



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΚΑΡΥΩΣΗΣ ΣΤΟΝ
ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟ ΜΥΚΗΤΑ *VERTICILLIUM*

ΙΩΑΝΝΗΣ Α. ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, M.Sc.

ΑΘΗΝΑ 2014



HELLENIC REPUBLIC
**National and Kapodistrian
University of Athens**

SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY
DEPARTMENT OF GENETICS & BIOTECHNOLOGY

Ph.D. DISSERTATION

**GENETIC AND MOLECULAR STUDY OF HETEROKARYOSIS
IN THE PLANT PATHOGENIC FUNGUS *VERTICILLIUM***

IOANNIS A. PAPAIOANNOU

BIOLOGIST, M.Sc.

ATHENS 2014

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής
του Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας
(Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών).

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο – ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως.»

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΚΥΡΙΟΣ ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ**Μιλτιάδης Α. Τύπας**

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**Μιλτιάδης Α. Τύπας**

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επαμεινώνδας Ι. Παπλωματάς

Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, ΓΠΑ

Αικατερίνη-Μαρία Παππά

Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**Μιλτιάδης Α. Τύπας**

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επαμεινώνδας Ι. Παπλωματάς

Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, ΓΠΑ

Αικατερίνη-Μαρία Παππά

Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Νικόλαος Ι. Πανόπουλος

Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεώργιος Ι. Ζερβάκης

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, ΓΠΑ

Βασιλική Σοφianoπούλου

Ερευνήτρια Α', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος

Βασίλειος Ν. Κουβέλης

Λέκτορας Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

«Πολλοὶ ἀπὸ τοὺς πραγματικοὺς βιβλιοφίλους φρονοῦν ὅτι δὲν χρειάζεται
‘πρόλογος’ διὰ τὰς μελέτας καὶ ἐν γένει τὰ συγγράματα, καὶ ὅτι αὐτὰ τὰ ἴδια μὲ μόνον
τὸν τίτλον εἶναι εἰς θέσιν νὰ προλογίσουν τὸ περιεχόμενον. Τῆς αὐτῆς γνώμης εἶμαι
καὶ ἐγώ».

Γεώργιος Α. Αναστασόπουλος, «Ελληνική Εκδοτική Εταιρεία», 1947

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας αυτήν τη διατριβή, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την έκφραση των θερμών μου ευχαριστιών σε ορισμένους ανθρώπους που συνέβαλαν, ο καθένας σε κάποιον βαθμό, στην ολοκλήρωσή της.

Στον κύριο εμπνευστή αυτής της εργασίας, ανεξάντλητο δάσκαλό μου, ενθουσιώδη ερευνητή και ακούραστο εμψυχωτή μου, κ. Μιλτιάδη Τύπα. Τον ευχαριστώ *θερμότατα* για όλη την πολυετή υποστήριξή του προς εμένα, στο επιστημονικό και το ανθρώπινο επίπεδο.

Στον κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά, που μου έκανε την τιμή να συμμετάσχει στη συμβουλευτική μου επιτροπή, για την πάντοτε πρόθυμη και συνεπή συνεργασία και την επιστημονική του κρίση. Στην κ. Κατερίνα Παππά, για την εποικοδομητική αλληλεπίδραση και την επιστημονική της συμβουλή. Σε ολόκληρη την εξεταστική επιτροπή, για την πρόθυμη ενασχόλησή τους και τις υποδείξεις τους επί του κειμένου της διατριβής.

Στον κ. Λευτέρη Λιγοξυγκάκη για την παραχώρηση βιολογικού υλικού και ερευνητικών του δεδομένων, καθώς και για την ηθική του υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας. Στον κ. Παναγιώτη Αποστολάκο και τον κ. Παντελή Λιβανό, για τη σπουδαία τους συμβολή στα πειράματα μικροσκοπίας που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας. Στα πολυάριθμα μέλη, πρώην και νυν, του εργαστηρίου Γενετικής – φίλους και συνεργάτες επί σειρά ετών. Σε όλους τους – δεκάδες – ανθρώπους που παρείχαν βιολογικό υλικό και ανασυνδυασμένα μόρια DNA, ανεκτίμητη πρώτη ύλη για την έκβαση της έρευνάς μου.

Πρωτίστως και προπάντων στην οικογένειά μου – το *θερμότερο* και *μεγαλύτερο* ευχαριστώ στους ανθρώπους που ανιδιοτελώς πάντοτε με στήριξαν, με ενέπνευσαν, με διαπαιδαγώγησαν και δημιούργησαν τις βάσεις και προϋποθέσεις για όλη τη μέχρι σήμερα ανθρώπινη και επιστημονική μου πορεία.

Σας ευχαριστώ θερμά.

I. Α. Π.

*Στους γονείς μου,
Καλλιόπη και Αριστεΐδη*

Πίνακας περιεχομένων

	Σελίδα
Πίνακας περιεχομένων	vi
Περίληψη	xii
Αρκτικόλεξα – συντομογραφίες	xvii
Ευρετήριο εικόνων	xix
Ευρετήριο πινάκων	xxii
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	1
1.1 Η κυτταρική σύντηξη (αναστόμωση) στους υφομύκητες	1
1.1.1 Εισαγωγικά στοιχεία	1
1.1.2 Τύποι κυτταρικής σύντηξης	2
<i>A. Σύντηξη υφών</i>	2
<i>B. Σύντηξη κονιδίων σε φάση βλάστησης</i>	5
1.1.3 Κυτταρική βιολογία και φυσιολογία της σύντηξης	7
<i>A. Η πορεία της σύντηξης</i>	7
<i>B. Δεκτικότητα – επαγωγή και εξωτερικοί παράγοντες</i>	7
1.1.4 Μοριακή βάση της σύντηξης	10
1.1.5 Ο ρόλος της βλαστητικής σύντηξης	14
1.1.6 Σύγκριση της κυτταρικής σύντηξης στους υφομύκητες και τους ζυμομύκητες	16
1.2 Ετεροκαρύωση	16
1.3 Ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα	19
1.3.1 Μηχανισμοί αναγνώρισης του ιδίου από το έτερον	19
1.3.2 Μηχανισμοί αναγνώρισης στους μύκητες	19
1.3.3 Λειτουργία – βιολογική σημασία της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας	21
1.3.4 Χαρακτηριστικά των προγραμματών κυτταρικού θανάτου στους υφομύκητες	23
<i>A. Εισαγωγικά στοιχεία</i>	23
<i>B. Μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από την ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα – ζώνες αντεπίδρασης (barrage zones)</i>	24
<i>Γ. Σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου</i>	26
<i>Δ. Γονίδια κυτταρικού θανάτου</i>	27
1.3.5 Μοριακοί μηχανισμοί της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας	27
<i>A. Εισαγωγικά στοιχεία</i>	27
<i>B. Γονίδια ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στο είδος <i>Neurospora crassa</i></i>	28
<i>Γ. Γονίδια ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στο είδος <i>Podospora anserina</i></i>	31
<i>Δ. Γονίδια ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στο είδος <i>Cryphonectria parasitica</i></i>	35
<i>E. Ρυθμιστές της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στα είδη <i>N. crassa</i> και <i>P. anserina</i></i>	36
<i>ΣΤ. Επίδραση της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης</i>	37
1.3.6 Εξελικτικές συνέπειες των προγραμμάτων γενετικής αναγνώρισης	39
1.3.7 Ομοιότητα της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας με τους μηχανισμούς	40

αναγνώρισης διαφορετικών ειδών	
1.4 Το γένος φυτοπαθογόνων μυκήτων <i>Verticillium</i>	41
1.4.1 Είδη του γένους <i>Verticillium</i> και συστηματική κατάταξη	41
1.4.2 Μορφολογία και διάκριση των ειδών του <i>Verticillium</i>	42
1.4.3 Βιολογία και φυτοπαθολογική σημασία των ειδών του γένους <i>Verticillium</i>	45
1.4.4 Φυλές (races), παθότυποι (pathotypes) και μοριακή διάγνωση	47
1.4.5 Τα γονιδιώματα των ειδών <i>V. dahliae</i> και <i>V. albo-atrum</i>	50
1.4.6 Οι πρώτες ενδείξεις της σύντηξης κονιδίων/υφών και της ετεροκαρύωσης στο γένος <i>Verticillium</i>	51
1.4.7 Η ετεροκαρύωση στο <i>Verticillium</i>	52
1.4.8 Ο παραφυλετικός κύκλος στο <i>Verticillium</i>	53
1.4.9 Η ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα στο <i>Verticillium</i>	54
<i>A. Μέθοδοι εκτίμησης της συμβατότητας μέχρι το 1990</i>	54
<i>B. Η επανάσταση των μεταλλαγών nit: κατάταξη σε Ομάδες Βλαστητικής Συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups, VCGs)</i>	57
<i>Γ. Συσχέτιση των VCGs με φυτοπαθολογικά, μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά</i>	58
<i>Δ. Η πυρηνική ριβοσωμική επανάληψη (rDNA) ως πιθανός στόχος μελέτης για τον εντοπισμό συσχετίσεων με τις VCGs του μύκητα <i>V. dahliae</i></i>	62
<i>E. Περιορισμοί του συστήματος των VCGs βάσει των μεταλλαγών nit</i>	64
1.5 Στόχοι της διατριβής	66

Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι	67
2.1 Στελέχη μικροοργανισμών	67
2.1.1 Στελέχη μυκήτων	67
2.1.2 Στελέχη βακτηρίων	71
2.1.3 Φαγική γονιδιακή βιβλιοθήκη του μύκητα <i>V. dahliae</i>	72
2.2 Θρεπτικά υποστρώματα	73
2.2.1 Θρεπτικά υποστρώματα για μύκητες	73
2.2.2 Θρεπτικά υποστρώματα για βακτήρια/βακτηριοφάγους	74
2.3 Καλλιέργεια και διατήρηση μικροοργανισμών	75
2.3.1 Καλλιέργεια, προετοιμασία κονιδιακών εναιωρημάτων και διατήρηση μυκήτων	75
2.3.2 Καλλιέργεια και διατήρηση βακτηρίων	77
2.4 Μορφολογικός/φυσιολογικός χαρακτηρισμός μυκήτων	77
2.5 Μικροσκοπία	78
2.6 Μεθοδολογία γενετικής μελέτης	79
2.6.1 Χαρακτηρισμός ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) των μυκήτων	79
2.6.2 Μεταλλαξογένεση μυκήτων με υπεριώδη ακτινοβολία (UV)	79
2.6.3 Μεταλλαξογένεση μυκήτων με νιτροζογουανιδίνη (MNNG)	80
2.6.4 Τεχνικές εμπλουτισμού αυξότροφων μεταλλαγών μυκήτων	81
2.6.5 Επιλογή μεταλλαγών ανθεκτικότητας των μυκήτων σε παρεμποδιστές αύξησης	81
2.6.6 Χαρακτηρισμός μεταλλαγών <i>nit</i> των μυκήτων	82
2.6.7 Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών <i>nit</i> των μυκήτων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα – κατάταξη στελεχών σε VCGs	83
2.6.8 Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών <i>nit</i> των μυκήτων σε υγρό θρεπτικό υλικό	84
2.6.9 Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας στελεχών μυκήτων φυσικού τύπου	84
2.6.10 Γενετική ανάλυση ετεροκαρύων	85
2.7 Μεθοδολογία μοριακής μελέτης	85
2.7.1 Πλασμίδια/φαγεμίδια (plasmids/phagemids)	85
2.7.2 Απομόνωση ολικού DNA μυκήτων	87

2.7.3	Γρήγορη απομόνωση ολικού DNA μυκήτων	87
2.7.4	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>E. coli</i>	88
	A. Μέθοδος αλκαλικής λύσης για απομόνωση σε μικρή κλίμακα	88
	B. Μέθοδος αλκαλικής λύσης για απομόνωση σε μεσαία κλίμακα	88
	Γ. Μέθοδος βρασμού	89
	Δ. Εμπορικό κιτ πλασμιδιακής απομόνωσης	89
2.7.5	Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου λ	89
2.7.6	Απομόνωση ολικού RNA μυκήτων	90
	A. Μέθοδος αντιδραστηρίου TRI (Ambion, Life Technologies)	90
	B. Εμπορικό κιτ απομόνωσης ολικού RNA	90
2.7.7	Εκτίμηση ποιότητας και ποσότητας απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων	91
2.7.8	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	91
2.7.9	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time Polymerase Chain Reaction, qPCR)	95
2.7.10	Αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription)	96
2.7.11	Έκλουση DNA από ζώνες σε πηκτώματα αγαρόζης	96
	A. Έκλουση DNA από ζώνες σε πηκτώματα αγαρόζης με τη μέθοδο NaI-silica	96
	B. Έκλουση DNA με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλουσης (electroelution)	97
	Γ. Έκλουση DNA από ζώνες σε πηκτώματα αγαρόζης με εμπορικό κιτ	97
2.7.12	Καθαρισμός μιγμάτων αντιδράσεων από ένζυμα, άλατα, δευτερογενή προϊόντα, νουκλεοτίδια και εκκινητές (primers)	98
	A. Εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1)	98
	B. Μέθοδος PEG	98
	Γ. Εμπορικό κιτ καθαρισμού	98
2.7.13	Πέψη μορίων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	98
2.7.14	Κλωνοποίηση προϊόντων PCR σε πλασμιδιακούς φορείς	99
	A. Κλωνοποίηση με προσθήκη άκρων TA	99
	B. Κλωνοποίηση με ισοσκελή άκρα (blunt-end ligation)	100
	Γ. Κλωνοποίηση με συμπληρωματικά ή «κολλώδη» (cohesive) άκρα	100
	Δ. Κλωνοποίηση με εμπορικούς φορείς/κιτ κλωνοποίησης	100
	E. Κλωνοποίηση με την τεχνολογία Gateway κατά το σύστημα OSCAR	101
2.7.15	Μετασχηματισμός μικροοργανισμών	103
	A. Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E. coli</i> με τη μέθοδο CaCl ₂	103
	B. Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E. coli</i> με τη μέθοδο CaCl ₂ /RbCl ₂	104
	Γ. Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>A. tumefaciens</i> με τη μέθοδο ψύξης-απόψυξης	104
	Δ. Δημιουργία πρωτοπλαστών του μύκητα <i>V. dahliae</i> και μετασχηματισμός τους	105
	E. Μετασχηματισμός του μύκητα <i>V. dahliae</i> με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)	106
	ΣΤ. Μετασχηματισμός του μύκητα <i>V. dahliae</i> μέσω του βακτηρίου <i>A. tumefaciens</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation, ATMT)	107
2.7.16	Σάρωση φαγικής γονιδιακής βιβλιοθήκης	108
	A. Προετοιμασία κυττάρων δεκτικών στη μόλυνση από τον φάγο λ	108
	B. Τιτλοδότηση της φαγικής βιβλιοθήκης	108
	Γ. Επίστρωση της φαγικής βιβλιοθήκης	108
	Δ. Εφαρμογή μεμβρανών υβριδισμού – στερέωση των φάγων	109
	E. Επιλογή και επιβεβαίωση των θετικών πλακών	109
2.7.17	Στύπωμα (blotting) κατά Southern	109
2.7.18	Υβριδισμοί DNA	110
	A. Σήμανση των μορίων DNA – ιχνηθετών (probes)	110
	B. Πρόπλυση, προϋβριδισμός και υβριδισμός των μεμβρανών	111
	Γ. Εκπλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας του ιχνηθέτη	111

<i>Δ. Ανίχνευση σήματος στις μεμβράνες υβριδισμού</i>	111
2.7.19 Προσδιορισμός πρωτοταγούς αλληλουχίας DNA (αλληλούχηση)	111
2.8 Στατιστικές και βιοπληροφορικές αναλύσεις	112
2.8.1 Στατιστικές αναλύσεις	112
2.8.2 Ανάλυση ομάδων (cluster analysis)	112
2.8.3 Χαρακτηρισμός και πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής εσωνίων	112
2.8.4 Πρόβλεψη πρωτεϊνικών ιδιοτήτων και τριτοταγών πρωτεϊνικών δομών	113
2.8.5 Ανάλυση πρωτοταγών αλληλουχιών DNA και πρωτεϊνών <i>in silico</i>	113
2.8.6 Φυλογενετικές αναλύσεις	114
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα	115
3.1 Πληθυσμιακές αναλύσεις των Ομάδων Βλαστητικής Συμβατότητας (VCGs) του μύκητα <i>V. dahliae</i>	115
3.1.1 Κατάταξη σε VCGs ενός πληθυσμού στελεχών <i>V. dahliae</i> από την Κρήτη	115
3.1.2 Μορφολογική σύγκριση των VCGs του <i>V. dahliae</i>	119
3.1.3 Μοριακοί δείκτες PCR M1, M2, M3 και M4	120
3.1.4 Πολυμορφικά πρότυπα RAPD-PCR και δείκτες SCAR a11 και a19	122
3.1.5 Μοριακοί δείκτες PCR Tm5/Tm7, 35-1/35-2, Tr1/Tr2 και E10-RAPD	123
3.1.6 Ανάλυση της περιοχής ITS1-5.8S-ITS2 του πυρηνικού rDNA	125
3.1.7 Ανάλυση της διαγονιδιακής περιοχής IGS του πυρηνικού rDNA	128
<i>A. Δομική ανάλυση της περιοχής IGS των μυκήτων του γένους <i>Verticillium</i></i>	128
<i>B. Δομική και φυλογενετική ανάλυση της υποπεριοχής P μεταξύ των VCGs του <i>V. dahliae</i></i>	130
3.1.8 Μελέτη κατανομής εσωνίων τύπου I του γονιδίου 18S του πυρηνικού rDNA	134
<i>A. Σάρωση συλλογής στελεχών <i>Verticillium</i> με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο 18S</i>	134
<i>B. Σάρωση συλλογής στελεχών <i>Verticillium</i> με εκκινητές ειδικούς για τα εσώνια</i>	140
<i>Γ. Ανάλυση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου 18S και των εσωνίων με qPCR</i>	140
<i>Δ. Εκτομή των εσωνίων από τα πρόδρομα μετάγραφα του γονιδίου 18S</i>	141
3.1.9 Αναζήτηση εσωνίων στο γονίδιο 28S του πυρηνικού rDNA	142
3.2 Γενετική-φυσιολογική μελέτη της ετεροκαρύωσης στον μύκητα <i>V. dahliae</i> και ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών	143
3.2.1 Ανάλυση σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) και συσχέτισης με την ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα	143
3.2.2 Διερεύνηση μεθοδολογιών κατασκευής μεταλλαγών του μύκητα <i>V. dahliae</i> για χρήση σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας	147
<i>A. Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration, MIC) παρεμποδιστών αύξησης του <i>V. dahliae</i></i>	147
<i>B. Επιλογή αυτόματων μεταλλαγών ανθεκτικότητας του μύκητα <i>V. dahliae</i> σε παρεμποδιστές αύξησης</i>	148
<i>Γ. Μεταλλαξογένεση του μύκητα <i>V. dahliae</i> με υπεριώδη ακτινοβολία (UV)</i>	149
<i>Δ. Μεταλλαξογένεση του μύκητα <i>V. dahliae</i> με επίδραση νιτροζογουανιδίνης (MNNG)</i>	152
<i>Ε. Δοκιμή μεθόδων εμπλουτισμού σε αυξοτροφίες κατόπιν μεταλλαξογένεσης</i>	154
3.2.3 Χαρακτηρισμός αυξοτροφών μεταλλαγών του μύκητα <i>V. dahliae</i> και χρήση σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας	155
3.2.4 Δημιουργία και χαρακτηρισμός μεταλλαγών <i>nit</i>	157
3.2.5 Ανάπτυξη νέας μεθόδου μεγάλης κλίμακας για τις δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών <i>nit</i>	160

3.2.6	Γενετική ανάλυση ετεροκαρύων	164
3.2.7	Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ πρωτοπλαστών	165
3.2.8	Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ κονιδίων σε νερό	167
3.2.9	Ανάπτυξη νέας μεθόδου μεγάλης κλίμακας για την κατάταξη συμβατότητας στελεχών <i>Verticillium</i> φυσικού τύπου	168
3.3	Κυτταροβιολογική μελέτη της ετεροκαρύωσης στον μύκητα <i>V. dahliae</i>	175
3.3.1	Σύντηξη κονιδίων του <i>V. dahliae</i> μέσω δημιουργίας CATs	175
3.3.2	Σύντηξη μεταξύ υφών του <i>V. dahliae</i> και φαινότυπος ασυμβατότητας	180
3.3.3	Λειτουργική μελέτη του ρόλου της MAP κινάσης Vmk1 στη σύντηξη κονιδίων και υφών του <i>V. dahliae</i>	184
3.4	Μοριακή-λειτουργική μελέτη πιθανών γονιδίων ετεροκαρύωσης στον μύκητα <i>V. dahliae</i>	185
3.4.1	Εντοπισμός πιθανών γονιδίων <i>het</i> με PCR ετερόλογων εκκινητών στο γένος <i>Verticillium</i>	185
3.4.2	Σάρωση γονιδιακής βιβλιοθήκης του είδους <i>V. dahliae</i> και υβριδισμοί κατά Southern για πιθανά γονίδια <i>het</i> στο γένος <i>Verticillium</i>	185
3.4.3	Εντοπισμός πιθανών γονιδίων <i>het</i> και άλλων σχετικών γονιδίων στο γένος <i>Verticillium</i> με αναζήτηση σε γονιδιωματικές αλληλουχίες <i>in silico</i>	187
3.4.4	Εντοπισμός γονιδίων με μοτίβο HET στο γονιδίωμα του είδους <i>V. dahliae</i>	187
3.4.5	Ενίσχυση με PCR και κλωνοποίηση ομόλογων γονιδίων <i>het</i> του <i>V. dahliae</i>	192
3.4.6	Δομική και πληθυσμιακή μελέτη ομόλογων γονιδίων <i>het</i> του <i>V. dahliae</i>	193
	A. Το γονίδιο <i>het-c1</i> (ομόλογο του γονιδίου <i>het-c</i> του μύκητα <i>N. crassa</i>)	193
	B. Το γονίδιο <i>het-c2</i> (ομόλογο του γονιδίου <i>het-c</i> του μύκητα <i>P. anserina</i>)	196
	Γ. Γονίδια συζευκτικού τύπου στο γένος <i>Verticillium</i>	200
3.4.7	Λειτουργική μελέτη πιθανών γονιδίων <i>het</i> στον μύκητα <i>V. dahliae</i>	202
	A. Βελτιστοποίηση συστήματος γενετικού μετασχηματισμού του μύκητα <i>V. dahliae</i> με τη μέθοδο σύντηξης πρωτοπλαστών (PEG/CaCl ₂)	202
	B. Ανάπτυξη συστήματος γενετικού μετασχηματισμού του μύκητα <i>V. dahliae</i> με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (<i>electroporation</i>)	204
	Γ. Κατασκευή μεταλλαγμένων στελεχών με γονιδιακή απενεργοποίηση (<i>knock-out mutants</i>) για ομόλογα γονίδια <i>het</i> του <i>V. dahliae</i>	205
	Δ. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων στελεχών με γονιδιακή απενεργοποίηση (<i>knock-out mutants</i>) ομόλογων γονιδίων <i>het</i> του είδους <i>V. dahliae</i>	211
	Δ.1 Απενεργοποίηση του γονιδίου <i>het-c1</i> (ομόλογου του γονιδίου <i>het-c</i> του <i>N. crassa</i>)	211
	Δ.2 Απενεργοποίηση του γονιδίου <i>het-c2</i> (ομόλογου του γονιδίου <i>het-c</i> του <i>P. anserina</i>)	212
	Δ.3 Απενεργοποίηση του γονιδίου <i>un-24</i>	212
	Δ.4 Απενεργοποίηση του γονιδίου <i>vib-1</i>	212
	Δ.5 Απενεργοποίηση του γονιδίου <i>hex-1</i>	213
	Δ.6 Απενεργοποίηση του γονιδίου MAT1-2-1	213

Κεφάλαιο 4. Συμπεράσματα – Συζήτηση	215
4.1 Πληθυσμιακές αναλύσεις των Ομάδων Βλαστητικής Συμβατότητας (VCGs) του μύκητα <i>V. dahliae</i>	215
4.2 Γενετική-φυσιολογική μελέτη της ετεροκαρύωσης στον μύκητα <i>V. dahliae</i> και ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών	222
4.3 Κυτταροβιολογική μελέτη της ετεροκαρύωσης στον μύκητα <i>V. dahliae</i>	227
4.4 Μοριακή-λειτουργική μελέτη γονιδίων ετεροκαρύωσης στον μύκητα <i>V. dahliae</i>	230
4.5 Σύνοψη των ευρημάτων της έρευνας	237
4.6 Μελλοντικές προοπτικές	239
Κεφάλαιο 5. Βιβλιογραφία	240
Παραρτήματα	I
Σύντομο βιογραφικό σημείωμα – κατάλογος δημοσιεύσεων	II

Περίληψη

Ο παραφυλετικός κύκλος στους ασκομύκητες ξεκινά με την αναστόμωση σπορίων ή υφών διαφορετικών γονοτύπων προς σχηματισμό βιώσιμων ετεροκαρύων, τα οποία φιλοξενούν γενετικά διακριτούς πυρήνες σε κοινό κυτταρόπλασμα. Αυτή η διαδικασία, ωστόσο, συχνά παρεμποδίζεται στους πληθυσμούς των μυκήτων από συστήματα ετεροκαρυωτικής ή βλαστητικής ασυμβατότητας. Η ασυμβατότητα έχει μελετηθεί αναλυτικά μόνον σε λίγους μύκητες-μοντέλα και έχει βρεθεί πως ελέγχεται από ένα σύνολο πολυμορφικών γονιδίων *het*. Με βάση τη μέθοδο συμπληρωματικότητας μεταλλαγών *nit* (στο μονοπάτι αφομοίωσης των νιτρικών ιόντων) τα στελέχη διαφόρων μυκήτων κατατάσσονται σε Ομάδες Βλαστητικής Συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups, VCGs), οι οποίες ιδιαίτερα για τους αφυλετικούς ασκομύκητες θεωρείται παραδοσιακά πως αποτελούν γενετικά ομοιογενείς και απομονωμένες ενδοειδικές υποομάδες.

Οι αφυλετικοί φυτοπαθολόγοι ασκομύκητες του γένους *Verticillium* (με κύριο αντιπρόσωπο το είδος *V. dahliae*) έχουν μεγάλη οικολογική και οικονομική σημασία διεθνώς. Η κατανόηση της πληθυσμιακής δομής και της γενετικής δυναμικής των πληθυσμών τους αναμένεται να συμβάλει καθοριστικά στην αποτελεσματική αντιμετώπισή τους. Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της ετεροκαρύωσης/ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας κυρίως στο είδος *V. dahliae* με παράλληλες προσεγγίσεις πληθυσμιακής βιολογίας, γενετικής, κυτταρικής βιολογίας-φυσιολογίας και μοριακής βιολογίας-γονιδιωματικής ανάλυσης.

Πληθυσμιακή ανάλυση. Μελετήθηκε ένας πληθυσμός του *V. dahliae* από την Κρήτη, εμπλουτισμένος με διεθνή στελέχη από πολυάριθμους ξενιστές, και κατέστη εφικτή η συσχέτιση των VCGs με μορφολογικά και φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών του. Ακολούθησε έλεγχος γνωστών δεικτών πολυμορφισμού για τη συσχέτισή τους με τις VCGs ή/και φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών και αναπτύχθηκαν νέοι μοριακοί δείκτες πολυμορφισμού PCR (*αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης*) και SCAR (*ενίσχυσης περιοχών DNA χαρακτηρισμένης αλληλουχίας*) για την επιτυχή μοριακή διάκριση-πρόβλεψη των VCGs του *V. dahliae*. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (rDNA) σε εκτεταμένη συλλογή στελεχών *V. dahliae* όλων των VCGs. Η εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή ITS1-5.8S-ITS2 αποδείχθηκε αξιοσημείωτα συντηρημένη εντός του είδους, με εξαίρεση σημειακό νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό (SNP) με δυνατότητα εφαρμογής ως αξιόπιστου διαγνωστικού χαρακτήρα της υποομάδας VCG 2A. Αντιθέτως με το γονίδιο 28S (rRNA μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας), που αποδείχθηκε ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των VCGs, εντός του γονιδίου 18S (rRNA μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας) ανιχνεύθηκε νέο εσώνιο τύπου I (group-I intron) στην πλειοψηφία των ριβοσωμικών επαναλήψεων των στελεχών των VCGs 4A και 6. Με χρήση ειδικών εκκινητών PCR και με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (real-time quantitative PCR) αποκαλύφθηκε αξιοσημείωτη ετερογένεια στο περιεχόμενο του γονιδίου σε εσώνια, τόσο μεταξύ όσο και εντός στελεχών όλων των VCGs του μύκητα. Σε μια υπερμεταβλητή περιοχή της μη μεταγραφόμενης διαχωριστικής περιοχής IGS εντοπίστηκαν και μελετήθηκαν δομικά πολλαπλά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, οι οποίες επέτρεψαν την ομαδοποίηση συγκεκριμένων VCGs. Η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών αυτής της περιοχής DNA αποδείχθηκε άριστο εργαλείο για τη μελέτη των γενετικών σχέσεων εντός και μεταξύ των VCGs του *V. dahliae*, κατέρριψε τη γενική υπόθεση της γενετικής ομοιογένειας εντός των

VCGs, και αποκάλυψε πολύπλοκο πρότυπο γενετικών σχέσεων μεταξύ των υποομάδων διαφορετικών VCGs.

Γενετική ανάλυση. Η κατάταξη σε VCGs συγκρίθηκε με τις ζώνες αντεπίδρασης (barrages, ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος για ορισμένους μύκητες φαινότυπος ασυμβατότητας μεταξύ στελεχών φυσικού τύπου) και αποδείχθηκε ότι τα δύο φαινόμενα διαφέρουν ως προς τον γενετικό τους έλεγχο. Εφαρμόστηκαν διάφορες μέθοδοι απομόνωσης μεταλλαγών του *V. dahliae* προς χρήση σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας για την κατάταξη συμβατότητας (επιλογή αυτόματων τομέων αποικιών σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα, μεταλλαξογένεση με υπεριώδη ακτινοβολία και χημικούς παράγοντες, διάφορες μέθοδοι εμπλουτισμού αυξότροφων μεταλλαγών). Αναπτύχθηκαν μέθοδοι για την ταχεία εκτίμηση της συμβατότητας στελεχών *V. dahliae* σε μεγάλη κλίμακα, με χρήση μεταλλαξογένεσης UV για την επαγωγή μεταλλαγών *nit* και με δοκιμασίες συμπληρωματικότητας των μεταλλαγών σε υγρό θρεπτικό υλικό MM εντός τρυβλίων μικροτιτλοποίησης. Η γενετική ανάλυση ετεροκαρύων που προέκυψαν από δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών *nit* κατέδειξε πως ασθενείς αντιδράσεις μεταξύ διαφορετικών VCGs είναι όντως ετεροκαρυωτικές, υποδηλώνοντας πως δεν υφίστανται απόλυτοι γενετικοί φραγμοί μεταξύ των VCGs. Η παραδοσιακή διαδικασία κατάταξης στελεχών του μύκητα σε VCGs συγκρίθηκε με άλλες μεθόδους (χρήση αυξότροφων μεταλλαγών για αμινοξέα, πουρίνες/πυριμιδίνες ή βιταμίνες, δημιουργία και σύντηξη πρωτοπλαστών, νέο σύστημα κατάταξης στελεχών φυσικού τύπου βάσει στελεχών ελέγχου με ανθεκτικότητα στον παρεμποδιστικό παράγοντα benomyl) και αποκαλύφθηκε πως η εφαρμογή διαφορετικών γενετικών δεικτών αποδίδει διαφορετικά αποτελέσματα κατά την κατάταξη συμβατότητας, εξαιτίας πιθανώς των διαφορετικών επιπέδων επιλεκτικής πίεσης σε κάθε περίπτωση.

Κυτταροβιολογική/φυσιολογική ανάλυση. Αποδείχθηκε πως τα κονίδια του *V. dahliae* σε φάση βλάστησης συντήκονται συχνά μεταξύ τους μέσω του σχηματισμού *σωλήνων αναστόμωσης κονιδίων* (CATs) υπό περιβαλλοντικές συνθήκες που διαφέρουν από τις αντίστοιχες για τους μύκητες-μοντέλα. Πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική περιγραφή των CATs στο είδος *V. dahliae*, καθώς και μελέτη των παραγόντων που επιδρούν στον σχηματισμό τους. Μελετήθηκε μικροσκοπικά η οργάνωση των αποικιών του μύκητα και οι αναστομώσεις εντός και μεταξύ αυτών, σε συνδυασμό με τη μελέτη της πυρηνικής οργάνωσης και συμπεριφοράς. Βρέθηκε πως οι υφές ασύμβατων στελεχών που συντήκονται οδηγούνται συχνά σε κυτταρικό θάνατο. Αποδείχθηκε πως οι υφές των ασύμβατων στελεχών του *V. dahliae* κατά κανόνα επιδεικνύουν αμοιβαία «ανοχή» και συντήκονται μεταξύ τους, αλλά τα ετεροκαρυωτικά κύτταρα αποκλείονται από το υπόλοιπο μυκήλιο και υποβάλλονται σε πορεία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Με τον φαινοτυπικό έλεγχο διαθέσιμου στελέχους που φέρει γονιδιακή απενεργοποίηση της MAP κινάσης Vmk1 (ομόλογη της Fus3 του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*) αποδείχθηκε πως το γονίδιο *vmk1* απαιτείται για την αναστόμωση μεταξύ κονιδίων και μεταξύ υφών.

Γονιδιωματική ανάλυση και μοριακή/λειτουργική μελέτη. Με βάση εκφυλισμένους εκκινητές για συντηρημένες περιοχές γονιδίων *het* εντοπίστηκαν τμήματα ομόλογων γονιδίων *het* σε είδη *Verticillium*, κλωνοποιήθηκαν για προσδιορισμό της αλληλουχίας τους και χρησιμοποιήθηκαν ως ιχνηθέτες σε υβριδισμούς κατά Southern για τη μελέτη της κατανομής του γονιδίου *het-c1*, και σε σάρωση γονιδιακής βιβλιοθήκης του *V. dahliae* για την ανάκτηση των γονιδίων *mod-E* και *un-24*. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση *in silico* των διαθέσιμων γονιδιωματικών αλληλουχιών των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum* για τον εντοπισμό και την ανάλυση όλων των πιθανών γονιδίων *het* στο γένος *Verticillium*,

την ανίχνευση γονιδίων με σχετικά πρωτεϊνικά μοτίβα (HET, STAND-NACHT, HeLo), και την ανάλυση της κατανομής τους στα χρωμοσώματα του *V. dahliae*. Η δομική και πληθυσμιακή ανάλυση των γονιδίων *het-c1* και *het-c2* αποκάλυψε πως οι πιθανές περιοχές καθορισμού της αλληλομορφικής ειδικότητας είναι συντηρημένες μεταξύ των VCGs του *V. dahliae*, ενώ ο συζευκτικός τύπος MAT1-2-1 επικρατεί στους πληθυσμούς του είδους. Τα γονίδια *het-c1*, *het-c2*, *un-24*, *vib-1*, *hex-1* και MAT1-2-1 επιλέχθηκαν για περαιτέρω λειτουργική μελέτη μέσω της κατασκευής – με διάφορες μεθοδολογίες – αντίστοιχων μεταλλαγμένων στελεχών με γονιδιακές απενεργοποιήσεις (knock-out mutants). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η ρυθμιστική βάση του φαινομένου της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας είναι συντηρημένη μεταξύ των ασκομυκήτων, ενώ για την αναγνώριση του ετέρου στρατολογούνται σε διαφορετικούς μύκητες διαφορετικά (και ίσως μοναδικά κατά περίπτωση) γονίδια με άλλες παράλληλες κυτταρικές λειτουργίες.

Abstract

Anastomosis (fusion) of conidia or hyphae is the first step towards the establishment of viable heterokaryons and the parasexual cycle in ascomycetes. This process, however, is often hampered in natural populations of fungi by vegetative or heterokaryon incompatibility systems. Incompatibility has been thoroughly studied in only a limited number of model fungi and is known to be controlled by a set of polymorphic *het* genes. Based on complementation studies of *nit* mutants (in the nitrate assimilation pathway), strains of various fungi are classified to Vegetative Compatibility Groups (VCGs), which are traditionally considered for asexual ascomycetes to comprise genetically homogeneous and isolated subspecific groups.

The asexual plant pathogenic ascomycetes of the genus *Verticillium* (with *V. dahliae* as the most important member) are characterized by great ecological and economic worldwide significance. A comprehensive understanding of their population biology is predicted to facilitate effective disease management. The goal of this study was the analysis of heterokaryosis/heterokaryon incompatibility mainly in *V. dahliae* with (i) population, (ii) genetic, (iii) cell biology, and (iv) genomic and molecular-functional experimental approaches.

Population analysis. A *V. dahliae* population from Crete (Greece), amended with representative strains from various hosts and geographic origins, was studied, and significant correlations of their VCG classification with morphological and phytopathological traits were detected. New PCR-based and SCAR molecular markers were developed and employed for the efficient molecular discrimination-prediction of *V. dahliae* VCGs. In addition, the nuclear rDNA region was analyzed in an extended worldwide collection of *V. dahliae* strains, including representatives of all VCGs. The internal transcribed spacer region ITS1-5.8S-ITS2 was found to be conserved between VCGs, with the exception of a single nucleotide polymorphism (SNP) that was demonstrated to be a reliable molecular fingerprint of VCG 2A. In contrast to the 28S gene (coding for the large ribosomal subunit rRNA), which was overall conserved between VCGs, a novel 18S-located (small subunit rRNA) group-I intron was detected in the majority of the rDNA repeats of all *V. dahliae* strains of VCGs 4A and 6. Remarkable heterogeneity regarding intron content was identified within and between strains of all VCGs of the fungus, by using PCR screenings with intron-specific primers and real-time quantitative PCR analyses. When the organization of multiple repetitive DNA elements in a highly variable IGS (intergenic spacer) region was structurally analyzed in strains of all VCGs, an association with VCG classification was revealed. Phylogenetic analysis of the sequences of this region was demonstrated to be an excellent tool for the study of genetic relationships within and between *V. dahliae* VCGs, contradicted the general assumption of intra-VCG genetic homogeneity, and revealed a complex pattern of molecular relationships between subgroups of different VCGs.

Genetic analysis. The traditional VCG classification system was compared with barrage zone formation (i.e., an incompatibility-related phenotype that is widely used in population studies of several fungi), and it was shown that the two phenomena are not correlated and are presumably governed by different genetic systems. Several methods were employed for the isolation of *V. dahliae* mutants of different types (isolation of spontaneous sectors on suitably supplemented growth media, UV and chemical mutagenesis, auxotroph

enrichment techniques), which were subsequently used in complementation tests for the compatibility-based classification of *V. dahliae* strains. Novel high-throughput methods were developed for the rapid VCG profiling of *V. dahliae* populations (i.e., UV mutagenesis for the induction of *nit* mutants and complementation testing in liquid microcultures in microplates). Genetic analyses of representative heterokaryons demonstrated that the frequently encountered weak complementation reactions between different VCGs are actually heterokaryotic, suggesting that no absolute genetic barriers exist between VCGs. The traditional VCG classification procedure was compared to other methods and/or genetic markers (i.e., auxotrophic mutants requiring amino acids, purines/pyrimidines or vitamins, protoplast fusion, a novel classification system of wild-type strains based on complementation reactions with appropriate benomyl-resistant tester strains), and it was revealed that the application of different genetic markers results in different compatibility classifications, probably due to the different levels of selection pressure that are imposed on heterokaryon formation in each method.

Cell biology/physiological analysis. *V. dahliae* germlings were found to frequently anastomose through conidial anastomosis tubes (CATs) under different environmental conditions than the model fungi. A description of *V. dahliae* CATs at the microscopic level and an assessment of relevant environmental and physiological parameters was provided. The hyphal organization and anastomosis bridges within mature colonies of the fungus were also analyzed, in combination with nuclear organization and behavior. It was shown that anastomosing hyphae of incompatible strains are often subjected to programmed cell death. Hyphae of incompatible *V. dahliae* strains were found to exhibit a mutual tolerance behavior leading to incompatible anastomoses, which are rapidly confined and led to programmed cell death. The *V. dahliae* *vmk1* gene, coding for the Vmk1 MAP kinase (a homolog of the Fus3 MAP kinase of *Saccharomyces cerevisiae*), was found to be essential for anastomosis between conidia and between hyphae, by phenotypic analysis of a *vmk1* knock-out mutant strain.

Genomic analysis and molecular/functional study. With the use of PCR primers that were designed on heterologous gene sequences and/or conserved regions of *het* genes, gene fragments of homologous *het* genes were amplified from *Verticillium* species, cloned, sequenced, and used as probes for Southern hybridization analyses (for the study of the distribution of the gene *het-c1* between *Verticillium* species) and for the screening of a *V. dahliae* genomic library (for the cloning and sequencing of *V. dahliae* *mod-E* and *un-24* homologs). In addition, an *in silico* analysis of the available genomic sequences of *V. dahliae* and *V. albo-atrum* was performed, which allowed the identification and analysis of all putative *het* genes in *Verticillium*, the detection of all genes coding for proteins with relevant domains (HET, STAND-NACHT, HeLo), and the analysis of their distribution along the chromosomes of *V. dahliae*. Structural and population analyses of *het-c1* and *het-c2* revealed that the corresponding putative allele specificity regions are conserved between *V. dahliae* VCGs, and that the MAT1-2-1 idiomorph prevails at the mating-type locus of strains of all VCGs. *Het-c1*, *het-c2*, *un-24*, *vib-1*, *hex-1*, and MAT1-2-1 genes were chosen for further functional study through the construction – with various methods – of corresponding gene deletion strains. The results suggest that the regulation of heterokaryon incompatibility is conserved among ascomycetes, whereas different gene sets with various cellular functions are recruited in different fungi for non-self recognition.

Αρκτικόλεξα – συντομογραφίες

AFLP	a mplified f ragment l ength p olymorphism = πολυμορφισμός μεγέθους ενισχυόμενων τμημάτων
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> - m ediated t ransformation = μετασχηματισμός μέσω <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
CAT	c onidial a nastomosis t ube = σωλήνας αναστόμωσης κονιδίων
DIC	d ifferential i nterference c ontrast = αντίθεση διαφορικής συμβολής (μικροσκοπία Nomarski)
GLTP	g lycolipid t ransfer p rotein = πρωτεΐνη μεταφοράς γλυκολιπιδίων
GPCR	G - p rotein- c oupled r eceptor = υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνη
GT	g erm t ube = βλαστικός σωλήνας
GWAS	g enome- w ide a ssociation s tudy = μελέτη συσχετίσεων σε γονιδιωματικό επίπεδο
<i>het</i> gene	h eterokaryon i ncompatibility g ene = γονίδιο ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας
HI	h eterokaryon i ncompatibility = ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα
HNWD	HET – N ACHT – W D motifs = πρωτεϊνικά μοτίβα HET – NACHT – WD
HSI strain	h eterokaryon s elf- i ncompatible strain = ετεροκαρυωτικά αυτο-ασύμβατο στέλεχος
HSP90	h eat- s hock p rotein 90 = πρωτεΐνη θερμικής καταπόνησης 90 (πρωτεΐνη-μοριακή συνοδός, chaperone)
<i>idi</i> gene	i nduced- d uring- i ncompatibility g ene = γονίδιο επαγόμενο κατά την ασυμβατότητα
IGS	i ntergenic s pacers = διαγονιδιακή διαχωριστική περιοχή (του rDNA)
ITS	i nternal t ranscribed s pacers = εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή (του rDNA)
LSU gene	l arge s ub- u nit r rRNA g ene = γονίδιο του rRNA της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας
<i>mat</i> gene	m ating- t ype g ene = γονίδιο συζευκτικού τύπου
MIC	m inimum i nhibitory c oncentration = ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
<i>mod</i> gene	m odifier g ene = τροποποιητικό γονίδιο
<i>nit</i> mutant	n itrate- n on- u tilizing m utant = μεταλλαγή που αδυνατεί να χρησιμοποιήσει τα νιτρικά ιόντα (ως πηγή αζώτου)
ORF	o pen r eading f rame = ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (του DNA)
PCD	p rogrammed c ell d eath = προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος
PCR	p olymerase c hain r eaction = αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<i>pin-c</i> gene	p artner for i ncompatibility g ene = γονίδιο-«εταίρος» για την ασυμβατότητα
<i>pix-6</i> gene	p artner for v ic- s ix = γονίδιο-«εταίρος» του γονιδίου <i>vic-6</i>
qPCR	q uantitative r eal- t ime p olymerase c hain r eaction = ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
RAPD	r andom a mplified p olymorphic D NA = τυχαίο ενισχυόμενο πολυμορφικό DNA

rDNA	ribosomal DNA = ριβοσωμικό DNA (σύμπλεγμα των γονιδίων των ριβοσωμικών RNAs)
REMI	restriction enzyme-mediated integration = ενσωμάτωση μέσω περιοριστικού ενζύμου
SCAR	sequence-characterized amplified region = ενίσχυση περιοχής χαρακτηρισμένης αλληλουχίας
sddH ₂ O	sterile double-distilled H₂O = αποστειρωμένο, δις απεσταγμένο νερό
RFLP	restriction fragment length polymorphism = πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων
RIP mutation	repeat-induced point mutation = σημειακή μεταλλαγή επαγόμενη από επαναλήψεις
RNR	ribonucleotide reductase = ριβονουκλεοτιδική αναγωγή
SNP	single nucleotide polymorphism = σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός
SSU gene	small sub-unit rRNA gene = γονίδιο του rRNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας
UV	ultra-violet light = υπεριώδες φως (υπεριώδης ακτινοβολία)
VCG	vegetative compatibility group = ομάδα βλαστητικής συμβατότητας
<i>vib-1</i> gene	vegetative incompatibility blocked-1 gene = γονίδιο 1 διακοπής της βλαστητικής ασυμβατότητας
<i>vic</i> gene	vegetative incompatibility gene = γονίδιο βλαστητικής ασυμβατότητας

Ευρετήριο εικόνων

	Σελίδα
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	1
Εικόνα 1.1. Σχηματική αναπαράσταση αποικιών υφομυκήτων.	3
Εικόνα 1.2. Σύντηξη υφών σε αποικία του μύκητα <i>N. crassa</i> .	4
Εικόνα 1.3. Τύποι σύντηξης υφών στον μύκητα <i>N. crassa</i> .	4
Εικόνα 1.4. Σχηματικές αναπαραστάσεις σύντηξης κονιδίων.	5
Εικόνα 1.5. Σωλήνες αναστόμωσης κονιδίων στον μύκητα <i>N. crassa</i> .	6
Εικόνα 1.6. Διαγραμματική παρουσίαση σύντηξης υφών στον μύκητα <i>N. crassa</i> .	8
Εικόνα 1.7. Διαδικασία σύντηξης υφών στον μύκητα <i>N. crassa</i> .	9
Εικόνα 1.8. Απαραίτητα γονίδια για τη σύντηξη κονιδίων στον μύκητα <i>N. crassa</i> .	12
Εικόνα 1.9. Διέλευση πυρήνων διαμέσου σύντηξης υφών στον μύκητα <i>N. crassa</i> .	17
Εικόνα 1.10. Πυρηνική συμπεριφορά κατά τη σύντηξη στον μύκητα <i>F. oxysporum</i> .	18
Εικόνα 1.11. Σύγκριση ετεροκαρυωτικής συμβατότητας και ασυμβατότητας.	20
Εικόνα 1.12. Παραδείγματα ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) στους μύκητες.	25
Εικόνα 1.13. Φαινότυπος ασυμβατότητας στον μύκητα <i>P. anserina</i> .	25
Εικόνα 1.14. Αντίδραση ασυμβατότητας σε υφές του μύκητα <i>N. crassa</i> .	26
Εικόνα 1.15. Μοντέλο λειτουργίας της πρωτεΐνης VIB-1 στην ασυμβατότητα.	38
Εικόνα 1.16. Φυλογενετικό δένδρο του αναθεωρημένου γένους <i>Verticillium</i> .	43
Εικόνα 1.17. Μακροσκοπική και μικροσκοπική μορφολογία του είδους <i>V. dahliae</i> .	45
Εικόνα 1.18. Συμπτώματα της φυτικής ασθένειας που προκαλεί το είδος <i>V. dahliae</i> .	46
Εικόνα 1.19. Βιολογικός κύκλος του είδους <i>V. dahliae</i> .	49
Εικόνα 1.20. Ενδείξεις ετεροκαρύωσης από μικροσκοπία στο γένος <i>Verticillium</i> .	52
Εικόνα 1.21. Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μορφολογικών μεταλλαγών του είδους <i>V. dahliae</i> .	56
Εικόνα 1.22. Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών <i>nit</i> του είδους <i>V. dahliae</i> .	59
Εικόνα 1.23. Δενδρόγραμμα AFLPs για τις VCGs του είδους <i>V. dahliae</i> .	61
Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι	69
Εικόνα 2.1. Λειτουργικοί χάρτες βασικών φορέων DNA.	88
Εικόνα 2.2. Στρατηγική δημιουργίας κασετών γονιδιακής διαγραφής με το σύστημα OSCAR.	104
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα	117
Εικόνα 3.1. Εφαρμογή μοριακών δεικτών PCR M1 και M2.	123
Εικόνα 3.2. Εφαρμογή μοριακών δεικτών PCR M3 και M4.	124
Εικόνα 3.3. Ανάπτυξη νέων μοριακών δεικτών SCAR.	125
Εικόνα 3.4. Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης συλλογής <i>V. dahliae</i> βάσει των μοριακών δεικτών Tm5/Tm7, 35-1/35-2 και Tr1/Tr2.	127
Εικόνα 3.5. Οργάνωση του πυρηνικού rDNA του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	128
Εικόνα 3.6. Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης συλλογής <i>V. dahliae</i> βάσει των αποτελεσμάτων των μοριακών δεικτών M1, M2 και ITS2-SNP.	129
Εικόνα 3.7. Δομική οργάνωση της περιοχής IGS του είδους <i>V. dahliae</i> .	131
Εικόνα 3.8. Φυλογενετικό δένδρο από ανάλυση της περιοχής IGS του είδους <i>V. dahliae</i> .	135
Εικόνα 3.9. Ανίχνευση εσωνίων τύπου I στο γονίδιο 18S του είδους <i>V. dahliae</i> .	140
Εικόνα 3.10. Δομική οργάνωση και πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής εσωνίων	141

	τύπου I των μυκήτων του γένους <i>Verticillium</i> .	
Εικόνα 3.11.	Ανάλυση RT-PCR για την εκτομή εσωνίων τύπου I του γονιδίου 18S του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	144
Εικόνα 3.12.	Παραδείγματα ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) μεταξύ στελεχών φυσικού τύπου του είδους <i>V. dahliae</i> .	146
Εικόνα 3.13.	Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης παρεμποδιστικών ουσιών στο είδος <i>V. dahliae</i> .	149
Εικόνα 3.14.	Επίδραση του δεσοξυχολικού νατρίου στη μορφογένεση των αποικιών του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	151
Εικόνα 3.15.	Καμπύλη βιωσιμότητας του είδους <i>V. dahliae</i> κατόπιν ακτινοβόλησης UV.	152
Εικόνα 3.16.	Παραδείγματα μεταλλαγών του είδους <i>V. dahliae</i> κατόπιν ακτινοβόλησης UV.	153
Εικόνα 3.17.	Καμπύλη βιωσιμότητας του είδους <i>V. dahliae</i> κατόπιν χημικής μεταλλαξογένεσης με MNNG.	154
Εικόνα 3.18.	Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ αυξότροφων μεταλλαγών του είδους <i>V. dahliae</i> .	158
Εικόνα 3.19.	Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταλλαγών <i>nit</i> του είδους <i>V. dahliae</i> σε υγρές μικροκαλλιέργειες.	163
Εικόνα 3.20.	Παραδείγματα μορφολογικών τύπων ετεροκαρύων μεταξύ στελεχών του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	165
Εικόνα 3.21.	Παραδείγματα ετεροκαρύων κατόπιν σύντηξης πρωτοπλαστών του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	169
Εικόνα 3.22.	Μεταλλαγές ανθεκτικότητας του μύκητα <i>V. dahliae</i> στον παρεμποδιστικό παράγοντα benomyl.	170
Εικόνα 3.23.	Δοκιμασίες αύξησης μεταλλαγών ανθεκτικότητας του μύκητα <i>V. dahliae</i> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του παρεμποδιστή benomyl.	173
Εικόνα 3.24.	Σχηματισμός ετεροκαρύων μεταξύ στελεχών ελέγχου <i>nit ben^R</i> και στελεχών φυσικού τύπου μυκήτων του γένους <i>Verticillium</i> .	175
Εικόνα 3.25.	Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης συλλογής <i>V. dahliae</i> βάσει συμπληρωματικότητας με διπλά μεταλλαγμένα στελέχη ελέγχου.	176
Εικόνα 3.26.	Επίδραση της ηλικίας των κονιδίων και του θρεπτικού υλικού στην πορεία βλάστησης των κονιδίων του είδους <i>V. dahliae</i> .	177
Εικόνα 3.27.	Σωλήνες αναστόμωσης κονιδίων στον μύκητα <i>V. dahliae</i> .	179
Εικόνα 3.28.	Πυρηνική οργάνωση και συμπεριφορά σε κονίδια και υφές του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	180
Εικόνα 3.29.	Οργάνωση υφών και πυρήνων σε αποικίες του είδους <i>V. dahliae</i> , αναστομώσεις υφών στο εσωτερικό αποικιών του είδους.	183
Εικόνα 3.30.	Κυτταρικός θάνατος κατά τη σύντηξη υφών μεταξύ ασύμβατων στελεχών του είδους <i>V. dahliae</i> .	185
Εικόνα 3.31.	Απομόνωση και καταστροφή κυττάρου-δέκτη πυρήνα κατά την ασύμβατη σύντηξη υφών στο είδος <i>V. dahliae</i> .	186
Εικόνα 3.32.	Μελέτες υβριδισμού DNA για τον εντοπισμό ομόλογων γονιδίων <i>het</i> σε είδη του γένους <i>Verticillium</i> .	188
Εικόνα 3.33.	Ανάλυση τοπολογικής ομαδοποίησης πιθανών γονιδίων <i>het</i> στα χρωμοσώματα του είδους <i>V. dahliae</i> .	194
Εικόνα 3.34.	Ενίσχυση PCR ομόλογων γονιδίων <i>het</i> του είδους <i>V. dahliae</i> .	195
Εικόνα 3.35.	Πρόβλεψη ιδιοτήτων της πρωτεΐνης HET-C1 του είδους <i>V. dahliae</i> .	197
Εικόνα 3.36.	Πλήθυσμιακή ανάλυση της περιοχής καθορισμού αλληλομορφικής ειδικότητας του γονιδίου <i>het-c1</i> στον μύκητα <i>V. dahliae</i> .	198
Εικόνα 3.37.	Τρισδιάστατο προβλεπόμενο μοντέλο της πρωτεΐνης HET-C2 του είδους <i>V. dahliae</i> .	199
Εικόνα 3.38.	Πρόβλεψη ιδιοτήτων της πρωτεΐνης HET-C2 του είδους <i>V. dahliae</i> .	200
Εικόνα 3.39.	Εντοπισμός αμινοξικών θέσεων με πιθανή συμμετοχή στον έλεγχο	201

	της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στην επιφάνεια της πρωτεΐνης HET-C2 του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	
Εικόνα 3.40.	Πληθυσμιακή ανάλυση του γονιδίου <i>het-c2</i> του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	202
Εικόνα 3.41.	Οργάνωση του γενετικού τόπου συζευκτικού τύπου στους μύκητες του γένους <i>Verticillium</i> .	203
Εικόνα 3.42.	Μετασχηματισμός πρωτοπλαστών του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	206
Εικόνα 3.43.	Στρατηγική λειτουργικής διακοπής του γονιδίου <i>het-c1</i> του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	209
Εικόνα 3.44.	Επιβεβαίωση αδρανοποίησης του γονιδίου <i>het-c1</i> του μύκητα <i>V. dahliae</i> με ανάλυση RT-PCR και υβριδισμό κατά Southern.	209
Εικόνα 3.45.	Στρατηγική λειτουργικής διακοπής του γονιδίου <i>het-c2</i> του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	210
Εικόνα 3.46.	Κατασκευή κασετών διαγραφής έξι ομόλογων γονιδίων <i>het</i> του είδους <i>V. dahliae</i> με το σύστημα OSCAR και επιβεβαίωση με περιοριστική ανάλυση.	212
Εικόνα 3.57.	Μορφολογική σύγκριση στοχευμένων μεταλλαγών του είδους <i>V. dahliae</i> με απενεργοποιημένα ομόλογα γονίδια <i>het</i> με το αρχικό τους στέλεχος.	215
Εικόνα 3.48.	Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας (βάσει μεταλλαγών <i>nit</i>) στελέχους <i>V. dahliae</i> με απενεργοποιημένο το γονίδιο <i>vib-1</i> με στελέχη ελέγχου διαφορετικών VCGs.	215

Ευρετήριο πινάκων

	Σελίδα
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	1
Πίνακας 1.1. Γονίδια σύντηξης κονιδίων/υφών στον μύκητα <i>N. crassa</i> .	11
Πίνακας 1.2. Γονίδια <i>het</i> του μύκητα <i>N. crassa</i> .	29
Πίνακας 1.3. Γονίδια <i>het</i> του μύκητα <i>P. anserina</i> .	32
Πίνακας 1.4. Συστηματική κατάταξη του γένους <i>Verticillium</i> .	42
Πίνακας 1.5. Μορφολογικά χαρακτηριστικά και διάκριση των ειδών του γένους <i>Verticillium</i> .	44
Πίνακας 1.6. Μόλυνση, συμπτώματα, εξάπλωση και αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης.	48
Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι	69
Πίνακας 2.1. Στελέχη μυκήτων.	69
Πίνακας 2.2. Στελέχη βακτηρίων.	74
Πίνακας 2.3. Θρεπτικά υποστρώματα για μύκητες.	75
Πίνακας 2.4. Θρεπτικά υποστρώματα για βακτήρια/βακτηριοφάγους.	77
Πίνακας 2.5. Κατάταξη μεταλλαγών μυκήτων στις κλάσεις <i>nit</i> .	85
Πίνακας 2.6. Πλασμίδια/φαγεμίδια.	87
Πίνακας 2.7. Πίνακας εκκινήτων για τις αναλύσεις PCR.	94
Πίνακας 2.8. Πίνακας εκκινήτων για τις αναλύσεις qPCR πραγματικού χρόνου.	98
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα	117
Πίνακας 3.1. Κατάταξη σε VCGs και μοριακός χαρακτηρισμός συλλογής στελεχών <i>Verticillium</i> .	118
Πίνακας 3.2. Στελέχη <i>Verticillium</i> που χρησιμοποιήθηκαν για τη δομική και φυλογενετική μελέτη της περιοχής IGS.	133
Πίνακας 3.3. Στελέχη <i>Verticillium</i> που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της κατανομής εσωνίων τύπου I στο γονίδιο 18S.	137
Πίνακας 3.4. Απόλυτη ποσοτικοποίηση αριθμού αντιγράφων του γονιδίου 18S και λόγου εσωνίων τύπου I σε στελέχη <i>Verticillium</i> .	143
Πίνακας 3.5. Σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης μεταξύ ειδών <i>Verticillium</i> .	146
Πίνακας 3.6. Σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης μεταξύ των VCGs του είδους <i>V. dahliae</i> .	147
Πίνακας 3.7. Συσχέτιση σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης με μορφολογικά χαρακτηριστικά στελεχών <i>Verticillium</i> .	148
Πίνακας 3.8. Ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις παρεμποδιστών αύξησης για τον μύκητα <i>V. dahliae</i> .	150
Πίνακας 3.9. Χαρακτηρισμός μεταλλαγών του είδους <i>V. dahliae</i> κατόπιν μεταλλαξογένεσης UV.	153
Πίνακας 3.10. Χαρακτηρισμός μεταλλαγών του είδους <i>V. dahliae</i> κατόπιν χημικής μεταλλαξογένεσης με MNNG.	155
Πίνακας 3.11. Εμπλουτισμός αυξοτροφών μεταλλαγών με θερμική επίδραση στα κονίδια του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	156
Πίνακας 3.12. Μεταλλαγές αυξοτροφίας στελεχών του είδους <i>V. dahliae</i> .	158
Πίνακας 3.13. Στελέχη <i>Verticillium</i> που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση μεταλλαγών <i>nit</i> .	160
Πίνακας 3.14. Συχνότητες επαναφοράς μεταλλαγών <i>nit</i> του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	161
Πίνακας 3.15. Κατάταξη στελεχών <i>Verticillium</i> σε VCGs με τη νέα μέθοδο	164

Πίνακας 3.16.	δοκιμασιών συμπληρωματικότητας σε υγρές μικροκαλλιέργειες. Γενετική ανάλυση κονιδίων και υφών από ετεροκάρυα του είδους <i>V. dahliae</i> .	167
Πίνακας 3.17.	Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας με σύντηξη πρωτοπλαστών από στελέχη του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	168
Πίνακας 3.18.	Δοκιμασίες αύξησης μεταλλαγών του μύκητα <i>V. dahliae</i> με ανθεκτικότητα στον παρεμποδιστή benomyl σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του παρεμποδιστή.	171
Πίνακας 3.19.	Κατάταξη στελεχών <i>Verticillium</i> φυσικού τύπου με δοκιμασίες συμπληρωματικότητας με διπλά μεταλλαγμένα στελέχη ελέγχου <i>nit ben^R</i> .	174
Πίνακας 3.20.	Αναζήτηση ομόλογων γονιδίων <i>het</i> στα γονιδιώματα των ειδών <i>V. dahliae</i> και <i>V. albo-atrum</i> .	190
Πίνακας 3.21.	Γονίδια με μοτίβο HET στο γονιδίωμα του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	192
Πίνακας 3.22.	Διερεύνηση απόδοσης του μετασχηματισμού πρωτοπλαστών του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> .	205

1. Εισαγωγή

1.1 Η κυτταρική σύντηξη (αναστόμωση) στους υφομύκητες

1.1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Το καλοκαίρι του 1888 ο καθηγητής Marshall Ward έκανε μια σπουδαία ανακάλυψη μελετώντας τη μορφολογία ενός μύκητα του γένους *Botrytis* που ευθυνόταν για μια ασθένεια των λευκών κρίνων. Μεταξύ των υφών που αποτελούσαν το μυκήλιο του παθογόνου, παρατήρησε πολυάριθμες διασυνδέσεις· η δημιουργία τους ξεκινούσε με την εμφάνιση βραχέων κλάδων των υφών, οι οποίοι χαρακτηρίζονταν από «αμοιβαία έλξη» και τελικά συντήκονταν. Ο Ward υπέθεσε πως οι υφές που επρόκειτο να συντηχθούν επικοινωνούσαν και αλληλεπιδρούσαν με ένα είδος τροπισμού μέσω άγνωστων διαχεόμενων σημάτων (Ward, 1888).

Σήμερα είναι γνωστό ότι η κυτταρική σύντηξη (ή αναστόμωση) είναι κοινό χαρακτηριστικό των υφομυκήτων, συμβαίνει σε διάφορα αναπτυξιακά τους στάδια, και αφορά διάφορους τύπους σπορίων και υφών (Glass *et al.*, 2000; Fleißner *et al.*, 2008; Read *et al.*, 2009). Τα κονίδια πολλών διαφορετικών ειδών μυκήτων, όταν βρίσκονται στη φάση της βλάστησης, αναπτύσσουν εξειδικευμένες βραχείες δομές σύντηξης, γνωστές ως σωλήνες αναστόμωσης κονιδίων (conidial anastomosis tubes) (Roca *et al.*, 2005a; Read *et al.*, 2009). Μέσω αυτών, διακριτά βλαστάνοντα κονίδια (germlings) συντήκονται σε λειτουργικές μονάδες ανώτερης τάξης, οι οποίες εν συνεχεία αναπτύσσονται σε μυκηλιακές αποικίες. Επιπλέον, η σύντηξη μπορεί να συμβεί και μεταξύ άλλων τύπων σπορίων σε φάση βλάστησης, όπως μεταξύ ουρεδοσπορίων (uredospores) ή ασκοσπορίων (Read & Roca, 2006).

Εντός της ώριμης αποικίας οι υφές διαφοροποιούνται σε διακριτούς τύπους, που επιδεικνύουν διαφορετικά χαρακτηριστικά αύξησης. Σε αντίθεση με τις υφές της ακραίας, περιφερειακής περιοχής της αποικίας, εκείνες του εσωτερικού της αποικίας – που αντιστοιχεί στο γηραιότερο τμήμα του μυκηλίου – συχνά εμφανίζουν αμοιβαία έλξη και σύντηξη, με αποτέλεσμα την αύξηση του βαθμού μυκηλιακής διασύνδεσης (Hickey *et al.*, 2002). Εκτός από τη διασύνδεση μεταξύ μεμονωμένων υφών, η κυτταρική σύντηξη σε κάποιες περιπτώσεις αφορά ολόκληρα συσσωματώματα υφών, όπως στις μυκηλιακές «χορδές» (cords) και τα ριζόμορφα (Fricker *et al.*, 2007; Heaton *et al.*, 2010).

Η διαδικασία της σύντηξης απαντάται επιπλέον κατά τη φυλετική αναπαραγωγή των ετεροθαλικών ειδών των μυκήτων, όπου πραγματοποιείται είτε μεταξύ βλαστητικών υφών, δημιουργώντας έτσι ένα παροδικό ετεροκαρυωτικό στάδιο, είτε με τη συμμετοχή εξειδικευμένων αναπαραγωγικών υφών που καλούνται τριχογόνια (Bruggeman *et al.*, 2003). Κατόπιν της γονιμοποίησης, ο σχηματισμός του ασκού, που περιέχει τα φυλετικά σπόρια των ασκομυκήτων, πραγματοποιείται επίσης μέσω κυτταρικής σύντηξης (Raju, 1980).

Ο ρόλος και η λειτουργία του σχηματισμού αναστομών κατά τη βλαστητική αύξηση και την ανάπτυξη των υφομυκήτων δεν έχουν διαλευκανθεί ακόμα πλήρως. Ο Ward υπέθεσε πως οι αναστομές δημιουργούνται ώστε «να εξασφαλίζουν την πλέον ομοιόμορφη κατανομή των θρεπτικών στοιχείων σε όλο το μυκήλιο, ή να εξομαλύνουν ανισορροπίες που αναπόφευκτα ανακύπτουν στη μεταβολική διαδικασία» (Ward, 1888),

δηλαδή ότι η σύντηξη συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης εντός της αποικίας. Κατόπιν περισσότερων από 120 χρόνια έρευνας, η υπόθεση αυτή εξακολουθεί να είναι ευρέως αποδεκτή (Glass *et al.*, 2004; Fleißner *et al.*, 2008; Read *et al.*, 2009), αν και όχι πλήρως τεκμηριωμένη (Fleißner, 2012). Αντιθέτως, σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην κατανόηση της μοριακής βάσης της σύντηξης μεταξύ σπορίων και μεταξύ υφών. Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στους σαπροτροφικούς μύκητες *Neurospora crassa* και *Sordaria macrospora* (Fleißner *et al.*, 2008; Read *et al.*, 2009), αν και περισσότερο πρόσφατα έχουν επεκταθεί σε παθογόνα είδη, όπως τα *Fusarium oxysporum* και *Alternaria brassicicola* (Craven *et al.*, 2008; Prados Rosales & Di Pietro, 2008; López-Berges *et al.*, 2010; Ruiz-Roldán *et al.*, 2010). Μεθοδολογίες πρόσθιας (forward) και αντίστροφης (reverse) γενετικής ανάλυσης, σε συνδυασμό με βιοχημικές προσεγγίσεις και τεχνικές απεικόνισης ζωντανών κυττάρων (live cell imaging), έχουν επιτρέψει την ταυτοποίηση αρκετών γονιδίων και πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αναστομώνσεων.

1.1.2 Τύποι κυτταρικής σύντηξης

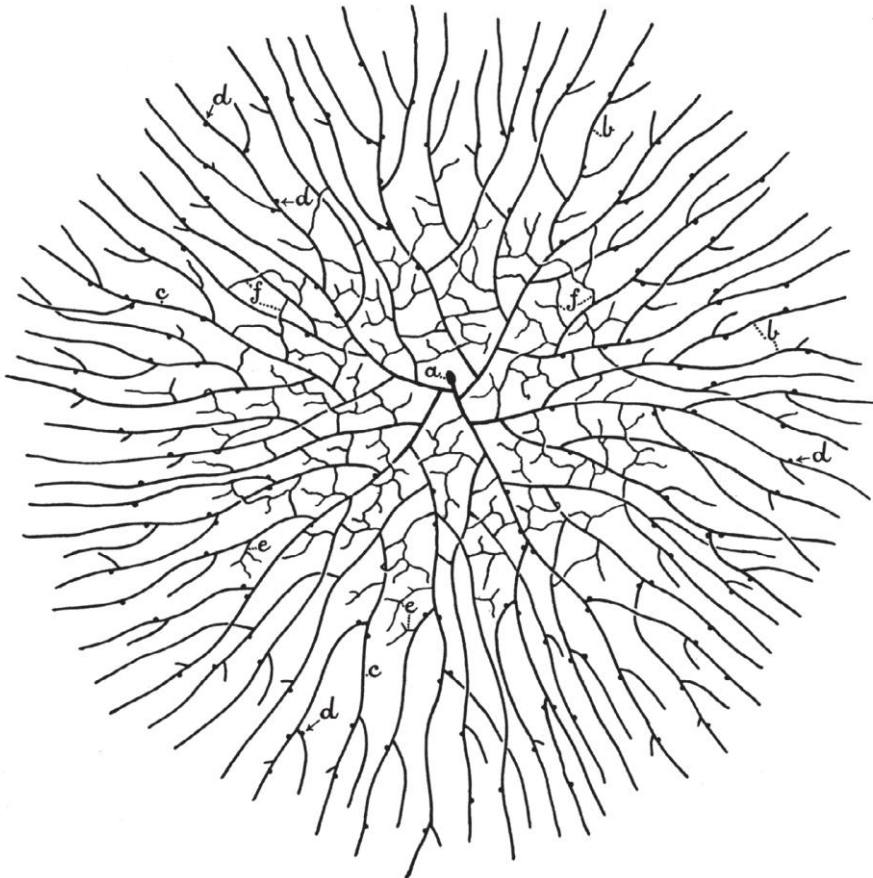
A. Σύντηξη υφών

Οι αποικίες των υφομυκήτων διακρίνονται γενικά σε μορφολογικά διακριτές περιοχές υφών (Εικόνα 1.1). Οι υφές της περιφερειακής ζώνης κάθε αποικίας επιδεικνύουν αρνητικό αυτοτροπισμό, με αποτέλεσμα οι επάκριες υφές και οι κλάδοι αυτών να αποφεύγουν η μία την άλλη και να αυξάνονται πάντοτε προς τον εξωτερικό χώρο της αποικίας (Trinci, 1984). Αντιθέτως, οι κλάδοι που δημιουργούνται στις εσωτερικές, γηραιότερες περιοχές της αποικίας και πληρώνουν τον κενό χώρο μεταξύ των υφών από τις οποίες προέρχονται, χαρακτηρίζονται από θετικό αυτοτροπισμό, ώστε να εμφανίζουν συχνά αμοιβαία έλξη και σύντηξη, και να δημιουργούν έτσι ένα πυκνά διασυνδεδεμένο μυκήλιο (Εικόνες 1.1 και 1.2) (Buller, 1931; Hickey *et al.*, 2002).

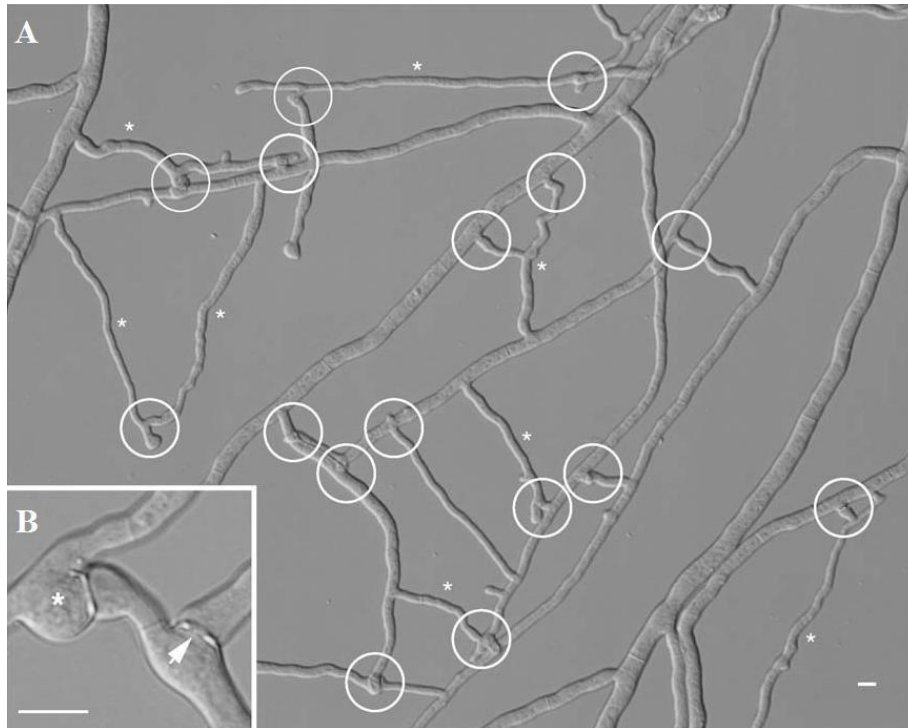
Εκτός από το συχνό φαινόμενο της αμοιβαίας έλξης δύο άκρων γειτονικών υφών, κλάδοι υφών προς σύντηξη μπορούν επίσης να επάγουν τον σχηματισμό νέων προεξοχών υφών (pegs) στις πλευρές γειτονικών τους υφών. Αυτές οι κυτταρικές προεξοχές αναπτύσσονται σε νέα άκρα υφών που μπορούν να συντηχθούν με τις υφές-ερεθίσματα. Αυτός ο γενικός τύπος σύντηξης μεταξύ άκρων (tip-to-tip) φαίνεται να είναι ο πλέον συνηθισμένος στους υφομύκητες, συμπεριλαμβανομένων για παράδειγμα των *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Cryphonectria parasitica*, *Pyricularia oryzae* και *N. crassa*. Σπανιότερα, άκρα υφών μπορούν να συντηχθούν με τις πλευρές γειτονικών τους υφών χωρίς δημιουργία ορατών κυτταρικών προεξοχών, ή και με κονίδια σε φάση βλάστησης (Chen & Wu, 1977; Naito, 1978; Newhouse & MacDonald, 1991; McCabe *et al.*, 1999; Hickey *et al.*, 2002). Οι διαφορετικοί τύποι σύντηξης υφών εντός ώριμων αποικιών του μύκητα *N. crassa* παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.3.

Οι αλλαγές στην κατεύθυνση της αύξησης των υφών κατά τη διάρκεια τροπικών αποκρίσεων σχετίζονται με την αλλαγή της θέσης του σωματίου Spitzenkörper (Riquelme *et al.*, 1998; Hickey *et al.*, 2002). Αυτό το σωματίο θεωρείται πως αποτελεί το κέντρο διανομής κυστιδίων μέσω του οποίου διοχετεύονται στο αυξανόμενο άκρο της υφής κυστίδια που περιέχουν ένζυμα και άλλα απαραίτητα συστατικά για την αύξηση (Gierz & Bartnicki-García, 2001; Riquelme *et al.*, 2007). Αφού έλθουν σε επαφή δύο άκρα υφών προς σύντηξη στο είδος

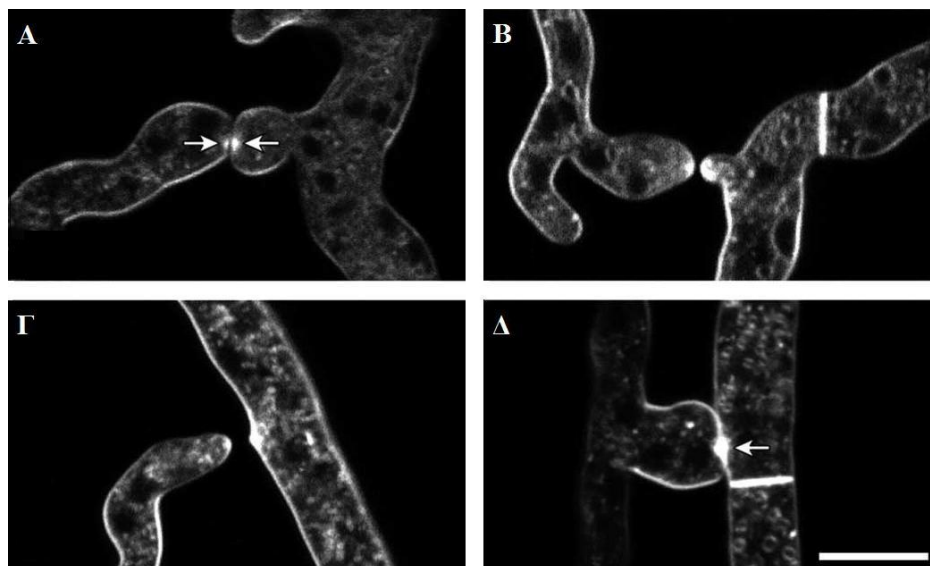
N. crassa, τα σωματία Spitzenkörper των δύο υφών προσανατολίζονται το ένα ακριβώς απέναντι από το άλλο και σηματοδοτούν το σημείο στο οποίο θα δημιουργηθεί ο πόρος της σύντηξης. Αυτές οι πλούσιες σε κυστίδια δομές παραμένουν σε αυτήν την περιοχή μέχρι να ολοκληρωθεί η σύντηξη (Εικόνα 1.3), υποδηλώνοντας την πιθανή συμμετοχή τους σε διάφορες λειτουργίες κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της αναστόμωσης, όπως στη διανομή ενζύμων αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος (Hickey *et al.*, 2002).



Εικόνα 1.1. Η κλασική σχηματική αναπαράσταση μιας αποικίας υφομύκητα (συγκεκριμένα του βασιδιομύκητα *Coprinus sterquilinus*) από τον Buller, όπου φαίνονται οι διακριτές μορφολογικές περιοχές από τις οποίες απαρτίζεται η αποικία, καθώς και η σύντηξη (αναστόμωση) υφών. Σημειώνονται ένα βασιδιοσπόριο που έχει βλαστήσει προς παραγωγή της αποικίας (**a**), ακραίες υφές στην περιφέρεια της αποικίας που επιδεικνύουν αμοιβαία αποφυγή (**b** και **c**), μυκηλιακοί κρίκοι (χαρακτηριστικοί του μυκηλίου των βασιδιομυκήτων) (**d**), υφές προς σύντηξη πριν την αναστόμωση (**e**), και υφές που έχουν συντηχθεί μέσω αναστομώνσεων (**f**) (από Buller, 1931).



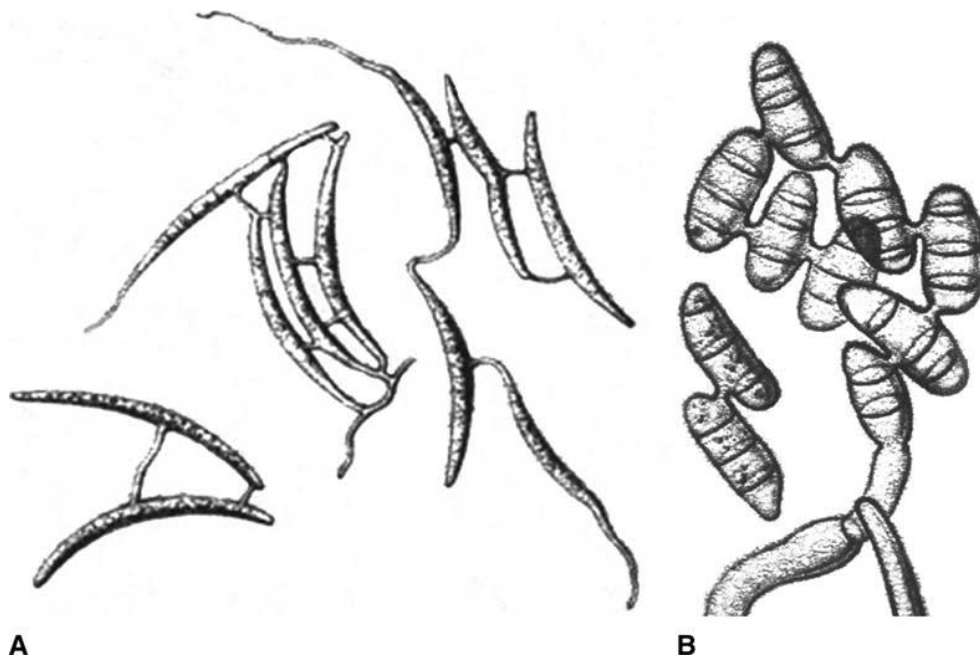
Εικόνα 1.2. Σύντηξη υφών σε ώριμη αποικία του μύκητα *Neurospora crassa*. **A.** Στο εσωτερικό της αποικίας (περίπου 1-2 cm εσωτερικά του μετώπου των ακραίων υφών) εξειδικευμένες υφές σύντηξης (σημειώνονται με αστερίσκους) αναστομώνονται με άλλες υφές προκειμένου να εδραιωθεί ένα μυκηλιακό δίκτυο (οι συντήξεις σημειώνονται με κύκλους). **B.** Λεπτομέρεια αναστομώνσεων υφών διακρίνονται η ιστροπική διόγκωση των άκρων κατόπιν της επαφής (αστερίσκος) και ένας πόρος σύντηξης (βέλος). Κλίμακα: 10 μm (προσαρμογή από Read *et al.*, 2009).



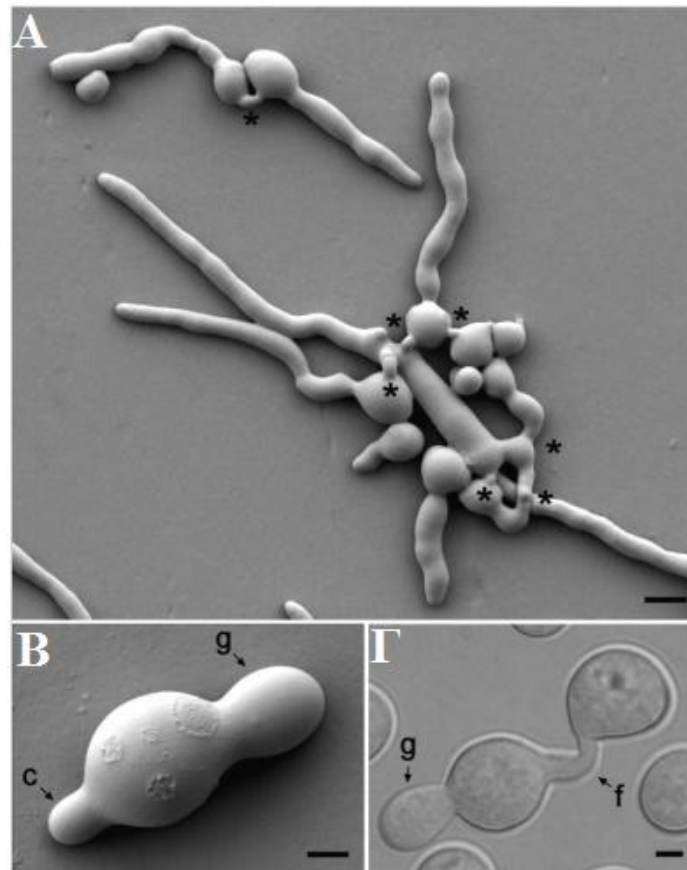
Εικόνα 1.3. Φωτογραφίες από συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) διάφορων τύπων σύντηξης υφών εντός ώριμων αποικιών του μύκητα *Neurospora crassa*. **A.** Σύντηξη δύο άκρων υφών (tip-to-tip). **B.** Προσέγγιση (προς σύντηξη) άκρου υφής με προεξοχή σύντηξης (peg). **Γ.** Προσέγγιση (προς σύντηξη) άκρου υφής με προεξοχή σύντηξης (peg) που μόλις έχει αρχίσει να δημιουργείται. **Δ.** Σύντηξη άκρου υφής απευθείας με πλευρική επιφάνεια υφής. Στα άκρα σύντηξης είναι ορατό (ως έντονο λευκό σήμα) το σωματίο Spitzenkörper. Κλίμακα: 10 μm (προσαρμογή από Hickey *et al.*, 2002).

B. Σύντηξη κονιδίων σε φάση βλάστησης

Εκτός από τη σύντηξη υφών, οι πρώτοι μυκητολόγοι παρατήρησαν και έναν ακόμα τύπο κυτταρικής συγχώνευσης στους υφομύκητες, δηλαδή τη σύντηξη βλασθητικών σπορίων. Το 1930 ο Köhler περιέγραψε τον σχηματισμό βραχέων γεφυρών σύντηξης μεταξύ κονιδίων, μεταξύ βλαστικών σωλήνων (germ tubes, GTs), ή μεταξύ των δύο, στο είδος *Botrytis alli*. Προκειμένου να διακρίνει αυτές τις γέφυρες από τους GTs και τις γενικές υφές, ο Köhler τις περιέγραψε ως υφές σύντηξης (Fusionshyphen). Αρκετά αργότερα, οι Roca και συνεργάτες χρησιμοποίησαν την περιγραφή «σωλήνες αναστόμωσης κονιδίων» (conidial anastomosis tubes, CATs) για τις αντίστοιχες δομές που παρατήρησαν στους μύκητες *Colletotrichum* spp. και *N. crassa* (Roca *et al.*, 2003; 2004; 2005b). Η σύντηξη μεταξύ σπορίων, βλασθημένων ή μη, είναι κοινή στους υφομύκητες, καθώς έχει αναφερθεί για περισσότερα από 70 είδη που ανήκουν σε περισσότερα από 20 γένη (Roca *et al.*, 2005a), και είναι γνωστή στους μυκητολόγους ήδη από το 1863 (Tulasne & Tulasne, 1863). Παραδείγματα αναστομωμένων κονιδίων και κονιδίων σε φάση βλάστησης μέσω του σχηματισμού CATs παρουσιάζονται στις Εικόνες 1.4 και 1.5. Επίσης, συχνά παρατηρείται σύντηξη των άκρων των GTs, ακολουθούμενη από τη δημιουργία ενός νέου αυξανόμενου άκρου υφής (Roca *et al.*, 2005b; Fleißner *et al.*, 2005).



Εικόνα 1.4. Δύο σχηματικές απεικονίσεις από την πρώτη αναφορά σύντηξης μεταξύ κονιδίων και κονιδίων σε φάση βλάστησης. **A.** *Cryptospora autia*, **B.** *Hypomyces rosellus* (από Tulasne & Tulasne, 1863).



Εικόνα 1.5. Φωτογραφίες από μικροσκοπικές παρατηρήσεις των σωλήνων αναστόμωσης κονιδίων (CATs) και βλαστικών σωλήνων (GTs) του μύκητα *Neurospora crassa*. **A.** Βλαστημένα μακροκονίδια με επιμηκυμένους GTs που αποφεύγουν ο ένας τον άλλο και CATs που έχουν συντηχθεί (αστερίσκοι). Η φωτογραφία ελήφθη με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης σε χαμηλή θερμοκρασία. Κλίμακα: 10 μm . **B.** Ένα μακροκονίδιο που έχει παράξει έναν GT (g) και έναν CAT (c). Η φωτογραφία ελήφθη με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης σε χαμηλή θερμοκρασία. Κλίμακα: 2,5 μm . **Γ.** Απευθείας σύντηξη (f) των CATs που έχουν παραχθεί από δύο κονίδια, ένα εκ των οποίων έχει δημιουργήσει και έναν GT (g). Αυτή η φωτογραφία ελήφθη με μικροσκοπία αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski). Κλίμακα: 2,5 μm (από Roca *et al.*, 2005b).

Οι CATs στο είδος *N. crassa* σχηματίζονται είτε απευθείας από τα κονίδια είτε από τους GTs. Οι CATs είναι λεπτότεροι και βραχύτεροι από τους GTs – συχνά εμφανίζονται ως κυτταρικές προεξοχές – και, σε αντίθεση με τους τελευταίους, έχουν πεπερασμένη δυνατότητα αύξησης, δεν διακλαδίζονται, δεν φέρουν σέπτα, και η παραγωγή τους εξαρτάται από την πυκνότητα των κονιδίων. Επιπλέον, οι CATs εμφανίζουν θετικό αυτοτροπισμό (αμοιβαία έλξη), αντιθέτως με τους GTs, που χαρακτηρίζονται από συμπεριφορά αμοιβαίας αποφυγής. Οι δύο τύποι σωλήνων των κονιδίων βρίσκονται υπό διαφορετικό γενετικό έλεγχο, όπως καταδεικνύεται από την ταυτοποίηση μεταλλαγών του μύκητα που αδυνατούν να δημιουργήσουν CATs ή των οποίων οι CATs αδυνατούν να εισέλθουν στη διαδικασία αμοιβαίας έλξης ή/και σύντηξης, ενώ παράγουν κανονικά αυξανόμενους GTs. Τέλος, έχει αποδειχθεί πως η προσθήκη χημικών παραγόντων που αποδιοργανώνουν τους μικροσωληνίσκους, όπως η χημική ουσία benomyl, εμποδίζει τον σχηματισμό και την επιμήκυνση των GTs, αλλά όχι και των CATs, των οποίων η παραγωγή, η αμοιβαία έλξη και η σύντηξη εξαρτάται μόνον από τον κυτταροσκελετό της F-ακτίνης (Roca *et al.*, 2005a; Fleißner *et al.*, 2005; Read *et al.*, 2010; Lichius *et al.*, 2010).

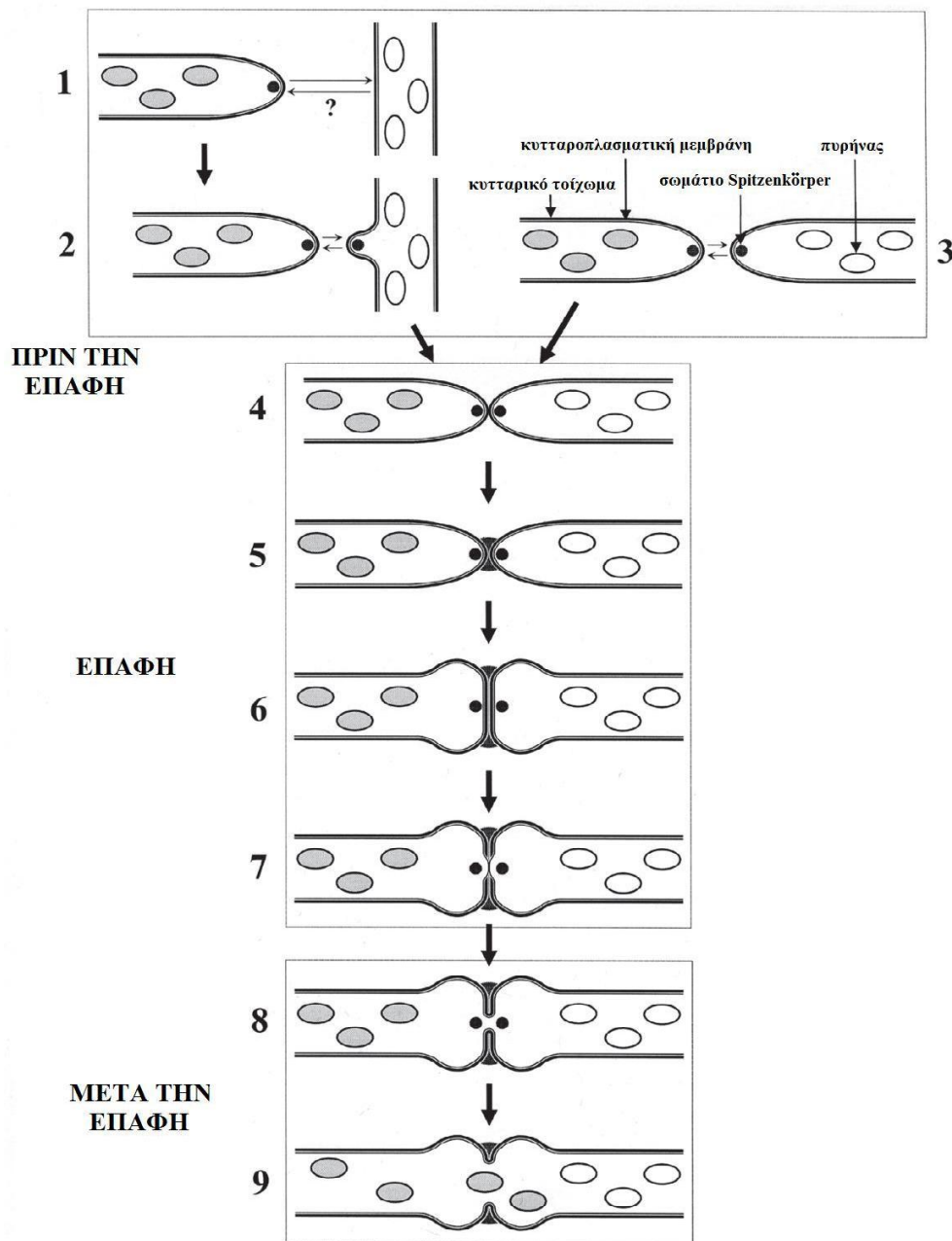
1.1.3 Κυτταρική βιολογία και φυσιολογία της σύντηξης

A. Η πορεία της σύντηξης

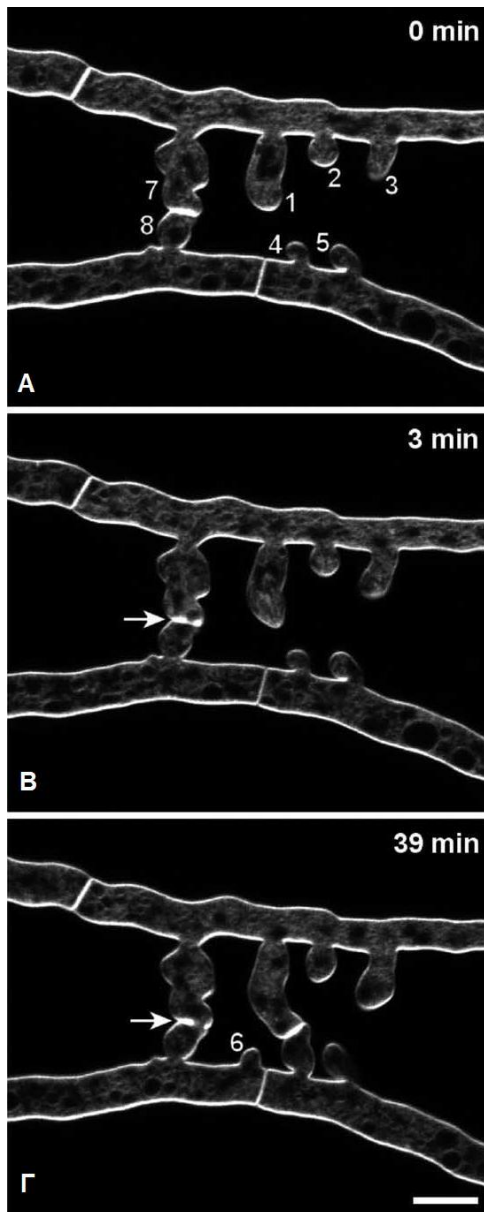
Από τη σκοπιά της κυτταρικής βιολογίας, η σύντηξη υφών και η σύντηξη κονιδίων σε φάση βλάστησης αποτελούν προσεκτικά ενορχηστρωμένες διαδικασίες πολλών βημάτων, τα επιμέρους στάδια των οποίων εξαρτώνται από τη συγκεκριμένη χωροχρονική προσαρμογή του κυτταρικού προγράμματος (Εικόνες 1.6 και 1.7). Η έναρξη της διαδικασίας σύντηξης φαίνεται ότι απαιτεί μια ελάχιστη δεκτικότητα (competence), δεδομένου ότι δεν συντήκονται όλοι οι κλάδοι υφών εντός μιας αποικίας ούτε όλα τα σπόρια που βλαστάνουν (Buller, 1931; Hickey *et al.*, 2002). Από τη στιγμή που έχει εδραιωθεί αυτή η επάρκεια, τα άκρα προς σύντηξη (άκρα υφών ή CATs) χρειάζεται είτε να ανιχνεύσουν είτε να επάγουν τη δημιουργία ενός γειτονικού άκρου-συντρόφου για τη σύντηξη (επαγωγή). Η επακόλουθη τροπική αλληλεπίδραση απαιτεί να «μεταφραστούν» τα σχετικά εξωτερικά σήματα σε επαναπροσανατολισμό του μηχανισμού επάκριας αύξησης προς την κατεύθυνση του κυττάρου-συντρόφου (χημειοτροπισμός). Όταν τα δύο άκρα έλθουν σε επαφή, πρέπει να αναγνωρίσουν τη διακυτταρική επαφή και να μετατρέψουν το κυτταρικό τους πρόγραμμα από «κατευθυνόμενη αύξηση» σε «προσκόλληση και σύντηξη» (διακυτταρική προσκόλληση). Σε αυτό το στάδιο πιθανά εμπλέκονται η εκκριτική δραστηριότητα και μεταβολές στην οργάνωση των κυτταρικών τοιχωμάτων στην περιοχή επαφής ώστε να αποτραπεί τυχόν κυτταροπλασματική διαρροή κατά την επακόλουθη δημιουργία πόρου (αναδιοργάνωση κυτταρικών τοιχωμάτων). Τελικά, ο σχηματισμός του πόρου σύντηξης περιλαμβάνει τη στοχευμένη αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος και την ένωση των πλασματικών μεμβρανών προς επίτευξη κυτταροπλασματικής συνέχειας μεταξύ των υπό διαδικασία σύντηξης υφών/κονιδίων. Τότε, το κυτταροπλασματικό υλικό, συμπεριλαμβανομένων των πυρήνων, μπορεί να διέλθει από τον πόρο και τελικά να αναμιχθεί μεταξύ των αναστομωμένων υφών/κονιδίων. Ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται προσωρινά κατά τη διάρκεια του χημειοτροπισμού των CATs. Η ακτίνη του κυτταροσκελετού, αλλά όχι οι μικροσωληνίσκοι, είναι απαραίτητη για τη διαδικασία της σύντηξης (Εικόνες 1.6 και 1.7) (Roca *et al.*, 2005a; Read *et al.*, 2012; Fleißner, 2012).

B. Δεκτικότητα (competency) – επαγωγή (induction) και εξωτερικοί παράγοντες

Ήδη από την εποχή των πρώτων μυκητολόγων είχε παρατηρηθεί αρνητική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας της βλασθητικής αναστόμωσης των υφών ή των κονιδίων στους υφομύκητες και της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στοιχείων· μερικά παραδείγματα αποτελούν τα είδη *Leptosphaeria coniothyrium*, *Monilia fructigena* (Laibach, 1928), *B. allii*, *Fusarium* spp. (Köhler, 1930), *N. crassa* (Glass & Fleißner, 2006), καθώς και η ακραία περίπτωση του *Colletotrichum lindemuthianum*, στο οποίο η σύντηξη των κονιδίων μέσω CATs αναστέλλεται πλήρως από την παρουσία θρεπτικών συστατικών και παρατηρείται μόνον στο νερό (Ishikawa *et al.*, 2010). Ειδικότερα, αποδείχθηκε πρόσφατα ότι στο είδος *N. crassa* σημαντική αναστολή στη σύντηξη κονιδίων ασκούν συγκεκριμένα αμινοξέα – ιδιαίτερα η τρυπτοφάνη, και δευτερευόντως η γλυκίνη και η λυσίνη – και προτάθηκε ότι η τρυπτοφάνη παίζει ρόλο σηματοδοτικού μορίου ρύθμισης της σύντηξης των CATs (Fischer-Harman *et al.*, 2012). Αντιθέτως με τη σύντηξη κονιδίων μέσω CATs, η τρυπτοφάνη και οι χαμηλές τιμές pH δεν επιδρούν σημαντικά στη βλασθητική σύντηξη των υφών στις ώριμες



Εικόνα 1.6. Διαγραμματική παρουσίαση της διαδικασίας σύντηξης των υφών εντός ώριμων αποικιών του μύκητα *Neurospora crassa*. Δύο εναλλακτικοί τρόποι έναρξης της πορείας απεικονίζονται, δηλαδή επαγωγή της δημιουργίας υφής σύντηξης στην πλευρική επιφάνεια μιας υφής από άκρο γειτονικής υφής, ή προσέγγιση δύο υπαρχόντων άκρων υφών (Roca *et al.*, 2005b). Οι πυρήνες των δύο υφών που συντήκονται είναι γκρι και λευκοί, αντίστοιχα. Στάδιο 1: Το άκρο μιας υφής προς σύντηξη εκκρίνει κάποιο διαχεόμενο χημειοτροπικό σινιάλο που ρυθμίζει τον σχηματισμό του σωματίου Spitzenkörper. Στάδια 2 και 3: Τα δύο άκρα εκκρίνουν διαχεόμενα μόρια-σινιάλα που ρυθμίζουν τη συμπεριφορά του σωματίου Spitzenkörper και την αμοιβαία έλξη. Στάδια 4 και 5: Επαφή των υφών, διακοπή της επάκριας αύξησης, σταθερή προσκόλληση των υφών με έκκριση σταθεροποιητικού υλικού. Στάδια 6 και 7: Μετάβαση από την πολική σε περισσότερο ισοτροπική αύξηση, που καταλήγει στη διάγκωση των προσκολλημένων άκρων των υφών και διάλυση του κυτταρικού τοιχώματος, ώστε να γίνει επαφή των πλασματικών μεμβρανών. Στάδιο 8: Σύντηξη των πλασματικών μεμβρανών των δύο υφών και σχηματισμός του πόρου αναστόμωσης· το σώματιο Spitzenkörper παραμένει σε συσχέτιση με τον πόρο καθώς αυτός αυξάνει σε διάμετρο, και αρχίζει η κυτταροπλασματική ροή μεταξύ των υφών. Στάδιο 9: Η διάμετρος του πόρου σύντηξης αυξάνει περαιτέρω και το σώματιο Spitzenkörper εξαφανίζεται· οργανίδια (όπως πυρήνες, κυστίδια και μιτοχόνδρια) μετακινούνται ελεύθερα μεταξύ των υφών που έχουν συντηχθεί, ίσως εξαιτίας διαφορών στην πίεση σπαργής των δύο υφών (προσαρμογή από Glass *et al.*, 2004).



Εικόνα 1.7. Φωτογραφίες από συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) της διαδικασίας σύντηξης υφών, εντός ώριμων αποικιών του μύκητα *Neurospora crassa*. Α-Γ. Στάδια της επαγωγής, της αμοιβαίας έλξης και της αναστόμωσης υφών σύντηξης, αντίστοιχα. Κλίμακα: 10 μm (προσαρμογή από Hickey *et al.*, 2002).

αποικίες του μύκητα *C. lindemuthianum*, υποδηλώνοντας έτσι διαφορετική ρύθμιση της σύντηξης των υφών από τη σύντηξη των κονιδίων μέσω CATs (Fischer-Harman *et al.*, 2012).

Επιπλέον, πρόσφατα αναφέρθηκε επίδραση της πηγής αζώτου στη συχνότητα σύντηξης των κονιδίων του *F. oxysporum*. Παρουσία νιτρικού αμμωνίου η αναστόμωση ήταν σημαντικά σπανιότερη σε σχέση με καλλιέργειες που αναπτύσσονταν σε νιτρικό νάτριο. Αυτή η ανασταλτική επίδραση του αμμωνίου μάλιστα μπορούσε να αναιρεθεί με την παρουσία ραπαμυκίνης (rapamycin), που είναι ένας εξειδικευμένος αναστολέας της κινάσης σερίνης/θρεονίνης TOR (López-Berges *et al.*, 2010). Η κινάση TOR είναι συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και ελέγχει την αύξηση και την ανάπτυξη σε απόκριση στη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων (Martin & Hall, 2005; Soulard *et al.*, 2009). Επιπρόσθετα, η αναστολή της σύντηξης από την παρουσία αμμωνιακών ιόντων εξαρτάται από τις πρωτεΐνες MeaB και AreA (López-Berges *et al.*, 2010), δύο κεντρικών ρυθμιστών του μεταβολισμού αζώτου (Wong *et al.*, 2007; Caddick *et al.*, 1994). Συνεπώς, η επίδραση της διαθεσιμότητας θρεπτικών στοιχείων στη συχνότητα της σύντηξης φαίνεται πως βασίζεται

τουλάχιστον εν μέρει σε γενικά μονοπάτια που ελέγχουν την απόκριση στα θρεπτικά συστατικά, και ιδιαίτερα στην πηγή αζώτου.

Εκτός από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών υλικών, η αναστόμωση σε διάφορα είδη επηρεάζεται και από διάφορα άλλα εξωκυτταρικά σήματα και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αυτοί περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία επώασης, το εξωκυτταρικό pH (Fischer-Harman *et al.*, 2012), την ηλικία των κονιδίων (Ishikawa *et al.*, 2010), τις συνθήκες επώασης των καλλιεργειών από τις οποίες συλλέγονται τα κονίδια και την υδροφοβικότητα των υποστρωμάτων (Read *et al.*, 2012).

1.1.4 Μοριακή βάση της σύντηξης

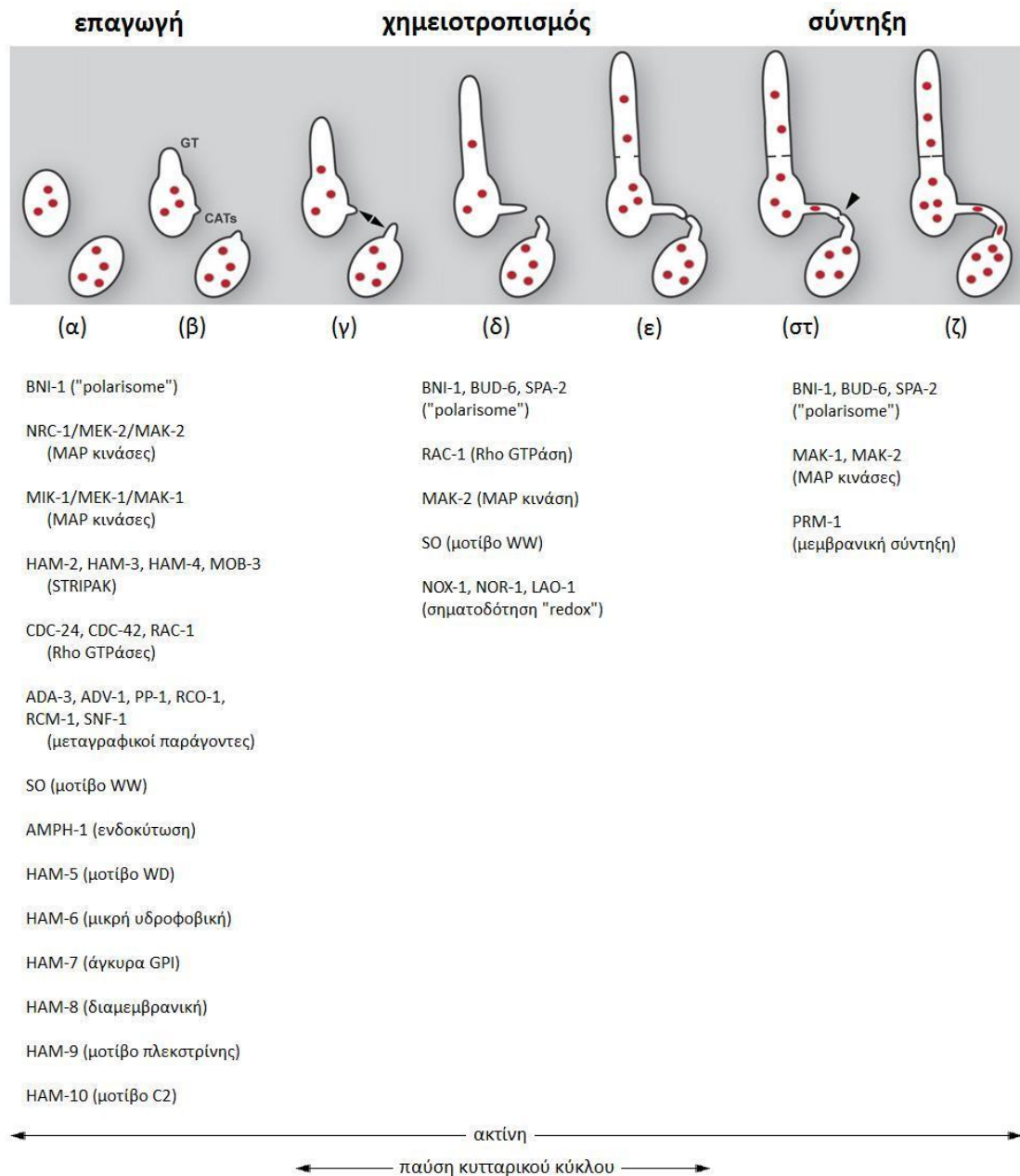
Η ανάλυση μεταλλαγών ελαττωματικών σε μία ή περισσότερες πτυχές της διαδικασίας σύντηξης υφών ή σπορίων επέτρεψε τα τελευταία χρόνια την ταυτοποίηση αρκετών γονιδίων και πρωτεϊνών που απαιτούνται για αυτήν την πολύπλοκη διαδικασία, κυρίως στον μύκητα-μοντέλο *N. crassa* (Πίνακας 1.1). Αν και οι περισσότερες μελέτες στο μοριακό επίπεδο αφορούν τη σύντηξη μεταξύ κονιδίων, για όσες μεταλλαγές έχουν μελετηθεί και στους δύο τύπους σύντηξης έχει αποδειχθεί πως όλες αυτές είναι ελαττωματικές στη σύντηξη κονιδίων είναι επίσης ελαττωματικές και στη σύντηξη υφών στην ώριμη αποικία. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει πως οι δύο διαδικασίες μοιράζονται έναν κοινό μοριακό μηχανισμό (Xiang *et al.*, 2002; Pandey *et al.*, 2004; Fleißner *et al.*, 2005; Prados Rosales & Di Pietro, 2008; Simonin *et al.*, 2010; Aldabbous *et al.*, 2010). Από την άλλη πλευρά, πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν πως ορισμένες μεταλλαγές μπορεί να επηρεάζουν μόνον την αναστόμωση των υφών και όχι των κονιδίων (Fu *et al.*, 2011), που ίσως υποδεικνύει διαφορετική ρύθμιση στις δύο περιπτώσεις. Ορισμένες πρωτεΐνες φαίνεται πως είναι απαραίτητες για περισσότερα του ενός στάδια της σύντηξης κονιδίων μέσω CATs (Εικόνα 1.8).

Μεταξύ των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στις διάφορες φάσεις της διαδικασίας σύντηξης στον μύκητα *N. crassa* και σε άλλα είδη, συγκαταλέγεται το μονοπάτι MAP κινασών NRC-1/MEK-2/MAK-2, που είναι ομόλογο με το μονοπάτι Fus3 – της απόκρισης στις φερομόνες – του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Pandey *et al.*, 2004; Roca *et al.*, 2005a; b; Maerz *et al.*, 2008). Επιπλέον, ο σχηματισμός των CATs και η σύντηξη μεταξύ ώριμων υφών είναι σημαντικά ελαττωμένοι σε στελέχη που δεν παράγουν την πρωτεΐνη SO, η οποία φέρει το μοτίβο WW και συναντάται μόνον στους νηματοειδείς ασκομύκητες. Οι δύο πρωτεΐνες MAK-2 και SO παρουσιάζουν μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική συντονισμένη ταλάντωση στην κατανομή τους εντός δύο CATs που αλληλεπιδρούν, κατά τέτοιον τρόπο ώστε σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή η MAK-2 να είναι προσωρινά εντοπισμένη στο άκρο του ενός CAT και η SO ταυτόχρονα συγκεντρωμένη στο άκρο του έτερου CAT (Fleißner *et al.*, 2009b). Για την ερμηνεία αυτής της συμπεριφοράς έχει προταθεί πως σε κάθε ένα από το ζεύγος των βλαστανόντων κονιδίων συμβαίνει μια διαρκής συντονισμένη εναλλαγή μεταξύ δύο καταστάσεων, της αποστολής και της υποδοχής σημάτων, η οποία εξασφαλίζει τη διαφορετικότητα των δύο «εταίρων» πριν τη σύντηξη, κατά παρόμοιο τρόπο με το σύστημα του ζυμομύκητα *S. cerevisiae* όπου μόνον κύτταρα αντίθετου συζευκτικού τύπου μπορούν να συζευχθούν, μέσω της παραγωγής φερομονών και των αντίστοιχων υποδοχέων τους (Fleißner *et al.*, 2009b; Goryachev *et al.*, 2012). Εκτός από το μονοπάτι μεταγωγής σήματος της MAP κινάσης MAK-2, για τη βλαστητική σύντηξη στο είδος *N. crassa* απαραίτητα είναι και τα άλλα δύο μονοπάτια των MAP κινασών, MAK-1 και OS-2 (Maerz *et al.*, 2008).

Πίνακας 1.1						
Γονίδια με συμμετοχή στη βλαστητική σύντηξη στον μύκητα <i>Neurospora crassa</i>						
Γονίδιο	Κωδικός ¹	Πρωτεΐνη	Στάδιο συμμετοχής στην ανάπτυξη των CATs			Αναφορές ²
			Επαγωγή	Χημειο-τροπισμός	Σύντηξη	
<i>ada-3</i>	NCU02896	Μεταγραφικός παράγοντας	•			1
<i>adv-1</i>	NCU07392	Μεταγραφικός παράγοντας	•			1
<i>amph-1</i>	NCU01069	Αμφιφυσίνη	•			1
<i>bni-1</i>	NCU01431	Σωματίο πολικότητας			•	2
<i>bud-6</i>	NCU08468	Σωματίο πολικότητας			•	2
<i>cdc-24</i>	NCU00957	Παράγοντας ανταλλαγής γουανίνης	•			3
<i>cdc-42</i>	NCU06454	Rho GTPάση	•			3
<i>cse-1</i>	NCU04379	Πρωτεΐνη πρόσδεσης Ca ²⁺		•		4
<i>gprig-1</i>	NCU09757	Πρωτεΐνη άγκυρας GPI			•	5
<i>grip-1</i>	NCU06663	Πρωτεΐνη άγκυρας GPI			•	5
<i>grip-2</i>	NCU07999	Πρωτεΐνη άγκυρας GPI			•	5
<i>grip-3</i>	NCU06508	Πρωτεΐνη άγκυρας GPI			•	5
<i>gpit-1</i>	NCU05644	Πρωτεΐνη άγκυρας GPI			•	5
<i>ham-2</i>	NCU03727	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη	•			1, 6, 7
<i>ham-3</i>	NCU08741	Στριάτινη	•			1, 8
<i>ham-4</i>	NCU00528	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη			•	1, 8
<i>ham-5</i>	NCU01789	Πρωτεΐνη με μοτίβο WD40	•			1, 9
<i>ham-6</i>	NCU02767	Μικρή υδροφοβική πρωτεΐνη	•			1
<i>ham-7</i>	NCU00881	Πρωτεΐνη άγκυρας GPI	•			1
<i>ham-8</i>	NCU02811	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη	•			1
<i>ham-9</i>	NCU07389	Πρωτεΐνη με μοτίβο πλεκστρίνης	•			1
<i>ham-10</i>	NCU02833	Πρωτεΐνη με μοτίβο C2	•			1
<i>ham-11</i>	NCU04732	Πρωτεΐνη αναστόμωσης		•	•	10
<i>mak-1</i>	NCU09842	MAP κινάση	•	•		1, 3
<i>mak-2</i>	NCU02393	MAP κινάση	•			1, 7, 11
<i>mek-1</i>	NCU06419	MAP κινάση κινάση	•	•		1, 3
<i>mek-2</i>	NCU04612	MAP κινάση κινάση	•			1
<i>mik-1</i>	NCU02234	MAP κινάση κινάση	•	•		1, 3
<i>lao-1</i>	NCU05113	Πρωτεΐνη όμοια με οξειδάση ασκορβικού οξέος	•	•		3
<i>lfd-1</i>	NCU09307	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη			•	18
<i>mob-3</i>	NCU07674	Φοσεΐνη	•			1, 12
<i>nfh-2</i>	NCU02806	Ρυθμιστική πρωτεΐνη 14-3-3		•		4
<i>nor-1</i>	NCU07850	Ρυθμιστής οξειδάσης NADPH	•	•		3
<i>nox-1</i>	NCU02110	Οξειδάση NADPH	•	•		3
<i>nrc-1</i>	NCU06182	MAP κινάση κινάση κινάση	•			1, 7, 11
<i>pik-1</i>	NCU10397	4-κινάση φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης		•		4
<i>pk-1</i>	NCU00506	Παράγοντας συγκρότησης της V-ATPάσης	•			1
<i>pp-1</i>	NCU00340	Μεταγραφικός παράγοντας	•			13
<i>pp2A</i>	NCU06563	Καταλυτική υπομονάδα της φωσφατάσης 2A	•			1
<i>prm-1</i>	NCU09337	Μεμβρανική πρωτεΐνη	•	•	•	14
<i>rac-1</i>	NCU02160	Rho GTPάση	•			1, 3
<i>rcm-1</i>	NCU06842	Μεταγραφικός παράγοντας	•			9
<i>rc-1</i>	NCU06205	Μεταγραφικός παράγοντας	•			1, 9
<i>snf5</i>	NCU00421	Μεταγραφικός παράγοντας	•			1
<i>so</i>	NCU02794	Πρωτεΐνη με μοτίβο WW	•	•		1, 15, 16, 17
<i>sra-2</i>	NCU03115	Σωματίο πολικότητας			•	2

¹ Βάση γονιδιωματικών δεδομένων του μύκητα *N. crassa* (Broad Institute, 2013).

² Αναφορές: **1** = Fu *et al.*, 2011, **2** = Lichius *et al.*, 2012, **3** = Lichius, 2010, **4** = Palma-Guerrero *et al.*, 2013; **5** = Bowman *et al.*, 2006, **6** = Xiang *et al.*, 2002, **7** = Roca *et al.*, 2005b, **8** = Simonin *et al.*, 2010, **9** = Aldabbous *et al.*, 2010, **10** = Leeder *et al.*, 2013; **11** = Pandey *et al.*, 2004, **12** = Maerz *et al.*, 2009, **13** = Read *et al.*, 2010, **14** = Fleißner *et al.*, 2009a, **15** = Fleißner *et al.*, 2005, **16** = Fleißner *et al.*, 2009b, **17** = Fleißner & Glass, 2007, **18** = Palma-Guerrero *et al.*, 2014.



Εικόνα 1.8. Σχηματική απεικόνιση-περίληψη της διαδοχής των αναπτυξιακών σταδίων της δημιουργίας και της σύντηξης των CATs στον μύκητα *Neurospora crassa*. Οι τρεις κύριες φάσεις της διαδικασίας είναι η επαγωγή, ο χημειοτροπισμός και η σύντηξη των CATs. (α) Τα μακροκονίδια του *N. crassa* που δεν έχουν βλαστήσει περιέχουν κατά μέσο όρο 3-6 πυρήνες (κόκκινοι κύκλοι) και αρχικά αναπτύσσονται αποκλειστικά με ιστροπική επέκταση. (β) Η εγκαθίδρυση κυτταρικής πολικότητας οδηγεί στην ανάπτυξη βλαστικών σωλήνων (GTs), ενώ επίσης σε αυτήν τη φάση μπορούν να δημιουργηθούν σωλήνες αναστόμωσης κονιδίων (CATs). (γ) Γενετικά όμοια κύτταρα επικοινωνούν μέσω απελευθέρωσης/αντίληψης άγνωστου χημειοτακτικού μορίου από τους CATs (βέλη). (δ) Η διαδικασία χημειοτακτισμού των CATs επιτρέπει την αμοιβαία έλξη και προσέγγισή τους, προς επίτευξη διακυτταρικής επαφής. (ε) Σταθερή προσκόλληση των CATs. (στ) Σχηματισμός του πόρου σύντηξης (βέλος). (ζ) Ανάμιξη κυτταροπλασματικού υλικού (συμπεριλαμβανομένων των πυρήνων). Ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται προσωρινά κατά τη διάρκεια του χημειοτροπισμού των CATs, και η ακτίνη – αλλά όχι οι μικροσωληνίσκοι – είναι απαραίτητη για την επίτευξη της σύντηξης των CATs. Τα γνωστά γονίδια που απαιτούνται για τις διαφορετικές φάσεις δημιουργίας και σύντηξης των CATs παρατίθενται κάτω από το σχήμα (προσαρμογή από Read *et al.*, 2012).

Άλλα τρία απαραίτητα γονίδια για τη βλαστητική σύντηξη των ειδών *N. crassa* και *S. macrospora* είναι τα *ham-2*, *ham-3* και *ham-4* (Simonin *et al.*, 2010; Bernhards & Pöggeler, 2011). Αυτά είναι ομόλογα γονιδίων του συμπλόκου Far του ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, το οποίο απαιτείται για την προσωρινή παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 κατόπιν της φερομονικής διέγερσης (Kemp & Sprague, 2003). Παρομοίως με τη σύζευξη του ζυμομύκητα, η σύντηξη βλαστανόντων κονιδίων του *N. crassa* συνοδεύεται επίσης από μιτωτική παύση (Roca *et al.*, 2010). Τα ανθρώπινα ομόλογα των *ham-3* και *ham-4* (striatin και SLMAP) είναι συστατικά του συμπλόκου STRIPAK, ενός μεγάλου πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου. Με βάση μελέτες σε διάφορα συστήματα, τα σύμπλοκα της πρωτεΐνης striatin θεωρείται ότι λειτουργούν ως τοπικά συγκροτούμενα σωματίδια σηματοδότησης (signalosomes), εμπλεκόμενα στον συντονισμό διαφορετικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος (Benoist *et al.*, 2006; Bernhards & Pöggeler, 2011). Όσον αφορά το σύμπλοκο SLMAP, αυτό απαιτείται για τη σύντηξη των μυοβλαστών κατά τη μυϊκή ανάπτυξη (Guzzo *et al.*, 2004), υποδηλώνοντας έτσι πιθανά συντηρημένες λειτουργίες από τους μύκητες μέχρι τα θηλαστικά. Τέλος, είναι ενδιαφέρον πως τα γονίδια που κωδικοποιούν για δύο ακόμα συστατικά του συμπλόκου STRIPAK – τις πρωτεΐνες MOB-3 και PP2A – βρέθηκαν επίσης να είναι απαραίτητα για τη σύντηξη στα είδη *N. crassa* και *S. macrospora*, μεταξύ υφών και κονιδίων, αντίστοιχα (Maerz *et al.*, 2009; Bernhards & Pöggeler, 2011; Fu *et al.*, 2011).

Αρκετά ακόμα γονίδια και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί ως απαραίτητοι παράγοντες για τη βλαστητική σύντηξη κονιδίων/υφών. Στον μύκητα *N. crassa* αυτά περιλαμβάνουν μέλη της ομάδας των Rho GTPασών CDC-42 και RAC-1, καθώς επίσης και τον παράγοντά τους ανταλλαγής γουανίνης CDC-24, που είναι απαραίτητοι ρυθμιστές της εδραίωσης και διατήρησης κυτταρικής πολικότητας (Araujo-Palomares *et al.*, 2011): τα συστατικά του «σωματίου πολικότητας» (polarisome) BNI-1, BUD-6 και SPA-2 (Lichius *et al.*, 2012): το σύμπλοκο ARP2/3 που σχετίζεται με τη συναρμολόγηση, τη δυναμική και πιθανά τη διασύνδεση της F-ακτίνης (Lichius *et al.*, 2011): συστατικά που εμπλέκονται στον σχηματισμό αγκυρών γλυκοζυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (GPI), οι οποίες προσδένουν πρωτεΐνες στο εξωτερικό «φύλλο» της πλασματικής μεμβράνης (Bowman *et al.*, 2006; 2009): την πρωτεΐνη ενδοκύτωσης AMPH-1 (Berepiki *et al.*, 2011): τις πρωτεΐνες NOX-1, NOR-1 και RAC-1 ως συστατικά του συμπλόκου NOX που εμπλέκεται στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση: την πρωτεΐνη HAM-5, η οποία φέρει μοτίβο WD40 και πιθανά εμπλέκεται στη ρύθμιση αποκρίσεων μέσω MAP κινασών (Aldabbous *et al.*, 2010): τις πρωτεΐνες PRM-1 και LFD-1, οι οποίες εμπλέκονται στην ένωση των πλασματικών μεμβρανών (Fleißner *et al.*, 2009a; Palma-Guerrero *et al.*, 2014): τις πρωτεΐνες HAM-6, HAM-7 και HAM-8, για τις οποίες έχει επίσης προταθεί ότι εμπλέκονται στο τελικό αυτό στάδιο κυτταρικής σύντηξης (Fu *et al.*, 2011): και τους μεταγραφικούς παράγοντες ADA-3, ADV-1, PP-1, RCM-1, RCO-1 και SNF-5 (Aldabbous *et al.*, 2010; Read *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2011). Περισσότερο πρόσφατα βρέθηκε πως ο μεταγραφικός παράγοντας PP-1 (στόχος του μονοπατιού της MAP κινάσης MAK-2 και ομόλογος με τον Ste12 του ζυμομύκητα *S. cerevisiae*) ρυθμίζει άλλα γονίδια που απαιτούνται για τον χημειοτροπισμό και τη σύντηξη των CATs, όπως το *ham-11* (Leeder *et al.*, 2013). Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη συσχετίσεων των γονιδιωμάτων 112 στελεχών φυσικού τύπου του μύκητα *N. crassa* με την ικανότητα των CATs για σύντηξη (genome-wide association study, GWAS) επέτρεψε την αναγνώριση της συμμετοχής στη διαδικασία των γονιδίων *cse-1*, που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη πρόσδεσης του ασβεστίου, καθώς επίσης και των *pik-1* (κωδικοποιεί για την 4-κινάση της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης που εμπλέκεται στη διαδικασία έκκρισης από το σωματίο Golgi προς την πλασματική μεμβράνη)

και *nfh-2* (ρυθμιστική πρωτεΐνη 14-3-3 που προσδένει διάφορες πρωτεΐνες σηματοδότησης), τα οποία αλληλεπιδρούν με το *cse-1* (Palma-Guerrero *et al.*, 2013). Τέλος, στο είδος *Aspergillus fumigatus*, μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του μεταγραφικού ενεργοποιητή NsdD (τύπου GATA) είναι ελαττωματικές στη δημιουργία ετεροκαρύων, υποδηλώνοντας ελαττωματική σύντηξη υφών (Szewczyk & Krappmann, 2010).

Από την άλλη πλευρά, στον μύκητα *N. crassa* δεν είναι απαραίτητοι για τη σύντηξη κονιδίων ή υφών οι φερομόνες και οι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς τους (Kim & Borkovich, 2004; 2006), υποδεικνύοντας πως η φυλετική και η βλαστητική σύντηξη χρησιμοποιούν διαφορετικά σήματα και υποδοχείς. Επίσης, μεταλλαγμένα στελέχη του ίδιου μύκητα χωρίς την υπομονάδα Gβ, Gγ ή τις τρεις υπομονάδες Ga των G-πρωτεϊνών εξακολουθούν να είναι ικανά για βλαστητική σύντηξη, υποδηλώνοντας ότι η δημιουργία αναστομάσεων δεν εξαρτάται από τη σηματοδότηση μέσω G-πρωτεϊνών (Kays & Borkovich, 2004; Krystofova & Borkovich, 2005; Fleißner, 2012). Ομοίως, για τη σύντηξη δεν είναι απαραίτητο το μονοπάτι σηματοδότησης μέσω cAMP/πρωτεϊνικής κινάσης A (Lichius *et al.*, 2010), όπως επίσης δεν απαιτείται το μονοπάτι σηματοδότησης μέσω κινασών ιστιδίνης (Read *et al.*, 2012). Τέλος, έχουν ανιχνευθεί αρκετές μεταλλαγές που υπόκεινται σε σύντηξη των CATs με βραδύτερο ρυθμό από τον φυσικό τύπο (Lichius *et al.*, 2010), αλλά δεν είναι ακόμα σαφές εάν τα αντίστοιχα γονίδια εμπλέκονται άμεσα στη διαδικασία.

1.1.5 Ο ρόλος της βλαστητικής σύντηξης

Η σύντηξη μεταξύ σπορίων ή/και σπορίων σε φάση βλάστησης κατά τη διάρκεια εδραίωσης μιας αποικίας θεωρείται ότι αυξάνει την αρμοστικότητα (fitness) και την ανταγωνιστικότητα του υπό δημιουργία μυκηλίου (Fleißner *et al.*, 2008). Η κοινή χρήση των πόρων πολλών διαφορετικών «εταίρων» πιθανά επιτρέπει υψηλότερους ρυθμούς βλάστησης ή/και αύξησης, και συνεπώς ταχύτερο αποικισμό ενός δεδομένου υποστρώματος (Hay, 1995; Roca *et al.*, 2003; Simonin *et al.*, 2012). Επιπλέον, η αύξηση του μεγέθους της αποικίας μέσω της συνένωσης πολλών μικρότερων «ατόμων» ίσως να αυξάνει τις πιθανότητες για επιτυχή καθιέρωση της αποικίας, όπως είναι γνωστό ότι συμβαίνει σε διάφορα είδη βασιδιομυκήτων (Fleißner, 2012).

Σχετικά με την αναστόμωση υφών στις ώριμες αποικίες, αυτή θεωρείται γενικά ότι προάγει την ομοιοστάση εντός του μυκηλιακού δικτύου. Διαφορετικά τμήματα του μυκηλίου μπορούν σε δεδομένη χρονική στιγμή να επιδεικνύουν διαφορετική μεταβολική δραστηριότητα, όπως απέδειξε η σύγκριση των μεταβολικών προτύπων των εσωτερικών και των εξωτερικών περιοχών αυξανόμενων αποικιών στο είδος *N. crassa* (Kasuga & Glass, 2008). Σε αυτήν τη μελέτη βρέθηκε πως τα γονίδια που εμπλέκονται στην πρωτεϊνική βιοσύνθεση και την παραγωγή ενέργειας είναι περισσότερο ενεργά στη μεσαία περιοχή του μυκηλίου, ενώ οι παράγοντες που σχετίζονται με την επάκρια αύξηση, τη βιοσύνθεση μεμβρανών και τη σηματοδότηση είναι εμπλουτισμένοι στην περιφέρεια της αποικίας. Επομένως, η ομοιόμορφη ακτινωτή αύξηση εξαρτάται πιθανά από την αποτελεσματική ανακατανομή των θρεπτικών στοιχείων και των μορίων από τις πηγές στις δεξαμενές τους. Πραγματικά, αντιθέτως με τον φυσικό τύπο του μύκητα, ο οποίος χαρακτηρίζεται από πολύ ομοιόμορφα αυξανόμενα μέτωπα υφών στην περιφέρεια της αποικίας, η μεταλλαγή *so*, ελαττωματική στη σύντηξη των υφών, επιδεικνύει ανομοιόμορφη περιφέρεια με διαφορές στη γραμμική αύξηση των ακραίων υφών (Fleißner *et al.*, 2005). Μια ελκυστική υπόθεση είναι ότι η έλλειψη διασυνδέσεων μεταξύ των υφών στη μεταλλαγή καταλήγει σε

ανομοιόμορφη κατανομή των θρεπτικών στοιχείων και των αυξητικών μορίων μεταξύ διαφορετικών περιοχών του μυκηλίου, προκαλώντας έτσι την άνιση αύξηση των υφών (Fleißner, 2012).

Άλλη μια σημαντική λειτουργία της σύντηξης των υφών αποτελεί η προώθηση της ακεραιότητας του μυκηλίου κατόπιν τραυματισμού. Οι αποικίες των υφομυκήτων αυξάνονται τυπικά ως πολυπύρηννα συγκύτια. Αν και αυτή η δομική οργάνωση παρέχει αναπτυξιακά πλεονεκτήματα, εντούτοις θέτει ολόκληρη την αποικία σε κίνδυνο ύστερα από ενδεχόμενο τραυματισμό επιμέρους τμημάτων της. Προκειμένου να αποφευχθεί η υπερβολική απώλεια κυτταροπλάσματος μετά από τον τραυματισμό, οι πόροι των σέπτων εκατέρωθεν του σημείου διαρροής φράσσονται γρήγορα από ένα εξειδικευμένο οργανίδιο εξαγωνικού σχήματος, το σωμάτιο Woronin (Woronin body) (Woronin, 1864; Tenney *et al.*, 2000). Αφού το τραυματισμένο τμήμα της υφής έχει αποφραχθεί, νέα επάκρια αύξηση ξεκινά από τα γειτονικά άθικτα διαμερίσματα. Αυτά τα νέα άκρα υφών αναπτύσσονται διαμέσου του κατεστραμμένου τμήματος και μπορούν να συντηχθούν, αποκαθιστώντας έτσι την κυτταροπλασματική συνέχεια της υφής (Buller, 1933; Fleißner, 2012).

Επιπρόσθετα, η δυνατότητα σχηματισμού αναστομώσεων μεταξύ γενετικά διαφορετικών «ατόμων», ως το πρώτο στάδιο του παραφυλετικού κύκλου, θεωρείται ότι προάγει τη γενετική ποικιλότητα μέσω του παραφυλετικού ανασυνδυασμού, ειδικά σε είδη που στερούνται φυλετικής αναπαραγωγής (Pontecorvo, 1956; Read & Roca, 2006). Αν και αυτή η διαδικασία έχει αποδειχθεί πολύτιμη για τη γενετική ανάλυση αφυλετικών ειδών μυκήτων, όπως το *Aspergillus niger* (Swart *et al.*, 2001), ο ρόλος της στη φύση παραμένει ασαφής. Στο φυσικό περιβάλλον η δημιουργία ετεροκαρύων περιορίζεται από τη βλαστική ασυμβατότητα, η οποία περιορίζει ή και αποτρέπει τη γενετική ροή και τον ανασυνδυασμό (Bégueret *et al.*, 1994; Glass *et al.*, 2000; Loubradou & Turcq, 2000).

Άλλη μια ενδιαφέρουσα προοπτική που έχει αρχίσει προσφάτως να διαφαίνεται για τον ρόλο της κυτταρικής σύντηξης στους υφομύκητες είναι η πιθανή σχέση της με την παθογονικότητα. Η σύντηξη φαίνεται να είναι κοινό χαρακτηριστικό που παρατηρείται συχνά σε διάφορες φάσεις της διαδικασίας μόλυνσης των φυτών-ξενιστών από φυτοπαθογόνους μύκητες, όπως οι *Colletotrichum* spp., *Magnaporthe grisea* και *F. oxysporum* (Chen & Wu, 1977; Latunte-Dada *et al.*, 1999; Prados-Rosales & Di Pietro, 2008). Μεταλλαγές διαγραφής των γονιδίων των μονοπατιών των MAP κινασών, αλλά και του γονιδίου *so*, οδηγούν σε απώλεια της δυνατότητας σύντηξης αλλά και της παθογονικότητας σε διάφορους φυτοπαθογόνους μύκητες, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις σε αυτήν τη συσχέτιση (Zhao *et al.*, 2007; Craven *et al.*, 2008; Maerz *et al.* 2008). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν πως τα μονοπάτια σηματοδότησης της σύντηξης των υφών και της παθογονικότητας είναι τουλάχιστον εν μέρει κοινά (Fleißner, 2012). Επιπλέον, ο σχηματισμός αππρεσσορίων (appressoria), εξειδικευμένων δομών μόλυνσης που προσκολλώνται σταθερά στους ιστούς των ξενιστών, έχει διάφορα χαρακτηριστικά που ομοιάζουν με τη σύντηξη κονιδίων και υφών. Τέλος, η σχέση μεταξύ αναστόμωσης υφών και μολυσματικής ικανότητας είναι γνωστή στη μυκοπαρασιτική αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή μεταξύ δύο ζυγομυκήτων. Η μόλυνση του *Absidia glauca* από το παράσιτό του *Parasitella parasitica* περιλαμβάνει τροπικές αλληλεπιδράσεις και επακόλουθη σύντηξη των υφών του ξενιστή με εκείνες του παθογόνου (Kellner *et al.*, 1993).

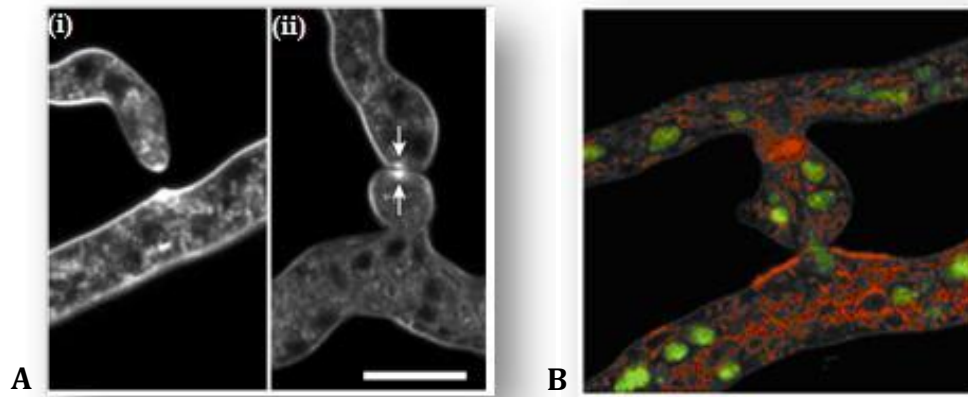
1.1.6 Σύγκριση της κυτταρικής σύντηξης στους υφομύκητες και τους ζυμομύκητες

Η σύζευξη του ζυμομύκητα *S. cerevisiae* αποτελεί το καλύτερα μελετημένο παράδειγμα διακυτταρικής σηματοδότησης στους μύκητες, και οδηγεί στη σύντηξη μεταξύ γενετικά διαφορετικών κυττάρων. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η πρόσδεση φερομονών στους αντίστοιχους *συζευγμένους με G-πρωτεΐνες υποδοχείς* (G-protein-coupled receptors, GPCRs) οδηγεί στη φωσφορυλίωση της MAP κινάσης Fus3 (Dohlman & Thorner, 2001; Qi & Elion, 2005; Chen *et al.*, 2007), την προσωρινή παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, τον πολυμερισμό της ακτίνης, την πολική αύξηση των «προεξοχών σύζευξης» (mating projections) και την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη σύζευξη. Η αναδιαμόρφωση των κυτταρικών τοιχωμάτων και η τοπική τους αποικοδόμηση δημιουργεί έναν πόρο που επιτρέπει τη σύντηξη των πλασματικών μεμβρανών, στην οποία συμμετέχει η πρωτεΐνη Prm1 (Chen *et al.*, 2007). Τόσο η σηματοδότηση μέσω ομόλογων MAP κινασών όσο και η πρωτεΐνη PRM-1 είναι απαραίτητες και για τη σύντηξη υφών στον υφομύκητα *N. crassa*, όπου παρατηρείται επίσης προσωρινή παύση του κυτταρικού κύκλου και συμμετοχή της ακτίνης (βλ. αντίστοιχη ενότητα). Αυτές οι παρατηρήσεις αποτελούν σημαντικές ενδείξεις ότι, παρά τους διαφορετικούς φυσιολογικούς τους ρόλους, οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί της κυτταρικής σύντηξης στους ζυμομύκητες και τους υφομύκητες είναι συντηρημένοι. Μάλιστα, ένα φαινόμενο αντίστοιχο με την ταλάντωση στην κατανομή της MAP κινάσης MAK-2 κατά τη σύντηξη των CATs στον *N. crassa* έχει καταγραφεί και κατά τη σύζευξη του *S. cerevisiae*, κατά την οποία συμβαίνει ταλαντωτική φωσφορυλίωση και, συνεπώς, ενεργοποίηση της MAP κινάσης Fus3 (Hilioti *et al.*, 2008). Ωστόσο, ο σηματοδοτικός μηχανισμός στα πρώτα στάδια της διαδικασίας είναι διαφορετικός στα δύο συστήματα, καθώς στην πορεία σύντηξης στον *N. crassa* δεν εμπλέκεται σηματοδότηση μέσω φερομονών-GPCRs (Read *et al.*, 2010), αντιθέτως με ό, τι συμβαίνει στον ζυμομύκητα.

1.2 Ετεροκαρύωση

Οι μύκητες απαντώνται συνήθως σε πολυσύχναστα ενδιαιτήματα και, επομένως, εμπλέκονται σε μια ποικιλία βιοτικών αλληλεπιδράσεων με άλλα «άτομα» του ίδιου είδους, άλλα είδη μυκήτων, διαφορετικούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ή ακόμα και πολυάριθμα βακτηριακά είδη. Μια ιδιαίτερα σημαντική πτυχή αυτών των αλληλεπιδράσεων, που κυμαίνονται από τη συμβίωση μέχρι τον παρασιτισμό, είναι η ικανότητα για αναγνώριση του ετέρου (Frey-Klett *et al.*, 2011; Leeder *et al.*, 2011).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του τρόπου ζωής των υφομυκήτων είναι η ικανότητά τους να υποβάλλονται σε συντήξεις (αναστομώσεις) υφών εντός των αποικιών τους, ώστε να σχηματίζουν μυκηλιακά δίκτυα, τα οποία θεωρείται ότι διασφαλίζουν την αποτελεσματική μεταφορά θρεπτικών στοιχείων και την κοινή χρήση των πόρων (Fleißner, 2012). Η σύντηξη βλαστητικών υφών όμως είναι δυνατή και μεταξύ υφών διαφορετικών αποικιών, κατόπιν της φυσικής επαφής τους, και μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία κυτταροπλασματικών γεφυρών μεταξύ των μυκηλίων τους. Μέσω αυτών διέρχεται το κυτταρόπλασμα, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων μεταβολιτών, οργανιδίων αλλά και πυρήνων (Εικόνα 1.9), δίνοντας έτσι γένεση σε ετεροκαρυωτικά μυκήλια που περιέχουν πυρήνες και διάφορα συστατικά και από τους δύο «εταίρους» (Glass *et al.*, 2000; Saupé, 2000). Η έννοια της ετεροκαρύωσης ορίστηκε από τους Hansen & Smith (1932) για την περιγραφή τέτοιων

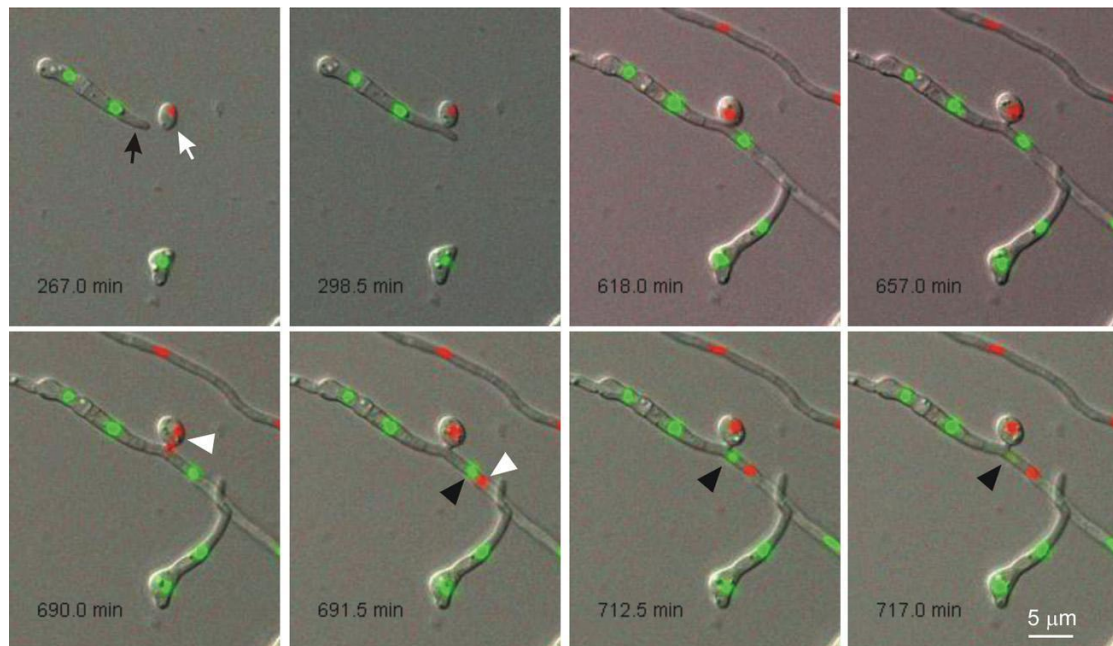


Εικόνα 1.9. Α. Φωτογραφίες από μικροσκοπικές παρατηρήσεις αναστόμωσης υφών του μύκητα *Neurospora crassa* με συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) κατόπιν χρώσης με τη φθορίζουσα χρωστική FM4-64. (i) Το άκρο μιας υφής αυξάνεται προς μια αναπτυσσόμενη προεξοχή (peg) μιας άλλης υφής· και στα δύο άκρα παρατηρούνται τα σωμάτια Spitzenkörper (στάδιο πριν την επαφή). (ii) Στάδιο μετά την επαφή: τα δύο άκρα σε επαφή έχουν διογκωθεί και η επάκρια αύξηση έχει σταματήσει, ωστόσο τα σωμάτια Spitzenkörper διακρίνονται ακόμα (από Hickey *et al.*, 2002). Β. Στάδιο μετά τη σύντηξη: οι μεμβράνες έχουν χρωματισθεί με τη φθορίζουσα χρωστική FM4-64 ενώ οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με ιστόνη H1::GFP. Διακρίνεται ξεκάθαρα η διέλευση πυρήνων μέσα από την αναστόμωση των υφών (η Α από Hickey *et al.*, 2002, η Β από Glass *et al.*, 2004).

περιπτώσεων ως «η κατάσταση του κυττάρου που περιέχει δύο ή περισσότερους γενετικά διαφορετικούς πυρήνες».

Αφού δημιουργηθεί ένα βιώσιμο ετεροκάρυο μεταξύ δύο στελεχών ενός μύκητα, η τύχη των γενετικά διαφορετικών πυρήνων μπορεί να διαφέρει σε διαφορετικούς τύπους μυκήτων, ως αποτέλεσμα της διαφορετικής πυρηνικής οργάνωσης και συμπεριφοράς. Τα περισσότερα κυτταρικά διαμερίσματα των υφών ορισμένων μυκήτων, όπως τα *Verticillium dahliae* και *Gibberella fujikuroi*, είναι μονοπύρνα και μετανάστευση πυρήνων μέσω των πόρων των σέπτων δεν έχει ποτέ παρατηρηθεί. Σε μύκητες με αυτήν την οργάνωση, η κατάσταση της ετεροκαρύωσης περιορίζεται στα κύτταρα που έχουν εμπλακεί τα ίδια σε γεγονότα αναστόμωσης, ενώ το υπόλοιπο μυκήλιο παραμένει ομοκαρυωτικό (Puhalla & Mayfield, 1974; Typas & Heale, 1976; 1977). Αντιθέτως με αυτόν τον τύπο οργάνωσης, η κατάσταση στην πλειονότητα των μελετημένων μυκήτων είναι διαφορετική· κάθε κυτταρικό διαμέρισμα μπορεί να είναι διπύρνο ή πολυπύρνο, περικλείοντας δεκάδες ή ακόμα και εκατοντάδες πυρήνες, ανάλογα με το είδος (π.χ. για τον μύκητα-μοντέλο *N. crassa* έχουν αναφερθεί μέχρι 100 ή και περισσότεροι πυρήνες ανά κυτταρικό διαμέρισμα, ενώ για τον *Aspergillus nidulans* η αντίστοιχη τιμή υπολογίζεται να φθάνει περίπου τους 60 πυρήνες ανά κύτταρο), και σε πολλούς από αυτούς τους μύκητες έχει παρατηρηθεί πως οι πυρήνες μπορούν να μεταναστεύουν ελεύθερα μεταξύ των κυττάρων, διερχόμενοι μέσω των πόρων των σέπτων που διαχωρίζουν τα κυτταρικά διαμερίσματα (ανασκόπηση από Roper *et al.*, 2011). Σε τέτοια συστήματα είναι δυνατή η μετανάστευση, κατόπιν διαδοχικών διπλασιασμών, των γενετικά διαφορετικών πυρήνων ενός ετεροκαρύου στα γειτονικά κύτταρα, με τελικό αποτέλεσμα την επέκταση της ετεροκαρυωτικής κατάστασης σε ολόκληρο το μυκήλιο (Glass *et al.*, 2000; Saupé, 2000).

Όταν γενετικά όμοιες υφές συντήκονται στον φυτοπαθογόνο μύκητα *F. oxysporum*, παρατηρείται μια ενδιαφέρουσα πυρηνική συμπεριφορά (Εικόνα 1.10). Ο σχηματισμός μιας



Εικόνα 1.10. Χρονική διαδοχή φωτογραφιών (από μικροσκοπία φθορισμού) της σύντηξης δύο άκρων υφών, μεταξύ ενός τμήματος υφής με πυρήνες σημασμένους με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (μαύρο βέλος) και ενός κονιδίου σε βλάστηση, με πυρήνες σημασμένους με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη ChFP (λευκό βέλος) του μύκητα *Fusarium oxysporum*. Κατόπιν της αναστόμωσης, ο πυρήνας που φέρει τη σήμανση της ChFP διαιρείται, και ο ένας θυγατρικός πυρήνας (λευκά βέλη) μεταναστεύει μέσω του πόρου της σύντηξης στο γειτονικό κύτταρο, προσπερνώντας έναν πυρήνα σημασμένο με GFP (μαύρα βέλη), ο φθορισμός του οποίου εξαφανίζεται μετά από 25 min (από Ruiz-Roldán *et al.*, 2010).

γέφυρας αναστόμωσης μεταξύ των μονοπύρηνων διαμερισμάτων δύο υφών ακολουθείται από μια μιτωτική πυρηνική διαίρεση στο αναστομωμένο κύτταρο της μιας υφής. Ακολούθως, ένας από τους δύο θυγατρικούς πυρήνες μεταναστεύει μέσω της γέφυρας στο αναστομωμένο διαμέρισμα της άλλης υφής, γεγονός το οποίο ακολουθείται από αποικοδόμηση του οικείου πυρήνα (Ruiz-Roldán *et al.*, 2010). Αυτός ο ιδιαίτερος μηχανισμός ίσως εξασφαλίζει τη σταθερότητα του αριθμού των πυρήνων στα τυπικά μονοπύρηννα κυτταρικά διαμερίσματα του *F. oxysporum*. Αντιθέτως, στον μύκητα *N. crassa*, του οποίου οι υφές αποτελούνται από πολυπύρηννα διαμερίσματα, δεν παρατηρείται παρόμοια πυρηνική συμπεριφορά κατά τη συμβατή σύντηξη (Roca *et al.*, 2010).

Παρότι η διαδικασία σύντηξης (αναστόμωσης) των βλαστητικών υφών προς δημιουργία βιώσιμων ετεροκαρύων μεταξύ γενετικά διαφορετικών αποικιών μυκήτων είναι δυνατή σε πολλά είδη μυκήτων, δεν συμβαίνει μεταξύ των αποικιών με όλους τους δυνατούς γονότυπους. Είναι γνωστό από πολλά χρόνια πως κατά την επαφή διαφορετικών στελεχών ενός μύκητα, ο σχηματισμός βιώσιμων ετεροκαρύων παρεμποδίζεται σε πολλές περιπτώσεις από τη λειτουργία συστημάτων ασυμβατότητας (Caten & Jinks, 1966; Heale, 1966). Σήμερα είναι γενικά αποδεκτό πως ο σχηματισμός βιώσιμων ετεροκαρύων μεταξύ δύο γενετικά διαφορετικών στελεχών ενός μύκητα είναι επιτρεπτός μόνον εφόσον αυτά δεν διαφέρουν γενετικά σε ένα σύνολο γονιδίων που ελέγχουν την ετεροκαρύωση· σε αντίθετη περίπτωση, πυροδοτείται η απόκριση της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας, η οποία καταλήγει στην

καταστροφή των ετεροκαρυωτικών κυττάρων μέσω μιας πορείας προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Glass *et al.*, 2000; Sauré, 2000; Hutchison & Glass, 2012).

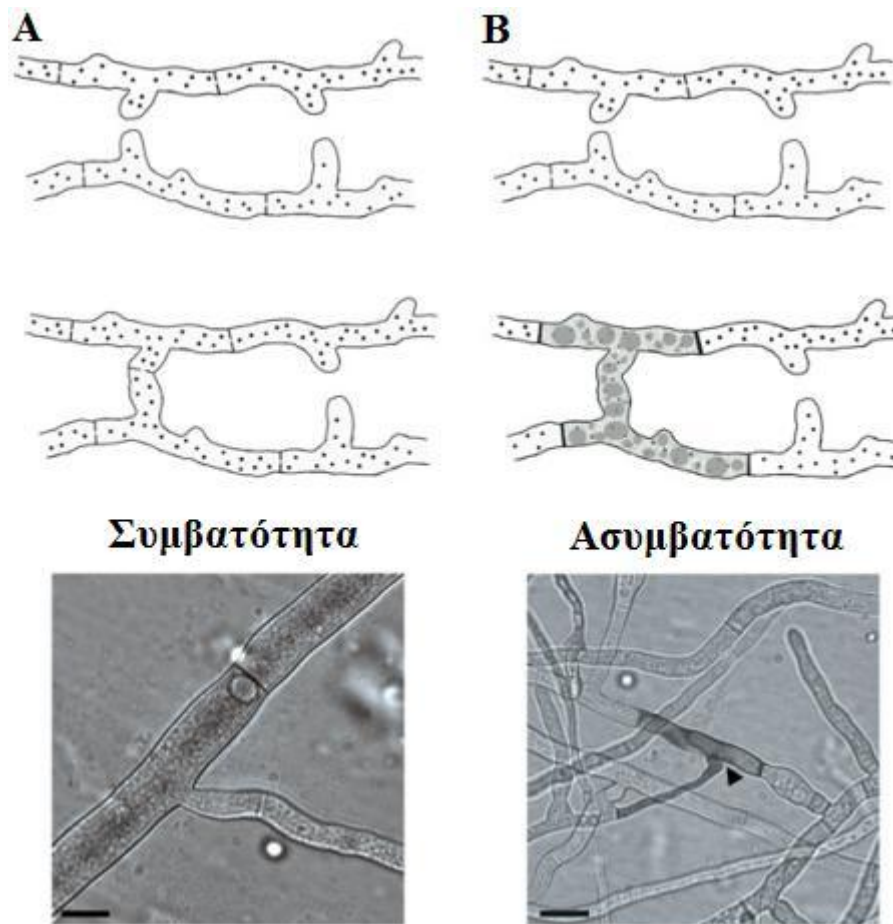
1.3 Ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα

1.3.1 Μηχανισμοί αναγνώρισης του ιδίου (self) από το έτερον (non-self)

Η ύπαρξη μηχανισμών για τη διάκριση του ιδίου από το έτερον είναι διαδεδομένοι σε όλο το φάσμα του έμβιου κόσμου, συμπεριλαμβανομένων των ευκαρυωτικών και των προκαρυωτικών οργανισμών, και παρουσιάζει αξιοσημείωτη εξελικτική ποικιλία. Το πλέον γνωστό παράδειγμα είναι το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών, που διακρίνεται σε έμφυτες και προσαρμοστικές αποκρίσεις· κύριο χαρακτηριστικό των τελευταίων είναι η παραγωγή – μέσω σωματικού ανασυνδυασμού – των πολυμορφικών πρωτεϊνών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), οι οποίες συμμετέχουν στη διάκριση του ιδίου από το έτερον (Chaplin, 2010). Άλλα αντίστοιχα συστήματα αναγνώρισης απαντώνται σε κατώτερα ευκαρυωτικά ασπόνδυλα, όπως το αποικιακό ασκίδιο *Botryllus schlosseri* (McKittrick & De Tomaso, 2010) και το κνιδόζωο *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cadavid, 2004), όπου πολυμορφικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν τις αποκρίσεις στο έτερον (Rosa *et al.*, 2010). Η ικανότητα των φυτών να διακρίνουν το ίδιο από το έτερον μοιράζεται πολλές μηχανιστικές ομοιότητες με τις διαδικασίες των ζώων (Ronald & Beutler, 2010), και είναι απαραίτητη τόσο για την προστασία από παθογόνα, όσο και για την αποφυγή της αυτογονιμοποίησης σε πολλά είδη (Dodds & Rathjen, 2010). Στα πρώτιστα, η αμοιβάδα *Dictyostelium discoideum* επιδεικνύει παρόμοια συμπεριφορά αναγνώρισης και έχει την ικανότητα να επιτρέπει την πρόσβαση στα καρποσώματα μόνον στους ίδιους γονοτύπους (Li & Rugganan, 2010), ενώ στην πολυκύτταρη αμοιβάδα *Physarum polycephalum* έχουν αναφερθεί αντιδράσεις ασυμβατότητας κατόπιν βλαστητικής σύντηξης (Lane & Carlile, 1979). Πρόσφατα, έχουν επίσης αναφερθεί μηχανισμοί για την προκαρυωτική διάκριση του ιδίου από το έτερον, με ποικιλία στους υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς (Gibbs *et al.*, 2008; Be'er *et al.*, 2009; Velicer & Vos, 2009; MacIntyre *et al.*, 2010). Οι υφομύκητες, τέλος, χαρακτηρίζονται από έναν πολύπλοκο μηχανισμό για τη διάκριση της γενετικής ταυτότητας, που ονομάζεται ετεροκαρυωτική ή βλαστητική ασυμβατότητα (Glass & Dementhon, 2006; Lu, 2006; Pinan-Lucarré *et al.*, 2007; Hutchison & Glass, 2012).

1.3.2 Μηχανισμοί αναγνώρισης στους μύκητες

Όταν δύο διαφορετικές αποικίες ενός υφομύκητα έλθουν σε επαφή, οι υφές τους μπορούν να συντηχθούν και να σχηματίσουν ένα ετεροκαρυωτικό μυκήλιο, το οποίο περιλαμβάνει πυρήνες και κυτταρικά συστατικά και από τους δύο «εταίρους». Ωστόσο, σχηματισμός βιώσιμων, σταθερών ετεροκαρυών μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνον εάν τα δύο στελέχη που συντήκονται είναι γενετικά ταυτόσημα σε όλα τα γονίδια ετεροκαρύωσης *het* (*heterokaryon incompatibility*) ή αλλιώς *vic* (*vegetative incompatibility*). Τα γονίδια *het* ορίζονται ως εκείνα τα γονίδια για τα οποία η ετεροζυγωτία δεν είναι ανεκτή σε ένα ετεροκάρυο (Glass & Kaneko, 2003). Εάν οι δύο αποικίες διαφέρουν γενετικά σε ένα ή περισσότερα γονίδια *het*, που είναι και το πιθανότερο σενάριο στη φύση, το κύτταρο που



Εικόνα 1.11. Σχηματική αναπαράσταση και φωτογραφίες από μικροσκοπική παρατήρηση αλληλεπιδράσεων συμβατών και ασύμβατων υφών του μύκητα *Neurospora crassa*. **A.** Εάν δύο υφές είναι γενετικά όμοιες, μπορούν να αλληλεπιδράσουν χημειοτροπικά με επιτυχία, και συντηξείς μεταξύ τους δημιουργούν ένα βιώσιμο ετεροκάρυο. **B.** Εάν δύο υφές διαφέρουν γενετικά σε οποιοδήποτε από τα γονίδια *het*, η σύντηξη μπορεί ακόμα να συμβεί, αλλά το αναστομωμένο κύτταρο αποκλείεται από το υπόλοιπο μυκήλιο και πυροδοτείται γρήγορα η αντίδραση κυτταρικού θανάτου. Φωτογραφίες από μικροσκοπία αντίθετης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski) κάτω από διάγραμμα απεικονίζουν παραδείγματα συμβατών και ασύμβατων ετεροκαρύν φυσικού τύπου, κατόπιν χρώσης με μια ζωτική χρωστική (κυανό του μεθυλενίου) που συσσωρεύεται ειδικά στα νεκρά κύτταρα, όπως στο παράδειγμα του ασύμβατου ετεροκαρύου στην περίπτωση (B) (προσαρμογή από Hutchison & Glass, 2012).

προκύπτει από τη σύντηξη αποκλείεται γρήγορα από το υπόλοιπο μυκήλιο με έμφραξη των πόρων των σέπτων και εισέρχεται ακολούθως σε μια πορεία *προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου* (*programmed cell death*, PCD), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.11. Σε αυτήν την περίπτωση τα δύο στελέχη θεωρούνται ασύμβατα (Glass *et al.*, 2000; Saupé, 2000; Glass & Dementhon, 2006; Pinan-Lucarré *et al.*, 2007). Η *ετεροκαρνωτική ασυμβατότητα* (*heterokaryon incompatibility*, HI) ή βλαστητική ασυμβατότητα έχει μελετηθεί κυρίως στους ασκομύκητες-μοντέλα *N. crassa*, *Podospora anserina* και *Cryphonectria parasitica*, αλλά επίσης και σε αντιπροσώπους βασιδιομυκήτων (Worrall, 1997) και σε ενδομυκορριζικούς μύκητες (Giovannetti *et al.*, 2006).

Σε διάφορα είδη μυκήτων, όπως τα *Rhizoctonia solani* (Hyakumachi & Ui, 1987), *Gibberella fujikuroi* (Correll *et al.*, 1989), *Glomus mosseae* (Giovannetti *et al.*, 2003) και *Tuber borchii* (Sbrana *et al.*, 2007), έχει παρατηρηθεί πως οι υφές των ασύμβατων στελεχών

έχουν τη δυνατότητα αναγνώρισης πριν τη σύντηξη, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η αναστόμωση όταν τα στελέχη που έρχονται σε επαφή είναι ασύμβατα. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της σηματοδότησης της σύντηξης υφών και της αναγνώρισης του ετέρου. Από την άλλη πλευρά, στα περισσότερα μελετημένα είδη, όπως τα *N. crassa* και *P. anserina*, οι υφές των ασύμβατων στελεχών συντήκονται προς σχηματισμό ετεροκαρύων, αλλά τα αναστομωμένα κύτταρα αποκλείονται από το μυκήλιο και υποβάλλονται γρήγορα σε PCD (Glass & Kaneko, 2003). Συνεπώς, η όλη πορεία της ΗΙ μπορεί να διαιρεθεί σε δύο φάσεις, η πρώτη εκ των οποίων περιλαμβάνει τους μηχανισμούς για την αναγνώριση και τη διάκριση του ιδίου από το έτερον, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει τους μηχανισμούς που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Έτσι, οι μηχανισμοί αναγνώρισης λειτουργούν μαζί με ένα μονοπάτι PCD προκειμένου να επιτρέπεται η δημιουργία ετεροκαρύων μεταξύ μόνον γενετικά όμοιων «ατόμων».

Πρόσφατη μελέτη της βλαστητικής σύντηξης στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Colletotrichum lindemuthianum* με φθορίζοντες πυρηνικούς δείκτες (Ishikawa *et al.*, 2012) απέδειξε πως η σύντηξη υφών ώριμων αποικιών ασύμβατου γονότυπου οδήγησε γρήγορα στον PCD λόγω ΗΙ, όπως ήταν αναμενόμενο. Ωστόσο, η σύντηξη μέσω CATs των βλαστημένων κονιδίων των ίδιων ασύμβατων στελεχών ήταν εφικτή και δεν πυροδότησε την απόκριση της ΗΙ, αλλά οδήγησε στη δημιουργία σταθερών ετεροκαρυωτικών αποικιών. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν πως η απόκριση ΗΙ καταστέλλεται κατά τα αρχικά στάδια εδραίωσης της αποικίας στο είδος *C. lindemuthianum*, και συνεπώς είναι πιθανό η σύντηξη των CATs να συμβάλει στην αύξηση της γενετικής ποικιλότητας ειδικά στους αφυλετικούς μύκητες (Ishikawa *et al.*, 2012).

1.3.3 Λειτουργία – βιολογική σημασία της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας

Η ΗΙ είναι ένα φαινόμενο διαδεδομένο στους υφομύκητες, αλλά η λειτουργία της και η βιολογική της σημασία δεν είναι ακόμα προφανείς. Δύο εναλλακτικές θεωρίες έχουν διατυπωθεί προς απάντηση αυτών των ερωτημάτων, η υπόθεση του μηχανισμού αναγνώρισης και η υπόθεση της εξελικτικής τυχαιότητας (Glass *et al.*, 2000; Sauré *et al.*, 2000). Σύμφωνα με την πρώτη υπόθεση, του μηχανισμού αναγνώρισης, οι πολυμορφισμοί στα γονίδια *het* διατηρούνται λόγω επιλογής, καθώς η ικανότητα περιορισμού του σχηματισμού ετεροκαρύων κατόπιν αναγνώρισης της γενετικής ταυτότητας προσδίδει επιλεκτικά πλεονεκτήματα στους μύκητες. Σε αυτά τα πλεονεκτήματα ανήκουν ο περιορισμός της οριζόντιας μεταφοράς μολυσματικών κυτταροπλασματικών στοιχείων, όπως οι ιοί, τα μεταθετά στοιχεία, τα πλασμίδια γήρανσης και τα κατεστραμμένα οργανίδια (Caten, 1972), καθώς και η αποφυγή διαφόρων μορφών πυρηνικού παρασιτισμού, όπως στην περίπτωση αρμοστικού πλεονεκτήματος κάποιου γονότυπου σε σχέση με άλλους (Hartl *et al.*, 1975).

Με την πάροδο των ετών έχουν συσσωρευθεί πολλές ενδείξεις που συνηγορούν υπέρ της θεωρίας του μηχανισμού αναγνώρισης, η οποία είναι η επικρατής σήμερα (Hutchison & Glass, 2012). Η ΗΙ έχει σημαντικές συνέπειες για τους μύκητες, καθώς πράγματι αποτρέπει τη μεταφορά επιβλαβών γενετικών στοιχείων μεταξύ αποικιών, συμπεριλαμβανομένων των μυκοϊών (mycoviruses) και των πλασμιδίων γήρανσης (senescence plasmids)· έχει υποτεθεί πως η ΗΙ λειτουργεί ως ένα έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα των μυκήτων (Paoletti & Sauré, 2009). Η επίδραση της ΗΙ στη μετάδοση ιών μεταξύ των αποικιών έχει μελετηθεί διεξοδικά στον φυτοπαθογόνο μύκητα *C. parasitica* (Cortesi *et al.*, 2001; Milgroom & Cortesi, 2004). Η μόλυνση του *C. parasitica* με ιούς προκαλεί έναν φαινότυπο υπομολυσματικότητας, και έτσι

οι μυκοϊοί έχουν χρησιμοποιηθεί ως παράγοντες βιοελέγχου (Milgroom & Cortesi, 2004). Οι ιοί των μυκήτων γενικά στερούνται εξωκυτταρικής φάσης στον μολυσματικό τους κύκλο, και εξαρτώνται από την κυτταροπλασματική μεταφορά μέσω σύντηξης υφών, και όχι από εξωτερική μόλυνση, για τη μετάδοση σε νέους ξενιστές (Nuss, 2010). Διαφορές στα γονίδια *het* σε έναν πληθυσμό του μύκητα προκαλούν μια σημαντική ελάττωση στον ρυθμό μετάδοσης των ιών, μέσω του περιορισμού της κυτταροπλασματικής μεταφοράς μεταξύ αποικιών του *C. parasitica* (Cortesi *et al.*, 2001; Biella *et al.*, 2002). Επιπλέον, διαφορές στα γονίδια *het* είναι ικανές να αποτρέψουν πλήρως τη μεταφορά ιών σε είδη του γένους *Aspergillus* (van Diepeningen *et al.*, 1997), και να περιορίσουν τη μετάδοση μορίων dsRNA (double-stranded RNA) που σχετίζονται με την υπομολυσματικότητα στο παθογόνο είδος *Sclerotinia homoeocarpa* (Deng *et al.*, 2002). Για αυτόν τον λόγο, σε όσες περιπτώσεις η ποικιλομορφία των γονιδίων *het* σε έναν πληθυσμό μυκήτων είναι υψηλή, ο βιολογικός έλεγχος με τη χρήση ιών έχει μικρή πιθανότητα να είναι αποτελεσματικός (Milgroom & Cortesi, 2004).

Μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα περίπτωση είναι εκείνη του παθογόνου της «ολλανδικής ασθένειας της φτελιάς» (Dutch elm disease), *Ophiostoma novo-ulmi* (Brasier, 1991). Αυτό το παθογόνο μολύνει τυπικά μια νέα περιοχή ως κλωνικός πληθυσμός, ο οποίος αναμένεται να είναι επιρρεπής στην ική μόλυνση. Όπως και το είδος *C. parasitica*, έτσι και το *O. novo-ulmi* καθίσταται υπομολυσματικό κατόπιν ικής μόλυνσης (Paoletti *et al.*, 2006). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί πως το *O. novo-ulmi* μπορεί να αποκτήσει τη γενετική πληροφορία για τον αντίθετο συζευκτικό τύπο, αλλά και εναλλακτικά αλληλόμορφα των γονιδίων *het*, από σπάνια γεγονότα διασταύρωσης με το είδος *O. ulmi*. Η γενετική ποικιλομορφία στα γονίδια *het* μπορεί να περιορίσει τη σύντηξη στον πληθυσμό και, συνεπώς, τη μεταφορά ιών μεταξύ στελεχών του *O. novo-ulmi*, ενώ η ικανότητα για φυλετική σύζευξη πιθανά παρέχει επιλεκτικό πλεονέκτημα στους απογόνους με γενετικές διαφορές σε πολλαπλά γονίδια *het* (Paoletti *et al.*, 2006). Επομένως, αυτή η μελέτη παρέχει ισχυρές ενδείξεις ότι οι γενετικές διαφορές στα γονίδια *het* μπορούν να εμποδίσουν αποτελεσματικά τη μετάδοση ιών, καθώς επίσης και να επηρεάσουν την πληθυσμιακή δομή των μυκήτων.

Εκτός από την ανασταλτική επίδραση στη μετάδοση των ιών, η ΗΙ έχει αποδειχθεί πως περιορίζει τη μεταφορά ενός μιτοχονδριακού φαινοτύπου γήρανσης στον μύκητα *P. anserina* (Aanen *et al.*, 2010) και μιτοχονδριακών πλασμιδίων γήρανσης στους *N. crassa* και *P. anserina* (Debets *et al.*, 1994; Debets *et al.*, 2012). Τα μιτοχονδριακά πλασμίδια γήρανσης είναι κυκλικά μόρια DNA που ενσωματώνονται στο μιτοχονδριακό DNA των μυκήτων και προκαλούν συχνά θνησιγόνες μεταλλαγές· τα ελαττωματικά μιτοχόνδρια διαρούνται ταχύτερα από τα λειτουργικά, με αποτέλεσμα τη σταδιακή καταστροφή της αποικίας (Maheshwari & Navaraj, 2008).

Άλλη μια περίπτωση στην οποία η ΗΙ επιφέρει επιλεκτικό πλεονέκτημα στους μύκητες είναι η παραγωγή αφλατοξινών στους Ασπέργιλλους. Η παραγωγή αφλατοξινών είναι σημαντικά υψηλότερη σε συμβατές ετεροκαρωτικές «διασταυρώσεις» και χαμηλότερη σε ασύμβατες. Επομένως, τα μυκηλιακά δίκτυα που σχηματίζονται από συντήξεις μεταξύ συμβατών υφών προσφέρουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα (Wicklowsky & Horn, 2007).

Τέλος, τα αποτελέσματα των Debets & Griffiths (1998) υποδηλώνουν πως η ΗΙ αποτρέπει την «υπεξαίρεση πόρων» (resource plundering) των μητρικών μυκηλίων από γενετικά διαφορετικά στελέχη, επιτρέποντας μόνον σε γενετικά ταυτόσημα στελέχη την πρόσβαση στα θρεπτικά στοιχεία και τους πόρους των μητρικών «ιστών». Συμπερασματικά, οι διαφορές στα γονίδια *het* αποτελούν – τουλάχιστον εν μέρει – εμπόδιο στη μετάδοση

επιβλαβών στοιχείων μεταξύ των υφών, ειδικά κυτταροπλασματικών στοιχείων, μπορούν να επηρεάσουν την πληθυσμιακή δομή των μυκήτων διαμέσου επιλεκτικών πλεονεκτημάτων που προσφέρουν σε αυτούς, και επιπλέον αποτρέπουν τον παρασιτισμό μεταξύ διαφορετικών γονοτύπων στους πληθυσμούς των υφομύκητων.

Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με την εναλλακτική θεωρία, της εξελικτικής τυχαιότητας, η ΗΙ υφίσταται τυχαία χωρίς να αποτελεί αντικείμενο επιλογής. Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση, σε κάθε πληθυσμό μυκήτων υπάρχει ένας αριθμός επιλεκτικά ουδέτερων μεταλλαγών· τα γονίδια *het* θα μπορούσαν να αποτελούν εκείνο το κλάσμα των ουδέτερων πολυμορφικών γονιδίων, για τα οποία η συνύπαρξη των αλληλομόρφων τους σε κοινό κυτταρόπλασμα τυχαίνει να είναι καταστροφική (Bégueret *et al.*, 1994; Saupé, 2000). Κατά τη θεωρία της τυχαιότητας, εφόσον τα γονίδια *het* δεν διατηρούνται εξελικτικά για να περιορίζουν την ετεροκαρύωση, θα ήταν πολύ πιθανό να έχουν άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Πράγματι, τέτοιες λειτουργίες έχουν διαπιστωθεί για αρκετά από τα γονίδια *het*, χωρίς πάντως αυτό να αποκλείει και την πρώτη υπόθεση, του μηχανισμού ετερο-αναγνώρισης. Σε τελική ανάλυση, η ορθότητα των δύο εναλλακτικών υποθέσεων μπορεί να ελεγχθεί με πληθυσμιακές αναλύσεις, με κριτήριο τη βασική εξελικτική υπόθεση στην οποία βασίζεται έκαστη, δηλαδή τη διατήρηση των πολυμορφικών γονιδίων *het* λόγω θετικής επιλογής κατά τη θεωρία του μηχανισμού ετερο-αναγνώρισης, έναντι της υποκείμενης επιλεκτικής ουδετερότητας, κατά την υπόθεση της τυχαιότητας (Saupé, 2000). Τα περισσότερα διαθέσιμα δεδομένα συνηγορούν σήμερα υπέρ της πρώτης θεωρίας (βλ. επόμενες παραγράφους).

1.3.4 Χαρακτηριστικά των προγραμμάτων κυτταρικού θανάτου στους υφομύκητες

A. Εισαγωγικά στοιχεία

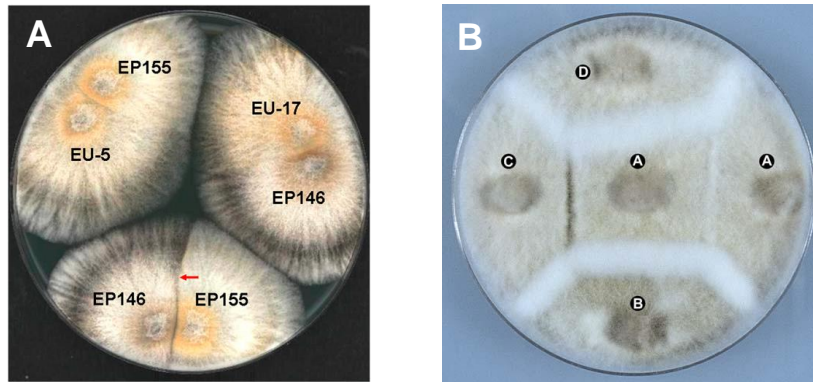
Στους υφομύκητες η ΗΙ είναι λειτουργικά συνδεδεμένη με τον κυτταρικό θάνατο, ώστε η σύντηξη και η κοινή χρήση των πόρων να επιτρέπονται μόνον σε γενετικά όμοια στελέχη. Τα προγράμματα κυτταρικού θανάτου, όπως και τα προγράμματα αναγνώρισης του ίδιου και διάκρισης από το έτερον, είναι διαδεδομένα σε ευρύ φάσμα οργανισμών και διακρίνονται σε δύο γενικές κατηγορίες, τα αποπτωτικά (τύπος I) και τα μη αποπτωτικά (Degterev & Yuan, 2008). Πολλά εναλλακτικά μη αποπτωτικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου, συμπεριλαμβανομένων της αυτοφαγίας (τύπος II) και της νεκρόπτωσης (necroptosis), είναι σημαντικά για τον κυτταρικό θάνατο και την ανάπτυξη (Degterev & Yuan, 2008; Yuan & Kroemer, 2010). Εκτός από την ΗΙ, οι υφομύκητες χρησιμοποιούν μηχανισμούς PCD σε ολόκληρο τον κύκλο ζωής τους και την ανάπτυξή τους, για παράδειγμα κατά την ανάπτυξη των βασιδιοκαρπίων, τη διαδικασία μόλυνσης και τη γήρανση (Mousavi & Robson, 2003; Emri *et al.*, 2005; Hamann *et al.*, 2008). Είναι αξιοσημείωτο πως οι μορφολογικές και ορισμένες βιοχημικές αλλαγές που παρατηρούνται στα κύτταρα που καταστρέφονται λόγω της ΗΙ (βλ. επόμενη παράγραφο) ομοιάζουν με αντίστοιχα χαρακτηριστικά του PCD ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (Konopleva *et al.*, 1999), αν και υπάρχουν πρόσφατα δεδομένα που υποδηλώνουν ότι το συγκεκριμένο μονοπάτι κυτταρικού θανάτου που επάγεται από την ΗΙ είναι ειδικό για τους μύκητες και μοναδικό στην απόκριση της ΗΙ (βλ. επόμενες παραγράφους).

B. *Μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από την ετεροκαρνωτική ασυμβατότητα – ζώνες αντεπίδρασης (barrage zones)*

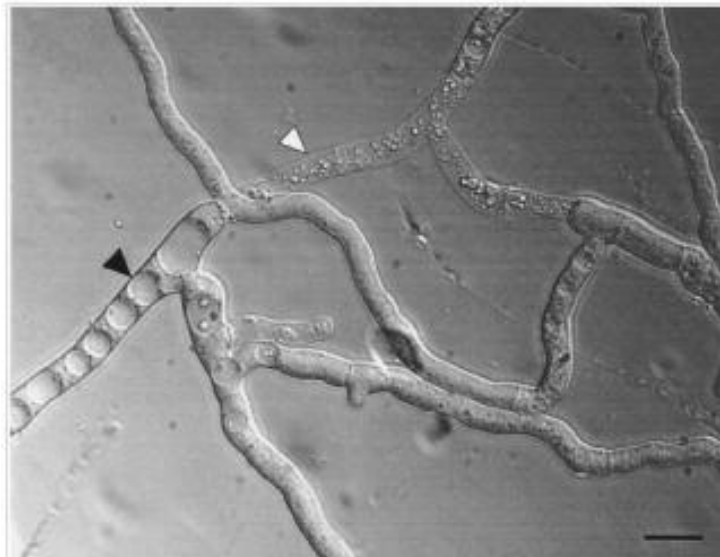
Μακροσκοπικά, ο φαινότυπος του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από την ΗΙ στην περιοχή επαφής των αποικιών δύο ασύμβατων στελεχών μυκήτων συχνά αποτελείται από τον σχηματισμό μιας ζώνης αντεπίδρασης (barrage ή demarcation ή aversion zone) κατά μήκος της περιοχής επαφής (Εικόνα 1.12). Αυτή έχει υποτεθεί πως αποτελεί έναν τύπο αναγνώρισης του ετέρου και έχει χρησιμοποιηθεί για την κατάταξη στελεχών των μυκήτων σε ομάδες μυκηλιακής συμβατότητας (Leslie, 1993; Smith *et al.*, 2006). Οι ζώνες αντεπίδρασης είναι συνήθως υπερυψωμένες με έντονη απόθεση χρωστικής ή άλλοτε με χαρακτηριστική απουσία υφών (διαυγείς ζώνες) (Esser & Meinhardt, 1984; Worrall, 1997; Micalí & Smith, 2003; Pinan-Lucarré *et al.*, 2007). Η παραγωγή ζωνών αντεπίδρασης και η ΗΙ έχει θεωρηθεί πως αποτελούν διαφορετικές εκφάνσεις της ίδιας λειτουργίας ασυμβατότητας, μια υπόθεση που υποστηρίζεται από την υψηλή συσχέτιση των δύο φαινομένων σε ορισμένα είδη μυκήτων, όπως τα *P. anserina* και *Fusarium graminearum* (Rizet, 1952; Leslie, 1993; McCallum *et al.*, 2004). Ωστόσο, ο σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης δεν σχετίζεται πάντοτε με την ΗΙ, όπως έχει τεκμηριωθεί στα είδη *N. crassa*, *Sclerotinia sclerotiorum* και *C. parasitica* (Ford *et al.*, 1995; Micalí & Smith, 2003; Smith *et al.*, 2006), και η εμφάνιση των ζωνών αυτών μπορεί να ποικίλει σημαντικά (Micalí & Smith, 2003; Aanen *et al.*, 2010; Ikeda *et al.*, 2011). Τα ασύμβατα ετεροκάρυα επιδεικνύουν επίσης γενικά ελαττωμένη αύξηση και έλλειψη κονιδιογένεσης (Aanen *et al.*, 2010).

Η μικροσκοπική δομή και ο κυτταρικός φαινότυπος του PCD έχει χαρακτηριστεί λεπτομερώς για λίγους υφομύκητες, κυρίως για τους μύκητες-μοντέλα *N. crassa* και *P. anserina* (Εικόνες 1.13 και 1.14). Σε αυτά τα είδη παρατηρείται αλλαγή του σχήματος των κυτταροπλασματικών κυστιδίων από κυλινδρικά σε στρογγυλά, πλήρωση των κυττάρων από τα κυστίδια που συντήκονται, και μετατόπιση των γνωστών πρωτεϊνών αυτοφαγίας στο κενοτόπιο. Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένος σχηματισμός σέπτων και έμφραξη των πόρων τους (πιθανώς προκειμένου να εξασφαλισθεί ο αποκλεισμός των ασύμβατων ετεροκαρνωτικών κυτταρικών διαμερισμάτων από το υπόλοιπο μυκήλιο), συσσώρευση σταγονιδίων λιπιδίων και ανώμαλη απόθεση υλικού του κυτταρικού τοιχώματος, αποικοδόμηση οργανιδίων, κατακερματισμός του DNA και συρρίκνωση της πλασματικής μεμβράνης, προτού το κύτταρο καταστραφεί με τη διάρρηξη της μεμβράνης των κυστιδίων, αλλά και της πλασματικής μεμβράνης (Jacobson *et al.*, 1998; Marek *et al.*, 1998; Glass *et al.*, 2000; Marek *et al.*, 2003; Pinan-Lucarré *et al.*, 2003; 2005). Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει πως η πυροδότηση της ΗΙ συνοδεύεται από γενική ελάττωση της πρωτεϊνσύνθεσης και της παραγωγής RNA (Labarère *et al.*, 1974), ενώ ταυτόχρονα εμφανίζονται νέες πρωτεΐνες (Boucherie *et al.*, 1981) και αυξάνονται οι ενεργότητες φαινολοξειδασών, αφυδρογονασών (π.χ. του μηλικού/NADH), οξειδασών αμινοξέων και πρωτεασών (Bégueret & Bernet, 1973; Boucherie & Bernet, 1978; Bourges *et al.*, 1998). Η επαγωγή της αυτοφαγίας από τη ραπαμυκίνη (rapamycin) προκαλεί τον ίδιο φαινότυπο με εκείνον της ΗΙ (Dementhon *et al.*, 2003). Ωστόσο, μεταλλαγές σε γονίδια που απαιτούνται για την αυτοφαγία επιταχύνουν τον κυτταρικό θάνατο, υποδηλώνοντας πως η αυτοφαγία είναι μια απόκριση στην ΗΙ και δεν εμπλέκεται στην πρόκληση του κυτταρικού θανάτου (Pinan-Lucarré *et al.*, 2005).

Ο ασκομύκητας *Rosellinia necatrix* επιδεικνύει επίσης έναν φαινότυπο PCD που χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλών κυστιδίων, την κατάρρευση της μεμβράνης του κενοτοπίου, και εν συνεχεία αλλαγές στην πυρηνική δομή και την καταστροφή της

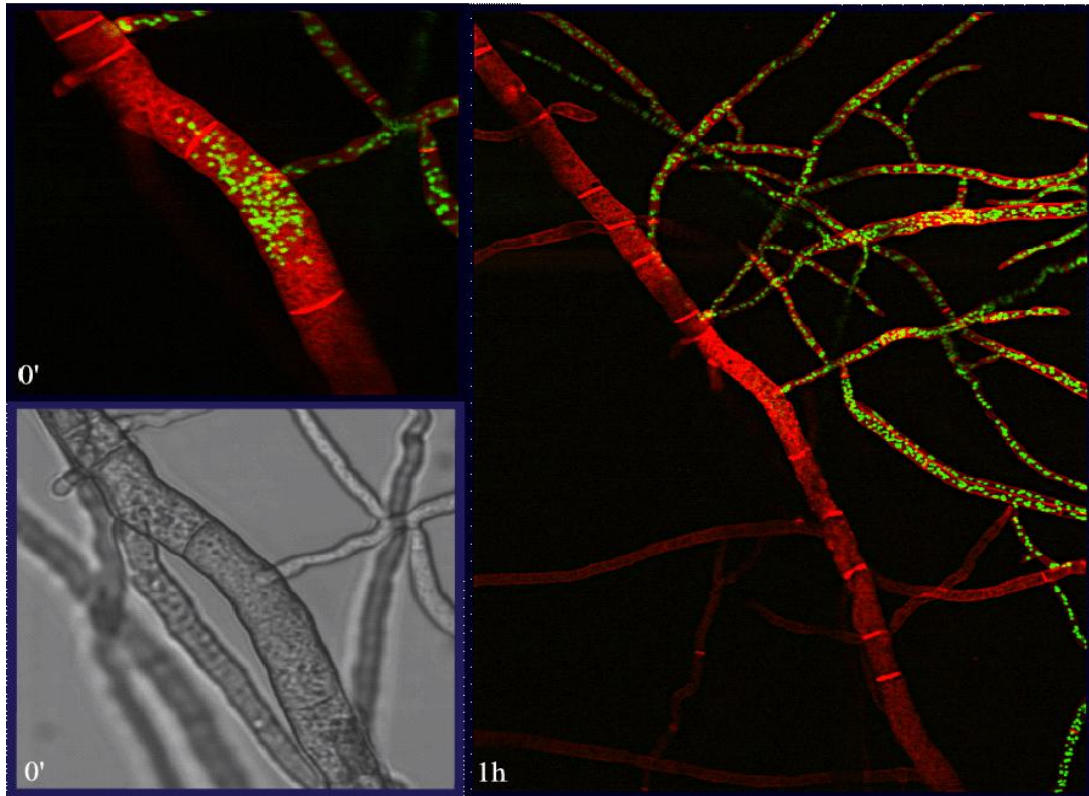


Εικόνα 1.12. Μακροσκοπική μορφολογία συμβατών και ασύμβατων ζευγών στελεχών των μυκήτων *Cryphonectria parasitica* (A) και *Fusarium graminearum* (B). Στην περίπτωση των ασύμβατων στελεχών παράγονται διακριτές ζώνες αντεπίδρασης (barrage zones), όπως στο ζεύγος EP146-EP155 στην περίπτωση A (κόκκινο βέλος) και το ζεύγος A-C στην περίπτωση B, ενώ οι συμβατές αποικίες συντήκονται χωρίς καμία ορατή μορφολογική διαφοροποίηση. Η μορφολογία των ζωνών αντεπίδρασης εμφανίζει σημαντική ετερογένεια μεταξύ διαφορετικών ειδών (η A από Choi *et al.*, 2012, και η B από McCallum *et al.*, 2004).



Εικόνα 1.13. Φωτογραφία από μικροσκοπική παρατήρηση ενός ασύμβατου στελέχους *het-c het-e* του μύκητα *P. anserina*. Χαρακτηριστική είναι η πλήρωση του κυτταροπλάσματος με κενोटόπια (μαύρο βέλος), ενώ εμφανής είναι και η ύπαρξη τελείως κατεστραμμένων κυτταρικών διαμερισμάτων (λευκό βέλος) (από Sauré, 2000).

πλασματικής μεμβράνης (Inoue *et al.*, 2011). Στον μύκητα *N. crassa* ο PCD που επάγεται από την HI περιλαμβάνει αποικοδόμηση οργανιδίων, πλασμόλυση, σχηματισμό μεμβρανοσυνδεδεμένων δομών στο κυτταρόπλασμα (Jacobson *et al.*, 1998), και κατακερματισμό του DNA (Marek *et al.*, 2003). Ένας παρόμοιος φαινότυπος κυτταρικού θανάτου παρατηρήθηκε και στο είδος *C. parasitica*, όπου περιελάμβανε διάσπαση της δομής του κυττάρου και εκφυλισμό του κυτταροπλάσματος, αποικοδόμηση οργανιδίων και κατάρρευση της μεμβράνης του κενοτοπίου (Newhouse & MacDonald, 1991). Δεν είναι γνωστό εάν ο PCD που επάγεται λόγω HI σε διαφορετικά είδη και λόγω γενετικών διαφορών σε διαφορετικά γονίδια *het* είναι αποτέλεσμα κοινών ή διαφορετικών κατά περίπτωση κυτταρικών μηχανισμών· η μεγάλη ομοιότητα στους φαινότυπους αυτών των αποκρίσεων σε όλες τις μελετημένες περιπτώσεις είναι μια ισχυρή ένδειξη για τη μεσολάβηση μονοπατιών με κοινό γενετικό ή βιοχημικό υπόβαθρο για την εκδήλωση του φαινοτύπου του PCD λόγω HI (Glass *et al.*, 2000; Hutchison & Glass, 2012).



