

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

**Μελέτη της επίδρασης παρεμποδιστών της αναπνευστικής αλυσίδας
στο μεταβολισμό μυκήτων του γένους *Aspergillus*, με εφαρμογή
μοριακής γενετικής και μεταβολομικής**

Ιωάννης Φ. Καλαμπόκης

Επιβλέπων Καθηγητής:
Βόντας Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα
2021

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Ευρωπαϊκή Ένωση
European Social Fund

**Operational Programme
Human Resources Development,
Education and Lifelong Learning**

Co-financed by Greece and the European Union



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

**Μελέτη της επίδρασης παρεμποδιστών της αναπνευστικής αλυσίδας
στο μεταβολισμό μυκήτων του γένους *Aspergillus*, με εφαρμογή
μοριακής γενετικής και μεταβολομικής**

**“Studying the impact of respiratory inhibitors in the metabolism of
Aspergillus species, by applying molecular genetics and
metabolomics.”**

Ιωάννης Φ. Καλαμπόκης

Μέλη Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Βόντας Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Διαλλινάς Γεώργιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Τσιτσιγιάννης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής:

Βόντας Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Διαλλινάς Γεώργιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Τσιτσιγιάννης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Παπλωματάς Επαμεινώνδας, Καθηγητής ΓΠΑ

Λιαπής Κωνσταντίνος, Τακτικός Ερευνητής Α, ΜΦΙ

Χαλαμπαλάκη Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

Gkrintzalis Konstantinos, Ass. Professor Dublin City University

Μελέτη της επίδρασης παρεμποδιστών της αναπνευστικής αλυσίδας στο μεταβολισμό μυκήτων του γένους *Aspergillus*, με εφαρμογή μοριακής γενετικής και μεταβολομικής

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας

Περίληψη

Στόχος της διδακτορικής διατριβής είναι μέσω της αξιοποίησης καινοτόμων “ομικών” τεχνικών και χρησιμοποιώντας τον πρότυπο ασκομύκητα *Aspergillus nidulans*, να μελετηθούν οι μηχανισμοί που επηρεάζουν την πρόσληψη, αποτοξικοποίηση και απέκκριση του μυκητοκτόνου boscalid, του κυριότερου εκπροσώπου της ομάδας των παρεμποδιστών της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος.

Στέλεχος με διαγεγραμμένα επτά γονίδια που κωδικοποιούν μεταφορείς που ελέγχουν την ενεργή πρόσληψη πουρινών, εμφάνισε μειωμένη ευαισθησία στο boscalid. Έπειτα από φυσιολογικές και τοξικολογικές βιοδοκιμές, βρέθηκε ο ρόλος του UapC μεταφορέα στην ενεργή πρόσληψη της δ.ο.. Με εφαρμογή μεταβολομικής μελετήθηκε η επίδραση του boscalid στο μεταβολισμό των ισογεννητικών στελεχών που υπερεκφράζουν ή έχουν διαγεγραμμένα γονίδια που κωδικοποιούν μεταφορείς πουρινών, οι οποίοι σχετίζονται με την πρόσληψη της δ.ο..

Διερευνήθηκε επιπλέον η επίδραση του boscalid στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων του μύκητα, αρχικά με πιλοτικό πείραμα μελέτης και κατανόησης της φυσιολογίας της χρονικής της εξέλιξης και ακολούθως της μελέτης της τοξικότητας του boscalid σε αυτήν. Από τα αποτελέσματα φάνηκε παρόμοια επίπτωση της δ.ο. όπως και στην περίπτωση της μεταβολομικής ανάλυσης των μυκηλιακών υφών

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η επίδραση της δ.ο. ακολούθησε πρωτεομική και μεταβολομική ανάλυση. Παρουσία της βρέθηκε συσσώρευση ηλεκτρικού και μειωμένα επίπεδα φουμαρικού οξέος και αυξημένα επίπεδα τριών εκ των τεσσάρων υπομονάδων του ενζύμου στόχου. Επίσης, ένζυμα και μεταβολίτες με ρόλο κατά την αποτοξικοποίηση, εκφράστηκαν ώστε να αντιμετωπιστεί η τοξική επίδραση της δ.ο..

Το γεγονός ότι η έκφραση των AtrB και AtrD ABC μεταφορέων, φαίνεται να αυξάνει στις 6 ημέρες, οδήγησε στη μελέτη της συσχέτισης της δράσης τους με την ευαισθησία στο boscalid. Κατασκευάστηκαν στελέχη με διαγεγραμμένα και υπερεκφρασμένα τα αντίστοιχα γονίδια και ακολούθησαν φυσιολογικές και τοξικολογικές βιοδοκιμές.

Η ανακάλυψη για πρώτη φορά μεταφορέων που συμμετέχουν στην ενεργή προσρόφηση μυκητοκτόνων, αλλά και απεκκριτικών μεταφορέων μη μελετημένων, καθιστά πιθανή την ανακάλυψη νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας. Επιπλέον, το γεγονός ότι η υδρόλυση της τρεχαλόζης βρέθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην άρση του λήθαργου και ο μετέπειτα ρόλος της γλυκερόλης στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων, υποδεικνύουν τα βιοσυνθετικά τους μονοπάτια ως πολλά υποσχόμενους στόχους για την ανάπτυξη νέας γενιάς Φ.Π.

Επιστημονική Περιοχή: Γεωργική Φαρμακολογία

Λέξεις κλειδιά: Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα, Μυκητοκτόνα, Μηχανισμός Δράσης, Διαμεμβρανικοί Πρωτεϊνικοί Μεταφορείς, Γενετική, Πρωτεομική, Μεταβολομική, Βιολογία Συστημάτων

Studying the impact of respiratory inhibitors in the metabolism of *Aspergillus* species, by applying molecular genetics and metabolomics.

*Department of Plant Sciences
Laboratory of Pesticide Science*

Abstract

The aim of the doctoral dissertation is by using innovative "omics" techniques and the model organism *Aspergillus nidulans*, to study the mechanisms that affect the uptake, detoxification, and excretion of the fungicide boscalid, the main representative of the succinate dehydrogenase inhibitors.

A strain genetically inactivated in all 7 genes encoding transporters that control the active uptake of purines showed reduced sensitivity to boscalid. After physiological and toxicological bioassays, the role of the UapC transporter in the active uptake of boscalid was found. The effect of boscalid on the metabolism of isogenetic strains expressing or genetically lacking boscalid-related nucleobase transporters by employing metabolomics was investigated.

The effect of boscalid on the germination of conidiospores of the fungus was further investigated, first with a pilot study to understand the underlying mechanism, followed by the study of the toxicity of boscalid in it. The results showed a similar effect of d.o. as in the case of metabolic analysis of mycelial hyphae.

To clarify the effect of SDHs on the metabolism of the fungus, proteomic and metabolic analysis was applied. In boscalid presence an accumulation of succinate and reduced levels of fumarate was recorded, with increased levels of three of the four subunits of the target enzyme. Also, enzymes and metabolites with a role in detoxification, were expressed to address the toxic effect of boscalid.

The fact that the expression of AtrB and AtrD ABC transporters seem to increase 6 days post-treatment, led to the study of their impact in boscalid toxicity. Strains were constructed with the corresponding genes deleted and overexpressed, followed by physiological and toxicological bioassays.

The discovery of transporters involved in the active uptake or excretion of antifungal compounds that are poorly studied or even uncharacterized, is likely to lead to the

discovery of new mechanisms of resistance. Additionally, the fact that trehalose hydrolysis proved to play an important role in the breakage of conidial dormancy, with the subsequent role of of glycerol in germination, highlights their biosynthetic pathways as promising targets for novel and improved PPPs.

Scientific area: Pesticide Science

Key words: Plant Protection Products, Fungicides, Mode of Action, Transmembrane Transporters, Genetics, Proteomics, Metabolomics, System Biology

Ευχαριστίες

Η πραγματοποίηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αποτέλεσε παράδειγμα επιτυχούς συνεργασίας διαφορετικών μεταξύ τους επιστημονικών φορέων, μέσω της οποίας και αποκόμισα σημαντικά οφέλη, κρίσιμα για την περαιτέρω επιστημονική μου εξέλιξη.

Ο κύριος όγκος της Διατριβής, οι μελέτες αποτελεσματικότητας των φυτοπροστατευτικών δραστικών ουσιών (δ.ο.) και οι GC/EI/MS μεταβολομικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του τμήματος Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επιστημονική καθοδήγηση του Επίκουρου Καθηγητή Κωνσταντίνου Α. Αλιφέρη, τον οποίον και θα ήθελα να ευχαριστήσω τόσο για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη που μου έδειξε, όσο κυρίως για το γεγονός ότι με εμπιστεύθηκε στον μέγιστο βαθμό, μια εμπιστοσύνη καταλυτική για την επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής. Υπήρξε πρόθυμος να υποστηρίξει οποιοδήποτε πείραμα και επιστημονική συνεργασία. Ακόμη και σε προσωπικό επίπεδο μου στάθηκε σε σημαντικό βαθμό, που πλέον τον θεωρώ προσωπικό φίλο.

Τα πειράματα μοριακής βιολογίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Γενετικής του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επιστημονική καθοδήγηση του καθηγητή Γεωργίου Διαλλινά, τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Οι πολύωρες συζητήσεις περί της μελέτης των πρωτεϊνικών μεταφορέων ακόμη και κατά τις πρώτες πρωινές ώρες μου αποκάλυψαν ένα νέο για μένα, πολύ ενδιαφέρον επιστημονικό πεδίο. Οι παρατηρήσεις του, η υπομονή του, αλλά κυρίως οι νέες ιδέες και προτάσεις του, καθόρισαν σε σημαντικό βαθμό την επιτυχία της Διατριβής.

Σημαντικό ρόλο έπαιξε και ο ερευνητής Dr. Joackhim Korcka του τμήματος Molecular Physiology του Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology, εκ των πρωτοπόρων της GC/EI/ToF-MS μεταβολομικής, στον οποίο πραγματοποίησα τρίμηνη μετεκπαίδευση. Μαζί με τον επιστημονικό του συνεργάτη Dr. Alexander Erban με δίδαξαν την ανάλυση δεδομένων μεγάλου όγκου, όπως αυτά που προκύπτουν από τα δεδομένα των “ομικών” τεχνικών. Επιπλέον όντας οι δημιουργοί της Golm Metabolome Database, μιας εκ των σημαντικότερων μεταβολομικών βάσεων, με εκπαίδευσαν στην δημιουργία αλλά και

συντήρηση μιας τέτοιας βάσης. Το σημαντικότερο όμως είναι, ότι με την διάθεση των αναλυτικών μηχανημάτων τους και της γνώσης τους η συμβολή τους υπήρξε καθοριστική στα πειράματα της μεταβολομικής ανάλυσης της επίδρασης της δραστικής στην φυσιολογία της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων. Επιπλέον με την αμεσότητά τους και την διάθεση να απαντήσουν σε οποιαδήποτε απορία μου, αποτελούν παράδειγμα επιστημόνων. Αποτέλεσε ιδιαίτερη τιμή που με αποδέχτηκαν.

Σημαντική συμβολή είχε και η μετεκπαίδευση μου για τρίμηνο στο Molecular and Applied Microbiology τμήμα του Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology (HKI), υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Axel A Brakhage, εκ των κορυφαίων ερευνητών στην σχετική με τον *Aspergillus fumigatus* έρευνα. Μαζί με τους ερευνητές Dr. Olaf Kniemeyer και Dr. Thomas Krüger με εκπαίδευσαν στις τελευταίες εξελίξεις στις μοριακές τεχνικές και την πρωτεομική ανάλυση. Με την άφογη συνεργασία τους πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα πρωτεομικής ανάλυσης, τα οποία αποδείχθηκαν κρίσιμα, καθώς συμπλήρωσαν σε σημαντικό βαθμό αυτά της μεταβολομικής, παρέχοντας κρίσιμα δεδομένα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία και άφογη επικοινωνία που είχα με τον Επιβλέποντα Καθηγητή Ιωάννη Βόντα, διευθυντή του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας. Με την συμβολή του και με την ελευθερία που μου παρείχε να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό του εργαστηρίου, βοήθησε με την επιτυχή έκβαση των πειραμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, για την τιμή που μου κάνανε, να αποδεχτούν να είναι κριτές της Διδακτορικής μου Διατριβής, καθώς και για τις καίριες επισημάνσεις τους. Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη και τον Καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά μέλος και διευθυντής αντίστοιχα του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τον Ερευνητή Α' Δρ. Κωνσταντίνο Λιαπή, διευθυντή του Εργαστηρίου Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων, του τομέα Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων & Φυτοφαρμακευτικής του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Την κα Μαρία Χαλαμπαλάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τέλος τον

Αναπληρωτή Καθηγητή .Κωνσταντίνο Γκρίντζαλη του School of Biotechnology του Dublin City University.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη και ιδιαίτερα τους φοιτητές μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς που πέρασαν αυτά τα χρόνια από την ομάδα του Pesticide Metabolomics Group, για την άψογη συνεργασία τους, παρά τις υπερβολικές πολλές φορές απαιτήσεις μου. Ιδιαίτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Υποψήφιες Διδάκτορες Μάιρα Λυκογιάννη και Άννα-Ευγενία Παπαδοπούλου, και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Δήμητρα Καραμάνου και Στέφανο Κολαϊνή, καθώς εκτός των άλλων στάθηκαν δίπλα μου σαν φίλοι, υποστηρίζοντάς με σημαντικό βαθμό και σε ψυχολογικό επίπεδο.

