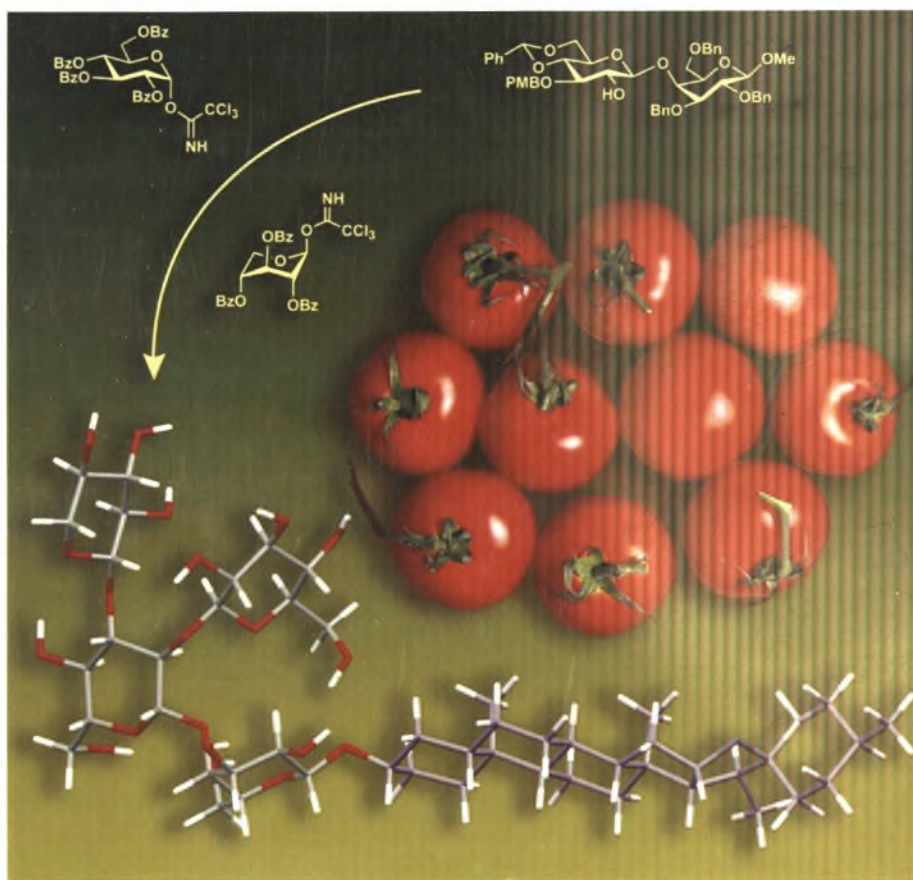


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΙΝΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ
ΜΥΚΗΤΑ *Fusarium solani* ΣΤΕΛΕΧΟΣ FsK



ΣΤΕΛΙΟΣ ΚΑΡΟΥΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009



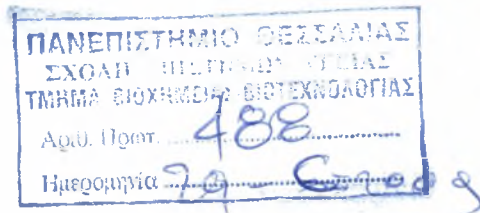
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7361/1
Ημερ. Εισ.: 15-09-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ




004000087194

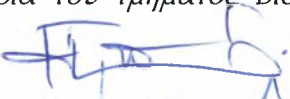



Περιεχόμενα

A.Εισαγωγή.....	σελ.3
Παθογένεια.....	σελ.3
1. Άμυνα των φυτικών οργανισμών.....	σελ.3
1.1.Αμυντικοί μηχανισμοί.....	σελ.3
1.2.Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	σελ.4
1.3. Θεμελιώδης άμυνα.....	σελ.5
1.4. Επαγόμενη άμυνα.....	σελ.8
1.5. Μοριακός «Συναγερμός».....	σελ.9
2. Μύκητες.....	σελ.10
2.1. Παθογόνοι μύκητες.....	σελ.11
2.2. Μη παθογόνοι μυκορριζικοί μύκητες.....	σελ.11
2.3. Προστασία του ριζικού συστήματος.....	σελ.12
2.3.1.Επαγόμενη Ανθεκτικότητα που προκαλείται από φυτο-προστατευτικούς οργανισμούς.....	σελ.14
2.3.2 <i>Fusarium Solani</i>	
3.1. Επαγόμενη Προστασία Μέσω του <i>Fusarium solani</i> (FsK).....	σελ.17
4. Τοματίνη.....	σελ.18
5.1. Τοματινάση	σελ 19
5.2 Πως δρουν οι γλυκοσιδάσες	σελ 20
B. Σκοπός της παρούσας εργασίας	σελ 22
Γ . Υλικά και Μέθοδοι	σελ 23
Γ.1. Απομόνωση και καθαρισμός της τοματινάσης του μύκητα <i>Fusarium solani</i> με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής	σελ 23
Γ. 2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	σελ 27
Γ.2.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΜΕΤΟΥΣΙΩΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ SDS (SDS-PAGE)	σελ 29
Γ.2.2. Προετοιμασία των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων	σελ 32
Γ.2.3. Χρώση με κυανό του Coomasie	σελ 33
Γ. 3. Tomatinase Assays	σελ 34
Γ.4. TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας)	σελ 35
Γ. 5. Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford.....	σελ 37
Γ. 6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	σελ 38
Γ. 7. Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης	σελ 40
Γ. 8. Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης	σελ 41
Γ. 9. Ενοποίηση των άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης	σελ 42

Γ. 10. Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς	σελ 43
Γ. 11 Χειρισμός πλασμιδίων	σελ 44
Γ.11.1. Προετοιμασία κυττάρων ικανών για μετασχηματισμό	σελ 44
Γ.11.2. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων E.coli	σελ 45
Γ.12. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	σελ 46
Γ.12.1. Μέθοδος του βρασμού (Boiling method, Holmes and Quigley 1981)	σελ 46
Γ.12.2. Πρωτόκολλο Miniprep (Qiagen)	σελ 47
Γ.13. Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού	σελ 48
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ 50
Δ. 1. Στήλη mono-Q	σελ 50
Δ. 2. TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας)	σελ 51
Δ. 3. Primers	σελ 53
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ 62
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ 64

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της παρακάτω τριμελούς επιτροπής
Κοντού Μαρία (*Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*) 

Παπαδοπούλου Καλλιόπη (*Επίκουρος Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*) 

Δελής Κώστας (*Διδάσκων σύμφωνα με το Π.Δ. 407 / 80*) 

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή για την υπόδειξη και την παρακολούθηση του θέματος, για την καθοδήγηση, τις χρήσιμες συμβουλές και τη στήριξη στην πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κροκιδά Αφροδίτη και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μπεκρή Φώτη και Κατσαρού Δήμητρα για τη βοήθειά τους, τις παρατηρήσεις τους και τα εύστοχα σχόλιά τους καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου λειτουργικής βιοχημείας για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα.

A. Εισαγωγή

Παθογένεια

Η διαδικασία προσβολής και αποικισμού του ξενιστή και η ικανότητα αναπαραγωγής ενός παθογόνου οργανισμού ονομάζεται παθογένεια.”

Τα φυτά αλληλεπιδρούν με οργανισμούς του περιβάλλοντος. Τα στελέχη που διαθέτουν την ικανότητα να ολοκληρώνουν με επιτυχία τη διαδικασία της παθογένειας ονομάζονται παθογενή ή μολυσματικά. Η παθογένεση εξαρτάται από την ικανότητα του στελέχους να καταστρέφει τα κύτταρα του ξενιστή πριν προλάβουν να αναπτυχθούν οι μηχανισμοί άμυνας. (1)Οι στρατηγικές που έχουν αναπτύξει τα παθογόνα σχετίζονται και με την εξουδετέρωση των μηχανισμών αναγνώρισης της εισβολής. Ανάλογη πορεία εξέλιξης ακολουθούν και οι φυτικοί οργανισμοί αναπτύσσοντας μηχανισμούς προσαρμογής σε διάφορες καταπονήσεις από το βιοτικό ή το αβιοτικό περιβάλλον. Η απεριόριστη ευελιξία των φυτικών οργανισμών σε βιοχημικό επίπεδο είναι υπεύθυνη για την επιβίωση τους, καθιστώντας ικανή την αποίκηση ακόμη και αντίξοων φυσικών περιβαλλόντων.

1. Άμυνα των φυτικών οργανισμών

1.1. Αμυντικοί μηχανισμοί

Η άμυνα των φυτικών οργανισμών απέναντι στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις επιτυγχάνεται μέσω φυσικών παρεμβαλλόμενων αμυντικών φραγμάτων, όπως η επιδερμίδα και η εφυμενίδα, και μέσω της βιοχημικής σύνθεσης ενώσεων που μπορεί να είναι τοξικές ή/και αποτρεπτικές για τα παθογόνα. Σε κάθε περίπτωση ο φυτικός οργανισμός επιδιώκει να εξισορροπήσει μεταξύ δύο

φαινομενικά ασυμβίβαστων αναγκών. Από τη μια πλευρά έγκειται η ανάγκη για ταχεία ανάπτυξη και από την άλλη η ανάγκη επιβίωσης. Η πρώτη αφορά τον αγώνα για υπέρσχυση και εξασφάλιση θρεπτικών ουσιών σε βάρος των περιβαλλόντων οργανισμών και η δεύτερη αφορά την προσπάθεια για διατήρηση των αμυντικών μηχανισμών έναντι παθογόνων και άλλων επιβλαβών οργανισμών. Η άμυνα των φυτικών οργανισμών έναντι των παθογόνων μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε: i) Θεμελιώδης προϋπάρχουσα άμυνα και ii) Επαγόμενη άμυνα.

Στη θεμελιώδη προϋπάρχουσα άμυνα περιλαμβάνονται οι μόνιμοι μηχανισμοί προστασίας λόγω της δομής των φυτών. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι μορφολογικοί χαρακτήρες, όπως ορισμένα εξαρτήματα της επιδερμίδας (άκανθες, τρίχες κ.α.). Με τις συγκεκριμένες κατασκευές παρέχεται η μηχανική προστασία. Επιπλέον, σε αυτές θα πρέπει να προστεθεί και ένα προσαρμοσμένο και εκτεταμένο χημικό οπλοστάσιο δευτερογενών μεταβολιτών που φέρονται σε συγκεκριμένους ιστούς και όργανα

1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Στα φυτά παράγεται και ένας μεγάλος αριθμός οργανικών μορίων, η σύνθεση των οποίων δεν φαίνεται να σχετίζεται ευθέως με τις ανάγκες της αύξησης και της ανάπτυξης. Αρχικά, θεωρήθηκε πως τα οργανικά αυτά μόρια αποτελούν προϊόντα μεταβολικής δραστηριότητας που δε σχετίζεται με φυσιολογικές λειτουργίες ζωτικής σημασίας και χαρακτηρίστηκε ως μια δευτερεύουσα σημασίας δραστηριότητα. Έτσι, οι ενώσεις αυτές ονομάστηκαν δευτερογενείς μεταβολίτες ή προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού. (6) Σύμφωνα με τη θεώρηση αυτή, τα προϊόντα του μεταβολισμού χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Στη μια συγκαταλέγονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες, ενώ στον αντίποδα βρίσκονται τα

προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού όπως αμινοξέα, λιπίδια, νουκλεοτίδια, υδατάνθρακες οργανικά οξέα κ.α., τα οποία διαδραματίζουν ζωτικής σημασίας ρόλους σε λειτουργίες όπως η αναπνοή, η φωτοσύνθεση, η αφομοίωση ανόργανων θρεπτικών στοιχείων κ.α. ενώ η ύπαρξή τους χαρακτηρίζει όλα ανεξαιρέτως τα κύτταρα. Στα φυσικά οικοσυστήματα οι φυτικοί οργανισμοί βρίσκονται συνεχώς σε επαφή με ένα εχθρικό βιοτικό περιβάλλον. Βακτήρια, ιοί, μύκητες, νηματώδεις, ακάρεα, έντομα, φυτοφάγα ζώα, συγκροτούν ένα μακρύ κατάλογο απειλητικών για την επιβίωση εχθρών. Δεδομένου ότι τα φυτά αδυνατούν να αντεπεξέλθουν στις αντίξοες συνθήκες του βιοτικού περιβάλλοντος με τη φυγή, αναγκάστηκαν μέσω της εξέλιξης να εφοδιαστούν εκτός από την κατάλληλη δομή, και με ένα τεράστιο βιοχημικό οπλοστάσιο δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι θωρακίζουν τα φυτικά κύτταρα έναντι των επίδοξων εχθρών.

Στην επαγόμενη άμυνα περιλαμβάνονται οι βιοχημικοί μηχανισμοί που εμφανίζονται μόνο σε κατάσταση προσβολής ή άλλου είδους καταπόνησης. Το περιβάλλον ανάπτυξης του φυτικού οργανισμού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο είδος των αμυντικών μηχανισμών που αναπτύσσονται σε κάθε περίπτωση. Οι μηχανισμοί της θεμελιώδους άμυνας παρουσιάζονται συνήθως ενισχυμένοι σε φυτά τα οποία αποικίζουν περιβάλλοντα με περιορισμένα αποθέματα θρεπτικών συστατικών (μεσογειακό οικοσύστημα).

1.3. Θεμελιώδης άμυνα

Οι φυτικοί οργανισμοί δίνουν προτεραιότητα στην αμυντική θωράκιση των επιφανειών που είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό περιβάλλον. Η επιδερμίδα και τα εξαρτήματά της, η κουτίνη και οι κηροί της εφυμενίδας των υπέργειων οργάνων, καθώς και η σουβερίνη, που καλύπτει κυρίως τα υπόγεια όργανα, αποτελούν βασικό τμήμα της θεμελιώδους άμυνας. Με αυτό τον τρόπο οι δευτερογενείς

μεταβολίτες συσσωρεύονται σε περιοχές πάνω ή κοντά στην επιφάνεια των φυτικών οργάνων. Τα σημαντικότερα εφόδια όμως αποτελούν η προσαρμογή στο φυσικό περιβάλλον και ο συνδυασμός των μηχανισμών, προσδίδοντας σε κάθε φυτικό είδος περισσότερους μηχανισμούς άμυνας και ένα μεγάλο αριθμό αμυντικών μεταβολιτών.

Η θεμελιώδης άμυνα δεν αποτελεί ένα απλό, άκαμπτο σύνολο αμυντικών μηχανισμών. Αντίθετα, μπορεί και προσαρμόζεται, όχι μόνο σε βιοτικές καταπονήσεις, αλλά και στις διάφορες συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον (Πίνακας 1). Μεγάλη επίδραση στη διαμόρφωση της θεμελιώδους άμυνας έχει η εποχή, το στάδιο της ανάπτυξης και το είδος του οργάνου (20). Έτσι, τα νεαρά φύλλα θωρακίζονται με υψηλότερες συγκεντρώσεις δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ οι καρποί εμφανίζονται με μειωμένη αμυντική προστασία, καθώς η κατανάλωση τους αποτελεί συνήθως μέρος της διαδικασίας εξάπλωσης του είδους. Επιπλέον, η επιλογή του είδους των αμυντικών μεταβολιτών που παράγονται, εξαρτάται και από τη διαθεσιμότητα ορισμένων θρεπτικών στοιχείων, όπως του αζώτου. Έλλειψη αζώτου έχει ως αποτέλεσμα τις περισσότερες φορές τη σύνθεση μεταβολιτών που περιέχουν κυρίως άνθρακα στο μόριο τους, σε βάρος μεταβολιτών που περιέχουν άζωτο. Ταυτόχρονα, ρόλο στην επένδυση της άμυνας διαδραματίζει και η διάρκεια ζωής των υπό προστασία οργάνων. Άλλη μια σημαντική συνεισφορά στην άμυνα ενός φυτικού οργανισμού έχουν και οι απονεκρωμένοι ιστοί, στους οποίους, όμως, σε κάποια στάδια της ανάπτυξης συσσωρεύονται δευτερογενείς μεταβολίτες, συνήθως φαινολικές ουσίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ιστών αποτελούν το εγκάρδιο ξύλο του κορμού ορισμένων δένδρων, καθώς και ορισμένα επιδερμικά εξαρτήματα.

