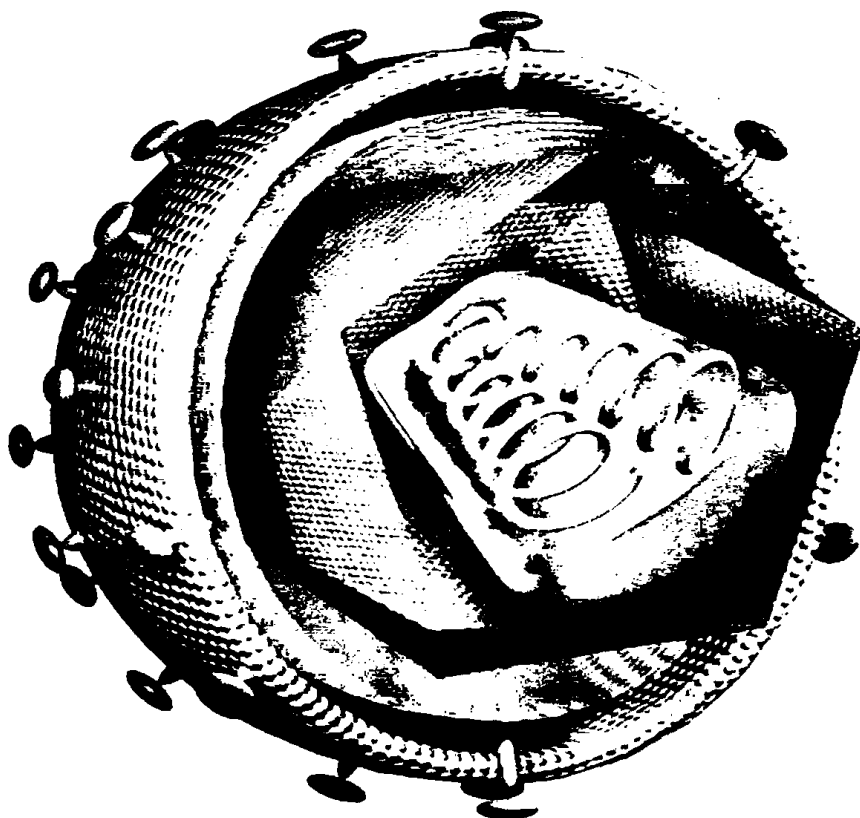


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΔΠΜΣ: Αγροχημεία & Βιολογικές Καλλιέργειες
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας



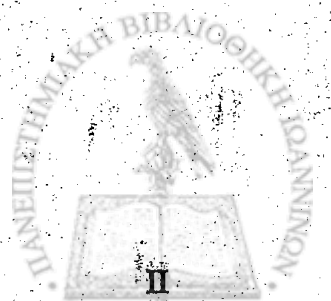
**«Σάρωση τοπικών απομονώσεων φυτοπαθογόνων μυκήτων γ
παρουσία μορίων δίκλωνου RNA και μερικός μοριακός χαρακτι
ενός από τα ανωτέρω μόρια»**

Μαγκλάρας Παναγιώτης
Ιωάννινα, 2009

Επιβλέπων: Ευστάθιος Χατζηλουκάς (Αν. Καθηγητής)



**Αφιερώνεται στους
γονείς μου**



Περιεχόμενα	III
Πίνακας συντομογραφιών	1
Ευχαριστίες	2
Περίληψη	3
Πρόλογος	5
Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή	6
Μύκητες	7
Συστηματική ταξινόμηση μυκήτων	9
Οι περιοχές ITS των ριβωσωμικών γονιδίων	12
Βλαστική ασυμβατότητα	13
Χημική καταπολέμηση των μυκήτων	14
Μυκοϊοί με γονιδίωμα από δίκλωνο RNA (dsRNA)	
Εισαγωγικά στοιχεία	15
Συστηματική ταξινόμηση μυκοϊών dsRNA	17
Καταγωγή και εξέλιξη των μυκοϊών dsRNA	18
Προσαρμογή των μυκοϊών dsRNA	22
Η επίδραση των μυκοϊών στο φαινότυπο και στην έκφραση των γονιδίων του μύκητα	22
Οι υποϊοί στον μύκητα <i>Cryphonectria parasitica</i>	
α. Γενικά	24
β. Η οργάνωση του γονιδιώματος των υποϊών	25
γ. Η χρήση των υποϊών ως αντιδραστήρια βιολογικού ελέγχου	29
Χρησιμοποίηση των μυκοϊών dsRNA ως αντιδραστήρια βιολογικού ελέγχου	33
Σκοπός της εργασίας	34
Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και μέθοδοι	35
2.1. Δειγματοληψία	36
2.2. Απομόνωση μυκήτων από τα φυτικά δείγματα	36
2.3. Μικροσκοπία μυκητιακών απομονώσεων	39
2.4. Εκχύλιση νουκλεϊνικών οξέων και επιβεβαίωση της ύπαρξης μορίων δίκλωνου RNA (dsRNA)	39
2.5. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων	42
2.6. Ενζυμικές δοκιμές διαπίστωσης της φύσης των απομονωθέντων νουκλεϊνικών οξέων	43
2.7. Μοριακή ταυτοποίηση του μύκητα-ξενιστή	45
2.8. Ενίσχυση της περιοχής ITS των ριβωσωμικών γονιδίων (rDNA) με τη χρήση PCR	47
2.9. Αντίδραση δεσμοποίησης	51
2.10. Μετασηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με το προϊόν της αντίδρασης δεσμοποίησης	52
2.11. Επιβεβαίωση της παρουσίας ανασυνδυασμένου φορέα στις μετασηματισμένες λευκές αποικίες των τρυβλίων μετασηματισμού	55
2.12. Ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA	56
2.13. Μοριακή ταυτοποίηση του μυκοϊού dsRNA	56
2.13.1. Προετοιμασία	57
2.13.2. Σύνθεση και κλωνοποίηση συμπληρωματικού DNA	58
2.13.2.1. Σύνθεση cDNA με μίγμα τυχαίων εξαμερών εκκινητών και εννεαμερών εκκινητών	59
2.13.2.2. Σύνθεση cDNA με εκκινητές με φραγή στο 3' - άκρο	61
2.13.2.3. Αντίδραση δεσμοποίησης των μορίων cDNA με τον	



φορέα pCR ^R II	63
2.13.2.3. Μετασχηματισμός επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων με το προϊόν της αντίδρασης δεσμοποίησης	64
2.14. Έλεγχος της προέλευσης των κλωνοποιημένων μορίων cDNA μέσω της διαδικασίας στυπώματος και υβριδισμού νουκλεϊνικών οξέων	65
2.14.1. Εισαγωγή	65
2.14.2. Σήμανση του ιχνηλάτη	66
2.14.3. Αποδιάταξη dsRNA και dsDNA	67
2.14.4. Προετοιμασία του πηγματος αγαρόζης	67
2.14.5. Μεταφορά των νουκλεϊνικών οξέων σε μεμβράνη	67
2.14.6. Υβριδισμός	68
2.14.7. Ανίχνευση του ιχνηλάτη	69
2.14.8. Έλεγχος της προέλευσης του κλώνου pcDNA-11b μέσω χρήσης PCR και RT-PCR	70
2.14.9. Απομάκρυνση του υβριδοποιημένου ιχνηλάτη από τη μεμβράνη υβριδοποίησης	71
Κεφάλαιο 3^ο: Αποτελέσματα	73
3.1. Δειγματοληψία και απομόνωση, καθαρισμός, καλλιέργεια και μορφολογική εξέταση μυκήτων από φυτικά δείγματα	74
3.2. Εκχύλιση dsRNA από τους απομονωθέντες μύκητες και επιβεβαίωση της φύσης των απομονωθέντων μορίων dsRNA	77
3.3. Μοριακή ταυτοποίηση των μυκήτων-φορέων dsRNA	81
3.4. Μερικός μοριακός χαρακτηρισμός του dsRNA από τον μύκητα <i>Penicillium rolonicum</i> (απομόνωση Πιπ 2)	87
3.4.1. Κλωνοποίηση τμημάτων των μορίων dsRNA και ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων αυτών	87
3.4.2. Προσδιορισμός της προέλευσης των τμημάτων των κλωνοποιηθέντων cDNA	95
3.4.3 Έλεγχος της προέλευσης του κλώνου pcDNA-11b μέσω χρήσης PCR και RT-PCR	99
Κεφάλαιο 4^ο: Συζήτηση	103
4.1 Σάρωση τοπικών απομονώσεων φυτοπαθογόνων μυκήτων για την ανίχνευση στελεχών που περιέχουν μόρια δίκλωνου RNA	103
4.2 Κλωνοποίηση και μερική μοριακή ανάλυση ενός μορίου dsRNA της απομόνωσης Πιπ 2	105
4.3 Προσδιορισμός της προέλευσης των κλωνοποιηθέντων τμημάτων cDNA	106
Βιβλιογραφία	109

Πίνακας συντομογραφιών

Amp	Ampicillin	Αμπικιλίνη
bp	Base pairs	Ζεύγη βάσεων
CP	Coat protein	Πρωτεΐνη περιβλήματος
dH ₂ O	Distilled water	Απιονισμένο νερό
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate	Τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο
dsRNA	Double stranded RNA	Δίκλωνο RNA
EDTA	Ethylenediaminetetra acetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετροξικό οξύ
ITS	Internal Transcribed Spacers	Εσωτερικά Μεταγραφόμενες Περιοχές
Kan	Kanamycin	Καναμυκίνη
OD	Optical Density	Οπτική πυκνότητα
ORF	Open Reading Frame	Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
rDNA	Ribosomal DNA	Ριβοσωμικό DNA
RDRP	RNA- depended RNA polymerase	RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση
rRNA	Ribosomal RNA	Ριβοσωμικό RNA
rpm	Revolutions per minute	Περιστροφές ανά λεπτό
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
ssRNA	Single stranded RNA	Μονόκλωνο RNA
TAE	Tris-acetate	Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης
Tet	Tetracyclin	Τετρακυκλίνη
Tris	Tris (hydromethylaminomethane)	Τρις (υδροξυμεθυλ) αμινομεθανικό
VCG	Vegetative Compatibility Groups	Ομάδες βλαστικής ασυμβατότητας



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. αναπληρωτή καθηγητή Ευστάθιο Χατζηλουκά για τη υπομονετική του καθοδήγηση και για τις εύστοχες συμβολές του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και για τις τελικές διορθώσεις που επέφερε στο κείμενο, διασφαλίζοντας έτσι την επιστημονική ολοκλήρωση του θέματος. Επίσης, τον κύριο αναπληρωτή καθηγητή Θεολόγο Μιχαηλίδη και τη κυρία λέκτορα Αμαλία-Σοφία Αφένδρα, τόσο για τα αντιδραστήρια και για τις συμβολές τους που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, όσο και για τις διορθώσεις στο κείμενο της πτυχιακής εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρα Κωνσταντίνα Κόλλα για το δείγμα Βλ1.4 που μου παρείχε, για την επίδειξη των αρχικών πρωτοκόλλων και για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε, καθώς και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Ανδρέα Παπαβλασόπουλο για τη δειγματοληψία που πραγματοποιησέ στην περιοχή στην Άρτα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους και τις συναδέλφισσες για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Περίληψη

Από περιοχές της Αιτωλοακαρνανίας και της Ηπείρου απομονώθηκαν από διάφορα φυτά 78 είδη/στελέχη μυκήτων. Με βάση τις δοκιμές DNaseI και RNaseA τέσσερα από αυτά διαπιστώθηκαν θετικά στην παρουσία dsRNA μορίων. Οι μύκητες-ξενιστές ταυτοποιήθηκαν ταξινομικά μέσω κλωνοποίησης και προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της Εσωτερικής Μεταγραφόμενης Διαχωριστικής Περιοχής των ριβοσωμικών τους γονιδίων 18S rDNA και 28S rDNA. Έτσι, λοιπόν βρέθηκε ότι οι μύκητες ανήκουν στα είδη *Penicillium polonicum*, *P. rinophilium*, *Aspergillus ochraceus* και *A. japonicus*. Με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο ζώνωσης, ένας από τους μυκοϊούς πιθανά να ανήκει στην οικογένεια Totiviridae και τα άλλα τρία είδη ενδεχομένως να πρόκειται για μικτές μολύνσεις. Από το μύκητα *P. polonicum*, απομονώσαμε ένα μόριο dsRNA μεγέθους 3.5 kb και το χρησιμοποιήσαμε ως εκμαγείο για τη σύνθεση και κλωνοποίηση cDNA. Η αλληλουχία των κλώνων των ενθέσεων ταυτοποιήθηκε αλλά δεν παρουσίαζε καμία ομολογία με τις κατατιθέμενες στην τράπεζα δεδομένων. Ωστόσο, ο υβριδισμός κατά Northern επιβεβαίωσε τη dsRNA προέλευση των κλώνων. Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την προέλευση του κλώνου pcDNA- 11b μέσω χρήσης PCR και RT-PCR. Τα αμπλικόνια που προέκυψαν παρουσίαζαν ομολογία με το dsRNA και με το γονιδιωματικό DNA του *P. polonicum*. Επιπλέον με τον υβριδισμό κατά Northern διαπιστώθηκε ομολογία των αμπλικονίων, που προέκυψαν από τον εκκινητή 11pcDNAExt, μόνο με το dsRNA και με το pcDNA-11 και όχι με το γονιδιωματικό DNA.

Abstract

From areas of Aitoloakarnania and Epirus we have isolated 78 plant samples bearing symptoms of infection with fungi. Based on DNaseI and RNaseA tests four of the isolates were found positive for the presence various of dsRNA molecules. The fungal hosts were taxonomically identified via cloning and sequencing of their Internal Transcribed Spacers located between their ribosomal genes. The so characterized fungi were found to belong to the following species: *Penicillium polonicum*, *P.*

pinophilium, *Aspergillus ochraceus* and *A. japonicus*. Based on their gel electrophoretic banding pattern, the isolated dsRNA molecules were classified as follows: one of them belongs to the family Totiviridae, while the other three appear to be mixed infections. A 3.5 kb-long dsRNA molecule isolated from *P. polonicum*, served as a template to synthesize cDNA, which was subsequently cloned. Several different clones were obtained and their sequences were determined. Bioinformatic analysis revealed that there are no homologous sequences deposited in the data banks. Northern hybridization confirmed the dsRNA origin of these clones. Furthermore, RT-PCR assays were performed using primers designed on the basis of the insert sequence of one cDNA clone (pcDNA-11b) in order to verify the origin of this insert. The amplicons obtained, were homologous to the insert of pcDNA-11b, when the latter was used as a probe in a blot hybridization experiment. The same primers were used to amplify genomic DNA of the fungal host and one of the amplicons proved to be homologous to the above probe as well. The results are discussed.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συνεχής αύξηση του πληθυσμού της γης και η ανάγκη εξασφάλισης τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο καθιστούν απαραίτητη τη βελτιστοποίηση των υπαρχόντων καλλιεργητικών τεχνικών και την εισαγωγή νέων μεθόδων καλλιέργειας που θα συντελέσουν στην αύξηση της αγροτικής παραγωγής. Η χρησιμοποίηση χημικών λιπασμάτων για την αύξηση της φυτικής παραγωγής και η χρήση φυτοφαρμάκων για την αντιμετώπιση των ασθενειών και των εχθρών των καλλιεργειών αποτελούν μέχρι και σήμερα τις σύνηθες πρακτικές στη γεωργία. Όμως, η μη ορθολογική χρήση τους προκαλεί κινδύνους τόσο για τον παραγωγό και για τον καταναλωτή των αγροτικών προϊόντων όσο και για το οικοσύστημα, ιδίως όταν πρόκειται για εκλεκτικές τοξικές ενώσεις με ευρύ φάσμα δράσεως και μεγάλη υπολειμματική διάρκεια. Από την άλλη, με την προώθηση διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών στις καιρικές μεταβολές, σε ασθένειες και σε εχθρούς των καλλιεργειών ελλοχεύει ο κίνδυνος της αλλοίωσης της βιοποικιλότητας και του περαιτέρω αθέμιτου ελέγχου της αγροτικής παραγωγής από τις πολυεθνικές αγροχημικές εταιρίες. Ωστόσο, η υιοθέτηση και η εφαρμογή βιολογικών μεθόδων καλλιέργειας μπορεί να περιορίσει σημαντικά την επιβάρυνση του περιβάλλοντος από τις χημικές ουσίες. Η χρήση βιοδιασπώμενων οργανικών ουσιών, ωφέλιμων εντόμων, παρασιτικών ή ανταγωνιστικών μικροοργανισμών και ιών είναι μερικές από τις εφαρμογές της βιολογικής καλλιέργειας. Ιδιαίτερα η υπομολυσματικότητα που εμφανίζουν ορισμένα στελέχη μυκήτων και οφείλεται στην παρουσία μυκοϊών από dsRNA, αποτελεί μια ακόμη φυσική και βιολογική μέθοδο αντιμετώπισης των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Έτσι λοιπόν η μελέτη, η έρευνα και η δυνατότητα χρήσης των μυκοϊών dsRNA ως αντιδραστήρια βιολογικής καταπολέμησης θα συμβάλλει στη μείωση της εφαρμογής των μυκητοκτόνων.

Κεφάλαιο 1:

Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Μύκητες

Οι μύκητες είναι κατώτεροι μη φωτοσυνθετικοί ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι αυξάνονται επί οργανικών υποστρωμάτων. Τα κύτταρα τους προστατεύονται με κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αποτελείται από χιτίνη ή άλλους πολυσακχαρίτες. Οι μύκητες κατά κανόνα δε διαθέτουν αυτόνομη κίνηση και αναπτύσσονται υπό μορφή διακλαδιζόμενων νηματίων που ονομάζονται υφές οι οποίες διαφοροποιούνται μεν μορφολογικά, καθόλου όμως (ή ελάχιστα) λειτουργικά (Αγγελής 2007).

Το βλαστικό σώμα των μυκήτων ονομάζεται θαλλός και αποτελείται από υφές διαμέτρου 2-10 μm. Οι υφές μοιάζουν με σωλήνες που περιέχουν πρωτόπλασμα, οργανίδια και τυπικούς πυρήνες. Ο πυρήνας περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη που διαθέτει δυο στοιβάδες και χαρακτηριστικούς πόρους. Συνήθως έχει πυρηνίσκο, ο οποίος έχει μια περιοχή που συγκροτείται από RNA και ενίοτε εξαφανίζεται κατά την πυρηνική διαίρεση. Στο κυτταρόπλασμα, που περιβάλλεται από την πρωτοπλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα, έχουν διαπιστωθεί διάφορα οργανίδια ή έγκλειστα, όπως μιτοχόνδρια, χυμοτόπια - τα οποία εκτός των κορυφών των υφών καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος των υφών -, ενδοπλασματικό δίκτυο, ριβοσώματα, στοιχεία Golgi (δεν είναι παρόντα σε όλους τους μύκητες), κυστίδια, σταγονίδια λίπους ή κρύσταλλοι γλυκογόνου. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί η παρουσία λυσοσωμάτων, τα οποία αποτελούν μεμβρανώδεις κατασκευές που αναπτύσσονται μεταξύ της πρωτοπλασματικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος (Τζάμος 2004). Το σύνολο των υφών ονομάζεται μυκήλιο. Οι μύκητες μπορεί να είναι μονοκύτταροι (ζύμες) ή πολυκύτταροι (νηματοειδείς ή μυκηλιακοί μύκητες) (Αγγελής 2007).

Οι μύκητες αναπαράγονται με αγενή ή εγγενή σπόρια. Στην αγενή αναπαραγωγή ένα μητρικό κύτταρο διαιρείται μιτωτικά και δίνει δυο θυγατρικά κύτταρα χωρίς την παρέμβαση άλλου κυττάρου διαφορετικού «φύλου» (Χατζηλουκάς 2006). Κατά την εγγενή αναπαραγωγή λαμβάνει χώρα η σύντηξη δυο πυρήνων αντίθετου «φύλου», η οποία ακολουθείται από την ισομερή ανάμιξη του εμπεριεχομένου γενετικού υλικού. Τρία είναι τα διακριτά στάδια της εγγενούς αναπαραγωγής των μυκήτων. Το πρώτο είναι η πλασμογαμία που συνενώνει τα πρωτοπλάσματα και φέρνει πλησίον στο ίδιο κύτταρο δυο διαφορετικούς πυρήνες. Η συνένωση των δυο πυρήνων που ήλθαν σε επαφή μέσω της πλασμογαμίας είναι το δεύτερο στάδιο και ονομάζεται καρυογαμία.

Το ζυγωτό κύτταρο που προκύπτει έχει ένα διπλοειδή πυρήνα που εμπεριέχει δυο αντίγραφα του κάθε χρωμοσώματος. Στη συνέχεια ακολουθεί η μείωση κατά την οποία το γενετικό υλικό του διπλοειδούς πυρήνα διαχωρίζεται σε τέσσερα ίσα μέρη και προκύπτουν τέσσερα απλοειδή κύτταρα, όπου στο καθένα κατανέμεται τελικά μια χρωματίδα (Χατζηλουκάς 2006).

Οι μύκητες είναι ευρέως διαδεδομένοι σε όλη τη φύση: ξηρά, έδαφος, θάλασσα, γλυκά νερά και στον αέρα ως σπόρια. Διαβιώνουν ως παράσιτα επί ζώντων οργανισμών και προκαλούν ασθένειες ή ως σαπρόφυτα όταν αναπτύσσονται επί οργανικής ύλης. Οι περισσότεροι μύκητες, εμφανίζουν και τις δυο ιδιότητες σε διαφορετικά στάδια του βιολογικού τους κύκλου και ονομάζονται ημιπαράσιτα. Ανάλογα με τη σημασία του παρασιτισμού για την επιβίωση ενός μύκητα, οι φυτοπαθογόνοι μύκητες διακρίνονται ως εξής:

A. Υποχρεωτικά παράσιτα, όπου οι μύκητες αυτοί επιβιώνουν και τρέφονται αποκλειστικά σε ζωντανά φυτικά κύτταρα. Η διαχείμαση και διαίωσιση των οργανισμών αυτών επάνω στο νεκρωμένο φυτικό ιστό επιτυγχάνεται μόνο μέσω ειδικών ανθεκτικών σπορίων. Στα παράσιτά αυτά ανήκουν:

1. Τα μέλη της τάξης *Uredinales*, που προκαλούν τις φυτικές σκωριάσεις.
2. Τα μέλη της οικογένειας *Erysiphaceae* (τάξη *Erysiphales*, φύλο Ασκομύκητες, βασίλειο Μύκητες) που προκαλούν τις ασθένειες ωΐδια.

B. Προαιρετικά παράσιτα, οι μύκητες αυτοί διαβιούν σαπροφυτικά (συνήθως στο έδαφος) και εάν συμβεί να έρθουν σε επαφή με έναν από τους ξενιστές ενώ επικρατούν ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, τότε προκαλούν ασθένειες.

Προαιρετικά παράσιτα αποτελούν είδη των γενών *Sclerotinia* (Ασκομύκητες), *Rhizoctonia* (ατελής μύκητας, με τέλεια μορφή που ανήκει στους Βασιδιομύκητες) και *Verticillium* (ατελής μύκητας, του οποίου η τέλεια μορφή κατατάσσεται στους Ασκομύκητες). Επιπλέον, στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα παράσιτα αδυναμίας, δηλαδή μύκητες που διαβιούν σαπροφυτικά και όταν έρθουν σε επαφή με τον ξενιστή τους μπορούν να τον προσβάλλουν μόνο όταν ο τελευταίος είναι εξασθενημένος από άλλους παράγοντες (π.χ. ξηρασία, παγετό, έλλειψη θρεπτικών ουσιών, κλπ). Τέτοιοι μύκητες είναι π.χ. ο *Colletotrichum gloeosporioides*, ο *Botrytis cinerea*, κ.α. Υπάρχουν επίσης ελάχιστοι φυτοπαθογόνοι μύκητες, οι οποίοι διαβιούν κατ' εξοχήν ως σαπρόφυτοι και μόνο περιστασιακά προκαλούν ασθένειες κατά βάση μετασυλλεκτικές (π.χ. από το γένος *Penicillium*).

Γ. Προαιρετικά σαπρόφυτα, που αποτελούν τη συντριπτική πλειοψηφία των φυτοπαθογόνων μυκήτων και είναι εκείνοι που διαβιούν κατ' εξοχήν ως παράσιτα αλλά μπορούν να επιβιώσουν και επί νεκρής φυτικής ύλης. (Χατζηλουκάς 2006)

Ως οργανισμοί ενδιαφέρουν τόσο τη βασική βιολογική έρευνα, όσο και την εφαρμοσμένη μικροβιολογία, την οικολογία, τη φυτοπαθολογία και την ιατρική. Το κρασί, η μύρα, η ωρίμανση ορισμένων τυριών, πολλά αντιβιοτικά (πενικιλίνη, κεφαλοσπορίνες) κι ένα πλήθος άλλων βιομηχανικών προϊόντων (π.χ. κιτρικό οξύ, βιταμίνες, ένζυμα) είναι προϊόντα μεταβολικών δραστηριοτήτων μυκήτων. Σε μύκητες οφείλονται πολλά φαινόμενα σήψεως και ποιοτικής υποβάθμισης που συχνά παρατηρούνται σε τρόφιμα, κτηνοτροφές, ξύλα, δέρματα και πολλά άλλα βιομηχανικά προϊόντα. Παράλληλα, όμως συμβάλλουν στη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους μέσω της διάσπασης νεκρών φυτικών υπολειμμάτων, ενώ πολλά είδη μυκήτων αναπτύσσουν εξειδικευμένες συμβιωτικές σχέσεις με τις ρίζες ανώτερων φυτών, γνωστές ως μυκόρριζες, συντελώντας έτσι στη επιβίωση πολλών ειδών φυτών (Μπαλής 1993). Ωστόσο, περίπου 50 είδη μυκήτων προκαλούν ασθένειες στους ανθρώπους και άλλες τόσες στα ζώα, ενώ υπάρχουν πάνω από 10000 είδη που προκαλούν σοβαρές ασθένειες στα φυτά. Επισημαίνεται ότι διαπιστώθηκαν πάνω από 6500 είδη υποχρεωτικών παρασίτων και ότι υπάρχουν πολλά προαιρετικά παράσιτα, καθώς κάθε καλλιεργούμενο φυτό προσβάλλεται από ένα ή περισσότερους μύκητες. Χαρακτηριστικό είναι ότι σχεδόν ο μεγαλύτερος αριθμός των καλλιεργούμενων φυτών προσβάλλεται από κάποιον περονόσπορο, οΐδιο ή σκωρίαση (Τζάμος 2004).

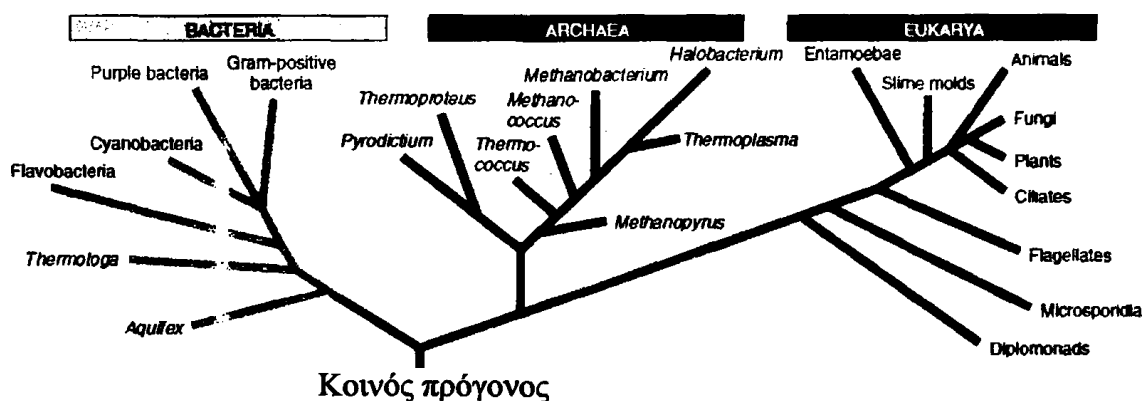
Συστηματική ταξινόμηση μυκήτων

Ενώ τα πρώτα συστήματα ταξινόμησης των οργανισμών βασίζονταν στους φαινοτυπικούς τους χαρακτήρες, οι εργασίες του Carl Woese, στα μέσα της δεκαετίας του '80 συνέβαλαν στη φυλογενετική ταξινόμηση των οργανισμών. Ήδη από τις αρχές του '80 είχε γίνει γνωστό, ότι το ριβοσωμικό RNA (rRNA) όλων ανεξαιρέτως των οργανισμών, είναι μεταξύ των πλέον συντηρημένων εξελικτικά μακρομορίων, καθώς δεν μπορούν να συσσωρεύσουν πολλές μεταλλάξεις, γιατί οι τελευταίες είναι συνηθέστατα θνησιγόνες, τα γονίδια δε που το κωδικοποιούν δεν μεταφέρονται από είδος σε είδος. Η σύγκριση των μορίων rRNA των οργανισμών θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμη για τον προσδιορισμό των εξελικτικών σχέσεων. Κάθε ομοιότητα μεταξύ

των αλληλουχιών των νουκλεοτιδίων θα υποδήλωνε φυλογενετική σχέση μεταξύ των αλληλουχιών και κατά επέκταση μεταξύ των οργανισμών.

Ο Carl Woese, μετά από μελέτες διάφορων μορίων rRNA κατέληξε το 1987 στο συμπέρασμα ότι το 16S rRNA για τα βακτήρια και τα αρχαία και το 18S rRNA για τα ευκαρυωτικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακά χρονόμετρα, επειδή τα μόρια αυτά υπάρχουν σε όλους τους οργανισμούς και έχουν μεγάλες σε μήκος και σε σημαντικό βαθμό συντηρημένες αλληλουχίες. Συγχρόνως έχουν αρκετές περιοχές υψηλής μεταβλητότητας που επιτρέπουν την ανεύρεση στενών σχέσεων μεταξύ των ειδών.

Με βάση τις φυλογενετικές μελέτες οι βασικές γραμμές της κυτταρικής εξέλιξης στον πλανήτη είναι τρεις: μια που κατέληξε σε βακτήρια, μια που κατέληξε σε αρχαία και μία που κατέληξε σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς (ζώα, φυτά, μύκητες πρωτόζωα και φύκη). Οι μύκητες εξελικτικά είναι πιο κοντά στα αρχαία με τα οποία έχουν κοινό πρόγονο παρά στα βακτήρια και σύμφωνα με τις φυλογενετικές αναλύσεις του DNA που κωδικοποιεί μόρια rRNA ή του 18S rRNA, προέρχονται από τα πρωτόζωα, εξελικτική πορεία που κράτησε 400 εκατομμύρια χρόνια (Εικόνα 1.1) (Αγγελής 2008).



Εικόνα 1.1. Ταξινόμηση των μικροοργανισμών με βάση το ριβοσωμικό RNA των οργανισμών (Αγγελής 2007).

Οι μύκητες σήμερα κατατάσσονται σε δυο υπερομάδες: στους Αληθινούς Μύκητες και στους Ψευδομύκητες.

Η ταξινόμηση των μυκήτων σύμφωνα με τον βιολόγο-μυκητολόγο Αλεξόπουλο είναι η ακόλουθη (Alexopoulos *et al.* 1996):

1) Αληθινοί Μύκητες:

Βασίλειο: Μύκητες

Φύλο: *Chytridiomycota*

Zygomycota

Ascomycota

Basidiomycota

2) Ψευδομύκητες:

Βασίλειο: *STRAMENOPILA*

Φύλο: *Oomycota*

Hyphochytriumycota

Labyrinthulomycota

Βασίλειο: *PROTISTS*

Φύλο: *Plasmodiophoromycota*

Dictyosteliomycota

Acrasiomycota

Myxomycota

Ο φυτοπαθολόγος Άγριος (Agrios 1997) ταξινομεί τους μύκητες με την εξής σειρά:

1) Αληθινοί Μύκητες:

Βασίλειο: Μύκητες

Φύλο: *Chytridiomycota*

Zygomycota

Ascomycota

Basidiomycota

2) Ψευδομύκητες:

Βασίλειο: *PROTOZOA*

Φύλο: *Plasmodiophoromycota*

Myxomycota

Βασίλειο: *CHROMISTA*

Φύλο: *Oomycota*

Τα φύλα *Ascomycota* και *Basidiomycota* περιλαμβάνουν το μεγαλύτερο αριθμό μυκήτων. Επίσης, σύμφωνα με τη σύγχρονη ταξινόμηση των μυκήτων, οι ωομύκητες και οι μυξομύκητες δεν ταξινομούνται πλέον στους αληθινούς μύκητες αλλά στους ψευδομύκητες.



Οι περιοχές ITS των ριβοσωμικών γονιδίων

Ένα σημαντικό εργαλείο στην ταξινόμηση των μυκήτων είναι η ανακάλυψη και ο καθορισμός των Εσωτερικών Μεταγραφόμενων (Διαχωριστικών) Περιοχών των ριβοσωμικών γονιδίων (Internal transcribed Spacers, ITS). Οι περιοχές ITS αποτελούνται από δύο μη κωδικοποιημένες περιοχές που εδράζονται μεταξύ των υψηλά συντηρημένων και επαναλαμβανόμενων περιοχών του ριβοσωμικού DNA (rDNA) οι οποίες κωδικοποιούν τα 28S, 5.8S rRNA (που βρίσκονται στη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος) και 18S rRNA (που συναντάται στη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος) (Εικόνα 1.2). Σε αντίθεση με τις συντηρημένες περιοχές των ριβοσωμικών γονιδίων οι περιοχές ITS έχουν υποστεί μεταλλάξεις που ενδεχομένως καθίστανται πλέον μοναδικές, και κατά συνέπεια χαρακτηριστικές για κάθε είδος.



Εικόνα 1.2. Οι ITS περιοχές των ριβοσωμικών γονιδίων (White *et al.* 1990, τροποποιημένο).

Τα γονίδια του πυρηνικού rDNA εξελίχθηκαν σχετικά αργά, σε αντίθεση με τα μιτοχονδριακά rRNA γονίδια που εξελίχθηκαν πιο γρήγορα, και είναι χρήσιμα για τη μελέτη σχετικών συγγενικών οργανισμών και την ταξινόμηση σε επίπεδο τάξης ή οικογένειας. Η ITS και η περιοχή των οπερονίων του πυρηνικού rRNA, εξελίχθηκαν πιο γρήγορα και μπορεί να ποικίλουν μεταξύ ειδών του ίδιου γένους καθώς και μεταξύ πληθυσμών (White *et al.* 1990).

Η ενίσχυση της περιοχής ITS του rDNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ακολουθούμενη από κλωνοποίηση και ταυτοποίηση της αλληλουχίας του DNA προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με την κλωνοποίηση και την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κωδικών περιοχών των rRNA γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος αυτή : 1) απαιτεί μικρή ποσότητα χρωμοσωμικού DNA, (0.1 έως 10 ng) για την ενίσχυση της ITS περιοχής, 2) επιτρέπει να αναλυθούν και οι δυο αλυσίδες της περιοχής κατά την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, οπότε μειώνονται τα λάθη και 3) είναι συμβατή με την

αυτόματη ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA (White *et al.* 1990).

Βλαστική ασυμβατότητα

Ένα ειδικό χαρακτηριστικό των μυκήτων είναι η δυνατότητα της αναστόμωσης των υφών τους. Γειτονικές υφές του θαλλού διεγείρονται και εκπτύσσουν πλάγιες διακλαδώσεις οι οποίες έρχονται σε επαφή ή κάμπτονται κι έρχονται σε επαφή τα επάκρια τμήματα τους. Στο σημείο επαφής επέρχεται λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων και δημιουργείται έτσι μια γέφυρα επικοινωνίας μεταξύ των υφών. Αυτή η ιδιότητα είναι καλά αναπτυγμένη στους ασκομύκητες και τους βασιδιομύκητες (Μπαλής 1993).

Στους μύκητες υπάρχουν τρία συμπληρωματικά συστήματα ασυμβατότητας: α) ένα σύστημα που προκαλεί δια-ειδική (interspecific) ασυμβατότητα και εμποδίζει την αναστόμωση υφών από διαφορετικά είδη, β) ένα δεύτερο σύστημα, το σύστημα ζευγαρώματος που ονομάζεται και ομογενής ασυμβατότητα ή ετερογενής συμβατότητα, που καθιστά δυνατή την αναστόμωση μεταξύ ανεξάρτητων ατόμων του ίδιου είδους, ώστε να ανασυνδυαστούν και να παράγουν εγγενή σπόρια. Αυτό το σύστημα ελέγχεται από τα γονίδια *mt* ή *mat* και μόνο άτομα με διαφορετικά αλληλόμορφα μπορούν να ενωθούν και γ) το σύστημα της σωματικής ή βλαστικής ασυμβατότητας που ελέγχεται από τα *vic* ή *het* γονίδια και επιτρέπει την αναστόμωση μεταξύ ατόμων με τους ίδιους αλληλόμορφους. Σε πολλούς μύκητες βρέθηκαν γονίδια *het*, με τα οποία ελέγχεται η βλαστική ασυμβατότητα (Pihmark 2001). Έτσι στον μύκητα *Cryphonectria parasitica* βρέθηκαν έξι, οχτώ στον *Aspergillus nidulans*, εννιά στον *Podospora anserine*, έντεκα στον *Neurospora crassa* και τουλάχιστον τρεις στον *Heterobasidium annosum* (Loubradou *et al.* 2000).

Άτομα από το ίδιο είδος αλλά με διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια *vic* ή *het* μπορούν ως ένα βαθμό να αναστομωθούν, αλλά συνήθως τα νέα άτομα που προκύπτουν θανατώνονται αμέσως μετά την αναστόμωση. Η σωματική ασυμβατότητα έχει αναφερθεί μόνο στους ανώτερους μύκητες. Στους ασκομύκητες εκφράζεται μεταξύ των ομοκαρυωτικών ατόμων. Οι ομοκαρυωτικοί βασιδιομύκητες μαζί με τα συμπληρωματικά τους αλληλόμορφα γονίδια *mat* συντήκονται και παράγουν ετεροκαρυωτικά δευτεροβάθμια μυκήλια και η βλαστική ασυμβατότητα λαμβάνει χώρα μεταξύ των ετεροκαρυωτικών ατόμων. Υφές που έχουν χάσει ένα

πυρήνα, γίνονται ομοκαρυωτικές και μπορούν και πάλι να συγχωνευτούν με κύτταρα που έχουν συμπληρωματικά αλληλόμορφα γονίδια *mat*. Τα ομοκαρυωτικά άτομα μπορούν επίσης να ενωθούν με τις υφές ετεροκαρυωτικών και με αυτό τον τρόπο να αποκτήσουν ένα πυρήνα.

