

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ. ΜΟΡ. ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**“ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΣΙΓΗΣΗ ΣΕ ΜΥΚΗΤΕΣ
ΚΑΙ ΩΟΜΥΚΗΤΕΣ”**

Σπανού Ζαχαρούλα

**Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Νικόλαος Πανόπουλος
Δεύτερος εξεταστής: Δρ. Κρίτων Καλαντίδης
Συνεπιβλέπων: Δρ. Νικόλαος Σκανδάλης
Συνεπιβλέπων: Dr. Arnaud BOTTIN**

Ηράκλειο Κρήτης, 2008

Στην μεγάλη μου αδυναμία . . .

τον πατέρα μου.

Ευχαριστίες

Αυτή η μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε, βέβαια, μετά από μεγάλη προσωπική προσπάθεια. Δεν είμαι όμως τόσο αγάριστη και αντιλαμβάνομαι ότι τίποτα δεν θα ήταν εφικτό αν δεν υπήρχαν καλοί συνεργάτες και φίλοι.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που τόσα χρόνια με στηρίζει τόσο ηθικά όσο και οικονομικά. Σε κάθε βήμα της ζωής μου βρίσκονται πάντα δίπλα μου, να με ακούν, να με αγαπούν για αυτό που είμαι και να με συμβουλεύουν. Επιπλέον ευχαριστώ, το Βικουλάκι μου, μια αληθινή φίλη που ακόμα και από μακριά τα λόγια της αποτελούν βάλσαμο.

Ο καθηγητής μου, κύριος Πανόπουλος Νικόλαος, αποτέλεσε εκτός από επιβλέπων καθηγητής, και καλός σύμβουλος. Οι συζητήσεις μας ήταν ουσιαστικές και αποτελούν κατευθυντήριες γραμμές για το μέλλον. Ευχαριστώ που μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριο του και να συμβάλλω και εγώ όσο μπορώ στο επιστημονικό του έργο. Επιπλέον, ευχαριστώ τα παιδιά του εργαστηρίου, Μαρίνα, Νίκο, Παναγιώτη και Σπυριδούλα, που με αγάλιασαν και μαζί διανύσαμε τόσα χρόνια συνεργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντά μου Σκανδάλη Νικόλαο για τη συνεργασία και την καθοδήγηση κατά την διάρκεια των πειραμάτων μου.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δεύτερο εξεταστή μου τον κύριο Καλαντίδη Κρίτωνα και την ομάδα του για την προθυμία τους να με βοηθήσουν σε όποιο πρόβλημα αντιμετώπισα. Δίχως την δική τους συμβολή τα πράγματα θα ήταν πολύ ζόρικα. Σας ευχαριστώ Έλενα, Heiko, Jutta, Νίκο και Τάσο.

Σειρά έχει τώρα το Εργαστήριο Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας. Τα μέλη αυτού του εργαστηρίου είναι πάνω από όλα φίλοι. Μαζί τους ανακάλυψα τα περισσότερα μέρη της Κρήτης και οι πιο ωραίες αναμνήσεις μου εδώ οφείλονται κατά ένα πολύ μεγάλο μέρος σε αυτή την παρέα. Ευχαριστώ, λοιπόν, πολύ τους: Αλεξάνδρα, Γιούλη Δημήτρη, Εύη και Θάνια. Επίσης, συμμετέχουν: Γιώργος και Μιχάλης.

Ειδική φυσικά παράγραφο και αναφορά στον Νίκο, που τον έχω μέσα στην καρδιά μου. Τι να πω για το Νίκο? Πραγματικά, μεγάλο στήριγμα. Σ' ευχαριστώ πολύ.

Τώρα που φεύγω, λοιπόν, είμαι χαρούμενη που κλείνει ένα κεφάλαιο από τη ζωή μου και ανυπομονώ για το επόμενο. Εις το επανειδείν!

Abstract

A diverse group of fungi and oomycetes, including members of the genera *Phytophthora* and *Colletotrichum* spp., have pathogenic lifestyles on the plants. Elucidation of disease mechanisms for such microorganisms is often hampered by lack of suitable genetic analysis tools. RNAi (RNA-mediated gene silencing) allows for the targeted inhibition of gene expression at the post-transcriptional level (gene “knockdown”). This method constitutes the most recent development in the repertoire of genetic analysis tools for eukaryotic organisms and is being increasingly employed in the investigation of host-pathogen interactions involving plants and lower eukaryotic pathogens. This dissertation describes preliminary efforts to establish RNAi-mediated methodologies in a plant pathogenic ascomycete (*Colletotrichum higginsianum*) and two oomycete phytopathogens (*Phytophthora parasitica* and *Aphanomyces euteiches*).

In order to develop and optimize the RNAi methodology we initially chose the *sgfp* gene as a suitable marker gene to be targeted. The strategy which was followed was to firstly introduce the gene into the organism under study and subsequently to trigger its silencing by introducing specially designed *sGfp*-specific silencing cassettes. To implement this strategy, we designed primers with *Eco*RI restriction sites and amplified a 330 nt sequence from the *sGfp* gene variant, cloned this fragment into the pENTRY3C vector (GATEWAY SYSTEM) in both directions, and, by applying two sequential LR reactions, one for each insert direction, we transferred them to the destination vector pK7GWIWG2(I),0, thus, constructing two hairpin cassettes (As/S and S/As). These hairpin cassettes were then transferred to two expression vectors, pNC2 for *Phytophthora* and the binary agrobacterium vector pBIG4MRBrev for *Colletotrichum*. A series of additional *sGfp* cassettes (sense and antisense) for stable transformation were also designed for the generation of *sGfp* expressing transformants and for silencing of the *sGfp* transgene. The hairpin and antisense cassettes were expected to generate double-stranded RNA molecules and eventually trigger the silencing of the *sGfp* marker gene. By applying fungal protoplast transformation and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, we attempted to induce the *sGfp* and silencing constructs. Putative positive transformants were obtained by selection for antibiotic resistance on appropriately supplemented agar plates and were examined for the presence of green fluorescent mycelium by fluorescence microscopy.

Efficient RNAi methodology would further enable the study of the biological role of putative fungal phytopathogenesis proteins (effectors) and genes such as those involved in cell wall biosynthesis. The cell walls of oomycetes were generally considered to be devoid of chitin. However, recent evidence indicated the presence of chitin as well as of putative chitin biosynthesis genes (*Chs*) in *P. parasitica* and *A. euteiches*. Accordingly, we sought to isolate *Chs* genes from *P. parasitica* and *A. euteiches*. Moreover, we sought to isolate *Chs* genes as a prelude to designing constructs for *Chs* gene silencing in these fungi. Two full-length *Chs* cDNAs were isolated from *A. euteiches* (encoding *Ae*CHS 1 and *Ae*CHS 2) and one partial-length *Chs* cDNA from *P. parasitica* (*Ppn0_Chs*) coding for the more conserved part of the protein. Phylogenetic analysis showed that the *Chs* genes in these oomycetes arose from duplication of an ancestral gene which gave origin to two distinct clades for *Chs* among phytopathogenic oomycetes. Based on the above, a silencing antisense cassette was designed for the *Ppn0_Chs* gene.

Περίληψη

Πολλοί μύκητες και ωομύκητες, συμπεριλαμβανομένων μελών των γενών *Phytophthora* και *Aphanomyces*, έχουν την ικανότητα να προκαλούν ασθένειες σε διάφορα είδη φυτών. Η έλλειψη διαθέσιμων εργαλείων μοριακής γενετικής ανάλυσης αποτελεί τροχοπέδη στις έρευνες επί των μηχανισμών πρόκλησης ασθενειών από τους εν λόγω μύκητες. Η γονιδιακή σίγηση επιτρέπει την στοχευμένη αναστολή της έκφρασης γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Αυτή η μέθοδος αποτελεί ένα σύγχρονο εργαλείο γενετικής ανάλυσης για τους ευκαρυώτες και χρησιμοποιείται ευρέως στην διαλεύκανση της αλληλεπίδρασης φυτών με τα παθογόνα τους. Σε αυτή τη διατριβή περιγράφονται οι προσπάθειες βελτίωσης και εφαρμογής μεθοδολογιών σίγησης σε ένα φυτοπαθογόνο ασκομύκητα (*Colletotrichum higginsianum*) και σε δύο φυτοπαθογόνους ωομύκητες (*Phytophthora parasitica* και *Aphanomyces euteiches*).

Αρχικά για τη βελτίωση και εφαρμογή της μεθόδου της σίγησης επελέχθη ως γονίδιο αναφοράς το *sGfp*. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε αφορούσε την αρχική εισαγωγή του γονιδίου στον μύκητα και στη συνέχεια την επαγωγή του μηχανισμού σίγησης στο μύκητα εισάγοντας ειδικά σχεδιασμένες σιγητικές κασέτες για το *sGfp*. Σχεδιάστηκαν εκκινητές με περιοριστικές θέσεις *EcoRI* και απομονώσαμε με PCR τμήμα του *sGfp* 330nt. Το τμήμα αυτό κλωνοποιήθηκε στον φορέα pENTRY3C και στις δύο κατευθύνσεις, και εφαρμόζοντας δύο LR αντιδράσεις (μια για κάθε κατεύθυνση), μεταφέρθηκε τελικά στον φορέα Gateway pK7GWIWG2(I),0 ώστε να προκύψουν δύο σιγητικές φουρκέτες (As/S and S/As). Αυτές οι δύο σιγητικές φουρκέτες μεταφερθηκαν στη συνέχεια σε δύο φορείς έκφρασης, τον pNC2 για την *Phytophthora* και τον δυαδικό αγροβακτηριακό φορέα pBIG4MRBrev για το *Colletotrichum*. Επίσης σχεδιάστηκαν μια σειρά από άλλες *sGfp* κασέτες (sense και antisense) για σταθερό μετασχηματισμό με σκοπό την δημιουργία *sGfp* στελεχών και για την μετέπειτα σίγηση του ενδογενούς *sGfp* γονιδίου τους. Αναμένετο οι φουρκέτες και οι antisense κασέτες να δημιουργήσουν μόρια dsRNA και να επάγουν τον μηχανισμό σίγησης στο μύκητα για το γονίδιο αναφοράς *sGfp*. Επιχειρήθηκε η εισαγωγή του *sGfp* και των σιγητικών κασετών στους παραπάνω μικροοργανισμούς με μετασχηματισμό σε πρωτοπλάστες και με τη χρήση αγροβακτηρίου. Φαινομενικά θετικά στελέχη επιλέχθηκαν με βάση την ανθεκτικότητα τους σε αντιβιοτικό και ελέχθηκαν για την παρουσία της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης κάτω από μικροσκόπιο παρουσία υπεριώδους.

Αποτελεσματική μέθοδος πρόκλησης της σίγησης παρέχει τη δυνατότητα μελέτης του βιολογικού ρόλου πιθανών παραγόντων παθογένειας των μυκήτων και γονιδίων των οποίων εμπλέκονται στην σύνθεση του κυτταρικού τους τοιχώματος. Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη: βασικό χαρακτηριστικό των ωομυκήτων είναι η απουσία χιτίνης στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Όμως, πρόσφατες έρευνες απέδειξαν την παρουσία χιτίνης όπως επίσης και γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεσή της (*Chs*) στην *P. parasitica* και στον *A. euteiches*. Στην παρούσα διατριβή επιχειρήθηκε η απομόνωση *Chs* γονιδίων από την *P. parasitica* και τον *A. euteiches*, με σκοπό το σχεδιασμό σιγητικών κατασκευών για αυτά τα γονίδια. Απομονώθηκαν δύο πλήρους μήκους *Chs* cDNAs από τον *A. euteiches*, που κωδικοποιούν τις συνθάσες *AeCHS* 1 και *AeCHS* 2, και ένα μερικού μήκους *Chs* cDNA από την *P. parasitica* (*Ppn0_ChS*) που κωδικοποιεί την πιο συντηρημένη περιοχή της πρωτεΐνης. Φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα *Chs* γονίδια αυτών των ωομυκήτων προέρχονται από διπλασιασμό ενός κοινού γονιδίου που έδωσε δύο διακριτές υποδιαίρεσεις για τα *Chs* γονίδια των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Με βάση τα παραπάνω, σχεδιάστηκε γονιδιακή κασέτα (As) για το *Ppn0_ChS* γονίδιο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΩΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:	8
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:	23
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:	38
ΣΥΖΗΤΗΣΗ:	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	59

ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:	68
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:	71
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:	74
ΣΥΖΗΤΗΣΗ:	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	89

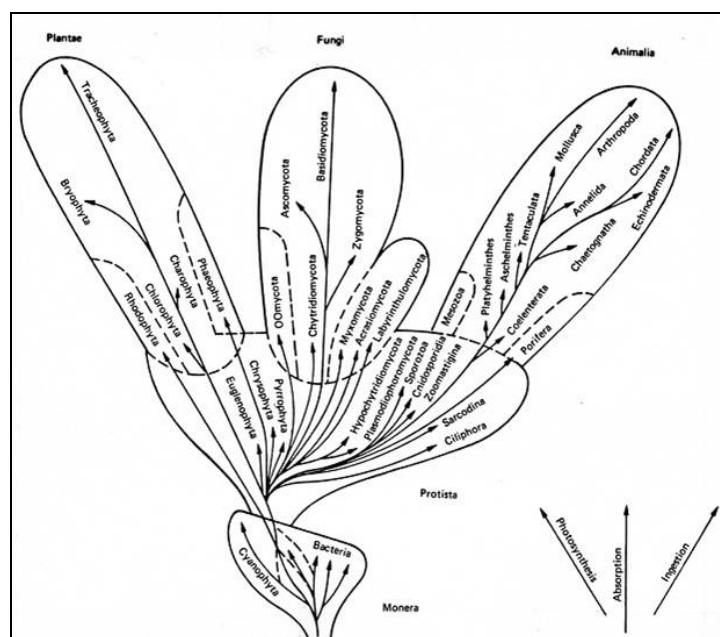
Πρώτη Ενότητα

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΙΓΗΣΗΣ
ΓΙΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ
ΣΕ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΩΟΜΥΚΗΤΕΣ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

Χαρακτηριστικά των Μυκήτων

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, ετερότροφοι, που τυπικά έχουν ένα θαλλό (μυκήλιο) αποτελούμενο από διακλαδιζόμενα σωληνοειδή νημάτια, τις υφές, με κυτταρικό τοίχωμα του οποίου το κύριο δομικό συστατικό είναι η χιτίνη. Οι υφές εκκρίνουν εξωκυτταρικά ένζυμα που διασπών τις οργανικές ουσίες του υποστρώματος ή συστατικά του ξενιστή στον οποίο αναπτύσσονται και προσλαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξή τους. Οι μύκητες αναπαράγονται αγενώς και εγγενώς και παράγουν σπόρια ποικίλης μορφολογίας, έχουν όμως ουσιώδεις διαφορές από τα φυτικά σπέρματα διότι δεν περιέχουν προσχηματισμένο έμβρυο. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά οδήγησαν τους ερευνητές να προτείνουν ένα ξεχωριστό βασίλειο, αυτό των Μυκήτων [82].



Εικόνα 1: Το φυλογενετικό δέντρο των πέντε βασιλείων κατά Whittaker.

Η κλασική ταξινόμηση των μυκήτων, που βασιζόταν αρχικά σε μορφολογικά, φυσιολογικά και άλλα μη μοριακά κριτήρια δεν κατέληξε σε ένα ενιαίο σύστημα με αποτέλεσμα να υπάρχουν διάφορα συστήματα ταξινόμησης των μυκήτων. Το βασίλειο των Μυκήτων διακρίνεται σε 4 φύλα, με βάση τη μέθοδο παραγωγής και το είδος των εγγενών σπορίων τους: Χυτριομύκητες, Ζυγομύκητες, Βασιοδιομύκητες και Ασκομύκητες.

Μύκητες ως παθογόνα φυτών

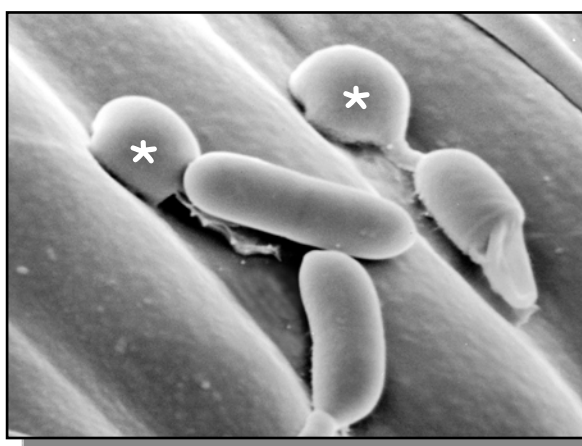
Πολλοί μύκητες έχουν την ικανότητα να προκαλούν ασθένειες (pathogenicity) σε διάφορα είδη καλλιεργούμενων και μη φυτών. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο μύκητας είναι το παθογόνο ή παράσιτο και το φυτό ο ξενιστής. Ανάλογα με τη σημασία του παρασιτισμού για την επιβίωση τους, οι φυτοπαθογόνοι μύκητες διακρίνονται σε υποχρεωτικά παράσιτα (obligate parasites), προαιρετικά παράσιτα (facultative parasites) και προαιρετικά σαπρόφυτα (facultative saprophytes). Ο σκοπός του παρασιτισμού είναι η αξιοποίηση θρεπτικών συστατικών από το φυτό και η συνέχιση του κύκλου ζωής του παθογόνου στον ξενιστή.

Για να υπάρξει μια επιτυχής μόλυνση ένα κρίσιμο στάδιο είναι η αρχική διείσδυση του παράσιτου στον φυτικό ιστό (penetration) [49]. Με σκοπό να ξεπεράσουν τους διάφορους φυσικούς φραγμούς που παρουσιάζονται τα φυτικά όργανα (π.χ. φύλλα, ρίζα), οι μύκητες έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς. Τα υποχρεωτικά παράσιτα δεν προκαλούν τον άμεσο θάνατο των κυττάρων του ξενιστή τους, αλλά προσπορίζονται τις απαραίτητες για αυτά θρεπτικές ουσίες, μέσω εισόδου στα κύτταρα του ξενιστή, ή δημιουργίας στενής φυσιολογικής/βιοχημικής επικοινωνίας με αυτά. Τρέφονται, δηλαδή απομυζώντας ζωντανά κύτταρα και συνεπώς είναι ως προς τον τύπο θρέψης τους, βιότροφοι οργανισμοί (π.χ. μέλη του γένους *Colletotrichum*). Αντίθετα, η συντριπτική πλειοψηφία των μη-υποχρεωτικών παρασίτων παράγει τοξίνες και υδρολυτικά ή άλλα ένζυμα, τα οποία προκαλούν την άμεση καταστροφή των κυττάρων του ξενιστή και στη συνέχεια τρέφονται από τις ουσίες που προκύπτουν από την αποικοδόμηση των φυτικών κυττάρων. Ο τρόπος θρέψης τους ομοιάζει με αυτό τον σαπροφυτικών οργανισμών.

Μιά απαραίτητη προϋπόθεση για μια επιτυχή μόλυνση είναι η φυσική επαφή παθογόνου-ξενιστή [39] και πρόσφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. διασπορά με άνεμο, βροχή, έντομα, φορείς κτλ.). Η μόλυνση ενός φυτού-ξενιστή από το παθογόνο γίνεται είτε με τα σπόριά τους, είτε με τις υφές τους, είτε τέλος με ειδικές δομές όπως τα βλαστώνοντα σκληρώτια. Μια δεύτερη προϋπόθεση για να υπάρξει επιτυχής μόλυνση και εξέλιξη της ασθένειας είναι η μη “αναγνώριση” του μύκητα ως παθογόνο από το φυτό [83]. Αυτή η διαδικασία αλληλεπίδρασης είναι εξειδικευμένη, γενετικά καθορισμένη και βασισμένη σε μόρια-σήματα αναγνώρισης από το φυτό και το παθογόνο. Στην περίπτωση της μόλυνσης από σπόρια μυκήτων, η διαδικασία αναγνώρισης αρχίζει από το στάδιο της βλάστησης των σπορίων του μύκητα. Ο

βλαστικός σωλήνας που σχηματίζεται στη φυτική επιφάνεια είναι το όργανο του μύκητα που θα επιτύχει το επόμενο στάδιο της μόλυνσης, δηλαδή την είσοδο του παθογόνου στους φυτικούς ιστούς. Το στάδιο της βλάστησης εξαρτάται σημαντικά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως θερμοκρασία, υγρασία, παρουσία ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας και φυτικές εκκρίσεις [11].

Η αναγνώριση συνεχίζεται κατά τη διαδικασία εισόδου του παθογόνου στο κύτταρο-ιστολογικό εσωτερικό του ξενιστή, και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί διαφέρουν από το εκάστοτε ζεύγος παθογόνου-ξενιστή. Η είσοδος μπορεί να γίνει είτε από φυσικές οπές του φυτού (π.χ. στομάτια) [33, 62], είτε από πληγές στον καλυπτήριο ιστό (π.χ. μηχανικές βλάβες από έντομα, χαλάζι ή άλλες αιτίες), είτε με ενεργή διάτρηση άθικτων φυτικών ιστών από το παθογόνο. Στην τελευταία περίπτωση η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα απαιτεί την παρουσία ύδατος, ενώ η επιφάνεια της φυτικής εφυμενίδας παρέχει επαρκή θρεπτικά συστατικά για την αρχική ανάπτυξη του μύκητα. Στο άκρο του βλαστικού σωλήνα σχηματίζεται μια δισκοειδής δομή, το απρεσόριο, που χρησιμεύει στη προσκόλληση της βλαστητικής υφής του



Εικόνα 2: Σχηματισμός απρεσορίου (αστερίσκος) από το *Colletotrichum lindemuthianum*.

σπορίου στην επιφάνεια του φυτού. Παράλληλα, από το απρεσόριο σχηματίζεται μια λεπτή υφή, η υφή μόλυνσης, η οποία διαπερνά την εφυμενίδα και εισέρχεται στον μεσοκυττάριο χώρο του υποκείμενου ιστού [58]. Η υφή μόλυνσης λαμβάνει στη συνέχεια το κανονικό της μέγεθος ενώ ταυτόχρονα ασκεί διαρκή πίεση [35]. Τα υποκείμενα τοιχώματα των επιδερμικών κυττάρων λύνονται με τη χρήση ενζύμων και την άσκηση μηχανικής πίεσης [35, 72] και τελικά η υφή μόλυνσης εισέρχεται στο παρέγχυμα. Σε άλλες περιπτώσεις ο μύκητας μπορεί να αναπτύσσεται στους μεσοκυττάριους χώρους του ιστού και να τρέφεται μέσω μυζητήρων που εισέρχονται στα παρακείμενα κύτταρα. Στην περίπτωση μυκήτων του γένους *Fusarium*, που προσβάλλει τη ρίζα, οι υφές εισέρχονται απευθείας στο έσω- ή ενδο- κυτταρικό χώρο διατρύπωντας την στοιβάδα των επιδερμικών κυττάρων [65].

Colletotrichum higginsianum

Το μεγάλο γένος των Ασκομυκήτων, *Colletotrichum*, είναι μια από τις οικονομικά σημαντικότερες ομάδες φυτικών παθογόνων που προκαλούν την ασθένεια της “ανθράκωσης” (anthracnose) και του κανίματος (blight) σε μεγάλο εύρος εύκρατων και τροπικών καλλιεργειών. Καλλιέργειες τις οποίες προσβάλλει είναι τα δημητριακά, λαχανικά και φρούτα [1]. Συγκεκριμένα, το *C. higginsianum* προκαλεί την ανθράκωση



Εικόνα 3: Συμπτώματα ανθράκωσης μετά από μόλυνση του *Colletotrichum lagenarium* σε κολοκυνθοειδές.

(μαύρες κηλίδες στα φύλλα) σε μεγάλο εύρος φυτών της οικογένειας Cruciferae στις νότιες Η.Π.Α, στην Ιαπωνία, στις Δυτικές Ινδίες και στην Νοτιοανατολική Ασία [70]. Ένα άλλο φυτό που μολύνει επιτυχώς είναι το *Arabidopsis thaliana*, φυτό μοντέλο του οποίου το γονιδίωμα είναι πλήρως αλληλουχημένο και διατίθενται ποικίλες σειρές μεταλλάξεων του [57]. Έτσι, αυτό το παθοσύστημα αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη της παθογένειας του μύκητα και τον αμυντικό μηχανισμό του φυτού.

Ως οργανισμός μοντέλο για την διεξαγωγή πειραμάτων, τα είδη του γένους *Colletotrichum* έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι απλοειδείς οργανισμοί και έτσι δεν είναι πολύπλοκοι σε πειράματα κλασσικής γενετικής ανάλυσης και σε πειράματα knock-out. Επίσης, ο μύκητας αυτός μπορεί και καλλιεργείται αξενικά και να μετασηματίζεται, γεγονός που διευκολύνει πειράματα τη γενετική ανάλυση μεταλλάξεων (mutational analysis) και την ταυτοποίηση γονιδιακών λειτουργιών μετά από στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων [19, 63, 64]. Επίσης, κονίδια του μύκητα μπορούν να μετασηματιστούν με πολύ μεγάλη ευχέρεια με την μεταφορά T-DNA από το *Agrobacterium tumefaciens*.

Πολλά είδη του γένους *Colletotrichum* χρησιμοποιούν μια ενδιαφέρουσα στρατηγική ημιβιοτροφικής μόλυνσης [51] κατά την οποία ο μύκητας αρχικά αναπτύσσεται στο εσωτερικό των ζωντανών φυτικών κυττάρων απομυζώντας θρεπτικά συστατικά από τον ξενιστή (βιοτροφική φάση), ενώ στη συνέχεια μεταπίπτει σε μια καταστροφική για το φυτό επέκταση (νεκροτροφική φάση) [55, 56, 79]. Τα ασκοσπόρια αυτών των μυκήτων διασπείρονται στο περιβάλλον με το νερό

και βλαστάνουν σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας (92%), ενώ οι πρωτογενείς και δευτερογενείς μολύνσεις γίνονται με κονίδια με απευθείας διάτρηση της εφυμενίδας (παραγωγή λυτικών ενζύμων). Κατά τη διάρκεια της μολυσματικής διαδικασίας ο μύκητας σχηματίζει ποικίλες, εξειδικευμένες δομές όπως βλαστικούς σωλήνες, απρεσόρια, υφές διείσδυσης (infection pegs), βιοτροφικές πρωτογενείς υφές (δομή παρόμοια με τον μυζητήρα της *Phytophthora*) και δευτερογενείς νεκροτροφικές υφές [60]. Για τους παραπάνω λόγους τα είδη του *Colletotrichum* θεωρούνται ελκυστικά μοντέλα για έρευνα σχετική με την μοριακή βάση της παθογένειας των μυκήτων [18, 61].

Ωομύκητες

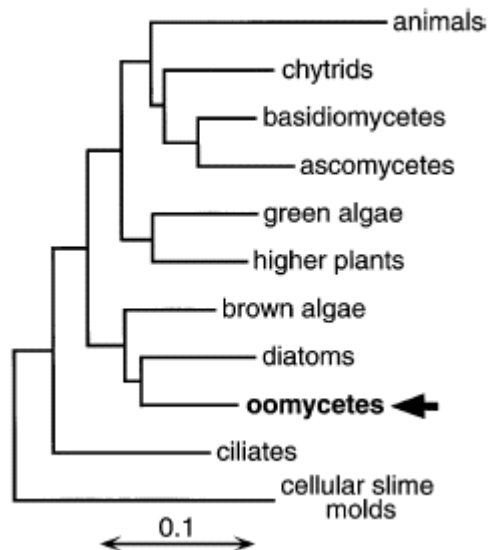
Οι Ωομύκητες αρχικά είχαν ενταχθεί στο βασίλειο των Μυκήτων λόγω των μορφολογικών και φυσιολογικών ομοιοτήτων μεταξύ τους [47]. Πρόκειται για νηματοειδείς μύκητες που παράγουν σπόρια και παρουσιάζουν παρόμοιες στρατηγικές μόλυνσης του ξενιστή τους με αυτές των μυκήτων (σχηματισμός απρεσόριου και μυζητήρα). Επίσης, το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από πολυσακχαρίτες και ακολουθούν ετερότροφο τύπο θρέψης.

Όμως υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των Μυκήτων και των Ωομυκήτων, γεγονός που οδήγησε στον πλήρη φυλογενετικό διαχωρισμό τους:

1. Οι μύκητες είναι απλοειδείς (n) ή δικάρυοι (n) στο μεγαλύτερο τμήμα του κύκλου ζωής τους, ενώ οι Ωομύκητες είναι διπλοειδείς (2n) (διπλοειδής θαλλός στον οποίο η μείωση συμβαίνει στα γαμετάγγεια)
2. Αγενής αναπαραγωγή με ποικιλία διμαστιγωτών ζωοσπορίων.
3. Ωογονική αναπαραγωγή μέσω γαμεταγγειακής επαφής που οδηγεί στην παραγωγή εγγενών σπορίων, τα ωοσπόρια.
4. Οι μυκηλιακές υφές των μυκήτων έχουν διαχωριστικά διαφράγματα (septa), ενώ αυτές των Ωομυκήτων έχουν συγκήτια.
5. Πολλοί Ωομύκητες παρουσιάζουν μερική αυξοτροφία για στερόλες. Οι μεμβράνες τους περιέχουν λιπίδια με ασυνήθιστη δομή και μακριές αλυσίδες λιπαρών οξέων τα οποία πιθανώς αντικαθιστούν τα μόρια στερόλης των μυκηλιακών μεμβρανών.
6. Μύκητες και Ωομύκητες συνθέτουν λυσίνη από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια.

7. Τα κυτταρικά τοιχώματα των Ωομυκήτων συνθέτονται κυρίως από κυτταρίνη και όχι χιτίνη [42], όπως συμβαίνει με τους Μύκητες.

Γενικά πολλά συστήματα ταξινόμησης των μυκήτων προτάθηκαν κατά καιρούς, ανάλογα με τα κριτήρια ταξινόμησης τους. Οι Ωομύκητες αποτελούν μια ξεχωριστή κλάση και θεωρούνται Ψευδομύκητες (οργανισμοί που ομοιάζουν με μύκητες). Μετά από μελέτες στο rRNA, το μεταβολισμό και τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματός τους βρέθηκε ότι οι Ωομύκητες είναι συγγενέστεροι με τα Φύκη (Brown Algae) και τα Διάτομα, παρά με τους υπόλοιπους Μύκητες [36, 12, 66].

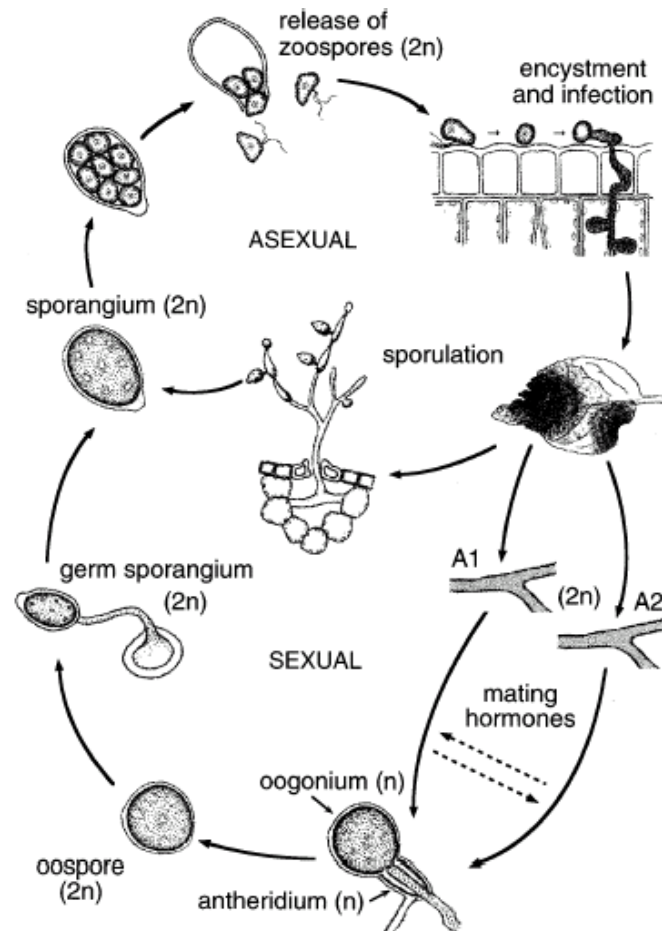


Εικόνα 4: Φυλογενετική κατάταξη των Ωομυκήτων σε σχέση με τους υπόλοιπους μύκητες, βασιζόμενη στη σύγκριση των 16S rRNA αλληλουχιών.

Αναπαραγωγή των Ωομυκήτων:

Οι Ωομύκητες χαρακτηρίζονται ως ευκαρπικοί μύκητες (τμήμα του θαλλού του, και όχι ολόκληρος, μετατρέπεται σε αναπαραγωγικό όργανο) και κατά την αγενή αναπαραγωγή τους παράγουν ζωοσπόρια μέσα σε ζωοσποριάγγεια. Τα ζωοσποριάγγεια φέρουν δύο μαστίγια με αντίθετη κατεύθυνση. Κατά την διάδοση του μύκητα, σπάζει το ζωοσποριάγγειο, μεταδίδεται αερογενώς μέχρι να συναντήσει ξενιστή και να εκβλαστήσουν τα σπόρια. Τα γλαυδοσπόρια των Ωομυκήτων, ως δομές αγενούς αναπαραγωγής, δίνουν τη δυνατότητα στο μικροοργανισμό να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα, από εποχή σε εποχή [36, 54].

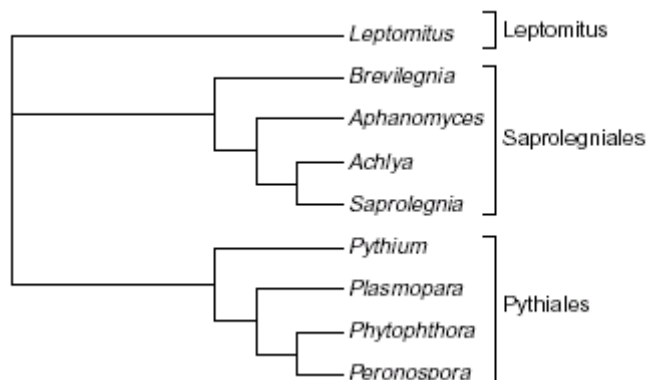
Η εγγενής αναπαραγωγή τους, μια σπάνια διαδικασία, γίνεται με τη συνένωση δύο μορφολογικά διαφοροποιημένων σποραγγείων, του ανθηριδίου (αρσενικό) και του ωογονίου (θηλυκό). Το προϊόν της συνένωσης, ο ζυγώτης, ονομάζεται ωοσπόριο.



Εικόνα 5: Κύκλος αναπαραγωγής των Ωομυκήτων.

