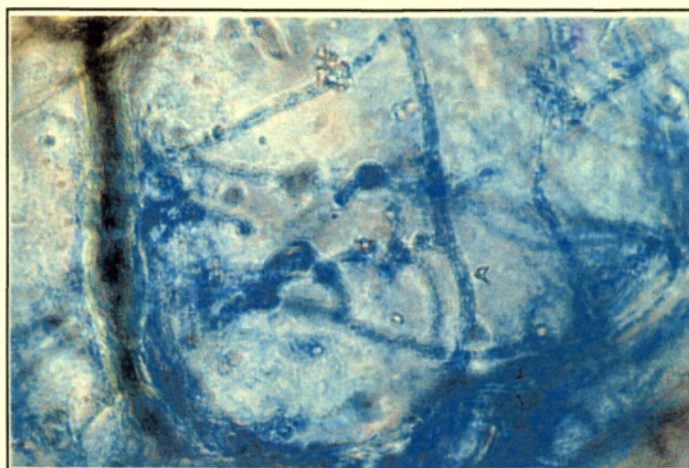


Τ.Ε.Ι Καλαμάτας  
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας  
Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας

Ποσοτικοποίηση της σήψης λαιμού και ρίζας φυτών τομάτας από  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* με τη χρήση γενετικά  
τροποποιημένου στελέχους του μύκητα

Αγγέλου Ιωάννα

Πτυχιακή Εργασία



Καλαμάτα 2000

Τ.Ε.Ι Καλαμάτας  
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας  
Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας



Ποσοτικοποίηση της σήψης λαιμού και ρίζας φυτών τομάτας από *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* με τη χρήση γενετικά τροποποιημένου στελέχους του μύκητα

Σπουδάστρια:  
Αγγέλου Ιωάννα

Υπεύθυνοι Καθηγητές:  
Μαρκόπουλος Κυριάκος, Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Καλαμάτα 2000

Στο εξώφυλλο: Ανίχνευση δραστηριότητας β-γλουκουρονιδάσης σε μεταμορφωμένο στέλεχος του μύκητα FORL, εντός κυττάρων ρίζας φυτού τομάτας.

*Στους γονείς μου Θεόδωρο και Νικολέττα*

## ***Αντί προλόγου***

Για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν:

Ευχαριστώ πολύ την επιβλέπουσα κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση και διεξαγωγή του πειράματος, καθώς και για τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου μετέδωσε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη συνάδελφο και φίλη Μαρία για την πολύτιμη βοήθειά της στους εργαστηριακούς χώρους. Χωρίς αυτήν τα πάντα θα ήταν πιο δύσκολα.

Ακόμη ευχαριστώ τη φίλη Άντζελα για τη βοήθεια και τις συμβουλές της για τη μορφή του κειμένου, καθώς και το φίλο Ηλία για τις φωτογραφίες.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους υπεύθυνους του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας για τη διάθεση των εργαστηριακών χώρων.

Τέλος, ευχαριστώ τον κ. Μαρκόπουλο Κυριάκο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ και να διεξάγω την παρούσα πτυχιακή εργασία στο Ινστιτούτο Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας, καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή.....	σελ. 5
---------------	--------

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

1.1 Ταξινόμηση.....	σελ. 6
1.1.1 <i>Formae speciales</i> .....	σελ. 8
1.1.2 Διαφορές του <i>Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i> από το <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> .....	σελ. 8
1.2 Συμπτώματα.....	σελ. 9
1.3 Τρόποι εξάπλωσης της ασθένειας.....	σελ. 10
1.4 Έλεγχος της ασθένειας.....	σελ. 12
1.4.1 Χημικός έλεγχος.....	σελ. 13
1.4.2 Ανθεκτικές ποικιλίες.....	σελ. 14
1.4.3 Βιολογικός έλεγχος.....	σελ. 14
1.4.4 Καλλιεργητικοί χειρισμοί.....	σελ. 16

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

2.1 Μεταμόρφωση νηματόμορφων μυκήτων.....	σελ. 17
2.1.1 Τροποποίηση με τη χρήση PEG.....	σελ. 17
2.1.2 Διάτρηση πρωτοπλαστών με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος(Ηλεκτροπόρωση).....	σελ. 18
2.1.3 Μεταμόρφωση άθικτων κυττάρων με τη χρήση αλκαλικών ιόντων.....	σελ. 18
2.1.4 Μεταμόρφωση με χρήση βαλλιστικής.....	σελ. 19
2.1.5 Μεταμόρφωση με τη χρήση του <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	σελ. 19
2.1.6 Γονίδια-Δείκτες ή Μάρτυρες επιλογής.....	σελ. 20
2.2 Το γονίδιο GUS.....	σελ. 22
2.3 Χρήσεις του γονιδίου GUS-A.....	σελ. 23

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

Υλικά.....	σελ. 25
Σχηματική απεικόνιση της όλης διαδικασίας.....	σελ. 28
3.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης.....	σελ. 30
3.2 Μέθοδοι και τεχνικές για τη μελέτη του DNA.....	σελ. 30
3.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα.....	σελ. 30
3.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα.....	σελ. 30
3.2.3 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από μυκήλιο του μύκητα FORL.....	σελ. 32
3.2.4 Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με χρήση φαινόλης.....	σελ. 32
3.2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	σελ. 33
3.2.6 Απομόνωση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης.....	σελ. 33
3.2.7 Σήμανση νουκλεϊνικών οξέων με DIG-11-dUTP.....	σελ. 34
3.2.8 Πέψη DNA.....	σελ. 35
3.2.9 Μεταφορά μορίων DNA πηκτή αγαρόζης σε νάυλον μεμβράνη Hybond N <sup>+</sup> .....	σελ. 35
3.2.10 Υβριδισμός κατά Southern.....	σελ. 36
3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	σελ. 37
3.3.1 Ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	σελ. 37
3.3.2 Ενίσχυση τμημάτων DNA των γονιδίων <i>hph</i> και <i>uidA</i> .....	σελ. 37
3.4 Μέθοδοι για τη μελέτη πρωτεϊνών.....	σελ. 38
3.4.1 Μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	σελ. 38
3.4.2 Μέτρηση δραστικότητας GUS.....	σελ. 39
3.4.3 Ιστοχημική ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου GUS.....	σελ. 40
3.4.4 Μέτρηση δραστικότητας GUS σε ρίζες τομάτας.....	σελ. 40
3.5 Μεταμόρφωση του FORL.....	σελ. 41
3.5.1 Απομόνωση και μεταμόρφωση πρωτοπλαστών.....	σελ. 41
3.5.2 Αναγέννηση πρωτοπλαστών.....	σελ. 41
3.6 Σπορά και ανάπτυξη φυτών τομάτας.....	σελ. 42
3.6.1 Μολύνσεις φυτών.....	σελ. 43

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### Αποτελέσματα

4.1 Δημιουργία πρωτοπλαστών.....	σελ. 44
4.2 Υπόστρωμα επιλογής.....	σελ. 45
4.3 Αναγέννηση πρωτοπλαστών.....	σελ. 45
4.4 <i>In situ</i> έλεγχος τροποποιημένων στελεχών.....	σελ. 46
4.5 Έλεγχος μιτωτικής σταθερότητας.....	σελ. 46
4.6 Άλλες μετρήσεις φυσιολογίας.....	σελ. 48
4.7 Έλεγχος εισαγωγής των γονιδίων <i>hph</i> και <i>uidA</i> στο γονιδίωμα των τροποποιημένων στελεχών.....	σελ. 50
4.8 Ανάλυση με κατά <i>Southern</i> υβριδισμό των μεταμορφωμένων στελεχών <i>FORL</i> .....	σελ. 51
4.9 Μέτρηση παραγωγής πρωτεϊνών και δραστικότητας <i>GUS</i> στα τροποποιημένα στελέχη.....	σελ. 53
4.10 Μέτρηση περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και δραστικότητας <i>GUS</i> στο στέλεχος <i>f30</i> .....	σελ. 55
4.11 Έλεγχος φυτοπαθογένειας του <i>f30</i> .....	σελ. 58
4.12 Μολύνσεις φυτών τομάτας και μέτρηση δραστικότητας του <i>GUS</i> σε φυτικό ιστό για το στέλεχος <i>f30</i> .....	σελ. 59

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>

### Συζήτηση των αποτελεσμάτων

5.1 Γενικά.....	σελ. 62
5.2 Απομόνωση και αναγέννηση πρωτοπλαστών.....	σελ. 62
5.3 Δραστικότητα γονιδίου <i>GUS</i> .....	σελ. 63
5.4 Ποσοτικοποίηση της βιομάζας του <i>FORL</i> .....	σελ. 64
5.5 Δυνατότητες χρήσης των μεταμορφωμένων στελεχών.....	σελ. 65

<b>Βιβλιογραφία</b> .....	σελ. 67
<b>Περίληψη</b> .....	σελ. 76
<b>Summary</b> .....	σελ. 77

## Εισαγωγή

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* είναι ένα κοινό φυτοπαθογόνο εδάφους, με παγκόσμια κατανομή. Σαν είδος, πιθανόν προκαλεί μεγαλύτερη οικονομική καταστροφή σε γεωργικές καλλιέργειες από οποιοδήποτε άλλο φυτοπαθογόνο (Correll, 1991).

Ανάμεσα στα είδη υπάρχει υψηλό επίπεδο ειδίκευσης σε ξενιστές. Έχουν περιγραφεί πάνω από 120 *formae speciales* και φυλές, ικανές να προκαλέσουν ασθένειες αγγειακού μαρασμού σε πολλές γεωργικές καλλιέργειες (Correll, 1991).

Μία από αυτές τις ειδικευμένες μορφές του μύκητα είναι το *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) που προσβάλλει την τομάτα. Αρχικά η ασθένεια αναγνωρίστηκε σε φυτά τομάτας σε καλλιέργειες υπό κάλυψη στις περιοχές Ονο και Kamiiso της Ιαπωνίας το 1969 (Jarvis, 1988). Στη συνέχεια εμφανίστηκε σε υπαίθριες καλλιέργειες στην Καλιφόρνια το 1971 και ακολούθησαν στα επόμενα 20 χρόνια ο Καναδάς, το Μεξικό, η Ιαπωνία, η Ελλάδα, η Ιταλία, η Ολλανδία, η Γαλλία και η Μεγάλη Βρετανία.

Στόχο της συγκεκριμένης μελέτης, αποτέλεσε η δημιουργία ενός εργαλείου παρακολούθησης της εξάπλωσης της ασθένειας σε φυτικούς ιστούς. Για το λόγο αυτό ένα άγριο στέλεχος του μύκητα FORL μεταμορφώθηκε, με την ταυτόχρονη εισαγωγή στο γονιδίωμα του των γονιδίων β-D-γλουκουρονιδάση (GUS, *uidA*) του βακτηρίου *Escherichia coli*, ως το γονίδιο έκφρασης και του γονιδίου της φωσφοτρανσφεράσης της υγρομυκίνης, ως το γονίδιο επιλογής. Μετρώντας την έκφραση του γονιδίου GUS η ποσοτικοποίηση της ασθένειας ήταν εφικτή.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### 1.1 Ταξινόμηση

Το γένος *Fusarium* ανήκει στην κλάση Hyrhomycetes των Δευτερομυκήτων και την τάξη Tuberculariales (οικ. Tuberculariaceae) που έχει ως χαρακτηριστικό την παραγωγή κονιδίων σε σποριοδόχεια. Αποτελεί δε την ατελή μορφή των Ασκομυκήτων που ανήκουν στην κλάση Pyrenomycetes και την τάξη Hyrocrales.

Οι Δευτερομύκητες ανήκουν στους ανώτερους μύκητες και σχηματίζουν πολυκύτταρο μυκήλιο. Περιλαμβάνουν είδη που αναπαράγονται μόνο αγενώς. Τα στελέχη που είναι ικανά να αναστομώνονται και να δημιουργούν σταθερά ετεροκάρυα, αποτελούν μία βλαστικώς συμβατή (vegetable compatible) ομάδα και έχει αποδειχθεί πως μοιράζονται συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος των αποικιών, τα ισοενζυμικά πρότυπα και την παθογένεια. Από τη στιγμή που η δημιουργία αναστομώσεων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη δυνατότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού, τα στελέχη που δεν είναι βλαστικώς συμβατά, ανήκουν σε γενετικά ευδιάκριτους πληθυσμούς (Menzies *et al.*, 1990).

Ο μύκητας FORL παράγει μικροκονίδια (Εικ. 1.1.3). Όλα τα είδη του *Fusarium* έχουν ένα κοινό ταξινομικό χαρακτηριστικό: την παραγωγή μακροκονιδίων με ιδιαίτερο σχήμα, από σπορειοδόχεια τα οποία φέρουν το κύτταρο της βάσης σε σχήμα ποδιού (Εικ. 1.1.1, 1.1.2). Αυτό το σταθερό χαρακτηριστικό συνδυαζόμενο με άλλα κριτήρια, συνθέτουν τη βάση για την κλασική προσέγγιση της ταξινόμησης του *Fusarium*. Με βάση τα κριτήρια αυτά έχουν αναπτυχθεί αρκετές ταξινομικές κλείδες. Ορισμένα είδη παράγουν επίσης χλαμυδοσπόρια και σε αυτά συμπεριλαμβάνεται και το FORL (Εικ. 1.1.4, 1.1.5)

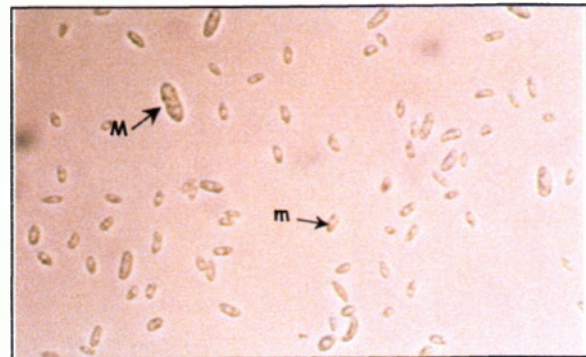




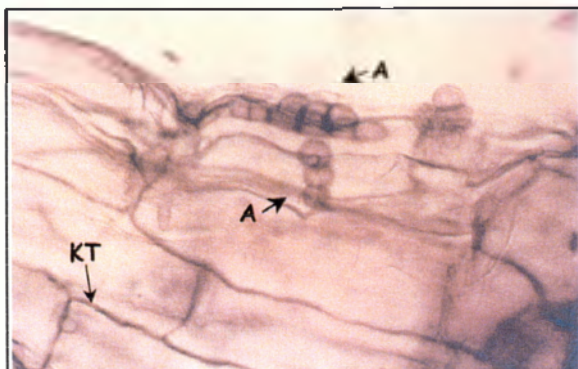
Εικ. 1.1.1. Μυκηλιακή υφή με σπορειοδόχειο.



Εικ. 1.1.2. Χαρακτηριστικά μακροκονίδια με σέπτα.



Εικ. 1.1.3. Υαλώδη Μακρο- (M) και μικροκονίδια (μ).



Εικ. 1.1.4. Χλαμυδοσπόρια σε μορφή αλυσίδας (A) εντός κυτάρων ρίζας τομάτας. Διακρίνονται τα κυτταρικά τοιχώματα (KT).



Εικ. 1.1.5. Κατασκευές χλαμυδοσπορίων (X), εντός κυτάρων ρίζας φυτού τομάτας, έπειτα από προσβολή με FORL. Η χρώση τους έγινε με χρήση trypan blue.

### **1.1.1 *Formae speciales***

Ένα βασικό πρόβλημα που διαιωνίζεται στην αναγνώριση του *Fusarium* είναι ότι τα μέλη του γένους ποικίλουν αρκετά σε μορφολογικά και μη μορφολογικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης και της παθογένειας. Τα κριτήρια χρησιμοποιούνται στα συστήματα ταξινόμησης. Μερικές υποδιαιρέσεις εντός των ειδών του *Fusarium* βασίζονται στη φυσιολογία (*formae speciales* και φυλές) ή στη γενετική (ομάδες συμβατότητας), οι οποίες δεν αναγνωρίζονται από το Διεθνή Κώδικα Βοτανικής Ονοματολογίας σύμφωνα με το άρθρο 4,3 (Windels, 1991). Οι Snyder και Hansen χρησιμοποίησαν ένα διαχωρισμό σε εξειδικευμένες μορφές για να αναγνωριστούν παθογενή στελέχη, τα οποία ξεχώριζαν μορφολογικά από σαπροφυτικά στελέχη του είδους, αλλά διέφεραν στην ικανότητά τους να προσβάλλουν συγκεκριμένους ξενιστές.

Αρχικά πιστευόταν ότι οι εξειδικευμένες μορφές ήταν παθογόνα αποκλειστικά για έναν μόνο ξενιστή γι' αυτό έπαιρναν το όνομά τους από το λατινικό όνομα του φυτού ξενιστή. Στην πραγματικότητα όμως εξειδίκευση προσβολής υπάρχει για μερικές μόνο εξειδικευμένες μορφές. Ορισμένες από αυτές έχουν συγκεκριμένους ξενιστές και προκαλούν εξωτερικά συμπτώματα σήψης μόνο σε αυτούς. Για ορισμένες εξειδικευμένες μορφές όμως ο αριθμός των ξενιστών είναι πολύ μεγάλος. Επίσης για αρκετές «*formae speciales*» βρέθηκε πως ήταν φυλές μιας άλλης εξειδικευμένης μορφής (Windels, 1991). Το παθογόνο FORL της τομάτας έχει αποδειχθεί πως έχει μεγάλη ικανότητα προσβολής και φυτών της οικογένειας Leguminosae, όπως τα *Vicia faba* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Trifolium pratense* L. και *Trifolium repens* L. (Menzies *et al.*, 1990).

### **1.1.2 Διαφορές του *Fusarium oxysporum f.sp. radialis-lycopersici* από το *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici***

Οι Jarvis και Shoemaker ισχυρίστηκαν πως το αίτιο της σήψης λαιμού και ρίζας της τομάτας δεν ήταν μία νέα φυλή του *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* (FOL), αλλά μία νέα εξειδικευμένη μορφή του *Fusarium oxysporum* και ονόμασαν το μύκητα *Fusarium oxysporum* Schlecht *f.sp. radialis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker. Ο ισχυρισμός τους στηρίζεται στις εξής παρατηρήσεις τους: 1) Ο νέος οργανισμός



είχε διαφορετικά ευδιάκριτα συμπτώματα από αυτά που προκαλούνται από το FOL, 2) Το FOL κινείται πολύ γρήγορα μέσω του αγγειακού ιστού του ξενιστή, ενώ το FORL στερείται κίνησης μέσω του αγγειακού συστήματος του βλαστού, και 3) Η άριστη θερμοκρασία εξάπλωσης του FORL είναι περίπου στους 18 °C, ενώ η φουζαρίωση της τομάτας ευνοείται από θερμοκρασίες γύρω στους 27 °C. (Menzies *et al.*, 1990).

## 1.2 Συμπτώματα

Σε καλλιέργειες υπό κάλυψη, η ασθένεια χαρακτηρίζεται από μία απότομη σήψη ακριβώς προτού ωριμάσουν οι πρώτοι καρποί και είναι έτοιμοι για συγκομιδή, ιδιαίτερα τις ημέρες με ηλιοφάνεια. Τα προσβεβλημένα φυτά είναι πιθανό να επανέλθουν σε κάποιο βαθμό τη νύχτα, ή τις νεφοσκεπείς ημέρες, ή όταν το φορτίο των καρπών μειώνεται με τη συγκομιδή, όμως παρ' όλα αυτά, τελικά νεκρώνονται.

Αλλα συμπτώματα σε «ώριμες» καλλιέργειες υπό κάλυψη περιλαμβάνουν καφέ σήψη του φλοιού στο ύψος του εδάφους, συνήθως με ταυτόχρονο ξεφλούδισμα των εξωτερικών στρωμάτων του βλαστού. Παρατηρείται επίσης ένας καφέ-κόκκινος μεταχρωματισμός των αγγείων, που εκτείνεται προς την επάνω πλευρά του βλαστού για 5-10 εκ., και συνήθως ποτέ πάνω από 25 εκ. (Εικ. 1.2.1). Σε σοβαρή σήψη έχουμε απώλεια της αρχικής σπερματικής ρίζας και αρκετές μικρές γκρι-καφέ περιοχές στο σημείο εμφάνισης των πλευρικών ριζών. Μπορούν να εμφανιστούν δευτερογενείς ρίζες επάνω στην περιοχή του βλαστού, λέπτυνση της κορυφής του βλαστού, μάρανση των ανώτερων φύλλων, και πιθανόν η νέκρωσή τους. Οι καρποί των μολυσμένων φυτών είναι μαλακοί και στερούνται το φυσιολογικό έντονο χρώμα τους. Ο μύκητας μπορεί να απομονωθεί μόνο 1-2 εκ. πάνω από το μεταχρωματισμό της ρίζας (Menzies and Jarvis, 1994).

Σε αποστειρωμένα και βαρέως επαναπροσβεβλημένα εδάφη, τα νεαρά φυτά επηρεάζονται σοβαρά, πέφτουν στο έδαφος και μοιάζουν προσβεβλημένα από *Pythium spp.* (Jarvis, 1988).

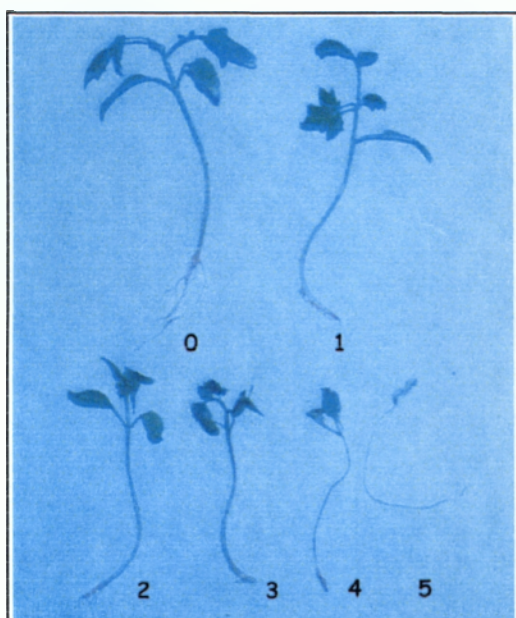


*Εικ. 1.2.1. Φυτό τομάτας προσβεβλημένο από FORL. Διακρίνεται ο χαρακτηριστικός μεταχρωματισμός στην περιοχή του λαιμού (1), μερικά εκατοστά επάνω από το έδαφος. Διακρίνονται επίσης τα φύλλα της βάσης που έχουν νεκρωθεί (2), ενώ τα ανώτερα φύλλα έχουν κίτρινους μεταχρωματισμούς (3).*

### **1.3 Τρόποι εξάπλωσης της ασθένειας**

Η ασθένεια της σήψης λαιμού και ριζών της τομάτας έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 15-18 °C (Jarvis, 1988). Το παθογόνο συνήθως εισβάλλει στους φλοιώδεις ιστούς των ριζών και του υποκοτύλιου, μέσω των πληγών που δημιουργούνται από τις αναφυόμενες δευτερεύουσες και επιπρόσθετες ρίζες, και προκαλεί το καφέτιασμα αυτών των περιοχών. Το σύμπτωμα της προσβολής επεκτείνεται στο αγγειακό σύστημα, μέχρι τα 25 εκ. από τη ζώνη μετάβασης ρίζας-βλαστού (Jarvis, 1988). Το παθογόνο εισβάλλει στα κύτταρα μέχρι να φτάσει στην αγγειακή στήλη. Πολλά συμπτώματα ακολουθούν, από τα οποία τα πιο εμφανή είναι η πραγματική σήψη και/ή χλώρωση και το καφέτιασμα των φύλλων. Οι προσβεβλημένοι αγγειακοί ιστοί μεταχρωματίζονται και τα αγγειακά μέρη καταρρέουν ή παραμορφώνονται (Εικ. 1.3.1, 1.3.2). Αρχικά, τα κύτταρα του μύκητα αναπτύσσονται σε περιορισμένη περιοχή των αγγείων και εισβάλλουν σε γειτονικά αγγεία με απ' ευθείας διείσδυση δια μέσου των αλωφόρων βοθρίων. Τα κύτταρα του παρεγχύματος αποικούνται μόνο στο τελευταίο στάδιο της ασθένειας και κυρίως όταν αυτά είναι ετοιμοθάνατα. Τα κονίδια συσσωρεύονται στις πλάκες διάτρησης

των αγγείων, αλλά δε φαίνεται να «μπλοκάρουν» την προς τα επάνω κίνηση του παθογόνου. Παρ' όλα αυτά όμως η φραγή στις πλάκες διατρήσεως και η δημιουργία τυλώσεων και εκκρίσεων στα αγγειακά μέρη, αναφέρεται από ορισμένους ερευνητές ότι επιβραδύνουν την εξάπλωση του μύκητα, γεγονός που αποδίδεται βασικά στην αντίσταση του ξενιστή (Charest *et al.*, 1984).