Η βιολογική σημασία της σωματικής ασυμβατότητας δεν είναι ξεκάθαρη, αλλά δρα ως ένας μηχανισμός γενετικής απομόνωσης και ως ένα εμπόδιο στην ανταλλαγή κυτταροπλάσματος και πυρήνων, μειώνοντας κατά συνέπεια και τη διάδοση των μυκοϊών, εξασθετισμένων οργανιδίων και επιβλαβών οργανισμών μέσα σε ένα μυκητιακό πληθυσμό (Ihmmark 2001).

Χημική καταπολέμηση των μυκήτων

Η αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούν στα φυτά οι μύκητες στηρίζεται κυρίως στην εφαρμογή χημικών ενώσεων, των μυκητοκτόνων. Τα μυκητοκτόνα ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους διακρίνονται : α) σε προστατευτικά και β) σε διασυστηματικά. Τα προστατευτικά φάρμακα είναι εκείνα που δεν εισέρχονται και δεν κυκλοφορούν στο εσωτερικό των φυτικών οργάνων και προστατεύουν μόνο το μέρος του φυτικού σώματος στο οποίο έχουν εναποτεθεί. Τα φάρμακα αυτά πρέπει να δράσουν πριν το παθογόνο μολύνει και εγκατασταθεί στο εσωτερικό του ιστού. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα χαλκούχα και διθειοκαρβαμιδικά για την καταπολέμηση των περονόσπορων (πατάτας, καπνού, αμπέλου), τα φθαλιμίδια και οι κινόνες για τα φουζικλάδια και το θείο για το ωίδιο της αμπέλου. Τα διασυστηματικά, αντίθετα παραλαμβάνονται από το φυτό και μετακινούνται μέσα στο φυτικό σώμα με συμπλαστική (προς τα κάτω) ή αποπλαστική (προς τα πάνω) κίνηση. Τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται για τοπική εξουδετέρωση παθογόνων που έχουν εγκατασταθεί μέσα στον ιστό. Οι κυριότερες ομάδες των οργανικών διασυστηματικών φαρμάκων είναι: τα καρβαξαμιδικά για την αντιμετώπιση των σκωριάσεων και άνθρακα στα σιτηρά, τα βενζιμιδαζολικά και οι παρεμποδιστές στερόλης για την καταπολέμηση φαιάς σήψης, ωιδίων, σκωριάσεων, φουζικλαδίων, κερκοσποριάσεων και μετασυλλεκτικών σήψεων, τα οργανοφωσφορικά, τα φαινυλαμίδια τα καρβαμιδικά και οι ισοξαλόζες για την αντιμετώπιση των ωομύκητων.

Το κύριο κριτήριο για την εφαρμογή των μυκητοκτόνων είναι η εκλεκτική τοξικότητα που διαθέτουν. Η ιδιότητα αυτή είναι που εξασφαλίζει παρεμπόδιση του



παθογόνου με ελάχιστη τοξικότητα στον ξενιστή και ταυτόχρονα ελαχιστοποίηση των κινδύνων για το χειριστή και για τον καταναλωτή, αλλά και ελαχιστοποίηση των επιδράσεων για το περιβάλλον. Όμως, η αναγνώριση των εκλεκτικά τοξικών ουσιών είναι δύσκολη, καθώς οι οργανισμοί παρουσιάζουν περισσότερες ομοιότητες παρά διαφορές και η εφαρμογή χημικών μέσων για την αναστολή μιας σημαντικής λειτουργίας σε ένα οργανισμό (παθογόνο) χωρίς να επηρεασθούν άλλοι οργανισμοί που θα εκτεθούν στον παρεμποδιστή είναι περιορισμένη (Γεωργόπουλος 1992).

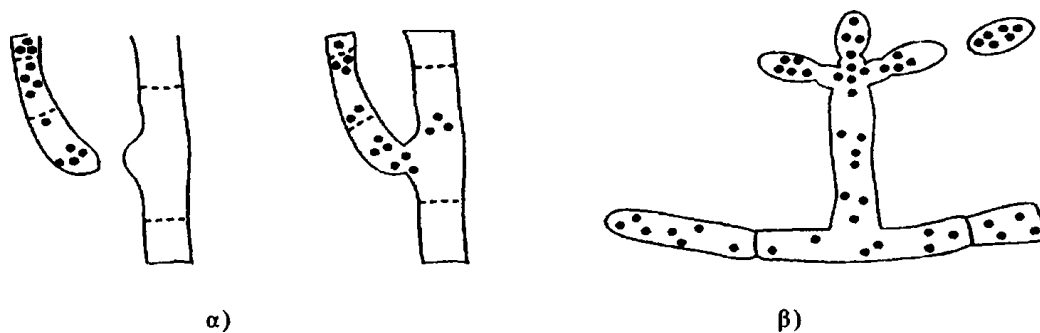
Για αυτό λοιπόν η βιολογική καταπολέμηση των ασθενειών με μείωση του αριθμού των παθογόνων ή τον περιορισμό της δραστηριότητάς τους μέσω της χρήσης ενός ή περισσότερων άλλων οργανισμών βρίσκει όλο και περισσότερο εφαρμογή στις μέρες μας. Η μέθοδος αυτή είναι η πλέον φιλική προς το περιβάλλον αλλά προϋποθέτει εκτεταμένη γνώση της βιολογίας του παθογόνου και των άλλων χρησιμοποιούμενων οργανισμών (Χατζηλουκάς 2006). Από τους μικροοργανισμούς, οι μύκητες *Peniophora gigantean*, *Gliocladium virens* καθώς και πολλά είδη του σαπρόφυτου *Trichoderma* παρασιτούν επί πολλών φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως: *Heterobasidium annosum*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium sclerotium* και *Fusarium oxysporum* (Brimner et al. 2003). Επίσης είναι δυνατή η χρήση μεταδοτικών υπομολυσματικών μυκήτων ως βιολογικά αντιδραστήρια αντιμετώπισης των ασθενειών. Όταν τα ιωμένα υπομολυσματικά στελέχη έρθουν σε επαφή με μη μολυσμένα φυτοπαθογόνα στελέχη του ίδιου είδους τα τελευταία καθίστανται επίσης υπομολυσματικά, λόγω προφανώς μετάδοσής σε αυτά του ιού (Χατζηλουκάς 2006). Η υπομολυσματικότητα αναφέρεται στη μείωση της παθογόνου ικανότητας ενός μύκητα να μολύνει, να αποικίσει, να θανατώσει, ή και να αναπαραχθεί πάνω σε ευαίσθητους ιστούς ξενιστών, καθώς και στην εμφάνιση χαρακτηριστικών φαινοτύπων. Σε κάθε περίπτωση, η υπομολυσματικότητα μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις στον πυρήνα, στα μιτοχόνδρια και σε πλασμίδια ή στην παρουσία dsRNA μυκοϊών. (Bolland 2004).

Μυκοϊοί με γονιδίωμα από δίκλωνο RNA (dsRNA)

Εισαγωγικά στοιχεία

Ενώ το γονιδίωμα των φυτικών ιών αποτελείται από μονόκλωνο ή δίκλωνο RNA ή DNA, το γονιδίωμα των ιών που προσβάλλουν μύκητες, γνωστών ως μυκοϊοών ή μυκητοϊοών αποτελείται κυρίως από δίκλιωνα μόρια RNA (dsRNA), σε μικρότερο

ποσοστό από μονόκλιωνα μόρια RNA (ssRNA) και πιο σπάνια από δίκλιωνα μόρια DNA (Pearson *et al.* 2009). Οι μυκοϊοί με γονιδίωμα από dsRNA δε διαθέτουν εξωκυττάριο μηχανισμό μόλυνσης του ξενιστή και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα του μύκητα. Στη φύση μεταδίδονται μέσω της παραγωγής των αγενών και εγγενών σπορίων που παράγουν οι μύκητες (κάθετη μεταφορά) και ενδοκυττάρια μέσω της αναστόμωσης των υφών και της ετεροκαρύωσης (οριζόντια μεταφορά). Κατά την φάση της πλασμογαμίας, μεταξύ γειτονικών υφών ξεχωριστών μυκήτων, λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή πυρηνικού υλικού και κυτταροπλάσματος (Εικόνα 1.3) (Ghabrial 1998).



Εικόνα 1.3. Μετάδοση των μυκοϊών α) μέσω της αναστόμωσης των υφών και β) με σπόρια. (Nuss 2005, τροποποιημένο).

Τα δίκλιωνα μόρια RNA είναι πολύ σταθερά μόρια και δεν μπορούν να λειτουργήσουν ως εκμαγεία mRNA για μετάφραση, ούτε ως εκμαγείο για τη μεταγραφή τους από τις μεταγραφάσες των κυττάρων του ξενιστή. Επίσης, η απευθείας έκθεση του dsRNA στο κυτταρόπλασμα του μύκητα θα ενεργοποιούσε τους αμυντικούς μηχανισμούς του, όπως τον μηχανισμό της απόπτωσης, την παραγωγή ιντερφερόνης, την τροποποίηση των μηχανισμών μετάφρασης του ξενιστή και τη σίγαση του RNA. Για αυτό, λοιπόν, το γονιδίωμα των μυκοϊών dsRNA (όπως και όλων των ιών) προστατεύεται από το κυτταρόπλασμα του ξενιστή με τα καψίδια, που είναι σταθερά κλειστά πρωτεϊνικά μόρια και περιέχουν τα απαραίτητα ένζυμα για τη σύνθεση mRNA και για την έναρξη της αντιγραφής. Στους περισσότερους μυκοϊούς τα καψίδια έχουν εικοσαεδρική δομή, με εξαίρεση τους υποϊούς που στερούνται καψιδίου, αλλά διαθέτουν πλειομορφικά κυστίδια. Οι εξωτερικές στοιβάδες του καψιδίου είναι υπεύθυνες για την εκκίνηση της μόλυνσης λόγω του ότι όταν διασταθούν, αποδίδουν στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή τον μεταγραφικά

ενεργό πυρήνα του ιοσωματίου. Συγχρόνως, οι εξωτερικές στοιβάδες του καψιδίου και οι πρωτεΐνες του παρουσιάζουν εξειδικευμένη προσαρμογή με τους ξενιστές και μεγαλύτερη ποικιλομορφία στην οργάνωση και στη δομή τους, σε σχέση με τα εσωτερικά στρώματα και τις μη δομικές πρωτεΐνες.

Πολλοί από τους μυκοϊούς dsRNA έχουν το γονιδίωμα τους χωρισμένο σε τεμάχια. Αυτό αποτελεί έναν μηχανισμό ευχερούς διάσπασης του συνολικού μεταφραστικού προϊόντος του γονιδιώματος σε πολλές διακριτές πρωτεΐνες. Τα ξεχωριστά τμήματα του γονιδιώματος μπορούν να ανταλλαχθούν όταν συμβατοί ιοί μολύνουν το ίδιο κύτταρο, αυξάνοντας τη γενετική ποικιλομορφία του ιικού πληθυσμού, ενώ οι μεταλλάξεις μπορούν να συμβούν μόνο σε μεμονωμένα γονίδια και όχι σε ολόκληρο το γονιδίωμά τους. Κάθε τεμάχιο του γονιδιώματος μπορεί να μεταγράφεται χωριστά, συνθέτοντας αντίγραφα μορίων RNA θετικής πολικότητας [RNA(+)] πλήρους μήκους [full-length (+) RNA copies], τα οποία χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας RNA αρνητικής πολικότητας [RNA(-)] πλήρους μήκους (Mertens 2004).

Συστηματική ταξινόμηση μυκοϊών dsRNA

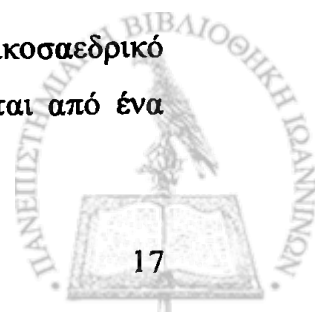
Οι μυκοϊοί dsRNA, όπως και όλοι οι ιοί, δε διαθέτουν οργανωμένη κυτταρική δομή και η ταξινόμηση τους γίνεται με βάση το μήκητα-ξενιστή τους, τον αριθμό των γονιδιωματικών τεμαχίων που περιέχουν στο ιοσωμάτιο και την καψιδική τους δομή. Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης Ιών (ICTV) οι dsRNA ιοί ταξινομούνται σε 8 οικογένειες και έχουν μεγάλη ιατρική, κτηνιατρική και γεωργική σημασία. Οι dsRNA ιοί που προσβάλλουν μύκητες κατατάσσονται στις εξής πέντε οικογένειες (Εικόνα 1.4):

1. Hypoviridae

Οι ιοί αυτοί στερούνται αληθινού ιοσωμάτιου και το γενετικό τους υλικό περιβάλλεται από πλειομορφικό κυστίδιο διαμέτρου 50-80 nm. Το γονιδίωμα τους αποτελείται από ένα γραμμικό dsRNA μεγέθους 9-13 Kb. Η οικογένεια αυτή έχει μόνο ένα γένος, το *Hypovirus*, με ξενιστή το μύκητα *Cryphonectria parasitica*.

2. Totiviridae

Οι ιοί αυτοί περικλείουν το γονιδίωμα τους σε ένα συμμετρικό εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο, μεγέθους 30-40 nm. Το γονιδίωμά τους αποτελείται από ένα γραμμικό μόριο dsRNA και έχει μέγεθος 4-7 Kb.



3. Partitiviridae

Το γενετικό τους υλικό περικλείεται σε ένα συμμετρικό εικοσάεδρο πρωτεϊνικό καψίδιο με διάμετρο 30-40 nm. Το γονιδίωμα τους αποτελείται από δυο γραμμικά μέρη, χωριστά συσκευασμένα, όμοιου συνήθως μεγέθους και το συνολικό τους άθροισμα είναι 4-6 Kb.

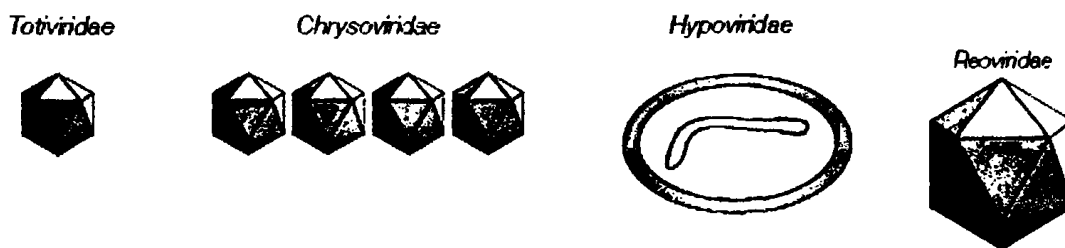
4. Chrysoviridae

Το γονιδίωμα αποτελείται από τέσσερα τμήματα χωριστά συσκευασμένα σε εικοσάεδρα πρωτεϊνικά καψίδια με διάμετρο 30-40 nm.

5. Reoviridae

Το γονιδίωμα αποτελείται από 10, 11 ή 12 τμήματα συσκευασμένα σ' ένα εικοσάεδρο πρωτεϊνικό καψίδιο (με 1, 2 ή 3 στοιβάδες) με διαμέτρους 70-90 nm (Mertens 2004).

Γενικά από τα είδη των dsRNA ιών που έχουν αναγνωρισθεί, ο μεγαλύτερος αριθμός έχει ταξινομηθεί στην οικογένεια των Partitiviridae.



Εικόνα 1.4. Ταξινόμηση των μυκοϊών με βάση τη δομή και τον αριθμό του γονιδιώματος (Nuss 2005, τροποποιημένο).

Εντούτοις, υπάρχουν και αρκετά αταξινόμητα είδη που είναι ισομετρικά και το μέγεθος τους ποικίλει (Pearson *et al.* 2009).

Καταγωγή και εξέλιξη των μυκοϊών dsRNA

Για την καταγωγή των μυκοϊών υπάρχουν δυο θεωρίες. Σύμφωνα με την πρώτη οι μυκοϊοί θεωρούνται ότι έχουν αρχαία προέλευση. Αυτό στηρίχθηκε στην υπόθεση ότι ένας πρόγονος ιός μόλυνε έναν μονοκύτταρο οργανισμό, από τον οποίο προήλθαν τα πρωτόζωα και οι μύκητες. Η ανακάλυψη του *Totivirus* Hn 190Sv, που προσβάλλει τον μύκητα *Helminthosporium victoriae*, αποκάλυψε ότι υπάρχει στενότερη σχέση με τους ιούς των πρωτόζωων «leishmaniavirus» LRV1 και LRV2 (που ανήκουν στους

Totiviridae) απ' ότι με τους ιούς ζυμών. Έτσι, λοιπόν, προκύπτει ότι ο Hn 190Sv και οι LRVs υπήρχαν πριν το διαχωρισμό των μυκήτων και των ζυμών (Ghabrial 1998). Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι οι μυκοϊοί έχουν μετακινηθεί από τα φυτά-ξενιστές στους μύκητες. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στη σύγκριση των αλληλουχιών μεταξύ των μυκοϊών και των φυτικών ιών (Pearson *et al.* 2009).

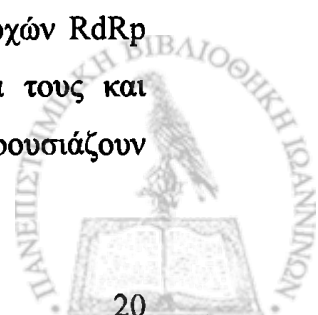
Επιπλέον, η προέλευση των ιών στηρίζεται σε τρεις θεωρίες, συμφωνά με τις οποίες οι ιοί προήλθαν: 1) από εκφυλισμένες δομές ενδοκυττάρων παράσιτων, 2) από αυτό-αντιγραφή κυτταρικού mRNA και 3) από προβιοτικά αυτό-αντιγραφόμενα μόρια RNA (Koonin *et al.* 1993). Η προέλευση των Totiviridae στηρίζεται στη θεωρία του αυτό-αντιγραφόμενου κυτταρικού mRNA, λόγω της προφανούς αρχαίας καταγωγής τους, την απλότητα του γονιδιώματός τους, τη στενή σχέση μεταξύ των περιοχών που κωδικοποιούν τις RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (RNA dependend RNA polymerase, RdRp) και της ικανότητας να χρησιμοποιούν τις πρωτεΐνες του ξενιστή τους. Ένα κυτταρικό mRNA (π.χ. το mRNA που κωδικοποιεί μια RdRp [RNA-εξαρτώμενη-RNA-πολυμεράση]) ίσως είχε αποκτήσει την ικανότητα να αντιγράφει τον εαυτό του μέσω απόκτησης μίας αλληλουχίας έναρξης της αντιγραφής του. Εάν αυτό το αυτό-αντιγραφόμενο mRNA μπορούσε να αποκτήσει και ένα γονίδιο για το πρωτεϊνικό περίβλημα, τότε θα μπορούσε πολύ απλά να δημιουργηθεί έτσι ένας ιός RNA (+). Η αντιγραφή της αλυσίδας (+) οδηγεί στη σύνθεση της αλυσίδας (-) και συνεπώς, είναι δυνατόν οι ιοί dsRNA να προήλθαν από ιούς RNA με αλυσίδα (+). Εναλλακτικά, ο μηχανισμός ελέγχου της κυτταρικής μετάφρασης περιλαμβάνει τη παραγωγή αντινοσηματικών RNA, που μπορεί να οδηγήσει στη σύνθεση dsRNA (Koonin 1992).

Οι αντιγραφικές μονάδες (ρεπλικόνια) 20S και 23S RNA του σακχαρομύκητα και οι αντιγραφικές του μορφές (Replicative Forms, RFs) καθώς και τα μόρια dsRNA T και W, ίσως αντιπροσωπεύουν τα απολιθώματα των προγονικών αντιγράφων RNA από τα οποία προήλθαν οι μονόκλωνοι και οι δίκλωνοι RNA ιοί με απλά γονιδιώματα. (Ghabrial 1998). Με βάση τη δοκιμαστική φυλογενετική των RdRp των ιών RNA (+), οι Koonin *et al.* 1993, ομαδοποίησαν τα αντίγραφα των μορίων 20S/23S RNA (ή τα αντίγραφα T/W των μορίων dsRNA) με εκείνα που είχαν (φαγική) προκαρυωτική καταγωγή κάτω από την υπερομάδα 2 των RNA ιών με (+) αλυσίδα. Η ομαδοποίηση των περιοχών RdRp των Totiviridae μαζί με τους ιούς RNA αλυσίδας (+) της υπερομάδας 1, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι Totiviridae μπορεί να προήλθαν από αντίγραφα του 20S RNA και να έχουν προκαρυωτική καταγωγή.

Επίσης, οι ιοί Totivirus θα μπορούσαν να έχουν προέλθει από προγόνους με σύνθετα γονιδιώματα μέσω της μείωσης ή της απώλειας γονιδίων που δεν ήταν απαραίτητα για την επιβίωσή τους. Οι Partitiviridae, ίσως να είχαν προέλθει από Totiviridae με διαχωρισμό του γονιδιώματος τους σε δυο μόρια dsRNA. Οι Partitiviridae έχουν απλά γονιδιώματα που αποτελούνται από δυο γονίδια που κωδικοποιούν τις καψιδιακές πρωτεΐνες (coat protein, CP) και RdRp, αλλά αντίθετα από τους Totiviridae, τα γονίδια τους βρίσκονται σε διαφορετικά τεμάχια. Έτσι, ενώ οι partitiviridae εκφράζουν χωριστά τις πρωτεΐνες CP και RdRp, οι Totiviridae εκφράζουν την πρωτεΐνη RdRp ως μια πρωτεΐνη CP-RdRp, ως αποτέλεσμα της συγχώνευσης των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης της CP και RdRp. Αντίθετα οι Totiviridae (π.χ. ο ιός Hn 190Sv) που εκφράζουν την RdRp χωριστά, πιθανά μέσω ενός εσωτερικού μηχανισμού έναρξης, ίσως να αποτελούν ένα ενδιάμεσο κρίκο της εξέλιξης των Partitiviridae από τον πρόγονο Totiviridae (Ghabrial 1998).

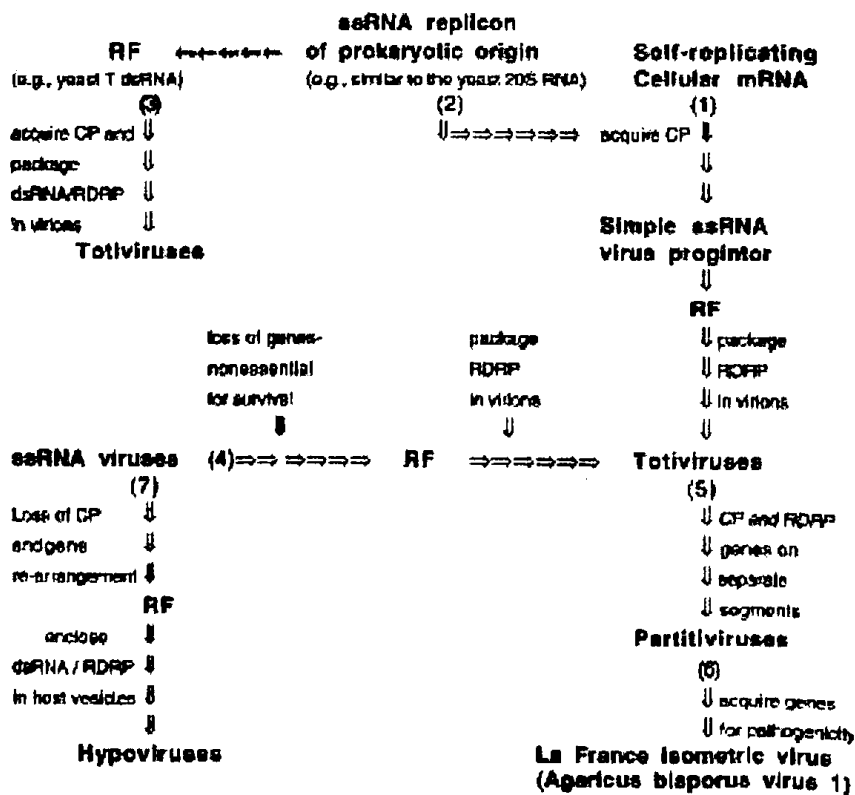
Η πλειοψηφία των ιών dsRNA θεωρούνται ότι έχουν πολυφυλετική καταγωγή, λόγω της ποικιλομορφίας του γονιδιώματος τους. Η συγκριτική ανάλυση των περιοχών RdRp των dsRNA μυκοϊών, η οποία έχει τα πιο συντηρημένα γονίδια μεταξύ των RNA ιών, αποκάλυψε την εξαιρετικά μικρή ομοιότητα των ιών dsRNA από διαφορετικά γένη ακόμη και σε αυτά που ανήκουν στην ίδια την οικογένεια. Επιπλέον, η φυλογενετική ανάλυση των περιοχών RdRp, έδειξε την έλλειψη συντήρησης στην αρχική ακολουθία και στο μέγεθος μεταξύ των πολυμερασών. Οι περιοχές RdRp των dsRNA ιών συνηθίζονται να ομαδοποιούνται σε διαφορετικές υποδιαιρέσεις (υπερομάδες) των RNA ιών με αλυσίδα (+). Η συγκέντρωση των ιών RNA (+) σε τρεις υπερμάδες για την ταξινόμηση των RNA ιών, με βάση την RNA πολυμεράση δεν έγινε αποδεχτή (Zanotto *et al.* 1996). Έτσι, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι είναι πιο κατάλληλο να παρουσιαστούν οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των ιών RNA, ως ένα σύνολο ευδιάκριτων υποδένδρων, όπου οι συνδέσεις μεταξύ τους δεν είναι ξεκάθαρες, παρά σαν ένα ενιαίο και επιλυμένο φυλογενετικό δένδρο.

Όμως, οι ισομετρικοί dsRNA Totiviridae που μολύνουν κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (μύκητες, πρωτόζωα) πιθανολογείται ότι έχουν μονοφυλετική καταγωγή. Η συγκριτική ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας των περιοχών RdRp των Totiviridae, έδειξε ότι έχουν πολλές ομοιότητες στην ακολουθία τους και περιέχουν οχτώ χαρακτηριστικά συντηρημένα μοτίβα. Επίσης, παρουσιάζουν



ομοιότητες στην νουκλεοτιδική τους ακολουθία με τους Totiviridae που προσβάλλουν ζύμες, μύκητες καπνιάς και παρασιτικών πρωτόζωων.

Επιπλέον, οι υποϊοί εμφανίζονται να έχουν ομοιότητες στην ακολουθία τους με τους φυτικούς ιούς RNA (+) και μπορεί να προήλθαν από αντίγραφα δομών ενός αρχέγονου ιού ssRNA. Από την εξέταση της σχετικής οργάνωσης των οργανωμένων περιοχών του υποϊού CHV1-713 και του φυτικού ιού poty RNA (+), προκύπτει ότι ο CHV1-713 ίσως να έχει εξελιχθεί από την ανακατάταξη του γονιδιώματος του φυτικού ιού poty RNA (+). Μια σειρά από γεγονότα που έλαβαν χώρα στο γονιδίωμα των ιών poty οδήγησαν σε αυτή την εξέλιξη: 1) μετάθεση του γονιδίου ελικάσης, 2) διπλασιασμός της ακολουθίας που κωδικοποιεί την περιοχή της Πρωτεΐνης του Βοηθητικού Παράγοντα (Helper Component-Proteinase, HC-Pro), 3) απαλοιφή της ακολουθίας που κωδικοποιεί την περιοχή πρωτεάσης του NIa, 4) απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τη σύνθεση του πρωτεϊνικού περιβλήματος, 5) εμφάνιση του κωδικόνιου λήξης που διαχωρίζει τα δυο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης. Λόγω της ενδοκυττάριας μεταφοράς των μυκοϊών, η παρουσία πρωτεϊνικού περιβλήματος είναι απαραίτητη, καθώς η απουσία του οδηγεί στην αντικατάσταση του ποσοστού του γονιδιώματος ssRNA με τις πιο κυρίαρχες δομές dsRNA (Εικόνα 1.5) (Ghabrial 1998).



Εικόνα 1.5. Διαγραμματική απεικόνιση των πιθανών μονοπατιών εξέλιξης των μυκοϊών (Ghabrial 1998).

Προσαρμογή των μυκοϊών dsRNA

Η λανθάνουσα ή η ασυμπτωματική σχέση των πιο πολλών μυκοϊών με τους ξενιστές τους είναι ένα αποδεικτικό στοιχείο, ότι οι μύκητες και οι μυκοϊοί έχουν συνεξελιχθεί και συν-προσαρμοστεί σε ένα ιδιαίτερο βαθμό. Πολλοί μυκοϊοί διατηρούν τα γονίδια που είναι απαραίτητα για την επιβίωση τους αλλά χρησιμοποιούν αποτελεσματικά και τις πρωτεΐνες των ξενιστών τους. Τα κύτταρα του ξενιστή έχουν εξελιχθεί ούτως ώστε να υποστηρίζουν την αντιγραφή του ιού μέχρι ένα επίπεδο, πριν ο ιός γίνει παθογόνος. Η παθογένεση του ιού και ο θάνατος του μύκητα θα οδηγούσε στην αποβολή του ιού, ο οποίος στερείται εξωκυττάριας μόλυνσης.

Ο Totivirus *Hv 190S*, που προσβάλλει τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Helminthosporium victoriae*, χρησιμοποιεί τις πρωτεΐνες (μια κινάση και μια πρωτεάση) που κωδικοποιεί ο ξενιστής για τη μετα-μεταγραφική τροποποίηση του δικού του πρωτεϊνικού περιβλήματος. Η φωσφορυλίωση και η πρωτεολυτική επεξεργασία του πρωτεϊνικού περιβλήματος ίσως να παίζουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής και στην απελευθέρωση των αντιγράφων της αλυσίδας (+) από τα ισωμάτια. Ο υποϊός που μολύνει τον μύκητα *Cryphonectria parasitica*, μειώνει τη μολυσματικότητα του τροποποιώντας τη δράση της πρωτεΐνης G, η οποία σχετίζεται με τις διαδικασίες μεταγωγής του κυτταρικού σήματος (Ghabrial 1998).

Η επίδραση των μυκοϊών στο φαινότυπο και στην έκφραση των γονιδίων του μύκητα

Οι μυκοϊοί επιδρούν στη μολυσματικότητα των φυτοπαθογόνων μυκήτων είτε αυξάνοντάς είτε μειώνοντάς την. Η υπερμολυσματικότητα που συνδέεται με την παρουσία ορισμένων dsRNA, έχει διαπιστωθεί σε λίγα είδη π.χ. *Nectria radicola* (Ahn *et al.* 2001). Η υπομολυσματικότητα που παρατηρείται στο μύκητα *Cryphonectria parasitica* οφείλεται στην παρουσία dsRNA υποϊού. Οι μυκοϊοί, λόγω της συνεξέλιξης τους με τους μύκητες, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν προκαλούν κάποια εμφανή αλλαγή στην μορφολογία των ξενιστών τους. Η σύγκριση των φαινοτύπων υγιών και μολυσμένων με μυκοϊούς στελεχών μυκήτων μπορεί να μας

βοηθήσει στην κατανόηση της επίδρασης των dsRNA μυκοϊών στο φαινότυπο των μυκήτων.

Έτσι, μεταξύ άλλων τα συμπτώματα που εμφανίζουν οι μύκητες είναι: η στειρότητα των θηλυκών ατόμων κατά την εγγενή αναπαραγωγή, η μείωση της αγενούς σποροπαραγωγής, οι αλλαγές στη μορφολογία των αποικιών με τροποποίηση της χρωστικής που παράγεται, και η ελάττωση της συσσώρευσης ειδικών μεταβολιτών όπως το οξαλικό οξύ (Nuss 2005). Επιπλέον οι μυκοϊοί επιδρούν και στην έκφραση των γονιδίων του μύκητα.

Η λακκάση είναι ένα ένζυμο που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του μύκητα και στη μολυσματικότητά του, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης λιγνίνης, του σχηματισμού καρποφοριών και της παραγωγής χρωστικής. Η αδυναμία διείσδυσης του έλκους της καστανιάς σε μολυσμένα στελέχη *Cryphonectria parasitica* από υποϊό, μπορεί να οφείλεται στη μείωση των επιπέδων έκφρασης της λακκάσης (Rigling *et al.* 1991). Η γενετική ανάλυση της *Cryphonectria parasitica* αποκάλυψε την παρουσία τριών γονιδίων λακκάσης των *lac1*, *lac2*, και *lac3* (Rigling *et al.* 1993). Το επίπεδο έκφρασης της λακκάσης μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το περιβάλλον, το θρεπτικό μέσο, την ηλικία της καλλιέργειας και από το ποσοστό του διαθέσιμου φωτός (Choi *et al.* 1992). Μολύνσεις με τον υποϊό CHV1, είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 75 % της δραστηριότητας της λακκάσης (Rigling *et al.* 1991). Επιπλέον, το επίπεδο έκφρασης της λακκάσης μπορεί να ρυθμιστεί στο επίπεδο της μεταγραφής ή της σταθερότητας του mRNA της λακκάσης (Choi *et al.* 1992). Ένα παρόμοιο αποτέλεσμα υπομολυσματικότητας έχει παρατηρηθεί και σε έναν άλλο μύκητα, τον *Diaporthe amibigua* (Smit *et al.* 1996).

Η κουτινάση είναι ένα άλλο ένζυμο που μειώνεται από τη μόλυνση με υποϊό. Η κουτινάση θεωρείται σημαντική για τους φυτοπαθογόνους μύκητες, διότι χάρη σε αυτή μπορούν να διαπεράσουν την επιδερμίδα των φυτικών κυττάρων και να εισέλθουν σε αυτά. Πράγματι έχει αναφερθεί θετική σχέση μεταξύ του ποσοστού παραγωγής κουτινάσης και μολυσματικότητας σε μερικούς φυτοπαθογόνους μύκητες (Li *et al.* 2003). Οι Varley *et al.* 1992, έδειξαν ότι σε ένα υπομολυσματικό στέλεχος της *Cryphonectria parasitica* μειώνεται σημαντικά το ποσοστό της κουτινάσης σε σύγκριση με ένα υγιές στέλεχος, προτείνοντας ότι η παρουσία dsRNA μπορεί να έχει μερική επίδραση πάνω στην έκφραση του γονιδίου της κουτινάσης.

Αρκετά άλλα υδρολυτικά ένζυμα, όπως οι πολυγαλακτουρονάσες και οι κυτταρινάσες, τα οποία βοηθούν τους μύκητες στη διείσδυση και στην παθογόνο

ικανότητά τους, μειώνονται σημαντικά κατά τη μόλυνση της *Cryphonectria parasitica* με υποϊούς (Gao *et al.* 1995, Gao *et al.* 1996).

Αν και έχουν χαρακτηριστεί διάφορα γονίδια σχετικά με την παθογένεια των μυκήτων, μετά την μόλυνση των μυκήτων από υποϊούς πολλά γονίδια ή πρωτεΐνες πιθανώς μπορούν επιπλέον να δρουν συνδυαστικά προκειμένου να προκαλέσουν τα υπομολυσματικά γνωρίσματα. Έτσι, έχει προταθεί ότι η μόλυνση με υποϊούς θα μπορούσε να διαταράξει τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των μυκήτων όπως το μηχανισμό μεταγωγής σημάτων (Dawe *et al.* 2001, Larson *et al.* 1992).

Οι πρωτεΐνες G είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε μηχανισμούς μεταγωγής σήματος και αποτελούνται από τρεις υπομονάδες (α , β , γ). Η υπομονάδα G α κλωνοποιήθηκε στη *Cryphonectria parasitica*, ονομάστηκε *cpg-1* και παρουσιάζει 98 % ομολογία με αυτή της *Neurospora crassa* (Zhang *et al.* 1998, Gao *et al.* 1996). Η μόλυνση με υποϊούς οδήγησε στη απορύθμιση της *cpg-1*, δείχνοντας έτσι τη συσχέτιση μεταξύ της μόλυνσης με ιό και της μεταγωγής σήματος στη *Cryphonectria parasitica*. Η G β υπομονάδα κωδικοποιείται από το γονίδιο *cpg-2*, που επίσης κλωνοποιήθηκε από τη *Cryphonectria parasitica*. Ωστόσο, η αδρανοποίηση αυτού του γονιδίου στη *C. parasitica*, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός ήπιου φαινοτύπου σε σύγκριση με την αδρανοποίηση του *cpg-1*, γεγονός που υποδεικνύει ότι η κάθε υπομονάδα της πρωτεΐνης G έχει διαφορετική επίδραση στην ανάπτυξη των υπομολυσματικών γνωρισμάτων. Αν και οι πολυάριθμοι μηχανισμοί με τους οποίους οι υποϊοί αλληλεπιδρούν ή ρυθμίζουν τη μεταγωγή σημάτων στους ξενιστές δεν είναι πλήρως κατανοητοί, είναι πιθανό ότι οι πρωτεΐνες G μπορεί να είναι υπεύθυνες για τη μεταβίβαση των ιικών σημάτων που απαιτούνται για να αρχίσει η εμφάνιση των υπομολυσματικών φαινοτυπικών γνωρισμάτων (Hillman *et al.* 2004).

Οι υποϊοί στον μύκητα *Cryphonectria parasitica*

α. Γενικά

Η ασθένεια έλκος της καστανιάς προκαλείται από το νηματοειδή ασκομύκητα *Cryphonectria parasitica* και διαγνώσθηκε για πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα στη Β. Αμερική. Ο μύκητας εισήλθε από την ανατολική Ασία και ενώ στα γηγενή δένδρα καστανιάς προκαλούσε ήπιες μολύνσεις στη Βόρεια Αμερική σε διάστημα 46 χρόνων (1904-1950) νέκρωσε περισσότερα από 30 εκατομμύρια στρέμματα αμερικανικής καστανιάς (*Castanea dentata*). Στην Ευρώπη η ασθένεια αναφέρθηκε αρχικά το 1938 στην Ιταλία και από εκεί μεταδόθηκε σε όλη την περιοχή εξάπλωσης

της καστανιάς. Στην Ελλάδα η ασθένεια εντοπίστηκε το 1963 στο Πήλιο και μέχρι σήμερα έχει εξαπλωθεί σε όλες σχεδόν τις περιοχές όπου αναπτύσσεται η καστανιά σε δάση και καστανεώνες όπως σε περιοχές της Μακεδονίας, της Ηπείρου, της Αιτωλοακαρνανίας της Ευρυτανίας και της Πελοποννήσου.