Τα αγενή σπόρια είναι σημαντικά για την βιολογία των Ωομυκήτων, επειδή αποτελούν την κύρια μορφή διάδοσής τους στη φύση. Ένας μύκητας μπορεί να πολλαπλασιαστεί αγενώς περισσότερες της μιας φορές ετησίως, ενώ εγγενή σπόρια βλαστάνουν μια φορά ετησίως και αποτελούν κατά κανόνα τη μορφή διαχείμασης του μύκητα. Επιπλέον, η σημασία της αγενούς αναπαραγωγής των μυκήτων, έγκειται στο γεγονός ότι τα προϊόντα της αποτελούν τη μολυσματική μορφή των παθογόνων μυκήτων. Παραδείγματος χάριν, στη *Phytophthora*, τα ζωοσπόρια είναι γνωστό ότι μεταφέρονται με τη βοήθεια του νερού στους κορμούς των δέντρων, διαμέσου των αυλακώσεων που σχηματίζει ο φλοιός τους και παραμένουν εκεί μέχρι να έρθουν οι κατάλληλες συνθήκες για να εκβλαστήσουν.

Οι Ωομύκητες με τον παρασιτικό τρόπο δράσης τους έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή καλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο, αλλά και φυσικών φυτικών πληθυσμών [20]. Στους Ωομύκητες συμπεριλαμβάνονται τα γένη *Phytophthora* και *Aphanomyces* καθένα από τα οποία περιλαμβάνει σημαντικά είδη φυτοπαθογόνων.



Εικόνα 6: Φυλογενετικό δέντρο των γενών των Ωομυκήτων.

Από την κλάση των Ωομυκήτων το γένος *Phytophthora* είναι το πιο διαδεδομένο και γνωστό για τις ολέθριες καταστροφές του σε καλλιεργούμενα φυτά. Η *Phytophthora* ανήκει στο βασίλειο των Στραμενοφίλων (Stramenophiles). Η *Phytophthora* είναι ημιβιότροφος ωομύκητας που αρχικά τρέφεται από τα ζωντανά φυτικά κύτταρα και μετά τα καταστρέφει, μια στρατηγική όμοια με αυτή που ακολουθεί ο Ασκομύκητας *Colletotrichum*. Τα διάφορα είδη του γένους *Phytophthora* (περίπου 60 σε αριθμό) είναι αιτία καταστροφών φυτικών εκτάσεων, αξίας χιλιάδων εκατομμυρίων δολαρίων κάθε χρόνο. Τα καλλιεργούμενα είδη που συνήθως πλήττονται είναι μεταξύ άλλων η πατάτα, η τομάτα, το κακάο και η σόγια. Παράλληλα, έχει απομονωθεί και από καλλωπιστικά φυτά [54]. Η *Phytophthora parasitica* μολύνει μια πλειάδα φυτικών ξενιστών, μεταξύ των οποίων και ο καπνός [41]. Στην *Phytophthora infestans* οφείλεται η λιμοκτονία των Ιρλανδών στα μέσα της δεκαετίας του 1840, όταν όλες οι καλλιέργειες πατάτας προσβλήθηκαν από την ασθένεια του (περονόσπορο). Επίσης, το Μάρτη του 2004 δέκα χιλιάδες βελανιδιές καταστράφηκαν κατά μήκος της ακτογραμμής της Καλιφόρνιας λόγω προσβολής από τη *Phytophthora ramorum*, η επιδημία της οποίας συνεχίζει να εξαπλώνεται βάζοντας σε κίνδυνο και την υπόλοιπη φυσική χλωρίδα της Αμερικής και της Ευρώπης.

Στην προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών παθογένειας των Ωομυκήτων σε φυτά ένα σημαντικό βήμα ήταν η αλληλούχηση του γονιδιώματος της *P. infestans*.

Η ανάλυση του γονιδιώματος αποκάλυψε ένα γένωμα μήκους 250 Mb, διπλάσιο αυτού του *Arabidopsis* [36, 42]. Το γένωμα του *Phytophthora sojae* είναι περίπου 90 Mb και της *P. ramorum* μόλις 55 Mb. Σε εξέλιξη βρίσκεται και η γονιδιωματική αλληλούχιση για άλλα είδη της *Phytophthora*. Παράλληλα, μια συλλογή 8.000 ESTs της *P. parasitica* έχει ήδη κατασκευαστεί και μελετάται από ερευνητική ομάδα στη Γαλλία (προσωπική πληροφορία, Dr. Arnaud Bottin).

Το παθογόνο *Aphanomyces euteiches*, ένα από τα σημαντικότερα παράσιτα ριζών των οσπρίων και ψυχανθών (μπιζέλι, μηδική, φασόλι) [59], θέτοντας σε κίνδυνο την Ευρωπαϊκή παραγωγή φυτικών πρωτεϊνών από ψυχανθή [37]. Επιβιώνει στο χώμα και μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί κανένας αποτελεσματικός τρόπος χημικής καταπολέμησής του. Ο *Aphanomyces* ανήκει στο βασίλειο των Στραμενοφίλων (Stramenophiles) [41] ως νεκρότροφος μύκητας, νεκρώνει τους ιστούς του ξενιστή πριν σχηματίσει αποικίες σε αυτούς και συνεπώς τρέφεται από νεκρά φυτικά κύτταρα. Μελέτες έχουν γίνει για την μοριακή ανάλυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του *A. euteiches* και του μοντέλου-φυτού, *Medicago truncatula* [25] και μια συλλογή 19000 ESTs από τον *A. euteiches*, που οδήγησε στην συναρμολόγηση 8.000 περίπου μοναδικών γονιδίων, έχει δημιουργηθεί πρόσφατα με σκοπό την εύρεση νέων παραγόντων παθογένειας [48, 24]. Ωομύκητες και Μύκητες, δύο ομάδες εξελικτικά μακρινές παρουσιάζουν κοινούς μηχανισμούς επιβίωσης και κοινούς ξενιστές. Ως νηματοειδείς μικροοργανισμοί έχουν κοινό μηχανισμό μόλυνσης. Επομένως, συγκριτική γενωμική ανάλυση μέσω των ESTs συλλογών μεταξύ Ωομυκήτων και Μυκήτων θα διευκολύνουν την ανακάλυψη και μελέτη γονιδίων παθογένειας (virulence genes) [18].

Κατά καιρούς, δημιουργούνται από τους φυτογενετιστές ανθεκτικές φυτικές ποικιλίες οι οποίες κρατούν την ανθεκτικότητά τους για κάποιο χρονικό διάστημα σε πολύ καλά επίπεδα μέχρι κάποια νέα φυγή του παθογόνου να εμφανιστεί. Αυτοί οι διαρκώς επαναλαμβανόμενοι κύκλοι επιδημιών κάνουν επιτακτική την ανάγκη για διαλεύκανση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης αυτών των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών με τους ξενιστές τους σε βάθος [54].

Μηχανισμός πρόκλησης Ασθενειών

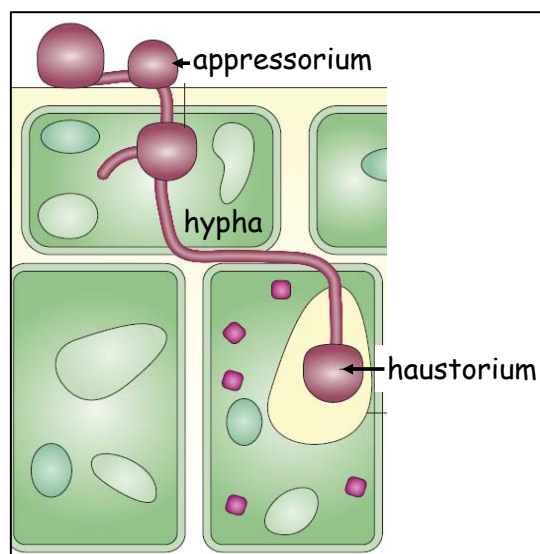
Οι Ωομύκητες ζουν ως παράσιτα των φυτών. Κατά την αλληλεπίδραση φυτών-παρασίτων διαδραματίζεται μια σειρά από γεγονότα σε μοριακό, βιοχημικό και φυσιολογικό επίπεδο, με συνέπειες για τον ξενιστή. Αυτές είναι η αφαίρεση ύδατος και θρεπτικών από τον ξενιστή προς όφελος του παθογόνου, και την παραγωγή ενός πλήθους βλαπτικών για το φυτό ουσιών, που προέρχονται είτε από το παθογόνο είτε από το φυτό ως αντίδραση κατά της προσβολής [7].

Οι Ωομύκητες για να εγκατασταθούν στον ξενιστή και να παρασιτήσουν έχουν αναπτύξει δομές που συμβάλλουν σε αυτό το σκοπό. Αφού εκβλαστήσει το σπόριο, δημιουργείται ένας δισκοειδής σχηματισμός, το απρεσόριο, που συμβάλει στην προσκόλληση του μύκητα. Στη συνέχεια, σωληνοειδής σχηματισμός (υφή μόλυνσης) διεισδύει στο εσωτερικό του φυτικού ιστού και μένει είτε στον αποπλαστικό χώρο είτε εισέρχεται στον κυτταροπλασματικό [7, 18, 42].

Κατά την διάρκεια των πρώτων σταδίων μόλυνσης, οι μικροοργανισμοί αυτοί εγκαθιστούν μία βιοτροφική σχέση με το φυτικό ξενιστή, μεγαλώνοντας μεταξύ ζωντανού φυτικού ιστού, όπου και δημιουργούν σχηματισμούς όπως οι μυζητήρες με την βοήθεια των οποίων απορροφούν θρεπτικά στοιχεία από τα φυτικά κύτταρα [9, 43].

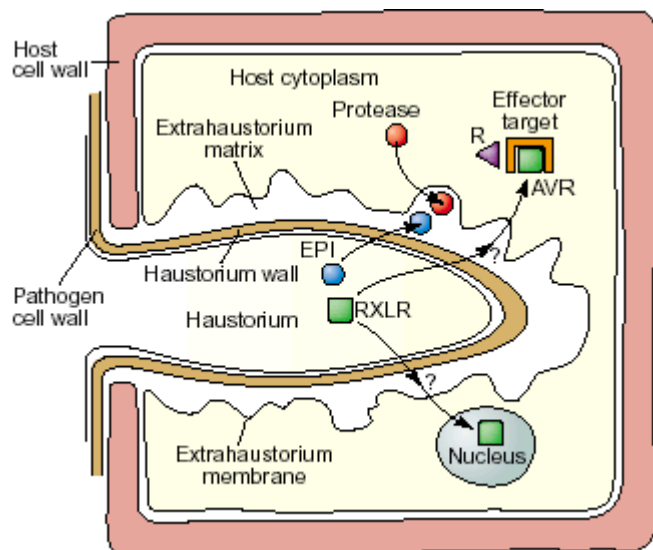
Η παθογόνος ικανότητα τους αποδίδεται στην παραγωγή και έκκριση από τη μεριά τους προς το φυτό παραγόντων παθογένειας, βιομορίων που επιρεάζουν τη δομή και λειτουργία του κυττάρου-ξενιστή προς όφελος του παθογόνου. Οι παράγοντες παθογένειας που εκκρίνουν κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες [43]:

- Αποπλαστικοί, που εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο μεταξύ των φυτικών κυττάρων-ξενιστή. Εκεί, αλληλεπιδρούν με επιφανειακούς υποδοχείς ή με εξωκυτταρικούς στόχους.



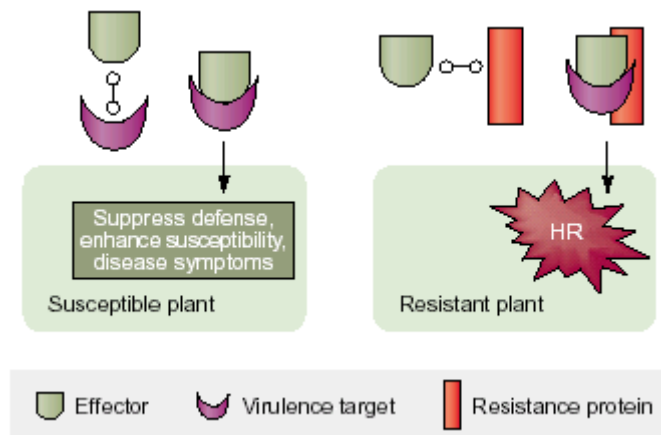
Εικόνα 7: Ο σχηματισμός χαρακτηριστικών δομών κατά την μολυσματική δράση των Ωομυκήτων.

- Κυτταροπλασματικοί, διοχετεύονται στο εσωτερικό του κυττάρου και εντοπίζονται στα ανάλογα με τη δράση τους υποκυτταρικά διαμερίσματα. Η μεταφορά τους γίνεται με ειδικές δομικές κατασκευές, μολυσματικά κυστίδια ή μυζητήρες, και στη συνέχεια κατευθύνονται είτε στο κυτταρόπλασμα είτε και στον πυρήνα. Σε αυτή την οικογένεια ανήκουν οι παράγοντες παθογένειας, πρωτεΐνες που μεταφέρονται [15]. Πρόσφατα, σε μια σειρά από διαφορετικούς Ωομύκητες βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε πως όλοι οι παράγοντες παθογένειας έχουν ένα κοινό μοτίβο (RxLR) κάτωθι από το αμινοτελικό σινιάλο έκκρισης. Αυτό το μοτίβο είναι παρόμοιο με το μοτίβο που συμμετέχει στην μεταφορά παραγόντων μολυσματικότητας εντός του κυτταροπλάσματος των ερυθροκυττάρων στην περίπτωση της ελονοσίας [43, 46, 80].



Εικόνα 8: Πιθανοί εντοπισμοί των κυτταροπλασματικών effectors μετά την έκκρισή τους από το μυζητήρα.

Η αλληλεπίδραση φυτού-παθογόνου διαμεσολαβείται από μια σειρά πρωτεϊνών και άλλων παραγόντων παθογένειας, συμβάλλοντας στον επαναπρογραμματισμό του αμυντικού ρολογιού του φυτού και την καταστολή του αμυντικού του μηχανισμού [28]. Φυσικά ο κανόνας είναι η εμφάνιση της ανθεκτικότητας. Γι' αυτό το σκοπό πιστεύεται ότι παρουσιάζεται μεγάλη ποικιλία στις πλούσιες σε λευκίνη περιοχές των R πρωτεϊνών, ώστε να αντιμετωπίζεται μεγαλύτερο εύρος παθογόνων.



Εικόνα 9: Τρόποι δράσης των effectors με τους κυτταρικούς στόχους του ξενιστή.

Τα gram αρνητικά βακτήρια έχουν παρουσιάσει δύο συστήματα μεταφοράς effectors στο κύτταρο-ξενιστή. Το Εκκριτικό Σύστημα Τύπου III (T3SS) συμβάλλει στην απευθείας έκκριση πρωτεϊνικών παραγόντων παθογένειας (Type III effectors) στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, ενώ το Εκκριτικό Σύστημα Τύπου II (T2SS) τους μεταφέρει στον αποπλαστικό χώρο. Οι μύκητες φαίνεται ότι έχουν επιτύχει και τα δύο με ένα μόνο σύστημα μεταφοράς και έκκρισης, μια δομή. Η δομή αυτή είναι ο μυζητήρας, που σε πρώτη φάση σχηματίζεται για την θρέψη του μύκητα και σε δεύτερη φάση για την επαγωγή της μολυσματικότητας του παθογόνου [3]. Οι πρωτεϊνικοί παράγοντες παθογένειας εκκρίνονται αρχικά στην υπερμυζητηριακή μήτρα και μετά εισάγονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Ο ακριβής μηχανισμός που διασχίζουν την φυτική κυτταροπλασματική μεμβράνη δεν είναι ακόμα γνωστός [43].

Οι μύκητες παράγουν μια σειρά από Παράγοντες Παθογένειας-πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με στόχους του φυτικού κυττάρου. Κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες “αμολυσματικότητας” (avirulence proteins, Avg του παθογόνου) και οι πρωτεΐνες που κωδικούνται από τα γονίδια ανθεκτικότητας (R genes). Η αλληλεπίδραση Avg-R πρωτεϊνών οδηγεί σε εκδήλωση που συχνά έχει τη μορφή αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR). Έτσι, νεκρώνεται η αρχική περιοχή μόλυνσης και παρεμποδίζεται η επέκταση της μόλυνσης στον ξενιστή. Αν το φυτό δεν περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας ή το παθογόνο δεν παράγει λειτουργικά αντίστοιχες πρωτεΐνες Avg τότε δεν ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί άμυνας και εκδηλώνονται τα συμπτώματα της ασθένειας.

Για τους παράγοντες ανθεκτικότητας R έχουν προταθεί δύο τρόποι δράσης, ο άμεσος και ο έμμεσος. Είτε οι Avg δεσμεύονται απευθείας στους στόχους τους, και επάγονται μοριακά γεγονότα που διευκολύνουν το σχηματισμό παθογόνων αποικιών (άμεσος), είτε οι R πρωτεΐνες δεσμεύονται αρχικά με τους κυτταρικούς στόχους εντοπίζοντας δομικές αλλαγές και μετά είναι σε θέση να δεσμευτούν με τους effectors, “guard theory” (έμμεσος) [54, 3]. Έτσι, επάγεται η αμυντική απόκριση του φυτού στην εισβολή του παθογόνου.

Μηχανισμός Σίγησης και Μύκητες

Από τότε που ανακαλύφθηκε ότι τα δίκλινα μόρια RNA (dsRNA) μπορούν να επάγουν την εξειδικευμένη αποδόμηση ομόλογου RNA [22], αυτό το φαινόμενο έχει ερευνηθεί ευρέως με σκοπό την χρήση του ως μοριακό εργαλείο λειτουργικής γενετικής ανάλυσης σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Αυτού του τύπου η γονιδιακή σίγηση είναι γνωστή ως RNAi μηχανισμός (RNAi) στα ζώα, μεταμεταγραφική γονιδιακή σίγηση στα φυτά (post-transcriptional gene silencing, PGTS) και ως “quelling” στους μύκητες. Αν και οι μηχανισμοί έχουν πολλά κοινά στοιχεία [2], ο RNAi μηχανισμός θεωρείται ως ένας μηχανισμός προστασίας του γενώματος από τη δράση των μεταθετών στοιχείων, καθώς επίσης και ως ρυθμιστικός μηχανισμός της έκφρασης των κοινών και αναπτυξιακών γονιδίων του κυττάρου, μέσω των microRNAs. Η έρευνα τώρα έχει επικεντρωθεί στην αποσαφήνιση του ρόλου του RNAi μηχανισμού στους διάφορους οργανισμούς και την ταυτοποίηση των γονιδίων και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτόν. Για τους μύκητες, ο ασκομύκητας *Neurospora crassa* αποτελεί μοντέλο οργανισμό για τη μελέτη της σίγησης [23, 68].

Συνοπτικά, το dsRNA αποδομείται μέσω της δράσης μιας dsRNA ειδικής ενδονουκλεάσης, της Dicer, οδηγώντας στο σχηματισμό μικρών χαρακτηριστικών dsRNAs μήκους 21-25 νουκλεοτιδίων, γνωστών ως siRNAs (short interfering RNAs). Στη συνέχεια, τα μικρού μήκους dsRNAs συνδέονται σε ένα σύμπλοκο που επάγει την RNA σίγηση (RISC), σύμπλοκο στο οποίο επίσης προσδένονται τα ομόλογα ενδογενή mRNAs που γίνονται στόχος ενδονουκλεοτικής αποδόμησης, με αποτέλεσμα την τελική σίγηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί επίσης να ενισχυθεί σε κάποιους οργανισμούς όπου μια RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση δρα και συνθέτει νέα siRNAs από RNA τμήματα ήδη

αποδομημένων mRNAs. Όταν ένα dsRNA εισαχθεί από μια εξωγενή πηγή, τότε η σίγηση είναι ένα παροδικό φαινόμενο και κρατά για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, από μερικές μέρες μέχρι και πάνω από 2-3 εβδομάδες, εξαρτώμενο από τον οργανισμό, τον τύπο του κυττάρου και το αναπτυξιακό του στάδιο. Συμπερασματικά, μέσω του RNAi φαινομένου, εισάγοντας dsRNA που παρουσιάζει ομολογία με ένα επιθυμητό ενδογενές γονίδιο, μπορούμε να πετύχουμε την αποδόμηση των ομόλογων ενδογενών mRNAs και συνεπώς την μείωση του επιπέδου έκφρασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης [22].

Λόγω του μικρού τους μεγέθους πολλά γονιδιώματα Μυκήτων και Ωομυκήτων έχουν αλληλουχηθεί πλήρως ή αναμένεται να αλληλουχηθούν στο μέλλον. Με σκοπό την αξιοποίηση όλης αυτής της κωδικής πληροφορίας, ο μηχανισμός της σίγησης χρησιμοποιήθηκε ως μοριακό εργαλείο για την διερεύνηση του ρόλου κάποιων γονιδίων και την διαλεύκανση μοριακών μηχανισμών γονιδιακής έκφρασης στους μύκητες [53]. Οι σχετικές μεθοδολογίες και πρωτόκολλα έχουν ήδη αναπτυχθεί αποτελεσματικά σε ανώτερους ευκαρυωτικούς μηχανισμούς, με μεγάλου μήκους γονιδιώματα όπως η *D. melanogaster*, ο *C. elegans*, η *A. thaliana* και ο άνθρωπος [8]. Από τότε που αποδείχθηκε ότι η σίγηση λειτουργεί και στους Μύκητες, άνοιξαν νέες προοπτικές για την ταυτοποίηση και την ανακάλυψη γονιδίων, με αντίστροφη γενετική (reverse genetics). Εκτός από το μικρό γονιδίωμα, οι Νηματοειδείς Μύκητες έχουν και άλλα πλεονεκτήματα που τους καθιστούν οργανισμούς ιδανικούς για την εφαρμογή σίγησης, όπως το απλοειδές γονιδίωμα και ο ταχύς ρυθμός ανάπτυξης.

Για την επαγωγή του μηχανισμού σίγησης γενικά σχεδιάζονται ειδικές πλασμιδιακές κατασκευές έτσι ώστε μετά την εισαγωγή τους στο μύκητα να προκαλούν την παραγωγή dsRNA και να επάγουν την σίγηση. Αυτές οι κασέτες περιέχουν ρυθμιστικά στοιχεία διαφορετικά για τον κάθε μύκητα και περιέχουν παράλληλα ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσω επιλογής [45]. dsRNA παράγεται χάριν σε antisense κασέτες ή από φουρκέτες (hairpins) οι οποίες συχνά περιέχουν και ένα εσώνιο που προσφέρει σταθερότητα στην κατασκευή [52, 30]. Επίσης, έχουν γίνει προσπάθειες εισαγωγής στους μύκητες απευθείας dsRNA και επαγωγή παροδικής σίγησης [81]. Επίσης, το γονίδιο *gfp* (green fluorescent protein) χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς και παρατήρησης της εξέλιξης του φαινομένου [52]. Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη από το *Aequorea victoria* έχει αποδειχθεί ένα χρήσιμο σύστημα αναφοράς γενικά για *in vivo* μελέτες σε

πολλούς οργανισμούς [10]. Επίσης, υπάρχει και μια σειρά βελτιωμένων *gfp* γονιδίων, παραγώγων με αμινοξικές αντικαταστάσεις, όπως το *sGfp* γονίδιο (*sGFP* (S65T)), για τους ανώτερους ευκαρυώτες και έχει ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην *P. parasitica* [6]. Η GFP πρωτεΐνη μετά από σύντηξη με άλλη πρωτεΐνη μπορεί να δείξει την τοπολογία της τελευταίας μέσα στο κύτταρο ή τον οργανισμό. Τέλος, από μόνη της, η GFP πρωτεΐνη εκφραζόμενη υπό έναν ισχυρό υποκινητή, μπορεί να κάνει ένα οργανισμό να φθορίζει παρουσία UV και να συμβάλει ως μοριακό εργαλείο στην μελέτη αλληλεπίδρασης φυτού-ξενιστή [71].

Γενετικός Μετασχηματισμός Νηματοειδών Μυκήτων:

Για την μοριακή γενετική γονιδίων που κωδικεύουν πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες στους μύκητες, απαιτείται ένα αποτελεσματικό πρωτόκολλο για γενετικό μετασχηματισμό. Ο μετασχηματισμός των μυκήτων δεν είναι κάτι απλό και κάθε μύκητας θεωρείται μεμονωμένο σύστημα μελέτης και προσπάθειας εισαγωγής μιας γονιδιακής κασέτας. Η επιτυχία του μετασχηματισμού εξαρτάται από τη δομή και τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα. Συνεπώς, το ενζυμικό διάλυμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή πρωτοπλαστών, το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο μύκητας, η φύση του γονιδίου που μελετάται, η ποιότητα και ο σχεδιασμός της κατασκευής έχουν καθοριστική σημασία.

Επιτυχής μετασχηματισμός με τη χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) και λιποσωμάτων έχει γίνει σε πρωτοπλάστες της *Phytophthora* [4, 6, 26, 27, 44]. Κάτι τέτοιο όμως, δεν έχει επιτευχθεί ακόμα στον *Aphanomyces* [25]. Τα μόνα ενθαρρυντικά αποτελέσματα είναι η αναγέννηση πρωτοπλαστών απουσία γραμμικού DNA [76]. Καθώς, το πρωτόκολλο μετασχηματισμού πρωτοπλαστών Ωομυκήτων είναι δύσκολο γιατί εξαρτάται από την ποσότητα και την ποιότητα των πρωτοπλαστών και του γραμμικού DNA, καθώς και την ποιότητα των ενζύμων που χρησιμοποιούνται, νέες τεχνικές μετασχηματισμού αναπτύχθηκαν. Τέτοιες είναι ο βομβαρδισμό με μικροσωμάτια [13], η ηλεκτροπόρωση σε ζωοσπόρια [4, 77] και ο άμεσος μετασχηματισμός με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens* που φέρει ένα δυαδικό πλασμιδιακό φορέα [75]. Πειράματα μετασχηματισμού με τη χρήση του *A. tumefaciens* έχουν γίνει και στον Ασκομύκητα *Colletotrichum* [14, 73]. Αν και στην τελευταία μέθοδο απαιτείται διαφορετικός δυαδικός φορέας για κάθε μύκητα, η προσέγγιση αυτή προτιμάται γιατί το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι απλούστερο και συνήθως πιο αποτελεσματικό.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

Στα πλαίσια των παραπάνω, σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν ο σχεδιασμός, εφαρμογή και βελτιστοποίηση μεθοδολογιών γονιδιακής σίγησης σε ένα φυτοπαθογόνο ασκομύκητα (*Colletotrichum higginsianum*) και δύο φυτοπαθογόνους ωομύκητες (*Phytophthora parasitica* και *Aphanomyces euteiches*). Για το σχεδιασμό και την κατασκευή φορέων σίγησης, οι οποίοι θα προκαλούσαν την παραγωγή dsRNAs, αρχικά επιλέχθηκε το γονίδιο αναφοράς *sGfp* (πρώτη ενότητα της διατριβής). Με σκοπό την βελτιστοποίηση της μεθόδου μετασχηματισμού μυκήτων, μέρος της ίδιας ενότητας ήταν η προσπάθεια μετασχηματισμού πρωτοπλαστών της *P. parasitica* με σκοπό τη δημιουργία σταθερά GFP-μετασχηματισμένων στελεχών του ωομύκητα. Στο μύκητα *C. higginsianum* μας ήταν διαθέσιμο ήδη ένα σταθερά μετασχηματισμένο στέλεχος που εξέφραζε την sGFP πρωτεΐνη. Ο πειραματικός σχεδιασμός αποσκοπούσε στο μετασχηματισμό των ανωτέρω sGFP-μικροοργανισμών με πλασμιδιακές κατασκευές που αναμένετο να επάγουν το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης μέσω της παραγωγής *sGfp* dsRNAs με αποτέλεσμα ο μύκητας να πάψει να φθορίζει.

Έχοντας βελτιστοποιήσει τις συνθήκες μετασχηματισμού σε μύκητες και ωομύκητες, θα μπορούσε στη συνέχεια να διερευνηθεί η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε συγκεκριμένα ενδογενή γονίδια των μικροοργανισμών (δεύτερη ενότητα της διατριβής). Γι' αυτό το σκοπό επιδιώχθηκε η απομόνωση γονιδίων που κωδικεύουν χιτινάσες (CHS) από τους ωομύκητες *P. parasitica* και *A. euteiches* (δεύτερη ενότητα της εργασίας). Η σίγηση αυτών των γονιδίων θα συνέβαλε στην διαλεύκανση του βιολογικού τους ρόλου στον κύκλο ζωής των μικροοργανισμών ή/και στην παθογένεια τους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊκών οξέων καθώς και τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα δράσης τους είναι από τις εταιρείες MINOTECH Biotechnology, Promega Corporation, TAKARA και New England Biolabs. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα πλασμιδιακών φορέων GateWay της εταιρείας Invitrogen για την κλωνοποίηση τμήματος DNA σε επιθυμητό φορέα. Τα θρεπτικά και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Merck, Difco Laboratories, Sigma-Aldrich Inc. και Fluka. Τα κύτταρα *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των μετασχηματισμών ήταν του στελέχους DH5a και του στελέχους DH10b για τα μεγαλύτερα σε μέγεθος πλασμίδια. Το στέλεχος του *A. tumefaciens*, ήταν το AGL-1. Το στέλεχος της *P. parasitica* (*P. parasitica*, syn. *p. nicotianae*) που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκε (race 0) από φυτά καπνού και το στέλεχος *C. higginsianum* που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκε από φυτά *Brassica campestris*. Τα στελέχη των μυκήτων μας διατέθηκαν από τον Dr. Arnaud Bottin. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR συντέθηκαν κατόπιν παραγγελίας από το εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB). Προμήθειες άλλων ενζύμων και αντιδραστηρίων αναφέρονται στα επιμέρους εδάφια.

Θρεπτικά μέσα

- *P. parasitica*

V₈ 5% (1lt):

1. Προσθέτουμε 50 ml χυμού V₈ σε 900 ml H₂O.
2. Ρυθμίζουμε ώστε το pH = 5.0 (NaOH ή KOH).
3. Φιλτράρουμε το διάλυμα μέσα από Scrynol μεμβράνη 200 μm.
4. Συμπληρώνουμε με H₂O μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει το 1lt.
5. Ακολουθεί αποστείρωση στο αυτόκαστο στους 120 °C για 20 min.

- *C. higginsianum*

Πλούσιο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ANM (1 lt): Glucose 20 gr, Malt Extract 20 gr και Peptone 1 gr.

Φτωχό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης BANNEROT(1 lt): Glucose 2.8 gr, Yeast Extract 100 mgr, Peptone C 2 gr, MgSO₄· 7H₂O 1.3 gr και KH₂PO₄ 2.7 gr.

- **E. coli (DH5a, DH10b):**

LB (1 lt): NaCl 10 gr, Yeast Extract 5 gr και Triptone 10 gr.

Καλλιέργεια και διατήρηση μυκήτων/ωομυκήτων:

Οι μύκητες μεγαλώνουν με μορφή μυκηλιακών υφών σε πιάτα με κατάλληλο πλούσιο θρεπτικό μέσο. Για ανακαλλιέργειες, κόβεται ένα κομμάτι άγαρ (plug) που έχει αναπτυχθεί ο μύκητας και το τοποθετείται σε νέο πιάτο με στερεό θρεπτικό μέσο ώστε οι υφές να έρχονται σε επαφή με το νέο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Αν το νέο θρεπτικό μέσο είναι επίσης πλούσιο σε σύσταση τότε ο μύκητας θα δώσει επίσης υφές. Αν, όμως, το plug το μεταφερθεί σε φτωχό θρεπτικό μέσο τότε ο μύκητας, λόγω της στέρησης που νιώθει, επάγει διαδικασίες σποριογένεσης. Για την παραγωγή υγρής καλλιέργειας, μολύνεται φλάσκα είτε με ένα plug (1 plug/ 20 ml θρεπτικού) είτε με διάλυμα σπορίων.

Για την διατήρηση του μύκητα φυλάγονται τα πιάτα στους 16 °C για μικρό χρονικό διάστημα, ενώ για μεγάλο χρονικό διάστημα μεταφέρεται υδατικό διάλυμα σπορίων σε 30 % (v/v) stock γλυκερόλης.

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες αναπτύσσονται κοντά σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος και επομένως είτε για την παραγωγή υφών είτε για την παραγωγή σπορίων, οι καλλιέργειες τους αναπτύσσονται στους 24 °C. Σημειώνεται ακόμη ότι οι μύκητες θέλουν καλό αερισμό και σκοτάδι. Επίσης, οι υγρές καλλιέργειες αναπτύσσονται δίχως ανάδευση.

Ανάκτηση Ζωοσπορίων:

Τα ζωοσπόρια της *Phytophthora* είναι διμαστιγωτά και κινητά. Αυτά τα σπόρια προκύπτουν μετά τη διαδικασία της μίτωσης και είναι οι μορφές διασποράς του μύκητα με την βοήθεια του νερού της βροχής, και τη ροή του νερού γενικότερα. Ωστόσο είναι φτωχά σε αποθέματα και χάνουν γρήγορα την κινητικότητά τους: είναι η εγκύστωση, χαρακτηριζόμενη από την απώλεια των μαστιγίων και τη σύνθεση ενός τοιχώματος-περιβλήματος (κύστη). Αν τα εγκυστώμενα σπόρια βρεθούν σε ιδανικές συνθήκες, τότε αναπτύσσουν βλαστικούς σωλήνες οι οποίοι εξελίσσονται σε μυκηλιακές υφές ικανές να μένουν τις ρίζες των φυτών-ξενιστή.

Η τεχνική που ακολουθήθηκε για την ανάκτηση των ζωοσπορίων της *P. parasitica* var. *nicotianae* έγινε σύμφωνα με δημοσιευμένο πρωτόκολλο [29]. 4-5 παστίλιες μυκηλίου που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο βρώμης (oat meat agar) μεταφέρονται σε νέο πιάτο Petri που περιέχει το ίδιο στερεό μέσο και που είναι από πριν καλυμμένο με αποστειρωμένη μεμβράνη Agryl P17 (SODOCA Z.I. Est, Biesheim, BP28, 68600 Neufbrisach). Μετά από 7 μέρες ανάπτυξης, η μεμβράνη πλένεται σε διάλυμα KNO_3 0.01M, στραγγίζεται και τοποθετείται σε ένα νέο άδειο πιάτο Petri, όπου φυλάγεται για 5 μέρες σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25 °C και σε συνθήκες σκότους. Σε αυτή την περίοδο η θρεπτική στέρωση που υπόκειται το μυκήλιο επάγει την δημιουργία σποραγγίων. Η ανάκτηση των ζωοσπορίων συμβαίνει μετά από θερμικό σοκ: η μεμβράνη τεμαχίζεται και καλύπτεται με 10 ml αποστειρωμένου H_2O . Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση για περίπου 30 min στους 4 °C. Μετά από ένα γύρο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ξαναθερμαίνεται το υδατικό διάλυμα ζωοσπορίων, και ολοκληρώνεται η συγκομιδή τους πρεσσάροντας την μεμβράνη μέσα από μια σύριγγα. Το αιώρημα σπορίων καταμετρείται με τη βοήθεια αιμοκυτταρομέτρου (10^6 - 10^8 ζωοσπόρια/ml). Σημειώνεται ότι το διάλυμα σπορίων πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως αφού τα ζωοσπόρια εγκυστώνονται πολύ γρήγορα.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA:

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες μέθοδοι:

1. Μέθοδος βρασμού:

Για την απομόνωση σε μικρή κλίμακα πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε ως επί το πλείστον η μέθοδος λύσης με βρασμό που παρέχει μέτριας ποιότητας αλλά ικανοποιητικής ποσότητας DNA.