Εικ. 1.3.1. Νεαρά φυτά τομάτας σε διάφορα στάδια εξάπλωσης της ασθένειας. Στην επάνω σειρά από αριστερά, υγιές φυτό (0) και στάδιο 1, ενώ κάτω διακρίνονται φυτά από το στάδιο 2 έως την πλήρη νέκρωση (στάδιο 5) (βλέπε και κεφ. 4 παρ. 4.12)



Εικ. 1.3.2. Τα νεαρά φυτά ένα στάδιο πριν την πλήρη ξήρανσή τους, πέφτουν στο έδαφος εξαιτίας της σήψης των ιστών τους στο ύψος του λαιμού.

Συνοπτικά, οι πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι το FORL είναι ικανό να καταστρέψει τους παρεγχυματικούς ιστούς νεαρών ριζών και να επεκταθεί στο βλαστό, σε περιορισμένη απόσταση. Στα αγγεία προκαλεί κατάρρευση του υλικού, κατά τρόπο ανάλογο με ασθένειες σήψης και τις αντίστοιχες παρατηρήσεις σε αγγεία προσβεβλημένων φυτών (Charest *et al.*, 1984).

Η ασθένεια μεταδίδεται με τον αέρα υπό μορφή κονιδίων, ή από τα υπολείμματα καλλιεργειών στο έδαφος. Τα μικροκονίδια παρασύρονται από τον αέρα και το παθογόνο μεταφέρεται σε φυτά χωρίς συμπτώματα, ή ελαφρώς

προσβεβλημένα, σε κομπόστ ή καλλιέργειες εκτός εδάφους και μπορεί να επιβιώσει σε σωρούς σκουπιδιών, στο έδαφος, σε χοντρές ρίζες ή σε άλλους ξενιστές. Σε αποστειρωμένο έδαφος ο πληθυσμός του αυξάνει με ρυθμούς  $10^4$  ανά εβδομάδα (Menzie and Jarvis, 1994). Σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες η προσβολή εξαπλώνεται πολύ γρήγορα κατά σειρές, σε ποσοστό περίπου 1% ανά ημέρα. Αυτό ίσως σημαίνει ότι η εξάπλωση του μύκητα από φυτό σε φυτό γίνεται με λύση της συνέχειας των ιστών από μηχανικά αίτια και ευνοείται από το σύστημα ποτίσματος (Jarvis, 1988).

Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στο γεγονός ότι όταν η ασθένεια συναντάται σε αποστειρωμένα εδάφη η εξάπλωσή της είναι ταχύτατη και οι ζημιές μεγαλύτερες συγκριτικά με εκείνες που εμφανίζονται σε καλλιέργειες μη αποστειρωμένων εδαφών (Jarvis, 1988).

Όσον αφορά στις καλλιέργειες εκτός εδάφους η ασθένεια θεωρείται εξίσου καταστρεπτική και συνηθισμένη. Η μεταφορά του παθογόνου στις υδροπονικές καλλιέργειες γίνεται μέσω του ανακυκλούμενου θρεπτικού διαλύματος με αποτέλεσμα να μολύνεται όλο το σύστημα και να έχουμε γενική καταστροφή της καλλιέργειας.

#### **1.4 Έλεγχος της ασθένειας**

Πολλές προσπάθειες για τον έλεγχο της ασθένειας με διαδικασίες συμβατικής αποστείρωσης του εδάφους και με χρήση μυκητοκτόνων απέτυχαν, κυρίως εξαιτίας της πολύ σύντομης επαναπροσβολής των αποστειρωμένων εδαφών από μικροκονίδια παρασυρμένα από τον αέρα και της επακόλουθης έκρηξης του πληθυσμού στο έδαφος. Οι Rowe και Farley (1981) προτείνουν τρεις τρόπους για τον έλεγχο της προσβολής: 1) απομόνωση των σπορίων του FORL εντός του θερμοκηπίου, με συνδυασμό της χρήσης μεθόδων αποστείρωσης του εδάφους για την πρόληψη της επαναποίκησης, 2) την ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών τομάτας και 3) το βιολογικό έλεγχο. Από αυτές τις προσεγγίσεις, ο συνδυασμός αποστείρωσης εδάφους και μυκητοκτόνων δε χρησιμοποιείται πλέον. Όσον αφορά τη δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών, σήμερα ελάχιστες τέτοιες ποικιλίες είναι διαθέσιμες. Τέλος ο βιολογικός έλεγχος έχει σημειώσει επιτυχία σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις.



### 1.4.1 Χημικός έλεγχος

Εξαιτίας της σύντομης επαναποίκησης των αποστειρωμένων εδαφών από παρασυρόμενα από τον αέρα κονίδια, η αποστείρωση με ατμό και υποκαπνισμό του εδάφους είχε γενικότερα μικρή επιτυχία. Παρ' όλα αυτά εξακολουθούν να γίνονται πειράματα με διαφορετικές επεμβάσεις. Συγκεκριμένα ο ψεκασμός των φυτών με βενζο-(1,2,3)-θειαζολ-7-καρβοθειικό οξύ S-μεθυλεστέρα (ένα συνθετικό χημικό), μπορεί να προσφέρει αυξημένη αντίσταση ενάντια στο FORL. Η επέμβαση αυτή βοηθά στη μείωση της εξάπλωσης του μύκητα στο φυτό (Benhamou and Belanger, 1998). Υποκαπνισμοί του εδάφους με χρήση βρωμιούχου μεθυλίου/χλωροπικρίνης (MB-C 67), χλωροπικρίνης, μετα-νατρίου, dazomet και διχλωροπιροπέν/χλωροπικρίνης (C-17), θεωρούνται σχετικά επιτυχή μέσα καταπολέμησης της ασθένειας πριν τη φύτευση της καλλιέργειας (Jones *et al.*, 1996). Χρήση χλωριούχου νατρίου, πηγών αζώτου και χρήση ασβέστη σε μεταξύ τους συνδυασμούς, είχαν θετική επίδραση στη μείωση της εξάπλωσης (Woltz *et al.*, 1992). Σε πειράματα που έγιναν για τη μελέτη της επίδρασης που έχει το chitosan (ένα μη τοξικό και βιοδιασπώμενο πολυμερές από β-1,4-γλουκοζαμίνη), έδειξαν πως η θνησιμότητα των φυτών μειώθηκε σε μεγάλο βαθμό αγγίζοντας σε ορισμένες περιπτώσεις ποσοστό 90% (Benhamou and Theriault, 1992, Lafontaine and Benhamou, 1996). Τέλος πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* με καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και κατεχόλη, έδειξαν ικανοποιητική αναχαίτηση του παθογόνου (Kasenberg and Traquair, 1998).

Οι Jarvis και Thorpe (1976) δοκίμασαν διάφορα μυκητοκτόνα σε μεταχειρίσεις σπόρων και για διαβροχή του εδάφους τόσο κατά όσο και μετά τη μεταφύτευση. Καμία από αυτές δεν ήταν επιτυχής σε μη φυτοτοξικές δόσεις (Jarvis, 1988). Μεταχειρήσεις σπόρων που έχουν γίνει με χρήση chitosan (Benhamou *et al.*, 1994) ή μυκητοκτόνα που περιλαμβάνουν benomyl, captafol, imazalil, thiram και prochloraz-Mn, παρέχουν ελλιπή έλεγχο, αφήνουν υπερβολικά υπολείμματα σε εδώδιμους ιστούς και είναι συχνά πολύ φυτοτοξικά κυρίως σε φυτάρια όταν εφαρμόζονται στις συνιστώμενες δόσεις (Duffy and Defago, 1999).

### 1.4.2 Ανθεκτικές ποικιλίες

Σήμερα πολύ λίγες ποικιλίες είναι γνωστές για την ανθεκτικότητά τους στην ασθένεια σε υπαίθρια ή θερμοκηπιακή καλλιέργεια. Στις Η.Π.Α. από τις ποικιλίες που χρησιμοποιούνται μόνιμα σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες, μόνο η *Laruga* θεωρείται ανθεκτική. Στην Ιαπωνία ανθεκτικές θεωρούνται οι ποικιλίες IRB-301-30 και IRB-301-31 που δημιουργήθηκαν με μεταλλάξεις της *Lycopersicon peruvianum*. Στο Κεμπέκ δύο βελτιωμένες ποικιλίες, οι 15-12K και 15-12P που προέρχονταν από τις ποικιλίες *Laruga* και *Vendog* αποδείχθηκαν ανθεκτικές, ενώ μέση ανθεκτικότητα είχαν οι σειρές 17-3 και 19-2. Τέλος ανθεκτικότητα βρέθηκε στα είδη *L. hirsutum*, *L. hirsutum* f. *glabratum* και *L. pimpinellifolium* (Jarvis, 1988).

### 1.4.3 Βιολογικός έλεγχος

Λόγω της αποτυχίας του ελέγχου της ασθένειας με χημικά μέσα και της έντασης των προσβολών στα αποστειρωμένα εδάφη, ο Jarvis πρότεινε ότι η ασθένεια θα μπορούσε να ελεγχθεί με βιολογικά μέσα κατά παρόμοιο τρόπο με εκείνον που αφορά το βιολογικό έλεγχο των *formae speciales* του *Fusarium oxysporum* που επιφέρουν σήψη. Συγκεκριμένα ο εν λόγω ερευνητής προτείνει να γίνει αξιοποίηση των εδαφών που έχουν την ιδιότητα καταστολής της ασθένειας ή να γίνει εκμετάλλευση της δυνατότητας αύξησης των κατασταλτικών ουσιών στα συνήθη εδάφη.

Λόγω του κινδύνου που έχει η χρήση φυσικού εδάφους (αγρού) να προσθέτει και άλλα φυτοπαθογόνα στο έδαφος του θερμοκηπίου, οι Jarvis και Thorpe (1981) ερεύνησαν τη χρήση αποστειρωμένων εδαφών στα οποία χρησιμοποιήθηκε η χλωρή λίπανση ως μέσο αύξησης του πλυθισμού των ανταγωνιστικών προς το FORL μικροοργανισμών. Φυτά όπως leaf mustard (*Brassica juncea* Coss.), σπανάκι (*Spinacia oleracea* L.), κάρδαμο (*Lepidium sativum* L.) και μαρούλι (*Lactuca sativa* L.), μεγαλωμένα σε αποστειρωμένο και επαναπροσβλημένο με FORL έδαφος, κομματιάστηκαν μέσα στο έδαφος θερμοκηπίου πριν τη φύτευση των φυτών τομάτας. Το αποτέλεσμα ήταν η σημαντική μείωση της ασθένειας. Πιο συγκεκριμένα, το μαρούλι είχε καλύτερη επίδραση και μείωσε την ασθένεια εντελώς, ή σε μηδαμινά επίπεδα. Σε εμπορική κλίμακα η παρεμβολή καλλιέργειας μαρουλιού ανάμεσα σε

επιτυχείς καλλιέργειες τομάτας προσφέρει ένα φθινό και αποτελεσματικό τρόπο για τον έλεγχο της ασθένειας. Ο μηχανισμός δράσης του μαρουλιού παραμένει σήμερα άγνωστος (Jarvis and Thorpe 1981, Jarvis, 1988).

Μία άλλη μέθοδο βιολογικής καταπολέμησης αποτελεί η προσθήκη στο έδαφος φλούδας *hinoki* (*Chamaecyparis obtusa*). Πειραματισμός με τη μέθοδο αυτή έδειξε ότι η ασθένεια μειώθηκε αισθητά, εξαιτίας των πτητικών ελαίων και των μη πτητικών ουσιών της φλούδας που περιείχαν ουδέτερες και όξινες χημικές ενώσεις με μεγάλη αντιμυκητιακή δράση (Yu and Komada, 1999).

Οι Kasenberg και Traquair (1987) συσχέτισαν τις φαινολικές ενώσεις μαρουλιού και πικραλίδας, με την παρεμπόδιση ανάπτυξης του FORL και την εισβολή του στους ιστούς της τομάτας. Η έκκριση φυτοαλεξινών στους ιστούς της τομάτας, ή η αύξηση μικροβιακού πληθυσμού, ανταγωνιστικού του FORL, πιθανώς να έχουν επίσης το δικό τους ρόλο. Ο ανταγωνισμός για την αποίκιση της ριζόσφαιρας και των ριζικών εκκρίσεων μεταξύ διαφόρων μικροοργανισμών, ίσως είναι ένας πρωταρχικός μηχανισμός στο βιοέλεγχο του FORL και γενικότερα του *Fusarium*. Επακόλουθο αυτής της υπόθεσης ήταν ο πειραματισμός με διάφορα στελέχη βακτηρίων, μυκορριζών και άλλων μη παθογόνων μυκήτων. Συγκεκριμένα στελέχη του *Bacillus subtilis*, έδειξαν πως δρουν ανταγωνιστικά στην αποίκιση της ριζόσφαιρας και περιορίζουν την προσβολή από το FORL στο 50% (Bochow *et al.*, 1998). Ανάλογη δράση είχε και το βακτηριακό στέλεχος PCL1391 του *Pseudomonas chlororaphis* (Woeng *et al.*, 1998). Στελέχη από φθορίζοντα *Pseudomonas sp.* υποβοηθούν το βιολογικό έλεγχο που γίνεται με τη χρήση μη παθογόνων στελεχών του *Fusarium oxysporum*. Η επιτυχής καταστολή της ασθένειας με το συγκεκριμένο μικροβιακό συνδυασμό, συνδέθηκε με την παραγωγή σιδηροφόρου ψευδοβακτίνης (συνώνυμο : πυοβερδίνη) από το στέλεχος *P. putida* WCS 358. Το στέλεχος WCS 358 βοήθησε το βιολογικό έλεγχο που επιτυγχάνεται από το στέλεχος του μη παθογόνου *Fusarium oxysporum* Fo47. Σε παράλληλη δράση τα δύο αυτά στελέχη μείωσαν τη μυκηλιακή αύξηση του παθογόνου *F. oxysporum* εξαιτίας του ανταγωνισμού για σίδηρο και άνθρακα, αντίστοιχα (Duijf *et al.*, 1998, Duijff *et al.*, 1999). Άλλο ένα ενδοφυτικό βακτήριο με ανταγωνιστική δράση είναι το στέλεχος 63-28 του *Pseudomonas fluorescens* (Duffy and Defago, 1997, Piga *et al.*, 1997). Όσον αφορά διάφορα ανταγωνιστικά στελέχη μυκήτων, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στελέχη των *Fusarium culmorum*, *Penicillium brevicompactum* και *P. crustosum*

(Menzies *et al.*, 1996). Επίσης επιτυχή πειράματα έχουν γίνει με το στέλεχος SE 34 του *Bacillus pumilus* μόνο του ή σε συνδυασμό με chitosan (Benhamou *et al.*, 1998), καθώς και με το *Pythium oligandrum* το οποίο περιόρισε το FORL στους εξωτερικούς ιστούς της ρίζας (Benhamou *et al.*, 1997). Προστασία των φυτών τομάτας ενάντια στο FORL μπορεί να γίνει επίσης με το συνδυασμό του μύκητα *Trichoderma harzianum* και ηλιοαπολύμανσης ή χρήση βρωμιούχου μεθυλίου (Sivan *et al.*, 1987, Sivan and Chet, 1993).

Αρκετές επίσης αναφορές γίνονται για το ρόλο της αλληλεπίδρασης των ενδομυκορριζικών μυκήτων (VAM) αλληλεπιδρούν με παθογόνους μύκητες ριζών. Οι μύκητες VAM προκαλούν αλλαγές στη ριζόσφαιρα που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας μικροοργανισμών που μπορούν να ανταγωνιστούν άλλα παθογόνα εδάφους, όπως είναι το FORL. Υπάρχουν εμπορικά σκευάσματα *Glomus intraradices*, που διατίθενται για επεμβάσεις στο έδαφος μαζί με σκευάσματα *Trichoderma harzianum*. Τα δύο αυτά σκευάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωριστά, ή σε συνδυασμό για ακόμη καλύτερα αποτελέσματα (Datnoff *et al.*, 1995). Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η παρουσία του *G. intraradices* στο έδαφος είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της νέκρωσης των ριζών και τον περιορισμό του πληθυσμού του FORL (Caron *et al.*, 1986). Άλλοι μύκητες που κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι *Penicillium funiculosum* Thom και *Aspergillus ochraceus* Wilhelm (Jarvis, 1988).

#### **1.4.4 Καλλιεργητικοί χειρισμοί**

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η κατάλληλη θερμοκρασία για την εκδήλωση και εξάπλωση της ασθένειας είναι οι 15-18 °C, οι καλλιέργειες που έχουν φυτευθεί όψιμα σε θερμότερο έδαφος τείνουν να έχουν μικρότερο αριθμό προσβεβλημένων φυτών και με μικρότερη ένταση προσβολής. Γι' αυτό το λόγο η θερμοκρασία εδάφους θα πρέπει πριν τη φύτευση να αυξηθεί το λιγότερο στους 20 °C. Μία άλλη λύση αποτελεί η θέρμανση του νερού άρδευσης (Jarvis, 1988).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### 2.1 Μεταμόρφωση νηματόμορφων μυκήτων

Η μεταμόρφωση των μυκήτων με ενσωμάτωση ξένου DNA είναι μια αρκετά συνηθισμένη διαδικασία στους νηματόμορφους μύκητες (Finkelstein, 1989). Η δημιουργία συγκεκριμένων μεταλλάξεων με τη διαδικασία της μεταμόρφωσης στους νηματόμορφους μύκητες, επιτυγχάνεται είτε με διάρρηξη γονιδίων, είτε με αντικατάσταση γονιδίων (Fincham, 1989). Οι φορείς διάρρηξης γονιδίων εμπεριέχουν ένα τμήμα του γονιδίου στόχου και ένα μάρτυρα επιλογής σε άλλο σημείο του πλασμιδίου. Η διάρρηξη των γονιδίων συμβαίνει από ένα μοναδικό ανασυνδυασμό, μεταξύ του κλωνοποιημένου γονιδιακού τμήματος και την αντίστοιχη ομόλογη περιοχή του γονιδιώματος του μύκητα. Αυτός ο μοναδικός ανασυνδυασμός θα έχει ως αποτέλεσμα την εισαγωγή του ξένου DNA στο γονίδιο στόχο με διακοπή στην αλληλουχία κωδικοποίησης. Οι φορείς που αντικαθιστούν γονίδια, συνήθως περιέχουν ένα γονίδιο μάρτυρα επιλογής ενσωματωμένο στη θέση της αλληλουχίας στόχου, ανάμεσα σε αλληλουχίες DNA που πλευρίζουν το γονίδιο-στόχο. Η αντικατάσταση γονιδίων είναι αποτέλεσμα ενός διπλού ανασυνδυασμού, μεταξύ των πλευρικών DNA αλληλουχιών που υπάρχουν στο φορέα και στις αντίστοιχες ομόλογες περιοχές στο γονιδίωμα του μύκητα. Οι δύο αυτοί ανασυνδυασμοί, ένας από κάθε πλευρά του γονιδίου-στόχου, έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του γονιδίου-στόχου από το γονίδιο μάρτυρα επιλογής (Fincham, 1989, Hynes, 1996).

Ένα βασικό πρόβλημα που αντιμετωπίζεται στη διαδικασία γενετικής μεταμόρφωσης είναι η εύρεση κατάλληλης διαδικασίας εισαγωγής του ξένου γονιδιακού DNA εντός του κυττάρου-στόχου και εν συνεχεία η ενσωμάτωσή του στο τμήμα του DNA-δέκτη που επιδιώκουμε να τροποποιήσουμε. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι.

#### 2.1.1 Τροποποίηση με τη χρήση PEG

Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) είναι ένα πολυμερές με το γενικό χημικό τύπο  $H(OCH_2CH_2)_nOH$  όπου το  $n$  είναι ίσο με αριθμό μεγαλύτερο του 4 και είναι διαθέσιμη σε διάφορα μοριακά βάρη. Οι μέθοδοι τροποποίησης με τη χρήση της PEG

DEKA  
60

αναπτύχθηκαν για τη μεταμόρφωση διαφόρων νηματόμορφων μυκήτων και ποικίλει σε κάποιες λεπτομέρειες, αλλά ακολουθεί κάποια βασικά βήματα. Τα μίγματα προς τροποποίηση συνήθως περιέχουν πρωτοπλάστες σε πυκνότητα  $10^8$  με  $10^9$  /ml, το προς εισαγωγή DNA, 10 με 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και PEG. Η πολυθαιθυλενογλυκόλη έχει την ιδιότητα εξαιτίας της πυκνότητάς της, να εισάγει το ξένο DNA στο εσωτερικό των πρωτοπλαστών με μηχανισμούς ώσμωσης.

### **2.1.2 Διάρθρωση πρωτοπλαστών με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος (Ηλεκτροπόρωση- Electroporation)**

Η χρήση ηλεκτρικού ρεύματος έχει αποδειχθεί πως μπορεί να εφαρμοσθεί εναλλακτικά αντί της χρήσης της μεθόδου PEG για τη μεταμόρφωση νηματόμορφων μυκήτων (Ward *et al.*, 1988, Langin *et al.*, 1990). Η χρήση του ηλεκτρικού ρεύματος βρίσκει εφαρμογή στη λεγόμενη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης. Με τη μέθοδο αυτή τα κύτταρα υφίστανται την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο διανοίγει πόρους στο λιπιδικό στρώμα και σε άλλα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης. Έτσι διευκολύνεται η εισαγωγή ξένου DNA δια μέσου των πόρων εντός των υπό τροποποίηση κυττάρων.(Richey *et al.*, 1989). Η δημιουργία πόρων είναι αντιστρέψιμη και η επιβίωση του κυττάρου επέρχεται, υπό συγκεκριμένες συνθήκες εφαρμογής ηλεκτρικού ρεύματος. (Lurquin, 1997). Ενώ η χρήση υψηλής τάσης ηλεκτρισμού μπορεί να εξασφαλίσει υψηλά ποσοστά μεταμόρφωσης σε άθικτα κύτταρα ζυμών (Meilhoc *et al.*, 1990), η μέθοδος της ηλεκτροπόρωσης στους νηματόμορφους μύκητες συνήθως εφαρμόζεται σε πρωτοπλάστες (Richey *et al.*, 1989). Παρ' όλα αυτά, ένας περιορισμένος αριθμός μυκήτων έχει μεταμορφωθεί με ηλεκτροπόρωση χρησιμοποιώντας ως στόχους βλαστημένα κονίδια και μυκηλιακά θραύσματα.

### **2.1.3 Μεταμόρφωση άθικτων κυττάρων με τη χρήση αλκαλικών ιόντων**

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες γενετικής μεταμόρφωσης χωρίς να χρειάζεται να περάσουμε από το στάδιο των πρωτοπλαστών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι και η χρήση αλκαλικών μεταλλικών ιόντων για την αύξηση της διαπερατότητας του κυτταρικού περιβλήματος σε άθικτα κύτταρα και την εισαγωγή σε αυτά ξένου DNA (Fincham, 1989). Οι λεπτομέρειες

όμως για το πώς τα αλκαλικά μεταλλικά κατιόντα βοηθούν την είσοδο του DNA στα κύτταρα δεν έχουν γίνει εντελώς κατανοητές. Για παράδειγμα αναφέρουμε ότι έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία η χρήση ιόντων λιθίου.

#### **2.1.4 Μεταμόρφωση με χρήση βαλλιστικής**

Ένα σύστημα μεταμόρφωσης νηματόμορφων μυκήτων, η οποία παρακάμπτει επίσης το στάδιο προετοιμασίας πρωτοπλάστων, είναι ο βομβαρδισμός με μικροσφαιρίδια. Είναι μία φυσική μέθοδος εισαγωγής ξένου DNA κατά την οποία σφαιρίδια χρυσού ή σκόνη βολφραμίου επικαλυμμένα με το ξένο DNA, επιταχύνονται σε κενό με μεγάλη ταχύτητα εναντίον των κυττάρων ή ιστών-στόχων, με σκοπό να διεισδύσουν εντός αυτών. Αυτή η τεχνική αναπτύχθηκε από τον J. Sanford και τους συνεργάτες του στο πανεπιστήμιο Cornell, αρχικά για να ξεπεράσει τα όρια της γενετικής μεταμόρφωσης σε φυτικά είδη (Weissinger, *et al.*, 1987). Η επιτάχυνση πραγματοποιείται με τη χρήση μπαρουτιού, πεπιεσμένου αερίου, ή με χρήση ηλεκτρισμού με ειδικά όργανα-«πιστόλια».

