



Control



Control



25V



25V



TIAS1.3



TIAS1.3

ΑΘΗΝΑ 2012

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΣΤΡΙΓΓΛΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Διερεύνηση του ρόλου του συζευγμένου πρωτεϊνικού υποδοχέα VdSteA στην παθογένεια και βιολογία του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*

ΙΩΑΝΝΗΣ Α. ΣΤΡΙΓΓΛΗΣ

ΑΘΗΝΑ
2012

**Διερεύνηση του ρόλου του συζευγμένου πρωτεϊνικού
υποδοχέα VdSteA στην παθογένεια και βιολογία του
φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae***

ΙΩΑΝΝΗΣ Α. ΣΤΡΙΓΓΛΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

που υποβλήθηκε στο

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Επ. Καθηγητής, Επιβλέπων**
- 2. Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής**
- 3. Σωτήριος Τζάμος, Λέκτορας, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής**

ΑΘΗΝΑ 2012

*Στην οικογένεια μου,
για την αγάπη της και την υποστήριξη της προσπάθειάς μου*

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Δημήτριου Τσιτσιγιάννη. Για την απρόσκοπτη πραγματοποίηση της μελέτης ήταν σημαντική η χορήγηση υποτροφίας από το Ίδρυμα Μποδοσάκη.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντά μου, Δρ. Τσιτσιγιάννη, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και μου πρότεινε ένα ιδιαίτερα απαιτητικό θέμα, το οποίο ήταν πάνω στα ερευνητικά μου ενδιαφέροντα. Υπήρχε διαρκής επικοινωνία και ανταλλαγή απόψεων με τον Δρ. Τσιτσιγιάννη, ενώ με ώθησε ώστε να αναπτύξω πρωτοβουλία σε διάφορα ζητήματα που προέκυψαν στη διάρκεια των πειραμάτων. Κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού μου έδειξε συνεχές ενδιαφέρον και με καθοδήγησε στην κατανόηση και εφαρμογή σύγχρονων και πολύπλοκων εργαστηριακών τεχνικών. Επιπλέον, υπήρξε πολύ σημαντική η συμβολή του κατά τη συγγραφή της παρούσας μελέτης, όπου πραγματοποίησε λεπτομερείς και ουσιαστικές διορθώσεις, με αποτέλεσμα την έγκαιρη παράδοση της παρούσας εργασίας προς αξιολόγηση.

Στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης υπήρξε ουσιαστική η συμβολή του Καθηγητή Επαμεινώνδα Παπλωματά, ο οποίος ως μέλος της τριμελούς μου επιτροπής με βοήθησε ιδιαίτερα στην πραγματοποίηση της φυλογενετικής ανάλυσης. Ο Δρ Παπλωματάς είχε συνεχή επικοινωνία μαζί μου, ενώ οι συμβουλές και οι προτάσεις του με βοήθησαν τόσο στις πειραματικές διαδικασίες όσο και στη συγγραφή της μεταπτυχιακής μελέτης μου. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για το ειλικρινές ενδιαφέρον του και το συμβουλευτικό ρόλο του την περίοδο που εξέταζα τις επιλογές μου για την πραγματοποίηση διδακτορικών σπουδών.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Λέκτορα Φυτοπαθολογίας και τρίτο μέλος της εξεταστικής μου επιτροπής, Δρ. Σωτήριο Τζάμο. Ο Δρ. Τζάμος με βοήθησε ουσιαστικά κατά την πραγματοποίηση των στατιστικών αναλύσεων στα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας μελέτης, ενώ ήταν σημαντικός ο ρόλος του και οι προτάσεις του κατά τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας μου δόθηκε η δυνατότητα να συμμετέχω στις δραστηριότητες του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, παράλληλα με την πραγματοποίηση των πειραμάτων μου. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την

Επίκουρο Καθηγήτρια Πολύμνια Αντωνίου, η οποία με βοήθησε να ενισχύσω τις διαγνωστικές μου ικανότητες με την παροχή ασθενών φυτών και την εμπιστοσύνη της καθώς μου ανέθετε να τα μελετώ και να αναγνωρίζω το παθογόνο αίτιο σε κάθε περίπτωση. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Ελισάβετ Χατζηβασιλείου, η οποία με βοήθησε ιδιαίτερα την περίοδο που εξέταζα τις μελλοντικές μου επιλογές για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής και την Δρ. Μυρτώ Δημακοπούλου για τις ευχάριστες συζητήσεις που είχαμε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον Ομότιμο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας Ελευθέριο Τζάμο, ο οποίος μου έδωσε το ερέθισμα ώστε να εμβαθύνω στην επιστήμη της Φυτοπαθολογίας, ενώ με καθοδηγούσε ουσιαστικά ώστε να προσεγγίζω με προσοχή και σοβαρότητα τα ασθενή δείγματα κατά την εξέτασή τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επιπλέον και τους διδάκτορες Αλίκη Τζίμα και Παντελίδη Ιάκωβο. Ο Ιάκωβος εκτός από πολύ στενός μου φίλος, υπήρξε και σημαντική επιρροή για εμένα στο ξεκίνημα του μεταπτυχιακού μου, καθώς μου εμπιστεύτηκε την εκτέλεση ορισμένων πειραμάτων του αλλά και μου έδειξε τις βασικές αρχές ώστε να εργάζομαι και να οργανώνω σωστά το πρόγραμμα μου κατά την εργασία μου στο χώρο του εργαστηρίου. Η Αλίκη υπήρξε πολύ καλός συνομιλητής καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, όπου με συμβούλευε για θέματα που αφορούσαν το θεωρητικό υπόβαθρο της εργασίας μου ενώ υπήρξε σημαντική η συμβολή της κατά τη συγγραφή των συμπερασμάτων της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τους προπτυχιακούς φοιτητές Σταύρο Αγορίτση και Μαρία Ηλιάδη, τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Σοφία Κουντούρη και Αγγελοπούλου Φωτεινή, τον MSc γεωπόνο Σταύρο Παλαβούζη και τις υποψήφιες διδάκτορες Μαρία Τσολακίδου και Άρτεμις Γιαννακοπούλου, καθώς κατά την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας συνέβαλαν με τον τρόπο τους και τη φιλική τους στάση ώστε να δημιουργηθεί ένα ευχάριστο περιβάλλον εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Seogchan Kang από το Πανεπιστήμιο της Pennsylvania (The Pennsylvania State University, Department of Plant Pathology, U.S.A.) για την παραχώρηση του δυαδικού φορέα pGKO2.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract.....	7
1 Εισαγωγή.....	8
1.1 Ο εδαφογενής φυτοπαθογόνος μύκητας <i>Verticillium dahliae</i>.....	8
1.1.1 Η ασθένεια της βερτισιλλίωσης.....	8
1.1.2 Συμπτώματα βερτισιλλίωσης.....	9
1.1.3 Βιολογικός κύκλος του παθογόνου.....	14
1.1.4 Μηχανισμοί παθογένεσης.....	16
1.1.5 Φυσιολογία της άμυνας του φυτού ενάντια στη μόλυνση από είδη του γένους <i>Verticillium</i>	20
1.1.6 Ο ρόλος των μορίων σημάτων στην άμυνα του φυτού.....	22
1.1.7 Τρόποι αντιμετώπισης.....	23
1.2. Οι συζευγμένοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς με τις G πρωτεΐνες (G protein coupled receptors – GPCRs).....	25
1.2.1 Γενικά.....	25
1.2.2 Δομική Ταξινόμηση των GPCRs των μυκήτων.....	27
1.2.3 Οι GPCRs και η G πρωτεΐνη.....	29
1.2.4 Οι GPCRs και ο ρόλος τους στις λειτουργίες των μυκήτων.....	34
1.3 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	48
2. Πειραματικό Μέρος.....	50
2.1 Βιοπληροφορική και Φυλογενετική Ανάλυση των GPCRs του <i>V. dahliae</i>.....	50
2.1.1 Βιοπληροφορική Ανάλυση.....	50
2.1.2 Φυλογενετική Ανάλυση.....	51
2.2 Επιλογή του υπό μελέτη GPCR γονιδίου και σχεδιασμός εκκινητών.....	51
2.2.1 Επιλογή γονιδίου προς μελέτη.....	51
2.2.2 Σχεδιασμός εκκινητών.....	52
2.3 Καλλιέργεια στελεχών του μύκητα <i>V. dahliae</i> και απομόνωση DNA και RNA.....	54
2.3.1 Καλλιέργεια στελεχών <i>V. dahliae</i> και παραλαβή μυκηλίου.....	54
2.3.2 Απομόνωση DNA από το λυοφιλωμένο μυκήλιο του <i>V. dahliae</i>	55
2.3.3 Απομόνωση RNA από το μύκητα <i>V. dahliae</i>	56
2.4 Δημιουργία αλληλομόρφου αντικατάστασης.....	57
2.4.1 Εκκινητές που ενισχύουν τμήμα περίπου 1000 βάσεων πριν το γονίδιο....	58
2.4.2 Εκκινητές που ενισχύουν τμήμα περίπου 1000 βάσεων μετά το γονίδιο...58	

2.4.3 Εκκινητές για τον έλεγχο της κλωνοποίησης της κασέτας της γενετισίνης.....	59
2.5 Κλωνοποίηση προϊόντων PCR.	60
2.5.1 Προετοιμασία τμημάτων για την κλωνοποίηση	60
2.5.2 Σχεδιασμός αλληλόμορφων αντικατάστασης του υπό μελέτη γονιδίου	63
2.6 Εισαγωγή δυαδικού φορέα στο βακτήριο <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
2.6.1 Δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
2.6.2 Εισαγωγή pGKO2 σε επιδεκτικά κύτταρα <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
2.7 Μετασηματισμός του μύκητα <i>V. dahliae</i> με τη χρήση <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
2.8 Υβριδισμός κατά Southern στα μετασηματισμένα στελέχη του <i>V. dahliae</i>	69
2.9 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	72
2.9.1 Εκκινητές για τον έλεγχο της απενεργοποίησης του γονιδίου σε μεταγραφικό επίπεδο	73
2.10 Μορφολογικός και φυσιολογικός χαρακτηρισμός των <i>ΔVdSteA</i> στελεχών	74
2.11 Δοκιμές παθογένειας σε επιλεγμένους ξενιστές	75
2.12 Εκτίμηση παθογόνου ικανότητας και δείκτης ασθένειας	77
2.13 Πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν	78
2.13.1 Καθαρισμός προϊόντος PCR MinElute - PCR purification kit (Qiagen)..	78
2.13.2 Εξαγωγή DNA από πηκτή αγαρόζης - QIAquick Gel Extraction Kit Protocol using a microcentrifuge	79
2.13.3 Εξαγωγή πλασμιδιακού DNA - Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge	80
2.13.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA λίγων αντιγράφων - Isolation of a low-copy plasmid from <i>Agrobacterium</i> using QIAprep technology	80
2.14 Θρεπτικά Υποστρώματα ανάπτυξης μυκήτων και βακτηρίων	81
2.14.1 PDA (Potato Dextrose Agar)	81
2.14.2 SSN (Sucrose-Sodium-Nitrate).....	81
2.14.3 Luria Bertani medium (LB)	82
3. Αποτελέσματα	84
3.1 Βιοπληροφορική ανάλυση των GPCRs του μύκητα <i>V. dahliae</i>	84
3.2 Φυλογενετική ανάλυση των GPCRs του μύκητα <i>V. dahliae</i>	85
3.3 Ενίσχυση με PCR και κλωνοποίηση των περιοχών F1R1 και F2R2 στο φορέα pBluescript II SK (+/-).	88
3.3.1 Τμήμα F1R1.....	88
3.3.2 Τμήμα F2R2.....	89
3.4 Ενσωμάτωση της κασέτας της γενετισίνης στο φορέα p.IAS2.1	91

3.5 Μεταφορά του κλωνοποιημένου αλληλόμορφου αντικατάστασης από το πλασμίδιο p.IAS3.5 στο δυαδικό φορέα pGKO2	92
3.6 Εισαγωγή δυαδικού φορέα pGKO2 (κλώνος p.IAS4.1) στο <i>Agrobacterium</i>.....	93
3.7 Έλεγχος απενεργοποίησης του γονιδίου <i>VdSteA</i> στα στελέχη 25V και 70V του μύκητα <i>V. dahliae</i>	94
3.8 Υβριδισμός κατά Southern στα μετασηματισμένα $\Delta VdSteA$ <i>V. dahliae</i> στελέχη.....	99
3.8.1 Προετοιμασία ανιχνευτή (probe).....	99
3.8.2 Εξαγωγή DNA για πέψεις.....	100
3.8.3 Πέψη με το ένζυμο NcoI.....	101
3.8.4 Πέψη με το ένζυμο EcoRI	102
3.9 Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου <i>VdSteA</i> στα αγρίου τύπου και τα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta VdSteA$	103
3.10 Χαρακτηρισμός στελεχών με απενεργοποιημένο το γονίδιο <i>VdSteA</i> ως προς διάφορα φυσιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά....	105
3.10.1 Μυκηλιακή αύξηση σε τρυβλίο	106
3.10.2 Εκτίμηση παραγωγής κονιδίων και μικροσκληρωτίων σε τρυβλίο.....	115
3.10.3 Εκτίμηση βλαστικότητας κονιδίων.....	119
3.11 Δοκιμές παθογένειας σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας	121
3.11.1 Πρώτο πείραμα παθογένειας σε φυτά μελιτζάνας	121
3.11.2 Δεύτερο πείραμα παθογένειας σε φυτά μελιτζάνας.....	126
3.11.3 Πειράματα παθογένειας σε φυτά τομάτας	132
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα	140
5. Βιβλιογραφία	152
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	152
Ελληνική Βιβλιογραφία	166
Διαδύκτιο	166

Περίληψη

Η αδρομύκωση που προκαλείται από τον εδαφογενή, φυτοπαθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae* (Αδηλομύκητας) είναι μια δύσκολα ελεγχόμενη και καταστροφική ασθένεια για ένα μεγάλο εύρος ποωδών και ξυλωδών φυτών, επειδή προσβάλλει τους αγγειώδεις ιστούς των φυτών. Η αδυναμία επιτυχούς αντιμετώπισης της ασθένειας οφείλεται στην ικανότητα του μύκητα να επιβιώνει στο έδαφος για μεγάλες χρονικές περιόδους με ή χωρίς την παρουσία φυτού ξενιστή και στο γεγονός ότι αποικίζει τα αγγεία του ξύλου εντός του φυτού. Επιπλέον δεν υπάρχουν χημικά μέσα για τον έλεγχο της ασθένειας, ενώ το παθογόνο μπορεί να μεταδοθεί με αρκετούς τρόπους.

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης πραγματοποιήθηκε γονιδιωματική πρόβλεψη και φυλογενετική ανάλυση των συζευγμένων πρωτεϊνικών υποδοχέων με τις G πρωτεΐνες (GPCRs) στο μύκητα *Verticillium dahliae*. Στη συνέχεια έγινε επιλογή του γονιδίου ενός GPCR, που λειτουργεί ως φερομονικός υποδοχέας Ste2, και αφού πραγματοποιήθηκε η απενεργοποίηση του διερευνήθηκε ο ρόλος του στην παθογένεια και βιολογία του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*.

Οι συζευγμένοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς με τις G πρωτεΐνες ή GPCRs αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη οικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων και είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση εξωκυτταρικών σημάτων σε ενδοκυττάρια συστήματα απόκρισης σε ποικίλα ερεθίσματα όπως φως, πρωτόνια, Ca^{2+} , πτητικές ουσίες, φερομόνες, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, πρωτεΐνες, πεπτίδια, στεροειδή και λιπαρά οξέα.

Ως φερομόνες ορίζονται οι ουσίες που διευκολύνουν την επικοινωνία ή την αναπαραγωγή μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους και οι φυσιολογικές αντιδράσεις ή οι συμπεριφορές συχνά αλλάζουν όταν ένα άτομο αντιλαμβάνεται μια φερομόνη. Στους ασκομύκητες και τους βασιδιομύκητες, οι φερομόνες ανιχνεύονται από υποδοχείς φερομονών, οι οποίοι είναι GPCRs με 7 διαμεμβρανικές περιοχές. Αυτοί οι υποδοχείς ενεργοποιούνται με τη σύνδεση της φερομόνης και εκκινούν τα καθοδικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος ώστε να επιτευχθεί η σύζευξη. Στις δεκαετίες του 1970 και 1980 ανακαλύφθηκε μια ομάδα «στείρων» γονιδίων (Sterile genes, Ste), οι μεταλλάξεις των οποίων είχαν σαν αποτέλεσμα στείρους φαινοτύπους. Από αυτά τα STE γονίδια, τα *STE2* και *STE3* είναι υποδοχείς υπεύθυνοι για την αντίληψη των φερομονών.

Από τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης στο μύκητα *V. dahliae* προέκυψαν 15 γονίδια GPCR, τα οποία ομαδοποιήθηκαν με βάση το ερέθισμα το οποίο λαμβάνουν σε 7 κατηγορίες: Θεωρητικός υποδοχέας θρεπτικών στοιχείων (2 γονίδια GPCR), GPCRs περιέχουν περιοχή HlyIII (1 γονίδιο GPCR), Υποδοχέας άνθρακα/αζώτου (2 γονίδια GPCR), Υποδοχέας Ste2 (1 γονίδιο GPCR), Υποδοχέας Pth11 (5 γονίδια GPCR), Υποδοχέας cAMP (3 γονίδια GPCR) και Υποδοχέας μικροβιακής οψίνης (1 γονίδιο GPCR).

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε αλληλόμορφος αντικατάστασης για το γονίδιο *VdSteA*, ο οποίος ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα της φυλής 1 της τομάτας 70V και της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού 25V με τη βοήθεια του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*. Το γονίδιο *VdSteA* αντικαταστάθηκε από το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό γενετισίνη.

Στις δοκιμές παθογένειας που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά μελιτζάνας και τομάτας βρέθηκε ότι τα μεταλλαγμένα $\Delta VdSteA$ στελέχη του 70V προκαλούν τυπικά συμπτώματα σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας, ωστόσο η σοβαρότητα της ασθένειας ήταν στατιστικά μειωμένη σε σχέση με το άγριο στέλεχος σε φυτά μελιτζάνας, ενώ σε φυτά τομάτας τα μεταλλαγμένα $\Delta VdSteA$ στελέχη παρουσίασαν τάση για διαφοροποιημένη μείωση της δριμύτητας της ασθένειας. Στην περίπτωση των μεταλλαγμένων $\Delta VdSteA$ στελεχών του 25V παρατηρήθηκε στατιστικά μειωμένη δριμύτητα της ασθένειας σε σχέση με το άγριο στέλεχος τόσο σε φυτά μελιτζάνας όσο και σε φυτά τομάτας.

Τα μεταλλαγμένα $\Delta VdSteA$ του 70V και του 25V χαρακτηρίστηκαν επίσης ως προς τη μυκηλιακή αύξηση και το σχηματισμό μικροσκληρωτίων. Διαπιστώθηκε στατιστικά μειωμένη ανάπτυξη αποικίας στα $\Delta VdSteA$ του 70V έναντι της άγριας φυλής αλλά όχι στατιστική διαφορά ως προς το σχηματισμό μικροσκληρωτίων. Στην περίπτωση του 25V δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση με τα μεταλλαγμένα $\Delta VdSteA$ στελέχη ως προς την αύξηση της διαμέτρου της αποικίας, αλλά τα $\Delta VdSteA$ στελέχη παρουσίασαν μειωμένη ανάπτυξη μικροσκληρωτίων έναντι της άγριας φυλής. Συγκρίθηκε, επιπλέον, η κονιδιοποίηση και η παραγωγή μικροσκληρωτίων μεταξύ των άγριων φυλών 70V και 25V και των αντίστοιχων μεταλλαγμένων $\Delta VdSteA$ στελεχών τους. Διαπιστώθηκε αυξημένη κονιδιοποίηση αλλά και σχηματισμός μικροσκληρωτίων στα $\Delta VdSteA$ στελέχη έναντι της άγριας φυλής 70V, ενώ στην

περίπτωση του 25V δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφοροποίηση με τα *ΔVdSteA* στελέχη του ούτε όσον αφορά την κονιδιοποίηση ούτε όσον αφορά την παραγωγή μικροσκληρωτίων. Τέλος η μελέτη του ρυθμού βλαστικότητας των *ΔVdSteA* στελεχών και των άγριων φυλών 70V και 25V έδειξε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη και των δύο φυλών παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερα επίπεδα βλαστικότητας σε σχέση με τα άγρια στελέχη τους στα χρονικά διαστήματα στα οποία πραγματοποιήθηκε μέτρηση.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης σε συνδυασμό με αποτελέσματα άλλων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στην αλληλεπίδραση του μύκητα *V. dahliae* με τους ξενιστές του (Pantelides *et al.* 2010, Tzima *et al.* 2010, Tzima *et al.* 2011, Tzima *et al.* 2012) μπορούν να συμβάλουν στην κατανόηση των μονοπατιών που ρυθμίζουν σε μεταβολικό και κυτταρικό επίπεδο την παθογένεια και τη βιολογία του φυτοπαθογόνου αυτού μύκητα. Αυτή η κατανόηση μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό στρατηγικών αποτελεσματικής αντιμετώπισης ενός παθογόνου που δεν αντιμετωπίζεται με συμβατικά μέσα.

Abstract

The role of *VdSteA* G Protein coupled pheromone receptor in virulence and biology of the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*

I. A. STRINGLIS, E. J. PAPLOMATAS and D. I. TSITSIGIANNIS*

*Agricultural University of Athens, Department of Crop Science, Laboratory of Plant Pathology
Iera Odos 75, Athens 11855*

**Email : dimtsi@aua.gr*

V. dahliae is a soil-borne fungus causing wilt diseases in several hosts. The particular biology of this fungus complicates its treatment through conventional methods. Thus, the study of genes implicated in interactions of the fungus with its hosts is necessary to unravel the pathogenicity or virulence mechanisms and to discover putative novel methods to control the disease. G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) represent the largest family of transmembrane receptors consisting of seven transmembrane domains. GPCRs are critical factors in regulating morphogenesis, defense, mating, infection and virulence in various organisms. Protein sequences of characterized GPCRs of the well studied fungi *Aspergillus nidulans* and *Magnaporthe grisea* were used for alignment comparison with the genome of *V. dahliae*, in order to detect potential GPCRs. After performing phylogenetic analysis, the sequences of *V. dahliae* that showed high homology to the GPCRs of *A. nidulans* and *M. grisea* were selected in order to sort out the receptors by their molecular relativity. Seven different groups of GPCRs emerged from the phylogenetic analysis, varying in sensing different environmental signals. *Agrobacterium* mediated disruption of a pheromone GPCR (named as *VdSteA*) in two wild races, 70V and 25V of *V. dahliae* was performed in order to study the role of this receptor in virulence and morphology. 70V and 25V $\Delta VdSteA$ mutants displayed reduction in virulence in eggplants and tomato plants and 70V $\Delta VdSteA$ mutants exhibited increased microsclerotia formation and conidiation compared to their corresponding wild types. Both $\Delta VdSteA$ mutants exhibited higher conidial germination rates compared to the wild types.

1 Εισαγωγή

1.1 Ο εδαφογενής φυτοπαθογόνος μύκητας *Verticillium dahliae*

1.1.1 Η ασθένεια της βερτισιλλίωσης

Οι αδρομυκώσεις είναι καταστροφικές ασθένειες για ένα μεγάλο εύρος ποωδών και ξυλωδών φυτών, που προκαλούνται από εδαφογενείς κυρίως φυτοπαθογόνους μύκητες, με πιο καταστρεπτικούς αυτούς των γενών *Fusarium* και *Verticillium*, οι οποίοι προσβάλλουν τους αγγειώδεις ιστούς των φυτών (Παναγόπουλος, 2007). Οι βερτισιλλίώσεις, δηλαδή οι αδρομυκώσεις που προκαλούνται από το μύκητα *Verticillium* spp., παρατηρούνται παγκοσμίως, ωστόσο είναι πιο σημαντικές στις εύκρατες περιοχές. Ο μύκητας *Verticillium* spp. προσβάλλει περισσότερα από 200 είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων αρκετών ετησίων και δενδρωδών καλλιέργειών (Agrios, 2005). Ευπαθείς δενδρώδεις καλλιέργειες αποτελούν η ελιά, η φιστικιά τα πυρηνόκαρπα και το αμπέλι, ενώ στις ευπαθείς ετήσιες καλλιέργειες συγκαταλέγονται κηπευτικά φυτά όπως η τομάτα, η πατάτα, η μελιτζάνα, τα κολοκυνθοειδή και η φράουλα αλλά και βιομηχανικά φυτά όπως το βαμβάκι, ψυχανθή, όπως η μηδική και καλλωπιστικά φυτά, όπως η τριανταφυλλιά (Παναγόπουλος, 2007).

Τα συμπτώματα των βερτισιλλίωσεων είναι παρόμοια με αυτά των αδρομυκώσεων που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Fusarium* spp., ωστόσο σε αρκετούς ξενιστές και σε αρκετές περιοχές το *Verticillium* spp. επάγει μάρανση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από το *Fusarium* spp. Επιπλέον τα συμπτώματα της βερτισιλλίωσης αναπτύσσονται πιο αργά και συχνά εμφανίζονται ως ημιπληγίες μόνο στο κατώτερο ή στο εξωτερικό μέρος του φυτού ή σε μερικά από τα κλαδιά του (Agrios, 2005).

Σε κάποιους ξενιστές, οι βερτισιλλίώσεις αναπτύσσονται αρχικά στα σπορόφυτα, τα οποία νεκρώνονται σε μικρό χρονικό διάστημα από τη μόλυνση. Πιο κοινές είναι οι μεταγενέστερες μολύνσεις, που προκαλούν πτώση των ανωτέρων φύλλων και χλόρωση και νέκρωση των υπολοίπων φύλλων. Μεγαλύτερης ηλικίας φυτά που έχουν μολυνθεί με *Verticillium* spp. είναι συνήθως νάνα και οι αγγειώδεις ιστοί τους παρουσιάζουν χαρακτηριστικό καφέ μεταχρωματισμό. Όταν η

βερτισιλλίωση πρωτοεμφανίζεται σε έναν αγρό, είναι ήπια και τοπική. Στα χρόνια που ακολουθούν, καθώς το μόλυσμα επαυξάνεται και καθώς νέα, πιο μολυσματικά στελέχη του μύκητα πιθανόν να εμφανιστούν, οι προσβολές γίνονται σταδιακά πιο δριμυιές και εκτεταμένες μέχρι τελικά να διακοπεί η καλλιέργεια του ευπαθούς φυτού ή να αντικατασταθεί με πιο ανθεκτικές ποικιλίες (Agrios, 2005).

Δύο είδη του γένους *Verticillium*, τα *Verticillium dahliae* Kleb. και *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth., προκαλούν την ασθένεια βερτισιλλίωση στα πιο πολλά φυτά, και παράγουν κονίδια με μικρή διάρκεια ζωής. Ο *V. dahliae* παράγει επίσης μικροσκληρώτια, ενώ ο *V. albo-atrum* παράγει σκούρο και με παχύ τοίχωμα μυκήλιο, αλλά όχι μικροσκληρώτια (Agrios, 2005). Στην Ελλάδα έχει βρεθεί μέχρι τώρα ότι το είδος *V. dahliae* είναι η μόνη αιτία βερτισιλλιώσεων στις δενδρώδεις και πολυετείς καλλιέργειες και η βασικότερη αιτία στις ετήσιες καλλιέργειες (Παναγόπουλος, 2007).

1.1.2 Συμπτώματα βερτισιλλίωσης

Σε στελέχη ποωδών και δενδρωδών ξενιστών παρουσιάζεται αγγειακός μεταχρωματισμός (**Εικόνα 1**) ή ράβδωση που αποτελείται από σκουρόχρωμο, επιμήκη, νεκρωτικό ιστό. Αυτή η ράβδωση συνοδεύεται από εξωτερικά συμπτώματα όπως μαρανση, κιτρίνισμα και θάνατο των φύλλων, των κλάδων ή και ολόκληρων των φυτών. Μπορεί να ακολουθήσουν και χρόνια συμπτώματα όπως νανισμός, χλωρωτικό και παραμορφωμένο φύλλωμα (**Εικόνα 2**), ξήρανση φύλλων, αργή ανάπτυξη και νέκρωση οφθαλμών και κλάδων (Pataky, 1997).



Εικόνα 1: Ο χαρακτηριστικός καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου σε στέλεχος φυτού βαμβακιού.



Εικόνα 2: Χλώρωση, ξήρανση και νανισμός φυτών βαμβακιού που έχουν μολυνθεί από *V. dahliae* (δεξιά) σε σχέση με αμόλυντα φυτά (αριστερά). (από <http://www.cottoncnc.org.au>)

1.1.2.1 Δενδρώδεις ξενιστές

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα των αδρομυκώσεων, συνεπώς και της βερτισιλλίωσης, είναι η ημιπληγία, δηλαδή η μονόπλευρη εμφάνιση συμπτωμάτων πάνω στο δένδρο. Παρατηρούνται, δηλαδή, συμπτώματα στην πλευρά των προσβεβλημένων αγγείων και οργάνων (φύλλων και κλάδων) ενώ η άλλη πλευρά παραμένει ασυμπτωματική. Ωστόσο η προσβολή αργότερα επεκτείνεται και στην άλλη πλευρά (Παναγόπουλος, 2007).

Τα εξωτερικά συμπτώματα της βερτισιλλίωσης ποικίλουν και συχνά είναι δύσκολα στην αναγνώριση. Συνήθως το φύλλωμα σε έναν ή περισσότερους κλαδίσκους ενός κλάδου μαραίνεται ξαφνικά, ενώ μια γενική χλώρωση του φυλλώματος προηγείται μερικές φορές της μάρανσης. Άλλα εξωτερικά συμπτώματα είναι η μείωση της ανάπτυξης κλαδίσκων καθώς και η νέκρωση κλαδίσκων και κλάδων. Σε συγκεκριμένα δένδρα, όπως ο σφένδαμος, μπορούν να υπάρξουν επιμήκεις, νεκρωτικές περιοχές στο φλοιό των κλάδων ή του κορμού, λόγω της νέκρωσης του εσωτερικού φλοιού. Κάτω από το φλοιό σχηματίζονται υδαρείς περιοχές (Pataky, 1997).

Δένδρα ή θάμνοι που αναπτύσσουν ένα περιορισμένο ποσοστό μάρανσης σε ένα έτος ανάπτυξής τους μπορεί να εμφανίσουν επιπλέον μάρανση και νέκρωση το επόμενο έτος. Ακόμα μερικά είδη όπως για παράδειγμα τα πυρηνόκαρπα μπορεί να αναρρώσουν και να μην εμφανίσουν μάρανση τα επόμενα χρόνια ή μπορεί να μη

μαραθούν για αρκετά χρόνια, ωστόσο η επανεμφάνιση της ασθένειας είναι απρόβλεπτη (Pataky, 1997).

Το χαρακτηριστικό εσωτερικό σύμπτωμα της βερτισιλλίσωσης σε ξυλώδεις ξενιστές είναι ο καστανός ή καστανέρυθρος μεταχρωματισμός του ξυλώδους παρεγχύματος που εμφανίζεται στους κλαδίσκους, στους κλάδους και τον κορμό κατά τα μεταγενέστερα στάδια εξέλιξης της ασθένειας. Ο μεταχρωματισμός σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή εμφανίζεται σε μορφή ραβδώσεων ή τόξου ή κηλίδων (Παναγόπουλος, 2007). Στα πυρηνόκαρπα αρχικά η ασθένεια προκαλεί μαρασμό κλάδων και βραχιόνων και χλώρωση των φύλλων που εμφανίζονται στις αρχές καλοκαιριού. Αυτά τα συμπτώματα στη συνέχεια ακολουθούνται από καστανόχρωση, καρούλιασμα και πτώση των φύλλων και την αποξήρανση των κλάδων στο τέλος (Παναγόπουλος, 2007). Στα αγγεία του ενεργού ξύλου των προσβεβλημένων οργάνων του δένδρου παρατηρείται μεταχρωματισμός.

Στην ελιά η βερτισιλλίσωση εμφανίζεται με δύο μορφές συνδρόμων, το αποφυλλωτικό και το μη αποφυλλωτικό. Το αποφυλλωτικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από πρόωμη πτώση ασυμπτωματικών πράσινων φύλλων από μεμονωμένα κλαδιά και βραχίονες, τα οποία τελικά αποφυλλώνονται και νεκρώνονται. Αυτά τα συμπτώματα παρατηρούνται τέλη φθινοπώρου έως τέλη της άνοιξης, είτε σε ένα τμήμα του ελαιώνα είτε σε ολόκληρο τον ελαιώνα. Από την άλλη, το μη αποφυλλωτικό σύνδρομο εμφανίζει δύο μορφές συμπτωματολογίας, αυτή της αποπληξίας (ή σύνδρομο του απότομου μαρασμού) (**Εικόνα 3Α**) και αυτή της ημιπληγίας (ή σύνδρομο της βραδείας αποξήρανσης) (**Εικόνα 3Β**). Η αποπληξία εκδηλώνεται κυρίως στα τέλη του χειμώνα με αρχές της άνοιξης, παρουσιάζεται σε φυτώρια και σε νεαρά δένδρα και τα φύλλα καρουλιάζουν προς τα κάτω, παίρνοντας τεφρό ή καστανό χρώμα, χάνουν τη στιλπνότητά τους και τελικά αποξηραίνονται ενώ παραμένουν προσκολλημένα στα κλαδιά τους. Η ημιπληγία εκδηλώνεται την άνοιξη κατά την περίοδο της άνθησης και εξελίσσεται με αργό ρυθμό την περίοδο του καλοκαιριού. Στη δεύτερη περίπτωση η ασθένεια εκδηλώνεται σε μερικούς κλάδους του δένδρου και τα φύλλα γίνονται χλωρωτικά, ενώ τελικά αποξηραίνονται και πέφτουν. Παρατηρείται επίσης αποξήρανση των προσβεβλημένων κλάδων. Στην ελιά, συνήθως, δεν παρατηρείται μεταχρωματισμός του ενεργού ξύλου των προσβεβλημένων οργάνων (Παναγόπουλος 2007 , Jiménez-Díaz *et al.* 2012)

Στο αμπέλι η ασθένεια εμφανίζεται κατά το καλοκαίρι με απότομο μαρασμό και ξήρανση του φυλλώματος σε μερικές ή σε όλες τις κληματίδες, ενώ στη φιστικιά τα συμπτώματα είναι παρόμοια με αυτά των πυρηνοκάρπων αλλά δεν παρατηρείται συχνά μεταχρωματισμός του ξύλου (Παναγόπουλος, 2007).



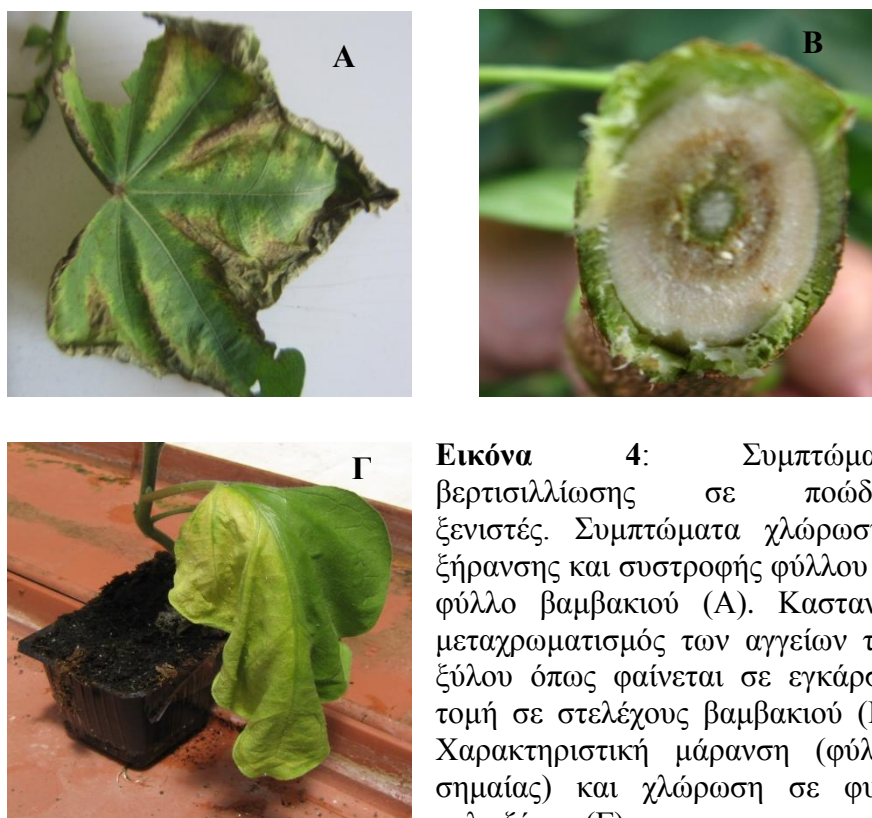
Εικόνα 3: Αποπληξία σε νεαρό δένδρο ελιάς (A) και ημιπληγία σε δένδρο μεγαλύτερης ηλικίας (B), ως αποτέλεσμα της βερτισιλώσης.

1.1.2.2 Ποώδεις ξενιστές

Σχεδόν όλα τα ποώδη φυτά προσβάλλονται με παρόμοιο τρόπο. Τα ασθενή φυτά μιας καλλιέργειας είναι στην αρχή μεμονωμένα ή σε ομάδες. Αρχικά, τα παλαιότερα και χαμηλότερα φύλλα συχνά εμφανίζουν χλώρωση μεταξύ των νευρώσεων και αργότερα μαραίνονται και αποκόπτονται, δηλαδή παρατηρείται το σύνδρομο της ημιπληγίας. Τα συμπτώματα σταδιακά μεταβαίνουν στα ανώτερα τμήματα του φυτού. Τα ασθενή φυτά είναι νάνα και αν μολυνθούν σε πολύ νεαρό στάδιο τότε νεκρώνονται πρώιμα. Η μάρανση (**Εικόνα 4**) κατά το μεσημέρι, που ακολουθείται από ανάρρωση το βράδυ είναι συνήθης για κάποιο χρονικό διάστημα (Pataky, 1997). Στην τομάτα, για παράδειγμα, τα εξωτερικά συμπτώματα μπορεί να μην εκδηλωθούν μέχρι τα φυτά να ασθενήσουν σε μεγάλο βαθμό ή να υποστούν υδατική καταπόνηση. Κίτρινες κηλίδες μπορούν να αναπτυχθούν σε παλαιότερα φύλλα και τα αγγεία εντός των χλωρωτικών περιοχών εμφανίζουν καφέ μεταχρωματισμό. Αργότερα στις κηλίδες αυτές αναπτύσσονται καφετί, νεκρωτικές

περιοχές. Μετά το κιτρίνισμα και τη μάρανση των κατώτερων φύλλων, που γίνεται αρχικά, τα ανώτερα φύλλα γίνονται ωχροπράσινα και το έλασμά τους κατσαρώνει προς τα πάνω (**Εικόνα 4**) (Pataky, 1997).

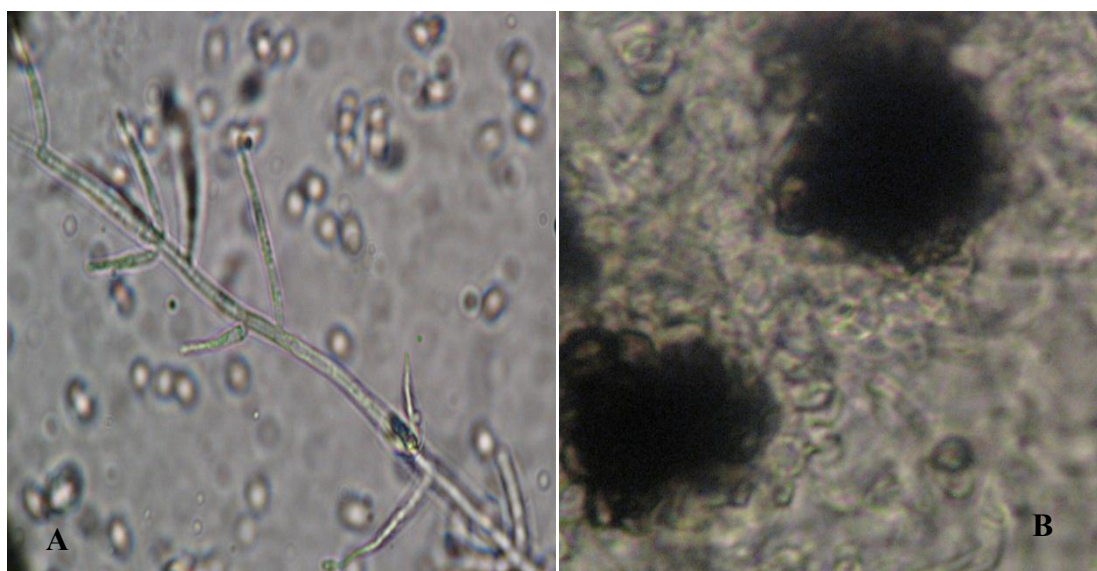
Τα συμπτώματα της βερτισιλλίωσης σε ποώδεις ξενιστές, όπως η τομάτα, εύκολα συγχέονται με τα συμπτώματα της φουζαρίωσης, της βακτηριακής μάρανσης και του βακτηριακού έλκους. Σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται απομόνωση και καλλιέργεια στο εργαστήριο για την ταυτοποίηση του παθογόνου αίτιου (Pataky, 1997). Οι νηματώδεις σε συνδυασμό με τη βερτισιλλίωση έχουν βρεθεί να έχουν συνεργιστική επίδραση στη μελιτζάνα, την πιπεριά, την τομάτα και την πατάτα. Σε μια καλλιέργεια, όταν ο μύκητας *Verticillium* δεν είναι ευρέως διαδεδομένος στην περιοχή φύτευσης των καλλιεργούμενων φυτών, τότε μόνο ένα περιστασιακό φυτό ή διάσπαρτα φυτά μπορεί να μαραθούν και να πεθάνουν, όταν όμως η ασθένεια είναι σοβαρή μαραίνονται και νεκρώνονται μεγάλοι αριθμοί φυτών πολύ γρήγορα (Pataky, 1997).



Εικόνα 4: Συμπτώματα βερτισιλλίωσης σε ποώδεις ξενιστές. Συμπτώματα χλώρωσης, ξήρανσης και συστροφής φύλλου σε φύλλο βαμβακιού (Α). Καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου όπως φαίνεται σε εγκάρσια τομή σε στελέχους βαμβακιού (Β). Χαρακτηριστική μάρανση (φύλλο σημαίας) και χλώρωση σε φυτό μελιτζάνας (Γ).

1.1.3 Βιολογικός κύκλος του παθογόνου

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* Kleb., ανήκει στους Αδηλομύκητες (Hyphomycetes). Έχει πολυκύτταρο μυκήλιο διαμέτρου 2-4,5 μm, που είναι αρχικά υαλώδες και στη συνέχεια γίνεται καστανό. Ο μύκητας σχηματίζει μικροσκληρώτια ποικίλου μεγέθους και σχήματος, διαμέτρου 15-100 μm. Σχηματίζει ελεύθερους, ανορθωμένους, υαλώδεις, πολυκύτταρους κονιδιοφόρους (**Εικόνα 5**) που έχουν χαρακτηριστική διακλάδωση κατά σπονδύλους (Παναγόπουλος, 2007). Στα εγκάρσια χωρίσματα του κονιδιοφόρου σχηματίζονται σπονδυλωτά 3-4 πλάγια, κοντά, μονοκύτταρα στηρίγματα (φιαλίδια) στις κορυφές των οποίων σχηματίζονται κονίδια (φιαλιδιοσπόρια). Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα υαλώδη, ωσειδή μέχρι ελλειψοειδή, διαστάσεων 2,5-8 μm x 1,4-3,2 μm, ενώ στην κορυφή κάθε στηρίγματος παράγονται διαδοχικά πολλά κονίδια, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μια κολλώδη ουσία με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρών κεφαλών κονιδίων. Η ελευθέρωση των κονιδίων γίνεται με το νερό (Παναγόπουλος, 2007). Επιπρόσθετα, η διακλάδωση των κονιδιοφόρων εμφανίζεται σε σπείρες σε διάφορα επίπεδα. Από αυτή την επονομαζόμενη “verticillate” τοποθέτηση των κονιδιοφόρων, των διακλαδώσεων και των φιαλιδίων έχει προέλθει το όνομα του γένους *Verticillium* (Fradin και Thomma, 2006).



Εικόνα 5: Ο κονιδιοφόρος του *V. dahliae*, σε μικροσκοπική παρατήρηση, όπου διακρίνεται η χαρακτηριστική του διακλάδωση στην οποία οφείλεται το όνομα του παθογόνου (A) Μικροσκοπική παρατήρηση μικροσκληρωτίων του μύκητα (B).

Ο μύκητας *V. dahliae* ευνοείται από μέσες θερμοκρασίες (21-27 °C) και γι' αυτό το λόγο επικρατεί και είναι σοβαρό παθογόνο σε θερμότερες περιοχές όπως είναι η Νότια Ευρώπη και η Μεσόγειος. Το παθογόνο έχει ευρύ κύκλο ξενιστών και δεν παρουσιάζει συνήθως παθογόνο εξειδίκευση, αφού τα μολύσματα από ένα φυτό προκαλούν ασθένεια και σε άλλες καλλιέργειες (όπως τα μολύσματα από βαμβάκι ή πατάτα που προκαλούν ασθένεια σε καρποφόρα δένδρα). Ωστόσο υπάρχουν απομονώσεις του μύκητα που παρουσιάζουν παθογόνο εξειδίκευση. Ο μύκητας *V. dahliae* προκαλεί μονοκυκλική ασθένεια, δηλαδή μόνο ένας κύκλος της ασθένειας και παραγωγής μολύσματος επισυμβαίνει σε μία καλλιεργητική περίοδο (Παναγόπουλος 2007, Schnathorst 1981, Fradin και Thomma 2006).

Ο κύκλος ζωής του μύκητα *V. dahliae* μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις : τη ληθαργική, την παρασιτική και τη σαπροφυτική. Κατά τη *ληθαργική φάση*, η βλάστηση των ληθαργικών μυκηλιακών κατασκευών (μικροσκληρώτια) εμποδίζεται λόγω της μυκόστασης ή της μικροβιόστασης, που ξεπερνιέται σε περίπτωση που υπάρχει περίσσεια αζώτου και άνθρακα στις ριζικές εκκρίσεις των φυτών που είναι ξενιστές της ασθένειας. Καθώς το κάθε αυτόνομο κύτταρο του μικροσκληρωτίου έχει τη δυνατότητα να βλαστήσει μία φορά, ένα μικροσκληρώτιο έχει τη δυνατότητα πολλαπλών βλαστήσεων, αυξάνοντας έτσι τη πιθανότητα επιτυχούς μόλυνσης. Οι υφές που προέρχονται από τα μικροσκληρώτια και αυξάνονται εκτός των ληθαργικών αυτών κατασκευών μπορούν να διασχίσουν μια περιορισμένη απόσταση, καθοδηγούμενες από την αναζήτηση θρεπτικών στοιχείων για να φτάσουν σε πιθανά φυτά ξενιστές, ενώ έχει υπολογιστεί ότι η σφαίρα επιρροής της ριζόσφαιρας στο *V. dahliae* πιθανώς να είναι 300 μm ή μικρότερη (Fradin και Thomma, 2006).

Τυπικά ο μύκητας εισέρχεται στο *παρασιτικό στάδιο* μολύνοντας ευπαθή φυτά, είτε μέσω του ακροριζίου είτε σε περιοχές διαμόρφωσης πλευρικών ριζών. Για να εισέλθει εντός των αγγειωδών ιστών (ενεργό ξύλο), ο μύκητας χρειάζεται να διασχίσει την ενδοδερμίδα, που δρα σαν φυσικό εμπόδιο έναντι της μόλυνσης. Ωστόσο, η προσπέλαση της ενδοδερμίδας μπορεί να επιτευχθεί όταν αυτή δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως (περιοχή ακροριζίου) ή όταν έχει καταστραφεί (από έντομα ή νηματώδεις) (Fradin και Thomma, 2006). Μετά την είσοδό του στις ρίζες ο μύκητας προχωρεί και εγκαθίσταται στα αγγεία του ξύλου. Μέσα στις αγγειώδεις δεσμίδες παρατηρείται το μυκήλιο και τα κονίδια του παθογόνου. Τα κονίδια μεταφέρονται με το ανοδικό ρεύμα των χυμών και παγιδεύονται σε κοιλότητες βοθρίων, όπου

βλαστάνουν και διατρυπούν γειτονικά όργανα ή ιστούς των αγγειωδών δεσμίδων, συνεχίζοντας έτσι τον αποικισμό. Αποτέλεσμα της αντίδρασης του ξενιστή στον αποικισμό του από το παράσιτο ή και της άμεσης δράσης του παθογόνου είναι η εμφάνιση του παθολογικού συνδρόμου της ασθένειας (Fradin και Thomma, 2006).

Η ανάπτυξη και η ένταση της ασθένειας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η επιβίωση του μολύσματος, η πυκνότητα του μολύσματος, η φυλή του παθογόνου, η ποικιλία του φυτού, το έδαφος, η θερμοκρασία του εδάφους και του αέρα, τα ζιζάνια, οι βροχοπτώσεις και οι αρδεύσεις, η συγκαλλιέργεια και οι καλλιεργητικές επεμβάσεις (Παναγόπουλος, 2007).

Κατά τη νέκρωση των ιστών ή τη γήρανση του φυτού ο μύκητας εισέρχεται στο *σαπροφυτικό στάδιο*. Εκτός από τους αγγειώδεις ιστούς, οι ρίζες, οι βλαστοί και τα φύλλα του φυτού μπορούν να αποικιστούν επίσης. Σε αυτό το στάδιο παράγονται μεγάλες ποσότητες μικροσκληρωτίων, τα οποία απελευθερώνονται στο έδαφος με την αποδόμηση της φυτικής ύλης, όπου μπορούν να επιβιώσουν για 10-15 χρόνια. Ο μύκητας επίσης επιβιώνει σαν μυκήλιο στα προσβεβλημένα υπολείμματα της καλλιέργειας (κυρίως των ετησίων καλλιεργειών), και στα διάφορα ζιζάνια-ξενιστές, αλλά και σε όργανα πολλαπλασιασμού των φυτών όπως βολβοί, σπόροι ή κόνδυλοι (Fradin και Thomma, 2006).

1.1.4 Μηχανισμοί παθογένεσης

Έχει προταθεί ότι είδη του γένους *Verticillium* spp. μπορούν να καταστείλουν για αρκετές ώρες τις αμυντικές αντιδράσεις των φυτών που ξεκινούν κοντά στα σημεία παγίδευσης, δίνοντας έτσι στο μύκητα το χρονικό περιθώριο για μία πλευρική διαφυγή σε παρακείμενα αγγεία (Gold και Robb 1995, Lee *et al.* 1992, Robb *et al.* 1989). Μέχρι τώρα υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες για το μοριακό έλεγχο και τις βασικές συνιστώσες στην παθογένεια των ειδών *Verticillium* spp. Ιστορικά, ωστόσο, η παραγωγή τοξινών ή ουσιών που μοιάζουν με επαγωγείς καθώς και ο ρόλος των υδρολυτικών ενζύμων έχουν κερδίσει μεγάλη προσοχή.

1.1.4.1 Υδρολυτικά ένζυμα

Τα είδη του γένους *Verticillium* spp. παράγουν ένζυμα που παίζουν ρόλο στην καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων (Bidochka *et al.* 1999, Cooper και Wood 1973, Dobinson *et al.* 1997, 2004). Τα πηκτινολυτικά ένζυμα έχουν μελετηθεί περισσότερο και θεωρείται ότι είναι κυρίαρχα στη διαδικασία της παθογένειας. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην παρατήρηση ότι οι μύκητες του γένους *Verticillium* spp. προκειμένου να εξαπλωθούν πρέπει να προσπελάσουν τις μεμβράνες που περιέχουν πηκτίνη και βρίσκονται μεταξύ των συστατικών των αγγείων και στο τέλος των ίδιων των αγγείων (Bishop and Cooper 1983b, Pegg *et al.* 1976). Επιπλέον, ορισμένες εναποθέσεις του ξενιστή που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειακή απόφραξη, είναι συχνά πλούσιες σε πηκτίνη και πρέπει να διαπεραστούν από το παθογόνο προκειμένου να επιτευχθεί συστηματική αποίκιση του ξενιστή (Ludwig, 1952). Αρκετά πηκτινολυτικά ένζυμα έχουν χαρακτηριστεί, περιλαμβανομένης της πολυγαλακτορουνάσης, της πηκτινικής λυάσης, και της πηκτινιστεράσης (Huang και Mahoney 1999, Mussel και Strause 1972, Wang και Keen 1970). Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα παραγωγής για αυτού του είδους τα ένζυμα σε διαφορετικά στελέχη *Verticillium* spp. σχετίζονται με το βαθμό μολυσματικότητας (Carder *et al.*, 1987).

Σε πρόσφατη έρευνα, του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α, των Tzima *et al.* (2011), μελετήθηκε ένα γονίδιο που εμπλέκεται στη δράση των κυτταρολυτικών ενζύμων, το *VdSNF1*. Πρόκειται για το γονίδιο μη ζύμωσης της σουκρόζης 1, το οποίο ρυθμίζει την καταβολική καταστολή και πραγματοποιήθηκε η απενεργοποίησή του στη φυλή 1 του μύκητα *V. dahliae*. Στα μεταλλάγματα που προέκυψαν δεν παρατηρήθηκε η επαγωγή κυτταρολυτικών ενζύμων σε υλικό επαγωγής και υλικό προσομοίωσης των αγγείων του ξύλου. Επιπλέον η ανάπτυξη των μεταλλαγμένων στελεχών μειώθηκε αισθητά, παρουσία πηκτινής ή γαλακτόζης ως πηγής άνθρακα, ενώ παρουσία γλυκόζης και ξυλόζης παρατηρήθηκε παρόμοια ανάπτυξη των μεταλλαγμένων στελεχών με τα αγρίου τύπου. Στα μεταλλαγμένα στελέχη μειώθηκε η παθογόνος ικανότητα κατά 87% περίπου, ενώ παρατηρήθηκαν και διαφορές ως προς την ικανότητα αποικισμού των αγγείων του ξύλου, με μειωμένη ικανότητα αποικισμού των μεταλλαγμένων έναντι του αγρίου στελέχους. Τέλος πειράματα ποσοτικοποίησης έδειξαν μειωμένο ενδοφυτικό αποικισμό των ριζών, του

βλαστού και των κοτυληδόνων από το μεταλλαγμένο στέλεχος έναντι του αγρίου στελέχους.

1.1.4.2 Τοξίνες και επαγωγείς

Αναφέρεται ότι τόσο ο μύκητας *V. albo-atrum*, όσο και ο μύκητας *V. dahliae*, παράγουν φυτοτοξίνες και άλλα μόρια που επάγουν το θάνατο του ξενιστή (Pegg, 1965). Σε πολλές έρευνες έχουν χρησιμοποιηθεί ακατέργαστα εκχυλίσματα καλλιεργειών του μύκητα που περιέχουν σύμπλοκα τοξινών των ειδών του γένους *Verticillium* spp. με στόχο την πρόκληση των μηχανισμών άμυνας του φυτού ή τη μελέτη της φυσιολογίας της άμυνας των φυτών. Ωστόσο, η ακριβής φύση των συστατικών των συμπλόκων αυτών συχνά δεν είναι ξεκάθαρη. Κατά γενική ομολογία, τα εκχυλίσματα αυτά έχει βρεθεί ότι περιέχουν μεγάλο μοριακού βάρους σύμπλοκα πρωτεΐνης-λιποπολυσακχαρίτη (PLP), γλυκοπρωτεΐνες ή/και λυτικά ένζυμα των κυτταρικών τοιχωμάτων. Πατάτα μολυσμένη από το μύκητα *V. dahliae* βρέθηκε να περιέχει μια γλυκοπεπτιδική τοξίνη που είναι συνδεδεμένη με την παραγωγή συμπτωμάτων σε ευπαθείς ξενιστές (Buchner *et al.*, 1982). Ένα χαμηλού μοριακού βάρους πολυπεπτιδικό κλάσμα του PLP βρέθηκε ότι επιφέρει διαφορετική τοξική δραστηριότητα σε φυτά, που σχετιζόταν με την εξειδίκευση παθογόνου-ξενιστή της απομόνωσης του μύκητα. Επιπρόσθετα, ανθεκτικά ή ανεκτικά φυτά βρέθηκαν να είναι μη ευαίσθητα στο τοξικό σύμπλοκο (Buchner *et al.*, 1989). Πειράματα ανοσοεντοπισμού έδειξαν συσσώρευση της τοξίνης στα κυτταρικά τοιχώματα αγγειακών ιστών σε στελέχη και κονδύλους ευπαθών φυτών (Nachmias *et al.*, 1985). Η τοξίνη επίσης δεν ανιχνεύτηκε σε μη παθογόνα στελέχη της ίδιας απομόνωσης (Buchner *et al.*, 1982). Όλα τα παραπάνω στηρίζουν την υπόθεση ότι το τοξικό σύμπλοκο είναι απαραίτητο για την πρόκληση παθογένειας (Buchner *et al.*, 1982).

Επιπλέον, στην περίπτωση μόλυνσης πατάτας με μύκητες του γένους *Verticillium* spp. έχει αποδοθεί το μειωμένο μέγεθος των ριζών λόγω της δραστηριότητας της τοξίνης (Buchner *et al.* 1989, Kotson και Rouse 1984). Ωστόσο ο νανισμός σαν σύμπτωμα μπορεί να επίσης να εξηγηθεί από τη μείωση της φωτοσύνθεσης που συμβαίνει κατά το κλείσιμο των στομάτων λόγω υδατικής καταπόνησης (Flexas και Medrano, 2002). Τέλος, η παρατήρηση ότι ανθεκτικά ή

ανεκτικά είδη φυτών συχνά δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στην δραστηριότητα της τοξίνης των ειδών του γένους *Verticillium* spp., οδήγησε στην υπόθεση ότι η έλλειψη ευαισθησίας στην τοξίνη θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση της ανθεκτικότητας ή ανεκτικότητας (Buchner *et al.* 1989, Gour και Dube 1985).

Σε πρόσφατες έρευνες, όπως αυτή των Pemberton και Salmond (2004) έχουν αναγνωριστεί πρωτεΐνες, σε διάφορους μύκητες, ωομύκητες και βακτήρια, που φαίνεται ότι ανήκουν σε μία τελευταία αναγνωριζόμενη οικογένεια μορίων επαγωγέων που ονομάζονται NLPs (Nep1-like proteins). Ένα NLP μέλος έχει απομονωθεί και από τον μύκητα *V. dahliae* και ονομάστηκε *VdNep* (Wang *et al.*, 2004a). Μέλη της οικογένειας NLP έχουν τη δυνατότητα επαγωγής κυτταρικού θανάτου, που μοιάζει με αντίδραση υπερευαισθησίας, σε διάφορα φυτικά είδη, προσδίνοντας τους έναν ρόλο επαγωγέα παρά τοξίνης (Pemberton και Salmond 2004, Wang *et al.* 2004a).

Σε εργασία των Tzima *et al.* (2010), μελετήθηκε ο ρόλος 2 γονιδίων της πρωτεϊνικής κινάσης Α (PKA) του κυκλικού cAMP, των *VdPKAC1* και *VdPKAC2*, στο μύκητα *V. dahliae*. Ομόλογα αυτών των γονιδίων αυτών έχουν μελετηθεί σε παθογόνα φυλλώματος. Μολονότι η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdPKAC1* δεν επηρέασε την ικανότητα του μύκητα να μολύνει την τομάτα και τη μελιτζάνα μέσω των ριζών, επηρέασε ωστόσο τη δριμύτητα της ασθένειας η οποία μειώθηκε αισθητά. Το αιθυλένιο που προέρχεται από τους μύκητες έχει θεωρηθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση συμπτωμάτων στις αδρομυκώσεις, γι' αυτό το λόγο μετρήθηκε η παραγωγή αιθυλενίου στα μεταλλαγμένα στελέχη. Τα στελέχη στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο *VdPKAC1*, παράγαγαν λιγότερο αιθυλένιο σε σχέση με το άγριο στέλεχος, καταδεικνύοντας ένα ρυθμιστικό ρόλο του PKA στη βιοσύνθεση του αιθυλενίου. Επιπλέον, η PKA επηρεάζει τη βλαστικότητα των σπορίων και την παραγωγή κωνιδίων και μικροσκληρωτίων, καθώς τα μεταλλαγμένα στελέχη είχαν ελαφρώς αυξημένη βλαστικότητα κωνιδίων, σημαντικά μειωμένη παραγωγή κωνιδίων και υψηλότερα επίπεδα παραγωγής μικροσκληρωτίων σε σχέση με τα αγρίου τύπου στελέχη.

1.1.5 Φυσιολογία της άμυνας του φυτού ενάντια στη μόλυνση από είδη του γένους *Verticillium*

Η ανοχή είναι ένας μηχανισμός άμυνας που συχνά έχει συνδεθεί με τις βερτισιλλιώσεις, καθώς δεν έχουν μέχρι σήμερα εντοπισθεί πλήρως ανθεκτικοί ξενιστές στη βερτισιλλίωση. Ενώ τα ευπαθή φυτά χαρακτηρίζονται από έντονο αποικισμό του μύκητα και έντονη συμπτωματολογία, τα ανθεκτικά χαρακτηρίζονται από μικρό αποικισμό και εμφανίζουν μειωμένη έκφραση της ασθένειας, ενώ τα ανεκτικά φυτά δείχνουν λίγα συμπτώματα παρά τον έντονο αποικισμό τους από το μύκητα. Ως ανοχή μπορεί να οριστεί η διαδικασία κατά την οποία το φυτό υπομένει την επίδραση μιας μόλυνσης από ένα παθογόνο, χωρίς όμως να επηρεάζεται σημαντικά η απόδοσή του (Agris, 2005). Ο ορισμός αυτός προφανώς δεν αποκλείει το γεγονός πως η στρεμματική απόδοση χωρίς το παθογόνο θα ήταν ακόμα καλύτερη και για το λόγο αυτό η ανοχή μπορεί να χαρακτηριστεί ως μερική αντοχή (Schafer, 1971). Με άλλα λόγια, η αντοχή ή ανθεκτικότητα μειώνει τους πληθυσμούς του παθογόνου ενώ η ανοχή μειώνει την απώλεια της φυσικής κατάστασης του ξενιστή χωρίς να επηρεάζει την ανάπτυξη του παθογόνου. Ωστόσο, η ανοχή είναι πολύ δύσκολο να καθοριστεί καθώς απαιτεί την ποσοτικοποίηση της ανάπτυξης του παθογόνου, η οποία πρέπει να συσχετιστεί με τα συμπτώματα, την παραγωγή ή/και την ποιότητα. Σε πολλές μελέτες έχει προταθεί ότι η ανοχή προκαλείται από την μη ευαισθησία του ξενιστή στα σύμπλοκα τοξινών των μυκήτων *Verticillium* (Buchner *et al.* 1982, 1989, Nachmias *et al.* 1985).

Πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί άμυνας σε μύκητες του γένους *Verticillium* spp., χρησιμοποιώντας φυτά βαμβακιού, τομάτας και λυκίσκου. Σε αυτές βρέθηκαν αρκετές διαφορετικές διαδικασίες είτε στην προαγγειακή φάση της μόλυνσης είτε στην αγγειακή, που φαίνεται να συνεισφέρουν στην αντοχή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πολλές μολύνσεις παραμένουν στην προαγγειακή φάση και ο μύκητας βρίσκεται στο φλοιό της ρίζας όπου αναπτύσσεται μεσοκυττάρια και ενδοκυττάρια, με τα φυτά να μολύνονται σε ένα περιορισμένο βαθμό (Huisman 1988, Talboys 1972).

Σε ένα ανθεκτικό φυτό ο μύκητας βρίσκεται στη ρίζα και στο λαιμό (stem base-βάση βλαστού), ως αποτέλεσμα των γρήγορων μηχανισμών άμυνας, ενώ αντίθετα σε ένα ευπαθές φυτό ο μύκητας διαφεύγει της άμυνας και αποικίζει όλο το

φυτό. Η γρήγορη εναπόθεση σουμπερίνης και άλλων συστατικών επίστρωσης στα αγγειακά κυτταρικά τοιχώματα, συμπεριλαμβανομένων και των χώρων παγίδευσης, δημιουργούν ένα φράγμα εναντίον της διείσδυσης του μύκητα και έτσι μπορεί να εμποδίσουν οριζόντια εξάπλωση (Robb *et al.*, 1989). Επιπλέον η δημιουργία τυλώσεων, διογκώσεις κυτταρικής μεμβράνης παρεγχυματικών κυττάρων των αγγειωδών δεσμίδων, καθώς και ο σχηματισμός θυλάκων λιγνίνης αποτελούν μηχανισμούς ανθεκτικότητας, που παρατηρούνται στις περιπτώσεις προσβολής από μύκητες που προκαλούν αδρομυκώσεις. Σε αυτή την περίπτωση οι ευπαθείς ποικιλίες φυτών καθυστερούν τη δημιουργία αυτών των σχηματισμών είτε τους σχηματίζουν σε περιορισμένο αριθμό (Τζάμος, 2007).