2. Μέθοδος αλκαλικής λύσης:

Για την απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας πλασμιδιακού χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική μέθοδος κυτταρικής λύσης [69]. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, σε υψηλό pH οι δεσμοί υδρογόνου του DNA διασπώνται, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται οι δύο αλυσίδες (μετουσίωση). Αν όμως το διάλυμα ουδετεροποιηθεί τότε το πλασμιδιακό DNA επανουσιώνεται ενώ το χρωμοσωμικό DNA παραμένει μετουσιωμένο.

Σε περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη η παρασκευή μεγαλύτερων ποσοτήτων DNA και υψηλότερης καθαρότητας εφαρμόστηκε η μέθοδος της μοριακής διήθησης με στήλες διαχωρισμού QIAGEN (QIAGEN plasmid Mini kit). Το αναλυτικό πρωτόκολλο και οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στο σχετικό εγχειρίδιο της εταιρείας.

Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων μυκήτων:

➤ Ομογενοποίηση μυκηλιακού ιστού:

Για την απομόνωση οποιουδήποτε νουκλεϊκού οξέος από έναν μυκηλιακό ιστό σημαντικό ρόλο για την απόδοση της μεθόδου και την ποιότητα του νουκλεϊνικού οξέος που θα απομονωθεί έχει το αποτελεσματικό σπάσιμο του ιστού. Έτσι σε κάθε περίπτωση λαμβάνουν χώρα τα παρακάτω:

1. Εμβολιάζεται με 1 κομμάτι άγαρ στερεής καλλιέργειας του μύκητα σε 20 ml υγρής καλλιέργειας και επωάζεται για 3-4 μέρες στους 24-25 °C χωρίς ανάδευση.
2. Συλλέγεται τα μυκήλια από 40-60 ml συνολικής καλλιέργειας σε Scrynol φίλτρο 10 μm υπό χαμηλή εφαρμογή κενού. Πλένεται το μυκήλιο με αποστειρωμένο dH₂O για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του θρεπτικού μέσου.
3. Μεταφέρεται το μυκήλιο σε ένα πιάτο Petri και αφαιρούνται τα κομμάτια άγαρ.
4. Στη συνέχεια, ο μυκηλιακός ιστός κονιορτοποιείται σε υγρό άζωτο μέχρι το σημείο που θα γίνει φίνα πούδρα. Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η αποτελεσματική μηχανική θραύση του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα.
5. Μοιράζεται σε ισοζυγείς ποσότητες των 100 mg νωπού ιστού και αποθηκεύεται στους -80 °C. Προσοχή ο ιστός να μένει συνέχεια παγωμένος ώστε να μην δράσουν υδρολυτικά ένζυμα (π.χ. RNάσες).

➤ Απομόνωση γενωμικού DNA ολικού RNA και από μύκητα:

Στη συνέχεια, αναλόγως για ποιο νουκλεϊκό οξύ επιθυμείται η εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν δυο kit της QIAGEN, το DNeasy Plant Mini kit για DNA και το RNeasy Plant Mini kit για RNA (RLT buffer), αντίστοιχα. Τα kits αυτά είναι κατάλληλα τόσο για φυτικό όσο και για μύκητες, μιας και είναι ιδανικό για ιστούς που περιέχουν πολυσακχαρίτες και πολυφαινόλες. Το αναλυτικό πρωτόκολλο και οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στο σχετικό εγχειρίδιο της εταιρείας.

Σημειώνεται ότι κατά την απομόνωση RNA τα tubes και τα tips που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα, και άρα απαλλαγμένα από RNases. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν διπλά γάντια για σιγουριά ότι δεν θα έρθουν σε επαφή τα δείγματα με τις RNases του δέρματός μας και να αποφευχθεί η αποδόμηση του ολικού RNA. Επιπροσθέτως, κατά την διάρκεια απομόνωσης του ολικού RNA έλαβε χώρα και η αποδόμηση του DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του αναλυτικού πρωτοκόλλου του kit RNase-Free DNase Set.

Η ποιότητα των νουκλεϊκών οξέων κρίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση και η ποσοτικοποίηση μετά από μέτρηση στο Nanodrop. Δίνεται προσοχή κατά την ηλεκτροφόρηση του ολικού RNA, η συσκευή και τα εξαρτήματά της να έχουν προηγουμένως σαπουνιστεί και να μην χρησιμοποιηθεί “μάρτυρας” που μπορεί να περιέχει RNases. Φυσιολογικά, κάποιος πρέπει να διακρίνει τις μικρές και τις μεγάλες ριβοσωμικές υπομονάδες του μύκητα (18S, 5.8S, 5S και 28S rRNAs και tRNAs).

Ποσοτικός Προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων:

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA ή του RNA μετά την διαδικασία απομόνωσης του είναι μια απαραίτητα διαδικασία για δύο λόγους:

1. Για να διαπιστωθεί κατά πόσο το δείγμα είναι απαλλαγμένο πρωτεΐνες και φαινολικές ενώσεις.
2. Για να υπολογιστεί η μάζα του.

Με σκοπό την εκτίμηση την παρουσία πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα DNA/RNA, μετράται η μέγιστη απορρόφηση (κορυφές) στα μήκη κύματος 260nm και 280nm. Για αυτό το σκοπό έγινε χρήση του οργάνου Nanodrop. Στο πρώτο απορροφά το DNA και στο δεύτερο οι πρωτεΐνες. Για να θεωρηθεί το δείγμα καθαρό θα πρέπει η αναλογία απορροφήσεων 260nm/280nm να είναι μικρότερο του 1.8. Αν το δείγμα δεν είναι αρκετά καθαρό ακολουθούν καθαρισμοί με φαινόλη, μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή αναλογία.

Το βήμα του υπολογισμού της μάζας του DNA είναι απαραίτητο, γιατί σε όλες τις μοριακές τεχνικές (π.χ. πέψεις, PCR) η μάζα του DNA πρέπει να είναι γνωστή και καθορισμένη. Επίσης, η καθαρότητά του δείγματος είναι πού σημαντική ώστε να αποφευχθεί η αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων λόγω παρουσίας παρεμποδιστών.

Διαδικασία απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος από γέλη αγαρόζης:

Για τον καθαρισμό τμημάτων DNA μετά από PCR ή αντιδράσεις με περιοριστικά ένζυμα, καθώς και μετά από ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο kit της εταιρείας QIAGEN, QIAquick[®] Gel Extraction kit.

Πέψη του μορίου DNA με Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες:

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση και στην κλωνοποίηση DNA είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες ζευγών βάσεων του DNA (συνήθως 4 έως 6) και διασπών τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που συγκρατούν δύο γειτονικές βάσεις και στις δύο αλυσίδες συμμετρικά εντός της περιοχής αναγνώρισης. Τα μεγέθη των περιοριστικών τμημάτων που προκύπτουν μετά τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών υπολογίζονται συγκρίνοντας τις αποστάσεις που διανύουν σε ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης, με τις αποστάσεις πρότυπων ζωνών DNA γνωστού μοριακού βάρους. Κάθε περιοριστικό ένζυμο έχει βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και σύστασης ρυθμιστικού διαλύματος στις οποίες δρα και οι οποίες δίνονται από τις κατασκευαστικές εταιρείες. Η συγκέντρωση των περισσότερων ενδονουκλεασών εκφράζεται σε Unit/μl, όπου 1 Unit ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη 1 μg DNA του φάγου λ σε 1 ώρα, υπό τις κατάλληλες συνθήκες δράσεως του εκάστοτε ενζύμου.

Πέψεις πλασμιδιακού DNA [69]:

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10-20μl, σε αποστειρωμένο σωληνάριο eppendorf, όπου τοποθετούνται τα εξής: Ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) ίση με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, ορισμένη ποσότητα DNA (0,5-1 μg), 1μl περιοριστικής ενδονουκλεάσης (2-10 U/μl) και κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού (dsH₂O) για τη ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης. Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 30°C ή στους 37°C για 1-2h, ανάλογα με τις βέλτιστες συνθήκες του περιοριστικού ενζύμου.

Μετά την πέψη του DNA, ο έλεγχος της μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας δείγματος. Με αυτή τη διαδικασία, επιλέγοντας κανείς τον κατάλληλο συνδυασμό ενζύμων, μπορεί να ταυτοποιήσει τους θετικούς κλώνους μετά

από μετασχηματισμό ή μπορεί να απομονώσει το επιθυμητό για αυτόν τμήμα DNA ώστε να συνεχίσει τις υποκλωνοποιήσεις.

Η κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) με αιθανόλη [69] είναι μια μέθοδος που ακολουθήθηκε κάθε φορά που επιθυμούσαμε την συμπύκνωση διαλυμάτων νουκλεϊκών οξέων.

Κλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακούς φορείς:

Μετά από μια ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με αντίδραση PCR είτε μετά από πέψη και εκχύλιση επιθυμητού τμήματος DNA (είτε πλασμιδιακού φορέα είτε ενθέματος DNA) άγαρ, μπορούμε να προχωρήσουμε σε σύνδεση των τμημάτων αυτών. Η σύνδεση (ligation) δύο ευθύγραμμων μορίων DNA με την επίδραση της λιγάσης του βακτηριοφάγου T₄ είναι μια ενζυμική αντίδραση κατά την οποία καταλύεται ο σχηματισμός ενός ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στα 5'-P άκρα του τμήματος στόχου και των 3'-OH άκρων του φορέα. Οι συνθήκες της αντίδρασης, και συνεπώς η απόδοσή της, εξαρτώνται κυρίως από το αν τα άκρα των τμημάτων DNA είναι συμβατά ή όχι και από την μοριακή αναλογία ενθέματος-φορέα.

Όταν τα άκρα των τμημάτων DNA είναι συμβατά τότε εκτελείται μια αντίδραση λιγάσης. Αν όμως τα άκρα δεν είναι συμβατά τότε προχωρούμε στην τροποποίηση των άκρων προς σύνδεση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με την επιλογή κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων που μετά από πέψη θα οδηγήσει σε απελευθέρωση συμβατών άκρων είτε με το γέμισμά τους από νουκλεοτίδια και την δημιουργία τυφλών άκρων. Η τελευταία αντίδραση γίνεται με την χρήση του ενζύμου Klenow της πολυμεράσης I, η οποία παρουσία νουκλεοτιδίων προχωράει σε πολυμερισμό των 5' άκρων του τμήματος DNA και την μετατροπή του σε τυφλό άκρο.

Μια ακόμη τροποποίηση είναι αυτή του φορέα κλωνοποίησης. Όταν ο φορέας κοπεί από ένζυμο που δεν δίνουν συμβατά άκρα τότε είναι έτοιμος προς κλωνοποίηση με το επιθυμητό ένθεμα. Σε περίπτωση όμως που ο φορέας πεφθεί με ένα μόνο ένζυμο ή με ένζυμο που οδηγούν σε συμβατά άκρα πρέπει να αποσφωριλωθεί υπό την παρουσία ενός ειδικού ενζύμου που αφαιρεί 5'-P των τμημάτων DNA (CIP). Με αυτή την διαδικασία αποφεύγεται η λήψη κούφιων από ένθεμα πλασμιδίων, μιας και η λιγάση αδυνατεί λόγω απουσίας του 5'-P να ξανακλείσει τον φορέα. Έτσι ο φορέας θα κλείσει μόνο παρουσία του 5'-P του

ενθέματος. Αυτή είναι μία μέθοδος που αυξάνει την απόδοση λήψης θετικών αποικιών μετά από μετασχηματισμό.

Οι παραπάνω ενζυμικές αντιδράσεις έλαβαν χώρα σύμφωνα με τις οδηγίες των εταιρειών των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν (PROMEGA).

Μετά την αντίδραση της λιγάσης ακολουθεί ο μετασχηματισμός των κυττάρων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και επιλογή των κυττάρων-αποικιών που δέχτηκαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

GATEWAY Cloning System:

Το GateWay Cloning System (Clontech) είναι ένα σύστημα που δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς ενός τμήματος DNA από φορέα σε φορέα αρκεί να βρίσκεται ανάμεσα στα κατάλληλα ανασυνδυαστικά άκρα κάθε φορά. Δύο ειδών αντιδράσεις ανασυνδυασμού μπορούν να συμβούν, η RL και η BP ($attB \times attP \leftrightarrow attR \times attL$). Με την RL αντίδραση κυρίως μεταφέρεται ένα τμήμα DNA (π.χ. ένα γονίδιο) από έναν pENTRY vector διαμέσου ενός pDESTINATION vector σε έναν φορέα έκφρασης, ενώ με την BP αντίδραση ένα τμήμα DNA μεταφέρεται από έναν φορέα έκφρασης διαμέσου ενός pDONOR vector για την κατασκευή ενός νέου pENTRY vector. Η επιτυχία της μεθόδου του συστήματος αυτού βασίζεται στην παρουσία εντός των ανασυνδυασμένων άκρων του θνησιγόνου γονιδίου *ccdB*, γεγονός που οδηγεί στην μη ανάπτυξη “κούφιών” αποικιών (αποικιών που ο πλασμιδιακός φορέας δεν έχει δεχτεί το ένθεμα.).

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αντίδραση LR αφού προηγουμένως είχε κλωνοποιηθεί το επιθυμητό τμήμα στον pENTRY vector. Σύμφωνα με αυτήν, μια αντίδραση ανασυνδυασμού συμβαίνει μεταξύ του pENTRY και του Destination Vector παρουσία κατάλληλων ενζύμων (RL Clonase mix). Με αυτή την αντίδραση υπάρχει η δυνατότητα μεταφοράς ενός τμήματος DNA σε έναν φορέα έκφρασης με μια μόνο αντίδραση. Χάριν στην δράση των ενζύμων Int, IHF και Xis έχουμε τον ανασυνδυασμό των *attR* ανασυνδυαστικών άκρων του pENTRY vector με τα *attL* του Destination Vector, και μετατροπή τους σε *attB* (φορέας έκφρασης) και *attP* (παραπροϊόν). Ο προσανατολισμός με τον οποίο θα μεταφερθεί το ένθεμα είναι συγκεκριμένος αφού γίνεται ανασυνδυασμός μόνο μεταξύ των άκρων *attL₁-attR₁* και *attL₂-attR₂*, αντίστοιχα.

Η αντίδραση LR έλαβε χώρα ως εξής: 1 μl Destination Vector (150 ng/μl σε TE), 1.5 μl pENTRY_3C vector (100 ng/μl σε TE), 2 μl RL Clonase mix (5×), 2μl RL

Reaction buf (5×) και 3.5 μl TE.

Το μίγμα παραμένει για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται πρωτεΐνάση K και το μίγμα επωάζεται για 10 min στους 37 °C. Ακολουθεί μετασχηματισμός του μίγματος σε *E.coli* και επίστρωση των μετασχηματισμένων βακτηρίων σε πιάτο με αντιβιοτικό επιλογής αυτό του φορέα έκφρασης (δηλαδή του προηγούμενου Destination Vector).

Η παρουσία του *ccdB* θνησιγόνου γονιδίου στον destination vector εξασφαλίζει το γεγονός ότι θα επιβιώσουν μόνο οι θετικές αποικίες *E.coli* στις οποίες το *ccdB* γονίδιο αντικαταστάθηκε από το γονίδιο του ενδιαφέροντος. Τα κύτταρα στα οποία το θνησιγόνο γονίδιο παραμένει αδυνατούν να επιβιώσουν. Έτσι, με αυτή τη μέθοδο αυξάνεται η πιθανότητα λήψης θετικών κλώνων.

Στη παρούσα εργασία ο pENTRY vector ήταν ο pENTRY_3C και ο Destination Vector ήταν ο pK7GWIWG2(I),0. Τα σχετικά ένζυμα και αντιδραστήρια τα προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Clontech.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης:

Στην παρούσα διατριβή, ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια *E. coli*. Οι αντιδράσεις PCR έγιναν σε τελικό όγκο 20μl σε αποστειρωμένα σωληνάκια των 500μl, τα οποία περιείχαν τα εξής: 100 nM από τον εκάστοτε εκκινητή, η κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10× της Pfu polymerase (με 20 mM MgSO₄), 100 μM dNTPs, 100-200 ng DNA, 1 Unit Pfu Polymerase (Invitrogen) και η κατάλληλη ποσότητα ddsH₂O για την ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης.

Το προαναφερθέν μίγμα υποβλήθηκε σε έναν αρχικό κύκλο στους 94°C για 5 min, ώστε να ανοιχθούν τα δίκλινα μόρια και σε 29 κύκλους ενίσχυσης: 45 sec στους 94 °C (αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA), 45 sec στους 58 °C (θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών με την μήτρα, ~2-3 °C πιο κάτω από το T_m του εκκινητή) και 1 min στους 72 °C (πολυμερισμός του DNA στην θερμοκρασία δράσης της πολυμεράσης). Τέλος, το μίγμα υποβλήθηκε σε έναν τελικό κύκλο στους 72°C για 5 min, ώστε να προλάβουν να επιμηκυνθούν τα ενισχυμένα μόρια.

Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA:

Οι αντιδράσεις αλληλούχησης κλωνοποιημένων τμημάτων DNA με σκοπό την ταυτοποίησή τους έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Μικροχημείας στο IMBB.

Μετασηματισμός προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων:

Ο παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E.coli* και ο μετασηματισμός τους με πλασμιδιακό DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Maniatis [69]. Οι μετασηματισμοί αγροβακτηρίων έγιναν κάθε φορά σύμφωνα και με τις δύο ακόλουθες μεθόδους.

- Μεταφορά πλασμιδίων σε Αγροβακτήριο με τριγωνική βακτηριακή σύζευξη:

Η εισαγωγή των πλασμιδιακών κατασκευών από σύζευξη *E.coli* DH5a ή DH10b (donors) στο αγροβακτήριο AGL-1 (recipient) πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της τριγωνικής σύζευξης (triparental mating) [67]. Ως βοηθητικό στέλεχος της σύζευξης χρησιμοποιείται (helper) χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli*, HB101 (pRK2013) [21]. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο αναπτύσσονται ο/η υγρές καλλιέργειες και των τριών βακτηρίων. 1 ml από κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρείται σε υψηλή ταχύτητα για 1 min. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και ακολουθούν 2 πλύσεις με 500 μl διαλύματος LB, ώστε να αφαιρεθούν τα ίχνη των αντιβιοτικών που περιείχαν οι καλλιέργειες. Στη συνέχεια, αναμιγνύουμε το δέκτη (200 μl), το δότη (100 μl) και το βοηθητικό πλάσμιδιο (100 μl) και τα αφήνουμε για επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί εναπόθεση σταγόνας του βακτηριακού διαλύματος σε τρυβλίο LB₀ και επώαση 2-3 ημερών στους 28 °C. Ακολούθως, με την χρήση αποστειρωμένης λούπας μεταφέρουμε την αποικία (streaking) που θα έχει αναπτυχθεί σε νέο μέσο επιλογής. Η επιλογή των μετασηματισμένων Αγροβακτηρίων έγινε σε στερεό θρεπτικό μέσο LB, παρουσία Rif (60 μg/ml) και του δείκτη επιλογής της εκάστοτε πλασμιδιακής κατασκευής που έχουμε εισάγει. Για έλεγχο της επιτυχίας της μεθόδου σε προεπιλεγμένα σημεία του ίδιου τρυβλίου στρικάrouμε και τις τρεις βακτηριακές καλλιέργειες ξεχωριστά (donor, helper και recipient). Αυτό που αναμένεται είναι η μη ανάπτυξη καμίας από αυτές, μιας και δεν περιέχουν και τις δύο ανθεκτικότητες σε αντιβιοτικά.

- Άμεσος μετασηματισμός του Αγροβακτηρίου

Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, πλασμίδιο από DNA (εκχύλισμα) μπορεί να μεταφερθεί απευθείας σε Αγροβακτήριο με την freeze-thaw μέθοδο. Αν και η απόδοση αυτής της μεθόδου είναι χαμηλή (περίπου 10³ transformants ανά μg DNA) σε σχέση με αυτή της τριγωνικής βακτηριακής σύζευξης, η τεχνική αυτή είναι

αξιόπιστη και γρήγορη. Επιπροσθέτως, με αυτή την μέθοδο εξαλείφεται η πλασμιδιακή αναδιάταξη που συχνά συναντάμε κατά την διάρκεια της τριγωνικής σύζευξης.

Παρασκευή επιδεκτικών αγροβακτηριακών κυττάρων:

- Αναπτύσσεται Αγροβακτηριακό στέλεχος που περιέχει το κατάλληλο Τι βοηθητικό πλασμίδιο σε 5 ml LB παρουσία Rif (60 µg/ml) για 2-3 μέρες στους 28 °C.
- Προστίθενται 2 ml από το αγροβακτηριακό εμβόλιο σε φλάσκα (των 250 ml) με 50 ml LB και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 28 °C, μέχρι η απορρόφηση στα 600nm να φτάσει σε τιμή O.D.: 0.5-1.0 (~5-6 h).
- Η βακτηριακή ανάπτυξη σταματά με ψύξη σε πάγο και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 2800 rpm για 5 min στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναδυναμώνονται σε κρύο 1 ml 20 mM CaCl₂. Τα κύτταρα μοιράζονται σε aliquots των 100 µl. Ακολουθεί πάγωμα σε υγρό άζωτο ή ξηρό πάγο και αποθήκευση στους -80°C για 4-8 εβδομάδες.

Μετασηματισμός αγροβακτηριακών κυττάρων:

- Βγάζουμε από τους -80°C erpedorf που περιέχει 100 µl επιδεκτικών αγροβακτηριακών κυττάρων και αφήνεται στον πάγο να ξεπαγώσει.
- Προστίθεται το πλασμιδιακό DNA (~1.0 µg) και το δείγμα αφήνεται στους 0°C για 30 min.
- Ακολουθεί σοκ των κυττάρων σε υγρό άζωτο μέχρι να παγώσει πλήρως το δείγμα και στη συνέχεια επώαση στους 37 °C για 30 min.
- Το κυτταρικό εναιώρημα εμβολιάζεται σε 1 ml LB και ακολουθεί επώαση στους 28°C για 2-4 ώρες. Έτσι τα κύτταρα αναρρώνουν και τους δίνεται ο χρόνος να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό τους DNA (καθώς και τις ανθεκτικότητες στα αντίστοιχα αντιβιοτικά που περιέχουν).
- Μετά την ανάρρωση το κυτταρικό αιώρημα φυγοκεντρείται για 30 sec και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Ακολουθεί επαναιώρηση της πελέτας με 100 µl υγρού θρεπτικού και εμβολιασμός σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής των μετασηματισμένων κυττάρων.

- Ανθεκτικές αποικίες εμφανίζονται μετά από 2-3 μέρες επώασης στους 28°C.
- Μετασηματισμός μηκύτων με την χρήση του *A. tumefaciens*:
 1. Αναπτύσσεται Αγροβακτηριακή καλλιέργεια παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών (ριφαμπικίνη και το αντιβιοτικό της επιπλέον πλασμιδιακής κατασκευής που περιέχει) για 2 μέρες στους 28 °C μέχρι να σχηματιστεί καλά το βακτηριακό νέφος.
 2. Στη συνέχεια, εμβολιάζεται το αγροβακτηριακό διάλυμα σε *Διάλυμα Επαγωγής* έτσι ώστε να έχουμε αρχική απορρόφηση O.D.₆₀₀ ίση με 0.15.
 3. Επωάζεται για ~6 h στους 28 °C υπό ανάδευση, μέχρι O.D.₆₀₀ ίση με 0.5-0.8.
 4. Στη συνέχεια, ρυθμίζεται ο αριθμός των σπορίων του μύκητα ώστε να είναι ίσα με 10⁶ κονίδια /ml.
 5. Σε ένα πιάτο που περιέχει *Θρεπτικό επαγωγής* [7] στρώνεται κομμάτι αποστειρωμένης σελλοφάνης και στη συνέχεια απλώνονται από 100 μl του Αγροβακτηριακού διαλύματος και του διαλύματος των σπορίων.
 6. Ακολουθεί επώαση στους 24 °C (θερμοκρασία ανάπτυξης του μύκητα) για 2 μέρες. Σε αυτό το χρονικό διάστημα το αγροβακτήριο μολύνει τον μύκητα μεταφέροντας ταυτόχρονα το T-DNA του. Επίσης, δίνεται η δυνατότητα στον μύκητα να το ενσωματώσει και να εκφράσει τις κατάλληλες ανθεκτικότητες σε αντιβιοτικά.
 7. Μεταφέρεται η σελλοφάνη σε *θρεπτικό μέσο επιλογής* (2 % agar) που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά (επιπλέον σεφοταξίμη 200 μM για να σκοτωθούν τα Αγροβακτήρια).
 8. Καλύπτεται με ένα λεπτό στρώμα την σελλοφάνη με *θρεπτικό μέσο επιλογής* (1.5 % low melting agarose) που περιέχει επίσης τα κατάλληλα αντιβιοτικά.
 9. Επωάζεται για 5-7 μέρες στους 24 °C, μέχρι τα transformants να βγουν στην επιφάνεια του *θρεπτικού μέσου επιλογής* (1.5 % low melting agarose).
 10. Απομονώνονται οι υφές των transformants και μεταφέρονται σε νέα πιάτα με *θρεπτικό μέσο επιλογής*, αυξάνοντας το αντιβιοτικό επιλογής κατά 1.5.

Διάλυμα Επαγωγής: MM salts 1×, MES 10 mM pH = 5.6 και AcS 200 μM

Θρεπτικό επαγωγής: MM salts 1×, MES 40 mM pH = 5.6, AcS 200 μM, 0.5 % (w/v) γλυκερόλη και γλυκόζη 5 mM

- Μετασχηματισμός πρωτοπλαστών μυκήτων [40]:

Κατά την διάρκεια της διαδικασίας λαμβάνεται μεγάλη προσοχή για την αποφυγή πιθανών μολύνσεων και γίνεται προσπάθεια για γρήγορη εκτέλεση του πρωτοκόλου, ώστε να έχουμε την μεγαλύτερη δυνατή απόδοση της μεθόδου. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι σε κάθε βήμα της μεθόδου η ισοτονικότητα του διαλύματος πρέπει να μένει σταθερή ώστε οι πρωτοπλάστες να μη σπάσουν.

- Εμβολιάζεται 1 κομμάτι agar στερεής καλλιέργειας του μύκητα (*P. parasitica*) σε 20 ml υγρής καλλιέργειας (V_8 5%) και επώαζεται για 3-4 μέρες στους 24-25 °C χωρίς ανάδευση.

Τα ακόλουθα λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασία δωματίου:

- Συλλέγονται τα μυκήλια από 40-60 ml συνολικής καλλιέργειας σε Scrynol φίλτρο 10 μm υπό χαμηλή εφαρμογή κενού και πλένονται με *Διάλυμα KC*.
- Μεταφέρεται το μυκήλιο σε ένα πιάτο Petri που περιέχει 15 ml *Διαλύματος KC*. Αφαιρούνται τα κομμάτια agar και αφήνονται οι μυκηλιακές υφές για επώαση 15 min.
- Αφαιρείται το *Διάλυμα KC* και στη συνέχεια προστίθενται 15 ml από το Ενζυμικό *Διάλυμα σε KC*. Λιώνεται το μυκήλιο με τη βοήθεια αποστειρωμένων λεπίδων.
- Ακολουθεί επώαση υπό χαμηλή ανάδευση (~60 rpm) στο σκοτάδι για πάνω από 2,5 h.
- Κατά την διάρκεια της επώασης ξεπαγώνονται οι υπό μετασχηματισμό πλασμιδιακοί φορείς (30 μg υψηλής ποιότητας γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA σε νερό) και ετοιμάζονται τα λιποσώματα (30 μl Lipofectin® Gibco BRL® σε 240 μl H₂O).
- Συλλέγονται οι πρωτοπλάστες μέσω Scrynol φίλτρου 48 μm εντός ενός falcon tube.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στα 3250 rpm χωρίς φρένο.
- Επαναιώρηση σε 5 ml *Διαλύματος KC* (όχι Vortex). Συνίσταται η αρχική επαναιώρηση του ιζήματος σε μικρότερο όγκο διαλύματος.
- Επανάληψη των δυο προηγούμενων σταδίων.
- Κατά την διάρκεια των φυγοκεντρήσεων αναμιγνύεται το πλασμιδιακό DNA με τα λιποσώματα και τα αφήνονται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση για 10 min στα 3250 rpm χωρίς φρένο.

- Επαναιώρηση σε 10 ml *Διαλύματος MTC20*. Απαρίθμηση των πρωτοπλαστών με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου.
- Επαναιώρηση σε 10 ml *Διαλύματος MTC20*, σε τελική συγκέντρωση $10 \cdot 10^6$ κύτταρα / 600 μl (χρήση αιμοκυτταρόμετρου).
- Μεταφορά του προεπωασμένου μίγματος λιποσωμάτων-γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA στο falcon tube που περιέχει τους πρωτοπλάστες και επώαση για 10 min.
- Προστίθενται προσεκτικά 600 μl *Διαλύματος PEG/MTC20*, επώαση για 10 min.
- Προστίθενται equal volume (στην αρχή αργά και στη συνέχεια πιο γρήγορα) υγρής καλλιέργειας V_8 5% / 1M mannitol (25% v/v).
- Οριζόντια επώαση στους 24-25 °C για όλη τη νύχτα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στα 2900-4000 rpm και απόρριψη του υπερκείμενου. Προστίθενται 500 μl υγρής καλλιέργειας V_8 5% και ακολουθεί επίστρωση σε τρυβλίο V_8 5% που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαση στους 24-25 °C.
- Η εμφάνιση μετασηματισμένων μυκήτων σημειώνεται μεταξύ 4-12 ημερών. Οι αποικίες συλλέγονται για να ακολουθήσει ένας δεύτερος έλεγχος αυξάνοντας το αντιβιοτικό στο μέσο επιλογής κατά 1.5-2 φορές.

Διάλυμα KC : 0.64 M KCl, 0.2 M CaCl₂

Ενζυμικό Διάλυμα σε KC : 10 mg/ml Driselase from *Basidiomycetes sp.* (SIGMA), 1 mg/ml Caylase C3 (CAYLA)

(διαλυτοποίηση των ενζύμων στο διάλυμα KC, φυγοκέντρηση για 5 min στα 1.000g, αποστείρωση του υπερκείμενου με τη χρήση φίλτρου, το διάλυμα να είναι φρέσκο)

Διάλυμα MTC20 : 1M mannitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM CaCl₂

Διάλυμα PEG/MTC20: 40% PEG 6.000 σε MTC20

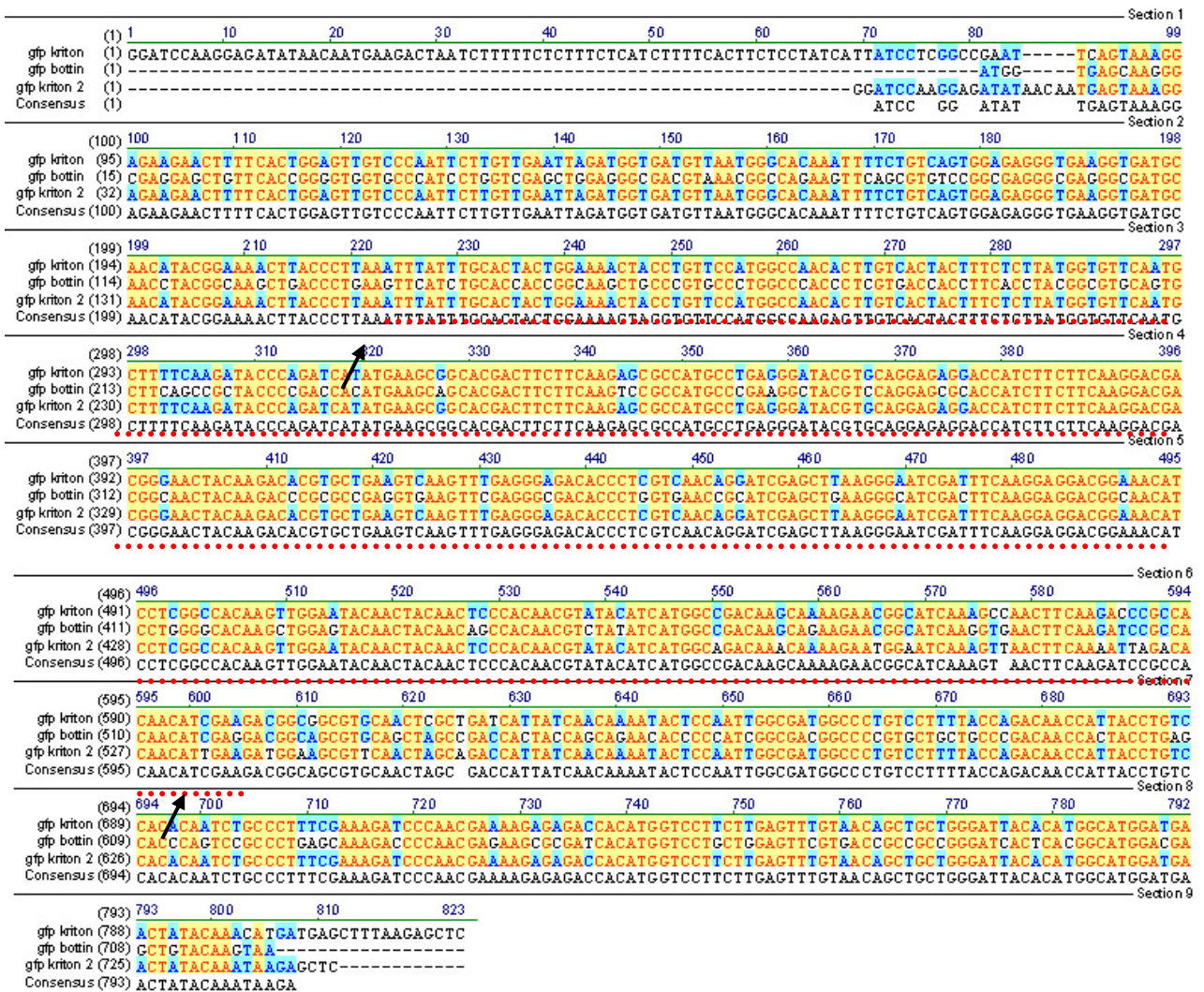
(για καλύτερη διαλυτοποίηση ανάδευση στους 65 °C, αποστείρωση με τη χρήση φίλτρου και πριν την χρήση επώαση στους 37 °C)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

Κατασκευή σιγητικής φουρκέτας του γονιδίου *sGfp*:

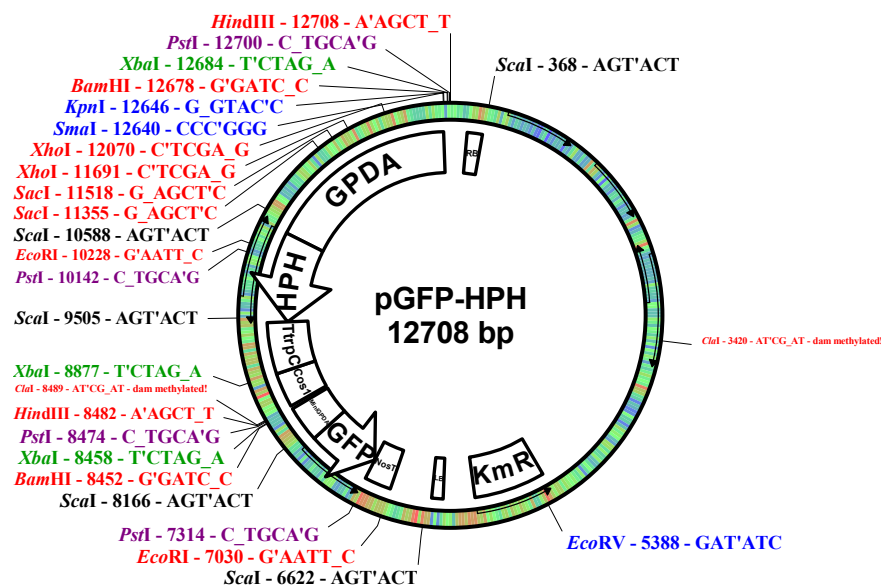
Αρχικά, για την κατασκευή των σιγητικών φουρκετών του γονιδίου *sGfp*, τόσο για τον ωομύκητα *P. parasitica* όσο και για τον μύκητα *C. higginsianum*, ακολουθήθηκε κοινή πορεία. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε τμήμα το γονιδίου του *sGfp* μήκους περίπου 330 nt (βλ. παρακάτω), και κλωνοποιήθηκε στον φορέα Gateway pENTRY_3C. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανασυνδυασμός του πλασμιδίου που προέκυψε με τον φορέα προορισμού (Destination vector) pK7GWIWG2(I),0 εφαρμόζοντας μια LR αντίδραση ανασυνδυασμού (gateway αντίδραση). Οι διαδοχικές αυτές αντιδράσεις οδήγησαν στην τελική κατασκευή δύο σιγητικών φουρκετών του *sGfp*, μία Sense / Antisense και μια Antisense / Sense, η δομή των οποίων (κατεύθυνση/διάταξη των ενθεμάτων) επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση.