Εικόνα 1.14. Εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy) της σύντηξης υφών μεταξύ δύο ασύμβατων στελεχών του μύκητα *Neurospora crassa*. Το ένα στέλεχος είναι σημασμένο με ιστόνη H1::GFP (πράσινοι πυρήνες) ενώ και τα δύο έχουν υποστεί χρώση με τη φθορίζουσα χρωστική FM4-64 (χρωματίζει εκλεκτικά τις μεμβράνες, κόκκινες υφές στη φωτογραφία). Τα δύο στελέχη διαφέρουν στο γονίδιο *het-c*. Στον χρόνο 0' φαίνεται ευκρινώς η διέλευση πράσινων σημασμένων πυρήνων στο συντηγμένο κύτταρο, μέσω της αναστόμωσης. Πολύ σύντομα το κύτταρο αυτό αποκλείεται από την υπόλοιπη υφή του μυκηλίου-δέκτη και εισέρχεται σε πορεία PCD. Το σήμα της H1::GFP έχει χαθεί 1 h αργότερα, ενώ το υπό κατάρρευση μεμβρανικό σύστημα του ασύμβατου ετεροκαρύου υφίσταται εντονότερη χρώση από τα άλλα κύτταρα λόγω αύξησης της διαπερότητας της πλασματικής μεμβράνης και ενσωμάτωσης στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες (από Prof. N. Louise Glass, University of California, Berkeley).

Γ. Σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου

Σε πολλούς μύκητες, ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species) έχουν συσχετισθεί με τη σηματοδότηση ή τον κυτταρικό θάνατο. Κατόπιν μεταξύ τους επαφής, τα είδη *Coprinus cinereus* και *P. anserina* εμφανίζουν συσσώρευση υπεροξειδίου του υδρογόνου και σε κάποιες περιπτώσεις κυτταρικό θάνατο. Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται να παίζουν τον ρόλο σηματοδοτικού μορίου μεταξύ των ειδών, και όχι απαραίτητα παράγοντα τοξικού θανάτου (Silar, 2005). Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου έχουν συσχετισθεί σε αλληλεπιδράσεις HI σε αρκετά είδη ασκομυκήτων που προκαλούν ασθένειες στο σταφύλι (Freitas *et al.*, 2009), και τα επίπεδά τους είναι αυξημένα κατά τη διάρκεια του PCD λόγω HI στον μύκητα *N. crassa* (Hutchison *et al.*, 2009).

A. Γονίδια κυτταρικού θανάτου

Αν και ο κυτταρικός θάνατος στους υφομύκητες έχει τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης, τα είδη των μυκήτων δεν κατέχουν το πλήρες σύνολο των αποπτωτικών γονιδίων που έχουν αναγνωρισθεί σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι υφομύκητες στερούνται βασικών γνωστών συστατικών του PCD, όπως είναι μέλη των γονιδιακών οικογενειών BAX και BCL (Fedorova *et al.*, 2005), αλλά έχουν συντηρημένα καταρροϊκά (downstream) συστατικά, όπως τα γονίδια PARP (poly (ADP-ribose) polymerase), AIF1 (apoptosis inducing factor 1), AMID (AIF-homologous mitochondrion-associated inducer of death), APAF1 (apoptotic protease activating factor 1), EndoG (endonuclease G) και οι μετακασπάσες (metacaspases) (Fedorova *et al.*, 2005; Sharon *et al.*, 2009). Μερικά από τα ομόλογα γονίδια απόπτωσης στους υφομύκητες έχουν επίπτωση στον κυτταρικό θάνατο όταν απαλειφθούν, ενώ άλλα όχι, υποδεικνύοντας έτσι πως τα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου πιθανώς ρυθμίζονται διαφορετικά στους υφομύκητες από ό, τι σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, και ότι τα προγράμματα θανάτου μπορεί να ποικίλουν ακόμα και μεταξύ των μυκήτων. Μεταλλαγμένα στελέχη του μύκητα *N. crassa* χωρίς το ομόλογο του γονιδίου AIF1 ή ομόλογα μετακασπασών δεν είχαν καμία αλλαγή στον PCD που επάγεται από την ΗΙ (Hutchison *et al.*, 2009).

1.3.5 Μοριακοί μηχανισμοί της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας

A. Εισαγωγικά στοιχεία

Οι ασκομύκητες έχουν γενικά περίπου 10 γονίδια *het* (13 γονίδια *het* έχουν περιγραφεί στον μύκητα *N. crassa*, 9 στον *P. anserina*, 8 στον *A. nidulans* και τουλάχιστον 6 στον *C. parasitica*: Glass & Kuldau, 1992; Bégueret *et al.*, 1994; Anwar *et al.*, 2013; Cortesi & Milgroom, 1998), και κάθε ένα έχει τυπικά 2-3 διαφορετικά αλληλόμορφα (Glass & Kaneko, 2003; Aanen *et al.*, 2010). Η κλωνοποίηση και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός γονιδίων *het* έχουν επιτευχθεί μέχρι σήμερα στα είδη *N. crassa*, *P. anserina* και *C. parasitica* (βλ. επόμενες παραγράφους). Η διαθεσιμότητα γονιδιωματικών αλληλουχιών πολυάριθμων υφομυκήτων και οι νέες τεχνολογικές δυνατότητες πληθυσμιακής γονιδιωματικής ανάλυσης έχουν επιταχύνει πρόσφατα τη συγκριτική μελέτη και την πρόβλεψη πιθανών γονιδίων *het* και σε άλλα είδη (Pál *et al.*, 2007; Fedorova *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2012).

Η ΗΙ ρυθμίζεται από αλληλόμορφα και μη αλληλόμορφα γενετικά συστήματα. Στα αλληλόμορφα συστήματα η αντίδραση ΗΙ πυροδοτείται στο ασύμβατο ετεροκάρυο ως αποτέλεσμα της ταυτόχρονης παρουσίας διαφορετικών αλληλομόρφων του ίδιου γονιδίου. Ωστόσο, τα περισσότερα χαρακτηρισμένα γονίδια *het* έχουν κι ένα μη αλληλόμορφο γονίδιο-«εταίρο» που απαιτείται για την εκδήλωση της ΗΙ (Aanen *et al.*, 2010). Σε αυτά τα μη αλληλόμορφα συστήματα η ασυμβατότητα προκαλείται από την αλληλεπίδραση συγκεκριμένων συνδυασμών αλληλομόρφων διαφορετικών γονιδίων (Kaneko *et al.*, 2006). Σε κάποιες περιπτώσεις, οι μη αλληλόμορφοι «εταίροι» διατηρούνται σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) λόγω στενής φυσικής σύνδεσης (π.χ. *het-c* και *pin-c*) ή μέσω καταστολής του ανασυνδυασμού λόγω αναστροφών (π.χ. *het-6* και *un-24*). Σε άλλες περιπτώσεις, οι μη αλληλόμορφοι «εταίροι» δεν συνδέονται και αυτο-ασύμβατοι μειωτικοί απόγονοι μπορούν να παραχθούν, όπως στο σύστημα *het-R/het-V* στον μύκητα *P. anserina*. Τέλος, σε πολλές περιπτώσεις, τα γονίδια *het* συμμετέχουν ταυτόχρονα σε αλληλόμορφη και

μη αλληλόμορφες αλληλεπιδράσεις με άλλα γονίδια, όπως στην περίπτωση των γονιδίων *het-c* και *pin-c* του μύκητα *N. crassa* (Kaneko *et al.*, 2006).

Άλλο ένα κοινό χαρακτηριστικό των γονιδίων HI στα είδη *N. crassa* και *P. anserina* είναι πως, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, ένας από τους μη αλληλόμορφους «εταίρους» κωδικοποιεί για κάποια πρωτεΐνη που φέρει το μοτίβο HET (Fedorova *et al.*, 2005; Glass & Dementhon, 2006). Το μοτίβο HET (Pfam PF06985) έχει μέγεθος περίπου 150 αμινοξικών καταλοίπων και απαντάται μόνον στους υφομύκητες. Αξίζει να σημειωθεί πως η υπερέκφραση μόνου του μοτίβου HET βρέθηκε ότι προκαλεί κυτταρικό θάνατο στο είδος *P. anserina* (Paoletti & Clavé, 2007). Ωστόσο, η αναζήτηση γονιδίων που να κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με μοτίβο HET στα γονιδιώματα μυκήτων δεν είναι επαρκής προσέγγιση για την αναγνώριση νέων γονιδίων *het*, καθώς ο αριθμός των γονιδίων με μοτίβο HET είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τα γονίδια *het* στα μελετημένα συστήματα, π.χ. ανιχνεύονται 55 γονίδια με μοτίβο HET στον μύκητα *N. crassa* (Fedorova *et al.*, 2005), 130 στον *P. anserina* (Bidard *et al.*, 2013) και 96 στον *C. parasitica* (Choi *et al.*, 2012), έναντι 13, 9 και 6 γονιδίων *het*, αντίστοιχα (Hutchison & Glass, 2012; Choi *et al.*, 2012).

B. Γονίδια ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στο είδος *Neurospora crassa*

Ο μύκητας *N. crassa* είναι ένας νηματοειδής, ετεροθαλλικός ασκομύκητας που εντοπίζεται χαρακτηριστικά στο ψωμί και σε καμένη βλάστηση κατόπιν δασικών πυρκαγιών. Αυτό το είδος έχει υπάρξει ο κυριότερος μύκητας-μοντέλο για τη μελέτη της HI για δεκαετίες (Garnjobst, 1953). Δεκατρία γονίδια *het* έχουν ανιχνευθεί σε αυτό το είδος, τα *mat*, *het-c*, *het-d*, *het-e*, *het-i*, *het-5*, *het-6*, *het-7*, *het-8*, *het-9*, *het-10*, *un-24* και *pin-c* (Garnjobst, 1953; Mylyk, 1975; Perkins, 1975; Smith *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2006), ενώ 3 γενετικοί τόποι (loci) *het* έχουν αναλυθεί μοριακά, οι *het-c/pin-c*, *un-24/het-6* και *mat*, που αλληλεπιδρά με το μη συνδεδεμένο ρυθμιστικό γονίδιο *tol* (Glass *et al.*, 1988; Saupé *et al.*, 1996; Shiu & Glass, 1999; Smith *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2006; Micali & Smith, 2006). Όλες οι αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε καταστροφή του ετεροκαρυωτικού κυττάρου μέσω PCD, εκτός από την αλληλόμορφη αλληλεπίδραση *het-I/het-i* που οδηγεί στην εκδίωξη των πυρήνων του ενός τύπου από το ετεροκάρυο (Saupé, 2000). Τα γονίδια *het* του *N. crassa* που έχουν κλωνοποιηθεί και αναλυθεί σε μοριακό επίπεδο, καθώς και οι γενετικές τους αλληλεπιδράσεις, συνοψίζονται στον Πίνακα 1.2.

Ένας από τα καλύτερα μελετημένους γενετικούς τόπους HI στον μύκητα *N. crassa* είναι το σύστημα *het-c/pin-c*. Σε αυτήν την περίπτωση, η αναγνώριση του ετέρου και η HI εξασφαλίζεται από τις συνεργιστικές μη αλληλόμορφες αλληλεπιδράσεις του γονιδίου *het-c* με τον «εταίρο του για την ασυμβατότητα» *pin-c* (partner for incompatibility), ενώ οι ταυτόχρονες αλληλόμορφες αλληλεπιδράσεις στο *het-c* ενισχύουν την ένταση του φαινοτύπου της ασυμβατότητας (Kaneko *et al.*, 2006). Το γονίδιο *het-c* κωδικοποιεί για μια πλούσια σε γλυκίνη πρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης (Saupé *et al.*, 1996), ενώ έχουν χαρακτηριστεί 3 αλληλόμορφα του γονιδίου, τα *het-c^{OR}*, *het-c^{PA}* και *het-c^{GR}*, που χαρακτηρίζονται από μεταξύ τους συνολική ταυτότητα της τάξης του 86%. Ο πολυμορφισμός μεταξύ αυτών εντοπίζεται σε 4 περιοχές του γονιδίου, μία εκ των οποίων χαρακτηρίζεται από τη διαφορική παρουσία/απουσία δύο εισδοχών/ελλείψεων (indels) μεγεθών 15 και 45 bp αντίστοιχα. Αυτή η μεταβλητή περιοχή έχει αποδειχθεί πως καθορίζει την αλληλομορφική ειδικότητα (Saupé *et al.*, 1996; Saupé & Glass, 1997). Το γονίδιο *het-c* αλληλεπιδρά γενετικά με το επίσης πολυμορφικό γονίδιο *pin-c*, το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με μοτίβο

Πίνακας 1.2				
Κλωνοποιημένα γονίδια ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας στο είδος <i>Neurospora crassa</i> . Οι αλληλόμορφες και μη αλληλόμορφες γενετικές αλληλεπιδράσεις των γονιδίων <i>het</i> απεικονίζονται σχηματικά.				
Γονίδιο – αριθμός αλληλομόρφων	Μέγεθος πρωτεΐνης (αα) ¹	Χαρακτηριστικά γονιδίου/πρωτεΐνης	Αναφορές	
Γονίδια <i>het</i>				
<i>het-c</i>	3	966	πλούσια σε γλυκίνη μεμβρανική πρωτεΐνη, μεταβλητή περιοχή που ορίζει την αλληλομορφική ειδικότητα	Saupé <i>et al.</i> , 1996; Saupé & Glass, 1997
<i>pin-c</i>	3	938	μοτίβο HET	Kaneko <i>et al.</i> , 2006
<i>het-6</i>	2	680	μοτίβο HET	Smith <i>et al.</i> , 2000
<i>un-24</i>	2	929	μεγάλη υπομονάδα ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής τύπου I, μεταβλητή περιοχή που ορίζει την ειδικότητα	Smith <i>et al.</i> , 2000
<i>mat</i>	2	293	γονίδιο συζευκτικού τύπου, μεταγραφικός παράγοντας (μοτίβο alpha-box ή HMG-box)	Glass <i>et al.</i> , 1990; Staben & Yanofsky, 1990
Γενετικές αλληλεπιδράσεις γονιδίων <i>het</i>				
Ρυθμιστικά γονίδια				
<i>tol</i>	1	1011	μεταλλαγές του καταστέλλουν την ασυμβατότητα συζευκτικού τύπου, μοτίβο HET, αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS)	Leslie & Yamashiro, 1997; Shiu & Glass, 1999
<i>vib-1</i>	1	670	ρυθμιστής της ασυμβατότητας <i>het-c/pin-c</i> , <i>mat</i> , <i>un-24/het-6</i> , απαραίτητο για την έκφραση των <i>pin-c</i> , <i>tol</i> , <i>het-6</i> και άλλων, αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS)	Xiang & Glass, 2002; Dementhon <i>et al.</i> , 2006

¹ Το μέγεθος των πρωτεϊνικών προϊόντων των γονιδίων *het* συχνά διαφέρει μεταξύ των αλληλομόρφων τους· εδώ παρατίθεται ενδεικτικά το μέγεθος ενός αλληλομόρφου σε κάθε περίπτωση.

HET (Kaneko *et al.*, 2006). Αν και η περιοχή ειδικότητας του γονιδίου *pin-c* δεν είναι γνωστή, δεδομένα από πληθυσμιακές μελέτες και υπολογιστικές αναλύσεις έχουν επιτρέψει την αναγνώριση αρκετών υπογήφινων περιοχών (Hall *et al.*, 2010). Τα πολυμορφικά γονίδια *het-c* και *pin-c* είναι στενά συνδεδεμένα (εντός 1 kb χρωμοσωμικού DNA) και απαντώνται σε 3 απλοτύπους: *het-c1 pin-c1*, *het-c2 pin-c2* και *het-c3 pin-c3* (Kaneko *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2010). Τα αλληλόμορφα των γονιδίων *het-c* και *pin-c* τελούν υπό σταθεροποιούσα επιλογή (balancing selection)· «άτομα» που φέρουν τους διαφορετικούς απλοτύπους *het-c pin-c* συναντώνται εξίσου συχνά στους φυσικούς πληθυσμούς του μύκητα, επιδεικνύουν ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης (δηλαδή δεν συμβαίνει ανασυνδυασμός μεταξύ των γονιδίων *het-c* και

pin-c), και χαρακτηρίζονται από διαειδικούς πολυμορφισμούς (δηλαδή οι αλληλομορφικοί πολυμορφισμοί έχουν διατηρηθεί σε γεγονότα ειδογένεσης και εκτείνονται σε διάφορα είδη εντός των Sordariaceae· Charlesworth, 2006) (Wu *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2010). Η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών HET-C διαφορετικής αλληλομορφικής ειδικότητας σε ετεροσύμπλοκα έχει αποδειχθεί (Sarkar *et al.*, 2002), ενώ δεν είναι ακόμα γνωστό εάν οι πρωτεΐνες HET-C και PIN-C αλληλεπιδρούν. Το ετεροσύμπλοκο HET-C προσδένεται στην πλασματική μεμβράνη κατά την αντίδραση HI και έχει προταθεί πως ίσως σχετίζεται με την πυροδότηση του πλειοτροπικού φαινοτύπου της ασυμβατότητας (Sarkar *et al.*, 2002).

Αν και ομόλογα γονίδια των *het-c* και *pin-c* υφίστανται σε πολλούς υφομύκητες, αυτά τα δύο γονίδια συμμετέχουν στην HI μόνον στο γένος *Neurospora* και σε συγγενικά γένη (Hall *et al.*, 2010). Τα ομόλογα του *het-c* στα είδη *P. anserina*, *Fusarium proliferatum* και *Aspergillus niger* δεν επιδεικνύουν αλληλομορφική ποικιλομορφία (Sauré *et al.*, 2000; Kerényi *et al.*, 2006; van Diepeningen *et al.*, 2009). Παρόλα αυτά, πολυμορφισμός στο γονίδιο *het-c* έχει ανιχνευθεί στο είδος *Botrytis cinerea* (Fournier *et al.*, 2003), και σε ορισμένες περιπτώσεις μετασχηματισμός ενός μύκητα με ασύμβατο αλληλόμορφο *het-c* του μύκητα *N. crassa* πυροδοτεί τον PCD, ακόμα κι αν ο μύκητας-στόχος δεν διαθέτει πολλαπλά αλληλόμορφα για το *het-c* (Sauré *et al.*, 2000; van Diepeningen *et al.*, 2009). Είναι ενδιαφέρον ότι ένα ομόλογο του γονιδίου *het-c* που ίσως έχει μεταφερθεί οριζόντια από κάποιον υφομύκητα ανιχνεύθηκε στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* (γονίδιο *phcA*), και αυτό το αλληλόμορφο προκαλεί αντίδραση PCD όταν εισαχθεί στον μύκητα *N. crassa* (Wichmann *et al.*, 2008). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η αξιοποίηση του γονιδίου *het-c* από το *P. syringae* ίσως προσφέρει στο βακτήριο ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στον ανταγωνισμό του με υφομύκητες στο περιβάλλον, καθώς με αυτό πιθανά μπορεί να προκαλεί λύση των μυκήτων και να τους χρησιμοποιεί ως πηγή θρεπτικών συστατικών (Wichmann *et al.*, 2008).

Τα γονίδια του γενετικού τόπου *het-6/un-24* έχουν ορισμένες ομοιότητες με τα *het-c* και *pin-c*, καθώς απαντώνται με τη μορφή διαφορετικών αλληλομόρφων (*het-6^{PA} un-24^{PA}* και *het-6^{OR} un-24^{OR}*), προϋποθέτουν αλληλόμορφες και μη αλληλεπιδράσεις για τη λειτουργία τους, και επιδεικνύουν ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης (Mir-Rashed *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000; Micali & Smith, 2006; Powell *et al.*, 2007; Lafontaine & Smith, 2012). Η ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των *un-24* και *het-6* διατηρείται λόγω μιας παρακεντρικής αναστροφής (Micali & Smith, 2006). Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα συστήματα γονιδίων *het*, ένας από τους γενετικούς «εταίρους» αυτού του γενετικού τόπου, το γονίδιο *het-6*, κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με μοτίβο HET, ενώ τα αλληλόμορφα χαρακτηρίζονται από μεταξύ τους ταυτότητα 68% για τα αντίστοιχα πολυπεπτίδια (Smith *et al.*, 2000). Το γονίδιο *un-24* κωδικοποιεί για τη μεγάλη υπομονάδα της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγάσης τύπου I (ribonucleotide reductase, RNR), μιας πρωτεΐνης απαραίτητης για την αντιγραφή του DNA (συγκεκριμένα για τη μετατροπή των πρόδρομων μορίων του RNA σε πρόδρομα μόρια της βιοσύνθεσης του DNA) (Smith *et al.*, 2006). Πρόσφατα προτάθηκε ότι στην ασυμβατότητα που επάγεται από το γονίδιο *un-24* εμπλέκεται η δημιουργία ετεροσυμπλόκου των ασύμβατων RNR πρωτεϊνών, η οποία επιτυγχάνεται μέσω διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών (Smith *et al.*, 2013a). Σε άλλη πρόσφατη εργασία αποδείχθηκε πως η ετερόλογη έκφραση του γονιδίου *un-24* στον ζυμομύκητα *S. cerevisiae* σε χαμηλά επίπεδα επάγει έναν φαινότυπο χαρακτηριστικό της HI στους υφομύκητες, ενώ σε υψηλά επίπεδα έκφρασης ο φαινότυπος ασυμβατότητας αναστέλλεται, κάτι που ίσως σχετίζεται με τη λειτουργία πρωτεϊνών θερμικής καταπόνησης (heat-shock protein 70, HSP70) (Smith *et al.*, 2013b). Το

γονίδιο *un-24* αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας ενδιαφέρουσας ιδιότητας πολλών γονιδίων *het*, ότι δηλαδή συχνά κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που έχουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες εκτός από την ΗΙ.

Άλλο ένα παράδειγμα γονιδίου *het* με διπλή κυτταρική λειτουργία είναι το γονίδιο συζευκτικού τύπου, *mat* (mating type). Υπάρχουν δύο ιδιόμορφα του γενετικού τύπου *mat*, τα *a* και *A* (τα αλληλόμορφα σε αυτήν την περίπτωση καλούνται «ιδιόμορφα» καθώς διαφέρουν τελείως στην αλληλουχία: Glass *et al.*, 1988), και δύο «άτομα» πρέπει να ανήκουν σε αντίθετους συζευκτικούς τύπους για να συζευθούν φυλετικά (Glass *et al.*, 1988; Yun *et al.*, 2000). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της βλαστητικής αύξησης, το γονίδιο συζευκτικού τύπου λειτουργεί ως γονίδιο *het*, έτσι ώστε η σύντηξη μεταξύ στελεχών αντίθετου συζευκτικού τύπου να επάγει την ΗΙ και τον PCD (Garnjost, 1953; Glass *et al.*, 1988). Ο μη αλληλόμορφος «εταίρος» του *mat* είναι το ρυθμιστικό γονίδιο *tol*, ένα μη συνδεδεμένο γονίδιο που φέρει μοτίβο HET. Μεταλλαγές του γονιδίου *tol* καταστέλλουν την ασυμβατότητα συζευκτικού τύπου και επιτρέπουν σε ασύμβατα ετεροκάρυα μικτού συζευκτικού τύπου να αναπτύσσονται κανονικά (Newmeyer, 1970; Shiu & Glass, 1999). Κατά τη διάρκεια του φυλετικού κύκλου το γονίδιο *tol* αποσιωπείται και έτσι αποφεύγεται τότε η αντίδραση ασυμβατότητας (Shiu & Glass, 1999). Είναι ενδιαφέρον πως ένα ψευδο-ομοθαλικό συγγενικό είδος του *N. crassa*, το *Neurospora tetrasperma*, φέρει ένα μεταλλαγμένο, μη λειτουργικό γονίδιο *tol*, με αποτέλεσμα αυτό το είδος να μπορεί να υπάρχει ως φυσικό ετεροκάρυο που περιέχει και τους δύο συζευκτικούς τύπους (Jacobson, 1992). Η ενσωμάτωση ενός λειτουργικού γονιδίου *tol* του είδους *N. crassa* στο *N. tetrasperma* μπορεί να προκαλέσει ασυμβατότητα συζευκτικού τύπου, ενώ η μεταφορά του αλληλομόρφου *tol* του *N. tetrasperma* στο *N. crassa* καταστέλλει την ασυμβατότητα συζευκτικού τύπου (Jacobson, 1992). Η ασυμβατότητα του συζευκτικού τύπου απαντάται και σε άλλους μύκητες εκτός από τον *N. crassa*, όπως οι *Sordaria brevicollis*, *Aspergillus heterothallicus* και *Ascobolus stercorarius*, αλλά απουσιάζει από άλλους, όπως οι *P. anserina* και *Neurospora sitophila* (Shiu & Glass, 1999).

Γ. Γονίδια ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στο είδος *Podospora anserina*

Ο μύκητας *P. anserina* αποτελεί ένα ψευδο-ομοθαλικό είδος με 9 χαρτογραφημένα γονίδια *het*, πέντε εκ των οποίων έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί στο μοριακό επίπεδο (*het-c*, *het-e*, *het-d*, *het-r* και *het-s*), και τα οποία συμμετέχουν σε 5 αλληλόμορφες και 3 μη αλληλόμορφες αλληλεπιδράσεις (*het-c/het-e*, *het-c/het-d* και *het-r/het-v*). Το γονίδιο *het-v* εμπλέκεται ταυτόχρονα σε αλληλόμορφη και σε μη αλληλόμορφη αλληλεπίδραση με το *het-r* (Saupé *et al.*, 1994; 1995a; 1995b; Coustou *et al.*, 1997; Pinan-Lucarré *et al.*, 2007). Τα γονίδια *het* του *P. anserina* που έχουν αναλυθεί σε μοριακό επίπεδο, καθώς και οι γενετικές τους αλληλεπιδράσεις, συνοψίζονται στον Πίνακα 1.3. Αρκετά από τα γονίδια που συμμετέχουν στην ΗΙ στον *P. anserina* έχουν μια συγκεκριμένη δομή μοτίβων και αποτελούν μέλη μιας γονιδιακής οικογένειας που ονομάζεται *HNWD*: αυτά τα γονίδια περιέχουν ένα μοτίβο HET, ένα μοτίβο NACHT και επαναλήψεις WD (Paoletti *et al.*, 2007). Το μοτίβο NACHT ανήκει στην τάξη πρωτεϊνικών μοτίβων STAND, τα οποία έχουν ενεργότητα NTPάσης (NTPase) και έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στον PCD τόσο στα ζώα όσο και στα φυτά (Leipe *et al.*, 2004). Στον μύκητα *P. anserina* η ενεργότητα NTPάσης έχει αποδειχθεί πως είναι απαραίτητη για τη λειτουργία ΗΙ (Espagne *et al.*, 1997). Οι επαναλήψεις WD σχηματίζουν μια δομή β-προπέλλας και τυπικά διευκολύνουν τις πρωτεϊνικές

Πίνακας 1.3				
Κλωνοποιημένα γονίδια ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στο είδος <i>Podospora anserina</i> . Οι αλληλόμορφες και μη αλληλόμορφες γενετικές αλληλεπιδράσεις των γονιδίων <i>het</i> απεικονίζονται σχηματικά.				
Γονίδιο – αριθμός αλληλομόρφων	Μέγεθος πρωτεΐνης (αα) ¹	Χαρακτηριστικά γονιδίου/πρωτεΐνης	Αναφορές	
Γονίδια <i>het</i>				
<i>het-r</i>	2	-	πρωτεΐνη HNWD ²	Chevanne <i>et al.</i> , 2009
<i>het-e</i>	4	1056	πρωτεΐνη HNWD	Saupé <i>et al.</i> , 1995b; Espagne <i>et al.</i> , 1997; Espagne <i>et al.</i> , 2002
<i>het-d</i>	3	1376	πρωτεΐνη HNWD	Espagne <i>et al.</i> , 2002
<i>het-c</i>	4	208	πρωτεΐνη μεταφοράς γλυκολιπιδίων, αλληλομορφική ειδικότητα μεμονωμένων αμινοξέων	Saupé <i>et al.</i> , 1994; Saupé <i>et al.</i> , 1995a
<i>het-s</i>	2	289	μολυσματική πρωτεΐνη-prion	Turcq <i>et al.</i> , 1991; Coustou <i>et al.</i> , 1997; Balguerie <i>et al.</i> , 2003
Γενετικές αλληλεπιδράσεις γονιδίων <i>het</i>				
Ρυθμιστικά γονίδια				
<i>mod-A</i>	1	687	μεταλλαγές του καταστέλλουν τη μη αλληλόμορφη ασυμβατότητα <i>het-c/-e</i> , <i>het-c/-d</i> και <i>het-r/-v</i> , περιοχή πρόσδεσης SH3	Barreau <i>et al.</i> , 1998
<i>mod-D</i>	1	354	μεταλλαγές του καταστέλλουν την ασυμβατότητα <i>het-c/-e</i> σε στελέχη <i>mod-A1</i> , υπομονάδα α πρωτεΐνης G, θέση πρόσδεσης GTP	Loubradou <i>et al.</i> , 1999
<i>mod-E</i>	1	701	μερικός ρυθμιστής της ασυμβατότητας <i>het-r/-v</i> πρωτεΐνη-μοριακή συνοδός HspP90	Loubradou <i>et al.</i> , 1997
Επαγόμενα γονίδια				
<i>idi-1</i>	1	201	επάγεται κατά την ασυμβατότητα <i>het-c/-e</i> και <i>het-r/-v</i> , κατά τη στέρωση άνθρακα/αζώτου, από τη ραπαμυκίνη, πεπτιδικό σινιάλο, πρωτεΐνη κυτταρικού τοιχώματος	Bourges <i>et al.</i> , 1998; Dementhon <i>et al.</i> , 2003
<i>idi-2</i>	1	157	επάγεται κατά την ασυμβατότητα <i>het-r/-v</i> , πεπτιδικό σινιάλο, περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη	Bourges <i>et al.</i> , 1998
<i>idi-3</i>	1	196	επάγεται κατά την ασυμβατότητα <i>het-c/-e</i> και <i>het-r/-v</i> , πεπτιδικό σινιάλο	Bourges <i>et al.</i> , 1998
<i>idi-4</i>	1	83	μεταγραφικός παράγοντας του τύπου «φερμουάρ λευκίνης», επάγει άλλα γονίδια <i>idi</i> και την πορεία αυτοφαγίας	Dementhon <i>et al.</i> , 2004; Dementhon & Saupé, 2005

<i>idi-6</i> (<i>pspA</i>)	1	532	επάγεται κατά την ασυμβατότητα <i>het-c/-e</i> και <i>het-r/-v</i> , πιθανή συμμετοχή σε μονοπάτι αυτοφαγίας, πρωτεάση σερίνης τύπου σουμπτιλίσινης	Paoletti <i>et al.</i> , 2001; Pinan-Lucarré <i>et al.</i> , 2003
<i>idi-7</i>	1	-	πιθανή συμμετοχή σε μονοπάτι αυτοφαγίας	Pinan-Lucarré <i>et al.</i> , 2003

¹ Το μέγεθος των πρωτεϊνικών προϊόντων των γονιδίων *het* συχνά διαφέρει μεταξύ των αλληλομόρφων τους· εδώ παρατίθεται ενδεικτικά το μέγεθος ενός αλληλομόρφου σε κάθε περίπτωση.

² Οι πρωτεΐνες HNWD φέρουν μοτίβα HET, NACHT (ενεργότητα NTPάσης) και επαναλήψεις WD (Paoletti *et al.*, 2007).

αλληλεπιδράσεις (Smith, 2008). Η ποικιλομορφία στον αριθμό των επαναλήψεων WD έχει αποδειχθεί πως συμβάλλει στον καθορισμό της αλληλομορφικής ειδικότητας για τα 3 γονίδια HNWD που έχουν χαρακτηριστεί μοριακά (*het-d*, *het-e* και *het-r*) (Sauré *et al.*, 1995b, Espagne *et al.*, 1997; 2002; Chevanne *et al.*, 2009).

Πρόσφατα αποδείχθηκε πως η ανίχνευση πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες HNWD σε πληθυσμιακό επίπεδο θα μπορούσε να διευκολύνει την αναγνώριση των γονιδίων *het*, όπως στην περίπτωση του γονιδίου *het-R/r* (Chevanne *et al.*, 2009). Τόσο η μη αλληλόμορφη αλληλεπίδραση *het-R/het-V* όσο και η αλληλόμορφη *het-V/het-VI* προκαλούν την ΗΙ, ενώ η αλληλεπίδραση *het-R/het-V* είναι ευαίσθητη στη θερμοκρασία (Labarère, 1973; 1974). Αντιθέτως με αρκετά από τα γονίδια *het* του μύκητα *N. crassa*, τα γονίδια *het-R* και *het-V* δεν είναι συνδεδεμένα, το οποίο καθιστά δυνατή τη δημιουργία αυτο-ασύμβατων μειωτικών απογόνων· αυτοί οι απόγονοι βλαστάνουν αλλά επιδεικνύουν μειωμένη αύξηση και κυτταρικό θάνατο, και αυτό το χαρακτηριστικό έχει διευκολύνει σε σημαντικό βαθμό την αναζήτηση μεταλλαγών (mutant screens) (Pinan-Lucarré *et al.*, 2007).

Τα γονίδια *het-d* και *het-e* είναι δύο ακόμα γονίδια HNWD του είδους *P. anserina* που έχουν χαρακτηριστεί στο μοριακό επίπεδο, και για τα οποία έχουν ανιχνευθεί πολλαπλά αλληλόμορφα (4 για το *het-e* και 3 για το *het-d*) (Sauré *et al.*, 1995b; Espagne *et al.*, 1997; Espagne *et al.*, 2002). Για τα δύο αυτά γονίδια η αλληλομορφική ειδικότητα καθορίζεται από την ενεργότητα NTPάσης στο μοτίβο NACHT και από τον αριθμό των επαναλήψεων WD· και για τις δύο πρωτεΐνες, ένας ελάχιστος αριθμός επαναλήψεων WD απαιτείται για τη λειτουργικότητα (11 για το γονίδιο *het-d*, 10 για το *het-e*) (Espagne *et al.*, 2002). Οι περιοχές επαναλήψεων WD υπόκεινται σε μια ποικιλία εξελικτικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων της επαγόμενης από επαναλήψεις σημειακής μεταλλαξογένεσης (repeat induced point mutation, RIP) (έναν μηχανισμό αποσιώπησης στους μύκητες· Galagan & Selker, 2004), της συντονισμένης εξέλιξης (concerted evolution) (οι επαναλήψεις WD ανταλλάσσονται μεταξύ των αλληλομόρφων και υποβάλλονται σε ομογενοποίηση της αλληλουχίας), και της διαφοροποιούσας εξέλιξης (diversifying selection) (Paoletti *et al.*, 2007). Η περιοχή επαναλήψεων WD μεταλλάσσεται συχνά, με αποτέλεσμα ασύμβατα ετεροκάρυα να επιβιώνουν ενίοτε λόγω σωματικών ελλείψεων ή ανακατατάξεων εντός αυτής της περιοχής (Chevanne *et al.*, 2010). Συνεπώς, τα γονίδια *het* του μύκητα *P. anserina* που περιέχουν επαναλήψεις WD έχουν τη δυνατότητα να δημιουργούν νέα αλληλόμορφα μέσω της διαφοροποιούσας επιλογής, ανακατατάξεων ή του μηχανισμού RIP, και μπορούν περαιτέρω να τροποποιούν αυτά τα αλληλόμορφα μέσω μηχανισμών συντονισμένης εξέλιξης (Paoletti *et al.*, 2007; Chevanne *et al.*, 2010).

Τα γονίδια *het-e* και *het-d* αλληλεπιδρούν με το *het-c* (δεν πρέπει να συγχέεται με το γονίδιο *het-c* του μύκητα *N. crassa*, που δεν είναι ομόλογό του), το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μεταφοράς γλυκολιπιδίων (glycolipid transfer protein, GLTP) (Sauré *et al.*, 1994) και απαντάται σε 11 αλληλομορφικούς τύπους. Αντιθέτως με πολλά άλλα γονίδια *het*, ο πολυμορφισμός εντοπίζεται σε διάσπαρτες μεμονωμένες αμινοξικές αλλαγές κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, και μια αμινοξική αλλαγή είναι αρκετή για να αλλάξει την αλληλομορφική ειδικότητα (Sauré *et al.*, 1995a; Bastiaans *et al.*, 2014). Το γονίδιο *het-c* στον μύκητα *P. anserina* απαιτείται επίσης για τη φυσιολογική μορφογένεση των ασκοσπορίων και των άκρων των υφών (Sauré *et al.*, 1994). Το γονίδιο *het-c* έχει ορθόλογα σε πολλούς ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως στον άνθρωπο, τα φυτά και τους νηματώδεις σκώληκες (Sauré *et al.*, 1994; Sauré *et al.*, 1995a), ενώ είναι ενδιαφέρον πως ένα ορθόλογο γονίδιο του *het-c*, το ACD11 στο πρότυπο πειραματόφυτο *Arabidopsis thaliana*, φαίνεται πως εμπλέκεται στον PCD (Brodersen *et al.*, 2002). Πρόσφατα λύθηκε κρυσταλλογραφικά η δομή της πρωτεΐνης HET-C, αποκαλύπτοντας πως αποτελείται από δύο αλληλόμορφα στρώματα (δομή «σάντουιτς»), τα οποία αποτελούνται από 8 α-έλικες. Η μεταφορά γλυκολιπιδίων πραγματοποιείται από μια κοιλότητα μεταξύ των δύο στρωμάτων, το περιβάλλον της οποίας είναι ισχυρά υδρόφοβο (υδρόφοβη «τσέπη») για να φιλοξενεί τις μη πολικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες του γλυκολιπιδίου, ενώ η είσοδος της «φυλάσσεται» από ένα πολικό «κέντρο αναγνώρισης» της κεφαλής του γλυκολιπιδίου (Kenoth *et al.*, 2010).

Το γονίδιο *het-s* στον μύκητα *P. anserina* αποτελεί εξαίρεση των άλλων χαρακτηρισμένων γονιδίων *het*. Η ασυμβατότητα του *het-s* βασίζεται μόνον σε αλληλόμορφες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλληλόμορφων *het-s* και *het-S* (Rizet, 1952), και δεν εμπλέκεται σε αυτό το σύστημα κανένα γονίδιο που να κωδικοποιεί για πρωτεΐνη με μοτίβο HET. Υπάρχουν δύο αλληλόμορφα σε αυτόν τον γενετικό τόπο, τα *het-s* και *het-S*, και το αλληλόμορφο *het-s* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που μπορεί να σχηματίσει μολυσματικές πρωτεΐνες-prions (Coustou *et al.*, 1997). Στελέχη με το αλληλόμορφο *het-s* μπορούν να έχουν έναν από τους δύο φαινότυπους, [Het-s*] (η μη μολυσματική μορφή) ή [Het-s] (η μολυσματική κατάσταση prion) (Sauré, 2007; 2011). Τα στελέχη [Het-s*] και [Het-S] σχηματίζουν συμβατά ετεροκάρυα, ενώ τα στελέχη [Het-s] είναι ασύμβατα με τα στελέχη [Het-S] (Sauré, 2007; 2011; Sauré & Daskalov, 2012). Ο φαινότυπος prion [Het-s] μπορεί να προκύψει αυτόματα σε ένα στέλεχος [Het-s*] κατά τη διάρκεια της αύξησης ή της κυτταροπλασματικής επαφής, αλλά επίσης μπορεί να απολεσθεί κατά τη διάρκεια σχηματισμού δομών που περιέχουν μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος (Sauré, 2007; 2011). Δομικές αναλύσεις αποκάλυψαν πως το prion [Het-s] σχηματίζει πολύ οργανωμένες αμυλοειδείς δομές, αλλά βρίσκεται σε μη δομημένη μορφή στη μη μολυσματική κατάσταση [Het-s*] (Dos Reis *et al.*, 2002; Maddelein *et al.*, 2002; Balguerie *et al.*, 2003). Η τοξικότητα σε αυτό το σύστημα ασκείται στην πλασματική μεμβράνη από το μοτίβο HeLo, το οποίο δρα ως τοξίνη σχηματισμού πόρων στη μεμβράνη (Mathur *et al.*, 2012; Seuring *et al.*, 2012). Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν πως στο σύστημα *het-s/het-S* εμπλέκεται μια πρωτεΐνη STAND που ονομάζεται NWD2 και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο στενά συνδεδεμένο με το *het-s* (Daskalov *et al.*, 2012), υποδηλώνοντας έτσι τη γενικευμένη σημασία των πρωτεϊνών της κατηγορίας STAND με μοτίβο NACHT στον έλεγχο της ΗΙ.

Με τη σύγκριση των γονιδίων *het* των μυκήτων *P. anserina* και *N. crassa*, γίνονται προφανή ορισμένα πρότυπα ή ενδείξεις εξελικτικών διαδικασιών. Γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με μοτίβα HET είναι κεντρικοί ρυθμιστές της ΗΙ και σχεδόν πάντοτε συμμετέχουν σε γενετικές αλληλεπιδράσεις με άλλα γονίδια. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν

για μια ποικιλία πρωτεϊνών με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, πρωτεϊνών μεταφοράς γλυκολιπιδίων, ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση του DNA, μεταγραφικών ρυθμιστών, ακόμα και μολυσματικών πρωτεϊνών-*prions*. Ισχυρή σταθεροποιούσα επιλογή διατηρεί πολλαπλά αλληλόμορφα για πολλά γονίδια *het*, αν και το εύρος της ποικιλότητας όσον αφορά την αλληλουχία και τον αριθμό των αλληλομόρφων ποικίλει.

Δ. Γονίδια ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στο είδος *Cryphonectria parasitica*

Η παρουσία μυκοϊών θεωρείται γενικά πως ελαττώνει την ικανότητα των φυτοπαθογόνων μυκήτων για μόλυνση των ξενιστών τους – μια κατάσταση που περιγράφεται ως υπομολυσματικότητα – και προσφέρει μια πιθανή στρατηγική βιολογικού ελέγχου διάφορων παθογόνων μυκήτων (Nuss, 2010; Pearson *et al.*, 2009). Αντιθέτως με τους ιούς των φυτών και των ζώων, οι ιοί των μυκήτων γενικά στερούνται εξωκυτταρικής φάσης στον κύκλο αντιγραφής τους (Wickner, 2001), αλλά βασίζονται για τη μετάδοσή τους στην κυτταροπλασματική ανταλλαγή μέσω της αναστόμωσης των υφών ή μέσω αφυλετικών σπορίων. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πως η λειτουργία των συστημάτων HI στους πληθυσμούς του μύκητα *C. parasitica*, που προκαλεί τη φυτική ασθένεια «έλκος της καστανιάς» (chestnut blight), μπορεί να περιορίσει σημαντικά τη μετάδοση τέτοιων ιών (Milgroom & Cortesi, 2004). Η βλαστητική ασυμβατότητα σε αυτόν τον μύκητα ελέγχεται από τουλάχιστον 6 γονίδια *vic*, με δύο γνωστά αλληλόμορφα σε κάθε γενετικό τόπο (Cortesi & Milgroom, 1998).

Με μια συγκριτική γονιδιωματική προσέγγιση σε μια πρόσφατη μελέτη (Choi *et al.*, 2012) ανιχνεύθηκαν 7 υποψήφια πολυμορφικά γονίδια που σχετίζονται με 4 από τους 6 γενετικούς τόπους *vic* του φυτοπαθογόνου ασκομύκητα *C. parasitica*. Περισσότερα του ενός ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (*open reading frames*, ORFs) εντοπίστηκαν και στους τρεις γενετικούς τόπους *vic2*, *vic6* και *vic7*. Αξίζει να σημειωθεί πως ένα ORF στον γενετικό τόπο *vic4* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με μοτίβα NTPάσης τύπου NACHT και επαναλήψεων WD, που είναι γνώρισμα αρκετών γνωστών γονιδίων *het* (Chevanne *et al.*, 2010), ενώ ένα από τα δύο ORFs του τόπου *vic6* φέρει μοτίβο HET και είναι πιθανά ομόλογο με το γονίδιο *pin-c2* που συμμετέχει στον έλεγχο της HI στον μύκητα *N. crassa*. Εντός του γενετικού τόπου *vic7* ανιχνεύθηκαν επίσης δύο ORFs, ένα εκ των οποίων προβλέπεται πως κωδικοποιεί για πρωτεΐνη με μοτίβο HET, ενώ το άλλο για μια πρωτεΐνη με μοτίβο αγκυρίνης (ankyrin). Τέλος, και στον γενετικό τόπο *vic2* ανιχνεύθηκαν δύο ORFs, κωδικοποιώντας για μια πρωτεΐνη της οικογένειας των φωσφολιπασών πατατίνης (patatin) (Andrews *et al.*, 1988), και μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με την πρωτεΐνη SNARE Sec9 της πλασματικής μεμβράνης των μυκήτων (Hong, 2005; Jahn & Scheller, 2006), αντίστοιχα (Choi *et al.*, 2012).

Η λειτουργική απενεργοποίηση των γονιδίων *vic2*, *vic6* και *vic7* είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη μετάδοση ιών και στις τρεις περιπτώσεις. Ο γενετικός χαρακτηρισμός του τόπου *vic6* αποκάλυψε μάλιστα πως μη αλληλόμορφες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο στενά συνδεδεμένων γονιδίων εντός αυτής της περιοχής, των *vic6* (με μοτίβο HET) και *pix6* (*partner of vic-six*), εμπλέκονται στον έλεγχο της δημιουργίας ετεροκαρύων και τη συχνότητα μετάδοσης των ιών (Choi *et al.*, 2012). Είναι αξιοσημείωτο πως η αύξηση στη μετάδοση ιών στα μεταλλαγμένα στελέχη *vic* δεν συνοδεύτηκε από απώλεια της δυνατότητας σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones). Αντίστροφα, η γενετική διαφορά στελεχών στο γονίδιο *vic4* οδηγεί σε σχηματισμό ζωνών αντεπίδρασης χωρίς να αποτρέπει τον σχηματισμό ετεροκαρύων (Smith *et al.*, 2006) ή να περιορίζει τη μετάδοση ιών (Cortesi

et al., 2001). Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν πως η συμβατότητα για ετεροκαρνωτική ανάπτυξη και ο σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης ίσως δεν αποτελούν διαφορετικές εκφάνσεις του ίδιου μηχανισμού, αντιθέτως με την παραδοσιακά αποδεκτή ταυτότητά τους, και πιθανά τελούν υπό διαφορετικό γενετικό έλεγχο.

E. Ρυθμιστές της ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας στα είδη N. crassa και P. anserina

Εκτός από τα γονίδια *het* υπάρχουν πολλά γονίδια στους μύκητες *N. crassa* και *P. anserina* που μπορούν να τροποποιούν ή να καταστέλλουν την απόκριση του PCD κατά τη διάρκεια της ΗΙ (Πίνακες 1.2 και 1.3 για τους δύο μύκητες, αντίστοιχα). Στον *P. anserina* η αναζήτηση κατασταλατικών μεταλλαγών για τον κυτταρικό θάνατο σε αυτο-ασύμβατα στελέχη επέτρεψε την ανίχνευση αρκετών *τροποποιητικών γονιδίων mod (modifier)* (Belcour & Bernet, 1969; Bernet, 1971; Bernet *et al.*, 1973). Στα απλά και τα διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *mod-A1* και *mod-B1* καταστέλλεται ο PCD εξαιτίας των μη αλληλόμορφων αλληλεπιδράσεων *het* (δεν επηρεάζεται η αλληλόμορφη αλληλεπίδραση *het-s/het-S*) (Belcour & Bernet, 1969; Bernet, 1971; Bernet *et al.*, 1973; Labarère, 1973). Όπως συμβαίνει και για αρκετά από τα γονίδια *het* του *P. anserina*, τα μεταλλαγμένα στελέχη *mod-A1 mod-B1* είναι ελαττωματικά και στη φυλετική αναπαραγωγή και στείρα υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας (Barreau *et al.*, 1988). Το γονίδιο *mod-B* δεν έχει κλωνοποιηθεί ακόμα, αλλά το *mod-A1* βρέθηκε ότι κωδικοποιεί για μια πλούσια σε προλίνη/λευκίνη πρωτεΐνη με περιοχή πρόσδεσης SH3 και μικρή ομολογία με άλλες γνωστές πρωτεΐνες (Barreau *et al.*, 1988). Δύο επιπλέον γονίδια *mod* έχουν κλωνοποιηθεί και επίσης εμπλέκονται σε επιπρόσθετες κυτταρικές λειτουργίες όπως η αύξηση, η παραγωγή χρωστικής και ο φυλετικός κύκλος (Loubradou *et al.*, 1997; 1999)· το *mod-E* κωδικοποιεί για ένα ομόλογο *πρωτεΐνης-μοριακής συνοδού (chaperone) HSP90 (heat-shock protein 90 chaperone)* (Loubradou *et al.*, 1997) και το *mod-D* για την υπομονάδα Ga της ετεροτριμερικής πρωτεΐνης G (Loubradou *et al.*, 1999). Επομένως, ο χαρακτηρισμός των γονιδίων *mod* υποδηλώνει ότι στον μύκητα *P. anserina* τα γονίδια που εμπλέκονται στην ΗΙ σχετίζονται επίσης και με διάφορες άλλες πτυχές της ανάπτυξης, ειδικά της φυλετικής αναπαραγωγής.

Και για τα δύο είδη, *P. anserina* και *N. crassa*, δραματικές μεταγραφικές αλλαγές συνοδεύουν τις φαινοτυπικές αλλαγές που σχετίζονται με την ΗΙ (Boucherie *et al.*, 1981; Bourges *et al.*, 1998; Paoletti *et al.*, 2001; Hutchison *et al.*, 2009; Bidard *et al.*, 2013). Στον μύκητα *P. anserina* τα γονίδια που επάγονται κατά τη διάρκεια της ασυμβατότητας (ονομάζονται *idi, induced during incompatibility*) περιλαμβάνουν μία πρωτεάση (*idi-6*) (Paoletti *et al.*, 2001), ένα ομόλογο ATG8 (*idi-7*) (Pinan-Lucarré *et al.*, 2003) και έναν μεταγραφικό παράγοντα bZIP (*idi-4*) (Dementhon *et al.*, 2004). Και τα τρία αυτά γονίδια είναι είτε ομόλογα γνωστών γονιδίων αυτοφαγίας είτε έχει αποδειχθεί πως εμπλέκονται στον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο στον μύκητα *P. anserina*. Μεταλλαγές αυτοφαγίας επιδεικνύουν ταχύτερο κυτταρικό θάνατο στον *P. anserina*, υποδηλώνοντας ότι (α) η αυτοφαγία ίσως παίζει στην πραγματικότητα προστατευτικό ρόλο κατά τη διάρκεια της ΗΙ, και (β) ο παρόμοιος με την αυτοφαγία κυτταρικός θάνατος που παρατηρείται στον *P. anserina* ίσως να είναι στην πραγματικότητα ένας εναλλακτικός τύπος κυστιδιακού κυτταρικού θανάτου (Pinan-Lucarré *et al.*, 2005; 2007).

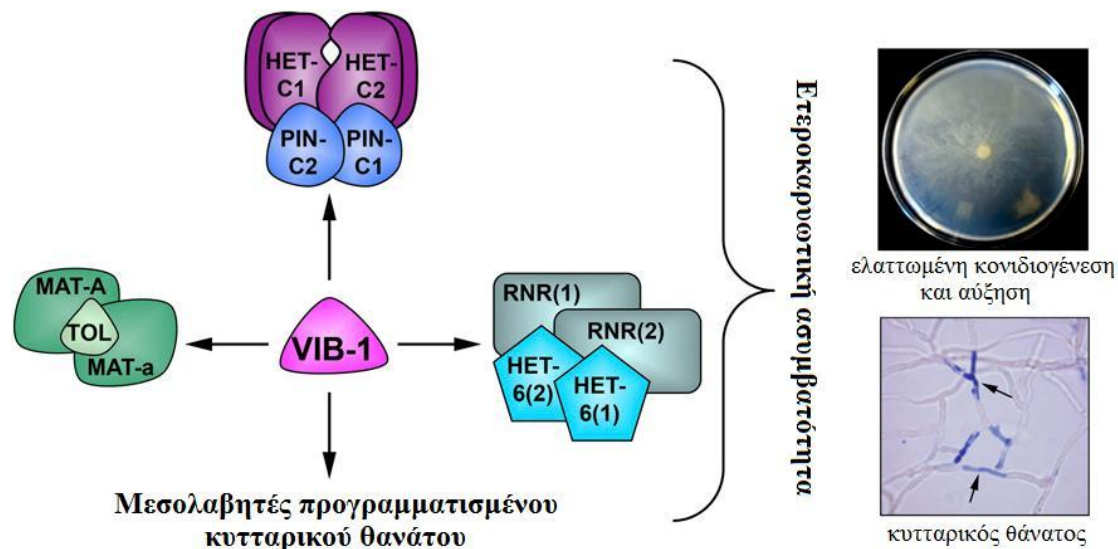
Στον μύκητα *N. crassa*, μεταλλαγές στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα *vib-1 (vegetative incompatibility blocked - 1)* καταστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από γενετικές διαφορές στα γονίδια ασυμβατότητας *het-c/pin-c, het-*

6/un-24, mat, het-e και *het-8* (Εικόνα 1.15) (Xiang & Glass, 2002; 2004; Dementhon *et al.*, 2006; Lafontaine & Smith, 2012). Επιπρόσθετα, το γονίδιο *vib-1* είναι απαραίτητο για την έκφραση τουλάχιστον μερικών από τα γονίδια με μοτίβο HET του *N. crassa*, συμπεριλαμβανομένων των *pin-c*, *tol* και *het-6*, ενώ επίσης απαιτείται για την παραγωγή εξωκυτταρικών πρωτεασών κατόπιν στέρησης άνθρακα ή αζώτου (Dementhon *et al.*, 2006). Είναι ενδιαφέρον πως, όπως και αρκετά από τα γονίδια *mod*, το γονίδιο *vib-1* εμπλέκεται επίσης στη φυλετική αναπαραγωγή και ρυθμίζει θετικά τον σχηματισμό πρωτοπεριθηκίων (Hutchison & Glass, 2010), ενώ επίσης παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην κονιδιογένεση (Xiang & Glass, 2004). Το γονίδιο *vib-1* κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο 670 αμινοξικών καταλοίπων, που αποτελεί ρυθμιστή ενεργότητας όξινης φωσφατάσης (Xiang & Glass, 2004), και ομόλογά του υπάρχουν σε όλους τους υφομύκητες· έτσι, έχει υποθεθεί πως και η λειτουργία του στην ΗΙ ίσως είναι συντηρημένη (Hutchison & Glass, 2010). Με βάση τα παραπάνω ευρήματα έχει προταθεί ένα μοντέλο κατά το οποίο οι πορείες ΗΙ και στέρησης άνθρακα/αζώτου διασυνδέονται, ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας VIB-1 είναι ίσως κύριος ρυθμιστής και των δύο (Dementhon *et al.*, 2006).

Περαιτέρω πρόσφατα βρέθηκε πως η πρωτεΐνη IME-2 στον μύκητα *N. crassa* (ομόλογη της πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης Ime2 του ζυμομύκητα *S. cerevisiae*) αλληλεπιδρά γενετικά με την πρωτεΐνη VIB-1 κατά την αναγνώριση του ετέρου και τον επακόλουθο PCD (Hutchison *et al.*, 2012). Τα διαθέσιμα δεδομένα υποδεικνύουν πως η IME-2 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της VIB-1 και, επιπλέον, ότι ρυθμίζει αρνητικά ένα μονοπάτι κυτταρικού θανάτου που λειτουργεί παράλληλα με το μονοπάτι κυτταρικού θανάτου στο οποίο εμπλέκεται η VIB-1. Είναι μάλιστα ενδιαφέρον πως το νέο, παράλληλο μονοπάτι πιθανά λειτουργεί μέσω των μιτοχονδρίων ή σε σχέση με αυτά (Hutchison *et al.*, 2012).

ΣΤ. Επίδραση της ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης

Οι συνέπειες της ΗΙ στη γονιδιακή έκφραση μελετήθηκαν σε γονιδιωματική κλίμακα για πρώτη φορά στον μύκητα *N. crassa*, κατά την αντίδραση ασυμβατότητας *het-c/pin-c* (Hutchison *et al.*, 2009). Οι αλλαγές στα επίπεδα μεταγραφής ήταν ευρείες, καθώς περισσότερα από 3000 γονίδια χαρακτηρίζονταν από σημαντικά αυξημένα ή ελαττωμένα μεταγραφή (σε περίπου ίσες αναλογίες μεταξύ τους) κατά την αντίδραση ΗΙ. Ακόμα πιο εντυπωσιακή είναι η κλίμακα του επαναπρογραμματισμού της γονιδιακής έκφρασης κατά την ΗΙ στο άλλο σύστημα-μοντέλο, τον μύκητα *P. anserina* (Bidard *et al.*, 2013). Σε αυτόν, περισσότερα από 4500 γονίδια εμφάνισαν τουλάχιστον διπλάσια ή υποδιπλάσια επίπεδα έκφρασης κατά την ασυμβατότητα (και πάλι, σε περίπου ίσες αναλογίες). Πιο αναλυτικά, η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με μοτίβα HET, NACHT και HeLo, που είναι χαρακτηριστικά των μελετημένων γονιδίων *het*, ήταν αυξημένη, καθώς επίσης και η έκφραση γονιδίων αυτοφαγίας, γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με πρωτεολυτικές και υδρολυτικές ενεργότητες, γονιδιακών ομάδων (clusters) του δευτερογενούς μεταβολισμού, γονιδίων τοξινών και γονιδίων που κωδικοποιούν για σηματοδοτικά μόρια (effectors). Στην αντίστοιχη μελέτη για τον μύκητα *N. crassa* παρατηρήθηκε σημαντική μεταγραφική αύξηση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, καθώς επίσης και γονιδίων σηματοδότησης, των μονοπατιών της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης και της σηματοδότησης ασβεστίου (Hutchison *et al.*, 2009). Η σημαντική ομοιότητα στα πρότυπα έκφρασης μεταξύ των δύο ειδών υποδηλώνουν μηχανιστική ομοιότητα στην απόκριση



Εικόνα 1.15. Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης της ΗΙ και του PCD από τον μεταγραφικό παράγοντα VIB-1 στον μύκητα *Neurospora crassa*. Ο VIB-1 απαιτείται για την ΗΙ που προκαλείται από γενετικές διαφορές στον συζευκτικό τύπο (MAT-A ή MAT-a, αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη TOL), το γονίδιο *het-6* (αλληλεπιδρά με τη μεγάλη υπομονάδα της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής, RNR, προϊόν του γονιδίου *un-24*) και το *het-c/pin-c* (Xiang & Glass, 2002; 2004; Lafontaine & Smith, 2012), και ενεργοποιεί τον PCD μέσω άγνωστων μεσολαβητών (Dementhon *et al.*, 2006). Οι φαινοτυπικές επιπτώσεις της ΗΙ στον *N. crassa* περιλαμβάνουν την αναστολή της αύξησης και την καταστολή της κονιδιογένεσης. Τα ασύμβατα ετεροκαρυωτικά διαμερίσματα των υφών αποκλείονται από το υπόλοιπο μυκήλιο και υποβάλλονται σε κυτταρικό θάνατο, και έτσι εμφανίζονται σκούρα χρωματισμένα κατόπιν χρώσης με ζωτικές χρωστικές, όπως το κυανό του μεθυλενίου (βέλη) (προσαρμογή από Hutchison *et al.*, 2012).

ασυμβατότητας στους δύο μύκητες, που είναι σε συμφωνία και με τη μορφολογική ομοιότητα των αποκρίσεων που παρατηρείται μεταξύ των ειδών (Bidard *et al.*, 2013).

Είναι αξιοσημείωτη η σύγκριση των μεταβολών στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης που επάγονται στον μύκητα *N. crassa* κατά την απόκριση ΗΙ και από την επίδραση με χημικούς παράγοντες που προκαλούν τον PCD, όπως η σταυροσπορίνη (staurosporine) και η φυτοσφιγκοσίνη (phytosphingosine). Οι αλλαγές στα μεταγραφικά επίπεδα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο περιπτώσεων, με τους αριθμούς των επαγόμενων και κατεσταλμένων γονιδίων να είναι πολύ μικρότεροι στην περίπτωση των χημικών παραγόντων, π.χ. με μόλις 135 γονίδια να έχουν σημαντικά διαφορετική έκφραση κατόπιν επίδρασης με σταυροσπορίνη (Videira *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2011). Επιπλέον, τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποδεικνύουν πως τα γονίδια του μύκητα που κωδικοποιούν για ομόλογα κασπασών των θηλαστικών ή του παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης (apoptosis-inducing factor, AIF) δεν απαιτούνται για την ΗΙ ή τον PCD. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν πως ο PCD κατά την ΗΙ λαμβάνει χώρα μέσω ενός νέου και πιθανά ειδικού για τους μύκητες μηχανισμού, που είναι πιθανά και ελκυστικός φαρμακευτικός στόχος για την αντιμετώπιση παθογόνων μυκήτων (Hutchison *et al.*, 2009).

Αν και η ΗΙ στους βασιδιομύκητες έχει μελετηθεί πολύ λιγότερο σε σχέση με τα είδη-μοντέλα των ασκομυκήτων, μια πρόσφατη μελέτη είχε στόχο την ανίχνευση γονιδίων των οποίων η έκφραση επάγεται κατά την απόκριση ΗΙ στον νηματοειδή βασιδιομύκητα *Amylostereum areolatum* με μια προσέγγιση διαφορικού υβριδισμού (subtractive hybridisation) (van der Nest *et al.*, 2011). Μεταξύ των γονιδίων που προσδιορίστηκαν

ανήκουν γονίδια διακυτταρικής προσκόλλησης, απόκρισης σε συνθήκες καταπόνησης (stress) και άμυνας, καθώς επίσης και γονίδια κυτταρικού θανάτου.

1.3.6 Εξελικτικές συνέπειες των προγραμμάτων γενετικής αναγνώρισης

Η αλληλομορφική ποικιλομορφία απαιτείται για την αναγνώριση του ετέρου, και συνεπώς θα μπορούσε να υποθεθεί πως υφίστανται ίσως ισχυρές εξελικτικές πιέσεις για τον περιορισμό της δυνατότητας σύντηξης στα γενετικά ταυτόσημα στελέχη. Οι υφομύκητες των οποίων τα γονίδια *het* έχουν χαρτογραφηθεί έχουν τυπικά 8-11 (ασκομύκητες) ή 1-4 (βασιδιομύκητες) τέτοια γονίδια, και 2-3 αλληλόμορφα σε κάθε γονίδιο (Aanen *et al.*, 2010). Τα γονίδια *het* δεν είναι ομαδοποιημένα, αλλά γενικά βρίσκονται διασκορπισμένα στο γονιδίωμα των υφομυκήτων. Έτσι, για ένα είδος με 8 γονίδια *het* και δύο αλληλόμορφα σε κάθε ένα, προβλέπονται 2^8 ή 256 διαφορετικοί συνδυασμοί αλληλομόρφων. Επομένως, αναμένεται ότι επιτυχείς συντήξεις μεταξύ στελεχών που είναι ταυτόσημα ή τουλάχιστον πολύ συγγενικά στους αλληλομορφικούς συνδυασμούς *het* είναι σχεδόν απίθανο να συμβούν στη φύση. Όταν χαρακτηρίστηκαν φυλογενετικά, τα γονίδια αναγνώρισης του ετέρου συχνά βρέθηκε να χαρακτηρίζονται από σταθεροποιούσα επιλογή και μερικές φορές να επιδεικνύουν διαειδικό πολυμορφισμό (Charlesworth, 2006). Αν και δεν ισχύει πάντοτε στους μύκητες (Milgroom & Kortesi, 1999; Kausrud *et al.*, 2006), πολλά γονίδια γενετικής αναγνώρισης έχει αποδειχθεί πως εμφανίζουν αυτόν τον τύπο εξελικτικής υπογραφής. Στον μύκητα *N. crassa* τα γονίδια *het-c* και *pin-c* βρίσκονται υπό σταθεροποιούσα επιλογή και εμφανίζουν διαειδικό πολυμορφισμό (Wu *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2010). Μια πρόσφατη μελέτη του γενετικού τόπου *het-c pin-c* στο γένος *Neurospora* έδειξε ότι αυτός ο γενετικός τόπος πιθανώς προέκυψε μέσω διπλασιασμού και ανακατατάξεων που οδήγησαν σε αλλαγή στη γονιδιακή σειρά, έτσι ώστε το γονίδιο *pin-c* να βρεθεί ακριβώς δίπλα στο *het-c* (Hall *et al.*, 2010). Περισσότερο απομακρυσμένοι μύκητες περιέχουν ένα σαφές ορθόλογο του *het-c* και ομόλογα του *pin-c*, αλλά φαίνεται ότι η λειτουργία της ΗΙ περιορίζεται μόνον σε αυτά τα είδη όπου τα γονίδια *het-c* και *pin-c* είναι γειτονικά και βρίσκονται υπό ανισορροπία σύνδεσης (Hall *et al.*, 2010). Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο γενετικός τόπος *het-c pin-c* αρχικά είχε δύο αλληλόμορφα και ότι ένα τρίτο αλληλόμορφο δημιουργήθηκε με ένα σπάνιο γεγονός ανασυνδυασμού μεταξύ των υπαρχόντων (Hall *et al.*, 2010). Τα αλληλόμορφα των γονιδίων *het-6* και *un-24*, όπως και ο γενετικός τόπος *het-c pin-c*, είναι παρόντα σε ίσες συχνότητες στους πληθυσμούς του *N. crassa*, και αυτά τα αλληλόμορφα έχουν διατηρηθεί κατόπιν γεγονότων ειδογένεσης (Smith *et al.*, 2006; Powell *et al.*, 2007), όπως επίσης και η παρακεντρική αναστροφή που σχετίζεται με τη γονιδιωματική περιοχή των *un-24 het-6* και παρεμποδίζει τον μεταξύ τους ανασυνδυασμό.

Εξελικτικές προσομοιώσεις υπολόγισαν πως περισσότερα από δύο αλληλόμορφα σε ένα γονίδιο *het* θα υπήρχαν μόνον εάν υπήρχε κάποιος περιορισμός στη δημιουργία νέων γονιδίων *het* (Muirhead *et al.*, 2002). Επιπρόσθετα, το μοντέλο προβλέπει πως ο διαειδικός πολυμορφισμός θα υπήρχε μόνον εάν ο ρυθμός δημιουργίας μεταλλαγών ήταν σχετικά χαμηλός, το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι πολλοί πολυμορφισμοί των γονιδίων *het* αποτελούνται από εισδοχές/ελλείψεις (indels) ή αναστροφές, που είναι σχετικά σπάνιοι τύποι μεταλλαγών (Muirhead *et al.*, 2002). Έτσι, είναι πιθανό ότι τα αλληλόμορφα τουλάχιστον κάποιων από τα γονίδια *het* έχουν διατηρηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα και βρίσκονται υπό ισχυρές επιλεκτικές πιέσεις.

Στον μύκητα *P. anserina* η οικογένεια γονιδίων που περιλαμβάνει τα μοτίβα NACHT/WD (μερικά περιέχουν επίσης μοτίβα HET) υπόκεινται σε συντονισμένη εξέλιξη του μοτίβου επαναλήψεων WD, το οποίο ποικίλει ευρέως στον αριθμό των επαναλήψεων (Paoletti *et al.*, 2007). Ακόμα και ψευδογονίδια που έχουν απενεργοποιηθεί μέσω του μηχανισμού RIP περιέχουν λειτουργικές αλληλουχίες επαναλήψεων WD (Paoletti *et al.*, 2007). Τέσσερα κατάλοιπα στην περιοχή των επαναλήψεων WD βρίσκονται υπό θετική διαφοροποιούσα εξέλιξη, και αυτά τα κατάλοιπα εντάσσονται σε μια προβλεπόμενη επιφάνεια πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Paoletti *et al.*, 2007). Σε αυτήν την περίπτωση, φαίνεται πως νέα αλληλόμορφα θα μπορούσαν να δημιουργηθούν με αλλαγή στον αριθμό των επαναλήψεων ή μέσω μεταλλαγών στην περιοχή WD, και αυτές οι μεταλλαγές θα μπορούσαν να διαδοθούν σε άλλες πρωτεΐνες που φέρουν επαναλήψεις WD μέσω της συντονισμένης εξέλιξης. Συνεπώς, υπάρχουν πολλοί τρόποι για τη δημιουργία νέων γονιδίων *het*, όπως επίσης και για τη δημιουργία νέων αλληλομόρφων για αυτά τα γονίδια.

1.3.7 Ομοιότητα της ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας με τους μηχανισμούς αναγνώρισης διαφορετικών ειδών

Η HI θεωρείται γενικά ένας μηχανισμός που στοχεύει στην καταστροφή του κυττάρου που προκύπτει από τη σύντηξη μεταξύ ασύμβατων «ατόμων» του ίδιου είδους. Για έναν τέτοιο μηχανισμό καταστροφής είναι ίσως δύσκολο να εξηγηθούν ο βαθμός και η πολυπλοκότητα των αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση που συνοδεύουν αυτήν την απόκριση (Hutchison *et al.*, 2009; Bidard *et al.*, 2013). Οι Paoletti & Sauré (2009) πρότειναν, λαμβάνοντας υπόψη και την ομολογία μεταξύ των πρωτεϊνών STAND της HI και των υποδοχέων αναγνώρισης παθογόνων των τύπων NLR (στα ζώα) ή NBS-LRR (στα φυτά), πως ο μηχανισμός ασυμβατότητας ίσως να έχει προκύψει εξελικτικά από τους μηχανισμούς ανίχνευσης και απόκρισης στην παρουσία διαφορετικών ειδών. Αυτή η πρόταση συνάδει με τη γενική συζήτηση περί εξελικτικών σχέσεων μεταξύ της αναγνώρισης της ενδοειδικής ετερότητας (allorecognition) και της διαειδικής αναγνώρισης (xenorecognition) (Rinkevich, 2004; Aanen *et al.*, 2008). Η επιλογή που ασκείται στις πρωτεΐνες STAND μέσω της ανάγκης για ανίχνευση παθογόνων ίσως να αποτελεί την εξωτερική επιλεκτική πίεση που χρειάζεται για τη διατήρηση του πολυμορφισμού στα γονίδια αναγνώρισης του ετέρου (HI), που είναι δύσκολο να εξηγηθεί διαφορετικά, κάτι που είναι γνωστό ως «παράδοξο του Crozier» (Crozier, 1986; Rousset & Roze, 2007; Aanen *et al.*, 2008).

Σε υποστήριξη αυτής της υπόθεσης, οι Bidard *et al.* (2013) πρότειναν, για την ερμηνεία της ευρείας μεταγραφικής απόκρισης που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της HI, ότι η απάντηση στην παρουσία διαφορετικών «ατόμων» του ίδιου είδους ενεργοποιεί έναν μεταβολικό καταρράκτη (cascade) που λειτουργεί και για την απόκριση σε διαφορετικά είδη. Για έναν τέτοιο μηχανισμό μπορεί να προβλεφθεί η εμπλοκή του σε πολλές διαφορετικές βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων του μυκοπααρασιτισμού, του ενδοφυτικού τρόπου ζωής, του ανταγωνισμού ή της άμυνας του ξενιστή έναντι μικροβιακών παθογόνων, κάτι που ίσως εξηγεί την κυτταροβιολογική/βιοχημική του πολυπλοκότητα. Αυτός ο καταρράκτης είναι γνωστό πως περιλαμβάνει πρωτεΐνες-μόρια σηματοδότησης, τοξίνες, πρωτεάσες, λιπάσες, φαινολοξειδάσες και συστατικά του δευτερογενούς μεταβολισμού, τα οποία εμπλέκονται σε διάφορες μορφές διαειδικών αλληλεπιδράσεων σε πολλά είδη μυκήτων (Fox & Howlett, 2008; Berendsen *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2010; de Jonge *et al.*, 2011; Schmidt & Panstruga, 2011; Veneault-Fourrey & Martin, 2011).

1.4 Το γένος φυτοπαθογόνων μυκήτων *Verticillium*

1.4.1 Είδη του γένους *Verticillium* και συστηματική κατάταξη

Το γένος *Verticillium* έχει μακρά ταξινομική ιστορία με πολυάριθμες αναθεωρήσεις και μετακινήσεις τάξων, που συνεχίζονται μέχρι και σήμερα. Η πρώτη περιγραφή του γένους έγινε το 1816 για την κατάταξη ενός σαπροτροφικού αφυλετικού μύκητα με υαλώδεις σπονδυλωτούς κονιδιοφόρους και μονοκύτταρα ωοειδή κονιδιοσπόρια, του *V. tenerum* (von Esenbeck, 1816). Στα χρόνια που ακολούθησαν το γένος επεκτεινόταν συνεχώς ώστε να συμπεριλάβει τελικά περισσότερα από 250 είδη και ταξινομικές ποικιλίες αφυλετικών ειδών (Zare *et al.*, 2004; Index Fungorum, 2013) που μοιράζονται τη γενική αυτή βλαστητική μορφολογία. Διαμορφώθηκε έτσι σε ένα πολυπληθές, ετερογενές και πολυφυλετικό γένος που περιελάμβανε φυτοπαθογόνους αντιπροσώπους οικονομικής σημασίας (π.χ. *V. dahliae*), εντομοπαθογόνους παράγοντες βιοελέγχου (π.χ. *V. lecanii*), σαπροτροφικούς μύκητες (π.χ. *V. tenerum*), μεταξύ άλλων που παρασιτούν σε νηματώδεις σκώληκες του εδάφους (π.χ. *V. chlamydosporium*) ή σε άλλους μύκητες (μυκητόφιλοι ή υπερπαρασιτικοί αντιπρόσωποι, π.χ. *V. fungicola*).

Την προηγούμενη δεκαετία έγινε μια συστηματική προσπάθεια αναθεώρησης της συστηματικής του γένους με τη συμβολή της μοριακής συστηματικής μελέτης, η οποία κατέληξε στον περιορισμό του γένους *Verticillium* (*sensu stricto*) – με το είδος *V. dahliae* (Klebahn, 1913) ως νέο είδος-τύπο (Gams *et al.*, 2005) – σε 5 μόνον φυτοπαθογόνα είδη, τα *V. albo-atrum* (Reinke & Berthold, 1879), *V. dahliae* (Klebahn, 1913), *V. nubilum* (Pethybridge, 1918), *V. tricorpus* (Isaac, 1953) και *V. longisporum* (Karapara *et al.*, 1997). Τα υπόλοιπα είδη μεταφέρθηκαν σε άλλα γένη, όπως τα *Lecanicillium* (που περιλαμβάνει παθογόνα εντόμων και μυκήτων), *Pochonia* και *Haptocillium* (παράσιτα νηματωδών σκωλήκων), και *Gibellulopsis* και *Musicillium* (παθογόνα φυτών) (Gams & Zare, 2001; Zare & Gams, 2001a; b; Zare *et al.*, 2001; Zare *et al.*, 2004; Zare *et al.*, 2007; Zare & Gams, 2008). Ταυτόχρονα, το γένος *Verticillium* *s. str.* μεταφέρθηκε στην οικογένεια Plectosphaerellaceae (στην οποία ανήκουν και τα γένη *Gibellulopsis* και *Musicillium*), που σχετίζεται με το σημαντικό γένος φυτοπαθογόνων μυκήτων *Colletotrichum* στη συγγενική οικογένεια Glomerellaceae (Zhang *et al.*, 2006; Zare *et al.*, 2007). Η οικογένεια Plectosphaerellaceae έχει ασαφή φυλογενετική θέση εντός της υποκλάσης Hypocreomycetidae του φύλου των Ασκομυκήτων, εντασσόμενη στην τάξη Phyllachorales ή στη νέα τάξη Glomerellales (Lumbsch & Huhndorf, 2010; Réblová *et al.*, 2011; Morgenstern *et al.*, 2012). Η τρέχουσα αποδεκτή συστηματική κατάταξη του γένους *Verticillium* συνοψίζεται στον Πίνακα 1.4.

Πρόσφατες φυλογενετικές αναλύσεις οδήγησαν στην πρόταση ενός νέου ταξινομικού πλαισίου για το γένος *Verticillium*, με αναθεώρηση των ορίων των γνωστών ειδών και την περιγραφή 5 νέων (Inderbitzin *et al.*, 2011a). Σύμφωνα με αυτήν τη μελέτη, το γένος διακρίνεται σε δύο κύριες ομάδες, Flavexudans και Flavnonexudans, που χαρακτηρίζονται από την παραγωγή ή την απουσία κίτρινων χρωστικών στις υφές, αντίστοιχα. Ο κλάδος Flavexudans αποτελείται από τα είδη *V. albo-atrum*, *V. tricorpus*, *V. zaregamsianum*, *V. isaacii* και *V. klebahnii*, εκ των οποίων τα δύο τελευταία δεν διακρίνονται μορφολογικά από το *V. tricorpus*, αλλά μπορεί να διαφέρουν στην παθογονικότητα. Ο άλλος κλάδος, Flavnonexudans, περιέχει τα είδη *V. nubilum*, *V. dahliae* και *V. longisporum*, καθώς επίσης και τα δύο είδη *V. alfalfae* και *V. nonalfalfae* που ομοιάζουν μορφολογικά με το *V. albo-atrum* του άλλου κλάδου (Inderbitzin *et al.*, 2011a). Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των 10

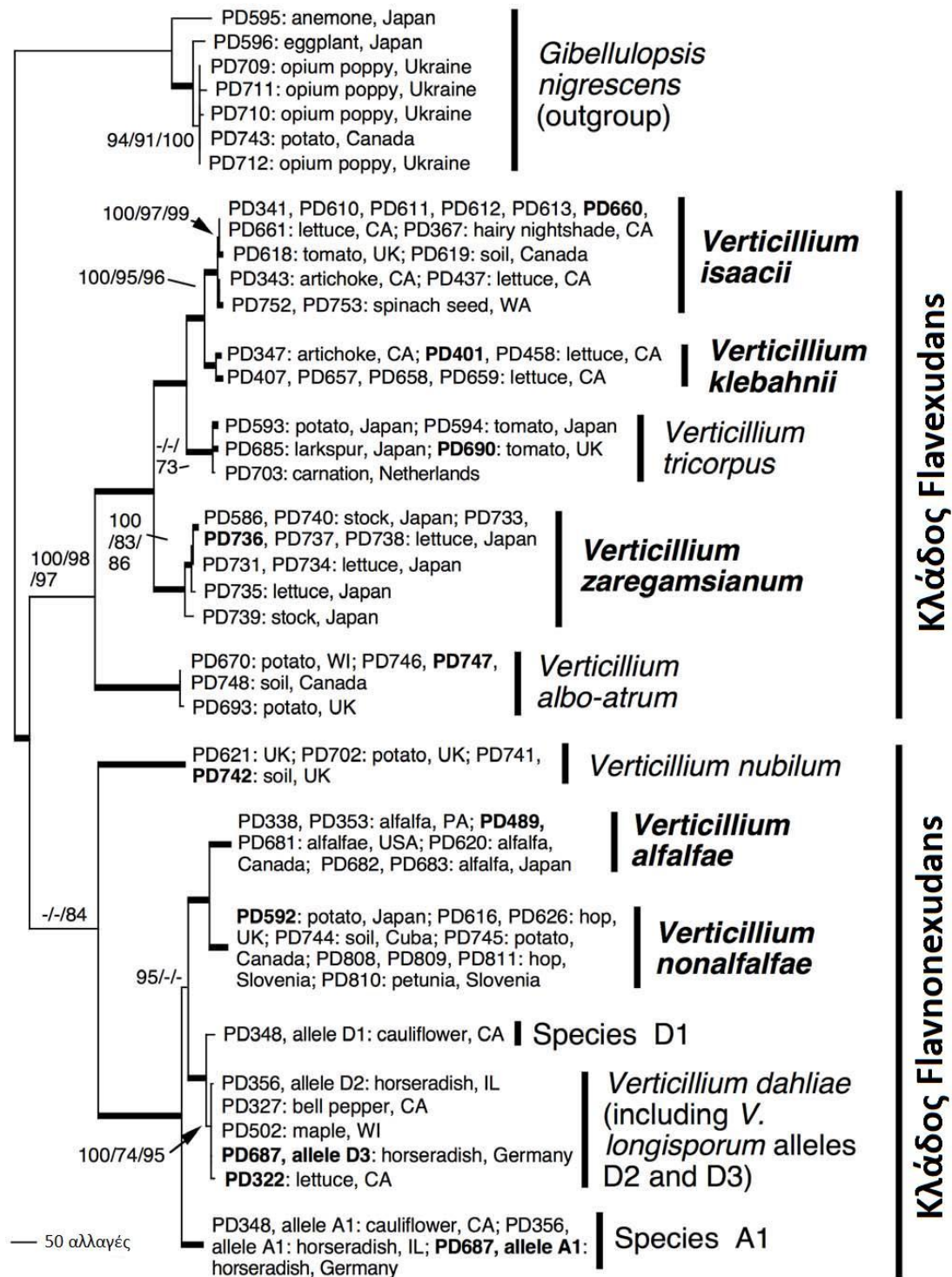
Πίνακας 1.4	
Η τρέχουσα συστηματική κατάταξη του γένους <i>Verticillium</i> (κατά το NCBI Taxonomy, 2013 και τη βιβλιογραφία που αναφέρεται στο κείμενο)	
ΥΠΕΡΒΑΣΙΛΕΙΟ	Eukaryota (Opisthokonta)
ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Fungi
ΥΠΟΒΑΣΙΛΕΙΟ	Dikarya
ΦΥΛΟ	Ascomycota
ΥΠΟΦΥΛΟ	Pezizomycotina
ΚΛΑΣΗ	Sordariomycetes
ΥΠΟΚΛΑΣΗ	Hypocreomycetidae
ΤΑΞΗ	Glomerellales
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Plectosphaerellaceae (mitosporic)
ΓΕΝΟΣ	<i>Verticillium</i>

προτεινόμενων ειδών του γένους *Verticillium* απεικονίζονται στο φυλογενετικό δένδρο της Εικόνας 1.16.

Ειδικά η ταξινομική θέση των στελεχών του *V. longisporum* έχει αποτελέσει σημείο διχογνωμίας για αρκετά χρόνια, καθώς η αναγωγή του το 1997 σε διακριτό είδος (Kararapa *et al.*, 1997) δεν έγινε αποδεκτή από όλους τους ερευνητές. Το είδος αυτό έχει ιδιαίτερα γνωρίσματα, όπως το περίπου διπλάσιο μέσο μήκος κωνιδίων και η σχεδόν διπλάσια ποσότητα DNA ανά πυρήνα σε σχέση με το συγγενικό είδος *V. dahliae*, αντικρουόμενα δεδομένα σχετικά με τις φυλογενετικές σχέσεις του με τα άλλα είδη του γένους, και ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών του (Kararapa & Typas, 2001; Barbara & Clewes, 2003; Fahleson *et al.*, 2004; Pantou *et al.*, 2005; Klosterman *et al.*, 2009). Το είδος έχει περιγραφεί ως «περίπου διπλοειδές» (near-diploid) (Kararapa *et al.*, 1997) ή «αμφιαπλοειδές» (Collins *et al.*, 2003), ενώ ήδη από αρκετά χρόνια έχει εισαχθεί και η θεωρία για την πιθανή προέλευσή του μέσω διαειδικού υβριδισμού (Kararapa *et al.*, 1997). Δεδομένα από πρόσφατες φυλογενετικές αναλύσεις (Inderbitzin *et al.*, 2011b; Tran *et al.*, 2013) ενίσχυσαν περαιτέρω αυτήν την υπόθεση, και προτείνεται πλέον πως τα στελέχη του διπλοειδούς *V. longisporum* έχουν προέλθει από τρία ανεξάρτητα γεγονότα διαειδικού υβριδισμού ενός άγνωστου πατρικού είδους (A1) με ένα επίσης άγνωστο είδος (D1), καθώς επίσης και με δύο διαφορετικές εξελικτικές γραμμές (lineages) του *V. dahliae* (D2 και D3) (Inderbitzin *et al.*, 2011b; Tran *et al.*, 2013).

1.4.2 Μορφολογία και διάκριση των ειδών του *Verticillium*

Τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και τα κυριότερα κριτήρια διάκρισης μεταξύ των φυτοπαθογόνων ειδών του γένους *Verticillium* (σύμφωνα με τον παραδοσιακό και προς το παρόν ευρέως αποδεκτό ταξινομικό ορισμό τους) συνοψίζονται στον Πίνακα 1.5. Στην Εικόνα 1.17 παρουσιάζεται η τυπική μακροσκοπική και μικροσκοπική μορφολογία του είδους *V. dahliae*.



Εικόνα 1.16. Φυλογενετικό δένδρο των 10 ειδών του *Verticillium*, σύμφωνα με τη νέα συστηματική πρόταση των Inderbitzin *et al.* (2011a), βάσει των συνδυασμένων αλληλουχιών των γονιδίων *ACT* (ακτίνη), *EF* (παράγοντας επιμήκυνσης 1-α), *GPD* (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης) και *TS* (συνθάση τρυπτοφάνης), και με χρήση του *Gibellulopsis nigrescens* ως εξωτερικής ομάδας (outgroup). Το δένδρο της εικόνας είναι το συναινετικό δένδρο που προέκυψε με ανάλυση κατά Bayes (Bayesian inference, BI). Οι αριθμοί σε κάθε διακλάδωση του δένδρου αποτελούν τις τιμές υποστήριξης κατά τις αναλύσεις BI, μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) και μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony), αντίστοιχα. Οι κλάδοι με έντονη γραμμή είχαν άριστη υποστήριξη από όλες τις μεθόδους (από Inderbitzin *et al.*, 2011a).

Πίνακας 1.5

Μορφολογικά χαρακτηριστικά και διάκριση των ειδών του γένους *Verticillium***Μακροσκοπικά
χαρακτηριστικά**

- αρχικά λευκές, βαμβακώδεις αποικίες με μέτριο πάχος ανάπτυξης
- στη συνέχεια υπόλευκες, σκουρόχρωμες έως μαύρες λόγω σχηματισμού διατηρητικών δομών
- κίτρινες-πορτοκαλί χρωστικές στα *V. albo-atrum* και *V. tricorpus*

(Hawksworth & Talboys, 1970; Inderbitzin *et al.*, 2011a)

**Μικροσκοπικά
χαρακτηριστικά**

- υαλώδεις μυκήλιο
- υαλώδεις κονιδιοφόροι με 2-3 σπονδύλους· κάθε σπόνδυλος φέρει 2-4 απτρακτοειδείς κλάδους· κάθε κλάδος καταλήγει σε φιαλίδιο με πολυάριθμα φιαλιδιοσπόρια
- φιαλίδια με διάφορα σχήματα, ενίοτε δευτερογενώς διακλαδισμένα
- κονίδια συνήθως μονοκύτταρα υαλώδη, με σχήμα ωσειδές, επίμηκες νεφροειδές ή ελλειψοειδές, διαστάσεων (2,5-10,5 x 1,4-4) μm

(Hawksworth & Talboys, 1970)

Διατηρητικές δομές

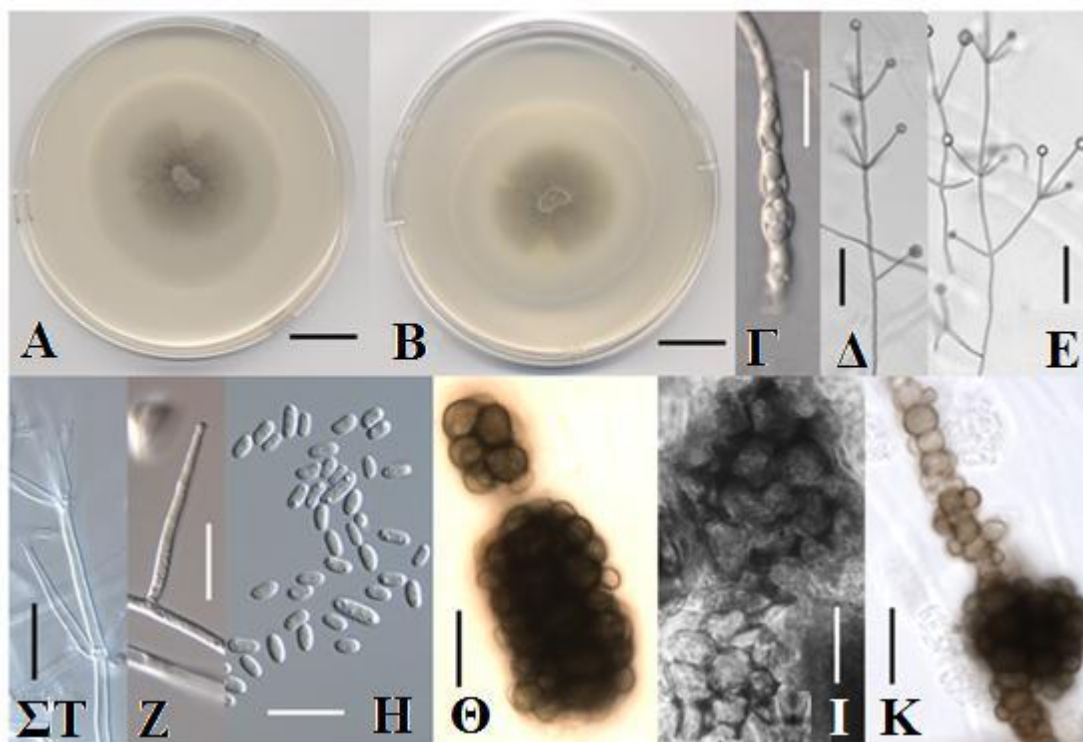
- μικροσκληρώτια στα *V. dahliae* και *V. longisporum*
- σκοτεινόχρωμο διατηρητικό μυκήλιο (dark resting mycelium, DRM) στο *V. albo-atrum*
- μικροσκληρώτια, DRM και γλαμυδοσπόρια στο *V. tricorpus*
- γλαμυδοσπόρια στο *V. nubilum*

(Heale & Isaac, 1965; Hawksworth & Talboys, 1970; Heale & Typas, 1976; Karapara *et al.*, 1997)

**Κριτήρια διάκρισης
των ειδών**

- μορφολογικά (π.χ. διατηρητικές δομές, διαστάσεις κονιδίων)
- φυσιολογικά-βιοχημικά (π.χ. επίδραση διαφορετικών θρεπτικών συστατικών, θερμοκρασίας, pH και υπεριώδους ακτινοβολίας στην αύξησή τους και στην έκκριση εξωκυτταρικών ενζύμων)
- φυτοπαθολογικά (π.χ. φάσμα ξενιστών)
- μοριακά-βιοχημικά (π.χ. ηλεκτροφορητικά πρωτεϊνικά και ενζυμικά πρότυπα, πρότυπα RFLPs, RAPD-PCR)

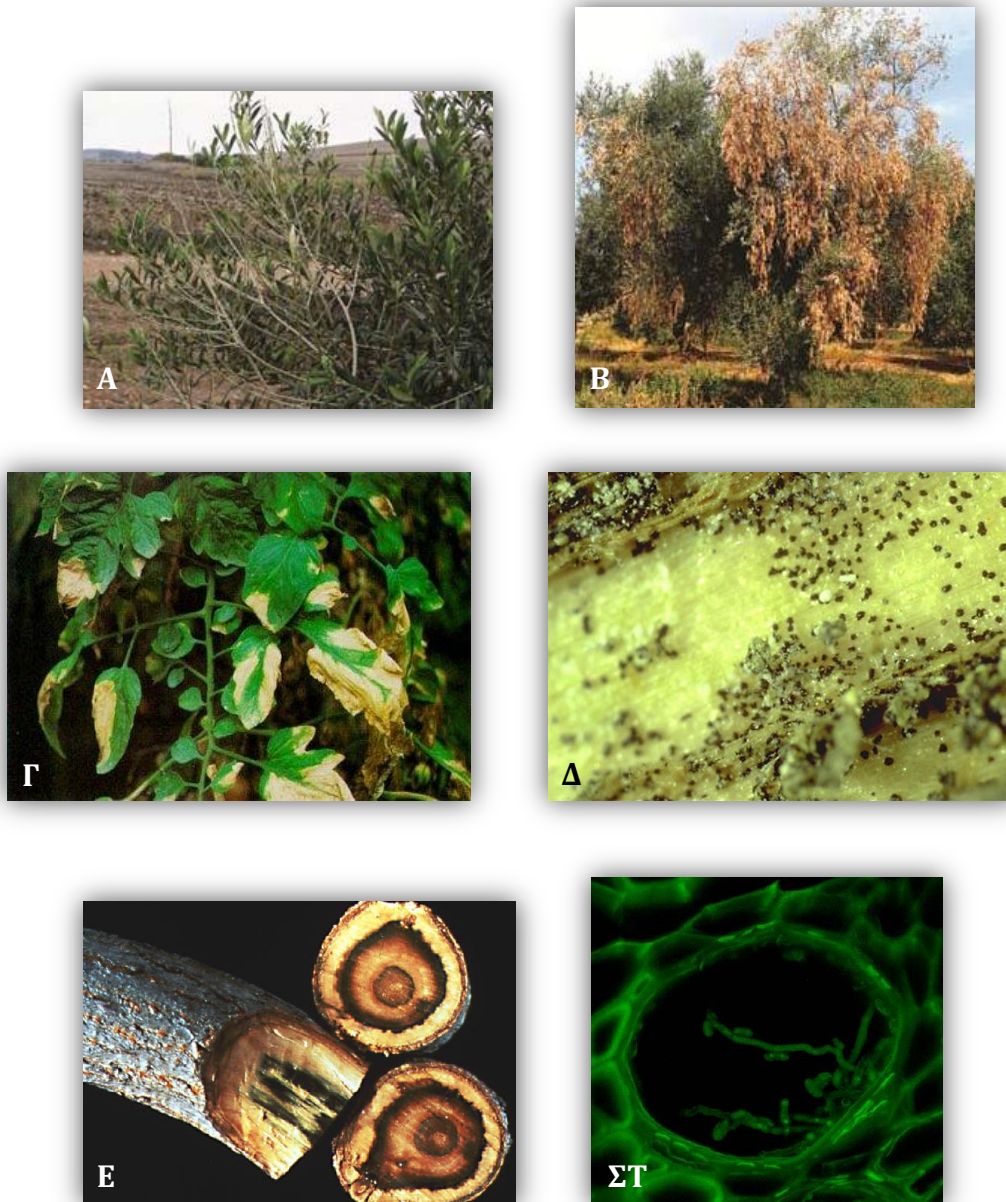
(Heale & Isaac, 1965; Puhalla, 1973; Micales *et al.*, 1986; Typas *et al.*, 1992; Okoli *et al.*, 1993; 1994; Moukhamedov *et al.*, 1994; Morton *et al.*, 1995; Koike *et al.*, 1996; Karapara *et al.*, 1997; Bidochka *et al.*, 1999; Pegg & Brady, 2002; Inderbitzin *et al.*, 2011a)



Εικόνα 1.17. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα *Verticillium dahliae*. **A.** Εμπρόσθια όψη αποικίας (ηλικίας 14 ημερών, σε θρεπτικό υλικό PDA). **B.** Οπίσθια όψη αποικίας (14 ημερών, PDA). **Γ.** Διογκωμένα κύτταρα στο μυκήλιο (28 ημερών, PDA). **Δ.** Κονidioφόρος (15 ημερών, WA-p). **Ε.** Διακλαδισμένος κονιοδιοφόρος (12 ημέρες, WA-p). **ΣΤ.** Φιαλίδια σε σπείρες (25 ημέρες, WA-p). **Ζ.** Μεμονωμένο φιαλίδιο (14 ημέρες, PDA). **Η.** Κονίδια (9 ημέρες, PDA). **Θ.** Μικροσκληρώτια (12 ημέρες, WA-p). **Ι.** Μικροσκληρώτια του πρωτότυπου υλικού του ολότυπου του *V. dahliae* από κλάδο του φυτού *Dahlia* sp. **Κ.** Βραχεία υφή με καφέ χρωστική, αποτελούμενη από σφαιροειδή κύτταρα, σε επαφή με μικροσκληρώτιο (49 ημέρες, PDA). Κλίμακα: (A), (B) = 2 cm, (Γ), (ΣΤ)-(Κ) = 20 μm, (Δ), (Ε) = 50 μm. Μέθοδος απεικόνισης: (A), (B) = ψηφιακός σαρωτής εγγράφων (document scanner), (Γ), (ΣΤ)-(Η) = μικροσκοπία αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski), (Δ), (Ε), (Θ), (Κ) = μικροσκοπία φωτεινού πεδίου (bright field), (Ι) = μικροσκοπία αντίθεσης φάσεων (phase contrast) (από Inderbitzin *et al.*, 2011a).

1.4.3 Βιολογία και φυτοπαθολογική σημασία των ειδών του γένους *Verticillium*

Τα φυτοπαθογόνα είδη του γένους *Verticillium* είναι υπεύθυνα για μερικές από τις σημαντικότερες ασθένειες παγκοσμίως που προσβάλλουν τα λαχανικά, τις μεγάλες καλλιέργειες, τις δενδρώδεις καλλιέργειες, πολυάριθμα καλλωπιστικά και αυτοφυή φυτά και ζιζάνια, κυρίως στις εύκρατες και τις υποτροπικές περιοχές. Η ασθένεια που προκαλεί το *Verticillium* στα φυτά ανήκει στην κατηγορία των αδρομυκώσεων, δηλαδή ασθενειών που προκαλούνται από την παρουσία και τη δραστηριότητα του παθογόνου μύκητα στα αγγεία του ξυλώματος του φυτού (σχετικές αδρομυκώσεις προκαλούνται και από άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες, των γενών *Ceratocystis*, *Ophiostoma* και *Fusarium*). Τυπικά συμπτώματα της αδρομύκωσης είναι η απώλεια σπαργής, η χλόρωση φύλλων και άλλων πράσινων τμημάτων του φυτικού σώματος, ο μαρασμός (εξ ου και η κοινή αγγλοσαξονική ονομασία της ασθένειας, “*Verticillium wilt*”), και τελικά η νέκρωση τμημάτων ή και ολόκληρου του προσβεβλημένου φυτού (Εικόνα 1.18). Χαρακτηριστικός είναι ο καστανός



Εικόνα 1.18. Τυπικά συμπτώματα βερτισιλλίωσης (από τον μύκητα *Verticillium dahliae*) σε διάφορους φυτικούς ξενιστές. **A.** Αποφύλλωση κλάδου και κλαδίσκων ενός τμήματος δένδρου ελιάς (ποικιλίας “Arbequina”). **B.** Οξύς μαρασμός λόγω του *Verticillium* ενός δένδρου ελιάς (ποικιλίας “Amfissis”). **Γ.** Επιναστία, μαρασμός και νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα τομάτας. **Δ.** Παρουσία πληθώρας μικροσκληρωτίων σε τομή κονδύλου πατάτας. **Ε.** Μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου σφενδάμου. **ΣΤ.** Αύξηση υφών και παραγωγή κονιδίων του μύκητα μέσα στα αγγεία του φυτικού ξυλώματος (οι A και B από Jiménez-Díaz *et al.*, 2012, οι Γ, Δ από *American Phytopathological Society*, η E από Department of Plant Pathology, University of Minnesota, και η ΣΤ από Prof. R. Rowe, Molecular and Cellular Imaging Center, The Ohio State University).

μεταχρωματισμός των αγγειακών ιστών (Εικόνα 1.18), καθώς και η φυσική τους απόφραξη από μυκήλιο, σπόρια, πολυσακχαρίτες μυκητιακής παραγωγής ή τυλώσεις των γειτονικών παρεγχυματικών κυττάρων (Pegg, 1974; Green, 1981; DeVay, 1989; Pegg, 1989; Pegg & Brady, 2002; Klosterman *et al.*, 2009). Μεταξύ των ειδών του *Verticillium*, τη μεγαλύτερη

φυτοπαθολογική σημασία παρουσιάζουν πρωτίστως το *V. dahliae* και δευτερευόντως τα *V. albo-atrum* και *V. longisporum*: αυτά προσβάλλουν περισσότερα από 400 είδη φυτών (που ανήκουν σε περισσότερες από 60 διαφορετικές οικογένειες) σε όλον τον κόσμο και προκαλούν σημαντικές ετήσιες απώλειες στη φυτική παραγωγή παγκοσμίως, ενώ ο κατάλογος των ξενιστών συνεχώς εμπλουτίζεται με νέες αναφορές (Bell, 1994; Agrios, 2005; Klosterman *et al.*, 2009; Ligoixigakis, 2009). Στον Πίνακα 1.6 συνοψίζονται οι βασικότεροι παράγοντες που ευνοούν τη μόλυνση, τα συμπτώματα, οι τρόποι εξάπλωσης και οι κύριες στρατηγικές αντιμετώπισης της φυτικής ασθένειας που προκαλείται από τα είδη του *Verticillium* (βερτισιλλίωση).

Τα είδη του *Verticillium* είναι εδαφογενείς αφυλετικοί υφομύκητες. Οι βλαστητικές υφές και τα κονίδια του *V. dahliae* δεν επιβιώνουν εκτός του ξενιστή για περισσότερο από μερικές εβδομάδες, πιθανώς γιατί ο μύκητας σε αυτήν τη μορφή δεν είναι ικανός να ανταγωνισθεί άλλους μικροοργανισμούς του εδάφους (Isaac, 1953). Ωστόσο, ο μύκητας μπορεί να διατηρηθεί είτε στις ρίζες ζιζανίων και ασυμπτωματικών φυτών, είτε απουσία ξενιστών με τη μορφή των ανθεκτικών μικροσκληρωτίων (διατηρητικών δομών) στο έδαφος για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 14 ετών (Wilhelm, 1955; Schnathorst, 1981). Αλλαγές στη ριζόσφαιρα που προκαλούνται από εκκρίσεις των ριζών διεγείρουν τη βλάστηση των μικροσκληρωτίων και επιτρέπουν στον μύκητα να αποικίσει πρώτα τη ριζοδερμίδα και ύστερα να εισέλθει στα αγγεία του ξύλου. Ο κύκλος ζωής του *V. dahliae* παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.19. Έχει αναφερθεί πως τα είδη *V. dahliae* και *V. albo-atrum* μπορούν σπάνια να προσβάλουν ίσως και τα φύλλα ευπαθών ξενιστών με αερομεταφερόμενα κονίδια, γεγονός που επιφέρει διασυστηματική προσβολή (Λιγοξυγκάκης, 1998; Agrios, 2005). Η μακροβιότητα των μικροσκληρωτίων στο έδαφος, το αγγειακό σύστημα των φυτών-ξενιστών ως το ιδιαίτερο ενδιαίτημα του μύκητα, η σπανιότητα ανθεκτικών φυτικών ποικιλιών, αλλά και η σχετική έλλειψη εξειδίκευσης ως προς τον ξενιστή δυσχεραίνουν τον έλεγχο της ασθένειας, η οποία εξακολουθεί να προκαλεί δριμερείς ετήσιες οικονομικές απώλειες (Pegg & Brady, 2002; Klosterman *et al.*, 2009).

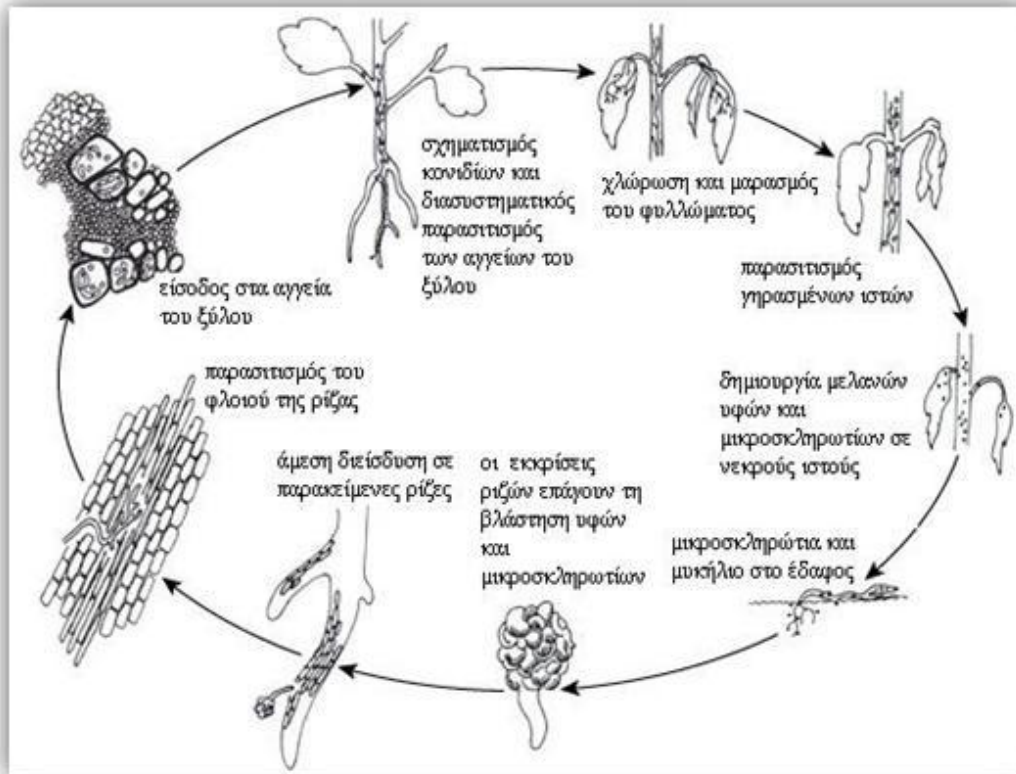
1.4.4 Φυλές (races), παθότυποι (pathotypes) και μοριακή διάγνωση

Η κατανόηση της γενετικής ποικιλότητας και της πληθυσμιακής δομής του μύκητα *V. dahliae* προβλέπεται ότι μπορεί να διευκολύνει την πρόβλεψη της παθογονικότητας (pathogenicity) και μολυσματικότητας (virulence) πληθυσμών του παθογόνου σε διάφορους ξενιστές, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για τον σχεδιασμό αποτελεσματικών φυτοπροστατευτικών στρατηγικών. Εξαιτίας της εμπορικής σημασίας της τομάτας, η μόλυνσή της από τον *V. dahliae* έχει μελετηθεί εκτενώς ήδη από αρκετές δεκαετίες και έχουν περιγραφεί δύο φυσιολογικές φυλές (races) του μύκητα. Η φυλή 1 περιλαμβάνει εκείνα τα στελέχη που δεν εμφανίζουν σημαντική μολυσματικότητα σε ποικιλίες τομάτας που φέρουν τον γενετικό τόπο ανθεκτικότητας *Ve*, ενώ η φυλή 2 περιέχει τα στελέχη του μύκητα που είναι ικανά να προκαλέσουν ασθένεια σε ποικιλίες τομάτας ανεξαρτήτως του *Ve* (Pegg, 1974; Pegg & Brady, 2002). Η ανθεκτικότητα που σχετίζεται με τον γενετικό τόπο *Ve* οφείλεται πιο συγκεκριμένα στο γονίδιο *Ve1*, που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη-υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας (de Jonge *et al.*, 2012). Μια δοκιμασία βάσει της *αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης* (polymerase chain reaction, PCR), που σχετίζεται με την ενίσχυση μιας περιοχής DNA ειδικής για τη φυλή 1 (B68-TV), έχει προταθεί για τη διάκριση των δύο

Πίνακας 1.6	
Μόλυνση, συμπτώματα, εξάπλωση και αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης	
Παράγοντες που επηρεάζουν τη μόλυνση	<ul style="list-style-type: none"> • αβιοτικοί (π.χ. θερμοκρασία, φως, υγρασία, αερισμός) • βιοτικοί (π.χ. πυκνότητα του μύκητα-μολύσματος, παρουσία εδαφικών νηματωδών σκωλήκων και εντόμων)
Συμπτώματα της φυτικής ασθένειας	<ul style="list-style-type: none"> • φυσική απόφραξη αγγείων, μειωμένη ροή νερού • παραγωγή τοξικών ουσιών από τον μύκητα • τα παραπάνω οδηγούν σε: επινασσία φύλλων, μαρασμό, νεκρωτικές κιτρινομπρούτζινες κηλίδες που καταλήγουν στην νέκρωση και την πτώση των φύλλων, καστανό μεταχρωματισμό των αγγείων του ξύλου, νανισμό • το κυριότερο σύμπτωμα είναι ο μαρασμός (εξ ου και η κοινή αγγλοσαξονική ονομασία της ασθένειας “<i>Verticillium wilt</i>”)
Εξάπλωση του παθογόνου	<ul style="list-style-type: none"> • με σπόρους και κονδύλους μολυσμένων φυτών • φύτευση σε μολυσμένο έδαφος ή φύτευση μολυσμένου υλικού • μεταφορείς μολυσμένου υλικού (π.χ. άνεμος, βροχή, έντομα, ζώα, ανθρωπογενείς δραστηριότητες: άρδευση, γεωργικά μηχανήματα)
Αντιμετώπιση	<ul style="list-style-type: none"> • Επιλογή ανθεκτικών ποικιλιών, αμειψισπορά, απολύμανση του εδάφους με ατμό, χημικά απολυμαντικά ή ηλιοαπολύμανση, φυτοφάρμακα, λίπανση, άρδευση, ζιζανιοκτονία, βιοέλεγχος με φυσικούς ανταγωνιστές του μύκητα όπως <i>Talaromyces flavus</i>, <i>Trichoderma</i> spp. και <i>Streptomyces</i> spp.
(Pegg, 1974; Λιγοξυγκάκης, 1998; Pegg & Brady, 2002; Agrios, 2005)	

φυλών του *V. dahliae* ως προς την τομάτα (χρήση εκκινητών Tr1/Tr2· Usami *et al.*, 2007). Η διαθεσιμότητα μιας τέτοιας αξιόπιστης μεθόδου θα ήταν χρήσιμη εναλλακτική των επίπονων, χρονοβόρων και μερικές φορές υποκειμενικών παραδοσιακών δοκιμασιών μολυσματικότητας (virulence assays). Με τη χρήση εσωτερικών εκκινητών σχεδιασμένων για την παραπάνω αλληλουχία DNA, η ειδικότητα της δοκιμασίας PCR επαληθεύτηκε και σε έναν μεγαλύτερο πληθυσμό στελεχών του *V. dahliae* από διάφορους ξενιστές, κυρίως από τη Β. Αμερική, με μεγάλη επιτυχία στην πρόβλεψη (Maruthachalam *et al.*, 2010).

Δεδομένου ότι τα στελέχη του μύκητα *V. dahliae* γενικά δεν επιδεικνύουν εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή, αλλά μπορούν να μολύνουν πολλά διαφορετικά φυτά (Heale, 1988; Pegg & Brady, 2002), ο χαρακτηρισμός των πληθυσμών του μύκητα σε σχέση με την παθογονικότητα είναι πολύπλοκος (Strausbaugh *et al.*, 1992; Daayf *et al.*, 1995). Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, προτάθηκε ένα σύστημα για την κατάταξη των στελεχών του *V. dahliae* σε παθότυπους (pathotypes), βάσει της παθογονικότητάς τους στους ξενιστές τομάτα, μελιτζάνα, πιπεριά και αντιπροσώπους των σταυρανθών (Horiuchi *et al.*, 1990; Hagiwara, 1990). Σε αυτό το σύστημα κατάταξης, ανάλογα με την απόκριση των 4 φυτών-ξενιστών σε κάθε στέλεχος του *V. dahliae* (σε δοκιμασίες τεχνητής μόλυνσης) πραγματοποιείται η κατάταξή του σε έναν από τους ακόλουθους παθότυπους: (α) παθότυπος τομάτας (μολύνει την τομάτα, τη μελιτζάνα και τη ρέβα), (β) παθότυπος μελιτζάνας (μολύνει



Εικόνα 1.19. Ο βιολογικός κύκλος των ειδών *Verticillium dahliae* και *V. albo-atrum* (προσαρμογή από Rowe, 1985).

τη μελιτζάνα και τη ρέβα), (γ) παθότυπος πιπεριάς (μολύνει τη μελιτζάνα, την πιπεριά και τη ρέβα), (δ) παθότυπος τομάτας-πιπεριάς (μολύνει και τους τέσσερις ξενιστές), και (ε) παθότυπος σταυρανθών (μολύνει μόνον τη ρέβα και άλλους αντιπροσώπους των σταυρανθών, και αντιστοιχεί κατά κανόνα στο συγγενικό είδος *V. longisporum*) (Horiuchi *et al.*, 1990; Hagiwara, 1990; Ligoixakis & Markakis, 2012). Για τη μοριακή διάγνωση του παθότυπου της τομάτας έχει προταθεί η εφαρμογή δύο ζευγών εκκινητών σε αντιδράσεις PCR (35-1/35-2 και Tm5/Tm7), που βασίζονται σε μια αλληλουχία ρετρομεταθετού στοιχείου του *V. dahliae* και σε μια γονιδιωματική περιοχή πλησίον της ειδικής για τη φυλή 1 περιοχής B68-TV, αντίστοιχα (Usami *et al.*, 2005; 2007). Παρομοίως, η χρήση ενός εκκινητικού ολιγονουκλεοτιδίου (E10) έχει προταθεί για τη διαγνωστική παραγωγή μιας ζώνης DNA χαρακτηριστικού μεγέθους στα πρότυπα *τυχαίου ενισχυόμενου πολυμορφικού DNA* (random amplified polymorphic DNA, RAPD) μόνον των στελεχών που είναι παθογόνα στην πιπεριά, ώστε να τα διαφοροποιεί από τους υπόλοιπους παθότυπους (Usami *et al.*, 2007). Τέτοιες προσεγγίσεις εύχρηστων μοριακών εργαλείων διάκρισης που βασίζονται στην PCR, εφόσον η ειδικότητά τους επαληθευτεί τόσο σε διεθνείς συλλογές στελεχών, όσο και σε γεωγραφικά απομονωμένους πληθυσμούς του παθογόνου, θα μπορούσαν να αποδειχθούν πολύτιμα εργαλεία μεγάλης πρακτικής σημασίας, καθώς μπορούν να συμπληρώσουν, αν όχι και να αντικαταστήσουν, τις επίπονες και χρονοβόρες παραδοσιακές δοκιμασίες μολυσματικότητας.

1.4.5 Τα γονιδιώματα των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum*

Ο προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός των γονιδιωματικών αλληλουχιών των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum* ανακοινώθηκαν από τους Klosterman *et al.* το 2011. Τα δύο γονιδιώματα προσδιορίστηκαν από τα αντιπροσωπευτικά στελέχη Ls.17 (ιδιαίτερα μολυσματικό στο μαρούλι) του *V. dahliae* και Ms.102 (απομονωμένο από τριφύλλι) του *V. albo-atrum* (το στέλεχος αυτό ανήκει στο νέο είδος *V. alfalfae* σύμφωνα με το νέο σύστημα ταξινόμησης των Inderbitzin *et al.* που προτάθηκε το 2011a). Τα γονιδιώματα των μυκήτων *V. dahliae* Ls.17 και *V. albo-atrum* Ms.102 φθάνουν σε μέγεθος τα 33,83 και 32,83 Mb αντίστοιχα, οργανώνονται σε 8 χρωμοσώματα στην περίπτωση του *V. dahliae*, και περιέχουν 10535 και 10221 πρωτεϊνικά γονίδια, αντίστοιχα. Επιπλέον, τα δύο γονιδιώματα βρέθηκε ότι περιέχουν ασυνήθιστα πολλά γονίδια για ένζυμα αποικοδόμησης της πηκτίνης και άλλων υδατανθράκων, υποδηλώνοντας μια ιδιαίτερη ικανότητα αυτών των μυκήτων να αποικοδομούν τα φυτικά φράγματα πηκτίνης (Klosterman *et al.*, 2011).

Το υψηλό επίπεδο συνταινικότητας μεταξύ των δύο γονιδιωμάτων διακόπτεται από την παρουσία 4 ευδιάκριτων γονιδιωματικών νησίδων (genomic islands) που είναι παρούσες μόνον στο *V. dahliae* και στις οποίες απαντώνται πολυάριθμα μεταθετά στοιχεία, διπλασιασμένα γονίδια και γονίδια σημαντικά για τη σηματοδότηση, τη μεταγραφική ρύθμιση και τον μεταβολισμό σιδήρου/λιπιδίων (Klosterman *et al.*, 2011). Σε συνδυασμό με την ιδιαίτερη ικανότητα για αποικοδόμηση της πηκτίνης, αυτές οι νησίδες ίσως συμβάλλουν στη διευρυμένη γενετική ποικιλότητα και μολυσματικότητα του *V. dahliae*, που αποτελεί το βασικότερο αίτιο των ασθενειών που προκαλούνται από τους μύκητες του γένους *Verticillium*.

Σε μεταγενέστερη μελέτη αναλύθηκαν περαιτέρω οι αλληλουχίες μεταθετών στοιχείων εντός των δύο γονιδιωμάτων και αναφέρθηκε η παρουσία πολυάριθμων ρетроμεταθετών στοιχείων τάξης I (class I retrotransposons) και μεταθετών στοιχείων DNA τάξης II (class II “cut-and-paste” DNA retroelements) (Amyotte *et al.*, 2012). Για παράδειγμα, στο είδος *V. dahliae* εντοπίστηκαν 56 πλήρεις αλληλουχίες ρетроμεταθετών στοιχείων των τύπων Gypsy, Copia και LINE, καθώς επίσης και 34 πλήρη στοιχεία των υπεροικογενειών των DNA μεταθετών στοιχείων Tc1/mariner, Activator και Mutator. Η μελέτη της συχνότητας και της κατανομής των μεταθετών στοιχείων των ειδών του *Verticillium* υποδηλώνει πως τα μεταθετά στοιχεία διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στην παραγωγή της γενετικής ποικιλότητας εντός και μεταξύ των ειδών του *Verticillium* (Amyotte *et al.*, 2012).

Άλλο ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του γονιδιωματικού περιεχομένου των αφυλετικών ειδών του *Verticillium* είναι η παρουσία σε αυτά γονιδίων συζευκτικού τύπου (mating type genes), τα οποία είναι γνωστό ότι καθορίζουν τη συζευκτική πολικότητα στους φυλετικούς ασκομύκητες, και μάλιστα με οργάνωση τυπική για τα ετεροθαλικά είδη (Usami *et al.*, 2009; Klosterman *et al.*, 2011). Στις γονιδιωματικές αλληλουχίες των στελεχών *V. dahliae* Ls.17 και *V. albo-atrum* Ms.102 ανιχνεύθηκαν τα αντίθετα ιδιόμορφα MAT1-2-1 (που φέρει μοτίβο HMG-box) και MAT1-1-1 (που φέρει μοτίβο alpha-box), αντίστοιχα (Klosterman *et al.*, 2011), ενώ σε πληθυσμούς του είδους *V. dahliae* βρέθηκε ότι τα περισσότερα από τα στελέχη του μύκητα φέρουν το ιδιόμορφο MAT1-2-1 και μόνον λίγα στελέχη φέρουν το εναλλακτικό ιδιόμορφο MAT1-1-1 (Usami *et al.*, 2009; Inderbitzin *et al.*, 2011b). Η μελέτη της κατανομής αυτών των γονιδίων μεταξύ των ομάδων βλαστητικής συμβατότητας (βλ. αντίστοιχη ενότητα) του *V. dahliae* θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς αυτά τα γονίδια είναι γνωστό ότι συμπεριφέρονται και ως γονίδια HI (*het*) σε ορισμένους

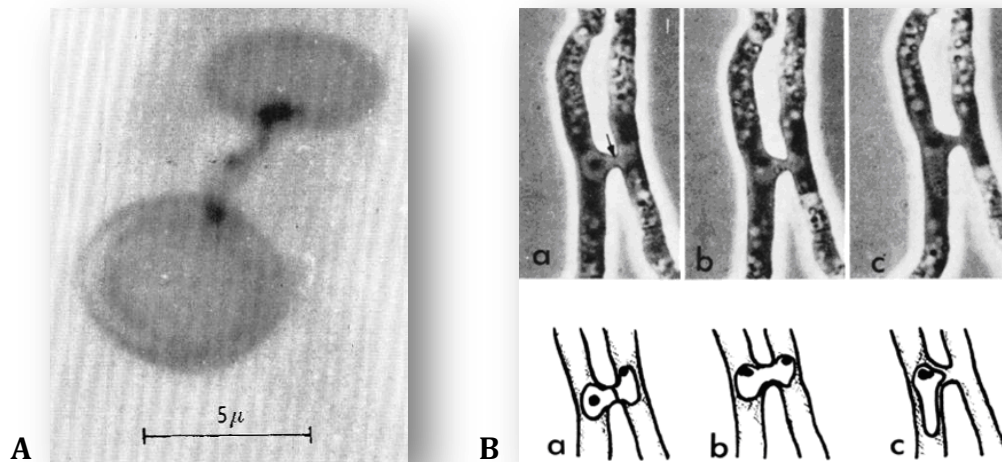
ασκομύκητες, όπως ο *N. crassa*, και επομένως συμμετέχουν στον έλεγχο της γενετικής απομόνωσης μεταξύ των ασύμβατων ομάδων (Glass *et al.*, 2000). Τέλος, τα στελέχη του *V. longisporum* έχει αναφερθεί ότι φέρουν δύο αντίγραφα του γενετικού τόπου MAT1-1 (Inderbitzin *et al.*, 2011b).

Η ταχύτερη εξέλιξη των νέων τεχνολογιών προσδιορισμού αλληλουχιών DNA, όπως οι μέθοδοι της πυροαλληλούχησης (pyrosequencing, 454-Roche) και Illumina, επέτρεψε περισσότερο πρόσφατα τον μερικό ή ολικό προσδιορισμό και την ανάλυση των γονιδιωμάτων πολλών ακόμα στελεχών του *V. dahliae*, όπως 10 στελεχών των φυλών 1 και 2 της τομάτας (de Jonge *et al.*, 2012; 2013). Αυτές οι συγκριτικές μελέτες διευκόλυναν τον προσδιορισμό του γονιδίου *Ave1* στα στελέχη της φυλής 1, το οποίο συμβάλλει στη μολυσματικότητα του μύκητα (de Jonge *et al.*, 2012), και τις εκτεταμένες γενετικές ανακατατάξεις ως σημαντικό παράγοντα προαγωγής της γενετικής ποικιλομορφίας (de Jonge *et al.*, 2013). Ο προσδιορισμός των γονιδιωμάτων περισσότερων στελεχών των ειδών *V. dahliae* και *V. longisporum* βρίσκεται σε εξέλιξη (NCBI Genome Database, 2013; VertiBase: *Verticillium longisporum* BioFung database, 2013). Η διαθεσιμότητα και η συγκριτική ανάλυση των γονιδιωματικών αλληλουχιών αναμένεται να αποκαλύψουν σημαντικά στοιχεία για τη μορφογένεση, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και την προσαρμογή των φυτοπαθογόνων ειδών του *Verticillium* στο περιβάλλον τους. Επίσης, προβλέπεται να συμβάλουν καθοριστικά στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν τη μολυσματικότητα και την εξειδίκευση των μυκήτων ως προς τους ξενιστές τους (Broad Institute, 2013).

1.4.6 Οι πρώτες ενδείξεις της σύντηξης κονιδίων/υφών και της ετεροκαρύωσης στο γένος *Verticillium*

Η πρώτη αναφορά αναστομωμένων κονιδίων σε φάση βλάστησης στο γένος *Verticillium* έγινε ήδη από τους Reinke & Berthold (1879), κατά την αρχική περιγραφή του είδους *V. albo-atrum*. Αρκετά χρόνια αργότερα, οι Schreiber & Green (1966) ανέφεραν ότι η αναστόμωση στο *V. dahliae* μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταξύ βλαστανόντων κονιδίων, μεταξύ υφών και βλαστανόντων κονιδίων, και μεταξύ υφών ώριμων αποικιών του μύκητα. Το ίδιο έτος ο Heale (1966) φωτογράφησε κονίδια σε φάση βλάστησης του *V. albo-atrum*, τα οποία είχαν συντηχθεί με έναν σωλήνα αναστόμωσης (CAT), μέσω του οποίου διακρίνεται η διέλευση επιμήκους πυρήνα. Τέλος, οι Puhalla & Mayfield (1974) παρακολούθησαν μικροσκοπικά την πορεία μετανάστευσης απλοειδούς πυρήνα μέσω αναστόμωσης υφών και την επακόλουθη καρυογαμία στο αναστομωμένο κύτταρο-δέκτη, στο *V. dahliae* (Εικόνα 1.20).

Την ίδια περίπου εποχή, ο Hastie (1962) έδειξε για πρώτη φορά πως είναι δυνατή η δημιουργία – υπό επιλεκτική πίεση – ασταθών ετεροκαρύων σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό μεταξύ βλαστανόντων αυξότροφων κονιδίων του είδους *V. albo-atrum*, και ανέφερε τη δυνατότητα αφυλετικού γενετικού ανασυνδυασμού. Με παρόμοιο τρόπο οι Fordyce & Green (1964) απέδειξαν πως είναι δυνατή – μόνον υπό πίεση επιλογής – η διαειδική αναστόμωση και ο παραφυλετικός ανασυνδυασμός μεταξύ αυξότροφων μεταλλαγών των *V. dahliae* και *V. albo-atrum*. Αυτές ήταν οι πρώτες παρατηρήσεις που άνοιξαν τον δρόμο για τη μελέτη του παραφυλετικού κύκλου στα είδη του *Verticillium*.



Εικόνα 1.20. Α. Κονίδια του μύκητα *Verticillium albo-atrum* σε φάση βλάστησης, τα οποία έχουν συντηχθεί μέσω σωλήνα αναστόμωσης (CAT). Είναι εμφανής η διέλευση επιμήκους πυρήνα μέσω της αναστόμωσης (χρώση Feulgen κατόπιν όξινης υδρόλυσης στους 60°C για 9 min) (από Heale, 1966). Β. Φωτογραφίες από μικροσκοπικές παρατηρήσεις και επεξηγηματική απεικόνιση της διαδικασίας μετανάστευσης απλοειδών πυρήνων μέσω αναστομώνσεων βλασθητικών υφών και της καρυογαμίας στο είδος *V. dahliae* (από Puhalla & Mayfield, 1974).

1.4.7 Η ετεροκαρύωση στο *Verticillium*

Η δημιουργία ετεροκαρύων μεταξύ γενετικά ανόμοιων στελεχών του ίδιου ή και διαφορετικών ειδών του γένους *Verticillium* έχει τεκμηριωθεί πειραματικά ήδη από πολλά χρόνια, και είναι γνωστό πως επιτυγχάνεται με τον σχηματισμό αναστομώνσεων μεταξύ των κονιδίων τους ή των υφών τους (Hastie, 1962; Heale, 1966; Puhalla & Mayfield, 1974; Tymas & Heale, 1976). Τα κυτταρικά διαμερίσματα των υφών στα είδη του *Verticillium* είναι μονοπύρηννα (με εξαίρεση τα ακραία κύτταρα των υφών που είναι διπύρηννα ή σπανιότερα πολυπύρηννα) χωρίς δυνατότητα μετανάστευσης των πυρήνων στα γειτονικά κύτταρα (Puhalla & Mayfield, 1974; Tymas & Heale, 1977), αντιθέτως με ό, τι συμβαίνει σε πολλούς από τους μύκητες-μοντέλα, όπως οι *N. crassa* και *A. nidulans*, των οποίων το μυκήλιο αποτελείται από πολυπύρηννα κυτταρικά διαμερίσματα με δυνατότητα μετακίνησης των πυρήνων μεταξύ των κυττάρων (Roper *et al.*, 2011). Αποτέλεσμα αυτής της οργάνωσης στα είδη του *Verticillium* είναι ο περιορισμός της ετεροκαρυωτικής κατάστασης σε έναν μικρό αριθμό αναστομωμένων κυττάρων, χωρίς τη δυνατότητα επέκτασης στις υπόλοιπες περιοχές του μυκηλίου που βρίσκονται «μακριά» από την περιοχή αναστόμωσης, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία μωσαϊκών μυκηλίων που απαρτίζονται από διακριτές ομοκαρυωτικές και ετεροκαρυωτικές περιοχές (Puhalla & Mayfield, 1974; Tymas & Heale, 1976). Οι πυρηνικές αναλογίες των κατά κανόνα μονοπύρηννων κονιδίων που προκύπτουν από τα ετεροκάρυα του *Verticillium* αποκλίνουν συχνά σε σημαντικό βαθμό από την ισορροπία (Heale, 1966), το οποίο συνάδει με τη γενική διαπίστωση πως τα ετεροκάρυα δεν είναι γενετικά ομοιογενή, αλλά αποτελούνται από μωσαϊκά μυκηλιακών περιοχών με διαφορετικό γενετικό περιεχόμενο. Σε αυτά τα μυκήλια-χίμαιρες ο περιορισμένος αριθμός ετεροκαρυωτικών κυττάρων προβλέπεται πως μπορεί να ικανοποιήσει τις τροφικές απαιτήσεις μεγάλων αυξότροφων ομοκαρυωτικών περιοχών του μυκηλίου (Puhalla & Mayfield, 1974; Hastie & Heale, 1984). Ετερόζυγοι

διπλοειδείς τομείς (sectors) εμφανίζονται κατόπιν επώασης για 8-12 ημέρες σε υψηλή θερμοκρασία (30°C), ως αποτέλεσμα προφανώς της καρυογαμίας, η οποία θεωρείται ότι μπορεί να συμβεί στα αναστομωμένα κύτταρα (Hastie & Heale, 1984).

1.4.8 Ο παραφυλετικός κύκλος στο *Verticillium*

Το γένος *Verticillium* ανήκει στους ατελείς (ή αφυλετικούς ή μιτοσπορικούς) υφομύκητες, καθώς ουδέποτε μέχρι σήμερα έχει εντοπισθεί για τα είδη του εγγενές στάδιο αναπαραγωγής στη φύση, ούτε έχει καταστεί δυνατή η επαγωγή του υπό εργαστηριακές συνθήκες. Συνεπώς, οι πληθυσμοί τους θεωρείται ότι πολλαπλασιάζονται κλωνικά (Milgroom, 1996), με την όποια περιορισμένη γενετική ποικιλότητα να προκύπτει μέσω της συσσώρευσης μεταλλαγών (Leslie, 1993) και εκτεταμένων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων (de Jonge *et al.*, 2013). Ο μοναδικός τρόπος ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ στελεχών και γενετικού ανασυνδυασμού σε αυτά τα είδη είναι μέσω του παραφυλετικού κύκλου, ο οποίος αποκτά έτσι ιδιαίτερη σημασία για αυτούς τους αφυλετικούς φυτοπαθογόνους μύκητες (Hastie, 1964; Heale, 1966; Hastie & Heale, 1984; Heale, 1988).

Ο γενετικός ανασυνδυασμός απουσία φυλετικού κύκλου στο είδος *V. albo-atrum* αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Hastie (1962) και τα κύρια χαρακτηριστικά του περιγράφηκαν λίγο αργότερα (Hastie, 1964). Οι βασικές ιδιότητες του παραφυλετικού κύκλου είναι κοινές για τα δύο περισσότερο μελετημένα είδη, *V. dahliae* και *V. albo-atrum* (Hastie & Heale, 1984), τα οποία μοιράζονται πολλές ομοιότητες στον κύκλο και με τον πρότυπο μύκητα *A. nidulans* (Pontecorvo, 1956), εκτός από τη δομή των ετεροκαρύων (βλ. προηγούμενη παράγραφο) και τη συχνότητα παραγωγής ανασυνδυασμένων γονοτύπων (Hastie, 1967) (βλ. στη συνέχεια). Ο παραφυλετικός κύκλος ξεκινάει με τη δημιουργία ετεροκαρύων, δηλαδή υφών που φιλοξενούν γενετικά διαφορετικούς πυρήνες, κατόπιν της πυρηνικής μετανάστευσης μέσω αναστομώσεων. Οι απλοειδείς ετεροπυρήνες εντός των αναστομωμένων κυττάρων των ετεροκαρύων ενίοτε συντήκονται προς σχηματισμό διπλοειδών (καρυογαμία). Αυτοί μπορούν να διατηρηθούν παροδικά και να δώσουν γένεση σε διπλοειδείς μυκηλιακές περιοχές, μέσω διαδοχικών μιτωτικών διαιρέσεων, ενώ αρκετά συχνά εισέρχονται σε μια πορεία άτυπων μιτωτικών διαιρέσεων, κατά τις οποίες οι διπλοειδείς πυρήνες επανέρχονται εν τέλει στην απλοειδή κατάσταση διαμέσου μιας σειράς ασταθών ανευπλοειδών χρωμοσωμικών συνδυασμών. Η στοχαστική απώλεια των χρωμοσωμάτων (έλλειψη διαχωρισμού, non-disjunction) σε αυτήν την πορεία του απλοειδισμού (haploidisation) συνοδεύεται από μιτωτικούς επιχιασμούς που συμβαίνουν στα είδη του *Verticillium* με ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα. Μέσα από όλην τη διαδικασία του παραφυλετικού κύκλου δημιουργούνται τελικά μωσαϊκά μυκήλια που φέρουν τους απλοειδείς πατρικούς τύπους, ετερόζυγους διπλοειδείς πυρήνες, νέους ανασυνδυασμένους απλοειδείς συνδυασμούς, καθώς επίσης και μια σειρά ασταθών ανευπλοειδών πυρήνων (Hastie, 1964; Heale, 1966; Hastie & Heale, 1984; Heale, 1988).

Η συχνότητα δημιουργίας ανευπλοειδών πυρήνων από διπλοειδείς μέσω της πορείας του απλοειδισμού εκτιμήθηκε από τον Hastie (1981) σε 0,035 γεγονότα ανά πυρηνική διαίρεση, που είναι σχεδόν η διπλάσια τιμή από την αντίστοιχη για τον *A. nidulans* (0,02), κατά τον Käfer (1961). Η υψηλή συχνότητα απλοειδισμού υποδηλώνει σχετική σπανιότητα της διπλοειδούς κατάστασης στα είδη του γένους *Verticillium*, καθώς η συχνότητα της «αντίστροφης» διαδικασίας σύντηξης απλοειδών πυρήνων προς σχηματισμό διπλοειδών είναι

πολύ μικρότερη (περίπου 10^{-6}) (Typas & Heale, 1977; Hastie & Heale, 1984). Σχετικά με τον μιτωτικό ανασυνδυασμό, ο Hastie (1968) βρήκε πως αυτός είναι συχνότερος στα φιαλίδια των κονιδιοφόρων σε σχέση με τα βλαστώνοντα κονίδια, και υπολόγισε τη μέση συχνότητά του στα φιαλίδια των κονιδιοφόρων σε περίπου 0,2 γεγονότα ανά πυρηνική διαίρεση (Hastie, 1967). Αυτή είναι μια ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα μιτωτικού ανασυνδυασμού, καθώς είναι μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες εκτιμήσεις για τον *A. nidulans*, που είναι 0,02 ανά πυρηνική διαίρεση (Käfer, 1961). Αυτή η υψηλή συχνότητα του μιτωτικού ανασυνδυασμού στο γένος *Verticillium* φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνη για τη συχνή εμφάνιση ανασυνδυασμένων προϊόντων στη γενεαλογία μεμονωμένων πυρηνικών οικογενειών (Hastie, 1981). Παρά τη συχνά συγχρονισμένη εμφάνισή τους σε μεγάλες πυρηνικές γενεαλογίες, ο μιτωτικός ανασυνδυασμός και η έλλειψη διαχωρισμού (ή η εξάλειψη) χρωμοσωμάτων, που οδηγεί στον σχηματισμό ανευπλοειδών πυρήνων, είναι ανεξάρτητα και τυχαία γεγονότα (Hastie, 1981).

Ο αφυλετικός γενετικός ανασυνδυασμός μέσω του παραφυλετικού κύκλου παρέχει τις πληροφορίες που απαιτούνται για τη γενετική ανάλυση των ειδών του γένους *Verticillium*. Η στρατηγική τέτοιων αναλύσεων θα πρέπει να ελαχιστοποιεί την επίδραση του κλωνικού πολλαπλασιασμού των προϊόντων των επιχιασμών και των ανασυνδυασμένων γονοτύπων, ο οποίος αποτελεί έμφυτη ιδιότητα της παραφυλετικής παραγωγής νέων γονοτύπων. Μερικά παραδείγματα τέτοιων λεπτομερών αναλύσεων των *Verticillium* spp. αποτελούν οι αναφορές των Hastie (1964; 1978; 1981) και Typas & Heale (1978). Με την παραδοσιακή ερμηνεία των συχνοτήτων γονιδιακού ανασυνδυασμού που προκύπτουν από την καταμέτρηση ανεξάρτητων απλοειδών απογόνων είναι δυνατή η συσχέτιση γενετικών τόπων (loci) με ομάδες σύνδεσης (linkage groups), ακόμα και η χαρτογράφησή τους εντός αυτών των ομάδων σύνδεσης. Επιπλέον, τα κεντρομερίδια μπορούν να χαρτογραφηθούν μέσω της ερμηνείας των δεδομένων του μιτωτικού ανασυνδυασμού που προκύπτουν από την ανάλυση φιαλιδίων (Hastie, 1967; 1968).

1.4.9 Η ετεροκαρνωτική ασυμβατότητα στο *Verticillium*

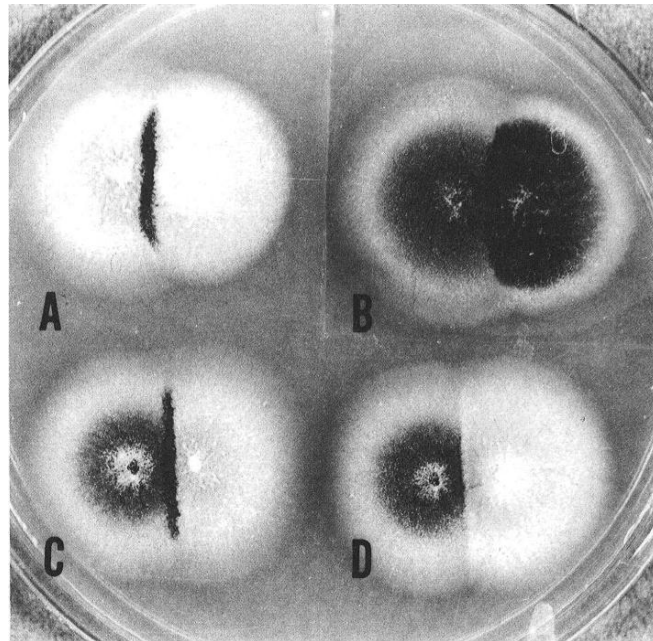
A. Μέθοδοι εκτίμησης της συμβατότητας μέχρι το 1990

Δεδομένης της αφυλετικής φύσης των ειδών του *Verticillium*, ο πειραματικά τεκμηριωμένος παραφυλετικός κύκλος θεωρείται ο μοναδικός τρόπος ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ των μελών των ειδών αυτών (Puhalla & Mayfield, 1974; Typas & Heale, 1978; Hastie & Heale, 1984). Ωστόσο, ήδη από τις πρώτες σχετικές μελέτες έγινε αντιληπτό πως όταν αποικίες διαφορετικών στελεχών των ειδών του *Verticillium* έλθουν σε επαφή, ο σχηματισμός βιώσιμων ετεροκαρύων συχνά παρεμποδίζεται από τη λειτουργία συστημάτων ετεροκαρνωτικής ή βλαστητικής ασυμβατότητας, κατά αντίστοιχο τρόπο με ό, τι παρατηρείται στη μεγάλη πλειοψηφία των μελετημένων μυκήτων (Heale, 1966; Typas & Heale, 1976; Saupé, 2000). Η διάκριση μεταξύ βιώσιμων ετεροκαρύων και ασύμβατων αλληλεπιδράσεων στελεχών του *Verticillium* απλώς και μόνον με την παρατήρηση της ζώνης επαφής τους σε συγκαλλιέργειες δεν είναι δυνατή, αντιθέτως με άλλους μύκητες όπως οι *P. anserina* και *F. graminearum* (Micali & Smith, 2003; McCallum *et al.*, 2004). Έτσι, για την εκτίμηση του εύρους της συμβατότητας και την κατάταξη των στελεχών σε αντίστοιχες ομάδες συμβατότητας (compatibility groups) έχουν χρησιμοποιηθεί «διασταυρώσεις»

διάφορων τύπων συμπληρωματικών μεταλλαγών των υπό μελέτη στελεχών. Ανάλογα με τον τύπο των μεταλλαγών που χρησιμοποιούνται σε κάθε μέθοδο, οι δοκιμασίες συμπληρωματικότητάς τους πραγματοποιούνται είτε (α) υπό επιλεκτική πίεση (forced compatibility assays) π.χ. σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό για αυξότροφες μεταλλαγές ή σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με παρεμποδιστές αύξησης για μεταλλαγές ανθεκτικότητας σε αυτούς (Hastie, 1964; Heale, 1966; Typas & Heale, 1976; 1978; Clarkson & Heale, 1985; Typas, 1983; Joaquim & Rowe, 1990), είτε (β) απουσία επιλεκτικής πίεσης (natural compatibility assays) π.χ. με τη χρήση κατάλληλων μορφολογικών μεταλλαγών των μυκήτων (Puhalla, 1979; Puhalla & Hummel, 1983).

Είναι αξιοσημείωτο πως με τη χρήση διαφορετικών τύπων γενετικών δεικτών για την εκτίμηση της συμβατότητας στον μύκητα *V. dahliae* οι ερευνητές κατέληξαν σε αντιφατικά συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, πειράματα με αυξότροφες μεταλλαγές (στα μονοπάτια βιοσύνθεσης αμινοξέων, πουρινών/πυριμιδινών, βιταμινών) των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum* δεν παρείχαν σαφείς ενδείξεις για την ύπαρξη συγκεκριμένων ομάδων ετεροκαρωτικής συμβατότητας. Διαφορετικοί συνδυασμοί σημασμένων στελεχών παρήγαγαν ετεροκάρυα με διαφορετικό εύρος πρωτότροφης αύξησης, συχνότητα και σταθερότητα, αλλά μόνον λίγα ζεύγη στελεχών ήταν τελείως ασύμβατα. Ακόμα και για μερικούς από τους «μερικούς» ασύμβατους συνδυασμούς ήταν δυνατή η απομόνωση ετερόζυγων διπλοειδών κονιδίων με χρήση εναλλακτικών τύπων αυξοτροφικών δεικτών, υποδεικνύοντας σπανιότητα της απόλυτης ασυμβατότητας (Hastie, 1973; Typas & Heale, 1976; Clarkson & Heale, 1985). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και με τη χρήση συνδυασμών μεταλλαγών αυξοτροφίας και μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε διάφορους αντιμυκητιακούς παράγοντες (Typas, 1983). Είναι ενδιαφέρον πως κατέστη δυνατός ο σχηματισμός «τεχνητών» ετεροκαρύων ακόμα και μεταξύ ασύμβατων ζευγών στελεχών, καθώς επίσης και μεταξύ διαφορετικών ειδών του *Verticillium*, με μεθόδους σύντηξης πρωτοπλαστών και με μικρο-ενέσεις πυρήνων ή/και κυτταροπλασματικού υλικού (Typas, 1983). Συνεπώς, με τη χρήση δοκιμασιών συμπληρωματικότητας μεταξύ κατάλληλων γενετικών δεικτών υπό συνθήκες επιλεκτικής πίεσης, δεν παρατηρήθηκε σαφής κατηγοριοποίηση σε συμβατούς και ασύμβατους συνδυασμούς στελεχών, αλλά πολύ περισσότερο μια συνεχής κατανομή μεταξύ της συμβατότητας και των σχετικά σπάνιων περιπτώσεων απόλυτης ασυμβατότητας, με μια σειρά ενδιάμεσων καταστάσεων «μερικής» συμβατότητας (partial compatibility) (Typas, 1983; Hastie & Heale, 1984).

Η έννοια των συγκεκριμένων ομάδων συμβατότητας εντός του είδους *V. dahliae* εισήχθη με τη χρήση σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταλλαγών – κατόπιν επαγωγής με υπεριώδη ακτινοβολία (ultra-violet light, UV) – του μύκητα στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της χρωστικής των μικροσκληρωτίων (Εικόνα 1.21). Με αυτήν τη μέθοδο ανιχνεύθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ασυμβατότητας στους πληθυσμούς του *V. dahliae* (π.χ. 94 στελέχη του μύκητα κατατάχθηκαν σε 16 διαφορετικές ομάδες συμβατότητας), με τα στελέχη διαφορετικών ομάδων συμβατότητας να αδυνατούν να σχηματίσουν ετεροκάρυα σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας (Puhalla, 1979; Puhalla & Hummel, 1983). Η παρατήρηση της ασυμβατότητας μεταξύ φυσικών στελεχών του μύκητα σε τόσο μεγάλο βαθμό έρχεται



Εικόνα 1.21. Δοκιμασίες ετεροκαρύωσης μεταξύ μεταλλαγών στο χρώμα των μικροσκληρωτίων του μύκητα *Verticillium dahliae*, σε πλήρες θρεπτικό υλικό PCDA. **A.** Δύο μεταλλαγές *alm* (albino microsclerotia· μικροσκληρώτια χωρίς χρωστική) σχηματίζουν μαύρα μικροσκληρώτια κατά μήκος της ζώνης επαφής τους. **B.** Δύο μεταλλαγές *brm* (brown microsclerotia· καφέ μικροσκληρώτια) και *alm*, εκ των οποίων η *brm* εκκρίνει διαχεόμενες ουσίες που προκαλούν το μαύρισμα του μεγαλύτερου μέρους της αποικίας *alm*. Τέτοιες μεταλλαγές είναι ακατάλληλες για δοκιμασίες συμπληρωματικότητας. **C.** Δύο μεταλλαγές *brm* και *alm* σχηματίζουν μαύρα μικροσκληρώτια μόνον κατά μήκος της ζώνης επαφής τους. **D.** Δύο μεταλλαγές *brm* και *alm* δεν επιδεικνύουν καμία προφανή αλληλεπίδραση (από Puhalla, 1979).

σαφώς σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των προαναφερθεισών μελετών, όπου δεν παρατηρήθηκε «αυστηρή» ασυμβατότητα.

Η αντίφαση στα αποτελέσματα των δύο τύπων μελετών πιθανότατα μπορεί να αποδοθεί στην ίδια τη φύση των γενετικών δοκιμασιών. Είναι πιθανόν πως οι συνθήκες έντονης επιλεκτικής πίεσης που αφορούν τις δοκιμασίες αυξοτροφιών/μεταλλαγών ανθεκτικότητας, αλλά όχι τις «διασταυρώσεις» των μορφολογικών μεταλλαγών, είναι αρκετές για την υπέρβαση σε κάποιον βαθμό της λειτουργίας των συστημάτων ΗΙ, μόνον στις πρώτες δοκιμασίες (Hastie & Heale, 1984). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί με σαφήνεια η πλειοτροπική επίδραση των χρησιμοποιούμενων γενετικών δεικτών στα αποτελέσματα των δοκιμασιών συμπληρωματικότητας, καθώς με αλλαγή του τύπου των αυξοτροφιών που χρησιμοποιούνταν ως δείκτες ήταν δυνατός ο σχηματισμός ετεροκαρύων και η απομόνωση ετερόζυγων διπλοειδών κονιδίων από συνδυασμούς στελεχών που με άλλους αυξοτροφικούς δείκτες ήταν ασύμβατοι (Tyras & Heale, 1976). Άλλη μια σημαντική διαπίστωση που αφορά την πιθανή επίδραση του τύπου των μεταλλαγών-γενετικών δεικτών στα αποτελέσματα της κατάταξης συμβατότητας είναι η περιπλοκή που μπορεί να υπεισέλθει με χρήση δεικτών που υπόκεινται σε κυτταροπλασματική κληρονομικότητα. Για παράδειγμα, ο χαρακτήρας *hyl* (hyaline, μεταλλαγές χωρίς μικροσκληρώτια και χρωστική) αποδείχθηκε πως ελέγχεται κυτταροπλασματικά στο γένος *Verticillium* (Tyras & Heale, 1976; 1978; 1979), και συνεπώς η χρήση του για τη διαπίστωση της ετεροκαρυωτικής συμβατότητας θα μπορούσε να διακρίνει πιθανά ετεροπλάσματα και όχι απαραίτητα πραγματικά ετεροκάρυα. Τέλος, η

αξιοποίηση των τεχνικών της σύντηξης πρωτοπλαστών και των μικροενέσεων πυρήνων επέτρεψε τη λήψη ετεροκαρύων και ετερόζυγων διπλοειδών κονιδίων από όλους σχεδόν τους ενδοειδικούς και τους διαειδικούς συνδυασμούς που δοκιμάστηκαν (Τυρπας, 1983). Αυτό αποτελεί μια σαφή απόδειξη για την επίδραση της χρησιμοποιούμενης μεθόδου στην κατάταξη στελεχών σε ομάδες συμβατότητας, ενώ ταυτόχρονα υποδηλώνει πως ορισμένοι τουλάχιστον από τους παράγοντες ασυμβατότητας στα είδη του *Verticillium* λειτουργούν στο επίπεδο του κυτταρικού τοιχώματος (Τυρπας, 1983).

B. Η επανάσταση των μεταλλαγών nit: κατάταξη σε Ομάδες Βλαστητικής Συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups, VCGs)

Μια σημαντική προϋπόθεση για την κατάταξη στελεχών ενός μύκητα σε ομάδες συμβατότητας σε μεγάλη κλίμακα είναι η διαθεσιμότητα κατάλληλης μεθόδου που να καθιστά εφικτή την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό συμπληρωματικών μεταλλαγών μεγάλου αριθμού στελεχών του μύκητα. Μια κατηγορία μεταλλαγών που πληροί αυτά τα κριτήρια είναι οι μεταλλαγές *nit* (*nitrate non-utilizing*) στο βιοχημικό μονοπάτι αφομοίωσης των νιτρικών ιόντων (Puhalla & Spieth, 1985). Αυτές οι μεταλλαγές χαρακτηρίζονται από το σπουδαίο πρακτικό πλεονέκτημα ότι προκύπτουν αυτόματα σε χαμηλές συχνότητες και η επιλογή τους μπορεί να γίνει εύκολα σε θρεπτικά υλικά εμπλουτισμένα με τοξικά χλωρικά ιόντα, καθώς είναι ανθεκτικές σε αυτά. Επιπλέον, η φαινοτυπική τους κατάταξη σε 3 συμπληρωματικές κλάσεις (*nit1*, *nit3* και *nitM*) είναι γρήγορη και απλή διαδικασία, καθώς βασίζεται στην αξιολόγηση της σχετικής δυνατότητας αύξησης των μεταλλαγών σε θρεπτικά υλικά με νιτρικά ιόντα, νιτρώδη ιόντα ή υποξανθίνη/ινοσίνη ως μοναδικές πηγές αζώτου (Correll *et al.*, 1987). Οι μεταλλαγές *nit1* αφορούν το δομικό γονίδιο (που κωδικοποιεί για την αποπρωτεΐνη) της νιτρικής αναγωγής (με ομόλογα τα *nit-3* του μύκητα *N. crassa* και *niaD* του *A. nidulans*). Οι μεταλλαγές αυτές αδυνατούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό με νιτρικά ιόντα ως μοναδική πηγή αζώτου, αλλά αναπτύσσονται φυσιολογικά τόσο στα νιτρώδη ιόντα όσο και την υποξανθίνη (Klittich & Leslie, 1988). Οι μεταλλαγές *nit3* αντιστοιχούν σε ένα ρυθμιστικό γονίδιο που είναι ειδικό για το μονοπάτι αφομοίωσης των νιτρικών ιόντων. Το γονίδιο αυτό (ομόλογο με το *nit-4* του *N. crassa*) απαιτείται για την επαγόμενη από τα νιτρικά ιόντα έκφραση της νιτρικής και της νιτρώδους αναγωγής σε συνθήκες έλλειψης των κύριων πηγών αζώτου (π.χ. γλουταμίνη, γλουταμικό οξύ, αμμώνιο). Ως εκ τούτου, αυτές οι μεταλλαγές δεν αναπτύσσονται ούτε στα νιτρικά ούτε τα νιτρώδη ιόντα, αναπτύσσονται όμως κανονικά στην υποξανθίνη (Klittich & Leslie, 1988; Yuan *et al.*, 1991). Τέλος, οι μεταλλαγές *nitM* αντιστοιχούν σε 5 διαφορετικά συντηρημένα γονίδια (έχουν χαρακτηριστεί μοριακά στα είδη *A. nidulans* και *N. crassa*: Probst *et al.*, 2014) που σχετίζονται με τη σύνθεση ενός συμπαράγοντα με μολυβδαίνιο (μολυβδοπτερίνη), ο οποίος απαιτείται για τις ενεργότητες νιτρικής αναγωγής και αφυδρογονάσης της ξανθίνης. Συνεπώς, οι μεταλλαγές αυτές αδυνατούν να αναπτυχθούν στα νιτρικά ιόντα ή την υποξανθίνη, αναπτύσσονται όμως παρόμοια με τον φυσικό τύπο στα νιτρώδη ιόντα (Marzluf, 1981; Klittich & Leslie, 1988; Marzluf, 1997). Αξίζει να σημειωθεί πως δεδομένου ότι οι μεταλλαγές *nitM* αντιστοιχούν σε περισσότερα του ενός γονίδια, έχει παρατηρηθεί η αναμενόμενη συμπληρωματικότητα μεταξύ διαφορετικών μεταλλαγών *nitM* ενός στελέχους ή συμβατών στελεχών (π.χ. Rataj-Guranowska *et al.*, 1993).

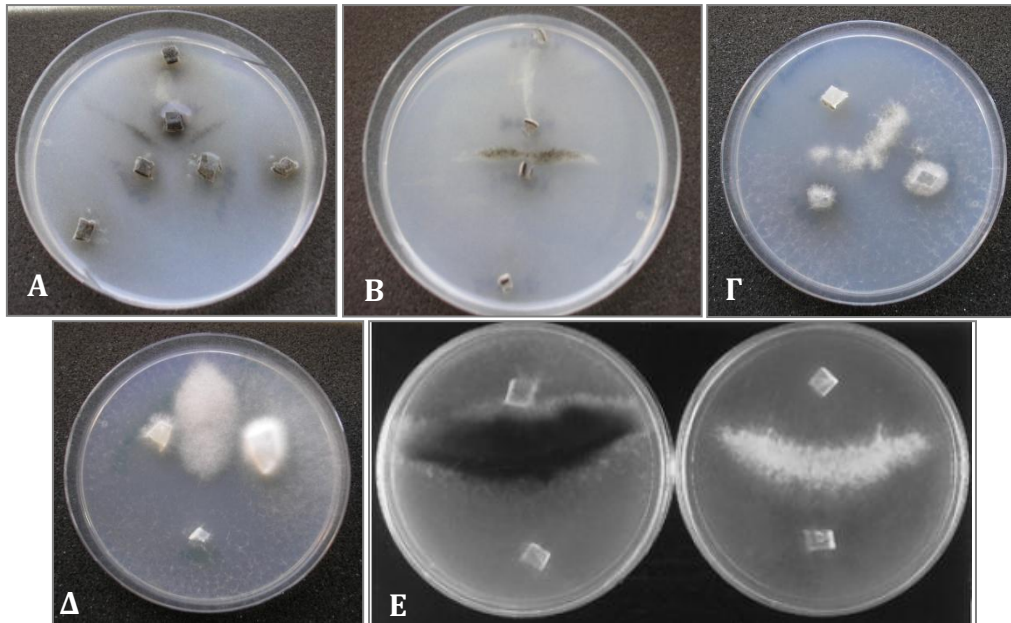
Μετά από τη χρήση τους για την κατάταξη στελεχών των ειδών *F. oxysporum* (Puhalla, 1985) και *V. albo-atrum* (Correll *et al.*, 1988), οι μεταλλαγές *nit* χρησιμοποιήθηκαν για την

ανάλυση πληθυσμών του *V. dahliae* για πρώτη φορά από τους Joaquim & Rowe (1990; 1991). Έκτοτε, και μέχρι σήμερα, το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε από πολυάριθμους ερευνητές σε πολλές μελέτες πληθυσμών του *V. dahliae* από διάφορους ξενιστές και από όλον τον κόσμο, και απέκτησε γενική αποδοχή ως αξιόπιστη μέθοδος (Strausbaugh *et al.*, 1992; Daayf *et al.*, 1995; Elena & Paplomatas, 1998; Korolev *et al.*, 2000; Zeise & von Tiedemann, 2001; Bhat *et al.*, 2003; Jiménez-Díaz *et al.*, 2006; Göre, 2009). Με βάση τις δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών *nit* των στελεχών του *V. dahliae* (Εικόνα 1.22), αυτά κατάτασσονται σε 5 κύριες ομάδες βλασθητικής συμβατότητας (vegetative compatibility groups, VCGs), τις VCGs 1, 2, 3, 4 και 6· τρεις από αυτές (οι VCGs 1, 2 και 4) υποδιαιρούνται σε υποομάδες Α και Β, ανάλογα με το εύρος και τη συχνότητα της πρωτότροφης αύξησης στις δοκιμασίες (Bell, 1994; Katan, 2000; Bhat *et al.*, 2003). Στην ίδια VCG κατατάσσονται στελέχη που παράγουν θετικές αντιδράσεις συμπληρωματικότητας, με αύξηση πρωτότροφου τύπου (η οποία αποδίδεται στον σχηματισμό βιώσιμων ετεροκαρύων, χωρίς την πυροδότηση αντίδρασης ασυμβατότητας), ενώ στελέχη διαφορετικών VCGs είναι μεταξύ τους ασύμβατα. Εκτός από το είδος *V. dahliae*, που συγκεντρώνει σχεδόν αποκλειστικά το ενδιαφέρον στις πληθυσμιακές μελέτες λόγω εξάπλωσης και φυτοπαθολογικής σημασίας, το σύστημα της κατάταξης σε VCGs βάσει των μεταλλαγών *nit* έχει εφαρμοσθεί και στα *V. albo-atrum* (Correll *et al.*, 1988), *Gibellulopsis nigrescens* (παλαιότερα *V. nigrescens*) και *V. tricorpus* (Korolev & Katan, 1999), για τα οποία εντοπίστηκαν 2, 9 και 11 ομάδες συμβατότητας, αντίστοιχα.

Η κατάταξη στελεχών μύκητων σε VCGs είναι ένα εύχρηστο εργαλείο για την πληθυσμιακή ανάλυση των μύκητων (Sauré, 2000) και τον χαρακτηρισμό της γενετικής ποικιλομορφίας σε μύκητες που στερούνται φυλετικής αναπαραγωγής, όπως στο γένος *Verticillium* (Rowe, 1995). Τα στελέχη των ειδών του *Verticillium*, που αποτελούν μιτοσπορικούς υφομύκητες, μπορούν να ανταλλάξουν γενετική πληροφορία μόνον μέσω της ετεροκαρύωσης και του παραφυλετικού κύκλου. Έτσι, με την πάροδο των ετών, έγινε η γενική παραδοχή ότι, αφού οι VCGs είναι μεταξύ τους ασύμβατες, τα στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικές VCGs είναι γενετικά απομονωμένα και, συνεπώς, ανήκουν σε διακριτές γενετικές ομάδες εντός του είδους, οι οποίες μπορεί να διαφέρουν σε χαρακτηριστικά της φυσιολογίας τους και της παθογονικότητάς τους (Leslie, 1993; Rowe, 1995; Katan, 2000).

Γ. Συσχέτιση των VCGs με φυτοπαθολογικά, μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά

Με την πάροδο των ετών, η ανάλυση των VCGs καθιερώθηκε ως ένα εύχρηστο εργαλείο για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και της δομής των πληθυσμών του μύκητα *V. dahliae* (Joaquim & Rowe, 1990; 1991; Strausbaugh *et al.*, 1992; Katan, 2000; Bhat *et al.*, 2003; Jiménez-Díaz *et al.*, 2006). Η αξιοποίηση δεδομένων σχετικά με τη γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών του μύκητα, των παθογονικών χαρακτηριστικών και της μολυσματικότητας κάθε ομάδας VCG, καθώς και της τυχόν γνωστής εξειδίκευσης σε συγκεκριμένους ξενιστές, θα επέτρεπαν την ακριβέστερη και έγκαιρη εκτίμηση του δυνητικού κινδύνου και την εφαρμογή της καταλληλότερης κατά περίπτωση διαχειριστικής πρακτικής για την αντιμετώπιση ενός σοβαρού φυτοπαθογόνου παράγοντα (Korolev *et al.*, 2000; Tsror & Levin, 2003). Σε κάποιες περιπτώσεις έχει αναφερθεί συσχέτιση μεταξύ των VCGs και της γεωγραφικής κατανομής· για παράδειγμα, στελέχη των VCGs 4 και 6 έχουν ανακτηθεί μόνον από τη Β. Αμερική (Dobinson *et al.*, 2000; Bhat *et al.*, 2003). Όσον αφορά την πιθανή σχέση των VCGs με φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά, ωστόσο, οι μέχρι τώρα



Εικόνα 1.22. Τυπικές δοκιμασίες συμπληρωματικότητας για τον μύκητα *Verticillium dahliae* με χρήση του συστήματος των μεταλλαγών *nit*. Διάφοροι μορφολογικοί τύποι ετεροκαρύων δημιουργούνται μεταξύ συμπληρωματικών μεταλλαγών *nit* συμβατών στελεχών (ίδιου VCG) σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό με νιτρικά ιόντα ως μοναδική πηγή αζώτου (A-Δ: I.A. Παπαϊωάννου & M.A. Τύπας, αδημοσίευτα αποτελέσματα· E: από Korolev *et al.*, 2000).

αναφορές ήταν μάλλον αντιφατικές. Οι VCGs γενικά δεν φαίνεται να σχετίζονται με την παθογονικότητα σε συγκεκριμένους ξενιστές, αν και υπάρχουν διάφορες ενδείξεις χαλαρής συσχέτισης μεταξύ των VCGs και της μολυσματικότητας σε κάποια φυτά, όπως το βαμβάκι, η πατάτα, η τομάτα, η μελιτζάνα και η πιπεριά (Strausbaugh *et al.*, 1992; Daayf *et al.*, 1995; Bhat & Subbarao, 1999; Dobinson *et al.*, 2000; Korolev *et al.*, 2000; Bhat *et al.*, 2003). Για παράδειγμα, πολλά από τα πλέον μολυσματικά στελέχη στην πατάτα ανήκουν στην υποομάδα VCG 4A, ενώ λιγότερο επιθετικά στελέχη εντάσσονται στις υποομάδες VCGs 2B και 4B (Dobinson *et al.*, 2000). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί η ύπαρξη πιθανής συσχέτισης μεταξύ συγκεκριμένων VCGs και της συστηματικής κατάταξης του αρχικού ξενιστή, όπως για παράδειγμα των VCGs 1 και 2 με το βαμβάκι, και της VCG 4 με μέλη της οικογένειας των Σολανοειδών (Solanaceae) (Joaquim & Rowe, 1990; Daayf *et al.*, 1995).

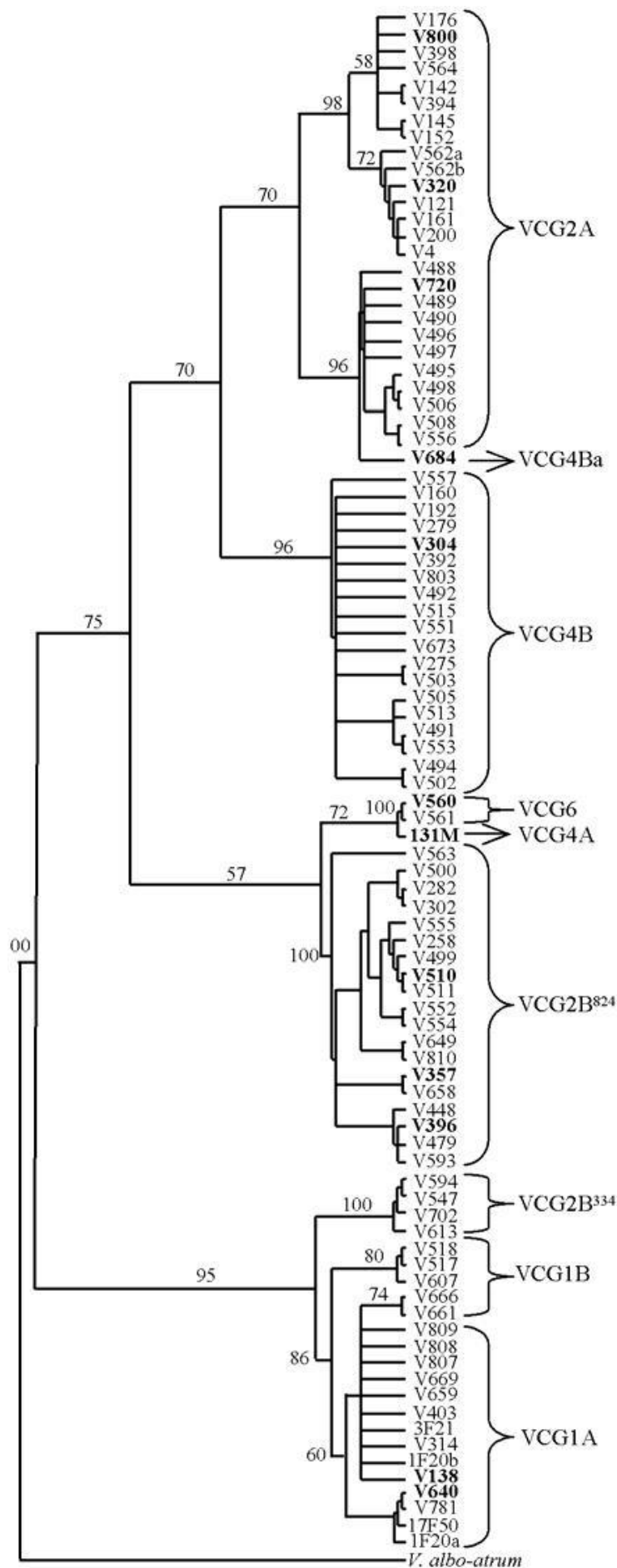
Εκτός από την ετερογένεια στα χαρακτηριστικά παθογονικότητας και μολυσματικότητας, σημαντική ποικιλομορφία παρατηρείται και στη μορφολογία και τη φυσιολογία μεταξύ διαφορετικών στελεχών του μύκητα *V. dahliae*. Αν και σε παλαιότερες μελέτες δεν βρέθηκε καμία προφανής σχέση μεταξύ τέτοιων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών και του παθογονικού δυναμικού (Isaac, 1957), δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα καμία διεξοδική μελέτη του μορφολογικού και φυσιολογικού προφίλ διαφορετικών ομάδων παθογονικότητας. Παρομοίως, αν και σημαντικές διαφορές έχουν αναφερθεί στη μορφολογία και τη φυσιολογία μεταξύ των μελών διαφορετικών VCGs (Korolev *et al.*, 2000; Zeise & von Tiedemann, 2001; Korolev *et al.*, 2008), η πιθανή αντανάκλαση της γενικά αποδεκτής γενετικής απομόνωσης των VCGs σε τέτοιες παραμέτρους δεν έχει μελετηθεί εκτενώς μέχρι σήμερα.

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μοριακές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένων της μελέτης του πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Dobinson *et al.*, 2000), της μελέτης του πολυμορφισμού μεγέθους ενισχυόμενων τμημάτων (amplified fragment length polymorphism, AFLP) (Collado-Romero *et al.*, 2006), του RAPD (Zeise & von Tiedemann, 2002), μοριακών δεικτών που βασίζονται στην PCR (Collado-Romero *et al.*, 2009), της φυλογενετικής ανάλυσης πολλαπλών γονιδίων (multi-locus phylogenetic analysis) (Collado-Romero *et al.*, 2008; Martin, 2010) και της ανάλυσης μικροδορυφορικών (microsatellite) αλληλουχιών (Berbegal *et al.*, 2011), έχουν εφαρμοσθεί για τη μελέτη της μοριακής ποικιλομορφίας και των γενετικών σχέσεων εντός και μεταξύ των VCGs του είδους *V. dahliae*. Τα αποτελέσματα μέχρι σήμερα ήταν σε μεγάλο βαθμό αντιφατικά: αν και σε αρκετές περιπτώσεις τα στελέχη μιας VCG αποδείχθηκε πως μπορεί να είναι μοριακά ετερογενή, εντούτοις από άλλους ερευνητές αποκαλύφθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των γενετικών ομάδων και των υποομάδων VCGs, ανεξάρτητα από τη γεωγραφική προέλευση ή τον αρχικό ξενιστή (Collado-Romero *et al.*, 2008).

Οι Bhat & Subbarao (1999) ανέφεραν, για παράδειγμα, πως δεν εντόπισαν καμία συσχέτιση μεταξύ των VCGs και των προτύπων RAPD που ελήφθησαν με χρήση ενός μεγάλου αριθμού τυχαίων εκκινητών. Η αξιοποίηση πυρηνικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (όπως υποπεριοχές της ριβοσωμικής επανάληψης και το στοιχείο E18) και άλλων ειδικών δεικτών (όπως μια υποπεριοχή του γονιδίου *trp1*) σε υβριδισμούς των προτύπων RFLPs διαφορετικών στελεχών (κατόπιν πέψης του χρωμοσωμικού DNA με διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες) οδήγησε στο συμπέρασμα πως οι VCGs 2A, 2B, 4A και 4B είναι γενετικά ετερογενείς και όχι μονοσήμαντα συσχετίσιμες με κάποιο πρότυπο μοριακού πολυμορφισμού (Dobinson *et al.*, 1998; Dobinson *et al.*, 2000).

Από την άλλη πλευρά, η χρήση ειδικών εκκινητών σε αναλύσεις PCR προσέφερε καλή συσχέτιση με τις υποομάδες των VCGs και αποκάλυψε ορισμένα ενδιαφέροντα στοιχεία για τις σχέσεις τους (Collins *et al.*, 2005; Jiménez-Díaz *et al.*, 2006; Collado-Romero *et al.*, 2006; 2008). Ωστόσο, και η χρήση αυτών των μοριακών δεικτών που βασίζονται στην PCR απέδειξε ότι ορισμένες από τις υποομάδες των VCGs (π.χ. VCG 2B) είναι ετερογενείς και πιθανώς πολυφυλετικές (Collado-Romero *et al.*, 2008). Η τεχνική των φθορίζοντων AFLPs επέτρεψε, κατά τους Collado-Romero *et al.* (2006), ομαδοποίηση των στελεχών που μελέτησαν σε πλήρη συμφωνία με το σύστημα των VCGs (Εικόνα 1.23), αλλά όταν η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε σε έναν πληθυσμό στελεχών του *V. dahliae* από την Κρήτη, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση (Δρ. Α. Ντούλης, προσωπική επικοινωνία).

Τέλος, για τη φυλογενετική ανάλυση αλληλουχιών DNA του είδους *V. dahliae* έχουν χρησιμοποιηθεί τα περισσότερα από τα καθιερωμένα για φυλογενετικές μελέτες γονίδια του πυρηνικού και του μιτοχondριακού DNA, μεταξύ των οποίων υποπεριοχές της πυρηνικής ριβοσωμικής επανάληψης (π.χ. ITS1-5.8S-ITS2), ποικίλα πυρηνικά γονίδια όπως της ακτίνης (*act*), της β-σωληνίνης (*β-tub*), της καλμοδουλίνης (*cal*), της ιστόνης 3 (*H3*) και της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II (*rpb1*), καθώς επίσης και μιτοχondριακά γονίδια όπως του κυτοχρώματος b (*cob*), του rRNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (*rns*), των υπομονάδων I και III της NADH αφυδρογονάσης (*nad1* και *nad3*) και της υπομονάδας III της κυτοχρωμικής οξειδάσης (*cox3*), αλλά και διαγονιδιακές περιοχές (Fahleson *et al.*, 2004; Pantou *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2006; Collado-Romero *et al.*, 2008; Martin, 2010). Αν και αυτή η μεθοδολογία προσέφερε ικανοποιητική ανάλυση στο επίπεδο του είδους και συνέβαλε στη διαλεύκανση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών του γένους *Verticillium*



Εικόνα 1.23. Συναινετικό δένδρο με τη μέθοδο της μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony) των VCGs του μύκητα *Verticillium dahliae*, βάσει ανάλυσης AFLP, με χρήση του *V. albo-atrum* ως εξωτερικής ομάδας (outgroup). VCG4Ba: στελέχος της VCG 4B από την αγκινάρα VCG2B³³⁴; στελέχη της VCG 2B από την αγκινάρα, που δίνουν χαρακτηριστικό προϊόν DNA μεγέθους 334 bp με ανάλυση μοριακών δεικτών PCR (Jiménez-Díaz *et al.*, 2006). VCG2B⁸²⁴: στελέχη της VCG 2B που δίνουν χαρακτηριστικό προϊόν DNA μεγέθους 824 bp με ανάλυση μοριακών δεικτών PCR (Collado-Romero *et al.*, 2006) (από Collado-Romero *et al.*, 2008).

(Fahleson *et al.*, 2004; Pantou *et al.*, 2005), είναι αξιοσημείωτο πως η φυλογενετική μελέτη μεμονωμένων γονιδίων, αλλά ακόμα και συνδυασμένων αλληλουχιών από πολλαπλά γονίδια, παρείχαν μόνον μικρή διακριτική ικανότητα (resolution) στο επίπεδο των VCGs του *V. dahliae*, καθώς όσες περιοχές DNA έχουν ελεγχθεί χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλό επίπεδο ενδοειδικού πολυμορφισμού (Collado-Romero *et al.*, 2008). Συνεπώς, αλληλουχίες νέων περιοχών DNA που να παρέχουν περισσότερες φυλογενετικές πληροφορίες και καλύτερη διακριτική ικανότητα για τις VCGs πρέπει να αναζητηθούν και να ελεγχθούν για την καταλληλότητά τους ως προς τον χαρακτηρισμό πληθυσμών του *V. dahliae* στο επίπεδο των VCGs.

Δ. Η πυρηνική ριβοσωμική επανάληψη (rDNA) ως πιθανός στόχος μελέτης για τον εντοπισμό συσχετίσεων με τις VCGs του μύκητα *V. dahliae*

Το πυρηνικό σύμπλεγμα των γονιδίων των ριβοσωμικών RNAs (rDNA), και ειδικά η εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή (internal transcribed spacer, ITS) είναι η δημοφιλέστερη γενετική περιοχή για τη διάκριση ειδών μυκήτων και για τη φυλογενετική μελέτη αυτών (Schoch *et al.*, 2012). Η περιοχή ITS είναι αξιοσημείωτα συντηρημένη εντός του είδους *V. dahliae* (Pramateftaki *et al.*, 2000; Collado-Romero *et al.*, 2008), ενώ δεν έχει εντοπισθεί σημαντική ποικιλομορφία ούτε στα γονίδια των ριβοσωμικών RNAs της μικρής (small sub-unit rRNA gene, SSU ή 18S) και της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας (large sub-unit rRNA gene, LSU ή 28S) σε πληθυσμούς του μύκητα. Η διαγονιδιακή διαχωριστική περιοχή (intergenic spacer, IGS) είναι καλά τεκμηριωμένο πως αποτελεί την ταχύτερα εξελισσόμενη περιοχή του συμπλέγματος rDNA, όντας πολυμορφική ακόμα και εντός των ειδών, και παρέχει ένα χρήσιμο εργαλείο για την ταξινόμηση και τη φυλογενετική μελέτη πολλών μυκήτων (Jackson *et al.*, 1999; Pantou *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2005; Mbofung *et al.*, 2007). Πράγματι, οι Morton *et al.* (1995) και οι Pramateftaki *et al.* (2000) αποκάλυψαν την ύπαρξη υψηλού επιπέδου ενδοειδικής ετερογένειας εντός της περιοχής IGS του *V. dahliae*, που αποδόθηκε κυρίως σε μία υπερμεταβλητή υποπεριοχή που φέρει μεγάλες εισδοχές/ελλείψεις (indels), καθώς επίσης και σημειακές αντικαταστάσεις, μεταξύ στελεχών του είδους. Από τότε, η περιοχή IGS έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές πληθυσμιακές μελέτες του είδους *V. dahliae*, οι οποίες έχουν αναδείξει το σημαντικό πληροφοριακό της δυναμικό, αν και παραμένουν αντιφατικές ως προς την πιθανή συσχέτιση της αλληλουχίας της περιοχής IGS με τον φαινότυπο μολυσματικότητας (Collins *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2006; Vallad *et al.*, 2006; Maruthachalam *et al.*, 2010; Atallah *et al.*, 2011b). Ο έλεγχος της χρήσης αυτής της μεταβλητής περιοχής σε δομική/φυλογενετική ανάλυση ως πιθανού μοριακού εργαλείου διάκρισης των VCGs και φυλογενετικής μελέτης αυτών, αποτελεί ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο.

Τα εσώνια τύπου I (group-I introns) αποτελούν μία από τις τέσσερις κύριες τάξεις εσώνιων και καταλύουν την εκτομή τους από τα πρόδρομα μετάγραφα μέσω ενός μηχανισμού ματίσματος (splicing) δύο βημάτων, που εξαρτάται από έναν εξωγενή συμπαραγοντα γουανωσίνης (Haugen *et al.*, 2005). Αν και η συντήρηση στο επίπεδο της αλληλουχίας είναι περιορισμένη, ο πυρήνας των εσώνιων τύπου I χαρακτηρίζεται από μια συντηρημένη δομική αρχιτεκτονική που αποτελείται από 10 ζευγαρωμένα τμήματα (P1-P10), τα οποία οργανώνονται σε τρεις επικράτειες: τη δομική επικράτεια (P4-P6), την επικράτεια υποστρώματος (P1, P10) και την καταλυτική επικράτεια (P3, P7 και P8) (Michel & Westhof, 1990; Woodson, 2005; Vicens *et al.*, 2008; Nielsen & Johansen, 2009). Βάσει των χαρακτηριστικών της δευτεροταγούς δομής, τα εσώνια τύπου I διακρίνονται σε 5 ομάδες (IA-

IE), οι οποίες διαιρούνται περαιτέρω σε 14 υποομάδες (Li & Zhang, 2005; Vicens *et al.*, 2008). Τα εσώνια τύπου I απαντώνται συχνά στα πυρηνικά και τα οργανιδιακά γονιδιώματα των ευκαρυωτικών οργανισμών, ιδίως στους μύκητες, τα φυτά και τα φύκη, ενώ είναι σπάνια στους ιούς, τα βακτήρια και τους φάγους, και απουσιάζουν από τα αρχαία (Haugen *et al.*, 2005). Τα πυρηνικά εσώνια τύπου I των ευκαρυωτικών οργανισμών περιορίζονται στα γονίδια των ριβοσωμικών RNAs, σε τουλάχιστον 47 και 44 διαφορετικές θέσεις των γονιδίων SSU και LSU, αντίστοιχα (Cannone *et al.*, 2002). Η κατανομή των εσωνίων τύπου I είναι γενικά σποραδική και ακανόνιστη, ακόμα και εντός ειδών ή μεταξύ φυλογενετικά συγγενικών τάξεων, ως αποτέλεσμα του συνδυασμού της κληρονομησης, της οριζόντιας μεταφοράς (μέσω των μηχανισμών της εισδοχής ή της αντίστροφης συρραφής), και της περιστασιακής εκτομής-απώλειας. Ειδικότερα στους ασκομύκητες, τα εσώνια τύπου I που έχουν ανιχνευθεί στο rDNA εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά σε 4 θέσεις του γονιδίου SSU (Ec516, Ec943, Ec989 και Ec1199 με αναφορά στην αλληλουχία του γονιδίου SSU του βακτηρίου *Escherichia coli*), και σε ισάριθμες θέσεις του γονιδίου LSU (Ec1921, Ec2066, Ec2449 και Ec2563) (Pantou *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Τα πρότυπα κατανομής και οι αλληλουχίες των εσωνίων τύπου I έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολυάριθμες μελέτες που στοχεύουν στην ανασύσταση των φυλογενετικών σχέσεων των μυκήτων και άλλων οργανισμών (Dujon, 1989; Bhattacharya *et al.*, 1996; 2005; Hibbett, 1996; Nikoh & Fukatsu, 2001; Haugen *et al.*, 2005; Hafez *et al.*, 2012).

Σε μια προηγούμενη μελέτη, ένα εσώνιο τύπου I, μεγέθους 839 bp, εντοπίστηκε σε μια πολύ συντηρημένη θέση εισδοχής (Ec943) του πυρηνικού γονιδίου SSU σε 36 από 38 στελέχη του *V. longisporum* που εξετάστηκαν, ενώ απουσίαζε από το *V. dahliae* και τα άλλα είδη του γένους *Verticillium* (Kararapa & Typas, 2001). Η παρουσία αυτού του εσωνίου σε 27 από 29 στελέχη του *V. longisporum* επαληθεύτηκε αργότερα από τους Collins *et al.* (2003), οι οποίοι επιπλέον χρησιμοποίησαν ειδικούς για το εσώνιο εκκνητές και ανίχνευσαν άλλο ένα στέλεχος του *V. longisporum* που έφερε το ίδιο εσώνιο σε μικρό αριθμό ριβοσωμικών επαναλήψεων, καθώς επίσης και ένα μοναδικό στέλεχος του *V. dahliae* που είχε ένα μικρότερο εσώνιο στην ίδια θέση του γονιδίου SSU. Και σε αυτήν τη μελέτη φάνηκε πως τα είδη *V. dahliae* και *V. albo-atrum* γενικά στερούνταν εσωνίων στο γονίδιο SSU. Εν συνεχεία, η ανίχνευση αυτού του εσωνίου, μήκους 839 bp, έχει αξιοποιηθεί – ως μοριακός δείκτης ειδικός για το *V. longisporum* – για τη διάκριση αυτού από τα υπόλοιπα είδη του *Verticillium* (Johanson *et al.*, 2006; Banno *et al.*, 2011; Ikeda *et al.*, 2012; Inderbitzin *et al.*, 2013). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί πως η παρουσία αυτού του εσωνίου ίσως να αποτελεί περαιτέρω έναν διαγνωστικό χαρακτήρα για τη διάκριση μεταξύ των υβριδικών εξελικτικών γραμμών (lineages) του *V. longisporum*, οι οποίες προέρχονται από διαφορετικούς συνδυασμούς πατρικών ειδών και επιδεικνύουν διαφορετικές ιδιότητες παθογονικότητας (Inderbitzin *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2013). Και σε αυτές τις μελέτες, το εσώνιο αναφέρθηκε ξανά ως απόν από τα είδη *V. dahliae* και *V. albo-atrum*. Η αναλυτική αναζήτηση αντίστοιχων εσωνίων μεταξύ των VCGs του *V. dahliae* έχει μεγάλο θεωρητικό ενδιαφέρον και αναμένεται να συμβάλει στην περιγραφή αξιόπιστων μοριακών εργαλείων διάκρισης και τη διαλεύκανση των σχέσεων μεταξύ των ειδών του *Verticillium*.

E. Περιορισμοί του συστήματος των VCGs βάσει των μεταλλαγών nit

Αν και είναι εύχρηστο για τον χαρακτηρισμό των πληθυσμών του *V. dahliae*, το σύστημα κατάταξης σε VCGs με τη χρήση μεταλλαγών *nit* χαρακτηρίζεται από διάφορους περιορισμούς ως προς τη συμβολή της μεθόδου στη διαλεύκανση της πληθυσμιακής βιολογίας του είδους. Αυτοί οι περιορισμοί διακρίνονται σε πρακτικά προβλήματα της διαδικασίας κατάταξης και σε γενικούς περιορισμούς της μεθόδου.

Στους πρακτικούς περιορισμούς ανήκει το γεγονός πως η διαδικασία για την κατάταξη στελεχών σε VCGs με τη χρήση των μεταλλαγών *nit* είναι μεν αρκετά γρήγορη ώστε να επιτρέπει τη διεξαγωγή μελετών σε ερευνητικό επίπεδο, αλλά δεν είναι πρακτική για εφαρμογή σε μεγαλύτερη κλίμακα (Leslie, 1993). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί γενικά σημαντική ετερογένεια στον βαθμό πρωτότροφης αύξησης και τη συχνότητα συμπληρωματικότητας μεταξύ διαφορετικών «διασταυρώσεων» (ή ακόμα και μεταξύ ανεξάρτητων μεταλλαγών *nit* του ίδιου ζεύγους στελεχών). Αυτές οι αντιδράσεις ποικίλουν από πρωτότροφη αύξηση που ομοιάζει με εκείνη του φυσικού τύπου του μύκητα (συνήθως καλούνται «ισχυρές» στη βιβλιογραφία), μέχρι λιγότερο «εύρωστες» αντιδράσεις, δηλαδή με αραιό εναέριο μυκήλιο και χαμηλό τάχος αύξησης (συνήθως αναφέρονται ως «ασθενείς» αντιδράσεις) και «οριακές» αντιδράσεις, οι οποίες συχνά χαρακτηρίζονται από μεμονωμένα συσσωματώματα μικροσκληρωτίων κατά μήκος της ζώνης επαφής των μεταλλαγών που «διασταυρώνονται» (Joaquim & Rowe, 1990; Strausbaugh *et al.*, 1992; Daayf *et al.*, 1995; Korolev *et al.*, 2000; Hadizadeh & Banhashemi, 2007; Göre, 2009; El-Bebany *et al.*, 2013). Το σύστημα κατάταξης σε VCGs βασίζεται κυρίως στις «ισχυρές» αντιδράσεις για την ένταξη των στελεχών του μύκητα σε VCGs και τις υποομάδες τους, αν και δεν έχει πραγματοποιηθεί ποτέ γενετική ανάλυση και σύγκριση των διαφορετικών αυτών τύπων αντιδράσεων. Χωρίς γενετική ανάλυση δεν είναι δυνατή η διάκριση από τη μορφολογία και μόνον μεταξύ πραγματικών βιώσιμων ετεροκαρύων, ετεροπλασμάτων (heteroplasmons· σε αυτά δεν διέρχονται πυρήνες από τις αναστομώσεις των υφών, αλλά μόνον κυτταροπλασματικό υλικό που περιέχει κάποιες ποσότητες των παραγόντων που αδυνατούν να συνθέσουν οι υφές των στελεχών· Typas, 1983) και της παροδικής ετεροκαρύωσης (transitory heterokaryosis· το φαινόμενο αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταξύ βλασθητικά ασύμβατων στελεχών, όταν ο ρυθμός καταστροφής των ετεροκαρυωτικών υφών δεν είναι αρκετά υψηλός ώστε να αποτρέψει την παραγωγή λειτουργικής νιτρικής αναγωγής, η οποία όμως δεν είναι και αρκετή για να στηρίξει επί μακρόν την πρωτότροφη αύξηση· Joaquim & Rowe, 1991). Αυτή η ετερογένεια στη μορφολογία των αντιδράσεων συμπληρωματικότητας, απουσία κατάλληλης γενετικής ανάλυσης, συνεπάγεται υποκειμενικότητα στην κατάταξη και αμφιβολίες ως προς την αξιοπιστία της. Τέλος, στους πρακτικούς περιορισμούς της μεθόδου συγκαταλέγονται η αδυναμία απομόνωσης μεταλλαγών ανθεκτικών στα χλωρικά ιόντα από ορισμένα στελέχη, η μεγάλη γενετική αστάθεια ορισμένων τέτοιων μεταλλαγών, η αδυναμία παραγωγής μεταλλαγών *nit* διαφορετικών κλάσεων από διάφορα στελέχη, η ανίχνευση *ετεροκαρυωτικά αυτο-ασύμβατων στελεχών* (*heterokaryon self-incompatible*, HSI) που δεν μπορούν να καταταχθούν, αλλά και η συχνή παρουσία στελεχών που είναι συμβατά, σε ποικίλο βαθμό, με τα στελέχη περισσότερων της μιας υποομάδων VCG (“bridging” strains) (Joaquim & Rowe, 1990; 1991; Strausbaugh, 1993; Elena & Paplomatas, 1998; Omer *et al.*, 2000; Chandelier *et al.*, 2003; Hiemstra & Rataj-Guranowska, 2003; Dervis & Bicici, 2005; Hadizadeh & Banhashemi, 2007; El-Bebany *et al.*, 2013).

Εκτός από τα πρακτικά προβλήματα που ανακύπτουν κατά την εφαρμογή του συστήματος των μεταλλαγών *nit* για την κατάταξη στελεχών του *V. dahliae* σε VCGs, υπάρχουν και ορισμένοι ακόμα εγγενείς περιορισμοί της μεθόδου, που σχετίζονται με τη φύση της διαδικασίας. Παρόλη τη γενική ασυμφωνία μεταξύ αυτής της μεθόδου και των μεθόδων που βασίζονται σε άλλους τύπους βιοχημικών ή μορφολογικών δεικτών για την κατάταξη (Tyras & Heale, 1976; Puhalla, 1979; Puhalla & Hummel, 1983; Clarkson & Heale, 1985), λεπτομερείς συγκριτικές αναλύσεις των διαφορετικών μεθόδων δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, αν και τέτοιες αντιφάσεις μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ερμηνεία και τη χρησιμότητα των δεδομένων που προκύπτουν από την κατάταξη σε VCGs. Αυτό το πρόβλημα στην περίπτωση του *V. dahliae* εντείνεται περαιτέρω από το γεγονός ότι ο αριθμός των γονιδίων ετεροκαρύωσης και η φύση των αντίστοιχων συστημάτων είναι ακόμα εντελώς άγνωστα σε αυτόν τον μύκητα. Τέλος, το σύστημα κατάταξης σε VCGs, ειδικά στην περίπτωση του *V. dahliae* όπου ο αριθμός των περιγεγραμμένων ομάδων είναι μικρός, επαρκεί για την περιγραφή της γενετικής ποικιλότητας μόνον σε έναν περιορισμένο βαθμό, και δεν μπορεί να αξιοποιηθεί για τον υπολογισμό της γενετικής ροής ή των επιπέδων του ανασυνδυασμού στους πληθυσμούς του παθογόνου (Klosterman *et al.*, 2009; Atallah *et al.*, 2011a).

