

Βάση πολλών ερευνών, όπως αυτές των Malik Zainul Abdit *et al.* (2011), των Chen W. *et al.* (2014) και των Costea και Stefanovic (2009), για την ανίχνευση καθώς και για το διαχωρισμό των ειδών του γένους *Cuscuta*, χρησιμοποιούνται μοριακές μέθοδοι με κυρίαρχη την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και την αλληλούχηση των προϊόντων της και σύγκρισή τους με γνωστές αλληλουχίες της συγκεκριμένης γονιδιακής περιοχής.

Η PCR είναι μια αξιόπιστη μοριακή μέθοδος πολλαπλασιασμού της περιοχής DNA που μας ενδιαφέρει, τόσες φορές ώστε να μπορεί να γίνει δυνατή η μελέτη της. (Guyer RL and Koshland ED, 1989; Hoelzel A.R. 1998).

Για να γίνει η ενίσχυση της περιοχής DNA υπό εξέταση απαιτείται το κατάλληλο ζεύγος εκκινήτων. Για τον χαρακτηρισμό των ειδών του γένους *Cuscuta* έχει χρησιμοποιηθεί η γονιδιωματική περιοχή μεταξύ των γονιδίων 18S και 26S του ριβοσωμικού RNA (Costea and Stefanovic, 2009).

Τελικά με Blast αναζήτηση, μέσω της σύγκρισης της αλληλουχίας που προκύπτει με άλλης υπάρχουσες-καταχωρημένες, μπορεί να γίνει ο τελικός χαρακτηρισμός. Αποτελεί μια τράπεζα – πηγή δεδομένων μιας ευρύτερης επιστημονικής κοινότητας (NCBI).

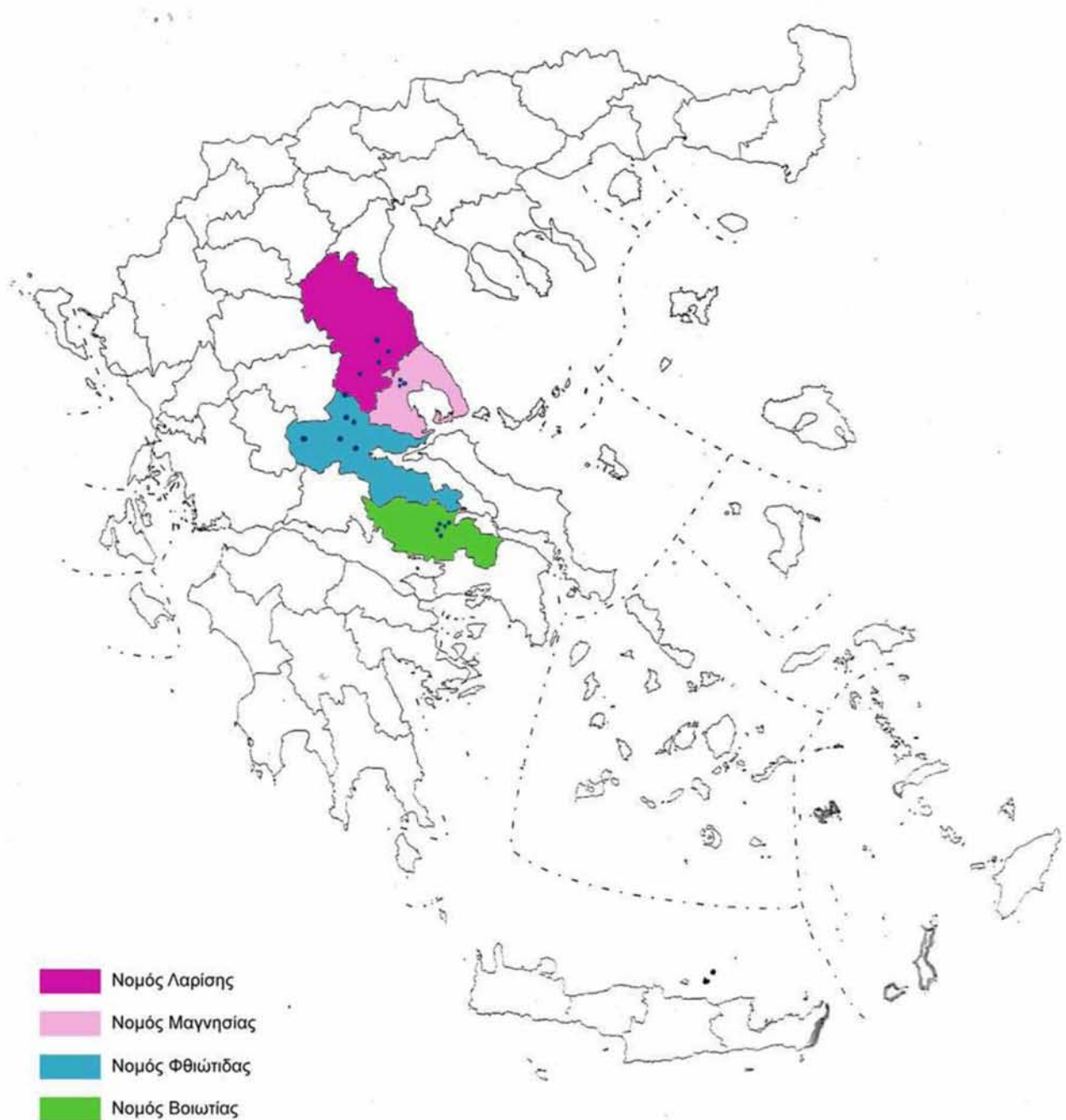
1.10.Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας υπήρξε η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους δειγμάτων του φανερόγαμου παράσιτου κουσκούτα, που παρασιτεί στο υπέργειο τμήμα πολλών καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών. Αρχικά έγινε χρήση μοριακών μεθόδων και συγκεκριμένα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και της αλληλούχησης των προϊόντων της PCR. Έγινε BLAST ανάλυση των αλληλουχιών που προέκυψαν και σύγκριση με αλληλουχίες που υπάρχουν στη βάση GenBank. Διαπιστώθηκε ότι υπήρχε αδυναμία ταυτοποίησης των δειγμάτων σε συγκεκριμένο είδος ή είδη. Επομένως απαραίτητη κρίθηκε η μελέτη των μορφολογικών χαρακτήρων των δειγμάτων κουσκούτας, όπου με συνδυασμό των παραπάνω μεθόδων πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των δειγμάτων σε επίπεδο είδους.

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1. Συλλογή δειγμάτων σπερματοφύτων παράσιτων κουσκούτα

Η συλλογή ζιζανίων πραγματοποιήθηκε στις περιοχές της Βοιωτίας, Φθιώτιδας, Μαγνησίας και Λαρίσας την περίοδο Ιουνίου- Ιουλίου 2014. Συνολικά συλλέχθηκαν 56 δείγματα, από πληθώρα ξενιστών. Οι περιοχές συλλογής, καθώς και οι ξενιστές δίνονται στην εικόνα 8 και στον πίνακα 6.



Εικόνα 8. Περιοχές συλλογής κουσκούτας

Πίνακας 6. Περιοχές όπου συλλέχθηκαν τα δείγματα κουσκούτας

Αριθμός Δείγματος	Τοποθεσία
1	Μαγνησία 2
2	Βοιωτία 3
3	Βοιωτία 11
4	Φθιώτιδα 12
5	Μαγνησία 2
6	Λάρισα 3
7	Λάρισα 4
8	Βοιωτία 5
9	Βοιωτία 12
10	Βοιωτία 15
11	Βοιωτία 13
12	Βοιωτία 8
13	Βοιωτία 7
14	Φθιώτιδα 3
15	Λάρισα 5
16	Φθιώτιδα 22
17	Λάρισα 2
18	Βοιωτία 6
19	Βοιωτία 1
20	Βοιωτία 14
21	Λάρισα 1
22	Λάρισα 8
23	Φθιώτιδα 6
24	Φθιώτιδα 5
25	Λάρισα 8
26	Φθιώτιδα 4
27	Λάρισα 9
28	Βοιωτία 9
29	Μαγνησία 1

30	Φθιώτιδα 21
31	Φθιώτιδα 9
32	Μαγνησία 1
33	Φθιώτιδα 8
34	Λάρισα 10
35	Βοιωτία 10
36	Λάρισα 7
37	Φθιώτιδα 5
38	Λάρισα 9
39	Βοιωτία 2
40	Λάρισα 1
41	Φθιώτιδα 19
42	Φθιώτιδα 2
43	Φθιώτιδα 7
44	Βοιωτία 14
45	Φθιώτιδα 16
46	Φθιώτιδα 1
47	Φθιώτιδα 10
48	Φθιώτιδα 7
49	Φθιώτιδα 14
50	Φθιώτιδα 14
51	Φθιώτιδα 15
52	Φθιώτιδα 11
53	Φθιώτιδα 18
55	Φθιώτιδα 13
56	Μαγνησία 3

2.2. Παρατήρηση μορφολογικών χαρακτήρων άνθους δειγμάτων κουσκούτας

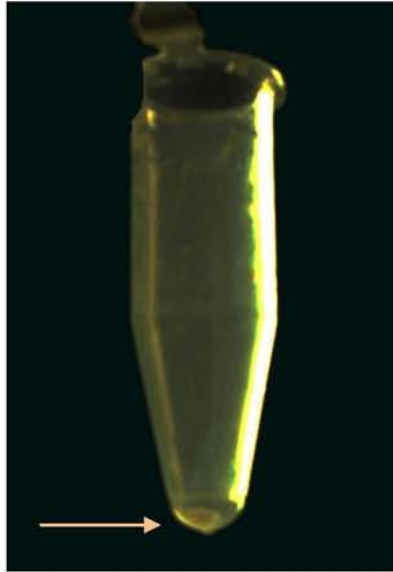
Παρατηρήθηκαν οι μορφολογικοί χαρακτήρες του άνθους από τρία αντιπροσωπευτικά δείγματα και μελετήθηκαν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (Nicon). Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ο χρωματισμός στους μίσχους και στη στεφάνη. Επιπλέον μετρήθηκε ο αριθμός των σεπάλων, των στύλων, των λοβών της στεφάνης και των ανθέρων και το σχήμα της κάψας. Τέλος διαπιστώθηκε εάν η κάψα περικλείεται πλήρως ή όχι από τη στεφάνη.

2.3. Απομόνωση ολικού DNA από το ολοπαράσιτο φυτό *Cuscuta* sp.

Η απομόνωση του ολικού DNA και για τα 56 φυτά του γένους *Cuscuta* πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Jarausch W. *et al.* (2006).

Από κάθε δείγμα ζυγίστηκε 1g φυτικού ιστού και εναποτέθηκε σε σακουλάκι τύπου ELISA (BIOREBA, Switzerland) σε θερμοκρασία 0°C στον πάγο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5ml ρυθμιστικού διαλύματος TEXTDir (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20mM EDTA, pH 8.0, 2% PVP 25) και πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του δείγματος με ομογενοποιητή χειρός (BIOREBA). Στη συνέχεια 2 ml από το χυμό που προέκυψε μεταφέρθηκε σε μικροσωληνίσκο τύπου Eppendorf, χωρητικότητας 2 ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 1160*g. Από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε 1ml σε νέο tube των 2 ml και επώαστηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 65°C για μία ώρα περίπου. Ακολούθησε προσθήκη 0,5 ml γλωροφορμίου και 0,5 ml φαινόλης. Με ανάδευση για 1 λεπτό της ώρας προέκυψε αιώρημα με μορφή γαλακτώματος. Το γαλακτόμορφο μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 17900*g. Από το μείγμα αυτό, 800 μl του υπερκειμένου μεταφέρθηκαν σε μικροσωληνίσκο χωρητικότητας 1,5ml.

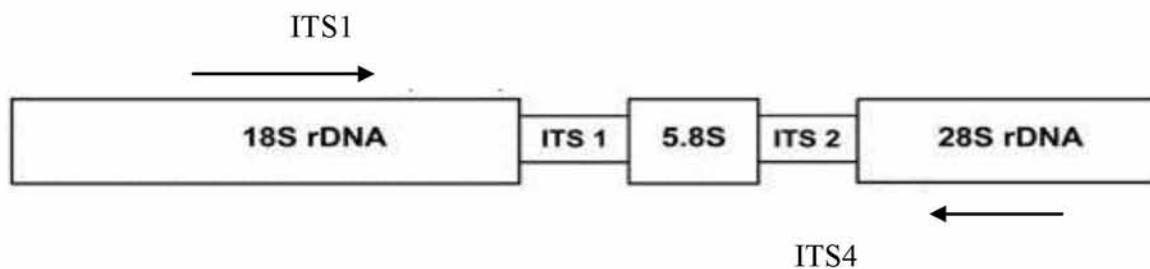
Σε αυτό προστέθηκαν 640 μl ισοπροπανόλης 100% (-20°C), ακολούθησε ανάδευση σε αναμεικτή περιδίνησης και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά στα 1160*g, απόρριψη της υπερκείμενης φάσης και προσθήκη αιθυλικής αλκοόλης 70%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 17900*g στροφές και κατόπιν απόρριψη της αιθυλικής αλκοόλης, με διατήρηση του ιζήματος (Εικ. 9). Με παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 με 30 λεπτά της ώρας εξατμίστηκε η αιθυλική αλκοόλη και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl υπερκάθαρου νερού. Κατόπιν αποθηκεύτηκε το δείγμα στους -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).



Εικόνα 9. Ίζημα όπως παρατηρείται μετά την τελευταία φυγοκέντρηση κατά την απομόνωση του ολικού DNA από το ολοπαράσιτο *Cuscuta*

2.4. Επιλεγμένη περιοχή γονιδιώματος κουσκούτας για ενίσχυση και επιλογή εκκινητών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Οι ακολουθίες των εκκινητών έχουν σχεδιαστεί με τρόπο ώστε να μπορούν να ενισχύσουν διάφορα τμήματα rRNA (White T.J. *et al.*, 1990). Η επιλογή εκκινητών έγινε με βάση την εργασία του W. Chen *et al.* (2014), καθώς χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος ITS1/ITS4 με αλληλουχίες 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' και 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' αντίστοιχα και αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 560, 600 και 717 bp ανάλογα το είδος. Οι ITS1/ITS4 ενισχύουν τις περιοχές, μέσω του 18S, 5,8S και μέρος 26S γονιδίων που εκφράζουν ριβοσωμικά RNAs. (White T.J. *et al.*, 1990). Οι περιοχές ITS1 και ITS2 μεταξύ των γονιδίων αυτών χρησιμοποιούνται για μοριακή κατάταξη σε επίπεδο είδους, αλλά και χαρακτηρισμό εντός του ίδιου είδους (Kendall J. Martin and Paul T. Rygielwicz, 2005) (Εικ. 10).



Εικόνα 10. Διαστήματα των ITS περιοχών των ITS1/ITS4 εκκινητών.

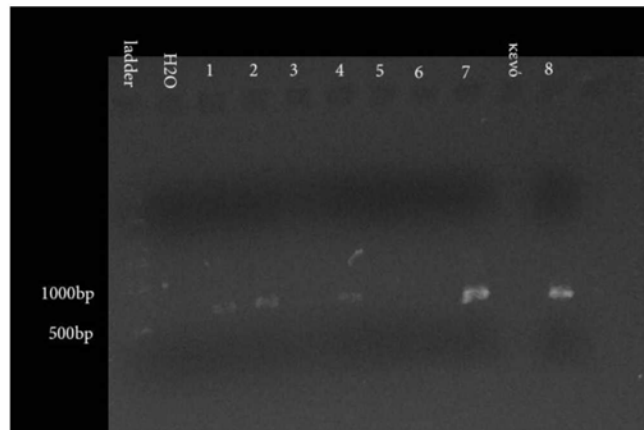
2.5.Βαθμιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Grandient PCR)

Για την εξακρίβωση της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών, έγιναν μια σειρά από αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCR), με το ίδιο δείγμα σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε θερμοκυκλοποιητή (Master Cycler Grandient Eppendorf). Ως αρνητικός μάρτυρας στο θερμοκυκλοποιητή στην ίδια θερμοκρασία με το άγνωστο δείγμα τοποθετήθηκε και μία αντίδραση χωρίς προσθήκη DNA, μόνο με νερό. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνίσκους Eppendorf για PCR, ενώ ο όγκος της αντίδρασης ήταν 25 μλ. Τα αντιδρώντα ήταν 9 μλ DEPC νερό, 1,25 μλ από κάθε εκκινητή, 12,5 μλ 2X Master Mix Taq Polymerase (NEB- 1X Master Mix Composition: 10mM Tris-HCl, 50mM KCl₂, 0,2mM dNTPs, 5% Glycerol, 0,08% IGEPAC CA-630, 0,05% Tween 20, 25 units/ml Taq DNA polymerase) και 1 μλ δείγματος DNA (- προϊόν DNA extraction) στα 4 (1, 2, 3, 4) από τα 8 δείγματα. Στα υπόλοιπα 4 (5, 6, 7, 8) δείγματα τα αντιδρώντα ήταν η 8 μλ DEPC νερό, 1,25 μλ από κάθε εκκινητή, 12,5 μλ 2X Master Mix Taq Polymerase, 1 μλ MgCl₂ 1,5mM και 1 μλ δείγματος DNA (προϊόν extraction) (Πιν. 7).

Πίνακας 7. Θερμοκρασίες αλυσιδωτής αντίδρασης Grandient PCR του δείγματος ΣΣΒ.

Θερμοκρασία (°C)	51.5	52.7	54.0	55.5	56.9	59.1
Δείγμα	1 & 5	2	6	3	4 & 7	8

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή όταν η θερμοκρασία ήταν 80°C για να αποφύγουμε τυχόν υβριδισμό εκκινητών σε λάθος θέση. Ακολούθησε αποδιάταξη των αλυσίδων DNA στους 94°C. Εφαρμόστηκε μια μέση θερμοκρασία για τον υβριδισμό των εκκινητών στη θέση του 18S ή του 26S του γονιδίου. Στη συνέχεια έγινε την αντιγραφή της αλυσίδας με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης στους 68°C, ενώ η διαδικασία επαναλήφθηκε για 30 κύκλους (Εικ. 11).