Τα μολυσμένα φυτά συσσωρεύουν σε ιστούς της ρίζας και του βλαστού δυνητικά αντιμικροβιακά συστατικά όπως πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεια (Pathogenesis Related - PR), όπως γλουκανάσες και χιτινάσες, φυτοαλεξίνες και φαινολικές ουσίες. Εν γένει, αυτές οι ουσίες παράγονται τόσο σε ανθεκτικά όσο και σε ευπαθή φυτά, αλλά ο ρυθμός και το επίπεδο παραγωγής τους είναι υψηλότερος στα ανθεκτικά φυτά (Bell 1969, Benhamou 1995; Cooper *et al.* 1996, Daayf *et al.* 1997, Gold και Robb 1995, Talboys 1972, Williams *et al.*, 2002).

Η ύπαρξη πολυγονικής ανθεκτικότητας σε διάφορα γένη *Verticillium* έχει εξακριβωθεί σε αρκετά φυτικά είδη, συμπεριλαμβανομένων της μηδικής, του βαμβακιού, της πατάτας και της φράουλας (Bolek *et al.* 2005, Simko *et al.* 2004b). Κυρίαρχα γονίδια ανθεκτικότητας έχουν βρεθεί σε βαμβάκι, ηλίανθο, πατάτα και τομάτα (Jansky *et al.* 2004, Lynch *et al.* 1997, Schaible *et al.* 1951). Στην τομάτα (*Lycopersicon esculentum*), ο γονιδιακός τύπος *Ve* παρέχει ανθεκτικότητα κατά των αδρομυκώσεων που προκαλούνται από μύκητες *Verticillium* spp. (Schaible *et al.*, 1951), έχει χρησιμοποιηθεί από βελτιωτές φυτών και έχει εισαχθεί στις περισσότερες καλλιεργούμενες ποικιλίες. Απομονώσεις από τα είδη *V. dahliae* και *V. albo-atrum* που αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας *Ve* έχουν καταταχθεί στη φυλή 1, ενώ όλες οι υπόλοιπες στη φυλή 2 (Pegg, 1974). Σε πειράματα όπου ο γονιδιακός τύπος *Ve1* της τομάτας μεταφέρθηκε στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, προέκυψαν διαγονιδιακά φυτά αραβίδωσης με ανθεκτικότητα στη φυλή 1 αλλά όχι στη φυλή 2 των μυκήτων *V. dahliae* και *V. albo atrum* και στο εξειδικευμένο ως προς τα σταυρανθή *Verticillium longisporum* (Fradin *et al.*, 2011).

1.1.6 Ο ρόλος των μορίων σημάτων στην άμυνα του φυτού

1.1.6.1 Σαλικυλικό οξύ

Τα ανθεκτικά φυτά χαρακτηρίζονται από μία γρήγορη αύξηση στην δραστηριότητα της PAL (Phenylalanine Ammonia Lyase). Το ένζυμο αυτό πέρα από τη σύνθεση λιγνίνης και σουμπερίνης, είναι ένα ρυθμιστικό ένζυμο-κλειδί στην σύνθεση του σαλικυλικού οξέος (SA) και στην εγκατάσταση της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής (Systemic Acquired Resistance - SAR) (Mauch-Mani και Slusarenko, 1996). Το SA, όπως το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο, είναι μία φυτική ορμόνη που δρα ως ένα μόριο σήμα στην βασική άμυνα του φυτού, όπως ακριβώς και στη μεσολαβούμενη άμυνα μέσω αλληλεπίδρασης «γόνου προς γόνου» (Thomma *et al.*, 2001).

1.1.6.2 Αιθυλένιο

Η παραγωγή αιθυλενίου αυξάνεται γρήγορα στην περίπτωση μόλυνσης από μύκητες του γένους *Verticillium* spp. (Pegg και Cronshaw, 1976). Αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος του αιθυλενίου στην ανθεκτικότητα των φυτών κατά των παθογόνων, η τρέχουσα άποψη είναι ότι το αιθυλένιο εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα των ξενιστών, αν και αυτό συμβαίνει σε συγκεκριμένες κλάσεις παθογόνων (Hoffman *et al.* 1999, Thomma *et al.*, 1999). Πέρα όμως από τη συνεισφορά του στην ανθεκτικότητα, φαίνεται ότι το αιθυλένιο ελέγχει την έκφραση συμπτωμάτων σε πολλές αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου (Hoffman *et al.* 1999, Lund *et al.* 1998, Thomma *et al.* 1999). Σε πρόσφατη εργασία των Pantelides *et al.* (2010), χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα φυτά σε γονίδια γνωστών μονοπατιών αμυντικών αντιδράσεων των φυτών για να διερευνηθεί ο ρόλος τους στην άμυνα έναντι του μύκητα *V. dahliae*. Τα φυτά *etr1-1* που στερούνταν το γονίδιο υποδοχής αιθυλενίου *ETR1* (ETHylene Receptor 1), εμφάνισαν αυξημένη ανθεκτικότητα, κάτι που δεν παρατηρήθηκε σε μεταλλαγμένα φυτά σε γονίδια του μονοπατιού του ιασμονικού οξέως, του σαλικυλικού οξέως αλλά και σε άλλα γονίδια του μονοπατιού του αιθυλενίου. Αυτά τα ευρήματα αποτελούν ένδειξη ότι το γονίδιο *ETR1* κατέχει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του φυτού έναντι αυτού του παθογόνου. Πειράματα ποσοτικοποίησης αποκάλυψαν ότι η μείωση της δριμύτητας στα συμπτώματα των φυτών *etr1-1* σχετιζόταν με τη σημαντική μείωση της αύξησης του παθογόνου στους

αγγειακούς ιστούς των φυτών, προτείνοντας έτσι ότι η ελαττωμένη πρόσληψη αιθυλενίου στα φυτά *etr1-1* έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα αντοχής στην ασθένεια.

1.1.6.3 Ιασμονικό οξύ

Ενώ το αιθυλένιο έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας στις αλληλεπιδράσεις μυκήτων του γένους *Verticillium* spp. με τους ξενιστές τους, το ιασμονικό οξύ (JA) φαίνεται να εμπλέκεται στην πραγματική αντοχή. Έχει βρεθεί σε πειράματα ότι τομάτες που στερούνταν JA και φυτά *Arabidopsis* όπου έλειπαν γονίδια βιοσύνθεσης του JA είναι πολύ πιο ευαίσθητα σε μολύνσεις μυκήτων *Verticillium* (Thaler *et al.* 2004, Tjamos *et al.* 2005).

1.1.7 Τρόποι αντιμετώπισης

Η βερτισιλλίωση είναι μία ασθένεια δύσκολα ελεγχόμενη. Το μεγάλο εύρος των ξενιστών του παθογόνου, η ικανότητα του μύκητα να επιβιώνει στο έδαφος για μεγάλες χρονικές περιόδους με ή χωρίς την παρουσία φυτού ξενιστή και ο αποικισμός των αγγείων του ξύλου εντός του φυτού περιορίζει κάθε προσπάθεια απάλειψης του παθογόνου. Επιπλέον η βερτισιλλίωση μεταδίδεται γενικότερα με τη χρήση μολυσμένου εξοπλισμού, με τη μεταφορά μολυσμένου χώματος, με την άρδευση και τη χρήση μολυσμένων σπόρων ή υλικών όπως ριζώματα, βολβοί ή κόνδυλοι (Pataky 1997, Fradin και Thomma 2006).

Για να είναι δυνατή η αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης θα πρέπει αρχικά να γίνει ορθή διάγνωση της ύπαρξης του παθογόνου, με καλλιέργεια του ασθενούς φυτικού ιστού στο εργαστήριο, καθώς παρόμοια συμπτώματα της βερτισιλλίωσης προκαλούνται και από άλλα αίτια. Αφού γίνει η αναγνώριση του *Verticillium* μπορούν να ληφθούν ορισμένα προληπτικά κυρίως μέτρα, που παρουσιάζονται παρακάτω, για τη μείωση της επίδρασης της ασθένειας (Pataky, 1997).

Όσον αφορά στη χημική καταπολέμηση της ασθένειας, αυτή δεν υπάρχει, γι' αυτό ο έλεγχος της ασθένειας πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και με καλλιεργητικές πρακτικές που στοχεύουν στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στο έδαφος. Η απομάκρυνση των φυτών που έχουν

διαγνωστεί να έχουν *Verticillium* αποτελεί ένα από τα πιο δραστικά μέτρα ελέγχου της ασθένειας. Για τον επιτυχή έλεγχο του μύκητα θα πρέπει να στοχευθούν τα σκληρώτια του μύκητα, αφού αποτελούν το αρχικό μόλυσμα (Fradin και Thomma, 2006). Η μείωση του μολύσματος μπορεί να γίνει ιδιαίτερα αποτελεσματικά με την ηλιοαπολύμανση, τη χρήση χημικών εδάφους και την εναλλαγή καλλιεργειών (Tjamos *et al.*, 1991).

Η ηλιοαπολύμανση των εδαφών (**Εικόνα 6**) αποτελεί μια μέθοδο που έχει δώσει ως τώρα ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση της βερτισιλλίωσης τόσο σε θερμοκηπιακές όσο και σε υπαίθριες καλλιέργειες. Πρόκειται για μια μέθοδο που αξιοποιεί την ηλιακή ακτινοβολία για την απολύμανση του εδάφους, αυξάνοντας τη θερμοκρασία του (με την κάλυψη της επιφανείας του με διαφανή φύλλα πολυαιθυλενίου) και η οποία δρα θεραπευτικά και σε ήδη εγκατεστημένους δενδρώνες (Tjamos *et al.*, 1991) .



Εικόνα 6: Εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης, κατά τους θερινούς μήνες, σε καλλιέργεια καρπουζιού σε περιοχή της Ηλείας.

Η απολύμανση των εδαφών με χημικά μέσα, όπως το βρωμιούχο μεθύλιο, ισχυρό απολυμαντικό εδάφους, έχει περιοριστεί καθώς η εφαρμογή χημικών σκευασμάτων στο έδαφος είναι επιβλαβής για το περιβάλλον και τον άνθρωπο

(Fradin και Thomma, 2006), ενώ η χρήση του βρωμιούχου μεθυλίου έχει ήδη απαγορευτεί στην Ευρώπη και σε άλλα μέρη του κόσμου (Termorshuizen *et al.*, 2006).

Η εναλλαγή καλλιεργειών ή η αμειψισπορά είναι μια μάλλον μη ελκυστική μέθοδος, καθώς τα μικροσκληρώτια του *V. dahliae* διατηρούνται στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα στο έδαφος και απαιτούν μακρές σε διάρκεια καλλιεργητικές εναλλαγές με μονοκοτυλήδονα, για να μειωθεί ο πληθυσμός των μικροσκληρωτίων κάτω από τα όρια που προκαλείται ασθένεια (Fradin και Thomma, 2006).

Άλλα καλλιεργητικά μέτρα που συνιστώνται είναι η αποφυγή της συγκαλλιέργειας ευπαθών φυτών (όπως π.χ. ελιάς με πατάτα), η άρδευση με συστήματα που δεν ευνοούν τη μεταφορά των μολυσμάτων, η καταστροφή των ζιζανίων, που αποτελούν ξενιστές και συμβάλλουν στην αύξηση του μολύσματος και η καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας. Προληπτικά, για την αποφυγή εμφάνισης της ασθένειας, συνιστάται η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού σε αμόλυντο αγρό, η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών ή υποκειμένων και η αποφυγή εγκατάστασης δενδροκομείων σε περιοχές όπου καλλιεργήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα ευπαθείς ξενιστές (Παναγόπουλος 2007, Τζάμος 2007).

Σαν εναλλακτική στις μέχρι πρόσφατα διαθέσιμες στρατηγικές ελέγχου της ασθένειας, αναπτύσσονται οι μέθοδοι βιοελέγχου κατά των ασθενειών που προκαλούν αδρομυκώσεις, κοινώς μέθοδοι βιολογικής αντιμετώπισης, με την χρήση στελεχών εδαφογενών βακτηρίων αλλά και μη παθογόνων στελεχών του μύκητα *Fusarium oxysporum* (Tjamos *et al.* 2005, Pantelides *et al.* 2008, Gizi *et al.* 2011).

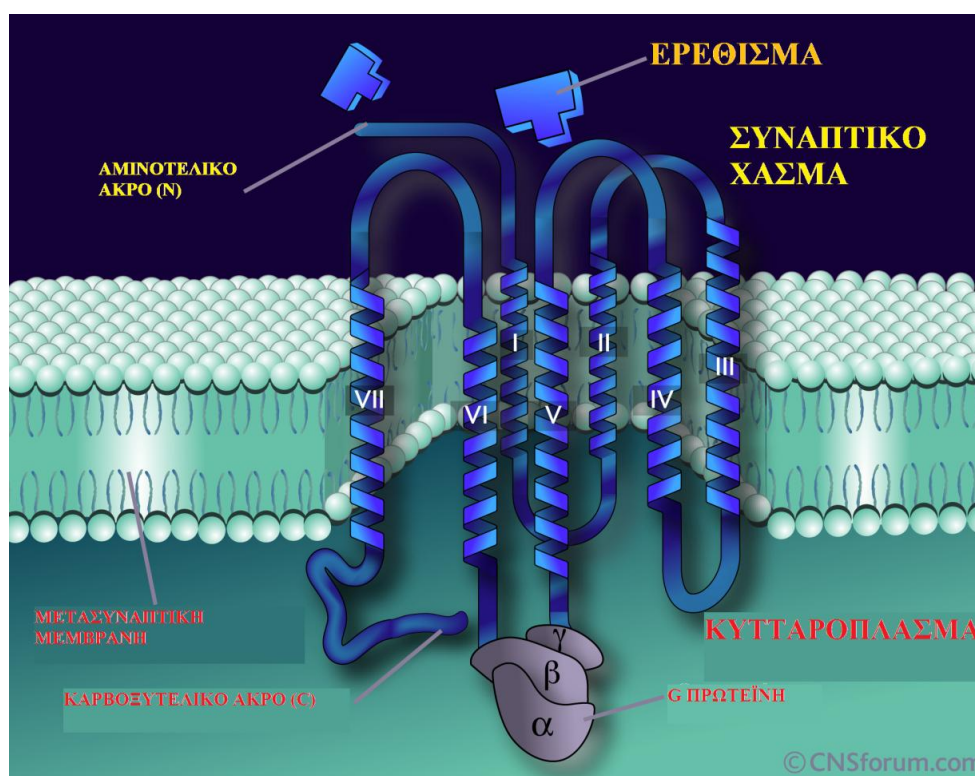
1.2. Οι συζευγμένοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς με τις G πρωτεΐνες (G protein coupled receptors – GPCRs)

1.2.1 Γενικά

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί είναι εκτεθειμένοι στο περιβάλλον, συνεπώς η αντίληψη των περιβαλλοντικών σημάτων και η εξασφάλιση της κατάλληλης κυτταρικής απόκρισης είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωσή τους. Οι

μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς για να αντιλαμβάνονται μια πληθώρα περιβαλλοντικών σημάτων και να προσαρμόζονται στις συνθήκες του περιβάλλοντος. Οι συζευγμένοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς με τις G πρωτεΐνες ή GPCRs αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη οικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων και είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση εξωκυτταρικών σημάτων σε ενδοκυττάρια συστήματα απόκρισης σε ποικίλα ερεθίσματα όπως φως, πρωτόνια, Ca^{2+} , πτητικές ουσίες, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, πρωτεΐνες, πεπτίδια, στεροειδή και λιπαρά οξέα (Maller, 2003).

Όλοι οι GPCRs διαθέτουν την ίδια θεμελιώδη αρχιτεκτονική (Εικόνα 7), αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές (transmembrane domains, TMs), και μοιράζονται κοινούς μηχανισμούς μεταγωγής σήματος, παρά το γεγονός ότι παρουσιάζουν σημαντική ποικιλότητα στην πρωτοταγή αλληλουχία τους και τη βιολογική λειτουργία τους. Οι ενεργοποιημένοι GPCRs ενεργοποιούν την ανταλλαγή του GTP με GDP στις πρωτεΐνες $G\alpha$, διαχωρίζοντας τις υπομονάδες $G\alpha$ and $G\beta\gamma$, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν βιολογικές αντιδράσεις συνδεδεμένες με πρωτεΐνες τελεστές που ρυθμίζουν την καθοδική μεταγωγή σημάτων.



Εικόνα 7: Δομή ενός υποδοχέα GPCR. Διακρίνονται οι 7 διαμεμβρανικές περιοχές (I, II, III, IV, V, VI και VII), η θέση στην οποία βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ο τρόπος που το αμινοτελικό άκρο (N) προσλαμβάνει το ερέθισμα και η σύνδεση του καρβοξυλικού άκρου (C) με τις υπομονάδες της G-πρωτεΐνης (α , β , γ). (Προσαρμογή από www.cnsforum.com)

1.2.2 Δομική Ταξινόμηση των GPCRs των μυκήτων

Ως GPCR αναφέρεται η οικογένεια υποδοχέων που περιέχει επτά διαμεμβρανικές περιοχές (TMs), οι οποίες εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αντιλαμβάνονται σήματα στο εξωτερικό του κυττάρου και ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος αλλά και κυτταρικές αποκρίσεις, όπου μεσολαβεί η G πρωτεΐνη (**Εικόνα 8**). Στους πιο μελετημένους GPCRs των θηλαστικών, αυτές οι εξωκυτταρικές περιοχές περιέχουν δύο υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης που σχηματίζουν ένα δισουλφιδικό δεσμό ο οποίος σταθεροποιεί τη δομή του υποδοχέα. Ενώ το βασικό χαρακτηριστικό των επτά διαμεμβρανικών ελίκων είναι συντηρημένο, ο σχετικός προσανατολισμός τους διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τη βακτηριακή ροδοψίνη, που αποτέλεσε το αρχικό δομικό μοντέλο των GPCR (Palczewski *et al.* 2000, Rasmussen *et al.* 2007).

Σύμφωνα με τους Attwood και Findlay (1994) και Kolakowski (1994), οι GPCRs ταξινομήθηκαν σε έξι κατηγορίες ανάλογα με την ομολογία των αλληλουχιών τους και τη λειτουργική τους ομοιότητα:

- Κατηγορία Α → Υπεροικογένεια υποδοχέων που μοιάζουν με τη ροδοψίνη (**Rhodopsin-like superfamily**)
- Κατηγορία Β → Οικογένεια υποδοχέων εκκριματίνης (**Secretin receptor family**)
- Κατηγορία Γ → Μεταβοτροπικοί υποδοχείς γλουταμίνης/φερομόνης (**Metabotropic glutamate/pheromone receptors**)
- Κατηγορία Δ → Φερομονικοί υποδοχείς σύζευξης μυκήτων (**Fungal mating pheromone receptors**)
- Κατηγορία Ε → Υποδοχείς κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) (**Cyclic AMP receptors**)
- Κατηγορία ΣΤ → Κατσαροί/Λείοι υποδοχείς (**Frizzled/Smoothed receptors**)
- Κατηγορία Ζ → Υποδοχείς γλυκόζης/σακχάρων (**glucose/sugar sensor**)

Την τελευταία δεκαετία έχει πραγματοποιηθεί σημαντική πρόοδος στην γονιδιωματική αλληλούχιση αρκετών οργανισμών με αποτέλεσμα να έχουν αναγνωρισθεί περισσότεροι GPCRs, ενώ έχουν προταθεί και αρκετά συστήματα

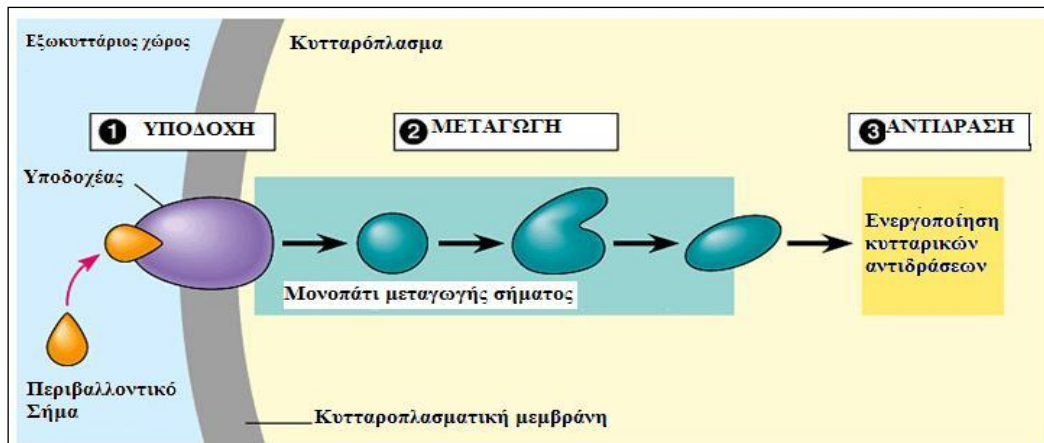
ταξινόμησης για τους μυκητολογικούς GPCRs. Σε μελέτη των Han *et al.* (2004a), οι GPCRs των μυκήτων χωρίζονται σε πέντε κατηγορίες, ανάλογα με την ομολογία των αλληλουχιών τους και το μόριο που αντιλαμβάνονται :

- Κατηγορία A → GPCRs παρόμοιοι με τους Ste2 υποδοχείς φερομόνης
- Κατηγορία B → GPCRs παρόμοιοι με τους Ste3 υποδοχείς φερομόνης
- Κατηγορία Γ → Ομόλογοι GPCRs με τον υποδοχέα γλυκόζης Gpr1
- Κατηγορία Δ → Πρωτεΐνες που μοιάζουν με τον αισθητήρα θρεπτικών ουσιών Stm1
- Κατηγορία E → Ομόλογοι GPCRs με τους υποδοχείς cAMP του αμοιβαδοειδούς *Dictyostelium discoideum*.

Αργότερα, αυτή η κατηγοριοποίηση επεκτάθηκε σε εννέα κατηγορίες για τους 16 συνολικά πιθανούς GPCRs στο μύκητα *Aspergillus nidulans* (Lafon *et al.* 2006, Yu 2006). Πρόσφατα, οι δέκα GPCRs στον μύκητα *Neurospora crassa* χωρίστηκαν σε 5 κατηγορίες:

- Υποδοχείς φερομόνης (Pre-1 και Pre-2),
- Πρωτεΐνες που μοιάζουν με υποδοχείς cAMP (Gpr-1, Gpr-2, και Gpr-3),
- Αισθητήρες άνθρακα (Gpr-4),
- Θεωρητικοί αισθητήρες αζώτου (Gpr-5 και Gpr-6),
- Μικροβιακές οψίνες (Nor-1 και Orp-1) (Borkovich *et al.*, 2004, Li *et al.* 2007b).

Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Magnaporthe grisea* και μια μεγάλη ομάδα μοναδικών πρωτεϊνών με 7 διαμεμβρανικές περιοχές που μοιάζουν με GPCR και περιέχουν μια συντηρημένη και εξειδικευμένη ως προς το μύκητα εξωκυτταρική περιοχή. Ο πιο γνωστός GPCR στο μύκητα αυτό, ο Pth11, έχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό απρεσσορίων και την παθογένεσή του (Kulkarni *et al.*, 2005).



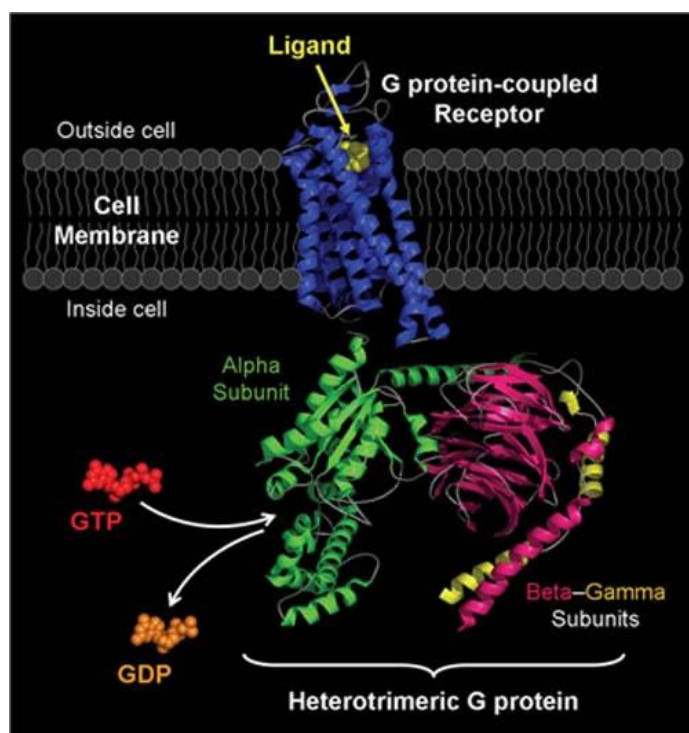
Εικόνα 8: Απλουστευμένη παρουσίαση του τρόπου με τον οποίο λειτουργεί ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος. Στην αρχή προσδένεται το ερέθισμα στον υποδοχέα, στη συνέχεια ενεργοποιούνται τα συστατικά μόρια του μονοπατιού μεταγωγής και στο τέλος ενεργοποιούνται ποικίλες κυτταρικές αντιδράσεις, ανάλογα με το μόριο πρόσδεσης (προσαρμογή από <http://www.bio.miami.edu>).

1.2.3 Οι GPCRs και η G πρωτεΐνη

1.2.3.1 Γενικά

Οι GPCRs οφείλουν το όνομά τους στις G πρωτεΐνες. Οι G πρωτεΐνες αποτελούνται από τρεις υπομονάδες, τις G_α , G_β και G_γ (**Εικόνα 9**). Στην G_α προσδένεται και υδρολύεται η τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP), ενώ οι υπόλοιπες δύο (G_β και G_γ) σχηματίζουν διμερές. Στην ανενεργή κατάσταση οι τρεις υπομονάδες είναι συνδεδεμένες τόσο μεταξύ τους όσο και με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα (GPCR). Ο υποδοχέας αυτός αποτελείται από επτά έλικες υδρόφοβων αμινοξέων που διαπερνούν την κυτταροπλασματική μεμβράνη με το καρβοξυλικό άκρο του να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και το αμινοτελικό άκρο του (N-terminal) εκτός του κυττάρου. Η α υπομονάδα μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα, ωστόσο η παρουσία του $\beta\gamma$ διμερούς ισχυροποιεί την πρόσδεση. Όταν προσδεθεί συμβατό σήμα επάγεται δομική αλλαγή στον υποδοχέα, η οποία επηρεάζει την διαμόρφωση της α υπομονάδας. Λόγω περιορισμένης συνάφειας το GDP απομακρύνεται από το ενεργό κέντρο της α υπομονάδας και στη θέση του προσδένεται GTP. Αυτό ενεργοποιεί την α υπομονάδα, με αποτέλεσμα η υπομονάδα α και το διμερές $\beta\gamma$ να αποσυνδέονται από τον υποδοχέα αλλά και μεταξύ τους και να μετατρέπονται σε ενεργά μόρια που μεταφέρουν το σήμα σε άλλα μονοπάτια. Η ενεργοποιημένη αυτή κατάσταση διαρκεί μέχρι το GTP να υδρολυθεί σε GDP με την

εσωτερική δράση GTPάσης που βρίσκεται στην α υπομονάδα. Όταν το GTP υδρολυθεί σε GDP η υπομονάδα α και το βγ διμερές επανασυνδέονται μεταξύ τους αλλά και με το διαμεμβρανικό υποδοχέα επιστρέφοντας στην αρχική ανενεργή μορφή. Συνεπώς παρόλο που το βγ διμερές δεν προσδένει GTP, η διάρκεια της ενεργοποίησής του εξαρτάται από την υδρόλυση του GTP από την α υπομονάδα (Neer 1995, Bötker 1998).



Εικόνα 9: Η θέση στην κυτταρική μεμβράνη του GPCR και ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται ο πρωτεϊνικός υποδοχέας και η G πρωτεΐνη. Διακρίνονται οι 3 υπομονάδες της G πρωτεΐνης (α,β,γ) καθώς και το σημείο ενεργοποίησης της α υπομονάδας με το GTP (προσαρμογή από www.mc.vanderbilt.edu).

1.2.3.2 Οι G πρωτεΐνες σε μυκηλιακούς μύκητες

Υπομονάδα Ga

Σε μυκηλιακούς μύκητες έχει βρεθεί ότι οι α υπομονάδες των G πρωτεϊνών εντάσσονται σε τρεις κατηγορίες. Οι Ga πρωτεΐνες των ομάδων I και III παρουσιάζουν ομοιότητα στη λειτουργία και την αλληλουχία με τις οικογένειες πρωτεϊνών Gai και Gas, αντίστοιχα που εντοπίζονται σε συστήματα θηλαστικών. Για την ομάδα II των Ga πρωτεϊνών σε μύκητες δεν υπάρχει αντίστοιχη οικογένεια σε συστήματα θηλαστικών, ώστε να υπάρχουν κάποιες ενδείξεις για την λειτουργία τους. Πιο συγκεκριμένα, πρωτεΐνες της ομάδας I των υπομονάδων Ga (αντίστοιχες των Gai στα θηλαστικά) φέρουν μια ομόλογη αλληλουχία (MGXXS) για μυριστικοποίηση στο αμινοτελικό άκρο και μία αλληλουχία (CAAX) για την ADP ριβοσυλίωση εξειδικευμένης τοξίνης (pertussis toxin) στο καρβοξυλικό άκρο. Όταν

ενεργοποιηθούν οι Gαί υπομονάδες προκαλούν μείωση των επιπέδων cAMP στο κύτταρο, επειδή δρουν παρεμποδιστικά στη λειτουργία της αδενυλικής κυκλάσης. Η ομάδα III των υπομονάδων Gα παρουσιάζει ομολογία με την οικογένεια των πρωτεϊνών Gas που εντοπίζεται στα θηλαστικά. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής είναι συντηρημένες, φέρουν επίσης αλληλουχία για μυριστικοποίηση στο αμινοτελικό άκρο τους και προκαλούν αύξηση των επιπέδων cAMP στο κύτταρο, διεγείροντας την λειτουργία της αδενυλικής κυκλάσης (Bölker 1998, Li *et al.* 2007). Η ομάδα II των υπομονάδων Gα (για την οποία δεν υπάρχει αντίστοιχη οικογένεια στα θηλαστικά) δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη όπως οι ομάδες I και III, ενώ σε λίγες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί κάποια βιολογική λειτουργία ή κάποιος χαρακτηριστικός φαινότυπος. Μια τέτοια περίπτωση είναι το γονίδιο *Gpa1* στη ζύμη *Schizosaccharomyces pombe*, που μεταδίδει το σήμα από την παρουσία φερομόνης, με ενεργοποίηση ενός MAPK μονοπατιού και τη συνεργιστική δράση της πρωτεΐνης Ras1 (Xu *et al.* 1994, Bölker 1998). Περιπτώσεις γονιδίων Gα της ομάδας II αποτελεί το γονίδιο *magC* στο μύκητα *M. grisea* και το γονίδιο *bcg-2* στο *Botrytis cinerea* (Li *et al.*, 2007). Στην περίπτωση των γονιδίων *Gpa1* στους μύκητες *S. cerevisiae* και *Candida albicans*, παρόλο που εμφανίζουν κάποια ομοιότητα στην αλληλουχία τους με τις πρωτεΐνες Gα της ομάδας I, δεν φέρουν τη συντηρημένη περιοχή ριβοξυλίωσης της τοξίνης pertussis. Γι' αυτό το λόγο εντάσσονται σε μία ενδιάμεση ομάδα I/II. Η ομάδα αυτή πιθανώς να αντανακλά μια ιδιαίτερη λειτουργία αυτών των G πρωτεϊνών, που δρουν σαν αρνητικοί ρυθμιστές του βγ διμερούς, το οποίο ενεργοποιεί τη μετάδοση σήματος κατά την ανταπόκριση της ζύμης στην παρουσία φερομόνης (Bölker, 1998). Τη λειτουργία των υπομονάδων Gα επηρεάζουν οι πρωτεΐνες RGS (regulators of G-protein signaling) που δρουν ως επαγωγείς της δράσης της GTPάσης, με αποτέλεσμα να περιορίζουν τη δράση των Gα υπομονάδων κατά την μετάδοση σήματος (Li *et al.*, 2007).

Το βγ διμερές των G πρωτεϊνών

Σε μυκηλιακούς μύκητες είναι πολύ συντηρημένες οι πρωτεΐνες Gβ (ποσοστό ομοιότητας 66–92%), ωστόσο παρουσιάζουν χαμηλότερη ομολογία με τις Gβ υπομονάδες των ζυμών *S. cerevisiae* and *S. pombe* (38% και 45% ομολογία, αντίστοιχα). Οι περισσότεροι μύκητες φέρουν μία πρωτεΐνη Gβ. Από έρευνα που έχει

πραγματοποιηθεί στους μύκητες *Cryphonectria parasitica* και *N. crassa* φαίνεται ότι η β υπομονάδα είναι απαραίτητη για τη δημιουργία συμπλόκου, καθώς και για την σταθερότητα των πρωτεϊνών Ga και Gγ (Li *et al.*, 2007). Σε αντίθεση με τα θηλαστικά οι περισσότεροι μύκητες που έχουν χαρακτηριστεί έχουν μία υπομονάδα Gγ, η οποία είναι ιδιαίτερα συντηρημένη (39– 92% ποσοστό ομοιότητας).

Πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι εκτός από τις κανονικές Gβ και Gγ υπομονάδες υπάρχουν στους μύκητες κι άλλες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μετάδοση σήματος από τους GPCRs. Η πρωτεΐνη RACK1 Gib2, που μοιάζει με την Gβ αλληλεπιδρά με την Ga πρωτεΐνη Gra1 (της ομάδας III), την Grg1 (Gγ), και την Grg2 (Gγ) για τη μετάδοση σήματος μέσω cAMP στο μύκητα *Cryptococcus neoformans*. Στη ζύμη *S. pombe*, η πρωτεΐνη Gnr1p που προσομοιάζει με την υπομονάδα Gβ αλληλεπιδρά με την Ga υπομονάδα Gra1p και λειτουργεί σαν αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού της φερομόνης. Αντίθετα δεν έχουν βρεθεί σε μυκηλιακούς μύκητες ομόλογες πρωτεΐνες με τις Gbp1p και Gpb2p, που προσομοιάζουν με τις Gβ, αλλά φέρουν μια kelch επαναλαμβανόμενη περιοχή, που αποτελεί μια πρωτεϊνική αλληλουχία 50 αμινοξέων, αντί για μια επαναλαμβανόμενη WD περιοχή και απαντώνται στη ζύμη *S. cerevisiae*. Επίσης, στο μονοπάτι μετάδοσης συμμετέχουν πρωτεΐνες φωσδουσίνης (phosducin) που επηρεάζουν τη λειτουργία του βγ διμερούς, σταθεροποιώντας το νεοσχηματιζόμενο πεπτίδιο Gβ, μέχρι να προσδεθεί στη γ υπομονάδα (Li *et al.*, 2007).

Σε πρόσφατη εργασία των Tzima *et al.* (2012) μελετήθηκε ο ρόλος της υπομονάδας β της G πρωτεΐνης στη φυλή 1 της τομάτας του μύκητα *V. dahliae*. Σε αυτή την εργασία, η διαγραφή του γονιδίου *VGB* είχε σαν αποτέλεσμα να μειωθεί στο μεταλλαγμένο στέλεχος 70ΔGb15 σημαντικά η παθογένεια, να αυξηθεί ο σχηματισμός μικροσκληρωτίων, η κονιδιοποίηση και η παραγωγή αιθυλενίου σε σχέση με το άγριο στέλεχος.

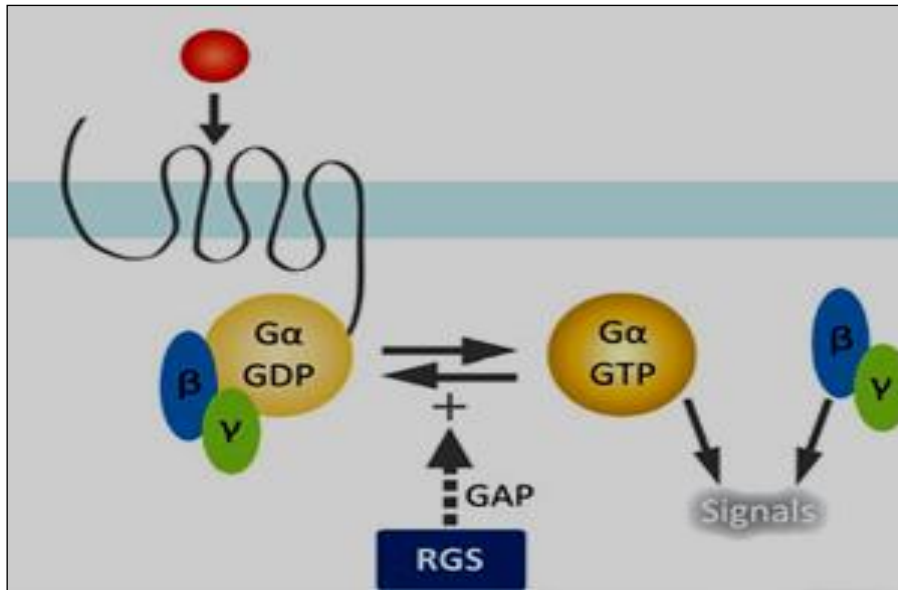
1.2.3.3 Ρύθμιση της μεταγωγής σήματος από τους GPCRs

Σε γενικές γραμμές, οι ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες ενεργοποιούνται από τους GPCRs οι οποίοι λειτουργούν σαν παράγοντες ανταλλαγής γουανίνης για τις G πρωτεΐνες. Η δομική αλλαγή που υφίσταται ο υποδοχέας μετά την πρόσδεση του συνδεδεμένου μορίου προάγει τη σύνδεση με την αντίστοιχη υπομονάδα Ga, ώστε να παρακινηθεί η ανταλλαγή του GDP με GTP και να γίνει ο διαχωρισμός της

υπομονάδας Gα από την υπομονάδα Gβγ. Στη συνέχεια, οι απελευθερωμένες Gα και Gβγ ενεργοποιούν τα καθοδικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος.

Εκτός από τους GPCRs, έχουν αναγνωριστεί στα θηλαστικά και στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans* οι πρωτεΐνες-ενεργοποιητές της μεταγωγής σημάτων μέσω της G πρωτεΐνης (AGS), ως μια ακόμα οικογένεια γονιδίων που ενεργοποιούν τη G πρωτεΐνη (Blumer *et al.*, 2007). Οι πρωτεΐνες AGS αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια βοηθητικών πρωτεϊνών που επηρεάζουν τη διάδοση των σημάτων, διευκολύνουν την επικοινωνία μεταξύ διαφορετικού τύπου μεταγωγικών μονοπατιών και παρέχουν το πεδίο για μια πληθώρα λειτουργιών τόσο του ετεροτριμερούς Gαβγ, όσο και των υπομονάδων Gα και Gβγ ξεχωριστά. Οι AGS ανταγωνίζονται με τους GPCRs για την ενεργοποίηση της G πρωτεΐνης και δεν έχει αναφερθεί η ύπαρξη τους στους μύκητες ακόμα.

Οι πρωτεΐνες RGS ενεργοποιούν τη δράσης της GTPάσης για την υπομονάδα Gα (**Εικόνα 10**). Λειτουργούν πρωταρχικά ως πρωτεΐνες επιτάχυνσης της δράσης της GTPάσης, με σκοπό να αυξηθούν οι ρυθμοί υδρόλυσης του GTP που είναι συνδεδεμένο με τις υπομονάδες Gα με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της υπομονάδας Gα. Μετά την υδρόλυση του GTP, η υπομονάδα Gα επιστρέφει στην ανενεργή κατάστασή της, όπου είναι συνδεδεμένη με GDP, και επανενώνεται με το σύμπλοκο Gβγ σχηματίζοντας ένα ετεροτριμερές, και οδηγώντας σε κατιούσα ρύθμιση της μεταγωγής σήματος από την G πρωτεΐνη (Dohlman *et al.* 1996, Tesmer *et al.* 1997, Dohlman και Thorner 2001, Siderovski και Willard, 2005). Γι' αυτό το λόγο, οι πρωτεΐνες RGS είναι σημαντικοί αρνητικοί ρυθμιστές του μεταγωγικού μονοπατιού των GPCRs.



Εικόνα 10: Ο τρόπος δράσης της πρωτεΐνης RGS. Επιταχύνει τη δράση της GTPασης με αποτέλεσμα η υπομονάδα Ga να ανταλλάξει το GTP με GDP, να επανέλθει στην αρχική ανενεργή της κατάσταση και να σχηματιστεί το ετεροτριμερές της G πρωτεΐνης (Επισύναψη από <http://www.bellbrooklabs.com>).

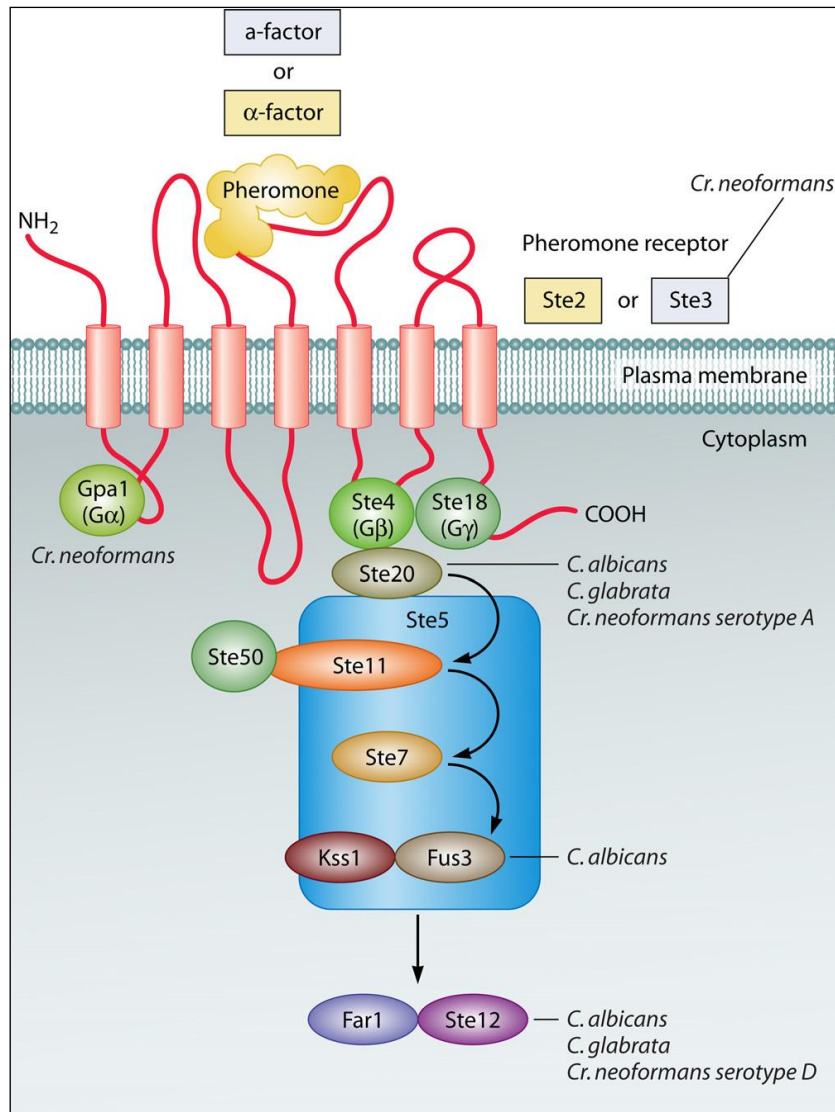
1.2.4 Οι GPCRs και ο ρόλος τους στις λειτουργίες των μυκήτων

1.2.4.1 GPCRs και αντίληψη Φερομόνης

Ως φερομόνες ορίζονται οι ουσίες που διευκολύνουν την επικοινωνία μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους (Karlson και Luscher, 1959). Οι φυσιολογικές αντιδράσεις ή η συμπεριφορά συχνά αλλάζουν όταν ένα άτομο αντιλαμβάνεται μια φερομόνη. Σε πολλούς οργανισμούς εκφράζονται συχνά φερομόνες διαφορετικού είδους όπως σεξουαλικές φερομόνες, διατροφικές φερομόνες και φερομόνες συναγερμού. Οι μύκητες, καθώς και τα σπονδυλωτά και τα έντομα, αξιοποιούν τις φερομόνες για να προσελκύσουν το ταίρι τους. Οι εξειδικευμένες φερομόνες συζευκτικού τύπου εκκρίνονται από κύτταρα ενός συζευκτικού τύπου και τις αντιλαμβάνονται κύτταρα του αντίθετου συζευκτικού τύπου. Στους ασκομύκητες και τους βασιδιομύκητες, οι φερομόνες ανιχνεύονται από υποδοχείς φερομονών, οι οποίοι είναι GPCRs με 7 διαμεμβρανικές περιοχές. Αυτοί οι υποδοχείς ενεργοποιούνται με τη σύνδεση της φερομόνης και ενεργοποιούν τα καθοδικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος ώστε να επιτευχθεί η σύζευξη.

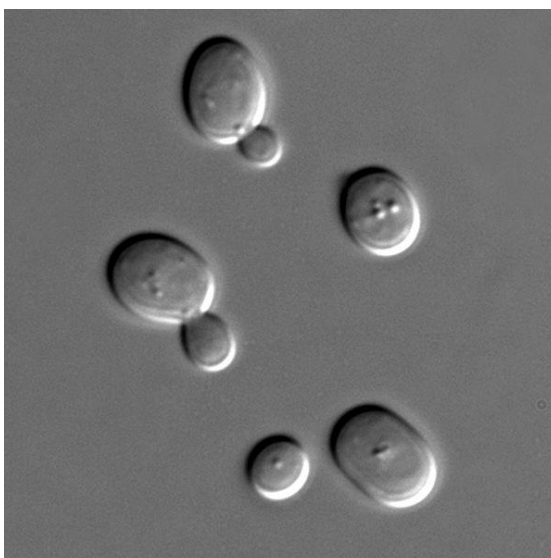
Ο γενετικός έλεγχος της σύζευξης έχει μελετηθεί για περισσότερες από 3 δεκαετίες στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, μέσω της οποίας έχει αυξηθεί η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ελέγχεται η σύζευξη σε μοριακό επίπεδο. Στις δεκαετίες του 1970 και 1980 ανακαλύφθηκε μια ομάδα «στείων» γονιδίων (Sterile genes, *Ste*), οι μεταλλάξεις των οποίων είχαν σαν αποτέλεσμα στείρους φαινοτύπους (Mackay και Manney 1974, Hartwell 1980). Γονίδια όπως το *STE2* ήταν γνωστά, πριν την κλωνοποίηση και την αλληλούχιση των γονιδίων *Ste*, για τη διαμεσολάβηση τους στις φερομονικές αντιδράσεις που χαρακτηρίζονται από εξειδίκευση κυτταρικού τύπου (Hartwell, 1980). Λίγα χρόνια αργότερα, έγινε διαδοχική κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός των γονιδίων *STE2*, *STE3*, *STE4*, *STE6*, *STE7*, *STE11*, *STE12* και *STE18*, με αποτέλεσμα να αποκαλυφθούν όλα τα συστατικά που συνιστούν το μονοπάτι μεταγωγής σημάτων φερομόνης (Burkholder και Hartwell 1985, Chaleff και Tatchell 1985, Hagen *et al.* 1986, Kuchler *et al.* 1989, Whiteway *et al.* 1989).

Από αυτά τα *STE* γονίδια, τα *STE2* και *STE3* είναι υποδοχείς υπεύθυνοι για την αντίληψη των φερομονών (**Εικόνα 11**). Τα δύο αυτά γονίδια αν και δεν σχετίζονται οι αλληλουχίες τους, έχουν την τυπική δομή των επτά διαμεμβρανικών περιοχών, που πιστοποιεί ότι είναι GPCR. Το γονίδιο *Ste2* εκφράζεται σε γονίδια τύπου α και αντιλαμβάνεται τον φερομονικό παράγοντα σύζευξης α , ενώ το γονίδιο *Ste3* εκφράζεται σε κύτταρα τύπου α και αντιλαμβάνεται τον φερομονικό παράγοντα σύζευξης α . Οι παράγοντες α και α είναι και οι δύο πεπτιδιακές φερομόνες. Τα γονίδια *Ste2* και *Ste3* αλλάζουν τη διαμόρφωσή τους από μια ανενεργή κατάσταση R σε μια ενεργή κατάσταση R! αφού επιτευχθεί η σύνδεση με τη φερομόνη. Παρά το γεγονός ότι δεν σχετίζονται οι αλληλουχίες των γονιδίων *Ste2* και *Ste3*, όταν μεταβαίνουν στην ενεργή κατάστασή τους ενεργοποιούν την ίδια υπομονάδα του $G\alpha$, την $G\alpha 1$, για να διευκολύνουν την ανταλλαγή του GDP με GTP και το διαχωρισμό του $G\alpha$ από το σύμπλοκο $G\beta\gamma$ (*Ste4/Ste18*). Σε πολλά συστήματα τόσο η απελευθερωμένη υπομονάδα $G\alpha$ όσο και η $G\beta\gamma$ αλληλεπιδρούν με καθοδικούς τελεστές που εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Ωστόσο, στο μεταγωγικό μονοπάτι σημάτων της ζύμης *S. cerevisiae* είναι το σύμπλοκο $G\beta\gamma$ που λειτουργεί ως η κινητήριος δύναμη για την επαγωγή των αντιδράσεων στο καθοδικό μονοπάτι μεταγωγής φερομόνης. Στα κύτταρα που στερούνται κάποια από τις υπομονάδες του συμπλόκου $G\beta\gamma$ παρεμποδίζονται όλες οι αντιδράσεις σύζευξης (Whiteway *et al.*, 1989).



Εικόνα 11: Το φερομονικό μονοπάτι μεταγωγής σήματος στους μύκητες. Στη φωτογραφία παρουσιάζεται το μονοπάτι της ζύμης *S. cerevisiae*. Μολονότι παρατηρούνται αλλαγές στο μονοπάτι σε άλλους μύκητες, το βασικό μονοπάτι της MAP κινάσης είναι συντηρημένο. Επισημαίνονται τα γονίδια των οποίων η διαγραφή επηρέασε την μολυσματικότητα διαφόρων μυκήτων (Butler, 2010).

Όταν τα κύτταρα αντιλαμβάνονται τις φερομόνες και ενεργοποιούν το συζευκτικό μονοπάτι τότε αλλάζει το μεταγραφικό τους προφίλ, διακόπτεται ο κυτταρικός τους κύκλος και παρουσιάζουν μια χημειοτακτική απόκριση (shmooing) προς το συζευκτικό τους σύντροφο (**Εικόνα 12**). Όλα τα συστατικά του μονοπατιού μεταγωγής φερομόνης, από το ανοδικό σύμπλοκο G πρωτεΐνης – υποδοχέα μέχρι τον καθοδικό μεταγραφικό παράγοντα, απαιτούνται για τις συζευκτικές αποκρίσεις (Herskowitz, 1995).



Εικόνα 12: Το χαρακτηριστικό shmooing όπως παρατηρείται σε κύτταρα ζύμης. Το ένα κύτταρο σχηματίζει ένα εξόγκωμα με σκοπό να προσεγγίσει το κύτταρο με το οποίο θα συζευχθεί (προσαρμογή από www.devbio.biology.gatech.edu).

Η συμβολή των GPCRs στην αντίληψη των φερομονών έχει μελετηθεί αρκετά στους μύκητες και πολλοί φερομονικοί υποδοχείς έχουν χαρακτηριστεί σε ασκομύκητες και βασιδιομύκητες, καθώς η αλληλουχία και οι δομή τους είναι συντηρημένη (**Πίνακας 1**). Στο γονιδίωμα των ασκομυκήτων έχουν αναγνωριστεί τόσο ο υποδοχέας φερομόνης Ste2 όσο και ο Ste3 και σε πολλούς από αυτούς τους υποδοχείς έχει αποδειχθεί πειραματικά ο ρόλος του στη σύζευξη ή την αντίληψη της φερομόνης (Kitamura & Shimoda, 1991, Tanaka et al. 1993, Kim & Borkovich 2004, 2006; Yi *et al.* 2008). Μεταλλάξεις στο γονίδιο *Ste2* στη ζύμη *S. cerevisiae* οδήγησαν σε ανωμαλίες σε επαγόμενες λειτουργίες του φερομονικού μονοπατιού, όπως σε διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης και της κυτταρικής συνένωσης. (Hartwell, 1980). Στη ζύμη *Schizosaccharomyces pombe* το γονίδιο *MAM2*, παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο *Ste2* του *Saccharomyces cerevisiae*. Διαγραφή του γονιδίου *mam2* έδειξε ότι δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση και την ανάπτυξη της ζύμης (Kitamura & Shimoda, 1991).

Στο μύκητα *U. maydis* που αποτελεί έναν ετεροβασιδιομύκητα, οι φερομόνες καθώς και οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς τους είναι πολύ σημαντικοί για τη σύζευξη

και την κυτταρική σύντηξη, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό των μολυσματικών δικαυρών (Casseltan & Olesnicky, 1998).

Στον μύκητα *Cryptococcus neoformans*, παθογόνο αίτιο της κρυπτοκοκκίασης, απομονώθηκε και μελετήθηκε ο ρόλος του γονιδίου του θεωρητικού υποδοχέα φερομόνης *CPRa* στη σύζευξη και το σχηματισμό υφών. Στα στελέχη στα οποία είχε διαγραφεί ο φερομονικός υποδοχέας μειώθηκε η ικανότητα σύζευξης, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε μείωση της ικανότητας σχηματισμού υφών. Βρέθηκε επίσης ότι ο υποδοχέας *CPRa* παίζει σημαντικό ρόλο και στη παθογένεια, καθώς τα κύτταρα που στερούνταν τον υποδοχέα *CPRa* προκαλούσαν μικρότερους θύλακες στον εγκέφαλο ποντικών σε σχέση με κύτταρα αγρίου τύπου, ενώ τα ποντίκια που είχαν μολυνθεί με μεταλλαγμένα στελέχη στο γονίδιο αυτού του υποδοχέα ζούσαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με αυτά που είχαν μολυνθεί με αγρίου τύπου κύτταρα. Φαίνεται λοιπόν ότι ο υποδοχέας αυτός δεν είναι σημαντικός μόνο για τη σύζευξη αλλά και για την επιβίωση και ανάπτυξη του παθογόνου στους ιστούς του ξενιστή (Chang *et al.* 2003, Chung *et al.* 2002).

Στο ανθρωποπαθογόνο οργανισμό *C. albicans* σε «αδιαφανή» κύτταρα (opaque cells) τύπου α που στερούνταν τον υποδοχέα *Ste2* μειώθηκε η συχνότητα σύζευξης με αγρίου τύπου κύτταρα α κατά 1000 φορές σε σχέση με τα στελέχη προέλευσής των μεταλλαγμένων. Αντιθέτως, η διαγραφή του *Ste2* από αδιαφανή κύτταρα α δεν επηρέασε σημαντικά την ικανότητα σύζευξης. Στο *C. albicans* είναι πολύ σημαντικός ο ρόλος της απόκρισης των «αδιαφανών» κυττάρων α στον παράγοντα α καθώς επάγεται η έκφραση 7 γονιδίων που σχετίζονται με τη μολυσματικότητα του παθογόνου. Συνεπώς η διαγραφή του *Ste2* επηρεάζει την επαγωγή αυτών των γονιδίων. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι το μονοπάτι παθογένειας και το φερομονικό μονοπάτι στο *C. albicans* μοιράζονται ορισμένα γονίδια απαραίτητα για την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων (Bennett και Johnson, 2003).

Μύκητας	Υποδοχέας τύπου Ste2	Υποδοχέας τύπου Ste3
Ασκομύκητες		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ste2</i>	<i>Ste3</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Mam2</i>	<i>Map3</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Ste2</i>	<i>Ste3</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Ste2</i>	<i>Ste3</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>GprA</i>	<i>GprB</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>PreB</i>	<i>PreA</i>
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Pre2</i>	<i>Pre1</i>
<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Ste2</i>	<i>Ste3</i>
<i>Sordaria macrospora</i>	<i>Pre2</i>	<i>Pre1</i>
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Pcpre2</i>	<i>Pcpre1</i>
Βασιδιομύκητες		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	–	<i>Ste3a, Ste3a</i>
<i>Ustilago maydis</i>	–	<i>Pra1, Pra2</i>
<i>Ustilago hordei</i>	–	<i>Uhpra1 Uhpra2</i>
<i>Coprinellus disseminatus</i>	–	<i>Cdste3.1, Cdste3.2 Cdste3.3</i>
<i>Coprinopsis cinerea</i>	–	<i>Rcb1, Rcb2, Rcb3, CC1G07395</i>

Πίνακας 1: Στην πρώτη στήλη του πίνακα αναγράφονται τα γένη των μυκήτων στα οποία έχουν αναγνωρισθεί και μελετηθεί φερομονικοί υποδοχείς, στη δεύτερη στήλη τα ομόλογα γονίδια του κάθε μύκητα ως προς τον φερομονικό υποδοχέα Ste2 και στην τρίτη στήλη τα ομόλογα γονίδια του κάθε μύκητα ως προς τον φερομονικό υποδοχέα Ste3. Παρατηρείται ότι στους βασιδιομύκητες δεν έχουν αναγνωρισθεί φερομονικοί υποδοχείς Ste2 (Προσαρμογή από Xue *et al.*, 2006).

Στο μύκητα *A. nidulans*, αναγνωρίστηκαν τα γονίδια *GprA* και *GprB* ως φερομονικοί υποδοχείς με βάση την ομολογία της αλληλουχίας τους με τα γονίδια *Ste2* και *Ste3*. Διαγραφή των *GprA* ή *GprB* ελαττώνει τη σεξουαλική αναπαραγωγή, οδηγεί στην παραγωγή μικρών κλειστοθηκίων που φέρουν ένα περιορισμένο αριθμό ασκοσπορίων, ενώ διπλά μεταλλάγματα των *GprA* και *GprB* στερούνται της δυνατότητας σχηματισμού καρποφοριών υπό ομοθαλικές συνθήκες (Seo *et al.*, 2004). Από την άλλη πλευρά, είναι ενδιαφέρον ότι οι δύο φερομονικοί υποδοχείς

έχουν βρεθεί να εκφράζονται δομικά ακόμα και σε είδη στα οποία δεν έχει διαπιστωθεί σεξουαλικός κύκλος. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν ο μύκητας *Candida glabrata* και ο μύκητας *Aspergillus fumigatus*, που αποτελούν παθογόνα του ανθρώπου. Μέχρι πρόσφατα οι μύκητες αυτοί θεωρούνταν ασεξουαλικά είδη στα οποία η γενετική θέση MAT, η οποία καθορίζει το συζευκτικό τύπο και ρυθμίζει τη σεξουαλική συμπεριφορά κυττάρων διαφορετικού συζευκτικού τύπου, έχει αναγνωριστεί με δύο ιδιομορφές, που αποτελεί χαρακτηριστικό των ετεροθαλλικών μυκήτων (Strikantha *et al.* 2003, Paoletti *et al.* 2005, Butler 2007).

Στους βασιδιομύκητες, η πλειοψηφία των συστατικών του μονοπατιού απόκρισης στη φερομόνη είναι συντηρημένα, αλλά το σύστημα αναγνώρισης των υποδοχέων φερομόνης/φερομόνης είναι τροποποιημένο σε σχέση με το παράδειγμα της ζύμης *S. cerevisiae*. Σε αντίθεση με τη ζύμη *S. cerevisiae*, όπου οι δύο φερομονικοί υποδοχείς (Ste2 και Ste3) δεν σχετίζονται ως προς την ομολογία τους και αναγνωρίζουν τον πεπτιδικό φερομονικό παράγοντα α και τον τροποποιημένο λιπιδιακό πεπτιδικό φερομονικό παράγοντα α, στους βασιδιομύκητες οι φερομόνες είναι όλες λιπιδιακά τροποποιημένες και τις αντιλαμβάνονται μόνο φερομονικοί υποδοχείς Ste3 (Kronstad και Staben 1997, Casselton 2002).

Μολονότι, παρατηρούνται συχνά αλληλουχικές ομοιότητες μεταξύ διαφορετικών υποδοχέων και φερομονών, οι υποδοχείς είναι ακόμα υψηλά εξειδικευμένοι και τυπικά δεν αναγνωρίζουν φερομόνες του ίδιου συζευκτικού τύπου για να αποφεύγεται η αυτοενεργοποίηση. Επιπλέον, τα γονίδια των υποδοχέων φερομόνης/φερομόνης ρυθμίζονται διαφορετικά στους ασκομύκητες και τους βασιδιομύκητες. Στους ασκομύκητες, η έκφραση αυτών των γονιδίων βρίσκεται υπό τον έλεγχο της γενετικής θέσης MAT, ενώ σε πολλούς βασιδιομύκητες αυτά τα γονίδια έχουν ενσωματωθεί ως συστατικά της γενετικής θέσης MAT, είτε σε τετραπολικά είτε σε διπολικά συστήματα σύζευξης (Xue *et al.*, 2008).

Συμπερασματικά, συστατικά αυτού του μονοπατιού έχουν αναγνωρισθεί σε είδη που στερούνται φανερού σεξουαλικού κύκλου (Calcagno *et al.* 2003, Paoletti *et al.* 2005), γεγονός που προτείνει την περαιτέρω έρευνα σε πολλούς μύκητες με άγνωστο σεξουαλικό κύκλο. Επιπλέον αυτό το μονοπάτι έχει συνδεθεί με τη μορφογένεση και την παθογένεια σε πολλά μυκητολογικά παθογόνα, όπως ο φυτοπαθογόνος μύκητας *M. grisea* και τα παθογόνα του ανθρώπου *C. albicans* και *C.*

glabrata. Στο μύκητα *M. grisea* η διαγραφή του γονιδίου *PMK1*, είχε σαν αποτέλεσμα τα μεταλλαγμένα στελέχη να μη σχηματίζουν απρεσσόρια και να αποτυγχάνουν να μεγαλώσουν με επεκτατικό τρόπο στα φυτά ρυζιού. Επιπλέον, δεν επηρεάστηκε η εγγενής και αγενής αναπαραγωγή του παθογόνου σε υλικό ανάπτυξης. Στις ζύμες *C. albicans* και *S. cerevisiae* η μετάβαση από τη φάση της ζύμης στη φάση της υφής ελέγχεται από 2 ρυθμιστικές πρωτεΐνες, τις *Ste12p* and *Phd1p*. Μεταλλαγμένα στελέχη με μονή απενεργοποίηση των γονιδίων *Ste12p* και *Phd1p* είναι μερικώς ελαττωματικά ως προς τη μυκηλιακή ανάπτυξή τους, ενώ το μεταλλαγμένο στέλεχος διπλής διαγραφής των 2 αυτών γονιδίων έχασε εντελώς τη δυνατότητα μυκηλιακής ανάπτυξης. Το αντίστοιχο διπλό μετάλλαγμα στη ζύμη *C. albicans* (όπου το γονίδιο *Cph1p* είναι το ομόλογο του *Ste12p* και το γονίδιο *Efg1p* είναι το ομόλογο του *Phd1p*) είχε επίσης ελαττωματική μυκηλιακή ανάπτυξη, ήταν ανίκανο να σχηματίσει υφές, ενώ ήταν και μη μολυσματικό σε πειράματα με ποντικούς (Xu και Hamer 1996, Lo *et al.* 1997, Calcagno *et al.* 2005). Στο μύκητα *Fusarium graminearum*, παθογόνο αίτιο της ξήρανσης των στάχων στο σιτάρι, η απενεργοποίηση του γονιδίου *GPMK1*, που είναι ορθόλογο γονίδιο του γονιδίου *FUS3*, έχει σαν αποτέλεσμα στείριότητα και απώλεια παθογόνου ικανότητας (Jenczmionka *et al.*, 2003). Οι Zhao *et al.* (2007) πρότειναν ότι το συζευκτικό μονοπάτι της MAP κινάσης είναι πιο σημαντικό στην παθογένεια των φυτοπαθογόνων σε σχέση με τα παθογόνα του ανθρώπου, καθώς οι φυτοπαθογόνοι μύκητες πρέπει να ξεπεράσουν φυσικά εμπόδια του ξενιστή, όπως τα ισχυρά κυτταρικά τοιχώματα. Στα παθογόνα του ανθρώπου είναι πιο σημαντικά ως προς την παθογένεια άλλα μονοπάτια της MAP κινάσης, όπως το μονοπάτι της ωσμωτικής ρύθμισης.

1.2.4.2 Οι GPCRs και η αντίληψη θρεπτικών συστατικών

Η αντίληψη των θρεπτικών συστατικών είναι βασική για όλα τα είδη κυττάρων, γι' αυτό το λόγο οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει πολλαπλά συστήματα αντίληψης για να διαισθάνονται εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά θρεπτικά σήματα και να προσαρμόζονται στο περιβάλλον αλλά και στη μεταβολική τους κατάσταση. Οι GPCRs αποτελούν ένα σημαντικό σύστημα αντίληψης το οποίο έχει βρεθεί σε αρκετά είδη μυκήτων να παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίληψη των θρεπτικών

στοιχείων (Xue *et al.* 1998, 2006, Lorenz *et al.* 2000, Bardwell 2004, Han *et al.* 2004a, Lemaire *et al.* 2004, Miwa *et al.* 2004, Maidan *et al.* 2005a, b).