Ένας αριθμός από διαφορετικούς ιούς έχουν αναγνωριστεί στην *Cryphonectria parasitica* και στις τρεις ηπείρους με τους περισσότερους από αυτούς να ανήκουν στην οικογένεια *Hypoviridae* (Linder-Basso *et al.* 2005). Οι υποϊοί μειώνουν την παθογόνο ικανότητα του μύκητα προκαλώντας υπομολυσματικότητα. Η ολική συχνότητα εμφάνισης των υποϊών στους πληθυσμούς *C. parasitica* είναι υψηλότερη στη Β. Αμερική (28 %) από ότι στην Κίνα (2 %) ή στην Ιαπωνία (6 %) (Peever *et al.* 1997, 1998).

β. Η οργάνωση του γονιδιώματος των υποϊών

Σήμερα έχουν αναγνωριστεί τέσσερις ομάδες υποϊών *Cryphonectria hypovirus* (CHV): ο CHV1 απαντά στην Ευρώπη, την Κίνα και την Ιαπωνία (Peever *et al.* 1998, Allemann *et al.* 1999), ο CHV2 έχει βρεθεί στην Β. Αμερική και στην Κίνα (Hillman *et al.* 1992, Peever *et al.* 1997, 1998), ο CHV3 εντοπίζεται μόνο στη Β. Αμερική (στο Οντάριο και στο Μίσιγκαν) (Peever *et al.* 1997) και ο CHV4 στη βορειανατολική Αμερική. Πιθανώς, οι CHV1 και CHV2 έχουν διαδοθεί στην Ευρώπη και την Β. Αμερική μέσω των ξενιστών τους (Gobbini *et al.* 2003).

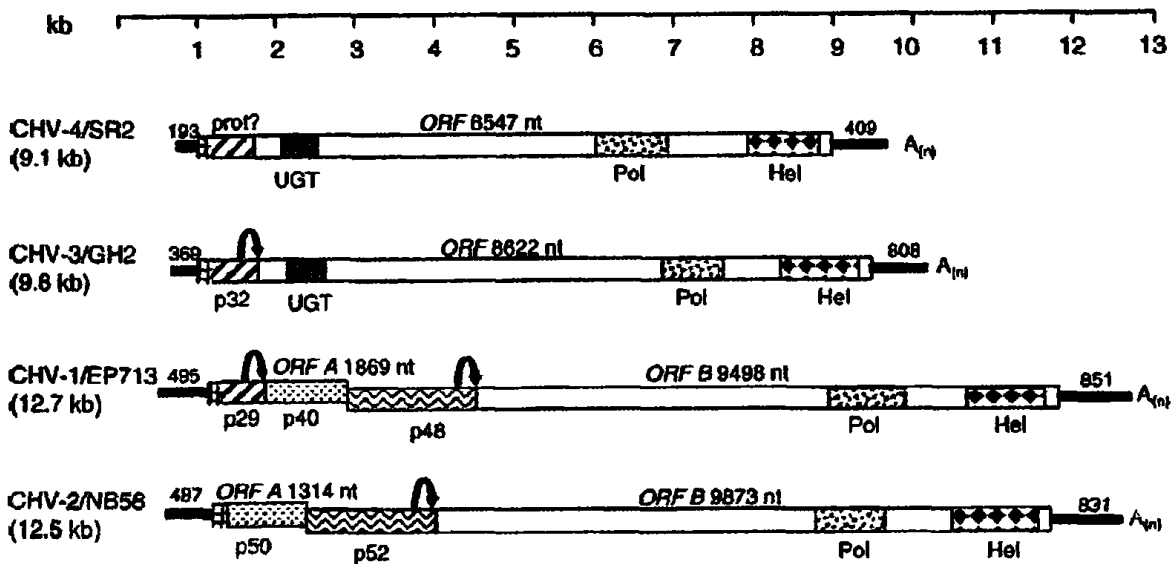
Ο καλύτερα μελετημένος υποϊός στη *C. parasitica* είναι ο CHV1, που μειώνει πάρα πολύ την παραγωγή χρωστικής, τη σποριογένεση και τη μολυσματικότητα του μύκητα. Ο CHV2 είναι ο ασθενέστερος από τους μυκοϊούς αλλά εμποδίζει τη μυκητιακή ανάπτυξη και γονιμότητα, ενώ ο CHV3 έχει μικρότερη επίδραση στη μορφολογία των μυκητιακών αποικιών από ότι ο CHV1 ή ο CHV2, αλλά μειώνει σημαντικά τη μολυσματικότητα του *C. parasitica*. Αντίθετα, τα περισσότερα στελέχη του CHV4 δεν προκαλούν ουσιώδης εξασθένηση στο ξενιστή, με αποτέλεσμα ο μύκητας, ο οποίος είναι μολυσμένος με αυτά τα στελέχη, να εξακολουθεί να προκαλεί σημαντικές καταστροφές στα δένδρα καστανιάς (Linder-Basso *et al.* 2005).

Οι υποϊοί, παρουσιάζουν διαφορές στο μέγεθος και στην οργάνωση του γονιδιώματος. Το στέλεχος CHV1-EP713, απομονώθηκε από ένα υπομολυσματικό ευρωπαϊκό στέλεχος της *C. parasitica*, το EP713. Το γονιδίωμα του CHV1-EP713 αποτελείται από 12.712 νουκλεοτίδια και έχει δυο μεγάλα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ΑΠΑ), το ΑΠΑ Α και το ΑΠΑ Β. Το ΑΠΑ Α κωδικοποιεί μια

πολυπρωτεΐνη την p69, η οποία με την αυτοκαταλυτική δράση μίας επικράτειας (papaain-like) που εδράζεται στο εσωτερικό της p29, διασπάται σε δυο πολυπεπίδια, το p29 και το p40 (Choi *et al.* 1991a, Choi *et al.* 1991b). Το ΑΠΑ Β κωδικοποιεί μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη, η οποία ελευθερώνει με αυτοκαταλυτική δράση την πολυπρωτεΐνη p48. Η σύνδεση μεταξύ του ΑΠΑ Α και ΑΠΑ Β, πραγματοποιείται μέσω του με το πεντανουκλεοτίδιο 5'-UAAUC-3', το οποίο λειτουργεί ως κωδικόνιο τερματισμού (UAA) για το ΑΠΑ Α και ως κωδικόνιο έναρξης (AUG) για το ΑΠΑ Β. Στο ΑΠΑ Β έχουν βρεθεί μοτίβα RdRp τα οποία παρουσιάζουν ομολογία με την αντίστοιχη οαλληλουχία των φυτικών ιών poty.

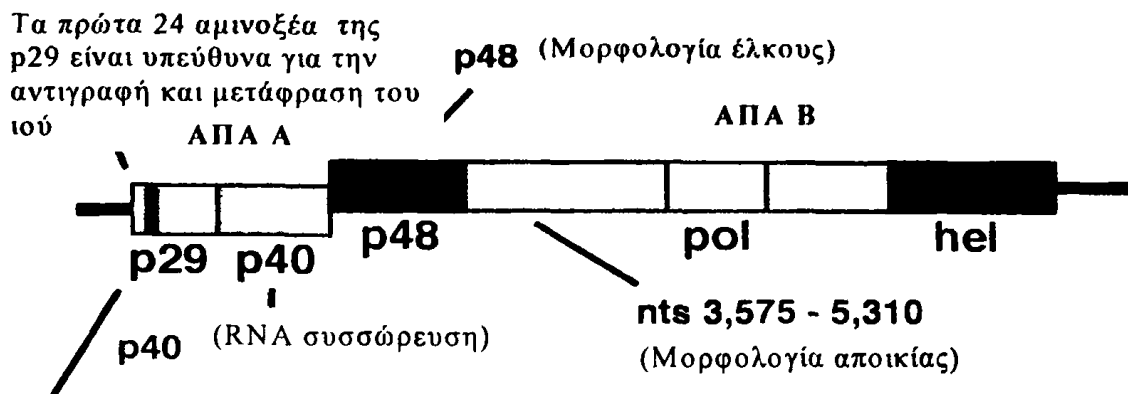
Η έρευνα σε απομονωμένα στελέχη της *C. parasitica*, αποκαλύψε σημαντικές διαφορές στο επίπεδο της υπομολυσματικότητας και στην μορφολογία, υποδηλώνοντας μια γενετική ποικιλομορφία των υποϊών. Για τη σύνθεση κλώνων cDNA επιλέχθηκε ο CHV1-Euro7, επειδή τα αποτελέσματα της δράσης του στη *C. parasitica* ήταν πολύ διαφορετικά σε σύγκριση με αυτά του CHV1-EP713 (Chen *et al.* 1999), παρόλο που τα δυο στελέχη παρουσιάζουν ομολογία κατά 87-93 % σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και 90-98 % στην αμινοξική ακολουθία. Το στέλεχος EP713 παρείχε έντονα συμπτώματα εξασθένησης, όπως καθυστερημένο ποσοστό αύξησης, μικρά έλκη στα δένδρα καστανιάς και μειωμένη παραγωγή σπορίων. Αντίθετα, όταν ο μύκητας *C. parasitica*, μολύνθηκε από το στέλεχος Euro7, παρουσίαζε γρηγορότερη αύξηση, μεγάλη επέκταση των ελκών και αυξανόμενη ικανότητα παραγωγής σπορίων.

Το γονιδίωμα του CHV2 αποτελείται από 12,5 kb, ενώ του CHV3 από 9,8 kb. Η οργάνωση του γονιδιώματος του CHV2 είναι αρκετά παρόμοια με αυτή του CHV1, έχει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης και πολυ-A ουρά στο 3' τελικό άκρο, αλλά στερείται μιας πρωτεΐσης παπαΐνης, η οποία απαντά στο ΑΠΑ Α του CHV1. Ο CHV3 περιέχει ένα πλαίσιο ανάγνωσης με μια υποθετική πρωτεΐση και τις συντηρημένες περιοχές της RdRp και της ελικάσης. Τέλος, ο CHV4 έχει μήκος 9.149 bp και έχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί μοτίβα RdRp και ελικάσης (Εικόνα 1.6) (Linder-Basso *et al.* 2005).



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος των τεσσάρων ειδών *Herpesvirus*. Με έντονο μαύρο σημειώνονται οι μη κωδικοποιούσες περιοχές του 5' και 3'-άκρου. Με το βέλος σημειώνεται η θέση διάσπασης από τη *cis* δράση της πρωτεΐνάσης και με τα καρό τετραγωνάκια οι ομόλογες περιοχές στα ΑΠΑ. Τέλος με το ερωτηματικό η πιθανή πρωτεΐνάση (δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί), με «Pol» η περιοχή RdRp, με «Hel» τα μοτίβα ελικάσης, με UGT η γλυκοζυλο-τρανσφεράση και με A_n η πολύ-A ουρά στο 3' άκρο (Linder-Basso *et al.* 2005, τροποποιημένο).

Η σύνθεση κλώνων cDNA πλήρους μήκους από υποϊούς βοήθησε στη μελέτη της λειτουργικής ανάλυσης του γονιδιώματος τους. Ο μετασχηματισμός υγιών στελεχών μυκήτων με το ΑΠΑ Α του CHV1-EP713, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας πορτοκαλί χρωστικής, μείωση της αγενούς σποριοπαραγωγής και της παραγωγής λακκάσης, αλλά καμία μεταβολή στη μολυσματικότητα. Έτσι, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η περιοχή ΑΠΑ Α του CHV1-EP713 είναι υπεύθυνη για τις φαινοτυπικές αλλαγές αλλά όχι για τη υπομολυσματικότητα των μυκήτων (Εικόνα 1.7) (Dawe *et al.* 2001).



Τα αμινοξέα από 25-73 της p29 είναι υπεύθυνα για τη καταστολή της χρωστικής και της σποριοπαραγωγής

Εικόνα 1.7. Γονιδιωματικός χάρτης του υποϊού CHV1-EP713, όπου διακρίνεται ο ρόλος της κάθε περιοχής (Dawe *et al.* 2001, τροποποιημένο).

Η πρωτεΐνη p29 του υποϊού CHV1-EP713, είναι παρόμοια με την HC-Pro των φυτοπαθογόνων ιών poty, περιέχει τουλάχιστον τρεις λειτουργικές περιοχές και έχει ποικίλα αποτελέσματα στην αλληλεπίδραση ιού-ξενιστή. Λειτουργίες που αποδίδονται στην p29 περιλαμβάνουν τη βιωσιμότητα του ιού, την αυτοπρωτεόλυση και καταστολή των διαδικασιών του ξενιστή (π.χ. παραγωγή λακκάσης, χρώση, παραγωγή κονιδίων, αύξηση της ικής αντιγραφής RNA και κάθετη μεταφορά του ιού μέσω κονιδίων) (Hillman *et al.* 2004). Περαιτέρω έρευνες με τη χρήση διάφορων μεταλλάξεων στους υποϊούς, αποκάλυψαν ότι η περιοχή p29 μπορεί να είναι υπεύθυνη για αυτές τις φαινοτυπικές αλλαγές. Για παράδειγμα μία μετάλλαξη απαλοιφής η Δp29, η οποία έχει χάσει το 88 % της κωδικοποιούσας περιοχής της p29 του ΑΠΑ Α, διατήρησε την ικανότητα ικής αντιγραφής και υπομολυσματικότητας, αλλά συνοδεύτηκε και από φαινοτυπικές αλλαγές, όπως μείωση της πορτοκαλί χρωστικής και αύξηση της παραγωγής κονιδίων και λακκάσης (Craven *et al.* 1993). Οι Suzuki *et al.* 1999, χρησιμοποιώντας μια διαφορετική σειρά μεταλλάξεων της p29, έδειξε ότι η αμινο-τελική (N-τελική) περιοχή από το κατάλοιπο Gly-25 έως το κατάλοιπο Gln-73 είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για συμπτώματα, όπως η καταστολή της παραγωγής της χρωστικής καθώς και της παραγωγής κονιδίων μέσω *cis*-δράσης. Μάλιστα, στην περιοχή αυτή εντοπίστηκαν τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, Cys-38, Cys-48, Cys-70 και Cys-72, από τα οποία τα Cys-70 και Cys-72 φαίνεται να παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, στην ικανότητα της p29 να δρα σαν καθοριστικός παράγοντας εμφάνισης των συμπτωμάτων, κατά τη μόλυνση με κλώνους cDNA. Έτσι η μετάλλαξη της Cys-70 οδήγησε στην εμφάνιση

φαινοτυπικών γνωρισμάτων, όπως μείωση του ποσοστού αύξησης της αποικίας και αλλαγές στη μορφολογία της καλλιέργειας, ενώ οι μεταλλάξεις στη Cys-38 και Cys-48 δεν προκάλεσαν καμία φαινοτυπική αλλαγή. Αντίστοιχα, η αντικατάσταση της Cys-72 με μια γλυκίνη οδήγησε στην εμφάνιση παραμορφωμένων αποικιών και στη μείωση του ρυθμού αύξησης σε διάφορα θρεπτικά μέσα.

γ. Η χρήση των υποϊών ως αντιδραστήρια βιολογικού ελέγχου

Παρότι η χημική καταπολέμηση της ασθένειας έλκους της καστανιάς δεν είναι δυνατή, η βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *C. parasitica* με τη χρησιμοποίηση υπομολυσματικών στελεχών, είναι πιο αποτελεσματική. Η μελέτη των Heiniger *et al.* 1994, για την ασθένεια έλκος της καστανιάς κατέληξε στα εξής συμπεράσματα:

1. Η υπομολυσματικότητα μειώνει σε μεγάλο βαθμό τη δριμύτητα του έλκους της καστανιάς στην Ευρώπη.
2. Σε ευρωπαϊκά δάση καστανιάς προσβεβλημένα από την ασθένεια παρατηρούνται επιφανειακά και θεραπευμένα έλκη.
3. Οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί του μύκητα *C. parasitica* χαρακτηρίζονται γενικά από υψηλή συχνότητα μόλυνσεως από υποϊούς και από σταθερά χαμηλό επίπεδο ποικιλομορφίας της βλαστικής ασυμβατότητας.

Η οφειλόμενη στον υποϊό υπομολυσματικότητα μπορεί να συμβάλει στον αποτελεσματικό έλεγχο της ασθένειας στην Ευρώπη (Anagnostakis *et al.* 1987). Στα πρεμνοφυή καστανοδάση, η βιολογική καταπολέμηση πραγματοποιείται με τοποθέτηση μολύσματος περιμετρικά των ελκών. Το μόλυσμα αποτελείται από φυσικά υπομολυσματικά στελέχη του μύκητα *C. parasitica* προσβεβλημένα από τον ιό *Cryphonectria hyrovirus*. Στη συνέχεια ο ιός μεταφέρεται από το μόλυσμα στο μολυσματικό στέλεχος, που προκαλεί το έλκος και σταματά την αύξηση. Το δένδρο παράγει τραυματικό ιστό και επουλώνει το έλκος. Η επέμβαση γίνεται σε τουλάχιστον δυο δένδρα ανά στρέμμα, η δε μέθοδος καταπολέμησης βασίζεται στη φυσική μετάδοση των υπομολυσματικών στελεχών στο καστανοδάσος. Η ίδια βιολογική μέθοδος εφαρμόζεται και στους καστανεώνες με τη διαφορά ότι εδώ συνίσταται η τοποθέτηση μολύσματος στα έλκη όλων των δένδρων κάθε καστανεώνα. Επιπλέον, οι δενδροκομικές επεμβάσεις, όπως η κλάδευση των προσβεβλημένων κλαδιών και επάλειψη των τομών με προστατευτική ουσία καθώς και η απολύμανση των εργαλείων κλάδευσης κατά τη μετακίνηση από δένδρο σε δένδρο, η υλοτομία και η απομάκρυνση των έντονα ασθενών δένδρων, η φύτευση

εμβολιασμένων από το φυτώριο δενδρυλλίων και όχι ο εμβολιασμός στα κτήματα με άγρια υποκείμενα συντελούν στον περιορισμό διάδοσης της ασθένειας. Τα δένδρα που αναπτύσσονται σε καστανεώνες, ίσως έχουν μια μεγαλύτερη πιθανότητα να επιβιώσουν, αφού η ανταγωνιστική βλάστηση τα διατηρεί «καθαρότερα» επιτρέποντας στα δένδρα να αναπτύσσονται γρηγορότερα.

Ωστόσο, προσπάθειες εγκατάστασης και διατήρησης υπομολυσματικών στελεχών *C. parasitica* με τεχνητή εισαγωγή σε δάση καστανιάς στη Β. Αμερική ήταν αναποτελεσματικές. Οι αιτίες της αποτυχίας θα πρέπει να εστιαστούν στις διαφορετικές ποικιλίες καστανιάς της Β. Αμερικής και της Ευρώπης, στη διαφορετική δομή του μύκητα-ξενιστή και στις διαφορετικές δυνατότητες των γηγενών υποϊών. Αφ' ενός μεν το ευρωπαϊκό είδος καστανιάς, το *Castanea sativa* είναι λιγότερο ευαίσθητο από το αμερικάνικο στέλεχος *C. denticata*, αφ' ετέρου δε ο αργός ρυθμός εξάπλωσης των ελκών σε ώριμα στελέχη *C. sativa*, ίσως να παρέχει μια ευκαιρία για την μετατροπή των ελκών σε συμβατά υπομολυσματικά στελέχη. Η κυριότερη όμως αιτία του προβλήματος, οφείλεται στο υψηλό επίπεδο ποικιλομορφίας των ομάδων βλαστικής συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups, VCG) που παρατηρείται στους πληθυσμούς της *C. parasitica* στη Β. Αμερική έναντι αυτών που διαπιστώθηκαν στην Ευρώπη και περιορίζουν σημαντικά τη διάδοση των υποϊών (Dawe *et al.* 2001). Η βλαστική ασυμβατότητα στη *C. parasitica* ελέγχεται από τουλάχιστον έξι γενετικούς τόπους *vic*, καθένας από τους οποίους αποτελείται από δυο αλληλόμορφους. Στελέχη μυκήτων με ίδιους αλληλόμορφους σε όλους τους τόπους *vic* αμέσως αναστομώνονται επιτρέποντας τη διάδοση των ιών. Όταν ο αριθμός των διαφορετικών αλληλόμορφων *vic* αυξάνει, η ικανότητα των μυκήτων να συντηχθούν μειώνεται και παρεμποδίζεται η διάδοση των ιών. Συνεπώς, η εισαγωγή υποϊών προβλέπεται να διασπαρθεί πολύ αργά μεταξύ των πληθυσμών της *C. parasitica* που χαρακτηρίζονται από υψηλό επίπεδο ποικιλομορφίας των ομάδων βλαστικής ασυμβατότητας (Nuss 2005). Επίσης η εγγενής αναπαραγωγή του μύκητα λαμβάνει χώρα περισσότερο στη Β. Αμερική από ότι στην Ευρώπη. Κατά την εγγενή αναπαραγωγή τα ασκοσπόρια είναι «ελεύθερα» από υποϊούς και μεταδίδονται σε μεγαλύτερες αποστάσεις σε σχέση με τα κονίδια. Η διασπορά αυτή μειώνει τη μόλυνση των πληθυσμών της *C. parasitica* με υποϊούς (Milgroom *et al.* 2004). Τέλος θα πρέπει να επισημανθούν και οι διαφορετικές δυνατότητες των υποϊών στην Ευρώπη να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικά αντιδραστήρια σε αντιδιαστολή με αυτούς που υπάρχουν ή έχουν εισαχθεί στην Β. Αμερική. Οι MacDonald *et al.* 1991, έχουν

επισημάνει ότι τα υπομολυσματικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν τις περισσότερες φορές ως βιολογικοί παράγοντες ελέγχου της ασθένειας στη Β. Αμερική περιείχαν αυξημένη εξασθένιση των άγριων στελεχών υποϊού CHV1-EP713. Έτσι, λοιπόν, προσθέτουν ότι η επιτυχία της υπομολυσματικότητας για το βιολογικό έλεγχο της ασθένειας ενδεχομένως να απαιτεί συνεχή χρήση υπομολυσματικού εμβολίου. Η άποψη στηρίζεται και στις αναφορές για το υψηλό επίπεδο διατήρησης και διάδοσης των υπομολυσματικών στελεχών που περιέχουν το ήπιο στέλεχος υποϊού CHV1-Euro7, αφού ελευθερώθηκε σε ώριμους καστανεώνες στη Β. Αμερική εκτός της φυσικής περιοχής της καστανιάς (Dawe *et al.* 2001) και στην επικράτηση του ήπιου ιταλικού στέλεχος υποϊού στα επουλωμένα δένδρα καστανιάς στην Ευρώπη.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η υπομολυσματικότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το βιολογικό έλεγχο της ασθένειας στην Ευρώπη. Αντίθετα στη Β. Αμερική οι υποϊοί χρησιμοποιούνται μόνο ως αντιδραστήρια για βιολογική θεραπεία της ασθένειας καθώς απαιτούνται συνεχείς επεμβάσεις αφού σε ένα πραγματικό βιολογικό έλεγχο το μόλυσμα πρέπει να αυτοδιατηρείται στη μολυσμένη αποικία και να μεταδίδεται από μόνο του σε νέες μολύνσεις (Anagnostakis 2001).

Εντούτοις, τα προβλήματα που υπάρχουν μπορούν να αντιμετωπισθούν με περαιτέρω έρευνες και με τη σύνθεση κλώνων cDNA πλήρους μήκους. Οι υποϊοί RNA δε μεταδίδονται με τα ασκοσπόρια κατά τη διασταύρωση. Αυτό δυστυχώς οφείλεται στο ότι τα ασκοσπόρια που προκύπτουν αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα των ομάδων βλαστικής ασυμβατότητας ως αποτέλεσμα της αναδιοργάνωσης των αλληλόμορφων των γενετικών τόπων *vic*. Η ενσωμάτωση ιικού cDNA στο χρωμόσωμα των διαγονιδιακών υπομολυσματικών στελεχών επιτρέπει τη διάδοσή τους στους απογόνους με ασκοσπόρια, όπου το ιικό RNA αναπαράγεται και αντιγράφεται στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, κάθε αγενές σπόριο που παράγεται από υπομολυσματικά στελέχη περιέχει ένα πυρηνικό αντίγραφο του ιικού cDNA (cDNA που προέρχεται από RNA ιό). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα φυσικά υπομολυσματικά στελέχη, στα οποία το ποσοστό των «υγιών» κονιδίων (μη προσβεβλημένα από τον ιό) κυμαίνεται μεταξύ 10-90 % και ως εκ τούτου απαιτεί συνεχώς εμβολιασμό με μολυσμένα στελέχη. Έτσι, προτείνεται ότι η χρήση διαγονιδιακών υπομολυσματικών στελεχών θα συμβάλλει στην επίλυση των προβλημάτων κατά τη διάδοση των ιών καθώς και στην αύξηση της διασποράς των υπομολυσματικών φαινοτύπων (Dawe *et al.* 2001). Η απελευθέρωση των διαγονιδιακών οργανισμών στο περιβάλλον θα πρέπει να γίνεται αφού προηγουμένως έχουν πραγματοποιηθεί μακροχρόνιες έρευνες για τη

μελέτη της αλληλεπίδρασης των εν λόγω οργανισμών με άλλα είδη, τόσο σε εργαστηριακές συνθήκες όσο και σε συνθήκες πεδίου και να επιβεβαιώνονται με μελέτες επιδημιολογικού τύπου.

Πειράματα που έγιναν στον αγρό, το 1994, με το διαγονιδιακό υπομολυσματικό στέλεχος *C. parasitica* που περιείχε το άγριο τύπο υποϊού CHV1-EP713 επιβεβαίωσαν τη διάδοση των υποϊών με ασκοσπόρια, παρέχοντάς την πρώτη ένδειξη για διάδοση του κυτταροπλασματικού cDNA σε μη διαγονιδιακά ενδογενή στελέχη *C. parasitica*. Εντούτοις το διαγονιδιακό στέλεχος, με τον υποϊό CHV1-EP713, απέτυχε να παραμείνει στην περιοχή περισσότερο από δυο χρόνια αφότου απελευθερώθηκε. Μετά από δυο χρόνια το πείραμα επαναλήφθηκε αλλά με μια τροποποίηση του αρχικού πληθυσμού. Τρία γηγενή μολυσμένα στελέχη *C. parasitica* απομονώθηκαν από την περιοχή δοκιμής, τα οποία αντιπροσωπεύουν τρεις διαφορετικές ομάδες βλαστικής ασυμβατότητας και των δυο τύπων διασταύρωσης και μετασηματίστηκαν με αντίγραφα cDNA του υποϊού άγριου τύπου CHV1-EP713. Η εφαρμογή των διαγονιδιακών στελεχών έγινε με ψεκάσμο του μίγματος σπορίων στην περιοχή δοκιμής για τρία καλοκαίρια αρχίζοντας το 1998. Ενώ αυτή η μελέτη είναι σε εξέλιξη, υπάρχουν στοιχεία για τη μετάδοση του cDNA ανεξάρτητα από την εισαγωγή διαγονιδιακών στελεχών και μετάδοσης ιικού cDNA μέσω της διασταύρωσης των ασκοσπορίων στην περιοχή δοκιμής (Dawe *et al.* 2001).

Επίσης, η διαθεσιμότητα ενός μολυσματικού κλώνου cDNA από τον ήπιο υποϊό CHV1-Euro7 μας παρέχει τη δυνατότητα «κατασκευής» μια δεύτερη γενιά διαγονιδιακών υπομολυσματικών στελεχών, τα οποία θα συνδυάζουν τις αυξημένες δυνατότητες αποικισμού και σποροπαραγωγής με ένα νέο τρόπο διάδοσης των υποϊών με ασκοσπόρια. Ταυτόχρονα, η «κατασκευή» διαγονιδιακών υπομολυσματικών στελεχών με μία ανασυνδυασμένη, χίμαιρα, το CHV1-EP713-CHV1-Euro7, που περιέχει το ΑΠΑ Α από το CHV1-Euro7 και το ΑΠΑ Β από το CHV1-EP713 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση φαινοτυπικών γνωρισμάτων που οφείλονται στο ΑΠΑ Β του άγριου στελέχους CHV1-EP713 (Chen *et al.* 2000).

Συγχρόνως, ο μοριακός χαρακτηρισμός των γενετικών τόπων *vic* θα μπορούσε να μας παρέχει τα «μέσα» για τη σύνθεση «τεχνητών» στελεχών μυκήτων που θα αναστομώνονται με μύκητες διαφορετικών τύπων ομάδων βλαστικής ασυμβατότητας. Έτσι, θα αυξόνταν και η πιθανότητα διάδοσης των υποϊών στους μυκητιακούς πληθυσμούς.

Εκτός από τον μύκητα *C. parasitica* μυκοϊοί με γονιδίωμα dsRNA έχουν εντοπισθεί και σε άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες. Χαρακτηριστικά αναφέρονται οι μύκητες *Fusarium graminearum* (Chu *et al.* 2002), *F. poae* (Compel *et al.* 1999), *F. solani* *f.sp. robiniae* (Nogawa *et al.* 1993), *Penicillium chrysogenum* (Jiang *et al.* 2004), *Rhizoctonia solani* (Lakshman *et al.* 1994), *Heterobasidium annosum* (Ihrmark 2001), *Helminthosporium victoriae* (Huang *et al.* 1996), *Rosellina necatrix* (Wei *et al.* 2003), *Diaporthe perijuncta* (Preisig *et al.* 2000), *Botrytis cinerea* (Castro *et al.* 2003), κ.ά.

Επιπλέον η παρουσία μορίων dsRNA στα μιτοχόνδρια των μυκήτων συντελούν στη βιολογική καταπολέμηση των ασθενειών που προκαλούν οι φυτοπαθογόνοι μύκητες *Sclerotinia minor* και *S. homoeocarpa*. Για τον μύκητα *S. minor*, η δριμύτητα της ασθένειας μειώθηκε περισσότερο από 50 % και ο αριθμός των σκληρωτίων που παράχθηκαν, στους μολυσμένους με μόρια dsRNA ιστούς, μειώθηκε κατά 90 %. Στον *S. homoeocarpa* έχει αναφερθεί ότι η αποτελεσματικότητα του βιολογικού ελέγχου ανέρχεται σε ποσοστό πάνω από 90% υπό ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες και σε 80 % υπό συνθήκες πεδίου και ήταν συγκρίσιμη με την μεταχείριση με μυκητοκτόνα. Μονές επεμβάσεις με το υπομολυσματικό στέλεχος *Sh12B*, που περιέχει ένα στέλεχος του είδους *Ophiostoma mitovirus 3a* (*OMV3a*), ήταν τόσο αποτελεσματικές όσο η εφαρμογή έως και τέσσερις φορές ενός μυκητοκτόνου και η αποτελεσματικότητα του διατηρήθηκε στον πληθυσμό μέχρι και τον επόμενο χρόνο (Boland 2004).

Επίσης, στους μύκητες *Ophiostoma ulmi* και *O. novo-ulmi* που είναι υπεύθυνοι για τη γραφίωση της φτελιάς (Dutch elm), βρέθηκαν στα μιτοχόνδρια δώδεκα μη καψιδιωμένα μόρια dsRNA διαφορετικού μεγέθους και ονομάστηκαν παράγοντες d. Η παρουσία τους είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της μιτοχονδριακής οξειδάσης του κυτοχρώματος *c* στον *O. novo-ulmi*, οδηγώντας έτσι στην αναπνευστική ανεπάρκεια του μύκητα (McCabe *et al.* 1999). Παράλληλα, οι παράγοντες d παρεμποδίζουν τη μόλυνση του ξυλώματος της φτελιάς από τον *O. novo*. Η διασπορά όμως των dsRNA μορίων στα είδη του *Ophiostoma* εξαρτάται από τις ομάδες βλαστικής ασυμβατότητας (Boland 2004).

Χρησιμοποίηση των μυκοϊών dsRNA ως αντιδραστήρια βιολογικού ελέγχου

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις οι μυκοϊοί και οι ιοί mitovirus έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως αντιδραστήρια βιολογικού

ελέγχου των ασθενειών που προκαλούνται από φυτοπαθογόνους μύκητες. Για να γίνει αυτό εφικτό θα πρέπει οι μυκοϊοί dsRNA και οι ιοί mitovirus να πετύχουν παράλληλα δυο ανεξάρτητους στόχους: 1) να μειώσουν την παθογόνο δύναμη των μυκήτων και 2) να διασφαλίσουν ότι τα μόρια dsRNA μπορούν να διαβιβάζονται αρκετά αποτελεσματικά (μεταξύ των μυκήτων) ώστε να διατηρούνται σε ένα μεγάλο ποσοστό μέσα στο μυκητιακό πληθυσμό. Η βλαστική ασυμβατότητα μεταξύ των διάφορων στελεχών μυκήτων αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο στη διάδοση των ιών dsRNA. Η απευθείας ενσωμάτωση του ιού dsRNA στο γονιδίωμα του μύκητα και η μεταφορά του μέσω της μυκητιακής αναπαραγωγής, θα βοηθούσε στην επίλυση του προβλήματος της βλαστικής ασυμβατότητας και θα επέτρεπε τη χρήση των μυκοϊών dsRNA και των ιών mitovirus ως αντιδραστήρια βιολογικού ελέγχου (McCabe *et al.* 1999).

Σκοπός της εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν: 1) η απομόνωση μυκήτων από φυτικά δείγματα και ο έλεγχος τους για την ύπαρξη μυκοϊών με γονιδίωμα από dsRNA, 2) η μοριακή ταυτοποίηση των μυκήτων-ξενιστών και 3) και ο κατά το δυνατόν εκτενέστερος μοριακός χαρακτηρισμός των μορίων dsRNA.

Κεφάλαιο 2:
Υλικά και Μέθοδοι

Κεφάλαιο 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Δειγματοληψία:

Από περιοχές της Αιτωλοακαρνανίας, της Άρτας και των Ιωαννίνων συλλέχθηκαν φυτικά δείγματα, τα οποία εμφάνιζαν προσβολές από μύκητες. Η δειγματοληψία αφορούσε καρπούς και φύλλα φυτών με γεωργική σημασία προερχόμενα από υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειες (πιπεριά, εσπεριδοειδή, ελιά, αμπέλι, καρύδια, βερικοκιά, αχλαδιά, νεκταρινιά, ροδακινιά, κορομηλιά, τριανταφυλλιά). Τα φυτά εμφάνιζαν διαφορά συμπτώματα όπως φλύκταινες, χλωρωτικές και νεκρωτικές κηλίδες, κηλίδες ελαίου, μαλακές σήψεις και εξανθήματα τα οποία μαρτυρούσαν τη μόλυνση από μύκητες.

2.2. Απομόνωση μυκήτων από τα φυτικά δείγματα:

Στο εργαστήριο και κάτω από ασηπτικές συνθήκες εμβολιάστηκαν τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (Potato-Dextrose Agar, PDA) με μικρά τεμάχια υγιούς και μολυσμένου φυτικού ιστού και επώαστηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (23 °C) για δυο εβδομάδες. Ακολούθησαν διαδοχικές ανακαλλιέργειες, σε τρυβλία PDA, ώστε να απομονωθούν καθαρά στελέχη μυκήτων. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα σπόρια των μυκήτων σε μικροσωληνάρια και αποθηκεύθηκαν στην υπερκατάψυξη (-80 °C), ενώ παράλληλα προετοιμάστηκαν και μικροσκοπικά παρασκευάσματα, ώστε να ταυτοποιηθούν οι μύκητες σε επίπεδο γένους. Τέλος, εμβολιάστηκαν υγρές καλλιέργειες (Potato-Dextrose-Medium, PDM) με σπόρια μυκήτων, ώστε να αναπτυχθεί μυκήλιο ικανοποιητικής μάζας. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας και η διάρκεια επώασης εξαρτήθηκε από το είδος του μύκητα. Το μυκήλιο συλλέχθηκε σε σακουλάκια και αποθηκεύτηκε στους -80 °C. Τα πρωτόκολλα και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είναι τα εξής (Rigling *et al.* 1993):

Διαλύματα και θρεπτικά απομόνωσης:

Για 1lt στερεού θρεπτικού υλικού PDA:

1. 200 gr πατάτας σε 500 ml απιονισμένο νερό (distilled water, dH₂O) αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο.



- 20 gr δεξτρόζης σε 200 ml dH₂O αναδεύονται με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.
- Το διάλυμα της δεξτρόζης προστίθεται το ζωμό πατάτας, μετά το αυτόκαυστο, και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με dH₂O. Ακολουθεί καλή ανάδευση.
- Το διάλυμα προστίθεται σε κωνική φιάλη με 17 g άγαρ.
- Ακολουθεί αποστείρωση στο αυτόκαυστο.
- Μετά την ψύξη του διαλύματος σε θερμοκρασία μικρότερη των 55°C, προστίθενται αντιβιοτικά όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1 (Sambrook *et al.* 2001).

Πίνακας 2.1:

Αντιβιοτικό	Διάλυμα αποθήκευσης	Διάλυμα εργασίας	Ποσότητα ανά 1Lt θρεπτικού υλικού
Τετρακυκλίνη	10 mg/ml	12-15 mg/ml	1,5 ml
Αμπικιλίνη	25 mg/ml	35-50 mg/ml	2,0 ml
Καναμυκίνη	25 mg/ml	50 mg/ml	2,0 ml

Για 1lt υγρού θρεπτικού υλικού PDM

- 200 gr πατάτας σε 500 ml dH₂O και αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο.
- 20 gr δεξτρόζης σε 200 ml dH₂O και αναδεύονται με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.
- Προστίθεται το διάλυμα της δεξτρόζης στο ζωμό πατάτας μετά το αυτόκαυστο, και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1lt με dH₂O. Το διάλυμα αναδεύεται καλά.
- Το διάλυμα προστίθεται σε κωνική φιάλη και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.
- Μετά την ψύξη του διαλύματος σε θερμοκρασία μικρότερη των 55°C, προστίθενται αντιβιοτικά όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1

Πρωτόκολλο αποθήκευσης σπορίων στους -80 °C

Προσθήκη 1ml διαλύματος 30% γλυκερόλης σε [1X] ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate-buffer Saline, PBS) σε μικροσωληνάριο και αναγράφεται σε αυτό ο κωδικός του μύκητα και η ημερομηνία αποθήκευσης των σπορίων.