Εικόνα 11. Προϊόν αντίδρασης PCR (ITS1/ITS4) του δείγματος 1 (όπως απεικονίζεται στον πίνακα 6), όταν 1: προϊόν αντίδρασης PCR με $T_m=51.5$, 2: προϊόν αντίδρασης PCR με $T_m=52.7$, 3: προϊόν αντίδρασης PCR με $T_m=55.5$, 4: προϊόν αντίδρασης PCR με $T_m=56.9$, 5: προϊόν αντίδρασης PCR με $T_m=51.5$, 6: προϊόν αντίδρασης PCR με $T_m=54.0$, 7: προϊόν αντίδρασης PCR με $T_m=56.9$, 8: προϊόν αντίδρασης PCR με $T_m=59.1$, ladder: DNA size marker 1kb (NEB)

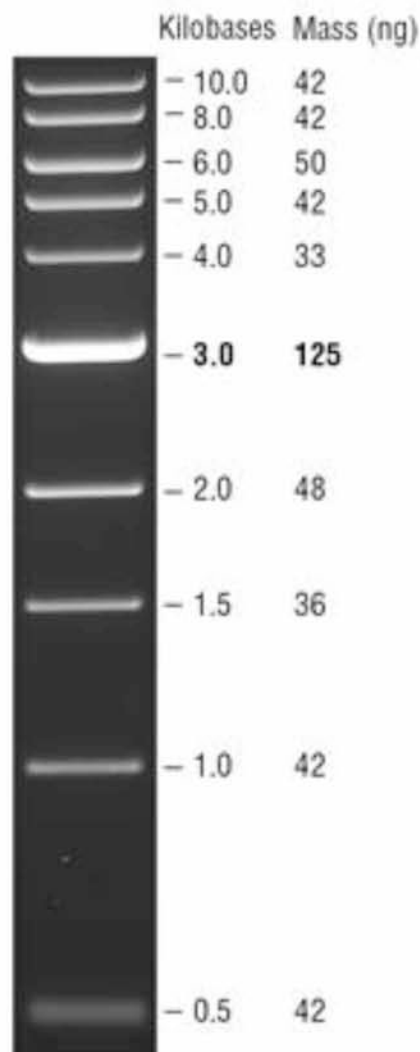
2.6. Θερμοκρασιακό προφίλ PCR

Το θερμοκρασιακό προφίλ που τελικά ακολουθήθηκε για τις αντιδράσεις όλων των υπόλοιπων δειγμάτων αποτελούνταν από 8 βήματα και 30 κύκλους. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή όταν η θερμοκρασία ήταν 80°C . Ακολούθησε αποδιάταξη των αλυσίδων DNA στους 94°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια παρέμεινε για ακόμα 1 λεπτό στη θερμοκρασία αυτή. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε θερμοκρασία 56.9°C για τον υβριδισμό των εκκινητών στη θέση του 18S ή του 26S του γονιδίου για 1 λεπτό. Ακολούθησε αντιγραφή της αλυσίδας με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης στους 68°C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα. Όλη η αντιγραφή πραγματοποιήθηκε σε 30 κύκλους. Τέλος τα δείγματα παρέμειναν για 10 λεπτά στους 68°C και απομακρύνθηκαν από τον θερμοκυκλοποιητή όταν η θερμοκρασία έφτασε στους 8°C .

2.7. Οριζόντια ηλεκτροφόρηση

Μετά την ολοκλήρωση της PCR, ακολούθησε οριζόντια ηλεκτροφόρηση για να διαπιστωθεί εάν η αντίδραση ήταν επιτυχής (ύπαρξη προϊόντος). Από κάθε αντίδραση 5μl αναμείχθηκαν με 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης τμήματος (0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll Type 400 –Pharmacia- σε diH_2O) και τοποθετήθηκαν εντός βοθρίων πηκτής αгарόζης 1%

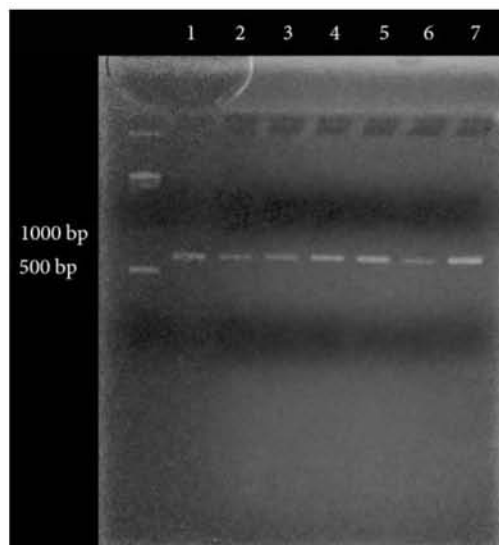
σε ρυθμιστικό διάλυμα 10X TBE (108g Boric acid, 40ml EDTA 0,5M, pH: 8.0, for 1 liter). Σε ξεχωριστό βοθρίο τοποθετήθηκαν 5μl δείκτη μοριακού βάρους DNA 1kb DNA ladder (NEB, New England Biolabs) (Εικ. 12). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε σταθερή τάση 100V και διήρκησε 40 λεπτά. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή αγαρόζης εμβαπτίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 1,6 μg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE για 40 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε εμβάπτιση της πηκτής σε diH₂O για 30 λεπτά. Οι ζώνες DNA των προϊόντων της PCR και του δείκτη DNA έγιναν ορατές σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (312 nm), όπου και φωτογραφήθηκε η πηκτή. Το μέγεθος των τμημάτων DNA των προϊόντων της PCR καθαρίστηκε μετά από σύγκριση με το δείκτη μοριακού βάρους.



Εικόνα 12. Δείκτης 1kb της NEB

2.8. Αλληλούχιση της γονιδιωματικής περιοχής ITS1, 5,8S και ITS2 δειγμάτων κουσκούτας

Επιλέχθηκαν 2 δείγματα, στα οποία είχε προκύψει έντονη ζώνη μετά την PCR (Εικ. 13). Τα δείγματα ήταν από τις περιοχές της Φθιώτιδας και της Βοιωτίας και παρασιτούσαν σε αγριομελιτζάνα, βέλιουρα, ραδίκι και αγριομάρουλο (Πίν. 8). Η αλληλούχιση διερευνήθηκε από την εταιρεία 'Κέντρο Γενετικών Ερευνών & Αναλύσεων Α.Ε. BioGenomica' με τη μέθοδο Sanger (Sanger F. *et al.*, 1977). Το δείγμα αποτελούνταν από 5μl προϊόντος PCR και οι εκκινητές ήταν οι ITS1/ITS4 (συγκέντρωσης 10pmol/μl).



Εικόνα 13. Προϊόντα PCR (ITS1/ITS4) δειγμάτων κουσκούτας, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας όπου από αριστερά προς τα δεξιά, στις θέσεις 1: βρίσκεται ο δείκτης ladder μοριακού βάρους DNA 1kb (NEB), 2: το δείγμα 1, 3: το δείγμα 2, 4: το δείγμα 3, 5: το δείγμα 4, 6: το δείγμα 5, 7: το δείγμα 6 και 8: το δείγμα 7. Για αλληλούχιση στάλθηκαν τα δείγματα 2 και 4 όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Τοποθεσία συλλογής και ξενιστές δειγμάτων που αλληλουχήθηκαν.

Δείγμα	Τοποθεσία	Ξενιστής
2	Φθιώτιδα 22	Αγριομελιτζάνα
4	Βοιωτία 8	Βέλιουρας, ραδίκι, αγριομελιτζάνα, αγριομάρουλο

2.9.Ανάλυση και σύγκριση των αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με το λογισμικό BioEdit v7.2.0 (Hall T.A., 1999). Ακολούθησε έρευνα και σύγκριση των αλληλουχιών των δειγμάτων μεταξύ τους και με άλλες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων γενετικών αλληλουχιών GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Benson D.A. *et al.*, 2013), με χρήση του λογισμικού BLAST (Basic Local Alignment Search Total).

3.Αποτελέσματα

3.1. Καταγραφή αυτοφυών φυτών του φανερόγαμου παράσιτου και των ξενιστών του στις ευρύτερες περιοχές της Στερεάς Ελλάδας, Ευβοίας, Μαγνησίας και Λάρισας

Όπως φαίνεται στον πίνακα 9 το εύρος ξενιστών που παρασιτούν τα φυτά κουσκούτας στην Κεντρική Ελλάδα είναι εξαιρετικά ευρύ. Συγκεκριμένα καταγράφηκαν 39 είδη που ανήκουν σε 21 οικογένειες. Στη συνέχεια αξιολογήθηκαν οι ξενιστές του ανάλογα με τη συχνότητα παρασιτισμού τους για τις διάφορες τοποθεσίες συλλογής του παρασίτου. Στον πίνακα 10, δίνονται τα ζιζάνια που αναγνωρίστηκαν ως ξενιστές της κουσκούτας και οι οικογένειες στις οποίες ανήκουν.

Πίνακας 9. Περιοχές από τα σημεία συλλογής κουσκούτας και ξενιστές του παρασίτου ανά περιοχή

Αριθμός Δείγματος	Τοποθεσία	Ξενιστές
1	Μαγνησία 2	Ραδίκι
2	Βοιωτία 3	Αγριομάραθος, λουβουδιά, αγριομάρουλο, ραδίκι
3	Βοιωτία 11	Ραδίκι, πολυκόμπι, τριβόλι
4	Φθιώτιδα 12	Αγριομελιτζάνα
5	Μαγνησία 2	Κόνυζα μικρή
6	Λάρισα 3	Ασκόλυμπρος, ραδίκι, χονδρίλλα, πικραγουριά
7	Λάρισα 4	Αγριομελιτζάνα, κόνυζα μικρή, ραδίκι, σετάρια σπονδυλωτή, πολυκόμπι, αντράκλα
8	Βοιωτία 5	Βλήτο άσπρο, λουβουδιά, αγριομελιτζάνα, πικραγουριά,

		σετάρια σπονδυλωτή
9	Βοιωτία 12	Κοινό ηλιοτρόπιο, κόνυζα καναδική, ραδίκι, μολόχα
10	Βοιωτία 15	Αγριομελιτζάνα, ραδίκι
11	Βοιωτία 13	Κοινό ηλιοτρόπιο, λουβουδιά, ασπράγκαθο, κόνυζα καναδική, ραδίκι, αγριοβαμβακιά, μολόχα, βέλιουρας, πολυκόμπι, τριβόλι
12	Βοιωτία 8	Αγριομάρουλο, αγριομελιτζάνα, ραδίκι, βέλιουρας
13	Βοιωτία 7	Βλήτο άσπρο, βλήτο πλαγιαστό, τραχύ βλήτο, περικοκλάδα, χροζοφόρα, αντράκλα, τριβόλι
14	Φθιώτιδα 3	Λουβουδιά, αγριομάρουλο, ραδίκι, αντράκλα
15	Λάρισα 5	Ραδίκι, μολόχα
16	Φθιώτιδα 22	Αγριομελιτζάνα
17	Λάρισα 2	Ραδίκι, χονδρίλλα
18	Βοιωτία 6	Ραδίκι, αλογοουρά, μολόχα, τριβόλι
19	Βοιωτία 1	Κύναγχο το οξύ,

		λουβουδιά, ραδίκι
20	Βοιωτία 14	Πεντάνευρο το λογχόφυλλο, ραδίκι, βρωμόχορτο, πολυκόμπι, βάτος
21	Λάρισα 1	Λουβουδιά, κοινός ζωχός, ραδίκι, περικοκλάδα, πικραγγουριά, μολόχα, αντράκλα, τριβόλι
22	Λάρισα 8	Χονδρίλλα, πικραγγουριά
23	Φθιώτιδα 6	Αγριομάραθος, ραδίκι
24	Φθιώτιδα 5	Πολυκόμπι
25	Λάρισα 8	Χονδρίλλα, πικραγγουριά
26	Φθιώτιδα 4	Αγριομελιτζάνα,
27	Λάρισα 9	Χροζοφόρα, μολόχα, πολυκόμπι
28	Βοιωτία 9	Χροζοφόρα, βέλιουρας, αντράκλα, τριβόλι
29	Μαγνησία 1	Αγριομελιτζάνα, μολόχα, τριβόλι
30	Φθιώτιδα 21	Τραχύ βλήτο, λουβουδιά, αγριομελιτζάνα, περικοκλάδα, τριβόλι
31	Φθιώτιδα 9	Λουβουδιά, πολυκόμπι

32	Μαγνησία 1	Αγριομελιτζάνα, μολόχα, τριβόλι
33	Φθιώτιδα 8	Αγριομελιτζάνα, πολυκόμπι
34	Λάρισα 10	Ραδίκι
35	Βοιωτία 10	Βλήτο άσπρο, βλήτο πλαγιαστό, βλήτο τραχύ, άγριο καρότο, λουβουδιά, αγριομελιτζάνα, αστέρας, κοινός ζωχός, κόνυζα καναδική, περικοκλάδα, χροζοφόρα
36	Λάρισα 7	Χονδρίλλα
37	Φθιώτιδα 5	Πολυκόμπι
38	Λάρισα 9	Χροζοφόρα, μολόχα, πολυκόμπι
39	Βοιωτία 2	Μηδική
40	Λάρισα 1	Λουβουδιά, κοινός ζωχός, ραδίκι, περικοκλάδα, πικραγουριά, μολόχα, αντράκλα, τριβόλι
41	Φθιώτιδα 19	Αγριομελιτζάνα
42	Φθιώτιδα 2	Λουβουδιά, αγριομελιτζάνα, πολυκόμπι
43	Φθιώτιδα 7	Ραδίκι, Χονδρίλλα
44	Βοιωτία 14	Πεντάνευρο το λογχόφυλλο, ραδίκι,

		βρωμόχορτο, πολυκόμπι, βάτος
45	Φθιώτιδα 16	Λουβουδιά, πολυκόμπι
46	Φθιώτιδα 1	Λουβουδιά, αγριομελιτζάνα, πολυκόμπι
47	Φθιώτιδα 10	Μηδική
48	Φθιώτιδα 7	Ραδίκι, χονδρίλλα
49	Φθιώτιδα 14	Ραδίκι, χονδρίλλα, πορφυρή κύπερη, πολυκόμπι
50	Φθιώτιδα 14	Ραδίκι, χονδρίλλα, πορφυρή κύπερη, πολυκόμπι
51	Φθιώτιδα 15	Λουβουδιά, ραδίκι, πολυκόμπι
52	Φθιώτιδα 11	Χοιροβότανο, περικοκλάδα
53	Φθιώτιδα 18	Λουβουδιά, αγριομελιτζάνα
55	Φθιώτιδα 13	Αγριομάραθος, ραδίκι
56	Μαγνησία 3	Ραδίκι

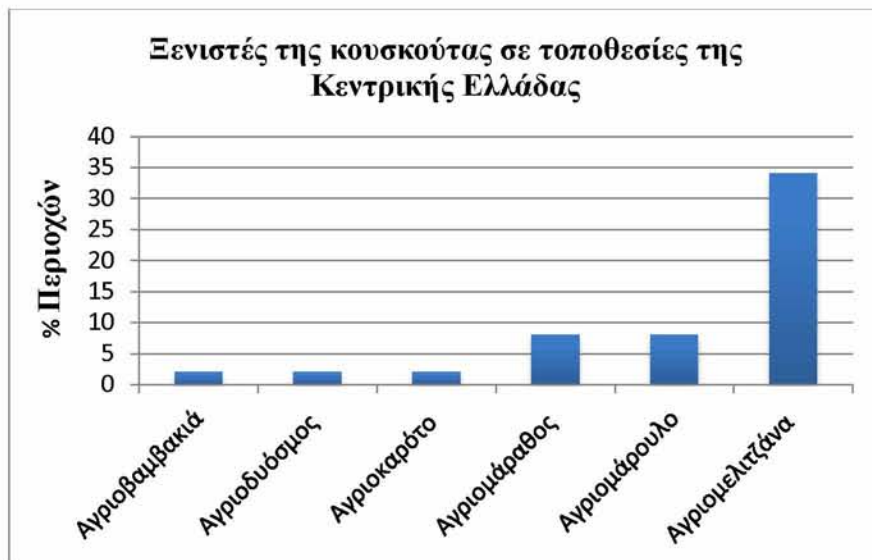
Πίνακας 10. Ξενιστές της κουσκούτας και οι οικογένειες στις οποίες ανήκουν

Κοινό Όνομα	Επιστημονικό Όνομα	Οικογένεια
Αγριοβαμβακιά	<i>Abuliton theophrasti</i>	<i>Malvaceae</i>
Αγριοδυσμός	<i>Mentha longifolia</i>	<i>Lamiaceae</i>
Αγριοκαρότο	<i>Daucus carota</i>	<i>Apiaceae</i>
Αγριομάραθος	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Apiaceae</i>