Η επιλογή του τμήματος του *sGfp* γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο στην αντίδραση της PCR επιλέχθηκε μετά από βιοπληροφορική ανάλυση *in silico*, των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών τριών *Gfp* γονιδίων για να διαπιστωθεί πόσο ομόλογα είναι μεταξύ τους και να εντοπιστούν οι συντηρημένες μεταξύ τους περιοχές (Εικόνα 10). Τα τρία αυτά γονίδια διατίθενται στα εργαστήρια Βιοτεχνολογίας Φυτών και Μοριακής Βιολογίας Φυτών Αυτό έγινε με σκοπό να επιλεγθεί μια περιοχή όσο γίνεται πιο συντηρημένη και για τα τρία γονίδια, ώστε να δημιουργηθεί μια σιγητική φουρκέτα ικανή να προκαλέσει σίγηση και στα τρία *Gfp* γονίδια σε διάφορους οργανισμούς που αυτά ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον. Μετά από αυτή την αναζήτηση βρέθηκαν τα εξής:



Εικόνα 10: Στοιχισή των τριών *Gfp* αλληλουχιών και αναγνώριση των περιοχών με τον υψηλότερο βαθμό συντήρησης, όπου η αλληλουχία *gfp_kriton* είναι αυτή του *mGfp5*, η *gfp_kriton2* είναι του *mGfp4* και η *gfp_bottin* είναι αυτή του *sGfp*. Η πιο συντηρημένη περιοχή, μέρος της οποίας κλωνοποιήθηκε (βλ. κείμενο), είναι υπογραμμισμένη με τελείες.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα βρέθηκε ότι η πιο καλά συντηρημένη περιοχή είναι η περιοχή 222-606 του *sGfp* ("*gfp_bottin*" στη λεζάντα της εικόνας 10, και αρίθμηση της Εικόνας 10). Σχεδιάστηκαν εκκινητές που θα υβριδίζονται στα άκρα αυτής της περιοχής και θα επιτρέπουν τον πολυμερισμό της με αντίδραση PCR. Ως αλληλουχία-εκμαγείο για τον πολυμερισμό του επιθυμητού τμήματος χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *sGfp*-TYG-NOS (X54257) μεγέθους 720 βάσεων [10], που ήταν κλωνοποιημένο στον φορέα pGFP-HPH (παραχωρήθηκε από την Επιστημονική ομάδα «Interactions Plantes-Microorganismes», Toulouse, FRANCE, υπό τη διεύθυνση του Dr. Bernard Dumas).



Εικόνα 11: Φορέας pGFP-HPH, ο οποίος περιέχει το γονίδιο *sgfp*-TYG-NOS.

Οι εκκινητές αυτοί, επίσης, σχεδιάστηκαν να περιέχουν περιοριστική θέση *EcoRI* στα 5' άκρα τους, ώστε μετά από *EcoRI* πέψη του PCR προϊόντος και του pENTRY_3C φορέα να εισαχθεί το τμήμα του *sGfp* στον τελευταίο, αντικαθιστώντας το *ccdB* γονίδιο.

Ακολουθούν οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες πραγματοποίησης της PCR:

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'→3'	Temperature annealing (°C)
sGFP_F	Forward primer – <i>EcoRI</i> - Forward primer CTACGTCG GAATTC GCACCATCTTCTTCAAGGAC	62.8
sGFP_R	Reversed primer- <i>EcoRI</i> - Reversed primer CAGGGCG GAATTC GTGCTCAGGTAGTGGTTGT	64.2

Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε DNA του πλασμιδίου pGFP-HPH που απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια *E. coli* DH5a. Οι αντιδράσεις PCR έγιναν σε τελικό όγκο 20μl σε αποστειρωμένα σωληνάκια των 500 μl, τα οποία περιείχαν τα εξής:

100 nM από τον εκάστοτε εκκινητή

Η κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10× της Taq Polymerase

Η κατάλληλη ποσότητα ddsH₂O για την ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης.

100 μ M dNTPs

2 mM MgCl₂

2 μ g DNA

1 Unit Taq Polymerase

Το προαναφερθέν μίγμα υποβλήθηκε σε έναν αρχικό κύκλο στους 94°C για 5 min, ώστε να ανοιχθούν τα δίκλινα μόρια και σε 29 κύκλους ενίσχυσης:

45 sec στους 94°C

45 sec στους 58°C

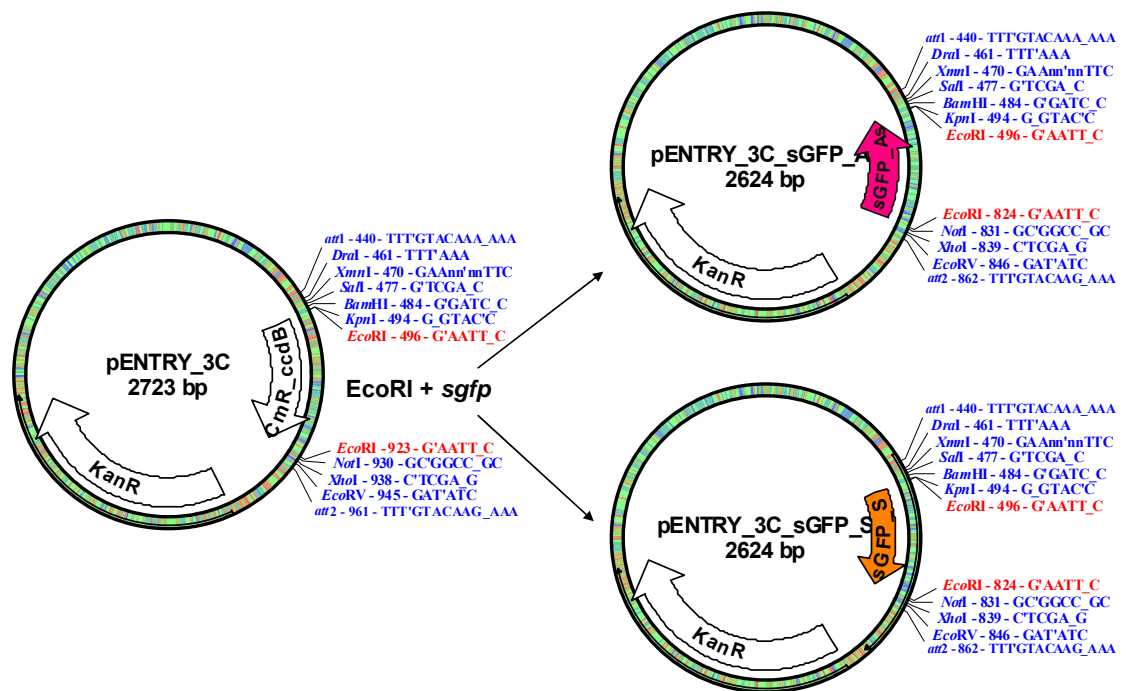
1 min στους 72°C (θερμοκρασία δράσης της Taq Polymerase)

Τέλος, το μίγμα υποβλήθηκε σε έναν τελικό κύκλο στους 72°C για 5 min, ώστε να προλάβουν να επιμηκυνθούν τα ενισχυμένα μόρια.

Το προϊόν που θα σχηματίζεται μετά την PCR θα είναι μεγέθους ~330bp αρκετού για τον σχηματισμό σταθερής φουρκέτας και την επαγωγή του σιγητικού μηχανισμού των μυκήτων. Δημιουργήθηκαν *EcoRI* άκρα στο προϊόν PCR μετά από 3 ώρες πέψης.

pENTRY_3C φορέας

Το τμήμα του *sGfp* με το μεγαλύτερο βαθμό συντήρησης (330nt) εισήχθηκε στον Gateway φορέα pENTRY_3C με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων. Ο φορέας pENTRY_3C περιέχει το θνησιγόνο γονίδιο *ccdB* καθώς και το γονίδιο ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη. Επίσης, εκατέρωθεν του το θνησιγόνου γονιδίου *ccdB* έχει δύο θέσεις περιορισμού *EcoRI*. Πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα με *EcoRI*. Ακολούθησε καθαρισμός του μίγματος των νουκλεϊνικών οξέων (φορέας και *ccdB*) με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Στη συνέχεια, έγινε απευθείας αντίδραση σύνδεσης με το συντηρημένο τμήμα του γονιδίου *sGfp* και μετά μετασχηματισμός σε κύτταρα *E.coli* DH5a. Τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pENTRY_3C_ *ccdB* δεν επιβίωσαν. Τα κύτταρα που δέχτηκαν το γονίδιο *sGfp* ελέχθησαν με περιοριστική πέψη *EcoRI*. Το ένθεμα το 330nt επειδή ήταν επίσης κομμένο στα άκρα του με *EcoRI* μπήκε στο φορέα pENTRY_3C και με τις δύο κατευθύνσεις (S ή As). Στάλθηκαν τυχαίοι κλώνοι για αλληλούχηση δύο θετικοί κλώνοι που περιείχαν το γονίδιο *sGfp* και διαπιστώθηκε ότι ο ένας περιείχε το γονίδιο σε φορά sense και ο δεύτερος σε φορά antisense.

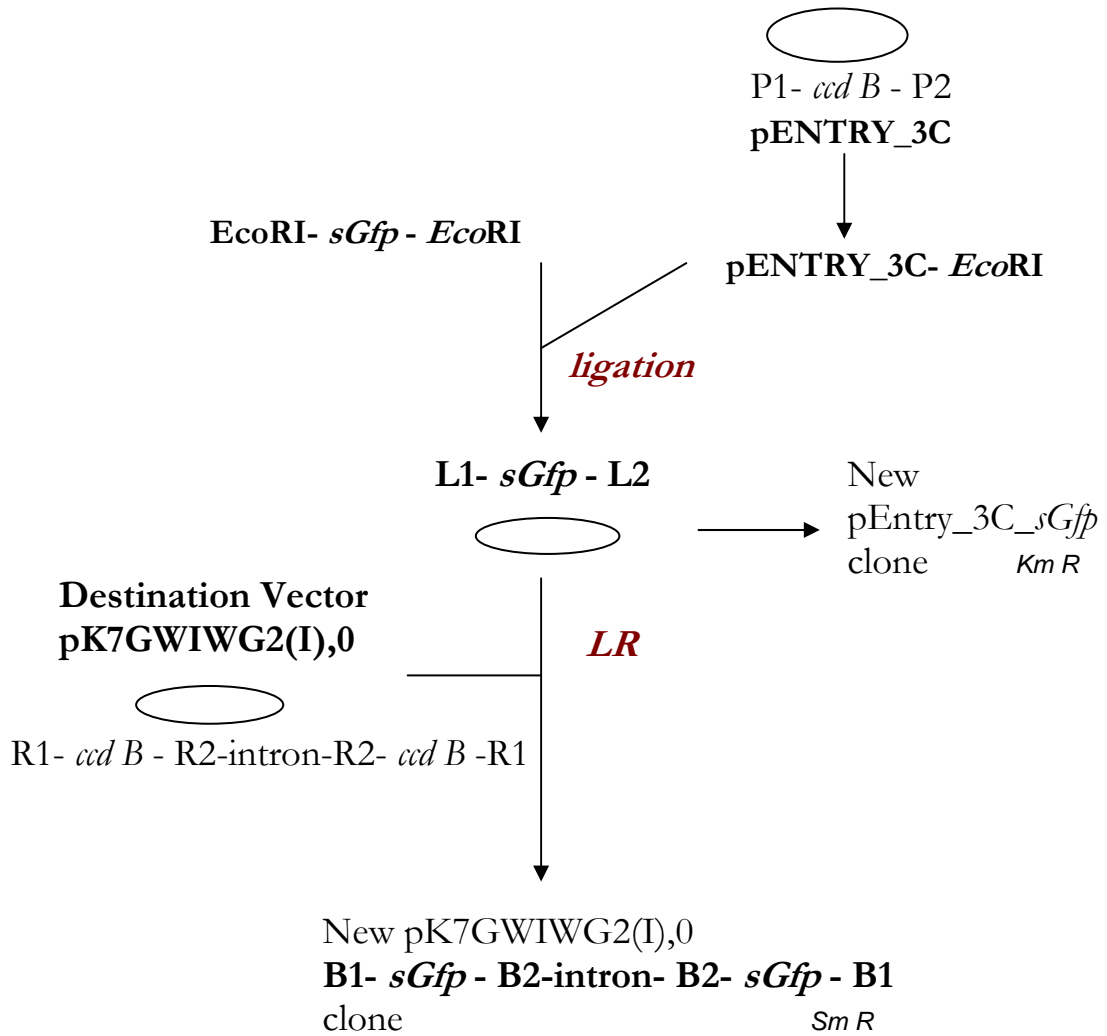


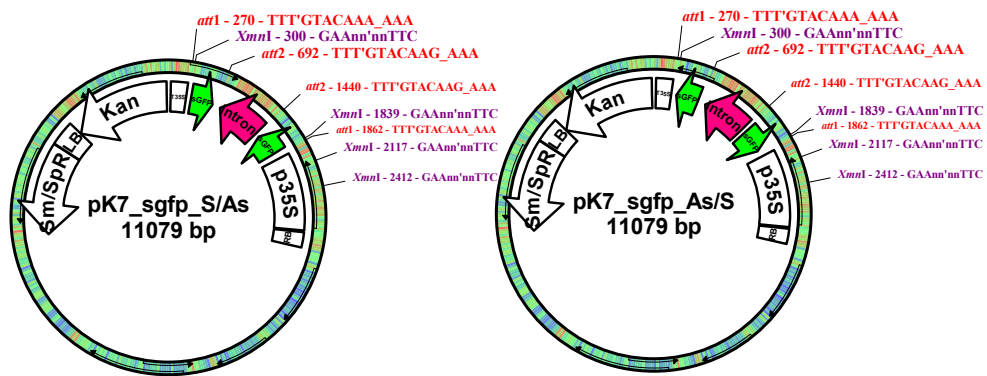
Εικόνα 12: Σχηματισμός των ENTRY φορέων pENTRY_3C_sGfp.

LR αντίδραση

Το επόμενο βήμα για τον σχηματισμό της *sGfp* φουρκέτας ήταν μια LR αντίδραση. Ως destination vector χρησιμοποιήθηκε αυτός του pK7GWIWG2(I),0 και ως ENTRY vector ο pENTRY_3C_sGfp. Ακολουθώντας τις οδηγίες του πρωτοκόλλου της εταιρείας Invitrogen πραγματοποιήθηκε αντίδραση ανασυνδυασμού. Το τμήμα του *sGfp* αντικατέστησε το θνησιγόνο γονίδιο *ccdB*. Η κατεύθυνση που εισήλθε το *sGfp* είναι απόλυτα καθορισμένη, αφού έχουμε ανασυνδυασμό μόνο ανάμεσα στις *attL1* - *attR1* και *attR2* - *attL2* ανασυνδυαστικές περιοχές. Συνεπώς, μετά από LR αντίδραση του pENTRY_3C_sGfp_sense και του pENTRY_3C_sGfp_antisense με τον pK7GWIWG2(I),0 οδηγηθήκαμε στον σχηματισμό των φουρκετών sense/antisense και antisense/sense, αντίστοιχα. Η επιτυχία της αντίδρασης πιστοποιείται μετά από πέψη με *XhoI*, μια θέση περιορισμού που δημιουργείται εκατέρωθεν του εσωνίου του *Chs* γονιδίου που φέρει ο φορέας προορισμού, μόνο μετά από επιτυχή ανασυνδυασμό του επιθυμητού τμήματος και στα δύο μέρη του, και τελικά οδηγεί στην εκτομή του (νουκλεοτιδικό τμήμα ~800bp).

Ακολουθεί σχηματικά απεικόνιση των συνεχόμενων αντιδράσεων:





Εικόνα 13: Σχηματισμός ενδιάμεσων φορέων pK7_sGfp_S/As και pK7_sGfp_As/S.

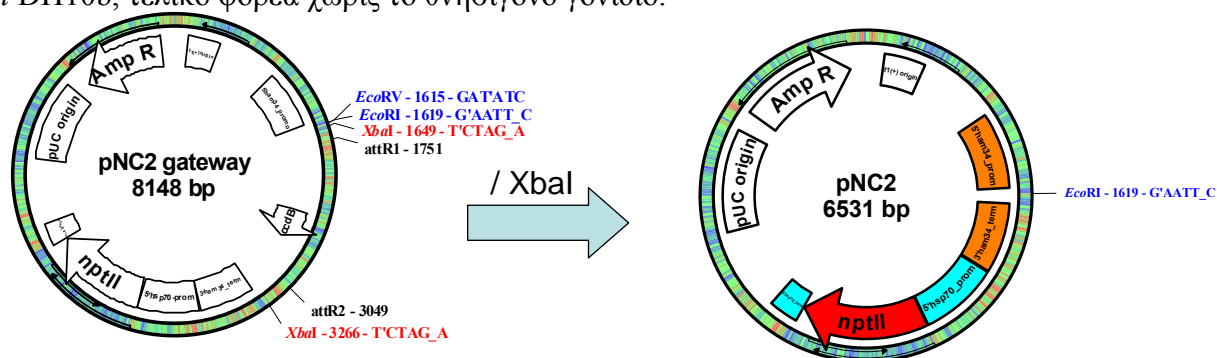
pK7GWIWG2(I),0 φορέας

Ο pK7GWIWG2(I),0 είναι ένας Gateway φορέας που οδηγεί μετά από LR αντίδραση στον σχηματισμό σιγητικής φουρκέτας κατάλληλης για φυτικούς οργανισμούς. Η χρήση αυτού του φορέα έγινε γιατί είναι ένας φορέας που με μια αντίδραση ανασυνδυασμού λαμβάνεται η σιγητική φουρκέτα, αποφεύγοντας επιπλέον αντιδράσεις. Το γεγονός ότι το εσώνιο είναι φυτικής προέλευσης (CHS, chalcone synthase) δεν δημιουργεί πρόβλημα στο σχεδιασμό των πειραμάτων, αφού τα *cis* στοιχεία που αναγνωρίζονται από τον μηχανισμό ματίσματος (splicing) των μυκήτων (donor site και acceptor site) είναι όμοια με αυτά των φυτών (5'ss: GUAUGU και 3'ss: YAG).

Ο pK7GWIWG2(I),0 δεν έχει περιοριστικές θέσεις ανάδρομα του μεταγραφικού τερματιστή T35S και κατάδρομα του υποκινητή P35S, ώστε να κόβουμε την φουρκέτα και να την τοποθετούσαμε στον εκάστοτε επιθυμητό φορέα. Όμως, ανασυνδυασμός με τον κατάλληλο pENTRY (*attL*) φορέα οδηγεί στον σχηματισμό των κατάλληλων περιοριστικών θέσεων. Π.χ RL αντίδραση του pK7GWIWG2(I),0 με τον pENTR_3C δίνει δίπλα στα *attR1* την περιοριστική θέση *XmnI*. Το τελευταίο ένζυμο δεν κόβει το *sGfp*, ενώ τον pK7GWIWG2(I),0 στα ύψη 4660 και 4955 (εντός του promoter). Έτσι, ακολούθησε η εξαγωγή της σιγητικής φουρκέτας.

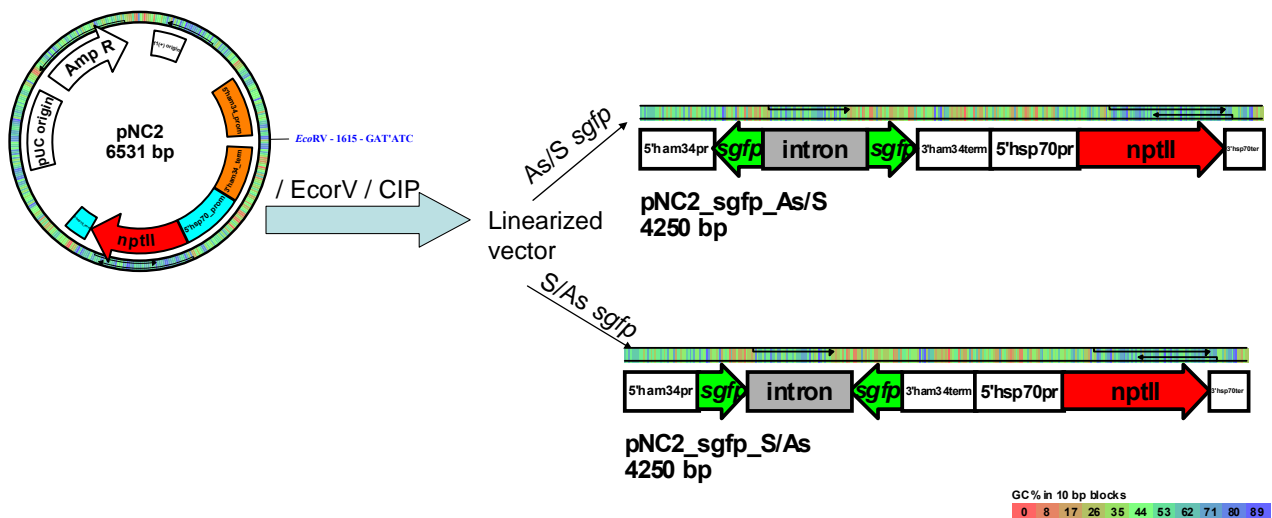
Κατασκευή σιγητικού φορέα για πρωτοπλάστες της *P. parasitica*:

Για την κατασκευή πλασμίδιου που να περιέχει τη σιγητική κασέτα για το γονίδιο *sGfp* και γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε ως “backbone” το πλασμίδιο pNC2_Gateway (παραχωρήθηκε από την Επιστημονική ομάδα «Interactions Plantes-Microorganismes», Toulouse, FRANCE, υπό τη διεύθυνση του Dr. Bernard Dumas, Εικόνα 14). Το πλασμίδιο αυτό περιέχει το θνησιγόνο γονίδιο *ccdB* υπό τον υποκινητή 5'*ham34* και τερματιστή τον 3'*ham34*. Επίσης, περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην geneticin (αντιβιοτικό G418) υπό τον υποκινητή 5'*hsp70* και τερματιστή τον 3'*hsp70*. Αρχικά, με διπλή πέψη αφαιρέθηκε το γονίδιο *ccdB* και ακολούθως εφαρμόστηκε αντίδραση λιγοποίησης. Ο φορέας επαναλιγοποιήθηκε δίνοντας, μετά από μετασχηματισμό σε βακτηριακά *E.coli* DH10b, τελικό φορέα χωρίς το θνησιγόνο γονίδιο.



Εικόνα 14: Σχηματισμός του φορέα pNC2 χωρίς το γονίδιο *ccdB*.

Μετά από αυτή τη διαδικασία οι περισσότερες περιοριστικές θέσεις παρέμειναν στο “backbone”. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκε η μοναδική περιοριστική θέση *EcoRV* και ο φορέας γραμμοποιήθηκε ξανά. Αφού αποφωσφορυλιώθηκε, χρησιμοποιήθηκε ως φορέας κλωνοποίησης σε δύο περιπτώσεις. Στην πρώτη το ένθεμα ήταν η σιγητική φουρκέτα *sGfp*_As/S και στην δεύτερη η σιγητική φουρκέτα *sGfp*_S/As. Η αντίδραση σύνδεσης ήταν μια αντίδραση τυφλών άκρων, επομένως ελήφθησαν κλώνοι που περιείχαν τις φουρκέτες σε φορά 5'→3' ως προς το εσώνιο και το αντίστροφο. Για να ελεγχθεί αν είχαμε την κατασκευή με τη σωστή-λειτουργική για το εσώνιο κατεύθυνση έγινε ελεγκτική πέψη με *SpeI*.

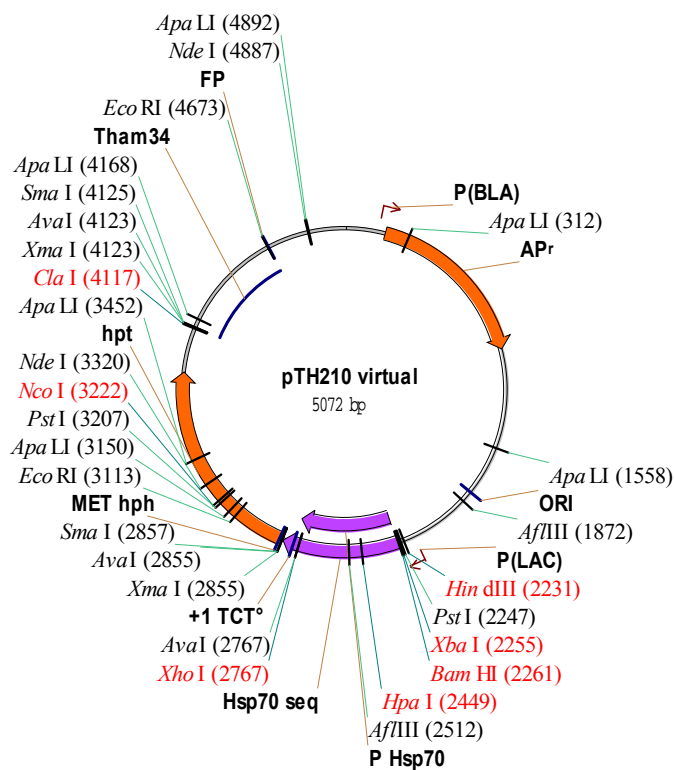


Εικόνα 15: Διάγραμμα κατασκευής των σιγητικών πλασμιδίων pNC2_sGfp_As/S και pNC2_sGfp_S/As.

Οι σιγητικές κασέτες που κατασκευάστηκαν προκαλούν σίγηση σε περίπτωση που ένα στέλεχος *Phytophthora* έχει προηγουμένως μετασχηματιστεί με το γονίδιο *sGfp* και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε ένα αντιβιοτικό, εκτός της geneticin. Έτσι, με διπλή επιλογή σε αντιβιοτικό υπάρχει η δυνατότητα λήψης θετικών σιγημένων transformants. Το *sGfp* στέλεχος, όμως, που υπήρχε στο εργαστήριο ήταν ανθεκτικό σε geneticin. Για αυτό το λόγο προχωρήσαμε και στην κατασκευή νέων σιγητικών κατασκευών με γονίδιο ανθεκτικότητας για άλλο αντιβιοτικό.

Μια πρώτη προσέγγιση ήταν η κατασκευή ενός πλασμιδίου που θα περιείχε το γονίδιο *mGfp4* και το οποίο θα χρησιμοποιούνταν μαζί με ένα δεύτερο πλασμίδιο που θα περιείχε την ανθεκτικότητα σε υδρομυκίνη για εκ νέου μετασχηματισμό σε πρωτοπλάστες της *Phytophthora*. Το πλασμίδιο pTH210 περιείχε το γονίδιο της υδρομυκίνης με τα ρυθμιστικά στοιχεία για έκφραση στη *Phytophthora* παραχωρήθηκε από την Επιστημονική ομάδα «Interactions Plantes-Microorganismes», Toulouse, FRANCE, (Dr. Bernard Dumas). Για το πλασμίδιο που θα περιείχε το γονίδιο *mGfp4* χρησιμοποιήθηκε ως “backbone” το ίδιο πλασμίδιο (pTH210), αφού πραγματοποιήθηκε πλήρη πέψη με *SmaI*, απομόνωση του φορέα από

το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη μετά από ηλεκτροφόρηση και αποφωσφορυλίωση του. Το γονίδιο *mGfp4* απομονώθηκε μετά από διπλή πέψη του φορέα pT20_ *mGfp4* (παραχωρήθηκε από την Επιστημονική ομάδα «Μοριακής Βιολογίας Φυτών», Ηράκλειο, Κρήτη υπό τη διεύθυνση του Dr. Κρίτωνα Καλαντίδη) με *Sma*I και *Sac*I και γέμισμα των άκρων του. Τέλος, το *mGfp4* εισήχθη στον άδειο πλέον pTH210 με αντίδραση λιγοποίησης τυφλών άκρων. Συνεπώς, προέκυψαν δύο πλασμίδια pTH210_ *mGfp4*: το ένα με την κατεύθυνση sense, και το άλλο με την antisense σε σχέση με τον υποκινητή *hsp70*. Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν μετά από αλληλούχηση χρησιμοποιώντας εκκινητές σχεδιασμένους μέσα στο γονίδιο *mGfp4*.

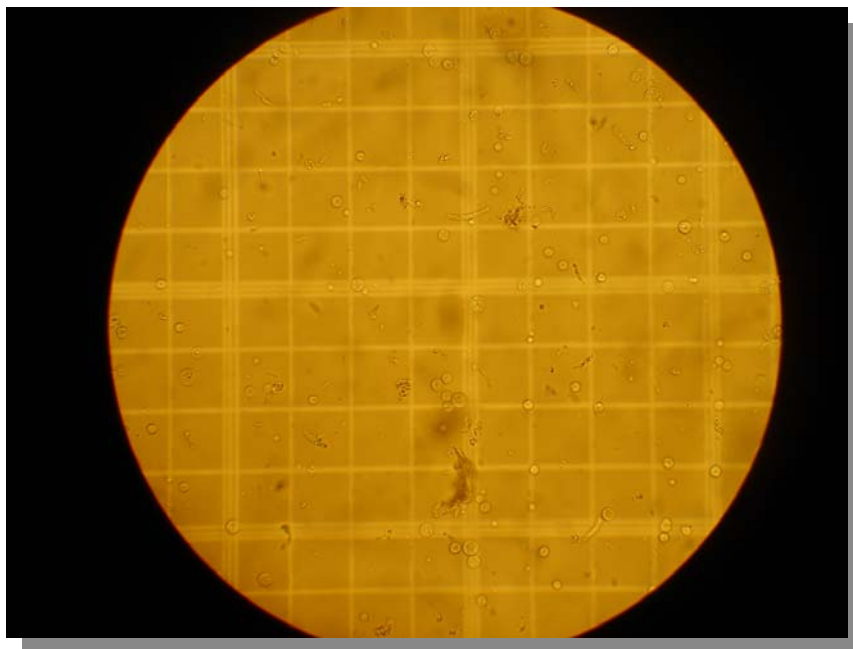


Εικόνα 16: Ο φορέας pTH210 ο οποίος περιέχει το γονίδιο της ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη με υποκινητή τον *P_{Hsp70}* και τερματιστή τον *Tham34*.

Μετασηματισμός της *Phytophthora parasitica*.

Έχοντας κατασκευάσει πλασμιδιακές κατασκευές που προκαλούν τη σίγηση του γονιδίου *sGfp* στην *Phytophthora* προχωρήσαμε σε μετασηματισμό του στελέχους *sGFP P. parasitica* (*Ppn0*) που διαθέταμε στο εργαστήριο (Δρ. Ν. Σκανδάλης). Κατά την εφαρμογή του μετασηματισμού παρασκευάστηκαν πρωτοπλάστες επώζοντας θραύσματα μυκηλιακών υφών σε κατάλληλο ενζυμικό διάλυμα, ώστε να λυθεί το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα και να παραμείνουν τελικά ακέραιοι πλωτοπλάστες. Ακολούθως, γραμμοποιήθηκαν τα πλασμίδια που περιείχαν

τις σιγητικές κασέτες και την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό με τέτοιο τρόπο ώστε να κόβονται σε μοναδική θέση και να αφήνουν ακέραια τα επιθυμητά γονίδια και τα ρυθμιστικά τους στοιχεία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Bam*HI για τους φορείς pTH210 και pTH210_ *mGfp4*_As, αντίστοιχα. Η λιποφεκτίνη (λιποσώματα) που χρησιμοποιήθηκε, χρησίμευσε ως βοηθητικό μόριο για την προσκόλληση του γραμμικού μορίου DNA (γραμμικό πλασμίδιο) στην υδρόφοβη μεμβράνη του πρωτοπλάστη. Συνεπώς, κατά την ανάρρωση και την αναγέννηση των πρωτοπλαστών, το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα δημιουργείται ξανά, το γραμμικό μόριο DNA εισέρχεται στο εσωτερικό του πρωτοπλάστη και τελικά ενσωματώνεται στο γένωμα του μύκητα, ως αυτόνομο χρωμόσωμα και εκφράζει τις ιδιότητες που του εισήχθησαν. Τέλος, εφαρμόστηκε σοκ των πρωτοπλαστών με πολυαιθυλενογλυκόλη, ένα σακχαρικό διάλυμα που προκαλεί την μείωση του υδατικού διαλύματος και την τελική συμπύκνωση του μίγματος, φέρνοντας τα μόρια σε επαφή (πρωτοπλάστες με σύμπλοκο λιποσωμάτων-γραμμικού DNA). Το πείραμα του μετασχηματισμού ολοκληρώνεται με την αναγέννηση των πρωτοπλαστών παρουσία πλήρους θρεπτικού μέσου (V₈ 5%).