Με σπάτουλα που έχει κάει και κρυώσει καλά (για να μην καούνε τα σπόρια) «ξύνεται» η επιφάνεια του τρυβλίου (περίπου τη μισή) και λαμβάνεται μια ικανοποιητική ποσότητα μύκητα, η οποία και τοποθετείται στο μικροσωληνάριο.

Ακολουθεί καλή ανάδευση, ώστε όλη η ποσότητα των σπορίων να βρίσκεται μέσα στο διάλυμα.

Το μικροσωληνάριο τοποθετείται στο πάγο και στην συνέχεια αποθηκεύεται σε κουτί στους -80 °C.

ΠΡΟΣΟΧΗ:

Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Πριν ο μύκητας αποθηκευτεί γίνεται έλεγχος σε μόνιμο παρασκεύασμα αν παρατηρούνται σπόρια ή όχι.

Πρωτόκολλο αποθήκευσης μυκηλίου στους -80 °C

1. Το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης όπου έγινε η καλλιέργεια του μύκητα διηθείται με τη βοήθεια ηθμού (σουρωτήρι), ο οποίος προηγουμένως έχει καθαριστεί με 70 % αιθανόλη και dH₂O.
2. Με τη βοήθεια καθαρής λαβίδας τοποθετείται το μυκήλιο σε λωρίδα διηθητικού χαρτιού και αφήνεται να στεγνώσει όσο το δυνατόν περισσότερο (με τη βοήθεια της λαβίδας το μυκήλιο μετακινείται πάνω στο χαρτί).
3. Το στεγνό μυκήλιο ζυγίζεται και αποθηκεύεται σε <<σακουλάκι>> που έχει κατασκευαστεί με διηθητικό χαρτί και συραπτικό.
4. Στο σακουλάκι αναγράφονται ο κωδικός του μύκητα, η ημερομηνία αποθήκευσης και το βάρος του στεγνού μυκηλίου πριν την αποθήκευση.
5. Στο φύλλο αποθήκευσης μυκηλίων αναγράφονται ο κωδικός του μύκητα, η ημερομηνία αποθήκευσης, η διάρκεια παραμονής του μύκητα σε υγρή καλλιέργεια, καθώς και το βάρος του μυκηλίου μετά το στέγνωμα.
6. Τα σακουλάκια με τα μυκήλια τοποθετούνται σε κουτί και αποθηκεύονται στους -80 °C.

Κάθε φορά που απομονώνεται ένα νέο μυκήλιο χρησιμοποιείται καθαρός ηθμός, λαβίδα και χαρτί.

ΠΡΟΣΟΧΗ

Δεν πρέπει το μυκήλιο να πιέζεται έντονα πάνω στο χαρτί με τη βοήθεια της σπάτουλας. Τα «σακουλάκια» που περιέχουν μυκήλια δεν πρέπει να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα εκτός ψυγείου. Για το λόγο αυτό τα ήδη αποθηκευμένα μυκήλια τοποθετούνται στους -20 °C έως ότου να αποθηκευτούν όλα μαζί στους -80 °C.

2.3. Μικροσκοπία μυκητιακών απομονώσεων

Παρασκευή μονίμων μικροσκοπικών παρασκευασμάτων

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα σημειώνεται ο κωδικός του μύκητα και η ημερομηνία επεξεργασίας του πλακιδίου. Με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας ρίχνονται 1-2 σταγόνες διαλύματος 30% γλυκερόλη-1X PBS στην αντικειμενοφόρο. Το τρυβλίο ανοίγεται λίγο και με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας λαμβάνεται μικρή ποσότητα δείγματος από περιοχή που υπολογίζεται πως έχουν σχηματιστεί σπόρια (προς το κέντρο του τρυβλίου) και τοποθετείται στην σταγόνα. Το δείγμα «απλώνεται» λίγο, ώστε να παρατηρηθεί καλύτερα στο μικροσκόπιο και καλύπτεται προσεκτικά με καλυπτρίδα ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρος. Το παρασκεύασμα μονιμοποιείται με κόλλα και αποθηκεύεται στους 4 °C.

Διαλύματα, ρυθμιστικά μικροσκοπίας:

Διάλυμα γλυκερόλης 30% σε [1X] PBS (Sambrook *et al.* 2001)

Σε αποστειρωμένη φιάλη των 100ml προστίθενται με τη βοήθεια αποστειρωμένου ογκομετρικού σωλήνα 70ml [1X] PBS (αποστειρωμένου) και 30 ml γλυκερόλης. Το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά.

Ρυθμιστικό διάλυμα [10X] PBS (1L): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄. Το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.

2.4. Εκχύλιση νουκλεϊνικών οξέων και επιβεβαίωση της ύπαρξης μορίων δίκλωνου RNA (dsRNA)

Εισαγωγή:

Η εκχύλιση των νουκλεϊνικών οξέων έγινε σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης, με τη χρήση υγρού αζώτου και συμφωνά με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Morris και Dodds (1979). Η κυτταρίνη, Whatman CF-11, που χρησιμοποιήθηκε ως υλικό πλήρωσης της στήλης χρωματογραφίας, επιλέχθηκε λόγω της εκλεκτικής ικανότητας που εμφανίζει για δίκλιωνα μόρια τα οποία και συγκρατεί. Επίσης, κατά την εκχύλιση το ποσοστό της αιθανόλης στο ρυθμιστικό πλύσης της στήλης είναι εκείνο που επιτρέπει την εκλεκτική απομάκρυνση του DNA και τον εμπλουτισμό της στήλης σε dsRNA. Η παρουσία των μορίων dsRNA επιβεβαιώνεται με τις δοκιμές DNaseI και RNaseA. Με τη δοκιμή DNaseI διαπιστώνεται, εάν το εκχυλισμένο νουκλεϊνικό οξύ

είναι DNA ή RNA, καθώς η DNaseI υδρολύει το DNA, ενώ με τη δοκιμή RNaseA συμπεραίνεται, εάν το RNA είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο. Το δίκλωνο RNA σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (0.5 M NaCl) προστατεύεται από τη δράση του ενζύμου RNaseA, το οποίο στις ίδιες συνθήκες αλατότητας υδρολύει το μονόκλωνο RNA. Σε συνθήκες χαμηλής ή απουσίας αλατότητας η RNaseA αποδομεί το δίκλωνο RNA.

Πρωτόκολλο εκχύλισης δίκλωνου RNA

A. Εκχύλιση

1. Σε γουδί λειοτριβείται 1-1.5 gr (βάρος μετά από -80°C) μυκηλίου σε υγρό άζωτό και αφού κονιορτοποιηθεί πλήρως τοποθετεί η σκόνη σε σωλήνα των 15 ml. Ακολούθως προστίθενται 1 ml κορεσμένου διαλύματος θειικού οξέος (Saturated Ammonium Sulfate, S.A.S.) και 6 ml ρυθμιστικού διαλύματος μυρμηκικού (Formate buffer, F.B.). Το δείγμα αναδεύεται καλά στο vortex. Στη συνέχεια προστίθενται 3.4 ml φαινόλη και 0.6 ml χλωροφόρμιο. Έντονη ανάδευση σε ανακινητή vortex (Προσοχή, όλα τα δείγματα δουλεύονται στον πάγο).
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 7000 rpm και στους 4°C .
3. Λαμβάνονται 8 ml υπερκείμενου, με προσοχή ώστε να μην απορροφηθεί και από την κάτω φάση της φαινόλης, σε νέο σωλήνα των 15 ml. Προστίθενται 1.46 ml απόλυτης αιθανόλης θερμοκρασίας -20°C και αναδεύονται ήπια (15,43% αιθανόλη). Το δείγμα είναι έτοιμο να τοποθετηθεί στη στήλη.

B. Κατασκευή της χρωματογραφικής στήλης

1. Αποχύνεται το υπερκείμενο του υλικού της στήλης. Προστίθεται το δείγμα και αναδεύεται ήπια. Στη συνέχεια τα δείγματα επάαζονται για 30 λεπτά στον πάγο τοποθετώντας τα σωληνάκια σε πλάγια θέση. Κατά τη διάρκεια της επάασης τα σωληνάκια περιοδικά αναδεύονται ήπια
2. Το περιεχόμενο μεταφέρεται σε σιφόνιο των 10 ml του οποίου το στόμιο έχει φραγεί με υαλοβάμβακα για τη συγκράτηση της κυτταρίνης. Η στήλη αφήνεται να τρέξει μέχρι να σταματήσει να στάζει.
3. Η στήλη εκπλένεται 3 φορές με 8 ml διαλύματος αιθανόλης-οξικού αμμωνίου (Ethanol NH_4Ac), με προσοχή ώστε να μην αναταράσσεται η κυτταρίνη.



4. Τα δείγματα εκλύονται με 5 ml 0.2 M οξικού αμμωνίου και συλλέγονται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50 ml τύπου Corning. Ακολουθεί η καταβύθιση των μορίων dsRNA.

Γ. Καταβύθιση dsRNA

1. Στα 5 ml διαλύματος dsRNA προστίθενται 10 μl [10%] διαλύματος φικόλλης (Ficoll® PM 400, Sigma) και 13.5 ml παγωμένης απόλυτης αιθανόλης, αναδεύονται σε vortex και αποθηκεύονται στους -80 °C για 15 έως 20 ώρες (overnight).
2. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στις 8500 rpm και στους 4° C.
3. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.
4. Το ίζημα εκπλένεται με 5 ml [70%] αιθανόλης (-20 °C).
5. Στη συνέχεια το ίζημα ξηραίνεται σε κενό (speed vac).
6. Ακολούθως το ίζημα διαλυτοποιείται με 50 μl αποστειρωμένο dH₂O μεταχειρισμένο με διαιθυλοπυροκαρβονικό οξύ (Diethylpyrocarbonate, DEPC, dH₂O/DEPC).

Μετά τη διαλυτοποίηση των δειγμάτων ακολουθεί δοκιμαστική ηλεκτροφόριση, με 10 μl από κάθε δείγμα.

Διαλύματα εκχύλισης dsRNA

- Ρυθμιστικό διάλυμα κορεσμένου θειικού αμμωνίου (Saturated Ammonium Sulfate, S.A.S.)

Παρασκευάζεται διάλυμα *Tris*-hydroxymethyl-aminoethane (Tris) 0.01 M. Σε 90 ml ρυθμίζεται το pH στο 7 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml. Στο διάλυμα προστίθενται 76.68 gr (NH₄)₂SO₄ και διαλύονται με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Μετά την αποστείρωση σχηματίζονται κρύσταλλοι στον πυθμένα της φιάλης, οι οποίοι δεν επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του διαλύματος.

- Ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού (Formate Buffer, F.B.) (500 ml)

Με τη βοήθεια αποστειρωμένων σκευών, διαλύονται 5.15 gr μυρμηκικού νατρίου σε 500 ml αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και προστίθενται 3 ml μυρμηκικού οξέος. Το διάλυμα δεν χρειάζεται αποστείρωση.

- 0.2 M οξικό αμμώνιο [CH₃COONH₄, (NH₄Ac)] (250 ml)



Σε 250 ml αποστειρωμένο απιονισμένο νερό διαλύονται με αποστειρωμένο μαγνήτη 4.0 gr NH₄Ac. Το διάλυμα αποστειρώνεται με διήθηση μέσω ηθμού (διάμετρος πόρων 0.45 μm) και εισάγεται σε αποστειρωμένη φιάλη.

- **Διάλυμα πλύσης της στήλης (18,66% αιθανόλης-οξικού αμμωνίου, Ethanolic NH₄Ac)**

Σε αποστειρωμένη φιάλη εισάγεται 150 ml 0.2M NH₄Ac και 28 ml απόλυτης αναλυτικής αιθανόλης. Το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά.

Προετοιμασία στήλης εκλεκτικού εμπλουτισμού του ds RNA

1. Σε σωλήνα των 15 ml προστίθενται 0.5 gr κυτταρίνης CF-11 (Whatman), 12 ml F.B. και 2 ml S.A.S. και αναδεύονται ήπια.
 2. Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο 100 °C για 30 λεπτά.
 3. Κατά τη διάρκεια της επώασης ο σωλήνας αναδεύονται ήπια.
 4. Ο σωλήνας απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 3500 rpm (θερμοκρασία δωματίου).
 5. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
 6. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη δύο φορές. Τη δεύτερη φορά προστίθενται στο σωλήνα 11.5 ml F.B και 1.5 ml S.A.S και την τρίτη 11 ml F.B και 1 ml S.A.S.
 7. Την τελευταία φορά δεν απομακρύνεται το υπερκείμενο και ο σωλήνας αποθηκεύεται στους 4 °C (μέγιστος χρόνος αποθήκευσης: 2 μήνες).
- Πριν από κάθε χρήση της στήλης απορρίπτεται το υπερκείμενο.

2.5. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων (Sambrook *et al.* 2001)

Σε κωνική φιάλη των 250 ml προστίθενται 98 ml απιονισμένο νερό, 2 ml [50X] ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Tris-acetate-EDTA, TAE) και 0.8 gr αγαρόζη.

Το διάλυμα βράζει μέχρι να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη (το διάλυμα γίνεται διαυγές). Το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί λίγο και στη συνέχεια προστίθενται 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο (ΠΡΟΣΟΧΗ!!!)

Έως ότου κρυώσει το μείγμα συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Το παραπάνω μίγμα αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει. Όταν το διάλυμα πήξει, αφαιρείται το χτένι που χρησιμοποιήθηκε για την

δημιουργία φρεατίων, καθώς και τα πλάγια τμήματα του πλαισίου και προστίθεται [1X] ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρισης (980 ml dH₂O και 20 ml [50X] TAE) .

Προετοιμάζονται τα προς ηλεκτροφόριση δείγματα ως εξής: Σε ένα μικροσωληνάκι προστίθενται 20 μl δείγματος και 4 μl διάλυμα φόρτωσης.

Για τον μάρτυρα μοριακών βαρών (MMB), σε ένα μικροσωληνάκι προστίθενται:

-0.5μl [250ng/μl] λDNA/*Hind*III

-1.0μl [10X] ρυθμιστικό φόρτωσης και

-4.5μl απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό

Τελικός όγκος 6.0μl

Τέλος, προστίθενται το διάλυμα φόρτωσης στη συσκευή και τα δείγματα στα αντίστοιχα πηγαδάκια.

[50X] Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1L: Προσθήκη 242 gr Tris, 57.1 ml C₂H₆O (glacial acetic acid), 100 ml 0.5M EDTA(Ethylenediaminetetraacetic Na₂) pH: 8, ογκομέτρηση και συμπλήρωση με dH₂O μέχρις όγκου 1L.

2.6. Ενζυμικές δοκιμές διαπίστωσης της φύσης των απομονωθέντων νουκλεϊνικών οξέων:

A. Δοκιμή DNaseI:

Για τη δοκιμή DNaseI χρησιμοποιούνται:

α) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα χωρίς DNaseI

β) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα με DNaseI

γ) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα και λ*Hind* III

δ) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα με DNaseI και λ*Hind* III

Το DNA λ*Hind*III προστίθεται ως αποδεικτικό της ύπαρξης νουκλεολυτικής ενεργότητας στα δείγματα, ότι δηλαδή δεν υφίστανται στα δείγματα αναστολείς της ενεργότητας του ενζύμου, ή ότι το ένζυμο δεν είναι (ενδεχομένως) ανενεργό.

α) dsRNA

5.0 μl dsRNA

0.8 μl [10X] ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI

2.2 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

β) dsRNA + DNaseI



5.0 μl dsRNA
0.8 μl [10X] ρυθμιστικό διάλυμα DNase I
0.5 μl [5 units/ μl] DNaseI
1.7 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

γ) dsRNA + λDNA/*Hind* III

5.0 μl dsRNA
0.8 μl [10X] ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI
1.0 μl [250ng/ μl] λDNA/*Hind* III
1.2 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

δ) dsRNA + DNaseI + λDNA/*Hind* III

5.0 μl dsRNA
0.8 μl [10X] ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI
1.0 μl [250ng/ μl] λDNA/*Hind* III
0.5 μl [5 units/ μl] DNaseI
0.7 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

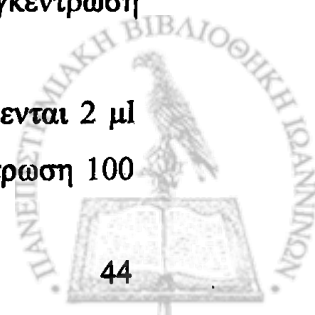
Όλα τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 30 λεπτά και στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.2 %

B. Δοκιμή RNaseA:

Για τη δοκιμή RNaseA χρησιμοποιούνται:

- α) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα χωρίς προσθήκη RNaseA σε υψηλή συγκέντρωση NaCl
- β) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα με προσθήκη RNaseA σε υψηλή συγκέντρωση NaCl
- γ) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα σε χαμηλή συγκέντρωση NaCl
- δ) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα με προσθήκη RNase σε χαμηλή συγκέντρωση NaCl

Για να παρασκευαστεί RNase A συγκέντρωσης 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αρχικά προστίθενται 2 μl [10mg/ml] RNase A σε 198 μl dH₂O οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 100



μg/ml. Στη συνέχεια προστίθενται 40 μl [100 μg/ml] RNase A σε 60 μl dH₂O οπότε προκύπτει το διάλυμα της RNase A με συγκέντρωση 40 μg/ml.

Η αρχική συγκέντρωση του NaCl είναι 5 M και η τελική στην αντίδραση 0.5 M.

α) dsRNA + 0,5M NaCl

5.0 μl dsRNA

0.8 μl [5.0 M] NaCl

2.2 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

β) dsRNA + 0,5M NaCl + RNase A

5.0 μl dsRNA

0.8 μl [5.0 M] NaCl

1.0 μl [40 μg/ml] RNase A

1.2 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

γ) dsRNA

5.0 μl dsRNA

3.0 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

δ) dsRNA + RNase A

5.0 μl dsRNA

1.0 μl [40 μg/ml] RNase A

2.0 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

Όλα τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 30 λεπτά, στη συνέχεια στις αντιδράσεις (γ) και (δ) προστίθεται 0.8 μl [5 M] NaCl, ώστε όλα τα δείγματα κατά την ηλεκτροφόρηση να κινούνται με την ίδια ταχύτητα και κατόπιν ηλεκτροφορούνται σε πήγμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.2 %.

2.7. Μοριακή ταυτοποίηση του μύκητα-ξενιστή

Εισαγωγή:



5.0 μ l dsRNA
0.8 μ l [10X] ρυθμιστικό διάλυμα DNase I
0.5 μ l [5 units/ μ l] DNaseI
1.7 μ l dH₂O/DEPC

8.0 μ l

γ) dsRNA + λDNA/*Hind* III

5.0 μ l dsRNA
0.8 μ l [10X] ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI
1.0 μ l [250ng/ μ l] λDNA/*Hind* III
1.2 μ l dH₂O/DEPC

8.0 μ l

δ) dsRNA + DNaseI + λDNA/*Hind* III

5.0 μ l dsRNA
0.8 μ l [10X] ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI
1.0 μ l [250ng/ μ l] λDNA/*Hind* III
0.5 μ l [5 units/ μ l] DNaseI
0.7 μ l dH₂O/DEPC

8.0 μ l

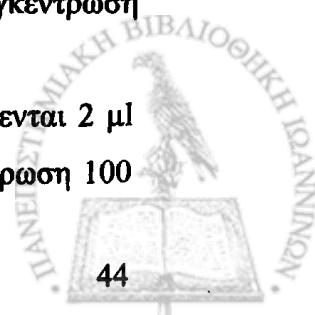
Όλα τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 30 λεπτά και στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.2 %

B. Δοκιμή RNaseA:

Για τη δοκιμή RNaseA χρησιμοποιούνται:

- α) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα χωρίς προσθήκη RNaseA σε υψηλή συγκέντρωση NaCl
- β) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα με προσθήκη RNaseA σε υψηλή συγκέντρωση NaCl
- γ) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα σε χαμηλή συγκέντρωση NaCl
- δ) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα με προσθήκη RNase σε χαμηλή συγκέντρωση NaCl

Για να παρασκευαστεί RNase A συγκέντρωσης 40 μ g/ml αρχικά προστίθενται 2 μ l [10mg/ml] RNase A σε 198 μ l dH₂O οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 100



μg/ml. Στη συνέχεια προστίθενται 40 μl [100 μg/ml] RNase A σε 60 μl dH₂O οπότε προκύπτει το διάλυμα της RNase A με συγκέντρωση 40 μg/ml.

Η αρχική συγκέντρωση του NaCl είναι 5 M και η τελική στην αντίδραση 0.5 M.

α) dsRNA + 0,5M NaCl

5.0 μl dsRNA

0.8 μl [5.0 M] NaCl

2.2 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

β) dsRNA + 0,5M NaCl + RNase A

5.0 μl dsRNA

0.8 μl [5.0 M] NaCl

1.0 μl [40 μg/ml] RNase A

1.2 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

γ) dsRNA

5.0 μl dsRNA

3.0 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

δ) dsRNA + RNase A

5.0 μl dsRNA

1.0 μl [40 μg/ml] RNase A

2.0 μl dH₂O/DEPC

8.0 μl

Όλα τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 30 λεπτά, στη συνέχεια στις αντιδράσεις (γ) και (δ) προστίθεται 0.8 μl [5 M] NaCl, ώστε όλα τα δείγματα κατά την ηλεκτροφόρηση να κινούνται με την ίδια ταχύτητα και κατόπιν ηλεκτροφορούνται σε πήγμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.2 %.

2.7. Μοριακή ταυτοποίηση του μύκητα-ξενιστή

Εισαγωγή:



Η μοριακή ταυτοποίηση του μύκητα απαιτεί αρχικά την απομόνωση γονιδιωματικού DNA και την μεταχείριση του με RNaseA, ώστε να απομακρύνουμε το RNA του μύκητα και τα μόρια dsRNA του μυκοΐου. Με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και με τους κατάλληλους εκκινητές ενισχύεται η περιοχή ITS του rDNA. Κατόπιν θα ακολουθήσει ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR από πήκτωμα αγαρόζης και η αντίδραση δεσμοποίησης με τον πλασμιδιακό φορέα. Ο μετασχηματισμός του κλωνοποιημένου φορέα με τα επιδεκτικά κύτταρα θα γίνει με ηλεκτροδιάτρηση. Η επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων γίνεται σε τρυβλία με το κατάλληλο αντιβιοτικό, ενώ η επιβεβαίωση των θετικών κλώνων θα γίνει με απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Τέλος, η αλληλουχία θα συγκριθεί με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες σε γενετικές τράπεζες με το πρόγραμμα nBLAST.

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από μυκήλιο (Lee *et al.* 1990)

1. Με τη βοήθεια υγρού αζώτου λειοτριβείται σε γουδί 100 mg κατεψυγμένου μυκηλίου και ακολούθως μεταφέρεται η μυκηλιακή σκόνη σε σωληνάκι του 1.5 ml.
2. Προστίθενται 400 μl διάλυμα λύσης (Lysis Buffer) και αναδεύονται ήπια.
3. Το δείγμα επωάζεται στους 65 °C για 60 λεπτά.
4. Ακολούθως προστίθενται 400 μl φαινόλης:χλωροφόρμιο (1:1 v/v) και αναδεύονται ήπια.
5. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10.000 g για 15 λεπτά.
6. Από την υπερκείμενη φάση παίρνονται 300-350 μl και μεταφέρονται σε νέο σωληνάκι του 1.5 ml.
7. Προστίθενται 10 μl [3M] οξικού νατρίου (NaOAc), 0.7 όγκους ισοπροπανόλης και αναδεύονται ήπια.
8. Το δείγμα αποθηκεύεται στους -80 °C για 1 ώρα.
9. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10000 g για 20 λεπτά.
10. Το ίζημα εκπλένεται με 1 ml [70%] αιθανόλης και επαναφυγοκεντρείται στις 10.000 g για 10 λεπτά.
11. Το ίζημα ξηραίνεται και ακολούθως επαναιωρείται σε 50 μl TE.
12. Φυλάσσονται 5.0 μl για μάρτυρα και το υπόλοιπο μεταχειρίζεται με RNaseA

Μεταχείριση με RNaseA

45.0 μl DNA



2.5 μ l [1 mg/ml] RNaseA

2.5 μ l dH₂O

50.0 μ l

Επώαση στους 37 °C 30 λεπτά. Η τελική συγκέντρωση της RNaseA στην παραπάνω αντίδραση είναι 50 μ g/ml. Ακολουθως ηλεκτροφορείται το 1/10 του όγκου σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

Διαλύματα:

Ρυθμιστικό λύσης: 50 mM Tris-HCl pH: 7.2, 50 mM EDTA, 3% Θειϊκό Δωδεκυλικό Νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), 1% β -mercaptoethanol.

TE: 10 mM Tris-HCl pH: 8.0, 1 mM EDTA pH: 8.0

2.8. Ενίσχυση της περιοχής ITS των ριβοσωμικών γονιδίων (rDNA) με τη χρήση PCR

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) μας επιτρέπει την *in vitro* εκθετική ενίσχυση (πολλαπλασιασμό) συγκεκριμένου τμήματος DNA με αποτέλεσμα τη σύνθεση ικανής ποσότητας για την περαιτέρω μελέτη του και κατά συνέπεια την ανίχνευση και προσδιορισμό του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται. Προκειμένου να εφαρμοσθεί η μέθοδος PCR, είναι απαραίτητο να είναι γνωστή η αλληλουχία των δυο άκρων του προς ενίσχυση τμήματος (DNA στόχος) και συγκεκριμένα είκοσι περίπου νουκλεοτίδια από κάθε άκρο. Με τον τρόπο αυτό συντίθεται ολιγομερή τμήματα DNA το καθένα συμπληρωματικό του αντίστοιχου άκρου, γνωστά ως DNA εκκινητές (primers). Η τεχνική PCR βασίζεται στη χρησιμοποίηση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών (π.χ. το ένζυμο *Taq* DNA πολυμεράση που προέρχεται από τον προκαρυώτη *Thermus aquaticus*), καθώς η αντίδραση λαμβάνει χώρα με την εφαρμογή πολλών διαδοχικών κύκλων θερμάνσεως και ψύξεως. Το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία που επιδιώκεται να αντιγραφεί από τους εκκινητές και η DNA πολυμεράση παράγει πολλά αντίγραφα της επιλεγμένης αλληλουχίας. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε μικροσωληνίσκο των 0.5 ml, ο οποίος πρέπει να περιέχει:

1. Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για τη δημιουργία και διατήρηση του απαραίτητου pH για τη δράση του ενζύμου.
2. Την απαραίτητη συγκέντρωση ιόντων Mg⁺⁺, που δρα ως συμπράγοντας της πολυμεράσης.

3. Μόριο εκμαγείο που είναι το DNA που περιέχει ή αποτελεί την προς ενίσχυση αλληλουχία (DNA στόχος).

4. Τα τέσσερα διαφορετικά τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), τα οποία αποτελούν τους δομικούς λίθους για το σχηματισμό της νεοσύστατης αλυσίδας DNA.

5. Τα μόρια εκκινήσεως.

6. Την θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση.

Η εκτέλεση της αντιδράσεως απαιτεί διαδοχικούς κύκλους εναλλαγής θερμοκρασιών, συνθήκες που εξασφαλίζονται με τη χρήση ειδικών εργαστηριακών συσκευών που είναι γνωστές ως θερμοκοιτίδες ή θερμοκυκλοποιητές ή συσκευές PCR. (Sambrook *et al.* 2001).

Γενικά ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Το στάδιο της αποδιάταξης του εκμαγείου DNA που επιτυγχάνεται με τη θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες που πραγματοποιείται με επώαση του μίγματος της αντίδρασης στους 90-95 °C για 30-60 δευτερόλεπτα.

2. Το στάδιο της επανασύνδεσης του εκμαγείου με τους εκκινήτες, όπου ο κάθε εκκινήτης δεσμεύεται σε κάποια περιοχή της μίας από τις δυο αλυσίδες, η οποία περιέχει εκείνη την αλληλουχία βάσεων, που είναι συμπληρωματική ως προς αυτή του εκκινήτη. Φυσικά ο κάθε εκκινήτης δεσμεύεται σε διαφορετική αλυσίδα και σε αντιπαράλληλη κατεύθυνση σχηματίζοντας έτσι ο καθένας τους ένα μικρό δίκλωνο τμήμα. Η επανασύνδεση γίνεται συνήθως με επώαση για 30-60 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 40 έως 70 °C, ανάλογα με το μήκος των εκκινήτων και την αλατότητα του διαλύματος.

3. Το στάδιο της επιμήκυνσης των δεσμευμένων εκκινήτων. Το ένζυμο DNA πολυμεράση πολυμερίζει τα μονομερή dNTP (συνήθως μέσω επώασης επί 30-60 δευτερόλεπτα στους 72 °C) καταλήγοντας έτσι στη σύνθεση νέων τμημάτων DNA.

Ο παραπάνω κύκλος επαναλαμβάνεται συνήθως 25 έως 35 φορές και ολοκληρώνεται με μια τελευταία επώαση στους 72 °C για 10 λεπτά, ώστε να συμπληρωθούν στην απαιτούμενη έκταση όλες οι τυχόν υφιστάμενες ημιτελείς αλυσίδες. (Χατζηλουκάς 2008)

Στην προκειμένη περίπτωση η στοιχειομετρία της αντίδρασης PCR παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2.2: Σύστασης αντιδράσεων PCR



Δείγμα	Δείγμα 1 (no DNA)	Δείγμα 2 (1:1 DNA)	Δείγμα 3 (1:10 DNA)	Τελικές συγκεντρώσεις
Αρνητικός μάρτυρας (no DNA)	-	-	-	
Αραίωση DNA: 10 ⁰	-	1.0 μl	-	
Αραίωση DNA: 1:10	-	-	1.0 μl	
5X Phusion™ HF Buffer	10.0 μl	10.0 μl	10.0 μl	1X
10 mM dNTPs	1.0 μl	1.0 μl	1.0 μl	800 μM
100 % DMSO	1.5 μl	1.5 μl	1.5 μl	3 %
Εκκινητής 1	1.0 μl	1.0 μl	1.0 μl	0.5μM
Εκκινητής 2	1.0 μl	1.0 μl	1.0 μl	0.5μM
Phusion™ DNA polymerase 2u/μl	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl	0.02 u/μl
dH ₂ O	35.0 μl	34.0 μl	34.0 μl	
Συνολικός όγκος	50.0 μl	50.0 μl	50.0 μl	

Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί μία μικρή τροποποίηση των δημοσιευμένων εκκινητών ITS4 και ITS5 (White *et al.* 1990) και οι αλληλουχίες τους παρατίθενται στον πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Χρησιμοποιηθέντων εκκινητών σε διαδικασίες PCR, RT-PCR και ταυτοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Εκκινητής	Αλληλουχία	T _m (°C)
<u>PCR:</u> Εκκινητής1 (ITS 4)	5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'	58
Εκκινητής 2 (ITS 5.1)	5'-GAA-GTA-AAA-GTC-GTA-ACA-AGG-3'	58

PCR / RT-PCR:		
11pcDNAExtF	5'- GCT GTA TGC TGA TCA CTC TAA -3'	62
11pcDNAExtR	5'- GTG CAT GTT AGG TGT ATC ATG -3'	60
11pcDNAIntF	5'- ACC TCA AGC AAG TGC TAT TGC GA-3'	68
11pcDNAntR	5'- GTC TGC TGA TGC AAT CGA GCC A-3'	68
<u>Ταυτοποίησης</u> <u>νουκλεοτιδικής</u> <u>αλληλουχίας</u> M13 Forward (-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	50
M13 Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	50

Η DNA πολυμεράση Phusion™ (Finnzymes) συνθέτει τυφλά άκρα στο αμπλικόνιο που προκύπτει.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή, MJ της Research και το θερμοκρασιακό προφίλ της αντίδρασης είναι το ακόλουθο:

94 °C για 5 λεπτά	} 30 κύκλοι
94 °C για 1 λεπτό	
58 °C για 1 λεπτό	
72 °C για 1 λεπτό	
72 °C για 10 λεπτά	

Το προϊόν της αντίδρασης ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση 5.0 μl της (1/10 όγκου αντίδρασης) σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.5 % και διαπιστώνεται εάν οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι καταλληλότερες, ώστε να προκύπτει η μέγιστη δυνατή απόδοση της αντίδρασης. Αφού καθοριστούν οι ευνοϊκότερες συνθήκες της αντίδρασης ετοιμάζεται μια μεγάλης κλίμακας αντίδραση (100.0 μl) και ηλεκτροφορείται όλο το δείγμα σε παρασκευαστικό πήγμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.5 %. Στη συνέχεια απομονώνεται από το πήγμα η επιθυμητή ζώνη και εκχυλίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου από το σύστημα Geneclean®KIT BIO 101 Systems. Το επόμενο βήμα είναι η αντίδραση δεσμοποίησης της ένθεσης του DNA με τον φορέα.

2.9. Αντίδραση δεσμοποίησης

Η ένθεση του DNA στο φορέα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση, η οποία καταλύει την ομοιοπολική σύνδεση του υπό κλωνοποίηση τμήματος DNA με το φορέα. Το ένζυμο αυτό, που η δράση του εξαρτάται από το ενεργειακό απόθεμα ATP, αναγνωρίζει άκρα, όχι όμως προέλευση και μέγεθος DNA. Έτσι τα τμήματα του DNA που πρόκειται να συνδεθούν πρέπει να είναι συμβατά (ομόλογα ή συμπληρωματικά). Ο κάθε πλασμιδιακός φορέας φέρει συνήθως τέσσερις βασικές χαρακτηριστικές ιδιότητες: 1) την αρχή αντιγραφής, 2) ένα γονίδιο επιλογής και 3) μία σειρά θέσεων περιοριστικών ενζύμων, που απαντώνται μια μόνο φορά στον φορέα και ονομάζονται πολυσυνδέτης. Αυτές οι θέσεις χρησιμοποιούνται για την γραμμοποίηση του πλασμιδίου, προκειμένου να ανασυνδυαστεί με την προσθήκη του εξωγενούς DNA. 4) Φέρει επίσης ένα γονίδιο (ή τμήμα του) διαλογής, για την ευχερή διάκριση των αποικιών με ανασυνδυασμένο φορέα.

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pCR[®] blunt της Invitrogen, ο οποίος φέρει τυφλά άκρα (Εικόνα 2.1). Η αντίδραση δεσμοποίησης είναι η ακόλουθη:

7.0 μl DNA

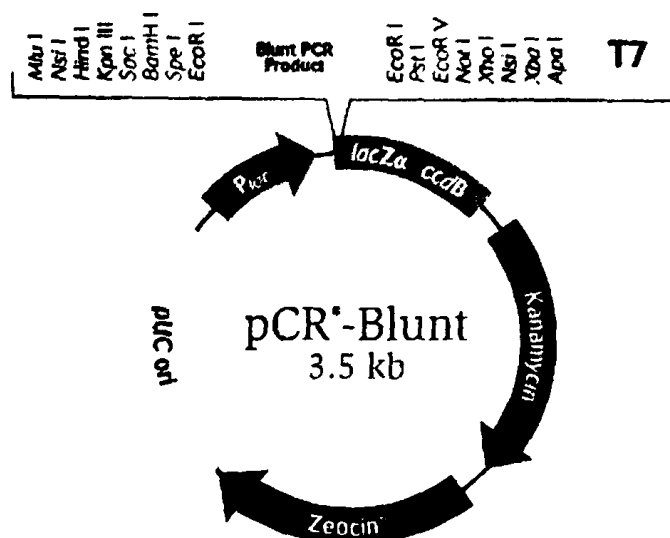
1.0 μl φορέας (25 ng)

1.0 μl [10X] ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA ligase

1.0 μl [4units/ μl] T4 DNA ligase

10.0 μl

Επώαση στους 16 °C για 16 έως 18 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί ο μετασχηματισμός των ανασυνδυασμένων μορίων σε βακτηριακά κύτταρα.



Εικόνα 2.1. Γενετικός και περιοριστικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pCR[®] blunt.

2.10. Μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων με το προϊόν της αντίδρασης δεσμοποίησης

Κατά το μετασχηματισμό, τα ανασυνδυασμένα μόρια μπορούν πλέον να εισαχθούν στα βακτηριακά κύτταρα είτε μέσω της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) είτε μέσω του χημικού μετασχηματισμού. Τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Εκεί αναπτύσσονται μόνο τα βακτήρια που περιέχουν πλασμίδια τα οποία τους προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Από τη διαίρεση κάθε ανθεκτικού κυττάρου προκύπτει μια αποικία βακτηρίων. Τα βακτήρια κάθε αποικίας έχουν προέλθει από ένα μόνο κύτταρο, το οποίο περιέχει ένα μόνο μόριο ανασυνδυασμένου DNA (Watson *et al.* 2007). Η διαλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών (η διάκριση μεταξύ αποικιών που έχουν προσλάβει ένα ανασυνδυασμένο μόριο φορέα-ένθεσης από εκείνες τις αποικίες οι οποίες έχουν προσλάβει απλώς επανακυκλοποιημένο φορέα χωρίς ένθεση) στηρίζεται στη δράση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση και στη χρήση ενός χρωμογόνου υποστρώματος αυτού του ενζύμου του X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολ-3-υλ-β-D-γαλακτοζίδιο) (Χατζηλουκάς 2008). Το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση υδρολύει τη χημική ουσία X-gal παράγοντας μια αδιάλυτη μπλε χρωστική. Σε πολλούς φορείς η θέση κλωνοποίησης βρίσκεται μέσα σε ένα γονίδιο, στο *lacZ'*, που κωδικοποιεί το αμινοτελικό άκρο της β-γαλακτοζιδάσης. Ένα τέτοιος

φορέας μπορεί να μεταφερθεί σε κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος, στο χρωμόσωμα του οποίου κωδικοποιεί ένα μεταλλαγμένο γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης, από το οποίο απουσιάζουν ορισμένες αλληλουχίες που κωδικοποιούν το αμινοτελικό άκρο. Στην περίπτωση αυτή οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες που παράγονται από το μεταλλαγμένο γονίδιο και το *lacZ'* συνδυάζονται και προκύπτει το ενεργό ένζυμο. Έτσι, οι αποικίες που περιέχουν φορείς στους οποίους δεν έχει γίνει ένθεση DNA αποκτούν μπλε χρώμα. Αντίθετα οι βακτηριακές αποικίες που φέρουν ανασυνδυασμένους φορείς παραμένουν άχρωμες («λευκές») καθώς η ένθεση ενός τμήματος DNA στο *lacZ'* προκαλεί την αδρανοποίηση του.