1.5 Στόχοι της διατριβής

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη του φαινομένου της ετεροκαρύωσης/ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στο γένος φυτοπαθογόνων μυκήτων *Verticillium* (με έμφαση στο είδος *V. dahliae*), καθώς επίσης και των συνεπειών του σε πληθυσμιακό επίπεδο (διάκριση σε VCGs), με παράλληλες προσεγγίσεις πληθυσμιακής βιολογίας, γενετικής, φυσιολογίας-κυτταρικής βιολογίας και μοριακής βιολογίας-γονιδιωματικής ανάλυσης. Η ερευνητική προσπάθεια εστιάσθηκε πιο συγκεκριμένα στους επιμέρους στόχους:

- κατάταξη ελληνικού πληθυσμού του μύκητα *V. dahliae* (από την Κρήτη) σε VCGs και σύγκριση με γεωγραφικά, φυτοπαθολογικά και μορφολογικά γνωρίσματα των στελεχών
- ανάπτυξη νέων μοριακών εργαλείων για την αξιόπιστη πρόβλεψη και διάκριση των VCGs του *V. dahliae*
- φυλογενετική ανάλυση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των VCGs του *V. dahliae*
- γενετική ανάλυση ετεροκαρύων και μεταλλαγών που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας σε πληθυσμούς του μύκητα
- ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών για την ταχεία, αξιόπιστη και σε μεγάλη κλίμακα κατάταξη στελεχών του μύκητα σε VCGs με χρήση των μεταλλαγών *nit*, καθώς και νέων μεθόδων κατάταξης με νέους γενετικούς δείκτες
- φυσιολογική μελέτη και μικροσκοπική τεκμηρίωση της σύντηξης μεταξύ κονιδίων σε φάση βλάστησης του *V. dahliae* μέσω της δημιουργίας σωλήνων CATs
- μικροσκοπική μελέτη της διαδικασίας σύντηξης υφών, της πυρηνικής οργάνωσης και συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια του φαινομένου της ετεροκαρύωσης και του φαινοτύπου ασυμβατότητας σε κυτταρικό επίπεδο στο *V. dahliae*
- εντοπισμός πιθανών γονιδίων *het*, άλλων γονιδίων σχετικών με αυτά και γονιδίων για πρωτεΐνες με πιθανά σχετικά μοτίβα στους μύκητες του γένους *Verticillium*, με παράλληλες προσεγγίσεις (πειραματικές και γονιδιωματικής ανάλυσης *in silico*)
- δομική μελέτη *in silico* και πληθυσμιακή ανάλυση επιλεγμένων γονιδίων *het* στον μύκητα *V. dahliae*
- λειτουργική μελέτη επιλεγμένων γονιδίων *het* στον μύκητα *V. dahliae* μέσω της στοχευμένης κατασκευής αντίστοιχων μεταλλαγών απενεργοποίησης (knock-out mutants)

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Στελέχη μικροοργανισμών

2.1.1 Στελέχη μυκήτων

Στο πλαίσιο και για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής δημιουργήθηκε και συντηρήθηκε μια εκτεταμένη συλλογή στελεχών μυκήτων (φυσικού τύπου) του γένους *Verticillium*, από πολλές περιοχές του κόσμου, 41 φυτικούς ξενιστές και όλες τις VCGs του είδους *V. dahliae*. Τα 198 στελέχη μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, μαζί με την τεκμηρίωσή τους, παρατίθενται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1					
Στελέχη μυκήτων φυσικού τύπου					
A/A	Στέλεχος	Ξενιστής ^α	Χώρα προέλευσης	VCG ^β	Πηγή ^γ
<i>Verticillium dahliae</i>					
1.	T9	βαμβάκι ¹	ΗΠΑ (CA)	1A	1
2.	V44	βαμβάκι	ΗΠΑ (TX)	1A	1
3.	V138I	βαμβάκι	Ισπανία	1A	2
4.	cotVd03	βαμβάκι	Τουρκία	1A	3
5.	cotVd11	βαμβάκι	Τουρκία	1A	3
6.	cotVd16	βαμβάκι	Τουρκία	1A	3
7.	cotVd19	βαμβάκι	Τουρκία	1A	3
8.	cotVd47	βαμβάκι	Τουρκία	1A	3
9.	V607I (R04)	φράξος ²	ΗΠΑ (MN)	1B	2
10.	V661I (328 v-1)	βαμβάκι	Ελλάδα	1B	2
11.	V666I (347 v-1)	βαμβάκι	Ελλάδα	1B	2
12.	cot201	βαμβάκι	Ισραήλ	1	9
13.	Dvd-T5	τομάτα ³	Καναδάς	2A	4
14.	PH	φισίκι ⁴	ΗΠΑ (CA)	2A	1
15.	V320I	βαμβάκι	ΗΠΑ (CA)	2A	2
16.	V720I (V39)	ελιά ⁵	Ιταλία	2A	2
17.	V800I	ελιά	Ισπανία	2A	2
18.	ep8	μελιτζάνα ⁶	Ισραήλ	2A	9
19.	7V	τομάτα	Ελλάδα	2A	8
20.	31V	πεπόνι ⁷	Ελλάδα	2A	8
21.	cotVd04	βαμβάκι	Τουρκία	2A	3
22.	egrVd17	μελιτζάνα	Τουρκία	2A	3
23.	egrVd23	μελιτζάνα	Τουρκία	2A	3
24.	98-1	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	2A	5
25.	113-1	μελιτζάνα	Ελλάδα (Κρήτη)	2A	5
26.	140-2	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	2A	5
27.	164-1	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	2A	5
28.	179-4	πεπόνι	Ελλάδα (Κρήτη)	2A	5
29.	247b-3	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	2A	5

30.	20V	τομάτα	Ελλάδα	2A (2B)	8
31.	136-1	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	2A (2B)	5
32.	136-3	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	2A (2B)	5
33.	294-5	στύφνος ⁸	Ελλάδα (Κρήτη)	2A (2B)	5
34.	302-1	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	2A (2B)	5
35.	998-1	μελιτζάνα	Ελλάδα (Κρήτη)	2A (2B, 4A)	5
36.	116-1	μπάμια ⁹	Ελλάδα (Κρήτη)	2A (2B, 4B)	5
37.	43-4	στύφνος	Ελλάδα (Κρήτη)	2A (4A, 4B)	5
38.	592-2	ραπανάκι ¹⁰	Ελλάδα (Κρήτη)	2A (4A, 4B)	5
39.	115	βαμβάκι	Συρία	2B	1
40.	V54	πιπεριά ¹¹	Αυστρία	2B	6
41.	cot274	βαμβάκι	Τουρκία	2B	3
42.	V3	φράουλα ¹²	Γερμανία	2B	6
43.	V4	φράουλα	Γερμανία	2B	6
44.	V16	πατάτα ¹³	Γερμανία	2B	6
45.	V38	ηλιοτρόπιο ¹⁴	Γερμανία	2B	6
46.	V41	ρέβα ¹⁵	Γερμανία	2B	6
47.	V42	ρέβα	Ρωσία	2B	6
48.	V49	πιπεριά	Αυστρία	2B	6
49.	V52	πιπεριά	Αυστρία	2B	6
50.	V57	φράουλα	Γερμανία	2B	6
51.	V73	λινάρι ¹⁶	Γερμανία	2B	6
52.	V85	πατάτα	Γερμανία	2B	6
53.	V87	πατάτα	Γερμανία	2B	6
54.	cot11	βαμβάκι	Ισραήλ	2B	8
55.	cotVd06	βαμβάκι	Τουρκία	2B	3
56.	cotVd13	βαμβάκι	Τουρκία	2B	3
57.	cotVd18	βαμβάκι	Τουρκία	2B	3
58.	Ls.17	μαρούλι ¹⁷	ΗΠΑ (CA)	2B	7
59.	V357I (JY)	βαμβάκι	Κίνα	2B	2
60.	V510I (tom20)	τομάτα	Ισραήλ	2B	2
61.	V613I	αγκινάρα ¹⁸	Ισπανία	2B	2
62.	449-2	μπρόκολο ¹⁹	Ελλάδα (Κρήτη)	2B	5
63.	570-2	ραπανάκι	Ελλάδα (Κρήτη)	2B	5
64.	Cf.38 ^δ	καυτερή πιπεριά ²⁰	ΗΠΑ (CA)	2B	7
65.	V702I	αγκινάρα	Ισπανία	2Ba	2
66.	124-8	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (1)	5
67.	123-3	ελιά	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A)	5
68.	171-2	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A)	5
69.	423-1	φιστίκι	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A)	5
70.	454-1	λουβάνα ²¹	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A)	5
71.	487-1	ανθεμίδα ²²	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A)	5
72.	530-1	πιπεριά	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A)	5
73.	577-1	λουβουδιά ²³	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A)	5
74.	997-1	μελιτζάνα	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A)	5
75.	128V	πιπεριά	Ελλάδα	2B (1, 4A)	8
76.	17-1	μελιτζάνα	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A, 4A)	5
77.	150-5	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A, 4A)	5
78.	525-1	μελιτζάνα	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (2A, 4A)	5
79.	999-1	μελιτζάνα	Ελλάδα (Κρήτη)	2B (4A, 4B)	5
80.	25V (SS4)	βαμβάκι	ΗΠΑ	2AB (1, 4A)	8
81.	70-21	πιπεριά	ΗΠΑ (AZ)	3	1
82.	PCW	πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	3	1
83.	BB	πατάτα	ΗΠΑ (ID)	4A	1
84.	30-6	πατάτα	Καναδάς	4A	4
85.	Dvd-E6	μελιτζάνα	Καναδάς	4A	4
86.	86	πατάτα	ΗΠΑ (WA)	4A	4

87.	90	πατάτα	ΗΠΑ (SD)	4A	4
88.	108	πατάτα	ΗΠΑ (WY)	4A	4
89.	111	πατάτα	ΗΠΑ (MT)	4A	4
90.	129	πατάτα	ΗΠΑ (WA)	4A	4
91.	170	πατάτα	Καναδάς	4A	4
92.	21-18	πατάτα	Καναδάς	4A	4
93.	66-12	πατάτα	Καναδάς	4A	4
94.	66-13	πατάτα	ΗΠΑ (ME)	4A	4
95.	83-1	πατάτα	ΗΠΑ (WI)	4A	4
96.	P103	πατάτα	ΗΠΑ (OH)	4A	4
97.	V830	πατάτα	ΗΠΑ (OH)	4A	6
98.	131-M	πατάτα	ΗΠΑ	4A	2
99.	171-4A	πατάτα	ΗΠΑ	4A	2
100.	1V	βαμβάκι	Ελλάδα	4B	8
101.	3V	ελιά	Ελλάδα	4B	8
102.	Dvd2	τομάτα	Καναδάς	4B	4
103.	Dvd3	πατάτα	Καναδάς	4B	4
104.	P3	πατάτα	ΗΠΑ (OH)	4B	4
105.	S39	πατάτα	ΗΠΑ (OH)	4B	1
106.	pn4	αραχίδα ²⁴	Ισραήλ	4B	9
107.	rt112	πατάτα	Ισραήλ	4B	8
108.	149	πατάτα	Καναδάς	4B	4
109.	152	πατάτα	ΗΠΑ (OR)	4B	4
110.	157	πατάτα	ΗΠΑ (OR)	4B	4
111.	V2	φράουλα	Γερμανία	4B	6
112.	V5	φράουλα	Γερμανία	4B	6
113.	V8	πατάτα	Γερμανία	4B	6
114.	V9	πατάτα	Γερμανία	4B	6
115.	V39	ηλιοτρόπιο	Γερμανία	4B	6
116.	V74	ηλιοτρόπιο	Γερμανία	4B	6
117.	V88	πατάτα	Γερμανία	4B	6
118.	egpVd02	μελιτζάνα	Τουρκία	4B	3
119.	egpVd04	μελιτζάνα	Τουρκία	4B	3
120.	egpVd12	μελιτζάνα	Τουρκία	4B	3
121.	V304I (cot120)	βαμβάκι	Ισραήλ	4B	2
122.	V684I	αγκινάρα	Ισπανία	4B	2
123.	16-1	πατάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
124.	44-3	πατάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
125.	273-1	σύφνος	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
126.	413-5	μαρούλι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
127.	453-1	βίκος ²⁵	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
128.	455-1	αντίδι ²⁶	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
129.	461-3	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
130.	463-1	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
131.	464-1	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
132.	464-3	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
133.	473-1	κολοκύθι ²⁷	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
134.	un1-1	λουβάνα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B	5
135.	235-1	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
136.	354-1	κολοκύθι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
137.	414-1	λάχανο ²⁸	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
138.	433-2	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
139.	434-2	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
140.	435-1	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
141.	437-1	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
142.	437-2	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
143.	444-1	πατάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5

144.	447-1	ραπανάκι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
145.	451-1	μαρούλι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
146.	451-2	μαρούλι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
147.	456-1	γλυκάνισο ²⁹	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
148.	457-5	σπανάκι ³⁰	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
149.	460-1	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
150.	465-2	κατιφές ³¹	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
151.	466-1	σύφνος	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
152.	467-2	βρωμολάχανο ³²	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
153.	469-1	κουνουπίδι ³³	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
154.	469-2	κουνουπίδι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
155.	476-3	σπανάκι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
156.	478-1	αντίδι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
157.	479-1	αντίδι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
158.	490-2	μαρτιάκο ³⁴	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
159.	526-1	μελιτζάνα	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
160.	554-1	αντίδι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
161.	578-1	λουβουδιά	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
162.	586-2	λουβουδιά	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
163.	802-1	ελιά	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (4A)	5
164.	It1-1	μαρούλι	Ελλάδα (Κρήτη)	4B (3, 4A)	5
165.	Ca.83	πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	6	7
166.	Ca.146	πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	6	7
167.	Ca.148	πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	6	7
168.	Cf.162 ^e	καυτερή πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	HSI	7
169.	V13	βαμβάκι	Ισπανία	HSI	6
170.	Vd76	βαμβάκι	Ελλάδα	-	11
171.	Ud1-4-1	ιαπωνικός νάρδος ³⁵	Ιαπωνία	-	10
172.	CA26	λάχανο	Ιαπωνία	-	10
173.	TO-0	τομάτα	Ιαπωνία	-	10
<i>Verticillium longisporum</i>					
174.	81	ελαιοκράμβη ³⁶	Δανία	-	6
175.	161	σακχαρότευτλο ³⁷	Σουηδία	-	12
176.	86207	άγριο ραπανάκι ³⁸	Ιαπωνία	-	12
177.	CA10	λάχανο	Ιαπωνία	-	10
178.	Dk-1	ιαπωνικό ραπανάκι ³⁹	Ιαπωνία	-	10
179.	G19	ελαιοκράμβη	Γερμανία	-	12
180.	G22	ελαιοκράμβη	Γερμανία	-	12
181.	K2	ελαιοκράμβη	Ρωσία	-	13
182.	K12	ελαιοκράμβη	Ρωσία	-	13
<i>Verticillium albo-atrum</i>					
183.	220	τριφύλλι ⁴⁰	Ηνωμένο Βασίλειο	-	12
184.	HP	πατάτα	Ιαπωνία	-	10
185.	Ms.102	τριφύλλι	ΗΠΑ (PA)	-	7
186.	M33	λυκίσκος ⁴¹	Ηνωμένο Βασίλειο	-	12
187.	P10	λυκίσκος	Γερμανία	-	14
188.	T2	λυκίσκος	Σλοβενία	-	14
189.	V90	βαμβάκι	Κεντρική Ασία	-	13
<i>Verticillium tricorpus</i>					
190.	Vtr15	έδαφος	Ισραήλ	VTR-5	9
191.	Vtr18	έδαφος	Ισραήλ	VTR-5	9
192.	Vtr19	πατάτα	Ισραήλ	VTR-7	9
193.	Vtr22	πατάτα	Ισραήλ	VTR-7	9

Verticillium nubilum					
194.	278734	πατάτα	Ηνωμένο Βασίλειο	-	IMI
Gibellulopsis nigrescens (πρώην Verticillium nigrescens)					
195.	9	πατάτα	Ισραήλ	VN-5	9
196.	14	Graminae	Ισραήλ	VN-5	9
197.	18	έδαφος	Ισραήλ	VN-10	9
198.	19	έδαφος	Ισραήλ	VN-11	9
<p>^α Επιστημονικές ονομασίες ξενιστών (κοινές αγγλικές ονομασίες σε παρενθέσεις): ¹<i>Gossypium hirsutum</i> (cotton), ²<i>Fraxinus pennsylvanica</i> (green ash), ³<i>Solanum lycopersicum</i> (tomato), ⁴<i>Pistacia vera</i> (pistachio), ⁵<i>Olea europaea</i> (olive), ⁶<i>Solanum melongena</i> (eggplant), ⁷<i>Cucumis melo</i> (melon), ⁸<i>Solanum nigrum</i> (black nightshade), ⁹<i>Abelmoschus esculentus</i> (okra), ¹⁰<i>Raphanus sativus</i> (radish), ¹¹<i>Capsicum annuum</i> (pepper), ¹²<i>Fragaria x ananassa</i> (strawberry), ¹³<i>Solanum tuberosum</i> (potato), ¹⁴<i>Helianthus annuus</i> (sunflower), ¹⁵<i>Brassica rapa</i> (turnip), ¹⁶<i>Linum usitatissimum</i> (flax), ¹⁷<i>Lactuca sativa</i> (lettuce), ¹⁸<i>Cynara cardunculus</i> (artichoke), ¹⁹<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> (broccoli), ²⁰<i>Capsicum annuum</i> (chili pepper), ²¹<i>Lathyrus ochrus</i> (Cyprus-vetch), ²²<i>Anthemis melanolepis</i> (anthesis), ²³<i>Chenopodium album</i> (lamb's quarters), ²⁴<i>Arachis hypogaea</i> (peanut), ²⁵<i>Vicia sativa</i> (vetch), ²⁶<i>Cichorium intybus</i> (chicory), ²⁷<i>Cucurbita pepo</i> (summer squash), ²⁸<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> (cabbage), ²⁹<i>Pimpinella anisum</i> (anise), ³⁰<i>Spinacia oleracea</i> (spinach), ³¹<i>Tagetes erecta</i> (marigold), ³²<i>Cardaria draba</i> (whitetop), ³³<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (cauliflower), ³⁴<i>Senecio vulgaris</i> (groundsel), ³⁵<i>Aralia cordata</i> (udo – Japanese spikenard), ³⁶<i>Brassica napus</i> (oilseed rape), ³⁷<i>Beta vulgaris</i> (sugar beet), ³⁸<i>Raphanus raphanistrum</i> (wild radish), ³⁹<i>Raphanus sativus</i> (daikon – Japanese radish), ⁴⁰<i>Medicago sativa</i> (alfalfa), ⁴¹<i>Humulus lupulus</i> (hop).</p>					
<p>^β Για όσα στελέχη είναι θετικά σε (συνήθως «ασθενείς») αντιδράσεις συμπληρωματικότητας με στελέχη ελέγχου (δηλαδή χαρακτηρισμένα στελέχη που χρησιμοποιούνται ευρέως σε διεθνές επίπεδο για την κατάταξη νέων στελεχών σε VCGs) περισσότερων της μιας VCGs (“bridging” strains), οι «δευτερεύουσες» αντιδράσεις παρατίθενται σε παρενθέσεις. HSI: ετεροκαρυωτικά αυτο-ασύμβατα στελέχη (<u>heterokaryon self-incompatible</u>).</p>					
<p>^γ Πηγές στελεχών: 1 = R. Rowe, OARDC, The Ohio State University, USA; 2 = M. Jiménez-Gasco, The Pennsylvania State University, USA; 3 = S. Dervis, University of Mustafa Kemal, Turkey; 4 = K. Dobinson, University of Western Ontario, Canada & Agriculture and Agri-Food, Canada; 5 = E. Λιγοζυγκάκης, Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών, ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. – Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός «Δήμητρα», Ελλάδα; 6 = A. von Tiedemann, University of Göttingen, Germany; 7 = K. Subbarao, University of California, Davis, USA; 8 = E. Παπλωματάς, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα; 8 = T. Katan, The Volcani Center, Israel; 10 = T. Usami, Chiba University, Japan; 11 = E. Τζάμος, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα; 12 = J. Heale, University of London, UK; 13 = O. Strunnikova, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Russia; 14 = S. Radišek, Slovenian Institute for Hop Research and Brewing, Slovenia; IMI = International Mycological Institute, UK (presently Centre for Agricultural Bioscience International, CABI, UK).</p>					
<p>^δ Η αρχική κατάταξη του στελέχους Cf.38 (στη VCG 6) αναθεωρήθηκε στην παρούσα διατριβή και το στέλεχος εντάχθηκε εκ νέου στη VCG 2B.</p>					
<p>^ε Η αρχική κατάταξη του στελέχους Cf.162 (στη VCG 6) αναθεωρήθηκε στην παρούσα διατριβή και το στέλεχος χαρακτηρίστηκε ως HSI (ετεροκαρυωτικά αυτο-ασύμβατο).</p>					

2.1.2 Στελέχη βακτηρίων

Τα στελέχη των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Agrobacterium tumefaciens* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, οι γονότυποί τους και οι χρήσεις τους παρατίθενται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2			
Στελέχη βακτηρίων			
A/A	Στέλεχος	Γονότυπος ^α	Χρήση
<i>Escherichia coli</i>			
1.	DH5a	F– Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK–, mK+) <i>phoA supE44</i> λ– <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	γενική κλωνοποίηση και διατήρηση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων
2.	DB3.1 ^β	F– <i>gyrA462 endA1</i> Δ(<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB mrr hsdS20</i> (rB–, mB–) <i>supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (SmR) <i>xyl-5</i> λ– <i>leu mtl1</i>	κλωνοποίηση και διατήρηση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που έφεραν το θνησιγόνο γονίδιο <i>ccdB</i> ^γ
3.	LE392	<i>hsdR514</i> (rk–, mk+) <i>glnV</i> (<i>supE44</i>) <i>tryT</i> (<i>supF58</i>) <i>lacY1</i> or Δ(<i>lacIZY</i>)6 <i>galK2 galT22 metB1 trpR55</i>	σάρωση φαγικής γονιδιακής βιβλιοθήκης και χειρισμός φάγων
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
4.	AGL-1 ^β	C58 <i>recA::bla rif^R cb^R</i> – pTiBo542ΔT-DNA	μετασηματισμός μυκήτων
5.	EHA101 ^β	C58 <i>rif^R</i> – pEHA101 (pTiBo542ΔT-DNA) <i>km^R</i>	μετασηματισμός μυκήτων
6.	GV3101::pMP90 ^β	C58 <i>rif^R</i> – pMP90 (pTiC58ΔT-DNA) <i>gm^R</i>	μετασηματισμός μυκήτων
^α Πηγές: Hanahan, 1985; Promega, 2013; Life Technologies (Invitrogen), 2013 (για τα στελέχη <i>E. coli</i>), Hellens & Mullineaux, 2000 (για τα στελέχη <i>A. tumefaciens</i>). Συντομογραφίες δεικτών ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά: <i>rif</i> : ριφαμπικίνη, <i>cb</i> : καρβενικιλίνη, <i>km</i> : καναμυκίνη, <i>gm</i> : γενταμυκίνη.			
^β Το στέλεχος <i>E. coli</i> DB3.1 προσφέρθηκε από τον Dr. S. Klosterman (ARS, USDA, USA), το στέλεχος <i>A. tumefaciens</i> AGL-1 από τον Δρ. Κ. Χααραλαμπίδη (Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ), και τα στελέχη <i>A. tumefaciens</i> EHA101 και GV3101::pMP90 από την Δρ. Α.-Μ. Παππά (Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ).			
^γ Το γονίδιο επιλογής <i>ccdB</i> κωδικοποιεί για μια τοξίνη που στοχεύει στο ένζυμο DNA γυράση (DNA gyrase), το οποίο είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του DNA των βακτηριακών κυττάρων. Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που φέρουν αυτό το γονίδιο μπορούν να διατηρηθούν μόνο σε ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη με συγκεκριμένες μεταλλαγές του γονιδίου της DNA γυράσης, όπως στο <i>E. coli</i> DB3.1 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.			

2.1.3 Φαγική γονιδιακή βιβλιοθήκη του μύκητα *V. dahliae*

Η γονιδιακή βιβλιοθήκη του μύκητα *V. dahliae* που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατασκευασμένη στο στέλεχος λGEM11 (Promega) του βακτηριοφάγου λ του βακτηρίου *E. coli*, από ολικό DNA του στελέχους *V. dahliae* Dvd-T5 (Πίνακας 2.1). Οι βραχίονες των ανασυνδυασμένων φάγων (μεγέθους περίπου 20 και 9 kb για τον αριστερό και τον δεξιό βραχίονα, αντίστοιχα) είχαν συγκολληθεί με τμήματα – στο εύρος μεγέθους περίπου 12-15 kb – του ολικού DNA του μύκητα, κατόπιν επεξεργασίας των φάγων και του ολικού μυκητιακού DNA με τα περιοριστικά ένζυμα *XhoI* και *Sau3AI*, αντίστοιχα. Η γονιδιακή βιβλιοθήκη προσφέρθηκε από την Dr. K. Dobinson (University of Western Ontario, Canada & Agriculture and Agri-Food, Canada).

2.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Για την προετοιμασία στερεών θρεπτικών μέσων προστέθηκε στο υγρό θρεπτικό υλικό (broth) άγαρ σε τελική συγκέντρωση 1,5%, με εξαιρέσεις τα υλικά TRA και WAC (Πίνακας 2.3), για τα οποία χρησιμοποιήθηκε περιεκτικότητα άγαρ 0,7% και 2,0%, αντίστοιχα. Όλα τα θρεπτικά υλικά υποβάλλονταν σε υγρή αποστείρωση (121°C για 20 min) αμέσως μετά την παρασκευή τους. Η προσθήκη αντιβιοτικών, αντιμυκητιακών παρεμποδιστών αύξησης ή άλλων θερμοευαίσθητων χημικών ουσιών γινόταν κατόπιν της αποστείρωσης και ψύξης των θρεπτικών υλικών μέχρι τους 50°C περίπου, εντός θαλάμου νηματικής ροής (laminar flow), από αποστειρωμένα διαλύματα διατήρησης των ουσιών (stock solutions) με κατάλληλη κατά περίπτωση συγκέντρωση. Τα διαλύματα διατήρησης είχαν αποστειρωθεί εκ των προτέρων με διήθηση μέσω φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,22 μm, εκτός από τις περιπτώσεις όπου ως διαλύτης χρησιμοποιούνταν η αιθανόλη σε συγκέντρωση τουλάχιστον 70%, οπότε και η αποστείρωση δεν ήταν απαραίτητη.

2.2.1 Θρεπτικά υποστρώματα για μύκητες

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για μύκητες και η σύστασή τους παρατίθενται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3			
Θρεπτικά υποστρώματα για μύκητες			
A/A	Θρεπτικό υλικό	Συμβολισμός	Αναφορά/ Κατασκευαστής
1.	Πλήρες θρεπτικό υλικό πατάτας-δεξτρόζης	PDA	Typas & Heale, 1976/ Scharlau
<p>Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού υλικού προστέθηκαν σε 800 mL απεσταγμένου νερού (dH₂O) 200 g αποφλοιωμένης και τεμαχισμένης πατάτας, ακολούθησε βρασμός υπό ήπια ανάδευση επί 10 min, διήθηση του υπερκείμενου μέσω διπλής γάζας, διάλυση σε αυτό δεξτρόζης σε τελική περιεκτικότητα 1,5%, συμπλήρωση του τελικού όγκου μέχρι 1 L και ρύθμιση του pH στην τιμή 6,5. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Potato Dextrose Broth (PDB, Scharlau) σε μορφή σκόνης, το οποίο διαλυόταν σε dH₂O σε κατάλληλη αναλογία, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.</p>			
2.	Πλήρες θρεπτικό υλικό για μύκητες του γένους <i>Verticillium</i>	CM	Typas & Heale, 1976
<p>Σύσταση ανά λίτρο θρεπτικού υλικού: 30,0 g σακχαρόζης, 0,35 g KH₂PO₄, 2,0 g NaNO₃, 0,5 g KCl, 0,033 g FeSO₄·7H₂O, 0,62 g MgSO₄·7H₂O, 0,765 g β-glycerophosphat Dinatriumsalz x 5H₂O, 2,0 g εκχυλίσματος ζύμης, 2,0 g πεπτόνης, 2,0 g εκχυλίσματος βύνης, 2,0 g υδρολυμένης καζεΐνης. Ρύθμιση του pH στην τιμή 6,8.</p>			
3.	Πλήρες θρεπτικό υλικό αναγέννησης πρωτοπλαστών (top regeneration agar)	TRA	Πάντου, 2005
<p>Σύσταση ανά λίτρο θρεπτικού υλικού: 410,0 g σακχαρόζης, 1,0 g εκχυλίσματος ζύμης, 1,25 g υδρολυμένης καζεΐνης. Σημειώνεται πως για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προστέθηκε βακτηριολογικό άγαρ σε συγκέντρωση 0,7%.</p>			

4.	Πλήρες θρεπτικό υλικό βάσης αναγέννησης πρωτοπλαστών (bottom regeneration agar)	BRA	Πάντου, 2005
Σύσταση ανά λίτρο θρεπτικού υλικού: 205,4 g σακχαρόζης, 1,0 g εκχυλίσματος ζύμης, 1,4 g υδρολυμένης καζεΐνης.			
5.	Ελάχιστο θρεπτικό υλικό Czapek-Dox	MM	Typas & Heale, 1976
Σύσταση ανά λίτρο θρεπτικού υλικού: 30,0 g σακχαρόζης, 0,35 g KH_2PO_4 , 2,0 g NaNO_3 , 0,5 g KCl , 0,033 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,62 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,765 g β -glycerophosphat Dinatriumsalz x $5\text{H}_2\text{O}$. Ρύθμιση του pH στην τιμή 6,8.			
6.	Ελάχιστο θρεπτικό υλικό με νιτρώδη ιόντα ως μοναδική πηγή αζώτου	MM (NO₂⁻)	Correll <i>et al.</i> , 1987
Η σύσταση ήταν η ίδια με εκείνη του ελάχιστου θρεπτικού υλικού MM, με τη μόνη διαφοροποίηση ότι αντί για NaNO_3 χρησιμοποιήθηκε NaNO_2 σε συγκέντρωση 0,5 g/L.			
7.	Ελάχιστο θρεπτικό υλικό με υποξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου	MM (HX)	Correll <i>et al.</i> , 1987
Η σύσταση ήταν η ίδια με εκείνη του ελάχιστου θρεπτικού υλικού MM, με τη μόνη διαφοροποίηση ότι αντί για NaNO_3 χρησιμοποιήθηκε υποξανθίνη (HX) σε συγκέντρωση 0,2 g/L. Η προσθήκη της HX έγινε μετά από την αποστείρωση του υλικού, από διάλυμα HX σε δις απεσταγμένο νερό (ddH ₂ O), συγκέντρωσης 20 g/L (η αύξηση του pH του διαλύματος με σταδιακή προσθήκη NaOH ήταν απαραίτητη για την πλήρη διάλυση της HX στο νερό), αποστειρωμένο με διήθηση μέσω φίλτρου με διάμετρο πόρων 0,22 μm.			
8.	Ελάχιστο θρεπτικό υλικό νερού-άγαρ	WA	παρούσα εργασία
Σύσταση ανά λίτρο θρεπτικού υλικού: 5 g γλυκόζης.			
9.	Εκλεκτικό θρεπτικό υλικό πλούσιο σε χλωρικά ιόντα για συλλογή μεταλλαγών <i>nit</i>	MMC	Puhalla & Spieth, 1985
Σύσταση ανά λίτρο θρεπτικού υλικού: 20,0 g γλυκόζης, 1,0 g KH_2PO_4 , 0,5 g KCl , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2 g βαλίνης, 31,9 g NaClO_3 .			
10.	Εκλεκτικό θρεπτικό υλικό πλούσιο σε χλωρικά ιόντα για συλλογή μεταλλαγών <i>nit</i>	WAC	Korolev & Katan, 1997
Σύσταση ανά λίτρο θρεπτικού υλικού: 0, 2 g γλυκόζης, 30,0-40,0 g NaClO_3 . Σημειώνεται πως για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προστέθηκε άγαρ σε συγκέντρωση 2,0%.			

2.2.2 Θρεπτικά υποστρώματα για βακτήρια/βακτηριοφάγους

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για βακτήρια/βακτηριοφάγους και η σύστασή τους παρατίθενται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4			
Θρεπτικά υποστρώματα για βακτήρια/βακτηριοφάγους			
A/A	Θρεπτικό υλικό	Συμβολισμός	Αναφορά
1.	Πλήρες θρεπτικό υλικό Lysogeny Broth	LB	Sambrook & Russell, 2001
Σύσταση ανά λίτρο θρεπτικού υλικού: 10 g βακτηριολογικής τρυπτόνης, 5 g εκχυλίσματος ζύμης, 10 g NaCl. Ρύθμιση του pH στην τιμή 7,0.			
2.	Εμπλουτισμένο πλήρες θρεπτικό υλικό LB/MgSO ₄ /μαλτόζη	LB+	Sambrook & Russell, 2001
Η σύσταση ήταν η ίδια με εκείνη του θρεπτικού υλικού LB, με την προσθήκη MgSO ₄ σε συγκέντρωση 10 mM και μαλτόζης σε συγκέντρωση 0,2% (σημειώνεται ότι η προσθήκη μαλτόζης πραγματοποιήθηκε κατά την αύξηση απομονωμένων φάγων για απομόνωση του φαγικού DNA τους, αλλά όχι για τις επιστρώσεις φάγων κατά τη σάρωση της γονιδιακής βιβλιοθήκης).			
3.	Πλήρες θρεπτικό υλικό NZCYM	NZCYM	Sambrook & Russell, 2001
Σύσταση ανά λίτρο θρεπτικού υλικού: 5,0 g NaCl, 5,0 g εκχυλίσματος ζύμης, 10,0 g NZ amine (ενζυμικά υδρολυμένης καζεΐνης), 2,0 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1,0 g αμινοξέων καζεΐνης (casamino acids). Ρύθμιση του pH στην τιμή 7,0.			
4.	Ελάχιστο θρεπτικό υλικό για το βακτήριο <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AT	Hooykaas <i>et al.</i> , 1979
Σύσταση ανά λίτρο θρεπτικού υλικού: 2,05 g K ₂ HPO ₄ , 1,45 g KH ₂ PO ₄ , 0,15 g NaCl, 0,5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1 g CaCl ₂ ·6H ₂ O, 0,0025 g FeSO ₄ ·7H ₂ O, 0,5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,0 g γλυκόζης.			
5.	Θρεπτικό υλικό επαγωγής (induction) για το βακτήριο <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	IM	Bundock <i>et al.</i> , 1995
Η σύσταση ήταν η ίδια με εκείνη του θρεπτικού υλικού AT, με τις διαφοροποιήσεις ότι χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση γλυκόζης 10 mM και ότι μετά την αποστείρωση του υλικού προστέθηκαν επιπλέον, από κατάλληλα αποστειρωμένα διαλύματα διατήρησης (stock solutions), γλυκερόλη σε συγκέντρωση 0,5%, 2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid (MES, pH = 5,3) σε τελική συγκέντρωση 40 mM, και ακετοσυριγκόνη σε συγκέντρωση 200 μM. Τα διαλύματα διατήρησης των MES (1M σε απεσταγμένο νερό, pH 5,3, αποστείρωση με διήθηση μέσω φίλτρου με διάμετρο πόρων 0,22 μm) και ακετοσυριγκόνης (200 mM σε αιθανόλη 95%) διατηρούνταν στους -20°C.			

2.3 Καλλιέργεια και διατήρηση μικροοργανισμών

2.3.1 Καλλιέργεια, προετοιμασία κονιδιακών εναιωρημάτων και διατήρηση μυκήτων

Η ανάπτυξη των μυκήτων πραγματοποιήθηκε ως επί το πλείστον στα θρεπτικά υποστρώματα PDA και CM (Πίνακας 2.3), σε στερεές (εντός τρυβλίων με δυνατότητα αερισμού ή σωλήνων με κεκλιμένη επιφάνεια θρεπτικού υλικού) ή υγρές καλλιέργειες (εντός κωνικών φιαλών στις οποίες το θρεπτικό υλικό δεν ξεπερνούσε το 1/5 του ωφέλιμου όγκου των φιαλών για τον απρόσκοπτο αερισμό των καλλιεργειών). Η επώαση των καλλιεργειών έγινε στους 24°C (σκοτάδι) για χρονικό διάστημα 1-6 εβδομάδων, και με ανακίνηση σε 120-150 rpm για 1-7 ημέρες για τις υγρές καλλιέργειες. Οι εμβολιασμοί των καλλιεργειών πραγματοποιούνταν υπό ασηπτικές συνθήκες: α) με τη μεταφορά κονιδίων από εναιωρήματα

γνωστής συγκέντρωσης, β) με αποστειρωμένες βελόνες ανατομίας (ή οδοντογλυφίδες) από την περιφέρεια νεαρών αποικιών (ηλικίας 1 εβδομάδας), ανεπτυγμένων στο ίδιο θρεπτικό υλικό, ή γ) με τη μεταφορά κυκλικών τμημάτων μυκηλίου-άγαρ διαμέτρου 0,5 cm (με τη χρήση αποστειρωμένου κυλινδρικού οργάνου, cork borer), από την περιφέρεια νεαρών αποικιών (ηλικίας 1 εβδομάδας), ανεπτυγμένων στο ίδιο θρεπτικό υλικό. Σε όσα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας, αυτές αναφέρονται συγκεκριμένα στις αντίστοιχες παραγράφους του κειμένου.

Η προετοιμασία κονιδιακών εναιωρημάτων των μυκήτων πραγματοποιήθηκε με δύο εναλλακτικές διαδικασίες: α) τμήμα μυκηλίου-άγαρ διαμέτρου 0,5 cm λαμβανόταν από την περιφέρεια αποικίας του επιθυμητού στελέχους, μεταφερόταν με ασηπτικούς χειρισμούς σε 1 mL αποστειρωμένου διαλύματος NaCl 0,9% ή γλυκόζης 0,2%, και ακολουθούσε έντονη ανάδευση (vortexing) για την απελευθέρωση των κονιδίων στο διάλυμα, β) για τη συλλογή μεγαλύτερου αριθμού κονιδίων, γινόταν έκπλυση της επιφάνειας ανεπτυγμένης αποικίας του μύκητα (ή τρυβλίου εμβολιασμένου με κονίδια με τη μέθοδο παράλληλων γραμμών) με 10 mL αποστειρωμένου διαλύματος NaCl 0,9% ή γλυκόζης 0,2%, με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού, και ακολουθούσε συλλογή του διαλύματος κονιδίων. Και στις δύο διαδικασίες, το διάλυμα κονιδίων υποβαλλόταν σε διήθηση μέσω τετραπλής αποστειρωμένης γάζας ή κατάλληλων γυάλινων φίλτρων (sintered glass filters, No. 1), η οποία ήταν επαρκής για την πλήρη απομάκρυνση βιώσιμων τμημάτων υφών του μύκητα, σύμφωνα με μικροσκοπικές παρατηρήσεις των εναιωρημάτων. Επιπλέον, δεν χρειάστηκε προσθήκη απορρυπαντικών ουσιών, όπως επιβάλλεται σε άλλους μύκητες με ξηρά σπόρια, καθώς ουδέποτε παρατηρήθηκε στα μικροσκοπικά παρασκευάσματα συσσωμάτωση (clumping) των κονιδίων. Η συγκέντρωση των κονιδίων των εναιωρημάτων προσδιοριζόταν, κατόπιν παρασκευής κατάλληλων δεκαδικών αραιώσεων, με μικροσκοπική καταμέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου improved Neubauer και ρυθμιζόταν στο εύρος συγκεντρώσεων 10^3 - 10^8 κονίδια/mL εναιωρήματος, ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Κατόπιν της επίστρωσης 100 μ L κονιδιακού εναιωρήματος χαμηλής συγκέντρωσης (μέχρι 10^3 κονιδίων/mL) σε τρυβλίο PDA και επώασης για 3 ημέρες στους 24°C, ήταν δυνατή η λήψη μονοσποριακών (single-spore) αποικιών των αντίστοιχων στελεχών μυκήτων· αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλες τις απομονώσεις φυσικού τύπου και όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη που δημιουργήθηκαν στην παρούσα εργασία, προκειμένου να εξασφαλισθεί πως όλα τα πειράματα ξεκινούσαν με ομοκαρυωτικές αποικίες των στελεχών.

Όλα τα στελέχη μυκήτων διατηρούνταν σε σφραγισμένα τρυβλία PDA ή CM στους 4°C για διάστημα μέχρι 2 μηνών. Η μακροχρόνια διατήρηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε με 3 εναλλακτικές διαδικασίες: α) δημιουργία κονιδιακών εναιωρημάτων (με συγκέντρωση κονιδίων τουλάχιστον 10^6 κονιδίων/mL) σε υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 20% (ή σε υγρό θρεπτικό υλικό CM με προσθήκη γλυκερόλης 20%) και διατήρηση στους -80°C, β) ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό PDA σε σωλήνες υπό κλίση (slopes) και διατήρηση στους 4°C, και γ) ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό PDA σε σωλήνες υπό κλίση (slopes) και διατήρηση στους 24°C, κατόπιν κάλυψης της αποικίας με αποστειρωμένο παραφινέλαιο. Η πρώτη διαδικασία (διατήρησης στους -80°C) ήταν η βέλτιστη με κριτήρια τόσο τη βιωσιμότητα των καλλιέργειών (τουλάχιστον για 4 έτη), όσο και τη μορφολογία των αποικιών κατά την ανάπτυξη μετά από μακροχρόνια διατήρηση.

2.3.2 Καλλιέργεια και διατήρηση βακτηρίων

Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε κατεξοχήν στο πλήρες θρεπτικό υλικό LB (για το βακτήριο *Escherichia coli*) και το πλήρες και το ελάχιστο υλικό LB και AT, αντίστοιχα (για το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*) (Πίνακας 2.4). Ανάλογα με τις ανάγκες των επιμέρους πειραμάτων, χρησιμοποιούνταν στερεές (σε τρυβλία) ή υγρές (σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή κωνικές φιάλες) καλλιέργειες, με την προσθήκη στο θρεπτικό υλικό των κατάλληλων αντιβιοτικών όποτε ήταν απαραίτητο. Για τις υγρές καλλιέργειες, το θρεπτικό υλικό δεν ξεπερνούσε ποτέ το 1/5 του ωφέλιμου όγκου της φιάλης, για τον απρόσκοπτο αερισμό τους, ενώ ο εμβολιασμός τους γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες είτε με μεταφορά μόνης αποικίας είτε από φρέσκια αρχική καλλιέργεια (starter culture), ανεπτυγμένη στις ίδιες συνθήκες. Η επώαση των στερεών καλλιεργειών των βακτηρίων *E. coli* και *A. tumefaciens* γινόταν στους 37°C και στους 28°C, αντίστοιχα· για το *E. coli* στο θρεπτικό υλικό LB η επώαση ήταν ολονύκτια (μέχρι 16 h), ενώ για το *A. tumefaciens* η επώαση στο υλικό LB ήταν 2-3 ημέρες, και στο υλικό AT 4-5 ημέρες, ανάλογα με το στέλεχος. Για τις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες θερμοκρασίες επώασης, και ανακίνηση σε 80-180 rpm για το βακτήριο *E. coli* (ανάλογα με την επιθυμητή διάρκεια επώασης), και 200-250 rpm για το *A. tumefaciens*. Σε όσα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας, αυτές αναφέρονται συγκεκριμένα στις αντίστοιχες παραγράφους του κειμένου.

Τα βακτηριακά στελέχη διατηρούνταν για βραχυπρόθεσμη χρήση σε υγρές καλλιέργειες σε θερμοκρασία δωματίου (για διάστημα μέχρι 5 ημερών) ή σε σφραγισμένα τρυβλία στους 4°C (για διάστημα μέχρι 2 μηνών). Για τη μακροπρόθεσμη διατήρηση βακτηριακών στελεχών και κλώνων προστέθηκε σε 1 mL φρέσκιας υγρής καλλιέργειας σε πλήρες θρεπτικό υλικό LB (ιδανικά στο τέλος της εκθετικής φάσης, παρουσία των απαραίτητων αντιβιοτικών όποτε ήταν απαραίτητο) γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 25% και ακολούθησε διατήρηση στους -80°C. Η βιωσιμότητα των στελεχών υπό αυτές τις συνθήκες εξακριβώθηκε για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 4 ετών.

2.4 Μορφολογικός/φυσιολογικός χαρακτηρισμός μυκήτων

Για τη μελέτη όλων των μορφολογικών/φυσιολογικών παραμέτρων των μυκήτων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό PDA, εμβολιασμένες με αποστειρωμένες ανατομικές βελόνες (ή οδοντογλυφίδες) από την περιφέρεια νεαρών αποικιών (ηλικίας 1 εβδομάδας), ανεπτυγμένων στο ίδιο θρεπτικό υλικό. Η επώαση όλων των τρυβλίων γινόταν στους 24°C (σκοτάδι) για τα χρονικά διαστήματα που αναφέρονται. Για όλες τις παραμέτρους υπολογίστηκε η μέση τιμή από 3 ανεξάρτητες μετρήσεις (σε ανεξάρτητες αποικίες).

Για τον προσδιορισμό του ακτινωτού τάχους αύξησης (radial growth rate), η διάμετρος αποικιών του υπό μελέτη στελέχους καταμετρήθηκε σε δύο αλληλοκάθετους άξονες, κάθε 2 ημέρες από τη στιγμή του εμβολιασμού και για χρονικό διάστημα 3 εβδομάδων. Από αυτά τα δεδομένα έγινε ο υπολογισμός του ακτινωτού τάχους αύξησης για το διάστημα των 3 εβδομάδων ή για επιμέρους στάδια της αύξησης.

Για την εκτίμηση της δυνατότητας των στελεχών των μυκήτων για παραγωγή σκουρόχρωμης χρωστικής (pigmentation), αποικίες τους ελέγχθηκαν κάθε 2 ημέρες από τη στιγμή του εμβολιασμού τους και για 45 ημέρες για την ορατή συσσώρευση σκουρόχρωμης χρωστικής στην κάτω επιφάνεια του μυκηλίου. Επιπλέον, στο τέλος αυτού του διαστήματος

επώασης (45 ημέρες) έγινε εκτίμηση της έντασης της παραχθείσας χρωστικής/κάλυψης της επιφάνειας του μυκηλίου και αντιστοίχιση σε μία αυθαίρετη κλίμακα 0-4 (με το 0 να αντιστοιχεί σε απουσία χρωστικής και το 4 σε εντελώς μαύρες αποικίες).

Για τον προσδιορισμό της σποριοποίησης (κονιδιογένεσης) ελήφθη ένα κυκλικό τμήμα μυκηλίου-άγαρ διαμέτρου 0,5 cm από την περιφέρεια (0,3 cm εσωτερικά της περιφέρειας της αποικίας) και τοποθετήθηκε εντός 1 mL αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού (sdH₂O) με γλυκόζη 0,2% σε σωλήνα τύπου Eppendorf (1,5 mL). Ακολούθησε έντονη ανάδευση (vortexing) για την πλήρη απελευθέρωση των κονιδίων στο νερό, δεκαδικές αραιώσεις όποτε ήταν απαραίτητο και καταμέτρηση των κονιδίων σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου improved Neubauer. Τα ίδια δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τη μικροσκοπική μέτρηση του μήκους των κονιδίων (σε τελική μεγέθυνση 640x)· το μέσο μήκος κονιδίων των διαφορετικών στελεχών υπολογίστηκε ως η μέση τιμή 50 μετρήσεων ανά στέλεχος. Επιπλέον, τα ίδια δείγματα κονιδιακών εναιωρημάτων χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κονιδίων, κατόπιν επίστρωσης κατάλληλων αραιώσεων σε τρυβλία PDA και καταμέτρηση των αποικιών 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

2.5 Μικροσκοπία

Η μικροσκοπική παρατήρηση ζωντανών κυττάρων (live-cell imaging) των μυκήτων του γένους *Verticillium* πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο τύπου Zeiss AxioPlan (Carl Zeiss) με δυνατότητα μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (differential interference contrast, DIC ή Nomarski). Το ίδιο μικροσκόπιο, εξοπλισμένο με πηγή φωτός UV και κατάλληλους συνδυασμούς φίλτρων, χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού κατόπιν χρώσης των δειγμάτων με φθορίζουσες χρωστικές ή σήμανση των στελεχών με φθορίζουσες πυρηνικές πρωτεΐνες. Η ψηφιακή φωτογράφιση πραγματοποιήθηκε μέσω της κάμερας Zeiss AxioCam MRc5 και το λογισμικό AxioVs40 V4.40.0 (Carl Zeiss). Για τη μελέτη της σύντηξης υφών εντός και μεταξύ ώριμων αποικιών στελεχών *Verticillium* πραγματοποιήθηκε σημειακός εμβολιασμός των επιθυμητών στελεχών σε λεπτό στρώμα στερεού θρεπτικού υλικού WA ή MM (συγκέντρωση άγαρ 1,0%) επί αποστειρωμένων αντικειμενοφόρων πλακών μικροσκοπίας, και ακολούθησε επώαση σε αποστειρωμένο θάλαμο κορεσμένο σε υδρατμούς, στους 24°C (σκοτάδι) για το επιθυμητό χρονικό διάστημα. Κατόπιν της επώασης, γινόταν προσθήκη μιας σταγόνας νερού ή κατάλληλων διαλυμάτων των επιθυμητών χρωστικών στην περιοχή συνάντησης των υφών των αποικιών, κάλυψη με καλυπτρίδα και μικροσκοπική παρατήρηση.

Για τη μελέτη της βλάστησης των κονιδίων και της σύντηξης αυτών μέσω CATs εντός υγρού θρεπτικού υλικού ελέγχθηκαν διάφορα πλήρη και ελάχιστα θρεπτικά υλικά, εμβολιαζόμενα με κονίδια διαφορετικών ηλικιών σε τελική συγκέντρωση $5 \cdot 10^6$ κονίδια/mL. Η επώαση των κονιδίων πραγματοποιήθηκε για διάφορα χρονικά διαστήματα στους 24°C (σκοτάδι) είτε εντός τρυβλίων διαμέτρου 4 cm, με 5 mL θρεπτικού υλικού σε κάθε τρυβλίο, είτε σε κατάλληλες αντικειμενοφόρες πλάκες με μικροθαλάμους επώασης (multichamber slides, εταιρείας ibidi), με 200 μ L θρεπτικού υλικού σε κάθε μικροθάλαμο. Η μικροσκοπική παρατήρηση αυτών των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο τύπου Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss).

Για τη διάκριση των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα των μυκήτων πραγματοποιήθηκε χρώση με τις χημικές ουσίες κυανού του μεθυλενίου (methylene blue) και κυανού του Evan

(Evan's blue) σε συγκέντρωση 0,003% w/v (κατά τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Hutchison *et al.*, 2012), ή με τις φθορίζουσες χρωστικές ιωδιούχο προπιδίο (propidium iodide, PI) και διοξική φλουρεσεΐνη (fluorescein diacetate, FDA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Sigma) και τα πρωτόκολλα των Livanos *et al.* (2012). Για τη χρώση του κυτταρικού τοιχώματος των κονιδίων και των υφών χρησιμοποιήθηκαν οι φθορίζουσες χρωστικές κυανούν της ανιλίνης (aniline blue) και calcofluor (Sigma), ενώ για την επιλεκτική χρώση πυρήνων χρησιμοποιήθηκαν οι φθορίζουσες χρωστικές bisBenzimide (Hoechst) και 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (DAPI) (Sigma), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τους Roca *et al.* (2003) και Apostolakis *et al.* (2009).

2.6 Μεθοδολογία γενετικής μελέτης

2.6.1 Χαρακτηρισμός ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) των μυκήτων

Διαφορετικά πλήρη (PDA, CM) και ελάχιστα (MM, WA) θρεπτικά υλικά (Πίνακας 2.3) ελέγχθηκαν υπό διαφορετικές συνθήκες φωτισμού των τρυβλίων (φωτοπερίοδος 12 h με φυσικό φως ή συνεχές σκοτάδι), προκειμένου να καθορισθούν οι βέλτιστες συνθήκες επώασης για την παραγωγή διακριτών ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) μεταξύ στελεχών των μυκήτων. Για κάθε «διασταύρωση», δύο στελέχη εμβολιάζονταν ταυτόχρονα σε μεταξύ τους απόσταση 1,5 cm στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού με αποστειρωμένες ανατομικές βελόνες (ή οδοντογλυφίδες), από την περιφέρεια αποικιών ηλικίας 1 εβδομάδας, ανεπτυγμένων στο θρεπτικό υπόστρωμα CM. Όλα τα τρυβλία επωάζονταν στους 24°C για 10 ημέρες. Σε προκαταρκτικά πειράματα διαπιστώθηκε πως μέχρι 5 διαφορετικά στελέχη μπορούσαν να εμβολιάζονται σε διάταξη σχήματος σταυρού σε κάθε τρυβλίο, χωρίς να επηρεάζονται τα αποτελέσματα των επιμέρους «διασταυρώσεων». Κατόπιν της επώασης, η καταγραφή των αποτελεσμάτων γινόταν υπό διερχόμενο φωτισμό, και η ένταση κάθε ζώνης αντεπίδρασης αντιστοιχίζονταν σε μια κλίμακα 0-3 (με το 0 να αντιστοιχεί σε απουσία ζώνης και το 3 στις ζώνες μέγιστης έντασης). Κάθε «διασταύρωση» πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον δύο επαναλήψεις.

2.6.2 Μεταλλαξογένεση μυκήτων με υπεριώδη ακτινοβολία (UV)

Σε προκαταρκτικά πειράματα διαπιστώθηκε σημαντική διακύμανση μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων στα ποσοστά βιωσιμότητας των κονιδίων κατόπιν της ακτινοβόλησης, όταν αυτή γινόταν σε υδατικό εναιώρημα κονιδίων (ακόμα και όταν γινόταν υπό συνεχή ανάδευση). Για τον λόγο αυτό, εφαρμόστηκε εναλλακτική διαδικασία κατά την οποία κονιδιακά εναιωρήματα κατάλληλης συγκέντρωσης επιστρώνονταν σε τρυβλία PDA (κατά περίπτωση εμπλουτισμένου με διάφορους αντιμυκητιακούς παρεμποδιστικούς παράγοντες ανάπτυξης) ή MMC και WAC (για την απομόνωση μεταλλαγών *nit*) και αμέσως μετά υποβάλλονταν σε ακτινοβόληση υπεριώδους φωτός (UV). Διάφορες πηγές UV, κατακόρυφες αποστάσεις από την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού και χρονικά διαστήματα ακτινοβόλησης αξιολογήθηκαν ως προς την επαναληψιμότητα της μεθόδου και τα ποσοστά ανάκτησης επιθυμητών μεταλλαγών. Αμέσως μετά την ακτινοβόληση, τα τρυβλία μεταφέρονταν σε σκοτεινό θάλαμο 24°C, για την αποφυγή φαινομένων φωτοεπιδιόρθωσης,

και επωάζονταν μέχρι την εμφάνιση διακριτών αποικιών (παρατηρήθηκε πως η βλάστηση κατόπιν της ακτινοβόλησης καθυστερούσε κατά περίπου 24 h σε σχέση με πειράματα ελέγχου χωρίς επίδραση UV). Για τη διευκόλυνση της καταμέτρησης των διαφορετικών αποικιών και τη μεταφορά τους σε άλλα θρεπτικά υποστρώματα προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό ακτινοβόλησης δεσοξυχολικό νάτριο (SDC), που είναι γνωστός παράγοντας επαγωγής μικρο-αποικιακής αύξησης (περιορισμένης και συμπαγούς αύξησης των αποικιών, micro-colonial growth), σε διάφορες συγκεντρώσεις, ώστε να είναι δυνατή η αύξηση 100-150 διακριτών αποικιών ανά τρυβλίο διαμέτρου 9 cm. Για τη δημιουργία καμπύλης βιωσιμότητας, τρυβλία επιστρωμένα με κονιδιακά εναιωρήματα διαφορετικών συγκεντρώσεων υποβάλλονταν σε ακτινοβόληση για 9 αυξανόμενα χρονικά διαστήματα και ακολουθούσε καταμέτρηση των αποικιών και αναγωγή στον αρχικό τίτλο του εναιωρήματος. Για κάθε χρόνο ακτινοβόλησης λαμβανόταν η μέση τιμή βιωσιμότητας όπως υπολογιζόταν από τουλάχιστον δύο αραιώσεις του εναιωρήματος, σε τρεις επαναλήψεις έκαστη. Από την καμπύλη βιωσιμότητας, που υπολογιζόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, προσδιοριζόταν ο χρόνος ακτινοβόλησης που επέφερε ποσοστό βιωσιμότητας 5%, και αυτός εφαρμοζόταν σε κατάλληλο αριθμό τρυβλίων σε κάθε πείραμα ώστε να προκύπτει ικανός αριθμός βιώσιμων αποικιών για τις ανάγκες του πειράματος. Για την απομόνωση μορφολογικών και αυξοτροφικών μεταλλαγών, εφαρμόστηκε η διαδικασία της τυχαίας απομόνωσης αποικιών που είχαν υποβληθεί σε μεταλλαξογένεση (total isolation method), κατά την οποία 500 τυχαία επιλεγμένες μονοσποριακές αποικίες σε κάθε πείραμα μεταφέρονταν σε κατάλληλες διατάξεις σε ελάχιστο (MM) και πλήρες (CM) θρεπτικό υλικό, ώστε να ελεγχθεί ο φαινότυπός τους.

2.6.3 Μεταλλαξογένεση μυκήτων με νιτροζογουανιδίνη (MNNG)

Για τη μεταλλαξογένεση των μυκήτων με τον χημικό μεταλλαξογόνο παράγοντα νιτροζογουανιδίνη (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine; MNNG, Serva) χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα διατήρησης (stock) της ουσίας συγκέντρωσης 12,5 mg/mL σε αιθανόλη, τα οποία φυλάσσονταν στους 4°C για χρονικά διαστήματα όχι μεγαλύτερα της 1 εβδομάδας. Δείγματα κονιδίων των μυκήτων, διαφόρων συγκεντρώσεων, σε 500 μ L αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού (sdH₂O) με γλυκόζη 0,2% μεταφέρονταν σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου Eppendorf (1,5 mL) και εκεί υποβάλλονταν στην επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων MNNG, για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, στους 20°C. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 min στις 6.000 rpm, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση των κονιδίων σε 500 μ L του ίδιου διαλύματος (γλυκόζη 0,2%). Η διαδικασία έκπλυσης επαναλαμβανόταν άλλες 2 φορές, και τα κονίδια τελικά επαναιωρούνταν σε 150 μ L διαλύματος γλυκόζης 0,2% και επιστρώνονταν σε κατάλληλα τρυβλία. Για τη δημιουργία καμπύλης βιωσιμότητας, γινόταν αναγωγή των διαφορετικών συνδυασμών συγκέντρωσης MNNG και χρόνου επίδρασης σε μεταλλαξογόνο δόση MNNG (γινόμενο συγκέντρωσης επί χρόνο, M x s), και η καμπύλη υπολογιζόταν με 11 σημεία αυξανόμενης δόσης (για κάθε δόση προσδιοριζόταν η μέση τιμή από 3 επαναλήψεις). Οι υπόλοιπες διαδικαστικές λεπτομέρειες ήταν κοινές με τη μέθοδο μεταλλαξογένεσης με UV.

2.6.4 Τεχνικές εμπλουτισμού αυξότροφων μεταλλαγών μυκήτων

Για τον εμπλουτισμό αυξότροφων μεταλλαγών αξιολογήθηκαν 3 μέθοδοι: α) επίδραση γλυκερόλης, β) επίδραση υψηλής θερμοκρασίας, και γ) επίδραση διαδοχικών διηθήσεων. Κατά την πρώτη μέθοδο της επίδρασης γλυκερόλης (Ruhalla, 1976), διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (3 και 6%) προστέθηκαν σε θρεπτικά υλικά CM με γλυκόζη ή σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα (1%), προτού επιστρωθούν με τα προς ακτινοβόληση κονιδιακά εναιωρήματα. Ύστερα από επώαση στους 24°C για 4 ημέρες κατόπιν της ακτινοβόλησης, κάθε τρυβλίο επιστρώθηκε με 5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού CN (σύσταση ανά 100 mL: 0,5 g εκχυλίσματος βύνης, 0,5 g εκχυλίσματος ζύμης, 0,5 g πεπτόνης και 0,75 g άγαρ), επώασθη στους 24°C για 2 επιπλέον ημέρες και ακολούθησε υπολογισμός του ποσοστού βιωσιμότητας και έλεγχος για αυξοτροφίες σε 500 μονοσποριακές αποικίες από κάθε δείγμα.

Η δεύτερη μέθοδος, επίδρασης υψηλής θερμοκρασίας, αναπτύχθηκε βάσει προκαταρκτικών παρατηρήσεων καθυστερημένης βλάστησης αυξότροφων κονιδίων και μειωμένης βιωσιμότητας πρωτότροφων κονιδίων σε θερμοκρασίες άνω των 30°C. Κατά τη μέθοδο αυτή, τα ακτινοβολημένα τρυβλία MM επώασθησαν στους 24°C για 24 h (ώστε να βλαστήσουν τα πρωτότροφα κονίδια), μεταφέρθηκαν στους 37°C για διάφορα χρονικά διαστήματα από 6 έως 72 h, και επανατοποθετήθηκαν στους 24°C με επίστρωση σε κάθε τρυβλίο 5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού CN. Ακολούθησε επώαση 3 ημερών πριν την καταμέτρηση των αποικιών και τον έλεγχο 500 μονοσποριακών αποικιών για αυξοτροφίες.

Για την τρίτη μέθοδο, των διαδοχικών διηθήσεων, η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε στο επιθυμητό επίπεδο βιωσιμότητας σε υδατικό εναιώρημα κονιδίων (διάλυμα γλυκόζης 0,2%), τα οποία στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε 100 mL ελάχιστου θρεπτικού υλικού MM εντός κωνικής φιάλης των 500 mL και επώασθησαν στους 24°C, υπό ανάδευση (150 rpm). Τρεις ημέρες μετά την έναρξη της επώασης η καλλιέργεια διηθήθηκε μέσω τετραπλής αποστειρωμένης γάζας ώστε να απομακρυνθούν τα βλαστημένα πρωτότροφα κονίδια. Η επώαση συνεχίστηκε και η διήθηση επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές, ανά 24 ώρες. Στη συνέχεια, δείγματα της διηθημένης καλλιέργειας επιστρώθηκαν σε τρυβλία PDA και ακολούθησε έλεγχος 500 μονοσποριακών αποικιών για αυξοτροφικές μεταλλαγές.

Σε όλες τις περιπτώσεις αυξότροφων μεταλλαγών ακολούθησε ο προσδιορισμός του τύπου τους με παράλληλους εμβολιασμούς των αποικιών τους (replica inoculation) σε θρεπτικά υλικά MM εμπλουτισμένα με διαφορετικούς συνδυασμούς αμινοξέων, πουρινών/πυριμιδινών και βιταμινών, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται από τον Tyras (1976). Σε αυτές τις δοκιμασίες, κάθε αμινοξύ και πουρίνη/πυριμιδίνη προστέθηκε στο ελάχιστο θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 20 μg/mL, ενώ οι βιταμίνες σε συγκέντρωση 1 μg/mL έκαστη.

2.6.5 Επιλογή μεταλλαγών ανθεκτικότητας των μυκήτων σε παρεμποδιστές αύξησης

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration, MIC) μιας σειράς μυκητιακών παρεμποδιστών αύξησης πραγματοποιήθηκε με τρεις συμπληρωματικές μεθόδους: α) δοκιμασίες διάχυσης σε άγαρ, β) δοκιμασίες επίστρωσης κονιδίων, και γ) δοκιμασίες τμημάτων μυκηλίου-άγαρ. Στην πρώτη μέθοδο, δημιουργήθηκαν τέσσερα βοθρία διαμέτρου 0,5 cm ανά τρυβλίο με στερεό θρεπτικό

υπόστρωμα PDA στο οποίο είχε επιστρωθεί κονιδιακό εναιώρημα (συγκέντρωσης περίπου 10^5 κονιδίων/mL). Ακολούθησε προσθήκη σε κάθε ένα από τα βοθρία 50 μ L διαλύματος αυξανόμενης συγκέντρωσης της ουσίας, τα τρυβλία επωάστηκαν στους 24°C για 3 ημέρες και έγινε καταγραφή ζωνών αναστολής της βλάστησης των κονιδίων γύρω από τα βοθρία. Κατά τη δεύτερη και την τρίτη μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν στερεά θρεπτικά υλικά PDA εμπλουτισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις των χημικών παραγόντων, στα οποία επιστρώθηκε πυκνό κονιδιακό εναιώρημα (δεύτερη μέθοδος) ή τοποθετήθηκαν κυκλικά τμήματα μυκηλίου-άγαρ διαμέτρου 0,5 cm από νεαρές καλλιέργειες σε υλικό PDA (τρίτη μέθοδος), ακολούθησε επώαση στους 24°C για 3 και 15 ημέρες, αντίστοιχα, και καταγραφή των αποτελεσμάτων.

Η επιλογή μεταλλαγών ανθεκτικότητας των μυκήτων σε παρεμποδιστές αύξησης πραγματοποιήθηκε στην προσδιορισμένη MIC για κάθε χημική ουσία, με τέσσερις τρόπους: α) επίστρωση πυκνών κονιδιακών εναιωρημάτων (συγκέντρωσης τουλάχιστον 10^6 κονιδίων/mL) σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA, εμπλουτισμένο με τον επιθυμητό χημικό παράγοντα στη συγκέντρωση MIC) και επώαση στους 24°C μέχρι να εμφανισθούν ανθεκτικές αποικίες, β) ίδια διαδικασία με την πρώτη μέθοδο, με τη διαφορά ότι τα τρυβλία υποβλήθηκαν σε μεταλλαξογένεση με ακτινοβόληση UV σε επίπεδο βιωσιμότητας 5%, γ) χημική μεταλλαξογένεση με MNNG και επίστρωση στα αντίστοιχα επιλεκτικά θρεπτικά υλικά, δ) τοποθέτηση κυκλικών τμημάτων μυκηλίου-άγαρ διαμέτρου 0,5 cm (από νεαρές καλλιέργειες σε υλικό PDA) σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA εμπλουτισμένο με τον επιθυμητό χημικό παράγοντα στη συγκέντρωση MIC, και επώαση στους 24°C μέχρι την εμφάνιση ανθεκτικών τομέων (sectors) αποικιών. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο, μονοσποριακές αποικίες λαμβάνονταν από κάθε ανθεκτικό μυκήλιο, αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό PDA και ελεγχόταν εκ νέου η διατήρηση της ικανότητας των κονιδίων τους να αυξάνονται στη συγκέντρωση MIC του αντίστοιχου χημικού παράγοντα. Ειδικά για την περίπτωση της χημικής ουσίας benomyl τα όρια ανθεκτικότητας των μεταλλαγών ελέγχθηκαν με δοκιμές αύξησης (growth assays) σε 5 διαδοχικές συγκεντρώσεις στο εύρος 1,0-100,0 μ g/mL.

Συγκεκριμένα για την επιλογή μεταλλαγών *nit*, χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον η δεύτερη μέθοδος (ακτινοβόλησης κονιδιακών εναιωρημάτων) με επίστρωση ανά τρυβλίο 10^4 - 10^5 κονιδίων των επιθυμητών στελεχών, καθώς επίσης και η τέταρτη μέθοδος (επιλογής ανθεκτικών τομέων) για την επιλογή αυτόματων μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα χλωρικά ιόντα. Κατόπιν ελέγχου των μονοσποριακών ανθεκτικών αποικιών (βλ. επόμενη παράγραφο) ένα σημαντικό ποσοστό αυτών σε κάθε πείραμα αντιστοιχούσε στις τρεις κλάσεις των μεταλλαγών *nit* (*nit1*, *nit3* ή *nitM*).

2.6.6 Χαρακτηρισμός μεταλλαγών *nit* των μυκήτων

Μονοσποριακές αποικίες με ανθεκτικότητα στα χλωρικά ιόντα ελέγχθηκαν για τη σταθερότητα του φαινοτύπου τους και κατατάχθηκαν στις κλάσεις μεταλλαγών *nit1*, *nit3* και *nitM*. Η κατάταξη πραγματοποιήθηκε με δοκιμασίες αύξησης (growth assays) σε στερεά ελάχιστα θρεπτικά υλικά με μοναδικές πηγές αζώτου τα νιτρικά ιόντα (υλικό MM), τα νιτρώδη ιόντα (υλικό MM-NO₂⁻) ή την υποξανθίνη (υλικό MM-HX), σύμφωνα με τους Correll *et al.* (1987) και Joaquim & Rowe (1990). Ο εμβολιασμός των μεταλλαγών στα διαφορετικά θρεπτικά υλικά γινόταν με χρήση αποστειρωμένων ανατομικών βελονών (ή

οδοντογλυφίδων), σε διατάξεις 16 ή 25 αποικιών ανά τρυβλίο, και η καταγραφή των αποτελεσμάτων ύστερα από 5 ημέρες επώασης των τρυβλίων στους 24°C. Με τη συγκριτική αξιολόγηση της δυνατότητας αύξησης των μεταλλαγών στις διαφορετικές πηγές αζώτου (σύμφωνα με τον Πίνακα 2.5) ήταν δυνατή η κατάταξη των μεταλλαγών στις τρεις συμπληρωματικές κλάσεις των μεταλλαγών *nit*.

Πίνακας 2.5			
Κατάταξη μεταλλαγών μυκήτων στις κλάσεις <i>nit</i> (προσαρμογή από Korolev & Katan, 1999)			
	NO_3^-	NO_2^-	HX
<i>nit1</i>	- ή +/-	+	+
<i>nit3</i>	- ή +/-	+/-	+
<i>nitM</i>	- ή +/-	+/- ή +	+/-
+ φυσικού τύπου μυκηλιακή ανάπτυξη με εναέριες υφές και κονιδιογένεση - απουσία ανάπτυξης +/- μερική ανάπτυξη μυκηλίου με μικρότερο τάχος αύξησης, περιορισμένη παραγωγή εναέριων υφών και ελαττωμένη κονιδιογένεση			

Για τον έλεγχο της σταθερότητας των μεταλλαγών *nit* χρησιμοποιήθηκαν κονιδιακά εναιωρήματα των μεταλλαγών, τα οποία επιστρώθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό (MM), ενώ ταυτόχρονα δεκαδικές αραιώσεις τους επιστρώθηκαν σε πλήρες υλικό (PDA), για τον ακριβή προσδιορισμό του αριθμού βιώσιμων μονάδων (colony-forming units, cfu) ανά δείγμα. Η συχνότητα επαναφοράς (reversion) στην πρωτοτροφία για κάθε μεταλλαγή υπολογίστηκε κατόπιν αναγωγής των αποτελεσμάτων στον αρχικό τίτλο του κάθε εναιωρήματος.

2.6.7 Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών *nit* των μυκήτων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα – κατάταξη στελεχών σε VCGs

Οι δοκιμασίες συμπληρωματικότητας (complementation tests) πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία με ελάχιστο θρεπτικό υλικό MM (Typas & Heale, 1976; Correll *et al.*, 1987; Joaquim & Rowe, 1990). Συμπληρωματικές μεταλλαγές *nit* των υπό μελέτη στελεχών εμβολιάστηκαν στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού, σε μεταξύ τους απόσταση 1 cm με χρήση αποστειρωμένων ανατομικών βελονών (ή οδοντογλυφίδων), ή σε απόσταση 2 cm με μεταφορά κυκλικών τμημάτων μυκηλίου-άγαρ διαμέτρου 0,3 cm ή σταγόνων κονιδιακών εναιωρημάτων συγκέντρωσης 10^4 κονιδίων/mL. Η επώαση των τρυβλίων έγινε στους 24°C, και έλεγχος για την πιθανή δημιουργία ετεροκαρύων γινόταν κάθε 3 ημέρες, μέχρι και 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό.

Για την κατάταξη στελεχών του μύκητα *V. dahliae* σε VCGs χρησιμοποιήθηκε η παραπάνω τεχνική με τη διεθνώς αποδεκτή και ευρύτατα χρησιμοποιούμενη σε παρόμοιες αναλύσεις συλλογή στελεχών ελέγχου των VCGs (δηλαδή χαρακτηρισμένα στελέχη γνωστών VCGs που χρησιμοποιούνται σε διεθνές επίπεδο για την κατάταξη νέων στελεχών του μύκητα σε VCGs· VCG tester strains), του Dr. R. Rowe (OARDC, The Ohio State University, USA): στελέχη *V. dahliae* T9 και V44 (VCG 1), PH (VCG 2A), 115 (VCG 2B),

70-21 και PCW (VCG 3), BB (VCG 4A) και S39 (VCG 4B), καθώς επίσης και το στέλεχος Ca.146 (από τον Dr. K. Subbarao, University of California, Davis, USA) για την VCG 6 (Πίνακας 2.1).

2.6.8 Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών *nit* των μυκήτων σε υγρό θρεπτικό υλικό

Μικροτροβλία τιτλοποίησης (96 θέσεων) χρησιμοποιήθηκαν ως επί το πλείστον για τις δοκιμασίες συμπληρωματικότητας των μεταλλαγών *nit* σε υγρό θρεπτικό υλικό MM, και διάφορες εναλλακτικές μέθοδοι εμβολιασμού ελέγχθηκαν σε μια προκαταρκτική διερεύνηση. Τα βήματα της βέλτιστης διαδικασίας που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία ήταν:

1. ανάμιξη σταγόνων 25 μL από κονιδιακά εναιωρήματα (συγκέντρωσης 10^5 - 10^6 κονιδίων/mL) κάθε μιας από ένα ζεύγος συμπληρωματικών μεταλλαγών *nit*, σε κάθε πηγάδι του μικροτροβλίου,
2. προσθήκη υγρού θρεπτικού υλικού MM μέχρι τελικό όγκο 100 μL σε κάθε πηγάδι,
3. στατική επώαση των μικροτροβλίων στους 24°C (σκοτάδι) για 10 ημέρες,
4. καταγραφή του βαθμού μυκηλιακής πρωτότροφης αύξησης σε κάθε πηγάδι.

Κάθε «διασταύρωση» επαναλήφθηκε 4-8 φορές, ενώ δειγματοληπτικά το μυκήλιο θετικών αντιδράσεων μεταφέρθηκε σε στερεό υλικό MM για τον έλεγχο δυνατότητας περαιτέρω αύξησης.

2.6.9 Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας στελεχών μυκήτων φυσικού τύπου

Μια νέα μέθοδος για τον έλεγχο συμβατότητας απομονώσεων φυσικού τύπου του *Verticillium* αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή, βάσει παλαιότερης έρευνας για τη σύντηξη πρωτοπλαστών στον μύκητα *Aspergillus* (Bradshaw & Peberdy, 1984). Για τις ανάγκες αυτής της μεθόδου δημιουργήθηκαν διπλά μεταλλαγμένα στελέχη ελέγχου του μύκητα *V. dahliae*, ανθεκτικά στον αντιμυκητιακό παράγοντα benomyl και *nit* (*nit1* ή *nitM*). Τμήματα μυκηλίου-άγαρ από αποικίες ηλικίας 1 εβδομάδας αυτών των στελεχών τοποθετούνταν στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υλικού MM εμπλουτισμένου με τη χημική ουσία benomyl, σε επαφή με αντίστοιχα τμήματα από αποικίες στελεχών φυσικού τύπου του *V. dahliae* και των υπόλοιπων ειδών του γένους *Verticillium*. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 24°C, για 4 εβδομάδες. Στο τέλος κάθε εβδομάδας μετά τον εμβολιασμό, γινόταν παρατήρηση των τρυβλίων για πρωτότροφη αύξηση, η οποία ήταν αναμενόμενη μόνον για τις περιπτώσεις όπου θα είχε συμβεί αναστόμωση υφών και δημιουργία ετεροκαρύων μεταξύ των υπό δοκιμή στελεχών. Τέσσερις «διασταυρώσεις» μπορούσαν να ελεγχθούν ανά τρυβλίο διαμέτρου 9 cm, χωρίς αλλοιώσεις στα αποτελέσματα των επιμέρους δοκιμασιών, σύμφωνα με προκαταρκτική διερεύνηση της μεθόδου. Κάθε «διασταύρωση» επαναλήφθηκε τουλάχιστον 2 φορές. Σε μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου, τα τμήματα μυκηλίου-άγαρ των στελεχών φυσικού τύπου τοποθετούνταν επί σταγόνας 30 μL κονιδιακού εναιωρήματος (10^5 κονίδια/mL) του εκάστοτε στελέχους ελέγχου, με όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους του πειράματος ίδιες με τη βασική μέθοδο.

2.6.10 Γενετική ανάλυση ετεροκαρύων

Προκειμένου να αποκλεισθεί η πιθανότητα οι θετικές αντιδράσεις συμπληρωματικότητας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα να οφείλονται σε διάχυση μεταβολιτών στο θρεπτικό υπόστρωμα (cross-feeding) αντί για πραγματική ετεροκαρύωση, οι δοκιμασίες επαναλήφθηκαν με παρεμβολή μεταξύ των εμβολίων φύλλων σελλοφάνης (cellorhane), οι πόροι της οποίας επιτρέπουν τη διέλευση μεταβολιτών ενώ αποτρέπουν τη φυσική επαφή των υφών των διαφορετικών αποικιών. Για την ανάλυση κονιδίων προετοιμάζονταν κονιδιακά εναιωρήματα από την επιφάνεια ετεροκαρύων που είχαν αναπτυχθεί σε στερεό υλικό MM για 4 εβδομάδες, και επιστρώνονταν εκ νέου σε υλικό MM για να ελεγχθεί η διατήρηση της αυξοτροφίας τους. Επιπλέον, κατόπιν δεκαδικών αραιώσεων και επίστρωσης σε υλικό PDA, περίπου 500 τυχαία επιλεγμένα κονίδια από κάθε ετεροκάρυο μεταφέρονταν σε κατάλληλες διατάξεις στα υλικά MM και MM-HX, ώστε να διαπιστωθούν οι τροφικές τους απαιτήσεις και, κατά συνέπεια, οι πυρηνικοί τους τύποι. Παράλληλα, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου, μεταφέρθηκαν 80-100 μεμονωμένα άκρα υφών (μήκους μικρότερου από 0,5 mm) από κάθε ετεροκάρυο σε θρεπτικά υλικά MM και MM-HX για τον προσδιορισμό της αυξοτροφίας τους.

2.7 Μεθοδολογία μοριακής μελέτης

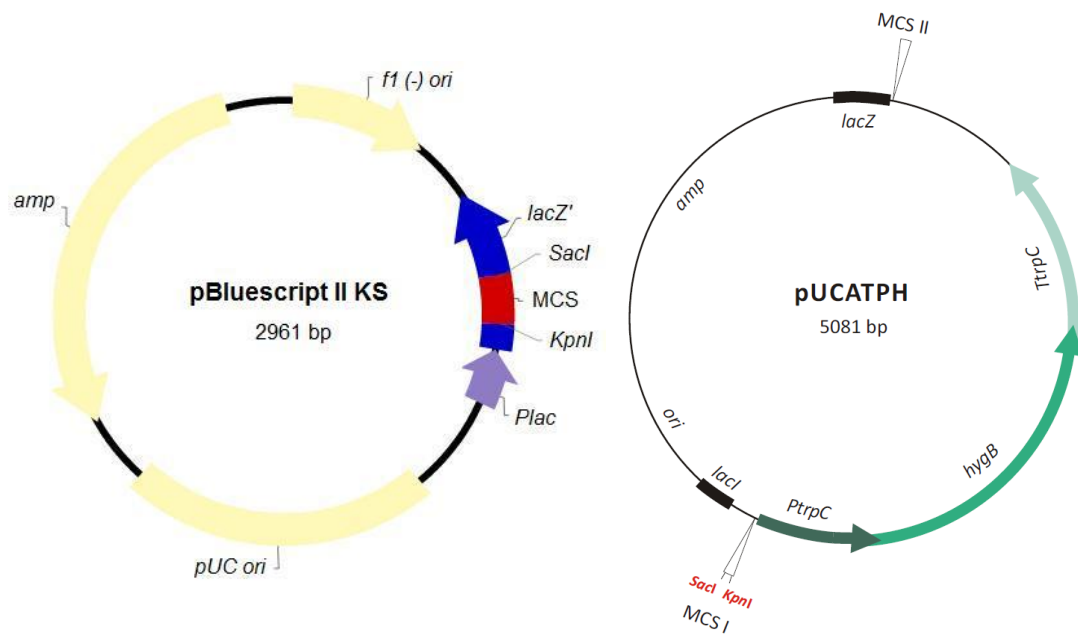
2.7.1 Πλασμίδια/φαγεμίδια (plasmids/phagemids)

Τα πλασμίδια/φαγεμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς επίσης και οι κυριότερες χρήσεις τους, παρατίθενται στον Πίνακα 2.6.

Πίνακας 2.6			
Πλασμίδια/φαγεμίδια			
A/A	Πλασμίδιο/Φαγεμίδιο	Χρήση στην παρούσα εργασία	Αναφορά
1.	pBluescript II KS	κλωνοποίηση, κατασκευή και αλληλούχηση τμημάτων DNA	Stratagene (Agilent Technologies)
2.	pCRII-TOPO	κλωνοποίηση και αλληλούχηση τμημάτων DNA	Invitrogen (Life Technologies)
3.	pTZ57R/T	κλωνοποίηση και αλληλούχηση τμημάτων DNA	Fermentas (Thermo Scientific)
4.	pJET1.2	κλωνοποίηση και αλληλούχηση τμημάτων DNA	Fermentas (Thermo Scientific)
5.	pOSCAR	κατασκευή κασετών για στοχευμένη γονιδιακή απαλοιφή (gene deletion) με την τεχνολογία ATMT	Paz <i>et al.</i> , 2011
6.	pA-Hyg-OSCAR	δότης κασέτας ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη B (hygB) στις κατασκευές του πλασμιδίου pOSCAR	Paz <i>et al.</i> , 2011
7.	pUCATPH	βελτιστοποίηση μεθόδων γενετικής τροποποίησης, στοχευμένη γονιδιακή διακοπή (gene disruption)	Lu <i>et al.</i> , 1994

8.	pIGPAPA	κατασκευή στελεχών μυκήτων με κυτταροπλασματική έκφραση της GFP	Horwitz <i>et al.</i> , 1999
9.	pMF357	κατασκευή στελεχών μυκήτων με πράσινους σημασμένους πυρήνες (GFP)	Ishikawa <i>et al.</i> , 2012
10.	pGR02	κατασκευή στελεχών μυκήτων με κόκκινους σημασμένους πυρήνες (dsRed)	Ishikawa <i>et al.</i> , 2012

Οι λειτουργικοί χάρτες των κυριότερων φορέων DNA, pBluescript II KS και pUCATPH παρατίθενται στην Εικόνα 2.1. Το πλασμίδιο pOSCAR μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το πλασμίδιο pA-Hyg-OSCAR για την κατασκευή κασετών στοχευμένης γονιδιακής απαλοιφής με την *in vitro* ανασυνδυαστική τεχνολογία κλωνοποίησης Gateway (Invitrogen, Life Technologies), αλλά και για τον μετασχηματισμό μυκήτων μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* (τα βασικά λειτουργικά χαρακτηριστικά των δύο πλασμιδίων, καθώς και η στρατηγική κλωνοποίησης συνοψίζονται στην Εικόνα 2.2, στη συνέχεια του παρόντος κεφαλαίου).



Εικόνα 2.1. Λειτουργικοί χάρτες των φορέων DNA, pBluescript II KS και pUCATPH. *amp*: κασέτα ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη, *ori*: σημείο έναρξης της αντιγραφής, *f1 (-) ori*: σημείο έναρξης της αντιγραφής μονόκλωνου DNA, *Plac*: υποκινητής του οπερονίου *lac*, *lacZ'*: κωδική αλληλουχία του τμήματος *a* της β-γαλακτοζιδάσης, MCS: πολυσύνδεσμος κλωνοποίησης (multiple cloning site), *SacI* και *KpnI*: οι δύο ακραίες περιοριστικές θέσεις του πολυσυνδέσμου, *PptrC*: υποκινητής του γονιδίου *trpC* του μύκητα *Aspergillus nidulans*, *hygB*: γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη B, *TtrpC*: αλληλουχία λήξης της μεταγραφής του γονιδίου *trpC* του *A. nidulans*.

Τα πλασμίδια pMF357 και pGR02 φέρουν αντίστοιχα το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (sGFP) σε μεταγραφική σύντηξη με το γονίδιο της ιστόνης H1 του μύκητα *N. crassa*, και το γονίδιο για μια διμερική μορφή της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης dsRed – “tdimer2(12)” – σε σύντηξη με το γονίδιο της ιστόνης H4-2 του μύκητα *F. graminearum*. Επιπλέον, τα δύο αυτά πλασμίδια φέρουν κασέτες ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη B (hygromycin B, γονίδιο *hph*) και τη φλεομυκίνη (phleomycin, γονίδιο *ble*), αντίστοιχα, για την επιλογή των μετασχηματισμένων μυκήτων.

2.7.2 Απομόνωση ολικού DNA μυκήτων

Η απομόνωση ολικού DNA μυκήτων σε μικρή κλίμακα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται από τους Tyras *et al.* (1992), με επιμέρους τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου. Υγρές καλλιέργειες των επιθυμητών στελεχών επώασθηκαν στους 24°C (σκοτάδι), για 4-5 ημέρες, στις 120 grm, σε υγρό θρεπτικό υλικό PDB ή CM. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση των καλλιεργειών, ψύξη των μυκηλίων στους -80°C για τουλάχιστον 30 min και τοποθέτηση σε λυοφιλωτή υπό ψύξη για πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας των δειγμάτων. Ακολούθησε κονιοροποίηση των ξηρών μυκηλίων σε υγρό άζωτο έως ότου τα μυκήλια έπαιρναν τη μορφή άνυδρης λεπτόκοκκης σκόνης, με την οποία αποθηκεύονταν μακροχρόνια στους -20°C ή τους -70°C, με μηδαμινό κατακερματισμό των νουκλεϊκών οξέων από νουκλεάσες (Murray & Thompson, 1980).

Η απομόνωση DNA έγινε από 30-50 mg λυοφιλωμένου μυκηλίου ανά δείγμα, τα οποία τοποθετούνταν σε 500 µL διαλύματος ομογενοποίησης (0,2 M Tris-HCl pH 8,5, 0,25 M NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS) εντός σωλήνων τύπου Eppendorf (1,5 mL), και ομογενοποιούνταν πλήρως με χρήση εμβόλου. Ακολούθησε προσθήκη 350 µL φαινόλης (pH 7,8) και 150 µL χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), ήπια ανάδευση μέχρι ομογενοποίησης και διαχωρισμός των φάσεων με φυγοκέντρηση για 1 h στις 12000 rpm. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης η άνω υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα, στον οποίο είχαν προστεθεί 0,2 mg RNase A (από διάλυμα διατήρησης συγκέντρωσης 10 mg/mL, Sigma), επώασθηκε στους 37°C για 30 min και ακολούθησε εκ νέου εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) και φυγοκέντρηση για 20 min στις 12000 rpm. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε έως ότου η μεσόφαση κατέστη πρακτικά αόρατη και το DNA ήταν ικανοποιητικής καθαρότητας. Στη συνέχεια, έγινε νέα εκχύλιση της υδατικής φάσης με 1 όγκο χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), φυγοκέντρηση για 10 min στις 12000 rpm, λήψη της υδατικής φάσης και κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 0,1 όγκου οξικού νατρίου 3 M και 0,6 όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης. Κατόπιν επώασης των δειγμάτων για 30 min στους 4°C πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min, έκπλυση του ιζήματος DNA με 500 µL παγωμένης αιθανόλης 70%, πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με επώαση στους 65°C ή σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 min, και αναδιάλυση του DNA σε 100 µL αποστειρωμένου δις απεσταγμένου νερού (sterile double-distilled water, sddH₂O) ή διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0).

Εναλλακτικά, η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε από νωπό μυκήλιο (από ένα κυκλικό τμήμα διαμέτρου περίπου 1 cm) ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, με τη μόνη διαφορά ότι αμέσως μετά την ομογενοποίηση στο διάλυμα εκχύλισης πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min, ώστε να κατακρημνισθούν τα κυτταρικά θραύσματα, και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα τύπου Eppendorf (1,5 mL).

2.7.3 Γρήγορη απομόνωση ολικού DNA μυκήτων

Σε περιπτώσεις όπου έπρεπε να ελεγχθούν μεγάλοι αριθμοί στελεχών μυκήτων με δοκιμασίες PCR, εφαρμόστηκε εναλλακτική γρήγορη διαδικασία για την απομόνωση μικρής ποσότητας ολικού DNA. Κυκλικό τμήμα επιφανειακού μυκηλίου διαμέτρου 0,3 cm από το κάθε στέλεχος αποκόπηκε από φρέσκια καλλιέργεια του στελέχους σε τρυβλίο PDA,

απομακρύνθηκε η περίσσεια του άγαρ, και μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου Eppendorf (1,5 mL), στον οποίο είχαν τοποθετηθεί 50 µL διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0). Ακολούθησε βρασμός των δειγμάτων για 10 min, απότομη ψύξη στους 0°C για 5 min, και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα που διατηρούνταν στον πάγο, και 3-5 µL από αυτό προστέθηκαν απευθείας ως μήτρα DNA σε αντιδράσεις PCR.

2.7.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E. coli*

A. Μέθοδος αλκαλικής λύσης για απομόνωση σε μικρή κλίμακα

Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Sambrook & Russel (2001) με επιμέρους τροποποιήσεις. Συνοπτικά, η απομόνωση έγινε από 1,5-4,5 mL κορεσμένης καλλιέργειας του επιθυμητού στελέχους *E. coli* ανά δείγμα, η επαναιώρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε 100 µL διαλύματος I (50 mM γλυκόζη, 10 mM EDTA pH 8,0, 25 mM Tris-HCl pH=8,0), όπου και προστέθηκαν 30 µg RNase A (από διάλυμα διατήρησης συγκέντρωσης 10 mg/mL, Sigma) και ακολούθησε επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως προστέθηκαν 200 µL πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος II (0,2 N NaOH, 1% SDS), έγινε ήπια ανάδευση με 5-6 αναστροφές των σωλήνων (προσωρινή διατήρηση στον πάγο), προσθήκη 200 µL διαλύματος III (προέκυπτε με ανάμιξη 60,0 mL διαλύματος οξικού καλίου 5 M, 11,5 mL παγόμορφου (glacial) οξικού οξέος και 28,5 mL απεσταγμένου νερού) σε θερμοκρασία 4°C, πλήρης ανάμιξη, και επώαση στον πάγο για 5 min, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα τύπου Eppendorf (1,5 mL). Συνήθως αυτό υποβλήθηκε σε εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) (φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min), κατακρήμνιση του DNA με 2 όγκους αιθανόλης (επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min), έκπλυση με 500 µL αιθανόλη 70% (φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 min), και αναδιάλυση του ιζήματος DNA σε 20-50 µL sddH₂O ή διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0).

B. Μέθοδος αλκαλικής λύσης για απομόνωση σε μεσαία κλίμακα

Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Sambrook & Russel (2001) με επιμέρους τροποποιήσεις κατά αντιστοιχία με τη διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση σε μικρή κλίμακα. Συνοπτικά, η απομόνωση έγινε από 100 mL κορεσμένης καλλιέργειας του επιθυμητού στελέχους *E. coli* ανά δείγμα, επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 2 mL διαλύματος I, προσθήκη 4 mL διαλύματος II (ήπια ανάδευση και μεταφορά στον πάγο), προσθήκη 3 mL διαλύματος III (πλήρης ανάμιξη και επώαση στον πάγο για 5 min), φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 20 min, διήθηση του υπερκείμενου μέσω τριπλής γάζας, κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 0,6 όγκου ισοπροπανόλης (φυγοκέντρηση για 20 min στις 12000 rpm), έκπλυση με αιθανόλη 70% (φυγοκέντρηση για 8 min στις 12000 rpm), αναδιάλυση σε 1 mL διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0) με προσθήκη 100 µg RNase A και επώαση στους 37°C για 30 min. Ακολούθησαν καθαρισμός του DNA με εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη, κατακρήμνιση του DNA, έκπλυση με 70% αιθανόλη και αναδιάλυση σε 100-200

μL διαλύματος TE, όπως περιγράφεται και για το πρωτόκολλο απομόνωσης σε μικρή κλίμακα.

Γ. Μέθοδος βρασμού

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων, όταν δεν υπήρχε πειραματική απαίτηση για απομόνωση DNA υψηλής καθαρότητας (κατά κανόνα χρησιμοποιήθηκε για περιοριστική ανάλυση κλώνων *E. coli*). Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Sambrook & Russel (2001) με επιμέρους τροποποιήσεις. Συνοπτικά, η απομόνωση έγινε από 1,2 mL κορεσμένης καλλιέργειας του επιθυμητού στελέχους *E. coli* ανά δείγμα, η επαναιώρηση των κυττάρων έγινε σε 200 μL διαλύματος STET (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0, 5% Triton X-100), προστέθηκαν 25 μL πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος λυσοζύμης (συγκέντρωσης 10 mg/mL σε 10 mM Tris-HCl pH 8,0) με έντονη ανάδευση (vortexing) για 5 s, ακολούθησε βρασμός για 40 s, γρήγορη μεταφορά στον πάγο, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min, μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα τύπου Eppendorf (1,5 mL), κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 40 μL διαλύματος οξικού νατρίου pH 5,2 και 420 μL ισοπροπανόλης (επάωση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min), και αναδιάλυση του ιζήματος DNA σε 30 μL $sddH_2O$.

Δ. Εμπορικό κιτ πλασμιδιακής απομόνωσης

Χρησιμοποιήθηκε το κιτ NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε περιπτώσεις όπου ήταν απαραίτητη η απομόνωση πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας (προοριζόμενου κυρίως για αλληλούχηση DNA). Χρησιμοποιήθηκαν 4,5 mL κορεσμένης καλλιέργειας του επιθυμητού στελέχους *E. coli* ανά δείγμα.

2.7.5 Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου λ

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από την Πάντου (2005). Συνοπτικά, υγρή καλλιέργεια 50 mL θρεπτικού υλικού NZCYM ή LB+ εμβολιάστηκε με 250 μL καλλιέργειας *E. coli* LE392 ($OD_{600} = 0,6$) και 150 μL εναιωρήματος φάγων (10^9 pfu) και επωάστηκε στις 180 rpm στους 37 °C για 16 h (στο τέλος της επώασης ήταν ορατά συσσωματώματα κυτταρικών υπολειμμάτων). Ακολούθησε προσθήκη 1 mL χλωροφορμίου και ανάδευση στους 37°C για 10 min, ώστε να λυθούν όλα τα ήδη μολυσμένα βακτηριακά κύτταρα, ενώ η διάκριση της υδατικής φάσης έγινε με φυγοκέντρηση σε 5000 rpm για 15 min στους 4°C. Εν συνεχεία προστέθηκαν 50 mL διαλύματος TM (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM $MgSO_4$) και 150 μL ενζύμου DNase I (από διάλυμα διατήρησης συγκέντρωσης 10 mg/ml, Sigma) και έγινε επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 2 h. Ακολούθησε προσθήκη στο δείγμα 6 g NaCl και 10,8 g PEG-8000, αναδιάλυση με ισχυρή ανάδευση, εκ νέου επώαση στον πάγο για 1-16 h και κατακρήμνιση των φαγικών σωματίων με φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 20 min στους 4°C. Το ίζημα των φάγων διαλυτοποιήθηκε σε 1,5 mL διαλύματος TM και μεταφέρθηκε σε σωλήνες τύπου Eppendorf (1,5 mL). Τα δείγματα εκχυλίσθηκαν

τουλάχιστον δύο φορές (μέχρις ότου η μεσόφαση να καταστεί αόρατη) με ίσο όγκο χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 5000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη σε κάθε δείγμα 25 μ L διαλύματος 0,5 M EDTA pH 8,0 και 50 μ L διαλύματος 5M NaCl και εκχύλιση με 500 μ L φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Η εκχύλιση επαναλαμβανόταν μέχρι να εξαφανισθεί η επώαση και ακολούθησε ένα επιπλέον βήμα εκχύλισης με ίσο όγκο χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Η κατακρήμνιση του DNA έγινε με προσθήκη 2 όγκων αιθανόλης και επώαση στον πάγο για 30 min, φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 15 min στους 4°C, απόρριψη του υπερκειμένου, έκπλυση με 500 μ L 70% αιθανόλης και επανάληψη της φυγοκέντρησης σε 12000 rpm για 15 min στους 4°C. Το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 50-100 μ L διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0).

2.7.6 Απομόνωση ολικού RNA μυκήτων

A. Μέθοδος αντιδραστηρίου TRI (Ambion, Life Technologies)

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε από λυοφιλωμένο μυκήλιο (που είχε διατηρηθεί στους -80°C αμέσως μετά την κονιορτοποίηση με υγρό άζωτο) με το αντιδραστήριο TRI (Ambion) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την προστασία του RNA από τη δράση των νουκλεασών, όλα τα υλικά είχαν εκπλυθεί, πριν την αποστείρωσή τους, με απεσταγμένο νερό κατόπιν επεξεργασίας του με τον αναστολέα νουκλεασών DEPC (0,1%, Sigma). Όλα τα υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν στους 150°C για 2 h και όλες οι πιπέττες καθαρίστηκαν πριν τη χρήση με διάλυμα αιθανόλης 70% και, στη συνέχεια, αποστειρώθηκαν με ακτινοβολία UV. Ποσότητα 50-100 mg λυοφιλωμένου μυκηλίου ομογενοποιήθηκαν με χρήση εμβόλου εντός 1 mL του αντιδραστηρίου TRI. Ακολούθησαν επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση για 10 min στις 12000 rpm στους 4°C και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα τύπου Eppendorf (1,5 mL), προσθήκη 100 mL χλωροφορμίου, έντονη ανάδευση και επώαση για 5-15 min σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min στους 4°C και μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα. Η κατακρήμνιση του RNA έγινε με προσθήκη 500 μ L διαλύματος ισοπροπανόλης, έντονη ανάδευση και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 8 min στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος RNA με 1 mL διαλύματος αιθανόλης 75%, φυγοκέντρηση στις 9000 rpm για 10 min, απομάκρυνση της αιθανόλης, ξήρανση του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου, και αναδιάλυση του ιζήματος σε 40-100 μ L ddH₂O με DEPC 0,1%. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80°C.

B. Εμπορικό κιτ απομόνωσης ολικού RNA

Εναλλακτικά, για την απομόνωση ολικού RNA μυκήτων χρησιμοποιήθηκε το κιτ NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε από 30-50 mg λυοφιλωμένου μυκηλίου (κονιορτοποιημένου με υγρό άζωτο και διατηρημένου στους -80°C) ανά δείγμα.

2.7.7 Εκτίμηση ποιότητας και ποσότητας απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων

Για την ποιοτική και την ποσοτική εκτίμηση των απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτώματα αγαρόζης κατάλληλης κατά περίπτωση συγκέντρωσης (Sambrook & Russell, 2001), παράλληλα με μάρτυρες DNA ή RNA γνωστών συγκεντρώσεων και μεγεθών (*λHindIII*, 100 bp DNA ladder, 1 kb DNA ladder, high range RNA ladder – NEB, Fermentas). Ως ηλεκτροφορητικό διάλυμα γενικής χρήσης χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα TAE (για την παρασκευή 1 L διαλύματος 50X αναμιγνύονταν 242 g βάσης Tris, 57,1 mL παγόμορφου οξικού οξέος και 100 mL 0,5 M EDTA pH 8,0), και η τάση της ηλεκτροφόρησης ρυθμιζόταν κατά κανόνα στο εύρος 2-5 V/cm μεταξύ των ηλεκτροδίων της ηλεκτροφορητικής συσκευής (Sambrook & Russell, 2001). Σε ειδικές περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε και το υψηλότερης διακριτικής ικανότητας ηλεκτροφορητικό σύστημα ORIGINS (Elchrom Scientific) σε πηκτώματα πολυμερούς poly(NAT) 6%, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα νουκλεϊκά οξέα στα πηκτώματα αγαρόζης οπτικοποιήθηκαν με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία στη συσκευή UVP transilluminator (Ultra-Violet Products), κατόπιν χρώσης τους με διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (κατά κανόνα, τα πηκτώματα εμβαπτιζόνταν μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 1 μg/mL για 10 min, και στη συνέχεια εμβαπτιζόνταν σε απεσταγμένο νερό για 2 min).

Όποτε ήταν απαραίτητη μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποιοτική/ποσοτική εκτίμηση των νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτομετρία υπεριώδους με τη συσκευή Ultrospec 2000 UV/Visible (Amersham Pharmacia). Κατόπιν κατάλληλων αραιώσεων των δειγμάτων (σε ρυθμιστικό διάλυμα 5 mM Tris-HCl pH 8,0), προσδιορίστηκαν οι τιμές οπτικής πυκνότητάς τους στα μήκη κύματος 260 nm (OD_{260}) και 280 nm (OD_{280}). Με βάση αυτές τις τιμές, οι ποσότητες των νουκλεϊκών οξέων ανά δείγμα υπολογίστηκαν με βάση τις αντιστοιχίες $OD_{260}=1$ για 50 μg δίκλωνου DNA ή 40 μg RNA ανά mL διαλύματος (η ελάχιστη απαιτούμενη συγκέντρωση για ακριβείς μετρήσεις είναι 1 μg/mL), και η καθαρότητά τους με βάση το κριτήριο $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$ τουλάχιστον για το δίκλωνο DNA ή 2,0 για το RNA (Sambrook & Russell, 2001).

2.7.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Όλες οι αναλύσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε συσκευές PTC-200 Gradient Peltier Thermal Cycler (MJ Research) σε όγκο αντίδρασης 20-100 μL κατά περίπτωση. Σε επιμέρους πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διάφορες θερμοανθεκτικές DNA πολυμεράσες, συμπεριλαμβανομένων των Taq DNA polymerase (HyTest), GoTaq DNA polymerase (Promega) και Kapa Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems) για διαγνωστικές αναλύσεις PCR, Herculase II Fusion DNA polymerase (Stratagene, Agilent Technologies) για PCR μεγάλου μήκους (long-range PCR), και Pfu DNA polymerase (Stratagene, Agilent Technologies) και Phusion high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific) για PCR υψηλής πιστότητας, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Οι τυπικές αντιδράσεις PCR περιείχαν κατά κανόνα το ρυθμιστικό διάλυμα που αντιστοιχούσε στη DNA πολυμεράση, σε συγκέντρωση 1x, 1,5 mM $MgCl_2$, 5% DMSO, 200 μM από κάθε ένα εκ των τεσσάρων dNTPs, 0,4 μM από το κάθε ένα εκκινητικό ολιγονουκλεοτίδιο (primer), 30 ng

DNA, και 0,5-1,5 U της DNA πολυμεράσης, ανάλογα με το ένζυμο και τον τελικό όγκο της αντίδρασης. Το τυπικό πρόγραμμα ενίσχυσης DNA για τις διαγνωστικές αναλύσεις PCR περιελάμβανε ένα βήμα αρχικής αποδιάταξης στους 95°C για 3 min, ακολουθούμενου από 35 κύκλους αποδιάταξης (95°C για 30 s), υβριδισμού (30 s σε θερμοκρασία που υπολογιζόταν ανάλογα με τις θερμοκρασίες αποδιάταξης T_m των εκάστοτε εκκινητών) και ενίσχυσης (1 min/kb στους 72°C), και ένα τελικό βήμα ενίσχυσης στους 72°C για 5 min. Σε όλα τα πειράματα PCR συμπεριλαμβάνονταν αρνητικοί μάρτυρες ελέγχου (δείγματα χωρίς DNA) και όλες οι διαγνωστικές αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε τουλάχιστον 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις έκαστη. Για τις ανάγκες των πειραμάτων αυτής της διατριβής σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν πολυάριθμα ομόλογα και ετερόλογα εκκινητικά μόρια (primers), τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 2.7.

Πίνακας 2.7			
Πίνακας εκκινητών (primers) για τις αναλύσεις PCR (με τη σειρά αναφοράς στο κείμενο)			
A/A	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' – 3')	Αναφορά
1.	VdM1F	CCATAGCATCACAGCGAACTCTACTA	Ραπαίοαννου <i>et al.</i> , 2013b
2.	VdM1R	AAACCAACACCGAACTGACCAATC	Ραπαίοαννου <i>et al.</i> , 2013b
3.	VdM2F	GCTATCCGCCGTCTCGCT	Ραπαίοαννου <i>et al.</i> , 2013b
4.	VdM2R	GGTACGGCCCTGGCGCTT	Ραπαίοαννου <i>et al.</i> , 2013b
5.	VdM3F	CCGCCCGCGAGAAGGTT	Παρούσα εργασία
6.	VdM3R	AAGAGGGGGAGGCTGGTTGAG	Παρούσα εργασία
7.	VdM4F	GGGGCTCATACGGGGACTTGG	Παρούσα εργασία
8.	VdM4R	GGCAGTTTGAAGGGCGTCAATG	Παρούσα εργασία
9.	B1	CTACGGCAAGGCGACGCT	Παρούσα εργασία
10.	R1	IIICGICGICATCIGGC	Παρούσα εργασία
11.	R2	ICGICTTATCIGGCCTAC	Παρούσα εργασία
12.	E1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Παρούσα εργασία
13.	E2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Παρούσα εργασία
14.	I1	CTGGCTTGGTGATG	Παρούσα εργασία
15.	a3F	GGCGGGATCCAGGAGCTTTTCTTT	Παρούσα εργασία
16.	a3R	CGCGCACGGGGTTTTCAT	Παρούσα εργασία
17.	a6F	TGAGGGTCAAAGCAAATG	Παρούσα εργασία
18.	a6R	ACCGACCGTTACCTGAGTTC	Παρούσα εργασία
19.	a11F	CCCACGGGCACCAAGGAGTAG	Παρούσα εργασία
20.	a11R	ATGGTGGCAGGCTGGTGATGAA	Παρούσα εργασία
21.	a14F	TGCTGCCAGGGAAGATGAGAAAC	Παρούσα εργασία
22.	a14R	GTGCGCAAGACGGGTGAAGAT	Παρούσα εργασία
23.	a19F	CTCGCGACCCGATTTACGG	Παρούσα εργασία
24.	a19R	ATGTCTCGTAGGGCTATGTATGTT	Παρούσα εργασία
25.	Tm5	CGTAACTTGAATCTCATTGACAGGAACAGG	Usami <i>et al.</i> , 2007
26.	Tm7	GACTGCAGCTCGCGTCCGCGAGCCCGACACC	Usami <i>et al.</i> , 2007
27.	35-1	AAGTTGAGGGACATAAATACCTGGGGTGCG	Usami <i>et al.</i> , 2005
28.	35-2	TCGAAAAGTACGTAGAATTTATTCGCTAAT	Usami <i>et al.</i> , 2005
29.	Tr1	TGAAGTAGCCGATAGCTTTGTCTTGCCCGG	Usami <i>et al.</i> , 2007
30.	Tr2	TGTCTGGATTAATCGCCGCAATAGAGACGC	Usami <i>et al.</i> , 2007
31.	E10	CCGGTGCCTTCT	Usami <i>et al.</i> , 2007
32.	18S-ITS1	GTCCCTGCCCTTTGTA	Pantou <i>et al.</i> , 2005
33.	28S-ITS2	CCTGGTGGTTTCTTTTCC	Pantou <i>et al.</i> , 2005
34.	CNL12	CTGAACGCCTCTAAGTCAG	White <i>et al.</i> , 1990
35.	CNS1	GAGACAAGCATATGACTACTG	White <i>et al.</i> , 1990

36.	VdIGSpF2	TCAATTCCCGGGTAGGTGGTCTCT	Papaioannou <i>et al.</i> , 2013a
37.	VdIGSpR	ACGCCGTGCAGCCGAAAGT	Papaioannou <i>et al.</i> , 2013a
38.	18SVDF	GCGAAACTGCGAATGGCT	Karapapa & Typas, 2001
39.	18SVDR	GTAATGATCCCTCCGCTG	Karapapa & Typas, 2001
40.	18Sc	GGGACAGTCGGGGGCATCAGTATT	Papaioannou <i>et al.</i> , 2014
41.	18Se	CTAAGAACGGCCATGCACCACCAC	Papaioannou <i>et al.</i> , 2014
42.	18Sa	CCGAACACATGGCTAGTCTCCTC	Papaioannou <i>et al.</i> , 2014
43.	18Sb	ATTGATTGCAAAGCTACCTATGG	Papaioannou <i>et al.</i> , 2014
44.	18Sd	CAGGCTCCCGTTTTGG	Papaioannou <i>et al.</i> , 2014
45.	28SF	GTTCCGGCGGGGAGGTC	Papaioannou <i>et al.</i> , 2014
46.	28SR	GTCGCTTTCTGGCAGGATTCT	Papaioannou <i>et al.</i> , 2014
47.	un24F	TCCAACGGTATGTTCCCATGC	Παρούσα εργασία
48.	un24R	TCAGCAATGATGCGGTTCTCT	Παρούσα εργασία
49.	hetcF	GGGGCTCATACCGGGGACTTGG	Παρούσα εργασία
50.	hetcR	GGCAGTTTGAAGGGCGTCAATG	Παρούσα εργασία
51.	hetpcF	GACAC(AT)TGCTG(CT)ATCGA(CT)AAG	Παρούσα εργασία
52.	hetpcR	TCGATGAT(CT)CC(CT)CAGAG	Παρούσα εργασία
53.	het6BF	ACACCTACATATTCC(AC)CCCTC	Παρούσα εργασία
54.	het6BR	CATATG(CT)(A)TATCGTCGCCG	Παρούσα εργασία
55.	VdNhetcF	TCGTTCTTACAGTACCAGGCACATCA	Παρούσα εργασία
56.	VdNhetcR	ATCAGCGAAAACACCACCCAGTCTCTCA	Παρούσα εργασία
57.	VNhetcF2	GGAATCCTACCCTCGCCACCTC	Παρούσα εργασία
58.	VNhetcR2	TCAGCGAAAACACCACCCAGCCTCTC	Παρούσα εργασία
59.	VdPhetcF	CAAACAATCACCAGCCGCCATCA	Παρούσα εργασία
60.	VdPhetcR	TGCAGGTCCCACATTTACATCC	Παρούσα εργασία
61.	Vdun24F	TCTGCCCTCAACGCGACTTCTAA	Παρούσα εργασία
62.	Vdun24R	AATGTCGTTCTCGCGCTCTTTGCTGTCC	Παρούσα εργασία
63.	VdMAT12F	CAGGCCCATGGTCTGTGAT	Παρούσα εργασία
64.	VdMAT12R	CTAGCTGTGCTGCCACTTGTTC	Παρούσα εργασία
65.	VdmodEF	GAGTTTCTTTGCAATTTCCCTTAG	Παρούσα εργασία
66.	VdmodER	ACTTTTCTGGTATCCCGTGTATTATCA	Παρούσα εργασία
67.	Vdhet6F	GCAGGCAACGGTACACACTATCA	Παρούσα εργασία
68.	Vdhet6R	CTCATGGCCTCTAGCAATCTGG	Παρούσα εργασία
69.	Vdvib1F	TCGCGGATTGAGTCGTTGA	Παρούσα εργασία
70.	Vdvib1R	CATGTGCGCTCTCGGTTGG	Παρούσα εργασία
71.	Vdhex1F	CCGCCCGGAGAAAGGTT	Παρούσα εργασία
72.	Vdhex1R	AAGAGGGGGAGGCTGGTTGAG	Παρούσα εργασία
73.	NspFEcoR	CCGGAATCCGGTCCCCTCGAGACAGAGATAGA	Παρούσα εργασία
74.	NspRXhol	CGCTCGAGCGGCTGGCCGATGAGGAGATGAAA	Παρούσα εργασία
75.	PhcFBamH	CGGATCCGCGCAAACAATCACCAGCCGCCATCA	Παρούσα εργασία
76.	PhcRXbal	GCTCTAGAGCATGCAGGTCCCACATTTACATCC	Παρούσα εργασία
77.	VDMAT111F2	CCACTCGAAACCCACCCTGTC	Usami <i>et al.</i> , 2009
78.	VDMAT111R3	GGCCTCCATGTTGTAAGCGT	Usami <i>et al.</i> , 2009
79.	PtpCR	CTCCAGCCAAGCCAAAAAG	Πάντου, 2005
80.	Nhc1B2r	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTAACAAAGTGGAAGCGGC</u> <u>GAAGCAAGGGAGTCTG</u>	Παρούσα εργασία
81.	Nhc2B1r	<u>GGGGACTGCTTTTTGTACAAACTTGTTGGTATGG</u> <u>CGCAATGGAAATGTCAA</u>	Παρούσα εργασία
82.	Nhc3B4-b	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTTCGCCT</u> <u>CCTCGTCCTTCTGTC</u>	Παρούσα εργασία
83.	Nhc4B3-b	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTAGCTCCG</u> <u>GTTCTGCCTATCGTA</u>	Παρούσα εργασία
84.	Phc1B2r	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTAACAAAGTGGAACGTTTC</u> <u>GCGATCCGTCCTGGTA</u>	Παρούσα εργασία
85.	Phc2B1r	<u>GGGGACTGCTTTTTGTACAAACTTGATGTGGG</u> <u>GTCGATTGCGTTGTC</u>	Παρούσα εργασία
86.	Phc3B4	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTGTTGTG</u>	Παρούσα εργασία

87.	Phc4B3	GCGTGCTCTTGGGGAATAC <u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTAGAGCGA</u> GAGGATGATCAGGACGAA	Παρούσα εργασία
88.	un1B2r	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGAAAGCATGT</u> CGGGGAGCTGTGAGGT	Παρούσα εργασία
89.	un2B1r	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTGGGGTAA</u> GAGGCGACGGAGTGA	Παρούσα εργασία
90.	un3B4	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTTCTGTC</u> GCGCTGGCTGATA	Παρούσα εργασία
91.	un4B3	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTCGGCTTG</u> CGCGTCCTGTG	Παρούσα εργασία
92.	vb1B2r	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGAAATCGCGG</u> ATTGAGTCGTTGATG	Παρούσα εργασία
93.	vb2B1r	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTGGCCACC</u> CCCGTTGAAG	Παρούσα εργασία
94.	vb3B4	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTACAGGC</u> CGCCGCTCGTTCTC	Παρούσα εργασία
95.	vb4B3	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTCATGTGC</u> GCTCTCGTTGGTG	Παρούσα εργασία
96.	hx1B2r	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGAAAGTCCCC</u> GTCCCTTCAGCATC	Παρούσα εργασία
97.	hx2B1r	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTGCGGGCG</u> GTCGCAGTTGTTTA	Παρούσα εργασία
98.	hx3B4	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTGAAAG</u> GGCGATGGCGTGAC	Παρούσα εργασία
99.	hx4B3	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTGAGCGGA</u> GGGTGAGGGCATACT	Παρούσα εργασία
100.	MAT1B2r	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGAACTCGC</u> CGTCGTGGAATGA	Παρούσα εργασία
101.	MAT2B1r	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTGGGCGGG</u> GCGAGTTTAGCA	Παρούσα εργασία
102.	MAT3B4	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTTCTTGCA</u> CAGGCTTGGATTAC	Παρούσα εργασία
103.	MAT4B3	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTAGGCTGC</u> CCGGACTTTATG	Παρούσα εργασία
104.	OSC-F	CGCCAATATATCCTGTCAAACACT	Paz <i>et al.</i> , 2011
105.	Hyg-R(210)	GCCGATGCAAAGTGCCGATAAACA	Paz <i>et al.</i> , 2011
106.	Hyg-F(850)	AGAGCTTGGTTGACGGCAATTTTCG	Paz <i>et al.</i> , 2011
107.	OSC-R	CTAGAGGCGCGCCGATATCCT	Paz <i>et al.</i> , 2011
108.	Vdun24FF	GCCCTGCCCGCCTACGTTGATTAC	Παρούσα εργασία
109.	Vdun24FR	GTTACGGACGCCATGTTGCTTGAT	Παρούσα εργασία
110.	Vdvib1FF	GAAAACGCCGCCCAACTC	Παρούσα εργασία
111.	Vdvib1FR	CGACCCTGCGCTAGATCCAAAAG	Παρούσα εργασία
112.	Vdhex1FF	GTCGATTCCCTGCAACCACAT	Παρούσα εργασία
113.	Vdhex1FR	CCAGCTCCACCCAGATACATACAG	Παρούσα εργασία

Οι ανασυνδυαστικές θέσεις *attB* (*attB* recombination sites) B2r, B1r, B4 ή B3, οι οποίες προστέθηκαν στο 5' άκρο όσων εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα OSCAR, είναι υπογραμμισμένες στις αλληλουχίες των αντίστοιχων εκκινητών.

2.7.9 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time Polymerase Chain Reaction, qPCR)

Τα ζεύγη εκκινητών για τις αναλύσεις με τη μέθοδο qPCR σχεδιάστηκαν με τα εργαλεία *PrimerQuest* (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>, Integrated DNA Technologies) και *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, Untergasser *et al.*, 2007) και υποβλήθηκαν σε έλεγχο *in silico* σύμφωνα με τα κριτήρια που περιγράφονται από τους D'haene *et al.* (2010). Όλες οι αναλύσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για τρεις επαναλήψεις του πειράματος για κάθε δείγμα, στη συσκευή Mx3000P real-time PCR system (Stratagene, Agilent Technologies) με το κιτ Brilliant SYBR Green qRT-PCR Master Mix kit (Stratagene, Agilent Technologies), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η βελτιστοποίηση των συγκεντρώσεων των εκκινητών έγινε για κάθε ζεύγος ανεξάρτητα και οι άριστες συγκεντρώσεις ήταν 50 nM για τους εκκινητές *tef1F/R*, *18SF* και *intuniF*, και 150 nM για τους εκκινητές *18SR.intuniR* και *intspF/R* (Πίνακας 2.8). Το πρωτόκολλο ενίσχυσης αποτελούνταν από ένα βήμα αρχικής αποδιάταξης (95°C για 10 min), ακολουθούμενου από 40 κύκλους αποδιάταξης (95°C για 30 s), υβριδισμού των εκκινητών (57°C για 1 min) και ενίσχυσης (72°C για 30 s). Η συσκευή είχε ρυθμισθεί ώστε να καταγράφει τα επίπεδα φθορισμού στο τέλος των βημάτων υβριδισμών και ενίσχυσης όλων των κύκλων. Κατόπιν της ενίσχυσης, ακολούθησε ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης (dissociation curve analysis), η οποία ξεκινούσε με επώαση στους 95°C για 1 min, ακολουθούμενη από επώαση στους 55°C για 30 s, και τελικά σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας (σε ρυθμό 0,1°C/s) μέχρι τους 95°C με συνεχή καταγραφή του φθορισμού. Σε όλα τα πειράματα συμπεριελήφθησαν αντιδράσεις ελέγχου χωρίς DNA για τον έλεγχο της απουσίας πιθανών μολύνσεων ή διμερών εκκινητικών μορίων. Η απουσία μη ειδικών προϊόντων επαληθεύθηκε με την ανάλυση της καμπύλης τήξης και την οπτικοποίηση των προϊόντων PCR σε πηκτώματα αγαρόζης συγκέντρωσης 2,0%.

Η μέθοδος απόλυτης ποσοτικοποίησης με qPCR χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων της πυρηνικής ριβοσωμικής επανάληψης rDNA και του λόγου των αριθμών αντιγράφων εσωνίων εντός αυτού, σύμφωνα με τους Lee *et al.* (2008). Για αυτόν τον σκοπό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *tef1F/R*, *18SF/R*, *intuniF/R* και *intspF/R* (Πίνακας 2.8). Τα προϊόντα PCR που ελήφθησαν από το ολικό DNA των στελεχών *V. dahliae* BB με τα ζεύγη εκκινητών *tef1F/R*, *18SF/R* και *intuniF/R*, και *V. longisporum* K12 με το ζεύγος εκκινητών *intspF/R* κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pBluescript II και ένας κλώνος για το κάθε προϊόν, με το σωστό περιοριστικό πρότυπο, επιλέχθηκε και επαληθεύθηκε με αλληλούχηση. Στη συνέχεια, ακολούθησε καθαρισμός των πλασμιδίων, ποσοτικός προσδιορισμός τους και προετοιμάστηκε για το κάθε ένα μια σειρά δεκαδικών αραιώσεων, στο εύρος συγκεντρώσεων $4,0 \cdot 10^8$ - $4,0 \cdot 10^2$ αντίγραφα/μL (σύμφωνα με τους υπολογισμούς που συνοψίζονται από τους Lee *et al.*, 2008). Αυτές οι σειρές δεκαδικών αραιώσεων χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπων καμπυλών qPCR για τους 4 στόχους DNA. Όλες οι καμπύλες χαρακτηρίζονταν από υψηλή γραμμικότητα ($R^2 > 0,999$) στο εύρος όπου ελέγχθηκαν. Η απόδοση της ενίσχυσης με τα ζεύγη εκκινητών *tef1F/R*, *18SF/R*, *intuniF/R* και *intspF/R* ήταν 96,7, 95,4, 89,2 και 91,8%, αντίστοιχα. Με βάση τις αντίστοιχες πρότυπες καμπύλες, οι υπολογισθείσες οριακές τιμές c_t (threshold cycle) των διαφορετικών δειγμάτων μετατράπηκαν σε αριθμούς αντιγράφων ανά δείγμα. Τελικά, ο γονιδιωματικός αριθμός αντιγράφων του γονιδίου SSU-rRNA προσδιορίστηκε με διαίρεση

του αριθμού των αντιγράφων του τμήματος SSU σε κάθε δείγμα προς τον αριθμό των αντιγράφων του μοναδιαίου στο γονιδίωμα γονιδίου αναφοράς (*tef1*) στο ίδιο δείγμα. Παρομοίως, ο λόγος του αριθμού αντιγράφων των δύο μορφών εσωνίων τύπου I που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο SSU προσδιορίστηκε σε κάθε δείγμα με τη διαίρεση του αριθμού προϊόντων PCR που προέκυψαν με τα ζεύγη εκκινητών *intuniF/R* και *intspF/R*, αντίστοιχα, στο ίδιο δείγμα.

Πίνακας 2.8

Πίνακας εκκινητών (primers) για τις αναλύσεις qPCR πραγματικού χρόνου			
A/A	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' – 3')	Αναφορά
1.	<i>tef1F</i>	GGTTCGTCACCCTGTGTATATC	Παρούσα εργασία
2.	<i>tef1R</i>	GTGCATGGTCTGCATCAAAG	Παρούσα εργασία
3.	18SF	CCTGCGGCTTAATTTGACTC	Παρούσα εργασία
4.	18SR	AACTAAGAACGGCCATGCAC	Παρούσα εργασία
5.	<i>intuniF</i>	AAAGCCGTCTGTGAAAGCAG	Παρούσα εργασία
6.	<i>intuniR</i>	GTCCATTGTTGCATCTCACG	Παρούσα εργασία
7.	<i>intspF</i>	TGTCCATTCTTCTCCCTCT	Παρούσα εργασία
8.	<i>intspR</i>	ATTCTCGTTCCTTATGCCTGAC	Παρούσα εργασία

2.7.10 Αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription)

Ολικό RNA μυκήτων, απομονωμένο είτε με το αντιδραστήριο TRI (Ambion, Life Technologies) είτε με το κιτ NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) (βλ. αντίστοιχη παράγραφο), υποβλήθηκε σε πέψη με το ένζυμο TURBO DNase (Invitrogen, Life Technologies) ή το ένζυμο RNase-free DNase I (Fermentas, Thermo Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, για την πλήρη απομάκρυνση του DNA. Στη συνέχεια, προκειμένου να γίνει η σύνθεση του cDNA, τουλάχιστον 1 µg καθαρισμένου RNA υποβλήθηκε σε αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση πρώτης αλυσίδας DNA (first strand synthesis) με τα ένζυμα Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies) ή RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas, Thermo Scientific), με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων oligo(dT) ή τυχαίων εξαμερών εκκινητών (random hexamer primers) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Το παραχθέν cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα DNA (2 µL ανά αντίδραση) σε αναλύσεις PCR με ειδικά ζεύγη εκκινητών.

2.7.11 Έκλουση DNA από ζώνες σε πηκτώματα αγαρόζης

A. Έκλουση DNA από ζώνες σε πηκτώματα αγαρόζης με τη μέθοδο NaI-silica

Στην περίπτωση ύπαρξης πολλαπλών ζωνών DNA σε προϊόντα PCR ή σε περιοριστικές αναλύσεις εφαρμόστηκε καθαρισμός της επιθυμητής ζώνης κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης (συγκέντρωσης 0,8% και κατασκευασμένο με διάλυμα TAE 1x) με τη μέθοδο NaI-silica, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Boyle & Lew, 1995. Για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου απαιτήθηκε η

προπαρασκευή του υποστρώματος σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου (silica matrix) ως εξής: ανάμιξη 10 g σφαιριδίων silica (Sigma) σε 100 mL διαλύματος PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄), στατική επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h ώστε να καθιζάνουν τα σφαιρίδια, απόρριψη του υπερκειμένου που περιείχε λεπτό σωματιδιακό υλικό και μία επανάληψη των προηγούμενων σταδίων, φυγοκέντρηση στα 2000 g για 2 min, αναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα NaI 3 M με τελική συγκέντρωση των σφαιριδίων silica 100 mg/mL, διατήρηση στους 4°C στο σκοτάδι.

Για την απομόνωση ζώνης DNA η διαδικασία συνοπτικά ξεκινούσε με την εκτομή της επιθυμητής ζώνης από το πήκτωμα αγαρόζης (κατόπιν της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε χαμηλή τάση για τον βέλτιστο διαχωρισμό των ζωνών), μεταφορά σε προζυγισμένο σωλήνα τύπου Eppendorf (1,5 mL), προσθήκη 2 όγκων διαλύματος NaI 6 M και επώαση στους 56°C για 5-10 min μέχρι να λιώσει τελείως η αγαρόζη (με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα). Ακολουθούσε προσθήκη 10-15 μ L υποστρώματος silica (silica matrix) (τουλάχιστον 2-3 μ L για κάθε μ g DNA), επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min με ανάδευση κάθε 1 min, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 30 s και απόρριψη υπερκειμένου, έκπλυση των σφαιριδίων δις με 500 μ L διαλύματος έκπλυσης (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM EDTA pH 8,0, 50% αιθανόλη) (έντονη ανάδευση σε κάθε αναδιάλυση και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 30 s και απόρριψη του υπερκειμένου). Μετά την τελευταία έκπλυση πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση (12000 rpm για 30 s) και απόρριψη των υπολειμμάτων του διαλύματος έκπλυσης. Τέλος, ακολούθησε η έκλυση του DNA σε 10-15 μ L sddH₂O ή TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0) με επώαση στους 56°C για 5 min, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 2 min και συλλογή του υπερκειμένου. Η απόδοση της μεθόδου ήταν σημαντικά αυξημένη όταν η διαδικασία της έκλυσης επαναλαμβανόταν μία φορά.

B. Έκλυση DNA με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλυσης (electroelution)

Για τη μέθοδο της ηλεκτροέκλυσης, οι απομονωμένες ζώνες DNA από πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρονταν σε θαλάμους μεμβράνης διαπίδυσης, οι οποίοι πληρώνονταν με αποστειρωμένο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TAE 1x) και σφραγίζονταν με κατάλληλους συνδετήρες (clips) χωρίς να εισέλθουν φυσαλίδες αέρα. Οι ζώνες τοποθετήθηκαν εντός της ηλεκτροφορητικής συσκευής με διεύθυνση κάθετη στο ηλεκτρικό πεδίο και εφαρμόστηκε υψηλή τάση (5-6 V/cm μεταξύ των ηλεκτροδίων) για 1 h. Ακολούθησε αναστροφή των πόλων του κυκλώματος στην ίδια τάση για 1 min, ελήφθη το υπερκείμενο και μεταφέρθηκε σε σωλήνες τύπου Eppendorf (1,5 mL). Ο περαιτέρω καθαρισμός του δείγματος έγινε με εκχύλιση με έναν όγκο φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και η κατακρήμνιση με προσθήκη 0,1 όγκου 3 M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2 όγκων αιθανόλης, όπως περιγράφεται αναλυτικότερα στην αντίστοιχη παράγραφο (2.7.12).

Γ. Έκλυση DNA από ζώνες σε πηκτώματα αγαρόζης με εμπορικό κιτ

Εναλλακτικά, για την απομόνωση ζωνών DNA από πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το κιτ NucleoSpin Extract II ή NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.7.12 Καθαρισμός μιγμάτων αντιδράσεων από ένζυμα, άλατα, δευτερογενή προϊόντα, νουκλεοτίδια και εκκινητές (primers)

A. Εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφορμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1)

Προκειμένου να απομακρυνθούν ένζυμα και άλατα από μίγματα αντιδράσεων (π.χ. πέψεων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες) πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του DNA με προσθήκη στο δείγμα ενός όγκου φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1), ανάμιξη μέχρι ομογενοποίησης, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min και λήψη του υπερκειμένου. Σε περίπτωση που η μεσόφαση δεν ήταν άορατη, η εκχύλιση επαναλαμβανόταν μέχρι το DNA να είναι ικανοποιητικής καθαρότητας. Στη συνέχεια ακολουθούσε κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 0,1 όγκου διαλύματος 3 M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2 όγκων αιθανόλης ή 0,6-0,8 όγκου ισοπροπανόλης, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min, απόρριψη του υπερκειμένου, έκπλυση με 500 μ L διαλύματος αιθανόλης 70%, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 min, πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37°C για 10 min, και τελικά αναδιάλυση σε κατάλληλο όγκο sdH_2O ή TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0).

B. Μέθοδος PEG

Για τον καθαρισμό του DNA με αυτήν τη μέθοδο πραγματοποιήθηκε ανάμιξη του δείγματος με έναν όγκο διαλύματος καθαρισμού (για την παρασκευή 50 mL διαλύθηκαν σε sdH_2O 10,0 g PEG-8000 και 7,3 g NaCl) και επώαση του δείγματος στους 37°C για 15 min. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 20 min και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Ακολούθησε προσθήκη 125 μ L παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 80%, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 min και απομάκρυνση του υπερκειμένου (αυτό το στάδιο επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές). Μετά την τελευταία απομάκρυνση της αιθανόλης το δείγμα επώασθηκε στους 37°C για 10 min και επαναδιαλύθηκε σε 15 μ L sdH_2O ή TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0).

Γ. Εμπορικό κιτ καθαρισμού

Εναλλακτικά, για τον καθαρισμό DNA χρησιμοποιήθηκε το κιτ NucleoSpin Extract II ή NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.7.13 Πέψη μορίων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η περιοριστική ανάλυση ή/και γραμμικοποίηση απομονωμένων πλασμιδίων από βακτηριακούς κλώνους, προϊόντων PCR, αλλά και η πέψη ολικού DNA μυκήτων ή

βακτηριοφάγων για μεταφορά κατά Southern και υβριδιστικές αναλύσεις, πραγματοποιήθηκε με πέψεις με πολυάριθμες περιοριστικές ενδονουκλεάσες των εταιρειών Fermentas (Thermo Scientific), Takara και NEB, σε απλές ή διπλές πέψεις, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Κατόπιν του τέλους επώασης των αντιδράσεων πέψης στην κατάλληλη θερμοκρασία έγινε αδρανοποίηση του ενζύμου (με τη μέθοδο που προτεινόταν από τους κατασκευαστές, ανάλογα με το ένζυμο) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (0,8%), σε σύγκριση με το ηλεκτροφορητικό πρότυπο θραυσμάτων DNA γνωστού μεγέθους των κλιμάκων 100 bp DNA ladder ή 1 kb DNA ladder (Fermentas, Thermo Scientific).

2.7.14 Κλωνοποίηση προϊόντων PCR σε πλασμιδιακούς φορείς

A. Κλωνοποίηση με προσθήκη άκρων TA

Η απομόνωση του φορέα από κατάλληλο βακτηριακό κλώνο ακολουθήθηκε από πλήρη πέψη του με το ένζυμο *EcoRV*, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Fermentas, Thermo Scientific), για τη δημιουργία ισοσκελών (blunt) άκρων DNA. Κατόπιν του καθαρισμού του με εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) και κατακρήμνισή του με αιθανόλη (2X) πραγματοποιήθηκε η προσθήκη καταλοίπων T στα 3' άκρα του με την ακόλουθη αντίδραση:

- sdH₂O: μέχρι τα 20 μL
- 10X ρυθμιστικό διάλυμα: 2 μL
- MgCl₂ (stock 25 mM): 1,2 μL (τελική συγκέντρωση 1,5 mM)
- DNA: x μL (~500 ng)
- dTTP: 1 μL (τελική συγκέντρωση 500 μM)
- Taq πολυμεράση: 0,2 μL (1 unit),

που επώασθη στους 74°C για 2 h. Ακολούθησε εκ νέου καθαρισμός του DNA και καταβύθιση του DNA με ήπιους χειρισμούς ώστε να μην χαθούν τα άκρα T.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 3' A άκρων στο τμήμα DNA προς κλωνοποίηση με αντίστοιχη αντίδραση με την προηγούμενη (με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνταν dATP αντί για dTTP), εφόσον το τμήμα DNA είχε κι αυτό ισοσκελή άκρα. Στην περίπτωση που το τμήμα προς κλωνοποίηση είχε προέλθει από περιοριστική πέψη με ένζυμο που δημιουργεί κολλώδη (cohesive) άκρα, αυτά μετατρέπονταν σε ισοσκελή με το ένζυμο Klenow fragment (Takara ή Fermentas, Thermo Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, πριν την προσθήκη 3' A άκρων. Τέλος, στις περιπτώσεις προϊόντων PCR που είχαν μόλις ληφθεί με θερμοανθεκτική πολυμεράση DNA χωρίς 3'-5' εξωνουκλεολυτική ενεργότητα, καμία κατεργασία των άκρων δεν ήταν απαραίτητη, καθώς αυτές οι πολυμεράσες τείνουν να προσθέτουν κατάλοιπα A στα 3' άκρα των προϊόντων PCR. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε καθαρισμός και καταβύθιση του DNA με ήπιους χειρισμούς ώστε να μην χαθούν τα άκρα A (Sambrook & Russell, 2001).

Η αντίδραση διασύνδεσης (ligation) των μορίων του γραμμικοποιημένου φορέα (vector) και του ενθέματος (insert), με T και A 3' άκρα αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε για 1 h στους 22°C, και στη συνέχεια επιπλέον για 16 h στους 16°C, με χρήση 1-5 U DNA λιγάσης του φάγου T4 (Invitrogen, Life Technologies ή Fermentas, Thermo Scientific), στο

κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και σε τελικό όγκο αντίδρασης 10-20 μL , σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 50 ng φορέα κλωνοποίησης και τόση ποσότητα ενθέματος ώστε η μοριακή αναλογία DNA φορέα-ενθέματος να είναι στο εύρος 1:3 έως 1:7. Διαπιστώθηκε πως η απόδοση της μεθόδου ήταν αυξημένη όταν γινόταν προσθήκη στο μίγμα της αντίδρασης διαλύματος PEG-4000 σε τελική συγκέντρωση 5%.

B. Κλωνοποίηση με ισοσκελή άκρα (*blunt-end ligation*)

Πραγματοποιήθηκε όπως και στην περίπτωση της κλωνοποίησης με προσθήκη άκρων TA με τη διαφορά ότι στα μόρια DNA του φορέα και του ενθέματος δεν προστέθηκαν T και A άκρα, αντίστοιχα, αλλά στην αντίδραση διασύνδεσης (*ligation*) χρησιμοποιήθηκαν μόρια χωρίς προεξέχοντα άκρα. Στην περίπτωση που το τμήμα προς κλωνοποίηση είχε προέλθει από περιοριστική πέψη με ένζυμο που δημιουργεί κολλώδη (*cohesive*) άκρα, αυτά μετατρέπονταν πριν την αντίδραση διασύνδεσης σε ισοσκελή με το ένζυμο Klenow fragment (Takara ή Fermentas, Thermo Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, και στη συνέχεια το δείγμα υποβαλλόταν σε μια από τις διαδικασίες καθαρισμού του DNA.

Γ. Κλωνοποίηση με συμπληρωματικά ή «κολλώδη» (*cohesive*) άκρα

Τόσο το DNA του φορέα (*vector*) όσο και το DNA του ενθέματος (*insert*) υποβάλλονταν σε πλήρη πέψη με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο ή με περιοριστικά ένζυμα που δημιουργούν συμπληρωματικά μεταξύ τους άκρα. Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για κλωνοποίηση τμημάτων DNA με συγκεκριμένο προσανατολισμό του ενθέματος στα μόρια του φορέα (*directional cloning*), για την οποία απαιτήθηκε διπλή περιοριστική πέψη τόσο του φορέα όσο και του ενθέματος με το ίδιο ζεύγος περιοριστικών ενδονουκλεασών. Κατόπιν της ολοκλήρωσης των αντιδράσεων πέψης και διαπίστωσης της πληρότητας αυτών με ηλεκτροφόρηση μέρους των αντιδράσεων σε πήκτωμα αγαρόζης, τα περιοριστικά ένζυμα αδρανοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών και οι αντιδράσεις υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με μια από τις μεθόδους καθαρισμού του DNA.

Οι αντιδράσεις διασύνδεσης (*ligation*) των μορίων του φορέα και του ενθέματος με τα συμπληρωματικά άκρα πραγματοποιήθηκαν για 1 h στους 22°C, με 0,1-1 U DNA λιγάσης του φάγου T4 (Invitrogen, Life Technologies ή Fermentas, Thermo Scientific), στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μL , σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 50 ng φορέα κλωνοποίησης και τόση ποσότητα ενθέματος ώστε η μοριακή αναλογία DNA φορέα-ενθέματος να είναι στο εύρος 1:3 έως 1:5. Αυτή η μέθοδος διασύνδεσης μορίων DNA είχε γενικά υψηλότερη απόδοση από τις προηγούμενες μεθόδους.

Δ. Κλωνοποίηση με εμπορικούς φορείς/κιτ κλωνοποίησης

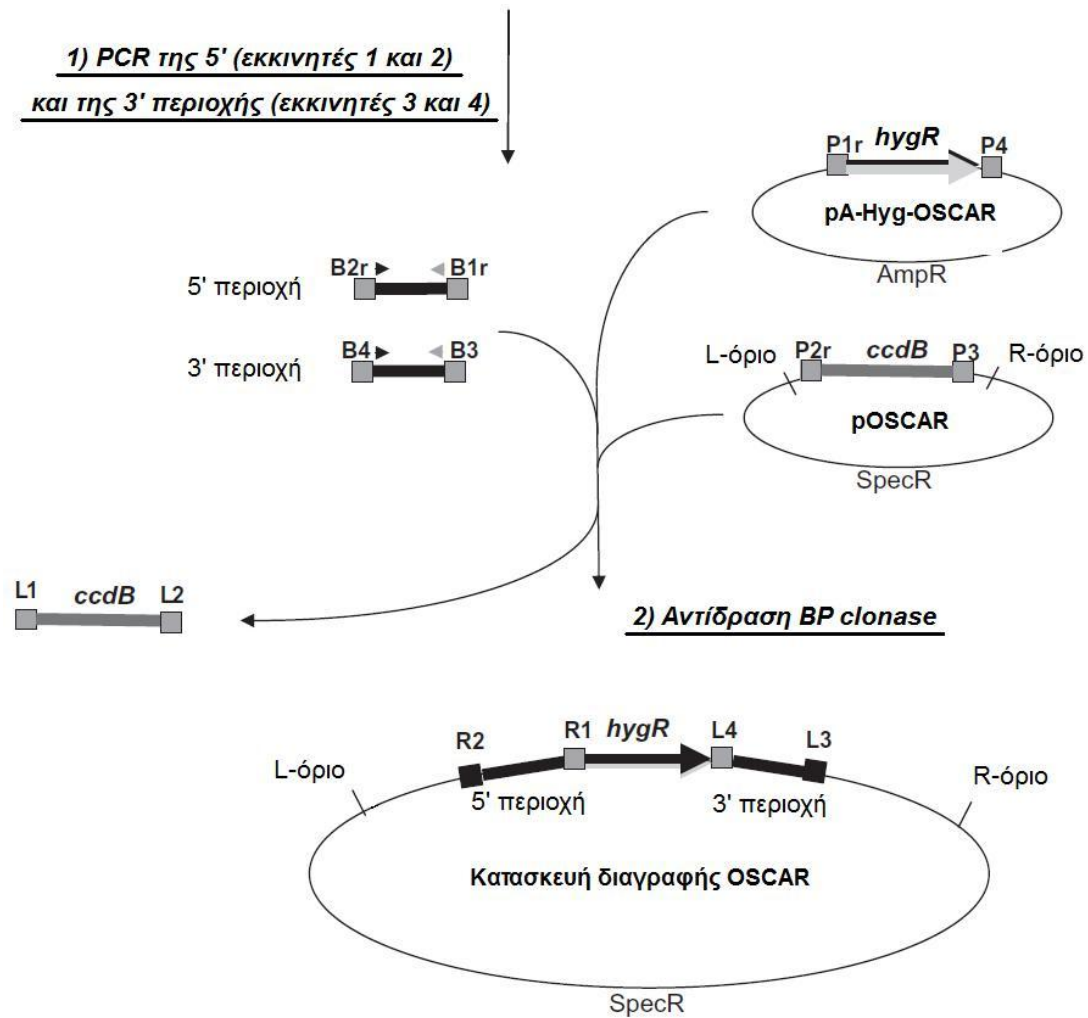
Σε ειδικές περιπτώσεις (πληθυσμιακές μελέτες ή κλωνοποίηση τμημάτων DNA μεγάλου μεγέθους) η κλωνοποίηση μορίων DNA έγινε με τη χρήση των εμπορικών φορέων

κλωνοποίησης pCRII-TOPO του κιτ TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Life Technologies), pTZ57R/T του κιτ InsTAclone PCR cloning kit (Fermentas, Thermo Scientific) ή pJET1.2 του κιτ CloneJET PCR cloning kit (Fermentas, Thermo Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

E. Κλωνοποίηση με την τεχνολογία Gateway κατά το σύστημα OSCAR

Για την κατασκευή φορέων στοχευμένης γονιδιακής απαλοιφής (gene deletion) με διπλό ομόλογο επιχιασμό, κατόπιν μετασχηματισμού του μύκητα *V. dahliae* μέσω του βακτηρίου *A. tumefaciens*, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των πλασμιδίων pOSCAR/pA-Hyg-OSCAR (Paz *et al.*, 2011) που βασίζεται στην *in vitro* ανασυνδυαστική τεχνολογία κλωνοποίησης Gateway (Invitrogen, Life Technologies). Για κάθε γονίδιο προς διαγραφή σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών, κατά τέτοιον τρόπο ώστε να ενισχύουν γονιδιοματική περιοχή περίπου 1 kb αναρροϊκά (upstream) ή καταρροϊκά (downstream) του γονιδίου-στόχου. Στην 5' περιοχή του κάθε ενός εκ των τεσσάρων εκκινητών προστέθηκε διαφορετική αλληλουχία ανασυνδυασμού *attB* (συγκεκριμένα, οι εκκινητές 1 και 2 σχεδιάστηκαν ώστε να ενισχύουν την 5' περιοχή του γονιδίου και τα 5' άκρα τους έφεραν τις αλληλουχίες *attB2r* και *attB1r*, αντίστοιχα, ενώ οι εκκινητές 3 και 4 ενίσχυαν την 3' περιοχή του γονιδίου και τα 5' άκρα τους έφεραν τις αλληλουχίες *attB4* και *attB3*, αντίστοιχα) (Πίνακας 2.7). Κατόπιν της ενίσχυσης με PCR των αντίστοιχων περιοχών με τα δύο ζεύγη εκκινητών, τα δύο τμήματα DNA καθαρίστηκαν μαζί κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης και έκλουσης με στήλες NucleoSpin Extract II ή Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel).

Για τη δημιουργία της κατασκευής, πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση με το ένζυμο Gateway BP clonase II enzyme mix (Invitrogen, Life Technologies) σε τελικό όγκο 5 μ L, η οποία περιελάμβανε 15-20 ng (συνολικά) των δύο καθαρισμένων τμημάτων που αντιστοιχούν στην 5' και την 3' περιοχή του γονιδίου, 60 ng του πλασμιδίου pOSCAR, 60 ng του πλασμιδίου pA-Hyg-OSCAR και 1 μ L του μίγματος ενζύμου. Ακολούθησε επώαση της αντίδρασης στους 25°C για 16 h, και στη συνέχεια τερματισμός της με προσθήκη 0,5 μ L διαλύματος πρωτεΐνάσης K (20 μ g/mL, Invitrogen, Life Technologies). Τα βασικά λειτουργικά χαρακτηριστικά των πλασμιδίων pOSCAR και pA-Hyg-OSCAR και η στρατηγική κατασκευής των κασετών γονιδιακής απαλοιφής με το σύστημα OSCAR απεικονίζεται στην Εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2. Λειτουργικοί χάρτες των φορέων pOSCAR και pA-Hyg-OSCAR και η στρατηγική κατασκευής κασετών στοχευμένης γονιδιακής απαλοιφής με το σύστημα OSCAR. Στα 5' άκρα των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της 5' και της 3' γονιδιοματικής περιοχής κάθε γονιδίου προς διαγραφή προστέθηκαν οι διαφορετικές θέσεις ανασυνδυασμού *attB2r* και *attB1r* (για την 5' περιοχή), και οι *attB4* και *attB3* (για την 3' περιοχή). Οι αντίστοιχες θέσεις *attP1r* και *attP4*, καθώς και *attP2r* και *attP3*, περιβάλλουν την κασέτα ανθεκτικότητας στην υγραμμική B (στο πλασμίδιο pA-Hyg-OSCAR) και το τοξικό για το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* DH5a γονίδιο *ccdB* (στο πλασμίδιο pOSCAR), αντίστοιχα. Με την κατάλληλη ανάμιξη των προϊόντων PCR για τις δύο γονιδιοματικές περιοχές με τα δύο πλασμίδια κατά την αντίδραση με το ένζυμο BP clonase II (Invitrogen, Life Technologies), δημιουργείται σε ένα βήμα η κατασκευή γονιδιακής απαλοιφής που παρατίθεται στο κάτω μέρος της εικόνας. *Amp^R* και *Spec^R*: γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και τη σπεκτινομυκίνη, αντίστοιχα (προσαρμογή από Paz *et al.*, 2011).

2.7.15 Μετασηματισμός μικροοργανισμών

A. Μετασηματισμός του βακτηρίου *E. coli* με τη μέθοδο $CaCl_2$

Για την προετοιμασία δεκτικών κυττάρων προς άμεσο μετασηματισμό, 10 mL θρεπτικού υλικού LB εμβολιάζονταν με εμβόλιο 1-2% από αρχική καλλιέργεια (η οποία είχε δημιουργηθεί κατόπιν εμβολιασμού 2 mL υλικού LB με μονή αποικία του επιθυμητού στελέχους και ολονύκτια στατική επώαση στους 37°C) και επωάζονταν στους 37°C υπό ανακίνηση (180 rpm) για περίπου 2 h, μέχρι η καλλιέργεια να εισέλθει στην εκθετική φάση ανάπτυξης ($OD_{600}=0,3-0,4$ που αντιστοιχεί σε $5 \cdot 10^7-10^8$ κύτταρα/mL). Ακολούθησε γρήγορη μεταφορά της καλλιέργειας στον πάγο για 2 λεπτά για ανάσχεση της βακτηριακής αύξησης, μεταφορά 1,5 mL καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου Eppendorf (1,5 mL), φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 1 min, απόρριψη του υπερκειμένου, επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 1 mL διαλύματος 0,1 M $CaCl_2$ και επώαση στον πάγο για 30 min. Τέλος, επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση όπως και προηγουμένως, απόρριψη του υπερκειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 0,2 mL διαλύματος 0,1 M $CaCl_2$. Το δείγμα κατά τη διάρκεια των χειρισμών ήταν τοποθετημένο στον πάγο και τα διαλύματα είχαν θερμοκρασία 4°C.

Εναλλακτικά, παρασκευάστηκαν με αντίστοιχη διαδικασία δεκτικά κύτταρα προς μακροχρόνια διατήρηση στους -80°C, για μελλοντικά πειράματα μετασηματισμού. Για αυτόν τον σκοπό χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια 100 mL θρεπτικού υλικού LB, εμβολιαζόμενη και αναπτυσσόμενη στις συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω, μέχρι η οπτική πυκνότητα να φθάσει την τιμή $OD_{600}=0,3$. Κατόπιν της μεταφοράς της καλλιέργειας στον πάγο για 5 min, φυγοκεντρήθηκε για 7 min στα 8000 g (στους 4°C), απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 50 mL διαλύματος I (0,1 M $CaCl_2$). Ακολούθησε επώαση στους 4°C για τουλάχιστον 2 h, φυγοκέντρηση όπως και προηγουμένως, απόρριψη του υπερκειμένου και αναδιάλυση των κυττάρων σε 5 mL διαλύματος II (0,1 M $CaCl_2$, 20% γλυκερόλη). Το εναιώρημα διαμοιράστηκε σε σωλήνες τύπου Eppendorf (1,5 mL), οι οποίοι μεταφέρθηκαν για διατήρηση στους -80°C.

Για τον μετασηματισμό των δεκτικών κυττάρων *E. coli*, προστέθηκαν σε 100 μ L εναιωρήματος δεκτικών κυττάρων 50-200 ng πλασμιδιακού DNA ή η αντίστοιχη ποσότητα των προϊόντων αντιδράσεων διασύνδεσης (ligation), σε όγκο διαλύματος που δεν ξεπερνούσε τα 20 μ L, και το μίγμα κατόπιν ήπιας ανάμιξης επωάστηκε στον πάγο για τουλάχιστον 30 min. Ακολούθως, το δείγμα μεταφέρθηκε στους 42°C για 2 min, και στη συνέχεια επανατοποθετήθηκε στον πάγο, για 2 min (θερμικό σοκ). Προστέθηκε 1 mL θρεπτικού υλικού LB και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 h. Στη συνέχεια, δείγματα των κυττάρων επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό LB εμπλουτισμένο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής (στην πλειονότητα των περιπτώσεων αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 μ g/mL ή καναμυκίνη 50 μ g/mL ή σπεκτινομυκίνη 100 μ g/mL). Στις περιπτώσεις πειραμάτων μετασηματισμού κυττάρων *E. coli* με τα προϊόντα αντιδράσεων συγκόλλησης (DNA ligation) στον φορέα pBluescript II, το θρεπτικό υλικό επιλογής εμπλουτίστηκε επιπλέον με X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ- β -D-γαλακτοπυρανοσίδιο) σε συγκέντρωση 40 μ g/mL (από διάλυμα διατήρησης συγκέντρωσης 20 mg/mL σε διμεθυλφορμαμίδιο, διατηρούμενου στους -20°C στο σκοτάδι), για χρωματική επιλογή των μετασηματισμένων αποικιών με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (σύστημα μπλε/λευκών αποικιών, blue/white screening). Τα

τροβλία του μετασχηματισμού επωάσθηκαν στους 37°C για 14-16 h, μέχρι την εμφάνιση των μετασχηματισμένων βακτηριακών αποικιών. Με τη μέθοδο CaCl₂ επετεύχθησαν τυπικά αποδόσεις μετασχηματισμού τουλάχιστον 10⁶ μετασχηματισμένων αποικιών ανά μg πλασμιδιακού DNA.

B. Μετασχηματισμός του βακτηρίου *E. coli* με τη μέθοδο CaCl₂/RbCl₂

Όταν απαιτήθηκε μεγαλύτερη απόδοση μετασχηματισμού, εφαρμόστηκε εναλλακτική διαδικασία ταυτόχρονης επίδρασης στα κύτταρα *E. coli* με κατιόντα Ca²⁺ και Rb⁺ (κατά Kushner, 1978, με επιμέρους τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου), η οποία επέτρεψε την αύξηση της απόδοσης μετασχηματισμού μέχρι 10⁷-10⁸ μετασχηματισμένες αποικίες ανά μg πλασμιδιακού DNA. Συνοπτικά, καλλιέργεια του επιθυμητού στελέχους *E. coli* σε θρεπτικό υλικό LB επωάσθηκε (1% εμβόλιο, 37°C, 180 rpm) μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm να φθάσει την τιμή 0,35. Δείγμα της καλλιέργειας (1,5 mL) φυγοκεντρήθηκε στις 12000 rpm για 1 min και αναδιαλύθηκε σε 1 mL διαλύματος I (0,01 M RbCl, 0,01 M MOPS pH 7,0). Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρωση όπως και προηγουμένως και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 mL διαλύματος II (0,01 M RbCl, 0,01 M MOPS pH 6,5, 5 mM CaCl₂). Το κυτταρικό εναιώρημα επωάσθηκε στον πάγο για τουλάχιστον 30 min, προτού φυγοκεντρηθεί ξανά προκειμένου να αναδιαλυθεί σε 200 μL διαλύματος II (το δείγμα παρέμεινε στον πάγο κατά τη διάρκεια όλων των χειρισμών). Ακολούθησε η προσθήκη 50-200 ng πλασμιδιακού DNA ή η αντίστοιχη ποσότητα των προϊόντων αντιδράσεων διασύνδεσης (ligation), σε όγκο διαλύματος που δεν ξεπερνούσε τα 20 μL, επώαση στον πάγο για 30 min, και θερμικό σοκ με μεταφορά στους 42°C για 3 min και εκ νέου τοποθέτηση στον πάγο για 3 min. Στη συνέχεια, προστέθηκε στο δείγμα 1 mL θρεπτικού υλικού LB ή εναλλακτικά ZB (σύσταση ανά λίτρο: 16 g nutrient broth, 10 g πεπτόνης, 2 g γλυκόζης και προσαρμογή του pH στην τιμή 7,5) και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 h. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επίστρωση των δειγμάτων σε τρυβλία θρεπτικού υλικού LB εμπλουτισμένου με τα κατάλληλα αντιβιοτικά για την επιλογή και X-gal όποτε ήταν απαραίτητο (βλ. πρωτόκολλο μετασχηματισμού με μέθοδο CaCl₂), τα οποία επωάσθηκαν στους 37°C για 14-16 h, μέχρι να εμφανισθούν οι μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες.

Γ. Μετασχηματισμός του βακτηρίου *A. tumefaciens* με τη μέθοδο ψύξης-απόψυξης

Για την προετοιμασία δεκτικών κυττάρων του βακτηρίου *A. tumefaciens* και τον μετασχηματισμό τους βελτιστοποιήθηκε και εφαρμόστηκε μια μέθοδος ψύξης-απόψυξης (freeze-thaw) των κυττάρων σε υγρό άζωτο, με επίδραση CaCl₂ και θερμικού σοκ (τροποποίηση από Holsters *et al.*, 1978). Η απόδοση του μετασχηματισμού με αυτήν τη διαδικασία ήταν τυπικά στο εύρος 10³-10⁴ μετασχηματισμένες αποικίες ανά μg πλασμιδιακού DNA. Για την προετοιμασία των δεκτικών κυττάρων 50 mL θρεπτικού υλικού LB εμπλουτισμένου με τα απαραίτητα αντιβιοτικά (ριφαμπικίνη σε συγκέντρωση 40 μg/mL, καρβενικιλίνη 50 μg/mL, γενταμυκίνη 40 μg/mL ή/και καναμυκίνη 50 μg/mL, ανάλογα με το στέλεχος) εμβολιάσθηκαν με αρχικό εμβόλιο 0,5% (από αρχική καλλιέργεια εμβολιασμένη με μονή αποικία του επιθυμητού στελέχους και ανεπτυγμένη στις ίδιες συνθήκες) και επωάσθηκε υπό ανάδευση (180 rpm) για 14-16 h, μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας

στα 600 nm να φθάσει την τιμή 0,6. Ακολούθως, η καλλιέργεια τοποθετήθηκε στον πάγο για 10 min, ώστε να ανασταλεί η περαιτέρω βακτηριακή αύξηση και φυγοκεντρήθηκε σε παγωμένους σωλήνες στις 4000 rpm για 8 min (στους 4°C). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα, αφού αναδιαλύθηκε σε 1 mL διαλύματος CaCl_2 20 mM (στους 4°C), διαμοιράστηκε ανά 100 μL σε παγωμένους σωλήνες τύπου Eppendorf (1,5 mL).

Για τον μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων, προστέθηκε μέχρι 1 μg πλασμιδιακού DNA (διαλυμένο σε όγκο sddH_2O που δεν ξεπερνούσε τα 20 μL) στο δείγμα, έγινε ήπια ανάμιξη του μίγματος και εισαγωγή του σε δοχείο με υγρό άζωτο για 5 min. Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφέρθηκε άμεσα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 5 min. Τότε προστέθηκε 1 mL θρεπτικού υλικού LB και ακολούθησε επώαση στους 28°C για 3-4 h (μετά την πρώτη ώρα επώασης εφαρμόστηκε ήπια ανάδευση). Τέλος, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε κατάλληλο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό LB (εμπλουτισμένο με τα απαραίτητα κατά περίπτωση αντιβιοτικά) και επώασθηκαν στους 28°C μέχρι την εμφάνιση των μετασχηματισμένων αποικιών (οι οποίες ήταν διακριτές περίπου 48 ώρες αργότερα).

Δ. Δημιουργία πρωτοπλαστών του μύκητα *V. dahliae* και μετασχηματισμός τους

Για τη διαδικασία παραγωγής πρωτοπλαστών από στελέχη του μύκητα *V. dahliae* ήταν απαραίτητη η προετοιμασία ενός διαλύματος φωσφορικών-KCl (διάλυμα I), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθεί. Αρχικά προετοιμάστηκαν διαλύματα KH_2PO_4 1/15 M (9,08 g/L) και Na_2HPO_4 1/15 M (9,46 g/L). Στη συνέχεια αναμιχθηκαν 877 mL διαλύματος KH_2PO_4 1/15 M και 123 mL διαλύματος Na_2HPO_4 1/15 M για τη δημιουργία 1 L διαλύματος φωσφορικών pH 6,0. Σε 900 mL από αυτό διαλύθηκαν περαιτέρω 44,7 g KCl, ακολούθησε ρύθμιση του pH με HCl στην τιμή 5,8 (άριστο pH για τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων – γλουκανασών – που χρησιμοποιούνται για την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των κονιδίων), και το διάλυμα συμπληρώθηκε με απεσταγμένο H_2O μέχρι τελικό όγκο 1 L (διάλυμα I).

Για την προετοιμασία πρωτοπλαστών από στελέχη του *V. dahliae* (διαδικασία προσαρμοσμένη από το πρωτόκολλο που περιγράφεται από την Πάντου, 2005), τρυβλία πλήρους θρεπτικού υλικού PDA (1-10 τρυβλία ανάλογα με τον ρυθμό κονιδιογένεσης του κάθε στελέχους) εμβολιάστηκαν με επίστρωση αραιού κονιδιακού εναιωρήματος (μέχρι 10^3 κονίδια/mL) του επιθυμητού στελέχους ή με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών και επώασθηκαν για 5-7 ημέρες στους 24°C. Στη συνέχεια, 5 mL υδατικού κονιδιακού εναιωρήματος που προετοιμάστηκε από αυτά τα τρυβλία (συγκέντρωσης τουλάχιστον 10^7 κονιδίων/mL) χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό καλλιέργειας 50 mL υγρού θρεπτικού υλικού CM, η οποία επώασθηκε υπό ανάδευση (150 rpm) για 6-8 h στους 24°C, μέχρι να διαπιστωθεί με μικροσκοπική παρατήρηση ότι η πλειοψηφία των κονιδίων βρίσκονταν στο αρχικό στάδιο της βλάστησης. Ακολούθησε συλλογή του μυκηλίου με φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, αναδιάλυση σε 30 mL διαλύματος I και – προαιρετικά – προσθήκη 0,5 mL DTT 1 M (dithiothreitol, Sigma) και επώαση υπό ήπια ανάδευση (60 rpm) για 2 h στους 30°C. Ακολούθως, το μυκήλιο φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 6000 rpm και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά ώστε να αποφευχθεί σημαντική απώλεια κονιδίων. Το μυκηλιακό ίζημα αναδιαλύθηκε εκ νέου σε 30 mL διαλύματος I, στο οποίο είχαν προστεθεί 0,5 g μίγματος υδρολυτικών ενζύμων Glucanex ή 0,1 g μίγματος υδρολυτικών ενζύμων του μύκητα *Trichoderma harzianum* (Sigma) και ακολούθησε επώαση

του μίγματος υπό ήπια ανάδευση (40 rpm) για 1-2 h στους 30°C, με μικροσκοπική παρακολούθηση της πορείας δημιουργίας πρωτοπλαστών. Όταν τουλάχιστον το 80% των κονιδίων είχε μετατραπεί σε πρωτοπλάστες, το μίγμα διηθήθηκε μέσω αποστειρωμένων φίλτρων “sintered glass” No. 1 για την απομάκρυνση τμημάτων υφών, και το διήθημα φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 10 min στους 4°C.

Για τον μετασηματισμό των πρωτοπλαστών, το διήθημα από το προηγούμενο στάδιο αναδιλύθηκε σε κατάλληλο όγκο διαλύματος II (STC: 1,2 M σορβιτόλη, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM CaCl₂) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 10⁷ πρωτοπλάστες/mL. Σε 100 μL του εναιωρήματος πρωτοπλαστών εντός σωλήνα τύπου Eppendorf (1,5 mL) προστέθηκαν μέχρι 5 μg κυκλικού ή γραμμικού DNA (αναδιαλυμένα σε όγκο που δεν ξεπερνούσε τα 50 μL) και προαιρετικά αουριντρικαρβοξυλικού οξέος (ATA: παρεμποδίζει τη δράση DNAσών) σε συγκέντρωση 2 mM. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 30 min. Στη συνέχεια, έγινε διαδοχική προσθήκη 200, 400 και 600 μL διαλύματος III (PTC: 40% PEG-6000, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM CaCl₂), με ήπια ανάδευση με αναστροφές του σωλήνα μέχρι πλήρους ανάμιξης ύστερα από την κάθε προσθήκη. Το δείγμα διατηρήθηκε στον πάγο για 20 min και στη συνέχεια αραιώθηκε με διάλυμα II μέχρι το 1,5 mL. Ακολούθησε καταβύθιση των πρωτοπλαστών με φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 10 min (στοις 4°C), και έκπλυση του ιζήματος δις με διαδοχική αναδιάλυση σε 1 mL διαλύματος II, καταβύθιση με φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκειμένου. Μετά τη δεύτερη έκπλυση το ίζημα των πρωτοπλαστών αναδιλύθηκε σε 1 mL διαλύματος II, αναμίχθηκε με 4 mL θεραπευτικού υλικού TRA σε θερμοκρασία 48°C και επιστρώθηκε σε τρυβλία αναγέννησης (με στερεό θεραπευτικό υλικό BRA). Τα τρυβλία επώασθησαν για 24 h στους 24°C πριν την προσθήκη του κατάλληλου παράγοντα επιλογής (συνήθως υδρομυκίνη B σε συγκέντρωση 50 μg/mL ή γενετισίνη – G418 – 100 μg/mL) με την ανάμιξη σε 4 mL προθερμασμένου (στοις 48°C) άγαρ 1,0% και επίστρωση στα τρυβλία. Εναλλακτικά, όταν για τον μετασηματισμό χρησιμοποιούνταν αυξότροφα στελέχη και η επιλογή βασιζόταν στην αποκατάσταση της πρωτοτροφίας, η επίστρωση γινόταν σε ελάχιστο θεραπευτικό υλικό (MM) χωρίς την προσθήκη παράγοντα επιλογής. Ακολούθησε επώαση στους 24°C για περίπου 5 ημέρες, οπότε ήταν ορατές οι μετασηματισμένες αποικίες του μύκητα, οι οποίες σχημάτιζαν εναέριο μυκήλιο πάνω από το στρώμα του παράγοντα επιλογής.

E. Μετασηματισμός του μύκητα *V. dahliae* με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)

Για τον μετασηματισμό του μύκητα *V. dahliae* με την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης προετοιμάστηκε και επώασθηκε υγρή καλλιέργεια του μύκητα με τον τρόπο που περιγράφεται στο πρωτόκολλο δημιουργίας πρωτοπλαστών. Όταν η πλειοψηφία των κονιδίων βρισκόταν στο αρχικό στάδιο της βλάστησης, γινόταν διακοπή της επώασης και τρεις διαδοχικές εκπλύσεις των κονιδίων με διάλυμα σορβιτόλης 1 M σε θερμοκρασία 4°C (σε κάθε επανάληψη γινόταν φυγοκέντρηση του κονιδιακού εναιωρήματος στις 6000 rpm για 10 min στους 4°C, απόρριψη του υπερκειμένου και αναδιάλυση σε κατάλληλο όγκο διαλύματος σορβιτόλης 1 M, ώστε η τελική συγκέντρωση του εναιωρήματος να είναι τουλάχιστον 10⁷ κονίδια/mL). Παράλληλα, γινόταν προετοιμασία του επιθυμητού κυκλικού ή γραμμικού DNA, πλήρης απομάκρυνση των αλάτων κατά τον καθαρισμό του, με στήλες NucleoSpin Extract II ή Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel), και έκλουσή του σε 15 μL sddH₂O (με pH προσαρμοσμένο στην τιμή 7,5). Ακολούθησε προσθήκη του DNA

(τουλάχιστον 2 μg) σε 50 μL κονιδιακού εναιωρήματος σε σωλήνα τύπου Eppendorf (1,5 mL), ανάμιξη και επώαση στον πάγο για 15 min. Στη συνέχεια, το μίγμα μεταφέρθηκε σε παγωμένη κυβέττα ηλεκτροδιάτρησης (0,1 cm) και εφαρμόστηκαν παλμοί ηλεκτρικού ρεύματος, σε διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης BTX Electro Cell Manipulator 600 (διαφορετικοί συνδυασμοί ρυθμίσεων τάσης, αντίστασης, χωρητικότητας). Αμέσως μετά προστέθηκαν στο δείγμα 1 mL διαλύματος σορβιτόλης 1 M θερμοκρασίας 4°C και το δείγμα διατηρήθηκε στον πάγο για 15 min. Ακολούθησε επίστρωση δειγμάτων του μίγματος σε τρυβλία PDA ή MM, ανάλογα με τον τύπο της επιλογής του μετασχηματισμού, και η διαδικασία για την επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών που περιγράφεται αναλυτικά στο πρωτόκολλο μετασχηματισμού των πρωτοπλαστών.

Εναλλακτικά, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροδιάτρηση με την ίδια διαδικασία σε κονίδια στελεχών του *V. dahliae* που δεν είχαν βλαστήσει, αμέσως μετά τη συλλογή τους από τις αποικίες του μύκητα, αλλά και σε πρωτοπλάστες που είχαν δημιουργηθεί με τη διαδικασία που περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο.

ΣΤ. *Μετασχηματισμός του μύκητα V. dahliae μέσω του βακτηρίου A. tumefaciens (Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation, ATMT)*

Για τον μετασχηματισμό του μύκητα *V. dahliae* μέσω του βακτηρίου *A. tumefaciens* χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *A. tumefaciens* AGL-1, EHA101 και GV3101::pMP90, μετασχηματισμένα με τον κατάλληλο κατά περίπτωση δυαδικό (binary) φορέα DNA, σχεδιασμένο για γονιδιακή έκφραση στον μύκητα κατόπιν ενσωμάτωσης του T-DNA στο γονιδίωμα του μύκητα ή για στοχευμένη γονιδιακή απενεργοποίηση μέσω διπλού ομόλογου επιχιασμού. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση των διαδικασιών που περιγράφονται από τους Mullins *et al.* (2001) και Santhanam (2012). Αρχικά, μονή αποικία από φρέσκο τρυβλίο LB εμπλουτισμένο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά (χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση ριφαμπικίνη σε συγκέντρωση 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, καρβενικιλίνη 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, γενταμυκίνη 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, καναμυκίνη 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ή/και σπεκτινομυκίνη 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) του επιθυμητού στελέχους *A. tumefaciens* χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό καλλιέργειας 10 mL θρεπτικού υλικού MM (με το αντιβιοτικό στο οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα το επιθυμητό πλασμίδιο), η οποία επώασθηκε για τουλάχιστον 36 h στους 28°C υπό ανακίνηση (στις 200 rpm). Ακολούθησε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (5000 rpm για 5 min) και αναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε θρεπτικό μέσο επαγωγής (IM) ώστε η οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος στα 600 nm να έχει την τιμή $\text{OD}=0,15$. Η νέα καλλιέργεια επώασθηκε για τουλάχιστον 6 h στους 28°C στις 250 rpm (τελική τιμή οπτικής πυκνότητας $\text{OD}_{600}=0,3$). Παράλληλα, κονιδιακό εναιώρημα συγκέντρωσης περίπου 10^6 κονιδίων/mL προετοιμάστηκε από φρέσκια καλλιέργεια σε τρυβλίο PDA (ηλικίας 5 ημερών) του επιθυμητού στελέχους του μύκητα *V. dahliae*, και εκπλύθηκε με απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό κατόπιν φυγοκέντρησης στις 4000 rpm για 10 min (ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 10^6 κονίδια/mL). Ακολούθησε ανάμιξη ίσων όγκων καλλιέργειας *A. tumefaciens* και εναιωρήματος κονιδίων, και 200 μL από αυτό το μίγμα επιστρώθηκαν σε αποστειρωμένο φίλτρο Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences) που είχε τοποθετηθεί σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό IM, προτού επωασθούν για 48 h στους 24°C. Στη συνέχεια, το φίλτρο μεταφέρθηκε σε θρεπτικό υλικό επιλογής (PDA εμπλουτισμένο με υγρομυκίνη B σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ή γενετισίνη, G418, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για την επιλογή των

μετασηματισμένων αποικιών, και σεφοταξίμη, cefotaxime, 200 µg/mL ή timentin – ένα εμπορικό μίγμα τικαρσιλίνης και κλαβουλανικού οξέος – στην ίδια συγκέντρωση, για την εξάλειψη της βακτηριακής αύξησης). Το τρυβλίο επιλογής επωάσθηκε στους 24°C μέχρι την εμφάνιση μετασηματισμένων αποικιών (οι οποίες ήταν ορατές περίπου 1 εβδομάδα αργότερα).

2.7.16 Σάρωση φαγικής γονιδιακής βιβλιοθήκης

A. Προετοιμασία κυττάρων δεκτικών στη μόλυνση από τον φάγο λ

Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 20 mL θρεπτικού υλικού LB+ με μονή αποικία του βακτηριακού στελέχους *E. coli* LE392. Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε υπό ανάδευση στις 180 rpm στους 37°C για 4-5 h, φυγοκεντρήθηκε στις 3000 στροφές για 15 min (στους 4°C) και το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύθηκε σε 0,4 όγκου διαλύματος MgSO₄ 10 mM ώστε η οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος στα 600 nm να φθάσει την τιμή 2,0. Το εναιώρημα των συγκεντρωμένων κυττάρων διατηρήθηκε στους 4°C για διάστημα μέχρι 5 ημερών.

B. Τιτλοδότηση της φαγικής βιβλιοθήκης

Κατόπιν της προετοιμασίας δεκαδικών αραιώσεων της φαγικής βιβλιοθήκης σε διάλυμα SM (10 mM MgSO₄, 0,01% gelatin, 0,1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5), προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες από τις διαφορετικές αραιώσεις σε 100 µL συγκεντρωμένων κυττάρων έκαστη και επωάσθηκαν στους 37°C για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κάθε μίγμα 4 mL θρεπτικού υλικού LB+ (με συγκέντρωση άγαρ 0,7%) θερμοκρασίας 47 °C, έγινε ανάμιξη και επίστρωση στα τρυβλία τιτλοδότησης που περιείχαν το ίδιο θρεπτικό υλικό με συγκέντρωση άγαρ 1,5%. Ακολούθησε επώαση στους 37°C μέχρι την εμφάνιση των φαγικών πλακών (4-6 h) και έγινε καταμέτρηση του αριθμού των πλακών σε κάθε τρυβλίο, ώστε να υπολογισθεί ο τίτλος της βιβλιοθήκης σε pfu (plaque forming units) / mL βιβλιοθήκης.

Γ. Επίστρωση της φαγικής βιβλιοθήκης

Σε κάθε τρυβλίο διαμέτρου 150 mm επιστρώθηκαν 35000 pfu με την ίδια διαδικασία που εφαρμόσθηκε κατά την τιτλοδότηση, με τη διαφορά ότι στο θρεπτικό υλικό επίστρωσης το άγαρ αντικαταστάθηκε από αγαρόζη συγκέντρωσης 0,7%. Τα τρυβλία επωάσθηκαν στους 37°C για 6 h περίπου, μέχρι να εμφανιστούν διακριτές πλάκες. Τα τρυβλία διατηρήθηκαν στους 4°C για τουλάχιστον 1-2 h πριν την εφαρμογή των μεμβρανών.

Δ. Εφαρμογή μεμβρανών υβριδισμού – στερέωση των φάγων

Η σάρωση της βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε με χρήση θετικά φορτισμένης μεμβράνης νάυλον Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences). Μετά τη μεταφορά των φάγων στις μεμβράνες με εφαρμογή τους στην επιφάνεια των τρυβλίων και αργή απομάκρυνσή τους, τα μεν τρυβλία διατηρήθηκαν στους 4°C, οι δε μεμβράνες επώασθηκαν διαδοχικά σε διάλυμα αποδιάταξης (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), διάλυμα εξουδετέρωσης (3 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7,4) και διάλυμα έκπλυσης (3 M NaCl, 0,3 M κιτρικό νάτριο, pH 7,2) με εμβάπτιση στο κάθε διάλυμα για 15 min, και στη συνέχεια αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσουν πλήρως. Για τη μόνιμη στερέωση του φαγικού DNA στις μεμβράνες, η πλευρά τους που είχε έρθει σε επαφή με την επιφάνεια των τρυβλίων εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV για 3 min.

Ε. Επιλογή και επιβεβαίωση των θετικών πλακών

Κατόπιν του υβριδισμού των μεμβρανών με τον επιθυμητό ιχνηθέτη DNA (βλ. αντίστοιχη παράγραφο για τη διαδικασία) και την ευθυγράμμιση των θετικών σημάτων με τα αρχικά τρυβλία, αποκόπηκαν από τα τρυβλία οι περιοχές άγαρ/αγαρόζης που περιελάμβαναν τις αντίστοιχες φαγικές πλάκες, με τη χρήση κομμένων ακροφυσίων μικροπιπέττας (του 1 mL), και μεταφέρθηκαν έκαστη σε 1 mL διαλύματος SM με την προσθήκη 1-2 σταγόνων χλωροφορμίου. Η έκλυση των φάγων από το τμήμα άγαρ/αγαρόζης στο διάλυμα έγινε υπό ανάδευση στους 4°C για τουλάχιστον 4 h. Με νέα τιτλοδότηση υπολογίστηκε πως κάθε πλάκα απελευθέρωσε στο διάλυμα περίπου 10^6 - 10^7 φάγους. Όλη η διαδικασία σάρωσης της γονιδιακής βιβλιοθήκης επαναλήφθηκε τουλάχιστον μία φορά ξεκινώντας από τις καθαρισμένες φαγικές πλάκες και με διαδοχικά μικρότερες συγκεντρώσεις φάγων στα τρυβλία επίστρωσης, μέχρι να καταστεί εφικτή η απομόνωση μοναδιαίων πλακών.

Για την επιβεβαίωση των θετικών σημάτων, από το κάθε φαγικό εναιώρημα ελήφθησαν 50 μL και επώασθηκαν για 1 min στους 95°C. Από αυτά, 5 μL χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα DNA σε αντιδράσεις PCR τελικού όγκου 25 μL (βλ. αντίστοιχη παράγραφο για τη διαδικασία), με εκκινητές ειδικούς για την επιθυμητή γονιδιωματική περιοχή. Από τους απομονωμένους φάγους των οποίων το θετικό σήμα επιβεβαιώθηκε με ανάλυση PCR, απομονώθηκε φαγικό DNA, το οποίο υποβλήθηκε περαιτέρω σε περιοριστική ανάλυση για την απομόνωση του τμήματος DNA που περιείχε την επιθυμητή περιοχή.

2.7.17 Στύπωμα (blotting) κατά Southern

Η μεταφορά κατά Southern ζωνών DNA από πήκτωμα αγαρόζης σε μεμβράνη υβριδισμού (βλ. αντίστοιχη παράγραφο για την περαιτέρω διαδικασία υβριδισμού DNA) πραγματοποιήθηκε υπό κενό (vacuum blotting) με τη συσκευή VacuGene Pump (Pharmacia), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μεταφορά έγινε από πήκτώματα αγαρόζης συγκέντρωσης 0,8% και με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x, στα οποία τουλάχιστον 1 μg ανά δείγμα ολικού DNA μύκητα ή φάγου (κατόπιν πέψης του με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα, αδρανοποίηση των ενζύμων και καθαρισμό της αντίδρασης) είχε ηλεκτροφορηθεί σε

χαμηλή τάση (κατά κανόνα μικρότερη από 2 V/cm μεταξύ των ηλεκτροδίων της ηλεκτροφορητικής συσκευής), ώστε να επιτευχθεί ο βέλτιστος διαχωρισμός των ζωνών DNA. Κατόπιν του τέλους της ηλεκτροφόρησης, και πριν τη μεταφορά των ζωνών του DNA στη μεμβράνη υβριδισμού, το πήκτωμα εμβαπτίσθηκε διαδοχικά σε όξινο διάλυμα αποπουρινοποίησης (διάλυμα I: 0,25 M HCl), σε αλκαλικό διάλυμα αποδιάταξης (διάλυμα II: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) και σε εξισορροπητικό διάλυμα (διάλυμα III: 0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 3 M NaCl), επωαζόμενο για 7-10 min στο καθένα. Κατόπιν αυτής της επεξεργασίας, η μεταφορά του DNA στη μεμβράνη υβριδισμού πραγματοποιήθηκε υπό κενό με την επίδραση του διαλύματος αλάτων (SSC 20x: 3 M NaCl, 0,3 M κιτρικό νάτριο, pH 7,0) για 1 h. Ακολούθησε εμβάπτιση της μεμβράνης σε διάλυμα SSC 2x για 10 min (στατικά, σε θερμοκρασία δωματίου), στέγνωμα στους 37°C και ομοιοπολική διασύνδεση των μορίων DNA στη μεμβράνη με έκθεση σε ακτινοβολία UV για 3 min.

2.7.18 Υβριδισμοί DNA

Για τα πειράματα υβριδισμών DNA χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, υβριδισμοί με ραδιενεργά σημασμένους ιχνηθέτες DNA (DNA probes) και με ιχνηθέτες σημασμένους με το μη ραδιενεργό σύστημα της διγοξυγενίνης/αλκαλικής φωσφατάσης (DIG, Roche). Ακολούθως παρατίθεται συνοπτικά η πειραματική διαδικασία.

A. Σήμανση των μορίων DNA – ιχνηθετών (probes)

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σήμανση ιχνηθετών DNA με το σύστημα DIG (Roche) εφαρμόστηκε η μέθοδος αντιγραφής του επιθυμητού τμήματος DNA-μήτρας από το ένζυμο Klenow παρουσία τυχαίων εξαμερών (primers) και του τροποποιημένου νουκλεοτιδίου DIG-dUTP, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αντίδραση σήμανσης χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 μg απομονωμένου και καθαρισμένου επιθυμητού DNA. Η εκτίμηση της απόδοσης της αντίδρασης σήμανσης και η υπόλοιπη διαδικασία του υβριδισμού DNA πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Roche). Στις επόμενες παραγράφους θα περιγραφεί αναλυτικά η εναλλακτική διαδικασία υβριδισμών DNA με ραδιενεργά σημασμένους ιχνηθέτες.

Προκειμένου να γίνει ραδιενεργή σήμανση ιχνηθετών DNA εφαρμόστηκε η μέθοδος των τυχαίων δεκαμερών, παρουσία ραδιενεργής τριφωσφορικής δεοξυκυτιδίνης [α - 32 P]dCTP (3000Ci/mMol) και με το High Prime Labeling kit (Roche). Πριν από τη διαδικασία σήμανσης η ραδιενεργή δεοξυκυτιδίνη είχε λάβει τη θερμοκρασία δωματίου, πίσω από το απαραίτητο προστατευτικό κάλυμμα, και 100 ng του προς σήμανση DNA είχαν αναδιαλυθεί σε 12 μL sddH₂O. Ακολούθησε αποδιάταξη του DNA με βρασμό για 10 min και γρήγορη ψύξη σε πάγο/αιθανόλη (0°C) για 2 min. Στη συνέχεια, έγινε ανάμιξη 12 μL αποδιαταγμένου DNA (100 ng), 4 μL του διαλύματος High Prime Solution (Roche) και 4 μL 40μCi [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mMol) (από αυτό το στάδιο κι έπειτα όλα τα βήματα πραγματοποιήθηκαν πίσω από το προστατευτικό κάλυμμα, με λήψη των απαραίτητων μέτρων ασφάλειας). Το δείγμα επώασθηκε στους 37°C για 1 h, πριν την προσθήκη 2 μL 0,2 M EDTA (pH 8,0) και εκ νέου επώαση στους 65°C για 10 min. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των μη

ενσωματωμένων ραδιενεργών νουκλεοτιδίων με τη χρήση του Qiaquick Nucleotide Removal kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

B. Πρόπλυση, προϋβριδισμός και υβριδισμός των μεμβρανών

Η πρόπλυση των μεμβρανών υβριδισμού έγινε υπό ανάδευση (σε κατάλληλο θάλαμο υβριδισμών Hybaid) στους 42°C για 2 h με διάλυμα πρόπλυσης (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS), και ακολούθησε προϋβριδισμός σε 30 mL διαλύματος CHURCH (0,5 M NaP*, 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA pH 8,0) για τουλάχιστον 1 h στη θερμοκρασία του υβριδισμού. Ακολούθησε προσθήκη του ιχνηθέτη DNA στο ίδιο διάλυμα, αφού πρώτα αυτός είχε αποδιαταχθεί με βρασμό για 5 min και γρήγορη ψύξη σε πάγο/αιθανόλη (0°C). Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε στους 68°C για ομόλογους ιχνηθέτες και τους 62°C για ετερόλους ιχνηθέτες, για 14-16 h.

* Σύσταση διαλύματος NaP: 1 M Na₂HPO₄, 1,2% H₃PO₄.

Γ. Εκπλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας του ιχνηθέτη

Εφαρμόστηκαν τουλάχιστον 3 εκπλύσεις των μεμβρανών: α) έκπλυση με το διάλυμα CHURCH A (5% SDS, 40 mM NaP, 1 mM EDTA pH 8,0) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, β) έκπλυση με το διάλυμα CHURCH A για 15 min στη θερμοκρασία του υβριδισμού, και γ) έκπλυση με το διάλυμα CHURCH B (1% SDS, 40 mM NaP, 1 mM EDTA pH 8,0) για 30 min στη θερμοκρασία του υβριδισμού. Στις περιπτώσεις που μετά από την τρίτη έκπλυση εξακολουθούσαν να ανιχνεύονται πολλές μη εστιασμένες κρούσεις από την επιφάνεια της μεμβράνης με τον μετρητή Geiger (υψηλό υπόβαθρο), επαναλαμβάνονταν η τελευταία έκπλυση.

Δ. Ανίχνευση σήματος στις μεμβράνες υβριδισμού

Η ανίχνευση του ραδιενεργού σήματος πραγματοποιήθηκε με αυτοραδιογραφική έκθεση των μεμβρανών σε φιλμ ακτίνων X, σε κασέτες με ειδικές πλάκες ενίσχυσης του ραδιενεργού σήματος. Η έκθεση διήρκεσε κατά περίπτωση από 1 ημέρα έως 1 εβδομάδα, ενώ η εμφάνιση των φιλμ έγινε με κλασικές εμφανιστικές μεθόδους (διαδοχική εμφάπτιση για 3 min σε διάλυμα developer, σύντομη έκπλυση σε νερό, 3 min σε διάλυμα fixer, σύντομη έκπλυση σε νερό) σε σκοτεινό θάλαμο.

2.7.19 Προσδιορισμός πρωτοταγούς αλληλουχίας DNA (αλληλούχηση)

Η αλληλούχηση (sequencing) κλώνων DNA πραγματοποιήθηκε σε έναν αυτόματο αλληλουχητή LI-COR DNA Analyzer IR² (LI-COR Biosciences), ενώ για την προετοιμασία των αντιδράσεων αλληλούχησης χρησιμοποιήθηκε το SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (Epicentre Biotechnologies) και τα κατάλληλα σημασμένα (με τις

φθορίζουσες ομάδες IRD-700/-800) ολιγονουκλεοτίδια. Η αλληλούχηση των κλωνοποιημένων τμημάτων στους φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με χρήση καθολικών σημασμένων εκκινητών (M13 forward, reverse). Για όλες τις αντιδράσεις έγινε αλληλούχηση και των δύο αλυσίδων του DNA, για τη βέλτιστη ακρίβεια των αλληλουχιών.

2.8 Στατιστικές και βιοπληροφορικές αναλύσεις

2.8.1 Στατιστικές αναλύσεις

Ο έλεγχος στατιστικής σημαντικότητας διαφορών στη μέση τιμή παραμέτρων μεταξύ δύο ή περισσότερων ομάδων στελεχών πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή κατάλληλων στατιστικών δοκιμασιών στο λογισμικό SPSS Statistics 20 (IBM Corporation). Πριν τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κανονικότητας (normality) της κατανομής των δεδομένων με τις δοκιμασίες Kolmogorov-Smirnov και Shapiro-Wilk, με τη συνεκτίμηση των τιμών ασυμμετρίας (skewness) και κύρτωσης (kurtosis) της κατανομής, και με οπτική εξέταση της γραμμικότητας σε διαγράμματα P-P (probability-probability) και Q-Q (quantile-quantile). Για όσα σύνολα δεδομένων χαρακτηρίζονταν από κανονική κατανομή και δεν παραβίαζαν την υπόθεση ίσων διακυμάνσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία Levene (Levene, 1960), οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμασία *t* (Student's *t* test) για τις διχοτομικές ανεξάρτητες μεταβλητές και τη δοκιμασία ANOVA μονής κατεύθυνσης (one-way analysis of variance) για τις μεταβλητές με περισσότερες των 2 ομάδων. Τα σύνολα δεδομένων που δεν ικανοποιούσαν τις παραπάνω προϋποθέσεις υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τις μη παραμετρικές διαδικασίες Mann-Whitney U (Fagerland & Sandvik, 2009) και Kruskal-Wallis H (Kruskal & Wallis, 1952), αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών ANOVA και Kruskal-Wallis H ελέγχθηκαν περαιτέρω με τις *post hoc* δοκιμασίες Tukey's HSD και Bonferroni (για ίσες διακυμάνσεις) και Dunnett's T3 (για ανόμοιες διακυμάνσεις).

2.8.2 Ανάλυση ομάδων (cluster analysis)

Για την ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης (hierarchical cluster analysis) και τη δημιουργία αντίστοιχων δενδρογραμμμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS Software 20, με το κριτήριο ελάχιστης διακύμανσης του Ward (Everitt *et al.*, 2001) ως τη μέθοδο ομαδοποίησης και την τετραγωνική Ευκλείδεια απόσταση ως το μέτρο των αποστάσεων.

2.8.3 Χαρακτηρισμός και πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής εσωνίων

Τα εσώνια που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία ονοματίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες ονοματολογίας που πρότειναν οι Johansen & Haugen (2001), και η θέση εισδοχής τους καθορίστηκε με αναφορά στην αλληλουχία του γονιδίου SSU-rRNA του βακτηρίου *E. coli* (κωδικός αριθμός στη βάση δεδομένων NCBI GenBank: AB035922). Η πρόβλεψη της

δευτεροταγούς δομής των εσωνίων βασίστηκε στο λογισμικό πρόβλεψης διπλώματος του RNA, *mfold* (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>; Zuker, 2003), με εφαρμογή των γενικά αποδεκτών περιορισμών και συμβάσεων για τα εσώνια τύπου I (Michel & Westhof, 1990; Cech *et al.*, 1994; Cannone *et al.*, 2002; Li & Zhang, 2005). Για την ακριβή ανίχνευση των ελίκων P1 και P10 των δομών των εσωνίων, μέρος της αλληλουχίας των γειτονικών γονιδιακών περιοχών (εξωνίων) συμπεριελήφθη στα μοντέλα. Οι πλέον πιθανές δομές σχεδιάστηκαν τελικά με το γραφιστικό λογισμικό CorelDRAW Graphics Suite X6 (Corel Corporation).

2.8.4 Πρόβλεψη πρωτεϊνικών ιδιοτήτων και τριτοταγών πρωτεϊνικών δομών

Η αναζήτηση πεπτιδικών σινιάλων σε αμινοξικές ακολουθίες πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; Petersen *et al.*, 2011), ενώ για την πρόβλεψη διαμεμβρανικών περιοχών και αντίστοιχων τοπολογιών χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>; Buchan *et al.*, 2013), αλγόριθμος MEMSAT-SVM (Nugent *et al.*, 2009). Η πρόβλεψη δευτεροταγών δομών πολυπεπτιδικών αλυσίδων έγινε με τα λογισμικά Quick2D (http://toolkit.lmb.uni-muenchen.de/quick2_d; Biegert *et al.*, 2006) και PSIPRED. Για τη δομική μοντελοποίηση πρωτεϊνών βάσει ομολογίας (homology modeling) χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή HHPred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>; Söding *et al.*, 2005) και ο αλγόριθμος MODELLER 9.12 (<http://salilab.org/modeller>; Eswar *et al.*, 2007), ενώ η οπτικοποίηση και περαιτέρω μελέτη των τρισδιάστατων πρωτεϊνικών δομών έγιναν με το πρόγραμμα PyMol v1.6 (<http://www.pymol.org>).