1.2.4.3 Οι GPCRs ως υποδοχείς σακχάρων

Η γλυκόζη συνιστά πρωταρχική πηγή ενέργειας και άνθρακα για τα περισσότερα κύτταρα και οι οργανισμοί έχουν εξελίξει σύνθετους μηχανισμούς για να την αντιλαμβάνονται. Οι μύκητες και ιδιαίτερα οι ζύμες έχουν αναπτύξει πολλαπλούς τρόπους διαίσθησης και μεταφοράς ζυμούμενων σακχάρων όπως η γλυκόζη και οι GPCRs παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίληψη αυτών των σακχάρων. Στη ζύμη *S. cerevisiae*, έχει αναγνωριστεί ένας υποδοχέας αντίληψης σακχάρων, ο Gpr1 (Xue *et al.*, 1998). Ο υποδοχέας αυτός αντιλαμβάνεται τη γλυκόζη και τη σουκρόζη και ενεργοποιεί την Gra2, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση για να μετατρέψει το ATP σε cAMP και με αυτό τον τρόπο ενεργοποιείται τελικά η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) (Xue *et al.* 1998, Kraakman *et al.* 1999, Lorenz *et al.* 2000, Lemaire *et al.* 2004).

Έχει βρεθεί ότι η φωσφορυλίωση της γλυκόζης απαιτείται για την ταχεία ενεργοποίηση της σύνθεσης cAMP από τη γλυκόζη. Η 6-φωσφορική γλυκόζη που αποτελεί προϊόν της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης μπορεί να προκαλέσει μια μικρή αύξηση του cAMP, απουσία του υποδοχέα Gpr1, ενώ η αλληλεπίδραση του Gpr1 με τη γλυκόζη από μόνη της δεν μπορεί να προκαλέσει ταχεία αύξηση της αδενυλικής κυκλάσης, υποδηλώνοντας έτσι ότι η 6-φωσφορική γλυκόζη μπορεί να λειτουργεί ως δευτερογενής αγγελιοφόρος στην ενεργοποίηση του cAMP.

Η πρωτεϊνική αλληλουχία του Gpr1 είναι συντηρημένη σε ασκομύκητες, μεταξύ των οποίων στις ζύμες και τους νηματοειδείς μύκητες, ωστόσο λειτουργικές αναλύσεις σε αυτές τις ομόλογες αλληλουχίες έδειξαν ότι δεν έχουν το ρόλο των αισθητήρων άνθρακα. Ο υποδοχέας Gpr1 της ανθρωποπαθογόνου ζύμης *C. albicans* είναι ομόλογος με τον Gpr1 από τη ζύμη *S. cerevisiae*. Αποτελέσματα πειραμάτων επίστασης έδειξαν ότι ο Gpr1 δρα ανοδικά σε σχέση με τη Gra2 της υπομονάδας Ga και αλληλεπιδρά άμεσα με την Gra2 στο *C. albicans*, όπως και στο *S. cerevisiae* (Miwa *et al.* 2004, Maidan *et al.* 2005a, b). Ωστόσο παραμένει ακόμα ασαφής ο ρόλος της Gpr1 στην αντίληψη σακχάρων στη ζύμη *C. albicans*.

Ομόλογες αλληλουχίες του Gpr1 έχουν αναφερθεί σε αρκετούς μυκηλιακούς μύκητες όπως στον *N. crassa* (Li και Borkovich, 2006), τον *A. fumigatus* (Gehrke *et al.*, 2010) και στον *M. grisea* (Kulkarni *et al.*, 2005). Ο *Gpr4* είναι το ομόλογο γονίδιο του *Gpr1* στον μύκητα *N. crassa* και αναλύσεις επίστασης έδειξαν ότι το Gpr-4 λειτουργεί ανοδικά του *Gna-1* της υπομονάδας Ga. Η γλυκόζη επάγει την παραγωγή cAMP στον *N. crassa*, με παρόμοιο τρόπο με αυτό στη ζύμη *S. cerevisiae*, και σε μεταλλάγματα του *Gpr4* παρεμποδίζεται αυτή η διέγερση, γεγονός που υποδεικνύει ότι το *Gpr-4* διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αντίληψη της γλυκόζης και στην ενεργοποίηση του μονοπατιού του cAMP (Li και Borkovich, 2006). Στο μύκητα *A. fumigatus*, η απενεργοποίηση του ομόλογου γονιδίου *GprD* είχε σαν αποτέλεσμα δραστική μείωση της ανάπτυξης, περιορισμό της εξάπλωσης των υφών, καθυστέρηση στη βλάστηση των κονιδίων ενώ στις υφές παρατηρήθηκε αύξηση στην τάση για διακλάδωση. Επιπλέον, τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσίασαν εξασθένιση της μολυσματικότητας τους σε πειράματα σε ποντικούς (Gehrke *et al.*, 2010). Επίσης, και στο μύκητα *M. grisea* έχει αναγνωριστεί και το ομόλογο γονίδιο του *Gpr1*, αλλά δεν έχει ακόμα αναλυθεί ο λειτουργικός του ρόλος (Kulkarni *et al.*, 2005), ενώ στους βασιδιομύκητες δεν έχει αναφερθεί κανένα ομόλογο γονίδιο του υποδοχέα γλυκόζης *Gpr1*.

1.2.4.4 Οι GPCRs και η αντίληψη αμινοξέων

Οι GPCRs αποτελούν κοινούς αισθητήρες αμινοξέων στους ανθρώπους. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η κατηγορία 3 των GPCRs που αντιλαμβάνονται τα αμινοξέα L, δηλαδή το ισομερές των αμινοξέων που απαντάται στις πρωτεΐνες κατά τη μετάφραση που επιτελείται στο ριβόσωμα, και ο εξωκυτταρικός υποδοχέας αντίληψης ασβεστίου CaR, ο οποίος αποκρίνεται σε έντονες διακυμάνσεις στη συγκέντρωση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης Ca²⁺ καθώς και σε αρωματικές, αλειφατικές και πολικές αλυσίδες αμινοξέων (Conigrave και Hampson, 2006). Τα αμινοξέα αποτελούν σημαντικά θρεπτικά στοιχεία και για τους μύκητες και ανιχνεύονται από εξειδικευμένα συστήματα αντίληψης, τα οποία περιλαμβάνουν την περμεάση αμινοξέων Gap1 και το SPS σύστημα Ssy1–Ptr3–Ssy5 (Bahn *et al.*, 2007). Επιπλέον στους μύκητες έχει αναφερθεί ότι και οι GPCRs αντιλαμβάνονται τα αμινοξέα.

Στην ανθρωποπαθογόνο ζύμη *C. albicans*, η μεθειονίνη είναι σημαντική για τη μετάβαση από το στάδιο της ζύμης στο στάδιο της υφής σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα και έχει βρεθεί ότι ο Gpr1 αντιλαμβάνεται τη μεθειονίνη και ελέγχει το σχηματισμό υφών παρουσία πηγών άνθρακα όπως η γλυκόζη (Maidan *et al.*, 2005a, b).

Στον μύκητα *C. neoformans* ο υποδοχέας Gpr4 βρέθηκε επίσης να αντιλαμβάνεται αμινοξέα και να ενεργοποιεί το μονοπάτι του cAMP (Xue *et al.*, 2006) και η πρωτεΐνη Gra1 της υπομονάδας Ga ελέγχει τη μεταγωγή του cAMP και παίζει σημαντικό ρόλο στη σύζευξη και την παραγωγή παραγόντων παθογένειας, όπως σχηματισμό προστατευτικής κάψουλας γύρω από τα κύτταρα και παραγωγή μελανίνης. Η Gpr4 είναι μια πρωτεΐνη με 7 διαμεμβρανικές περιοχές που μοιράζεται δομική ομοιότητα με τον αισθητήρα γλυκόζης Gpr1 της ζύμης *S. cerevisiae*. Και οι δύο είναι μεγέθους άνω των 800 αμινοξέων με επιμήκεις κυτταροπλασματικούς βρόχους και μακριές καρβοξυτελικές ουρές. Πειράματα μεταλλαξογένεσης αποκάλυψαν ότι η Gpr4 είναι σημαντική για την παραγωγή θυλάκων και για τη σύζευξη, δύο χαρακτηριστικά που ελέγχονται από το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Gra1-cAMP. Γενετικές και βιοχημικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η Gpr4 ενεργοποιεί την Gra1 και εμπλέκεται στη ρύθμιση του μονοπατιού μεταγωγής cAMP. Επιπλέον ανοδικοί υποδοχείς εκτός από τον Gpr4 μπορεί να ελέγχουν τη λειτουργία του Gra1, επειδή η Gpr4 δεν είναι σημαντική για την παραγωγή μελανίνης και την παθογένεια.

1.2.4.5 Ο υποδοχέας αζώτου Stm1

Στη ζύμη *S. pombe* και υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου απομονώθηκε μια πρωτεΐνη με 7 διαμεμβρανικές περιοχές, η Stm1, η οποία απαιτείται για την κατάλληλη αναγνώριση των σημάτων έλλειψης αζώτου (Chung *et al.*, 2001). Υπό συνθήκες κορεσμού θρεπτικών συστατικών, η υπερέκφραση του Stm1 παρεμπόδισε τη μυκηλιακή αύξηση με αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα ενδοκυτταρικού cAMP, αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών Ste11, Mei2 και Mam2, που εμφανίζουν εξειδίκευση στη διαδικασία της μείωσης και διευκόλυνε τη σεξουαλική ανάπτυξη των ομοθαλικών κυττάρων. Η Stm1 μπορούσε να λειτουργήσει ως ένα μόριο παρατηρητής που αντιλαμβάνεται τη θρεπτική κατάσταση των κυττάρων, σταματά τον κυτταρικό κύκλο πολλαπλασιασμού και προετοιμάζει το κύτταρο να εισέλθει σε

κατάσταση μείωσης υπό συνθήκες τροφικής έλλειψης (Chung *et al.*, 2003). Οι αλληλουχίες του *Stm1* είναι συντηρημένες σε άλλους ασκομύκητες όπως οι *N. crassa* και *A. nidulans* και σε βασιδιομύκητες όπως οι *C. neoformans* και *U. maydis*, ωστόσο οι λειτουργίες τους είναι ακόμα ασαφείς (Borkovich *et al.*, 2004). Στον μύκητα *A. nidulans* έχουν αναγνωριστεί 3 ομόλογες αλληλουχίες του *Stm1* και στους μύκητες *C. neoformans* και *U. maydis* έχουν αναγνωριστεί 2 ομόλογες αλληλουχίες του *Stm1*, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτή η ομάδα GPCR μπορεί να είναι σημαντική σε αυτούς τους μύκητες.

1.2.4.6 Οι μικροβιακές οψίνες και οι φωτοχημικές αντιδράσεις

Οι οψίνες είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών με 7 διαμεμβρανικές έλικες που λειτουργούν ως αντλίες ιόντων που αποκρίνονται στο φως ή ως αισθητήριои υποδοχείς. Προηγουμένως, έχουν αναγνωριστεί γονίδια που κωδικοποιούν οψίνες σε ζώα και σε Αρχαία και πιο πρόσφατα στους μύκητες και σε άλλους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς.

Η αντίληψη του φωτός είναι σημαντική για την ανάπτυξη των μυκήτων, ειδικά για τη σποριογένεση και τη σύζευξη (Idnurm και Heitman, 2005). Η *NOP-1* του μύκητα *N. crassa*, είναι μια οψίνη ομόλογη με την οψίνη των Αρχαίων και αποτελεί την πρώτη οψίνη που αναγνωρίστηκε σε μύκητες (Li *et al.*, 2007b). Η ανίχνευση της γονιδιακής έκφρασης και η ετερόλογη έκφραση της *NOP-1* στη ζύμη *Pichia pastoris* επιβεβαίωσαν ότι η *NOP-1* λειτουργεί όπως η ροδοψίνη στη φωτοβιολογία του *N. crassa* (Bieszke *et al.*, 1999a). Το γονίδιο *NOP-1* εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε καλλιέργειες που προωθούν την αγενή σποριογένεση στον *N. crassa*. Σε αναλύσεις των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *NOP-1* σε στελέχη αγρίου τύπου και μεταλλάγματά του, στα οποία είχαν απενεργοποιηθεί τα συστατικά του μονοπατιού αντίληψης φωτός *wc-1* και *wc-2*, σε διαφορετικά στάδια κονιδιοποίησης, βρέθηκε ότι η *NOP-1* συνιστά μια πρωτεΐνη που εκφράζεται αρκετά στα τελευταία στάδια της κονιδιοποίησης, η οποία ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων κονιδιοποίησης *AI-2*, *CON-10* και *CON-13*. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη *NOP-1* ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα την καροτενογένεση (μια διαδικασία βιοσύνθεσης καροτενοειδών ελεγχόμενη από το φως) και την καταστολή της

έκφρασης εξειδικευμένων με την κονιδιοποίηση γονιδίων στο μύκητα *N. crassa* (Bieszke *et al.*, 2007).

Πρωτεΐνες που μοιάζουν με οψίνες έχουν αναγνωριστεί και σε άλλους μύκητες με βάση την ομολογία των αλληλουχιών τους με την NOP-1. Στον μύκητα *Leptosphaeria maculans*, που προκαλεί ασθένεια σε φυτά του είδους *Brassica*, έχει χαρακτηριστεί ένα γονίδιο οψίνης. Αυτή η οψίνη μεταγράφεται σε υψηλά επίπεδα στα μυκήλια ανεξάρτητα του φωτός, σε αντίθεση με την NOP-1 που εκφράζεται μόνο παρουσία φωτός (Idnurm και Howlett, 2001). Μια ομόλογη οψίνη έχει επίσης αναγνωριστεί στον μύκητα *C. neoformans*, αλλά η λειτουργία της δεν έχει μελετηθεί ως τώρα.

1.2.4.7 Δυνητικοί υποδοχείς ελεύθερων λιπαρών οξέων

Οι οξυλιπίνες περιλαμβάνουν μια οικογένεια μορίων μεταγωγής σήματος που προέρχονται από οξυγονωμένα λιπαρά οξέα και παρουσιάζουν ισχυρές βιολογικές δραστηριότητες στα ζώα, στα φυτά και στους μύκητες. Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs) λειτουργούν ως υποκαταστάτες για ορφανούς GPCRs των θηλαστικών και έχει προταθεί ότι παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ομοίωση της γλυκόζης. Οι υποδοχείς GPR40 και GPR120 ενεργοποιούνται από μεσαίου και μεγάλου μεγέθους αλυσίδες FFAs, ενώ οι υποδοχείς GPR41 και GPR43 ενεργοποιούνται από μικρού μεγέθους αλυσίδες FFAs (Itoh *et al.* 2003, Tanaka *et al.* 2007).

Στην περίπτωση των μυκήτων, έχουν αναγνωριστεί οξυλιπίνες στο μύκητα *A. nidulans* και έχουν βρεθεί να λειτουργούν ως μόρια μεταγωγής σήματος που ενισχύουν την επικοινωνία του μύκητα με τον ξενιστή του (Tsitsigiannis και Keller, 2006, 2007). Σε είδη του γένους *Aspergillus* έχουν αναγνωριστεί 3 διοξυγενάσες λιπαρών οξέων (PpoA, PpoB και PpoC), οι οποίες ελέγχουν τη βιοσύνθεση των παραγόντων οξυλιπίνης psi και έχουν βρεθεί να συγχρονίζουν την εγγενή και αγενή σποριογένεση καθώς και τον αποικισμό του μύκητα στον ξενιστή και την παραγωγή μυκοτοξίνης (Tsitsigiannis *et al.*, 2005b). Στην περίπτωση των *C. neoformans* και *C. albicans* δεν έχει βρεθεί ομόλογη πρωτεΐνη των πρωτεϊνών Ppo (Noverr *et al.*, 2001) και παραμένει ακόμα άγνωστος ο τρόπος με τον οποίο οι μύκητες αντιλαμβάνονται

τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Ωστόσο στον μύκητα *A. nidulans* όσο και τον μύκητα *C. neoformans*, έχουν αναγνωρισθεί πολλοί καινούριοι υποψήφιοι GPCR και είναι πιθανό κάποιος από αυτούς να εξυπηρετεί στην αντίληψη των λιπαρών οξέων.

1.2.4.8 Ορφανοί GPCRs στους μύκητες

Οι περισσότεροι μύκητες περιέχουν πρωτεΐνες με 7 διαμεμβρανικές περιοχές για τις οποίες δεν υπάρχει γνώση του τρόπου λειτουργίας τους. Ωστόσο θα πρέπει και αυτοί οι υποδοχείς να αναγνωρίζουν κάποιους υποκαταστάτες κρίνοντας από την πολυπλοκότητα των περιβαλλοντικών σημάτων κατά τις αλληλεπιδράσεις των μυκήτων με τους ξενιστές τους. Πρόσφατα, οι Xue *et al.* (2007) αναγνώρισαν ορισμένα συστατικά μεταγωγής σήματος φυτικής προέλευσης τα οποία είναι σημαντικά για τη σεξουαλική ανάπτυξη του μύκητα *C. neoformans* κατά την αλληλεπίδραση του με το φυτό ξενιστή.

Στον μύκητα *A. nidulans* έχουν χαρακτηριστεί 16 GPCRs αλλά δεν έχουν αναγνωρισθεί όλα τα μόρια σύνδεσης σε όλους αυτούς τους υποδοχείς, ενώ στον μύκητα *M. grisea* έχουν αναγνωρισθεί 76 πρωτεΐνες που μοιάζουν με GPCRs, από τους οποίες οι 61 είναι πρωτεΐνες που μοιάζουν με Pth11 και οι 15 είναι GPCRs που μοιάζουν με GPCRs που έχουν αναφερθεί σε άλλους μύκητες (Kulkarni *et al.*, 2005).

1.3 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο εδαφογενής μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ένας σημαντικός φυτοπαθογόνος μικροοργανισμός που είναι ιδιαίτερα καταστροφικός για περισσότερα από 200 είδη φυτών, πολλά από τα οποία είναι υψηλής εμπορικής σημασίας. Τα συμπτώματα που προκαλεί η ασθένεια είναι μάρανση, νανισμός, χλώρωση και τέλος νέκρωση του φυτού. Η σοβαρότητα της ασθένειας για την αγροτική παραγωγή εντοπίζεται στην παγκόσμια εξάπλωση του μύκητα *V. dahliae* καθώς και στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν αποτελεσματικά χημικά μέτρα για την αντιμετώπισή του. Η αδυναμία αντιμετώπισης του *V. dahliae* οφείλεται στη βιολογία του παθογόνου. Ο μύκητας ζει στο έδαφος, επιβιώνει με πολύ ανθεκτικές μυκηλιακές κατασκευές (μικροσκληρώτια) για 10-15 χρόνια και εισέρχεται από τις ρίζες στο αγγειακό σύστημα του φυτού, εκεί όπου η πρόσβαση χημικών φυτοπροστατευτικών ουσιών είναι πολύ δύσκολη. Για το λόγο αυτό καθίσταται πλέον σημαντική η κατανόηση των μηχανισμών σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο, που σχετίζονται με την παθογένεια και τις αλληλεπιδράσεις του παθογόνου με τον ξενιστή του, ώστε να σχεδιαστούν πιθανές στρατηγικές που θα οδηγήσουν σε μια πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του μύκητα.

Στα πλαίσια αυτά κινείται και η παρούσα μελέτη της οποίας αρχικός σκοπός ήταν η βιοπληροφορική και φυλογενετική ανάλυση του μύκητα *V. dahliae*, ώστε να αναγνωριστούν οι πιθανοί συζευγμένοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς με τις G πρωτεΐνες (GPCRs). Αρκετά μέλη αυτής της μεγάλης ομάδας διαμεμβρανικών υποδοχέων, που είναι συντηρημένοι σε αρκετούς ζωικούς οργανισμούς αλλά και μικροοργανισμούς, παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση ασθενειών, γι' αυτό το λόγο αποτελούν στόχο πολλών φαρμάκων του ανθρώπου. Από τους GPCRs που βρέθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε επιλογή ενός γονιδίου GPCR, που είναι ομόλογο με το γονίδιο *Ste2* του *S. cerevisiae*, ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος του στη βιολογία και στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκε η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA*, που κωδικοποιεί έναν πρωτεϊνικό υποδοχέα φερομόνης στο μύκητα *V. dahliae*.

Σημαντικό ρόλο στην επιλογή του γονιδίου *VdSteA* έπαιξε το γεγονός ότι γονίδια του μονοπατιού που ενεργοποιείται από το φερομονικό υποδοχέα *Ste2*, εμπλέκονται στη μορφολογία αλλά και στην παθογένεια ενός αριθμού

μυκητολογικών παθογόνων, τόσο του ανθρώπου όσο και των φυτών. Περιπτώσεις αυτών των μυκήτων είναι οι φυτοπαθογόνοι οργανισμοί *M. grisea*, *F. graminearum*, ο μύκητας *A. nidulans* και ο μύκητας *C. albicans*, που προσβάλλει τον άνθρωπο. Ένας επιπλέον λόγος επιλογής του συγκεκριμένου γονιδίου ήταν η μοναδικότητα του στο γονιδίωμα του *V. dahliae*, όπως προέκυψε μετά τη βιοπληροφορική ανάλυση, συνεπώς η απενεργοποίηση του γονιδίου θα παρείχε μια καλή εικόνα του ρόλου που διαδραματίζει στο μύκητα *V. dahliae*.

Ο ρόλος του *VdSteA* στη μολυσματικότητα του *V. dahliae* μελετήθηκε με τη διενέργεια πειραμάτων παθογένειας σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας, ενώ ο ρόλος του γονιδίου στη φυσιολογία και τη μορφολογία του μύκητα διερευνήθηκε με συγκριτικά πειράματα ανάπτυξης του αγρίων και μεταλλαγμένων στελεχών του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα, με συγκριτικές μετρήσεις παραγωγής κονιδίων και μικροσκληρωτίων καθώς και με πειράματα βλαστικότητας των κονιδίων του παθογόνου.

Τα ευρήματα αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης θα βοηθήσουν στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ένας φερομονικός υποδοχέας GPCR συμμετέχει στην αλληλεπίδραση του μύκητα *V. dahliae* με τους ξενιστές του αλλά και πως επηρεάζει τη βιολογία του μύκητα σε φυσιολογικό και μορφολογικό επίπεδο.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Βιοπληροφορική και Φυλογενετική Ανάλυση των GPCRs του *V. dahliae*

2.1.1 Βιοπληροφορική Ανάλυση

Το γονιδίωμα πολλών μυκήτων έχει αλληλουχηθεί και βρίσκεται διαθέσιμο σε διάφορες βάσεις δεδομένων μεταξύ των οποίων και στην ιστοσελίδα <http://www.broadinstitute.org>. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες γνωστών και μελετημένων GPCRs των μυκηλιακών μυκήτων *Aspergillus nidulans* και *Magnaporthe grisea* με σκοπό να βρεθούν πιθανοί GPCRs στο φυτοπαθογόνο μύκητα *V. dahliae*. Πιο συγκεκριμένα το αλληλουχημένο γονιδίωμα αυτών των μυκήτων βρίσκεται στις παρακάτω ιστοσελίδες.

❖ *Aspergillus nidulans*

http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html

❖ *Magnaporthe grisea*

<http://www.broadinstitute.org/annotation/fungi/magnaporthe/>

❖ *Verticillium dahliae*

http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html

Αφού ανακτήθηκαν οι επιθυμητές πρωτεϊνικές αλληλουχίες των διαθέσιμων GPCRs του *A. nidulans* και του *M. grisea* έγινε αναζήτηση «πρωτεΐνης προς πρωτεΐνη» (blastP) στην ιστοσελίδα όπου βρίσκεται το αλληλουχημένο γονιδίωμα του *V. dahliae*. Στην περίπτωση του *A. nidulans* χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των γονιδίων με κωδική ονομασία **GPRA**, **GPRC**, **GPRD**, **GPRE**, **GPRH** και **AN5720** (Xue et al, 2006) και στην περίπτωση του *M. grisea* οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των γονιδίων με κωδική ονομασία **MG09015**, **MG06738**, **MG04711**, **MG05072**, **MG10473**, **MG04698**, **MG02855**, **MG08803**, **MG05871** (Kulkarni, 2005). Στο τέλος της βιοπληροφορικής ανάλυσης έγινε επιλογή των αλληλουχιών που είχαν το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας με αυτές των *A. nidulans*

και *M. grisea* καθώς και αυτών των αλληλουχιών του *V. dahliae* που ήταν κοινές σαν αποτέλεσμα μεταξύ των συγκρίσεων τους με τους δύο μύκητες, αντιστοιχούσαν δηλαδή σε GPCR τόσο του *A. nidulans* όσο και του *M. grisea*. Για την επιλογή των αλληλουχιών το όριο του E-value ήταν της τάξης του $1e^{-09}$.

2.1.2 Φυλογενετική Ανάλυση

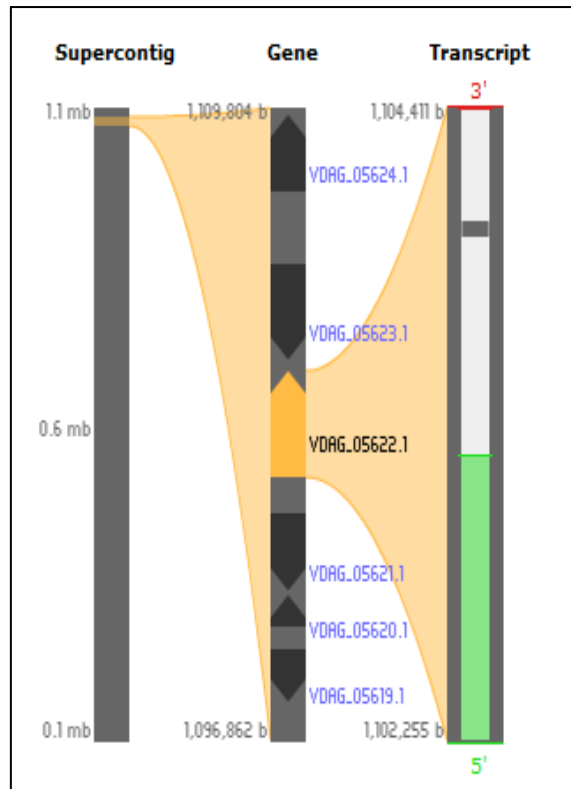
Στις πρωτεϊνικές αλληλουχίες που επιλέχθηκαν από τη βιοπληροφορική ανάλυση έγινε φυλογενετική ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος MEGA4. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διαπιστωθεί η γενετική απόσταση μεταξύ των GPCRs του *V. dahliae* και των γνωστών GPCRs των μυκήτων *A. nidulans* και *M. grisea*. Το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε είναι της μορφής UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean ή Μέθοδος Ομαδοποίησης Αστάθμητων Ζευγών με Αριθμητικούς Μέσους Όρους). Στα φυλογενετικά δέντρα αυτού του τύπου οι διακλαδώσεις έχουν ίδιο μήκος από τη ρίζα έως την κορυφή της διακλάδωσης και χρησιμοποιούνται για να δείξουν το βαθμό της γενετικής συγγένειας μεταξύ διαφόρων γονιδίων.

2.2 Επιλογή του υπό μελέτη GPCR γονιδίου και σχεδιασμός εκκινητών

2.2.1 Επιλογή γονιδίου προς μελέτη

Μετά τη φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική αξιολόγηση σε ορισμένους GPCRs των μυκήτων *A. nidulans* και *M. grisea*, ώστε να διαπιστωθεί ο ρόλος τους σε αυτούς καθώς και ο πιθανός ρόλος των αντίστοιχων GPCRs στο *V. dahliae*. Έγινε τελικά επιλογή ενός μοναδικού γονιδίου GPCR, που έχει μεγάλη ομολογία με τους υποδοχείς φερομόνης Ste2, το οποίο ονομάστηκε στην παρούσα εργασία *VdSteA*.

Στο αλληλουχημένο γονιδίωμα του *V. dahliae* το γονίδιο *VdSteA* έχει την κωδική ονομασία **V DAG_05622**. Πρόκειται για ένα γονίδιο 2157 βάσεων, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 του μύκητα (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της θέσης του γονιδίου στο γονιδίωμα, καθώς και του μεταγραφήματος του.

2.2.2 Σχεδιασμός εκκινήτων

Για τη δημιουργία του τμήματος αντικατάστασης του γονιδίου *VdsteA* στο μύκητα *V.dahliae*, στα στελέχη 25V και 70V, σχεδιάστηκαν απλοί εκκινήτες με σκοπό να ενισχύσουν με PCR δύο περιοχές περίπου 1000 βάσεων (bp) πριν το κωδικόνιο έναρξης και λήξης του γονιδίου αντίστοιχα. Η κωδική ονομασία 25V αντιστοιχεί σε απομόνωση μη αποφυλλωτικής φυλής βαμβακιού από τις ΗΠΑ, ενώ η κωδική ονομασία 70V αντιστοιχεί στη φυλή 1 της τομάτας. Ο σχεδιασμός όλων των εκκινήτων (**Εικόνα 14**) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη σχεδιάστηκαν στο πρόγραμμα Primer Select (Lasergene).

AGACTGGACACACGTACCCATTGGAGTAGACGAAGGGCGGAGTATCCTTGTACCATTGTCTTGAATCATCGATCTGAAAAGTGACCTCGTAGAAG
 AGTGTGATAAAGCGCTTAGGGTGGCTTGTGGGCAAAACCCATTATCAACTAGGCTCGGGTAGGCCATATGACTCTTATGGTTCGGCGAGTCTAAAT
 ATGTCCGTCCCAGCAGCAAGGGAACATAACCTGTACTCGAAAGCGTAGGGGCGAGTTCTGGGGCGGAACTGGTGGTTCGGGGCCGTGACGCCG
 AGGCAGACATAGGATATGTCTGCTGCTCAAGGTATCCCAAAGCTTCGAAGCGAGGGGTACCAGCGAGCATCTGAAACCCCGGGGAAACGCAA
 GTAGGCCAATCTCGTACTCGGGTCTCTGGAGTCAGAGCGTACTGCCACGTCTCGGTCAACCTCTGAGCGTGTATGTTTTGCGAACGAGCTGGTG
 CTTACAGATAGTAAACGAGCATGCCACCGAGTTGCTTACTGCTCGAACTTGCATGCTCGCTCATAGTATAGATTGGAGTCCAGTAGTACTCA
 AATCCTGCCGAACCTTACAGGTAGAGCATGCTGAGGATACTGCGTCATCATAGCCATGGTGAATTTGAAGGCACTGCCGCCATGATGGTGAACA
 TGACCAGTAGGGCGCTGGATTGACTATAGGGTCTGCGCGCTGCACCACGACTGGGGAGAGCAAGGCAAAAGAAAGCCTGGGCTCCGGTTG
 TGACCAGCAAAAAGCCACCCATATTTGAGAGGAAACGCATGGCTGAGACGAATAGCCTACGGGTAAGGTGAAGCAGCAAAAGTGGATGTATCTGTGC
 GGAAGCTGTATGTCTCAACTCGATTGAATAACCTGTCTGTGAATTTGAAATTTACGACAGGTTGGCTTCGCACAGTATTGTTATATATGACGACA
 ACCAGGCCATCAACACATGGGGTCTTTCATCATTTGCTATCTGTGTCTCAAGAAGGCGGACAGTCCGCAAGGAAGTACAGCCTTAAATCGCCTGGT
 CAATGGGTTCCGGGCTCGGGTTCGAAGTCCAAAGCCGTGACGAGAGGGTATGCAAGTCTGACTCAGCCAGGCAACATTTACGGGTTGCAC
 CGGTACTGTACAGTGTCTCTTACCCAAGAAGAATACCATGGTTCAAGGTTACGGACTCTTAGCCAGATTAAAGTGTCAACCCCTGGGAG
 TGTAGGTAGCTGAACAGCCTGGTTGAGTGTGGTTCGACATTGATGTGGTGTCTGGAAAATCGAGCCATCTGGCCACGTGTGTAAGTGAACAGGCT
 TCCCTCATGTGTTGTGAAGGTTCAATGTCTCAGGCCGACGGGACGGGGGGGAGGACAGGGTCAAGTGGTGGCAACAGGGTCAAATCAAT
 GAATCAGGCAAAATCGGTGGCGTGTCTTGCATCTGATACAGTATACGTAACAGTACGTTGATATGATAGTATTACTTGTATTGTTGGGAGGATGTGTAG
 TCGCCAGCCCTTCTGGTTATTGACCTGGGAGGGTAGGCTAGGGATCAAGTATGATAGTATTACTTGTATTGTTGGGAGGATGTGTAG
 TCGTCTGTTCTGCTACATGGTATTCTGGTGTGATGTCTGTTGATGTCTGAGTGTAGCAAGACAAGAAAGGGCACGGGAACCTAGGCCAGGAGGTG
 GCCAGCCTTCCCGTGAAGAACCACGACGCTCCTCGTCAACTCTGCTGACTTGGACTCATAGGCTCAGCTGAGATCGCGGTTTCATCAAATATT
 CAACATCGATCTAGCCTCATTGAACTACCGACTGGTGTGAGTGGCGGGTGTGGCTAATGTAGCCTCAGGCCTTGTCTTGTGGTGAACAAATAC
 GAAGGGTCTGTGCAAAACAGCCAGGAACAATATCAAGAGAACAATCCACTATTCTACGCCAACATGCCATTTTCTCCACCCGTACACCATTTCT
 TCGTCTTACAGAATGCCGCTCAGTATGCTCTCCGAGCAGTCCGGTGGTGCATTTTATATTCGGCCAGCGCAGTACTCTCATCTGTTTCTATCAC
 ACCAGGACGAGCTACCCATCATCCAGCCAATATTTGCACCTAGCTCTCCGCTGCATCTGTCCAGCAGATGACACGAATCGAGATCTCTCTTGG
 AAGCTTCTGATCCAAAATCAGTCTTACTTGGCGTACCCTTTTCTTGACACTACGGTGAAGCCGACGGTATACATCTCGGTATACAGGACAGGATT
 GAGCTTTCACAGGCTCAAGGCAACCGGCTGTGTATCAAATAGAATCAGCGCATACTCTCTCTTGGGCAATACCAGTAACTGTCTGCACGGCA
 TTGTCCGAAGAGGATCGCAACCAGAGCTTTCGTGACATGCCACCGAGATTCCGCAACATTCACGAAGAGCACACTGCACTATGGCCTTATCCGAC
 CCGTCTTACAAAACCTTCTGCTCTATTGCGTGTGATGGTGTACCAGAAATCCCTGTTGCGGTTGCGGATGTCAACAGGATCATCTTATACAGC
 GTGAAAACGGTATCAACTATGGGCGCCAGATCGGGAGCTCCTTCACTGCTGCTGCTTGGTCTGCATAACGCCCTCAGCAAGATTCCCT
 AAGCTATCTCAGTGGCTTACATCGCCGCCCTGACCGTCAACATCTCCGATGGTACTCTTAACTGTCTTTCACGAGCAGTGGGAACGAA
 TTTCTACATCTTTGCTGGGACTATTTCTGGGTCGCCCTCAGGATTTGCAAGTGCAGTGTGCAATCCGAAATGGCAATTTGATGCTTCTTTCA
 TCATGTTCCAAGCTGTCTCGGCTTGCAGGCTTGGCGCACTGTCAACCTTGTGCACTACGGTGAAGCCGACGGTATACATCTCGGTATACAGGACG
 GTGTTTCTTTCACGGCCATCGGCATTTCGCGTGGCAAGCGCAGTAGGCCAGATCAGGTTTATGCTGACGCTGTCCGATACACCATCCGTACTG
 GTGGCTCTCTGACCAGTGTATGGTGGCACTTCTATATTCTATTACTGCGCTCTTCAACGTCAGGCTGGTGGGATCTGTGGAAGAAC
 CGAACCTTCTACCGACGCGGGGGGCTTGTCTGCGGTTGAAGTACTGGTATCACAAATGGCATTCTGATGATCATCTCTGGTTCGTATTTT
 CCCTACACATTTGCTCCAGTATCTGACTAACACGTTGACAGTCAATTTGCGCGCTTTGGGTTGGCGCAATTTGGCAGGCTTTCGAAACCTGGC
 TCTTGGCCCTCAGTCCGTGATCTGTTCTGCCCCTCGGAACGCTGATTGCCAACCGCATTTGCAACACCGGAATCTTACCATGAAGTCAAA
 GCCCGTCAACCAAGCAGCAAGGACGATCAGATATGCTTTAAGGACATCTCCAGATTGGTTCGGATGCCACTGAGAGCAATGCGGCTAC
 GACACCGGTTTACATCTCGGATAGAGGCTGGCCGTTCTCGTGTGCAACCCATCCATAGACCTCGAACTCGCGGCTCGAGGATGATGGAGAC
 CTGAAATGGGAGTGGTGGAGTCAATCTGAAATTTGATCGACGCGAGGACAGGGTTTAGAGGCTCAGGCAAGGCTGGAATGAAGCCACAGATGGTGCACCGTGCAT
 TATTTTCTTTGCTTTTGTCTTCTCTCGTCCATCGAAACCTTCGTGTGGAATCAGATGGCACCCGGGAATCACTTGAATATGAACAGAGAGATC
 GGAGTCCAGAGCGTTTCTGAAATGTCCTTTCCCCGAGAGCCAATGAATTTCACTAGGATCTGACAATTTACTGGACCAAGGTTACTGGCTTTT
 GGTAAGCTTTGAAGACATGTACCTGATGTATGATTGATCTACTTTATTAGATAGCCGATGGCTGGTACCAGTGGTATCAGTACTGCTT
 CCTTCAACGGTGTTCGGTTCAGGCGCTTTCGCTCACCGTTCCCGAACGATGGTGTGACAGCAGGGCGATGGCCGTACCACGTAGCGAATCA
 CCCAACAGACCAATCCCGACCAATCTTCCGCTAAAGCCTTTGAGGTACCATCTCGTCCAGTGAACGTTGTCTTAGCAGAAACTATGGG
 GGATATCCCGTCCCGTTCAACAGCGCGGCTAGGACGAAGATAGCATACCCATGGCACCGCTTCTCCGCCACAAGTGGTGTGATTGGAGACCA
 CGGTTGGCGTACCAATAGTCTGTATATCTGGGGCGTCTGTGGCGGACCCCTCAACGACAATATCTGCTTTCGTAGCGCATCTGCAATATTC
 TGGCATTGGAAGAAAGCAAGGCCAAGTTTGTATCCAAGGCGCGATCTCAGACTGCAGAAATCGAAGACGCCGACATCATGGCCTTACGTTGAGCCTG
 GAGGCCAGCATACTAGATCTATTCTGTGACGACTCTGCTGCCGACAGAGTAAAGCGTCCGCGCAAGTTGGCGGAGTAGTGCATCTTTTCGGGT
 TCGGGGGATTGGAGGTGCCGGTAGGCTGGATGGCAAGGGTATGCTAATGGTCAAGGCTCATCTAGCAGGTCGGGTTGATGCGCTGCACCTGGTTT
 TGCCGGAGCCTGCGCATTCTCTCGTATTGCCAGTCACTGATGGACCCGTGACAGGCAAAAGGCTGGAATGAAGCCACAGATGGTGCACCGTGCAT
 GATGGCTGGCAAGTCCGTTATTTAAGGAGCTGCTAACATATGGCGCGTTCAGGTTGCCGAGGGGAGAATGAGTGGGGGAAAGGCCGATTTT
 GCAACGGGGGCTGCCCGTAGAGGGCGCGGAGTCTGATCGAGATGGTGTGATGGTGGGATTGAGAAGTCTGTGGAAAGTTCTGAGGTGTGCTG
 TAACTCAGTGAATGGGGGAAGTGGGGCGCTGTGAGGACGTTCTGAGCCTAAGTACTGACTCCACGACGCTGGTGTCTGGTATCTTAGGC
 GGAGGCGGAGCTCCAGTTCGCTAGGAGCAACAGGTGGTTGACTAGAAGGACGGCTGCTAGCTCGTGTGTTGATGCCACAGAAAGTCTGTGCAC
 CTCTGATGCGAGTGTGAGCCTGTTGGTATGATGACGGAATGTGAGGGCTGTCTGCTATGACAGGCGCTTTCGGCAAGACATCTCGCAGAATGGT
 GAGGAAGTCAACAAGTGTGATTCTACCAAAGTGTGAGTCACTCCAGAAATCCTGTATGAAGAACATGAGACTACATCCCAAAACGTGGA
 CCAGCCAGCCAGATACGGATGGTATACCTGACCCTGGGGATCGACATGTCTCCGGGCTTACCACCATATGCTCGGTGGGCGTTACGTATATGAGAG
 GTGCCCTCCCGAGGATAGGCATAGGACACGCGTATGGACAGAGGAAAGCGGTAGGTGGTGCCTC

Εικόνα 14: Αλληλουχία 5585 βάσεων που συμπεριλαμβάνει το γονίδιο *VdSteA*. Επισημάνση των περιοχών με βάση τις οποίες σχεδιάστηκαν οι παρακάτω εκκινήτες για την απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA* και την ανάλυση των μετασηματισμένων στελεχών:

VdSteA-F1-XhoI, **VdSteA-R1-EcoRI**, **VdSteA-F2-BamHI**, **VdSteA-R2-XbaI**, **VdSteA-F3**, **VdSteA-R3**, **VdSteA-F5**, **VdSteA-R5**, **VdSteA-F4**, **VdSteA-R4**, **VdSteA-F7**, **VdSteA-R7**.

Εκκινητές για το γονίδιο της τουμπουλίνης

Το γονίδιο της β-τουμπουλίνης (b-tubulin) του *V. dahliae* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς στα πειράματα PCR γενωμικού DNA και cDNA των αγρίων και μεταλλαγμένων στελεχών. Η β-τουμπουλίνη αποτελεί ένα “housekeeping” γονίδιο στο μύκητα *V. dahliae*. Οι εκκινητές της β-τουμπουλίνης, **Bt1a** και **Bt1b** ενισχύουν ένα τμήμα 550 βάσεων μέσα στο γονιδίωμα του μύκητα *V.dahliae*.

Εκκινητές	
Bt1a	5'- TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG - 3'
Bt1b	5'- GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC - 3'

2.3 Καλλιέργεια στελεχών του μύκητα *V. dahliae* και απομόνωση DNA και RNA

2.3.1 Καλλιέργεια στελεχών *V. dahliae* και παραλαβή μυκηλίου

Το μυκήλιο των στελεχών αγρίου τύπου (Wt) του *V.dahliae* διατηρείται σε κρυοφιαλίδια στους -80°C μέσα σε διάλυμα γλυκερόλης με συγκέντρωση 25%. Για να ενεργοποιηθεί το παγωμένο αυτό μυκήλιο ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Προετοιμασία τρυβλίων Petri με PDA (στερεό θρεπτικό υλικό ανάπτυξης μυκήτων)
- Απόξεση με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα του παγωμένου διαλύματος γλυκερόλης και λήψη μικρής ποσότητας από αυτό
- Δημιουργία παράλληλων γραμμών (streaking) με την οδοντογλυφίδα πάνω στο PDA, ώστε να αναπτυχθεί ο μύκητας.
- Τοποθέτηση τρυβλίων ανάποδα σε επωαστικό θάλαμο που έχει σταθερή θερμοκρασία (23°C) για 4-5 ημέρες.

Αφού αναπτυχθεί το μυκήλιο στα τρυβλία, μεταφέρονται κομμάτια από αυτό σε κωνικές φιάλες των 250 ml που περιέχουν 100 ml SSN (υγρό θρεπτικό υλικό ανάπτυξης μυκήτων). Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο (orbital shaker) με ανακινούμενη βάση (120 στροφές/λεπτό) και σταθερή θερμοκρασία (25°C). Μετά από 4 ημέρες το SSN θολώνει, γεγονός που σημαίνει ότι

ο μύκητας έχει αναπτυχθεί ικανοποιητικά και υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση κονιδίων του μύκητα. Γίνεται διαχωρισμός του SSN και των κονιδίων από το μυκήλιο με πέρασμα του περιεχομένου των κωνικών από φίλτρο. Το μυκήλιο στη συνέχεια συμπιέζεται και στεγνώνεται ανάμεσα σε φύλλα διηθητικού χαρτιού και τοποθετείται σε σωληνάκια erpendorf και μετά στους -80°C . Στην περίπτωση που το μυκήλιο προορίζεται για εξαγωγή RNA, τα σωληνάκια erpendorf μετά το στέγνωμα τοποθετούνται άμεσα σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια στους -80°C , ώστε να μην καταστραφεί το RNA.

Το μυκήλιο στη συνέχεια αφυγραίνεται εντελώς για να είναι δυνατή η συντήρηση του μυκηλίου για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C χωρίς να αλλοιωθεί. Γι' αυτό το λόγο τα σωληνάκια erpendorf, στα οποία έχουν γίνει τρύπες στο καπάκι, με το μυκήλιο τοποθετούνται σε μηχανήμα λυοφιλίωσης για 24 ώρες, τα δείγματα διατηρούνται παγωμένα και υφίστανται συνθήκες χαμηλής πίεσης και προσρόφησης στις οποίες το παγωμένο νερό απομακρύνεται με εξάχνωση. Με αυτό τον τρόπο απομακρύνεται η υγρασία από τα δείγματα που βρίσκονται στα σωληνάκια erpendorf, παίρνουν τη μορφή νιφάδων και μπορούν πλέον να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C .

2.3.2 Απομόνωση DNA από το λυοφιλωμένο μυκήλιο του *V.dahliae*

Η απομόνωση του μυκηλιακού DNA πραγματοποιήθηκε με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

Ο μύκητας αναπτύσσεται σε τρυβλία με 15 ml SSN. Αφού αναπτυχθεί ικανοποιητική ποσότητα μυκηλίου, αυτό παραλαμβάνεται και αφού αφυγρανθεί με αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά τοποθετείται σε μικροσωληνίσκους erpendorf και στη συνέχεια σε μηχανήμα λυοφιλίωσης. Στη συνέχεια κονιορτοποιούνται οι λυοφιλωμένες υφές μέχρι να γίνουν λεπτή σκόνη, με τη χρήση αποστειρωμένων μυτερών οδοντογλυφίδων και χρησιμοποιείται λυοφιλωμένο μυκήλιο ~100 mg. Στο μικροσωληνίσκο προστίθενται 700 μl LETS buffer (20 mM EDTA-pH 8.0, 0.5% SDS, 10mM Tris-HCl-pH 8.0, 0.1M LiCl) ώστε να γίνει η λύση των κυττάρων και ακολουθεί ανακίνηση με τη χρήση των οδοντογλυφίδων καθώς και με αναστροφή των σωληνίσκων αρκετές φορές. Αφού τα σωληνάκια αφεθούν για επώαση για 5

λεπτά, προστίθενται 700 μl Φαινόλη : Χλωροφόρμιο : Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1), με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες. Αφού τα σωληνάκια ανακινηθούν με αναστροφή 10-15 φορές, αφήνονται για επώαση για 5 λεπτά. Μετά φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά στους 4° C και η υπερκείμενη φάση που προκύπτει μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και προστίθεται ίσος όγκος Φαινόλη : Χλωροφόρμιο : Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C και μεταφέρεται ξανά η υπερκείμενη φάση σε νέο σωληνάκι, όπου προστίθεται 1 ml 95% EtOH, για να γίνει κατακρήμνιση του DNA. Μετά από ανακίνηση των σωληνίσκων και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4° C παραλαμβάνεται το DNA σε ίζημα (pellet). Απομακρύνεται η υπερκείμενη φάση και ακολουθεί προσθήκη 70% EtOH για να γίνει έκλυση του ιζήματος. Αφού πραγματοποιηθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT) γίνεται παραλαβή του DNA σε ίζημα. Απορρίπτεται προσεχτικά η υγρή φάση για να μην χαθεί το ίζημα και αφήνεται το ίζημα να στεγνώσει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος, επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα με 40 μl 10 mM Tris buffer (pH 8.0) και προστίθενται 2 μl RNase (10 mg/ml stock). Μετά από θερμική αδρανοποίηση πιθανών επιμολύνσεων με DNase και πέψη του RNA για 30 λεπτά στους 50° C, τα σωληνάκια eppendorf με το DNA διατηρούνται στους -20°C.

2.3.3 Απομόνωση RNA από το μύκητα *V. dahliae*

Η απομόνωση ολικού RNA από το μύκητα *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Tri-Reagent της εταιρείας MRCgene (TR118) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθεί:

Έγινε παραλαβή μυκηλίου του μύκητα από τρυβλία με 15 ml SSN, όπου αναπτυσσόταν και αφού αφυγράνθηκε με αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά τοποθετήθηκε άμεσα σε υγρό άζωτο. Ακολούθησε λυοφιλίωση των μυκηλίων. Για το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιείται λυοφιλιωμένο μυκήλιο ~100 mg, το οποίο λειοτριβείται σε υγρό άζωτο με τη βοήθεια αποστειρωμένων πλαστικών γουδοχειριών μέσα στα σωληνάκια. Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml Tri-Reagent και γίνεται ανάμιξη με στροβιλισμό (vortex). Αφού οι μικροσωληνίσκοι επωαστούν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 200 μl χλωροφόρμιο και γίνεται vortex για 15 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά

τουλάχιστον και φυγοκέντρωση στις 13,000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C. Η υπερκείμενη φάση που προκύπτει μεταφέρεται σε νέο καθαρό σωληνάκι των 1.5 ml και πραγματοποιείται εκχύλιση με ίσο όγκο Φαινόλη : Χλωροφόρμιο : Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) και ανάδευση. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 12,000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C. και μεταφέρεται ξανά η υπερκείμενη φάση σε καθαρό σωληνάκι που περιέχει 500 μl ισοπροπανόλης, όπου πραγματοποιείται ανάμιξη, για να πραγματοποιηθεί η κατακρήμνιση του RNA. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και φυγοκέντρωση στις 13,000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C, απορρίπτεται η υπερκείμενη φάση που προκύπτει και ξεπλένεται το ίζημα μία φορά με 1 ml 70% αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13,000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C μετά την οποία απομακρύνεται η αιθανόλη και αφήνεται το ίζημα να στεγνώσει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (δίνεται ωστόσο προσοχή να μην στεγνώσει το ίζημα τελείως). Μετά το στέγνωμα γίνεται επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος σε 50 μl αποστειρωμένο RNase free νερό και τα σωληνάκια eppendorf με το RNA διατηρούνται στους -80 °C.

2.4 Δημιουργία αλληλομόρφου αντικατάστασης

Για την κατασκευή του αλληλόμορφου αντικατάστασης πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των περιοχών πριν το κωδικόνιο έναρξης και μετά το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου *VdSteA*. Έγινε αντίδραση PCR σε ολικό γενωματικό DNA του μύκητα *V. dahliae*, σε μια απομόνωση από ραπανάκι (*raphani*). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των 1000 βάσεων πριν το γονίδιο ήταν οι **VdSteA-F1-XhoI** και **VdSteA-R1-EcoRI** και αυτοί που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των 1000 βάσεων μετά το γονίδιο ήταν οι **VdSteA-F2-BamHI** και **VdSteA-R2-XbaI**. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ένζυμο πολυμεράσης Taq της εταιρείας Invitrogen (Cat. No. 10342-020) με τη συνιστώμενη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων (1 μl DNA πολυμεράση, 2 mM MgCl₂, 1X συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, 200 μM νουκλεοτίδια). Οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 25 μM, ενώ οι συνθήκες της αντίδρασης καθορίστηκαν από τη θερμοκρασία τήξεως του κάθε ζεύγους εκκινητών (με την θερμοκρασία υβριδισμού να είναι 52 °C) και το μήκος του τμήματος που έπρεπε να ενισχύσουν (επέκταση στους 72 °C περίπου 1 min για κάθε 1000 βάσεις). Μια τυπική αντίδραση

περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 2 min, 35 κύκλους με αποδιάταξη 30 sec στους 95 °C, υβριδισμό 30 sec στους 52 °C (ή ανάλογη θερμοκρασία υβριδισμού των εκάστοτε εκκινητών) και επέκταση 1 min και 30 sec (ή ανάλογα με το μήκος του τμήματος) στους 72 °C κι ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72 °C για 10 min.

2.4.1 Εκκινητές που ενισχύουν τμήμα περίπου 1000 βάσεων πριν το γονίδιο

Οι εκκινητές **VdSteA-F1-XhoI** και **VdSteA-R1-EcoRI** ενισχύουν ένα τμήμα 1059 βάσεων πριν από το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *VdSteA*. Για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση του τμήματος αυτού στο φορέα αντικατάστασης pBluescript, προστέθηκαν στους εκκινητές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται και κόβονται εξειδικευμένα από τα περιοριστικά ένζυμα XhoI (CTCGAG) [New England Biolabs, R0146S] και EcoRI (GAATTC) [New England Biolabs, RO101S]. Τα ένζυμα αυτά δεν κόβουν στην αλληλουχία του γονιδίου *VdSteA*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
Εκκινητής VdSteA-F1	5' - CGGAAAATCGAGCCATCTA - 3'
XhoI	5'...CTCGAG...3' 3'...GAGCTC...5'
Εκκινητής VdSteA-F1-XhoI	5' - GCGCGCCTCGAGCGGAAAATCGAGCCATCTA - 3'
Εκκινητής VdSteA-R1	5' - CCGGTTGCCTTGAGCCTGTGAA - 3'
EcoRI	5'...GAATTC...3' 3'...CTTAAG...5'
Εκκινητής VdSteA-R1-EcoRI	5' GCGCGCGAATTC CCGGTTGCCTTGAGCCTGTGAA 3'

2.4.2 Εκκινητές που ενισχύουν τμήμα περίπου 1000 βάσεων μετά το γονίδιο

Οι εκκινητές **VdSteA-F2-BamHI** και **VdSteA-R2-XbaI** ενισχύουν ένα τμήμα 1033 βάσεων μετά από το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου *VdSteA*. Για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση του τμήματος αυτού στο φορέα αντικατάστασης pBluescript, προστέθηκαν στους εκκινητές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται και κόβονται εξειδικευμένα από τα περιοριστικά ένζυμα BamHI (GGATCC) [New England Biolabs, RO136S] και XbaI (TCTAGA) [New England Biolabs, RO145S]. Τα ένζυμα αυτά δεν κόβουν στην αλληλουχία του γονιδίου *VdSteA*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
Εκκινητής VdSteA-F2	5'- AGGCTCAGGCAAGGCAACT - 3'
BamHI	5'... GGATCC... 3' 3'... CCTAGG... 5'
Εκκινητής VdSteA-F2- BamHI	5'- GCGCGCGGATCCAGGCTCAGGCAAGGCAACT- 3'
Εκκινητής VdSteA-R2	5'- CGCAGGCTCCGGCAAACC - 3'
XbaI	5'... TCTAGA... 3' 3'... AGATCT... 5'
Εκκινητής VdSteA-R2- XbaI	5'- GCGCGCTCTAGACGCAGGCTCCGGCAAACC - 3'

2.4.3 Εκκινητές για τον έλεγχο της κλωνοποίησης της κασέτας της γενετισίνης.

Ο έλεγχος της ύπαρξης της κασέτας γενετισίνης μεταξύ των δύο περιοχών στον αλληλόμορφο αντικατάστασης καθώς και στα μετασηματισμένα *V. dahliae* στελέχη, ως προς την αντικατάσταση του υπό μελέτη γονιδίου από τον αλληλόμορφο αντικατάστασης έγινε με τους εκκινητές **Gen-F** και **Gen-R**. Οι εκκινητές Gen-F και Gen-R ενισχύουν ένα τμήμα 844 βάσεων (**Εικόνα 15**) μέσα στην κασέτα της γενετισίνης και σχεδιάστηκαν ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος της ύπαρξης του γονιδίου της γενετισίνης ανάμεσα στα τμήματα F1R1 και F2R2, κατά την κατασκευή του αλληλομόρφου αντικατάστασης.

BstX
CATGTTGGATAGGGCGAATTGGGTACTCAAATGGTTCGCCGCTTGACGNCATTCCGAAACCCCAATTTCCAGCCGCTTNGCAAGCGCTACCTGATTGGC
GGCAGGAATATGATGCTCGCCACGCGCCAGCAGTGCAGTCAAGCACCAACCTGGAAACACCTCGTTCAGCCTGGCAGCCAGCAACACAGTGTAC
ACCACTCGATCCGTCACCAACTCAACCCCATCGAACCGTAACCCCATCACTGTCCGCGAGTCCCGACTCTTCCAAACAACACGCATCATCCACACCCAC
TGCACGTTCCGCACGGCAATCTCCAATTCATTCATATCCAATTAATTGATACAGCTTCGCAGGAACCCAAATCTTCAAATGATTGAACAAGATGGATTGCA
CGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCGCCGCTGTTCCGGCTGTACAGCGC
AGGGGCGCCCGGTCTTTTGTGCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGT
CCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGGCCGGGCGAGGATCTCCTGTATCTCACCTTGCTCC
TGCCGAGAAAATATCCATCATGGCTGATGCAATGCGCGGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGC
GAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGCAGAAGAATATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGC
GAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCTGCTTGGCGAATATCATGGTGAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTG
GCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAACTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCT
TACGGTATCGCCGCTCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAAATCATTCCACTCAACATTCAGGCTCCTCTGCGCACGT
AAAGTCCAAAGGCAATACCTGCTCGGTGGAATGCGCGGGCTGTGCTGATTTACGCACATATGCGCAATCTTGAAGCGGAGGAGTCTCTCGTGTG
GGGTTACAGTGTTTAATAAAAAGAATGGTCAAATCAAATGCTAGATATACCTGTGACACACTCTAGTTGTTGACCCCTATACTCTTAATACATCAGACAGT
ACATGTCATGTTGATGATGATGATAATGTCTGTTTAGATTCCAAGTGTCTACTGCTGGCGTCGAC

Εικόνα 15: Αλληλουχία του γονιδίου της γενετισίνης μεγέθους 1481 βάσεων. Με πράσινο επισημαίνεται η περιοχή του ανοδικού εκκινητή (**Gen-F**) και με κόκκινο η περιοχή όπου βρίσκεται ο καθοδικός εκκινητής (**Gen-R**). Επισημαίνονται επίσης οι θέσεις περιορισμού των ενζύμων **BstX** και **Sall**.

Εκκινητές Γενετισίνης	
Gen-F	5'- AGACAATCGGCTGCTCTGAT- 3'
Gen-R	5'- ACTCCTCCGCTTCAAGTCAA - 3'

Για τις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε ένζυμο πολυμεράσης Taq της εταιρείας Invitrogen (Cat. No. 10342-020) με τη συνιστώμενη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων (1 μ l DNA πολυμεράση, 2mM MgCl₂, 10X συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, 200 μ M νουκλεοτίδια). Οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 25 μ M, ενώ οι συνθήκες της αντίδρασης καθορίστηκαν από την θερμοκρασία τήξεως του κάθε ζεύγους εκκινητών (με την θερμοκρασία υβριδισμού να είναι 55 °C) και το μήκος του τμήματος που έπρεπε να ενισχύσουν (επέκταση στους 72 °C για 1 min για κάθε 1000 βάσεις). Μια τυπική αντίδραση περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 min, 39 κύκλους με αποδιάταξη 30 sec στους 95 °C, υβριδισμό 30 sec στους 55 °C και επέκταση 1 min στους 72 °C κι ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72 °C για 8 min.

2.5 Κλωνοποίηση προϊόντων PCR.

2.5.1 Προετοιμασία τμημάτων για την κλωνοποίηση

Για το σχηματισμό του αλληλομόρφου αντικατάστασης, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pBluescript II SK (+/-) της εταιρείας Stratagene (**Εικόνα 16**), στον οποίο κλωνοποιήθηκαν τα προϊόντα VdSteA-F1R1 και VdSteA-F2R2. Στο πρώτο στάδιο του σχηματισμού του αλληλομόρφου αντικατάστασης το προϊόν VdSteA-F1R1 κλωνοποιήθηκε στο φορέα pBluescript II SK (+/-) και προέκυψε ο φορέας **pIAS.1**. Πιο αναλυτικά, για την κλωνοποίηση του τμήματος VdSteA-F1R1, αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση της περιοχής στόχου. Στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος της αντίδρασης PCR με τη χρήση του MinElute PCR purification kit (Cat. No. 28004) της εταιρείας Qiagen (το πρωτόκολλο περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.13.1). Μετά τον καθαρισμό ακολούθησε αντίδραση πέψης με τα ένζυμα XhoI - EcoRI της εταιρείας New England Biolabs (NEB) τόσο στο προϊόν της PCR όσο και στο φορέα και ακολούθησε επώαση για 5

ώρες σε θάλαμο με θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 37 °C. Η αντίδραση πέψης που πραγματοποιήθηκε ήταν η εξής:

VdSteA-F1R1		Φορέας pBluescript	
DNA	1 µl	DNA	18 µl
Buffer EcoRI	2 µl	Buffer EcoRI	3 µl
EcoRI	1 µl	EcoRI	1,5 µl
XhoI	1 µl	XhoI	1,5 µl
Νερό	15 µl	Νερό	6 µl
Τελικός Όγκος	20 µl	Τελικός Όγκος	30 µl

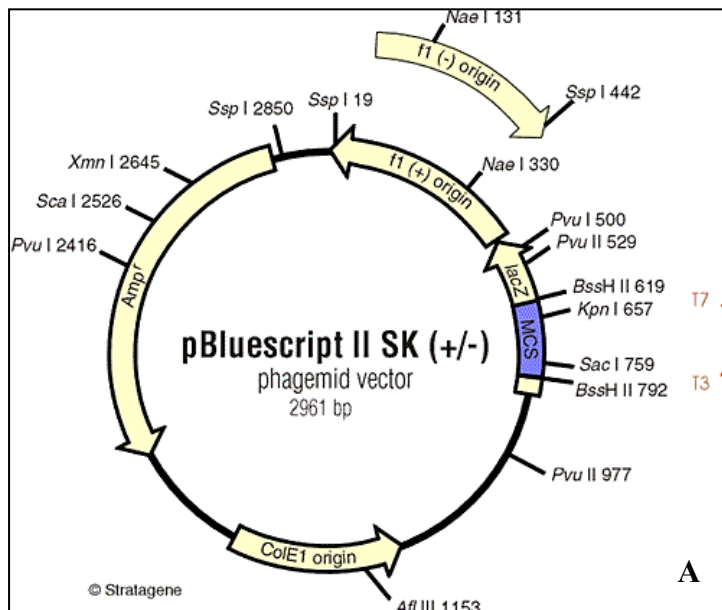
Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των πέψεων σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 0.8 % και εξαγωγή από πηκτή (gel extraction) των επιθυμητών κομματιών DNA του προϊόντος και του φορέα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο QIAquick Gel extraction kit Protocol (Cat. No. 28704) της εταιρίας Qiagen (περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.13.2) και η έκλουση του DNA έγινε σε όγκο 30 µl. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για ποσοτικοποίηση του DNA και αντίδραση συνένωσης (ligation) του τμήματος DNA με τον πλασμιδιακό φορέα (σε αναλογία τμήματος εισδοχής/φορέα περίπου 3:1) χρησιμοποιώντας το ένζυμο της T4 λιγάσης (New England Biolabs, M0202L).

Αντίδραση συνένωσης (ligation)	
Φορέας pBluescript (100 ng)	2 µl
VdSteA-F1R1 (300 ng)	8 µl
Buffer λιγάσης	2 µl
T4 λιγάση	1 µl
Νερό	7 µl
Τελικός Όγκος	20 µl

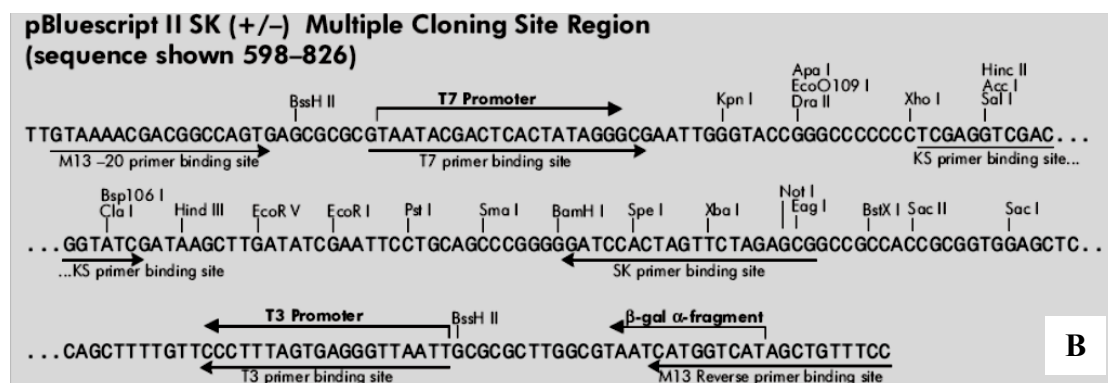
Η αντίδραση επώαστηκε στους 16 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ακολούθησε μετασχηματισμός, με εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (από την αντίδραση συνένωσης) σε επιδεκτικά κύτταρα (competent cells) DH5a του βακτηρίου *E. coli* (CaCl₂ Competent Cells) σύμφωνα με πρωτόκολλο που αναφέρεται παρακάτω. Μετά το μετασχηματισμό τα βακτήρια απλώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό LB agar με αντιβιοτικό επιλογής των μετασχηματισμένων βακτηρίων στην αμικιλίνη. Μετά από επώαση των τρυβλίων για ένα ολόκληρο

βράδου σε επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 37 °C, ακολούθησε επιλογή των αποικιών, που είχαν αναπτυχθεί στο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό, και καλλιέργειά τους για ένα ολόκληρο βράδου σε υγρή καλλιέργεια LB, στους 37 °C υπό ανάδευση. Πιο αναλυτικά, τοποθετήθηκε με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα μία αποικία σε ένα αποστειρωμένο σωλήνα falcon, που περιείχε LB και αμπικιλίνη, ώστε να γίνει απομόνωση πλασμιδιακού DNA από την κάθε αποικία ξεχωριστά.