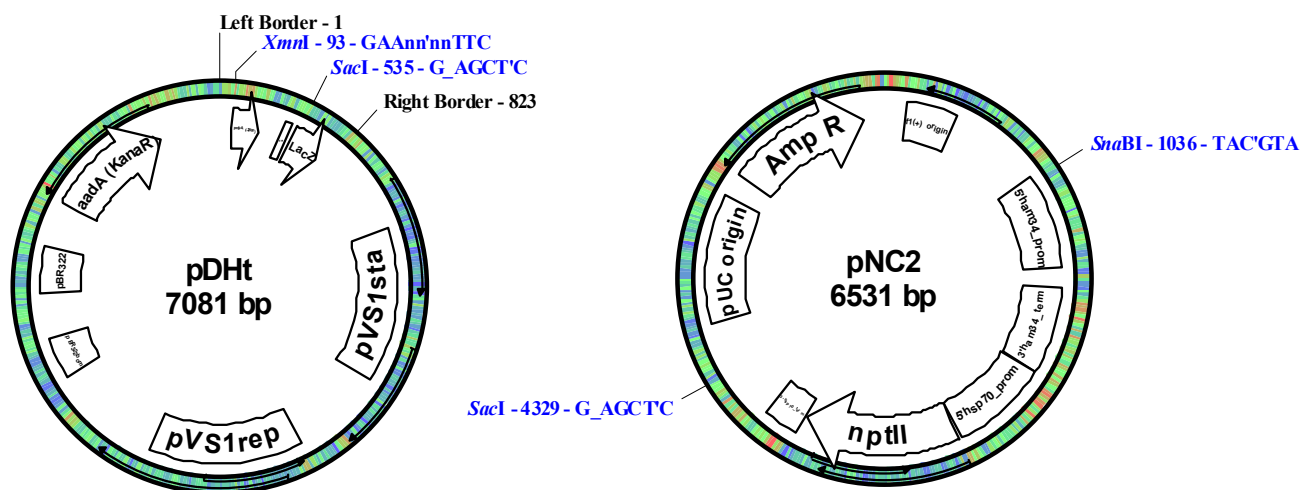
Εικόνα 17: Πρωτοπλάστες της *P.parasitica* κατά την μικροσκοπική παρατήρηση σε αιμοκυτταρόμετρο. Διακρίνονται και θραύσματα από μυκηλιακές υφές.

Επιπροσθέτως, όταν συλλέγουμε το διάλυμα πρωτοπλαστών και ακολουθεί η μικροσκοπική παρατήρηση, υπάρχει η περίπτωση στο διάλυμα να περιέχονται θραύσματα μυκηλιακών υφών ή και σποριάγγεια (διπλοειδή). Τα τελευταία συνήθως είναι παρά μόνο άδεια κύτταρα.

Αν και η παρασκευή των πρωτοπλαστών ήταν επιτυχής (καλή ποιότητα και ποσότητα), οι τελευταίοι δεν αναγεννήθηκαν. Ακολούθησαν επαναλήψεις χωρίς όμως να δίνουν αποτέλεσμα.

Η λιποφεκτίνη είναι ένα αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται ευρέως στο μετασχηματισμό κυττάρων θηλαστικών. Σε αυτές όμως τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται και ένας ειδικός ορός στον οποίο αρχικά αραιώνεται η λιποφεκτίνη και στη συνέχεια προστίθεται και το γραμμικό DNA. Ακολουθήθηκε και το πρωτόκολλο αυτό χωρίς και πάλι να δούμε αναγέννηση πρωτοπλαστών και σχηματισμό υφών στο τέλος της διαδικασίας.

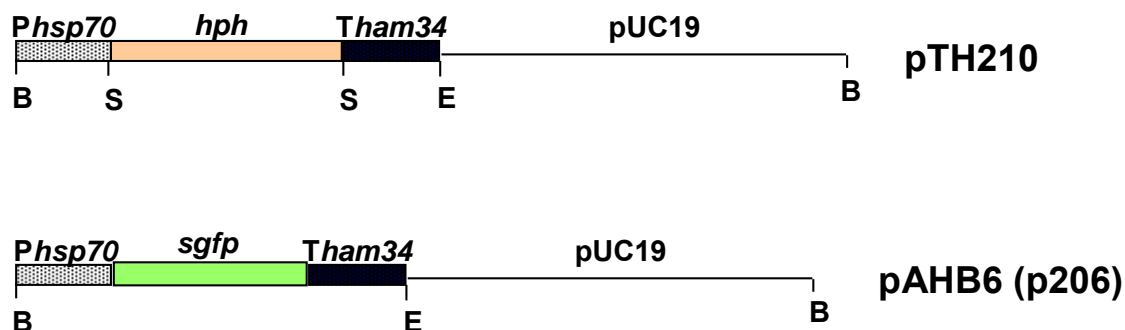
Στην προσπάθεια εύρεσης λύσης στο πρόβλημα του μετασχηματισμού πρωτοπλαστών έγινε μια νέα προσέγγιση, η κατασκευή ενός πλασμιδίου που θα επέτρεπε τον μετασχηματισμό της *Ppn0* με αγροβακτήριο. Αυτή η μέθοδος έχει ήδη εφαρμοστεί επιτυχώς στο παρελθόν με την *P. infestans*. Ως “backbone” του αγροβακτηριακού φορέα χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pDHt (παραχωρήθηκε από την Επιστημονική ομάδα «Interactions Plantes-Microorganismes», Toulouse, FRANCE, υπό τη διεύθυνση του Dr. Bernard Dumas). Το πλασμίδιο αυτό είναι ο αγροβακτηριακός φορέας με τα left και right borders και ανάμεσα τους υπάρχει ένα multicloning site. Εφαρμόστηκε η πέψη στον φορέα με *XmnI* και *SacI*. Ως ένθεμα χρησιμοποιήθηκε η περιοχή του φορέα pNC2 (χωρίς το *ccdB*, βλ. ανωτέρω) που είχε κατασκευαστεί προηγουμένως, και που φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην geneticin και τα ρυθμιστικά στοιχεία για την *P. parasitica*. Το ένθεμα αυτό απομονώθηκε μετά από πέψη με τα ένζυμα *SnaBI* και *SacI* και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή υψηλής συγκέντρωσης σε αгарόζη. Ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης, απομόνωση θετικού κλώνου και εξακρίβωσή του με περιοριστική ανάλυση. Απομένει η εισαγωγή της σιγητικής φουρκέτας



Εικόνα 18: Ο φορέας pDHt, ο οποίος περιέχει τα left και right borders για τη μεταφορά του T-DNA από το αγροβακτήριο στο εσωτερικό του μύκητα. Ο φορέας pNC2, ο οποίος περιέχει το γονίδιο της ανθεκτικότητας σε geneticin και τα κατάλληλα για την *Ppnθ* ρυθμιστικά στοιχεία.

Μετά από σειρά προσπαθειών μετασχηματισμού πρωτοπλαστών που δεν στέφθηκαν με επιτυχία, έγινε μια ακόμα προσπάθεια στο εργαστήριο του Dr. Bernard Dumas (υπό την επίβλεψη του Arnaud Bottin) στο *w.t.* στέλεχος της *Ppnθ* με ισομοριακό μίγμα DNA των πλασμιδίων pTH210 (ανθεκτικότητα στην υδρομυκίνη) και pAHB6 (γονίδιο *sGfp*). Τα πλασμίδια γραμμοποιήθηκαν με *Bam*HI. Η συγκέντρωση των πρωτοπλαστών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν $5 \times 10^6/600\mu\text{l}$ (λιγότεροι από ότι θα έπρεπε). Μετά την πρώτη μέρα ανάρρωσης των πρωτοπλαστών, κατά την οποία αναγεννάται το κυτταρικό τοίχωμα, και πριν τους απλώσουμε σε τρυβλίο με V₈ 5% και υδρομυκίνη (30μg/ml), παρατηρήθηκε δείγμα στο μικροσκόπιο και φάνηκαν ήδη οι πρώτες υφές. Από την δεύτερη μέρα άρχισαν να φαίνονται οι πρώτες υφές στο τρυβλίο ανάπτυξης κάτω από το στερεοσκόπιο. Μετά από 4-5 μέρες τα πρώτα μυκήλια είχαν μεγαλώσει τόσο που έπρεπε να ανακαλλιεργηθούν σε νέα τρυβλία με θρεπτικό όπου χρησιμοποιήθηκε υδρομυκίνη σε αυξημένη συγκέντρωση (50μg/ml), ώστε να ασκηθεί ακόμα μεγαλύτερη πίεση επιλογής στο μύκητα και να αυξηθούν οι πιθανότητες σταθερής ενσωμάτωσης του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό και κατ' επέκταση του πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο *sGfp*. Συνολικά, αναπτύχθηκαν 14 “transformants”, τα οποία αφού άπλωσαν τις υφές τους πάνω σε αποστειρωμένη μεμβράνη σελοφάν, παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο σε υπεριώδες φως. Διαπιστώθηκε ότι κανένα “transformant” δεν φθορίζε.

Παρατηρήθηκαν μόνο κάποια κίτρινα ίχνη εξαιτίας του αυτοφθορισμού του μύκητα. Από τη στιγμή που δεν παρατηρήθηκε φθορισμός το πείραμα σταμάτησε και δεν ελέγχθηκε το επίπεδο έκφρασης της ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη.

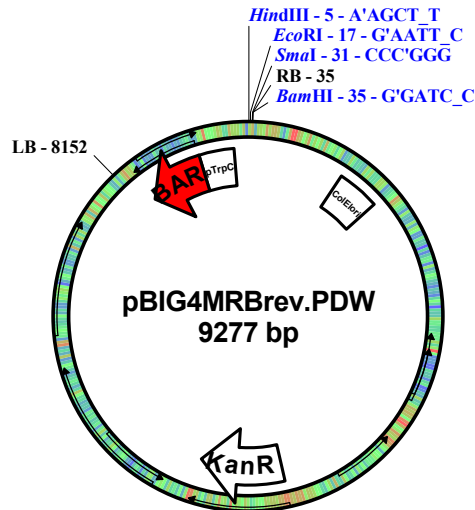


Εικόνα 19: Ο φορέας pTH210, ο οποίος περιέχει το γονίδιο της ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη, και ο φορέας p206, ο οποίος περιέχει το γονίδιο *sGfp*, με υποκινητή τον *PHsp70* και τερματιστή τον *Tham34*.

Κατασκευή σιγητικού φορέα για τον *Colletotrichum higginsianum*:

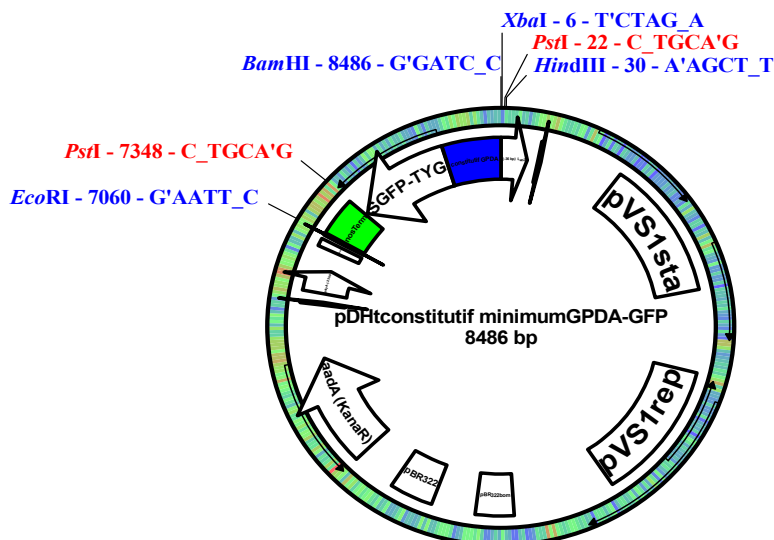
Καθώς το *C. higginsianum* μετασχηματίζεται συνεπιάζοντας αγροβακτήριο με σπόρια του ασκομύκητα, θα πρέπει να υπάρχει ένας κατάλληλος δυαδικός φορέας για αυτόν. Ο δυαδικός αυτός φορέας θα πρέπει να φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας για το βακτήριο, τα αριστερά και δεξιά άκρα, και ανάμεσα σε αυτά, τα ρυθμιστικά στοιχεία που αναγνωρίζονται από το *Colletotrichum*, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό για το μύκητα, και ένα multicloning site για να κλωνοποιηθεί το επιθυμητό τμήμα DNA.

Στην περίπτωση του *C. higginsianum* ο δυαδικός αυτός φορέας δεν υπήρχε και συνεπώς έπρεπε να κατασκευαστεί εξ αρχής. Ο αγροβακτηριακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε ως “backbone” ήταν αυτός του pBIG4MRBrev (παραχωρήθηκε από τον Dr. Richard O’Connell). Ο φορέας αυτός φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη για το βακτήριο τα αριστερά και δεξιά άκρα, και ανάμεσα το γονίδιο ανθεκτικότητας στο Bialaphos acetyltransferase/ ζιζανιοκτόνο BASTA (*bar*) για το μύκητα υπό τον υποκινητή *TrpC* του *Aspergillus nidulans*.



Εικόνα 20: Ο φορέας pBIG4MRBrev, στον οποίο θα προστεθεί ο υποκινητής miniGPDA και ο τερματιστής NosT.

Σχεδιάστηκε ζευγάρι εκκινητών που θα υβριδίζονται στα άκρα του υποκινητή miniGPDA και ένα άλλο ζευγάρι που θα υβριδίζεται στα άκρα του τερματιστή NosT. Τα ρυθμιστικά αυτά στοιχεία είναι κατάλληλα για έκφραση γονιδίων του γένους *Colletotrichum* και έχουμε χρησιμοποιηθεί σε αντίστοιχες μελέτες στο παρελθόν. Ως αλληλουχία-εκμαγείο για τον πολυμερισμό των επιθυμητών τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pDht_miniGPDA_GFP (παραχωρήθηκε από την Επιστημονική ομάδα «Interactions Plantes-Microorganismes», Toulouse, FRANCE, υπό τη διεύθυνση του Dr. Bernard Dumas).



Εικόνα 21: Ο φορέας pDht_miniGPDA_GFP, ο οποίος περιέχει τον υποκινητή τον miniGPDA και τον τερματιστή NosT.

Οι εκκινητές αυτοί, επίσης, σχεδιάστηκαν να περιέχουν περιοριστικές θέσεις, ώστε μετά από πέψη των PCR προϊόντων τους να σχηματίζονται ενθέματα με τέτοια άκρα ώστε να συνδέονται στις αντίστοιχες θέσεις του δυαδικού φορέα και στην επιθυμητή κατεύθυνση.

miniGPDA		GC+AT T _m (°C)
Forward	Primer- BamHI -Primer 5'- CTCTAGA GGATCC GATCGATAGCTGGC -3'	84.0
Reversed	Primer- BamHI -Primer 5'-GCTCACCAT GGATCC GTCTGCTC-3'	74.0
NosT		
Forward	Primer- EcoRI -Primer 5'-GCCGCC GAATTC AGATCG-3'	62.0
Reversed	Primer- HindIII -Primer 5'-GACCATGAGTACG AAGCTT CATG-3'	68.0

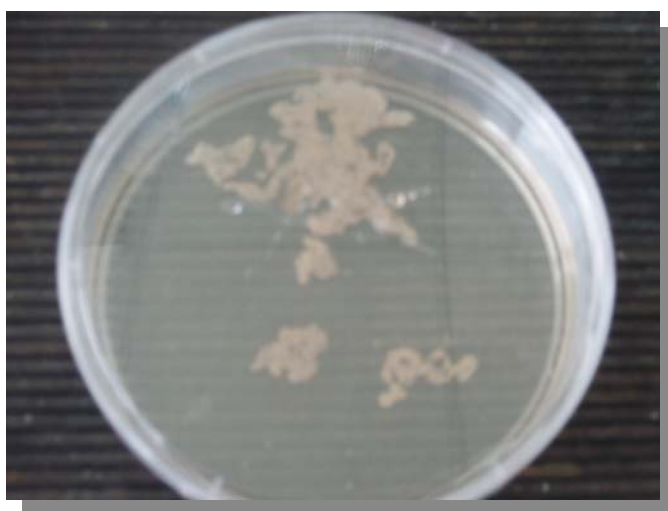
Ο δυαδικός φορέας αρχικά κόπηκε με *BamHI* και συνδέθηκε με τον υποκινητή miniGPDA. Στη συνέχεια, κόπηκε με *EcoRI* και *HindIII* και συνδέθηκε με τον τερματιστή *NosT*. Τέλος, εφαρμόστηκε πέψη με *SmaI* και σύνδεση με τη σιγητική φουρκέτα του *sGfp* (τυφλά άκρα, αφού είναι κομμένη με *XmnI*), As/S και S/As. Ο έλεγχος της σωστής κατεύθυνσης του εσωνίου ελέγχθηκε με πέψη *PstI* και *SpeI*. Οι δυαδικοί φορείς pBIG4_ *sGfp*_As/S και pBIG4_ *sGfp*_S/As μετασχηματίστηκαν στο αγροβακτηριακό στέλεχος AGL-1 και εφαρμόστηκε μετασχηματισμός σπορίων ενός σταθερού *sGfp* στελέχους του *Colletotrichum* (μετασχηματισμένο από τον Dr. Νικόλαο Σκανδάλη) με την χρήση του στελέχους AGL-1 του *Agrobacterium tumefaciens*. Η τελική συγκέντρωση του BASTA ήταν 50 µg/ml. Κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, σταγόνα διαλύματος σπορίων (δεν πρέπει να αναπτυχθούν παρουσία του BASTA) και σταγόνα διαλύματος αγροβακτηρίου (δεν πρέπει να αναπτυχθούν λόγω σεφοταξίμης), τα οποία δεν αναπτύχθηκαν. Απομονώθηκαν εν δυνάμει “transformants” τα οποία μετά από ανάπτυξη τους (10 ημέρες) σε επιφάνεια σελοφάνης παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο παρουσία UV για να διαπιστωθεί αν μειώνονται τα επίπεδα φθορισμού της GFP πρωτεΐνης. Όμως, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε, γεγονός που μας οδήγησε στην υπόθεση ότι ο δυαδικός φορέας ίσως να μην κατασκευάστηκε σωστά. Με

περιοριστικές αναλύσεις που έγιναν, θεωρήθηκε πιθανόν το πρόβλημα να οφείλεται στην μη ένθεση του υποκινητή στο αγροβακτηριακό φορέα. Έτσι, η σιγητική κασέτα κατασκευάστηκε ξανά από την αρχή χρησιμοποιώντας ακριβώς τις ίδιες περιοριστικές θέσεις. Το μόνο που άλλαξε ήταν ο φορέας κλωνοποίησης, που σε αυτή την περίπτωση ήταν ο pBlueScript II KS+. Αφού κατασκευάστηκαν οι ενδιάμεσοι φορείς pBlueScript II KS+_sGfp_S/As και pBlueScript II KS+_sGfp_As/S, στάλθηκαν για αλληλούχηση και διαπιστώθηκε ότι όλα τα ενθέματα εισήχθησαν με τη σωστή κατεύθυνση. Σε επόμενο στάδιο, έγινε προσπάθεια πολυμερισμού ολόκληρης της κασέτας με την εφαρμογή PCR. Το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό του “forward” για τον υποκινητή miniGPDA και του “reverse” για τον τερματιστή *NosT*. Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος δεν επετεύχθη και σχεδιάστηκε νέο ζεύγος εκκινητών που υβριδίζονταν στην περιοχή των εκκινητών αλληλούχησης M13. Και πάλι, όμως δεν ελήφθη προϊόν και το πείραμα σταμάτησε σε αυτό το σημείο, δηλαδή την κατασκευή της σιγητικής κασέτας σε ένα ενδιάμεσο φορέα. Συνεπώς, η μόνη μελλοντική προσέγγιση θα ήταν αυτή της χρήσης περιοριστικών ενζύμων για την απομόνωση της κασέτας και την ένθεσή της στον τελικό αγροβακτηριακό φορέα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ:

Ο γενετικός μετασχηματισμός πρωτοπλαστών είναι ένα πείραμα με πολλά στάδια στα οποία χρησιμοποιούνται διαφορετικά διαλύματα και ακολουθούνται ευαίσθητοι χειρισμοί. Η αποτυχία ενός πειράματος μετασχηματισμού μπορεί, επομένως, να οφείλεται σε διαφορετικά αίτια κάθε φορά. Γενικώς, αυτό που χρίζει ιδιαίτερης προσοχής είναι να διατηρείται πάντα η συγκέντρωση του σακχάρου σταθερή (μανιτόλη 1M, όχι κάτω από 0.75M) σε όλα τα στάδια του μετασχηματισμού, ώστε να μην χάνεται η ισοτονικότητα του διαλύματος και να αποφεύγεται η τελική ρήξη της μεμβράνης του πρωτοπλάστη. Επίσης, ιδιαίτερη προσοχή στο pH του διαλύματος μιας και οι πρωτοπλάστες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στις αλλαγές αυτού. Ακόμη, είναι πολύ σημαντικό να λαμβάνεται υψηλής συγκέντρωσης και ποιότητας DNA (πλήρης πέψη και όχι ίχνη αιθανόλης), καθώς και πρωτοπλάστων. Αν δεν τηρούνται οι ιδανικές αναλογίες σε κάθε πείραμα τότε μειώνονται οι πιθανότητες για ένα θετικά μετασχηματισμένο μύκητα (transformant).

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την λύση του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα ήταν τα Driselase και Caylase C3. Τα λυτικά αυτά ένζυμα είναι τα κατάλληλα για τη λύση του τοιχώματος της *Phytophthora*. Το μίγμα Caylase C3 εμφανίζει τη δράση β -1.3, β -1.4, α -1.3 και α -1.4 γλυκανάσης, κυτταρινάσης και λυσοζύμης. Το μίγμα Driselase εμφανίζει τη δράση ξυλανάσης, χιτινάσης και λαμιναρινάσης. Πρέπει τα ένζυμα αυτά να χρησιμοποιηθούν στις προτεινόμενες συγκεντρώσεις, ειδάλτως γίνονται τοξικά για το μύκητα ή οι πρωτοπλάστες αδυνατούν να αναγεννηθούν. Επίσης, ο μυκηλιακός ιστός πρέπει να είναι το μέγιστο 3-4 ημερών για να διευκολύνει τη δράση των ενζύμων και να έχουμε υψηλότερης ποιότητας και ποσότητας πρωτοπλάστες.



Εικόνα 22: Η εμφάνιση των μυκηλιακών υφών μετά από 2 ώρες επώσης τους με το ενζυμικό διάλυμα. Το διάλυμα έχει αρχίσει να γίνεται διαυγές.

Αλλαγές που θα συνίσταται να γίνουν ως προς το πρωτόκολλο δεν αφορούν τα στάδια για την παρασκευή των πρωτοπλαστών. Πριν την εφαρμογή σοκ με PEG, οι πρωτοπλάστες πάντα αριθμούνται σε αιμοκυτταρόμετρο. Η μικροσκοπική αυτή παρατήρηση επιτρέπει παράλληλα τη διαπίστωση της κατάστασης των πρωτοπλαστών (ποιότητα). Πολλές φορές οι πρωτοπλάστες μπορεί να είναι αρκετοί σε ποσότητα ώστε να συνεχιστεί το πρωτόκολλο του μετασχηματισμού, αλλά να μην είναι καλής ποιότητας. Οι πρωτοπλάστες που προτιμώνται είναι οι μεσαίου και μεγάλου μεγέθους και φυσικά αυτοί που περιέχουν ακόμα τον πυρήνα τους (εμπύρηνοι). Συγκεκριμένα, στην εργασία αυτή όσα πειράματα και αν πραγματοποιήθηκαν είτε στην Ελλάδα είτε στη Γαλλία, οι πρωτοπλάστες ήταν καλής ποιότητας. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το πρόβλημα εστιάζεται στο στάδιο του σοκ με PEG ή στο στάδιο ανάρρωσης των πρωτοπλαστών, όπου το κυτταρικό τους τοίχωμα αναγεννάται.

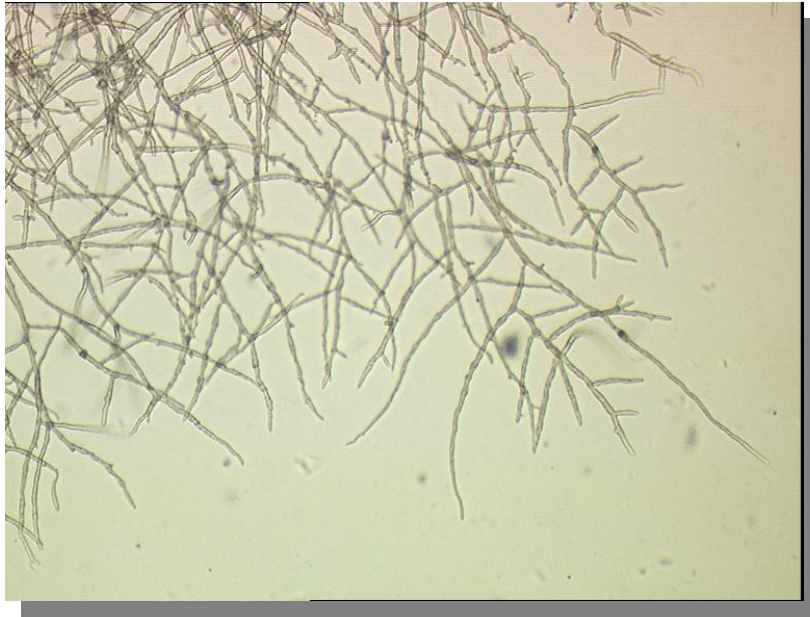
Μια πιθανή λύση στο πρόβλημα αυτό θα ήταν να ακολουθηθεί μια εναλλακτική προσέγγιση κατά την οποία γίνεται μετασχηματισμός πρωτοπλαστών απευθείας με dsRNA [81]. Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο δεν εφαρμόζεται το σοκ με PEG και οι πρωτοπλάστες μετά τη συνεπώαση με το dsRNA τοποθετούνται αμέσως σε θρεπτικό για αναγέννηση. Το πρωτόκολλο αυτό οδηγεί σε παροδική σίγηση γονιδίων. Αν όμως κάποιος επιθυμεί τη μελέτη γονιδίων σχετικών με την ανάπτυξη του μύκητα, το πρωτόκολλο αυτό δεν είναι το κατάλληλο. Φυσικά, η μεθοδολογία αυτή θα μπορούσε να δοκιμαστεί και με γραμμικό DNA, αλλά οι πιθανότητες θα είναι μικρότερες. Γενικά, εφαρμόζοντας το μετασχηματισμό πρωτοπλαστών απευθείας με dsRNA υπάρχουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι της κλασικής μεθόδου, όπως ότι απαιτείται μικρότερος αριθμός πρωτοπλαστών $0.2-1 \times 10^5$ κύτταρα/ ml, έναντι 1.7×10^7 κύτταρα/ ml και ότι δε χρειάζεται να κατασκευαστεί πλασμιδιακός φορέας για τον κάθε μύκητα που μελετάται και για το κάθε γονίδιο.

Στην *P. infestans* και άλλα είδη του γένους *Phytophthora* έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζουν γενωμική αστάθεια [42]. Παρατηρείται η παρουσία αλληλουχιών παρόμοιων των μεταθετών στοιχείων και συχνοί ανασυνδυασμοί κατά τη μίτωση. Επίσης, αν μετασχηματιστεί κάποιο διπλοειδές τμήμα του μύκητα πιθανόν η έκφραση θα χαθεί στην επόμενη γενιά. Αυτό σημαίνει ότι ακόμα και αν ένα γονίδιο έχει ενσωματωθεί στο γένωμα του Ωομύκητα αποτελεσματικά, μπορεί να μην εκφράζεται σε όλους τις υφές του οργανισμού ή μπορεί από γενιά σε γενιά να μειώνεται το επίπεδο έκφρασης του. Το γεγονός της γενωμικής αστάθειας της *Phytophthora* δυσχεραίνει τη διεξαγωγή συμπερασμάτων αν δεν υπάρχει ένα σταθερό «transformant» και ειδικά όταν χρησιμοποιείται το γονίδιο *sGfp* για μικροσκοπικές παρατηρήσεις. Συνεπώς, είναι δύσκολο να εμπιστευτεί κανείς ένα ασταθές «transformant». Αυτός ήταν, άλλωστε, και ο κύριος λόγος που έγινε εξ' αρχής προσπάθεια μετασχηματισμού ενός *w.t.* στελέχους της *P. parasitica* στο εργαστήριο της Γαλλίας.

Επίσης, η καλύτερη λύση θα ήταν η μελλοντική προσπάθεια μετασχηματισμού των πρωτοπλαστών με ένα μοναδικό πλασμίδιο που θα φέρει και το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό και το επιθυμητό προς έκφραση γονίδιο. Οι πιθανότητες επιτυχίας θα αυξηθούν γιατί ο μύκητας θα έχει να ενσωματώσει ένα μοναδικό και όχι δύο ανεξάρτητα μόρια DNA. Με αυτό τον τρόπο, παρατηρώντας ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό του αναγεννημένου μύκητα από γενιά σε γενιά

(ανακαλλιέργειες) θα αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι ο μύκητας έχει προσλάβει και εκφράζει και την δεύτερη επιθυμητή ιδιότητα. Φυσικά, η μακροσκοπική παρατήρηση θα πρέπει να ακολουθηθεί από μοριακά δεδομένα που θα αποδεικνύουν ότι τα γονίδια ενσωματώθηκαν επιτυχώς στο γένωμα του μύκητα. Αυτές οι τεχνικές είναι η PCR (κατάλληλο ζεύγος εκκινητών) και η υβριδοποίηση κατά Southern (κατάλληλος ιχνηλάτης).

Όσον αφορά τις προσπάθειες μετασχηματισμού που έλαβαν χώρα στη Γαλλία, όταν παρατηρήθηκε δείγμα των αναγεννημένων πρωτοπλαστών στο μικροσκόπιο και φάνηκαν ήδη οι πρώτες υφές σήμαινε ότι αρχικά τουλάχιστον πετύχαμε να πάρουμε ζωντανούς πρωτοπλάστες. Το γεγονός ότι τα “transformants” δεν φθόριζαν πράσινο παρουσία UV σημαίνει ότι το *sGfp* δεν ενσωματώθηκε στο γένωμα του μύκητα. Αν και τα “transformants” αναπτύχθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις υγρομυκίνης, αυτό δεν πιστοποιεί ότι ενσωματώθηκε το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό. Ο μόνος τρόπος είναι με μοριακές τεχνικές. Έτσι, με μοριακό έλεγχο θα μπορούσε να αποδειχθεί η επιτυχία του πρωτόκολλου του μετασχηματισμού. Όμως, μια βασική διαφορά κατά την εφαρμογή αυτού του πρωτόκολλου ήταν ότι το αντιδραστήριο της λιποφεκτίνης αντικαταστάθηκε από το Turbofect (Fermentas). Το αντιδραστήριο αυτό είναι ένα κατιονικό πολυμερές και δεσμεύεται με το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA. Το σύμπλοκο Turbofect-DNA είναι πιο σταθερό, προστατεύει το DNA από τυχόν αποδόμησή του και διευκολύνει την μεταφορά του στο εσωτερικό των κυττάρων. Συγκρινόμενο με άλλα αντιδραστήρια, όπως η λιποφεκτίνη, παρουσιάζει λιγότερη τοξικότητα για τα κύτταρα. Έτσι, αν και είχαμε λιγότερους από το ιδανικό πρωτοπλάστες λάβαμε 14 ‘transformants’. Πιθανόν, να έπαιξε σημαντικό ρόλο στην διεξαγωγή του πειράματος. Επίσης, μια τελευταία διαφορά είναι ότι οι πρωτοπλάστες μετά το σοκ με PEG αναρρώσαν σε θρεπτικό V₈ 5% το οποίο δεν είχε φιλτραρισθεί, και συνεπώς ήταν πιο πλούσιο σε θρεπτικές ουσίες για τους πρωτοπλάστες.



Εικόνα 23: Η εμφάνιση των μυκηλιακών υφών της *Pph0* μετά από 4-5 μέρες ανάπτυξης στην επιφάνεια σελοφάνης.

Όσον αφορά στο *Colletotrichum*, κατασκευάστηκε σε ενδιάμεσο φορέα (pBlueScript II KS+) ολόκληρη η σιγητική κασέτα φέροντας επίσης τον υποκινητή και τον τερματιστή. Το γεγονός αυτό συνέβαλε στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αυτής της προσπάθειας μέσω αλληλούχησης του φορέα σε κάθε βήμα κατασκευής του. Γενικώς, σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών με σκοπό να χρησιμοποιηθούν κατά την αλληλούχηση των κασετών, αλλά σχεδόν ποτέ δεν έδιναν αποτέλεσμα όταν το εκμαγείο για τον αλληλουχητή ήταν το τελικό πλασμίδιο. Μια δεύτερη προσέγγιση για να σιγουρευτεί κανείς ότι το εκάστοτε ένθεμα συνδεόταν στον φορέα κλωνοποίησης είναι η υβριδοποίηση. Αυτό, όμως, συνεπάγεται το σχεδιασμό τόσων ιχνηλατών όσων και των διαφορετικών ενθεμάτων και ότι σε κάποιες περιπτώσεις δεν θα φαινόταν η κατεύθυνση του ενθέματος μέσα στον φορέα. Επίσης, ο φορέας pBlueScript II KS+ είναι μικρότερος σε μέγεθος από ότι ο pBIG4MRBrev, και αυτή του η ιδιότητα τον κάνει πιο εύκολο σε αντιδράσεις σύνδεσης και μετασχηματισμού σε βακτηριακά κύτταρα. Σημαντικό είναι, ακόμη να κατασκευάζονται φουρκέτες που να περιλαμβάνουν εσώνια με προέλευση ίδια με του μύκητα που πρόκειται να μετασχηματιστεί. Για το μέλλον επίσης θα μπορούσε να κατασκευαστεί ένα πλασμίδιο με “backbone” τον pBIG4MRBrev και το οποίο θα έφερε επίσης τον υποκινητή και τον τερματιστή, αλλά στη θέση του επιθυμητού γονιδίου να τοποθετούνταν το *ccdB*. Συνεπώς, θα δημιουργούνταν ένας gateway φορέας έκφρασης γονιδίων, ειδικά για το *Colletotrichum*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Bailey, J. A. and M. J. Jeger. 1992. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. CAB International, Wallingford, Oxon.
2. Baulcombe D. 2005. RNA silencing. Trends in Biochemical Sciences. 30(6):290-293.
3. Birch P.R.J., A.P. Rehmany, L. Pritchard, S. Kamoun and Jim L. Beynon, 2006, "Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells", Update TRENDS in Microbiology 14:8-11.
4. Blanco F.A. and H.S. Judelson. 2005. A bZIP transcription factor from *Phytophthora* interacts with a protein kinase and is required for zoospore motility and plant infection. Mol. Microb. 56, 638–648.
5. Bob B.B., G. Wilhelm and J.L. Russel, Biochemistry and Molecular Biology of Plants.
6. Bottin A., L. Larche, F. Villalba, E. Gaulin, M. T. Esquerre-Tugaye and M. Rickauer. 1999. Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. FEMS Microbiology Letters. 176:51-56.
7. Bundock P, A. Dulk-Ras, A. Beijersbergen and P.J. Hooykaas. 1995. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 14:3206–3214.
8. Carpenter, A.E. and D.M. Sabatini. 2004. Systematic genome-wide screens of gene function. Nat. Rev. Genet. 5:11-12.
9. Chisholm S.T., G. Coaker, B. Day and B.J. Staskawicz. 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. Cell. 124:803-814.
10. Chiu, W.L., Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi and J. Sheen. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. Curr. Biol. 6:325-330.
11. Cole GT, Hoch HC, eds. 1991. The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. New York: Plenum. 555 pp.