2.8.5 Ανάλυση πρωτοταγών αλληλουχιών DNA και πρωτεϊνών *in silico*

Ο χειρισμός αλληλουχιών, η πρόβλεψη ORFs, η μετάφραση κωδικών περιοχών *in silico*, η «συναρμολόγηση» (assembly), ο σχεδιασμός εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων για τυπικές αναλύσεις PCR, η περιοριστική ανάλυση τμημάτων DNA *in silico* και η δομική μελέτη αλληλουχιών (π.χ. εντοπισμός ευθέων και ανεστραμμένων επαναλήψεων) πραγματοποιήθηκαν κυρίως με τα προγράμματα EditSeq, SeqMan, MegAlign, PrimerSelect, SeqBuilder και GeneQuest του πακέτου λογισμικού ανάλυσης αλληλουχιών Lasergene 8 (DNASTar). Οι εκκινητές για τις αναλύσεις qPCR σχεδιάστηκαν με τα προγράμματα *PrimerQuest* (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>, Integrated DNA Technologies) και *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, Untergasser *et al.*, 2007), και υποβλήθηκαν σε έλεγχο *in silico* σύμφωνα με τα κριτήρια που περιγράφονται από τους D'haene *et al.* (2010), ενώ τα αποτελέσματα των αναλύσεων qPCR υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το λογισμικό MxPro QPCR software (Stratagene, Agilent Technologies). Ο έλεγχος και η διόρθωση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκαν στο πρόγραμμα e-Seq v2.0 (LI-COR Biosciences). Η σύγκριση των αλληλουχιών με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων έγινε με τους αλγόριθμους BLAST 2.2.27+ (Altschul *et al.*, 1997) του NCBI (2013) και της βάσης δεδομένων του Broad Institute (2013). Οι πολλαπλές στοιχίσεις νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

και αμινοξικών ακολουθιών πραγματοποιήθηκαν με τους αλγόριθμους ClustalW και MUSCLE, με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους τους, στο λογισμικό MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011), κατόπιν διόρθωσης όπου αυτό ήταν απαραίτητο. Η αναζήτηση πρωτεϊνικών μοτίβων σε αμινοξικές ακολουθίες έγινε με τη μηχανή αναζήτησης της βάσης δεδομένων Pfam 27.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk>; Punta *et al.*, 2012).

2.8.6 Φυλογενετικές αναλύσεις

Οι φυλογενετικές αναλύσεις βασίστηκαν σε πολλαπλές στοιχίσεις αλληλουχιών DNA με τους αλγόριθμους ClustalW και MUSCLE, με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους τους, στο φυλογενετικό λογισμικό MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011), κατόπιν διόρθωσης όπου αυτό ήταν απαραίτητο. Τα κενά των στοιχίσεων θεωρήθηκαν απόντα στοιχεία και παραλείφθηκαν από την ανάλυση. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood, ML) στο πρόγραμμα MEGA 5.05, και με την ανάλυση Bayes (Bayesian inference, BI) στο πρόγραμμα MrBayes 3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2012). Τα αποτελέσματα του πληροφοριακού κριτηρίου Bayes (Bayesian information criterion) και του διορθωμένου πληροφοριακού κριτηρίου Akaike (corrected Akaike information criterion) συνεκτιμήθηκαν για την επιλογή του βέλτιστου μοντέλου αντικατάστασης (substitution model) για τα νουκλεοτιδικά σύνολα δεδομένων κατά την ανάλυση ML (μοντέλο τριών παραμέτρων Tamura με σταθερές θέσεις) στο πρόγραμμα MEGA 5.05. Η αξιοπιστία των τοπολογιών των δένδρων ML εκτιμήθηκε με ανάλυση bootstrap βάσει 1000 επαναλήψεων (Felsenstein, 1985). Στη μέθοδο BI χρησιμοποιήθηκαν τυχαία αρχικά δένδρα και η περίοδος προσαρμογής (burn-in) ορίστηκε στις 500000 γενιές, καθώς αυτή ήταν σαφώς επαρκής για να συγκλίνουν οι παράμετροι της πιθανότητας και του μοντέλου. Κατόπιν της περιόδου προσαρμογής, ακολούθησε δειγματοληψία 15001 δένδρων (κάθε 100 κύκλους) από την κατανομή της εκ των υστέρων πιθανότητας (posterior probability) κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας (1500000 γενιές). Δύο ανεξάρτητες αναζητήσεις MCMCMC (Metropolis-Coupled Markov Chain Monte Carlo) διεξήχθησαν ξεκινώντας από διαφορετικά τυχαία σημεία.

3. Αποτελέσματα

3.1 Πληθυσμιακές αναλύσεις των Ομάδων Βλαστητικής Συμβατότητας (VCGs) του μύκητα *V. dahliae*

3.1.1 Κατάταξη σε VCGs ενός πληθυσμού στελεχών *V. dahliae* από την Κρήτη

Ένας πληθυσμός 69 στελεχών του μύκητα *V. dahliae* από πολυάριθμους καλλιεργούμενους και αυτοφυείς ξενιστές σε διάφορες περιοχές της Κρήτης (στελέχη με έντονους χαρακτήρες στον Πίνακα **3.1**, περισσότερες πληροφορίες στον Πίνακα **2.1**) αναλύθηκε ως προς τη δομή του στο επίπεδο των VCGs. Η κατάταξη των στελεχών σε VCGs πραγματοποιήθηκε με τη μεθοδολογία των δοκιμασιών συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών *nit* σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Από το σύνολο των στελεχών απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν 586 μεταλλαγές *nit*, με την πλειοψηφία να εντάσσεται στις κλάσεις *nit1* (52,5% του συνόλου) και *nitM* (45,1%), ενώ οι μεταλλαγές *nit3* ήταν σημαντικά σπανιότερες (2,4%). Οι δοκιμασίες ελέγχου μεταξύ συμπληρωματικών μεταλλαγών του ίδιου στελέχους χαρακτηρίστηκαν από θετικές αντιδράσεις σε όλες τις περιπτώσεις. Οι «διασταυρώσεις» με τα διεθνή στελέχη ελέγχου των VCGs επέτρεψαν την κατάταξη του πληθυσμού στις VCGs 2A (12 στελέχη), 2B (15 στελέχη) και 4B (42 στελέχη) (Πίνακας **3.1**). Κανένα στέλεχος δεν κατατάχθηκε στις VCGs 1, 3, 4A ή 6.

Είναι αξιοσημείωτο πως μόνον 20 από τα 69 στελέχη αντέδρασαν θετικά με τα στελέχη ελέγχου μίας μόνον VCG. Για τα υπόλοιπα 49 στελέχη (71,0% του συνόλου) καταγράφηκαν συστηματικά θετικές αντιδράσεις ποικίλου βαθμού πρωτότροφης αύξησης με τα στελέχη ελέγχου περισσότερων της μίας VCGs (σε τουλάχιστον 5 επαναλήψεις για κάθε τέτοια περίπτωση). Η κατάταξη αυτών των στελεχών βασίστηκε στην εντονότερη θετική αντίδραση (μέγιστη πυκνότητα εναέριου μυκηλίου και μέγιστο τάχος αύξησης του υποτιθέμενου ετεροκαρού), ενώ οι υπόλοιπες «ασθενέστερες» αλληλεπιδράσεις καταγράφηκαν ως επιπλέον δευτερεύουσες αντιδράσεις με άλλες VCGs (Πίνακας **3.1**).

Στον πληθυσμό των 69 στελεχών *V. dahliae* από την Κρήτη προστέθηκαν 15 διεθνή στελέχη ελέγχου όλων των VCGs (Πίνακας **3.1**) και ακολούθησε σύγκριση της κατάταξης των 84 στελεχών σε VCGs με το προφίλ παθογονικότητάς τους (παθότυποι, φυλές ως προς την τομάτα, μολυσματικότητα σε διάφορους ξενιστές· τα φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά διερευνήθηκαν από τον Δρ. Ε. Λιγοξυγκάκη στο πλαίσιο ερευνητικής συνεργασίας μας, Πίνακας **3.1** και Παράρτημα **1**). Οι αναλύσεις αποκάλυψαν πως τα μέλη της VCG 2B ήταν περισσότερο μολυσματικά στην πιπεριά σε σχέση με τις VCGs 2A και 4B. Όλα τα στελέχη που μόλυναν την πιπεριά κατατάχθηκαν στη VCG 2B. Ως εκ τούτου, αυτή ήταν η μοναδική VCG που περιελάμβανε στελέχη και των τεσσάρων παθοτύπων (τομάτας, μελιτζάνας, πιπεριάς, τομάτας-πιπεριάς). Η VCG 2A περιελάμβανε αποκλειστικά στελέχη του παθότυπου τομάτας, ενώ η VCG 4B περιείχε στελέχη των παθοτύπων τομάτας και μελιτζάνας. Όσον αφορά την κατανομή στελεχών των φυλών 1 και 2 ως προς την τομάτα, η φυλή 2 ήταν σημαντικά συχνότερη μεταξύ των μελών της VCG 4B, ενώ η φυλή 1 κυριαρχούσε στις VCGs 2A και 2B (Παράρτημα **2**).

Πίνακας 3.1												
Κατάταξη σε VCGs και μοριακός χαρακτηρισμός (μοριακοί δείκτες PCR και ITS2-SNP) των στελεχών <i>Verticillium</i> , σε σύγκριση με τα φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους (παθότυποι, φυλές ως προς την τομάτα) (περισσότερες πληροφορίες για τα στελέχη παρατίθενται στον Πίνακα 2.1)												
Στέλεχος ^α	VCG ^β	Δείκτες PCR ^γ				ITS2-SNP	Δείκτες PCR ^δ				Παθό- τυπος ^ε	Φυλή τομάτας
		M1	M2	M3	M4		E10-RAPD	Tr	Tm	35		
<i>V. dahliae</i>												
T9 ^{στ}	1A	I	+	-	-	C	-	-	-	-	M	ΔΜ ^ζ
cot201 ^{στ}	1	I	-	-	-	C	-	+	+	+	T	1
Dvd-T5 ^{στ}	2A	II	-	-	+	A	+	+	+	+	T	1
PH ^{στ}	2A	II	-	-	+	A	-	-	+	+	T	1
98-1 ^{στ}	2A	II	-	-	+	A	-	+	+	+	T	1
113-1 ^{στ}	2A	II	-	-	+	A	-	+	+	+	T	1
140-2 ^{στ}	2A	II	-	-	+	A	-	+	+	+	T	2
164-1 ^{στ}	2A	II	-	-	+	A	-	+	+	+	T	1
179-4 ^{στ}	2A	II	-	-	+	A	-	+	+	+	T	1
247b-3 ^{στ}	2A	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
136-1 ^{στ}	2A (2B)	II	-	-	+	A	-	+	+	+	T	1
136-3 ^{στ}	2A (2B)	II	-	-	+	A	-	+	+	+	T	1
998-1 ^{στ}	2A (2B, 4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
116-1 ^{στ}	2A (2B, 4B)	II	-	-	+	A	-	+	+	+	T	1
43-4	2A (4A, 4B)	II	-	-	+	A	-	+	+	+	T	1
592-2 ^{στ}	2A (4A, 4B)	II	-	-	+	A	-	+	+	+	T	2
V54 ^{στ}	2B	I	+	+	-	C	+	+	+	+	T	1
cot274 ^{στ}	2B	I	+	+	-	C	+	+	-	-	M	ΔΜ
449-2 ^{στ}	2B	I	+	+	-	C	+	-	-	-	M	ΔΜ
570-2	2B	I	+	+	-	C	+	-	+	+	T	2
Cf.38 ^{στ,η}	2B	I	+	+	-	C	-	+	-	-	Π	ΔΜ
124-8 ^{στ}	2B (1)	I	+	+	-	C	+	+	+	+	M	ΔΜ
123-3 ^{στ}	2B (2A)	I	+	+	-	C	+	+	+	+	T-Π	1
171-2 ^{στ}	2B (2A)	I	+	+	-	C	+	+	+	+	T-Π	1
423-1 ^{στ}	2B (2A)	I	+	+	-	C	+	+	+	+	T	1
454-1 ^{στ}	2B (2A)	I	+	+	-	C	+	+	+	+	T	2
487-1 ^{στ}	2B (2A)	I	+	+	-	C	+	-	-	-	M	ΔΜ
530-1 ^{στ}	2B (2A)	I	+	+	-	C	+	+	+	+	T	1
577-1 ^{στ}	2B (2A)	I	+	+	-	C	-	+	+	+	T	1
997-1	2B (2A)	I	+	+	-	C	+	-	+	+	T	2
17-1	2B (2A, 4A)	I	+	-	-	C	+	+	+	+	T-Π	1
150-5	2B (2A, 4A)	I	+	-	-	C	+	+	+	+	T-Π	1
525-1 ^{στ}	2B (2A, 4A)	I	+	-	-	C	+	+	+	+	T	1
999-1 ^{στ}	2B (4A, 4B)	I	+	+	-	C	+	+	+	+	T-Π	1
70-21 ^{στ}	3	I	-	-	-	C	-	-	-	-	M	ΔΜ
PCW ^{στ}	3	I	-	-	-	C	-	-	-	+	T	2
BB ^{στ}	4A	I	-	+	+	C	-	-	-	+	M	ΔΜ
30-6 ^{στ}	4A	I	-	+	+	C	-	+	-	+	M	ΔΜ
S39 ^{στ}	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	-	M	ΔΜ
pn4 ^{στ}	4B	II	-	-	+	C	-	+	+	-	T	1
16-1 ^{στ}	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	1
44-3	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	1
273-1 ^{στ}	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
413-5	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
453-1	4B	II	-	-	+	C	-	-	-	-	M	ΔΜ
455-1 ^{στ}	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2

461-3 ^{στ}	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
463-1	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
464-1	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
464-3 ^{στ}	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
473-1	4B	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
un1-1	4B	II	-	-	+	C	-	-	-	-	M	ΔM
235-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
354-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
414-1 ^{στ}	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
433-2	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
434-2 ^{στ}	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
435-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
437-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
437-2	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
444-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
447-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
451-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
451-2	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
456-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	M	ΔM
457-5	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	-	-	M	ΔM
460-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
465-2 ^{στ}	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
466-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
467-2 ^{στ}	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
469-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	1
469-2	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	1
476-3	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	M	ΔM
478-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	1
479-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	1
490-2 ^{στ}	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	M	ΔM
526-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
554-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	-	-	M	ΔM
578-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	M	ΔM
586-2 ^{στ}	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	M	ΔM
802-1	4B (4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
lt1-1 ^{στ}	4B (3, 4A)	II	-	-	+	C	-	-	+	+	T	2
Ca.146 ^{στ}	6	I	-	-	-	C	+	+	+	+	T	1
Vd76 ^{στ}	ΔA ^θ	I	-	-	-	C	-	-	-	-	M	ΔM
V44 ^{στ}	1A	I	-	-	-	C						
V138I	1A	I	-	-	-	C						
cotVd03	1A	I	+	-	-	C						
cotVd11	1A	I	-	-	-	C						
cotVd16	1A	I	-	-	-	C						
cotVd19	1A	I	-	-	-	C						
cotVd47	1A	I	-	-	-	C						
V607I	1B	I	-	-	-	C						
V661I	1B	I	-	-	-	C						
V666I	1B	I	-	-	-	C						
V320I	2A	II	-	-	+	A						
V720I	2A	II	-	-	+	A						
V800I	2A	II	-	-	+	A						
ep8	2A	II	-	-	+	A						
7V	2A	II	-	-	+	A						
31V	2A	II	-	-	+	A						
cotVd04	2A	II	-	-	+	A						
egpVd17	2A	II	-	-	+	A						
egpVd23	2A	II	-	-	+	A						

294-5	2A (2B)	II	-	-	+	A
302-1	2A (2B)	II	-	-	+	A
20V	2A (2B)	II	-	-	+	A
25V (SS4)	2AB (1, 4A)	II	-	-	+	A
115	2B	I	+	+	-	C
V3	2B	I	+	+	-	C
V4	2B	I	+	+	-	C
V16	2B	I	+	+	-	C
V38	2B	I	+	+	-	C
V41	2B	I	+	+	-	C
V42	2B	I	+	+	-	C
V49	2B	I	+	+	-	C
V52	2B	I	+	+	-	C
V57	2B	I	+	+	-	C
V73	2B	I	+	+	-	C
V85	2B	I	+	+	-	C
V87	2B	I	+	-	-	C
cot11	2B	I	+	+	-	C
cotVd06	2B	I	-	+	-	C
cotVd13	2B	I	+	+	-	C
cotVd18	2B	I	+	+	-	C
Ls.17	2B	I	+	+	-	C
V357I	2B	I	+	+	-	C
V510I	2B	I	+	+	-	C
V613I	2B	I	+	+	-	C
V702I	2Ba	I	+	+	-	C
128V	2B (1, 4A)	I	+	-	-	C
Dvd-E6	4A	I	-	+	+	C
86	4A	I	-	+	+	C
90	4A	I	-	+	+	C
108	4A	I	-	+	+	C
111	4A	I	-	+	+	C
129	4A	I	-	+	+	C
170	4A	I	-	+	+	C
21-18	4A	I	-	-	+	C
66-12	4A	I	-	+	+	C
66-13	4A	I	-	+	+	C
83-1	4A	I	-	+	+	C
P103	4A	I	-	+	+	C
V830	4A	I	-	+	+	C
131-M	4A	I	-	+	+	C
171-4A	4A	I	-	+	+	C
1V	4B	II	-	-	+	C
3V	4B	II	-	-	+	C
Dvd2	4B	II	-	-	+	C
Dvd3	4B	II	-	-	+	C
P3	4B	II	-	-	+	C
pt112	4B	II	-	-	+	C
149	4B	II	-	-	+	C
152	4B	II	-	-	+	C
157	4B	II	-	-	+	C
V2	4B	II	-	-	+	C
V5	4B	II	-	-	+	C
V8	4B	II	-	-	+	C
V9	4B	II	-	-	+	C
V39	4B	II	-	-	+	C
V74	4B	II	-	-	+	C

V88	4B	II	-	-	+	C
egpVd02	4B	II	-	-	+	C
egpVd04	4B	II	-	-	+	C
egpVd12	4B	II	-	-	+	C
V304I	4B	II	-	-	+	C
V684I	4B	II	-	-	+	C
Ca.83	6	I	-	-	-	C
Ca.148	6	I	-	-	-	C
Cf.162 ¹	HSI	I	+	-	-	C
V13	HSI	II	-	-	+	C
<i>V. albo-atrum</i>						
Ms.102	-	I	-	-	-	C
M33	-	I	-	-	-	C
220	-	I	-	-	-	C
V90	-	I	-	-	-	C
<i>V. longisporum</i>						
G19	-	I+II	+	-	-	C
K12	-	I	+	-	-	C
^a Τα στελέχη <i>V. dahliae</i> με έντονους χαρακτήρες προέρχονται από διάφορες περιοχές της Κρήτης· η κατάταξή τους σε VCGs μελετήθηκε στην παρούσα εργασία και ο φυτοπαθολογικός τους χαρακτηρισμός (παθότυποι, φυλές ως προς την τομάτα) πραγματοποιήθηκε από τον Δρ. Ε. Λιγοξυγκάκη (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., Ηράκλειο Κρήτης), στο πλαίσιο ερευνητικής μας συνεργασίας.						
^b Οι μεταλλαγές <i>nit</i> αρκετών στελεχών συμμετείχαν σε θετικές αντιδράσεις συμπληρωματικότητας με στελέχη ελέγχου περισσότερων της μιας VCGs. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι «ασθενέστερες» αντιδράσεις παρατίθενται σε παρενθέσεις.						
^v Για τους μοριακούς δείκτες M2, M3 και M4 καταγράφεται η παρουσία (+) ή απουσία (-) των χαρακτηριστικών ζωνών DNA, μεγέθους περίπου 650, 200 και 750 bp, αντίστοιχα.						
^δ Μοριακοί δείκτες PCR, Tr = Tr1/Tr2, Tm = Tm5/Tm7, 35 = 35-1/35-2.						
^ε Οι παθότυποι συμβολίζονται ως εξής: M = παθότυπος μελιτζάνας, T = παθότυπος τομάτας, Π = παθότυπος πιπεριάς, T-Π = παθότυπος τομάτας-πιπεριάς.						
^{στ} Στελέχη για τα οποία πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση της περιοχής ITS1-5.8S-ITS2 (κωδικοί GenBank: JX104774-JX104823). Για όλα τα υπόλοιπα, ο προσδιορισμός του γονότυπου του ITS2-SNP πραγματοποιήθηκε με μεθοδολογία PCR-RFLP (<i>Bse</i> MI).						
^ζ ΔM = δεν μολύνει την τομάτα.						
^η Η αρχική κατάταξη του στελέχους <i>V. dahliae</i> Cf.38 (στη VCG 6) αναθεωρήθηκε στην παρούσα διατριβή και το στέλεχος κατατάχθηκε εκ νέου στη VCG 2B.						
^θ Οι μεταλλαγές του δεν αντέδρασαν σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας με τα στελέχη ελέγχου καμίας VCG.						
^ι Η αρχική κατάταξη του στελέχους <i>V. dahliae</i> Cf.162 (στη VCG 6) αναθεωρήθηκε στην παρούσα διατριβή και το στέλεχος χαρακτηρίστηκε εκ νέου ως ετεροκαρυωτικά αυτο-ασύμβατο (HSI).						

3.1.2 Μορφολογική σύγκριση των VCGs του *V. dahliae*

Η ίδια συλλογή 84 στελεχών του *V. dahliae* (Πίνακας 3.1) μελετήθηκε ως προς 5 μορφολογικές παραμέτρους: ακτινωτό τάχος αύξησης των αποικιών, χρόνος παραγωγής χρωστικής, ένταση χρωστικής/κάλυψη της αποικίας, κονιοδιογένεση και μέσο μήκος κονιδίων (η μορφολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τους Δρ. Ε. Λιγοξυγκάκη και Δρ. Ε. Μαρκάκη, ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., Ηράκλειο Κρήτης· τα αποτελέσματα παρατίθενται αναλυτικά στο Παράρτημα 3). Από τις 5 παραμέτρους, το κονιδιακό μέγεθος, ο χρόνος παραγωγής και η ένταση της παραγόμενης χρωστικής είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ συγκεκριμένων VCGs. Τα στελέχη της VCG 2B παρήγαγαν συστηματικά βραχύτερα κονίδια

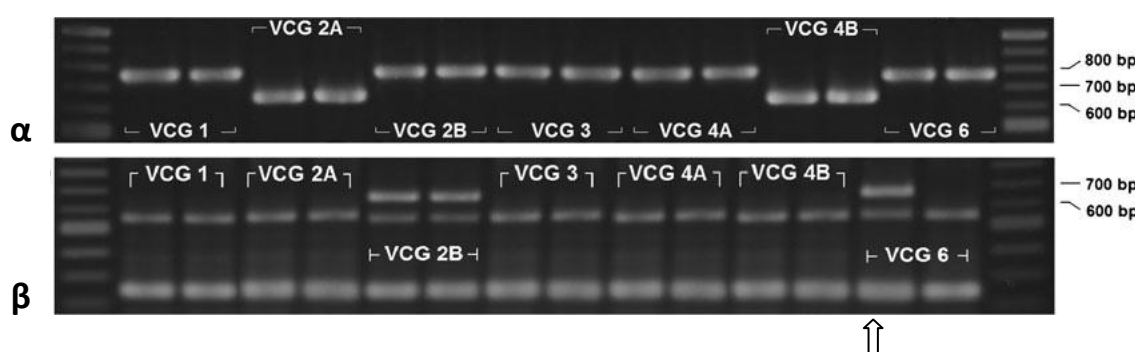
κατά μέσο όρο και απαιτούσαν σημαντικά λιγότερο χρόνο για να συσσωρεύσουν σκούρες χρωστικές στις αποικίες τους, σε σχέση με τα μέλη των VCGs 2A και 4B, τα οποία ήταν μορφολογικά παρόμοια (Παράρτημα 4).

3.1.3 Μοριακοί δείκτες PCR M1, M2, M3 και M4

Βάσει των αποτελεσμάτων μιας προκαταρκτικής αναζήτησης για πολυμορφικές περιοχές DNA στο γονιδίωμα του μύκητα *V. dahliae* με συσχέτιση με το σύστημα κατάταξης σε VCGs, επιλέχθηκαν 4 ζεύγη εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων (VdM1F-R, VdM2F-R, VdM3F-R και VdM4F-R), τα οποία εφαρμόστηκαν σε αναλύσεις PCR για το σύνολο των 176 στελεχών *Verticillium* του Πίνακα 3.1 (περιλαμβάνονταν κυρίως αντιπρόσωποι του είδους *V. dahliae* διεθνούς προέλευσης, από πολυάριθμους ξενιστές και όλες τις VCGs). Η ανάλυση PCR με το ζεύγος εκκινητών VdM1F-R (δείκτης M1) παρήγαγε ένα προϊόν ενίσχυσης μεγέθους 772 bp από όλα τα μέλη των VCGs 1, 2B, 3, 4A και 6 (ομάδα I) ή 646 bp από όλα τα στελέχη των VCGs 2A και 4B (ομάδα II) του είδους *V. dahliae*, χωρίς καμία εξαίρεση (Πίνακας 3.1 και Εικόνα 3.1). Επιπλέον, όλα τα στελέχη *V. albo-atrum* και *V. longisporum* εντάχθηκαν στην ομάδα I, εκτός από το στέλεχος *V. longisporum* G19, που εμφάνισε ταυτόχρονα και τις δύο ζώνες. Προκειμένου να καθορισθεί το αίτιο του πολυμορφισμού στο επίπεδο της αλληλουχίας DNA, τα προϊόντα ενίσχυσης από τα αντιπροσωπευτικά στελέχη 487-1 (ομάδα I) και 164-1 (ομάδα II) του *V. dahliae* κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν (κωδικοί GenBank: JX104825 και JX104824, αντίστοιχα). Οι αλληλουχίες ήταν κατά 99% ταυτόσημες στην κοινή τους περιοχή και ομόλογες με την 5' περιοχή του γονιδίου *mod-E*, που κωδικοποιεί για μια μοριακή συνοδό της κλάσης των πρωτεϊνών θερμικής καταπόνησης HSP90 και ταυτόχρονα αποτελεί ομόλογο γονίδιο ενός ρυθμιστή της ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας στον μύκητα *P. anserina*. Η διαφορά μεγέθους των προϊόντων ενίσχυσης οφειλόταν στην παρουσία μιας εισδοχής/έλλειψης (indel) μήκους 126 bp, στη θέση -77 αναρροϊκά (upstream) του κωδικονίου έναρξης του γονιδίου *mod-E*. Η εισδοχή των 126 bp δεν εμφάνισε σημαντική ομοιότητα με καμία γνωστή αλληλουχία ούτε ανιχνεύθηκε σε αυτή κάποιο αναγνωρίσιμο χαρακτηριστικό μοτίβο.

Η ενίσχυση PCR επί του ολικού DNA των 176 στελεχών *Verticillium* με το ζεύγος εκκινητών VdM2F-R (δείκτης M2) παρήγαγε ένα πολυμορφικό πρότυπο ζώνων DNA μεταξύ διαφορετικών VCGs. Εκτός από ένα καθολικής παρουσίας προϊόν PCR μεγέθους περίπου 260 bp και ένα προϊόν μεγέθους περίπου 550 bp, το οποίο ενισχύθηκε από τα περισσότερα στελέχη, όλα – και μόνον – τα στελέχη της VCG 2B του *V. dahliae* χαρακτηρίζονταν από ένα επιπλέον προϊόν ενίσχυσης μεγέθους 650 bp (Πίνακας 3.1 και Εικόνα 3.1). Το προϊόν PCR από το στέλεχος 449-2 (VCG 2B) κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε (κωδικός GenBank: JX104826), και η ανάλυση κατέδειξε πως αποτελεί μέρος γονιδίου μιας υποθετικής πρωτεΐνης του *V. dahliae* (κωδικός *Verticillium* database: VDAG_04007). Οι μόνες εξαιρέσεις της μονοσήμαντης συσχέτισης του χαρακτηριστικού προϊόντος DNA με τη VCG 2B ήταν 2 στελέχη της VCG 1 (που εμφάνισαν τη χαρακτηριστική ζώνη) και 1 στέλεχος της VCG 2B που δεν την παρήγαγε (συνολικό ποσοστό επιτυχούς διάκρισης της VCG 2B από τις υπόλοιπες ομάδες: 98,3%) (Πίνακας 3.1). Σημειώνεται πως το στέλεχος *V. dahliae* Cf.38, που χαρακτηρίστηκε από τη διακριτική ζώνη των 650 bp (Εικόνα 3.1) και αρχικά είχε ενταχθεί στη VCG 6 (Bhat *et al.*, 2003), κατατάχθηκε εκ νέου στη VCG 2B στην παρούσα εργασία. Τέλος,

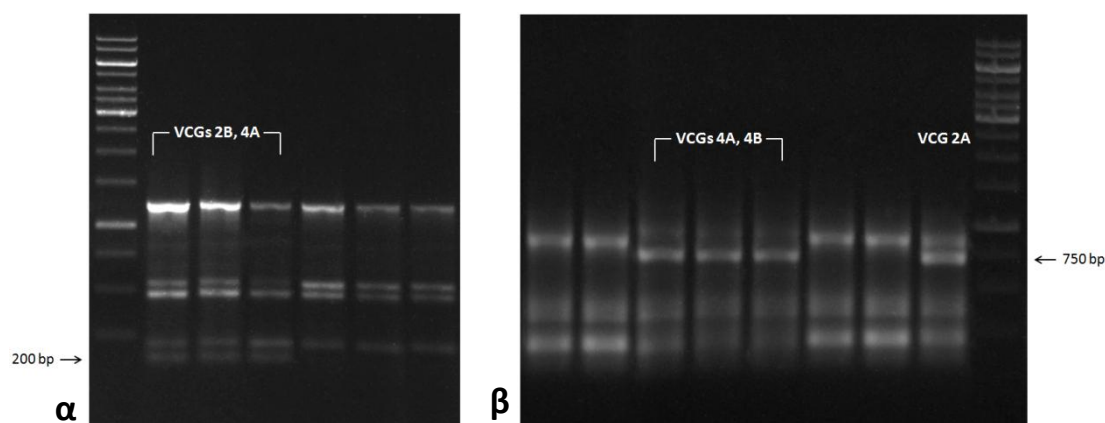
οι δύο καθολικής παρουσίας ζώνες (260 και 550 bp, αντίστοιχα) απομονώθηκαν από τα 3 στελέχη του *V. dahliae* 113-1 (VCG 2A), 449-2 (VCG 2B) και 453-1 (VCG 4B), κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχίστηκαν. Από την ανάλυση των αλληλουχιών προέκυψε πως το μεν προϊόν των 260 bp ήταν ένα απόλυτα συντηρημένο τμήμα του γονιδίου της ιστόνης 4 του *V. dahliae* (κωδικός *Verticillium* database: VDAG_10036), ενώ το προϊόν των 550 bp αντιστοιχούσε σε διαγονιδιακή περιοχή. Η στοίχιση των αλληλουχιών αυτού του προϊόντος PCR για τα 3 στελέχη που εξετάστηκαν με την ομόλογη γονιδιωματική (στέλεχος Ls.17, VCG 2B) αποκάλυψε την παρουσία 7 θέσεων σημειακού πολυμορφισμού, στις οποίες οι αλληλουχίες των 2 στελεχών της VCG 2B ήταν ταυτόσημες, ενώ διέφεραν από τους αντιπροσώπους των VCGs 2A και 4B.



Εικόνα 3.1. Φωτογραφίες ηλεκτροφορήσεων σε πηκτώματα αγαρόζης αντιπροσωπευτικών προϊόντων των μοριακών δεικτών PCR M1 (α) και M2 (β), όπου φαίνονται οι διαφορές των ηλεκτροφορητικών προτύπων PCR μεταξύ διαφορετικών VCGs. Δύο αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε VCG του είδους *Verticillium dahliae* απεικονίζονται σε κάθε περίπτωση: στελέχη V44 και cotVd47 (VCG 1), PH και 113-1 (VCG 2A), cot274 και 570-2 (VCG 2B), 70-21 και PCW (VCG 3), BB και 30-6 (VCG 4A), 16-1 και 453-1 (VCG 4B), και Cf.38 και Ca.146 (VCG 6). Σημειώνεται πως η κατάταξη του στελέχους Cf.38 (βέλος) αναθεωρήθηκε σε πειράματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια της παρούσας εργασίας, και το στέλεχος κατατάχθηκε εκ νέου στη VCG 2B. Η εκτίμηση του μοριακού βάρους των ζωνών DNA βασίστηκε στην παράλληλη ηλεκτροφόρηση της κλίμακας 100 bp DNA ladder (New England Biolabs), στην πρώτη και την τελευταία διαδρομή κάθε πηκτώματος (προσαρμογή από Papaioannou *et al.*, 2013b).

Ολικό DNA των 176 στελεχών του Πίνακα 3.1 υποβλήθηκε περαιτέρω σε αναλύσεις PCR με τα ζεύγη εκκινητών VdM3F-R και VdM4F-R (δείκτες M3 και M4, αντίστοιχα). Στην πρώτη περίπτωση (M3), ελήφθη πολυμορφικό πρότυπο ζωνών DNA (Εικόνα 3.2), με ένα χαρακτηριστικό προϊόν (περίπου 200 bp) να ενισχύεται από τα στελέχη των VCGs 2B και 4A (Πίνακας 3.1). Κατόπιν απομόνωσης των αντίστοιχων ζωνών DNA από το στέλεχος Ls.17 (VCG 2B), κλωνοποίησης και αλληλούχισής τους, βρέθηκε πως το κύριο προϊόν PCR της αντίδρασης (μεγέθους περίπου 1200 bp) αντιστοιχούσε στο γονίδιο *hex-1* του *V. dahliae* (κωδικοποιεί για την κύρια πρωτεΐνη του σωματίου Woronin που αποφράσσει τους πόρους των σέπτων κατόπιν μηχανικής βλάβης των υφών και πιθανά ύστερα από πυροδότηση της αντίδρασης HI), ενώ η χαρακτηριστική ζώνη των 200 bp (από το στέλεχος 115, VCG 2B) αντιστοιχούσε σε τμήμα διαγονιδιακής περιοχής 190 bp καταρροϊκά (downstream) της κωδικής περιοχής του γονιδίου της 1,3-β-γλυκοζιδάσης (κωδικός *Verticillium* database: VDAG_02469). Για τον μοριακό δείκτη M3 καταγράφηκαν 6 εξαιρέσεις στη συσχέτιση με τις VCGs 2B και 4A (συνολική ακρίβεια δείκτη: 96,6%).

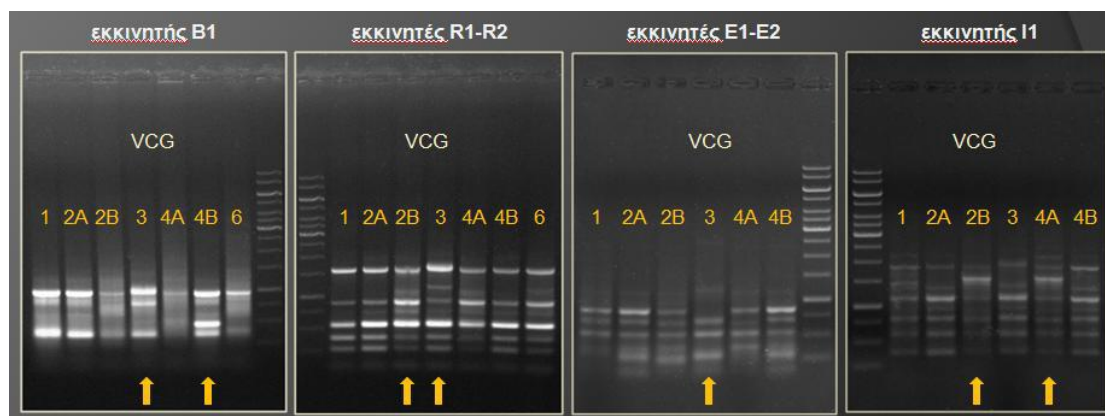
Στην περίπτωση του ζεύγους εκκινητών VdM4F-R (δείκτης M4) προέκυψε ένα ακόμα πολυμορφικό πρότυπο προϊόντων DNA (Εικόνα 3.2), με μια χαρακτηριστική ζώνη μεγέθους περίπου 750 bp να παράγεται μόνον από τα στελέχη των VCGs 2A, 4A και 4B, χωρίς καμία εξαίρεση (Πίνακας 3.1). Η απομόνωση, κλωνοποίηση και αλληλούχηση του μεγαλύτερου προϊόντος ενίσχυσης (930 bp) από το στέλεχος 115 (VCG 2B) κατέδειξε πως αυτό αποτελούσε τμήμα του γονιδίου ετεροκαρωτικής ασυμβατότητας *het-c*, ενώ η ίδια διαδικασία για το προϊόν πολυμορφικής εμφάνισης (750 bp) από τα στελέχη PH (VCG 2A) και BB (VCG 4A) αποκάλυψε πως αυτό ήταν τμήμα ρετρομεταθετού στοιχείου (κλώνος VDF35, κωδικός GenBank: AB095265) που εντοπίζεται στο γονιδίωμα του *V. dahliae*.



Εικόνα 3.2. Φωτογραφίες ηλεκτροφορήσεων σε πηκτώματα αγαρόζης αντιπροσωπευτικών προϊόντων των μοριακών δεικτών PCR M3 (α) και M4 (β), όπου φαίνονται οι διαφορές των ηλεκτροφορητικών προτύπων PCR μεταξύ διαφορετικών VCGs. Η σειρά των στελεγχών του είδους *Verticillium dahliae* που έχουν περιληφθεί στα πηκτώματα είναι, κατά σειρά ηλεκτροφόρησης: (α) 115 και V54 (VCG 2B), BB (VCG 4A), T9 (VCG 1), PH (VCG 2A), S39 (VCG 4B), (β) T9 (VCG 1), 70-21 (VCG 3), BB (VCG 4A), S39 και 273-1 (VCG 4B), cot274 και 449-2 (VCG 2B), και 164-1 (VCG 2A). Η εκτίμηση του μοριακού βάρους των ζωνών DNA βασίστηκε στην παράλληλη ηλεκτροφόρηση της κλίμακας 1 kb DNA ladder (Fermentas), στην πρώτη και την τελευταία διαδρομή των πηκτωμάτων, αντίστοιχα.

3.1.4 Πολυμορφικά πρότυπα RAPD-PCR και δείκτες SCAR a11 και a19

Τρία αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε VCG του *V. dahliae* ελέγχθηκαν σε αναλύσεις RAPD-PCR με μεγάλο αριθμό μη ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων, για τον εντοπισμό πολυμορφικών προτύπων με πιθανή συσχέτιση με το σύστημα των VCGs. Τέτοια πρότυπα ελήφθησαν σε τέσσερις περιπτώσεις, με χρήση των εκκινητών B1, R1-R2, E1-E2 και I1, αντίστοιχα (Εικόνα 3.3). Ακολούθησε η απομόνωση, η κλωνοποίηση και η αλληλούχηση 11 ζωνών DNA ειδικών για συγκεκριμένες VCGs. Καμία ζώνη δεν αντιστοιχούσε σε γνωστό γονίδιο ετεροκαρωτικής ασυμβατότητας· σε 8 περιπτώσεις τα προϊόντα PCR ταυτοποιήθηκαν ως διαγονιδιακές περιοχές, και 3 ήταν ταυτόσημα κατά 94, 98 και 96% με το γονίδιο της περμεάσης του αλλαντοϊκού οξέος του είδους *V. albo-atrum* (κωδικός *Verticillium* database: VDBG_02244), το γονίδιο με κωδικό VDBG_06529 του *V. albo-atrum* (cullin-associated NEDD8-dissociated protein), και μια πρωτεΐνη του *V. albo-atrum* που περιέχει το βακτηριακού τύπου μοτίβο της α-L-ραμνοζιδάσης (VDBG_02795), αντίστοιχα.



Εικόνα 3.3. Φωτογραφίες ηλεκτροφορήσεων σε πηκτώματα αгарόζης των προϊόντων ενίσχυσης δοκιμασιών RAPD-PCR με τα μη ειδικά ολιγονουκλεοτίδια B1, R1-R2, E1-E2 και I1, από τα αντιπροσωπευτικά στελέχη των VCGs του είδους *Verticillium dahliae* T9 (VCG 1), Dvd-T5 (VCG 2A), V54 (VCG 2B), 70-21 (VCG 3), BB (VCG 4A), S39 (VCG 4B) και Ca.146 (VCG 6). Με κίτρινα βέλη επισημαίνονται μοναδικά πρότυπα RAPD-PCR συγκεκριμένων VCGs. Η εκτίμηση του μοριακού βάρους των ζωνών DNA βασίστηκε στην παράλληλη ηλεκτροφόρηση της κλίμακας 1 kb DNA ladder (Fermentas), στην πρώτη ή την τελευταία διαδρομή των πηκτωμάτων.

Με βάση τις 3 κωδικές αλληλουχίες και 2 τυχαία επιλεγμένες διαγονιδιακές περιοχές σχεδιάσθηκαν ζεύγη ειδικών εκκινητών (a3F-R, a6F-R, a11F-R, a14F-R και a19F-R) για αναλύσεις SCAR (sequence-characterized amplified region, ενίσχυση περιοχής χαρακτηρισμένης αλληλουχίας) της ίδιας συλλογής αντιπροσωπευτικών στελεχών των VCGs του *V. dahliae*. Τα ειδικά προϊόντα PCR για τις κωδικές αλληλουχίες ελήφθησαν χωρίς διαφοροποιήσεις από τα στελέχη όλων των VCGs, αποδεικνύοντας πως ο πολυμορφισμός των αρχικών προτύπων οφειλόταν στη συγκεκριμένη αλληλουχία των αρχικών ολιγονουκλεοτιδίων και όχι στη διαφορική παρουσία/απουσία της περιοχής. Αντιθέτως, για τις 2 διαγονιδιακές περιοχές ελήφθησαν προϊόντα (με τα ζεύγη εκκινητών a11F-R και a19F-R) μόνον από τα στελέχη της VCG 4B και των VCGs 2B και 4A, αντίστοιχα, ανάλογα με τα αποτελέσματα των αρχικών αντιδράσεων RAPD-PCR (με τους εκκινητές B1 και I1, αντίστοιχα). Κάθε ένα από τα δύο ειδικά ζεύγη εκκινητών εφαρμόστηκε σε αναλύσεις PCR με 84 στελέχη *V. dahliae* όλων των VCGs (Πίνακας 3.1), με συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 90,5 και 85,8% για τους δύο δείκτες SCAR, a11 και a19, αντίστοιχα.

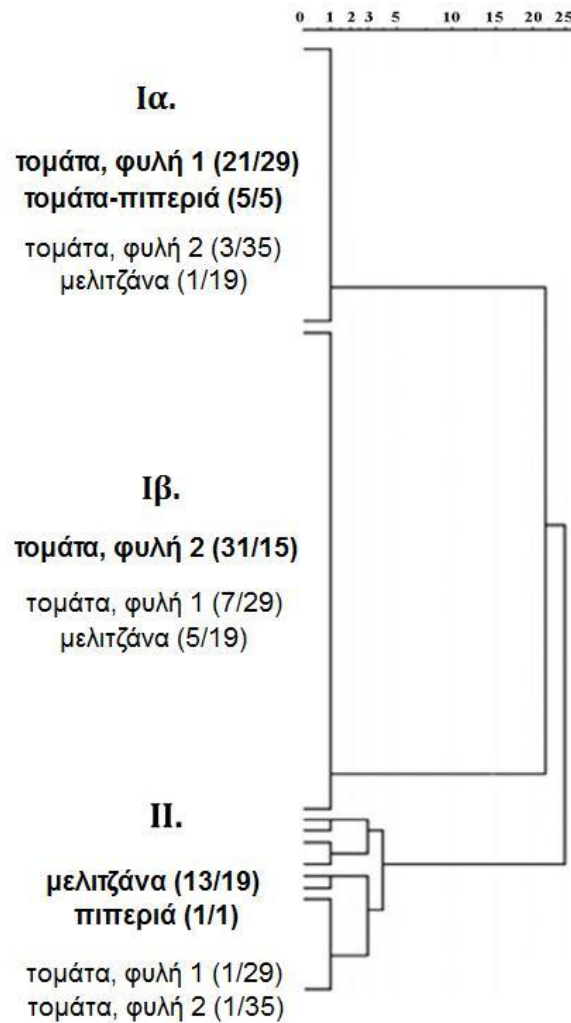
3.1.5 Μοριακοί δείκτες PCR Tm5/Tm7, 35-1/35-2, Tr1/Tr2 και E10-RAPD

Οι μοριακοί δείκτες PCR Tm5/Tm7 και 35-1/35-2 έχουν προταθεί σε προηγούμενες μελέτες ως πιθανά ειδικό για τον παθότυπο της τομάτας (Usami *et al.*, 2005; 2007), ο δείκτης Tr1/Tr2 ως ειδικός για τη φυλή 1 της τομάτας (Usami *et al.*, 2007; Maruthachalam *et al.*, 2010) και ο δείκτης E10-RAPD ως ειδικός για τον παθότυπο της πιπεριάς (Usami *et al.*, 2007). Προκειμένου να ελεγχθεί η συσχέτιση των δεικτών με τους παθότυπους και τις φυλές τομάτας, αλλά και με το σύστημα των VCGs, η συλλογή 84 στελεχών του μύκητα (πληθυσμός από την Κρήτη και διεθνή στελέχη ελέγχου των VCGs· Πίνακας 3.1) υποβλήθηκε σε αντίστοιχες αναλύσεις PCR/RAPD-PCR.

Τα περισσότερα στελέχη της φυλής 1 της τομάτας χαρακτηρίστηκαν από την παραγωγή του αναμενόμενου προϊόντος PCR (680 bp) με χρήση των εκκινητών Tr1/Tr2, η ταυτότητα του οποίου επιβεβαιώθηκε με κλωνοποίηση και αλληλούχησή του από το στέλεχος 999-1 (αλληλουχία ταυτόσημη με την TomR1, η οποία περιλαμβάνει την ειδική για τη φυλή 1 αλληλουχία B68-TV· κωδικός GenBank: AB095266). Η επιτυχία πρόγνωσης της φυλής με τον μοριακό δείκτη Tr1/Tr2 ήταν συνολικά 84,4% για το σύνολο της συλλογής (Πίνακας 3.1). Επιπλέον, αυτός ο δείκτης επέτρεψε την κατάταξη των 20 στελεχών που δεν μόλυναν την τομάτα σε αντίστοιχες «φυλές», αλλά όχι τη διάκρισή τους από τα στελέχη που ήταν παθογόνα στην τομάτα. Τέλος, παρατηρήθηκε γενική απουσία του χαρακτηριστικού προϊόντος ενίσχυσης από τα στελέχη της VCG 4B, καθιστώντας ανακριβή την πρόγνωση της φυλής εντός αυτής της VCG.

Σχετικά με τους μοριακούς δείκτες Tm5/Tm7 και 35-1/35-2 για τον παθότυπο της τομάτας, η εμφάνιση ενός χαρακτηριστικού προϊόντος PCR (περίπου 600 bp) σημειώθηκε και στις δύο περιπτώσεις από όλα τα στελέχη των παθότυπων τομάτας και τομάτας-πιπεριάς, με μία μόνον εξαίρεση για τον κάθε δείκτη. Αντιθέτως, δεν υπήρχαν προϊόντα ενίσχυσης από την πλειοψηφία των μελών του παθότυπου της μελιτζάνας και της πιπεριάς (Πίνακας 3.1). Η αξιοπιστία της πρόβλεψης παθότυπου με τους δείκτες Tm5/Tm7 και 35-1/35-2 ήταν και για τους δύο 98,3-100% για τους παθότυπους τομάτας και τομάτας-πιπεριάς, αλλά χαμηλότερη (57,9-63,2%) για τον παθότυπο μελιτζάνας, καθώς αρκετά στελέχη του τελευταίου έδιναν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Τέλος, όσον αφορά τον δείκτη E10 για τον παθότυπο πιπεριάς, τα αποτελέσματα της αντίστοιχης δοκιμασίας RAPD δεν εμφάνισαν καμία συσχέτιση με τον παθότυπο πιπεριάς, αλλά σημαντική σχέση με τη VCG 2B (Πίνακας 3.1).

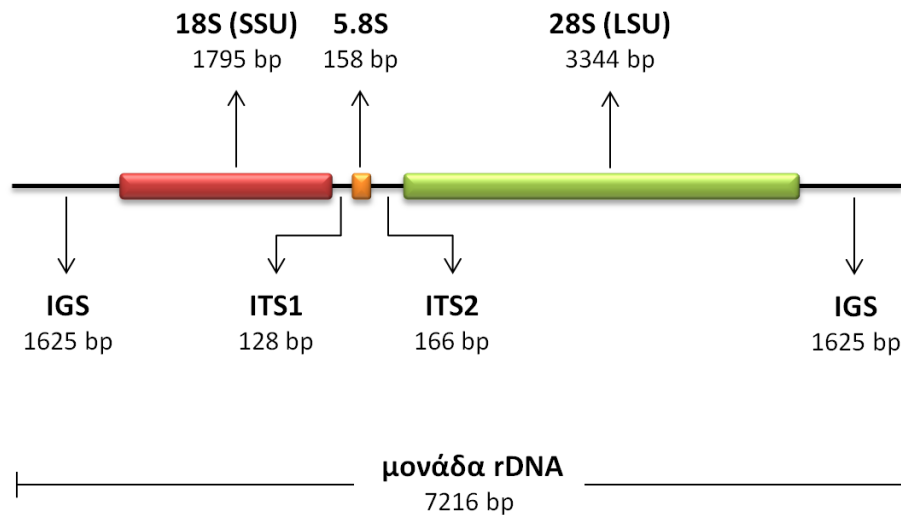
Τα αποτελέσματα για τους μοριακούς δείκτες PCR Tm5/Tm7, 35-1/35-2 και Tr1/Tr2 επί της συλλογής των 84 στελεχών *V. dahliae* υποβλήθηκαν σε ανάλυση ομαδοποίησης και το δένδρογραμμα που προέκυψε παρατίθεται στην Εικόνα 3.4. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, η συλλογή διακρίθηκε με σαφήνεια στους παθότυπους τομάτας/τομάτας-πιπεριάς (ομάδα I του δένδρογραμματος) και μελιτζάνας/πιπεριάς (ομάδα II), ενώ ο παθότυπος τομάτας διακρίθηκε περαιτέρω σε φυλές 1 και 2, στις υποομάδες Ia και Ib, αντίστοιχα (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4. Δενδρογράμμο από ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης (μέθοδος ελάχιστης διακύμανσης του Ward, τετραγωνική Ευκλείδεια απόσταση ως το μέτρο των αποστάσεων) του συνδυασμού των αποτελεσμάτων για τους μοριακούς δείκτες PCR Tm5/Tm7, 35-1/35-2 και Tr1/Tr2 επί της συλλογής 84 στελεχών *Verticillium dahliae*. Δίπλα από κάθε κύρια ομάδα του δενδρογράμματος παρατίθενται τα φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά των μελών της (παθότυπος, φυλή τομάτας) και σε παρενθέσεις παρατίθεται το πλήθος στελεχών της αντίστοιχης κατηγορίας που περιέχεται στην τρέχουσα ομάδα (πρώτος αριθμός) και το συνολικό πλήθος μελών της κατηγορίας (δεύτερος αριθμός) (προσαρμογή από Παραϊοαννου *et al.*, 2013b).

3.1.6 Ανάλυση της περιοχής ITS1-5.8S-ITS2 του πυρηνικού rDNA

Η επαναλαμβανόμενη μονάδα του πυρηνικού rDNA στον μύκητα *V. dahliae* φέρει τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα τρία μόρια rRNA, 18S (SSU), 5.8S και 28S (LSU), διαχωρισμένα από δύο επιμέρους εσωτερικές μεταγραφόμενες περιοχές, ITS1 και ITS2. Οι διαδοχικές επαναλήψεις του συμπλέγματος του rDNA διαχωρίζονται με τη ριβοσωμική διαγονιδιακή περιοχή IGS. Η δομή του rDNA του αντιπροσωπευτικού στελέχους *V. dahliae* Vd76 και τα μεγέθη των επιμέρους υποπεριοχών του παρατίθενται στην Εικόνα 3.5.



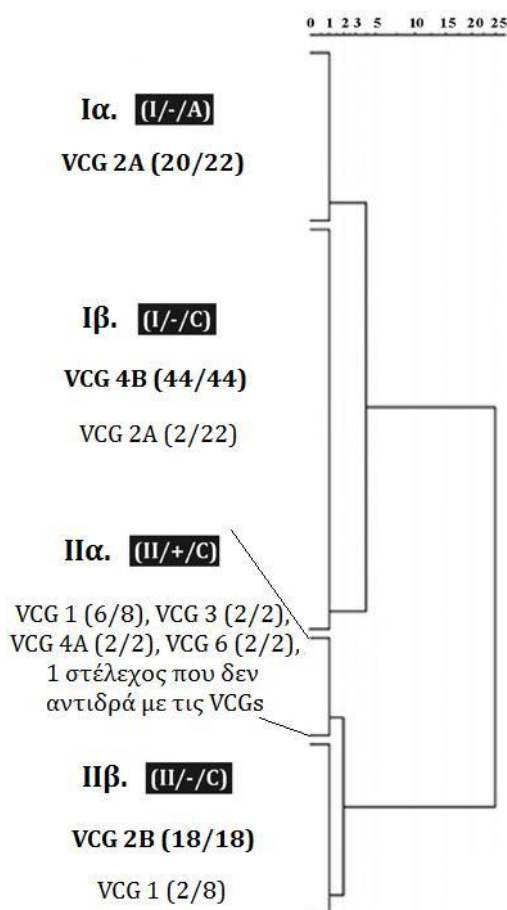
Εικόνα 3.5. Η οργάνωση της μονάδας του πυρηνικού rDNA του αντιπροσωπευτικού στελεχούς *Verticillium dahliae* Vd76 (κωδικός GenBank: AF104926). Τα μεγέθη όλων των γονιδίων και των διαγονιδιακών περιοχών του συμπλέγματος παρατίθενται κάτω από τις ονομασίες τους.

Η περιοχή ITS1-5.8S-ITS2, που παρεμβάλλεται μεταξύ των γονιδίων 18S και 28S, έχει συνολικό μέγεθος 452 bp για το στέλεχος *V. dahliae* Vd76, και ενισχύθηκε εξ ολοκλήρου με PCR στην παρούσα εργασία με το ζεύγος εκκινητών 18S-ITS1 και 28S-ITS2 (μέγεθος προϊόντος PCR: 711 bp). Για την ανάλυση της περιοχής ITS1-5.8S-ITS2 χρησιμοποιήθηκε μια συλλογή 176 στελεχών μυκήτων του γένους *Verticillium* από πολυάριθμους ξενιστές, διαφορετικές γεωγραφικές προελεύσεις και όλες τις VCGs του είδους *V. dahliae* (Πίνακας 3.1). Κατόπιν ενίσχυσης της περιοχής με PCR επί του ολικού DNA κάθε στελεχούς, πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση των προϊόντων 50 τυχαία επιλεγμένων στελεχών *V. dahliae*, συμπεριλαμβανομένων αντιπροσώπων όλων των VCGs (Πίνακας 3.1). Η ανάλυση των αλληλουχιών (κωδικοί GenBank: JX104774-JX104823) αποκάλυψε πως η περιοχή ITS1-5.8S-ITS2 είναι ιδιαίτερα συντηρημένη εντός του είδους *V. dahliae* (οι περισσότερες αλληλουχίες ήταν ταυτόσημες με την ομόλογη αλληλουχία του στελεχούς *V. dahliae* 76, κωδικός GenBank: AF104926). Μοναδική εξαίρεση στην αξιοσημείωτη συντήρηση της περιοχής αποτέλεσε ένας σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism, SNP) στη θέση 370 (εντός της υποπεριοχής ITS2) των αλληλουχιών από 11 στελέχη της VCG 2A, τα οποία εμφάνιζαν ένα κατάλοιπο αδενίνης αντί για την κυτοσίνη που παρατηρήθηκε σε όλα τα υπόλοιπα στελέχη.

Προκειμένου να επαληθευθεί περαιτέρω η συσχέτιση του ITS2-SNP με τη VCG 2A, τα προϊόντα ενίσχυσης των υπόλοιπων στελεχών της συλλογής υποβλήθηκαν σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Bse*MI, το οποίο επελέγη διότι η θέση αναγνώρισής του περιλαμβάνει τη θέση του SNP και το αποτέλεσμα της πέψης θα μπορούσε να διαχωρίσει τα στελέχη με διαφορετικό γονότυπο στη θέση ITS2-SNP (αναμενόταν πέψη του προϊόντος PCR προς παραγωγή δύο περιοριστικών τμημάτων, μεγεθών 553 και 158 bp, μόνον στην περίπτωση του γονοτύπου «370-A»). Πράγματι, από τα 176 στελέχη *Verticillium* που εξετάστηκαν συνολικά (εκ των οποίων τα 27 ανήκαν στη VCG 2A του *V. dahliae*), μόνον τα μέλη *V. dahliae* της VCG 2A χαρακτηρίζονταν από γονότυπο «370-A», με μοναδικές εξαιρέσεις δύο στελέχη *V.*

dahliae με τύπο «370-C», αν και ανήκαν στη VCG 2A (Πίνακας 3.1). Επιπρόσθετα, η αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων για κατατεθειμένες αλληλουχίες ITS1-5.8S-ITS2 από περισσότερα στελέχη *V. dahliae* απέδωσε 389 αλληλουχίες στελεχών από όλον τον κόσμο (άγνωστων VCGs στην πλειοψηφία τους), η πολλαπλή στοίχιση των οποίων κατέδειξε αφενός πως η περιοχή είναι ιδιαίτερα συντηρημένη, αφετέρου πως ο ITS2-SNP είναι ο μοναδικός πολυμορφισμός που εντοπίστηκε σε 381 από 389 αλληλουχίες (103 από αυτές ανήκαν στον τύπο «370-A»).

Τα αποτελέσματα του σημειακού πολυμορφισμού ITS2-SNP συνδυάστηκαν με τα αποτελέσματα για τους μοριακούς δείκτες M1 και M2 για τη συλλογή στελεχών που περιελάμβανε τον πληθυσμό *V. dahliae* από την Κρήτη και διεθνή στελέχη ελέγχου όλων των VCGs, και υποβλήθηκαν σε ανάλυση ομαδοποίησης: το δενδρόγραμμα που προέκυψε παρατίθεται στην Εικόνα 3.6. Σύμφωνα με την ανάλυση, ο συνδυασμός των τριών μοριακών εργαλείων επέτρεψε τη διάκριση του πληθυσμού με σαφήνεια σε δύο ομάδες (I και II), εκ των οποίων η πρώτη διακρίνεται περαιτέρω στις VCGs 2A και 4B (υποομάδες Iα και Iβ, αντίστοιχα), ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει τις υπόλοιπες VCGs, με τη VCG 2B να περιορίζεται σε διακριτή υποομάδα (IIβ) (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6. Δενδρόγραμμα από ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης (μέθοδος ελάχιστης διακύμανσης του Ward, τετραγωνική Ευκλείδεια απόσταση ως το μέτρο των αποστάσεων) του συνδυασμού των αποτελεσμάτων για τους μοριακούς δείκτες M1, M2 και ITS2-SNP για μια συλλογή 98 στελεχών *Verticillium dahliae*. Δίπλα από κάθε κύρια ομάδα του δενδρογράμματος παρατίθεται ο απλότυπος της (M1/M2/ITS2-SNP) και σε παρενθέσεις δίπλα σε κάθε VCG παρατίθεται ο αριθμός των μελών της που εντάσσονται στην τρέχουσα ομάδα (πρώτος αριθμός) και το συνολικό πλήθος στελεχών της (δεύτερος αριθμός) (προσαρμογή από Παραιοαννου *et al.*, 2013b).

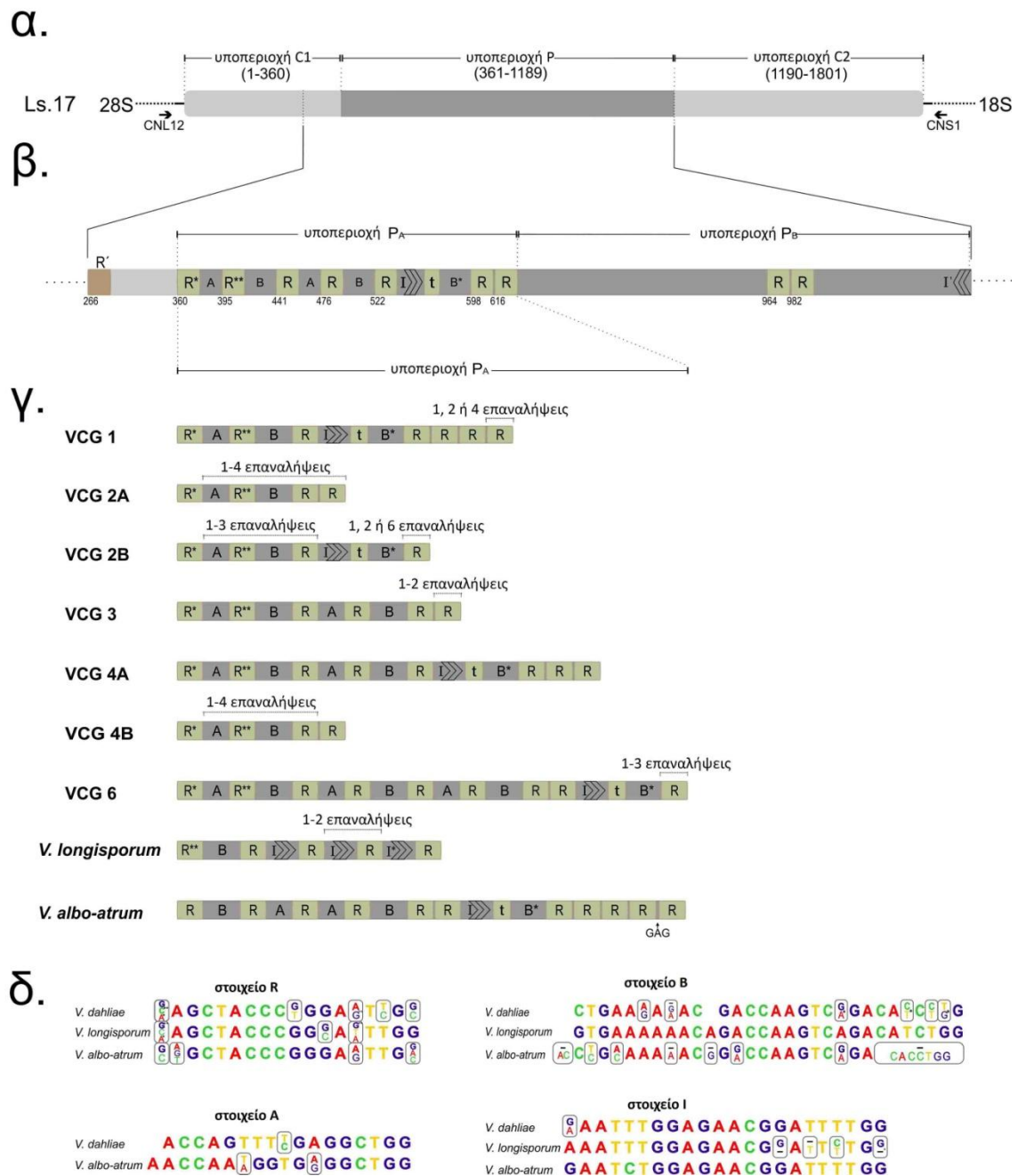
3.1.7 Ανάλυση της διαγονιδιακής περιοχής IGS του πυρηνικού rDNA

A. Δομική ανάλυση της περιοχής IGS των μυκήτων του γένους *Verticillium*

Για τη μελέτη της ποικιλομορφίας εντός της περιοχής IGS του είδους *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στη βάση δεδομένων GenBank, και οι 201 αλληλουχίες που ανακτήθηκαν (στελεχών από διάφορους ξενιστές και διαφορετικές γεωγραφικές προελεύσεις) υποβλήθηκαν σε πολλαπλή στοίχιση. Παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη ετερογένεια στο συνολικό μέγεθος της περιοχής (από 1212 έως 1968 bp). Με κριτήριο την κατανομή των πολυμορφισμών κατά μήκος της στοίχισης, ανιχνεύθηκαν τρεις διακριτές υποπεριοχές: μια κεντρική, ιδιαίτερα πολυμορφική υποπεριοχή P (εκτεινόμενη μεταξύ των νουκλεοτιδικών θέσεων 361-1189 με αναφορά στην αλληλουχία του στελέχους Ls.17), με δύο συντηρημένες υποπεριοχές εκατέρωθεν, τις C1 (1-360 nt) και C2 (1190-1801 nt) (Εικόνα 3.7α). Ο βαθμός συντήρησης της αλληλουχίας κυμαινόταν μεταξύ 95,3-100% και 97,8-100% (ταυτότητα αλληλουχιών ανά δύο) για τις υποπεριοχές C1 και C2, αντίστοιχα. Ο πολυμορφισμός στις συντηρημένες υποπεριοχές οφειλόταν κυρίως σε διασκορπισμένες σημειακές αντικαταστάσεις (με τις μεταλλαγές μετάπτωσης να ανιχνεύονται σε διπλάσια συχνότητα από τις μεταλλαγές μεταστροφής και στις δύο υποπεριοχές) και, σε μικρότερο βαθμό, σε λίγες μικρές (μήκους 1-2 bp) εισδοχές/ελλείψεις (indels). Η υποπεριοχή P ήταν λιγότερο συντηρημένη (εντοπίστηκαν αλληλουχίες που χαρακτηρίζονταν από ποσοστό ταυτότητας μόλις 83,0%) και χαρακτηριζόταν από μια πληθώρα εισδοχών/ελλείψεων διαφόρων μεγεθών, καθώς και πολυάριθμες σημειακές μεταλλαγές.

Η δομική ανάλυση των αλληλουχιών IGS αποκάλυψε την καθολική παρουσία 4 επαναλαμβανόμενων στοιχείων, τα οποία οργανώνονταν σε διάφορα πρότυπα ως αλληλένδετες ομάδες επαναλήψεων (Εικόνα 3.7β και γ). Το συχνότερο στοιχείο σε όλες τις αλληλουχίες ήταν μια ατελής επανάληψη μήκους 18 bp (στοιχείο R), σε 5-14 ευθείες επαναλήψεις (εκτός από την πρώτη που ήταν πάντοτε ανεστραμμένη). Αν και η πλειονότητα των επαναλήψεων R ήταν απόλυτα συντηρημένες μεταξύ των αλληλουχιών, ανιχνεύθηκαν επίσης ορισμένες παραλλαγές του στοιχείου (Εικόνα 3.7δ). Εκτός από το στοιχείο R, εντοπίστηκαν ακόμα 3 κλάσεις βραχέων επαναλαμβανόμενων στοιχείων με συντηρημένες αλληλουχίες, τα στοιχεία A (17 bp, ατελείς ευθείες επαναλήψεις, σε 1-4 επαναλήψεις), B (28 bp, ατελείς ευθείες επαναλήψεις, σε 1-4 επαναλήψεις) και I (21-22 bp, ένα ζεύγος τέλειων ανεστραμμένων επαναλήψεων) (Εικόνα 3.7β-δ). Αξίζει να σημειωθεί πως οι 4 κλάσεις επαναλαμβανόμενων στοιχείων συχνά οργανώνονταν σε επαναλαμβανόμενες δομές ανώτερης τάξης (π.χ. η δομή R-A-R-B ανιχνεύθηκε σε όλες τις αλληλουχίες, σε 1-4 διαδοχικές επαναλήψεις, ως μία μεγάλη επαναλαμβανόμενη δομή μήκους 81 bp), ή σε μεγάλες σύνθετες ομάδες (π.χ. η ομάδα I-t-B-R, όπου το στοιχείο t αποτελούσε τμήμα του στοιχείου R) (Εικόνα 3.7β και γ). Η ποικιλομορφία στο μέγεθος της περιοχής IGS οφειλόταν κυρίως στους διαφορετικούς αριθμούς των 4 συντηρημένων επαναλαμβανόμενων στοιχείων, στο πρώτο τμήμα της υποπεριοχής P (υποπεριοχή P_A).

Όσον αφορά την περιοχή IGS των ειδών *V. albo-atrum* και *V. longisporum*, αυτή βρέθηκε πως χαρακτηριζόταν από ιδιαίτερη για το κάθε είδος διάταξη των ίδιων επαναλαμβανόμενων στοιχείων με το *V. dahliae*, ή παραλλαγών τους (Εικόνα 3.7γ). Τα στοιχεία R και I ήταν τα πλέον συντηρημένα, ενώ οι αλληλουχίες των στοιχείων A και B απέκλιναν περισσότερο (Εικόνα 3.7δ).



Εικόνα 3.7. (α) Διαγραμματική παρουσίαση της οργάνωσης της περιοχής IGS του μύκητα *Verticillium dahliae* (στέλεχος Ls.17) στις υποπεριοχές C1, P και C2. Με βέλη επισημαίνονται οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών PCR CNL12 και CNS1, εντός των γειτονικών γονιδίων 28S και 18S, αντίστοιχα. (β) Οργάνωση των επαναλαμβανόμενων ευθέων και ανεστραμμένων επαναλαμβανόμενων στοιχείων R, A, B και I στην πολυμορφική υποπεριοχή P της περιοχής IGS, στο στέλεχος *V. dahliae* Ls.17. Αστερίσκοι δίπλα στα στοιχεία R και B υποδηλώνουν την παρουσία παραλλαγών στην αλληλουχία τους· οι αντίστοιχες αλληλουχίες παρατίθενται στην Εικόνα 3.7δ. (γ) Συναινετική δομική οργάνωση της ετερογενούς υποπεριοχής P της περιοχής IGS για τις διαφορετικές VCGs του *V. dahliae* και τα είδη *V. albo-atrum* και *V. longisporum*. Ο αστερίσκος δίπλα στο στοιχείο I υποδηλώνει παραλλαγή στην αλληλουχία του· η αντίστοιχη αλληλουχία παρατίθεται στην Εικόνα 3.7δ. (δ) Αλληλουχίες των επαναλαμβανόμενων στοιχείων R, A, B και I και των παραλλαγών τους στα 3 είδη *Verticillium*. Όλες οι πολυμορφικές θέσεις επισημαίνονται με πλαίσια· σε κάθε πλαίσιο, η πάνω βάση είναι η συχνότερη στις αλληλουχίες που εξετάστηκαν, ενώ από κάτω αναφέρονται οι εναλλακτικές βάσεις. Αστερίσκοι δίπλα σε βάσεις των πολυμορφικών θέσεων αντιστοιχούν σε παραλλαγές που επισημαίνονται στις Εικόνες 3.7β και γ (προσαρμογή από Παραιοαννου *et al.*, 2013a).

B. Δομική και φυλογενετική ανάλυση της υποπεριοχής P μεταξύ των VCGs του V. dahliae

Προκειμένου να μελετηθεί το ενδεχόμενο πιθανής συσχέτισης του ιδιαίτερου πολυμορφισμού της περιοχής IGS με τον διαχωρισμό του είδους *V. dahliae* σε VCGs, η περιοχή IGS ενισχύθηκε εξ ολοκλήρου με PCR (με τους εκκινητές CNL12 και CNS1) από 50 στελέχη *Verticillium* (Πίνακας 3.2), όλα τα προϊόντα ενίσχυσης κλωνοποιήθηκαν (λόγω μη ικανοποιητικής ποιότητας των αλληλουχιών κατόπιν δοκιμαστικής απευθείας αλληλούχησης των προϊόντων PCR) και ακολούθησε αλληλούχηση με τους κατάλληλα σημασμένους εκκινητές VdIGSpF2 και VdIGSpR, οι οποίοι είχαν σχεδιασθεί – βάσει πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών IGS – για πρόσδεση σε συντηρημένες θέσεις εκατέρωθεν της πολυμορφικής υποπεριοχής P. Στη δομική και φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών που ακολούθησε συμπεριελήφθησαν οι αλληλουχίες 18 ακόμα στελεχών *Verticillium* που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων GenBank (συνολικά μελετήθηκαν οι αλληλουχίες από 59 στελέχη *V. dahliae* όλων των VCGs, 4 *V. albo-atrum* και 5 *V. longisporum*· Πίνακας 3.2).

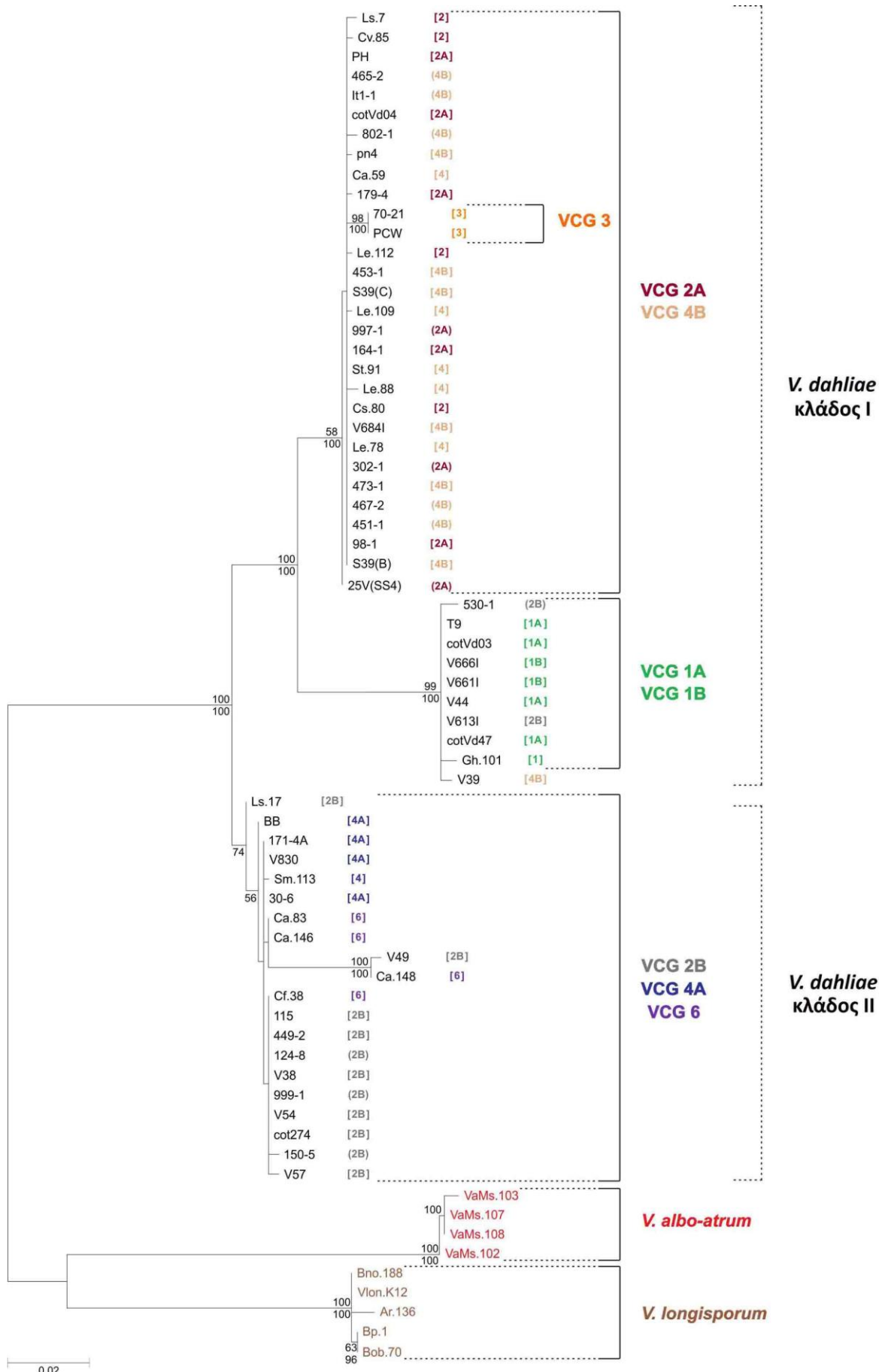
Με τη δομική ανάλυση των αλληλουχιών βρέθηκε πως τα μέλη κάθε μιας VCG ήταν παρόμοια όσον αφορά τη δομή της υποπεριοχής P, ενώ χαρακτηριστικές διαφορές εντοπίστηκαν μεταξύ διαφορετικών VCGs. Τα στελέχη των VCGs 2A, 4B και 3 χαρακτηρίζονταν από κοινή οργάνωση επαναλήψεων R-A-R-B στις αλληλουχίες τους, ενώ στα στελέχη που ανήκαν στις VCGs 1, 2B, 4A και 6 ανιχνεύθηκε η σύνθετη ομάδα I-t-B*-R (Εικόνα 3.7γ και δ). Χαρακτηριστική για όλα τα μέλη της VCG 1 ήταν επίσης η ύπαρξη μιας ομάδας αποτελούμενης από 4-8 διαδοχικές επαναλήψεις του στοιχείου R.

Η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της δομικής μελέτης και επέτρεψε περαιτέρω τη διάκριση αλλά και τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των VCGs του *V. dahliae* (το φυλογενετικό δένδρο που προέκυψε παρατίθεται στην Εικόνα 3.8). Το είδος *V. dahliae* διαχωρίστηκε με άριστη φυλογενετική υποστήριξη σε δύο κύριους ενδοειδικούς κλάδους, με τον πρώτο να περιλαμβάνει τα στελέχη των VCGs 1, 2A, 4B και 3 (κλάδος I), ενώ στον άλλο εντάχθηκαν οι VCGs 2B, 4A και 6 (κλάδος II). Ο κλάδος I υποδιαιρέθηκε περαιτέρω με σαφήνεια σε δύο ομάδες, εκ των οποίων η μία περιείχε όλα τα στελέχη της VCG 1, διακριτά από τις VCG 2B και 4A (στην άλλη υποομάδα). Εντός του κλάδου II δεν ήταν σαφής η φυλογενετική διάκριση μεταξύ των VCGs 2B, 4A και 6, αν και παρατηρήθηκε μια τάση διαχωρισμού τους. Η VCG 2B αποδείχθηκε η πλέον ετερογενής ομάδα, με δύο μέλη της να εντάσσονται στον κλάδο της VCG 1, μαζί και με μια εξαίρεση της VCG 4B. Προκειμένου να αποκλεισθεί η πιθανότητα εσφαλμένης ταξινόμησης αυτών των στελεχών σε VCGs, η διαδικασία κατάταξής τους επαναλήφθηκε και επιβεβαιώθηκε ο αρχικός χαρακτηρισμός τους. Τέλος, με τη φυλογενετική ανάλυση της πολυμορφικής υποπεριοχής P των αλληλουχιών IGS επετεύχθη άριστος διαχωρισμός στο επίπεδο του είδους για τα *V. dahliae*, *V. albo-atrum* και *V. longisporum* (Εικόνα 3.8).

Πίνακας 3.2				
Στελέχη <i>Verticillium</i> που χρησιμοποιήθηκαν για τη δομική και τη φυλογενετική μελέτη της πολυμορφικής υποπεριοχής IGS P, με την κατάταξη σε VCGs, τους ξενιστές, τη γεωγραφική προέλευση και τους κωδικούς GenBank των αντίστοιχων αλληλουχιών IGS				
Στέλεχος ^α	VCG ^β	Ξενιστής	Προέλευση	Κωδικός GenBank
<i>V. dahliae</i>				
T9	1A	βαμβάκι	ΗΠΑ (CA)	KC152269
V44	1A	βαμβάκι	ΗΠΑ (TX)	KC152270
cotVd03	1A	βαμβάκι	Τουρκία	KC152271
cotVd47	1A	βαμβάκι	Τουρκία	KC152272
V661I	1B	βαμβάκι	Ελλάδα	KC152273
V666I	1B	βαμβάκι	Ελλάδα	KC152274
Gh.101	1	βαμβάκι	ΗΠΑ (CA)	DQ165203
PH	2A	φιστίκι	ΗΠΑ (CA)	KC152275
cotVd04	2A	βαμβάκι	Τουρκία	KC152279
98-1	2A	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152278
164-1	2A	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152277
179-4	2A	πεπόνι	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152276
302-1	2A (2B)	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152293
115	2B	βαμβάκι	Συρία	KC152281
V54	2B	πιπεριά	Αυστρία	KC152280
cot274	2B	βαμβάκι	Ισραήλ	KC152282
V38	2B	ηλιοτρόπιο	Γερμανία	KC152284
V49	2B	πιπεριά	Αυστρία	KC152285
V57	2B	φράουλα	Γερμανία	KC152286
Ls.17	2B	μαρούλι	ΗΠΑ (CA)	KC152288
V613I	2B	αγκινάρα	Ισπανία	KC152287
449-2	2B	μπρόκολο	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152283
Cf.38 ^γ	2B	καυτερή πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	KC152317
124-8	2B (1)	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152289
530-1	2B (2A)	πιπεριά	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152294
997-1	2B (2A)	μελιτζάνα	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152290
25V (SS4)	2AB (1, 4A)	βαμβάκι	ΗΠΑ	KC152295
150-5	2B (2A, 4A)	τομάτα	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152291
999-1	2B (4A, 4B)	μελιτζάνα	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152292
Le.112	2	τομάτα	ΗΠΑ (CA)	FJ931480
Ls.7	2	μαρούλι	ΗΠΑ (CA)	DQ165207
Cs.80	2	αγκινάρα	ΗΠΑ (CA)	DQ165201
Cv.85	2	καρπούζι	ΗΠΑ (CA)	DQ165240
70-21	3	πιπεριά	ΗΠΑ (AZ)	KC152296
PCW	3	πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	KC152297
BB	4A	πατάτα	ΗΠΑ (ID)	KC152298
30-6	4A	πατάτα	Καναδάς	KC152299
V830	4A	πατάτα	ΗΠΑ (OH)	KC152301
171-4A	4A	πατάτα	ΗΠΑ	KC152300
S39	4B	πατάτα	ΗΠΑ (OH)	KC152302, KC152303
pn4	4B	αραχίδα	Ισραήλ	KC152304
V39	4B	ηλιοτρόπιο	Γερμανία	KC152308
V684I	4B	αγκινάρα	Ισπανία	KC152307
453-1	4B	βίκος	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152305
473-1	4B	κολοκύθι	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152306
451-1	4B (4A)	μαρούλι	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152309
465-2	4B (4A)	κατιφές	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152310
467-2	4B (4A)	βρωμολάχανο	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152312
802-1	4B (4A)	ελιά	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152311

It1-1	4B (3, 4A)	μαρούλι	Ελλάδα (Κρήτη)	KC152313
Ca.59	4	πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	DQ165195
Le.78	4	τομάτα	ΗΠΑ (CA)	FJ931478
Le.88	4	τομάτα	ΗΠΑ (CA)	FJ931479
Le.109	4	τομάτα	ΗΠΑ (CA)	DQ165238
Sm.113	4	μελιτζάνα	ΗΠΑ (MD)	DQ165205
St.91	4	πατάτα	ΗΠΑ (ID/OR)	DQ165231
Ca.83	6	πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	KC152314
Ca.146	6	πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	KC152315
Ca.148	6	πιπεριά	ΗΠΑ (CA)	KC152316
<i>V. albo-atrum</i>				
Ms.102	-	τριφύλλι	ΗΠΑ (PA)	KC152318
Ms.103	-	τριφύλλι	ΗΠΑ (PA)	DQ165192
Ms.107	-	τριφύλλι	ΗΠΑ (PA)	FJ931528
Ms.108	-	τριφύλλι	ΗΠΑ (PA)	GQ336791
<i>V. longisporum</i>				
Ar.136	-	χρένο ^δ	ΗΠΑ (IL)	DQ165183
Bno.188	-	ελαιοκράμβη	Γερμανία	DQ165185
Bob.70	-	κουνουπίδι	ΗΠΑ (CA)	DQ165187
Bp.1	-	κινέζικο λάχανο ^δ	ΗΠΑ (CA)	DQ165190
K12	-	ελαιοκράμβη	Ρωσία	KC152319
^α Οι αλληλουχίες IGS των στελεχών με έντονους χαρακτήρες αποκτήθηκαν στην παρούσα εργασία.				
^β Ορισμένα στελέχη είναι γνωστό ότι αντιδρούν σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας με τα στελέχη ελέγχου περισσότερων της μίας VCGs· σε αυτές τις περιπτώσεις, οι δευτερεύουσες αντιδράσεις παρατίθενται σε παρενθέσεις.				
^γ Η αρχική κατάταξη του στελέχους <i>V. dahliae</i> Cf.38 (στη VCG 6) αναθεωρήθηκε στην παρούσα διατριβή και το στέλεχος κατατάχθηκε εκ νέου στη VCG 2B.				
^δ Ξενιστές επιπλέον όσων αναφέρονται στις υποσημειώσεις του Πίνακα 2.1: <i>Armoracia rusticana</i> (horseradish) = χρένο, <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> (napa cabbage) = κινέζικο λάχανο.				

Εικόνα 3.8 (επόμενη σελίδα). Φυλογενετικό δένδρο από ανάλυση ML των πολυμορφικών αλληλουχιών IGS P από 68 στελέχη *Verticillium*. Δίπλα στους κλάδους παρατίθενται όσες τιμές υποστήριξης bootstrap της ανάλυσης ML (από 1000 επαναλήψεις) ήταν άνω του 50% (επάνω) και οι αντίστοιχες εκ των υστέρων πιθανότητες της ανάλυσης BI (κάτω), που υπολογίστηκαν από 1500000 γενιές. Δίπλα στον κωδικό αριθμό κάθε στελέχους παρατίθεται η κατάταξή του σε VCGs σε αγκύλες, ή η κύρια VCG σε παρενθέσεις για όσα στελέχη αντιδρούν με τα στελέχη ελέγχου περισσότερων της μίας VCGs. Δεξιά από το δένδρο επισημαίνεται η ομαδοποίηση των στελεχών σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης σε VCGs και οι κύριοι κλάδοι (για το *V. dahliae*) ή τα είδη (για τα *V. albo-atrum* και *V. longisporum*) (προσαρμογή από Papaioannou *et al.*, 2013a).



3.1.8 Μελέτη κατανομής εσωνίων τύπου I του γονιδίου 18S του πυρηνικού rDNA

A. Σάρωση συλλογής στελεχών *Verticillium* με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο 18S

Για την ανίχνευση εισδοχών στο γονίδιο 18S (SSU), η κωδική περιοχή του γονιδίου (εξαιρουμένων των 79 bp του 5' άκρου) ενισχύθηκε με PCR με τους εκκινητές 18SVDF-R, από ολικό DNA κάθε ενός εκ των 114 στελεχών *Verticillium* του Πίνακα 3.3. Για 5 εκ των 6 στελεχών *V. longisporum* το προϊόν ενίσχυσης είχε μέγεθος 2,5 kb, το οποίο αποδίδεται στην ύπαρξη ενός ήδη περιγεγραμμένου εσωνίου τύπου I (Kararapa & Typas, 2001). Προς επαλήθευση αυτής της υπόθεσης, το προϊόν PCR για το στέλεχος *V. longisporum* K12 υποκλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε· η αλληλουχία της εισδοχής ήταν ταυτόσημη με την κατατεθειμένη αλληλουχία του εσωνίου (κωδικός GenBank: AF153421), το οποίο στο εξής θα αναφέρεται ως εσώνιο Vert.S943-1. Το έκτο στέλεχος *V. longisporum* χαρακτηρίστηκε από προϊόν PCR μεγέθους 1,7 kb, που είναι ενδεικτικό της απουσίας εισδοχών στο γονίδιο 18S (Εικόνα 3.9α).

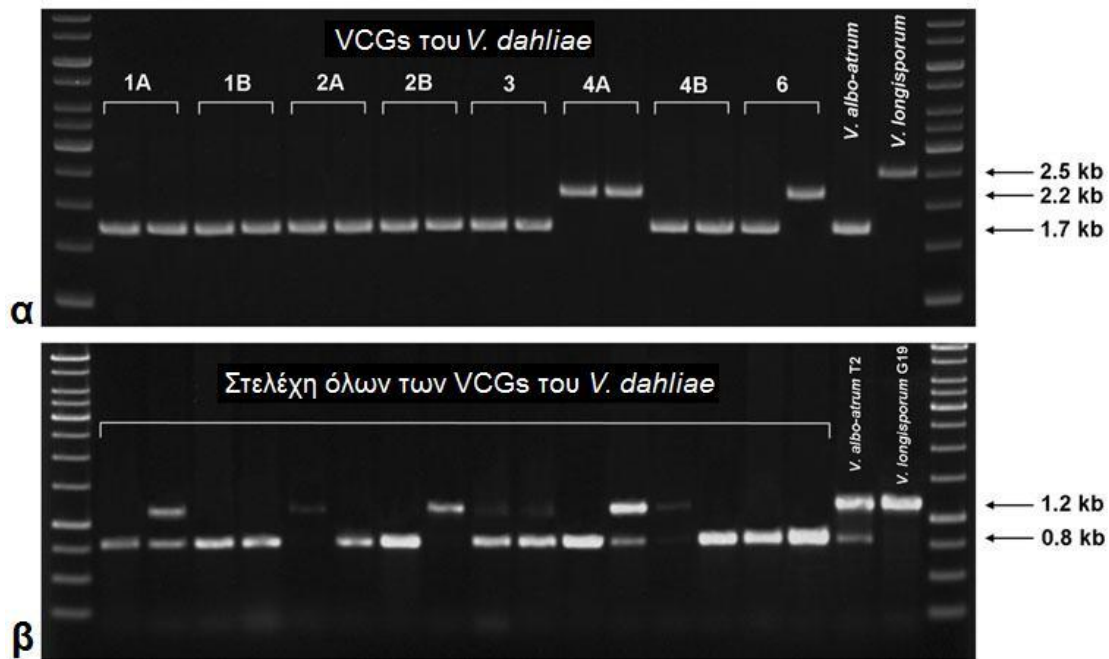
Η πλειοψηφία των στελεχών του *V. dahliae* απέδωσε προϊόν PCR μεγέθους 1,7 kb. Ωστόσο, για 14 από τα 16 στελέχη της VCG 4A και τα 3 στελέχη της VCG 6 που έχουν απομονωθεί από τη γλυκιά πιπεριά, το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης ήταν 2,2 kb (Εικόνα 3.9α). Το προϊόν PCR του στελέχους *V. dahliae* BB (VCG 4A) υποκλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε εξ ολοκλήρου (κωδικός GenBank: KF318969). Η ανάλυση της αλληλουχίας κατέδειξε την ύπαρξη μίας εισδοχής μήκους 475 bp, στην ίδια θέση του γονιδίου 18S όπως και στο *V. longisporum* (νουκλεοτιδική θέση 1165, η οποία αντιστοιχεί στη θέση 943 της ομόλογης αλληλουχίας του βακτηρίου *E. coli*) (Εικόνα 3.10α). Η εισδοχή ήταν όμοια σε αλληλουχία με το εσώνιο Vert.S943-1, με την εξαίρεση δύο ελλείψεων (μήκους 180 και 186 bp, αντίστοιχα), ενώ όλα τα χαρακτηριστικά μοτίβα των εσωνίων τύπου I (στοιχεία IGS, P, Q, R, S και 3' άκρου) ήταν ταυτόσημα μεταξύ των δύο εισδοχών. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα και τη δομική σύγκριση με αντιπροσώπους όλων των υποομάδων των εσωνίων τύπου I, η εισδοχή του *V. dahliae* BB χαρακτηρίστηκε ως τυπικό εσώνιο τύπου I (υποομάδα IC1), και συμβολίστηκε ως Vert.S943-2. Με τη σύγκριση των προβλεπόμενων δομών των δύο εσωνίων βρέθηκε πως οι δύο εισδοχές/ελλείψεις βρίσκονται εντός των τμημάτων της αλληλουχίας που σχηματίζουν τις θηλιές P6 και P8, ενώ όλα τα πιθανά λειτουργικά στοιχεία παραμένουν ανέπαφα (Εικόνα 3.10β). Πέραν του εσωνίου, η σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου 18S με όσες υπάρχουν κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων GenBank έδειξε πως το γονίδιο είναι ιδιαίτερα συντηρημένο στο *V. dahliae* (99,0-100% ταυτότητα).

Τρία επιπλέον στελέχη από κάθε μία εκ των VCGs 4A και 6 επιλέχθηκαν τυχαία (30-6, 171-4A και V830 της VCG 4A, Ca.83, Ca.146 και Ca.148 της VCG 6), υποβλήθηκαν σε PCR με τους εκκινητές 18Sc/e (οι θέσεις πρόσδεσής τους επισημαίνονται στην Εικόνα 3.10α), και τα προϊόντα ενίσχυσης κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν (κωδικοί GenBank: KF318970-75). Όλα τα στελέχη περιείχαν το ίδιο εσώνιο (Vert.S943-2), στην ίδια θέση του γονιδίου 18S, και οι αλληλουχίες του εσωνίου μεταξύ των στελεχών ήταν ταυτόσημες. Επιπλέον, για δύο στελέχη της VCG 4A η ενίσχυση PCR του γονιδίου 18S απέδωσε διπλές ζώνες DNA, μεγεθών 1,7 και 2,2 kb, υποδηλώνοντας πως οι ριβοσωμικές επαναλήψεις αυτών των στελεχών είναι ετερογενείς σε σχέση με την παρουσία/απουσία του εσωνίου Vert.S943-2. Τέλος, η ενίσχυση με PCR του γονιδίου 18S από τους αντιπροσώπους των *V. albo-atrum*, *V. tricorpus* και *V. nubilum* απέδωσε προϊόντα μεγέθους 1,7 kb (Πίνακας 3.3).

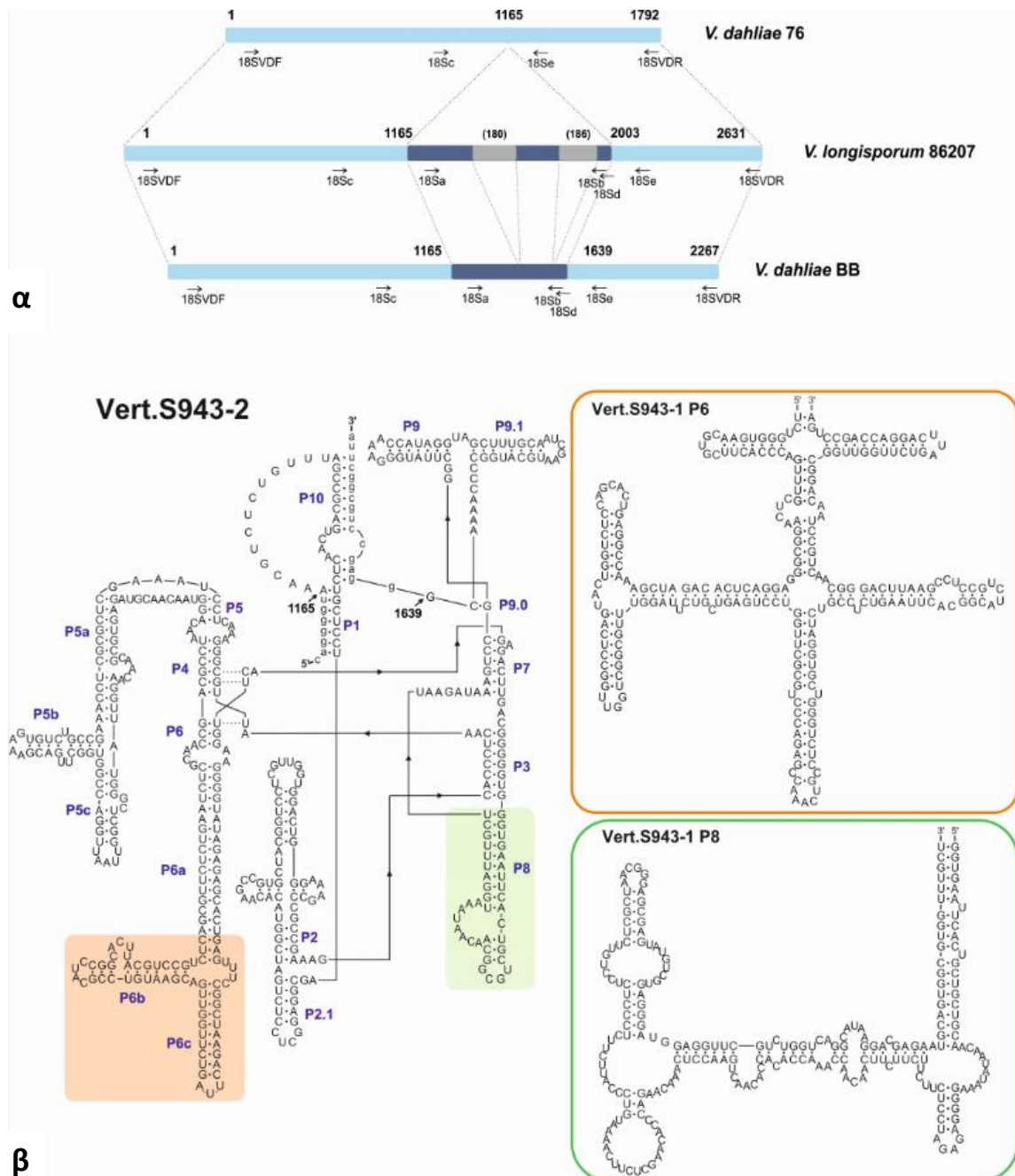
Πίνακας 3.3				
Στελέχη <i>Verticillium</i> που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της κατανομής των εσωνίων τύπου I στο γονίδιο 18S (SSU) του πυρηνικού rDNA (περισσότερες πληροφορίες για τα στελέχη παρατίθενται στον Πίνακα 2.1)				
Στέλεχος	VCG ^a	18SVDF/R ^b	18Sa/b ^b	18Sc/d ^b
<i>V. dahliae</i>				
T9	1A	1.7	0.4	0.8
V44 ^y	1A	1.7	0.4	0.8
V138I ^y	1A	1.7	0.4	0.8
cotVd03 ^y	1A	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
cotVd11	1A	1.7	0.4	0.8
cotVd47 ^y	1A	1.7	0.4	0.8
V607I ^y	1B	1.7	0.4	0.8
V661I ^y	1B	1.7	0.4	0.8
V666I ^y	1B	1.7	0.4	0.8
Dvd-T5	2A	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
PH ^y	2A	1.7	0.4	0.8
V320I	2A	1.7	0.4	0.8
V720I ^y	2A	1.7	0.4	0.8
V800I ^y	2A	1.7	0.4	0.8
cotVd04	2A	1.7	0.4	0.8
egpVd17 ^y	2A	1.7	0.4	0.8
98-1 ^y	2A	1.7	-	-
113-1	2A	1.7	-	-
140-2	2A	1.7	-	-
164-1 ^y	2A	1.7	-	-
179-4	2A	1.7	-	-
247b-3	2A	1.7	-	-
136-3 ^y	2A (2B)	1.7	-	-
302-1 ^y	2A (2B)	1.7	-	-
998-1	2A (2B, 4A)	1.7	-	-
115 ^y	2B	1.7	0.4	0.8
V54	2B	1.7	0.4	0.8
cot274	2B	1.7	0.4	0.8
V16	2B	1.7	0.4	0.8
V38 ^y	2B	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
V42	2B	1.7	-	-
V49	2B	1.7	0.4	0.8
V57 ^y	2B	1.7	0.4	0.8
Ls.17 ^y	2B	1.7	0.4	0.8
V357I	2B	1.7	0.4	0.8
V510I	2B	1.7	0.4	0.8
V613I	2B	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
449-2	2B	1.7	0.4	0.8
Cf.38 ^{y,δ}	2B	1.7	0.4	0.8

V702I ^Y	2Ba	1.7	0.4	0.8
124-8	2B (1)	1.7	-	-
530-1 ^Y	2B (2A)	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
577-1	2B (2A)	1.7	-	-
997-1 ^Y	2B (2A)	1.7	-	-
150-5 ^Y	2B (2A, 4A)	1.7	-	-
525-1	2B (2A, 4A)	1.7	-	-
999-1 ^Y	2B (4A, 4B)	1.7	0.4	0.8
25V (SS4)	2AB (1, 4A)	1.7	0.4	0.8
70-21 ^Y	3	1.7	0.4	0.8
PCW ^Y	3	1.7	0.4	0.8
BB ^Y	4A	2.2	0.4	0.8
30-6	4A	1.7+2.2	0.4	0.8
Dvd-E6 ^Y	4A	2.2	0.4	0.8
86	4A	2.2	0.4	0.8
90	4A	2.2	0.4	0.8
108	4A	2.2	0.4	0.8
111	4A	2.2	0.4	0.8
129	4A	2.2	0.4	0.8
170	4A	1.7	0.4	0.8
21-18	4A	2.2	0.4	0.8
66-13	4A	2.2	0.4	0.8
83-1	4A	2.2	0.4	0.8
P103	4A	2.2	0.4	0.8
V830 ^Y	4A	2.2	0.4	0.8
131-M ^Y	4A	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
171-4A ^Y	4A	1.7+2.2	0.4	0.8
S39	4B	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
pn4 ^Y	4B	1.7	0.4	0.8
149	4B	1.7	0.4	0.8
V39 ^Y	4B	1.7	0.4	0.8
egpVd02 ^Y	4B	1.7	0.4	0.8
V684I ^Y	4B	1.7	0.4	0.8
16-1	4B	1.7	-	-
44-3	4B	1.7	-	-
273-1 ^Y	4B	1.7	-	-
413-5	4B	1.7	-	-
453-1	4B	1.7	-	-
455-1	4B	1.7	-	-
461-3	4B	1.7	-	-
463-1 ^Y	4B	1.7	-	-
464-3	4B	1.7	-	-
473-1	4B	1.7	-	-
un1-1 ^Y	4B	1.7	-	-
235-1	4B (4A)	1.7	-	-
451-1	4B (4A)	1.7	-	-

456-1 ^Y	4B (4A)	1.7	-	-
465-2	4B (4A)	1.7	0.4	0.8
466-1	4B (4A)	1.7	-	-
467-2 ^Y	4B (4A)	1.7	-	-
469-1	4B (4A)	1.7	-	-
478-1	4B (4A)	1.7	-	-
554-1	4B (4A)	1.7	-	-
578-1	4B (4A)	1.7	0.4	0.8
802-1	4B (4A)	1.7	-	-
It1-1	4B (3, 4A)	1.7	-	-
Ca.83 ^Y	6	2.2	0.4	0.8
Ca.146 ^Y	6	2.2	0.4	0.8
Ca.148 ^Y	6	2.2	0.4	0.8
Cf.162 ^{Y,ε}	HSI	1.7	0.4	0.8
V13	HSI ^{στ}	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
Vd76	ΔA ^ζ	1.7	-	-
CA26	-	1.7	0.4	0.8
<i>V. longisporum</i>				
81 ^Y	-	2.5	0.7	1.2
161	-	2.5	0.7	1.2
86207	-	2.5	0.7	1.2
G19 ^Y	-	1.7	0.7	1.2
G22	-	2.5	0.7	1.2
K12 ^Y	-	2.5	0.7	1.2
<i>V. albo-atrum</i>				
220 ^Y	-	1.7	0.7	1.2
M33	-	1.7	0.7	1.2
T2 ^Y	-	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
V90	-	1.7	0.7	1.2
<i>Verticillium spp.</i>				
<i>V. tricorpus</i> 22	-	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
<i>V. nubilum</i> 278734	-	1.7	0.4+0.7	0.8+1.2
^α Ορισμένα στελέχη είναι γνωστό ότι αντιδρούν σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας με τα στελέχη ελέγχου περισσότερων της μίας VCGs· σε αυτές τις περιπτώσεις, οι δευτερεύουσες αντιδράσεις παρατίθενται σε παρενθέσεις.				
^β Παρατίθεται το μέγεθος (σε kb) των προϊόντων ενίσχυσης PCR που ελήφθησαν με τη χρήση των αντίστοιχων εκκινητών, όπως προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτώματα αγαρόζης.				
^γ Επισημαίνονται τα στελέχη που ελέγχθηκαν για την παρουσία εισδοχών στο γονίδιο 28S (LSU).				
^δ Η αρχική κατάταξη του στελέχους <i>V. dahliae</i> Cf.38 (στη VCG 6) αναθεωρήθηκε στην παρούσα διατριβή και το στέλεχος κατατάχθηκε εκ νέου στη VCG 2B.				
^ε Η αρχική κατάταξη του στελέχους <i>V. dahliae</i> Cf.162 (στη VCG 6) αναθεωρήθηκε στην παρούσα διατριβή και το στέλεχος χαρακτηρίστηκε εκ νέου ως αυτο-ασύμβατο (HSI).				
^{στ} HSI = ετεροκαρυωτικά αυτο-ασύμβατα στελέχη (heterokaryon self-incompatible).				
^ζ ΔA = δεν αντέδρασε σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας με τα στελέχη ελέγχου καμίας VCG.				



Εικόνα 3.9. Φωτογραφίες ηλεκτροφορήσεων σε πηκτώματα αγαρόζης προϊόντων PCR. **(α)** Σάρωση PCR με το ζεύγος εκκινητών 18SVDF-R των αντιπροσωπευτικών στελεχών *Verticillium dahliae* T9 και cotVd03 (VCG 1A), V661I και V607I (VCG 1B), Dvd-T5 και PH (VCG 2A), V54 και 115 (VCG 2B), 70-21 και PCW (VCG 3), BB και 21-18 (VCG 4A), S39 και 461-3 (VCG 4B), Cf.38 (πρώην VCG 6, αναθεωρήθηκε σε VCG 2B), Ca.146 (VCG 6), *V. albo-atrum* M33 και *V. longisporum* K12 (στις διαδρομές 2-18, αντίστοιχα). Η εκτίμηση των μοριακών μεγεθών των προϊόντων PCR έχει πραγματοποιηθεί με παράλληλη ηλεκτροφόρηση της κλίμακας 1 kb DNA ladder (Fermentas) στην πρώτη και την τελευταία διαδρομή της ηλεκτροφόρησης. **(β)** Σάρωση PCR με το ειδικό για τα εσώνια ζεύγος εκκινητών 18Sc/d επιλεγμένων στελεχών όλων των VCGs του *V. dahliae*: T9, cotVd03, V661I, V607I, Dvd-T5, PH, 115, V38, V613I, 530-1, 70-21, 131-M, S39, pn4, Cf.38, Ca.146, *V. albo-atrum* T2 και *V. longisporum* G19 (στις διαδρομές 2-18 της ηλεκτροφόρησης, αντίστοιχα). Παρατηρείται σημαντική ετερογένεια μεταξύ των στελεχών ως προς το περιεχόμενο του γονιδίου 18S σε εσώνια, αλλά και ποικιλότητα στην απόδοση της αντίδρασης PCR για τα προϊόντα ενίσχυσης. Για τα στελέχη Dvd-T5, V38 και S39, η παρουσία της ζώνης DNA μεγέθους 0,8 kb είναι μόλις ορατή στη φωτογραφία αυτού του πηκτώματος αγαρόζης. Η εκτίμηση των μοριακών μεγεθών των προϊόντων PCR έχει πραγματοποιηθεί με παράλληλη ηλεκτροφόρηση της κλίμακας 1 kb DNA ladder (Fermentas) στην πρώτη και την τελευταία διαδρομή της ηλεκτροφόρησης (προσαρμογή από Papaioannou *et al.*, 2014).



Εικόνα 3.10. (α) Σύγκριση της δομικής οργάνωσης των γονιδίων 18S (SSU) του στελέχους *V. dahliae* Vd76, που δεν φέρει εσώνια (κωδικός GenBank: AF104926), του *V. longisporum* 86207 (AF153421), και του *V. dahliae* BB, που προσδιορίστηκε σε αυτήν τη μελέτη (KF318969). Επάνω από τις τρεις σχηματικές αναπαραστάσεις παρατίθενται οι νουκλεοτιδικές θέσεις των εσωνίων και τα μεγέθη των δύο εισδοχών/ελλείψεων μεταξύ των δύο εσωνίων σε παρενθέσεις. Οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών PCR που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα μελέτης της κατανομής των εσωνίων επισημαίνονται με βέλη κάτω από τις αναπαραστάσεις. (β) Η προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή του εσωνίου τύπου I Vert.S943-2. Τμήματα της αλληλουχίας των γειτονικών εξωνίων έχουν συμπεριληφθεί στο μοντέλο για τον ακριβή προσδιορισμό των ελίκων P1 και P10· αυτά τα νουκλεοτίδια εμφανίζονται με πεζούς χαρακτήρες. Τμήματα των περιφερειακών δομών μίσχου-θηλιάς P6 και P8 που είναι διαφορετικά μεταξύ των δύο εσωνίων επισημαίνονται με πλαίσια και οι αντίστοιχες δομές του εσωνίου Vert.S943-1 παρατίθενται στα δεξιά της εικόνας (προσαρμογή από Παραιοαννου *et al.*, 2014).

B. Σάρωση συλλογής στελεχών *Verticillium* με εκκινητές ειδικούς για τα εσώνια

Το ζεύγος εκκινητών 18Sa/b σχεδιάστηκε για πρόσδεση σε συντηρημένες θέσεις των δύο εσωνίων τύπου I (Εικόνα 3.10α), επιτρέποντας με PCR τη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο μορφών λόγω διαφορετικού μεγέθους ενισχυόμενου προϊόντος σε κάθε περίπτωση (0,7 kb για το εσώνιο Vert.S943-1 και 0,4 kb για το Vert.S943-2). Είναι αξιοσημείωτο πως η σάρωση PCR της ίδιας συλλογής των 114 στελεχών *Verticillium* με αυτούς τους εκκινητές απέδωσε προϊόντα του ενός ή και των δύο χαρακτηριστικών μεγεθών από την πλειοψηφία των στελεχών (Εικόνα 3.9β), υποδηλώνοντας ότι η παρουσία του εσωνίου Vert.S943-2 είναι συχνή στο *V. dahliae*, ενώ και το Vert.S943-1 ανιχνεύθηκε σε 8 στελέχη του είδους. Η θέση όλων των εσωνίων στο γονίδιο 18S (Ec943) επιβεβαιώθηκε για όλα τα στελέχη, με επανάληψη της σάρωσης PCR της συλλογής με το ζεύγος εκκινητών 18Sc/d, το οποίο αποδίδει προϊόντα χαρακτηριστικών μεγεθών μόνον εφόσον τα εσώνια βρίσκονται στη συγκεκριμένη θέση του γονιδίου 18S (με μεγέθη 1,2 kb για το εσώνιο Vert.S943-1 και 0,8 kb για το Vert.S943-2· Εικόνα 3.10α) (όλα τα αποτελέσματα των σαρώσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3). Η φύση των εισδοχών και η θέση τους στο γονίδιο 18S επαληθεύθηκε περαιτέρω με αλληλούχηση των προϊόντων ενίσχυσης για τα τυχαία επιλεγμένα στελέχη *V. dahliae* cotVd03 και 131-M (κωδικοί GenBank: KF318977, KF318980) για το εσώνιο Vert.S943-1, και cotVd03, cotVd47 και 115 (κωδικοί GenBank: KF318976, KF318978-79) για το Vert.S943-2.

Όλα τα στελέχη *V. longisporum* (συμπεριλαμβανομένου του στελέχους που φαινόταν να μην φέρει εσώνια με ενίσχυση PCR του γονιδίου 18S), καθώς και 3 εκ των 4 στελεχών *V. albo-atrum*, χαρακτηρίστηκαν από την παρουσία του εσωνίου Vert.S943-1 με χρήση των ειδικών για τα εσώνια εκκινητών. Το τέταρτο στέλεχος *V. albo-atrum*, όπως επίσης και οι αντιπρόσωποι των *V. tricorpus* και *V. nubilum*, απέδωσαν ταυτόχρονα προϊόντα ενίσχυσης χαρακτηριστικά και για τους δύο τύπους εσωνίων (Πίνακας 3.3).

Η παρουσία ή απουσία του ενός ή και των δύο τύπων εσωνίων ελέγχθηκε περαιτέρω με υβριδισμούς κατά Southern για 13 στελέχη *Verticillium* (10 στελέχη *V. dahliae* διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης και όλων των VCGs, 2 *V. longisporum* και 1 *V. albo-atrum*), οι οποίοι επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της σάρωσης PCR με τους ειδικούς για τα εσώνια εκκινητές.

Γ. Ανάλυση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου 18S και των εσωνίων με qPCR

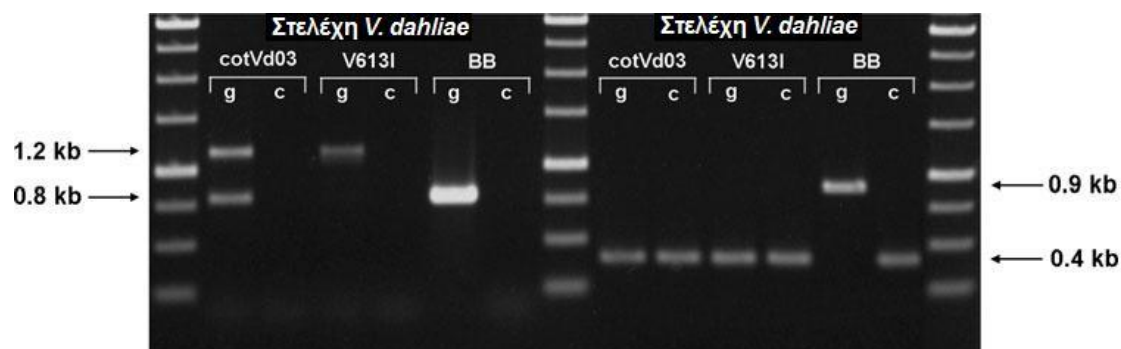
Είναι αξιοσημείωτη η σημαντική ετερογένεια που παρατηρήθηκε κατά τις αναλύσεις PCR στην απόδοση των αντιδράσεων μεταξύ διαφορετικών στελεχών (Εικόνα 3.9β). Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα, που υποδεικνύουν την παρουσία «ακέραιων» αντιγράφων του γονιδίου 18S – χωρίς εσώνια – αλλά και αντιγράφων που φέρουν το ένα ή το άλλο εσώνιο, στο DNA του ίδιου στελέχους (Πίνακας 3.3), υποδηλώνουν πιθανή ετερογένεια στον αριθμό ριβοσωμικών επαναλήψεων μεταξύ στελεχών, αλλά και ποικιλομορφία στο περιεχόμενο εσωνίων του γονιδίου 18S, όχι μόνο μεταξύ στελεχών, αλλά και μεταξύ των ριβοσωμικών επαναλήψεων κάθε στελέχους. Προκειμένου να επαληθευθεί περαιτέρω αυτή η υπόθεση, χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία ποσοτικής αντίδρασης qPCR πραγματικού χρόνου για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου 18S (και κατ' επέκταση της ριβοσωμικής επανάληψης), και του λόγου του πλήθους αντιγράφων των δύο εσωνίων σε επιλεγμένα στελέχη. Ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου 18S αποδείχθηκε όντως ότι ποικίλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών

στελεχών του *V. dahliae*, στο εύρος 39-70 αντιγράφων ανά απλοειδές γονιδίωμα (με μέση τιμή τα 52 αντίγραφα· Πίνακας 3.4). Όσον αφορά την ανίχνευση εσωνίων με τη μεθοδολογία qPCR, τα αποτελέσματα ήταν σε πλήρη συμφωνία με τις συμβατικές σαρώσεις PCR (Πίνακας 3.4). Για δύο στελέχη του *V. dahliae* που έφεραν και τους δύο τύπους εσωνίων σε αντίγραφα του γονιδίου 18S, βρέθηκε ότι η αναλογία των δύο μορφών στο rDNA τους είναι περίπου 25% Vert.S943-1 προς 75% Vert.S943-2, υποδηλώνοντας έτσι ότι το πρώτο εσώνιο, όποτε υπάρχει, απαντάται σε μειοψηφία ριβοσωμικών επαναλήψεων σε στελέχη του *V. dahliae*. Αντιθέτως, όλες οι ριβοσωμικές επαναλήψεις του στελέχους *V. longisporum* K12 βρέθηκε ότι φέρουν το εσώνιο Vert.S943-1 στο γονίδιο 18S (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4			
Αριθμοί αντιγράφων του γονιδίου 18S και αναλογίες αντιγράφων εσωνίων τύπου I, όπως καθορίστηκαν με μεθοδολογία qPCR για επιλεγμένα στελέχη <i>Verticillium</i>			
Στέλεχος	Αριθμός αντιγράφων του 18S ^α	Περιεχόμενο εσωνίων του 18S ^β	Λόγος αντιγράφων εσωνίων στο 18S ^γ
<i>V. dahliae</i> T9	48,24 ± 0,23	μόνον Vert.S943-2	καμία ενίσχυση του Vert.S943-1
<i>V. dahliae</i> V6071	38,65 ± 0,14	μόνον Vert.S943-2	καμία ενίσχυση του Vert.S943-1
<i>V. dahliae</i> V6131	70,40 ± 0,28	και οι δύο τύποι	0,278
<i>V. dahliae</i> cotVd03	48,95 ± 0,19	και οι δύο τύποι	0,208
<i>V. dahliae</i> 273-1	55,36 ± 0,24	απουσία εσωνίων	καμία ενίσχυση εσωνίων
<i>V. longisporum</i> K12	ΔΕ ^δ	μόνον Vert.S943-1	0,957
^α Παρατίθεται η μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (3 δείγματα, σε 2 επαναλήψεις του πειράματος).			
^β Όπως προσδιορίστηκε με συμβατικές αναλύσεις PCR (Πίνακας 3.3).			
^γ Λόγος αντιγράφων του εσωνίου Vert.S943-1 προς το ολικό περιεχόμενο εσωνίων, όπως προσδιορίστηκε με αναλύσεις qPCR πραγματικού χρόνου.			
^δ ΔΕ = δεν εξετάστηκε.			

Δ. Εκτομή των εσωνίων από τα πρόδρομα μετάγραφα του γονιδίου 18S

Ολικό RNA από 3 στελέχη *V. dahliae* με διαφορετικό περιεχόμενο εσωνίων στο γονίδιο 18S (cotVd03, V6131 και BB) απομονώθηκε και υποβλήθηκε σε αντίστροφη μεταγραφή και ανάλυση PCR με τα ζεύγη εκκινητών 18Sc/e και 18Sc/d (οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών επισημαίνονται στην Εικόνα 3.10α). Όταν χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που προσδένονται στο γονίδιο 18S εκατέρωθεν του εσωνίου (18Sc/e), ελήφθησαν προϊόντα μεγέθους που υποδηλώνει απουσία εσωνίων (0,4 kb), ενώ με χρήση ζεύγους εκκινητών ειδικού για το εσώνιο (18Sc/d), δεν ελήφθησαν προϊόντα ενίσχυσης (Εικόνα 3.11). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν την εκτομή και των δύο εσωνίων από τα πρόδρομα ριβοσωμικά μετάγραφα.



Εικόνα 3.11. Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) των στελεχών *Verticillium dahliae* cotVd03, V613I και BB, με τα ζεύγη εκκινητών 18Sc/d (στο πρώτο τμήμα της εικόνας) και 18Sc/e (στο δεύτερο τμήμα). Για κάθε στέλεχος και συνδυασμό εκκινητών, τα προϊόντα PCR επί του γονιδιωματικού DNA (συμβολίζονται ως «g») ή του ολικού cDNA («c»), έχουν ηλεκτροφορηθεί σε παρακείμενες θέσεις στο πήκτωμα αγαρόζης (προσαρμογή από Παπαϊωάννου *et al.*, 2014).

3.1.9 Αναζήτηση εσώνιων στο γονίδιο 28S του πυρηνικού rDNA

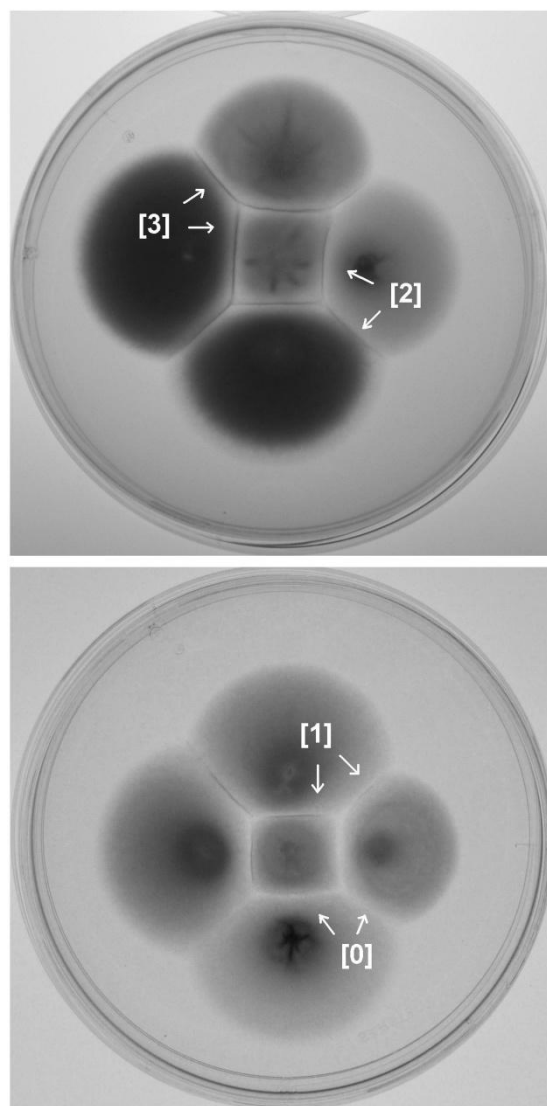
Από πολυάριθμες μελέτες του γονιδίου 28S (LSU) διαφόρων μυκήτων έχει βρεθεί πως εσώνια τύπου I εντοπίζονται συχνά σε συντηρημένες θέσεις μιας περιοχής μεγέθους περίπου 1 kb, πλησιέστερα στο 3' άκρο του γονιδίου (Pantou *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Βάσει αυτής της παρατήρησης και της αλληλουχίας του γονιδίου από το αντιπροσωπευτικό στέλεχος *V. dahliae* Vd76 (κωδικός GenBank: AF104926) σχεδιάστηκε το ζεύγος εκκινητών 28SF-R, με το οποίο έγινε ανάλυση PCR 50 στελεχών *Verticillium*, συμπεριλαμβανομένων αντιπροσώπων όλων των VCGs του *V. dahliae* (Πίνακας 3.3). Από το ολικό DNA όλων των στελεχών προέκυψαν προϊόντα ενίσχυσης μεγέθους 1,2 kb (το αναμενόμενο μέγεθος ενίσχυσης της περιοχής απουσία οποιασδήποτε εισδοχής) χωρίς κανέναν πολυμορφισμό μεγέθους. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν απουσία ανιχνεύσιμων εισδοχών στην 3' περιοχή του γονιδίου 28S.

3.2 Γενετική-φυσιολογική μελέτη της ετεροκαρύωσης στον μύκητα *V. dahliae* και ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών

3.2.1 Ανάλυση σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) και συσχέτισης με την ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα

Κατά τη διάρκεια μιας προκαταρκτικής διερεύνησης των τύπων μυκηλιακής αντεπίδρασης μεταξύ στελεχών *Verticillium* φυσικού τύπου, μια συλλογή 20 στελεχών όλων των ειδών «διασταυρώθηκαν» σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς, σε διαφορετικά πλήρη και ελάχιστα θρεπτικά υλικά, και επώασθησαν υπό διαφορετικές συνθήκες φωτισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στην παραγωγή ζωνών αντεπίδρασης επιδρούν σημαντικά τόσο το *θρεπτικό υπόστρωμα* όσο και οι *συνθήκες επώασης*. Τα αποτελέσματα με τη μέγιστη επαναληψιμότητα διακριτών ζωνών ελήφθησαν επί του θρεπτικού υλικού CM και με επώαση στο σκοτάδι για 10 ημέρες, και αυτές οι συνθήκες εφαρμόστηκαν στα επόμενα πειράματα.

Τα 69 στελέχη *Verticillium* που αναφέρονται στο Παράρτημα 5 χρησιμοποιήθηκαν σε 692 διαφορετικούς συνδυασμούς «διασταύρωσης» (σε τουλάχιστον 2 επαναλήψεις έκαστη· τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα 5). Τέσσερις τύποι αντιδράσεων παρατηρήθηκαν γενικά για όλα τα είδη *Verticillium*: (α) ο σχηματισμός ζώνης αντεπίδρασης κατά μήκος της περιοχής επαφής των αποικιών των στελεχών, δηλαδή μιας διακριτής ζώνης συμπυκνωμένων υφών, συχνά με ταυτόχρονη παραγωγή σκούρας χρωστικής (η ένταση των ζωνών αντεπίδρασης κατηγοριοποιήθηκε σε μια αυθαίρετη κλίμακα 0-3· παραδείγματα απεικονίζονται στην Εικόνα 3.12), (β) συγχώνευση των αποικιών χωρίς καμία μορφολογική διαφοροποίηση, (γ) υπερκάλυψη της μιας αποικίας από την άλλη, και (δ) δημιουργία διαυγούς ζώνης χωρίς υφές ή με λεπτό μυκήλιο μεταξύ των αποικιών. Ο σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης ήταν ο συχνότερος τύπος αντίδρασης (παρατηρήθηκε στο 80,4 και 75,4% των «διασταυρώσεων» για το *V. dahliae* ή όλα τα είδη *Verticillium*, αντίστοιχα· Πίνακας 3.5), και μάλιστα καταγράφηκε και σε «διασταυρώσεις» αποικιών του ίδιου στελέχους με ακόμα μεγαλύτερες συχνότητες (90,7 και 84,4%, αντίστοιχα). Οι υπόλοιποι τύποι αντιδράσεων ήταν σπανιότεροι, με τον τύπο (γ) να απαντάται κυρίως σε διαειδικές δοκιμασίες. Για σύγκριση, 385 διαφορετικοί συνδυασμοί της ίδιας συλλογής στελεχών «διασταυρώθηκαν» (σε τουλάχιστον 2 επαναλήψεις έκαστος) σε θρεπτικό υλικό MM (Παράρτημα 6), όπου παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αναστολή της παραγωγής ζωνών αντεπίδρασης (14,3% για όλα τα είδη), με τον τύπο αντίδρασης (δ) να επικρατεί σε αυτές τις συνθήκες. Όσον αφορά την επαναληψιμότητα της μεθόδου, για τη μεγάλη πλειοψηφία των «διασταυρώσεων» τα αποτελέσματα των επαναλήψεων ήταν πανομοιότυπα. Προκειμένου να επαληθευθεί αυτή η παρατήρηση, 24 τυχαία επιλεγμένοι συνδυασμοί επαναλήφθηκαν 10 φορές έκαστος· τα αποτελέσματα ήταν πάντοτε πανομοιότυπα σχετικά με την παραγωγή ζωνών και όμοια σε ποσοστό 80-100% (κατά μέσο όρο 86,3%) όσον αφορά την εκτίμηση της έντασης των ζωνών (Παράρτημα 5).



Εικόνα 3.12. Τύποι μυκηλιακής ανταπίδρασης μεταξύ στελεχών *Verticillium dahliae* φυσικού τύπου στο θρεπτικό υλικό CM, στο τέλος της περιόδου επώασης (10 ημέρες). Η κλίμακα 4 σημείων (0-3) που χρησιμοποιήθηκε για την κατηγοριοποίηση των ζωνών ανταπίδρασης ανάλογα με την έντασή τους, απεικονίζεται με αντιπροσωπευτικά παραδείγματα (επισημαίνονται με βέλη· για κάθε παράδειγμα, η αντίστοιχη κλάση στην κλίμακα 0-3 σημειώνεται σε αγκύλη).

Πίνακας 3.5						
Συχνότητα (%) και μέση ένταση (σε κλίμακα 0-3· παρατίθεται σε παρένθεση) του σχηματισμού ζωνών ανταπίδρασης (barrage zones) μεταξύ ειδών <i>Verticillium</i>						
είδος	Vd	Vaa	Vlon	Vtr	Vnubi	Gnig
Vd	80,4 (1,9)	75,0 (1,8)	66,0 (1,9)	55,6 (1,9)	44,4 (1,5)	82,4 (1,5)
Vaa	75,0 (1,8)	64,3 (2,0)	45,5 (1,6)	75,0 (1,7)	0	100 (1,3)
Vlon	66,0 (1,9)	45,5 (1,6)	64,3 (1,5)	62,5 (1,5)	33,3 (1,5)	25,0 (2,0)
Vtr	55,6 (1,9)	75,0 (1,7)	62,5 (1,5)	87,5 (1,7)	100 (1,0)	83,3 (1,4)
Vnubi	44,4 (1,5)	0	33,3 (1,5)	100 (1,0)	100 (2,5)	0
Gnig	82,4 (1,5)	100 (1,3)	25,0 (2,0)	83,3 (1,4)	0	60,0 (1,4)

^a Συντομογραφίες ειδών: Vd = *V. dahliae*, Vaa = *V. albo-atrum*, Vlon = *V. longisporum*, Vtr = *V. tricorpus*, Vnubi = *V. nubilum*, Gnig = *Gibellulopsis nigrescens* (πρώην *V. nigrescens*).

Είναι αξιοσημείωτο πως για το είδος *V. dahliae* δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής ζωνών αντεπίδρασης και της ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας (κατά το σύστημα των μεταλλαγών *nit*). Αντιθέτως, ζώνες σχηματίστηκαν εξίσου συχνά σε «διασταυρώσεις» στελεχών που ανήκαν στην ίδια ή σε διαφορετικές VCGs (Πίνακας 3.6). Επιπλέον, ορισμένα στελέχη ήταν συμβατά (δεν σχημάτιζαν ζώνες αντεπίδρασης) με μόνον το ένα μέλος συμβατών «διασταυρώσεων», ενώ άλλα ήταν συμβατά και με τα δύο μέλη ασύμβατων «διασταυρώσεων». Αυτές οι παρατηρήσεις εμπόδισαν τη σαφή κατάταξη των στελεχών σε ομάδες μυκηλιακής συμβατότητας. Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως η συχνότητα και η ένταση του σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης ήταν γενικά χαρακτηριστικές για κάθε στέλεχος, με ακραία παραδείγματα στελέχη που έτειναν να σχηματίσουν ζώνες με όλα ή τα περισσότερα άλλα στελέχη (π.χ. στελέχη *V. dahliae* V16, Dvd-E6 και V13· Πίνακας 3.7), και στελέχη που αδυνατούσαν γενικά να σχηματίσουν ζώνες (π.χ. στελέχη *V. dahliae* cotVd47, 131-M και *V. longisporum* Dk-1).

Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα συσχέτισης μεταξύ της μυκηλιακής συμβατότητας και της μορφολογίας της αποικίας, ένα σύνολο 26 στελεχών, συμπεριλαμβανομένων αντιπροσωπευτικών στελεχών όλων των VCGs του *V. dahliae*, μελετήθηκε ως προς το τάχος αύξησης των αποικιών τους, την πυκνότητα των εναέριων υφών και την παραγωγή χρωστικής στο θρεπτικό υλικό CM (Πίνακας 3.7). Ο σχηματισμός των ζωνών αντεπίδρασης δεν σχετιζόταν με την ταχύτητα αύξησης και την πυκνότητα των υφών, αλλά στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν – τόσο για τη συχνότητα των ζωνών ($p = 0,001$) όσο και την έντασή τους ($p = 0,008$) – μεταξύ στελεχών με περιορισμένη και εκτεταμένη παραγωγή χρωστικής, με τα πρώτα να είναι περισσότερο δραστήρια στην παραγωγή ζωνών αντεπίδρασης (Παράρτημα 7). Όταν πραγματοποιήθηκε ανάλυση 328 «διασταυρώσεων» μεταξύ αυτών των 26 στελεχών σε σχέση με τη συνολική ικανότητα παραγωγής χρωστικής για κάθε ζεύγος, ήταν δυνατή η διάκριση τριών ομάδων ζευγών (με μικρή, ενδιάμεση και μεγάλη συνολική ικανότητα παραγωγής χρωστικής) με στατιστικά σημαντικές ($p = 0,01$) διαφορές μεταξύ τους στον σχηματισμό ζωνών αντεπίδρασης (Παράρτημα 8).

Πίνακας 3.6

Συχνότητα (%) και μέση ένταση (σε κλίμακα 0-3· παρατίθεται σε παρένθεση) του σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) μεταξύ των VCGs του *Verticillium dahliae*

VCG	1A	1B	2A	2B	3	4A	4B	6	HSI
1A	92,9 (2,2)	75,0 (1,8)	54,5 (2,0)	86,7 (1,9)	75,0 (1,8)	77,8 (1,9)	57,1 (2,0)	75,0 (2,3)	100 (2,5)
1B	75,0 (1,8)	100 (2,3)	33,3 (1,0)	66,7 (1,3)	100 (2,0)	100 (1,5)	100 (2,5)	100 (1,3)	0
2A	54,5 (2,0)	33,3 (1,0)	92,3 (2,4)	72,0 (1,8)	75,0 (1,6)	100 (2,1)	80,0 (1,6)	0	100 (2,8)
2B	86,7 (1,9)	66,7 (1,3)	72,0 (1,8)	82,6 (2,1)	66,7 (1,6)	100 (1,7)	71,4 (1,8)	100 (2,2)	92,3 (2,0)
3	75,0 (1,8)	100 (2,0)	75,0 (1,6)	66,7 (1,6)	100 (1,9)	100 (1,9)	75,0 (1,4)	ΔΕ ^α	100 (2,3)
4A	77,8 (1,9)	100 (1,5)	100 (2,1)	100 (1,7)	100 (1,9)	78,6 (2,2)	84,2 (2,1)	0	100 (2,1)
4B	57,1 (2,0)	100 (2,5)	80,0 (1,6)	71,4 (1,8)	75,0 (1,4)	84,2 (2,1)	83,3 (1,8)	75,0 (1,8)	83,3 (2,2)
6	75,0 (2,3)	100 (1,3)	0	100 (2,2)	ND	0	75,0 (1,8)	100 (1,5)	100 (1,4)
HSI	100 (2,5)	0	100 (2,8)	92,3 (2,0)	100 (2,3)	100 (2,1)	83,3 (2,2)	100 (1,4)	100 (2,2)

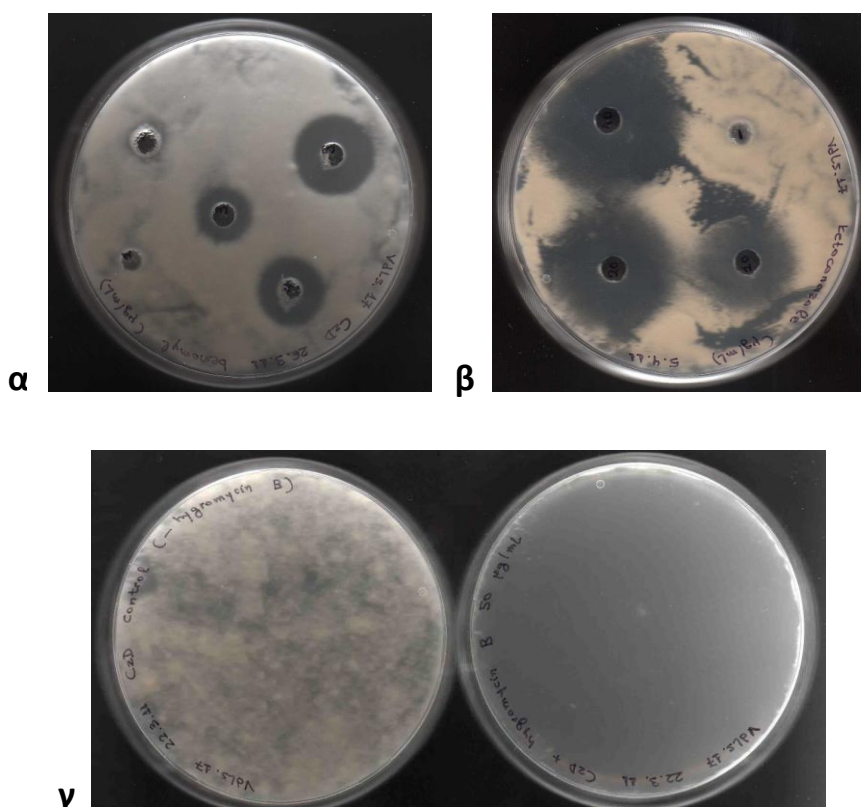
^α ΔΕ = δεν εξετάσθηκε.

Πίνακας 3.7				
Μορφολογικά χαρακτηριστικά στελεχών <i>Verticillium</i> και συχνότητα (%) και μέση ένταση του σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones)				
Στέλεχος	Τάχος αύξησης ^α (cm/ημέρα)	Πυκνότητα υφών ^β (1-4)	Παραγωγή χρωστικής ^γ (0-4)	Συχνότητα και μέση ένταση σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης ^δ
<i>V. dahliae</i>				
T9	0.4	1	3	81,8 (33), 2,0
V44	0.3	1	2	82,4 (34), 2,0
PH	0.4	3	4	60,6 (33), 1,9
V320I	0.4	4	0	88,9 (36), 2,3
115	0.5	2	4	61,1 (36), 1,3
LS.17	0.5	4	2	93,3 (30), 2,0
V16	0.4	4	2	100 (31), 2,1
V702I	0.4	4	4	70,4 (27), 2,0
25V (SS4)	0.4	3	4	80,0 (35), 1,4
530-1	0.3	4	1	67,9 (28), 1,6
70-21	0.4	2	3	86,5 (37), 1,8
PCW	0.4	2	4	53,6 (28), 1,5
BB	0.4	2	2	90,3 (31), 1,8
Dvd-E6	0.5	4	2	97,0 (33), 2,1
V830	0.5	4	2	91,7 (36), 1,8
S39	0.4	3	4	69,0 (29), 1,7
V684I	0.4	3	3	90,6 (32), 1,8
Ca.83	0.4	2	3	71,4 (7), 1,4
Cf.162	0.4	4	1	83,3 (30), 1,8
V13	0.5	4	2	95,0 (40), 2,2
CA26	0.4	3	4	62,9 (35), 1,4
TO-0	0.3	3	4	40,0 (30), 1,3
<i>V. longisporum</i>				
81	0.4	4	3	75,8 (33), 2,0
K2	0.4	2	0	71,4 (35), 1,7
<i>V. albo-atrum</i>				
Ms.102	0.4	2	3	45,2 (31), 1,4
T2	0.4	3	1	97,0 (32), 2,0
^α Μέσο τάχος αύξησης αποικιών στο θρεπτικό υλικό CM, μέχρι το τέλος της δεύτερης εβδομάδας αύξησης.				
^β Αξιολογήθηκε 2 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό στο θρεπτικό υλικό CM, σε κλίμακα 1-4.				
^γ Αξιολογήθηκε 3 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό στο θρεπτικό υλικό CM, σε κλίμακα 0-4.				
^δ Αξιολογήθηκε 10 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των «διασταυρώσεων», σε κλίμακα 0-3. Για κάθε στέλεχος παρατίθεται η επί τοις εκατό συχνότητα του σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης, το πλήθος των διαφορετικών «διασταυρώσεων» που ελήφθησαν υπόψιν για αυτόν τον υπολογισμό (σε παρένθεση), και η μέση τιμή της έντασης των ζωνών.				

3.2.2 Διερεύνηση μεθοδολογιών κατασκευής μεταλλαγών του μύκητα *V. dahliae* για χρήση σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας

A. Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration, MIC*) παρεμποδιστών αύξησης του *V. dahliae*

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων μιας σειράς παρεμποδιστικών αντιμυκητιακών παραγόντων (αναλυτικής καθαρότητας ή ως συστατικά εμπορικά διαθέσιμων φυτοφαρμάκων) στη βλάστηση και την αύξηση κονιδίων του αντιπροσωπευτικού στελέχους *V. dahliae* Ls.17. Στα αρχικά πειράματα προσδιορίστηκε η τάξη μεγέθους της ανασταλτικής συγκέντρωσης κάθε ουσίας με τη μελέτη των δακτυλίων αναστολής σε δοκιμασίες διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υλικό PDA, το οποίο είχε επιστρωθεί με πυκνό κονιδιακό εναιώρημα του στελέχους (συγκέντρωσης τουλάχιστον 10^6 κονιδίων/mL) (agar diffusion tests· Εικόνα 3.13). Στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις, εν συνεχεία, επιβεβαιώθηκε και προσδιορίστηκε με ακρίβεια η MIC με επίστρωση πυκνών κονιδιακών εναιωρημάτων σε τρυβλία υλικού PDA εμπλουτισμένου με την αντίστοιχη χημική ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις (Πίνακας 3.8).



Εικόνα 3.13. Η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ PDA διαφορετικών συγκεντρώσεων των παρεμποδιστών αύξησης benomyl (α) και ketoconazole (β) για τον προσδιορισμό των τιμών τους MIC στη βλάστηση των κονιδίων του στελέχους *Verticillium dahliae* Ls.17, η οποία εκδηλώνεται με τη δημιουργία ζωνών αναστολής γύρω από τα βοθρία-πηγές των παρεμποδιστών. (γ) Για τον ακριβή προσδιορισμό της τιμής MIC πραγματοποιήθηκε έλεγχος αύξησης πυκνού κονιδιακού εναιωρήματος σε θρεπτικά υλικά PDA εμπλουτισμένα με διαφορετικές συγκεντρώσεις του παρεμποδιστή (στο παράδειγμα της φωτογραφίας ελέγχθηκε η επίδραση της υγρομυκίνης B).

Πίνακας 3.8			
Ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) παρεμποδιστών αύξησης του στελέχους <i>Verticillium dahliae</i> Ls.17 σε θρεπτικό υλικό PDA			
Εμπορικό σκεύασμα	- Δραστική ουσία	Διάλυμα διατήρησης	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)
Αντιβιοτικά και άλλοι παρεμποδιστές			
	υγρομυκίνη B (hygromycin B)	50 mg/mL (σε νερό)	50 µg/mL
	γενετισίνη (geneticin) – G418	100 mg/mL (σε νερό)	100 µg/mL
	κετοконаζόλη (ketoconazole)	20 mg/mL (σε μεθανόλη)	15 µg/mL
	μικοναζόλη (miconazole)	20 mg/mL (σε μεθανόλη)	200 µg/mL
	χλωρικό νάτριο (sodium chlorate)		30 mg/mL
	θειικός χαλκός (copper sulfate)		40 mg/mL
	νατριούχος αμυτάλη (sodium amytal)	απευθείας διάλυση	40 mg/mL
	ορθοβαναδικό νάτριο (sodium orthovanadate)	ουσίας στο	10 mg/mL
	σεληνιώδες νάτριο (sodium selenite)	αποστειρωμένο	10 mg/mL
	νατραζίδιο (sodium azide)	θρεπτικό υλικό	25 mg/mL
	καναμυκίνη (kanamycin)		10 mg/mL
	χλωραμφαινικόλη (chloramphenicol)		5 mg/mL
Φυτοφάρμακα			
Benlate (DuPont)	benomyl (50% w/w)	10 mg/mL (σε DMSO)	1,5 µg/mL
Antracol (BAYER)	propineb + triadimenol (65% + 2% w/w)	10 mg/mL (σε νερό)	200 µg/mL
Morgan (ΕΛΛΑΓΡΕΤ ΑΒΕΕ)	captan (83% w/w)	10 mg/mL (σε νερό)	50 µg/mL
Topas (SYNGENTA)	penconazole (10% w/v)	10 mg/mL (σε νερό)	1,5 µg/mL
Dithane (BASF)	mancozeb (72% w/w)	10 mg/mL (σε νερό)	15 µg/mL
Quadris (SYNGENTA)	azoxystrobin (25% w/v)	10 mg/mL (σε νερό)	5 µg/mL

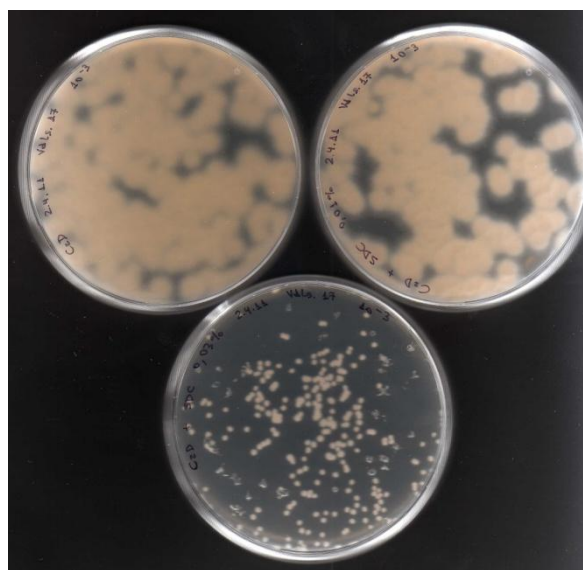
B. Επιλογή αυτόματων μεταλλαγών ανθεκτικότητας του μύκητα *V. dahliae* σε παρεμποδιστές αύξησης

Για την επιλογή αυτόματων μεταλλαγών ανθεκτικότητας διαφόρων στελεχών του *V. dahliae* στους παρεμποδιστικούς παράγοντες αύξησης που αναφέρονται στον Πίνακα 3.8 ελέγχθηκαν δύο μέθοδοι: (α) επίστρωση πυκνών κονιδιακών εναιωρημάτων (με συγκεντρώσεις τουλάχιστον 10^6 κονιδίων/mL) σε θρεπτικά υλικά PDA εμπλουτισμένα με τις συγκεντρώσεις MIC των παρεμποδιστών (Πίνακας 3.8), και (β) εμβολιασμός των ίδιων θρεπτικών υλικών με τμήματα άγαρ-μυκηλίου από καλλιέργειες των στελεχών *V. dahliae* σε PDA, ηλικίας περίπου 1 εβδομάδας. Με παρατεταμένη επώαση (μέχρι 5 εβδομάδων κατά περίπτωση) των τρυβλίων στους 24°C η πρώτη μέθοδος ήταν επιτυχής με σημαντική απόδοση ($>10^6$) μόνον στην περίπτωση των χλωρικών ιόντων, ενώ με τη δεύτερη μέθοδο ελήφθησαν ανθεκτικοί τομείς (sectors), με σειρά συχνότητας, στους παρεμποδιστές χλωρικό νάτριο, κετοконаζόλη, μικοναζόλη, αζοξυστροβίνη, πενκοναζόλη, benomyl, αμυτάλη και χλωραμφαινικόλη. Ωστόσο, κατόπιν απομόνωσης μονοσποριακών καλλιεργειών από τους

ανθεκτικούς τομείς και επανέλεγχο του φαινοτύπου τους, βρέθηκε πως η πλειονότητα δεν αντιστοιχούσε σε σταθερά ανθεκτικές μεταλλαγές. Συνεπώς, αποδείχθηκε πως η επιλογή αυτόματων μεταλλαγών για εφαρμογή σε πληθυσμιακό επίπεδο ήταν αρκετά αποδοτική μόνον στην περίπτωση των χλωρικών ιόντων, προς απομόνωση μεταλλαγών *nit*.

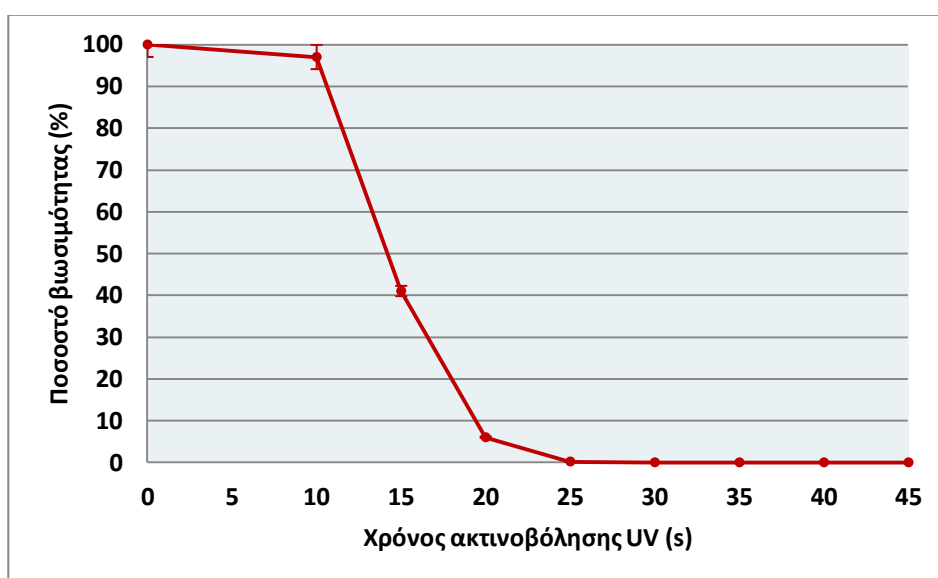
Γ. Μεταλλαξογένεση του μύκητα *V. dahliae* με υπεριώδη ακτινοβολία (UV)

Η κλασική μεθοδολογία μεταλλαξογένεσης του μύκητα με ακτινοβολία UV βελτιστοποιήθηκε και ελέγχθηκε για την παραγωγή αυξότροφων μεταλλαγών, μεταλλαγών *nit* και μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε παρεμποδιστικούς παράγοντες, προς χρήση σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας του *V. dahliae*. Σε προκαταρκτικά πειράματα δοκιμάστηκε η ικανότητα αύξησης του μύκητα σε θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις δεσοξυχολικού νατρίου (sodium deoxycholate, SDC), που προκαλεί την αργή και συμπαγή μικρο-αποικιακή αύξηση (micro-colonial growth) των υφομυκήτων (Εικόνα 3.14). Ως βέλτιστη συγκέντρωση SDC, στην οποία ήταν δυνατή η αύξηση 150-200 διακριτών αποικιών ανά τρυβλίο διαμέτρου 90 mm, προσδιορίστηκε η τιμή 0,03% w/v. Σε θρεπτικό υλικό PDA εμπλουτισμένο με αυτήν τη συγκέντρωση SDC βρέθηκε πως οι αποικίες αυξάνονταν μέχρι μακροσκοπικά ορατού μεγέθους περίπου 24 h αργότερα από ό, τι στα αντίστοιχα τρυβλία ελέγχου και είχαν συμπαγή μορφολογία, χωρίς ωστόσο ελάττωση στη βιωσιμότητα.



Εικόνα 3.14. Επίδραση του δεσοξυχολικού νατρίου (SDC) στην ανάπτυξη κονιδίων του στελέχους *Verticillium dahliae* Ls.17 στο θρεπτικό υλικό PDA. Σε κάθε τρυβλίο έχουν επιστρωθεί 100 κονίδια του μύκητα, σε υλικό εμπλουτισμένο με SDC σε συγκεντρώσεις 0,01% w/v (πάνω δεξιά) και 0,03% w/v (κάτω). Το τρυβλίο πάνω αριστερά αποτελεί τον μάρτυρα του πειράματος (PDA-SDC). Τα τρυβλία έχουν επωαστεί στους 24°C για 5 ημέρες. Διακριτές μικρο-αποικίες, με αργή αύξηση και συμπαγή μορφολογία, εμφανίζονται στην περίπτωση του PDA+SDC 0,03% (κάτω).

Στα αρχικά πειράματα ακτινοβόλησης παρατηρήθηκε ανομοιογένεια στη βιωσιμότητα των κονιδίων όταν αυτά ακτινοβολούνταν σε υδατικό διάλυμα πριν από την επίστρωσή τους σε τρυβλία PDA+SDC (ακόμα και σε συνθήκες συνεχούς ανάδευσης των εναιωρημάτων κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης). Για αυτόν τον λόγο εφαρμόστηκε η μέθοδος επίστρωσης των κονιδίων σε τρυβλία PDA+SDC πριν την ακτινοβόληση. Με αυτήν τη μέθοδο παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία των κονιδίων στην υπεριώδη ακτινοβολία. Ενδεικτικά, ενώ με την πρώτη διαδικασία παρατηρήθηκε ποσοστό βιωσιμότητας των κονιδίων της τάξης του 5% μετά τα 4 min 30 s ακτινοβόλησης, το ίδιο ποσοστό επετεύχθη στη δεύτερη με μόλις 20 s ακτινοβόλησης, με σταθερές όλες τις άλλες συνθήκες. Έτσι, επελέγη το εύρος χρόνων ακτινοβόλησης από 10 έως 45 s για τη δημιουργία καμπύλης βιωσιμότητας των κονιδίων (Εικόνα 3.15).

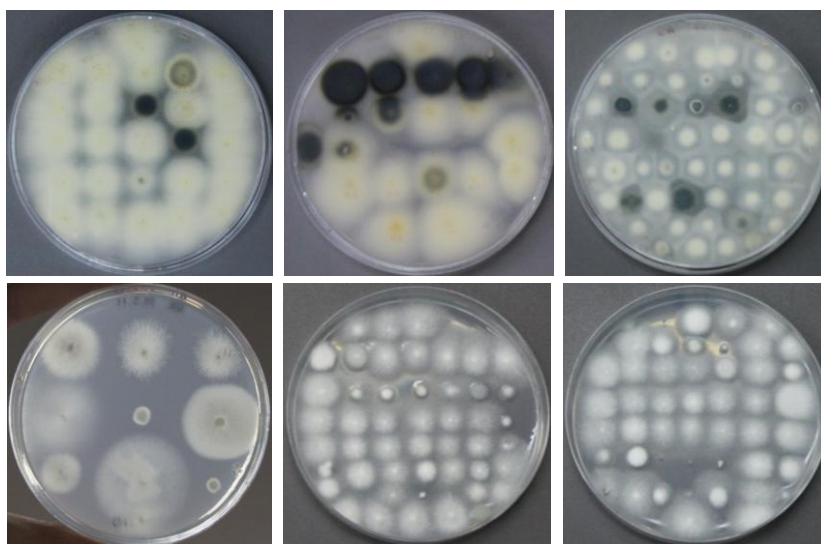


Εικόνα 3.15. Καμπύλη βιωσιμότητας των κονιδίων του στελέχους *Verticillium dahliae* Ls.17 κατόπιν ακτινοβόλησης UV.

Βάσει της καμπύλης βιωσιμότητας επιλέχθηκε ως χρόνος ακτινοβόλησης υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες τα 20 s, στα οποία αντιστοιχούσε ποσοστό βιωσιμότητας των κονιδίων περίπου 5%, και σε κάθε τρυβλίο επιστρώνονταν $2,5 \cdot 10^3$ κονίδια, ώστε να αναπτυχθούν, κατόπιν της ακτινοβόλησης, 100-150 διακριτές αποικίες ανά τρυβλίο. Παρατηρήθηκε πως οι αποικίες στα ακτινοβολημένα τρυβλία εμφάνιζαν καθυστέρηση βλάστησης κατά περίπου 24 h σε σχέση με τρυβλία ελέγχου, και γίνονταν μακροσκοπικά ορατές σε τρυβλία PDA+SDC κατόπιν 3-4 ημερών επώασης στους 24°C.

Για τον έλεγχο βιοχημικών και μορφολογικών μεταλλαγών μεταξύ των επιζώντων κονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ολικής απομόνωσης (total isolation method), κατά την οποία 500 τυχαία επιλεγμένες μονοσποριακές αποικίες από το κάθε ανεξάρτητο πείραμα μεταφέρθηκαν σε πλήρες (CM) και ελάχιστο (MM) θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα της μελέτης 2000 αποικιών του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 κατόπιν ακτινοβόλησης UV συνοψίζονται στον Πίνακα 3.9 και παραδείγματα βιοχημικών-μορφολογικών μεταλλαγών παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.16.

Πίνακας 3.9		
Κατάταξη 2000 αποικιών του στελέχους <i>Verticillium dahliae</i> Ls.17 σε μορφολογικές-βιοχημικές κλάσεις, κατόπιν μεταλλαξογένεσης με ακτινοβόληση UV		
Φαινότυπος	αριθμός αποικιών	ποσοστό (%) επί των επιζώντων
Βιοχημικές μεταλλαγές		
αυξότροφες	8	0,4
μερικώς αυξότροφες	30	1,5
βραδύτροφες (σε CM+MM)	44	2,2
λιγότερη ανάπτυξη στο CM σε σχέση με το MM	48	2,4
πολύ μικρές και συμπαγείς	8	0,4
πολύ μικρές με πετρώδη εμφάνιση και έντονη παραγωγή χρωστικής	14	0,7
ταχύτερη ακτινωτή αύξηση	4	0,2
Σύνολο:	156	7,8
Μορφολογικές μεταλλαγές		
ταχεία παραγωγή σκούρας χρωστικής	44	2,2
παραγωγή κίτρινων-πορτοκαλί χρωστικών	10	0,5
παραγωγή χρωστικών με έντονη ζώνωση	4	0,2
συμπαγής εμφάνιση	22	1,1
πυκνό εναέριο μυκήλιο	102	5,1
αραιό ή καθόλου εναέριο μυκήλιο	14	0,7
«απώθηση» υφών γειτονικών αποικιών	24	1,2
Σύνολο:	220	11,0



Εικόνα 3.16. Παραδείγματα μορφολογικών-βιοχημικών μεταλλαγών του στελέχους *Verticillium dahliae* Ls.17, που δημιουργήθηκαν με μεταλλαξογένεση UV.

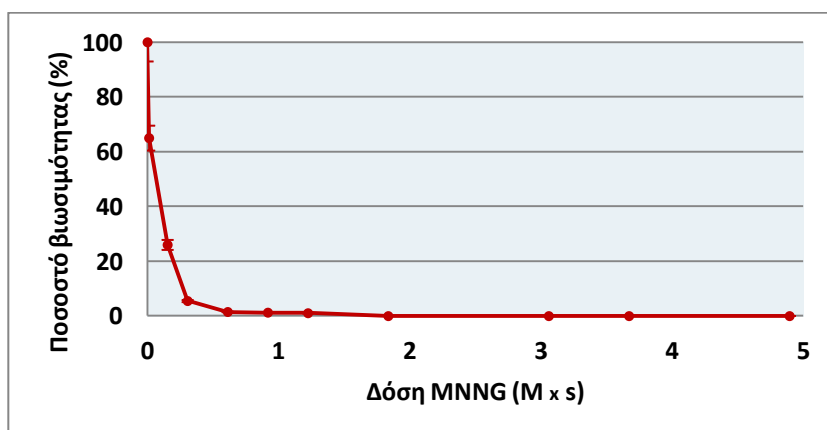
Εκτός από την επαγωγή βιοχημικών-μορφολογικών μεταλλαγών, ελέγχθηκε η δυνατότητα δημιουργίας μεταλλαγών ανθεκτικότητας του *V. dahliae* στους παρεμποδιστικούς παράγοντες χλωρικά ιόντα (για απομόνωση μεταλλαγών *nit*), benomyl, κετοκοναζόλη, πενκοναζόλη, και αζοξυστροβίνη, με διάφορους χρόνους ακτινοβόλησης. Για τα χλωρικά

ίοντα, ακόμα και για το στέλεχος *V. dahliae* Ls.17 από το οποίο δεν ήταν δυνατή η απομόνωση αυτόματων ανθεκτικών αποικιών, σημειώθηκαν σημαντικές αποδόσεις στην παραγωγή μεταλλαγών ανθεκτικότητας, που έφθαναν την αξιοσημείωτη τιμή 14,4% επί των επιζώντων σε επίπεδο βιωσιμότητας 5%. Με αυτήν την απόδοση κατέστη εφικτή η δημιουργία μεταλλαγών σε μεγάλη κλίμακα από διάφορα στελέχη *V. dahliae*, η οποία θα περιγραφεί αναλυτικά στην παράγραφο 3.2.4.

Από τους υπόλοιπους παρεμποδιστές, επίσης αποδοτική για την εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα ήταν η δημιουργία μεταλλαγών ανθεκτικότητας στην ουσία benomyl, με συχνότητες στο εύρος 10^{-3} - 10^{-4} ως προς τον πληθυσμό των κονιδίων που επιβίωναν στο επίπεδο βιωσιμότητας 5%. Η δημιουργία ανθεκτικών μεταλλαγών αυτού του τύπου επεκτάθηκε στην παρούσα εργασία σε διάφορα στελέχη *Verticillium* για περαιτέρω γενετικές δοκιμασίες, και αναλύεται διεξοδικά στην παράγραφο 3.2.7. Στους υπόλοιπους παρεμποδιστές απομονώθηκαν ορισμένες γενετικά ασταθείς μεταλλαγές (απώλεια του φαινοτύπου ανθεκτικότητας μετά από απομόνωση μονοσποριακών αποικιών και επανέλεγχο) και συχνά νάνες μεταλλαγές, η πλειονότητα των οποίων δεν επιβίωνε με διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε νέο θρεπτικό υλικό. Ιδιαίτερα για την περίπτωση του παρεμποδιστή πενκοναζόλη, απομονώθηκαν πολυάριθμες νάνες αποικίες, οι οποίες παρουσίαζαν ποικιλία στον ρυθμό αύξησής τους όταν μεταφέρονταν σε πλήρη θρεπτικά υλικά απουσία του παρεμποδιστή.

Δ. Μεταλλαξογένεση του μύκητα *V. dahliae* με επίδραση νιτροζογουανιδίνης (MNNG)

Η μέθοδος μεταλλαξογένεσης του *V. dahliae* με τον χημικό παράγοντα N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (νιτροζογουανιδίνη, MNNG) ελέγχθηκε σε σύγκριση με τη μεταλλαξογένεση UV, για την απόδοσή της σε βιοχημικές και μορφολογικές μεταλλαγές. Η καμπύλη βιωσιμότητας των κονιδίων του στελέχους *V. dahliae* Ls.17, κατόπιν επίδρασης με διαφορετικούς συνδυασμούς συγκέντρωσης MNNG και χρόνου επίδρασης, παρατίθεται στην Εικόνα 3.17.



Εικόνα 3.17. Καμπύλη βιωσιμότητας των κονιδίων του στελέχους *Verticillium dahliae* Ls.17, κατόπιν μεταλλαξογένεσης με τον χημικό παράγοντα νιτροζογουανιδίνη (MNNG). Για σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών συνδυασμών συγκέντρωσης MNNG και χρόνου επίδρασης, η μεταλλαξογόνος δόση έχει κανονικοποιηθεί για κάθε επίδραση ως το γινόμενο της συγκέντρωσης MNNG (M) επί τον χρόνο επίδρασης (s).

Βάσει της καμπύλης βιωσιμότητας προσδιορίστηκε η μεταλλαξογόνος δόση 0,306 M·s (αντιστοιχεί σε κατεργασία των κονιδίων με διάλυμα MNNG συγκέντρωσης 25 µg/mL για 30 min) ως η κατάλληλη για επίτευξη ποσοστού βιωσιμότητας των κονιδίων περίπου 5%. Με αυτήν τη δόση πραγματοποιήθηκε μεταλλαξογένεση του στελέχους *V. dahliae* Ls.17, και τα αποτελέσματα του ελέγχου 1023 μονοσποριακών αποικιών στα θρεπτικά υλικά CM και MM, με τη μέθοδο της ολικής απομόνωσης, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.10.

Πίνακας 3.10		
Κατάταξη 1023 αποικιών του στελέχους <i>Verticillium dahliae</i> Ls.17 σε μορφολογικές-βιοχημικές κλάσεις, κατόπιν μεταλλαξογένεσης με νιτροζογουανιδίνη (MNNG)		
Φαινότυπος	αριθμός αποικιών	ποσοστό (%) επί των επιζώντων
Βιοχημικές μεταλλαγές		
αυξότροφες	0	0
μερικώς αυξότροφες	4	0,4
βραδύτροφες (σε CM+MM)	10	1,0
πολύ μικρές και συμπαγείς	4	0,4
πολύ μικρές με πετρώδη εμφάνιση και έντονη παραγωγή χρωστικής	3	0,3
ταχύτερη ακτινωτή αύξηση	20	2,0
Σύνολο:	41	4,1
Μορφολογικές μεταλλαγές		
ταχεία παραγωγή σκούρας χρωστικής	18	1,8
παραγωγή κίτρινων-πορτοκαλί χρωστικών	5	0,5
καφέ μικροσκληρώτια	1	0,1
συμπαγής εμφάνιση	11	1,1
πυκνό εναέριο μυκήλιο	30	0,3
«απώθηση» υφών γειτονικών υφών	2	0,2
Σύνολο:	67	6,6

Όταν ελέγχθηκε η μεταλλαξογένεση με MNNG για τη δημιουργία μεταλλαγών ανθεκτικότητας στους αντιμυκητιακούς παράγοντες χλωρικά ιόντα, benomyl, κετοκοναζόλη και αζοξυστροβίνη, η απόδοση για τους δύο πρώτους παρεμποδιστές ήταν της ίδιας τάξης μεγέθους με τη μέθοδο ακτινοβόλησης UV, ενώ για την κετοκοναζόλη και την αζοξυστροβίνη ελήφθησαν με μεγάλη συχνότητα (κατά μέσο 4,5% επί των επιζώντων) νάνες αποικίες, οι οποίες κατόπιν μονοσποριακής απομόνωσης και επανελέγχου εξακριβώθηκε πως είτε ήταν μη βιώσιμες είτε ασταθείς ως προς τον φαινότυπο ανθεκτικότητας. Σε σύγκριση με τη μεταλλαξογένεση με ακτινοβολία UV, η επίδραση με MNNG βρέθηκε υπό τις δεδομένες συνθήκες λιγότερο αποτελεσματική στην παραγωγή βιοχημικών-μορφολογικών μεταλλαγών, και εξίσου χρήσιμη για την παραγωγή μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε παρεμποδιστές.

E. Δοκιμή μεθόδων εμπλουτισμού σε αυξοτροφίες κατόπιν μεταλλαξογένεσης

Σε μια προσπάθεια αύξησης της απόδοσης των μεθόδων μεταλλαξογένεσης στην παραγωγή αυξότροφων μεταλλαγών, ώστε η διαδικασία να καταστεί εφαρμόσιμη σε πληθυσμιακό επίπεδο, ελέγχθηκαν 3 μέθοδοι εμπλουτισμού, ήτοι η μέθοδος γλυκερόλης, η μέθοδος επίδρασης υψηλής θερμοκρασίας και η μέθοδος διαδοχικών διηθήσεων του κονιδιακού εναιωρήματος (οι διαδικασίες περιγράφονται αναλυτικά στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι»). Από αυτές, η μέθοδος γλυκερόλης και η μέθοδος διηθήσεων δεν ήταν αποτελεσματικές στην αύξηση της συχνότητας αυξότροφων μεταλλαγών σε σχέση με τη γενική μέθοδο ολικής απομόνωσης (total isolation). Η ανάπτυξη της μεθόδου επίδρασης των κονιδίων με υψηλή θερμοκρασία βασίστηκε στην παρατήρηση πως η βιωσιμότητα των πρωτότροφων κονιδίων ελαττωνόταν όταν αυτά επώαζονταν σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 30°C για διάφορα χρονικά διαστήματα. Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου χρόνου επώασης, τρυβλία ελάχιστου θρεπτικού υλικού MM, επιστρωμένα με κονιδιακά εναιωρήματα γνωστής συγκέντρωσης του στελέχους *V. dahliae* Ls.17, επώαθησαν στους 24°C για 24 h, ώστε η βλάστηση να προσεγγίσει το ποσοστό 100%, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 37°C για διάφορα χρονικά διαστήματα, και τέλος επανήλθαν στους 24°C για 3 επιπλέον ημέρες. Το ποσοστό βιωσιμότητας των βλαστημένων κονιδίων βρέθηκε πως ελαττωνόταν εκθετικά με την αύξηση του χρόνου επώασης στους 37°C (Πίνακας 3.11).

Πίνακας 3.11				
Επίδραση υψηλής θερμοκρασίας στη βιωσιμότητα βλαστημένων κονιδίων του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> Ls.17				
Τρυβλίο MM	24°C (h)	37°C (h)	24°C (h)	Ποσοστό βιωσιμότητας (%)
μάρτυρας	72	-	-	100
A6	24	6	72	3,7
A12	24	12	72	0,5
A24	24	24	72	<0,1
A36	24	26	72	0

Κάθε τρυβλίο με επιστρωμένο κονιδιακό εναιώρημα επώαθη διαδοχικά στους 24, τους 37 και ξανά τους 24°C, για τους χρόνους που αναφέρονται στις αντίστοιχες στήλες, πριν τον υπολογισμό του ποσοστού βιωσιμότητας.

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρατίθενται στον Πίνακα 3.11, επιλέχθηκε ο χρόνος επώασης 12 h στους 37°C, με τον οποίο επετεύχθη ελάττωση της βιωσιμότητας των βλαστημένων κονιδίων κατά 99,5%. Η μεταλλαξογένεση πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία ελάχιστου θρεπτικού υλικού MM, τα οποία υποβλήθηκαν στη διαδοχική αλλαγή της θερμοκρασίας επώασης σύμφωνα με τον Πίνακα 3.11 (12 h στους 37°C). Με αυτήν τη διαδικασία αναμενόταν πως τα αυξότροφα κονίδια που δεν θα βλάσταναν κατά τις πρώτες 24 h στο MM λόγω των τροφικών τους απαιτήσεων, πιθανά θα διέφευγαν της καταστροφής κατά την επακόλουθη επώαση στους 37°C, αντιθέτως με τα πρωτότροφα, βλαστημένα κονίδια. Στο τελικό στάδιο επώασης στους

24°C έγινε επίστρωση των τρυβλίων με πλήρες θρεπτικό υλικό CN, ώστε να επιτραπεί πλέον η ανάπτυξη και των αυξότροφων κονιδίων.

Σε αυτές τις συνθήκες, ο έλεγχος 500 μονοσποριακών αποικιών του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 κατόπιν μεταλλαξογένεσης με ακτινοβολία UV, απέδωσε αυξοτροφίες σε ποσοστό 2,4% επί των επιζώντων, που αποτελεί την εξαπλάσια συχνότητα της αντίστοιχης τιμής χωρίς εμπλουτισμό (Πίνακας 3.9). Αυτή η μέθοδος εμπλουτισμού, συνεπώς, εφαρμόστηκε για την απομόνωση των αυξότροφων μεταλλαγών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

3.2.3 Χαρακτηρισμός αυξότροφων μεταλλαγών του μύκητα *V. dahliae* και χρήση σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας

Κατόπιν μεταλλαξογένεσης με ακτινοβολία UV ή με επίδραση MNNG και εμπλουτισμό με τη μέθοδο επώασης σε υψηλή θερμοκρασία, επιλέχθηκε ένα σύνολο 14 σταθερών αυξότροφων μεταλλαγών από τα 4 στελέχη *V. dahliae* T9 (VCG 1), Ls.17 (VCG 2B), S39 (VCG 4B) και Vd76 (δεν αντιδρά με τα στελέχη των γνωστών VCGs με τη μεθοδολογία των μεταλλαγών *nit*). Η πλειονότητα των μεταλλαγών αυξοτροφίας είχε τη μορφολογία των αντίστοιχων φυσικών τύπων στο πλήρες θρεπτικό υλικό PDA (ορισμένες παρουσίαζαν περισσότερο συμπαγή εμφάνιση αποικίας ή/και ταχύτερη παραγωγή σκούρας πράσινης χρωστικής). Για τον προσδιορισμό των τύπων των μεταλλαγών, μεταφέρθηκαν με παράλληλους εμβολιασμούς (*replica inoculation*) σε διατάξεις επί τρυβλίων με υλικό MM εμπλουτισμένο με διαφορετικούς συνδυασμούς αμινοξέων, πουρινών/πυριμιδινών και βιταμινών. Το σύνολο των 14 αυξοτροφιών αντιστοιχούσε στα βιοσυνθετικά μονοπάτια 4 μονοπατιών, των αμινοξέων αργινίνης και μεθειονίνης, της πουρίνης αδενίνης και της βιταμίνης θειαμίνης (Πίνακας 3.12). Οι μισές μεταλλαγές, και ιδιαίτερα εκείνη της αυξοτροφίας για τη θειαμίνη, εμφάνιζαν δυνατότητα περιορισμένης αύξησης στο ελάχιστο θρεπτικό υλικό MM (*leaky*). Επιπλέον, όταν υπολογίσθηκαν οι συχνότητες αυτόματης επαναφοράς στην πρωτοτροφία (με επιστρώσεις πυκνών κονιδιακών εναιωρημάτων σε ελάχιστο υλικό MM), βρέθηκε ότι περίπου οι μισές μεταλλαγές είχαν σχετικά μεγάλες συχνότητες επαναφοράς (μεγαλύτερες από 10^{-6}).

Πίνακας 3.12				
Μεταλλαγές αυξοτροφίας στελεχών του <i>Verticillium dahliae</i> και χαρακτηρισμός τους				
Στέλεχος (VCG)	Μεταλλαγή ^β	Τύπος ^γ	Δυνατότητα αύξησης στο MM ^δ	Συχνότητα επαναφοράς στην πρωτοτροφία
T9 (VCG 1)	U2	<i>ade</i>	-	$7,3 \times 10^{-6}$
	U6	<i>ade</i>	-	$8,2 \times 10^{-5}$
	N1	<i>arg</i>	+	$4,4 \times 10^{-5}$
Ls.17 (VCG 2B)	U7	<i>ade</i>	-	$5,6 \times 10^{-6}$
	U11	<i>ade</i>	+	$9,3 \times 10^{-5}$
	U16	<i>arg</i>	+	$1,2 \times 10^{-7}$
	U18	<i>met</i>	+	$7,8 \times 10^{-6}$
	N4	<i>ade</i>	-	$7,7 \times 10^{-5}$
S39 (VCG 4B)	N8	<i>thi</i>	++	$4,3 \times 10^{-6}$
	U19	<i>arg</i>	-	$2,1 \times 10^{-7}$
Vd76 (ΔA ^α)	N12	<i>ade</i>	+	$3,6 \times 10^{-6}$
	U24	<i>ade</i>	+	$8,2 \times 10^{-5}$
	U27	<i>ade</i>	-	$8,9 \times 10^{-6}$
	U29	<i>met</i>	-	$6,2 \times 10^{-5}$

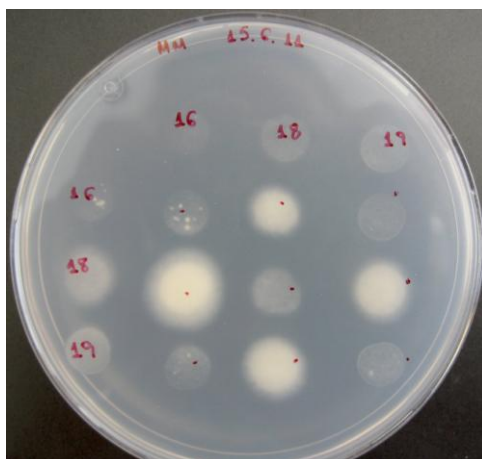
^α ΔA = δεν αντιδρά με τα στελέχη ελέγχου καμίας VCG σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας *nit*.

^β Ο πρώτος χαρακτήρας στην κωδική ονομασία κάθε μεταλλαγής συμβολίζει τη μέθοδο μεταλλαξογένεσης που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της· U = ακτινοβόληση UV, N = επίδραση με νιτροζογουανιδίνη.

^γ *ade* = αδεκίνη, *arg* = αργινίνη, *met* = μεθειονίνη, *thi* = θειαμίνη.

^δ Οι μισές από τις διαθέσιμες αυξότροφες μεταλλαγές χαρακτηρίζονταν από μικρή ικανότητα αύξησης στο ελάχιστο υλικό MM (+), και ιδιαίτερα εκείνη της θειαμίνης του στελέχους Ls.17 (++) (leaky mutants). Σε κάθε περίπτωση, η δυνατότητα αύξησης ήταν σημαντικά μικρότερη από εκείνη των αντίστοιχων φυσικών τύπων, ενώ με την προσθήκη της αντίστοιχης χημικής ουσίας (*ade*, *arg*, *met* ή *thi*) αποκαθίστατο αύξηση παρόμοια με του φυσικού τύπου.

Όλες οι αυξότροφες μεταλλαγές του Πίνακα 3.12 χρησιμοποιήθηκαν για «διασταυρώσεις» σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς, επί ελάχιστου θρεπτικού υλικού MM, με την ίδια μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε και για τις δοκιμασίες συμπληρωματικότητας των μεταλλαγών *nit*. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων καταγράφηκαν θετικές αντιδράσεις συμπληρωματικότητας, ποικίλου βαθμού πρωτότροφης αύξησης, ακόμα και μεταξύ μεταλλαγών της ίδιας κλάσης για τις περιπτώσεις της αδεκίνης και της αργινίνης, υποδηλώνοντας ότι για κάθε ένα από τα 2 αυτά συστατικά, οι διαθέσιμες μεταλλαγές αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά γονίδια. Επιπλέον, θετικές δοκιμασίες ελήφθησαν και μεταξύ των στελεχών *V. dahliae* Ls.17, S39 και Vd76, τα οποία δεν κατατάσσονται στην ίδια VCG με τη μεθοδολογία των μεταλλαγών *nit*. Ωστόσο, η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων στις «διασταυρώσεις» των αυξότροφων μεταλλαγών δεν ήταν ικανοποιητική εξαιτίας της σημαντικής αύξησης υποβάθρου που παρατηρήθηκε σε πολλές περιπτώσεις και στη συχνή επαναφορά στην πρωτοτροφία. Ως εναλλακτική διαδικασία δοκιμασιών συμπληρωματικότητας ελέγχθηκε η μέθοδος εμβολιασμού μικτών σταγόνων κονιδιακών εναιωρημάτων των υπό μελέτη μεταλλαγών (συγκέντρωσης περίπου 10^5 κονιδίων/mL), στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υλικού MM. Τα αποτελέσματα με αυτήν τη μέθοδο ήταν σαφή μετά από μόλις 1 εβδομάδα επώασης στους 24°C, αλλά και πάλι παρατηρήθηκε ανάπτυξη υποβάθρου ή/και επαναφορά στην πρωτοτροφία σε αρκετές σταγόνες ελέγχου (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.18. Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ των μονοαυξότροφων μεταλλαγών U16, U18 και U19 των στελεχών *Verticillium dahliae* Ls.17 και S39, με τη μέθοδο σταγόνων κονιδιακών εναιωρημάτων σε στερεό θρεπτικό υλικό MM (κατόπιν 1 εβδομάδας επώασης στους 24°C). Παρατηρείται στοιχειώδης ανάπτυξη ακόμα και στις σταγόνες ελέγχου (negative controls), που σημειώνονται στο τρυβλίο της φωτογραφίας με τις ενδείξεις «16», «18» και «19» για τις 3 μεταλλαγές.

3.2.4 Δημιουργία και χαρακτηρισμός μεταλλαγών *nit*

Μια συλλογή 27 αντιπροσωπευτικών στελεχών όλων των VCGs του *V. dahliae* (Πίνακας 3.13) χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ενός συνόλου 785 μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα χλωρικά ιόντα (Παράρτημα 9) με δύο μεθόδους: (α) παραδοσιακή επιλογή ανθεκτικών τομέων αποικιών που προκύπτουν αυτόματα από τμήματα μυκηλίου-άγαρ σε θρεπτικά υλικά εμπλουτισμένα με χλωρικά ιόντα, και (β) μία νέα μέθοδο μεταλλαξογένεσης (με ακτινοβόληση UV) κονιδίων με επιλογή στα ίδια θρεπτικά υλικά. Η συχνότητα ανθεκτικών αποικιών με τη δεύτερη μέθοδο ήταν ιδιαίτερα υψηλή, περίπου 10^{-2} κατά μέσο όρο σε επίπεδο βιωσιμότητας 5%, 10 ημέρες μετά την ακτινοβόληση των κονιδίων. Σχεδόν οι μισές από όλες τις ανθεκτικές στα χλωρικά ιόντα αποικίες που επιλέχθηκαν και με τις δύο μεθόδους (45,4% συνολικά) ήταν σταθερές μεταλλαγές *nit* (χωρίς επαναφορά στην πρωτοτροφία κατόπιν 3 διαδοχικών ανακαλλιέργειών σε MM). Μεταξύ αυτών, οι δύο μέθοδοι ήταν εξίσου αποδοτικές στην παραγωγή μεταλλαγών *nit1* (51,2 και 53,1% για τις μεταλλαγές που προέκυψαν αυτόματα και κατόπιν μεταλλαξογένεσης, αντίστοιχα) και *nitM* (48,8 και 46,9%, αντίστοιχα). Αν και παρατηρήθηκε ετερογένεια στα χαρακτηριστικά αύξησης των μεταλλαγών στα νιτρώδη ιόντα, δεν απομονώθηκε καμία μεταλλαγή *nit3*, καθώς με συμπληρωματικές δοκιμασίες ελέγχου όλες οι υποψήφιες μεταλλαγές κατατάχθηκαν στην κλάση *nit1*. Ανεξάρτητες μεταλλαγές *nitM* ορισμένων στελεχών ταξινομήθηκαν σε τουλάχιστον 3 διαφορετικές ομάδες συμπληρωματικότητας, οι οποίες σε δοκιμασίες ελέγχου παρήγαγαν γενικά ετεροκάρυα με πλουσιότερη πρωτότροφη αύξηση σε σχέση με αντίστοιχες «διασταυρώσεις» μεταξύ μεταλλαγών *nit1* και *nitM*.

Ένα σημαντικό ποσοστό ανθεκτικών στα χλωρικά ιόντα αποικιών που δημιουργήθηκαν και με τις δύο μεθόδους (47,1% συνολικά) είχαν ή απέκτησαν τη δυνατότητα αύξησης σε θρεπτικό υλικό MM με νιτρικά ιόντα, νιτρώδη ιόντα ή υποξανθίνη ως πηγή αζώτου, εξαρχής ή με διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε υλικό MM. Επιπρόσθετα, ένα ποσοστό 5,5% όλων των ανθεκτικών αποικιών επιδείκνυαν χαρακτηριστικά αύξησης όμοια με τον φυσικό τύπο στα

νιτρικά και τα νιτρώδη ιόντα, αλλά δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν στην υποξανθίνη. Αυτές οι μεταλλαγές ανακτήθηκαν και με τις δύο μεθόδους, αλλά ήταν συχνότερες μεταξύ των μεταλλαγών που προέκυψαν με ακτινοβόληση UV. Είναι ενδιαφέρον ότι η συχνότητα αυτών των μεταλλαγών ήταν χαρακτηριστική σε μεγάλο βαθμό για το κάθε στέλεχος, με μέγιστη συχνότητα για τα στελέχη PCW και CA26 (21,4 και 37,5%, αντίστοιχα). Δέκα μεταλλαγές που δεν αναπτύσσονταν σε καμία από τις τρεις προαναφερθείσες πηγές αζώτου, αλλά αυξάνονταν κανονικά στο θρεπτικό υλικό PDA και το MM με ταρταρικό αμμώνιο ως μοναδική πηγή αζώτου εντοπίστηκαν μεταξύ των μεταλλαγών που προκλήθηκαν με ακτινοβολία UV. Τέλος, απέτυχε η απομόνωση μεταλλαγών *nit* από ένα στέλεχος (TO-0), καθώς αυτό ήταν ανθεκτικό στο εύρος συγκεντρώσεων χλωρικών ιόντων που δοκιμάστηκαν.

Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας των μεταλλαγών *nit* προσδιορίστηκαν οι συχνότητες επαναφοράς στην πρωτοτροφία για 46 τυχαία επιλεγμένες μεταλλαγές (Πίνακας 3.14). Οι συχνότητες επαναφοράς ποίκιλαν σε μεγάλο βαθμό, στο ιδιαίτερα εκτεταμένο εύρος τιμών 10^{-3} έως 10^{-8} . Είναι αξιοσημείωτο πως οι συχνότητες επαναφοράς σχετίζονταν με το κάθε στέλεχος, ούτως ώστε το εύρος των συχνοτήτων ανεξάρτητων μεταλλαγών του ίδιου στελέχους να μην υπερβαίνει ποτέ τις δύο δεκαδικές τάξεις μεγέθους (Πίνακας 3.14). Από την άλλη πλευρά, δεν ανιχνεύθηκε καμία συσχέτιση της σταθερότητας με τις VCGs, τη μέθοδο παραγωγής των μεταλλαγών ή τις κλάσεις των μεταλλαγών.

Πίνακας 3.13			
Στελέχη <i>Verticillium</i> που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση μεταλλαγών <i>nit</i> (περισσότερες πληροφορίες για τα στελέχη παρατίθενται στον Πίνακα 2.1)			
Στέλεχος	VCG ^a	Στέλεχος	VCG
<i>V. dahliae</i>			
T9 [A]	1A	PCW [O]	3
V44 [B]	1A	BB [P]	4A
V607I [C]	1B	V830 [Q]	4A
V661I [D]	1B	Dvd-E6 [R]	4A
PH [E]	2A	S39 [S]	4B
V320I [F]	2A	V684I [T]	4B
115 [G]	2B	Ca.83 [U]	6
Is.17 [H]	2B	Ca.146 [V]	6
V16 [I]	2B	Ca.148 [W]	6
Cf.38 ^b [J]	2B	Cf.162 ^{v,d} [X]	HSI
V702I [K]	2Ba	V13 ^d [Y]	HSI
530-1 [L]	2B (2A)	CA26 ^e [Z]	-
25V (SS4) [M]	2AB (1, 4A)	TO-0 ^e	-
70-21 [N]	3		
<i>V. albo-atrum</i>			
Ms.102	-	T2	-
<i>V. longisporum</i>			
81	-	K2	-

^α Ορισμένα στελέχη είναι γνωστό ότι αντιδρούν σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας με τα στελέχη ελέγχου περισσότερων της μίας VCGs· σε αυτές τις περιπτώσεις, οι δευτερεύουσες αντιδράσεις παρατίθενται σε παρενθέσεις.
^β Η αρχική κατάταξη του στελέχους <i>V. dahliae</i> Cf.38 (στη VCG 6) αναθεωρήθηκε στην παρούσα διατριβή και το στέλεχος κατατάχθηκε εκ νέου στη VCG 2B.
^γ Η αρχική κατάταξη του στελέχους <i>V. dahliae</i> Cf.162 (στη VCG 6) αναθεωρήθηκε στην παρούσα διατριβή και το στέλεχος χαρακτηρίστηκε εκ νέου ως αυτο-ασύμβατο (HSI).
^δ HSI = ετεροκαρυωτικά αυτο-ασύμβατα στελέχη (heterokaryon self-incompatible).
^ε Στέλεχη συζευκτικού τύπου MAT1-1-1 (Usami <i>et al.</i> , 2009).

Πίνακας 3.14

Συχνότητες επαναφοράς μεταλλαγών *nit* του μύκητα *Verticillium dahliae*

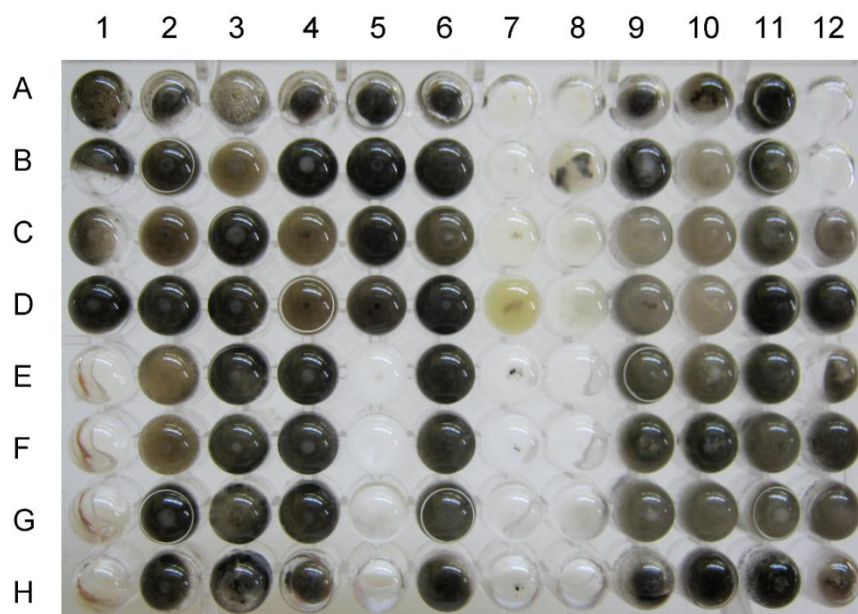
Στέλεχος	Μεταλλαγή ^α	Τύπος μεταλλαγής	Μέση συχνότητα επαναφοράς
T9	T9.2U	nitM	$<8,0 \times 10^{-8}$
	T9.9U	<i>nit1</i>	$6,3 \times 10^{-7}$
	T9.16S	nitM	$1,4 \times 10^{-7}$
V44	V44.3U	<i>nit1</i>	$3,6 \times 10^{-7}$
	V44.9U	nitM	$<7,4 \times 10^{-7}$
	V44.16S	nitM	$3,6 \times 10^{-6}$
PH	PH.5U	nitM	$9,1 \times 10^{-7}$
	PH.53S	<i>nit1</i>	$7,1 \times 10^{-7}$
	PH.69S	<i>nit1</i>	$1,1 \times 10^{-7}$
V320I	V320I.3U	<i>nit1</i>	$9,2 \times 10^{-5}$
	V320I.10S	nitM	$3,6 \times 10^{-6}$
	V320I.14S	nitM	$7,4 \times 10^{-6}$
115	115.1S	<i>nit1</i>	$1,3 \times 10^{-5}$
Ls.17	Ls.17.5U	<i>nit1</i>	$6,3 \times 10^{-6}$
	Ls.17.10S	<i>nit1</i>	$3,2 \times 10^{-5}$
	Ls.17.15S	nitM	$2,2 \times 10^{-5}$
Cf.38	Cf.38.19U	nitM	$2,1 \times 10^{-3}$
	Cf.38.37S	<i>nit1</i>	$8,1 \times 10^{-4}$
	Cf.38.44S	<i>nit1</i>	$6,1 \times 10^{-4}$
V702I	V702I.1U	nitM	$1,0 \times 10^{-4}$
	V702I.8U	<i>nit1</i>	$6,2 \times 10^{-4}$
	V702I.14S	<i>nit1</i>	$9,2 \times 10^{-5}$
70-21	70-21.7U	<i>nit1</i>	$1,3 \times 10^{-4}$
	70-21.16S	nitM	$9,1 \times 10^{-5}$
	70-21.30S	<i>nit1</i>	$3,3 \times 10^{-4}$
PCW	PCW.5U	nitM	$5,3 \times 10^{-4}$
	PCW.25S	<i>nit1</i>	$1,6 \times 10^{-3}$
BB	BB.11U	<i>nit1</i>	$1,8 \times 10^{-6}$
	BB.16S	<i>nit1</i>	$2,3 \times 10^{-7}$
	BB.23S	nitM	$1,0 \times 10^{-7}$
S39	S39.14U	<i>nit1</i>	$1,5 \times 10^{-7}$
	S39.15U	nitM	$2,0 \times 10^{-5}$

	S39.31S	nitM	$7,8 \times 10^{-6}$
V684I	V684I.10U	<i>nit1</i>	$2,3 \times 10^{-5}$
	V684I.17S	nitM	$6,5 \times 10^{-6}$
	V684I.19S	<i>nit1</i>	$7,9 \times 10^{-6}$
Ca.83	Ca.83.3U	<i>nit1</i>	$3,1 \times 10^{-6}$
	Ca.83.9U	<i>nit1</i>	$1,3 \times 10^{-5}$
	Ca.83.12S	nitM	$1,3 \times 10^{-7}$
Ca.146	Ca.146.6S	nitM	$5,6 \times 10^{-7}$
Ca.148	Ca.148.4U	<i>nit1</i>	$1,2 \times 10^{-4}$
	Ca.148.7S	<i>nit1</i>	$1,9 \times 10^{-5}$
	Ca.148.11S	<i>nit1</i>	$9,1 \times 10^{-6}$
V13	V13.14U	<i>nit1</i>	$<1,2 \times 10^{-7}$
	V13.30U	<i>nit1</i>	$9,7 \times 10^{-6}$
	V13.49S	nitM	$<6,3 \times 10^{-7}$

^α Ο τελευταίος χαρακτήρας της κωδικής ονομασίας κάθε μίας μεταλλαγής συμβολίζει τη μέθοδο παραγωγής της: «U» για ακτινοβόληση UV, «S» για απομόνωση αυτόματου τομέα αποικίας.