Τα βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε ως επιδεκτικά για τον μετασχηματισμό είναι το στέλεχος *TOP 10* του *Escherichia coli* και ο γονότυπος τους είναι ο εξής: *F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG*

Ο μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιείται σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

Αρχικά γίνεται προετοιμασία των επιδεκτικών κυττάρων:

1. Σε 2 κωνικές φιάλες του 1 λίτρου που περιέχουν 250 ml LB, μοιράζονται 5 ml φρέσκιας καλλιέργειας *E. Coli*, που είχε προηγουμένως αναπτυχθεί για 4 ώρες.
2. Τα κύτταρα αναπτύσσονται υπό ανάδευση στις 300 rpm στους 37 °C OD600 περίπου 0.5-0.7. Τα καλύτερα αποτελέσματα δίνονται όταν η καλλιέργεια βρίσκεται στο μέσο της εκθετικής φάσης αύξησης.
3. Τα κύτταρα ψύχονται σε πάγο για περίπου 20 λεπτά. Για όλα τα ενδιάμεσα βήματα, τα κύτταρα διατηρούνται κοντά στους 0 °C (υδατόλουτρο νερού/πάγου) και παγώνονται τα δοχεία που θα χρησιμοποιήθουν. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε αποστειρωμένο κρύο δοχείο φυγοκέντρησης 500 ml και φυγοκεντρούνται στις 4.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C.
4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται με προσοχή. Είναι καλύτερα να «θυσιάστουν» μερικά κύτταρα παρά να μείνει υπερκείμενο.
5. Ήπια επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 500 ml παγωμένης γλυκερόλης 10 %. Φυγοκέντρηση στις 4.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C.
6. Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου.
7. Το ιζήμα επαναδιαλυτοποιείται σε 250 ml παγωμένης γλυκερόλης 10 %. Φυγοκέντρηση στις 4000g για 15 λεπτά στους 4 °C. Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου.

8. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με 20 ml παγωμένης γλυκερόλης 10 % και μεταφέρονται σε σωληνάκι των 50 ml. Φυγοκέντρωση στις 4000 g για 15 λεπτά στους 4 °C. Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου.

9. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε τελικό όγκο 1-2 ml παγωμένης [10 %] γλυκερόλης. Η συγκέντρωση των κυττάρων πρέπει να είναι περίπου $1-3 \times 10^{10}$ κύτταρα/ml.

10. Αυτό το διάλυμα μπορεί να χωριστεί σε μικροσωληνάκια με 40 μl αιώρημα κυττάρων, να ψυχθεί σε υγρό άζωτο και να αποθηκευτεί στους -70 °C. Τα κύτταρα σε αυτήν την κατάσταση διατηρούνται μέχρι και 6 μήνες τουλάχιστον.

Το επόμενο βήμα είναι η ηλεκτροδιάτρηση:

1. Τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο.

Για κάθε δείγμα που θα χρησιμοποιηθεί: τοποθετείται ένα μικροσωληνάκι των 1.5 ml, μια κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης 0.1 ή 0.2 cm στον πάγο και ένα σωληνάκι 17 x 100 mm με 1 ml S.O.C. σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Σε ένα παγωμένο μικροσωληνάκι των 1.5 ml προστίθενται 20 μl διαλύματος κυττάρων για κυψελίδα 0.1 cm (ή 20 - 40 μl διαλύματος κυττάρων για κυψελίδα 0.2 cm) και 2.0 μl από το προϊόν της αντίδρασης δεσμοποίησης.

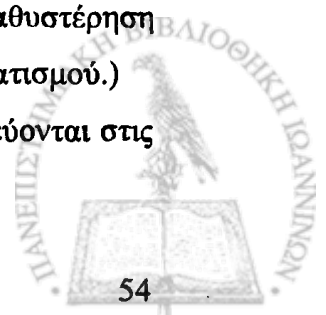
3. Από την οθόνη «Home» επιλέγεται η εντολή «Pre-set protocol», μετά το πρωτόκολλο για βακτήρια (πληκτρολογείται 4 και μετά «Enter» 2 φορές). Όταν χρησιμοποιηθεί η κυψελίδα 0.1 πληκτρολογείται «Enter» για να ανοίξει το πρωτόκολλο «*E. coli*, 1mm cuvette Protocol Detail screen». Όταν χρησιμοποιείται η κυψελίδα 0.2 πληκτρολογείται 2 και μετά «Enter», ή 3 και μετά «Enter», ώστε να εμφανιστεί η οθόνη «Protocol Detail screen to pulse at 2.5 or 3.0 kV».

4. Το μίγμα των κυττάρων και DNA μεταφέρεται σε παγωμένη κυψελίδα και ανακινείται. Τοποθετείται η κυψελίδα στο «ShockPod». Κλείνεται το καπάκι.

5. Πληκτρολόγείται «pulse» μια φορά.

6. Η κυψελίδα βγαίνει α μ έ σ ω ς και προτίθεται 1 ml S.O.C. στην κυψελίδα. Γρήγορα αλλά απαλά επαναδιαλυτοποιούνται τα κύτταρα με μια πιπέτα Paster (το διάστημα μεταξύ του παλμού και της μεταφοράς των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό είναι κρίσιμο για την ανάκτηση των μετασχηματισμένων κυττάρων. Καθυστέρηση ακόμη και 1 λεπτού προκαλεί υποτριπλασιασμό της ικανότητας μετασχηματισμού.)

7. Το διάλυμα των κυττάρων μεταφέρεται σε νέο μικροσωλήνα και αναδεύονται στις 225 rpm για 1 ώρα στους 37 °C.



8. Καταγράφονται οι συνθήκες και οι παραμέτροι του παλμού. Ο σταθερός χρόνος πρέπει να είναι στα 5 milliseconds.
9. Το διάλυμα των κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό (Luria-Bertani-Agar, LBA) που περιέχουν αντιβιοτικό καναμυκίνη και X-gal σε τελικές συγκεντρώσεις 50 µg/ml.
10. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 16 έως 18 ώρες.

Διαλύματα-θρεπτικά υλικά μετασχηματισμού

Γλυκερόλη 10% (-20° C)

- **S.O.B.** (ανά λίτρο): 20.0 gr Bacto-tryptone, 5.0 gr Bacto-yeast extract, 0.5 gr NaCl, 2.5 mM KCl.

Το pH ρυθμίζεται στο 7.5 με 5 M NaOH και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο. Όταν το διάλυμα ψυχθεί προστίθενται MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 10 mM

- **S.O.C:** Σε 97 ml S.O.B. προστίθενται 1 ml 1M MgSO₄ και 2 ml 1M γλυκόζη.

Luria-Bertani (LB):

10.0 gr Bacto-tryptone	}	ανά λίτρο, pH= 7.5
5.0 gr Bacto-yeast extract		
10.0 gr NaCl		

- **Luria-Bertani agar (LBA):** LB περιέχον 1.5 % άγαρ.

Καναμυκίνη 25 mg/ml

X-gal 20 mg/ml

2.11. Επιβεβαίωση της παρουσίας ανασυνδυσμένου φορέα στις μετασχηματισμένες λευκές αποικίες των τρυβλίων μετασχηματισμού

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι λευκές αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία περιέχουν μόρια ανασυνδυσμένου με ένθεση φορέα ακολουθεί: α) εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας LB, που περιέχει καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωσή 50 µg/ml, με μια λευκή αποικία, β) απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini-prep) και γ) πέψη του προϊόντος με περιοριστικά ένζυμα. Η απομόνωση γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου του συστήματος της εταιρείας Macherey-Nagel.

Στην αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιείται ως αρνητικό μάρτυρας και μη μεταχειρισμένο πλασμιδιακό DNA:

Πλασμιδιακό DNA μεταχειρισμένο με περιοριστικά ένζυμα:

3.0 μl pDNA

0.8 μl [10X] Ρυθμιστικό διάλυμα περιοριστικού (Restriction Buffer, RB)

0.5 μl [12 units/μl] *EcoR* I

3.7 μl dH₂O

8.0 μl

Αρνητικός Μάρτυρας:

3.0 μl pDNA

0.8 μl [10X] RB

4.2 μl dH₂O

8.0 μl

Τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 1 ώρα και κατόπιν ηλεκτροφορούνται σε πήγμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.5 %. Αφού διαπιστωθεί η ύπαρξη ένθεσης DNA στους ανασυνδυασμένους κλώνους, μια μικρή ποσότητα από το υπόλοιπο της υγρής καλλιέργειας επιστρώνεται σε νέο τρυβλίο LBA-καναμυκίνης-X-gal με κρίκο ώστε να εμφανιστούν μονές αποικίες αλλά και για να καθαρισθεί η αρχική καλλιέργεια. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 16 έως 18 ώρες και από τις μονές αποικίες εμβολιάζονται υγρές καλλιέργειες LB για να απομονωθεί πλασμιδιακό DNA που θα χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ένθεσης του DNA. Το υπόλοιπο της υγρής καλλιέργειας χρησιμοποιείται για την παρασκευή καλλιέργειας προς μόνιμη φύλαξη με την προσθήκη γλυκερόλης σε τελική συγκέντρωση 10 % και διατήρηση σε θερμοκρασία -80 °C.

2.12. Ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA

Η ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA πραγματοποιήθηκε από την εταιρία MacroGen Inc, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια: Universal Forward Primer M13 (-20) και Universal Reverse Primer M13, των οποίων η αλληλουχία παρατίθεται στον Πίνακα 2.3 και η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA που απαιτείται για την ανάγνωση είναι 100 ng/μl. Η αλληλουχία συγκρίθηκε με άλλες που είναι κατατιθέμενες στη βάση δεδομένων GenBank με το πρόγραμμα nucleotide Blast (nBlast) του NCBI και έτσι τελικά ταυτοποιήθηκε ο μύκητας.

2.13. Μοριακή ταυτοποίηση του μυκοϊού dsRNA



2.13.1. Προετοιμασία:

Αφού διαπιστώθηκε η ύπαρξη μορίων dsRNA ακολουθεί εκχύλισή του από μεγαλύτερη ποσότητα μυκηλίου. Συνήθως συμπυκνώνεται το δείγμα σε μικρό όγκο (20.0 μ l) με την προσθήκη [3 M] CH₃COONa και με 3 όγκους απόλυτης αιθανόλης παγωμένης. Έπειτα, γίνεται μεταχείριση του δείγματος με DNaseI για την απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA του μύκητα και με RNaseA σε συνθήκες υψηλής αλατότητας για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου επιμόλυνσης του dsRNA με μονόκλιωνα μόρια RNA του μύκητα ή του μυκοϊού.

Μεταχείριση του δείγματος με DNaseI

20.0 μ l dsRNA

2.5 μ l [10X] ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI

1.5 μ l [5 units/ μ l] DNaseI

1.0 μ l dH₂O/DEPC

25.0 μ l

Το δείγμα επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά και στη συνέχεια αδρανοποιείται η DNaseI με επώαση στους 70 °C για 10 λεπτά.

Μεταχείριση του δείγματος με RNaseA

25.0 μ l dsRNA

3.0 μ l [5 M] NaCl

1.2 μ l [40 μ g/ ml] RNaseA

0.8 μ l dH₂O/DEPC

30.0 μ l

Επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά.

Η εξουδετέρωση της RNaseA, αλλά και ο πλήρης καθαρισμός του dsRNA από τα ρυθμιστικά διαλύματα των ενζύμων γίνεται με την προσθήκη φαινόλης, χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

Εξουδετέρωση DNaseI και RNaseA (Sambrook)

1. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης. Ισχυρό vortex.

2. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, 15000 rpm, 4 °C

3. Λήψη υπερκείμενου και προσθήκη ίσου όγκου μίγματος φαινόλης-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1). Ισχυρό vortex.

4. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, 15000 rpm, 4 °C.
5. Λήψη υπερκειμένου και προσθήκη ίσου όγκου μίγματος χλωροφόρμιο ισοαμλική αλκοόλη 24:1. Ισχυρό vortex.
6. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, 15000 rpm, 4 °C.
7. Λήψη υπερκειμένου.

Συμπύκνωση δείγματος (Sambrook *et al.* 2001)

1. Προσθήκη [3 M] CH₃COONa, ώστε η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 0.3 M.
2. Προσθήκη 3 όγκων απόλυτης αιθανόλης (-20 °C) για νουκλεϊκά οξέα.
3. Ήπια ανάδευση.
4. Επάωση στους -80 °C για περίπου 1 ώρα.
5. Φυγοκέντρηση 15000 rpm, 30 λεπτά, 4 °C.
6. Απόρριψη του υπερκειμένου.
7. Καθαρισμός του ιζήματος με 70 % αιθανόλη (-20 °C).
8. Στέγνωμα του ιζήματος στο Speedvac (THERMO).
9. Διαλυτοποίηση στον επιθυμητό όγκο με dH₂O/DEPC.

2.13.2. Σύνθεση και κλωνοποίηση συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA)

Η κλωνοποίηση του μυκοϊού προϋποθέτει τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο dsRNA. Η σύνθεση του cDNA θα γίνει με τη διαδικασία της συζευγμένης αντίστροφης μεταγραφής – αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης [reverse transcription-PCR (RT-PCR)]. Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή (τρανσκριπτάση) των ρετροϊών μπορεί να συνθέσει DNA παρουσία: 1) μήτρας RNA, 2) εκκινητή με 3'-ελεύθερο υδροξύλιο και 3) τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs). Το προϊόν της αντίδρασης είναι ένα υβρίδιο RNA-DNA και η σύνθεση των δίκλωνων μορίων DNA γίνεται με τη βοήθεια της PCR, έχοντας ως εκμαγείο το DNA του υβριδίου. Τα τμήματα αυτά του cDNA που συντίθενται μπορούν να κλωνοποιηθούν σε κατάλληλους φορείς, στους οποίους έχουν δημιουργηθεί συμβατά άκρα. Η δημιουργία ενός πληθυσμού τέτοιων ανασυνδυασμένων φορέων που έχουν εισαχθεί σε βακτήρια, αποτελούν μια cDNA βιβλιοθήκη του γονιδιώματος του ιού.

Για τη σύνθεση του cDNA με RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές προσεγγίσεις: 1) Κατά την πρώτη χρησιμοποιήθηκε μίγμα τυχαίων εξαμερών εκκινητών (Random primers) με εννεαμερείς εκκινητές, οι οποίοι χρησιμεύουν σε αντιδράσεις σύνθεσης τυχαία ενισχυόμενου πολυμορφικού DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Με αυτόν τον τρόπο η εκκίνηση της αντίστροφης μεταγραφής γίνεται από πολλές θέσεις και όχι μόνο από ένα 3' άκρο, ενώ τα τμήματα του cDNA που προκύπτουν είναι μικρά σε μέγεθος.

2) Στη δεύτερη προσέγγιση σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, των οποίων το 3'-OH άκρο είχε «φραγεί» με φωσφορική ομάδα. Οι εκκινητές αυτοί συνδέονται με τα 3'-OH άκρα του dsRNA μέσω του ενζύμου T4 RNA δεσμάση (T4 RNA ligase). Ακολούθως η σύνθεση του cDNA γίνεται με τους συμπληρωματικούς εκκινητές. Με τη τεχνική αυτή επιδιώκεται να συντεθούνε μόρια cDNA πλήρους μήκους.

Από παρασκευαστικό πήγμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.2 % απομονώνεται η επιθυμητή ζώνη του dsRNA (μεγέθους περίπου 3.3 Kb) και εκχυλίζεται από το πήγμα σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου του συστήματος GenClean. Το προϊόν της απομόνωσης (1/10) ηλεκτροφορεύεται σε διαγνωστικό πήγμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.2 %, ώστε να καθορισθεί η ποσότητα του dsRNA που θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση του cDNA. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για αυτό τον σκοπό είναι τα εξής:

2.13.2.1. Σύνθεση cDNA με μίγμα τυχαίων εξαμερών εκκινητών και εννεαμερών εκκινητών:

Σύνθεση της πρώτης αλυσίδας cDNA (1st strand cDNA)

Προσθήκη:

9.0 μl dsRNA

1.0 μl [500 ng/ μl] τυχαίων εκκινητών

2.0 μl [20 pmoles/ μl] εννεαμερών εκκινητών

12.0 μl

Επώαση στους 100 °C για 10 λεπτά.

Αμέσως σε υγρό άζωτο για 1-2 λεπτά.

Προσθήκη:

Τελικές συγκεντρώσεις

4.0 μl [5X] ρυθμιστικό διάλυμα Super script [1X]

0.8 μl [50 mM] dNTPs [2.0 mM]



2.0 μl [0.1 M] DTT (Dithiothreitol) [0.01 M]
 1.0 μl [40 units/ μl] RNase out [2.0 units/ μl]

Επώαση στους 25 °C για 2 λεπτά

Προσθήκη: 1.0 μl [200 units/ μl] του ενζύμου Super Script II (Invitrogen).
 Ακολουθούν διαδοχικές επωάσεις στους: 25 °C για 10 λεπτά, 42 °C για 50 λεπτά και 70 °C για 15 λεπτά.

Οι εννεαμερείς εκκινητές είναι μίγμα των παρακάτω εκκινητών και η αλληλουχία τους παρατίθεται στον Πίνακα 2.4:

- 2.22 μl 100 pmoles/ μl OPA 2
- 2.22 μl 100 pmoles/ μl OPG 2
- 2.22 μl 100 pmoles/ μl OPH 13
- 2.22 μl 100 pmoles/ μl OPAII 16
- 2.22 μl 100 pmoles/ μl OPAH 18
- 2.22 μl 100 pmoles/ μl OP AI 5
- 2.22 μl 100 pmoles/ μl OP AI 8
- 2.22 μl 100 pmoles/ μl OP AI 13
- 2.22 μl 100 pmoles/ μl OP AI 14

Πίνακας 2.4: Εννεαμερείς εκκινητές

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm (°C)
OPA 2	5'- TGC CGA GCT G -3'	34
OPG 2	5'- GGC ACT GAG G -3'	34
OPH 13	5'- GAC GCC ACA C -3'	34
OPAI 16	5'- CAA GGT GGG T -3'	32
OPAH 18	5'- GGG CTA GTC A -3'	32
OPAI 5	5'- GTC GTA GCG G -3'	34
OPAI 8	5'- AAG CCC CCC A -3'	34
OPAI 13	5'- ACG CTG CGA C -3'	34
OPAI 14	5'- TGG TGC ACT C -3'	32

Σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας cDNA (2nd strand cDNA)

Προσθήκη:

20.0 μl πρώτης αλυσίδας cDNA

Τελικές συγκεντρώσεις



1.0 μl [500 ng/ μl] τυχαίων εκκινητών	
2.0 μl [20 pmoles/ μl] εννεαμερών εκκινητών	
3.0 μl [10X] ρυθμιστικό διάλυμα DyNazyme EXT	[1X]
1.8 μl [50 mM] MgCl ₂	[3.0 mM]
0.5 μl [50 mM] dNTPs	[0.8 mM]
1.2 μl [1units/ μl] DyNazyme EXT πολυμεράση	
<hr/>	
30.0 μl	

Η αντίδραση πραγματοποιείται στον θερμοκυκλοποιητή MiniCycler της εταιρείας MJ Research. Το θερμοκρασιακό προφίλ της αντίδρασης είναι το ακόλουθο:

94 °C για 2 λεπτά.	} 30 κύκλοι
94 °C για 45 δευτερόλεπτα	
40 °C για 1 λεπτό	
72 °C για 2 λεπτά	
72 °C για 7 λεπτά	

Στη συνέχεια ηλεκτροφορείται 5.0 μl από το προϊόν της αντίδρασης σε πήγμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1 %.

Το ένζυμο DyNazyme EXT πολυμεράση (Finnzymes) συνθέτει προϊόν με τυφλά άκρα. Τα τμήματα του cDNA που προέκυψαν θα κλωνοποιηθούν στο φορέα pCR® II της Invitrogen, ο οποίος φέρει θυμίνη (T) στο 3'-άκρο. Για αυτό λοιπόν προστίθεται αδενίνη (A) στο 3'-άκρο με το ένζυμο *Taq* DNA πολυμεράση:

Προσθήκη:	Τελικές συγκεντρώσεις:
25.0 μl δεύτερης αλυσίδας cDNA	
3.2 μl [10X] ρυθμιστικό διάλυμα PCR	[1X]
3.2 μl [10 mM] dNTPs	[1 mM]
0.8 μl [5 units/μl] <i>Taq</i> DNA πολυμεράση (Invitrogen)	
<hr/>	
32.2 μl	

Επώαση στους 72 °C για 30 λεπτά. Ακολούθως, το δείγμα κατακρημνίζεται με [3 M] CH₃COONa (pH: 5.5) και 3 όγκους απόλυτης αιθανόλης (-20 °C) για νουκλεϊνικά οξέα σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Η διαλυτοποίηση γίνεται με 5.0 μl TE [1X].

2.13.2.2. Σύνθεση cDNA με εκκινητές με φραγή στο 3'- άκρο

Προσθήκη εκκινητών oligodG με φραγή στο 3-OH του dsRNA μέσω του ενζύμου T4 RNA Ligase2

Προσθήκη:



7.0 μl dsRNA
1.0 μl [10X] ρυθμιστικό διάλυμα T4 RNA Ligase2
1.0 μl [23 pmoles/ μl] εκκινητές oligodG με φραγή στο 3'- άκρο
1.0 μl [10 units/ μl] T4 RNA Ligase2

10.0 μl

Επώαση στους 37 °C για 45 λεπτά και στη συνέχεια στους 70 °C για 10 λεπτά.

Ακολουθεί κατακρήμνιση με [3 M] CH₃COONa (pH: 5.5) και 3 όγκους απόλυτης αιθανόλης(-20 °C) για νουκλεϊνικά οξέα σύμφωνα με το προαναφερθέν πρωτόκολλο (τμήμα 2.13.2.1.).

Η διαλυτοποίηση γίνεται με 2.0 μl dH₂O/DEPC.

Σύνθεση της πρώτης αλυσίδας cDNA

Προσθήκη:

2.0 μl dsRNA
1.0 μl [20 pmoles/ μl] oligodC
3.0 μl

Επώαση στους 100 °C για 10 λεπτά.

Αμέσως σε υγρό άζωτο για 1-2 λεπτά.

Προσθήκη:

Τελικές συγκεντρώσεις

7.5 μl [2X] ρυθμιστικό διάλυμα Bca	[1X]
3.0 μl [25 mM] MgSO ₄	[5.0 mM]
0.75 μl [10 mM] dNTPs	[0.5 mM]
0.375 μl [40units/ μl] RNase inhibitor	[1.0 units/ μl]
0.75 μl [22 units/ μl] Bca Best πολυμεράση	[1.1 units/ μl]

12.375 μl

Ακολουθούν διαδοχικές επώσεις στους 65 °C για 30 λεπτά, 98 °C για 5 λεπτά και 5 °C για 5 λεπτά.

Προσθήκη εκκινητών oligodG με φραγή στο 3-OH της πρώτης αλυσίδας cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου T4 RNA Ligase 2

Προσθήκη:

12.375 μl πρώτης αλυσίδας cDNA
1.6 μl [10X] ρυθμιστικό διάλυμα T4 RNA Ligase2
1.0 μl [23 pmoles/ μl] εκκινητών oligodG με φραγή στο 3'- άκρο



1.0 μl [10 units/ μl] T4 RNA Ligase2

16.0 μl

Επώαση στους 37 °C για 45 λεπτά και στη συνέχεια στους 70 °C για 10 λεπτά.

Ακολουθεί κατακρήμνιση με 3 M CH₃COONa (pH: 5.5) και 3 όγκους απόλυτης αιθανόλης (-20 °C) για νουκλεϊνικά οξέα σύμφωνα με το πρωτόκολλο (τμήμα 2.13.2.1.).

Η διαλυτοποίηση γίνεται με 10.0 μl dH₂O/DEPC.

Σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας cDNA

Προσθήκη:

Τελικές συγκεντρώσεις

10.0 μl πρώτης αλυσίδας cDNA	
10.0 μl [2X] ρυθμιστικό διάλυμα Bca	[1X]
1.5 μl [25 mM] MgSO ₄	[2.5 mM]
1.0 μl [20 pmoles/ μl] oligodC	
1.0 μl [20 pmoles/ μl] oligodG	
0.25 μl [10 mM] dNTPs	[0.1 mM]
0.25 μl [5 units/ μl] Bca optimized πολυμεράση	
1.0 μl dH ₂ O/DEPC	

25.0 μl

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή MiniCycler της εταιρείας MJ Research και το θερμοκρασιακό προφίλ της αντίδρασης είναι το ακόλουθο:

94 °C για 1 λεπτό

94 °C για 30 δευτερόλεπτα

60 °C για 30 δευτερόλεπτα

72 °C για 1 λεπτό

72 °C για 5 λεπτά

} 30 κύκλοι

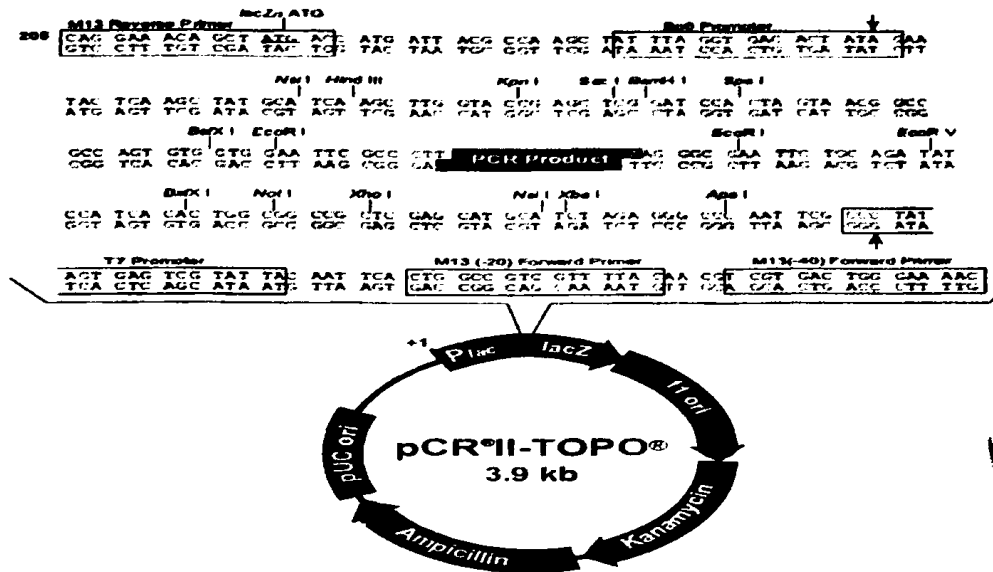
Στη συνέχεια ηλεκτροφορεύεται 5.0 μl από το προϊόν της αντίδρασης σε πήγμα αгарόζης συγκέντρωσης 1 %. Ακολούθως, κατακρημνίζεται το δείγμα με [3 M] CH₃COONa (pH: 5.5) και 3 όγκους απόλυτης αιθανόλης (-20 °C) για νουκλεϊνικά οξέα σύμφωνα με το πρωτόκολλο (τμήμα 2.13.2.1.).

Η διαλυτοποίηση γίνεται με 5.0 μl [1X] TE.

2.13.2.3. Αντίδραση δεσμοποίησης των μορίων cDNA με τον φορέα pCR^R II



Η αντίδραση δεσμοποίησης πραγματοποιείται με τη χρήση της τοποϊσομεράσης I η οποία καταλύει τη σύνδεση μεταξύ του 3'- T- άκρου του φορέα pCR[®] II (Invitrogen) με το 3'-A- άκρο της ένθεσης του cDNA.



Εικόνα 2.2. Γενετικός και περιοριστικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pCR[®] II.

Η στοιχειομετρία της αντίδρασης είναι η ακόλουθη:

4.0 μl cDNA

1.0 μl διάλυμα άλατος (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂)

1.0 μl φορέα pCR[®] II (25ng)

6.0 μl

Επώαση στους 23 °C για 5 λεπτά.

2.13.2.3. Μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων με το προϊόν της αντίδρασης δεσμοποίησης

Τα ανασυνδυασμένα μόρια cDNA θα εισαχθούν σε επιδεικτικά κύτταρα TOP10 του *Escherichia coli* με χημικό μετασχηματισμό. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το εξής:

1. Ο μικροσωλήνας με τα επιδεικτικά κύτταρα τοποθετείται σε πάγο και προστίθενται

2.0 μl από το προϊόν της αντίδρασης δεσμοποίησης και επωάζονται για 30 λεπτά.



2. Ακολουθεί η υποβολή σε θερμικό σοκ. Συγκεκριμένα ο μικροσωλήνας μεταφέρεται με ταχύτητα από τον πάγο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42 °C και επώαζεται για 45 δευτερόλεπτα.
3. Άμεση ταχύτατη μεταφορά του μικροσωλήνα από το υδατόλουτρο στον πάγο και επώαση για 2-3 λεπτά.
4. Προσθήκη 250 μl θρεπτικού S.O.C. και επώαση στους 37 °C για μια ώρα με ανάδευση στους 220 rpm. Η επώαση αυτή επιτρέπει στα κύτταρα να αναρρώσουν από το θερμικό σοκ και να εκφράσουν το γονίδιο *bla* (γονίδιο της β λακταμάσης).
5. Διασπορά της καλλιέργειας μετασχηματισμού σε τρυβλία LBA-Kan-X-gal, με όγκους των 50 μl ανά τρυβλίο. Οι τελικές συγκεντρώσεις της καναμυκίνης (Kan) και του X-gal είναι 50 μg/ml.
6. Επώαση στους 37 °C για 16 έως 18 ώρες.

Η διαπίστωσή της παρουσίας ανασυνδυασμένου φορέα στις μετασχηματισμένες λευκές αποικίες των τρυβλίων μετασχηματισμού, η αποθήκευση στην υπερκατάψυξη των θετικών κλώνων που εντοπίστηκαν, καθώς και η ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA γίνεται όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.14. Έλεγχος της προέλευσης των κλωνοποιημένων μορίων cDNA μέσω της διαδικασίας στυπώματος και υβριδισμού νουκλεϊνικών οξέων.

2.14.1. Εισαγωγή

Για να διαπιστωθεί εάν οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι, που προέκυψαν από τη σύνθεση του cDNA, παρουσιάζουν ομολογία με το dsRNA και όχι με το γονιδιωματικό DNA του μύκητα χρησιμοποιείται η διαδικασία της μεταφοράς και υβριδοποίησης νουκλεϊνικών οξέων κατά Southern (Sambrook *et al.* 2001). Με τη διαδικασία αυτή καθίσταται δυνατή η ανίχνευση και η αποτύπωση της ύπαρξης ή μη ομολόγων περιοχών μεταξύ δυο ή περισσότερων δειγμάτων DNA ή RNA. Αρχικά ηλεκτροφορούνται τα δείγματα σε πήγμα αγαρόζης όπου τα μόρια RNA, πρέπει να βρίσκονται σε μονόκλωνη κατάσταση ώστε να μην δημιουργούν βρόγχους με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου μέσω συμπληρωματικότητας και να μην επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε αλκαλικό διάλυμα ώστε τα νουκλεϊνικά οξέα να αποδιαταχθούν. Στη συσκευή μεταφοράς μεταφέρεται στο

ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, το οποίο μέσω της δράσης τριχοειδών δυνάμεων συμπαρασύρει τα μονόκλιωνα μόρια DNA και RNA και ακινητοποιεί μονόκλιωνα πλέον πάνω σε ειδική νάιλον μεμβράνη υβριδοποίησης. Έτσι, πάνω στη μεμβράνη αποτυπώνεται το ακριβές πρότυπο ζώνωσης των DNA και RNA που υπάρχει στο πηγμα. Ακολούθως, μέσω χρήσης ενός γνωστού ειδικά σημασμένου μορίου DNA υβριδοποιείται η μεμβράνη και ανιχνεύεται η παρουσία ομολόγων περιοχών στα ηλεκτροφορηθέντα δείγματα (Χατζόπουλος 2001).

Το dsRNA στο παρασκευαστικό πηγμα αγαρόζης θα πρέπει να είναι σε μονόκλιωνα κατάσταση, οπότε και τα υπόλοιπα δείγματα αποδιατάσσονται με χημικό τρόπο. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στηρίζεται στο στύπωμα και υβριδισμός κατά Northern με μερικές τροποποιήσεις.

2.14.2. Σήμανση του ιχνηλάτη

Ως ιχνηλάτης χρησιμοποιήθηκε η ένθεση των επιβεβαιωμένων θετικών κλώνων που προέκυψαν από την κλωνοποίηση των μορίων cDNA. Το πλασμαδιακό DNA αντιδρά με το περιοριστικό ένζυμο *EcoR* I, στους 37 °C για 16 έως 18 ώρες. Η στοιχειομετρία της αντίδρασης είναι η εξής:

21.0 μl pDNA

2.5 μl [10X] RB

1.5 μl [12 units/μl] *EcoR* I

25.0 μl

Το προϊόν της πέψης ηλεκτοφορείται σε πηγμα αγαρόζης 1.2 % και ακολουθεί απομόνωση της ένθεσης από το πήκτωμα σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου από το σύστημα GeneClean®KIT BIO 101 Systems. Στη συνέχεια η ένθεση ηλεκτροφορείται και απομονώνεται πάλι με εκχύλιση από το πηγμα. Η διαδικασία αυτή γίνεται ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης της ένθεσης από μόρια του φορέα. Αποδιάταξη 15.0 μl του ιχνηλάτη με θέρμανση στους 100 °C για 10 λεπτά και αμέση τοποθέτηση του δείγματος σε παγόθερο για 2 λεπτά.

Προσθήκη:

2.0 μl dNTPs (1 mM dATP, 1mM dGTP, 1mM dCTP, 0.65 mM dTTP,
0.35 mM dUTP)

2.0 μl τυχαίων εκκινητών

1.0 μl [2 units/μl] Klenow



20.0 μl

Το δείγμα φυγοκεντρείται σύντομα για 20 δευτερόλεπτα και επωάζεται στους 37 °C για 2-18 ώρες. Για να αδρανοποιηθεί το ένζυμο Klenow προστίθενται 2.0 μl 2 mM EDTA και επωάζεται στους 65 °C για 10 λεπτά. Το δείγμα αποθηκεύεται στους -20 °C, μέχρις ότου να χρησιμοποιηθεί.

2.14.3. Αποδιάταξη dsRNA και dsDNA

2.0 μl dsRNA/dsDNA

2.0 μl [10X] MOPS

4.0 μl [37%] φορμαλδεΐδη

10.0 μl φορμαμίδη

18.0 μl

Επώαση στους 55 °C για 1 ώρα και αμέσως τοποθετούνται τα δείγματα σε παγόνηρο για 10 λεπτά.

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήγμα αгарόζης συγκέντρωσης 1 % και η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου είναι 10 ng/ μl.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήγμα φωτογραφίζεται σε UV.

2.14.4. Προετοιμασία του πηγματος αгарόζης

Ακολουθούν διαδοχικές επώσεις του πηγματος υπό ανάδευση σε διαφορετικά διαλύματα:

Αρχικά σε διάλυμα 0.25 N HCl για 20 λεπτά.

Στη συνέχεια σε dH₂O/DEPC για 5 λεπτά.

Κατόπιν σε διάλυμα αποδιάταξης 1.5 M NaCl/ 0.5 M NaOH (2X15 λεπτά).

Σε διάλυμα εξουδετέρωσης 1 M Tris pH: 7.5/ 1.5 M NaCl (2X15 λεπτά).

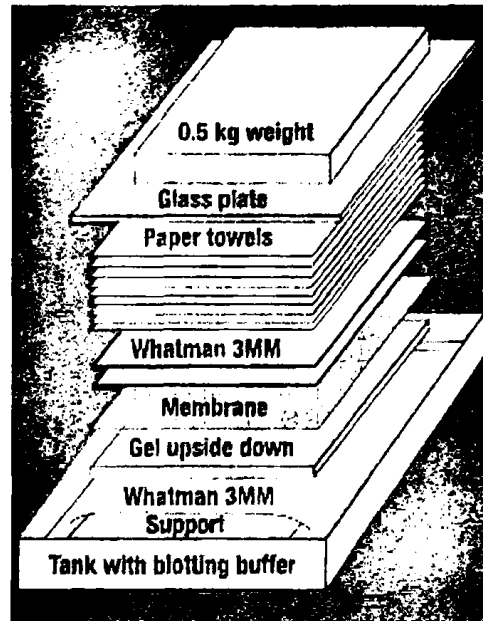
2.14.5. Μεταφορά των νουκλεϊνικών οξέων σε μεμβράνη

Η συσκευή μεταφοράς των νουκλεϊνικών οξέων γεμίζεται με 20 X SSC.

Ένα τεμάχιο διηθητικού χαρτιού Whatman 3 MM τοποθετείται (το αποκαλούμενο «γέφυρα») διαποτισμένο με το ρυθμιστικό μεταφοράς 20 X SSC, με τρόπο ώστε τα άκρα του να εμβαπτίζονται στο ρυθμιστικό μεταφοράς και ακολούθως απομακρύνονται οι φυσαλίδες.

Το πήγμα αγαρόζης τοποθετείται επάνω στη «γέφυρα» ανεστραμμένο και κόβεται η μια άκρη του με αποστειρωμένο νυστέρι.

Στη συνέχεια τοποθετείται τεμάχιο μεμβράνης (porablot NY plus, Macherey-Nagel), το οποίο έχει τις ίδιες διαστάσεις με το πήγμα και είναι διαποτισμένο με 2 X SSC και ακολούθως: 2 βρεγμένα κομμάτια με 2 X SSC, ίδιου μεγέθους με τη μεμβράνη, Whatman 3 MM, απορροφητικό χαρτί μέχρι ύψους 5 εκατοστών, την υάλινη πλάκα και ένα βαρίδι των 500 γραμμαρίων.



Εικόνα 2.3. Σχηματική παράσταση κατασκευής μεταφοράς νουκλεϊνικών οξέων κατά Northern από πήγμα αγαρόζης σε μεμβράνη υβριδοποίησης (Sambrook *et al.* 2001).

Η μεταφορά των νουκλεϊνικών οξέων στη μεμβράνη πραγματοποιείται για 18-20 ώρες. Ακολουθεί η καθήλωση των μεταφερθέντων μονόκλωνων πλέον νουκλεϊνικών οξέων μέσω ακτινοβολίας της μεμβράνης με υπεριώδη ακτινοβολία για 5 λεπτά. Τέλος η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα 2 X SSC και αναδεύεται έντονα επί για 5 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη πήγματος τα οποία προκαλούν αύξηση του ανεπιθύμητου υποβάθρου.