Από τις υγρές αυτές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το πρωτόκολλο Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep kit and a Microcentrifuge (Cat. No. 12143) της εταιρίας Qiagen (περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.13.3). Ακολούθησε πέψη του πλασμιδιακού DNA με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και EcoRI, για τον έλεγχο της κλωνοποίησης στο πλασμίδιο του τμήματος DNA με το επιθυμητό μέγεθος. Στο τέλος πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του τμήματος και σύγκριση με τις αλληλουχίες 1000 βάσεων για να επιβεβαιωθεί η κλωνοποίηση του υπό μελέτη τμήματος.



Εικόνα 16: Ο πλασμιδιακός φορέας pBluescript II SK (+/-). Διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων, η θέση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και η θέση έναρξης της αντιγραφής (A) Η θέση πολλαπλής κλωνοποίησης του πλασμιδιακού φορέα, όπου διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης διαφόρων ενζύμων περιορισμού (B).



B

2.5.2 Σχεδιασμός αλληλόμορφων αντικατάστασης του υπό μελέτη γονιδίου

Από την παραπάνω διαδικασία δημιουργήθηκε, όπως αναφέρθηκε, ο φορέας **pIAS.1**, ο οποίος προέκυψε από την κλωνοποίηση ενός τμήματος 1000 περίπου βάσεων πριν το κωδικόνιο έναρξης γονιδίου αντικατάστασης (VdSteA-F1R1) στο φορέα pBluescript II SK (+/-). Μετά τη δημιουργία του φορέα **pIAS.1** ακολούθησε η δημιουργία του φορέα **pIAS.2** (pBluescript II SK (+/-) - F1R1- F2R2). Στη συγκεκριμένη κλωνοποίηση η πέψη καθώς και η αντίδραση συνένωσης πραγματοποιήθηκαν μεταξύ του τμήματος VdSteA-F2R2 και του φορέα **pIAS.1**, και όχι του pBluescript. Κατά τ' άλλα ακολουθήθηκαν τα βήματα που έγιναν για τη δημιουργία του φορέα **pIAS.1**, ωστόσο τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την περίπτωση ήταν τα BamHI-XbaI (NEB).

Στο τελικό στάδιο κατασκευής του αλληλομόρφου αντικατάστασης ενσωματώθηκε στο φορέα **pIAS.2** το γονίδιο της γενετισίνης (1600 βάσεις). Αυτό απομονώθηκε από το πλασμίδιο SK666 (που παραχωρήθηκε από τον καθηγητή S. Kang) με πέψη του με τα ένζυμα EcoRI και BamHI της εταιρίας New England Biolabs (επώαση 5 ώρες στους 37 °C).

SK666		Φορέας pIAS.2	
DNA (300 ng/μl)	18 μl	DNA (300 ng/μl)	15 μl
Buffer EcoRI	2,5 μl	Buffer EcoRI	2,5 μl
BSA 10X	2,5 μl	BSA 10X	2,5 μl
EcoRI	1 μl	EcoRI	2,5 μl
XhoI	1 μl	XhoI	2,5 μl
Νερό	- μl	Νερό	3 μl
Τελικός Όγκος	25 μl	Τελικός Όγκος	25 μl

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των πέψεων, εξαγωγή από την πηκτική και καθαρισμός των επιθυμητών τμημάτων και αντίδραση συνένωσης του κλώνου **pIAS.2** και του γονιδίου της γενετισίνης:

Αντίδραση συνένωσης (ligation)	
Φορέας pIAS.2 (100 ng)	2 μ l
Γονίδιο γενετισίνης (300 ng)	12 μ l
Buffer λιγάσης	2 μ l
T4 λιγάση	1 μ l
Νερό	5 μ l
Τελικός Όγκος	20 μ l

Μετά την επώαση της αντίδρασης συνένωσης (16 °C - 16 ώρες), ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες που περιγράφηκαν παραπάνω για τη δημιουργία του φορέα pIAS.1.

Κατ' αυτό τον τρόπο δημιουργήθηκε ο κλώνος pIAS.3. (pBluescript II SK (+/-) - F1R1 - GENETICIN - F2R2). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πέψεις με τα ένζυμα XhoI-XbaI (NEB) στον κλώνο pIAS.3 και το δυαδικό φορέα pGKO2 (που παραχωρήθηκε από τον καθηγητή S. Kang).

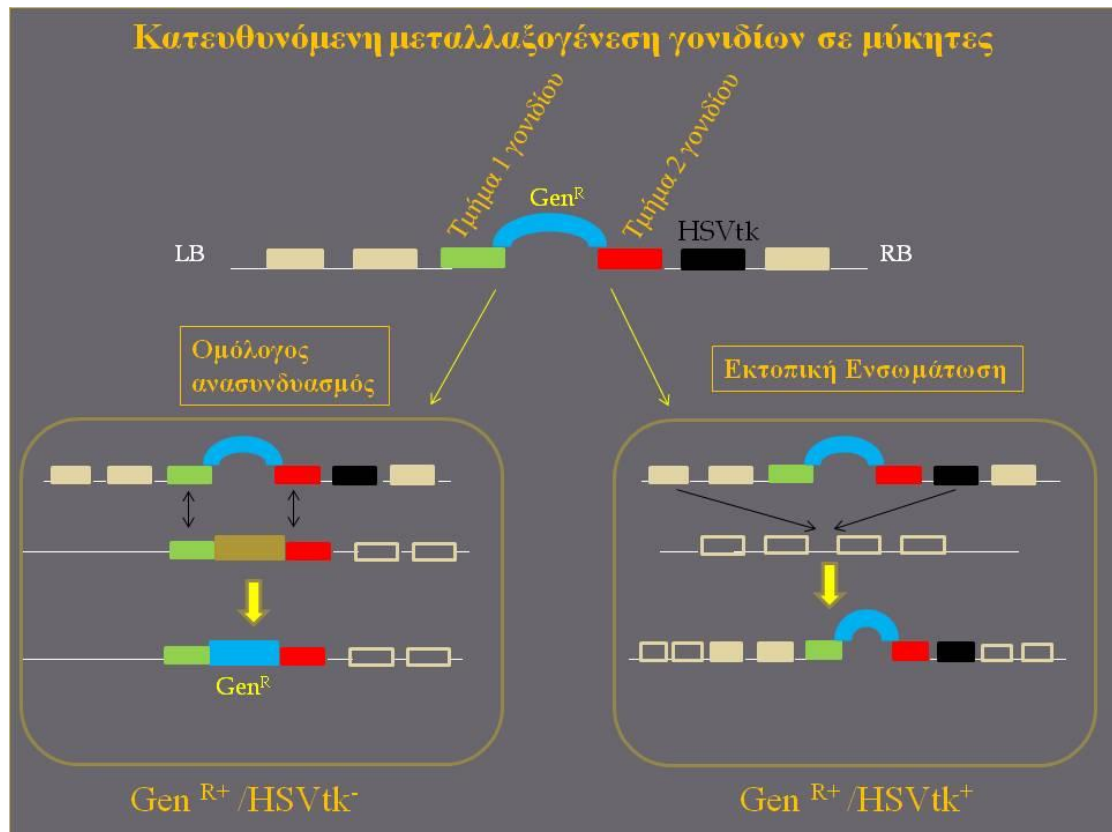
pIAS.3.		pGKO2	
DNA	10 μ l	DNA	2 μ l
Buffer EcoRI	2,5 μ l	Buffer EcoRI	2 μ l
BSA 10X	2,5 μ l	BSA 10X	2 μ l
EcoRI	1 μ l	EcoRI	1 μ l
XhoI	1 μ l	XhoI	1 μ l
Νερό	8 μ l	Νερό	12 μ l
Τελικός Όγκος	25 μ l	Τελικός Όγκος	20 μ l

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των πέψεων, εξαγωγή από την πηκτική και καθαρισμός των επιθυμητών τμημάτων και αντίδραση συνένωσης του κλώνου pGKO2 και του αλληλομόρφου αντικατάστασης:

Αντίδραση συνένωσης (ligation)	
Φορέας pGKO2 (50 ng)	3 μ l
Αλληλόμορφος αντικατάστασης (150 ng)	3 μ l
Buffer λιγάσης	1 μ l
T4 λιγάση	1 μ l
Νερό	2 μ l
Τελικός Όγκος	10 μ l

Μετά την επώαση της αντίδρασης συνένωσης (16 °C - 16 ώρες), ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες που περιγράφηκαν παραπάνω για τη δημιουργία του φορέα **pIAS.1**. Σε αυτή την περίπτωση ωστόσο μετά το μετασχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων *E. coli*, αυτά καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB agar που είχε ως αντιβιοτικό επιλογής την καναμικίνη, ενώ οι αποικίες που προέκυψαν αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια με LB και καναμικίνη. Με την παραπάνω διαδικασία εισαγωγής του αλληλομόρφου αντικατάστασης στο δυαδικό φορέα pGKO₂ προέκυψε ο κλώνος **pIAS.4**.

Μετά την ενσωμάτωση του φορέα **pIAS.4** στο T-DNA του *Agrobacterium tumefaciens* ακολούθησε μετασχηματισμός του μύκητα *V. dahliae*. Πιο αναλυτικά ο αλληλόμορφος αντικατάστασης μέσω του T-DNA του *A. tumefaciens* ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα και μετά από ομόλογο ανασυνδυασμό πραγματοποιήθηκε η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA*. Ο φορέας pGKO2 φέρει αρνητικό γονίδιο αναφοράς *HSVtk*, στην T-DNA περιοχή του, για τυχαία (εκτοπική) ενσωμάτωση που αυξάνει επιπλέον την συχνότητα γονιδιακής αντικατάστασης (Khang κ.α., 2005). Συγκεκριμένα το προϊόν του γονιδίου *HSVtk* (herpes simplex virus thymidine kinase gene) μετατρέπει την ουσία F₂DU (5-Fluoro-2'-deoxyuridine) σε ένωση τοξική για μύκητες. Έτσι στην περίπτωση που γίνει τυχαία ενσωμάτωση ολόκληρης της κασέτας σε κάποιο σημείο του γονιδιώματος, λειτουργεί το γονίδιο *HSVtk*, με αποτέλεσμα τα ανθεκτικά - εκτοπικά στελέχη να είναι ευαίσθητα στην ουσία F₂DU (**Εικόνα 17**). Συνεπώς με επιλογή μετασχηματισμένων στελεχών *V. dahliae*, σε υλικό παρουσία F₂DU και του αντίστοιχου αντιβιοτικού, αυξάνεται η πιθανότητα απομόνωσης στελεχών, στα οποία το ενδογενές γονίδιο θα έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό με ομόλογο ανασυνδυασμό.



Εικόνα 17: Ο τρόπος λειτουργίας του γονιδίου HSVtk (μαύρο κουτάκι). Το γονίδιο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του μύκητα μόνο στην περίπτωση εκτοπικής (τυχαίας) ενσωμάτωσης, προσδίδοντας ευαισθησία στην ουσία F₂DU. Στον ομόλογο ανασυνδυασμό γίνεται μόνο αντικατάσταση του αλληλόμορφου – στόχου, ενώ το γονίδιο HSVtk δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του μύκητα.

2.6 Εισαγωγή δυαδικού φορέα στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*

2.6.1 Δημιουργία επιδεικτικών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens*

Για την ενσωμάτωση της επιθυμητής κατασκευής αλληλόμορφου αντικατάστασης στο γονιδίωμα του μύκητα ο κατάλληλος δυαδικός φορέας (pGKO2) εισήχθη στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* με την εξής διαδικασία. Προκειμένου να σχηματιστούν κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* επιδεικτικά στην εισαγωγή του δυαδικού φορέα (Shawn's Protocol), εμβολιάστηκε μεμονωμένη αποικία (1-2 ημερών) του στελέχους GV3101 (hypervirulent *A. tumefaciens* strain) σε 4 ml υλικό LB που περιέχει καναμικίνη και η καλλιέργεια επώαστηκε στους 28 °C, με

περιστροφή 250 rpm μέχρι την αρχική λογαριθμική φάση (early log phase, OD600 = 0.3 – 0.6). Στη συνέχεια η καλλιέργεια 4 ml εμβολιάστηκε σε κωνική φιάλη 500 ml που περιείχε 100 ml LB και ακολούθησε επώαση στους 28 °C, με περιστροφή 250 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει 0.5 (OD600 = 0.5). Μετά από παραμονή της καλλιέργειας για 10 min στον πάγο, ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4 °C και στα 3.000 g για 10 min. Μετά από αφαίρεση της υπερκείμενης φάσης το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 2 ml 20 mM CaCl₂, και μεταφέρθηκε σε πλαστικά σωληνάκια 1.5 ml (100-200 μl ανά σωληνάκι). Τα σωληνάκια με τα κύτταρα βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C).

2.6.2 Εισαγωγή pGKO2 σε επιδεκτικά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens*

Για την εισαγωγή του επιθυμητού πλασμιδίου στα επιδεκτικά κύτταρα, 100 μl επιδεκτικών κυττάρων τοποθετήθηκαν σε πάγο να υγροποιηθούν. Ποσότητα 1 μg (περίπου 5 μl) του φορέα **pIAS.4** ανακατεύτηκε προσεκτικά με τα κύτταρα. Τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν για 5 min σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια για 25 min στους 37 °C. Μετά την προσθήκη 1 ml υλικού LB, ακολούθησε επώαση στους 28 °C, με περιστροφή 250 rpm για 3 h. Η καλλιέργεια απλώθηκε στη συνέχεια σε υλικό LB που περιείχε καναμικίνη σε συγκέντρωση 75 μg/ml. Μετά από δύο μέρες επώαση στους 28 °C, παρατηρήθηκαν οι αποικίες του *Agrobacterium tumefaciens* μετασχηματισμένες με τον επιθυμητό δυαδικό φορέα.

2.7 Μετασχηματισμός του μύκητα *V. dahliae* με τη χρήση *Agrobacterium tumefaciens*

Για τον μετασχηματισμό του μύκητα *V. dahliae* (Mullins κ.α., 2001), παρασκευάστηκαν τα απαραίτητα υλικά σύμφωνα με τον **πίνακα 2**. Στη συνέχεια, ο κλώνος *Agrobacterium tumefaciens* που έφερε τον κατάλληλο φορέα επώαστηκε σε MM (Minimal Medium) στους 28 °C, με περιστροφή 250 rpm για 2 ημέρες. Τα κύτταρα *Agrobacterium* αραιώθηκαν σε υλικό IM (induction medium), που περιείχε καναμικίνη και ακετοσυρινγκόνη, μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα (OD) 0.15 και επώαστηκαν για 6 h στους 28 °C με περιστροφή 250 rpm. Ακολούθησε ανάμειξη

100 µl αιωρήματος κονιδίων του μύκητα *V. dahliae* (συγκέντρωσης 10^6 κονίδια / ml) με 100 µl ανεπτυγμένης καλλιέργειας *Agrobacterium* και άπλωμα σε αποστειρωμένη μεμβράνη Hybond (Εικόνα 18) που είχε τοποθετηθεί σε υλικό συγκαλλιέργειας (Co-cultivation medium). Μετά από συγκαλλιέργεια δύο ημερών οι μεμβράνες Hybond μεταφέρθηκαν σε υλικό επιλογής (PDA) που περιείχε κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού γενετισίνης, 200 µM σεφοταξίμη και 100 µg/ml μοξαλακτάμη. Οι μετασχηματισμένες αποικίες του μύκητα εμφανίστηκαν μετά από 3-4 μέρες επώασης στο υλικό επιλογής.

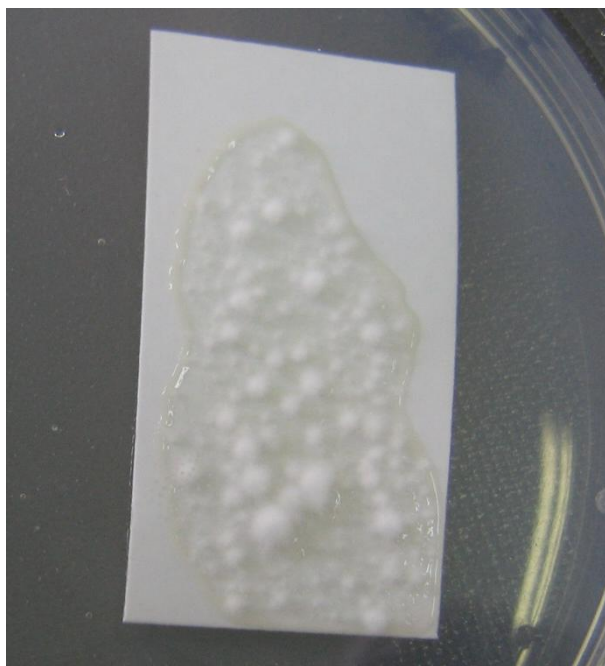
Διαλύματα - Αντιδραστήρια	Πυκνό διάλυμα (100 ml) ¹		MM ²	IM ³	CM ⁴
	Χημική Ουσία	Ποσότητα	Ποσότητα για παρασκευή 100 ml		
Phosphate-buffer (pH 7.0)	K ₂ HPO ₄	20.00 g	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
	KH ₂ PO ₄	14.50 g			
M-N	MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.00 g	2.00 ml	2.00 ml	2.00 ml
	NaCl	1.50 g			
1% CaCl ₂ · 2H ₂ O	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.00 g	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g			
	H ₃ BO ₃	0.01 g			
	MnSO ₄ · H ₂ O	0.01 g			
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.01 g			
20% NH ₄ NO ₃	NH ₄ NO ₃	20.00 g	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml
20% Γλυκόζη	Γλυκόζη	20.00 g	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
0.01% FeSO ₄	FeSO ₄	0.01 g	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
50% Γλυκερόλη	Γλυκερόλη	50 ml	-	1.00 ml	1.00 ml
1M MES (pH 5.3)	MES	21.32 g	-	4.00 ml	4.00 ml
Αποστειρωμένο H ₂ O			93.5 ml	88.5 ml	88.50 ml
Καναμικίνη (50mg/ml)			0.15 ml	0.15 ml	0.15 ml
Ακετοσυρινγκόνη (200 µM)			-	0.2 ml	0.20 ml
Agar			-	-	1.50 g

Πίνακας 2. Παρασκευή πυκνών διαλυμάτων και υλικών για ATMT μετασχηματισμό

¹ Όλα τα πυκνά διαλύματα παρασκευάστηκαν σε απιονισμένο νερό, με εξαίρεση την ακετοσυρινγκόνη που παρασκευάστηκε σε 95% αιθανόλη. Το πυκνό αυτό διάλυμα δεν αποστειρώθηκε επιπλέον. Τα διαλύματα καναμικίνης και MES αποστειρώθηκαν με διέλευση από φίλτρο 0.22-μm.

^{2, 3, 4} Τα υλικά MM (minimal medium), IM (induction medium, υλικό επαγωγής) και CM (co-cultivation medium, υλικό συγκαλλιέργειας) παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 2.3.1, χωρίς την προσθήκη καναμικίνης, ακετοσυρινγκόνης και MES (τα οποία προστέθηκαν κατά τον μετασχηματισμό). Ακολούθησε αποστείρωση για 20 λεπτά στους 120 °C, με πίεση 1 atm.

Όλα τα παραπάνω υλικά και διαλύματα διατηρήθηκαν στους 4 °C, με εξαίρεση τα διαλύματα, καναμικίνης, ακετοσυρινγκόνης και MES που αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.



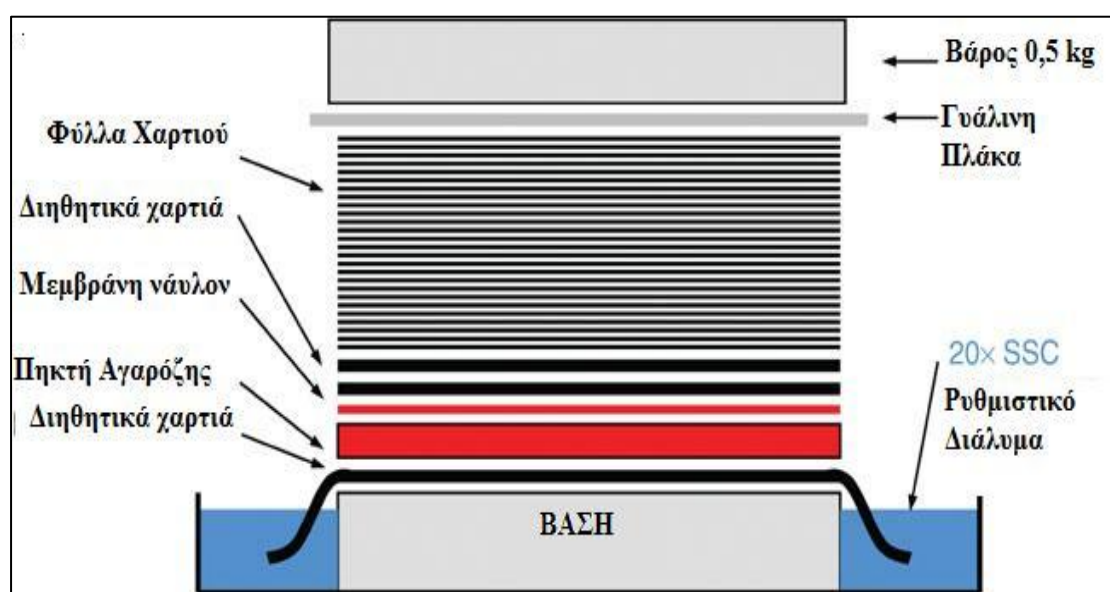
Εικόνα 18: Ανάπτυξη μυκηλίου σε μεμβράνη Hybond, δύο ημέρες μετά από την τοποθέτησή της σε τρυβλίο με υλικό συγκαλλιέργειας *Agrobacterium* και *V. dahliae*.

2.8 Υβριδισμός κατά Southern στα μετασχηματισμένα στελέχη του *V. dahliae*

Ο υβριδισμός κατά Southern εφαρμόστηκε προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αντικατάσταση του γονιδίου *VdSteA* από τον αλληλόμορφο αντικατάστασης στο γονιδίωμα του μύκητα *V. dahliae*. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε πέψη με το

περιοριστικό ένζυμο EcoRI και το περιοριστικό ένζυμο NcoI (New England Biolabs, RO193S) σε 30 μg γονιδιακού DNA αντιπροσωπευτικών μετασηματισμένων και αγρίου στελεχών του μύκητα για 12-16 h. Τα τμήματα που προέκυψαν διαχωρίστηκαν σε πηκτή αгарόζης (1%) σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X, με εφαρμογή τάσης 20 Volt για 16 -20 h.

Μετά από χειρισμό της πηκτής με διάλυμα 0,25 M HCl για 10 min, διάλυμα αποδιάταξης (1,5 M NaCl & 0,5 M NaOH) για 20 min και διάλυμα εξουδετέρωσης (1,5 M NaCl & 0,5 M Tris, 1 mM EDTA) για 20 min, ακολούθησε αποτύπωση της πηκτής σε μεμβράνη Hybond για 12 -16 h. (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Τα μέρη από τα οποία αποτελείται το σύστημα αποτύπωσης της πηκτής αγαρόζης σε μεμβράνη Hybond. Τα άκρα των διηθητικών χαρτιών που τοποθετούνται πάνω από τη βάση είναι βυθισμένα μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα 20X SSC. Το παχύ κόκκινο αναπαριστά την πηκτή αγαρόζης και τα λεπτό κόκκινο τη μεμβράνη Hybond, όπου γίνεται η αποτύπωση. Επάνω από τη μεμβράνη τοποθετούνται διηθητικά χαρτιά κορεσμένα σε 20x SSC, καθώς και φύλλα απορροφητικού χαρτιού. Αυτά με την προσθήκη βάρους, απορροφούν το ρυθμιστικό διάλυμα από κάτω προς επάνω, παρασύρουν και το DNA, το οποίο βρίσκεται στην πηκτή και το μεταφέρουν στη μεμβράνη Hybond, στην οποία γίνονται οι περαιτέρω χειρισμοί για τον υβριδισμό και την αποτύπωση (προσαρμογή από *Nature protocols*).

Μετά από προσήλωση του DNA στη μεμβράνη με εφαρμογή ακτινοβολίας UV για 3 min, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε σωλήνα υβριδισμού και πραγματοποιήθηκε προϋβριδισμός για 1 h στους 42 °C σε διάλυμα υβριδισμού (5X SSC, 50% φορμαμίδιο, 0.01% N-Laurylsarconsine, 2 % Blocking, 0.2 % SDS). Το τμήμα DNA που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής είχε σημειωθεί με DIG μετά από εφαρμογή PCR σύμφωνα με το nonradioactive Dig labeling and detection kit (Cat No. 11093657910). Αποδιατάχθηκαν 2 μl ανιχνευτή DNA (περίπου 150 ng) (probe) σε 8

μl διαλύματος υβριδισμού σε κοχλάζων νερό για 10 min και προστέθηκε μαζί με νέο διάλυμα υβριδισμού (20 ml) στο σωλήνα που περιείχε τη μεμβράνη. Ακολούθησε υβριδισμός στους 42 °C και περιστροφή 8 rev/min για 12 – 16 h. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το τμήμα 1000 βάσεων από το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *VdSteA*, που σημάνθηκε με την παρακάτω αντίδραση PCR.

Αντίδραση PCR για Probe	
DNA	1 μl
Buffer 10x	3 μl
MgCl₂	0,9 μl
Dig- dNTPs	2,5 μl
VdSteA-F1-XhoI	1 μl
VdSteA-R1-EcoRI	1 μl
Νερό	20,3
Τελικός Όγκος	30 μl

Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε έκπλυση της περίσσειας ανιχνευτή με ανάδευση της μεμβράνης δύο φορές για 5 min σε wash solution I (2X SSC, 0.1 % SDS) σε θερμοκρασία δωματίου και δύο φορές για 15 min σε wash solution II (0.1X SSC, 0.1 % SDS) σε θερμοκρασία 65 °C.

Για την εμφάνιση, πραγματοποιήθηκε χειρισμός της μεμβράνης με Buffer 1 (maleic acid buffer, pH 7.5) για 1 min, ακολούθησε μπλοκάρισμα (blocking) της μεμβράνης με ανάδευση σε 100 ml Buffer 2 (1% Blocking reagent in Buffer 1) για 30 min. Το σύζευγμα DIG αντισώματος - αλκαλικής φωσφατάσης διαλύθηκε σε συγκέντρωση 150 mU/ml (1:5000) σε 20 ml Buffer 2 και ακολούθησε επώαση μεμβράνης με ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία 25 °C. Το σύζευγμα DIG αντισώματος-αλκαλικής φωσφατάσης απομακρύνθηκε με έκπλυση της μεμβράνης δύο φορές επί 15 min σε 100 ml Buffer 1 με ανάδευση. Μετά από εξισορρόπηση της μεμβράνης σε 20 ml Buffer 3 (0.1M NaCl, 0.1 Tris, 50 mM MgCl₂) για 2 min ακολούθησε προσθήκη του αντιδραστηρίου CPD star (30 – 40 μl / cm² μεμβράνης) της εταιρείας Amersham (Αγγλία) (RPN 3682, for chemiluminescent detection of alkaline phosphatase), για παραγωγή σήματος μετά από έκθεση ειδικού φιλμ (X-Ray) για 15 – 30 min παρουσία της μεμβράνης και εμφάνιση σε σκοτεινό θάλαμο με κατάλληλα φωτογραφικά υγρά εμφάνισης και στερέωσης. Πιο αναλυτικά η μεμβράνη

η οποία έχει εμποτιστεί με το αντιδραστήριο CPD star, τοποθετείται στην κασετίνα εμφάνισης με την πλευρά της αποτύπωσης προς τα επάνω. Στη συνέχεια σε συνθήκες σκότους τοποθετείται το φιλμ επάνω στη μεμβράνη και εκτίθεται για 40 min στο αντιδραστήριο CPD star. Μετά την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος πραγματοποιείται η εμφάνιση του φιλμ σε συνθήκες σκότους με φωτογραφικά υγρά ως εξής:

1. Το φιλμ εμβαπτίζεται, σε σκουρόχρωμη λεκάνη, μέσα σε 400 ml υγρού εμφάνισης (developer) και αναδεύεται για 2 λεπτά. Σε αυτή τη φάση σκουραίνει το φιλμ και αρχίζει να εμφανίζεται το σήμα.
2. Ακολουθεί εμβάπτιση του φιλμ, σε ανοιχτόχρωμη λεκάνη, μέσα σε 400 ml υγρού στερέωσης (fixing solution) και ανάδευσή του για 3 λεπτά. Σε αυτή τη φάση η εικόνα γίνεται πιο καθαρή και σταθεροποιείται ώστε να μην επηρεάζεται το σήμα, παρουσία φωτός.
3. Ακολουθεί ξέπλυμα του φιλμ με νερό της βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει.

2.9 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Αφού έγινε απομόνωση RNA από τα μετασηματισμένα στελέχη, με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω (2.3.3), πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής. Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του επιπέδου μεταγραφής του υπό μελέτη γονιδίου καθώς και του γονιδίου της β τουμπουλίνης στο μύκητα *V. dahliae* που χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς.

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Superscript III αντίστροφης μεταγραφάσης της εταιρείας Invitrogen (Cat. No. 18080-044). Αρχικά τοποθετήθηκαν 2 µg RNA μαζί με oligoDTs (30 µM) και dNTPS (2,5 mM) σε τελικό όγκο 13,5 µl και ακολούθησε αποδιάταξη του RNA στους 65 °C για 5 min. Στη συνέχεια η αντίδραση τοποθετήθηκε σε πάγο για 1 min και ακολούθησε προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων (Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης RT τελικής συγκέντρωσης 5X, DTT 100 mM, 20 U παρεμποδιστή ριβοζονουκλεασών, 50 U ένζυμο Superscript III). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 µl και επώαστηκε για 60 λεπτά στους 50 °C και ακολούθησε απενεργοποίηση του ενζύμου

στους 70 °C για 15 min. Για την ενίσχυση με PCR του μετάγραφου του υπό μελέτη γονιδίου πραγματοποιήθηκε αντίδραση σε 1 µl από την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί στις κωδικές περιοχές των υπό μελέτη γονιδίων. Παρακάτω παρουσιάζεται η αντίδραση της RT-PCR, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε.

RT-PCR	
RNA (2 µg) + Νερό	8,5 µl
30 µM oligoDT	2 µl
2,5 mM dNTPs	3 µl
Τελικός όγκος	13,5 µl
65°C για 5 mins – 1 min στον πάγο	
5X Buffer	4 µl
100mM DTT	1 µl
RNA guard	0,5 µl
Superscript III	1 µl
Τελικός όγκος	20 µl
50°C για 60 mins και 70°C για 15 mins	

2.9.1 Εκκινητές για τον έλεγχο της απενεργοποίησης του γονιδίου σε μεταγραφικό επίπεδο

Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση του γονιδίου τόσο στα άγρια όσο και στα μεταλλαγμένα στελέχη, σχεδιάστηκαν οι εκκινητές **VdSteA-F4**, **VdSteA-R4**, **VdSteA-F7** και **VdSteA-R7** (Εικόνα 14). Το ζευγάρι εκκινητών **VdSteA-F4** και **VdSteA-R4** ενισχύει ένα τμήμα περίπου 150 βάσεων εντός της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *VdSteA* και το ζευγάρι εκκινητών **VdSteA-F7** και **VdSteA-R7** ενισχύει ένα τμήμα περίπου 330 βάσεων εντός της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *VdSteA*.

Εκκινητές	
VdSteA-F4	5' - CACATTCCTTTGCTGGCGACTATTC -3'
VdSteA-R4	5' - AGACAGCGGGTAAGAGGTTGACAG - 3'
VdSteA-F7	5' - GCATAACGCCCTCAGCAAGATT - 3'
VdSteA-R7	5' - CCGATGGCCGTGAAAGAAACA - 3'

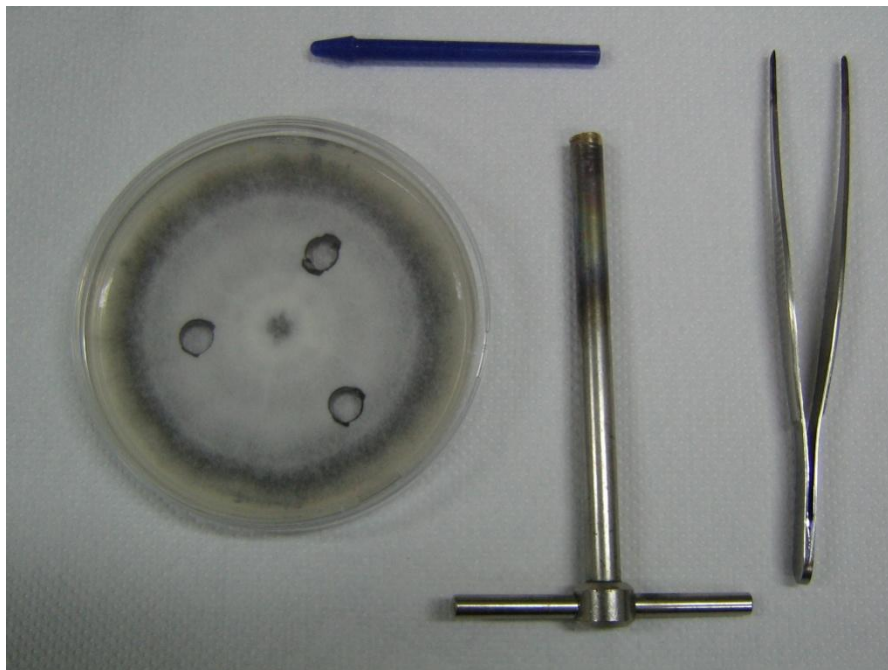
2.10 Μορφολογικός και φυσιολογικός χαρακτηρισμός των $\Delta VdSteA$ στελεχών.

Αντιπροσωπευτικά $\Delta VdSteA$ στελέχη που προέκυψαν στα πλαίσια αυτής της μελέτης, αξιολογήθηκαν ως προς διάφορα φυσιολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα άγρια στελέχη από τα οποία προέκυψαν. Για την αξιολόγηση της μυκηλιακής αύξησης αγρίων και μεταλλαγμένων στελεχών πραγματοποιήθηκε πείραμα μέτρησης διαμέτρου με τοποθέτηση 10 μl (συγκέντρωσης 10^6 κον/ ml) στο κέντρο τρυβλίων που περιείχαν 25 ml θρεπτικού υποστρώματος SSN-agar (Sucrose-Sodium-Nitrate H plus agar). Από τη στιγμή που τοποθετήθηκαν τα 10 μl στο κέντρο των τρυβλίων μετρήθηκε η διάμετρος των αποικιών για χρονικό διάστημα από 2 μέχρι 30 ημέρες. Ταυτόχρονα έγινε καταγραφή της εμφάνισης και μορφολογίας των αποικιών.

Για να συγκριθεί η ικανότητα παραγωγής κονιδίων και μικροσκληρωτίων μεταξύ των στελεχών αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αυτών των χαρακτηριστικών ως εξής: Με φελλοτρυπητήρα, με διάμετρο στομίου 0,5 cm, απομονώθηκαν 3 δισκία από τρυβλία όπου είχαν αναπτυχθεί τα στελέχη του *V. dahliae* για χρονικό διάστημα 30 ημερών. Στη συνέχεια έγινε παραλαβή των κυκλικών αυτών τμημάτων, που αποτελούνταν από θρεπτικό υλικό και ανεπτυγμένο μυκήλιο, και περαιτέρω τοποθέτηση τους σε μικροσωληνίσκο που περιείχε 800 ml αποστειρωμένο νερό. Αφού έγινε η διάλυση τους εντός του μικροσωληνίσκου με μικρό αποστειρωμένο πλαστικό γουδοχέρι στη συνέχεια έγινε μέτρηση κονιδίων και μικροσκληρωτίων σε αιματοκυτταρόμετρο (**Εικόνα 20**).

Για την εκτίμηση της βλαστικής ικανότητας μεταξύ των άγριων στελεχών *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων $\Delta VdSteA$ ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 ml για 4 ημέρες. Από τις κωνικές

αυτές έγινε παραλαβή 3 ml ανά στέλεχος, με συγκέντρωση 10^8 κονίδια/ml και τοποθέτησή τους σε σωλήνες των 15 ml, οι οποίοι αναπύχθηκαν υπό ανάδευση για ένα βράδυ. Την επόμενη ημέρα, τοποθετήθηκε 1 ml από κάθε σωλήνα σε καινούριο σωλήνα των 15 ml που περιείχε 9 ml αποστειρωμένου SSN και τοποθετήθηκαν και αυτοί οι σωλήνες υπό ανάδευση. Παράλληλα από αυτούς τους σωλήνες γινόταν παραλαβή δείγματος και μέτρηση ποσοστού βλαστημένων κονιδίων ανά στέλεχος κάθε 2 ώρες, με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου.

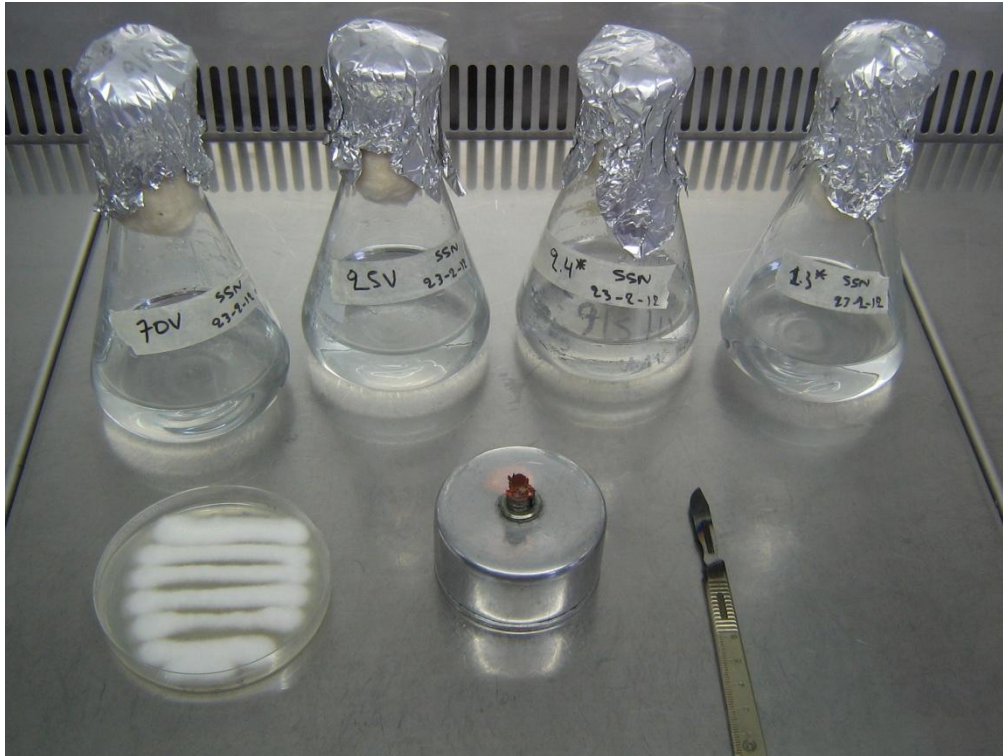


Εικόνα 20: Τα εργαλεία με τα οποία έγινε η λήψη των δισκίων και η διάλυσή τους, ώστε να γίνει η μέτρηση κονιδίων και μικροσκληρωτίων. Διακρίνονται 1 μικρό πλαστικό γουδοχέρι, 1 μεταλλικός φελλοτρυπητήρας και μια μεταλλική λαβίδα, με την οποία γινόταν η παραλαβή των κομμένων τμημάτων από το τρυβλίο. Αριστερά στη φωτογραφία ένα τρυβλίο όπου φαίνεται ο τρόπος δειγματοληψίας για τις μετρήσεις.

2.11 Δοκιμές παθογένειας σε επιλεγμένους ξενιστές

Για τη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *VdSteA* στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*, μεταλλαγμένα στελέχη στο παραπάνω γονίδιο εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν ασθένεια σε φυτά μελιτζάνας (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) και φυτά τομάτας (*Lycopersicon esculentum* cv. Ailsa Craig).

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα παθογένειας. Στο πρώτο πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε φυτά *Solanum melongena* εξετάστηκε η παθογένεια των αγρίων στελεχών 25V και 70V του *V.dahliae* και 6 μεταλλαγμένων $\Delta VdSteA$ στελεχών, των TIAS 1.3, TIAS 1.4, TIAS 1.6 (μεταλλαγμένα στελέχη του 25V) και των TIAS 2.2, TIAS 2.3, TIAS 2.4 (μεταλλαγμένα στελέχη του 70V) (10 φυτά ανά επέμβαση), τα οποία μολύνθηκαν στο στάδιο του τρίτου πραγματικού φύλλου, με ριζοπότισμα 10 ml αιωρήματος κονιδίων συγκέντρωσης 4×10^6 κονίδια/ml του υπό μελέτη στελεχούς αντίστοιχα. Στο δεύτερο πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε φυτά *Solanum melongena* εξετάστηκε η παθογένεια των αγρίων στελεχών 25V και 70V του *V.dahliae* και 2 επιλεγμένων μεταλλαγμένων $\Delta VdSteA$ στελεχών, των TIAS1.3 (μεταλλαγμένο στέλεχος του 25V) και TIAS 2.4 (μεταλλαγμένο στέλεχος του 70V) (20 φυτά ανά επέμβαση), τα οποία μολύνθηκαν στο στάδιο του τρίτου πραγματικού φύλλου, με ριζοπότισμα 10 ml αιωρήματος κονιδίων συγκέντρωσης 4×10^6 κονίδια/ml του υπό μελέτη στελεχούς αντίστοιχα. Η τρίτη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε φυτά τομάτας (3 επαναλήψεις, 10 φυτά / επανάληψη) και επανεξετάστηκε η παθογένεια των ίδιων στελεχών. Τα φυτά τομάτας μολύνθηκαν στο στάδιο του τέταρτου πραγματικού φύλλου με ριζοπότισμα 10 ml αιωρήματος κονιδίων συγκέντρωσης 4×10^6 κονίδια/ml. Σε όλα τα παραπάνω πειράματα, για την παρασκευή του μολύσματος, τα υπό μελέτη στελέχη ενεργοποιήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA και στη συνέχεια τμήμα μυκηλίου από κάθε στέλεχος καλλιεργήθηκε για τέσσερις μέρες σε υλικό SSN υπό ανάδευση (**Εικόνα 21**). Ακολούθησε διήθηση των καλλιεργειών σε 4–5 στρώσεις τούλι και δημιουργία αιωρήματος συγκέντρωσης 4×10^6 κονιδίων ανά ml.



Εικόνα 21: Διαδικασία μόλυνσης κωνικών που περιέχουν SSN. Διακρίνονται κωνικές που περιέχουν αποστειρωμένο υλικό SSN, τρυβλίο PDA όπου έχει αναπτυχθεί το μυκήλιο του μύκητα, εστία φωτιάς και νυστέρι. Με το νυστέρι, το οποίο καίγεται στη φωτιά, κόβονται 3 τμήματα από το αναπτυσσόμενο μυκήλιο και τοποθετούνται εντός της κωνικής, το στόμιο της οποίας, επίσης καίγεται στη φλόγα. Στη συνέχεια, αφού κλειστεί καλά η κωνική φιάλη, με βαμβάκι και αλουμινοχαρτό όπως στη φωτογραφία, τοποθετούνται για ανάδευση, σε επωαστικό θάλαμο, μέχρι να θολώσει από τον αναπτυσσόμενο μύκητα το περιεχόμενο της κωνικής. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής.

2.12 Εκτίμηση παθογόνου ικανότητας και δείκτης ασθένειας

Για την εκτίμηση της παθογόνου ικανότητας αγρίων και μεταλλαγμένων στελεχών, καταγράφηκε η πρόοδος της ασθένειας κάθε στελέχους σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και υπολογίστηκε ο δείκτης AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve, εμβαδό κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας).

Το ποσοστό της ασθένειας στις μετρήσεις σε φυτά μελιτζάνας υπολογίστηκε από τον αριθμό των φύλλων που παρουσίασαν συμπτώματα σε σχέση με το συνολικό αριθμό φύλλων κάθε φυτού. Στην περίπτωση της τομάτας το ποσοστό της ασθένειας υπολογίστηκε με την καταμέτρηση του ποσοστού ασθενών φυλλαρίων σε κάθε πραγματικό φύλλο, που παρουσίαζε συμπτώματα. Ακολούθησε γραφική παράσταση των ποσοστών ασθένειας κάθε επέμβασης σε σχέση με το χρόνο. Με βάση το εμβαδό της καμπύλης προόδου της ασθένειας που προέκυψε υπολογίστηκε ο δείκτης

AUDPC, σύμφωνα με τη μέθοδο των Campbell και Madden (1990). Προκειμένου να συσχετιστεί ο δείκτης AUDPC με την ένταση της ασθένειας, ο δείκτης αυτός εκφράστηκε ως ποσοστό της μέγιστης τιμής AUDPC για όλη την διάρκεια του πειράματος (που αντιστοιχεί σε 100 % προσβολή) και αναφέρθηκε ως ποσοστό ασθένειας βάση AUDPC (Korolev *et al.*, 2001).

Τιμές με βάση αυτό το ποσοστό για κάθε επέμβαση υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA και οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με πολλαπλή δοκιμή κατά Duncan (Duncan's multiple range test).

2.13 Πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν

2.13.1 Καθαρισμός προϊόντος PCR MinElute - PCR purification kit (Qiagen)

1. Προσθήκη 5 όγκων Buffer PBI σε ένα όγκο της αντίδρασης PCR και μίξη.
2. Έλεγχος ότι το χρώμα του μίγματος είναι κίτρινο (παρόμοιο με το Buffer PBI χωρίς το δείγμα PCR).
3. Τοποθέτηση μιας στήλης MinElute σε ένα παρεχόμενο συλλεκτικό σωληνάκι σε κατάλληλο στήριγμα.
4. Για τη δέσμευση του DNA, τοποθετείται το δείγμα στη στήλη MinElute και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
5. Απόρριψη του διηθήματος και τοποθέτηση της στήλης πίσω στο συλλεκτικό σωληνάκι.
6. Προσθήκη 750 μ l Buffer PE στη στήλη MinElute και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, για ξέπλυμα του DNA.
7. Απόρριψη του διηθήματος και τοποθέτηση της στήλης πίσω στο συλλεκτικό σωληνάκι. Φυγοκέντρηση της στήλης για ένα ακόμη λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα.
8. Τοποθέτηση της στήλης MinElute σε ένα καθαρό σωληνάκι μικροφυγοκέντρου των 1,5 ml.
9. Για την έκλυση του DNA, ακολουθεί προσθήκη 30 μ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ή νερού (pH 7.0-8.5) στο κέντρο της μεμβράνης, στάση για 1 λεπτό και μετά φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

2.13.2 Εξαγωγή DNA από πηκτή αγαρόζης - QIAquick Gel Extraction Kit Protocol using a microcentrifuge

1. Αποκοπή του τμήματος DNA από το πήγμα αγαρόζης με ένα καθαρό, κοφτερό χειρουργικό νυστέρι.
2. Ζύγιση του τμήματος της πηκτής σε ένα άχρωμο σωληνάκι. Προσθήκη 3 όγκων Buffer QG σε ένα όγκο του πηγματος (100 mg – 100 µl)
3. Επώαση στους 50° C για 10 λεπτά (ή μέχρι τη πλήρη διάλυση του τμήματος πηγματος). Για τη διευκόλυνση της διάλυσης του πηγματος, πραγματοποιείται ανάμιξη με στροβιλισμό (vortex) κάθε 2-3 λεπτά κατά τη διάρκεια της επώασης.
4. Κατόπιν πλήρους διάλυσης του τμήματος πηκτής, γίνεται έλεγχος του χρώματος του μίγματος και αυτό πρέπει να παραμένει κίτρινο (παρόμοιο με το Buffer QG χωρίς το τμήμα πηγματος).
5. Προσθήκη ενός όγκου πηγματος ισοπροπανόλης στο δείγμα και ανάμιξη.
6. Τοποθέτηση μιας στήλης QIAquick spin σε ένα παρεχόμενο συλλεκτικό σωληνάκι των 2 ml.
7. Για τη δέσμευση του DNA, τοποθέτηση του δείγματος στην στήλη QIAquick και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
8. Απόρριψη του διηθήματος και τοποθέτηση της στήλης QIAquick πίσω στο ίδιο συλλεκτικό σωληνάκι.
9. Προαιρετικά: Προσθήκη 0.5 ml Buffer QG στην στήλη QIAquick και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
10. Για ξέπλυμα, προσθήκη 0.75 ml Buffer PE στην στήλη QIAquick και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό κατόπιν παραμονής του στη στήλη για 5 λεπτά.
11. Απόρριψη του διηθήματος και φυγοκέντρηση της στήλης QIAquick για 1 ακόμη λεπτό στα $\geq 10,000 \times g$ (13,000 rpm).
12. Τοποθέτηση της στήλης QIAquick σε ένα καθαρό σωληνάκι μικροφυγοκέντρου των 1,5 ml.
13. Για την έκλυση του DNA, προσθήκη 40 - 50 µl Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ή νερού (pH 7.0-8.5) στο κέντρο της μεμβράνης QIAquick, παραμονή της μεμβράνης για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα.

2.13.3 Εξαγωγή πλασμιδιακού DNA - Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge

1. Συλλογή βακτηριακών κυττάρων από 3 ml καλλιέργειας σε LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό, με φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13000 rpm.
2. Επαναιωρηματοποίηση ιζηματοποιημένων βακτηριακών κυττάρων σε 250 µl Buffer P1 και μεταφορά σε ένα σωληνάκι μικροφυγοκέντρου.
3. Προσθήκη 250 µl Buffer P2 και επιμελής μίξη αναποδογυρίζοντας τα σωληνάκια 4-6 φορές.
4. Προσθήκη 350 µl Buffer N3 και άμεση και επιμελής μίξη αναποδογυρίζοντας τα σωληνάκια 4-6 φορές.
5. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13,000 rpm (-17,900 x g) σε μια επιτραπέζια φυγόκεντρο.
6. Τοποθέτηση της υπερκείμενης φάσης του βήματος 4 στην στήλη QIAprep Spin με μετάγγιση ή πιπέτα.
7. Φυγοκέντρηση για 30-60 δευτερόλεπτα. Απόρριψη διηθήματος.
8. Συνιστάται: Πλύση της στήλης QIAprep Spin με προσθήκη 0.5 ml Buffer PB και φυγοκέντρηση για 30-60 δευτερόλεπτα. Απόρριψη διηθήματος.
9. Ξέπλυμα της στήλης QIAprep Spin με προσθήκη 0.75 ml Buffer PE και φυγοκέντρηση για 30-60 δευτερόλεπτα.
10. Απόρριψη διηθήματος και φυγοκέντρηση για 1 ακόμη λεπτό για απομάκρυνση του υπολειμματικού buffer πλυσίματος.
11. Τοποθέτηση της στήλης QIAprep Spin σε ένα καθαρό σωληνάκι μικροφυγοκέντρου των 1,5 ml. Για την έκλυση του DNA, προσθήκη 50 µl Buffer EB στο κέντρο της μεμβράνης QIAquick, παραμονή της μεμβράνης για 1 λεπτό και ακολούθως φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

2.13.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA λίγων αντιγράφων - Isolation of a low-copy plasmid from Agrobacterium using QIAprep technology

1. Ανάπτυξη κυττάρων *Agrobacterium* που περιέχουν το φορέα σε υγρή καλλιέργεια θρεπτικού υλικού LB (1 αποικία σε 10 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB που περιέχουν καναμικίνη και ριφαμπικίνη).

2. Συλλογή κυττάρων με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 3,500 rpm (-1500 x g) σε σωληνάκια.
3. Επαναιωρηματοποίηση σε 250 µl Buffer N3 και άμεση αλλά προσεκτική ανατροπή των σωληνίσκων 4-6 φορές.
4. Μεταφορά της εναιωρούμενης φάσης στα τοιχώματα των στηλών QIAprep spin και φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 1 λεπτό.
5. Πλύση της μεμβράνης μία φορά με 1 ml Buffer PB.
6. Πλύση της μεμβράνης δύο φορές με 1 ml Buffer PE.
7. Στέγνωμα της μεμβράνης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων Buffer PE με ζωηρό χτύπημα των σωληνίσκων ανάποδα σε απορροφητικό χαρτί.
9. Για τη δέσμευση του DNA, προσθήκη 50 µl Buffer EB προθερμασμένο στους 70° C κατευθείαν στο κέντρο της μεμβράνης.
10. Παραμονή της μεμβράνης για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 1 λεπτό.

2.14 Θρεπτικά Υποστρώματα ανάπτυξης μυκήτων και βακτηρίων

2.14.1 PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Για 1 λίτρο PDA :

Σε μια κωνική φιάλη που περιέχει 500 ml απιονισμένο νερό, προστίθενται 200 g πατάτας και βράζουν σε μπεν μαρί για 45 min. Παράλληλα 20 g άγαρ προστίθενται σε κωνική φιάλη με 500 ml απιονισμένο νερό και βράζουν σε μπεν μαρί μέχρι να λιώσει καλά το άγαρ. Το εκχύλισμα της πατάτας φιλτράρεται σε τουλουπάνι και προστίθεται το λιωμένο άγαρ και 20 g γλυκόζης. Ογκομετρείται το τελικό διάλυμα και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1 λίτρου. Ακολουθεί αποστείρωση σε υγρό κλίβανο, στους 120 °C για 20 min.

2.14.2 SSN (*Sucrose-Sodium-Nitrate*)

Για 1 λίτρο SSN προστίθενται τα παρακάτω υλικά σε 900 ml απιονισμένο νερό, το οποίο αναδεύεται και ακολουθεί αποστείρωση σε υγρό κλίβανο, στους 120 °C για 20 min:

Υλικά	Ποσότητα
Sucrose	15 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
NaNO_3	2 g
KCl	0.5 g
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	1 ml

Για το διάλυμα ιχνοστοιχείων γίνεται ζύγιση των παρακάτω υλικών και προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι να συμπληρωθούν 100 ml :

Υλικά	Ποσότητα
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	249 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	40 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	41 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	51 mg

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος SSN (SSN agar), πριν την αποστείρωση προσθήκη 20 g Agar ανά λίτρο υλικού.

2.14.3 *Luria Bertani medium (LB)*

Για 1 λίτρο LB προστίθενται τα παρακάτω υλικά σε 950 ml απιονισμένο νερό και ακολουθεί αποστείρωση σε υγρό κλίβανο, στους 120 °C για 20 min :

Υλικά	Ποσότητα
Bacto tryptone	10 g
Bacto yeast extract	5 g
NaCl	10 g

Μετά την προσθήκη των υλικών, υπό ανάδευση, και την πλήρη διάλυσή τους γίνεται ρύθμιση του pH στην τιμή 7.0 με προσθήκη 5 N NaOH. Αφού συμπληρωθεί ο όγκος με νερό μέχρι το 1 λίτρο, ακολουθεί αποστείρωση σε υγρό κλίβανο, στους 120 °C για 15 min :

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος LB (LB agar), πριν την αποστείρωση προσθήκη 15 g Agar Bacteriological grade ανά λίτρο υλικού.

3. Αποτελέσματα

3.1 Βιοπληροφορική ανάλυση των GPCRs του μύκητα *V. dahliae*

Η διαδικασία σύμφωνα με την οποία πραγματοποιήθηκε η βιοπληροφορική ανάλυση περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1. Στα αποτελέσματα της αναζήτησης, βρέθηκαν ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες στο μύκητα *V. dahliae* που προέκυψαν μεταξύ της σύγκρισης α) είτε των πρωτεϊνικών αλληλουχιών του *A. nidulans* με το *V. dahliae* β) ή των πρωτεϊνικών αλληλουχιών του *M. grisea* με το *V. dahliae*, ή και γ) των ομόλογων αλληλουχιών στο *V. dahliae* που αντιστοιχούσαν σε αλληλουχίες και του *A. nidulans* και του *M. grisea*. Μετά το πέρας της ανάλυσης έγινε επιλογή των αλληλουχιών που είχαν τη μεγαλύτερη ομολογία με τους GPCRs των μυκήτων *A. nidulans* και *M. grisea* (Πίνακας 3).

<i>A. nidulans</i>	<i>M. grisea</i>	<i>V. dahliae</i>	Είδος GPCR	E-value (<i>A. nidulans</i> / <i>M. grisea</i>)
GprH	---	VDAG_02846.1	Υποδοχέας cAMP	0.0
GprC	---	VDAG_04720.1	Υποδοχέας άνθρακα/αζώτου	0.0
GprD	---			4,55e ⁻³⁰
GprE	---			1,20e ⁻²⁹
---	MG10473	VDAG_06164.1	Υποδοχέας Pth11	0.0
---	MG05871	VDAG_02831.1	Υποδοχέας Pth11	5,53e ⁻³⁸
---	MG05072	VDAG_03447.1	GPCR με περιοχή HlyIII	0.0
---	MG09015	VDAG_02933.1	Υποδοχέας οψίνης	0.0
---	MG08803	VDAG_07964.1	Υποδοχέας άνθρακα/αζώτου	1,56e ⁻³⁹
---	MG10473	VDAG_01992.1	Υποδοχέας Pth11	0.0
GprA	MG04711	VDAG_05622.1	Υποδοχέας Ste2	5,41e ⁻¹⁵ / 0.0
GprH	MG06738	VDAG_04611.1	Υποδοχέας cAMP	0.0 / 0.0
		VDAG_09140.1	Υποδοχέας cAMP	1.4e ⁻⁴⁵ / 0.0
AN5720	MG02855	VDAG_02461.1	Υποδοχέας θρεπτικών	0.0 / 0.0
	MG04698	VDAG_05794.1	Υποδοχέας θρεπτικών	2,53e ⁻²⁹ / 0.0
AF119670	MG05871	VDAG_06141.1	Υποδοχέας Pth11	0.0 / 0.0
		VDAG_00617.1	Υποδοχέας Pth11	0.0 / 0.0

Πίνακας 3. Στην πρώτη και δεύτερη στήλη βρίσκονται οι μελετημένοι GPCRs των μυκήτων *A. nidulans* και *M. grisea* που χρησιμοποιήθηκαν στην αναζήτηση. Στην τρίτη στήλη βρίσκονται οι GPCRs του μύκητα *V. dahliae* με τη μεγαλύτερη ομολογία ως προς τους GPCRs των 2 πρώτων στηλών, στην τέταρτη στήλη αναφέρεται το είδος του GPCR και στην τελευταία στήλη το E-value με το οποίο έγινε η επιλογή των GPCRs.

Την περίοδο που ολοκληρώθηκε η βιοπληροφορική ανάλυση της παρούσας μελέτης οι Zheng *et al.* (2010) δημοσίευσαν μελέτη όπου είχαν αναγνωρίσει πιθανούς GPCRs στο μύκητα *V. dahliae*. Τα δημοσιευμένα αποτελέσματά τους (πίνακας 4) επιβεβαίωσαν τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, ως προς τους πιθανούς GPCRs στο μύκητα *V. dahliae*.

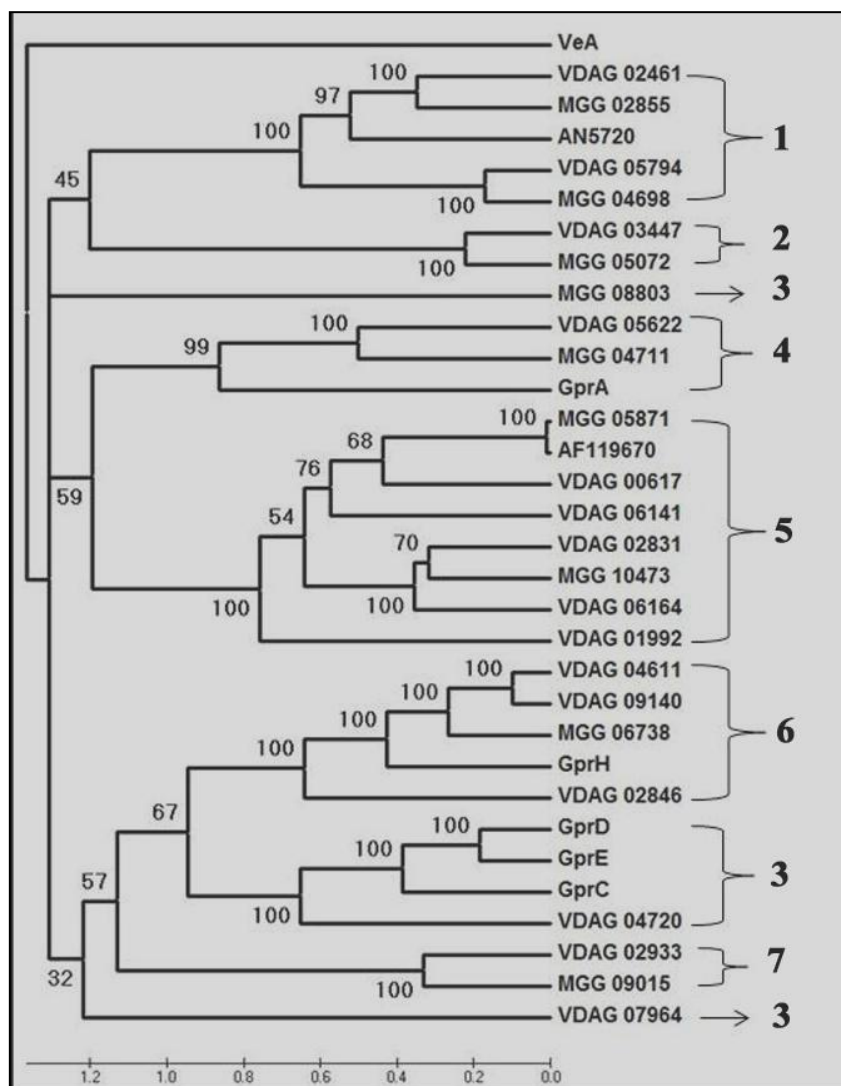
Class number	Class name	V. dahliae
		Entry (E-value)
Six classes found in fungi^a		
I	Ste2	VDAG_05622 (0.0)
II	Ste3	VDAG_06338 ^e
III	Carbon/amino acid receptor	VDAG_00060 (0.0)
		VDAG_07964 (0.0)
		VDAG_05120 (0.0)
		VDAG_04720 ^d (0.0)
IV	Putative nutrient receptor	VDAG_02461 (0.0)
		VDAG_05794 (0.0)
V	cAMP receptor-like	VDAG_04611 (0.0)
		VDAG_02846 (0.0)
		VDAG_09140 (0.0)
VI	Microbial Opsin	VDAG_02933 (0.0)
		VDAG_06764 (0.0)
New receptors in fungi^b		
VII	RGS_domain GPCR	VDAG_08194 (0.0)
		VDAG_09977 (0.0)
VIII	HLYIII_domain GPCR	VDAG_03447 (0.0)
		VDAG_00450 (8.1e-39)
		VDAG_03172 (0.0)
IX	Similar to animal GPCR	VDAG_03157 (0.0)
Novel receptors in fungi^c		
X	PTM1-like GPCR	VDAG_06634
XI	GPCR 89 like receptors	VDAG_10279
XII	Family C-like GPCR	VDAG_00541

Πίνακας 4. Οι GPCRs που προέβλεψαν οι Zheng *et al.* (2010), ότι βρίσκονται στο μύκητα *V. dahliae*. Για τη βιοπληροφορική τους ανάλυση χρησιμοποίησαν μελετημένους GPCRs των μυκήτων *Aspergillus spp.*, *Neurospora crassa* και *Magnaporthe grisea*.