3.2.5 Ανάπτυξη νέας μεθόδου μεγάλης κλίμακας για τις δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών *nit*

Στο πλαίσιο αυτής της διατριβής αναπτύχθηκε μια νέα ταχεία μέθοδος μεγάλης κλίμακας για την κατάταξη στελεχών του *V. dahliae* σε VCGs μέσω δοκιμασιών συμπληρωματικότητας μεταλλαγών *nit* σε υγρό θρεπτικό υλικό MM. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων-βοθρίων και η βελτιστοποιημένη μέθοδος εμβολιασμών (βλ. αντίστοιχη παράγραφο στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι») εφαρμόστηκε σε συλλογή 26 στελεχών *V. dahliae* όλων των VCGs (Πίνακας 3.8· εξαιρέθηκε το στέλεχος TO-0, καθώς δεν ήταν δυνατή η απομόνωση μεταλλαγών *nit* από αυτό). Όλα τα στελέχη «διασταυρώθηκαν» σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς συμπληρωματικών μεταλλαγών *nit*, χρησιμοποιώντας τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες μεταλλαγές *nit* από κάθε στέλεχος, και με 2-4 επαναλήψεις όλων των δοκιμασιών. Ένα παράδειγμα της νέας μεθόδου δοκιμασιών συμπληρωματικότητας σε υγρό θρεπτικό υλικό MM παρατίθεται στην Εικόνα 3.19. Τα αποτελέσματα κατόπιν 10 ημερών επώασης των τρυβλίων ήταν σαφή και υψηλής επαναληψιμότητας (κατά μέσο 97,5%), και συνοψίζονται στον Πίνακα 3.15. Κατόπιν της καταγραφής των αποτελεσμάτων, οι μυκηλιακές μάζες από 24 τυχαία επιλεγμένες δοκιμασίες μεταφέρθηκαν στην επιφάνεια στερεού υλικού MM, όπου όλες διατήρησαν την ικανότητά τους για αργή αύξηση, ενώ τα κονίδια αυτών – όταν ελέγχθηκαν σε υλικό MM – διατηρούσαν τον φαινότυπο *nit*. Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η αύξηση πρωτότροφου τύπου εντός του υγρού υλικού MM, υπό τις δεδομένες συνθήκες, οφείλεται όντως σε ετεροκαρύωση και όχι σε ενδεχόμενη επαναφορά στην πρωτοτροφία.



Εικόνα 3.19. Παράδειγμα δοκιμασιών μεγάλης κλίμακας για δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταλλαγών *nit* από στελέχη του μύκητα *Verticillium dahliae*, σε υγρό θρεπτικό υλικό MM εντός βοθρίων τρυβλίου μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Το τρυβλίο φωτογραφήθηκε μετά από 10 ημέρες επώασης των «διασταυρώσεων» στους 24°C (στατικά, στο σκοτάδι). Η σημαντική μυκηλιακή αύξηση σε ένα βοθρίο, συνήθως συνοδευόμενη από σημαντική παραγωγή χρωστικής, ερμηνεύεται ως βλαστητική συμβατότητα μεταξύ των αντίστοιχων στελεχών φυσικού τύπου.

Προκειμένου να ελεγχθεί η συμφωνία των αποτελεσμάτων της νέας μεθόδου με την παραδοσιακή μεθοδολογία δοκιμασιών σε στερεό ελάχιστο θρεπτικό υλικό, όλες οι «διασταυρώσεις» επαναλήφθηκαν σε στερεό υλικό MM, σε τουλάχιστον 2 επαναλήψεις έκαστη. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων ήταν σε άριστη συμφωνία (συνολική ταυτότητα 96,0%). Επιπρόσθετα, ελέγχθηκε η επίδραση της σταθερότητας των μεταλλαγών *nit* στα αποτελέσματα των δοκιμασιών συμπληρωματικότητας, με συγκριτική ανάλυση ανεξάρτητων μεταλλαγών *nit* διαφορετικών ρυθμών επαναφοράς (Πίνακας 3.14) και με τις δύο μεθόδους. Είναι αξιοσημείωτο πως, όταν ελέγχθηκαν μεταλλαγές με συχνότητες επαναφοράς μεγαλύτερες από 10^{-6} , ελήφθησαν συχνά ψευδώς θετικά αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους, αποδεικνύοντας την ανάγκη προσεκτικής επιλογής των μεταλλαγών *nit* προς χρήση σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας για την κατάταξη στελεχών σε VCGs.

Εκτός από τις VCGs 1A και 6, οι οποίες δεν εμφάνισαν ποτέ θετικές αντιδράσεις με άλλες ομάδες, αρκετές αντιδράσεις «διασύνδεσης» (“bridging” reactions, cross-reactions) καταγράφηκαν για όλες τις υπόλοιπες VCGs, ακόμα και για ευρέως χρησιμοποιούμενα διεθνή στελέχη ελέγχου των VCGs (π.χ. PH, 115, 70-21, BB και S39) (Πίνακας 3.15). Πιο συγκεκριμένα, τέτοιες αντιδράσεις παρατηρήθηκαν συχνά μεταξύ των υποομάδων VCG 2A-2B και των 4A-4B, ενώ περιστασιακά καταγράφηκαν και σε όλους τους συνδυασμούς των υποομάδων των VCGs 2 και 4 (VCG 2A-4A, 2A-4B, 2B-4A και 2B-4B), καθώς επίσης και της VCG 3 με τις VCGs 2A, 4A και 4B (Πίνακας 3.15). Αυτές οι αντιδράσεις ποίκιλαν στον βαθμό της πρωτότροφης αύξησης, από εκτεταμένη μέχρι περιορισμένη μυκηλιακή ανάπτυξη, ή ακόμα και παραγωγή μεμονωμένων ομάδων μικροσκληρωτίων (Εικόνα 3.20α-β).

Πίνακας 3.15

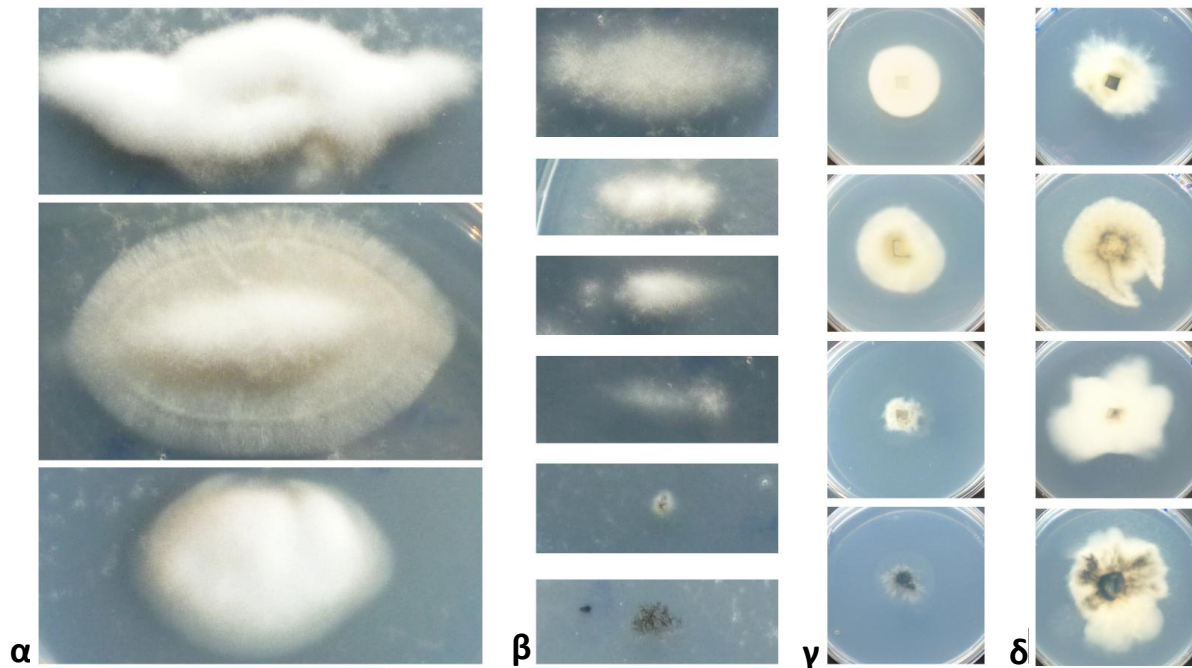
Αποτελέσματα της νέας μεθόδου μεγάλης κλίμακας για δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών *nit* (στελεχών του μύκητα *Verticillium dahliae*), σε υγρό θρεπτικό υλικό

VCG	1A		1B		2A		2B				2Ba		2AB		3		4A			4B			6			HSI		-
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z		
A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E	-	-	-	-	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F	-	-	-	-	+	+	-	+/-	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+/-	
G	-	-	-	-	+/-	-	+	+	-	+/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	
H	-	-	-	-	+	+/-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	
I	-	-	-	-	+/-	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
J	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
K	-	-	-	-	-	+/-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L	-	-	-	-	-	+/-	+	+	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
P	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	+	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
T	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Z	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	

Για λόγους οικονομίας χώρους σε αυτόν τον Πίνακα έχουν χρησιμοποιηθεί κωδικοί ενός γράμματος για τα στελέχη *V. dahliae*, σύμφωνα με την αντιστοιχία που παρατίθεται αναλυτικά στον Πίνακα 3.13.

Η ένταση των αντιδράσεων συμπληρωματικότητας συμβολίζεται ως «+» για τις «ισχυρές» αντιδράσεις (οι οποίες χαρακτηρίζονται από πυκνή μυκηλιακή αύξηση πρωτότροφου τύπου, συνήθως συνοδευόμενη από εκτεταμένη παραγωγή μικροσκληρωτίων), «+/-» για τις «ασθενείς» αντιδράσεις (χαρακτηρίζονται από περιορισμένη μυκηλιακή αύξηση ή μόνον παραγωγή μικροσκληρωτίων), και «-» για την απουσία ορατής μυκηλιακής ανάπτυξης.

Η πλήρης κατάταξη των στελεχών L και M είναι 2B (2A) και 2AB (1, 4A), αντίστοιχα (σε παρενθέσεις οι δευτερεύουσες αντιδράσεις με επιπλέον VCGs της βασικής). HSI: αυτο-ασύμβατα στελέχη.



Εικόνα 3.20. Παραδείγματα μορφολογικών τύπων ετεροκαρύων από δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταλλαγών *nit* από στελέχη *V. dahliae* σε στερεό θρεπτικό υλικό MM. (α) «Ισχυρές» αντιδράσεις συμπληρωματικότητας, που χαρακτηρίζονται από συμπαγείς αποικίες με πυκνό εναέριο μυκήλιο και σημαντικό τάχος αύξησης. (β) «Ασθενείς» αντιδράσεις, που ποικίλουν από αργή πρωτότροφη αύξηση με αραιό εναέριο μυκήλιο μέχρι νησίδες υφών και μικροσκληρωτίων ή και μεμονωμένες ομάδες μικροσκληρωτίων. Όλες οι φωτογραφίες των ετεροκαρύων στις σειρές (α) και (β) ελήφθησαν μετά από 4 εβδομάδες επώασης και είναι στην ίδια κλίμακα. (γ) Ετεροκάρυα που είχαν προκύψει τόσο από «ισχυρές» (δύο πάνω φωτογραφίες) όσο και από «ασθενείς» (δύο κάτω φωτογραφίες) αντιδράσεις διατηρούσαν την ικανότητα αύξησης σε MM με ανακαλλιέργειες από την κεντρική ετεροκαρυωτική περιοχή, αν και τα «ασθενή» ετεροκάρυα αυξανόνταν με σημαντικά χαμηλότερους ρυθμούς και η περιφέρειά τους ήταν περισσότερο ακανόνιστη (οι φωτογραφίες ελήφθησαν 2 εβδομάδες μετά την ανακαλλιέργεια). (δ) Ετεροκαρυωτικές αποικίες ηλικίας 4 εβδομάδων σε θρεπτικό υλικό MM με τυπικά χαρακτηριστικά ετεροκαρύων, συμπεριλαμβανομένων της ακανόνιστης αύξησης (όσον αφορά τόσο το σχήμα της αποικίας όσο και την κατανομή της χρωστικής), και την εμφάνιση ταχύτερα αυξανόμενων τομέων.

Στο πλαίσιο των πειραμάτων που προαναφέρθηκαν παρατηρήθηκε βλαστητική συμβατότητα του στελέχους Cf.38 (το οποίο είχε καταταχθεί παλαιότερα στη VCG 6· Bhat *et al.*, 2003) με όλα τα στελέχη της VCG 2B, αλλά όχι με τα άλλα στελέχη της VCG 6. Αυτή η συμπεριφορά επιβεβαιώθηκε με έλεγχο όλων των διαθέσιμων μεταλλαγών *nit* του στελέχους, σε πολλαπλές επαναλήψεις κάθε μίας δοκιμασίας. Συνεπώς η ταξινόμηση του στελέχους αναθεωρήθηκε στην παρούσα εργασία, και το στέλεχος κατατάχθηκε εκ νέου στη VCG 2B. Επιπλέον, όλες οι μεταλλαγές *nit* από 5 στελέχη (V607I, V661I, V830, Dvd-E6 και Cf.162) αδυνατούσαν να παράξουν θετικές αντιδράσεις ακόμα και με συμπληρωματικές μεταλλαγές των ιδίων στελεχών, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς και τις επαναλήψεις του πειράματος. Αυτά τα στελέχη, επομένως χαρακτηρίστηκαν ως *ετεροκαρυωτικά αυτο-ασύμβατα* (*heterokaryon self-incompatible*, HSI) υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

3.2.6 Γενετική ανάλυση ετεροκαρύων

Με στόχο τη διαλεύκανση των γενετικών διαφορών μεταξύ των «ισχυρών» και των «ασθενών» αντιπιδράσεων συμπληρωματικότητας, επιλέχθηκαν τυχαία 10 ετεροκάρυα από κάθε μία εκ των δύο κατηγοριών. Όταν επαναλήφθηκαν οι αντίστοιχες δοκιμασίες συμπληρωματικότητας σε στερεό υλικό MM με την παρεμβολή φύλλων σελλοφάνης (cellophane), η οποία επιτρέπει τη διάχυση μεταβολιτών, αλλά όχι και τη φυσική επαφή/σύντηξη των υφών, δεν καταγράφηκε καμία αύξηση πρωτότροφου τύπου, υποδηλώνοντας πως η συμπληρωματικότητα δεν οφειλόταν στην αύξηση λόγω διάχυσης ουσιών (συντροφικότητα). Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως τα ετεροκάρυα που προέρχονταν από αρχικές «ασθενείς» αντιδράσεις χαρακτηρίζονταν γενικά από χαμηλότερους ρυθμούς αύξησης σε σχέση με εκείνα από «ισχυρές» (Εικόνα **3.20γ**), ακανόνιστη αύξηση όσον αφορά τόσο το σχήμα της αποικίας όσο και την κατανομή χρωστικής, παρήγαγαν περιστασιακά ταχύτερα αυξανόμενους τομείς (Εικόνα **3.20δ**), και συχνά «διαχωρίζονταν» σε καλλιέργειες με μία εκ των πατρικών μεταλλαγών *nit1* ή *nitM* ύστερα από 1-3 ανακαλλιέργειες σε MM. Αντιθέτως, οι καλλιέργειες των περισσότερων ετεροκαρύων από «ισχυρές» αντιδράσεις ήταν σταθερές ύστερα από τουλάχιστον 5 διαδοχικές ανακαλλιέργειες.

Τα ετεροκάρυα που προέκυψαν από 3 «ισχυρές» και 3 «ασθενείς» αντιδράσεις αναλύθηκαν περαιτέρω (Πίνακας **3.16**). Μεταφορές τμημάτων μυκηλίου-άγαρ από τις κεντρικές περιοχές των 6 ετεροκαρύων οδηγούσαν πάντοτε σε αύξηση στο MM, δίνοντας γένεση σε χαρακτηριστικές συμπαγείς αποικίες με ένα πλατύ εξωτερικό περιθώριο λεπτού μυκηλίου, το οποίο ήταν όμοιο με την αύξηση των μεταλλαγών *nit* (Εικόνα **3.20γ**). Επιπλέον, επιδείκνυαν χαμηλότερους ρυθμούς αύξησης από τις πατρικές μεταλλαγές *nit* σε θρεπτικό υλικό MM με κατάλληλες πηγές αζώτου. Τα κονίδια ετεροκαρύων ηλικίας 4 εβδομάδων ήταν πάντοτε αυξότροφα όποτε ελέγχονταν με επίστρωση σε υλικό MM. Η ανάλυση κονιδίων με δοκιμασίες αύξησης 500 κατά μέσο όρο κονιδίων από κάθε ετεροκάρυο, σε ελάχιστα θρεπτικά υλικά με διαφορετικές πηγές αζώτου, κατέδειξε πως οι πυρηνικές αναλογίες των ετεροκαρύων ποίκιλλαν στο εύρος 1:1 έως 1:9, με συχνότερο κατά κανόνα τον τύπο *nitM*. Επιπλέον, οι αναλογίες ήταν λιγότερο ισορροπημένες για τα «ασθενή» σε σχέση με τα «ισχυρά» ετεροκάρυα (Πίνακας **3.16**). Τέλος, με τη μεταφορά άκρων υφών πλάτους 0,5 mm από την περιφέρεια των ετεροκαρύων σε θρεπτικό υλικό MM αποδείχθηκε πως ήταν ομοκαρυωτικά για τον ένα ή τον άλλο τύπο *nit*, με τον ένα να επικρατεί σε κάθε περίπτωση (Πίνακας **3.16**).

Πίνακας 3.16					
Αναλύσεις κονιδίων και άκρων υφών από ετεροκάρυα του <i>Verticillium dahliae</i>					
Συστατικά ετεροκαρύου		Πυρηνική αναλογία κονιδίων A:B (αριθμός κονιδίων που ελέγχθηκαν)	Αριθμός άκρων υφών του τύπου		Μέση διάμετρος αποικίας ^α (mm)
A (<i>nit1</i>)	B (<i>nitM</i>)		A	B	
Ετεροκάρυα από αρχικές «ισχυρές» αντιδράσεις					
Ls.17.10S (VCG 2B)	Ls.17.15S (VCG 2B)	1,0 : 2,9 (525)	56	24	26
T9.8U (VCG 1A)	V44.15S (VCG 1A)	1,0 : 3,8 (489)	24	76	24
70-21.7U (VCG 3)	PCW.20U (VCG 3)	1,9 : 1,0 (505)	58	42	20
Ετεροκάρυα από αρχικές «ασθενείς» αντιδράσεις					
115.1S (VCG 2B)	Cf38.42S (VCG 2B)	1,0 : 5,4 (516)	38	52	17
V320I.5U (VCG 2A)	Ls.17.15S (VCG 2B)	1,0 : 8,6 (435)	6	74	11
530-1.23S (VCG 2AB)	S39.45S (VCG 4B)	3,4 : 1,0 (412)	41	59	15

^α Μέση διάμετρος ετεροκαρύου κατόπιν επώασης για 8 ημέρες στους 24°C (σκοτάδι).

3.2.7 Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ πρωτοπλαστών

Προκειμένου να διερευνηθεί τυχόν επίδραση του κυτταρικού τοιχώματος στη συμβατότητα μεταξύ στελεχών διαφορετικών VCGs του *V. dahliae*, ένα αντιπροσωπευτικό σύνολο μεταλλαγών *nit* από στελέχη όλων των ομάδων (Πίνακας 3.17) χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή πρωτοπλαστών (από κονίδια σε φάση βλάστησης) και δοκιμασιών συμπληρωματικότητας μεταξύ αυτών, κατόπιν επίδρασης με διάλυμα PEG που επάγει τη σύντηξή τους. Όλα τα μίγματα πρωτοπλαστών-«διασταυρώσεις» επιστρώθηκαν σε τρυβλία ελάχιστου θρεπτικού υλικού MM, σε τουλάχιστον 2 επαναλήψεις έκαστη, και η καταγραφή των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε 2 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Παρατηρήθηκε πως εκτός από τους αναμενόμενους συνδυασμούς (συμβατούς κατά το παραδοσιακό σύστημα των VCGs· παράγραφος 3.2.5), οι θετικές δοκιμασίες αυξήθηκαν κατά 40,0% (σε σύνολο 30 εφικτών «διασταυρώσεων» μεταξύ συμπληρωματικών μεταλλαγών), μεταξύ στελεχών που ανήκαν σε διαφορετικές (υπο)ομάδες του συστήματος των VCGs. Ενδεικτικά, παρατηρήθηκε συμβατότητα μεταξύ των αντιπροσώπων των VCGs 1A-2A, 1A-2B, 2B-4A, 2B-6, 4A-6, καθώς επίσης και συμβατότητα ενός μη αντιδρώντος στελέχους (HSI) με τις VCGs 1, 2A και 2B (Πίνακας 3.17). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως οι φραγμοί ασυμβατότητας μεταξύ ορισμένων τουλάχιστον VCGs σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα, ενώ η σύντηξη μεταξύ πρωτοπλαστών κατά την επίδραση με διάλυμα PEG πιθανά επάγει περαιτέρω τη δημιουργία βιώσιμων ετεροκαρύων.

Σημειώνεται ότι για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων οφειλόμενων σε τυχόν επαναφορά στην πρωτοτροφία (reversion) χρησιμοποιήθηκε για κάθε «διασταύρωση» πλήθος πρωτοπλαστών κατά τουλάχιστον μία δεκαδική τάξη μεγέθους μικρότερο από τον αντίστροφο της τιμής σταθερότητας (Πίνακας 3.14), καθώς και αντίστοιχες δοκιμασίες ελέγχου με επίστροφή πρωτοπλαστών από μεμονωμένα στελέχη· τα αποτελέσματα συμβάδιζαν σε κάθε περίπτωση με τις αντίστοιχες συχνότητες επαναφοράς στην πρωτοτροφία για τα κονίδια των ίδιων στελεχών (Πίνακας 3.14). Εκτός από όσες δοκιμασίες συμπληρωματικότητας απορρίφθηκαν ως πιθανά αποτελέσματα επαναφοράς, από όλες τις υπόλοιπες θετικές δοκιμασίες ελήφθησαν κονίδια, τα οποία ελέγχθηκαν ως προς τις τροφικές τους απαιτήσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις αποδείχθηκε πως ήταν αυξότροφα και ανήκαν στους

πατρικούς τύπους (*nit1* ή *nitM*) με διάφορες αναλογίες, υποδηλώνοντας πως η αύξηση πρωτότροφου τύπου στις αντίστοιχες δοκιμασίες οφειλόταν όντως σε ετεροκαρύωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αργή ετεροκαρυωτική αύξηση, ενίοτε περιορισμένη σε δεσμίδες διατηρητικών δομών (μικροσκληρωτίων) (Εικόνα 3.21).

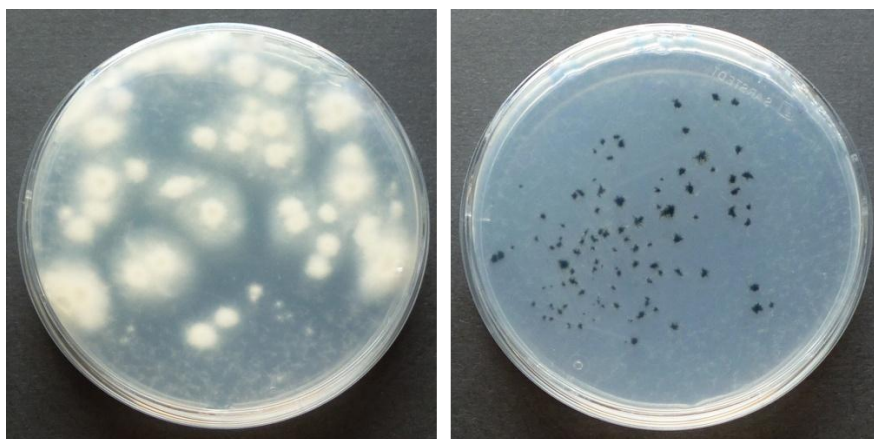
Παράλληλα με τα πειράματα σύντηξης πρωτοπλαστών των στελεχών του Πίνακα 3.17, πραγματοποιήθηκαν για σύγκριση συνδυασμοί κονιδίων των αντίστοιχων στελεχών, οι οποίοι υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία με τους πρωτοπλάστες. Θετικές δοκιμασίες συμπληρωματικότητας ελήφθησαν μόνον για τους αναμενόμενους συνδυασμούς που χαρακτηρίζονται από ετεροκαρυωτική αύξηση κατά τις παραδοσιακές μεθόδους (παράγραφος 3.2.5). Συμπεραίνεται, επομένως, πως η ασυμβατότητα ετεροκαρύωσης για αυτό το σύνολο στελεχών του *V. dahliae* δεν περιορίζεται στις υφές των ώριμων αποικιών, αλλά αντίστοιχα επεκτείνεται και στο επίπεδο των (βλαστηνόντων) κονιδίων υπό τις ίδιες συνθήκες.

Πίνακας 3.17

Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας με σύντηξη πρωτοπλαστών από στελέχη του *Verticillium dahliae*

Στέλεχος (μεταλλαγή, κλάση μεταλλαγής)	VCG	T9 (<i>λ, nit1</i>)	V44 (<i>γ, nitM</i>)	PH (<i>γ, nitM</i>)	V3201 (<i>λ, nit1</i>)	Ls.17 (<i>ξ, nit1</i>)	V7021 (<i>α, nitM</i>)	BB (1.6, <i>nitM</i>)	S39 (<i>s4, nit1</i>)	Ca.146 (<i>s1.2, nitM</i>)	Ca.148 (<i>s1.11, nit1</i>)	V13 (1.10, <i>nitM</i>)
		1A	1A	2A	2A	2B	2B	4A	4B	6	6	HSI
T9 (<i>λ, nit1</i>)	1A	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
V44 (<i>γ, nitM</i>)	1A		-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
PH (<i>γ, nitM</i>)	2A			-	+	+	+	-	-	-	-	-
V3201 (<i>λ, nit1</i>)	2A				^a	-	+	^a	-	-	^a	+
Ls.17 (<i>ξ, nit1</i>)	2B					-	+	+	-	+	-	+
V7021 (<i>α, nitM</i>)	2B						-	-	-	-	-	-
BB (1.6, <i>nitM</i>)	4A							-	+	+	+	-
S39 (<i>s4, nit1</i>)	4B								-	-	-	-
Ca.146 (<i>s1.2, nitM</i>)	6									-	+	-
Ca.148 (<i>s1.11, nit1</i>)	6										-	-
V13 (1.10, <i>nitM</i>)	HSI											-

^a Σε τουλάχιστον μία επανάληψη των δοκιμασιών σύντηξης πρωτοπλαστών παρατηρήθηκε θετική αντίδραση που αποδόθηκε σε πιθανή επαναφορά στην πρωτοτροφία, βάσει των αντίστοιχων δοκιμασιών ελέγχου και του ελέγχου των τροφικών απαιτήσεων των μονοπύρηνων κονιδίων· αυτές οι περιπτώσεις απορρίφθηκαν και σημειώνονται σε αυτόν τον Πίνακα ως «-».



Εικόνα 3.21. Παραδείγματα ετεροκαρύων κατόπιν σύντηξης πρωτοπλαστών με συμπληρωματικούς γονοτύπους *nit* και επίστρωσης σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό MM. Συχνά τα ετεροκάρυα είχαν ιδιόμορφη μορφολογία και αργή αύξηση, ενίοτε περιορισμένα σε δεσμίδες μικροσκληρωτίων (δεξιά).

3.2.8 Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ κονιδίων σε νερό

Βάσει του ευρήματος στην παρούσα εργασία ότι η σύντηξη των κονιδίων μέσω CATs (συχνά σε υπερδομές αποτελούμενες από αλληλοσυνδεδεμένα πολλαπλά κονίδια σε φάση βλάστησης και νεαρές υφές) επάγεται στο νερό ενώ αναστέλλεται από την παρουσία θρεπτικών συστατικών (παράγραφος 3.3.1), πραγματοποιήθηκε έλεγχος αυτών των συνθηκών για δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ του συνόλου των μεταλλαγών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.17. Για κάθε δοκιμασία-«διασταύρωση» (έκαστη πραγματοποιήθηκε σε 5 ανεξάρτητες επαναλήψεις) κονίδια ηλικίας 15 ημερών από τα δύο μεταλλαγμένα στελέχη *nit* αναμίχθηκαν σε ίση αναλογία και τελική συνολική συγκέντρωση $5 \cdot 10^6$ κονίδια/mL σε αποστειρωμένο νερό με προσθήκη γλυκόζης 0,5%. Τα μίγματα επώασθησαν στους 24°C (σκοτάδι) για 3 ημέρες και, εν συνεχεία, επιστρώθηκαν σε τρυβλία MM, τα οποία επώασθησαν στις ίδιες συνθήκες για 10 ημέρες. Οι δοκιμασίες ελέγχου αποτελούνταν από κονίδια μεμονωμένων στελεχών που υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία, ενώ κονίδια από όλα τα υποτιθέμενα ετεροκάρυα ελέγχθηκαν δειγματοληπτικά για τις τροφικές τους απαιτήσεις, με στόχο την αναγνώριση τυχόν ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων οφειλομένων σε πιθανή επαναφορά στην πρωτοτροφία (reversion).

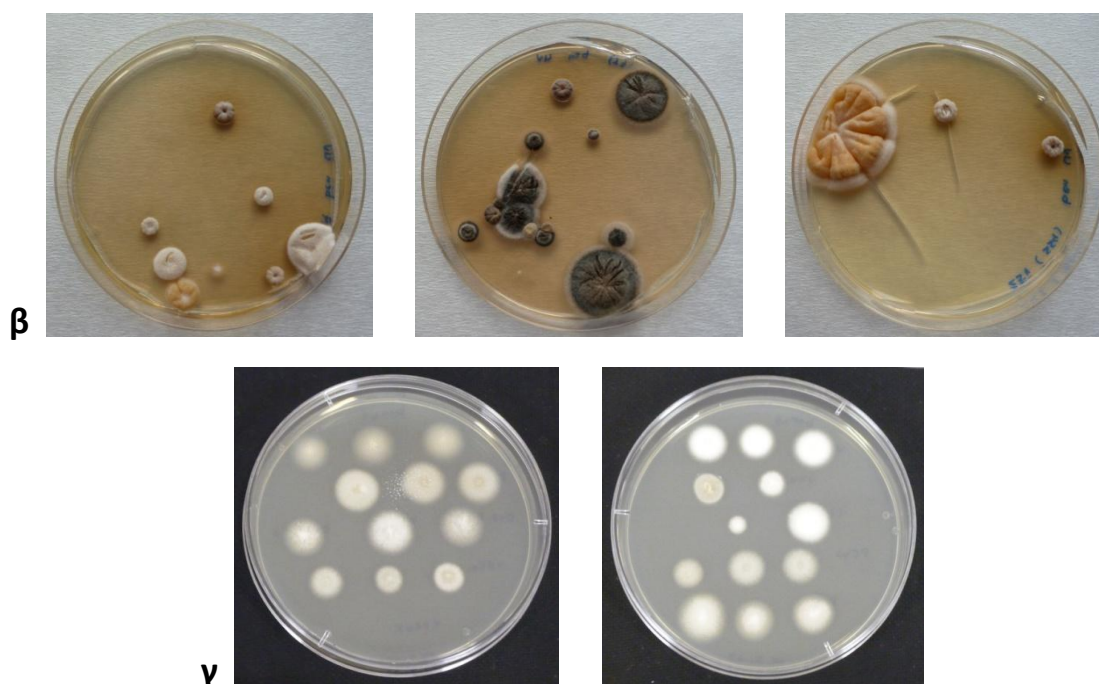
Είναι αξιοσημείωτο πως με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου η πλειοψηφία των «διασταυρώσεων» (54 σε σύνολο 66· 81,8%), συμβατών και μη κατά την παραδοσιακή μέθοδο κατάταξης στελεχών σε VCGs, απέδωσαν πραγματική ετεροκαρυωτική αύξηση σε τουλάχιστον μία εκ των επαναλήψεων. Ωστόσο, η απόδοση της μεθόδου ποίκιλε σημαντικά μεταξύ διαφορετικών συνδυασμών, ενώ επίσης συχνά παρατηρήθηκε σποραδική και αργή ετεροκαρυωτική αύξηση, ή και περιοριζόμενη σε δεσμίδες διατηρητικών δομών (μικροσκληρωτίων), αντίστοιχα με ό, τι παρατηρήθηκε κατά τις δοκιμασίες συμπληρωματικότητας μεταξύ πρωτοπλαστών των ίδιων στελεχών. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ελάττωση στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων επάγει τον σχηματισμό βιώσιμων ετεροκαρύων στην πλειονότητα των συνδυασμών διαφορετικών VCGs, υποδηλώνοντας την απουσία απόλυτων φραγμών ασυμβατότητας για την πλειοψηφία των στελεχών *V. dahliae*.

3.2.9 Ανάπτυξη νέας μεθόδου μεγάλης κλίμακας για την κατάταξη συμβατότητας στελεχών *Verticillium* φυσικού τύπου

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος για την κατάταξη στελεχών φυσικού τύπου των ειδών *Verticillium* ανάλογα με τη βλαστητική τους συμβατότητα, με χρήση κατάλληλα κατασκευασμένων, διπλά μεταλλαγμένων στελεχών ελέγχου *nit ben^R* (*nit* και ανθεκτικά στον παρεμποδιστή αύξησης *benomyl*). Η μέθοδος βασίσθηκε στην ιδέα ότι όταν τοποθετηθούν τμήματα άγαρ-μυκηλίου από ένα στέλεχος φυσικού τύπου και ένα στέλεχος *nit ben^R* σε επαφή μεταξύ τους επί θρεπτικού υλικού MM εμπλουτισμένου με τον παράγοντα *benomyl* – δηλαδή ενός θρεπτικού υλικού που δεν επιτρέπει την αύξηση κανενός από τα δύο στελέχη – πρωτότροφη αύξηση αναμένεται να παρατηρηθεί μόνον εφόσον λάβει χώρα δημιουργία ετεροκαρύου μεταξύ των δύο στελεχών.

Για την παραγωγή των στελεχών ελέγχου προσδιορίστηκε καταρχήν η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) του *benlate* (φυτοφαρμάκου που περιέχει τη δραστική ουσία *benomyl* σε συγκέντρωση 50% w/w) για τα είδη του *Verticillium*, στο 1,0 μg/mL. Ακολούθησε ακτινοβόληση UV κονιδιακών εναιωρημάτων στελεχών *Verticillium* φυσικού τύπου και μεταλλαγών *nit*, κατόπιν επίστρωσής τους σε θρεπτικό υλικό PDA εμπλουτισμένο με 1,5 μg *benomyl*/mL, για την επαγωγή μεταλλαγμένων στελεχών ανθεκτικότητας στο *benomyl*. Από τα 31 στελέχη *Verticillium* που δοκιμάστηκαν (Πίνακας 3.13), ανιχνεύθηκε μόνον ένα στέλεχος *V. longisporum* (K2) με ικανότητα αύξησης σε αυτή τη συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου. Η απόδοση της επαγωγής μεταλλαγών ανθεκτικότητας με ακτινοβόληση UV ποίκιλε μεταξύ 10^{-3} και 10^{-4} μεταξύ των επιζώντων, σε επίπεδο βιωσιμότητας 5%. Σημειώνεται πως μεταξύ των ανθεκτικών μεταλλαγών που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε συστηματικά σαφής πολυμορφισμός ως προς το τάχος αύξησης, αλλά και ιδιάζοντα μορφολογικά χαρακτηριστικά που εμφανίζονταν μόνον κατόπιν διατήρησης των μεταλλαγών στους 4°C (Εικόνα 3.22). Με αυτήν τη διαδικασία δημιουργήθηκε μια συλλογή 61 ανθεκτικών μεταλλαγών από στελέχη *V. dahliae* και *V. albo-atrum*, καθώς και από μεταλλαγές *nit* αυτών, με το ίδιο τάχος αύξησης με τους αντίστοιχους φυσικούς τύπους. Όταν αυτές οι μεταλλαγές ελέγχθηκαν με δοκιμασίες αύξησης σε διάφορες συγκεντρώσεις του *benlate* (στο εύρος 1,0-100,0 μg/mL), περίπου το ένα τρίτο των μεταλλαγών ήταν σταθερά ανθεκτικές σε συγκεντρώσεις μέχρι 1,5 μg/mL αλλά δεν αναπτύσσονταν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Οι περισσότερες από τις υπόλοιπες μεταλλαγές μπορούσαν να αναπτυχθούν μέχρι και σε συγκέντρωση 100,0 μg *benlate*/mL, είτε φυσιολογικά είτε με ελαττωμένο τάχος αύξησης ή/και ιδιάζοντα μορφολογικά χαρακτηριστικά (πολύ συμπαγείς αποικίες, ακανόνιστο περιθώριο υφών, έλλειψη εναέριων υφών) (Πίνακας 3.18 και Εικόνα 3.23).





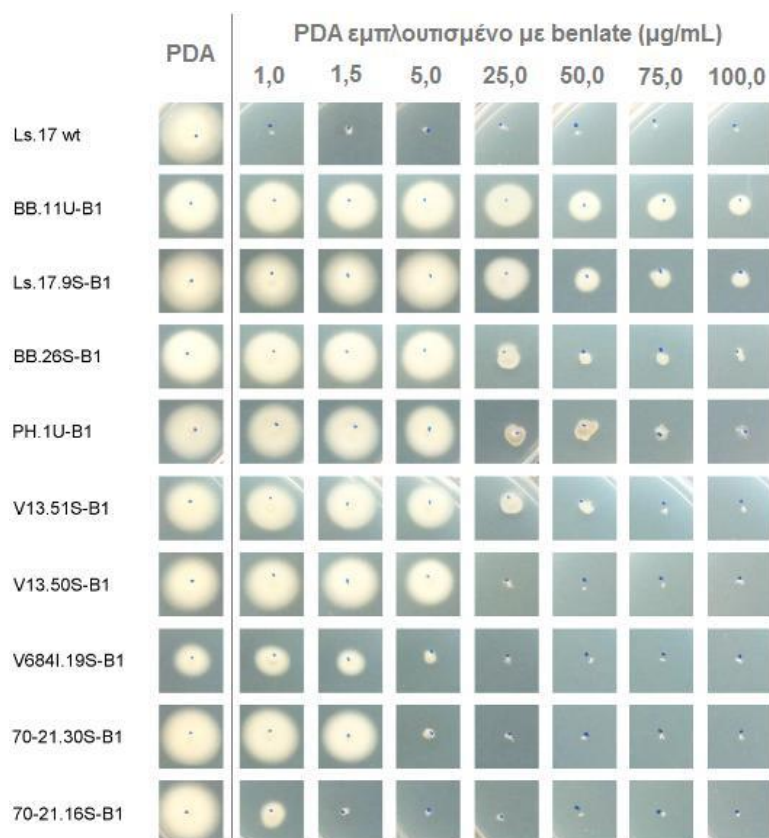
Εικόνα 3.22. (α) Μεταλλαγές ανθεκτικότητας των στελεχών *V. dahliae* V13 (αριστερά) και V684I (δεξιά) στον παρεμποδιστή αύξησης benomyl (συγκέντρωση 1,5 µg/mL), κατόπιν μεταλλαξογένεσης με ακτινοβόληση UV. Παρατηρείται σαφής πολυμορφισμός των μεταλλαγών ως προς το τάχος αύξησης. (β) Μεταλλαγές ανθεκτικότητας στην ουσία benomyl των στελεχών *V. dahliae* S39 (αριστερά), 115 (κέντρο) και 25V-SS4 (δεξιά), κατόπιν μεταλλαξογένεσης των στελεχών με ακτινοβόληση UV και διατήρηση στους 4°C. (γ) Μεταφορά των μεταλλαγών που παρουσιάζονται στην περίπτωση (β) σε διατάξεις στο σε θρεπτικό υλικό PDA εμπλουτισμένο με benomyl, με επώαση στους 24°C.

Πίνακας 3.18

Δοκιμασίες αύξησης μεταλλαγών *ben^R* (ανθεκτικών στο benomyl) σε στερεό θρεπτικό υλικό PDA εμπλουτισμένο με benomyl σε διάφορες συγκεντρώσεις^α

Πατρικό στέλεχος	μεταλλαγή <i>ben^R</i>	0	1,0	1,5	5,0	25,0	50,0	75,0	100,0
Ls.17	φυσικός τύπος	+	-	-	-	-	-	-	-
T9	T9.B1 ^β	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
	T9.B2	+	+	+	+	+	+	+	+
V44	V44.B1 ^β	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
	V44.B2	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
V44.6U (<i>nit1</i>)	V44.6U-B1 ^β	+	+	+	+	+	+	+	+
V44.11S (<i>nitM</i>)	V44.11S-B1 ^γ	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
PH	PH.B1 ^β	+	+	+	+	+	-	-	-
	PH.B2	+	+	+	+	+/-	-	-	-
PH.1U (<i>nit1</i>)	PH.1U-B1 ^γ	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-
PH.42S (<i>nitM</i>)	PH.42S-B1 ^β	+	+	+	-	-	-	-	-
V320I	V320I.B1 ^β	+	+	+	+	+	+	+	+
	V320I.B2	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
	V320I.B3	+	+	+	+	+	+	+	+
115.1S (<i>nit1</i>)	115.1S-B1 ^β	+	+	+	+/-	-	-	-	-
	115.1S-B2	+	+	+	+	+/-	-	-	-

Ls.17	Ls.17.B1 ^β	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
	Ls.17.B2	+	+	+	+	+	+	+	+
Ls.17.12S (<i>nit1</i>)	Ls.17.12S-B1 ^β	+	+	+	+	-	-	-	-
Ls.17.9S (<i>nitM</i>)	Ls.17.9S-B1 ^γ	+	+	+	+	+	+	+	+
V16	V16.B1 ^β	+	+	+	+	+	+	+	+/-
	V16.B2	+	+	+	+	-	-	-	-
Cf.38	Cf.38.B1 ^β	+	+	+	+	+	+	+/-	+
	Cf.38.B2	+	+	+	-	-	-	-	-
V702I	V702I.B1 ^β	+	+	+	-	-	-	-	-
	V702I.B2	+	+	+	-	-	-	-	-
530-1	530-1.B1 ^β	+	+	+	-	-	-	-	-
25V (SS4)	25V.B1	+	+	+	+	-	-	-	-
70-21	70-21.B1 ^β	+	+	+	-	-	-	-	-
70-21.30S (<i>nit1</i>)	70-21.30S-B1 ^γ	+	+	+	+/-	-	-	-	-
70-21.16S (<i>nitM</i>)	70-21.16S-B1 ^β	+	+	+/-	-	-	-	-	-
PCW	PCW.B1 ^β	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
	PCW.B2	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
BB	BB.B1 ^β	+	+	+	-	-	-	-	-
	BB.B2	+	+	+	+	+	+	+	+
BB.11U (<i>nit1</i>)	BB.11U-B1 ^{β,γ}	+	+	+	+	+	+	+	+
BB.26S (<i>nitM</i>)	BB.26S-B1	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
V830	V830.B1 ^β	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
	V830.B2	+	+	+	-	-	-	-	-
Dvd-E6	Dvd-E6.B1 ^β	+	+	+	-	-	-	-	-
	Dvd-E6.B2	+	+	+	+	+	+	+	+
S39	S39.B1 ^{β,γ}	+	+	+	+/-	-	-	-	-
	S39.B2	+	+	+	-	-	-	-	-
S39.42S (<i>nit1</i>)	S39.42S-B1	+	+	+	+	+	+	+	+
S39.43S (<i>nitM</i>)	S39.43S-B1 ^β	+	+	+	+	+	+	+	+
V684I	V684I.B1 ^β	+	+	+	+	+	+	+	+
	V684I.B2	+	+	+	+	+	+	+	+/-
V684I.19S (<i>nit1</i>)	V684I.19S-B1 ^β	+	+	+	+/-	-	-	-	-
V684I.11U (<i>nitM</i>)	V684I.11U-B1 ^γ	+	+	+	+	-	-	-	-
Ca.83	Ca.83.B1 ^β	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ca.83.B2	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ca.83.B3	+	+	+	+	+	+	+	+
Cf.162	Cf.162.B1 ^β	+	+	+	-	-	-	-	-
	Cf.162.B2	+	+	+	-	-	-	-	-
V13	V13.B1	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-
	V13.B2	+	+	+	+	+	+	+	+
V13.51S (<i>nit1</i>)	V13.51S-B1 ^γ	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-
V13.50S (<i>nitM</i>)	V13.50S-B1 ^β	+	+	+	+	-	-	-	-
CA26	CA26.B1 ^β	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-
	CA26.B2	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>V. albo-atrum</i> T2	T2.B1 ^β	+	+	+	+	-	-	-	-
	T2.B2	+	+	+	+	+	+	+	+
^α Η ικανότητα των μεταλλαγών για αύξηση στα διαφορετικά θρεπτικά υλικά συμβολίζεται ως «+» (για αύξηση παρόμοια με εκείνη στο τρυβλίο PDA ελέγχου, εκτός από μικρή ελάττωση στο τάχος αύξησης), «+/-» (για δραματική ελάττωση του τάχους αύξησης ή ιδιάζοντα μορφολογικά χαρακτηριστικά) ή «-» (καμία αύξηση).									
^β Τα μεταλλαγμένα στελέχη διατηρήθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης στους -80°C για χρονικά διαστήματα μέχρι ενός έτους πριν τον έλεγχο, ώστε να ελεγχθεί η επίδραση της μακροχρόνιας διατήρησης στον φαινότυπο.									
^γ Τα διπλά μεταλλαγμένα στελέχη <i>nit ben^R</i> που χρησιμοποιήθηκαν ως στελέχη ελέγχου για δοκιμασίες συμβατότητας με στελέχη <i>Verticillium</i> φυσικού τύπου, υπό συνθήκες επιλεκτικής πίεσης.									



Εικόνα 3.23. Παραδείγματα δοκιμασιών αύξησης ανεξάρτητων μεταλλαγών *ben^R* (ανθεκτικών στη χημική ουσία benomyl) σε διάφορες συγκεντρώσεις του φυτοφαρμάκου benlate (50% w/w benomyl). Ο φυσικός τύπος του στελέχους Ls.17 παρατίθεται στην πρώτη σειρά ως μάρτυρας, και η αύξηση κάθε μεταλλαγής σε θρεπτικό υλικό PDA (χωρίς προσθήκη του χημικού παράγοντα) απεικονίζεται στην πρώτη στήλη. Παρατηρείται ετερογένεια μεταξύ των μεταλλαγών ως προς τα όρια ανθεκτικότητάς τους στο benlate, και αύξηση ορισμένων σε υψηλές συγκεντρώσεις ($\geq 25,0$ µg benlate/mL) με ιδιάζοντα μορφολογικά χαρακτηριστικά (π.χ. συμπαγείς αποικίες με μικρό τάχος αύξησης, ακανόνιστο περιθώριο, έλλειψη εναέριων υφών).

Οκτώ διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *nit ben^R* επιλέχθηκαν ώστε να αντιπροσωπεύουν τις VCGs του *V. dahliae*, μαζί και με ένα στέλεχος HSI (μεταλλαγές των στελεχών *V. dahliae* V44, PH, Ls.17, 70-21, BB, S39, V684I και V13· Πίνακας 3.18). Κάθε ένα εκ των 31 στελεχών *Verticillium* του Πίνακα 3.13 «διασταυρώθηκε» με κάθε ένα από τα 8 στελέχη ελέγχου με τη μεθοδολογία που περιγράφεται αναλυτικά στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι» (έκαστος συνδυασμός σε τουλάχιστον 2 επαναλήψεις). Τα αποτελέσματα των «διασταυρώσεων» παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.19. Το στέλεχος *V. longisporum* K2, που ήταν ανθεκτικό στο benomyl, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Για τα υπόλοιπα 30 στελέχη, περισσότερες από τις μισές «διασταυρώσεις» (65,7%) οδήγησαν σε πρωτότροφη αύξηση, η οποία ποίκιλε από περιορισμένο εναέριο μυκήλιο σε επαφή με τα εμβόλια, μέχρι εκτεταμένη αύξηση επί του επιλεκτικού υλικού (Εικόνα 3.24). Οι αποικίες που παράχθηκαν με αυτόν τον τρόπο είχαν τα τυπικά μορφολογικά γνωρίσματα των ετεροκαρύν του *V. dahliae*, συμπεριλαμβανομένων του χαμηλότερου τάχους αύξησης από τα πατρικά στελέχη, ακανόνιστο σχήμα και ένα πλατύ περιθώριο χαρακτηριστικής για τις μεταλλαγές *nit* επιφανειακής αύξησης γύρω από την περιοχή πρωτότροφης αύξησης (Εικόνα 3.24). Η πιθανότητα επαναφοράς του φαινότυπου *nit* στην πρωτοτροφία αποκλείστηκε με

δοκιμαστικούς ελέγχους των στελεχών ελέγχου, τα οποία δεν αναπτύχθηκαν σε καμία περίπτωση. Επιπλέον, η επανάληψη 24 τυχαία επιλεγμένων δοκιμασιών με παρεμβολή φύλλων σελλοφάνης μεταξύ των εμβολίων έδειξε ότι η φυσική επαφή των μυκηλίων ήταν απαραίτητη για την πρωτότροφη αύξηση. Όταν ελήφθησαν κονιδιακά εναιωρήματα από τα υποθετικά ετεροκάρυα των ίδιων 24 «διασταυρώσεων» και επιστρώθηκαν σε θρεπτικό υλικό MM εμπλουτισμένο με benlate, δεν παρατηρήθηκε καμία αύξηση. Όλα αυτά τα αποτελέσματα συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι τα μυκίλια που παράχθηκαν ήταν όντως ετεροκαρυωτικά, με το κάθε ένα να αποτελείται από ένα «συστατικό» φυσικού τύπου και ένα διπλά μεταλλαγμένο.

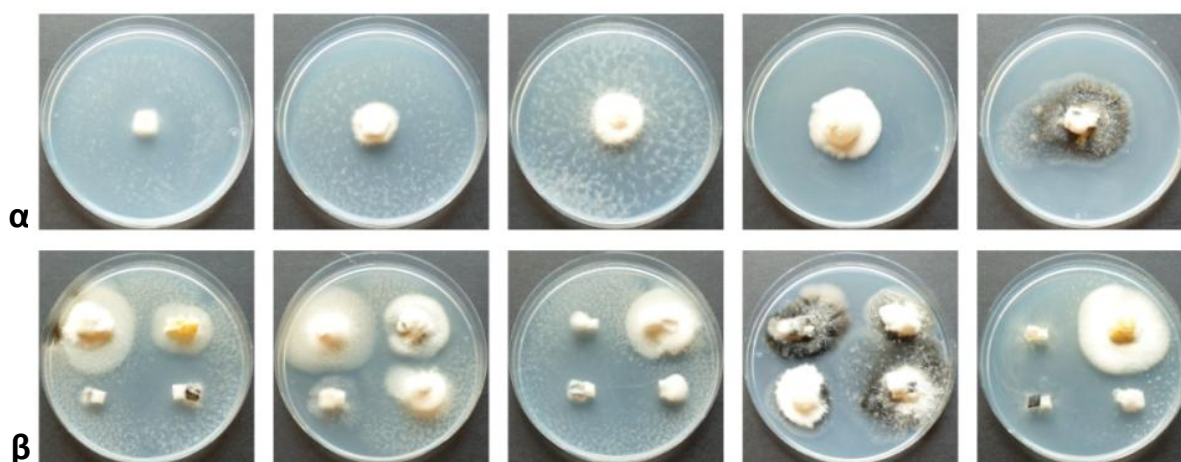
Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν κατά μέσο όρο 86%. Σε μια προσπάθεια περαιτέρω επαύξησης της επαναληψιμότητας δοκιμάστηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο κατά το οποίο το τμήμα άγαρ-μυκηλίου κάθε στελέχους φυσικού τύπου ερχόταν σε επαφή με μία σταγόνα 30 μ L του κονιδιακού εναιωρήματος κάθε στελέχους ελέγχου (πιο αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας παρατίθεται στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι») (Εικόνα 3.24). Αυτή η τεχνική χαρακτηρίστηκε από σχεδόν άριστη επαναληψιμότητα (τουλάχιστον 95% κατά μέσο όρο) εφόσον οι συγκεντρώσεις των κονιδιακών εναιωρημάτων ήταν αυστηρά ρυθμισμένες (σε συγκέντρωση 10^5 κονιδίων/mL).

Πίνακας 3.19

Κατάταξη^a στελεχών *Verticillium* φυσικού τύπου με δοκιμασίες συμβατότητας βάσει διπλά μεταλλαγμένων στελεχών ελέγχου *nit ben*^R

Στέλεχος	Διπλά μεταλλαγμένα στελέχη ελέγχου <i>nit ben</i> ^R στελεχών του <i>V. dahliae</i>							
	V44	PH	Ls.17	70-21	BB	S39	V684I	V13
	<i>V. dahliae</i>							
T9	-	++	++	++	++	++	++	++
V44	-	++	+	-	++	-	++	-
V607I	-	+	+/-	-	+	-	-	+/-
V661I	-	++	-	-	+	-	+	-
PH	+	++	-	-	++	-	++	-
V320I	++	++	++	++	++	++	++	++
115	-	++	+	-	+	++	-	-
Ls.17	-	++	+	-	++	++	++	++
V16	++	++	+	+	++	++	++	-
Cf.38	+	+	+	+	++	+	++	++
V702I	+	++	+	+	++	+	++	-
530-1	++	++	++	++	++	++	++	++
25V (SS4)	-	++	-	-	++	-	++	-
70-21	-	++	-	-	++	-	++	-
PCW	-	++	-	-	++	-	++	-
BB	-	+	++	-	++	+	++	+
V830	+	++	+	++	+	++	++	++
Dvd-E6	++	++	++	++	++	++	++	++
S39	-	+	-	-	++	-	++	-
V684I	++	++	+	-	++	+	++	++
Ca.83	++	++	++	++	++	++	++	++
Ca.146	-	+	+	-	+	-	++	-
Ca.148	-	+	+	-	++	+	++	+
Cf.162	+	++	+	+	++	++	++	++
V13	-	++	-	-	++	++	++	-

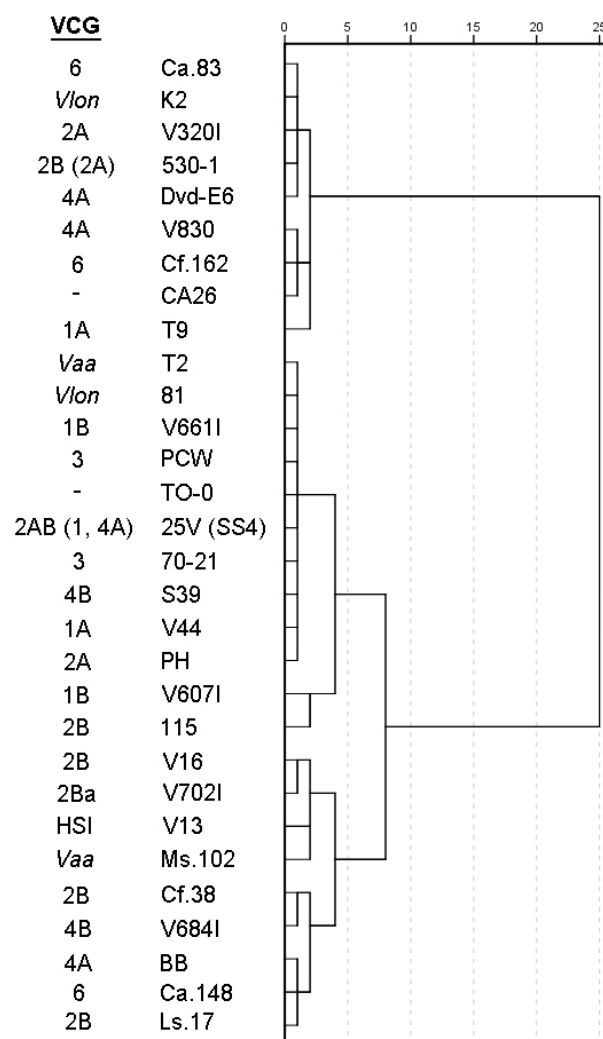
TO-0	-	++	-	-	++	-	++	-
CA26	++	++	+/-	++	++	++	++	++
<i>V. albo-atrum</i>								
Ms.102	-	++	-	++	++	+	++	-
T2	-	++	-	-	+	-	++	-
<i>V. longisporum</i>								
81	-	++	-	-	+	-	++	-
K2 ^β	++	++	++	++	++	++	++	++
^α Η ετεροκαρυωτική αύξηση χαρακτηρίστηκε ως «++» (για φυσιολογική αύξηση πρωτότροφου τύπου, με τις αποικίες να έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 2 cm μετά από επώαση 3 εβδομάδων), «+» (για αργή αύξηση πρωτότροφου τύπου, με τις αποικίες να έχουν διάμετρο μικρότερη από 2 cm μετά από επώαση 3 εβδομάδων), «+/-» (για οριακή αύξηση μόνον σε επαφή με τα εμβόλια), ή «-» (όταν δεν παρατηρήθηκε καμία μυκηλιακή αύξηση).								
^β Το στέλεχος <i>V. longisporum</i> K2 παρουσίασε έμφυτη ανθεκτικότητα στο φυτοφάρμακο benlate στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν.								



Εικόνα 3.24. Παραδείγματα σχηματισμού ετεροκαρύων υπό επιλεκτική πίεση μεταξύ διπλά μεταλλαγμένων στελεχών ελέγχου *nit ben^R* και στελεχών *Verticillium* φυσικού τύπου. Δύο εναλλακτικές μέθοδοι δοκιμάστηκαν για τη διεξαγωγή των δοκιμασιών: **(α)** συν-εμβολιασμός τμήματος άγαρ-μυκηλίου κάθε στελέχους φυσικού τύπου με μια σταγόνα 30 µL (συγκέντρωσης 10^5 κονιδίων/mL) κάθε στελέχους ελέγχου, επί του επιλεκτικού υλικού (MM εμπλουτισμένο με 1,5 µg benlate / mL), και **(β)** συν-εμβολιασμός σε επαφή τμημάτων άγαρ-μυκηλίου κάθε στελέχους φυσικού τύπου και κάθε στελέχους ελέγχου, επί του ίδιου επιλεκτικού υλικού. Στη δεύτερη μέθοδο, μέχρι 4 ανεξάρτητες «διασταυρώσεις» μπορούσαν να ελεγχθούν σε κάθε τρυβλίο χωρίς αλλοίωση των αποτελεσμάτων. Οι περισσότερες αποικίες είχαν τα τυπικά μορφολογικά γνωρίσματα των ετεροκαρύων, συμπεριλαμβανομένων της αργής αύξησης, του ακανόνιστου σχήματος αποικίας, της ασύμμετρης κατανομής χρωστικής, και της συχνής εμφάνισης ταχύτερα αυξανόμενων τομέων.

Η σύγκριση της νέας μεθόδου με το παραδοσιακό σύστημα για την κατάταξη των στελεχών *V. dahliae* σε VCGs (βάσει της συμπληρωματικότητας των μεταλλαγών *nit*) κατέδειξε πως με τη νέα μέθοδο αποκαλύφθηκαν υψηλότερα επίπεδα συμβατότητας μεταξύ των στελεχών *V. dahliae*. Επιπρόσθετα, με τη μέθοδο αυτή καταγράφηκαν αρκετές θετικές διαειδικές αντιδράσεις του *V. dahliae* με το *V. albo-atrum* και το *V. longisporum* (Πίνακας 3.19). Σημαντική ποικιλομορφία παρατηρήθηκε στα πρότυπα συμβατότητας διαφορετικών στελεχών φυσικού τύπου με τη σειρά των 8 στελεχών ελέγχου. Όλα τα στελέχη που είχαν

χαρακτηρισθεί ως HSI με την παραδοσιακή μέθοδο, αποδείχθηκαν συμβατά με περισσότερα του ενός στελέχη ελέγχου με τη νέα (Πίνακας 3.19). Όταν χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα συμπληρωματικότητας για ανάλυση ομαδοποιήσεων (το δενδρόγραμμα παρατίθεται στην Εικόνα 3.25), προέκυψαν δύο κύριες ομάδες, κάθε μία εκ των οποίων υποδιαιρέθηκε σε τουλάχιστον δύο υποομάδες. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η ένταξη του στελέχους *V. longisporum* K2 στην πρώτη ομάδα δεν είναι ενδεικτική για τη συμπεριφορά συμβατότητας του στελέχους, καθώς είναι εγγενώς ανθεκτικό στο benomyl. Ωστόσο, συμπεριελήφθη στην ανάλυση ως στέλεχος ελέγχου. Όλα τα υπόλοιπα στελέχη των *V. albo-atrum* και *V. longisporum* εντάχθηκαν στην άλλη κύρια ομάδα, αν και όχι διακριτά από τα στελέχη του *V. dahliae*. Είναι αξιοσημείωτο πως δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του συστήματος κατάταξης σε VCGs (με μεταλλαγές *nit*) και της νέας ομαδοποίησης (Εικόνα 3.25).

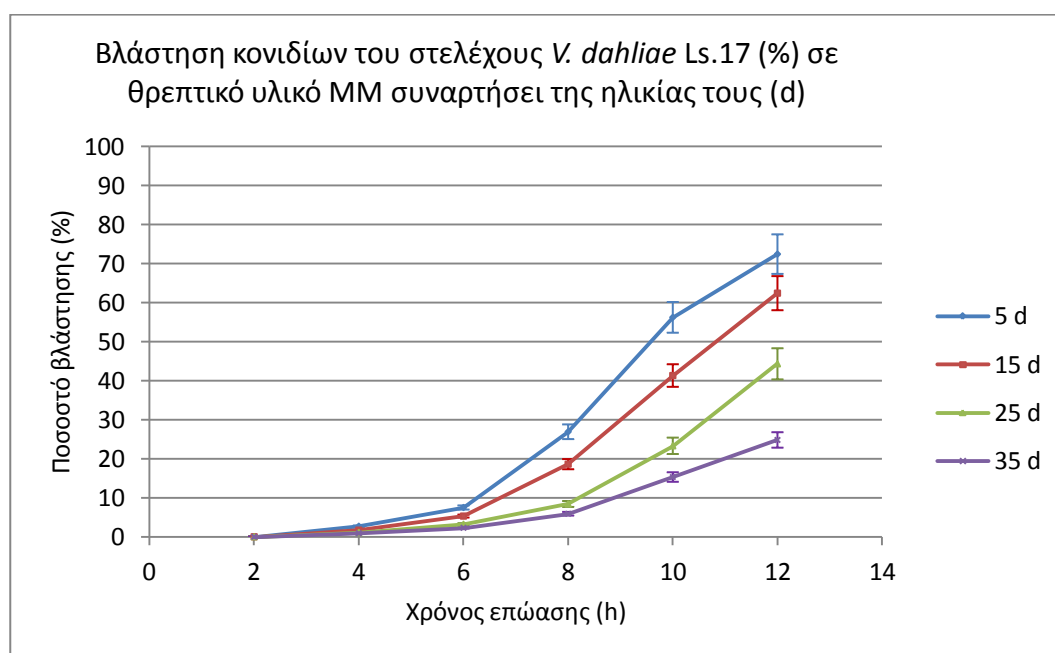


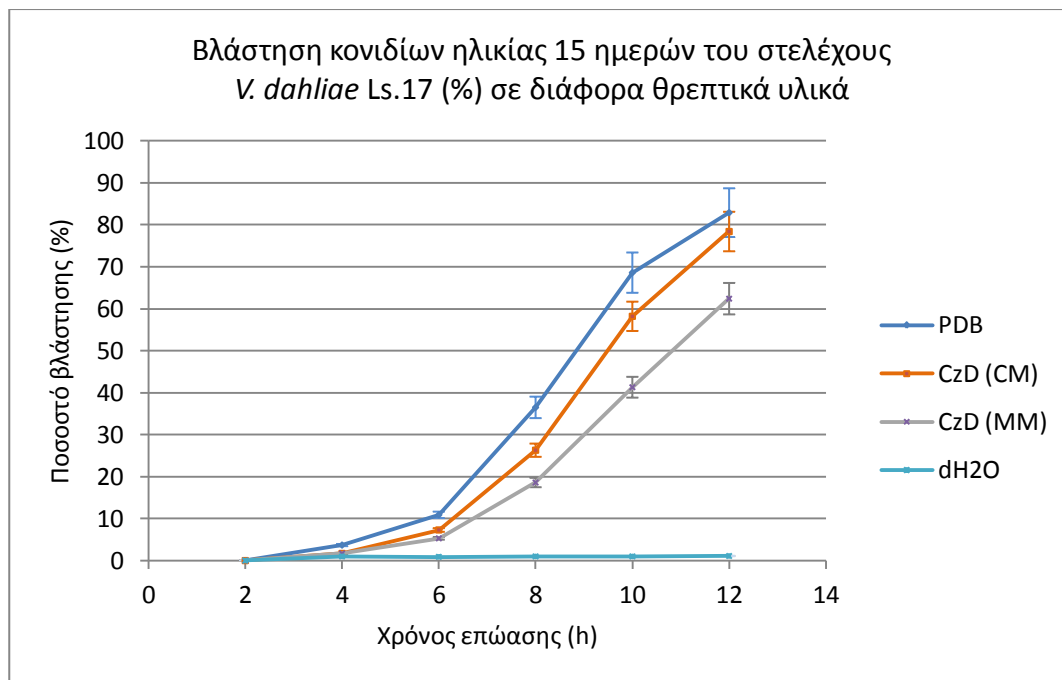
Εικόνα 3.25. Δενδρόγραμμα από ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης (μέθοδος της ελάχιστης διακύμανσης του Ward) 30 στελεχών *Verticillium* φυσικού τύπου, με κριτήριο τα πρότυπα συμπληρωματικότητας αυτών με 8 διπλά μεταλλαγμένα στελέχη ελέγχου που αντιστοιχούν στις VCGs του *V. dahliae*. Η ταξινόμηση των στελεχών σε VCGs σύμφωνα με την παραδοσιακή μεθοδολογία (δοκιμασίας συμπληρωματικότητας μεταλλαγών *nit*) παρατίθεται στην αριστερή πλευρά της εικόνας. *Vaa*: *V. albo-atrum*, *Vlon*: *V. longisporum*, HSI: αυτο-ασύμβατα στελέχη.

3.3 Κυτταροβιολογική μελέτη της ετεροκαρύωσης στον μύκητα *V. dahliae*

3.3.1 Σύντηξη κονιδίων του *V. dahliae* μέσω δημιουργίας CATs

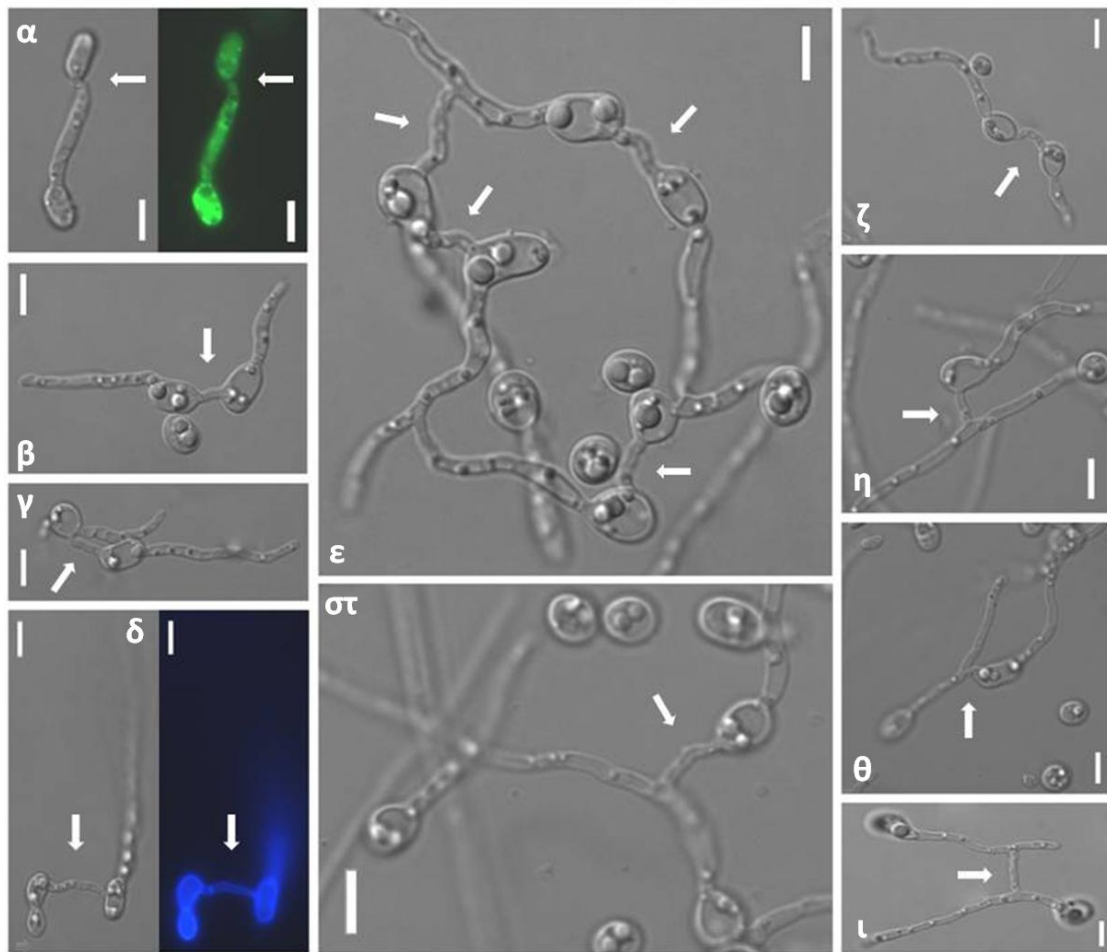
Κατά τη διάρκεια μιας προκαταρκτικής διερεύνησης των βέλτιστων συνθηκών για τη σύντηξη κονιδίων του *V. dahliae* μέσω CATs (σωλήνες αναστόμωσης κονιδίων, *conidial anastomosis tubes*) παρατηρήθηκε ότι η σύντηξη δεν συμβαίνει παρά μόνον μετά την έναρξη της διαδικασίας βλάστησης των κονιδίων. Για τον λόγο αυτόν κρίθηκε απαραίτητη αρχικά η καταγραφή της πορείας βλάστησης αντιπροσωπευτικών στελεχών *V. dahliae* σε διάφορες συνθήκες. Μεταξύ διαφόρων παραμέτρων που ελέγχθηκαν, οι δύο παράγοντες που επιδρούσαν πλέον καθοριστικά στον ρυθμό βλάστησης ήταν η ηλικία των αποικιών από τις οποίες λαμβάνονταν τα κονίδια (νεαρότερα κονίδια βλάσταναν σημαντικά ταχύτερα) και το θρεπτικό υλικό επώασης (μεγαλύτερη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών επιτάχυνε τη διαδικασία βλάστησης) (Εικόνα 3.26). Ειδικά στην περίπτωση του απεσταγμένου νερού το ποσοστό βλάστησης δεν ξεπερνούσε ποτέ την τιμή 2,0% (τα κονίδια παρακολουθούνταν μικροσκοπικά για 72 h μετά τον εμβολιασμό), ενώ η έντονη πλήρωση του κυτταροπλάσματος των κονιδίων υπό βλάστηση με κυστίδια και η χαρακτηριστική περίσφιξη που παρατηρήθηκε συχνά στο άκρο των αυξανόμενων υφών ήταν ενδείξεις ότι όσα κονίδια βλάσταναν υποβάλλονταν σε κυτταρικό θάνατο λόγω της παρατεταμένης απουσίας θρεπτικών στοιχείων και πιθανά ωσμωτικών φαινομένων. Αντιθέτως, κονίδια που επωάζονταν σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό ή νερό βρύσης με προσθήκη γλυκόζης σε συγκέντρωση 0,5% παρουσίαζαν αργή αλλά ικανοποιητική βλάστηση και βιωσιμότητα.





Εικόνα 3.26. Γραφικές παραστάσεις της επίδρασης της ηλικίας των κονιδίων και του θρεπτικού υλικού επώασης στην πορεία βλάστησης των κονιδίων του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 στους 24°C (σκοτάδι).

Στα θρεπτικά υλικά PDB, CM και MM η σύντηξη των κονιδίων ήταν σπάνια και συνέβαινε με άμεση επαφή κονιδίου με το αυξανόμενο άκρο νεαρής υφής, χωρίς τον σχηματισμό και τη μεσολάβηση ορατού CAT (Εικόνα 3.27α). Αντιθέτως, σε νερό παρουσία γλυκόζης ο σχηματισμός CATs σε κονίδια υπό βλάστηση ήταν ιδιαίτερα συχνός και επέτρεπε τη σύντηξη μεταξύ κονιδίων, μεταξύ κονιδίων και νεαρών υφών και μεταξύ νεαρών υφών. Μάλιστα, σε αυτές τις συνθήκες παρατηρήθηκε συχνά πολλαπλή σύντηξη περισσότερων των δύο βλαστανόντων κονιδίων, που οδηγούσε σε υπερδομές-δίκτυα αλληλοσυνδεδεμένων κονιδίων και νεαρών υφών (Εικόνα 3.27). Οι CATs ήταν γενικά λεπτότεροι κατά 1-2 μm από τους GTs (βλαστικοί σωλήνες, *germ tubes*) και βραχύτεροι με πεπερασμένη δυνατότητα αύξησης (τυπικά είχαν μήκος μικρότερο από 10 μm), ενώ οι GTs γενικά εμφανίζουν επ' αόριστον δυνατότητα επέκτασης, δίνοντας γένεση στις βλασθητικές υφές. Επιπλέον, αντιθέτως με τους GTs, οι CATs δεν διακλαδίζονταν και δεν ήταν ευαίσθητοι στον χημικό παράγοντα αποδιοργάνωσης των μικροσωληνίσκων *benomyl* (μέχρι τη συγκέντρωση 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Σε ορισμένες περιπτώσεις καταγράφηκε με σαφήνεια η παρουσία σέπτου σε CATs, με κατάλληλη φθορίζουσα χρώση του κυτταρικού τοιχώματος (*calcofluor*) (Εικόνα 3.27δ).

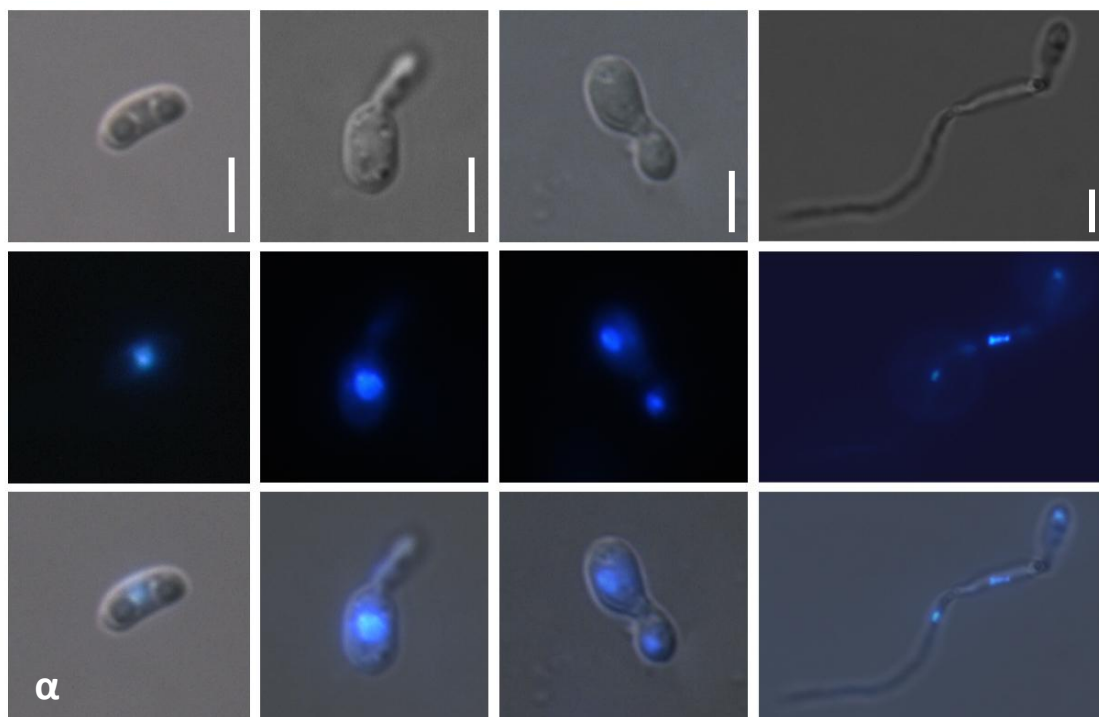


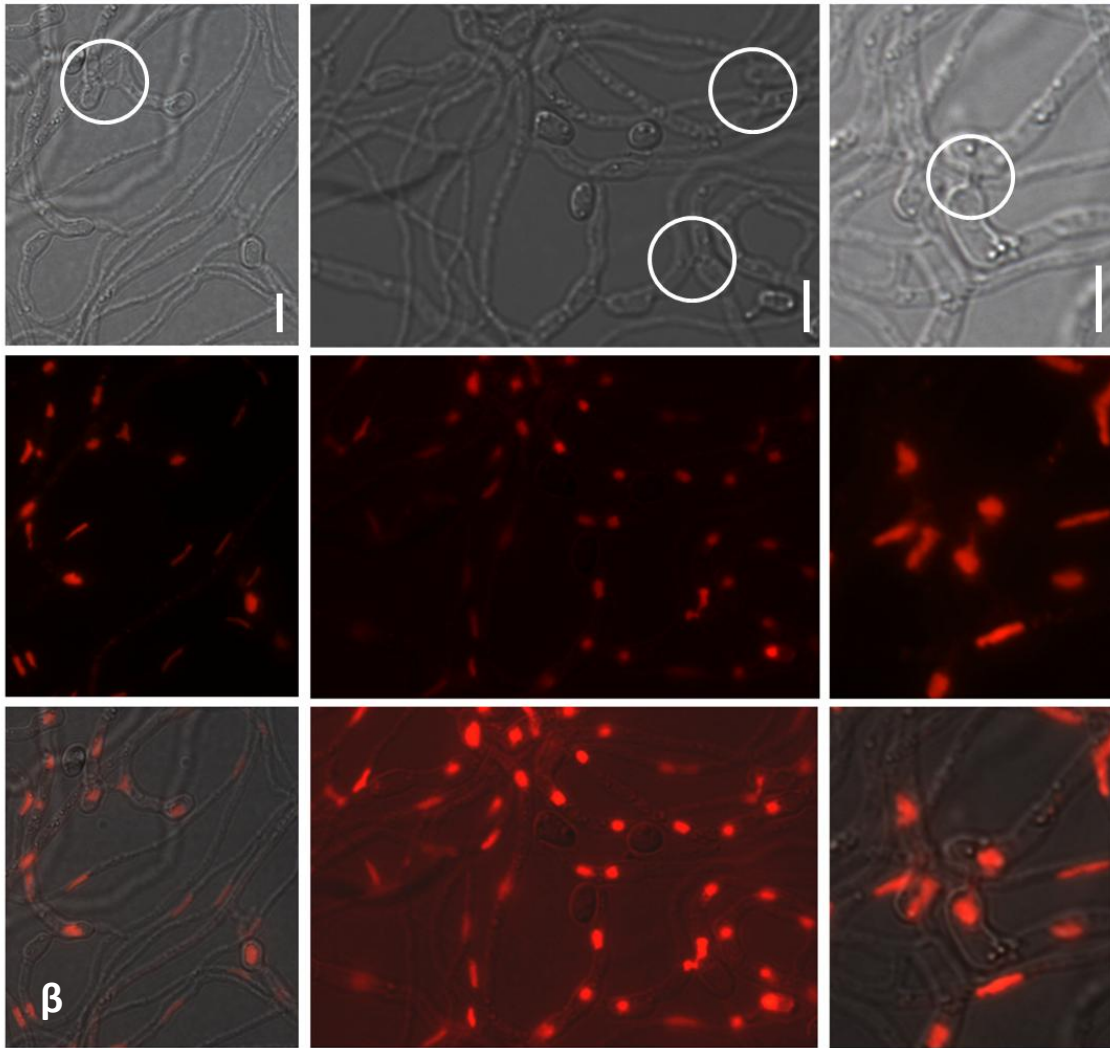
Εικόνα 3.27. Φωτογραφίες από τη μικροσκοπική παρατήρηση σύντηξης βλαστημένων κονιδίων μέσω CATs, του στελέχους *V. dahliae* Ls.17, κατόπιν επώασης για 72 h σε νερό παρουσία γλυκόζης 0,5%, εκτός από την περίπτωση (α), κατά την οποία τα κονίδια επώασθησαν για 12 h σε υλικό MM. Οι δεξιές εικόνες στις περιπτώσεις (α) και (δ) προέκυψαν με μικροσκοπία φθορισμού, κατόπιν χρώσης των κονιδίων στα αριστερά με τις χρωστικές διοξική φλουρεσεΐνη, που χρωματίζει το κυτταρόπλασμα των ζωντανών κυττάρων (α), και calcofluor για την εκλεκτική χρώση του κυτταρικού τοιχώματος (δ). Οι αναστομώσεις μέσω CATs επισημαίνονται με λευκά βέλη. Η λευκή μπάρα σε κάθε φωτογραφία αποτελεί την κλίμακα μεγέθυνσης (αντιστοιχεί σε κάθε περίπτωση σε 5 μm). Όλες οι φωτογραφίες φωτεινού πεδίου έχουν ληφθεί με μικροσκοπία DIC (Nomarski).

Εκτός από το υλικό επώασης, στη συχνότητα σύντηξης επιδρούσαν και άλλοι παράγοντες. Η ηλικία των κονιδίων είχε αντίστροφη επίδραση από ό, τι στον ρυθμό βλάστησης, με τα γηραιότερα κονίδια να συντήκονται συχνότερα. Επιπρόσθετα, σημαντική επίδραση στη σύντηξη ασκούσε η συγκέντρωση των κονιδίων, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να επιτρέπουν συχνότερη σύντηξη (ωστόσο χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις μέχρι $5 \cdot 10^6$ κονίδια/mL, καθώς σε μεγαλύτερες πυκνότητες ήταν δύσκολη η ευκρινής παρατήρηση μεμονωμένων κονιδίων στο μικροσκόπιο). Αυτή η σχέση υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή στη διαδικασία σύντηξης κάποιου εκκρινόμενου χημειοτακτικού μορίου από τα κονίδια που εισέρχονται στην κατάλληλη φάση κατά τη βλάστησή τους. Ο χρόνος επώασης ήταν επίσης σημαντικός, με μεγαλύτερους χρόνους (μέχρι την ανάπτυξη μυκηλίου) να ευνοούν τη συχνότητα σύντηξης. Τέλος, συστηματικές διαφορές στη συχνότητα του φαινομένου (μέχρι

20,0% σχετικής διαφοράς) καταγράφηκαν μεταξύ διαφορετικών στελεχών του *V. dahliae*, με το στέλεχος φυσικού τύπου 123V να υπερτερεί έναντι των στελεχών T9, Ls.17 και Vd76. Με επώαση για 72 h σε νερό (παρουσία γλυκόζης 0,5%) κονιδίων ηλικίας 21 ημερών του στελέχους 123V καταγράφηκαν οι μεγαλύτερες συχνότητες σύντηξης, που προσέγγιζαν το ποσοστό 35,0% επί όσων κονιδίων βρίσκονταν σε φάση βλάστησης.

Με επιλεκτική χρώση του DNA με τις φθορίζουσες χρωστικές Hoechst σε ζωντανά κύτταρα και με ιωδιούχο προπίδιο σε στερεωμένα (fixed) κατόπιν επίδρασης με γλουταρική αλδεΐδη κατέστη εφικτή η μελέτη της πυρηνικής οργάνωσης σε πληθυσμούς κονιδίων και κονιδίων σε φάση βλάστησης. Στη συντριπτική πλειοψηφία των κονιδίων εντοπίστηκε ένας μοναδικός πυρήνας, ο οποίος υποβαλλόταν σε διαίρεση μόνον κατόπιν της έναρξης επιμήκυνσης του GT. Στις περιπτώσεις μεμονωμένων βλαστημένων κονιδίων ο ένας θυγατρικός πυρήνας μετανάστευε εντός της αναπτυσσόμενης υφής και ο άλλος γενικά παρέμενε εντός του κονιδίου, συχνά στην αντιδιαμετρική κυτταροπλασματική περιοχή του σημείου βλάστησης, υποδηλώνοντας την ύπαρξη πολικότητας στη διαδικασία κατανομής των πυρήνων (Εικόνα **3.28α**). Σε περιπτώσεις συνδεδεμένων δικτύων βλαστημένων κονιδίων μέσω CATs – νεαρό μυκήλιο, ωστόσο, καταγράφηκε περισσότερο πολύπλοκη πυρηνική κατανομή. Αυτή περιελάμβανε σε πολλές περιπτώσεις αρχικά βλαστημένα κονίδια χωρίς πυρήνα, υποδηλώνοντας συχνά πιθανή μετακίνηση πυρήνων μέσω των CATs. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μάλιστα, κατέστη εφικτή η μικροσκοπική καταγραφή πυρήνων που εισέρχονται στη διαδικασία μετανάστευσης μέσω γειτονικών CATs (Εικόνα **3.28β**). Τα δεδομένα αυτά στοιχειοθετούν μικροσκοπικά την υπόθεση για τους μύκητες του γένους *Verticillium* περί δημιουργίας ετεροκαρύων μέσω των CATs στο επίπεδο των βλαστημένων κονιδίων, και συνάδουν με τα αντίστοιχα γενετικά αποτελέσματα (παράγραφος **3.2.8**).





Εικόνα 3.28. Φωτογραφίες από τη μικροσκοπική παρατήρηση κονιδίων του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 σε διάφορα στάδια βλάστησης, (**α**) για μεμονωμένα κονίδια, και (**β**) για δίκτυα αλληλοσυνδεδεμένων κονιδίων-υφών σε νεαρό μυκήλιο, παράλληλα με την πυρηνική οργάνωση. Σε κάθε περίπτωση, οι φωτογραφίες της επάνω σειράς έχει ληφθεί με μικροσκοπία DIC (Nomarski), της μεσαίας σειράς με μικροσκοπία φθορισμού, ενώ στην κάτω σειρά παρατίθεται το αποτέλεσμα της επικάλυψης των φωτογραφιών. Η φθορίζουσα χρώση των πυρήνων πραγματοποιήθηκε στην περίπτωση (**α**) με τη χρωστική Hoechst για ζωντανά κύτταρα, ενώ στην περίπτωση (**β**) χρησιμοποιήθηκε η χρωστική ιωδιούχο προπίδιο κατόπιν επίδρασης στα παρασκευάσματα με γλουταρική αλδεύδη. Στην περίπτωση (**α**) παρατίθενται φωτογραφίες μονοπύρηνων κονιδίων σε διάφορα στάδια βλάστησης· η διαίρεση του πυρήνα γίνεται μετά από την έναρξη επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα (GT), και στη συνέχεια ο ένας αντισταμετρική περιοχή από το σημείο βλάστησης. Η πυρηνική οργάνωση σε δίκτυα κονιδίων-νεαρό μυκήλιο είναι πολυπλοκότερη (**β**). Σε λευκούς κύκλους επισημαίνονται γεγονότα αναστόμωσης, για τα οποία ήταν ορατός με τη μικροσκοπία φθορισμού πυρήνας σε διαδικασία διέλευσης μέσω της γέφυρας σύντηξης (CAT). Η λευκή μπάρα σε κάθε σετ φωτογραφιών αποτελεί την κλίμακα μεγέθυνσης (αντιστοιχεί σε κάθε περίπτωση σε 5 μm).

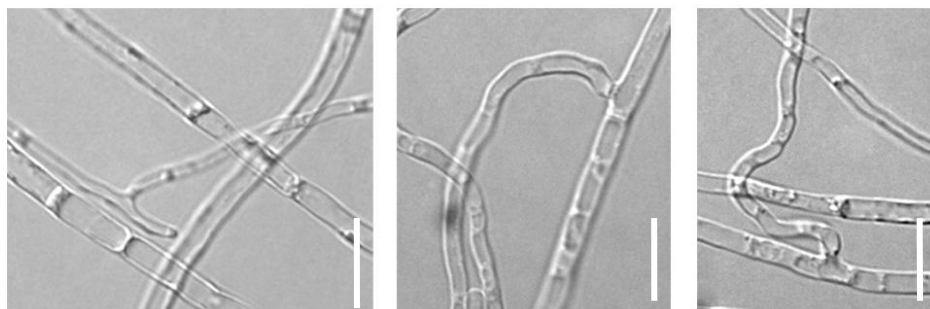
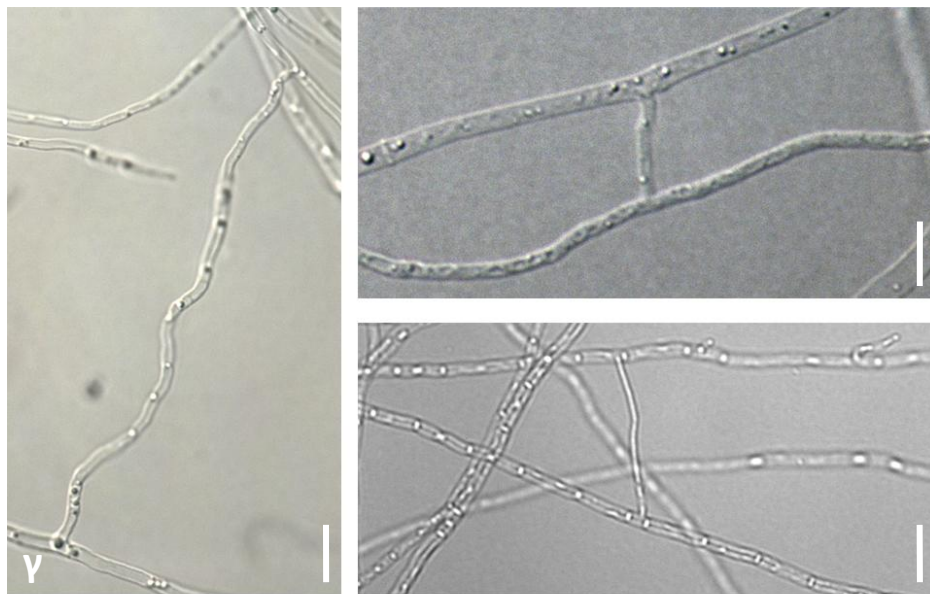
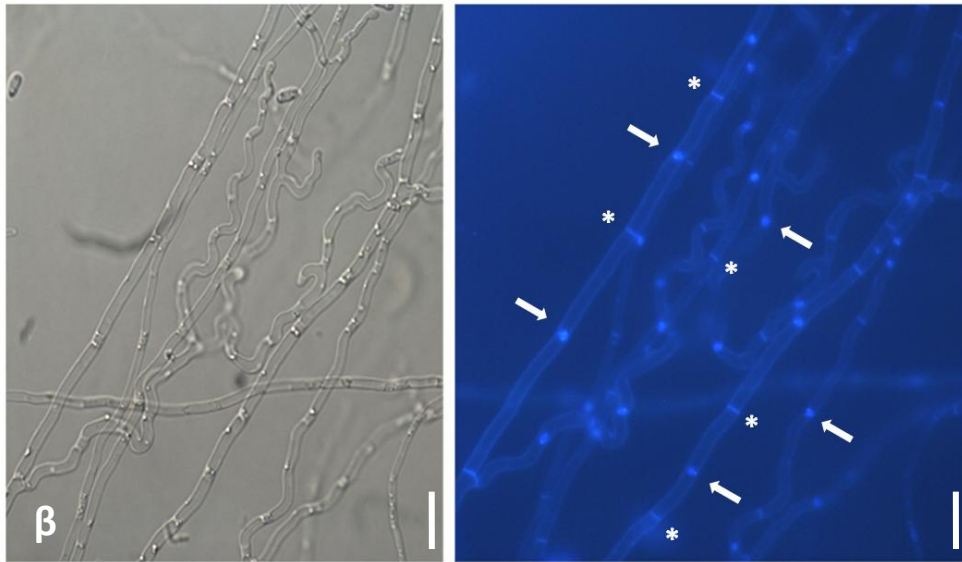
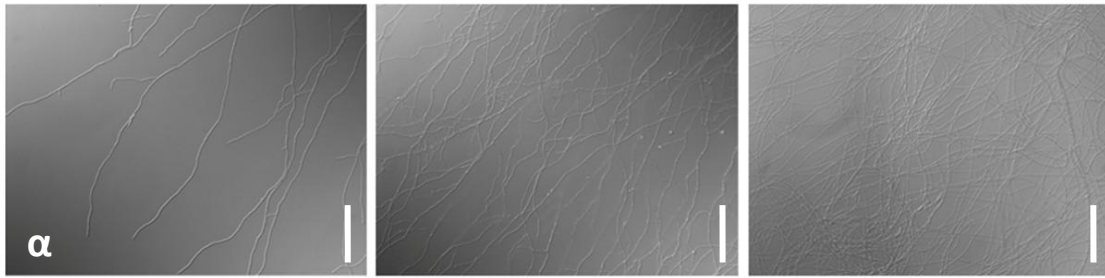
3.3.2 Σύντηξη μεταξύ υφών του *V. dahliae* και φαινότυπος ασυμβατότητας

Η μικροσκοπική μελέτη της οργάνωσης των αποικιών αντιπροσωπευτικών στελεχών του μύκητα *V. dahliae* επέτρεψε τη διάκριση τριών ομόκεντρων ζωνών σε κάθε αποικία (Εικόνα 3.29α). Η εξωτερική αποτελείται από τα αυξανόμενα άκρα των υφών, τα οποία συνήθως επιδεικνύουν αρνητικό τροπισμό (αμοιβαία αποφυγή) και δεν διακλαδίζονται. Στην ενδιάμεση περιοχή οι υφές διακλαδίζονται αλλά δεν συντήκονται. Τέλος, η εσωτερική (και γηραιότερη) περιοχή καταλαμβάνεται από δίκτυο αλληλοσυνδεδεμένων διαμερισμάτων υφών, με πολυάριθμες διακλαδώσεις και αναστομώσεις. Με επιλεκτική χρώση πυρήνων με τη φθορίζουσα χρωστική Hoechst βρέθηκε ότι οι υφές φέρουν τυπικά έναν πυρήνα ανά κυτταρικό διαμέρισμα, αν και η συχνότητα των σέπτων ήταν γενικά ακανόνιστη κατά μήκος των υφών (Εικόνα 3.29β). Τα αυξανόμενα άκρα των υφών στην εξωτερική ζώνη τυπικά δεν έφεραν κανέναν πυρήνα στην ακραία τους περιοχή, ενώ 2-3 πυρήνες ήταν συνήθως ορατοί στο εσωτερικό των επιμηκών ακραίων κυττάρων.

Η αναστόμωση μεταξύ υφών της ίδιας αποικίας ήταν ορατή μόνον στην εσωτερική περιοχή (Εικόνα 3.29γ), με διαφορετική συχνότητα ανάλογα με την ηλικία της μυκηλιακής περιοχής (περισσότερες συντήξεις στα γηραιότερα – αν και περισσότερο δυσδιάκριτα λόγω πυκνότητας υφών – τμήματα), το θρεπτικό υλικό (περισσότερες συντήξεις σε νερό παρουσία γλυκόζης 0,5% και MM, σε σχέση με τα πλήρη υλικά PDA και CM) και το στέλεχος (περισσότερες συντήξεις για τα στελέχη *V. dahliae* PH και 123V, σε σχέση με τα T9, Ls.17 και Vd76). Οι ίδιοι παράγοντες προσδιορίστηκαν ως σημαντικοί για τον καθορισμό της συχνότητας της σύντηξης και στο επίπεδο των βλαστημένων κονιδίων μέσω CATs (παράγραφος 3.3.1), υποδηλώνοντας έτσι κοινή γενετική ρύθμιση της διαδικασίας στα δύο επίπεδα.

Η μικροσκοπική μελέτη της ζώνης επαφής διαφορετικών αποικιών του ίδιου και διαφορετικών στελεχών του μύκητα *V. dahliae* κατέδειξε – κατόπιν παρατήρησης μεγάλου αριθμού συνδυασμών μεταξύ όλων των VCGs και των υποομάδων τους – πως στη μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων λαμβάνει χώρα μυκηλιακή επαφή και συγχώνευση των περιφερειακών ζωνών των αποικιών. Μόνον σε δύο περιπτώσεις «διασταύρωσης» αποικιών των ασύμβατων ζευγών στελεχών *V. dahliae* V702I-Ca.148 και PCW-Ca.146 παρατηρήθηκε αμοιβαία απόθεση των άκρων των υφών και διατήρηση διαυγούς ζώνης χωρίς υφές μεταξύ των αποικιών. Η απόθεση των υφών στην τελευταία περίπτωση θα μπορούσε να αποδοθεί στην έκκριση από τα άκρα τους άγνωστων σηματοδοτικών μορίων, τα οποία συμμετέχουν σε επαναπροσδιορισμό της κατεύθυνσης αύξησης των υφών.

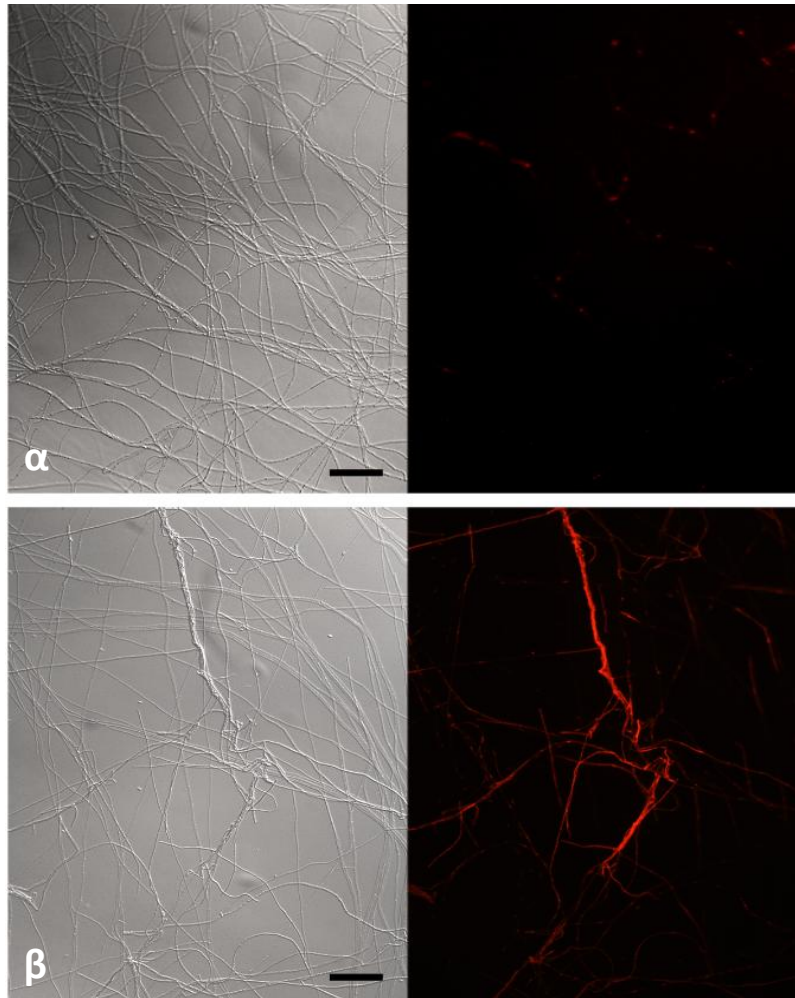
Στη γενική περίπτωση της συγχώνευσης των διαφορετικών αποικιών παρατηρήθηκε πως κλάδοι υφών, πέραν των ακραίων περιοχών που ουδέποτε συμμετείχαν σε γεγονότα σύντηξης, υποβάλλονταν σε γεγονότα αναστόμωσης τόσο μεταξύ υφών προερχόμενων από την ίδια αποικία, όσο και μεταξύ υφών των διαφορετικών αποικιών. Οι συντήξεις πραγματοποιούνταν (α) μεταξύ άκρων κλάδων που άλλαζαν διεύθυνση αύξησης όταν προσεγγίζαν την υφή-«στόχο» και συντήκονταν πλευρικά με την τελευταία, ή (β) με τη μεσολάβηση κυτταροπλασματικών γεφυρών αναστόμωσης, δηλαδή βραχέων μη διακλαδιζόμενων υφών που προέκυπταν ως διακλαδώσεις μίας υφής και συντήκονταν με άλλη, αυξανόμενη σε παράλληλη διεύθυνση ως προς την πρώτη (παραδείγματα στην Εικόνα 3.29γ). Συχνά παρατηρήθηκαν στο σημείο σύντηξης ευδιάκριτα κυτταροπλασματικά σώματα (στο άκρο της υφής σύντηξης), τα οποία πιθανά αντιστοιχούν στο σωματίο Spitzenkörper.



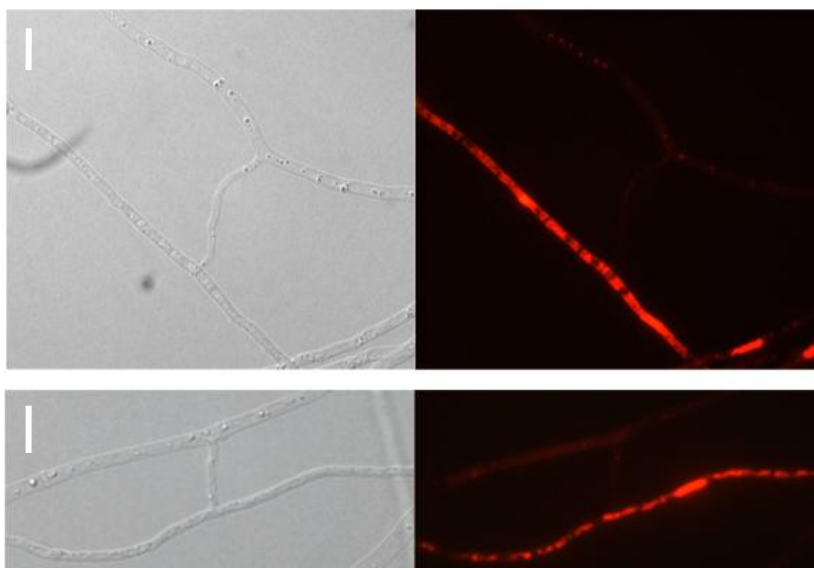
Εικόνα 3.29 (προηγούμενη σελίδα). (α) Φωτογραφίες από τη μικροσκοπική παρατήρηση της οργάνωσης των υφών στην αποικία του στελέχους *V. dahliae* Ls.17. Στις τρεις φωτογραφίες απεικονίζονται η περιοχή των ακραίων υφών (αριστερά), η υπο-ακραία περιοχή (κέντρο) και η εσωτερική περιοχή (δεξιά). Η λευκή μπάρα αντιστοιχεί στην κλίμακα μεγέθυνσης (50 μm). (β) Λεπτομέρεια εσωτερικής περιοχής της αποικίας με μικροσκοπία DIC (αριστερά) και μικροσκοπία φθορισμού της ίδιας περιοχής (δεξιά) κατόπιν διπλής χρώσης με τις χρωστικές Hoechst για ζωντανά κύτταρα (χρωματίζει εκλεκτικά τους πυρήνες) και calcofluor (για το κυτταρικό τοίχωμα). Ένας πυρήνας εντοπίζεται ανά κυτταρικό διαμέρισμα, μεταξύ διαδοχικών σέπτων. Η λευκή μπάρα αντιστοιχεί στην κλίμακα μεγέθυνσης (10 μm). (γ) Παραδείγματα κυτταροπλασματικών γεφυρών αναστόμωσης του εσωτερικού της αποικίας και λεπτομέρειες γεγονότων σύντηξης. Η λευκή μπάρα αντιστοιχεί στην κλίμακα μεγέθυνσης (10 μm).

Συντήξεις μεταξύ υφών από διαφορετικές αποικίες καταγράφηκαν σε πολυάριθμες «διασταυρώσεις» τόσο μεταξύ συμβατών, όσο και μεταξύ ασύμβατων συνδυασμών στελεχών. Στις περισσότερες περιπτώσεις ασύμβατων συνδυασμών, ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι στις περιοχές των συντήξεων λάμβαναν χώρα χαρακτηριστικές αλλαγές στη μορφολογία των αντίστοιχων υφών· σχηματίζονταν δεσμίδες υφών με παχιά κυτταρικά τοιχώματα και ογκώδη κυστίδια στο κυτταρόπλασμα τους (Εικόνα 3.30). Αυτή η μορφολογική αλλαγή πιθανότατα οδηγεί στον μακροσκοπικά ορατό φαινότυπο των ζωνών αντεπίδρασης (barage zones) σε ασύμβατους συνδυασμούς στελεχών (παράγραφος 3.2.1). Προκειμένου να μελετηθεί η βιωσιμότητα των υφών που υποβάλλονται σε τέτοιες ασύμβατες συντήξεις, χρησιμοποιήθηκαν οι χρωστικές κυανούν του μεθυλενίου και κυανούν του Evan (χρωματίζουν επιλεκτικά το κυτταρόπλασμα νεκρών κυττάρων), καθώς επίσης και ο συνδυασμός των φθορίζουσών χρωστικών διοξική φλουορεσεΐνη (για ζωντανά κύτταρα) και ιωδιούχο προπίδιο (για νεκρά κύτταρα). Ενώ σε όλες τις περιπτώσεις συμβατών «διασταυρώσεων» τα νεκρά κύτταρα ήταν λίγα σε αριθμό (σε κάθε περίπτωση λιγότερα από το 10% των κυττάρων ανά οπτικό πεδίο) και σποραδικά (σε καμία περίπτωση δεν ταυτίζονταν με κύτταρα που συμμετείχαν σε σύντηξη), στις ζώνες επαφής των ασύμβατων «διασταυρώσεων» τα αποτελέσματα ήταν πολύ διαφορετικά. Πληθώρα νεκρών κυττάρων ή κυττάρων σε διαδικασία κυτταρικού θανάτου καταγράφονταν κατά μήκος της ζώνης επαφής, συμπεριλαμβάνοντας όλες τις περιπτώσεις των «ανώμαλων» δεσμίδων υφών με τα παχιά κυτταρικά τοιχώματα (Εικόνα 3.30).

Επιπρόσθετα, κατέστη δυνατή η μικροσκοπική καταγραφή περιπτώσεων μεμονωμένων συντήξεων, στις οποίες η μία εκ των δύο συμμετεχουσών υφών υποβάλλεται σε κυτταρικό θάνατο, ενώ η άλλη παραμένει ανεπηρέαστη (Εικόνα 3.31). Αυτές οι παρατηρήσεις, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα δεδομένα αλλά και την εμπειρία από τους μύκητες-μοντέλα, αποδεικνύουν για τον μύκητα *V. dahliae* πως στην περίπτωση ασύμβατων συνδυασμών στελεχών οι υφές τους κατά κανόνα εξακολουθούν να επιδεικνύουν συμπεριφορά αμοιβαίας «ανοχής» και μάλιστα συντήκονται μεταξύ τους, αλλά τα ετεροκαρυωτικά κύτταρα-δέκτες πυρήνα, που έχουν δημιουργηθεί με τη μετανάστευση αυτού μέσω κυτταροπλασματικής γέφυρας, αποκλείονται από το υπόλοιπο μυκήλιο και υποβάλλονται σε πορεία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 3.30. Φωτογραφίες από τη μικροσκοπική παρατήρηση υφών στη ζώνη επαφής (**α**) συμβατών (115 και Cf.38) και (**β**) ασύμβατων (Ls.17 και V16) στελεχών του *V. dahliae*. Στα αριστερά παρατίθενται εικόνες από μικροσκοπία DIC, ενώ στα δεξιά φωτογραφίες από μικροσκοπία φθορισμού των ίδιων περιοχών κατόπιν χρώσης με ιωδιούχο προπίδιο, το οποίο χρωματίζει εκλεκτικά κύτταρα σε διαδικασία κυτταρικού θανάτου. Τα κύτταρα υπό νέκρωση στην περίπτωση του συμβατού συνδυασμού (**α**) είναι ολιγάριθμα και σποραδικά, ενώ αντιθέτως στη ζώνη επαφής του ασύμβατου ζεύγους υπάρχει πληθώρα κυττάρων που έχουν υποβληθεί σε πορεία κυτταρικού θανάτου· αυτές οι υφές συχνά σχηματίζουν δεσμίδες με παχιά κυτταρικά τοιχώματα (**β**). Οι μαύρες μπάρες αντιστοιχούν στην κλίμακα μεγέθυνσης (50 μm).



Εικόνα 3.31. Φωτογραφίες από τη μικροσκοπική παρατήρηση υφών ασύμβατων στελεχών *V. dahliae* (Ls.17 και V16) που έχουν συντηχθεί στη ζώνη επαφής των ασύμβατων αποικιών. Στα αριστερά παρατίθενται φωτογραφίες των αναστομών από μικροσκοπία DIC, ενώ στα δεξιά φωτογραφίες των ίδιων περιοχών από μικροσκοπία φθορισμού, κατόπιν χρώσης των παρασκευασμάτων με τη φθορίζουσα χρωστική ιωδιούχο προπίδιο, το οποίο χρωματίζει εκλεκτικά τα κύτταρα που βρίσκονται σε διαδικασία θανάτου. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται πως μόνον στο ένα κύτταρο έχει πυροδοτηθεί η αντίδραση κυτταρικού θανάτου, ενώ το άλλο αναστομωμένο κύτταρο παραμένει ανεπηρέαστο. Οι λευκές μπάρες αντιστοιχούν στην κλίμακα μεγέθυνσης (10 μm).

3.3.3 Λειτουργική μελέτη του ρόλου της MAP κινάσης Vmk1 στη σύντηξη κονιδίων και υφών του *V. dahliae*

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα συμμετοχής της MAP κινάσης Vmk1 (ομόλογη των Fus3/Kss1 του *Saccharomyces cerevisiae*) στη διαδικασία αναστόμωσης στον μύκητα *V. dahliae*, χρησιμοποιήθηκε και μελετήθηκε λειτουργικά μεταλλαγμένο στέλεχος με γονιδιακή διακοπή (gene disruption mutant) του γονιδίου *vmk1* (123V-C11), σε σύγκριση με το αντίστοιχο στέλεχος φυσικού τύπου (123V), που έχει κατασκευασθεί κατά το παρελθόν από τη Δρ. Ε. Πάντου (Πάντου, 2005). Σε προηγούμενη μελέτη έχει προσδιορισθεί ότι το συγκεκριμένο μεταλλαγμένο στέλεχος χαρακτηρίζεται από σημαντικά περιορισμένη μολυσματικότητα, καθώς επίσης και ελαττωμένη δυνατότητα σχηματισμού μικροσκληρωτίων (Ε. Πάντου, Α. Τζίμα, Ε. Παπλωματάς και Μ. Α. Τύπας, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι, σε αντίθεση με το στέλεχος φυσικού τύπου που είναι ιδιαίτερα παραγωγικό όσον αφορά τη σύντηξη τόσο μεταξύ κονιδίων σε φάση βλάστησης, όσο και μεταξύ υφών εντός ώριμων αποικιών (παράγραφοι 3.3.1 και 3.3.2), τα κονίδια του μεταλλαγμένου στελέχους με απενεργοποιημένο το γονίδιο *vmk1* αδυνατούν να συντηχθούν μέσω CATs. Στην περίπτωση του μεταλλαγμένου στελέχους δεν παρατηρήθηκαν ευκρινή CATs σε καμία περίπτωση, υποδηλώνοντας ότι το στάδιο της διαδικασίας σύντηξης στο οποίο απαιτείται η MAP κινάση Vmk1 είναι το αρχικό στάδιο της επαγωγής (induction). Όμοια με την περίπτωση των κονιδίων σε φάση βλάστησης, αναστομώσεις δεν παρατηρήθηκαν ούτε μεταξύ υφών εντός ώριμων αποικιών του μεταλλαγμένου στελέχους 123V-C11.

3.4 Μοριακή-λειτουργική μελέτη πιθανών γονιδίων ετεροκαρύωσης στον μύκητα *V. dahliae*

3.4.1 Εντοπισμός πιθανών γονιδίων *het* με PCR ετερόλογων εκκινητών στο γένος *Verticillium*

Στην αρχική φάση εκπόνησης της παρούσας εργασίας, προτού γίνουν δημόσια διαθέσιμες οι οριστικές γονιδιωματικές αλληλουχίες των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum*, επιλέχθηκε ένα αντιπροσωπευτικό σύνολο 44 στελεχών *Verticillium* (30 στελέχη *V. dahliae* όλων των VCGs, 4 *V. longisporum*, 4 *V. albo-atrum*, 4 *V. tricorpus*, 1 *V. nubilum* και 1 *G. nigrescens*) για αναζήτηση με αναλύσεις PCR τμημάτων πιθανών γονιδίων *het*. Χρησιμοποιήθηκαν τα 4 ζεύγη ετερόλογων/εκφυλισμένων εκκινητών un24F-R, hetcF-R, hetpcF-R και het6BF-R, σχεδιασμένων βάσει συντηρημένων περιοχών των γονιδίων *un-24*, *Nchet-c*, *Pahet-c* και *het-6* από κατατεθειμένες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων, αντίστοιχα, και του ομόλογου ζεύγους εκκινητών VdM1F-R για το γονίδιο *mod-E*, το οποίο σχεδιάστηκε βάσει διαθέσιμης αλληλουχίας του γονιδίου από το *V. dahliae*.

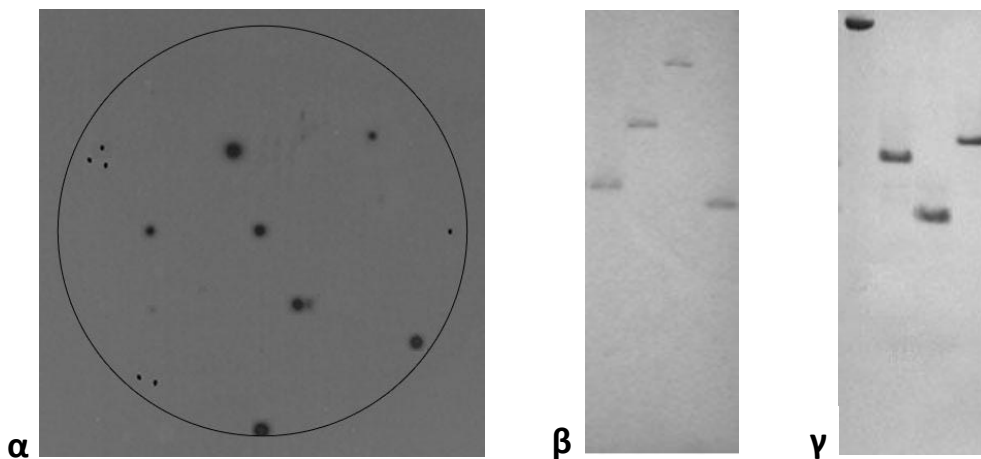
Κατόπιν της απαραίτητης βελτιστοποίησης των συνθηκών για κάθε μια αντίδραση PCR ελήφθησαν προϊόντα ενίσχυσης των αναμενόμενων μοριακών μεγεθών για τα γονίδια *un-24* (τμήμα μεγέθους 1,2 kb) από τους αντιπροσώπους των ειδών *V. dahliae*, *V. longisporum*, *V. albo-atrum* και *V. tricorpus*: *het-c1* (ομόλογου του γονιδίου *Nchet-c*: 0,9 kb) από τα *V. dahliae*, *V. tricorpus* και *V. nubilum*: *het-c2* (ομόλογου του γονιδίου *Pahet-c*: 0,7 kb) από τα *V. dahliae*, *V. longisporum*, *V. albo-atrum* και *V. tricorpus*: και *mod-E* από τα *V. dahliae*, *V. albo-atrum* και *V. longisporum*. Ειδικά για το τελευταίο γονίδιο, το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης διέφερε για τους αντιπροσώπους των VCGs 2A και 4B του *V. dahliae* (0,6 kb) από όλα τα υπόλοιπα στελέχη του *V. dahliae* και των άλλων ειδών (0,8 kb), ενώ ένα στέλεχος *V. longisporum* (G19) παρήγαγε διπλό προϊόν ενίσχυσης, και των δύο χαρακτηριστικών μεγεθών (αναλυτική περιγραφή του διμορφισμού και μοριακή διερεύνηση στην παράγραφο 3.1.3). Για την επιβεβαίωση της ταυτότητας των προϊόντων PCR για τα τμήματα όλων των γονιδίων που διερευνήθηκαν ακολούθησε εκτομή από πηκτώματα αγαρόζης και καθαρισμός των αναμενόμενων ζωνών από τουλάχιστον δύο αντιπροσωπευτικά στελέχη για κάθε γονίδιο, κλωνοποίησή τους στον φορέα pBluescript II και προσδιορισμός της αλληλουχίας τους.

3.4.2 Σάρωση γονιδιακής βιβλιοθήκης του είδους *V. dahliae* και υβριδισμοί κατά Southern για πιθανά γονίδια *het* στο γένος *Verticillium*

Για την ανάκτηση της συνολικής αλληλουχίας του γονιδίου *mod-E* πραγματοποιήθηκε σάρωση γονιδιακής βιβλιοθήκης του *V. dahliae* (στέλεχος Dvd-T5), με ιχνηθέτη DNA το ομόλογο κλωνοποιημένο τμήμα του γονιδίου (βλ. παράγραφο 3.4.1) σημασμένο με το σύστημα υβριδισμών DIG και με ραδιενεργή [α - 32 P]dCTP. Το πρώτο βήμα σάρωσης της βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε με το σύστημα DIG σε αυστηρές συνθήκες υβριδισμού, οι θετικές φαγικές πλάκες επιβεβαιώθηκαν με PCR με τους ειδικούς εκκινητές VdM1F-R, και τέσσερις από αυτές υποβλήθηκαν σε δεύτερο βήμα σάρωσης με ραδιενεργά σημασμένο ιχνηθέτη για βελτίωση του υβριδιστικού σήματος (Εικόνα 3.32a). Η περιοριστική ανάλυση του DNA των απομονωμένων θετικών φάγων με τα ένζυμα *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SalI*, *SacI* και

*Bst*XI, σε απλές και διπλές πέψεις, επέτρεψε τον εντοπισμό δύο διαφορετικών φάγων που περιείχαν το γονίδιο *mod-E*. Επιλεγμένα περιοριστικά τμήματα του DNA αυτών, κατόπιν υβριδισμού DNA κατά Southern με τον ίδιο ιχνηθέτη, υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα pBluescript II για τον προσδιορισμό της συνολικής κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου. Αυτή είχε μέγεθος 2166 bp και ήταν κατά 99% ταυτόσημη με εκείνη του γονιδιωματικού στελέχους *V. dahliae* Ls.17 (VDAG_04645 στη βάση δεδομένων *Verticillium* group database, Broad Institute).

Η ίδια διαδικασία σάρωσης της γονιδιακής βιβλιοθήκης του *V. dahliae* επαναλήφθηκε για τα γονίδια *un-24* και *het-c1*. Κατά το δεύτερο βήμα σάρωσης με ραδιενεργούς ιχνηθέτες κατέστη εφικτή η λήψη σαφούς υβριδιστικού σήματος μόνον για το γονίδιο *un-24*, για το οποίο απομονώθηκαν τέσσερις διαφορετικοί θετικοί φάγοι. Αυτοί περιείχαν το σύνολο της κωδικής περιοχής του γονιδίου, όπως αποδείχθηκε με περιοριστική ανάλυση και προσδιορισμό της αλληλουχίας τμημάτων τους, σε σύγκριση με την ήδη τότε διαθέσιμη γονιδιωματική αλληλουχία του είδους *V. dahliae* (κωδικός γονιδίου VDAG_04045). Προκειμένου να διευκρινισθεί η αιτία απουσίας σήματος κατά τη δεύτερη σάρωση της βιβλιοθήκης για το γονίδιο *het-c1*, πραγματοποιήθηκαν υβριδισμοί DNA κατά Southern περιοριστικών πέψεων χρωμοσωμικού DNA των στελεχών *V. dahliae* Dvd-T5 και *V. tricorpus* 21 με το κλωνοποιημένο τμήμα του γονιδίου κατόπιν σήμανσής του με το σύστημα DIG. Οι υβριδισμοί ήταν θετικοί σε κάθε περίπτωση, επιβεβαιώνοντας την παρουσία του γονιδίου και στα δύο είδη (Εικόνα 3.32β-γ).



Εικόνα 3.32. Εντοπισμός και ανάκτηση πιθανών γονιδίων ετεροκαρύωσης στο γένος *Verticillium* βάσει τεχνικών υβριδισμού DNA. (α) Σάρωση φαγικής γονιδιακής βιβλιοθήκης του στελέχους *V. dahliae* Dvd-T5 για το γονίδιο *mod-E*. (β) και (γ) Υβριδισμοί DNA κατά Southern περιοριστικών πέψεων (με τα ένζυμα *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I και *Xho*I) χρωμοσωμικού DNA των στελεχών *V. dahliae* Dvd-T5 και *V. tricorpus* 21, αντίστοιχα, για το γονίδιο *het-c1*.

3.4.3 Εντοπισμός πιθανών γονιδίων *het* και άλλων σχετικών γονιδίων στο γένος *Verticillium* με αναζήτηση σε γονιδιωματικές αλληλουχίες *in silico*

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής έγιναν διαθέσιμες οι χαρακτηρισμένες (annotated) γονιδιωματικές αλληλουχίες των ειδών *V. dahliae* (στέλεχος Ls.17) και *V. albo-atrum* (στέλεχος Ms.102· αργότερα προτάθηκε η μετονομασία του σε *V. alfalfae* Ms.102 από τους Inderbitzin *et al.*, 2011a) από το Broad Institute (Klosterman *et al.*, 2011). Για τον εντοπισμό ομόλογων γονιδίων στα είδη του γένους *Verticillium* των γονιδίων *het* και άλλων γονιδίων σχετικών με την ετεροκαρύωση, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στα δύο γονιδιώματα με τους αλγόριθμους Blast των βάσεων δεδομένων των Broad Institute (*Verticillium* group database) και MycoCosm του Joint Genome Institute (Grigoriev *et al.*, 2012). Δεδομένου ότι για τα περισσότερα περιγεγραμμένα γονίδια η ταυτότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο με γονιδιωματικές αλληλουχίες των ειδών του *Verticillium* ήταν περιορισμένη έως μη ανιχνεύσιμη, η αναζήτηση επαναλήφθηκε στο επίπεδο των προβλεπόμενων πρωτεϊνικών ακολουθιών (αλγόριθμος BlastX) με τιμή-κατώφλι (threshold) της παραμέτρου E-value 10^{-3} και χρήση του πίνακα BLOSUM62. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.20.

Για το γονίδιο *het-c1* (ομόλογο του γονιδίου *het-c* του μύκητα *N. crassa*) εντοπίστηκε παράλογο γονίδιο (με μέγιστη ομοιότητα πρωτεϊνικού προϊόντος 68,3% για περισσότερη από τη μισή πρωτεϊνική ακολουθία) σε διαφορετικό χρωμόσωμα (στο χρωμόσωμα 1, με κωδικό αριθμό VDAG_00930 και μέγεθος 3225 bp· το *het-c1* εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 5, Πίνακας 3.20). Το εύρημα αυτό επεκτείνεται γενικά στους ασκομύκητες και τους περισσότερους βασιδιομύκητες (van der Nest *et al.*, 2014), αν και δεν υπάρχουν ενδείξεις για λειτουργική συσχέτιση του παράλογου γονιδίου με τον έλεγχο της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας. Από την άλλη πλευρά δεν κατέστη δυνατός ο εντοπισμός στο γονιδίωμα του *V. dahliae* ομόλογου γονιδίου του *het-s*, που κωδικοποιεί για μια μολυσματική-πρωτεΐνη (prion) στον μύκητα *P. anserina* (ούτε κανενός γονιδίου με το χαρακτηριστικό του μοτίβο HeLo), ούτε και του συνδεδεμένου και λειτουργικά σχετικού γονιδίου *NWD2* (με μοτίβο NACHT).

3.4.4 Εντοπισμός γονιδίων με μοτίβο HET στο γονιδίωμα του είδους *V. dahliae*

Η αναζήτηση στο γονιδίωμα του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 για γονίδια με μοτίβο HET (heterokaryon incompatibility protein domain) στο προβλεπόμενο πρωτεϊνικό τους προϊόν (αναζήτηση γονιδίων με περιγεγραμμένα μοτίβα Pfam, αναλύσεις BlastP και BlastX) αποκάλυψε την παρουσία 32 τέτοιων γονιδίων. Οι πρωτεϊνικές ακολουθίες τους αναλύθηκαν ως προς τα μοτίβα τους και τα χαρακτηριστικά τους συνοψίζονται στον Πίνακα 3.21.

Από τα δεδομένα του Πίνακα 3.21 συνάγεται πως το μοτίβο HET στα γονίδια του *V. dahliae* εντοπίζεται κατά κανόνα στην περιοχή του πρωτεϊνικού μορίου που βρίσκεται πλησιέστερα στο αμινοτελικό άκρο και έχει μέσο μέγεθος 149 αμινοξικών καταλοίπων, όπως παρατηρείται γενικά στα περιγεγραμμένα γονίδια με μοτίβο HET. Εκτός της περιοχής του μοτίβου HET ανιχνεύθηκαν χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ομοιότητας μεταξύ των πρωτεϊνών.

Πίνακας 3.20

Αναζήτηση ομόλογων γονιδίων *het* και άλλων σχετικών με την ετεροκαρύωση στα γονιδιώματα των *V. dahliae* Ls.17 και *V. albo-atrum* Ms.102

Γονίδιο	Κωδικός γονιδίου στην οικεία βάση δεδομένων ^α	Κωδικός γονιδίου στη βάση δεδομένων του <i>V. dahliae</i> ^β	Χρωμόσωμα του <i>V. dahliae</i>	Αποτελέσματα BlastX			Μέγεθος γονιδίου/ πρωτεΐνης (bp/αα)	Προβλεπόμενα μοτίβα (μηχανή αναζήτησης Pfam ^γ)	Κωδικός ομόλογου γονιδίου στο γονιδίωμα του <i>V. albo-atrum</i> ²
				Μήκος στοιχείου με μέγιστο score (αα)	Ποσοστό ταυτότητας (%)	Ποσοστό ομοιότητας (%)			
Γονίδια του μύκητα-μοντέλου <i>Neurospora crassa</i>									
<i>mat a-1</i>	GenBank M54787 (NEUMTA1A)	VDAG_02444	3	147 (Expect: 3.312E-18)	36	50	799/232	HMG (High mobility group) box	-
<i>mat A-1</i>	NCU01958	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nchet-c</i>	NCU03493	VDAG_07017	5	437	68	76	2567/818	Heterokaryon incompatibility protein Het-c	VDBG_05369
<i>pin-c</i>	NCU03494	VDAG_09889	1	353	32	46	2306/743	Heterokaryon incompatibility protein (HET domain)	VDBG_07089
<i>un-24</i>	NCU03539	VDAG_04045	3	893	76	83	2890/903	ATP cone domain, Ribonucleotide reductase, barrel domain, Ribonucleotide reductase, all-alpha domain	VDBG_01511
<i>het-6</i>	NCU03533	VDAG_09347	4	695	33	48	1941/646	Heterokaryon incompatibility protein (HET domain)	VDBG_07625
<i>vib-1</i>	NCU03725	VDAG_01460	1	125	68	76	1346/339	NDT80 / PhoG like DNA-binding family	VDBG_04231
<i>tol</i>	NCU04453	VDAG_06728	8	445	28	42	2291/639	Heterokaryon incompatibility protein (HET domain)	VDBG_02712
<i>ham-2</i>	NCU03727	VDAG_01452	1	703	46	59	3598/1044	N1221 superfamily, DUF3402	VDBG_04223
<i>mr-a</i>	NCU07887	VDAG_06641	8	315	88	93	1931/414	RNRR2, Ferritin-like superfamily	VDBG_06996

Γονίδια του μύκητα-μοντέλου <i>Podospora anserina</i>									
<i>PaHet-c</i>	Pa_3_1370	VDAG_08072	6	205	70	81	841/206	Glycolipid transfer protein (GLTP)	VDBG_08489
<i>het-d*</i>	Pa_2_7940	VDAG_06017	8	242	45	58	1974/657	Heterokaryon incompatibility protein (HET domain)	VDBG_02622
<i>het-e*</i>	Pa_4_1920	VDAG_06017	8	260	45	58	1974/657	Heterokaryon incompatibility protein (HET domain)	VDBG_02622
<i>het-r*</i>	GenBank FJ897832	VDAG_02854	3	373	32	51	1893/515	WD domain, G-beta repeat, NLE (NUC135) domain	VDBG_02383
<i>het-s</i>	Pa_3_620	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>idi-1</i>	Pa_3_2920	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>idi-2</i>	Pa_5_4020	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>idi-3</i>	Pa_2_13400	VDAG_00261	2	142	42	59	618/205	-	VDBG_00647
<i>idi-4</i>	Pa_6_10650	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>idi-6 / pspA</i>	GenBank AF047689	VDAG_02670	3	523	66	79	1650/526	Subtilase family, Subtilisin N-terminal Region	VDBG_02202
<i>idi-7</i>	GenBank AF502254	VDAG_01226	1	118	66	77	1449/417	Coproporphyrinogen III oxidase	VDBG_03998
<i>mod-A</i>	Pa_4_4470	VDAG_05329	2	739	36	52	2157/700	-	VDBG_10029
<i>mod-D</i>	Pa_1_23950	VDAG_08980	5	355	83	92	1354/355	G-protein alpha subunit	VDBG_04398
<i>mod-E</i>	Pa_2_3760	VDAG_04645	3	703	86	91	2555/701	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase, Hsp90 protein	VDBG_09407
^α <i>Neurospora crassa</i> genome project: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html <i>Podospora anserina</i> genome project: http://podospora.igmors.u-psud.fr/ GenBank: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/									
^β http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html									
^γ http://pfam.sanger.ac.uk/									
* Τα σημειωμένα γονίδια δεν φέρουν όλα τα χαρακτηριστικά μοτίβα των ομολόγων τους στους μύκητες-μοντέλα (βλ. κείμενο για λεπτομέρειες).									
Σημείωση: εκτός από όπου αναφέρεται διαφορετικά, η τιμή της παραμέτρου Expect ήταν 0.									

Πίνακας 3.21

Γονίδια με μοτίβο HET στο γονιδίωμα του *Verticillium dahliae* (στέλεχος Ls.17)

Γονίδιο ^α	Χρωμόσωμα	Μέγεθος πρωτεΐνης (αα)	Θέση μοτίβου HET (μέγεθος μοτίβου) (αα)	Παρουσία άλλων μοτίβων στην πρωτεΐνη
VDAG_01170	1	382	87 – 227 (141)	-
VDAG_01241 ^β	1	150	64 – 120 (56)	-
VDAG_01366	1	502	24 – 180 (157)	Ankyrin repeats (3 copies)
VDAG_09889	1	743	224 – 399 (176)	-
VDAG_00709	2	651	106 – 254 (149)	-
VDAG_07899	2	588	22 – 155 (134)	-
VDAG_07938	2	576	33 – 186 (154)	-
VDAG_02858	3	682	68 – 228 (161)	SLT_L ^δ
VDAG_03631 ^β	3	567	1 – 80 (80)	-
VDAG_03646	3	618	66 – 215 (150)	-
VDAG_03996	3	845	42 – 249 (208)	συντηρημένη θέση ανοσοσφαιρινών
VDAG_09754 ^β	3	792	108 – 342 (235)	-
VDAG_09817	3	360	22 – 134 (113)	-
VDAG_04963	4	609	108 – 273 (166)	WW (ή Rsp5 ή WWP)
VDAG_05752	4	671	105 – 257 (153)	SH3_6 ^δ
VDAG_09150	4	167	45 – 150 (106)	FAP ^δ
VDAG_09285	4	414	31 – 149 (116)	-
VDAG_09347	4	646	65 – 236 (172)	-
VDAG_07035	5	619	204 – 332 (129)	-
VDAG_07411	5	564	41 – 193 (153)	-
VDAG_07561 ^β	5	826	309 – 438 (130)	DUF4242 ^δ
VDAG_03421	6	832	267 – 411 (145)	-
VDAG_03433 ^β	6	165	67 – 155 (89)	-
VDAG_03515 ^β	6	718	325 – 406 (82)	-
VDAG_02275	7	742	47 – 227 (181)	-
VDAG_02289	7	679	49 – 241 (193)	-
VDAG_06014	8	644	21 – 134 (114)	συντηρημένη θέση αδευδικής αφυδρογονάσης
VDAG_06017	8	657	22 – 146 (125)	-
VDAG_06548	8	929	314 – 464 (151)	-
VDAG_06728	8	639	153 – 302 (150)	-
VDAG_10140	- ^γ	851	321 – 444 (124)	-
VDAG_10521 ^β	- ^γ	402	166 – 232 (67)	-

^α Οι κωδικοί των γονιδίων αναφέρονται στη γονιδιωματική βάση δεδομένων του Broad Institute: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html.

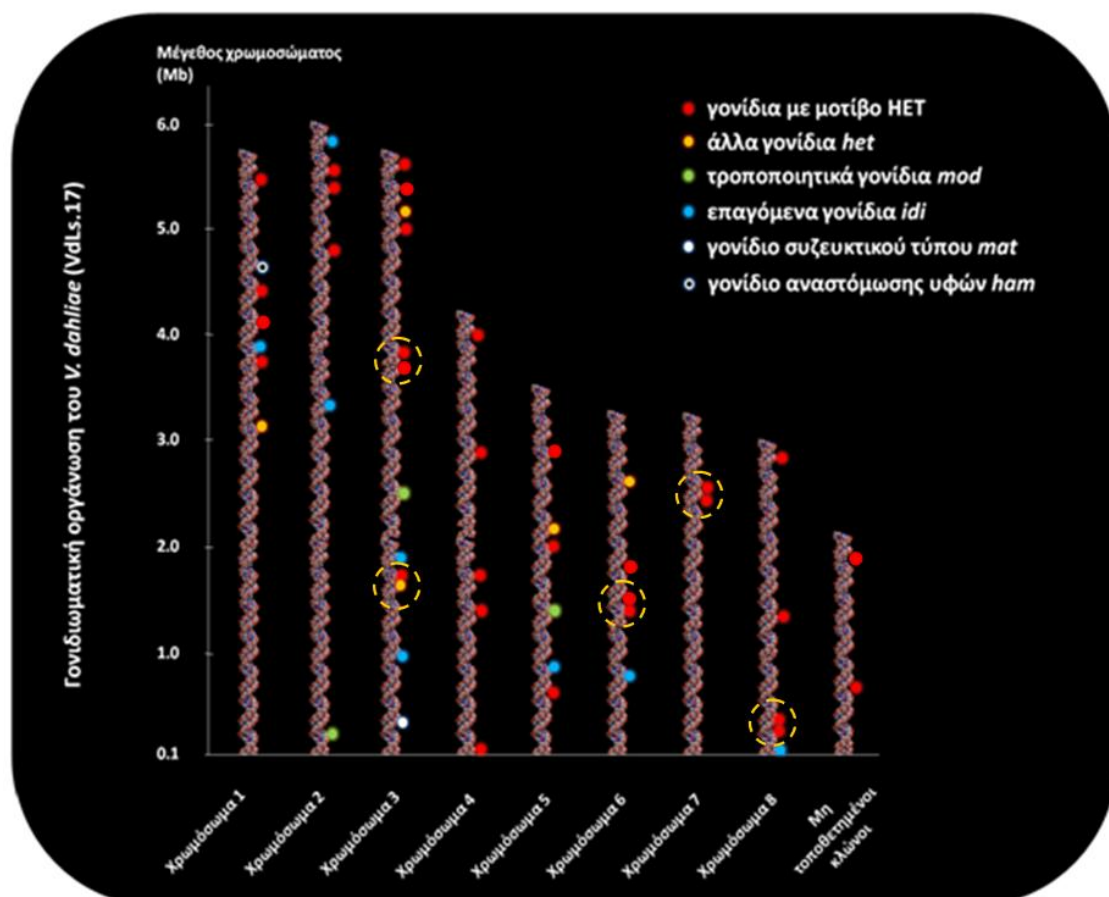
^β Για αυτά τα γονίδια οι περιοχές των μοτίβων HET δεν επισημαίνονται στη βάση δεδομένων του Broad Institute. Ωστόσο, τα γονίδια εντοπίστηκαν με αναζητήσεις BlastX/BlastP και έλεγχο στη βάση δεδομένων Pfam, όπου ο εντοπισμός του μοτίβου βρέθηκε σημαντικός για τα VDAG_01241 ($E=2,7 \cdot 10^{-8}$), VDAG_09754 ($E=2,7 \cdot 10^{-17}$), VDAG_03433 ($E=2,0 \cdot 10^{-21}$), VDAG_07561 ($E=1,6 \cdot 10^{-6}$) και VDAG_10521 ($E=9,0 \cdot 10^{-7}$), ενώ το μοτίβο είχε μερική ακολουθία (truncated form) για τα γονίδια VDAG_01241, VDAG_03433, VDAG_03515, VDAG_07561 (αμινοτελικό τμήμα), VDAG_03631 (καρβοξυτελικό τμήμα) και VDAG_10521 (εσωτερικό τμήμα).

^γ Η γονιδιωματική θέση δεν έχει προσδιορισθεί από το πρόγραμμα αλληλούχησης του γονιδιώματος από το Broad Institute (unpositioned scaffolds).

^δ SLT_L: Soluble lytic murein transglycosylase L domain, SH3_6: SH3 domain of the SH3b1 type, FAP: Fibronectin-attachment protein, DUF4242: Domain of unknown function.

Τα γονίδια με μοτίβο HET είναι κατανεμημένα σε όλα τα χρωμοσώματα, χωρίς ιδιαίτερη ομαδοποίηση, με 4 εξαιρέσεις: τα ζεύγη γονιδίων VDAG_03631 και VDAG_03646 στο χρωμόσωμα 3 (απέχουν μεταξύ τους 34,8 kb και παρεμβάλλονται 14 ORFs), VDAG_03421 και VDAG_03433 στο χρωμόσωμα 6 (27,8 kb· 11 ORFs), VDAG_02275 και VDAG_02289 στο χρωμόσωμα 7 (48,0 kb· 13 ORFs), και VDAG_06014 και VDAG_06017 στο χρωμόσωμα 8 (5,8 kb· 2 ORFs). Στην ίδια ανάλυση συμπεριελήφθησαν τα ομόλογα των γονιδίων *het* και άλλων γονιδίων σχετικών με την ετεροκαρύωση, προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα τοπολογικής ομαδοποίησης γονιδίων με λειτουργική συσχέτιση στο πλαίσιο του φαινομένου (η κατανομή όλων των γονιδίων που εντοπίστηκαν στα χρωμοσώματα του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 3.33). Το γονίδιο *het-r* (VDAG_02854) στο χρωμόσωμα 3 βρέθηκε να απέχει 8,4 kb από ένα γονίδιο με μοτίβο HET (VDAG_02858), με 3 παρεμβαλλόμενα ORFs μεταξύ των δύο γονιδίων. Σημειώνεται πως από τα δύο ζεύγη γονιδίων *het* του μύκητα *N. crassa*, τα οποία βρίσκονται σε στενή σύνδεση σε αυτόν τον μύκητα – ζεύγη γονιδίων *het-c/pin-c* (με μοτίβο HET) και *het-6* (με μοτίβο HET)/*un-24* – κανένα δεν βρέθηκε σε σύνδεση στον *V. dahliae*. Τα γονίδια *het-c1* (ομόλογο του γονιδίου *het-c* του *N. crassa*) και *pin-c* εντοπίστηκαν σε διαφορετικά χρωμοσώματα του *V. dahliae* (χρωμοσώματα 5 και 1, αντίστοιχα) και κανένα γονίδιο με μοτίβο HET δεν ανιχνεύθηκε πλησίον του *het-c1*. Παρομοίως, τα γονίδια *het-6* και *un-24* του *V. dahliae* ανιχνεύθηκαν σε διαφορετικά χρωμοσώματα του μύκητα (χρωμοσώματα 4 και 3, αντίστοιχα) και κανένα γονίδιο με μοτίβο HET δεν εντοπίστηκε σε στενή σύνδεση με το γονίδιο *un-24*.

Εκτός από τα γονίδια με μοτίβο HET, το άλλο χαρακτηριστικό μοτίβο για τις πρωτεΐνες της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας, NACHT (της οικογένειας STAND), δεν βρέθηκε να κωδικοποιείται από κανένα γονίδιο του *V. dahliae*. Ομοίως, κανένα γονίδιο του μύκητα από όσα προβλέφθηκε να κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με μοτίβο HET δεν περιέχει ταυτόχρονα το μοτίβο WD. Συνεπώς, η οικογένεια γονιδίων HNWD (HET – NACHT – WD) βρέθηκε να απουσιάζει εξ ολοκλήρου από το γονιδίωμα του *V. dahliae*. Έτσι, τα ομόλογα γονίδια του *V. dahliae* που εντοπίστηκαν βάσει των ποσοστών συνολικής ταυτότητας/ομοιότητας στο πρωτεϊνικό επίπεδο για τα γονίδια *het-e*, *het-d* και *het-r* (τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των γονιδίων HNWD στον μύκητα *P. anserina*) δεν αποτελούν γνήσια μέλη της οικογένειας HNWD στην περίπτωση του *V. dahliae*, καθώς φέρουν μόνον το μοτίβο HET (τα δύο πρώτα) ή το μοτίβο WD (το τελευταίο) (Πίνακες 3.20 και 3.21).

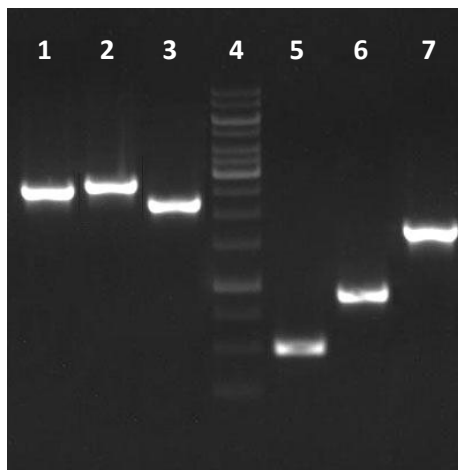


Εικόνα 3.33. Κατανομή γονιδίων με μοτίβο HET και των ομολόγων των σχετικών με την ετεροκαρύωση/ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα γονιδίων *het*, *mod*, *idi*, *mat* και *ham* στα χρωμοσώματα του *Verticillium dahliae* (στέλεχος Ls.17). Τα γονίδια που χαρακτηρίζονται από στενή γειτονία στα χρωμοσώματα 3, 6, 7 και 8 είναι κυκλωμένα με διακεκομμένες γραμμές.

3.4.5 Ενίσχυση με PCR και κλωνοποίηση ομολόγων γονιδίων *het* του *V. dahliae*

Προκειμένου να μελετηθούν στο δομικό και λειτουργικό επίπεδο επιλεγμένα γονίδια του μύκητα *V. dahliae* με ομολογία προς γνωστά γονίδια *het*, απαιτήθηκε η κλωνοποίησή τους σε εύχρηστο φορέα κλωνοποίησης / γενετικής μηχανικής. Με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία για τα γονίδια *mod-E* και *un-24* (βλ. παράγραφο 3.4.2) και τη γονιδιωματική αλληλουχία του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 (Broad Institute), η οποία έγινε διαθέσιμη στην αρχική φάση της εργασίας, σχεδιάστηκαν ομόλογοι εκκινητές για την ενίσχυση με PCR των κωδικών περιοχών επιλεγμένων γονιδίων *het*. Με την εφαρμογή των εκκινητών VdNhetcF-R (εναλλακτικά VNhetcF2-R2 για καλύτερη απόδοση), VdPhetcF-R, Vdun24F-R, VdMAT12F-R, VdcmoEF-R, Vdhet6F-R και Vdvib1F-R σε αντιδράσεις PCR με κατάλληλες κατά περίπτωση συνθήκες κατέστη εφικτή η αποδοτική ενίσχυση των ομολόγων γονιδίων του *V. dahliae* για τα γνωστά γονίδια ετεροκαρύωσης *het-c1* (ομόλογου του γονιδίου *Nhetc-c*), *het-c2* (ομόλογου του γονιδίου *PaHet-c*), *un-24*, *MAT1-2-1*, *mod-E*, *het-6* και *vib-1* (Εικόνα 3.34). Επιπλέον, ενισχύθηκε το γονίδιο *hex-1*, που κωδικοποιεί για την κύρια πρωτεΐνη του σωματίου Woronin (Woronin

body), με χρήση των εκκινητών Vdhex1F-R. Τα προϊόντα ενίσχυσης όλων των γονιδίων από το στέλεχος *V. dahliae* Ls.17 κλωνοποιήθηκαν στον φορέα κλωνοποίησης pBluescript II και η ταυτότητά τους επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση τμημάτων των άκρων τους.



Εικόνα 3.34. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (συγκέντρωσης 0,8%) προϊόντων ενίσχυσης PCR των κωδικών περιοχών των γονιδίων *het-c1*, *un-24*, *mod-E*, *MAT1-2-1*, *het-c2* και *het-6* του στελέχους *Verticillium dahliae* Vd76, κατόπιν βελτιστοποίησης των συνθηκών PCR κατά περίπτωση (στις διαδρομές 1-3 και 4-6 του πηκτώματος, αντίστοιχα). Στην ενδιάμεση διαδρομή 4 έχει ηλεκτροφορηθεί μάρτυρας μοριακών μεγεθών DNA (1 kb DNA ladder, Fermentas), για τον προσδιορισμό των μεγεθών των προϊόντων.

3.4.6 Δομική και πληθυσμιακή μελέτη ομόλογων γονιδίων *het* του *V. dahliae*

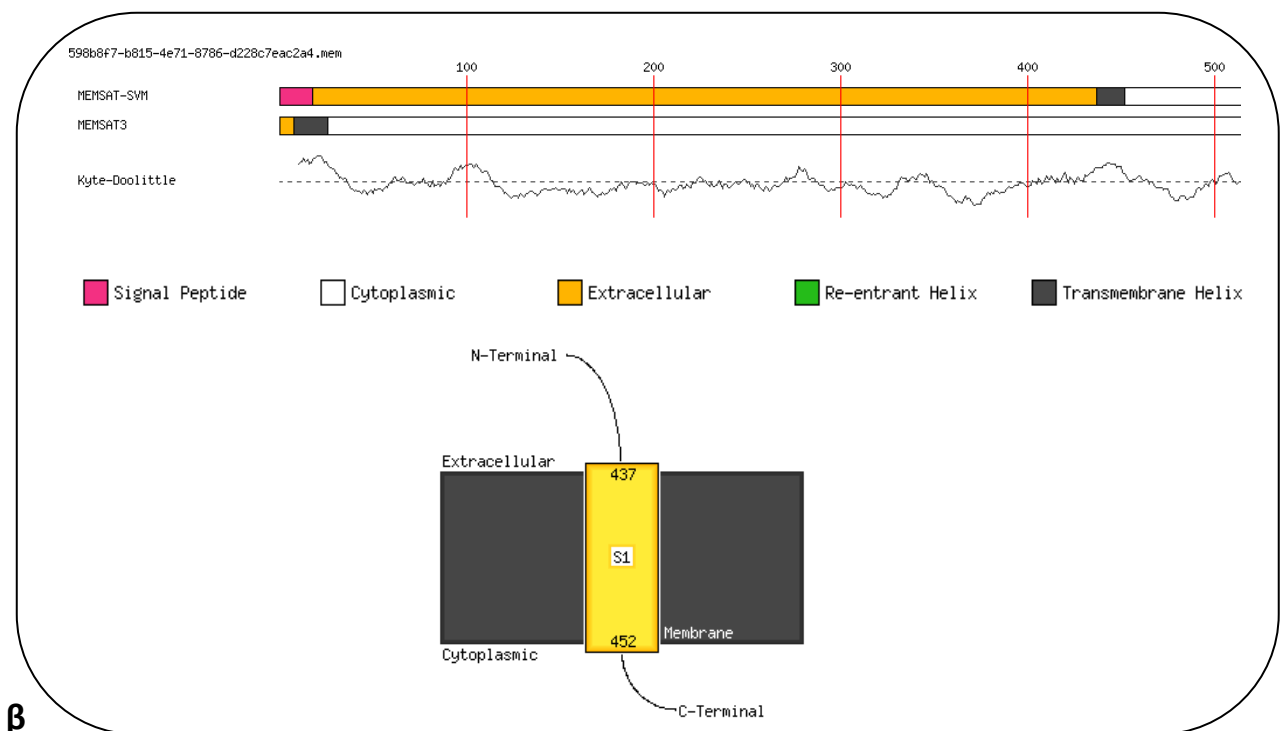
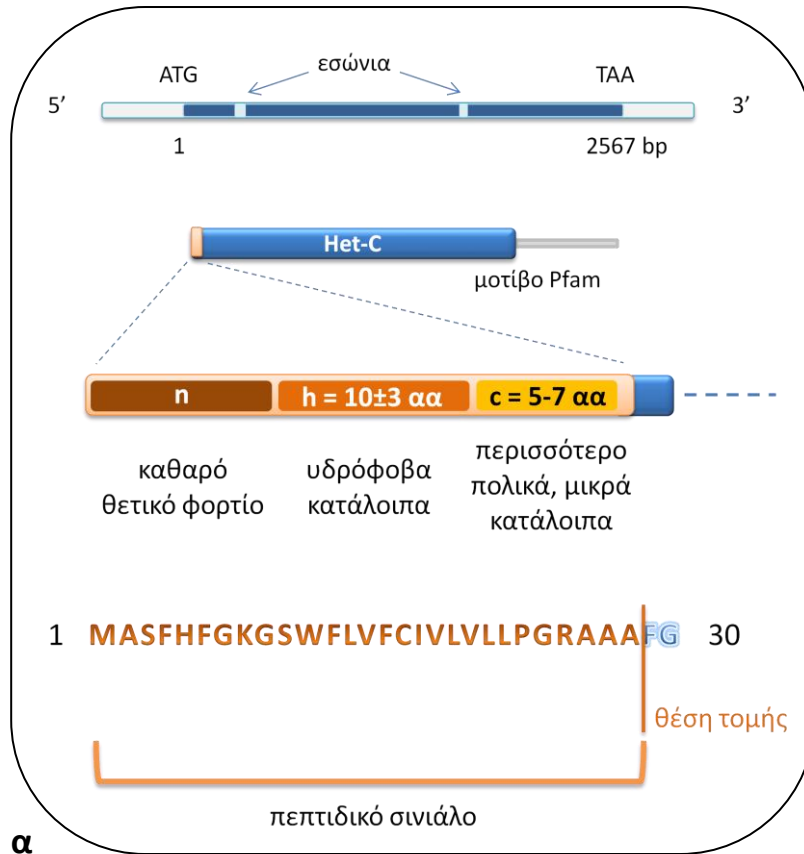
Από τα ομόλογα γονίδια στο *Verticillium* γνωστών γονιδίων *het* άλλων μυκήτων που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία (συνοπτικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.20) κρίθηκε απαραίτητη η περαιτέρω δομική (*in silico*) και πληθυσμιακή ανάλυση των γονιδίων *het-c1* (ομόλογου του γονιδίου *het-c* του μύκητα *N. crassa*), *het-c2* (ομόλογου του γονιδίου *het-c* του μύκητα *P. anserina*) και MAT, με βάση τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα.

A. Το γονίδιο *het-c1* (ομόλογο του γονιδίου *het-c* του μύκητα *N. crassa*)

Το γονίδιο *het-c1* (VDAG_07017) εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 5 του *V. dahliae* Ls.17 (το μέγεθος της κωδικής περιοχής – συμπεριλαμβανομένων των εσώνων – είναι 2567 bp, με δύο εσώνια μεγέθους 59 και 51 bp, στις νουκλεοτιδικές θέσεις του γονιδίου 307 και 1610, αντίστοιχα). Το προβλεπόμενο πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου έχει μέγεθος 818 αμινοξικών καταλοίπων, με το μοτίβο “Heterokaryon incompatibility protein Het-C” (Pfam) να εντοπίζεται στην περιοχή 1-628 αα. Η πρωτεϊνική ακολουθία μελετήθηκε με τον αλγόριθμο πρόγνωσης SignalP 4.1, βάσει του οποίου προβλέφθηκε με άριστη πιθανότητα η ύπαρξη στο αμινοτελικό άκρο (1-28 αα) πεπτιδικού σινιάλου για είσοδο της πρωτεΐνης στο εκκριτικό μονοπάτι του κυττάρου. Η περαιτέρω διερεύνηση της ακολουθίας επέτρεψε την πρόβλεψη

διαμεμβρανικής περιοχής του μορίου (437-452 αα, με τιμή-score 0,403), με τον εντοπισμό του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης να προβλέπεται στην εξωκυτταρική περιοχή (αλγόριθμος PSIPRED v3.0 Predict Transmembrane Topology, MEMSAT-SVM Prediction) (Εικόνα **3.35**).

Για τον εντοπισμό της πιθανής περιοχής καθορισμού της αλληλομορφικής ειδικότητας του γονιδίου *het-c1* στο γένος *Verticillium* πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση αμινοξικών ακολουθιών των πρωτεϊνικών προϊόντων των τριών αλληλομόρφων *het-c* του μύκητα *N. crassa* (*het-c^{OR}*, *het-c^{GR}* και *het-c^{PA}*) με τις ακολουθίες των ομόλογων πρωτεϊνών των ειδών *V. dahliae*, *V. albo-atrum* (Πίνακας **3.20**, Broad Institute) και *V. tricorpus* (παράγραφος **3.4.1**). Από την ανάλυση προέκυψε πως οι ομόλογες πρωτεΐνες των τριών ειδών *Verticillium* είχαν μεταξύ τους ταυτόσημες αμινοξικές ακολουθίες στη γνωστή περιοχή καθορισμού του αλληλομορφικού τύπου για το είδος-μοντέλο *N. crassa*, ενώ μοιράζονταν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με τον τύπο Het-c^{GR} του *N. crassa* (Εικόνα **3.36**). Προκειμένου να μελετηθεί η πιθανότητα πολυμορφισμού σε αυτήν την περιοχή του πρωτεϊνικού μορίου στους φυσικούς πληθυσμούς του είδους *V. dahliae*, σχεδιάσθηκαν κατάλληλοι εκκινητές (NspFEcoR-NspRXhoI) για ενίσχυση με PCR τμήματος του γονιδίου *het-c1* (μεγέθους 513 bp) που περιλαμβάνει την πιθανή περιοχή καθορισμού του αλληλομορφικού τύπου. Ακολούθησε ενίσχυση αυτού του τμήματος από 40 αντιπροσωπευτικά στελέχη *V. dahliae* από όλον τον κόσμο και όλες τις VCGs, ανάλυση RFLPs όλων των προϊόντων ενίσχυσης με τα περιοριστικά ένζυμα *NotI*, *SalI* και *HaeIII*, καθώς επίσης και κλωνοποίηση και αλληλούχηση των προϊόντων PCR από 8 αντιπροσωπευτικά στελέχη των διαφορετικών ομάδων VCGs. Όλες οι αναλύσεις κατέδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου *het-c1* είναι απόλυτα συντηρημένη μεταξύ όλων των VCGs του μύκητα *V. dahliae*, χωρίς την ύπαρξη εισδοχών/ελλείψεων ή άλλων πολυμορφισμών, αντιθέτως με την περίπτωση του *N. crassa* (Εικόνα **3.36**).



Εικόνα 3.35. (α) Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου *het-c1* του είδους *Verticillium dahliae* (στέλεχος Ls.17), του πρωτεϊνικού του προϊόντος με το χαρακτηριστικό του μοτίβο (Pfam), και της δομής του προβλεπόμενου πεπτιδικού σινιάλου στο αμινοτελικό του άκρο (αλγόριθμος SignalP 4.1). (β) Πρόβλεψη πιθανής διαμεμβρανικής περιοχής και τοπολογίας της πρωτεΐνης Het-c1 του είδους *V. dahliae* (αλγόριθμος PSIPRED Predict Transmembrane Topology, MEMSAT).



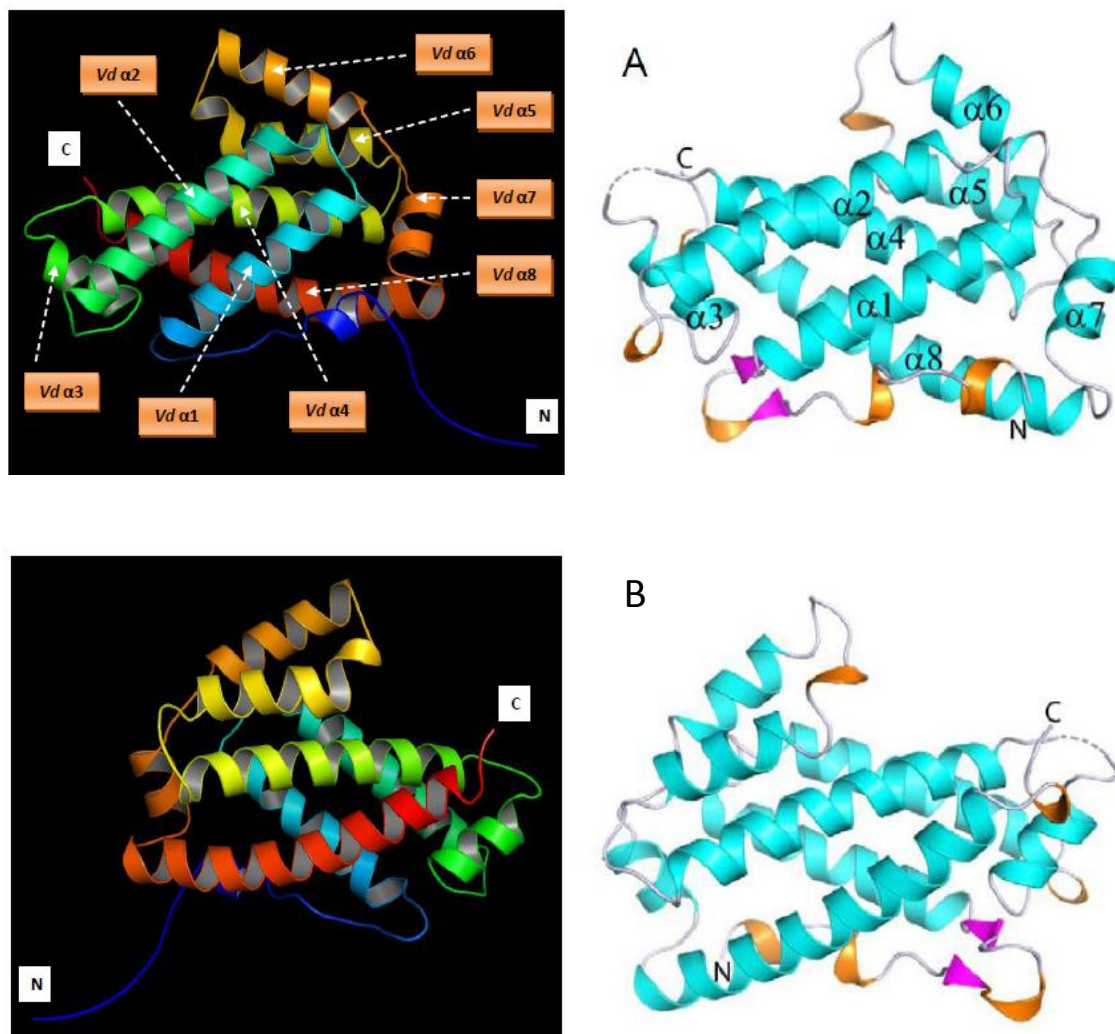
Εικόνα 3.36. (α) Πολλαπλή στοίχιση της περιοχής καθορισμού του αλληλομορφικού τύπου για τις πρωτεΐνες Het-C του μύκητα *Neurospora crassa* (προϊόντα των αλληλομόρφων *het-c^{OR}*, *het-c^{GR}* και *het-c^{PA}*) και τις ομόλογες πρωτεΐνες Het-C1 των ειδών *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum* και *V. tricorpus*. (β) Πολλαπλή στοίχιση αμινοξικών ακολουθιών της ίδιας περιοχής του πρωτεϊνικού μορίου από 8 αντιπροσωπευτικά στελέχη των διαφορετικών VCGs του *V. dahliae*. Οι δύο στοιχίσεις έχουν πραγματοποιηθεί με το πρόγραμμα MegAlign (Lasergene 8, DNASTar). Ο βαθμός ομοιότητας σε κάθε θέση των στοιχίσεων απεικονίζεται με χρωματική κλίμακα, σύμφωνα με την επεξήγηση που παρατίθεται δεξιά από τις στοιχίσεις.

B. Το γονίδιο *het-c2* (ομόλογο του γονιδίου *het-c* του μύκητα *P. anserina*)

Το γονίδιο *het-c2* (VDAG_08072) εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 6 του *V. dahliae* Ls.17, με μέγεθος κωδικής περιοχής 841 bp (συμπεριλαμβανομένων των εσώνων) και τρία εσώνια (μεγέθους 61, 81 και 78 bp, στις νουκλεοτιδικές θέσεις του γονιδίου 149, 269 και 469, αντίστοιχα). Το προβλεπόμενο πρωτεϊνικό μόριο έχει μέγεθος 206 αμινοξικών καταλοίπων, ενώ στην περιοχή 31-174 αα ανιχνεύθηκε το μοτίβο “Glycolipid Transfer Protein – GLTP” (Pfam). Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης (με τα προγράμματα Quick2D και PSIPRED v2.6) και η στοίχιση αυτής με τις αντίστοιχες δομές κρυσταλλογραφικά λυμένων δομών ομόλογων πρωτεϊνών από οργανισμούς με μικρότερη (*P. anserina*) ή μεγαλύτερη φυλογενετική απόσταση (ερυθρό μικροφύκος *Galdieria sulphuraria*, *Bos taurus*, *Homo sapiens*) αποκάλυψαν σημαντικές δομικές ομοιότητες στη δευτεροταγή οργάνωση της πρωτεΐνης Het-c2 με τις ομόλογές της, κυρίως με εκείνη του μύκητα *P. anserina* (εντοπισμός 8 α-ελίκων ποικίλου μήκους, περιορισμένος αριθμός καταλοίπων στην αμινοτελική περιοχή του μορίου με διαμόρφωση β-κλώνου, απουσία δισουλφιδικών δεσμών, «χαλαρή» μορφή αποδιάταξης – “disordered region” – στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης).

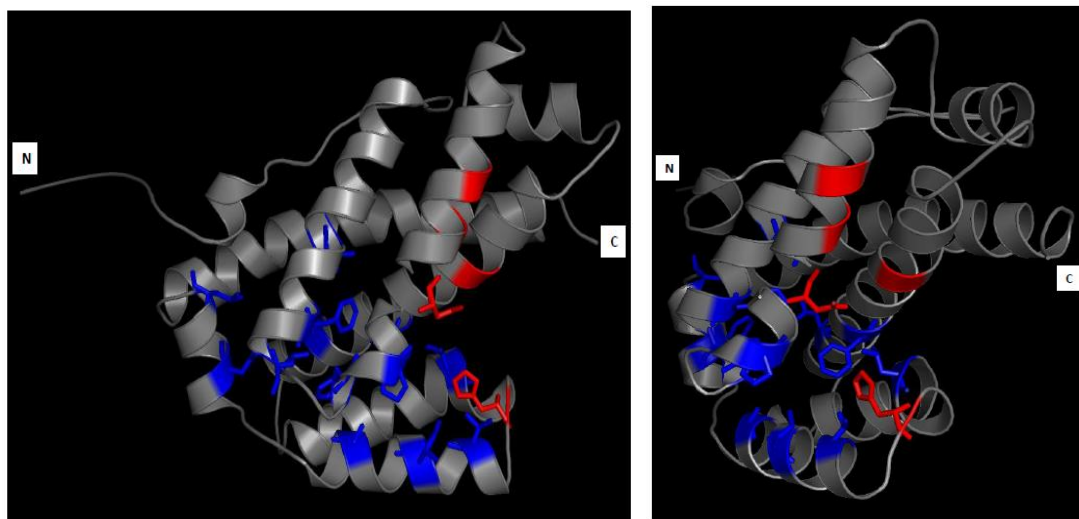
Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε δομική μοντελοποίηση της πρωτεΐνης Het-c2 του *V. dahliae* «βάσει ομολογίας» (“homology modeling”) με το λογισμικό HHPred και χρησιμοποιώντας ως μήτρες για τη δημιουργία του τρισδιάστατου μοντέλου τις

κατατεθειμένες δομές των ομόλογων πρωτεϊνών GLTP των οργανισμών *P. anserina*, *G. sulphuraria* και *B. taurus* (IDs 3kn0, 2i3f και 1wbe στη βάση δεδομένων PDB, αντίστοιχα και οι τρεις είχαν πιθανότητα αξιοπιστίας 100% για τη μοντελοποίηση της πρωτεΐνης Het-c2 σύμφωνα με την πρόβλεψη του αλγορίθμου HHPred). Η δημιουργία και ο έλεγχος του τρισδιάστατου μοντέλου της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Modeller 9.12, ενώ η οπτικοποίηση και μελέτη του μοντέλου έγινε με το πρόγραμμα PyMol v1.6 (Εικόνα 3.37).



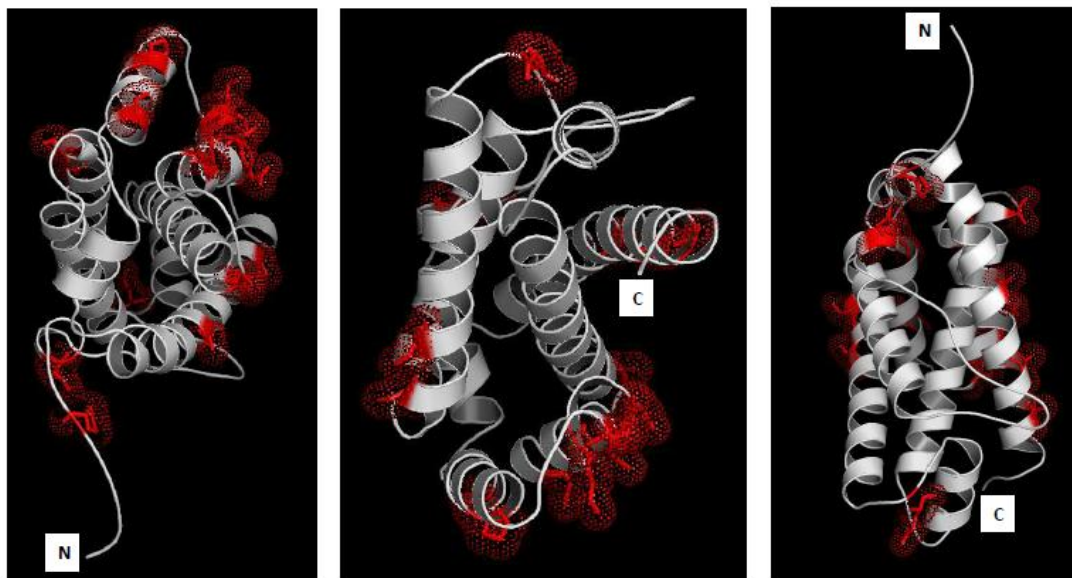
Εικόνα 3.37. Προβλεπόμενο τρισδιάστατο μοντέλο της πρωτεΐνης Het-c2 του μύκητα *Verticillium dahliae* (στα αριστερά σκουρόχρωμα πλαίσια) σε σύγκριση με τη δομή της ομόλογης πρωτεΐνης του *Podospora anserina* (δεξιά σχήματα). (A) Πρόσθια όψη, (B) οπίσθια όψη των πρωτεϊνών (PyMol v1.6). Οι 8 α-έλικες (α1-α8) της πρωτεΐνης Het-c2 του *V. dahliae* επισημαίνονται με πορτοκαλί πλαίσια. Η δομική μοντελοποίηση «βάσει ομολογίας» (“homology modeling”) πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα HHPred και Modeller 9.12.

Η πρωτεΐνη κυριαρχείται από τη διαμόρφωση α -έλικας, αποτελούμενη από ένα χαρακτηριστικό «σάντουιτς» δύο στρωμάτων, το πρώτο εκ των οποίων απαρτίζεται από τις α -έλικες $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 6$ και $\alpha 7$, ενώ το άλλο αποτελείται από τις α -έλικες $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ και $\alpha 8$ (Εικόνα 3.38). Μεταξύ των κρυσταλλογραφικά λυμένων ομόλογων πρωτεϊνών των ειδών *P. anserina* και *H. sapiens* παρατηρείται απόλυτη συντήρηση και ομόλογος δομικός εντοπισμός (homologous positioning) για 5 αμινοξικά κατάλοιπα (D66, N70, K73, W109 και H147 της πρωτεΐνης PaHet-c), τα οποία σχηματίζουν ένα «κέντρο αναγνώρισης» της κεφαλής του σακχάρου του γλυκολιπιδίου και πιθανά προσδίδουν ειδικότητα για την πρόσδεση γλυκολιπιδίων. Τα ίδια αμινοξικά κατάλοιπα ανιχνεύθηκαν στις ομόλογες θέσεις και στην πρωτεΐνη του *V. dahliae*, συμμετέχοντας στην ίδια γεωμετρική διαμόρφωση με τις δύο ομόλογες πρωτεΐνες. Αυτό το «κέντρο αναγνώρισης» εντοπίστηκε στην είσοδο μιας υδρόφοβης κοιλότητας-«τσέπης», στο περιβάλλον της οποίας αναμένεται να διευθετούνται οι μη πολικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες του γλυκολιπιδίου (Εικόνα 3.32). Η υδρόφοβη «τσέπη» βρέθηκε ότι επενδύεται εσωτερικά από 24 μη πολικά κατάλοιπα, οι πλευρικές αλυσίδες των οποίων δημιουργούν την κατάλληλη υδρόφοβη επένδυση-μικροπεριβάλλον για τον προσανατολισμό των μη πολικών αλυσίδων του γλυκολιπιδίου. Από το σύνολο των 24 αμινοξικών καταλοίπων που επενδύουν αυτήν την υδρόφοβη «τσέπη», τα 22 είναι συντηρημένα μεταξύ των ομόλογων πρωτεϊνών των *V. dahliae* και *P. anserina*, αντιστοιχώντας σε ένα ποσοστό ταυτότητας (91,7%) πολύ υψηλότερο από το συνολικό για ολόκληρη την πρωτεΐνη μεταξύ των δύο ειδών (70,3%). Αυτή η διαφορά θα μπορούσε να αποδοθεί στους δομικούς-λειτουργικούς περιορισμούς αυτής της περιοχής, οι οποίοι εκφράζονται ως εξελικτική πίεση για συντήρηση των αμινοξικών καταλοίπων με τις κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες στη συγκεκριμένη περιοχή της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.38. Απεικόνιση του προβλεπόμενου «κέντρου αναγνώρισης» της κεφαλής του σακχάρου (κόκκινο χρώμα) στην είσοδο μιας υδρόφοβης κοιλότητας-«τσέπης» της πρωτεΐνης (μπλε χρώμα), που πιθανά φιλοξενεί τις μη πολικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες των γλυκολιπιδίων κατά τη μεταφορά τους από την πρωτεΐνη Het-c2 του μύκητα *Verticillium dahliae* (PyMol v1.6).

Ο καθορισμός της αλληλομορφικής ειδικότητας για το γονίδιο *het-c* του μύκητα *P. anserina* έχει βρεθεί πως επιτελείται μέσω μεμονωμένων αμινοξικών αλλαγών, διάσπαρτων κατά μήκος του πρωτεϊνικού μορίου. Με πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών των πρωτεϊνικών προϊόντων των διαφορετικών αλληλομόρφων του, μαζί και με την ομόλογη πρωτεΐνη Het-c2 του *V. dahliae*, εντοπίστηκαν 16 αμινοξικές θέσεις της τελευταίας, που αντιστοιχούν στις πολυμορφικές θέσεις στους φυσικούς πληθυσμούς του *P. anserina*. Όλες οι θέσεις εντοπίστηκαν σε τμήματα της πρωτεΐνης Het-c2 με διαμόρφωση α-έλικας ή ελικωμένης δομής (coil), στην επιφάνεια του μορίου και με προσανατολισμό πλευρικών αλυσίδων προς το εξωτερικό περιβάλλον του μορίου (Εικόνα 3.39), ο οποίος θα τους επέτρεπε πιθανά τη συμμετοχή τους σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας. Καμία από τις 16 θέσεις δεν εντοπίστηκε στο «κέντρο αναγνώρισης» του σακχάρου ή την επένδυση της υδρόφοβης κοιλότητας, που αποτελεί μια ένδειξη πως εάν η πρωτεΐνη όντως συμμετέχει στον έλεγχο της ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας, αυτή η λειτουργία εξυπηρετείται από διαφορετική περιοχή του πρωτεϊνικού μορίου και δεν έχει σχέση με την άλλη λειτουργία της πρωτεΐνης, που είναι η μεταφορά γλυκολιπιδίων.



Εικόνα 3.39. Εντοπισμός αμινοξικών θέσεων με πιθανή συμμετοχή στον έλεγχο της ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας, στην επιφάνεια της πρωτεΐνης Het-c2 του μύκητα *Verticillium dahliae* (PyMol v1.6).

Με στόχο τον εντοπισμό πιθανών πολυμορφισμών του γονιδίου *het-c2* στους φυσικούς πληθυσμούς του είδους *V. dahliae* σχεδιάστηκαν οι εκκινητές PhcFBamH-PhcRXbaI για ενίσχυση με PCR ολόκληρης της κωδικής περιοχής του γονιδίου (841 bp). Ακολούθησε ενίσχυση του γονιδίου από μια συλλογή 40 αντιπροσωπευτικών στελεχών του μύκητα από όλον τον κόσμο και όλες τις VCGs, ανάλυση RFLPs όλων των προϊόντων ενίσχυσης με τα περιοριστικά ένζυμα *AluI*, *HaeIII* και *Hin6I*, και κλωνοποίηση και αλληλούχιση των προϊόντων PCR από 8 αντιπροσωπευτικά στελέχη όλων των VCGs. Τα αποτελέσματα όλων

των αναλύσεων συνηγορούν στην αποκάλυψη αξιοσημείωτης συντήρησης στο γονίδιο *het-c2* μεταξύ όλων των VCGs του είδους, με έναν μοναδικό σημειακό πολυμορφισμό στο στέλεχος PH (VCG 2A), στη θέση 69 της αμινοξικής στοίχισης (Εικόνα 3.40). Αυτή η θέση δεν αντιστοιχεί σε καμία από τις προβλεπόμενες – σύμφωνα με τη σύγκριση των αλληλομόρφων του είδους *P. anserina* που παρουσιάστηκε παραπάνω – θέσεις συμμετοχής στον έλεγχο της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας.



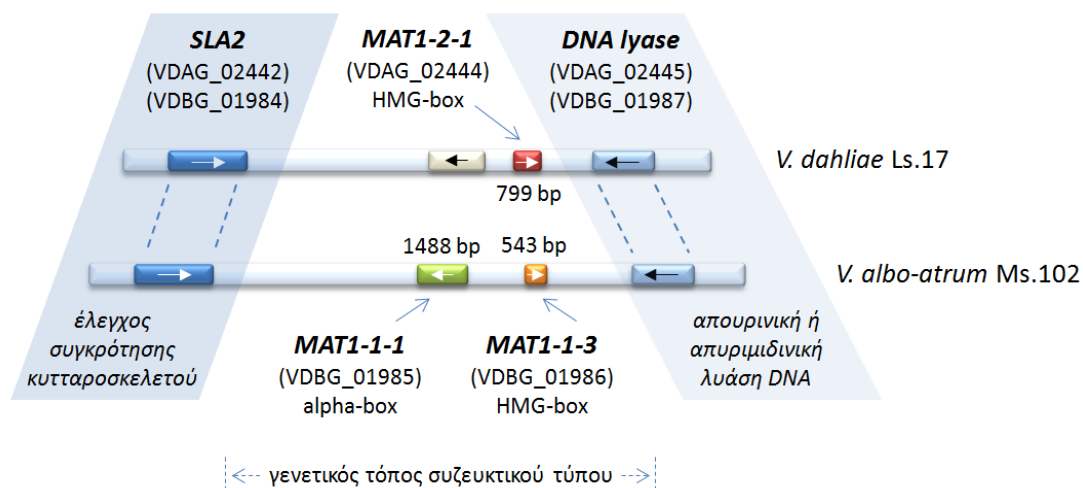
Εικόνα 3.40. Μέρος της πολλαπλής στοίχισης αμινοξικών ακολουθιών της πρωτεΐνης Het-c2 από 8 αντιπροσωπευτικά στελέχη των διαφορετικών VCGs του *Verticillium dahliae*. Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MegAlign (Lasergene 8, DNASTar). Ο βαθμός ομοιότητας σε κάθε θέση της στοίχισης απεικονίζεται με χρωματική κλίμακα, σύμφωνα με την επεξήγηση που παρατίθεται δεξιά από τη στοίχιση.

Γ. Γονίδια συζευκτικού τύπου στο γένος *Verticillium*

Για την ανίχνευση γονιδίων συζευκτικού τύπου (MAT) στο γονιδίωμα του *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε αρχικά αναζήτηση όλων των γονιδίων του που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με μοτίβο High Mobility Group (HMG), η οποία απέδωσε 9 αποτελέσματα. Με κριτήρια τις καθιερωμένες υπο-ομαδοποιήσεις του μοτίβου (σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Pfam), την ταυτόχρονη παρουσία άλλων μοτίβων σε ορισμένα πρωτεϊνικά μόρια, τα ποσοστά ταυτότητας και ομοιότητας με χαρακτηρισμένες αλληλουχίες γονιδίων συζευκτικού τύπου άλλων υφομυκήτων και τη συνήθη για αυτά τα γονίδια των υφομυκήτων συνταινικότητα των γονιδίων *SLA2 – mat – DNA lyase*, προσδιορίστηκε ως γονίδιο συζευκτικού τύπου MAT1-2-1 για το στέλεχος *V. dahliae* Ls.17 το γονίδιο με κωδικό αριθμό VDAG_02444, στο χρωμόσωμα 3 (με μέγεθος πρωτεΐνης 290 αα και ποσοστό ομοιότητας 62% με το προϊόν του γονιδίου MAT1-2-1 του συγγενικού είδους *Glomerella lindemuthiana*). Δεν βρέθηκε καμία ένδειξη για παρουσία του γονιδίου του αντίθετου συζευκτικού τύπου, MAT1-1-1, στο γονιδίωμα του *V. dahliae* Ls.17, καθώς η αναζήτηση σε αυτό για γονίδια που να κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με μοτίβο alpha-box ή με σημαντική ομοιότητα με πρωτεΐνες MAT1-1-1 άλλων υφομυκήτων, δεν απέδωσε κανένα αποτέλεσμα. Συμπερασματικά, το είδος

V. dahliae αποδείχθηκε πως έχει οργάνωση ετεροθαλικού μύκητα ως προς την παρουσία των γονιδίων *mat*, με το στέλεχος Ls.17 να φέρει το ιδιόμορφο MAT1-2-1 (με μοτίβο HMG-box) μεταξύ των συντηρημένων γονιδίων *SLA2* και *DNA lyase*.

Όταν η ίδια ανάλυση επαναλήφθηκε για το γονιδίωμα του *V. albo-atrum* Ms.102, βρέθηκε πως αυτό φέρει στην ίδια γονιδιοματική θέση το ιδιόμορφο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον αντίθετο συζευκτικό τύπο, MAT1-1-1, με μοτίβο alpha-box στο προβλεπόμενο γονιδιακό του προϊόν (κωδικός γονιδίου VDBG_01985). Στον γενετικό τόπο του συζευκτικού τύπου στον αντιπρόσωπο του *V. albo-atrum* εντοπίστηκε επιπλέον ένα δεύτερο ORF (VDBG_01986), με μοτίβο HMG-box στο πρωτεϊνικό του προϊόν και ομοιότητα με την πρωτεΐνη συζευκτικού τύπου MAT1-1-3 του υφομύκητα *Cryphonectria parasitica*. Το γονίδιο αυτό δεν σχετίζεται σε επίπεδο νουκλεοτιδικής ή πρωτεϊνικής ακολουθίας με το γονίδιο MAT1-2-1 του *V. dahliae* Ls.17, παρότι φέρουν και τα δύο μοτίβα HMG-box στα πρωτεϊνικά τους μόρια και κατέχουν την ίδια γονιδιοματική θέση. Η οργάνωση του γενετικού τόπου συζευκτικού τύπου (mating type locus) των δύο μυκήτων και οι ιδιότητες των γονιδίων τους παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.41.



Εικόνα 3.41. Οργάνωση του γενετικού τόπου συζευκτικού τύπου των μυκήτων *Verticillium dahliae* και *V. albo-atrum*, κατόπιν ανάλυσης των γονιδιοματικών αλληλουχιών των στελεχών τους Ls.17 και Ms.102, αντίστοιχα. Οι κωδικοί αριθμοί όλων των γονιδίων παρατίθενται σε παρενθέσεις (με τα προθέματα VDAG για το *V. dahliae* και VDBG για το *V. albo-atrum*), ενώ για τα γονίδια *MAT* παρατίθενται επίσης τα χαρακτηριστικά τους μοτίβα, alpha-box ή HMG-box. Τα βέλη εντός των πλαίσιων που συμβολίζουν τα διαφορετικά γονίδια απεικονίζουν τη φορά της μεταγραφής τους. Η συνταινικότητα της περιοχής οριοθετείται από τα δύο συντηρημένα γονίδια *SLA2* και *DNA lyase*, τα οποία επισημαίνονται με έγχρωμα πλαίσια. Το γονίδιο που συμβολίζεται με λευκό πλαίσιο στην περίπτωση του είδους *V. dahliae* δεν φέρει ομολογία με γνωστά γονίδια συζευκτικού τύπου.

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο μύκητας *V. dahliae* φέρει στους φυσικούς πληθυσμούς του μόνον το γονίδιο MAT1-2-1 ή και τα δύο εναλλακτικά ιδιόμορφα στον γενετικό τόπο συζευκτικού τύπου, και επιπλέον κατά πόσον αυτή η κατανομή σχετίζεται με το σύστημα των VCGs, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές VdMAT12F-R για την ενίσχυση τμήματος 669 bp του γονιδίου από μια εκτεταμένη συλλογή 176 στελεχών *Verticillium*

(Πίνακας 3.1), από διαφορετικές περιοχές του κόσμου, με διαφορετικό φυτοπαθολογικό προφίλ (φυλές ως προς την τομάτα, παθότυποι) και όλες τις VCGs. Με τη μοναδική εξαίρεση του στελέχους Ca.146 (VCG 6), για την οποία δεν κατέστη δυνατή η λήψη προϊόντος PCR με αυτούς τους εκκινητές, το γονίδιο MAT1-2-1 ενισχύθηκε από όλα τα υπόλοιπα στελέχη *V. dahliae* της συλλογής. Η ταυτότητα των προϊόντων ενίσχυσης από αντιπροσωπευτικά στελέχη διαφορετικών VCGs (449-2 από VCG 2B, 70-21 από VCG 3, pn4 και 453-1 από VCG 4B) επιβεβαιώθηκε κατόπιν κλωνοποίησης και αλληλούχησης. Το στέλεχος Ca.146 ελέγχθηκε στη συνέχεια με τους εκκινητές VdMAT111F2-VdMAT111R3, οι οποίοι επιτρέπουν την ενίσχυση ενός τμήματος του γονιδίου MAT1-1-1, μεγέθους 997 bp. Το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε, αλληλουχήθηκε και η ακολουθία του βρέθηκε ταυτόσημη με κατατεθειμένη αλληλουχία γονιδίου MAT1-1-1 από το *V. dahliae* (κωδικός GenBank: AB505215). Το γονίδιο MAT1-1-1 δεν ενισχύθηκε από κανένα άλλο στέλεχος *V. dahliae* της συλλογής με αυτούς τους εκκινητές.

Όσον αφορά τα στελέχη των άλλων ειδών, *V. albo-atrum* και *V. longisporum*, της συλλογής που ελέγχθηκε (Πίνακας 3.1), το γονίδιο MAT1-2-1 ενισχύθηκε από τα 2 στελέχη *V. longisporum* και από 2 εκ των 4 στελεχών *V. albo-atrum* (M33 και V90). Αντιθέτως, το ιδίομορφο MAT1-1-1 ενισχύθηκε μόνον από τα υπόλοιπα στελέχη *V. albo-atrum* (220 και Ms.102).

3.4.7 Λειτουργική μελέτη πιθανών γονιδίων *het* στον μύκητα *V. dahliae*

A. Βελτιστοποίηση συστήματος γενετικού μετασχηματισμού του μύκητα *V. dahliae* με τη μέθοδο σύντηξης πρωτοπλαστών (PEG/CaCl₂)

Σε προκαταρκτικά πειράματα της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε εκτεταμένος έλεγχος των επιμέρους παραμέτρων και βελτιστοποίηση της διαδικασίας του γενετικού μετασχηματισμού πρωτοπλαστών του *V. dahliae*. Το βέλτιστο πρωτόκολλο, που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα επόμενα πειράματα για τη λειτουργική μελέτη πιθανών γονιδίων *het* στον μύκητα, περιγράφεται αναλυτικά στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι».

Η βελτιστοποιημένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε επιπλέον για την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης που φέρει η φύση/ποσότητα της εκάστοτε κατασκευής DNA στην απόδοση του μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η επίδραση: (α) της ποσότητας DNA, (β) της διάταξης των μορίων DNA (κυκλική ή γραμμική μορφή), (γ) της φύσης του DNA (κατασκευές διαφορετικού μεγέθους/αλληλουχίας), (δ) του συστήματος και του γονιδίου επιλογής, (δ) της προηγηθείσας επεξεργασίας του DNA με περιοριστικά ένζυμα, παρουσία των αντίστοιχων ενζύμων στο μίγμα της αντίδρασης (restriction enzyme-mediated integration, REMI), και (ε) διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων κατά την επίδραση REMI. Προκειμένου να εξακριβωθεί η επίδραση των παραπάνω παραμέτρων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μετασχηματισμού του αντιπροσωπευτικού στελέχους *V. dahliae* Ls.17 ή της μεταλλαγής του *c1* (*nit1*) με διάφορες ποσότητες διαφορετικών κατασκευών DNA. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.22.

Πίνακας 3.22				
Διερεύνηση απόδοσης του μετασχηματισμού πρωτοπλαστών του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>				
Κατασκευή DNA	Ποσότητα (μg)	Στέλεχος-δέκτης	Γονίδιο επιλογής	Μέση απόδοση μετασχηματισμού ^α (αποικίες / μg DNA)
πλασμίδιο pUCATPH (κυκλική μορφή)	1	Ls.17 wt	<i>hygB</i>	22
πλασμίδιο pUCATPH (κυκλική μορφή)	3	Ls.17 wt	<i>hygB</i>	23
πλασμίδιο pUCATPH (γραμμική μορφή)	3	Ls.17 wt	<i>hygB</i>	30
πλασμίδιο pUCATPH (κυκλική μορφή)	5	Ls.17 wt	<i>hygB</i>	12
πλασμίδιο pIGPAPA (κυκλική μορφή)	5	Ls.17 wt	<i>hygB</i>	15
πλασμίδιο pBS- <i>hygB</i>	5	Ls.17 wt	<i>hygB</i>	6
πλασμίδιο pBS- <i>gen</i>	5	Ls.17 wt	<i>gen</i>	10
πλασμίδιο pUCATPH, REMI (100 units <i>HindIII</i>)	5	Ls.17 wt	<i>hygB</i>	15
πλασμίδιο pUCATPH, REMI (100 units <i>XbaI</i>)	5	Ls.17 wt	<i>hygB</i>	6
pNH24 (κυκλική μορφή)	5	Ls.17 <i>nit1</i>	<i>FoniaD</i> ^β	5,0 x 10 ²
pAN301 (κυκλική μορφή)	5	Ls.17 <i>nit1</i>	<i>AnniaD</i> ^β	2,5 x 10 ²

^α Από 3 ανεξάρτητα πειράματα για την κάθε κατασκευή DNA.