Πίνακας 1. Παράγοντες Καταπόνησης στο περιβάλλον (αναφορά)

Αβιοτικοί			Βιοτικοί
Φυσικοί	Χημικοί	Ανθρωπογενείς	
Ορατή ακτινοβολία Έλλειψη Περίσσεια UV-ακτινοβολία	Θρεπτικά συστατικά- περιβάλλον Έλλειψη- Περίσσεια-Μη ισορροπημένη σύσταση	Ρύπανση- Φυτοφάρμακα- Υποβάθμιση εδαφών- Ιονίζουσες ακτινοβολίες Ηλεκτρομαγνητικά πεδία	Φυτά Επικάλυψη – Αλληλοπάθεια – Παρασιτισμός
Θερμοκρασία Υπερθέρμανση Ψύχος Παγετός	Αλατότητα Βαρέα Μέταλλα Όξινο pH Βασικό pH		Παθογόνα Προσβολές ιών, μυκήτων, βακτηρίων
Υδατικό περιβάλλον Εηρή ατμόσφαιρα Εηρό έδαφος Κατάκλιση	Αέριο περιβάλλον Έλλειψη οξυγόνου Αλλαγές στη σύσταση της ατμόσφαιρας		Ζώα Κατανάλωση Τραυματισμοί
Μηχανική καταπόνηση Άνεμος Κάλυψη Κάλυψη από χιόνι Σχηματισμός			

πάγου	
Τραυματισμοί	

1.4. Επαγόμενη άμυνα

Η εισβολή των παθογόνων στο εσωτερικό των κυττάρων σηματοδοτεί μια σειρά αντιδράσεων από την πλευρά του φυτού. Ο χρόνος απόκρισης και η ταχύτητα των αντιδράσεων αυτών καθορίζει την επιτυχία της εξουδετέρωσης του εισβολέα. Με την εξουδετέρωση του παθογόνου προσδίδεται και μια επίκτητη ανθεκτικότητα, που σε ορισμένες περιπτώσεις δεν περιορίζεται στην περιοχή μόλυνσης, αλλά χαρακτηρίζει πλέον ολόκληρο το σώμα του φυτού. Οι επαγόμενοι αμυντικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τις παρακάτω διεργασίες:

α) **Σύνθεση φυτοαλεξινών.** Τα κύτταρα που έχουν προσβληθεί, αλλά και τα γειτονικά τους, συνθέτουν φυτοαλεξίνες, δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι λιπόφιλες ουσίες και εξαιρετικά τοξικές για τα παθογόνα.

β) **Αντίδραση υπερευαισθησίας.** Στην περιοχή της προσβολής δημιουργείται νεκρωτική κηλίδα, λόγω επιλεκτικής νέκρωσης των κυττάρων της περιοχής, ως αποτέλεσμα της διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Με άλλα λόγια το φυτό προτιμά την νέκρωση συγκεκριμένων ιστών αποτρέποντας την εξάπλωση της μόλυνσης (20)

γ) **Παραγωγή ορισμένων μορίων-σημάτων συναγερμού.** Ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί παραγωγής οξειδίου του αζώτου, σαλικυλικού, γιασμονικού και βενζοϊκού οξέος και αιθυλενίου.

δ) **Ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων.** Κατά κανόνα στην εσωτερική πλευρά των κυτταρικών τοιχωμάτων δημιουργούνται προεκβολές (θηλές). Στις θηλές αυτές εναποτίθενται φαινολικές ουσίες και καλλόζη. Ταυτόχρονα, παρατηρείται και αυξημένη εναπόθεση λιγνίνης και ορισμένων αμυντικών γλυκοπρωτεϊνών, έτσι ώστε να περιορίζεται η εξάπλωση του παθογόνου.

ε) **Σύνθεση νέων πρωτεϊνών.** Ενεργοποιείται η παραγωγή πρωτεϊνών που σχετίζονται με την παθογένεση [pathogenesis related proteins] – PRP). Η δράση των πρωτεϊνών αυτών (λεκτίνες, χιτινάσες κ.α.) στοχεύει στην εξουδετέρωση του παθογόνου. Οι πρωτεΐνες παράγονται ανεξάρτητα από το είδος του παθογόνου και εκκρίνονται στους μεσοκυττάριους χώρους ή εναποτίθενται στο χυμοτόπιο. Για τη μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων είναι υπεύθυνα μόρια σήματα συναγερμού, όπως αναφέρθηκε για τις περιπτώσεις του σαλικυλικού οξέος του αιθυλενίου κ.α.

1.5. Μοριακός «Συναγερμός»

Τα φυτά αντιλαμβάνονται την προσβολή από κάποιο παθογόνο κατά κανόνα μέσω εξειδικευμένων σημάτων, των διεγερτών. Οι διεγέρτες είναι συνήθως τμήματα των κυτταρικών τοιχωμάτων ή μεμονωμένα μόρια πολυσακχαριτών του παθογόνου, τα οποία έχουν προκύψει από την υδρολυτική δράση αμυντικών ενζύμων που διαθέτουν οι φυτικοί οργανισμοί. Το ρόλο του διεγέρτη μπορεί να έχουν και άλλα μόρια, όπως οι γλυκοπρωτεΐνες, διάφορα πεπτίδια, λιπαρά οξέα, ένζυμα του παθογόνου, αλλά και τμήματα του ιστού που έχει προσβληθεί(20). Μέσω αυτών των μορίων ενεργοποιούνται εξειδικευμένοι υποδοχείς που βρίσκονται στα φυτικά κύτταρα. Οι υποδοχείς αυτοί με τη σειρά τους παράγουν ένα εσωτερικό σήμα, το οποίο μπορεί να είναι NO, σαλικυλικό οξύ κ.α.. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίηση άλλων παραγόντων. Έτσι μέσω κατάλληλων μηχανισμών μεταγωγής του σήματος, η αντίδραση γενικεύεται.

2. Μύκητες

Οι μύκητες είναι οργανισμοί που διαθέτουν εύκαμπτα κυτταρικά τοιχώματα και έχουν την ανάγκη υδατανθράκων εξωτερικής προελεύσεως για τη διατροφή τους. Μπορεί να είναι μονοκύτταροι, όπως οι ζύμες, ή πολυκύτταροι. Η δομική μονάδα των πολυκύτταρων μυκήτων είναι η υφή. Τα είδη αλλά και ο πληθυσμός που συναντώνται σε ένα έδαφος καθορίζονται κυρίως από τον αερισμό, την υγρασία, το pH, τη θερμοκρασία αλλά και την οργανική ουσία. Σε όλα τα εδάφη υπάρχουν όλες σχεδόν οι τάξεις των μυκήτων.

Η πλειονότητα όμως της ενεργούς μυκητοχλωρίδας εντοπίζεται στους ατελείς μύκητες και συγκεκριμένα στα γένη *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Glilocladium*, *Cladosporium* και *Fusarium* και στους φυκομύκητες *Mucor*, *Rhizopus* και *Mortierella*. Η σύνθεση των μυκήτων στο έδαφος, ελέγχεται από την ποσότητα και τη μορφή του άνθρακα. Έτσι, τα *Penicillia*, σε γενικές γραμμές, αποικοδομούν κυτταρίνη και ξυλάνες (20), ενώ η συχνότητα εμφάνισης των Mucorales, τα οποία αποικοδομούν πρωτεΐνες, αυξάνεται με την εντατικοποίηση της διαδικασίας της αποσύνθεσης και της ανοργανοποίησης στο έδαφος. Ο *Mucor hiemalis f. hiemalis*, εξαιτίας της ταχύτατης ανάπτυξης του, αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς μύκητες στο έδαφος και τον πιο αντιπροσωπευτικό των Mucorales (Zygomycotina). Η ποσότητα του διοξειδίου του άνθρακα και η ικανότητα των μυκήτων να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂, παρά σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου καθορίζει την κατακόρυφη διανομή τους σε ένα έδαφος. Λίγες είναι οι γνώσεις σχετικά με την πληθυσμιακή δυναμική, την κοινοτική δομή και την ποικιλότητα. Ο χρόνος ζωής των μυκήτων είναι εντελώς σχετικός. Εφόσον υπάρχει ελεύθερος χώρος και θρεπτικά συστατικά, αναπτύσσονται

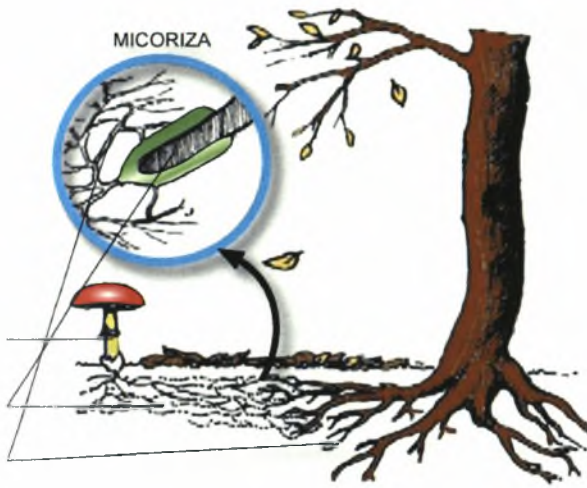
2.1. Παθογόνοι μύκητες

Οι μύκητες αποτελούν τη σπουδαιότερη ομάδα παθογόνων των φυτών λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο αριθμό ασθενειών και την οικονομική ζημία που προκύπτει από μερικές από αυτές τις ασθένειες. Ο αριθμός των ειδών των μυκήτων που προκαλούν ασθένειες σε ανώτερα φυτά είναι πολύ μεγάλος. Υπολογίζονται περίπου 6.500 είδη μυκήτων που αποτελούν υποχρεωτικά παράσιτα των ανωτέρων φυτών. Τα μη υποχρεωτικά παράσιτα είναι πολύ περισσότερα. Ένα μόνο γένος των Αδηλομυκήτων, το γένος *Cercospora*, διαθέτει 1200 παρασιτικά είδη. Σε κάποιους από τους κατώτερους μύκητες δε διακρίνεται κυτταρικό τοίχωμα σε όλη ή σε ένα μέρος της διάρκειας του βιολογικού τους κύκλου.

2.2. Μη παθογόνοι μυκορριζικοί μύκητες

Η ικανότητα των φυτών να προσλαμβάνουν το νερό και τα θρεπτικά συστατικά, όταν αυτά βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση στο έδαφος, οφείλεται στο εκτεταμένο ριζικό τους σύστημα. Αυτή η απορροφητική ικανότητα των ριζών βελτιώνεται σημαντικά όταν στις ρίζες συμβιώνουν μύκητες. Στη φύση, οι νεαρές ρίζες των περισσότερων φυτικών ειδών είναι συνδεδεμένες με μύκητες και σχηματίζουν τη μυκόρριζα. Η μυκόρριζα (Εικόνα 1) αποτελείται από συμβιωτικούς σχηματισμούς οι οποίοι απαρτίζονται από μη ή ελάχιστα παθογόνους μύκητες και ζωντανά κύτταρα της ρίζας. Όταν η νεαρή ρίζα προσβάλλεται από το μύκητα, σταματά ο σχηματισμός ριζικών τριχιδίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της επιφάνειας απορρόφησης της ρίζας.(20) Τον ρόλο αυτόν αναλαμβάνουν τώρα οι υφές των μυκορριζών. Κατά τη διάρκεια της συμβίωσης αυτής οι μύκητες παίρνουν από το φυτό οργανικές ενώσεις, κυρίως σάκχαρα, και ως αντάλλαγμα μεταφέρουν στις

ρίζες νερό, θρεπτικά στοιχεία και ιόντα αυξάνοντας την απορροφητική ικανότητα της ρίζας.



Εικόνα 1. Μυκόριζα

2.3. Προστασία του ριζικού συστήματος

Υπάρχει και μια κατηγορία ωφέλιμων ανταγωνιστών μικροοργανισμών στις τάξεις των οποίων συγκαταλέγονται βακτήρια και μύκητες που έχουν ως αποστολή την προστασία του ριζικού συστήματος των φυτών από επίδοξους εισβολείς, όπως φυτοπαθογόνους μύκητες και φυτοπαθογόνα βακτήρια. Παράλληλα προστατεύουν και από μύκητες, βακτήρια και ιούς που προσβάλλουν το υπέργειο μέρος των φυτών. Μερικά από τα σημαντικότερα γένη που παρέχουν εξαιρετικής σπουδαιότητας μικρόβια στην αντιμετώπιση των ασθενειών του ριζικού συστήματος είναι: *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Coniothyrium*, *Verticillium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Gliocladium*, *Pythium*, *Talaromyces*. Επίσης, οι μη παθογόνες φυλές *Rhizoctonia*, οι μη παθογόνες φυλές *Fusarium*, οι μη παθογόνες φυλές *Pseudomonas solanacearum*, και οι *Phlebia gigantea* αποτελούν μερικούς από τους πιο «δοκιμασμένους» μικροοργανισμούς.

Όπως φαίνεται, το έδαφος και ειδικά η ριζόσφαιρα αποτελεί πεδίο σκληρών αντιπαραθέσεων και υπέρμετρου ανταγωνισμού που φθάνει στα όρια του κανιβαλισμού. Τα πρωτόζωα και οι νηματώδεις τρέφονται με μικροοργανισμούς, τα ακάρεα τρέφονται με μύκητες, οι μύκητες και τα βακτήρια προσβάλλουν και θανατώνουν νηματώδεις αλλά και ακάρεα, οι νηματώδεις πιθανόν τρέφονται με πρωτόζωα και τα ακάρεα πιθανόν τρέφονται με νηματώδη, οι αμοιβάδες τρέφονται με μύκητες και νηματώδη, ενώ οι νηματώδεις και οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί παρασιτούν το ριζικό σύστημα(8). Όλα αυτά βεβαίως, έχουν σημαντικές επιδράσεις στην ανάπτυξη και παραγωγή των φυτών, στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων και την διαθεσιμότητα τους στα φυτά. Όμως εκτός από αυτά υπάρχει και ανταγωνισμός και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ωφέλιμων μικροοργανισμών. Βακτήρια που συγκαταλέγονται στους ανταγωνιστές ανταγωνίζονται μεταξύ τους, μύκητες που συγκαταλέγονται στους ανταγωνιστές ανταγωνίζονται μεταξύ τους και φυσικά ωφέλιμα βακτηρία ανταγωνίζονται ωφέλιμους μύκητες και το αντίθετο. Μυκόρριζες ανταγωνίζονται και παρασιτούν ωφέλιμους μύκητες που ανήκουν στο γένος *Trichoderma*(9). Η ευαισθησία, η ανεκτικότητα ή η ανθεκτικότητα των φυτών απέναντι στα παθογόνα συνιστά μια μάλλον εξελικτική διαδικασία με έντονη την επίδραση και αλληλεπίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Η άμυνα των φυτών σε μεγάλο βαθμό καθορίζεται από τα γονίδια και το περιβάλλον. Τα γονίδια συμβάλουν με την έκφραση αντιμυκητιακών και αντιβακτηριακών πρωτεϊνών, ενώ το περιβάλλον και ειδικά η θερμοκρασία και η υγρασία καθορίζουν αν οι συνθήκες θα είναι ευνοϊκές ή όχι για μια μόλυνση. Η παρουσία θρεπτικών και η απουσία τοξικών ουσιών, στο σημείο προσβολής, είναι ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας.

Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί, που προστατεύουν το ριζικό σύστημα των φυτών (Εικόνα 2), διαθέτουν μια σειρά από μηχανισμούς μέσω των οποίων αναστέλλουν την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών ή προκαλούν ακόμα και την

καταστροφή τους. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι η αντιβίωση, οι τοξίνες, ο παρασιτισμός, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά και χώρο, και η επαγομένη συστηματική ανθεκτικότητα.



Εικόνα 2. Υγιές ριζικό σύστημα

2.3.1. Επαγόμενη Ανθεκτικότητα που προκαλείται από φυτο-προστατευτικούς οργανισμούς

Επαγόμενη ανθεκτικότητα (βλεπε 2.1.2) μπορεί να προκληθεί και από μη παθογόνες φυλές μικροοργανισμών. Έτσι, σε φυτά τομάτας που εφαρμόστηκε ο *Bacillus subtilis* στο ριζικό σύστημα είχε σαν αποτέλεσμα μείωση έως 50% του παρασιτισμού από τον *Phytophthora infestans*, ενώ σε φυτά φασολιού χρησιμοποιήθηκε *Pseudomonas aeruginosa* μέσω του σαλικυλικού οξέος επιτεύχθηκε ανθεκτικότητα κατά του *Botrytis cinerea*. Ακόμη, ένα μείγμα από ριζοβακτήρια που επάγουν την αύξηση του φυτού (plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (*Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Curtobacterium flaccumfaciens*) μελετήθηκε για την αποτελεσματικότητά του έναντι παθογόνων σε παθογόνα φυλλώματος στο αγγούρι. Μέσω της επαγόμενης συστηματικής ανθεκτικότητας (induced systemic resistance) παρατηρήθηκε καταστολή της γωνιώδους κηλίδωσης (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) και της ανθράκωσης (*Colletotrichum orbiculare*). Ομοίως θετικά αποτελέσματα κατά της ανθράκωσης, της γωνιώδους κηλίδωσης και της

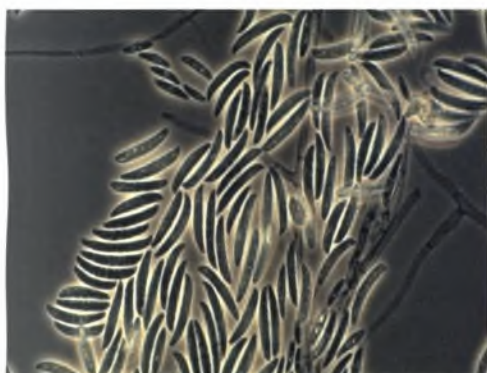
μάρανσης από *Fusarium* στο αγγούρι παρατηρήθηκε ύστερα από εφαρμογή μυκήτων που επάγουν την αύξηση του φυτού (plant growth promoting fungi-PGPF)(10). PGPR οδήγησαν άμεσα ή έμμεσα σε επαγόμενη συστηματική ανθεκτικότητα φυτών αγγουριού κατά του *Erwinia tracheiphila* και φυτών τομάτας κατά των cucumber mosaic virus (CMV) και tomato mottle virus (ToMoV) 3.

2.3.2. *Fusarium solani*

Ο *Fusarium solani* είναι ένας νηματοειδής μύκητας (Εικόνα 3) που μπορεί να εντοπιστεί τόσο στα φυτά όσο και στο χώμα (Εικόνα 4).



Εικόνα 3. *Fusarium solani* σε στερεή καλλιέργεια



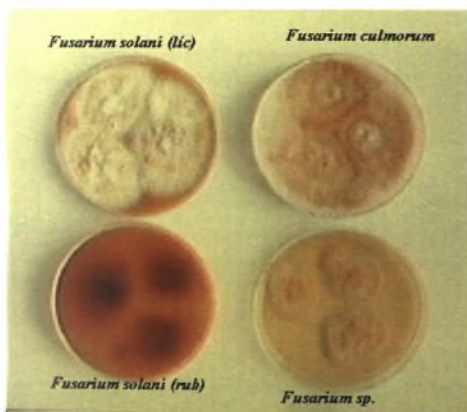
Εικόνα 4. *Fusarium solani* στο μικροσκόπιο

Βρίσκεται στη φυσιολογική μυκητιακή χλωρίδα προϊόντων, όπως το ρύζι, το φασόλι, τη ντομάτα, τη σόγια, και άλλων συγκομιδών και αποτελεί ένα γνωστό πλέον φυτοπαθογόνο (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Φυτοπαθογόνος δράση *Fusarium solani*.

Η μακροσκοπική μορφολογία μπορεί να ποικίλει σημαντικά στα διαφορετικά θρεπτικά στα οποία αναπτύσσεται ο μύκητας (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Διάφορα στελέχη *Fusarium* .

3.1. Επαγόμενη Προστασία Μέσω του *Fusarium solani* (FsK)

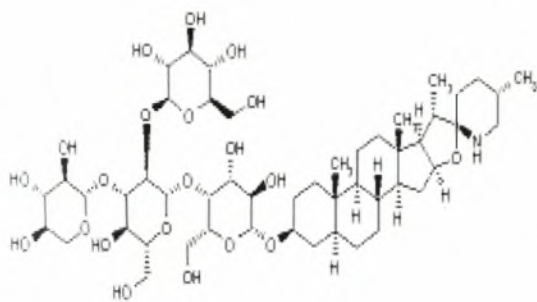
Το στέλεχος του μύκητα που μελετάται εδώ (Πίνακας 2) είναι το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium solani* (θα αναφέρεται ως FsK στο κείμενο). Απομονώθηκε από ένα επισχετικό compost από υπολείμματα στεμφύλων και παραπροϊόντων ελαιουργίας (1). Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφανίζει την ικανότητα να επιφέρει στα φυτά της τομάτας ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα φυλλώματος *Septoria lycopersici* (1). Ο μύκητας προστατεύει επίσης τοπικά το φυτό έναντι της προσβολής από το ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum radices-lycopersici* (1)(13) μέσω του μηχανισμού άμυνας που εμπλέκεται το αιθυλένιο. Ο *Fusarium*, και άλλοι μύκητες παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα γνωστά ως τοματινάσες. Οι τοματινάσες διασπούν την *α-tomatine* σε λιγότερο τοξικά παράγωγα. Οι τοματινάσες του *Fusarium solani* και του *Fusarium oxysporum* διασπούν την β1-συνδεδεμένη γαλακτόζη και απελευθερώνουν την β-lycotetraose και την τοματιδίνη. (15)

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά *Fusarium solani*

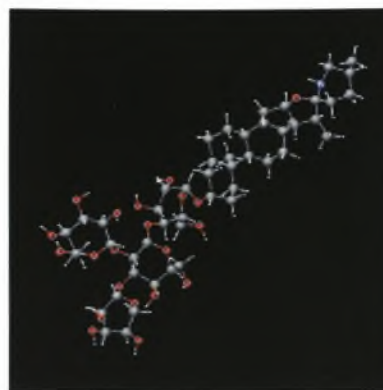
Βασίλειο	Μυκητες
Φύλο	Ασκομύκητες
Τάξη	Hypocreales
Οικογένεια	Hypocreaceae
Γένος	<i>Fusarium</i>

4. Τοματίνη

Στο φυτό της τομάτας παράγεται ένας δευτερογενής μεταβολίτης, η α-τοματίνη (Εικόνα 7, Εικόνα 8).



Εικόνα 7. Συντακτικός τύπος α-τοματίνης.

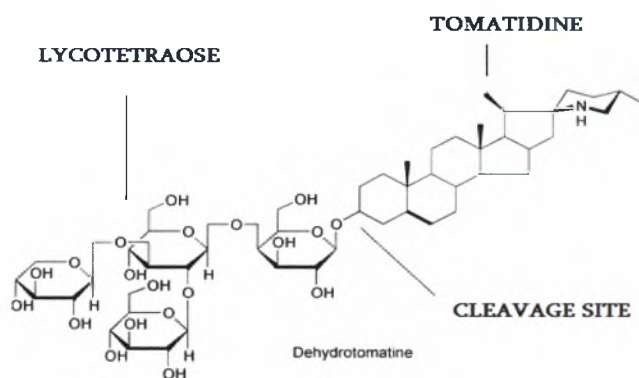


Εικόνα 8. Δομή τοματίνης (14)

Αποτελεί μια σαπωνίνη που εμποδίζει την ανάπτυξη των μυκήτων καθώς είναι τοξική γι' αυτούς. Εντοπίζεται ως ένα σύμπλεγμα το οποίο προστατεύει τα φυτά από την επίθεση ενός ευρέους φάσματος παθογόνων μυκήτων. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν τέτοιες «επιθέσεις» στις υγιείς ντομάτες, η α-τοματίνη βρίσκεται στα φύλλα σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις. Οι περισσότερες σαπωνίνες παρουσιάζουν υδρόφοβο χαρακτήρα, έχουν αιμολυτικές και χολιστερολικές ιδιότητες και εμφανίζουν σημαντική αντιμυκητιακή δράση. Τα θεωρούμενα μυκητοτοξικά αποτελέσματα της α-τοματίνης, καθώς και άλλων σαπωνινών, οφείλονται στην αλληλεπίδρασή τους με τις 3β-υδροξυστερόλες των μυκήτων(16). Η αλληλεπίδρασή αυτή προκαλεί την αυξανόμενη διαπερατότητα των μεμβρανών και την επακόλουθη διαρροή των ηλεκτρολυτών. Τέτοιου είδους σαπωνίνες μπορεί να συναντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε υγιείς φυτικούς οργανισμούς.

5.1. Τοματινάση

Παθογόνα της τομάτας έχουν την ικανότητα να αντιστέκονται στην τοξικότητα της α -τοματίνης λόγω της μεμβρανικής τους σύστασης και άλλοι παθογόνοι μύκητες παράγοντας κάποια εξωκυτταρικά ένζυμα που την υδρολύουν σε λιγότερο τοξικά παράγωγα. Μια τέτοια δράση παρουσιάζει και το ένζυμο τοματινάση (Εικόνα 9). Με αυτόν τον μηχανισμό μύκητες όπως ο *Fusarium solani* πετυχαίνουν να παρακάμπτουν την άμυνα του φυτού αποδυναμώνοντας το χημικό του οπλοστάσιο.(18)



Εικόνα 9 . Υδρόλυση της α -τοματίνης από το ένζυμο τοματινάση.

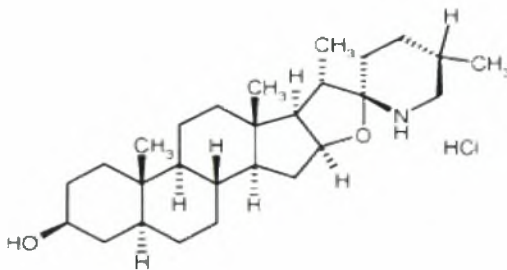
Η τοματινάση είναι μια γλυκοσιδάση που ανήκει στην οικογένεια των β -γλυκοσυδασών. Η αποτοξικοποίηση της α -τοματίνης επιτυγχάνεται καθώς η τοματινάση απομακρύνει είτε ένα σάκχαρο είτε και τα τέσσερα σάκχαρα από την τοματίνη. (2)

Οι γλυκοσιδάσες χωρίζονται σε 45 οικογένειες. Εντοπίζονται σε προκαρυωτικούς οργανισμούς και σε βακτήρια τόσο ενδοκυττάρικα όσο και εξωκυτταρικά (ως

εξωκυτταρικά ένζυμα). Χρησιμοποιούνται για την απόκτηση κυρίως θρεπτικών συστατικών. Τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής υδρολύουν O-, N- ή S-γλυκοσυλ-δεσμού. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία των φυτών, καθώς συμμετέχουν στην βιοσύνθεση της λιγνίνης, στη χημική προστασία του φυτού ενάντια στα παθογόνα αλλά και γενικότερα στην αύξηση και στην ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών.

Οι β-γλυκοσιδάσες καταλύουν την υδρόλυση του γλυκοσιδικού δεσμού μεταξύ του ανω άνθρακα και του “γλυκοσιδικού” οξυγόνου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσα από έναν μηχανισμό στον οποίο η ανω διαμόρφωση της γλυκόζης διατηρείται.

Η τοματινάση χρησιμοποιείται σαν όπλο από τον *Fusarium solani* προκειμένου να «παρακάμψει» μια άμυνα του φυτού, που επρόκειτο να προσβάλει. Υδρολύοντας την τοματινή προκύπτουν δύο παράγωγά της. Αυτά είναι λιγότερο τοξικά και είναι η τοματιδίνη (Εικόνα 10) και το Lycotetraose. (7)



Εικόνα 10. Τοματιδίνη

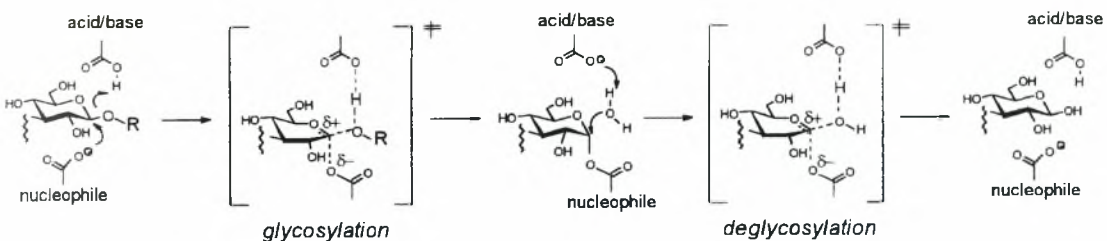
5.2 Πως δρουν οι γλυκοσιδάσες

Η ενζυμική υδρόλυση του γλυκοσιδικού δεσμού πραγματοποιείται μέσω μιας γενικής όξινης κατάλυσης που απαιτεί δύο πολύ σημαντικά κατάλοιπα. Έναν δότη πρωτονίων και ένα νουκλεόφιλο μόριο/βάση. Αυτού του είδους η υδρόλυση πραγματοποιείται μέσω δύο κυρίων σημαντικών μηχανισμών.(3) Οι μηχανισμοί

αυτοί χρησιμοποιούν είτε μια γενική διατήρηση, είτε μια αναστροφή, της ανωμερούς διαμόρφωσης του μορίου που πρόκειται να υδρολυθεί. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις, διατήρηση – αναστροφή, η θέση του δότη πρωτονίων είναι η ίδια, βρίσκεται πάντα στην περιοχή του υδρογόνου του γλυκοσιδικού οξυγόνου. Στα ένζυμα που χρησιμοποιούν το μηχανισμό διατήρησης, η νουκλεόφιλη καταλυτική βάση βρίσκεται σε στενή εγγύτητα με τον ανωμερή άνθρακα του σακχάρου. Αυτή η βάση ωστόσο βρίσκεται πιο μακριά στην περίπτωση αναστροφής, όπου ένα μόριο νερού θα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ της βάσης και του σακχάρου.