#### **2.1.5 Μεταμόρφωση με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens***

Η μεταμόρφωση νηματόμορφων μυκήτων με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens* έχει αναφερθεί σχετικά πρόσφατα (Groot *et al.*, 1998). Το *Agrobacterium* χρησιμοποιείται ευρύτατα ως ενδιάμεσος φορέας στη διαδικασία γενετικής μεταμόρφωσης μιας μεγάλης ποικιλίας φυτικών ειδών (Hamilton *et al.*, 1996). Παρ' όλα αυτά μέχρι πρόσφατα δεν είχε χρησιμοποιηθεί σε μεταμορφώσεις νηματόμορφων μυκήτων. Κατά τη διάρκεια της αύξησης των όγκων στα φυτά, το *Agrobacterium* μεταφέρει το T-DNA (μέρος του Ti-πλασμιδίου το οποίο πλευρίζεται από ατελείς όμοιες επαναλήψεις), εντός του φυτικού κυττάρου. Η ανταλλαγή T-DNA εξαρτάται από την αύξηση των ιικών γονιδίων (*vir*), τα οποία επίσης εντοπίζονται στο Ti-πλασμίδιο (Tinland, 1996). Τα γονίδια *vir* επάγονται από φυτικά συστατικά που εκκρίνονται από τραυματισμένα φυτικά κύτταρα, π.χ. ακετοσυριγγόνη (AS). Όταν τα γονίδια *vir* επάγονται, το T-DNA ενσωματώνεται εντός του φυτικού γονιδιώματος σε τυχαία θέση (Tinland, 1996). Ο Groot και συνεργάτες του (1998), κατασκεύασαν ένα πλασμίδιο που περιείχε το γονίδιο αντοχής στην υγρομυκίνη του *E. coli*, υπό τον

έλεγχο των αλληλουχιών του προαγωγέα *gpd* και τερματισμού *trpC* του *A. nidulans* ανάμεσα στο δεξί και αριστερό όριο του T-DNA.\* Αυτός ο φορέας στη συνέχεια εισήχθη με ηλεκτροπόρωση εντός ενός βοηθητικού στελέχους του *A. tumefaciens* που έφερε τα γονίδια *nir* που κωδικοποιούν το σύστημα μεταφοράς του T-DNA. Επιτυχείς μεταμορφώσεις έχουν επιτευχθεί για νηματόμορφοι μύκητες που ανήκουν στις τρεις κύριες ταξινομικές διαιρέσεις (Deuteromycotina, Ascomycotina και Basidiomycotina). Η ακετοσυριγγόνη θεωρείται απαραίτητη για τη επιτυχία αυτών των μεταμορφώσεων.

### **2.1.6 Γονίδια-Δείκτες ή Μάρτυρες επιλογής**

Γονίδια που προσδίδουν αντοχή σε μυκητοκτόνα και αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα ως μηχανισμοί αυτόματης επιλογής ανθεκτικών στελεχών μετά από εφαρμογή διαδικασιών γενετικής μεταμόρφωσης. Μεταξύ αυτών των γονιδίων, μερικά παραδείγματα αναφέρονται σε γονίδια που προσδίδουν αντοχή σε διάφορα φυτοφάρμακα και αντιβιοτικά όπως τα benomyl, bialophos, bleomycin/rheomycin ή στην Hygromycine B.

Μεταξύ άλλων ένας ευρύτατα χρησιμοποιημένος μάρτυρας επιλογής είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο φωσφοτρανσφεράση της Β-υγρομυκίνης (*hph*), που απενεργοποιεί το αντιβιοτικό ευρέους φάσματος Υγρομυκίνη-Β. Ο Punt και οι συνεργάτες του (1987), κατασκεύασαν ένα πλασμίδιο (pAN7-1) στο οποίο η έκφραση του γονιδίου *hph* του *E.coli* που είναι ενσωματωμένο σε αυτό, ελέγχεται από τις αλληλουχίες του *A. nidulans* (*gpd*, *trpC*).

---

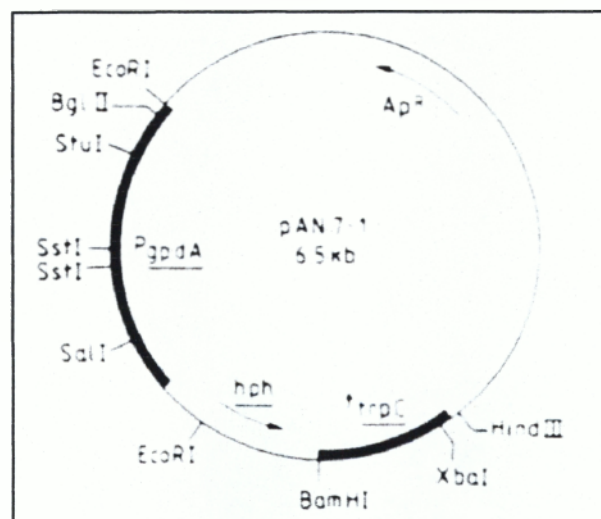
- **Συγχωνεύσεις γονιδίων**

Οι συγχωνεύσεις γονιδίων μπορούν να οριστούν ως κατασκευές DNA (που πραγματοποιούνται *in vitro* ή *in vivo*), οι οποίες κωδικοποιούν ένα γονίδιο (έκφρασης), το οποίο μεταγράφεται και/ή μεταφράζεται υπό τον έλεγχο των αλληλουχιών του προαγωγέα κάποιου άλλου γονιδίου. Οι προαγωγείς αυτοί έχουν ως χαρακτηριστικό το γεγονός ότι αναγνωρίζονται από το μηχανισμό μεταγραφής - μετάφρασης του νέου οργανισμού.

Συνήθως είναι ισχυροί προαγωγείς που εκφράζονται συνεχώς αλλά και προαγωγείς που εκφράζονται υπό ορισμένες συνθήκες (π.χ. θερμοκρασίας).

Ένα τέτοιο τεχνητό πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο *hph*, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας μεταφοράς αυτού του γονιδίου σε άλλα κύτταρα σε διάφορες διαδικασίες γενετικής τροποποίησής τους (Εικ. 2.1.1). Εάν αυτό επιτευχθεί τα κύτταρα που έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση είναι εύκολο να αναγνωρισθούν και να επιλεγούν από τα μη γενετικά τροποποιημένα με απλή χρήση του αντιβιοτικού "Hygromycine B". Έτσι σε αυτήν την περίπτωση, λέμε ότι το γονίδιο *hph* αποτελεί μάρτυρα επιλογής των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων. Η εισαγωγή του συγκεκριμένου πλασμιδίου, γίνεται παράλληλα με την εισαγωγή άλλων πλασμιδίων που φέρουν γονίδια με επιθυμητά γνωρίσματα, σε οργανισμούς προς τροποποίηση, έτσι ώστε η επιλογή των γενετικά μεταμορφωμένων οργανισμών να είναι εύκολη με τη χρήση του αντιβιοτικού.

Μεταξύ των Ασκομυκήτων που έχουν επιτυχώς μεταμορφωθεί με το γονίδιο *hph* περιλαμβάνονται οι: *Aspergillus nidulans* (Punt *et al.*, 1987), *Fulvia fulva* (Oliver *et al.*, 1987), *Fusarium graminearum* (Wiebe *et al.*, 1997), *M. grisea* (Leung *et al.*, 1990), *B. cinerea* (Hamada *et al.*, 1994), *Botryotinia fuckeliana* (Hilber *et al.*, 1994), *Venturia inequalis* (Parker *et al.*, 1995), *S. nodorum* (Cooley *et al.*, 1988), και *Trichoderma* sp (Sivan and Chet, 1993, Manczinger, 1997).

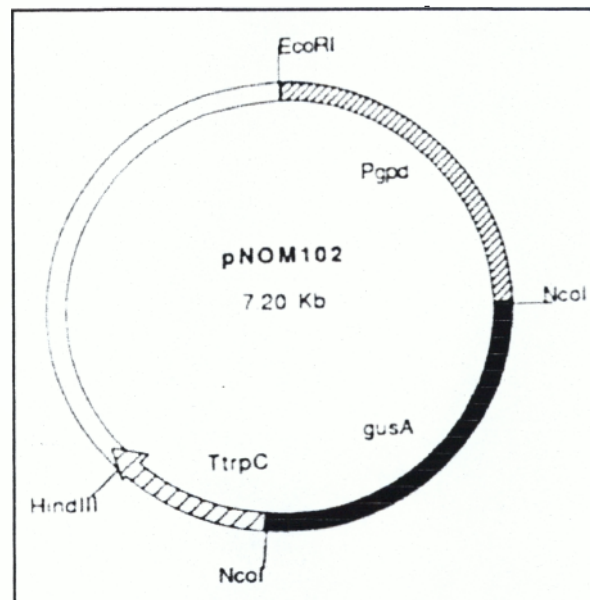


Εικ. 2.1.1 Χάρτης του πλασμιδίου pAN 7-1 το οποίο περιέχει το γονίδιο *hph* που απενεργοποιεί το αντιβιοτικό Hygromycine B.



## 2.2 Το γονίδιο GUS

Το γονίδιο του *Escherichia coli* που κωδικοποιεί το ένζυμο β-γλουκουρονιδάση *uid A* (GUS) αναπτύχθηκε ως σύστημα ελέγχου γονιδιακής έκφρασης. Έχει κλωνοποιηθεί και αλληλουχηθεί, και κωδικοποιεί ένα σταθερό ένζυμο, το οποίο έχει επιθυμητά χαρακτηριστικά για την κατασκευή και συγχώνευση άλλων γονιδίων (Jefferson, 1987). Το γονίδιο του GUS κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pNOM 102 υπό τον έλεγχο των *gpd/trp* αλληλουχιών του *A. nidulans* (Εικ. 2.2.1).



2.2.1 Χάρτης του πλασμιδίου του pNOM 102 που περιέχει το γονίδιο *uidA* του GUS.

Η β-γλουκουρονιδάση του βακτηρίου *Escherichia coli* (GUS), έχει μονομερές μοριακό βάρος περίπου 68.200 daltons, αν και υπό συγκεκριμένες συνθήκες πηκτής πολυακρυλαμίδης μετακινείται λίγο αργότερα από ότι προβλέπεται, (γύρω στα 74.000 daltons). Η συμπεριφορά του έμφυτου ενζύμου σε χρωματογραφία στήλης της πηκτής δείχνει ότι πιθανώς είναι ένα τετραμερές. Το GUS αποτελεί μία υδρολάση, η οποία καταλύει τη διάσπαση μιας ευρείας ποικιλίας γλουκουρονιδίων, πολλά από τα οποία είναι διαθέσιμα στο εμπόριο ως φασματοφωτομετρικά, φλουορομετρικά και ιστοχημικά υποστρώματα. Πέραν της σταθερότητάς του, το ένζυμο αυτό αντέχει σε πολλά απορρυπαντικά και σε μεγάλη ποικιλία ιόντων, χωρίς

να έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις σ' αυτά. Επειδή όμως παρεμποδίζεται από μερικά δυσθενή μεταλλικά ιόντα, όπως  $\text{Cu}^{2+}$  και  $\text{Zn}^{2+}$ , είναι σκόπιμο κατά τη δοκιμή του να συμπεριλαμβάνεται EDTA. Η γλουκουρονιδάση μπορεί να δοκιμασθεί σε οποιοδήποτε φυσιολογικό pH με άριστες τιμές μεταξύ 5,2 και 8,0, είναι περίπου 50% ενεργό σε pH 4,3 και ανθεκτικό σε θερμική αδράνεια με χρόνο ημιζωής στους 55 °C για περίπου 2 ώρες. Μπορεί να δεχθεί μεγάλες αμινοτελικές προσθήκες άλλων πεπτιδίων με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η κατασκευή μεταφραζόμενων γονιδιακών συγχωνεύσεων (Jefferson, 1987). Η ιδιότητα αυτή καθιστά το γονίδιο GUS-A χρήσιμο εργαλείο στην παρακολούθηση της γονιδιακής έκφρασης.

### 2.3 Χρήσεις του γονιδίου GUS-A

Το γονίδιο της β-γλουκουρονιδάσης χρησιμοποιείται ως δείκτης γονιδιακής έκφρασης στη μοριακή βιολογία φυτών με αρκετά πλεονεκτήματα. Στα περισσότερα φυτικά και μυκητολογικά συστήματα έχουν μελετηθεί πολύ χαμηλές μη ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου.

Το γονίδιο GUS χρησιμοποιήθηκε για σήμανση στο *E. coli* και στο *Caenorhabditis elegans*, αλλά προσφάτως έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στην παρακολούθηση της έκφρασης χιμαιρικών γονιδίων σε φυτά. Αρκετοί παθογενείς μύκητες έχουν τροποποιηθεί με GUS χωρίς να χάσουν τη φυτοπαθογένειά τους. Με την τροποποίηση, γονίδια δείκτες μπορούν να εισαχθούν στο γονιδίωμα μυκήτων και στη συνέχεια να παρακολουθηθούν. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα χαρακτηριστικά του μύκητα, τόσο φυσιολογικά όσο και μορφολογικά να μην επηρεαστούν από την τροποποίηση. Με την τροποποίηση γίνονται ορατές οι προσβάλλουσες υφές του μύκητα, γίνεται εφικτή η μέτρηση της βιομάζας του μύκητα, η αναγνώριση γενοτύπων φυτών με ανθεκτικότητα σε μυκητολογικές ασθένειες και η μελέτη της δραστηριότητας του ενζύμου.

Συγκεκριμένα ο μύκητας *Bipolaris sorokiniana* τροποποιήθηκε με το GUS για τη μελέτη των αποικιών του μύκητα σε ρίζες σιτηρών (Liljeroth *et al.*, 1993). Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* τροποποιήθηκε με το GUS για αντίστοιχο πείραμα με φυτά λιναριού (Couteaudier *et al.*, 1993). Ο μύκητας *Phytophthora infestans* ποσοτικοποιήθηκε σε φυτά πατάτας (Kamoun *et al.*, 1998). Ο μύκητας *Trichoderma harzianum* τροποποιήθηκε για τη μελέτη του τρόπου ανταγωνισμού του με άλλους



μύκητες στην αποίκιση της ριζόσφαιρας (Thrane *et al.*, 1995). Ο προσδιορισμός της βιομάζας των μυκήτων *Cladosporium fulvum* και *Leptosphaeria maculans* σε φυτά τομάτας και λάχανου, έγινε επίσης με τη χρήση του γονιδίου της β-γλουκουρονιδάσης (Oliver *et al.*, 1993).

Η έκφραση του γονιδίου της β-γλουκουρονιδάσης και άρα η ύπαρξη του γονιδίου μπορεί να ελεγχθεί με τη χρήση διαφόρων εμπορικών σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα του ενζύμου. Αυτά είναι:

- \*p-nitrophenyl glucuronide (PNPG ή PNG)
- \*4-methyl umbelliferyl glucuronide (MUG)
- \*5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-GLUC)
- \*naphthol AS-BI glucuronide (NAG)
- \*resorufin glucuronide (ReG)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### ΥΛΙΚΑ

#### -Βακτηριακά στελέχη

*Escherichia coli* DH5a μεταμορφωμένο με τα πλασμίδια pNOM 102 και pAN.  
Τα πλασμίδια παρασχέθηκαν από την Dr. M. Drufresne.

#### -Ενζυμα

Το ένζυμο της γλουκανάσης που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή πρωτοπλαστών κατά τη διαδικασία της τροποποίησης του μύκητα παρασχέθηκε από το σκεύασμα Glucanex της εταιρίας Novo Nordisk.

#### -Αντιβιοτικά

Για τη διαλογή των τροποποιημένων στελεχών του μύκητα που περιείχαν τα πλασμίδια με το ανθεκτικό γονίδιο σε αντιβιοτικό, χρησιμοποιήθηκε το σκεύασμα Hygromycine B της εταιρείας Sigma, σε συγκέντρωση 70 µg/ml στο θρεπτικό υπόστρωμα έπειτα από την αποστείρωση αυτού.

Έγινε επίσης χρήση του αντιβιοτικού Ampicilline σε συγκέντρωση 100 µl/ml για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών που φέρουν τα πλασμίδια pNOM 102 και pAN 7-1.

#### -Θρεπτικά υποστρώματα

Για τα βακτηριακά στελέχη :

LB (ανά λίτρο)	Peptone 10 gr, NaCl 10 gr, Yeast extract 5 gr, Agar 16 gr
----------------	-----------------------------------------------------------

Για το FORL :

PDA	BDH
PDB	Πατάτα 400 gr, Sucrose 20 gr, ρύθμιση pH σε 6,4 με CaCO <sub>3</sub>
MM (ανά λίτρο)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 gr, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5 gr, KCl 0,5 gr, NaNO <sub>3</sub> 2 gr, Glucose 20 gr, Sucrose 200 gr, Agar 12,5 gr

*-Διαλύματα, Ρυθμιστικά Διαλύματα και Αντιδραστήρια*

Όλα τα διαλύματα έγιναν με διαλύτη απιονισμένο νερό και χρησιμοποιήθηκαν έπειτα από αποστείρωσή τους για 20' στους 121 °C.

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA:

GET	Glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris/HCl 25 mM, (pH : 8,0)
	NaOH 0,2 N, SDS 1%
KoAc	KoAc 60 ml (5 M), Acetic acid 11,5 ml, H <sub>2</sub> O 28,5 ml, (pH 4,8)
TE	Tris 10 mM, EDTA 1 mM

Για την παραγωγή πρωτοπλαστών και εισαγωγή του πλασμιδιακού DNA :

MgP	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 56,16 gr / 180 ml H <sub>2</sub> O (pH : 5,8), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,42 gr / 100 ml H <sub>2</sub> O Μετά την αποστείρωση προσθέτω 20 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> στα 180 ml του MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
PEG	PEG 4000 30 gr σε 0,6 M MOPS. Προσθέτω νερό ως τα 50 ml Αν κρυσταλλώσει θερμαίνω στους 37 °C.
MS	Sorbitol 1 M, MOPS 10 mM (pH : 6,3)
MSC	Sorbitol 1 M, MOPS 10 mM (pH : 6,3), CaCl <sub>2</sub> 10 mM (φιλτραρισμένο)

Για την ανίχνευση παραγωγής της πρωτεΐνης β-γλουκουρονιδάσης :

X-Gluc	NaP 20 ml (50 mM), EDTA 50 μl (0,5 M), Triton X-100 100 μl, X-Gluc (διαλυμένο σε dimethylformamide) 10 mg
NaP	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 57,7 ml (1 M), NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 42,3 ml (1 M)

Για την απομόνωση DNA από το μυκήλιο του μύκητα :

Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσεως (DNA-Ext)	Tris 200 mM (pH : 8,5), EDTA 25 mM, SDS 0,5%
50XTAE (διάλυμα ηλεκτροφόρησης)	Tris 24,2%, CH <sub>3</sub> COOH 57,1 ml, EDTA 100 ml (0,5 M) Ρύθμιση pH : 8,0 με HCl

RNase	10mg/ml dH <sub>2</sub> O. Βράσιμο για 10 λεπτά. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Βράσιμο για άλλα 10 λεπτά. Ακολουθεί τεστ της RNάσης : Πρόσθεση 2 µg RNase σε 10 µg διαλύματος DNA. Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα. Ανάλυση σε πηκτική αгарόζης (0,8%) χωρίς και με RNάση.
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Για τη διαδικασία μεταφοράς του DNA από πηκτική αгарόζης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ή νάυλον κατά Southern:

Διάλυμα αποδιάταξης	NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M
Διάλυμα εξουδετέρωσης	Tris 1 M, NaCl 1,5 M
20XSSC (ανά λίτρο)	NaCl 175,3 gr, Tri-sodium citrate 88,2 gr

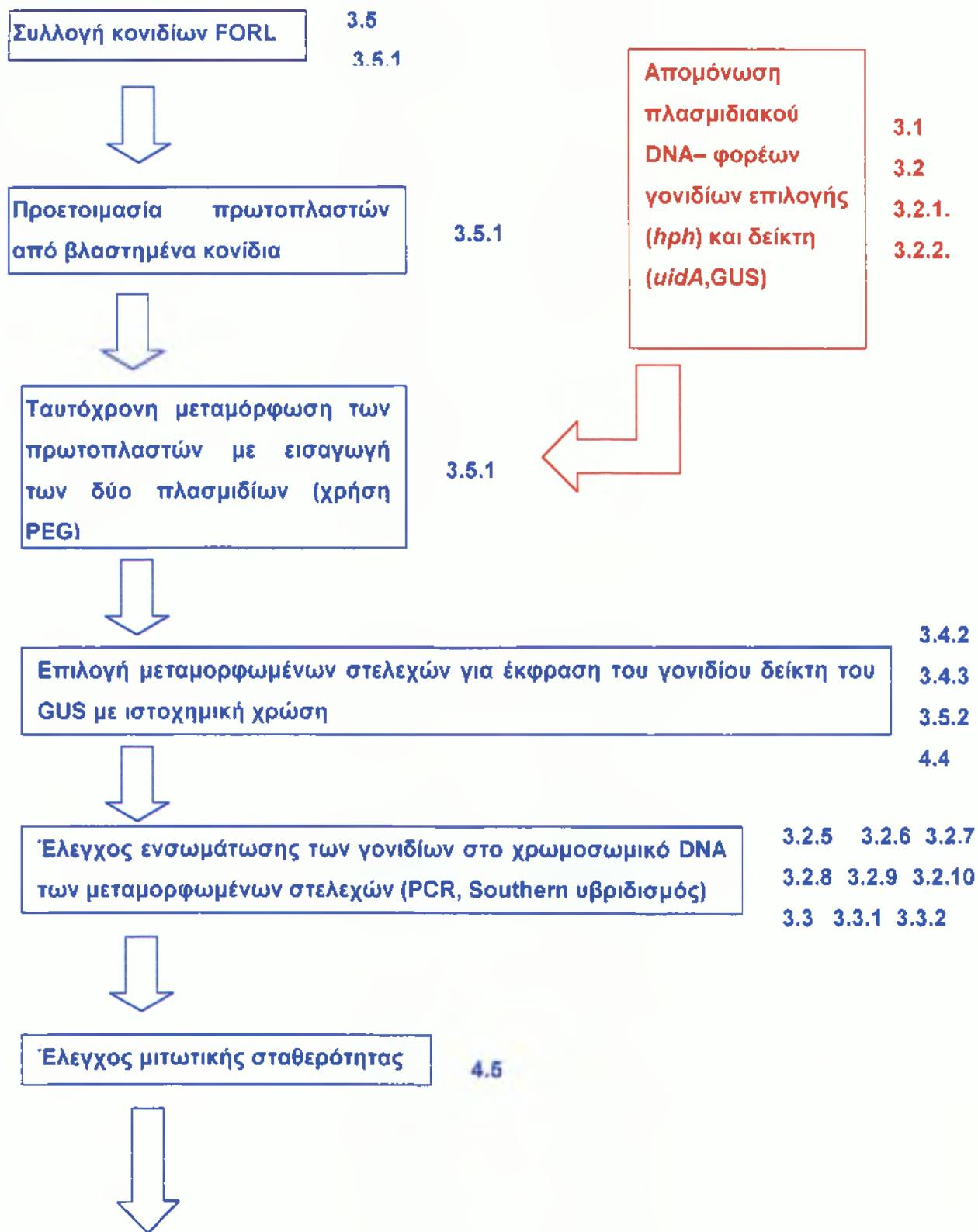
Για τον υβριδισμό :

Διάλυμα NR υβριδισμού	5XSSC, 0,02% SDS, 0,1% Sacrosyl, 1% Blocking reagent
Διάλυμα ανίχνευσης I	Tris 100 mM, NaCl 150 mM, pH : 7,5
Διάλυμα ανίχνευσης II	Tris 100 mM, NaCl 150mM, Blocking reagent 10%, pH : 7,5
Διάλυμα ανίχνευσης III	Tris 10 mM, NaCl 100 mM, MgCl <sub>2</sub> 50 mM, pH : 9,2

Για την απομόνωση της πρωτεΐνης :

Ρυθμιστικό Διάλυμα εξαγωγής πρωτεϊνών	NaP 50 mM (pH : 7,0), EDTA 1 mM, μετά την αποστείρωση προστέθηκαν 20 µM PMSF διαλυμένο σε μεθανόλη.
---------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------

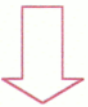
Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την επίτευξη του στόχου της συγκεκριμένης εργασίας, αναφέρονται σχηματικά παρακάτω, ενώ η παράπλευρη αρίθμηση παραπέμπει στις ανάλογες παραγράφους όπου περιγράφονται αναλυτικά οι διαδικασίες και τα πρωτόκολλα. (Τα τέσσερα διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύουν τις τρεις διαφορετικές φάσεις οργάνωσης και διεξαγωγής των πειραματικών διαδικασιών: προετοιμασία των φορέων, μεταμόρφωση και έλεγχος επιτυχίας αυτής, χαρακτηρισμός των μεταμορφωμένων στελεχών και χρήση μεταμορφωμένων στελεχών στο φυτό).





Έλεγχος διατήρησης της παθογένειας των μεταμορφωμένων στελεχών και άλλες μετρήσεις φυσιολογίας και ανάπτυξης για σύγκριση με το άγριο στέλεχος

4.6



Μέτρηση ενζυμικής δραστηρότητας του GUS στα μεταμορφωμένα στελέχη

3.4

3.4.1

3.4.2



Επιλογή του στελέχους f30 για μετρήσεις της δραστηρότητας της β-γλουκουρονιδάσης σε φυτικούς ιστούς μετά τη μόλυνση από το παθογόνο

3.4.4

3.6

3.6.1

### **3.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης**

Τα βακτηριακά στελέχη του *E. coli* DH5a μεταμορφωμένα με τα πλασμίδια pNOM 102 και pAN 7-1 που περιείχαν τα γονίδια *uidA* και *hph* (β-γλουκουρονιδάσης και αντοχής στην υδρομυκίνη, αντίστοιχα) αναπτύχθηκαν στους 37 °C σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα LB+Amp (100 µg/ml). Η ανανέωση των καλλιεργειών τους ήταν μηνιαία.