^β Γονίδια της νιτρικής αναγωγής (*niaD*) των μυκήτων *Fusarium oxysporum* (*Fo*) και *Aspergillus nidulans* (*An*), υπό τον έλεγχο των ενδογενών ρυθμιστικών περιοχών τους.

Από τα δεδομένα του Πίνακα 3.22 προκύπτει ότι με το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο μετασχηματισμού πρωτοπλαστών η ικανοποιητική απόδοση, σε σχέση με άλλους μύκητες, επιτρέπει επιτυχή πειράματα ακόμα και με χρήση 1 μg DNA ανά μετασχηματισμό. Επιπλέον, η απόδοση μετασχηματισμού ανά μg DNA ήταν αυξημένη όταν γινόταν χρήση γραμμικοποιημένων κατασκευών DNA. Με βάση τα δεδομένα αυτά, επιλέχθηκε η ποσότητα των 3 μg γραμμικοποιημένου πλασμιδιακού DNA για τα περισσότερα πειράματα μετασχηματισμού που ακολούθησαν. Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε πως τόσο το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά για την επιλογή, όσο και η φύση του πλασμιδίου (μέγεθος/αλληλουχία) επιδρούν σε κάποιον βαθμό, χωρίς όμως να θέτουν απαγορευτικούς περιορισμούς για όσους συνδυασμούς μελετήθηκαν εδώ, στην απόδοση του μετασχηματισμού. Η τεχνολογία REMI, αποδοτικότερη με χρήση του περιοριστικού ενζύμου *HindIII*, δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση της απόδοσης.

Είναι αξιοσημείωτες οι εξαιρετικά υψηλές αποδόσεις μετασχηματισμού που επιτεύχθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος-δέκτης μία μεταλλαγή *nit1* του μύκητα (ελαττωματική στην αποπρωτεΐνη της νιτρικής αναγωγής) και ετερόλογα γονίδια *niaD* (που κωδικοποιούν για τη νιτρική αναγωγή) για την επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών σε MM, σε σύγκριση με τους πλασμιδιακούς φορείς που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιμυκητιακούς παράγοντες (υγρομυκίνη B, γενετισίνη-G418). Η υψηλότερη απόδοση καταγράφηκε όταν χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pNH24 (που φέρει κλωνοποιημένο το γονίδιο *niaD* του μύκητα *Fusarium oxysporum* υπό τον έλεγχο των ενδογενών ρυθμιστικών περιοχών του), ενώ μικρότερη αλλά εξίσου σημαντική ήταν η απόδοση για το πλασμίδιο pAN301 (φέρει, αντίστοιχα, το γονίδιο *niaD* του μύκητα *Aspergillus nidulans*).

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε έντονη ανομοιογένεια στο τάχος αύξησης/εμφάνισης των μετασχηματισμένων αποικιών (Εικόνα 3.42). Η δημιουργία σταθερά

μετασηματισμένων αποικιών προϋποθέτει τον επιτυχή μετασηματισμό πρωτοπλαστών με την αντίστοιχη κατασκευή DNA, την ενσωμάτωσή του σε κάποια χρωμοσωμική θέση ως αποτέλεσμα ανασυνδυαστικών γεγονότων και την έκφραση του γονιδίου ανθεκτικότητας στον δείκτη επιλογής, η οποία προβλέπεται ότι εξαρτάται από τη χρωμοσωμική θέση εισδοχής. Συνεπώς, η υπολογιζόμενη απόδοση του μετασηματισμού αντανάκλα όλα τα παραπάνω γεγονότα, ενώ η στοχαστική φύση των διαδικασιών αντανάκλαται στην ετερογένεια των ανθεκτικών αποικιών (Εικόνα 3.42). Δειγματοληπτικός έλεγχος τυχαία επιλεγμένων μεταλλαγών έδειξε πως η πλειονότητα επρόκειτο για σταθερές μεταλλαγές με συχνές μορφολογικές διαφοροποιήσεις από τον φυσικό τύπο, υποδηλώνοντας την πιθανή χρησιμότητα της μεθόδου και ως εργαλείο ευρείας, τυχαίας μεταλλαξογένεσης εισδοχής.



Εικόνα 3.42. Ετερογένεια των ανθεκτικών αποικιών στον δείκτη επιλογής υγρομυκίνη B, κατόπιν μετασηματισμού πρωτοπλαστών του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 με το πλασμίδιο pUCATPH.

B. Ανάπτυξη συστήματος γενετικού μετασηματισμού του μύκητα V. dahliae με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας διερευνήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης κονιδίων και πρωτοπλαστών του *V. dahliae* ως εναλλακτική μέθοδος μετασηματισμού του μύκητα με πλασμιδιακό DNA. Η διαδικασία που διαμορφώθηκε από τα προκαταρκτικά πειράματα βελτιστοποίησης περιγράφεται αναλυτικά στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι». Για την επιλογή των μετασηματισμένων αποικιών ελέγχθηκε το σύστημα του δείκτη επιλογής υγρομυκίνη B (όταν χρησιμοποιήθηκε για τον μετασηματισμό το πλασμίδιο pUCATPH που φέρει το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας), και της συμπλήρωσης της αυξοτροφίας *nit1* του μύκητα με τα γονίδια νιτρικής αναγωγής (*niaD*) των μυκήτων *F. oxysporum* (στο πλασμίδιο pNH24) και *A. nidulans* (πλασμίδιο pAN301). Σε όλα τα πειράματα βελτιστοποίησης χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος-δέκτης η μεταλλαγή c1 (*nit1*- μεταλλαγμένο γονίδιο νιτρικής αναγωγής).

Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης εφαρμόστηκε επιτυχώς, με επίτευξη της μέγιστης απόδοσης μετασηματισμού όταν χρησιμοποιήθηκαν πρωτοπλάστες, χωρίς κατεργασία με PEG, και συνθήκες ηλεκτροδιάτρησης 2,5 kV/resistance, αντίσταση R1 (13 ohms), 1 kV (χωρίς χρήση ρύθμισης ηλεκτροχωρητικότητας) σε παγωμένες κυβέττες διαδρομής 0,1 cm. Με αυτές τις συνθήκες η απόδοση ήταν κατά μέσο όρο 4 μετασηματισμένες αποικίες ανά μg DNA. Όπως και στην περίπτωση του μετασηματισμού των πρωτοπλαστών με τη μέθοδο PEG/CaCl₂, έτσι και για την ηλεκτροδιάτρηση η απόδοση μετασηματισμού ήταν σημαντικά

υψηλότερη με χρήση του γονιδίου της νιτρικής αναγωγάσης για επιλογή των μετασηματισμένων αποικιών σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό MM, στην τάξη μεγέθους των μερικών δεκάδων αποικιών ανά μg DNA (με σημαντική, ωστόσο, διακύμανση μεταξύ ανεξάρτητων πειραμάτων). Παρατηρήθηκε ότι κατόπιν επίδρασης PEG στους πρωτοπλάστες η απόδοση της ηλεκτροδιάτρησης ελαττωνόταν, πιθανά λόγω σημαντικής μείωσης της βιωσιμότητας των πρωτοπλαστών. Επιπλέον, με τη βελτιστοποιημένη διαδικασία ήταν δυνατός και ο απευθείας μετασηματισμός κονιδίων με ηλεκτροδιάτρηση, με χαμηλή ωστόσο απόδοση (μικρότερη της 1 αποικίας ανά μg DNA κατά μέσο όρο).

Συμπερασματικά, η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης αναπτύχθηκε επιτυχώς ως εναλλακτικό σύστημα μετασηματισμού πρωτοπλαστών του μύκητα *V. dahliae*, με αποδόσεις χαμηλότερες σε σχέση με τη διαδικασία μέσω PEG/CaCl₂. Η μέθοδος, ωστόσο, χαρακτηρίζεται από το συγκριτικό πλεονέκτημα ότι μπορεί να εφαρμοσθεί επιτυχώς και απευθείας σε κονίδια, χωρίς την ανάγκη προετοιμασίας βιώσιμων πρωτοπλαστών. Οι δύο μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά για τη στοχευμένη δημιουργία μεταλλαγών με γονδιακές απενεργοποιήσεις (βλέπε αντίστοιχες παραγράφους στη συνέχεια του παρόντος Κεφαλαίου).

Γ. Κατασκευή μεταλλαγμένων στελεχών με γονδιακή απενεργοποίηση (*knock-out mutants*) για ομόλογα γονίδια *het* του *V. dahliae*

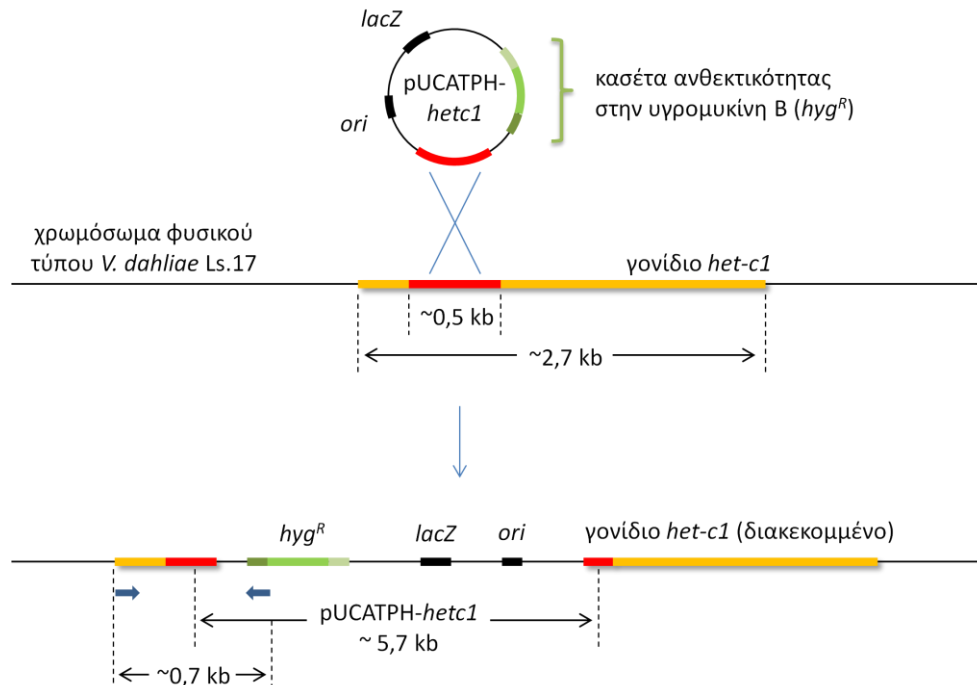
Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα συμμετοχής γονιδίων του *V. dahliae* με ομολογία προς περιγεγραμμένα γονίδια *het* άλλων μυκήτων στον έλεγχο της ετεροκαρύωσης/ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας, κρίθηκε απαραίτητη η λειτουργική διερεύνηση των επιλεγμένων γονιδίων *het-c1* (ομόλογο του *het-c* του μύκητα *N. crassa*), *het-c2* (ομόλογο του *het-c* του *P. anserina*), *un-24*, *vib-1*, *hex-1* και MAT1-2-1, μέσω της στοχευμένης δημιουργίας μεταλλαγών απενεργοποίησης (*gene knock-out*) του *V. dahliae* για τα αντίστοιχα γονίδια. Για την κατασκευή των μεταλλαγών χρησιμοποιήθηκαν δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις, εκείνη της γονδιακής διακοπής (*gene disruption*) και εκείνη της απαλοιφής (*gene deletion*), βάσει απλού ή διπλού επιχιασμού ομόλογης περιοχής, αντίστοιχα. Επιπλέον, για την προετοιμασία των κατασκευών απαλοιφής (*deletion constructs*) χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά (α) η κλασική διαδικασία διαδοχικών βημάτων υποκλωνοποίησης κατάλληλων περιοχών DNA σε πλασμιδιακό φορέα, (β) η δημιουργία κασέτας απαλοιφής με χρήση του μεταθετού στοιχείου *Entranceposon* και την επίδραση του ενζύμου μετάθεσης *MuA transposase* (Finnzymes) σε πλασμιδιακό φορέα *in vitro*, και (γ) η τεχνική OSCAR (*One-Step Construction for Agrobacterium-Ready Plasmids*), βασισμένη στη δημιουργία της επιθυμητής κατασκευής απαλοιφής με ένα βήμα κλωνοποίησης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, μέσω ανασυνδυασμού *in vitro* σε κατάλληλες θέσεις ανασυνδυασμού *att* (*att recombination site*) των επιθυμητών τμημάτων DNA (βάσει τεχνολογίας Gateway). Κατόπιν της δημιουργίας και του ελέγχου των κατάλληλων κατασκευών απαλοιφής, αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασηματισμό του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 *nit1*, είτε με προετοιμασία πρωτοπλαστών του μύκητα και μετασηματισμό αυτών με τη μέθοδο CaCl₂/PEG, είτε μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT).

Η πρώτη μέθοδος δημιουργίας της κατασκευής απενεργοποίησης (διαδοχικά βήματα υποκλωνοποίησης σε πλασμιδιακό φορέα) εφαρμόστηκε στην περίπτωση του γονιδίου *het-*

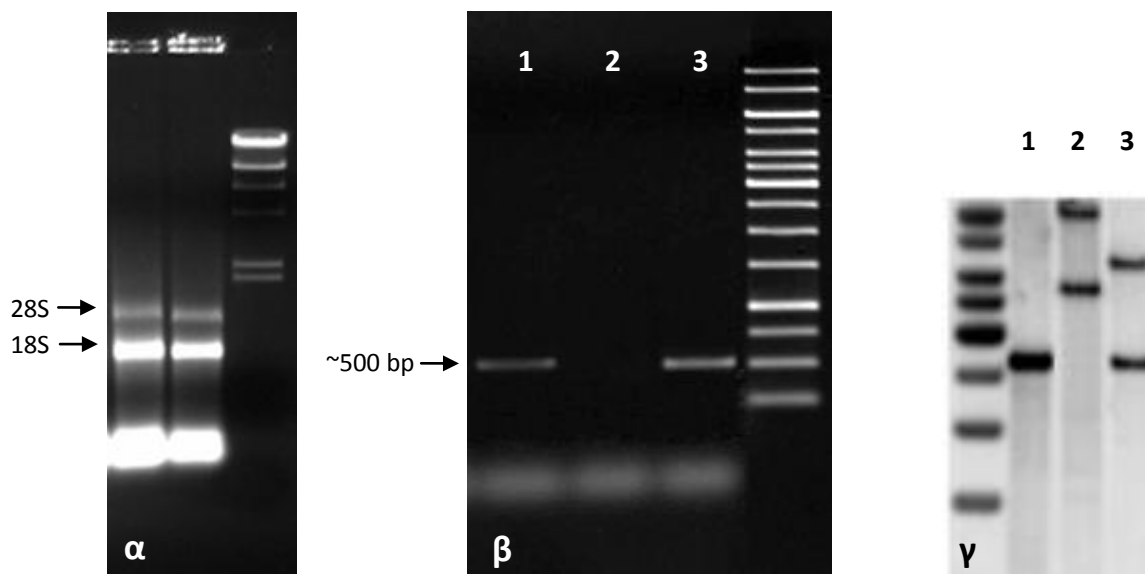
c1, με πειραματικό σχεδιασμό που περιελάμβανε τον μετασηματισμό πρωτοπλαστών του μύκητα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και τη γονιδιακή διακοπή μέσω απλού ομόλογου επιχιασμού (η δομή της κατασκευής απαλοιφής και η πειραματική πορεία παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.43). Για τον σκοπό αυτό, κλωνοποιήθηκε εσωτερικό τμήμα μεγέθους 513 bp του γονιδίου *het-c1* (κατόπιν ενίσχυσής του με PCR με τους εκκινητές NspF EcoR-NspR XhoI από ολικό DNA του στελέχους *V. dahliae* Ls.17) στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II. Αφού η ταυτότητα του ενθέματος επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση, το ένθεμα μεταφέρθηκε στο πλασμίδιο pUCATPH, το οποίο φέρει κασέτα έκφρασης του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη B υπό τον έλεγχο του υποκινητή και της τερματικής αλληλουχίας μεταγραφής του γονιδίου *trpC* του μύκητα *A. nidulans*. Αυτός ο πλασμιδιακός φορέας χρησιμοποιήθηκε για τον μετασηματισμό πρωτοπλαστών του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 *nit1*, ενώ η επιλογή των μετασηματισμένων αποικιών του μύκητα πραγματοποιήθηκε με προσθήκη υγρομυκίνης B στο θρεπτικό υλικό αναγέννησης των πρωτοπλαστών, σε συγκέντρωση 50 µg/mL (η οποία είχε βρεθεί σε προκαταρκτικά πειράματα ότι είναι επαρκής για την πλήρη καταστολή της ανάπτυξης του μύκητα *V. dahliae* στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες). Με PCR σε τυχαία επιλεγμένες ανθεκτικές αποικίες του μύκητα με τους εκκινητές VdNhetcF-PtrpCR, με τους οποίους είναι δυνατή η ενίσχυση προϊόντος 750 bp μόνον στην περίπτωση των ομόλογα ανασυνδυασμένων αποικιών, έγινε επιλογή 4 από 25 μετασηματισμένες αποικίες, στις οποίες είχε συμβεί ομόλογος ανασυνδυασμός, δηλαδή διακοπή του γονιδίου φυσικού τύπου με την παρεμβολή ολόκληρου του φορέα διακοπής λόγω απλού επιχιασμού στην ομόλογη περιοχή (Εικόνα 3.44). Η διακοπή της έκφρασης του γονιδίου επιβεβαιώθηκε με RT-PCR αντίστροφης μεταγραφής, ενώ η ομόλογη ένθεση της κατασκευής μόνον στην ομόλογη γονιδιωματική θέση αποδείχθηκε με υβριδισμό κατά Southern (σε πέψη ολικού DNA με το περιοριστικό ένζυμο *PstI*, που έχει μία θέση αναγνώρισης στον φορέα απενεργοποίησης αλλά όχι εντός του κλωνοποιημένου τμήματος του γονιδίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης DNA) (Εικόνα 3.44).

Για τη διακοπή του γονιδίου *het-c2*, για το οποίο δεν ήταν δυνατή η ενίσχυση εσωτερικού τμήματός του με σημαντικό μέγεθος (ώστε να προάγει τον ομόλογο επιχιασμό) λόγω του μικρού μεγέθους του (841 bp), εφαρμόστηκε η δεύτερη διαδικασία προετοιμασίας της κατασκευής απαλοιφής, με τη χρήση *in vitro* του μεταθετού στοιχείου Entranceroson και του ενζύμου μετάθεσης MuA transposase (Finnzymes) (η δομή της κατασκευής απαλοιφής και ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.45). Σε αυτήν την περίπτωση, ολόκληρο το γονίδιο *het-c2* ενισχύθηκε με PCR με το ζεύγος εκκινητών VdPhetcF-R από ολικό DNA του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 και το προϊόν ενίσχυσης κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II και αλληλουχίστηκε για επιβεβαίωση της ταυτότητάς του. Εν συνεχεία, η περιοχή των πρώτων 89 bp του γονιδίου απομακρύνθηκε με διπλή περιοριστική πέψη του πλασμιδίου, το οποίο επανακυκλοποιήθηκε με αντίδραση συγκόλλησης (ligation) κατόπιν μετατροπής των άκρων του σε ισοσκελή (blunt) με το ένζυμο Klenow fragment (New England Biolabs). Το νέο πλασμίδιο υποβλήθηκε σε αντίδραση μετάθεσης του μεταθετού στοιχείου Entranceroson *in vitro*, και από τους κλώνους που προέκυψαν επιλέχθηκε εκείνο το πλασμίδιο που έφερε το μεταθετό στοιχείο στη θέση 654 του γονιδίου (όπως προσδιορίστηκε κατόπιν αντιδράσεων PCR με εκκινητές εκατέρωθεν του πολυσυνδέσμου κλωνοποίησης του πλασμιδίου και εκκινητές ειδικούς για το μεταθετό στοιχείο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, και αλληλούχηση των προϊόντων ενίσχυσης). Στη συνέχεια, το τροποποιημένο τμήμα DNA μεταφέρθηκε στον φορέα γονιδιακής διακοπής pUCATPH. Ο μετασηματισμός του μύκητα και ο έλεγχος των

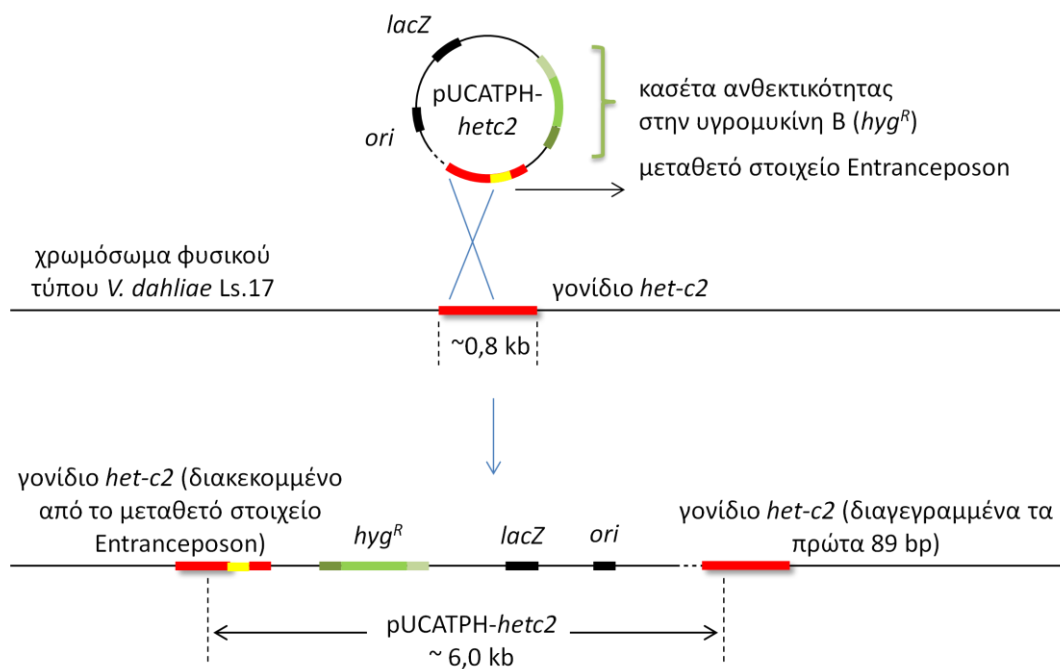
αποικιών έγινε με τον ίδιο τρόπο που παρουσιάστηκε αναλυτικά παραπάνω. Από σύνολο 34 μετασηματισμένων αποικιών του μύκητα που ελέγχθηκαν, επιλέχθηκαν 2 αποικίες για τις οποίες αποδείχθηκε η ομόλογη ένθεση (μόνον στην ομόλογη γονιδιοματική θέση) και διακοπή της έκφρασης του γονιδίου.



Εικόνα 3.43. Στρατηγική διακοπής (gene disruption) του γονιδίου *het-c1* του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 *nit1*, με απλό επιχιασμό και ομόλογη ένθεση ολόκληρου του φορέα απενεργοποίησης εντός της κωδικής περιοχής του γονιδίου φυσικού τύπου. Με κόκκινο χρώμα σημειώνεται το εσωτερικό τμήμα του γονιδίου που κλωνοποιήθηκε στον φορέα και χρησιμοποιήθηκε για την προαγωγή του επιχιασμού. Με σκούρα μπλε βέλη στο κάτω μέρος της εικόνας επισημαίνονται οι θέσεις των εκκινητών VdNhetcF-PtrpCR, με τους οποίους πραγματοποιήθηκε η σάρωση των μετασηματισμένων αποικιών για τον εντοπισμό ομόλογα ανασυνδυασμένων μεταλλαγών.



Εικόνα 3.44 (προηγούμενη σελίδα). (α) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (0,8%) ολικού RNA από το στέλεχος *V. dahliae* Ls.17 *nit1* (πρώτη διαδρομή) και από μεταλλαγή διακοπής του γονιδίου *het-c1* με ομόλογη ένθεση (gene disruption) στο προηγούμενο στέλεχος (δεύτερη διαδρομή). Στην τελευταία διαδρομή του πηκτώματος ηλεκτροφορήθηκε ο δείκτης μοριακών μεγεθών DNA λ*Hind*III (Fermentas). Επισημαίνονται οι ζώνες των άφθονων ριβοσωμικών RNAs 28S και 18S, ως ένδειξη της καλής ποιότητας του RNA. (β) Ηλεκτροφόρηση προϊόντων RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών NspFEcoR-NspRXhoI (με τους οποίους ενισχύεται ένα εσωτερικό τμήμα του γονιδίου *het-c1*, μεγέθους 513 bp). Στις διαδρομές 1-3 έχουν ηλεκτροφορηθεί, αντίστοιχα, τα προϊόντα ενίσχυσης από το στέλεχος *V. dahliae* Ls.17 *nit1*, μια μεταλλαγή διακοπής του γονιδίου *het-c1* με ομόλογη ένθεση στο προηγούμενο στέλεχος, και μια μεταλλαγή εκτοπικής ενσωμάτωσης της κατασκευής γονιδιακής διακοπής στο πρώτο στέλεχος. Στην τελευταία διαδρομή του πηκτώματος έχει ηλεκτροφορηθεί η κλίμακα μοριακών μεγεθών DNA 1 kb DNA ladder (Fermentas). (γ) Υβριδισμός κατά Southern για την επιβεβαίωση της ομόλογης ένθεσης του φορέα γονιδιακής απενεργοποίησης pUCATPH-*hetc1* στο γονίδιο *het-c1* του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 *nit1*. Στις τρεις διαδρομές έχουν ηλεκτροφορηθεί τα ίδια δείγματα, με την ίδια σειρά, όπως και στο πήκτωμα αγαρόζης της φωτογραφίας (β). Τα ολικά DNA των τριών στελεχών είχαν υποστεί πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Pst*I και ως ιχνηθέτης DNA για τον υβριδισμό χρησιμοποιήθηκε το εσωτερικό τμήμα του γονιδίου *het-c1* που ήταν κλωνοποιημένο στον φορέα γονιδιακής διακοπής pUCATPH-*hetc1*.



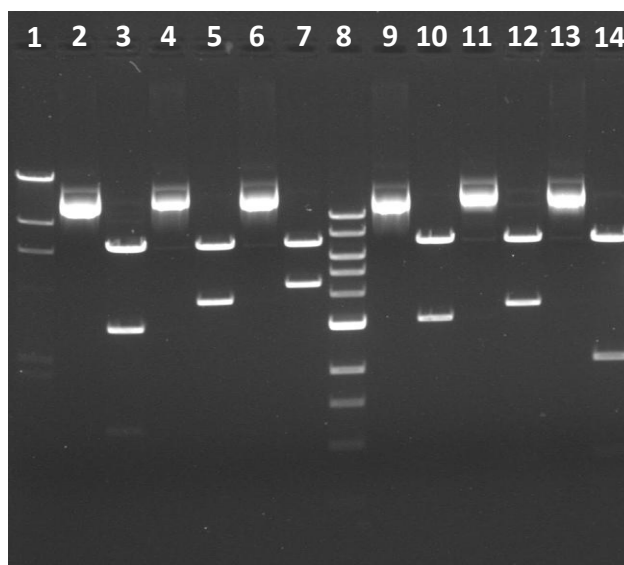
Εικόνα 3.45. Στρατηγική διακοπής (gene disruption) του γονιδίου *het-c2* του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 *nit1*, με απλό επιχιασμό και ομόλογη ένθεση ολόκληρου του φορέα απενεργοποίησης εντός της κωδικής περιοχής του γονιδίου φυσικού τύπου. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται τα τμήματα του γονιδίου *het-c2*, με κίτρινο το μεταθετό στοιχείο Entranceposon (Finnzymes) και με διακεκομμένες γραμμές η απαλοιφή ενός τμήματος (μεγέθους 89 bp) από την 5' κωδική περιοχή του γονιδίου *het-c2*.

Τόσο για τα 2 γονίδια που προαναφέρθηκαν (*het-c1* και *het-c2*), όσο και για τα *un-24*, *vib-1*, *hex-1* και *MAT1-2-1*, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική OSCAR για την αποδοτική δημιουργία κατασκευών απαλοιφής σε δυαδικούς φορείς (binary vectors), κατάλληλους τόσο για τον μετασχηματισμό πρωτοπλαστών με CaCl_2/PEG , όσο και τον μετασχηματισμό του μύκητα μέσω ATMT. Για κάθε ένα από τα 6 γονίδια σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών, ένα για κάθε μία από τις γειτονικές περιοχές του γονιδίου (αναρροϊκά και καταρροϊκά της κωδικής περιοχής), ενώ σε κάθε έναν προστέθηκε μια κατάλληλη αλληλουχία ανασυνδυασμού *att* (όλοι οι εκκινητές παρατίθενται με τις αλληλουχίες τους στον Πίνακα 2.7· στις ονομασίες των εκκινητών, τα γονίδια *het-c1*, *het-c2*, *un-24*, *vib-1*, *hex-1* και *MAT1-2-1* συμβολίζονται ως Nhc, Phc, un, vb, hx και MAT, αντίστοιχα· για κάθε γονίδιο οι εκκινητές 1 και 2 χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της 5' περιοχής και οι εκκινητές 3 και 4 για την ενίσχυση της 3' περιοχής· τέλος, οι ανασυνδυαστικές θέσεις *attB* επισημαίνονται ως B2r, B1r, B4 και B3 κατά περίπτωση). Με αυτούς τους εκκινητές ενισχύθηκε από ολικό DNA του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 ένα τμήμα μεγέθους περίπου 1 kb από την κάθε μία γειτονική περιοχή. Τα προϊόντα PCR των γειτονικών περιοχών χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια σε μια αντίδραση με κατάλληλο ένζυμο ανασυνδυασμού (BP clonase II), παρουσία ενός δυαδικού φορέα και ενός δεύτερου πλασμιδίου, δότη της κασέτας ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη B (η βελτιστοποιημένη διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.6.14 του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι»). Με αυτήν τη μέθοδο ελήφθησαν ανασυνδυασμένοι κλώνοι για όλα τα γονίδια, ενώ η δομή των πλασμιδίων επιβεβαιώθηκε αρχικά με διπλές περιοριστικές πέψεις με τον συνδυασμό ενζύμων *HindIII-KpnI* (Εικόνα 3.46), και στη συνέχεια με αντιδράσεις PCR με τα δύο ζεύγη εκκινητών OSC-F και Hyg-R(210), και Hyg-F(850) και OSC-R, σύμφωνα με τους Paz *et al.* (2011). Πλασμίδια με τη σωστή διάταξη εντοπίστηκαν σε όλες τις περιπτώσεις, με απόδοση που κυμάνθηκε στο εύρος 25-75% των ανθεκτικών κλώνων.

Οι κατασκευές απαλοιφής των 6 γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό των στελεχών *A. tumefaciens* AGL-1, EHA101 και GV3101::pMP90, με τα οποία εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 *nit1* με τη μεθοδολογία ATMT (για την περίπτωση του γονιδίου *un-24*), ή για απευθείας μετασχηματισμό πρωτοπλαστών του ίδιου στελέχους του μύκητα (για τα υπόλοιπα γονίδια). Με τη μέθοδο OSCAR, η γονιδιακή διακοπή επιτυγχάνεται μέσω διπλού ομόλογου επιχιασμού στις γειτονικές περιοχές εκατέρωθεν του γονιδίου ενδιαφέροντος (στο χρωμοσωμικό DNA) και του γονιδίου επιλογής (στην κατασκευή απαλοιφής). Για τη σάρωση με PCR των μετασχηματισμένων αποικιών του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών NspFEcor-NspRXhoI, PhcFBamH-PhcRXbaI, Vdun24FF-R, Vdvib1FF-R, Vdhex1FF-R και VdMAT12F-R, για την απαλοιφή των γονιδίων *het-c1*, *het-c2*, *un-24*, *vib-1*, *hex-1* και *MAT1-2-1*, αντίστοιχα. Αυτοί οι εκκινητές ήταν σχεδιασμένοι έτσι ώστε να αποδίδουν προϊόν ενίσχυσης PCR από εσωτερικό τμήμα του αντίστοιχου γονιδίου. Συνεπώς, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη όσες μετασχηματισμένες αποικίες του μύκητα δεν έδιναν τα αντίστοιχα προϊόντα PCR με αυτούς τους εκκινητές ούτε από το ολικό DNA ούτε από το cDNA (κατόπιν αντίστροφης μεταγραφής του ολικού RNA) τους, δηλαδή όσες ήταν ομόλογα ανασυνδυασμένες και είχε διακοπεί η έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων.

Με τη στρατηγική του διπλού ομόλογου επιχιασμού (με κάθε μία από τις γειτονικές περιοχές κάθε γονιδίου να έχει μέγεθος περίπου 1 kb) καταγράφηκαν υψηλά ποσοστά ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ των μετασχηματισμένων στελεχών, που κυμαίνονταν μεταξύ 30-70% του συνόλου των αποικιών που ελέγχθηκαν ανά γονίδιο. Για τα γονίδια *het-*

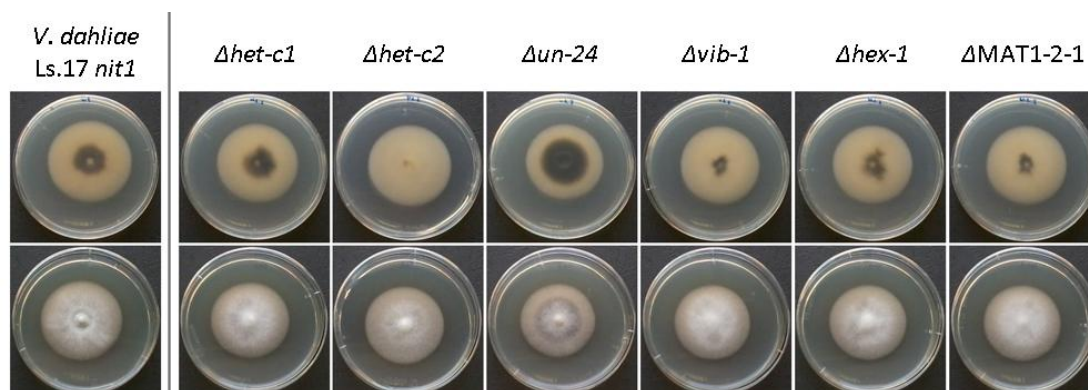
c1 και *het-c2*, που στοχεύθηκαν και με τις προαναφερθείσες στρατηγικές γονιδιακής διακοπής, ελήφθησαν μετασηματισμένες αποικίες και με τη μέθοδο διπλού επιχιασμού για γονιδιακή απαλοιφή. Η σύγκριση των μεταλλαγών με διακοπή με τις μεταλλαγές με απαλοιφή των δύο γονιδίων κατέδειξε πως τα μεταλλαγμένα στελέχη από τις δύο μεθόδους ήταν φαινοτυπικά ταυτόσημα, και για τα δύο γονίδια, επιβεβαιώνοντας πως ο φαινότυπος που μελετήθηκε δεν οφειλόταν σε πιθανό βραχύτερο πρωτεϊνικό προϊόν στην περίπτωση της γονιδιακής διακοπής. Για όσες επιλέχθηκαν για περαιτέρω φαινοτυπική μελέτη επιβεβαιώθηκε και η απουσία επιπλέον εισδοχών της κατασκευής απαλοιφής με υβριδισμούς κατά Southern (με τμήμα της κασέτας ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη B ως ιχνηθέτη). Συνολικά, για τα γονίδια *het-c1*, *het-c2*, *un-24*, *vib-1*, *hex-1* και MAT1-2-1 απομονώθηκαν 4, 3, 8, 4, 3 και 2 μεταλλαγμένα στελέχη με αντίστοιχη γονιδιακή απαλοιφή (knock-out mutants), ως αποτέλεσμα μοναδικής εισδοχής και ομόλογου γενετικού ανασυνδυασμού στα χρωμοσώματα του στελέχους *V. dahliae* Ls.17 *nit1*. Τα ηλεγμένα μεταλλαγμένα στελέχη ήταν φαινοτυπικά πανομοιότυπα μεταξύ τους για κάθε γονίδιο και, συνεπώς, στη συνέχεια θα αναφερθούν τα αποτελέσματα για ένα αντιπροσωπευτικό μεταλλαγμένο στέλεχος με απαλοιφή ανά γονίδιο.



Εικόνα 3.46. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (0,8%) των κατασκευών γονιδιακής απαλοιφής με το σύστημα OSCAR για τα γονίδια *het-c1* (θέση πηκτώματος 2), *het-c2* (θέση 4), *un-24* (θέση 6), *vib-1* (θέση 9), *hex-1* (θέση 11) και MAT1-2-1 (θέση 13). Στην επόμενη διαδρομή από κάθε μία κατασκευή έχει ηλεκτροφορηθεί η αντίστοιχη διπλή πέψη της με τα περιοριστικά ένζυμα *HindIII* και *KpnI*, από τα αποτελέσματα των οποίων διαπιστώθηκε η ορθή διάταξη των κατασκευών που προορίζονταν για διπλό ομόλογο επιχιασμό εκατέρωθεν του γονιδίου προς απαλοιφή. Στις θέσεις 1 και 8 του πηκτώματος ηλεκτροφορήθηκαν οι δείκτες μοριακών μεγεθών DNA λ*HindIII* (Fermentas) και 1 kb DNA ladder (Fermentas), αντίστοιχα.

Δ. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων στελεχών με γονιδιακή απενεργοποίηση (*knock-out mutants*) ομόλογων γονιδίων *het* του είδους *V. dahliae*

Τα μεταλλαγμένα στελέχη που φέρουν γονιδιακή απαλοιφή για κάθε ένα από τα έξι γονίδια που μελετήθηκαν (θα συμβολίζονται στο εξής ως $\Delta het-c1$, $\Delta het-c2$, $\Delta un-24$, $\Delta vib-1$, $\Delta hex-1$ και $\Delta MAT1-2-1$, αντίστοιχα) ελέγχθηκαν φαινοτυπικά, σε σύγκριση με το στέλεχος *V. dahliae* στο γενετικό υπόβαθρο του οποίου κατασκευάστηκαν (*V. dahliae* Ls.17 *nit1*), ως προς τη γενική μορφολογία της αποικίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA (τάχος ακτινωτής αύξησης, πυκνότητα εναέριων υφών, παραγωγή μικροσκληρωτίων και κάλυψη της αποικίας με χρωστική, κονιδιογένεση), τη μορφολογία των υφών σε μικροσκοπικό επίπεδο, και τη συμπεριφορά (α)-συμβατότητας με αντιπροσωπευτικά στελέχη όλων των ομάδων VCGs. Ο έλεγχος συμβατότητας πραγματοποιήθηκε με παραδοσιακές δοκιμασίες συμπληρωματικότητας των στελεχών με γονιδιακή απενεργοποίηση, με συμπληρωματικά στελέχη *nitM* των στελεχών T9, V44 (VCG 1), PH (VCG 2A), Ls.17 (VCG 2B), 70-21, PCW (VCG 3), BB (VCG 4A), V684I (VCG 4B), Ca.146 (VCG 6) και V13 (HSI) (Πίνακας 2.1) σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MM, καθώς επίσης και με τη νέα μέθοδο εκτίμησης της συμβατότητας σε υγρές μικροκαλλιέργειες, που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία (σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.5). Η μορφολογία των αποικιών όλων των μεταλλαγμένων στελεχών σε θρεπτικό υλικό PDA, σε σύγκριση με το αρχικό στέλεχος, παρατίθεται στην Εικόνα 3.47.



Εικόνα 3.47. Μορφολογία αποικιών μεταλλαγμένων στελεχών του *V. dahliae* Ls.17 *nit1* (στην αριστερή στήλη της εικόνας) με γονιδιακή απενεργοποίηση για κάθε ένα από τα γονίδια *het-c1*, *het-c2*, *un-24*, *vib-1*, *hex-1* και *MAT1-2-1*. Όλα τα στελέχη εμβολιάστηκαν σημειακά σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA και αναπτύχθηκαν στους 24°C (σκοτάδι) για 14 ημέρες. Στην επάνω σειρά παρατίθενται φωτογραφίες της οπίσθιας όψης των τρυβλίων, ενώ στην κάτω της πρόσθιας όψης.

Δ.1 Απενεργοποίηση του γονιδίου *het-c1* (ομόλογου του γονιδίου *het-c* του *N. crassa*)

Η λειτουργική απενεργοποίηση του γονιδίου *het-c1* δεν οδήγησε σε κάποια ορατή φαινοτυπική μεταβολή στη βλαστική μορφολογία και φυσιολογία, με μοναδική εξαίρεση μια μικρή αύξηση στην πυκνότητα εναέριων υφών της αποικίας σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA (χωρίς αυτή να συνοδεύεται, ωστόσο, από αλλαγή στον ρυθμό κονιδιογένεσης του στελέχους). Η συμπεριφορά συμβατότητας του μεταλλαγμένου στελέχους με όλα τα συμβατά

και ασύμβατα στελέχη ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν αμετάβλητη σε σχέση με το αρχικό στέλεχος.

Δ.2 Απενεργοποίηση του γονιδίου *het-c2* (ομόλογου του γονιδίου *het-c* του *P. anserina*)

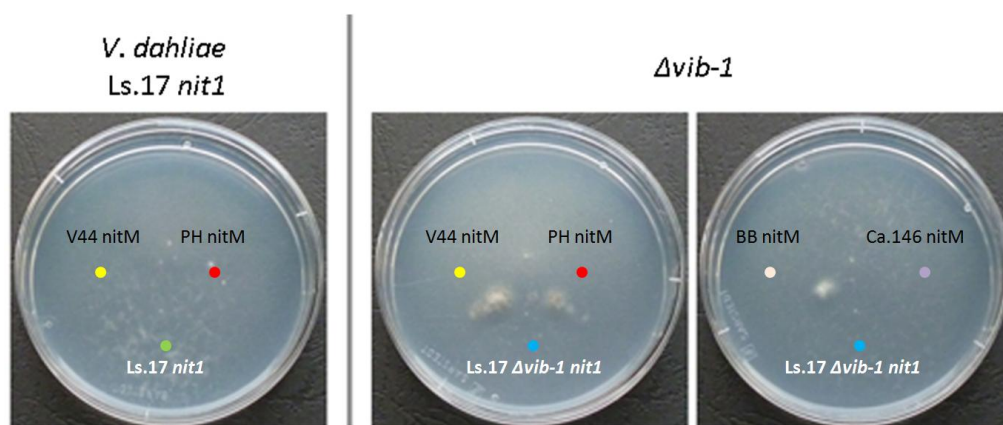
Το μεταλλαγμένο στέλεχος Δ *het-c2* επέδειξε σχεδόν αδυναμία παραγωγής μικροσκληρωτίων και χρωστικής (περιορισμένη παραγωγή παρατηρήθηκε μόνον κατόπιν παρατεταμένης επώασης για περισσότερο από 4 εβδομάδες) και μικρή ελάττωση (5% κατά μέσο όρο) στο τάχος ακτινωτής αύξησης των αποικιών του. Η πυκνότητα εναέριων υφών ήταν μικρότερη από το αρχικό στέλεχος, αλλά ο αριθμός των παραγόμενων κονιδίων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο. Σε μικροσκοπικό επίπεδο παρατηρήθηκε πως το μεταλλαγμένο στέλεχος παρουσίαζε μεγαλύτερο βαθμό διακλάδωσης στην υπο-ακραία περιοχή των υφών του σε σχέση με το αρχικό στέλεχος. Η συμπεριφορά συμβατότητας ήταν αμετάβλητη σε όλες τις περιπτώσεις.

Δ.3 Απενεργοποίηση του γονιδίου *un-24*

Η απαλοιφή του γονιδίου *un-24* οδήγησε σε σημαντικά τροποποιημένη βλαστική μορφολογία και φυσιολογία. Οι αποικίες του στελέχους χαρακτηρίζονταν από γρήγορη και ευρεία παραγωγή μικροσκληρωτίων και κάλυψη από χρωστική (το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας των αποικιών καλύπτονταν από χρωστική ήδη από το τέλος της πρώτης εβδομάδας επώασης), μικρότερο τάχος αύξησης (κατά περίπου 20% κατά μέσο όρο), μικρότερη πυκνότητα εναέριων υφών και περιορισμένη κονιδιογένεση κατά περίπου 40% σε σχέση με το αρχικό στέλεχος. Παρατηρήθηκε επιπλέον πως τα κονίδια του στελέχους Δ *un-24* εμφάνιζαν καθυστερημένη βλάστηση σε σχέση με το στέλεχος φυσικού τύπου. Ωστόσο, το μεταλλαγμένο στέλεχος δεν παρουσίασε καμία μεταβολή στη συμπεριφορά συμβατότητας με τα αντιπροσωπευτικά στελέχη ελέγχου όλων των VCGs.

Δ.4 Απενεργοποίηση του γονιδίου *vib-1*

Σημαντικές αποκλίσεις από τη βλαστική μορφολογία, αλλά και τροποποίηση της συμπεριφοράς βλαστικής συμβατότητας καταγράφηκαν για το στέλεχος Δ *vib-1*. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *vib-1* οδήγησε σε πολύ ελαττωμένη παραγωγή μικροσκληρωτίων και χρωστικής, και ελαφρώς μικρότερο τάχος αύξησης (περίπου 10%). Η πυκνότητα εναέριων υφών ήταν μεγαλύτερη και η κονιδιογένεση τουλάχιστον δεκαπλάσια από εκείνη του αρχικού στελέχους. Επιπρόσθετα, η απαλοιφή του γονιδίου *vib-1* κατέστησε το μεταλλαγμένο στέλεχος ικανό να αντιδράσει θετικά – αν και με ασθενή συμπληρωματικότητα – σε δοκιμασίες συμβατότητας με στελέχη ασύμβατα ή λιγότερο συμβατά με το αρχικό στέλεχος (*V. dahliae* V44, PH και BB). Ενδεικτικές δοκιμασίες συμπληρωματικότητας του μεταλλαγμένου στελέχους παρατίθενται στην Εικόνα **3.48**.



Εικόνα 3.48. Δοκιμασίες συμπληρωματικότητας βάσει μεταλλαγών *nit* του μεταλλαγμένου στελέχους με γονιδιακή απαλοιφή *V. dahliae* Ls.17 Δ *vib-1* σε σύγκριση με το αρχικό του στέλεχος, σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό MM. Το μεταλλαγμένο στέλεχος Ls.17 Δ *vib-1* αποδίδει θετικές αντιδράσεις συμπληρωματικότητας με τρία ασύμβατα για το Ls.17 στέλεχος, τα *V. dahliae* V44, PH και Ca.146. Οι χρωματιστές τελείες υποδεικνύουν το σημείο εμβολιασμού κάθε μιας από τις μεταλλαγές *nit* που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες συμπληρωματικότητας.

Δ.5 Απενεργοποίηση του γονιδίου *hex-1*

Το μεταλλαγμένο στέλεχος Δ *hex-1* χαρακτηρίστηκε σε μικροσκοπικό επίπεδο από καθολική απουσία των σωματίων Woronin (Woronin bodies) από τις περιοχές των σέπτων του μυκήλιου. Επιπλέον, μικροσκοπικές παρατηρήσεις με κατάλληλες χρώσεις για διάκριση των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα υφών (κυανούν του μεθυλενίου και συνδυασμός των φθοριζουσών χρωστικών διοξική φλουρεσεΐνη και ιωδιούχο προπίδιο· παράγραφος 3.3.4) κατέδειξαν συχνή νέκρωση κυττάρων των αέριων υφών, καθώς επίσης και μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων υπό νέκρωση όταν το μυκήλιο επωαζόταν σε απεσταγμένο νερό (υποτονικές συνθήκες). Σε μακροσκοπικό επίπεδο η απενεργοποίηση του γονιδίου *hex-1* οδήγησε σε μικρότερο αριθμό κονιδίων (κατά περίπου 40% κατά μέσο όρο), μικρότερο (κατά περίπου 10%) τάχος ακτινωτής αύξησης και μικρότερη δυνατότητα παραγωγής μικροσκληρωτίων και χρωστικής από το αντίστοιχο αρχικό στέλεχος του μύκητα. Καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στη συμπεριφορά συμβατότητας του μεταλλαγμένου στελέχους με το σύνολο των στελεχών ελέγχου των VCGs.

Δ.6 Απενεργοποίηση του γονιδίου MAT1-2-1

Η απενεργοποίηση του γονιδίου MAT1-2-1 δεν επέφερε καμία αλλαγή στη συμβατότητα του μεταλλαγμένου στελέχους με στελέχη ελέγχου όλων των VCGs του *V. dahliae*. Ωστόσο, καταγράφηκαν περιορισμένες μεταβολές στη γενική βλαστητική μορφολογία: ελαφρά μικρότερο (~5%) τάχος αύξησης, σχετικά μικρότερη παραγωγή μικροσκληρωτίων/χρωστικής, πυκνότερο εναέριο μυκήλιο και οριακά λιγότερη κονιδιογένεση (περίπου 10%) σε σχέση με το αρχικό στέλεχος.

Συνολικά, από τα έξι πιθανά γονίδια που εξετάστηκαν λειτουργικά στην παρούσα εργασία, το γονίδιο του συντηρημένου μεταγραφικού παράγοντα VIB-1 αποδείχθηκε πως συμμετέχει στον έλεγχο της ασυμβατότητας στον μύκητα *V. dahliae* ασκώντας κατασταλτική επίδραση στο φαινόμενο. Το ίδιο γονίδιο βρέθηκε να έχει πλειοτροπική επίδραση στη μορφολογία/φυσιολογία του μύκητα, με αρνητική ρύθμιση της κονιδιογένεσης και συμμετοχή στην παραγωγή μικροσκληρωτίων.

Με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε δεν υπήρξαν ενδείξεις για συμμετοχή των υπόλοιπων γονιδίων στον έλεγχο της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας. Ωστόσο, σημαντικές μεταβολές στη βλαστητική μορφολογία του μύκητα καταγράφηκαν για τα γονίδια *het-c2*, *un-24* και *hex-1*, με το τελευταίο ιδιαίτερα να είναι σημαντικό για τη διατήρηση της ακεραιότητας και βιωσιμότητας των άκρων των υφών και την επούλωση αυτών κατόπιν ωσμωτικής καταπόνησης. Μηδενικές έως περιορισμένες φαινοτυπικές μεταβολές για τον μύκητα *V. dahliae* επέφερε η απαλοιφή των γονιδίων *het-c1* και MAT1-2-1.

4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

4.1 Πληθυσμιακές αναλύσεις των Ομάδων Βλαστητικής Συμβατότητας (VCGs) του μύκητα *V. dahliae*

Οι μύκητες του γένους *Verticillium* είναι υπεύθυνοι για μια από τις σημαντικότερες φυτικές ασθένειες που προσβάλλει πληθώρα καλλιεργήσιμων και άλλων φυτών παγκοσμίως (Agris, 2005; Klosterman *et al.*, 2009). Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτών των μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων της εισόδου και δραστηριότητας των παθογόνων σε εσωτερικούς αγγειακούς ιστούς των φυτών μέσω της ριζοδερμίδας, της δυνατότητας για μακροχρόνια επιβίωση εκτός ξενιστή με τη μορφή διατηρητικών δομών, της απουσίας εξειδίκευσης προς συγκεκριμένους ξενιστές και της έλλειψης επιτρεπόμενων χημικών μέσων καταπολέμησης, καθιστούν τον σχεδιασμό και την εφαρμογή κατάλληλων φυτοπροστατευτικών στρατηγικών συχνά ανεπαρκείς (Pegg & Brady, 2002). Η πλημμελής κατανόηση της πληθυσμιακής βιολογίας αυτών των παθογόνων μυκήτων δυσχεραίνει σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό την αποτελεσματική αντιμετώπισή τους (Jiménez-Díaz *et al.*, 2006; Atallah *et al.*, 2011a).

Με στόχο την περιγραφή των πληθυσμών αυτών των μυκήτων σε πληθυσμιακό επίπεδο έχει αξιοποιηθεί από πολυάριθμους ερευνητές κατά την τελευταία εικοσαετία η κατάταξη των στελεχών σε Ομάδες Βλαστητικής Συμβατότητας (VCGs): αυτές βασίσθηκαν εννοιολογικά και συνδέθηκαν μεθοδολογικά με τη γνωστή ιδιότητα της ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας (HI), ειδικά στον κύριο αντιπρόσωπο *V. dahliae* (Joaquim & Rowe, 1990; Katan, 2000). Παρά την ευρεία αποδοχή και χρήση της μεθόδου για πολλά χρόνια, η χρησιμότητα των δεδομένων που προκύπτουν από την εφαρμογή της περιορίζονται τόσο από μια σειρά διαδικαστικών προβλημάτων (π.χ. ακαταλληλότητα για εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα, παραγωγή μεταλλαγών, φαινοτυπική ετερογένεια αντιδράσεων), όσο, κυρίως, και από γενετικές ασάφειες που δεν έχουν διερευνηθεί σε βάθος ποτέ μέχρι σήμερα (π.χ. ασυμφωνία με άλλες μεθόδους) (π.χ. Joaquim & Rowe, 1991; Leslie, 1993; Daayf *et al.*, 1995; Pegg & Brady, 2002). Προς την κατεύθυνση συμπλήρωσης αυτών των κενών, ιδιαίτερη έμφαση στην παρούσα εργασία δόθηκε στην ανάλυση των VCGs του *V. dahliae* σε πληθυσμιακό επίπεδο, την αναζήτηση τυχόν συσχετίσεων του συστήματος με άλλα βιολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα (παθογονικότητα, μορφολογία), την ανάπτυξη νέων μοριακών εργαλείων κατάλληλων για πρόβλεψη/διάκριση των VCGs, καθώς επίσης και τη φυλογενετική μελέτη εντός και μεταξύ αυτών.

Ο πληθυσμός *V. dahliae* από την Κρήτη που μελετήθηκε χαρακτηρίζεται από απουσία των VCGs 1, 3 και 4A, κυριαρχείται από τη VCG 4B και περιλαμβάνει επιπλέον μέλη των VCGs 2A και 2B σε χαμηλότερες και περίπου ίσες συχνότητες. Από τις VCGs που απουσιάζουν, είναι γνωστό πως η VCG 4A εξαπλώνεται μόνον στη Β. Αμερική (Dobinson *et al.*, 2000): η VCG 3 έχει αναφερθεί μόνον σπανίως στην Ελλάδα (Elena & Paplomatas, 1998) και διεθνώς: και η VCG 6 είναι μια σχετικά νεότερη ομάδα που δεν έχει μέχρι σήμερα συμπεριληφθεί στις περισσότερες πληθυσμιακές μελέτες. Όσον αφορά τη VCG 1, αν και αυτή εντοπίζεται συχνά σε άλλες μεσογειακές χώρες όπως η Ισπανία (Jiménez-Díaz *et al.*, 2006), η Τουρκία (Dervis *et al.*, 2007) και το Ισραήλ (Korolev *et al.*, 2008), σπάνια έχει αναφερθεί στην Ελλάδα (Elena, 1999; Collado-Romero *et al.*, 2006). Έτσι, μόνον στελέχη

που ανήκουν στις VCGs 2A και 2B ανιχνεύθηκαν στις δύο δυτικούς νομούς της Κρήτης, ενώ η VCG 4B βρέθηκε να επικρατεί στο ανατολικότερο άκρο. Οι τρεις υποομάδες ήταν παρούσες σε παρόμοιες συχνότητες στην ενδιάμεση περιοχή, γεγονός που ίσως υποδηλώνει σε κάποιο βαθμό μια προοδευτική γεωγραφική μετάβαση στη γενετική δομή των πληθυσμών του παθογόνου κατά μήκος του νησιού.

Ένα αξιοσημείωτο εύρημα της ανάλυσης των VCGs αυτού του πληθυσμού *V. dahliae* ήταν η ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα (71,0%) των στελεχών που επιδείκνυαν κάποιο βαθμό συμβατότητας με στελέχη ελέγχου περισσότερων της μίας ομάδας ή υποομάδας VCGs. Η ύπαρξη τέτοιων στελεχών «διασύνδεσης» (“bridging strains”) έχει αναφερθεί επανειλημμένως στη βιβλιογραφία (π.χ. Joaquim & Rowe, 1990; 1991; Strausbaugh *et al.*, 1992; Elena & Paplomatas, 1998), αν και συνήθως απουσιάζουν σχετικές ποσοτικές πληροφορίες. Διαφορετικές πιθανές εξηγήσεις στο κυτταρικό/γενετικό επίπεδο μπορούν να δοθούν για αυτόν τον τύπο των συχνά ασθενών (ή/και μη επαναλήψιμων) αντεπιδράσεων. Αυτές περιλαμβάνουν την αποτυχία των πυρήνων να μεταναστεύσουν μέσω των κυτταροπλασματικών γεφυρών αναστόμωσης, την αδυναμία για σχηματισμό πραγματικών ετεροκαρύων, δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις γονιδιακών προϊόντων στο κυτταρόπλασμα σε συσχέτιση με κυτταροπλασματικούς παράγοντες ή την «παροδική» ετεροκαρύωση (Tyras, 1983; Joaquim & Rowe, 1991). Όλες αυτές οι υποθέσεις έχουν ως κοινή βάση την απουσία πραγματικής ανταλλαγής πυρηνικού γενετικού υλικού μεταξύ των ασύμβατων εταίρων, οι οποίοι έτσι αναμένεται να παραμένουν γενετικά διακριτοί. Ωστόσο, η συχνή εμφάνιση αντιδράσεων «διασύνδεσης» δυσχεραίνει την αντικειμενική και αξιόπιστη κατάταξη σε VCGs αρκετών στελεχών του μύκητα. Αυτό το γεγονός υπογραμμίζει την ανάγκη συνδυασμού της παραδοσιακής μεθοδολογίας με περισσότερο αξιόπιστα και πληροφοριακά μοριακά εργαλεία πρόγνωσης, όπως αυτά που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία.

Όσον αφορά τη συσχέτιση του συστήματος των VCGs με άλλα χαρακτηριστικά των στελεχών, αξίζει να σημειωθεί πως η VCG 2B ήταν η μόνη ομάδα που περιελάμβανε στελέχη και των τριών παθότυπων που εντοπίστηκαν στην Κρήτη (παθότυποι τομάτας, μελιτζάνας, τομάτας-πιπεριάς). Από την άλλη πλευρά, η VCG 2A περιείχε μόνον στελέχη παθογόνα στην τομάτα. Όσον αφορά την κατανομή των φυλών της τομάτας μεταξύ των VCGs, η φυλή 2 ήταν σημαντικά περισσότερο συχνή από τη φυλή 1 εντός της VCG 4B, ενώ η φυλή 1 κυριαρχούσε στις VCGs 2A και 4B. Σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις (Zeise & von Tiedemann, 2001), τα στελέχη της VCG 2B παρήγαγαν βραχύτερα κονίδια και οι καλλιέργειές τους απαιτούσαν σημαντικά λιγότερο χρόνο για την παραγωγή σκουρόχρωμων χρωστικών και την επίτευξη της τελικής έντασης χρωστικής σε σχέση με τα μέλη των VCGs 2A και 4B. Έτσι, συγκρίνοντας τις VCGs 2A, 2B και 4B, που αποτελούν τις διεθνώς συχνότερες και πολυπληθέστερες ομάδες, τα στελέχη της VCG 2B αποτέλεσαν τη μορφολογικά περισσότερο διακριτή ομάδα, ενώ τα στελέχη των VCGs 2A και 4B ήταν στατιστικά αδιαφοροποίητα σε όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν. Αυτή η μορφολογική συνάφεια των υποομάδων VCG 2A και 4B συμφωνεί με τη μοριακή ομοιότητά τους και τη φυλογενετική τους συγγένεια, όπως αποκαλύφθηκαν στην παρούσα εργασία (βλ. παρακάτω), και αποτελεί πιθανότατα ένα μείζον σημείο που χρήζει αναθεώρησης στο υπάρχον σύστημα κατάταξης σε VCGs.

Μεταξύ των μοριακών δεικτών PCR που αναλύθηκαν και μελετήθηκαν, η περιοχή ITS1-5.8S-ITS2 αποδείχθηκε αξιοσημείωτα συντηρημένη εντός του είδους *V. dahliae*, όπως ήταν αναμενόμενο με βάση προηγούμενα ευρήματα (Pantou *et al.*, 2005; Collado-Romero *et al.*, 2008). Ωστόσο, εντοπίστηκε για πρώτη φορά εντός αυτής σημειακός νουκλεοτιδικός

πολυμορφισμός (ITS2-SNP) που αποδείχθηκε ότι αποτελεί αξιόπιστο μοριακό αποτύπωμα της VCG 2A του *V. dahliae*. Με βάση μάλιστα αυτόν τον πολυμορφισμό, αναπτύχθηκε μια διαδικασία PCR-RFLP, κατάλληλη για εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα, για τη γρήγορη και αξιόπιστη διάκριση της VCG 2A σε πληθυσμούς του μύκητα. Προς την ίδια κατεύθυνση, αναπτύχθηκαν τέσσερις νέοι μοριακοί δείκτες πολυμορφισμού βάσει της PCR, οι οποίοι επιτρέπουν τη γρήγορη σάρωση εκτεταμένων συλλογών του μύκητα για την αξιόπιστη πρόγνωση συγκεκριμένων υποομάδων VCG: (α) ο δείκτης M1 (διμορφισμός μεγέθους της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *mod-E*) για τις VCGs 2A και 4B, (β) ο δείκτης M2 (μέρος γονιδίου μιας υποθετικής πρωτεΐνης) για τη VCG 2B, (γ) ο δείκτης M3 (σχετιζόμενος με το γονίδιο *hex-1*) για τις VCGs 2B και 4A, και (δ) ο δείκτης M4 (σχετιζόμενος με το γονίδιο *het-c* και ρετρομεταθετό στοιχείο) για τις VCGs 2A, 4B και 4A. Επιπλέον, ελέγχθηκαν πολυάριθμα μη ειδικά ολιγονουκλεοτίδια σε αναλύσεις RAPD-PCR και, βάσει των αποτελεσμάτων, σχεδιάστηκαν δύο επιπλέον δείκτες SCAR για την αξιόπιστη διάκριση των στελεχών της VCG 4B (δείκτης a11) και των VCGs 2B και 4A (δείκτης a19), αντίστοιχα (και οι δύο δείκτες αφορούν διαγονιδιακές περιοχές). Ο συνδυασμός της χρήσης αυτών των εύχρηστων εργαλείων επιτρέπει την αξιόπιστη πρόβλεψη και διάκριση των VCGs 2A, 2B, 4A και 4B του *V. dahliae* σε μεγάλη κλίμακα, γεγονός το οποίο αναμένεται να διευκολύνει μελλοντικές πληθυσμιακές μελέτες. Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι οι συσχετίσεις των μοριακών δεικτών με τις VCGs του *V. dahliae* υποδηλώνουν μοριακή ομοιότητα μεταξύ των VCGs 2A και 4B, και μεταξύ των VCGs 2B και 4A, αντιθέτως με τα αναμενόμενα από τις δοκιμασίες συμπληρωματικότητας (τα στελέχη της VCG 2A είναι συχνά/μερικώς συμβατά με εκείνα της VCG 2B, και αντίστοιχες παρατηρήσεις αφορούν τις VCGs 4A και 4B). Η σχέση αυτή θα συζητηθεί εκτενέστερα στη συνέχεια, κατά την περιγραφή της φυλογενετικής ανάλυσης των VCGs. Είναι επίσης αξιοσημείωτο πως τρεις από τους τέσσερις μοριακούς δείκτες βρέθηκε να σχετίζονται με πιθανά γονίδια ετεροκαρύωσης (*het-c*, *mod-E* και *hex-1*), το οποίο χρήζει μελλοντικής έρευνας καθώς αποτελεί μια ένδειξη για πιθανή σχέση του πολυμορφισμού αυτών των γονιδίων με τον μοριακό μηχανισμό διαχωρισμού των VCGs.

Παράλληλα με την ανάπτυξη των νέων μοριακών δεικτών PCR, PCR-RFLP και SCAR που προαναφέρθηκαν, ελέγχθηκαν επιπλέον στην παρούσα εργασία γνωστοί δείκτες PCR και RAPD για την αναζήτηση συσχέτισης με φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών ή/και το σύστημα των VCGs, στον πληθυσμό που χρησιμοποιήθηκε. Ανιχνεύθηκε ικανοποιητική συσχέτιση του μοριακού δείκτη Tr1/Tr2 (σχετίζεται με την ενίσχυση τμήματος της γονιδιοματικής περιοχής B68-TV, που είναι ειδική για τη φυλή 1 της τομάτας· Usami *et al.*, 2007) με τις φυλές της τομάτας (συνολικός δείκτης αξιοπιστίας 84,4%), αν και χαμηλότερος από την σχεδόν άριστη τιμή 96,0% που αναφέρθηκε σε άλλη μελέτη με στελέχη από την Αμερική (Maruthachalam *et al.*, 2010). Δύο νέα ευρήματα εδώ ήταν: (α) ότι προϊόντα ενίσχυσης PCR με το αναμενόμενο μέγεθος παρήχθησαν από αρκετά στελέχη που δεν ήταν παθογόνα στην τομάτα, υπογραμμίζοντας έτσι πως αυτός ο μοριακός δείκτης δεν κάνει διάκριση μεταξύ στελεχών παθογόνων και μη στην τομάτα, και (β) πως η ειδική για τη φυλή 1 αλληλουχία DNA απουσιάζει γενικά από μέλη της υποομάδας VCG 4B, γεγονός που εισάγει σύγχυση στην πρόβλεψη της φυλής εντός αυτής της VCG. Συνεπώς, η χρήση του μοριακού δείκτη Tr1/Tr2 ως διαχωριστικού εργαλείου για τις φυλές της τομάτας θα πρέπει να περιορίζεται σε παθογόνους για την τομάτα πληθυσμούς του *V. dahliae*, με μικρή συχνότητα της VCG 4B. Η παρατήρηση πως το χαρακτηριστικό για τη φυλή 1 προϊόν PCR μπορεί να ενισχυθεί και από στελέχη που δεν είναι παθογόνα στην τομάτα, οδηγεί στο συμπέρασμα πως

η σχετική περιοχή DNA μάλλον δεν σχετίζεται άμεσα με τον μηχανισμό παθογονικότητας, αντιθέτως με προηγούμενη υπόθεση (Maruthachalam *et al.*, 2010).

Η εφαρμογή των δύο ειδικών για τον παθότυπο της τομάτας ζευγών εκκινητών PCR Tm5/Tm7 και 35-1/35-2 (ενισχύουν μια γονιδιωματική περιοχή πλησίον της ειδικής για τη φυλή 1 περιοχής B68-TV και τμήμα ρετρομεταθετού στοιχείου, αντίστοιχα· Usami *et al.*, 2005; 2007) παρήγαγε ικανοποιητικά αποτελέσματα για την πρόβλεψη του παθότυπου της τομάτας, με τους συνολικούς δείκτες αξιοπιστίας να φθάνουν τις τιμές 90,5% και 89,3%, αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον πως κανένας από τους δύο δείκτες δεν επέτρεψε τη διάκριση μεταξύ των παθότυπων τομάτας και τομάτας-πιπεριάς, υποδηλώνοντας έτσι ένα κοινό γενετικό υπόβαθρο των δύο. Για τον μοναδικό αντιπρόσωπο του παθότυπου πιπεριάς δεν κατέστη δυνατή η ενίσχυση χαρακτηριστικών προϊόντων PCR για τους δύο δείκτες, με αποτέλεσμα την ομαδοποίηση αυτού του στελέχους με την πλειοψηφία των μελών του παθότυπου μελιτζάνας, σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα των Koike και συνεργατών (1996). Τέλος, για τον ίδιο αντιπρόσωπο του παθότυπου πιπεριάς δεν ήταν δυνατή η λήψη του χαρακτηριστικού προϊόντος ενίσχυσης ούτε και του φερόμενου ως ειδικού για τον παθότυπο πιπεριάς μοριακού δείκτη PCR-RAPD E10. Αντιθέτως, ο έλεγχος του δείκτη οδήγησε σε θετικό αποτέλεσμα για τα πέντε μέλη της ομάδας τομάτας-πιπεριάς, καθώς επίσης και την πλειοψηφία των υπόλοιπων στελεχών της VCG 2B, το οποίο χρήζει περαιτέρω μελλοντικής μελέτης. Η επαλήθευση της συσχέτισης των προαναφερθέντων μοριακών δεικτών με τους παθότυπους και τις φυλές σε εκτεταμένους πληθυσμούς του παθογόνου θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας εναλλακτικής ταχείας και αξιόπιστης μεθοδολογίας πρόβλεψης, η οποία θα μπορούσε να συμπληρώσει ή ακόμα και να αντικαταστήσει σε κάποιο βαθμό τις παραδοσιακές χρονοβόρες δοκιμασίες μολυσματικότητας. Μια τέτοια μεθοδολογική πρόοδος αναμένεται να διευκολύνει σημαντικά την έγκαιρη διάγνωση και εφαρμογή κατάλληλων φυτοπροστατευτικών προγραμμάτων.

Η συγκριτική ανάλυση της περιοχής IGS του πυρηνικού rDNA του *V. dahliae* επέτρεψε την ανίχνευση μιας ιδιαίτερα πολυμορφικής υποπεριοχής (P), η οποία περιβάλλεται από δύο περισσότερο συντηρημένες περιοχές (C1 και C2). Αυτή η οργάνωση πιθανώς αντανακλά τις διαφορετικές λειτουργίες αυτών των υποπεριοχών. Οι περισσότερο συντηρημένες υποπεριοχές ίσως σχετίζονται με λειτουργίες που αφορούν την παραγωγή και επεξεργασία του rRNA, ενώ η πλέον πολυμορφική υποπεριοχή P πιθανώς είναι υπεύθυνη για την προαγωγή γεγονότων άνισου επιχιασμού και την ομογενοποίηση μεταξύ των συμπλόκων του rDNA (Pramateftaki *et al.*, 2000; Ganley & Kobayashi, 2011). Σε αυτές τις διαδικασίες συντονισμένης (concerted) εξέλιξης, μέσω άνισης ανταλλαγής χρωματίδων και γονιδιακής μετατροπής (Eickbush & Eickbush, 2007), είναι πιθανή η συμμετοχή των τεσσάρων τάξεων στοιχειωδών επαναλαμβανόμενων στοιχείων που ανιχνεύθηκαν (R, A, B και I), καθώς επίσης και της επαναλαμβανόμενης δομής R-A-R-B· η τελευταία αποδείχθηκε πως μπορεί να διαφέρει στον αριθμό επαναλήψεων μεταξύ διαφορετικών απλοτύπων IGS ενός στελέχους *V. dahliae*. Η εκτεταμένη ετερογένεια και η επαναλαμβανόμενη σύσταση της περιοχής IGS του *V. dahliae* θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν κατά την ανάπτυξη μοριακών δοκιμασιών για τη διάγνωση και την ποσοτικοποίηση του παθογόνου (Bilodeau *et al.*, 2012), καθώς ίσως να εισάγουν περιορισμούς στην ακρίβεια τέτοιων εργαλείων.

Με τη δομική και τη φυλογενετική ανάλυση της πολυμορφικής υποπεριοχής IGS επετεύχθη σαφής διάκριση του *V. dahliae* σε δύο ενδοειδικές εξελικτικές γραμμές (lineages), με τον κλάδο I να περιλαμβάνει τις VCGs 1, 2A, 4B και 3, ενώ ο κλάδος II περιέχει τις VCGs 2B, 4A και 6. Είναι αξιοσημείωτο πως τα στελέχη των VCGs 2A και 4B ομαδοποιήθηκαν

δομικά και φυλογενετικά (στον κλάδο I), διακριτά από τις «αδελφές» VCG υποομάδες τους 2B και 4A, αντίστοιχα. Παρομοίως, οι υποομάδες VCG 2B και 4A εντάχθηκαν από κοινού στον κλάδο II. Η σαφής διαφορετικότητα των «αδελφών» υποομάδων VCGs (VCG 2A-2B και 4A-4B), και οι στενές γενετικές σχέσεις κατά το πρότυπο VCG 2A-4B και VCG 2B-4A βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά που συζητήθηκαν ωρίτερα στο παρόν Κεφάλαιο, καθώς επίσης και με παρατηρήσεις άλλων ερευνητών (Collado-Romero *et al.*, 2006; 2008; Martin, 2010). Βάσει όλων αυτών των δεδομένων, προτείνεται πως οι κύριες παραδοσιακές ομάδες VCG 2 και 4 δεν έχουν νόημα από γενετικής άποψης και η χρήση τους σε μελλοντικές πληθυσμιακές μελέτες του *V. dahliae* θα πρέπει να επαναπροσδιορισθεί. Συνολικά, βάσει αυτών των ευρημάτων: (α) καταρρίπτεται η παραδοσιακή υπόθεση περί γενετικής ομοιογένειας εντός των VCGs του *V. dahliae*, και (β) τίθεται υπό αμφισβήτηση η υποτιθέμενη γενετική απομόνωση των VCGs· αυτά τα ευρήματα έχουν σημαντικές συνέπειες για την κατανόηση της πληθυσμιακής βιολογίας του οργανισμού.

Κανένα δομικό ή φυλογενετικό χαρακτηριστικό δεν επέτρεψε τη διάκριση μεταξύ των υποομάδων VCG 1A και 1B, όπως γενικά έχουν παρατηρήσει και άλλοι ερευνητές χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους (Collado-Romero *et al.*, 2008; Martin, 2010)· αποκαλύπτεται, επομένως, γενετική ομοιογένεια μεταξύ των δύο υποομάδων. Όσον αφορά τη VCG 3, τα δύο μοναδικά διαθέσιμα στελέχη δεν διακρίθηκαν από τον υποκλάδο VCG 2A/4B, εντός του κλάδου I. Αυτό το αποτέλεσμα πιθανώς σχετίζεται με παρατηρήσεις συχνών αντιδράσεων «διασύνδεσης» αυτών των στελεχών με τις υποομάδες της VCG 4 (Strausbaugh *et al.*, 1992 και παρούσα εργασία). Τα δεδομένα αυτά, μαζί και με τη σπανιότητα ανάκτησης τέτοιων στελεχών σε παγκόσμιο επίπεδο και την αγνόησή τους από τις περισσότερες μελέτες, συνηγορούν στη διατύπωση της υπόθεσης πως τα μέλη της VCG 3 πιθανώς αποτελούν ιδιάζοντα στελέχη *V. dahliae* με ιδιότητες «διασύνδεσης» μεταξύ άλλων ομάδων VCGs, με περιορισμένη χρησιμότητα για την πληθυσμιακή μελέτη του μύκητα.

Στον άλλο κύριο κλάδο (II) του φυλογενετικού δένδρου ομαδοποιήθηκαν οι VCGs 2B, 4A και 6. Θα πρέπει να σημειωθεί πως τα στελέχη της VCG 6 από τη γλυκιά πιπεριά (bell pepper) τοποθετήθηκαν σε κοινό κλάδο, σε μικρή φυλογενετική απόσταση από τη VCG 4A, ενώ ένα άλλο στέλεχος – φερόμενο ως μέλος της VCG 6 – από την καυτερή πιπεριά (chili pepper, από την Καλιφόρνια των ΗΠΑ· Bhat *et al.*, 2003) τοποθετήθηκε πλησίον της πλειοψηφίας των μελών της VCG 2B. Επειδή το στέλεχος αυτό (Cf.38) διέφερε από τα υπόλοιπα της VCG 6 και σε άλλα μοριακά χαρακτηριστικά (μοριακοί δείκτες που παρουσιάστηκαν προηγουμένως), η κατάταξή του στο σύστημα των VCGs επανεξετάστηκε στην παρούσα εργασία και βρέθηκε με σαφήνεια πως αποτελούσε τυπικό μέλος της VCG 2B. Ο άλλος αντιπρόσωπος της VCG 6 (Cf.162) από την καυτερή πιπεριά δεν αντιδρούσε με τα στελέχη ελέγχου καμίας VCG, και έτσι χαρακτηρίστηκε ως ετεροκαρυωτικά αυτο-ασύμβατο στέλεχος (HSI). Έτσι, στην παρούσα εργασία επαναπροσδιορίστηκε η VCG 6 ως μια μικρή ομάδα στελεχών από τη γλυκιά πιπεριά (όλα από την Καλιφόρνια), της οποίας θα πρέπει να ανακτηθούν και μελετηθούν περισσότερα στελέχη προκειμένου να μπορούν να διατυπωθούν συμπεράσματα για τη σημασία της. Πάντως, η φυλογενετική συνάφεια αυτής της ομάδας με τη VCG 4A κατά την ανάλυση της περιοχής IGS βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με τα ευρήματα κατά την αναζήτηση εσωνίων τύπου I στο γονίδιο 18S, καθώς αυτές οι δύο VCGs ήταν οι μοναδικές εντός του είδους *V. dahliae* με ένα νέο εσώνιο στην πλειοψηφία των ριβοσωμικών τους επαναλήψεων. Η γενετική ομοιότητα μεταξύ των δύο VCGs ίσως σχετίζεται με την κοινή τους γεωγραφική εξάπλωση (και τα δύο εντοπίζονται μόνον στη Β.

Αμερική· Dobinson *et al.*, 2000; Bhat *et al.*, 2003) και συνεπώς την πιθανή τους κοινή καταγωγή ή συνεξέλιξη/ανασυνδυασμό.

Παρά το γεγονός ότι η φυλογενετική ανάλυση των ομάδων VCGs του *V. dahliae*, σε συνδυασμό και με τα υπόλοιπα μοριακά δεδομένα που συγκεντρώθηκαν στην εργασία, καταδεικνύουν πως οι VCGs είναι γενετικά ετερογενείς, υπάρχει σημαντική ομοιογένεια εντός των υποομάδων VCGs (σε συμφωνία και με τους Collado-Romero *et al.*, 2006). Εξαιρέσεις σε αυτήν τη διαπίστωση αποτελούν η VCG 2B, η οποία πιθανώς είναι πολυφυλετική (έχει παρατηρηθεί και από τους Collado-Romero *et al.*, 2008; Jiménez-Gasco *et al.*, 2014), και σε μικρότερο βαθμό η VCG 4B, με ορισμένα εξαιρετικά μέλη τους να ομαδοποιούνται σε κλάδους άλλων VCGs κατά τη φυλογενετική ανάλυση. Αξίζει να σημειωθεί πως με τη χρήση της δομικής και φυλογενετικής ανάλυσης βάσει της πολυμορφικής περιοχής IGS κατέστη δυνατή, εκτός από τη μελέτη των σχέσεων εντός και μεταξύ των VCGs του *V. dahliae*, η διάκριση των τριών κύριων φυτοπαθογόνων ειδών του γένους, *V. dahliae*, *V. albo-atrum* και *V. longisporum*, με άριστη φυλογενετική υποστήριξη. Επιπλέον, αυτή η ανάλυση αποδείχθηκε πολύ χρήσιμη για επιβεβαίωση/διαλεύκανση (π.χ. για τα στελέχη «διασύνδεσης» των VCGs) και άρα για κατάταξη στελεχών σε VCGs του *V. dahliae* σε μεγάλη κλίμακα. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη, καθώς τα αποτελέσματα συμφωνούν με όλες τις μέχρι σήμερα σχετικές μελέτες βάσει αλληλούχησης πολλαπλών γονιδίων, αναλύσεων AFLP και μιτοχονδριακών απλοτύπων (Collado-Romero *et al.*, 2008; Martin, 2010; Jiménez-Gasco *et al.*, 2014). Έτσι, επαληθεύθηκε πως η ανάλυση της πολυμορφικής περιοχής IGS αποτελεί ένα άριστο εργαλείο για την ενδο- και δια-ειδική διάκριση στο γένος *Verticillium*, την πρόβλεψη της κατάταξης του *V. dahliae* σε VCGs και τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ τους.

Τα εσώνια τύπου I έχουν ανιχνευθεί στα πυρηνικά ριβοσωμικά γονίδια των rRNAs διαφόρων μυκήτων και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες διάκρισης και φυλογενετικής ανάλυσης, καθώς η κατανομή τους είναι ιδιαίτερα ακανόνιστη, ακόμα και στο ενδοειδικό επίπεδο (Hibbett, 1996; Pantou *et al.*, 2003; Hafez *et al.*, 2012). Σε αυτήν την εργασία, αντιθέτως με τις προηγούμενες υποθέσεις περί απουσίας τέτοιων εσωνίων από το *V. dahliae* (Karapara & Typas, 2001; Collins *et al.*, 2003; Inderbitzin *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2013), εντοπίστηκε ένα εσώνιο τύπου I στο γονίδιο 18S (SSU) των περισσότερων στελεχών των VCGs 4A και 6 του *V. dahliae*, υποδηλώνοντας γενετική συγγένεια μεταξύ των δύο VCGs. Η παρουσία αυτών των εσωνίων προφανώς έχει διαφύγει των προηγούμενων μελετών εξαιτίας της απουσίας ή υποεκπροσώπησης στελεχών αυτών των VCGs από τις συλλογές των μυκήτων που έχουν μελετηθεί. Το νέο εσώνιο ομοιάζει στο επίπεδο της αλληλουχίας και ταυτίζεται δομικά – εκτός από το μέγεθος δύο περιφερειακών θηλειών – με ένα αντίστοιχο εσώνιο τύπου I που έχει εντοπισθεί στην ίδια θέση του γονιδίου 18S στο συγγενικό είδος *V. longisporum* (Karapara & Typas, 2001). Σχετιζόμενα εσώνια τύπου I με διαφορά στο μέγεθος διαφόρων θηλειών έχουν ανιχνευθεί και σε άλλους οργανισμούς, παρέχοντας ενδείξεις για την πολύπλοκη εξέλιξη αυτών των στοιχείων (Michel & Westhof, 1990; Müller *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως όταν για τη σάρωση με PCR της συλλογής μυκήτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για τα εσώνια, αντί για τους εκκινητές του γονιδίου 18S, αποκαλύφθηκε μία πληθώρα εισδοχών με ποικίλη κατανομή στην ίδια θέση των επαναλήψεων του γονιδίου 18S όλων των ειδών *Verticillium* που μελετήθηκαν. Όλες αυτές οι εισδοχές βρέθηκε πως αντιστοιχούν στα δύο εσώνια τύπου I, με τη μεγαλύτερη μορφή να επικρατεί στα είδη *V. longisporum* και *V. albo-atrum*, τη μικρότερη στο *V. dahliae*, ενώ και

τα δύο ήταν παρόντα στους αντιπροσώπους των ειδών *V. tricorpus* και *V. nubilum*. Η αποτυχία της συμβατικής PCR βάσει του γονιδίου 18S για την ανίχνευση των εσώνιων αποδίδεται στην επιλεκτική φύση της ενίσχυσης στην περίπτωση των πολυαντιγραφικών στόχων· η τεχνική PCR ενισχύει αποδοτικότερα την πλειοψηφία των ανόμοιων στόχων, ειδικά όταν αυτή αποδίδει ένα βραχύτερο, χωρίς εσώνια, προϊόν ενίσχυσης. Επομένως, εσώνια παρόντα σε μειωθητικό αριθμό ριβοσωμικών επαναλήψεων μπορούν συχνά να διαφεύγουν της ανίχνευσης με συμβατικές σαρώσεις PCR του γονιδίου 18S. Έτσι κατά πάσα πιθανότητα εξηγείται η αποτυχία προηγούμενων μελετών να ανιχνεύσουν τα εσώνια του γονιδίου 18S στο *V. dahliae* και τα συγγενικά του είδη. Αυτό το εύρημα εγείρει σοβαρές αμφιβολίες όσον αφορά την ακρίβεια των μεθόδων που βασίζονται στην ανίχνευση πολυαντιγραφικών στόχων DNA για χρήση σε πληθυσμιακές μελέτες και υπογραμμίζει την προσοχή που απαιτείται κατά την ερμηνεία των αντίστοιχων αποτελεσμάτων. Η ετερογένεια ή «ετεροζυγωτία» μεταξύ των επαναλήψεων της πυρηνικής ριβοσωμικής επανάληψης και, πιο συγκεκριμένα, η ενδογονιδιωματική ποικιλομορφία για την παρουσία ή απουσία εσώνιων τύπου I έχει αναφερθεί στο παρελθόν και για άλλους μύκητες (Hibbett, 1996; Lickey *et al.*, 2003). Αυτές οι παρατηρήσεις ίσως εξηγούνται από την παροδικότητα στη διαδικασία της «αργής» ομογενοποιητικής εξέλιξης των πολυαντιγραφικών γονιδίων, τον ανασυνδυασμό μεταξύ διακριτών τύπων rDNA που ακολουθεί τον (παρα)-φυλετικό ανασυνδυασμό ή/και την κινητικότητα εσώνιων, δηλαδή μετακίνηση εσώνιων σε διαφορετικά γονίδια και είδη μέσω των μηχανισμών της εισδοχής ή της αντίστροφης συρραφής (DePriest, 1993; Haugen *et al.*, 2005; Simon *et al.*, 2005).

Με ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων σε εναλλασσόμενο πεδίο (pulsed-field gel electrophoresis· PFGE) και τεχνικές υβριδισμού DNA, ο αριθμός των επαναλήψεων του rDNA διαφόρων ζυμών και λίγων υφομυκήτων έχει προσδιορισθεί στο εύρος από περίπου 30 έως περισσότερες από 200 επαναλήψεις ανά απλοειδές γονιδίωμα (Garber *et al.*, 1988; Maleszka & Clark-Walker, 1993; Howlett *et al.*, 1997). Πρόσφατα, ο αριθμός επαναλήψεων του rDNA του *V. dahliae* εκτιμήθηκε με μια μέθοδο qPCR σχετικής ποσοτικοποίησης που βασιζόταν στην περιοχή IGS, να κυμαίνεται από 24 έως 73 επαναλήψεις ανά γονιδίωμα (Bilodeau *et al.*, 2012). Ωστόσο, οι συγγραφείς τόνισαν πως αυτές οι τιμές είναι μόνον εκτιμήσεις των πραγματικών επειδή οι αποδόσεις ενίσχυσης για την περιοχή IGS και για κάθε ένα από τα γονίδια αναφοράς (παρόντα σε ένα αντίγραφο ανά γονιδίωμα) που χρησιμοποιήσαν στους υπολογισμούς τους ήταν διαφορετικές. Μια ακριβέστερη μέθοδος που βασίζεται επίσης στην ποσοτική αντίδραση qPCR πραγματικού χρόνου είναι η απόλυτη ποσοτικοποίηση, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση του *Aspergillus fumigatus*, επιτρέποντας τον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου 18S μεταξύ διαφορετικών στελεχών του στο εύρος 38 έως 91 αντίγραφα ανά γονιδίωμα (Herrera *et al.*, 2009). Στην παρούσα εργασία, εφαρμόστηκε αυτή η μέθοδος για τον ακριβή προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων του rDNA στο είδος *V. dahliae*. Αυτός βρέθηκε να κυμαίνεται σε ένα παρόμοιο εύρος, από 39 έως 70 αντίγραφα ανά απλοειδές γονιδίωμα μεταξύ διαφορετικών στελεχών του μύκητα. Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε πως μέθοδοι ανίχνευσης που βασίζονται στην ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου είναι κατάλληλες για την ευαίσθητη και ποσοτική ανίχνευση εισδοχών που είναι παρούσες ακόμα και σε μικρούς αριθμούς επαναλήψεων του rDNA. Αυτό το εύρημα πρέπει να ισχύει και για πολλούς άλλους οργανισμούς και ίσως αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμο σε μελλοντικές μελέτες εξέλιξης των ετερογενών πολυαντιγραφικών περιοχών DNA κατά την προσαρμογή των μυκήτων σε ποικίλα μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα.

4.2 Γενετική-φυσιολογική μελέτη της ετεροκαρύωσης στον μύκητα *V. dahliae* και ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών

Για πρώτη φορά στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σε μεγάλη κλίμακα ανάλυση του σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) των μυκήτων του γένους *Verticillium*. Βρέθηκε ότι το φαινόμενο είναι ιδιαίτερα συχνό σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Η υψηλή συχνότητα που παρατηρήθηκε βρίσκεται σε συμφωνία με αναφορές για άλλους μύκητες (π.χ. *Botrytis cinerea* και *Sclerotium rolfsii*; Korolev *et al.*, 2008b; Remesal & Navas-Cortés, 2012). Είναι ενδιαφέρον πως ο σχηματισμός των ζωνών ήταν συχνός ακόμα και σε «διασταυρώσεις» των υπό δοκιμή στελεχών με τον εαυτό τους, κάτι που έχει παρατηρηθεί ξανά π.χ. στους μύκητες *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *Sclerotinia sclerotiorum* και *Rosellinia necatrix* (Page, 1961; Tariq *et al.*, 1985; McCallum *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 2011). Αν και η γενετική βάση αυτού του φαινομένου είναι άγνωστη προς το παρόν, θα μπορούσε να υποθεθεί πως αυτές οι αντιδράσεις εαυτού δεν οφείλονται απαραίτητα στην ασυμβατότητα· αντιθέτως, θα μπορούσαν να σχετίζονται με τη μειωμένη δυνατότητα που παρατηρήθηκε για πολλά στελέχη για σχηματισμό βιώσιμων αναστομάσεων, αλλά και την ικανότητα των στελεχών για παραγωγή χρωστικής. Η τελευταία παρατήρηση υποδεικνύει την ύπαρξη ενός πιθανού συνδέσμου μεταξύ της συμπεριφοράς συμβατότητας και της μορφογένεσης του μύκητα, και χρήζει μελλοντικής διερεύνησης. Η προαγωγή του σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης σε πλήρες θρεπτικό υλικό για τα είδη του *Verticillium* έρχεται σε αντίθεση με την περίπτωση του είδους *N. crassa*, όπου απαιτείται θρεπτικό υλικό πτωχό σε πηγή αζώτου για τον αποδοτικό σχηματισμό των ζωνών (Micalì & Smith, 2003). Αυτή η διαφορά υποδηλώνει πως τα γονίδια που εμπλέκονται στον σχηματισμό των ζωνών αντεπίδρασης στους δύο μύκητες βρίσκονται πιθανώς υπό τον έλεγχο διαφορετικών ρυθμιστικών μονοπατιών.

Οι μυκηλιακές αντιδράσεις δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση των ειδών του *Verticillium*, καθώς ποικίλες αναλογίες συμβατών αλληλεπιδράσεων καταγράφηκαν σχεδόν σε όλους τους διαειδικούς συνδυασμούς· αντίστοιχες παρατηρήσεις έχουν καταγραφεί για τους μύκητες *F. graminearum* και *F. pseudograminearum* (Akinsanmi *et al.*, 2008). Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκε καμία σημαντική συσχέτιση των ζωνών αντεπίδρασης με την ΗΙ για καμία από τις VCGs του *V. dahliae*, με τις ζώνες να σχηματίζονται σε σημαντικές συχνότητες τόσο εντός όσο και μεταξύ των VCGs. Ο συχνός σχηματισμός ζωνών ακόμα και εντός των VCGs υποδηλώνει πως η μυκηλιακή συμβατότητα είναι περισσότερο περιορισμένη στους πληθυσμούς του *V. dahliae* σε σχέση με την ετεροκαρυωτική συμβατότητα. Αυτή η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ των δύο υπαινίσσεται πως οι δύο διαδικασίες αποκαλύπτουν τη γενετική ποικιλότητα στους πληθυσμούς του *V. dahliae* σε διαφορετικά επίπεδα, και η ποικιλότητα των αποτελεσμάτων καταδεικνύει πως η μυκηλιακή αλληλεπίδραση πιθανώς ελέγχεται από πολλαπλούς και ίσως ποσοτικούς γενετικούς παράγοντες. Παρόμοια δεδομένα έχουν επίσης αναφερθεί για άλλους μύκητες, π.χ. *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. homoeocarpa*, *N. crassa*, *Cryphonectria parasitica* και *Botrytis cinerea* (Ford *et al.*, 1995; Micalì & Smith, 2003; Smith *et al.*, 2006; Jo *et al.*, 2008; Korolev *et al.*, 2008), υποδηλώνοντας συνολικά πως η παραδοσιακά υποτιθέμενη αναλογία μεταξύ της μυκηλιακής και της ΗΙ δεν αποτελεί γενικό κανόνα για τους ασκομύκητες.

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, η χρήση των μεταλλαγών *nit* για μελέτες κατάταξης στελεχών του μύκητα *V. dahliae* σε VCGs έχει αποκτήσει ευρεία αποδοχή και έχει εφαρμοσθεί σε πολυάριθμες εργασίες (π.χ. Joaquim & Rowe, 1991; Korolev *et al.*, 2000; Jiménez-Díaz *et al.*, 2006). Ωστόσο, οι διαθέσιμες τεχνικές για την παραγωγή και τις δοκιμασίες συμπληρωματικότητας αυτών των μεταλλαγών δεν είναι αρκετά ταχείες ή πρακτικές για εφαρμογή σε μελέτες μεγάλης κλίμακας (Leslie, 1993). Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν και περιγράφονται νέες μέθοδοι για τη γρήγορη, επαναλήψιμη και σε μεγάλη κλίμακα (high-throughput) παραγωγή μεταλλαγών *nit* κατόπιν μεταλλαξογένεσης, και για τη δοκιμασία συμπληρωματικότητας μεταξύ μεταλλαγών *nit* σε υγρές μικροκαλλιέργειες. Τόσο η φυσική (UV) όσο και η χημική (νιτροζογουανιδίνη, MNNG) μεταλλαξογένεση αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποδοτικές για την ταχεία παραγωγή μεταλλαγών από πολυάριθμα στελέχη του μύκητα. Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση της χημικής μεταλλαξογένεσης δεν προτείνεται για εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα, εξαιτίας των δυνητικών κινδύνων που ενέχει η συχνή χρήση χημικών μεταλλαξογόνων· αυτά τα προβλήματα ελαχιστοποιούνται στην περίπτωση της ακτινοβόλησης UV. Με τα βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα, τα δύο βήματα μπορούν να ολοκληρωθούν αξιόπιστα σε σημαντικά λιγότερο χρόνο σε σχέση με τις παραδοσιακές διαδικασίες. Επιπλέον, μπορούν να εφαρμοσθούν για τον ταυτόχρονο έλεγχο εκατοντάδων ανεξάρτητων «διασταυρώσεων» σε κάθε πείραμα, χωρίς την ανάγκη για ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό, επιπλέον αποθηκευτικό χώρο ή επιπρόσθετη τεχνική εμπειρία. Τα προτερήματα αυτά, μαζί με την υψηλή επαναληψιμότητα και συμφωνία με τις παραδοσιακές διαδικασίες, καθιστούν τις νέες τεχνικές κατάλληλους υποψηφίους για την κατάταξη σε VCGs εκτεταμένων πληθυσμών του *V. dahliae*, καθώς επίσης πιθανώς και άλλων μυκήτων.

Θα μπορούσε να υποθεθεί πως η διαθεσιμότητα μιας νέας μεθόδου για την κατάταξη βάσει συμπληρωματικότητας που δεν θα απαιτούσε την παραγωγή μεταλλαγών κάθε στελέχους, θα διευκόλυνε ιδιαίτερα τις πληθυσμιακές αναλύσεις. Προς αυτήν την κατεύθυνση, επινοήθηκε και εφαρμόστηκε μια νέα μέθοδος για την κατάταξη στελεχών *Verticillium* φυσικού τύπου, με τη χρήση ενός συνόλου διπλά σημασμένων στελεχών ελέγχου *nit ben^R*. Η δημιουργία σταθερών μεταλλαγών ανθεκτικότητας του μύκητα στην αντιμυκητιακή παρεμποδιστική ουσία benomyl (αποδίδεται σε μεταλλαγές του γονιδίου της β-σωληνίνης· Koenaadt *et al.*, 1992; Maymon *et al.*, 2006) αποδείχθηκε η πλέον αποδοτική και μεθοδολογικά εφικτή για εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα – με εφαρμογή μεταλλαξογένεσης UV ή MNNG – μεταξύ διαφόρων παρεμποδιστών αύξησης που ελέγχθηκαν. Βρέθηκε πως η νέα μέθοδος είναι πρακτική για εφαρμογή σε μεγάλους αριθμούς στελεχών μυκήτων και χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική επαναληψιμότητα. Περαιτέρω επαλήθευση, ωστόσο, της νέας μεθόδου σε εκτεταμένους πληθυσμούς του μύκητα και ανάλυση πιθανής συσχέτισης με άλλα βιολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *Verticillium* κρίνεται απαραίτητη πριν την ενδεχόμενη εφαρμογή της σε πληθυσμιακές μελέτες.

Είναι αρκετά ενδιαφέρον πως η κατάταξη συμπληρωματικότητας των στελεχών του *V. dahliae* με τη νέα μέθοδο διέφερε σε αξιοσημείωτο βαθμό από την παραδοσιακή κατάταξη σε VCGs με χρήση των μεταλλαγών *nit*. Η παρατήρηση αυτή επεκτείνεται στα ευρήματα από τις δοκιμασίες σύντηξης πρωτοπλαστών από αντιπροσωπευτικό σύνολο στελεχών όλων των VCGs, που απέδωσαν 40,0% περισσότερα θετικά αποτελέσματα συμπληρωματικότητας σε σχέση με την παραδοσιακή διαδικασία ελέγχου των μεταλλαγών *nit*. Η διεύρυνση του πλήθους των συμβατών συνδυασμών κατόπιν απομάκρυνσης του κυτταρικού τοιχώματος από τα κονίδια (κατά την προετοιμασία των πρωτοπλαστών) υποδηλώνει πως μέρος τουλάχιστον των φραγμών ασυμβατότητας στα είδη του γένους *Verticillium* σχετίζονται με το κυτταρικό

τοίχωμα. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έχουν γίνει ξανά στο παρελθόν για τους μύκητες του γένους *Verticillium*, σε ενδο- και δια-ειδικούς συνδυασμούς (Typas, 1983), χωρίς όμως να έχει επιχειρηθεί σύγκριση του φαινομένου με την κατάταξη σε VCGs. Επιπρόσθετα, αυτές οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στα αποτελέσματα των δοκιμασιών συμπληρωματικότητας με χρήση διαφορετικών μεθόδων/γενετικών δεικτών βρίσκονται σε συμφωνία με δύο ακόμα ευρήματα της παρούσας εργασίας: (α) την απουσία συσχέτισης μεταξύ των δοκιμασιών συμπληρωματικότητας μεταλλαγών *nit* και του σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης μεταξύ των αντίστοιχων στελεχών φυσικού τύπου *V. dahliae*, και (β) τις θετικές δοκιμασίες συμπληρωματικότητας που ελήφθησαν μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *V. dahliae* διαφορετικών VCGs (κατά το σύστημα των μεταλλαγών *nit*) όταν χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγές αυξοτροφίας αυτών σε διάφορες ουσίες (αργινίνη, μεθειονίνη, αδενίνη, θειαμίνη). Σημαντική επίδραση του τύπου των εκάστοτε γενετικών δεικτών στην κατάταξη συμβατότητας του *Verticillium* έχουν καταδείξει και προηγούμενες μελέτες, π.χ. με τη χρήση βιοχημικών μεταλλαγών αυξοτροφίας, ανθεκτικότητας σε αντιμυκητιακούς χημικούς παράγοντες, και χρωματικών μεταλλαγών μικροσκληρωτίων (Typas & Heale, 1976; Puhalla, 1979; Puhalla & Hummel, 1983; Clarkson & Heale, 1985; Joaquim & Rowe, 1990). Υπό το πρίσμα αυτών των δεδομένων, προκύπτει με σαφήνεια πως διαφορετικές μέθοδοι εκτίμησης της συμβατότητας, με χρήση διαφορετικών γενετικών δεικτών, αποδίδουν διαφορετικά αποτελέσματα ως προς την κατάταξη συμβατότητας στελεχών του *V. dahliae*. Αυτές οι διαφορές θα μπορούσαν να αποδοθούν στα διαφορετικά επίπεδα επιλεκτικής πίεσης που ασκούνται στους διαφορετικούς τύπους μεταλλαγών που χρησιμοποιούνται στις διάφορες μεθόδους. Έχει υποτεθεί στο παρελθόν πως οι φραγμοί ασυμβατότητας θα μπορούσαν σε κάποιον βαθμό να υπερκεραστούν ώστε να επιτραπεί περιορισμένη δημιουργία αναστομάσεων των υφών και δημιουργία ετεροκαρύων μόνον υπό ισχυρά επιλεκτικές συνθήκες (Hastie & Heale, 1984). Σε επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης, παλαιότερη έρευνα έχει καταδείξει πως ο παραφυλετικός ανασυνδυασμός σε επιλεκτικές συνθήκες είναι δυνατός μεταξύ στελεχών του *F. oxysporum* που είχαν ενταχθεί σε διαφορετικές VCGs με δοκιμασίες συμπληρωματικότητας των μεταλλαγών *nit* (Molnár *et al.*, 1990). Κατά συνέπεια, μια διεξοδική συγκριτική διερεύνηση των διαφορετικών μεθόδων για την εκτίμηση της βλαστητικής συμβατότητας στο *V. dahliae*, στη βάση της βιολογικής τους σημασίας, είναι καίριας σημασίας για τη διαλεύκανση της πληθυσμιακής βιολογίας και της δυναμικής αυτού του φυτοπαθογόνου μύκητα, και πιθανώς πολλών άλλων μυκήτων.

Μια ακραία προέκταση των προηγούμενων παρατηρήσεων αφορά την περίπτωση δοκιμασιών συμπληρωματικότητας κατόπιν ανάμιξης των κονιδίων των διαφορετικών στελεχών και επώασης αυτών σε νερό παρουσία γλυκόζης. Το πείραμα αυτό σχεδιάστηκε με αφορμή το εύρημα (βλ. επόμενη παράγραφο) ότι η σύντηξη των κονιδίων του *V. dahliae* γενικά επάγεται σε υψηλές συχνότητες μόνον στο νερό (παρουσία γλυκόζης ώστε να βλαστήσουν τα κονίδια), σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα θρεπτικά υλικά, όπου η σύντηξη είναι σπάνια και αμφίβολη. Είναι αξιοσημείωτο πως με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου κατέστη δυνατός ο υπερκερασμός των φραγμών ασυμβατότητας σε πολλές περιπτώσεις παραδοσιακά ασύμβατων συνδυασμών στελεχών από διαφορετικές VCGs, οδηγώντας σε εγκαθίδρυση βιώσιμων ετεροκαρύων, αν και συχνά με σποραδική εμφάνιση και ιδιόμορφη αργή ανάπτυξη. Ένα αντίστοιχο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Colletotrichum lindemuthianum*, όπου παρατηρήθηκε επίσης πως η HI καταστέλλεται κατά το στάδιο της σύντηξης των κονιδίων, επιτρέποντας τη δημιουργία βιώσιμων ετεροκαρύων, αντιθέτως με ό, τι συμβαίνει μεταξύ υφών ώριμων αποικιών των ίδιων στελεχών του μύκητα

(Ishikawa *et al.*, 2012). Δεδομένου ότι ο μύκητας *V. dahliae* κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του βρίσκεται συχνά σε περιβάλλοντα με περιοριστικές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών, το εύρημα ότι η απουσία των θρεπτικών συστατικών πιθανώς του επιτρέπει να ξεπεράσει την ΗΙ μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες για την ερμηνεία της πληθυσμιακής του συμπεριφοράς και χρήζει μελλοντικής διεξοδικότερης έρευνας.

Ένα φαινόμενο που παρατηρείται συχνά στις παραδοσιακές μελέτες κατάταξης σε VCGs με τη χρήση των μεταλλαγών *nit* είναι η σημαντική ποικιλομορφία στον βαθμό πρωτότροφης αύξησης μεταξύ διαφορετικών «διασταυρώσεων», ή ακόμα και μεταξύ ανεξάρτητων μεταλλαγών *nit* του ίδιου ζεύγους στελεχών (Joaquim & Rowe, 1990; Strausbaugh *et al.*, 1992; Daayf *et al.*, 1995; Korolev *et al.*, 2000; Jiménez-Díaz *et al.*, 2006; Göre, 2009). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις διακρίνονται εμπειρικά στις αόριστα οριζόμενες ομάδες των «ασχυρών» και «ασθενών» αντιδράσεων, με τις πρώτες να θεωρούνται ετεροκαρυωτικές και να λαμβάνονται βασικά υπόψιν για την κατάταξη στελεχών στο σύστημα των VCGs. Οι «ασθενείς» αντιδράσεις πολλές φορές αποτελούν τις συχνά απαντώμενες αντιδράσεις «διασύνδεσης» μεταξύ διαφορετικών VCGs ή υποομάδων τους, και κατά κανόνα έχουν αγνοηθεί κατά την κατάταξη στελεχών σε VCGs (Joaquim & Rowe, 1990; 1991; Elena & Paplomatas, 1998; Hiemstra & Rataj-Guranowska, 2003; Hadizadeh & Banhashemi, 2007; El-Bebany *et al.*, 2013). Αντιπροσωπευτικές «ισχυρές» και «ασθενείς» αντιδράσεις συμπληρωματικότητας αναλύθηκαν σε γενετικό επίπεδο για πρώτη φορά στην παρούσα εργασία, και βρέθηκε ότι: (α) οι «ασθενείς» αντιδράσεις μπορεί να οφείλονται σε πραγματική ετεροκαρύωση, παρομοίως με τις «ισχυρές» αποκρίσεις, και (β) τα ετεροκάρυα που προέρχονται από «ασθενείς» αλληλεπιδράσεις είναι ασταθή, με τα δυσανάλογα πυρηνικά συστατικά τους να υποστηρίζουν παροδικά την ετεροκαρυωτική πρωτότροφη αύξηση προτού διαχωρισθούν σε νέα ομοκαρυωτικά μυκήλια. Επομένως, αποκαλύπτεται η ύπαρξη μιας συνεχούς διαβάθμισης μεταξύ των σταθερών και των περισσότερο ασταθών ετεροκαρυών στο *V. dahliae*, αντί για ξεκάθαρη συμβατότητα ή ασυμβατότητα. Αυτή η ιδέα μπορεί να συνδυασθεί με τα ευρήματα που συζητήθηκαν ανωτέρω περί παροδικής καταστολής της ασυμβατότητας στο στάδιο των κονιδίων που συντήκονται όσο βρίσκονται στο νερό, αλλά και της επίδρασης της μεθόδου/γενετικού δείκτη στα αποτελέσματα της κατάταξης. Τα αποτελέσματα αυτά συνολικά εισάγουν μια χαλαρότερη θεώρηση της ασυμβατότητας ως συνάρτηση των περιβαλλοντικών συνθηκών και της επιλεκτικής πίεσης για την ετεροκαρύωση, αντί για την έννοια των απόλυτων γενετικών φραγμών. Επιπλέον, στην παρούσα εργασία ανιχνεύθηκαν ετεροκαρυωτικά αυτο-ασύμβατα στελέχη (HSI), τα οποία συμμετείχαν σε θετικές αντιδράσεις όταν δοκιμάστηκαν υπό επιλεκτική πίεση με το νέο σύστημα των διπλά σημασμένων δεικτών *nit ben^R*. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με αναφορές για αντίστοιχα στελέχη άλλων μυκήτων που εμφανίζουν δραματική ελάττωση αλλά όχι πλήρη αδυναμία σχηματισμού αναστομάσεων των υφών (Correll *et al.*, 1989; Hawthorne & Rees-George, 1996). Το πιο σημαντικό σημείο είναι πως το σύνολο αυτών των ευρημάτων υποδηλώνει την έλλειψη απόλυτων γενετικών φραγμών μεταξύ των VCGs του *V. dahliae*, γεγονός που – αν υποστηριχθεί περαιτέρω από μελλοντική έρευνα – πρόκειται πιθανώς να έχει σημαντικές συνέπειες για την ερμηνεία των δεδομένων κατάταξης των πληθυσμών του μύκητα σε VCGs.

Άλλο ένα εύρημα αυτής της εργασίας που αξίζει ίσως να μελετηθεί διεξοδικότερα στο μέλλον αποτελεί η ποικιλία των μεταλλαγών με ανθεκτικότητα στα χλωρικά ιόντα που αποκτήθηκαν, ιδίως κατόπιν επίδρασης με ακτινοβολία UV. Οι μεταλλαγές *nit3* ήταν γενικά σπάνιες στα πειράματα που παρουσιάζονται εδώ, το οποίο συμφωνεί με τις περισσότερες

αναφορές για το *V. dahliae* στα κοινά θρεπτικά υποστρώματα με χλωρικά ιόντα (Joaquim & Rowe, 1990; Strausbaugh *et al.*, 1992; Daayf *et al.*, 1995; Elena & Paplomatas, 1998; Korolev *et al.*, 2000; Jiménez-Díaz *et al.*, 2006; Göre, 2009). Μεταλλαγές που αδυνατούσαν να αναπτυχθούν σε όλες τις πηγές αζώτου που δοκιμάστηκαν εκτός από το αμμώνιο είναι πιθανώς ελαττωματικές στο γονίδιο *areA* (Min *et al.*, 2012), που αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή μεταβολισμού του αζώτου, ενώ και άλλοι σπάνιοι φαινότυποι καταγράφηκαν επίσης.

Είναι ενδιαφέρουσα η ανακάλυψη ενός αξιοσημείωτα εκτεταμένου και ειδικού για το στέλεχος εύρους ρυθμών αυτόματης επαναφοράς στην πρωτοτροφία για πολυάριθμες μεταλλαγές *nit* που ελέγχθηκαν. Όπως ήταν αναμενόμενο, βρέθηκε σημαντική επίδραση της σταθερότητας αυτών των μεταλλαγών στην αξιοπιστία των δοκιμασιών συμπληρωματικότητας, τόσο σε στερεό όσο και σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Αυτά τα δεδομένα υπογραμμίζουν την ανάγκη για προσεκτική επιλογή των κατάλληλων μεταλλαγών *nit* πριν τη χρήση τους σε μελέτες συμπληρωματικότητας μυκήτων. Επιπλέον, συγκεντρώθηκαν ενδείξεις για επιλεκτικό πλεονέκτημα του τύπου *nitM* σε σχέση με τις μεταλλαγές *nitI* σε επιλεγμένα ετεροκάρυα του *V. dahliae*. Η πιθανή σχέση αυτής της γενετικής ανισορροπίας με την αξιοπιστία των δοκιμασιών συμπληρωματικότητας αξίζει ιδιαίτερης προσοχής στη μελλοντική έρευνα.

Τέλος, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των μεθόδων μεταλλαξογένεσης με UV και MNNG, σε συνδυασμό με διάφορες γνωστές και νέες τεχνικές εμπλουτισμού, για την απομόνωση αυξότροφων μεταλλαγών σε διάφορες ουσίες, όπως αμινοξέα, πουρίνες/πυριμιδίνες και βιταμίνες. Η μέθοδος εμπλουτισμού με επίδραση υψηλής θερμοκρασίας στα βλαστημένα κονίδια του μύκητα ήταν η πλέον αποδοτική· συνεπώς, η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για την απομόνωση μεταλλαγών στα αμινοξέα αργινίνη και μεθειονίνη, την πουρίνη αδενίνη και τη βιταμίνη θειαμίνη. Οι μεταλλαγές τέτοιων τύπων εξακολουθούν να είναι πολύτιμες για την κλασική γενετική ανάλυση των μυκήτων, και ως εκ τούτου η περαιτέρω βελτίωση κατάλληλων μεθόδων εμπλουτισμού για την αποδοτική απομόνωσή τους, όπως αυτή που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, θα διευκολύνει σημαντικά αντίστοιχες μελλοντικές έρευνες.

4.3 Κυτταροβιολογική μελέτη της ετεροκαρύωσης στον μύκητα *V. dahliae*

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά συστηματική μικροσκοπική μελέτη της διαδικασίας σύντηξης των κονιδίων μέσω *σωλήνων αναστόμωσης κονιδίων* (conidial anastomosis tubes, CATs), καθώς επίσης και μιας σειράς παραμέτρων που βρέθηκε να επιδρούν σημαντικά στη συχνότητα του φαινομένου. Οι CATs του *V. dahliae* είχαν παρόμοια μορφολογικά γνωρίσματα με εκείνα των *N. crassa* (Roca *et al.*, 2005b) και *Colletotrichum* spp. (Roca *et al.*, 2003; 2004), συμπεριλαμβανομένων του μικρότερου πάχους από τους *βλαστικούς σωλήνες* (germ tubes, GTs), της πεπερασμένης δυνατότητας αύξησης, της απουσίας διακλάδωσης και της ανθεκτικότητας στον χημικό παράγοντα αποδιοργάνωσης των μικροσωληνίσκων benomyl.

Αντιθέτως όμως με τον μύκητα-μοντέλο *N. crassa*, ο οποίος απαιτεί την παρουσία θρεπτικών συστατικών για τη δημιουργία CATs και τη σύντηξη των κονιδίων μέσω αυτών, στο είδος *V. dahliae* τα θρεπτικά συστατικά όλων των θρεπτικών υλικών ανέστειλαν σε σχεδόν απόλυτο βαθμό το φαινόμενο. Από την άλλη πλευρά, η σύντηξη των κονιδίων του *V. dahliae* ήταν συχνή στο νερό (παρουσία γλυκόζης, διότι τα κονίδια του μύκητα δεν βλαστάνουν φυσιολογικά σε απεσταγμένο νερό). Άλλες διαφορές μεταξύ των δύο μυκήτων ως προς τη σύντηξη των CATs είναι: (α) νεαρά κονίδια του *N. crassa* (ηλικίας 5-6 ημερών σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό Vogel's) είναι ιδανικά για τη σύντηξη μέσω CATs, αντιθέτως με τον *V. dahliae*, στον οποίο γηραιότερα κονίδια (ηλικίας 21 ημερών σε υλικό PDA) απέδωσαν τη μεγαλύτερη συχνότητα σύντηξης· (β) η διαδικασία της σύντηξης απαιτεί περισσότερο χρόνο για να ολοκληρωθεί στον *V. dahliae* (72 h στο νερό) σε σχέση με τον *N. crassa* (5-6 h σε θρεπτικό υλικό Vogel's)· και (γ) λιγότερα κονίδια του *V. dahliae* εμπλέκονται τελικά σε συντήξεις μέσω CATs (το μέγιστο ποσοστό ήταν 35,0% για ένα στέλεχος) σε σύγκριση με τον *N. crassa*, του οποίου τα μισά περίπου κονίδια μπορούν τυπικά να συντηχθούν στο υλικό Vogel's (Roca *et al.*, 2005b). Αυτές οι διαφορές μεταξύ των δύο μυκήτων πιθανώς σχετίζονται με τη διαφορετική φυσιολογία και την οικολογική τους συμπεριφορά. Αντιθέτως με το σαπροτροφικό φυλετικό είδος *N. crassa*, το οποίο ευδοκίμει σε καμένη βλάστηση και άλλα ενδαιτήματα με σχετική πληθώρα θρεπτικών συστατικών, το αφυλετικό *V. dahliae* εκτίθεται για μεγάλο μέρος του κύκλου ζωής του σε απουσία ή ιδιαίτερα περιοριστική συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων. Η σύντηξη μεταξύ σπορίων θεωρείται ότι αυξάνει τις πιθανότητες επιτυχούς εδραίωσης μιας αποικίας, μέσω της αύξησης της αρμοστικότητας και της ανταγωνιστικότητας (Fleißner *et al.*, 2008), καθώς και του ταχύτερου αποικισμού δεδομένου υποστρώματος λόγω συνάθροισης διαφορετικών «ατόμων» (Hay, 1995; Roca *et al.*, 2003; Simonin *et al.*, 2012). Συνεπώς, ο μύκητας *V. dahliae* θα είχε σημαντικό οικολογικό όφελος από αυτήν τη διαδικασία, ιδιαίτερα στο έδαφος – εκτός των ξενιστών του – όπου τα κονίδια δεν μπορούν να επιβιώσουν για περισσότερο από μερικές εβδομάδες λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών και της αδυναμίας του μύκητα σε αυτήν τη μορφή να ανταγωνισθεί άλλους μικροοργανισμούς του εδάφους (Isaac, 1953; Pegg & Brady, 2002). Επιπλέον, ιδιαίτερα σε αφυλετικά είδη μυκήτων, όπως το *V. dahliae*, ο σχηματισμός αναστομώσεων μεταξύ γενετικά διαφορετικών «ατόμων» πιθανώς ευνοείται από τις επιλεκτικές συνθήκες, καθώς προάγει τη γενετική ποικιλότητα μέσω του

παραφυλετικού ανασυνδυασμού (Pontecorvo, 1956; Read & Roca, 2006), διαδικασία ήσσονος σημασίας για τους φυλετικούς οργανισμούς.

Αντιθέτως με τον μύκητα *N. crassa*, οι συνθήκες επαγωγής της σύντηξης μέσω CATs για τον *V. dahliae* ομοιάζουν με τις αντίστοιχες που αναφέρθηκαν για έναν άλλο φυτοπαθογόνο μύκητα, τον *Colletotrichum lindemuthianum* (Ishikawa *et al.*, 2010). Ωστόσο, ο *C. lindemuthianum* βλαστάνει ικανοποιητικά σε νερό (χωρίς προσθήκη γλυκόζης), όπου συμβαίνει και η σύντηξη με συχνότητες κατά κανόνα χαμηλότερες από 25%. Όπως βρέθηκε στην παρούσα εργασία για τον *V. dahliae*, έτσι και για τον *C. lindemuthianum* σημαντικοί παράγοντες για την επαγωγή της σύντηξης κονιδίων μέσω CATs ήταν: (α) η απουσία θρεπτικών συστατικών, (β) η μεγαλύτερη ηλικία των κονιδίων, (γ) η υψηλή συγκέντρωση των κονιδίων (υποδηλώνοντας την πιθανή συμμετοχή στη διαδικασία κάποιου άγνωστου χημειοτακτικού σηματοδοτικού μορίου), (δ) ο μεγαλύτερος χρόνος επώασης, και (ε) το στέλεχος του μύκητα. Αξίζει να σημειωθεί πως το σύνολο αυτών των συνθηκών αποκλίνει από τις βασικές για την αύξηση και διατήρηση πολλών μυκήτων στο εργαστήριο· αυτό ίσως εξηγεί αναφορές για απουσία δημιουργίας και σύντηξης CATs από ερευνητές άλλων μυκήτων, π.χ. *Aspergillus nidulans*, *Magnaporthe grisea* και *Alternaria brassicicola* (Craven *et al.*, 2008; Read *et al.*, 2010), παρότι το φαινόμενο της σύντηξης κονιδίων είναι γνωστό από πολλά χρόνια για τους ασκομύκητες (Roca *et al.*, 2005a).

Η μικροσκοπική μελέτη της πυρηνικής οργάνωσης και συμπεριφοράς με χρήση κατάλληλων φθορίζουσών χρωστικών στην περίπτωση των μεμονωμένων βλαστημένων κονιδίων κατέδειξε πως ο μοναδικός πυρήνας του κάθε κονιδίου υποβαλλόταν σε διαίρεση κατόπιν της έναρξης επιμήκυνσης του GT, και ο ένας θυγατρικός πυρήνας κατά κανόνα μετανάστευε εντός του σωλήνα του GT, ενώ ο άλλος παρέμενε εντός του κονιδίου (συντά στην αντιδιαμετρική θέση του σημείου δημιουργίας του GT). Αντιθέτως, κατά τη σύντηξη των CATs προς δημιουργίαν αλληλοσυνδεδεμένων δικτύων βλαστημένων κονιδίων αποκαλύφθηκε πολύπλοκη πυρηνική κατανομή. Πολύ συχνά στις αναστομωμένες δομές παρατηρήθηκαν κονίδια κενά πυρήνων, οι οποίοι πιθανώς είχαν μεταναστεύσει μέσω των CATs προς γειτονικά βλαστημένα κονίδια. Μάλιστα, κατέστη εφικτή η μικροσκοπική καταγραφή πυρήνων στη διαδικασία μετανάστευσης διαμέσου των CATs. Τα δεδομένα αυτά στοιχειοθετούν τη νέα για τους μύκητες του γένους *Verticillium* υπόθεση για έναρξη του παραφυλετικού κύκλου μέσω δημιουργίας ετεροκαρύων στο επίπεδο των βλαστημένων κονιδίων, μέσω των CATs. Αυτή η υπόθεση συνάδει περαιτέρω με τα ευρήματα της γενετικής ανάλυσης της συμβατότητας στην παρούσα εργασία, κατά την οποία πληθώρα ετεροκαρύων ελήφθησαν – ακόμα και από αρκετούς παραδοσιακά «ασύμβατους» συνδυασμούς – όταν τα κονίδια των διαφορετικών στελεχών αναμίχθηκαν και επώασθηκαν στο νερό, πριν την επίστρωσή τους στο επιλεκτικό θρεπτικό μέσο. Η δημιουργία ετεροκαρύων μεταξύ «ασύμβατων» στελεχών υπό αυτές τις συνθήκες φαίνεται πως βασίζεται στη σημαντική επαγωγή της σύντηξης των κονιδίων στο νερό, και ίσως ακόμα σχετίζεται με το εύρημα άλλων μελετητών ότι η ασυμβατότητα στο είδος *C. lindemuthianum* μπορεί να υπερκερασθεί στο στάδιο των βλαστημένων κονιδίων προς δημιουργία βιώσιμων ετεροκαρύων, αντιθέτως με τις υφές ώριμων αποικιών των ίδιων στελεχών (Ishikawa *et al.*, 2012).

Σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί πως η MAP κινάση Vmk1 (ομόλογη της MAP κινάσης Fus3 του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*) είναι απαραίτητη για τη μολυσματικότητα, καθώς και για τη φυσιολογική παραγωγή μικροσκληρωτίων και χρωστικής σε αποικίες του μύκητα *V. dahliae* (Rauyaree *et al.*, 2005; Πάντου, Τζίμα, Παπλωματάς και

Τύπας, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Σε αυτήν την εργασία προσδιορίστηκε επιπλέον η αναγκαιότητα λειτουργικότητας του γονιδίου *vmk1* για την αναστόμωση στον μύκητα, τόσο στο επίπεδο των βλαστημένων κονιδίων μέσω CATs, όσο και μεταξύ υφών εντός ώριμων αποικιών. Ειδικά στην περίπτωση των κονιδίων παρατηρήθηκε πως οι CATs δεν σχηματίζονταν καθόλου στο μεταλλαγμένο στέλεχος με απενεργοποιημένη τη MAP κινάση, υποδηλώνοντας πως το στάδιο της διαδικασίας σύντηξης στο οποίο συμμετέχει η κινάση είναι το αρχικό στάδιο επαγωγής (induction) της διαδικασίας. Παρόμοια συμμετοχή στην αναστόμωση έχει αποδειχθεί στο παρελθόν για τις ομόλογες MAP κινάσες MAK-2 στον μύκητα *N. crassa* (Pandey *et al.*, 2004) και AMK1 στον *Alternaria brassicicola* (Craven *et al.*, 2008), υπογραμμίζοντας έναν συντηρημένο ρόλο αυτής της MAP κινάσης στην αναστόμωση υφών στους υφομύκητες. Επιπρόσθετα, η πλειοτροπική επίδραση της MAP κινάσης του *V. dahliae* στη μορφογένεση της αποικίας, την παθογονικότητα και την αναστόμωση αποτελεί ένδειξη λειτουργικής διασύνδεσης αυτών των διαδικασιών, όπως έχει υποθεθεί στο παρελθόν και για άλλους φυτοπαθολόγους μύκητες, αλλά και με εξαιρέσεις (Zhao *et al.*, 2007; Craven *et al.*, 2008; Maerz *et al.* 2008; Fleißner, 2012).

Η οργάνωση της αποικίας του *V. dahliae* ταυτίζεται με εκείνη του *N. crassa* ως προς την παρουσία αναστομών μονών στην εσωτερική περιοχή της αποικίας (Hickey *et al.*, 2002), αλλά η μελέτη της πυρηνικής οργάνωσης – ένας πυρήνας ανά κυτταρικό διαμέρισμα – αντιτίθεται στην κατάσταση ορισμένων μυκήτων-μοντέλων όπως οι *N. crassa* και *A. nidulans*, που φέρουν πολυάριθμους πυρήνες ανά κύτταρο (Roper *et al.*, 2011). Περισσότεροι του ενός πυρήνες στο είδος *V. dahliae* παρατηρήθηκαν κατά κανόνα στα ακραία κύτταρα των υφών, τα οποία ωστόσο δεν συμμετείχαν ποτέ σε αναστομές.

Είναι ενδιαφέρον πως στους περισσότερους συνδυασμούς ασύμβατων στελεχών που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε «ανοχή» των υφών διαφορετικού γονοτύπου, οι οποίες συγχωνεύονταν στις εξωτερικές τους περιοχές και συχνά οι εσωτερικές υφές συντήκονταν μεταξύ τους. Αντιθέτως όμως με τις συμβατές συντήξεις που οδηγούσαν σε βιώσιμα ετεροκάρυα, οι ετερο-συντήξεις συνήθως οδηγούσαν τις υφές-δέκτες πυρήνα σε πορεία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ύστερα από αποκλεισμό από τις γειτονικές υφές. Αυτός ο φαινότυπος ασυμβατότητας συνάδει με το γενικό μοντέλο HI που έχει περιγραφεί για τους μύκητες-μοντέλα (Glass *et al.*, 2000; Sauré, 2000; Glass & Dementhon, 2006; Hutchison & Glass, 2012). Επιπλέον, οι υπό νέκρωση υφές σε πολλές περιπτώσεις ασύμβατων ζευγών στελεχών σχημάτιζαν δεσμίδες υφών με παχιά κυτταρικά τοιχώματα και ογκώδη κυστίδια στο εσωτερικό τους. Πιθανότατα πρόκειται ακριβώς για εκείνη τη μορφολογική αλλοίωση που οδηγεί στον μακροσκοπικά ορατό φαινότυπο των ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) σε ασύμβατους συνδυασμούς στελεχών (Esser, 2006).

Σε δύο περιπτώσεις ασύμβατων ζευγών στελεχών *V. dahliae* παρατηρήθηκε ένας εναλλακτικός φαινότυπος αμοιβαίας απώθησης υφών και διατήρησης διαηγούς ζώνης χωρίς υφές μεταξύ των αποικιών. Σε αυτήν τη διαδικασία προβλέπεται η συμμετοχή κάποιου άγνωστου διαχεόμενου μορίου-σινιάλου, που οδηγεί τα αυξανόμενα άκρα των υφών σε αλλαγή της κατεύθυνσης αύξησής τους, ώστε να μην έλθουν σε φυσική επαφή τα μυκήλια διαφορετικού γονοτύπου. Αντίστοιχη αποφυγή της αναστόμωσης με αναγνώριση του ετέρου πριν τη σύντηξη έχει αναφερθεί για ορισμένα είδη μυκήτων, όπως τα *Rhizoctonia solani* (Hyakumachi & Ui, 1987), *Gibberella fujikuroi* (Correll *et al.*, 1989), *Glomus mosseae* (Giovannetti *et al.*, 2003) και *Tuber borchii* (Sbrana *et al.*, 2007). Μελλοντική έρευνα κρίνεται απαραίτητη για τη διαλεύκανση του μηχανισμού αποφυγής πριν την επαφή, καθώς και της σχετικής σημασίας αυτής της συμπεριφοράς στην HI στο γένος *Verticillium*.

4.4 Μοριακή-λειτουργική μελέτη γονιδίων ετεροκαρύωσης στον μύκητα *V. dahliae*

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη/βελτιστοποίηση αποδοτικών συστημάτων γενετικού μετασχηματισμού του μύκητα *V. dahliae*. Προς αυτήν την κατεύθυνση, διερευνήθηκε μια σειρά παραμέτρων της κλασικής διαδικασίας προετοιμασίας πρωτοπλαστών του μύκητα και μετασχηματισμού αυτών παρουσία ιόντων Ca^{2+} και PEG. Με τη βελτιστοποιημένη διαδικασία που περιγράφεται εδώ επετεύχθησαν σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις (που ξεπέρασαν τις 30 μετασχηματισμένες αποικίες ανά μg DNA) σε σχέση με αντίστοιχες τιμές που έχουν αναφερθεί στο παρελθόν για αυτήν τη μέθοδο στο *V. dahliae* (3-5 μετασχηματισμένες αποικίες ανά μg DNA· Dobinson, 1995). Μεταξύ των παραμέτρων που δοκιμάστηκαν, η διάταξη του DNA είχε σημαντική επίδραση στην απόδοση του μετασχηματισμού (με τη γραμμική μορφή να υπερτερεί της κυκλικής μορφής των πλασμιδίων), όχι όμως και η μεθοδολογία REMI (Riggle & Kumamoto, 1998), η οποία δεν οδήγησε σε αξιόλογη περαιτέρω βελτίωση της μεθόδου. Παράλληλα, στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε νέα μεθοδολογία μετασχηματισμού του μύκητα με την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation), η οποία εφαρμόστηκε επιτυχώς τόσο στην περίπτωση πρωτοπλαστών, όσο και σε ακατέργαστα κονίδια. Οι αποδόσεις της ηλεκτροδιάτρησης ήταν γενικώς χαμηλότερες σε σχέση με τον μετασχηματισμό πρωτοπλαστών μέσω PEG/ CaCl_2 , ωστόσο η πρακτική ευκολία στον χειρισμό της – ειδικά στην περίπτωση των κονιδίων – την καθιστά χρήσιμη εναλλακτική για τη γενετική ανάλυση του *V. dahliae*. Η διαθεσιμότητα των δύο αποδοτικών μεθόδων μετασχηματισμού, μαζί και με την καθιερωμένη πλέον τεχνική μετασχηματισμού μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT; Mullins *et al.*, 2001; Santhanam, 2012), καθιστά εφικτούς πολύπλοκους γενετικούς χειρισμούς για τη διεξοδική μοριακή-γενετική μελέτη του οργανισμού.

Ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα για τα συστήματα μετασχηματισμού του *V. dahliae* ήταν οι εξαιρετικά υψηλές αποδόσεις που καταγράφηκαν όταν η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών πραγματοποιήθηκε σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό (για την αποκατάσταση αυξοτροφίας στον μεταβολισμό του αζώτου με χρήση ετερόλογων γονιδίων *nit1* στον φορέα μετασχηματισμού) σε σχέση με το πλήρες υλικό παρουσία παρεμποδιστικού παράγοντα (στην περίπτωση μετασχηματισμού με φορέα που έφερε το γονίδιο ανθεκτικότητας στον αντίστοιχο παρεμποδιστή). Η χρήση των ετερόλογων γονιδίων *nit1* για επιλογή σε ελάχιστο υλικό έχει επιπλέον τα πλεονεκτήματα ότι: (α) καταργεί την ανάγκη για χρήση χημικών ουσιών-αντιβιοτικών υψηλού κόστους, και (β) στελέχη με γονότυπο *nit1* που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αυτό το σύστημα ως στελέχη-δέκτες μετασχηματισμού μπορούν να απομονωθούν με σχετική ευκολία από τα περισσότερα στελέχη *V. dahliae* με τις παραδοσιακές μεθόδους, καθώς και με ιδιαίτερα υψηλές αποδόσεις με τις τεχνικές που βελτιστοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Ως εκ τούτου, αυτή η τεχνική αναμένεται να διευκολύνει σημαντικά μελλοντικές εφαρμογές γενετικής μηχανικής στον μύκητα.

Για την αναζήτηση πιθανών γονιδίων ετεροκαρύωσης στους μύκητες του γένους *Verticillium* χρησιμοποιήθηκαν δύο παράλληλες προσεγγίσεις, συγκεκριμένα πειραματικές (αναλύσεις PCR βάσει ετερόλογων εκκινητών και υβριδιστικές τεχνικές) και γονιδιωματικές μέθοδοι, οι οποίες επιτάχυναν σημαντικά τη διαδικασία μετά τον προσδιορισμό των

οριστικών γονιδιωματικών αλληλουχιών των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum* (ή *V. alfalfae* σύμφωνα με τους Inderbitzin *et al.*, 2011a). Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των δύο προσεγγίσεων απέδωσε την ανίχνευση μιας σειράς γονιδίων στο γένος *Verticillium* ομόλογων με περιγεγραμμένα γονίδια ετεροκαρύωσης των βασικών μυκήτων-μοντέλων *N. crassa* και *P. anserina*. Παρά το γεγονός ότι η έμφαση στην παρούσα εργασία δόθηκε στο κύριο φυτοπαθογόνο είδος *V. dahliae*, η γονιδιωματική ανάλυση έδειξε πως ομόλογα όλων των προσδιορισμένων γονιδίων υπάρχουν και στο *V. albo-atrum*, ενώ το συμπληρωματικό πειραματικό σκέλος της ανάλυσης επέτρεψε την ανίχνευση όσων γονιδίων αναζητήθηκαν και στα υπόλοιπα συγγενικά είδη *V. tricorpus*, *V. longisporum* και *V. nubilum*. Έτσι, καταδείχθηκε συντήρηση όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν σε επίπεδο πρωτεϊνικής ακολουθίας των γονιδιακών προϊόντων εντός του γένους *Verticillium*.

Στο είδος *V. dahliae* εντοπίστηκαν ομόλογα γονίδια για όλα τα μελετημένα γονίδια *het* του *N. crassa*, συμπεριλαμβανομένων των *het-c* (το ομόλογό του στον *V. dahliae* ονομάστηκε *het-c1* για διάκρισή του από το *het-c2* που είναι το ομόλογο του διαφορετικού γονιδίου *het-c* του *P. anserina*), *pin-c*, *un-24*, *het-6*, *MAT1-2-1*, *tol* και *vib-1*. Στα πρωτεϊνικά προϊόντα των ομόλογων γονιδίων του *V. dahliae* ανιχνεύθηκαν τα ίδια μοτίβα με όσα έχουν συσχετισθεί με τη λειτουργία της ΗΙ στον μύκητα *N. crassa*, με πλέον χαρακτηριστικά το μοτίβο HET στα προϊόντα των γονιδίων *pin-c*, *het-6* και *tol*, μοτίβο Het-c στην πρωτεΐνη του γονιδίου *het-c1* και μοτίβο HMG στον μεταγραφικό παράγοντα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *MAT1-2-1*. Η συντήρηση αυτών των γονιδίων φαίνεται πως είναι γενική για τους ασκομύκητες, όπως επίσης και για πολλούς βασιδιομύκητες (Pál *et al.*, 2007; van der Nest *et al.*, 2014). Για το γονίδιο *het-c1* ανιχνεύθηκε στο γονιδίωμα του *V. dahliae* και ένα μη συνδεδεμένο παράλογο γονίδιο. Αυτό ανιχνεύεται σε πολλούς ασκομύκητες, ακόμα και σε βασιδιομύκητες (van der Nest *et al.*, 2014), αν και δεν υπάρχουν ενδείξεις για συμμετοχή του στον έλεγχο της ετεροκαρύωσης σε κανέναν οργανισμό. Αντιθέτως, πάντως, με το είδος *N. crassa*, για το οποίο είναι γνωστή η στενή χρωμοσωμική σύνδεση των γονιδίων *het-c/pin-c* και *un-24/het-6*, καμία σύνδεση δεν ανιχνεύθηκε για τα ομόλογά τους στο *V. dahliae*, όπου τα αντίστοιχα γονίδια βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Αυτό αποτελεί ένδειξη πως η σύνδεση αυτών των γονιδίων, που στον φυλετικό μύκητα *N. crassa* συμβάλλει στη διατήρηση ισχυρής ανισορροπίας σύνδεσης και άρα στην αποφυγή δημιουργίας αυτο-ασύμβατων μειωτικών απογόνων (Wu *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2010), δεν έχει το ίδιο επιλεκτικό πλεονέκτημα στον *V. dahliae*. Η διαφορά ανάμεσα στα δύο είδη θα μπορούσε να οφείλεται είτε στην φυλετική φύση του *V. dahliae* και τη σπανιότητα του γονιδιωματικού ανασυνδυασμού σε σχέση με τους φυλετικούς μύκητες, είτε στην απουσία συμμετοχής των γονιδίων στον έλεγχο της ΗΙ στον *V. dahliae*.

Αντιθέτως με τη συντήρηση των συστατικών του μηχανισμού ΗΙ μεταξύ των ειδών *N. crassa* και *V. dahliae*, η κατάσταση ήταν διαφορετική για τα γονίδια *het* του μύκητα *P. anserina*. Από αυτά, σαφές ομόλογο εντοπίστηκε στο *V. dahliae* για το συντηρημένο γονίδιο *het-c* (*het-c2* στο *V. dahliae*), αλλά όχι και για την κύρια οικογένεια των γονιδίων HNWD (*het-e*, *het-d* και *het-r*). Για τα τελευταία, τα πιθανά ομόλογα (με σχετικά χαμηλά ποσοστά ομοιότητας) του *V. dahliae* έφεραν μόνον τα μοτίβα HET (τα δύο πρώτα) ή WD (το τρίτο), αλλά κανένα τον χαρακτηριστικό συνδυασμό μοτίβων HET-NACHT-WD. Με αυτά τα δεδομένα: (α) τίθεται υπό αμφισβήτηση η ύπαρξη πραγματικής ομολογίας για αυτά τα τρία γονίδια, ενώ (β) είναι αμφίβολη η συμμετοχή και του γονιδίου *het-c2* στον έλεγχο της ετεροκαρύωσης, καθώς στη σχετική λειτουργία του ομόλογού του γονιδίου στο είδος *P. anserina* εμπλέκονται μη αλληλόμορφες αλληλεπιδράσεις με τα γονίδια της οικογένειας

HNWD, που είναι απόντα στο *V. dahliae*. Επιπλέον, δεν εντοπίστηκε στο *V. dahliae* κανένα ομόλογο του γονιδίου *het-s*, που κωδικοποιεί για μια μολυσματική πρωτεΐνη-γρίον στο *P. anserina*, καθώς επίσης και κανένα ομόλογο για το γονίδιο *NWD2*, που πρόσφατα βρέθηκε πως αλληλεπιδρά με το *het-s*.

Οι δύο πλέον χαρακτηριστικές οικογένειες πρωτεϊνικών μοτίβων που έχουν συσχετισθεί με τον έλεγχο της ΗΙ είναι αυτές των προαναφερθέντων μοτίβων HET και NACHT. Το πρώτο έχει καθολική συμμετοχή σε όλα τα συστήματα που έχουν μελετηθεί (Aanen *et al.*, 2010; Hutchison & Glass, 2012), συμπεριλαμβανομένου και του είδους *Cryphonectria parasitica*, για το οποίο η πρώτη μελέτη του φαινομένου σε μοριακό επίπεδο έγινε σχετικά πρόσφατα (Choi *et al.*, 2012). Αντιθέτως, το δεύτερο συμμετέχει στα συστήματα των *P. anserina* και *C. parasitica*, αλλά όχι και του *N. crassa* (Aanen *et al.*, 2010; Hutchison & Glass, 2012; Choi *et al.*, 2012). Το μοτίβο HET ανιχνεύεται στα προϊόντα πολυάριθμων γονιδίων σε όλα τα είδη ασκομυκήτων, σε ποικίλο αριθμό (από περίπου 30 για το είδος *Sclerotinia sclerotiorum* μέχρι τουλάχιστον 130 για τα είδη *P. anserina* και *Cladonia grayi*; Bidard *et al.*, 2013; van der Nest *et al.*, 2014), που είναι γενικά πολύ μεγαλύτερος από τον προβλεπόμενο από γενετικές αναλύσεις αριθμό γονιδίων *het* (περίπου 10 γονίδια κατά μέσο όρο σε κάθε είδος; Glass & Kaneko, 2003; Aanen *et al.*, 2010). Στο γονιδίωμα του *V. dahliae* ανιχνεύθηκαν 32 γονίδια με μοτίβο HET στο πρωτεϊνικό τους προϊόν. Αντιθέτως, δεν εντοπίστηκε κανένα γονίδιο του *V. dahliae* που να κωδικοποιεί για πρωτεΐνη με μοτίβο NACHT, παρότι οι περισσότεροι ασκομύκητες (με εξαίρεση τον *N. crassa*) και επίσης λίγοι βασιδιομύκητες φέρουν πολλαπλά τέτοια γονίδια (π.χ. 21 γονίδια για τον ασκομύκητα *C. grayi* και 57 για τον βασιδιομύκητα *Laccaria bicolor*; van der Nest *et al.*, 2014). Η γενική απουσία του μοτίβου NACHT από τον μύκητα *V. dahliae* αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη για τη μη συμμετοχή του αντίστοιχου συστήματος στον έλεγχο της ΗΙ, τουλάχιστον όχι με την ίδια λειτουργία όπως στα είδη *P. anserina* και *C. parasitica*.

Από τα ομόλογα γονίδια *het* που εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του *V. dahliae* τα *het-c1*, *het-c2* και MAT1-2-1 επιλέχθηκαν για περαιτέρω δομική και πληθυσμιακή μελέτη. Το γονίδιο *het-c1* βρέθηκε πως κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη πλούσια σε γλυκίνη, όπως συμβαίνει και στον μύκητα *N. crassa* (Sauré *et al.*, 1996). Ωστόσο, αντιθέτως με τον τελευταίο, δεν βρέθηκε κανένας πολυμορφισμός στην πιθανή περιοχή καθορισμού της αλληλομορφικής ειδικότητας της πρωτεΐνης, όταν αυτή εντοπίστηκε και μελετήθηκε σε μια συλλογή στελεχών του *V. dahliae* από όλες τις VCGs. Η έλλειψη πολυμορφισμού σε αυτήν τη χαρακτηριστική περιοχή της πρωτεΐνης Het-c υποδεικνύει πιθανώς πως το γονίδιο δεν συμμετέχει στον έλεγχο της ΗΙ μεταξύ στελεχών διαφορετικών VCGs, ή πως η αλληλομορφική ειδικότητά του στον μύκητα *V. dahliae* καθορίζεται με κάποιον διαφορετικό, νέο τρόπο. Η έλλειψη πολυμορφισμού σε ομόλογα γονίδια του *het-c* έχει αναφερθεί και για άλλους μύκητες (*P. anserina*, *Fusarium proliferatum*, *Aspergillus niger*; Sauré *et al.*, 2000; Kerényi *et al.*, 2006; van Diepeningen *et al.*, 2009), και έχει οδηγήσει στη γενική πεποίθηση πως το γονίδιο *het-c*, αν και αρκετά συντηρημένο, συμμετέχει στον έλεγχο της ΗΙ μόνον στο γένος *Neurospora* και σε συγγενικά γένη μυκήτων (Hall *et al.*, 2010).

Η δομική μελέτη του πρωτεϊνικού προϊόντος του γονιδίου *het-c2*, το οποίο κωδικοποιεί για έναν συντηρημένο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς κυτταροπλασματικό μεταφορέα γλυκολιπιδίων (Sauré *et al.*, 1994), επέτρεψε – μέσω δομικής μοντελοποίησης βάσει ομολογίας (homology modeling) – την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της ομόλογης πρωτεΐνης του *V. dahliae* με άριστη τιμή αξιοπιστίας. Με τη μελέτη του μοντέλου κατέστη εφικτός ο προσδιορισμός δύο διακριτών περιοχών, δηλαδή: (α) ενός πιθανού κέντρου

«αναγνώρισης» πολικών κεφαλών γλυκολιπιδίων, και (β) μιας υδρόφοβης κοιλότητας κατάλληλης για τη φιλοξενία των μη πολικών υδρογονανθρακικών αλυσίδων τους, σε πλήρη συμφωνία με τα ευρήματα μιας δομικής μελέτης της ομόλογης πρωτεΐνης του *P. anserina* (Kenoth *et al.*, 2010). Εκτός από την πρόβλεψη για διατήρηση του ρόλου μεταφοράς γλυκολιπιδίων στο είδος *V. dahliae*, η δομική μελέτη εδώ επέτρεψε επιπλέον τον εντοπισμό των πιθανών θέσεων πολυμορφισμού – με βάση όλα τα δεδομένα για τον φυσικό πολυμορφισμό του γονιδίου στους πληθυσμούς του *P. anserina* (Sauré *et al.*, 1995a; Bastiaans *et al.*, 2014) – στην επιφάνεια της υποθετικής πρωτεΐνης του *V. dahliae*. Αυτή η περιοχή του πρωτεϊνικού μορίου είναι πιθανώς κατάλληλη για συμμετοχή σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στον έλεγχο της ΗΙ, ανεξάρτητα από την άλλη λειτουργία της πρωτεΐνης. Παρά ταύτα, τα αποτελέσματα της πληθυσμιακής μελέτης του γονιδίου σε αντιπροσώπους όλων των VCGs του *V. dahliae* δεν υποστήριξαν μια τέτοια πιθανότητα σε αυτό το είδος· σχεδόν μηδενικά επίπεδα πολυμορφισμού ανιχνεύθηκαν στο επίπεδο της πρωτεϊνικής ακολουθίας μεταξύ των διαφορετικών VCGs. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, δεν δικαιολογείται πιθανή συμμετοχή του γονιδίου *het-c2* στον έλεγχο της ασυμβατότητας μεταξύ των VCGs του *V. dahliae*, τουλάχιστον όχι με τον ίδιο μηχανισμό όπως συμβαίνει στον μύκητα *P. anserina*.

Εκτός από τη συμμετοχή τους στις διαδικασίες που σχετίζονται με τη φυλετική σύζευξη, τα γονίδια συζευκτικού τύπου είναι επίσης γνωστό πως ελέγχουν την ΗΙ σε έναν αριθμό μυκήτων, συμπεριλαμβανομένου του *N. crassa* (Shiu & Glass, 1999). Σε αυτόν τον οργανισμό, όταν δύο «άτομα» αντίθετου συζευκτικού τύπου έλθουν σε βλαστητική επαφή, πυροδοτείται μια αντίδραση ασυμβατότητας και τα ετεροκάρυά τους καταστρέφονται (Glass *et al.*, 2000). Οι μύκητες *V. dahliae* και *V. albo-atrum*, αν και θεωρούμενοι ως αφυλετικοί, φέρουν γονίδια συζευκτικού τύπου στα γονιδιώματά τους (ιδιόμορφα MAT1-2-1 και MAT1-1-1, αντίστοιχα, για τα στελέχη *V. dahliae* Ls.17 και *V. albo-atrum* Ms.102, αντίστοιχα· Usami *et al.*, 2009; Klosterman *et al.*, 2011). Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη διερεύνηση της κατανομής των γονιδίων συζευκτικού τύπου μεταξύ των VCGs του αφυλετικού είδους *V. dahliae*. Όλες οι VCGs βρέθηκε ότι περιλαμβάνουν στελέχη που φέρουν το ιδιόμορφο MAT1-2-1, με την εξαίρεση της VCG 6, η οποία περιείχε στελέχη και των δύο τύπων. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν πως το ιδιόμορφο MAT1-2-1 είναι κυρίαρχο στους πληθυσμούς του *V. dahliae* (σε συμφωνία με τους Usami *et al.*, 2009 και Inderbitzin *et al.*, 2011b) και ότι η κατανομή των ιδιομόρφων συζευκτικού τύπου δεν σχετίζεται με την κατάταξη των στελεχών σε VCGs. Συνεπώς, το γονίδιο συζευκτικού τύπου δεν αναμένεται να κωδικοποιεί για κάποιον φραγμό ασυμβατότητας μεταξύ των VCGs του *V. dahliae*, όπως βρέθηκε και για τα *het-c1* και *het-c2*.

Η λειτουργική ανάλυση των έξι γονιδίων MAT1-2-1, *het-c1*, *het-c2*, *un-24*, *vib-1* και *hex-1* (κωδικοποιεί για την κύρια πρωτεΐνη του σωματίου Woronin, που πιθανώς εμπλέκεται στην απόφραξη των πόρων των σέπτων κατόπιν της πυροδότησης αντίδρασης ασυμβατότητας· Dhavale & Jedd, 2007; Son *et al.*, 2013) με την κατασκευή αντίστοιχων μεταλλαγμένων στελεχών του μύκητα *V. dahliae* με γονιδιακή απενεργοποίηση (knock-out mutant) του κάθε γονιδίου κρίθηκε απαραίτητη για τη διαλεύκανση της πιθανότητας συμμετοχής αυτών των γονιδίων στον έλεγχο της ΗΙ στον μύκητα, σε συσχέτιση με το σύστημα των VCGs. Αυτή είναι η πρώτη λειτουργική μελέτη της πιθανής συμμετοχής των πέντε εκ των έξι γονιδίων (εκτός από το *het-c1*) στον έλεγχο της ΗΙ σε άλλον μύκητα πέραν των μυκήτων-μοντέλων στους οποίους έχουν μελετηθεί αρχικά, δηλαδή *N. crassa* και *P.*

anserina (Sauré *et al.*, 1994; 1996; Glass *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000; Xiang & Glass, 2002; 2004; Dementhon *et al.*, 2006; Dhavale & Jedd, 2007; Lafontaine & Smith, 2012).

Από τα έξι γονίδια που μελετήθηκαν, άμεσες ενδείξεις για συμμετοχή στον έλεγχο της ΗΙ στον μύκητα *V. dahliae* προέκυψαν μόνον για το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα VIB-1. Μάλιστα, εκτός από την καταστολή του φαινομένου (η απενεργοποίηση του γονιδίου μετέτρεψε τον μύκητα σε μερικώς συμβατό με προηγουμένως ασύμβατα στελέχη ελέγχου των VCGs), το γονίδιο αποδείχθηκε ότι είναι ταυτόχρονα αρνητικός ρυθμιστής της κονιδιογένεσης, ενώ επίσης απαιτείται για τη φυσιολογική παραγωγή μικροσκληρωτίων και χρωστικής στις αποικίες του *V. dahliae*. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τον ρόλο του ομόλογου γονιδίου στον μύκητα-μοντέλο *N. crassa*: αυτό έχει ομοίως αποδειχθεί πως αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή-μερικό καταστολέα της ΗΙ που πυροδοτείται από αλληλομορφικές διαφορές στα γονίδια ετεροκαρύωσης *het-c*, *un-24/het-6* και *mat*, και πιθανώς και σε άλλα, όπως τα *het-8* και *het-e*, που δεν έχουν όμως χαρακτηριστεί ακόμα σε μοριακό επίπεδο (Xiang & Glass, 2002; 2004; Lafontaine & Smith, 2012). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως το γονίδιο *vib-1* στον μύκητα *N. crassa* απαιτείται για την έκφραση γονιδίων που περιέχουν το μοτίβο HET, συμπεριλαμβανομένων των *pin-c*, *tol* και *het-6*, καθώς επίσης και καταρροϊκών (downstream) συστατικών του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου λόγω ασυμβατότητας, όπως γονιδίων εξωκυτταρικών πρωτεασών (Dementhon *et al.*, 2006). Είναι αξιοσημείωτο ότι, ενώ με τη γενετική δοκιμασία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε συμμετοχή του ρυθμιστικού γονιδίου *vib-1* στη διαδικασία ασυμβατότητας, το αντίθετο συνέβη για τα ομόλογα των τριών γνωστών γονιδίων-στόχων του στον *N. crassa*, δηλαδή *het-c*, *un-24/het-6* και *mat* (*het-c1*, *un-24* και *MAT1-2-1* για το είδος *V. dahliae*, αντίστοιχα). Με βάση αυτά τα ευρήματα, αλλά και προηγούμενα δεδομένα για τα είδη *N. crassa*, *P. anserina* και *C. parasitica* (Sauré, 2000; Choi *et al.*, 2012; Hutchison & Glass, 2012), προκύπτει πως η ρυθμιστική βάση του φαινομένου της ΗΙ είναι κατά πάσα πιθανότητα συντηρημένη και κοινή μεταξύ ασκομυκήτων με ποικίλες φυλογενετικές αποστάσεις, όχι όμως και τα γονίδια αναγνώρισης του ετέρου (γονίδια *het*) που δρουν στο πρώτο επίπεδο του μηχανισμού. Είναι πιθανό πως για τον ρόλο της αναγνώρισης έχουν στρατολογηθεί εξελικτικά σε κάθε μύκητα ή κάθε ομάδα μυκήτων διαφορετικά σύνολα γονιδίων, πολλά εκ των οποίων φαίνεται πως έχουν άλλες παράλληλες κυτταρικές λειτουργίες.

Εκτός από τη συμμετοχή του στον έλεγχο της ΗΙ, το γονίδιο *vib-1* στον μύκητα *V. dahliae* βρέθηκε πως αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της κονιδιογένεσης, όπως ακριβώς ισχύει και για το ομόλογό του στον *N. crassa* (Xiang & Glass, 2002). Η συμμετοχή του γονιδίου, περαιτέρω, στην παραγωγή μικροσκληρωτίων και χρωστικής στον *V. dahliae* υποδηλώνει πλειοτροπική και πιθανώς κεντρική επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα στον κυτταρικό μεταβολισμό: αυτή ίσως σχετίζεται με τη ρύθμιση ενεργότητας όξινης φωσφατάσης που έχει βρεθεί για την πρωτεΐνη VIB-1 στον *N. crassa* (Xiang & Glass, 2002).

Κανένα από τα υπόλοιπα πέντε γονίδια που μελετήθηκαν δεν βρέθηκε να συμμετέχει άμεσα στον έλεγχο της ΗΙ στο είδος *V. dahliae* με τη γενετική δοκιμασία συμπληρωματικότητας που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία. Το εύρημα αυτό συμφωνεί και με την πληθυσμιακή μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τα γονίδια *het-c1*, *het-c2* και *MAT1-2-1*, σύμφωνα με την οποία δεν παρατηρήθηκε σημαντικός πολυμορφισμός μεταξύ των VCGs του είδους *V. dahliae* που να δικαιολογεί τη συμμετοχή τους στον μηχανισμό αναγνώρισης του ετέρου στους φυσικούς πληθυσμούς του. Εντούτοις, η γονιδιακή απενεργοποίηση των γονιδίων *het-c2*, *un-24* και *hex-1* οδήγησε σε σημαντικές φαινοτυπικές

μεταβολές στη γενική βλαστητική μορφολογία ή/και φυσιολογία του μύκητα. Το γονίδιο *het-c2* του *V. dahliae*, πιθανός κυτταροπλασματικός μεταφορέας γλυκολιπιδίων κατά τη δομική μελέτη, αποδείχθηκε απαραίτητο για την παραγωγή μικροσκληρωτίων και χρωστικής στις αποικίες του μύκητα, αλλά και για τη διατήρηση του φυσιολογικού προτύπου διακλάδωσης των υφών του. Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί στο παρελθόν για το ομόλογο του γονιδίου στον μύκητα *P. anserina*, εδραιώνοντας έτσι την αντίληψη για σημαντική δομική και λειτουργική συντήρηση του γονιδίου στους ασκομύκητες· εξαίρεση αποτελεί η λειτουργία της HI, η οποία σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα γνώσεις περιορίζεται για το γονίδιο αυτό μόνον στο είδος *P. anserina* (Sauré *et al.*, 1994).

Η λειτουργική απενεργοποίηση του γονιδίου *un-24* στο είδος *V. dahliae* είχε αντίθετη επίδραση στην παραγωγή μικροσκληρωτίων και χρωστικής από το γονίδιο *het-c2*, δηλαδή οδήγησε σε σημαντικά ταχύτερη και εκτενέστερη παραγωγή σε σχέση με το αρχικό στέλεχος. Επίσης, το μεταλλαγμένο στέλεχος χαρακτηρίστηκε από ελαττωμένο τάχος αύξησης, ελαττωμένη κονιδιογένεση και ελαττωμένο ρυθμό βλάστησης των κονιδίων, υποδεικνύοντας και για αυτό το γονίδιο σημαντική συμμετοχή σε θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες. Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με τη σημαντική συντήρηση του γονιδιακού προϊόντος σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας, αλλά και την ομοιότητα των φαινοτύπων απενεργοποίησης στα είδη *V. dahliae* και *N. crassa*, υποστηρίζουν ότι το γονίδιο έχει πιθανώς την ίδια βασική λειτουργία στον μύκητα *V. dahliae* με την χαρακτηρισμένη στον *N. crassa*, δηλαδή εκείνη της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής με συμμετοχή στην αντιγραφή του DNA (Smith *et al.*, 2000). Εκτός από τις βασικές και συντηρημένες λειτουργίες τους, οι φαινότυποι των γονιδίων *het-c2* και *un-24* έχουν πιθανώς μεγάλο ενδιαφέρον ειδικά για τους μύκητες του γένους *Verticillium* όσον αφορά την αντίθετη και σημαντική επίδρασή τους στην παραγωγή μικροσκληρωτίων και χρωστικής. Τα μικροσκληρώτια, στα οποία συγκεντρώνεται η παραγωγή των σκούρων χρωστικών, αποτελούν την ανθεκτική διατηρητική δομή του είδους *V. dahliae*, με την οποία ο μύκητας μπορεί να αντεπεξέλθει σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και να παραμείνει βιώσιμος στο έδαφος για μεγάλα χρονικά διαστήματα, αποτελώντας και την κύρια πηγή μόλυσματος για τους επιρρεπείς ξενιστές του (Wilhelm, 1955; Schnathorst, 1981; Pegg & Brady, 2002). Συνεπώς, η μοριακή γενετική μελέτη του μηχανισμού ανάπτυξης και μορφογένεσης αυτών των δομών έχει ιδιαίτερη σημασία για αυτόν τον φυτοπαθογόνο μύκητα, καθώς αποτελεί πολλά υποσχόμενο πεδίο μελέτης στο πλαίσιο διαμόρφωσης αποτελεσματικών φυτοπροστατευτικών στρατηγικών. Ο εντοπισμός και η λειτουργική μελέτη γονιδίων όπως τα *het-c2* και *un-24*, με συμμετοχή σε αυτήν τη βασική αναπτυξιακή διαδικασία του μύκητα, αναμένεται να συμβάλει καθοριστικά στην έρευνα προς αυτήν την κατεύθυνση.

Το συντηρημένο γονίδιο *hex-1* αποτελεί βασικό συστατικό των σωματίων Woronin στους υφομύκητες. Αυτά θεωρούνται υπεύθυνα για τη φυσική απόφραξη των πόρων των σέπτων εκείνων των κυτταρικών διαμερισμάτων που έχουν υποστεί μηχανική βλάβη/κυτταροπλασματική διαρροή ή έχουν εισέλθει σε πορεία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Dhavale & Jedd, 2007; Son *et al.*, 2013). Η απενεργοποίηση του γονιδίου στον μύκητα *V. dahliae* οδήγησε σε φαινοτυπικά συμπτώματα που μπορούν να αποδοθούν στη διακοπή αυτής της βασικής λειτουργίας του γονιδίου: σημαντικά συχνότερο κυτταρικό θάνατο, ειδικά στις εναέριες υφές, αλλά και κατόπιν υποτονικής επίδρασης στο μυκήλιο – τα οποία ίσως οφείλονται στην ελαττωμένη δυνατότητα του μυκηλίου για επούλωση τραυμάτων από μηχανικά και οσμωτικά αίτια – και ακολούθως ελαττωμένο τάχος αύξησης και μικρότερο αριθμό κονιδίων. Η πιθανή συμμετοχή του γονιδίου *hex-1* και των

σωματίων Woronin στον αποκλεισμό των κυττάρων στα οποία πυροδοτείται η αντίδραση HI καθιστά την περαιτέρω λειτουργική διερεύνηση του γονιδίου ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο για τη βασική κυτταροβιολογική μελέτη του μύκητα *V. dahliae*.

Η γονιδιακή απενεργοποίηση, τέλος, των γονιδίων *het-c1* και MAT1-2-1, οδήγησε σε ασήμαντες (για το *het-c1*) ή μικρές (για το MAT1-2-1) φαινοτυπικές μεταβολές στη βλαστική μορφολογία του είδους *V. dahliae*, αν και καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στη συμπεριφορά βλαστικής συμβατότητάς του, σε συμφωνία και με τις προηγηθείσες πληθυσμιακές μελέτες των γονιδίων. Πέραν της συμμετοχής του στην HI, το γονίδιο *het-c* του μύκητα *N. crassa* (ομόλογο του *het-c1* του *V. dahliae*) έχει άγνωστη λειτουργία και η απαλοιφή του δεν οδηγεί σε αναγνωρίσιμες φαινοτυπικές μεταβολές (Sauvé *et al.*, 1996)· το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση του *Fusarium proliferatum* (Kerényi *et al.*, 2006). Ομοίως, είναι άγνωστη η λειτουργία των γονιδίων συζευκτικού τύπου (MAT) στους αφυλετικούς μύκητες. Προσφάτως, αναφέρθηκε ότι αυτά τα γονίδια – πέραν του γνωστού ρόλου τους στον καθορισμό της συζευκτικής πολικότητας κατά τη διάρκεια του φυλετικού κύκλου στους φυλετικούς μύκητες – συμμετέχουν και στη ρύθμιση βλαστικών διαδικασιών όπως η μορφογένεση των υφών, ο σχηματισμός σπορίων και η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Böhm *et al.*, 2013). Αυτή η ανακάλυψη πιθανώς σχετίζεται με τα παρόμοια για το είδος *V. dahliae* ευρήματα (τάχος αύξησης, παραγωγή χρωστικής/μικροσκληρωτίων, πυκνότητα υφών, κονιδιογένεση). Μια συναρπαστική υπόθεση για μελλοντική διερεύνηση αποτελεί η πιθανότητα συντήρησης αυτών των γονιδίων στο γένος *Verticillium*, όπως επίσης και σε άλλους αφυλετικούς μύκητες, για τη διεξαγωγή κρυπτικών φυλετικών διεργασιών, υπό άγνωστες μέχρι σήμερα συνθήκες· αυτό έχει αποδειχθεί τα τελευταία χρόνια για μια σειρά σημαντικών από κλινική και βιοτεχνολογική άποψη υφομυκήτων που παραδοσιακά θεωρούνταν αφυλετικοί (O’Gorman *et al.*, 2009; Böhm *et al.*, 2013). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται για το είδος *V. dahliae* από πρόσφατες πληθυσμιακές αναλύσεις που έχουν επιτρέψει την αναγνώριση πιθανών ενδείξεων φυλετικού ανασυνδυασμού του μύκητα (Atallah *et al.*, 2010; Inderbitzin *et al.*, 2011b), και – εφόσον επιβεβαιωθεί από τη μελλοντική έρευνα – αναμένεται να συμβάλει καθοριστικά στη μοριακή γενετική και την πληθυσμιακή μελέτη και κατανόηση ενός γένους σημαντικών διεθνώς φυτοπαθογόνων μυκήτων.

4.5 Σύνοψη των ευρημάτων της έρευνας

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μελέτη του φαινομένου της ετεροκαρύωσης/ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας στο γένος φυτοπαθογόνων μυκήτων *Verticillium* (με έμφαση στον κύριο αντιπρόσωπο *V. dahliae*), καθώς επίσης και των συνεπειών του σε πληθυσμιακό επίπεδο, με παράλληλες προσεγγίσεις: α) πληθυσμιακών, β) γενετικών, γ) κυτταροβιολογικών/φυσιολογικών, και δ) γονιδιωματικών και μοριακών/λειτουργικών αναλύσεων. Τα σημαντικότερα ευρήματα της έρευνας συνοψίζονται στα ακόλουθα:

- πληθυσμός στελεχών *V. dahliae* από την Κρήτη κατατάχθηκε στις VCGs 2A, 2B και 4B, με ιδιαίτερα συχνή παρουσία στελεχών «διασύνδεσης» διαφορετικών VCGs
- ανιχνεύθηκαν συσχετίσεις της κατάταξης σε VCGs με μορφολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών, καθώς επίσης και με φυτοπαθολογικά γνωρίσματα (φυλές, παθότυποι)
- αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν σε εκτεταμένη διεθνή συλλογή στελεχών *V. dahliae* τέσσερις νέοι **μοριακοί δείκτες πολυμορφισμού** βάσει της αντίδρασης PCR (M1-4) και δύο νέοι δείκτες SCAR (a11 και a19), **ο συνδυασμός των οποίων επιτρέπει την ταχεία μοριακή διάκριση-πρόβλεψη της κατάταξης σε VCGs**
- ελέγχθηκαν οι γνωστοί μοριακοί δείκτες PCR Tm5/Tm7, 35-1/35-2, Tr1/Tr2 και E10-RAPD και ανιχνεύθηκαν συσχετίσεις αυτών με φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *V. dahliae* (φυλές, παθότυποι) και με την κατάταξή τους σε VCGs
- ανιχνεύθηκε εντός της πυρηνικής περιοχής ITS1-5.8S-ITS2 σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) που αποδείχθηκε αξιόπιστο μοριακό αποτύπωμα της VCG 2A
- εντοπίστηκε εντός της **διαχωριστικής περιοχής IGS** του πυρηνικού rDNA υπερμεταβλητή περιοχή, η δομική και φυλογενετική μελέτη της οποίας σε συλλογή στελεχών *V. dahliae* όλων των VCGs αποδείχθηκε **άριστο εργαλείο μελέτης της μοριακής ποικιλότητας εντός και μεταξύ των VCGs· καταρρίφθηκε η γενική υπόθεση της γενετικής ομοιογένειας εντός των VCGs και αποκαλύφθηκε πολύπλοκο πρότυπο γενετικών σχέσεων μεταξύ υποομάδων διαφορετικών VCGs, θέτοντας υπό αμφισβήτηση και τη γενική υπόθεση γενετικής απομόνωσης των VCGs**
- ανιχνεύθηκε στην πλειοψηφία των ριβοσωμικών επαναλήψεων του rDNA των στελεχών που ανήκουν στις VCGs 4A και 6 του *V. dahliae* νέο εσώνιο τύπου I· η ανάλυση σε εκτεταμένη συλλογή στελεχών με ειδικούς για το εσώνιο εκκινητές και ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου αποκάλυψε **αξιοσημείωτη ετερογένεια των ριβοσωμικών επαναλήψεων** όσον αφορά την παρουσία εσώνιων, τόσο μεταξύ όσο και εντός στελεχών όλων των VCGs
- πραγματοποιήθηκε σύγκριση του συστήματος κατάταξης σε VCGs με τον σχηματισμό ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) και αποδείχθηκε πως τα δύο φαινόμενα είναι εν μέρει ανεξάρτητα, τελώντας υπό διακριτό γενετικό έλεγχο
- διερευνήθηκαν εναλλακτικές μεθοδολογίες παραγωγής μεταλλαγών διάφορων τύπων από στελέχη του *V. dahliae* προς χρήση σε δοκιμασίες συμπληρωματικότητας
- αναπτύχθηκαν **νέα συστήματα μεγάλης κλίμακας για την ταχεία κατάταξη πληθυσμών του *V. dahliae* σε VCGs**, με την παραγωγή μεταλλαγών *nit* κατόπιν ακτινοβόλησης UV και δοκιμασίες συμπληρωματικότητας αυτών σε υγρές μικροκαλλιέργειες

- συγκρίθηκαν διαφορετικές μέθοδοι δοκιμασιών συμπληρωματικότητας στο είδος *V. dahliae* και αποδείχθηκε πως η χρήση διαφορετικών γενετικών δεικτών αποδίδει διαφορετικά αποτελέσματα συμβατότητας, εξαιτίας πιθανώς των διαφορετικών κατά περίπτωση επιπέδων επιλεκτικής πίεσης
- η γενετική ανάλυση ετεροκαρύων μεταξύ μεταλλαγών *nit* αποκάλυψε πως ασθeneis αντεπιδράσεις συμπληρωματικότητας μεταξύ VCGs μπορεί να είναι όντως ετεροκαρνωτικές, καταργώντας την υπόθεση της γενετικής απομόνωσης των VCGs
- αναπτύχθηκε νέα μεθοδολογία για την κατάταξη συμβατότητας σε μεγάλη κλίμακα στελεχών *V. dahliae* φυσικού τύπου, με χρήση διπλά μεταλλαγμένων στελεχών ελέγχου με ανθεκτικότητα στην παρεμποδιστική χημική ουσία benomyl
- πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική περιγραφή της σύντηξης κονιδίων του *V. dahliae* μέσω CATs, μελετήθηκαν οι παράγοντες που επιδρούν στη συχνότητά της, και καταγράφηκε πιθανή μετανάστευση πυρήνων μεταξύ των CATs
- μελετήθηκε μικροσκοπικά η οργάνωση των αποικιών του *V. dahliae* και η αναστόμωση εντός και μεταξύ αυτών, σε συνδυασμό με την πυρηνική οργάνωση και συμπεριφορά
- βρέθηκε πως οι ασύμβατες υφές κατά κανόνα επιδεικνύουν συμπεριφορά αμοιβαίας «ανοχής» μέχρι τη σύντηξή τους, η οποία όμως οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο κατόπιν του αποκλεισμού τους από το υπόλοιπο μυκήλιο
- αποδείχθηκε με λειτουργική μελέτη του γονιδίου της MAP κινάσης *Vmk1* πως αυτή απαιτείται για την αναστόμωση στο είδος *V. dahliae*, τόσο στο επίπεδο των κονιδίων (στάδιο επαγωγής), όσο και μεταξύ υφών εντός ώριμων αποικιών του μύκητα
- εκφυλισμένοι εκκινητές PCR χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων γονιδίων *het* από είδη του *Verticillium*, τα οποία κλωνοποιήθηκαν, προσδιορίστηκε η αλληλουχία τους, και χρησιμοποιήθηκαν ως ιχνηθέτες για τη μελέτη της κατανομής του γονιδίου *het-c1* με υβριδισμούς κατά Southern και την ανάκτηση των γονιδίων *mod-E* και *un-24* με σάρωση γονιδιακής βιβλιοθήκης του είδους *V. dahliae*
- παράλληλη ανάλυση των διαθέσιμων γονιδιωματικών αλληλουχιών των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum* επέτρεψε τον εντοπισμό όλων των πιθανών γονιδίων *het*, των γονιδίων με τα σχετικά μοτίβα HET, STAND-NACHT και HeLo, καθώς επίσης και τη μελέτη της κατανομής τους επί των χρωμοσωμάτων του *V. dahliae*. ακολούθησε η κλωνοποίηση επιλεγμένων γονιδίων
- για το γονίδιο *het-c1* προβλέφθηκε πως κωδικοποιεί για διαμεμβρανική πρωτεΐνη, με την πιθανή περιοχή καθορισμού της αλληλομορφικής ειδικότητας να είναι συντηρημένη μεταξύ των VCGs του *V. dahliae*
- δομική μοντελοποίηση βάσει ομολογίας (homology modeling) για το γονίδιο *het-c2* επέτρεψε την πρόβλεψη ότι αυτό κωδικοποιεί για συντηρημένο κυτταροπλασματικό μεταφορέα γλυκολιπιδίων, ενώ η πληθυσμιακή του μελέτη κατέδειξε απουσία πολυμορφισμού μεταξύ των VCGs του *V. dahliae*
- γονιδιωματικές και πληθυσμιακές αναλύσεις αποκάλυψαν την παρουσία γονιδίων συζευκτικού τύπου σε όλες τις VCGs του αφυλετικού μύκητα *V. dahliae*, με τον τύπο MAT1-2-1 να επικρατεί στους φυσικούς πληθυσμούς του
- πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση των έξι γονιδίων *het-c1*, *het-c2*, *un-24*, *vib-1*, *hex-1* και MAT1-2-1 μέσω κατασκευής μεταλλαγμένων στελεχών με γονιδιακή απενεργοποίηση (knock-out mutants) κάθε ενός εκ των γονιδίων, με διαφορετικές μεθοδολογίες· προς αυτήν την κατεύθυνση βελτιστοποιήθηκε στην παρούσα εργασία το

- σύστημα δημιουργίας και μετασχηματισμού πρωτοπλαστών του μύκητα *V. dahliae* και επίσης αναπτύχθηκε διαδικασία μετασχηματισμού κονιδίων του με ηλεκτροδιάτρηση
- το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα **VIB-1** αποδείχθηκε πως αποτελεί **μερικό καταστολέα της ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας στο *V. dahliae***, καθώς επίσης και αρνητικό ρυθμιστή της κονιδιογένεσης, υποδηλώνοντας συντηρημένη ρυθμιστική βάση του φαινομένου στους ασκομύκητες και **λειτουργική διασύνδεση με θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες**
 - κανένα από τα ομόλογα των υπόλοιπων γνωστών γονιδίων *het* δεν βρέθηκε να επιδρά άμεσα στη ρύθμιση της συμπεριφοράς συμβατότητας του μύκητα, υποδεικνύοντας πως **τον ρόλο της αναγνώρισης του ετέρου αναλαμβάνουν διαφορετικά σύνολα γονιδίων σε διαφορετικούς μύκητες**
 - η απαλοιφή των γονιδίων *het-c2*, *un-24* και *hex-1* προκάλεσε **σημαντικές μεταβολές στη γενική μακρο- και μικρο-σκοπική βλαστητική μορφολογία και φυσιολογία** του μύκητα, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής μικροσκληρωτίων/χρωστικής, της κονιδιογένεσης και της μορφολογίας/ανθεκτικότητας των υφών σε καταπονήσεις· η περαιτέρω μελέτη αυτών των γονιδίων αναμένεται να συμβάλει στη **βασική μοριακή γενετική μελέτη** του οργανισμού, ενώ έχει **φυτοπαθολογικό ενδιαφέρον** κυρίως λόγω της συμμετοχής τους στην παραγωγή των μικροσκληρωτίων

4.6 Μελλοντικές προοπτικές

Με βάση τα ευρήματα και πορίσματα της παρούσας έρευνας αναδεικνύονται ως ιδιαίτερα ελκυστικοί ερευνητικοί στόχοι για μελλοντική διερεύνηση, μεταξύ άλλων, οι ακόλουθοι:

- ανάλυση της βιολογικής σημασίας του παραφυλετικού κύκλου στους φυσικούς πληθυσμούς του μύκητα *V. dahliae*
- παρακολούθηση στο κυτταρικό επίπεδο των σταδίων του παραφυλετικού κύκλου και της ετεροκαρνωτικής ασυμβατότητας, σε συνδυασμό με την πυρηνική συμπεριφορά και τη λειτουργία του σωματίου Woronin
- μοριακή γενετική ανάλυση της ρύθμισης του γονιδίου *vib-1* και των αλληλεπιδράσεών του με άλλα γονίδια
- διερεύνηση της πιθανής λειτουργικότητας του γονιδίου συζευκτικού τύπου στον αφυλετικό μύκητα *V. dahliae* για τον καθορισμό της συζευκτικής πολικότητας σε ενδεχόμενες κρυπτικές φυλετικές διεργασίες
- μελέτη της πιθανής λειτουργικότητας των ομόλογων γονιδίων *het* του είδους *V. dahliae* στα χαρακτηρισμένα συστήματα των μυκήτων-μοντέλων, και αντίστροφα
- αναζήτηση νέων γονιδίων ετεροκαρύωσης στο είδος *V. dahliae*

5. Βιβλιογραφία

- Aanen D.K., Debets A.J., Glass N.L., and Saupé S.J. (2010). Biology and genetics of vegetative incompatibility in fungi. In: Borkovich K.A. and Ebbole D.J. (eds.), Cellular and molecular biology of filamentous fungi. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, DC, pp. 274-288.
- Aanen D.K., Debets A.J., de Visser J.A., and Hoekstra R.F. (2008). The social evolution of somatic fusion. *Bioessays* **30**: 1193-1203.
- Agrios G.N. (2005). *Plant Pathology*, 5th edition. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
- Akinsanmi O.A., Backhouse D., Simpfendorfer S., and Chakraborty S. (2008). Mycelial compatibility reactions of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* isolates compared with AFLP groupings. *Plant Pathology* **57**: 251-261.
- Aldabbous M.S., Roca M.G., Stout A., Huang I.C., Read N.D., and Free S.J. (2010). The *ham-5*, *rcm-1* and *rco-1* genes regulate hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Microbiology* **156**: 2621-2629.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Amyotte S.G., Tan X., Pennerman K., Jimenez-Gasco M.M., Klosterman S.J., Ma L.-J., Dobinson K.F., and Veronese P. (2012). Transposable elements in phytopathogenic *Verticillium* spp.: insights into genome evolution and inter- and intra-specific diversification. *BMC Genomics* **13**: 314.
- Andrews D., Beames B., Summers M.D., and Park W.D. (1988). Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochemical Journal* **252**: 199-206.
- Anwar M.M., Croft J.H., and Dales R.B.G. (1993). Analysis of heterokaryon incompatibility between heterokaryon-compatibility (h-c) groups R and G1 provides evidence that at least 8 *het* loci control somatic incompatibility in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* **139**: 1599-1603.
- Apostolakos P., Livanos P., Nikolakopoulou T.L., and Galatis B. (2009). The role of callose in guard-cell wall differentiation and stomatal pore formation in the fern *Asplenium nidus*. *Annals of Botany* **104**: 1373-1387.
- Araujo-Palomares C.L., Richthammer C., Seiler S., and Castro-Longoria E. (2011). Functional characterization and cellular dynamics of the CDC-42 - RAC - CDC-24 module in *Neurospora crassa*. *PLoS One* **6**: e27148.
- Atallah Z.K., Hayes R.J., and Subbarao K.V. (2011a). Fifteen years of *Verticillium* wilt of lettuce in America's salad bowl: a tale of immigration, subjugation, and abatement. *Plant Disease* **95**: 784-792.
- Atallah Z.K., Maruthachalam K., Vallad G.E., Davis R.M., Klosterman S.J., and Subbarao K.V. (2011b). Analysis of *Verticillium dahliae* suggests a lack of correlation between genotypic diversity and virulence phenotypes. *Plant Disease* **95**: 1224-1232.
- Atallah Z.K., Maruthachalam K., du Toit L., Koike S.T., Davis R.M., Klosterman S.J., Hayes R.J., and Subbarao K.V. (2010). Population analyses of the vascular plant pathogen *Verticillium dahliae* detect recombination and transcontinental gene flow. *Fungal Genetics and Biology* **47**: 416-422.
- Balguerie A., Dos Reis S., Ritter C., Chaignepain S., Couлары-Salin B., Forge V., Bathany K., Lascu I., Schmitter J. M., Riek R. *et al.* (2003). Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of *Podospora anserina*. *The EMBO Journal* **22**: 2071-2081.

- Banno S., Saito H., Sakai H., Urushibara T., Ikeda K., Kabe T., Kemmochi I., and Fujimura M. (2011). Quantitative nested real-time PCR detection of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* in the soil of cabbage fields. *Journal of General Plant Pathology* **77**: 282-291.
- Barbara D.J. and Clewes E. (2003). Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Molecular Plant Pathology* **4**: 297-305.
- Barreau C., Iskandar M., Loubradou G., Levallois V., and Bégueret J. (1998). The *mod-A* suppressor of nonallelic heterokaryon incompatibility in *Podospora anserina* encodes a proline-rich polypeptide involved in female organ formation. *Genetics* **149**: 915-926.
- Bastiaans E., Debets A.J.M., Aanen D.K., van Diepeningen A.D., Saupé S.J., and Paoletti M. (2014). Natural variation of heterokaryon incompatibility gene *het-c* in *Podospora anserina* reveals diversifying selection. *Molecular Biology and Evolution* (in press, DOI: 10.1093/molbev/msu047).
- Be'er A., Zhang H.P., Florin E.L., Payne S.M., Ben-Jacob E., and Swinney H.L. (2009). Deadly competition between sibling bacterial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **106**: 428-433.
- Bégueret J. and Bernet J. (1973). Proteolytic enzymes and protoplasmic incompatibility in *Podospora anserina*. *Nature New Biology* **243**: 94-96.
- Bégueret J., Turcq B., and Clavé C. (1994). Vegetative incompatibility in filamentous fungi – *het* genes begin to talk. *Trends in Genetics* **10**: 441-446.
- Belcour L. and Bernet J. (1969). Sur la mise en évidence d'un gène dont la mutation supprime spécifiquement certaines manifestations d'incompatibilité chez le *Podospora anserina*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris)* **269**: 712-714.
- Bell A.A. (1994). Mechanisms of disease resistance in *Gossypium* and variation in *Verticillium dahliae*. In: *Proceedings of the World Cotton Research Conference-I* (CSIRO, Melbourne, Australia), pp. 225-235.
- Benoist M., Gaillard S., and Castets F. (2006). The striatin family: a new signaling platform in dendritic spines. *Journal of Physiology - Paris* **99**: 146-153.
- Berbegal M., Garzón C.D., Ortega A., Armengol J., Jiménez-Díaz R.M., and Jiménez-Gasco M.M. (2011). Development and application of new molecular markers for analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations. *Plant Pathology* **60**: 866-877.
- Berendsen R.L., Baars J.J.P., Kalkhove S.I.C., Lugones L.G., Wösten H.A.B., and Bakker P.A.H.M. (2010). Pathogen profile: *Lecanicillium fungicola*, causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Molecular Plant Pathology* **11**: 585-595.
- Berepiki A., Lichius A., and Read N.D. (2011). Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nature Reviews Microbiology* **9**: 877-887.
- Bernet J. (1971). Sur un cas de suppression de l'incompatibilité cellulaire chez le champignon *Podospora anserina*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris)* **273**: 1120-1122.
- Bernet J., Bégueret J., and Labarère J. (1973). Incompatibility in the fungus *Podospora anserina*. Are the mutations abolishing the incompatibility reaction ribosomal mutations? *Molecular and General Genetics* **124**: 35-50.
- Bernhards Y. and Pöggeler S. (2011). The phocein homologue SmMOB3 is essential for vegetative cell fusion and sexual development in the filamentous ascomycete *Sordaria macrospora*. *Current Genetics* **57**: 133-149.
- Bhat R.G., Smith R.F., Koike S.T., Wu B.M., and Subbarao K.V. (2003). Characterization of *Verticillium dahliae* isolates and wilt epidemics of pepper. *Plant Disease* **87**: 789-797.
- Bhat R.G. and Subbarao K.V. (1999). Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **89**: 1218-1225.
- Bhattacharya D., Friedl T., and Damberger S. (1996). Nuclear-encoded rDNA group I introns: origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae. *Molecular Biology and Evolution* **13**: 978-989.
- Bhattacharya D., Reeb V., Simon D.M., and Lutzoni F. (2005). Phylogenetic analysis suggests reverse splicing spread of group I introns in fungal ribosomal DNA. *BMC Evolutionary Biology* **5**: 68.
- Bidard F., Clavé C., and Saupé S. (2013). The transcriptional response to nonself in the fungus *Podospora anserina*. *G3: Genes | Genomes | Genetics* **3**: 1015-1030.

- Bidochka M.J., St Leger R.J., Stuart A., and Gowanlock K. (1999). Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. *Microbiology* **145**: 955-963.
- Biegert A., Mayer C., Remmert M., Söding J., and Lupas A.N. (2006). The MPI bioinformatics toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Research* **24**: W335-W339.
- Biella S., Smith M.L., Aist J.R., Cortesi P., and Milgroom M.G. (2002). Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **269**: 2269-2276.
- Bilodeau G.J., Koike S.T., Uribe P., and Martin F.N. (2012). Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology* **102**: 331-343.
- Böhm J., Hoff B., O’Gorman C.M., Wolfers S., Klix V., Binger D., Zadra I., Kürnsteiner H., Pöggeler S., Dyer P.S., and Kück U. (2013). Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **110**: 1476-1481.
- Boucherie H. and Bernet J. (1978). Protoplasmic incompatibility and self-lysis in *Podospora anserina*: enzyme activities associated with cell destruction. *Canadian Journal of Botany* **56**: 2171-2176.
- Boucherie H., Dupont C.H., and Bernet J. (1981). Polypeptide synthesis during protoplasmic incompatibility in the fungus *Podospora anserina*. *Biochimica et biophysica acta* **653**: 18-26.
- Bourges N., Groppi A., Barreau C., Clavé C., and Bégueret J. (1998). Regulation of gene expression during the vegetative incompatibility reaction in *Podospora anserina*: characterization of three induced genes. *Genetics* **150**: 633-641.
- Bowman S.M., Piwowar A., Aldabbous M., Vierula J., and Free S.J. (2006). Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **5**: 587-600.
- Bowman S.M., Piwowar A., Arnone E.D., Matsumoto R., Koudelka G.B., and Free S.J. (2009). Characterization of GPIT-1 and GPIT-2, two auxiliary components of the *Neurospora crassa* GPI transamidase complex. *Mycologia* **101**: 764-772.
- Boyle J.S. and Lew A.M. (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics* **11**: 8.
- Bradshaw R.E. and Peberdy J.F. (1984). Protoplast fusion in *Aspergillus*: selection of interspecific heterokaryons using antifungal inhibitors. *Journal of Microbiological Methods* **3**: 27-32.
- Brasier C.M. (1991). *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of the current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia* **15**: 151-161.
- Broad Institute (2013). Διαδικτυακή βάση δεδομένων: <http://www.broadinstitute.org/>.
- Brodersen P., Petersen M., Pike H.M., Olszak B., Skov S., Odum N., Jorgensen L.B., Brown R.E., and Mundy J. (2002). Knockout of *Arabidopsis* ACCELERATED-CELL-DEATH11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes and Development* **16**: 490-502.
- Bruggeman J., Debets A.J., Swart K., and Hoekstra R.F. (2003). Male and female roles in crosses of *Aspergillus nidulans* as revealed by vegetatively incompatible parents. *Fungal Genetics and Biology* **39**: 136-141.
- Buchan D.W.A., Minneci F., Nugent T.C.O., Bryson K., and Jones D.T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* **41**: W340-W348.
- Buller A. (1931). Researches on fungi. Longman, London.
- Buller A. (1933). Researches on fungi. Longman, London.
- Bundock P., den Dulk-Ras A., Beijersbergen A., and Hooykaas P.J.J. (1995). Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **14**: 3206-3214.

- Cadavid L.F. (2004). Self-discrimination in colonial invertebrates: genetic control of allorecognition in the hydroid *Hydractinia*. *Developmental & Comparative Immunology* **28**: 871-879.
- Caddick M.X., Peters D., and Platt A. (1994). Nitrogen regulation in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**: 169-177.
- Cannone J.J., Subramanian S., Schnare M.N. *et al.* (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* **3**: 2 [Correction: *BMC Bioinformatics* **3**: 15].
- Caten C.E. (1972). Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection of fungi. *Journal of General Microbiology* **72**: 221-229.
- Caten C.E. and Jinks J.L. (1966). Heterokaryosis: its significance in wild homothallic ascomycetes and fungi imperfecti. *Transactions of the British Mycological Society* **49**: 81-93.
- Cech T.R., Damberger S.H., and Gutell E.R. (1994). Representation of the secondary and tertiary structure of group I introns. *Nature Structural Biology* **1**: 273-280.
- Chandelier A., Laurent F., Dantinne D., Mariage L., Etienne M., and Cavelier M. (2003). Genetic and molecular characterization of *Verticillium dahliae* isolates from woody ornamentals in Belgian nurseries. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 943-952.
- Chaplin D.D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**: S3-S23.
- Charlesworth D. (2006). Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *PLoS Genetics* **2**: e64.
- Chen E.H., Grote E., Mohler W., and Vignery A. (2007). Cell-cell fusion. *FEBS Letters* **581**: 2181-2193.
- Chen J. and Wu H. (1977). Hyphal anastomosis in *Pyricularia oryzae*. *Protoplasma* **92**: 281-287.
- Chevanne D., Bastiaans E., Debets A., Saupé S.J., Clavé C., and Paoletti M. (2009). Identification of the *het-r* vegetative incompatibility gene of *Podospora anserina* as a member of the fast evolving HNWD gene family. *Current Genetics* **55**: 93-102.
- Chevanne D., Saupé S.J., Clavé C., and Paoletti M. (2010). WD-repeat instability and diversification of the *Podospora anserina* HNWD non-self recognition gene family. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 134.
- Choi G.H., Dawe A.L., Churbanov A., Smith, M.L., Milgroom M.G., and Nuss, D.L. (2012). Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* **190**: 113-127.
- Clarkson J.M. and Heale J.B. (1985). Heterokaryon compatibility and genetic recombination within a host plant between wilt isolates of *Verticillium albo-atrum* from hop. *Plant Pathology* **34**: 129-138.
- Collado-Romero M., Berbegal M., Jiménez-Díaz R.M., Armengol J. and Mercado-Blanco J. (2009). A PCR-based “molecular tool box” for *in planta* differential detection of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups infecting artichoke. *Plant Pathology* **58**: 515-526.
- Collado-Romero M., Mercado-Blanco J., Olivares-García C., and Jiménez-Díaz R.M. (2008). Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups. *Phytopathology* **98**: 1019-1028.
- Collado-Romero M., Mercado-Blanco J., Olivares-García C., Valverde-Corredor A., and Jiménez-Díaz R.M. (2006). Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology* **96**: 485-495.
- Collins A., Mercado-Blanco J., Jiménez-Díaz R. M., Olivares V., Clewes E., and Barbara D.J. (2005). Correlation of molecular markers and biological properties in *Verticillium dahliae* and the possible origins of some isolates. *Plant Pathology* **54**: 549-557.