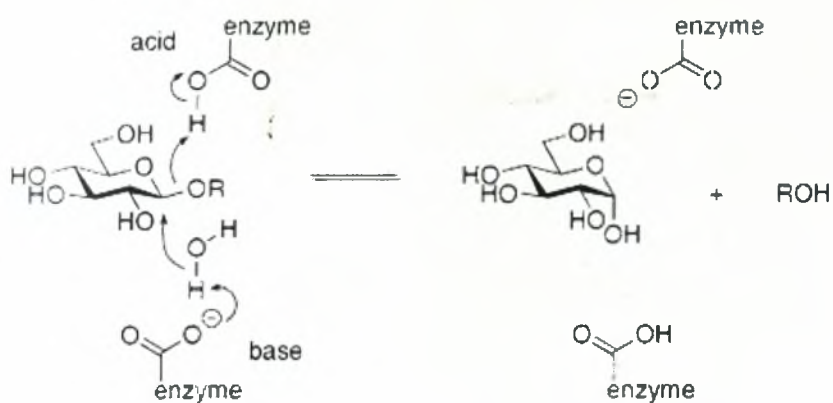
Αυτή η διαφορά οδηγεί σε μια μέση απόσταση μεταξύ των δύο καταλυτικών καταλοίπων των 5.5 Å στα ένζυμα που χρησιμοποιούν το μηχανισμό της διατήρησης, ενώ στα ένζυμα που χρησιμοποιούν τον μηχανισμό της αναστροφής φτάνουμε σε μια απόσταση των 10 Å. (5)

A) Retaining Mechanism



Εικόνα 11 : Retaining Mechanism

B) Inverting Mechanism



Εικόνα 12 : Inverting Mechanism

B. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση της τοματινάσης από τον μύκητα FsK και η μελέτη της ενζυμικής της δράσης. Παράλληλα, η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό την προσπάθεια εύρεσης του γονιδίου της τοματινάσης στο γονιδίωμα του μύκητα, μια αντίστροφη από την παραπάνω πορεία μελέτης. Είναι γνωστό ότι οι τοματινάσες παράγονται από παθογόνους μύκητες. Ο FsK είναι ένας μη παθογόνος μύκητας. Επομένως, ένας επιπρόσθετος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η προσπάθεια διαχωρισμού των παθογόνων από τα μη παθογόνα στελέχη μυκήτων με βασικό κριτήριο την παραγωγή του ενζύμου της τοματινάσης.

Γ. Υλικά και Μέθοδοι

Acrylamide 30%	<i>Appliechem</i>
TEMED	<i>Sigma</i>
Ammonium Sulfate	<i>Sigma</i>
Agarose	<i>Biorad</i>
Polymerase	<i>Kapa Taq</i>
dNTPs	<i>Mix Biotline</i>
Restriction Enzymes	<i>Takara, NEB</i>
Bradford	<i>BIOQUANT της MERCK</i>

Πίνακας 3 : Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

Γ.1. Απομόνωση και καθαρισμός της τοματινάσης του μύκητα *Fusarium solani* με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

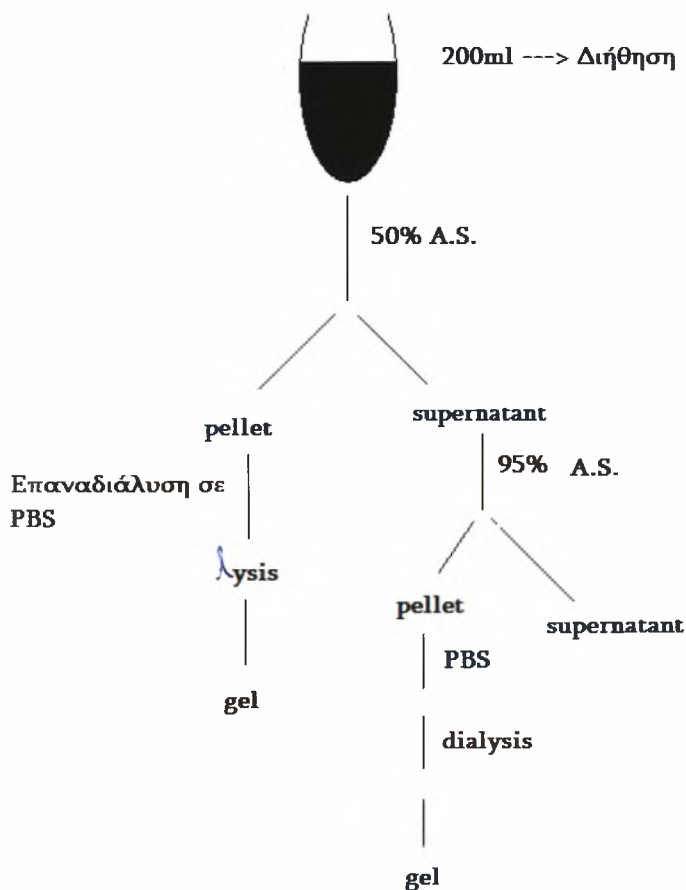
Από στερεή καλλιέργεια του μύκητα FsK αποσπάστηκε τμήμα του και εμβολιάστηκε σε υγρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια εμβολιάστηκε με τοματίνη και αναπτύχθηκε για 5 μέρες σε θερμοκρασία 29°C.

LB : Για την παρασκευή ενός λίτρου διαλύματος προστίθενται 10 ng Bactotryptone, 10 gr yeast extract, 5 gr NaCl. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου τρυβλίων προστίθενται στα παραπάνω 15gr άγαρ. Τα θρεπτικά διαλύματα αποστειρώνονται και φυλάσσονται στους 4°C.

Αφού έχει αναπτυχθεί η καλλιέργεια την «φιλτράρουμε» με τουλουπάνη έτσι ώστε να απομακρύνουμε το μυκήλιο.

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε κατακρήμνιση με Ammonium Sulfate σύμφωνα με μια στρατηγική αρχικής απομόνωσης της τοματίνης από την συνολική καλλιέργεια.

Αυτό επιτυγχάνεται καθώς το ένζυμο που προσπαθούμε να απομονώσουμε πιθανόν να βρίσκεται σε κάποιο ίζημα που προκύπτει από την παρακάτω διαδικασία. (Εικόνα 13) Αυτό έγινε προκειμένου να επέλθει ένας αρχικός καθαρισμός της τοματινάσης.



Εικόνα 13 : Σχέδιο Κατακρημνίσεων

Από το διήθημα που περιέχει την πρωτεΐνη χρησιμοποιούμε 200ml. Κάνουμε κατακρήμνιση με 50% Ammonium Sulfate και παίρνουμε pellet και supernatant. Η κατακρήμνιση επιτυγχάνεται στους 0°C ρίχνοντας σιγα-σιγα Ammonium Sulfate και αναδεύοντας ταυτόχρονα. Μετά από κάθε κατακρήμνιση φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφες για μισή ώρα. Μετά τις φυγοκεντρήσεις παρουσιάζεται ίζημα το οποίο διαλύεται πιπετάροντας με 0,5 ml PBS.

Στη συνέχεια κάνουμε dialysis (διαπήδηση) over night. Στη διαπήδηση χρησιμοποιούμε μεμβράνες. Οι μεμβράνες παρασκευάζονται ως εξής : δημιουργούμε ένα διάλυμα 4g NaHCO₃ (BAKER) σε 300ml H₂O και το αφήνουμε να βράζει για 30min. Οι μεμβράνες με αυτό τον τρόπο καθίστανται ημιδιαπερατές.

Η παρουσία της τοματίνης διεγείρει την παραγωγή της τοματινάσης. Ο καθαρισμός της από την καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Με την τεχνική αυτή πετυχαίνεται κλασμάτωση των μορίων με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο και εφαρμόζεται για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών, αφού μόρια που παρουσιάζουν έστω και μικρές διαφορές στο φορτίο τους μπορούν εύκολα να διαχωριστούν. Οι ιονικοί ανταλλάκτες που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από αδιάλυτο στο νερό υλικό, πάνω στο οποίο βρίσκονται ομοιοπολικά συνδεδεμένες οι φορτισμένες ομάδες που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν αμφίδρομα από το περιβάλλον τους, με ηλεκτροστατικές δυνάμεις, ιόντα και πρωτεΐνες αντίθετου φορτίου. Ανάλογα με το είδος του φορτίου που οι ανταλλάκτες μπορούν να δεσμεύσουν διακρίνονται σε ανιονικούς και κατιονικούς. Η αποδέσμευση των πρωτεϊνών από έναν ανταλλάκτη, επιτυγχάνεται συνήθως με διαβίβαση από τη στήλη, ρυθμιστικού διαλύματος με διαβαθμισμένη συγκέντρωση άλατος, ώστε με τη σταδιακή αύξηση της ιονικής ισχύος του διαλύματος έκλυσης οι ηλεκτροστατικές

δυνάμεις μεταξύ ανταλλάκτη-πρωτεϊνών να εξασθενούν, επιτρέποντας την απόσπασή τους από τον ανταλλάκτη και τον εκλεκτικό διαχωρισμό.

Ο ιονικός ανταλλάκτης που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία είναι ο προσροφητής MonoQ (HiTrap Sepharose Column) (Εικόνα 14). Η στήλη είναι θετικά φορτισμένη, οπότε δεσμεύει τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες. Η τοματινάση στο ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο βρίσκεται με pH ίσο με 8, είναι αρνητικά φορτισμένη και δεσμεύεται από τη στήλη MonoQ.



Εικόνα 14. Στήλη MonoQ (HiTrap Sepharose Column).

Αρχικά, η στήλη εξισορροπείται με τη διαβίβαση, 10 πλάσιου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης (20mM Tris-HCl pH 8,0 , 150mM NaCl, 5mM MgCl₂) σε θερμοκρασία 4°C. Το προϊόν αραιώνεται με διάλυμα εξισορρόπησης για την αποτελεσματικότερη δέσμευση των πρωτεϊνών και διαβιβάζεται στη στήλη χρωματογραφίας. Ο κλασματοσυλλέκτης ρυθμίζεται ώστε να συλλέγονται κλάσματα των 5ml, και αρχίζει η έκπλυση της στήλης με 15ml από το διάλυμα εξισορρόπησης. Κατά την έκπλυση αποδεσμεύονται από τη στήλη οι πρωτεΐνες που έχουν δεσμευτεί σε αυτήν χαλαρά. Η έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιείται με τη διαβίβαση 20ml αυξανόμενης συγκέντρωσης NaCl (gradient, 0 - 1M) κατά 5% κάθε φορά. Ο κλασματοσυλλέκτης (Εικόνα 15) σε αυτή τη περίπτωση ρυθμίζεται ώστε να συλλέγονται κλάσματα του 1ml. Τέλος, για να επιτευχθεί η πλήρης απομάκρυνση της επιθυμητής πρωτεΐνης από τη στήλη, διαβιβάζονται επιπλέον 5ml διαλύματος 100% NaCl. Κατά τη διάρκεια αυτής της

διαδικασίας, η οπτική απορρόφηση των εκλουσμάτων καταγράφεται από ειδικό καταγραφέα στα 280nm.



Εικόνα 15. Κλασματοσυλλέκτης και καταγραφέας χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής.

Όλα τα στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου 10% ή 12%. Τέλος, τα κλάσματα που περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη συλλέγονται και φυλάσσονται στους -20°C , ύστερα από διαπίδυση O/N στους 4°C σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 3mM MgCl_2 , 3mM DTT).

Γ. 2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια (DNA, RNA) διαχωρίζονται καθώς κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, μέσα από τους πόρους ενός πηκτώματος. Η ταχύτητα μετακίνησης των (U) εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο του μορίου (Z) και από τον συντελεστή τριβής (f) σύμφωνα με τον τύπο $U = E \cdot Z / f$. Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής f_v που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται καθώς επίσης και από την πυκνότητα και το ιξώδες του μέσου (πήκτωμα).

Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διαμέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μετακινούνται πιο αργά. Τα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Το πήκτωμα που χρησιμοποιείται για την περίπτωση των πρωτεϊνών είναι το πολυακρυλαμίδιο που παρέχει μεγάλη επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων, είναι χημικά αδρανές, διαφανές, σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος και επιπλέον το μέγεθος των πόρων του μπορεί να ποικίλει σημαντικά.

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται από το συμπολυμερισμό ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{CN}_2$) και N,N μεθυλενοδισακρυλαμιδίου ή bis ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{C}_n-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) σε αναλογία 30/1 w/w αντίστοιχα. Το bis ακρυλαμίδιο συνδέει τις μακριές αλυσίδες του πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου, σχηματίζοντας έτσι ένα τρισδιάστατο πλέγμα, το μέγεθος των πόρων του οποίου εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών που παράγονται από το σύστημα υπερθειικού αμμωνίου (APS) και N,N,N,N τετραμέθυλοαιθυλοδιαμίνης (TEMED). Το TEMED προκαλεί την δημιουργία ελευθέρων ριζών από το APS οι οποίες καταλύουν τον πολυμερισμό.

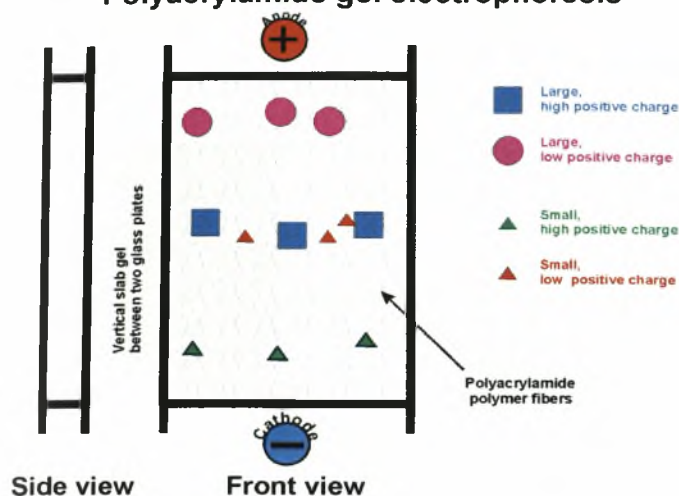
Το σύστημα ηλεκτροφόρησης μπορεί να είναι συνεχές ή ασυνεχές. Στο συνεχές σύστημα χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα στην πηκτή και στα δοχεία ηλεκτροδίων. Στο ασυνεχές σύστημα διακρίνονται δύο πηκτές, η πηκτή επιστοίβαξης και η πηκτή διαχωρισμού. Υπάρχουν και τρία διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα ηλεκτροδίων, το διάλυμα ηλεκτροδίων, το διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης και το διάλυμα πηκτής διαχωρισμού. Η σύσταση, το pH και το μέγεθος των πόρων των δύο πηκτών είναι τέτοια, ώστε στην πηκτή επιστοίβαξης τα δείγματα να συμπυκνώνονται και στο τέλος οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης. Στην πηκτή διαχωρισμού επιτελείται ο διαχωρισμός τους,

λόγω διαφορετικής κινητικότητας κάθε πρωτεΐνης. Έτσι επιτυγχάνεται πολύ καλύτερος διαχωρισμός από ότι στο συνεχές σύστημα. Τέλος, η ηλεκτροφόρηση δύναται να γίνει παρουσία ή απουσία αποδιατακτικών μέσων, όπως του απορρυπαντικού SDS (θειικό δωδεκανικό νάτριο) ή της ουρίας. Στην πρώτη περίπτωση (ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες), τα πρωτεϊνικά μόρια διατηρούν άθικτες τις ανώτερες διαμορφώσεις τους και παραμένουν κατά κανόνα δραστικά. Στη δεύτερη περίπτωση (ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες) αποδιατάσσονται οι τυχόν υπομονάδες των πρωτεϊνών λαμβάνοντας τυχαίες διαμορφώσεις και διαχωρίζονται.