Αγριομάρουλο	<i>Lactuca serriola</i>	<i>Compositae</i>
Αγριομελιτζάνα	<i>Xanthium strumarium</i>	<i>Compositae</i>
Αγριοτρίφυλλο	<i>Trifolium spp</i>	<i>Leguminosae</i>
Αντράκλα	<i>Portulaca oleracea</i>	<i>Portulacaceae</i>
Αλογοουρά	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Equisetaceae</i>
Ασκόλυμπος	<i>Scolymus hispanicus</i>	<i>Compositae</i>
Ασπράγκαθο	<i>Cirsium arvense</i>	<i>Compositae</i>
Αστέρας	<i>Aster squamatus</i>	<i>Compositae</i>
Βάτος	<i>Rubus spp.</i>	<i>Rosaceae</i>
Βέλιουρας	<i>Sorghum halepense</i>	<i>Poaceae</i>
Βλήτο άσπρο	<i>Amaranthus albus</i>	<i>Amaranthaceae</i>
Βλήτο πλαγιαστό	<i>Amaranthus blitoides</i>	<i>Amaranthaceae</i>
Βλήτο τραχύ	<i>Amaranthus retroflexus</i>	<i>Amaranthaceae</i>
Βρωμόχορτο	<i>Ballota nigra</i>	<i>Lamiaceae</i>
Ζωχός κοινός	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Compositae</i>
Ηλιοτρόπιο κοινό	<i>Heliotropium europaeum</i>	<i>Boraginaceae</i>
Κόνυζα καναδική	<i>Conyza canadensis</i>	<i>Compositae</i>
Κόνυζα μικρή	<i>Conyza bonariensis</i>	<i>Compositae</i>
Κύνναγχο το οξύ	<i>Cynanchum acutum</i>	<i>Apocynaceae</i>
Λουβουδιά	<i>Chenopodium album</i>	<i>Chenopodiaceae</i>
Μηδική	<i>Medicago spp</i>	<i>Leguminosae</i>
Μολόχα	<i>Malva sylvestris</i>	<i>Malvaceae</i>
Πεντάνευρο το λογχόφυλλο	<i>Plantago lanceolata</i>	<i>Compositae</i>
Περικοκλάδα	<i>Convolvulus arvensis</i>	<i>Convolvulaceae</i>
Πικραγγουριά	<i>Ecballium elaterium</i>	<i>Cucurbitaceae</i>
Πολυκόμπι	<i>Polygonum aviculare</i>	<i>Polygonaceae</i>
Πορφυρή κύπερη	<i>Cyperus rotundus</i>	<i>Cyperaceae</i>
Ραδίκι	<i>Cichorium intybus</i>	<i>Compositae</i>
Σετάρια πράσινη	<i>Setaria viridis</i>	<i>Poaceae</i>
Σετάρια σπονδυλωτή	<i>Setaria verticillata</i>	<i>Poaceae</i>
Στύφνος	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Solanaceae</i>

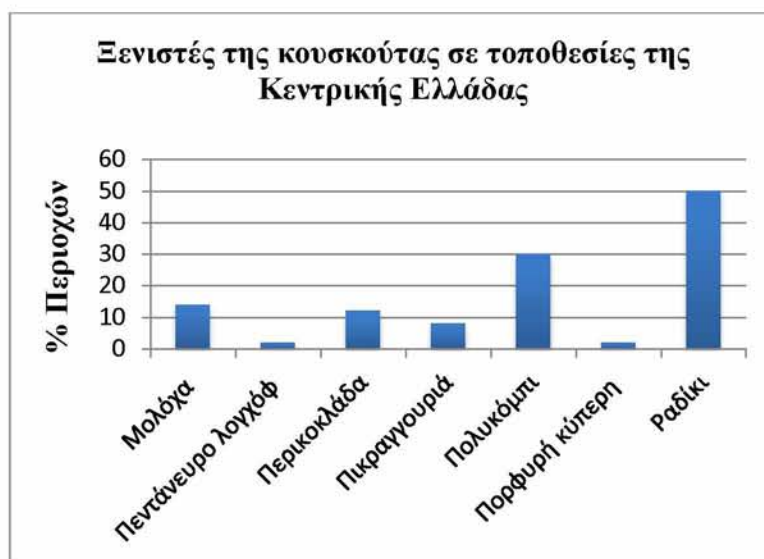
Τριβόλι	<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Zygophyllaceae</i>
Χοιροβότανο	<i>Picris echioides</i>	<i>Compositae</i>
Χονδρίλλα	<i>Chondrilla juncea</i>	<i>Compositae</i>
Χροζοφόρα	<i>Chrozophora tinctoria</i>	<i>Euphorbiaceae</i>

Στο διάγραμμα 1, παρατηρούμε μεγαλύτερη συχνότητα παρασιτισμού στην αγριομελιτζάνα, με ποσοστό 34%, σε σχέση με το αγριομάρουλο και τον αγριομάραθο με ποσοστά παρασιτισμού 8%. Τα ποσοστά για την αγριοβαμβακιά και τον αγριοδυόσμο είναι πολύ χαμηλά.



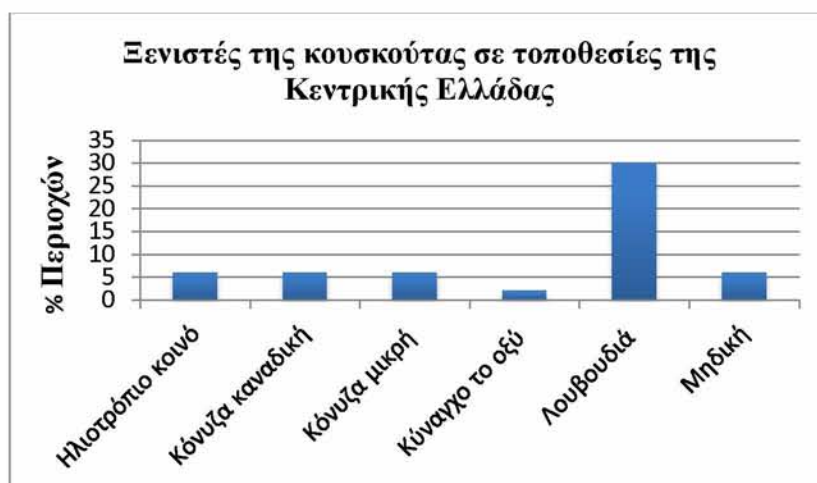
Διάγραμμα 1. Ποσοστό παρασιτισμού διαφόρων ειδών κουσκούτας στην Κεντρική Ελλάδα.

Στο διάγραμμα 2, το ραδίκι με ποσοστό παρασιτισμού 50% φαίνεται να είναι ο συχνότερος ξενιστής της κουσκούτας, συγκριτικά με το πολυκόμπι που ακολουθεί με ποσοστό προσβολής 30%. Ακολουθούν σε συχνότητα ξενιστών η μολόχα με 14%, η περικοκλάδα με 12% και η πικραγγουριά με 8%.

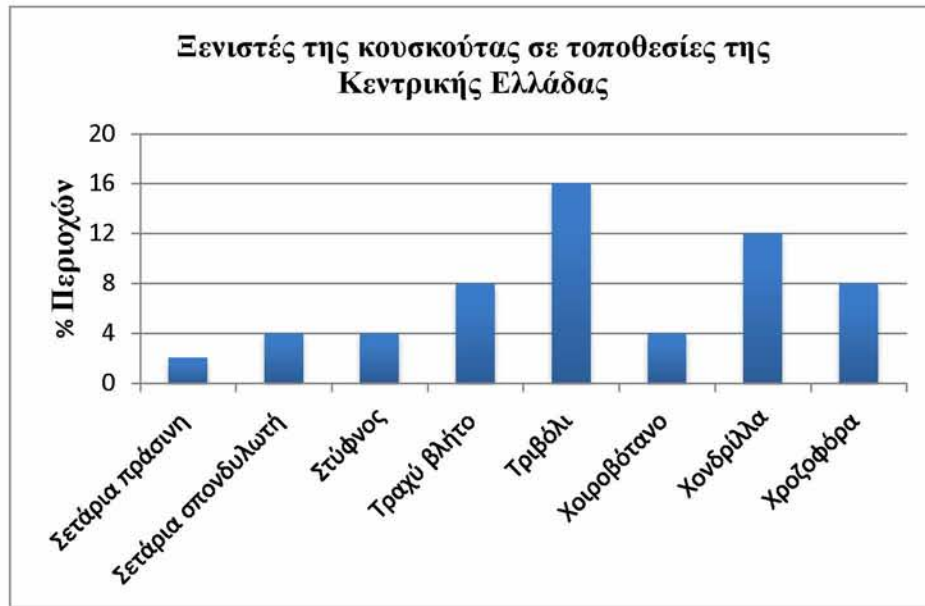


Διάγραμμα 2. Ποσοστό παρασιτισμού διαφόρων ειδών κουσκούτας στην Κεντρική Ελλάδα.

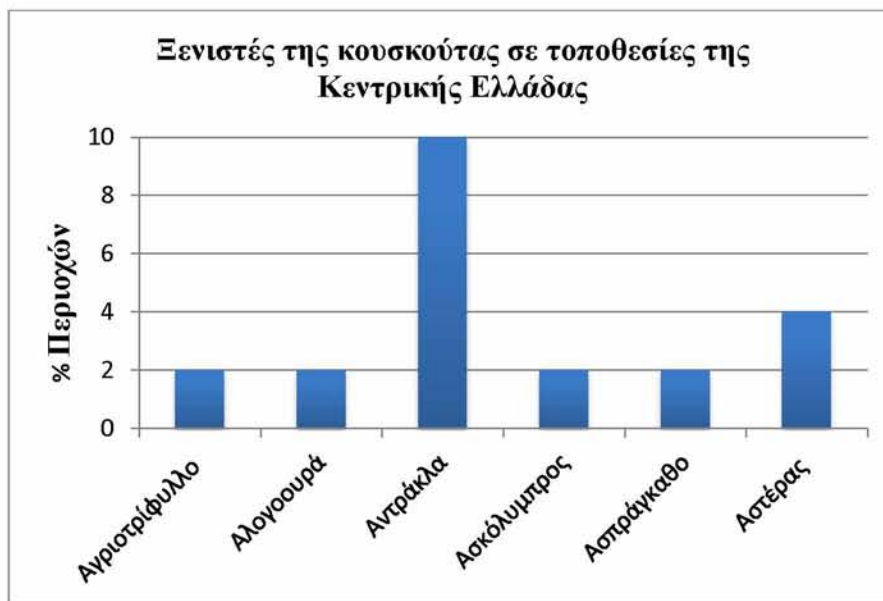
Η λουβουδιά (διάγραμμα 3), είναι εξίσου συχνός ξενιστής της κουσκούτας με το πολυκόμπι, με ποσοστό 30% για τις περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας. Υψηλό είναι επίσης και το ποσοστό παρασιτισμού για το τριβόλι με συχνότητα 16%, τη χονδρίλλα με 12% και την αντράκλα (Διάγραμμα 5) με συχνότητα 10%. Ακολουθούν η χροζοφόρα (Διάγραμμα 4), ο βέλιουρας και ο κοινός ζωχός (Διάγραμμα 6)



Διάγραμμα 3. Ποσοστό παρασιτισμού διαφόρων ειδών κουσκούτας στην Κεντρική Ελλάδα.

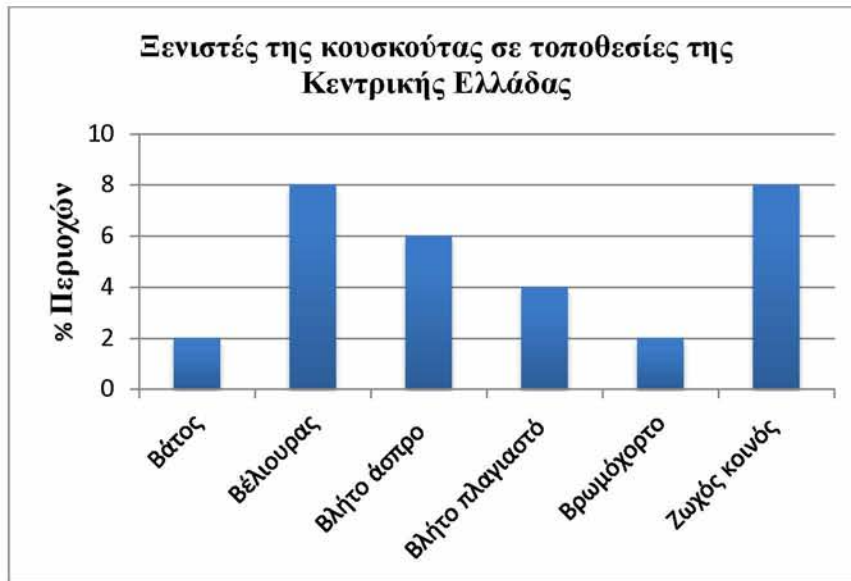


Διάγραμμα 4. Ποσοστό παρασιτισμού διαφόρων ειδών κουσκούτας στην Κεντρική Ελλάδα.

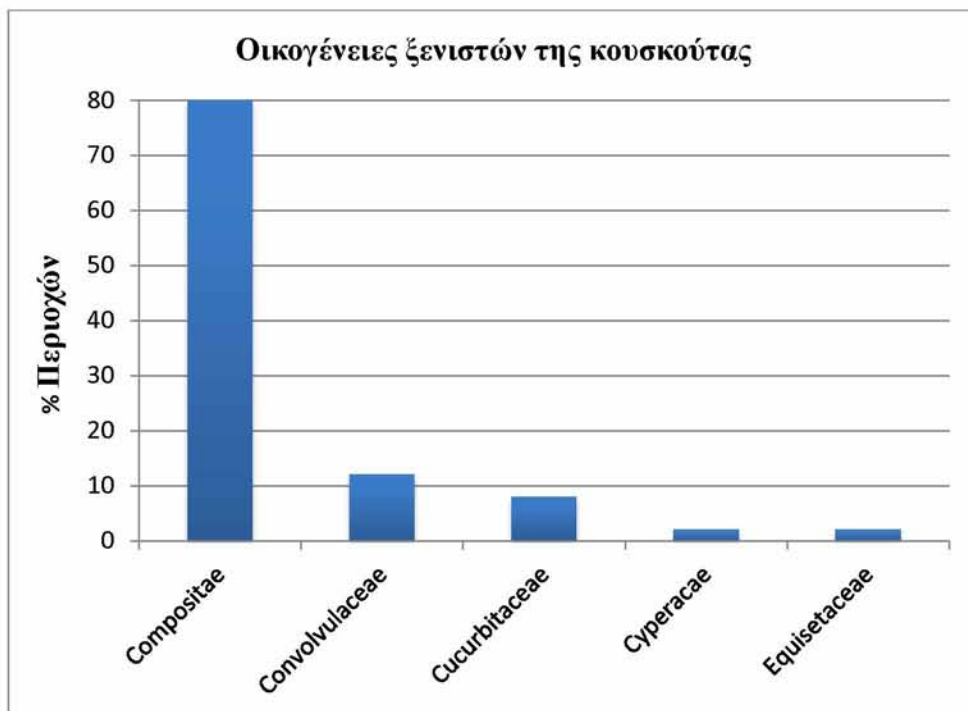


Διάγραμμα 5. Ποσοστό παρασιτισμού διαφόρων ειδών κουσκούτας στην Κεντρική Ελλάδα.

Από τα διαγράμματα 1, 2, 3, 4 και 5 διαπιστώνουμε ότι τα είδη των ζιζανίων αγριομελιτζάνα (34%), λουβουδιά (30%), ραδίκι (50%) και πολυκόμπι (30%) είναι τα ζιζάνια που παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά παρασιτισμού στις τοποθεσίες της Κεντρικής Ελλάδας που έγινε η δειγματοληψία των παρασίτων.



Διάγραμμα 6. Ποσοστό παρασιτισμού διαφόρων ειδών κουσκούτας στην Κεντρική Ελλάδα.

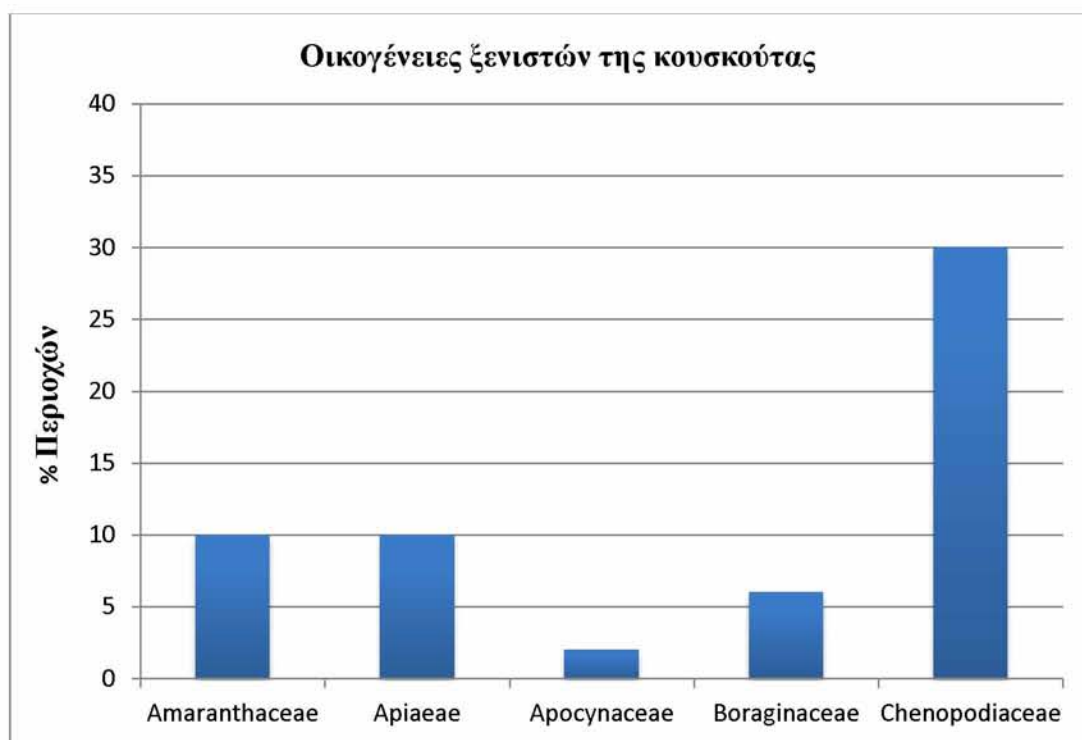


Διάγραμμα 7. Ποσοστό παρασιτισμού διαφόρων οικογενειών από ξενιστές κουσκούτας στην περιοχή της Κεντρικής Ελλάδας.