12. Cooke D. E. L., A. Drenth, J. M. Duncan, G. Wagels and C. M. Brasier. 2000. A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. 30:17–32.
13. Cvitanich C. and H. Judelson. 2003. Stable transformation of the oomycete, *Phytophthora infestans*, using microprojectile bombardment. *Curr. Genet.* 42, 228–235.
14. de Groot M. J.A., P. Bundock, P. J.J Hooykaas and A. G.M. Beijersbergen. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16, 839 – 842.
15. de Wit JGM Pierre and Joosten HAJ Matthieu. Avirulence and resistance genes in the *Cladosporium fulvum*-tomato interaction. 1999. *Current Opinion in Microbiology*. 2:368-373.
16. Dodds Peter N., Gregory J. Lawrence, Ann-Maree Catanzariti, Michael A. Ayliffe, and Jeffrey G. Ellis, 2004, “The *Melampsora lini* AvrL567 Avirulence Genes Are Expressed in Haustoria and Their Products Are Recognized inside Plant Cells”, *The Plant Cell*, 16:755–768.
17. Dufresne M., S. Perfect, A.L. Pellier, J.A. Bailey and T. Langin. 2000. A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Plant Cell* 12:1579-1590.
18. Edgar Huitema, Jorunn I.B. Bos, Miaoying Tian, Joe Win, Mark E. Waugh and Sophien Kamoun. 2004. Linking sequence to phenotype in *Phytophthora*–plant interactions. *TRENDS in Microbiology*. 12:193-200.
19. Epstein L., K. Lusnak and S. Kaur. 1998. Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*). *Fungal Genet. Biol.* 23:189-203.
20. Erwin and Ribeiro, 1996, *Phytophthora* diseases worldwide. St Paul, MN : APS Press.
21. Figurski, D. H., and D.R. Helinski.1979. Replication of an Origin-containing derivative of plasmid RK-2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:1648-1625.
22. Fire A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-811.

23. Fulci V. and G. Macino. 2007. Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. *Current Opinion in Microbiology*. 10:199-203.
24. Gaulin, E., M. A. Madoui, A. Bottin, C. Jacquet, C. Mathe, A. Couloux, P. Wincker, and B. Dumas. 2008. Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: new oomycete putative pathogenicity factors and metabolic pathways. *PLoS ONE* 3:e1723).
25. Gaulin, E., C. Jacquet, A. Bottin, and B. Dumas. 2007. “Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*”, *Molecular Plant Pathology*, 8:5:539-548.
26. Gaulin, E., Jauneau, A., Villalba, F., Rickauer, M., Esquerré-Tugayé, M.T. and Bottin, A. 2002. The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica var. nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *J. Cell Sci.* 115, 4565–4575.
27. Gaulin, E., Haget, N., Khatib, M., Herbert, C., Rickauer, C. and Bottin, B. 2007. Transgenic sequences are frequently lost in *Phytophthora parasitica* transformants without reversion of the transgene-induced silenced state. *Can. J. Microbiol.* 53, 152–157.
28. Gaulin E., N. Dramé, C. Lafitte, T. Torto-Alalibo, Y. Martinez, C. Ameline-Torregrosa, M. Khatib, H. Mazarguil, F. Villalba-Mateos, S. Kamoun, C. Mazars, B. Dumas, A. Bottin, M.T. Esquerré-Tugayé and M. Rickauer. 2006. Cellulose Binding Domains of a Phytophthora Cell Wall Protein Are Novel Pathogen-Associated Molecular Patterns. *The Plant Cell*. 18:1766-1777.
29. Gooding G.V. and G.B. Lucas. 1959. Factors influencing sporangial formation and zoospore activity in *Phytophthora parasitica var. nicotianae*. *Phytopathology* 49: 277–281.
30. Goldoni M., G. Azzalin, G. Macino and C. Cogoni. 2004. Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology*. 41:1016-1024.
31. Grinsted J, Bennett PM (1988) Preparation and electrophoresis of plasmid DNA. In: Grinsted J, Bennett PM (eds) *Methods in Microbiology*. Vol 21. London: Academic Press, pp 129–142.
32. Higgins B.B. 1917. A *Colletotrichum* leaf spot of turnips. *J. Agric. Res.* 5:157-163.

33. Hoch HC, Staples RC. 1987. Structural and chemical changes among the rust fungi during appressorium development. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:231–47.
34. Horsh, R.B., J. Fry, N. Hoffmann, J. Neidermayer, S.G. Rogers, and R.T. Fraley. 1988. Leaf disc transformation. Sect A5:1-9. In Gelvin et al.
35. Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP. 1991. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11281–84.
36. Howard S. Judelson. 1997. The Genetics and Biology of *Phytophthora infestans*: Modern Approaches to a Historical Challenge. *Fungal Genetics and Biology.* 22:65–76.
37. Huguet B. 2001. Maladie du pois. *Phytoma.* 6:36-38.
38. Huitema E., J.I.B. Bos, M. Tian, J. Win, M.E. Waugh and S. Kamoun. 2004. Linking sequence to phenotype in *Phytophthora*–plant interactions. *TRENDS in Microbiology.* 12:193-200.
39. Jones EBG. 1994. Fungal adhesion. *Mycol. Res.* 98:961–81.
40. Judelson, H.S., Tyler, B.M. and Michelmore, R.W. 1991. Transformation of the oomycete pathogen, *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:602-607.
41. Kamoun Sophien. 2001. Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for classical problem. *Current Opinion in Plant Biology.* 4:295-300.
42. Kamoun Sophien. 2003. Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell.* 2:191-199.
43. Kamoun S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology,* 44:41-60.
44. Kamoun, S., P. van West, V.G.A.A. Vleeshouwers, K.E. de Groot and F. Govers. 1998. Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell.* 10:1413–1426.
45. Kaster K. R., Burgett S. G. And Ingolia T.D. 1984. Hygromycin B resistance as dominant selectable marker in yeast. *Curr. Genet.* 8:155-358.
46. Morgan W., J. Bos, C. Bruce, M. Lee, H.Y. Liu, S.K. Oh, J. Song, J. Win, C. Young and S. Kamoun. 2005. Structure and Function of RXLR Effectors of Plant Pathogenic Oomycetes. *Genomics of Disease.* 161-171.

47. Latijnhouwers M., P. J.G.M. de Wit and F. Govers. 2003. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *TRENDS in Microbiology*. Vol.11 No.10.
48. Madoui MA, Gaulin E, Mathé C, San Clemente H, Couloux A, Wincker P, Dumas B. 2007. AphanoDB: a genomic resource for *Aphanomyces* pathogens. *BMC Genomics*. 20;8:471.
49. Mendgen K., M. Hahn and H. Deising. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Reviews of Phytopathology*. 34:367-86.
50. Moriwaki J., H. Ohkubo, H. Horie, S. Kasuyama and T. Sato. 1997. Genotypic differences between *Colletotrichum higginsianum* and *C. gloeosporioides* based on arbitrarily primed PCR analysis. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63:395-398.
51. Munch S., U. Lingner, D.S. Floss, N. Ludwig, N. Sauer and H.B. Deising. 2007. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species, *Journal of Plant Physiology*. 165(1):41-51.
52. Nakayashiki H., S. Hanada, N. B. Quon, N. Kadotani, Y. Tosa and S. Mayama, 2005. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 42:175-183.
53. Nakayashiki H., S. Hanada, N. B. Quon, N. Kadotani, Y. Tosa and S. Mayama. 2005. RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications. *FEBS Letters*. 579(26):5950-5957.
54. Nicholls Henry. 2004. Stopping the rot. *PloS Biology*. 2:0891-0895.
55. O'Connell R.J., J.A. Bailey and D.V. Richmond. 1985. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Plant Pathol.* 27:75-98.
56. O'Connell R.J., A.B. Uronu, G. Waksman, C. Nash, J.P.R. Keon and J.A. Bailey. 1993. Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. *Plant Pathol.* 42: 774-783.
57. O'Connell R., Herbert C., Sreenivasaprasad S., Khatib M., Esquerre-Tugaye M. T. Dumas B. 2004 A novel *Arabidopsis-Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of Plant-Fungal interaction, *MPMI*, 17(3):272-282.

58. Pain NA, O'Connell RJ, Green JR. 1995. A plasma membrane-associated protein is a marker for differentiation and polarisation of *Colletotrichum lindemuthianum* appressoria. *Protoplasma* 127:233–42.
59. Papavizas, G. C., and W. A. Ayers. 1974. *Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet. A review. USDA Technical Bulletin 1485:1-158.
60. Perfect S.E., H.B. Hughes, R.J. O'Connell and J.R. Green. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungalplant interactions. *Fungal Genet. Biol.* 27:186-198.
61. Perfect S.E., K.L. Pixton, R.J. O'Connell and J.R. Green. 2000. The distribution and expression of a biotrophy-related gene, CIH1, within the genus *Colletotrichum*. *Mol. Plant Pathol.* 1:213-221.
62. Read ND, Kellock LJ, Knight H, Trewavas AJ. 1992. Contact sensing during infection by fungal pathogens. In *Perspectives in Plant Cell Recognition*, ed. JA Callow, JR Green, 48:137–72. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
63. Redman R.S., J.C. Ranson and R.J. Rodriguez. 1999. Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:969-975.
64. Redman R.S. and R.J. Rodriguez. 1994. Factors which affect efficient transformation of *Colletotrichum* species. *Exp. Mycol.* 18:230-246.
65. Rodr'iguez-G'alvez E, Mendgen K. 1995. The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma.* 189:61–72.
66. Riethmueller, A., H. Voglmayr, M. Goeker, M. Weiss, and F. Oberwinkler. 2002. Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94:834-849.
67. Rogers, S.G., H. Klee, R.B. Horch, and R.T. Fraley. 1988. Use of cointegrating Ti plasmid vectors. Sect. A2:1-12. In Gelvin et al.
68. Romano N, Macino G. 1992 Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol.* 6(22):3343-53.
69. Sambrook, L., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, Second ed. Cold Spring Harbor.

70. Scheffer R.P. 1950. Anthracnose leafspot of crucifers. N. C. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. 92., Sutton B.C. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K.
71. Si-Ammour A., B. Mauch-Mani and F. Mauch. 2003. Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: β -aminobutyric acid but not BTH protects potato and *Arabidopsis* from infection. *Molecular Plant Pathology*, 4: 237-248.
72. Sweigard JA, Chumley FG, Valent B. 1992. Disruption of a *Magnaporthe grisea* cutinase gene. *Mol. Gen. Genet.* 232:183–90, Wijesundera RLC, Bailey JA, Byrde RJW, Fielding AH. 1989. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34:403–13.
73. Takahara H., G. Tsuji, Y. Kubo, M. Yamamoto, K. Toyoda, Y. Inagaki, Y. Ichinose and T. Shiraishi. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. *Journal of General Plant Pathology.* 70:93-96.
74. Van der Hoorn R.A.L., P. J.G.M. De Wit and M.H.A.J. Joosten. 2002. Balancing selection favors guarding resistance proteins. *TRENDS in Plant Science.* 7:67-71.
75. Vijn, I. and Govers, F. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol.* 4:459–467.
76. Weiland J.J. 2001. Regeneration of pathogenic *Aphanomyces cochlioides* and *A. euteiches* from protoplasts. *J. Sugarbeet Res.* 38, 139–151.
77. Weiland, J.J. 2003. Transformation of *Pythium aphanidermatum* to geneticin resistance. *Curr. Genet.* 42:344–352.
78. Weld Richard J, Plummer Kim M, Carpenter Margaret A and Ridgway Harley J. 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research.* 16:31-44.
79. Wharton P.S., A.M. Julian and R.J. O’Connell. 2001. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 91:149-158.

80. Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, Hein I, Toth IK, Pritchard L, Birch PR. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*. 450(7166):115-8.
81. Whisson S. C., A. O. Avrova, P. Van West, and J. T. Jones. 2005. A method for double-stranded RNA-mediated transient gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathology*. 6:153 – 163.
82. Whittaker R. H. The Kingdoms of the Living World. 1957. *Ecology*, 38(3):536-538.
83. Zhou XL, Stumpf MA, Hoch HC, Kung C. 1991. A mechano-sensitive cation channel in the plasma membrane of the topography sensing fungus *Uromyces*. *Science* 253:1415–17.

Δεύτερη Ενότητα

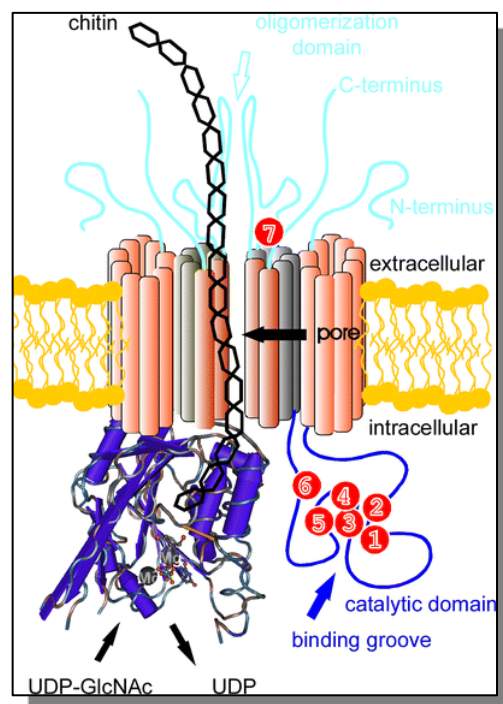
“ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΥΝΘΑΣΩΝ ΤΗΣ ΧΙΤΙΝΗΣ
ΑΠΟ ΟΟΜΥΚΗΤΕΣ”

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

Το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων παίζει πολλαπλούς ρόλους στην βιολογία των μικροοργανισμών: παρέχει μηχανική στήριξη και οσμωτική προστασία, ενώ παράλληλα εμπλέκεται στην ανάπτυξη, κυτταρική αύξηση, μορφογένεση, καθορισμό σχήματος, σηματοδότηση και αλληλεπίδραση τους με το περιβάλλον. Στους παθογόνους μικροοργανισμούς, το κυτταρικό τοίχωμα παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεια τους καθώς λειτουργεί ως χώρος εναπόθεσης μορίων που σχετίζονται με την αναγνώριση, προσκόλληση και μόλυνση του ξενιστή. Επίσης, περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό αντιγόνων τα οποία αφ' ενός επάγουν την ανοσολογική απόκριση των ζώων ή τους αντίστοιχους μηχανισμούς άμυνας στα φυτά, και αφετέρου αποτελούν στόχους των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή (26, 35, 44). Ανάλυση της δομής και σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος επιτρέπει την αναγνώριση συγκεκριμένων συστατικών τα οποία είναι ελκυστικοί, πιθανοί στόχοι για το σχεδιασμό αντιμικροβιακών ουσιών (21). Μεταξύ αυτών η χιτίνη είναι ένα κρυσταλλικό πολυμερές β -(1, 4) N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης (GlcNAc), το οποίο πολύ συχνά συναντάται μερικώς απακετυλιωμένο και συνδεδεμένο με πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες.

Η χιτίνη συναντάται αποκλειστικά στους ευκαρυώτες ζωικούς οργανισμούς, συνήθως ως συστατικό του κελύφους και της επιδερμίδας των οστρακόδερμων, των εντόμων, των σαλιγκαριών και των νηματωδών είναι θεμελιώδες δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, ενώ παράλληλα απαντάται και στους θαλάσσιους σπόγγους, άλγη σε πολλά πρώτιστα όπως τα διάτομα, στις αμοιβάδες και στα βλεφαριδωτά (16, 17, 25). Κατά συνέπεια, η χιτίνη είναι πολύ διαδεδομένος και ο δεύτερος πιο άφθονος πολυσακχαρίτης στην φύση, με τουλάχιστον 10 γιγατόνους να συνθέτονται και να αποδομούνται κάθε χρόνο στη βιόσφαιρα. Όμως, απουσιάζει πλήρως από τα σπονδυλωτά και τα ανώτερα φυτά και, θεωρητικά τουλάχιστον, θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανό στόχο για το σχεδιασμό αντιμικροβιακών ουσιών χωρίς μοριακούς στόχους στους ανώτερους οργανισμούς με σκοπό την αντιμετώπιση ανθρώπινων και φυτικών ασθενειών που προκαλούνται από τους μύκητες (32, 34, 41).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η χιτίνη είναι ένα πολυμερές β -1, 4 γλυκόζης και αποτελείται από κατάλοιπα *N*-ακετυλογλυκοζαμίνης που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς β -1, 4 και σχηματίζει επιμήκεις ευθείες αλυσίδες (μικροϊνίδια) που χρησιμεύουν ως δομικά στοιχεία. Έτσι, η χιτίνη μοιάζει με την κυτταρίνη, εκτός από το ότι ο υποκαταστάτης στον C-2 του σακχαρικού δακτυλίου είναι μια ακετυλιωμένη αμινομάδα, αντί μίας υδροξυλομάδας.



Εικόνα 1: Απεικόνιση του μορίου της συνθάσης της χιτίνης

Η κλάση των Ωομυκήτων είναι μια πολυπληθής ομάδα διπλοειδών κατώτερων ευκαρυωτών που περιλαμβάνει οργανισμούς γνωστούς ως «water moulds» (13). Οι Ωομυκήτες κατατάσσονταν μέχρι πρόσφατα στο Βασίλειο των Μυκήτων λόγω των παρόμοιων οικολογικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. Όμως, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι οργανισμοί αυτοί είναι εξελικτικά συγγενέστεροι με τα διάτομα, τα χρωμόφυτα άλγη και άλλα «heterokont» πρώτιστα που ανήκουν στο Βασίλειο των Stramenopile (4). Περιλαμβάνουν πλήθος παθογόνων ειδών, όπως το παράσιτο του σολωμού *Saprolegnia parasitica* (45) και την *Phytophthora infestans* που προκαλεί καταστρεπτικές επιδημίες στην πατάτα (27). Έχουν παρόμοιους μηχανισμούς μόλυνσης με τους μύκητες (24, 29) και τα μέλη της ομάδας «apicomplexans» (7, 22). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό διαχωρισμού των Ωομυκήτων από τους Πραγματικούς Μύκητες (True fungi) είναι η παρουσία κυτταρίνης και η απουσία χιτίνης από το κυτταρικό τους τοίχωμα (24). Όμως, το κυτταρικό τοίχωμα των σχετικά συγγενών τους Χυτρίδιομυκήτων (Chytridiomycetes) περιλαμβάνει και τα δύο πολυμερή, και η χιτίνη έχει αναμφίβολα εντοπιστεί με βιοφυσικές αναλύσεις στα μέλη των τάξεων Leptomitale και Saprolegniale (2, 8). Στην *Saprolegnia monoica* (*S. monoica*), η ενζυματική δράση μιας συνθάσης της χιτίνης (CHS) έχει χαρακτηριστεί πλήρως, και έχουν ταυτοποιηθεί δυο *Chs* γονίδια, εκ των οποίων το ένα έχει αλληλουχηθεί πλήρως (30, 33). Στις τάξεις των Peronosporales και Pythiales, τμηματικές αλληλουχίες πιθανών CHS έχουν ταυτοποιηθεί στην *Plasmopara viticola* και την

Phytophthora capsici (33, 46). Όμως, υπάρχουν αμυδρά βιοχημικά στοιχεία που να αποδεικνύουν την ύπαρξη της χιτίνης σε αυτούς τους οργανισμούς (14, 15). Προσδιορισμός χιτίνης με λεκτίνη και κυττοχημικές αναλύσεις έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα στην *P. parasitica* (11) και την *Phytophthora cinnamomi*, (3) ενώ, αντιθέτως, έδωσαν θετικά στην *Plasmopara viticola* (46) και *Pythium ultimum* (11). Στις τελευταίες όμως περιπτώσεις, η παρουσία του πολυμερούς στην τυπική κρυσταλλική του μορφή δεν έχει ακόμα στοιχειοθετηθεί.

Μεταξύ των Ωομυκήτων, μέλη του γένους *Aphanomyces* (Saprolegnialae) είναι παθογόνα φυτών ή ζώων, τόσο χερσαίων και υδάτινων. Το είδος *A. euteiches* προσβάλλει τους σπόρους και τις ρίζες πολλών λαχανοκομικών ειδών και είναι το κυριότερο παθογόνο του μπιζελιού σε πολλές χώρες (19). Αποτελεσματικά χημικά φυτοφάρμακα ή ανθεκτικές ποικιλίες δεν είναι διαθέσιμες για την αντιμετώπιση του παθογόνου. Έχουν δρομολογηθεί πρόσφατα πολλές έρευνες σχετικές με το γένωμα μελών του γένους *Aphanomyces* και *Phytophthora*. Πρόσφατα δημιουργήθηκε μια βάση δεδομένων 19.000 ESTs από cDNAs του *A. euteiches* που οδήγησε στην συναρμολόγηση 8.000 *ca* μοναδικών γονιδίων («unigenes»), γεγονός που αντιπροσωπεύει μια πρώτη προσπάθεια ικανής για την ταυτοποίηση σχετικών με την παθογένεια του *A. euteiches* μορίων (effectors) (20). Παράλληλα, μια συλλογή 8.000 ESTs της *P. parasitica* έχει ήδη κατασκευαστεί και εξετάζεται (αδημοσίευτη πληροφορία, Dr. Arnaud Bottin, INRA-Toulouse).

Λόγω του σημαντικού ρόλου του κυτταρικού τοιχώματος στην βιολογία του μικροοργανισμού και στην αλληλεπίδραση του με τον ξενιστή του, έγινε προσπάθεια τα πλαίσια αυτής της διατριβής απομόνωσης, ταυτοποίησης και χαρακτηρισμού πιθανών *Chs* γονιδίων σε δύο Ωομύκητες, τον *A. euteiches* και την *P. parasitica*, με σκοπό την μελέτη της εξέλιξης αυτών των σημαντικών ενζύμων, την μελλοντική ανάπτυξη εργαλείων γενετικής ανάλυσης βασισμένα στη σιγητική καταστολή για τη μελέτη του βιολογικού τους ρόλου, και την προοπτική τα ένζυμα αυτά να αποτελέσουν πιθανούς μελλοντικούς εξειδικευμένους στόχους για την καταπολέμηση φυτικών ασθενειών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

Στελέχη:

Το στέλεχος *A. euteiches* ATCC201684 απομονώθηκε από φυτά μπιζελιού στη Δανία και μας διατέθη από τον Dr. F. Krajinski (University of Hannover, Germany). Το στέλεχος της *P. parasitica* (*P. parasitica*, syn. *P. nicotianae*) “race 0” απομονώθηκε από φυτά καπνού και μας διατέθη από τον Dr. JP. Helgenson, University of Wisconsin, Madison, WI, USA.

Συνθήκες ανάπτυξης και διατήρησης καλλιιεργειών:

Ο *A. euteiches* διατηρείται σε 1,7% Corn Meal Agar (CMA, Sigma-Aldrich) μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειες κάθε μήνα στο σκοτάδι στους 24°C. Για διατήρηση μεγάλης χρονικής διάρκειας, μυκήλιο διατηρείται σε αποστειρωμένο νερό στο σκοτάδι στους 16°C. Ο *P. parasitica* διατηρείται σε φιλτραρισμένο 5% v/v τρυβλία V₈ άγαρ με συνεχείς ανακαλλιέργειες κάθε δύο μήνες στο σκοτάδι στους 24°C. Οι αντίστοιχες υγρές καλλιέργειες αναπτύσσονται σε 100ml υγρού θρεπτικού μέσου σε φυάλες Roux χωρίς ανάδευση. Για την ανάπτυξη μυκηλίου προσθέτουμε ένα κομμάτι μυκηλίου από μητρική στερεή καλλιέργεια ανά 20ml πλήρους υγρού θρεπτικού μέσου. Ακολουθεί επώαση για 3-4 μέρες. Η συλλογή του μυκηλίου γίνεται με φιλτράρισμα υπό κενό, με παράλληλα ξεπλύματα για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων θρεπτικού μέσου. Το στεγνό μυκήλιο στη συνέχεια ζυγίζεται και αποθηκεύεται στους -80°C κατευθείαν είτε σε μορφή σκόνης μετά από λειοτριβήση σε πορσελάνινο γουδί.

Μοριακές τεχνικές:

Απομόνωση RNA (SV Total RNA Isolation kit, Promega) από τον *A. euteiches* και την *P. parasitica* και απομόνωση DNA (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) από την *P. parasitica* έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και χρησιμοποιώντας ως αρχικό υλικό 100μg λεπτής λειοτριβημένης μάζας μυκηλίου. Υγρές καλλιέργειες του *A. euteiches* για την απομόνωση RNA έγιναν παρουσία νικομυκίνης Z (50μM).

Αντιδράσεις RT-PCR πραγματοποιήθηκαν σε 3 mg RNA της *P. parasitica*, χρησιμοποιώντας την Superscript™ III αντίστροφη μεταγραφάση (Invitrogen) και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Επίσης, εφαρμόστηκε Gradient PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα cDNA που απομονώθηκε από τους δύο Ωομύκητες. Οι αντιδράσεις PCR έγιναν σε τελικό όγκο 25μl σε αποστειρωμένα σωληνάκια των 200μl, τα οποία περιείχαν τα εξής:

- 100ng cDNA
- 200 μM dNTPs
- 20 μM από τον εκάστοτε εκφυλισμένο εκκινητή
- Η κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10× της Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity
- 2 mM MgSO₄
- Η κατάλληλη ποσότητα ddsH₂O για την ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης
- 1 Unit Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity

Το προαναφερθέν μίγμα υποβλήθηκε σε έναν αρχικό κύκλο στους 95°C για 5 min, ώστε να αποδιαταχθούν τα δίκλιωνα μόρια και σε 30 κύκλους ενίσχυσης: 1 min στους 95°C, 1 min στους 55°C, R = 3.0 °C/s +0.0 °C/s, G = 10.0 °C, 1,5 min στους 68°C (άριστη θερμοκρασία δράσης της Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity).

Τέλος, το μίγμα υποβλήθηκε σε έναν τελικό κύκλο στους 68°C για 5 min, ώστε να επιμηκυνθούν πλήρως τα ενισχυμένα μόρια.

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR έγινε μετά από ηλεκτροφόρηση και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up kit, Promega). Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEM-Teasy της εταιρείας Promega.

Οι αντιδράσεις RACE-PCR έγιναν χρησιμοποιώντας το Gene Racer kit της εταιρείας Invitrogen. Συγκεκριμένα, για την 3'-RACE-PCR αντίδραση κατασκευάστηκε cDNA χρησιμοποιώντας ως αρχικό υλικό 3,8 mg total RNA της *P. parasitica* και με εκκινητή τον GeneRacer[™] Oligo dT του kit. Για τις αντιδράσεις 5'-RACE-PCR κατασκευάστηκαν cDNAs χρησιμοποιώντας ως αρχικό υλικό 5 mg total RNA της *P. parasitica* και του *A. euteiches*, έχοντας ως εκκινητές random primers του kit. Ακολούθησε κλωνοποίηση των PCR προϊόντων (4 μl από το συνολικό όγκο της αντίδρασης) στον pCR[®]4-TOPO φορέα και μετασχηματισμός 2 μl του τελικού μίγματος σε One Shot TOP[®]10 δεκτικά κύτταρα σύμφωνα με το TOPO TA-Cloning Kit for Sequencing της εταιρείας Invitrogen και η τελική επιλογή λευκών (θετικών)

αποικιών έγινε σε πιάτα LB-Km50-X-Gal-IPTG. Τέλος, οι αλληλουχίες πραγματοποιήθηκαν από την εταιρεία Millegen.

Βιοπληροφορικές αναλύσεις και σχεδιασμοί:

Εκκινητές για τον πολυμερισμό τμημάτων DNA σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα DNAMAN_522 έχοντας ως εκμαγείο είτε γενωμικό είτε cDNA με σκοπό την πραγματοποίηση των προηγούμενων διαδικασιών.

Gradient PCR primers

<i>P. parasitica</i>			
Primer	Sequence	Tm	Primer degeneracy
PPCHSF	5'-SCA-TYA-CYA-TGT-ACA-ACG-AAG-3'	60°C	64-fold
PPCHSR_1	5'-GCG-TCC-TTS-ACR-TAR-TGC-3'	56°C	64-fold
PPCHSR_2	5'-CAR-VCC-CTT-VGT-GCC-CC-3'	58°C	256-fold

RACE-PCR primers

<i>P. parasitica</i>		
5'-RACE <i>Chs</i> primers		
Primer	Sequence	Tm
Race5' Ppn0_chs	5'-GTC-TTT-CTT-CTG-TTC-TTT-GAG-ATA-TGC-3'	74°C
nRace5' Ppn0_chs	5'-AAG-TTA-TTG-GCG-AGT-TTC-TTG-AGT-AGT-GT-3'	72°C
3'-RACE <i>Chs</i> primers		
Primer	Sequence	Tm
Race3' Ppn0_chs	5'-GCA-CTA-CAC-GGC-GTT-AAT-CC-3'	62°C
nRace3' Ppn0_chs	5'-CAC-GGC-GTT-AAT-CCC-GAG-CTT-CGT-3'	76°C

<i>A. euteiches</i>		
5'-RACE primers for <i>Chs1</i>		
Primer	Sequence	Tm
Race5' Aph_chs1	5'-GAG-CAA-GTT-GTA-GTC-TGG-GTC-GAC-TT-3'	78°C
nRace5' Aph_chs1	5'-GTT-GCA-AAA-AGC-GTT-GAA-GAA-CCA-TAA-G-3'	78°C
5'-RACE primers for <i>Chs2</i>		
Primer	Sequence	Tm
Race5' Aph_chs2	5'-ACC-AGC-AAA-GAA-AGA-GCC-ATT-GAG-C-3'	74°C
nRace5' Aph_chs2	5'-CAA-TGG-CAT-CTT-TTA-CAT-AGT-GCA-TCG-3'	76°C

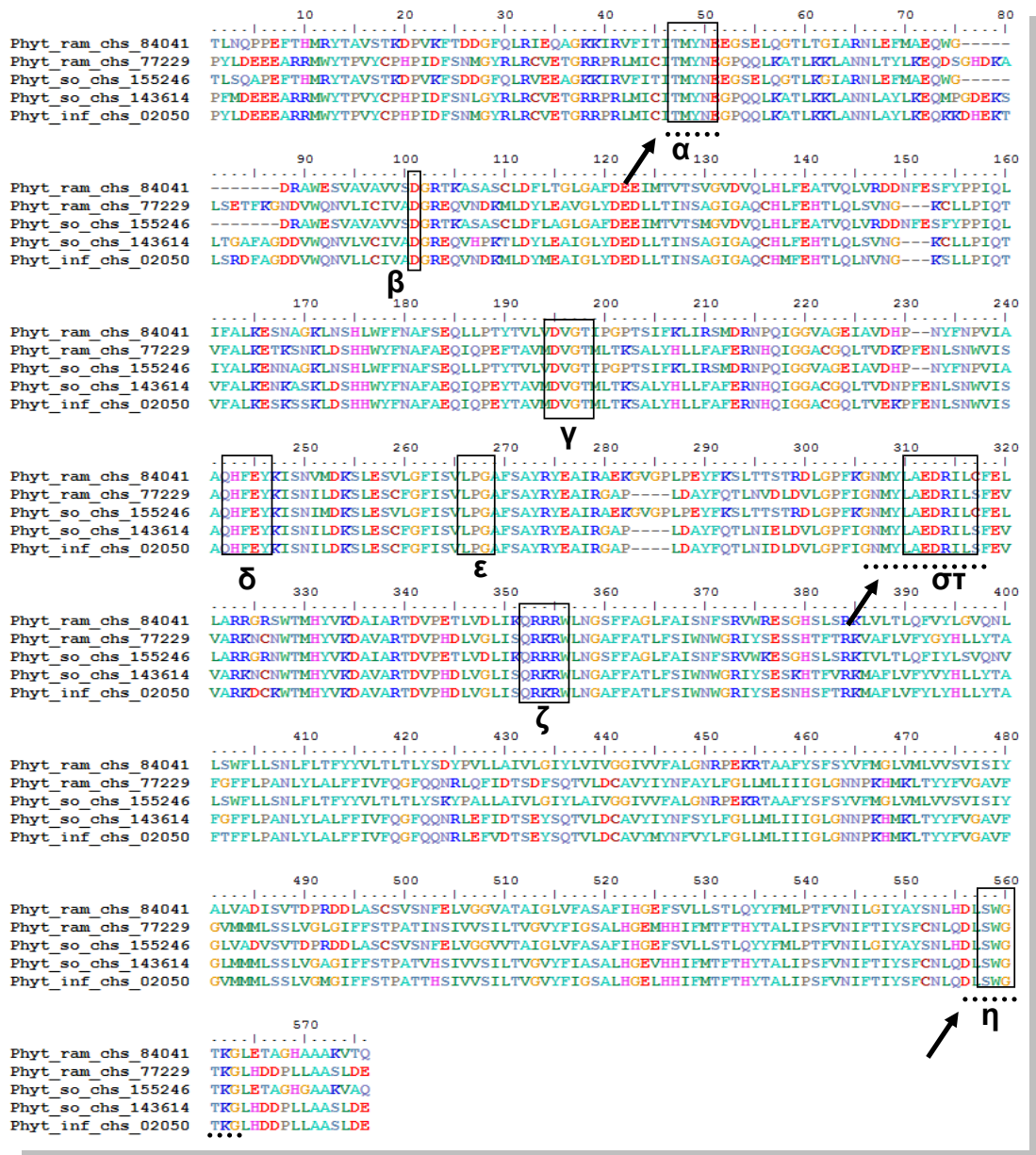
Τα αποτελέσματα αλληλούχησης των cDNAs μεταφράστηκαν εικονικώς με τη χρήση του προγράμματος ExPASy-translation tool του Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). Στη συνέχεια, οι πεπτιδικές αλληλουχίες που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν ως αλληλουχίες αναφοράς για αναζήτηση ομόλογων, ήδη κατατεθειμένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών στη βάση δεδομένων του National Center of Biotechnology (NCBI), κάνοντας χρήση του προγράμματος tBLASTn (1). Βάσει της ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες CHS πρωτεϊνών που βρέθηκαν, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες επεξεργάστηκαν και διορθώθηκαν. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα CLUSTAL_W (42), η πιστοποίηση της ποιότητας των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Chromas, ενώ η περαιτέρω επεξεργασία τους έγινε με τη βοήθεια του Bioedit_ 704 (31/05/05; 23). Τελικώς το φυλογενετικό δέντρο των CHS αμινοξικών αλληλουχιών κατασκευάστηκε με τη χρήση του λογισμικό MEGA3.1 (28).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

Βιοπληροφορική ανάλυση των CHS της *P. parasitica* και εντοπισμός συντηρημένων περιοχών DNA:

Με σκοπό την απομόνωση πιθανών γονιδίων CHS από τον ωομύκητα *P. parasitica*, αρχικά συλλέχθηκαν και στοιχίστηκαν γνωστές αμινοξικές αλληλουχίες από ήδη ταυτοποιημένες chs σε μέλη του γένους *Phytophthora*. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως αλληλουχίες αναφοράς για την εύρεση συντηρημένων περιοχών μεταξύ τους, χαρακτηριστικές των CHS πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, από την ιστοσελίδα του genome project databases του DOE Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>) ελήφθησαν οι αλληλουχίες CHS1 και CHS2 της *P. ramorum* (Phyra1_1:77229 και Phyra1_1:84041), καθώς και οι CHS1 και CHS2 της *P. sojae* (Physo1_1:143614 και Physo1_1:15524). Επίσης, από την ιστοσελίδα του Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/>) ελήφθη η αλληλουχία της CHS1 της *P. infestans* (PITG_02050.1).