2.14.6. Υβριδισμός

Η μεμβράνη τοποθετείται στον ειδικό γυάλινο σωλήνα της συσκευής υβριδοποίησης με το διάλυμα προϋβριδισμού (20 ml/ 100 cm²) και επωάζεται υπό ανάδευση στους 68 °C για 1 ώρα.

Ο σημασμένος ιχνηλάτης αποδιατάσσεται με επώαση στους 100 °C για 10 λεπτά, το δείγμα αμέσως τοποθετείται σε παγόνερο για 2 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται στο προθερμασμένο στους 68 °C διάλυμα υβριδισμού (3.5 ml/ 100 cm²).

Το διάλυμα του προϋβριδισμού απορρίπτεται και προστίθεται το προθερμασμένο διάλυμα υβριδισμού και αποδιαταγμένου ιχνηλάτη στο σωληνάκι που περιέχει την μεμβράνη.

Επώαση στους 68 °C για 15-18 ώρες.

Στη συνέχεια ακολουθούν σύντομες πλύσεις υπό ανάδευση της μεμβράνης:

α. Με διάλυμα 2 X SSC για 5 λεπτά στους 23 °C.

β. Με διάλυμα 2 X SSC/ 0.1% SDS (50 ml/ 100 cm²) για 2X5 λεπτά στους 23 °C .

γ. Με διάλυμα 0.5 X SSC/ 0.1% SDS (50 ml/ 100 cm²) για 2X15 λεπτά στους 68 °C.

2.14.7. Ανίχνευση του ιχνηλάτη

Η ανίχνευση του ιχνηλάτη γίνεται με διαδοχικές πλύσεις υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου:

1. Αρχικά με ρυθμιστικό πλύσης (Washing Buffer) για 5 λεπτά.
2. Με [1X] ρυθμιστικού «Blocking» (Blocking Solution, 100 ml/ 100 cm²) για 30 λεπτά
3. Με διάλυμα αντισώματος (Antibody solution, 20 ml/ 100 cm²) για 30 λεπτά
4. Με ρυθμιστικό πλύσης (100 ml/ 100 cm²) για 2X15 λεπτά.
5. Με ρυθμιστικό ανίχνευσης (Detection Buffer, 20 ml/ 100 cm²) για 1-5 λεπτά.
6. Με διάλυμα χρωμογόνου (Colorsubstrate solution) για 1-18 ώρες χωρίς ανάδευση.
7. Η αντίδραση ανίχνευσης του ιχνηλάτη σταματάει με την επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα TE (50 ml/ 100 cm²) για 5 λεπτά υπό ανάδευση.

Διαλύματα:

Διάλυμα προϋβριδισμού: 5XSSC, 0.1 % N-lauroylsarcosine (w/v), 0.02 % SDS (w/v), 1 % Blocking solution (v/v).

Διάλυμα υβριδισμού: Το διάλυμα υβριδισμού προκύπτει από την ανάμιξη κατάλληλου όγκου διαλύματος προϋβριδισμού και αποδιαταγμένου ιχνηλάτη.

Ρυθμιστικό Διάλυμα μαλεϊκού οξέος (Maleic acid buffer), pH: 7.5: 0.1 M Μαλεϊκού οξέως, 0.15 M NaCl.

Ρυθμιστικό πλύσης: Ρυθμιστικό Διάλυμα μαλεϊκού οξέος και 0.3 % (v/v) Tween 20.



Πυκνό [10X] διάλυμα αποθήκευσης «Blocking»: Διαλύονται 10 gr (10 % w/v) «Αντιδραστήριο «Blocking» σε 100 ml ρυθμιστικού διαλυματός μαλεϊκού οξέος, υπό ανάδευση στους 65 °C. Το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.

[1X] Διάλυμα «Blocking»: Το πυκνό [10X] διάλυμα αποθήκευσης «Blocking» διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μαλεϊκού οξέος με αναλογία 1:10. Το διάλυμα διατηρείται στους 2-8 °C για 12 ώρες.

Διάλυμα αντισώματος: Φυγοκέντρωση του συζευγμένου αντισώματος αντι-διγοξυγενίνης-αλκαλικής φωσφατάσης (Anti-Digoxigenin-AP) για 5 λεπτά στις 10.000 rpm στους 4 °C, με τη βοήθεια πιπέτας παίρνεται από την επιφάνεια του διαλύματος 1.0 μl συζευγμένου αντισώματος (Anti-Digoxigenin-AP) και προστίθεται σε 5 ml [1X] Διάλυμα «Blocking».

Ρυθμιστικό ανίχνευσης: 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH: 9.5.

Διάλυμα χρωμογόνου: Προσθήκη 200 μl NBT/BCIP σε 10 ml ρυθμιστικού ανίχνευσης, το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο και προετοιμάζεται πάντα φρέσκο.

Ρυθμιστικό TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH: 8.0.

2.14.8. Έλεγχος της προέλευση του κλώνου pcDNA 11b μέσω χρήσης PCR και RT-PCR

Για να διαπιστωθεί επιπλέον η σχέση του κλώνου pcDNA 11b με τον μύκητα-ξενιστή *Penicillium polonicum* σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών με βάση την αλληλουχία του pcDNA 11b, το 11pcDNAExt (11pcDNAExtF/11pcDNAExtR) (external= εξωτερικό ζεύγος) και το 11pcDNAInt (11pcDNAIntF/11pcDNAIntR) (internal= εσωτερικό ζεύγος). Οι αντιδράσεις PCR θα δείξουν αν τυχόν υπάρχουν συμπληρωματικές θέσεις δέσμευσης επί του γονιδιωματικού DNA του *P. polonicum* και η μέθοδος RT-PCR θα επιβεβαιώσει την πιθανή μυκοϊκή προέλευση του κλώνου. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 2.3. Για το γονιδιωματικό DNA η στοιχειομετρία των αντιδράσεων PCR είναι αντίστοιχη με αυτό που περιγράφεται παραπάνω, αλλά το θερμοκρασιακό προφίλ για το κάθε ζεύγος είναι το ακόλουθο:

11pcDNAExt

94 °C για 5 λεπτά

11pcDNAInt

94 °C για 5 λεπτά



94 °C για 1 λεπτό
 61 °C για 1 λεπτό
 72 °C για 1 λεπτό
 72 °C για 10 λεπτά

30 κύκλοι

94 °C για 1 λεπτό
 63 °C για 1 λεπτό
 72 °C για 1 λεπτό
 72 °C για 10 λεπτά

30 κύκλοι

Ομοίως η σύνθεση cDNA πραγματοποιείται όπως περιγράφηκε προηγουμένως, με την πρώτη μέθοδο, χρησιμοποιώντας όμως τους ειδικούς εκκινητές κάθε φορά. Αντίστοιχα το θερμοκρασιακό προφίλ για τη σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας του cDNA για το κάθε ζεύγος εκκινητών είναι το εξής:

11pcDNAExt

94 °C για 1 λεπτό

94 °C για 30 δευτερόλεπτα

60 °C για 30 δευτερόλεπτα

72 °C για 1 λεπτό

72 °C για 5 λεπτά

30 κύκλοι

11pcDNAInt

94 °C για 3 λεπτά

94 °C για 1 λεπτό

63 °C για 45 δευτερόλεπτα

72 °C για 1 λεπτό

72 °C για 10 λεπτά

Για να διαπιστωθεί η σχέση των προϊόντων της PCR και της RT-PCR, που προέκυψαν από τους εκκινητές 11pcDNAExt, με τον κλώνο pcDNA-11b, με το dsRNA και με το *P. rolonicum* ακολούθησε υβριδισμός του RNA. Ο υβριδισμός έγινε όπως αναφέρεται παραπάνω αλλά αντί για χημική αποδιάταξη του dsRNA έγινε θερμική με επώαση στους 100° C για 10 λεπτά και 2 λεπτά σε υγρό άζωτο. Ο ιχνηλάτης που χρησιμοποιήθηκε αρχικά είναι ο pcDNA-11b μετά από πέψη με το *EcoRI*.

2.14.9. Απομάκρυνση του υβριδοποιημένου ιχνηλάτη από τη μεμβράνη υβριδοποίησης

Επιπλέον, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι και η ποσότητα του γονιδιωματικού DNA του *P. rolonicum* ήταν επαρκής για τον υβριδισμό, απομακρύνθηκε ο προηγούμενος ιχνηλάτης από τη μεμβράνη και έγινε νέος υβριδισμός χρησιμοποιώντας ως ιχνηλάτη το αμπλικόνιο της περιοχής ITS σημασμένο με μη ραδιενεργό αντίσωμα, όπως προαναφέρθηκε (τμήμα. 2.14.2)

Το πρωτόκολλο που ακολούθησαμε για την απομάκρυνση του ιχνηλάτη είναι το εξής:

1. Επώαση της μεμβράνης υβριδισμού στους 60°C με προθερμασμένο διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) ($50\text{ ml}/100\text{cm}^2$) μέχρις ότου να φύγει η έντονη μπλε χρωστική από τα δείγματα υβριδισμού.
 2. Πλύση της μεμβράνης με dH_2O για 5 λεπτά στους 23°C ($50\text{ ml}/100\text{cm}^2$).
 3. Επώαση σε διάλυμα $0.2\text{ N NaOH}/0.1\%$ SDS ($50\text{ ml}/100\text{ cm}^2$) για 2X5 20λεπτά στους 37°C .
 4. Πλύση με 2 X SSC για 3X15 λεπτά στους 23°C .
- Στη συνέχεια η μεμβράνη είναι έτοιμη για τον νέο υβριδισμό.

Κεφάλαιο 3:
Αποτελέσματα

Κεφάλαιο 3^ο/Αποτελέσματα

3.1.: Δειγματοληψία και απομόνωση, καθαρισμός, καλλιέργεια, και μορφολογική εξέταση μυκήτων από φυτικά δείγματα

Από περιοχές της Αιτωλοακαρνανίας, της Άρτας και των Ιωαννίνων απομονώθηκαν από διάφορα φυτά και τμήματά τους 78 στελέχη μυκήτων, τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1.: Κατάλογος δειγμάτων ελεγχθέντων για παρουσία μορίων dsRNA.

α/α	Κωδικός μύκητα	Φυτό (όργανο)	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Περιοχή δειγματοληψίας
1	Βλ 1.4	Βλίτο (ρίζα)	4/10/2004	Πλατανιά Ιωαννίνων
2	Αρ 2.3	Άγρια πιπεριά (βλαστός)	4/10/2004	Πλατανιά Ιωαννίνων
3	Αρ 2.6	Άγρια πιπεριά (βλαστό)	4/10/2004	Πλατανιά Ιωαννίνων
4	Πιπ1.1	Πιπεριά (καρπός)	19/12/2005	Κωστακιοί Άρτας
5	Πιπ2	Πιπεριά (καρπός)	19/12/2005	Κωστακιοί Άρτας
6	Πιπ3	Πιπεριά (καρπός)	19/12/2005	Κωστακιοί Άρτας
7	Βερ1.2	Βερικοκιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
8	Βερ2.1	Βερικοκιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
9	Βερ2.2	Βερικοκιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
10	Αμπ1	Αμπέλι (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
11	Αμπ1.1	Αμπέλι (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
12	Αμπ1.2	Αμπέλι (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
13	Αμπ2	Αμπέλι (καρπός)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
14	Αμπ2.1	Αμπέλι (καρπός)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
15	Συκ1.1	Συκιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
16	Συκ1.2	Συκιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
17	Ελ1	Ελιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
18	Ελ2	Ελιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
19	Νεκ1.1	Νεκταρινιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
20	Νεκ1.2	Νεκταρινιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
21	Εσπ1.1	Μανταρινιά (καρπός)	19/12/2005	Κωστακιοί Άρτας
22	Εσπ2.1	Μανταρινιά (καρπός)	19/12/2005	Κωστακιοί Άρτας
23	Αχλ1.1	Αχλαδιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
24	Αχλ1.2	Αχλαδιά (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
25	Ντ1.1	Ντομάτα (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
26	Ντ1.2.1	Ντομάτα (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
27	Ντ1.2.2	Ντομάτα (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
28	Ντ1.2.3	Ντομάτα (φύλλο)	1/9/2006	Λουτράκι Αιτωλ/νίας

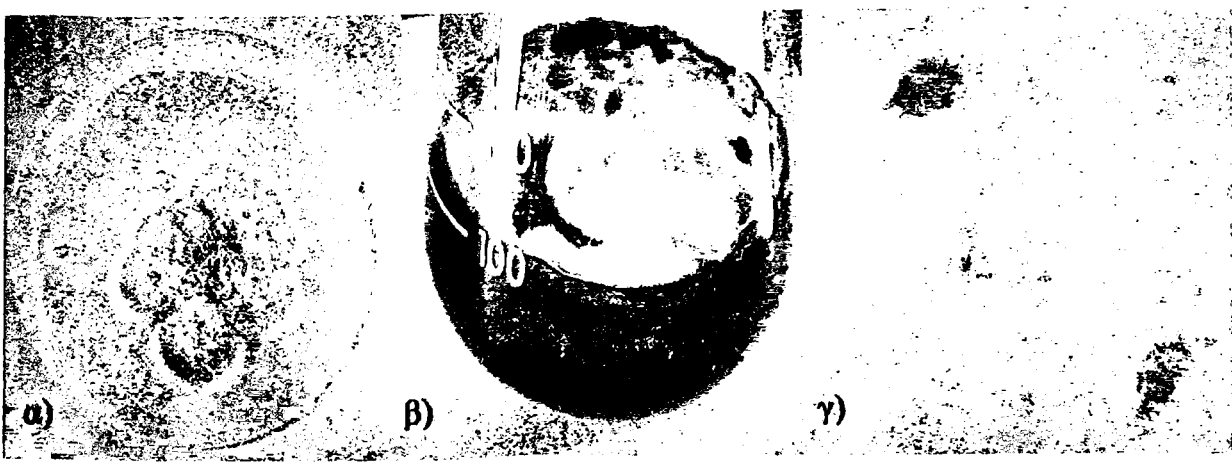
29	Καρ1.1	Καρυδιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
30	Καρ1.2.1	Καρυδιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
31	Καρ1.2.2	Καρυδιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
32	Καρ1.3	Καρυδιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
33	Καρ2.1	Καρυδιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
34	Καρ2.2	Καρυδιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
35	Καρ2.3	Καρυδιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
36	Κορ.1.1	Κορομηλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
37	Κορ.1.2	Κορομηλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
38	Κορ.1.3..2	Κορομηλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
39	Κορ.1.3.3.1	Κορομηλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
40	Κορ.1.3.3.2	Κορομηλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
41	Κορ.2.1	Κορομηλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
42	Κορ.2.2	Κορομηλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
43	Κορ.2.3	Κορομηλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
44	Κορ.3.1	Κορομηλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
45	Κορ.3.2	Κορομηλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
46	Τριαντ1.1	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
47	Τριαντ1.2.2	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
48	Τριαντ1.3	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
49	Τριαντ1.3.1	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
50	Τριαντ1.3.2	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
51	Τριαντ2.1	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
52	Τριαντ2.2	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
53	Τριαντ2.3	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
54	Τριαντ3.1	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
55	Τριαντ3.2	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
56	Τριαντ3.3	Τριανταφυλλιά (φύλλο)	21/10/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
57	Αχλ2.1	Αχλαδιά (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
58	Αχλ2.2	Αχλαδιά (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
59	Αχλ2.3	Αχλαδιά (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
60	Αγγ1	Αγγούρι (καρπός)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
61	Αγγ2	Αγγούρι (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
62	Αγγ3.1	Αγγούρι (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
63	Αγγ3.2	Αγγούρι (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
64	Μαντ1.1	Μανταρινιά (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
65	Μαντ1.2.1	Μανταρινιά (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
66	Μαντ2.1	Μανταρινιά (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
67	Πορτ1.4.1	Πορτοκαλιά (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας

68	Ντ2.1.1	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
69	Ντ2.2	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
70	Ντ2.3	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
71	Ντ3.1.2	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
72	Ντ3.2	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
73	Ντ4.1	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
74	Ντ4.2	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
75	Ντ4.3	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
76	Ντ5.1	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
77	Ντ5.2	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας
78	Ντ5.3	Ντομάτα (φύλλο)	12/11/06	Λουτράκι Αιτωλ/νίας

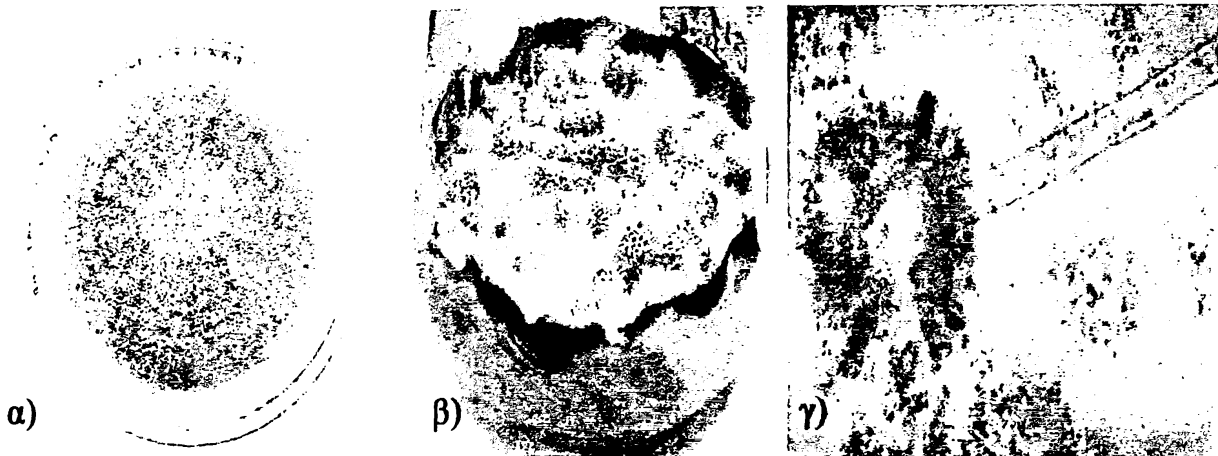
Τα δείγματα αρχικά καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (PDA), καθαρίστηκαν, φωτογραφήθηκαν μακροσκοπικά και μικροσκοπικά (Εικόνες 3.1, 3.2, 3.3, 3.4) όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 (τμήμα 2.2) και ακολούθως καλλιεργήθηκαν οι απομονωθέντες μύκητες προς ανάπτυξη μεγάλων ποσοτήτων μυκηλίου, προκειμένου να εκχυλιστεί dsRNA (Κεφ. 2, τμήμα 2.4).



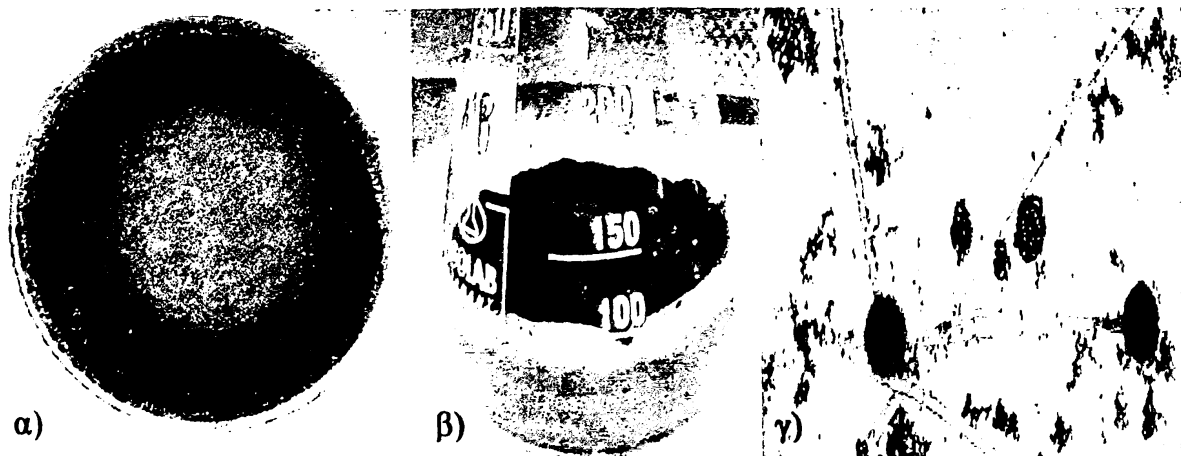
Εικόνα 3.1. Καλλιέργεια του Πιπ. 2 α) σε PDA, β) σε PDM, γ) μικροσκοπικό παρασκεύασμα κονιδιοφόρων και σπορίων της ίδιας απομόνωσης.



Εικόνα 3.2. Καλλιέργεια του Βερ 2.2 α) σε PDA, β) σε PDM, γ) μικροσκοπικό παρασκεύασμα κονιδιοφόρων και σπορίων της ίδιας απομόνωσης.



Εικόνα 3.3. Καλλιέργεια του Βλ 1.4 α) σε PDA, β) σε PDM, γ) μικροσκοπικό παρασκεύασμα κονιδιοφόρων και σπορίων της ίδιας απομόνωσης.

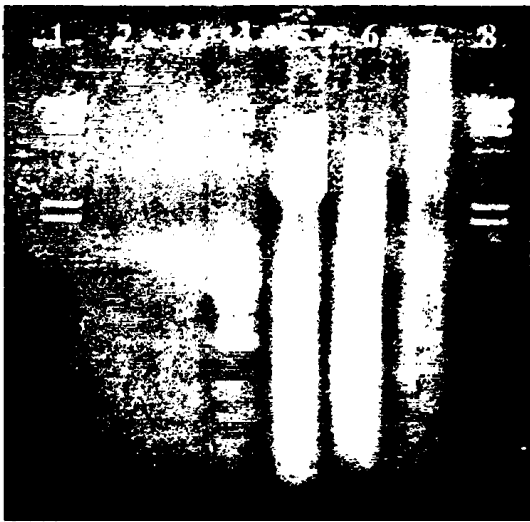


Εικόνα 3.4. Καλλιέργεια του Βερ 1.2 α) σε PDA, β) σε PDM, γ) μικροσκοπικό παρασκεύασμα κονιδιοφόρων και σπορίων της ίδιας απομόνωσης.

Από τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων Πιτ 2, Βερ 2.2, Βλ 1.4 και Βερ 1.2 προκύπτει ότι οι μύκητες Πιτ 2 και Βερ 2.2 ανήκουν στο γένος *Penicillium*, ενώ οι Βλ 1.4 και Βερ 1.2 ανήκουν στο γένος *Aspergillus*.

3.2.: Εκχύλιση dsRNA από τους απομονωθέντες μύκητες και επιβεβαίωση της φύσης των απομονωθέντων μορίων dsRNA

Το πρωτόκολλο εκχύλισης του dsRNA με τροποποιήσεις εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα και τελικά τέσσερα από αυτά, τα Πιτ2, Βερ2.2, Βλ1.4, Βερ1.2 χαρακτηρίστηκαν ως πιθανά για την παρουσία μορίων dsRNA (Εικόνα 3.5).

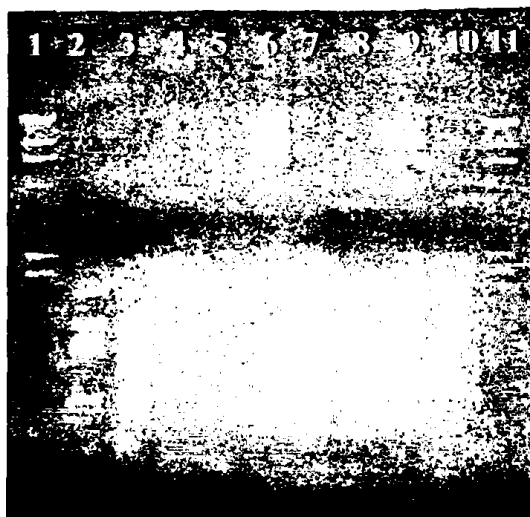


Εικόνα 3.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1.2 % των μορίων dsRNA που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα: *Cryphonectria parasitica* P46 και P47, Πιτ 2, Βερ 2.2, Βλ 1.4 και Βερ 1.2.

- Διαδρομές: 1, 8. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III
2. RNA *Cryphonectria parasitica* P46 (αρνητικός μάρτυρας)
3. RNA *Cryphonectria parasitica* P47 (θετικός μάρτυρας)
4. RNA Βλ1.4
5. RNA Πιτ2
6. RNA Βερ2.2
7. RNA Βερ1.2

Το στέλεχος P46 του μύκητα *Cryphonectria parasitica* δεν περιέχει dsRNA και χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας, ενώ το P47 περιέχει και λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας κατά την εκχύλιση dsRNA.

Η επιβεβαίωση της παρουσίας dsRNA έγινε με τις δοκιμές DNase I και RNase A (Εικόνες 3.6, 3.7, 3.8 και 3.9).



Εικόνα 3.6. Δοκιμή RNase A και DNase I στο RNA της απομόνωσης Βλ1.4.

Διαδρομές: 1,6,11 Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind* III

2. RNA Βλ1.4 + 0,5M NaCl

3. RNA Βλ1.4 + 0,5M NaCl +RNase A

4. RNA Βλ1.4

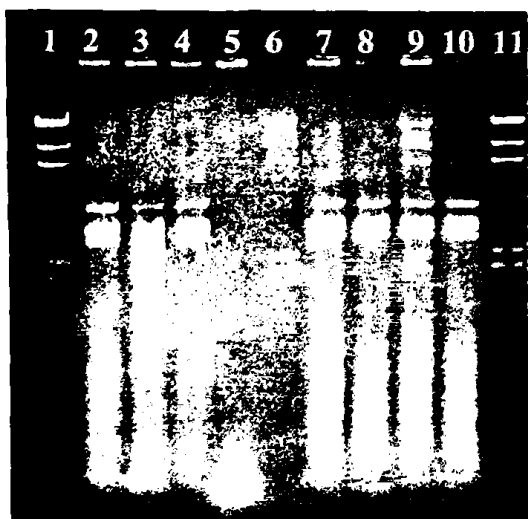
5. RNA Βλ1.4 + RNase A

7. RNA Βλ1.4

8. RNA Βλ1.4 + DNase I

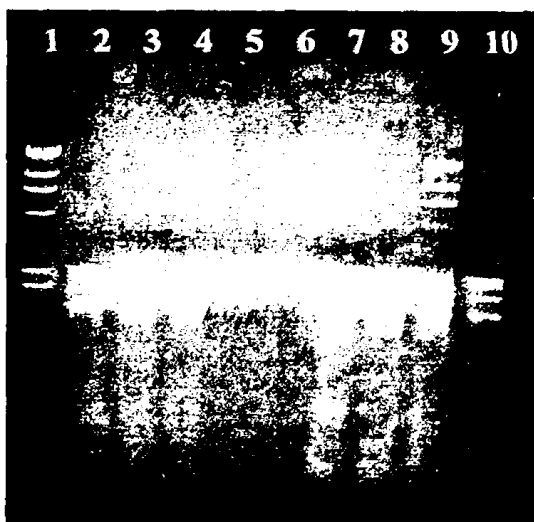
9. RNA Βλ1.4 + λDNA/*Hind*III

10. RNA Βλ1.4 + λDNA/*Hind*III + DNase I



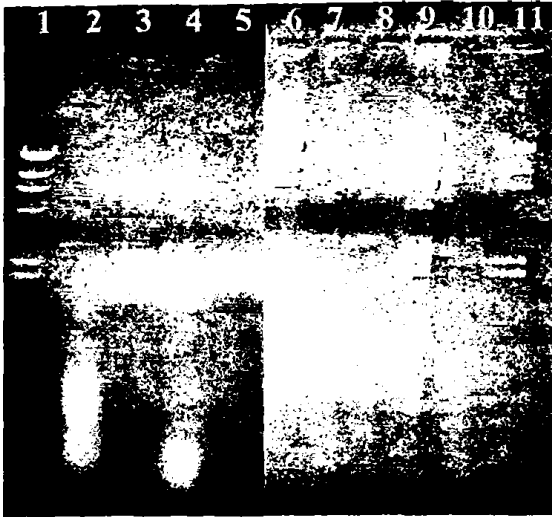
Εικόνα 3.7. Δοκιμή RNase A και DNase I στο RNA της απομόνωσης Πιπ 2.

- Διαδρομές:**
- 1,6,11 Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III
 2. RNA Πιπ2 + 0,5M NaCl
 3. RNA Πιπ2 +0,5M NaCl +RNase A
 4. RNA Πιπ2
 5. RNA Πιπ2 + 0,5M NaCl +RNase A
 7. RNA Πιπ2
 8. RNA Πιπ2 + DNase I
 9. RNA Πιπ2 + λDNA/*Hind*III
 10. RNA Πιπ2 + λDNA/*Hind*III + DNase I



Εικόνα 3.8. Δοκιμή RNase A και DNase I στο RNA της απομόνωσης Βερ 2.2.

- Διαδρομές:**
1. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III
 2. RNA Βερ2.2 +0,5M NaCl
 3. RNA Βερ2.2 +0,5M NaCl + RNase A
 4. RNA Βερ2.2
 5. RNA Βερ2.2 + RNase A
 6. RNA Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III
 7. RNA Βερ2.2
 8. RNA Βερ2.2 + DNase I
 9. RNA Βερ2.2 + λDNA/*Hind*III
 10. RNA Βερ2.2 + λDNA/*Hind*III + DNase I

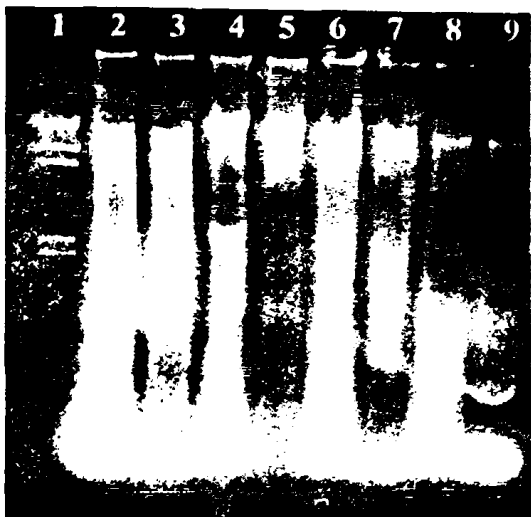


Εικόνα 3.9. Δοκιμή RNase A και DNase I στο RNA της απομόνωσης Βερ 1.2

- Διαδρομές:**
1. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III
 2. RNA Βερ1.2 + 0,5M NaCl
 3. RNA Βερ1.2 +0,5M NaCl + RNase A
 4. RNA Βερ1.2
 5. RNA Βερ1.2 + RNase A
 6. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III
 7. RNA Βερ1.2
 8. RNA Βερ1.2 + DNase I
 9. RNA Βερ1.2 + λ*Hind* III
 10. RNA Βερ1.2 + λDNA/*Hind*III + DNase I

3.3.: Μοριακή ταυτοποίηση των μυκήτων-φορέων dsRNA

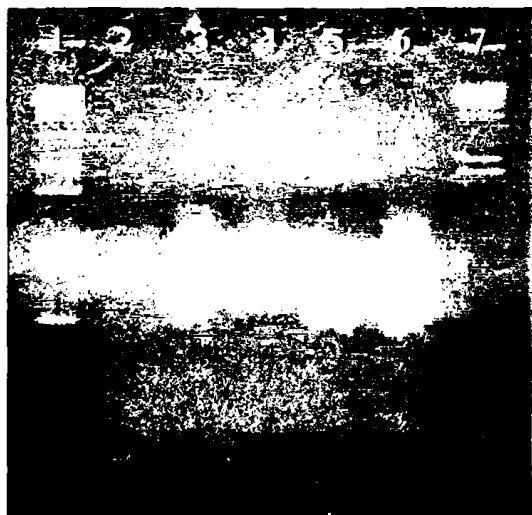
Αφού επιβεβαιώθηκε η παρουσία δίκλωνου RNA ακολούθησε η μοριακή ταυτοποίηση των μυκήτων-φορέων. Το γονιδιωματικό DNA του μύκητα που εκχυλίστηκε υποβλήθηκε σε μεταχείριση με RNase A, χωρίς την προσθήκη άλατος, για την απομάκρυνση των μορίων RNA (μονόκλωνο και δίκλωνο) (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10. Μεταχείριση του γονιδιωματικού DNA των μυκήτων με RNaseA.

- Διαδρομές:
1. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III
 2. DNA Βλ1.4 θετικός μάρτυρας
 3. DNA Βλ1.4 + RNase A
 4. DNA Πιπ2 θετικός μάρτυρας
 5. DNA Πιπ2 + RNase A
 6. DNA Βερ2.2 θετικός μάρτυρας
 7. DNA Βερ2.2 + RNase A
 8. DNA Βερ1.2 θετικός μάρτυρας
 9. DNA Βερ1.2 + RNase A

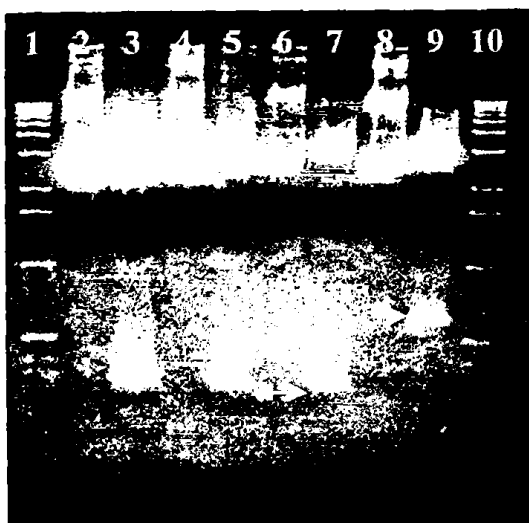
Στη συνέχεια με την τεχνική της PCR ενισχύθηκε η περιοχή ITS του rDNA των μυκήτων (Εικόνα 3.11). Το μέγεθος της περιοχής ITS σύμφωνα με τη βιβλιογραφία κυμαίνεται περίπου στις 550-600 bp (White *et al.* 1990).



Εικόνα 3.11. Ενίσχυση της περιοχής ITS του rDNA των μυκήτων με PCR.

- Διαδρομές:**
1. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA
 2. Αρνητικός μάρτυρας (δείγμα χωρίς DNA)
 3. DNA Βλ1.4
 4. DNA Πιπ2
 5. DNA Βερ2.2
 6. DNA Βερ1.2
 7. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III

Το προϊόν της αντίδρασης PCR δεσμοποιήθηκε με τον φορέα pCR[®] blunt και με ηλεκτροδιάτρηση εισήχθη σε κύτταρα TOP 10 του *Escherichia coli*. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό ελέγχθησαν για την παρουσία ένθεσης DNA με απομόνωση πλασμιδιακού DNA και με περιοριστική πέψη με το ένζυμο *EcoR* I (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12. Περιοριστική πέψη των ανασυνδυασμένων κλώνων με το ένζυμο *EcoRI*.

- Διαδρομές:**
1. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA
 2. Μάρτυρας pΒλ1.4
 3. pΒλ1.4 + *EcoR* I
 4. Μάρτυρας pΒερ2.2
 5. pΒερ2.2 + *EcoR* I
 6. Μάρτυρας pΒερ1.2
 7. pΒερ1.2 + *EcoR* I
 8. Μάρτυρας pΠιπ.2
 9. pΠιπ.2 + *EcoR* I

10. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA

Με τα κόκκινα βέλη στην παραπάνω φωτογραφία σημειώνεται η ένθεση DNA και παρατηρείται ότι το προϊόν της πέψης των ρBλ1.4, ρBερ2.2 και ρBερ1.2 είναι περίπου 300 bp, μικρότερο από το αντίστοιχο αναμενόμενο προϊόν της PCR. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην ύπαρξη θέσης *EcoR* I στο μέσο της αλληλουχίας της ένθεσης και θα διαπιστωθεί με την «ανάγνωση» της αλληλουχίας.

Βιοπληροφορική ανάλυση της ένθεσης των κλώνων ρBλ1.4, ρΠιπ2, ρBερ2.2 και ρBερ1.2

Η σύγκριση των αλληλουχιών DNA των θετικά ανασυνδυασμένων κλώνων με αλληλουχίες κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Το δείγμα Bλ 1.4 εμφάνισε ομοιότητα της τάξης του 100 % με την αντίστοιχη περιοχή του *Aspergillus ochraceus* EU273559 και η αλληλουχία της περιοχής του είναι η εξής:

```
TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGGTCCCTCGGGGCCCA  
ACCTCCCACCCGTGTATACCGTACCTTGTGTGCTTCGGCGAGCCCGCCCCCTTTTCT  
TTTAGGGGGCACAGCGCTCGCCGGAGACACCAACGTGAACACTGTCTGAAGTTTTGT  
CGTCTGAGTCGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTT  
CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCA  
GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCACCCCCCTGGTATTCCGGGGGGTATGC  
CTGTCCGAGCGTCATTTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTTCGTCCCC  
CCCCAGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCACCAGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTA  
TGGGGCTTTGTACCCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCTGCTGGCCGACGCTGAAAAG  
CAACCAACTATTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA  
A
```

Ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που περιέχουν τα ριβοσωμικά γονίδια και των περιοχών ITS είναι ο εξής: 1-32: 18S rRNA, 33-201: ITS1, 202-358: 5.8S rRNA, 359-533: ITS2, 534-571: 28S rRNA. Η σύνθεση της αλληλουχίας σε νουκλεοτίδια είναι: 27.85 % G, 19.96 % A, 23.99 % T, 28.20 % C

Ο μύκητας με τη κωδική ονομασία **Βερ 1.2** παρουσίασε ομοιότητα της τάξης του 100 % με το *Aspergillus japonicus* AJ876880 και η αλληλουχία της περιοχής του είναι η ακόλουθη:

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTTACCGAGTGCTGGGTCCCTTCGGGGCCC
AACCTCCCACCCGTGCTTACCGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCTTCGGGCGG
CCCGGGGCCTGCCCCGGGACCGCGCCCCGCCGGAGACCCCAATGGAACACTGTCTGA
AAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGATACCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCT
CTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCA
GAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTCCCCTCCAGCCCCGCTGGTTGTTGGGCCGCG
CCCCCCCCGGGGGCGGGCCTCGAGAGAAACGGCGGCACCGTCCGGTCCCTCGAGCGTAT
GGGGCTCTGTCACCCGCTCTATGGGCCCGGCCGGGGCTTGCCCTCGACCCCCAATCTT
CTCAGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA

Οι περιοχές των 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 και 28S rRNA καθορίζονται ως εξής: 1-32: 18S rRNA, 33-207: ITS1, 208-370: 5.8S rRNA, 371-519: ITS2, 520-557: 28S rRNA. Η περιεκτικότητα της αλληλουχίας σε G, A, T, C είναι 28.73 %, 18.13 %, 21.18 % και 31.96 % αντίστοιχα.