Φυσικά δεν πρέπει να παραλείψω τους Υποψήφιους Διδάκτορες κ. Σπύρο Βλογιαννίτη και Ευαγγελία Κάτσαβου, καθώς και τον Μεταδιδάκτορα Εμμανουήλ Φωτάκη, για όλη την ευχάριστη παρέα και κλίμα αυτά τα χρόνια, που σπάνια συναντά κανείς. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Υποψήφιο Διδακτορικό κ. Γεώργιο Καπετανάκη, για την άψογη συνεργασία κατά τα πρώτα στάδια της Διδακτορικής μου Διατριβής. Φυσικά πρέπει να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα κ. Ελευθέριο Δούκα για όλη τη βοήθεια που μου παρείχε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας, για την άψογη συνεργασία ήδη από τα πρώτα χρόνια που ξεκίνησα ως προπτυχιακός φοιτητής ακόμη. Την Λέκτορα κα Φωτεινή Φλουρή, τους ΕΔΙΠ Γεωργία Παζιώτου, Αναστάσιο Μαλανδράκη και Ηλία Κιούλο, καθώς και την ερευνήτρια κα Ευαγγελία Μώρου.

Τεράστια παράληψη όμως θα ήταν να μην ευχαριστήσω το μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Γενετικής του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Σωτήρη Αμίλλη. Η συμβολή του υπήρξε καθοριστική τόσο σε επιστημονικό, όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο. Ήταν εκείνος που στην πράξη και με πολλή υπομονή με δίδαξε μοριακές τεχνικές και ήταν πρόθυμος να συμβάλει σε οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία. Επιπλέον ήταν διαθέσιμος να μου λύσει την οποιαδήποτε απορία, όποτε και αν τον ρωτούσα. Το σημαντικότερο όμως ήταν η στήριξη σε ανθρώπινο επίπεδο που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της Διατριβής μου, καθώς οι συμβουλές του αποδείχτηκαν καίριες. Δε θα ήταν υπερβολή να τον χαρακτηρίσω φίλο, εκτός από επιστημονικό συνεργάτη.

Όλα αυτά όμως δε θα ήταν πραγματικότητα αν δεν είχα την αμέριστη συμπαράσταση της οικογένειάς μου, τους γονείς μου Φώτη και Αγαθή, τον αδερφό μου Κώστα, τους φίλους και τη σύντροφό μου Δήμητρα τους οποίους και ευχαριστώ, για την στήριξη που μου παρείχαν και τις θυσίες που έχουν κάνει.

Είναι αδύνατον να μην αναφέρω τον άνθρωπο που με μύησε στη μαγεία της επιστήμης, εμφυτεύοντάς μου την αγάπη για τη Γεωργική Φαρμακολογία. Πρόκειται για τον εκλιπόντα Επίκουρο Καθηγητή Αναστάσιο Μαρκόγλου. Πολλά από τα ερωτήματα που διερευνήθηκαν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, αποτελούν συνέχεια των μεταξύ μας συζητήσεων. Η επιρροή που μου άσκησαν οι επιστημονικές και όχι μόνο συζητήσεις μας, το επίπεδο των γνώσεών του, αλλά κυρίως το καθολικά αποδεκτό ήθος του, τον καθιστούν τον πρώτο μου Δάσκαλο. Για αυτόν το λόγο και ως ένδειξη ελάχιστης ευγνωμοσύνης, του αφιερώνω την παρούσα Διδακτορική Διατριβή.

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	1
1.1	Χημική φυτοπροστασία: σύντομη επισκόπηση και σύγχρονες προκλήσεις	3
1.2	Κυτοχρωμική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων – Αναπνευστική αλυσίδα	4
1.2.1	Μηχανισμός αναπνευστικής αλυσίδας	4
1.2.1.1	Αναγωγή NADH-ουβικινόνης (Σύμπλοκο I)	9
1.2.1.2	Αφυδρογονάση Ηλεκτρικού Οξέος (Σύμπλοκο II)	10
1.2.1.3	Κυτοχρωμική αναγωγή (Σύμπλοκο III)	12
1.2.1.4	Κυτοχρωμική οξειδάση (Σύμπλοκο IV)	14
1.2.1.5	Οξειδωτική φωσφορυλίωση και παραγωγή ATP	16
1.2.1.6	Εναλλακτική ή ενζυμική αναπνοή	17
1.2.2	Παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHIs)	19
1.2.2.1	Ιστορικά στοιχεία	19
1.2.2.2	Μηχανισμός δράσης	20
1.3	Ανθεκτικότητα μυκήτων στα μυκητοκτόνα	24
1.3.1	Γενετικός έλεγχος της ανθεκτικότητας	25
1.3.2	Βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας	26
1.3.3	Αντιμετώπιση ανθεκτικότητας	27
1.3.4	Προβλήματα Ανθεκτικότητας στους SDHIs	29
1.4	Ο πρότυπος οργανισμός <i>Aspergillus nidulans</i>	31
1.4.1	Το γένος <i>Aspergillus</i>	31
1.4.2	Σημασία ως πρότυπος οργανισμός	34
1.4.3	Συστηματική ταξινόμηση	36
1.4.3.1	Μορφολογία	37

1.4.4	Βιολογικός κύκλος	38
1.5	Διαμεμβρανικοί μεταφορείς.....	41
1.5.1	Μηχανισμοί ελέγχου εισόδου και απέκκρισης.....	41
1.5.2	Ρόλος και σημασία διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων	44
1.5.3	Μεταφορείς Νουκλεοτιδικών Βάσεων	46
1.5.4	ATP-binding Cassette (ABC) μεταφορείς	50
1.6	Μεταβολομική ανάλυση	53
1.6.1	Κατηγορίες μεταβολομικών αναλύσεων	55
1.6.2	Αρχές ανάπτυξης μεταβολομικών πρωτοκόλλων – Αναλυτικά μηχανήματα. 57	
1.6.3	Προ-επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων μεταβολομικής μεγάλης κλίμακας (large scale data analysis).....	62
1.6.4	Εφαρμογές μεταβολομικής	64
1.6.4.1	Γενικές εφαρμογές της μεταβολομικής	64
1.6.4.2	Αξιολόγηση της επίπτωσης της χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων και του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε αυτά στη μυκοτοξικογόνο ικανότητα των μυκήτων	65
1.6.4.3	Χημειοταξονομία του γένους <i>Aspergillus</i>	67
1.7	Βιοπληροφορική και διαδικτυακοί πόροι στην έρευνα των Ασπεργίλλων	68
2	Υλικά και Μεθοδολογία.....	71
2.1	Στελέχη <i>Aspergillus</i> sp.....	73
2.2	Βακτηριακά στελέχη <i>Escherichia coli</i>	76
2.3	Θρεπτικά Υποστρώματα.....	77
2.3.1	Θρεπτικά υποστρώματα μυκήτων	77
2.3.2	Θρεπτικά υποστρώματα βακτηρίων	80
2.4	Συντήρηση μυκητιακών στελεχών.....	81
2.5	Δραστικές ουσίες μυκητοκτόνων.....	81

2.6	Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές	84
2.7	Μέθοδοι γενετικής μηχανικής.....	86
2.7.1	Προετοιμασία βακτηρίων δεκτών πλασμιδίων	86
2.7.2	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	87
2.7.3	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα	87
2.7.4	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA του <i>A. nidulans</i>	88
2.7.5	Μετασχηματισμός στελεχών <i>A. nidulans</i>	89
2.7.5.1	Παραγωγή πρωτοπλαστών.....	90
2.7.5.2	Μετασχηματισμός πρωτοπλαστών	91
2.7.6	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	93
2.7.7	Ηλεκτροφόρηση.....	93
2.7.8	Κλωνοποίηση.....	94
2.7.8.1	Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	94
2.7.8.2	Κλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα.....	95
2.7.9	Κατασκευή πλασμιδίων	96
2.7.9.1	Στελέχη που εκφράζουν τους μεταφορείς πουρινών, πυριμιδινών και αλλαντοΐνης.....	96
2.7.9.2	Κατασκευή της αλληλουχίας απαλοιφής του <i>AN10902</i> και της αλληλουχίας <i>AN10902-gfp</i>	97
2.7.9.3	Κατασκευή της αλληλουχίας απαλοιφής των <i>atrB</i> και <i>atrD</i>	98
2.7.9.4	Κατασκευή αλληλουχίας υπερέκφρασης των <i>atrB</i> και <i>atrD</i> υπό τον έλεγχο του <i>gpdA</i> υποκινητή	99
2.8	Αξιολόγηση ευαισθησίας ειδών Ασπεργίλλων σε μυκητοκτόνα διαφορετικών χημικών ομάδων.....	99
2.9	Ποσοτικοποίηση της ανταγωνιστικής πρόσληψης του μυκητοκτόνου boscalid από μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων	100

2.10 Αξιολόγηση της επίδρασης πηγών άνθρακα, αζώτου και της υδρόλυσης της τρεχαλόζης στην κονιδιακή εκβλάστηση	102
2.11 Μεταβολομικές αναλύσεις	103
2.11.1 Μελέτη της επίδρασης του boscalid στον <i>A. nidulans</i>	103
2.11.1.1 Χημικά αντιδραστήρια	103
2.11.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων	103
2.11.1.3 Αέρια Χρωματογραφία	105
2.11.1.4 Ταυτοποίηση μεταβολιτών και κατασκευή μεταβολομικού προφίλ	106
2.11.1.5 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων	107
2.11.2 Μελέτη του μηχανισμού κονιδιακής εκβλάστησης	107
2.11.2.1 Χημικά αντιδραστήρια	107
2.11.2.2 Βιολογικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας για την παραγωγή κονιδιοσπορίων	108
2.11.2.3 Συνθήκες ανάπτυξης	109
2.11.2.4 Δειγματοληψία και προετοιμασία δειγμάτων για GC/EI-TOF/MS ανάλυση	109
2.11.2.5 Αναλυτικές συνθήκες GC/EI-TOF/MS ανάλυσης	110
2.11.2.6 Επεξεργασία δεδομένων και ταυτοποίηση μεταβολιτών	111
2.11.3 Μελέτη της επίδρασης του boscalid στην κονιδιακή εκβλάστηση του <i>A.</i> <i>nidulans</i>	113
2.11.3.1 Χημικά και αντιδραστήρια	113
2.11.3.2 Βιολογικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας	113
2.11.4 Μελέτη της επίδρασης των boscalid και isopyrazam στο μεταβολισμό του στελέχους FGSC A4	115
2.11.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων	115
2.11.4.2 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων	115

2.12	Πρωτεομική ανάλυση της επίδρασης του boscalid	117
2.12.1	Συνθήκες καλλιέργειας	117
2.12.2	Απομόνωση πρωτεϊνών	117
2.12.3	Αναλυτικές συνθήκες LC-MS/MS (orbitrap)	119
2.12.4	Ταυτοποίηση πρωτεϊνών	120
3	Αποτελέσματα και Συζήτηση	121
3.1	Τοξικότητα μυκητοκτόνων διαφορετικών χημικών ομάδων σε Ασπεργίλλους ..	123
3.1.1	Αξιολόγηση ευαισθησίας σε παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHs).....	124
3.1.2	Αξιολόγηση ευαισθησίας σε παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας	125
3.1.3	Αξιολόγηση ευαισθησίας στα fludioxonil και cyprodinil	126
3.2	Οι SDHs παρουσιάζουν δραστικότητα έναντι του <i>A. nidulans</i>	126
3.3	Το boscalid είναι αποτελεσματικό για σημαντικά είδη ασπεργίλλων	131
3.4	Ο ρόλος των μεταφορέων πουρινών/ νουκλεοβάσεων στην τοξικότητα του boscalid	133
3.4.1	Η δράση του boscalid επηρεάζεται από φυσιολογικές συνθήκες που ελέγχουν μεταφορείς.....	133
3.4.2	Μεταλλαγές σε μεταφορείς πουρινών και των σχετικών ρυθμιστικών γονιδίων, επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του boscalid.....	136
3.4.3	Πέντε μεταφορείς πουρινών συμβάλουν στην ευαισθησία έναντι του boscalid	139
3.4.4	Ο μεταφορέας UapC αναγνωρίζει το boscalid με μέτρια συγγένεια.....	141
3.4.5	Η μεταβολομική επιβεβαιώνει την επίδραση της πρόσληψης του boscalid μέσω μεταφορέων στον μεταβολισμό του <i>A. nidulans</i>	142
3.4.5.1	Επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης.....	143