Αντιθέτως τα είδη ζιζανίων με τα μικρότερα ποσοστά παρασιτισμού είναι η αγριοβαμβακιά, ο αγριοδυόσμος, το αγριοκαρότο, το αγριοτριφύλλο, η αλογοουρά, ο ασκόλυμπρος, το ασπράγκαθο, ο

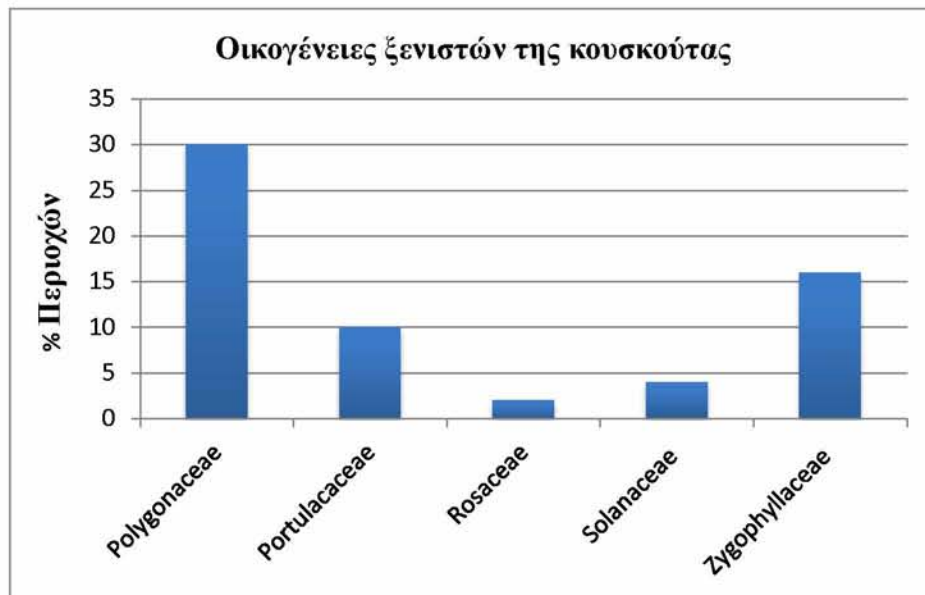
βάτος, το βρώμοχορτο, το κύναγχο το οξύ, το πεντάνευρο το λογχόφυλλο, η πορφυρή κύπερη και η πράσινη σετάρια όλα με ποσοστό 2%.

Στα διαγράμματα 7, 8, 9, 10 παρουσιάζονται τα ποσοστά των φυτών-ξενιστών με βάση τις οικογένειες που ανήκουν. Όπως γίνεται φανερό από το διάγραμμα 7, τα ζιζάνια της οικογένειας *Compositae* εμφανίζουν πολύ υψηλό ποσοστό παρασιτισμού, που φτάνει το 80%. Ακολουθούν σε συχνότητα προσβολής τα ζιζάνια των οικογενειών *Chenopodiaceae* (30%) (Διάγραμμα 8) και *Polygonaceae* (30%) (Διάγραμμα 9).

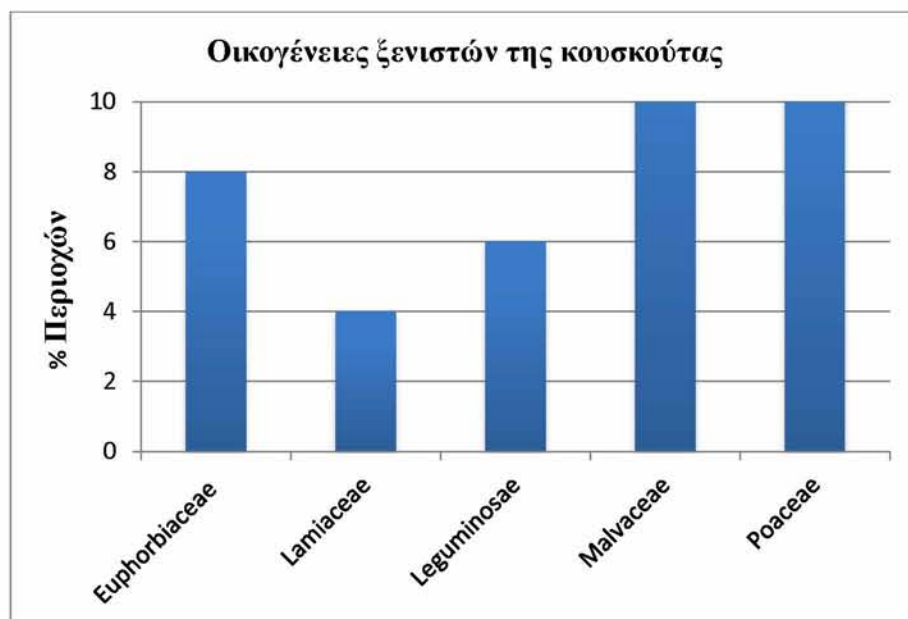


Διάγραμμα 8. Ποσοστό παρασιτισμού διαφόρων οικογενειών από ξενιστές κουσκούτας στην περιοχή της Κεντρικής Ελλάδας

Τα λιγότερο συχνά ζιζάνια που εμφανίζονται ως ξενιστές της κουσκούτας, ανήκουν φυτά των οικογενειών *Apocynaceae* (Διάγραμμα 8), *Cyperaceae* (Διάγραμμα 7), *Equisetaceae* (Διάγραμμα 7) και *Rosaceae* (Διάγραμμα 9) με ποσοστό παρασιτισμού μόλις 2%.



Διάγραμμα 9. Ποσοστό παρασιτισμού διαφόρων οικογενειών από ξενιστές κουσκούτας στην περιοχή της Κεντρικής Ελλάδας

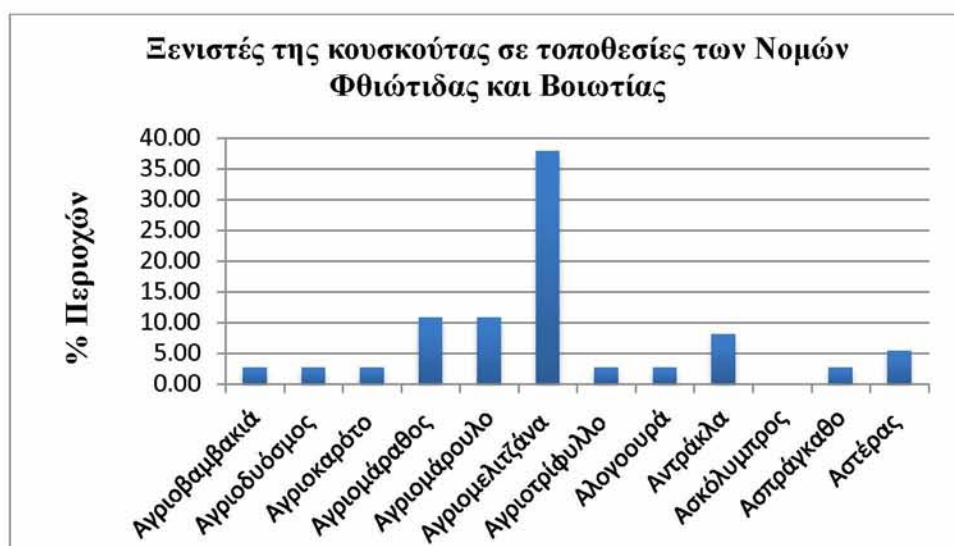


Διάγραμμα 10. Ποσοστό παρασιτισμού διαφόρων οικογενειών από ξενιστές κουσκούτας στην περιοχή της Κεντρικής Ελλάδας

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συχνότητα παρασιτισμού των ζιζανίων ανά περιοχή. Πιο συγκεκριμένα, στις περιοχές των Νομών Φθιώτιδας και Βοιωτίας, που ανήκουν στην Περιφέρεια της

Στερεάς Ελλάδας, το ραδίκι με ποσοστό παρασιτισμού 43,24% αποτελεί το συχνότερο ξενιστή της κουσκούτας (Διάγραμμα 13). Με ποσοστό 37,84%, όπως φαίνεται από τα διαγράμματα 11 και 12 ακολουθούν σε συχνότητα τα ζιζάνια αγριομελιτζάνα και λουβουδιά. Το πολυκόμπι (35,14%) αποτελεί επίσης συχνό ξενιστή της κουσκούτας (Διάγραμμα 13).

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 11, η αγριομελιτζάνα, ο αγριομάραθος, το αγριομάρουλο και η αντράκλα, είναι επίσης αρκετά συχνοί ξενιστές του παρασίτου στις περιοχές αυτές. Απεναντίας, λιγότερο σημαντικοί ξενιστές της κουσκούτας δείχνουν να είναι η αγριοβαμβακιά, ο αγριοδυόσμος, το αγριοκαρότο, το αγριοτριφύλλο, η αλογοουρά και το ασπράγκαθο ενώ ο ασκόλυμπος δεν εντοπίστηκε καθόλου ως ξενιστής της.



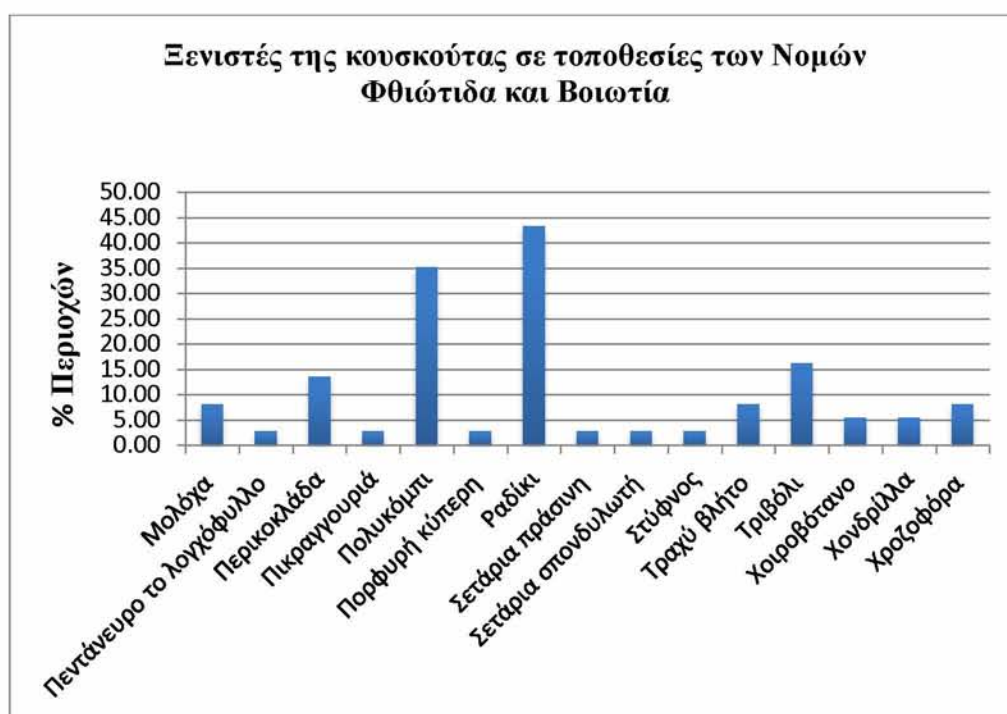
Διάγραμμα 11. Ποσοστό παρασιτισμού ξενιστών κουσκούτας σε τοποθεσίες των Νομών Φθιώτιδας και Βοιωτίας

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 12, περισσότερο με πολύ υψηλό ποσοστό η λουβουδιά και ακολούθως ο βέλιουρας, το κοινό ηλιοτρόπιο, η κόνυζα καναδική, η μηδική και το άσπρο βλήτο είναι αρκετά συχνοί ξενιστές του παρασίτου στις περιοχές αυτές. Λιγότερο σημαντικοί ξενιστές της κουσκούτας είναι ο βάτος, το πλαγιαστό βλήτο, το βρωμόχορτο, ο κοινός ζωχός και το κύναγχο το οξύ. Η κόνυζα η μικρή δεν βρέθηκε να είναι πουθενά στην περιφέρεια αυτή ως ξενιστής της κουσκούτας.



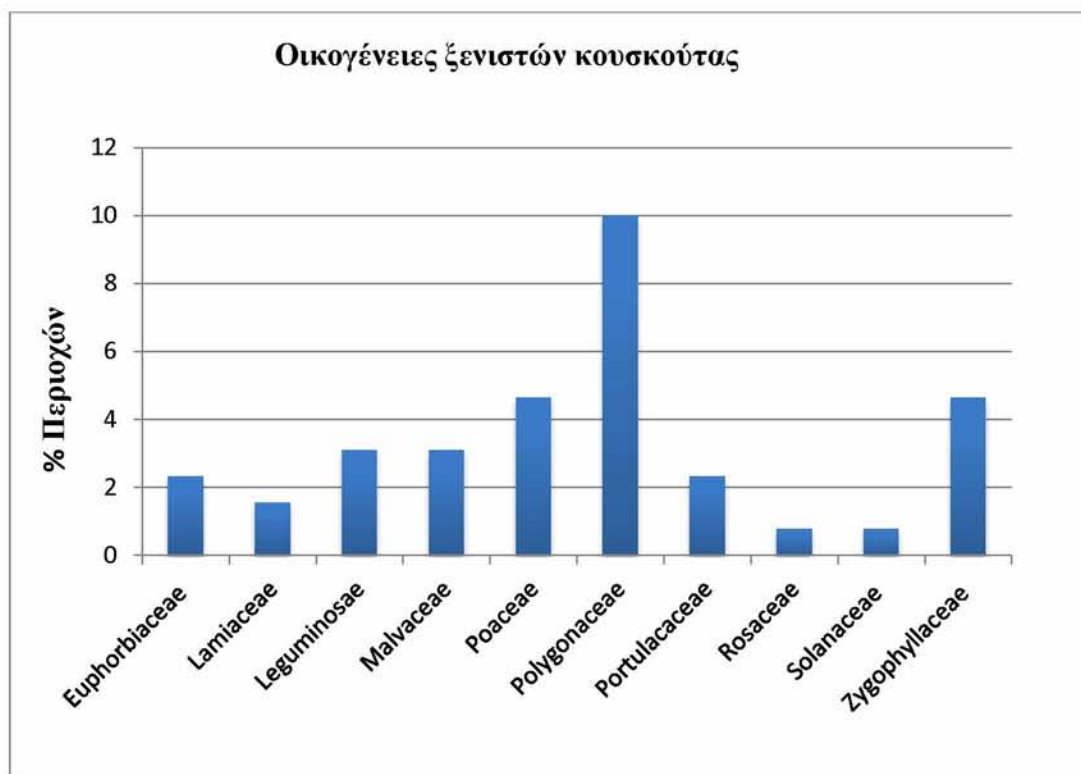
Διάγραμμα 12. Ποσοστό παρασιτισμού ξενιστών κουσκούτας σε τοποθεσίες των Νομών Φθιώτιδας και Βοιωτίας

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 13, ιδιαίτερα σημαντικοί ξενιστές του παρασίτου στις περιοχές αυτές είναι το ραδίκι και το πολυκόμπι. Ακολουθούν τα ζιζάνια περικοκλάδα, τριβόλι, τραχύ βλήτο και χροζοφόρα. Λιγότερο σημαντικοί ξενιστές της κουσκούτας το πεντάνευρο το λογχόφυλλο, η πικραγγουριά, η πορφυρή κύπερη, η σετάρια πράσινη, η σετάρια σπονδυλωτή, ο στύφνος, το χοιροβότανο και η χονδρίλλα.



Διάγραμμα 13. Ποσοστό παρασιτισμού ξενιστών κουσκούτας σε τοποθεσίες των Νομών Φθιώτιδας και Βοιωτίας

Ειδικότερα για τους Νομούς Φθιώτιδας και Βοιωτίας, φυτά της οικογένειας *Polygonaceae* (10%) έχουν υψηλά ποσοστά παρασιτισμού σε σχέση με φυτά που ανήκουν στις οικογένειες *Zygophyllaceae*, *Poaceae*, *Malvaceae*, *Leguminosae*, *Portulacaceae* και *Euphorbiaceae*. Πολύ μικρά σε συχνότητα ξενιστών είναι τα ζιζάνια των οικογενειών *Lamiaceae*, *Rosaceae* και *Solanaceae*.



Διάγραμμα 14. Ποσοστό παρασιτισμού των διαφόρων οικογενειών από ξενιστές της κουσκούτας σε τοποθεσίες των Νομών Φθιώτιδας και Βοιωτίας

Επίσης συχνός ξενιστής, με ποσοστό παρασιτισμού πάνω από 35% αποτελούν τα ζιζάνια της οικογένειας *Compositae* (Διάγραμμα 15). Ακολουθούν τα *Chenopodiaceae* με συχνότητα 11%. Πολύ μικρή είναι η συχνότητα φυτών που ανήκουν στις οικογένειες *Amaranthaceae*, *Ariaceae*, *Apocynaceae*, *Boraginaceae*, *Convolvulaceae*, *Curcubitaceae*, *Cyperaceae* και *Equisetaceae*.