Ακολουθεί σχετική εικόνα στην οποία φαίνονται συντηρημένα μοτίβα των συνθασών χιτίνης (α : (T/P)xYxE, β : D, γ : Dx(G/D)(T/C), δ : QxxEY, ϵ : LP(G/A), σ : L(A/G)EDRxL, η : Q(R/G)RRW, ζ : (S/T)WG). Από την στοίχιση παρατηρείται ότι υπάρχει μια περιοχή περίπου 500 αμινοξέων κατά μήκος της οποίας υπάρχουν περιοχές υψηλής αμινοξικής ομοιολογίας.



Εικόνα 2: Στοίχιση των ταυτοποιημένων CHS αμινοξικών αλληλουχιών από μέλη του γένους *Phytorhithora* και αναγνώριση των περιοχών με τον υψηλότερο βαθμό συντήρησης.

Ακολούθησε στοίχιση των αντίστοιχων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών για να διαπιστωθεί ο βαθμός συντήρησης σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Όντως, διαπιστώθηκε υψηλός βαθμός συντήρησης σε ορισμένες περιοχές και με βάση αυτές σχεδιάστηκαν εκφυλισμένοι εκκινητές (degenerated primers) που θα μπορούσαν να πολλαπλασιάσουν δύο χαρακτηριστικά τμήματα DNA, ένα ~800 nt (με εκκινητές σχεδιασμένους για τις περιοχές **α** και **στ**, βλ. εικόνα 2) και ένα ~1500 nt (με εκκινητές σχεδιασμένους για τις περιοχές **α** και **η**). Οι λόγοι που σχεδιάστηκαν ένας «forward» και 2 «reverse» degenerated primers, ώστε να δίνουν δύο πιθανά PCR προϊόντα, είναι πρώτον, για να αυξηθούν οι πιθανότητες λήψης προϊόντος από cDNA εκμαγείο και δεύτερον, για να αυξηθούν οι πιθανότητες λήψης και των δύο πιθανών CHS γονιδίων (CHS1 και CHS2).

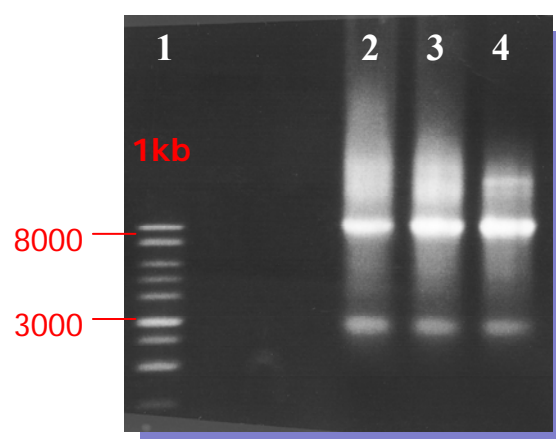
Gradient PCR:

Στην συνέχεια απομονώθηκε συνολικό RNA από υγρή καλλιέργεια ωομύκητα και ακολούθησε η κατασκευή του cDNA pool.

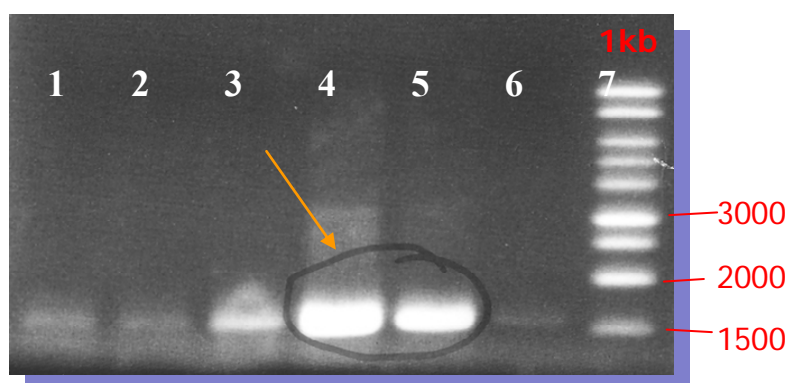
Για την εύρεση των ιδανικών συνθηκών πολυμερισμού των υποψήφιων *chs* γονιδίων της *P. parasitica*, εφαρμόστηκε gradient PCR. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα και για τους δύο συνδυασμούς εκφυλισμένων εκκινητών που είχαν σχεδιαστεί προηγουμένως.

Έτσι, εκτιμήθηκε ότι οι ιδανικές συνθήκες αντίδρασης είναι οι εξής:

1. Degenerated Primer Final Concentration: 20 μ M
2. Optimum T_m annealing: 55,83°C (45-65 °C)
3. 30 κύκλοι PCR
4. 100ng αρχικό cDNA template



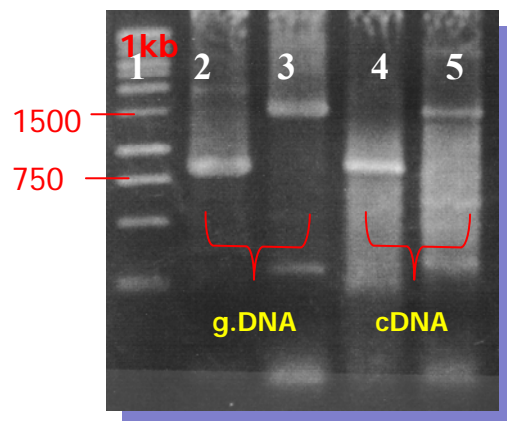
Εικόνα 3: Ενδεικτική ηλεκτροφορητική εικόνα δειγμάτων συνολικού RNA: (1) 1kb DNA ladder (Invitrogen), (2-4) Δείγματα.



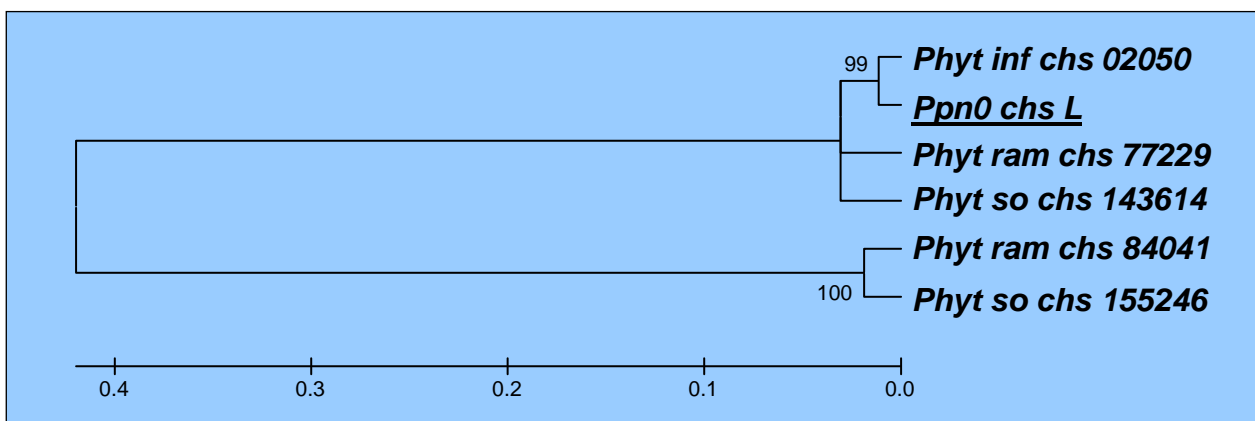
Εικόνα 4: Ενδεικτική ηλεκτροφορητική εικόνα δειγμάτων μετά από εφαρμογή Gradient PCR: (7) 1kb DNA ladder (Invitrogen), (1-6) Δείγματα μετά από εφαρμογή T_m annealing εύρους 10°C.

Το τελικό αποτέλεσμα ήταν να πολυμεριστούν και τα δύο τμήματα, τα οποία κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχίστηκαν, δίνοντας δύο αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα των 853nt και 1538nt, αντίστοιχα. Καθορίστηκαν οι αλληλουχίες συνολικά 8 θετικών κλώνων, 1 του μεγάλου τμήματος και 7 του μικρού. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ότι πρόκειται για τμήματα του ίδιου γονιδίου, δίνοντας μια μοναδική αλληλουχία για το CHS γονίδιο της *P. parasitica* και όχι δύο που αναμένονταν. Επίσης, πραγματοποιήθηκε PCR σε γενωμικό DNA της *P. parasitica* υπό τις ίδιες συνθήκες με την Gradient PCR. Παραλήφθηκαν τμήματα DNA ίδιου μεγέθους ανεξαρτήτως αν το εκμαγείο πολυμερισμού ήταν γενωμικό ή cDNA.

Έχοντας τη μεγαλύτερη περιοχή (1538nt) του cDNA της *chs* της *P. parasitica* (*Chs_Ppn0*) κατασκευάστηκε δενδρόγραμμα με βάση αυτή και μόνο την κοινή κεντρική αμινοξική περιοχή των *CHS* πρωτεϊνών του γένους *Phytophthora* και βρέθηκε ότι είναι πιο κοντά εξελικτικά με το αντίστοιχο ένζυμο της *P. infestans*.



Εικόνα 5: Ηλεκτροφορητική εικόνα δειγμάτων μετά από εφαρμογή PCR σε gDNA: (2) ~800nt, (3) ~1500nt, και σε cDNA: (4) ~800nt (5) ~1500nt, (1) 1kb DNA ladder (Invitrogen)

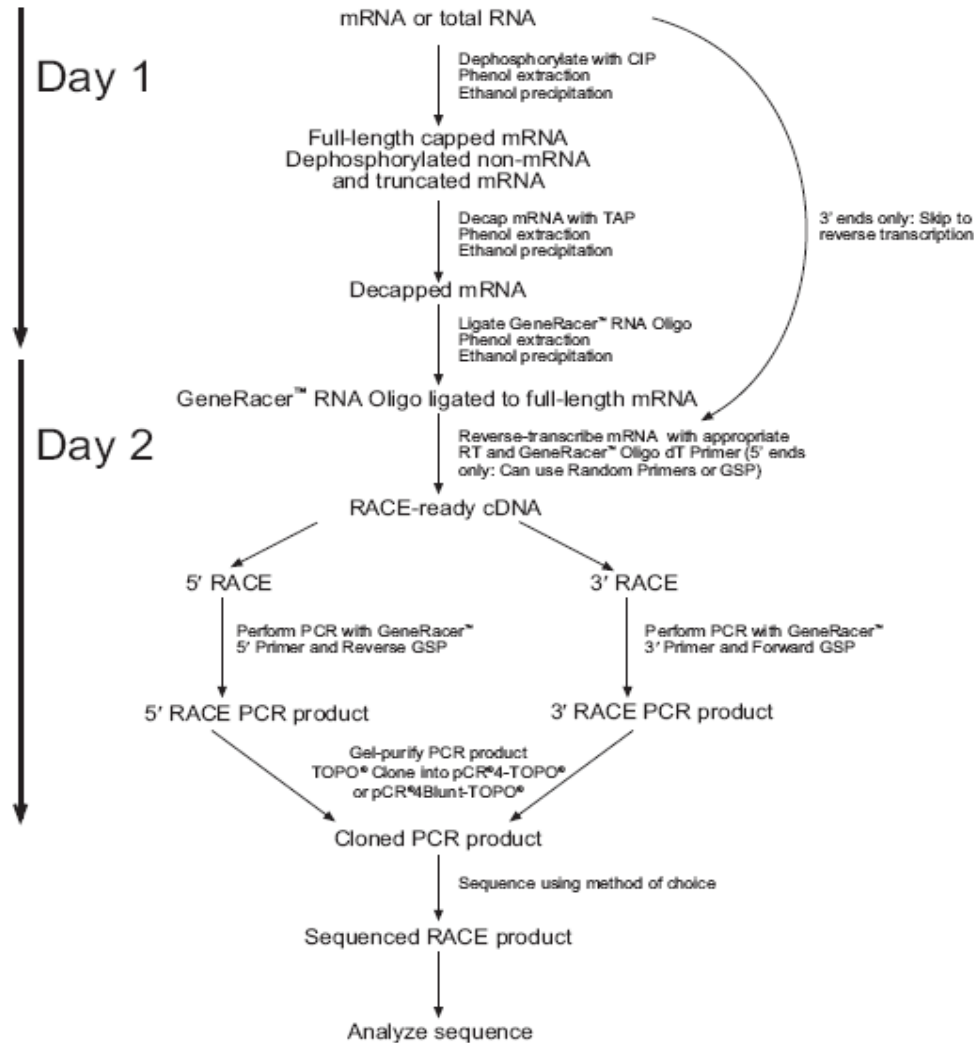


Εικόνα 6: Κατασκευή Bootstrap consensus tree (10.000 επαναλήψεις) βασισμένο στην κοινή συντηρημένη αμινοξική περιοχή των ήδη κατατεθειμένων *Phytophthora* CHS αλληλουχιών.

RACE PCR:

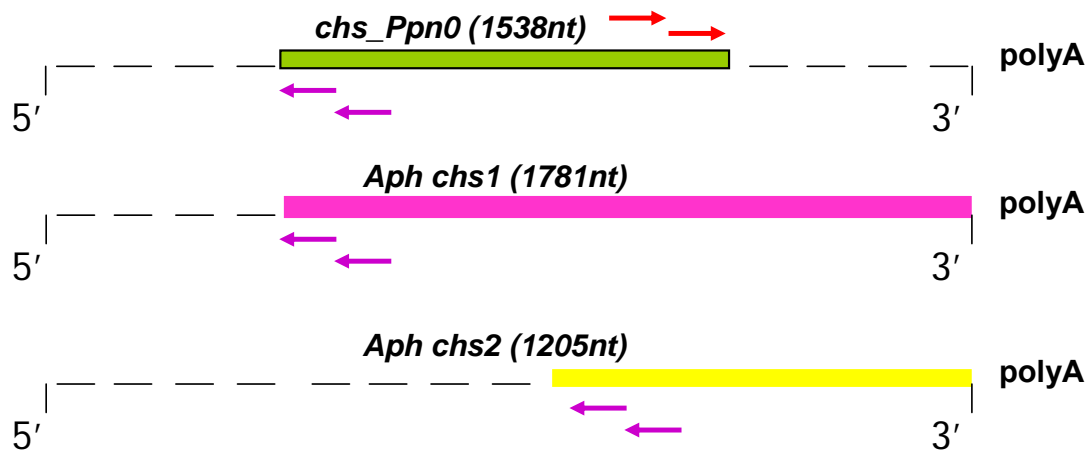
Αυτό που επετεύχθη με την gradient PCR ήταν η ανάκτηση της κεντρικής και παράλληλα πιο συντηρημένης περιοχής ενός *Chs* γονιδίου της *P. parasitica*. Παράλληλα, από προηγούμενα προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο πάνω στον *A. euteiches* είχαν ταυτοποιηθεί δύο cDNAs που κωδικεύουν πιθανές CHS (*Chs1* και *Chs2*) από συλλογή ESTs και με την εφαρμογή ανάλυση κατά Southern. Οι αλληλουχίες όμως αυτές αποτελούσαν κομμάτια των αντίστοιχων cDNAs, έχοντας έτσι διαθέσιμο μόνο ένα κομμάτι (το 3' τμήμα) των γονιδίων *chs*.

Με σκοπό την ανάκτηση της πλήρους αλληλουχίας του *chs* cDNA της *P. parasitica* και των δύο αντίστοιχων (*Chs1* και *Chs2*) του *A. euteiches*, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της 3' και 5' RACE-PCR. Η τεχνική RACE-PCR αποσκοπεί στην κλωνοποίηση πλήρους μήκους cDNAs αν υπάρχει διαθέσιμο ένα μικρό τους τμήμα. Με αυτή την τεχνική μπορούμε να «επεκτείνουμε» την γνωστή αλληλουχία τόσο προς το 5' άκρο όσο και προς το 3' άκρο. Η μέθοδος αυτή θεωρείται αξιόπιστη γιατί μέσα από τις ενζυματικές αντιδράσεις που προηγούνται κατά την κατασκευή του cDNA εκμαγείου εξασφαλίζεται ο πολυμερισμός μόνο των πλήρους μήκους μεταγράφων.



Εικόνα 7: Γράφημα στο οποίο φαίνονται συνοπτικά τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας που πρέπει να ακολουθηθούν για την εφαρμογή 3' και 5' RACE PCR σύμφωνα με την εταιρεία της Invitrogen.

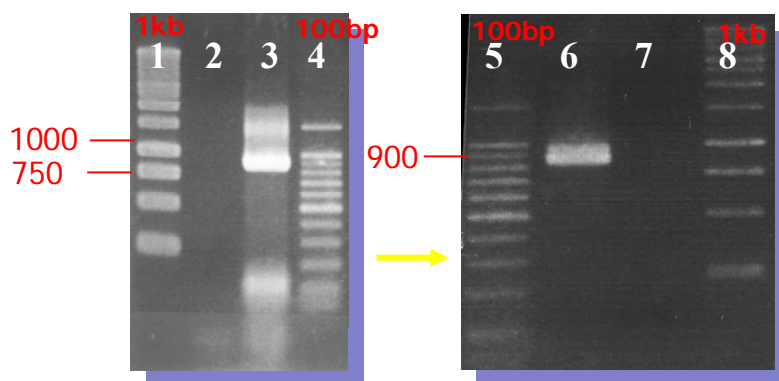
Από άλλα ήδη χαρακτηρισμένα *chs* γονίδια ωομυκήτων είναι γνωστό ότι τα γονίδια αυτά έχουν μήκος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας περί τα 3000nt. Έτσι σχεδιάστηκαν 3' και 5' RACE primers για την *P. parasitica* με σκοπό να πολυμεριστούν τμήματα περίπου 800nt το καθένα από τα 5' και 3' άκρα αντίστοιχα. Για τον *A. euteiches* σχεδιάστηκαν 5' RACE primers ώστε να δώσουν τμήματα ~1200nt και ~1800nt για την *Chs1* και την *Chs2*, αντίστοιχα. Επίσης, σχεδιάστηκαν και «nested» RACE primers ώστε να ενισχύσουμε την ποσότητα του προϊόντος και ταυτόχρονα ανακτηθεί η σωστή αλληλουχία.



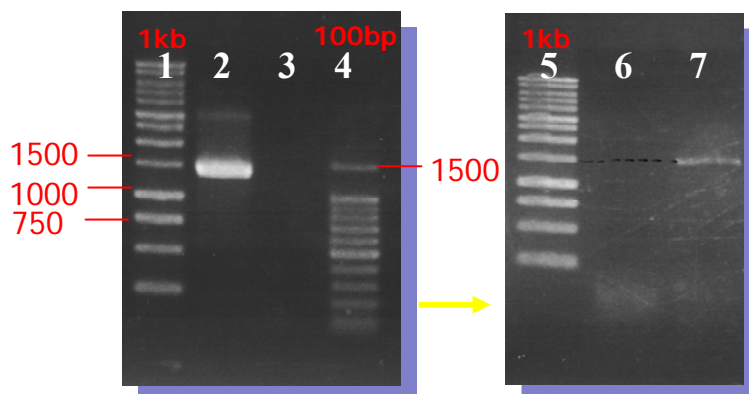
Εικόνα 8: Γράφημα στο οποίο φαίνεται ο σχεδιασμός των RACE και των αντίστοιχων nested primers για τα *chs* γονίδια, με σκοπό ανάκτηση της πλήρους αλληλουχίας τους.

Τα τμήματα που ανακτήθηκαν αποτυπώνονται με διακεκομμένες γραμμές.

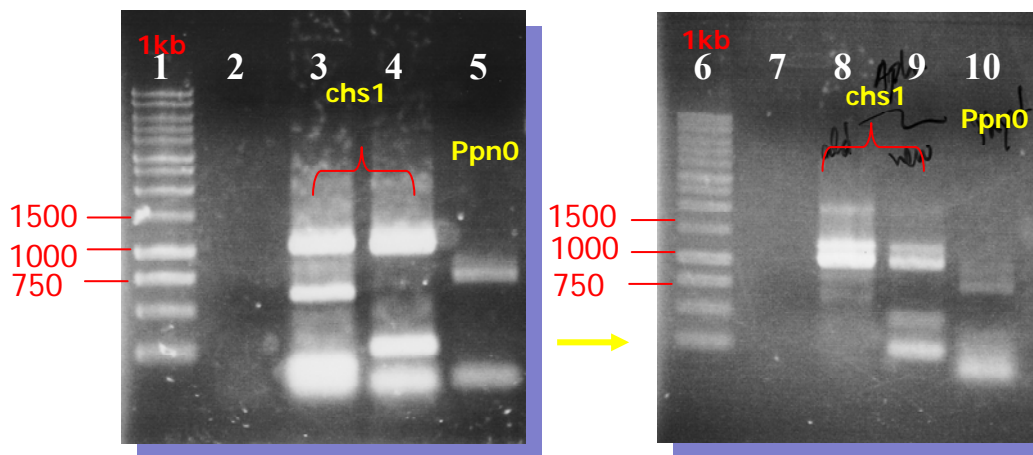
Ακολουθούν εικόνες που φαίνονται τα αποτελέσματα των RACE-PCR και των αντίστοιχων nested PCR.



Εικόνα 9: Ηλεκτροφορητική εικόνα των προϊόντων της 3' RACE PCR σε cDNA της *P. parasitica*: (2, 7) αρνητικό control, (3) 3' RACE-PCR, (6) 3' nested RACE-PCR, (1, 8) 1kb DNA ladder (Invitrogen), (4, 5) 100bp DNA ladder (Invitrogen)



Εικόνα 10: Ηλεκτροφορητική εικόνα των προϊόντων της 5' RACE PCR για το γονίδιο *Chs2* σε cDNA του *A. euteiches*: (3, 6) αρνητικό control, (2) 5' RACE-PCR, (7) 5' nested RACE-PCR, (1, 5) 1kb DNA ladder (Invitrogen), (4) 100bp DNA ladder (Invitrogen)



Εικόνα 11: Ηλεκτροφορητική εικόνα των προϊόντων της 5' RACE PCR για το γονίδιο *Chs1* σε cDNA του *A. euteiches* και το *Chs* γονίδιο σε cDNA της *P. parasitica*: (2, 7) αρνητικό control, (3, 4) *Aph_chs1* 5' RACE-PCR, (5) *Ppn0_chs* 5' RACE-PCR, (8, 9) *Aph_chs1* 5' nested RACE-PCR, (10) *Ppn0_chs* 5' nested RACE-PCR, (1, 6) 1kb DNA ladder (Invitrogen)

Τα προϊόντα της nested PCR με τα αναμενόμενα σχετικά μεγέθη κλωνοποιήθηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχηση. Όλα τα αποτελέσματα αλληλούχησης που ελήφθησαν ήταν τα αναμενόμενα εκτός από το *Ppn0_chs* 5' RACE-PCR, το οποίο αντιστοιχούσε σε rRNA της *Phytophthora* και δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω.

DNA Αλληλουχίες:

Μετά από την κλωνοποίηση των προϊόντων RACE-PCR ακολούθησε η αλληλούχηση των πολυμερισμένων τμημάτων cDNA και στις δύο κατευθύνσεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική επεξεργασία (Bioedit_ 705) των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, όπου αφαιρέθηκαν τα τμήματα του φορέα κλωνοποίησης, ενώθηκαν τα νέα αλληλουχημένα τμήματα με τα ήδη γνωστά και διορθώθηκαν σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα του αλληλουχητή, ώστε να πάρουν την τελική ακόλουθη μορφή.

chs2 Aphanomyces euteiches

```

SEQ DNAMAN1: 2524 bp;
Composition 641 A; 608 C; 576 G; 699 T; 0 OTHER
Percentage: 25.4% A; 24.1% C; 22.8% G; 27.7% T; 0.0%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 778.35 dsDNA: 1555.97
ORIGIN
1      TTTTTTGGTT TTGTCGATGC CCTTGCCTGA CGCTGGAACA AACTAGAGTA TGCAACAGAT
61     CATTGCCAAG CAAATCAACA AATCCCAATG CGTTTGTTCCA GCCCACGTCA AGACCAAAC
121    ATTGCCTCGA TCGAAAAACC CGAAGTCCAC GACTGTCATG CTCGGTGGCC AACGGACGTC

```

181 CGAAAAGGCC TCGTATGTGA CATTCAATGG CGACATCACC CCTCGTGCCA AACAACAGTT
241 AAGCGCCACG GAGATCATCA AGCGGGCTGA AAAGCTCGAC TACTACTTGC AGCTCGCTTA
301 TGGCTATGCG AAGCAAATCG AAGAAATGTC ACCGATTGCT ACCGTATCCA TGCACATCGT
361 CCAACAAGCA TGGGAAGGCC GAGGTTATCA ACTACCATAT CGAACAAGTC CCGAGTTTAC
421 GGATATGCGA TATACGGCTG TCGAAGCAA AGACCCGATC AACTTCACCA ACGATGGGTA
481 TGAGCTTCGC GTCAAAGAGT ACGGAAAGAC TGTCAAAGTA TTCGTCGCTG TAACAATGTA
541 CAACGAGCCA GCATCGCAGC TCGAAAGTAC GCTGCAAGGA CTCGCCAAAG GCATTGCTTA
601 TATGTGCGAA CAGCAAGGAT ATGACTACTG GCAGCATGTT GCCATCACTG TCGTGGCTGA
661 TGGTCGAACC AAGGTCAACC CGTCAACCTT GGCTTACTTA CAAAACTTG GCGGCTTCGA
721 CAAGCAAATC ATGAACGAGA TCTCATCCGG GATGTCGACG AAAGTTCACT TGTTCAAGTC
781 CACGATTCAA TTACCCTCTG AAGTTGAAGG CTTGTTTAC CCTCCAGTTC AACTCATCTT
841 TGCCTTAAAG GAGAGCAATT ACGGCAAGTT GCATTCTCAT TTGTGTTTCT TCAATGGCTT
901 TTGTGAACAA GTGACCCCA AGTATACTGT TCTCGTTGAC GTAGGCACCA TTCCTGGCGA
961 AACGTCAGTC TACCGTTTGA TTCGGAGCAT GGAACGCAAC CCTCAGATCG GTGGTGTTCG
1021 CCGAGAGATT GCTGTCGAAA AACCGCAATT TCTGAATCAG GTCATTGCAG CTCAACATTT
1081 CGAGTACAAG GTAGCCAACA TCATGGACGC TTCGTTGCAA TCTGTCCTTG GCTTTATTGG
1141 TGTCTTACCC GGTGCGTTTT CAGCTTATCG TTATGATGCC ATTCGTGCTT CAAATGGTGA
1201 AGGCCCACTT GTGGAATACT TCAAAAGTTT GACAGCTTCC AAGAAAGAAC TCGGGTTGTT
1261 CGTCGGCAAC ATGTACCTTG CCGAGGACCG AATTCTCTGC TTCGAGATT TGGCACGAAA
1321 AGGATGCAAG TGGACGATGC ACTATGTAAA AGATGCCATT GCAACCACTG ATGTGCCGTA
1381 GACACTGGTC GACTTGATCA AGCAGCGGCG TCGCTGGCTC AATGGCTCTT TCTTTGCTGG
1441 TCTGTTTGTCT ATCTGGAATC TTGGTTCGCT GTGGCGTAAC ACCGCCCA GCAATTCACG
1501 CAAGTGTGCC TTTACCATCC AGTTTTGCTA TCTGGCGATA CAGAATGTGC TCAATTGGTT
1561 TTTGCTCAGC AATCTCTTTT TGACTTTCTA CTACATTTTG TCGCTGGCTC TGTCTACCG
1621 ATCACCATC CTTCTGCGAG TTATATTAAC AGTGTATTTT GTGCTCGTTG GAAGTTTGTG
1681 CGTCTTCGCT CTCGGTAAACA AACCGAGGCA TCGAAGTGC GGGTTTACC GAATAAGTTC
1741 GTATGTCATG GGAACAATAA TGCTTTGGGT AACTGCCATA TCACTCTATG CACTGTCAGG
1801 TCAAGTATCT TATCTGGACA TTCGACCCGA CCTCCCCTCA TGCAGTGTGG CAAACTGGGA
1861 ACTCCCTGCT GGTGCCATGG CATCGATTGG ATTGATATTT CTCTCTGCAT TTTCTCATGG
1921 AGAATTCACG ATTTTGGCCA GCACTGTCCA GTATTACTTC ATGCTCCCCA CCTTTGTGAA
1981 CATTTTGGGA ATTTATGCTT ACAGCAACTT GCATGATTTG AGCTGGGGAA CGAAGGGGAT
2041 TGACTCGACT GGCCATTTTG GGGGGGCTTC TGGAGGAACA AGTATCAAAC AATTAGTTGC
2101 TATCCAGCTC AATACAGCGA ATATGGACAT TTCGTTAGAA GCAGATAAAC AAAAGCAAAG
2161 CGTTGCTGCT GAACATGAAG ATGTCGATAG CAGCTTTCGT GTGTTCCGGT CTGCTCTTCT
2221 CTTGGCGTGG TTGCTTTTGA ATGGTGCATG GCCTACTTTC GCAACATCTT CCATCTCGTG
2281 CTCGTGTTAC TTGAAGTACT TGTCTGTAC AGTTGCGCTT TTCAACATCA TCGGATTTCT
2341 CGGTGTCTAT ATTTTTCTCG GATTTTCGCAT CACGCGTGGC GTTGTGGAAT GCGTGGAAAG
2401 GTTGGCCTAT CTATCGTCCG CCGACTGCTT GCCCGCTAT CGAGCCGAAA GATATTAATT
2461 TATATGAAT GTTGTGTAAT TCGACAACAA GAATATTGAA CCTTCAAAAA AAAAAAAAAA
2521 AAAAA

chs1 *Aphanomyces euteiches*

SEQ DNAMAN1: 2597 bp;

Composition 595 A; 675 C; 621 G; 706 T; 0 OTHER

Percentage: 22.9% A; 26.0% C; 23.9% G; 27.2% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 800.24 dsDNA: 1601.05

ORIGIN

1 GAAAATTTTG GTTTTGTTC CTCATACAAA GAGATGGTCG GGCAGCAAGA CAACAGACGA
61 CCGTCCGTCC GAACGAGCCG CGTCGGCAGT CACGTCCGCT TTGAGAACGA ATGCGTGACG
121 ACTCTCGATG CGTTCGGATA CATCGAACGA GGTTCGCGCG CCGAGGCGGA TATGTTTTAC
181 AGTGAAGCGA TCAATTGTTT CGTCAATGCT GGTGAATGTC TCCTCCTTGT GTCAGAGCGC
241 GACGGAGATG ATATTGCACC CATGCTTCTC GCCAAGGCC AAGAAGTCAT CGGATGGGCG
301 GAAAATCTGT CCCTCTGGCT CGAAGGAGGA CGTGGCGGAC CACTTCCTTC CCGCAAGTGC
361 CGTGGTATTG AAGTCCCTTT TCGAAGAA GAATGCTGGTG GCGATCACTA CGAAGAAGCG
421 ACTGAAATGA GCTACACCCC CGTCGCGACT GTGAACCCAA TTAACCTTAC CTCTGATGGG
481 TACCGCATGC AGTGTGTCGC GCATGGTCGG AAACCAACAA TGATGATCGT CATTACTATG
541 TACAACGAAG ATGCCGAGGA ATTGGCCACG AACTCCGCA AGGTGTGCAA CAACGTCGCA
601 TACATCCAAA AGAACGCATT GCCAGGTTAC AAGAATGATG ATGCTTGGAA AACATTGTT
661 GTGTGCATTG TGAGCGATGG CGGAACCAAG GCGAACCCAT GCACATTGGC CCTTCTGAGC
721 GAATTCGGCC TCTTCAACGA AGATGTCATG ACGATTTTCT CCACTGGTGC TAACACAACC
781 ATGCACTTGT TTGAACGCAC CCTTCGCTTG GCCAAGGACA AGAAGAAGGT CAAGTTGTAC
841 CATCTTTCGC ATTCGGATTC CTGCTACCCT CCTCTCCAAG TTGTGTATGC ATTGAAGGAA
901 TCGAACGCTG GCAAGTTGAA CTCGCACTTA TGTTCTTCA ACGCTTTTTG CAACCAAGTC
961 GACCCAGACT ACAACTTGCT CCTGGATGTG GGTACCTTGC CGACGAAATC TGCCTTCTAC
1021 AAGTTGCTCT CGACTTTGGA AATGAAGCGT GACGTCGGTG GTGCTGTGG TGAAATTGCC
1081 GTCAGTCAAC CCATTCCTCA CTTGTGGAAC TTCATCATTG CGACACAGCA CTTGAGTAC
1141 AAGGTGTCGA ACTTGTCTGA CAGGCTACT GAATCGTGTG TTGGCTTTGT ATCAGTGCCT
1201 CCGGTCGCGT TTTCTGCTA CCGCTTCTCA GCACTTCAAG GCCCCCCCT AAACGCTTAC
1261 TTCAAGAGTT TGACGACGGA TATGGCCGAC CTTGGTCCGT TCTACGGCAA CATGTACTTG
1321 GCCGAAGATC GTATCTTGTG TTTTGTGCTC TTGGCACGTA CGAACGGCAA CTGGAAGCTC
1381 AAGTACATTA AGGATGCTGT TGCCCGAACC GATGTGCCAT CTACCTTGGT GGAATGTGAT
1441 AATCAACGTC GTCGTTGGTT GAACGCGAGT TTCTTTGCCA GTTGTGACTG GATCGTGACG
1501 TGGGTCGCCC TCTACACCCA TACGAACCAC GGTATTTTGA CCAAGATTGG CTTTTTGATC

```

1561 CAATACTTCC AGTTGATCGT CCAATTCATG TTCGGTTGGT TCATGCTCGC TACATTTTAC
1621 CTCTCGGTGT ACTACACAGC CTTCAACAAGT TTGAAGAAGA ACAAACTCGG CTTTGCCCGAG
1681 ACGGAAGAAT GGTATGATGA TCACCCTCG ATTGCCATGT CCCTCTTCAA CGTCGTCTAC
1741 GCTGGCCTGA TCATGATTCA GCTCATCTTT GGCCCTCGGTA ACAAGCCTCA GCATGTCAAG
1801 AACCTCTACA CATTCTCTGC TGTGTGTGAT GCTATTATTG TTGCGGCTGG TGTTTTCTTT
1861 TCCTTCGCGT CGATTGCGTC GGGTGGAAC ATCTCGCTTT TCAACATTTG CTTGATTATC
1921 TCGACCCTTG GCGTGTATTT TGTGGCTGCT CTCATCCACT GCGAATTGCA CCACGTCTC
1981 TTCACGTTTC TGCAATACAT GCTCTTGCTT CCAACGACAA TTAACGTCCT CATGATCTAC
2041 GCCTTCAGTA ACTTGCAAGA CTTGAGTTGG GGTACCAAGG GTTTGACCGA CGTGTTGGGA
2101 CACGGCCCAA GCGGTGGCTC AGGCGTTGAC AAGCGAGTT CTGGAAGCTA CAAGGACTTG
2161 GTTGCTGCTC GCAAAGCTAA GGAAGCTGAG GACAAGAAAC ACGTGCTAA GGCCAACCTG
2221 GTGAAGAAGA ACTTTGAAGC GTTCCGCTCC AACATGCTTA CGTTCTGGCT CCTCTCGAAT
2281 GCTCTGCTCA TCATGACGTG CATTTACTTC GTCCGAGCCA ACGTCTTCTT CCCAAGTCTT
2341 TTCTTGTTC A TTGCCTTGT CAATCTTACC CGCTTGATCG GCTCTATCAG CTTTGTTTTC
2401 ATGACTGGC ACGACTCAT GGTGCTCTGC TTTTGCTTGC GCTCCGGTGG CTTTGAGCGA
2461 CGCAAAATGC GTGACGCCGC ACTTGAAAGAA GCAAATATG GCAAACCTCG CAGCTCCAAG
2521 GTCGAATCTG GAAAGCCATC CGTAGTCTTG AAGTAGACTC TCTATTTGGT TATCTTATCT
2581 CTTTTTTAAA AAAAAAA