3.4.5.2	Οι μεταφορείς πουρινών/ νουκλεοβάσεων έχουν σημαντικό αντίκτυπο στον μεταβολισμό του <i>A. nidulans</i> και της απόκρισής του στο boscalid.....	149
3.5	Μεταβολομική μελέτη της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων του <i>A. nidulans</i> ..	152
3.5.1	Επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης	152
3.5.2	Η υδρόλυση της τρεχαλόζης έχει κομβικό ρόλο στην κονιδιακή εκβλάστηση του στελέχους FGSC A4.....	161
3.5.3	Η γλυκερόλη και η μαννιτόλη παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της εκβλάστησης	162
3.5.4	Ο σχηματισμός της υφής εκβλάστησης είναι καθοριστικός για τον μεταβολισμό και τη χημική ομοιότητα των κονιδιοσπορίων	165
3.5.5	Η τρεχαλόζη δρα ως ενδογενής πηγή άνθρακα κατά την έναρξη της κονιδιακής εκβλάστησης.....	168
3.5.6	Η ταχεία είσοδος νερού μέσω ακουαπορίνης επηρεάζει την κονιδιακή εκβλάστηση	170
3.6	Μεταβολομική μελέτη της επίδρασης του boscalid στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων	172
3.6.1	Επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης	172
3.6.2	Μεταβολομική απόκριση των στελεχών στο boscalid.....	176
3.7	Μελέτη της επίδρασης του boscalid στον μεταβολισμό του <i>A. nidulans</i> με εφαρμογή μεταβολομικής και πρωτεομικής	183
3.7.1	Μεταβολομική μελέτη της επίδρασης των boscalid και isopyrazam	184
3.7.1.1	Γενική επισκόπηση της ανάλυσης.....	184
3.7.1.2	Οι SDHIs επηρεάζουν σειρά βιοσυνθετικών μονοπατιών με κυριότερο αυτό της βιοσύνθεσης αμινοξέων.....	188
3.7.1.3	Παρουσία SDHIs συσσωρεύεται ηλεκτρικό οξύ, στεριγματοκυστίνη και αμινοξέα με ρόλο στην αποτοξικοποίηση εξωγενών τοξικών μορίων ..	191

3.7.2	Πρωτεομική ανάλυση της επίδρασης του boscalid	193
3.7.2.1	Γενική επισκόπηση της ανάλυσης.....	193
3.7.2.2	Η παρουσία του boscalid οδηγεί στην υπερέκφραση υπομονάδων της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος.....	197
3.7.2.3	Η παρουσία boscalid ενεργοποιεί μονοπάτια αποτοξικοποίησης	199
3.7.2.4	Η παρουσία boscalid ενεργοποιεί διαμεμβρανικούς μεταφορείς	202
3.8	Οι AtrB και AtrD μεταφορείς συμβάλλουν στην ευαισθησία στο boscalid	206
3.8.1	Επίδραση του boscalid στα διαγεγραμμένα στελέχη	206
3.8.2	Επίδραση boscalid στα υπερεκφρασμένα στελέχη.....	208
4	Συμπεράσματα - Προοπτικές	213
4.1	Σύνοψη αποτελεσμάτων	215
4.2	Σημασία αποτελεσμάτων και μελλοντικές προοπτικές.....	219
5	Βιβλιογραφία	223

1 Εισαγωγή

1.1 Χημική φυτοπροστασία: σύντομη επισκόπηση και σύγχρονες προκλήσεις

Από τη στιγμή που ο άνθρωπος δημιούργησε τις πρώτες οργανωμένες κοινωνίες, περνώντας από το στάδιο του θηρευτή στο στάδιο του συλλέκτη, βρίσκεται διαρκώς αντιμέτωπος με προκλήσεις, τις οποίες και προσπαθεί να ξεπεράσει, ώστε να διασφαλίσει στο μέγιστο βαθμό τη βέλτιστη ποιότητα της ζωής του. Από τις μεγαλύτερες προκλήσεις είναι η εξασφάλιση της γεωργικής παραγωγής και η προστασία της από εχθρούς και ασθένειες, μία πρόκληση που συνεχίζει με αμείωτη ένταση έως την σύγχρονη εποχή (Schäfer et al. 2019, Kalampokis and Aliferis 2020).

Από τις τεχνικές που ανέπτυξε, η χημική φυτοπροστασία αποτελεί την αποτελεσματικότερη και συγχρόνως οικονομικότερη μέθοδο αντιμετώπισης των φυτοπαθογόνων και φυτοπαρασίτων. Η αποκλειστική χρήση άλλων μεθόδων όπως η εφαρμογή καλλιεργητικών μέτρων, η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και βιολογικών παραγόντων, συχνά δεν επαρκούν για την αντιμετώπιση πολύ σημαντικών παθογόνων, όπως ο βοτρυτής, το φουζικλάδιο, οι κερκόσπορες, οι περονόσποροι και τα ωίδια (Storck et al. 2017).

Τα πλεονεκτήματα όμως της χρήσης χημικών σκευασμάτων, οδήγησαν δυστυχώς στην αποκλειστική και δίχως σύνεση πολλές φορές χρήση τους, έχοντας ως αποτέλεσμα την εμφάνιση περιβαλλοντικών προβλημάτων, και της απώλειας της αποτελεσματικότητας πολλών εξ' αυτών, εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικών σε αυτά φυτοπαρασίτων (Hollomon 2015, Ishii and Hollomon 2015, Lucas et al. 2015, Zikankuba et al. 2019). Ταυτόχρονα τα τελευταία χρόνια οι αυξημένες απαιτήσεις του κοινωνικού συνόλου για ασφαλέστερα και φιλικότερα Φ.Π. προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον, καθιστούν τις ενώσεις αυτές υπό συνεχή πίεση, έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα, ένας σημαντικός αριθμός των έως σήμερα χρησιμοποιούμενων χημικών ενώσεων, να αποσύρονται από την κυκλοφορία, ενώ παραμένουν όσο το δυνατόν πιο εκλεκτικά μόρια (Schäfer et al. 2019, Vurro et al. 2019).

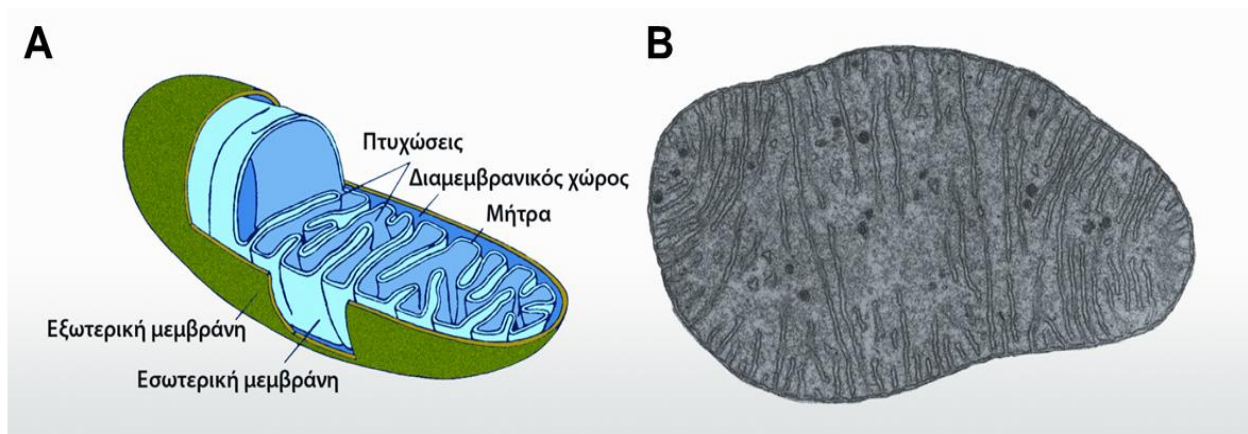
Μία από τις σημαντικότερες σύγχρονες ομάδες μυκητοκτόνων που αποτέλεσαν αντικείμενο της Διατριβής αποτελούν οι παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του

ηλεκτρικού οξέος (SDHIs), ενός ενζύμου που αποτελεί κομμάτι της αναπνευστικής αλυσίδας (Stammler et al. 2015).

1.2 Κυτοχρωμική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων – Αναπνευστική αλυσίδα

1.2.1 Μηχανισμός αναπνευστικής αλυσίδας

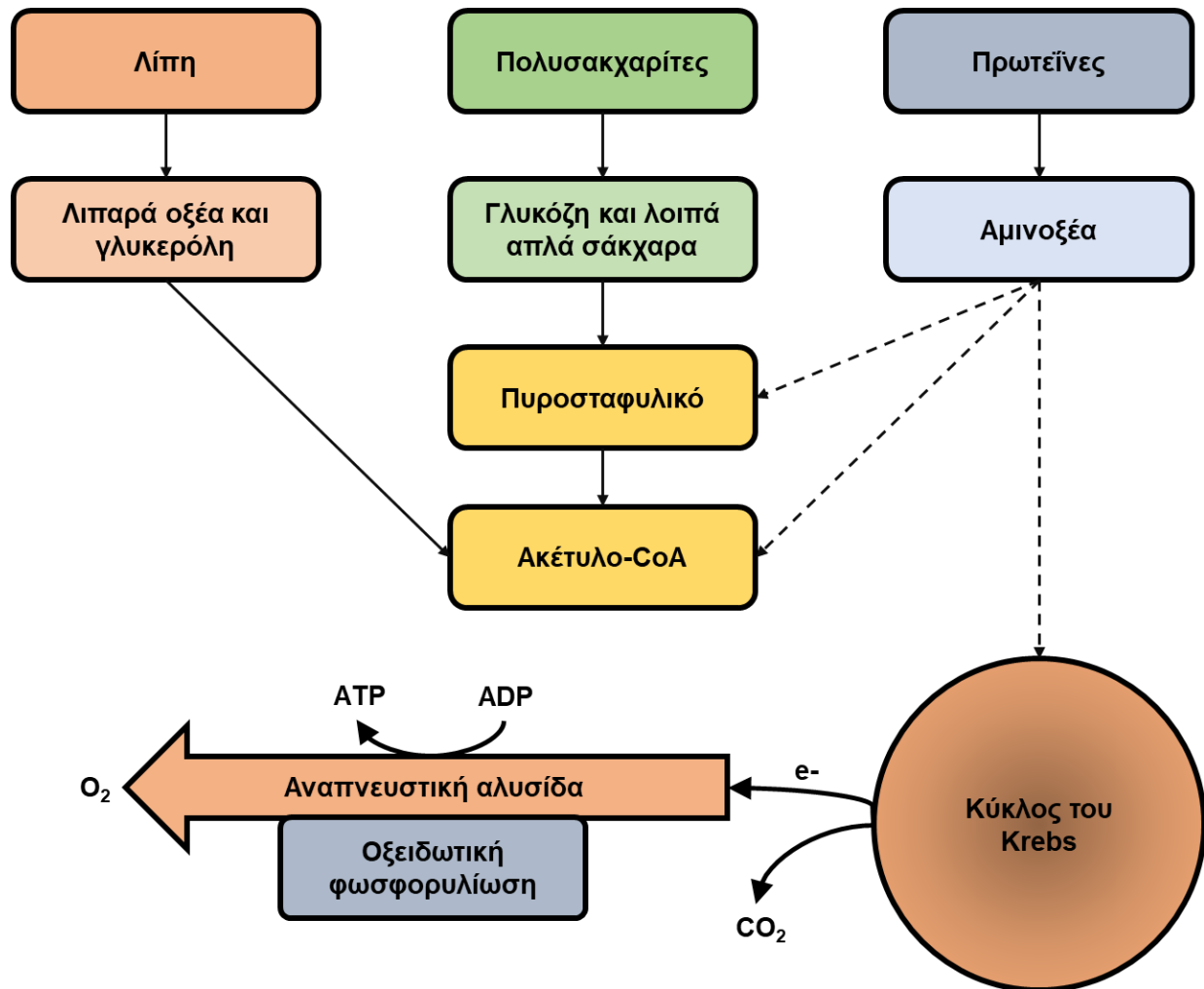
Η κυτταρική αναπνοή, αποτελεί κύριο βιοχημικό μηχανισμό ύψιστης σημασίας για την επιβίωση των οργανισμών. Είναι κρίσιμο κομμάτι της αερόβιας αναπνοής μέσω της οποίας παράγεται η απαραίτητη για τους οργανισμούς ενέργεια. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η αερόβια αναπνοή, κατά την οποία οξειδώνονται οι οργανικές ενώσεις προς CO₂ και H₂O, λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση Μιτοχονδρίου (A), Τομή σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (B) (Ζιώγας και Μαρκόγλου 2010)