Γ.2.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΜΕΤΟΥΣΙΩΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ SDS (SDS-PAGE)

Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση αποκλειστικά το μοριακό τους βάρος. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται πάνω στη ραχοκοκαλιά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με υδρόφοβους δεσμούς. Η δέσμευση γίνεται με σταθερό ποσό SDS ανά μονάδα βάρους πρωτεΐνης (περίπου 1,4 g SDS/g πρωτεΐνης) και έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση όλων των μη ομοιοπολικών δεσμών στο μόριο της πρωτεΐνης, την αποδιάταξή της και τη δημιουργία ενός επιμήκους συμπλόκου SDS πολυπεπτιδικής αλυσίδας με καθαρό αρνητικό φορτίο και περίπου σταθερό λόγο φορτίου ανά μονάδα μάζας πολυπεπτιδίου. Συνεπώς το ολικό φορτίο του συμπλόκου εξαρτάται μόνο από το μέγεθος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και η ηλεκτροφορητική κινητικότητά του στην πηκτή αποκλειστικά από το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου (Εικόνα 16).

Polyacrylamide gel electrophoresis



Εικόνα 16. Τεχνική Ηλεκτροφόρησης

Έτσι, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους μιας πρωτεΐνης ή των υπομονάδων αυτής, έπειτα από τη σύγκριση της κινητικότητας με τις κινητικότητες πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους στις ίδιες συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα η κινητικότητα ενός πολυπεπτιδίου στην SDS-PAGE είναι γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου του μοριακού του βάρους.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ταυτοποίηση, διαχωρισμό και χαρακτηρισμό πρωτεϊνών ή των υπομονάδων τους, καθώς επίσης για τον έλεγχο ομοιογένειας ενός πρωτεϊνικού κλάσματος. Παρουσιάζει όμως ορισμένους περιορισμούς. Έτσι, πολύ βασικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες με μεγάλο βαθμό γλυκοσυλίωσης (επειδή δεσμεύουν απορρυπαντικό μόνο στο πρωτεϊνικό τμήμα τους) κινούνται πιο αργά στην πηκτή με αποτέλεσμα να τις ταυτοποιούμε λανθασμένα. Επίσης, λανθασμένο μοριακό βάρος μπορεί να προκύψει και για ορισμένες περιπτώσεις πρωτεϊνών που δεν αποδιατάσσονται πλήρως με το SDS.

Η κατακόρυφη συσκευή χρησιμοποιείται κυρίως για ηλεκτροφορήσεις σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου (Εικόνα 17), ενώ η οριζόντια για πηκτές αγαρόζης (Εικόνα 18). Και στις δύο περιπτώσεις το δείγμα τοποθετείται με τη μορφή ζώνης οπότε τα μακρομόρια (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) κατά την κίνησή τους, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου για ορισμένο χρονικό διάστημα καταλαμβάνουν ορισμένες θέσεις

στην πηκτή. Λαμβάνεται τελικά ένα σύνολο ζωνών που αντιστοιχούν στα διάφορα μακρομόρια.



Εικόνα 17. Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 18. Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης

Συνήθως οι ζώνες γίνονται εμφανείς με την προσθήκη κατάλληλης βαφής. Για την δημιουργία της πηκτής ηλεκτροφόρησης απαιτούνται δύο διαλύματα, το ένα για την πηκτή διαχωρισμού (seperating gel) και το άλλο για την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) που εισάγεται στο επάνω μέρος της συσκευής και προκαλεί την επιστοίβαξη του δείγματος για να εισέλθει στη συνέχεια η άλλη πηκτή και να γίνει ο διαχωρισμός. Στο πείραμα αυτό τα διαλύματα προετοιμάζονται ως εξής (Πίνακας 4, 5):

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση	Συγκέντρωση	Συγκέντρωση	Συγκέντρωση
	8%	10%	12%	15%
	Όγκος (ml)			
Ακρυλαμίδιο 30%	5,3	6,7	8,0	10,0
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	5,0	5,0	5,0	5,0
SDS 10%	0,2	0,2	0,2	0,2

TEMED	0,012	0,008	0,008	0,008
APS 10%	0,2	0,2	0,2	0,2
ddH ₂ O	Up to 20ml	Up to 20ml	Up to 20ml	Up to 20ml

Πίνακας 4. Σύσταση πηκτής διαχωρισμού ανάλογα με το ποσοστό ακρυλαμίδης.

Αντιδραστήρια	Όγκος (ml)
Ακρυλαμίδιο 30%	0,83
Tris-HCl 1,0M (pH 6,8)	0,63
SDS 10%	0,05
ddH ₂ O	3,4
TEMED	0,005
APS 10%	0,05

Πίνακας 5. Σύσταση πηκτής επιστοιβαξης συγκέντρωσης 5%.

Το APS και το TEMED προστίθενται πάντα τελευταία, καθώς αποτελούν εκκινητές του πολυμερισμού

Γ.2.2. Προετοιμασία των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού σε αυτά (loading buffer, 3x) (Πίνακας 6) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση επιτυγχάνεται με βρασμό των δειγμάτων στους 100°C, για 5 λεπτά.

Αντιδραστήριο	Περιεκτικότητα/ Συγκέντρωση
Tris-HCl, 0,5M (pH 6,8)	62,5mM

SDS 10%	2%
Γλυκερόλη	10%
β- Μερκαπτοαιθανόλη	2%
Bromophenol blue	0,02%

Πίνακας 6. Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (loading buffer, 3x).

Η μερκαπτοαιθανόλη χρησιμοποιείται για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις επιμέρους αλυσίδες τους.

Στο επάνω και κάτω μέρος της συσκευής ηλεκτροφόρησης εισάγεται το running buffer, ώστε να αρχίσει να άγεται το ρεύμα και να μεταφέρει τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες στο κάτω μέρος της συσκευής, δηλαδή στην άνοδο. Για την παρασκευή πρότυπου διαλύματος 500 ml χρησιμοποιούνται:

72 gr γλυκίνης

15 gr Tris-HCl 10x

5 gr SDS

Αφού ετοιμαστεί η συσκευή και εισαχθούν τα δείγματα προσεκτικά, το σύστημα τροφοδοτείται με σταθερό ρεύμα έντασης $I=25$ mA. Όταν τα δείγματα φτάσουν στην πηκτή διαχωρισμού, ρυθμίζεται το σύστημα σε σταθερό ρεύμα έντασης $I=35$ mA.

Γ.2.3. Χρώση με κυανό του Coomassie

Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα χρωματισμού (staining solution: 40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 0,1gr Coomassie Brilliant Blue για 100ml διαλύματος) για 45 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποχρωματισμός της πηκτής με

διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution: 30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ), μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες.

Στο τέλος της διαδικασίας είναι ευδιάκριτες οι ζώνες των πρωτεϊνών, εξαιτίας της μπλε χρωστικής Coomassie Brilliant Blue, ενώ είναι δυνατός και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνικών τμημάτων μέσω της σύγκρισης των ζωνών με τους μάρτυρες μοριακού βάρους της BioRad (Πίνακας 7).

Μάρτυρας μοριακού βάρους	
Χρώμα	MB
Blue	196,143
Magenta	131,064
Green	90,555
Violet	42,076
Orange	31,931
Red	17,218
Blue	6,890

Πίνακας 7. Μάρτυρας πρωτεϊνών

Γ. 3. Tomatinase Assays

Σε αυτό το πείραμα ετοιμάστηκαν δύο διαλύματα, το ένα με τοματίνη και το άλλο χωρίς τοματίνη για να ελεγχθεί η παρουσία της τοματινάσης μέσω της δράσης της.

Αναλυτικότερα,

Διάλυμα 1: 10 mM Τοματίνη, 0.1 M NaOAc pH 5, εκχύλισμα του μύκητα με τοματινάση (50 μ l) σε τελικό όγκο 500 μ l.

Διάλυμα 2: 3 M NaOAc pH 5, εκχύλισμα του μύκητα με τοματινάση (50 μl) σε τελικό όγκο 500 μl. (Πίνακας 8)

Τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C O/N και στη συνέχεια συμπυκνώνονται με speed vac και αναδιαλύονται σε 30 μl ΕΤΟΗ και είναι έτοιμα για TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας) .

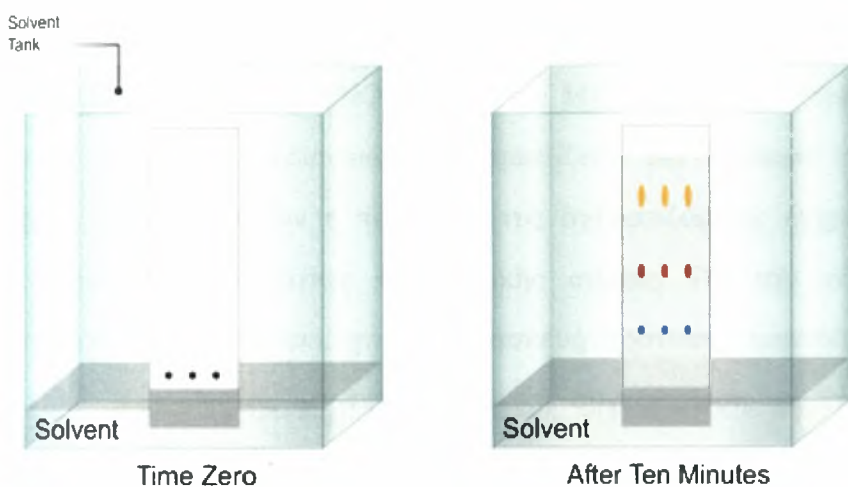
Stock Solution	+Tomatine	-Tomatine
10mM tomatine	12,5 μl	0 μl
3M NaOAc pH 5	17 μl	17 μl
Sample	50 μl	50 μl
dH ₂ O	420,5 μl	433 μl
Συνολικός Όγκος	500 μl	500 μl

Πίνακας 8 .Assay Τοματινάσης

Γ.4. TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας)

Με αυτήν την χρωματογραφική τεχνική έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των προϊόντων υδρόλυσης της α-τοματίνης. Χρησιμοποιούνται γυάλινες ή αλουμιένιες πλάκες επιστρωμένες με μια λεπτή στοιβάδα στατικής φάσης. Η στατική φάση συνήθως είναι γέλη πυριτίου ή λιγότερο συχνά οξείδιο αργιλίου, κυτταρίνη κτλ. Το δείγμα τοποθετείται με τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Φορτώνουμε 10μl από το κάθε δείγμα μας στο TLC plate καθώς και από 10μl τοματίνη και τοματιδίνη τα οποία θα λειτουργήσουν ως control. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια μέσα σε έναν αεροστεγή θάλαμο, στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών (Πίνακας 9) σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Οι διαλύτες πρέπει να έχουν εισαχθεί στο θάλαμο τουλάχιστον 10 min πριν την τοποθέτηση της πλάκας ώστε να έχει κορεσθεί ο υπερκείμενος χώρος

από τους ατμούς τους. Ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων (περίπου 10-20 min, ανάλογα με το ύψος της πλάκας) μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Στη συνέχεια αποσύρεται η πλάκα και στεγνώνει με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Τεχνική TLC

TLC διαλύτης	
Parts	Αντιδραστήρια
10	Acetic Acid
30	Ethyl Acetate
20	Methanol
1	H ₂ O

Πίνακας 9. Σύσταση TLC διαλύτη

Η παρατήρηση των κηλίδων σε αυτή την περίπτωση έγινε μετά από ψεκάσμο με ειδικά αντιδραστήρια.

Από το χρώμα των κηλίδων μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την κατηγορία των ουσιών που παρατηρούνται (φλαβονοειδές, αλκαλοειδές, σάκχαρο κτλ).

Γ. 5. Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός δείγματος σε πρωτεΐνες πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford (BIOQUANT της MERCK). Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με το αντιδραστήριο σε περίσσεια και σχηματίζεται μια έγχρωμη ένωση. Σε ορισμένο εύρος συγκεντρώσεων η ποσότητα της σχηματιζόμενης έγχρωμης ένωσης είναι ανάλογη της ποσότητας της αρχικής ουσίας. Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος, είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την πρωτεϊνική συγκέντρωση, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Αρχικά, λοιπόν, μετράται η απορρόφηση μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων BSA (Bovine Serum Albumin) στα 595nm. Συγκεκριμένα, σε 20μl από το κάθε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης (0,2- 1,4 mg/ml) προστίθεται 1ml διαλύματος Bradford. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση απορρόφησης στα 595nm έπειτα από 5 λεπτά (Εικόνα 20). Ακολούθως, μετράται η απορρόφηση του προς ανάλυση δείγματος και με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.



Γ. 6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Χρησιμοποιώντας ως μήτρα cDNA του μύκητα που είχε απομονωθεί έγινε προσπάθεια εντοπισμού του γονιδίου της τοματινάσης. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Κατά αυτήν πραγματοποιείται *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR – εκτός του στόχου DNA – είναι οι εκκινητές, τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, η DNA πολυμεράση, τα ιόντα μαγνησίου και το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει :

- ❖ Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93 – 95°C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation step).
- ❖ Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing step), προκειμένου οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ένας τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$. Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών T_m των δύο εκκινητών της αντίδρασης.
- ❖ Θερμοκρασία επιμήκυνσης ή πολυμερισμού (extension step). Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25–30 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα έλλειψη νουκλεοτιδίων. Η PCR βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς και, τελευταία, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της παραπάνω βασικής αντίδρασης. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή είναι η RT-PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται - ως μήτρα για ενίσχυση - RNA, το οποίο πρώτα μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse transcriptase). Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η αντίδραση PCR.

- Σε σωλήνα φυγοκέντρησης προστέθηκαν τα παρακάτω, σε τελικό όγκο 50 μl:
 - 40,5 μl αποστειρωμένο ddH₂O
 - 1 μl μίγμα των 10mM dNTPs
 - 5 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNAzyme
 - 1 μl εκκινητής έμπροσθεν
 - 1 μl εκκινητής ανάστροφος
 - 0,5 μl DNA πολυμεράση (2 U/μl).
- Το μίγμα αναμιγνύεται πολύ καλά και τοποθετείται στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα στον Πίνακα 10 :

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αρ. κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	4 λεπτά	1
Αποδιάταξη αλυσίδων DNA	94 °C	1 λεπτό	35

Υβριδισμός εκκινητών	58°C	1 λεπτό	35
Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	72°C	1 λεπτό	35
Τελική επιμήκυνση	72°C	20 λεπτά	1

Πίνακας 10. Πρόγραμμα PCR

Γ. 7. Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης

Το προϊόν της PCR πρέπει στη συνέχεια να ελεγχθεί με ηλεκτροφόρηση. Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Αν πρέπει να διαχωριστούν γραμμικά δίκλινα μόρια, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθός τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών μορίων εντός του ηλεκτρικού πεδίου της πηκτής δεν είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους τους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη, π.χ. σε 0,8% συγκέντρωση αγαρόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τμήματα του DNA που κυμαίνονται από 1 έως 12 kb (Χατζόπουλος, 2001). Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής :

- ❖ Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (συνήθως 1%) προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1XTAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει.

- ❖ Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει.
- ❖ Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως στην πηκτή βυθίζεται ειδική "χτένα" που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10X DLB.
- ❖ Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή απομακρύνεται η "χτένα" και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE.
- ❖ Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/ cm.