### **3.2 Μέθοδοι και τεχνικές για τη μελέτη του DNA**

#### **3.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα**

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Έπειτα από επώαση 24 ωρών καλλιέργειας βακτηριακής, μοναδικής αποικίας σε υγρό υπόστρωμα LB+Amp (100 µg/ml) στους 37 °C με έντονη ανάδευση, 1,5 ml από αυτή μεταφέρθηκε σε σωλήνα errendorf. Το περιεχόμενο του σωλήνα φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 µl διαλύματος GET. Έπειτα από παραμονή 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 200 µl παγωμένου διαλύματος 0,2 N NaOH, 1% SDS και 150 µl παγωμένου KoAc. Το διάλυμα παρέμεινε για 5 λεπτά στον πάγο και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο υλικό τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα errendorf και προστέθηκαν φαινόλη και χλωροφόρμιο για την εξαγωγή του πλασμιδίου. Ακολούθησε καθίζηση των νουκλεϊνικών οξέων με παγωμένη αιθανόλη (EtOH) 100%, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό, ξέπλυμα με 70% EtOH, νέα φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό και τελική επαναδιάλυση του ιζήματος σε 25 µl διαλύματος TE.

#### **3.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα**

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της QIAGEN για τη χρήση του QIAfilter Midi Kit.

Σε 50 ml υγρής καλλιέργειας LB+Amp (100 µg/ml), εμβολιάστηκε μοναδική βακτηριακή αποικία και επωάστηκε για 12 ώρες στους 37 °C με έντονη ανάδευση

(300 στροφές/λεπτό). Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στους 4 °C. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 4 ml διαλύματος P1. Πριν τη χρήση στο διάλυμα P1 είχε προστεθεί και RNάση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 ml διαλύματος P2 και το μίγμα αναδεύτηκε με προσοχή. Μετά από παραμονή του διαλύματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 10 ml παγωμένου διαλύματος P3 και ακολούθησε προσεκτική ανάδευση. Στο βήμα αυτό το διάλυμα P3 βοήθησε στην κατακρήμνιση του χρωμοσωμικού DNA, των πρωτεϊνών, των κυτταρικών υπολειμμάτων και του απορρυπαντικού SDS που έγιναν ορατά ως λευκή βαμβακώδης μάζα. Γι' αυτό το λόγο αμέσως μετά την προσθήκη του διαλύματος P3, το λυμένο πλέον διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδικό σωλήνα με φίλτρο (QIAfilter-Cartridge) που παρέχεται στο QIAfilter Plasmid Midi Kit και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Η λευκή βαμβακώδης μάζα μετά το πέρας του χρόνου αναμονής επέπλεε στην επιφάνεια του διαλύματος. Ένας σωλήνας QIAGEN-tip διαβρέχτηκε με διάλυμα QBT και η στήλη άδειασε με τη βοήθεια της βαρύτητας. Με τη βοήθεια εμβόλου το διάλυμα της στήλης QIAfilter-Cartridge αδειάστηκε στο προετοιμασμένο QIAGEN-tip. Το φιλτραρισμένο διάλυμα ήταν περίπου 10 ml και αυτό άδειασε με τη βοήθεια της βαρύτητας μέσω του ειδικού φίλτρου που περιείχε η στήλη. Ακολούθησε διπλό ξέπλυμα του QIAGEN-tip με προσθήκη διαλύματος QC 10 ml. Το πρώτο ξέπλυμα απομάκρυνε όλα τα πιθανά μολύσματα, ενώ το δεύτερο είναι απαραίτητο όταν χρησιμοποιούνται μεγάλου όγκου καλλιέργειες ή βακτηριακά στελέχη που παράγουν μεγάλα ποσά υδρογονανθράκων.

Η διάλυση του DNA έγινε σε 5 ml διαλύματος QF. Η δε κατακρήμνιση έγινε με προσθήκη 3,5 ml ισοπροπανόλης. Μετά από ανάδευση το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4 °C. Το υπερκείμενο υλικό απομακρύνθηκε με προσοχή. Ακολούθησε ξέπλυμα του DNA με 2 ml EtOH 70% και φυγοκέντρηση 10 λεπτών στις 13.000 στροφές/λεπτό. Έπειτα από 5-10 λεπτά στεγνώματος του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου, έγινε επαναδιάλυση αυτού σε διάλυμα TE σε όγκο ανάλογο του ιζήματος.

\* Τα διαλύματα P1, P2, P3, QBT, QC και QF, παρέχονται στο QIAfilter Plasmid Midi Kit της εταιρίας QIAGEN.



### **3.2.3 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από μυκήλιο του μύκητα FORL**

Χρησιμοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια 5 ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB. Το μυκήλιο στεγνώθηκε σε διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια κονιοροτοποιήθηκε παρουσία υγρού αζώτου σε γουδί. Η σκόνη εναιωρήθηκε σε 10 ml/gr ρυθμιστικού διαλύματος λύσεως (DNA-Ext) και έπειτα από ανάδευση θερμάνθηκε για 10-15 λεπτά στους 65 °C. Κατόπιν προστέθηκε η ίδια ποσότητα φαινόλης/χλωροφορμίου και το σκεύασμα φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά στις 10.000 στροφές/λεπτό. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 3 M NaAc και ισοπροπανόλη και ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 10.000 στροφές/λεπτό στους 4 °C. Έγινε ξέπλυμα με 70% EtOH ακολούθησε φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση του ιζήματος σε αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) και RNάση (συνολικός όγκος 1 ml). Το διάλυμα επωάστηκε στους 37 °C για 1 ώρα και στη συνέχεια μοιράστηκε ανά 0,5 ml σε δύο σωλήνες erpendorf. Προστέθηκε στη συνέχεια, ίση ποσότητα στο καθένα, φαινόλη/χλωροφόρμιο, το διάλυμα αναμίχθηκε καλά και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Στο υπερκείμενο υλικό προστέθηκε χλωροφόρμιο (0,5 ml ανά erpendorf), αναμίχθηκε καλά και φυγοκεντρήθηκε ξανά στις 13.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Ακολούθησε καθίζηση του υπερκειμένου με 1 ml 100% EtOH στις 13.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά, αφού προηγήθηκε παραμονή του διαλύματος αυτού σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά. Το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% EtOH (200 μl), φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά και αφού στέγνωσε καλά, το τελικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50 μl - 100 μl TE.

### **3.2.4 Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με χρήση φαινόλης**

Ο καθαρισμός των νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη, είναι ίσως η πιο κοινή και ευρύτατα χρησιμοποιούμενη διαδικασία στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας. Ο κύριος στόχος της μεθόδου είναι η απομάκρυνση των πρωτεϊνών ενός υδατικού διαλύματος που περιέχει τα επιθυμητά νουκλεϊνικά οξέα, με ανάμιξη του διαλύματος με φαινόλη σε συνθήκες που ευνοούν τη μετουσίωση και κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και έτσι το διαχωρισμό τους από το DNA. Η παράλληλη χρήση χλωροφορμίου ευνοεί την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας, λόγω της μετουσίωσης των πρωτεϊνών που προκαλεί, καθώς και της απομάκρυνσης των

λιπιδίων. Η φυγοκέντρωση του μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου και νουκλεϊνικών οξέων, έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο φάσεων. Της οργανικής, που περιέχει τις πρωτεΐνες και της υδατικής που περιέχει τα νουκλεϊνικά οξέα. Συνήθως το περισσότερο μέρος της πρωτεΐνης συγκεντρώνεται σε μία ενδιάμεση φάση, ανάμεσα στις δύο, που είναι λευκή και ιξώδης.

### **3.2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης**

Για την ανάλυση του DNA χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αγαρόζης με συγκεντρώσεις 0,8% έως 1,2%, βάσει του εύρους διαχωρισμού που χρειαζόταν σε κάθε περίπτωση, καθώς επίσης και ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που επρόκειτο να ηλεκτροφορηθούν και να διαχωρισθούν. Σε 100 ml διαλύματος 1ΧΤΑΕ προστέθηκε η ανάλογη ποσότητα αγαρόζης σε gr και το μίγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αγαρόζη διαλύθηκε τελείως και το διάλυμα έγινε ομοιογενές. Κατόπιν η πηκτή "χύθηκε" στην οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και έμεινε έως ότου έπηξε. Έπειτα από την τοποθέτηση των δειγμάτων στα "πηγαδάκια" της πηκτής, εφαρμόστηκε συνεχής τάση 20-100 V, σύμφωνα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού και το μέγεθος της πηκτής. Όταν η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης τελείωσε, η πηκτή βυθίστηκε για χρώση της σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 20 λεπτά και στη συνέχεια ξεπλύθηκε σε απιονισμένο νερό για άλλα 20 λεπτά.

### **3.2.6 Απομόνωση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης**

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων DNA από πηκτές αγαρόζης με σκοπό τη σήμανσή τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σαν ανιχνευτές.

Συγκεκριμένα, ύστερα από την ηλεκτροφορητική ανάλυση του DNA και το διαχωρισμό σε επιμέρους κλάσματα το επιθυμητό κλάσμα απομονώθηκε με αποκοπή της αντίστοιχης ζώνης από το ηλεκτροφόρημα της αγαρόζης, με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού. Το κομμάτι αυτό τοποθετήθηκε σε σωλήνα erpendorf και αφού ζυγίστηκε προστέθηκε, ο τριπλάσιος του βάρους του, όγκος διαλύματος QX1 (100 mg ~ 100 ml). Ο σωλήνας τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά και

στους 50 °C και παρέμεινε έως ότου το κομμάτι της πηκτής έλειωσε εντελώς. Ακολούθως προστέθηκε 1 ml ισοπροπανόλης και το μίγμα αναδεύτηκε. Για τη δέσμευση του DNA το δείγμα τοποθετήθηκε σε στήλη QIAquick και φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 13.000 στροφές/λεπτό αφού η στήλη τοποθετήθηκε πρώτα σε ειδικό σωλήνα συλλογής. Ο σωλήνας συλλογής αδειάστηκε και επανατοποθετήθηκε στη στήλη QIAquick. Το ξέπλυμα έγινε με την προσθήκη στη στήλη 0,75 ml διαλύματος PE και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 στροφές/λεπτό. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και η στήλη φυγοκεντρήθηκε για ένα επιπλέον λεπτό στις 13.000 στροφές/λεπτό. Στη συνέχεια η στήλη τοποθετήθηκε σε σωλήνα erpendorf 1,5 ml. Για την επαναδιάλυση του DNA χρησιμοποιήθηκαν 40 μl ddH<sub>2</sub>O στο κέντρο της στήλης και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 13.000 στροφές/λεπτό.

\*Τα διαλύματα και οι στήλες παρέχονται στο QIAquick Gel Extraction Kit της εταιρίας QIAGEN.

### **3.2.7 Σήμανση νουκλεϊνικών οξέων με DIG-11-dUTP**

Για τη σήμανση DNA με διγοξυγενίνη (DIG-11-dUTP), χρησιμοποιήθηκε το DIG DNA Labeling Kit της εταιρίας Boehringer και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Ένα τμήμα του GUS που απομονώθηκε από πηκτική αγαρόζης έπειτα από πέψη, αποδιατάχθηκε με βρασμό για 10 λεπτά, αφού προηγουμένως ο όγκος του είχε προσαρμοσθεί στα 15 μl. Αμέσως μετά τοποθετήθηκε στον πάγο όπου προστέθηκαν:

*Μίγμα εξαμερών	2 μl
*Μίγμα dNTPs	2 μl
*Klenow ένζυμο πολυμεράσης	1 μl

Το μίγμα ανακινήθηκε και επώαστηκε στους 37 °C για τουλάχιστον 60 λεπτά. Μετά το χρόνο επώασης προστέθηκαν 2 ml διαλύματος 0,5 M EDTA με pH 8,0 για τη λήξη της αντίδρασης. Μετά την προσθήκη 2,5 ml διαλύματος LiCl 4 M και 75 ml παγωμένης (20 °C) αιθανόλης 100% και ανάμιξης, το διάλυμα αφέθηκε να καθιζήσει για 24 ώρες στους -20 °C. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά. Το ίζημα ξεπλύθηκε με 50 μl παγωμένης EtOH 70% και αφού

φυγοκεντρήθηκε ξανά στις 13.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά και στέγνωσε με τη βοήθεια του αέρα, επαναδιαλύθηκε τελικά σε 50 μl διαλύματος TE.

Το σύστημα σήμανσης ανιχνευτών με διγοξυγενίνη (ένα στεροειδές απτένιο), είναι μη ραδιενεργό και χρησιμοποιείται σε υβριδισμούς που ακολουθεί ανίχνευση με χρωματισμό. Κατά την αποδιάταξη του DNA, η συμπλήρωση των κλώνων του συντίθεται με το Klenow ένζυμο πολυμεράσης, που χρησιμοποιεί τα 3' OH άκρα των τυχαίων ολιγονουκλεοτιδίων (εξαμερών) ως εκκινήτες και το μίγμα των δεοξυριβονουκλεομερών που περιέχουν τη διγοξυγενίνη. Οι υβριδισμένοι ανιχνευτές ανοσοανιχνεύονται με τη χρήση αντισώματος αντι-διγοξυγενίνη-AP, το οποίο φέρει μία φωσφατάση, και γίνονται ορατοί με τις χρωστικές ουσίες NBT και X-phosphate.

### **3.2.8 Πέψη DNA**

Χρωμοσωμικό DNA απομονώθηκε από μυκήλιο και έγινε πλήρης πέψη. Χρησιμοποιήθηκαν :

\*20 μl DNA

\*10 μl 10XTA

\*5 μl EcoR1

\* 65 μl dH<sub>2</sub>O

Το μίγμα αυτό επωάστηκε σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 10 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκε 3M KoAc για την καθίζηση του DNA, φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά, ακολούθησε καθίζηση με 100% EtOH και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό και στη συνέχεια ξέπλυμα με 70% EtOH, νέα φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά και η τελική επαναδιάλυση έγινε σε 30 μl ddH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 0.8%.

### **3.2.9 Μεταφορά μορίων DNA από την πηκτή αгарόζης σε νάυλον μεμβράνη Hybond N<sup>+</sup>**

Για τη μεταφορά του DNA από την πηκτή αгарόζης σε νάυλον μεμβράνη Hybond N<sup>+</sup> (Amersham), η πηκτή βυθίστηκε σε διάλυμα αποδιάταξης για 20', κατόπιν μεταφέρθηκε σε διάλυμα εξουδετέρωσης για άλλα 20' και στη συνέχεια τοποθετήθηκε, για τη μεταφορά των μορίων του DNA στη μεμβράνη με παθητική

διάχυση, πάνω στην ακόλουθη διάταξη: Σε δοχείο με ρυθμιστικό διάλυμα 20XSSC, τοποθετήθηκε μία "γέφυρα" χαρτιού 3MM, τα άκρα του οποίου βυθίστηκαν στο διάλυμα. Πάνω σ' αυτό τοποθετήθηκε η πηκτική και πάνω στην πηκτική η μεμβράνη. Πάνω στη μεμβράνη στοιβάχθηκαν 2 φύλλα 3MM χαρτιού, βρεγμένα με 20XSSC διάλυμα και κατόπιν πολλαπλά στεγνά φύλλα. Με τον τρόπο αυτό καθώς το ρυθμιστικό διάλυμα περνούσε μέσω της πηκτικής και της μεμβράνης στα στεγνά φύλλα 3MM χαρτιού, μετέφερε και τα μακρομόρια, τα οποία δεσμεύθηκαν πάνω στη μεμβράνη. Η διάταξη αυτή παρέμεινε για 2-18 ώρες και στη συνέχεια η μεμβράνη ψήθηκε στους 80 °C για 1 ώρα.

### **3.2.10 Υβριδισμός κατά Southern**

Για τον προσδιορισμό της τύχης του πλασμιδιακού DNA στα τροποποιημένα στελέχη, πραγματοποιήθηκε ανίχνευσή του μετά από υβριδισμό κατά Southern με σημασμένο ανιχνευτή του γονιδίου GUS.

Για τον υβριδισμό η μεμβράνη βυθίστηκε σε διάλυμα NR υβριδισμού και παρέμεινε για 1 ώρα με συνεχή ανάδευση στους 60-65 °C. Στη συνέχεια το διάλυμα αντικαταστάθηκε με 30 ml του ίδιου διαλύματος που περιείχε το σημασμένο ανιχνευτή του GUS. Η σήμανσή του έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο.

Έπειτα από 18 ώρες παραμονής της μεμβράνης στο διάλυμα του NR+ανιχνευτή με συνεχή ανάδευση στους 60-65 °C, ξεπλύθηκε για 10-15 λεπτά και για δύο φορές με διάλυμα 2XSSC, 0,1% SDS σε θερμοκρασία δωματίου και ανάδευση. Στη συνέχεια ακολούθησαν δύο ξεπλύματα για 15-20 λεπτά τη φορά, με διάλυμα 0,1XSSC, 0,1 SDS στους 60-65 °C με συνεχή ανάδευση. Έπειτα η μεμβράνη βυθίστηκε σε διάλυμα ανίχνευσης I για δύο ξεπλύματα και για 5 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου και ανάδευση, ακολούθησε παραμονή της σε διάλυμα ανίχνευσης II για 1 ώρα με τις ίδιες συνθήκες, ενώ στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε 20 ml διαλύματος ανίχνευσης II που περιείχαν 4ml αντισώματος αντιδιγοξυγενίνης, για 1 ώρα. Ακολούθησαν δύο ξεπλύματα των 30 λεπτών σε διάλυμα ανίχνευσης I και τέλος η μεμβράνη βάφτηκε με 10 ml διαλύματος ανίχνευσης III στο οποίο είχαν προστεθεί 45 μl NBT και 35 μl X-phosphate.



\*Το αντίσωμα και οι χρωστικές NBT και X-phosphate παρέχονται στο DIG DNA Labelling Kit της εταιρίας Boehringer.

### **3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

#### **3.3.1 Ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA που ήταν τροποποιημένα με τα γονίδια GUS (*uidA*) και *hph*, χρησιμοποιώντας κατάλληλα σχεδιασμένους εκκινητές (αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι η μήτρα αντιγραφής πρώτα αποδιατάσσεται με θέρμανση παρουσίας περισσειας των δύο ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών και τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs). Η θερμοκρασία του μίγματος της αντίδρασης στη συνέχεια ελαττώνεται σε τέτοιο βαθμό που επιτρέπει στους δύο εκκινητές να υβριδιστούν στις αλληλουχίες-στόχους της μήτρας αντιγραφής. Από αυτά τα δίκλινα πλέον σημεία, ξεκινάει η αντιγραφή του DNA με κάποια DNA πολυμεράση. Η παραπάνω διαδικασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινητών και αντιγραφή της περιεχόμενης ακολουθίας, επαναλαμβάνεται για αρκετούς κύκλους και έχει σαν αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό της ακολουθίας στόχου, της οποίας τα άκρα καθορίζονται από το 5' άκρο των εκκινητών και το μέγεθος της από τη μεταξύ τους απόσταση.

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με τις ανάγκες ήταν τα εξής:

\*pAN 7,1 Forward 5'-CAG CGA GAG CCT GAC CTA TTG C- 3'

\*pAN 7,1 Reverse 5' -GCC ATC GGT CCA GAC GGC CGC GC- 3'

\*pNOM 102 Forward 5' -AAC CCC AAC CCG TGA AAT C- 3'

\*pNOM 102 Reverse 5' -AAT AAC ATA CGG CGT GAC ATC G- 3'

#### **3.3.2 Ενίσχυση τμημάτων DNA των γονιδίων *hph* και *uidA*.**

Η ενσωμάτωση των γονιδίων *hph* και *uidA* στο γονιδίωμα των τροποποιημένων στελεχών μετά τη μεταμόρφωσή τους με τους πλασμιδιακούς φορείς, επιβεβαιώθηκε με την ενίσχυσή τους με PCR. Για την αντίδραση PCR σε σωλήνα erpendorf 0,5 ml αναμίχθηκαν τα εξής:



*Διάλυμα DNA	0,5 μl
*Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)	1 μl
*Εκκινητής (pAN 7,1 ή pNOM 102) Forward	1 μl 10 μM
*Εκκινητής (pAN 7,1 ή pNOM 102) Reverse	1 μl 10 μM
*Ρυθμιστικό διάλυμα για την PCR 10X	5 μl
*Ένζυμο πολυμεράσης Taq	0,5 μl
* ddH <sub>2</sub> O	41 μl
<hr/>	
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl

Αφού αναμίχθηκαν όλα τα παραπάνω σε πολύ καθαρές συνθήκες και με χρήση πάγου σε όλα τα βήματα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή, προγραμματισμένο για τις ακόλουθες θερμοκρασιακές αλλαγές:

Βήμα 1	1 κύκλος	95 °C	3,5 λεπτά
Βήμα 2	1 κύκλος	93 °C	3 λεπτά
Βήμα 3	34 κύκλοι	α) 92 °C	45 δευτερόλεπτα
		β) 60 °C	60 δευτερόλεπτα
		γ) 72 °C	120 δευτερόλεπτα
Βήμα 4	1 κύκλος	72 °C	10 λεπτά

Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα δείγματα αναλύθηκαν σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, παράλληλα με δείκτες μοριακών βαρών (markers), ώστε να εκτιμηθεί η εισαγωγή ή μη των γονιδίων στο γονιδίωμα των στελεχών, καθώς και το πλασμίδιο για τη σύγκριση του μεγέθους της ζώνης που ενισχύθηκε. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο λ*HindIII/EcoR1*.

### **3.4 Μέθοδοι για τη μελέτη πρωτεϊνών**

#### **3.4.1 Μέτρηση ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Πριν τις μετρήσεις για τη συνολική περιεκτικότητα του μυκηλίου σε πρωτεΐνες με τη μέθοδο Bradford, δημιουργήθηκε καμπύλη αναφοράς η οποία χρησιμοποιήθηκε ως βάση για τις μετρήσεις των άγνωστων δειγμάτων. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις του παρασκευάσματος BSA της εταιρίας BIO-RAD, με

συγκεκριμένη συγκέντρωση σε πρωτεΐνες, που περιείχαν από 2-20  $\mu\text{g/ml}$  πρωτεΐνης. Σε κάθε αραιώση το δείγμα είχε συνολικό όγκο 1 ml. Στη συνέχεια 800  $\mu\text{l}$  από κάθε αραιώση μεταφέρθηκαν σε νέους σωλήνες erpendorf και σε αυτά προστέθηκαν 200  $\mu\text{l}$  του σκευάσματος Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD). Τα 5 δείγματα αναμίχθηκαν καλά και έπειτα από χρόνο ανάμονης 5 λεπτών ή λιγότερου της μιας ώρας, έγιναν οι μετρήσεις σε σύγκριση πάντα με δείγμα αναφοράς που δεν περιείχε πρωτεΐνη. Στις μετρήσεις που έγιναν σε άγνωστα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 5-100  $\mu\text{l}$  άγνωστης πρωτεΐνης, 795-700  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O και 200  $\mu\text{l}$  Dye Reagent Concentrate.