Τα τελικά προϊόντα που προκύπτουν από το μεταβολισμό πηγών ενέργειας όπως τα λιπαρά οξέα, τα αμινοξέα και η γλυκόζη, θα μεταφερθούν από το κυτταρόπλασμα στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Εντός αυτών ο καταβολισμός θα συνεχιστεί μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs). Τα τελικά προϊόντα των μονοπατιών αυτών είναι δύο μόρια που χαρακτηρίζονται ως πλούσιοι δότες ηλεκτρονίων, τα NADH

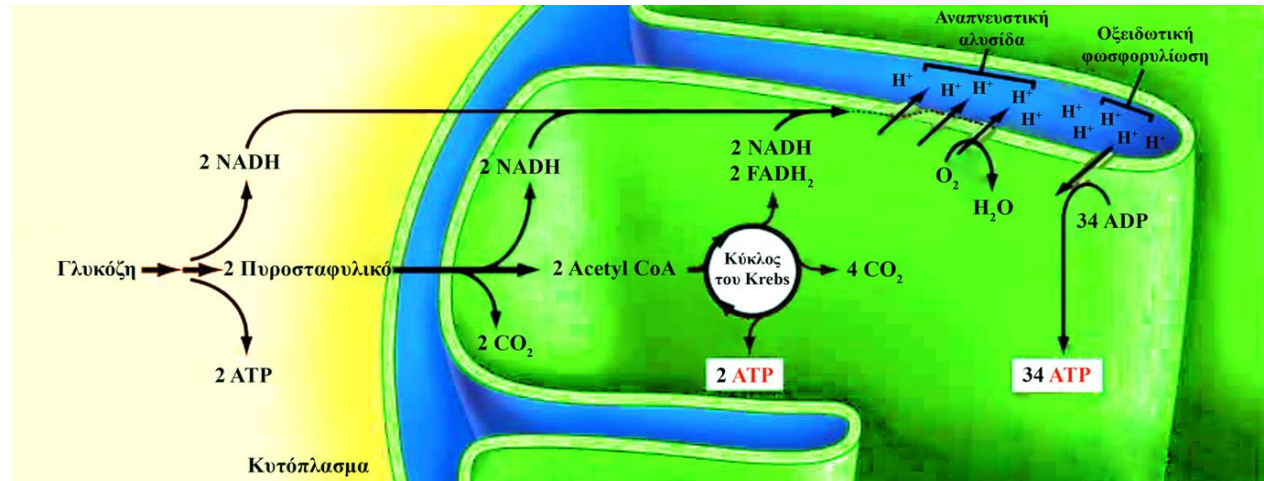
και $FADH_2$. Η κυτταρική αναπνοή χρησιμοποιεί τα υδρογόνα και ηλεκτρόνια που ελευθερώνονται κατά τη γλυκόλυση, την οξείδωση των λιπαρών οξέων και τον κύκλο του κιτρικού οξέος, οπότε και μεταφέρονται στο οξυγόνο, το οποίο ανάγεται σε νερό (Nelson and Cox 2008, Berg et al. 2012) (**Εικόνα 2**).



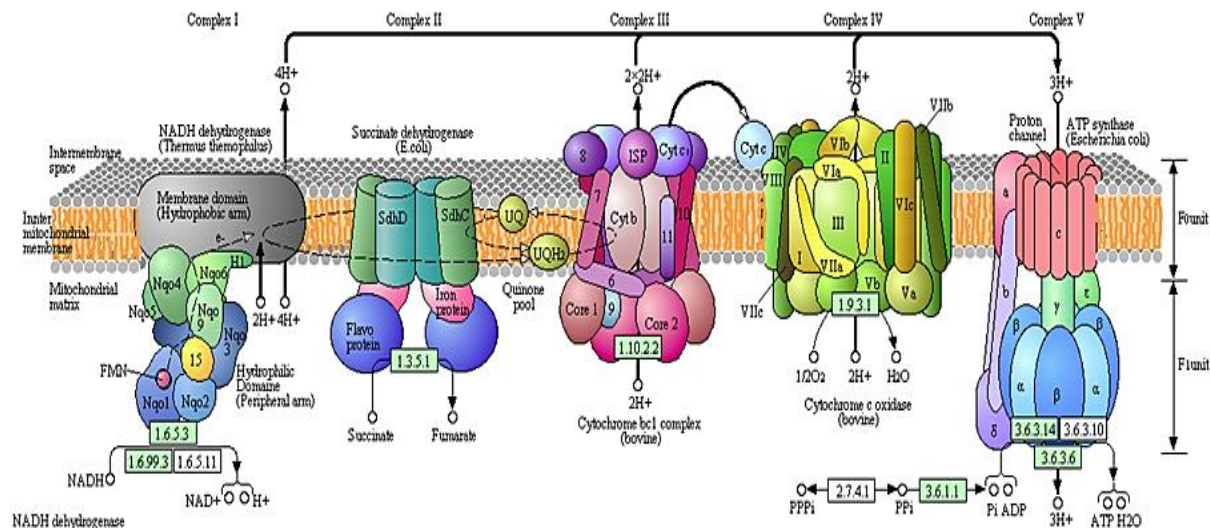
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του καταβολισμού μακρομορίων για την παραγωγή ενέργειας

Αντίθετα με τον κύκλο του Krebs και τον καταβολισμό των υδατανθρακών, που λαμβάνουν χώρα στη μήτρα του μιτοχονδρίου, η διαδικασία της αναπνοής πραγματοποιείται στην εσωτερική του μεμβράνη (**Εικόνα 3**). Η κυτταρική αναπνοή αποτελείται από 2 μηχανισμούς, πολύ στενά συνδεδεμένους μεταξύ τους. Την

κυτοχρωμική ροή των ηλεκτρονίων (e^-) προς το O_2 και αναγωγής του προς H_2O , γνωστή και ως κυτοχρωμική αλυσίδα μεταφοράς e^- και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Εικόνες 3, 4).

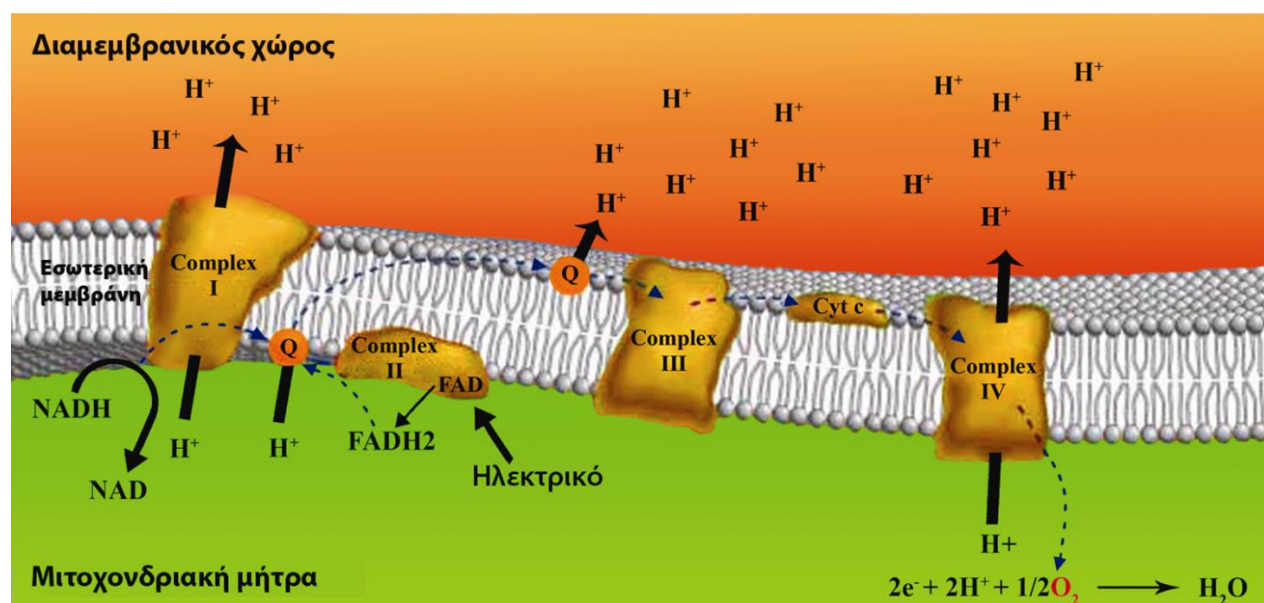


Εικόνα 3: Χωροθέτηση των αντιδράσεων του κύκλου του Krebs, της αναπνευστικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, στη μιτοχονδριακή μήτρα (Ζιώγας και Μαρκόγλου 2010)



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση αναπνευστικής αλυσίδας (Complex I-IV) και οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Complex V) του *A. nidulans* (προσαρμογή από KEGG)

Απαραίτητα για την αναπνευστική αλυσίδα είναι διάφορα ενζυμικά σύμπλοκα, οξειδοαναγωγικά ικανά να μεταφέρουν ηλεκτρόνια, τα οποία είναι τοποθετημένα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Αποτελούν τα διαμεμβρανικά *σύμπλοκα I, III, και IV* και το μη διαμεμβρανικό *σύμπλοκο II*, που καταλύουν τις αυθόρμητες και εξώθερμες οξειδώσεις του οξυγόνου (O_2) από τα μόρια $NADH$ και $FADH_2$. Παράλληλα, μέσω της δράσης τους, προκαλούν εντός του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων, μια βαθμιδωτή αύξηση της συγκέντρωσης H^+ (Nelson and Cox 2008, Berg et al. 2012) (Εικόνα 5).

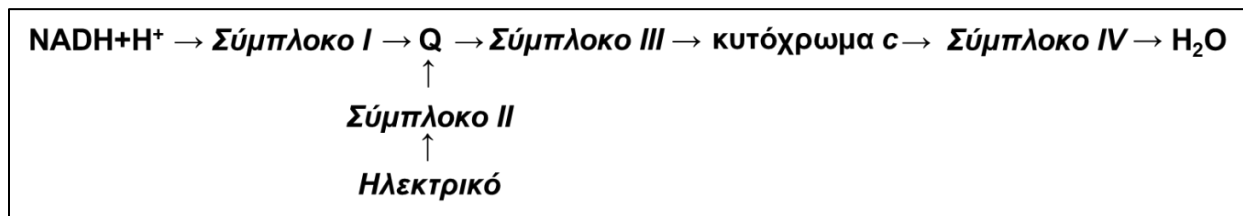


Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του γενικού μηχανισμού της αναπνευστικής αλυσίδας (Ζιώγας και Μαρκόγλου 2010)

Τα διαμεμβρανικά σύμπλοκα I, III και IV ενεργοποιούνται όταν ένα μόριο $NADH$ προσδένεται στην αναγωγή του $NADH$ (σύμπλοκο I), διοχετεύοντας πρωτόνια από τη μήτρα του μιτοχονδρίου στον διαμεμβρανικό χώρο, σχηματίζοντας δεξαμενή υψηλού δυναμικού H^+ . Στην περίπτωση πρόσδεσης μορίου $FADH_2$ στην αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (σύμπλοκο II), ενεργοποιούνται μόνο τα διαμεμβρανικά σύμπλοκα III και IV, παράγοντας δεξαμενή υψηλού, αλλά μικρότερου σε σχέση με το σύμπλοκο I, δυναμικού H^+ . Αυτή η διαφορά οφείλεται στη μη απελευθέρωση πρωτονίων προς τον διαμεμβρανικό χώρο από το σύμπλοκο II, καθώς η δράση του είναι παράλληλη αυτής του

συμπλόκου I, αποτελώντας το ιδανικότερο μέσο ταχύτατης μεταφοράς ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q.

Μεταξύ των διαφορετικών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, το συνένζυμο Q (ουβικινόνη) (CoQ) και το κυτόχρωμα C λειτουργούν ως ο συνδετικός τους κρίκος (Nelson and Cox 2008, Ζιώγας και Μαρκόγλου 2010) (**Εικόνα 5**). Το CoQ αποτελεί τον πρώτο κινητό μεταφορέα της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς συλλέγει τα ηλεκτρόνια από τα σύμπλοκα I και II και τα μεταφέρει στο σύμπλοκο III. Έπειτα από την αναγωγή του, τα ηλεκτρόνια παραλαμβάνονται από το κυτόχρωμα C, μέσω της οξειδωσής του και μεταφέρονται προς το σύμπλοκο IV. Έτσι το κυτόχρωμα C αποκτά τον ρόλο του δεύτερου κινητού μεταφορέα της αναπνευστικής αλυσίδας (**Εικόνα 6**).