Το δείγμα **Βερ 2.2** εμφάνισε ομοιότητα της τάξης του 100% με το *Penicillium pinophilum* AB194281 και η αλληλουχία της περιοχής του είναι η εξής:

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTTACCGAGTGCGGGCCCTTCGCGGCCCAA
CCTCCCACCCTTGTCTCTATACACCTGTTGCTTTGGCGGGCCACCAGGGGCCACCTG
GTCGCCGGGGGACGCACGTCTCCGGGCCCGCGCCCCGCCGAAGCGCTCTGTGAACCCT
GATGAAGATGGGCTGTCTGAGTACTGTGAAAATTGTCAAAACTTTCAACAATGGATC
TCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGCGCCCCCTGGCATTCGGG
GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGT
GGTCCCCCGGGACCTGCCCGAAAGGCAGCGGCGACGTCCGTCTGGTCCCTCGAGCG
TATGGGGCTCTGTCACTCGCTCGGGAAGGACCTGCGGGGGTGGTCACCACCATGTT
TTACCACGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTTACCCGCTGAACTTAA

Οι περιοχές ITS των ριβοσωμικών γονιδίων δεν μπόρεσαν να εξακριβωθούν. Η αλληλουχία του αποτελείται από τα εξής νουκλεοτιδία με ποσοστό 29.59 % G, 18.72 % A, 22.46 % T και 29.23 % C.

Τέλος το δείγμα Πιπ2 παρουσίασε ομολογία της τάξης του 99.8% με το *P. polonicum* AJ005492, όπου η νουκλεοτιδική αλληλουχίας της περιοχής είναι η ακόλουθη:

TTTCCGTAGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTTTGGGTCCAAC
 CTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTTACTGGCCGC
 CGGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCGCCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTG
 AAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCT
 TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAA
 TTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTCGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGC
 ATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTC
 CTCCGATTCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGA
 GCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCC
 AAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA

Οι περιοχές ITS των ριβοσωμικών γονιδίων καθορίστηκαν ως εξής: 1-31: 18S rRNA, 32-206: ITS1, 207-362: 5.8S rRNA, 363-528: ITS2, 529-566: 28S rRNA. Η περιεκτικότητα της αλληλουχίας σε βάσεις είναι: 27.74 % G, 19.43 % A, 23.14 % T, 29.68 % C.

Τελικά λοιπόν τα αποτελέσματα από την ταυτοποίηση των τεσσάρων ειδών μυκήτων συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Ταυτοποίηση των μυκήτων με βάση την αλληλουχία της περιοχής ITS1-5,8S rRNA-ITS2:

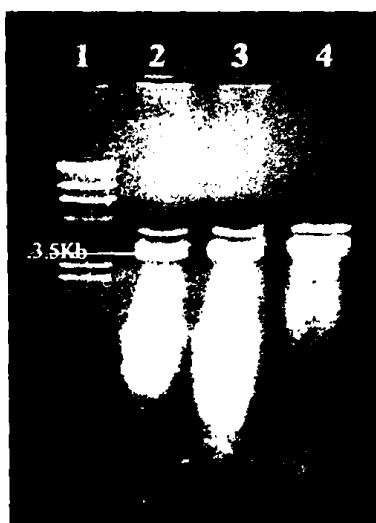
α/α	Κωδική ονομασία μύκητα	Ταυτότητα του μύκητα	Ποσοστό ομολογίας
1	Πιπ 2	<i>Penicillium polonicum</i> AJ005492	99.8 %
2	Βερ 2.2	<i>Penicillium pinophilum</i> AB194281	100 %

3	Βλ 1.4	<i>Aspergillus ochraceus</i> EU273559	100 %
4	Βερ 1.2	<i>Aspergillus japonicus</i> AJ876880	100 %

3.4.: Μερικός μοριακός χαρακτηρισμός του dsRNA από τον μύκητα *Penicillium rolonicum* (απομόνωση Πιπ 2)

3.4.1.: Κλωνοποίηση τμημάτων των μορίων dsRNA και ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων αυτών

Παράλληλα επιχειρήθηκε και ο μερικός μοριακός χαρακτηρισμός του πιθανού μυκοΐου που διαπιστώθηκε στο δείγμα Πιπ 2. Αφού εκχυλίστηκε ικανοποιητική ποσότητα dsRNA, το δείγμα υποβλήθηκε σε μεταχείριση με DNase I, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν μόρια DNA του μύκητα και με RNase A, σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, για την υδρόλυση των μονόκλωνων μορίων RNA (Εικόνα 3.13).

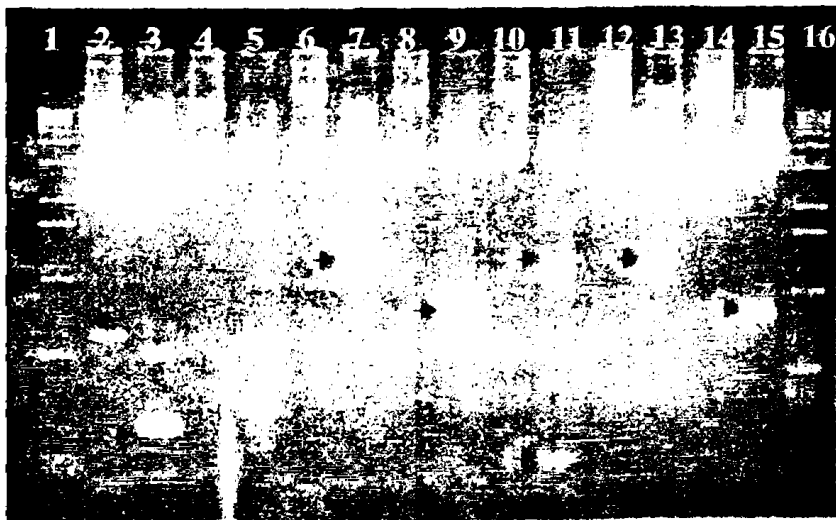


Εικόνα 3.13. Μεταχείριση του dsRNA με DNase I και με RNase A.

Διαδρομές:

1. Μάρτυρας μοριακών βαρών λ Hind III
2. Πιπ 2 μάρτυρας
3. Πιπ 2 + DNase I
4. Πιπ 2 + RNase A

Έπειτα, από πήγμα αгарόζης συγκέντρωσης 1.2 % απομονώθηκε η ζώνη μεγέθους 3.5 Kb του dsRNA και εκχυλίστηκε από το πήκτωμα σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου του συστήματος GenClean. Ακολούθησε σύνθεση cDNA. Τα τμήματα cDNA που συντίθενται συνδέονται με τον φορέα pCR[®] II και ο ανασυνδυασμένος πλέον φορέας εισάγεται με χημικό μετασχηματισμό στα επιδεκτικά κύτταρα TOP 10 της *Escherichia coli*. Από τα δύο πρωτόκολλα σύνθεσης μορίων cDNA προέκυψαν πλήθος θετικών ανασυνδυασμένων κλώνων και από αυτούς εξετάστηκαν αναλυτικά επτά, οι οποίοι ήταν αντιπροσωπευτικοί του διαφορετικού μεγέθους των ενθέσεων των κλώνων. Οι κλώνοι που εξετάστηκαν είναι οι: pcDNA-14, pcDNA-45, pcDNA-10, pcDNA-11, pcDNA-12, pcDNA-3, pcDNA-11b. Η επιβεβαίωση της ένθεσης DNA έγινε με την «πέψη» του πλασμιδιακού DNA με το ένζυμο *EcoR* I (Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.14. Περιοριστική πέψη των ανασυνδυασμένων κλώνων με το ένζυμο *EcoR*I. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνονται οι ενθέσεις.

Διαδρομές:

1. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA
2. Μάρτυρας pcDNA-14
3. pcDNA-14 + *EcoR* I
4. Μάρτυρας pcDNA- 45
5. pcDNA-45 + *EcoR* I
6. Μάρτυρας pcDNA-10
7. pcDNA-10+ *EcoR* I

8. Μάρτυρας pcDNA-11
9. pcDNA-11 + *EcoR* I
10. Μάρτυρας pcDNA-12
11. pcDNA-12 + *EcoR* I
12. Μάρτυρας pcDNA-3
13. pcDNA-3 + *EcoR* I
14. Μάρτυρας pcDNA-11b
15. pcDNA-11b + *EcoR* I
16. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA

Επίσης, η βιοπληροφορική ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των θετικά ανασυνδυασμένων κλώνων έγινε με το πρόγραμμα nucleotide BLAST του NCBI και δεν ταυτοποιήθηκαν με κάποια από τις κατατιθέμενες αλληλουχίες της GenBank.

Η αλληλουχία του pcDNA-14F είναι η ακόλουθη:

TTAGTCAGTCCAAGAGTCTATTGCGTGTCTGCGAGTCGTGACAGTATGTGCCAATGT
ACAGATACTGTAGAACTCCC GCGCGTTCGCATGCTGGAATCCTCGTCACTTGCATAGC
AAGCACGTGCTGATACAATGATGAACATTCACGACATTCCTGAGAGTAGCGTCTCACC
AGCCGTCCACGAAATGACTATGCACTTATCTATCTATTAGAAGATGTTATTCTTGCT
GTATATACACATAGTGCATCTAAACGACGCTTACCGCGCGACTTGTGCTCTAACCT
ACGTACTCACACTATTTATCAAAGTATAAGCGAGTTAATGACTATAGCGCAATACGTA
CGCGACCCGACGCGCCTCTCACTCTTCCTATGGCGAGAGTCTGATACACCTCAGCTG
TTATACTCTACGCTGATAAGTCTCATGTAGCTAAGGATCAGCTTAGAGCCGTCCTCT
CNTATGTAATATACAATGACCATAAATCCACCGCGGAGTATATTACNCAGTTATGAC
CGACACTTCTCTCTCGATCTATACTACATCTCGATCGGCTATCGCATCNTTAATGAC
TTCTCTACACTGACTTGCACGCACCTAGTGATAGTAAGCTACCCTCGTCACTGCCTG
CCACATATGCTTTCACCTCTTGTCGATGTCACATGTACTCACCTTTCGGCTTAGTATG
TCCAACCTCACCATTTATTGATATCCTCTCTCCTTACTTCTGTGATTAGTCTACTTC
TGTCTTAGCACAACCTAGTACTTCTGACCTTACATCCGCGCCAAATCCAGTATTAGTA
TCATCTACCCACTCTATAGTTATGACTTTCCTTCGCACTTATCTACTCGACATATATA
ACTTACTTACATCACAACCTTACCACCTATCATATGATATACAACCTTATTCTCATCT
CTCTCTTCTAAATGCTTCTTATTCTCTTGCATTGTCTTCTGATTCTTCTCATCCTAT
CCTTCTCGTCCCTCTCTTTACATATCCTACGTCTAAATGCATCTACCAGAACTAGACA
CATTAACACCTATATCCTTCTGACCGACTATTCACCTATATCTCACTTCTCTGCTTA



TCAGTACGACATTTATATAATAGAATATTTCTCTAATACTAATACATCGTTATAATAA
CCACGTTCCATTTCTCTTGTTTGCCATACACTGCTGAACCAACCTCTATAATTGCAGC
ATTACTACATACCGCTATATCTGTACTGGACTCCTATGACACTTTACGGTACTATAT
ATCT

Ενώ η αλληλουχία του pcDNA-14R είναι η εξής:

GGCGCTCTATTAGGGACCTTGNATACTCAAGCTATGCATCAAGACTTGGTACCGTAG
CTCGGTATCCACTACGTAACGGCTCCCGGGATCTGAGTTTTTTAAGCTGTCACGATC
AATAACACGCCCGCAATGCTCTCTGGTCCACCACACAAAGCGTTTTGTATGAAACTG
TCCCGAAACACTGTACGTAGCGACACTGCCCAAGTAGGCCGGTGGTCATTTCTCGCCC
TTTGGGAACCTGAGGGACTCTACACTCGTCATCTCTGCTCTTTAGAACACCGTGTAT
GAGTGATCCCCTAACCACACACCCGATCGCTAGATTCCTTAGGCATATATAACTGA
ATTCACTCCATCGTGATCCGCGTCTTCCACACATTTCCGGGATCACGCTGTGTCAGTC
ACTCGCAGCCCATCCCGTAATCCATTCGGAAGTCGATAGGCATAGACTCCTTACAAC
TGGGACCCCAAGAGCACGTGATTCTAGCCTTAATAACTCAGTTTACCTGGAACCTTCT
TTAGCGGAATACGTATGTCTATTAGTTATTAACCGTTCTGCGTACTCATCTCCATT
ATAGATCCTTTCTCCATGATGTAACCCTATTCGGTTATTTATCCCTTCAAAAATCCC
CGCCTTCAATTCGATTATAGCATCCACAGCACTCTGCCTTGTACCACTCTTATCTTC
ATCCTATCTTTTCATCAAATACGCCCCCTGCATCGGCTTTAAATCTACCTTACACCT
CTCCTCAACATCTCAATTAATCTACGTAGAAATGATCTCTTTATATTTCTCAGTAAGT
CCCTCTGCCGATAAAAATCATATCACTA

Οι παραπάνω αλληλουχίες δεν παρουσιάζουν καμία ομολογία μεταξύ τους και δε βρέθηκαν οι θέσεις κλωνοποίησης.

Η αλληλουχία του pcDNA-45F είναι η εξής:

CAAGGTGGGTGGGCAGACACATGCGTTGCGACCGTCTAGGACTGTCAGAAATAAACT
TCTGTCCGAGTGACTTCAGTTCAAGCTTAACGCTCCGACCTTTTCTCACCCTTGT
TCTGAATGCATGACACTAATCCACTCTAATCTCATGCTATATATTTATTTATCATCAA
TTCTATCTACGTTTAAGTCATTAATTTTCACATTTTCCCTTTTATTTCTGTACCTCCTC
CCCATATATATATTTGATAGGTCTATTTTCAACACTCTCTATAGATTTCCCTTCAGTC
CCTTCTCTCCTTGAACATATAACTTAATTTCCGGACTTATCTTACTCTTTTTTTCTTA

TTATTCCTATATCTCTCTTTGTTTTCCCTCTGTATTATTACTTGCCCTACAACCTTT
CTTTTAGTTCATCTTAATTTTTTATCATTTATCTCTTAATTATTACCTATTCCTTTTA
TTCTTTCTTTTAAATTCGCTCTTTCTTACTTCCTCTCTATTTTCTTATCTTAACAT
TTGTCTATAATTTTATAATTTCTTTTTTCTTTTATTTCGCTGTTTTTTATTATTAC
ATGTTAGCTACTTTTTCTTCTTTTGATAATTTTCTCAATTGTTTTCTTTGTCCCTTA
TACGTCTTCTATCCTTTTTTC

Το ποσοστό των νουκλεοτιδίων G, A, T, C στην αλληλουχία είναι: 8.81 %, 20.40 %, 48.69 % και 22.10 % αντίστοιχα.

Η αλληλουχία του pcDNA-45 R είναι η εξής:

GACGCCACACACCTTTATCAAAGTACCAAAGAATTAGGGGATCATACGCGCTTCCA
CGTATAATAATATGCACACCGCCAGCCCCGTAGGGATGACGATGTACACTCGTGAC
TCAGACCCGCGTGTGGCAATGTAAGTAACCATTACGATAGCCCCGTCACCAAGTA
GCTGCACCTGTCTTGCATGAGTGGACTATCGCCCCCTTGACGTATTTTCGTTAGACTCAC
TGGAGTCTTCGCCAATCTGAGGGCTGCTCAGCCTACTAGGTCTTATTTATATTTCTG
CCCTAGCTGCTATCGATGGATGCATAAAGCCCATACCGTGGGGGTAACCTCGTGACTG
ATGATTAGGGTTCATTCATAGAGGGAGTCCCTGACTTACTGCATTCCCCACCTATC
GTATGAGTTCGTGCGCTCTAATTACTTCTTCCTGATACTGTGAGGTTGTTTTCTATAAA
TAACACTATTGTCCACTTTGTGCCCTGGTTATTGTAATTGAGTACTATTTAAAATCCC
TTTTCCCACCTATCGTTTGTAAGTCAAGTCTCTATCCTGCAGCCTGTTCTAACTCCAG
TTCCTATATCGTAAATCGTAGTTGTGTGCATTTATAAGCTCGTAAATGGATTTCTTG
TGGGCTTTATTGTTACGCCTATGTTTATTACTGTCCATAATCCTTCATTCCTCCTGT
TACGGTCTCTTGTATTATATTTTTCTTTACTTTTAGACTTTCTGAATCTTCTTTTTT
ATTTATATTGTTTCAAACATTAACCTCCCT

Στις δυο παραπάνω αλληλουχίες του pcDNA-45 βρέθηκε η μία μόνο θέση κλωνοποίησης, ενώ δεν υπάρχει καμία ομόλογη περιοχή μεταξύ των δύο αλληλουχιών.

Ο κλώνος pcDNA-10 έχει την εξής αλληλουχία:



GTGGGGCTTAGCCAATAAGAACAGTAGCCGTAAGGCAATGGCGAGGATGGCAGATCC
AGAAGAGGAACTGGACGAAGCCACCCCCGGTTATGCCGGATCGATGGTTCGGATGGC
TATTGTGTGTTTTGGTGGCACTATGTCGTTACGGAAGATGGCAAAGTCAAGCTTCGC
TTTCCAGCCCACAGCGCCCCGAAGCGTATACTGACAACACACAGAAGTCAGACGAACA
GGTGCACCAAGGTAGGATGAGTGAACAGCCCGCCAATGCGGATGGTCAGGACTGGGT
GTCCGCTGTGCTGGAGCAGCGTGGGCCGATTGCGTCTACGACAACCCGCCGAATGAA
TAGATCAGTCGAGGTGGCAGCAGAGCATGTGGAGCGCTGCACATGTCTTAGTCGGGT
GAAGTGCCTGACCAGTTGCATGATGCCGTCGAGCAAATCATCGATCGCGGATGGGCT
GAGCAGGATACATCAGGTGCAAGGCTCGAGTGTGGGGCGAACGCGCTACATCAATCC
CTGGCAGCATACCATAGTTTAGAAGGAACGCCGCTCCTACAAGGGATGAAGTCCTA
ACTGCTCTCCGCTCATCATTTGTCCGCTGAGCAGCGTCAACAGGCTGAAGACGCGGGC
ATGCGAATAGAGGACAATGACTTTACGGCTGATCAAATGGTCGTGGCCTTGCAACGT
TTTGGACCCTACGCGCTGGGCGTTATTAATGGCGAGCCGGAGCAAGCGAGGGCCATG
GTAGTAGGTGATGGAGAGCCGATATTTGTGCGGAATTATGCTGGGCACTGGTCAGGC
ATAGGGCCAGGAGCGCGACGCATAGGTAGAAAGGCCTGCAGGGCGCGGCAGCTGAAC
GGCGTTAGCTT

Τα νουκλεοτίδια G, A, T, C απαντώνται σε ποσοστό 32.75 %, 24.42 %, 19.21 %, 23.61 % στην αλληλουχία.

Η ένθεση pcDNA-11 αποτελείται από την αλληλουχία:

GGCACTGAGGCTGTATGCTGGTCACTCTAACTCGCGAGTCACTCTCCGTCACGCTAA
TGAGACGCACCATTTGGCGGTTGTGCGGAACGGCGCAAACCTCAAGCAAGTGCTATT
GCGAATGTGGTTGTTGCATCTGGACATCTGGCTGGTGCTGACGTAAGCGTTAAAAT
CGACAACACGCTAGTGCGCAGGTCGTTGCCACCTGGTATAGCGTTGGAGGATGAGTG
CGAGTACGCGAAACGGCTACATGGTGTACGTGTCCACGTGAACTCGCTGGACGACAC
AGCTCGTGCACCTCCTGTGCTACGCGTGTGGGGTTGCCGCAGGCGAGGGCATCTCAGA
CCGCGTTACCCGATACGTCTGGGAACCAACCGAGCTCGTTTTCATGAGGGCGTTCT
GCCTGTATCGCGTGAGGTTGGGCTGCGTGACTCTGCCGCCACCGCGCGTGGGATAGT
TGCGTTCGCTGAGAAGTACGGTGCTGTGGCTGAGTGCGGTGAGTCGTTACGCATGGC
TTTGCACATGTATGGCACCAACAGTCCCGCTAACCGAGTATCGTTACGGTTGGGCGT
GGCTCGATTGCATCAGCAGACGCATCAGCGCCAGTTAGTGCGCGCTAATTACAGATG
CCACGAGCTGGCGGGAATGGAGTTAGTCTCACTAGCCATGCTGGTCCGTTGAAGGGCT

CGATTCCGGGTTTCGGCCACACGCTGCACGCTGCAGTGCGCAAGATGGGCTTGCATGA
TACACCTAACATGCACCCATACCTCGAGCCACGGGTTAGGCCGCTACGACA

Οι βάσεις G, A, T, C απαντώνται σε ποσοστό 31.31 %, 19.70 %, 22.60 % και 26.39 % αντίστοιχα.

Ομοίως για την ένθεση pcDNA-11b βρέθηκε η αλληλουχία:

GGCACTGAGGCTGTATGCTGGTCACTCTAACTCGCGAGTCACTCTCCGTCACGCTAA
TGAGACGCACCATTTGGCGGTGTGTGCGGAACGGCGCAAACCTCAAGCAAGTGCTATTT
GCGAATGTGGTTGTTGCATCTGGACATTTCTGGCTGGTGTGACGTAAGCGTTAAAAT
CGACAACACGCTAGTGCAGGTCGTTGCCACCTGGTATAGCGTTGGAGGATGAGTG
CGAGTACGCGAAACGGCTACATGGTGTACGTGTCCACGTGAACTCGCTGGACGACAC
AGCTCGTGCACCTCCTGTGCTACGCGTGTGGGGTTGCCGCAGGCGAGGGCATCTCAGA
CCGCGTTACCCGATACGTCTGGGAACCAACCGAGCTCGTTTTC'TATGGAGGCGTTCT
GCCTGTATCGCGTGAGGTTGGGCTGCGTGACTCTGCCGCCACCGCGCGTGGGATAGT
TGCGTTTCGCTGAGAAGTACGGTGTGTGGCTGAGTGCGGTGAGTCGTTACGCATGGC
TTTGCACATGTATGGCACCAACAGTCCCGCTAACCGAGTATCGTTACGGTTTGGGCG
TGGCTCGATTGCATCAGCAGACGCATCAGCGCCAGTTAGTGCGCGCTAATTACAGAT
GCCACGAGCTGGCGGGAATGGAGTTAGTCTCACTAGCCATGCTGGTTCGGTGAAGGGC
TCGATTCCGGGTTTCGGGCACACGCTGCACGCTGCACGCAAGATGGGCTTGCATG
ATACACCTAACATGCACCCATACCTCGAGCCACGGGTTAGGGCGCTACGACCA

Αντίστοιχα η περιεκτικότητα σε G, A, T, C είναι: 31.23 %, 19.65 %, 22.67 %, 26.45 %.

Η αλληλουχία της ένθεσης pcDNA-12 είναι η ακόλουθη:

GGGCTAGTCAATAAGAACAGTAGCCGTAAGGCAATGGCGAGGATGGCAGATCCAGAA
GAGGAACCTGGACGAAGCCACCCCGGTTATGCCGGATCGATGGTTTCGGATGGCTATTT
GTGTGTTTTGGTGGCACTATGTCGTTACGGAAGATGGCAAAGTCAAGCTTCGCTTTC
CAGCCCACAGCGCCCGAAGCGTATACTGACAACACACAGAAGTCAGACGAACAGGTG
CACCAAGGTAGGATGAGTGAACAGCCCGCCAATGCCGGATGGTCAGGACTGGGTGTCC
GCTGTGCTGGAGCAGCGTGGGCCGATTGCGTCTACGACAACCCGCCGAATGAATAGA

TCAGTCGAGGTGGCAGCAGAGCATGGGAGCGCTGCACATGTCTTAGTCGGGGAAGTG
CCTGACCAGTTGCATGATGCCGTCGAGCAAATCATCGATCGCGGATGGGCCTGAGCA
GGATACATCAGGTGCAAGGCTCGAGTGTGGGGCGAACGCGCTACATCAATCCCTGGC
AGCATACCATAGTTTAGTAAGGAACGCCGCCTCCTACAAGGGATGAAGTCCTAACTG
CTCTCCGCTCATCATTTGTCCGCTGAGCAGCGTCAACAGGCTGAAGACGCGGGCATGC
GAATAGAGGACAATGACTTTACGGCTGATCAAATGGCCGTGGCCTTGCAACGTTTGTG
GACCCTACGCGCTGGGCGTTATTAATGGCGAGCCGGAGCAAGCGAGGGCCATGGTAG
TAGGTGATGGAGAGCCGATATTTGTGCGGAATTATGCTGGGCACTGGTCACGCATAG
GGCCAGGAGCGCGACGCATAGGTAGAAGGCCTGCAGGGCGCGGCAGCTGAACGGCGT
TAGCT

Το ποσοστό των βάσεων G, A, T, C είναι 32.63 %, 24.48 %, 19.0 %, 23.89 %.

Η αλληλουχία του κλώνου pcDNA-3F παρουσιάζει αρκετά λάθη, οπότε παραθέτουμε την αλληλουχία του pcDNA-3R:

AGCTGCGACGAGTAGTTTATCGGGGGCCACAACTACCCGGGCATCGCGAACCTGGT
GTGGAACACCAGGTGCATCCATAGATCACTTATGCGCACACAACGTTGGGTCCGTAG
ACCCACCGTCATGCACTGTTCCTGCTGCGACGAGTAGTTTATCGGGGGCCACAAAC
TACCCGGGCATCGCGAACCTGGTGTGGAACACCAGGTGCATCCATAGATGCTTGTGC
GCTAGTCCGTTGTCCATTAGTATAGTCCATTTTCGGTTCAGCGCGACATTACATCAC
GCACCATGCAAGTTAAGAAGGAGGAAGGGCCAAGCTAACGCCGTTTCAGCTGCCGCGC
CCTGCAGGCCTTCTACCTATGCGTTCGCGCTCCTGGCCCTATGCCTGACCAGTGCCCA
GCATAATTCCGCACAAATATCGGCTCTCCATCACCTACTACCATGGCCCTCGCTTGC
TCCGGCTCGCCATTAATAACGCCAGCGCGTAGGGTCCAAAACGTTGCAAGGCCACG
ACCATTTGATCAGCCGTAAGTCATTTGTCCCTCTATTCGCATGCCCGCGTCTTCAGCC
TGTTGACGCTGCTCAGCGGACAATGATGAGCGGAGAGCAGTTAGGACTTCATCCCTT
GTAGGAGGCGGCGTTTCCTTCTAAACTATGGTATGCTGCCAGGGATTGATGTAGCGCG
TTCGCCCCACACTCGAGCCTTGCACCTGATGTATCCTGCTCAGCCCATCCGCGATCG
ATGATTTGCTCGACGGCATCATGCAACTGGTCAGGCACTTCCCCGACTAAGACATGT
GCAGCGCTCCCATGCTTCTGCTGCCACCTTCGACTGATCTATTCAT

Η αντίδραση ταυτοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ένθεσης pcDNA-3F θα πρέπει να επαναληφθεί. Στις αλληλουχίες των pcDNA-3R, pcDNA-10 και pcDNA-12 δε βρέθηκε η δεύτερη θέση κλωνοποίησης, προφανώς γιατί δεν

ολοκληρώθηκε η αντίδραση «ανάγνωσης» της αλληλουχίας. Η σύγκριση των αλληλουχιών της ένθεσης pcDNA-11 και pcDNA-11b, με το πρόγραμμα align BLAST έδειξε ομολογία 99.5 % μεταξύ των δυο κλώνων. Ομοίως, το ίδιο διαπιστώθηκε και για τις ενθέσεις των κλώνων pcDNA-10 και pcDNA-12 που το αντίστοιχο ποσοστό ομολογίας είναι 99 %. Αντίστοιχα, η ομολογία των αλληλουχιών του pcDNA-3R με τους pcDNA-10 και pcDNA-12 είναι 99 %. Ωστόσο, κατά τη σύγκριση του pcDNA-3R με το pcDNA-10R και pcDNA-12R το ποσοστό ταυτότητας των κλώνων είναι 99.6 %. Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της σύγκρισης των αλληλουχιών των ενθέσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Ποσοστό ομολογίας μεταξύ των αλληλουχιών των ενθέσεων

	pcDNA-3R	pcDNA-11b	pcDNA-12	pcDNA-11	pcDNA-10	pcDNA-45R	pcDNA-14R
pcDNA-3R	100 %	-	99 % (99.6 % pcDNA-12R)	-	99 % (99.6 % pcDNA-10R)	-	-
pcDNA-11b	-	100 %	-	99.5 %	-	-	-
pcDNA-12	99 % (99.6 % pcDNA-12R)	-	100 %	-	99 %	-	-
pcDNA-11	-	99.5 %	-	100 %	-	-	-
pcDNA-10	99 % (99.6 % pcDNA-10R)	-	99 %	-	100 %	-	-
pcDNA-14F	-	-	-	-	-	-	-
pcDNA-45F	-	-	-	-	-	-	-

3.4.2. Προσδιορισμός της προέλευσης των τμημάτων των κλωνοποιηθέντων cDNA

Προκειμένου να διαπιστωθεί η προέλευση των κλώνων ακολούθησε υβριδισμός κατά Northern και παρατηρήθηκε η ομολογία μεταξύ του dsRNA και των κλώνων pcDNA-14, pcDNA-45, pcDNA-10 και pcDNA-11b (Εικόνες 3.15, 3.16, 3.17, 3.18).



Εικόνα 3.15. α) Πήγμα αγαρόζης, β) Μembrάνη υβριδισμού. Υβριδισμός κατά Northern στο δείγμα pcDNA-14. Ως ιχνηλάτης χρησιμοποιήθηκε η ένθεση του κλώνου pcDNA-14.

Διαδρομές: 1, 1'. Μάρτυρας μοριακών βαρών λ Hind III
2, 2'. dsRNA Πιπ 2
3, 3'. Γονιδιωματικό DNA *P. polonicum*
4, 4'. pcDNA-14 + *EcoR* I
5, 5'. Μάρτυρας μοριακών βαρών λ Hind III

Ο ιχνηλάτης που χρησιμοποιήθηκε είναι η ένθεση του κλώνου pcDNA-14, που απομονώθηκε μετά από πέψη με *EcoR* I. Όπως διαπιστώνεται από τη φωτογραφία ο ιχνηλάτης υβριδίζει με το dsRNA και όχι με το γονιδιωματικό DNA του *P. polonicum*.



Εικόνα. 3.16. α) Πήγμα αγαρόζης, β) Μembrάνη υβριδισμού. Υβριδισμός κατά Northern στο δείγμα pcDNA 45. Ο ιχνηλάτης είναι η ένθεση του κλώνου pcDNA-45. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνεται ο υβριδισμός του dsRNA και του θετικού μάρτυρα pcDNA-45.

- Διαδρομές: 1, 1'. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III
 2, 2'. dsRNA Πιπ 2
 3, 3'. Γονιδιωματικό DNA *P. polonicum*
 4, 4'. pcDNA-45 + *Eco*R I
 5, 5'. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III

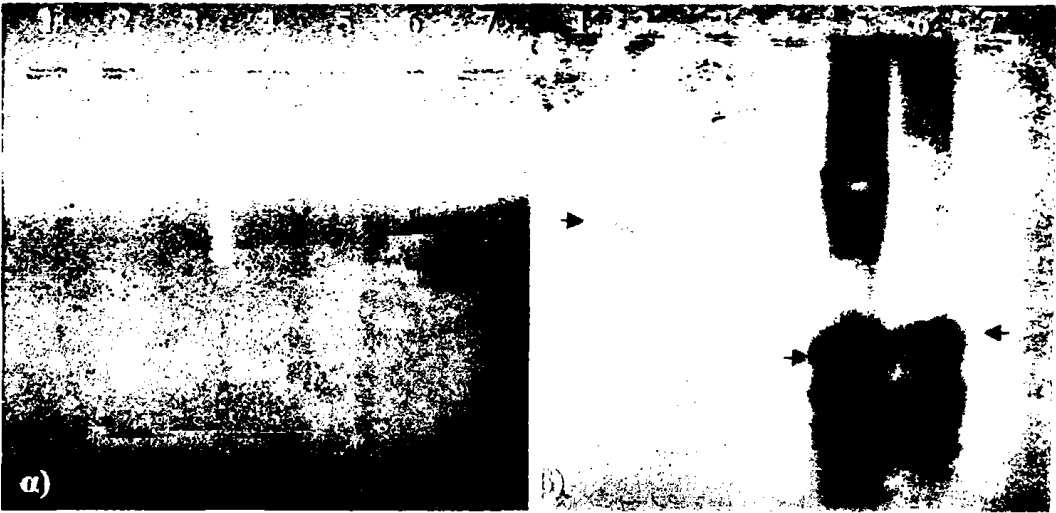
Ως ιχνηλάτης χρησιμοποιήθηκε η ένθεση του pcDNA-45 μετά από πέψη με *Eco*R I. Ομοίως, διαπιστώνεται ομολογία του pcDNA-45 με το dsRNA και όχι με το γονιδιωματικό DNA του *P. polonicum*.



Εικόνα 3.17. α) Πήγμα αγαρόζης, β) Μembrάνη υβριδισμού. Υβριδισμός κατά Northern στο δείγμα pcDNA-10. Ως ιχνηλάτης, χρησιμοποιήθηκε η ένθεση του pcDNA-10. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνεται ο υβριδισμός του dsRNA, του θετικού μάρτυρα pcDNA-10 και των δειγμάτων pcDNA-14, pcDNA-3, pcDNA-12.

- Διαδρομές:**
- 1, 1'. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III
 - 2, 2'. dsRNA Πιτ 2
 - 3, 3'. pcDNA-14 + *Eco*R I
 - 4, 4'. pcDNA-45 + *Eco*R I
 - 5, 5'. pcDNA-10 + *Eco*R I
 - 6, 6'. pcDNA-11 + *Eco*R I
 - 7, 7'. pcDNA-12 + *Eco*R I
 - 8, 8'. pcDNA-3 + *Eco*R I

Από την παραπάνω εικόνα παρατηρείται ο υβριδισμός του ιχνηλάτη, ένθεση του pcDNA-10, με το dsRNA. Επιπλέον, διαπιστώνεται ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ των κλώνων pcDNA-10 και pcDNA-14, ενώ επιβεβαιώνεται και η ομολογία των κλώνων pcDNA-10, pcDNA-3, pcDNA-12 που είχε παρατηρηθεί από τη σύγκριση των αλληλουχιών τους με τη χρήση του προγράμματος align BLAST.



Εικόνα 3.18. α) Πήγμα αγαρόζης, β) Μembrάνη υβριδισμού. Υβριδισμός κατά Northern στο δείγμα pcDNA-11b. Ο ιχνηλάτης είναι η ένθεση του pcDNA-11b. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνεται η θέση υβριδισμού του dsRNA του θετικού μάρτυρα pcDNA-11b και του pcDNA-11.

- Διαδρομές:**
- 1, 1'. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III



- 2, 2'. dsRNA Πιπ 2
- 3, 3'. Γονιδιωματικό DNA *P. polonicum*
- 4, 4'. pcDNA-10 + *EcoR* I
- 5, 5'. pcDNA-11 + *EcoR* I
- 6, 6'. pcDNA-11b + *EcoR* I
- 7, 7'. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III

Σαν ιχνηλάτης χρησιμοποιήθηκε η ένθεση του pcDNA-11b και επίσης διαπιστώνεται ομολογία με το dsRNA. Ο υβριδισμός του ιχνηλάτη με το pcDNA-11 επιβεβαιώνει και την ομολογία των δυο κλώνων όπως προκύπτει και από τη σύγκριση των αλληλουχιών τους.

3.4.3 Έλεγχος της προέλευσης του κλώνου pcDNA-11b μέσω χρήσης PCR και RT-PCR

Για περαιτέρω έλεγχο της προέλευσης του κλώνου pcDNA-11b, με βάση τη γνωστή του πλέον αλληλουχία, σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών (11pcDNAExt, 11pcDNAInt). Οι αντιδράσεις PCR αποδείξανε την παρουσία θέσεων δέσμησης των εκκινητών επί του γονιδιωματικού DNA του *P. polonicum* (Εικόνες 3.19, 3.20).



Εικόνα 3.19. Αμπλικόνια της RT-PCR και της PCR με τους εκκινητές 11pcDNAExt.

- Διαδρομές:
1. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA
 2. Αρνητικός μάρτυρας
 3. cDNA (1:10 dsRNA)
 4. cDNA (10⁰ dsRNA)

5. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA
6. Αρνητικός μάρτυρας
7. Αμπλικόνιο γονιδιωματικό DNA του *P. polonicum* (1:10 DNA)
8. Αμπλικόνιο γονιδιωματικό DNA του *P. polonicum* (1:20 DNA)

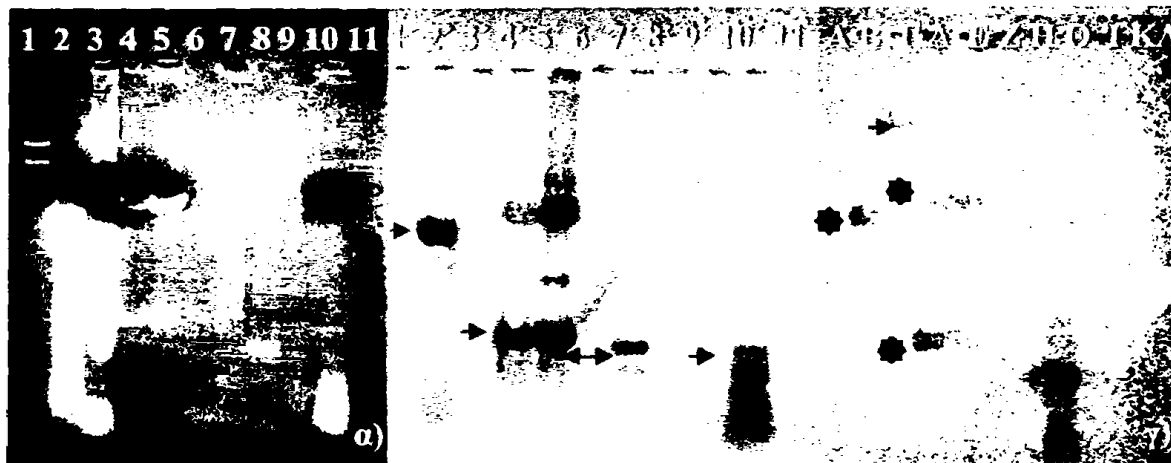


Εικόνα 3.20. Αμπλικόνια της RT-PCR και της PCR με τους εκκινητές 11pcDNAInt

- Διαδρομές:**
1. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA
 2. cDNA (1st cDNA με τους εκκινητές 11pcDNAExt, 2nd cDNA με τους εκκινητές 11pcDNAInt)
 3. cDNA (με τους εκκινητές 11pcDNAInt)
 4. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA
 5. Αρνητικός μάρτυρας
 6. Αμπλικόνιο γονιδιωματικού DNA του *P. polonicum* (1:10 DNA)
 7. Αμπλικόνιο γονιδιωματικού DNA του *P. polonicum* (1:20 DNA)
 8. Αμπλικόνιο γονιδιωματικού DNA του *P. polonicum* (10⁰ DNA)
 9. Αμπλικόνιο γονιδιωματικού DNA του *P. polonicum* (1:20 DNA) με τους εκκινητές ενίσχυσης της περιοχής ITS
 10. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA

Η ενίσχυση της περιοχής ITS (Εικόνα 3.20) με τους αντίστοιχους εκκινητές έγινε για να διαπιστωθεί ότι το παρασκεύασμα γονιδιωματικού DNA του μύκητα είναι όντως ενισχύσιμο υπό τις συνθήκες του πειράματος. Από τη σύγκριση των διαδρομών 2 και 3 των εικόνων 3.19 και 3.20 αντίστοιχα, παρατηρείται ότι η σύνθεση cDNA με RT-PCR, με το ζεύγος των εκκινητών 11pcDNAInt και το διαφορετικό θερμοκρασιακό προφίλ που εφαρμόστηκε ήταν πιο αποτελεσματική σε σχέση με την προηγούμενη.