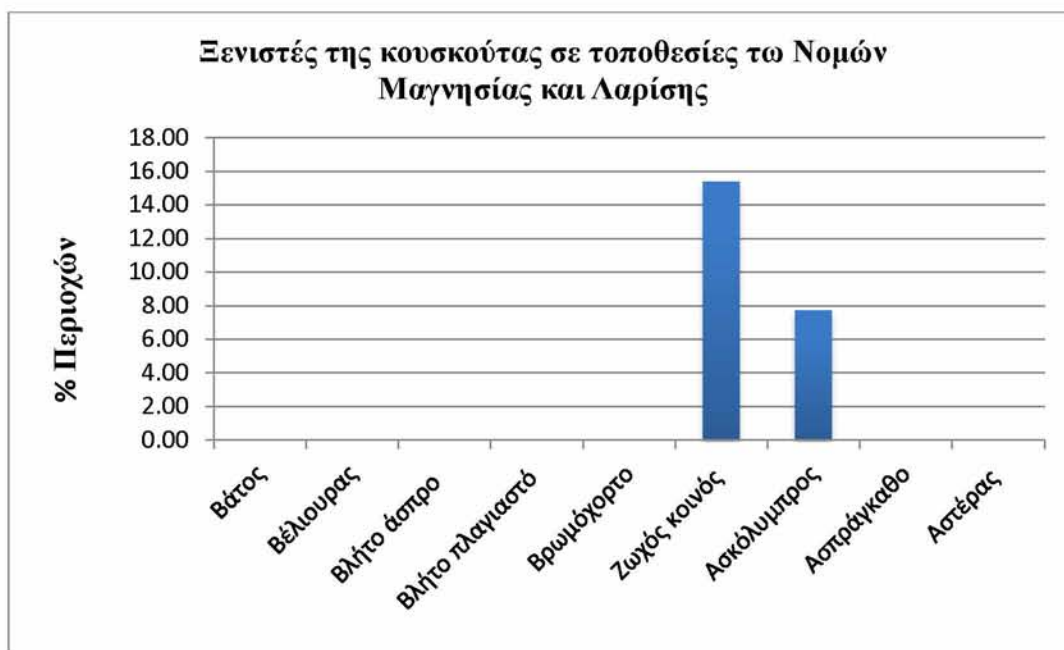
Διάγραμμα 15. Ποσοστό παρασιτισμού από ξενιστές της κουσκούτας σε τοποθεσίες των Νομών Φθιώτιδας και Βοιωτίας

Για την περιφέρεια της Θεσσαλίας, και πιο συγκεκριμένα για τους Νομούς Μαγνησίας και Λάρισας, παρατηρήσαμε ότι ο αγριοδυόσμος, το αγριοκαρότο, ο αγριομάραθος, το αγριομάρουλο, το αγριοτρίφυλλο και η αλογοουρά δεν συναντώνται καθόλου ως ξενιστές του ζιζανίου. Απεναντίας η συχνότητα παρασιτισμού για τα ζιζάνια αγριομελιτζάνα και αντράκλα είναι σημαντική (Διάγραμμα 16).



Διάγραμμα 16. Ποσοστό παρασιτισμού των διαφόρων ειδών της κουσκούτας σε τοποθεσίες των Νομών Μαγνησίας και Λαρίσης

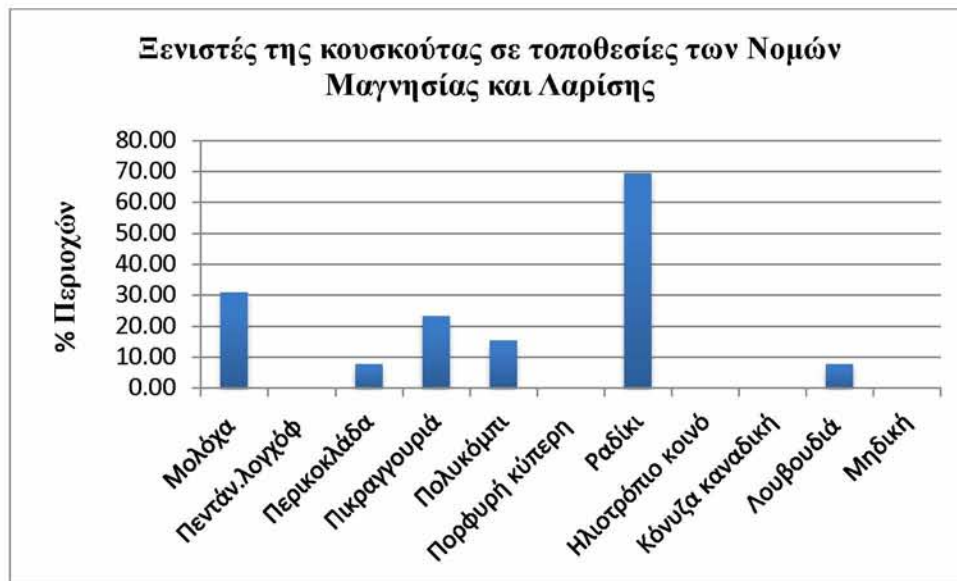
Όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα 17, ο βάτος, ο βέλιουρας, το άσπρο βλήτο, το πλαγιαστό βλήτο, το βρωμόχορτο, το ασπράγκαθο και ο αστέρας επίσης δεν συναντώνται καθόλου ως ξενιστές του ζιζανίου. Υψηλό όμως ήταν το ποσοστό παρασιτισμού για τα ζιζάνια κοινός ζωχός και ασκόλυμπος.



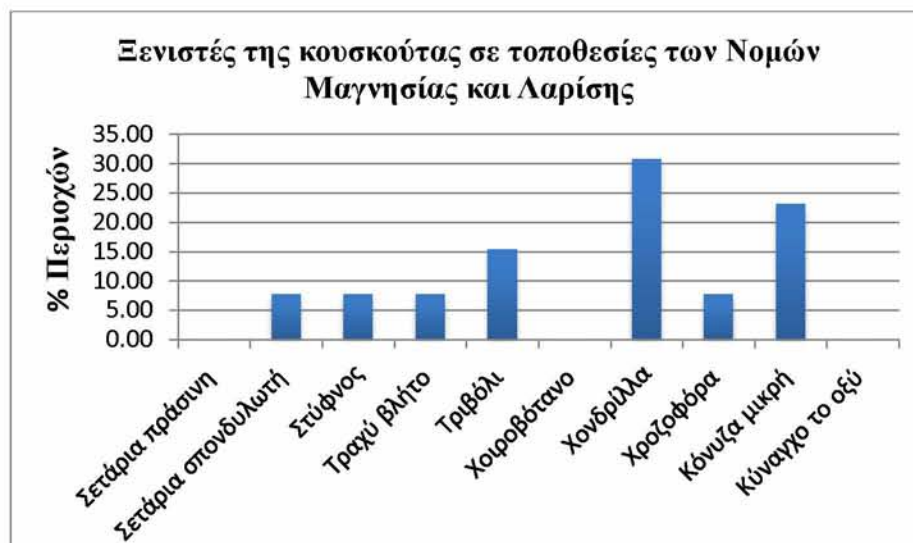
Διάγραμμα 17. Ποσοστό παρασιτισμού των διαφόρων ειδών της κουσκούτας σε τοποθεσίες των Νομών Μαγνησίας και Λαρίσης

Πολύ μεγάλο το ποσοστό παρασιτισμού παρατηρήθηκε για το ραδίκι που σχεδόν έφτασε το 70%, ακολουθώντας η μολόχα με 30%, η πικραγγουριά με 22%, το πολυκόμπι με 15%, η περικοκλάδα και η λουβουδιά με 9%. Δεν παρατηρήθηκε παρασιτισμός στα ζιζάνια πεντάνευρο λογχόφυλλο, κοινό ηλιοτρόπιο, κόνυζα και μηδική (Διάγραμμα 18).

Μεγάλο ποσοστό παρασιτισμού παρατηρήθηκε για τη χονδρίλλα με ποσοστό 31% και τη μικρή κόνυζα με ποσοστό 24%. Ακολούθησαν το τριβόλι με ποσοστό παρασιτισμού 15%, η σετάρια σπονδυλωτή, ο στύμφος, το τραχύ βλήτο και η χροζοφόρα με ποσοστό 8%. Δεν παρατηρήθηκε καθόλου παρασιτισμός στα φυτά σετάρια πράσινη, χοιροβότανο και κύναγχο το οξύ για την Περιφέρεια της Θεσσαλίας στις περιοχές που έγινε δειγματοληψία (Διάγραμμα 19).



Διάγραμμα 18. Ποσοστό παρασιτισμού των διαφόρων ειδών της κουσκούτας σε τοποθεσίες των Νομών Μαγνησίας και Λαρίσης



Διάγραμμα 19. Ποσοστό παρασιτισμού των διαφόρων ειδών της κουσκούτας σε τοποθεσίες των Νομών Μαγνησίας και Λαρίσης

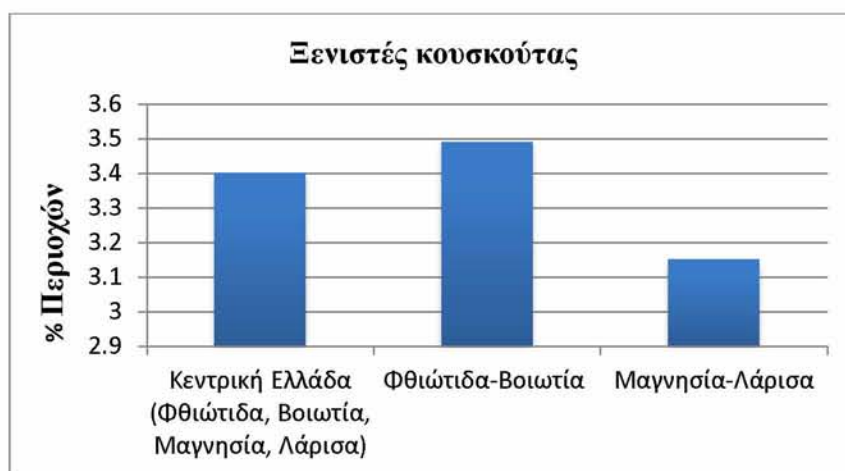
Επιπροσθέτως, η προσβολή για την περιοχή των Νομών Μαγνησίας και Λάρισας αφορούσαν φυτά των οικογενειών *Compositae*, *Chenopodiaceae*, *Malvaceae*, *Polygonaceae* και *Zygophyllaceae*. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 20, τα ζιζάνια που ανήκουν στην οικογένεια *Compositae*, δείχνουν

να είναι τα συχνότερα σε εμφάνιση ως ξενιστές της κουσκούτας και έχουν τα υψηλότερα ποσοστά παρασιτισμού.



Διάγραμμα 20. Ποσοστό παρασιτισμού των διαφόρων οικογενειών από ξενιστές της κουσκούτας σε τοποθεσίες των Νομών Μαγνησίας και Λάρισας

Τέλος, μελετήθηκε η συχνότητα προσβολής της κουσκούτας σχετικά με την περιοχή προσβολής (Διάγραμμα 21).



Διάγραμμα 21. Συγκριτικό διάγραμμα ξενιστών κουσκούτας, σε σχέση με την περιοχή προσβολής

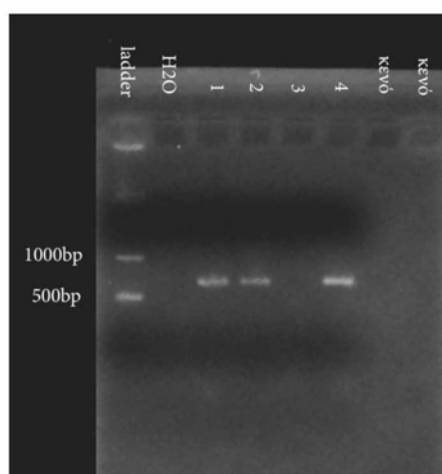
Όπως μπορούμε να δούμε τα φυτά κουσκούτας που συλλέχθηκαν κατά τη δειγματοληψία στις περιοχές της Φθιώτιδας και της Βοιωτίας ήταν περισσότερα συγκριτικά με τα φυτά των περιοχών της Μαγνησίας και της Λάρισας. Επιπλέον το μέσο πλήθος της κουσκούτας από τη Φθιώτιδα και Βοιωτία ήταν μεγαλύτερο του μέσου όρου της κουσκούτας στην ευρύτερη περιοχή της Κεντρικής Ελλάδας ενώ ο μέσος όρος φυτών κουσκούτας από την περιοχή της Μαγνησίας και της Λάρισας ήταν μικρότερος από το μέσο όρο που παρατηρήθηκε στην Κεντρική Ελλάδα γενικότερα.

Επιπλέον, η πιο συχνή προσβολή παρατηρήθηκε στα ζιζάνια ραδίκι, αγριομελιτζάνα, περικοκλάδα, χονδρίλλα, τριβόλι, πολυκόμπι και λουβουδιά. Το κύριο χαρακτηριστικό των παραπάνω ζιζανίων είναι η αντοχή σε συνθήκες ξηρασίας και η προσαρμοστικότητά τους στα μεσογειακά περιβάλλοντα.

3.2. Προσδιορισμός ειδών του παρασίτου σε περιοχές της Φθιώτιδας και της Βοιωτίας

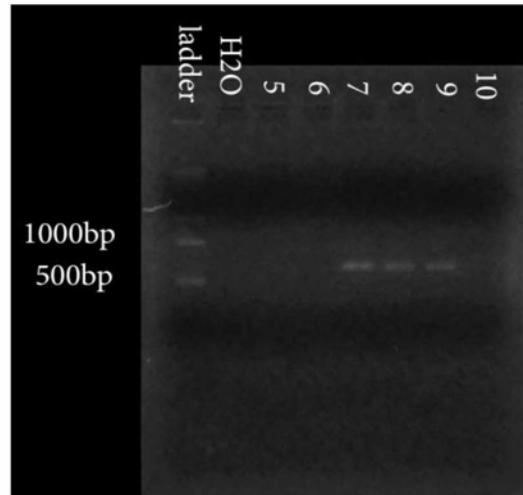
3.2.1. Ταυτοποίηση των δειγμάτων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έγινε μια προσπάθεια ταυτοποίησης των συλλεχθέντων δειγμάτων από περιοχές της Κεντρικής Ελλάδος. Στις εικόνες 14,15,16,17,18,19,20, 21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ύστερα από οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR.

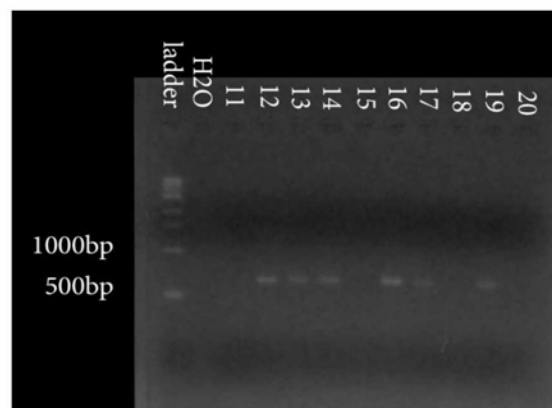


Εικόνα 14. Προϊόν αντίδρασης PCR (ITS1/ITS4 εκκινήτες), όπου από αριστερά προς τα δεξιά, στη θέση 1βρίσκεται ο ladder 1kb (NEB), στη θέση 2 ο αρνητικός μάρτυρας

(H₂O), στη θέση 3 το δείγμα 1, στη θέση 4 το δείγμα 2, στη θέση 5 το δείγμα 3 και στη θέση 6 το δείγμα 4

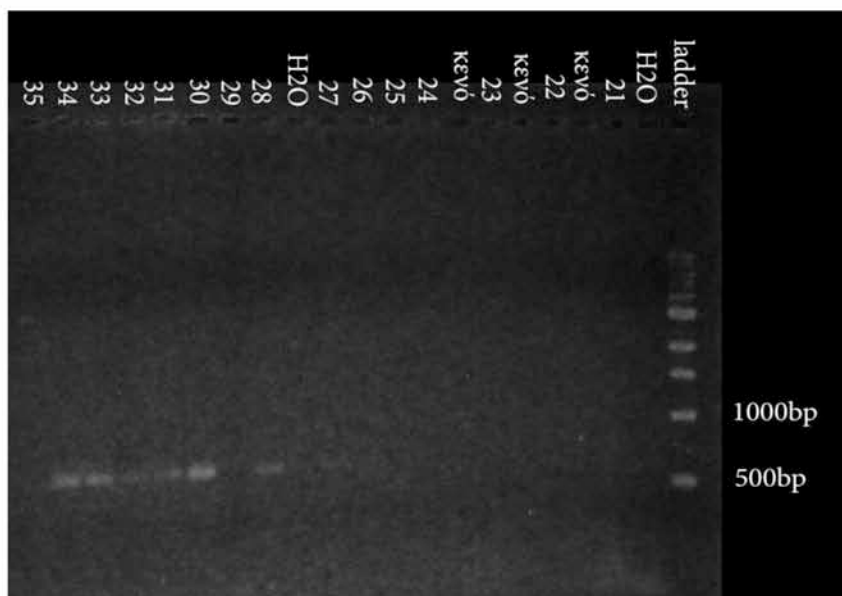


Εικόνα 15. Προϊόν αντίδρασης PCR (ITS1/ITS4 εκκινητές), όπου από αριστερά προς τα δεξιά, στη θέση 1 βρίσκεται ο ladder 1kb (NEB), στη θέση 2 ο αρνητικός μάρτυρας (H₂O), στη θέση 3 το δείγμα 5, στη θέση 4 το δείγμα 6, στη θέση 5 το δείγμα 7, στη θέση 6 το δείγμα 8, στη θέση 7 το δείγμα 9 και στη θέση 8 το δείγμα 10

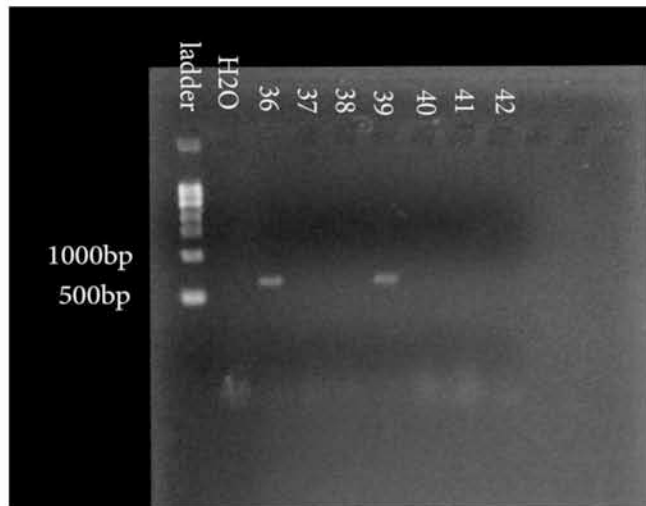


Εικόνα 16. Προϊόν αντίδρασης PCR (ITS1/ITS4 εκκινητές), όπου από αριστερά προς τα δεξιά, στη θέση 1 βρίσκεται ο ladder 1kb (NEB), στη θέση 2 ο αρνητικός μάρτυρας (H₂O), στη θέση 3 το δείγμα 11, στη θέση 4 το δείγμα 12, στη θέση 5 το δείγμα 13, στη θέση 6 το δείγμα 14, στη θέση 7 το δείγμα 15, στη θέση 8 το δείγμα 16, στη θέση 9 το δείγμα 17, στη θέση 10 το δείγμα 18, στη θέση 11 το δείγμα 19 και στη θέση 12 το δείγμα 20

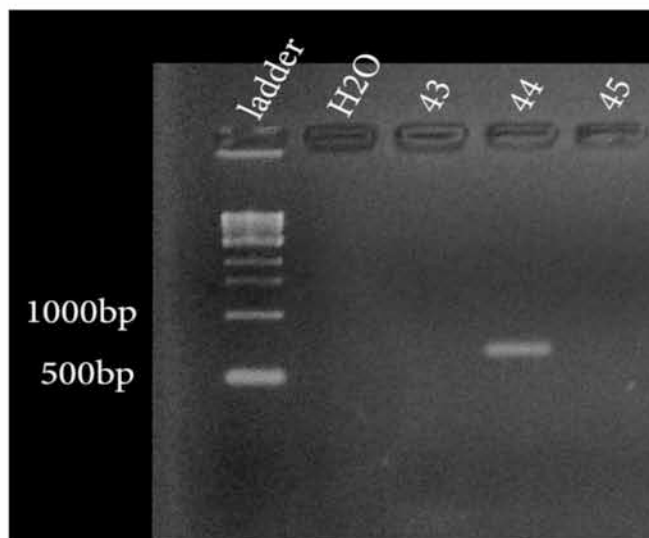
Στην εικόνα 17 όπου εμφανίζονται τα αποτελέσματα των προϊόντων PCR ορισμένων δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, έχουμε δύο αρνητικούς μάρτυρες επειδή έχουμε προϊόντα από δύο διαφορετικές αντιδράσεις PCR.