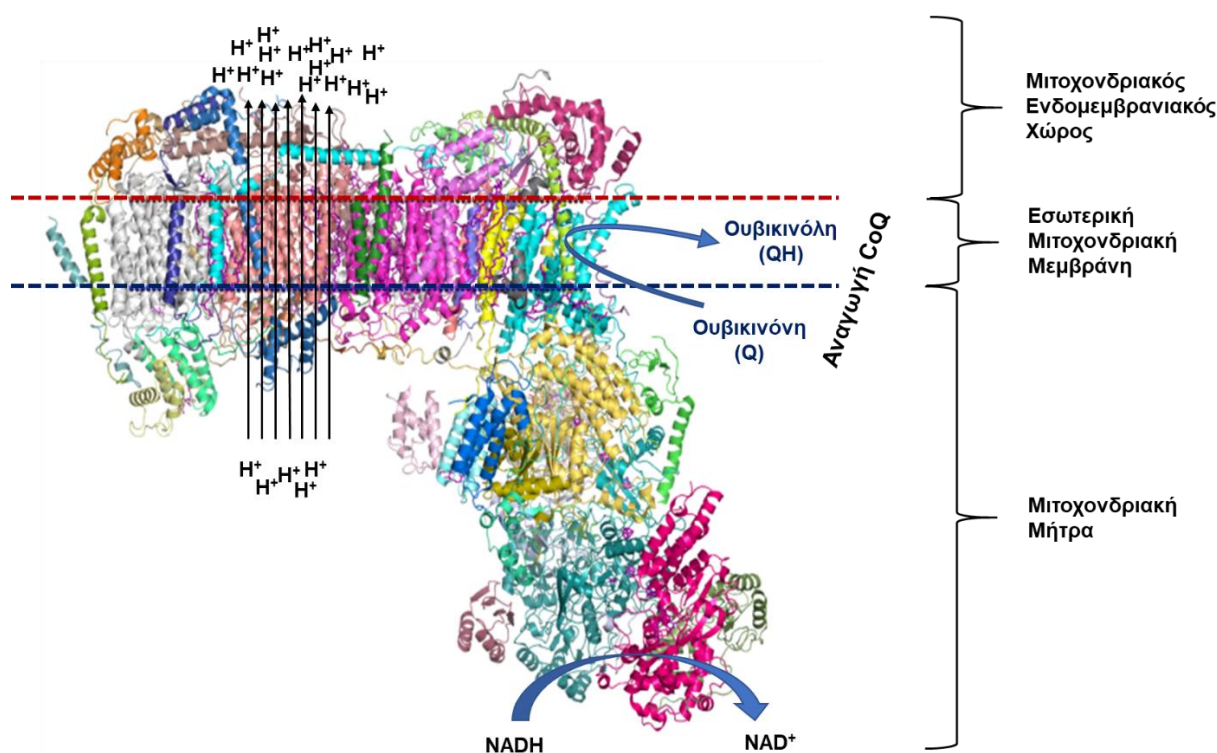


Εικόνα 6: Σύνοψη κυτοχρωμικής μεταφοράς ηλεκτρονίων

Η ροή ηλεκτρονίων από το NADH και το FADH₂ προς O₂ έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ελεύθερης ενέργειας. Η απελευθερωμένη ενέργεια χρησιμοποιείται για το σχηματισμό τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) από διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, που αποτελεί και το τελικό στάδιο της αναπνευστικής αλυσίδας. Το τελικό αποτέλεσμα είναι από κάθε μόριο NADH που προσδένεται να μεταφέρονται 6 H⁺ και να παράγονται 3 μόρια ATP, ενώ από το κάθε μόριο FADH₂ να μεταφέρονται 4 H⁺ και να παράγονται 2 μόρια ATP. Η παραγωγή ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι πολύ αποδοτική καθώς παράγονται 34 μόρια ATP, εν αντιθέσει με τα 2 μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης που παράγονται κατά την αυτόνομη γλυκόλυση (Denniston et al. 2013).

1.2.1.1 Αναγωγή NADH-ουβικινόνης (Σύμπλοκο I)

Το σύμπλοκο I γνωστό και ως αναγωγή/αφυδρογονάση του NADH (**Εικόνα 7**), με τις 42 διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μεταξύ των οποίων και μια μονονουκλεοτιδική φλαβοπρωτεΐνη (FMN) και έξι τουλάχιστον σίδηρο-θείο πρωτεΐνες (Efremov et al. 2010), αποτελεί όχι μόνο το μεγαλύτερο και πολυπλοκότερο ένζυμο της κυτοχρωμικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, αλλά και μία από τις μεγαλύτερες μεμβρανικές πρωτεϊνικές κατασκευές (Brandt 2006).



Εικόνα 7: Τρισδιάστατη δομή και χωροθέτηση του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Απεικονίζεται η ροή των H^+ από τη μιτοχονδριακή μήτρα στο μιτοχονδριακό ενδομεμβριανικό χώρο και η αναγωγή της ουβικινόνης σε ουβικινόλη λαμβάνει χώρα εντός της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η τρισδιάστατη δομή λήφθηκε από τη βάση δεδομένων *Orientations of Proteins in Membranes* (<https://opm.phar.umich.edu/>)

Αποτελεί το πρώτο ένζυμο της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων καταλύοντας δύο ταυτόχρονες αντιδράσεις. Η πρώτη είναι η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από το NADH προς την ουβικινόνη (Q), η οποία ανάγεται σε ουβικινόλη (QH_2). Παράλληλα καταλύεται

η μεταφορά τεσσάρων πρωτονίων (H^+) από τη μήτρα προς τον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, αποτελώντας έτσι την πρώτη αντλία πρωτονίων της αλυσίδας. Αυτή η συσσώρευση πρωτονίων συμβάλει στην εγκαθίδρυση του απαραίτητου ενεργειακού δυναμικού, για την παραγωγή ATP κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στο τέλος της αναπνευστικής αλυσίδας.

Παρότι ο ακριβής μηχανισμός της αντίδρασης δεν είναι απόλυτα γνωστός, εντούτοις μπορεί να συνοψιστεί ως: $NADH + H^+ + CoQ + 4H^+ \rightarrow NAD^+ + CoQH_2 + 4H^+$, οπότε για κάθε μόριο NADH τέσσερα πρωτόνια μεταφέρονται από τη μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο (Wikström 1984). Με τα έως τώρα δεδομένα είναι γνωστό ότι οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στο υδροφιλικό τμήμα του συμπλόκου, εντός της μιτοχονδριακής μήτρας. Αρχικά το NADH προσδένεται στο σύμπλοκο I, οξειδώνεται σε NAD^+ ανάγοντας τον 5-φωσφορική ριβοφλαβινικό υποκαταστάτη (FMN) προς $FMNH_2$. Τα ηλεκτρόνια περνούν δια των Fe-S πρωτεϊνών, στην ουβικινόνη η οποία ανάγεται σε ημικινόνη. Με επανάληψη της διαδικασίας η ημικινόνη ανάγεται σε ουβικινόλη (Sazanov 2015, Zickermann et al. 2015), η οποία θα μεταφερθεί προς το σύμπλοκο III.

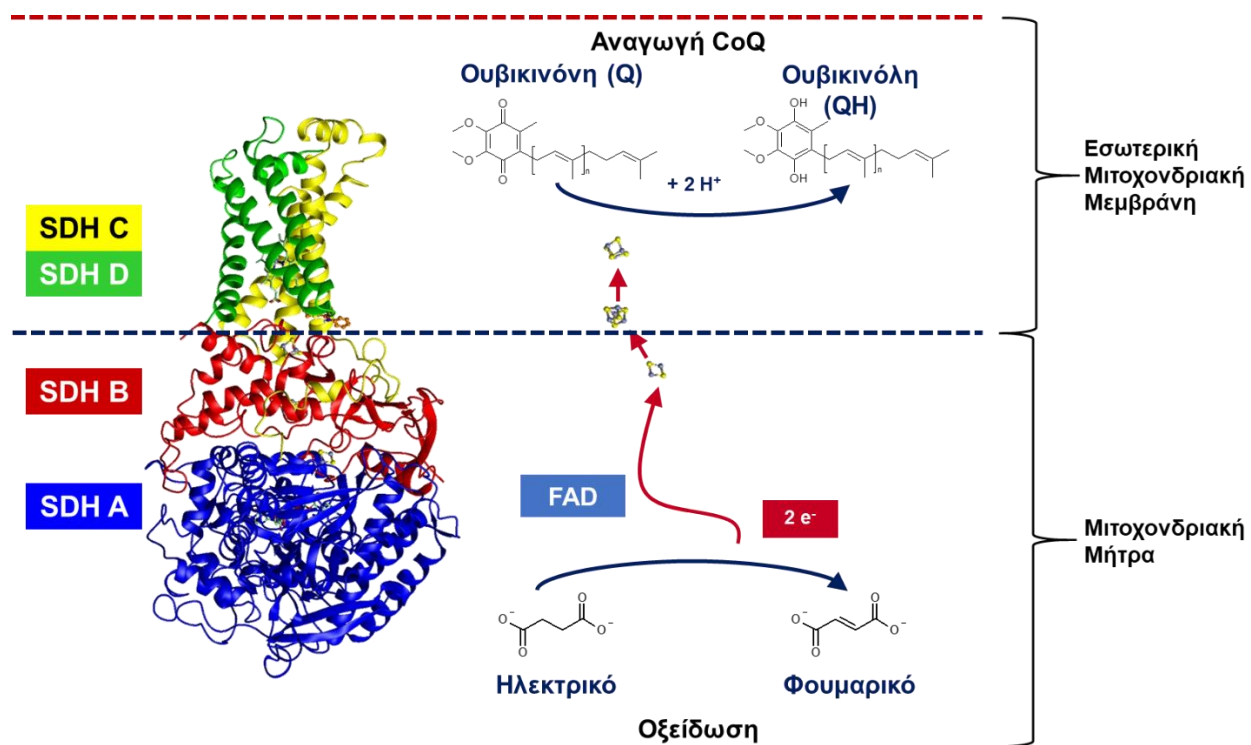
1.2.1.2 Αφυδρογονάση Ηλεκτρικού Οξέος (Σύμπλοκο II)

Η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (σύμπλοκο II), γνωστή και ως αναγωγάση ηλεκτρικού-ουβικινόνης (**Εικόνα 8**), βρίσκεται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων αποτελώντας το μόνο μη διαμεμβρανικό σύμπλοκο της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Αποτελεί το μοναδικό ένζυμο με συμμετοχή τόσο στον κύκλο του Krebs όσο και στην αναπνευστική αλυσίδα, καταλύοντας την οξείδωση του ηλεκτρικού προς φουμαρικό με ταυτόχρονη αναγωγή της ουβικινόνης σε ουβικινόλη, μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το $FADH_2$ στην ουβικινόνη, δίχως τη μεταφορά πρωτονίων στον διαμεμβρανικό χώρο (Oyedotun and Lemire 2004, Nelson and Cox 2008).

Δομικά το σύμπλοκο περιλαμβάνει τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες (Sun et al. 2005). Η υδρόφιλη φλαβοπρωτεΐνη SdhA, συνδέεται με το υφρόφιλο κομμάτι της Fe-S πρωτεΐνης SdhB. Έτσι σχηματίζεται εντός τη μιτοχονδριακής μήτρας το υδρόφιλο τμήμα

του συμπλόκου, στο οποίο λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις (Au et al. 1995). Το υδρόφοβο κομμάτι της SdhB με την σειρά του συνδέεται με τις υδρόφοβες υπομονάδες SdhC και SdhD, εντός του διαμεμβρανικού χώρου. Το υδρόφοβο κομμάτι δε μετέχει στην ενζυμική δραστηριότητα, αλλά λειτουργεί ως δομική κατασκευή αγκίστρωσης του συνενζύμου (Yankovskaya et al. 2003).



Εικόνα 8: Τρισδιάστατη δομή και χωροθέτηση του Συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας. Απεικονίζεται η αναγωγή της ουβικινόνης σε ουβικινόλη εντός της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και η οξείδωση του ηλεκτρικού οξέος προς φουμαρικό, εντός της μιτοχονδριακής μήτρας. Η τρισδιάστατη δομή λήφθηκε από τη βάση δεδομένων *Orientations of Proteins in Membranes* (<https://opm.phar.umich.edu/>)

Ο ακριβής μηχανισμός οξείδωσης του ηλεκτρικού οξέος, ο ρόλος των αιμικών κατασκευών του συμπλόκου καθώς και η ακριβής μεταφορά των ηλεκτρονίων δεν είναι πλήρως κατανοητός. Από όσα είναι έως τώρα γνωστά, αρχικά το ηλεκτρικό προσδένεται στην SdhA υπομονάδα και οξειδώνεται μέσω της αναγωγής του FAD σε FADH₂ προς φουμαρικό. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την FADH₂ στην SdhB υπομονάδα και δια των τριών κέντρων Fe-S ([2Fe-2S] -> [4Fe-4S] -> [3Fe-4S]), στον κενό χώρο μεταξύ των

υπομονάδω SdhB – SdhC – SdhD. Σε αυτό το κενό βρίσκεται η θέση πρόσδεσης της ουβικινόνης (Q). Έπειτα από διπλή αναγωγή της ουβικινόνης σε ουβικινόλη (QH₂), όπως στην περίπτωση του συμπλόκου I, η τελευταία θα απελευθερωθεί και θα μεταφερθεί στο σύμπλοκο III (Horsefield et al. 2006).