3.2 Φυλογενετική ανάλυση των GPCRs του μύκητα *V. dahliae*

Η διαδικασία σύμφωνα με την οποία πραγματοποιήθηκε η φυλογενετική ανάλυση περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.2. Μετά το πέρας της ανάλυσης προέκυψε ένα φυλογενετικό δέντρο, το οποίο ομαδοποιούσε τους υποδοχείς GPCRs με βάση τη γενετική τους απόσταση αλλά και με βάση τη λειτουργία τους, καθώς οι GPCRs που ήταν κοντά γενετικά φάνηκε να έχουν και παρόμοια λειτουργία ως προς

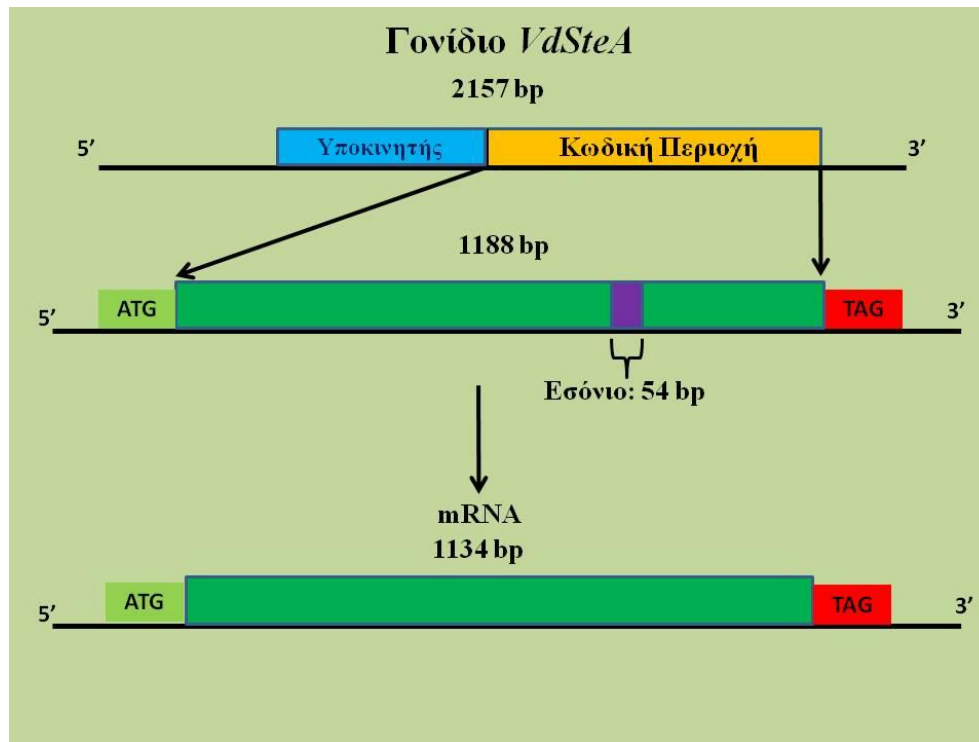
το περιβαλλοντικό ερέθισμα που αντιλαμβάνονται. Παρακάτω απεικονίζεται το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε (**Εικόνα 22**).



Εικόνα 22. Το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε μετά τη φυλογενετική ανάλυση, όπου διακρίνεται η γενετική απόσταση μεταξύ των GPCRs, στην κλίμακα στο κάτω μέρος της εικόνας. Οι αριθμοί υποδηλώνουν την ομάδα στην οποία ανήκουν οι GPCRs με βάση τη λειτουργία τους. (1) Θεωρητικός υποδοχέας θρεπτικών στοιχείων (2) GPCRs περιέχουν περιοχή HlyIII (3) Υποδοχέας άνθρακα/αζώτου (4) Υποδοχέας Ste2 (5) Υποδοχέας Pth11 (6) Υποδοχέας cAMP και (7) Υποδοχέας μικροβιακής οσμίνης.

Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 22** προέκυψαν 7 ομάδες με διακριτό ρόλο σε σχέση με το ερέθισμα που αντιλαμβάνονται. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να μελετηθεί ο υποδοχέας GPCR της ομάδας 4 που είναι ομόλογος με τον φερομονικό υποδοχέα Ste2 (κωδική ονομασία **VDAG_05622**), ώστε να μελετηθεί ο ρόλος του

στην παθογένεια και βιολογία του μύκητα *V. dahliae*. Στην παρούσα εργασία θα αναφέρεται το γονίδιο του συγκεκριμένου GPCR ως *VdSteA* (Εικόνα 23).



```
GCCAGCCGCTTTCTGGTTATTGACCTGGGAGGGCTAGGCTAGGGATCACGTTGATATGATAGTATTACTTT
GTATTGTGTGGGAGGATGTGGTAGTCGTCCTGTTTCGTCTACATGGTATTTCGTTGGTGAGTATCTGGTCAAT
GTCAGTGTAGCGAAGACAAGAAAGGGCACGGGAACCTAGGCCAGGGAGGTGGCCAGCCTTCCCGCTGAAGA
ACCACGCACGCTCCTCGTTCAACTCTCGTCGACTTGGCACTCATAGGCTCAGCTGAGATCGCGGTTTCATCA
AATATTCAACATCGATCTAGCCTCATTGAACTACCGACTGGTGTGAGTGGCGGGTTGTGCGTAATGTAGC
GCTCAGGCCCTTGGCTTCTTTGGGTGAACAATAAGGAGGTCGTTGCCAAACCAGCCAGGAACAATATCAAG
AGAACAATCCACTATTCCTACGCCAATGCCCATTTCCTCCACCCGCTACACCATTCTTCGTCTTACAGAA
TGCCGCTCAGTATGCTCTCCGAGCACTGCCGCTGGCTGCATTCTTATATTCGGCCAGCGCAGCTACTCCTC
ATCGTTTCCTATCACACCAGGACGAGTACCACCATCATCCAGCCAATATTCTGCACCTAGCTCTCCGCTGC
ATCTGTCCAGGCAGATGACACGAATCGAGATACTCTTGCAGGCTCTGATCCAAAATCAGTCCCTTACTTGC
GTCACCCCTTTCTTGCACACTACGGTGAAGCCCGACGGTCATACATTCGGTTCATACAGGCACGAGTTGAGCT
TTCACAGGCTCAAGGCAACCCGCTGTGTATCAAATAGAATCAGCGCATACTCTCCTCCTCTTGGGCAATCA
CCGATAACTGCTCGCACGGCATTGTCCGAAAGAGGATCGCGAACCAGAGCTTTCGTGACATCGCCACCGAGAT
TCGGCAACATTACGAAGAGCACACTGCACTATGCGCTTATCCGACCCTTCTACAAAACCTTCGCTCCTCAAT
GCGTCTGATGGTGTACCGAAATCCCTGTTGGCGTTGCCGATGTCAACGAGTTCATCCTATACAGCGTGAAT
ACGGTTCATCAACTATGGCGCCAGATCGGGAGCTCCTTCATACTGCTGCTCGTCTTGGTCTGCATAACGCC
TCAGCAAGATTCCTAAGCTATCTCAGTGGCTTCACATCGCCGCTGACCGTCAACATCATTCCGATGGTA
CTCTTAACTGTCTTTCACGAGCAGTTGGAACGAATTCACACATTCTTGTGTCGGCAGTCTCTCGGGTCG
CCCTCAGGATTTGCAGTGCAGTGTCCGATCCGAAATGCAATCTTGGCTCTTTTCATCATGGTCCAAAGCTGT
CCTCGGCTTGACAGGCTTGGGCGACTGTCAACCTCTTACCCGCTGTCTGGAAATGGTCTCAGTTTTACTGTC
GGCTTGTGTTTCTTTCACGGCCATCGGATTCGCGTGGCAAGCGCAGTAGGCCAGATCAGGTTTATGTGAC
GCTGTCCGATACACCATCCGTAATGGTGGCTCTCTGACCAGTGTGATGGGTGGCACTTATATCTATTTAC
TGGCTCTCTTCAACGTCAGCTGGTGAACCATCTTGTGAAGAACCGAACCTTCTACCGACCGCGGGGGC
TTGTCTGGGTTGAAGTACTGGTTATCAAAAATGGCATTCTGATGATCATTCTCTGTTGGTATTTCCCTACC
ACATTGCTCCAGTATCTGACTAACCGTGTGACAGTCAATTTGCCGGCTTGGGTGGCGCAATTGGCAGG
CTTTCGAAACCTGGCTCTTGGCCCTCACGTCGGTATCCTGTTCTCTGCCCTCGGAAACGCTGATTGCCAAC
GCATTGCAACACCGGAATCTTACATGAAGTCAAAGCCGTCACAAAACGAGCACGGGACGATCAGATATGC
TCTTAAAGGACATCTCCAGATTGGTTCGGATGCCACTGAGAGCAATGCGGCTACGAGCACCGGTTACATCTC
GGATAGAGGCTGGCCGTTCTCGTGTGCAACCGATCCCATAGACCTCGAACTGCGGCGCCTCGACGGATAC
GACGCTGAAATGGGAGTGGTCCGAGTCAATCGTGAATTTGATCGACCGGAGGACAGGGTTTAG
```

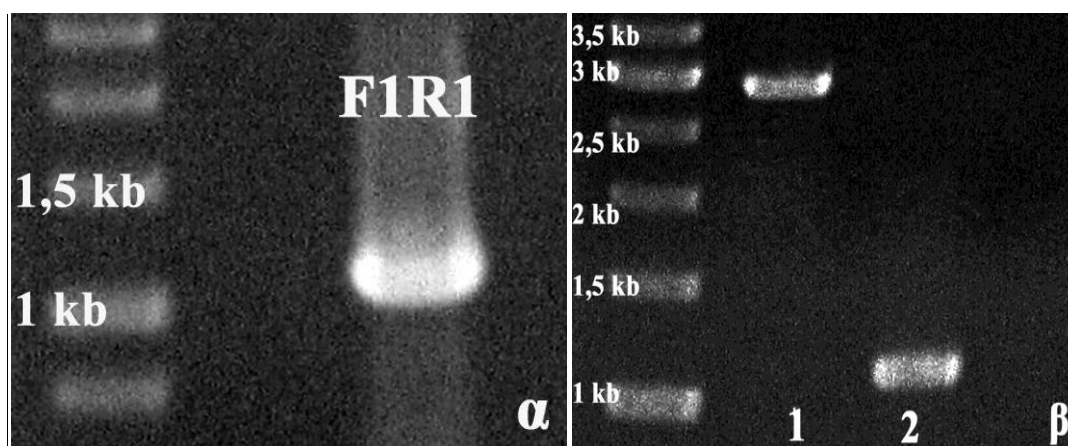
Εικόνα 23: Σχηματική παράσταση του γονιδίου *VdSteA*. Πρόκειται για μια γενετική τοποθεσία μεγέθους 2157 βάσεων η οποία βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 του μύκητα *V. dahliae*. Η κωδική του περιοχή η οποία είναι σημασμένη στην αλληλουχία του γονιδίου έχει μέγεθος 1188 βάσεων (εσόνια, εξόνια). Η αλληλουχία που έχει σημειωθεί με κίτρινο είναι ένα εσόνιο μεγέθους 54 βάσεων και το mRNA του γονιδίου αυτού έχει μέγεθος 1134 βάσεων (σύμφωνα με τη βάση δεδομένων αλληλουχιών του *V. dahliae* http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html).

3.3 Ενίσχυση με PCR και κλωνοποίηση των περιοχών F1R1 και F2R2 στο φορέα pBluescript II SK (+/-).

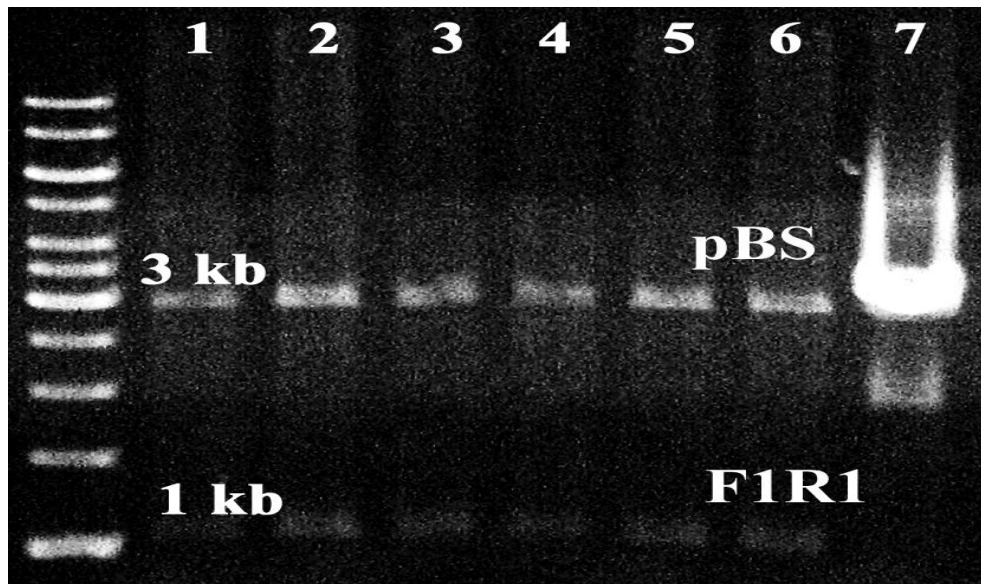
3.3.1 Τμήμα F1R1

Το τμήμα 1059 βάσεων πριν από το γονίδιο *VdSteA* ενισχύθηκε με αντίδραση PCR σε γενωματικό DNA του μύκητα *V. dahliae* (Εικόνα 24α), εφαρμόζοντας θερμοκρασία υβριδισμού 52 °C, χρησιμοποιώντας τους απλούς εκκινητές **VdSteA-F1-XhoI** και **VdSteA-R1-EcoRI** που σχεδιάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.

Στη συνέχεια το τμήμα αυτό όπως και ο φορέας pBluescript (pBS) υπέστησαν πέψη από τα ένζυμα XhoI και EcoRI (Εικόνα 24β). Ως αποτέλεσμα της πέψης το τμήμα F1R1 περιορίστηκε στις 1049 βάσεις. Ακολούθησε διαδικασία κλωνοποίησης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.1 και η παρουσία του αναμενόμενου μεγέθους τμήματος (1049 βάσεις) ελέγχθηκε με απομόνωση (Εικόνα 25) και στη συνέχεια πέψη του πλασμιδιακού DNA με τα ένζυμα XhoI και EcoRI.



Εικόνα 24: (α): Ενίσχυση τμήματος 1059 βάσεων (τμήμα F1R1) εφαρμόζοντας PCR με τους απλούς εκκινητές VdSteA-F1-XhoI, VdSteA-R1-EcoRI σε γενωματικό DNA του μύκητα *V. dahliae* (β): Πέψη του τμήματος F1R1 (1049 βάσεις) (διαδρομή 2) και του φορέα pBluescript (διαδρομή 1) με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI-EcoRI.



Εικόνα 25: Πέψη των φορέων p.IAS1.10 (1), p.IAS1.23 (2), p.IAS1.32 (3) p.IAS1.33 (4) p.IAS1.36 (5) p.IAS1.50 (6) και pBluescript (7) με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI-EcoRI για τον καθορισμό του μεγέθους του κλωνοποιημένου τμήματος.

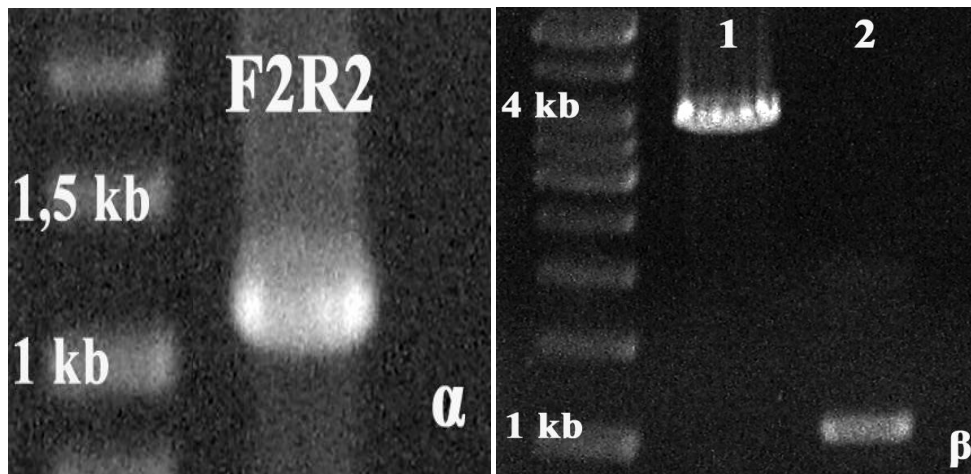
Αλληλούχιση των κλώνων p.IAS1.23, p.IAS1.36 και p.IAS1.50 επιβεβαίωσε την απομόνωση τμήματος 1049 βάσεων πριν από το γονίδιο *VdSteA* στο φορέα pBluescript. Από αυτούς τους κλώνους επιλέχθηκε ο p.IAS1.23 για να γίνει περαιτέρω η ενσωμάτωση του τμήματος F2R2 και να συνεχιστεί η κατασκευή του αλληλόμορφου αντικατάστασης.

3.3.2 Τμήμα F2R2

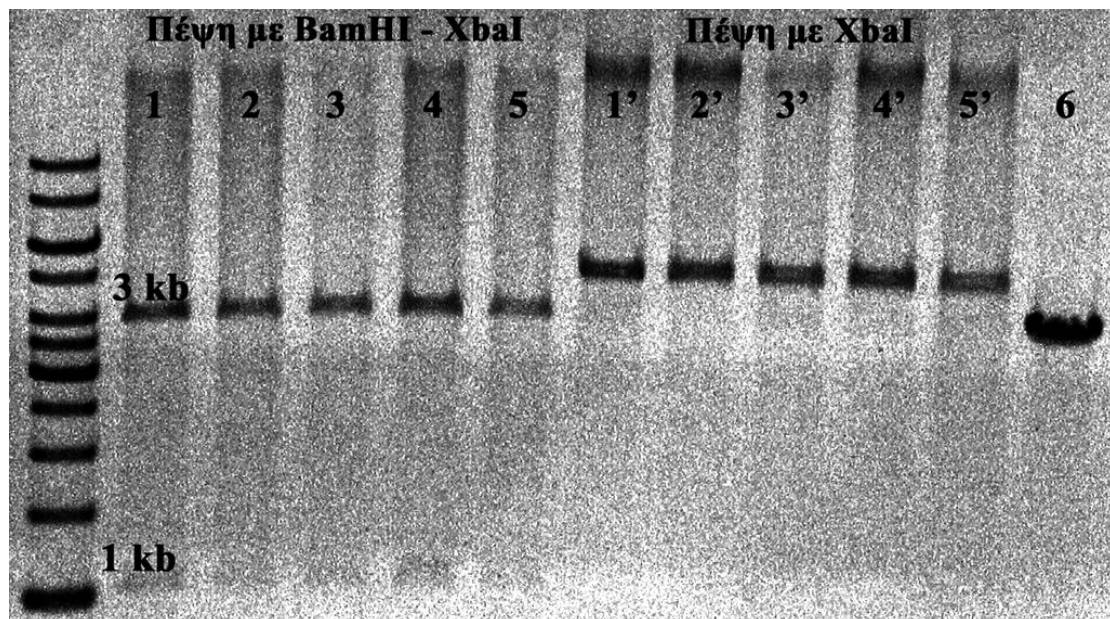
Το τμήμα 1033 βάσεων μετά από το γονίδιο *VdSteA* ενισχύθηκε με αντίδραση PCR σε γενωματικό DNA του μύκητα *V. dahliae*, εφαρμόζοντας θερμοκρασία υβριδισμού 52 °C, χρησιμοποιώντας τους απλούς εκκινητές **VdSteA-F2-BamHI** και **VdSteA-R2-XbaI** που σχεδιάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.

Στη συνέχεια το τμήμα αυτό (**Εικόνα 26α**) όπως και ο φορέας p.IAS1.23 υπέστησαν πέψη από τα ένζυμα BamHI και XbaI (**Εικόνα 26β**). Ως αποτέλεσμα της πέψης το προϊόν F2R2 περιορίστηκε στις 1020 βάσεις. Ακολούθησε διαδικασία κλωνοποίησης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5 και η παρουσία του αναμενόμενου μεγέθους τμήματος (1020 βάσεις) ελέγχθηκε με απομόνωση και στη

συνέχεια πέψη του πλασμιδιακού DNA με τα ένζυμα BamHI και XbaI, καθώς και με μονή πέψη με το XbaI (Εικόνα 27).



Εικόνα 26: (α): Ενίσχυση τμήματος 1033 βάσεων (τμήμα F2R2) εφαρμόζοντας PCR με τους απλούς εκκινητές VdSteA-F2-BamHI και VdSteA-R2-XbaI σε γενωματικό DNA του μύκητα *V. dahliae*. (β): Πέψη του τμήματος F2R2 (1020 βάσεις) (διαδρομή 2) και του φορέα p.IAS1.23 (διαδρομή 1) με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XbaI.



Εικόνα 27: Διπλή (BamHI-XbaI) και μονή (XbaI) πέψη των φορέων p.IAS2.1 (1-1'), p.IAS2.4 (2-2'), p.IAS2.9 (3-3'), p.IAS2.10 (4-4'), p.IAS2.11 (5-5') με τα περιοριστικά ένζυμα για τον καθορισμό του μεγέθους του κλωνοποιημένου τμήματος. Στη διαδρομή 6 διπλή πέψη του κλώνου p.IAS1.23 με BamHI-XbaI, ως μάρτυρας.

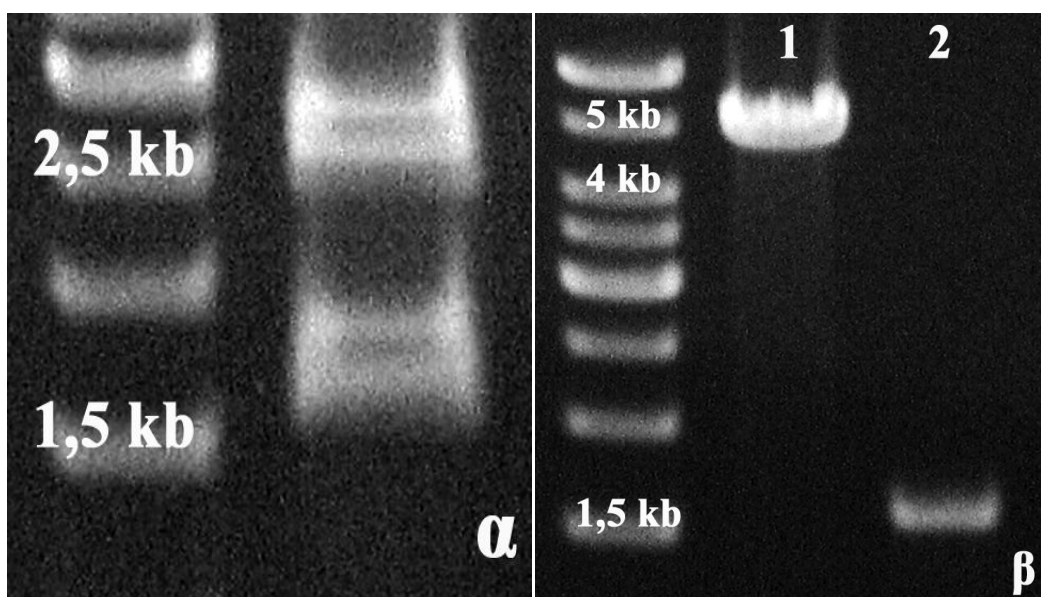
Αλληλούχιση των κλώνων p.IAS2.1, p.IAS2.4, p.IAS2.10 επιβεβαίωσε την απομόνωση τμήματος 1020 βάσεων μετά από το γονίδιο *VdSteA* στο φορέα

p.IAS1.23. Από αυτούς τους κλώνους επιλέχθηκε ο p.IAS2.1 για να γίνει η ενσωμάτωση της κασέτας της γενετισίνης και να ολοκληρωθεί η κατασκευή του αλληλόμορφου αντικατάστασης.

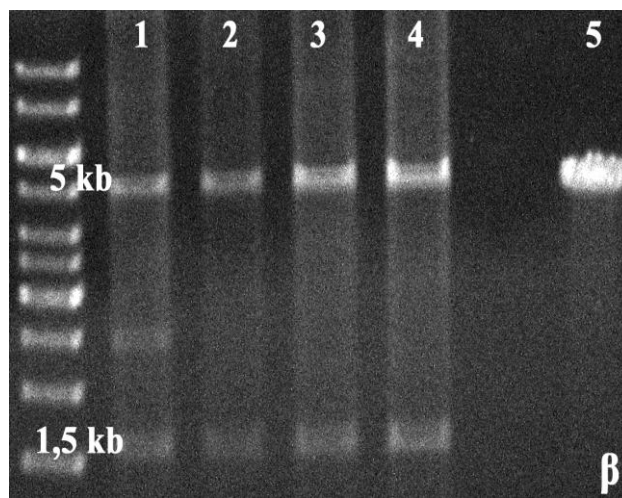
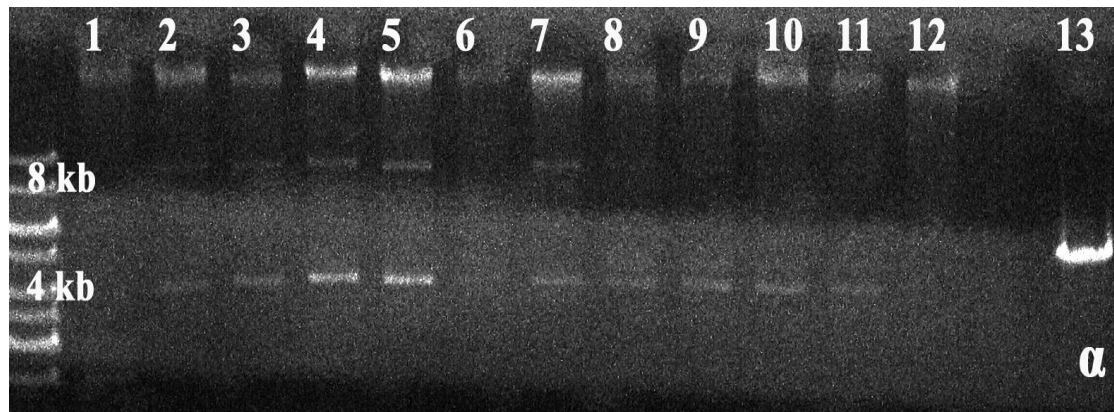
3.4 Ενσωμάτωση της κασέτας της γενετισίνης στο φορέα p.IAS2.1

Το γονίδιο της γενετισίνης απομονώθηκε από το πλασμίδιο SK666 κατόπιν πέψης με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (EcoRI-BamHI) που χρησιμοποιήθηκαν και για την κλωνοποίησή του στο φορέα p.IAS2.1.

Το πλασμίδιο SK666 καθώς και ο φορέας p.IAS2.1 υπέστησαν πέψη με τα ένζυμα EcoRI και BamHI (**Εικόνα 28α** και **28β**), ακολούθησε διαδικασία κλωνοποίησης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.1 και η παρουσία του αναμενόμενου μεγέθους τμήματος (1600 βάσεις) ελέγχθηκε με απομόνωση (**Εικόνα 29α**) και στη συνέχεια πέψη του πλασμιδιακού DNA με τα ένζυμα EcoRI και BamHI (**Εικόνα 29β**).



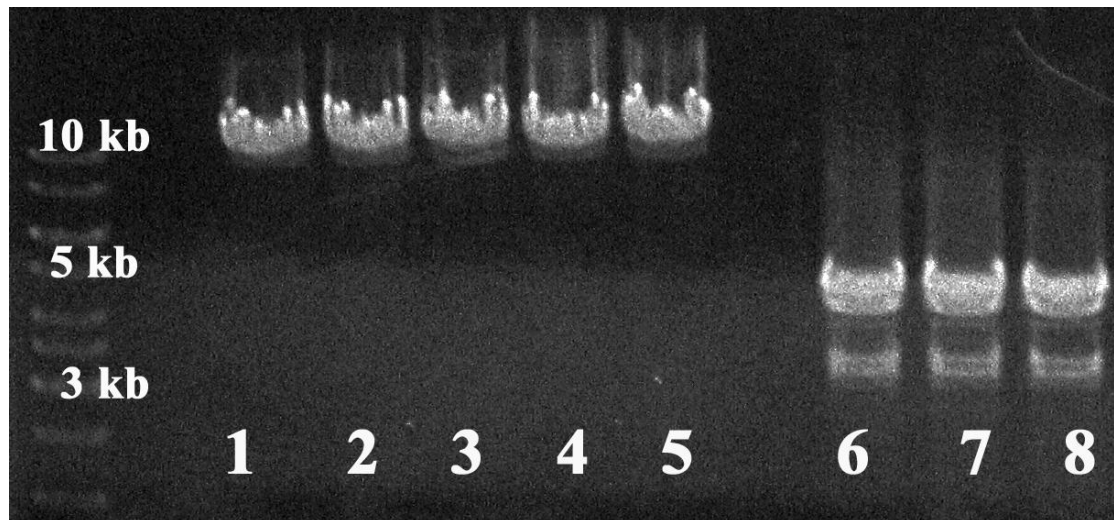
Εικόνα 28:(α) Πέψη του του πλασμιδίου SK666 με τα περιοριστικά ένζυμα με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και BamHI. Η κασέτα της γενετισίνης βρίσκεται στις 1600 περίπου βασεις. **(β)** Πέψη του τμήματος της γενετισίνης (1600 βάσεις) (διαδρομή 2) και του φορέα p.IAS2.1 (διαδρομή 1) με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και BamHI.



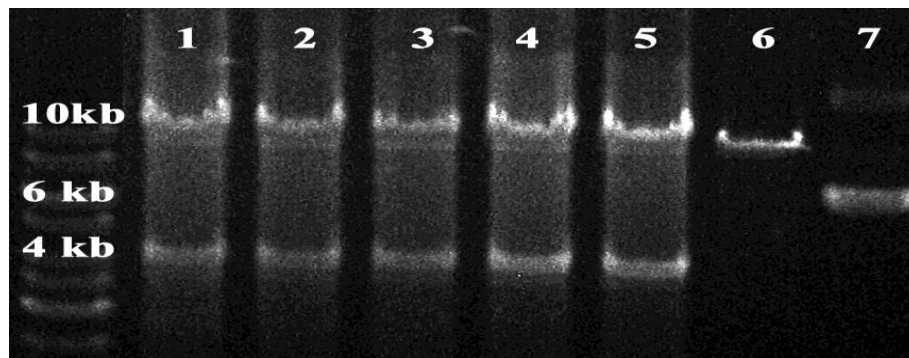
Εικόνα 29: (α) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κλώνους (διαδρομές 1-12) και ο κλώνος **p.IAS2.1** (διαδρομή 13) ως μάρτυρας. Επιλογή των κλώνων στις διαδρομές 2,3,4,5 για πέψεις. (β) Πέψη των κλώνων **p.IAS3.2** (διαδρομή 1), **p.IAS3.3** (διαδρομή 2), **p.IAS3.4** (διαδρομή 3) και του φορέα **p.IAS3.5** (διαδρομή 4) και του **p.IAS2.1**(διαδρομή 5) με τα ένζυμα EcoRI και BamHI για τον καθορισμό του μεγέθους του κλωνοποιημένου τμήματος.

3.5 Μεταφορά του κλωνοποιημένου αλληλόμορφου αντικατάστασης από το πλασμίδιο p.IAS3.5 στο δυαδικό φορέα pGKO2

Ο αλληλόμορφος αντικατάστασης **p.IAS3.5** και ο δυαδικός φορέας pGKO2 υπέστησαν πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και XbaI (**Εικόνα 30**), ακολούθησε διαδικασία κλωνοποίησης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5 και η παρουσία του αναμενόμενου μεγέθους τμήματος περίπου 4000 βάσεων ελέγχθηκε με απομόνωση και στη συνέχεια πέψη του πλασμιδιακού DNA με τα ένζυμα XhoI και XbaI (**Εικόνα 31**).



Εικόνα 30: Πέψη του φορέα PGKO2 (διαδρομές 1-5) και του αλληλομόρφου αντικατάστασης p.IAS3.5 (διαδρομές 6-8) με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και XbaI.

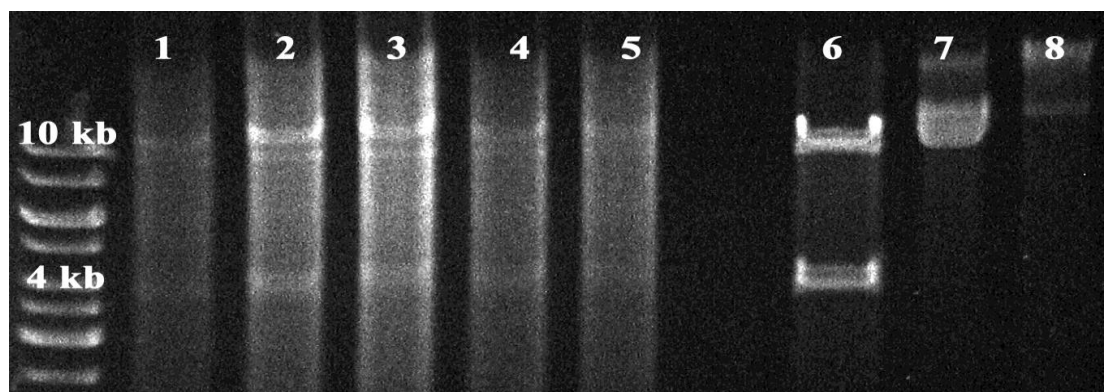


Εικόνα 31: Πέψη των κλώνων p.IAS4.1, 4.11, 4.16, 4.22, 4.27 (διαδρομές 1-5) και του δυαδικού φορέα PGKO2 (διαδρομή 7) με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και XbaI για την επιβεβαίωση ενσωμάτωσης του αλληλομόρφου αντικατάστασης στο δυαδικό φορέα. Στη διαδρομή 6 άκοπος δυαδικός φορέας PGKO2.

3.6 Εισαγωγή δυαδικού φορέα pGKO2 (κλώνος p.IAS4.1) στο *Agrobacterium*

Με σκοπό την απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA* στο μύκητα *V. dahliae*, οι φορείς αντικατάστασης που δημιουργήθηκαν με διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.2 και 3.3.4, εισήχθησαν στο βακτηριακό στέλεχος GV3101 του *Agrobacterium tumefaciens* (παράγραφος 2.6.1).

Η επιβεβαίωση των αποικιών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό με επιδεκτικά κύτταρα του στελέχους GV3101 του *Agrobacterium tumefaciens* πραγματοποιήθηκε με απομόνωση και στη συνέχεια πέψη του πλασμιδιακού DNA με τα ένζυμα XhoI και XbaI (Εικόνα 32), ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη της κλωνοποιημένης κασέτας του αλληλομόρφου αντικατάστασης.

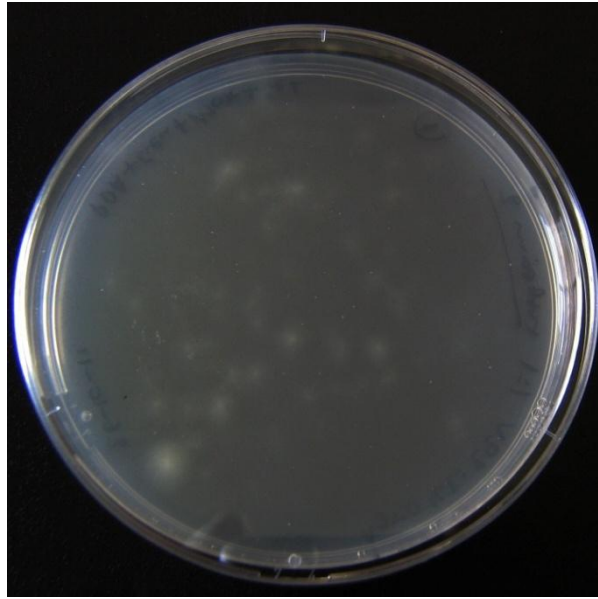


Εικόνα 32: Πέψη των κλώνων p.IAS5.1 (διαδρομή 1), p.IAS5.2 (διαδρομή 2), p.IAS5.3 (διαδρομή 3), p.IAS5.4 (διαδρομή 4) p.IAS5.5 (διαδρομή 5) και του αλληλόμορφου αντικατάστασης p.IAS4.1 (διαδρομή 6) και με τα περιοριστικά ένζυμα XbaI και XhoI. Στις διαδρομές 7 και 8, άκοπος αλληλόμορφος αντικατάστασης p.IAS4.1 και κλώνος p.IAS5.1, αντίστοιχα.

Ακολούθησε μετασχηματισμός των στελεχών 25V και 70V του μύκητα *V. dahliae*, με διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.7, ώστε να μεταφερθεί το τμήμα T-DNA του *A. tumefaciens*, που φέρει την κασέτα του αλληλομόρφου αντικατάστασης στο γένωμα του *V. dahliae*.

3.7 Έλεγχος απενεργοποίησης του γονιδίου *VdSteA* στα στελέχη 25V και 70V του μύκητα *V. dahliae*

Για τον έλεγχο των μονόσπορων αποικιών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό (Εικόνα 33), πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από τις μονόσπορες αποικίες σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2 και ακολούθησε μια σειρά από PCR με συνδυασμούς εκκινητών (παράγραφος 2.2.2) ώστε να διαπιστωθεί αν έχει πραγματοποιηθεί η απενεργοποίηση του γονιδίου καθώς και αν έχει εισαχθεί η κασέτα στο σωστό σημείο.



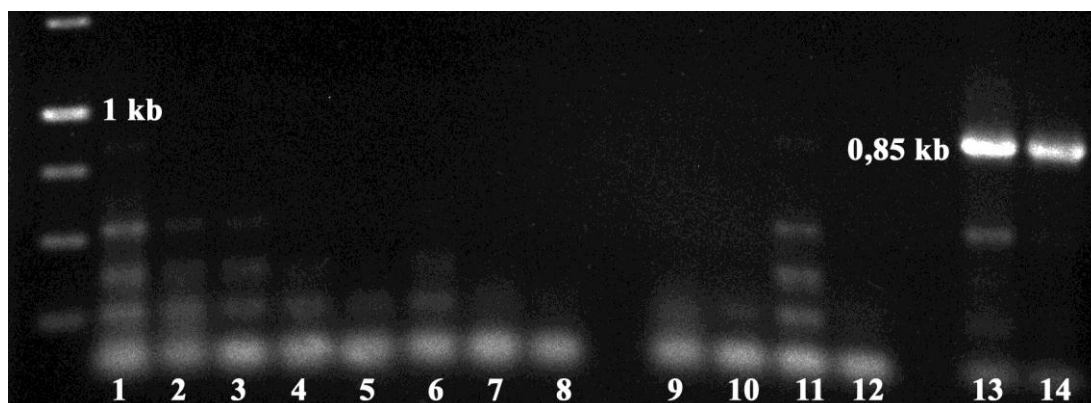
Εικόνα 33: Τρυβλίο με επιλεκτικό θρεπτικό υλικό όπου αναπτύσσονται μονόσπορες αποικίες 4 ημέρες μετά το μετασχηματισμό στελεχούς του *V. dahliae*, στο οποίο έχει γίνει μετασχηματισμός με *Agrobacterium*.

Συνδυασμός εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος
VdSteA-F3/VdSteA-R4	850 bp
Gen-F/VdSteA-R3	1400 bp
VdSteA-F3/Gen-R	1800bp
VdSteA-F4/VdSteA-R4	152 bp
VdSteA-F5/Gen-R	3000 bp

Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών VdSteA-F3 και VdSteA-R4 ($T_m=60^{\circ}\text{C}$, extension= 1 min) σε DNA μεταλλαγμένων αποικιών των στελεχών 25V και 70V, καθώς και σε DNA από τα άγρια στελέχη 25V και 70V του μύκητα *V. dahliae*. Αναμένεται ζώνη περίπου 850 bp στα στελέχη αγρίου τύπου (**Εικόνα 34**).

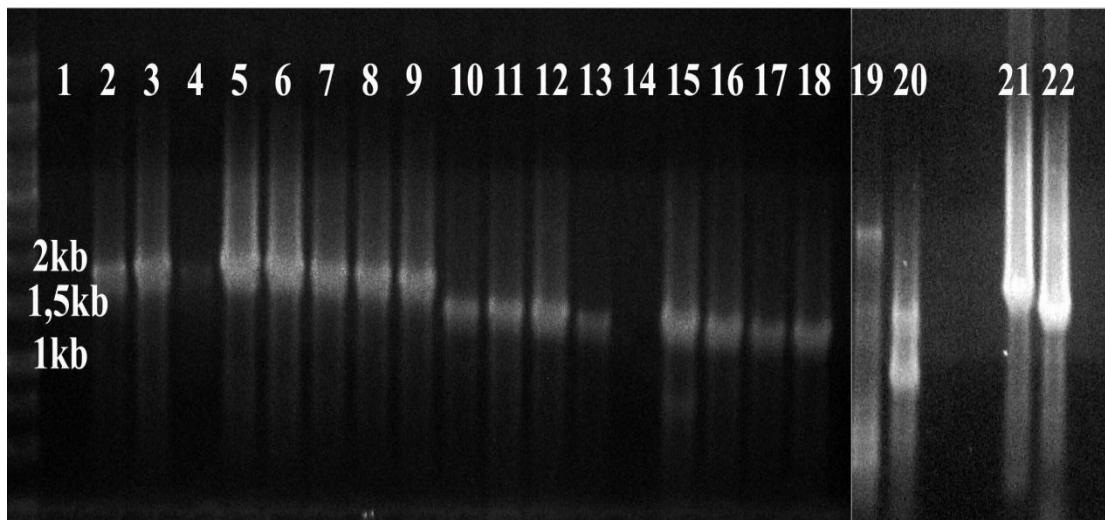
Τα μεταλλαγμένα στελέχη της φυλής 25V θα αναφέρονται ως TIAS1, και τα μεταλλαγμένα στελέχη της φυλής 70V ως TIAS2. . Στις φυλές 25V και 70V τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS1.1 – TIAS1.8 και TIAS2.1 – TIAS2.4 προέρχονται από τρυβλίο που είχαν την ουσία F₂DU ως υλικό επιλογής, ενώ τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS1.9 – TIAS1.14 και TIAS2.5 – TIAS2.9 προέρχονται από τρυβλία που δεν είχε την ουσία F₂DU ως υλικό επιλογής, (όπως εξηγείται και στην παράγραφο 2.5.2 η παρουσία F₂DU στο υλικό ανάπτυξης και του αντίστοιχου αντιβιοτικού, αυξάνει τη

πιθανότητα απομόνωσης στελεχών, στα οποία το ενδογενές γονίδιο θα έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό με ομόλογο ανασυνδυασμό. Τα τρυβλία χωρίς F₂DU χρησιμοποιούνται ώστε να απομονωθούν αν είναι δυνατόν και στελέχη στα οποία έχει εισαχθεί εκτοπικά η κασέτα, ώστε να μελετηθεί και ο τρόπος που επηρεάζονται και αυτά από την εισαγωγή της κασέτας στο γονιδιώμά τους χωρίς ωστόσο να διαγραφεί το γονίδιο στόχος).



Εικόνα 34: PCR των κλώνων TIAS1.1 (1), TIAS1.3 (2), TIAS 1.4 (3), TIAS1.5 (4), TIAS1.7 (5), TIAS2.1 (6), TIAS2.3 (7), TIAS2.4 (8), TIAS1.10 (9), TIAS1.13 (10), TIAS2.6 (11), TIAS2.8 (12), και γενωματικού DNA του αγρίου στελέχους 25V (13) και 70V (14) του μύκητα *V.dahliae* (διαδρομή 10) με τους εκκινητές VdSteA-F3 - VdSteA-R4 για την επιβεβαίωση της απενεργοποίησης του γονιδίου *VdSteA* στους κλώνους αυτούς. Ζώνη στο ύψος των 0,85 kb προέκυψε όπως αναμενόταν στα αγρίου τύπου στελέχη μόνο.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR με τα ζεύγη εκκινητών **Gen-F-VdSteA-R3** και **VdSteA-F3-Gen-R** ($T_m=60$ °C, extension= 2 min) σε DNA μεταλλαγμένων αποικιών των φυλών 25V και 70V σε DNA του κλώνου **p.IAS5.2** (θετικός μάρτυρας) καθώς και σε DNA από το άγριο στέλεχος 25V του μύκητα *V. dahliae*. Αναμένονται ζώνες στα μεταλλαγμένα στελέχη μόνο και στον κλώνο **p.IAS5.2** (Εικόνα 35).



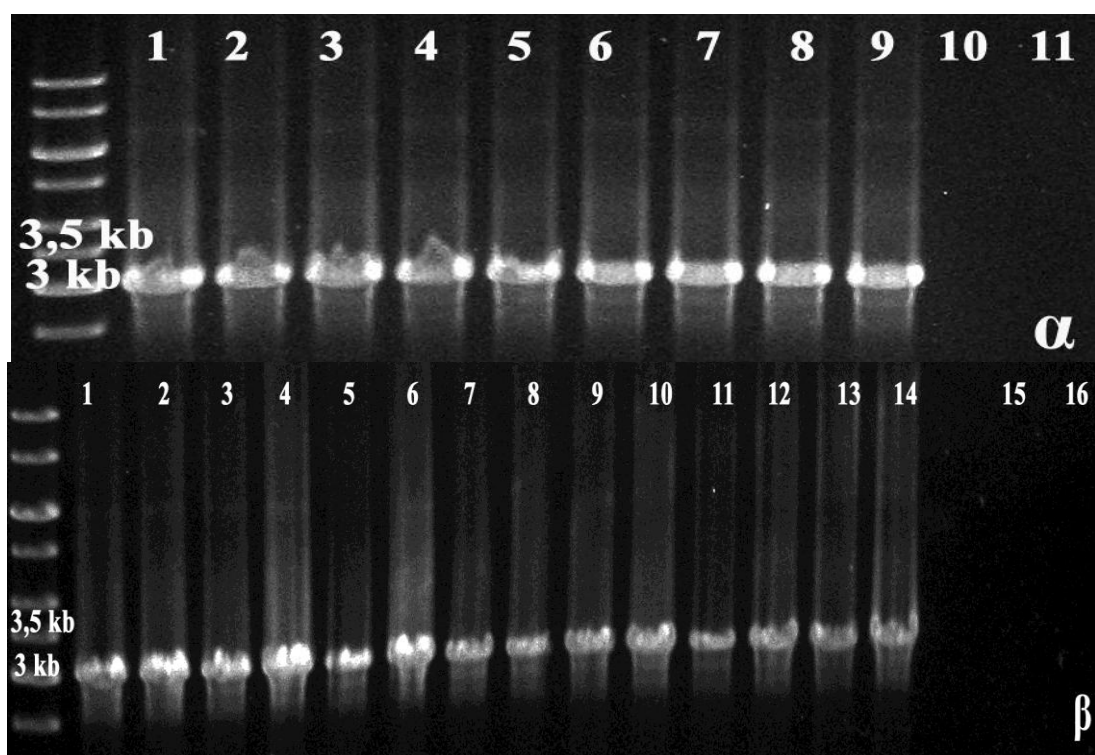
Εικόνα 35: PCR των κλώνων TIAS1.1 (1,10), TIAS1.3 (2,11), TIAS1.6 (3,12), TIAS1.8 (4,13), TIAS2.1 (5,14), TIAS2.3 (6,15), TIAS1.9 (7,16), TIAS1.13 (8,17), TIAS2.6 (9,18), και γενωματικού DNA του στελέχους 25V του μύκητα *V. dahliae* (19,20) και του κλώνου p.IAS5.2 (21,22). Οι διαδρομές 1-9, 19 και 21 έγιναν με τους εκκινητές VdSteA-F3-Gen-R (προϊόν 1800 bp) και οι διαδρομές 10-18, 20 και 22 έγιναν με τους εκκινητές Gen-F-VdSteA-R3 (προϊόν 1400 bp). Τα μεταλλαγμένα στελέχη καθώς και ο κλώνος έδωσαν τις αναμενόμενες ζώνες, στα 1800 και 1400 bp, ενώ το άγριο στέλεχος δεν έδωσε ζώνη σε κανένα από τα δύο ζεύγη εκκινητών.

Ακολούθησε η πραγματοποίηση PCR με τα ζεύγη εκκινητών **VdSteA-F4** και **VdSteA-R4** ($T_m=54^\circ\text{C}$, extension= 1 min) σε DNA μεταλλαγμένων αποικιών των στελεχών 25V και 70V, καθώς και σε DNA από το άγριο στέλεχος 25V του μύκητα *V. dahliae*. Αναμένεται ζώνη 152 bp στο άγριο στέλεχος μόνο (**Εικόνα 36**).



Εικόνα 36: PCR των κλώνων TIAS1.1 (1), TIAS1.3 (2), TIAS1.6 (3), TIAS1.8 (4), TIAS2.1 (5), TIAS2.3 (6), TIAS1.9 (7), TIAS1.13 (8), TIAS2.6 (9), και γενωματικού DNA του στελέχους 25V του μύκητα *V. dahliae* (10) με τους εκκινητές VdSteA-F4/VdSteA-R4 (προϊόν 152 bp). Τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν έδωσαν ζώνη στα 152 bp, ενώ το άγριο στέλεχος έδωσε την αναμενόμενη ζώνη.

Στο τέλος, για να διαπιστωθεί αν έχει πραγματοποιηθεί ο μετασηματισμός στο σωστό σημείο, πραγματοποιήθηκε PCR με τα ζεύγη εκκινητών **VdSteA-F5/Gen-R** ($T_m=60^\circ\text{C}$, extension= 3 min) σε DNA μεταλλαγμένων αποικιών $\Delta SteA$ των στελεχών 25V και 70V, στον κλώνο p.IAS5.2, καθώς και σε DNA από το άγριο στέλεχος 25V του μύκητα *V. dahliae*. Ο εκκινητής VdSteA-F5 έχει σχεδιαστεί σε περιοχή πριν τον υποκινητή του γονιδίου *VdSteA* και αναμένεται ζώνη περίπου 3000 bp στα μετασηματισμένα στελέχη μόνο (**Εικόνες 37α και 37β**). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η κασέτα δεν έχει ενσωματωθεί σε εκτοπική περιοχή του γενόματος του *V. dahliae* (ectopic transformants).



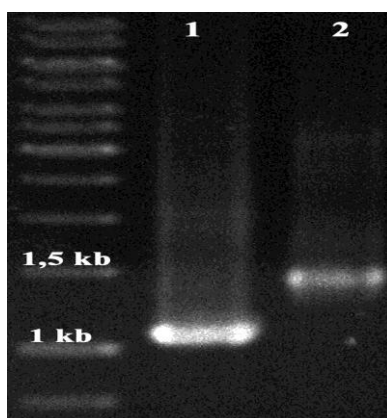
Εικόνα 37: (α) PCR των κλώνων TIAS1.1 (1), TIAS1.2 (2), TIAS1.6 (3), TIAS1.8 (4), TIAS2.1 (5), TIAS2.3 (6), TIAS1.9 (7), TIAS1.13 (8), TIAS2.6 (9), του γενωματικού DNA του στελέχους 25V (10) του κλώνου p.IAS5.2 (11) με τους εκκινητές VdSteA-F5/Gen-R (προϊόν 3000 bp). Τα μεταλλαγμένα στελέχη έδωσαν ζώνη στις 3000 bp, ενώ το άγριο στέλεχος και ο κλώνος p.IAS5.2 δεν έδωσαν ζώνη. (β) PCR των κλώνων TIAS1.3 (1), TIAS1.4 (2), TIAS1.5 (3), TIAS1.7 (4), TIAS2.2 (5), TIAS2.4 (6), TIAS1.10 (7), TIAS1.11 (8), TIAS1.12 (9), TIAS1.14 (10), TIAS2.5 (11), TIAS2.7 (12), TIAS2.8 (13), TIAS2.9 (14), του γενωματικού DNA του στελέχους 25V (15) του κλώνου p.IAS5.2 (16) με τους εκκινητές VdSteA-F5/Gen-R (προϊόν 3000 bp). Τα μεταλλαγμένα στελέχη έδωσαν ζώνη στις 3000 bp, ενώ το άγριο στέλεχος και ο κλώνος p.IAS5.2 δεν έδωσαν ζώνη.

3.8 Υβριδισμός κατά Southern στα μετασχηματισμένα *ΔVdSteA V. dahliae* στελέχη.

Με σκοπό την επιβεβαίωση των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔVdSteA* γενετικά ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

3.8.1 Προετοιμασία ανιχνευτή (*probe*)

Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε τμήμα περίπου 1000 βάσεων πριν από το γονίδιο *VdSteA*, το οποίο ενισχύθηκε με αντίδραση PCR {με DIG σύμφωνα με το nonradioactive Dig labeling and detection kit (Cat No. 11093657910)} σε γενωματικό DNA του στελέχους 25V του μύκητα *V. dahliae*, εφαρμόζοντας θερμοκρασία υβριδισμού 55 °C, χρησιμοποιώντας τους απλούς εκκινητές **VdSteA-F1-XhoI**, **VdSteA-R1-EcoRI** που σχεδιάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2 (**Εικόνα 38**). Η ζώνη του προϊόντος που έχει προέλθει από PCR με dig-dNTPs αναμένεται ψηλότερα σε σχέση με το προϊόν όπου έχουν χρησιμοποιηθεί μη σημασμένοι dNTPs, καθώς η πρόσδεση του DIG στο DNA το κάνει να τρέχει πιο αργά σε σχέση με το μη σημασμένο DNA.



Εικόνα 38: Ενίσχυση τμήματος περίπου 1000 βάσεων (τμήμα F1R1) εφαρμόζοντας PCR με τους απλούς εκκινητές VdSteA-F1-XhoI και VdSteA-R1-EcoRI σε γενωματικό DNA του στελέχους 25V του μύκητα *V. dahliae* (διαδρομή 1) και ενίσχυση τμήματος περίπου 1000 βάσεων (τμήμα F1R1) εφαρμόζοντας PCR με τους απλούς εκκινητές VdSteA-F1-XhoI και VdSteA-R1-EcoRI σε γενωματικό DNA του στελέχους 25V του μύκητα *V. dahliae* με τη χρήση DIG (διαδρομή 2).

3.8.2 Εξαγωγή DNA για πέψεις

Πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση των αγρίου τύπου φυλών 25V και 70V του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6, TIAS1.11, TIAS2.2, TIAS2.3, TIAS2.4 και TIAS2.7 σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA και ακολούθησε μεταφορά τμημάτων των μυκηλίων σε τρυβλία που περιείχαν SSN. Μετά την πάροδο 3-4 ημερών, υπό ασηπτικές συνθήκες συλλέχθηκε το ανεπτυγμένο μυκήλιο που είχε σχηματιστεί εντός του τρυβλίου και αφού αφυγράνθηκε εντός αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού τοποθετήθηκε στη συσκευή λυοφιλίωσης για την παραλαβή λυοφιλιωμένου μυκηλίου. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωματικού DNA των στελεχών σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στη παράγραφο 2.3.2 και έγινε ποσοτικοποίηση αυτού με το φωτόμετρο Nanodrop (πίνακας 5).

Ποσοτικοποίηση DNA με Nanodrop			
ΣΤΕΛΕΧΟΣ	DNA (μg/μl)	260/280	260/230
25V	534,2	1,89	1,55
TIAS1.3	873,4	1,92	1,72
TIAS1.4	817,1	1,92	1,71
TIAS1.6	1996,4	1,90	1,94
TIAS1.11	1194,1	1,93	1,81
70V	837,9	1,92	1,81
TIAS2.2	1581,3	1,92	1,96
TIAS2.3	1811,4	1,94	2,00
TIAS2.4	1951,4	1,95	1,90
TIAS2.7	1566,3	1,93	1,94

Πίνακας 5: Ποσοτικοποίηση του απομονωθέντος DNA των αγρίου τύπου φυλών 25V και 70V του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta VSteA$ TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6, TIAS1.11, TIAS2.2, TIAS2.3, TIAS2.4 και TIAS2.7.

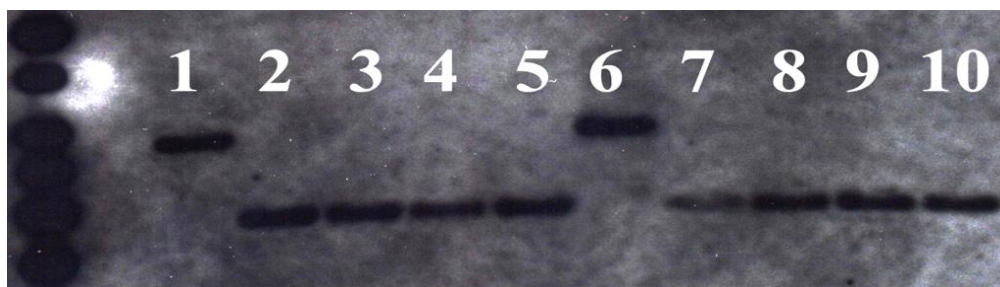
3.8.3 Πέψη με το ένζυμο *NcoI*

Στον πρώτο υβριδισμό κατά Southern που πραγματοποιήθηκε, έγινε πέψη του απομονωθέντος DNA με το ένζυμο *NcoI* σε 25 μg DNA σε τελικό όγκο αντίδρασης πέψης 100 μl για 12-16 ώρες στους 37° C και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των πέψεων σε πήγμα αγαρόζης 1% (**Εικόνα 39**).



Εικόνα 39: Πέψη των αγρίου τύπου στελεχών 25V (1) και 70V(6) του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta VdSteA$ TIAS1.3 (2), TIAS1.4 (3), TIAS1.6 (4), TIAS1.11 (5), TIAS2.2 (7), TIAS2.3 (8) TIAS2.4 (9) και TIAS2.7 (10) με το περιοριστικό ένζυμο *NcoI*.

Στη συνέχεια ακολούθησε σειρά διαδικασιών, οι οποίες περιγράφονται στην παράγραφο 2.8 και η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε μετά από έκθεση ειδικού φιλμ (X-Ray) για 40 min παρουσία της μεμβράνης σε σκοτεινό θάλαμο με κατάλληλα φωτογραφικά υγρά εμφάνισης και στερέωσης (**Εικόνα 40**).

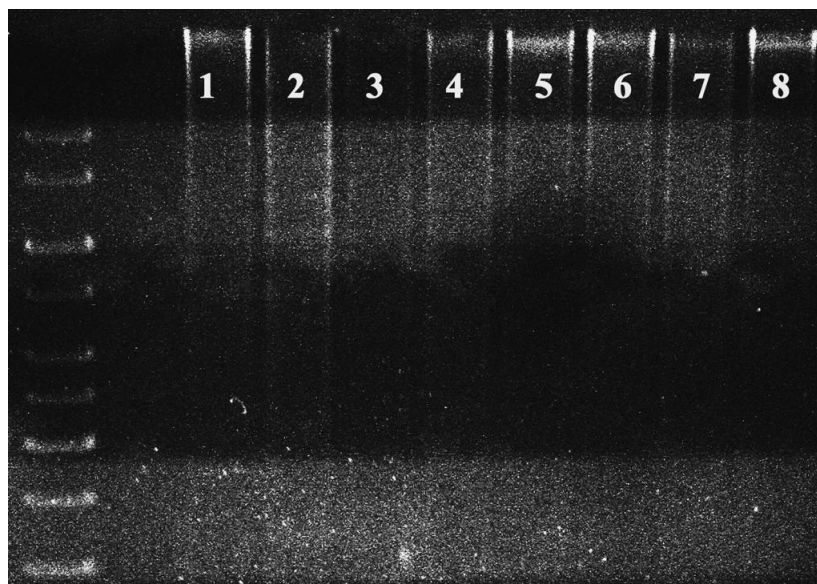


Εικόνα 40: Αποτύπωμα κατά Southern όπου εμφανίζονται οι υβριδισμένες ζώνες των αγρίου τύπου στελεχών 25V (1) και 70V(6) του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta VdSteA$ TIAS1.3 (2), TIAS1.4 (3), TIAS1.6 (4), TIAS1.11 (5), TIAS2.2 (7), TIAS2.3 (8) TIAS2.4 (9) και TIAS2.7(10), μετά από πέψη με *NcoI*.

Στις αγρίου τύπου φυλές 25V και 70V του μύκητα *V. dahliae* αναμένεται ένα προϊόν υβριδισμού 3000 περίπου βάσεων ενώ στα μεταλλαγμένα στελέχη ένα προϊόν υβριδισμού 2000 βάσεων περίπου. Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται και στο αποτύπωμα, και στα οκτώ μεταλλαγμένα στελέχη έχει πραγματοποιηθεί μόνο ομόλογος διπλός ανασυνδυασμός (κάτω ζώνες), τα οποία και διαφέρουν περίπου 1000 βάσεις από το άγριο στέλεχος ως αποτέλεσμα της πέψης με το περιοριστικό ένζυμο NcoI και του υβριδισμού με τον ανιχνευτή που αναφέρεται παραπάνω. Εάν είχε πραγματοποιηθεί μονός ή εκτοπικός ανασυνδυασμός θα παρατηρούσαμε την παρουσία δύο ζωνών στην αντίστοιχη πέψη.

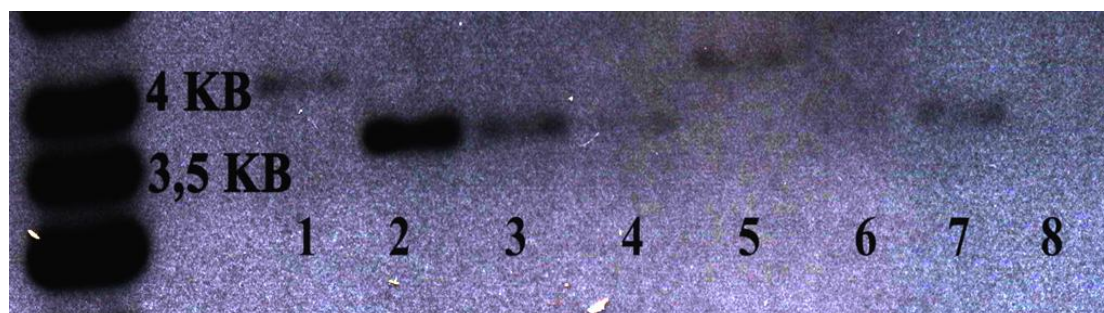
3.8.4 Πέψη με το ένζυμο *EcoRI*

Στον δεύτερο υβριδισμό κατά Southern που πραγματοποιήθηκε έγινε πέψη με το ένζυμο *EcoRI* σε 15 μg DNA των αγρίου τύπου στελεχών 25V και 70V του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6, TIAS2.2, TIAS2.3, TIAS2.4. σε τελικό όγκο αντίδρασης πέψης 100 μl για 12-16 ώρες στους 37 °C. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των πέψεων σε πήγμα αγαρόζης 1% (Εικόνα 41).



Εικόνα 41: Πέψη των αγρίου τύπου στελεχών 25V (1) και 70V (5) του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3 (2), TIAS1.4 (3), TIAS1.6 (4), TIAS2.2 (6), TIAS2.3 (7) και TIAS2.4 (8) με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI*.

Στη συνέχεια ακολούθησε σειρά διαδικασιών, οι οποίες περιγράφονται στην παράγραφο 2.8 και η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε μετά από έκθεση ειδικού φιλμ (X-Ray) για 40 min παρουσία της μεμβράνης σε σκοτεινό θάλαμο με κατάλληλα φωτογραφικά υγρά εμφάνισης και στερέωσης (**Εικόνα 42**).



Εικόνα 42: Αποτύπωμα κατά Southern όπου εμφανίζονται οι υβριδισμένες ζώνες των αγρίου τύπου στελεχών 25V (1) και 70V(5) του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3 (2), TIAS1.4 (3), TIAS1.6 (4), TIAS2.2 (6), TIAS2.3 (7) και TIAS2.4 (8), μετά από πέψη με EcoRI.

Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται και στο αποτύπωμα, υπάρχει διαφοροποίηση στις ζώνες υβριδισμού μεταξύ των έξι μεταλλαγμένων στελεχών και των δύο αγρίου τύπου στελεχών, οι οποίες διαφέρουν περίπου 500 βάσεις. Στο αγριο στέλεχος αναμένεται ένα προϊόν υβριδισμού περίπου 4000 βάσεων και στα μεταλλαγμένα στελέχη ένα προϊόν υβριδισμού περίπου 3500 βάσεων. Τα αποτελέσματα αυτής της Southern επιβεβαιώνουν επίσης την πραγματοποίηση διπλού γενετικού ανασυνδυασμού και απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA*.

3.9 Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *VdSteA* στα αγρίου τύπου και τα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta VdSteA$

Η μελέτη της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου *VdSteA* αποτελεί έναν επιπλέον τρόπο επιβεβαίωσης της διαγραφής του γονιδίου στα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6, TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4 και της εισαγωγής του αλληλόμορφου αντικατάστασης στη θέση του. Για το σκοπό αυτό τα μεταλλαγμένα στελέχη καθώς και οι αγρίου τύπου φυλές 25V, 70V και μια απομόνωση από ραπανάκι του μύκητα *V. dahliae* αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με PDA και

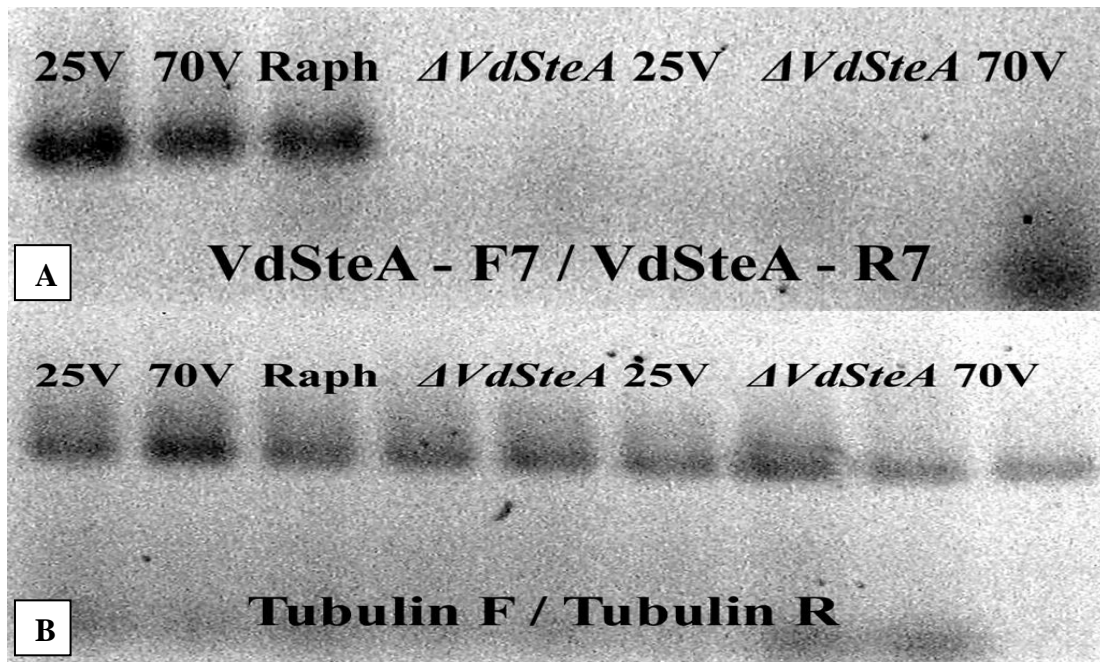
ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες που αναφέρονται στις παραγράφους 2.3.1. και 2.3.3. για να γίνει η παραλαβή του μυκηλίου και η εξαγωγή RNA.