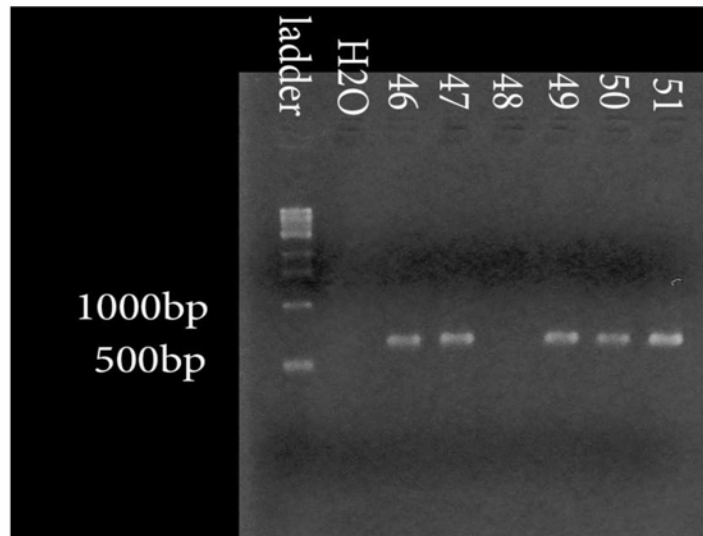
Εικόνα 17. Προϊόν αντίδρασης PCR (ITS1/ITS4 εκκινητές), όπου από αριστερά προς τα δεξιά, στη θέση 1 βρίσκεται το δείγμα 35, στη θέση 2 το δείγμα 34, στη θέση 3 το δείγμα 33, στη θέση 4 το δείγμα 32, στη θέση 5 το δείγμα 31, στη θέση 6 το δείγμα 30, στη θέση 7 το δείγμα 29, στη θέση 8 το δείγμα 28, στη θέση 9 βρίσκεται ένας αρνητικός μάρτυρας (H₂O), στη θέση 10 το δείγμα 27, στη θέση 11 το δείγμα 26 και στη θέση 12 το δείγμα 25, στη θέση 13 το δείγμα 24, η θέση 14 είναι κενή, στη θέση 15 το δείγμα 23, η θέση 16 είναι κενή, στη θέση 17 το δείγμα 22, η θέση 18 είναι κενή, στη θέση 19 το δείγμα 21, στη θέση 20 ο αρνητικός μάρτυρας (H₂O) και στη θέση 21 ο ladder 1kb (NEB).



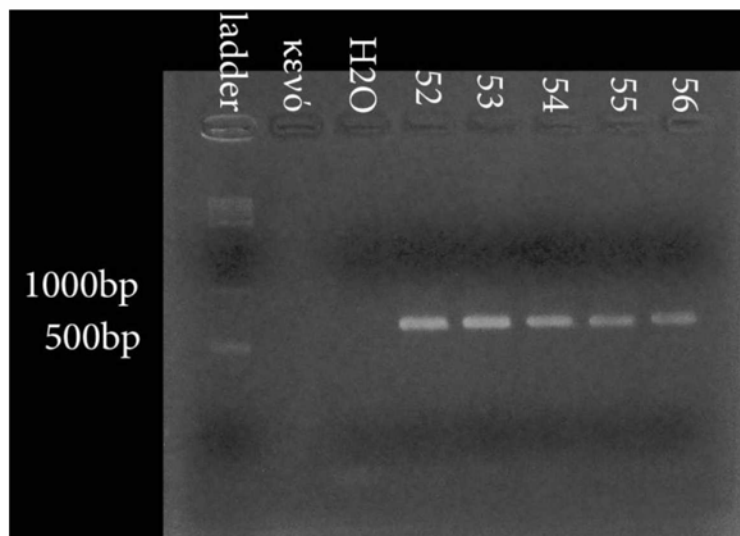
Εικόνα 18. Προϊόν αντίδρασης PCR (ITS1/ITS4 εκκινητές), όπου από αριστερά προς τα δεξιά, στη θέση 1 βρίσκεται ο ladder 1kb (NEB), στη θέση 2 ο αρνητικός μάρτυρας (H₂O), στη θέση 3 το δείγμα 36, στη θέση 4 το δείγμα 37, στη θέση 5 το δείγμα 38, στη θέση 6 το δείγμα 39, στη θέση 7 το δείγμα 40, στη θέση 8 το δείγμα 41 και στη θέση 9 το δείγμα 42



Εικόνα 19. Προϊόν αντίδρασης PCR (ITS1/ITS4 εκκινητές), όπου από αριστερά προς τα δεξιά, στη θέση 1 βρίσκεται ο ladder 1kb (NEB), στη θέση 2 ο αρνητικός μάρτυρας (H₂O), στη θέση 3 το δείγμα 43, στη θέση 4 το δείγμα 44 και στη θέση 5 το δείγμα 45



Εικόνα 20. Προϊόν αντίδρασης PCR (ITS1/ITS4 εκκινητές), όπου από αριστερά προς τα δεξιά, στη θέση 1 βρίσκεται ο ladder 1kb (NEB), στη θέση 2 ο αρνητικός μάρτυρας (H₂O), στη θέση 3 το δείγμα 46, στη θέση 4 το δείγμα 47 και στη θέση 5 το δείγμα 48, στη θέση 6 το δείγμα 49, στη θέση 7 το δείγμα 50 και στη θέση 8 το δείγμα 51



Εικόνα 21. Προϊόν αντίδρασης PCR (ITS1/ITS4 εκκινητές), όπου από αριστερά προς τα δεξιά, στη θέση 1 βρίσκεται ο ladder 1kb (NEB), η θέση 2 είναι κενή, στη θέση 3 ο αρνητικός μάρτυρας (H₂O), στη θέση 4 το δείγμα 52, στη θέση 5 το δείγμα 53, στη θέση 6 το δείγμα 54, στη θέση 7 το δείγμα 55 και στη θέση 8 το δείγμα 56

Στον πίνακα 11 παρουσιάζονται όλα τα δείγματα (όπως αυτά είναι αριθμημένα στην απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης) σε αντιστοιχία με την περιοχή συλλογής και τους ξενιστές που παρασιτούσαν.

Πίνακας 11. Αντιστοιχία προϊόντων PCR με την περιοχή συλλογής των δειγμάτων και των ξενιστών τους.

Αριθμός Δείγματος	Τοποθεσία	Προϊόν PCR
1	Μαγνησία 2	+
2	Βοιωτία 3	+
3	Βοιωτία 11	-
4	Φθιώτιδα 12	+
5	Μαγνησία 2	-
6	Λάρισα 3	-
7	Λάρισα 4	+
8	Βοιωτία 5	+
9	Βοιωτία 12	+
10	Βοιωτία 15	-
11	Βοιωτία 13	-
12	Βοιωτία 8	+
13	Βοιωτία 7	+
14	Φθιώτιδα 3	+
15	Λάρισα 5	-
16	Φθιώτιδα 22	+
17	Λάρισα 2	+
18	Βοιωτία 6	-
19	Βοιωτία 1	+
20	Βοιωτία 14	-
21	Λάρισα 1	-
22	Λάρισα 8	-
23	Φθιώτιδα 6	-

24	Φθιώτιδα 5	-
25	Λάρισα 8	-
26	Φθιώτιδα 4	-
27	Λάρισα 9	+
28	Βοιωτία 9	+
29	Μαγνησία 1	-
30	Φθιώτιδα 21	+
31	Φθιώτιδα 9	+
32	Μαγνησία 1	+
33	Φθιώτιδα 8	+
34	Λάρισα 10	+
35	Βοιωτία 10	-
36	Λάρισα 7	+
37	Φθιώτιδα 5	-
38	Λάρισα 9	-
39	Βοιωτία 2	+
40	Λάρισα 1	-
41	Φθιώτιδα 19	-
42	Φθιώτιδα 2	-
43	Φθιώτιδα 7	-
44	Βοιωτία 14	+
45	Φθιώτιδα 16	-
46	Φθιώτιδα 1	+
47	Φθιώτιδα 10	+
48	Φθιώτιδα 7	-
49	Φθιώτιδα 14	+
50	Φθιώτιδα 14	+
51	Φθιώτιδα 15	+
52	Φθιώτιδα 11	+
53	Φθιώτιδα 18	+
55	Φθιώτιδα 13	+
56	Μαγνησία 3	+

3.2.2. Μορφολογικοί χαρακτήρες

Οι μορφολογικοί χαρακτήρες του άνθους των δειγμάτων κουσκούτας παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Παρατηρήθηκε η ύπαρξη πράσινου και πορτοκαλί χρώματος στους μίσχου και κρεμώδη-λευκού χρώματος στη στεφάνη (Εικ. 21). Ο αριθμός των σεπάλων ήταν 5, των στύλων 2, των λοβών στη στεφάνη 5 και των ανθέρων 5. Η κάψα ήταν σε όλα τα δείγματα που παρατηρήθηκαν σχεδόν σφαιρική και η κάψα δεν περικλειόταν πλήρως από την στεφάνη (Εικ. 22).



Εικόνα 12. Άνθος κουσκούτας όπου φαίνεται η στεφάνη με τους ανθήρες και η ωσθήκη.



Εικόνα 13. Άνθος κουσκούτας στο οποίο φαίνονται οι δύο στύλοι και η μη επικαλυπτόμενη ωσθήκη του άνθους.

3.2.3. Blast ανάλυση των αλληλουχιών των δειγμάτων

Η αλληλούχηση του γονιδιώματος της περιοχής ITS1-5,8S-ITS2, με εκκινητές ITS1/ITS4 έγινε συνολικά σε 2 δείγματα και η μεταξύ τους σύγκριση έδειξε ότι οι αλληλουχίες ήταν πανομοιότυπες (Πιν. 12). Επίσης μετά από BLAST ανάλυση η αλληλουχία των δειγμάτων βρέθηκε ίδια με όλων των ειδών *Cuscuta australis* (KJ025065.1), *Cuscuta campestris* (DQ211586.1, EF194661.1), *Cuscuta pentagona* (EF194662.1, EU288348.1), *Cuscuta polygonorum* (EU330298.1) και *Cuscuta obtusiflora* (EU330299.1) (Stefanovic S. *et al.*, 2007; Cheng Y., 2005; Jung W. *et al.*, 2014; Stefanovic S. and Costea M., 2008; McNeal JR. *et al.*, 2007)

3.3.Ανάλυση των αποτελεσμάτων με Bioinformatics

Πίνακας 12. Σύγκριση αλληλουχιών δειγμάτων 2 και 4

	5	15	25	35	45	55
4_ITS1-4	GGSTTTTTTTT	TTYTSGGGAA	AWWWYMKAAG	AGGCACCCCS	MGCCTTYSAW	TCWAYAWATT
2_ITS1-4	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	65	75	85	95	105	115
4_ITS1-4	GTACAGGTAG	CARTRCTTTT	MCCCGAGGGK	TYGCAAWGA-	TTTCCTTTCS	SSTTATTGAT
2_ITS1-4	-----	-----	-----	-----AC	TTTCCTTTCG	GTTTATTGA-

	125	135	145	155		
165						
175						
4_ITS1-4	ATGCTTAAAA	TCAGCGGGTa	acccTTcSCC	ATgAACTTGG	GGTCGCAATC	AAAGAGCCAA
2_ITS1-4	AAGG-TGAAA	TCCACGGG-G	GWWTYTYGCC	-TG-ACTTGG	GGTCGC-ATC	-AAGAGCCAA

	185	195	205	215	225	235
4_ITS1-4	AACCGGCAGC	TTCATAGGAT	CCCGCCGCCA	CAATGAAaCC	gAGCAAGGCT	GGCAACTATG
2_ITS1-4	AACCGGCAGC	TTCATAGGAT	CCCGCCGCCA	CAATGAAgCc	GAGCAAGGCT	GGCAACTATG

	245	255	265	275	285	295
4_ITS1-4	CACACCTGGC	GCATCCcCCG	CaCACCAAGA	CATCAACAAA	ATCAAGGACA	ACATTTTCGG
2_ITS1-4	CACaCCTGGC	GCATCCACCG	CaCACCAAGA	CATCAACAAA	ATCaAGGACA	ACATTTTCGG

	305	315	325	335	345	355
4_ITS1-4	CCAACCACGC	CCAAGGAAGG	GCCCAGGAGG	CCAGGATCTA	TTCCCACTCC	ACACACGAGA
2_ITS1-4	CCAACCACGC	CCAAGGAAGG	GCCCAGGAGG	CCAGGATCTA	TTCCCACTCC	ACACACGAGA

	365	375	385	395	405	415
4_ITS1-4	GGGGAGACAT	AATGCATGAC	ACCCAAGCAT	ACGTGCCCTC	AACCgAATGG	CTTGAGGCGC
2_ITS1-4	GGGGAGACAT	AATGCATGAC	ACCCAAGCAT	ACGTGCCCTC	AACCgAATGG	CTTGAGGCGC

	425	435	445	455	465	475
4_ITS1-4	AACTTGCGTT	CAAAGTTTCG	ATGGTTcGCG	GGATTCTGCA	ATTACACCA	CGTATCGCAT
2_ITS1-4	AACTTGCGTT	CAAAGTTTCG	ATGGTTCaCG	GGATTCTGCA	ATTACACCA	CGTATCGCAT

	485	495	505	515	525	535
4_ITS1-4	TTCGCTACGT	TCTTCATCGA	TGCAAGAGCC	GAGATATCCA	TTGCCGAGAG	TCATTTTTAT
2_ITS1-4	TTCGCTACGT	TCTTCATCGA	TGCAAGAGCC	GAGATATCCA	TTGCCGAGAG	TCATTTTTAT

	545	555	565	575	585	595
4_ITS1-4	TGAAAGGATG	CAAAGCTCAC	AGGCAgCATA	ACcAAGCTCT	GCgAGGTTGC	ACACTCATTA
2_ITS1-4	TaAAAGGATG	CAAAGCTCAC	AGGCAgCATA	AccRAGCTCT	GCRAGGTTGC	ACACTCATTA

	605	615	625	635	645	655
4_ITS1-4	TTATATTCCCT	TGGCGCTGCT	GCGCCGGTGT	TTTTGTTCGT	CgGGGCAAA	TCAaAAAgAC
2_ITS1-4	TTATATTCCCT	TGGCGCTGCT	GCGCCGGTGT	TTTTGTTCGT	CtTGGgCaAa	tCAaAAAGAC

	665	675	685	695	705	715
4_ITS1-4	GGCACCCAGA	CATTCaAATC	AATAATTGGT	ACAGGTtAGC	AAGTCATTCT	ACCGCGAGGG
2_ITS1-4	GGCACCCAGA	CATTCgAATC	AgTAaTtGGW	ACAGGTtAGC	AgGTCATTCT	ACcGCGAGGG

	725	735	745	755	765	775
4_ITS1-4	TTCaACAATG	ATCCTTCCGC	AGGTTcCCC	TaCGGAAAG-	-----	-----
2_ITS1-4	TTCGAC-ATG	ATCCTT-CGC	A-G-T-CCCC	TACGGAAGGA	WMTTKKGGAA	CCCTCGGGTA