Συνοπτικά ο μηχανισμός μπορεί να αποδοθεί ως:

“ηλεκτρικό + ουβικινόνη => φουμαρικό + ουβικινόλη (ενδιάμεσο FAD => FADH₂)”

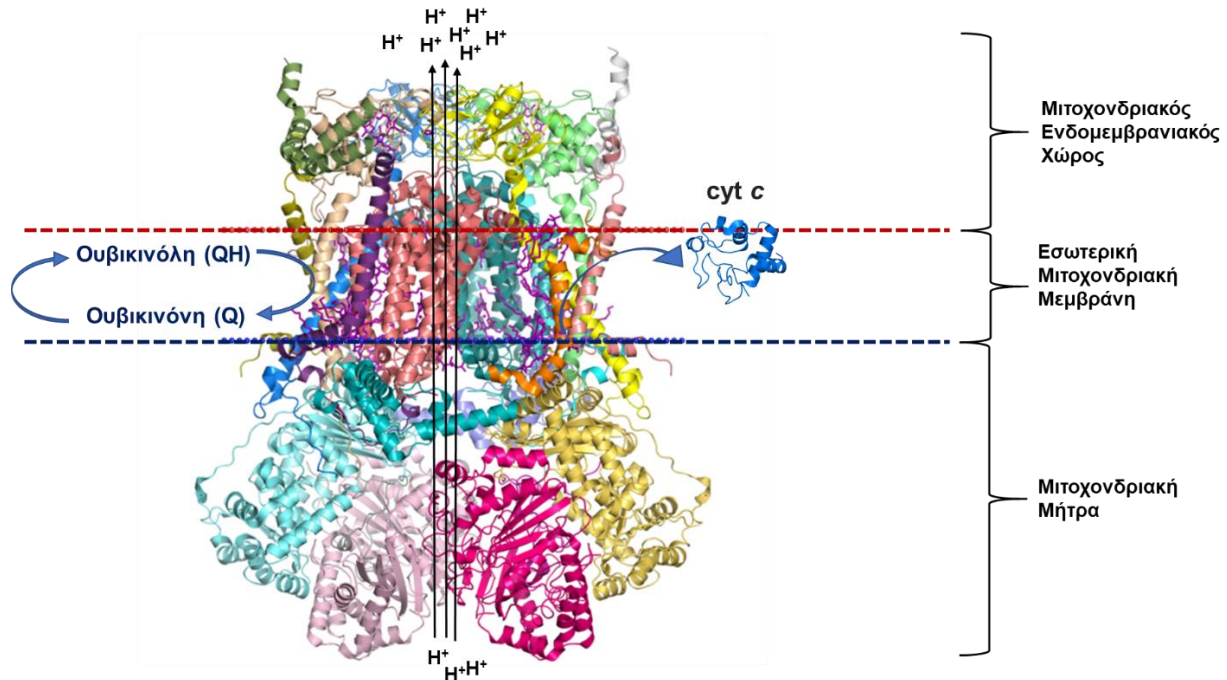
Με αυτόν τον μηχανισμό το ηλεκτρικό οξύ δρα ως δότης ηλεκτρονίων στην αλυσίδα των ηλεκτρονίων, και οι FADH/FAD ως φορείς των ηλεκτρονίων προς την ουβικινόνη.

1.2.1.3 Κυτοχρωμική αναγωγή (Σύμπλοκο III)

Το σύμπλοκο III γνωστό και ως κυτοχρωμική αναγωγή και σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων bc₁ (**Εικόνα 9**), αποτελεί τον δέκτη ηλεκτρονίων από το συνένζυμο Q και την δεύτερη αντλία πρωτονίων προς τον ενδομεμβριανικό χώρο της αναπνευστικής αλυσίδας (Nelson and Cox 2008, Berg et al. 2012).

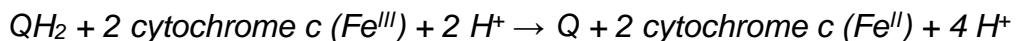
Δομικά ως σύμπλοκο εμφανίζει ποικιλομορφία, η οποία εξαρτάται από τον οργανισμό από τον οποίο προέρχεται. Έχουν αναφερθεί 11 πρωτεϊνικές υπομονάδες στα θηλαστικά (Zhang et al. 1998) και στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Joseph-Horne et al. 2001) και μόλις 3 σε περιπτώσεις πρωτοβακτηρίων (Yang and Trumpower 1986). Παρά τις διαφορές, μελέτες έδειξαν ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων 3 υπομονάδες και συγκεκριμένα το κυτόχρωμα B, που αποτελεί και τη μόνη υπομονάδα που κωδικοποιείται από μιτοχονδριακό DNA, το κυτόχρωμα c₁ και η μεμβρανικά προσηλωμένη πρωτεΐνη Rieske, εμφανίζουν ενεργά οξειδοαναγωγικά κέντρα και εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων. Οι υπόλοιπες υπομονάδες θεωρείται ότι έχουν κυρίως δομικό ρόλο (Zhang et al. 1998). Το σύμπλοκο τέλος φέρει δύο σημεία πρόσδεσης του συνένζυμου Q, μία εδραζόμενη στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Q_o), και μία προς την πλευρά της μήτρας του μιτοχονδρίου (Q_i).

Βιοχημικά το σύμπλοκο III καταλύει την οξείδωση του συνένζυμου-Q προς αναγωγή του κυτοχρώματος C, μεταφέροντας 4 πρωτόνια από τη μιτοχονδριακή μήτρα προς τον ενδομεμβριανικό χώρο



Εικόνα 9: Τρισδιάστατη δομή και χωροθέτηση του Συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας. Απεικονίζεται η ροή των H^+ από τη μιτοχονδριακή μήτρα στον μιτοχονδριακό ενδομεμβρανιακό χώρο, ο κύκλος ουβικινόνης – ουβικινόλης και η αναγωγή του κυτοχρώματος c εντός της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η τρισδιάστατη δομή λήφθηκε από τη βάση δεδομένων *Orientations of Proteins in Membranes* (<https://opm.phar.umich.edu/>)

.Η γενική χημική αντίδραση δίνεται από τον τύπο:



Ο μηχανισμός της μεταφοράς των πρωτονίων και ηλεκτρονίων δια του συμπλόκου III είναι πολύπλοκος, και έχει προταθεί ο κύκλος της ουβικινόνης κατά τον οποίο δύο μόρια ουβικινόλης οξειδώνονται σε ουβικινόνη και ένα μόριο ουβικινόνης ανάγεται σε ουβικινόλη (Crofts 2004). Πρόκειται για μία διαδικασία δύο σταδίων. Στο πρώτο στάδιο ένα μόριο ουβικινόνης και ένα μόριο ουβικινόλης προσδένονται στο κυτόχρωμα B. Από την δεσμευμένη ουβικινόλη απομακρύνονται δύο ηλεκτρόνια με ταυτόχρονη διάχυση δύο H^+ στον ενδομεμβρανιακό χώρο. Το ένα ηλεκτρόνιο θα μεταφερθεί από το κέντρο Rieske ($2Fe/2S$) στο κυτόχρωμα c_1 το οποίο με την σειρά του θα το μεταφέρει στο κυτόχρωμα C, το οποίο και θα αποδεσμευθεί από την θέση πρόσδεσής του. Το δεύτερο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από την B_L αίμη στην B_H αίμη και από εκεί στην δεσμευμένη ουβικινόνη που

θα αναχθεί σε ημιουβικινόλη, όπως συμβαίνει και στο σύμπλοκο I. Η αρχικά δεσμευμένη ουβικινόλη που πλέον οξειδώθηκε σε ημιουβικινόνη αποδεσμεύεται, ενώ η τελευταία παραμένει δεσμευμένη. Στο δεύτερο στάδιο μια δεύτερη ουβικινόλη δεσμεύεται από το κυτόχρωμα B. Ακολουθεί ο ίδιος με πριν μηχανισμός, καταλήγοντας στην αναγωγή ακόμη ενός κυτοχρώματος c από το πρώτο ηλεκτρόνιο, αλλά το δεύτερο αυτή την φορά ανάγει την ημιουβικινόνη του πρώτου σταδίου σε ουβικινόλη. Με το πέρας του δεύτερου κύκλου απελευθερώνονται τόσο το κυτόχρωμα c όσο και οι νεοσχηματισμένες ουβικινόνη και ουβικινόλη.

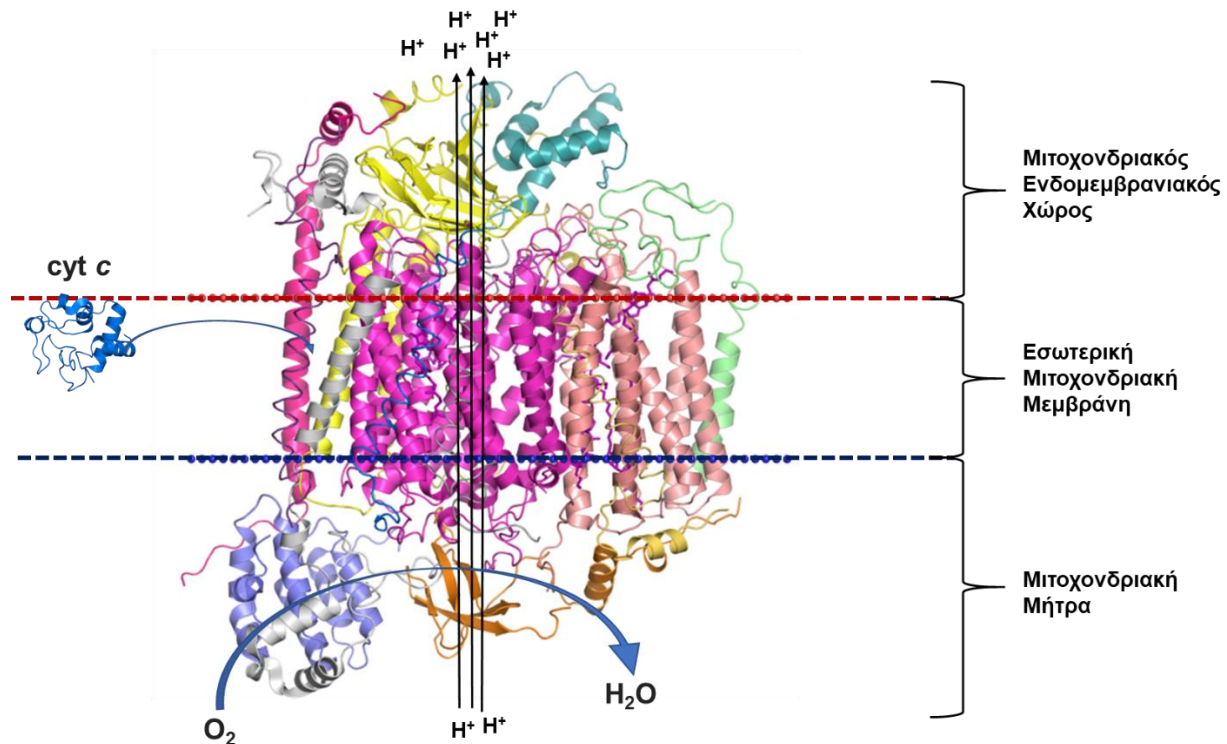
1.2.1.4 Κυτοχρωμική οξειδάση (Σύμπλοκο IV)

Το σύμπλοκο IV γνωστό και ως κυτοχρωμική οξειδάση ή σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων $a+a_3$ (**Εικόνα 10**), αποτελεί το τελευταίο στάδιο της κυτοχρωμικής μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτό αφαιρεί τα τέσσερα ηλεκτρόνια από τα αντίστοιχα μόρια κυτοχρώματος c, με τα οποία ανάγει μόρια O_2 σε H_2O .