Μετά την εξαγωγή του RNA των παραπάνω άγριων και μεταλλαγμένων στελεχών ακολούθησε η ποσοτικοποίησή του σε φωτόμετρο Nanodrop (πίνακας 6), ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα RNA που χρησιμοποιήθηκε για την RT-PCR, που έγινε με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.9.

Ποσοτικοποίηση RNA με nanodrop			
ΣΤΕΛΕΧΟΣ	RNA (µg/µl)	260/280	260/230
25V	258,4	1,89	1,12
TIAS1.3	306,8	1,74	1,23
TIAS1.4	380	1,81	1,50
TIAS1.6	273	1,72	1,44
70V	381,8	1,79	1,59
TIAS2.2	449,3	1,80	1,49
TIAS2.3	622,1	1,87	0,89
TIAS2.4	346,9	2,00	0,75
Raphani	442,7	1,81	1,59

Πίνακας 6: Ποσοτικοποίηση του απομονωθέντος RNA των αγρίου τύπου στελεχών 25V και 70V και της απομόνωσης από ραπανάκι του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6, TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4.

Για την ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου *VdSteA* στα μεταλλαγμένα και τα αγρίου τύπου στελέχη του μύκητα *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε PCR σε 1 µl cDNA ($T_m=54^{\circ}\text{C}$, extension= 1 min, 39 κύκλοι) με τα ζευγάρια εκκινητών, των οποίων ο σχεδιασμός περιγράφεται στην παράγραφο 2.9. καθώς και με εκκινητές τουμπουλίνης (παράγραφος 2.2.2.). Οι εκκινητές τουμπουλίνης (housekeeping gene) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες της παρουσία ίσης ποσότητας cDNA στα δείγματα αλλά και ως μάρτυρας επιτυχίας της PCR. Από τα 2 ζευγάρια εκκινητών για τον έλεγχο της απενεργοποίησης του γονιδίου σε μεταγραφικό επίπεδο έγινε επιλογή των *VdSteA*-F7 και *VdSteA*-R7, που ενισχύει ένα τμήμα περίπου 328 βάσεων εντός της κωδικής περιοχής του *VdSteA*, καθώς έδινε πιο ξεκάθαρη εικόνα της διαφοροποίησης μεταξύ μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου στελεχών (**Εικόνα 43**).



Εικόνα 43: (A) PCR των αγρίου τύπου στελεχών 25V, 70V και της απομόνωσης από ραπανάκι του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων $\Delta VdSteA$ στελεχών του 25V (TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6) και του 70V (TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4) με το ζεύγος εκκινητών VdSteA–F7 και VdSteA –R7. (B) PCR των αγρίου τύπου στελεχών 25V, 70V και της απομόνωσης από ραπανάκι του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων $\Delta VdSteA$ στελεχών του 25V (TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6) και του 70V (TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4) με το ζεύγος εκκινητών VdSteA–F7 και VdSteA –R7 με τους εκκινητές της τουμπουλίνης.

Όπως φαίνεται και στη φωτογραφία οι εκκινητές της τουμπουλίνης έδωσαν το αναμενόμενο προϊόν 550 βάσεων σε όλα τα στελέχη, μεταλλαγμένα και μη, ενώ οι εκκινητές VdSteA–F7 και VdSteA –R7 έδωσαν προϊόν μόνο στα τρία αγρίου τύπου στελέχη του *V. dahliae* και όχι στα μεταλλαγμένα. Αυτό πιστοποιεί ότι το γονίδιο δεν εκφράζεται στα μεταλλαγμένα στελέχη, συνεπώς έχει επιτευχθεί η διαγραφή του γονιδίου και η αντικατάστασή του από την κασέτα της γενετισίνης.

3.10 Χαρακτηρισμός στελεχών με απενεργοποιημένο το γονίδιο *VdSteA* ως προς διάφορα φυσιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά

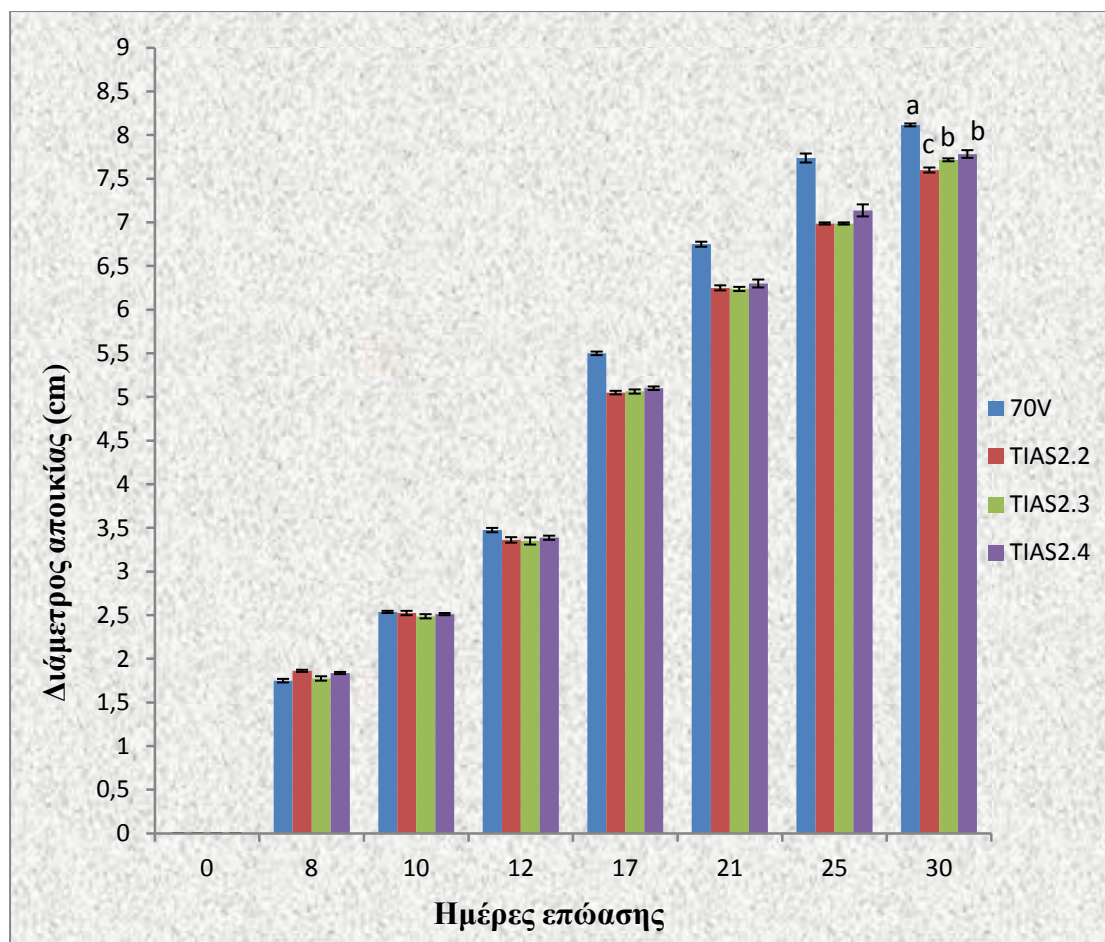
Οι αγρίου τύπου φυλές 25V και 70V του μύκητα *V. dahliae* καθώς και τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6, TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4,

στα οποία έχει πραγματοποιηθεί επιτυχής απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA*, αξιολογήθηκαν ως προς τη μυκηλιακή αύξηση, την ικανότητα παραγωγής κονιδίων και μικροσκληρωτίων και τη βλαστικότητα κονιδίων (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.11).

3.10.1 Μυκηλιακή αύξηση σε τρυβλίο

3.10.1.1 Μετρήσεις διαμέτρου μυκηλιακής αύξησης και ανάπτυξης μικροσκληρωτίων

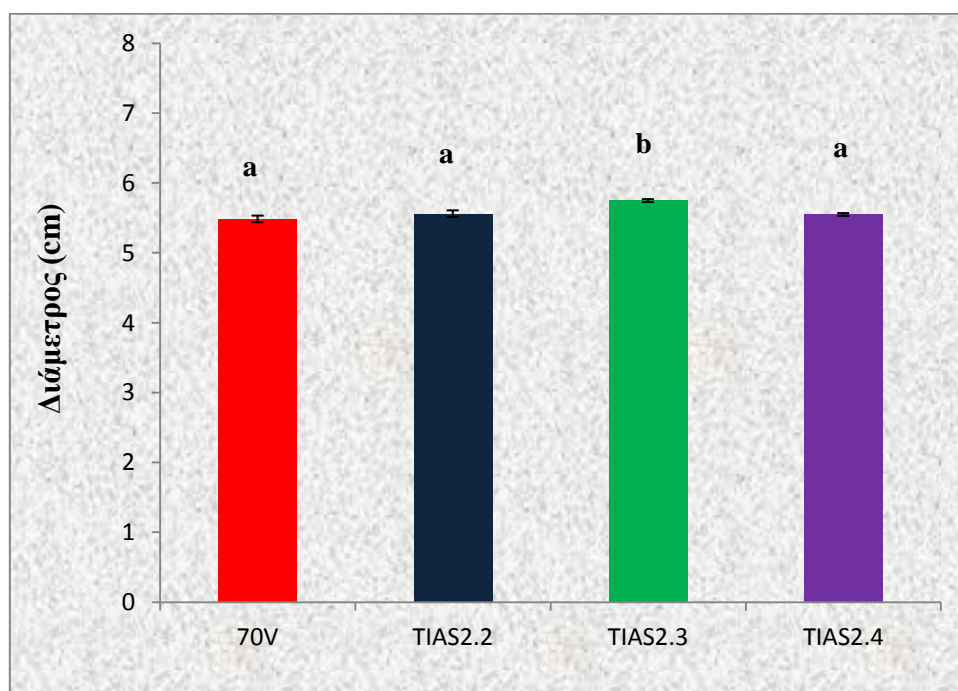
Στην αξιολόγηση της μυκηλιακής αύξησης συγκρίθηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου καθώς και των μικροσκληρωτίων των αγρίων στελεχών 25V και 70V καθώς και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6, TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4, σε τρυβλία που περιείχε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SSN agar. Πιο συγκεκριμένα οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ του αγρίου στελέχους 25V και των 3 μεταλλαγμένων στελεχών του TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6 και μεταξύ του αγρίου στελέχους 70V και των 3 μεταλλαγμένων στελεχών του TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4. Στο σχεδιάγραμμα που ακολουθεί (**Σχεδιάγραμμα 1**) παρουσιάζεται η αύξηση της διαμέτρου των στελεχών 70V και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4. Όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα αυτά τα στελέχη μέχρι τις 12 ημέρες παρουσίαζαν παρόμοιο ρυθμό αύξησης της διαμέτρου τους στο τρυβλίο, η οποία έφτασε μέχρι τα 3,5 εκατοστά ανάπτυξης. Στη συνέχεια το άγριο στέλεχος άρχισε να διαφοροποιείται ως προς το ρυθμό ανάπτυξής του. Πιο συγκεκριμένα στις 17, 21, 25 και 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος το άγριο στέλεχος αυξήθηκε με μεγαλύτερους ρυθμούς σε σχέση με τα μεταλλαγμένα στελέχη φτάνοντας στο τέλος των μετρήσεων να έχει σχεδόν 0,5 εκατοστά μεγαλύτερη διάμετρο μυκηλίου σε σχέση με τα μεταλλαγμένα στελέχη του. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση στις μετρήσεις διαμέτρου των 30 ημερών για το στέλεχος 70V και τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4 με το πρόγραμμα Statgraphics Plus. Η ανάλυση έδειξε ότι το άγριο στέλεχος έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάπτυξης με τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4, ενώ και μεταξύ των μεταλλαγμένων το στέλεχος TIAS2.2 παρουσιάζει μικρή διαφοροποίηση έναντι των TIAS2.3 και TIAS2.4.



Σχεδιάγραμμα 1: Ρυθμός ανάπτυξης του αγρίου στελέχους 70V του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta VdSteA$ TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4, σε σχέση με το χρόνο. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες, μετά την έναρξη της επώασης. Στον κάθετο άξονα απεικονίζονται οι μετρήσεις της διαμέτρου σε εκατοστά. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα (standard error). Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τέσσερις επαναλήψεις. Στις 30 ημέρες έχει πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

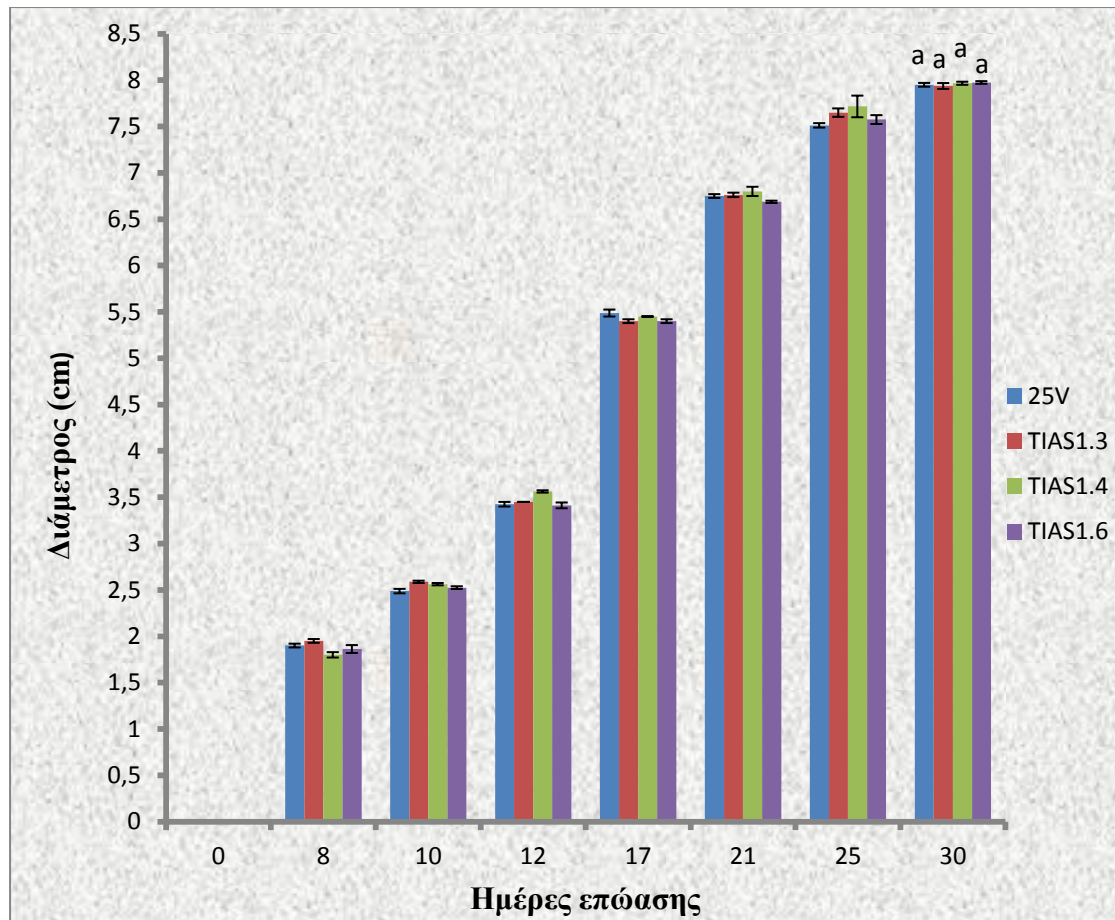
Όσον αφορά την παραγωγή μικροσκληρωτίων πραγματοποιήθηκε μέτρηση της διαμέτρου της περιοχής που κάλυπταν τα μικροσκληρώτια τόσο στο 70V όσο και στα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4, 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση στις μετρήσεις της διαμέτρου των μικροσκληρωτίων για το στέλεχος 70V και τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4 με το πρόγραμμα Statgraphics Plus. Παρατηρήθηκε ότι η διάμετρος της περιοχής ανάπτυξης των μικροσκληρωτίων δε διέφερε στατιστικά

μεταξύ του 70V και των μεταλλαγμένων TIAS2.2 και TIAS2.4, ενώ η ανάπτυξη στο TIAS2.3 διέφερε στατιστικά σημαντικά από το άγριο στέλεχος και τα άλλα 2 μεταλλαγμένα στελέχη (Σχεδιάγραμμα 2).



Σχεδιάγραμμα 2: Διάμετρος της περιοχής ανάπτυξης μικροσκληρωτίων της άγριας φυλής 70V του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4, 30 ημέρες από την έναρξη του πειράματος. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τέσσερις επαναλήψεις. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

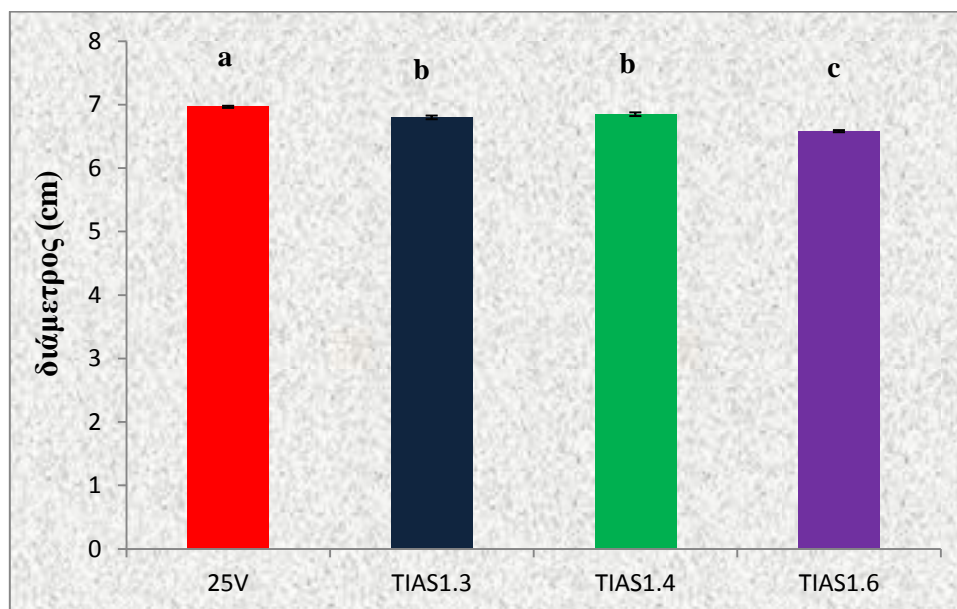
Οι ίδιες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και μεταξύ της άγριας φυλής 25V και των 3 μεταλλαγμένων στελεχών της, των TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6. Στο σχεδιάγραμμα που ακολουθεί (Σχεδιάγραμμα 3) παρουσιάζεται η αύξηση της διαμέτρου των στελεχών 25V και των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta VdSteA$ TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6. Όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα, μετά την πραγματοποίηση στατιστικής ανάλυσης, σε αυτά τα στελέχη δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο ρυθμό αύξησης της διαμέτρου τους στο τρυβλίο.



Σχεδιάγραμμα 3: Ρυθμός ανάπτυξης του αγρίου στελέχους 25V του μήκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta VdSteA$ TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, σε σχέση με το χρόνο. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες, μετά την έναρξη της επώασης. Στον κάθετο άξονα απεικονίζονται οι μετρήσεις της διαμέτρου σε εκατοστά. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τέσσερις επαναλήψεις. Στις 30 ημέρες έχει πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση. Τα ίδια γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας (P) ≤ 0.05 .

Όσον αφορά την παραγωγή μικροσκληρωτίων πραγματοποιήθηκε μέτρηση της διαμέτρου της περιοχής που κάλυπταν τα μικροσκληρώτια τόσο στο 25V όσο και στα 3 μεταλλαγμένα στελέχη του, τα TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, 30 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Παρατηρήθηκε, μετά από στατιστική ανάλυση, ότι η διάμετρος της περιοχής ανάπτυξης των μικροσκληρωτίων διέφερε μεταξύ του 25V και των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta VdSteA$ (**Σχεδιάγραμμα 4**). Επιπλέον,

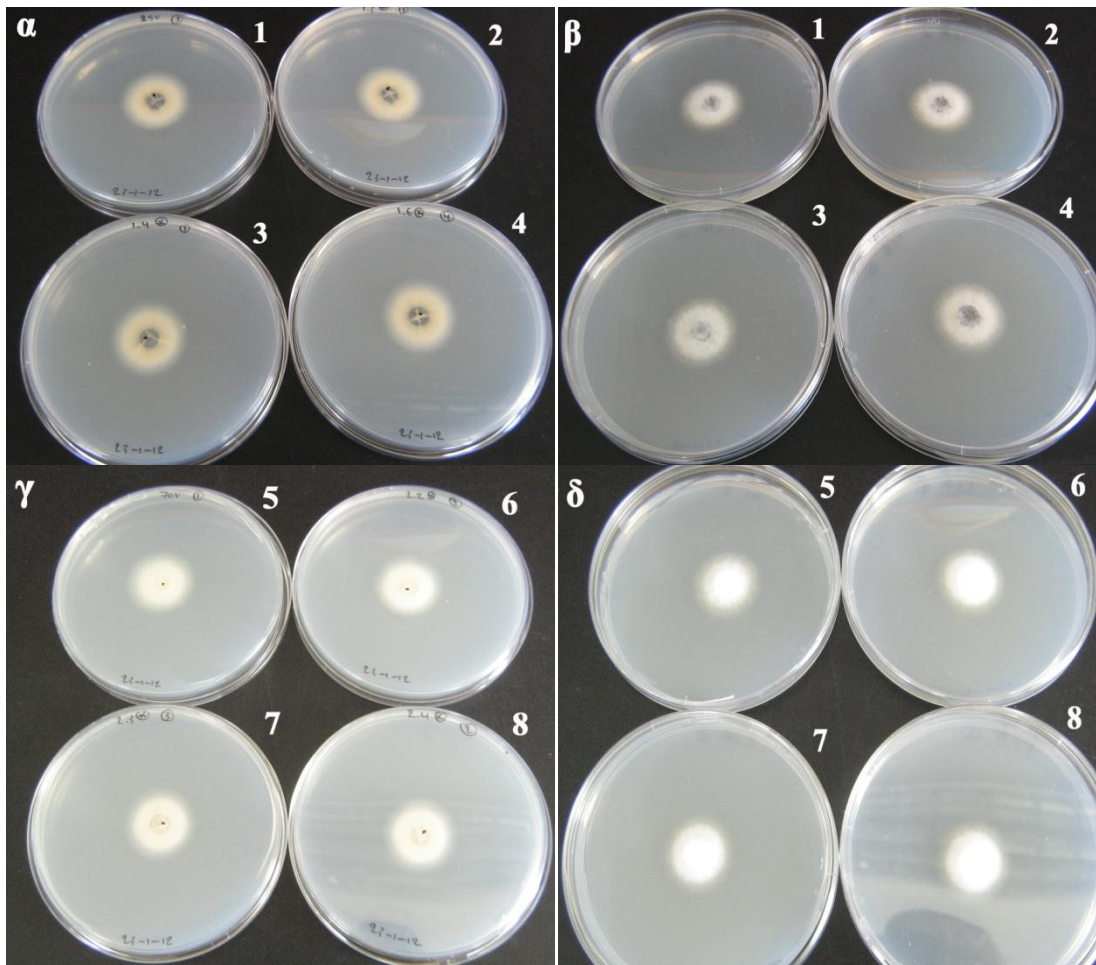
παρατηρήθηκε ότι τα μικροσκληρώτια σε αυτά τα στελέχη (25V, TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6 είχαν αναπτυχθεί σε μεγαλύτερη έκταση σε σχέση με τα μικροσκληρώτια στο 70V και στα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4.



Σχεδιάγραμμα 4: Διάμετρος της περιοχής ανάπτυξης μικροσκληρωτίων της άγριας φυλής 25V του μύκητα *V. dahliae* καθώς και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, στις 30 ημέρες από την έναρξη του πειράματος. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τέσσερις επαναλήψεις. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας (P) ≤ 0.05 .

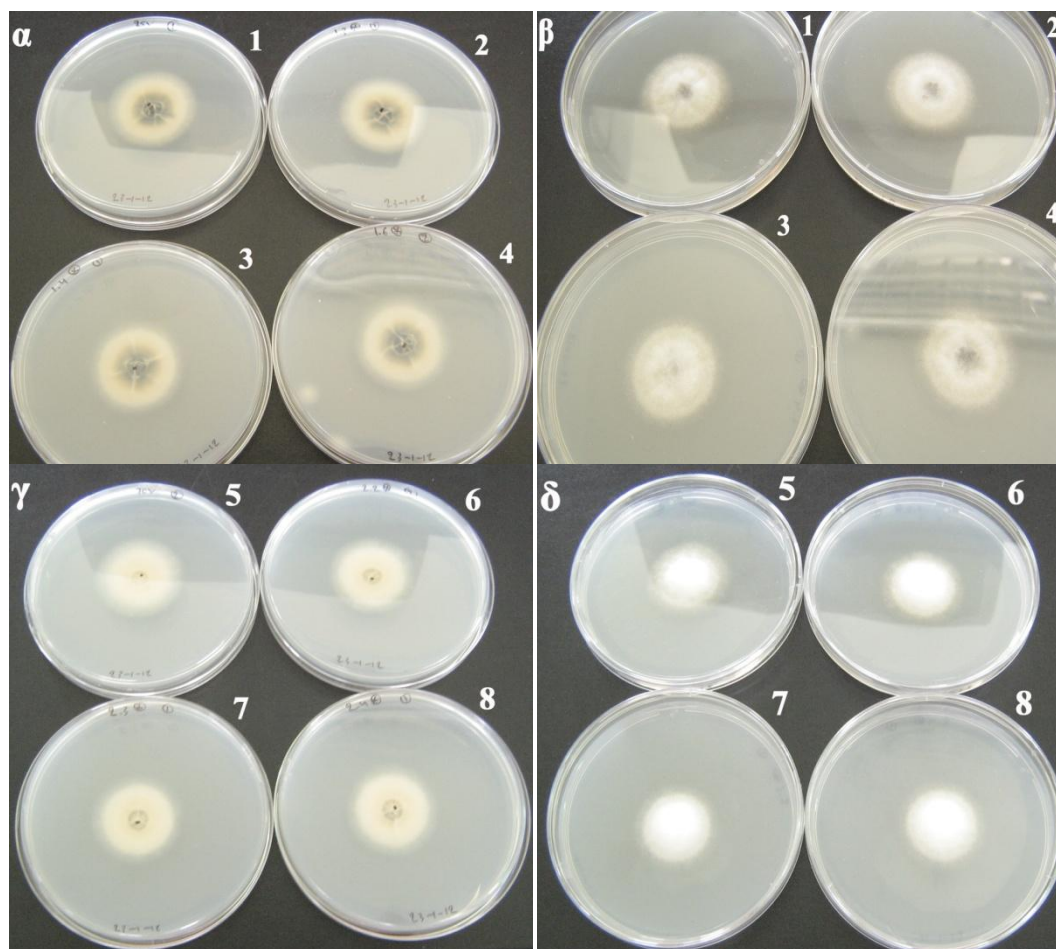
3.10.1.2 Οπτική παρατήρηση ανάπτυξης σε SSN agar

Η παραγωγή των μικροσκληρωτίων άρχισε να γίνεται ορατή 10 ημέρες από την έναρξη της επώασης των μυκήτων και ήταν ταυτόχρονη για το 25V και τα μεταλλαγμένα στελέχη του (**Εικόνα 44α και 44β**). Δεν παρατηρήθηκε ωστόσο ανάπτυξη μικροσκληρωτίων στις 10 ημέρες στο 70V και τα μεταλλαγμένα στελέχη του (**Εικόνα 44γ και 44δ**).



Εικόνα 44: (α) Απεικόνιση της κάτω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος 25V (1) και τα μεταλλαγμένα TIAS1.3 (2), TIAS1.4 (3) και TIAS1.6 (4) μετά από 10 ημέρες επώασης. Διακρίνεται η εμφάνιση των μικροσκληρωτίων. (β) Η άνω όψη των τρυβλίων που απεικονίζονται στο (α) (γ) Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται η κάτω όψη των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος 70V (5) και τα μεταλλαγμένα TIAS2.2 (6), TIAS2.3 (7) και TIAS2.4 (8). Εδώ δε διακρίνεται η εμφάνιση μικροσκληρωτίων. (δ) Η άνω όψη των τρυβλίων που απεικονίζονται στο (γ) όπου δεν παρατηρούνται μικροσκληρώτια.

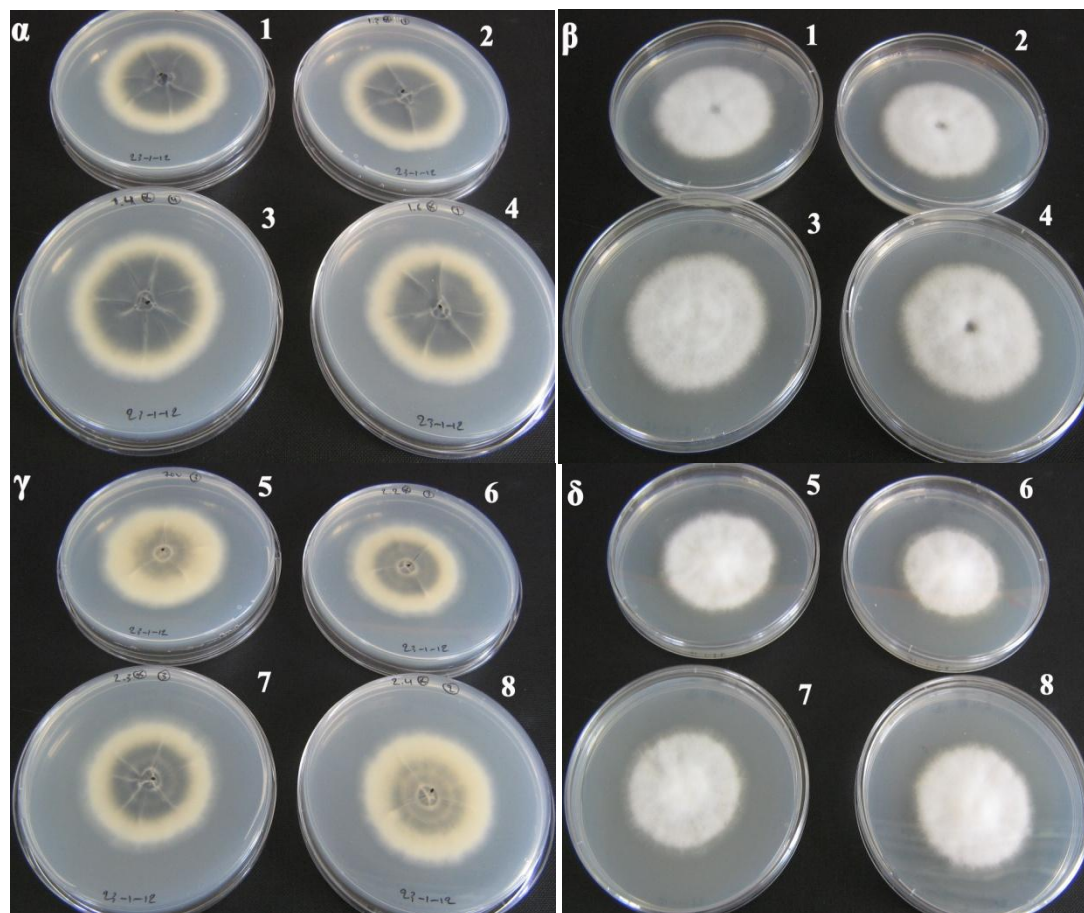
Στις 12 ημέρες μετά την επώαση δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις ως προς την ανάπτυξη της αποικίας αλλά και ως προς την παραγωγή μικροσκληρωτίων ανάμεσα στα άγρια στελέχη και τα μεταλλαγμένα στελέχη τους (**Εικόνα 45**).



Εικόνα 45: (α) Απεικόνιση της κάτω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος 25V (1) και τα μεταλλαγμένα TIAS1.3 (2), TIAS1.4 (3) και TIAS1.6 (4) μετά από 12 ημέρες επώασης. Διακρίνεται η ανάπτυξη μικροσκληρωτίων. (β) Η άνω όψη των τρυβλίων που απεικονίζονται στο (α). (γ) Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται η κάτω όψη των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος 70V (5) και τα μεταλλαγμένα TIAS2.2 (6), TIAS2.3 (7) και TIAS2.4 (8). Εδώ αρχίζει και διακρίνεται η ανάπτυξη μικροσκληρωτίων. (δ) Η άνω όψη των τρυβλίων που απεικονίζονται στο (γ).

Στις 17 ημέρες από την έναρξη της επώασης άρχισαν να παρατηρούνται ορισμένες διαφοροποιήσεις. Αυτές εντοπίστηκαν στο 70V και τα μεταλλαγμένα του στελέχους (TIAS2.2, TIAS2.3, TIAS2.4). Πιο συγκεκριμένα η διάμετρος της αποικίας του αγρίου στελέχους ήταν κατά 0,5 cm μεγαλύτερη από τις αποικίες των μεταλλαγμένων (όπως φαίνεται και στο **Σχεδιάγραμμα 1**). Επιπλέον, η ανάπτυξη μικροσκληρωτίων στα μεταλλαγμένα στελέχη ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με το άγριο στέλεχος (**Εικόνα 46γ και 46δ**). Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 46α και 46β**, δεν παρατηρήθηκε στις

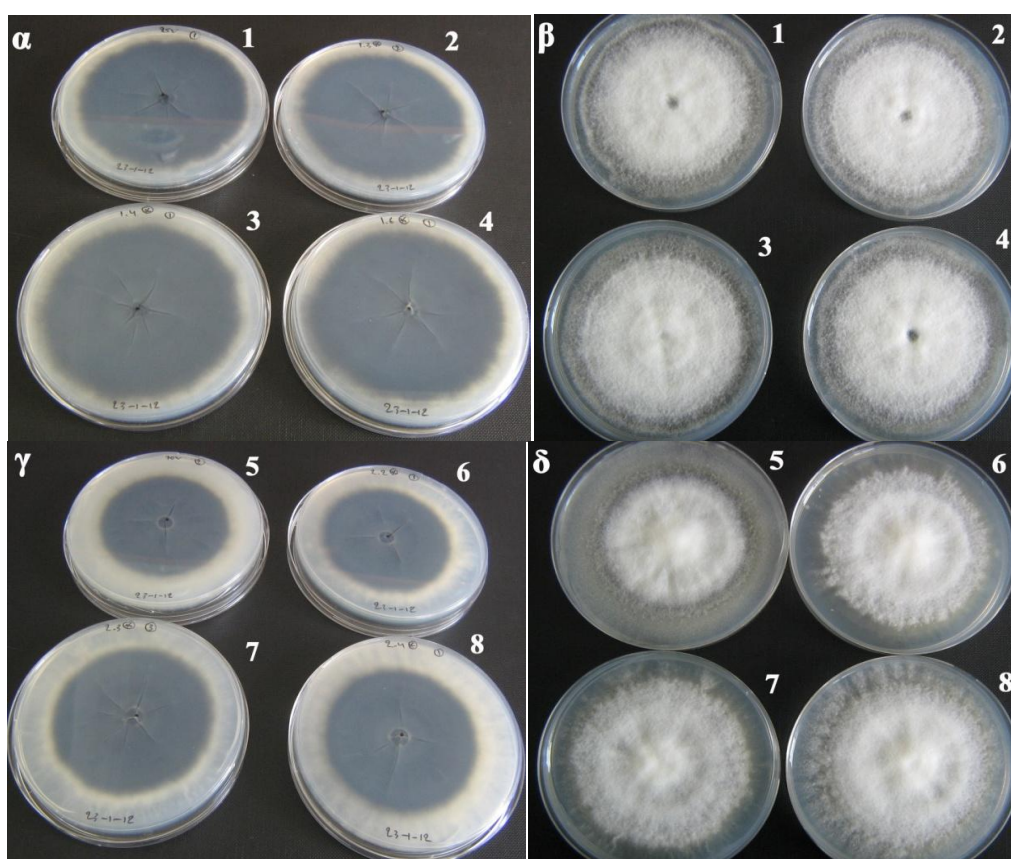
17 ημέρες κάποια σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στο άγριο στέλεχος 25V και τα μεταλλαγμένα στελέχη του (TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6).



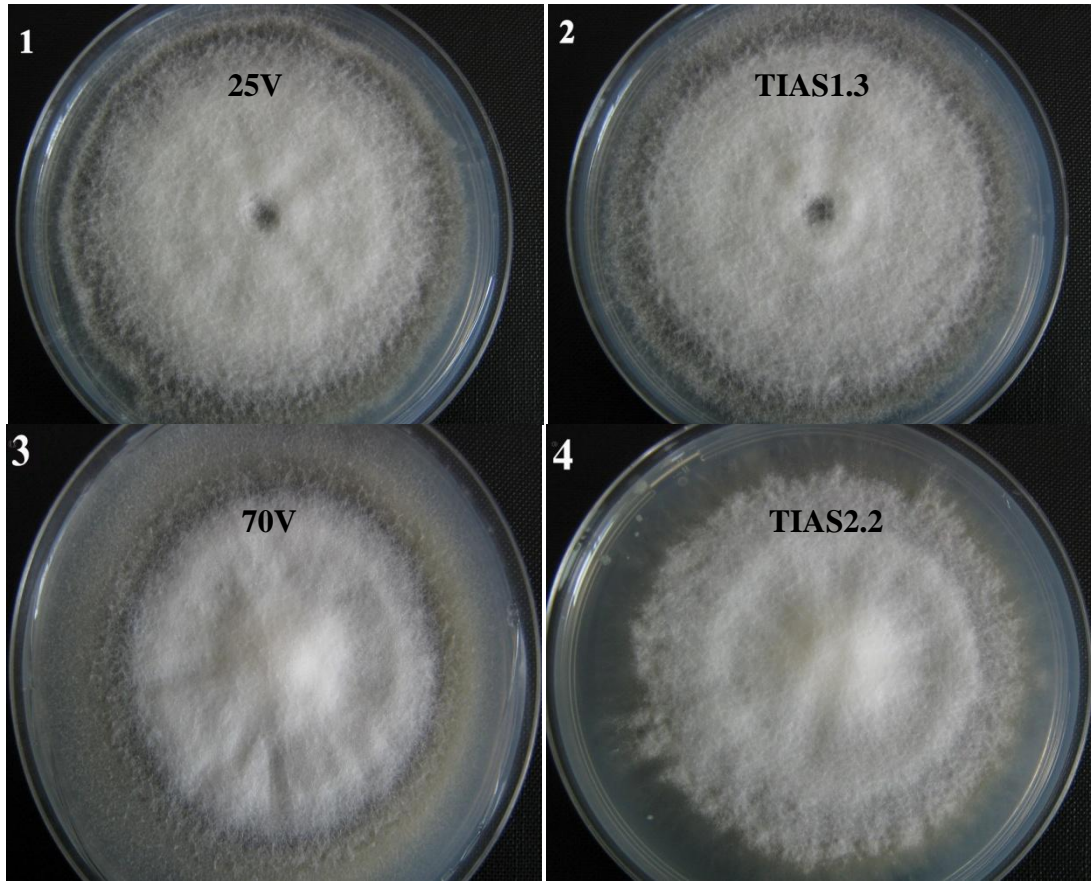
Εικόνα 46:(α) Κάτω όψη των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος 25V (1) και τα μεταλλαγμένα $\Delta VdSteA$ TIAS1.3 (2), TIAS1.4 (3) και TIAS1.6 (4), μετά από 17 ημέρες επώασης. Διακρίνεται η ομοιόμορφη ανάπτυξη μικροσκληρωτίων. (β) Η άνω όψη των τρυβλίων που απεικονίζονται στο (α). Δεν παρατηρείται σημαντική μορφολογική διαφοροποίηση (γ) Κάτω όψη τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος 70V (5) και τα μεταλλαγμένα $\Delta VdSteA$ TIAS2.2 (6), TIAS2.3 (7) και TIAS2.4 (8). Διακρίνεται διαφορετικός τρόπος και ρυθμός ανάπτυξης μικροσκληρωτίων ανάμεσα στα μεταλλαγμένα στελέχη και το άγριο στέλεχος. (δ) Η άνω όψη των τρυβλίων που απεικονίζονται στο (γ)

Στις 30 ημέρες, που ολοκληρώθηκαν οι παρατηρήσεις του συγκεκριμένου πειράματος, η ανάπτυξη μικροσκληρωτίων στο 25V και τα μεταλλαγμένα του ήταν ομοιόμορφη (**Εικόνα 47α**). Όσον αφορά το μυκήλιο στα μεταλλαγμένα στελέχη ήταν περισσότερο απλωμένο στην επιφάνεια του τρυβλίου (**Εικόνα 48.2**), από ότι στο άγριο στέλεχος (**Εικόνα 48.1**) που ήταν συγκεντρωμένο πιο κεντρικά στο τρυβλίο

(**Εικόνα 47β**). Στο 70V παρατηρήθηκε μικρότερη έκταση ανάπτυξης μικροσκληρωτίων ως προς την τελική ανάπτυξη της αποικίας σε σχέση με τα μεταλλαγμένα του, όπου τα μικροσκληρώτια κάλυπταν μεγαλύτερη επιφάνεια αποικίας (**Εικόνα 47γ**). Όσον αφορά την ανάπτυξη του μυκηλίου το 70V κάλυπτε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος στο τρυβλίο (**Εικόνα 48.3**), ωστόσο το πυκνότερο μυκήλιο ήταν πιο συγκεντρωμένο κεντρικά του τρυβλίου (**Εικόνα 47δ**). Από την άλλη, τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με μυκήλιο, είχαν ωστόσο πιο απλωτή ανάπτυξη πυκνού μυκηλίου (**Εικόνα 48.4**), ενώ παρατηρήθηκαν και ανομοιομορφίες στην περιφερειακή ανάπτυξη των αποικιών τους (**Εικόνα 47δ**).



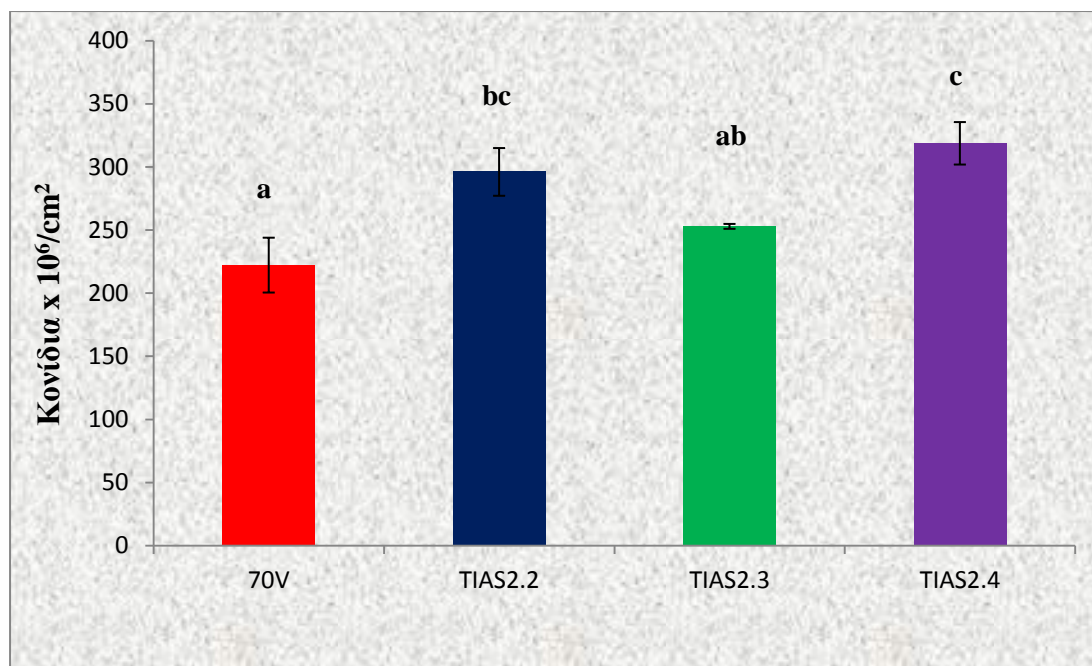
Εικόνα 47: (α) Κάτω όψη τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος 25V (1) και τα μεταλλαγμένα TIAS1.3 (2), TIAS1.4 (3) και TIAS1.6 (4) μετά από 30 ημέρες επώασης. Διακρίνεται ομοιόμορφη ανάπτυξη μικροσκληρωτίων. (β) Η άνω όψη των τρυβλίων που απεικονίζονται στο (α) παρατηρείται η ελαφρά πιο απλωτή ανάπτυξη πυκνού μυκηλίου στα μεταλλαγμένα στελέχη έναντι του 25V. (γ) Κάτω όψη τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος 70V (5) και τα μεταλλαγμένα TIAS2.2 (6), TIAS2.3 (7) και TIAS2.4 (8). (δ) Η άνω όψη των τρυβλίων που απεικονίζονται στο (γ).



Εικόνα 48: Η μυκηλιακή ανάπτυξη του αγρίου στελέχους 25V(1) και του $\Delta VdSteA$ στελέχους TIAS1.3(2) μετά από 30 ημέρες επώασης. Η μυκηλιακή ανάπτυξη του αγρίου στελέχους 70V (3) και του $\Delta VdSteA$ στελέχους TIAS2.2 (4) μετά από 30 ημέρες επώασης.

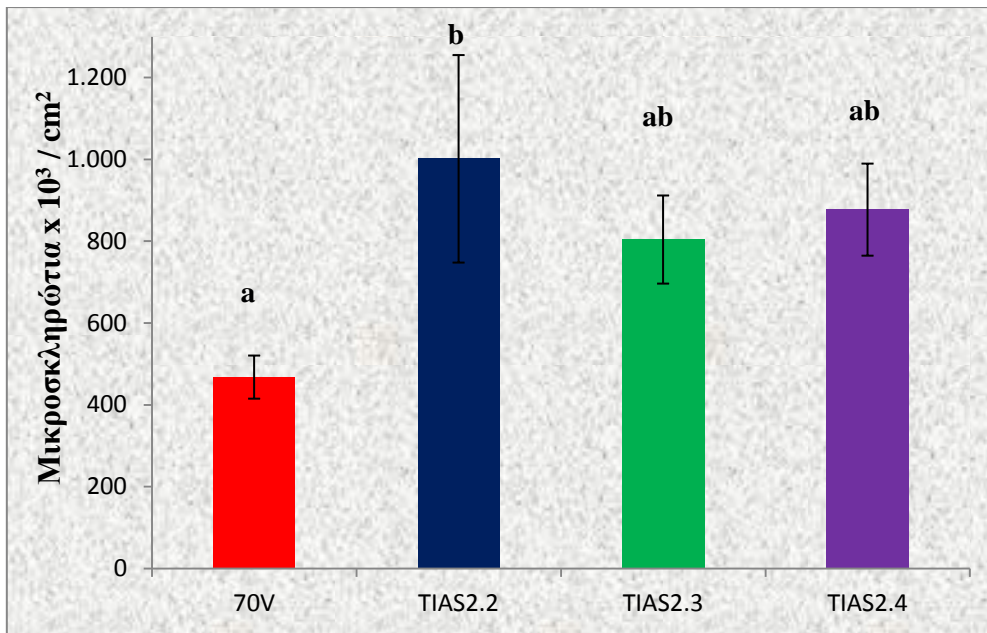
3.10.2 Εκτίμηση παραγωγής κονιδίων και μικροσκληρωτίων σε τρυβλίο

Για να συγκριθεί η ικανότητα παραγωγής κονιδίων και μικροσκληρωτίων μεταξύ των στελεχών αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αυτών των χαρακτηριστικών όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.11 . Οι μετρήσεις αυτές έγιναν μεταξύ των αγρίου τύπου φυλών 25V και 70V και των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta VdSteA$ TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6, TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4, σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SSN agar. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς και μετά τη διενέργεια στατιστικής ανάλυσης, το άγριο στέλεχος 70V παρήγαγε λιγότερα κονίδια / cm^2 ανεπτυγμένης αποικίας στις 30 ημέρες ανάπτυξης σε σχέση με τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS2.2 και TIAS2.4 και ίδια συγκέντρωση κονιδίων με το TIAS2.3 (Σχεδιάγραμμα 5).



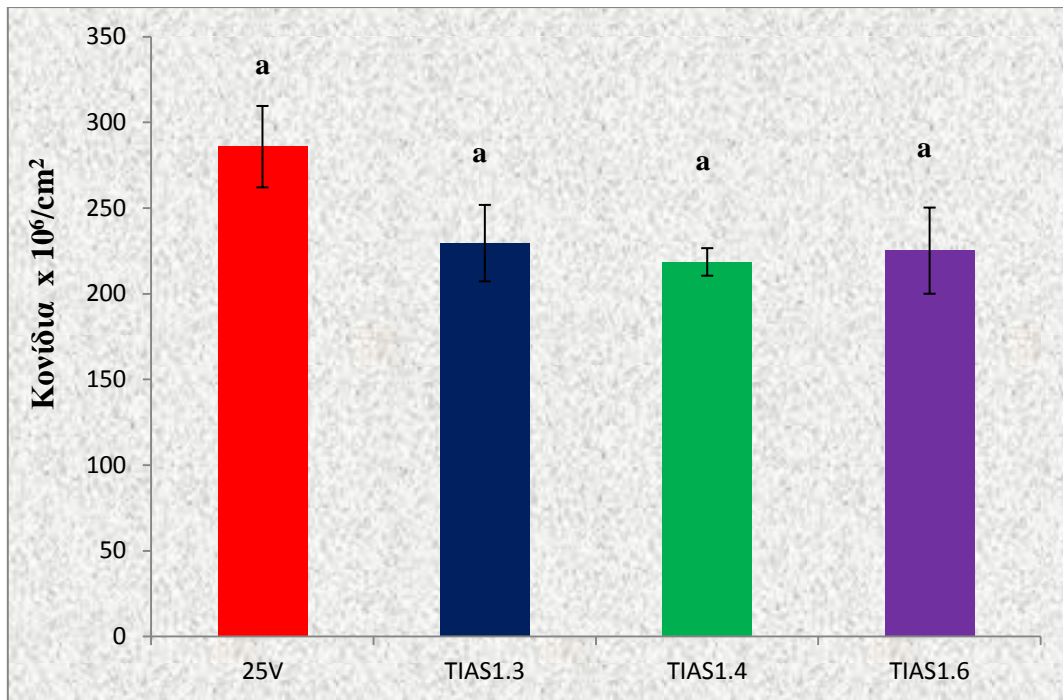
Σχεδιάγραμμα 5: Συγκέντρωση κονιδίων/cm² ανεπτυγμένης αποικίας, του αγρίου στελέχους 70V και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4, μετά από 30 ημέρες επώασης. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τέσσερις επαναλήψεις. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

Όσον αφορά το σχηματισμό μικροσκληρωτίων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του αγρίου στελέχους 70V και του μεταλλαγμένου TIAS2.2, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταλλαγμένων στελεχών. Παρά το γεγονός ότι το άγριο στέλεχος 70V παρήγαγε λιγότερα μικροσκληρώτια / cm² ανεπτυγμένης αποικίας σε σχέση με τα μεταλλαγμένα στελέχη στις 30 ημέρες ανάπτυξης σε τρυβλίο με SSN agar, η στατιστική ανάλυση έδειξε διαφοροποίηση μόνο με το TIAS2.2 (**Σχεδιάγραμμα 6**).



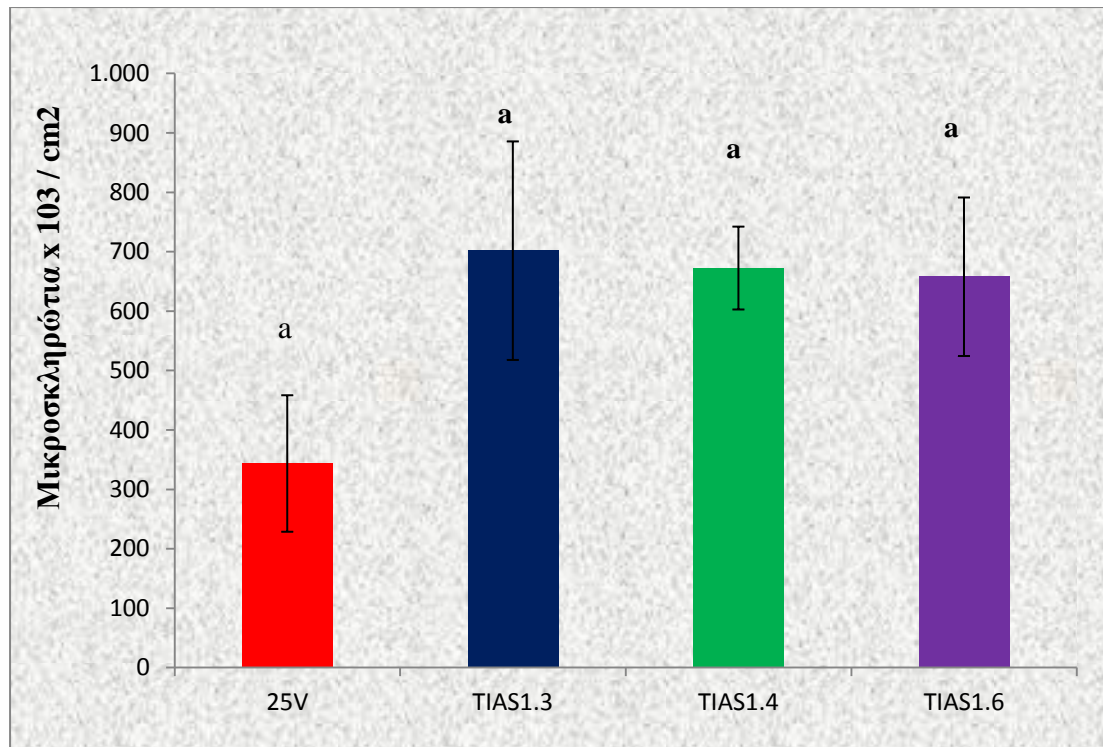
Σχεδιάγραμμα 6: Συγκέντρωση μικροσκληρωτίων/cm² ανεπτυγμένης αποικίας, του αγρίου στελέχους 70V και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4, μετά από 30 ημέρες επώασης. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τέσσερις επαναλήψεις. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας (P) ≤ 0.05 .

Οι υπολογισμοί που έγιναν στις μετρήσεις του αγρίου στελέχους 25V και των μεταλλαγμένων του έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην παραγωγή κονιδίων/cm² ανεπτυγμένης αποικίας μεταξύ του αγρίου στελέχους και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, μετά από 30 ημέρες επώασης σε τρυβλίο με SSN agar (**Σχεδιάγραμμα 7**).



Σχεδιάγραμμα 7: Συγκέντρωση κονιδίων/cm² ανεπτυγμένης αποικίας, του άγριου στελέχους 25V και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, μετά από 30 ημέρες επώασης. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τέσσερις επαναλήψεις. Τα ίδια γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας (P) ≤ 0.05 .

Στην περίπτωση του σχηματισμού μικροσκληρωτίων παρατηρήθηκε παρόμοια εικόνα με αυτή της παραγωγής κονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση η οποία έδειξε ότι η συγκέντρωση των μικροσκληρωτίων/cm² ανεπτυγμένης αποικίας του άγριου στελέχους 25V δε διέφερε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, μετά από 30 ημέρες επώασης σε τρυβλίο με SSN agar (**Σχεδιάγραμμα 8**).

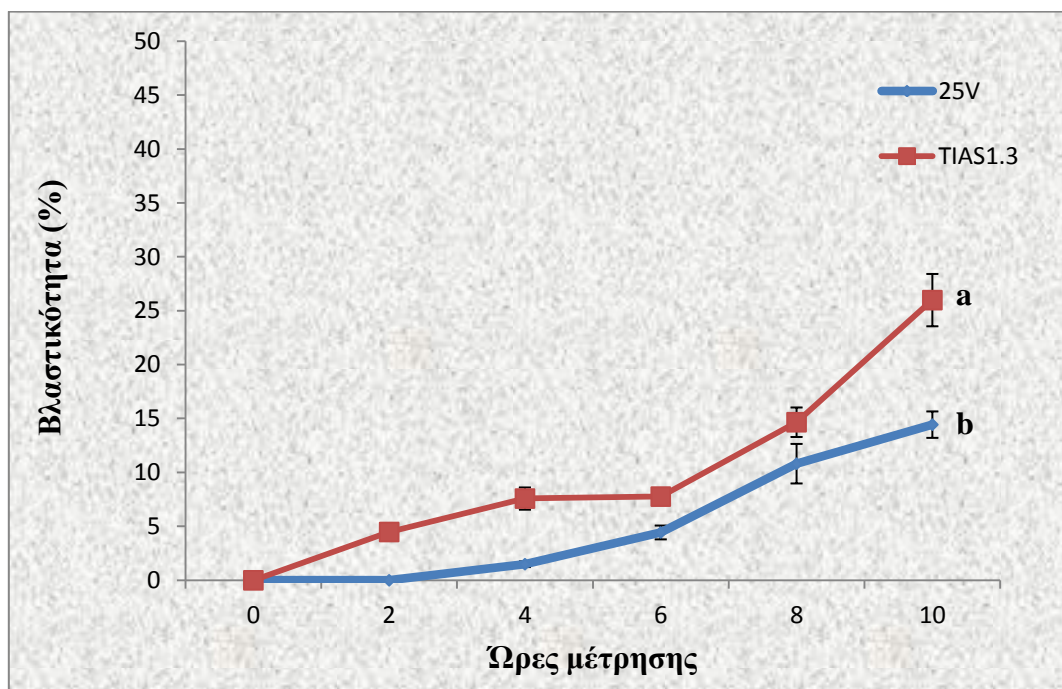


Σχεδιάγραμμα 8: Συγκέντρωση μικροσκληρωτίων/cm² ανεπτυγμένης αποικίας, του αγρίου στελέχους 25V και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, μετά από 30 ημέρες επώασης. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τέσσερις επαναλήψεις. Τα ίδια γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας (P) ≤ 0.05 .

3.10.3 Εκτίμηση βλαστικότητας κονιδίων

Για να εκτιμηθεί ο ρυθμός βλαστικότητας των κονιδίων μεταξύ των στελεχών αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.11. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν μεταξύ των αγρίου τύπου στελεχών 25V και 70V και των μεταλλαγμένων τους στελεχών TIAS1.3 και TIAS2.4, αντίστοιχα. Το συγκεκριμένο πείραμα διήρκεσε 10 ώρες και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν κάθε 2 ώρες. Η εκτίμηση της βλαστικότητας πραγματοποιήθηκε με μέτρηση σε αιματοκυτταρόμετρο των βλαστημένων κονιδίων έναντι του συνόλου των κονιδίων που καταμετρούνταν σε κάθε μέτρηση. Στην περίπτωση του αγρίου στελέχους 25V και του μεταλλαγμένου στελέχους του TIAS1.3 παρατηρήθηκε ότι

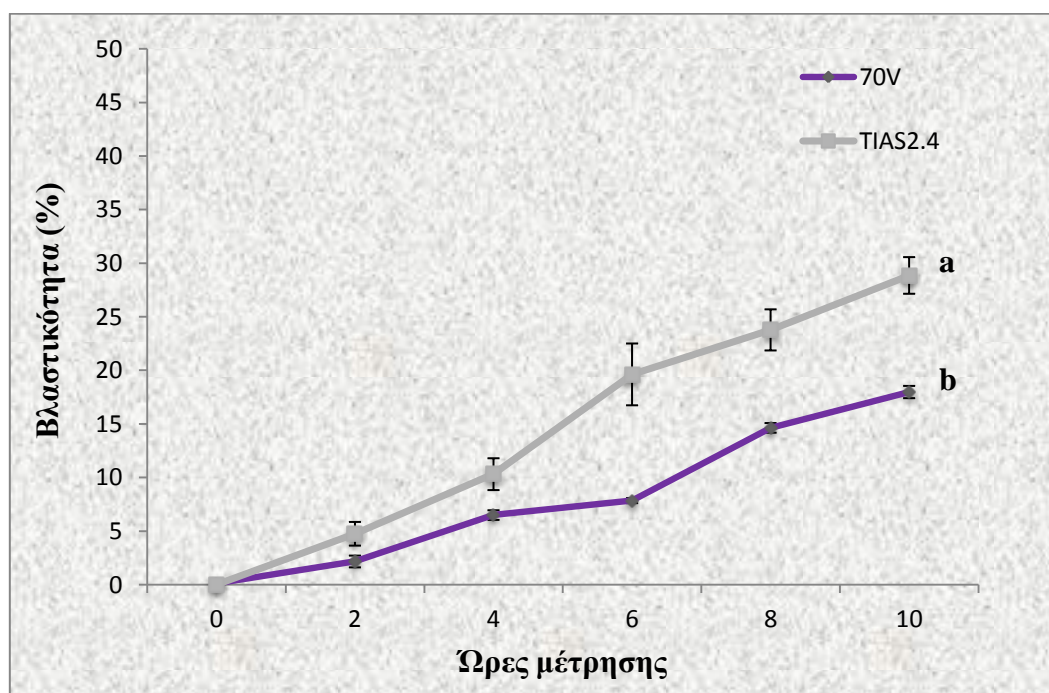
από την έναρξη έως το τέλος του πειράματος το μεταλλαγμένο στέλεχος παρουσίαζε υψηλότερο ποσοστό βλαστικότητα σε κάθε μέτρηση έναντι του αγρίου στελέχους. Στο τέλος του πειράματος το μεταλλαγμένο στέλεχος παρουσίαζε ποσοστό βλαστικότητα 26% ενώ το άγριο στέλεχος ποσοστό βλαστικότητα 14%. (Σχεδιάγραμμα 9). Στατιστική ανάλυση στις 10 ώρες μετρήσεων από την έναρξη των μετρήσεων έδειξε ότι τα επίπεδα βλαστικότητα του μεταλλαγμένου στελέχους διαφέρουν στατιστικά σημαντικά έναντι του αγρίου στελέχους.



Σχεδιάγραμμα 9: Ρυθμός μεταβολής του ποσοστού βλαστικότητα του αγρίου στελέχους 25V και του μεταλλαγμένου στελέχους TIAS1.3, για χρονικό διάστημα 10 ωρών. Οι γραμμές διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε γραμμή παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τέσσερις επαναλήψεις. Τα διαφορετικά γράμματα δίπλα στις γραμμές υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητα ($P \leq 0.05$).

Το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε και στην περίπτωση του αγρίου στελέχους 70V και του μεταλλαγμένου στελέχους TIAS2.4. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε το μεταλλαγμένο στέλεχος να έχει υψηλότερο ποσοστό βλαστικότητα έναντι του αγρίου στελέχους, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στις 10 ώρες μετρήσεων το ποσοστό βλαστικότητα του στελέχους TIAS2.4 ήταν 29% ενώ του αγρίου στελέχους 70V της τάξης του 18% (Σχεδιάγραμμα 10). Πραγματοποιήθηκε

στατιστική ανάλυση 10 ώρες από την έναρξη των μετρήσεων η οποία έδειξε ότι τα επίπεδα βλαστικότητας του μεταλλαγμένου στελέχους διαφέρουν στατιστικά σημαντικά έναντι του αγρίου στελέχους.