### **3.4.2 Μέτρηση δραστηκότητας GUS**

Η μέτρηση για τη δραστηκότητα της παραγωγής  $\beta$ -γλουκουρονιδάσης γίνεται με πολλούς τρόπους. Αυτοί αφορούν σε μετρήσεις που γίνονται: α) με τη χρήση φλουορομέτρησης, η οποία αποτελεί μέσο για πολύ ακριβείς μετρήσεις. Ως αντιδραστήριο σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται το σκεύασμα MUG. Άλλη μέθοδο μέτρησης αποτελεί: β) η φασματοφωτομέτρηση στην οποία χρησιμοποιείται το σκεύασμα PNG. Τέλος χρησιμοποιείται και γ) η ιστοχημική ανίχνευση του ενζύμου με τη χρήση του σκευάσματος X-Gluc. Η πιο απλή και οικονομική μέθοδος, είναι αυτή της φασματοφωτομέτρησης. Η απορρόφηση μετράται στα 415 nm, σε αντιπαράθεση με μία αντίδραση ελέγχου. Υπό αυτές τις συνθήκες, ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης ή απόσβεσης της p-nitrophenol είναι 14000. Επομένως σε όγκο 1 ml, απορρόφηση της τάξεως 0,014 αντιπροσωπεύει 1 nanomole παραγόμενου προϊόντος. Μία μονάδα ενζύμου ορίζεται ως η αναλογία ενζύμου που παράγει 1 nanomole προϊόντος (p-nitrophenol) ανά λεπτό στους 37 °C. Αυτό αντιπροσωπεύει περίπου 5 ng καθαρής  $\beta$ -γλουκουρονιδάσης (Jefferson, 1987)

Το μυκήλιο καλλιέργειας 5 ημερών σε υγρό υπόστρωμα PDB στους 25 °C, συλλέχθηκε σε 4 φύλλα διηθητικού χαρτιού miracloth και έπειτα από ξέπλυμα με 0,7% NaCl και κονιορτοποίησή του παρουσία υγρού αζώτου, συλλέχθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρωσης και επαναδιαλύθηκε σε αναλογία 3 ml διαλύματος εξαγωγής πρωτεϊνών ανά γραμμάριο μυκηλίου. Σ' αυτό παρέμεινε για περισσότερο χρόνο από 15 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές/λεπτό και το υπερκείμενο συλλέχθηκε για μετρήσεις της συνολικής περιεκτικότητας του μυκηλίου σε πρωτεΐνες με τη μέθοδο Bradford, καθώς και για τη μέτρηση της δραστηκότητας

του GUS με φασματοφωτομέτρηση. Η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της β-γλουκουρονιδάσης έγινε σε μήκος κύματος 415 nm έπειτα από επώαση του υπερκείμενου διαλύματος στους 37 °C για 1 ώρα και με την προσθήκη του χημικού υποστρώματος p-nitrophenyl-β-glucuronide (PNG) σε αναλογία 1:1 με την πρωτεΐνη. Μετά το χρόνο επώασης προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 10 μl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M για τη λήξη της αντίδρασης και ακολούθησε η μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 415 nm.

#### **3.4.3 Ιστοχημική ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου GUS**

Νεαρές μυκηλιακές υφές από μεμονωμένες αποικίες των πιθανών τροποποιημένων στελεχών, μεταφέρθηκαν σε microtiter assay plates που περιείχαν 200 μl υγρού υποστρώματος MM (χωρίς προσθήκη άγαρ), ανά θέση. Σε κάθε θέση εμβολιάστηκε κομμάτι υφών από κάθε στέλεχος και έπειτα από επώαση 24 ωρών στους 25 °C, 10 μl του ιστοχημικού υποστρώματος 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-γλουκουρονιδίου (διαλύματος X-Gluc) προστέθηκε σε κάθε θέση και αναδεύτηκε με τη χρήση πιπέτας. Έπειτα από χρονικό διάστημα περίπου 24 ωρών επώασης στο σκοτάδι, οι τροποποιημένες αποικίες αντέδρασαν με μπλε χρωματισμό, ενώ οι αποικίες μάρτυρες παρέμειναν άχρωμες.

#### **3.4.4 Μέτρηση δραστηριότητας GUS σε ρίζες τομάτας**

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας του GUS σε μολυσμένα φυτά με τροποποιημένο στέλεχος του μύκητα FORL, ακολουθήθηκε η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε και για την ανίχνευση της δραστηριότητας του γονιδίου και στο μυκήλιο (βλ. παράγραφο 3.4.2). Για κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν οι ρίζες από 5 φυτά και μετά τον προσδιορισμό του βάρους τους, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εξαγωγής και μέτρησης της πρωτεΐνης.

### **3.5 Μεταμόρφωση του FORL**

#### **3.5.1 Απομόνωση και μεταμόρφωση πρωτοπλαστών**

Διαλύματα κονιδίων ( $2 \times 10^8$  κονίδια/10 ml PDB) από καλλιέργεια του μύκητα 3-5 ημερών επώαστηκαν με ανάδευση (150 στροφές/λεπτό) στους  $25^\circ\text{C}$  για 8 ώρες. Κονίδια με βλαστικό σωλήνα 2-10 φορές μεγαλύτερο από το σπόριο συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση που έγινε στις 4.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά, ξεπλύθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε 10 ml διαλύματος MgP που περιείχε 3 gr ένζυμο γλουκανάση. Έπειτα από χρόνο 4 ωρών στους  $25^\circ\text{C}$  με ανάδευση (50 στροφές/λεπτό), οι πρωτοπλάστες χωρίστηκαν από τα υπολείμματα της κυτταρικής τους μεμβράνης και από τα μη βλαστημένα σπόρια με προσθήκη 10 ml 0,6 M σορβιτόλης για τη δημιουργία διαβάθμισης της πυκνότητας. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά. Οι πρωτοπλάστες συγκεντρώθηκαν στο διαχωριστικό στρώμα μεταξύ των δύο διαλυμάτων, ξεπλύθηκαν με 35 ml διάλυμα MSC, φυγοκεντρήθηκαν στις 8.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά και επαναδιαλύθηκαν σε 200 μl MSC. Το διάλυμα των πρωτοπλαστών παρέμεινε στον πάγο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια μοιράστηκε σε δύο σωλήνες erpendorf. Ο ένας από τους δύο ήταν ο μάρτυρας στον οποίο δεν έγινε προσθήκη των πλασμιδίων. Στο σωλήνα-μάρτυρα προστέθηκαν 50 μl διαλύματος MSC και 10 μl Aurin tri-carboxylic acid. Αντίθετα στο σωλήνα με το προς τροποποίηση διάλυμα των πρωτοπλαστών προστέθηκαν 1,5 μl του πλασμιδιακού DNA του pNOM 102, 1,5 μl του πλασμιδιακού DNA του pAN 7-1, 10 μl Aurin tri-carboxylic acid και 47 μl διαλύματος MSC. Μετά από χρόνο παραμονής στον πάγο 20 λεπτών, στους σωλήνες erpendorf προστέθηκαν με μεγάλη προσοχή 100 μl PEG 4000 και έμειναν για άλλα 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν προστέθηκε 1 ml MSC στο κάθε διάλυμα και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Η επαναδιάλυση έγινε σε 200 μl MSC, ενώ στη συνέχεια τα διαλύματα απλώθηκαν σε 4 τριβλία Petri (80 μl και 20 μl ανά δύο τριβλία) που περιείχαν το ειδικό υπόστρωμα επιλογής MM+Hyg 70 μg/ml.

#### **3.5.2 Αναγέννηση πρωτοπλαστών**

Έπειτα από 2-3 ημέρες επώασης στους  $25^\circ\text{C}$ , οι πρωτοπλάστες ήταν σε θέση να δημιουργήσουν αποικίες. Οι πιο αναπτυγμένες αποικίες επιλέχθηκαν και

μεταφέρθηκαν σε νέο μέσο επιλογής, για την επαλήθευση της ανθεκτικότητάς τους στην Υγρομυκίνη Β. Οι μεταφορές επαναλήφθηκαν για 4 τουλάχιστο φορές.

Τα στελέχη που μεγάλωναν σε όλες τις νέες μεταφορές εμβολιάστηκαν σε υπόστρωμα PDB (100 μl) και επωάστηκαν για 5 ημέρες στους 25 °C με συνεχή ανάδευση (150 στροφές/λεπτό). Τα μυκήλιά τους χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή DNA με τον τρόπο που έχει προαναφερθεί σε προηγούμενη παράγραφο.

### 3.6 Σπορά και ανάπτυξη φυτών τομάτας

Οι σπόροι τομάτας απολυμάνθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 20% για 15 λεπτά, στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με άφθονο νερό (ddH<sub>2</sub>O) και στεγνώθηκαν σε διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα περλίτη αποστειρωμένου για 60 λεπτά στους 121 °C. Μετά τη σπορά οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε φυσικό περιβάλλον με θερμοκρασία 25 °C. Ποτίζονταν με απιονισμένο νερό και 1-2 φορές την εβδομάδα με το ακόλουθο θρεπτικό διάλυμα φυτών και προσθήκη ιχνοστοιχείων:

#### Θρεπτικό διάλυμα φυτών

*K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,072% (w/v)
*KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,024% (w/v)
*MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,025% (w/v)
*Ca <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,025% (w/v)
*NO <sub>3</sub>	

#### Διάλυμα ιχνοστοιχείων

*FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200 mg/lit
*MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	200 mg/lit
*CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	15 mg/lit
*CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200 mg/lit
*H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	200 mg/lit
*Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	200 mg/lit
*ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	200 mg/lit

Το διάλυμα ιχνοστοιχείων προστίθεται πριν από κάθε πότισμα στο διάλυμα φυτών σε αναλογία 0,1 ml/l. Οι ποικιλίες που αναπτύχθηκαν ήταν το υβρίδιο F1 73-62 RZ, η τοπική ποικιλία "Κατσαρή" και η ποικιλία Ace-55.

### **3.6.1 Μολύνσεις φυτών**

Φυτά ηλικίας 2 και 3 εβδομάδων, πολύ προσεκτικά απομακρύνθηκαν από το υπόστρωμα και αφού ξεπλύθηκαν με ddH<sub>2</sub>O, μολύνθηκαν απ' ευθείας στη ρίζα με τη βοήθεια πιπέτας. Οι μολύνσεις έγιναν με 1 ml διαλύματος κονιδίων του μύκητα σε ddH<sub>2</sub>O συγκέντρωσης 1X10<sup>6</sup>. Μετά τη μόλυνση τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θάλαμο με φωτοπερίοδο 16 ωρών στους 18 °C για την εξασφάλιση συνθηκών προσβολής και εξάπλωσης του μύκητα.



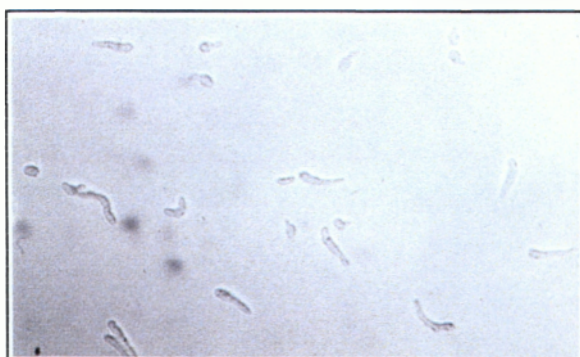
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### Αποτελέσματα

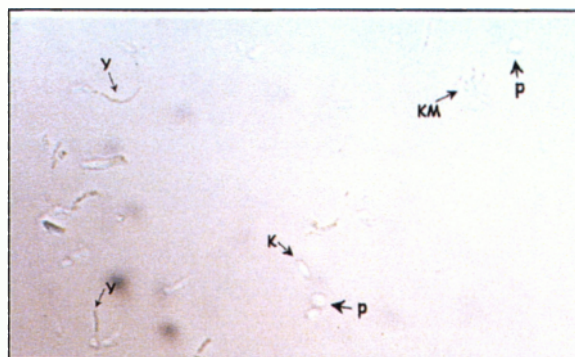
#### 4.1 Δημιουργία πρωτοπλαστών

Ως αρχικό υλικό για την παραγωγή πρωτοπλαστών χρησιμοποιήθηκαν νεοβλαστημένα σπόρια (Εικ. 4.1.1) και συγκεκριμένα επωασμένα για 8 ώρες σε υγρή καλλιέργεια PDB. Τα σπόρια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, ξεπλύθηκαν σε διάλυμα MgP και στη συνέχεια προστέθηκε νέο διάλυμα MgP και ποσότητα ενζύμου. Το ένζυμο γλουκανάση θεωρήθηκε το κατάλληλο για την επεξεργασία των κονιδίων του μύκητα και τη δημιουργία πρωτοπλαστών (Εικ. 4.1.2). Έπειτα από πολλές δοκιμές, η κατάλληλη ποσότητα για την απόκτηση πρωτοπλαστών σε συγκεντρώσεις μεγέθους  $10^7$  με  $10^8$ , ορίστηκε σε 3 gr/ml διαλύματος MgP. Επίσης αποδείχθηκε πως για την ομοιόμορφη δράση του ενζύμου στα κυτταρικά τοιχώματα, το διάλυμα έπρεπε να αναδεύεται ελαφρώς. Η ανάδευση ορίστηκε στις 50 στροφές/λεπτό.

Ως άριστος χρόνος επώασης με το ένζυμο λύσεως ορίστηκαν οι 4 ώρες. Η επώαση για λιγότερο χρόνο αποκάλυψε μεγάλες αθροίσεις πρωτοπλαστών, που ήταν ακατάλληλες για μεταμόρφωση, ενώ η έκθεση για μεγαλύτερο χρόνο στο ένζυμο κατέστρεφε τους πρωτοπλάστες.



Εικ. 4.1.1. Βλαστημένα κονίδια έπειτα από 8 ώρες επώασης σε υπόστρωμα PDB. Στο στάδιο αυτό είναι κατάλληλα για επεξεργασία με το ένζυμο γλουκανάση για παραγωγή πρωτοπλαστών.

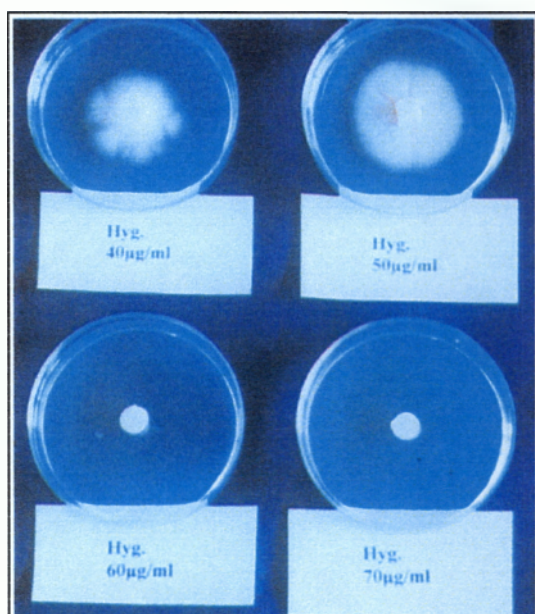


Εικ. 4.1.2. Οι πρωτοπλάστες (p) συλλέχθηκαν και έγινε καταμέτρησή τους με χρήση αιματοκυτομέτρου. Διακρίνονται υπολείμματα από κυτταρικές μεμβράνες (KM), άθικτα κονίδια (K) και υφές (Y) από το σώμα του μύκητα.



## 4.2 Υπόστρωμα επιλογής

Πριν τη μεταμόρφωση, το άγριο στέλεχος του FORL ελέγχθηκε για την ενδογενή του ανθεκτικότητα στην Υγρομικίνη Β. Η διαδικασία αυτή έγινε σε υπόστρωμα MM και για διάφορες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού. Βρέθηκε ότι η ανάπτυξη του μυκηλίου του FORL αναστελλόταν σε συγκέντρωση 70  $\mu\text{g}$  Υγρομικίνης Β ανά ml θρεπτικού υποστρώματος MM (Εικ. 4.2.1). Έτσι ως υπόστρωμα επιλογής ορίστηκε η συγκεκριμένη συγκέντρωση σε αντιβιοτικό. Η προσθήκη αυτού στο θρεπτικό υπόστρωμα έγινε μετά την αποστείρωση του υποστρώματος και όταν αυτό είχε θερμοκρασία χαμηλότερη από 50  $^{\circ}\text{C}$ .



*Εικ. 4.2.1. Τεστ υγρομικίνης. Το άγριο στέλεχος του FORL εμβολιάστηκε σε υπόστρωμα PDA με διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρομικίνης. Διακρίνεται η αναστολή της αύξησης του μύκητα για συγκεντρώσεις 60-70  $\mu\text{g}/\text{ml}$*

## 4.3 Αναγέννηση πρωτοπλαστών

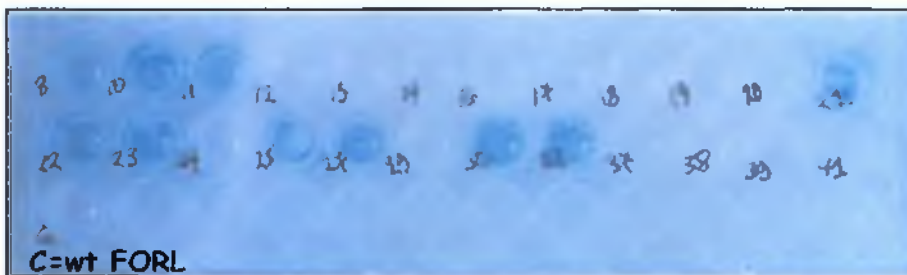
Οι πρωτοπλάστες που ετοιμάσθηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο μεταμόρφωσης με χρήση PEG και έγινε ταυτόχρονη εισαγωγή των δύο πλασμιδιακών φορέων, που φέρουν τα γονίδια επιλογής (ανθεκτικότητα στην υγρομικίνη-β) και δείκτη (β-γλουκουρονιδάση). Μετά το πέρας της διαδικασίας οι πρωτοπλάστες καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο το οποίο περιείχε θρεπτικό υλικό με προσθήκη υγρομικίνης. Κατά τη μεταφορά των πρωτοπλαστών που δημιούργησαν αποικίες στο μέσο επιλογής, σε νέα τριβλία, επιλέχθηκαν 428 πιθανά τροποποιημένα στελέχη. Ακολούθησαν 4 νέες μεταφορές σε καινούριο μέσο επιλογής (Υγρομικίνη). Μόνο τα 43 από τα 428 στελέχη

συνέχισαν να μεγαλώνουν. Τα στελέχη αυτά ονομάστηκαν με βάση τον αύξοντα αριθμό ως f1, f2, f3, κ.ο.κ. Ακολούθησε μεταφορά αυτών των στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα MM χωρίς επιλογή και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν και πάλι σε μέσο επιλογής. Κατά τη διαδικασία αυτή 25 ακόμη στελέχη έχασαν την ανθεκτικότητά τους στην Υγρομυκίνη Β και δεν αναπτύχθηκαν ξανά.

#### 4.4 *In situ* έλεγχος τροποποιημένων στελεχών

Τα 24 στελέχη που απέμειναν και παρέμειναν ανθεκτικά στην Υγρομυκίνη Β, δείχνοντας έτσι κανονική ενσωμάτωση του γονιδίου επιλογής *hph*, δοκιμάστηκαν στη συνέχεια για την παράλληλη ενσωμάτωση και του γονιδίου *uidA* της β-γλουκουρονιδάσης.

Έτσι, κομμάτια υφών από τα 24 στελέχη, εμβολιάστηκαν σε θέσεις microtiter assay plates με υπόστρωμα υγρού MM (200 μl ανά θέση). Μετά από επώαση 24 ωρών, προστέθηκαν σε κάθε θέση 10 μl από το ιστοχημικό υπόστρωμα X-Gluc. Από τα 24 στελέχη, μόνο τα 10 αντέδρασαν με μπλε χρωματισμό (Εικ. 4.4.1), που αποτέλεσε σημάδι παραγωγής και δραστικότητας του ενζύμου της β-γλουκουρονιδάσης. Η δοκιμή αυτή επαναλήφθηκε για 4 φορές και τα 10 στελέχη αντιδρούσαν πάντα με μπλε χρωματισμό.



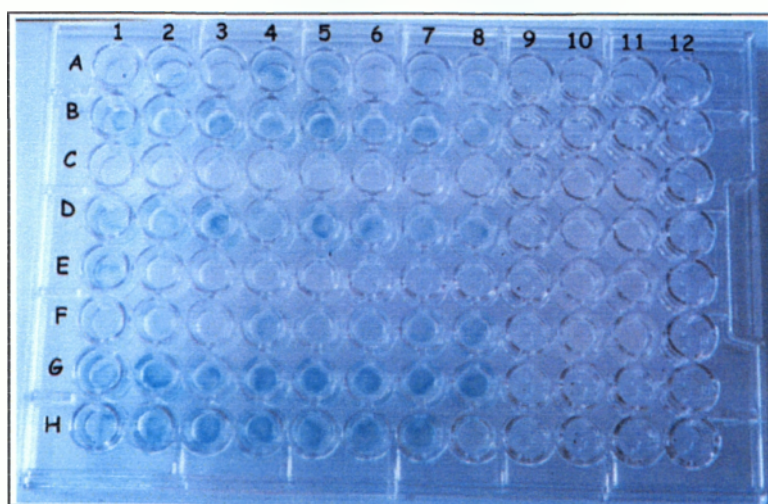
Εικ. 4.4.1. Δοκιμή των στελεχών *in situ*. Σε κάθε "πηγαδάκι" του "πίατου" που περιείχε 200 μl MM, εμβολιάστηκε κομμάτι νεαρών μυκηλιακών υφών από το κάθε στέλεχος. Μετά την προσθήκη του σκευάσματος X-Gluc αντέδρασαν με μπλε χρωματισμό τα στελέχη f8, f10, f11, f21, f22, f23, f25, f27, f30, f32 τα οποία διακρίνονται.

#### 4.5 Έλεγχος μιτωτικής σταθερότητας

Κονίδια που είχαν επωαστεί για 24 ώρες στους 25 °C, σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση μοναδικών αποικιών, με

τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Έτσι για το κάθε στέλεχος απομονώθηκαν αποικίες, οι οποίες μεγάλωσαν ξανά σε μέσο επιλογής και στη συνέχεια, έγινε διαβροχή του μυκηλίου τους με ddH<sub>2</sub>O, για τη συλλογή των κονιδίων που είχαν παράγει. Τα κονίδια αυτά αραιώθηκαν σε ddH<sub>2</sub>O και στη συνέχεια απλώθηκαν σε υπόστρωμα PDA. Έπειτα από επώαση 24 ωρών, απομονώθηκαν 8 αποικίες από το κάθε στέλεχος και μεταφέρθηκαν σε μέσο επιλογής MM+70 µg/ml Hyg. B. Από τις καλλιέργειες αυτές, κομμάτι των υφών τους εμβολιάστηκε σε θέση microtiter assay plate. Για κάθε στέλεχος η δοκιμή έγινε και για τις 8 μοναδικές αποικίες τους. Έπειτα από επώαση 24 ωρών στους 25 °C σε υπόστρωμα 200 µl MM, έγινε προσθήκη 10 µl υποστρώματος X-Gluc, ανά θέση. Η θετική αντίδραση με μπλε χρωματισμό, ελέγχθηκε μετά από 24 ώρες παραμονής των στελεχών στο σκοτάδι και στους 25 °C. Στο στέλεχος f11, παρατηρήθηκε αστάθεια στην έκφραση της ενζυμικής δραστηριότητας της β-γλουκουρονιδάσης. Έτσι, ενώ θα έπρεπε και στις 8 αποικίες το ένζυμο να δεσμευθεί από το υπόστρωμα της X-Gluc, αντιδρώντας με έντονο μπλε χρώμα, κάτι τέτοιο δε συνέβη.

Τα στελέχη που παρέμειναν έπειτα από όλες αυτές τις δοκιμές ήταν τα f8, f10, f21, f22, f23, f30 και f32 (Εικ. 4.5.1).



Εικ. 4.5.1. Τεστ μιτωτικής σταθερότητας *in situ*. Για κάθε στέλεχος ελέγχθηκαν μέχρι και 8 διαφορετικές αποικίες. Ανά σειρά διακρίνονται τα στελέχη: A1-A8: f8, B1-B8: f10, C1-C8: f11, D1-D8: f22, E1-E5: f21, F1-F8: f23, G1-G8: f30, H1-H7: f32. Στις θέσεις C10, C11, D10, D11, E10, E11, F10 και F11 έχουν εμβολιαστεί 8 αποικίες του άγριου στελέχους.

#### 4.6 Άλλες μετρήσεις φυσιολογίας

Τα 10 στελέχη που έδειξαν πως στο γένωμά τους είχε ενσωματωθεί το γονίδιο του GUS , εμβολιάστηκαν σε 100 ml υποστρώματος PDB και επωάστηκαν για 5 ημέρες στους 25 °C με συνεχή ανάδευση (150 στροφές/λεπτό). Το μυκήλιο συλλέχθηκε σε 4πλό τουλουπάνι, ενώ τα κονίδια συλλέχθηκαν από τη φιλτραρισμένη καλλιέργεια. Ακολούθησε ζύγιση του νωπού βάρους των μυκηλίων, έπειτα από απομάκρυνση της περίσσειας του θρεπτικού υποστρώματος σε διηθητικό χαρτί. Τα κονίδια που συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση της φιλτραρισμένης καλλιέργειας στις 5.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά, επαναδιαλύθηκαν σε μικρό όγκο νερού και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε με τη βοήθεια αιματοκυττόμετρου.

Οι μετρήσεις αυτές δεν έγιναν για τα στελέχη f25 και f27 μιας και δεν είχαν κανονική ανάπτυξη μυκηλίου και απορρίφθηκαν. Τα υπόλοιπα 8 στελέχη έδειξαν πως ελάχιστα διέφεραν από το FORL. Στον πίνακα 1 που ακολουθεί, αναφέρονται οι μετρήσεις του μυκηλιακού βάρους, καθώς και οι συγκεντρώσεις των κονιδίων για το κάθε στέλεχος, μεγαλωμένα στις ίδιες συνθήκες.