Πρόκειται για ένα μεγάλο σύμπλοκο που αποτελείται από 14 υπομονάδες, με τις τρεις μεγαλύτερες και λειτουργικά απαραίτητες (υπομονάδες I, II και III), να κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακό DNA, ενώ οι υπόλοιπες από πυρηνικό DNA (Balsa et al. 2012). Το σύμπλοκο περιέχει δύο αιμικές θέσεις (κυτοχρώματα a και a_3) και δύο θέσεις που περιέχουν άτομα χαλκού (Cu_A και Cu_B) (Tsukihara et al. 1995).

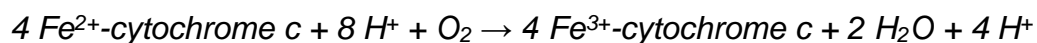
Αρχικά δύο μόρια κυτοχρώματος c απελευθερώνουν δύο ηλεκτρόνια στο κέντρο Cu_A . Από εκεί μεταφέρεται δια του κυτοχρώματος a, στο διπύρρηνο κέντρο που σχηματίζουν το κυτόχρωμα a_3 με το Cu_A . Εκεί τα μέταλλα ανάγονται σε Cu^+ και Fe^{2+} . Ο υδροξειδικός υποκαταστάτης πρωτονιώνεται και χάνεται ως νερό, δημιουργώντας ένα κενό μεταξύ των μετάλλων, αναγκάζοντας το ένζυμο να προσλάβει οξυγόνο. Εξαιτίας της εγγύτητας του συμπλόκου με το οξυγόνο, ανάγεται το τελευταίο σε υπεροξειδίο, το οποίο σχηματίζει γέφυρα με το Fe^{3+} του κυτοχρώματος a_3 . Προσθήκη τρίτου ηλεκτρονίου από το κυτόχρωμα c, με την προσθήκη πρωτονίου, οδηγεί στην διάσπαση του υπεροξειδίου και σχηματίζεται η φερρυλομάδα σε $Fe^{4+}=O$. Η προσθήκη του τελευταίου ηλεκτρονίου από το κυτόχρωμα c, με την προσθήκη ακόμη ενός πρωτονίου, ανάγει την φερρυλομάδα σε

Fe^{3+}OH . Με προσθήκη ακόμη δύο πρωτονίων, απελευθερώνονται δύο μόρια νερού και το ένζυμο επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση (Voet and Voet 2011).



Εικόνα 10: Τρισδιάστατη δομή και χωροθέτηση του Συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας. Απεικονίζεται η ροή των H^+ από τη μιτοχονδριακή μήτρα στον μιτοχονδριακό ενδομεμβρανιακό χώρο και η πρόσδεση του συνένζυμου c εντός της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η τρισδιάστατη δομή λήφθηκε από τη βάση δεδομένων Orientations of Proteins in Membranes (<https://opm.phar.umich.edu/>)

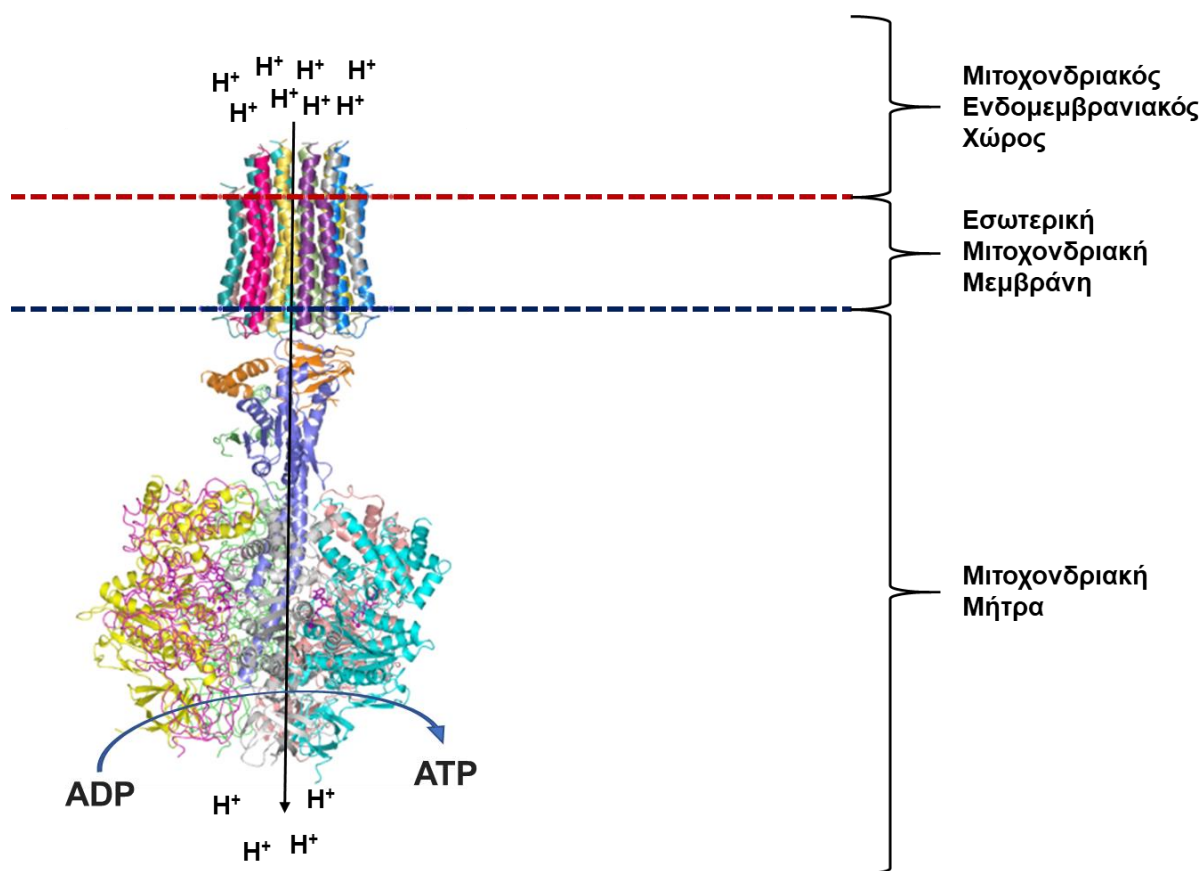
Σχηματικά η αντίδραση μπορεί να συνοψιστεί ως:



Από αυτήν φαίνεται πως το σύμπλοκο σε κάθε κύκλο αντλεί συνολικά 8 πρωτόνια από τη μήτρα, με τα τέσσερα από αυτά να περνούν στον διαμεμβρανικό χώρο, αποτελώντας έτσι την τρίτη και τελευταία αντλία πρωτονίων προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Ταυτόχρονα δεν επιτρέπει στα ανοιγμένα ενδιάμεσα να δράσουν ως ελεύθερες ρίζες, αλλά τις διατηρεί ισχυρά συνδεδεμένες στο σύμπλοκο, έως της πλήρους μετατροπής τους σε νερό.

1.2.1.5 Οξειδωτική φωσφορυλίωση και παραγωγή ATP

Παρότι η παραγωγή ATP κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση (**Εικόνα 11**) δεν αποτελεί λειτουργία της κυτοχρωμικής μεταφοράς ηλεκτρονίων, είναι τόσο στενά συνδεδεμένη με αυτή στο βαθμό που το υπεύθυνο ένζυμο (μιτοχονδριακή συνθετάση του ATP) αποτελεί το σύμπλοκο V του ευρύτερου μηχανισμού της αναπνευστικής αλυσίδας (Jonckheere et al. 2012).



Εικόνα 11: Τρισδιάστατη δομή και χωροθέτηση της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP. Απεικονίζεται η ροή των H^+ από τον μιτοχονδριακό ενδομεμβρανιακό χώρο προς τη μιτοχονδριακή μήτρα και η οξειδωτική φωσφορυλίωση του ADP προς ATP, εντός της μιτοχονδριακής μήτρας. Η τρισδιάστατη δομή λήφθηκε από τη βάση δεδομένων Orientations of Proteins in Membranes (<https://opm.phar.umich.edu/>)

Η συσσώρευση πρωτονίων στον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο, καθ' όλη την πορεία της κυτοχρωμικής μεταφοράς ηλεκτρονίων, έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία

διαφοράς ηλεκτροχημικού δυναμικού το οποίο επαρκεί για την παραγωγή ATP. Τα πρωτόνια αυτά, βάσει του χημειωσμωτικού μοντέλου, επανεισέρχονται δια του αγωγού πρωτονίων (F_0) της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP, στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Η κίνηση αυτή αναγκάζει την υπομονάδα c του ενζύμου να περιστραφεί, Μέσω της παραγόμενης από την περιστροφή αυτή ενέργεια, το ένζυμο μπορεί να καταλύσει την οξειδωτική φωσφορυλίωση του ADP προς ATP, από την καταλυτική μονάδα σύνθεσης του ATP (F_1) η οποία βρίσκεται προς την πλευρά της μήτρας του μιτοχονδρίου.

Αξίζει να αναφερθεί πως η κυτοχρωμική μεταφορά ηλεκτρονίων είναι σε τέτοιο βαθμό συνδεδεμένη με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, που αν για τον οποιοδήποτε λόγο διακοπεί η μεταφορά πρωτονίων προς τον διαμεμβρανικό χώρο, τότε σταματά και η παραγωγή ATP. Ομοίως, παύση λειτουργίας της συνθετάσης του ATP έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του δυναμικού των πρωτονίων έως τον κορεσμό, κατά τον οποίο απαιτείται περισσότερη ενέργεια για τη μεταφορά των πρωτονίων από αυτήν που παράγεται, οπότε και η λειτουργία του συστήματος σταματά (Nelson and Cox 2008)

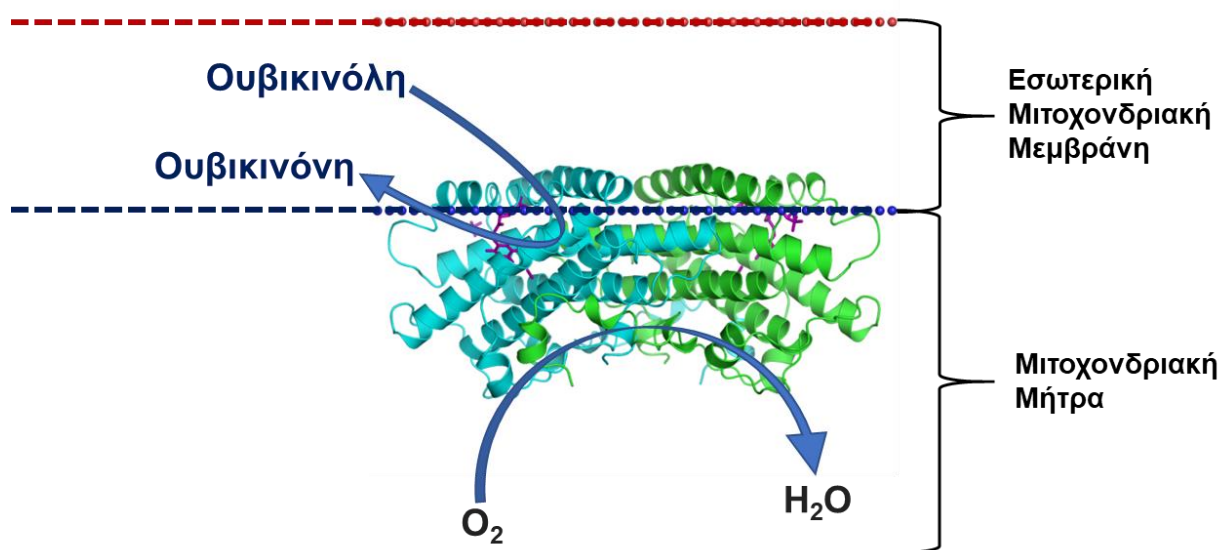
1.2.1.6 Εναλλακτική ή ενζυμική αναπνοή

Αρκετοί μύκητες εμφανίζουν ενζυμικά μονοπάτια μέσω των οποίων μπορούν σε κάποιο βαθμό να υποστηρίξουν την λειτουργία των συμπλόκων I-III. Το σημαντικότερο από αυτά είναι το μονοπάτι της εναλλακτικής οξειδάσης (Joseph-Horne et al. 2001) .

Η εναλλακτική οξειδάση (AOX) (**Εικόνα 12**) δρα παράλληλα του συμπλόκου III, καταλύοντας την οξειδωση της ουβικινόλης και τον σχηματισμό 2 μορίων H_2O από O_2 , παρακάμπτοντας τα σύμπλοκα III και IV της αναπνευστικής αλυσίδας (Berthold et al. 2000, Ζιώγας και Μαρκόγλου 2010).