»TAE : 1X TAE : 40mM Tris-acetate, 1mM EDTA

»Βρωμιούχο αιθίδιο : παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4°C. Η συγκέντρωσή του στην πηκτή της αγαρόζης είναι 0,5 µg/ml.

»10X DLB : 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται και η μπάντα που με βάση το μοριακό βάρος ταιριάζει με το μέγεθος ανακτάται από την πηκτή.

Γ. 8. Επανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

- 🟡 Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης απομονώνεται από την πηκτή με ξυραφάκι η ταινία του DNA που μας ενδιαφέρει.

🟡 Ζυγίζεται το κομμάτι της πηκτής σε erpendorf και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα QG σε αναλογία 3:1.

🟡 Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 10 λεπτά ώστε να λιώσει πλήρως η πηκτική. Γι' αυτό συνίσταται ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα (vortex) κάθε 2-3 λεπτά της επώασης. Στο τέλος της επώασης το χρώμα του μίγματος γίνεται κίτρινο.

🟡 Προστίθεται ίσος όγκος, με την πηκτική, ισοπροπανόλη και αναδεύεται καλά.

🟡 Προσαρμόζεται η στήλη, που διατίθεται στο kit, στο erpendorf ώστε να συλλεχθεί το DNA και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.

🟡 Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέχθηκε στο erpendorf και αυτό ξαναπροσαρμόζεται στη στήλη.

🟡 Προστίθενται 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος QG και επαναλαμβάνεται η διαδικασία.

🟡 Για να ξεπλυθεί το DNA προστίθενται 0,75 ml ρυθμιστικού διαλύματος PE και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

🟡 Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέχθηκε στο erpendorf και φυγοκεντρείται πάλι για 1 λεπτό στις 13.000 rpm.

🟡 Η στήλη προσαρμόζεται σε νέο erpendorf, προστίθενται 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος EB και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 15.000 rpm, προκειμένου να συλλεχθεί το DNA.

Γ. 9. Ενοποίηση των άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης

Αφού έχει ανακτηθεί η μπάντα εισάγεται σε πλασμιδιακό φορέα με τη βοήθεια της αντίδρασης της DNA λιγάσης. Η αντίδραση της DNA λιγάσης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl και περιέχει τα παρακάτω συστατικά :

- 10X ρυθμιστικό διάλυμα 1 μl

- T4 DNA λιγάση (1 unit/ μl) 1 μl
- pGEM T-Easy φορέα 1 μl
- Ένθετο DNA 1 μl
- ddH₂O 6 μl

Προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, η αναλογία άκρων φορέα προς ένθετο DNA θα πρέπει να είναι 1:3. Το δείγμα επωάζεται για 3 ώρες στους 25°C ή στους 4°C για 14-16 ώρες.

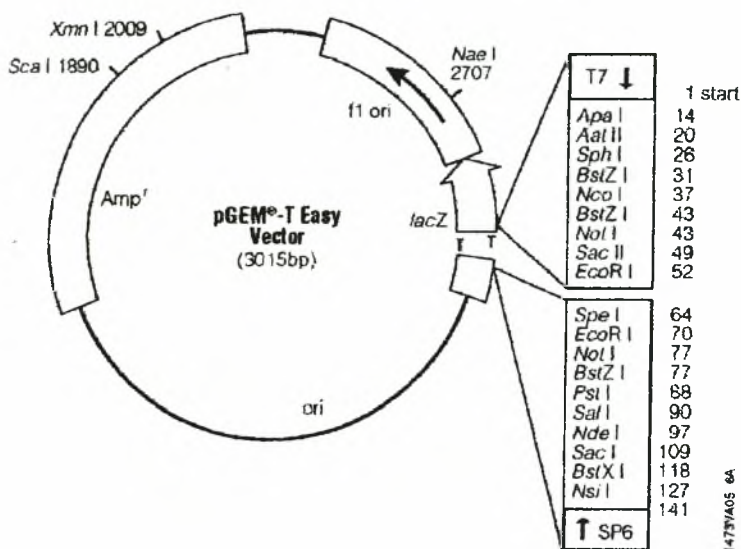
» 10X ρυθμιστικό διάλυμα: 300 μM Tris, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,8.

Γ. 10. Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το πλασμίδιο pGEM®-T Easy vector. Τα χαρακτηριστικά αυτού του φορέα, που τον κάνουν επιθυμητό προς χρήση είναι τα εξής :

- Ο υψηλός αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο.
- Το γονίδιο amp^r που του προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.
- Οι προαγωγείς που αναγνωρίζονται από τις SP6 και T7 RNA πολυμεράσες βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής υποκλωνοποίησης.
- Φέρει τμήμα του γονιδίου lacZ' που κωδικοποιεί για τα πρώτα 146 αμινοξέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, το οποίο χρησιμοποιείται για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων μέσω του μηχανισμού της α-συμπληρωματικότητας.
- Φέρει στα άκρα πολύT, ώστε να διευκολύνεται η σύνδεση με κατάλληλα διαμορφωμένα προϊόντα της αντίδρασης της PCR.

Το προϊόν της αντίδρασης PCR του γονιδίου που κωδικοποιεί για την τοματινάση υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM®-T Easy vector (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy Vector.

Γ. 11 Χειρισμός πλασμιδίων

Το προϊόν της αντίδρασης της DNA λιγάσης στη συνέχεια εισάγεται σε μετασχηματισμένα κύτταρα.

Γ.11.1. Προετοιμασία κυττάρων ικανών για μετασχηματισμό

Τα στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E.coli*) που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία ικανών κυττάρων για μετασχηματισμό ήταν τα DH5A. Η διαδικασία ήταν η παρακάτω :

- ❖ 200 ml θρεπτικού διαλύματος LB εμβολιάζονται με 2 ml υγρής καλλιέργειας του στελέχους που επιλέχθηκε.

- ❖ Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση μέχρι η οπτική πυκνότητα του αιωρήματος να φτάσει την τιμή O.D.₆₀₀=0,2-0,3.
- ❖ Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- ❖ Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml διαλύματος 0,1M παγωμένου MgCl₂.
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- ❖ Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 25 ml διαλύματος 0,1M CaCl₂ και αφήνονται στον πάγο για 20 λεπτά.
- ❖ Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και επαναδιασπείρονται σε 10 ml διαλύματος 0,1M CaCl₂, το οποίο βρίσκεται στον πάγο.
- ❖ Η αποθήκευση των δεκτικών κυττάρων γίνεται στους -80°C με την προσθήκη 20% γλυκερόλης.

Γ.11.2. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων E.coli

- ✓ Σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 100 μl δεκτικά κύτταρα του στελέχους XL1Blue μεταφέρονται 10-100 ng πλασμιδίου.
- ✓ Το δείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά.
- ✓ Υποβάλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση για 1-2 λεπτά, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου.
- ✓ Προστίθενται 200 μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 40-50 λεπτά.
- ✓ Τα κύτταρα στρωματώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- ✓ Μετά, γίνεται επώαση των τρυβλίων για όλο το βράδυ στους 37°C.
- ✓ Η φύλαξη των τρυβλίων γίνεται στο ψυγείο στους 4°C.

Στην περίπτωση που πρέπει να επιλέξουμε τις αποικίες που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προσθέτουμε στα κύτταρα – πριν αυτά απλωθούν στο τρυβλίο – 10 μl 100mM IPTG και 100 μl 2% X-Gal. Οι αποικίες που φέρουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται μπλε, λόγω της δράσης της β-γαλακτοσιδάσης. Αντίθετα, οι αποικίες που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται λευκές.

»100 mM IPTG : 23,8 gr IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 1 ml dH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

Γ.12. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Γ.12.1. Μέθοδος του βρασμού (Boiling method, Holmes and Quigley 1981)

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, 3 ml υγρής καλλιέργειας LB, που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάζονται με μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων E.coli. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση για 12-16 ώρες.

- i. Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 1,5 ml σε σωλήνα erpendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά.
- ii. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται όσο το δυνατόν περισσότερο, γιατί το ίζημα πρέπει να παραμείνει όσο το δυνατόν στεγνό.
- iii. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 μl STET και προστίθεται 1 μl λυσοζύμη (50 mg/ml).
- iv. Στη συνέχεια, γίνεται επώαση στους 100°C για 45sec και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 λεπτά.

- v. Το ίζημα απομακρύνεται με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα, καθώς αποτελείται από βακτηριακά υπολείμματα.
- vi. Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται 180 μl ισοπροπανόλης, ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά.
- vii. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 70 % v/v αιθανόλη.
- viii. Αφού στεγνώσει το ίζημα, επαναδιαλύεται σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

» θρεπτικό υλικό LB: 10 gr NaCl (BDH), 10 gr Bactotryptone (BDH), 5 gr Yeast Extract (BDH)

» διαλύματος STET: 8% sucrose (Merck), 5% Triton X100 (BDH), 50 mM Tris-HCl pH 8,0 (BDH), 50 mM EDTA (Serva)

» διάλυμα TE: 10 Mm Tris-HCl pH 8,0 (BDH), 1 mM EDTA (Serva)

» Λυσοζύμη : 50 mg λυσοζύμης (Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 1 ml dH₂O.

Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

Γ.12.2. Πρωτόκολλο Miniprep (Qiagen)

Εναλλακτικά και κυρίως στην περίπτωση που τα πλασμίδια πρόκειται να σταλούν για sequencing επιλέγεται η παρακάτω μέθοδος απομόνωσης:

- ❖ Μετά από φυγοκέντρηση 1,5 ml υγρής καλλιέργειας, τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα P1 που περιέχει Rnάση A.
- ❖ Προστίθενται 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα P2 και γίνεται ελαφρά ανακίνηση του φυγοκεντρικού σωλήνα (eppendorf).
- ❖ Προστίθενται επιπλέον 350 μl ρυθμιστικό διάλυμα N3 και αμέσως αναποδογυρίζεται το eppendorf 4-6 φορές. Το εναιώρημα θολώνει.

- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα λευκό ίζημα.
- ❖ Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται με πιπέτα σε μια στήλη Qiaprep.
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60 sec και απορρίπτεται το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο.
- ❖ Η στήλη ξεπλένεται με 0,75 ml ρυθμιστικό διάλυμα PE και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60 sec.
- ❖ Το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται για 1 λεπτό μέχρι να απαλειφθεί το υπολειπόμενο διάλυμα ξεπλύματος. Εάν παραμείνει αιθανόλη από το διάλυμα PE ίσως παρεμποδιστούν περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- ❖ Η στήλη Qiaprep τοποθετείται σε καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα 1,5 ml. Προκειμένου να ληφθεί το DNA, προστίθεται διάλυμα 50 μl EB (10mM Tris-HCl, pH=8,5) ή νερό. Το διάλυμα έκλουσης αφήνεται για 1 λεπτό και, τέλος, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε και λαμβάνεται το καθαρό πλασμιδιακό DNA.

Γ.13. Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Τα πλασμίδια που έχουν απομονωθεί, είναι αναγκαίο να πεμπτούν με ενδονουκλεάσες περιορισμού για να επιβεβαιωθεί η παρουσία του προϊόντος που κλωνοποιήθηκε. Οι πέψεις δειγμάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού πραγματοποιούνται σε όγκους που κυμαίνονται από 20 μl έως 100 μl, ανάλογα με την ποσότητα του DNA που υποβάλλεται σε πέψη.

- ✓ Σε σωλήνα eppendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου, Rnάση A αν το δείγμα

περιέχει RNA και, τέλος, dH₂O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Μια τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 30 μl περιλαμβάνει :

- Δείγμα DNA 1-5 μl
 - 10X ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 3 μl
 - Rnάση A (2,5 mg/ml) 1 μl
 - dH₂O έως τελικό όγκο 29 μl
- ✓ Προστίθεται 1 μl ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιείται η EcoRI (Takara).
- ✓ Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 3 με 4 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία.
- ✓ Μετά το πέρας της διαδικασίας τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.
- ✓ Εντοπίζεται μπάντα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος και το αντίστοιχο πλασμίδιο στέλνεται για sequencing.

Αντιβιοτικά

Αμπικιλίνη : Μητρικό διάλυμα : 50 mg/ml σε dH₂O. Τελική συγκέντρωση : 50 μg/ml
θρεπτικού διαλύματος.

Καναμυκίνη : Μητρικό διάλυμα : 50 mg/ml σε dH₂O. Τελική συγκέντρωση : 50 μg/ml
θρεπτικού διαλύματος.

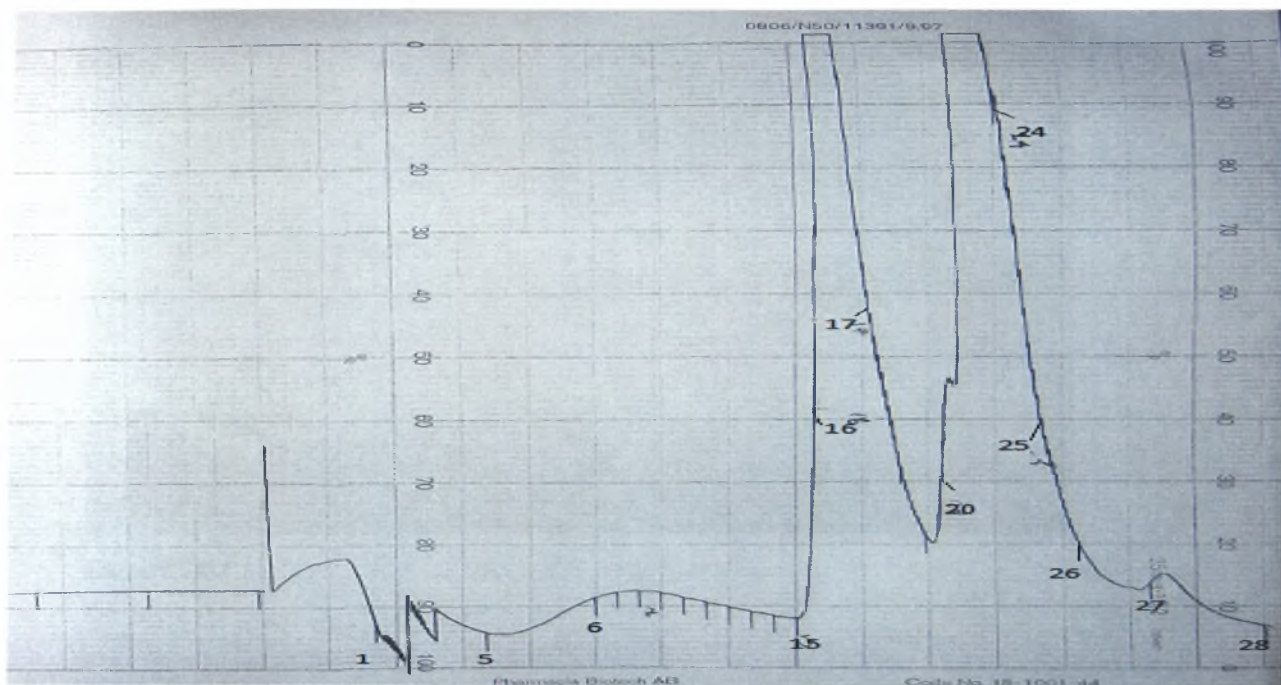
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ. 1. Στήλη μονο-Q

Οι κορυφές του χρωματογραφήματος (Εικόνα 22) αντιστοιχούν σε μεγάλη συγκέντρωση πρωτεΐνης(Πίνακας 11). Επιλέχθηκαν τα κλάσματα 3, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 και 28 για να ελεγχθεί η δραστικότητα τους με την τεχνική χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.