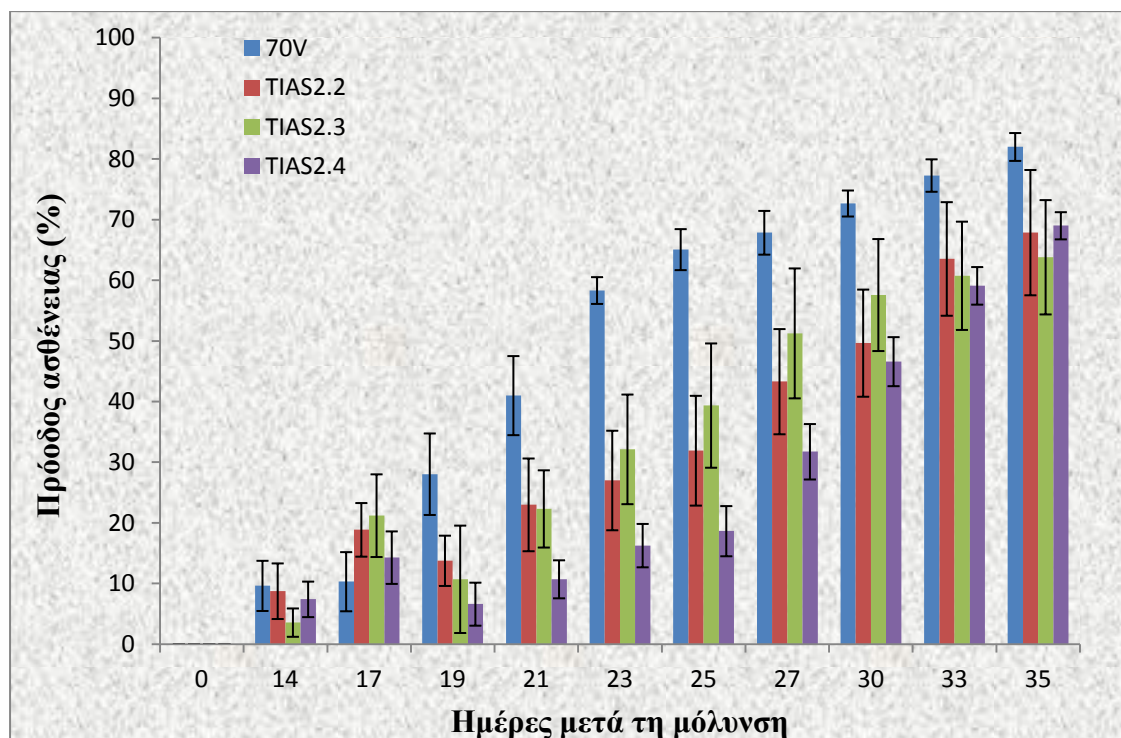
Σχεδιάγραμμα 10: Ρυθμός μεταβολής του ποσοστού βλαστικότητας του αγρίου στελέχους 70V και του μεταλλαγμένου στελέχους TIAS2.4, για χρονικό διάστημα 10 ωρών. Οι γραμμές διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε γραμμή παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τέσσερις επαναλήψεις. Τα διαφορετικά γράμματα δίπλα στις γραμμές υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας (P) ≤ 0.05 .

3.11 Δοκιμές παθογένειας σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας

3.11.1 Πρώτο πείραμα παθογένειας σε φυτά μελιτζάνας

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.12. Στο **σχεδιάγραμμα 11** παρουσιάζεται η πρόοδος της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας για χρονικό διάστημα 35 ημερών μετά τη μόλυνση τους με το άγριο στέλεχος 70V και τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4. Παρατηρείται ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη από τις 14 έως τις 17 ημέρες μετά τη μόλυνση προκαλούν παρόμοιο ή μεγαλύτερο ποσοστό συμπτωμάτων σε σχέση με το

άγριο στέλεχος, ωστόσο από τις 19 έως τις 35 ημέρες μετά τη μόλυνση η ασθένεια εξελίσσεται πιο γρήγορα αλλά και σε μεγαλύτερο ποσοστό στα φυτά που έχουν μολυνθεί με το άγριο στέλεχος 70V. Στις 35 ημέρες το άγριο στέλεχος είχε ποσοστό ασθένειας 82%, ενώ τα μεταλλαγμένα στελέχη 68% (TIAS2.2), 64% (TIAS2.3) και 69% (TIAS2.4).



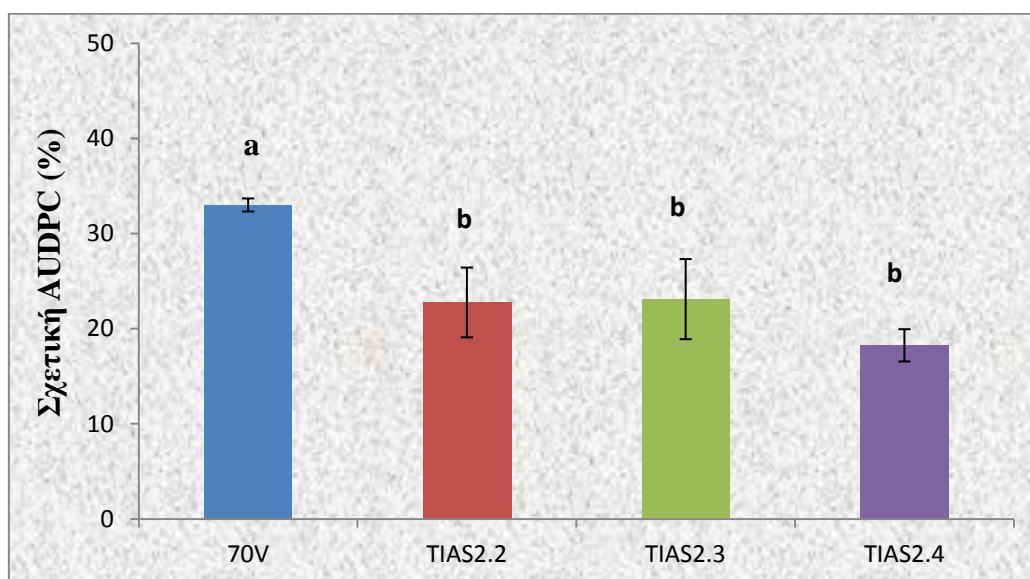
Σχεδιάγραμμα 11: Εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος 70V και τα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta VdSteA$ TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4, για χρονικό διάστημα 35 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος της ασθένειας επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για 10 φυτά.

Στο παραπάνω πείραμα, η εξέλιξη της ασθένειας που προκλήθηκε από τα υπό μελέτη στελέχη εκφράστηκε ως ποσοστό ασθένειας βάσει AUDPC (ο υπολογισμός του οποίου περιγράφεται στην παράγραφο 2.13), με βάση το οποίο έγινε η στατιστική ανάλυση. Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 7**) παρουσιάζεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και του τυπικού λάθους της σχετικής AUDPC για τα 10 φυτά που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος και τα μεταλλαγμένα στελέχη. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει το σχεδιάγραμμα 12 στο οποίο η στατιστική

ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της σοβαρότητας της ασθένειας μεταξύ του άγριου στελέχους και των μεταλλαγμένων στελεχών.

Στέλεχος	Μ.Ο Σχετικής AUDPC	Φυτά	Τυπικό λάθος
70V	33,01 a	10	0,68
TIAS2.2	22,77 b	10	3,67
TIAS2.3	23,12 b	10	4,21
TIAS2.4	18,26 b	10	1,69

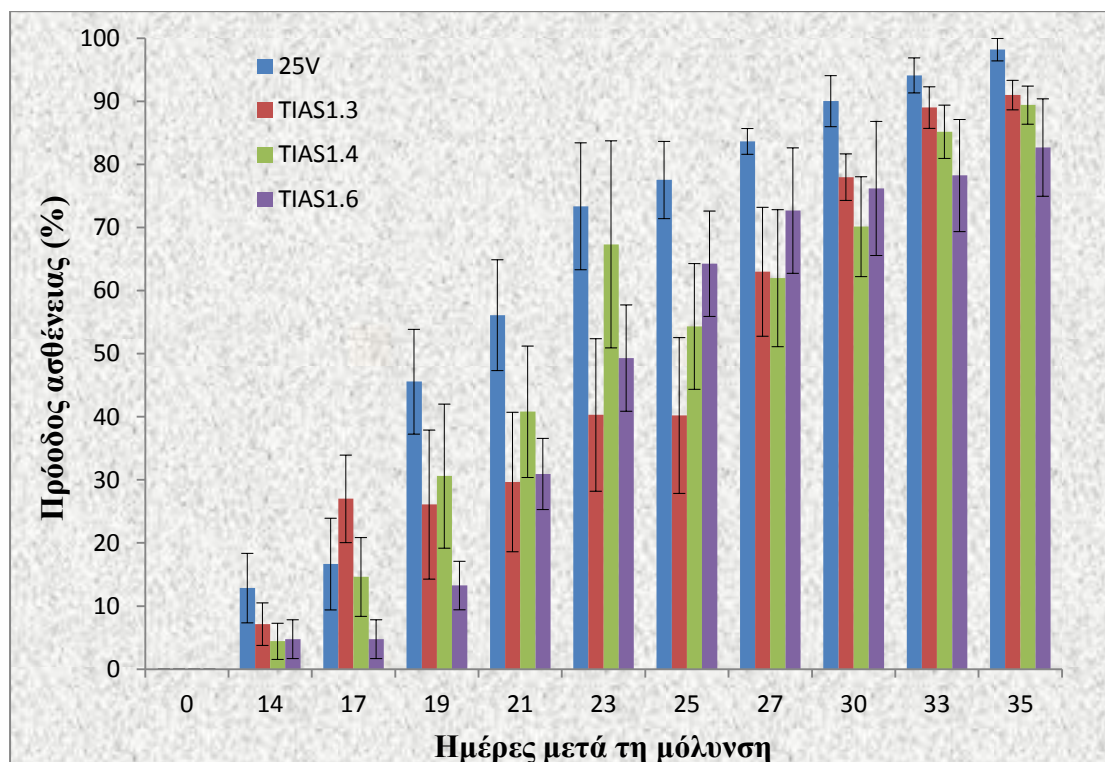
Πίνακας 7: Οι τιμές του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και το τυπικό λάθος της σχετικής AUDPC για τα μεταλλαγμένα στελέχη και το άγριο στέλεχος, σε 10 φυτά μελιτζάνας.



Σχεδιάγραμμα 12: Σχετική AUDPC του άγριου στελέχους 70V και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔVdSteA* TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4, για χρονικό διάστημα 35 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα ονόματα των στελεχών και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η σχετική AUDPC επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της σχετικής AUDPC για 10 φυτά. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

Στην περίπτωση του 25V και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3 TIAS1.4 TIAS1.6, παρουσιάζεται στο **σχεδιάγραμμα 13** η πρόοδος της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας για χρονικό διάστημα 35 ημερών μετά τη μόλυνση τους. Παρατηρείται ότι το άγριο στέλεχος παρήγαγε πιο πολλά συμπτώματα σε όλες τις ημέρες που πραγματοποιήθηκε μέτρηση μετά τη μόλυνση, με εξαίρεση τη 17^η ημέρα όπου το TIAS1.3 παρουσίασε μεγαλύτερο ποσοστό συμπτωμάτων. Στις 35 ημέρες το άγριο

στέλεχος είχε ποσοστό ασθένειας 98% και τα μεταλλαγμένα στελέχη είχαν 89% (TIAS1.4), 91% (TIAS1.3) και 83% (TIAS1.6).

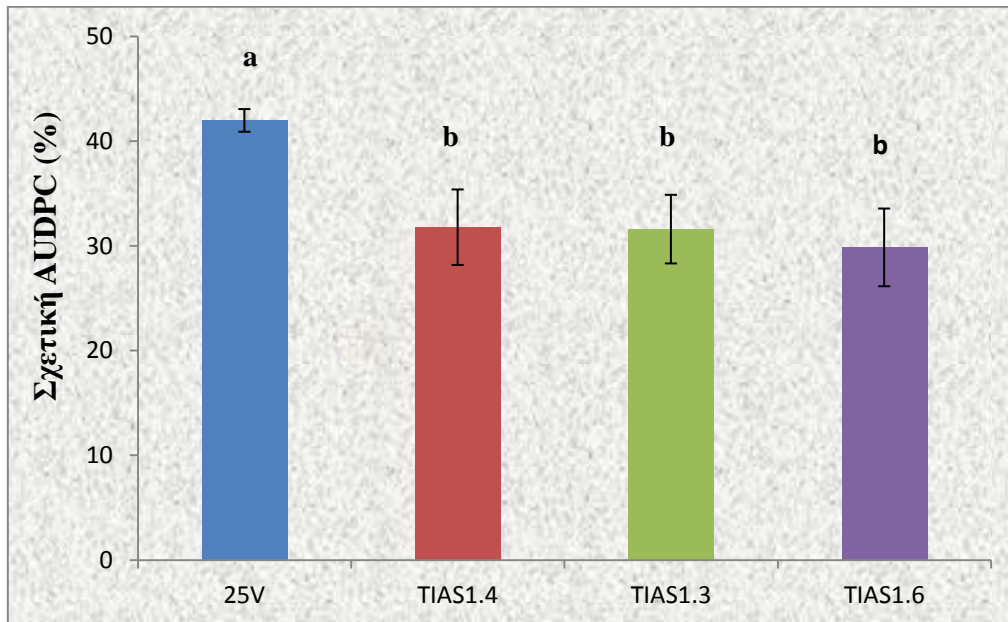


Σχεδιάγραμμα 13: Εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος 25V και τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔVdSteA* TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, για χρονικό διάστημα 35 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος της ασθένειας επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για 10 φυτά.

Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 8**) παρουσιάζεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και του τυπικού λάθους της σχετικής AUDPC για τα 10 φυτά που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος και τα μεταλλαγμένα στελέχη. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει το **σχεδιάγραμμα 14** στο οποίο η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της σοβαρότητας της ασθένειας μεταξύ του άγριου στελέχους και των μεταλλαγμένων στελεχών.

Στέλεχος	Μ.Ο Σχετικής AUDPC	Φυτά	Τυπικό λάθος
25V	41,97 a	10	1,08
TIAS1.3	31,78 b	10	3,60
TIAS1.4	31,60 b	10	3,27
TIAS1.6	29,85 b	10	3,71

Πίνακας 8: Οι τιμές του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και το τυπικό λάθος της σχετικής AUDPC για τα μεταλλαγμένα στελέχη και το άγριο στέλεχος, σε 10 φυτά μελιτζάνας.

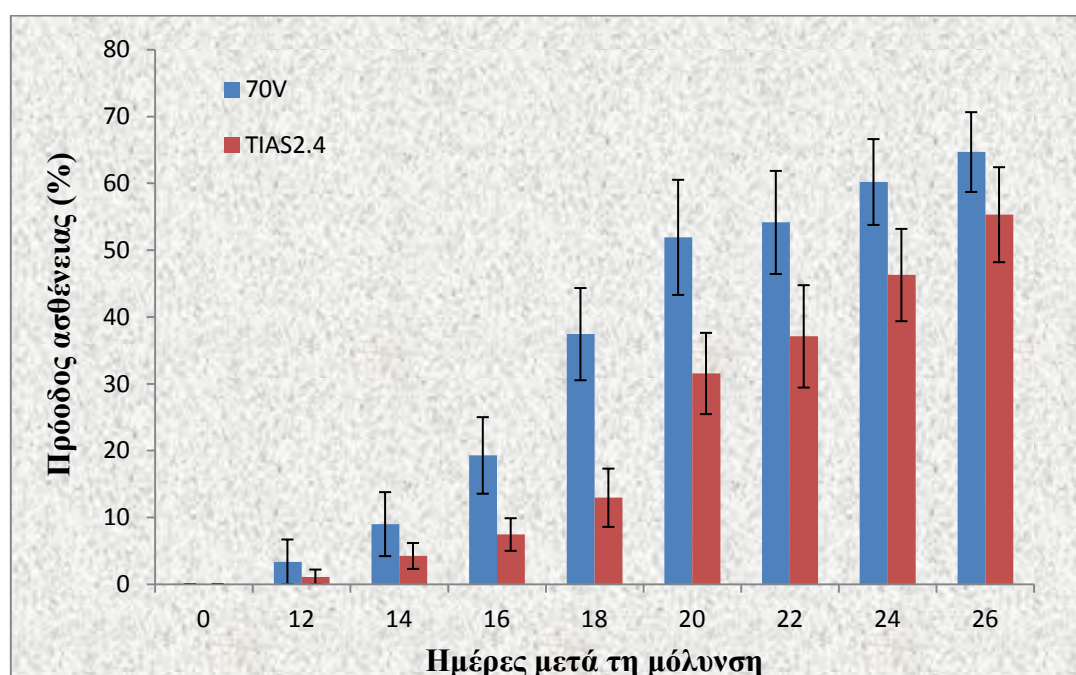


Σχεδιάγραμμα 14: Σχετική AUDPC του αγρίου στελέχους 25V και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔVdSteA* TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, για χρονικό διάστημα 35 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα ονόματα των στελεχών και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η σχετική AUDPC επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της σχετικής AUDPC για 10 φυτά. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας (P) ≤ 0.05 .

Στα φυτά του παραπάνω πειράματος μετρήθηκε και το ύψος στις 35 ημέρες μετά τη μόλυνση, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των φυτών που μολύνθηκαν με τα άγρια στελέχη και των φυτών που μολύνθηκαν με τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη τους.

3.11.2 Δεύτερο πείραμα παθογένειας σε φυτά μελιτζάνας

Στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις σε φυτά μελιτζάνας όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.12. Στο **σχεδιάγραμμα 15** παρουσιάζεται η πρόοδος της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας για χρονικό διάστημα 26 ημερών μετά τη μόλυνση τους με το άγριο στέλεχος 70V και το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS2.4. Παρατηρείται ότι το άγριο στέλεχος παρήγαγε μεγαλύτερο ποσοστό συμπτωμάτων έναντι του μεταλλαγμένου στελέχους TIAS2.4 σε όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν μετά τη μόλυνση. Στις 26 ημέρες το άγριο στέλεχος είχε ποσοστό ασθένειας 65%, ενώ το TIAS2.4 είχε 55%.



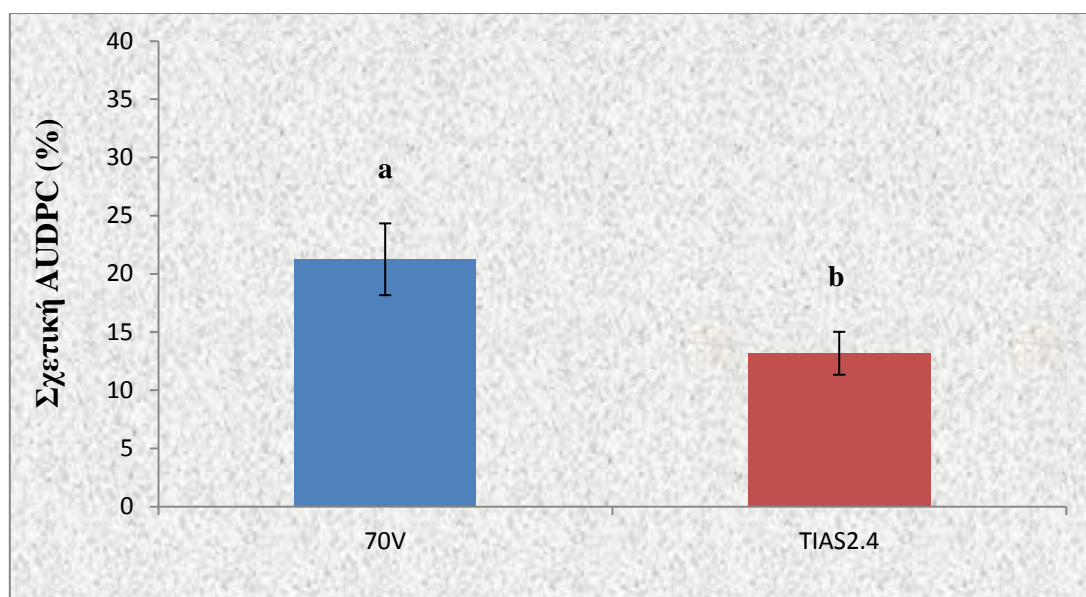
Σχεδιάγραμμα 15: Εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος 70V και το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔVdSteA* TIAS2.4, για χρονικό διάστημα 26 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος της ασθένειας επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για 20 φυτά.

Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 9**) παρουσιάζεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και του τυπικού λάθους της σχετικής AUDPC για τα 20 φυτά που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος και το μεταλλαγμένο

στέλεχος. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει το **σχεδιάγραμμα 16** στο οποίο η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της σοβαρότητας της ασθένειας μεταξύ του άγριου στελέχους και του μεταλλαγμένου στελέχους.

Στέλεχος	Μ.Ο Σχετικής AUDPC	Φυτά	Τυπικό λάθος
70V	21,25 a	20	3,09
TIAS2.4	13,17 b	20	1,84

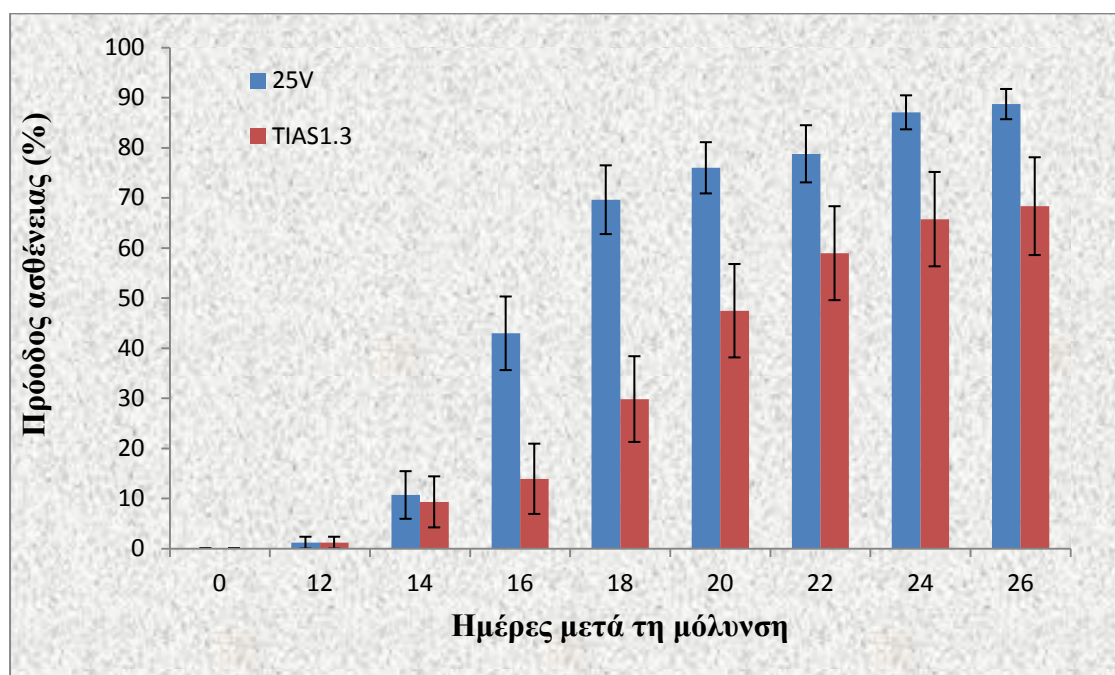
Πίνακας 9: Οι τιμές του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και το τυπικό λάθος της σχετικής AUDPC για το μεταλλαγμένο στέλεχος και το άγριο στέλεχος, σε 20 φυτά μελιτζάνας.(2 επαναλήψεις, 10 φυτά ανά επανάληψη)



Σχεδιάγραμμα 16: Σχετική AUDPC του αγρίου στελέχους 70V και του μεταλλαγμένου στελέχους TIAS2.4, για χρονικό διάστημα 26 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα ονόματα των στελεχών και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η σχετική AUDPC επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της σχετικής AUDPC για 20 φυτά. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας $(P) \leq 0.05$.

Στην περίπτωση του 25V και του μεταλλαγμένου στελέχους TIAS1.3 παρουσιάζεται στο **σχεδιάγραμμα 17** η εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας για χρονικό διάστημα 26 ημερών μετά τη μόλυνση τους. Παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση ότι το άγριο στέλεχος παρουσιάζει πιο πολλά συμπτώματα από το

μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.3 σε όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν μετά τη μόλυνση. Στις 26 ημέρες το άγριο στέλεχος είχε ποσοστό ασθένειας 89% και το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.3 είχε ποσοστό ασθένειας 68%.

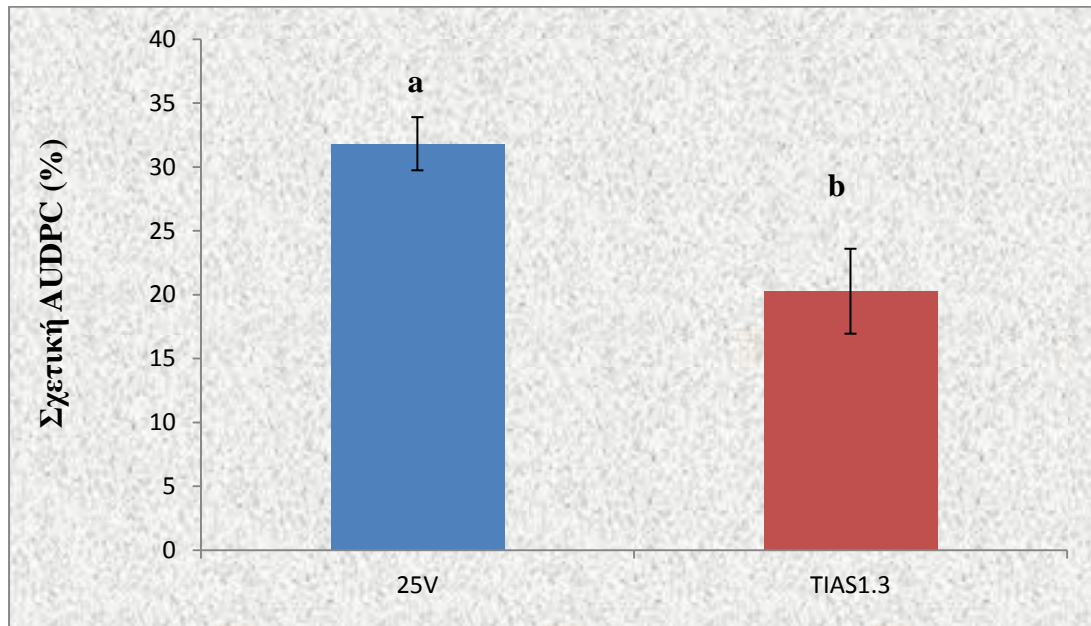


Σχεδιάγραμμα 17: Εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος 25V και το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.3, για χρονικό διάστημα 26 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος της ασθένειας επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για 20 φυτά.

Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 10**) παρουσιάζεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και του τυπικού λάθους της σχετικής AUDPC για τα 20 φυτά που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος και το μεταλλαγμένο στέλεχος. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει το **σχεδιάγραμμα 18** στο οποίο η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της σοβαρότητας της ασθένειας μεταξύ του άγριου στελέχους και του μεταλλαγμένου στελέχους.

Στέλεχος	Μ.Ο Σχετικής AUDPC	Φυτά	Τυπικό λάθος
25V	31,82 a	20	2,08
TIAS1.3	20,27 b	20	3,33

Πίνακας 10: Οι τιμές του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και το τυπικό λάθος της σχετικής AUDPC για το μεταλλαγμένο στέλεχος και το άγριο στέλεχος, σε 20 φυτά μελιτζάνας (2 επαναλήψεις, 10 φυτά ανά επανάληψη).

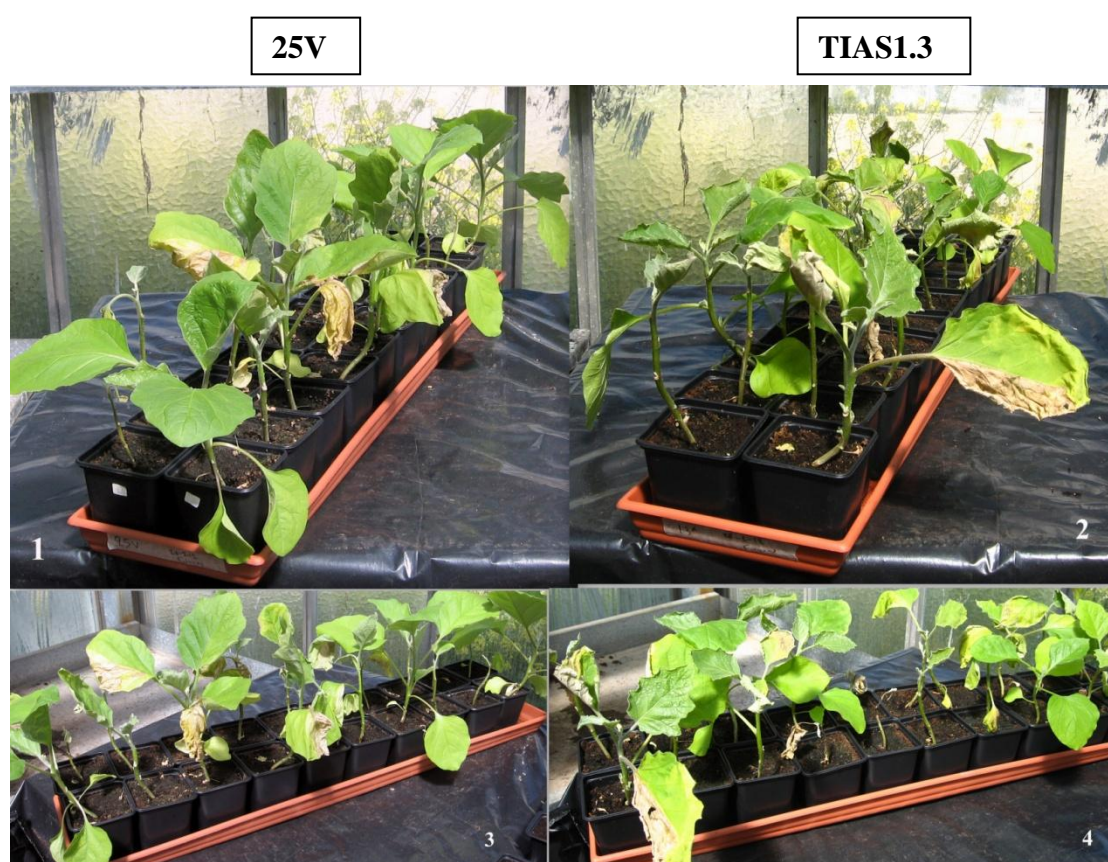


Σχεδιάγραμμα 18: Σχετική AUDPC του αγρίου στελέχους 25V και του μεταλλαγμένου στελέχους TIAS1.3, για χρονικό διάστημα 26 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα ονόματα των στελεχών και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η σχετική AUDPC επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της σχετικής AUDPC για 20 φυτά. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας $(P) \leq 0.05$.

Στα φυτά του παραπάνω πειράματος μετρήθηκε και το ύψος στις 26 ημέρες μετά τη μόλυνση, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των φυτών που μολύνθηκαν με τα άγρια στελέχη και των φυτών που μολύνθηκαν με τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη τους.

3.11.2.1 Οπτική παρατήρηση της ασθένειας

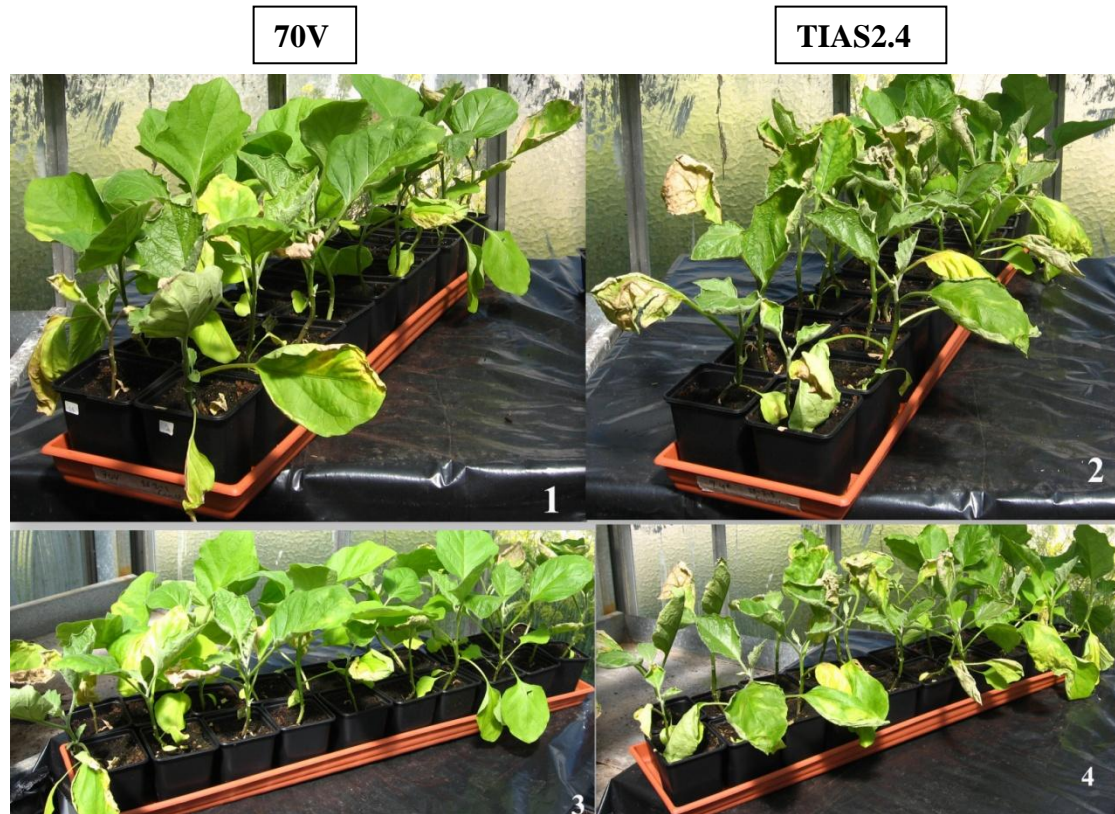
Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 49**) παρουσιάζεται η γενική εικόνα της εκδήλωσης της ασθένειας, του δεύτερου πειράματος παθογένειας, σε φυτά μελιτζάνας 26 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το άγριο στέλεχος 25V και το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.3. Στα φυτά που έχουν μολυνθεί με το άγριο στέλεχος (**Εικόνα 49.1** και **49.3**) είναι πιο έντονη η αποφύλλωση των φυτών και οι ξηράνσεις των φύλλων, ενώ η γενική εικόνα της ασθένειας των φυτών που έχουν μολυνθεί με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.3 είναι πιο ήπια (**Εικόνα 49.2, 49.4** και **51A**).



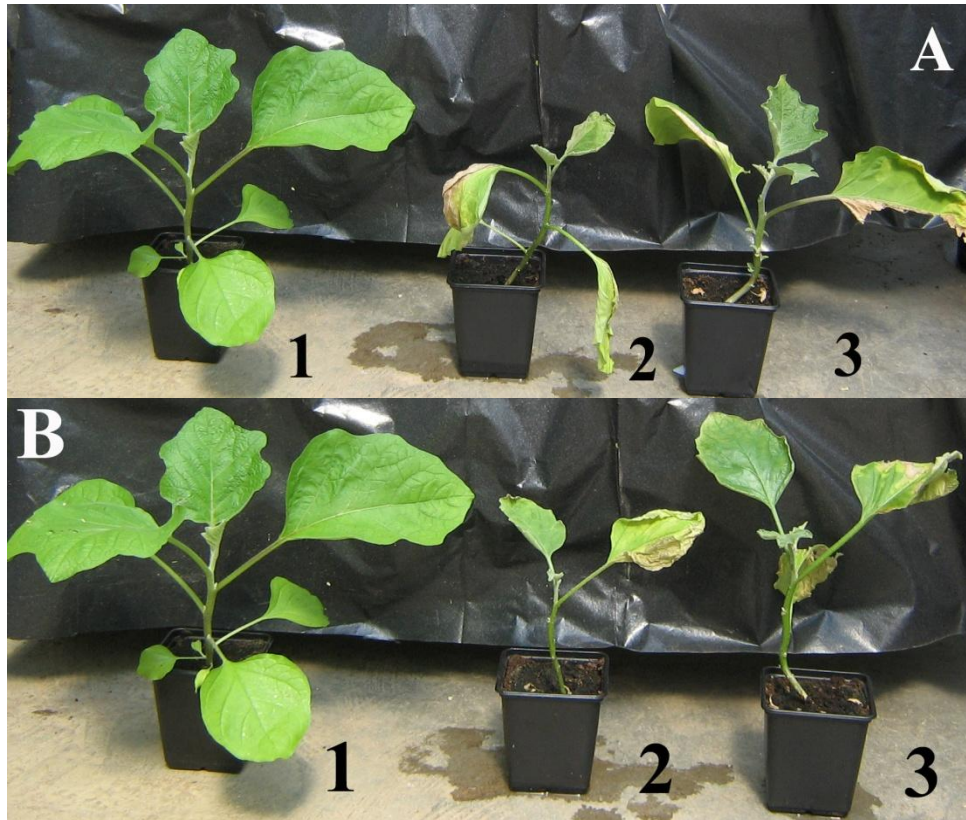
Εικόνα 49: (1) και (3) Τα φυτά μελιτζάνας που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος 25V , (2) και (4) Τα φυτά μελιτζάνας που μολύνθηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.3, 26 ημέρες μετά τη μόλυνσή τους.

Στην **εικόνα 50** παρουσιάζεται η γενική εικόνα της εκδήλωσης της ασθένειας, του δεύτερου πειράματος παθογένειας, σε φυτά μελιτζάνας 26 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το άγριο στέλεχος 70V και το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS2.4. Η συμπτωματολογική εικόνα στις 26 ημέρες είναι παρόμοια στα φυτά που έχουν μολυνθεί με το άγριο στέλεχος (**Εικόνα 50.1** και **50.3**) και στα φυτά που έχουν

μολυνθεί με το μεταλλαγμένο στέλεχος (Εικόνα 50.2 και 50.4), δηλαδή παρατηρούνται χλωρώσεις και ξηράνσεις των φύλλων σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών φυτών (Εικόνα 51B). Ωστόσο τα φυτά που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος παρουσίασαν αυτή τη γενική εικόνα πιο νωρίς σε σχέση με τα φυτά του μεταλλαγμένου στελέχους, όπως φαίνεται στο **σχεδιάγραμμα 15**.



Εικόνα 50: (1) και (3) Τα φυτά μελιτζάνας που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος 70V , (2) και (4) Τα φυτά μελιτζάνας που μολύνθηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS2.4, στις 26 ημέρες μετά τη μόλυνσή τους.

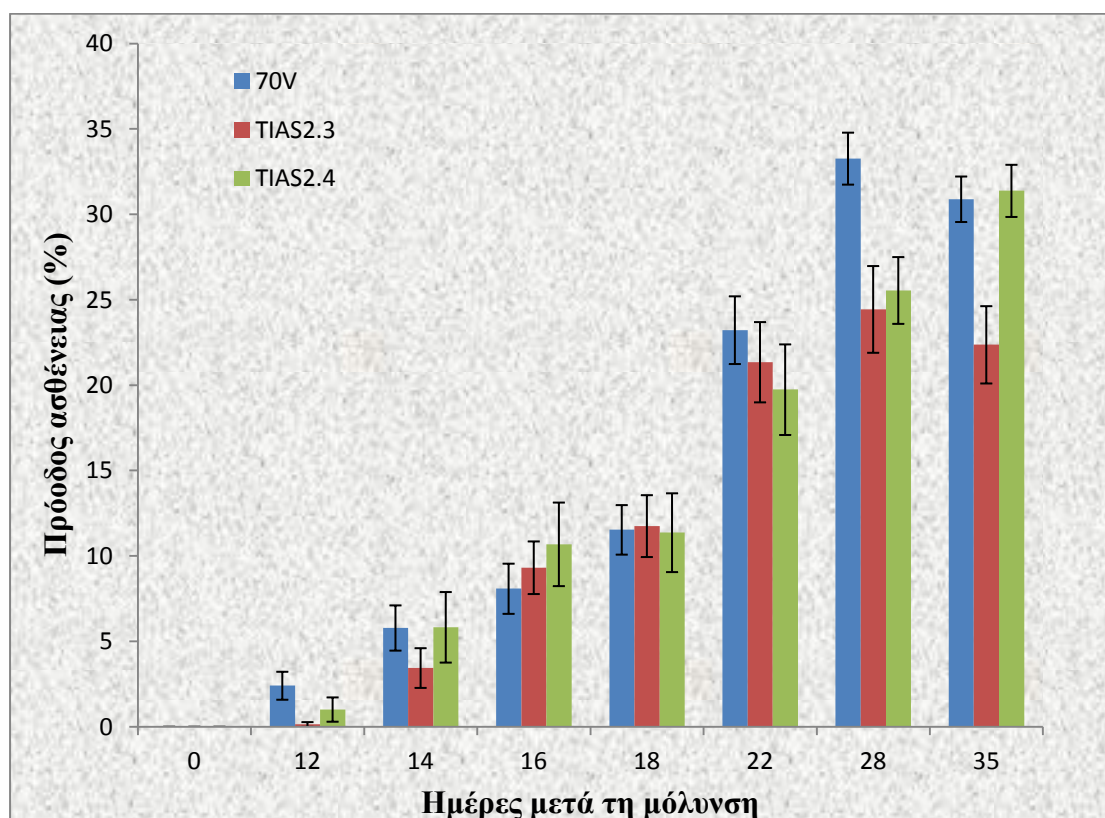


Εικόνα 51: (A) Εικόνα αμόλυντου φυτού (1), μολυσμένου φυτού με το άγριο στέλεχος 25V (2) και με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.3 (3), 26 ημέρες μετά τη μόλυνση. (B) Εικόνα αμόλυντου φυτού (1), μολυσμένου φυτού με το άγριο στέλεχος 70V (2) και με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS2.4 (3), 26 ημέρες μετά τη μόλυνση.

3.11.3 Πειράματα παθογένειας σε φυτά τομάτας

Οι 3 επαναλήψεις του πειράματος σε φυτά τομάτας πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.12. Στο **σχεδιάγραμμα 19** παρουσιάζεται η πρόοδος της ασθένειας σε φυτά τομάτας για χρονικό διάστημα 35 ημερών μετά τη μόλυνση τους με το άγριο στέλεχος 70V και τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔVdSteA* TIAS2.3 και TIAS2.4. Παρατηρείται ότι στις 12 ημέρες μετά τη μόλυνση το άγριο στέλεχος προκαλεί μεγαλύτερο ποσοστό συμπτωμάτων από τα μεταλλαγμένα στελέχη, ωστόσο από τις 14 έως τις 18 ημέρες μετά τη μόλυνση παρατηρείται παρόμοιο ποσοστό συμπτωμάτων από όλα τα στελέχη. Στις 22 και 28 ημέρες μετά τη μόλυνση το άγριο στέλεχος παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό συμπτωμάτων, ενώ στις 35 ημέρες έχει παρόμοιο ποσοστό συμπτωμάτων με το στέλεχος TIAS2.4 και μεγαλύτερο ποσοστό

συμπτωμάτων από το TIAS2.3. Στις 35 ημέρες το άγριο στέλεχος είχε ποσοστό ασθένειας 31%, ενώ τα μεταλλαγμένα στελέχη είχαν 23% (TIAS2.3) και 32% (TIAS2.4).



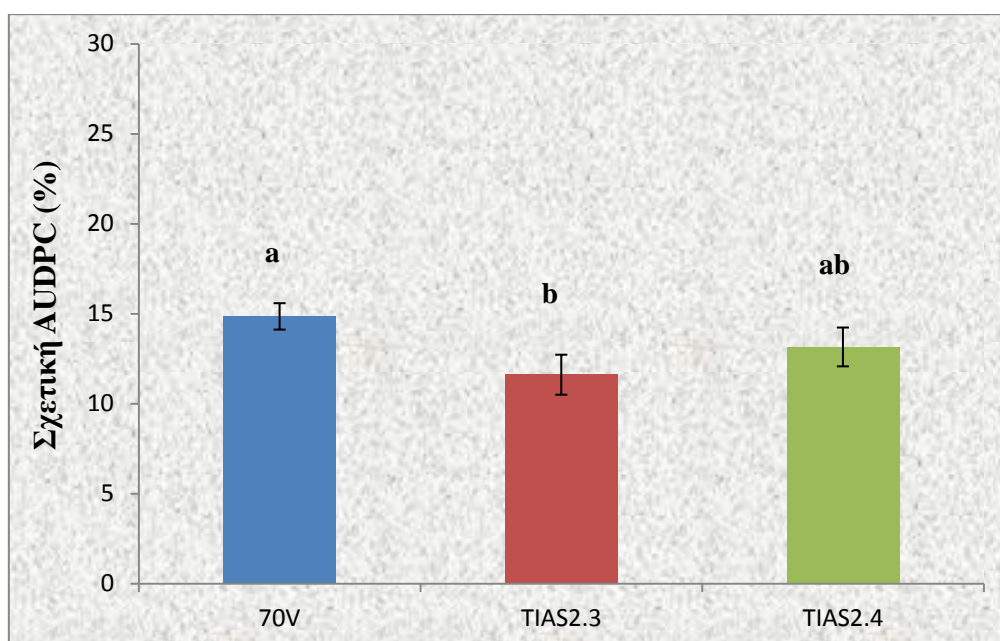
Σχεδιάγραμμα 19: Εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά τομάτας μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος 70V και τα μεταλλαγμένα *ΔVdSteA* στελέχη TIAS2.3 και TIAS2.4, για χρονικό διάστημα 35 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος της ασθένειας επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τριάντα φυτά.

Στο παραπάνω πείραμα, η εξέλιξη της ασθένειας που προκλήθηκε από τα υπό μελέτη στελέχη εκφράστηκε ως ποσοστό ασθένειας βάσει AUDPC (ο υπολογισμός του οποίου περιγράφεται στην παράγραφο 2.13), με βάση το οποίο έγινε η στατιστική ανάλυση. Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 11**) παρουσιάζεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και του τυπικού λάθους της σχετικής AUDPC για τα 30 φυτά των 3 επαναλήψεων που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος και τα μεταλλαγμένα στελέχη. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει το **σχεδιάγραμμα 20**

στο οποίο η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της σοβαρότητας της ασθένειας μεταξύ του άγριου στελέχους και του μεταλλαγμένου στελέχους TIAS2.3, αλλά όχι και με το στέλεχος TIAS2.4. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο Μ.Ο. της σχετικής AUDPC ανάμεσα στα μεταλλαγμένα στελέχη.

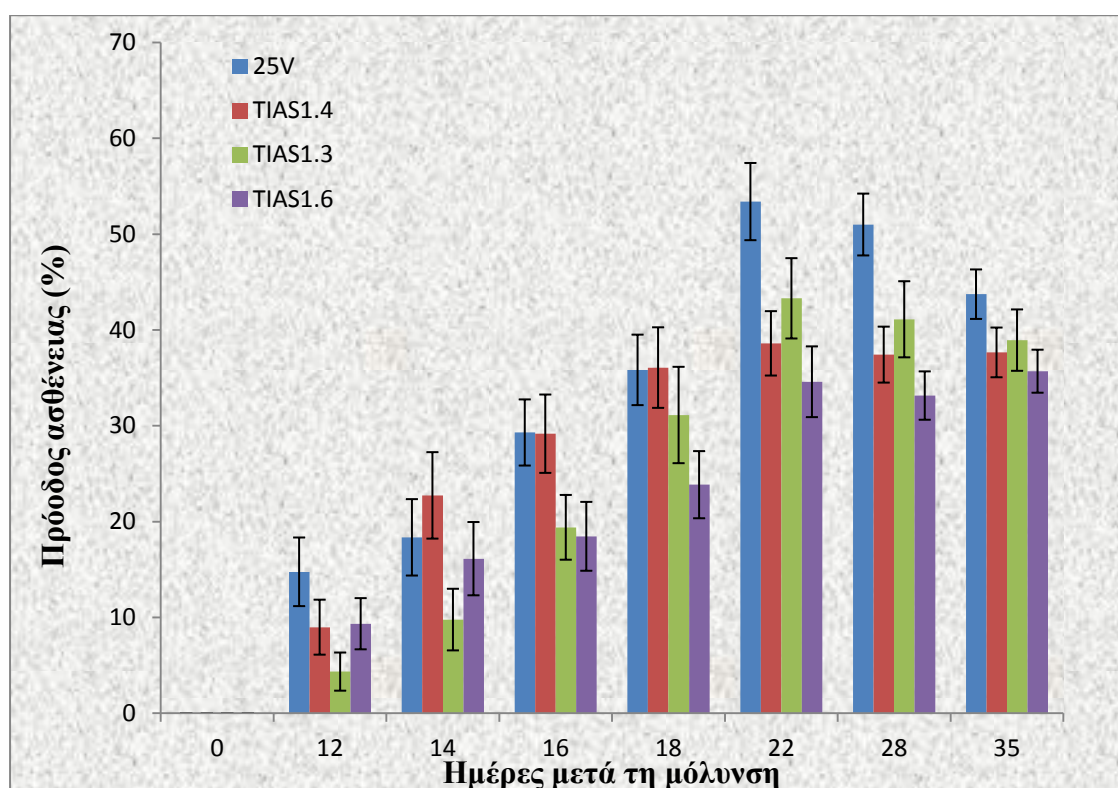
Στέλεχος	Μ.Ο Σχετικής AUDPC	Φυτά	Τυπικό λάθος
70V	14,85 a	30	0,73
TIAS2.3	11,61 b	30	1,11
TIAS2.4	12,82 a b	30	1,07

Πίνακας 11: Οι τιμές του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και το τυπικό λάθος της σχετικής AUDPC για το μεταλλαγμένο στέλεχος και το άγριο στέλεχος, σε 30 φυτά τομάτας (3 επαναλήψεις, 10 φυτά ανά επανάληψη).



Σχεδιάγραμμα 20: Σχετική AUDPC του αγρίου στελέχους 70V και των μεταλλαγμένων *ΔVdSteA* στελεχών TIAS2.3 και TIAS2.4, για χρονικό διάστημα 35 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα ονόματα των στελεχών και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η σχετική AUDPC επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της σχετικής AUDPC για τριάντα φυτά. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

Στην περίπτωση του 25V και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6 παρουσιάζεται στο **σχεδιάγραμμα 21** η πρόοδος της ασθένειας σε φυτά τομάτας για χρονικό διάστημα 35 ημερών μετά τη μόλυνση τους. Παρατηρείται ότι στις 14 ημέρες το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.4 παρήγαγε πιο πολλά συμπτώματα τόσο σε σχέση με το άγριο στέλεχος όσο και με τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα στελέχη. Ωστόσο στις επόμενες μετρήσεις παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των συμπτωμάτων στα φυτά που είχαν μολυνθεί με το άγριο στέλεχος, ενώ μετά από τις 22 ημέρες είχε σταθερά υψηλότερο ποσοστό έναντι των μεταλλαγμένων στελεχών. Στις 35 ημέρες το άγριο στέλεχος είχε ποσοστό ασθένειας 44% ενώ τα μεταλλαγμένα στελέχη είχαν 38% (TIAS1.4), 39% (TIAS1.3) και 36% (TIAS1.6).

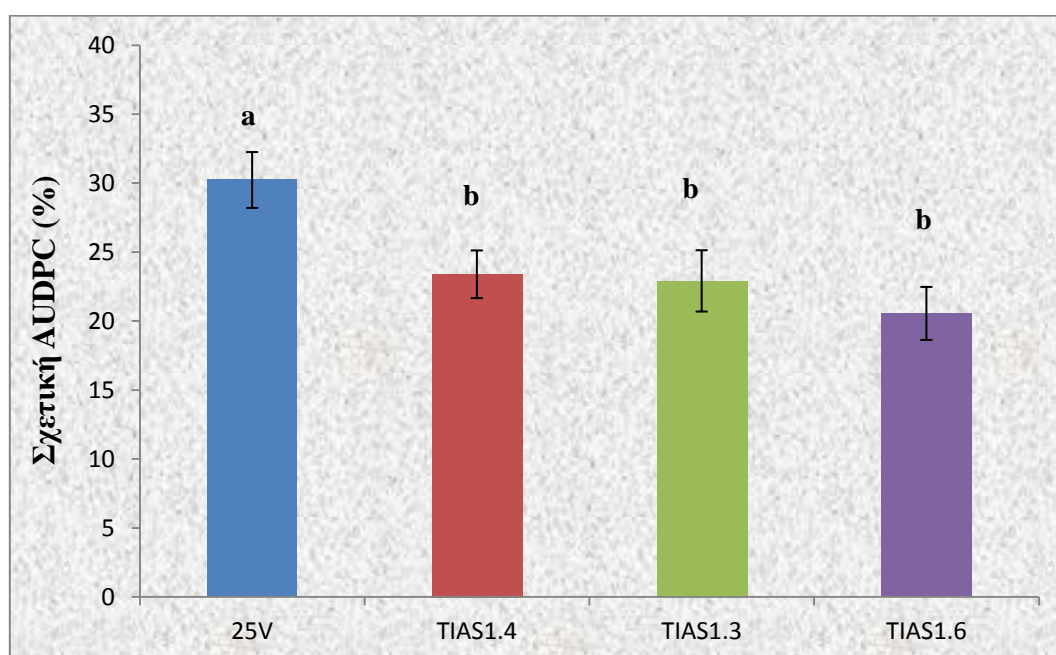


Σχεδιάγραμμα 21: Εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά τομάτας μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος 25V και τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔVdSteA* TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, για χρονικό διάστημα 35 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος της ασθένειας επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τριάντα φυτά.

Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 12**) παρουσιάζεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και του τυπικού λάθους της σχετικής AUDPC για τις τρεις επαναλήψεις που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος και τα μεταλλαγμένα στελέχη. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει το **σχεδιάγραμμα 22** στο οποίο η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της ποσότητας ασθένειας μεταξύ του άγριου στελέχους και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6.

Στέλεχος	M.O Σχετικής AUDPC	Φυτά	Τυπικό λάθος
25V	30,23 a	30	2,03
TIAS1.3	23,40 b	30	1,73
TIAS1.4	22,92 b	30	2,22
TIAS1.6	20,56 b	30	1,92

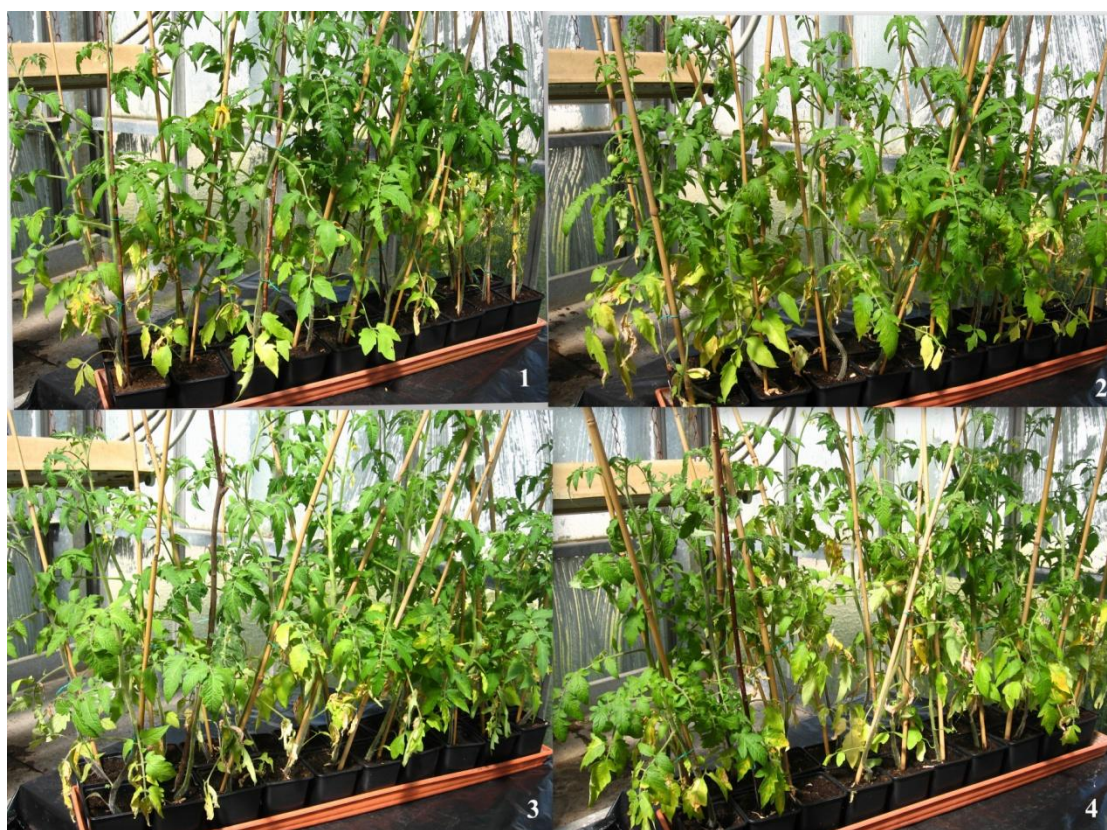
Πίνακας 12: Οι τιμές του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και το τυπικό λάθος της σχετικής AUDPC για το μεταλλαγμένο στέλεχος και το άγριο στέλεχος, σε 30 φυτά τομάτας (3 επαναλήψεις, 10 φυτά ανά επανάληψη).



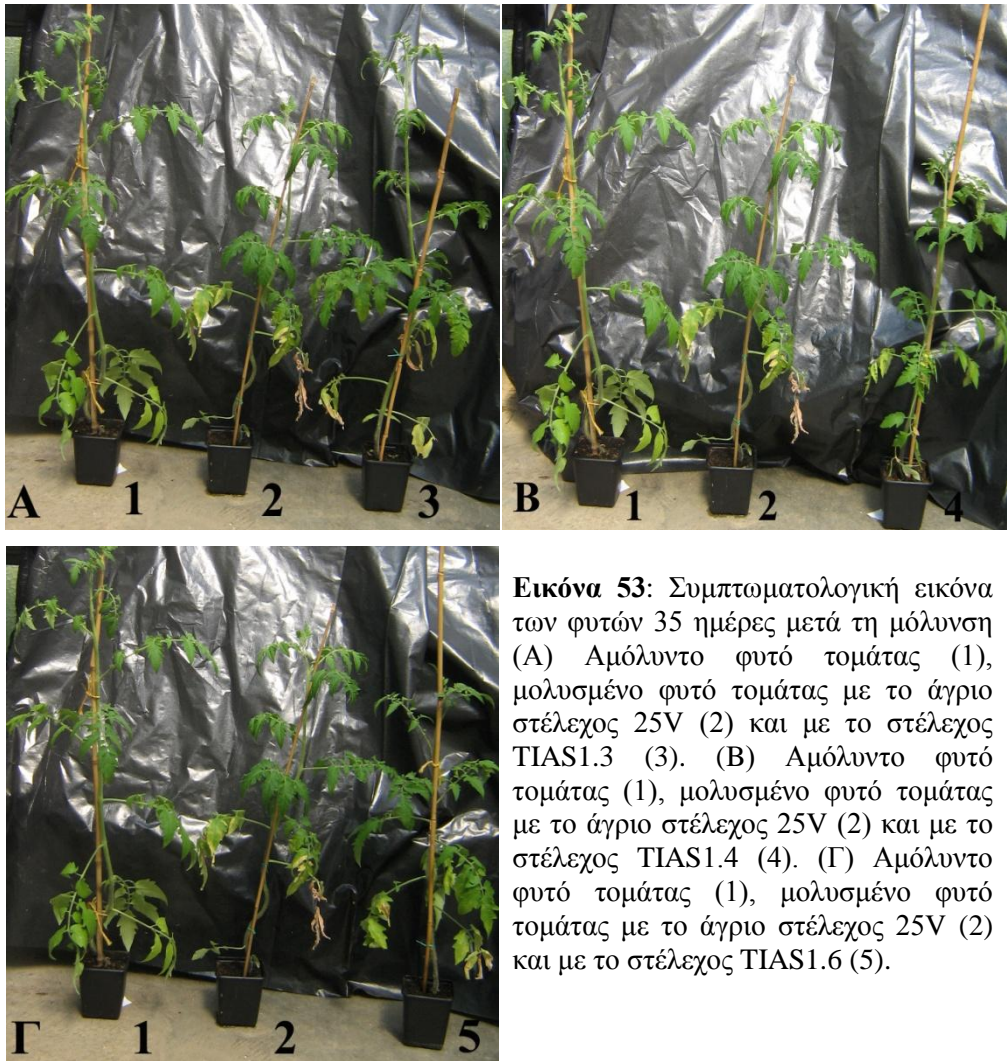
Σχεδιάγραμμα 22: Σχετική AUDPC του αγρίου στελέχους 25V και των μεταλλαγμένων *ΔVdSteA* στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, για χρονικό διάστημα 35 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα ονόματα των στελεχών και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η σχετική AUDPC επί τις %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της σχετικής AUDPC για τριάντα φυτά. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

3.11.3.1 Οπτική παρατήρηση της ασθένειας

Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 52**) παρουσιάζεται η γενική εικόνα της εκδήλωσης της ασθένειας, σε πειράματα παθογένειας, σε φυτά τομάτας 35 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το άγριο στέλεχος 25V και τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6. Σε όλα τα φυτά στις 35 ημέρες ανεξάρτητα με το στέλεχος με το οποίο έχουν μολυνθεί παρατηρείται παρόμοια συμπτωματολογική εικόνα (χλωρώσεις, μαράνσεις, αποφύλλωση) (**Εικόνα 53A, 53B και 53Γ**).

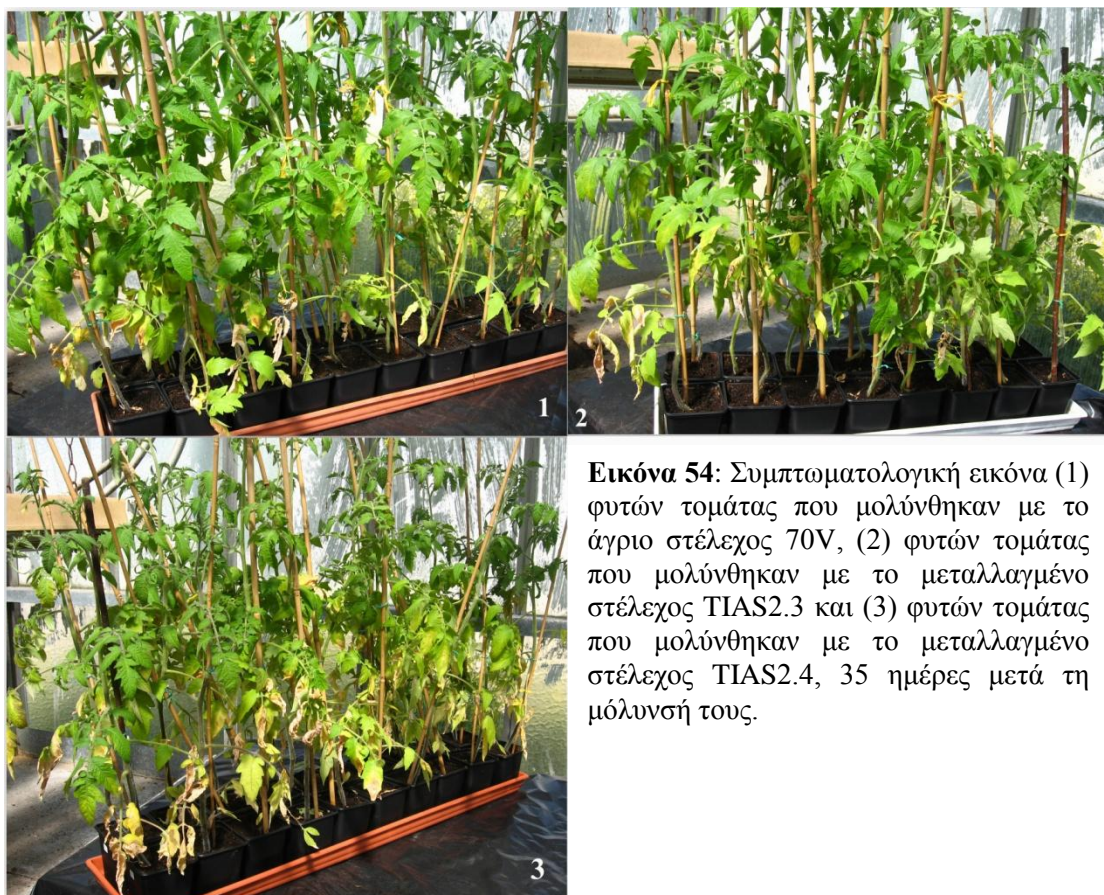


Εικόνα 52: (1) Συμπτωματολογική εικόνα φυτών τομάτας που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος 25V, (2) φυτών τομάτας που μολύνθηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.3, (3) φυτών τομάτας που μολύνθηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.4 και (4) φυτών τομάτας που μολύνθηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.6, 35 ημέρες μετά τη μόλυνσή τους.



Εικόνα 53: Συμπτωματολογική εικόνα των φυτών 35 ημέρες μετά τη μόλυνση (Α) Αμόλυντο φυτό τομάτας (1), μολυσμένο φυτό τομάτας με το άγριο στέλεχος 25V (2) και με το στέλεχος TIAS1.3 (3). (Β) Αμόλυντο φυτό τομάτας (1), μολυσμένο φυτό τομάτας με το άγριο στέλεχος 25V (2) και με το στέλεχος TIAS1.4 (4). (Γ) Αμόλυντο φυτό τομάτας (1), μολυσμένο φυτό τομάτας με το άγριο στέλεχος 25V (2) και με το στέλεχος TIAS1.6 (5).

Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 54**) παρουσιάζεται η γενική εικόνα της εκδήλωση της ασθένειας, σε πειράματα παθογένειας, σε φυτά τομάτας 35 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το άγριο στέλεχος 70V και τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS2.3 και TIAS2.4. Στις 35 ημέρες παρατηρείται πιο έντονη συμπτωματολογική εικόνα στα φυτά που έχουν μολυνθεί με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS2.4, ωστόσο το είδος των συμπτωμάτων είναι κοινό στα φυτά ανεξάρτητα με το στέλεχος με το οποίο έχουν μολυνθεί (χλωρώσεις, μαράνσεις, αποφύλλωση) (**Εικόνα 55A** και **55B**).