Στελέχη	f8	f10	f11	f21	f22	f23	f30	f32	FORL
<b>Βάρος μυκηλίου (gr)</b>	2,8	2,52	3,05	2,51	3,11	2,8	2,36	2,41	3,14
<b>Συγκέντρωση <math>\times 10^8</math> κονιδίων ανά ml</b>	1	3	1	6	5	4	3,8	5,9	3,8

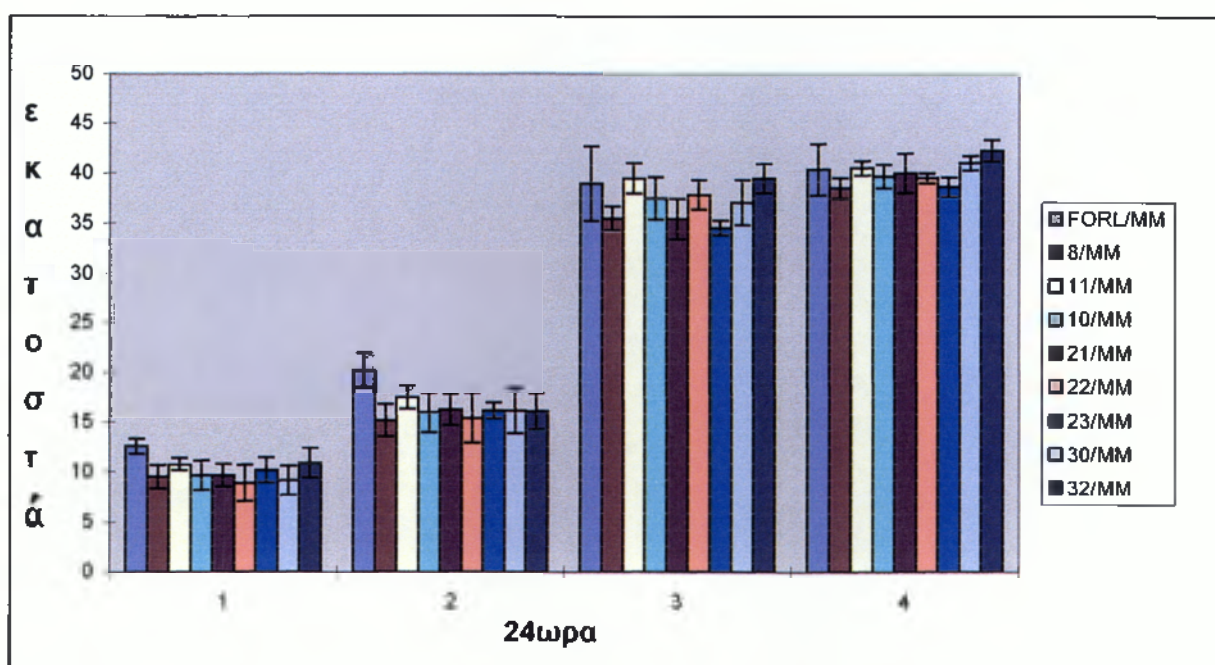
Πίνακας 1. Σύγκριση των μυκηλιακών βαρών, καθώς και της συγκέντρωσης κονιδίων όλων των στελεχών σε σύγκριση με το FORL

Επιπροσθέτως, δημιουργήθηκε καμπύλη ανάπτυξης των τροποποιημένων στελεχών σε σύγκριση πάντα με το άγριο στέλεχος. Τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (MM και PDA) και η ανάπτυξή τους παρακολούθηθηκε με καθημερινές μετρήσεις. Οι μετρήσεις αυτές έδειξαν πως δεν υπήρχε σημαντική διαφορά, όσον αφορά την ανάπτυξη, σε σύγκριση με το άγριο

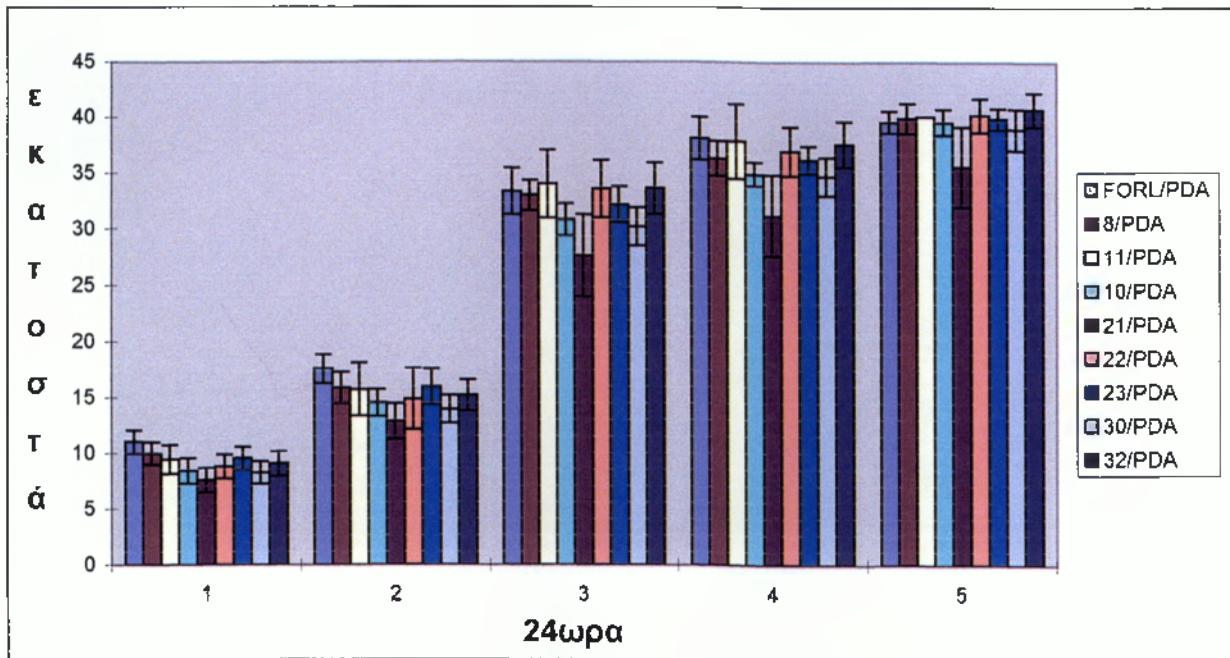


στέλεχος (Εικ. 4.6.1, 4.6.2). Το στέλεχος f21 μόνο παρουσίασε μικρό πρόβλημα στην ανάπτυξη, αλλά μόνο στο υπόστρωμα PDA.

Στα ακόλουθα διαγράμματα φαίνονται λεπτομερώς όλες οι μετρήσεις και για όλα τα στελέχη. Οι μετρήσεις έγιναν κάθε ημέρα για 4 συνεχόμενες ημέρες στο υπόστρωμα MM, και για 5 στο υπόστρωμα PDA.



Εικ. 4.6.1. Στο διάγραμμα φαίνονται οι μετρήσεις αύξησης των στελεχών (σε εκ.) σε σύγκριση με το FORL και σε υπόστρωμα MM. Πραγματοποιήθηκαν 4 μετρήσεις/24 ώρες. Οι μπάρες δηλώνουν το τυπικό σφάλμα.

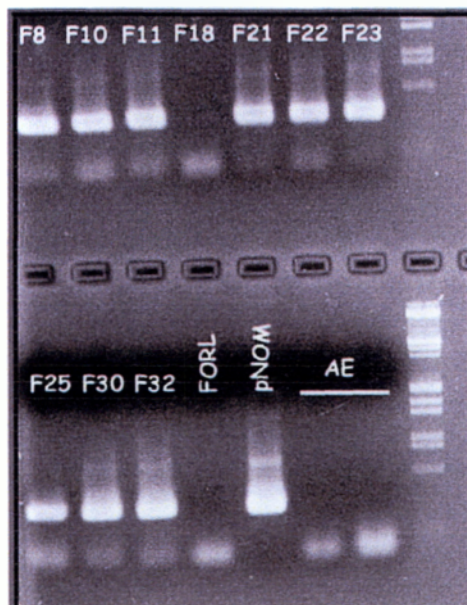


Εικ. 4.6.2. Στο διάγραμμα φαίνονται οι μετρήσεις αύξησης των στελεχών (σε εκ.) σε σύγκριση με το FORL και σε υπόστρωμα PDA. Πραγματοποιήθηκαν 5 μετρήσεις/24 ώρες. Οι μπάρες δηλώνουν το τυπικό σφάλμα.

#### 4.7 Έλεγχος εισαγωγής των γονιδίων *hph* και *uidA* στο γονιδίωμα των τροποποιημένων στελεχών

Η επαλήθευση της εισαγωγής των γονιδίων στο γονιδίωμα των μεταλλαγμάτων, έγινε με ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων αυτών με PCR.

Στις αναλύσεις που έγιναν με ηλεκτροφορήσεις πηκτών αγαρόζης 0,8%, επαληθεύθηκε το γεγονός της ενσωμάτωσης των γονιδίων αυτών στο DNA και των 8 στελεχών (Εικ. 4.7.1).



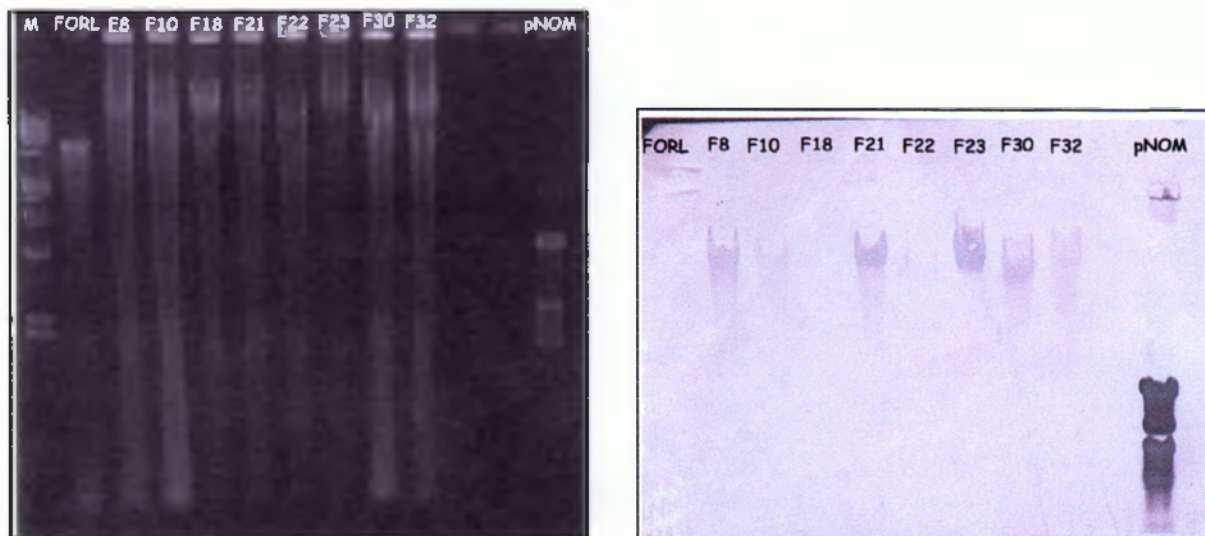
Εικ. 4.7.1. Η ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 0,8%, έδειξε πως πράγματι το γονίδιο *uidA* είχε ενσωματωθεί στο γονιδίωμα των στελεχών. Διακρίνονται κατά σειρά τα στελέχη *f8*, *f10*, *f11*, *f18*, *f21*, *f22*, *f23*, *f25*, *f30*, *f32*, *FORL*, *pNOM* 102, αντίδραση ελέγχου 1 (*AE*), αντίδραση ελέγχου 2 (*AE*) και μάρτυρας μοριακών βαρών. Ως μάρτυρας μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο *λHindIII/EcoR1*. Το στέλεχος *f18* αποτελεί στέλεχος ελέγχου το οποίο υπέστη τη διαδικασία της τροποποίησης, αλλά αποτέλεσε στέλεχος ελέγχου, γιατί ανήκε στο μίγμα όπου δεν έγινε προσθήκη του ξένου DNA.

#### 4.8 Ανάλυση με κατά Southern υβριδισμό των μεταμορφωμένων στελεχών *FORL*

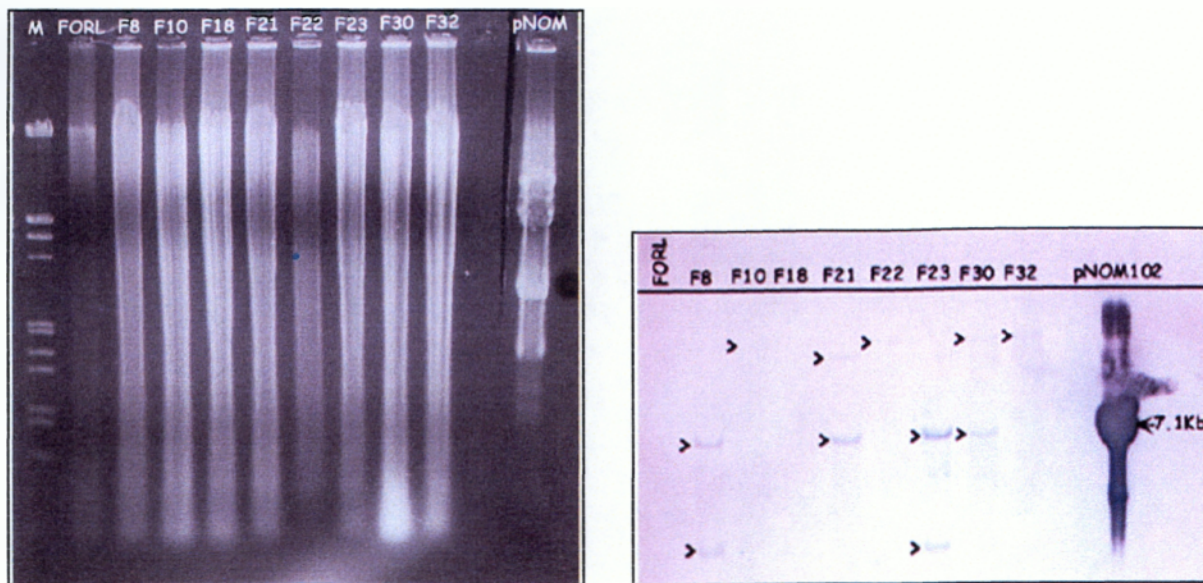
Περίπου 20 μg (~ 20 μl) ολικού γονιδιακού DNA των μεταμορφωμένων στελεχών καθώς και του άγριου στελέχους, τα οποία απομονώθηκαν από τα μυκήλιά τους, υπέστησαν πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoR1*, ένζυμο που κόβει το πλασμίδιο του *pNOM* 102 μία φορά. Στη συνέχεια τα DNA αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,8%. Ακολούθως μεταφέρθηκαν κατά Southern σε νάυλον μεμβράνη Hybond N<sup>+</sup>, η οποία υβριδοποιήθηκε με ένα τμήμα του γονιδίου *uidA*, το οποίο ενισχύθηκε με PCR και κατόπιν σημάνθηκε μη ραδιενεργά με dUTP-διγοξυγενίνη. Ο υβριδισμός έγινε για 18 ώρες στους 60-65 °C και στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλύθηκε, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.10. Σε ανάλυση που έγινε σε άκοπτο χρωμοσωμικό DNA, κανένα σήμα υβριδισμού δεν



ανιχνεύθηκε παρά μόνο στο μεγαλομοριακό γονιδιακό DNA, που αποδεικνύει πως η εισαγωγή του πλασμιδίου έγινε μέσα στα γονιδιώματα και όχι εκτοπικά (Εικ. 4.8.1). Σε μία τέτοια περίπτωση, θα υπήρχε ακόμη ένα σήμα υβριδισμού στις 7,2 kb όπου είναι το μήκος του πλασμιδίου. Μετά τη χρώση της μεμβράνης με NBT και X-phosphate, εντοπίστηκαν θετικά σήματα υβριδισμού σε όλα τα στελέχη. Συγκεκριμένα στα στελέχη f8, f21, f23 και f30 εμφανίστηκαν από δύο μπάντες υβριδισμού σε διαφορετικές όμως θέσεις για το κάθε στέλεχος (Εικ 4.8.2). Αυτό σημαίνει ότι το γονίδιο του GUS ενσωματώθηκε στα γονιδιώματα αυτών των στελεχών σε συνεχόμενες επαναλήψεις. Γι' αυτό άλλωστε και τα συγκεκριμένα σήματα (\*) υβριδισμού είναι πιο έντονα συγκρινόμενα με άλλα. Στα στελέχη f10, f22 και f32 εμφανίστηκε μόνο ένα σήμα υβριδισμού για το κάθε ένα, πράγμα που σημαίνει πως το γονίδιο του GUS έχει εισαχθεί στα γονιδιώματα αυτών των στελεχών μία φορά. Στο άγριο στέλεχος του FORL και στο στέλεχος f18 δεν ανιχνεύθηκε κανένα σήμα υβριδισμού.



Εικ. 4.8.1. Άκοπο χρωμοσωμικό DNA σε πηκτή αγαρόζης 0,8% και σε ανάλυση κατά Southern. Κανένα σήμα υβριδισμού δεν ανιχνεύθηκε. Διακρίνονται ανά στήλη: μάρτυρας μοριακών βαρών λHindIII/EcoR1, FORL, f8, f10, f18, f21, f22, f23, f30, f32 και τέλος το pNOM 102.

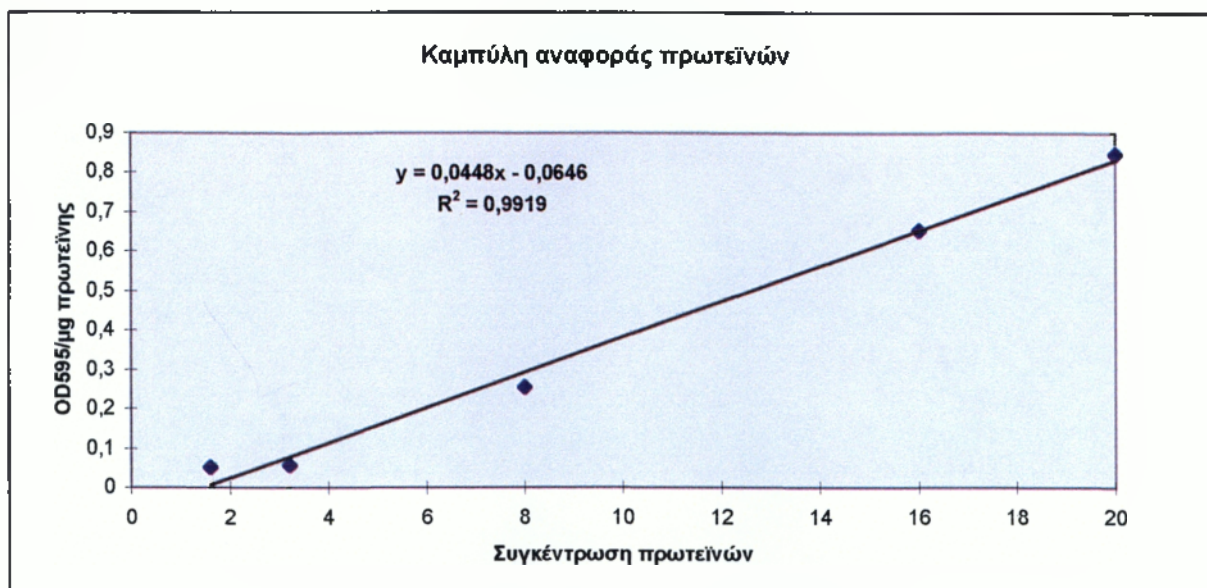


Εικ. 4.8.2. Η ύπαρξη του γονιδίου του GUS επαληθεύθηκε με ανίχνευση κατά Southern. Διακρίνονται ανά στήλη: Μάρτυρας μοριακών βαρών λHindIII/EcoR1, FORL, f8, f10, f18, f21, f22, f23, f30, f32 και τέλος το pNOM 102. Αριστερά, η πηκτή αγαρόζης από την οποία έγινε η μεταφορά DNA σε μεμβράνη.

#### 4.9 Μέτρηση παραγωγής πρωτεϊνών και δραστικότητας GUS στα τροποποιημένα στελέχη

Όλα τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε υγρό υπόστρωμα PDB και επωάστηκαν για 5 ημέρες. Ακολούθησε συλλογή των μυκηλίων, ξέπλυμα αυτών με 0,7% NaOH και κονιορτοποίησή τους για την εξαγωγή των πρωτεϊνών τους.

Έπειτα από τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς, έγιναν μετρήσεις της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες με τη μέθοδο Bradford και ακολούθησαν μετρήσεις για τη δραστικότητα της β-γλουκουρονιδάσης.

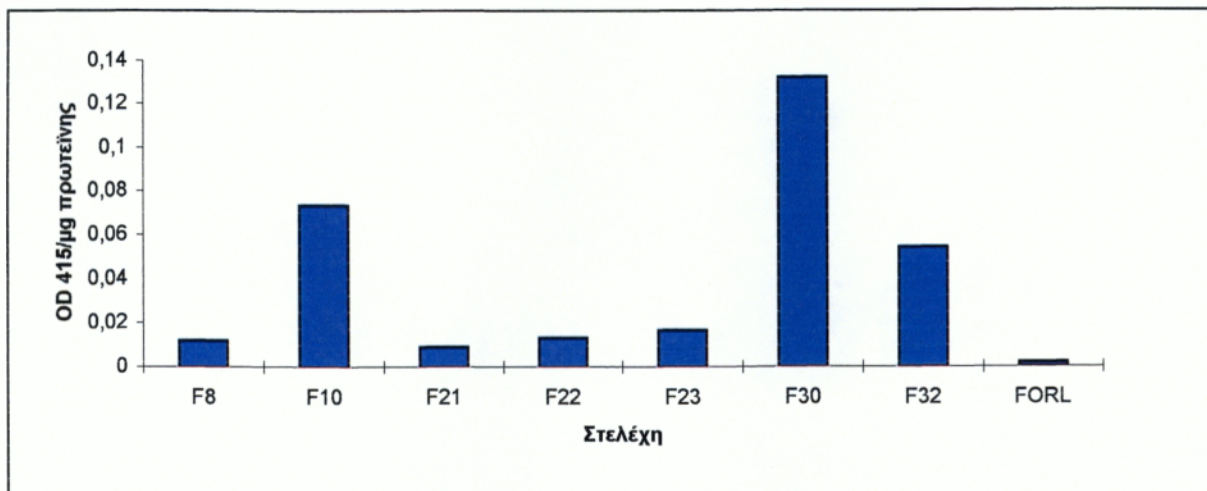


Εικ. 4.9.1. Η καμπύλη αναφοράς που δημιουργήθηκε για διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός για όλες τις επόμενες μετρήσεις.

Σε μικρήλια καλλιέργειας 5 ημερών έγιναν οι εξής μετρήσεις:

Στέλεχος	OD595	μg πρωτεΐνης	OD415	OD415/μgπρωτεΐνης
f8	0,260	7,27	0,087	0,0119
f10	0,152	4,81	0,354	0,073
f21	0,292	8	0,074	0,00925
f22	0,389	10,2	0,135	0,0132
f23	0,304	8,27	0,138	0,0166
f30	0,204	6	0,793	0,132
f32	0,434	11,22	0,609	0,054
FORL	0,163	5,06	0,017	0,003

Πίνακας 2. Αναλυτικές μετρήσεις συνολικών πρωτεϊνών και δραστικότητας GUS σε όλα τα μεταμορφωμένα στελέχη συμπεριλαμβανομένου και του FORL.



Εικ. 4.9.2. Διαγραμματική απεικόνιση της δραστικότητας του γονιδίου GUS σε όλα τα μεταμορφωμένα στελέχη, καθώς και στο άγριο στέλεχος του FORL.

#### 4.10 Μέτρηση περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και δραστικότητας GUS στο στέλεχος f30

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστικότητας της β-γλουκουρονιδάσης του στο στέλεχος f30, εμβολιάστηκαν  $2 \times 10^7$  κονίδια/ml, σε 50 ml υποστρώματος PDB και επωάστηκαν με συνεχή ανάδευση στους 25 °C. Οι μετρήσεις έγιναν έπειτα από 18-36-60-108-132 ώρες και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η διαδικασία της εξαγωγής των πρωτεϊνών και έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο (βλ. παρ. 3.4.2).