<i>Κλάσματα</i>	<i>Συγκέντρωση</i>
3	0 mg/ml
17	
18	0,336 mg/ml
19	0,824 mg/ml
20	0,580 mg/ml
21	0,396 mg/ml
22	0,245 mg/ml
23	0,112 mg/ml
24	0,160 mg/ml
25	
26	0,061 mg/ml
27	0,117 mg/ml
28	

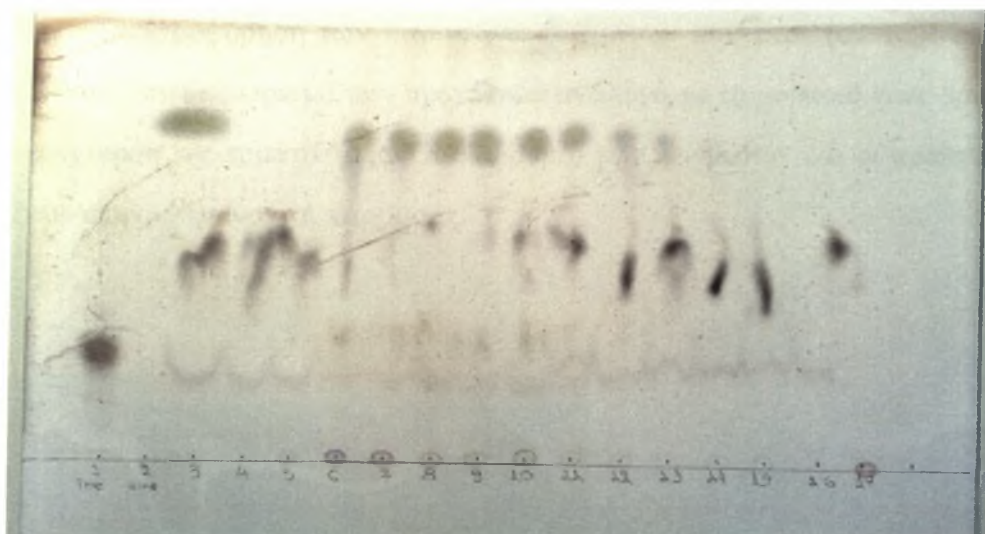
Πίνακας 11



Εικόνα 22. Στήλη mono-Q

Δ. 2. TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας)

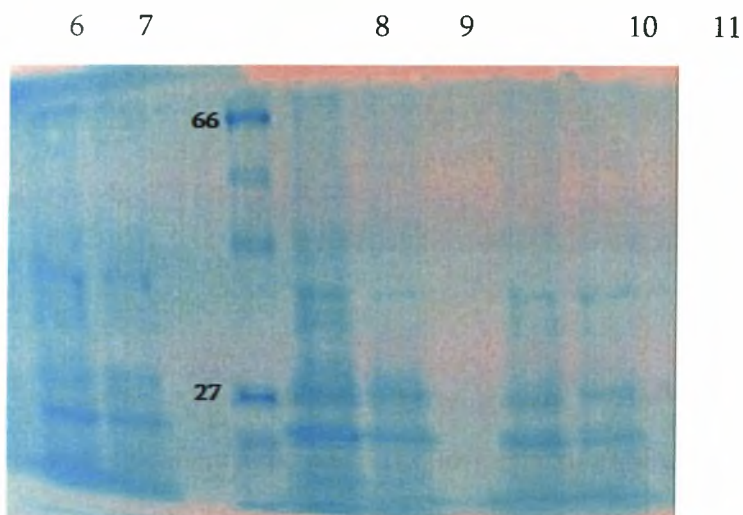
Η τοματιδίνη απεικονίζεται στην TLC με πράσινο χρώμα και σε συγκεκριμένο χαρακτηριστικό ύψος. Με αυτόν τον τρόπο, επιβεβαιώνεται έντονα η ύπαρξη της τοματιδίνης στα δείγματα 2 (control) έως 13 της TLC και πιο αχνά στα δείγματα 14 και 15 (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. TLC

1. δείγμα με τοματίνη
2. δείγμα με τοματιδίνη
3. κλάσμα 3 από τη στήλη μονο-Q (0 mg/ml)
4. κλάσμα 17 από τη στήλη μονο-Q
5. κλάσμα 18 από τη στήλη μονο-Q (0,336 mg/ml)
6. κλάσμα 19 από τη στήλη μονο-Q (0,824 mg/ml)
7. κλάσμα 20 από τη στήλη μονο-Q (0,580 mg/ml)
8. κλάσμα 21 από τη στήλη μονο-Q (0,396 mg/ml)
9. κλάσμα 22 από τη στήλη μονο-Q (0,245 mg/ml)
10. κλάσμα 23 από τη στήλη μονο-Q (0,112 mg/ml)
11. κλάσμα 24 από τη στήλη μονο-Q (0,160 mg/ml)
12. κλάσμα 25 από τη στήλη μονο-Q
13. κλάσμα 26 από τη στήλη μονο-Q (0,061 mg/ml)
14. κλάσμα 27 από τη στήλη μονο-Q (0,117 mg/ml)
15. κλάσμα 28 από τη στήλη μονο-Q

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των παραπάνω δειγμάτων που περιέχου τοματιδίνη (Εικόνα 24) για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και την ανίχνευση της τοματινάσης. Οι διαδρομές των δειγμάτων και οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν φαίνονται παρόμοιες.



Εικόνα 24. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

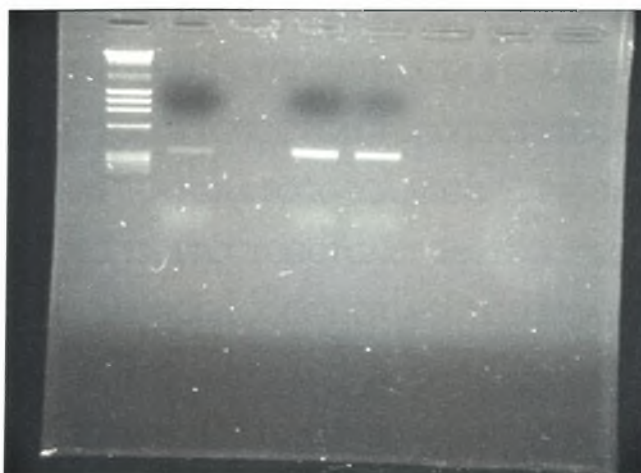
Δ. 3. Primers

Χρησιμοποιώντας ως πρότυπη την ομολογία των γονιδίων της τοματινάσης σε διάφορα είδη μυκήτων και μελετώντας τις κοινές τους περιοχές σχεδιάστηκαν οι παρακάτω primers για την πραγματοποίηση της PCR του ενζύμου από τον FsK.

5' AACGAGAACCTTGTCTGAGG 3'

5' TCCCGGGAGCCAGGTG 3'

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε gel αγαρόζης 1.5 % και το γονίδιο εντοπίστηκε σε μοριακό βάρος 1100 bp. (Εικόνα 25)



Εικόνα 25. Προϊόν PCR

Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM®-T Easy vector, ελέγχθηκαν οι αποικίες, βρεθηκαν θετικές, απομονώθηκαν πλασμίδια από αυτές και στάλθηκαν 2 κλώνοι για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης που προέκυψαν είναι τα παρακάτω:

Κλώνος 1:

0 952 ABI

```
NNCCTGCGAACCAGCTCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTTCCCGG
GAGCCAGGTGTAGGCATGGGCATCCGTGAAGCCCCAGAAGCTAATGTCGGTGA
TGCCTGCGTCCAAAGCCTCGGTTATGACGGCGCCGTAGATTTTCG
GTCTGGAGGGTAGTGTGAGGGTGTGGACATCCATCTCAGCAATTGTCACCTCC
AACCCGAGCGCCTTATAGGAGTTGACCATTTCCGTCAGTACGCCTGGTTCTGGG
GCAACTTCAGTAATGTGCATCTGGAGGGCTACTCCGTCGATA
GGGACGCCCTCCGATACGAGGCGAGTGACTAGTTCGAGGAGTGCCTGTCGCTT
GGCCGGAAGCACCTCGACAAGGTTCTCGTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCG
CCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGC
```

ATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCAT
AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAG
CCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA
GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACC
TGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTG
CGTATTGNGCGCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGC
GCTCGGTCGTTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATA
CGGTTATCCACAGAATCAAGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAG
GCCAGCAAAAAGCCAGGAACCCGTAAAAAGGCCGCGTTTCTGGCG
TTTTTTCATAAGGCTCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCAACCCTCA

Κλώσιος 2:

0 952 ABI

NNNAACTGCAACCATGCTCGGCCGCTGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTCCC
GGGAGCCAGGTGTAGGCATGGGCATCCGTGAAGCCCCAGAAGCTAATGTCGGT
GATGCCTGCGTCCAAAGCCTCGGTTATGACGGCGCCGTAGATTT
CGGTCTGGAGGGTAGTGTTGAGGGTGTGGACATCCATCTCAGCAATTGTCACC
TCCAACCCGAGCGCCTTATAGGAGTTGACCATTTCCGTCAGTACGCCTGGTTCT
GGGGCAACTTCAGTAATGTGCATCTGGAGGGCTACTCCGTCGA
TAGGGACGCCCTCCGATACGAGGCGAGTACTAGTTCGAGGAGTGCCTGTCCG
TTGGCCGGAAGCACCTCGACAAGGTTCTCGTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCC
GCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGAT
GCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTC
ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACG
AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT

GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAA
CCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTT
TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCT
GCGCTCGGTTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCCAAGGCGGTAA
TACGGTTATCCACAGAATCANGGGATAACGCANGAAAGAACATGTGAGCAAA
AGCCAGCCAAAGGCCCGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCG
TTTTCCCTAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAA

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης στη συνέχεια συγκρίθηκαν με άλλες ομόλογες αλληλουχίες συγγενικών μυκήτων (alignment) (Πίνακας 12).

C A T C A T C G G A G C G C T C G T C G C C G T T G C	Majority
30 40 50	
G T T C A T C A C T G T G T T C C T C G C C G C T A C	Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
C A T C A T C G G A G C G C T C G T C G C C G T T G C	Fusarium oxysporum Fotom1 gene for to
C A T C A T C G G A G C G C T C G T C G C C G T T G C	Fusarium oxysporum Fotom1r2 gene for
C A T C A T C G G A G C G C T C G T C G C C G T T G C	Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
C A T C A T C G G A G C G C T C G T C G C C G T T G C	Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
C A T C A T C G G A G C G C T C G T C G C C G T T G C	Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
- - - - -	tomatit7.seq
G C A C C G G A A C C A C C T C A C T G A G A G A G G	Majority
80 90 100	
A T A C C A G G A C T A G C C C G C T G A G A A A G G	Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
G C A C C G G A A C C A C C T C A C T G A G A G A G G	Fusarium oxysporum Fotom1 gene for to
G C A C C G G A A C C A C C T C A C T G A G A G A G G	Fusarium oxysporum Fotom1r2 gene for
G C A C C G G A A C C A C C T C A C T G A G A G A G G	Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
G C A C C G G A A C C A C C T C A C T G A G A G A G G	Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
G C A C C G G A A C C A C C T C A C T G A G A G A G G	Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
- - - - -	tomatit7.seq
T T T G G G T C C G G G G C G A T C A A T C C G T C C	Majority
130 140 150	
A T T G G G T C T G G G G C T A T T A G T C C G A C C	Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
T T T G G G T C C G G G G C G A T C A A T C C G T C C	Fusarium oxysporum Fotom1 gene for to
T T T G G G T C C G G G G C G A T C A A T C C G T C C	Fusarium oxysporum Fotom1r2 gene for
T T T G G G T C C G G G G C G A T C A A T C C G T C C	Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
T T T G G G T C C G G G G C G A T C A A T C C G T C C	Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
T T T G G G T C C G G G G C G A T C A A T C C G T C C	Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
- - - - -	tomatit7.seq
A G C C G T C C T T T C T G A G C A G T T C A A C A G	Majority
180 190 200	
G A C T G T C C T T G C T G A G C A G T T C G A G A G	Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
A G C C G T C C T T T C C G A G C A G T T C A A C A G	Fusarium oxysporum Fotom1 gene for to
A G C C G T C C T T T C C G A G C A G T T C A A C A G	Fusarium oxysporum Fotom1r2 gene for
A G C C G T C C T T T C C G A G C A G T T C A A C A G	Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
A G C C G T C C T T T C C G A G C A G T T C A A C A G	Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
A G C C G T C C T T T C C G A G C A G T T C A A C A G	Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
- - - - -	tomatit7.seq
A G T G G A A C T T C T T C C A T C A A T C C C C A G	Majority
230 240 250	
A G T G G T C A T T C A T C A A C C C G A C C A A A	Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
A G T G G A A C T T C T T C C A T C A A T C C C C A G	Fusarium oxysporum Fotom1 gene for to
A G T G G A A C T T C T T C C A T C A A T C C C C A G	Fusarium oxysporum Fotom1r2 gene for
A G T G G A A C T T C T T C C A T C A A T C C C C A G	Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
A G T G G A A C T T C T T C C A T C A A T C C C C A G	Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
A G T G G A A C T T C T T C C A T C A A T C C C C A G	Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
- - - - -	tomatit7.seq

G A C C G C C T C G T C A A A T T C G C A G A G G C C Majority

280 280 300

G A C C G T C T G G T T G A G T T C G C C G A A G C A
G A C C G C C T C G T C A A A T T C G C A G A G G C C
G A C C G C C T C G T C A A A T T C G C A G A G G C C
G A C C G C C T C G T C A A A T T C G C A G A G G C C
G A C C G C C T C G T C A A A T T C G C A G A G G C C

Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
Fusarium oxysporum Fotoml gene for to
Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for
Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
tomatit7.seq

T G G G C T T A T C T C G G G C T G C T G T A A C C C Majority

330 340 350

T G G G C T C A T C T C G A G C T G C T G C A A C C C
T G G G C T T A T C T C A G G G C T G C T G T A A C C C
T G G G C T T A T C T C G G G C T G C T G T A A C C C
T G G G C T T A T C T C G G G C T G C T G T A A C C C
T G G G C T T A T C T C G G G C T G C T G T A A C C C

Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
Fusarium oxysporum Fotoml gene for to
Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for
Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
tomatit7.seq

G C C C A G C A G C T C T T C G C G C T G C C A T G A Majority

380 390 400

A C C C T A C G G C A T T C C G T G C T G C A A T G G
G C C C A G C A G C T C T T C G C G C T G C C A T A A
G C C C A G C A G C T C T T C G C G C T G C C A T A A
G C C C A G C A G C T C T T C G C G C T G C C A T A A
G C C C A G C A G C T C T T C G C G C T G C C A T G A

Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
Fusarium oxysporum Fotoml gene for to
Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for
Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
tomatit7.seq

C A C C G G T A C C G C G G C A A G A T G G A T C G A Majority

430 440 450

C G G C G G T A T C A C G G C A A G G T A G A T C G G
C A C C G G T A C C G C G G C A A G A T G G A T C G A
C A C C G G T A C C G C G G C A A G A T G G A T C G A
C A C C G G T A C C G C G G C A A G A T G G A T C G A
C A C C G G T A C C G C G G C A A G A T G G A T C G A

Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
Fusarium oxysporum Fotoml gene for to
Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for
Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
tomatit7.seq

T A A A A C G A A T G G C A G T G G C C T G G C G T C Majority

480 490 500

G A A G A C C C A G G G C G G T G G T C T G C A G A C
T A A A A C G A A T G G C A G T G G C C T G G C G T C
T A A A A C G A A T G C C A G T G G C C T G G C G T C
C A A A A C G A A T G G C A G T G G C C T G G C G T C
C A A A A C G A A T G G C A G T G G C C T G G C G T C

Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
Fusarium oxysporum Fotoml gene for to
Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for
Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
tomatit7.seq

G T C C C G G C T A C G T T G A A G A G G C C T T T C Majority

530

540

550

G T C C T A G C T A T A T T G A T G A C G G C C T T C C
G T C C C G G C T A C G T T G A A G A G G C C A T T T C
G T C C C G G C T A C G T T G A A G A G G C C T T T C
G T C C C G G C T A C G T T G A A G A G G C C T T T G
G T C C C G G C T A C G T T G A A G A G G C C T T T C

Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
Fusarium oxysporum Fotom1 gene for to
Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for
Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
tomatit7.seq

G A T G C T A A G C T G T T C C T T A A C G A G A A C Majority

580

590

600

G A A G C C A A G C T A T T C A T C A A C G A A G C T
G A T G C C A A G C T G T T C T T C A A C G A G A A C
G A T G C T A A G C T A T T C C T T A A C G A G A A C
G A T G C T A A G C T G T T C C T T A A C G A G A A C
G A T G C T A A G C T G T T C C T T A A C G A G A A C
A T T A A C G A G A A C

Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
Fusarium oxysporum Fotom1 gene for to
Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for
Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
tomatit7.seq

G C G C C A A G A G C T C T A T G A G A T G G T A G C Majority

630

640

650

G C C T C A G G A G C T C T A C A A T C T G G T C T C
G C C C A A G A A C T C T A C G A G A T G G T A G C
G C G C C A A G A G C T C T A T G A G A T G G T A G C
G C G C C A A G A G C T C T A T G A G A T G G T A G C
G C G C C A A G A G C T C T A T G A G A T G G T A G C
G C G A C A G G C A C T C C T C G A A C T A G T C A C

Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
Fusarium oxysporum Fotom1 gene for to
Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for
Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
tomatit7.seq

C T A T C G A C G G G A T T G C C C T G C A G A T G C Majority

680

690

700

C G A T T G A C G G A G T T G C C C T G C A G A T G C
C C A T C G A T G G G A T T G C C C T G C A G A T G C
C T A T C G A C G G G A T T G C C C T G C A G A T G C
C T A T C G A C G G G A T T G C C C T G C A G A T G C
C T A T C G A C G G G A T T G C C C T G C A G A T G C
C T A T C G A C G G A G T A G C C C T G C A G A T G C

Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
Fusarium oxysporum Fotom1 gene for to
Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for
Fusarium oxysporum Fotomb gene for to
Fusarium oxysporum Fotomg gene for to
Fusarium oxysporum Fotomm gene for to
tomatit7.seq

```

- - G C C A G G T G T T A T T A G A G A A A T G G T C Majority
      730                740                750
C A A C C A G G T G T T A T T A G A G A A A T G G T C Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
- - G C C A G G T G T T A T T A G A G A A A T G G T T Fusarium oxysporum Fotom1 gene for toma
- - G C C A G G T G T T A T T A G A G A A A T G G T C Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for to
- - G C C A G G T G T T A T T A G A G A A A T G G T C Fusarium oxysporum Fotomb gene for toma
- - G C C A G G T G T T A T T A G A G A A A T G G T C Fusarium oxysporum Fotomg gene for toma
- - A C C A G G C G T A C T G A C G G A A A T G G T C Fusarium oxysporum Fotomm gene for toma
tomatit7.seq

C G A G G T C A C C A T C G C T G A A A T G G A T G T Majority
      780                790                800
G A A A G T A A C A A T C G C T G A A A T G G A T G T Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
C G A G G T C A C C A T C G C T G A A A T G G A T G T Fusarium oxysporum Fotom1 gene for toma
C G A G G T C A C C A T C G C T G A A A T G G A T G T Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for to
C G A G G T C A C C A T C G C T G A A A T G G A T G T Fusarium oxysporum Fotomb gene for toma
C G A G G T C A C C A T C G C T G A A A T G G A T G T Fusarium oxysporum Fotomg gene for toma
G G A G G T A A C A A T T G C T G A A T G G A T G T Fusarium oxysporum Fotomm gene for toma
tomatit7.seq

A G A C C G A G A T C T A C G G T G A T A T T A T C A Majority
      830                840                850
A A A C C G A A A T C T A C A G C A C T A T T G T C T Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
A G A C C G A G A T C T A C G G C G A T A T T A T C A Fusarium oxysporum Fotom1 gene for toma
A G A C C G A G A T C T A C G G T G A T A T T A T C A Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for to
A G A C C G A G A T C T A C G G T G A T A T T A T C A Fusarium oxysporum Fotomb gene for toma
A G A C C G A G A T C T A C G G T G A T A T T A T C A Fusarium oxysporum Fotomg gene for toma
A G A C C G A A A T C T A C G G C G C C G T C A T A A Fusarium oxysporum Fotomm gene for toma
tomatit7.seq

A C T G A T A T C A G C T T C T G G G G C T T C A C A Majority
      890                900                900
A C C G A C A T C A G T T T C T G G G G G T T T T A C C Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
A C C G A T A T C A G C T T C T G G G G G C T T C A C A Fusarium oxysporum Fotom1 gene for toma
A C T G A T A T C A G C T T C T G G G G G C T T C A C A Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for to
A C T G A T A T C A G C T T C T G G G G G C T T C A C A Fusarium oxysporum Fotomb gene for toma
A C T G A T A T C A G C T T C T G G G G G C T T C A C A Fusarium oxysporum Fotomg gene for toma
A C C G A C A T T A G C T T C T G G G G G C T T C A C G Fusarium oxysporum Fotomm gene for toma
tomatit7.seq

C C C G G G A G C A A A G C C C T T G A T G T T C A A Majority
      930                940                950
A A A G G G T G C A A A G C C C T T G A T G T T C G A Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
C C C G G G A G C A A A G C C C T T G A A G T T C A A A Fusarium oxysporum Fotom1 gene for toma
C C C G G G A G C A A A G C C C T T G A T G T T C A A A Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for to
C C C G G G A G C A A A G C C C T T G A T G T T C A A A Fusarium oxysporum Fotomb gene for toma
C C C G G G A G C A A A G C C C T T G A T G T T C A A A Fusarium oxysporum Fotomg gene for toma
C C C G G G - - - A A A - - - T C G A A T T C C C G Fusarium oxysporum Fotomm gene for toma
tomatit7.seq

```

```

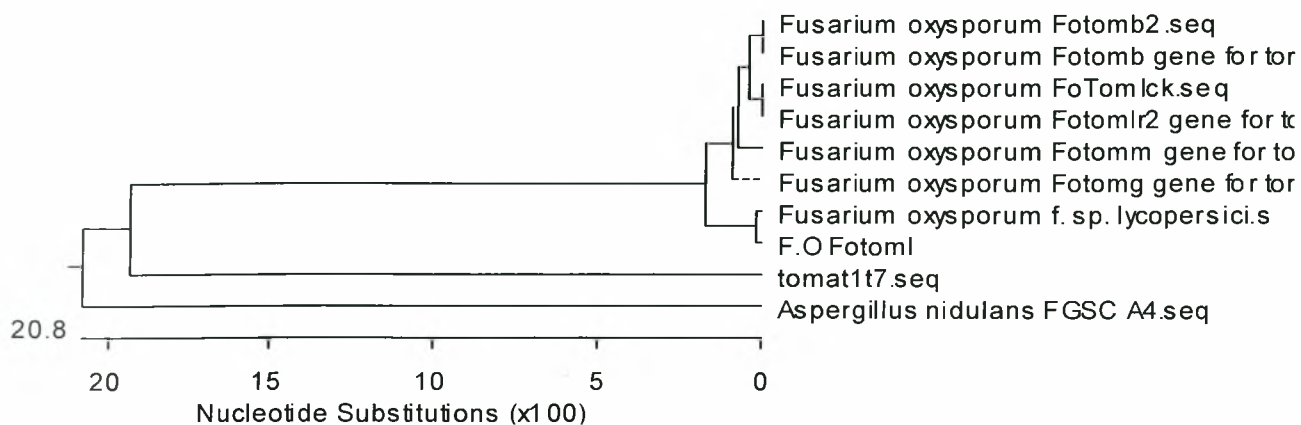
C A T T C T A T G C A A C T C A T A G T G C C C T T G Majority
          980                990                1000
C G T T C T A C G C T A T C C A C T C T G C T T T A A Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
C A T T C T A T G C A A C T C A T A G T G C C C C T T G Fusarium oxysporum Fotom1 gene for toma
C A T T C T A T G C A A C T C A T A G T G C C C C T T G Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for to
C A T T C T A T G C A A C T C A T A G T G C C C C T T G Fusarium oxysporum Fotomb gene for toma
C A T T C T A T G C A A C T C A T A G T G C C C C T T G Fusarium oxysporum Fotomg gene for toma
C A T T C T A T G C A A C T C A T A G T G C C C C T T G Fusarium oxysporum Fotomn gene for toma
G T A C G C A G G tomat1t7.seq
T G A X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X Majority
          1030                1040                1050
G G C A A T C A A A G C T G T G C A T A T G C G T C G Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
T G A Fusarium oxysporum Fotom1 gene for toma
T G A Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for to
T G A Fusarium oxysporum Fotomb gene for toma
T G A Fusarium oxysporum Fotomg gene for toma
T G A Fusarium oxysporum Fotomn gene for toma
tomat1t7.seq
X Majority
G Aspergillus nidulans FGSC A4.seq
Fusarium oxysporum Fotom1 gene for toma
Fusarium oxysporum Fotomlr2 gene for to
Fusarium oxysporum Fotomb gene for toma
Fusarium oxysporum Fotomg gene for toma
Fusarium oxysporum Fotomn gene for toma
tomat1t7.seq

```

t match the Consensus exactly.□

Πίνακας 12. Alignment

Από την σύγκριση των ομόλογων αλληλουχιών προκύπτει και το παρακάτω δέντρο (Εικόνα 26) που απεικονίζει ομοιότητες γενετικών τόπων της τοματινάσης μεταξύ των διαφόρων στελεχών *Fusarium*. Στο δέντρο το γονίδιο της τοματινάσης του Fsk ονομάστηκε tomat1t7.



Εικόνα 26. Δέντρο *Fusarium*.

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτό το πείραμα κατορθώθηκε για πρώτη φορά η απομόνωση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση της τοματινάσης του FsK. Μέχρι τώρα είχαν γίνει παρόμοια πειράματα με τοματινάσες από παθογόνους μύκητες.

Η τοματινάση χρησιμοποιείται από τους μύκητες – παθογόνους ή μη – αρχικά για να διασπαστεί η τοματίνη η οποία είναι τοξική και να μπορέσει ο μύκητας να εισέλθει στο φυτό. Μέχρι στιγμής γνωρίζαμε ότι μόνο οι παθογόνοι μύκητες μπορούν και παράγουν την τοματινάση. Παρατηρήσαμε όμως ότι και ο FsK που είναι μη παθογόνος μύκητας παράγει τόσο τοματινάση όσο και τοματιδίνη.

Ο FsK αναπτύχθηκε σε υγρές καλλιέργειες και απομονώθηκε από αυτόν τον ένζυμο τοματινάση. Για την απομόνωση και τον καθαρισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η στήλη ποσο-Q. Η παρουσία της τοματινάσης και η δραστηρότητά της, επιβεβαιώθηκαν με την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

Παράλληλα, έγινε προσπάθεια προσέγγισης του ενζύμου και γονιδιακά. Με το σχεδιασμό primers υψηλής ομολογίας για το γονίδιο της τοματινάσης

πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση και η αλληλούχησή του. Μετά την αλληλούχισή του γονιδίου παρατηρείται ότι η αλληλουχία της τοματινάσης του FsK παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό ομολογίας με τις αλληλουχίες της τοματινάσης άλλων στελεχών. Διαπιστώσαμε επίσης, ότι η τοματινάση του FsK παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό ομολογίας και με παθογόνους μύκητες. Μέχρι στιγμής γνωρίζαμε ότι με τέτοιου είδους υδρολάσες είναι «εξοπλισμένοι» μόνο οι παθογόνοι μύκητες. Ύστερα από τη μελέτη του FsK όμως, διαπιστώσαμε ότι και μη παθογόνοι μύκητες μπορούν και παράγουν τέτοια μοριακά εργαλεία. Επομένως, η παραγωγή του ενζύμου της τοματινάσης δεν αποτελεί κριτήριο για το εάν ένας μύκητας είναι παθογόνος ή μη.

Αναμένεται η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδίου της τοματινάσης καθώς επίσης σε εξέλιξη βρίσκονται και οι κινιτικές του μελέτες.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kavroulakis, N, Ntougias, S, Zervakis, GI, Ehaliotis, C, Haralampidis, K, Papadopoulou, KK. 2007. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*. 58(14):3853-3864.
2. K Lairini, A Perez-Espinosa, M Pineda, and M Ruiz-Rubio, May 1996, Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
3. Simos G., Panagiotidis C. A., Skoumbas A., Choli D., Ouzounis C., Georgatsos J. G., 1993, Barley β -glucosidase : expression during seed germination and maturation and partial amino acid sequences
4. Simos G., Georgatsos J. G. 1988, Lactose-hydrolyzing β -glycosidases of barley meal
5. Gideon Davies and Bernard Henrissat , 1995, Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases
6. Kumiko Oka, Akiko Okubo, Motoichiro Kodama and Hiroshi Otani 2006, Detoxification of α -tomatine by tomato pathogens *Alternaria alternata* tomato pathotype and *Corynespora cassiicola* and its role in infection
7. T. Quidde, A. E. Osbourn and P. Tudzynski , 1998 , Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*
8. Redman Regina S., Dunigan David D., Rodriguez Rusty J., 2001, Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?
9. Vinale Francesco, Sivasithamparam Krishnapillai, Ghisalberti Emilio L., Marra Roberta, Woo Sheridan L., Lorito Matteo, 2007, Trichoderma-plant - pathogen interactions
10. Ajit Varma, Savita Verma, Sudha, Nirmal Sahay, Britta Bütchorn, and Philipp Franken , 1998, *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte
11. Sprague SJ, Watt M, Kirkegaard JA, and Howlett BJ, 2007, Pathways of infection of *Brassica napus* roots by *Leptosphaeria maculans*.
12. J. -G. Fuchs, Y. Moëne-Loccoz and G. Défago, 1998, Ability of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 to Protect Tomato against *Fusarium* Wilt
13. Olivain C., Alabouvette C., 1998, Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain

14. Vicki A. Bamford,^a Ola O.Kolade,^a Anne E. Osbourn^b and Andrew M. Hemmings, 2004, Purification Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a fungal saponin-detoxifying enzyme.
15. Teresa Roldán-Arjona, Alonso Pérez-Espinosa, and Manuel Ruiz-Rubio, 1999, Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Defines a New Class of Saponinases
16. Sandrock, R. W., Della Penna, D., VanEtten, 1995, purification and characterization of β 2 - tomatinase, an Enzyme involved in the Degradation of α -tomatine and Isolation of the Gene Encoding β 2- Tomatinase from *Septoria lycopersici*
17. Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E. M., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H. ,2005, Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382.
18. Diaz J., Silvar C., Varela M. M., Bernal A., Merino F., 2005, *Fusarium* confers protection against several mycelial pathogens of pepper plants
19. Zehnder, G.W., Murphy, J.F., Sikora, E.J., Kloepper, J.W., 2001. Application to rhizobacteria for induced resistance.
20. Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger, 2002, Plant Physiology