- Collins A., Okoli C.A.N., Morton A., Parry D., Edwards S.G., and Barbara D.J. (2003). Isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic to crucifers are of at least three distinct molecular types. *Phytopathology* **93**: 364-376.
- Correll J.C., Gordon T.R., and McCain A.H. (1988). Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* **78**: 1017-1021.
- Correll J.C., Klittich C.J.R., and Leslie J.F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* **77**: 1640-1646.
- Correll J.C., Klittich C.J.R., and Leslie J.F. (1989). Heterokaryon self-incompatibility in *Gibberella fujikoroi* (*Fusarium moniliforme*). *Mycological Research* **93**: 21-27.
- Cortesi P., McCulloch C.E., Song H., Lin H., and Milgroom M.G. (2001). Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* **159**: 107-118.
- Cortesi P. and Milgroom M.G. (1998). Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2988-2994.
- Coustou V., Deleu C., Saupé S., and Bégueret, J. (1997). The protein product of the *het-s* heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 9773- 9778.
- Craven K.D., Velez H., Cho Y., Lawrence C.B., and Mitchell T.K. (2008). Anastomosis is required for virulence of the fungal necrotroph *Alternaria brassicicola*. *Eukaryotic Cell* **7**: 675-683.
- Crozier R. (1986). Genetic clonal recognition abilities in marine invertebrates must be maintained by selection for something else. *Evolution* **40**: 1100-1101.
- Daskalov A., Paoletti M., Ness F., and Saupé S.J. (2012). Genomic clustering and homology between HET-S and the NWD2 STAND protein in various fungal genomes. *PLoS ONE* **7**: e34854.
- D'haene B., Vandesompele J., and Hellemans J. (2010) Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods* **50**: 262-270.
- Daayf F., Nicole M., and Geiger J.-P. (1995). Differentiation of *Verticillium dahliae* populations on the basis of vegetative compatibility and pathogenicity on cotton. *European Journal of Plant Pathology* **101**: 69-79.
- Debets A.J.M., Dalstra H.J.P., Slakhorst M., Koopmanschap B., Hoekstra R.F., and Saupé S.J. (2012). High natural prevalence of a fungal prion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **109**: 10432-10437.
- Debets A.J.M. and Griffiths A.J.F. (1998). Polymorphism of *het*-genes prevents resource plundering in *Neurospora crassa*. *Mycological Research* **102**: 1343-1349.
- Debets F., Yang X., and Griffiths A.J.F. (1994). Vegetative incompatibility in *Neurospora*: its effect on horizontal transfer of mitochondrial plasmids and senescence in natural populations. *Current Genetics* **26**: 113-119.
- Degtarev A. and Yuan J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**: 378-390.
- Dementhon K., Iyer G., and Glass N.L. (2006). VIB-1 is required for expression of genes necessary for programmed cell death in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **5**: 2161-2173.
- Dementhon K., Paoletti M., Pinan-Lucarré B., Loubradou-Bourges N., Sabourin M., Saupé S.J., and Clavé C. (2003). Rapamycin mimics the incompatibility reaction in the fungus *Podospora anserina*. *Eukaryotic Cell* **2**: 238-246.
- Dementhon K. and Saupé S.J. (2005). DNA-binding specificity of the IDI-4 basic leucine zipper factor of *Podospora anserina* defined by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Eukaryotic Cell* **4**: 476-483.
- Dementhon K., Saupé S.J., and Clavé C. (2004). Characterization of IDI-4, a bZIP transcription factor inducing autophagy and cell death in the fungus *Podospora anserina*. *Molecular Microbiology* **53**: 1625-1640.
- Deng F., Melzer M.S., Boland G.J. (2002). Vegetative compatibility and transmission of hypovirulence-associated dsRNA in *Sclerotinia homoeocarpa*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **24**: 481-488.

- DePriest P.T. (1993). Small subunit rDNA variation in a population of lichen fungi due to optional group-I introns. *Gene* **134**: 67-74.
- Dervis S. and Bicici M. (2005). Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from cotton in Turkey. *Phytoparasitica* **33**: 157-168.
- Dervis S., Erten L., Soylu S., Tok F. M., Kurt S., Yıldız M., and Soylu E.M. (2007). Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from olive in western Turkey. *European Journal of Plant Pathology* **119**: 437-447.
- DeVay J.E. (1989). Selection, characterization, pathogenicity and virulence of pectinase-deficient mutants of *Verticillium albo-atrum*. In: *Vascular wilt diseases of plants*, Tjamos E.C. and Beckman C.H. (eds.), pp. 19-217. Springer-Verlag, Berlin.
- Dhavalé T. And Jedd G. (2007). The fungal Woronin body. In: *Biology of the fungal cell*, 2nd edn, *The Mycota VIII*, Howard R.J. and Gow N.A.R. (eds.), pp. 87-96, Springer-Verlag, Berlin.
- Diepeningen A.D. van, Debets A.J., and Hoekstra R.F. (1997). Heterokaryon incompatibility blocks virus transfer among natural isolates of black aspergilli. *Current Genetics* **32**: 209-217.
- Diepeningen A.D. van, Pál K., Lee T.A.J. van der, Hoekstra R.F., and Debets A.J.M. (2009). The *het-c* heterokaryon incompatibility gene in *Aspergillus niger*. *Mycological Research* **113**: 222-229.
- Dobinson K.F. (1995). Genetic transformation of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Botany* **73**: 710-715.
- Dobinson K.F., Harrington M.A., Omer M., and Rowe R.C. (2000). Molecular characterization of vegetative compatibility group 4a and 4b isolates of *Verticillium dahliae* associated with potato early dying. *Plant Disease* **84**: 1241-1245.
- Dobinson K.F., Patterson N.A., White G.J., and Grant S. (1998). DNA fingerprinting and vegetative compatibility analysis indicate multiple origins for *Verticillium dahliae* race 2 tomato isolates from Ontario, Canada. *Mycological Research* **102**: 1089-1095.
- Dodds P.N. and Rathjen J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539-548.
- Dohlman H.G. and Thorner J.W. (2001). Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annual Review of Biochemistry* **70**: 703-754.
- Dos Reis S., Coulary-Salin B., Forge V., Lascu I., Bégueret J., and Saupé S.J. (2002). The HET-s prion protein of the filamentous fungus *Podospora anserina* aggregates *in vitro* into amyloid-like fibrils. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 5703-5706.
- Dujon B. (1989). Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations, a review. *Gene* **82**: 91-114.
- Eickbush T.H. and Eickbush D.G. (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* **175**: 477-485.
- El-Bebany A.F., Alkher H., Adam L.R., and Daayf F. (2013). Vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* isolates from potato and sunflower using nitrate non-utilizing (*nit*) mutants and PCR-based approaches. *Canadian Journal of Plant Pathology* **35**: 1-9.
- Elena K. (1999). Genetic relationships among *Verticillium dahliae* isolates from cotton in Greece based on vegetative compatibility. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 609-616.
- Elena K. and Paplomatas E.J. (1998). Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae* isolates from different hosts in Greece. *Plant Pathology* **47**: 635-640.
- Emri T., Malnar Z., and Pócsi I. (2005). The appearances of autolytic and apoptotic markers are concomitant but differently regulated in carbon-starving *Aspergillus nidulans* cultures. *FEMS Microbiology Letters* **251**:297-303.
- Esenbeck N. von (1816). *Das System der Pilze und Schwämme*. Stahelschen Buchhandlung, Würzburg.
- Espagne E., Balhadère P., Bégueret J., and Turcq B. (1997). Reactivity in vegetative incompatibility of the HET-E protein of the fungus *Podospora anserina* is dependent on GTP-binding activity and a WD40 repeated domain. *Molecular and General Genetics* **256**: 620-627.

- Espagne E., Balhadère P., Penin M.L., Barreau C., and Turcq B. (2002). HET-E and HET-D belong to a new subfamily of WD40 proteins involved in vegetative incompatibility specificity in the fungus *Podospira anserina*. *Genetics* **161**: 71-81.
- Esser K. (2006). Heterogenic incompatibility in fungi. In: *The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality*, 2nd edn, Kües U. and Fischer R. (eds.), pp. 141-165. Springer-Verlag, Berlin.
- Esser K. and Meinhardt F. (1984). Barrage formation in fungi. In: *Cellular interactions. Encyclopedia of plant physiology*, vol. 17, Linskens H.F. and Heslop-Harrison J. (eds.), pp. 350-361. Springer, Berlin.
- Eswar N., Webb B., Marti-Renom M.A., Madhusudhan M.S., Eramian D., Shen M.Y., and Sali A. (2007). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Protein Science* **2**: 2.9.
- Everitt B.S., Landau S., and Leese M. (2001). *Cluster analysis*. London, UK: Edward Arnold.
- Fagerland M.W. and Sandvik L. (2009). The Wilcoxon-Mann-Whitney test under scrutiny. *Statistics in Medicine* **28**: 1487-1497.
- Fahleson J., Hu Q., and Dixelius C. (2004). Phylogenetic analysis of *Verticillium* species based on nuclear and mitochondrial sequences. *Archives of Microbiology* **181**: 435-442.
- Fedorova N.D., Badger J.H., Robson G.D., Wortman J.R., and Nierman W.C. (2005). Comparative analysis of programmed cell death pathways in filamentous fungi. *BMC Genomics* **6**: 177.
- Fedorova N.D., Khaldi N., Joardar V.S. et al. (2008). Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genetics* **4**: e1000046.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Fernandes A.S., Gonçalves A.P., Castro A., Lopes T.A., Gardner R., Glass N.L., and Videira A. (2011). Modulation of fungal sensitivity to staurosporine by targeting proteins identified by transcriptional profiling. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 1130-1138.
- Fischer-Harman V., Jackson K.J., Muñoz A., Shoji J.-y., and Read N.D. (2012). Evidence for tryptophan being a signal molecule that inhibits conidial anastomosis tube fusion during colony initiation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **49**: 896-902.
- Fleißner A. (2012). Hyphal fusion. In Pérez-Martín J. and Di Pietro A. (eds.), *Morphogenesis and pathogenicity in fungi*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 43-59.
- Fleissner A., Diamond S., and Glass N.L. (2009a). The *Saccharomyces cerevisiae* PRM1 homolog in *Neurospora crassa* is involved in vegetative and sexual cell fusion events but also has postfertilization functions. *Genetics* **181**: 497-510.
- Fleißner A. and Glass N.L. (2007). SO, a protein involved in hyphal fusion in *Neurospora crassa*, localizes to septal plugs. *Eukaryotic Cell* **6**: 84-94.
- Fleißner A., Leeder A.C., Roca M.G., and Read N.D. (2009b). Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **106**: 19387-19392.
- Fleißner A., Sarkar S., Jacobson D.J., Roca M.G., Read N.D., and Glass N.L. (2005). The *so* locus is required for vegetative cell fusion and postfertilization events in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **4**: 920-930.
- Fleißner A., Simonin A.R., and Glass N.L. (2008). Cell fusion in the filamentous fungus, *Neurospora crassa*. *Methods in Molecular Biology* **475**: 21-38.
- Ford E.J., Miller R.V., and Sherwood J.E. (1995). Heterokaryon formation and vegetative compatibility in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research* **99**: 241-247.
- Fordyce C. and Green R.J. (1964). Mechanisms of variation in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **54**: 795-798.
- Fournier E., Levis C., Fortini D., Leroux P., Giraud T., and Brygoo Y. (2003). Characterization of *Bc-hch*, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* *het-c* vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycologia* **95**: 251-261.
- Fox E.M. and Howlett B.J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* **11**: 481-487.

- Freitas R., Rego C., Oliveira H., and Ferreira R.B. (2009). Interactions among grapevine disease-causing fungi. The role of reactive oxygen species. *Phytopathologia Mediterranea* **48**: 117-127.
- Frey-Klett P., Burlinson, P., Deveau A., Barret M., Tarkka M., and Sarniguet A. (2011). Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **75**: 583-609.
- Fricker M.D., Boddy L., and Bebbler D. (2007). Network organisation of filamentous fungi. In: Howard R.J., Gow N.A.R. (eds.), *Biology of the Fungal Cell*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 309-330.
- Fu C., Iyer P., Herkal A., Abdullah J., Stout A., and Free S.J. (2011). Identification and characterization of genes required for cell-to-cell fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **10**: 1100-1109.
- Galagan J.E. and Selker E.U. (2004). RIP: the evolutionary cost of genome defense. *Trends in Genetics* **20**: 417-423.
- Gams W. and Zare R. (2001). A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. *Nova Hedwigia* **72**: 329-337.
- Gams W., Zare R., and Summerbell R.C. (2005). (1654) Proposal to conserve the generic name *Verticillium* (anamorphic *Ascomycetes*) with a conserved type. *Taxon* **54**: 179-179.
- Ganley A.R.D. and Kobayashi T. (2011). Monitoring the rate and dynamics of concerted evolution in the ribosomal DNA repeats of *Saccharomyces cerevisiae* using experimental evolution. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2883-2891.
- Garber R.C., Turgeon B.G., Selker E.U., and Yoder O.C. (1988). Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *Current Genetics* **14**: 573-582.
- Garnjobst L. (1953). Genetic control of heterokaryosis in *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany* **40**: 607-614.
- Gibbs K.A., Urbanowski M.L., and Greenberg E.P. (2008). Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. *Science* **321**: 256-259.
- Gierz G. and Bartnicki-García S. (2001). A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. *Journal of Theoretical Biology* **208**: 151-164.
- Giovannetti M., Avio L., Fortuna P., Pellegrino E., Sbrana C., and Strani P. (2006). At the root of the wood wide web: self recognition and non-self incompatibility in mycorrhizal networks. *Plant Signaling and Behavior* **1**: 1-5.
- Giovannetti M., Sbrana C., Strani P., Agnolucci M., Rinaudo V., and Avio L. (2003). Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 616-624.
- Glass N.L. and Dementhon K. (2006). Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 553-558.
- Glass N.L. and Donaldson G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1323-1330.
- Glass N.L. and Fleißner A. (2006). Re-wiring the network: understanding the mechanism and function of anastomosis in filamentous ascomycete fungi. In: Kues U. and Fischer R. (eds.), *Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 123-139.
- Glass N.L., Grotelueschen J., and Metzberg R.L. (1990). *Neurospora crassa* A mating-type region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**: 4912-4916.
- Glass N.L., Jacobson D.J., and Shiu P.K.T. (2000). The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* **34**: 165-186.
- Glass N.L. and Kaneko I. (2003). Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* **2**: 1-8.
- Glass N.L. and Kulda G.A. (1992). Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 201-224.
- Glass N.L., Vollmer S.J., Staben C., Metzberg R.L., and Yanofsky C. (1988). DNAs of the two mating type alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. *Science* **241**: 570-573.

- Glass N.L., Rasmussen C., Roca M.G., and Read N.D. (2004). Hyphal homing, fusion and mycelia interconnectedness. *Trends in Microbiology* **12**: 135-141.
- Göre M.E. (2009). Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from chrysanthemum in Turkey. *Phytoparasitica* **37**: 87-94.
- Goryachev A.B., Lichius A., Wright G.D., and Read N.D. (2012). Excitable behavior can explain the “ping-pong” mode of communication between cells using the same chemoattractant. *Bioessays* **34**: 259-266.
- Green R.J. (1981). An Overview. In: *Fungal Wilt Diseases of Plants*, Mace M.E., Bell A.A., and Beckman C.H. (eds.), pp. 1-20. Academic Press, New York.
- Grigoriev I.V., Nordberg H., Shabalov I., Aerts A., Cantor M., Goodstein D., Kuo A., Minovitsky S., Nikitin R., Ohm R.A., Otilar R., Poliakov A., Ratnere I., Riley R., Smirnova T., Rokhsar D., and Dubchak I. (2012). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Research* **40**: D26-32.
- Guzzo R.M., Wigle J., Salih M., Moore E.D., and Tuana B.S. (2004). Regulated expression and temporal induction of the tail-anchored sarcolemmal-membrane-associated protein is critical for myoblast fusion. *Biochemical Journal* **381**: 599-608.
- Hadizadeh I. and Banihashemi Z. (2007). Vegetative compatibility grouping of *Verticillium dahliae* from pistachio in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* **46**: 272-284.
- Hafez M., Iranpour M., Mullineux S.T., Sethuraman J., Wosnitza K.M., Lehn P., Kroeker J., Loewen P.C., Reid J., and Hausner G. (2012) Identification of group I introns within the SSU rDNA gene in species of *Ceratocystiopsis* and related taxa. *Fungal Biology* **116**: 98-111.
- Hagiwara H. (1990). Differentiation of the pathogenicity of *Verticillium dahliae* in Japan (in Japanese). *Plant Protection* **44**: 299-303.
- Hall C., Welch J., Kowbel D.J., and Glass N.L. (2010). Evolution and diversity of a fungal self/nonself recognition locus. *PLoS ONE* **5**: e14055.
- Hamann A., Brust D., and Osiewacz H.D. (2008). Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. *Trends in Microbiology* **16**: 276-283.
- Hanahan D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover D.M. (ed.), *DNA cloning: a practical approach*, vol. 1, IRL Press, McLean, Virginia, p. 109.
- Hansen H.N. and Smith R.E. (1932). The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **22**: 953-964.
- Hartl D.L., Dempster E.R., and Brown S.R. (1975). Adaptive significance of vegetative incompatibility in *Neurospora crassa*. *Genetics* **81**: 553-569.
- Hastie A.C. (1962). Genetic recombination in the hop-wilt fungus *Verticillium albo-atrum*. *Journal of General Microbiology* **27**: 373-382.
- Hastie A.C. (1964). The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. *Genetical Research* **5**: 305-315.
- Hastie A.C. (1967). Mitotic recombination in conidiophores of *Verticillium albo-atrum*. *Nature* **214**: 249-252.
- Hastie A.C. (1968). Phialide analysis of mitotic recombination in *Verticillium*. *Molecular and General Genetics* **102**: 232-240.
- Hastie A.C. (1973). Hybridization of *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*. *Transactions of the British Mycological Society* **60**: 511-523.
- Hastie A.C. (1978). Genetic analysis of species limits in *Verticillium*. In: *Taxonomy of Fungi*, Subramanian C.V. (ed.), pp. 155-163. University of Madras, India.
- Hastie A.C. (1981). The genetics of conidial fungi. In: *Biology of conidial fungi*, vol. 2, Cole G.T. and Kendrick W.B. (eds.), pp. 511-543. Academic Press, New York.
- Hastie A.C. and Heale J.B. (1984). Genetics of *Verticillium*. *Phytopathologia Mediterranea* **23**: 130-162.
- Haugen P., Simon D.M., and Bhattacharya D. (2005). The natural history of group I introns. *Trends in Genetics* **21**: 111-119.
- Hawksworth D.L. and Talboys P.W. (1970). *C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria*. No 255. *Verticillium albo-atrum*. No 256. *V. dahliae*. CABI, Kew, England.

- Hawthorne B.T. and Rees-George J. (1996). Use of nitrate non-utilizing mutants to study vegetative incompatibility in *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*), especially members of mating populations I, V and VI. *Mycological Research* **100**: 1075-1081.
- Hay F.S. (1995). Unusual germination of spores of *Arthrotrichum conoides* and *A. cladodes*. *Mycological Research* **99**: 981-982.
- Heale J.B. (1966). Heterokaryon synthesis and morphogenesis in *Verticillium*. *Journal of General Microbiology* **45**: 419-427.
- Heale J.B. (1988). *Verticillium* spp., the cause of vascular wilts in many species. *Advances in Plant Pathology* **6**: 291-312.
- Heale J.B. and Isaac I. (1965). Environmental factors in the production of dark resting structures in *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *Transactions of the British Mycological Society* **48**: 39-50.
- Heale J.B. and Typas M.A. (1976). Genetical aspects of variation in *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. In: *Proceedings of the 2nd International Verticillium Symposium*, p. 19. University of California, Berkeley, CA.
- Heaton L., Obara B., Grau V., Jones N., Nakagaki T., Boddy L., and Fricker M.D. (2012). Analysis of fungal networks. *Fungal Biology Reviews* **26**: 12-29.
- Hellens R. and Mullineaux P. (2000). A guide to *Agrobacterium* binary vectors. *Trends in Plant Science* **5**: 446-451.
- Herrera M.L., Vallor A.C., Gelfond J.A., Patterson T.F., and Wickes B.L. (2009). Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA copy numbers in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* **47**: 1325-1332.
- Hibbett D.S. (1996). Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in the nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi. *Molecular Biology and Evolution* **13**: 903-909.
- Hickey P.C., Jacobson D.J., Read N.D., and Glass N.L. (2002). Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **37**: 109-119.
- Hiemstra J.A. and Rataj-Guranowska M. (2003). Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from the Netherlands as compared to VCG diversity in Europe and in the USA. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 827-839.
- Hilioti Z., Sabbagh W., Paliwal S., Bergmann A., Goncalves M.D., Bardwell L., and Levchenko A. (2008). Oscillatory phosphorylation of yeast Fus3 MAP kinase controls periodic gene expression and morphogenesis. *Current Biology* **18**: 1700-1706.
- Holsters M., De Waele D., Depicker A., Messens E., Van Montagu M., and Schell J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics* **163**: 181-187.
- Hong S.G., Liu D., and Pryor B.M. (2005). Restriction mapping of the IGS region in *Alternaria* spp. reveals variable and conserved domains. *Mycological Research* **109**: 87-95.
- Hong W. (2005). SNAREs and traffic. *Biochimica et Biophysica Acta* **1744**: 493-517.
- Hooykaas P.J.J., Roobol, C., and Schilperoort R.A. (1979). Regulation of the transfer of Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of General Microbiology* **110**: 99-109.
- Horiuchi S., Hagiwara H., and Takeuchi S. (1990). Host specificity of isolates of *Verticillium dahliae* towards cruciferous and solanaceous plants. In: *Biological Control of Soil-Borne Pathogens*, Hornby D. (ed.). CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Horwitz B.A., Sharon A., Lu S.-W., Ritter V., Sandrock T.M., Yoder O.C., and Turgeon B.G. (1999). A G protein alpha subunit from *Cochliobolus heterostrophus* involved in mating and appressorium formation. *Fungal Genetics and Biology* **26**: 19-32.
- Howlett B.J., Rolls B.D., and Cozijnsen A.J. (1997). Organisation of ribosomal DNA in the ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Microbiological Research* **152**: 261-267.
- Hutchison E., Brown S., Tian C.G., and Glass N.L. (2009). Transcriptional profiling and functional analysis of heterokaryon incompatibility in *Neurospora crassa* reveals that reactive oxygen species, but not metacaspases, are associated with programmed cell death. *Microbiology* **155**: 3957-3970.

- Hutchison E.A., Bueche J.A., and Glass N.L. (2012). Diversification of a protein kinase cascade: IME-2 is involved in nonself recognition and programmed cell death in *Neurospora crassa*. *Genetics* **192**: 467-482.
- Hutchison E.A. and Glass N.L. (2010). Meiotic regulators Ndt80 and Ime2 have different roles in *Saccharomyces* and *Neurospora*. *Genetics* **185**: 1271-1282.
- Hutchison E.A. and Glass N.L. (2012). Programmed cell death and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. In Witzany G. (ed.), *Biocommunication of fungi*, Springer Science+Business Media, Dordrecht, Netherlands, pp. 115-138.
- Hyakumachi M. and Ui T. (1987). Non-self-anastomosing isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from fields of sugarbeet monoculture. *Transactions of the British Mycological Society* **89**: 155-159.
- Ikeda K., Banno S., Watanabe K. et al. (2012). Association of *Verticillium dahliae* and *Verticillium longisporum* with Chinese cabbage yellows and their distribution in the main production areas of Japan. *Journal of General Plant Pathology* **78**: 331-337.
- Ikeda K., Inoue K., Nakamura H., Hamanaka T., Ohta T., Kitazawa H., Kida C., Kanematsu S., and Park P. (2011). Genetic analysis of barrage line formation during mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology* **115**: 80-86.
- Inderbitzin P., Bostock R.M., Davis R.M., Usami T., Platt H.W., and Subbarao K.V. (2011a). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS ONE* **6**: e28341.
- Inderbitzin P., Davis R.M., Bostock R.M., and Subbarao K.V. (2011b). The ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range. *PLoS ONE* **6**: e18260.
- Inderbitzin P., Davis R.M., Bostock R.M., and Subbarao K.V. (2013). Identification and differentiation of *Verticillium* species and *V. longisporum* lineages by simplex and multiplex PCR assays. *PLoS ONE* **8**: e65990.
- Index Fungorum (2013). Διαδικτυακή βάση δεδομένων: <http://www.indexfungorum.org>.
- Inoue K., Kanematsu S., Park P., and Ikeda K. (2011). Cytological analysis of mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology* **115**: 87-95.
- Isaac I. (1953). A comparative study of pathogenic isolates of *Verticillium*; *V. nubilum* Pethybr. and *V. tricorpus* sp. nov. *Transactions of the British Mycological Society* **32**: 137-157.
- Isaac I. (1957). *Verticillium*-wilt of Brussels sprout. *Annals of Applied Biology* **45**: 276-283.
- Ishikawa F.H., Souza E.A., Read N.D. and Roca M.G. (2010). Live-cell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Biology* **114**: 2-9.
- Ishikawa F.H., Souza E.A., Shoji J.-y., Connolly L., Freitag M., Read N.D., and Roca M.G. (2012). Heterokaryon incompatibility is suppressed following conidial anastomosis tube fusion in a fungal plant pathogen. *PLoS ONE* **7**: e31175.
- Jackson C.J., Barton R.C., and Evans E.G.V. (1999). Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 931-936.
- Jacobson D.J., Beurkens K., and Klomparens L. (1998). Microscopic and ultrastructural examination of vegetative incompatibility in partial diploids heterozygous at *het* loci in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **23**: 45-56.
- Jacobson D.J. (1992). Control of mating type heterokaryon incompatibility by the *tol* gene in *Neurospora crassa* and *N. tetrasperma*. *Genome* **35**: 347-353.
- Jahn R. and Scheller R.H. (2006). SNAREs – engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**: 631-643.
- Jiménez-Díaz R.M., Cirulli M., Bubici G., Jiménez-Gasco María del Mar, Antoniou P.P., and Tjamos E.C. (2012). *Verticillium* wilt, a major threat to olive production: current status and future prospects for its management. *Plant Disease* **96**: 304-329.
- Jiménez-Díaz R.M., Mercado-Blanco J., Rodríguez-Jurado D., Giménez-Jaime A., García-Jiménez J., and Armengol J. (2006). Genetic and virulence diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting artichoke in eastern-central Spain. *Phytopathology* **96**: 288-298.

- Jiménez-Gasco M.M., Malcolm G.M., Berbegal M., Armengol J., and Jiménez-Díaz R.M. (2014). Complex molecular relationship between Vegetative Compatibility Groups in *Verticillium dahliae*: VCGs do not always align with clonal lineages. *Phytopathology* (in press).
- Jo Y.-K., Chang S.W., Rees J., and Jung G. (2008). Reassessment of vegetative compatibility of *Sclerotinia homoeocarpa* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology* **98**: 108-114.
- Joaquim T.R. and Rowe R.C. (1990). Reassessment of vegetative compatibility relationships among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology* **80**: 1160-1166.
- Joaquim T.R. and Rowe R.C. (1991). Vegetative compatibility and virulence of strains of *Verticillium dahliae* from soil and potato plants. *Phytopathology* **81**: 552-558.
- Johansen J.S. and Haugen P. (2001). A new nomenclature of group I introns in ribosomal DNA. *RNA* **7**: 935-936.
- Johansson A., Goud J.K.C., and Dixelius C. (2006). Plant host range of *Verticillium longisporum* and microsclerotia density in Swedish soils. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 139-149.
- Jonge R. de, Bolton M.D., Kombrink A., van den Berg G.C.M., Yadeta K.A., and Thomma B.P.H.J. (2013). Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Research* **23**: 1271-1282.
- Jonge R. de, Bolton M.D., and Thomma B.P. (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 400-406.
- Jonge R. de, Esse H.P. van, Maruthachalam K., Bolton M.D., Santhanam P., Saber M.K., Zhang Z., Usami T., Lievens B., Subbarao K.V., and Thomma B.P.H.J. (2012). Tomato immune receptor *Ve1* recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **27**: 5110-5115.
- Käfer E. (1961). The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **46**: 1581-1609.
- Kaneko I., Dementhon K., Xiang Q., and Glass N.L. (2006). Nonallelic interactions between *het-c* and a polymorphic locus, *pin-c*, are essential for nonself recognition and programmed cell death in *Neurospora crassa*. *Genetics* **172**: 1545-1555.
- Karapapa V.K., Bainbridge B.W., and Heale J.B. (1997). Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological Research* **101**: 1281-1294.
- Karapapa V.K. and Typas M.A. (2001). Molecular characterization of the host-adapted pathogen *Verticillium longisporum* on the basis of a group-I intron in the nuclear SSU-rRNA gene. *Current Microbiology* **42**: 217-224.
- Kasuga T. and Glass N.L. (2008). Dissecting colony development of *Neurospora crassa* using mRNA profiling and comparative genomics approaches. *Eukaryotic Cell* **7**: 1549-1564.
- Kays A.M. and Borkovich K.A. (2004). Severe impairment of growth and differentiation in a *Neurospora crassa* mutant lacking all heterotrimeric G alpha proteins. *Genetics* **166**: 1229-1240.
- Katan T. (2000). Vegetative compatibility in populations of *Verticillium* – An overview. In: *Advances in Verticillium Research and Disease Management*, Tjamos E., Rowe R.C., Heale J.B., and Fravel D. (eds.), pp. 69-86. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Kausarud H., Saetre G.P., Schmidt O., Decock C., and Schumacher T. (2006). Genetics of self/nonself recognition in *Serpula lacrymans*. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 503-510.
- Kellner M., Burmester A., Wostemeyer A., and Wostemeyer J. (1993). Transfer of genetic information from the mycoparasite *Parasitella parasitica* to its host *Absidia glauca*. *Current Genetics* **23**: 334-337.
- Kemp H.A. and Sprague G.F. Jr. (2003). Far3 and five interacting proteins prevent premature recovery from pheromone arrest in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 1750-1763.

- Kenoth R., Simanshu D.K., Kamlekar R.K., Pike H.M., Molotkovsky J.G., Benson L.M., Bergen H.R., Prendergast F.G., Malinina L., Venyaminov S.Y., Patel D.J., and Brown R.E. (2010). Structural determination and tryptophan fluorescence of heterokaryon incompatibility C2 protein (HET-C2), a fungal Glycolipid transfer protein (GLTP), provide novel insights into Glycolipid specificity and membrane interaction by the GLTP-fold. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 13066-13078.
- Kerényi Z., Olah B., Jeney A., Hornok L., and Leslie J.F. (2006). The homologue of *het-c* of *Neurospora crassa* lacks vegetative compatibility function in *Fusarium proliferatum*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 6527-6532.
- Kim H. and Borkovich K.A. (2004). A pheromone receptor gene, *pre-1*, is essential for mating type specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* **52**: 1781-1798.
- Kim H. and Borkovich K.A. (2006). Pheromones are essential for male fertility and sufficient to direct chemotropic polarized growth of trichogynes during mating in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **5**: 544-554.
- Klebahn H. (1913). Beiträge zur Kenntnis der Fungi Imperfecti I. Eine *Verticillium*-Krankheit auf Dahlien. *Mykologisches Zentralblatt* **3**: 49-66.
- Klittich C.J.R. and Leslie J.F. (1988). Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikoroii*). *Genetics* **118**: 417-423.
- Klosterman S.J., Atallah Z.K., Vallad G.E., and Subbarao K.V. (2009). Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium* species. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 39-62.
- Klosterman S.J., Subbarao K.V., Kang S., Veronese P., Gold S.E., Thomma B.P.H.J., Chen Z., Henrissat B., Lee Y.-H., Park J., et al. (2011). Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathogens* **7**: e1002137.
- Koenraadt H., Somerville S.C., and Jones A.L. (1992). Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* **82**: 1348-1354.
- Köhler E. (1930). Zur Kenntnis der vegetativen Anastomosen der Pilze (II. Mitteilung). *Planta* **10**: 495-522.
- Koike M., Fujita M., Nagao H., and Oshima S. (1996). Random amplified polymorphic DNA analysis of Japanese isolates of *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum*. *Plant Disease* **80**: 1224-1227.
- Konopleva M., Zhao S., Xie Z., Segall H., Younes A., et al. (1999). Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **457**: 217-236.
- Korolev, N., Elad, Y., and Katan, T. (2008b). Vegetative compatibility grouping in *Botrytis cinerea* using sulphate non-utilizing mutants. *European Journal of Plant Pathology* **122**: 369-383.
- Korolev N. and Katan T. (1997). Improved medium for selecting nitrate-nonutilizing (*nit*) mutants of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **87**: 1067-1070.
- Korolev N. and Katan T. (1999). Vegetative compatibility grouping in *Verticillium nigrescens* and *V. tricorpus*. *Mycological Research* **103**: 65-76.
- Korolev N., Katan J., and Katan T. (2000). Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in Israel: Their distribution and association with pathogenicity. *Phytopathology* **90**: 529-536.
- Korolev N., Pérez-Artés E., Mercado-Blanco J., Bejarano-Alcázar J., Rodríguez-Jurado D., Jiménez-Díaz R.M., Katan T., and Katan J. (2008). Vegetative compatibility of cotton-defoliating *Verticillium dahliae* in Israel and its pathogenicity to various crop plants. *European Journal of Plant Pathology* **122**: 603-617.
- Kruskal W.H. and Wallis W.A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* **47**: 583-621.
- Krystofova S. and Borkovich K.A. (2005). The heterotrimeric G-protein subunits GNG-1 and GNB-1 form a G $\beta\gamma$ dimer required for normal female fertility, asexual development, and Ga protein levels in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **4**: 365-378.

- Kushner S.R. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In: *Genetic Engineering*, Boyer H.B. and Nicosia S. (eds.), pp. 17-23. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Holland.
- Labarère J. (1973) Properties of an incompatibility system in *Podospora anserina* fungus and value of this system for the study of incompatibility. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Série D: Sciences Naturelles* **276**: 1301-1304.
- Labarère J., Bégueret J., and Bernet J. (1974). Incompatibility in *Podospora anserina*: comparative properties of the antagonistic cytoplasmic factors of a nonallelic system. *Journal of Bacteriology* **120**: 854-860.
- Lafontaine D.L. and Smith M.L. (2012). Diverse interactions mediate asymmetric incompatibility by the *het-6* supergene complex in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **49**: 65-73.
- Laibach F. (1928). Über Zellfusionen bei Pilzen. *Planta* **5**: 340-359.
- Lane E.B. and Carlile M.J. (1979). Post-fusion somatic incompatibility in plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Journal of Cell Science* **35**: 339-354.
- Latunde-Dada A., O'Connell R., Nash C., and Lucas J. (1999). Stomatal penetration of cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves by a *Colletotrichum* species causing latent anthracnose. *Plant Pathology* **48**: 777-785.
- Lee C., Lee S., Shin S.G., and Hwang S. (2008). Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78**: 371-376.
- Leeder A.C., Jonkers W., Li J., and Glass N.L. (2013). Early colony establishment in *Neurospora crassa* requires a MAP kinase regulatory network. *Genetics* **195**: 883-898.
- Leeder A.C., Palma-Guerrero J., and Glass N.L. (2011). The social network: deciphering fungal language. *Nature Reviews Microbiology* **9**: 440-451.
- Leipe D.D., Koonin E.V., and Aravind L. (2004). STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology* **343**: 1-28.
- Leslie J.F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* **31**: 127-150.
- Leslie J.F. and Yamashiro C.T. (1997). Effects of the *tol* mutation on allelic interactions at *het* loci in *Neurospora crassa*. *Genome* **40**: 834-840.
- Levene H. (1960). Robust tests for equality of variances. In: *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*, Olkin I. et al. (eds.), pp. 278-292. Stanford University Press, Stanford, CA.
- Li S.I. and Purugganan M.D. (2010). The cooperative amoeba: *Dictyostelium* as a model for social evolution. *Trends in Genetics* **27**: 48-54.
- Li Z. and Zhang Y. (2005). Predicting the secondary structures and tertiary interactions of 211 group I introns in IE subgroup. *Nucleic Acids Research* **33**: 2118-2128.
- Lichius A. (2010). Cell fusion in *Neurospora crassa*. Ph.D thesis, University of Edinburgh, Edinburgh, UK.
- Lichius A., Berepiki A., and Read N.D. (2011). Form follows function – the versatile fungal cytoskeleton. *Fungal Biology* **115**: 518-540.
- Lichius A., Roca M.G., and Read, N.D. (2010). How to distinguish conidial anastomosis tubes (CATs) from germ tubes, and to discriminate between cell fusion mutants blocked in CAT formation and CAT homing. In: *The Neurospora Protocol Guide*. <http://www.fgsc.net/Neurospora/NeurosporaProtocolGuide.htm>.
- Lichius A., Yáñez-Gutiérrez M.E., Read N.D., and Castro-Longoria E. (2012). Comparative live-cell imaging analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* reveal novel features of the filamentous fungal polarisome. *PLoS One* **71**: e30372.
- Lickey E.B., Hughes K.W., and Petersen R.H. (2003). Variability and phylogenetic incongruence of an SSU nrDNA group I intron in *Artomyces*, *Auriscalpium*, and *Lentinellus* (Auriscalpiaceae: Homobasidiomycetes). *Molecular Biology and Evolution* **20**: 1909-1916.

- Livanos P., Galatis B., Quader H., and Apostolakos P. (2012). Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. *Cytoskeleton* **69**: 1-21.
- Λιγοξυγκάκης Ε.Κ. (1998). *Μελέτη των βερτισιλλιώσεων των φυτών στη νήσο Κρήτη*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Γεωπονίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Ligoixgakis E.K. (2009). Determination of pathotypes of *Verticillium dahliae* and new hosts of *V. dahliae* race-2, and spread of the pathogen in Crete. In: *Proceedings of the 10th International Verticillium Symposium*, Tjamos E.C. (ed.), p. 101. Corfu, Greece.
- Ligoixgakis E.K. and Markakis E.A. (2012). Incidence and pathogenicity of races and isolates of *Verticillium dahliae* in Crete, southern Greece. *Phytoparasitica* **40**: 493-506.
- López-Berges M.S., Rispaïl N., Prados-Rosales R.C., and Di Pietro A. (2010). A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell* **22**: 2459-2475.
- Loubradou G. and Turcq B. (2000). Vegetative incompatibility in filamentous fungi: a roundabout way of understanding the phenomenon. *Research in Microbiology* **151**: 239-245.
- Loubradou G., Bégueret J., and Turcq B. (1997). A mutation in an HSP90 gene affects the sexual cycle and suppresses vegetative incompatibility in the fungus *Podospora anserina*. *Genetics* **147**: 581-588.
- Loubradou G., Bégueret J., and Turcq B. (1999). MOD-D, a Ga subunit of the fungus *Podospora anserina*, is involved in both regulation of development and vegetative incompatibility. *Genetics* **152**: 519-528.
- Lu B.C.K. (2006). Programmed cell death in fungi. In: Kües U. and Fischer R. (eds.), *The mycota: growth, differentiation, and sexuality*, I. Springer, New York, pp. 167-187.
- Lu S., Lyngholm L., Yang G., Bronson C., Yoder O.C., and Turgeon B.G. (1994). Tagged mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 12649-12653.
- Lumbsch H.T. and Huhndorf S.H. (2010). Myconet Volume 14. *Fieldiana, Life and Earth Sciences* **1**: 1-64.
- MacIntyre D.L., Miyata S.T., Kitaoka M., and Pukatzki S. (2010). The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **107**: 19520-19524.
- Maddelain M.L., Dos Reis S., Duvezin-Caubet S., Coulyary-Salin B., and Saupé S.J. (2002). Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**: 7402-7407.
- Maerz S., Dettmann A., Ziv C., Liu Y., Valerius O., Yarden O., and Seiler S. (2009). Two NDR kinase- MOB complexes function as distinct modules during septum formation and tip extension in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* **74**: 707-723.
- Maerz S., Ziv C., Vogt N., Helmstaedt K., Cohen N., Gorovits R., Yarden O., and Seiler S. (2008). The nuclear Dbf2-related kinase COT1 and the mitogen-activated protein kinases MAK1 and MAK2 genetically interact to regulate filamentous growth, hyphal fusion and sexual development in *Neurospora crassa*. *Genetics* **179**: 1313-1325.
- Maheshwari R. and Navaraj A. (2008). Senescence in fungi: the view from *Neurospora*. *FEMS Microbiology Letters* **280**: 135-143.
- Maleszka R. and Clark-Walker G.D. (1993). Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number. *Yeast* **9**: 53-58.
- Marek S., Wu J., Glass N.L., Gilchrist D.G., and Bostock R. (1998). Programmed cell death in fungi: Heterokaryon incompatibility involves nuclear DNA degradation. *Phytopathology* **88**: S58.
- Marek S., Wu J., Glass N.L., Gilchrist D.G., and Bostock R. (2003). Nuclear DNA degradation during heterokaryon incompatibility in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **40**: 126-137.
- Martin D.E. and Hall M.N. (2005). The expanding TOR signaling network. *Current Opinion in Cell Biology* **17**: 158-166.

- Martin F., Kohler A., Murat C., Balestrini R., Coutinho P.M. *et al.* (2010). Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* **464**: 1033-1038.
- Martin F.N. (2010). Mitochondrial haplotype analysis as a tool for differentiating isolates of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **100**: 1231-1239.
- Maruthachalam K., Atallah Z.K., Vallad G.E., Klosterman S.J., Hayes R.J., Davis R.M., and Subbarao K.V. (2010). Molecular variation among isolates of *Verticillium dahliae* and polymerase chain reaction-based differentiation of race. *Phytopathology* **100**: 1222-1230.
- Marzluf G.A. (1981). Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiological Reviews* **45**: 437-461.
- Marzluf G.A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 17-32.
- Mathur V., Seuring C., Riek R., Saupé S.J., and Liebman S.W. (2012). Localization of HET-S to the cell periphery, not to [Het-s] aggregates, is associated with [Het-s]-HET-S toxicity. *Molecular and Cellular Biology* **32**: 139-153.
- Maymon M., Zveibil A., Pivonia S., Minz D., and Freeman S. (2006). Identification and characterization of benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.). *Phytopathology* **96**: 542-548.
- Mbofung G.Y., Hong S.G., and Pryor B.M. (2007). Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- α , and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. *Phytopathology* **97**: 87-98.
- McCabe P., Gallagher M., and Deacon J. (1999). Microscopic observation of perfect hyphal fusion in *Rhizoctonia solani*. *Mycological Research* **103**.
- McCallum B.D., Tekauz A., and Gilbert J. (2004). Barrage zone formation between vegetatively incompatible *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates. *Phytopathology* **94**: 432-437.
- McKittrick T.R. and De Tomaso A.W. (2010). Molecular mechanisms of allorecognition in a basal chordate. *Seminars in Immunology* **22**: 34-38.
- Micales J.A., Bonde M.R., and Peterson G.L. (1986). The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon* **27**: 405-449.
- Micali C.O. and Smith M.L. (2003). On the independence of barrage formation and heterokaryon incompatibility in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 209-219.
- Micali C.O. and Smith M.L. (2006). A nonself recognition gene complex in *Neurospora crassa*. *Genetics* **173**: 1991-2004.
- Michel F. and Westhof E. (1990). Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *Journal of Molecular Biology* **216**: 585-610.
- Milgroom M.G. (1996). Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 457-477.
- Milgroom M.G. and Cortesi P. (1999). Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**: 10518-10523.
- Milgroom M.G. and Cortesi P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 311-338.
- Min K., Shin Y., Son H., Lee J., Kim J.-C., Choi G.J., and Lee Y.-W. (2012). Functional analyses of the nitrogen regulatory gene *areA* in *Gibberella zeae*. *FEMS Microbiology Letters* **334**: 66-73.
- Mir-Rashed N., Jacobson D.J., Dehghany M.R., Micali C.O., and Smith M.L. (2000). Molecular and functional analyses of incompatibility genes at *het-6* in a population of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **30**: 197-205.
- Molnár A., Sulyok L., and Hornok L. (1990). Parasexual recombination between vegetatively incompatible strains in *Fusarium oxysporum*. *Mycological Research* **94**: 393-398.

- Morgenstern I., Powlowski J., Ishmael N., Darmond C., Marqueteau S., Moisan M.-C., Quenneville G., and Tsang A. (2012). A molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal Biology* **116**: 489-502.
- Morton A., Tabrett A.M., Carder J.H., and Barbara D.J. (1995). Sub-repeat sequences in the ribosomal RNA intergenic regions of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. *Mycological Research* **99**: 257-266.
- Moukhamedov R., Hu X., Nazar R. N., and Robb J. (1994). Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* **84**: 256-259.
- Mousavi S.A.A. and Robson G.D. (2003). Entry into the stationary phase is associated with a rapid loss of viability and an apoptotic-like phenotype in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology* **39**: 221-229.
- Muirhead C.A., Glass N.L., and Slatkin M. (2002). Multi-locus self-recognition systems in fungi as a cause of trans-species polymorphism. *Genetics* **161**: 633-641.
- Mullins E.D., Chen X., Romaine P., Raina R., Geiser D.M., and Kang S. (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* **91**: 173-180.
- Müller K.M., Cannone J.J., Gutell R.R., and Sheath R.G. (2001). A structural and phylogenetic analysis of the group IC1 introns in the order *Bangiales* (*Rhodophyta*). *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1654-1667.
- Murray M. and Thompson W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**: 4321-4325.
- Mylyk O.M. (1975). Heterokaryon incompatibility genes in *Neurospora crassa* detected using duplication-producing chromosome rearrangements. *Genetics* **80**: 107-124.
- Naito H. (1978). Hyphal fusion in *Fusarium* leaf spot fungus of rice plants. *Transactions of the Mycological Society of Japan* **19**: 11-21.
- NCBI (2013). National Center for Biotechnology Information, διαδικτυακή βάση δεδομένων: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- NCBI GenBank (2013). Διαδικτυακή βάση δεδομένων: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.
- NCBI Genome (2013). Διαδικτυακή βάση δεδομένων: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>.
- NCBI Taxonomy (2013). Διαδικτυακή βάση δεδομένων: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.
- Nest M.A. van der, Steenkamp E.T., Slippers B., Mongae A., Zyl K. van, Stenlid J., Wingfield M.J., and Wingfield B.D. (2011). Gene expression associated with vegetative incompatibility in *Amylostereum areolatum*. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 1034-1043.
- Newhouse J. and MacDonald W. (1991). The ultrastructure of hyphal anastomoses between vegetatively compatible and incompatible virulent and hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. *Canadian Journal of Botany* **69**: 602-614.
- Newmeyer D. (1970). A suppressor of the heterokaryon-incompatibility associated with mating type in *Neurospora crassa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **12**: 914-926.
- Nielsen H. and Johansen S.D. (2009). Group I introns: moving in new directions. *RNA Biology* **6**: 375-383.
- Nikoh N. and Fukatsu T. (2001). Evolutionary dynamics of multiple group I introns in nuclear ribosomal RNA genes of endoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1631-1642.
- Nugent T. and Jones D.T. (2009). Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. *BMC Bioinformatics* **10**: 159.
- Nuss D.L. (2010). Mycoviruses. In: Borkovich K.A. and Ebbole D.J. (eds.), Cellular and molecular biology of filamentous fungi. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, pp. 145-152.
- Okoli C.A.N., Carder J.H., and Barbara D.J. (1993). Molecular variation and sub-specific groupings within *Verticillium dahliae*. *Mycological Research* **97**: 233-239.

- Okoli C.A.N., Carder J.H., and Barbara D.J. (1994). Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) and the relationships of some host-adopted isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology* **43**: 33-40.
- Omer M.A., Johnson D.A., and Rowe R.C. (2000). Recovery of *Verticillium dahliae* from North American certified seed potatoes and characterization of strains by vegetative compatibility and aggressiveness. *American Journal of Potato Research* **77**: 325-331.
- Page O.T. (1961). Variation in the banana-wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. *Canadian Journal of Botany* **39**: 545-557.
- Pál K., van Diepeningen A.D., Varga J., Hoekstra R.F., Dyer P.S., and Debets A.J. (2007). Sexual and vegetative compatibility genes in the aspergilli. *Studies in Mycology* **59**: 19-30.
- Palma-Guerrero J., Hall C.R., Kowbel D., Welch J., Taylor J.W., Brem R.B., and Glass N.L. (2013). Genome wide association identifies novel loci involved in fungal communication. *PLoS Genetics* **9**: e1003669.
- Palma-Guerrero J., Leeder A.C., Welch J., and Glass N.L. (2014). Identification and characterization of LFD1, a novel protein involved in membrane merger during cell fusion in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* (in press; DOI: 10.1111/mmi.12545).
- Pandey A., Roca M.G., Read N.D., and Glass N.L. (2004). Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **3**: 348-358.
- Πάντου Ε. (2005). Δομή και οργάνωση γονιδιώματος του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*. Διδακτορική Διατριβή, Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Pantou M.P., Mavridou A., and Typas M.A. (2003). IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 159-174.
- Pantou M.P., Strunnikova O.K., Shakhnazarova V.Y., Vishneyskaya N.A., Papalouka V.G., and Typas M.A. (2005). Molecular and immunochemical phylogeny of *Verticillium* species. *Mycological Research* **109**: 889-902.
- Pantou M.P. and Typas M.A. (2005). Electrophoretic karyotype and gene mapping of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *FEMS Microbiology Letters* **245**: 213-220.
- Paoletti M., Buck K.W., and Brasier C.M. (2006). Selective acquisition of novel mating type and vegetative incompatibility genes via interspecies gene transfer in the globally invading eukaryote *Ophiostoma novo-ulmi*. *Molecular Ecology* **15**: 249-262.
- Paoletti M., Castroviejo M., Bégueret J., and Clavé C. (2001). Identification and characterization of a gene encoding a subtilisin-like serine protease induced during the vegetative incompatibility reaction in *Podospora anserina*. *Current Genetics* **39**: 244-252.
- Paoletti M. and Clavé C. (2007). The fungus-specific HET domain mediates programmed cell death in *Podospora anserina*. *Eukaryotic Cell* **6**: 2001-2008.
- Paoletti M. and Saupé S.J. (2009). Fungal incompatibility: evolutionary origin in pathogen defense? *Bioessays* **31**: 1201-1210.
- Paoletti M., Saupé S.J., and Clavé C. (2007). Genesis of a fungal non-self recognition repertoire. *PLoS ONE* **2**: e283.
- Papaioannou I.A., Dimopoulou C.D., and Typas M.A. (2013a). Structural and phylogenetic analysis of the rDNA intergenic spacer region of *Verticillium dahliae*. *FEMS Microbiology Letters* **347**: 23-32.
- Papaioannou I.A., Dimopoulou C.D., and Typas M.A. (2014). "Cryptic" group-I introns in the nuclear SSU-rRNA gene of *Verticillium dahliae*. *Current Genetics* (in press). DOI: 10.1007/s00294-013-0417-7.
- Papaioannou I.A., Ligoigakis E.K., Vakalounakis D.J., Markakis E.A., and Typas M.A. (2013b). Phytopathogenic, morphological, genetic and molecular characterization of a *Verticillium dahliae* population from Crete, Greece. *European Journal of Plant Pathology* **136**: 577-596.
- Paz Z., García-Pedrajas M.D., Andrews D.L., Klosterman S.J., Baeza-Montaña L., and Gold S.E. (2011). One step construction of *Agrobacterium*-recombination-ready-plasmids

- (OSCAR), an efficient and robust tool for ATMT based gene deletion construction in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 677-684.
- 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.
- Pegg G.F. (1974). Verticillium diseases. *Review of Plant Pathology* **53**: 157-182.
- Pegg G.F. (1989). Pathogenesis in vascular diseases of plants. In: *Vascular wilt diseases of plants*, Tjamos E.C. and Beckman C.H. (eds.), pp. 51-94. Springer-Verlag, Berlin.
- Pegg G.F. and Brady B.L. (2002). *Verticillium wilts*. CABI Publishing, New York.
- Perkins D.D. (1975). The use of duplication-generating rearrangements for studying heterokaryon incompatibility genes in *Neurospora*. *Genetics* **80**: 87-105.
- Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., and Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**: 785-786.
- Pethybridge G.H. (1918). Notes on some saprophytic species of fungi associated with diseased potato plants and tubers. *Transactions of the British Mycological Society* **6**: 104-120.
- Pinan-Lucarré B., Balguerie A., and Clavé C. (2005). Accelerated cell death in *Podospora* autophagy mutants. *Eukaryotic Cell* **4**: 1765-1774.
- Pinan-Lucarré B., Paoletti M., and Clavé C. (2007). Cell death by incompatibility in the fungus *Podospora*. *Seminars in Cancer Biology* **17**: 101-111.
- Pinan-Lucarré B., Paoletti M., Dementhon K, Coulary-Salin B., and Clavé C. (2003). Autophagy is induced during cell death by incompatibility and is essential for differentiation in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Molecular Microbiology* **47**: 321-333.
- Pontecorvo G. (1956). The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology* **10**: 393-400.
- Powell A.J., Jacobson D.J., and Natvig D.O. (2007). Ancestral polymorphism and linkage disequilibrium at the *het-6* region in pseudohomothallic *Neurospora tetrasperma*. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 896-904.
- Prados Rosales R.C. and Di Pietro A. (2008). Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* **7**: 162-171.
- Pramateftaki P.V., Antoniou P.P., and Typas M.A. (2000). The complete DNA sequence of the nuclear ribosomal RNA gene complex of *Verticillium dahliae*: intraspecific heterogeneity within the Intergenic Spacer Region. *Fungal Genetics and Biology* **29**: 19-27.
- Probst C., Ringel P., Boysen V., Wirsing L., Alexander M.M., Mendel R.R., and Kruse T. (2014). Genetic characterization of the *Neurospora crassa* molybdenum cofactor biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology* (in press; DOI: 10.1016/j.fgb.2014.02.004).
- Puhalla J.E. (1973). Differences in sensitivity of *Verticillium* species to ultraviolet irradiation. *Phytopathology* **63**: 1448-1492.
- Puhalla J.E. (1976). Glycerol as a selective agent for auxotrophs of *Verticillium dahliae*. *Journal of General Microbiology* **94**: 409-412.
- Puhalla J.E. (1979). Classification of isolates of *Verticillium dahliae* based on heterokaryon incompatibility. *Phytopathology* **69**: 1186-1189.
- Puhalla J.E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* **63**: 179-183.
- Puhalla J.E. and Hummel M. (1983). Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **73**: 1305-1308.
- Puhalla J.E. and Mayfield J.E. (1974). The mechanism of heterokaryotic growth in *Verticillium dahliae*. *Genetics* **76**: 411-422.
- Puhalla J.E. and Spieth P.T. (1985). A comparison of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikoro* (*Fusarium moniliforme*). *Experimental Mycology* **9**: 39-47.
- Punta M., Coggill P.C., Eberhardt R.Y., Mistry J., Tate J. et al. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **40**: D290-D301.
- Qi M. and Elion E.A. (2005). MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science* **118**: 3569-3572.

- Qin Q.-M., Vallad G.E., Wu B.M., and Subbarao K.V. (2006). Phylogenetic analyses of phytopathogenic isolates of *Verticillium* spp. *Phytopathology* **96**: 582-592.
- Raju N.B. (1980). Meiosis and ascospore genesis in *Neurospora*. *European Journal of Cell Biology* **23**: 208-223.
- Rataj-Guranowska M., Iukaszewska N., Carder J.H., and Barbara D.J. (1993). A rapid method for the selection of the vegetatively compatible *nit* mutants of two wilt pathogens. *Phytopathologia Polonica* **5**: 83-89.
- Rauyaree P., Ospina-Giraldo M.D., Kang S., Bhat R.G., Subbarao K.V., Grant S.J., and Dobinson K.F. (2005). Mutations in VMK1, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*. *Current Genetics* **48**: 109-116.
- Read N.D., Fleißner A., Roca M.G., and Glass, N.L. (2010). Hyphal fusion. In: Borkovich K.A. and Ebbole D. (eds.), *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington D.C., pp. 260-273.
- Read N.D., Goryachev A.B., and Lichius A. (2012). The mechanistic basis of self-fusion between conidial anastomosis tubes during fungal colony initiation. *Fungal Biology Reviews* **26**: 1-11.
- Read N.D., Lichius A., Shoji J.Y., and Goryachev A.B. (2009). Self-signalling and self-fusion in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* **12**: 608-615.
- Read N.D., Roca M.G. (2006). Vegetative hyphal fusion in filamentous fungi. In: Baluska F., Volkmann D., Barlow P.W. (eds.), *Cell-Cell channels*. Landes Bioscience, Georgetown, TX, pp 87-98.
- Réblová M., Gams W., and Seifert K.A. (2011). *Monilochaetes* and allied genera of the *Glomerellales*, and a reconsideration of families in the *Microascales*. *Studies in Mycology* **68**: 163-191.
- Reinke J. and Berthold G. (1879). Die Zersetzung der Kartoffel durch Pilze. *Untersuchungen aus dem Botanischen Laboratorium der Universität Göttingen* **1**: 1-100.
- Remesal E. and Navas-Cortés J.A. (2012). An improved growth medium to assess mycelial compatibility groups in *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology* **160**: 237-242.
- Riggle P.J. and Kumamoto C.A. (1998). Genetic analysis in fungi using restriction-enzyme-mediated integration. *Current Opinion in Microbiology* **1**: 395-399.
- Rinkevich B. (2004). Primitive immune systems: are your ways my ways? *Immunology Reviews* **198**: 25-35.
- Riquelme M., Bartnicki-García S., González-Prieto J.M., Sánchez-León E., Verdín-Ramos J.A., Beltrán-Aguilar A., and Freitag M. (2007). Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **6**: 1853-1864.
- Riquelme M., Reynaga-Pena C.G., Gierz G., and Bartnicki-García S. (1998). What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology* **24**: 101-109.
- Rizet G. (1952). Les phénomènes de barrage chez *Podospira anserina*. I. Analyse génétique des barrages entre les souches *S* et *s*. *Revue de Cytologie et de Biologie Végétales* **13**: 51-92.
- Roca M.G., Arlt J., Jeffree C.E., and Read N.D. (2005b). Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **4**: 911-919.
- Roca M.G., Davide L.C., Davide L.M., Mendes-Costa M.C., Schwan R.F., and Wheals A.E. (2004). Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. *Mycological Research* **108**: 1320-1326.
- Roca M.G., Davide L.C., Mendes-Costa M.C., and Wheals A. (2003). Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. *Fungal Genetics and Biology* **40**: 138-145.
- Roca M.G., Kuo H.C., Lichius A., Freitag M., and Read N.D. (2010). Nuclear dynamics, mitosis, and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **9**: 1171-1183.
- Roca M., Read N.D., Wheals A.E. (2005a). Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters* **249**: 191-198.

- Ronald P.C. and Beutler B. (2010). Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. *Science* **330**: 1061-1064.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., and Huelsenbeck J.P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539-542.
- Roper M., Ellison C., Taylor J.W., and Glass N.L. (2011). Nuclear and genome dynamics in multinucleate ascomycete fungi. *Current Biology* **21**: R786-R793.
- Rosa S.F., Powell A.E., Rosengarten R.D., Nicotra M.L., Moreno M.A., Grimwood J., Lakkis F.G., Dellaporta S.L., and Buss L.W. (2010). *Hydractinia* allodeterminant *alr1* resides in an immunoglobulin superfamily-like gene complex. *Current Biology* **20**: 1122-1127.
- Rousset F. and Roze D. (2007). Constraints on the origin and maintenance of genetic kin recognition. *Evolution* **61**: 2320-2330.
- Rowe R.C. (1985). Potato early dying – a serious threat to the potato industry. *American Potato Journal* **62**: 157-161.
- Rowe R.C. (1995). Recent progress in understanding relationships between *Verticillium* species and subspecific groups. *Phytoparasitica* **23**: 31-38.
- Ruiz-Roldán M.C., Köhli M., Roncero M.I., Philippsen P., Di Pietro A., and Espeso E.A. (2010). Nuclear dynamics during germination, conidiation, and hyphal fusion of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* **9**: 1216-1224.
- Sambrook J. and Russell D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Santhanam P. (2012). Random insertional mutagenesis in fungal genomes to identify virulence factors. In Bolton M.D. and Thomma B.P.H.J. (eds.), Plant fungal pathogens: methods and protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. **835**, pp. 509-517.
- Sarkar S., Iyer G., Wu J., and Glass N.L. (2002). Nonself recognition is mediated by HET-C heterocomplex formation during vegetative incompatibility. *The EMBO Journal* **21**: 4841-4850.
- Saupé S.J. (2007). A short history of small s: a prion of the fungus *Podospora anserina*. *Prion* **1**: 110–115.
- Saupé S.J. (2011). The [Het-s] prion of *Podospora anserina* and its role in heterokaryon incompatibility. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **22**: 460-468.
- Saupé S.J. (2000). Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 489-502.
- Saupé S., Clavé C., Sabourin M., and Bégueret J. (2000). Characterization of *hch*, the *Podospora anserina* homolog of the *het-c* heterokaryon incompatibility gene of *Neurospora crassa*. *Current Genetics* **38**: 39-47.
- Saupé S.J. and Daskalov A. (2012). The [Het-s] prion, an amyloid fold as a cell death activation trigger. *PLoS Pathogens* **8**: e: 1002687.
- Saupé S., Descamps C., Turcq B., and Bégueret J. (1994). Inactivation of the *Podospora anserina* vegetative incompatibility locus *het-c*, whose product resembles a glycolipid transfer protein, drastically impairs ascospore production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 5927-5931.
- Saupé S.J. and Glass N.L. (1997). Allelic specificity at the *het-c* heterokaryon incompatibility locus of *Neurospora crassa* is determined by a highly variable domain. *Genetics* **146**: 1299-1309.
- Saupé S.J., Kuldau G.A., Smith M.L., and Glass N.L. (1996). The product of the *het-C* heterokaryon incompatibility gene of *Neurospora crassa* has characteristics of a glycine-rich cell wall protein. *Genetics* **143**: 1589-1600.
- Saupé S.J., Turcq B., and Bégueret J. (1995a). Sequence diversity and unusual variability at the *het-c* locus involved in vegetative incompatibility in the fungus *Podospora anserina*. *Current Genetics* **27**: 466-471.
- Saupé S., Turcq B., and Bégueret J. (1995b). A gene responsible for vegetative incompatibility in the fungus *Podospora anserina* encodes a protein with a GTP-binding motif and Gb homologous domain. *Gene* **162**: 135-139.

- Sbrana C., Nuti M.P., and Giovannetti M. (2007). Self-anastomosing ability and vegetative incompatibility of *Tuber borchii* isolates. *Mycorrhiza* **17**: 667-675.
- Schmidt S.M. and Panstruga R. (2011). Pathogenomics of fungal plant parasites: what have we learnt about pathogenesis? *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 392-399.
- Schnathorst W.C. (1981). Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: *Fungal wilt diseases of plants*, Mace M.E., Bell A.A., and Beckman C.H. (eds.), pp. 81-111. Academic Press, New York.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., and Fungal Barcoding Consortium (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **109**: 6241-6246.
- Schreiber L.R. and Green R.J. (1966). Anastomosis in *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* **56**: 1110-1111.
- Szewczyk E. and Krappmann S. (2010). Conserved regulators of mating are essential for *Aspergillus fumigatus* cleistothecium formation. *Eukaryotic Cell* **9**: 774-783.
- Seuring C., Greenwald J., Wasmer C., Wepf R., Saupé S.J., Meier B.H., and Riek R. (2012). The mechanism of toxicity in HET-S/HET-s prion incompatibility. *PLoS Biology* **10**: e1001451.
- Sharon A., Finkelstein A., Shlezinger N., and Hatam I. (2009). Fungal apoptosis: function, genes and gene function. *FEMS Microbiology Reviews* **33**: 833-854.
- Shiu P.K.T. and Glass N.L. (1999). Molecular characterization of *tol*, a mediator of mating-type-associated vegetative incompatibility in *Neurospora crassa*. *Genetics* **151**: 545-555.
- Silar P. (2005). Peroxide accumulation and cell death in filamentous fungi induced by contact with a contestant. *Mycological Research* **109**: 137-149.
- Simon D.M., Hummel C.L., Sheeley S.L., and Bhattacharya D. (2005). Heterogeneity of intron presence or absence in rDNA genes of the lichen species *Physcia aipolia* and *P. stellaris*. *Current Genetics* **47**: 389-399.
- Simonin A., Palma-Guerrero J., Fricker M., and Glass N.L. (2012). Physiological significance of network organization in fungi. *Eukaryotic Cell* **11**: 1345-1352.
- Simonin A.R., Rasmussen C.G., Yang M., and Glass N.L. (2010). Genes encoding a striatin-like protein (*ham-3*) and a forkhead associated protein (*ham-4*) are required for hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **47**: 855-868.
- Smith M.L., Gibbs C.C., and Milgroom M.G. (2006). Heterokaryon incompatibility function of barrage-associated vegetative incompatibility genes (*vic*) in *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia* **98**: 43-50.
- Smith M.L., Micali O.C., Hubbard S.P., Mir-Rashed N., Jacobson D.J., and Glass N.L. (2000). Vegetative incompatibility in the *het-6* region of *Neurospora crassa* is mediated by two linked genes. *Genetics* **155**: 1095-1104.
- Smith T.F. (2008). Diversity of WD-repeat proteins. *Subcellular Biochemistry* **48**: 20-30.
- Smith R.P., Wellman K., Haidari L., Masuda H., and Smith M.L. (2013a). Nonself recognition through intermolecular disulfide bond formation of ribonucleotide reductase in *Neurospora*. *Genetics* **193**: 1175-1183.
- Smith R.P., Wellman K., and Smith M.L. (2013b). Trans-species activity of a nonself recognition domain. *BMC Microbiology* **13**: 63.
- Söding J., Biegert A., and Lupas A.N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research* **33**: W244-W248.
- Son M., Lee K.-M., Yu J., Kang M., Park J.M., Kwon S.-J., and Kim K.-H. (2013). The *HEX1* gene of *Fusarium graminearum* is required for fungal asexual reproduction and pathogenesis and for efficient viral RNA accumulation of *Fusarium graminearum* virus 1. *Journal of Virology* **87**: 10356, DOI: 10.1128/JVI.01026-13.
- Soulard A., Cohen A., and Hall M.N. (2009). TOR signaling in invertebrates. *Current Opinion in Cell Biology* **21**: 825-836.
- Staben C. and Yanofsky C. (1990). *Neurospora crassa* a mating-type region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**: 4917-4921.

- Strausbaugh C.A. (1993). Assessment of vegetative compatibility and virulence of *Verticillium dahliae* isolates from Idaho potatoes and tester strains. *Phytopathology* **83**: 1253-1258.
- Strausbaugh C.A., Schroth M.N., Weinhold A.R., and Hancock J.G. (1992). Assessment of vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* tester strains and isolates from California potatoes. *Phytopathology* **82**: 61-68.
- Swart K., Debets A.J., Bos C.J., Slakhorst M., Holub E.F., Hoekstra R.F. (2001). Genetic analysis in the asexual fungus *Aspergillus niger*. *Acta Biologica Hungarica* **52**: 335-343.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739.
- Tariq V.-N., Gutteridge C.S., and Jeffries P. (1985). Comparative studies of cultural and biochemical characteristics used for distinguishing species within *Sclerotinia*. *Transactions of the British Mycological Society* **84**: 381-397.
- Tenney K., Hunt I., Sweigard J., Pounder J.I., McClain C., Bowman E.J., and Bowman B.J. (2000). *Hex-1*, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 205-217.
- Tran V.T., Braus-Stromeier S.A., Timpner C., and Braus G.H. (2013). Molecular diagnosis to discriminate pathogen and apathogen species of the hybrid *Verticillium longisporum* on the oilseed crop *Brassica napus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**: 4467-4483.
- Trinci A.P.J. (1984). Regulation of hyphal branching and hyphal orientation. In: Jennings D.H. and Rayner A.D.M. (eds.), *The ecology and physiology of the fungal mycelium*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 23-52.
- Tsror L. and Levin A.G. (2003). Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* Kleb. isolates from Olive in Israel. *Journal of Phytopathology* **151**: 451-455.
- Tulasne L.R. and Tulasne C. (1863). *Selecta Fungorum Carpologia*. Imperial Press, Paris.
- Turcq B., Deleu C., Denayrolles M., and Bégueret J. (1991). Two allelic genes responsible for vegetative incompatibility in the fungus *Podospora anserina* are not essential for the cell viability. *Molecular and General Genetics* **228**: 265-269.
- Typas M.A. (1976). *Genetical aspects of the mechanisms of variation and differentiation in species of Verticillium*. Ph.D. thesis, University of London.
- Typas M.A. (1983). Heterokaryon incompatibility and interspecific hybridization between *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae* following protoplast fusion and microinjection. *Journal of General Microbiology* **129**: 3043-3056.
- Typas M.A., Griffen A.M., Bainbridge B.W., and Heale J.B. (1992). Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and sub-species in the genus *Verticillium*. *FEMS Microbiology Letters* **95**: 157-162.
- Typas M.A. and Heale J.B. (1976). Heterokaryosis and role of cytoplasmic inheritance in the dark resting structure formation in *Verticillium* spp. *Molecular and General Genetics* **146**: 17-26.
- Typas M.A. and Heale J.B. (1977). Analysis of ploidy levels in strains of *Verticillium* using a Coulter counter. *Journal of General Microbiology* **101**: 177-180.
- Typas M.A. and Heale J.B. (1978). Heterozygous diploid analyses via the parasexual cycle and a cytoplasmic gene of inheritance in *Verticillium* spp. *Genetical Research* **31**: 131-144.
- Typas M.A. and Heale J.B. (1979). Transfer of a cytoplasmic factor by micro-injection in *Verticillium*. *Journal of General Microbiology* **121**: 231-242.
- Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., and Leunissen J.A.M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* **35** (suppl. 2): W71-W74.

- Usami T., Ishigaki S., Takashina H., Matsubara Y., and Amemiya Y. (2007). Cloning of DNA fragments specific to the pathotype and race of *Verticillium dahliae*. *Journal of General Plant Pathology* **73**: 89-95.
- Usami T., Itoh M., and Amemiya Y. (2009). Asexual fungus *Verticillium dahliae* is potentially heterothallic. *Journal of General Plant Pathology* **75**: 422-427.
- Usami T., Shishido M., Ebihara Y., Kamigahira Y., and Amemiya Y. (2005). Retrotransposon-like elements in the genome of *Verticillium dahliae* may be used as DNA markers for fungal species and pathotypes. *Journal of General Plant Pathology* **71**: 117-123.
- Vallad G.E., Qin Q.-M., Grube R., Hayes R.J., and Subbarao K.V. (2006). Characterization of race-specific interactions among isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic on lettuce. *Phytopathology* **96**: 1380-1387.
- van der Nest M.A., Olson A., Lind M., Véléz H., Dalman K., Durling M.B., Karlsson M., and Stenlid J. (2014). Distribution and evolution of *het* gene homologs in the basidiomycota. *Fungal Genetics and Biology* **64**: 45-57.
- Velicer G.J. and Vos M. (2009). Sociobiology of the myxobacteria. *Annual Review of Microbiology* **63**: 599-623.
- Veneault-Fourrey C. and Martin F. (2011). Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 444-450.
- VertiBase: *Verticillium longisporum* BioFung database (2013). Διαδικτυακή βάση δεδομένων: <http://biofung.gobics.de:1555/>.
- Vicens Q., Paukstelis P.J., Westhof E., Lambowitz A.M., and Cech T.R. (2008). Toward predicting self-splicing and protein-facilitated splicing of group I introns. *RNA* **14**: 2013-2029.
- Videira A., Kasuga T., Tian C., Lemos C., Castro A., and Glass N.L. (2009). Transcriptional analysis of the response of *Neurospora crassa* to phytosphingosine reveals links to mitochondrial function. *Microbiology* **155**: 3134-3141.
- Wang C., Li Z., Typas M.A., and Butt T.M. (2003). Nuclear large subunit rDNA group I intron distribution in a population of *Beauveria bassiana* strains: phylogenetic implications. *Mycological Research* **107**: 1189-1200.
- Ward H. (1888). A lily disease. *Annals of Botany* **2**: 319-382.
- White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., and White J.W. (eds.), pp. 315-322. Academic Press, New York.
- Wichmann G., Sun J., Dementhon K., Glass N.L., and Lindow S.E. (2008). A novel gene, *phcA* from *Pseudomonas syringae* induces programmed cell death in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* **68**: 672-689.
- Wicklów D.T. and Horn B.W. (2007). Association between vegetative compatibility and aflatoxin production by *Aspergillus* species during intraspecific competition. *Mycoscience* **48**: 267-273.
- Wickner, R.B. (2001) Viruses of yeasts, fungi and parasitic microorganisms. In Knipe D.M. and Howley P.M. (eds.), *Fields virology*, 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 629-658.
- Wilhelm S. (1955). Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* **45**: 180-181.
- Wong K.H., Hynes M.J., Todd R.B., and Davis M.A. (2007). Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **66**: 534-551.
- Woodson S.A. (2005). Structure and assembly of group I introns. *Current Opinion in Structural Biology* **15**: 324-330.
- Woronin M. (1864). Zur Entwicklungsgeschichte der *Ascobolus pulcherrimus* Cr. und einiger Pezizen. *Abhandlungen der Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung* **5**: 333-344.
- Worrall J.J. (1997). Somatic incompatibility in basidiomycetes. *Mycologia* **89**: 24-36.

- Wu J., Saupé S.J., and Glass N.L. (1998). Evidence for balancing selection operating at the *het-c* heterokaryon incompatibility locus in a group of filamentous fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**: 12398-12403.
- Xiang Q. and Glass N.L. (2002). Identification of *vib-1*, a locus involved in vegetative incompatibility mediated by *het-c* in *Neurospora crassa*. *Genetics* **162**: 89-101.
- Xiang Q. and Glass N.L. (2004). The control of mating type heterokaryon incompatibility by *vib-1*, a locus involved in *het-c* heterokaryon incompatibility in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 1063-1076.
- Xiang Q., Rasmussen C., and Glass N.L. (2002). The *ham-2* locus, encoding a putative transmembrane protein, is required for hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Genetics* **160**: 169-180.
- Yuan G.F., Fu Y.H., and Marzluf G.A. (1991). *nit-4*, a pathway-specific regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative binuclear zinc DNA-binding domain. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 5735-5745.
- Yuan J.Y. and Kroemer G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes and Development* **24**: 2592-2602.
- Yun S.-H., Arie T., Kaneko I., Yoder O.C., and Turgeon B.G. (2000). Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 7-20.
- Zare R. and Gams W. (2001a). A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* **73**: 1-50.
- Zare R. and Gams W. (2001b). A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. VI. The genus *Haptocillium*. *Nova Hedwigia* **73**: 271-292.
- Zare R. and Gams W. (2008). A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycological Research* **112**: 811-824.
- Zare R., Gams W., and Evans H.C. (2001). A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia* **73**: 51-86.
- Zare R., Gams W., and Schroers H.J. (2004). The type species of *Verticillium* is not congeneric with the plant-pathogenic species placed in *Verticillium* and it is not the anamorph of "*Nectria*" *inventa*. *Mycological Research* **108**: 576-582.
- Zare R., Gams W., Starink-Willems M., and Summerbell R.C. (2007). *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* **85**: 463-489.
- Zeise K. and Tiedemann A. von (2001). Morphological and physiological differentiation among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *V. longisporum*. *Journal of Phytopathology* **149**: 469-475.
- Zeise K. and Tiedemann A. von (2002). Application of RAPD-PCR for virulence type analysis within *Verticillium dahliae* and *V. longisporum*. *Journal of Phytopathology* **150**: 557-563.
- Zhang N., Castlebury L.A., Miller A.N., Huhndorf S.M., Schoch C.L., et al. (2006). An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia* **98**: 1076-1087.
- Zhao X., Mehrabi R., and Xu J.R. (2007). Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic Cell* **6**: 1701-1714.
- Zuker M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* **31**: 3406-3415.

Παραρτήματα

Στο επισυναπτόμενο συνοδευτικό υλικό παρατίθενται τα ακόλουθα παραρτήματα:

Παράρτημα	Περιγραφή
Παράρτημα 1	Φυτοπαθολογικός χαρακτηρισμός συλλογής στελεχών <i>V. dahliae</i> από την Κρήτη και διεθνών στελεχών ελέγχου των VCGs (παθότυποι, φυλές ως προς την τομάτα, μολυσματικότητα σε διάφορους ξενιστές).
Παράρτημα 2	Στατιστική ανάλυση συσχετίσεων μεταξύ φυτοπαθολογικών χαρακτηριστικών στελεχών <i>V. dahliae</i> και της κατάταξής τους σε VCGs.
Παράρτημα 3	Μορφολογικός χαρακτηρισμός συλλογής στελεχών <i>V. dahliae</i> από την Κρήτη και διεθνών στελεχών ελέγχου των VCGs (τάχος αύξησης, ρυθμός παραγωγής χρωστικής, ένταση χρωστικής, κονιδιογένεση, μήκος κονιδίων).
Παράρτημα 4	Στατιστική ανάλυση συσχετίσεων μεταξύ μορφολογικών χαρακτηριστικών στελεχών <i>V. dahliae</i> και της κατάταξής τους σε VCGs.
Παράρτημα 5	Σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) σε συλλογή στελεχών <i>Verticillium</i> (σε πλήρες θρεπτικό υλικό CM).
Παράρτημα 6	Σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) σε συλλογή στελεχών <i>Verticillium</i> (σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό).
Παράρτημα 7	Σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) σε ζεύγη μορφολογικά χαρακτηρισμένων στελεχών <i>Verticillium</i> .
Παράρτημα 8	Στατιστική ανάλυση συσχέτισης μεταξύ του σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) μεταξύ στελεχών <i>Verticillium</i> και της ικανότητάς τους για παραγωγή χρωστικής.
Παράρτημα 9	Χαρακτηρισμός μεταλλαγών <i>nit</i> .

Παράρτημα 1. Φυτοπαθολογικός χαρακτηρισμός συλλογής στελεχών *V. dahliae* από την Κρήτη και διεθνών στελεχών ελέγχου των VCGs (παθότυποι, φυλές ως προς την τομάτα, μολυσματικότητα σε διάφορους ξενιστές).

Στέλεχος	Δείκτης συμπτωμάτων μέσης φυτικής ασθένειας σε διάφορους ξενιστές					Παθότυπος	Φυλή ως προς τη τομάτα
	T ⁺ ^a	T ⁻ ^β	M ^γ	Π ^δ	P ^ε		
PH	0	2,2	4,0	0	3,1	τομάτας	1
Ca.146	1,0	1,1	3,5	0	3,6	τομάτας	1
Dvd-T5	0	1,1	2,1	0	1,6	τομάτας	1
V54	0	1,3	2,5	0	2,9	τομάτας	1
cot201	0	1,1	2,3	0	4,0	τομάτας	1
pn4	1,0	1,5	4,0	0	2,2	τομάτας	1
179-4	1,0	2,5	3,6	0	3,6	τομάτας	1
164-1	1,0	2,0	3,0	0	1,9	τομάτας	1
98-1	0	1,1	2,0	0	2,0	τομάτας	1
113-1	0	2,0	3,0	0	2,1	τομάτας	1
136-3	0	2,1	3,1	0	2,0	τομάτας	1
136-1	0	2,0	3,0	0	2,2	τομάτας	1
116-1	1,0	2,0	3,1	0	3,2	τομάτας	1
43-4	0	2,0	2,0	0	2,0	τομάτας	1
577-1	1,0	1,5	3,1	0	1,1	τομάτας	1
423-1	0	2,6	4,0	0	1,8	τομάτας	1
530-1	0	3,2	3,3	0	1,3	τομάτας	1
525-1	0	2,3	3,4	0	2,5	τομάτας	1
16-1	0	2,8	3,5	0	2,7	τομάτας	1
44-3	0	2,8	3,4	0	2,6	τομάτας	1
469-1	0	1,7	3,8	0	2,0	τομάτας	1
478-1	0	1,7	3,8	0	2,3	τομάτας	1
479-1	0	1,9	3,0	0	1,8	τομάτας	1
469-2	0	2,0	3,3	0	2,4	τομάτας	1
PCW	2,7	2,9	2,8	0	3,6	τομάτας	2
140-2	1,6	2,6	3,0	0	2,0	τομάτας	2
247b-3	2,9	3,1	2,8	0	2,3	τομάτας	2
592-2	2,7	3,4	3,5	0	3,2	τομάτας	2
998-1	2,0	2,0	3,1	0	1,1	τομάτας	2
570-2	2,9	2,9	3,5	0	3,3	τομάτας	2
454-1	3,2	3,2	2,9	0	1,8	τομάτας	2
997-1	3,2	3,0	3,0	0	3,0	τομάτας	2
455-1	3,4	3,2	1,2	0	3,0	τομάτας	2
273-1	1,1	1,1	3,0	0	1,1	τομάτας	2
413-5	1,9	2,4	3,3	0	3,4	τομάτας	2
461-3	2,8	2,8	3,3	0	2,8	τομάτας	2
463-1	2,7	2,6	3,0	0	2,9	τομάτας	2
464-3	2,5	2,7	3,8	0	3,0	τομάτας	2
464-1	2,3	2,6	3,7	0	3,1	τομάτας	2
473-1	3,1	3,7	2,4	0	2,4	τομάτας	2
437-2	2,4	2,8	3,2	0	2,4	τομάτας	2
444-1	1,1	1,1	2,5	0	1,8	τομάτας	2
434-2	2,5	2,3	3,8	0	3,0	τομάτας	2
451-1	2,4	3,1	3,8	0	1,4	τομάτας	2
465-2	2,1	2,0	4,0	0	3,6	τομάτας	2
802-1	1,1	1,1	3,6	0	3,5	τομάτας	2

466-1	1,1	1,1	2,0	0	1,2	τομάτας	2
526-1	4,0	3,8	4,0	0	3,6	τομάτας	2
414-1	1,7	1,9	3,1	0	2,5	τομάτας	2
467-2	2,7	2,7	3,2	0	3,3	τομάτας	2
433-2	1,9	1,6	3,4	0	2,7	τομάτας	2
447-1	2,6	2,7	3,0	0	2,5	τομάτας	2
435-1	2,6	2,5	3,4	0	3,1	τομάτας	2
437-1	2,2	2,6	2,8	0	2,5	τομάτας	2
235-1	3,0	3,0	3,5	0	2,3	τομάτας	2
451-2	1,8	2,3	3,0	0	1,5	τομάτας	2
460-1	2,5	2,9	3,6	0	3,4	τομάτας	2
354-1	1,1	1,1	3,4	0	2,8	τομάτας	2
lt1-1	1,7	2,0	3,0	0	1,2	τομάτας	2
123-3	0	2,0	2,2	3,0	2,0	τομάτας- πιπεριάς	1
171-2	0	2,5	3,1	3,1	2,0	τομάτας- πιπεριάς	1
17-1	1,0	2,0	3,5	3,0	2,1	τομάτας- πιπεριάς	1
150-5	1,0	2,0	3,1	3,0	1,1	τομάτας- πιπεριάς	1
999-1	0	2,2	3,0	3,0	1,1	τομάτας- πιπεριάς	1
T9	0	1,0	2,8	0	3,4	μελιτζάνας	ΜΠ ^{στ}
70-21	1,0	1,0	2,5	0	2,0	μελιτζάνας	ΜΠ
BB	0	0	2,7	0	2,9	μελιτζάνας	ΜΠ
30-6	0	0	3,8	0	3,1	μελιτζάνας	ΜΠ
S39	0	0	2,6	0	2,5	μελιτζάνας	ΜΠ
cot274	0	0	2,0	0	2,3	μελιτζάνας	ΜΠ
449-2	0	0	3,7	0	1,9	μελιτζάνας	ΜΠ
124-8	0	0	3,0	0	1,5	μελιτζάνας	ΜΠ
487-1	1,0	1,0	3,2	0	1,2	μελιτζάνας	ΜΠ
453-1	0	0	3,3	0	2,3	μελιτζάνας	ΜΠ
un1-1	0	0	3,0	0	1,3	μελιτζάνας	ΜΠ
554-1	0	0	1,6	0	3,6	μελιτζάνας	ΜΠ
578-1	0	0	3,0	0	1,2	μελιτζάνας	ΜΠ
456-1	0	0	3,2	0	2,5	μελιτζάνας	ΜΠ
457-5	0	0	3,0	0	1,3	μελιτζάνας	ΜΠ
476-3	0	0	3,0	0	1,6	μελιτζάνας	ΜΠ
586-2	0	0	3,0	0	1,2	μελιτζάνας	ΜΠ
490-2	0	0	2,9	0	1,5	μελιτζάνας	ΜΠ
Vd76	0	0	2,7	0	2,8	μελιτζάνας	ΜΠ
Cf.38	1,0	1,0	3,0	2,0	3,4	πιπεριάς	ΜΠ

^a Τομάτα, ποικιλία ACE 55 VF (Ve^+), ^b Τομάτα, ποικιλία EarlyPak No. 7 (Ve^-),
^γ Μελιτζάνα, ποικιλία Black Beauty, ^δ Πιπεριά, ποικιλία California Wonder, ^ε Ρέβα,
ποικιλία Snowball, ^{στ} ΜΠ = μη παθογόνο στην τομάτα.

Παράρτημα 2. Στατιστική ανάλυση συσχετίσεων μεταξύ φυτοπαθολογικών χαρακτηριστικών στελεχών *V. dahliae* και της κατάταξής τους σε VCGs.

Παράμετρος	μέση τιμή (SE) ή διάμεσος (R) ^γ για τη VCG 2A	μέση τιμή (SE) ή διάμεσος (R) ^γ για τη VCG 2B	μέση τιμή (SE) ή διάμεσος (R) ^γ για τη VCG 4B	Στατιστικοί δείκτες			Ανάλυση <i>post hoc</i> ^ε		
				SS ή X ^{2δ}	df	F	σημαντι- κότητα	Σημαντικά διαφορετικές ομάδες	p
μολυσματικότητα στην τομάτα (<i>Ve</i> ⁻) ^β	2,000 (2,4)	2,000 (3,2)	2,000 (3,8)	0,546	2	-	0,761	-	-
μολυσματικότητα στην τομάτα (<i>Ve</i> ⁺) ^β	0,500 (2,9)	0,000 (3,2)	1,400 (4,0)	3,533	2	-	0,171	-	-
μολυσματικότητα στη μελιτζάνα ^β	3,000 (2,0)	3,100 (2,0)	3,200 (2,8)	1,998	2	-	0,368	-	-
μολυσματικότητα στην πιπεριά ^β	0,000 (0,0)	0,000 (3,1)	0,000 (0,0)	18,020	2	-	<0,001**	2A - 2B 2B - 4B	0,050* 0,050*
μολυσματικότητα στη ρέβα ^α	2,300 (0,1919)	1,924 (0,1718)	2,384 (0,1163)	2,623 40,309	2 72	2,343	0,103	-	-

^α Κανονική κατανομή δεδομένων (διάγραμμα P-P, δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov) και ίσες διακυμάνσεις (δοκιμασία Levene)· η σημαντικότητα ελέγχθηκε με τη μέθοδο ANOVA μονής κατεύθυνσης. Για τις στήλες των στατιστικών παραμέτρων SS (άθροισμα τετραγώνων) και *df*, η επάνω τιμή αφορά την ανάλυση «μεταξύ ομάδων» και η κάτω «εντός ομάδων».

^β Η κατανομή των δεδομένων δεν ήταν κανονική (διάγραμμα P-P, δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov) ή/και οι διακυμάνσεις ήταν άνισες (δοκιμασία Levene)· η σημαντικότητα ελέγχθηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal-Wallis H.

^γ Η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα (SE) παρέχονται για τις παραμέτρους που ελέγχθηκαν με τη μέθοδο ANOVA, ενώ η διάμεσος και το εύρος (R) παρέχονται για τις παραμέτρους που ελέγχθηκαν με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis H.

^δ Το άθροισμα τετραγώνων (SS) παρέχεται για τις παραμέτρους που ελέγχθηκαν με τη μέθοδο ANOVA, ενώ το X^2 παρέχεται για τις παραμέτρους που υποβλήθηκαν στη δοκιμασία Kruskal-Wallis H.

^ε Η ανάλυση *post hoc* πραγματοποιήθηκε για εκείνες τις μεταβλητές με σημαντικές διαφορές κατά τις δοκιμασίες ANOVA ή Kruskal-Wallis H, με τις δοκιμασίες Bonferroni ή Dunnett's T3, αντίστοιχα.

* Η διαφορά είναι σημαντική σε επίπεδο 5%.

** Η διαφορά είναι σημαντική σε επίπεδο 1%.

Παράρτημα 3. Μορφολογικός χαρακτηρισμός συλλογής στελεχών *V. dahliae* από την Κρήτη και διεθνών στελεχών ελέγχου των VCGs (τάχος αύξησης, ρυθμός παραγωγής χρωστικής, ένταση χρωστικής, κονιδιογένεση, μήκος κονιδίων).

Στέλεχος	Τάχος αύξησης ^a (cm day ⁻¹)	Παραγωγή χρωστικής ^b (ημέρες μετά τον εμβολιασμό)	Τελική ένταση χρωστικής (0-4)	Κονιδιογένεση (x10 ⁶ κονίδια mL ⁻¹)	Μήκος κονιδίων [μέση τιμή (SEM) ^c , μm]
T9	0,21	-	0	1,44	4,0 (0,2)
cot201	0,22	21	1	2,58	4,3 (0,2)
Dvd-T5	0,29	-	0	1,20	5,0 (0,2)
PH	0,36	-	0	1,57	3,8 (0,1)
179-4	0,32	25	1	4,67	3,7 (0,2)
164-1	0,17	24	3	4,53	3,6 (0,1)
98-1	0,22	-	0	1,39	5,0 (0,2)
113-1	0,36	19	1	10,77	4,0 (0,2)
140-2	0,30	16	3	6,03	4,0 (0,3)
247b-3	0,35	15	4	3,84	4,7 (0,1)
136-3	0,40	14	4	6,27	4,0 (0,2)
136-1	0,17	24	1	9,26	5,0 (0,2)
116-1	0,17	33	1	8,85	5,0 (0,2)
592-2	0,45	18	3	1,00	3,7 (0,1)
43-4	0,33	27	1	5,88	5,0 (0,3)
998-1	0,22	32	2	7,65	4,9 (0,2)
V54	0,21	-	0	0,96	3,2 (0,2)
cot274	0,17	24	4	10,58	5,0 (0,3)
449-2	0,35	22	1	2,96	3,8 (0,1)
570-2	0,17	19	4	3,49	4,4 (0,3)
124-8	0,20	27	1	1,09	5,3 (0,3)
577-1	0,44	10	4	1,58	3,6 (0,1)
123-3	0,33	17	4	3,73	3,8 (0,1)
423-1	0,50	14	4	5,57	4,0 (0,2)
487-1	0,17	17	4	1,97	5,0 (0,2)
454-1	0,22	24	1	4,12	4,0 (0,2)
530-1	0,39	13	4	2,45	4,4 (0,2)
171-2	0,45	9	4	5,92	3,8 (0,3)
997-1	0,44	19	3	4,96	3,5 (0,2)
17-1	0,33	17	4	3,31	4,0 (0,1)
525-1	0,28	19	4	2,32	4,8 (0,2)
150-5	0,06	24	4	4,12	3,6 (0,2)
999-1	0,09	24	4	2,33	3,8 (0,2)
70-21	0,14	-	0	1,31	5,0 (0,2)
PCW	0,07	-	0	1,04	4,8 (0,2)
BB	0,14	18	4	1,87	5,5 (0,3)
30-6	0,43	7	3	1,20	3,7 (0,1)
S39	0,14	-	0	1,12	4,8 (0,2)
pn4	0,09	40	1	6,91	5,0 (0,3)
16-1	0,50	24	2	7,87	4,5 (0,3)
455-1	0,28	27	1	2,53	4,9 (0,3)
44-3	0,36	-	0	5,57	3,5 (0,1)
273-1	0,20	30	4	10,64	3,3 (0,1)

413-5	0,22	24	4	3,44	4,0 (0,2)
453-1	0,22	28	1	4,45	4,7 (0,2)
461-3	0,39	24	1	2,59	4,8 (0,2)
463-1	0,13	32	2	6,08	4,5 (0,3)
464-3	0,17	37	4	4,00	5,0 (0,2)
464-1	0,22	24	1	5,44	4,7 (0,2)
473-1	0,40	16	3	1,20	4,0 (0,2)
un1-1	0,15	27	3	6,74	4,5 (0,2)
437-2	0,28	24	2	6,79	4,1 (0,2)
444-1	0,17	32	1	3,52	4,9 (0,2)
434-2	0,17	32	1	3,49	4,5 (0,2)
451-1	0,50	27	2	4,49	4,1 (0,3)
465-2	0,17	32	1	3,01	5,7 (0,3)
554-1	0,33	-	0	1,87	4,5 (0,3)
469-1	0,17	30	1	3,86	5,3 (0,3)
578-1	0,25	32	1	1,73	4,0 (0,2)
802-1	0,17	32	3	5,01	4,9 (0,2)
466-1	0,22	30	1	4,43	5,1 (0,3)
526-1	0,28	24	1	1,31	3,5 (0,2)
414-1	0,13	15	2	8,38	4,8 (0,2)
456-1	0,38	24	3	5,39	4,9 (0,2)
457-5	0,17	20	3	6,98	4,8 (0,1)
467-2	0,33	24	2	5,00	4,6 (0,1)
433-2	0,17	27	1	8,08	5,0 (0,2)
447-1	0,39	24	2	6,69	4,9 (0,2)
476-3	0,22	37	1	8,43	4,7 (0,3)
478-1	0,27	24	1	3,89	4,7 (0,3)
435-1	0,07	17	3	2,13	4,8 (0,2)
586-2	0,35	22	1	3,23	4,7 (0,2)
437-1	0,09	27	1	4,59	4,1 (0,1)
479-1	0,39	24	1	3,98	4,9 (0,2)
490-2	0,34	16	1	5,36	4,1 (0,2)
469-2	0,22	30	1	1,57	4,6 (0,2)
235-1	0,17	-	0	2,41	4,7 (0,2)
451-2	0,45	19	3	8,48	4,0 (0,2)
460-1	0,17	32	1	4,08	5,8 (0,3)
354-1	0,30	24	3	9,37	4,2 (0,3)
lt1-1	0,11	30	1	9,15	4,5 (0,3)
Cf.38	0,17	30	1	1,73	5,0 (0,2)
Ca.146	0,13	15	1	7,46	5,1 (0,2)
Vd76	0,21	12	4	0,96	3,2 (0,2)

^a Έχει υπολογισθεί για την περίοδο μεταξύ 10 και 20 ημερών μετά τον εμβολιασμό.

^b Η καταγραφή της παραγωγής χρωστικής ολοκληρώθηκε 45 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

^γ SEM = τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (Standard Error of the Mean).

Παράρτημα 4. Στατιστική ανάλυση συσχετίσεων μεταξύ μορφολογικών χαρακτηριστικών στελεχών *V. dahliae* και της κατάταξής τους σε VCGs.

Παράμετρος	Στατιστικοί δείκτες						Ανάλυση <i>post hoc</i> ^ε		
	μέση τιμή (SE) ή διάμεσος (R) ^γ για τη VCG 2A	μέση τιμή (SE) ή διάμεσος (R) ^γ για τη VCG 2B	μέση τιμή (SE) ή διάμεσος (R) ^γ για τη VCG 4B	SS ή X ² ^δ	df	F	σημαντικότητα	Σημαντικά διαφορετικές ομάδες	p
τάχος αύξησης ^β	0,3100 (0,28)	0,2800 (0,44)	0,2200 (0,43)	2,669	2	-	0,263	-	-
παραγωγή χρωστικής ^α	22,45 (1,988)	18,69 (1,331)	26,60 (0,918)	748,176	2	11,004	<0,001**	2B - 4B	<0,001**
τελική ένταση χρωστικής ^β	1,000 (4)	4,000 (4)	1,000 (4)	2175,765	64	-	0,001**	2A - 2B 2B - 4B	0,025* 0,002**
κονιδιογένεση ^α	5,2319 (0,85424)	3,6159 (0,56084)	4,8930 (0,37206)	25,498	2	1,911	0,155	-	-
μήκος κονιδίων ^β	4,386 (0,1589)	4,118 (0,1458)	4,582 (0,0777)	480,267	72	4,445	0,015*	2B - 4B	0,013*
				2,693	2				
				21,807	72				

^α Κανονική κατανομή δεδομένων (διάγραμμα P-P, δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov) και ίσες διακυμάνσεις (δοκιμασία Levene)· η σημαντικότητα ελέγχθηκε με τη μέθοδο ANOVA μονής κατεύθυνσης. Για τις στήλες των στατιστικών παραμέτρων SS (άθροισμα τετραγώνων) και *df*, η επάνω τιμή αφορά την ανάλυση «μεταξύ ομάδων» και η κάτω «εντός ομάδων».

^β Η κατανομή των δεδομένων δεν ήταν κανονική (διάγραμμα P-P, δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov) ή/και οι διακυμάνσεις ήταν άνισες (δοκιμασία Levene)· η σημαντικότητα ελέγχθηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal-Wallis H.

^γ Η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα (SE) παρέχονται για τις παραμέτρους που ελέγχθηκαν με τη μέθοδο ANOVA, ενώ η διάμεσος και το εύρος (R) παρέχονται για τις παραμέτρους που ελέγχθηκαν με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis H.

^δ Το άθροισμα τετραγώνων (SS) παρέχεται για τις παραμέτρους που ελέγχθηκαν με τη μέθοδο ANOVA, ενώ το X² παρέχεται για τις παραμέτρους που υποβλήθηκαν στη δοκιμασία Kruskal-Wallis H.

^ε Η ανάλυση *post hoc* πραγματοποιήθηκε για εκείνες τις μεταβλητές με σημαντικές διαφορές κατά τις δοκιμασίες ANOVA ή Kruskal-Wallis H, με τις δοκιμασίες Bonferroni ή Dunnett's T3, αντίστοιχα.

* Η διαφορά είναι σημαντική σε επίπεδο 5%.

** Η διαφορά είναι σημαντική σε επίπεδο 1%.

Παράρτημα 5. Σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) σε συλλογή στελεχών *Verticillium* (σε πλήρες θρεπτικό υλικό CM). Στις αντίστοιχες στήλες του πίνακα παρέχονται ο αριθμός των επαναλήψεων για κάθε διασταύρωση (N), η μέση ένταση (I) σε μια κλίμακα 0-3, το εύρος (R) και το τυπικό σφάλμα μέση τιμής (SEM) για όσες διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10 επαναλήψεις. Οι τιμές της μέσης έντασης που ανήκουν στις κλάσεις 0,6-1,9 και 2,0-3,0 επισημαίνονται σε ανοικτό και σκούρο γκρι πλαίσιο, αντίστοιχα.

A/A	Στέλεχος A	VCG	Στέλεχος B	VCG	N	I	R	SEM (N=10)
πλήρες θρεπτικό υλικό (CM)								
1	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> T9	1A	2	2,5	2-3	
2	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V44	1A	10	2,1	2-3	0,10
3	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	2	2	2	
4	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	2	2,5	2-3	
5	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	2	2	2	
6	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	2	2	2	
7	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> PH	2A	2	0,5	0-1	
8	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	10	3	3	0
9	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	2	0,5	0-1	
10	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	2	2	
11	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	0	0	
12	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	2	2	
13	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	2,5	2-3	
14	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	2	2	
15	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	3	2,3	2-3	
16	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	1,5	1-2	
17	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	1	1	
18	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	3	1	1	
19	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	3	2	2	
20	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0	0	
21	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	2	1-3	
22	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2	2	
23	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2	2	
24	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	3	1,3	1-2	
25	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2	2	
26	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2,5	2-3	
27	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3	
28	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	3	1,3	1-2	
29	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1,5	1-2	
30	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	
31	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2,5	2-3	
32	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0,5	0-1	
33	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0,5	0-1	
34	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V44	1A	2	2,5	2-3	
35	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	4	2	1-3	
36	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	2	2,5	2-3	
37	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	2	2	2	
38	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	2	0	0	
39	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	2	2	2	
40	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> PH	2A	10	0,6	0-1	0,16
41	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	2	3	3	
42	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	0	0	
43	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	1,5	1-2	
44	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	2,5	2-3	
45	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	2,5	2-3	
46	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	2	1,5	1-2	
47	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	2,5	2-3	
48	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	0,5	0-1	
49	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	2,5	2-3	
50	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	3	1,3	1-2	
51	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	2	2	

52	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> PCW	3	3	1,3	1-2
53	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	2	1-3
54	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2	1-3
55	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2,5	2-3
56	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0,5	0-1
57	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2	2
58	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	3	3
59	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2	2
60	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3
61	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0,5	0-1
62	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	3	1,7	1-3
63	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1	1
64	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	2
65	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1,5	1-2
66	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0,5	0-1
67	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	2	3	3
68	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	4	1,8	1-3
69	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	2	1	1
70	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	2	1,5	1-2
71	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	2	2
72	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1	1
73	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> 157	4B	2	0	0
74	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	0	0
75	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0
76	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	2,5	2-3
77	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	2,5	2-3
78	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	2	3	3
79	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	3	0,3	0-1
80	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> PH	2A	2	1,5	1-2
81	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	0	0
82	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	2	0	0
83	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	2,5	2-3
84	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	1,5	1-2
85	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	2,5	2-3
86	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3
87	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0	0
88	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	1	1
89	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	2	0	0
90	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	1	1
91	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	0	0
92	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	2	0	0
93	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	1,5	1-2
94	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	0	0
95	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	2	2,5	2-3
96	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	2	2	1-3
97	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	2	2,3	1-3
98	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> PH	2A	2	0	0
99	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	1	1
100	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	0,5	0-1
101	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	1	1
102	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	1	1
103	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	2	0	0
104	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	5	2,2	1-3
105	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	2	2,5	2-3
106	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	2	0	0
107	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	1,5	1-2
108	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1,5	1-2
109	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	0	0
110	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	1	1
111	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	2	2
112	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	2,5	2-3

113	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	1,5	1-2	
114	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0,5	0-1	
115	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0	
116	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	2,5	2-3	
117	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	1	1	
118	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> PH	2A	2	2	1-3	
119	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	10	2,3	1-3	0,21
120	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	2	3	3	
121	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	3	3	
122	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	1	1	
123	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	3	0,3	0-1	
124	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	1	1	
125	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	1,5	1-2	
126	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	2	1,5	1-2	
127	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	3	0,3	0-1	
128	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	0	0	
129	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	3	3	
130	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0,5	0-1	
131	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	3	1,7	1-3	
132	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0	0	
133	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	2,5	2-3	
134	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2	1-3	
135	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2	1-3	
136	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0,5	0-1	
137	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	1,5	1-2	
138	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2	2	
139	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3	
140	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0,5	0-1	
141	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	
142	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1	
143	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	2	2	1-3	
144	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2	
145	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0,5	0-1	
146	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0	
147	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	2	3	3	
148	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	5	2,8	2-3	
149	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	2,5	2-3	
150	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	3	3	
151	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	1,5	1-2	
152	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	3	1,7	1-3	
153	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	2	0	0	
154	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	2,5	2-3	
155	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	2	1,5	1-2	
156	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	2	1-3	
157	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	2	2,5	2-3	
158	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	2,5	2-3	
159	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	1	1	
160	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1	
161	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	2	1-3	
162	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	1	1	
163	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	2,5	2-3	
164	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2,5	2-3	
165	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	3	2	1-3	
166	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	1,5	1-2	
167	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2,5	2-3	
168	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	3	3	
169	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3	
170	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1	1	
171	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	2	2	
172	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	2,5	2-3	
173	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	

174	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	3	3	
175	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	3	3	
176	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0	
177	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	1-3	
178	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	5	1,8	1-3	
179	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	2,5	2-3	
180	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	2	0	0	
181	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	1,5	1-2	
182	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	2	1	1	
183	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0	
184	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	0	0	
185	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	4	1,5	1-3	
186	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	1,5	1-2	
187	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	2,5	2-3	
188	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1	
189	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	1	1	
190	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	0,5	0-1	
191	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	1	1	
192	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	1	1	
193	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	2	2	
194	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	2	1	1	
195	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	1	1	
196	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	2,5	2-3	
197	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0	
198	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	2,5	2-3	
199	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	0	0	
200	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	10	0,5	0-1	0,17
201	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	2	1	1	
202	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	1,5	1-2	
203	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	2	1,5	1-2	
204	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	1,5	1-2	
205	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	2	0	0	
206	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	10	0,3	0-1	0,15
207	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	0	0	
208	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	1	1	
209	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	3	0,7	0-1	
210	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	1	1	
211	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0,5	0-1	
212	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1	1	
213	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	1	1	
214	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1,5	1-2	
215	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	1,5	1-2	
216	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0,5	0-1	
217	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	3	0,7	0-1	
218	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	0	0	
219	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HS I	2	0,5	0-1	
220	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	2	1,5	1-2	
221	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0,5	0-1	
222	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1	
223	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1	
224	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1	1	
225	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1,5	1-2	
226	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0	
227	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	3	3	
228	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	4	1,8	1-3	
229	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V16	2B	10	2,9	2-3	0,10
230	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	2,5	2-3	
231	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	2	1,5	1-2	
232	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	3	3	
233	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	2,5	2-3	
234	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	3	2	1-3	

235	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1
236	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	2,5	2-3
237	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	1	1
238	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1,5	1-2
239	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2,5	2-3
240	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2,5	2-3
241	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	2	1-3
242	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	3	3	3
243	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2	1-3
244	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3
245	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1	1
246	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1
247	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1
248	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	1-3
249	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2	1-3
250	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	1-3
251	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	2	2,5	2-3
252	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> V16	2B	4	2	1-3
253	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	2	1,5	1-2
254	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	0	0
255	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	3	1,7	1-3
256	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	1	1
257	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	2,5	2-3
258	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	2	2	1-3
259	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	3	3
260	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	2	2,5	2-3
261	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	10	1,4	1-2
262	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	1,5	1-2
263	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	2,5	2-3
264	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1
265	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	1,5	1-2
266	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	1	1
267	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1	1
268	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1	1
269	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	3	3
270	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	2,5	2-3
271	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2,5	2-3
272	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	3	2	1-3
273	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3
274	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1	1
275	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	2,5	2-3
276	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2
277	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	3	3
278	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1,5	1-2
279	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2,5	2-3
280	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	2	3	3
281	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	1,5	1-2
282	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	0	0
283	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	1	1
284	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	2,5	2-3
285	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	3	3
286	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	2	0	0
287	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	2	2	1-3
288	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	0,5	0-1
289	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	1	1
290	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1
291	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	2	2
292	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	1,5	1-2
293	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> BB	4A	3	2	1-3
294	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2	2
295	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	1,5	1-2

0,16

296	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	1,5	1-2	
297	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	10	0,9	0-1	0,10
298	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	2	2	1-3	
299	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	3	2	1-3	
300	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	2,5	2-3	
301	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	10	1,1	1-2	0,10
302	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	3	1,3	1-2	
303	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0,5	0-1	
304	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1,5	1-2	
305	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0	0	
306	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	2	
307	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2	1-3	
308	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1	1	
309	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	1,5	1-2	
310	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	2	1,5	1-2	
311	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	0,5	0-1	
312	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1	
313	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	1,5	1-2	
314	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0	0	
315	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1,5	1-2	
316	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	3	3	
317	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2,5	2-3	
318	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	1,5	1-2	
319	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2	2	
320	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2,5	2-3	
321	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3	
322	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	
323	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1,5	1-2	
324	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0	0	
325	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2,5	2-3	
326	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0,5	0-1	
327	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	2	
328	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	2	2,5	2-3	
329	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	3	3	
330	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	3	3	
331	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	2,5	2-3	
332	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	2,5	2-3	
333	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	3	3	
334	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	3	3	3	
335	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	2	2-3	
336	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	2	1-3	
337	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	2	1-3	
338	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	10	1,1	1-2	0,10
339	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	10	0,9	0-1	0,10
340	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0,5	0-1	
341	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1,5	1-2	
342	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1	1	
343	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	1	1	
344	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0	0	
345	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	0,5	0-1	
346	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2,5	2-3	
347	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3	
348	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	
349	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0,5	0-1	
350	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1	
351	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2	
352	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1	1	
353	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2	
354	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	2	1-3	
355	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	0	0	
356	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0,5	0-1	

357	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	1	1	
358	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> PCW	3	10	0	0	0
359	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	0,5	0-1	
360	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	1	1	
361	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1	1	
362	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	1	1	
363	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	1,5	1-2	
364	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	3	0,7	0-1	
365	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	1	1	
366	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2	1-3	
367	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2	1-3	
368	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	1	1	
369	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	
370	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0,5	0-1	
371	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1	
372	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2	
373	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2	1-3	
374	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	2	
375	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	2,5	2-3	
376	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> PCW	3	10	1,1	1-2	0,10
377	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	2,5	2-3	
378	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	2	1,5	1-2	
379	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2	2	
380	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	3	2,3	2-3	
381	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	1	1	
382	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2,5	2-3	
383	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	1,5	1-2	
384	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2	1-3	
385	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	3	3	
386	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0,5	0-1	
387	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1	
388	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	1	1	
389	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1	
390	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	1-3	
391	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1,5	1-2	
392	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	1,5	1-2	
393	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	2	
394	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	0	0	
395	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	1,5	1-2	
396	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	1	1	
397	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	2	1-3	
398	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> BB	4A	3	1,3	1-2	
399	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1,5	1-2	
400	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2	1-3	
401	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0,5	0-1	
402	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	3	0,7	0-1	
403	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2,5	2-3	
404	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3	
405	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	1	1	
406	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	
407	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0	
408	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1	
409	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1	1	
410	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0,5	0-1	
411	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0,5	0-1	
412	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0	
413	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1	1	
414	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	4	0	0	
415	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	1,5	1-2	
416	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	3	2	1-3	
417	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	10	2,2	2-3	0,13

418	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	10	0,8	0-1	0,13
419	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	1,5	1-2	
420	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	2	2,5	2-3	
421	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2,5	2-3	
422	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3	
423	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	
424	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1,5	1-2	
425	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	2,5	2-3	
426	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	
427	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	1-3	
428	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1	1	
429	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	2	
430	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	2	1	1	
431	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	5	0,2	0-1	
432	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	0	0	
433	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	2	0	0	
434	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2	1-3	
435	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	2	0	0	
436	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	0	0	
437	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0	
438	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	2,5	2-3	
439	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	3	3	3	
440	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	3	3	
441	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	3	3	
442	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	2	3	3	
443	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	2	2,5	2-3	
444	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	0	0	
445	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3	
446	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	2	2	
447	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2,5	2-3	
448	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	10	2,6	2-3	0,16
449	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	10	2,4	1-3	0,22
450	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2	1-3	
451	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> 157	4B	2	0	0	
452	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	1,5	1-2	
453	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	1,5	1-2	
454	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	1,5	1-2	
455	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	3	2	1-3	
456	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	2	2	
457	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1	1	
458	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	2	2	
459	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	
460	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2	
461	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2	1-3	
462	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2	
463	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	1	1	
464	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	1,5	1-2	
465	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0	
466	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2,5	2-3	
467	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	3	3	
468	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2,5	2-3	
469	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	1,5	1-2	
470	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	2	1,5	1-2	
471	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	2	2	
472	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2	1-3	
473	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2	1-3	
474	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	1,5	1-2	
475	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	3	0,7	0-1	
476	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1	
477	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	
478	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	3	3	

479	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	3	3	
480	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2,5	2-3	
481	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0	
482	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	1,5	1-2	
483	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0,5	0-1	
484	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	6	0,5	0-1	
485	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	5	1,6	1-3	
486	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	1,5	1-2	
487	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	2	1,5	1-2	
488	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	1,5	1-2	
489	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3	
490	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	3	0,3	0-1	
491	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0,5	0-1	
492	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1	1	
493	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1	1	
494	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2,5	2-3	
495	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2	
496	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	2	1	1	
497	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	4	1,8	1-2	
498	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> 157	4B	2	1,5	1-2	
499	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	3	2	2	
500	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	2	0	0-1	
501	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1	
502	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	1,5	1-2	
503	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> 157	4B	6	1,3	1-2	
504	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	1,5	1-2	
505	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	0,5	0-1	
506	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	1,5	1-2	
507	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	10	2,8	2-3	0,13
508	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	
509	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1	
510	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	
511	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	3	2,3	2-3	
512	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2	1-3	
513	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	2	
514	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. dahliae</i> 157	4B	2	1,5	1-2	
515	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. dahliae</i> V39	4B	3	1	1	
516	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	2	1,5	1-2	
517	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	1	1	
518	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. longisporum</i> CA10	-	2	0	0	
519	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	2	2	
520	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	2,5	2-3	
521	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	3	2,3	2-3	
522	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	0	0	
523	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2	2	
524	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	2	2	
525	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	1,5	1-2	
526	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	2,5	2-3	
527	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2,5	2-3	
528	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0	
529	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	1,5	1-2	
530	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	2	2,5	2-3	
531	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	4	2,3	2-3	
532	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	3	3	
533	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	2	1,5	1-2	
534	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	5	2,2	2-3	
535	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	2	2	
536	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	0	0	
537	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	1	1	
538	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	3	1,3	1-2	
539	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	2	2	

540	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	3	1	1	
541	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	2	1	1	
542	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0	
543	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0	
544	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	3	3	
545	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	3	0,7	0-1	
546	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	2	2	2	
547	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	1,5	1-2	
548	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	2	2	
549	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	1	1	
550	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	3	1,3	1-2	
551	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	
552	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	1,5	1-2	
553	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	2	1	1	
554	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	10	2,6	2-3	0,16
555	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	1	1	
556	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1	1	
557	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	2	2	
558	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	0	0	
559	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1	
560	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	2	
561	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1,5	1-2	
562	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1	1	
563	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0	
564	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	4	3	3	
565	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	4	1,3	1-2	
566	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	4	1,3	1-2	
567	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. dahliae</i> CA26	-	3	2,3	2-3	
568	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	3	2	1-3	
569	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	3	3	
570	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	3	3	
571	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0	
572	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2,5	2-3	
573	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	2	2,5	2-3	
574	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	1	1	
575	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	1	1	
576	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	1	1	
577	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	2,5	2-3	
578	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	5	1,6	1-2	
579	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1,5	1-2	
580	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	0	0	
581	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	1,5	1-2	
582	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	1	1	
583	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	2	1-3	
584	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1,5	1-2	
585	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. dahliae</i> CA26	-	10	0	0	0
586	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	10	0	0	0
587	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2	
588	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2,5	2-3	
589	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	3	0,3	0-1	
590	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0	
591	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1	
592	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	1	1	
593	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	
594	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	10	0,5	0-1	0,17
595	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0,5	0-1	
596	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	3	1,7	1-2	
597	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0	
598	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	1	1	
599	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0	
600	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	1	1	

601	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	2	2	
602	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0	0	
603	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	2	0	0	
604	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2	
605	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1	1	
606	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. longisporum</i> CA10	-	2	0	0	
607	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0	
608	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	1,5	1-2	
609	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	2	0	0	
610	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	2,5	2-3	
611	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	3	0,3	0-1	
612	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	2	2,5	2-3	
613	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	2	
614	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	3	0,3	0-1	
615	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	1	1	
616	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0	0	
617	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	2	0	0	
618	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	10	1,4	1-2	0,16
619	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0	0	
620	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	2	1	1	
621	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0	
622	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	1	1	
623	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2,5	2-3	
624	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0	
625	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	1	1	
626	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0	
627	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	1,5	1-2	
628	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	3	3	
629	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	3	3	
630	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. longisporum</i> CA10	-	2	1,5	1-2	
631	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2	
632	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	2	2,5	2-3	
633	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	1,5	1-2	
634	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2,5	2-3	
635	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> CA10	-	2	1,5	1-2	
636	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	2	0	0	
637	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	1,5	1-2	
638	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	3	1,7	1-2	
639	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	2	2	
640	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	2	2	
641	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. longisporum</i> CA10	-	2	1,5	1-2	
642	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	3	0,3	0-1	
643	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0	
644	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2	
645	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	2	0	0	
646	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0	
647	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0	
648	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0	
649	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1	1	
650	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0	
651	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	0	0	
652	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0	
653	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	3	0,7	0-1	
654	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	0	0	
655	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	2	1,5	1-2	
656	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	1,5	1-2	
657	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0	
658	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2	
659	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	2	1,5	1-2	
660	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	1	1	
661	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	1,5	2-2	

662	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	0	0
663	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	2,5	2-3
664	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	3	0,3	0-1
665	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	1,5	1-2
666	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	1	1,5	1-2
667	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	2	1	1
668	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	2	1,5	1-2
669	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	3	1,7	1-2
670	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	1	1
671	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	2	2	2
672	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	1	1
673	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	1,5	1-2
674	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	1,5	1-2
675	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	4	1,5	1-2
676	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	1,5	1-2
677	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	3	0,3	0-1
678	<i>V. nubilum</i> 278734	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	2,5	2-3
679	<i>V. nubilum</i> 278734	-	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	3	0,3	0-1
680	<i>V. nubilum</i> 278734	-	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	3	0,3	0-1
681	<i>V. nubilum</i> 278734	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
682	<i>V. nubilum</i> 278734	-	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	3	0,3	0-1
683	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	1,5	1-2
684	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	4	1	1
685	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
686	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	2,5	2-3
687	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	0	0
688	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	4	1,3	1-2
689	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	1	1
690	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
691	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	4	1	1
692	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	0	0

Παράρτημα 6. Σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) σε συλλογή στελεχών *Verticillium* (σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό MM). Στις αντίστοιχες στήλες του πίνακα παρέχονται ο αριθμός των επαναλήψεων για κάθε διασταύρωση (N), η μέση ένταση (I) σε μια κλίμακα 0-3, το εύρος (R) και το τυπικό σφάλμα μέση τιμής (SEM) για όσες διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10 επαναλήψεις. Οι τιμές της μέσης έντασης που ανήκουν στις κλάσεις 0,6-1,9 και 2,0-3,0 επισημαίνονται σε ανοικτό και σκούρο γκρι πλαίσιο, αντίστοιχα.

A/A	Στέλεχος A	VCG	Στέλεχος B	VCG	N	I	R	SEM (N=10)
ελάχιστο θρεπτικό υλικό (MM)								
1	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> T9	1A	2	0	0	
2	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V44	1A	3	0	0	
3	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	2	2,5	2-3	
4	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	2	0	0	
5	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	2	0	0	
6	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	2	0	0	
7	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	2	0	0	
8	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	0	0	
9	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	0	0	
10	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0	0	
11	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	0	0	
12	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0	0	
13	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	
14	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V44	1A	2	0	0	
15	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	4	1,3	1-2	
16	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	2	1,5	1-2	
17	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	2	0	0	
18	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	2	0	0	
19	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	2	0	0	
20	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	0	0	
21	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1	
22	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0	0	
23	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0	
24	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	2	2,5	2-3	
25	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	4	0	0	
26	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	2	0	0	
27	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	2	1,5	1-2	
28	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	2	2	
29	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1	1	
30	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. dahliae</i> 157	4B	2	0	0	
31	<i>V. dahliae</i> V138I	1A	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	0	0	
32	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	2	0	0	
33	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	3	0	0	
34	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> PH	2A	2	0	0	
35	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	1	1	
36	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	2	0	0	
37	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	0	0	
38	<i>V. dahliae</i> cotVd16	1A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	0	0	
39	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	2	1	1	
40	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	0	0	
41	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	0	0	
42	<i>V. dahliae</i> cotVd47	1A	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	2	0	0	
43	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	2	0	0	
44	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	2	0	0	
45	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	3	0	0	
46	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> PH	2A	2	0	0	
47	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	0	0	
48	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	0	0	
49	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	0	0	
50	<i>V. dahliae</i> V607I	1B	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	2	0	0	
51	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	<i>V. dahliae</i> V661I	1B	5	0	0	

52	<i>V. dahliae</i> V6611	1B	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	2	0	0
53	<i>V. dahliae</i> V6611	1B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	0	0
54	<i>V. dahliae</i> V6611	1B	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	0	0
55	<i>V. dahliae</i> V6611	1B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	0	0
56	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> V6611	1B	2	1,5	1-2
57	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	0	0
58	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	0	0
59	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	0	0
60	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	0	0
61	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0
62	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
63	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	1,5	1-2
64	<i>V. dahliae</i> V666I	1B	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	2	2
65	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> PH	2A	2	0	0
66	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	4	0	0
67	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	2	0	0
68	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	2	2
69	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	0,5	0-1
70	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	1	1
71	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	0	0
72	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	0	0
73	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	2	0	0
74	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	2	0	0
75	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	5	0	0
76	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	0	0
77	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	0	0
78	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	0	0
79	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	2	0	0
80	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	0	0
81	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	0	0
82	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0
83	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	5	1,2	1-2
84	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	1	1
85	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	2	0	0
86	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	0	0
87	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	2	0	0
88	<i>V. dahliae</i> egpVd23	2A	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0
89	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	2	0	0
90	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	0	0
91	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	2	1,5	1-2
92	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	0	0
93	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	1	1
94	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1,5	1-2
95	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	0	0
96	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	1,5	1-2
97	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	0	0
98	<i>V. dahliae</i> ep8	2A	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	0	0
99	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	0	0
100	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	2	0	0
101	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	0	0
102	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1
103	<i>V. dahliae</i> 31V	2A	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
104	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	5	0,2	0-1
105	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	2	1	1
106	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	0,5	0-1
107	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	0	0
108	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0	0
109	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	0	0
110	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	0	0
111	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	4	0	0
112	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	0	0

113	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	0	0
114	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	0	0
115	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	0	0
116	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	0	0
117	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	2	0	0
118	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> V16	2B	4	0	0
119	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	2	0	0
120	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	3	0,7	0-1
121	<i>V. dahliae</i> V357I	2B	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	0	0
122	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	0	0
123	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	2	0	0
124	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	0	0
125	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	0	0
126	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	0	0
127	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	2	0	0
128	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	0	0
129	<i>V. dahliae</i> cotVd18	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	0	0
130	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	2	0	0
131	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	1	1
132	<i>V. dahliae</i> 123-3	2B	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	2	0	0
133	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	0	0
134	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	2	0	0
135	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	4	0	0
136	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	1	1
137	<i>V. dahliae</i> Cf.38	2B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1	1
138	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	0	0
139	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	2	0	0
140	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	0	0
141	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	0	0
142	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0	0
143	<i>V. dahliae</i> 423-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	0	0
144	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	2	0	0
145	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	3	0,3	0-1
146	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0	0
147	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	2	0	0
148	<i>V. dahliae</i> 20V	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0	0
149	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	0	0
150	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	3	0,3	0-1
151	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0	0
152	<i>V. dahliae</i> 128V	2B (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	1	1
153	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0	0
154	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	0	0
155	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	0	0
156	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	0	0
157	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	0	0
158	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	0	0
159	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> PCW	3	3	0	0
160	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	2	0	0
161	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	0	0
162	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	1	1
163	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	0	0
164	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0
165	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	1	1
166	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
167	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	0	0
168	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	1,5	1-2
169	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1,5	1-2
170	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	0	0
171	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	0	0
172	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	1	1
173	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	0	0

174	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	4	0,3	0-1
175	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	0,5	0-1
176	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	0	0
177	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	0	0
178	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0	0
179	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	2	0	0
180	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	0	0
181	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	2	0	0
182	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	5	0	0
183	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	0	0
184	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	2	0	0
185	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	0	0
186	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	2	0	0
187	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	1	1
188	<i>V. dahliae</i> 131-M	4A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0
189	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	2	0	0
190	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	3	0,3	0-1
191	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	0	0
192	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	0	0
193	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	2	0	0
194	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	0	0
195	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2	2
196	<i>V. dahliae</i> 171-4A	4A	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0
197	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	0	0
198	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	3	0	0
199	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> 157	4B	2	0	0
200	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	0	0
201	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	0	0
202	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	0	0
203	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	0	0
204	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0
205	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
206	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	0	0
207	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	2	2	2
208	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	0	0
209	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	0	0
210	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0
211	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
212	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
213	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0	0
214	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	6	0	0
215	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	3	0	0
216	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	0	0
217	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	2	0	0
218	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0
219	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	2	0	0
220	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	4	0,5	0-1
221	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> 157	4B	2	0	0
222	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	3	0	0
223	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	2	0	0
224	<i>V. dahliae</i> V304I	4B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0
225	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	0	0
226	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> 157	4B	6	1,7	1-2
227	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	0	0
228	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	0	0
229	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	0	0
230	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. dahliae</i> 157	4B	2	0	0
231	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. dahliae</i> V39	4B	3	0	0
232	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	2	0	0
233	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	0	0
234	<i>V. dahliae</i> 157	4B	<i>V. longisporum</i> CA10	-	2	0	0

235	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>V. dahliae</i> V39	4B	2	0	0
236	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	3	0	0
237	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	0	0
238	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	2	0	0
239	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0
240	<i>V. dahliae</i> V39	4B	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	0	0
241	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	0	0
242	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	0	0
243	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
244	<i>V. dahliae</i> 1V	4B	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	1	1
245	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	2	0	0
246	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	4	0,3	0-1
247	<i>V. dahliae</i> 435-1	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	1,5	1-2
248	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	2	1,5	1-2
249	<i>V. dahliae</i> 456-1	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	3	0	0
250	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	2	0	0
251	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	0	0
252	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HS I	2	0	0
253	<i>V. dahliae</i> 457-5	4B (4A)	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	0	0
254	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	3	0	0
255	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	2	0	0
256	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0
257	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
258	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	2	0	0
259	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	2	1,5	1-2
260	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	3	0	0
261	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	2	0	0
262	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	0	0
263	<i>V. dahliae</i> Ca.146	6	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	1,5	1-2
264	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	3	0	0
265	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	2	2,5	2-3
266	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	3	0	0
267	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0
268	<i>V. dahliae</i> Ca.148	6	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	0	0
269	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HS I	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	2	0	0
270	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HS I	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	1	1
271	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HS I	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	0	0
272	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HS I	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
273	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	3	1,3	1-2
274	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	4	0	0
275	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0
276	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0
277	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0	0
278	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0
279	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	2	1	1
280	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
281	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	0	0
282	<i>V. dahliae</i> V13	HS I	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	0	0
283	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	2	0	0
284	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	5	0	0
285	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0
286	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	1,5	1-2
287	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	1	1
288	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	1,5	1-2
289	<i>V. dahliae</i> Ud1-4-1	-	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	1,5	1-2
290	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0
291	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. dahliae</i> CA26	-	4	0	0
292	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0
293	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
294	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0
295	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	0	0

296	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
297	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
298	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	2	0	0
299	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	0	0
300	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0	0
301	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	2	1	1
302	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	0	0
303	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0	0
304	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. longisporum</i> CA10	-	2	0	0
305	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	0	0
306	<i>V. albo-atrum</i> 220	-	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	2	0	0
307	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	2	0	0
308	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	3	0	0
309	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	2	0	0
310	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	0	0
311	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	3	0	0
312	<i>V. albo-atrum</i> HP	-	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	0	0
313	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0	0
314	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	2	0	0
315	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	0	0
316	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	2	0	0
317	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	0	0
318	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	0,5	0-1
319	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0
320	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0
321	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
322	<i>V. albo-atrum</i> P10	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
323	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2
324	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. longisporum</i> CA10	-	2	0	0
325	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	2	0	0
326	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0,5	0-1
327	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0	0
328	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> CA10	-	2	0	0
329	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	2	0	0
330	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0
331	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0
332	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	0,5	0-1
333	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	0	0
334	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. longisporum</i> CA10	-	2	0	0
335	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	3	0	0
336	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0
337	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0,5	0-1
338	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	2	0	0
339	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0
340	<i>V. longisporum</i> CA10	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
341	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0
342	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0
343	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
344	<i>V. longisporum</i> Dk-1	-	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	0	0
345	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>V. longisporum</i> G19	-	2	0	0
346	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	3	0	0
347	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	2	0,5	0-1
348	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0
349	<i>V. longisporum</i> G19	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
350	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0
351	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	2	1	1
352	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0
353	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
354	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	0	0
355	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	2	2,5	2-3
356	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	3	0,7	1

357	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0,5	0-1
358	<i>V. tricorpus</i> 15	VTR-5	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	0	0
359	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	2	0	0
360	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	2	0	0
361	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	3	0,3	0-1
362	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
363	<i>V. tricorpus</i> 18	VTR-5	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	3	3
364	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	2	0	0
365	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	0	0
366	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	0	0
367	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	<i>V. tricorpus</i> 19	VTR-7	3	0	0
368	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	2	0	0
369	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	0	0
370	<i>V. tricorpus</i> 22	VTR-7	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	3	0	0
371	<i>V. nubilum</i> 278734	-	<i>V. nubilum</i> 278734	-	2	0	0
372	<i>V. nubilum</i> 278734	-	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	3	0	0
373	<i>V. nubilum</i> 278734	-	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	3	0	0
374	<i>V. nubilum</i> 278734	-	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
375	<i>V. nubilum</i> 278734	-	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	3	0	0
376	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	2	0	0
377	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	4	0,3	0-1
378	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
379	<i>G. nigrescens</i> 9	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	0	0
380	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	2	0	0
381	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	4	0	0
382	<i>G. nigrescens</i> 14	VN-5	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	0	0
383	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	2	0	0
384	<i>G. nigrescens</i> 18	VN-10	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	4	0,3	0-1
385	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	<i>G. nigrescens</i> 19	VN-11	2	0	0

Παράρτημα 7. Σχηματισμός ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) σε ζεύγη μορφολογικά χαρακτηρισμένων στελεχών *Verticillium*. Στις αντίστοιχες στήλες του πίνακα παρέχονται ο αριθμός των επαναλήψεων (N), η μέση ένταση (I) σε μια κλίμακα 0-3, το εύρος (R), το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (SEM) για όσες διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10 επαναλήψεις, και η κλάση παραγωγής χρωστικής (κάθε στελέχους και αθροιστικά για κάθε ζεύγος στελεχών). Οι μέσες τιμές έντασης που ανήκουν στις κλάσεις 0,6-1,9 και 2,0-3,0 επισημαίνονται με ανοικτό και σκούρο γκρι πλαίσιο, αντίστοιχα.

A/A	Στέλεχος A	VCG	Στέλεχος B	VCG	N	I	R	SEM (N=10)	Κλάση παραγωγής χρωστικής		
									Στέλεχος A	Στέλεχος B	Ζεύγος
1	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> T9	1A	2	2,5	2-3		3	3	6
2	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V44	1A	10	2,1	2-3	0,10	3	2	5
7	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> PH	2A	2	0,5	0-1		3	4	7
8	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	10	3	3	0	3	0	3
12	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	2	2		3	4	7
13	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	2,5	2-3		3	2	5
14	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	2	2		3	2	5
16	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	1,5	1-2		3	4	7
17	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	1	1		3	1	4
18	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	3	1	1		3	4	7
19	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	3	2	2		3	3	6
20	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0	0		3	4	7
21	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	2	1-3		3	2	5
22	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2	2		3	2	5
23	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2	2		3	2	5
24	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	3	1,3	1-2		3	4	7
25	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2	2		3	3	6
26	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2,5	2-3		3	1	4
27	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3		3	2	5
28	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	3	1,3	1-2		3	4	7
29	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1,5	1-2		3	4	7
30	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2		3	3	6
31	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2,5	2-3		3	1	4
32	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0,5	0-1		3	3	6
33	<i>V. dahliae</i> T9	1A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0,5	0-1		3	0	3

34	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V44	1A	2	2,5	2-3		2	2	4
40	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> PH	2A	10	0,6	0-1	0,16	2	4	6
41	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	2	3	3		2	0	2
43	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	1,5	1-2		2	4	6
44	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	2,5	2-3		2	2	4
45	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	2,5	2-3		2	2	4
47	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	2,5	2-3		2	4	6
48	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	0,5	0-1		2	1	3
50	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	3	1,3	1-2		2	4	6
51	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	2	2		2	3	5
52	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> PCW	3	3	1,3	1-2		2	4	6
53	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	2	1-3		2	2	4
54	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2	1-3		2	2	4
55	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2,5	2-3		2	2	4
56	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0,5	0-1		2	4	6
57	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2	2		2	3	5
59	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2	2		2	1	3
60	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3		2	2	4
61	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0,5	0-1		2	4	6
62	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	3	1,7	1-3		2	4	6
63	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1	1		2	3	5
64	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	2		2	1	3
65	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1,5	1-2		2	3	5
66	<i>V. dahliae</i> V44	1A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0,5	0-1		2	0	2
118	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> PH	2A	2	2	1-3		4	4	8
119	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	10	2,3	1-3	0,21	4	0	4
123	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	3	0,3	0-1		4	4	8
124	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	1	1		4	2	6
125	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	1,5	1-2		4	2	6
127	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	3	0,3	0-1		4	4	8
128	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	0	0		4	1	5
130	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0,5	0-1		4	4	8
131	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	3	1,7	1-3		4	3	7

132	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0	0	4	4	8
133	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	2,5	2-3	4	2	6
134	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2	1-3	4	2	6
135	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2	1-3	4	2	6
136	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0,5	0-1	4	4	8
137	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	1,5	1-2	4	3	7
138	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2	2	4	1	5
139	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3	4	2	6
140	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0,5	0-1	4	4	8
141	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	4	4	8
142	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1	4	3	7
144	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2	4	1	5
145	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0,5	0-1	4	3	7
146	<i>V. dahliae</i> PH	2A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0	4	0	4
147	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	2	3	3	0	0	0
151	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	1,5	1-2	0	4	4
152	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	3	1,7	1-3	0	2	2
154	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	2,5	2-3	0	2	2
156	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	2	1-3	0	4	4
159	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	1	1	0	1	1
160	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1	0	4	4
161	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	2	1-3	0	3	3
162	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	1	1	0	4	4
163	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	2,5	2-3	0	2	2
164	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2,5	2-3	0	2	2
165	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	3	2	1-3	0	2	2
166	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	1,5	1-2	0	4	4
167	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2,5	2-3	0	3	3
168	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	3	3	0	1	1
169	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3	0	2	2
170	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1	1	0	4	4
171	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	2	2	0	4	4
173	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	0	3	3

174	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	3	3		0	1	1
175	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	3	3		0	3	3
177	<i>V. dahliae</i> V320I	2A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	1-3		0	0	0
199	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 115	2B	2	0	0		4	4	8
200	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	10	0,5	0-1	0,17	4	2	6
202	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	1,5	1-2		4	2	6
206	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	10	0,3	0-1	0,15	4	4	8
208	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	1	1		4	1	5
209	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	3	0,7	0-1		4	4	8
210	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	1	1		4	3	7
211	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0,5	0-1		4	4	8
212	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1	1		4	2	6
214	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1,5	1-2		4	2	6
215	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	1,5	1-2		4	2	6
216	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0,5	0-1		4	4	8
217	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	3	0,7	0-1		4	3	7
219	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	0,5	0-1		4	1	5
220	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	1,5	1-2		4	2	6
221	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0,5	0-1		4	4	8
222	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1		4	4	8
223	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1		4	3	7
224	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1	1		4	1	5
225	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1,5	1-2		4	3	7
226	<i>V. dahliae</i> 115	2B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0		4	0	4
227	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	2	3	3		2	2	4
229	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V16	2B	10	2,9	2-3	0,10	2	2	4
232	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	3	3		2	4	6
234	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	3	2	1-3		2	1	3
235	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1		2	4	6
236	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	2,5	2-3		2	3	5
237	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	1	1		2	4	6
238	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1,5	1-2		2	2	4
239	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2,5	2-3		2	2	4

240	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2,5	2-3	2	2	4
241	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	2	1-3	2	4	6
242	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	3	3	3	2	3	5
243	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2	1-3	2	1	3
244	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3	2	2	4
245	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1	1	2	4	6
246	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1	2	4	6
247	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1	2	3	5
248	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	1-3	2	1	3
249	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2	1-3	2	3	5
250	<i>V. dahliae</i> Ls.17	2B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	1-3	2	0	2
257	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V16	2B	2	2,5	2-3	2	2	4
261	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	10	1,4	1-2	2	4	6
262	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	1,5	1-2	2	1	3
264	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1	2	4	6
265	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	1,5	1-2	2	3	5
266	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	1	1	2	4	6
267	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1	1	2	2	4
268	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1	1	2	2	4
269	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	3	3	2	2	4
270	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	2,5	2-3	2	4	6
271	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2,5	2-3	2	3	5
272	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	3	2	1-3	2	1	3
273	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3	2	2	4
274	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1	1	2	4	6
275	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	2,5	2-3	2	4	6
276	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	2	3	5
277	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	3	3	2	1	3
278	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1,5	1-2	2	3	5
279	<i>V. dahliae</i> V16	2B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2,5	2-3	2	0	2
309	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	2	1,5	1-2	4	4	8
311	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	0,5	0-1	4	1	5
312	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	1	1	4	4	8

313	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	1,5	1-2		4	3	7
314	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0	0		4	4	8
315	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1,5	1-2		4	2	6
316	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	3	3		4	2	6
317	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2,5	2-3		4	2	6
318	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	1,5	1-2		4	4	8
319	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2	2		4	3	7
320	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2,5	2-3		4	1	5
321	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3		4	2	6
322	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0		4	4	8
323	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1,5	1-2		4	4	8
324	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0	0		4	3	7
325	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2,5	2-3		4	1	5
326	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0,5	0-1		4	3	7
327	<i>V. dahliae</i> V702I	2Ba	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	2		4	0	4
337	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	2	2	1-3		1	1	2
338	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	10	1,1	1-2	0,10	1	4	5
339	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	10	0,9	0-1	0,10	1	3	4
340	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	0,5	0-1		1	4	5
341	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1,5	1-2		1	2	3
342	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1	1		1	2	3
343	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	1	1		1	2	3
344	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0	0		1	4	5
345	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	0,5	0-1		1	3	4
346	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2,5	2-3		1	1	2
347	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3		1	2	3
348	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0		1	4	5
349	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0,5	0-1		1	4	5
350	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1		1	3	4
351	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2		1	1	2
352	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1	1		1	3	4
353	<i>V. dahliae</i> 530-1	2B (2A)	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2		1	0	1
356	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	2	0,5	0-1		4	4	8

357	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	1	1		4	3	7
358	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> PCW	3	10	0	0	0	4	4	8
359	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	0,5	0-1		4	2	6
361	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1	1		4	2	6
362	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	1	1		4	2	6
363	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	1,5	1-2		4	4	8
364	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	3	0,7	0-1		4	3	7
366	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2	1-3		4	1	5
367	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2	1-3		4	2	6
369	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0		4	4	8
370	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0,5	0-1		4	4	8
371	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1		4	3	7
372	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2		4	1	5
373	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2	1-3		4	3	7
374	<i>V. dahliae</i> 25V	2AB (1, 4A)	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	2		4	0	4
375	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	2	2,5	2-3		3	3	6
376	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> PCW	3	10	1,1	1-2	0,10	3	4	7
377	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	2,5	2-3		3	2	5
379	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2	2		3	2	5
380	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	3	2,3	2-3		3	2	5
381	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	1	1		3	4	7
382	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2,5	2-3		3	3	6
383	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	1,5	1-2		3	1	4
384	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2	1-3		3	2	5
386	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0,5	0-1		3	4	7
387	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1		3	4	7
389	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1		3	3	6
390	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	1-3		3	1	4
391	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1,5	1-2		3	3	6
393	<i>V. dahliae</i> 70-21	3	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	2		3	0	3
397	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> PCW	3	2	2	1-3		4	4	8
398	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> BB	4A	3	1,3	1-2		4	2	6
399	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	1,5	1-2		4	2	6

400	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2	1-3		4	2	6
401	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0,5	0-1		4	4	8
402	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	3	0,7	0-1		4	3	7
403	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2,5	2-3		4	1	5
404	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3		4	2	6
406	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0		4	4	8
407	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0		4	4	8
408	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1		4	3	7
409	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1	1		4	1	5
410	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0,5	0-1		4	3	7
411	<i>V. dahliae</i> PCW	3	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0,5	0-1		4	0	4
413	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> BB	4A	2	1	1		2	2	4
416	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	3	2	1-3		2	2	4
417	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	10	2,2	2-3	0,13	2	2	4
418	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	10	0,8	0-1	0,13	2	4	6
419	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	1,5	1-2		2	3	5
421	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2,5	2-3		2	1	3
422	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2,5	2-3		2	2	4
423	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0		2	4	6
424	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1,5	1-2		2	4	6
426	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2		2	3	5
427	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	1-3		2	1	3
428	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1	1		2	3	5
429	<i>V. dahliae</i> BB	4A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	2		2	0	2
447	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> V830	4A	2	2,5	2-3		2	2	4
448	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	10	2,6	2-3	0,16	2	2	4
449	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	10	2,4	1-3	0,22	2	4	6
450	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2	1-3		2	3	5
454	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	1,5	1-2		2	1	3
455	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	3	2	1-3		2	2	4
457	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1	1		2	4	6
458	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	2	2		2	4	6
459	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2		2	3	5

460	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2	2	1	3
461	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2	1-3	2	3	5
462	<i>V. dahliae</i> V830	4A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2	2	0	2
466	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	2	2,5	2-3	2	2	4
467	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	3	3	2	4	6
468	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	2,5	2-3	2	3	5
472	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	2	1-3	2	1	3
473	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	2	1-3	2	2	4
475	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	3	0,7	0-1	2	4	6
476	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1	2	4	6
477	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	2	3	5
478	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	3	3	2	1	3
479	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	3	3	2	3	5
480	<i>V. dahliae</i> Dvd-E6	4A	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2,5	2-3	2	0	2
483	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> S39	4B	2	0,5	0-1	4	4	8
485	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	5	1,6	1-3	4	3	7
488	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	1,5	1-2	4	1	5
489	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	2	3	3	4	2	6
490	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	3	0,3	0-1	4	4	8
491	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0,5	0-1	4	4	8
492	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1	1	4	3	7
493	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1	1	4	1	5
494	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2,5	2-3	4	3	7
495	<i>V. dahliae</i> S39	4B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2	4	0	4
502	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	2	1,5	1-2	3	3	6
506	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> Cf.162	H S I	2	1,5	1-2	3	1	4
507	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> V13	H S I	10	2,8	2-3	3	2	5
508	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	0	0	3	4	7
509	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1	3	4	7
510	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2	3	3	6
511	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	3	2,3	2-3	3	1	4
512	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2	1-3	3	3	6
513	<i>V. dahliae</i> V684I	4B	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2	2	3	0	3

538	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	3	1,3	1-2		3	3	6
541	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	2	1	1		3	2	5
542	<i>V. dahliae</i> Ca.83	6	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	0	0		3	4	7
553	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	2	1	1		1	1	2
554	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	10	2,6	2-3	0,16	1	2	3
556	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1	1		1	4	5
557	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	2	2		1	4	5
559	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0,5	0-1		1	3	4
560	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	2	2		1	1	2
561	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	1,5	1-2		1	3	4
562	<i>V. dahliae</i> Cf.162	HSI	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1	1		1	0	1
564	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	4	3	3		2	2	4
566	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	4	1,3	1-2		2	4	6
567	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. dahliae</i> CA26	-	3	2,3	2-3		2	4	6
568	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	3	2	1-3		2	3	5
569	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	3	3		2	1	3
570	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	3	3		2	3	5
572	<i>V. dahliae</i> V13	HSI	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	2,5	2-3		2	0	2
584	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	2	1,5	1-2		4	4	8
585	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. dahliae</i> CA26	-	10	0	0	0	4	4	8
586	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	10	0	0	0	4	3	7
587	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	1,5	1-2		4	1	5
588	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2,5	2-3		4	3	7
589	<i>V. dahliae</i> TO-0	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	3	0,3	0-1		4	0	4
591	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. dahliae</i> CA26	-	2	1	1		4	4	8
593	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	1,5	1-2		4	3	7
594	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	10	0,5	0-1	0,17	4	1	5
595	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0,5	0-1		4	3	7
596	<i>V. dahliae</i> CA26	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	3	1,7	1-2		4	0	4
616	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	2	0	0		3	3	6
618	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	10	1,4	1-2	0,16	3	1	4
619	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	0	0		3	3	6
621	<i>V. albo-atrum</i> Ms.102	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	0	0		3	0	3

628	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	2	3	3	1	1	2
629	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	3	3	1	3	4
631	<i>V. albo-atrum</i> T2	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2	1	0	1
634	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> 81	-	2	2,5	2-3	3	3	6
638	<i>V. longisporum</i> 81	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	3	1,7	1-2	3	0	3
658	<i>V. longisporum</i> K2	-	<i>V. longisporum</i> K2	-	2	1,5	1-2	0	0	0

Παράρτημα 8. Στατιστική ανάλυση συσχέτισης μεταξύ του σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης (barrage zones) μεταξύ στελεχών *Verticillium* και της ικανότητάς τους για παραγωγή χρωστικής (στους υπολογισμούς ελήφθησαν υπόψιν τα αποτελέσματα από 328 διαφορετικές διασταυρώσεις που παρατίθενται στο Παράρτημα 7).

Ομάδα Ι ^α	Ομάδα ΙΙ ^β	Ομάδα ΙΙΙ ^γ	Στατιστικοί δείκτες ANOVA			Ανάλυση <i>post hoc</i> (Tukey HSD)	
			<i>df</i> ^β	<i>F</i>	Σημαντικότητα	Σημαντικά διαφορετικές ομάδες	Σημαντικότητα
1,9 (0,1)	1,6 (0,1)	0,8 (0,1)	2 / 325	48,835	<0,001*	I - ΙΙ ΙΙ - ΙΙΙ Ι - ΙΙΙ	0,006* <0,001* <0,001*

^α Οι ομάδες Ι, ΙΙ και ΙΙΙ περιλαμβάνουν διασταυρώσεις με αθροιστική ικανότητα παραγωγής χρωστικής στις κλάσεις 0-4, 5-6 και 7-8, αντίστοιχα (στην κλίμακα 0-4 που χρησιμοποιήθηκε για κάθε στέλεχος). Η μέση τιμή της έντασης σχηματισμού ζωνών αντεπίδρασης και το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (σε παρένθεση) παρατίθενται για κάθε ομάδα.

^β *df* μεταξύ ομάδων / εντός ομάδων.

^γ Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο $p = 0.01$.

Παράρτημα 9. Χαρακτηρισμός μεταλλαγών *nit* που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία.

Στέλεχος	VCG	μεταλλαγή <i>nit</i>	Αύξηση σε θρεπτικό υλικό (πηγή αζώτου)			κλάση μεταλλαγής <i>nit</i>
			MM (NO ₃ ⁻)	MM (NO ₂ ⁻)	MM (HX)	
			T9	1A	T9.1U	
		T9.2U	-	+	-	nitM
		T9.3U	+	+	+	-
		T9.4U	-	-	-	-
		T9.5U	-	-	-	-
		T9.6U	-	-	-	-
		T9.7U	+	+	-	-
		T9.8U	-	+/-	+	<i>nit</i> 1
		T9.9U	-	+/-	+	<i>nit</i> 1
		T9.10S	-	+	-	nitM
		T9.11S	-	+	+	<i>nit</i> 1
		T9.12S	+	+	+	-
		T9.13S	-	+	+	<i>nit</i> 1
		T9.14S	-	-	-	-
		T9.15S	-	+	+	<i>nit</i> 1
		T9.16S	-	+	-	nitM
		T9.17S	-	-	+/-	<i>nit</i> 1
V44	1A	V44.1U	-	+	+	<i>nit</i> 1
		V44.2U	-	+	-	nitM
		V44.3U	-	+	+	<i>nit</i> 1
		V44.4U	+	+	-	-
		V44.5U	-	+	-	nitM
		V44.6U	-	+	+	<i>nit</i> 1
		V44.7U	-	+	+	<i>nit</i> 1
		V44.8U	+	+	+	-
		V44.9U	-	+	-	nitM
		V44.10S	+	+	+	-
		V44.11S	-	+	-	nitM
		V44.12S	-	+	-	nitM
		V44.13S	-	+	+	<i>nit</i> 1
		V44.14S	+	+	+	-
		V44.15S	-	+	-	nitM
		V44.16S	-	+	-	nitM
		V44.17S	+	+	+	-
		V44.18S	+	+	+	-
V607I (R04)	1B	V607I.1U	-	+	+	<i>nit</i> 1
		V607I.2U	-	+	+	<i>nit</i> 1
		V607I.3S	-	+	+	<i>nit</i> 1
		V607I.4S	-	+	-	nitM
		V607I.5S	-	+	-	nitM
		V607I.6S	-	+	-	nitM
V661I (328 v-1)	1B	V661I.1U	+	+	+	-
		V661I.2S	+	+	+	-
		V661I.3S	-	+	+	<i>nit</i> 1
		V661I.4S	-	+	+	<i>nit</i> 1

PH	2A	PH.1U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.2U	-	+	-	nitM
		PH.3U	+	+	-	-
		PH.4U	+	+	+	-
		PH.5U	-	+	-	nitM
		PH.6U	+	+	+	-
		PH.7U	+	+	-	-
		PH.8U	+	+	+	-
		PH.9U	+	+	+	-
		PH.10U	+	+	+	-
		PH.11U	+	+	+	-
		PH.12U	+	+	+	-
		PH.13U	+	+	+	-
		PH.14U	+	+	+	-
		PH.21U	+	+	+	-
		PH.22U	+	+	+	-
		PH.23U	+	+	+	-
		PH.24U	+	+	+	-
		PH.25U	+	+	+	-
		PH.26U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.27U	+	+	+	-
		PH.28U	+	+	+	-
		PH.29U	+	+	+	-
		PH.34S	+	+	+	-
		PH.35S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.36S	+	+	+	-
		PH.37S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.38S	+	+	+	-
		PH.39S	+	+	+	-
		PH.40S	+	+	+	-
		PH.41S	+	+	+	-
		PH.42S	-	+	+/-	nitM
		PH.43S	+	+	+	-
		PH.44S	+	+	+	-
		PH.45S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.46S	+	+	+	-
		PH.47S	+	+	+	-
		PH.48S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.49S	+	+	+	-
		PH.50S	-	+	+/-	nitM
		PH.51S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.52S	+	+	+	-
		PH.53S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.54S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.55S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.56S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.57S	+	+	+	-
		PH.58S	+	+	+	-
		PH.59S	-	+	+/-	nitM
		PH.60S	-	+	+/-	nitM

		PH.61S	+	+	+	-
		PH.62S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.63S	+	+	+	-
		PH.64S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.65S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.66S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.67S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.68S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.69S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.70S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.71S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.72S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.73S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.74S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PH.75S	-	+	+	<i>nit 1</i>
V320I	2A	V320I.1U	-	+	+/-	nitM
		V320I.2U	-	-	-	-
		V320I.3U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V320I.4U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V320I.5U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V320I.6U	+	+	+	-
		V320I.7U	+	+	-	-
		V320I.8U	+	+	+	-
		V320I.9S	-	-	-	-
		V320I.10S	-	+	-	nitM
		V320I.11S	+	+	+	-
		V320I.12S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V320I.13S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V320I.14S	-	+	-	nitM
		V320I.15S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V320I.16S	-	+	+	<i>nit 1</i>
115	2B	115.1S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		115.2S	-	+	-	nitM
Ls.17	2B	Ls.17.1U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ls.17.2U	-	+	-	nitM
		Ls.17.3U	-	+/-	+	<i>nit 1</i>
		Ls.17.4U	+	+	+	-
		Ls.17.5U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ls.17.6U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ls.17.7U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ls.17.8U	+	+	+	-
		Ls.17.9S	-	+	-	nitM
		Ls.17.10S	-	+/-	+	<i>nit 1</i>
		Ls.17.11S	+	+	+	-
		Ls.17.12S	-	+/-	+/-	<i>nit 1</i>
		Ls.17.13S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ls.17.14S	+	+	+	-
		Ls.17.15S	-	+	-	nitM
		Ls.17.16S	+/-	+/-	+/-	-
		Ls.17.17S	+	+	-	-

		Ls.17.18S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ls.17.19S	-	+	+	<i>nit 1</i>
V16	2B	V16.1U	-	+	-	nitM
		V16.2U	+/-	+	+	<i>nit 1</i>
		V16.3U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V16.4U	-	+	-	nitM
		V16.5U	+	+	+	-
		V16.6U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V16.7U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V16.8U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V16.9U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V16.10U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V16.11U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V16.12U	+	+	+	-
		V16.13U	+	+	+	-
		V16.14U	+	+	+	-
		V16.15U	+	+	+	-
		V16.16U	+	+	+	-
		V16.17S	-	+	-	nitM
		V16.18S	-	+	-	nitM
		V16.19S	-	+	-	nitM
		V16.20S	-	+	-	nitM
		V16.21S	-	+	-	nitM
		V16.22S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V16.23S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V16.24S	-	+	-	nitM
		V16.25S	-	+	-	nitM
		V16.26S	-	+	-	nitM
Cf.38	2B	Cf.38.1U	+	+	+	-
		Cf.38.2U	+	+	+	-
		Cf.38.3U	+	+	+	-
		Cf.38.4U	+	+	+	-
		Cf.38.5U	+	+	+	-
		Cf.38.12U	+	+	+	-
		Cf.38.13U	+	+	+	-
		Cf.38.14U	+	+	+	-
		Cf.38.15U	+	+	+	-
		Cf.38.16U	+	+	+	-
		Cf.38.17U	+	+	+	-
		Cf.38.18U	+	+	+	-
		Cf.38.19U	-	+	-	nitM
		Cf.38.20U	+	+	+	-
		Cf.38.21U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.38.22U	+	+	+	-
		Cf.38.23U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.38.24U	+	+	+	-
		Cf.38.25U	+	+	+	-
		Cf.38.26U	-	+	-	nitM
		Cf.38.27U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.38.28U	-	+	-	nitM

		Cf.38.29S	+	+	+	-
		Cf.38.30S	+	+	+	-
		Cf.38.31S	+	+	+	-
		Cf.38.32S	+	+	+	-
		Cf.38.33S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.38.34S	+	+	+	-
		Cf.38.35S	+	+	+	-
		Cf.38.36S	+	+	+	-
		Cf.38.37S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.38.38S	-	+	-	nitM
		Cf.38.39S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.38.40S	+	+	+	-
		Cf.38.41S	+	+	+	-
		Cf.38.42S	-	+	-	nitM
		Cf.38.43S	+	+	+	-
		Cf.38.44S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.38.45S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.38.46S	-	+	-	nitM
		Cf.38.47S	+	+	+	-
		Cf.38.48S	-	+	+	<i>nit 1</i>
V702I	2Ba	V702I.1U	-	+	-	nitM
		V702I.2U	+	+	+	-
		V702I.3U	+	+	+	-
		V702I.4U	+	+	+	-
		V702I.5U	+	+	+	-
		V702I.6U	+	+	+	-
		V702I.7U	+	+	+	-
		V702I.8U	-	+	+/-	<i>nit 1</i>
		V702I.9S	+	+/-	+	-
		V702I.10S	+	+	+	-
		V702I.11S	-	+	+/-	nitM
		V702I.12S	+	+	+	-
		V702I.13S	+	+	-	-
		V702I.14S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V702I.15S	+	+	+	-
		V702I.16S	+	+	+	-
530-1	2B (2A)	530-1.1U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.2U	-	+	-	nitM
		530-1.3U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.4U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.5U	+/-	-	-	-
		530-1.6U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.7U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.8U	+	+	+	-
		530-1.9U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.10U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.11U	+/-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.12U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.13U	-	+	-	nitM
		530-1.14U	-	+/-	+/-	<i>nit 1</i>

		530-1.15U	+/-	+/-	+	<i>nit 1</i>
		530-1.16U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.17U	+	+	+	-
		530-1.18U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.19U	+	+	+	-
		530-1.20U	-	+	-	nitM
		530-1.21S	+	+	+	-
		530-1.22S	+	+	+	-
		530-1.23S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.24S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.25S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.26S	+	+	+	-
		530-1.27S	-	+	-	nitM
		530-1.28S	-	+	-	nitM
		530-1.29S	+	+	+	-
		530-1.30S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.31S	+	+	+	-
		530-1.32S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.33S	+	+	+	-
		530-1.34S	+	+	+	-
		530-1.35S	+	+	+	-
		530-1.36S	-	+	-	nitM
		530-1.37S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.38S	+	+	+	-
		530-1.39S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.40S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.41S	+	+	+	-
		530-1.42S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.43S	+	+	+	-
		530-1.44S	-	+	-	nitM
		530-1.45S	+	+	+	-
		530-1.46S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.47S	+	+	+	-
		530-1.48S	-	+	-	nitM
		530-1.49S	-	+	-	nitM
		530-1.50S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.51S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.52S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.53S	-	+	-	nitM
		530-1.54S	-	+	-	nitM
		530-1.63S	-	+	-	nitM
		530-1.64S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.65S	-	+	-	nitM
		530-1.66S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		530-1.67S	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V (SS4)	2AB (1, 4A)	25V.1U	+	+	+	-
		25V.2U	+	+	+	-
		25V.3U	+	+	+	-
		25V.4U	+	+	+	-
		25V.5U	+	+	+	-

25V.6U	+	+	+	-
25V.7U	+	+	+	-
25V.8U	+	+	+	-
25V.9U	+	+	+	-
25V.10U	+	+	+	-
25V.11U	+	+	+	-
25V.12U	+	+	+	-
25V.13U	+	+	+	-
25V.14U	+	+	+	-
25V.15U	+	+	+/-	-
25V.16U	+	+	+	-
25V.17U	+	+	+	-
25V.18U	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V.19U	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V.20U	-	+	-	nitM
25V.21U	+	+	+	-
25V.22U	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V.23U	+	+	+	-
25V.24U	+	+	+	-
25V.25U	+	+	+	-
25V.26U	+	+	+	-
25V.27U	+	+	+	-
25V.28U	+	+	+	-
25V.29U	+	+	+	-
25V.30U	+	+	+	-
25V.31U	+	+	+	-
25V.32U	+	+	+	-
25V.33U	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V.34U	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V.35U	-	+	-	nitM
25V.36S	+	+	+	-
25V.37S	-	+	-	nitM
25V.38S	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V.39S	+	+	+	-
25V.40S	+	+	+	-
25V.41S	+	+	+	-
25V.42S	+	+	+	-
25V.43S	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V.44S	+	+	+	-
25V.45S	+	+	+	-
25V.46S	+	+	+	-
25V.47S	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V.48S	+	+	+	-
25V.49S	+	+	+	-
25V.50S	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V.51S	-	+	-	nitM
25V.52S	+	+	+	-
25V.53S	-	+	+	<i>nit 1</i>
25V.54S	+	+	+	-
25V.55S	+	+	+	-

		25V.56S	+	+	+	-
		25V.57S	+	+	+	-
		25V.58S	+	+	+	-
		25V.59S	+	+	+	-
		25V.60S	+	+	+	-
		25V.61S	+	+	+	-
		25V.62S	+	+	+	-
		25V.63S	+	+	+	-
		25V.64S	+	+	+	-
		25V.65S	+	+	+	-
		25V.66S	+	+	+	-
		25V.67S	+	+	+	-
		25V.68S	+	+	+	-
		25V.69S	+	+	+	-
		25V.70S	+	+	+	-
		25V.71S	+	+	+	-
		25V.72S	+	+	+	-
70-21	3	70-21.1U	-	+	-	nitM
		70-21.2U	+	+	+	-
		70-21.3U	+	+	+	-
		70-21.4U	+	+	+	-
		70-21.5U	+	+	+	-
		70-21.6U	+	+	+	-
		70-21.7U	-	+	+	nit 1
		70-21.8U	+	+	+	-
		70-21.9U	+	+	+	-
		70-21.10U	+	+	+	-
		70-21.11U	-	+	+	nit 1
		70-21.12U	+	+	+	-
		70-21.13U	+	+	+	-
		70-21.14U	-	+	-	nitM
		70-21.15U	+	+	+	-
		70-21.16S	-	+	-	nitM
		70-21.17S	+	+	+	-
		70-21.18S	+	+	+	-
		70-21.19S	+	+	+	-
		70-21.20S	+	+	+	-
		70-21.21S	+	+	+	-
		70-21.25S	+	+	+	-
		70-21.26S	+	+	+	-
		70-21.27S	+	+	+	-
		70-21.28S	+	+	+	-
		70-21.29S	+	+	+	-
		70-21.30S	-	+	+	nit 1
		70-21.31S	+	+	+	-
		70-21.32S	+	+	+	-
		70-21.33S	+	+	+	-
		70-21.34S	+	+	+	-
		70-21.35S	+	+	+	-
		70-21.36S	+	+	+	-

		70-21.40S	+	+	+	-
		70-21.41S	-	+	+	<i>nit 1</i>
PCW	3	PCW.1U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PCW.2U	-	+	-	nitM
		PCW.3U	+	+	-	-
		PCW.4U	+	+	-	-
		PCW.5U	-	+	-	nitM
		PCW.6U	+	+	-	-
		PCW.7U	+	+	-	-
		PCW.8U	+	+	-	-
		PCW.9U	+	+	-	-
		PCW.10U	+	+	-	-
		PCW.11U	+	+	+	-
		PCW.12U	+	+	+	-
		PCW.13U	+	+	+	-
		PCW.14U	+	+	+	-
		PCW.15U	-	+	-	nitM
		PCW.16U	+	+	+	-
		PCW.17U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PCW.18U	-	+	-	nitM
		PCW.19U	-	+	-	nitM
		PCW.20U	-	+	-	nitM
		PCW.21S	-	+	-	nitM
		PCW.22S	+	+	+	-
		PCW.23S	+	+	+	-
		PCW.24S	-	+	-	nitM
		PCW.25S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		PCW.26S	+	+	+	-
		PCW.27S	+	+	+	-
		PCW.28S	+	+	+	-
		PCW.29S	+	+	+	-
		PCW.30S	+	+	+	-
		PCW.31S	+	+	+	-
		PCW.32S	+	+	+	-
		PCW.33S	+	+	-	-
		PCW.34S	+	+	+	-
		PCW.35S	+	+	+	-
		PCW.36S	+	+	+	-
		PCW.37S	+	+	+	-
		PCW.38S	+	+	-	-
		PCW.39S	-	+	-	nitM
		PCW.40S	+	+	+	-
		PCW.41S	+	+	+	-
		PCW.42S	-	+	-	nitM
BB	4A	BB.1U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		BB.2U	-	+	-	nitM
		BB.3U	-	+	-	nitM
		BB.4U	-	+	-	nitM
		BB.5U	-	+	-	nitM
		BB.6U	-	+	-	nitM

		BB.7U	-	+	-	nitM
		BB.8U	-	+	-	nitM
		BB.9U	-	+	-	nitM
		BB.10U	-	+	-	nitM
		BB.11U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		BB.12U	-	+	-	nitM
		BB.13S	-	+	-	nitM
		BB.14S	-	+	-	nitM
		BB.15S	-	+	-	nitM
		BB.16S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		BB.17S	-	+	-	nitM
		BB.18S	-	+	-	nitM
		BB.19S	-	+	-	nitM
		BB.20S	-	+	-	nitM
		BB.21S	-	+	-	nitM
		BB.22S	-	+	-	nitM
		BB.23S	-	+	-	nitM
		BB.24S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		BB.25S	-	+	-	nitM
		BB.26S	-	+	-	nitM
V830	4A	V830.1U	-	+	+/-	nitM
		V830-2U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V830.3U	+	+	+	-
		V830.4U	+	+	-	-
		V830.5U	-	+	-	nitM
		V830.6U	-	-	-	-
		V830.7U	-	+/-	-	nitM
		V830.8U	+	+	+	-
		V830.9U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V830.10U	-	+/-	+	<i>nit 1</i>
		V830.11U	+	+	+/-	-
		V830.12U	-	+	-	nitM
		V830.13U	-	+	-	nitM
		V830.14U	+	+	-	-
		V830.15U	+	+	+	-
		V830.16U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V830.17S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V830.18S	-	+	-	nitM
		V830.19S	-	+	-	nitM
		V830.20S	-	+	-	nitM
		V830.21S	+	+	+	-
		V830.22S	+	+	+	-
		V830.23S	+	+	+	-
		V830.24S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V830.25S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V830.26S	-	+	-	nitM
		V830.27S	-	+	-	nitM
Dvd-E6	4A	Dvd-E6.1U	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.2U	-	-	-	-
		Dvd-E6.3U	+	+	-	-

		Dvd-E6.4U	+	+	+	-
		Dvd-E6.5U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Dvd-E6.6U	-	+/-	+	<i>nit 1</i>
		Dvd-E6.7U	-	-	-	-
		Dvd-E6.8U	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.9U	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.10U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Dvd-E6.11S	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.12S	+	+	+	-
		Dvd-E6.13S	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.14S	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.15S	+	+	+	-
		Dvd-E6.16S	+	+	-	-
		Dvd-E6.17S	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.18S	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.19S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Dvd-E6.20S	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.21S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Dvd-E6.22S	+	+	-	-
		Dvd-E6.23S	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.24S	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.25S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Dvd-E6.26S	+	+	+	-
		Dvd-E6.27S	-	+	-	nitM
		Dvd-E6.28S	+	+	+	-
S39	4B	S39.1U	-	+	-	nitM
		S39.2U	+	+	+	-
		S39.3U	+	+	+	-
		S39.4U	+	+	+	-
		S39.5U	+	+	+	-
		S39.6U	+	+	+	-
		S39.7U	+	+	+	-
		S39.8U	+	+	+	-
		S39.9U	+	+	+	-
		S39.10U	+	+	+	-
		S39.11U	+	+	+	-
		S39.12U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		S39.13U	+	+	+	-
		S39.14U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		S39.15U	-	+	-	nitM
		S39.16U	-	+	-	nitM
		S39.17U	+	+	+	-
		S39.18U	+	+	+	-
		S39.19U	+	+	+	-
		S39.20U	+	+	+	-
		S39.21U	+	+	+	-
		S39.22U	+	+	+	-
		S39.23U	+	+	+	-
		S39.24U	+	+	+	-
		S39.25U	+	+	+	-

		S39.26S	+	+	+	-
		S39.27S	+	+	+	-
		S39.28S	+	+	+	-
		S39.29S	+	+	+	-
		S39.30S	+	+	+	-
		S39.31S	-	+	-	nitM
		S39.32S	+	+	+	-
		S39.33S	+	+	+	-
		S39.34S	+	+	+	-
		S39.35S	+	+	+	-
		S39.36S	-	+	+	nit 1
		S39.37S	+	+	+	-
		S39.38S	-	+	-	nitM
		S39.39S	-	+	-	nitM
		S39.40S	+	+	+	-
		S39.41S	+	+	+	-
		S39.42S	-	+	+	nit 1
		S39.43S	-	+	-	nitM
		S39.44S	-	+	-	nitM
		S39.45S	-	+	-	nitM
		S39.46S	+	+	+	-
		S39.47S	+	+	+	-
		S39.48S	+	+	+	-
		S39.49S	+	+	+	-
		S39.50S	+	+	+	-
V684I	4B	V684I.1U	+	+	+	-
		V684I.2U	+	+	+	-
		V684I.3U	+	+	+	-
		V684I.4U	+	+	+	-
		V684I.5U	+	+	+	-
		V684I.6U	+	+	+	-
		V684I.7U	+	+	+	-
		V684I.8U	+	+	+	-
		V684I.9U	+	+	+	-
		V684I.10U	-	+	+	nit 1
		V684I.11U	-	+	+/-	nitM
		V684I.12S	+	+	+	-
		V684I.13S	+	+	+	-
		V684I.14S	+	+	+	-
		V684I.15S	+	+	+	-
		V684I.16S	+	+	+	-
		V684I.17S	-	+	-	nitM
		V684I.18S	+	+	+	-
		V684I.19S	+/-	+	+	nit 1
		V684I.20S	+	+	+	-
		V684I.21S	+	+	+	-
		V684I.22S	+	+	+	-
		V684I.23S	+	+	+	-
		V684I.24S	+	+	+	-
		V684I.25S	+	+	+	-

		V684I.26S	+	+	+	-
		V684I.27S	+	+	+	-
		V684I.28S	+	+	+	-
Ca.83	6	Ca.83.1U	-	+	-(+/-)	nitM
		Ca.83.2U	+	+	+	-
		Ca.83.3U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.83.4U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.83.5U	-	+	-	nitM
		Ca.83.6U	+/-	+/-	-	-
		Ca.83.7U	-	+	-	nitM
		Ca.83.8U	+	+	+	-
		Ca.83.9U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.83.10U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.83.11S	+	+	+	-
		Ca.83.12S	-	+	-	nitM
		Ca.83.13S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.83.14S	+	+	+	-
		Ca.83.15S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.83.16S	+	+	+	-
		Ca.83.17S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.83.18S	+	+	+	-
		Ca.83.19S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.83.20S	+	+	+	-
Ca.146	6	Ca.146.1U	-	+	-	nitM
		Ca.146.2U	-	+	-	nitM
		Ca.146.3U	-	+	-	nitM
		Ca.146.4U	-	+	-	nitM
		Ca.146.5U	-	+	-	nitM
		Ca.146.6S	-	+	-	nitM
		Ca.146.7S	-	+	-	nitM
		Ca.146.8S	-	+	-	nitM
		Ca.146.9S	-	+	-	nitM
		Ca.146.10S	-	+	-	nitM
		Ca.146.11S	+	+	+	-
		Ca.146.12S	-	+	-	nitM
Ca.148	6	Ca.148.1U	+	+	+	-
		Ca.148.2U	+	+	+	-
		Ca.148.3U	+	+	+	-
		Ca.148.4U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.148.5U	+	+	+	-
		Ca.148.6S	+	+	+	-
		Ca.148.7S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.148.8S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.148.9S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.148.10S	+	+	+	-
		Ca.148.11S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Ca.148.12S	+	+	+	-
Cf.162	H S I	Cf.162.1U	+	+	-	-
		Cf.162.2U	+	+	-	-
		Cf.162.3U	+	+	+	-

		Cf.162.4U	+	+	-	-
		Cf.162.5U	+	+	+	-
		Cf.162.6U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.162.7U	-	+	-	nitM
		Cf.162.8U	-	+	-	nitM
		Cf.162.9U	+	+	+	-
		Cf.162.10U	+	+	+	-
		Cf.162.11S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.162.12S	+	+	+	-
		Cf.162.13S	-	+	-	nitM
		Cf.162.14S	+	+/-	+/-	-
		Cf.162.15S	+	+/-	+/-	-
		Cf.162.16S	+	+	+	-
		Cf.162.17S	-	+	-	nitM
		Cf.162.18S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		Cf.162.19S	-	+	+	<i>nit 1</i>
V13	H S I	V13.1U	+	+	+	-
		V13.2U	+	+	+	-
		V13.3U	+	+	+	-
		V13.4U	+	+	+	-
		V13.5U	+	+	+	-
		V13.14U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.15U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.16U	+/-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.17U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.18U	-	+	-	nitM
		V13.19U	+	+	+	-
		V13.20U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.21U	+	+	+	-
		V13.22U	-	+	-	nitM
		V13.23U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.24U	+	+	+	-
		V13.25U	-	+	-	nitM
		V13.26U	+	+	+	-
		V13.27U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.28U	-	+	-	nitM
		V13.29U	-	+	-	nitM
		V13.30U	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.31S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.32S	-	+	-	nitM
		V13.33S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.34S	+	+	+	-
		V13.35S	-	+	-	nitM
		V13.36S	-	+	-	nitM
		V13.37S	+	+	+	-
		V13.38S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.39S	-	+	-	nitM
		V13.40S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.41S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.42S	+	+	+	-

		V13.43S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.44S	-	+	-	nitM
		V13.45S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.46S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.47S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.48S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.49S	-	+	-	nitM
		V13.50S	-	+	-	nitM
		V13.51S	-	+	+	<i>nit 1</i>
		V13.52S	-	+	+	<i>nit 1</i>
TO-0	-	TO-0.1U	+	+	+	-
		TO-0.2U	+	+	+	-
		TO-0.3U	+	+	+	-
		TO-0.4U	+	+	+	-
		TO-0.5U	+	+	+	-
		TO-0.6U	+	+	+	-
		TO-0.7U	+	+	+	-
		TO-0.8U	+	+	+	-
		TO-0.9U	+	+	+	-
		TO-0.10U	+	+	+	-
		TO-0.11U	+	+	+	-
		TO-0.12U	+	+	+	-
		TO-0.13U	+	+	+	-
		TO-0.14U	+	+	+	-
		TO-0.15U	+	+	+	-
		TO-0.16S	+	+	+	-
		TO-0.17S	+	+	+	-
		TO-0.18S	+	+	+	-
		TO-0.19S	+	+	+	-
		TO-0.20S	+	+	+	-
		TO-0.21S	+	+	+	-
		TO-0.22S	+	+	+	-
		TO-0.23S	+	+	+	-
		TO-0.24S	+	+	+	-
		TO-0.25S	+	+	+	-
		TO-0.26S	+	+	+	-
		TO-0.27S	+	+	+	-
		TO-0.28S	+	+	+	-
		TO-0.29S	+	+	+	-
		TO-0.30S	+	+	+	-
		TO-0.31S	+	+	+	-
		TO-0.32S	+	+	+	-
CA26	-	CA26.1U	+	+	+	-
		CA26.2U	+	+	-	-
		CA26.3U	-	+	-	nitM
		CA26.4U	+	+	-	-
		CA26.5U	+	+	-	-
		CA26.6U	+	+	-	-
		CA26.7U	+	+/-	-	-
		CA26.8U	+	+	-	-

CA26.9U	+	+	-	-
CA26.10U	-	+	-	nitM
CA26.11U	+	+	-	-
CA26.12U	+	+	-	-
CA26.13U	+	+	-	-
CA26.14U	+	+	-	-
CA26.15U	-	+	-	nitM
CA26.16U	+	+	-	-
CA26.17U	+	+	+	-
CA26.18U	+	+	-	-
CA26.19U	+	+	+	-
CA26.20U	-	+	-	nitM
CA26.21S	+	+	-	-
CA26.22S	-	+	-	nitM
CA26.23S	-	+	-	nitM
CA26.24S	-	+	-	nitM
CA26.25S	+	+	+	-
CA26.26S	+	+	+	-
CA26.27S	+	+	+	-
CA26.28S	+	+	+	-
CA26.29S	-	+	-	nitM
CA26.30S	-	+	-	nitM
CA26.31S	+	+	+	-
CA26.32S	+	+	+	-
CA26.33S	+	+	+	-
CA26.34S	+	+	-	-
CA26.35S	+	+	+	-
CA26.36S	+	+	+	-
CA26.37S	+	+	+	-
CA26.38S	+	+	-	-
CA26.39S	+	+	-	-
CA26.40S	+	+	+	-
CA26.41S	+	+	+	-
CA26.42S	-	+	-	nitM
CA26.43S	+	+	+	-
CA26.44S	+	+	+	-
CA26.45S	+	+	+	-
CA26.46S	+	+	-	-
CA26.47S	+	+	+	-
CA26.48S	+	+	+	-

Σύντομο βιογραφικό σημείωμα – Κατάλογος δημοσιεύσεων

Σπουδές

- 2002-2008 Προπτυχιακές σπουδές στο Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.
Βαθμός: «Άριστα», 8,58/10.
- 2006-2008 Εκπόνηση πτυχιακής εργασίας (Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας).
Βαθμός: «Άριστα», 10/10.
- 2008-2010 Μεταπτυχιακές σπουδές για τη λήψη Μεταπτυχιακού Διπλώματος
Ειδίκευσης στο γνωστικό αντικείμενο «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία», Τμήμα
Βιολογίας, ΕΚΠΑ.
Βαθμός: «Άριστα», 9,8/10.
- 2009-2010 Εκπόνηση μεταπτυχιακής εργασίας (Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας).
Βαθμός: «Άριστα», 10/10.
- 2010-2014 Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής (Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας).

Εργαστηριακά – εξειδικευμένα σεμινάρια (workshops)

- 2009 “Molecular approaches to unravel the hidden microbial world”, στο πλαίσιο
του Ευρωπαϊκού προγράμματος “MicrobeGR: Supporting Environmental
Microbiology and Biotechnology Research Potential in Western Greece”.
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας, Τμήμα Διαχείρισης
Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Αγρίνιο, 15-
17 Οκτωβρίου.
- 2012 “The impact of agricultural biotechnology on organisms and the
environment”, στο πλαίσιο του Ευρωπαϊκού προγράμματος «Ανάπτυξη του
Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου ως Κέντρου Αριστείας στους
τομείς της Φυτοϋγείας και Φυτοπροστασίας». Διοργάνωση από το
Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο στο Συνεδριακό Κέντρο του
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, 11 Δεκεμβρίου.
- 2013 «Εισαγωγή στο στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics: Βασικά θέματα
επεξεργασίας και ανάλυσης δεδομένων», Υπολογιστικό Κέντρο του Εθνικού
και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, 3-4 Ιουνίου.
- 2013 “3rd Summer School in Protein Structure & Function”, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 27-29 Ιουνίου.

Υποτροφίες – διακρίσεις

- 2004-2005 Χρηματικό έπαθλο από τα έσοδα της Κληρονομίας Παντιά Ράλλη
(Διεύθυνση Κληροδοτημάτων, ΕΚΠΑ) κατόπιν επιλογής από την
Πανεπιστημιακή Σύγκλητο ως «τον καλύτερο φοιτητή σε ήθος και πρόοδο
του τμήματος Βιολογίας κατά το πανεπιστημιακό έτος 2004-2005».

- 2008 Περάτωση προπτυχιακών σπουδών στο Τμήμα Βιολογίας (ΕΚΠΑ) με σειρά αποφοίτησης: 2^{ος} σε σύνολο 127 πτυχιούχων.
- 2009-2010 Λήψη υποτροφίας για μεταπτυχιακές σπουδές από το «Κοινωφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης» (διάρκεια υποτροφίας: 12 μήνες).
- 2010-2013 Επιλογή ως υποτρόφου στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος «Ηράκλειτος II: Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου» (διάρκεια υποτροφίας: 36 μήνες).
- 2013 Η εργασία στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό *European Journal of Plant Pathology* με στοιχεία 136(3): 577-596 εντάχθηκε στις πλέον δημοφιλείς δημοσιεύσεις του περιοδικού.

Μονογραφίες

1. **Παπαϊωάννου Ι.Α. (2008).** «Γενετική και μοριακή μελέτη γονιδίων ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας σε φυτοπαθογόνους μύκητες του γένους *Verticillium*», πτυχιακή διατριβή, Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
2. **Παπαϊωάννου Ι.Α. (2009).** «Επιγενετικά φαινόμενα και κυτταρική τύχη στους μύκητες», μεταπτυχιακή εργασία βιβλιογραφικής ανασκόπησης, Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
3. **Παπαϊωάννου Ι.Α. (2009).** «Συγκλίνουσα και αποκλίνουσα εξέλιξη, παράλογα και ορφανά γονίδια», μεταπτυχιακή εργασία βιβλιογραφικής ανασκόπησης, Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
4. **Παπαϊωάννου Ι.Α. (2010).** «Πληθυσμιακή και μοριακή μελέτη των Ομάδων Βλαστητικής Συμβατότητας του φυτοπαθογόνου μύκητα οικονομικής σημασίας *Verticillium dahliae*», μεταπτυχιακή διατριβή, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (Π.Μ.Σ.) για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Μ.Δ.Ε.) στη «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία», Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με σύστημα κριτών

1. Ligoixigakis E.K., **Papaioannou I.A.**, Markakis E.A. and Typas M.A. (2013). First report of pink rot of *Phoenix* and *Washingtonia* species caused by *Nalanthamala vermoesenii* in Greece. *Plant Disease* **97**(2): 285.
2. Ligoixigakis E.K., Markakis E.A., **Papaioannou I.A.** and Typas M.A. (2013). First report of palm rot of *Phoenix* spp. caused by *Neodeightonia phoenicum* in Greece. *Plant Disease* **97**(2): 286.
3. **Papaioannou I.A.**, Ligoixigakis E.K., Vakalounakis D.J., Markakis E.A. and Typas M.A. (2013). Phytopathogenic, morphological, genetic and molecular characterization of a *Verticillium dahliae* population from Crete, Greece. *European Journal of Plant Pathology* **136**(3): 577-596.
4. Ligoixigakis E.K., **Papaioannou I.A.**, Markakis E.A. and Typas M.A. (2013). First report of leaf spot of *Phoenix theophrasti* caused by *Paraconiothyrium variabile* in Greece. *Plant Disease* **97**(9): 1250.
5. **Papaioannou I.A.**, Dimopoulou C.D. and Typas M.A. (2013). Structural and phylogenetic analysis of the rDNA intergenic spacer region of *Verticillium dahliae*. *FEMS Microbiology Letters* **347**(1): 23-32.
6. Ligoixigakis E.K., Markakis E.A., **Papaioannou I.A.** and Typas M.A. (2013). First report of petiole (rachis) blight of *Washingtonia filifera* caused by *Phoma glomerata* in Greece. *Plant Disease* **97**(11): 1509.

7. **Papaioannou I.A.**, Dimopoulou C.D. and Typas M.A. (2014). “Cryptic” group-I introns in the nuclear SSU-rRNA gene of *Verticillium dahliae*. *Current Genetics* (in press). DOI: 10.1007/s00294-013-0417-7.
8. **Papaioannou I.A.** and Typas M.A. (2014). Barrage formation is independent from heterokaryon incompatibility in *Verticillium dahliae* (υποβληθείσα).
9. **Papaioannou I.A.** and Typas M.A. (2014). High-throughput assessment and genetic investigation of vegetative compatibility in *Verticillium dahliae* (υποβληθείσα).

Παρουσιάσεις – ανακοινώσεις σε διεθνή επιστημονικά συνέδρια

1. **Papaioannou I.A.** and Typas M.A. (2009). Searching for heterokaryon incompatibility genes in *Verticillium*. Αναρτημένη ανακοίνωση και προφορική παρουσίαση στο συνέδριο 10th International Verticillium Symposium, Corfu, Greece (16-20 Νοεμβρίου), περίληψη σελ. 56 τόμου πρακτικών.
2. **Papaioannou I.A.** and Typas M.A. (2011). New insights into the genetic structure of natural populations of the plant pathogenic ascomycete *Verticillium dahliae*. Αναρτημένη ανακοίνωση στο συνέδριο BAGECO 2011: “Microbial Genetics and Ecology”, Corfu, Greece (29 Μαΐου-2 Ιουνίου), περίληψη σελ. 204 τόμου πρακτικών.
3. **Papaioannou I.A.** and Typas M.A. (2011). Hunting mutants in phytopathogenic fungi: the case of the wilt fungus *Verticillium dahliae*. Αναρτημένη ανακοίνωση στο συνέδριο XVI Congress of European Mycologists - European Mycological Association, Halkidiki, Greece (19-23 Σεπτεμβρίου), περίληψη σελ. 305-306 τόμου πρακτικών.
4. **Papaioannou I.A.**, Dimopoulou C.D. and Typas M.A. (2013). Analysis of the intergenic spacer (IGS) region of the nuclear rDNA of *Verticillium dahliae* for VCG discrimination and phylogenetic studies. Αναρτημένη ανακοίνωση στο συνέδριο 11th International Verticillium Symposium, Göttingen, Germany (5-8 Μαΐου), περίληψη σελ. 84 τόμου πρακτικών.
5. **Papaioannou I.A.**, Dimopoulou C.D. and Typas M.A. (2013). Group-I introns in the nuclear SSU gene of *Verticillium dahliae*: structural characterization and study of distribution. Αναρτημένη ανακοίνωση στο συνέδριο 11th International Verticillium Symposium, Göttingen, Germany (5-8 Μαΐου), περίληψη σελ. 85 τόμου πρακτικών.
6. **Papaioannou I.A.**, Ligoixigakis E.K., Vakalounakis D.J., Markakis E.A. and Typas M.A. (2013). Studying a *Verticillium dahliae* population with a combination of phytopathological and morphological characterization with genetic and molecular profiling. Αναρτημένη ανακοίνωση στο συνέδριο 11th International Verticillium Symposium, Göttingen, Germany (5-8 Μαΐου), περίληψη σελ. 114 τόμου πρακτικών.
7. **Papaioannou I.A.** and Typas M.A. (2013). Genetic and molecular aspects of heterokaryosis and vegetative compatibility in *Verticillium*. Αναρτημένη ανακοίνωση στο συνέδριο XI International Fungal Biology Conference, Karlsruhe, Germany (29 Σεπτεμβρίου – 3 Οκτωβρίου), περίληψη σελ. 206 τόμου πρακτικών.

Παρουσιάσεις – ανακοινώσεις σε πανελλήνια επιστημονικά συνέδρια

1. **Παπαϊωάννου I.A.** και Τύπας M.A. (2008). Η ετεροκαρυωτική ασυμβατότητα στους αφυλετικούς μύκητες: γενετική και μοριακή διερεύνηση του φαινομένου σε φυτοπαθογόνους μύκητες του γένους *Verticillium*. Αναρτημένη ανακοίνωση και προφορική παρουσίαση στο 30^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ), Θεσσαλονίκη (22-24 Μαΐου), περίληψη σελ. 386-387 τόμου πρακτικών.
2. **Παπαϊωάννου I.A.** και Τύπας M.A. (2008). Γενετική και μοριακή μελέτη γονιδίων ετεροκαρυωτικής ασυμβατότητας σε φυτοπαθογόνους μύκητες του γένους *Verticillium*.

- Αναρτημένη ανακοίνωση στην Ημέρα Διπλωματικών Εργασιών 2008 του Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα (22 Οκτωβρίου).
3. Μιλτιάδης Α. Τύπας και συνεργάτες: Δρ. Β. Κουβέλης, Δρ. Μ. Πάντου, Δρ. Δ. Γκίκας, Δρ. Π. Πραματευτάκη, Δρ. Α. Μαυρίδου, Δρ. Α. Κριμιτζάς, Δρ. Α. Γκουντοπούλου, Δρ. Β. Καραπάπα, **κ. Ι. Παπαϊωάννου**, κ. L. Eboigbe (2008). Παρουσίαση των επιστημονικών δραστηριοτήτων της ερευνητικής ομάδας του Εργαστηρίου Γενετικής (Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ). Αναρτημένη ανακοίνωση στο 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας Μικροβιόκοσμος «Ο Ανεξερεύνητος Εθνικός μας Πλούτος», Αθήνα (12-14 Δεκεμβρίου).
 4. **Παπαϊωάννου Ι.Α.**, Abdelhalim M., Ντούλης Α.Γ., Λιγοξυγκάκης Ε.Κ., Βακαλουνάκης Δ.Ι. και Τύπας Μ.Α. (2010). Ανάπτυξη νέων μοριακών εργαλείων για τη γενετική ανάλυση πληθυσμών του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*. Προφορική παρουσίαση στο 15^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο της Ελληνικής Φυτοπαθολογικής Εταιρείας, Κέρκυρα (5-8 Οκτωβρίου), περίληψη σελ. 59 τόμου πρακτικών.
 5. **Παπαϊωάννου Ι.Α.** και Τύπας Μ.Α. (2010). Γονίδια ετεροκαρύωσης αποτελούν πηγή νέων εργαλείων δημιουργίας ενός άριστου μοριακού κιτ ανάλυσης της πληθυσμιακής δομής του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 61^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), Αλεξανδρούπολη (15-17 Οκτωβρίου), περίληψη σελ. 45 τόμου πρακτικών.
 6. **Παπαϊωάννου Ι.Α.** και Τύπας Μ.Α. (2010). Μοριακή κλωνοποίηση, δομική μοντελοποίηση και πληθυσμιακή και λειτουργική ανάλυση των πιθανών γονιδίων ετεροκαρύωσης *Vdhet1* και *Vdhet2* του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 61^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), Αλεξανδρούπολη (15-17 Οκτωβρίου), περίληψη σελ. 57 τόμου πρακτικών.
 7. **Παπαϊωάννου Ι.Α.**, Γεωργαλλή Μ. και Τύπας Μ.Α. (2010). *Verticillium*: ένας σεξουαλικά «προικισμένος» αφυλετικός μύκητας – γονιδιωματική, πληθυσμιακή και λειτουργική μελέτη. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 3^ο Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας «Μικροβιόκοσμος», Θεσσαλονίκη (16-18 Δεκεμβρίου), περίληψη σελ. 108-109 τόμου πρακτικών.
 8. **Παπαϊωάννου Ι.Α.** και Τύπας Μ.Α. (2011). Φυσιολογία και μοριακή ποικιλομορφία Ομάδων Βλαστητικής Συμβατότητας του *Verticillium dahliae*. Αναρτημένη ανακοίνωση και προφορική παρουσίαση (κατόπιν επιλογής από την Οργανωτική Επιτροπή) στο 4^ο Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας «Μικροβιόκοσμος», Ιωάννινα (21-23 Οκτωβρίου), περίληψη σελ. 50-51 τόμου πρακτικών.
 9. **Παπαϊωάννου Ι.Α.** και Τύπας Μ.Α. (2011). Application of OSCAR-ATMT in the plant pathogenic fungus *Verticillium*: a high-throughput technology for targeted gene deletion. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 62^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), Αθήνα (9-11 Δεκεμβρίου), περίληψη σελ. 105 τόμου πρακτικών.
 10. **Παπαϊωάννου Ι.Α.**, Λιγοξυγκάκης Ε.Κ., Βακαλουνάκης Δ.Ι., Μαρκάκης Ε.Α. και Τύπας Μ.Α. (2012). Συνδυαστική πληθυσμιακή ανάλυση του *Verticillium dahliae*: φυτοπαθολογικός χαρακτηρισμός, μορφολογία, γενετική και μοριακή διαφοροποίηση. Προφορική παρουσίαση στο 16^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο της Ελληνικής Φυτοπαθολογικής Εταιρείας, Θεσσαλονίκη (16-18 Οκτωβρίου), περίληψη σελ. 40 τόμου πρακτικών.
 11. Λιγοξυγκάκης Ε.Κ., Μαρκάκης Ε.Α., **Παπαϊωάννου Ι.Α.** και Τύπας Μ.Α. (2012). Πρώτη αναφορά της σήψης φύλλων *Phoenix* spp. προκαλούμενης από τον ασκομύκητα *Neodeightonia phoenicum* στην Ελλάδα. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 16^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο της Ελληνικής Φυτοπαθολογικής Εταιρείας, Θεσσαλονίκη (16-18 Οκτωβρίου), περίληψη σελ. 130 τόμου πρακτικών.
 12. Λιγοξυγκάκης Ε.Κ., **Παπαϊωάννου Ι.Α.**, Μαρκάκης Ε.Α. και Τύπας Μ.Α. (2012). Πρώτη αναφορά διεθνώς κηλίδωσης των φύλλων του φοίνικα *Phoenix theophrasti* προκαλούμενης από τον ασκομύκητα *Paraconiothyrium variabile*. Αναρτημένη

- ανακοίνωση στο 16^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο της Ελληνικής Φυτοπαθολογικής Εταιρείας, Θεσσαλονίκη (16-18 Οκτωβρίου), περίληψη σελ. 131 τόμου πρακτικών.
13. Λιγοξυγκάκης Ε.Κ., Παπαϊωάννου Ι.Α., Μαρκάκης Ε.Α., Φραγκούλη Ε.Ε. και Τύπας Μ.Α. (2012). Πρώτη αναφορά ρόδινης σήψης φοινικοειδών *Phoenix* και *Washingtonia* spp. προκαλούμενης από τον ασκομύκητα *Nalanthamala vermoesenii* στην Ελλάδα. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 16^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο της Ελληνικής Φυτοπαθολογικής Εταιρείας, Θεσσαλονίκη (16-18 Οκτωβρίου), περίληψη σελ. 132 τόμου πρακτικών.
 14. Παπαϊωάννου Ι.Α., Δημοπούλου Χ.Δ. και Τύπας Μ.Α. (2012). Φυλογενετική μελέτη και διάγνωση των VCGs του μύκητα *Verticillium dahliae* μέσω ανάλυσης της διαγονιδιακής περιοχής IGS της πυρηνικής ριβοσωμικής επανάληψης. Προφορική παρουσίαση (κατόπιν επιλογής από την Οργανωτική Επιτροπή) στο 5^ο Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας «Μικροβιόκοσμος», Αθήνα (13-15 Δεκεμβρίου), περίληψη σελ. 40-41 τόμου πρακτικών.
 15. Παπαϊωάννου Ι.Α., Δημοπούλου Χ.Δ. και Τύπας Μ.Α. (2012). Εσώνια τύπου-I στο πυρηνικό γονίδιο SSU του μύκητα *Verticillium dahliae*: κατανομή, ποικιλομορφία μεταξύ ριβοσωμικών επαναλήψεων και φυλογενετικές ενδείξεις. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 5^ο Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας «Μικροβιόκοσμος», Αθήνα (13-15 Δεκεμβρίου), περίληψη σελ. 38-39 τόμου πρακτικών.
 16. Παπαϊωάννου Ι.Α. και Τύπας Μ.Α. (2014). Ανάπτυξη και συγκριτική αξιολόγηση νέων μεθόδων για την εκτίμηση της βλαστητικής συμβατότητας στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae*. Αναρτημένη ανακοίνωση και σύντομη προφορική παρουσίαση στο 36^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (8-10 Μαΐου, Ιωάννινα).
 17. Παπαϊωάννου Ι.Α. και Τύπας Μ.Α. (2014). Μοριακή – φυλογενετική ανάλυση των ομάδων βλαστητικής συμβατότητας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*. Αναρτημένη ανακοίνωση και σύντομη προφορική παρουσίαση στο 36^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (8-10 Μαΐου, Ιωάννινα).