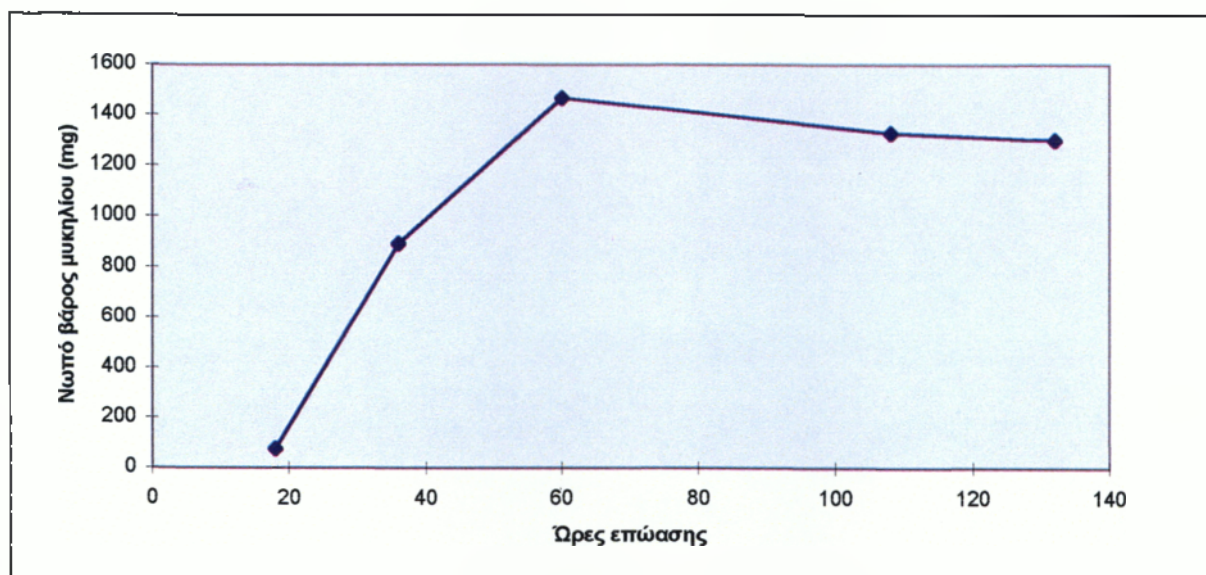
Με τις μετρήσεις που έγιναν στο φασματοφωτόμετρο, προσδιορίστηκε η σχέση μεταξύ της βιομάζας του μύκητα και της δραστικότητας του GUS. Παρατηρήθηκε ότι η δραστικότητα του GUS στο μυκήλιο, αναπτυσσόταν βαθμιαία, κυρίως κατά τη διάρκεια της εκθετικής αύξησης του μυκηλίου, μεταξύ των 18-36 και 60 ωρών. Παρ' όλα αυτά, μόλις η ανάπτυξη του μυκηλίου σταμάτησε, μετά την επώαση 60 ωρών, μία σημαντική πτώση στη δραστικότητα του GUS παρατηρήθηκε, που σημαίνει ότι η αύξηση αυτή συμβαίνει μόνο κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης του μύκητα.



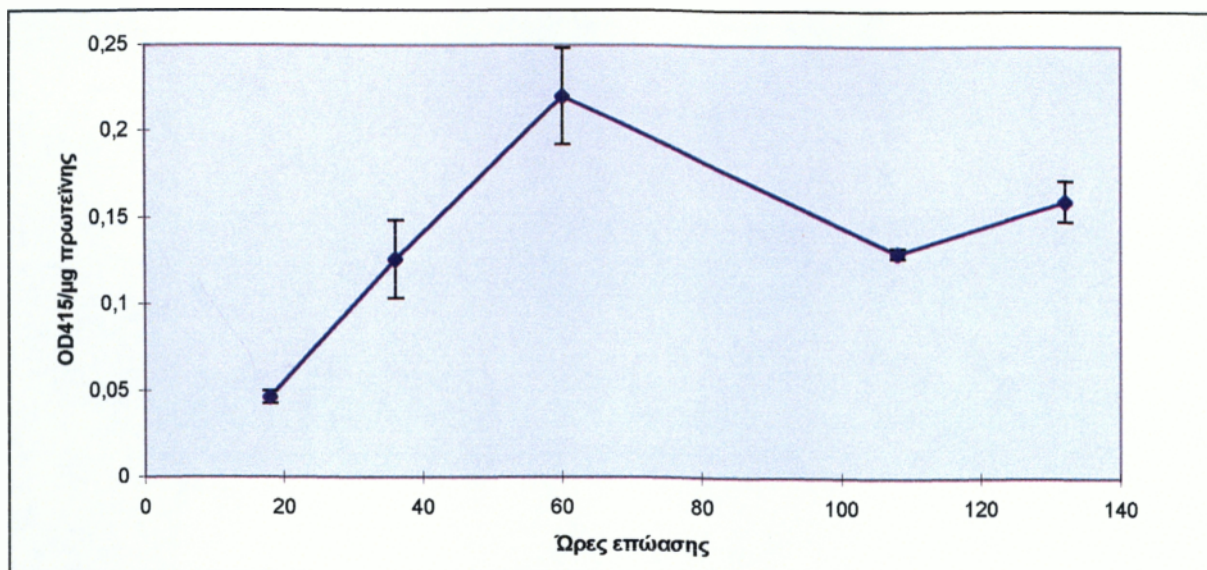
Αντίστοιχες μετρήσεις έγιναν και στις φιλτραρισμένες καλλιέργειες, όμως δεν υπήρξε καμία ένδειξη δραστικότητας του ενζύμου, γεγονός που αποδεικνύει πως η παραγωγή του γίνεται εντός των μυκηλιακών κυττάρων.

Ωρες επώασης μυκηλίου	Νωπό βάρος μυκηλίου	OD595	μg πρωτεΐνης	OD415
18	0,0756	0,0153	1,711	0,078
36	0,890	0,531	13,431	1,69
60	1,466	0,276	7,63	1,668
108	1,327	0,225	6,477	0,835
132	1,3	0,132	4,36	0,698

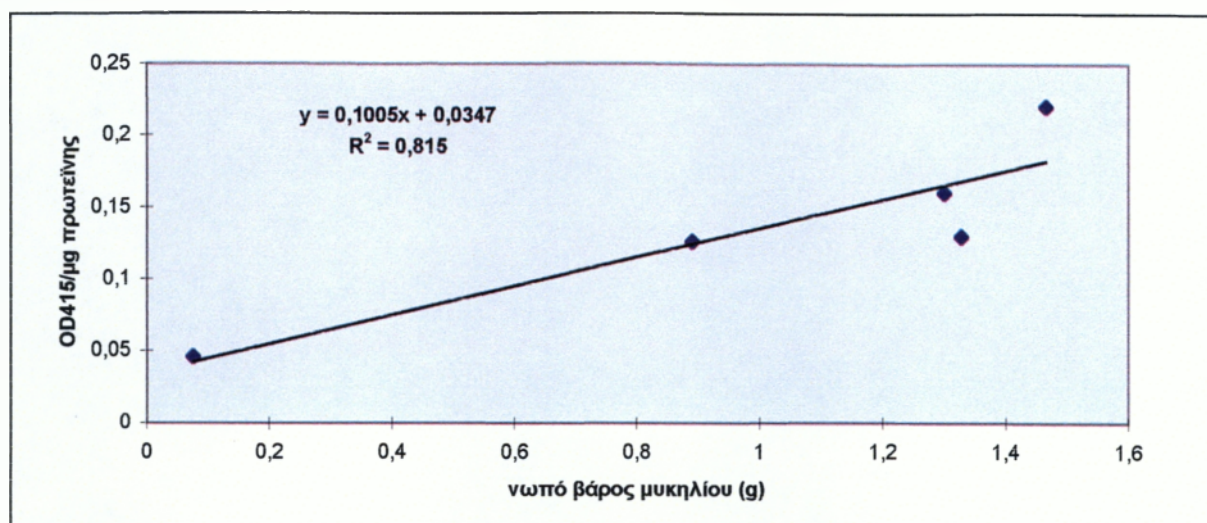
Πίνακας 3. Ζύγιση του μυκηλιακού βάρους και μέτρηση πρωτεϊνών καθώς και της δραστικότητας του GUS για διαφορετικές ώρες επώασης του στελέχους f30.



Εικ. 4.10.1. Μέτρηση της αύξησης του βάρους στο μυκήλιο του στελέχους f30.



Εικ. 4.10.2. Μέτρηση της δραστηριότητας της πρωτεΐνης β-γλουκουρονιδάσης στο μυκηλίο του στελέχους f30. Οι μπάρες δηλώνουν το τυπικό σφάλμα.



Εικ. 4.10.3. Συσχέτιση της παραγωγής της πρωτεΐνης β-γλουκουρονιδάση σε συνάρτηση με την αύξηση του μυκηλιακού βάρους του στελέχους f30.



#### 4.11 Έλεγχος φυτοπαθογένειας του f30

Φυτά ηλικίας 25 ημερών, απομακρύνθηκαν πολύ προσεκτικά από το υπόστρωμα του περλίτη και μολύνθηκαν απευθείας στη ρίζα, με τη βοήθεια πιπέτας, με 1 ml διαλύματος κονιδίων του μύκητα FORL σε αποστειρωμένο νερό, συγκέντρωσης  $1 \times 10^6$ /ml. Το ίδιο επαναλήφθηκε για ίδιο αριθμό φυτών και όμοια συγκέντρωση κονιδίων για το στέλεχος f30. Τα φυτά επανατοποθετήθηκαν σε περλίτη και στη συνέχεια σε θάλαμο με θερμοκρασία 18 °C. Έπειτα από 15-20 ημέρες τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας έγιναν ορατά, τόσο στα φυτά που ήταν μολυσμένα με το άγριο στέλεχος, όσο και στα φυτά που ήταν μολυσμένα με το μεταμορφωμένο στέλεχος f30. Σε διάρκεια 30-40 ημερών τουλάχιστον το 35% των φυτών είχαν νεκρωθεί εντελώς και στις δύο επεμβάσεις. Το γεγονός αυτό απέδειξε πως το στέλεχος f30 ήταν εξίσου παθογενές με το άγριο στέλεχος.

Οι μολύνσεις έγιναν σε φυτά της ποικιλίας "ACE-55", της ποικιλίας "Κατσαρή" και στο υβρίδιο F1 73-62 RZ (Εικ. 4.11.1).



Εικ. 4.11.1. Μολυσμένα φυτά τομάτας της ποικιλίας "Κατσαρή" με το άγριο στέλεχος και το τροποποιημένο στέλεχος f30. Οι μολύνσεις είναι 15 ημερών και τα συμπτώματα δε διαφέρουν μεταξύ των δύο στελεχών.

#### 4.12 Μολύνσεις φυτών τομάτας και μέτρηση δραστικότητας του GUS σε φυτικό ιστό για το στέλεχος f30

Μολύνθηκαν 30 φυτά ποικιλίας "Κατσαρή", ηλικίας 24 ημερών και 30 φυτά υβριδίου F1 73-62 RZ, ηλικίας 17 ημερών με το στέλεχος f30. Οι μολύνσεις έγιναν με τον τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί και σε συγκεντρώσεις της τάξεως  $1 \times 10^6$  κονίδια/ml. Τα φυτά στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θάλαμο στους 18 °C. Μετρήσεις για τον προσδιορισμό και μέτρηση της δραστικότητας του GUS έγιναν στις 3, 5, 10 και 20 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών. Για κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν τα ριζικά συστήματα από πέντε φυτά "Κατσαρής" και υβριδίου. Ακολούθησε ζύγιση των ριζών και του βλαστού και κατόπιν οι ρίζες προετοιμάστηκαν για την εξαγωγή της πρωτεΐνης και μέτρηση της δραστικότητας της β-γλουκουρονιδάσης, έπειτα από προσθήκη της PNG.

Παράλληλα με τις μετρήσεις της πρωτεΐνης παρακολουθήθηκε η εξάπλωση της ασθένειας και ταξινομήθηκε ανάλογα με την έκταση της προσβολής σε 5 στάδια. Αυτά ήταν:

Στάδιο 1: προσβολή < 10% (όχι εμφανή συμπτώματα).

Στάδιο 2: προσβολή 10%-40% (ελαφρώς μεταχρωματισμένο ριζικό σύστημα).

Στάδιο 3: προσβολή 40%-50% (αρχή μεταχρωματισμού της κεντρικής ρίζας).

Στάδιο 4: προσβολή 50%-80% (εμφανής μεταχρωματισμός της κεντρικής ρίζας, συμπτώματα μάρανσης στα κατώτερα φύλλα).

Στάδιο 5: προσβολή > 80% (πλήρης μεταχρωματισμός της κεντρικής ρίζας και χάσιμο αρκετών πλάγιων ριζών, αρχή χλώρωσης των ανώτερων φύλλων-θάνατος φυτού).

Έτσι κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών οι μετρήσεις ήταν:

##### Ποικιλία "Κατσαρή"

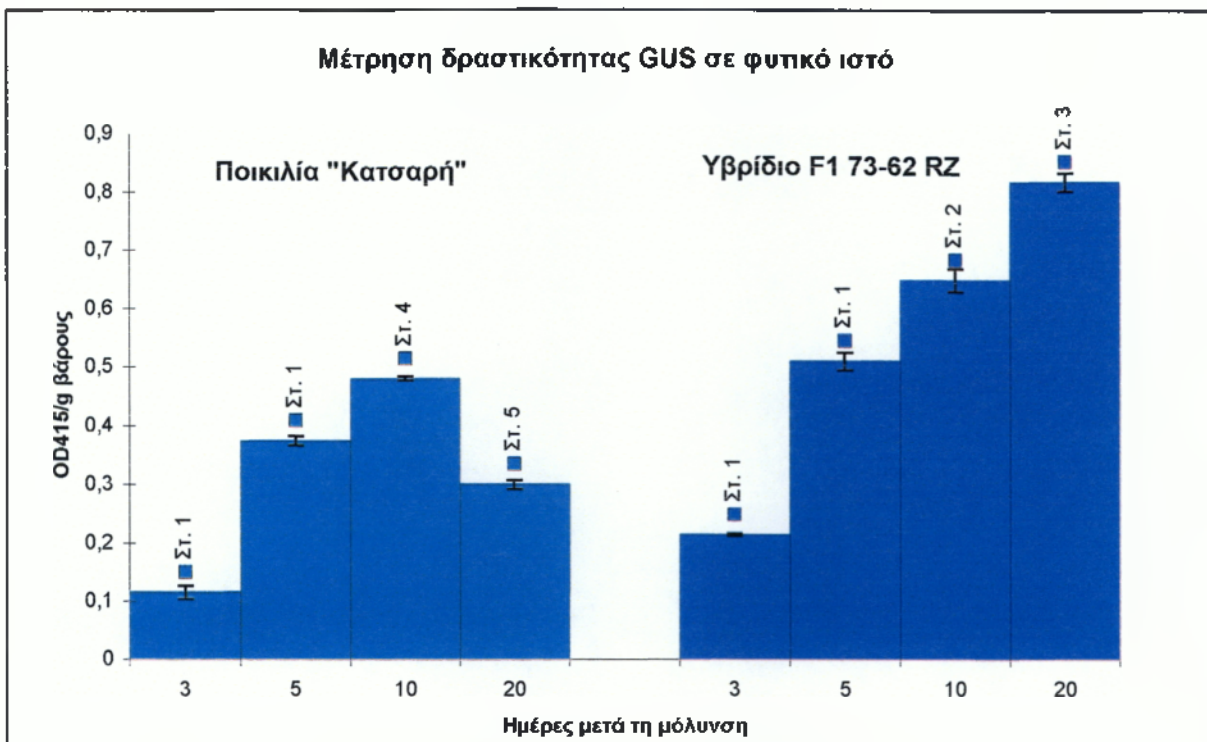
Ημέρα	Στάδιο	Βάρος ριζών (gr)	OD415
3	1	0,1781	0,0205
5	1	0,135	0,0505
10	4	0,2343	0,1125
20	5	0,2909	0,1055

Πίνακας 4. Πορεία εξάπλωσης του f30 σε φυτά τομάτας ποικιλίας "Κατσαρή"

### Υβρίδιο F1 73-62 RZ

Ημέρα	Στάδιο	Βάρος ριζών (gr)	OD415
3	1	0,0954	0,0205
5	1	0,0882	0,0455
10	2	0,0924	0,06
20	3	0,1075	0,088

Πίνακας 5. Πορεία εξάπλωσης του f30 σε φυτά του υβριδίου τομάτας "F1 73-62 RZ.



Εικ. 4.12.1. Στο διάγραμμα φαίνονται οι μετρήσεις της δραστικότητας του GUS για το στέλεχος f30 στο φυτικό ιστό, τόσο για την ποικιλία "Κατσαρή" (αριστερά), όσο και για το υβρίδιο F1 73-62 RZ (δεξιά), σε συνάρτηση με το βάρος των ριζικών συστημάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε μέτρηση. Οι μπάρες δηλώνουν το τυπικό σφάλμα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η δραστικότητα του GUS άρχισε να μειώνεται από τη 10<sup>η</sup> ημέρα και μετά, για τα φυτά της ποικιλίας "Κατσαρή". Διαπιστώθηκε μείωση της δραστικότητας δηλαδή, όταν η μόλυνση ήταν πολύ προχωρημένη και τα φυτά είχαν αρχίσει να νεκρώνονται. Αυτό παράλληλα σημαίνει πως και ο μύκητας

σταμάτησε να αναπτύσσεται, γεγονός που επαληθεύει τις μετρήσεις στην καλλιέργεια του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα. Για τα φυτά του υβριδίου, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε, μιας και τα συγκεκριμένα φυτά έδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην προσβολή και οι 20 ημέρες μόλυνσης δεν ήταν αρκετές για να παρατηρηθεί κάμψη στη δραστικότητα του ενζύμου.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>**

### **Συζήτηση των αποτελεσμάτων**

#### **5.1 Γενικά**

Ο μύκητας FORL μεταμορφώθηκε επιτυχώς, εκφράζοντας ταυτόχρονα δραστικότητα GUS και ανθεκτικότητα στην Υγρομυκίνη. Το πλασμιδιακό DNA ενσωματώθηκε στο μυκηλιακό γονιδίωμα όπως έδειξε η ανάλυση κατά Southern. Μερικά από τα μεταμορφωμένα στελέχη ήταν σταθερά και είχαν σχετικά σταθερό επίπεδο έκφρασης του GUS έπειτα από αρκετούς κύκλους παραγωγής κονιδίων, ενώ καμία δραστηριότητα GUS δε βρέθηκε στο άγριο στέλεχος. Παρ' όλα αυτά, αρκετές αποικίες που αρχικά εμφανίζονταν στο μέσο επιλογής έπειτα από τη μεταμόρφωση, έχασαν την αντοχή τους στην Υγρομυκίνη και σταμάτησαν να μεγαλώνουν. Πιθανόν, το πλασμιδιακό DNA να μην ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα αυτών των στελεχών. Τα μεταμορφωμένα στελέχη παρέμειναν μιτωτικά σταθερά και για τα δύο γονίδια, ακόμη και έπειτα από 4 ανακαλλιέργειες μεμονωμένων αποικιών. Το στέλεχος f30 που επιλέχθηκε για επιπλέον μελέτη, παρέμεινε σταθερό για 6 μήνες κατά τη διάρκεια των οποίων έγιναν συχνές ανακαλλιέργειες σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (MM, PDA και MM+70 μg Hyg B).

#### **5.2 Απομόνωση και αναγέννηση πρωτοπλαστών**

Γενικότερα η διαδικασία για την παραγωγή και απομόνωση των πρωτοπλαστών ήταν δύσκολη. Ως πιο αποτελεσματική μέθοδος για την παραγωγή τους θεωρήθηκε η μείωση του ενζύμου από τα 4 gr/ml διαλύματος MgP που αρχικά είχαν χρησιμοποιηθεί σε 3 gr/ml. Με τη χρήση λιγότερης αναλογίας ενζύμου γλουκανάσης στο διάλυμα, οι πρωτοπλάστες διατηρήθηκαν σε καλύτερη κατάσταση και ήταν πιο επιδεκτικοί στην ακολουθούμενη μεταμόρφωση. Όσο για τον τρόπο συλλογής και απομόνωσης αυτών, καλύτερη μέθοδος θεωρήθηκε αυτή της φυγοκέντρισης σε διαβάθμιση της πυκνότητας. Μεταξύ των δύο φάσεων των διαλυμάτων οι πρωτοπλάστες ξεχώρισαν ως λευκό διαχωριστικό στρώμα και η συλλογή τους ήταν σχετικά εύκολη, με τη χρήση πιπέτας Pasteur. Η συγκέντρωση



πάντως των πρωτοπλαστών δεν ξεπέρασε αυτήν της τάξεως των  $1 \times 10^7$  πρωτοπλαστών ανά ml διαλύματος. Το γεγονός αυτό εξηγεί τον περιορισμένο αριθμό μεταμορφωμένων στελεχών.

Κατά την αναγέννηση των πρωτοπλαστών σε υπόστρωμα επιλογής, αρχικά απομονώθηκαν 428 πιθανές αποικίες, οι οποίες όμως στις ανακαλλιέργειες που ακολούθησαν, έχασαν την ικανότητα αντοχής τους στο αντιβιοτικό. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως κατά την αντιγραφή του DNA για τη δημιουργία νέων κυττάρων, το ξένο DNA που εισήχθη αναγνωρίστηκε από το μυκηλιακό DNA και απορρίφθηκε. Μεγάλη σημασία για τη διατήρηση του ξένου πλασμιδιακού DNA έχει η θέση στην οποία αυτό θα εισαχθεί, γεγονός το οποίο είναι τυχαίο και όχι ελεγχόμενο. Στις επόμενες ανακαλλιέργειες και άλλα στελέχη δεν κατάφεραν να διατηρήσουν τα ξένα γονίδια στο γονιδίωμά τους και έτσι απορρίφθηκαν. Η διαδικασία αυτή κατέληξε σε 24 ανθεκτικά στην Υγρομυκίνη στελέχη.

Ακολούθησε έλεγχος *in situ* για την παράλληλη ενσωμάτωση του γονιδίου GUS στα 24 αυτά στελέχη. Έπειτα από 4 επαναλήψεις του ελέγχου αυτού με τη χρήση του σκευάσματος X-Gluc σε μοναδικές αποικίες, μόνο 10 στελέχη παρέμειναν τα οποία υποβλήθηκαν σε νέες δοκιμές ενσωμάτωσης και μιτωτικής σταθερότητας. Κατά τις δοκιμές αυτές υπήρξαν στελέχη που έδειξαν αδυναμία στην κανονική ανάπτυξη του μυκηλίου τους. Τα τελικά 7 στελέχη δε διέφεραν σημαντικά στη φυσιολογία από το άγριο στέλεχος και έτσι υποβλήθηκαν σε ενίσχυση των τμημάτων του DNA όπου είχαν εισαχθεί τα δύο πλασμίδια με τη βοήθεια της αντίδρασης PCR.

### **5.3 Δραστικότητα γονιδίου GUS**

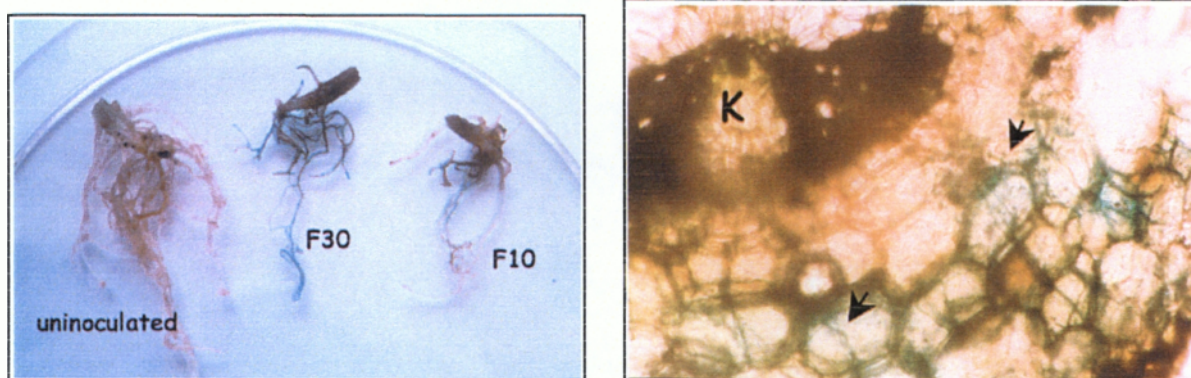
Η σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων της δραστικότητας του γονιδίου και της αύξησης του μυκηλιακού βάρους, έδειξε ότι η δραστικότητα του GUS έφτασε στο ανώτερο σημείο έπειτα από 60 ώρες καλλιέργειας του μύκητα, και στη συνέχεια έπεσε σημαντικά ενώ το βάρος του μυκηλίου σταθεροποιούταν. Προφανώς η παραγωγή του GUS ήταν υψηλή όταν τα κονίδια του μύκητα ήταν έτοιμα να βλαστήσουν και κατά τη διάρκεια αύξησης του μυκηλιακού βάρους (Green and Jensen, 1995).

Η ποσότητα παραγωγής του ενζύμου εκτός του ότι αποτελεί δείκτη για τη μέτρηση της βιομάζας, αποτελεί επίσης έκφραση της δράσης του ίδιου του μύκητα.



Το γεγονός αυτό στηρίζεται στο ότι η δραστηριότητα του GUS στο μυκήλιο ήταν σε συνδυασμό με την αναλογία των ενεργών κονιδίων. Σύμφωνα με αυτό οι Eparvier και Alabouvette (1994), θεώρησαν ότι η έκφραση του γονιδίου GUS στο *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* αντικατοπτρίζει τη μεταβολική δραστηριότητα του στελέχους. Επιπροσθέτως, ανακάλυψαν ότι η ένταση του χρώματος σε υφές βαμμένες με X-Gluc υποδεικνύουν τη δραστηριότητα του μύκητα στις ρίζες του φυτού (Εικ. 5.3.1, 5.3.2).