Προκειμένου να εξεταστεί η σχέση των προϊόντων της PCR και της RT-PCR (από το ζεύγος των εκκινητών 11pcDNAExt), με τους κλώνους pcDNA-11, pcDNA-11b, με το dsRNA και με το γονιδιωματικό DNA του *P. polonicum* πραγματοποιήθηκε και υβριδισμός κατά Northern.



Εικόνα 3.21. α) Πήγμα αγαρόζης, β) Μεμβράνη υβριδισμού 1, γ) Μεμβράνη υβριδισμού 2. Στην μεμβράνη υβριδισμού 1, ιχνηλάτης είναι η ένθεση του pcDNA-11b και στην μεμβράνη υβριδισμού 2 ιχνηλάτης είναι το αμπλικόνιο του γονιδιωματικό DNA του *P. polonicum* που προέκυψε από τους εκκινητές ITS.

Διαδρομές: 1, 1', Α. Μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/*Hind*III
 2, 2', Β. dsRNA Πιπ 2
 3, 3', Γ. Γονιδιωματικό DNA του *P. polonicum*
 4, 4', Δ. pcDNA-11 + *Eco*R I (θετικός μάρτυρας)
 5, 5', Ε. pcDNA-11b + *Eco*R I (θετικός μάρτυρας)
 6, 6', Ζ. Αρνητικός μάρτυρας
 7, 7', Η. Αμπλικόνιο γονιδιωματικού DNA του *P. polonicum*
 8, 8', Θ. Αμπλικόνιο γονιδιωματικού DNA του *P. polonicum* (ITS εκκινητές)
 9, 9', Ι. cDNA (1:10 dsRNA)
 10, 10', Κ. cDNA (10⁰ dsRNA)
 11, 11', Λ. Μάρτυρας μοριακών βαρών 1 Kb DNA

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο δείγμα από την αντίδραση της PCR. Όπως διαπιστώνεται από τη μεμβράνη υβριδισμού 1, ο ιχνηλάτης pcDNA-11b υβριδίζει με το dsRNA, με τους θετικούς μάρτυρες pcDNA-11b, pcDNA-11 καθώς και με το ένα προϊόν της RT-PCR, το cDNA (10⁰ dsRNA) (κόκκινα βέλη). Το

γεγονός ότι το δείγμα cDNA (1:10 dsRNA) δεν υβριδίζει με τον ιχνηλάτη ίσως να οφείλεται στη μικρή ποσότητα του δείγματος. Συγχρόνως ο ιχνηλάτης υβριδίζει με το αμπλικόνιο του γονιδιωματικού DNA του *P. polonicum*. Στη μεμβράνη υβριδισμού 2 απομακρύνθηκε ο προηγούμενος ιχνηλάτης και έγινε πάλι υβριδισμός χρησιμοποιώντας ως ιχνηλάτη το αμπλικόνιο του γονιδιωματικού DNA του *P. polonicum* που προέκυψε από τους εκκινητές ITS (με αστέρι σημειώνονται οι θέσεις του dsRNA, pcDNA-11b και του pcDNA-11 που δεν απομακρύνθηκαν τελείως μετά τη μεταχείριση της μεμβράνης 1 με DMF). Ο ιχνηλάτης λοιπόν υβριδίζει μόνο με το γονιδιωματικό DNA του *P. polonicum* και με το θετικό μάρτυρα (πορτοκαλί βέλη). Συνεπώς, η ποσότητα του γονιδιωματικού DNA ήταν επαρκής, ώστε αν υπήρχε ομολογία με τον ιχνηλάτη pcDNA11-b θα μπορούσε να υβριδίζει στη μεμβράνη υβριδισμού 1.

Κεφάλαιο 4:

Συζήτηση

Συζήτηση

4.1 Σάρωση τοπικών απομονώσεων φυτοπαθογόνων μυκήτων για την ανίχνευση στελεχών που περιέχουν μόρια δίκλωνου RNA:

Από περιοχές της Αιτωλοακαρνανίας, της Άρτας και των Ιωαννίνων απομονώθηκαν από φυτά 78 είδη μυκήτων. Με βάση τις δοκιμές DNase I και RNase A τέσσερα δείγματα διαπιστώθηκαν θετικά στην παρουσία μορίων dsRNA και το ποσοστό αυτών στο σύνολο των ελεγχόμενων δειγμάτων είναι της τάξης του 5 %. Οι ξενιστές αυτών των μορίων ταυτοποιήθηκαν ταξινομικά μέσω κλωνοποίησης και προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής ITS των ριβοσωμικών τους γονιδίων. Έτσι, οι μύκητες με την κωδική ονομασία Πιπ 2, Βερ 2.2, Βλ 1.4, Βερ 1.2 ανήκουν αντίστοιχα στα είδη *Penicillium polonicum*, *P. pinophilium*, *Aspergillus ochraceus* και *A. japonicus* (Κεφ. 3, τμήμα 3.3, Πίν. 3.2). Βάσει αυτών πρόκειται για ατελείς μορφές μυκήτων που ανήκουν στο φύλο *Ascomycota* (Alexopoulos *et al.* 1996). Το είδος *A. ochraceus* είναι φυτοπαθογόνος μύκητας, παράγει τη μυκοτοξίνη ωχρατοξίνη, που υποβαθμίζει την ποιότητα των παραγόμενων αμπελοκομικών προϊόντων (Τζάμος 2004). Επίσης σε ένα άλλο στέλεχος του *A. ochraceus*, το FA 0611, βρέθηκαν πρόσφατα τρία τεμάχια dsRNA και η σύγκριση των αλληλουχιών τους έδειξε ότι το AoR1 (από το dsRNA1) κωδικοποιεί μια πολυμεράση RdRp, ο AoR2 (dsRNA2) μια CP, ενώ ο ρόλος του AoR3 (dsRNA3) είναι άγνωστος (ενδεχομένως να πρόκειται για δορυφορικό dsRNA). Τελικά προτάθηκε ότι πρόκειται για ένα νέο μυκοϊό από dsRNA που ανήκει στο γένος *Partitivirus*, με ονομασία *A. ochraceus virus 1*, AoV1 (Liu *et al.* 2008). Στην παρούσα εργασία, το ηλεκτροφορητικό πρότυπο ζώνωσης των μορίων dsRNA που ανιχνεύτηκαν στην τοπική απομόνωση Βλ 1.4 (Κεφ 3, τμήμα 3.2, Εικ. 3.5), σαφώς διαφέρει από αυτό του AoV1. Βεβαίως, δεν είναι ακόμη πλήρως αποδεδειγμένο ότι πρόκειται για μυκοϊό, μολονότι αυτό είναι πολύ πιθανό. Εν τούτοις, οι 4 έως 5 ζώνες dsRNA που ανιχνεύονται στην απομόνωση Βλ 1.4, είναι δυνατόν, είτε να αποτελούν έναν νέο μυκοϊό του γένους *Chrysovirus*, είτε να αποτελούν συνδυασμό διαφόρων γονιδιωμάτων μυκοϊών, ως συνέπεια κάποιας μικτής μόλυνσης. Το είδος *A. japonicus* ανήκει στην κατηγορία των σαπρόφυτων μυκήτων και είναι υπεύθυνο για μετασυλλεκτικές σήψεις σε πολλά αγροτικά προϊόντα. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι κατά την αποθήκευση σπόρων ραπανιού και ελαιοκράμβης σε συνθήκες υγρασίας και υψηλής θερμοκρασίας, η μόλυνση τους από τον μύκητα εμποδίζει την εκβλάστηση

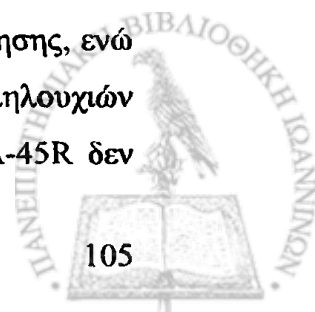
των σπόρων και την ανάπτυξη των φυτωρίων. Αυτό οφείλεται σε μια φυτοτοξίνη που παράγει ο μύκητας που είναι πλούσια στο σεκαλικό οξύ F (Zeng *et al.* 2001). Επίσης, με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο ζώνωσης του μορίου dsRNA που απομονώθηκε από το δείγμα Βερ 1.2, πιθανόν να ανήκει στην οικογένεια των Totiviridae (Κεφ 3, τμήμα 3.2, Εικ. 3.5). Στον μύκητα *A. japonicus* έχει παρατηρηθεί η παρουσία μυκοϊού με γονιδίωμα από dsRNA, αλλά δεν έχει ακόμη ταξινομηθεί (Varga *et al.* 1994). Τέλος, όσον αφορά τα άλλα δυο είδη μυκήτων που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία δεν υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία για την παρουσία σε αυτούς μορίων dsRNA. Παράλληλα, με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο ζώνωσης των μορίων dsRNA που απομονώθηκαν από τα δείγματα Πιπ 2 και Βερ 2.2 (Κεφ 3, τμήμα 3.2, Εικ. 3.5), ίσως να πρόκειται για μικτές μολύνσεις μυκοϊών.

4.2 Κλωνοποίηση και μερική μοριακή ανάλυση ενός μορίου dsRNA της απομόνωσης Πιπ 2:

Από το δείγμα Πιπ 2 απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης ένα μόριο dsRNA μεγέθους 3.5 Kb το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για τη σύνθεση cDNA και την κλωνοποίηση των μορίων που προέκυψαν. Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα, τα οποία ήταν εξίσου αποτελεσματικά, αφού οι κλώνοι που προέκυψαν ήταν οι ίδιοι, υπό την έννοια ότι κλωνοποιήθηκαν ενθέσεις των ιδίων μηκών. Ωστόσο, θεωρούμε ότι το πρωτόκολλο με το μίγμα των τυχαίων και εννεαμερών εκκινητών είναι πιο εύχρηστο λόγω των λιγότερων βημάτων που απαιτούνται για τη σύνθεση του cDNA, ενώ και ο κίνδυνος απώλειας μορίων dsRNA και cDNA με τις συνεχείς κατακρημνίσεις μειώνεται.

Από τα δυο πρωτόκολλα απομονώθηκε πλήθος κλώνων, συνολικά 94 (80 από το πρώτο και 14 από το δεύτερο πρωτόκολλο), από τους οποίους εξετάστηκαν περαιτέρω οι ακόλουθοι: pcDNA-14, pcDNA-45, pcDNA-10, pcDNA-11, pcDNA-11b, pcDNA-12, pcDNA-3. Η αλληλουχία των ενθέσεων των κλώνων ταυτοποιήθηκε και συγκρίθηκε με γνωστές κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων. Όμως δε βρέθηκε καμία γνωστή αλληλουχία που να εμφανίζει έστω και περιορισμένη ομολογία προς τις ενθέσεις.

Πιο συγκεκριμένα, στο κλώνο pcDNA-14 δε βρέθηκαν οι θέσεις κλωνοποίησης, ενώ στο pcDNA-45 βρέθηκε μόνο η μία. Επιπλέον, από τη σύγκριση των αλληλουχιών του pcDNA-14F με το pcDNA-14R και του pcDNA-45F με τον pcDNA-45R δεν



προέκυψε καμία ομολογία μεταξύ τους (Κεφ. 3, Πίνακας 3.3). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε κάποιο λάθος κατά την «ανάγνωση» της αλληλουχίας ή η αντίδραση δεν ολοκληρώθηκε ώστε να βρεθεί κάποια ομόλογη περιοχή. Οι αντιδράσεις αυτές πρέπει να επαναληφθούν.

Στους κλώνους pcDNA-10 και pcDNA-12 παρατηρείται υψηλό ποσοστό ταυτότητας της τάξης του 99 % καθώς και ομολογία στον υβριδισμό κατά Northern. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται είτε στην αλληλεπικάλυψη κάποιας περιοχής του ενός κλώνου από τον άλλο είτε να πρόκειται για τον ίδιο κλώνο.

Οι κλώνοι pcDNA-11b και pcDNA-3 προέκυψαν από το δεύτερο πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA. Τόσο από την σύγκριση των αλληλουχιών του κλώνου pcDNA-11 με τον pcDNA-11b, καθώς και των pcDNA-10, pcDNA-12 με τον pcDNA-3R (Κεφ. 3, Πίνακας 3.3), όσο και από τους υβριδισμούς κατά Northern (Κεφ. 3, Εικόνες 3.17 και 3.18) διαπιστώνεται ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ τους. Επομένως, κατά πάσα πιθανότητα πρόκειται για ταυτόσημες ενθέσεις, του pcDNA-11b με τον pcDNA-11 και του pcDNA-3 με τους pcDNA-10, pcDNA-12, που προέκυψαν από διαφορετικές μεθόδους σύνθεσης cDNA, μολονότι οι αλληλουχίες δεν είναι απολύτως όμοιες (ομοιότητες της τάξης του 99 έως 99,5%), γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται σε σφάλματα ταυτοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Επίσης, σε όλους τους κλώνους βρέθηκαν μικρά ΑΠΑ τα οποία όμως δεν κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη. Τα ανωτέρω δεν είναι δυνατό να αξιολογηθούν πλήρως επί του παρόντος, δεδομένου ότι θα πρέπει ενδεχομένως να καταβληθούν προσπάθειες έκφρασης αυτών των ενθέσεων σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης, ούτως ώστε να καταστεί σαφές το εάν περιέχονται κωδικοποιούσες αλληλουχίες ή εάν πρόκειται για εντελώς νέου τύπου γενετικά στοιχεία.

4.3 Προσδιορισμός της προέλευσης των κλωνοποιηθέντων τμημάτων cDNA

Η αδυναμία ανίχνευσης έστω και περιορισμένης ομολογίας των κλωνοποιηθέντων ενθέσεων με κάποια γνωστή αλληλουχία, καθώς και προσδιορισμού κάποιας λειτουργίας που ενδεχομένως κωδικοποιούν οι ενθέσεις αυτές, κατέστησε απαραίτητη την επιβεβαίωση της προέλευσής τους. Χρησιμοποιήθηκε ο υβριδισμός κατά Northern για την ανίχνευση και επιβεβαίωση της προέλευσης των ενθέσεων, των ακόλουθων κλώνων: pcDNA-14, pcDNA-45, pcDNA-10, pcDNA-11, pcDNA-11b, pcDNA-12, pcDNA-3. Το αποτέλεσμα του υβριδισμού έδειξε σαφώς ότι οι ενθέσεις αυτές προέρχονται από μόρια dsRNA (Κεφ. 3, τμήμα 3.4.2, Εικόνες 3.15,

3.16, 3.17, 3.18). Ταυτόχρονα, στον υβριδισμό κατά Northern (Κεφ. 3, **Εικόνα 3.17**) διαπιστώνουμε ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ του κλώνου pcDNA-10 με τον pcDNA-14. Η ομολογία αυτή αποδίδεται στην ύπαρξη κοινών περιοχών μεταξύ των δύο κλώνων.

Επιχειρήθηκε η περαιτέρω επιβεβαίωση της προέλευσης της ενθέσης pcDNA-11b. Με βάση τη γνωστή αλληλουχία του κλώνου σχεδιάστηκαν εκκινητές (Πίν. 2.3) με στόχο την πραγματοποίηση δοκιμών RT-PCR. Τα αμπλικόνια που προέκυψαν παρουσίαζαν ομολογία με τα μόρια dsRNA στον υβριδισμό κατά Northern (Κεφ. 3, **τμήμα 3.4.3, Εικ. 3.21β**), γεγονός που ενισχύει την πιθανή μυκοϊκή προέλευση του κλώνου pcDNA-11b. Όμως, οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν φαίνεται να έχουν συμπληρωματικές θέσεις δέσμευσης και επί του γονιδιωματικού DNA του *P. rolonicum* (Κεφ. 3, **τμήμα 3.4.3, Εικόνες 3.19, 3.20**). Επίσης, η ομολογία που διαπιστώθηκε μόνο με την αντίδραση PCR και όχι με τον υβριδισμό κατά Northern (Κεφ. 3, **τμήμα 3.4.3, Εικόνα 3.21γ**), θέτει ερωτήματα τόσο για την προέλευση αυτών των μορίων όσο και για τη θέση που εδράζονται αυτά τα μόρια dsRNA στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό πιθανώς μπορεί να οφείλεται σε επιμόλυνση των δειγμάτων με γονιδίωμα «μυκοϊού», καθώς η εμφάνιση ζώνης ομολογίας παρατηρείται μόνο στις αντιδράσεις PCR. Παράλληλα, η ομολογία αυτή που παρουσιάζεται ενδεχομένως να οφείλεται στην ύπαρξη αντιγράφου, ή αντιγράφων του γενετικού αυτού στοιχείου ενσωματωμένων στο γονιδίωμα του ξενιστή, όπως συμβαίνει με ρετροτρανσπζόνα π.χ. του τύπου των στοιχείων *Ty* του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Ωστόσο, η ένθεση αυτή πιθανόν δεν είναι δυνατόν να προέρχεται από γονιδιωματικό DNA, καθώς το νουκλεϊνικό οξύ που εκχυλίστηκε (Κεφ. 3, **τμήμα 3.4.1, Εικόνα 3.13**) μεταχειρίστηκε με το ένζυμο DNase I, ώστε να υδρολυθούν τα τυχόν μόρια DNA που θα υπήρχαν στο δείγμα. Επιπλέον, η ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, για ένα τόσο μεγάλο μόριο της τάξης των 794 bp (Κεφ. 3, **τμήμα 3.4.1**), δεν εμφάνισε καμία ομολογία με κάποια γνωστή αλληλουχία.

Παρόλα αυτά τα επόμενα βήματα της μελέτης θα πρέπει να είναι τα ακόλουθα:

1. Η κλωνοποίηση των ζωνών του γονιδιωματικού DNA του *P. rolonicum* που παρουσιάζουν ομολογία με το dsRNA και ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας θα συντελέσει στην ταυτοποίηση τους.

2. Η απομόνωση των ισοσωματίων από το μύκητα καθώς και η παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο θα βοηθήσει στην ταξινόμηση του ιού με βάση τη δομή του. Παράλληλα, θα αποτελέσουν και οδηγό για την ανεύρεση της θέσης τους στο εσωτερικό του κυττάρου του μύκητα-ξενιστή κατά τη σάρωση του μύκητα με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Επίσης, η εκχύλιση dsRNA από ισοσώματα μειώνει τον κίνδυνο μολύνσεων από τα νουκλεϊνικά οξέα του μύκητα, οπότε οι κλώνοι, που θα προκύψουν από τη σύνθεση cDNA, θα αντιπροσωπεύουν σε μεγαλύτερο ποσοστό το γονιδίωμα του dsRNA μυκοϊού.

3. Στο δείγμα Πιπ 2 με βάση τις γνωστές αλληλουχίες των κλώνων θα πρέπει να σχεδιαστούν εκκινητές και σε συνδυασμό με τους τυχαίους εκκινητές να συντεθούν cDNA πλήρους μήκους. Η τεχνική αυτή θα επιτρέψει την ταυτοποίηση με μεγαλύτερη ακρίβεια του ύποπτου μυκοϊού, καθώς και τη διαπίστωση του ρόλου του συγκεκριμένου μορίου dsRNA.

4. Ομοίως η ίδια διαδικασία θα πρέπει να γίνει τόσο και με τα άλλα μόρια dsRNA του Πιπ 2, όσο και με τα άλλα δείγματα.

5. Η εύρεση υγιούς στελέχους *P. rolonicum* και η σύγκριση καλλιεργειών σε PDA και PDM των στελεχών με υγιή και μολυσμένα με μόρια dsRNA θα επιτρέψει την παρατήρηση των πιθανόν φαινοτυπικών αλλαγών που προκαλούν τα μόρια dsRNA στην αποικία του ξενιστή. Επίσης, με τον εμβολιασμό φυτών με υγιή και μολυσμένα στελέχη του *P. rolonicum* και στη συνέχεια με τη σύγκριση αυτών, θα διαπιστωθεί η πιθανή δυνατότητα του μυκοϊού να προκαλεί υπομολυσματικότητα.

6. Επιπλέον θα πρέπει να εξεταστεί και η δυνατότητα μεταβίβασης των dsRNA μορίων από μολυσμένα στελέχη του *P. rolonicum* σε υγιή, είτε με τη μέθοδο της διαμόλυνσης ή του μετασχηματισμού με σφαιροπλάστες από υγιή στελέχη του *P. rolonicum*.

7. Ο καθορισμός των ομάδων βλαστικής ασυμβατότητας (VCG) στο είδος μπορεί να αποτελέσει ένα ακόμη πεδίο έρευνας. Η κλωνοποίηση και η ταυτοποίησή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων *vic* θα επιτρέψει τον καθορισμό της ποικιλομορφίας VCG. Μια προσέγγιση για την κλωνοποίηση είναι να βρεθούν μάρτυρες συνδέτες στα γονίδια *vic*, κατασκευάζοντας έναν προκαταρκτικό χρωμοσωμικό χάρτη σύνδεσης στο *P. rolonicum*. Αυτό θα γίνει με τη χρήση αντιδράσεων RAPD, οι οποίες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα για τη χαρτογράφηση εντός καθορισμένων γενεαλογικών δένδρων. Οι RAPDs μάρτυρες αναγνωρίζουν πολλές περιοχές από ποικίλα γονιδιώματα, επαναλαμβανόμενες τόσο καλά όσο

πλούσιες σε γονίδια περιοχές. Έτσι θα αντιμετωπιστούν και τα προβλήματα που θέτει η βλαστική ασυμβατότητα στη διασπορά των μυκοϊών μεταξύ ίδιων ειδών (Kubisiak *et al.* 2006).

Βιβλιογραφία

1. Agrios, G.N. (1997). Plant Pathology. Academic Press, fourth edition.
2. Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell M. (1996). Introductory Mycology. Fourth edition. John Wiley and Sons, Inc.
3. Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U., and Rigling, D. (1999). Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using RFLP markers. *Mol Ecol.* **8**: 843-854.
4. Ahn, I.-P., and Lee Y.-H. (2001). A viral Double-Stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. *MPMI.* **4**: 496-507.
5. Anagnostakis, S.L., and Kranz J. (1987). Population dynamics of *Cryphonectria parasitica* in a mixed-hardwood forest in Connecticut. *Phytopathology* **77**: 571-574.
6. Anagnostakis, S.L. (2001). American chestnut spout survival with biological control the chestnut-blight fungus population . *Forest Ecology and Management* **152**: 225-233.
7. Boland G. J. (2004). Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of *Sclerotinia* species. *Can. J. Plant Pathol.* **26**: 6–18.
8. Brimmer, T. A., and Boland G. J. (2003). A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems and Enviroments* **100**: 3-16.
9. Castro, M., Kramer, K., Valvidia, L., Ortiz, S., and Castillo A. (2003). A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence- associated traits to *Botrytis cinerea*. *FEMS Micribiology Letters* **288**: 87-91.
10. Chen, B., and Nuss, D. L. (1999). Infections cDNA clone of hypovirus CHV 1-Euro7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *J. Virol.* **73**: 985-992.
11. Chen, B., Geletka, L.M., and Nuss, D. L. (2000). Using chimeric hypoviruses to fine-tune the interaction between a pathogenic fungus and ist plant host. *J. Virol.* **74**: 7562-7567.
12. Choi, G. H., and Nuss. D. L. (1992). Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infections viral cDNA. *Science* **257**: 800-803.
13. Choi, G. H., Pawlyk, D. M., and Nuss, D. L. (1991a) The autocatalytic protease p29 encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus resembles the potyvirus-encoded protease HC-Pro. *Virology* **183**: 747-752.

14. Choi, G. H., Shapira, R., and Nuss, D. L. (1991b). Cotranslational autoproteolysis involved in gene expression from a double-stranded RNA genetic element associated with hypovirulence of chestnut blight fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1167-1171.
15. Craven, M. G., Pawlyk, D. M., Choi, G. H., and Nuss, D. L. (1993). Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence associated virus of the chestnut blight fungus. *J. Virol.* **67**:6513-6521.
16. Chu, Y.M, Lim, W.S, Yea, S.J., Cho, J.D., and Kim K.H. (2002). Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. *Applied and environmental microbiology* **68**: 2529-2534.
17. Compel, P., Papp, I, Bibo, M. Fekete, C., Hornok, L. (1999) Genetic interrelationships and genome organization of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. *Virus Genes* **18**: 49-56.
18. Dawe, A.L., and Nuss D.L. (2001). Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics* **35**: 1-29.
19. Gao, S., and Sahin, L., (1995). Activity of polygalacturonase by *Cryphonectria parasitica* in chestnut bark and its inhibition by extracts from American and Chinese chestnut. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**: 199-213.
20. Gao, S., and Nuss, D. L., (1996). Distinct roles for two G protein subunits in fungal virulence, morphology and reproduction revealed by targeted gene disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14122- 14127.
21. Ghabrial, S.A. (1998). Origin, Adaptation and Evolutionary Pathways of Fungal Viruses. *Virus Genes* **16**: 119-131.
22. Gobbin, D., Hoegger, P.J., Heiniger, U., and Rigling D., (2003). Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) in Europe. *Virus Research* **97**: 39-46.
23. Heiniger, U., and Rigling, D. (1994). Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 581-599.
24. Hillman, B.I., and Suzuki, N. (2004). Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Elsevier. Advances in virus research* **63**: 423-472.
25. Hillman, B.I., Tian, Y., Bedker, P.J., and Brown, M.P. (1992). A North American hypovirulent isolate of chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. *J. Gen. Virol.* **73**: 681-686.

26. Huang, S., and Ghabrial, S.A. (1996). Organization and expression of double-stranded RNA genome of *Helminthosporium victoriae* 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12541-12546.
27. Ihrmark, K. (2001). Double-stranded RNA Elements in the Root Rot Fungus *Heterobasidium annosum*. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
28. Jiang D., and Ghabrial S.A., (2004). Molecular characterization of *Penicillium chrysogenum* virus: reconsideration of the taxonomy of the genus *Chrysovirus*. *Journal of virology* **85**: 2111-2121.
29. Koonin, E.V., and Dolja, V.V. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**: 375-430.
30. Koonin, E.V. (1992). Evolution of double-stranded RNA viruses: a case for polyphyletic origin from different groups of positive-strand RNA viruses. *Sem. Virol* **3**: 327-339.
31. Kubisiak, T. L., Milgroom, M.G. (2006). Markers linked to vegetative incompatibility (*vic*) genes and a region of high heterogeneity and reduced recombination near the mating type locus (MAT) in *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 453-463.
32. Lakshman, D.K., and Tavantzis, S.M. (1994). Spontaneous appearance of genetically distinct double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **84**: 633-639
33. Larson, T. G., Choi, G. H., and Nuss, D. L. (1992). Regulatory pathways governing modulation of fungal gene expression by a virulence-attenuating mycovirus. *EMBO J.* **11**: 4539-4548.
34. Lee, S.B., and Taylor, J.W. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. PCR PROTOCOLS, A Guide to Methods and Applications. ACADEMIC PRESS.
35. Li, D., Ashby, A. M., and Johnstone K. (2003). Molecular evidence that the extracellular cutinase PbcI is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oilseed rape. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**: 545-52.

36. Linder-Basso, D., Dynek, J.N., and Hillman, B.I. (2005). Genome analysis of *Cryphonectria hypovirus 4*, the most common Hypovirus species in North America. *Virology* **337**: 192-203.
37. Liu, W., Duns, G., and Chen, J. (2008). Genomic characterization of a novel partivirus infecting *Aspergillus ochraceus*. *Virus Genes* **37**: 322-327.
38. Loubradou, G., and Turcq, B. (2000). Vegetative incompatibility in filamentous fungi: a roundabout way of understanding the phenomenon. *Res. Microbiol.* **151**: 239-245.
39. MacDonald, W.L., and Fulbright, D.W. (1991). Biological control of chestnut blight: use and limitation of transmissible hypovirulence. *Plant Dis.* **75**: 656-661.
40. McCabe, M.P., Pfeiffer P., and Van Alfen, N.K. (1999). The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogen fungi. *Trends in Microbiology* **7**: 377-381.
41. Mertens, P. (2004). The dsRNA viruses. *Virus Research* **101**: 3-13.
42. Milgroom M.G., and Cortesi, P., (2004). BIOLOGICAL CONTROL OF CHESTNUT BLIGHT WITH HYPOVIRULENCE: A Critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 311-38.
43. Morris, T.J, and Dodds J.A. (1979). Isolation and analyses of double- stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* **69**: 854-858.
44. Nogawa, M., Kageyama, S.T., and Okazaki, M. (1993). A double-stranded RNA mycoviruses from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani f. sp. Robiniae*. *FEMS Microbial. Lett.* **110**: 153-158.
45. Nuss, D.L. (2005). Hypovirulence: Mycovirulence at the fungal-plant interface. *Nature Publishing group* **3**: 632-642.
46. Pearson, M.N., Beever, R. E., Boine, B., and Arthur, K. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **10**: 115-128.
47. Peever, T.L., Liu, Y.C., and Milgroom, M.G. (1997). Diversity of hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology* **87**: 1026-1033.
48. Peever, T.L., Liu, Y.C., Wang, K., Hillman B.I., Foglia, R., and Milgroom, M.G. (1998). Incidence and diversity of double-stranded RNAs occurring in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*, in China and Japan. *Phytopathology* **88**: 811-817.

49. Preisig, O., Moleleki, N., Smit, W.A., Wingfeld, B.D., and Wingfield, M.J. (2000). A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. *Journal of General Virology* **81**: 3107-3114.
50. Rigling, D., and Van Alfen, N. K. (1991). Regulation of laccase biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA. *J. Bacteriol.* **173**: 8000-8003.
51. Rigling, D., and VanAlfen, N. K. (1993). Extra- and intracellular laccases of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3634-3639.
52. Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001). Molecular Cloning. A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor laboratory press.
53. Schafer, W. (1993). The role of cutinase in fungal pathogenicity. *Trends Microbiol.* **1**: 69-71.
54. Smit, W.A., Wingfield, B.D., and Wingfield, M.J. (1996). Reduction of laccase activity and other hypovirulence-associated traits in dsRNA-containing strains of *Diaporthe ambigua*. *Phytopathology* **86**: 1311-1316.
55. Suzuki, N., Chen, B., and Nuss, D.L. (1999). Mapping of a hypovirus p29 protease symptom determinant domain with sequence similarity to potyvirus HC-Pro protease. *J. Virol.* **73**: 9478-9484.
56. Varga, J., Kevei, F., Vágvölgyi, C., Vriesema, A., and Croft, J.H. (1994). Double-stranded RNA mycoviruses in section *Nigri* of *Aspergillus* genus. *Can. J. Microbiol.* **40**: 325-329.
57. Varley, D.A., Pldila, G.K., and Hiremath, S.T. (1992). Cutinase in *Cryphonectria parasitica*, the chestnut blight fungus: suppression of cutinase expression in isogenic hypovirulent strains containing double-stranded RNAs. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4539-4554.
58. Watson, J.D., Caudy, A.A., Myers, R.M., and Witkowski, J.A. (2007). Ανασυνδυασμένο DNA. Γονίδια και Γονιδιώματα-Μια συνοπτική παρουσίαση. Ακαδημαϊκές εκδόσεις.
59. White, T.J., Bruns, T., Lee S., and Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR PROTOCOLS, A Guide to Methods and Applications. ACADEMIC PRESS.
60. Wei, C.Z., Osaki, H., Iwanami, T., Matsumoto, N., and Ohtsu, Y. (2003). Molecular characterization of dsRNA segments 2 and 5 and electron microscopy of a novel

- reovirus from a hypovirulent isolate, W370, of the plant pathogen *Rosellinia necatrix*. *J. Gen. Virol.* **84** : 2431-2437.
61. Zanotto, P.M. deA., Gibbs, M.J., Gould, E.A., and Holmes, E.C. (1996). *J. Virol.* **70**: 6083-6096.
62. Zeng, R. S. Luo, S. M., Shi, M.B., Shi, Y.H., Zeng, O., and Tan, H.F. (2001). Allelopathy of *Aspergillus japonicus* on Crops. *Agron. J.* **93**: 60-64.
63. Zhang, L., Bassiri R., and VanAlfen, N.K. (1998). Viral repression of fungal pheromone precursor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 953-959.
64. Αγγελής Γ. (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.
65. Γεωργόπουλος, Σ.Γ., Ζιώγας, Β.Ν. (1992). Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών. Εκδόσεις Γ.Π.Α.
66. Μπαλής Κ. (1993). Μαθήματα γενικής μικροβιολογίας. Εισαγωγή στον κόσμο των Μυκήτων. Εκδόσεις Γ.Π.Α.
67. Τζάμος Ε. (2004). Φυτοπαθολογία.. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.
68. Χατζηλουκάς Ε. (2006). Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
69. Χατζηλουκάς Ε. (2008). Εργαστηριακές Ασκήσεις Μοριακής Βιολογίας. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
70. Χατζόπουλος Π. (2001). Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο.
- Διαδικτυακές πηγές
71. Lane L. <http://nu-distance.unl.edu/homer/Class/4/Mastery/text/dsRNA.html>.

49. Preisig, O., Moleleki, N., Smit, W.A., Wingfeld, B.D., and Wingfield, M.J. (2000). A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. *Journal of General Virology* **81**: 3107-3114.
50. Rigling, D., and Van Alfen, N. K. (1991). Regulation of laccase biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA. *J. Bacteriol.* **173**: 8000-8003.
51. Rigling, D., and VanAlfen, N. K. (1993). Extra- and intracellular laccases of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3634-3639.
52. Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001). Molecular Cloning. A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor laboratory press.
53. Schafer, W. (1993). The role of cutinase in fungal pathogenicity. *Trends Microbiol.* **1**: 69-71.
54. Smit, W.A., Wingfield, B.D., and Wingfield, M.J. (1996). Reduction of laccase activity and other hypovirulence-associated traits in dsRNA-containing strains of *Diaporthe ambigua*. *Phytopathology* **86**: 1311-1316.
55. Suzuki, N., Chen, B., and Nuss, D.L. (1999). Mapping of a hypovirus p29 protease symptom determinant domain with sequence similarity to potyvirus HC-Pro protease. *J. Virol.* **73**: 9478-9484.
56. Varga, J., Kevei, F., Vágvölgyi, C., Vriesema, A., and Croft, J.H. (1994). Double-stranded RNA mycoviruses in section *Nigri* of *Aspergillus* genus. *Can. J. Microbiol.* **40**: 325-329.
57. Varley, D.A., Pldila, G.K., and Hiremath, S.T. (1992). Cutinase in *Cryphonectria parasitica*, the chestnut blight fungus: suppression of cutinase expression in isogenic hypovirulent strains containing double-stranded RNAs. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4539-4554.
58. Watson, J.D., Caudy, A.A., Myers, R.M., and Witkowski, J.A. (2007). Ανασυνδυασμένο DNA. Γονίδια και Γονιδιώματα-Μια συνοπτική παρουσίαση. Ακαδημαϊκές εκδόσεις.
59. White, T.J., Bruns, T., Lee S., and Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR PROTOCOLS, A Guide to Methods and Applications. ACADEMIC PRESS.
60. Wei, C.Z., Osaki, H., Iwanami, T., Matsumoto, N., and Ohtsu, Y. (2003). Molecular characterization of dsRNA segments 2 and 5 and electron microscopy of a novel

- reovirus from a hypovirulent isolate, W370, of the plant pathogen *Rosellinia necatrix*. *J. Gen. Virol.* **84** : 2431-2437.
61. Zanotto, P.M. deA., Gibbs, M.J., Gould, E.A., and Holmes, E.C. (1996). *J. Virol.* **70**: 6083-6096.
62. Zeng, R. S. Luo, S. M., Shi, M.B., Shi, Y.H., Zeng, O., and Tan, H.F. (2001). Allelopathy of *Aspergillus japonicus* on Crops. *Agron. J.* **93**: 60-64.
63. Zhang, L., Bassiri R., and VanAlfen, N.K. (1998). Viral repression of fungal pheromone precursor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 953-959.
64. Αγγελής Γ. (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.
65. Γεωργόπουλος, Σ.Γ., Ζιώγας, Β.Ν. (1992). Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών. Εκδόσεις Γ.Π.Α.
66. Μπαλής Κ. (1993). Μαθήματα γενικής μικροβιολογίας. Εισαγωγή στον κόσμο των Μυκήτων. Εκδόσεις Γ.Π.Α.
67. Τζάμος Ε. (2004). Φυτοπαθολογία.. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.
68. Χατζηλουκάς Ε. (2006). Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
69. Χατζηλουκάς Ε. (2008). Εργαστηριακές Ασκήσεις Μοριακής Βιολογίας. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
70. Χατζόπουλος Π. (2001). Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο.
- Διαδικτυακές πηγές
71. Lane L. <http://nu-distance.unl.edu/homer/Class/4/Mastery/text/dsRNA.html>.