Κατατεθειμένες αλληλουχίες σε διαδικτυακές βάσεις δεδομένων

Έχουν κατατεθεί μέχρι σήμερα **125 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (συνολικά 81.453 νουκλεοτιδικές βάσεις)** στη διαδικτυακή βάση δεδομένων GenBank (NCBI), με κωδικούς αριθμούς πρόσβασης (accession numbers): JX104774-JX104823, JX104824-JX104825, JX104826, JX456472-JX456474, JX456475, JX456476-JX456477, KC152269-KC152319, KC802086-KC802087, KF318969-KF318980 και KJ653447.

Μέλος επιστημονικών εταιρειών

Genetics Society of America – GSA (2014-σήμερα), American Society for Microbiology – ASM (2014-σήμερα), Society for General Microbiology – SGM (2014-σήμερα), Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας – ΕΕΒΜΒ (2010-σήμερα), Επιστημονική Εταιρεία «Μικροβιόκοσμος» (2011-σήμερα), Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών – ΕΕΒΕ (2010-σήμερα), Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων – ΠΕΒ (2010-σήμερα).

Ξένες γλώσσες

Αγγλικά (άριστη γνώση), Γερμανικά (καλή γνώση), Γαλλικά (βασική γνώση).

Αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής έρευνας έχουν δημοσιευθεί ή βρίσκονται σε διαδικασία αξιολόγησης για δημοσίευση σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά (δημοσιεύσεις υπ' αριθμόν 3, 5 και 7-9) και έχουν παρουσιασθεί σε μια σειρά διεθνών (παρουσιάσεις υπ' αριθμόν 2-7) και πανελλήνιων (υπ' αριθμόν 4-10 και 14-17) επιστημονικών συνεδρίων.

Στο επισυναπτόμενο συνοδευτικό υλικό παρατίθενται ανάτυπα των δημοσιευμένων εργασιών.

Phytopathogenic, morphological, genetic and molecular characterization of a *Verticillium dahliae* population from Crete, Greece

Ioannis A. Papaioannou ·
Eleftherios K. Ligoxigakis ·
Demetrios J. Vakalounakis ·
Emmanouil A. Markakis · Milton A. Typas

Accepted: 14 February 2013 / Published online: 7 March 2013
© KNPV 2013

Abstract A population of 84 *V. dahliae* isolates mainly originating from Crete, Greece, was characterized in terms of pathogenicity and virulence on different hosts, in parallel with morphological/physiological characterization, vegetative compatibility grouping and mating type determination. Tomato race 2 was found to have supplanted race 1 and was more virulent on a tomato-susceptible cultivar than race 1. Using a differential host classification system which tests pathogenicity to tomato, eggplant, sweet pepper and

turnip, 59 isolates were assigned to tomato, 19 to eggplant, one to sweet pepper and five to tomato-sweet pepper pathogenicity groups. All isolates from Crete fell into VCG subgroups 2A, 2B and 4B, while a remarkably high incidence of bridging isolates (compatible with two or more VCGs) was recorded. The tomato-sweet pepper pathogenicity group was morphologically quite distinct from the others, while conidial length and pigment intensity were discriminatory parameters among VCGs 2A, 2B and 4B. PCR-based molecular marker Tr1/Tr2 was reliable in race prediction among tomato-pathogenic isolates, except for members of VCG 4B, while the application of markers Tm5/Tm7 and 35-1/35-2 was highly successful for tomato-pathogenic isolates. E10 marker was related to VCG 2B, rather than to pathogenicity groups. A single nucleotide polymorphism in the ITS2 region, and two novel molecular markers, M1 and M2, proved useful for the fast and accurate determination of major VCGs 2A, 2B and 4B, and can be used for high-throughput population analyses in future studies. The mating type was unrelated to VCG classification and probably does not control heterokaryon incompatibility in *V. dahliae*.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10658-013-0189-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. A. Papaioannou · M. A. Typas (✉)
Department of Genetics and Biotechnology, Faculty
of Biology, National and Kapodistrian University of Athens,
Panepistimiopolis, Athens 15701, Greece
e-mail: matypas@biol.uoa.gr

E. K. Ligoxigakis · D. J. Vakalounakis
Laboratory of Plant Pathology, Plant Protection Institute,
Hellenic Agricultural Organization – “Demeter”,
Directorate General of Agricultural Research (N.AG.RE.F.),
Heraklion 71003, Crete, Greece

E. A. Markakis
Laboratory of Plant Pathology, School of Agricultural
Technology, Technological Educational Institute of Crete,
Heraklion 71004, Crete, Greece

Keywords Host range pathogenicity groups · ITS1-5.8S-ITS2 · Mating type · Tomato races · PCR-based molecular markers · VCGs

Introduction

Verticillium dahliae Kleb. is an important soil-borne asexual ascomycete causing vascular wilt disease in more than 200 plant species worldwide and accounting for severe annual economic losses (Pegg and Brady 2002). Therefore, understanding of genetic diversity and early recording of its pathogenicity and virulence on different hosts are essential for planning plant protection strategies. Due to the commercial importance of tomato, *V. dahliae*-associated wilt was studied early enough to detect and describe two physiological races of the fungus. Race 1 contains isolates not substantially virulent on tomato cultivars carrying resistance locus *Ve*, and race 2 includes isolates capable of causing disease on race 1-resistant host cultivars (Pegg 1974). A PCR assay based on the amplification of a race 1-specific DNA sequence (B68-TV) was proposed for the differentiation of the two tomato races of *V. dahliae* (Usami et al. 2007), as an alternative to the laborious, time-consuming and sometimes subjective traditional virulence assays. Using internal primers that were based on the above sequence, its specificity was further validated on a larger, mainly Californian *V. dahliae* population from several hosts, with great success in prediction (Maruthachalam et al. 2010).

Since *V. dahliae* isolates do not generally show host specialization but can infect many different hosts (Heale 1988), characterization of populations of the pathogen with regard to pathogenicity is rather complex (Strausbaugh et al. 1992; Daayf et al. 1995). A system for the classification of *V. dahliae* isolates in four groups, based on their pathogenicity to the four differential hosts tomato, eggplant, sweet pepper and cruciferous species, was developed (Horiuchi et al. 1990; Hagiwara 1990). Tomato pathotype prediction was achieved with two sets of primers, namely 35-1/35-2 and Tm5/Tm7, based on the sequence of a *V. dahliae* retrotransposon-like element and a region adjacent to the B68-TV race 1-specific sequence, respectively (Usami et al. 2005, 2007). Similarly, another primer (E10) could be used for the production of a specific DNA band in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles only from the isolates pathogenic to sweet pepper, thus differentiating them from the other pathotypes (Usami et al. 2007). Such readily employed PCR-based molecular differentiation approaches, if verified with international and isolated

populations of the fungus, could prove tools of great practical importance as they might complement if not circumvent the laborious and time-consuming traditional virulence assays.

In species of *Verticillium* no sexual stage has ever been observed, whereas the parasexual cycle, which includes hyphal anastomosis, heterokaryon formation, nuclear fusion and diploid formation, and subsequent haploidization, has been experimentally established in *V. dahliae* and *V. albo-atrum* (Hastie 1962; Typas 1983). Since the fungus can only exchange genetic material through the parasexual cycle, heterokaryon incompatible isolates can be considered members of genetically distinct subgroups within the species. Such subgroups can be expected to differ in various traits, possibly including those related to pathogenicity and virulence, adaptation to habitats and sensitivity to fungicides (Katan 2000). Traditionally, vegetative compatibility in *V. dahliae* has been assessed by the use of nitrate-non-utilizing (*nit*) mutants, and numerous studies with isolates from different hosts of worldwide origin, classified them in five main vegetative compatibility groups, designated VCGs 1, 2, 3, 4 and 6; on the basis of frequency and vigor of complementation, each of VCGs 1, 2 and 4 was further subdivided into subgroups A and B (Joaquim and Rowe 1990, 1991; Strausbaugh et al. 1992; Katan 2000; Bhat et al. 2003; Jiménez-Díaz et al. 2006). Through the years, VCG analysis became a powerful tool for examining genetic diversity and structure among fungal populations, and molecular techniques, including Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), VCG-specific PCR-based molecular markers and multi-locus sequencing, were developed to study molecular variability and genetic relations in VCGs (Collado-Romero et al. 2006, 2008). Although isolates within a VCG were occasionally found to be molecularly diverse, a strongly positive relationship between genetic groups and VCG subgroups was revealed, regardless of geographic origin or host source (Collado-Romero et al. 2008). Interestingly enough, idiomorphic mating-type genes, known to determine mating polarity in sexual ascomycetes, have been recently detected in *V. dahliae*, exhibiting an organization that is typical of heterothallic species (Usami et al. 2009). Most of tested strains harboured the MAT1-2-1 (HMG-box domain-containing) idiomorph and only few *V. dahliae* strains contained the alternate idiomorph MAT1-1-1 (alpha-box domain-containing). It would be

of great interest to study the distribution of mating-type idiomorphs among VCGs of *V. dahliae*, since these genes are known to behave as heterokaryon incompatibility genes in ascomycetes like *N. crassa*, and thus participate in the control of genetic isolation between incompatible groups (Glass et al. 2000).

Concerning the relationship between VCGs and pathogenicity, results have so far been contradictory. VCGs do not appear to be generally related to pathogenicity to particular hosts, however, there are indications of correlation between VCG and virulence on certain hosts such as cotton, potato, tomato, eggplant and sweet pepper (Strausbaugh et al. 1992; Daayf et al. 1995; Bhat and Subbarao 1999; Korolev et al. 2000; Bhat et al. 2003). Furthermore, a potential relationship between certain VCGs and the taxonomic position of the host from which strains were isolated has been suggested, as for example of VCGs 1 and 2 with cotton, and VCG 4 with solanaceous plants (Joaquim and Rowe 1990; Daayf et al. 1995).

In addition to the variation in pathogenic and virulent characteristics, considerable variation is also observed in morphology and physiology among different individuals of the fungus. Although no clear correlation has been shown between such phenotypic parameters and pathogenic potential in early investigations (Isaac 1957), an extended study of the morphological and physiological profile of host range pathogenicity groups defined by pathogenicity to a set of differential hosts, has never been conducted before. Similarly, although significant differences in morphology and physiology among members of different VCGs have been reported (Korolev et al. 2000, 2008; Zeise and von Tiedemann 2001), the possible reflection of inter-VCG genetic isolation on such parameters has not yet been thoroughly studied.

The present investigation had a dual purpose. Firstly, to search for any correlation between the pathogenic profile of *V. dahliae* (tomato races and pathogenicity groups on the basis of their host range) and other biological properties, including comparative virulence on differential hosts, morphology and physiology, vegetative compatibility and the mating type; and secondly, to test the applicability of already proposed and also novel molecular differentiating tools for the discrimination of races, pathogenicity groups and VCGs of the fungus. For this, a population of *V. dahliae* from Crete, Greece, enriched with a set of strains of international origin, was employed.

Materials and methods

V. dahliae isolates, growth media and culture conditions

A total of 84 *V. dahliae* isolates were used throughout this study, including a collection of 69 isolates originating from a wide range of hosts on the island of Crete (Greece), and 15 isolates of international origin, mainly representing VCG tester strains (Table 1). In certain experiments where molecular markers were tested, 14 additional *V. dahliae*, three *V. albo-atrum* and two *V. longisporum* isolates were also included (Table 2). All isolates were maintained on potato dextrose agar (PDA) slopes under sterile liquid paraffin, stored at 4 °C, or as conidial suspensions in Czapek-Dox broth with 20 % glycerol, at –80 °C. Active cultures were obtained on PDA plates with incubation at 24 °C, in the dark.

Pathogenicity and virulence characterization

The pathogenicity assay for tomato race determination involved a root-dipping technique (Ligoxigakis and Vakalounakis 1994) using tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars EarlyPak No. 7 (lacks *Ve* locus; susceptible to both tomato races 1 and 2 of *V. dahliae*) and ACE 55 VF (possesses the *Ve* locus; resistant to race 1 of *V. dahliae*). A suspension of 10^7 conidia ml⁻¹ of each *V. dahliae* isolate was used to treat ten replicate seedlings of each cultivar, while ten seedlings treated only with sterile water were used as controls. Based on both aerial and underground Verticillium wilt symptoms (5 weeks post inoculation), an arbitrary five-point scale (0 = no symptoms, to 4 = plants dead) was used to score susceptibility to infection by the pathogen. Only isolates with a mean disease severity of >1.0 were considered virulent, in order to discriminate between *V. dahliae*-associated disease symptoms and other weak symptoms, occasionally observed. *V. dahliae* isolates were classified into host range pathogenicity groups according to Horiuchi's et al. (1990) and Hagiwara's (1990) criteria. The four plant species employed as differential hosts were tomato (*L. esculentum*) cv. Earlypak No. 7, eggplant (*Solanum melongena*) cv. Black Beauty, sweet pepper (*Capsicum annuum*) cv. California Wonder and turnip (*Brassica rapa*) cv. Snowball. The inoculation method, incubation conditions and assessment of disease severity were as in

Table 1 *V. dahliae* isolates used in this work, hosts, origins (source), mean disease indices (0–4 scale) on five differential hosts, deduced host range pathogenicity groups and tomato races, and molecular characteristics (markers Tr1/Tr2, Tm5/Tm7 and 35-1/35-2)

Isolate code	Host	Origin (source) ^a	Mean Disease Index (MDI) on differential hosts					Pathogenicity group	Tomato race	Molecular markers Tr/Tm/35 ^g
			T ⁺ b	T ⁻ c	E ^d	S ^e	C ^f			
PH	pistachio	USA, CA (A)	0	2.2	4.0	0	3.1	tomato	1	-/+/+
Ca.146	pepper	USA, CA (F)	1.0	1.1	3.5	0	3.6	tomato	1	+/+/+
Dvd-T5	tomato	Canada (C)	0	1.1	2.1	0	1.6	tomato	1	+/+/+
V54	pepper	Austria (E)	0	1.3	2.5	0	2.9	tomato	1	+/+/+
cof201	cotton	Israel (B)	0	1.1	2.3	0	4.0	tomato	1	+/+/+
pn4	peanut	Israel (B)	1.0	1.5	4.0	0	2.2	tomato	1	+/+/-
179-4	melon	Greece (D)	1.0	2.5	3.6	0	3.6	tomato	1	+/+/+
164-1	tomato	Greece (D)	1.0	2.0	3.0	0	1.9	tomato	1	+/+/+
98-1	tomato	Greece (D)	0	1.1	2.0	0	2.0	tomato	1	+/+/+
113-1	eggplant	Greece (D)	0	2.0	3.0	0	2.1	tomato	1	+/+/+
136-3	tomato	Greece (D)	0	2.1	3.1	0	2.0	tomato	1	+/+/+
136-1	tomato	Greece (D)	0	2.0	3.0	0	2.2	tomato	1	+/+/+
116-1	okra	Greece (D)	1.0	2.0	3.1	0	3.2	tomato	1	+/+/+
43-4	black nightshade	Greece (D)	0	2.0	2.0	0	2.0	tomato	1	+/+/+
577-1	lamb's quarters	Greece (D)	1.0	1.5	3.1	0	1.1	tomato	1	+/+/+
423-1	pistachio	Greece (D)	0	2.6	4.0	0	1.8	tomato	1	+/+/+
530-1	pepper	Greece (D)	0	3.2	3.3	0	1.3	tomato	1	+/+/+
525-1	eggplant	Greece (D)	0	2.3	3.4	0	2.5	tomato	1	+/+/+
16-1	potato	Greece (D)	0	2.8	3.5	0	2.7	tomato	1	-/+/+
44-3	potato	Greece (D)	0	2.8	3.4	0	2.6	tomato	1	-/+/+
469-1	cauliflower	Greece (D)	0	1.7	3.8	0	2.0	tomato	1	-/+/+
478-1	chicory	Greece (D)	0	1.7	3.8	0	2.3	tomato	1	-/+/+
479-1	endive	Greece (D)	0	1.9	3.0	0	1.8	tomato	1	-/+/+
469-2	cauliflower	Greece (D)	0	2.0	3.3	0	2.4	tomato	1	-/+/+
PCW	pepper	USA, CA (A)	2.7	2.9	2.8	0	3.6	tomato	2	-/-/+
140-2	tomato	Greece (D)	1.6	2.6	3.0	0	2.0	tomato	2	+/+/+
247b-3	tomato	Greece (D)	2.9	3.1	2.8	0	2.3	tomato	2	-/+/+
592-2	radish	Greece (D)	2.7	3.4	3.5	0	3.2	tomato	2	+/+/+
998-1	eggplant	Greece (D)	2.0	2.0	3.1	0	1.1	tomato	2	-/+/+
570-2	radish	Greece (D)	2.9	2.9	3.5	0	3.3	tomato	2	-/+/+
454-1	wild sweet pea	Greece (D)	3.2	3.2	2.9	0	1.8	tomato	2	+/+/+
997-1	eggplant	Greece (D)	3.2	3.0	3.0	0	3.0	tomato	2	-/+/+
455-1	chicory	Greece (D)	3.4	3.2	1.2	0	3.0	tomato	2	-/+/+
273-1	black nightshade	Greece (D)	1.1	1.1	3.0	0	1.1	tomato	2	-/+/+
413-5	romaine lettuce	Greece (D)	1.9	2.4	3.3	0	3.4	tomato	2	-/+/+
461-3	tomato	Greece (D)	2.8	2.8	3.3	0	2.8	tomato	2	-/+/+
463-1	tomato	Greece (D)	2.7	2.6	3.0	0	2.9	tomato	2	-/+/+
464-3	tomato	Greece (D)	2.5	2.7	3.8	0	3.0	tomato	2	-/+/+
464-1	tomato	Greece (D)	2.3	2.6	3.7	0	3.1	tomato	2	-/+/+
473-1	summer squash	Greece (D)	3.1	3.7	2.4	0	2.4	tomato	2	-/+/+
437-2	tomato	Greece (D)	2.4	2.8	3.2	0	2.4	tomato	2	-/+/+

Table 1 (continued)

Isolate code	Host	Origin (source) ^a	Mean Disease Index (MDI) on differential hosts					Pathogenicity group	Tomato race	Molecular markers Tr/Tm/35 ^g
			T ⁺ ^b	T ⁻ ^c	E ^d	S ^e	C ^f			
444-1	potato	Greece (D)	1.1	1.1	2.5	0	1.8	tomato	2	-/+/+
434-2	tomato	Greece (D)	2.5	2.3	3.8	0	3.0	tomato	2	-/+/+
451-1	romaine lettuce	Greece (D)	2.4	3.1	3.8	0	1.4	tomato	2	-/+/+
465-2	marigold	Greece (D)	2.1	2.0	4.0	0	3.6	tomato	2	-/+/+
802-1	olive	Greece (D)	1.1	1.1	3.6	0	3.5	tomato	2	-/+/+
466-1	black nightshade	Greece (D)	1.1	1.1	2.0	0	1.2	tomato	2	-/+/+
526-1	eggplant	Greece (D)	4.0	3.8	4.0	0	3.6	tomato	2	-/+/+
414-1	cabbage	Greece (D)	1.7	1.9	3.1	0	2.5	tomato	2	-/+/+
467-2	whitetop	Greece (D)	2.7	2.7	3.2	0	3.3	tomato	2	-/+/+
433-2	tomato	Greece (D)	1.9	1.6	3.4	0	2.7	tomato	2	-/+/+
447-1	radish	Greece (D)	2.6	2.7	3.0	0	2.5	tomato	2	-/+/+
435-1	tomato	Greece (D)	2.6	2.5	3.4	0	3.1	tomato	2	-/+/+
437-1	tomato	Greece (D)	2.2	2.6	2.8	0	2.5	tomato	2	-/+/+
235-1	tomato	Greece (D)	3.0	3.0	3.5	0	2.3	tomato	2	-/+/+
451-2	romaine lettuce	Greece (D)	1.8	2.3	3.0	0	1.5	tomato	2	-/+/+
460-1	tomato	Greece (D)	2.5	2.9	3.6	0	3.4	tomato	2	-/+/+
354-1	summer squash	Greece (D)	1.1	1.1	3.4	0	2.8	tomato	2	-/+/+
lt1-1	romaine lettuce	Greece (D)	1.7	2.0	3.0	0	1.2	tomato	2	-/+/+
123-3	olive	Greece (D)	0	2.0	2.2	3.0	2.0	tomato-sweet pepper	1	+/+/+
171-2	tomato	Greece (D)	0	2.5	3.1	3.1	2.0	tomato-sweet pepper	1	+/+/+
17-1	eggplant	Greece (D)	1.0	2.0	3.5	3.0	2.1	tomato-sweet pepper	1	+/+/+
150-5	tomato	Greece (D)	1.0	2.0	3.1	3.0	1.1	tomato-sweet pepper	1	+/+/+
999-1	eggplant	Greece (D)	0	2.2	3.0	3.0	1.1	tomato-sweet pepper	1	+/+/+
T9	cotton	USA, CA (A)	0	1.0	2.8	0	3.4	eggplant	NP ^h	-/-/-
70-21	pepper	USA, AZ (A)	1.0	1.0	2.5	0	2.0	eggplant	NP	-/-/-
BB	potato	USA, ID (A)	0	0	2.7	0	2.9	eggplant	NP	-/-/+
30-6	potato	USA, NJ (C)	0	0	3.8	0	3.1	eggplant	NP	+/-/+
S39	potato	USA, OH (A)	0	0	2.6	0	2.5	eggplant	NP	-/+/-
cot274	cotton	Israel (B)	0	0	2.0	0	2.3	eggplant	NP	+/-/-
449-2	broccoli	Greece (D)	0	0	3.7	0	1.9	eggplant	NP	-/-/-
124-8	tomato	Greece (D)	0	0	3.0	0	1.5	eggplant	NP	+/+/+
487-1	anthemism	Greece (D)	1.0	1.0	3.2	0	1.2	eggplant	NP	-/-/-
453-1	vetch	Greece (D)	0	0	3.3	0	2.3	eggplant	NP	-/-/-
un1-1	wild sweet pea	Greece (D)	0	0	3.0	0	1.3	eggplant	NP	-/-/-
554-1	chicory	Greece (D)	0	0	1.6	0	3.6	eggplant	NP	-/-/-
578-1	lamb's quarters	Greece (D)	0	0	3.0	0	1.2	eggplant	NP	-/+/+
456-1	anise	Greece (D)	0	0	3.2	0	2.5	eggplant	NP	-/+/+
457-5	spinach	Greece (D)	0	0	3.0	0	1.3	eggplant	NP	-/-/-
476-3	spinach	Greece (D)	0	0	3.0	0	1.6	eggplant	NP	-/+/+

Table 1 (continued)

Isolate code	Host	Origin (source) ^a	Mean Disease Index (MDI) on differential hosts					Pathogenicity group	Tomato race	Molecular markers Tr/Tm/35 ^g
			T ⁺ ^b	T ⁻ ^c	E ^d	S ^e	C ^f			
586-2	lamb's quarters	Greece (D)	0	0	3.0	0	1.2	eggplant	NP	-/+/+
490-2	groundsel	Greece (D)	0	0	2.9	0	1.5	eggplant	NP	-/+/+
Vd76	cotton	Greece (G)	0	0	2.7	0	2.8	eggplant	NP	-/-/-
Cf.38	pepper	USA, CA (F)	1.0	1.0	3.0	2.0	3.4	sweet pepper	NP	+/-/-

^a A = R. Rowe, OARDC, The Ohio State University, USA; B = T. Katan, The Volcani Center, Israel; C = K. Dobinson, University of Western Ontario, Canada & Agriculture and Agri-Food, Canada; D = E. Ligoxigakis, Plant Protection Institute, N.AG.RE.F., Greece (isolates collected from Crete); E = A. von Tiedemann, University of Göttingen, Germany; F = K. Subbarao, University of California, Davis, USA; G = E. Tjamos, Agricultural University of Athens, Greece; H = S. Dervis, University of Mustafa Kemal, Turkey; I = E. Paplomatas, Agricultural University of Athens, Greece; J = J. Heale, University of London, UK; and K = O. Strunnikova, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Russia

^b Tomato cv. ACE 55 VF (*Ve*⁺)

^c Tomato cv. EarlyPak No. 7 (*Ve*⁻)

^d Eggplant cv. Black Beauty

^e Sweet pepper cv. California Wonder

^f Turnip cv. Snowball

^g PCR-based molecular markers Tr = Tr1/Tr2, Tm = Tm5/Tm7, 35 = 35-1/35-2

^h NP not pathogenic to tomato

pathogenicity tests (Ligoxigakis and Vakalounakis 1994). According to the response of each host to *V. dahliae*, each isolate was classified into one of the following pathogenicity groups: (a) tomato group (pathogenic to tomato, eggplant and turnip), (b) eggplant group (pathogenic to eggplant and turnip), (c) sweet pepper group (pathogenic to eggplant, sweet pepper and turnip), and (d) tomato-sweet pepper group (pathogenic to all four plant hosts). No isolate pathogenic to turnip alone (crucifer group) was found in this study. Virulence of each isolate on each host cultivar was expressed as the mean disease index (MDI, in a 0–4 visual scale) for all treated plants per tested host and isolate. Each experiment was repeated twice. The average values of mean disease indices for groups of isolates were expressed as the average of mean disease indices (AMD).

Morphological and physiological characterization

The diameter of actively growing colonies on fresh PDA plates was measured at daily intervals and growth rate was calculated for the period between 10 and 20 days after inoculation for each isolate. Pigmentation was visually assessed by recording daily the appearance of

dark pigment at the bottom of PDA plates. At the end of the incubation period (45 days), all cultures were scored in a five-point ordinal graduation for the intensity of dark pigment (with 0 referring to white and 4 to entirely black colonies; Online Resource 1).

Conidiation was estimated by removing an agar disc from the periphery of two-week-old cultures with a cork borer (6-mm diameter) and placing it in an 1.5-ml Eppendorf tube with 1.0 ml of sterile distilled water. Tubes were thoroughly vortexed for the complete dislodgement of conidia into water and conidia were counted on a Neubauer haemocytometer. The same samples were also used for the measurement of conidial lengths under a light microscope (640× magnification) and mean conidial lengths were expressed as the averages of 30 readings per isolate.

All tests for qualitative morphological and physiological characteristics were performed in at least three replicates per parameter examined for each isolate.

VCG classification

VCG classification of *V. dahliae* isolates from Crete was performed according to standard procedures (Joaquim and Rowe 1990). Only those chlorate-

Table 2 Vegetative Compatibility Grouping (VCG) and molecular (ITS2-SNP, markers M1, M2 and E10-RAPD) characteristics of *Verticillium* isolates used, along with pathogenicity groups and tomato races

Isolate code	VCG (secondary interactions) ^a	ITS2-SNP	PCR-based molecular markers			Pathogenicity group	Tomato race
			M1	M2 ^b	E10-RAPD		
T9	1A	C	I	+	–	eggplant	NP ^c
cot201	1	C	I	–	–	tomato	1
Dvd-T5	2A	A	II	–	+	tomato	1
PH	2A	A	II	–	–	tomato	1
179-4	2A	A	II	–	–	tomato	1
164-1	2A	A	II	–	–	tomato	1
98-1	2A	A	II	–	–	tomato	1
113-1	2A	A	II	–	–	tomato	1
140-2	2A	A	II	–	–	tomato	2
247b-3	2A	C	II	–	–	tomato	2
136-3	2A (2B)	A	II	–	–	tomato	1
136-1	2A (2B)	A	II-1	–	–	tomato	1
116-1	2A (2B, 4B)	A	II	–	–	tomato	1
592-2	2A (4A, 4B)	A	II-2	–	–	tomato	2
43-4	2A (4A, 4B)	A	II	–	–	tomato	1
998-1	2A (2B, 4A)	C	II	–	–	tomato	2
V54	2B	C	I	+	+	tomato	1
cot274	2B	C	I	+	+	eggplant	NP
449-2	2B	C	I	+	+	eggplant	NP
570-2	2B	C	I	+	+	tomato	2
124-8	2B (1)	C	I	+	+	eggplant	NP
577-1	2B (2A)	C	I	+	–	tomato	1
123-3	2B (2A)	C	I	+	+	tomato-sweet pepper	1
423-1	2B (2A)	C	I	+	+	tomato	1
487-1	2B (2A)	C	I	+	+	eggplant	NP
454-1	2B (2A)	C	I	+	+	tomato	2
530-1	2B (2A)	C	I	+	+	tomato	1
171-2	2B (2A)	C	I	+	+	tomato-sweet pepper	1
997-1	2B (2A)	C	I	+	+	tomato	2
17-1	2B (2A, 4A)	C	I	+	+	tomato-sweet pepper	1
525-1	2B (2A, 4A)	C	I	+	+	tomato	1
150-5	2B (2A, 4A)	C	I	+	+	tomato-sweet pepper	1
999-1	2B (4A, 4B)	C	I	+	+	tomato-sweet pepper	1
70-21	3	C	I	–	–	eggplant	NP
PCW	3	C	I	–	–	tomato	2
BB	4A	C	I	–	–	eggplant	NP
30-6	4A	C	I	–	–	eggplant	NP
S39	4B	C	II	–	–	eggplant	NP
pn4	4B	C	II	–	–	tomato	1
16-1	4B	C	II	–	–	tomato	1
455-1	4B	C	II	–	–	tomato	2

Table 2 (continued)

Isolate code	VCG (secondary interactions) ^a	ITS2-SNP	PCR-based molecular markers			Pathogenicity group	Tomato race
			M1	M2 ^b	E10-RAPD		
44-3	4B	C	II	–	–	tomato	1
273-1	4B	C	II	–	–	tomato	2
413-5	4B	C	II	–	–	tomato	2
453-1	4B	C	II	–	–	eggplant	NP
461-3	4B	C	II	–	–	tomato	2
463-1	4B	C	II	–	–	tomato	2
464-3	4B	C	II	–	–	tomato	2
464-1	4B	C	II	–	–	tomato	2
473-1	4B	C	II	–	–	tomato	2
un1-1	4B	C	II	–	–	eggplant	NP
437-2	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
444-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
434-2	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
451-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
465-2	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
554-1	4B (4A)	C	II	–	–	eggplant	NP
469-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	1
578-1	4B (4A)	C	II	–	–	eggplant	NP
802-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
466-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
526-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
414-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
456-1	4B (4A)	C	II	–	–	eggplant	NP
457-5	4B (4A)	C	II	–	–	eggplant	NP
467-2	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
433-2	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
447-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
476-3	4B (4A)	C	II	–	–	eggplant	NP
478-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	1
435-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
586-2	4B (4A)	C	II	–	–	eggplant	NP
437-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
479-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	1
490-2	4B (4A)	C	II	–	–	eggplant	NP
469-2	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	1
235-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
451-2	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
460-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
354-1	4B (4A)	C	II	–	–	tomato	2
It1-1	4B (3, 4A)	C	II	–	–	tomato	2
Cf.38	6	C	I	+	–	sweet pepper	NP
Ca.146	6	C	I	–	+	tomato	1
Vd76	non-reacting	C	I	–	–	eggplant	NP

Table 2 (continued)

Isolate code	VCG (secondary interactions) ^a	ITS2-SNP	PCR-based molecular markers			Pathogenicity group	Tomato race
			M1	M2 ^b	E10-RAPD		
Additional <i>Verticillium</i> isolates							
V44 ^d	1	C	I	–			
cotVd47 ^e	1	C	I	–			
cotVd03 ^e	1A	C	I	+			
cotVd11 ^e	1A	C	I	–			
cotVd16 ^e	1A	C	I	–			
cotVd19 ^e	1A	C	I	–			
7V ^f	2A	A	II	–			
20V ^f	2A	A	II	–			
25V ^f	2A	A	II	–			
31V ^f	2A	A	II	–			
ep8 ^g	2A	A	II	–			
cotVd04 ^e	2A	A	II	–			
egpVd17 ^e	2A	A	II	–			
egpVd23 ^e	2A	A	II	–			
VaaM33 ^h	–	C	I	–			
Vaa220 ^h	–	C	I	–			
VaaV90 ⁱ	–	C	I	–			
VlonG19 ^h	–	C	I + II	+			
VlonK12 ⁱ	–	C	I	+			

^a Isolates were classified in VCGs according to the compatibility behaviour of their *nit* mutants, when being confronted with complementary testers of different VCGs. The tested mutants of several isolates produced complementation reactions with testers of more than one VCGs; in all these cases, the “weaker” reactions were recorded as “secondary” reactions and listed here in parentheses (see [Materials and methods](#) and [Results](#) for details)

^b For molecular marker M2, isolates were scored according to the presence or absence of the ca. 650-bp differentiating DNA band

^c NP not pathogenic to tomato

^d Provided by R. Rowe, OARDC, The Ohio State University, USA

^e Provided by S. Dervis, University of Mustafa Kemal, Turkey

^f Provided by E. Paplomatas, Agricultural University of Athens, Greece

^g Provided by T. Katan, The Volcani Center, Israel

^h Provided by J. Heale, University of London, UK

ⁱ Provided by O. Strunnikova, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Russia

resistant sectors that grew with a thin, expansive mycelium on Czapek-Dox minimal medium were considered probable *nit* mutants. These were then classified in *nit1*, *nit3* and NitM mutant classes, according to Correll et al. (1987). Intra-strain pairings were performed between complementary *nit* mutants of each isolate, in order to check for self-compatibility. International VCG tester strains T9 and V44 (VCG 1), PH (VCG 2A), 115 (VCG 2B), 70-21 and PCW (VCG 3), BB (VCG 4A) and S39 (VCG 4B), were used to group *V. dahliae*

isolates from Crete, by independent pairing of at least two different *nit* mutants of each isolate with complementary *nit* mutants of all the above mentioned VCG testers, on Czapek-Dox minimal medium (Joaquim and Rowe 1990). All pairings were repeated at least twice.

Statistical and cluster analysis

The statistical significance of the differences between two or more average values was tested with standard

statistical tests, as implemented in SPSS Statistics 20 software package (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Prior to analysis, the normality of data distributions was evaluated with both visual inspection of the linearity of corresponding P-P (Probability-Probability) plots and the output probability of Kolmogorov-Smirnov test. For all datasets found to fit the normal distribution and to comply with the assumption of equality of variances according to Levene's test (Levene 1960), comparisons were performed with Student's *t* test for the dichotomous independent variable of tomato race (1 and 2) and one-way Analysis of Variance (ANOVA) method for multi-group pathogenicity group and VCG variables. Datasets not filling the above requirements were processed via the non-parametric tests of Mann-Whitney U (Fagerland and Sandvik 2009) and Kruskal-Wallis H (Kruskal and Wallis 1952), respectively. The results from ANOVA and Kruskal-Wallis H test were further examined with Bonferroni (when variances were equal) and Dunnett's T3 (when variances were unequal) post-hoc tests. Hierarchical cluster analysis was performed and dendrograms were produced with SPSS Statistics 20 software package, with the Ward's minimum variance criterion (Everitt et al. 2001) as the clustering method and squared Euclidean distance as the distance metric.

DNA isolation, PCR, restriction digestion, cloning and sequencing

Fungal DNA was prepared by previously described procedures (Typas et al. 1992). Once eluted in ultra pure double distilled water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), DNA was stored at -20°C until further use, while its concentration was quantified spectrophotometrically (Sambrook and Russell 2001) using an Ultrospec 2000 UV/Visible spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

PCR amplifications were performed with KAPA Taq polymerase (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) or Herculase II Fusion DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) for the amplification of PCR products to be sequenced; a PTC-200 Gradient Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc., St. Bruno, Quebec, Canada) was used. All primer pairs used for the amplification of ITS1-5.8S-ITS2 and mating type idiomorphs, as well as primers tested for race-, pathogenicity group- and VCG-specific molecular markers, are listed in Table 3. The reaction mixture consisted of

KAPA Taq buffer C (without MgCl_2) at 1X concentration, 1.5 mM MgCl_2 , 100 μM of each dNTP, 5 pmol of each primer, 20–30 ng of genomic DNA, 0.025 u/ μl of the KAPA Taq DNA polymerase, and molecular-grade ultra pure water (Invitrogen) up to a final volume of 25 μl . The amplification programme included a 3-min step of initial denaturation at 95°C , followed by 35 cycles of denaturation (30 s at 95°C), annealing (30/60 s at 55/48 $^{\circ}\text{C}$ for M1/M2 markers, respectively) and extension (1 min at 72°C), and a final extension step of 5 min at 72°C . All PCR reactions were repeated at least twice and all experiments included negative controls (no DNA). PCR products were electrophoretically separated on ethidium bromide-stained agarose gels (1.2 % w/v) and visualized under UV light.

Restriction digestions were performed according to the manufacturer's instructions (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cloning of PCR products was carried out into vector pCRII-TOPO (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions or vector pBluescript II KS (Stratagene), according to standard procedures (Sambrook and Russell 2001), after gel purification of the desired DNA fragments with Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Sequencing reactions were carried out at a LI-COR DNA Analyzer IR2 automated sequencer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) using the SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). PCR products were purified using the NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel) before used as templates for sequencing reactions. All sequencing reactions were performed in both directions.

Results

Pathogenicity and virulence assays – molecular differentiation of tomato races and host range pathogenicity groups

Depending on the responses of four plant hosts tested (tomato, eggplant, sweet pepper and turnip), a population of 84 *V. dahliae* isolates was assigned to pathogenicity groups: 59 isolates were assigned to tomato, 19 to eggplant, one to sweet pepper and five to tomato-sweet pepper pathogenicity groups (Table 1). No isolate pathogenic to turnip alone was detected.

Table 3 Primers used throughout this study

Primer name	DNA target or differentiation purpose	Primer sequence (5'-3')	Reference
18S-ITS1	ITS1-5.8S-ITS2	GTCCCTGCCCTTTGTA	Pantou et al. 2005
28S-ITS2		CCTGGTGGTTTCTTTTCC	Pantou et al. 2005
VdMAT111F2	MAT1-1-1	CCACTCGAAACCCACCGTC	Usami et al. 2009
VdMAT111R3		GGCCTCCATGTTGTAAGCGT	Usami et al. 2009
VdMAT12F	MAT1-2-1	CAGGCCATGGTCGTGAT	This study
VdMAT12R		CTAGCTGTGCTGCCACTTGTTT	This study
Tr1	tomato race 2	TGAAGTAGCCGATAGCTTTGTCTTGCCCGG	Usami et al. 2007
Tr2		TGTCTGGATTAATCGCCGCAATAGAGACGC	Usami et al. 2007
35-1	tomato pathogenicity group	AAGTTGAGGGACATAATTACCTGGGGTGCG	Usami et al. 2005
35-2		TCGAAAAGTACGTAGAATTTATTCGCTAAT	Usami et al. 2005
Tm5		TGTCTGGATTAATCGCCGCAATAGAGACGC	Usami et al. 2007
Tm7		TGTCTGGATTAATCGCCGCAATAGAGACGC	Usami et al. 2007
E10	sweet pepper pathogenicity group	CCGTGTCCTTCT	Usami et al. 2007
VdM1F	M1 molecular marker	CCATAGCATCACAGCGAACTCTACTA	This study
VdM1R		AAACCAACACCGAACTGACCAATC	This study
VdM2F	M2 molecular marker	GCTATCCGCCGTCTCGCT	This study
VdM2R		GGTACGGCCCTGGCGCTT	This study

Furthermore, by testing the pathogenicity of the 59 isolates of tomato group on a race 1-susceptible and a resistant tomato cultivar, 24 isolates were grouped into race 1 and 35 into race 2. Interestingly, all five isolates of the tomato-sweet pepper group belonged to race 1. In total, the *V. dahliae* population tested consisted of 29 race 1, 35 race 2 and 20 tomato-non-pathogenic isolates (Table 1).

All tomato-pathogenic isolates caused, on average, moderate symptoms on race 1-susceptible tomato cv. EarlyPak No. 7 (average of mean disease indices, AMD=2.3). From the 29 race 1 isolates, eight caused weak symptoms (light yellowing of the first leaf) and were capable of colonizing the race 1-resistant ACE 55 VF cultivar (the pathogen could be re-isolated from stem sections), in several replicates of the experiment, without any other visible disease symptoms. These isolates were not regarded as virulent, as only those characterized by a mean disease index (MDI) of >1.0 were considered virulent (Table 1). Average virulence of race 2 isolates was slightly lower on ACE 55 VF than on EarlyPak No. 7 (AMD=2.3 and 2.5, respectively). Statistical analysis of AMD values between the two races demonstrated that, in addition to ACE 55 VF, there was also a significant difference of virulence on EarlyPak No. 7 (AMD=2.0 and 2.5 for races

1 and 2, respectively) and on sweet pepper (Table 4 and Online Resource 2). Indeed, the five tomato-sweet pepper pathogenicity group isolates belonged to tomato race 1, and all of them caused severe symptoms on sweet pepper (AMD=3.0), whereas all other *V. dahliae* isolates, with the exception of the member of sweet pepper group, Cf.38, caused no visible symptoms on this host. All *V. dahliae* isolates tested caused moderate to severe symptoms on eggplant (AMD=3.1) and slight to moderate symptoms on turnip (AMD=2.4), regardless of original host and pathogenicity group. In addition, only six of the *V. dahliae* isolates caused symptoms on pepper, indicating a higher resistance level of this crop to the pathogen. Overall, eggplant was generally the most susceptible host to *V. dahliae*, followed by turnip, and statistical analyses among the various pathogenicity groups showed significant differences for all plant hosts tested, except eggplant (Table 4 and Online Resource 3). Tomato group was significantly more virulent on turnip than the tomato-sweet pepper group (AMD=2.5 and 1.6, respectively).

The 84 *V. dahliae* isolates were subjected to PCR amplification with primers Tr1/Tr2, Tm5/Tm7, 35-1/35-2 (results are shown in Table 1) and E10 (Table 2). From all 29 race 1 isolates, PCR with primers

Table 4 Significant differences in virulence characteristics and morphological/physiological parameters between tomato races, host range pathogenicity groups and VCGs (2A, 2B and 4B) of*V. dahliae* isolates used in this study. The mean value for each group per parameter listed is shown in brackets

Parameter	Statistically significant differences		
	Between tomato races (1, 2)	Among pathogenicity groups (T ^a , E ^b , TSP ^c)	Among VCGs (2A, 2B, 4B)
Virulence characteristics			
Virulence on tomato (<i>Ve</i> ⁻)	1 (2.0) - 2 (2.5): 0.004**	T (2.3) - E (0.2): <0.001** E (0.2) - TSP (2.1): <0.001**	– ^d
Virulence on tomato (<i>Ve</i> ⁺)	1 (0.3) - 2 (2.3): <0.001**	T (1.5) - E (0.1): <0.001** T (1.5) - TSP (0.4): 0.017*	–
Virulence on sweet pepper	1 (0.5) - 2 (0): 0.011*	T (0) - TSP (3.0): <0.001** E (0) - TSP (3.0): <0.001**	2A (0) - 2B (0.9): 0.050* 2B (0.9) - 4B (0): 0.050*
Virulence on turnip	–	T (2.5) - TSP (1.6): 0.050*	–
Morphological/physiological characteristics			
Pigment production	–	–	2B (18.7) - 4B (26.6): <0.001**
Final pigment intensity	–	T (1.8) - TSP (4.0): <0.001** E (1.8) - TSP (4.0): <0.001**	2A (1.7) - 2B (3.2): 0.025* 2B (3.2) - 4B (1.6): 0.002**
Conidial length	–	T (4.5) - TSP (3.8): <0.001** E (4.5) - TSP (3.8): <0.001**	2B (4.1) - 4B (4.6): 0.013*

^a Tomato group^b Eggplant group^c Tomato-sweet pepper group^d Non-significant difference

* The difference is significant at the 5 % level

** The difference is significant at the 1 % level

Tr1/Tr2 yielded the expected ca. 680-bp amplicon, and when one of these (isolate 999-1) was randomly selected and sequenced, its sequence was found identical to the sequence TomR1 (GenBank AB095266), which includes the race 1-specific sequence B68-TV. Good congruence was observed between results from virulence assays and predictions of molecular marker Tr1/Tr2, i.e., 75.9 % and 91.4 % for race 1 and race 2 isolates, respectively. This marker also helped to classify the 20 non-pathogenic to tomato isolates into races, i.e., four into “race 1” and 16 into “race 2”, but failed to distinguish tomato-pathogenic from non-pathogenic isolates (Table 1).

Concerning the putative tomato pathogenicity group-specific molecular markers Tm5/Tm7 and 35-1/35-2, a tomato group-specific DNA band of ca. 600 bp was yielded in both cases from all isolates (64) belonging to tomato and tomato-sweet pepper groups – with the exception of isolates PCW for Tm5/Tm7 and pn4 for 35-1/35-2. On the contrary, no

amplification products were yielded from most isolates of eggplant and sweet pepper groups. Reliability of pathogenicity group prediction with Tm5/Tm7 and 35-1/35-2 was 98.3 % for tomato-group isolates, 100 % for tomato-sweet pepper and sweet pepper groups (only one isolate in the latter case), while the reliability score for eggplant group prediction was 63.2 % for Tm5/Tm7 and 57.9 % for 35-1/35-2 (Table 1). Finally, the E10 primer designed for detection of sweet pepper group-specific RAPD-PCR amplicons resulted in the expected band of ca. 800 bp from all five isolates of tomato-sweet pepper group, nine out of 59 isolates of tomato group, four out of 19 eggplant-group isolates, and no band from the sole sweet pepper-group isolate (Table 2).

Hierarchical cluster analysis of the *V. dahliae* population, based on combined data obtained by the molecular tools Tr1/Tr2, Tm5/Tm7 and 35-1/35-2, led to the construction of a dendrogram depicting the relations among pathogenicity groups and tomato races

(Fig. 1a). All isolates of tomato-sweet pepper group were clustered with the majority of tomato race 1 isolates in cluster I, while most of tomato race 2 isolates formed another cluster II. Clusters I and II grouped together, whereas the majority of eggplant group members, along with the sole sweet pepper group isolate, formed another distinct major clade of the dendrogram.

Vegetative Compatibility Grouping (VCG) and VCG-related molecular markers

Nit mutants were recovered from all 69 *V. dahliae* isolates originating from Crete and the majority of these were characterized as *nit1* and NitM (*nit3* mutants represented less than 3.0 % in a total of more than 550 isolated mutants). All isolates were readily self-

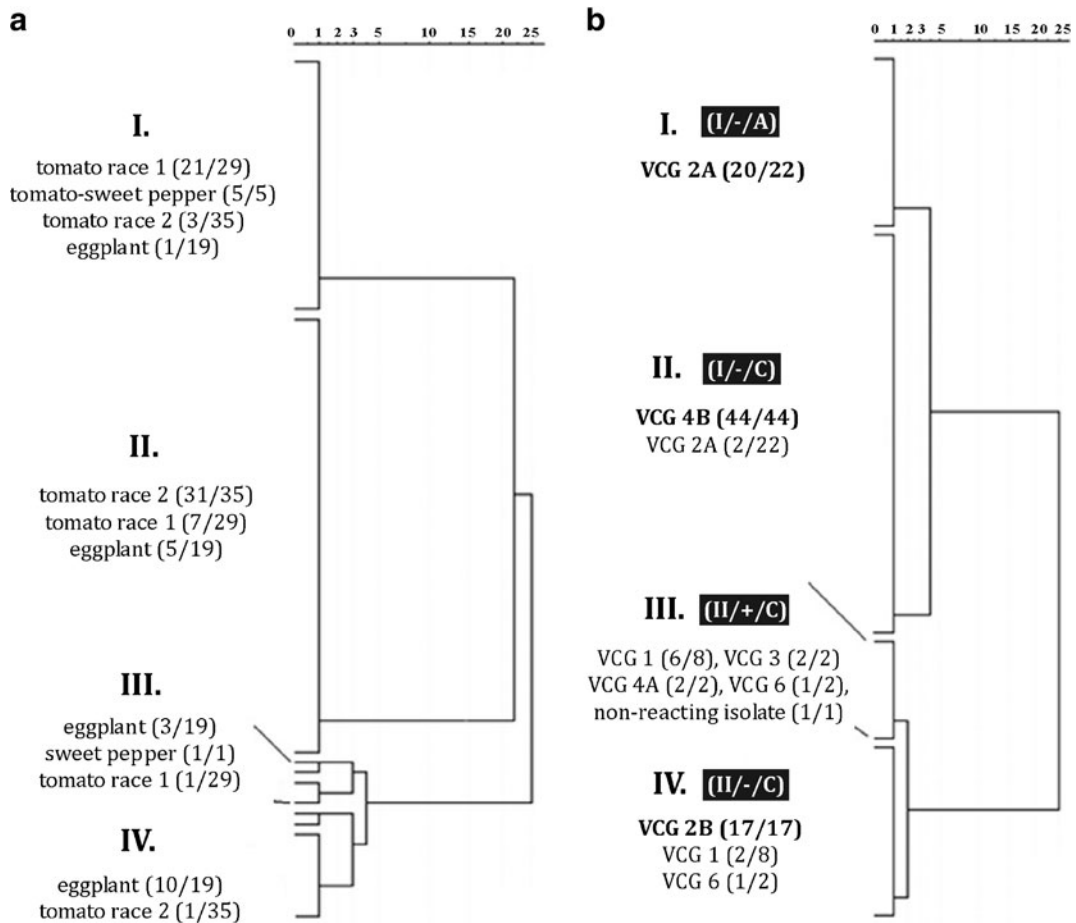


Fig. 1 a Dendrogram derived from hierarchical cluster analysis (Ward’s minimum variance method) of the combination of molecular markers Tr1/Tr2, Tm5/Tm7 and 35-1/35-2 for all *V. dahliae* isolates used in this study. Clusters are indicated in Roman numerals and under the numbers the pathogenic profile of isolates (pathogenicity groups and tomato races) is provided. The *first number in brackets* for each category corresponds to how many isolates of this category are assigned to the particular cluster, whereas the *second number* represents the total number of isolates of the same category included in the dendrogram. The scale derives from the squared Euclidean distance as the distance metric. **b** Dendrogram derived from hierarchical cluster analysis (Ward’s minimum variance method) of the combination

of molecular markers M1, M2 and ITS2-SNP, for all *V. dahliae* isolates used in this study, plus six VCG 1 and eight VCG 2A isolates (Table 2) included for disambiguation of clustering. The correlation of clusters with the VCG classification of isolates and the marker-derived haplotype (M1 marker/M2 marker/ITS2-SNP) corresponding to each cluster are summarized in the left. The *first number in brackets* for each category corresponds to how many isolates of this category are assigned to the particular cluster, whereas the second number is the total number of isolates of the same category included in the dendrogram. The scale derives from the squared Euclidean distance as the distance metric. Dendrograms were produced with SPSS 20 Statistics software package (IBM)

compatible in intra-strain tests between complementary mutants and were assigned to VCG 4B (42 isolates), VCG 2A (12 isolates) and VCG 2B (15 isolates; Table 2). None of the isolates belonged to VCGs 1, 3 or 4A. However, it is noted that only 20 out of 69 isolates reacted only with the tester strains of a single VCG. The remaining 49 isolates complemented to varying degrees (i.e., variability in density of aerial mycelium, growth rate, presence of microsclerotia, pigment intensity, reproducibility) the tester strains of more than one VCG subgroups and their classification was based on the comparative evaluation of vigour and frequency of prototrophic growth phenotypes produced between their *nit* mutants and those of the two or more compatible or “partially” compatible VCG testers. For every isolate tested, the reaction more closely resembling prototrophic growth was regarded as the “primary” VCG interaction, and “weaker” interactions (i.e., less abundant aerial hyphae and/or slower-growing heterokaryons) observed with other VCG (sub)groups, were recorded as “secondary” interactions. These VCG “bridging” isolates and their reproducible “secondary” interactions are listed in Table 2. In all these cases, each pairing was repeated in at least five independent experiments in an effort to eliminate subjectivity in VCG assignments. The vast majority of “secondary” interactions recorded shared all typical characteristics of normal heterokaryons, were temporally stable and reproducible.

Isolates from VCG 2B were significantly more virulent on sweet pepper than VCGs 2A and 4B (Table 4 and Online Resource 4). With the exception of isolate Cf.38 (sweet pepper pathogenicity group), the other five isolates pathogenic to sweet pepper were classified in VCG 2B. Tomato-sweet pepper group was therefore entirely confined to VCG 2B, and this VCG was the only cluster comprising isolates of all three pathogenicity groups. VCG 2A exclusively contained isolates belonging to tomato group, while VCG 4B included both tomato- and eggplant-group isolates. Including all 84 *V. dahliae* isolates (i.e., the 69 from Crete and the 15 tester strains of international origin), tomato group was observed among all VCGs except for 4A; eggplant group was detected among isolates of VCG subgroups 2B, 4A and 4B; and tomato-sweet pepper group was entirely confined to VCG 2B (Table 2). With regard to tomato race distribution among VCGs, race 2 proved to be significantly more frequent between VCG 4B members, while race 1 predominated VCGs 2A and 2B (Table 2).

ITS1-5.8S-ITS2 amplicons of all *V. dahliae* isolates were obtained and 50 of them –including all VCG tester strains– were sequenced, the sequences obtained (GenBank accession numbers JX104774–JX104823) were blasted against nucleotide databases and aligned. Regardless of origin, tomato races and pathogenicity groups, all sequences were identical to the *V. dahliae* strain 76 (GenBank accession number AF104926), with the exception of 11 VCG 2A isolates that had a single nucleotide substitution at position 370 (an adenosine instead of the cytidine) in their ITS2 region (Table 2). To examine the significance of this single nucleotide polymorphism (SNP), the remaining 34 isolates of the population, and a set of 19 more isolates added to the analysis, were characterized by PCR-RFLP (*Bse*MI) restriction digestion (Table 2). This restriction endonuclease was chosen because multiple alignment of ITS1-5.8S-ITS2 sequences showed that the enzyme is expected to cleave the amplicons at a target sequence that includes the SNPs and differentiates strains with alternate ITS2 alleles, producing two restriction fragments (of 553 and 158 bp, respectively) only for “370-A” genotype. From the 103 isolates examined, only two exceptions to the correlation of ITS2-SNP with VCG subgroup 2A were detected: isolates 247b-3 and 998-1 (“370-C” albeit VCG 2A). Performing an extensive database search for deposited complete or near-complete ITS1-5.8S-ITS2 sequences of more *V. dahliae* isolates, 389 sequences were retrieved and aligned (data available upon request), proving not only that the complete region is remarkably conserved in *V. dahliae* but mainly that the ITS2-SNP is the only polymorphism found in 381 out of 389 sequences (103 of the 389 isolates were of the “370-A” type). It is noted, however, that for most of these strains their VCG classification was unavailable.

Based on a preliminary investigation for the presence of polymorphic sequences in the genome of *V. dahliae* (Papaioannou and Typas, unpublished data), primer pairs VdM1F-VdM1R and VdM2F-VdM2R were chosen to test for detectable size polymorphism of amplicons putatively correlated with the VCG classification of isolates. When tested with the 103 isolates of the extended population studied here (Table 2), amplification with primers VdM1F-VdM1R produced a single amplicon of 772 bp from all members of VCGs 1, 2B, 3, 4A and 6 (group I) or 646 bp from all those classified in VCGs 2A and 4B (group II)

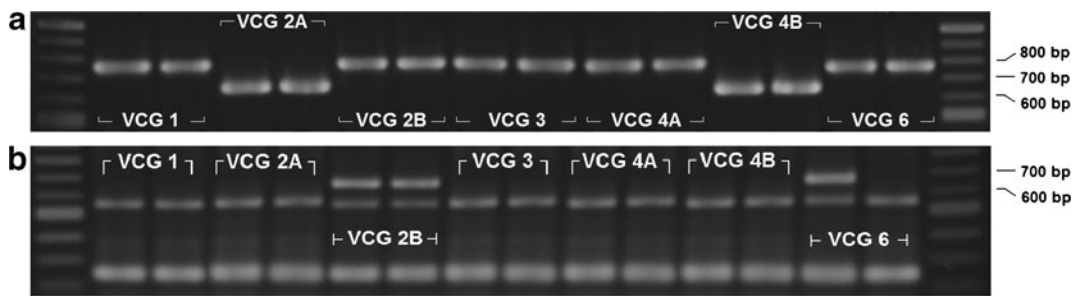


Fig. 2 Agarose gels of novel molecular markers M1 (a) and M2 (b), showing the differences of electrophoretic profiles among *V. dahliae* VCG subgroups. Two representative isolates of each VCG subgroup have been included in each case: isolates V44 and cotVd47 [VCG 1], PH and 113-1 [VCG 2A], cot274 and 570-2 [VCG 2B], 70-21 and PCW [VCG 3], BB and 30-6 [VCG

4A], 16-1 and 453-1 [VCG 4B], and Cf.38 and Ca.146 [VCG 6]. Estimation of molecular weight of DNA bands was based on the 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). PCR products were electrophoretically separated on ethidium bromide-stained agarose gels (1.2 %w/v) and visualized under UV light

(Fig. 2a). To detect the source of polymorphism, amplicons from one representative of each group (isolates 487-1 and 164-1) were cloned and sequenced. The sequences were almost identical (GenBank accession numbers JX104825 and JX104824, respectively) and homologous to *hsp90* fungal genes. The size difference recorded between the two sequences was due to the presence of an 126-bp indel. Notably, amplification with primers VdM1F-VdM1R produced a single group I-characteristic amplicon from all three *V. albo-atrum* isolates and *V. longisporum* strain K12, whereas *V. longisporum* G19 yielded both ca. 750-bp and 650-bp PCR products.

Similarly, amplification with primers VdM2F-VdM2R also yielded a differentiating polymorphic PCR pattern among the 103 fungal isolates examined. In addition to a ubiquitously observed nearly 260-bp PCR product, a ca. 550-bp amplicon was produced from most isolates, whereas all isolates classified in VCG 2B, as well as strains T9 and cotVd03 from VCG 1, and strain Cf.38 from VCG 6, were characterized by an additional ca. 650-bp amplicon (Fig. 2b, Table 2). The corresponding DNA amplicon of isolate 449-2 (VCG 2B) was cloned and sequenced (GenBank accession number JX104826); analysis indicated that it is part of an hypothetical *V. dahliae* protein-encoding gene (VDAG_04007, *Verticillium* group database, Broad Institute website: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html).

Hierarchical cluster analysis of the extended *V. dahliae* population, based on combined data from ITS2-SNP and molecular markers M1 and M2,

allowed the construction of a dendrogram (Fig. 1b) which reflects the division of *V. dahliae* population in VCGs, at least concerning VCGs 2A, 2B and 4B which were mostly represented in this study. The majority of VCG 2A isolates were positioned in cluster I, which was grouped together with all VCG 4B isolates in cluster II. All VCG 2B isolates were positioned in cluster IV, together with two VCG 1 and one VCG 6 representatives. All isolates from VCGs 3 and 4A and the majority of VCG 1 isolates were included in cluster III. Notably, the isolates of VCGs 2A and 4B were grouped together and distinctly from the other major clade of the dendrogram, which included their respective VCG counterpart subgroups, 2B and 4A, respectively.

Finally, based on the genomic sequence of *V. dahliae* strain VdLs.17 (*Verticillium* group database, Broad Institute), a specific pair of primers, VDMAT12F-VDMAT12R, was designed for the amplification of a 669-bp part of gene MAT1-2-1. With the exception of isolate Ca.146 (VCG 6), for which amplification failed to provide a product, PCR with DNA from all other isolates (83) produced the anticipated MAT1-2-1 idiomorph amplicon. The identity of the PCR products from representative isolates of different VCG subgroups, i.e., 449-2 (VCG 2B), 70-21 (VCG 3), pn4 and 453-1 (VCG 4B), were confirmed by cloning and sequencing. Isolate Ca.146 was subsequently tested with primers VdMAT111F2-VdMAT111R3 known to amplify a 997-bp part of idiomorph MAT1-1-1, and the amplicon obtained was sequenced and found identical to the *V. dahliae* MAT1-1-1 idiomorph sequence (with accession number AB505215).

Morphological and physiological characterization

Five morphological traits were examined for all 84 *V. dahliae* isolates (Online Resource 5). Regarding growth rate of colonies, isolates were placed in three rate classes, namely 0.06–0.20, 0.21–0.40, and 0.41–0.50 cm day^{-1} , with a distribution of the population at 39.3 %, 50.0 % and 10.7 %, respectively. With regard to pigmentation-related characteristics, eleven out of 84 *V. dahliae* isolates were characterized as hyaline, with no visible dark pigment after 45 days of incubation. The rest of the isolates required up to 2, 3, 4 or more than 4 weeks of incubation for macroscopically visible accumulation of dark pigment, at proportions of 9.6 %, 26.0 %, 39.7 % and 24.7 %, respectively. Considerably darkly-pigmented types (classes 2, 3, and 4) were more frequent (47.6 %) in the population than hyaline (13.1 %) and lightly-pigmented colonies (39.3 %).

Four classes of conidia production were delimited (i.e., 0.96–2.00, 2.01–4.00, 4.01–6.00 and 6.01–10.77 millions of conidia ml^{-1}), and the 84 isolates were grouped into these four classes at 25.0 %, 26.2 %, 23.8 % and 25.0 % frequencies, respectively. Regarding conidial length, *V. dahliae* isolates were divided into four groups of size range: 3.2–4.0, 4.1–4.5, 4.6–5.0, and 5.1–5.8 μm , with respective frequencies in the population: 33.3 %, 16.7 %, 41.7 % and 8.3 %. The conidial length of three *V. albo-atrum* and two *V. longisporum* strains was also measured for comparisons: 3.9 ± 0.2 , 3.4 ± 0.1 and 5.5 ± 0.2 μm for *V. albo-atrum* M33, 220 and V90, respectively; and 7.4 ± 0.3 and 7.0 ± 0.3 μm for *V. longisporum* G19 and K12, respectively.

No statistically significant differences could be inferred for any morphological or physiological parameter between tomato races 1 and 2. However, concerning the pathogenicity group classification system, it is noted that the tomato-sweet pepper group was quite distinct as it significantly differed from tomato and eggplant groups, both in final pigment intensity (darker colonies), and in mean conidial length (shorter conidia) (Table 4 and Online Resource 3). *V. dahliae* isolates exhibiting the highest growth rates recorded here (0.39–0.50 cm day^{-1}) were also found to be the most virulent strains on tomato *Ve*⁻. Conidial length and pigment intensity were also discriminatory parameters among certain VCG subgroups like the VCG 2B isolates that constantly produced shorter

conidia and required significantly less time to produce dark pigment and achieve the highest final pigment intensity than members of both VCGs 2A and 4B (Table 4 and Online Resource 4).

Discussion

The lack of detailed population genetic studies for *V. dahliae* has hindered progress in the efficient management of Verticillium wilt diseases. A general classification system that circumvents, at least partially, the complex pathogenic behaviour of *V. dahliae* and also helps to understand the migrational history and evolution of the pathogen, allowing at the same time both future prediction and management, is urgently needed. A first attempt was made by Horiuchi et al. (1990) and Hagiwara (1990) when the pathotype system – based on pathogenicity to four plant hosts – was introduced and successfully tested with Japanese fungal populations. Although not widely used, this system proved quite convenient for the classification of a number of *V. dahliae* isolates from Crete into host range pathogenicity groups (Ligoxigakis and Markakis 2012) and therefore was also used in our work. As shown by our results, tomato pathogenicity group is widely spread throughout Crete whereas eggplant group is more moderately spread. In contrast, tomato-sweet pepper and sweet pepper groups are rarely encountered on Crete. The absence of crucifer pathotype (comprising isolates pathogenic only to turnip) from Crete is probably due to the limited use of cruciferous crops on the island and the lack of the long-spored relative species *V. longisporum*, known to mainly infect cruciferous plants and to prefer cooler temperatures (Karapapa et al. 1997).

The majority of isolates from Crete were tomato-pathogenic and about 60 % of them belonged to race 2. After the first report of its presence on Crete in 1988, race 2 has rapidly supplanted race 1, thus posing a serious threat to the crop (Ligoxigakis and Vakalounakis 1994). The situation is similar in other places of the world and is usually attributed to the extensive use of race 1-resistant cultivars (Grogan et al. 1979; Bender and Shoemaker 1984; Maruthachalam et al. 2010). Our observation that race 1 isolates have limited ability to colonize resistant plants without causing significant disease symptoms is in agreement with previous reports (Grogan et al. 1979; Mingoichi and Clarkson 1994) and it may contribute to

the long-term survival of the race, in spite of the extensive cultivation of resistant tomato varieties. Also, in accordance with the above reports is the recording that race 2 isolates have a slightly lower average virulence for race 1-resistant tomato cultivars than for susceptible ones. Our finding that race 2 is more virulent than race 1 on the common host cultivar (EarlyPak No. 7) is in contrast with most previous reports (Grogan et al. 1979; Bender and Shoemaker 1984; Mingochi and Clarkson 1994), though in agreement with Korolev et al. (2009). This may be explained by the significant variation in virulence that the above researchers have observed within each race, the finding that race 2 isolates, even within one locale, might have multiple origins and be genetically distinct (Dobinson et al. 1998), and the consequences of the adaptation of race-2 isolates to their habitats, a few decades after their introduction. All *V. dahliae* isolates tested caused moderate to severe symptoms on eggplant and slight to moderate symptoms on turnip, regardless of original host and pathogenicity group, and in agreement with previous observations on the susceptibility of these two hosts (Mingochi and Clarkson 1994). The cotton-defoliating VCG 1 isolates of *V. dahliae* are known to be non-pathogenic to both Ve^+ and Ve^- cultivars of tomato (Daayf et al. 1995; Korolev et al. 2008, 2009). However, one such isolate in this study, cot201 from Israel, was classified in tomato pathogenicity group (as race 1) on the basis of the weak, near-threshold symptoms that it induced on Ve^- tomato (EarlyPak No. 7). This observation is due either to the well-known variation in virulence within pathotypes of *V. dahliae*, or to the possible subjectivity involved in the evaluation of marginal symptoms observed in pathogenicity experiments. More importantly, it underlines the need for the development of objective and reproducible tools for the characterization of pathogenicity groups and races of *V. dahliae*.

An alternative rapid and reliable methodology to the traditional time-consuming virulence assays for determining pathogenicity groups and races would greatly facilitate the implementation of proper plant protection programmes. The reliability score of molecular marker Tr1/Tr2 in prediction of tomato races was satisfactory (overall score 84.4 %), though less than the 96 % reported in another study with American isolates (Maruthachalam et al. 2010). However, we observed here that the corresponding race 1-specific sequence is generally absent from members of VCG subgroup 4B, a fact that imposes some confusion in

race prediction within this VCG. Moreover, an amplicon of the expected size was produced from several tomato non-pathogenic isolates, underlining that this molecular marker makes by itself no apparent distinction between tomato-pathogenic and other isolates. Thus, the use of Tr1/Tr2 as a race discrimination molecular tool should be restricted to tomato-pathogenic populations of *V. dahliae*, not predominated by VCG 4B. Our finding that a race 1-characteristic amplification product is obtainable from isolates that are not pathogenic to tomato, implies that the relevant DNA region is probably not directly associated with virulence, contrary to what was previously suggested (Maruthachalam et al. 2010).

The two tomato pathotype-specific primer pairs Tm5/Tm7 and 35-1/35-2 (Usami et al. 2005, 2007) produced reasonably good results for tomato-pathogenic isolates in this study, with total reliability scores reaching 90.5 % and 89.3 %, respectively. Interestingly, none of the two molecular markers distinguished between tomato and tomato-sweet pepper pathogenicity groups, which indicates a common genetic background. PCR with both markers failed to provide amplicons from the sole member of sweet pepper group, thus clustering this isolate with the majority of eggplant-group members and in agreement with the results of Koike et al. (1996). Similarly, the putatively sweet pepper-specific PCR-RAPD molecular marker E10 failed to provide the characteristic product from this isolate, in contrast to all five members of tomato-sweet pepper group, as well as the majority of other VCG 2B isolates, which welcomes future study.

The *V. dahliae* population from Crete is characterized by the absence of VCGs 1, 3, 4A; is predominated by VCG 4B; and has VCGs 2A and 2B at lower and fairly even frequencies. From the VCG groups that were absent, it is known that VCG 4A is distributed only in North America (Dobinson et al. 2000); VCG 3 is rarely found in Greece (Elena and Paplomatias 1998); and VCG 6 is a relatively new group that has not yet been included in most VCG studies. Similarly, although VCG 1 is frequently found in other Mediterranean countries like Spain (Jiménez-Díaz et al. 2006), Turkey (Dervis et al. 2007) and Israel (Korolev et al. 2008), it appears to be rare in Greece (Elena 1999; Collado-Romero et al. 2006). Thus, only isolates that belong to VCGs 2A and 2B were found in the two western prefectures of Crete (Chania and Rethymnon), whereas VCG 4B predominated the far eastern prefecture (Lasithi).

All three subgroups were encountered in the intermediate prefecture (Heraklion), which may indicate a gradual geographical transition in the genetic structure of the pathogen's population, across the island. Notably, VCG subgroup 2B was the only VCG comprising isolates of all three pathogenicity groups found on Crete. On the other hand, VCG 2A comprised only isolates pathogenic to tomato. Concerning tomato race distribution among VCGs, race 2 was significantly more frequent than race 1 in VCG 4B, whereas race 1 predominated VCGs 2A and 2B. In agreement with previous observations (Zeise and von Tiedemann 2001), VCG 2B isolates constantly produced shorter conidia and required significantly less time to produce dark pigment and achieve the highest final pigment intensity than members of both VCGs 2A and 4B. Hence, comparing VCGs 2A, 2B and 4B isolates from Crete, those belonging to VCG 2B constituted the morphologically most divergent group, whereas isolates of VCGs 2A and 4B were statistically indistinguishable in all parameters.

A striking feature of VCG analysis in this study was the remarkably high proportion (71.0 %) of isolates showing some degree of partial compatibility with tester isolates of more than one VCG subgroup. The existence of such “bridging” isolates has been repeatedly reported in the literature (Joaquim and Rowe 1990, 1991; Strausbaugh et al. 1992; Elena and Paplomatas 1998), although relevant quantitative information is usually lacking. Several possible explanations may be given for this type of weak and/or non-reproducible interactions like the failure of nuclei to migrate through anastomosis bridges, the failure of true heterokaryon formation, secondary interactions of gene products in the cytoplasm guided by extra-chromosomal factors or to “transitory” heterokaryosis (Typas 1983; Joaquim and Rowe 1991). All of these hypotheses involve no actual exchange of nuclear genetic material between the two incompatible partners, which are thus expected to remain genetically isolated from each other. This could explain the general intra-VCG uniformity of genetic markers/traits observed (Collado-Romero et al. 2006, 2008), although a plethora of inter-VCG weak interactions are often observed. In the light of these observations, a joint methodological approach combining VCG analysis with the use of appropriate molecular tools, such as those presented in this work, might be more reliable

and informative for the characterization of genetic relatedness in populations of *V. dahliae*, than VCG analysis alone.

From the other three molecular markers used, the ITS1-5.8S-ITS2 region of *V. dahliae* proved remarkably conserved, as expected (Pantou et al. 2005; Collado-Romero et al. 2008). However, a single nucleotide polymorphism in ITS2 was not only highly associated with VCG 2A in our population but also constituted the only widely encountered polymorphism in an extended database search. A high-throughput PCR-RFLP method for grouping isolates according to this VCG 2A-specific molecular fingerprint was developed, and it is proposed to be particularly suitable for rapid screening of large populations. Similarly, the other two novel molecular markers, M1 and M2, allowed clear differentiation between certain VCG subgroups in the *V. dahliae* population employed here. Molecular marker M2 is a characteristic genetic fingerprint of VCG subgroup 2B, while M1 marker unexceptionally grouped all VCG 2A and 4B isolates together and distinctly from all other VCGs, implying that these VCG subgroups are more closely related to each other than to their “sister” subgroups, VCGs 2B and 4A, respectively. This is in agreement with previous molecular and phylogenetic analyses (Collado-Romero et al. 2006, 2008; Jiménez-Gasco et al. 2009). Taken together, these data indicate that VCG groupings 2 and 4 are not really meaningful genetically and should be abandoned in future VCG terminology and population studies of *V. dahliae*. The combination of ITS2-SNP with molecular markers M1 and M2 can be used for the rapid and accurate detection of the major VCG subgroups 2A, 2B and 4B, and thus such tools are expected to be useful to high-throughput analyses of genetic relations of isolates within extended populations of the pathogen.

Apart from their participation in mating-related processes, mating-type genes are also known to control heterokaryon incompatibility in a number of fungi, including *N. crassa*. In this organism, when two confronting individuals differ in mating type, an incompatibility reaction is triggered and their heterokaryons are destroyed (Glass et al. 2000). The present study is the first investigation reported into the distribution of mating-type genes among VCGs of *V. dahliae*. All VCGs were shown to comprise only isolates bearing the MAT1-2-1 idiomorph, with the exception of VCG 6, which included isolates of both

mating types. These findings suggest that MAT1-2-1 idiomorph is prevalent in *V. dahliae* populations (in agreement with Usami et al. 2009 and Inderbitzin et al. 2011), and that the distribution of mating-type idiomorphs is unrelated to VCG classification. Thus, the mating-type gene is not expected to code for an incompatibility barrier between VCGs of *V. dahliae*.

Acknowledgments We would like to thank all individuals listed in the footnotes of Tables 1 and 2 for providing fungal isolates used in this study. I. A. Papaioannou and this research have been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

References

- Bender, C. G., & Shoemaker, P. B. (1984). Prevalence of *Verticillium* wilt of tomato and virulence of *Verticillium dahliae* race 1 and race 2 isolates in western North Carolina. *Plant Dis*, 68, 305–309.
- Bhat, R. G., Smith, R. F., Koike, S. T., Wu, B. M., & Subbarao, K. V. (2003). Characterization of *Verticillium dahliae* isolates and wilt epidemics of pepper. *Plant Dis*, 87, 789–797.
- Bhat, R. G., & Subbarao, K. V. (1999). Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 89, 1218–1225.
- Collado-Romero, M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., & Jiménez-Díaz, R. M. (2008). Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups. *Phytopathology*, 98, 1019–1028.
- Collado-Romero, M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., Valverde-Corredor, A., & Jiménez-Díaz, R. M. (2006). Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology*, 96, 485–495.
- Correll, J. C., Klittich, C. J. R., & Leslie, J. F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*, 77, 1640–1646.
- Daayf, F., Nicole, M., & Geiger, J.-P. (1995). Differentiation of *Verticillium dahliae* populations on the basis of vegetative compatibility and pathogenicity on cotton. *Eur J Plant Pathol*, 101, 69–79.
- Dervis, S., Erten, L., Soyulu, S., Tok, F. M., Kurt, S., Y ld z, M., et al. (2007). Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from olive in western Turkey. *Eur J Plant Pathol*, 119, 437–447.
- Dobinson, K. F., Harrington, M. A., Omer, M., & Rowe, R. C. (2000). Molecular characterization of vegetative compatibility groups 4A and 4B isolates of *Verticillium dahliae* associated with potato early dying. *Plant Dis*, 84, 1241–1245.
- Dobinson, K. F., Patterson, N. A., White, G. J., & Grant, S. (1998). DNA fingerprinting and vegetative compatibility analysis indicate multiple origins for *Verticillium dahliae* race 2 tomato isolates from Ontario, Canada. *Mycol Res*, 102, 1089–1095.
- Elena, K. (1999). Genetic relationships among *Verticillium dahliae* isolates from cotton in Greece based on vegetative compatibility. *Eur J Plant Pathol*, 105, 609–616.
- Elena, K., & Paplomatas, E. J. (1998). Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae* isolates from different hosts in Greece. *Plant Pathol*, 47, 635–640.
- Everitt, B. S., Landau, S., & Leese, M. (2001). *Cluster analysis*. London: Edward Arnold.
- Fagerland, M. W., & Sandvik, L. (2009). The Wilcoxon-Mann-Whitney test under scrutiny. *Stat Med*, 28, 1487–1497.
- Glass, N. L., Jacobson, D. J., & Shiu, P. K. T. (2000). The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu Rev Genet*, 34, 165–186.
- Grogan, R. G., Ioannou, N., Schneider, R. W., Small, M. A., & Kimble, K. A. (1979). *Verticillium* wilt on resistant tomato cultivars in California: virulence of isolates from plants and soil and relationship of inoculum density to disease incidence. *Phytopathology*, 69, 1176–1180.
- Hagiwara, H. (1990). Differentiation of the pathogenicity of *Verticillium dahliae* in Japan (in Japanese). *Plant Prot*, 44, 299–303.
- Hastie, A. C. (1962). Genetic recombination in the hop-wilt fungus *Verticillium albo-atrum*. *J Gen Microbiol*, 27, 373–382.
- Heale, J. B. (1988). *Verticillium* spp., the cause of vascular wilts in many species. *Adv Plant Pathol*, 6, 291–312.
- Horiuchi, S., Hagiwara, H., & Takeuchi, S. (1990). Host specificity of isolates of *Verticillium dahliae* towards cruciferous and solanaceous plants. In D. Hornby (Ed.), *Biological control of soil-borne pathogens*. Wallingford: CAB International.
- Inderbitzin, P., Davis, R. M., Bostock, R. M., & Subbarao, K. V. (2011). The ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range. *PLoS One*, 6, e18260.
- Isaac, I. (1957). *Verticillium*-wilt of Brussels sprout. *Ann Appl Biol*, 45, 276–283.
- Jiménez-Díaz, R. M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., Collado-Romero, M., Bejarano-Alcázar, J., Rodríguez-Jurado, D., et al. (2006). Genetic and virulence diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting artichoke in eastern-central Spain. *Phytopathology*, 96, 288–298.
- Jiménez-Gasco MM, Berbegal M, Malcolm GM, Armengol J, Jiménez-Díaz RM (2009) New insights on the phylogenetic relationships among vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae*. In EC Tjamos (ed.), Proceedings of the 10th International *Verticillium* Symposium (p. 28). Corfu, Greece
- Joaquim, T. R., & Rowe, R. C. (1990). Reassessment of vegetative compatibility relationships among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology*, 80, 1160–1166.
- Joaquim, T. R., & Rowe, R. C. (1991). Vegetative compatibility and virulence of strains of *Verticillium dahliae* from soil and potato plants. *Phytopathology*, 81, 552–558.

- Karapapa, V. K., Bainbridge, B. W., & Heale, J. B. (1997). Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycol Res*, *101*, 1281–1294.
- Katan, T. (2000). Vegetative compatibility in populations of *Verticillium* – an overview. In E. C. Tjamos, R. C. Rowe, J. B. Heale, & D. R. Fravel (Eds.), *Advances in verticillium: research and disease management* (pp. 69–86). St. Paul: American Phytopathological Society Press.
- Koike, M., Fujita, M., Nagao, H., & Ohshima, S. (1996). Random amplified polymorphic DNA analysis of Japanese isolates of *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum*. *Plant Dis*, *80*, 1224–1227.
- Korolev, N., Katan, J., & Katan, T. (2000). Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in Israel: their distribution and association with pathogenicity. *Phytopathology*, *90*, 529–566.
- Korolev, N., Katan, J., & Katan, T. (2009). Physiological races and vegetative compatibility groups among *Verticillium dahliae* isolates from tomato in Israel. *Acta Hort*, *808*, 57–64.
- Korolev, N., Pérez-Artés, E., Mercado-Blanco, J., Bejarano-Alcázar, J., Rodríguez-Jurado, D., Jiménez-Díaz, R. M., et al. (2008). Vegetative compatibility of cotton-defoliating *Verticillium dahliae* in Israel and its pathogenicity to various crop plants. *Eur J Plant Pathol*, *122*, 603–617.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc*, *47*, 583–621.
- Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variances. In I. Olkin et al. (Eds.), *Contributions to probability and statistics: essays in honor of Harold Hotelling* (pp. 278–292). Stanford: Stanford University Press.
- Ligoxigakis, E. K., & Markakis, E. A. (2012). Incidence and pathogenicity of races and isolates of *Verticillium dahliae* in Crete, southern Greece. *Phytoparasitica*, *40*, 493–506.
- Ligoxigakis, E. K., & Vakalounakis, D. J. (1994). The incidence and distribution of races of *Verticillium dahliae* in Crete. *Plant Pathol*, *43*, 755–758.
- Maruthachalam, K., Atallah, Z. K., Vallad, G. E., Klosterman, S. J., Hayes, R. J., Davis, R. M., et al. (2010). Molecular variation among isolates of *Verticillium dahliae* and polymerase chain reaction-based differentiation of race. *Phytopathology*, *100*, 1222–1230.
- Mingochi, D. S., & Clarkson, J. M. (1994). Pathogenicity of race-1 and race-2 tomato wilt isolates of *Verticillium dahliae* to four solanaceous and two non-solanaceous hosts. *J Phytopathol*, *141*, 225–232.
- Pantou, M. P., Strunnikova, O. K., Shakhnazarova, V. Y., Vishnevskaya, N. A., Papalouka, V. G., & Typas, M. A. (2005). Molecular and immunochemical phylogeny of *Verticillium* species. *Mycol Res*, *109*, 889–902.
- Pegg, G. F. (1974). *Verticillium* diseases. *Rev Plant Pathol*, *53*, 157–182.
- Pegg, G. F., & Brady, B. L. (2002). *Verticillium wilts*. New York: CABI Publishing.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Strausbaugh, C. A., Schroth, M. N., Weinhold, A. R., & Hancock, J. G. (1992). Assessment of vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* tester strains and isolates from California potatoes. *Phytopathology*, *82*, 61–68.
- Typas, M. A. (1983). Heterokaryon incompatibility and inter-specific hybridization between *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae* following protoplast fusion and micro-injection. *J Gen Microbiol*, *129*, 3043–3056.
- Typas, M. A., Griffen, A. M., Bainbridge, B. W., & Heale, J. B. (1992). Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and sub-species populations in the genus *Verticillium*. *FEMS Microbiol Lett*, *95*, 157–162.
- Usami, T., Ishigaki, S., Takashina, H., Matsubara, Y., & Amemiya, Y. (2007). Cloning of DNA fragments specific to the pathotype and race of *Verticillium dahliae*. *J Gen Plant Pathol*, *73*, 89–95.
- Usami, T., Itoh, M., & Amemiya, Y. (2009). Asexual fungus *Verticillium dahliae* is potentially heterothallic. *J Gen Plant Pathol*, *75*, 422–427.
- Usami, T., Shishido, M., Ebihara, Y., Kamigahira, Y., & Amemiya, Y. (2005). Retrotransposon-like elements in the genome of *Verticillium dahliae* may be used as DNA markers for fungal species and pathotypes. *J Gen Plant Pathol*, *71*, 117–123.
- Zeise, K., & von Tiedemann, A. (2001). Morphological and physiological differentiation among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *V. longisporum*. *J Phytopathol*, *149*, 469–475.

Structural and phylogenetic analysis of the rDNA intergenic spacer region of *Verticillium dahliae*

Ioannis A. Papaioannou, Chrysoula D. Dimopoulou & Milton A. Typas

Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Correspondence: Milton A. Typas, Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis 15701, Athens, Greece. Tel.: +30 210 7274633; fax: +30 210 7274318; e-mail: matypas@biol.uoa.gr

Received 21 May 2013; revised 8 July 2013; accepted 8 July 2013. Final version published online 29 July 2013.

DOI: 10.1111/1574-6968.12215

Editor: Tim Daniell

Keywords

IGS sequences; molecular differentiation tools; VCG discrimination; VCG phylogenetic relationships.

Introduction

Verticillium dahliae is a cosmopolitan soil-borne ascomycete causing wilt diseases on more than 400 agronomically important plant species. A thorough understanding of its population biology is predicted to facilitate disease management (Pegg & Brady, 2002; Atallah *et al.*, 2010). Numerous studies have classified isolates of *V. dahliae* into vegetative compatibility groups (VCGs) 1, 2, 3, 4, and 6 (of these, VCGs 1, 2, and 4 have been further subdivided depending on the vigor of heterokaryotic reactions). Because no sexual stage has ever been observed for *Verticillium* species, these fungi are predicted to exchange genetic material only through heterokaryon formation and the parasexual cycle, and thus, different VCGs can be assumed to represent genetically isolated intraspecific groups (Rowe, 1995; Katan, 2000; Bhat *et al.*, 2003; Jiménez-Díaz *et al.*, 2006). Although VCG classification is a convenient tool for the characterization of diversity in fungal populations, it is insufficient for the determination of genetic relatedness between isolates of *V. dahliae*, due to inherent methodological limitations, the small number of VCGs

Abstract

The nuclear ribosomal intergenic spacer (IGS) region was structurally analyzed and exploited for molecular discrimination and phylogenetic analysis of vegetative compatibility groups (VCGs) of *Verticillium dahliae*. A structural study of 201 available IGS sequences of the fungus was performed, and four classes of ubiquitous repetitive elements, organized in higher-order repetitive structures or composite blocks, were detected in a variable IGS subregion. This subregion was amplified from an international collection of 59 *V. dahliae* isolates covering all VCGs, together with nine representative *V. albo-atrum* and *V. longisporum* isolates, and sequenced. Structural and phylogenetic analyses of the sequences of this polymorphic IGS subregion were consistently informative and allowed the identification of two main lineages in *V. dahliae*, that is, clade I including VCGs 1A, 1B, 2A, 4B, and 3 and clade II containing VCGs 2B, 4A, and 6. Analysis of IGS sequences proved a highly suitable molecular tool for (a) rapid interspecific differentiation, (b) intraspecific discrimination among VCGs of *V. dahliae*, facilitating high-throughput VCG confirmation and prediction/profiling, and (c) phylogenetic analysis within and among *V. dahliae* VCGs.

defined – hence low resolution for *V. dahliae* populations – and the unknown nature of the genetic system governing vegetative incompatibility in this fungus (Joaquim & Rowe, 1990; Leslie, 1993; Daayf *et al.*, 1995; Rowe, 1995). In recent years, several molecular techniques including amplified fragment length polymorphism (AFLP) analyses (Collado-Romero *et al.*, 2006), PCR-based molecular marker tools (Collado-Romero *et al.*, 2009; Papaioannou *et al.*, 2013), and multilocus phylogenetic studies (Collado-Romero *et al.*, 2008; Martin, 2010) have been employed to study the genetic relationships within and among VCGs of *V. dahliae*. Notably, individual and even multilocus genealogies provided little resolution at the VCG level, due to the very low level of polymorphism observed in the DNA regions that were investigated (Collado-Romero *et al.*, 2008). Thus, sequences of novel DNA regions that provide more phylogenetic information and better discriminatory resolution for VCGs are needed for the reliable high-throughput characterization of *V. dahliae* populations at the VCG level.

The nuclear ribosomal RNA gene complex (rDNA) has been the most popular genetic region used for fungal

species discrimination and phylogenetics. However, no significant variability has been detected within the small and large ribosomal subunit RNA genes in *V. dahliae* populations, and the internal transcribed spacer (ITS) region is remarkably conserved among VCGs of the fungus (Pramateftaki *et al.*, 2000; Collado-Romero *et al.*, 2008; Papaioannou *et al.*, 2013). In contrast, the intergenic spacer (IGS) region was shown to be highly polymorphic even at the intraspecific level for several fungi, including *V. dahliae*, thus providing a useful tool for taxonomy and phylogeny (Morton *et al.*, 1995; Pramateftaki *et al.*, 2000; Pantou *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2005; Mbofung *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2013).

The purpose of the present study was to assess whether IGS sequences can be used for high-resolution molecular discrimination and phylogenetic analyses among VCGs of *V. dahliae*. To this end, a structural study of publicly available IGS sequences from *V. dahliae* isolates was performed, and the most variable IGS subregion was determined. This subregion was amplified from a collection of diverse *V. dahliae* isolates covering all VCGs, sequenced, and structurally and phylogenetically analyzed. We demonstrate here that IGS analysis is a highly suitable molecular tool for VCG prediction and profiling of *V. dahliae* populations, as well as for phylogenetic studies of the fungus.

Materials and methods

Fungal isolates and culture conditions

The IGS sequences of 201 *V. dahliae* isolates from different hosts and geographic origins (Table S1), of which the VCGs of only 11 isolates were known, were retrieved from GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA; website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and used for structural analysis. The IGS sequences of 59 *V. dahliae* (from diverse VCGs, host sources, and origins), four *V. albo-atrum*, and five *V. longisporum* isolates were employed in this work for VCG-related structural and phylogenetic analyses (Table 1). The maintenance of monoconidial cultures of all isolates and the culture conditions have been described previously (Papaioannou *et al.*, 2013).

DNA extraction, PCR, cloning, and sequencing

Total DNA of all isolates was extracted according to Typas *et al.* (1992) and stored at -20°C until further use. The IGS rDNA of each isolate was amplified with PCR using primers CNL12 and CNS1 (White *et al.*, 1990) and Kapa HiFi DNA polymerase (Kapa Biosystems, Woburn, MA), according to the manufacturer's suggestions and

procedures described previously (Papaioannou *et al.*, 2013). Because direct sequencing of PCR amplicons occasionally produced sequences of unsatisfactory quality during preliminary experiments (probably due to the *in vitro* formation of secondary structures or the presence of multiple IGS haplotypes within individuals), a cloning strategy was adopted. In detail, all PCR products were recovered from agarose gels, purified with the NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany), and cloned using the CloneJET PCR cloning kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). For each isolate, five bacterial clones were picked up after transformation and checked for insert size with colony PCR using universal vector primers, according to the manufacturer's suggestions. A single clone exhibiting the anticipated insert size was selected for bidirectional sequencing. Plasmids were purified using the NucleoSpin Plasmid kit (Macherey–Nagel) before used as templates for sequencing reactions. Automated sequencing (based on the Sanger method) was carried out according to Papaioannou *et al.* (2013) with primers VdIGSpF2 (5'-TCAATTCCCGGG TAGGTGGTCTCT-3') and VdIGSpR (5'-ACGCCGCT GCAGCCGAAAGT-3'), which anneal to conserved sites of the IGS region. All sequences were deposited at the GenBank database (NCBI), with accession numbers KC152269–KC152319.

Structural and phylogenetic analyses

Deposited DNA sequences were retrieved from GenBank (NCBI), and DNA similarity searches were performed with Basic Local Alignment Search Tool (BLAST 2.2.27+; Altschul *et al.*, 1997). Multiple alignments of nucleotide sequences were prepared using the MUSCLE algorithm as implemented in MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011), with minor manual editing after visual inspection. The program GENEQUEST of the software package Lasergene 6 (DNASTAR, Madison, WI) was used for structural analysis of the IGS rDNA region. Phylogenetic analysis was performed using the maximum-likelihood (ML) method in software MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) and the Bayesian inference (BI) method in program MRBAYES 3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2012). The Bayesian information criterion and the corrected Akaike information criterion scores were evaluated for selection of the substitution model best fitting the dataset for ML analysis (Tamura's three-parameter model with invariant sites) in MEGA 5.05. Reliability of nodes of the topologies was assessed by bootstrap analysis based on 1000 replications. For BI analysis, random starting trees were used, and the burn-in period was set to 500 000 generations as this was found to be clearly sufficient for the likelihood and the model parameters to reach equilibrium. After the burn-in

Table 1. *Verticillium* isolates used in this study for VCG-related analyses of the IGS subregion P, with code names, VCGs, original hosts, geographic origins (sources), and GenBank accession numbers

Isolate code	VCG*	Original host	Geographic origin (source [†])	GenBank accession number
<i>V. dahliae</i>				
Gh.101	1	Cotton	CA, USA (G)	DQ165203
T9	1A	Cotton	CA, USA (A)	KC152269
V44	1A	Cotton	TX, USA (A)	KC152270
cotVd03	1A	Cotton	Turkey (B)	KC152271
cotVd47	1A	Cotton	Turkey (B)	KC152272
V661I (328 v-1)	1B	Cotton	Greece (C)	KC152273
V666I (347 v-1)	1B	Cotton	Greece (C)	KC152274
Le.112	2	Tomato	CA, USA (G)	FJ931480
Ls.7	2	Lettuce	CA, USA (G)	DQ165207
Cs.80	2	Artichoke	CA, USA (G)	DQ165201
Cv.85	2	Watermelon	CA, USA (G)	DQ165240
PH	2A	Pistachio	CA, USA (A)	KC152275
179-4	2A	Melon	Greece (D)	KC152276
164-1	2A	Tomato	Greece (D)	KC152277
98-1	2A	Tomato	Greece (D)	KC152278
cotVd04	2A	Cotton	Turkey (B)	KC152279
V54	2B	Pepper	Austria (E)	KC152280
115	2B	Cotton	Syria (A)	KC152281
cot274	2B	Cotton	Israel (F)	KC152282
449-2	2B	Broccoli	Greece (C)	KC152283
V38	2B	Sunflower	Germany (E)	KC152284
V49	2B	Pepper	Austria (E)	KC152285
V57	2B	Strawberry	Germany (E)	KC152286
V613I	2B	Artichoke	Spain (C)	KC152287
Ls.17	2B	Lettuce	CA, USA (G)	KC152288
124-8	2B (1)	Tomato	Greece (D)	KC152289
997-1	2B (2A)	Eggplant	Greece (D)	KC152290
150-5	2B (2A, 4A)	Tomato	Greece (D)	KC152291
999-1	2B (4A, 4B)	Eggplant	Greece (D)	KC152292
302-1	2B (2A)	Tomato	Greece (D)	KC152293
530-1	2B (2A)	Pepper	Greece (D)	KC152294
25V (SS4)	2AB (1, 4A)	Cotton	USA (H)	KC152295
70-21	3	Pepper	AZ, USA (A)	KC152296
PCW	3	Pepper	CA, USA (A)	KC152297
Ca.59	4	Bell pepper	CA, USA (G)	DQ165195
Le.78	4	Tomato	CA, USA (G)	FJ931478
Le.88	4	Tomato	CA, USA (G)	FJ931479
Le.109	4	Tomato	CA, USA (G)	DQ165238
Sm.113	4	Eggplant	MD, USA (G)	DQ165205
St.91	4	Potato	ID/OR, USA (G)	DQ165231
BB	4A	Potato	ID, USA (A)	KC152298
30-6	4A	Potato	Canada (I)	KC152299
171-4A	4A	Potato	USA (C)	KC152300
V830	4A	Potato	OH, USA (E)	KC152301
S39	4B	Soil	OH, USA (A)	KC152302 (clone B), KC152303 (clone C)
pn4	4B	Peanut	Israel (F)	KC152304
453-1	4B	Vetch	Greece (D)	KC152305
473-1	4B	Summer squash	Greece (D)	KC152306
V684I	4B	Artichoke	Spain (C)	KC152307
V39	4B	Sunflower	Germany (E)	KC152308
451-1	4B (4A)	Lettuce	Greece (D)	KC152309
465-2	4B (4A)	Marigold	Greece (D)	KC152310
802-1	4B (4A)	Olive	Greece (D)	KC152311
467-2	4B (4A)	White top	Greece (D)	KC152312

Table 1. Continued

Isolate code	VCG*	Original host	Geographic origin (source [†])	GenBank accession number
lt1-1	4B (3, 4A)	Lettuce	Greece (D)	KC152313
Ca.83	6	Bell pepper	CA, USA (G)	KC152314
Ca.146	6	Bell pepper	CA, USA (G)	KC152315
Ca.148	6	Bell pepper	CA, USA (G)	KC152316
Cf.38	6	Chili pepper	CA, USA (G)	KC152317
<i>V. albo-atrum</i>				
Ms.102	–	Alfalfa	PA, USA (G)	KC152318
Ms.103	–	Alfalfa	PA, USA (G)	DQ165192
Ms.107	–	Alfalfa	PA, USA (G)	FJ931528
Ms.108	–	Alfalfa	PA, USA (G)	GQ336791
<i>V. longisporum</i>				
Vlon.K12	–	Oilseed rape	Russia (J)	KC152319
Bp.1	–	Napa cabbage	CA, USA (G)	DQ165190
Bob.70	–	Cauliflower	CA, USA (G)	DQ165187
Ar.136	–	Horseradish	IL, USA (G)	DQ165183
Bno.188	–	Oilseed rape	Germany (G)	DQ165185

*For certain *V. dahliae* isolates used in this study, data on 'bridging' behavior (isolates complementing to varying degrees the testers of more than one VCG) were available; these secondary VCG interactions are provided in brackets.

[†]A = R. Rowe, OARDC, The Ohio State University, USA; B = S. Dervis, University of Mustafa Kemal, Turkey; C = M. Jiménez-Gasco, The Pennsylvania State University, USA; D = E. Ligozigakis, Plant Protection Institute, N.A.G.RE.F., Greece; E = A. von Tiedemann, University of Göttingen, Germany; F = T. Katan, The Volcani Center, Israel; G = K. Subbarao, University of California, Davis, USA; H = E. Paplomatas, Agricultural University of Athens, Greece; I = K. Dobinson, University of Western Ontario, Canada & Agriculture and Agri-Food, Canada; J = O. Strunnikova, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Russia.

period, 15 001 trees were sampled from the posterior probability distribution (every 100 cycles) during the sampling period (1 500 000 generations). Two independent MCMCMC (Metropolis-Coupled Markov Chain Monte Carlo) searches were run using different random starting points.

Results

Structural analysis of the IGS region of *V. dahliae* and related species

The IGS sequences of 201 *V. dahliae* isolates available at the GenBank database were retrieved and aligned (Table S1). A pronounced length variation was observed, as complete sequences ranged in size from 1212 to 1968 bp. Based on the distribution of polymorphisms along the multiple sequence alignment, three distinct subregions were identified: a central, highly polymorphic subregion P (nucleotide positions 361–1189 with regard to the IGS sequence of *V. dahliae* isolate Ls.17; genome sequenced, Broad Institute, at http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html), flanked by two highly conserved subregions, C1 (nucleotides 1–360) and C2 (nucleotides 1190–1801), as shown in Fig. 1a. Sequence conservation ranged between 95.3% and 100% (pairwise identities) for subregion C1 and 97.8% and 100% for C2. Sequence polymorphism in these two

conserved subregions was due mainly to evenly scattered single-base substitutions (with transitions being twofold more frequent than transversions for both subregions) and, to a lesser extent, few small (mainly 1- to 2-bp) insertions/deletions (indels). Subregion P was less conserved (percentages of pairwise identities as low as 83.0% were identified) and was characterized by a multitude of indels of varying sizes as well as several point mutations.

A structural analysis of the IGS sequences (derived from *V. dahliae* isolates of different original hosts and geographic origins) revealed the ubiquitous presence of four repetitive elements, organized in different patterns as interwoven sets of repeats (Fig. 1b and c). The most commonly encountered element was an 18-bp imperfect repeat (element R) found in all sequences examined, in five to 14 copies. All R copies were direct repeats, apart from the first, imperfect inverted copy (R'), which was located in subregion C1 (nucleotide 266). The first direct R copy (nucleotide 360) was invariably located at the beginning of the polymorphic subregion P, while a pair of successive R copies could be identified in the 3' region of this subregion (nucleotide 964) in most sequences. Although the majority of R copies were perfectly conserved among all sequences, a number of sequence variants were also identified (Fig. 1d). In addition to the R repeats, three more classes of short repetitive elements with highly conserved sequences were identified, namely A (17 bp; imperfect direct repeats, found in one to four

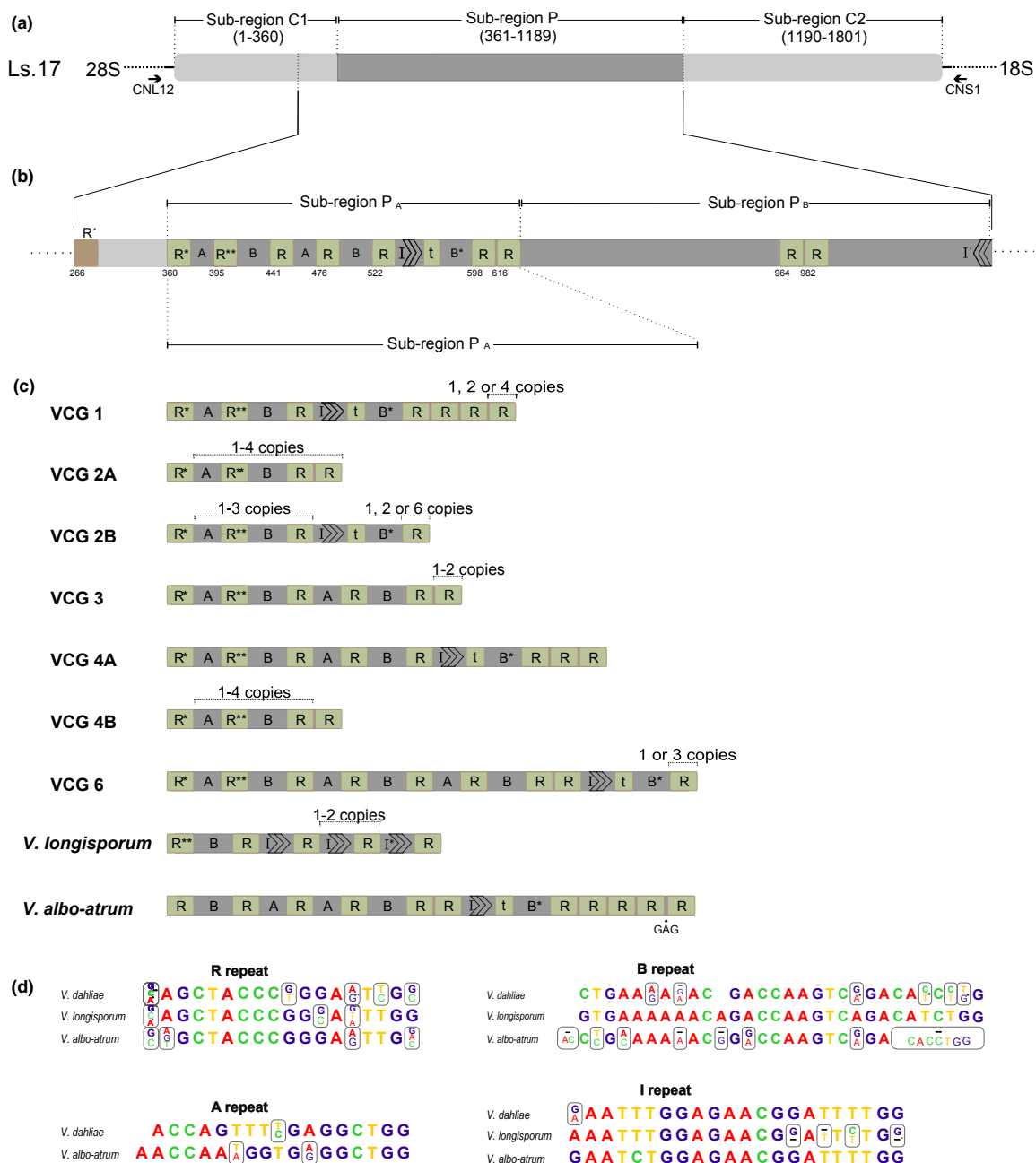


Fig. 1. (a) Diagrammatic representation of the nuclear rDNA IGS region of *Verticillium dahliae* isolate Ls.17, divided into subregions C1, P, and C2, with corresponding nucleotide positions indicated in parentheses. The arrows below the bar indicate the annealing positions of PCR primers CNL12 and CNS1, within the extremities of the 28S and 18S rRNA genes, respectively. (b) Organization of direct and inverted repetitive elements R, A, B, and I in the IGS polymorphic subregion P of *V. dahliae* Ls.17. The division of subregion P into two areas (P_A and P_B) is shown above the bar, while nucleotide start positions of R copies are provided below the bar. Asterisks next to the designations of R and B elements indicate sequence variants of them; the corresponding sequences are shown in Fig. 1d. (c) Consensus structural organization of IGS subregion P (area P_A) sequences of different *V. dahliae* VCGs and *V. albo-atrum* and *V. longisporum* isolates. The asterisk next to the I element's designation indicates a sequence variant of it; the corresponding sequence is shown in Fig. 1d. Area P_B is not included because it has the same structural organization in all isolates. (d) Sequences of repetitive elements R, A, B, and I and their variants present in isolates of the three *Verticillium* species examined. For each element, the sequences identified in *V. dahliae*, *V. albo-atrum*, and *V. longisporum* isolates are provided. All polymorphic positions are indicated with boxes; in each box, the upper base is the one most frequently encountered in the population, whereas substitutions present in sequence variants in one or more isolates are provided below. Asterisks next to bases in polymorphic sites correspond to variants of the elements as presented in Fig. 1b and c. Single- or multibase deletions are indicated with dashes.

copies), B (28 bp; imperfect direct repeats, one to four copies), and I (21–22 bp; a pair of perfect inverted repeats) (Fig. 1b–d). Elements R, A, and B were ubiquitously found in all isolates tested, whereas element I was identified in most of them. Interestingly, the four classes of repetitive elements were often associated in higher-order sequence repetitions (e.g. the structure R-A-R-B was identified in all sequences, in one to four consecutive iterations, as a large 81-bp repetitive element), or in long conserved composite blocks (e.g. the first I inverted repeat, whenever present, was always followed by a truncated form of the R element (t), then by a B repeat, and by at least one R copy: I-t-B-R) (Fig. 1b and c). The size variation observed among IGS sequences was mainly due to the varying numbers of the four short conserved repetitive elements, within the boundaries of the P subregion. Based on the distribution of such repetitive elements, subregion P could be divided into two distinct characteristic areas, P_A and P_B. Area P_A extended from the first direct R copy (nucleotide 360) to the last block of R copies in a successive row of repetitive elements (nucleotide 634), and area P_B followed P_A as far as the 3' end of subregion P (Fig. 1b and c). Area P_B contained only a pair of successive R copies (nucleotide 964) and the second I inverted repeat at its 3' end, thus being the most conserved DNA stretch within subregion P.

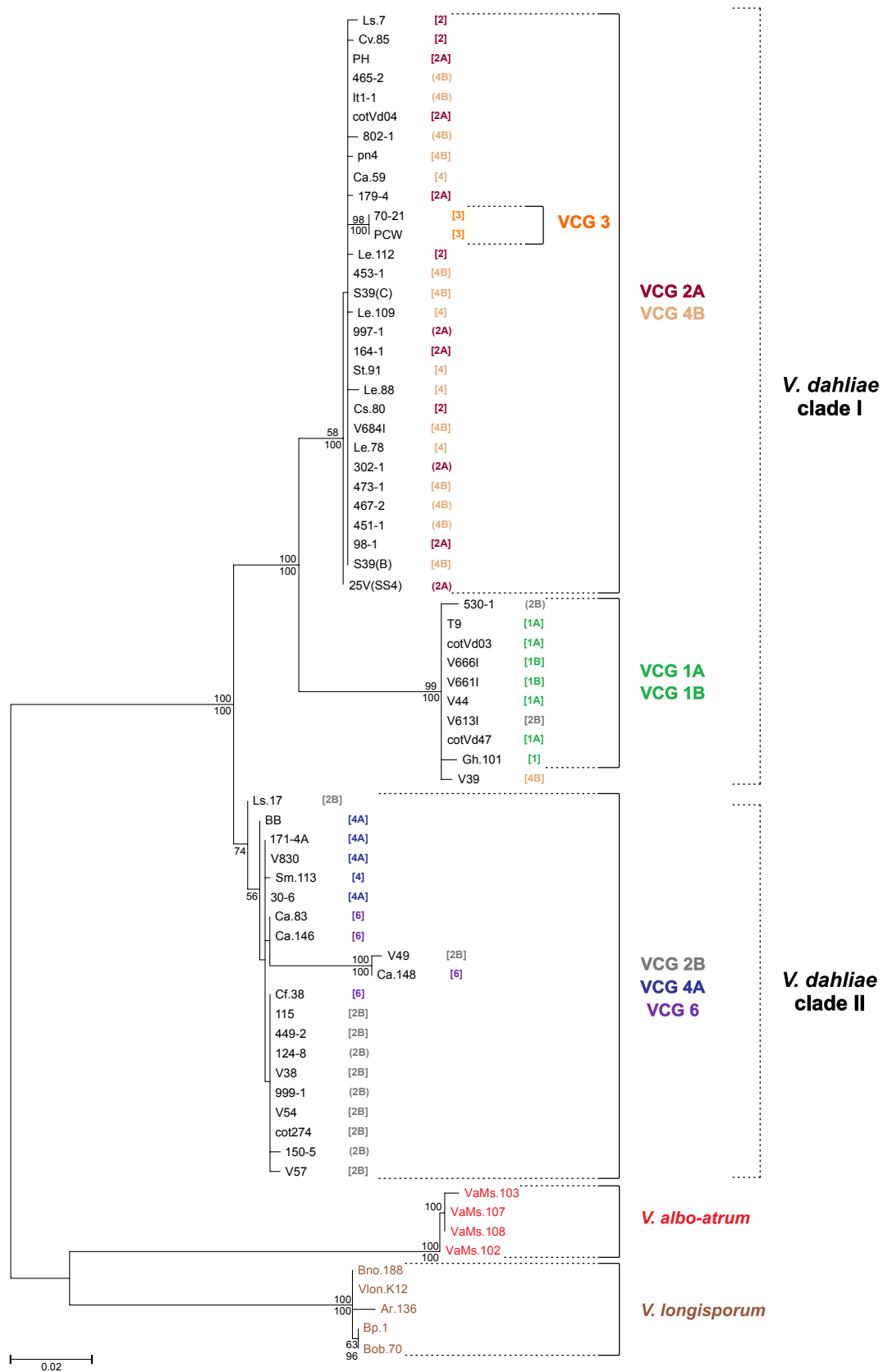
When the IGS sequences of four representative *V. albo-atrum* and five *V. longisporum* isolates were added to the analysis (Table 1), it became evident that the three species shared a common structural organization (Fig. 1c), consisting of variants of the same repetitive elements described for *V. dahliae* (Fig. 1d). Elements R and I were well conserved, while A and B repeats were more divergent. In comparison with *V. dahliae*, *V. albo-atrum* isolates had a higher level of R element repetition in subregion P, with 14 direct almost perfect copies and another truncated iteration. All *V. longisporum* strains shared a unique organization of the same subregion, although isolated from different hosts and distant geographic origins. The first conserved direct R copy was followed by a sequence variant of element B, to be then followed by three to four iterations of an R-I motif (Fig. 1c). The rest of the elements, that is, the conserved pair of R direct repeats in the 3' region of the subregion P and the downstream inverted copy of element I, were organized in the same way as in *V. dahliae* isolates.

Structural and phylogenetic analysis of IGS subregion P sequences among VCGs of *V. dahliae*

The IGS subregion P sequences of all isolates listed in Table 1 (covering all *V. dahliae* VCGs) were obtained, structurally analyzed, and used for phylogenetic analysis. Isolates within each VCG subgroup were structurally similar, while characteristic differences were observed among different VCG subgroups (Fig. 1c). Isolates belonging to VCGs 2A, 4B, and 3 shared a common organization of R-A-R-B iterations in their IGS sequences. On the other hand, isolates from VCGs 1, 2B, 4A, and 6 were characterized by an additional I-t-B*-R block (with B* corresponding to a particular sequence variant of element B; Fig. 1d). A R₍₄₋₈₎ box was unique to all members of VCG 1. The only apparent contradiction to this classification was isolate V39 with an I-t-B*-R block (albeit VCG 4B). VCG 2B was the most polymorphic VCG subgroup, with isolates 530-1, V613I, and V49 exhibiting unusual copy numbers of the R element or the R-A-R-B structure.

The phylogeny produced with IGS subregion P sequence analysis was generally consistent with the structural study. Two main intraspecific clades were distinguished (I and II) with excellent phylogenetic support, with the former including isolates from VCGs 2A, 4B, 3, and 1 and the latter consisting of isolates from VCGs 2B, 4A, and 6 (Fig. 2). Clade I was further unambiguously subdivided into two subclades, one of them encompassing all VCG 1 isolates (of both subgroups 1A and 1B), distinctly from VCGs 2A, 4B, and 3 (grouped in the other subclade). Isolate V39 (VCG 4B), which was structurally different in the IGS subregion P from the other VCG 4B strains, grouped with VCG 1 isolates rather than the 2A/4B subclade. The two isolates of VCG 3 were placed within the 2A/4B subclade. In clade II, a trend of distinction among VCGs 2B, 4A, and 6 was also observed, although it was only moderately supported by phylogenetic analysis (Fig. 2). VCG 2B was the most heterogeneous group, with the structurally aberrant isolates 530-1 and V613I grouping with VCG 1, in clade I. To exclude the possibility of previous misclassification of these exceptional isolates in VCGs (V39, 530-1, and V613I), we repeated their VCG assignment using international tester strains, and their original classification was indeed verified (data not shown).

Fig. 2. Phylogenetic tree derived from ML analysis of the IGS subregion P sequences (based on a sequence dataset of 1144 bp including gaps) of 68 *Verticillium* isolates (MEGA 5.05 software). ML bootstrap support values above 50% (upper numbers) calculated from 1000 replicates and BI posterior probabilities (lower numbers) produced over 1 500 000 generations (MRBAYES 3.2.1) are shown at nodes. Next to each isolate's code, the VCG classification of the isolate is provided in square brackets or in parentheses for those 'bridging' isolates reacting with the testers of more than one VCG (Table 1). On the right of the figure, the grouping of isolates according to VCGs and main clades (for *V. dahliae*) or species (for *V. albo-atrum* and *V. longisporum*) is indicated.



Two IGS length variants, clones S39(B) and S39(C), were detected in the case of isolate S39 (VCG 4B) during our cloning experiments, clearly indicating heterogeneity of the IGS region in this isolate. The sequences were identical except for the presence of an additional R-A-R-B box in the larger variant (C). The grouping of both sequences in the phylogenetic tree was the same, together with the majority of VCG 4B isolates. Ten of the *V. dahliae* isolates tested for which only main VCG assignments were available (i.e. VCGs 2 and 4, but unknown VCG subgroups; Table 1) were all unambiguously placed in tree clades that were associated with specific subgroups of these VCGs. Similarly, for twelve of the isolates analyzed, which are known to establish heterokaryons with the testers of more than one VCG subgroup ('bridging' strains; Table 1), grouping with only one of their compatible VCG clades was achieved. Overall, the IGS phylogeny-derived grouping of *V. dahliae* isolates was irrespective of host source and geographic origin. Finally, when four *V. albo-atrum* and five *V. longisporum* isolates were added to the analysis, excellent discrimination was achieved among the three plant pathogenic *Verticillium* species (Fig. 2).

Discussion

Comparative analysis of the nuclear rDNA IGS region of *V. dahliae* allowed the identification of a highly polymorphic subregion (P), flanked by two more conserved areas (C1 and C2). This organization putatively reflects the different functioning of these subregions, with the highly conserved subregions probably accommodating functions related to rRNA production and processing, while the most polymorphic subregion P might be responsible for the promotion of unequal crossing-over events and the maintenance of homogeneity between rDNA complexes (Pramateftaki *et al.*, 2000; Ganley & Kobayashi, 2011). Novel alterations in the IGS region are predicted to spread to neighboring spacer regions through the mechanisms of concerted evolution, by means of unequal chromatid exchange and biased gene conversion (Eickbush & Eickbush, 2007). A prediction of this model would be the presence of IGS variants in the same nucleus, at detectable frequencies, corresponding to intermediates in the process of slow homogenizing concerted evolution (Ganley & Scott, 2002). Indeed, although only five clones were checked for insert presence prior to sequencing, two length variants were detected in the case of isolate S39, differing from each other in the number of R-A-R-B iterations. It is, thus, hypothesized that this conserved repetitive box participates in the generation of polymorphism in the IGS region. The four classes of repetitive elements that were

identified, ubiquitous, and conserved among the three *Verticillium* species tested may constitute key factors of this mechanism. The extended heterogeneity in the IGS of *V. dahliae* should be taken into consideration when this region is used for the development of assays for detection and quantification (Bilodeau *et al.*, 2012), as it might reduce the accuracy of such practical tools.

Structural and phylogenetic analyses of the polymorphic IGS subregion P sequences confirmed that isolates within VCGs are molecularly similar, regardless of original host and geographic origin, in agreement with Collado-Romero *et al.* (2006). A clear division of *V. dahliae* into two intraspecific lineages was demonstrated, with clade I encompassing VCGs 1, 2A, 4B, and 3, whereas clade II included VCGs 2B, 4A, and 6. Remarkably, this grouping of VCGs was essentially the same as these produced before with multilocus sequencing, AFLP fingerprinting, and mitochondrial haplotype analyses (Collado-Romero *et al.*, 2008; Martin, 2010). Therefore, it was verified that even though it is based on a single DNA locus, the IGS polymorphic area-based method that we tested here produces a highly congruent phylogenetic profile with that known from previous comprehensive analyses of the fungus and can be used to reliably depict phylogenetic relations among VCGs. Moreover, because analysis of the whole IGS region of representative VCG tester strains led to an identical phylogeny (data not shown), sequencing of only the polymorphic subregion P significantly reduces the required amount of sequencing needed for an extended fungal population and, thus, is a practical tool for high-throughput population profiling purposes. An exception to this general congruence between the different methods was VCG 1, which was grouped externally to the rest of the intraspecific phylogeny in previous studies. A future study of *V. dahliae* VCGs with a more diverse collection of VCG 1 isolates may clarify the genetic relationships of VCG 1 with other VCGs, as well as distinguish between its subgroups, which remained undifferentiated with IGS analysis conducted here.

Isolates from VCGs 2A and 4B structurally and phylogenetically grouped together (in clade I) and distinctly from their 'sister' VCG subgroups 2B and 4A, respectively. The latter subgroups were also closely related to each other (in clade II). The clear differentiation of VCG 2A from 2B and VCG 4A from 4B is in agreement with previous observations (Collado-Romero *et al.*, 2006, 2008; Martin, 2010; Papaioannou *et al.*, 2013). Thus, based on the genetic relationships inferred from this pattern, it is proposed that main VCGs 2 and 4 are not genetically meaningful, and their use in future VCG classification studies should be reconsidered. Similarly, previous observations of cross-reactions of VCG 3 isolates with subgroups of VCG 4 (Strausbaugh *et al.*, 1992), which

possibly account for the rare report of such isolates from populations of the fungus and their omission from most phylogenetic studies, together with our finding that the only two available representative isolates were not differentiated from the VCG 2A/4B subclade, suggest altogether that this VCG may actually be an artifact of the methodology used for vegetative compatibility grouping and, thus, of limited utility in the population genetics of *V. dahliae*. Furthermore, Collado-Romero *et al.* (2008) previously concluded that VCG 2B is polyphyletic, based on multilocus and AFLP fingerprinting analyses. In agreement with that study, some heterogeneity was also observed in the collection tested here for VCG 2B as well as, to a lesser extent, within VCG 4B, with aberrant isolates grouping in the VCG 1-related subclade (clade I). Finally, the three VCG 6 isolates from bell pepper (Ca.83, Ca.146, and Ca.148) grouped together within cluster II, whereas the sole chili pepper VCG 6 isolate (Cf.38) was placed with the majority of VCG 2B isolates in the same cluster. This may be attributed to some restricted host-related isolation, as strains from the two pepper varieties have also been shown to differ in other molecular characteristics (I.A. Papaioannou & M.A. Typas, unpublished data).

In addition to its contribution to the phylogenetic study of VCGs, the IGS analysis has great potential to facilitate intra- and interspecific differentiation of *Verticillium* species. Within *V. dahliae*, we showed that IGS analysis is very useful for confirmation/disambiguation (e.g. for VCG 'bridging' isolates), for prediction (e.g. for isolates that have been only partially VCG assigned), and thus for profiling of *V. dahliae* VCG classification on large-scale analyses. Moreover, the clear discrimination achieved among the three plant pathogenic *Verticillium* species with sequence analysis of only one genetic locus (IGS subregion P) renders this method a suitable candidate for rapid and accurate interspecific discrimination.

Acknowledgements

The authors wish to thank all individuals listed in the footnote of Table 1 for providing fungal isolates used in this study. I.A.P. and this research have been cofinanced by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program 'Education and Lifelong Learning' of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

References

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and

- PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Atallah ZK, Maruthachalam K, du Toit L, Koike ST, Davis RM, Klosterman SJ, Hayes RJ & Subbarao KV (2010) Population analyses of the vascular plant pathogen *Verticillium dahliae* detect recombination and transcontinental gene flow. *Fungal Genet Biol* **47**: 416–422.
- Bhat RG, Smith RF, Koike ST, Wu BM & Subbarao KV (2003) Characterization of *Verticillium dahliae* isolates and wilt epidemics of pepper. *Plant Dis* **87**: 789–797.
- Bilodeau GJ, Koike ST, Uribe P & Martin FN (2012) Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology* **102**: 331–343.
- Collado-Romero M, Mercado-Blanco J, Olivares-García C, Valverde-Corredor A & Jiménez-Díaz RM (2006) Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology* **96**: 485–495.
- Collado-Romero M, Mercado-Blanco J, Olivares-García C & Jiménez-Díaz RM (2008) Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups. *Phytopathology* **98**: 1019–1028.
- Collado-Romero M, Berbegal M, Jiménez-Díaz RM, Armengol J & Mercado-Blanco J (2009) A PCR-based "molecular tool box" for *in planta* differential detection of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups infecting artichoke. *Plant Pathol* **58**: 515–526.
- Daayf F, Nicole M & Geiger J-P (1995) Differentiation of *Verticillium dahliae* populations on the basis of vegetative compatibility and pathogenicity on cotton. *Eur J Plant Pathol* **101**: 69–79.
- Eickbush TH & Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* **175**: 477–485.
- Ganley ARD & Kobayashi T (2011) Monitoring the rate and dynamics of concerted evolution in the ribosomal DNA repeats of *Saccharomyces cerevisiae* using experimental evolution. *Mol Biol Evol* **28**: 2883–2891.
- Ganley ARD & Scott B (2002) Concerted evolution in the ribosomal RNA genes of an *Epichloë* endophyte hybrid: comparison between tandemly arranged rDNA and dispersed 5S rrn genes. *Fungal Genet Biol* **35**: 39–51.
- Hong SG, Liu D & Pryor BM (2005) Restriction mapping of the IGS region in *Alternaria* spp. reveals variable and conserved domains. *Mycol Res* **109**: 87–95.
- Jiménez-Díaz RM, Mercado-Blanco J, Olivares-García C, Collado-Romero M, Bejarano-Alcázar J, Rodríguez-Jurado D, Giménez-Jaime A, García-Jiménez J & Armengol J (2006) Genetic and virulence diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting artichoke in eastern-central Spain. *Phytopathology* **96**: 288–298.
- Joaquim TR & Rowe RC (1990) Reassessment of vegetative compatibility relationships among strains of *Verticillium*

- dahliae* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology* **80**: 1160–1166.
- Katan T (2000) Vegetative compatibility in populations of *Verticillium* – an overview. Advances in *Verticillium*: research and disease management. *Proceedings of the 7th International Verticillium Symposium* (Tjamos EC, Rowe RC, Heale JB & Fravel DR, eds), pp. 69–86. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Leslie JF (1993) Fungal vegetative compatibility. *Annu Rev Phytopathol* **31**: 127–150.
- Martin FN (2010) Mitochondrial haplotype analysis as a tool for differentiating isolates of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **100**: 1231–1239.
- Mbofung GY, Hong SG & Pryor BM (2007) Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- α , and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. *Phytopathology* **97**: 87–98.
- Morton A, Tabrett AM, Carder JH & Barbara DJ (1995) Sub-repeat sequences in the ribosomal RNA intergenic regions of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. *Mycol Res* **99**: 257–266.
- Pantou MP, Mavridou A & Typas MA (2003) IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fungal Genet Biol* **38**: 159–174.
- Papaioannou IA, Ligozigakis EK, Vakalounakis DJ, Markakis EA & Typas MA (2013) Phytopathogenic, morphological, genetic and molecular characterization of a *Verticillium dahliae* population from Crete, Greece. *Eur J Plant Pathol* **136**: 577–596.
- Pegg GF & Brady BL (2002) *Verticillium Wilts*. CABI Publishing, New York, NY.
- Pramateftaki PV, Antoniou PP & Typas MA (2000) The complete DNA sequence of the nuclear RNA gene complex of *Verticillium dahliae*: intraspecific heterogeneity within the intergenic spacer region. *Fungal Genet Biol* **29**: 19–27.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA & Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* **61**: 539–542.
- Rowe RC (1995) Recent progress in understanding relationships between *Verticillium* species and subspecific groups. *Phytoparasitica* **23**: 31–38.
- Strausbaugh CA, Schroth MN, Weinhold AR & Hancock JG (1992) Assessment of vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* tester strains and isolates from California potatoes. *Phytopathology* **82**: 61–68.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731–2739.
- Tran VT, Braus-Stromeier SA, Timpner C & Braus GH (2013) Molecular diagnosis to discriminate pathogen and apathogen species of the hybrid *Verticillium longisporum* on the oilseed crop *Brassica napus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 4467–4483.
- Typas MA, Griffen AM, Bainbridge BW & Heale JB (1992) Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and sub-species populations in the genus *Verticillium*. *FEMS Microbiol Lett* **95**: 157–162.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB & Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ, eds), pp. 315–322. Academic Press, New York, NY.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Sequences of the IGS region of *V. dahliae* isolates used for structural analyses in this study, with code names, original hosts, geographic origins, sizes of the IGS region and GenBank accession numbers.

“Cryptic” group-I introns in the nuclear SSU-rRNA gene of *Verticillium dahliae*

Ioannis A. Papaioannou · Chrysoula D. Dimopoulou · Milton A. Typas

Received: 13 August 2013/Revised: 24 October 2013/Accepted: 6 November 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Group-I introns are widespread—though irregularly distributed—in eukaryotic organisms, and they have been extensively used for discrimination and phylogenetic analyses. Within the *Verticillium* genus, which comprises important phytopathogenic fungi, a group-I intron was previously identified in the SSU-rRNA (18S) gene of only *V. longisporum*. In this work, we aimed at elucidating the SSU-located intron distribution in *V. dahliae* and other *Verticillium* species, and the assessment of heterogeneity regarding intron content among rDNA repeats of fungal strains. Using conserved PCR primers for the amplification of the SSU gene, a structurally similar novel intron (sub-group IC1) was detected in only a few *V. dahliae* isolates. However, when intron-specific primers were used for the screening of a diverse collection of *Verticillium* isolates that originally failed to produce intron-containing SSU amplicons, most were found to contain one or both intron types, at variable rDNA repeat numbers. This marked heterogeneity was confirmed with qRT-PCR by testing rDNA copy numbers (varying from 39 to 70 copies per haploid genome) and intron copy ratios in selected isolates. Our results demonstrate that (a) IC1 group-I introns are not specific to *V. longisporum* within the *Verticillium* genus, (b) *V. dahliae*

isolates of vegetative compatibility groups (VCGs) 4A and 6, which bear the novel intron at most of their rDNA repeats, are closely related, and (c) there is considerable intra-genomic heterogeneity for the presence or absence of introns among the ribosomal repeats. These findings underline that distributions of introns in the highly heterogeneous repetitive rDNA complex should always be verified with sensitive methods to avoid misleading conclusions for the phylogeny of fungi and other organisms.

Keywords Inter-specific molecular differentiation · rDNA copy number · rDNA heterogeneity · Real-time quantitative PCR · VCG discrimination

Introduction

Group-I introns comprise one of the four major classes of introns and catalyze their own cleavage from precursor transcripts by a two-step splicing pathway that relies on an exogenous guanosine cofactor (Haugen et al. 2005). Although conservation at the sequence level is limited, the core of group-I introns is characterized by a conserved structural architecture consisting of 10 paired segments (P1–P10), which are organized in three domains: a structural or scaffolding domain (P4–P6), a substrate domain (P1, P10) and a catalytic domain (P3, P7 and P8) (Michel and Westhof 1990; Woodson 2005; Vicens et al. 2008; Nielsen and Johansen 2009). Based on secondary structure characteristics, group-I introns are classified into five groups (IA–IE), which are further sub-divided into 14 sub-groups (Li and Zhang 2005; Vicens et al. 2008). Group-I introns are frequently encountered in the nuclear and organelle genomes of eukaryotes, particularly of fungi, plants, and algae, whereas they are rare in viruses, bacteria,

Communicated by S. Hohmann.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00294-013-0417-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. A. Papaioannou · C. D. Dimopoulou · M. A. Typas (✉)
Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology,
National and Kapodistrian University of Athens,
Panepistimiopolis, 15701 Athens, Greece
e-mail: matypas@biol.uoa.gr

and phages, and absent from the Archaea (Haugen et al. 2005). Nuclear group-I introns of eukaryotic organisms are limited to ribosomal RNA genes, sporadically inserted in at least 47 and 44 different sites in the small (SSU) and large (LSU) subunit rRNA genes, respectively (Cannone et al. 2002). The distribution of group-I introns is generally scattered and irregular, even within a species or among phylogenetically closely related taxa, possibly resulting from the combination of vertical transmission, horizontal transfer (through homing or reverse splicing), and loss events. Particularly in ascomycete fungi, four positions in the SSU (namely Ec516, Ec943, Ec989, and Ec1199 with respect to the *Escherichia coli* SSU-rRNA gene sequence) and four positions in the LSU (namely Ec1921, Ec2066, Ec2449, and Ec2563) harbor, almost exclusively, the identified group-I introns within the rRNA ribosomal repeat (Pantou et al. 2003; Wang et al. 2003). The distribution patterns and the sequences of group-I introns have been widely used in numerous studies aiming at the reconstruction of phylogenetic relationships of fungi and other organisms (Dujon 1989; Bhattacharya et al. 1996, 2005; Hibbett 1996; Nikoh and Fukatsu 2001; Haugen et al. 2005; Hafez et al. 2012).

Verticillium dahliae is an important soil-borne asexual ascomycete causing vascular wilt disease in over 400 plants, including high-value crops, landscape, fruit, and ornamental trees, and shrubs (Pegg and Brady 2002). Isolates of this fungus that are vegetatively compatible are placed in the same vegetative compatibility group (VCG). According to this classification system, VCGs 1, 2, 3, 4, and 6 have been described, and of these, VCGs 1, 2, and 4 have been sub-divided depending on the vigor of compatibility reactions. These compatibility groups have been traditionally regarded as genetically distinct intra-specific sub-groups, which may differ in ecology, physiology, and virulence (Leslie 1993; Katan 2000; Bhat et al. 2003). Apart from *V. dahliae*, the phytopathogenic genus *Verticillium* also encompasses the relative species *V. albo-atrum*, *V. tricorpus* and *V. nubilum* (Klosterman et al. 2009), as well as the ‘nearly diploid’ ascomycete *V. longisporum* (Karapapa et al. 1997). The latter has been recently proposed to have originated by three inter-specific hybridization events (Inderbitzin et al. 2011).

In a previous study, a 839-bp-long group-I intron was found inserted in a highly conserved position (Ec943) of the nuclear SSU gene in 36 of the 38 *V. longisporum* isolates tested, whereas it was apparently absent from *V. dahliae* and the other *Verticillium* species (Karapapa and Typas 2001). The presence of this intron in 27 of 29 *V. longisporum* isolates was later confirmed by Collins et al. (2003), who also used specific primers and detected another *V. longisporum* isolate bearing the same intron in a minor repeat number, and a single *V. dahliae* isolate that

had a smaller intron inserted at the same position in its SSU gene. It was presumed that introns were absent from the remaining *V. dahliae* and *V. albo-atrum* isolates tested. Consequently, the detection of the 839-bp-long intron has been used thereafter as a *V. longisporum*-specific molecular marker for discrimination between this and its relative *Verticillium* species (Johansson et al. 2006; Banno et al. 2011; Ikeda et al. 2012; Inderbitzin et al. 2013). Furthermore, it was suggested that the presence of this intron may also be a discriminatory character between distinct *V. longisporum* hybrid lineages that descend from different combinations of parental species and exhibit different pathogenic abilities (Inderbitzin et al. 2013; Tran et al. 2013). In these works, the intron was again reported to be absent from *V. dahliae* and *V. albo-atrum* representative isolates.

The objective of this work was principally to test a diverse collection of isolates of *V. dahliae*—covering all VCGs—and related species for the presence of group-I introns in the nuclear SSU-rRNA gene, and to assess the extent of heterogeneity regarding intron presence among rDNA repeats. Detected introns were isolated, sequenced, and structurally characterized, and their inter- and intra-specific distributions were studied in detail. Heterogeneity of these introns within the rDNA of fungal individuals was demonstrated by conventional PCR with intron-specific primer pairs as well as by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). In vivo splicing of these introns from precursor ribosomal transcripts was shown with reverse transcription PCR. Furthermore, in the light of intron distribution and recent molecular data, a re-examination of VCG 6 with traditional vegetative compatibility assessment was undertaken, and an appropriate revision is proposed.

Materials and methods

Fungal strains and culture conditions

A collection of 114 *Verticillium* isolates from diverse geographic origins and original hosts (102 *V. dahliae*, 6 *V. longisporum*, 4 *V. albo-atrum*, and a single representative isolate from each of *V. tricorpus* and *V. nubilum*) were used in this study (Table 1). Isolates from all VCGs of *V. dahliae* were included in an attempt to achieve a broad coverage of the known genetic diversity of the species. Monoconidial cultures of all isolates were used. Isolates were maintained as conidial suspensions in potato dextrose broth (PDB; Scharlau, Barcelona, Spain) with 20 % glycerol, at -80°C , and active cultures were obtained on potato dextrose agar (PDA) plates with incubation at 24°C , in the dark.

Table 1 *Verticillium* isolates used in this study, with original hosts, geographic origins, VCGs, and the results from the PCR screenings with all primer pairs tested

Isolate	Host	Origin (source) ^a	VCG ^b	18SVDF/R ^c	18Sa/b ^c	18Sc/d ^c
<i>V. dahliae</i>						
T9 ^f	Cotton	USA, CA (A)	1A	1.7	0.4	0.8
V44 ^{d,f}	Cotton	USA, TX (A)	1A	1.7	0.4	0.8
V138I ^d	Cotton	Spain (B)	1A	1.7	0.4	0.8
cotVd03 ^d	Cotton	Turkey (C)	1A	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2
cotVd11	Cotton	Turkey (C)	1A	1.7	0.4	0.8
cotVd47 ^d	Cotton	Turkey (C)	1A	1.7	0.4	0.8
V661I (328 v-1) ^d	Cotton	Greece (B)	1B	1.7	0.4	0.8
V666I (347 v-1) ^d	Cotton	Greece (B)	1B	1.7	0.4	0.8
V607I (R04) ^d	Green ash	USA, MN (B)	1B	1.7	0.4	0.8
Dvd-T5	Tomato	Canada (D)	2A	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2
PH ^{d,f}	Pistachio	USA, CA (A)	2A	1.7	0.4	0.8
179-4	Melon	Greece (E)	2A	1.7	–	–
164-1 ^d	Tomato	Greece (E)	2A	1.7	–	–
98-1 ^d	Tomato	Greece (E)	2A	1.7	–	–
113-1	Eggplant	Greece (E)	2A	1.7	–	–
140-2	Tomato	Greece (E)	2A	1.7	–	–
247b-3	Tomato	Greece (E)	2A	1.7	–	–
V320I ^f	Cotton	USA, CA (B)	2A	1.7	0.4	0.8
V720I (V39) ^d	Olive	Italy (B)	2A	1.7	0.4	0.8
V800I ^d	Olive	Spain	2A	1.7	0.4	0.8
cotVd04	Cotton	Turkey (C)	2A	1.7	0.4	0.8
egpVd17 ^d	Eggplant	Turkey (C)	2A	1.7	0.4	0.8
136-3 ^d	Tomato	Greece (E)	2A (2B)	1.7	–	–
998-1	Eggplant	Greece (E)	2A (2B, 4A)	1.7	–	–
V54	Pepper	Austria (F)	2B	1.7	0.4	0.8
115 ^{d,f}	Cotton	Syria (A)	2B	1.7	0.4	0.8
cot274	Cotton	Turkey (C)	2B	1.7	0.4	0.8
449-2	Broccoli	Greece (E)	2B	1.7	0.4	0.8
V38 ^d	Sunflower	Germany (F)	2B	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2
V42	Turnip	Russia (F)	2B	1.7	–	–
V49	Pepper	Austria (F)	2B	1.7	0.4	0.8
V57 ^d	Strawberry	Germany (F)	2B	1.7	0.4	0.8
V16	Potato	Germany (F)	2B	1.7	0.4	0.8
V357I (JY)	Cotton	China (B)	2B	1.7	0.4	0.8
V510I (tom20)	Tomato	Israel (B)	2B	1.7	0.4	0.8
V613I	Artichoke	Spain (B)	2B	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2
V702I ^{d,f}	Artichoke	Spain (B)	2B	1.7	0.4	0.8
Ls.17 ^{d,f}	Lettuce	USA, CA (G)	2B	1.7	0.4	0.8
124-8	Tomato	Greece (E)	2B (1)	1.7	–	–
577-1	Lamb's quarters	Greece (E)	2B (2A)	1.7	–	–
997-1 ^d	Eggplant	Greece (E)	2B (2A)	1.7	–	–
525-1	Eggplant	Greece (E)	2B (2A, 4A)	1.7	–	–
150-5 ^d	Tomato	Greece (E)	2B (2A, 4A)	1.7	–	–
999-1 ^d	Eggplant	Greece (E)	2B (4A, 4B)	1.7	0.4	0.8
302-1 ^d	Tomato	Greece (E)	2B (2A)	1.7	–	–
530-1 ^d	Pepper	Greece (E)	2B (2A)	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2

Table 1 continued

Isolate	Host	Origin (source) ^a	VCG ^b	18SVDF/R ^c	18Sa/b ^c	18Sc/d ^c
25V (SS4)	Cotton	USA (H)	2AB (1, 4A)	1.7	0.4	0.8
70-21 ^{d,f}	Pepper	USA, AZ (A)	3	1.7	0.4	0.8
PCW ^{d,f}	Pepper	USA, CA (A)	3	1.7	0.4	0.8
BB ^{d,f}	Potato	USA, ID (A)	4A	2.2	0.4	0.8
30-6 ^f	Potato	Canada (D)	4A	1.7 + 2.2	0.4	0.8
21-18	Potato	Canada (D)	4A	2.2	0.4	0.8
90	Potato	USA, SD (D)	4A	2.2	0.4	0.8
111	Potato	USA, MT (D)	4A	2.2	0.4	0.8
129	Potato	USA, WA (D)	4A	2.2	0.4	0.8
Dvd-E6 ^d	Eggplant	Canada (D)	4A	2.2	0.4	0.8
P103	Potato	USA, OH (D)	4A	2.2	0.4	0.8
83-1	Potato	USA, WI (D)	4A	2.2	0.4	0.8
86	Potato	USA, WA (D)	4A	2.2	0.4	0.8
66-13	Potato	USA, ME (D)	4A	2.2	0.4	0.8
170	Potato	Canada (D)	4A	1.7	0.4	0.8
108	Potato	USA, WY (D)	4A	2.2	0.4	0.8
131-M ^d	Potato	USA (B)	4A	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2
171-4A ^d	Potato	USA (B)	4A	1.7 + 2.2	0.4	0.8
V830 ^d	Potato	USA, OH (F)	4A	2.2	0.4	0.8
S39 ^f	Potato	USA, OH (A)	4B	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2
pn4 ^d	Peanut	Israel (I)	4B	1.7	0.4	0.8
149	Potato	Canada (D)	4B	1.7	0.4	0.8
16-1	Potato	Greece (E)	4B	1.7	–	–
455-1	Chicory	Greece (E)	4B	1.7	–	–
44-3	Potato	Greece (E)	4B	1.7	–	–
273-1 ^d	Black nightshade	Greece (E)	4B	1.7	–	–
413-5	Romaine lettuce	Greece (E)	4B	1.7	–	–
453-1	Vetch	Greece (E)	4B	1.7	–	–
461-3	Tomato	Greece (E)	4B	1.7	–	–
463-1 ^d	Tomato	Greece (E)	4B	1.7	–	–
464-3	Tomato	Greece (E)	4B	1.7	–	–
473-1	Summer squash	Greece (E)	4B	1.7	–	–
un1-1 ^d	Wild sweet pea	Greece (E)	4B	1.7	–	–
V684I ^{d,f}	Artichoke	Spain (B)	4B	1.7	0.4	0.8
V39 ^d	Sunflower	Germany (F)	4B	1.7	0.4	0.8
egpVd02 ^d	Eggplant	Turkey (C)	4B	1.7	0.4	0.8
451-1	Romaine lettuce	Greece (E)	4B (4A)	1.7	–	–
465-2	Marigold	Greece (E)	4B (4A)	1.7	0.4	0.8
554-1	Chicory	Greece (E)	4B (4A)	1.7	–	–
469-1	Cauliflower	Greece (E)	4B (4A)	1.7	–	–
578-1	Lamb's quarters	Greece (E)	4B (4A)	1.7	0.4	0.8
802-1	Olive	Greece (E)	4B (4A)	1.7	–	–
466-1	Black nightshade	Greece (E)	4B (4A)	1.7	–	–
456-1 ^d	Anise	Greece (E)	4B (4A)	1.7	–	–
467-2 ^d	Whitetop	Greece (E)	4B (4A)	1.7	–	–
478-1	Chicory	Greece (E)	4B (4A)	1.7	–	–
235-1	Tomato	Greece (E)	4B (4A)	1.7	–	–
lt1-1	Romaine lettuce	Greece (E)	4B (3, 4A)	1.7	–	–

Table 1 continued

Isolate	Host	Origin (source) ^a	VCG ^b	18SVDF/R ^c	18Sa/b ^c	18Sc/d ^c
Cf.38 ^{d,f}	Chile pepper	USA, CA (G)	6	1.7	0.4	0.8
Cf.162 ^{d,f}	Chile pepper	USA, CA (G)	6	1.7	0.4	0.8
Ca.146 ^{d,f}	Bell pepper	USA, CA (G)	6	2.2	0.4	0.8
Ca.148 ^{d,f}	Bell pepper	USA, CA (G)	6	2.2	0.4	0.8
Ca.83 ^{d,f}	Bell pepper	USA, CA (G)	6	2.2	0.4	0.8
V13 ^f	Cotton	Spain (F)	HSI ^e	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2
CA26	Cabbage	Japan (J)	–	1.7	0.4	0.8
Vd76	Cotton	Greece (K)	–	1.7	–	–
<i>V. longisporum</i>						
G19 ^d	Oilseed rape	Germany (L)	–	1.7	0.7	1.2
K12 ^d	Oilseed rape	Russia (M)	–	2.5	0.7	1.2
81 ^d	Oilseed rape	Denmark (F)	–	2.5	0.7	1.2
86207	Wild radish	Japan (L)	–	2.5	0.7	1.2
161	Sugar-beet	Sweden (L)	–	2.5	0.7	1.2
G22	Oilseed rape	Germany (L)	–	2.5	0.7	1.2
<i>V. albo-atrum</i>						
M33	Hop	UK (L)	–	1.7	0.7	1.2
220 ^d	Alfalfa	UK (L)	–	1.7	0.7	1.2
V90	Cotton	Middle Asia (M)	–	1.7	0.7	1.2
T2 ^d	Hop	Slovenia (N)	–	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2
<i>Verticillium</i> spp.						
<i>V. tricorpus</i> 22	Potato	Israel (I)	–	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2
<i>V. nubilum</i> 278734	Potato	UK (IMI)	–	1.7	0.4 + 0.7	0.8 + 1.2

^a Provided by: A = R. Rowe, OARDC, The Ohio State University, USA; B = M. Jiménez-Gasco, The Pennsylvania State University, USA; C = S. Dervis, University of Mustafa Kemal, Turkey; D = K. Dobinson, University of Western Ontario, Canada & Agriculture and Agri-Food, Canada; E = E. Ligoigakis, Plant Protection Institute, N.AG.RE.F., Greece; F = A. von Tiedemann, University of Göttingen, Germany; G = K. Subbarao, University of California, Davis, USA; H = E. Paplomatas, Agriculture University of Athens, Greece; I = T. Katan, The Volcani Center, Israel; J = T. Usami, Chiba University, Japan; K = E. Tjamos, Agricultural University of Athens, Greece; L = J. Heale, University of London, UK; M = O. Strunnikova, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Russia; N = S. Radišek, Slovenian Institute for Hop Research and Brewing, Slovenia; IMI = International Mycological Institute, UK (presently Centre for Agricultural Bioscience International, CABI, UK)

^b Data on “bridging” behavior (i.e., complementation to varying degrees with tester strains of more than one VCG sub-groups) were available for several *V. dahliae* isolates that were included in this study; these secondary VCG interactions are provided in brackets

^c Length (in kilobase pairs) of PCR amplicons yielded with the corresponding primer pairs, as estimated with agarose gel electrophoresis

^d Isolates tested for the presence of insertions in the nuclear LSU gene

^e HSI heterokaryon self-incompatible

^f Isolates used in VCG classification experiments

DNA extraction, PCR, reverse transcription PCR, cloning, and sequencing

Total DNA of all isolates was extracted according to previously described procedures (Typas et al. 1992), quantified using standard spectrophotometric and agarose electrophoresis methods (Sambrook and Russell 2001), and subjected to PCR with primer pairs listed in Table 2. All PCR analyses were performed in a PTC-200 Gradient Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc., St. Bruno, Quebec, Canada) with KAPA Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA). The reaction mixture

consisted of KAPA Taq Buffer C (without MgCl₂) at 1× concentration, 1.5 mM MgCl₂ (Kapa Biosystems), DMSO (Stratagene Products Division, Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) at 5 % concentration, 200 μM of each dNTP (Kapa Biosystems), 0.4 μM of each primer, 30 ng of genomic DNA, 0.5 U of the KAPA Taq DNA polymerase, and molecular-grade water (Invitrogen RNA products, Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) up to a final volume of 25 μl. The amplification program included a 3-min step of initial denaturation at 95 °C, followed by 35 cycles of denaturation (30 s at 95 °C), annealing (30 s at the temperatures indicated in Table 2 for the different

Table 2 PCR primers used throughout this study

Primer	Sequence (5'–3')	Paired with primer	T_a (°C) ^a	Reference
18SVDF	GCGAAACTGCGAATGGCT	18SVDR	60	Karapapa and Typas 2001
18SVDR	GTAATGATCCCTCCGCTG			Karapapa and Typas 2001
18Sa	CCGAACACATGGCTAGTCTCCTC	18Sb	57	This study
18Sb	ATTCGATTGCAAAGCTACCTATGG			This study
18Sc	GGGACAGTCGGGGGCATCAGTATT	18Sd/e	58/58	This study
18Sd	CAGGCTCCCGTTTTGG			This study
18Se	CTAAGAACGGCCATGCACCACCAC			This study
28SF	GTTCCGGCGGGGAGGTC	28SR	58	This study
28SR	GTCGCTTTCTGGCACGGATTC			This study
Quantitative (real-time) PCR primers				
tef1F	GGTTCGTCACCCTGTGTATATC	tef1R	57	This study
tef1R	GTGCATGGTCTGCATCAAAG			This study
18SF	CCTGCGGCTTAATTTGACTC	18SR	57	This study
18SR	AACTAAGAACGGCCATGCAC			This study
intuniF	AAAGCCGTCTGTGAAAGCAG	intuniR	57	This study
intuniR	GTCCATTGTTGCATCTCACG			This study
intspF	TGTCCCATTCTTCTCCCTCT	intspR	57	This study
intspR	ATTCTCGTTCCTTATGCCTGAC			This study

^a Annealing temperature used during the PCR program

primer pairs), and extension (2 min at 72 °C), and a final extension step of 5 min at 72 °C. All reactions were repeated at least twice and all experiments included negative controls (no DNA). Amplification products were separated on ethidium bromide-stained agarose gels (1.0 % w/v) and visualized under UV light. Total RNA was extracted from 50 mg of lyophilized mycelium of each of three selected isolates with the NucleoSpin RNA II kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany), and treated with TURBO DNase (Invitrogen RNA products) for the complete removal of genomic DNA. About 1 µg of DNase-treated total RNA was used as template for first strand cDNA synthesis with the RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions; cDNA was then subjected to PCR with specific primer pairs (Table 2). Prior to sequencing, the desired PCR products were recovered from agarose gels with the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey–Nagel) and the purified fragments were directly sequenced or first cloned into pBluescript II KS vector (Stratagene) according to standard procedures (Sambrook and Russell 2001). Plasmids were purified with the NucleoSpin Plasmid kit (Macherey–Nagel) before sequencing. Sequencing reactions were carried out according to Papaioannou et al. (2013b). DNA sequences with overlapping ends were assembled in contigs with the program SeqMan of the software package Lasergene 6 (DNASTar, Madison, WI, USA). DNA

similarity searches were performed with Basic Local Alignment Search Tool (BLAST 2.2.27+; Altschul et al. 1997).

Quantitative (real-time) PCR

Primer pairs for qRT-PCR (Table 2) were designed using the online tools *PrimerQuest* (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>; Integrated DNA technologies, Coralville, Iowa, USA) and *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>; Untergasser et al. 2007) and were subjected to in silico validation according to the criteria proposed by D'haene et al. (2010). All qRT-PCR analyses were performed in three repetitions for each isolate and run in duplicate in an Mx3000P real-time PCR system (Stratagene) with the Brilliant SYBR Green qRT-PCR Master Mix kit (Stratagene), according to the manufacturer's recommendations. Optimization of primer concentrations was carried out for each primer pair and the optimal concentrations were 50 nM for primers tef1F/R, 18SF, and intuniF, and 150 nM for primers 18SR, intuniR, and intspF/R (Table 2). The thermal cycling protocol consisted of an initial denaturation step of 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C for denaturation, 1 min at 57 °C for annealing, and 30 s at 72 °C for extension. Fluorescence was recorded at the end of both the annealing step and the extension step of each cycle. Amplification was followed

by a dissociation curve analysis, starting with a 1-min incubation at 95 °C, followed by incubation at 55 °C for 30 s, and finally a ramp (at 0.1 °C s⁻¹) up to 95 °C with continuous fluorescence data collection. Control reactions with no template were included in all experiments for the confirmation of the absence of contaminating DNA and primer dimers. The absence of non-specific products was further confirmed by melting curve analysis and visualization of end products on 2 % agarose gels.

The absolute quantification method was used for the real-time PCR determination of rRNA gene and intron copy numbers, according to Lee et al. (2008). For this, primer pairs *tef1*F/R, 18SF/R, *intuni*F/R, and *intsp*F/R (Table 2) were used, targeting the transcription elongation factor 1 (*tef1*) gene of *V. dahliae*, a conserved intronless portion of the SSU-rRNA gene of *V. dahliae*, a common fragment of all group-I introns identified in this work, and a fragment specific to the 839-bp-long group-I intron, respectively. The *tef1* gene was used as a reference gene for copy number calculations, as it has been previously shown to be present in the genome of *V. dahliae* in a single copy with southern hybridization analyses (Pantou and Typas 2005; locus number VDAG_08296 at the *Verticillium* group database of Broad Institute: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html). The PCR products obtained from isolates *V. dahliae* BB with primer pairs *tef1*F/R, 18SF/R, and *intuni*F/R, and *V. longisporum* K12 with primer pair *intsp*F/R were cloned into plasmid vectors as described above and a single bacterial clone exhibiting the anticipated insert size was selected for each PCR amplicon and verified with sequencing. Consequently, plasmids were purified, quantified spectrophotometrically, and a tenfold dilution series was prepared for each one, in the range of 4.0×10^8 – 4.0×10^2 copies μl^{-1} (according to calculations summarized by Lee et al. 2008). These dilution series were then used for the construction of real-time PCR standard curves for the four DNA targets. All curves were highly linear ($R^2 > 0.999$) in the ranges tested. Amplification efficiencies of the primer sets *tef1*F/R, 18SF/R, *intuni*F/R, and *intsp*F/R were 96.7, 95.4, 89.2, and 91.8 %, respectively. Based on the corresponding standard curve of each target, the calculated threshold cycle values of different samples were converted into numbers of copies per sample. The copy number of the SSU-rRNA gene was finally determined by dividing the number of copies of the SSU fragment in each sample with the number of copies of the single-copy reference gene (*tef1*) in the same sample. Similarly, the copy ratio of the two intron types described in the present study was calculated for each sample by dividing the numbers of copies of products yielded with primers *intuni*F/R and *intsp*F/R, respectively, for each sample.

Prediction of secondary structures of introns

Introns were named according to the nomenclature guidelines proposed by Johansen and Haugen (2001) and their insertion position was determined with respect to the *E. coli* SSU-rRNA gene sequence (GenBank accession number AB035922). The prediction of their secondary structures was based on the *mfold* RNA folding online software (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>; Zuker 2003), with the generally accepted constraints and conventions for group-I introns (Michel and Westhof 1990; Cech et al. 1994; Cannone et al. 2002; Li and Zhang 2005). For the accurate identification of the P1 and P10 helices, parts of the flanking exon sequences were included in the models. The predicted structures were finally drawn with graphics design software CoreIDRAW Graphics Suite X6 (Corel Corporation, Ottawa, Canada).

Vegetative compatibility grouping

The production of chlorate-resistant *nit* mutants of selected *V. dahliae* isolates (Table 1 and Online Resource 1), their classification into *nit1* and *nitM* mutant classes, and their use in complementation tests for VCG classification were performed according to standard procedures (Correll et al. 1987; Joaquim and Rowe 1990), with the specifications described by Papaioannou et al. (2013b). All pairings were repeated at least twice.

Results

PCR screening with SSU-specific primers: group-I introns in *V. longisporum* and in VCGs 4A and 6 of *V. dahliae*

DNA from each of the 114 *Verticillium* isolates listed in Table 1 was used in PCR analysis with primer pair 18SVDF/R (designed to amplify nearly the full-sized SSU rDNA; Table 2), and the products were analyzed for detectable size differences. In agreement with all previous studies, the screening of five of six isolates of *V. longisporum* produced a single PCR product of 2.5 kb (Fig. 1a shows the representative amplicon of isolate K12; Table 1), presumably due to the presence of the previously described 839-bp-long intron in the SSU gene (Karapapa and Typas 2001). To verify this assumption, the amplicon of *V. longisporum* K12 was sub-cloned and sequenced; the sequence of the insertion matched perfectly the previously deposited intron sequence (GenBank accession number AF153421). This 839-bp-long group-I intron is referred to hereafter as intron Vert.S943-1. The sixth isolate of *V. longisporum* (G39) was characterized by a single band of 1.7 kb, which is indicative of the absence of any insertions in this region (Fig. 2a).

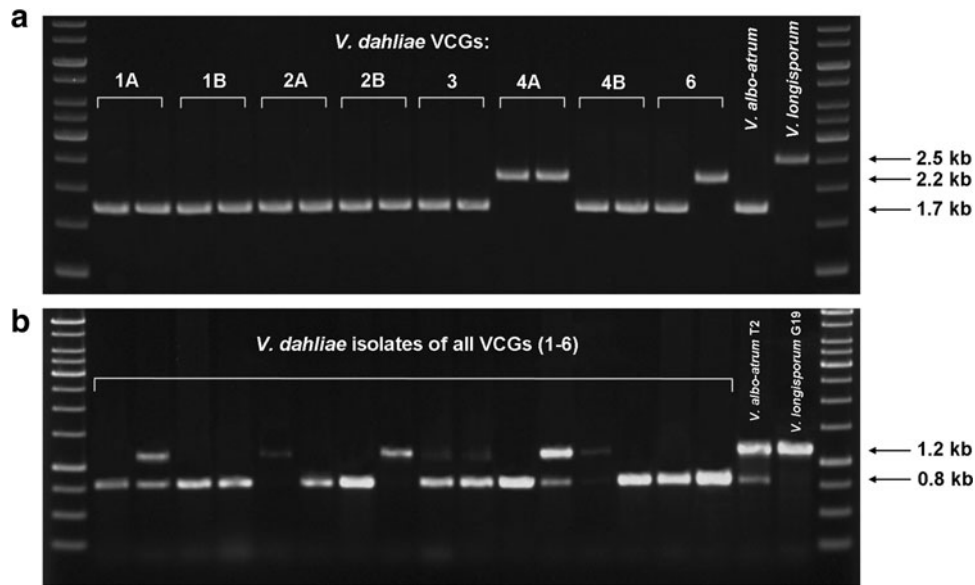


Fig. 1 **a** SSU PCR screening with primer pair 18SVDF/R of representative *V. dahliae* isolates T9, cotVd03 (VCG 1A), V661I, V607I (VCG 1B), Dvd-T5, PH (VCG 2A), V54, 115 (VCG 2B), 70-21, PCW (VCG 3), BB, 21-18 (VCG 4A), S39, 461-3 (VCG 4B), Cf.38, Ca.146 (VCG 6), *V. albo-atrum* M33, and *V. longisporum* K12 (corresponding to lanes 2–19 of the agarose gel, respectively). The 1 kb DNA ladder (Fermentas) has been run on the first and the last lanes of the gel for determination of approximate size of PCR products. **b** PCR screening with intron-specific primer pair 18Sc/d of

selected *V. dahliae* isolates of all VCGs, exhibiting variability in their SSU-located intron content: *V. dahliae* T9, cotVd03, V661I, V607I, Dvd-T5, PH, 115, V38, V613I, 530-1, 70-21, 131-M, S39, pn4, Cf.38, Ca.146, *V. albo-atrum* T2, and *V. longisporum* G19, respectively. For isolates Dvd-T5, V38, and S39, the 0.8 kb-sized band is hardly visible on this agarose gel. Considerable heterogeneity in the yield of different PCR products among isolates is observed. The 1 kb DNA ladder has been run on the first and the last lanes

As expected, for the majority of *V. dahliae* isolates, amplification resulted in a single 1.7-kb-long product. However, in 14 of 16 VCG 4A isolates and in the 3 VCG 6 isolates from bell pepper, a PCR amplicon of 2.2 kb was produced (representative amplicons are shown in Fig. 1a; Table 1). The corresponding PCR product of isolate BB (VCG 4A) was isolated, sub-cloned and sequenced (GenBank accession number KF318969). Analysis of this sequence demonstrated the presence of a single insertion of 475 bp, at exactly the same position as in *V. longisporum* (SSU nt position 1165, which corresponds to Ec943; Fig. 2a). Interestingly, this insertion was highly similar to intron Vert.S943-1, with the exception of two deleted internal regions (180 and 186 bp in length, respectively), whereas all conserved sequence and structural features of group-I introns (including the IGS, P, Q, R, S, and 3' end elements) were identical between the two insertions. On the basis of these characteristics and their comparison with available members of all group-I intron classes, the 475-bp-long insertion in the SSU of *V. dahliae* BB was characterized as a typical group-I intron (sub-group IC1), and designated as Vert.S943-2 intron. When the putative structures of the two introns were compared, it was clear that the two indels, which accounted for the size difference between the two introns, lie within the sequence stretches forming the P6 and P8 loops, respectively, while all other

putatively functional elements of the introns remain unaffected (Fig. 2b). Isolates 30-6, 171-4A and V830 (VCG 4A), and Ca.146, Ca.148 and Ca.83 (VCG 6) were further subjected to nested PCR with primers 18Sc/e (Table 2) and amplicons were cloned and sequenced. All these isolates contained the same intron (Vert.S943-2), inserted at the same SSU position, and no sequence variation regarding intron sequence was detected among them (GenBank accession numbers KF318970-75). It should be noted that a double DNA band of 1.7 and 2.2 kb was consistently amplified from genomic DNA of isolates 30-6 and 171-4A (VCG 4A), suggesting that the ribosomal repeats of these isolates are heterogeneous regarding the presence or absence of the Vert.S943-2 intron. Finally, PCR of all representative isolates of *V. albo-atrum*, *V. tricorpus*, and *V. nubilum* yielded a single 1.7-kb-sized product with primer pair 18SVDF/R (Table 1).

Among the five available isolates of *V. dahliae* VCG 6, intron Vert.S943-2 was detected in all three originating from bell pepper, as opposed to the other two, from chili pepper (Table 1). To test whether this discrepancy was possibly due to previous VCG misclassification, the vegetative compatibility behavior of the five isolates was re-examined, against 14 international testers of all VCGs (Table 1 and Online Resource 1). Compatibility tests among 125 chlorate-resistant *nit* mutants of VCG 6 isolates

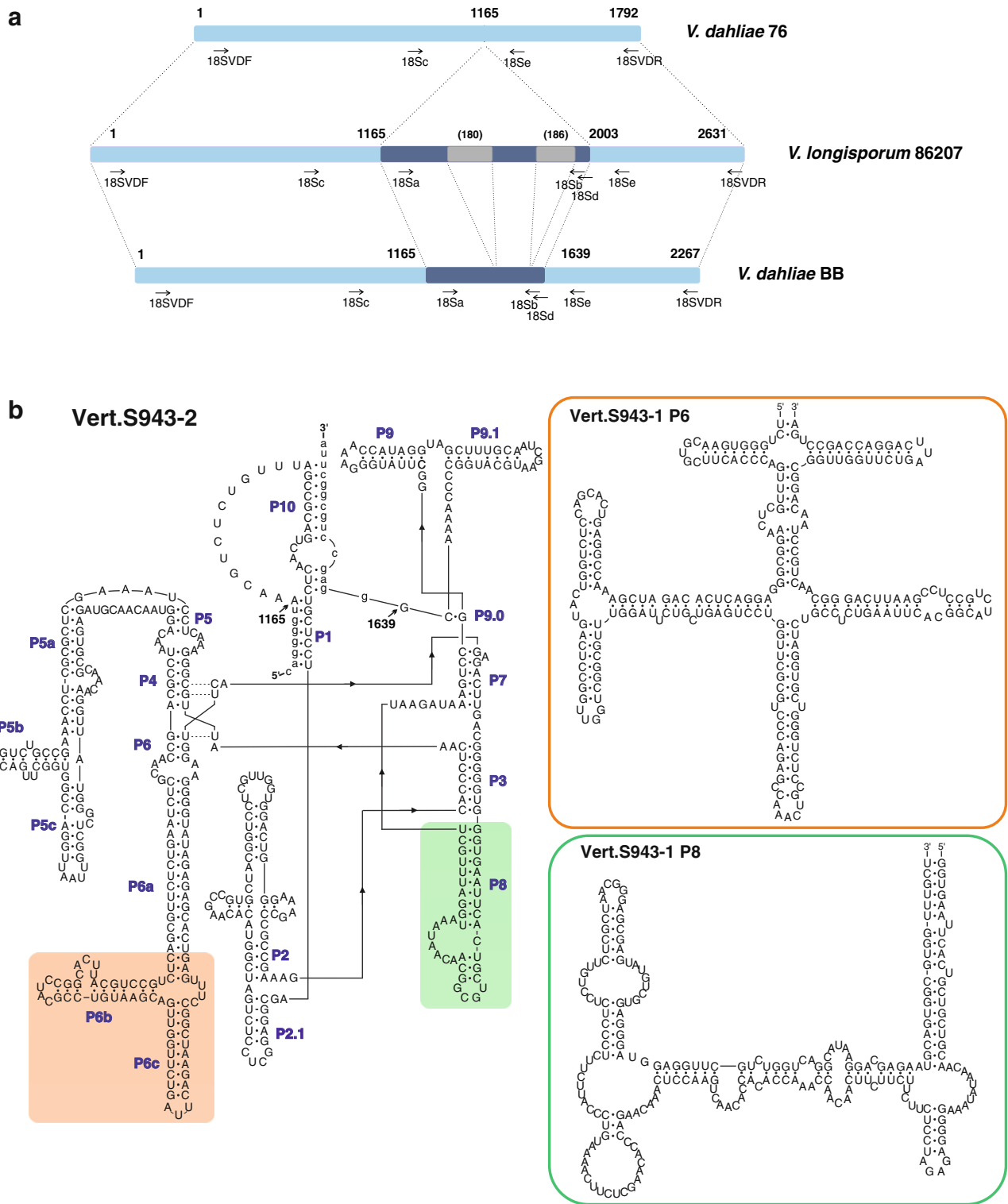


Fig. 2 a Structural organization of the SSU-rRNA gene of the intronless *V. dahliae* isolate 76 (GenBank accession number AF104926), *V. longisporum* 86207 (AF153421), and *V. dahliae* BB, determined in this study (GenBank accession number KF318969). The positions of group-I introns are shown above the corresponding bars and the lengths of two indels of significant sizes between the two introns are provided in parentheses. The positions of primers used in this study are also indicated with arrows below each bar. **b** The

predicted secondary structure of group-I intron Vert.S943-2. Parts of the flanking exon sequences are included in the model for the accurate determination of the P1 and P10 helices; these nucleotides are displayed as lower-case letters. Parts of the peripheral P6 and P8 stem-loop structures that are variable between the two introns are shown in boxes and the corresponding structures of intron Vert.S943-1 are provided on the right of the figure

and selected mutants from an extended collection of over 650 complementary *nit* mutants of the testers used (I.A. Papaioannou and M.A. Typas, unpublished data) demonstrated that the three isolates from bell pepper (Ca.83, Ca.146, and Ca.148) were readily compatible with each other, yielding heterokaryons with abundant aerial hyphae and extended pigmentation, but incompatible with all other tester strains (Online Resource 1). On the contrary, one of the two isolates from chili pepper, Cf.38, produced heterokaryons with all three testers of VCG 2B but failed to complement the three bell pepper VCG 6 isolates, thus being re-classified into VCG 2B. The second chili pepper isolate, Cf.162, was characterized as heterokaryon self-incompatible, since all its 28 *nit* mutants that were checked for self and non-self compatibility, in all possible combinations, consistently failed to complement each other or other tester mutants. Thus, the inclusion of only the three bell pepper isolates in VCG 6 is substantiated by the compatibility data.

PCR screening with intron-specific primers and qRT-PCR: both introns are frequently encountered in *Verticillium* species, in variable ribosomal repeat numbers

Intron-specific primer pair 18Sa/b was designed to anneal to conserved regions of both introns (Table 2; Fig. 2a), allowing at the same time differentiation between the two by different sizes of the corresponding PCR products (i.e., 0.7 kb for Vert.S943-1 and 0.4 kb for the Vert.S943-2 intron, respectively). Remarkably, the screening of the majority of *V. dahliae* isolates produced DNA bands of one or both characteristic sizes (Table 1; Fig. 1b), indicating that the Vert.S943-2 intron is widespread in *V. dahliae* populations, while Vert.S943-1 was also detected in eight isolates of the species. All isolates were further subjected to PCR screening with primer pair 18Sc/d (Table 2; Fig. 2a), designed to amplify a 1.2- or a 0.8-kb-long region only if the Vert.S943-1 or Vert.S943-2 intron, respectively, is located at the same SSU position (Ec943). It was shown that the position of all insertions was identical since the results of the two PCR screenings were fully congruent (Table 1). Sequencing of the PCR products of randomly selected *V. dahliae* isolates with Vert.S943-2-characteristic amplicons (cotVd03, cotVd47, and 115; GenBank accession numbers KF318976 and KF318978-79, respectively) and isolates with Vert.S943-1-characteristic amplicons (cotVd03 and 131-M; GenBank accession numbers KF318977 and KF318980, respectively) also confirmed the identity of these insertions as introns Vert.S943-1 and -2, and their SSU position. All *V. longisporum* isolates, including G19 that failed to produce a Vert.S943-1-characteristic amplicon with SSU-specific primers, were

characterized by the presence of Vert.S943-1 introns with intron-specific primer pairs, similarly to three of four *V. albo-atrum* isolates. The fourth *V. albo-atrum* isolate (T2), together with the *V. tricorpus* and *V. nubilum* representatives, exhibited the presence of PCR products characteristic of both intron types (Table 1). The presence or absence of one or both intron types was further tested by Southern hybridization experiments in 13 *Verticillium* isolates (10 *V. dahliae* strains from different geographic origins, including representatives of all VCGs, 2 *V. longisporum*, and 1 *V. albo-atrum* strains), which fully confirmed the results by the specific PCR screenings (data not shown).

Interestingly, significant differences in the yield of PCR amplicons were systematically observed among different isolates in each experiment (Fig. 1b), suggesting the presence of the two intron types in different copy numbers within the rDNA complex of various isolates. To further examine this observed heterogeneity, qRT-PCR was used for the determination of the SSU-rRNA gene copy numbers and the copy ratios of the two intron types in selected isolates. The SSU copy number in the genomes of five *V. dahliae* isolates varied significantly, ranging from 39 to 70 copies, with an average of 52 iterations (Table 3). Concerning intron detection, the results of qRT-PCR tests were fully congruent with the conventional PCR screenings, i.e., when the two representative intronless and the two isolates that did not contain the Vert.S943-1 intron were examined by qRT-PCR, tests failed to provide amplicons under any conditions (Table 3). For the *V. dahliae* isolates (30-6 and

Table 3 Copy numbers of the SSU-rRNA gene and copy ratios of group-I introns, determined with quantitative real-time PCR for selected *Verticillium* isolates

Isolate	SSU copy number ^a	SSU-located intron content ^b	Copy ratio of introns ^c
<i>V. dahliae</i> T9	48.24 ± 0.23	Only Vert.S943-2	No amplification of Vert.S943-1
<i>V. dahliae</i> V6071 (R04)	38.65 ± 0.14	Only Vert.S943-2	No amplification of Vert.S943-1
<i>V. dahliae</i> V6131	70.40 ± 0.28	Both intron types	0.278
<i>V. dahliae</i> cotVd03	48.95 ± 0.19	Both intron types	0.208
<i>V. dahliae</i> 273-1	55.36 ± 0.24	No introns	No amplification of any introns
<i>V. longisporum</i> K12	ND ^d	Only Vert.S943-1	0.957

^a Mean ± standard deviation (three samples, run in duplicate)

^b Determined by conventional PCR screenings presented in Table 1

^c Copy ratio of Vert.S943-1 introns to total introns, determined by qRT-PCR experiments

^d ND not determined

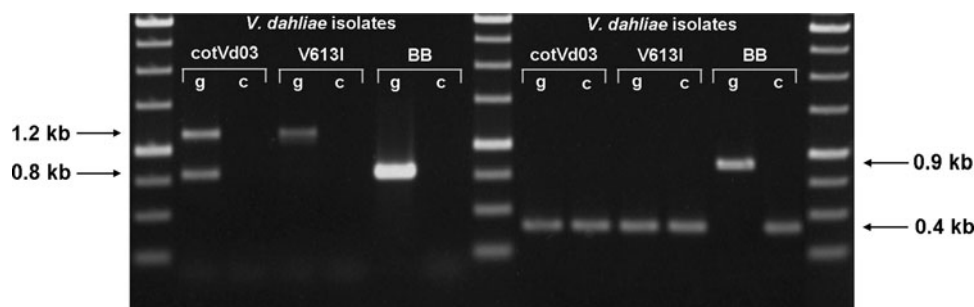


Fig. 3 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) products of *V. dahliae* isolates cotVd03, V613I, and BB with primer pairs 18Sc/d (between the first and the middle run of 1 kb DNA ladder) and 18Sc/e (between the middle and the last run of 1 kb DNA

ladder). For each isolate and primer combination, PCR products with genomic DNA (designated as “g”) or cDNA (“c”) as the template, are shown next to each other on the agarose gel

171-4) found to harbor both introns in their SSU gene copies, the two introns were detected by qRT-PCR in a ratio of approximately 25 % Vert.S943-1 to 75 % Vert.S943-2, indicating that the former intron, whenever present, is only found in a minor ribosomal repeat number in the *V. dahliae* isolates tested. On the other hand, all ribosomal repeats of *V. longisporum* K12 seemed to uniformly bear the Vert.S943-1 intron in the SSU gene (Table 3).

Excision of introns from precursor SSU-rRNA transcripts of *V. dahliae*

Total RNA from three *V. dahliae* isolates (cotVd03, V613I, and BB) was extracted and subjected to reverse transcription PCR with primer pairs 18Sc/d and 18Sc/e (Fig. 3; annealing positions of primers are illustrated in Fig. 2a). No amplification was detected from cDNAs with the former primer pair, which demonstrates the absence of introns from mature rRNAs. When the same cDNAs were tested in PCR with the latter primer pair surrounding the insertion position (both primers annealing at regions of the SSU gene), products of intronless-characteristic size (0.4 kb) were obtained, confirming the excision of both introns from precursor rRNA transcripts.

Absence of introns in the LSU-rRNA (28S) gene of *Verticillium* species

Numerous studies of the LSU gene of various fungi have previously reported that group-I introns are usually inserted at highly conserved positions within an approx. 1-kb-long area of the gene nearer to its 3' end (Pantou et al. 2003; Wang et al. 2003). Based on this observation and the complete sequence of the nuclear ribosomal complex of *V. dahliae* (GenBank accession number AF104926), a primer pair (28SF-28SR; Table 2) was designed to specifically amplify this region, with an expected length of amplicons

without any insertions of 1145 bp. Fifty *Verticillium* isolates of all *V. dahliae* VCGs and from various original hosts and geographic origins (Table 1) were tested with this primer pair for detectable size polymorphism of the amplified LSU region. Screening of all isolates invariably yielded a 1.1-kb-long amplicon, suggesting the absence of introns or other detectable sources of heterogeneity in the 3' area of the LSU gene.

Discussion

Group-I introns have been detected in the nuclear ribosomal RNA genes of various fungi and have been used extensively for discrimination and phylogenetic analyses, as their distribution is highly irregular, even at the intra-specific level (Hibbett 1996; Pantou et al. 2003; Hafez et al. 2012). In *Verticillium*, a group-I intron (Vert.S943-1) has been previously detected by PCR in the majority of *V. longisporum* isolates tested, and was generally assumed to be absent from the other *Verticillium* species (Karapapa and Typas 2001; Collins et al. 2003; Inderbitzin et al. 2013; Tran et al. 2013). In this work, contrary to the previous reports, a group-I intron (named Vert.S943-2) that is highly similar to Vert.S943-1 was found located at the same SSU position of most *V. dahliae* isolates of VCGs 4A and 6. Presumably, the presence of group-I introns in the SSU gene of such *V. dahliae* isolates has not been detected during previous investigations due to the absence or under-representation of isolates from these VCGs in the fungal collections tested.

The common intron content for VCGs 4A and 6 is in agreement with a recent phylogenetic analysis of the IGS region (Papaioannou et al. 2013a) and, taken together, these results suggest a close genetic relationship between the two groups. Notably, the two VCGs share a common geographic distribution, i.e., both are limited to North America, which might account, at least in part, for their

common genetic characteristics as a result of common descent or co-evolution. Within VCG 6, isolates originating from bell pepper differed in intron distribution from those from chili pepper. Similarly, the two groups of members of this VCG have been found to differ in additional molecular traits (Papaioannou et al. 2013a, b). Remarkably, the re-evaluation of VCG classification for the five VCG 6 isolates tested here justified the preservation in this group of only the bell pepper isolates, which were identical to VCG 4A members regarding intron content. From the remaining chili pepper isolates, one (Cf.38) was clearly a VCG 2B member and the other (Cf.162) was generally unable to form heterokaryons. It should be noted that globally only few members of VCG 6 are available to date, and therefore, a larger number of such isolates should be obtained and studied before comprehensive conclusions on the genetic homogeneity and the significance of this VCG can be reached.

Importantly, when intron-specific primers were used instead of SSU-specific primers for the PCR screening of the fungal collection, a multitude of insertions with variable distributions was revealed at the same position of the SSU gene of all *Verticillium* species. These insertions were found to correspond to introns Vert.S943-1 and -2, with the former prevailing in *V. longisporum* and *V. albo-atrum*, the latter in *V. dahliae*, and both being present in the unique *V. tricorpus* and *V. nubilum* representative strains. The failure of conventional SSU-based PCR to detect the existing introns can be attributed to the biased nature of amplification when a multi-copy region is targeted, since PCR is expected to preferentially amplify the majority of dissimilar targets, especially when these yield a shorter, intronless product. Thus, introns present in less repeat numbers might often elude detection by SSU PCR screenings, which probably accounts for the failure of previous studies to identify SSU-located introns in *V. dahliae* and its relative species. This finding raises serious concerns about the accuracy of methods that are based on the detection of DNA multi-copy targets for use in population studies and underlines the care that must be taken in interpreting results.

In the case of *Verticillium*, SSU-specific primers are expected to identify not only *V. longisporum* but also *V. dahliae* VCGs 4A and 6. Naturally, this is mostly important for North America, where these VCGs are known to be present (Dobinson et al. 2000; Bhat et al. 2003), while it may be of little relevance for other geographic areas which lack these VCG groups. However, given the widespread occurrence of the two ribosomal intron types in all *Verticillium* species, the results from all such screenings should still be treated with caution. The same rationale should be applicable to the use of the Vert.S943-1 intron for differentiation between *V. longisporum* lineages (Tran et al.

2013), as an isolate (G19) which appeared to be intronless with general SSU PCR-testing was actually found to bear Vert.S943-1 intron in a minor repeat number. Taking into consideration the distributions of the two intron types, it could be hypothesized that Vert.S943-1 is the parental type within the *Verticillium* species complex, with its “shortened” version, Vert.S943-2, probably having originated from it by losing two DNA regions that were nonessential for splicing activity. Similarly, related group-I introns that differ in the length of various loops have been described for other organisms (Michel and Westhof 1990; Müller et al. 2001; Wang et al. 2003).

The rDNA complex of eukaryotic organisms is known to comprise multiple copies of ribosomal repeats arranged as tandem iterations separated by noncoding spacers in the nuclear organizer region of one or more chromosomes (Rooney and Ward 2005). The recovery of more than one PCR amplicon types (differing in their intron content) from the majority of isolates examined in this study clearly demonstrates the presence of more than one types of ribosomal repeats in the genomes of *Verticillium* isolates. Heterogeneity or “heterozygosity” among repeats of the nuclear ribosomal complex and, more specifically, intra-genomic variability for the presence or absence of group-I introns have been reported in the past for several fungi (Hibbett 1996; Lickey et al. 2003). This might be explained by transience in the process of slow homogenizing concerted evolution of multi-copy genes, recombination between distinct rDNA types following (para-)sexual recombination and/or intron mobility, i.e., movement of introns into different genes and species through the mechanisms of homing or reverse splicing (DePriest 1993; Haugen et al. 2005; Simon et al. 2005).

Using mainly pulsed-field gel electrophoresis and hybridization-based techniques, the rDNA copy number of various yeasts and few filamentous fungi has been previously reported to vary, in the range of approx. 30 to more than 200 copies per haploid genome (Garber et al. 1988; Maleszka and Clark-Walker 1993; Howlett et al. 1997). Recently, the rDNA copy number of few *V. dahliae* isolates was estimated by a qRT-PCR relative quantification method that was based on the IGS region, to range from approximately 24 to 73 copies per genome (Bilodeau et al. 2012). However, the authors pointed out that these values should be considered only as an estimate because the amplification efficiencies for the IGS region and each of the single-copy genes used in their calculations were different. A more accurate method is the qRT-PCR absolute quantification method, which was used for *Aspergillus fumigatus*, defining the SSU-rRNA gene copy number among different strains of the fungus between 38 and 91 copies per genome (Herrera et al. 2009). In our work, we adopted this method for the accurate determination of the rDNA copy

number of *V. dahliae*, and this was found to vary among different isolates in a similar range, from 39 to 70 copies per haploid genome. Moreover, we demonstrated here that qRT-PCR-based detection methods are appropriate for the sensitive and quantitative identification of insertions present in a few copy numbers within the ribosomal repeat. This must be applicable in many other organisms and may prove very useful in future adaptation studies addressing the rate of change of the ratios between dissimilar copies in response to different environmental stimuli imposing varying levels of selective pressure.

Our results altogether underline that the nuclear rDNA complex of *Verticillium* species can be highly heterogeneous regarding both the identity of insertions (i.e., different group-I introns in the SSU gene) and their copy numbers. It was further demonstrated that insertions that are present in a minor repeat number (i.e., in only a few rDNA repeats) can remain undetected by conventional screenings. Thus, it was shown that more sensitive methods such as Southern blots, PCR screenings with intron-specific primers, and qRT-PCR can be successfully employed and should be used for the elucidation of the presence and the distribution of insertions in the rDNA complex, to avoid incomplete or even misleading results. These conclusions are predicted to be relevant to discrimination and phylogenetic studies of many fungi and other eukaryotic organisms.

Acknowledgments We are grateful to all individuals mentioned in the footnote of Table 1 for providing fungal isolates used in this study. Ioannis A. Papaioannou and this research have been cofinanced by the European Union (European Social Fund—ESF) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF)—Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Banno S, Saito H, Sakai H, Urushibara T, Ikeda K, Kabe T, Kemmochi I, Fujimura M (2011) Quantitative nested real-time PCR detection of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* in the soil of cabbage fields. *J Gen Plant Pathol* 77:282–291
- Bhat RG, Smith RF, Koike ST, Wu BM, Subbarao KV (2003) Characterization of *Verticillium dahliae* isolates and wilt epidemics of pepper. *Plant Dis* 87:789–797
- Bhattacharya D, Friedl T, Damberger S (1996) Nuclear-encoded rDNA group I introns: origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae. *Mol Biol Evol* 13:978–989
- Bhattacharya D, Reeb V, Simon DM, Lutzoni F (2005) Phylogenetic analysis suggests reverse splicing spread of group I introns in fungal ribosomal DNA. *BMC Evol Biol* 5:68
- Bilodeau GJ, Koike ST, Uribe P, Martin FN (2012) Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology* 102:331–343
- Cannone JJ, Subramanian S, Schnare MN et al (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinforma* 3:2 (Correction: *BMC Bioinformatics* 3:15)
- Cech TR, Damberger SH, Gutell ER (1994) Representation of the secondary and tertiary structure of group I introns. *Nat Struct Biol* 1:273–280
- Collins A, Okoli CAN, Morton A, Parry D, Edwards SG, Barbara DJ (2003) Isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic to crucifers are of at least three distinct molecular types. *Phytopathology* 93:364–376
- Correll JC, Klittich CJR, Leslie JF (1987) Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77:1640–1646
- D’haene B, Vandesompele J, Hellemans J (2010) Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods* 50:262–270
- DePriest PT (1993) Small subunit rDNA variation in a population of lichen fungi due to optional group-I introns. *Gene* 134:67–74
- Dobinson KF, Harrington MA, Omer M, Rowe RC (2000) Molecular characterization of vegetative compatibility groups 4A and 4B isolates of *Verticillium dahliae* associated with potato early dying. *Plant Dis* 84:1241–1245
- Dujon B (1989) Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations, a review. *Gene* 82:91–114
- Garber RC, Turgeon BG, Selker EU, Yoder OC (1988) Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr Genet* 14:573–582
- Hafez M, Iranpour M, Mullineux ST, Sethuraman J, Wosnitza KM, Lehn P, Kroecker J, Loewen PC, Reid J, Hausner G (2012) Identification of group I introns within the SSU rDNA gene in species of *Ceratocystopsis* and related taxa. *Fungal Biol* 116:98–111
- Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D (2005) The natural history of group I introns. *Trends Genet* 21:111–119
- Herrera ML, Vallor AC, Gelfond JA, Patterson TF, Wickes BL (2009) Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA copy numbers in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 47:1325–1332
- Hibbett DS (1996) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in the nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi. *Mol Biol Evol* 13:903–909
- Howlett BJ, Rolls BD, Cozijnsen AJ (1997) Organisation of ribosomal DNA in the ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Microbiol Res* 152:261–267
- Ikeda K, Banno S, Watanabe K et al (2012) Association of *Verticillium dahliae* and *Verticillium longisporum* with Chinese cabbage yellows and their distribution in the main production areas of Japan. *J Gen Plant Pathol* 78:331–337
- Inderbitzin P, Davis RM, Bostock RM, Subbarao KV (2011) The ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range. *PLoS One* 6:e18260. doi:10.1371/journal.pone.0018260
- Inderbitzin P, Davis RM, Bostock RM, Subbarao KV (2013) Identification and differentiation of *Verticillium* species and *V. longisporum* lineages by simplex and multiplex PCR assays. *PLoS One* 8:e65990. doi:10.1371/journal.pone.0065990
- Joaquim TR, Rowe RC (1990) Reassessment of vegetative compatibility relationships among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology* 80:1160–1166
- Johansen JS, Haugen P (2001) A new nomenclature of group I introns in ribosomal DNA. *RNA* 7:935–936

- Johansson A, Goud JKC, Dixelius C (2006) Plant host range of *Verticillium longisporum* and microsclerotia density in Swedish soils. *Eur J Plant Pathol* 114:139–149
- Karapapa VK, Typas MA (2001) Molecular characterization of the host-adapted pathogen *Verticillium longisporum* on the basis of a group-I intron found in the nuclear SSU-rRNA gene. *Curr Microbiol* 42:217–224
- Karapapa VK, Bainbridge BW, Heale JB (1997) Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycol Res* 101:1281–1294
- Katan T (2000) Vegetative compatibility in populations of *Verticillium*—an overview. In: Tjamos EC, Rowe RC, Heale JB, Fravel DR (eds) *Advances in Verticillium: research and disease management*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, pp 69–86
- Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, Subbarao KV (2009) Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. *Annu Rev Phytopathol* 47:39–62
- Lee C, Lee S, Shin SG, Hwang S (2008) Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:371–376
- Leslie JF (1993) Fungal vegetative compatibility. *Annu Rev Phytopathol* 31:127–150
- Li Z, Zhang Y (2005) Predicting the secondary structures and tertiary interactions of 211 group I introns in IE subgroup. *Nucleic Acids Res* 33:2118–2128
- Lickey EB, Hughes KW, Petersen RH (2003) Variability and phylogenetic incongruence of an SSU nrDNA group I intron in *Artomyces*, *Auriscalpium*, and *Lentinellus* (Auriscalpiaceae: Homobasidiomycetes). *Mol Biol Evol* 20:1909–1916
- Maleszka R, Clark-Walker GD (1993) Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number. *Yeast* 9:53–58
- Michel F, Westhof E (1990) Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol* 216:585–610
- Müller KM, Cannone JJ, Gutell RR, Sheath RG (2001) A structural and phylogenetic analysis of the group IC1 introns in the order *Bangiales* (Rhodophyta). *Mol Biol Evol* 18:1654–1667
- Nielsen H, Johansen SD (2009) Group I introns: moving in new directions. *RNA Biol* 6:375–383
- Nikoh N, Fukatsu T (2001) Evolutionary dynamics of multiple group I introns in nuclear ribosomal RNA genes of endoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Mol Biol Evol* 18:1631–1642
- Pantou MP, Typas MA (2005) Electrophoretic karyotype and gene mapping of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *FEMS Microbiol Lett* 245:213–220
- Pantou MP, Mavridou A, Typas MA (2003) IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fungal Genet Biol* 38:159–174
- Papaioannou IA, Dimopoulou CD, Typas MA (2013a) Structural and phylogenetic analysis of the rDNA intergenic spacer region of *Verticillium dahliae*. *FEMS Microbiol Lett* 347:23–32
- Papaioannou IA, Ligoxigakis EK, Vakalounakis DJ, Markakis EA, Typas MA (2013b) Phytopathogenic, morphological, genetic and molecular characterization of a *Verticillium dahliae* population from Crete, Greece. *Eur J Plant Pathol* 136:577–596
- Pegg GF, Brady BL (2002) *Verticillium* wilts. CABI Publishing, New York
- Rooney AP, Ward TJ (2005) Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5084–5089
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Simon DM, Hummel CL, Sheeley SL, Bhattacharya D (2005) Heterogeneity of intron presence or absence in rDNA genes of the lichen species *Physcia aipolia* and *P. stellaris*. *Curr Genet* 47:389–399
- Tran VT, Braus-Stromeyer SA, Timpner C, Braus GH (2013) Molecular diagnosis to discriminate pathogen and apathogen species of the hybrid *Verticillium longisporum* on the oilseed crop *Brassica napus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4467–4483
- Typas MA, Griffen AM, Bainbridge BW, Heale JB (1992) Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and sub-species populations in the genus *Verticillium*. *FEMS Microbiol Lett* 95:157–162
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35(suppl. 2):W71–W74
- Vicens Q, Paukstelis PJ, Westhof E, Lambowitz AM, Cech TR (2008) Toward predicting self-splicing and protein-facilitated splicing of group I introns. *RNA* 14:2013–2029
- Wang C, Li Z, Typas MA, Butt TM (2003) Nuclear large subunit rDNA group I intron distribution in a population of *Beauveria bassiana* strains: phylogenetic implications. *Mycol Res* 107:1189–1200
- Woodson SA (2005) Structure and assembly of group I introns. *Curr Opin Struc Biol* 15:324–330
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406–3415