Η ανάλυση των γενωματικών DNA των στελεχών κατά Southern έδειξε πως για το κάθε στέλεχος η εισαγωγή του γονιδίου του GUS έγινε σε τυχαία θέση και σε διαφορετικά αντίγραφα για το καθένα. Παρατηρείται όμως ότι το πόσες φορές έχει εισαχθεί το γονίδιο του GUS στο γονιδίωμά τους δεν επηρεάζει την ποσότητα παραγωγής και έκφρασης της β-γλουκουρονιδάσης. Έτσι παρ' όλο που στο στέλεχος f10 το γονίδιο έχει ενσωματωθεί μία φορά, η παραγωγή του ενζύμου δε δείχνει να υστερεί συγκρινόμενη με αυτήν του στελέχους f30 όπου το γονίδιο έχει ενσωματωθεί περισσότερες φορές.



Εικ. 5.3.1, 5.3.2. Ανίχνευση των υφών του στελέχους f30 στο φυτικό ιστό έπειτα από χρώση του με χρήση X-Gluc και παραμονή στους 37 °C.

#### 5.4 Ποσοτικοποίηση της βιομάζας του FORL

Η όλη διαδικασία της μεταμόρφωσης και μέτρησης της δραστηριότητας του γονιδίου GUS για το στέλεχος f30, υπέδειξε ότι η ποσοτικοποίηση της βιομάζας του μύκητα στο φυτικό ιστό είναι εφικτή αλλά για πολύ αρχικά στάδια της ασθένειας. Κυρίως η ανίχνευση και μέτρηση, μπορεί να γίνει πολύ νωρίς, όταν ακόμη τα συμπτώματα της προσβολής δεν είναι ορατά. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τις μετρήσεις δραστηριότητας του GUS στο στέλεχος f30, σε φυτά τομάτας ποικιλίας

"Κατσαρή" και του υβριδίου F1 73-62 RZ, παρατηρείται ότι όσο η ασθένεια προχωρά κατά στάδιο, τόσο η δραστηριότητα του ενζύμου αυξάνεται. Όταν η ασθένεια έχει φτάσει στο στάδιο 5, είναι δηλαδή αρκετά προχωρημένη, παρατηρείται κάμψη στην παραγωγή της β-γλουκουρονιδάσης. Εξήγηση αυτού ίσως αποτελεί το γεγονός ότι ο μύκητας καταλαμβάνοντας και αποικιώντας όλο το χώρο της αγγειακής στήλης, έχει σταματήσει πλέον να αυξάνεται και, όπως έχει αποδειχθεί, η παραγωγή και δραστηριότητα του ενζύμου είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αύξηση του μυκηλιακού βάρους.

Επίσης οι συγκεκριμένες μετρήσεις μας δίνουν τη δυνατότητα να συμπεράνουμε πως το συγκεκριμένο υβρίδιο F1 73-62 RZ είναι πιο ανθεκτικό στην προσβολή από FORL σε σύγκριση με την ποικιλία "Κατσαρή". Αυτό επαληθεύεται από την μελέτη της πορείας της ασθένειας και στις δύο περιπτώσεις. Έτσι ενώ κατά την 3<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα τα φυτά δείχνουν να έχουν παράλληλες πορείες μόλυνσης από τη 10<sup>η</sup> ημέρα και μετά, το υβρίδιο παρουσιάζεται πιο ανθεκτικό στην ασθένεια. Παρ' όλο που οι μετρήσεις της δραστηριότητας του GUS για το υβρίδιο είναι αυξημένες σε σύγκριση με την "Κατσαρή", δεν ανιχνεύονται σοβαρά συμπτώματα στα φυτά ακόμη και την 20<sup>η</sup> ημέρα. Το γεγονός της ανθεκτικότητας ενισχύεται και από το ότι τα φυτά του υβριδίου ήταν κατά μία εβδομάδα μικρότερα σε σύγκριση με τα φυτά της "Κατσαρής". Είναι γνωστό ότι τα νεαρότερα φυτά είναι πιο ευπρόσβλητα από το FORL. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές ότι υβρίδια στο γονιδίωμα των οποίων έχει ενσωματωθεί το γονίδιο αντοχής στον ιό του μωσαϊκού της τομάτας (TMV), είναι εξίσου ανθεκτικά και στο FORL (Jarvis, 1988).

### ***5.5 Δυνατότητες χρήσης των μεταμορφωμένων στελεχών***

Ο σκοπός της μεταμόρφωσης του FORL με το γονίδιο έκφρασης GUS, ήταν η απόκτηση ενός εργαλείου για οικολογικές μελέτες του μύκητα. Έτσι, εκτός από τη δυνατότητα για την ποσοτικοποίηση της βιομάζας στο φυτικό ιστό, υπάρχει δυνατότητα χρήσης του για μελέτη της καταστολής του πληθυσμού του μύκητα όταν βρίσκεται με άλλα ανταγωνιστικά στελέχη, καθώς και δυνατότητα χρήσης του για τη λεπτομερή μελέτη της πορείας αποίκησης του ριζικού συστήματος σε φυτά τομάτας. Επίσης πολύ σημαντική είναι η χρήση τέτοιων στελεχών για την ανίχνευση

γενοτύπων φυτών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε ασθένειες που οφείλονται στο συγκεκριμένο μύκητα.

Για τη χρήση των μεταλλαγμένων στελεχών σε οικολογικές μελέτες, είναι πολύ σημαντικό τα επιλεγμένα αυτά στελέχη να είναι φαινοτυπικά όμοια με το άγριο στέλεχος. Για τον έλεγχο της φυσιολογίας των στελεχών, απλές δοκιμές σχεδιάστηκαν για την εκτίμηση τυχόν διαφορών από το άγριο στέλεχος. Τα αποτελέσματα των δοκιμών φυσιολογίας αποδεικνύουν τη σημαντικότητα εκτίμησης των μεταλλαγμάτων πριν την εκπόνηση μακροπρόθεσμων μελετών. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα και στην ακόλουθη δοκιμή για τον έλεγχο της φυτοπαθογένειας του στελέχους f30, αποδείχθηκε ότι αυτό ήταν εξίσου παθογενές με το άγριο στέλεχος του FORL. Ο έλεγχος αυτός άλλωστε επαληθεύθηκε σε τρεις διαφορετικές ποικιλίες τομάτας και η πορεία εξάπλωσης της ασθένειας ήταν ανάλογη και για τα δύο συγκρινόμενα στελέχη.

## **Βιβλιογραφία**

Benhamou, N. 1992. *Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici, agent of tomato crown and root rot.* Phytopathology **82**: 1185-1193.

Benhamou, N., and Belanger, R.R. 1998. *Benzothiadiazol-mediated induced resistance to Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in tomato.* Plant Physiology **118**: 4,1203-1212.

Benhamou, N., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1998. *Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response.* Planta **204**: 153-168.

Benhamou, N., Lafontaine, P.J., and Nicole, M. 1994. *Induction of systemic resistance to Fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan.* Phytopathology **84**: 1432-1444.

Benhamou, N., Rey, P., Cherif, M., Hockenull, J., and Tirilly, Y. 1997. *Treatment with the mycoparasite Pythium oligandrum triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici.* Phytopathology **87**: 108-122.

Benhamou, N., and Theriault, G. 1992. *Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici.* Physiological and Molecular Plant Pathology **41**: 33-52.

Bochow, H. 1992. *Phytosanitary effects of Bacillus subtilis as biocontrol agent.* Mededeligen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent. **57**: 387-393.

Bochow, H., Dolej, S., Lyr, H., Russell, P.E., Dehne, H.W., and Sisler, H.D. 1999. *Mechanisms of tolerance induction in plants by root colonising Bacillus subtilis isolates*. Modern Fungicides and Antifungal Compounds II: 411-416.

Caron, M. 1986. *Effect of preinfestation of the soil by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus intraradices, on Fusarium crown and root rot of tomatoes*. Phytoprotection **67**: 15-19

Caron, Michel, Fortin, J., Andre, and Richard, Claude. 1986. *Effect of phosphorus concentration and Glomus intraradices on Fusarium crown and root rot of tomatoes*. Phytopathology **76**: 942-946.

Charest, P.M., Ouellette, G.B., and Pauze F.J. 1984. *Cytological observations of early infection process by Fusarium oxysporum f.sp. radices-lycopersici in tomato plants*. Canadian Journal of Botany **62**: 1232-1244.

Chin-A-Woeng, F.C., Thomas, Bloemberg, V., Guido, van der Bij, J., Arjan, van der Drift, M.G.M., Koen, Schripsema, Jan, Kroon, Bernadette, Scheffer, J., Rudy, Keel, Christoph, Bakker, A.H.M., Peter, Tichy, Hans-Volker, de Bruijn, J., Frans, Thomas-Oates, E., Jane, and Lugtenberg, J.J., Ben. 1998. *Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing Pseudomonas chlororaphis PCL 1391 of tomato root rot caused by Fusarium oxysporum f.sp. radices-lycopersici*. Molecular Plant-Microbe Interactions **11**: 1069-1077.

Cooley, R.N., Shaw, R.K., Franklin, F.C.H., and Caten, C.E. 1988. *Transformation of the phytopathogenic fungus Septoria nodorum to Hygromycin-B resistance*. Current Genetics **13**: 383-389.

Correl, C., James. 1991. *The relationship between formae speciales, races and vegetative compatibility groups in Fusarium oxysporum*. Phytopathology **81**: 1061-1063.



Couteaudier, Yvonne, Daboussi, Marie-Josée, Eparvier, Agnes, Langin, Thierry, and Orcival, Jean. 1993. *The GUS gene fusion system (Escherichia coli  $\beta$ -D-glucuronidase gene), a useful tool in studies of root colonization by Fusarium oxysporum*. Applied and Environmental Microbiology **59**: 1767-1773.

Datnoff, L.E., Nemeček, S., and Pernezny, K. 1995. *Biological control of Fusarium crown and root rot of tomato in Florida using Trichoderma harzianum and Glomus intraradices*. Biological Control **5**: 427-431.

Duffy, B.K., and Defago, G. 1997. *Zinc improves biocontrol of Fusarium crown and root rot of tomato by Pseudomonas fluorescens and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis*. Phytopathology **87**: 1250-1257.

Duffy, B.K., and Defago, G. 1999. *Macro- and microelement fertilizers influence the severity of Fusarium crown and root rot of tomato in a soilless production system*. Hortscience **34**: 287-291.

Duijf, J., Ben, Recorbet, Ghislaine, Bakker, A.H.M., Peter, Loper, E., Joyce, and Lemanceau, Philippe. 1999. *Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of Fusarium wilt by the combination of non pathogenic Fusarium oxysporum Fo47 and Pseudomonas putida WCS358*. Phytopathology **89**: 1073-1079.

Duijf, J., Ben, Pouhair, Daniel, Olivain, Chantal, Alabouvette, Claude, and Lemanceau, Philippe. 1998. *Implication of systemic induced resistance in the suppression of Fusarium wilt of tomato by Pseudomonas fluorescens WCS417r and by nonpathogenic Fusarium oxysporum Fo47*. European Journal of Plant Pathology **104**: 903-910.

Eparvier, A., and Alabouvette, C. 1994. *Competition between pathogenic and non pathogenic Fusarium oxysporum for root colonization*. Biocontrol Science and Technology **4**: 35-47.



Fincham, J.R.S. 1989. *Transformation in fungi*. Microbiological reviews **53**: 148-170.

Finkelstein, D.B. 1989. *Improvement in fungal product synthesis by recombinant DNA technology*. Annals of the New York Academy of Sciences **646**: 202-206.

Green, Helge, and Jensen, D.F. 1995. *A tool for monitoring Trichoderma harzianum: II. The use of a GUS transformant for ecological studies in the rhizosphere*. Phytopathology **85**: 1436-1440.

de Groot, J.A., Marcel, Bundock, Paul, Hooykaas, J.J., Paul, and Beijersbergen, G.M., Alice. 1998. *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi*. Nature Biotechnology **16**: 839-842.

Hamada, W., Reignault, P., Bompeix, G., and Boccara, M. 1994. *Transformation of Botrytis cinerea with the Hygromycin-B resistance gene, hph*. Current Genetics **26**: 251-255.

Hamilton, C.M., Frary, A., Lewis, C., and Tanksley, S.D. 1996. *Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes*. P National Academy of Science USA **93**: 9975-9979.

Hilber, U.W., Bodmer, M., Smith, F.D., and Koller, W. 1994. *Biolistic transformation of conidia of Botryotina fuckeliana*. Current Genetics **13**: 383-389.

Hynes, M.J. 1996. *Genetic transformation of filamentous fungi*. J. Genet **75**: 279-311.

Ingold, C.T., and Hudson, H.J. 1993. *The biology of fungi*. Chapman and Hall editions: 109-117.

Jarvis, W.R., 1988. *Fusarium crown and root rot of tomatoes*. Phytoprotection **69**: 49-64.

Jarvis, W.R., and Thorpe, H.J. 1981. *Control of Fusarium foot and root rot of tomato by soil amendment with lettuce residues*. Canadian Journal of Plant Pathology **3**: 159-162.

Jefferson, A., Richard. 1987. *Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system*. Plant Molecular Biology Reporter **5**: 387-405.

Jones, J.P., Gilreath, J.P., Overman, A.J., and Noling, J.W. 1996. *Control of soil-borne diseases of mulched tomato by fumigation*. Proceeding of the Florida State Horticultural Society **108**: 201-203.

Kamoun, Sophien, van West, Pieter, and Govers, Francine. 1998. *Quantification of late blight resistance of potato using transgenic Phytophthora infestans expressing  $\beta$ -glucuronidase*. European Journal of Plant Pathology **104**: 521-525.

Kasenberg, T.R., and Traquair, J.A. 1988. *Effects of phenolics on growth of Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in vitro*. Canadian Journal of Botany **66**: 1174-1177.

Katan, Talma, Zamir, D., Sarfatti, Matti, and Katan, J. 1991. *Vegetative compatibility groups and subgroups in Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. Phytopathology **81**: 255-262.

Lafontaine, P.J., and Benhamou, N. 1996. *Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. Biocontrol Science and Technology **6**: 111-124.

Langin, T., Daboussi, M.J., Gerlinger, C., and Brygoo, Y. 1990. *Influence of biological parameters and gene transfer technique on transformation of Fusarium oxysporum*. Current Genetics **17**: 313-319.

Lemanceau, P., and Alabouvette, C. 1991. *Biological control of Fusarium diseases by the association of fluorescent Pseudomonas and non-pathogenic Fusarium*. Bulletin SROP **14**: 45-50.

Leung, H., Lehtinen, U., Karjalainen, R., Skinner, D., Tooley, P., Leong, S., and Ellingboe, A. 1990. *Transformation of the rice blast fungus Magnaporthe grisea to Hygromycin-B resistance*. Current Genetics **17**: 409-411.

Liljeroth, E., Jansson, H.-B., and Schafer, W. 1993. *Transformation of Bipolaris sorokiniana with the GUS gene and use for studying fungal colonization of barley roots*. Phytopathology **83**: 1484-1489.

Lurquin, P.F. 1997. *Gene transfer by electroporation*. Mol. Biotechnology **7**: 5-35.

Malardier, Laurence, Daboussi, J., Marie, Julien, Jacqueline, Roussel, Francine, Scazzocchio, Claudio, and Brygoo, Yves. 1989. *Cloning of the nitrate reductase gene (niaD) of Aspergillus nidulans and its use for transformation of Fusarium oxysporum*. Gene **78**: 147-156.

Marois, J.J., and Mitchell, D.J. 1981. *Effects of fumigation and fungal antagonists on the relationships of inoculum density to infection incidence and disease severity in Fusarium crown rot of tomato*. Phytopathology **71**: 167-170.

Marois, J.J., and Mitchell, D.J. 1981. *Effects of fungal communities on the pathogenic and saprophytic activities of Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. Phytopathology **71**: 1251-1256.

Marois, J.J., Mitchell, D.J., and Sonoda, R.M. 1981. *Biological control of Fusarium crown rot of tomato under field conditions*. *Phytopathology* **71**: 1257-1260.

Manczinger, L., Komonyi, O., Antal, Z., and Ferenczy, L. 1997. *A method for high-frequency transformation of Trichoderma viride*. *Journal of Microbiological Methods* **29**: 207-210.

Mc Govern, R.J., Varvina, C.S., Noling, J.W., Datnoff, L.A., and Yonce, H.D. 1998. *Evaluation of application methods of metam sodium for management of Fusarium crown and root rot in tomato in Southwest Florida*. *Plant Disease* **82**: 919-923.

Meilhoc, E., Masson, J.M., Teissie, J. 1990. *High-efficiency transformation of intact yeast-cells by electric-field pulses*. *Bio-Technology* **8**: 223-227

Menzies, J.G., Ehret, D.L., and Roeber, R.U. 1997. *Root fungi increase the growth and yield and decrease the severity of Fusarium crown and root rot of tomato plants grown in soilless culture. (refereed)*. *Acta Horticulturae* 1997, **450** : 457-466.

Menzies, J.G., and Jarvis, W.R. 1994. *The infestation of tomato seed by Fusarium oxysporum f. sp. radialis-lycopersici*. *Plant Pathology* **43**: 378-386.

Menzies, J.G., Koch, C., and Seywerd, F. 1990. *Additions to the host range of Fusarium oxysporum f. sp. radialis-lycopersici*. *Plant Disease* **74**: 569-572.

Nelson, E., Paul. 1991. *History of Fusarium systematics*. *Phytopathology* **81**: 1045-1051.

Oliver, P., Richard, Farman, L., Mark, Jones, D.G., Jonathan, and Hammond-Kosack, E., Kim. 1993. *Use of fungal transformants expressing  $\beta$ -glucuronidase activity to detect infection and measure hyphal biomass in infected plant tissues*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 521-525.

Oliver, P., Roberts, I.N., Harling, R., Kenyon, L., Punt, P.J., Dingemans, M.A., and Vandenhonder, C.A.M.J.J. 1987. *Transformation of Fulvia fulva, a fungal pathogen of tomato, to hygromycin-B resistance*. Current Genetics **12**: 231-233.

Parker, D.M., Hilber, U.W., Bodmer, M., Smith, F.D., Yao, C., and Koller, W. 1995. *Production and transformation of conidia of Venturia inaequalis*. Phytopathology **85**: 87-91.

Piga, P.M., Belanger, R.R., Paulitz, T.C., and Benhamou, N. 1997. *Increased resistance to Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in tomato plants treated with the endophytic bacterium Pseudomonas fluorescens strain 63-28*. Phytopathological and Molecular Plant Pathology **50**: 301-320.

Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Pouwels, P.H., and Vandenhondel, C.A.M.J.J. 1987. *Transformation of Aspergillus based on the Hygromycin-B resistance marker from Escherichia coli*. Gene **56**: 117-124.

Reddy, M.S., Campell, S.E., Young, S.E., and Brown, G. 1991. *Greenhouse evaluation of rhizobacteria for the suppression of crown and root rot of tomato caused by Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. Bulletin SROP **14**: 39-44.

Richey, M.G., Marek, E.T., Schardl, C.L., and Smith, D.A. 1989. *Transformation of filamentous fungi with plasmid DNA by electroporation*. Phytopathology **79**: 844-847.

Sivan, Alex, and Chet, Ilan. 1993. *Integrated control of fusarium crown and root rot of tomato with Trichoderma harzianum in combination with methyl bromide or soil solarization*. Crop Protection **12**: 380-286.

Sivan, A., Ucko, O., and Chet, I. 1987. *Biological control of Fusarium crown rot of tomato by Trichoderma harzianum under field conditions*. Plant Disease **71**: 587-592.



Thrane, C., Lubeck, M., Green, H., Degefu, Y., Allerup, S., Thrane, U., and Jensen, Funck, D. 1995. *A tool for monitoring Trichoderma harzianum: I. Transformation with the GUS gene by protoplast technology.* Phytopathology **85**: 1428-1435.

Tinland, B. 1996. *The integration of T-DNA into plant genomes.* Trends Plant Science **1**: 178-184.

Ward, M., Wilson, L.J., Carmona, C.L., and Turner, G. 1988. *The OLIC3 gene of Aspergillus niger isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation.* Current Genetics **14**: 37-42.

Weissinger, A., Tomes, D., and Sanford, J., Kline, T., Fromm, M. 1987. *Microprojectile bombardment for maize transformation.* In Vitro Cellular & Developmental Biology **23**: A75-A75.

Wiebe, M.G., Novakova, M., Miller, L., Blakebrough, M.L., Robson, G.D., Punt, P.J., and Trinci, A.P.J. 1997. *Protoplast production and transformation of morphological mutants of the Quorn® myco-protein fungus, Fusarium graminearum, A315, using the Hygromycin-B resistance plasmid pAN 7-1.* Mycological Research **101**: 871-877.

Windels, E., Carol. 1991. *Current status of Fusarium taxonomy.* Phytopathology **81**: 1048-1051 .

Woltz, S.S., Jones, J.P., and Scott, J.W. 1992. *Sodium chloride, nitrogen source and lime influence Fusarium crown rot severity in tomato.* HortScience **27**: 1087-1088.

Yu, J.Q., and Komada, H. 1999. *Hinoki (Chamaecyparis obtusa) bark, a substrate with anti-pathogen properties that suppress some root diseases of tomato.* Scientia Horticulturae **81**: 13-24.

## Περίληψη

Η σήψη λαιμού και ρίζας, που προκαλείται από το μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker, είναι μία σοβαρή ασθένεια που συναντάται κυρίως σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας.

Ένα άγριο στέλεχος του μύκητα μεταμορφώθηκε επιτυχώς με τα γονίδια β-D-γλουκουρονιδάση (GUS, *uidA*) του *E. coli* ως το γονίδιο έκφρασης, και το γονίδιο της φωσφοτρανσφεράσης της υγρομυκίνης (*hph*) ως το γονίδιο επιλογής. Η εισαγωγή των γονιδίων επιτεύχθηκε με τους πλασμιδιακούς φορείς pNOM 102 102 και pAN 7-1, αντίστοιχα. Επτά (7) τροποποιημένα στελέχη απομονώθηκαν έπειτα από δοκιμές που έγιναν για την επαλήθευση εισαγωγής και ενσωμάτωσης των δύο γονιδίων με αναλύσεις PCR και Southern. Αυτά τα στελέχη ελέγχθηκαν για μιτωτική σταθερότητα με απομονώσεις μοναδικών αποικιών, και ακολούθησε δημιουργία καμπύλης ανάπτυξης (σε δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα), καθώς και έλαβαν μέρος και άλλες μετρήσεις που αφορούσαν στη φυσιολογία αυτών των στελεχών (ζύγιση μυκηλιακού βάρους, μέτρηση συγκέντρωσης παραγομένων κονιδίων). Τα στελέχη δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές από το άγριο στέλεχος. Η δραστηριότητα του GUS μετρήθηκε για τα μεταμορφωμένα στελέχη με τη χρήση p-νιτροφαινόλης γλουκουρονιδίου σαν υπόστρωμα και ακολούθησαν μετρήσεις σε φασματοφωτόμετρο στα 415 nm. Το στέλεχος f30 έδειξε πως υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στη δραστηριότητα του GUS και στο νωπό μυκηλιακού βάρους του στελέχους. Η ανίχνευση της μυκηλιακής βιομάζας σε φυτά επιτεύχθηκε με την παρακολούθηση της δραστηριότητας του GUS μάκρο- και μικροσκοπικά και η ποσοτικοποίηση της ασθένειας ήταν εφικτή με τη μέτρηση της δραστηριότητας της β-γλουκουρονιδάσης σε εκχυλίσματα μολυσμένων φυτικών ιστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ποσοτικοποίηση της μυκηλιακής βιομάζας είναι εφικτή κυρίως κατά τα πρώιμα στάδια της ασθένειας.

## Summary

Fusarium crown and root rot, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker, is a serious disease of greenhouse tomatoes.

A wild type isolate was successfully cotransformed with the *E. coli*  $\beta$ -D-glucuronidase (GUS,*uidA*) as the reporter gene, and the hygromycine phosphotransferase (*hph*) gene as the selective marker. The insertion was accomplished with the plasmid vectors pNOM 102 102 and pAN 7-1 respectively. Seven (7) transformants were isolated after being tested for the incorporation of the two genes by PCR and Southern blot analysis. These transformants were tested for mitotic stability by single conidia isolation, and growth patterns in two different substrates were obtained. Other physiology tests took place such as mycelial weighing and conidia concentration. The isolates were found to be similar to the wild-type strain. GUS activity was quantified for the transformants using p-nitrophenol glucuronide as a substrate and spectrophotometer assays followed at 415 nm. The f30 transformant gave positive correlation between GUS activity levels and the fresh weight of the mycelium. Detection of fungal biomass *in planta* was achieved by following the expression of GUS both macro- and microscopically and quantification of the disease was feasible by measurements of  $\beta$ -glucuronidase activity in infected plant extracts. The results show that quantification of the fungal biomass is possible especially during the early infection stages.