	785	795	805	815	825	835
4_ITS1-4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2_ITS1-4	GATGAMTTGC	TACCTGKACA	TATAGTWGTS	TAGATGGGGT	GCSTSTKCTA	TTGCAGASAA
			
	845	855				
4_ITS1-4	-----	-----	--			
2_ITS1-4	ACACGGGGAC	CRCGCGTGWG	AS			

Πίνακας 13. Συγκριτικός πίνακας μεταξύ των *C. pentagona*, *C. campestris*, *C. polygonorum*, *C. obtusiflora* και του δείγματος 2

	5	15	25	35	45	55
Cuscuta pe	CCTGCGGAAG	GATCATTGTC	GAACCCTCGC	GGTAGAATGA	CTTGCTAACC	TGTACCAATT
Cuscuta ca	-----GAAG	GATCATTGTC	GAACCCTCGC	GGTAGAATGA	CTTGCTAACC	TGTACCAATT
Cuscuta po	GAAGGATCAT	TGTCGAACCC	TCGCGGTAGA	ATGA----CT	----TG---C	-----
Cuscuta ob	GAAGGATCAT	TGTCGAACCC	TCGCGGTAGA	ATGA----CT	----TG---C	-----
2_ITS1-4	-----	-----	-----	-----A	CTT--T--CC	T-TTCGGTTT

	65	75	85	95	105	115
Cuscuta pe	ATTG--ATTC	GAATGTCTGG	GTGCCGTCT-	TTCTGA-TTT	--G-CCCACG	ACGAACAAAA
Cuscuta ca	ATTG--ATTC	GAATGTCTGG	GTGCCGTCT-	TTCTGA-TTT	--G-CCCACG	ACGAACAAAA
Cuscuta po	T--A--A---	-----	-C---CTG--	---T-----	-----	-----AAA
Cuscuta ob	T--A--A---	-----	-C---CTG--	---T-----	-----	-----AAA
2_ITS1-4	ATTGAAAGGT	GAAATCCACG	GGGGWWTYTY	GCCTGACTTG	GGGTCGCATC	AAGAGC-CAA

	125	135	145	155	165	175
Cuscuta pe	ACACCGGCGC	AGCAGCGCCA	-AGGAATATA	ATAATGAGTG	TGCAACCTCG	CAGAGCTTG-
Cuscuta ca	ACACCGGCGC	AGCAGCGCCA	-AGGAATATA	ATAATGAGTG	TGCAACCTCG	CAGAGCTTG-
Cuscuta po	ACACCGGCGC	AGCAGCGCCA	-AGGAATATA	ATAATGAGTG	TGCAACCTCG	CAGAKCTYN-
Cuscuta ob	ACACCGGCGC	AGCAGCGCCA	-AGGAATATA	ATAATGAGTG	TGCAACCTCG	CAGAGCTTA-
2_ITS1-4	A-A-C--CG-	-GCAGCTTCA	TAGG-ATCCC	GCCGCCACAA	TGAAGcCGAG	CAAGGCTGGC

	185	195	205	215	225	235
Cuscuta pe	-GTTATGC-T	GCCTGTGAGC	-T---TTGCA	-TCCTTTCAA	TAAAAATGAC	TCTCGG-CAA
Cuscuta ca	-GTTATGC-T	GCCTGTGAGC	-T---TTGCA	-TCCTTTCAA	TAAAAATGAC	TCTCGG-CAA
Cuscuta po	-GTTATGC-T	GCCTGTGAGC	-T---TTGCA	-TCCTTTCAA	TAAAAATGAC	TCTCGG-CAA
Cuscuta ob	-GTTATGC-T	GCCTGTGAGC	-T---TTGCA	-TCCTTTCAA	TAAAAATGAC	TCTCGG-CAA
2_ITS1-4	AACTATGCAC	aCCTG-GCGC	ATCCACCGCa	CACCAAGACA	TCAACAAAA-	TCaAGGACAA

	245	255	265	275	285	295
Cuscuta pe	TGGATATCTC	GGCTCTTGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACG	TGG-TGTGAA
Cuscuta ca	TGGATATCTC	GGCTCTTGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACG	TGG-TGTGAA
Cuscuta po	TGGATATCTC	GGCTCTTGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACG	TGG-TGTGAA
Cuscuta ob	TGGATATCTC	GGCTCTTGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACG	TGG-TGTGAA
2_ITS1-4	--CAT-TTTC	GG--C---CA	ACCACGCCCA	AGGAAGGGCC	CAG-GAGGCC	AGGATCT-AT

	305	315	325	335	345	355
Cuscuta pe	TTGCAGAAT-	C-C-CGCGA-	---A-CCATC	GAAACTTTGA	-ACGCAAG--	T---TGCGCC
Cuscuta ca	TTGCAGAAT-	C-C-CGCGA-	---A-CCATC	GAAACTTTGA	-ACGCAAG--	T---TGCGCC
Cuscuta po	TTGCAGAAT-	C-C-CGCGA-	---A-CCATC	GAAACTTTGA	-ACGCAAG--	T---TGCGCC
Cuscuta ob	TTGCAGAAT-	C-C-CGCGA-	---A-CCATC	GAAACTTTGA	-ACGCAAG--	T---TGCGCC
2_ITS1-4	TCCCCTCCA	CACACGAGAG	GGGAGACAT-	-AATGCATGA	CACCCAAGCA	TACGTGC-CC

	365	375	385	395	405	415
Cuscuta pe	TCAAGCCATT	CGGTTGAGGG	CACGTATGCT	TGGGTGTCAT	GCATTATGTC	TCCCCTCTCG
Cuscuta ca	TCAAGCCATT	CGGTTGAGGG	CACGTATGCT	TGGGTGTCAT	GCATTATGTC	TCCCCTCTCG
Cuscuta po	TCAAGCCATT	CGGTTGAGGG	CACGTATGCT	TGGGTGTCAT	GCATTATGTC	TCCCCTCTCG
Cuscuta ob	TCAAGCCATT	CGGTTGAGGG	CACGTATGCT	TGGGTGTCAT	GCATTATGTC	TCCCCTCTCG
2_ITS1-4	TCAACCgAAT	GGCTTGA-GG	--CGCA-ACT	TGCGT-TCA-	-AAGTTTCGA	TGGT-TCaC-

	425	435	445	455	465	475
Cuscuta pe	TGTGTGGAGT	-GGGAATAGA	-TCCTGGCCT	C-C--TGGGC	-CCTTCCTTG	GGCG-TGGTT
Cuscuta ca	TGTGTGGAGT	-GGGAATAGA	-TCCTGGCCT	C-C--TGGGC	-CCTTCCTTG	GGCG-TGGTT
Cuscuta po	TGTGTGGAGT	-GGGAATAGA	-TCCTGGCCT	C-C--TGGGC	-CCTTCCTTG	GGCG-TGGTT
Cuscuta ob	TGTGTGGAGT	-GGGAATAGA	-TCCTGGCCT	C-C--TGGGC	-CCTTCCTTG	GGCG-TGGTT
2_ITS1-4	---G-GGATT	CTGCAATTCA	CACCACGTAT	CGCATTTCGC	TACGTTCTTC	ATCGATGCAA

	485	495	505	515	525	535
Cuscuta pe	G-GCCGA-AA	AT--GTTGTC	---CTTGA-T	TTTGTT----	-GATGTCTTG	GTGTGCGG-T
Cuscuta ca	G-GCCGA-AA	AT--GTTGTC	---CTTGA-T	TTTGTT----	-GATGTCTTG	GTGTGCGG-T
Cuscuta po	G-GCCGA-AA	AT--GTTGTC	---CTTGA-T	TTTGTT----	-GATGTCTTG	GTGTGCGG-T
Cuscuta ob	G-GCCGA-AA	AT--GTTGTC	---CTTGA-T	TTTGTT----	-GATGTCTTG	GTGTGCGG-T
2_ITS1-4	GAGCCGAGAT	ATCCATTGCC	GAGAGTCATT	TTTATTaAAA	GGATGCAAAG	CTCACAGGCA

	545	555	565	575	585	595
Cuscuta pe	GGATGCGCCA	GGTGTGCATA	GTTGC-CAGC	CTTGCTCGGC	TTCATTGTGG	CGGCGGGATC
Cuscuta ca	GGATGCGCCA	GGTGTGCATA	GTTGC-CAGC	CTTGCTCGGC	TTCATTGTGG	CGGCGGGATC
Cuscuta po	GGATGYGCCA	GGTGTGCATA	GTTGC-CAGC	CTTGCTCGGC	TTCATTGTGG	CGKCGGGATC
Cuscuta ob	GGATGTGCCA	GGTGTGCATA	GTTGC-CAGC	CTTGCTCGGC	TTCATTGTGG	CGTCCGGATC
2_ITS1-4	gCATAAaccRA	GCTCTGCRAG	GTTGCACACT	CATTATTATA	TTCCTTGCGC	CTGC-TGCGC

	605	615	625	635	645	655
Cuscuta pe	CTATGAAGCT	G-CCGGTTTT	GGC-TCTTTG	ATTG-CGACC	CCAAGTCAGG	CGAG-
Cuscuta ca	CTATGAAGCT	G-CCGGTTTT	GGC-TCTTTG	ATTG-CGACC	CCAAGTCAGG	CGAGA
Cuscuta po	CTATGAAGCT	G-CCGGTTTT	GGC-TCTTTG	ATTG-CGACC	CCAAGTCAGG	CGAGACTACC
Cuscuta ob	CTATGAAGCT	G-CCGGTTTT	GGC-TCTTTG	ATTG-CGACC	CCAAGTCAGG	CGAGACTACC
2_ITS1-4	CGGTGTTTTT	GTTCTGCTtTG	GgCaAatCAa	AAAGACGGCA	CCCAGACATT	CgAATCAgTA

	665	675	685	695	705	715
Cuscuta pe	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cuscuta ca	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cuscuta po	CGCTGAGTTT	AA-----	-----	-----	-----	-----

Cuscuta ob 2 ITS1-4	CGCTGAGTTT aTtGGWACAG	AA----- GTtAGCAgGT	----- CATTCTACcG	----- CGAGGGTTCG	----- ACATGATCCT	----- TCGCAGTCCC

	725	735	745	755	765	775
Cuscuta pe	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cuscuta ca	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cuscuta po	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cuscuta ob 2 ITS1-4	CTACGGAAGG	AWMTTKKGGG	ACCCTCGGGT	AGATGAMTTG	CTACCTGKAC	ATATAGTWGT

	785	795	805	815	825	
Cuscuta pe	-----	-----	-----	-----	-----	---
Cuscuta ca	-----	-----	-----	-----	-----	---
Cuscuta po	-----	-----	-----	-----	-----	---
Cuscuta ob 2 ITS1-4	STAGATGGGG	TGCSTSTKCT	ATTGCAGASA	AACACGGGGA	CCRCGCGTGW	GAS

Πίνακας 14. Συγκριτικός πίνακας μεταξύ των *C. australis*, *C. pentagona*, *C. campestris* και του δείγματος 4

	5	15	25	35	45	55
Cuscuta au	GTCCACTGAA	CCTTATCATT	TAGAGGAA--	GGAGAAGTCG	TA--ACAAG-	GTT----TCC
Cuscuta pe	-----	-----	-----	-----	-----G-	GTT----TCC
Cuscuta ca	-----	-----	-----	-----	-----	ATT----TCC
4 ITS1-4	-----GGS	TTTTTTTTTY	TSGGGAAAWW	WYMKAAGAGG	CACCCCSMGC	CTTYSAWTCW

	65	75	85	95	105	115
Cuscuta au	GTA-GGTGAA	CCTGCGGAAG	GA-TCATTGT	CGAACCCTCG	CGGTAG-AAT	GACTTGCTAA
Cuscuta pe	GTA-GGTGAA	CCTGCGGAAG	GA-TCATTGT	CGAACCCTCG	CGGTAG-AAT	GACTTGCTAA
Cuscuta ca	GTA-GGTGAA	CCTGCGGAAG	GA-TCATTGT	CGAACCCTCG	CGGTAG-AAT	GACTTGCTAA
4 ITS1-4	AYAWATTGTA	-C--AGGTAG	CARTRCTT-T	T--MCCCCGAG	GGKTYGCAAW	GA-TT--T-

	125	135	145	155	165	175
Cuscuta au	CCTGTACCAA	TTATTGAT-T	-CG-AATGTC	--TGGGT--G	CCGTCTTTCT	G-ATTTGCCC
Cuscuta pe	CCTGTACCAA	TTATTGAT-T	-CG-AATGTC	--TGGGT--G	CCGTCTTTCT	G-ATTTGCCC
Cuscuta ca	CCTGTACCAA	TTATTGAT-T	-CG-AATGTC	--TGGGT--G	CCGTCTTTCT	G-ATTTGCCC
4 ITS1-4	CCT-TTCSSS	TTATTGATAT	GCTTAAAATC	AGCGGGTaac	ccTTcSCCAT	gAACTTGGGG

	185	195	205	215	225	235
Cuscuta au	ACGACGAACA	AAAACACCGG	CGCAGCAGCG	CCA-AGGAAT	ATAATAATGA	GTGTGCAACC
Cuscuta pe	ACGACGAACA	AAAACACCGG	CGCAGCAGCG	CCA-AGGAAT	ATAATAATGA	GTGTGCAACC
Cuscuta ca	ACGACGAACA	AAAACACCGG	CGCAGCAGCG	CCA-AGGAAT	ATAATAATGA	GTGTGCAACC
4 ITS1-4	TCG-CAATCA	AAGAGCCAAA	ACCGGCAGCT	TCATAGG-AT	CCCGCCGCCA	CAATGAAaCC

	245	255	265	275	285	295
Cuscuta au	TCGCAGAGCT	TG--GTTATG	C-TGCCTGTG	AGC-TT---T	GCA-TCCTTT	CAATAAAAAAT
Cuscuta pe	TCGCAGAGCT	TG--GTTATG	C-TGCCTGTG	AGC-TT---T	GCA-TCCTTT	CAATAAAAAAT
Cuscuta ca	TCGCAGAGCT	TG--GTTATG	C-TGCCTGTG	AGC-TT---T	GCA-TCCTTT	CAATAAAAAAT
4 ITS1-4	gAGCAAGGCT	GGCAACTATG	CACACCTG-G	CGCATCCcCC	GCaACCAAG	ACATCAACA-

	305	315	325	335	345	355
Cuscuta au	GACTCTCGG-	CAATGGATAT	CTCGGCTCTT	GCATCGATGA	AGAACGTAGC	GAAATGCGAT
Cuscuta pe	GACTCTCGG-	CAATGGATAT	CTCGGCTCTT	GCATCGATGA	AGAACGTAGC	GAAATGCGAT

Cuscuta ca 4 ITS1-4	GACTCTCGG- AAATCAAGGA	CAATGGATAT CAA--CAT-T	CTCGGCTCTT TTCGG--C--	GCATCGATGA -CAACCACGC	AGAACGTAGC CCAAGGAAGG	GAAATGTGAT GCCCAG-GAG
 365 375 385 395 405 415
Cuscuta au Cuscuta pe Cuscuta ca 4 ITS1-4	ACGTGG-TGT ACGTGG-TGT ACGTGG-TGT GCCAGGATCT	GAATTGCAGA GAATTGCAGA GAATTGCAGA -ATTCCTACT	AT-C-C-CGC AT-C-C-CGC AT-C-C-CGC CCACACACGA	GA----A-CC GA----A-CC GA----A-CC GAGGGGAGAC	ATCGAAACTT ATCGAAACTT ATCGAAACTT AT--AATGCA	TGA-ACGCAA TGA-ACGCAA TGA-ACGCAA TGACACCCAA
 425 435 445 455 465 475
Cuscuta au Cuscuta pe Cuscuta ca 4 ITS1-4	G--T---TGC G--T---TGC G--T---TGC GCATACGTGC	GCCTCAAGCC GCCTCAAGCC GCCTCAAGCC -CCTCAACCg	ATTCGGTTGA ATTCGGTTGA ATTCGGTTGA AATGGCTTGA	GGGCACGTAT GGGCACGTAT GGGCACGTAT -GG--CGCA-	GCTTGGGTGT GCTTGGGTGT GCTTGGGTGT ACTT--GCGT	CATGCATTAT CATGCATTAT CATGCATTAT --T-CA--AA
 485 495 505 515 525 535
Cuscuta au Cuscuta pe Cuscuta ca 4 ITS1-4	GTCTCCCTC GTCTCCCTC GTCTCCCTC GT-TT--CGA	TCGTGTG-TG TCGTGTG-TG TCGTGTG-TG TGGTTCGCGG	GAGT-GGGAA GAGT-GGGAA GAGT-GGGAA GATTCTGCAA	TAGA-TCCTG TAGA-TCCTG TAGA-TCCTG TTCACACCAC	GCCTC-C--T GCCTC-C--T GCCTC-C--T GTATCGCATT	GGGC-CCTTC GGGC-CCTTC GGGC-CCTTC TCGCTACGTT
 545 555 565 575 585 595
Cuscuta au Cuscuta pe Cuscuta ca 4 ITS1-4	CTTGGGCG-T CTTGGGCG-T CTTGGGCG-T CTTCATCGAT	GTTG-GCCG GTTG-GCCG GTTG-GCCG GCAAGAGCCG	A-AAAT--GT A-AAAT--GT A-AAAT--GT AGATATCCAT	TGTCCTTGAT TGTCCTTGAT TGTCCTTGAT TG-CC--GAG	TTTGTGATG TTTGTGATG TTTGTGATG A--G-TCAT-	TCTTGGTGTG TCTTGGTGTG TCTTGGTGTG TTTTATTGAA
 605 615 625 635 645 655
Cuscuta au Cuscuta pe Cuscuta ca 4 ITS1-4	CGG-TG-GAT CGG-TG-GAT CGG-TG-GAT AGGATGCAAAA	GCGC-CAGGT GCGC-CAGGT GCGC-CAGGT GCTCACAGG-	GTGCATAGTT GTGCATAGTT GTGCATAGTT CAgCATA--A	GCCAGCCTTG GCCAGCCTTG GCCAGCCTTG CcAAGCTCTG	CTCGGCTTCA CTCGGCTTCA CTCGGCTTCA CgAGGTTGCA	TTGTGGCGGC TTGTGGCGGC TTGTGGCGGC CACTCATTAT
 665 675 685 695
Cuscuta au Cuscuta pe Cuscuta ca 4 ITS1-4	GGGA-TCCTA GGGA-TCCTA GGGA-TCCTA TATATTCTCT-	TGAAGCTGC- TGAAGCTGC- TGAAGCTGC- TGGCGCTGCT	-CGGTTTTGG -CGGTTTTGG -CGGTTTTGG GCGCCGGT-G	CTCTTTGATT CTCTTTGATT CTCTTTGATT TT-TTTGTTC	G-CGACCCCA G-CGACCCCA G-CGACCCCA GTCGgGGGCA	AGTCAGGCGA AGTCAGGCGA AGTCAGGCGA AATCA-aAAA
 725 735 745 755 765 775
Cuscuta au Cuscuta pe Cuscuta ca 4 ITS1-4	GACTACCCGC G----- GACTACCCGC gACGGCACCC	TGAGTTTAAG ----- TGAGTTTAAG AGACATT---	CATATCAATA ----- CATATCAATA CaAATCAATA	AGCGG---AG ----- AGCGG---AG ATTGGTACAG	G-AA----- ----- G-AAAT---- GTtAGCAAGT	----- ----- ----- CATTCTACCG
 785 795 805 815 825	
Cuscuta au 4 ITS1-4	----- CGAGGGTTCa	----- ACAATGATCC	----- TTCCGCAGGT	----- TCcCCCTaCG	----- GAAAG	

Από τους παραπάνω πίνακες μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η ομοιότητα στις αλληλουχίες μεταξύ των ειδών που παρουσιάζονται αλλά και η ομοιότητα αυτών των ειδών με τα δείγματα 2 και 4 που μελετήθηκαν είναι μεγάλη. Στο μεγαλύτερο μέρος τους, οι αλληλουχίες που προβάλλονται ταυτίζονται, ενώ λίγες είναι οι διαφορές τους.