```

chs *Phytophthora parasitica*

SEQ DNAMAN1: 2292 bp;

Composition 576 A; 591 C; 548 G; 576 T; 1 OTHER

Percentage: 25.1% A; 25.8% C; 23.9% G; 25.1% T; 0.0%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 706.79 dsDNA: 1413.01

ORIGIN

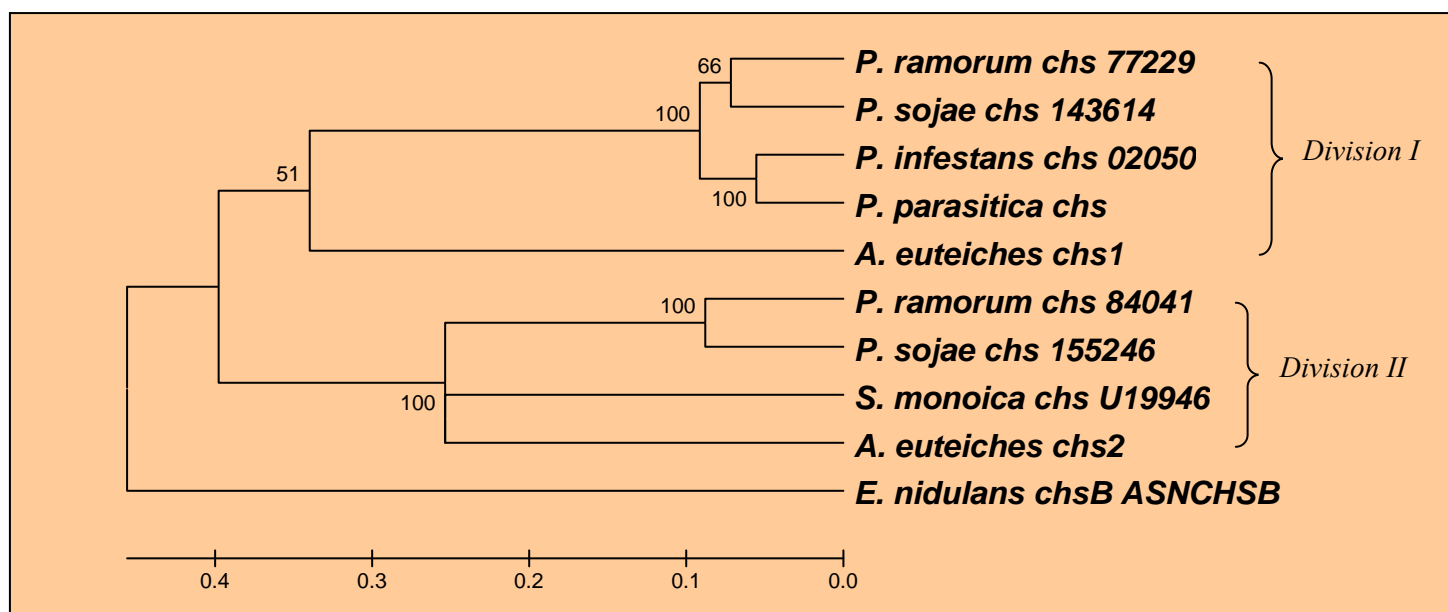
```

1 ATTACTATGT ACAACGAAG ACCACAGCAA CTCAAGGCGA CACTCAAGAA ACTCGCCAAT
61 AACTTGGCAT ATCTCAAAGA ACAGAAGAAA GACCACGAGA AGACTCTGTC CAGAGATTTC
121 GCAGGCGAAG ACGTGTGGCA GAATGTGCTG CTCTGCATTG TGGCAGACGG TCGCGAACAG
181 ATTAACGATA AGATGCTGGA TTACCTGGAA GCTATCGGAC TGTACGACGA AGACCTCTTG
241 ACGATCAACA GTGCCGGTAT TGGCGCCAG TGCCACATGT TCGAGCACAC TCTGCAACTC
301 AATGTGAATG GCAAGAGTCT GTTGCCAATT CAGACGGTAT TCGTCTAAA GGAGACCAA
361 TCCAGCAAAC TGGACTCGCA CCACTGGTAC TTCAATGCGT TCGCGGAACA GATCCAGCCG
421 GAGTACACCG CAGTGATGGA TGTGTGTACA ATGCTCACCA AGTCGGCTCT GTATCATTTG
481 CTGTTTGCAT TCGAACGCAA CCACCAGATT GGAGGAGCGT GTGGTCAGCT GACAGTGGAG
541 AAACCATTC AGAACTTGAG CAACTGGGTC ATCTCAGCGC AGCACTTCGA GTACAAGATC
601 TCCAACATCC TCGACAAGTC GCTGGAGAGC TGTTTTGGCT TTATCAGTGT GCTTCTGGT
661 GCTTCTCGG CCTATCGATA CGAAGCCATT CGAGGAGCTC CGTTAGACGC ATACTTCCAG
721 ACTTTAAACG TCGATCTGGA CGTGTGGGA CCTTTCATTG GCAATATGTA TCTCGCAGAA
781 GACAGGATG TGTCTGTCGA GTTGTGGCT CGAAAGGACT GCAAGTGGAG GATGCACACT
841 GTCAAGGACG CTGTAGCTCG CACAGATGTA CCACACGACC TAGTGGGACT CATTTCACAG
901 CGCAAACGGT GGCTCAACGG TCGTCTTTT GCCACTCTTT TCATCATTTG GAACTGGGGC
961 CGCATCTACT CGGAAAGCAA CCACTCGTTC ACACGGAAGA CGGCGTTTCT CGTCTTCTAT
1021 CTGTACCATG TGCTGTACAC GGCATTCACC TTCTTCTGTC CTGCAAATTT GTACCTCGCG
1081 CTCTTCTTCA TCGTCTTTCA AGGATTCCAG CAAAATCGTC TCGAGTTCGT GGACACATCC
1141 GAGTACTCGC AAAGTGTATT GGATTGTGCA GTTTACATCT ACAACTTTGT GTATCTGTTT
1201 GGGCTTCTGA TGCTGATCAT TATTGGTCTT GGCAACAACC CCAAGCACAT GAAGCTCACG
1261 TACTACTTTG TTGGTGCCGT GTTCGGAGTC ATGATGATGC TGTGCTCTTT GGTGGTCTC
1321 GGCATTTTCT TCTCAACGCC AGCTACAGTT CACTCCATCG TGGTCTCAAT CCTTACGGTT
1381 GCGGTATACT TCATTGGTTC AGCGTGCAT GCGGAGCTCC ACCACATTTT CATGACTTTT
1441 ACGCACTACA CGGCGTTAAT CCCGAGCTTC GTGAACATCT TCACGATCTA CTCGTTCTGC
1501 AACCTCAGG ACTTATCGT GGGCACTAAG GGCTTGACG ATGATCCATT GCTGGCTGCT
1561 TCACTGGATG ATACGGAGAA GGGAGACTTT AAGGACGTGA TCGCTAAGCG TCGTGAATG
1621 GAGGAGCGTC GTCGTGAAGA GAATGAGCGT GTGGAGAACA GGGAGAAGAA TTTGAGGCC
1681 TTCCGCTCCA ACATTCGCT CACCTGGACA TTCTCCAACC TCATCTTCGC TCTTTCATC
1741 GTGTACTTTG CCGATTCTG GACGTACATG CCCATCTGT ACATCTTCGT GGCCAGTATC
1801 AACTCGTGTG GACTACTGGG ATGCATTGGC CACTGGATCT ACATCCCNCA CGGCTGGACT
1861 GCGCGAGAGT TTCCTCGATA AGTCGGAATG TGGCAACGGT ACCGGTCTGCT ACCCGCAGAA
1921 CTCGTACGTG CAGCTTGACG AGCATACGC CGCTCTCGCA GAGGACCAGC GCACTTACGC
1981 GTCCGGACGC ACAAATGCCT CAGTGCATG CATCAACGAA GTCCTCCG TCGTTTAAAGT
2041 GGATCGAGAG AACAAAGACAA CCTCAAGTGG ATTTTGTGTC GATCGCGAGC AGTAAACAC
2101 GCAGAGAGGT TCCAGTCATT CGATTTGCAG CAAACCTGCA ACACTCAACA ACAACATTAG
2161 CCACAGCAAA CAAGTCGAGC AGTGAGTCCA GTGAGTCTT ACCGTAGATG ATGATGCACG
2221 TTTATAAATC GCCGACATGA TACAATTTGC AGTTTTCCAT TTGCCTTAAA AAAAAAAAAA
2281 AAAAAAAAAA AA

```

Κατασκευή Δενδρογράμματος:

Οι παραπάνω *chs* αλληλουχίες συγκρίθηκαν με ήδη γνωστές *chs* αλληλουχίες, κατατεθειμένες στις γονιδιακές τράπεζες των NCBI, JGI και BROAD Institute. Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση των δεδομένων με τη χρήση του λογισμικού MEGA 3.1. Συγκεκριμένα κατασκευάστηκε δενδρόγραμμα με τη μέθοδο Neighbor-Joining, παράμετρος Kimura 2 και με υποστήριξη 10.000 επαναλήψεων της μεθόδου Bootstrap.



Εικόνα 12: Κατασκευή Bootstrap consensus tree (10.000 επαναλήψεις) σύμφωνα με το βαθμό συντήρησης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των ήδη κατατεθειμένων CHS γονιδίων.

P.: *Phytophthora*, A: *Aphanomyces*, S: *Saprolegnia* και E.: *Emericella*

ΣΥΖΗΤΗΣΗ:

Τα αποτελέσματα αυτής της ενότητας αποτελούν μέρος της μελέτης του κυτταρικού τοιχώματος του *A. euteiches*, η οποία απέδειξε την παρουσία χιτίνης σε έναν οργανισμό, μέλους των Ωομυκήτων, για τους οποίους κυριαρχούσε η ιδέα ότι στο κυτταρικό τους τοίχωμα επικρατεί μόνο β-γλυκάνη/κυτταρίνη (2, 5, 6, 37). Ο μοριακός εντοπισμός της έκφρασης των *chs* στους Ωομύκητες επεκτάθηκε και στην *P. parasitica* που μέχρι τώρα δεν είχε γίνει καμία σχετική μελέτη. Η μοριακή μελέτη στον *A. euteiches* ξεκίνησε με τον εντοπισμό τμημάτων δύο πιθανών *chs* μετά από σάρωση EST συλλογής (31) και ολοκληρώθηκε με την εφαρμογή 5' RACE PCR. Για

την *P. parasitica* διατίθεται συλλογή 8000 ESTs (αδημοσίευτη πληροφορία, Dr. Arnaud Bottin, INRA-Toulouse) της οποίας οι αλληλουχίες ελέχθησαν και δεν έδωσαν πιθανή *chs*. Επομένως, η απομόνωση μιας πιθανής *chs* σε έναν οργανισμό που θεωρείτο ότι περιέχει μόνο κυτταρίνη (και μάλιστα από cDNA) δείχνει ότι όχι μόνο περιλαμβάνεται γονίδιο *chs* στο γένωμα του οργανισμού, αλλά και εκφράζεται. Λαμβάνεται σοβαρά υπόψη ότι το γονιδίωμα για τους δύο αυτούς οργανισμούς δεν είναι πλήρως αλληλουχημένο όπως συμβαίνει με άλλους Ωομύκητες. Επίσης, με PCR που εφαρμόστηκε για την *chs* της *P. parasitica* σε γενωμικό και cDNA εκμαγείο πολυμερίστηκαν τμήματα DNA ίδιου μήκους, δείχνοντας ότι τα γονίδια πιθανότατα δεν περιέχουν εσώνια στο εσωτερικό τους.

Στην παρούσα ενότητα απομονώθηκε ένα μόνο γονίδιο πιθανής συνθάσης της χιτίνης (CHS) στην *P. parasitica*. Μετά από ανάλυση της αλληλουχίας και κατασκευή δένδρογράμματος βασισμένο στην κεντρική και πιο συντηρημένη αμινοξική περιοχή των CHS της *Phytophthora* (Εικόνα 6) βρέθηκε ότι η CHS_ *Ppn0* είναι εξελικτικά συγγενέστερη με αυτή της *P. infestans* και ανήκει στην οικογένεια των *chs1* γονιδίων. Το γονιδίωμα της *P. infestans* είναι πλήρως αλληλουχημένο και ενημερωμένο (annotated). Επίσης διατίθεται συλλογή με 75000 ESTs (18000 γονίδια) στα οποία οι αλληλουχίες εκ των δύο διαπιστώθηκε ομολογία με *chs* γονίδια (36, 43). Μετά όμως από στοίχιση αυτών των αλληλουχιών εντοπίζεται ότι πρόκειται για δύο αλληλεπικαλυπτόμενες αλληλουχίες του ίδιου γονιδίου, ίσως και του μοναδικού. Ενδέχεται και η *P. parasitica* να ανήκει στην ίδια περίπτωση. Το γεγονός, όμως, ότι απομονώθηκε μέχρι στιγμής μόνο ένα γονίδιο στην *P. parasitica* δεν αποδεικνύει ότι είναι και το μοναδικό. Μελλοντικά θα πρέπει να σχεδιαστούν primers που να βασίζονται σε συντηρημένες περιοχές χαρακτηριστικές για τα *chs2* γονίδια του γένους της *Phytophthora*. Βιοπληροφορική αναζήτηση των γονιδιωμάτων των *P. ramorum* και *P. sojae* έδωσαν δύο γονίδια ομόλογα με *chs*, γονίδια όμως που δεν έχουν μέχρι τώρα κλωνοποιηθεί και δεν είναι γνωστό κατά πόσο εκφράζονται, υπό ποιες συνθήκες ή παραμένουν ανενεργά.

Στη διάρκεια των πειραμάτων εφαρμόστηκε RACE PCR και στους δύο οργανισμούς με σκοπό των πλήρη χαρακτηρισμό αυτών των γονιδίων. Γενικώς, το ιδανικό στη RACE PCR είναι να λαμβάνει κανείς μία μόνο ζώνη μετά από κάθε αντίδραση. Αυτό όμως δεν συμβαίνει πάντα και ειδικά όταν πρόκειται για ένα σπάνιο μετάγραφο όπως του *chs* ή για ένα μεγάλο τμήμα cDNA. Επίσης, η εμφάνιση «smear» ή μηδενικού προϊόντος είναι επίσης πιθανή. Ειδικά η 5' RACE PCR είναι

πιο δύσκολη από την αντίστοιχη 3' RACE μίας και είναι πιο δύσκολο να κατασκευαστεί καλής ποιότητας (μη αποδομημένο) εκμαγείο και επίσης ο «adaptor» του kit πρέπει να συνδεθεί με το cDNA μέσω σύνδεσης τυφλών άκρων (blunt-end ligation). Το γεγονός όμως ότι εμφανίζονται περισσότερες από μια ζώνες είναι κάτι αναμενόμενο και πρέπει να χαρακτηριστούν όλες. Σε κάθε περίπτωση, για τον χαρακτηρισμό των cDNA συνίσταται εκτός από «nested» RACE PCR να εφαρμόζεται και υβριδοποίηση κατά Southern με ένα nested εκκινητής ή άλλο ιχνηλάτης (probe). Επιπλέον, πρέπει να γίνεται αλληλούχηση περισσότερων του ενός κλώνων γιατί ενδέχεται μια ζώνη να αντιστοιχεί σε περισσότερα από ένα προϊόντα PCR. Η αλληλούχηση επίσης μπορεί να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα αν υπάρχουν ένα ή περισσότερα αλληλόμορφα για το ίδιο γονίδιο. Στην περίπτωση της 5' RACE PCR της *Ppn0* λάβαμε προϊόν με το επιθυμητό μέγεθος, όμως τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ομολογία ριβοσωμικού RNA της *Phytophthora* αποτέλεσμα που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αντίδραση πρέπει να επαναληφθεί και πιθανόν με τη χρήση νέων εκκινητών.

Ο λόγος που απομονώθηκε το total RNA του *A. euteiches* για την εφαρμογή 5'-RACE PCR μετά από καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο παρουσία νικομυσίνης Z (ένας ανταγωνιστής των CHS) (39) ήταν το ότι αυτή η χημική ένωση έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνει την έκφραση του γονιδίου *chs2* στον *Aphanomyces* (*AeCHS2*) έως και οκτώ φορές. Για το *AeCHS1* τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν τα ίδια (αδημοσίευτη πληροφορία, Dr. Arnaud Bottin, INRA-Toulouse). Συνεπώς, αυτός ήταν ένας τρόπος αύξησης των πιθανοτήτων επιτυχίας της μεθόδου.

Έκτος από τους τεχνικούς λόγους υπάρχουν και βιολογικοί λόγοι που μπορεί να εμφανίζονται περισσότερες τις μιας ζώνες σε αντιδράσεις RACE-PCR. Το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να είναι μια αιτία για πολλά προϊόντα στη 5' και 3' RACE PCR. Διαφορετικές θέσεις έναρξης της μεταγραφής και πολυαδενυλίωσης μπορούν να οδηγήσουν σε πολλαπλά προϊόντα 5'-RACE και 3'-RACE PCR, αντίστοιχα. Τέλος, το επιθυμητό γονίδιο μπορεί να είναι μέλος μιας πολυγονιδιακής οικογένειας και οι σχεδιασμένοι primers να πολυμερίζουν και άλλα μέλη.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα ενότητα παρουσιάζεται η απομόνωση και οι πλήρεις αλληλουχίες των cDNA των *AeCHS1*, *AeCHS2* και του μεγαλύτερου και πιο συντηρημένου τμήματος της *Ppn0_chs*. Τμήματα των cDNA αλληλουχιών των *AeCHS1*, *AeCHS2* έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων GenBank με τους κωδικούς

EU522489 και EU447431 αντίστοιχα. Στο μέλλον θα πρέπει να κατατεθούν οι πλήρεις αλληλουχίες τους, καθώς και η αντίστοιχη της *Ppn0_chs*.

Η παρουσία χιτοσακχαριτών στο κυτταρικό τοίχωμα του *A. euteiches* και της *P. parasitica* υποστηρίζεται από την έκφραση γονιδίων σχετικών με τη σύνθεση χιτίνης. Οι συνθάσες της χιτίνης (CHS) είναι διαμεμβρανικές γλυκοσυλτρανσφεράσες, ένζυμα που καταλύουν την μεταφορά καταλοίπων GlcNAc από UDP- GlcNAc σε μη αναγωγικά άκρα αλυσίδων χιτίνης. Ανήκουν στην οικογένεια 2 των γλυκοσυλτρανσφερασών (10). Αναλύσεις σχετικές με ομολογία των αλληλουχιών συνθασών χιτίνης (CHS) οδήγησαν στην κατάταξη των CHS που προέρχονται από τους μύκητες σε επτά διακριτές κλάσεις. Οι κλάσεις αυτές ομαδοποιούνται σε δύο Υποδιαιρέσεις (Divisions): την Division I, που περιλαμβάνει τις κλάσεις I, II και III των ενζύμων, και την Division II, που περιλαμβάνει τις κλάσεις IV, V, VI των ενζύμων, ενώ η κλάση VII των CHS των μυκήτων και οι CHS των ζώων σχηματίζουν διακριτές ομάδες (12, 38).

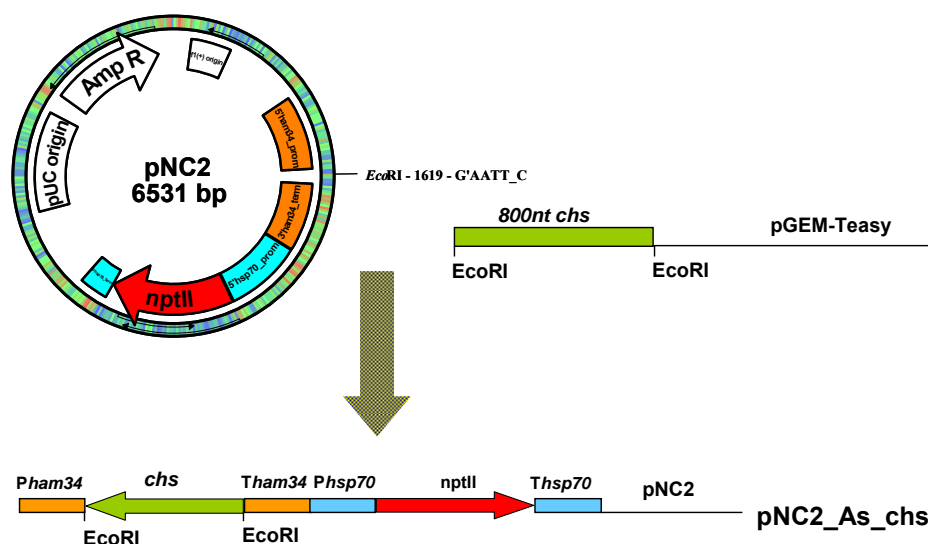
Από το τελικό δενδρόγραμμα που προέκυψε (Εικόνα 12), οι εξελικτικές αποστάσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι συνθάσες της χιτίνης από ένα αρχικό γονίδιο το οποίο διπλασιάστηκε, δίνοντας στη συνέχεια τις δύο διακριτές Υποδιαιρέσεις (Division I και II).

Έχοντας στη διάθεση μας όλη τη γενετική πληροφορία μπορούμε με reverse genetics να προχωρήσουμε στην έρευνα του βιολογικού ρόλου των συνθασών της χιτίνης στην σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των Ωομυκήτων (πρόκληση σίγησης-“knock-down”). Στους Μύκητες εντοπίζονται τουλάχιστον τρία *chs* γονίδια, το καθένα από τα οποία ανταποκρίνεται σε διαφορετικό ρόλο για τον οργανισμό (9, 39). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι στην εξέλιξη των ωομυκήτων χρειάστηκαν λιγότερα *Chs* γονίδια. Η μελέτη του ρόλου των *Chs* θα μπορούσε να γίνει είτε με την ταυτόχρονη σίγηση όλων των *chs* είτε με την μεμονωμένη σίγηση έκαστης.

Η πρόκληση σίγησης θα μπορούσε να εφαρμοστεί μέσω μετασηματισμού σε πρωτοπλάστες ή με τη συνεπώση *Agrobacterium* και μυκηλίου του ωομύκητα. Η προσέγγιση αυτή είναι πιο εφικτή για την *Phytophthora* στην οποία αυτές οι τεχνικές έχουν καθιερωθεί (27), ενώ στον *Aphanomyces* γίνονται ακόμα προσπάθειες για την απόκτηση καλής ποιότητας και ποσότητας πρωτοπλαστών (18). Συγκεκριμένα, θα μπορούσε να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι απαραίτητη η παρουσία χιτίνης για την βιωσιμότητα του ωομύκητα (lethal knock-out) ή όχι. Αν δεν επρόκειτο για γονίδιο αναγκαίο για την βιωσιμότητα του ωομύκητα θα μπορούσαμε στη συνέχεια με

πειράματα μολύνσεων σε φύλλα καπνού (*P. parasitica*) ή ρίζα της *Medicago truncatula* (*A. euteiches*) να ερευνήσουμε την σημαντικότητα του μορίου της χιτίνης για την παθογένεια των εν λόγω ωομυκήτων. Έτσι, θα μπορούσαν να ανοίξουν νέες προοπτικές για την ανάπτυξη νέων μυκητοκτόνων φαρμάκων και αντιμετώπιση των ασθενειών, εκτιμώντας όμως παράλληλα την περίπτωση καταστροφής και ωφέλιμων για το οικοσύστημα οργανισμούς (π.χ. σαλιγκάρια, μυκκόριζες κτλ).

Με σκοπό τα παραπάνω έγινε μια πρώτη προσέγγιση για την κατασκευή πλασμιδίου που θα περιείχε το τμήμα των 800nt της *Ppn0_CHS* σε antisense μορφή και θα χρησιμοποιούνταν για το μετασχηματισμό πρωτοπλαστών της *P. parasitica*. Τελικός σκοπός είναι η πρόκληση σταθερής σίγησης της *Ppn0_CHS* και συνεπώς η μελέτη του βιολογικού της ρόλου.



Εικόνα 12: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση του συλλογισμού κατασκευή antisense κασέττας για τη σίγηση της *Ppn0_chs*.

Το πείραμα αυτό όμως δεν στέφτηκε με επιτυχία και παράλληλα έχει προγραμματιστεί η κατασκευή με *in vitro* μεταγραφή dsRNA της *Ppn0_CHS* με σκοπό τον μετασχηματισμό πρωτοπλαστών της *P. parasitica* (47). Το αναμενόμενο αποτέλεσμα θα είναι η επαγωγή παροδικής σίγησης της *Ppn0_CHS*.

Ανακεφαλαιώνοντας, το σημαντικότερο συμπέρασμα από αυτή την εργασία είναι ότι σε οργανισμούς (Ωομυκήτες) που θεωρούνταν μέχρι πρότινος ότι η βασική τους διαφορά με τους Πραγματικούς Μύκητες είναι η σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυτταρίνης αντί χιτίνης, ανακαλύπτεται ότι γονίδια συνθασών χιτίνης όχι μόνο περιλαμβάνονται στο γονιδίωμα των Ωομυκήτων αλλά και εκφράζονται.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
2. Aronson, J. M., and C. C. Bertke. 1987. Isolation and analysis of cell walls, p. 175-185. In M. S. Fuller and A. Jaworski (ed.), *Zoosporic fungi in teaching and research*. Southeastern Publishing Corporation, Athens, GA.
3. Bacic, A., M. L. Williams, and A. E. Clarke. 1985. Studies on the cell surface of zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomi*: nature of the surface saccharides as determined by quantitative lectin binding studies. *J. Histochem. Cytochem.* 33:384-388.
4. Baldauf, S. L. 2003. The deep roots of eukaryotes. *Science* 300:1703-1706.
5. Bartnicki-García, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22:87-108.
6. Bartnicki-García, S., and M. C. Wang. 1983. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*, p. 121-137. In P. H. Tsao (ed.), *Phytophthora : its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. APS Press, St Paul, Minnesota, USA.
7. Birch, P. R. J., A. P. Rehmany, L. Pritchard, S. Kamoun, and J. L. Beynon. 2006. Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol.* 14:8-11.
8. Bulone, V., H. Chanzy, L. Gay, V. Girard, and M. Fèvre. 1992. Characterization of chitin and chitin synthase from the cellulosic cell wall fungus *Saprolegnia monoica*. *Exp. Mycol.* 16:8-21.
9. Cabib, E., A. Sburlati, B. Bowers, and S. J. Silverman. 1989. Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 108:1665-1672.
10. Campbell, J. A., G. J. Davies, V. Bulone, and B. Henrissat. 1997. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 326:929-939.

11. Chérif, M., N. Benhamou, and R. R. Bélanger. 1992. Occurrence of cellulose and chitin in the hyphal walls of *Pythium ultimum*: a comparative study with other plant pathogenic fungi. *Can. J. Microbiol.* 39:213-222.
12. Choquer, M., M. Boccara, I. R. Gonçalves, M. C. Soulié, and A. Vidal-Cros. 2004. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euscomycetes genomes. *Eur. J. Biochem.* 271:2153-2164.
13. Dick, M. W. 2001. *Straminipilous fungi*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
14. Dietrich, S. M. 1973. Carbohydrates from the hyphal walls of some Oomycetes. *Biochim. Biophys. Acta* 313:95-98.
15. Dietrich, S. M. 1975. Comparative study of hyphal wall components of Oomycetes: *Saprolegniaceae* and *Pythiaceae*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 47:155-162.
16. Ehrlich, H., M. Krautter, T. Hanke, P. Simon, C. Knieb, S. Heinemann, and H. Worch. 2007. First evidence of the presence of chitin in skeletons of marine sponges. Part II. Glass sponges (Hexactinellida: Porifera). *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 308:473-483.
17. Ehrlich, H., M. Maldonado, K. D. Spindler, C. Eckert, T. Hanke, R. Born, C. Goebel, P. Simon, S. Heinemann, and H. Worch. 2007. First evidence of chitin as a component of the skeletal fibers of marine sponges. Part I. Verongidae (demospongia: Porifera). *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 308:347-356.
18. Gaulin, E., N. Haget, M. Khatib, C. Herbert, M. Rickauer, and A. Bottin. 2007. Transgenic sequences are frequently lost in *Phytophthora parasitica* transformants without reversion of the transgene-induced silenced state. *Can. J. Microbiol.* 53:152-157.
19. Gaulin, E., C. Jacquet, A. Bottin, and B. Dumas. 2007. Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mol. Plant Pathol.* 8:539-548.
20. Gaulin, E., M. A. Madoui, A. Bottin, C. Jacquet, C. Mathe, A. Couloux, P. Wincker, and B. Dumas. 2008. Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: new oomycete putative pathogenicity factors and metabolic pathways. *PLoS ONE* 3:e1723.
21. Goldman, R. C., and A. Branstrom. 1999. Targeting cell wall synthesis and assembly in microbes: similarities and contrasts between bacteria and fungi. *Curr. Pharm. Des.* 5:473-501.

22. Haldar, K., S. Kamoun, N. L. Hiller, S. Bhattacharje, and C. van Ooij. 2006. Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:922-931.
23. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*:95-98.
24. Hardham, A. R. 2007. Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cell. Microbiol.* 9:31-39.
25. Herth, W., M. Mulisch, and P. Zugenmaier. 1986. p. 107-120. In R. Muzarelli, C. Jeuniaux, and G.-W. Gooday (ed.), *Chitin in nature and technology*. Plenum Press, New York, London.
26. Hüchelhoven, R. 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:101-127.
27. Judelson, H. S. 2007. Genomics of the plant pathogenic oomycete *Phytophthora*: insights into biology and evolution. *Adv. Genet.* 57:97-141.
28. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5:150-163.
29. Latijnhouwers, M., P. J. de Wit, and F. Govers. 2003. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends Microbiol.* 11:462-469.
30. Leal-Morales, C. A., L. Gay, M. Fèvre, and S. Bartnicki-García. 1997. The properties and localization of *Saprolegnia monoica* chitin synthase differ from those of other fungi. *Microbiology* 143:2473-2483.
31. Madoui, M. A., E. Gaulin, C. Mathe, H. San Clemente, A. Couloux, P. Wincker, and B. Dumas. 2007. AphanoDB: a genomic resource for *Aphanomyces* pathogens. *BMC Genomics* 8:471.
32. Madrid, M. P., A. Di Pietro, and M. I. Roncero. 2003. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol. Microbiol.* 47:257-266.
33. Mort-Bontemps, M., L. Gay, and M. Fèvre. 1997. CHS2, a chitin synthase gene from the oomycete *Saprolegnia monoica*. *Microbiology* 143:2009-2020.
34. Munro, C. A., and N. A. Gow. 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 39:41-53.

35. Netea, M. G., G. D. Brown, B. J. Kullberg, and N. A. Gow. 2008. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:67-78.
36. Randall, T. A., Dwyer, R. A., Huitema, E., Beyer, K., Cvitanich, C., Kelkar, H., Ah Fong, A. M. V., Gates, K., Roberts, S., Yatzkan, E., Gaffney, T., Law, M., Testa, A., Torto, T., Zhang, M., Zheng, L., Mueller, E., Windass, J., Binder, A., Birch, P. R. J., Gisi, U., Govers, F., Gow, N., Mauch, F., van West, P., Waugh, M., Yu, J., Boller, T., Kamoun, S., Lam, S. T., and Judelson, H. S. 2005. Large-scale gene discovery in the oomycete *Phytophthora infestans* reveals likely components of phytopathogenicity shared with true fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:229-243.
37. Ruiz-Herrera, J. 1992. Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly. CRC Press, Boca Raton.
38. Ruiz-Herrera, J., J. M. Gonzalez-Prieto, and R. Ruiz-Medrano. 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 1:247-256.
39. Ruiz-Herrera, J., and G. San-Blas. 2003. Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 3:77-91.
40. Shaw, J. A., P. C. Mol, B. Bowers, S. J. Silverman, M. H. Valdivieso, A. Durán, and E. Cabib. 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* 114:111-123.
41. Soulié, M. C., A. Piffeteau, M. Choquer, M. Boccara, and A. Vidal-Cros. 2003. Disruption of *Botrytis cinerea* class I chitin synthase gene Bchs1 results in cell wall weakening and reduced virulence. *Fungal Genet. Biol.* 40:38-46.
42. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
43. Torto TA, Li S, Styer A, Huitema E, Testa A, Gow NA, van West P, Kamoun S., EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Res.* 2003. 13(7):1675-85.

44. Tyler, B. M. 2002. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:137-167.
45. van West, P. 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete parasite with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 20:99-104.
46. Werner, S., U. Steiner, R. Becher, A. Kortekamp, E. Zyprian, and H. B. Deising. 2002. Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208:169-173.
47. Whisson S. C., A. O. Avrova, P. Van West, and J. T. Jones. 2005. A method for double-stranded RNA-mediated transient gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathology.* 6:153 – 163.