Εικόνα 54: Συμπτωματολογική εικόνα (1) φυτών τομάτας που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος 70V, (2) φυτών τομάτας που μολύνθηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS2.3 και (3) φυτών τομάτας που μολύνθηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS2.4, 35 ημέρες μετά τη μόλυνσή τους.



Εικόνα 55: Συμπτωματολογική εικόνα των φυτών 35 ημέρες μετά τη μόλυνση. (A) Αμόλυντο φυτό τομάτας (1), μολυσμένο φυτό τομάτας με το άγριο στέλεχος 70V (2) και με το στέλεχος TIAS2.3 (3). (B) Αμόλυντο φυτό τομάτας (1), μολυσμένο φυτό τομάτας με το άγριο στέλεχος 70V (2) και με το στέλεχος TIAS2.4 (3).

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η αδρομύκωση που προκαλείται από τον εδαφογενή, φυτοπαθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae* (Αδηλομύκητας) είναι μια δύσκολα ελεγχόμενη και καταστροφική ασθένεια για ένα μεγάλο εύρος ποωδών και ξυλωδών φυτών, επειδή προσβάλλει τους αγγειώδεις ιστούς των φυτών (Παναγόπουλος, 2007). Πρόκειται για μια ασθένεια με παγκόσμια εξάπλωση ωστόσο είναι πιο σημαντική στις εύκρατες περιοχές. Η αδυναμία επιτυχούς αντιμετώπισης της ασθένειας οφείλεται στην ικανότητα του μύκητα να επιβιώνει στο έδαφος για μεγάλες χρονικές περιόδους με ή χωρίς την παρουσία φυτού ξενιστή και στο γεγονός ότι αποικίζει τα αγγεία του ξύλου εντός του φυτού. Επιπλέον δεν υπάρχουν χημικά μέσα για τον έλεγχο της ασθένειας, ενώ το παθογόνο μπορεί να μεταδοθεί με αρκετούς τρόπους (Pataky 1997, Fradin και Thomma 2006). Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντική η κατανόηση των μηχανισμών σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο που εμπλέκονται στην παθογένεια και βιολογία του μύκητα *V. dahliae*. Πιο συγκεκριμένα, η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ο μύκητας αντιλαμβάνεται τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και διαφοροποιεί τη συμπεριφορά του ώστε να μολύνει ένα φυτό ή να σχηματίσει μικροσκληρώτια μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό μελλοντικών στρατηγικών που θα αντιμετωπίσουν πιο αποτελεσματικά ένα παθογόνο που δεν αντιμετωπίζεται με τις συνηθισμένες γεωργικές πρακτικές.

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, συνεπώς και το *V. dahliae*, βρίσκονται εκτεθειμένοι στο περιβάλλον γι' αυτό και η δυνατότητα αντίληψης των διαφόρων περιβαλλοντικών σημάτων και η εξασφάλιση της κατάλληλης κυτταρικής απόκρισης είναι σημαντικά για την επιβίωσή τους. Οι μικροοργανισμοί για το λόγο αυτό έχουν εξελίξει πολύπλοκους μηχανισμούς για να αισθάνονται αλλά και να προσαρμόζονται στο περιβάλλον σαν αντίδραση μιας πληθώρας περιβαλλοντικών σημάτων (Xue et al, 2008). Σημαντικό ρόλο στην αντίληψη των ερεθισμάτων παίζουν οι συζευγμένοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς με τις G πρωτεΐνες (GPCRs), οι οποίοι αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων και είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση εξωκυτταρικών σημάτων σε ενδοκυττάρια συστήματα απόκρισης σε ποικίλα ερεθίσματα (Maller, 2003). Η οικογένεια των GPCRs αναφέρεται σε πρωτεΐνες που περιέχουν επτά διαμεμβρανικές περιοχές (transmembrane domains, TMs), εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αντιλαμβάνονται εξωγενή

σήματα και στη συνέχεια ενεργοποιούν το ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής σημάτων της G πρωτεΐνης και διάφορες κυτταρικές αντιδράσεις.

Η πρωτοτυπία της παρούσας εργασίας έγκειται στην αναγνώριση των πιθανών γονιδίων με ρόλο GPCR στο μύκητα *V. dahliae* και εν συνεχεία στη μελέτη του γονιδίου ενός διαμεμβρανικού υποδοχέα με γνωστό ρόλο στην αντίληψη φερομόνης σε άλλους οργανισμούς, σε φυτοπαθογόνο μύκητα χωρίς γνωστό σεξουαλικό κύκλο και εγγενή μορφή.

Πιο συγκεκριμένα οι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν:

- Η αναζήτηση και αναγνώριση γονιδίων συζευγμένων πρωτεϊνικών υποδοχέων με τις G πρωτεΐνες στο μύκητα *Verticillium dahliae*.
- Η κλωνοποίηση και η απενεργοποίηση ενός GPCR με ρόλο στην αντίληψη φερομόνης (γονίδιο *VdSteA*) σε 2 άγρια στελέχη του μύκητα *V. dahliae* με διαφορετική προέλευση απομόνωσης, τα 25V και 70V. Η κωδική ονομασία 25V αντιστοιχεί σε απομόνωση μη αποφυλλωτικής φυλής βαμβακιού από τις ΗΠΑ, ενώ η κωδική ονομασία 70V αντιστοιχεί στη φυλή 1 της τομάτας.
- Η λειτουργική ανάλυση του ρόλου του γονιδίου *VdSteA* στα 2 άγρια στελέχη με την πραγματοποίηση πειραμάτων μορφολογίας και φυσιολογίας στα μεταλλαγμένα στελέχη, καθώς και με δοκιμές παθογένειας σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση ώστε να αναγνωριστούν πιθανά γονίδια με ρόλο GPCR στο μύκητα *V. dahliae*, αλλά και φυλογενετική ανάλυση ώστε αυτά τα γονίδια να ομαδοποιηθούν με βάση την ομολογία τους με γνωστούς και μελετημένους GPCRs των μυκήτων *Aspergillus nidulans* και *Magnaporthe grisea*. Από την ανάλυση αυτή προέκυψαν 15 γονίδια GPCR, τα οποία ομαδοποιήθηκαν με βάση το ερέθισμα το οποίο λαμβάνουν σε 7 κατηγορίες:

1. Θεωρητικός υποδοχέας θρεπτικών στοιχείων (2 γονίδια GPCR)
2. GPCRs περιέχουν περιοχή HlyIII (1 γονίδιο GPCR)
3. Υποδοχέας άνθρακα/αζώτου (2 γονίδια GPCR)
4. Υποδοχέας Ste2 (1 γονίδιο GPCR)
5. Υποδοχέας Pth11 (5 γονίδια GPCR)
6. Υποδοχέας cAMP (3 γονίδια GPCR) και

7. Υποδοχέας μικροβιακής οσμίνης (1 γονίδιο GPCR).

Την περίοδο που ολοκληρώθηκε η βιοπληροφορική ανάλυση της παρούσας μελέτης οι Zheng *et al.* (2010) δημοσίευσαν εργασία όπου είχαν αναγνωρίσει πιθανούς GPCRs στο μύκητα *V. dahliae*. Τα δημοσιευμένα αποτελέσματά τους επιβεβαίωσαν τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, ως προς τους πιθανούς GPCRs στο μύκητα *V. dahliae*. Πιο αναλυτικά, μετά τη χρήση προηγμένων βιοπληροφορικών και φυλογενετικών αναλύσεων αναγνώρισαν 13 κατηγορίες GPCRs, εντός των οποίων και οι GPCRS των 7 κατηγοριών που αναγνωρίστηκαν στην παρούσα εργασία.

Οι μύκητες αξιοποιούν τις φερομόνες για να προσελκύσουν τον αντίθετο συζευκτικό τύπο. Οι εξειδικευμένες φερομόνες συζευκτικού τύπου εκκρίνονται από κύτταρα ενός συζευκτικού τύπου και τις αντιλαμβάνονται κύτταρα του αντίθετου συζευκτικού τύπου. Αυτοί οι υποδοχείς ενεργοποιούνται με τη σύνδεση της φερομόνης και εκκινούν τα καθοδικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος ώστε να επιτευχθεί η σύζευξη.

Στις δεκαετίες του 1970 και 1980 ανακαλύφθηκε μια ομάδα «στείρων» γονιδίων (Sterile genes, Ste), οι μεταλλάξεις των οποίων είχαν σαν αποτέλεσμα στείρους φαινοτύπους (Mackay και Manney 1974, Hartwell 1980). Λίγα χρόνια αργότερα, έγινε διαδοχική κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός των γονιδίων του φερομονικού μονοπατιού *STE2*, *STE3*, *STE4*, *STE6*, *STE7*, *STE11*, *STE12* και *STE18* (Burkholder και Hartwell 1985, Chaleff και Tatchell 1985, Hagen *et al.* 1986, Kuchler *et al.* 1989, Whiteway *et al.* 1989). Από αυτά τα STE γονίδια, τα *STE2* και *STE3* είναι υποδοχείς υπεύθυνοι για την αντίληψη των φερομονών. Στο γονιδίωμα των ασκομυκήτων έχουν αναγνωρισθεί τόσο ο υποδοχέας φερομόνης Ste2 όσο και ο Ste3 και σε πολλούς από αυτούς τους υποδοχείς έχει αποδειχθεί πειραματικά ο ρόλος του στη σύζευξη ή την αντίληψη της φερομόνης (Kitamura & Shimoda, 1991, Tanaka *et al.* 1993, Kim & Borkovich 2004, 2006; Yi *et al.* 2008). Στους βασιδιομύκητες οι φερομόνες είναι όλες λιπιδιακά τροποποιημένες και τις αντιλαμβάνονται μόνο οι φερομονικοί υποδοχείς Ste3 (Kronstad και Staben 1997, Casselton 2002).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *Ste2* στη ζύμη *S. cerevisiae* οδήγησαν σε ανωμαλίες σε επαγόμενες λειτουργίες του φερομονικού μονοπατιού, όπως σε διακοπή της

κυτταρικής διαίρεσης και της κυτταρικής συνένωσης (Hartwell, 1980). Στη ζύμη *Schizosaccharomyces pombe* το γονίδιο *MAM2*, παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο *Ste2* του *Saccharomyces cerevisiae*. Διαγραφή του γονιδίου *mam2* έδειξε ότι δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση και την ανάπτυξη της ζύμης (Kitamura & Shimoda, 1991). Στο μύκητα *U. maydis*, που αποτελεί έναν ετεροβασιδιομύκητα, οι φερομόνες καθώς και οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς τους είναι πολύ σημαντικοί για την σύζευξη και την κυτταρική σύντηξη, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό των μολυσματικών δικαρυίων (Casselton και Olesnicky, 1998). Στον μύκητα *Cryptococcus neoformans*, παθογόνο αίτιο της κρυπτοκοκκίασης, απομονώθηκε και μελετήθηκε ο ρόλος του γονιδίου του θεωρητικού υποδοχέα φερομόνης *CPRa* στη σύζευξη και το σχηματισμό υφών. Στα στελέχη στα οποία είχε διαγραφεί ο φερομονικός υποδοχέας μειώθηκε η ικανότητα σύζευξης, ενώ τα κύτταρα που στερούνταν τον υποδοχέα *CPRa* προκαλούσαν μικρότερους θύλακες στον εγκέφαλο ποντικών σε σχέση με κύτταρα αγρίου τύπου, ενώ τα ποντίκια που είχαν μολυνθεί με μεταλλαγμένα στελέχη στο γονίδιο αυτού του υποδοχέα ζούσαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με αυτά που είχαν μολυνθεί με αγρίου τύπου κύτταρα (Chang *et al.* 2003, Chung *et al.* 2002). Στον ανθρωποπαθογόνο οργανισμό *C. albicans* σε κύτταρα τύπου *a* που στερούνταν τον υποδοχέα *Ste2* μειώθηκε η συχνότητα σύζευξης με αγρίου τύπου κύτταρα *a* κατά 1000 φορές σε σχέση με τα στελέχη προέλευσής των μεταλλαγμένων. Στο *C. albicans* είναι πολύ σημαντικός ο ρόλος της απόκρισης των κυττάρων *a* στον παράγοντα *a* καθώς επάγεται η έκφραση 7 γονιδίων που σχετίζονται με τη μολυσματικότητα του παθογόνου. Συνεπώς η διαγραφή του *Ste2* επηρεάζει την επαγωγή αυτών των γονιδίων. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι το μονοπάτι παθογένειας και το φερομονικό μονοπάτι στο *C. albicans* μοιράζονται ορισμένα γονίδια απαραίτητα για την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων (Bennett, 2003). Τέλος, στο μύκητα *A. nidulans*, αναγνωρίστηκαν τα γονίδια *GprA* και *GprB* ως φερομονικοί υποδοχείς με βάση την ομολογία της αλληλουχίας τους με τα γονίδια *Ste2* και *Ste3*. Διαγραφή των *GprA* ή *GprB* ελαττώνει τη σεξουαλική αναπαραγωγή, οδηγεί στην παραγωγή μικρών κλειστοθηκίων που φέρουν ένα περιορισμένο αριθμό ασκοσπορίων, ενώ διπλά μεταλλάγματα των *GprA* και *GprB* στερούνται της δυνατότητας σχηματισμού καρποφοριών υπό ομοθαλικές συνθήκες (Seo *et al.*, 2004).

Η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA* στη φυλή 1 της τομάτας 70V του μύκητα *V. dahliae* είχε σαν αποτέλεσμα να επηρεαστούν ορισμένα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Πιο αναλυτικά, τα μεταλλαγμένα $\Delta VdSteA$ στελέχη TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4 παρουσίασαν μικρότερη ανάπτυξη διαμέτρου αποικίας όταν αναπτύχθηκαν για 30 ημέρες σε τρυβλίο που περιείχε ως θρεπτικό υλικό PDA. Αρχικά η ανάπτυξη στο τρυβλίο ήταν παρόμοια, ωστόσο το άγριο στέλεχος άρχισε να διαφοροποιείται μετά από τις 17 ημέρες ανάπτυξης και να αναπτύσσει διάμετρο αποικίας με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα μεταλλαγμένα στελέχη. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέτρηση της διαμέτρου όπου είχαν αναπτυχθεί μικροσκληρώτια μεταξύ του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών, στις 30 ημέρες ανάπτυξης σε τρυβλίο με PDA, ωστόσο ο σχηματισμός μικροσκληρωτίων στις 17 ημέρες ανάπτυξης ήταν πιο έντονος στα μεταλλαγμένα στελέχη σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Επιπλέον η εικόνα της αποικίας του αγρίου στελέχους ήταν ακτινωτή στις 30 ημέρες ανάπτυξης, σε αντίθεση με τα μεταλλαγμένα στελέχη που παρουσίαζαν “κροσσωτή” περιφερειακή ανάπτυξη. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA* επηρέασε την ικανότητα παραγωγής κονιδίων και μικροσκληρωτίων στα μεταλλαγμένα στελέχη, καθώς τα στελέχη TIAS2.2 και TIAS2.4 μετά την ανάπτυξή τους για 30 ημέρες σε τρυβλία με PDA παρουσίασαν μεγαλύτερη παραγωγή κονιδίων / cm² σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Παρά το γεγονός ότι το στέλεχος TIAS2.3 δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά, η διαφοροποίηση των άλλων 2 στελεχών από το άγριο στέλεχος δείχνει ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA* οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή κονιδίων. Παρατηρήθηκε διαφοροποίηση και στην περίπτωση του σχηματισμού μικροσκληρωτίων μετά από 30 ημέρες ανάπτυξης σε τρυβλία με PDA, καθώς το στέλεχος TIAS2.2 σχημάτιζε περισσότερα μικροσκληρώτια από το άγριο στέλεχος, ενώ τα στελέχη TIAS2.3 και TIAS2.4 δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά από αυτό. Ωστόσο η στατιστική ανάλυση έδειξε μια τάση και αυτών των στελεχών να διαφοροποιούνται καθώς δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά από το TIAS2.2. Τέλος τα πειράματα βλαστικότητας κονιδίων έδειξαν ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA* είχε σαν αποτέλεσμα το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS2.4 να παρουσιάζει στατιστικά υψηλότερα επίπεδα βλαστικότητας σε σχέση με το άγριο στέλεχος στα χρονικά διαστήματα στα οποία πραγματοποιήθηκε μέτρηση.

Στην περίπτωση της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού 25V η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA* δεν προκάλεσε διαφοροποίηση στην ανάπτυξη της διαμέτρου της αποικίας του αγρίου στελέχους και των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6, καθώς σε όλες τις ημέρες μέτρησης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Παρατηρήθηκε ωστόσο στατιστικά σημαντική διαφορά στη διάμετρο ανάπτυξης μικροσκληρωτίων, όπου στο άγριο στέλεχος τα μικροσκληρώτια αναπτύχθηκαν σε μεγαλύτερη διάμετρο σε σχέση με τα μεταλλαγμένα. Η εικόνα της αποικίας ήταν παρεμφερής στο άγριο και τα μεταλλαγμένα στελέχη σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA* δεν επηρέασε την ικανότητα παραγωγής κονιδίων και μικροσκληρωτίων στα μεταλλαγμένα στελέχη, καθώς στα στελέχη TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6 η παραγωγή κονιδίων / cm² δε διέφερε στατιστικά σε σχέση με το άγριο στέλεχος, μετά την ανάπτυξή τους για 30 ημέρες σε τρυβλία με PDA. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση ούτε στην περίπτωση του σχηματισμού μικροσκληρωτίων μετά από 30 ημέρες ανάπτυξης σε τρυβλία με PDA, καθώς ο σχηματισμός μικροσκληρωτίων / cm² των μεταλλαγμένων στελεχών TIAS2.2, TIAS2.3 και TIAS2.4 δε διέφερε στατιστικά σημαντικά από το άγριο στέλεχος. Τέλος τα πειράματα βλαστικότητας κονιδίων έδειξαν ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdSteA* είχε σαν αποτέλεσμα μόνο στο μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.3 να παρουσιάζονται στατιστικά υψηλότερα επίπεδα βλαστικότητας σε σχέση με το άγριο στέλεχος στα χρονικά διαστήματα στα οποία πραγματοποιήθηκε μέτρηση.

Φαίνεται λοιπόν ότι η απενεργοποίηση το συγκεκριμένου γονιδίου επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τα φυσιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά στη μη αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού 25V και στη φυλή 1 της τομάτας 70V παρά το γεγονός ότι είναι 2 άγρια στελέχη του ίδιου μύκητα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην γενετική παραλλακτικότητα που παρουσιάζουν οι διάφορες απομονώσεις του *V. dahliae*, καθώς το παθογόνο αναπτύσσεται και εξελίσσεται ώστε να προσαρμόζεται ανάλογα με τον ξενιστή, την περιοχή και τις συνθήκες ανάπτυξης του (Collado-Romero *et al.* 2006, Fahleson *et al.* 2003), με αποτέλεσμα το γονίδιο να μην έχει την ίδια σημασία και στα 2 άγρια στελέχη. Επιπλέον, εξαιτίας της πρωτοτυπίας της παρούσας εργασίας δεν είναι δυνατή η σύγκριση των πειραμάτων μορφολογίας και φυσιολογίας με άλλα ερευνητικά δεδομένα, καθώς στους οργανισμούς όπου έχει μελετηθεί ο ρόλος των φερομονικών υποδοχέων από τη διαγραφή του γονιδίου

επηρεάζεται ο μηχανισμός της σύζευξης (Hartwell, 1980) ή ο σχηματισμός εγγενών καρποφοριών, όπως στην περίπτωση του μύκητα *A. nidulans* (Seo *et al.*, 2004).

Στα πλαίσια της μελέτης πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας για να διαπιστωθεί ο ρόλος του γονιδίου *VdSteA* στη μολυσματικότητα του μύκητα *V. dahliae*. Στην περίπτωση του στελέχους 70V, στο πρώτο πείραμα παθογένειας που πραγματοποιήθηκε σε φυτά μελιτζάνας, παρατηρήθηκε ότι η σοβαρότητα της ασθένειας του αγρίου στελέχους ήταν στατιστικά μεγαλύτερη συγκριτικά με τα μεταλλαγμένα στελέχη. Με εξαίρεση τις μετρήσεις των 14 και 17 ημερών μετά τη μόλυνση όπου τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσίασαν παρόμοια πρόοδο ασθένειας με το άγριο στέλεχος στις επόμενες μετρήσεις η πρόοδος της ασθένειας ήταν μεγαλύτερη στο άγριο στέλεχος. Στις 35 ημέρες το άγριο στέλεχος 70V είχε ποσοστό ασθένειας 82 %, ενώ τα μεταλλαγμένα στελέχη 68 % (TIAS2.2), 64 % (TIAS2.3) και 69 % (TIAS2.4). Στο δεύτερο πείραμα αξιολόγησης της παθογένειας σε φυτά μελιτζάνας, το άγριο στέλεχος παρουσίασε επίσης στατιστικά μεγαλύτερη σοβαρότητα της ασθένειας σε σχέση με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS2.4, καθώς στις 26 ημέρες το άγριο στέλεχος είχε ποσοστό ασθένειας 65%, ενώ το TIAS2.4 55%. Σε πείραμα παθογένειας 3 επαναλήψεων σε φυτά τομάτας το άγριο στέλεχος παρουσίασε στατιστικά μεγαλύτερο ποσοστό ασθένειας σε σχέση με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS2.3 ενώ δε διέφερε στατιστικά σημαντικά από το στέλεχος TIAS2.4. Ωστόσο και τα 2 στελέχη έδειξαν τάση για μειωμένη σοβαρότητα ασθένειας συγκριτικά με το άγριο στέλεχος. Συμπερασματικά, στη μελιτζάνα που αποτελεί ιδιαίτερα ευπαθή ξενιστή για το μύκητα *V. dahliae* τα αποτελέσματα των πειραμάτων παθογένειας ήταν πιο ξεκάθαρα, καθώς όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη (TIAS2.2, TIAS2.3, TIAS2.4) παρουσίασαν μειωμένη παθογένεια κατά 10-12 % σε σχέση με το άγριο στέλεχος 70V. Στην περίπτωση της τομάτας η μόλυνση με το *V. dahliae* παρουσίασε διαφοροποίηση καθώς παρατηρήθηκε σε σχέση με το άγριο στέλεχος στατιστικά μειωμένη παθογένεια από το στέλεχος TIAS2.3 κατά 3,2% και στατιστικά παρόμοια σοβαρότητα ασθένειας με το TIAS2.4 κατά 2%. Επιπλέον παρατηρήθηκε μετά τις 28 ημέρες από τη μόλυνση ότι η εξέλιξη της ασθένειας δεν παρουσίασε αύξηση όσο αυξάνονταν σε μέγεθος τα φυτά, αλλά παρέμεινε σταθερή με αποτέλεσμα να μειώνεται ποσοστιαία η πρόοδος της ασθένειας με την πάροδο του χρόνου. Αυτό το γεγονός εξηγείται από τις κυκλικές περιόδους της μυκητολογικής εξάλειψης που

χαρακτηρίζουν τον τρόπο ζωής του *V.dahliae* στο αγγειακό σύστημα των φυτών, όπως η τομάτα και η ελαιοκράμβη (Chen *et al.*, 2004; Eynck *et al.*, 2007; Heinz *et al.*, 1998).

Στην περίπτωση του στελέχους 25V, στο πρώτο πείραμα παθογένειας σε φυτά μελιτζάνας, παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό ασθένειας του αγρίου στελέχους ήταν στατιστικά μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό των μεταλλαγμένων στελεχών. Στις 35 ημέρες το άγριο στέλεχος είχε ποσοστό ασθένειας 98% και τα μεταλλαγμένα στελέχη είχαν 89% (TIAS1.4), 91% (TIAS1.3) και 83% (TIAS1.6). Στο δεύτερο πείραμα παθογένειας σε φυτά μελιτζάνας, το άγριο στέλεχος παρουσίασε στατιστικά μεγαλύτερο ποσοστό ασθένειας σε σχέση με το μεταλλαγμένο στέλεχος TIAS1.3. Στις 26 ημέρες το άγριο στέλεχος είχε ποσοστό ασθένειας 65%, ενώ το TIAS2.4 55%. Στο πείραμα παθογένειας σε φυτά τομάτας το άγριο στέλεχος παρουσίασε στατιστικά μεγαλύτερο ποσοστό ασθένειας σε σχέση με τα μεταλλαγμένα στελέχη TIAS1.3, TIAS1.4 και TIAS1.6. Στις 35 ημέρες το άγριο στέλεχος είχε ποσοστό ασθένειας 44% ενώ τα μεταλλαγμένα στελέχη είχαν 38% (TIAS1.4), 39% (TIAS1.3) και 36% (TIAS1.6). Συμπερασματικά, στη μελιτζάνα τα αποτελέσματα των πειραμάτων παθογένειας έδειξαν ότι όλα τα μεταλλαγμένα $\Delta VdSteA$ στελέχη (TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6) παρουσίασαν μειωμένη παθογένεια κατά 10-12 % σε σχέση με το άγριο στέλεχος 25V. Στην περίπτωση της τομάτας τα μεταλλαγμένα $\Delta VdSteA$ στελέχη (TIAS1.3, TIAS1.4, TIAS1.6) παρουσίασαν μειωμένη παθογένεια κατά 8-10 % σε σχέση με το άγριο στέλεχος 25V ενώ παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση μετά τις 22 ημέρες από τη μόλυνση ότι η πρόοδος της ασθένειας παρουσίαζε στασιμότητα καθώς αναπτύσσονταν τα φυτά με αποτέλεσμα να μειώνεται το ποσοστό ασθένειας των φυτών, γεγονός που όπως εξηγήθηκε παραπάνω σχετίζεται με την αλληλεπίδραση της τομάτας με το μύκητα *V. dahliae* (Chen *et al.*, 2004; Eynck *et al.*, 2007; Heinz *et al.*, 1998).

Στα πειράματα παθογένειας διαπιστώθηκε ότι η διαγραφή του φερομονικού υποδοχέα *VdSteA* επηρεάζει την παθογόνο δύναμη του *V. dahliae* όπως αποδείχθηκε στα μεταλλαγμένα στελέχη και του 25V και του 70V. Η διαγραφή φερομονικών υποδοχέων έχει οδηγήσει σε μείωση της παθογόνου ικανότητας σε παθογόνα του ανθρώπου όπως στο μύκητα *Cryptococcus neoformans* (Chang *et al.* 2003, Chung *et al.* 2002) καθώς και στη ζύμη *C. albicans* (Bennett, 2003), ενώ ο παράλληλος ρόλος της διαγραφής και στη συζευκτική ικανότητα αυτών των μυκήτων δείχνουν τη

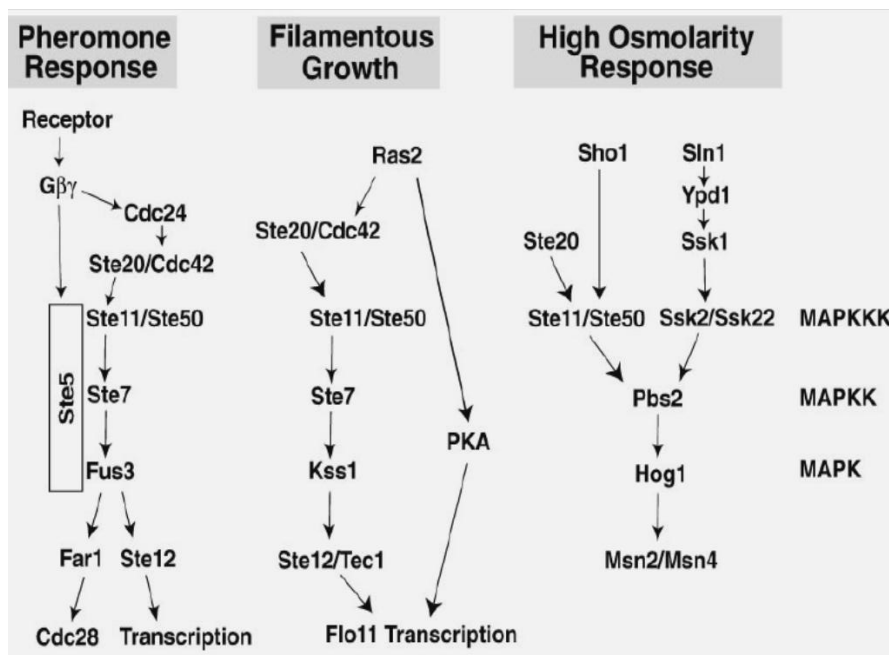
σημασία του γονιδίου *SteA* τόσο στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων όσο και στην αλληλεπίδραση των μυκήτων με τους ξενιστές τους.

Συμπερασματικά από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη το γονίδιο *VdSteA* φαίνεται ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη της αποικίας και των μικροσκληρωτίων, στην κονιδιοποίηση, στη βλαστικότητα των κονιδίων και την παθογόνο ικανότητα της φυλής 70V έναντι φυτών τομάτας και μελιτζάνας, ενώ στην περίπτωση της φυλής 25V το γονίδιο φαίνεται ότι παίζει ρόλο στο σχηματισμό μικροσκληρωτίων, στη βλαστικότητα των κονιδίων και στην παθογόνο ικανότητα της ικανότητα έναντι φυτών τομάτας και μελιτζάνας.

Ο τρόπος με τον οποίο εμπλέκεται το γονίδιο *VdSteA* στη βιολογία του *V. dahliae* δεν είναι ξεκάθαρος, καθώς στις ζύμες, όπου έχει μελετηθεί εκτενώς το γονίδιο του φερομονικού υποδοχέα *Ste2* παίζει ρόλο στο μονοπάτι μεταγωγής της φερομόνης, το οποίο καθορίζει την επιτυχή έκβαση της σύζευξης μεταξύ κυττάρων διαφορετικού συζευκτικού τύπου. Ωστόσο σε έναν οργανισμό χωρίς γνωστό σεξουαλικό κύκλο αλλά και εγγενή μορφή, όπως ο μύκητας *V. dahliae*, πιθανότατα ο υποδοχέας αυτός να μην εξυπηρετεί τους σκοπούς του μονοπατιού όπως στις ζύμες, αλλά να έχει κάποια άλλη χρησιμότητα.

Στο φερομονικό μονοπάτι των ζυμών η φερομόνη που προσδένεται στο φερομονικό υποδοχέα *Ste2* ενεργοποιεί τη G πρωτεΐνη η οποία με τη σειρά της μέσω των υπομονάδων της δίνει έναυσμα στο μονοπάτι των MAPKs να ρυθμίσουν τη σύζευξη. Ωστόσο στις ζύμες ορισμένα συστατικά του μονοπατιού της φερομόνης, όπως η MAP κινάση *Fus3*, η MAPK κινάση *Ste7*, η MAPKK κινάση *Ste11* και η Gβγ υπομονάδες *Ste20/Cdc42*, είναι κοινά με άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, όπως το μονοπάτι της μυκηλιακής ανάπτυξης και της απόκρισης σε ωσμωτική καταπόνηση (Εικόνα 56) (Dohlman and Thorner, 2001). Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι πολλαπλά ερεθίσματα μπορούν να τροποποιήσουν το τελικό αποτέλεσμα ενός μονοπατιού. Για παράδειγμα υπάρχει ένδειξη ότι οι ελλειμματικές συνθήκες άνθρακα και οι πρωτεϊνικές κινάσες του cAMP δρουν συνεργιστικά με τις συνθήκες έλλειψης αζώτου ώστε να ενεργοποιήσουν το γονίδιο και τελικά την πρωτεϊνική κινάση *A Kss1*, ώστε να γίνει η επαγωγή γονιδίων μυκηλιακής ανάπτυξης στη ζύμη *S. cerevisiae* (Cullen *et al.* 2000, Madhani 2000, Robertson *et al.* 1998). Τα μονοπάτια των MAP κινάσεων και του cAMP στους φυτοπαθογόνους μύκητες εμπλέκονται στην

ανάπτυξη και στην παθογένειά τους (Delgado-Jarana *et al.* 2005, Tzima *et al.* 2011, Tzima *et al.* 2012). Φαίνεται δηλαδή ότι συστατικά στο μονοπάτι που ενεργοποιείται από το φερομονικό υποδοχέα ενεργοποιούνται και από άλλα ερεθίσματα οδηγώντας σε συγκεκριμένο φαινοτυπικό ή λειτουργικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 56: Τα τρία μονοπάτια ενεργοποίησης των MAPK κινασών που μοιράζονται από κοινού γονίδια, στη ζύμη *S. cerevisiae*.

Στην παρούσα εργασία η διαγραφή του γονιδίου *VdSteA* επηρέασε τη μορφολογία και την παθογένεια του βερτισιλλίου, ωστόσο δεν το έκανε σε δραματικό ποσοστό, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση ότι ο ρόλος του φερομονικού υποδοχέα σε διάφορες φυσιολογικές και μορφολογικές λειτουργίες του *V. dahliae* μπορεί να αντικατασταθεί από τον υποδοχέα κάποιου άλλου ερεθίσματος. Επιπλέον η επιρροή του *VdSteA* στην παθογένεια και την ανάπτυξη, καθώς και το γεγονός ότι το συγκεκριμένο φερομονικό μονοπάτι στη ζύμη εμπεριέχει γονίδια των MAP κινασών, πιθανόν να οφείλεται σε άλλα μονοπάτια με τα οποία μπορεί να αλληλεπιδρά, όπως αυτό του cAMP το οποίο ενεργοποιείται από πηγές άνθρακα. Ο φαινότυπος που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία στη φυλή 70V (αύξηση παραγωγής κονιδίων, αύξηση βλαστικότητας κονιδίων, οριακή αύξηση σχηματισμού μικροσκληρωτίων και μείωση παθογένειας σε φυτά μελιτζάνας και τομάτας) προσομοιάζει με το φαινότυπο που παρατηρήθηκε πρόσφατα στην ίδια φυλή του

μύκητα *V. dahliae* σε εργασία των Tzima *et al.* (2012). Στην εργασία αυτή παρατηρήθηκε η ίδια φαινοτυπική εικόνα σε πιο έντονο όμως βαθμό μετά τη διαγραφή της β υπομονάδας της G πρωτεΐνης (VGB), που βρέθηκε να ρυθμίζει τη μεταγωγή σήματος στο μονοπάτι του cAMP. Υποθετικά, το γονίδιο *VdSteA* ίσως να παίζει στο μύκητα *V. dahliae* κάποιο επικουρικό ρόλο, μαζί με τον υποδοχέα κάποιου άλλου ερεθίσματος στην ενεργοποίηση αυτής της υπομονάδας. Συνεπώς η διαγραφή του γονιδίου *VdSteA* μπορεί να οδηγεί σε μειωμένη ενεργοποίηση της β υπομονάδας VGB, με αποτέλεσμα πιο ήπιο φαινότυπο σε σχέση με την απενεργοποίηση της VGB, μια υπόθεση που θα πρέπει να ελεγχθεί μελλοντικά.

Η μείωση της ανάπτυξης της αποικίας και η παράλληλη αύξηση της παραγωγής κονιδίων και της βλαστικότητας στη φυλή 70V μπορεί να οφείλεται στην απορρύθμιση που μπορεί να προκαλεί η διαγραφή του υποδοχέα στην ικανότητα του οργανισμού να αντιλαμβάνεται διάφορα ερεθίσματα, με αποτέλεσμα ο μύκητας να μην είναι σε θέση να αντιληφθεί είτε την πυκνότητα του πληθυσμού του, είτε τη διαθεσιμότητα πηγών ενέργειας, είτε τη θέση του στο χώρο γεγονός αρκετά σημαντικό στην περίπτωση της μόλυνσης ενός φυτού.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε στο πείραμα παθογένειας στη μελιτζάνα ότι η σοβαρότητα της ασθένειας στα μεταλλαγμένα στελέχη ήταν μεγαλύτερη τις πρώτες 17 ημέρες μετά τη μόλυνση σε σχέση με τη φυλή 70V, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη παράγουν περισσότερα κονίδια τα οποία επιπλέον βλαστάνουν γρηγορότερα σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Ωστόσο η πρόοδος της ασθένειας σε αυτά τα στελέχη δεν ακολούθησε στις επόμενες μετρήσεις τον ίδιο ρυθμό με αποτέλεσμα η άγρια φυλή να μολύνει σε μεγαλύτερο ποσοστό τα φυτά μελιτζάνας. Αυτές οι επιπλέον διεργασίες μολυσματικότητας λογικά απαιτούν ενέργεια και τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν έχουν τα αποθέματα ενέργειας ώστε να αποικίσουν με επιτυχία το αγγειακό σύστημα των φυτών.

Για να αποσαφηνιστεί περαιτέρω η λειτουργία του γονιδίου *VdsteA* στο μύκητα *V. dahliae* καθώς και το μεταγωγικό μονοπάτι σήματος στο οποίο συμμετέχει προτείνονται να πραγματοποιηθούν τα ακόλουθα πειράματα:

1. Πειράματα επαναφοράς (complementation) του γονιδίου στα μεταλλαγμένα στελέχη, ώστε να διαπιστωθεί αν ο φαινότυπός τους οφείλεται αποκλειστικά στη διαγραφή του γονιδίου *VdsteA*.

2. Πειράματα υπερέκφρασης (overexpression) του γονιδίου στις άγριες φυλές 25V και 70V, ώστε να διαπιστωθεί πως επηρεάζεται ο φαινότυπός τους κατά την υπερέκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου.
3. Πειράματα γονιδιακής έκφρασης διαφόρων γνωστών γονιδίων του μονοπατιού της G πρωτεΐνης, πρωτεϊνικής κινάσης, MAPK κινασών μεταξύ των άγριων φυλών και των $\Delta VdSteA$ ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του SteA στη ρύθμιση της έκφρασης αυτών των γονιδίων στο *V. dahliae*.
4. Μετασχηματισμός των $\Delta VdSteA$ στελεχών με το γονίδιο της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP και στη συνέχεια μόλυνση φυτών και παρατήρηση της συμπεριφοράς των κονιδίων στη ρίζα, για να διαπιστωθεί αν η μειωμένη παθογένεια οφείλεται στην αδυναμία επαφής με τη ρίζα ή στην περιορισμένη ικανότητα αντίληψης των ερεθισμάτων της ριζόσφαιρας.
5. Κατασκευή διπλών μεταλλαγμάτων όπου θα είναι απενεργοποιημένος ο υποδοχέας φερομόνης *VdSteA* μαζί με συνδυασμούς υποδοχέων διαφόρων ερεθισμάτων, ώστε να διαπιστωθεί αν η δράση του επικαλύπτει ή επικαλύπτεται από κάποιο άλλο υποδοχέα.
6. Καθώς σε άλλους οργανισμούς, όπως ζύμες και βασιδιομύκητες ο υποδοχέας αυτός παίζει ρόλο στη σύζευξη κυττάρων διαφορετικού συζευκτικού τύπου θα μπορούσε να μελετηθεί η συμπεριφορά και η αναστόμωση των υφών ανάμεσα στα μεταλλαγμένα $\Delta VdSteA$ στελέχη και σε ίδιες ή διαφορετικές φυλές του μύκητα *V. dahliae*.

5. Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Agrios, G.N. (2005)** Plant Pathology, 5th edition. San Diego: Academic Press.
- Attwood TK & Findlay JB (1994)** Fingerprinting G-protein coupled receptors. *Protein Engineering*. **7**: 195–203.
- Bahn, Y.S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J. & Cardenas, M.E. (2007)** Sensing the environment: lessons from fungi. *Nature Reviews Microbiology*. **5**: 57–69.
- Bardwell, L. (2004)** A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides*. **25**: 1465–1476.
- Bell, A.A. (1969)**. Phytoalexin production and Verticillium wilt resistance in cotton. *Phytopathology*. **59**: 1119–1127.
- Benhamou, N. (1995)** Ultrastructural and cytochemical aspects of the response of eggplant parenchyma cells in direct contact with *Verticillium*-infected xylem vessels. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **46**: 321–338.
- Bennett, R.J. and Johnson, A.D. (2005)** Mating in *Candida albicans* and the Search for a Sexual Cycle. *Annual Review of Microbiology*. **59**:233–55
- Bidochka, M.J., Burke, S. and Ng, L. (1999)** Extracellular hydrolytic enzymes in the fungal genus *Verticillium*: adaptations for pathogenesis. *Canadian Journal of Microbiology*. **45**: 856–864.
- Bieszke, J.A., Braun, E.L., Bean, L.E., Kang, S., Natvig, D.O. & Borkovich, K.A. (1999a)** The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proceedings of National Academy of Science USA*. **96**: 8034–8039.
- Bieszke, J.A., Li, L. & Borkovich, K.A. (2007)** The fungal opsin gene *nop-1* is negatively-regulated by a component of the blue light sensing pathway and influences conidiation-specific gene expression in *Neurospora crassa*. *Current Genetics*. **52**: 149–157.

- Bishop, C.D. and Cooper, R.M.** (1983b) An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiological Plant Pathology*. **23**, 323–343.
- Blumer, J.B., Smrcka, A.V. & Lanier, S.M.** (2007) Mechanistic pathways and biological roles for receptor-independent activators of G-protein signaling. *Pharmacology and Therapeutics*. **113**: 488–506.
- Bolek, Y., El-Zik, K.M., Pepper, A.E., Bell, A.A., Magill, C.W., Thaxton, P.M. and Reddy, O.U.K.** (2005) Mapping of *Verticillium* wilt resistance genes in cotton. *Plant Science*. **168**: 1581–1590.
- Bölker M.** (1998) Sex and Crime: Heterotrimeric G Proteins in Fungal Mating and Pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*. **25**: 143–156.
- Borkovich KA, Alex LA, Yarden O et al.** (2004) Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**: 1–108.
- Buchner, V., Burstein, Y. and Nachmias, A.** (1989) Comparison of *Verticillium dahliae* -produced phytotoxic peptides purified from culture fluids and infected potato stems. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **35**: 253– 269.
- Buchner, V., Nachmias, A. and Burstein, Y.** (1982) Isolation and partial characterization of a phytotoxic glycopeptide from a protein lipopolysaccharide complex produced by a potato isolate of *Verticillium dahliae*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **138**: 261–264.
- Burkholder, A.C. & Hartwell, L.H.** (1985) The yeast alpha-factor receptor: structural properties deduced from the sequence of the *STE2* gene. *Nucleic Acids Research*. **13**: 8463–8475.
- Butler, G.** (2010) Fungal Sex and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. **23**(1): 140–159
- Butler G** (2007) The evolution of MAT: the ascomycetes. Sex in Fungi (Heitman J, Kronstad JW, Taylor JW & Casselton LA, eds), pp. 3–18. ASM Press, Washington, DC.
- Calcagno, A.M., Bignell, E., Warn, P., Jones, M.D., Denning, D.W., Muhlschlegel, F.A., Rogers, T.R. & Haynes, K.** (2003) *Candida glabrata* *STE12* is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. *Molecular Microbiology*. **50**: 1309–1318.

- Calcagno, A.M., Bignell, E., Rogers, T.R., Jones, M.D., Muhlschlegel, F.A. & Haynes, K.** (2005) *Candida glabrata Ste11* is involved in adaptation to hypertonic stress, maintenance of wild-type levels of filamentation and plays a role in virulence. *Medical Mycology*. **43**: 355–364.
- Campbell C.L., and Madden L.V.,** (1990). Introduction to Plant Disease Epidemiology. *John Wiley & Sons Inc., New York*.
- Carder, J.H., Hignett, R.C. and Swinburne, T.R.** (1987) Relationship between the virulence of hop isolates of *Verticillium albo-atrum* and their in vitro secretion of cell-wall degrading enzymes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **31**: 441–452.
- Casselton, L.A.** (2002) Mate recognition in fungi. *Heredity*. **88**: 142–147.
- Casselton, L.A., and Olesnicky, N.S.** (1998) Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62**:55–70.
- Chaleff, D.T. & Tatchell, K.** (1985) Molecular cloning and characterization of the *STE7* and *STE11* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. **5**: 1878–1886.
- Chang, Y.C., Miller, G.F. and Chung, K.J.K.** (2003) Importance of a developmentally regulated pheromone receptor of *Cryptococcus neoformans* for virulence. *Infection and Immunity*. **71** (9): 4953–4960.
- Chen, P., Lee, B., Robb, J.** (2004) Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium 22 dahliae* in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **64**: 283-291.
- Chung, K.S., Won, M., Lee, S.B., Jang, Y.J., Hoe, K.L., Kim, D.U., Lee, J.W., Kim, K.W. & Yoo, H.S.** (2001) Isolation of a novel gene from *Schizosaccharomyces pombe*: *stm11* encoding a seven transmembrane loop protein that may couple with the heterotrimeric G alpha 2 protein, Gpa2. *Journal of Biological Chemistry*. **276**: 40190–40201.
- Chung, K.S., Kim, D.U., Ryoo, S.W., et al.** (2003) Functional overexpression of the *Stm1* protein, a G-protein-coupled receptor, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnology Letters*. **25**: 267–272.

- Chung, S., Karos, M., Chang, Y. C, Lukszo, J., Wickes, B. L., and Kwon-Chung, K. J.** (2002) Molecular analysis of *CPR α* , a *MAT α* -specific pheromone receptor gene of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. **1**:432–439.
- Collado-Romero, M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., Valverde-Corredor, A., and Jiménez-Díaz R.M.** (2006) Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology*. **96** (5): 485-495.
- Conigrave, A.D. & Hampson, D.R.** (2006) Broad-spectrum L-amino acid sensing by class 3 G-protein-coupled receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. **17**: 398–407.
- Cooper, R.M., Resende, M.L.V., Flood, J., Rowan, M.G., Beale, M.H. and Potter, U.** (1996) Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature*. **379**: 159–162.
- Cooper, R.M. and Wood, R.K.S.** (1973) Induction of synthesis of extracellular cell-wall degrading enzymes in vascular wilt fungi. *Nature*. **246**: 309–311.
- Cullen, P.J., Schultz, J., Horecka, J., Stevenson, B.J., Jigami, Y. and Sprague G.F. Jr.** (2000) Defects in protein glycosylation cause *SHO1*-dependent Activation of a *STE12* signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**: 1005–1018.
- Daayf, F., Nicole, M., Boher, B., Pando, A. and Geiger, J.P.** (1997) Early vascular defense reactions of cotton roots infected with defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*. **103**: 125–136.
- Dobinson, K.F., Grant, S.J. and Kang, S.** (2004). Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Current Genetics*. **45**: 104–110.
- Dobinson, K.F., Lecomte, N. and Lazarovits, G.** (1997) Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Microbiology*. **43**: 227–233.
- Dohlman, H.G., Song, J., Ma, D., Courchesne, W.E. & Thorner, J.** (1996) Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with G α 1 (the G-protein alpha subunit). *Molecular and Cellular Biology*. **16**: 5194–5209.

- Dohlman, H.G. & Thorner, J.W.** (2001) Regulation of G protein initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annual Review of Biochemistry*. **70**: 703–754.
- Eynck, C., Koopmann, B., Grunewaldt-Stoecker, G., Karlovsky, P., Von Tiedemann, A.** (2007) Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V.dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology*.**118**: 259-274.
- Fahleson, J., Lagercrantz, U., Hu, Q., Steventon, L.A., and Dixelius, C.** (2003) Estimation of genetic variation among *Verticillium* isolates using AFLP analysis. *European Journal of Plant Pathology*. **109**:361-371.
- Flexas, J. and Medrano, H.** (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*. **89**: 183–189.
- Fradin, E.F., El-Haliem, A.A., Masini, L., van den Berg, G.C.M., Joosten, M.H.A.J., and Thomma, B.P.H.J.** (2011) Interfamily transfer of Tomato Ve1 Mediates *Verticillium* Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **156**(4): 2255-2265.
- Fradin, E. F., Thomma, B. P. H. J.** (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*, *Molecular Plant Pathology*, **7**(2):71–86.
- Gehrke, A., Heinekamp, T., Jacobsen, I.D., and Brakhage, A.A.** (2010) Heptahelical receptors GprC and GprD of *Aspergillus fumigatus* are essential regulators of colony growth, hyphal morphogenesis, and virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**(12): 3989–3998
- Gizi, D., Stringlis, I.A., Tjamos, S.E., Paplomatas, E.J.** (2011) Seedling vaccination by stem injecting a conidial suspension of F2, a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain, suppresses *Verticillium* wilt of eggplant. *Biological Control*. **58**: 387-392.
- Gold, J. and Robb, J.** (1995) The role of the coating response in *Craigella* tomatoes infected with *Verticillium dahliae*, races 1 and 2. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **47**: 141–157.
- Gour, H.N. and Dube, H.C.** (1985) Effects of ouabain and phytotoxic metabolites from *Verticillium dahliae* on the cell-membranes of cotton plants. *Physiological Plant Pathology*. **27**: 109–118.

- Hagen, D.C., McCaffrey, G. & Sprague, G.F. Jr** (1986) Evidence the yeast *STE3* gene encodes a receptor for the peptide pheromone a factor: gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **83**: 1418–1422.
- Han KH, Seo JA & Yu JH** (2004a) A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. **51**: 1333–1345.
- Hartwell, L.H.** (1980) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone. *Journal of Cell Biology*. **85**: 811–822.
- Heinz, R., Lee, S.W., Saparno, A., Nazar, R.N., Robb, J.** (1998) Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **52**: 385-396.
- Herskowitz, I.** (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*. **80**: 187–197.
- Hoffman, T., Schmidt, J.S., Zheng, X.Y. and Bent, A.F.** (1999) Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology*. **119**: 935–949.
- Huang, L.K. and Mahoney, R.R.** (1999) Purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *Journal of Applied Microbiology*. **86**: 145–156.
- Huisman, O.C.** (1988) Seasonal colonization of roots of field-grown cotton by *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus*. *Phytopathology*, **78**: 708–716.
- Idnurm, A. & Heitman, J.** (2005) Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biology*. **3**: e95.
- Idnurm, A. & Howlett, B.J.** (2001) Characterization of an opsin gene from the ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Genome*. **44**: 167–171.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., et al.** (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*. **422**: 173–176.

- Jansky, S., Rouse, D.I. and Kauth, P.J.** (2004) Inheritance of resistance to *Verticillium dahliae* in diploid interspecific potato hybrids. *Plant Disease*. **88**: 1075–1078.
- Jenczmionka, N.J., Maier, F.J., Losch, A.P., and Schafer. W.,** (2003) Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head-blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase gpmk1. *Current Genetics*. **43**:87–95.
- Jiménez-Díaz, R. M. , Cirulli, M. , Bubici, G. , Jiménez-Gasco, M. M. , Antoniou, P. P. , Tjamos, E. C.** (2012) Verticillium Wilt, a major threat to olive production: current status and future prospects for its management. *Plant Disease*, **96** (3): 304-329.
- Karlson, P., & Luscher, M.** (1959) Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*. **183**: 55–56.
- Kim, H. & Borkovich, K.A.** (2004) A pheromone receptor gene, *pre-1*, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*. **52**: 1781–1798.
- Kim, H. & Borkovich, K.A.** (2006) Pheromones are essential for male fertility and sufficient to direct chemotropic polarized growth of trichogynes during mating in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*. **5**: 544–554.
- Kitamura, K. & Shimoda, C.** (1991) The *Schizosaccharomyces pombe mam2* gene encodes a putative pheromone receptor which has a significant homology with the *Saccharomyces cerevisiae* Ste2 protein. *The EMBO Journal*. **10**: 3743–3751.
- Kolakowski, L.F.Jr.** (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*. **2**: 1–7.
- Korolev, N., Pérez-Artés, E., Bejarano-Alcázar, J., Rodríguez-Jurado, D., Katan, J., Katan, T., and Jiménez-Díaz, R.M.,** (2001) Comparative study of genetic diversity and pathogenicity among populations of *Verticillium dahliae* from cotton in Spain and Israel. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 443–456.
- Kotcon, J.B. and Rouse, D.I.** (1984) Root deterioration in the potato early dying syndrome causes and effects of root biomass reductions associated with colonization by *Verticillium dahliae*. *American Pot Journal*. **61**: 557–568.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W., Donaton, M.C., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J.H. & Thevelein, J.M.** (1999) A *Saccharomyces*

cerevisiae G-protein coupled receptor, *Gpr1*, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Molecular Microbiology*. 32: 1002–1012.

Kronstad, J.W. & Staben, C. (1997) Mating type in filamentous fungi. *Annual Review of Genetics*. 31: 245–276.

Kuchler, K., Sterne, R.E., & Thorner, J. (1989) *Saccharomyces cerevisiae* *STE6* gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO Journal*. 8: 3973–3984.

Kulkarni, R.D., Thon, M.R., Pan, H. & Dean, R.A., (2005) Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome Biology*. 6: R24.

Lafon, A., Han, K.H., Seo, J.A., Yu, J.H. & d'Enfert, C. (2006) G-protein and cAMP-mediated signaling in Aspergilli: a genomic perspective. *Fungal Genetics and Biology*. 43: 490–502.

Lee, S.W., Mazar, R.N., Powell, D.A. and Robb, J. (1992) Reduced PAL gene expression in Verticillium-infected resistant tomatoes. *Plant Molecular Biology*. 18: 345–352.

Lemaire, K., Van de Velde, S., Van Dijck, P. & Thevelein, J.M. (2004) Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor *Gpr1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*. 16: 293–299.

Li, L., Wright, S.J., Krystofova, S., Park, G., & Borkovich, K.A. (2007b) Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annual Review of Microbiology*. 61: 423–452.

Li, L. & Borkovich, K.A. (2006) *GPR-4* is a predicted G-protein coupled receptor required for carbon source-dependent asexual growth and development in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*. 5: 1287–1300.

Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G.R. (1997) Non filamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 90: 939–949.

Lorenz, M.C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M.E., Xue, Y., Hirsch, J.P. & Heitman, J. (2000) The G protein-coupled receptor *Gpr1* is a nutrient sensor that

- regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **154**: 609–622.
- Lund, S.T., Stall, R.E. and Klee, H.J.** (1998) Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell*. **10**: 371–382.
- Ludwig, R.A.** (1952) Studies on the physiology of hadromycotic wilting in the tomato plant. *Macdonald College Technology Bulletin*. **20**: 1–40.
- Lynch, D.R., Kawchuck, L.M. and Hachey, J.** (1997) Identification of a gene conferring high levels of resistance to Verticillium wilt in *Solanum chacoense*. *Plant Disease*. **81**: 1001–1014.
- Mackay, V., & Manney, T.R.** (1974) Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and phenotypic characterization of non mating mutants. *Genetics*. **76**: 255–271.
- Madhani, H.D.** (2000) Interplay of intrinsic and extrinsic signals in yeast differentiation *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97** (25): 13461–13463.
- Maidan, M.M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S., Tournu, H., Thevelein, J.M. & Van Dijck, P.** (2005a) The G protein-coupled receptor *Gpr1* and the G α protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*. **16**: 1971–1986.
- Maidan, M.M., Thevelein, J.M. & Van Dijck, P.** (2005b) Carbon source induced yeast-to-hypha transition in *Candida albicans* is dependent on the presence of amino acids and on the G-protein-coupled receptor *Gpr1*. *Biochemical Society Transactions*. **33**: 291–293.
- Maller, J.L.** (2003) Signal transduction. Fishing at the cell surface. *Science* **300**: 594–595.
- Mauch-Mani, B. and Slusarenko, A.J.** (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia lyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell*. **8**: 203–212.
- Miwa, T., Takagi, Y., Shinozaki, M., Yun, C.W., Schell, W.A., Perfect, J.R., Kumagai, H. & Tamaki, H.** (2004) *Gpr1*, a putative G-protein coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. **3**: 919–931.

- Mullins, E.D., and Kang, S.** (2001) Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cell and Molecular Life Sciences*. **58** 2043 – 2052
- Mussel, H.W. and Strause, B.** (1972) Characterization of two polygalacturonases produced by *Verticillium albo-atrum*. *Canadian Journal of Biochemistry*. **50**: 625–632.
- Nachmias, A., Buchner, V. and Burstein, Y.** (1985) Biological and immunochemical characterization of a low molecular weight phytotoxin isolated from a protein-lipopolysaccharide complex produced by a potato isolate of *Verticillium dahliae* Kleb. *Physiological Plant Pathology*. **26**: 43–55.
- Neer E. J.,** (1995) Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell*, **80**: 249 – 257.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori T., et al.** (2000) Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*. **289**: 739–745.
- Pantelides, I. S., Tjamos, S. E., Paplomatas, E. J** (2010) Ethylene perception via *ETR1* is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant Pathology*. **11**(2): 191–202.
- Pantelides, I.S., Tjamos, S.E., Striglis, I.A., Chatzipavlidis, I., Paplomatas, E.J.** (2009) Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation. *Biological Control*. **50**: 30-36.
- Paoletti, M., Rydholm, C., Schwier, E.U., Anderson, M.J., Szakacs, G., Lutzoni, F., Debeauvais, J.P., Latge, J.P., Denning, D.W. & Dyer, P.S.** (2005) Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Current Biology*. **15**: 1242–1248.
- Pegg, G.F.** (1965) Phytotoxin production by *Verticillium albo-atrum* Reinke and Berthold. *Nature*. **208**: 1228–1229.
- Pegg, G.F., Gull, K. and Newsam, R.J.** (1976) Transmission electron microscopy of *Verticillium albo-atrum* hyphae in xylem vessels of tomato plants. *Physiological Plant Pathology*. **8**: 221–224.
- Pegg, G.F. and Cronshaw, D.K.** (1976) Relationship of *in vitro* to *in vivo* ethylene production in *Pseudomonas solanacearum* infection of tomato. *Physiological Plant Pathology*. **9**: 145–154.

- Pegg, G.F.** (1974) *Verticillium* diseases. *Review of Plant Pathology*. **53**: 157–182.
- Pemberton, C.L. and Salmond, G.P.C.** (2004) The Nep1-like proteins—a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Molecular Plant Pathology*. **5**: 353–359.
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., et al.** (2007) Crystal structure of the human β 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. **450**: 383–387.
- Robb, E.J., Powell, D.A. and Street, P.F.S.** (1989) Vascular coating: a barrier to colonization by the pathogen in *Verticillium* wilt of tomato. *Canadian Journal of Botany*. **67**: 600–607.
- Robertson, L.S. and Fink, G.R.** (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95**: 13783–13787.
- Schafer, J.F.** (1971) Tolerance to plant disease. *Annual Review of Phytopathology*. **9**: 235–252.
- Schaible, L., Cannon, O.S. and Waddoups, V.** (1951) inheritance of resistance to *Verticillium* wilt in a tomato cross. *Phytopathology*. **41**: 986–990.
- Schnathorst, W.C.** (1981) Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In *Fungal Wilt Diseases of Plants* (Mace, M.E., Bell, A.A. and Beckman, C.H., eds), pp. 81–111. New York: Academic Press.
- Seo, J.A., Han, K.H. & Yu, J.H.** (2004) The *gprA* and *gprB* genes encode putative G protein-coupled receptors required for self fertilization in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. **53**: 1611–1623.
- Siderovski, D.P. & Willard, F.S.** (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *International Journal of Biological Sciences*. **1**: 51–66.
- Simko, I., Haynes, K.G., Ewing, E.E., Costanzo, S., Christ, B.J. and Jones, R.W.** (2004) Mapping genes for resistance to *Verticillium albo-atrum* in tetraploid and diploid populations using haplotype association tests and genetic linkage analysis. *Molecular Genomics and Genetics*. **271**: 522–531.

- Srikantha, T., Lachke, S.A. & Soll, D.R.** (2003) Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell*. **2**: 328–340.
- Talboys, P.W.** (1972) A discussion on disease resistance in plants. *Proceedings of the Royal Society*, **181**: 319–332.
- Tanaka, K., Davey, J., Imai, Y. & Yamamoto, M.** (1993) *Schizosaccharomyces pombe map31* encodes the putative M-factor receptor. *Molecular and Cellular Biology*. **13**: 80–88.
- Tanaka, T., Katsuma, S., Adachi, T., Koshimizu, T.A., Hirasawa, A. & Tsujimoto, G.** (2007) Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. **377**: 523–527.
- Thaler, J.S., Owen, B. and Higgins, V.J.** (2004) The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology*. **135**: 530–538.
- Termorshuizen, A.J, van Rijn, E., van der Gaag, D.J., Alabouvette, C., Chen, Y., Lagerlof, J., Malandrakis, A.A., Paplomatas, E.J., Ramert, B., Ryckeboer, J., Steinberg, C., Zmora-Nahum, S.** (2006) Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems variability in pathogen response. *Soil Biology & Biochemistry*. **38**: 2461-2477.
- Tesmer, J.J., Berman, D.M., Gilman, 9A.G. & Sprang, S.R.** (1997) Structure of RGS4 bound to AIF4-activated Gi (α 1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell*. **89**: 251–261.
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F. and Cammue, B.P.A.** (2001) The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology*. **13**: 63–68.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, K.F.M.J. and Broekaert, W.F.** (1999). Requirement of functional Ethylene-Insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*. **121**: 1093–1101.
- Tjamos, S.E., Flemetakis, E., Paplomatas, E.J. and Katinakis, P.** (2005) Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant–Microbe Interactions*. **18**: 555–561.

- Tjamos, E. C., Biris, D. A., and Paplomatas, E. J.** (1991) Recovery of olive trees from *Verticillium* wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease*. **75**: 557-562.
- Tsitsigiannis, D.I. & Keller, N.P.** (2006) Oxylipins act as determinants of natural product biosynthesis and seed colonization in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. **59**: 882–892.
- Tsitsigiannis, D.I. & Keller, N.P.** (2007) Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends in Microbiology*. **15**: 109–118.
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M., Zarnowski, R. & Keller, N.P.** (2005b) Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*. **151**: 1809–1821.
- Tzima, A.K., Paplomatas E.J., Tsitsigiannis, D.I., Kang, S.** (2012) The G protein β subunit controls virulence and multiple growth and development-related traits in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*. doi:10.1016/j.fgb.2012.02.005
- Tzima, A.K., Paplomatas, E.J., Rauyaree, P., Ospina-Giraldo, M.D., and Kang S.** (2011) *VdSNF1*, the Sucrose Nonfermenting Protein Kinase Gene of *Verticillium dahliae*, Is Required for Virulence and Expression of Genes Involved in Cell-Wall Degradation. *Molecular Plant Microbe Interactions*. **24** (1): 129–142.
- Tzima, A., Paplomatas, E. J., Rauyaree, P., Kang, S.** (2010) Roles of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A in virulence and development of the soilborne plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*. **47**(5): 406–415
- Wang, J.-Y., Cai, Y., Gou, J.-Y., Mao, Y.-B., Xu, Y.-H., Jiang, W.-H. and Chen, X.-Y.** (2004a) VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 4989–4995.
- Wang, M.C. and Keen, N.T.** (1970) Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **141**: 749–757.
- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D.Y., Bell, L., Saari, G.C., Grant, F.J., O'Hara, P. & MacKay, V.L.** (1989) The *STE4* and *STE18* genes of yeast encode potential β and γ subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell*. **56**: 467–477.

- Williams, J., Hall, S.A., Hawkesford, M.J., Beale, M.H. and Cooper, R.M.** (2002) Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiology*. **128**: 150–159.
- Xu, J.R. & Hamer, J.E.** (1996) MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes and Development*. **10**: 2696–2706.
- Xu, H. P., White, M., Marcus, S., and Wigler, M.** (1994) Concerted action of RAS and G proteins in the sexual response pathways of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, **14**: 50–58.
- Xue, C., Hsueh, Y.P. & Heitman, J.** (2008) Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. **32**: 1010–1032
- Xue, C., Tada, Y., Dong, X. & Heitman, J.** (2007) The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host & Microbe*. **1**: 263–273.
- Xue, C., Bahn, Y.S., Cox, G.M. & Heitman, J.** (2006) G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP-PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell*. **17**: 667–679.
- Xue, Y., Batlle, M. & Hirsch, J.P.** (1998) *GPR1* encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G alpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO Journal*. **17**: 1996–2007.
- Yi, S, Sahni, N., Daniels, K.J., Pujol, C., Srikantha, T. & Soll, D.R.** (2008) The same receptor, G Protein, and mitogen-activated protein kinase pathway activate different downstream regulators in the alternative white and opaque pheromone responses of *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*. **19**: 957–970.
- Yu, J.H.** (2006) Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Microbiology*. **44**: 145–154.
- Zhao, X., Mehrabi, R., and Xu, J.R.** (2007) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Fungal Pathogenesis. *Eukaryotic Cell*. **6**(10): 1701–1714 .

Ελληνική Βιβλιογραφία

Παναγόπουλος, Χ.Γ.,2007. Αδρομυκώσεις, Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιάς, σελ: 206-217.

Τζάμος Ε., 2007. Γενική Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα – Πειραιάς.

Διαδύκτιο

1. web.aces.uiuc.edu
Nancy R. Pataky, Director of the Plant Disease Clinic, University Of Illinois, Verticillium Wilt Disease report on Plant Disease (1997).
2. http://www.cottoncrc.org.au/industry/Tools/Symptoms_Identification_Tool/Cotton_Symptoms?dd_sym%20cause=disease (σελ 4)
3. <http://g-protein.seebyseeing.net/> (σελ 21)
4. http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F09_13.html (σελ 23)
5. <http://www.mc.vanderbilt.edu/lens/article/?id=112&pg=999> (σελ 25)
6. http://www.bellbrooklabs.com/transcreener_rgscreen_assay_service.html (σελ. 28)
7. http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html (σελ 50)
8. http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html (σελ 50)
9. <http://www.broadinstitute.org/annotation/fungi/magnaporthe/> (σελ 50)
10. http://www.devbio.biology.gatech.edu/?page_id=1226 (σελ 32)