4.Συζήτηση- Συμπεράσματα

4.Συζήτηση-Συμπεράσματα

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους δειγμάτων, του φανερόγαμου παράσιτου κουσκούτα από την Κεντρική Ελλάδα. Για το λόγο αυτό έγινε η συλλογή δειγμάτων του παρασίτου από διάφορες περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας. Συνολικά καταγράφηκαν 39 αυτοφυών και καλλιεργούμενων φυτών στα οποία παρασιτεί η κουσκούτα. Στις αγροτικές περιοχές, όπου και έγινε η συλλογή, διαπιστώσαμε ότι συχνότεροι ξενιστές της ήταν τα ζιζάνια χονδρίλλα (*Chondrilla juncea*, Compositae), ραδίκι (*Cichorium intybus*, Compositae), περικοκλάδα (*Convolvulus arvensis*, Convolvulaceae), πολυκόμπι (*Polygonum aviculare*, Polygonaceae), τριβόλι (*Tribulus terrestris*, Zygophyllaceae) και αγριομελιτζάνα (*Xanthium strumarium*, Compositae). Κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των ζιζανίων είναι η αντοχή τους σε συνθήκες ξηρασίας

Από το σύνολο των δειγμάτων επιλέχθηκαν 2 από αυτά, με κριτήρια α) την περιοχή συλλογής και β) την ποικιλομορφία των ξενιστών τους για να γίνει αλληλούχηση των προϊόντων της PCR (στην περιοχή γονιδιώματος ITS1- 5,8S- ITS2).

Οι αλληλουχίες των δύο δειγμάτων ήταν πανομοιότυπες και μετά από BLAST ανάλυση φάνηκε ότι ήταν όμοιες και με αλληλουχίες (που υπάρχουν στη βάση GenBank) των ειδών *Cuscuta australis*, *Cuscuta campestris*, *Cuscuta pentagona*, *Cuscuta polygonorum* και *Cuscuta obtusiflora*. Επομένως με τις μοριακές μεθόδους που εφαρμόστηκαν είναι φανερό ότι υπάρχει αδυναμία ταυτοποίησης των δειγμάτων σε συγκεκριμένο είδος (ή είδη) αλλά να περιοριστεί τελικά σε ομάδα ειδών. Κρίθηκε επομένως σκόπιμη και η σύγκριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών.

Μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών του άνθους των δειγμάτων και η σύγκρισή τους με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ανθέων των υπό εξέταση ειδών (*Cuscuta australis*, *Cuscuta campestris*, *Cuscuta pentagona*, *Cuscuta polygonorum* και *Cuscuta obtusiflora*) είχε ως αποτέλεσμα να αποκλειστούν κάποια είδη και τελικά να διαπιστωθεί ότι πρόκειται για το είδος *Cuscuta campestris*. Στο είδος *C.campestris* ο κάλυκας είναι ωοειδής με αμβλείς καταλήξεις. διαθέτει ωοειδή, με αμβλείς καταλήξεις κάλυκα. Η στεφάνη είναι λευκή, λογχοειδής, οξεία και συχνά κυρτή και η κάψα επικαλύπτεται από τη στεφάνη στο μισό με ένα τέταρτο της επιφάνειά της. Ο αριθμός των σεπάλων ήταν 5, των στύλων 2, των λοβών στη στεφάνη 5 και των ανθήρων 5 (Barath K., 2009).

Για την ταυτοποίηση του είδους (ή των ειδών) συνδυάστηκε η παραπάνω καταγραφή μορφολογικών χαρακτήρων με τις μοριακές μεθόδους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και αλληλούχησης του προϊόντος της PCR. Όσον αφορά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης παρατηρήθηκε ότι δεν έδωσαν όλα τα δείγματα προϊόν. Πιθανόν κατά τη διαδικασία καθαρισμού του ολικού DNA να υπήρχαν μέχρι το τελικό στάδιο παρεμποδιστές της αντίδρασης, που εμπόδισαν τη δράση του ενζύμου. Από το σύνολο των 56 δειγμάτων, προϊόν PCR έδωσαν τα 31. Εναλλακτικά της αλληλούχησης για διαφοροποίηση ειδών χρησιμοποιείται ευρέως η μέθοδος του πολυμορφισμού (RFLP). Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, διότι μετά από σύγκριση των αλληλουχιών των υπό εξέταση δειγμάτων από τη βάση GenBank (BLAST ανάλυση) οι διαφορές στις αλληλουχίες τους ήταν ελάχιστες.

5.Βιβλιογραφία

1. Abdel Khalik K.N. (2006), Seed morphology of *Cuscuta L. (Convolvulaceae)* in Egypt and its systematic significance, South Vallery University Faculty of Science, Botany Department, Sohag, **117**:3–4, 217–224
2. Alik Zainul Abdin, Khanda Jabeen Mirza, Salim Kham Khan, Usha Kiran, Mauhl Ram and Parwej Ahmad (2011), Development and Detection Efficiency of SCAR Markers of *Cuscuta reflexa* and its Adulterant *Cuscuta chinensis*, Department of Biotechnology, Faculty of Science, Jamia Hamdard, New Delhi, India Department of Botany and Microbiology, College of Science, King Saud University, Riyadh 11451, Kingdom, Saudi Arabia
3. Aly R. (2013), Trafficking of molecules between parasitic plants and their hosts, Department of Plant Pathology and Weed Research, Agricultural Research Organization, Newe Ya'ar Research Center, Ramat Yishay, Israel **53**: 231-241
4. Ashigh J. and Marquez E. Esther (2010), Dodder (*Cuscuta spp.*) Biology and Management, New Mexico State University, Cooperative Extension Service, College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences, (http://aces.nmsu.edu/pubs/_a/A615/)
5. Barath K. (2009), The genus *Cuscuta (Convolvulaceae)* in the Andaman Islands with a new record, Journal Acta Botanica, Hungary, **51**, 261-272
6. Benson D.A., Cavanagh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sanger E.W. (2013), GenBank, Nucleic Acids Research 41(Database issue): D36-D42 www.ncbi.nlm.nih.gov Last update: 7/2/2015
7. Bhatia H., Manhas R.K., Kumar K., Magotra R. (2014) Traditional knowledge on poisonous plants of Udhampur district of Jammu and Kashmir, India, **152**: 16-207.
8. Birschwilks M., Haupt S., Hofius D. and Neuman S. (2005), Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta sp.*, Journal of Experimental Botany- Oxford Journals, **57**: 911-921.
9. Bleischwitz M., Markus A., Fuchsbauer H.L. and Kaldenhoff R. (2010) ,Significance of Cuscutain, a cysteine protease from *Cuscuta reflexa*, in host-parasite interactions, BMC Plant Biology, **10**:10-227.

10. Britton Nathaniel Lord and Brown Addison (1896), An Illustrated Flora of the Northern United States, Canada, and the British Possessions, Charles Scribner's Sons New York, Volume 3, 26-29
11. Burnham R.J. (2012), *Cuscuta epithymum* Murray, Plant diversity website, University of Michigan (<http://climbers.lsa.umich.edu/wp-content/uploads/2013/07/CuscepitCONVFINAL.pdf>)
12. Burnham R.J. (2013), *Cuscuta pentagona* Engelm., Plant diversity website, University of Michigan (<http://climbers.lsa.umich.edu/wp-content/uploads/2013/07/CuscpentCONVFINAL.pdf>)
13. Chen W., Dugan F.M., and McGee R. (2014), First Report of Dodder (*Cuscuta pentagona*) on Chickpea (*Cicer arietinum*) in the United States, USDA Agricultural Research Service, Washington State University, **98**:165.2-165.2
14. Cheng Y. (2005), *Cuscuta* molecular identification, Human Agricultural University, College of Bio-Safety
15. Costea M., Stefanovic S. (2009), Molecular Phylogeny of the *Cuscuta californica* Complex (*Convolvulaceae*) and a New Species from New Mexico and Trans-Pecos, American Society of Plant Taxonomists, **34(3)**: 570-579
16. Costea M., Aiston F. and Stefanovic S. (2008), Species delimitation, phylogenetic relationships, and two species in the *Cuscuta gracillima* complex (*Convolvulaceae*), Botany **86**: 670-681-NRC Canada
17. Costea M., Ruiz I.G. and Stefanovic S. (2011), Systematics of “horned” dodders: phylogenetic relationships, taxonomy, and two species within the *Cuscuta chapalana* complex (*Convolvulaceae*), University of Toronto, **89**:715-730
18. Costea M., Tardif F. J. (2005), The biology of Canadian weeds. 133. *Cuscuta campestris* Yuncker, *C. gronovii* Willd. ex Schult., *C. umbrosa* Beyr. ex Hook., *C. epithymum* (L.) L. and *C. epilinum* Weihe, Canadian Journal of Plant Science, **86(1)**:293-316
19. Dawson J.H., Musselman L.J., Wolswinkel P. and Dorr. I. (1994) “Biology and control of *Cuscuta*” Review of Weed Science, **6**:265-317
20. Dörr I. 1972. Der Anschluß der *Cuscuta*-Hyphen an die Siebröhren ihrer Wirtspflanzen. Protoplasma, **75**:167–187
21. Ghousa K., Sajedib S., Mirzaeec M.R. and Arazmjoc M. (2013), First report of parasite dodder (*Cuscuta campestris*) on jujube trees (*Ziziphus jujuba*) from Iran, **46**:16

22. Guyer R.L., Koshland D.E. (1989), Journal: The Molecule of the Year. Science, **246**:1543–1546.
23. Hajimehdipour H., Kondori B.M., Amin G.R., Adib N., Rastegar H., Shekarchi M. (2012), Development of a validated HPLC method for the simultaneous determination of flavonoids in *Cuscuta chinensis* Lam. by ultra-violet detection, DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, **20**:57
24. Hall T.A. (1999), BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series, **41**:95-98
25. Heintz W. (1989), Transmission of a new mycoplasma like organism (MLO) from *Cuscuta odorata* (Ruiz & Pav.) to herbaceous plants and attempts to elimination in the vector, Journal of Phytopathology **125**: 171-186
26. Hoelzel A.R. (1998), Molecular genetic analysis of populations, Oxford University Press, **63**: 273-275
27. Jarausch W. (2006), DNA Extraction from Plant Material for Phytoplasma detection.
28. Jayasuriya K.M., Baskin J.M., Geneve R.L., Baskin C.C., Chien C.T. (2008), Physical dormancy in seeds of the holoparasitic angiosperm *Cuscuta australis* (*Convolvulaceae*, *Cuscutaceae*): dormancy-breaking requirements, anatomy of the water gap and sensitivity cycling, **102(1)**: 39-48
29. Jung W., Ko J., So H., Cho J., Ham S., Yum P. (2014), Genetic information of Korea native resource, Medicinal Crops Seed Supply Center, Traditional of Korean Medicine, **288**:529-851
30. Kendall J. M. and Rygielwicz P.T. (2005), Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts, BMC Microbiology, **5**:5-28
31. Lanini W.T. and Kogan M. (2005), Biology and Management of *Cuscuta* in Crops, Pontificia Universidad Catolica de Chile, **32**:3
32. McNeal J.R., Arumuganathan K., Kuehl J.V., Boore J.L., Depamphillis C.W. (2007), Systematic and plastid genome evolution of the cryptically photosynthetic parasitic plants genus *Cuscuta* (*Convolvulaceae*), BMC Biology, **5**:5
33. Nickrent D.L. and Musselman L.J. (2004), Introduction to Parasitic Flowering Plants, The Plant Health Instructor, 1) Department of Plant Biology, Southern Illinois University 2) Department of Biological Sciences, Old Dominion University
- The authors gratefully acknowledge information and ideas provided by Drs. Frank Tainter and Robert Eplee in the early stages of this publication

34. Patel J. N. and Patel N. K. (2010) "Study of Parasite Hosts of the Genus *Cuscuta* and its Traditional Uses in Planpur Taluka, Gujarat, India," *Ethnobotanical Leaflets*, **2**:3.
35. Patel S., Sharma V., Chauhan N.S., Dixit V.K. (2012), An updated review on the parasitic herb of *Cuscuta reflexa* Roxb, **10**:3
36. Ranjan A., Ichihashi Y., Farhi M., Zumstein K., Townsley B., David-Schwartz R., Sinha N.R. (2014), De novo assembly and characterization of the transcriptome of the parasitic weed *Cuscuta pentagona* identifies genes associated with plant parasitism, *Plant Physiology*. Department of Plant Biology, University of California at Davis, **166**:1087-1089
37. Ray Sahelian M.D. (2014), *Cuscuta* herb and seed supplement health benefit, **20**:1
38. Runyon J.B., Mark C. Mescher and Consuelo M. De Morales (2008), Parasitism by *Cuscuta pentagona* Attenuates Host Plant Defenses against Insect Herbivores, *Plant Physiology –American Society of Plant Biologists*, **146**:987-995
39. Runyon J.B., Tooker J.F., Mark C. Mescher and Consuelo M. De Morales (2009), Parasitic Plants in Agriculture: Chemical Ecology of Germination and Host-Plant Location as Targets for Sustainable Control: A Review, **1**:123-136
40. Sanger F., Nicklan S., Coulson A.R. (1977), DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**:5463-7
41. Schwartz R.D., Runo S., Townsley B., Machuka J. and Neelima S. (2014), Long-distance transport of mRNA via parenchyma cells and phloem across the host- parasite junction in *Cuscuta*, *Section of Plant Biology, University of California, Department of Biochemistry and Biotechnology*, **179(4)**:1133-1141
42. Scott P. (2008), *Physiology Plant and Behavior of Plants*, Wiley
43. Silvertown J. (1999), Seed ecology, dormancy and germination: a modern synthesis from Baskin and Baskin, *Am. J. Bot.*, **86**:903-905
44. Stefanovic S. and Costea M. (2008), Reticulate evolution in the parasitic genus *Cuscuta (Convolvulaceae)*: over and over and over again, *Biology-University of Toronto Mississauga*, **86**:791-808
45. Stefanovic S., Kuzmina M., Costea M. (2007), Delimitation of major lineages within *Cuscuta subgenus Grammica (Convolvulaceae)* using plastid and nuclear DNA sequences, *Am. J. Bot.* **94(4)**:568-89

46. White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. (1990), Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, Academic Press INC.
47. Wright M.A.R., Welsh M., Costea M. (2011), Diversity and evolution of the gynoeceium in *Cuscuta* (dodders, *Convolvulaceae*) in relation to their reproductive biology: two styles are better than one, Department of Biology, Wilfrid Laurier University, **296**:51-76
48. Γεωργόπουλος Σ.Γ. (1984), Βασικές Αρχές Φυτοπαθολογίας, Αθήνα
49. Γεωργόπουλος Σ.Γ. (1992), Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενειών των φυτών, Αθήνα
50. Λόλας Π. Χ. (2007), Ζιζάνια-Ζιζανιοκτόνα, Τύχη και Συμπεριφορά στο Περιβάλλον, Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, 2^η έκδοση, Θεσσαλονίκη
51. National Center for Biotechnology Information. Available at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Last update 12/2/15
52. *Cuscuta* Parasitic Vine. Available at <<http://www.sciencechannel.com/tv-shows/through-the-wormhole/videos/cuscuta-parasite.htm>>. Last updated 12/2/15
53. Pests in Gardens and Landscapes, University of California Agriculture & Natural Resources. Available at <<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/PESTNOTES/pn7496.html>>. Last updated 12/2/15
54. Johnson R.W. (1992), *Cuscuta australis* R.Br., Plantnet. Available at <<http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgibin/NSWfl.pl?page=nswfl&lvl=sp&name=Cuscuta~australis>>. Last updated 12/2/15