Η εναλλακτική οξειδάση κωδικοποιείται από πυρηνικό DNA και είναι παρούσα σε πλήθος μυκήτων, με χαρακτηριστικές εξαιρέσεις τους ζυμομύκητες *S. cerevisiae* και *S. Pompe* (Albury et al. 1996, Atteia et al. 2004, McDonald and Vanlerberghe 2004). Παραμένει άγνωστο κατά πόσο εκφράζεται συνεχώς αποτελώντας κύριο κομμάτι της αναπνευστικής αλυσίδας στους μύκητες και τα φυτά. Αντιθέτως με τα επιμέρους συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας, οι μηχανισμοί έκφρασης και ρύθμισης της

εναλλακτικής οξειδάσης, φαίνεται να ελέγχεται από πολύπλοκους μηχανισμούς. Στις περισσότερες των περιπτώσεων φαίνεται να επάγεται έπειτα από τη δράση εξειδικευμένων παρεμποδιστών της αναπνευστικής αλυσίδας και ιδίως των παρεμποδιστών του συμπλόκου III (Ziogas et al. 1997, Miguez et al. 2004). Επιπλέον υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές πως μπορεί να εκφραστεί μόνο σε μεταλλαγμένα ανθεκτικά στελέχη (Ziogas et al. 1997), καθώς και περιπτώσεις συνεχούς της έκφρασης (Joseph-Horne et al. 1998).



Εικόνα 12: Τρισδιάστατη δομή και χωροθέτηση της εναλλακτικής οξειδάσης. Απεικονίζεται η οξείδωση της ουβικινόλης σε ουβικινόνη εντός της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και η δημιουργία δύο μορίων H₂O από το O₂ εντός της μιτοχονδριακής μήτρας. Η τρισδιάστατη δομή λήφθηκε από τη βάση δεδομένων Orientations of Proteins in Membranes (<https://opm.phar.umich.edu/>)

Από τις διάφορες θεωρίες που έχουν προταθεί για τον ρόλο των εναλλακτικών μονοπατιών της αναπνευστικής αλυσίδας, δύο φαίνεται πως είναι οι επικρατέστερες. Η πρώτη προτείνει την δράση της κατά τον τυχόν κορεσμό της αναπνευστικής αλυσίδας με ηλεκτρόνια, καταναλώνοντας την περίσσεια ενέργειας και O₂, συμβάλλοντας τελικά στην αντιμετώπιση πιθανού οξειδωτικού στρες (Maxwell et al. 1999). Η δεύτερη υποστηρίζει ότι δρα κατά την παρουσία παρεμποδιστών των συμπλόκων III και IV, παρακάμπτοντάς τα, ώστε να συνεχιστεί η σύνθεση ATP σε σαφώς μικρότερους ρυθμούς, τουλάχιστον

μέχρι την άρση της επίδρασης του παρεμποδιστικού παράγοντα (Avila-Adame and Köller 2003). Κοινό χαρακτηριστικό όλων των προτεινόμενων θεωριών είναι πως οποιαδήποτε μεταβολική κατάσταση μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος, μιτοχονδριακού NaDPH και ανηγμένης ουβικινόλης, μπορεί να αυξήσει την ροή ηλεκτρονίων προς την εναλλακτική οξειδάση (Vanlerberghe and McIntosh 1997).

1.2.2 Παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHIs)

1.2.2.1 Ιστορικά στοιχεία

Λαμβάνοντας υπόψη το ιστορικό χρήσης, τις χημικές καινοτομίες που έφεραν και το ευρύ φάσμα δράσης έναντι στοχευμένων φυτοπαθογόνων, οι αναστολείς της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHIs) αποτελούν μια εκ των πλέον σημαντικών και ταυτόχρονα την πλέον σύγχρονη, ομάδα μυκητοκτόνων που διατίθεται στους αγρότες για φυτοπροστασία (Avenot and Michailides 2010). Όπως γίνεται αντιληπτό από την ονομασία τους, ο μηχανισμός δράσης των SDHIs είναι η αναστολή της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (§1.2.1.2).

Έως και το 2009, ιστορικά οι δ.ο. που ανήκαν στην ομάδα ήταν γνωστές ως καρβοξαμιδικά. Έπειτα από την δημιουργία της ομάδας εργασίας “*Working Group for succinate dehydrogenase (complex II, succinate–ubiquinone reductase) inhibitors (SDHIs)*” (FRAC, Fungicide Resistance Action Committee), αποφασίστηκε ότι ορθότερη ήταν η αναφορά του στόχου και όχι της χημικής τους δομής, οπότε και μετονομάστηκαν σε αναστολείς της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHIs) (Stammler et al. 2015). Παρά την επικράτηση του όρου SDHIs, ακόμη και σήμερα οι δύο ονομασίες χρησιμοποιούνται παράλληλα για να χαρακτηρίσουν την ίδια ομάδα μυκητοκτόνων.

Πρώτοι εκπρόσωποι των SDHIs, αποτελώντας ταυτόχρονα και τα πρώτα διασυστηματικά μυκητοκτόνα, παρουσιάστηκαν στο εμπόριο στα τέλη της δεκαετίας του 1960 (Ζιώγας and Μαρκόγλου 2010). Αυτές ήταν οι δ.ο. carboxin και oxycarboxin με

διασυστηματική δράση έναντι βασιδιομυκήτων κυρίως ειδών του γένους *Rhizoctonia*, αλλά και σκωριάσεων, ανθρακώσεων και δαυλιτών (Von Schmelting and Kulka 1966). Η εφαρμογή και ακόλουθη εμπορική επιτυχία τους διασφαλίστηκε εξαιτίας της απόσυρσης των υδραργυρούχων σκευασμάτων, που έως τότε χρησιμοποιούνταν κατά κύριο λόγο σε επενδύσεις σπόρων (Plimmer 2003). Σύντομα και έως και την δεκαετία του 1990, ακολούθησε σειρά χημικών ανάλογων, όπως τα benodanil, mepronil, και furametpyr, στα οποία το φάσμα δράσης, αν και διευρύνθηκε όσον αφορά τα είδη, παρέμενε περιορισμένο έναντι βασιδιομυκήτων (*Tilletia*, *Puccinia*, *Pyphula*, *Ustilago*, *Gymnosporangium*, *Sclerotium* κ.ά.).

Το ορόσημο που σηματοδότησε την ανάπτυξη της δεύτερης γενιάς των SDHIs, αποτέλεσε η ανακάλυψη και διάθεση στην αγορά της δ.ο. boscalid το 2003. Η αντικατάσταση του δακτυλίου 1,4-οξαθειίνης από ένα μόριο πυριδίνης, με την ταυτόχρονη εισαγωγή μιας φαινυλομάδας στη θέση 2' του ανιλιδιοδακτυλίου, είχε ως αποτέλεσμα έναν SDHI με σημαντική διεύρυνση του φάσματος δράσης, ενάντια και σε πλήθος ειδών φυτοπαθογόνων ασκομυκήτων (Stammler et al. 2007, Stammler et al. 2008). Σύντομα χρησιμοποιώντας ως βάση το boscalid, το σύνολο σχεδόν των βιομηχανιών χημικών φυτοφαρμάκων, παρουσίασαν και συνεχίζουν να παρουσιάζουν με αμείωτο ρυθμό, σειρά νέων SDHIs, με δράση εναντίων των σημαντικότερων φυτοπαθογόνων και για χρήση σε όλες τις κύριες καλλιέργειες (Stammler et al. 2015). Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι και των δύο γενεών SDHIs με σημαντική εφαρμογή στην σύγχρονη φυτοπροστασία αποτελούν τα benzovindiflupyr, benodanilfluopyram, bixafen, carboxin, fenfuram, furametpyr, flutolanil, fluopyram, fluxapyroxad, isofetamid, isopyrazam, mepronil, oxycarboxin, penflufen, penthiopyrad, sedaxane και thifluzamide.

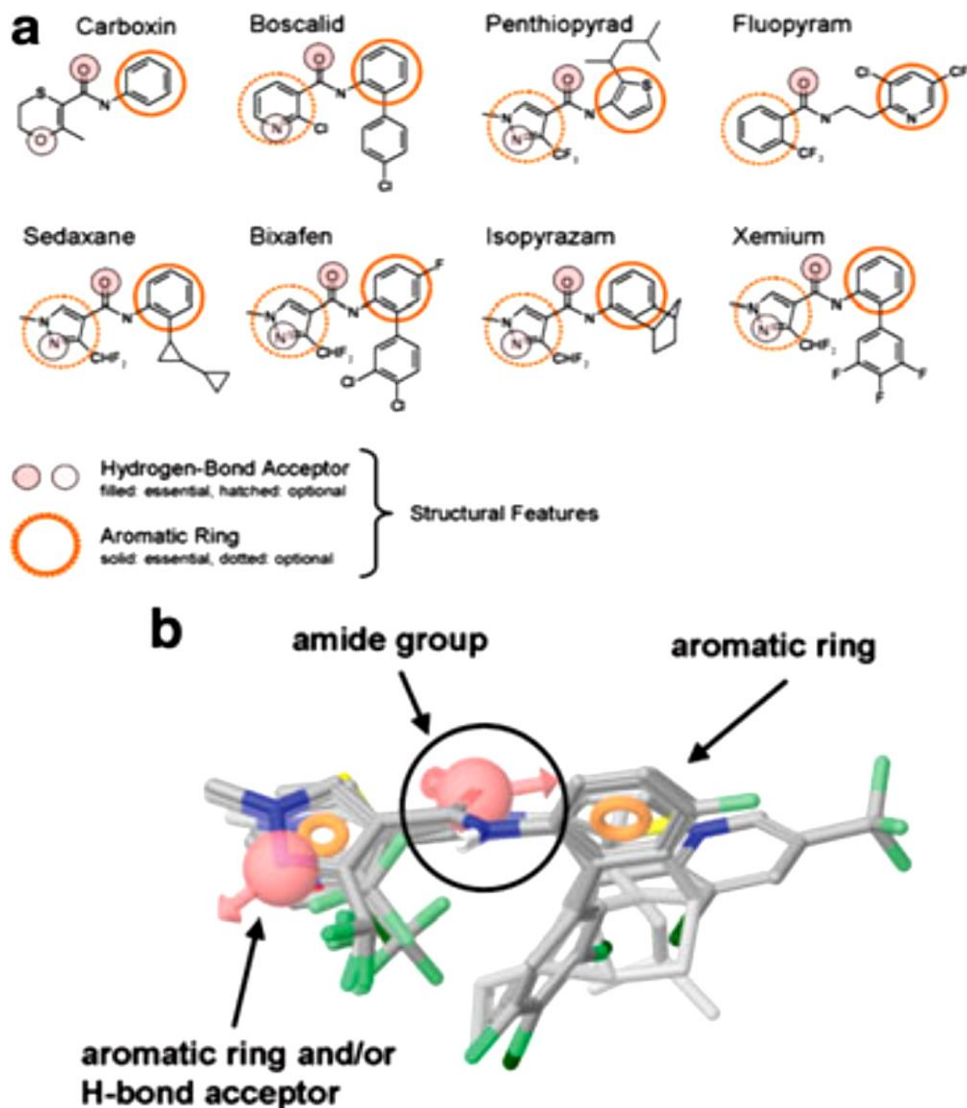
1.2.2.2 Μηχανισμός δράσης

Παρότι με τη διεύρυνση του φάσματος δράσης τους, αυξήθηκε η δομική τους πολυπλοκότητα, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι έως τώρα γνωστοί SDHIs μοιράζονται κοινά χημικά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι απαραίτητα για τη μυκητοκτόνο τους δράση (Stammler et al. 2015), υποδηλώνοντας έναν πολύ όμοιο μηχανισμό

πρόσδεσής τους στον υποκυτταρικό τους στόχο (**Εικόνα 13**). Αυτά φαίνεται πως είναι ο αρωματικός δακτύλιος στο τμήμα του ανιλιδιοδακτύλιου που εξασφαλίζει βέλτιστες υδρόφοβες επαφές ή π-π αλληλεπιδράσεις με το σημείο σύνδεσης της ουβικινόνης, καθώς και το κεντρικό αμιδικό κομμάτι που είναι απαραίτητο για τις αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου του ίδιου σημείου. Επιπλέον αρκετοί SDHs όπως τα boscalid και isopyrazam, φέρουν πυριδινικό ή πυραζολικό δακτύλιο, ο οποίος μέσω του αρωματικού αζώτου, πιθανόν να βελτιώνει την χημική τους συγγένεια με το σημείο σύνδεσης. Τρισδιάστατη στοίχιση των χημικών δομών φανερώνει ότι *i*) τα προηγούμενα κοινά δομικά στοιχεία αλληλοεπικαλύπτονται σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό οπότε πιθανότατα έχουν τον ίδιο μηχανισμό σύνδεσης στον στόχο, *ii*) το τμήμα του καρβοξυλικού οξέος είναι δομικά αρκετά συντηρημένο και *iii*) ο ανιλιδιοδακτύλιος αποτελεί εκείνο το τμήμα με τη μεγαλύτερη ποικιλότητα μεταξύ των διαφόρων SDHs.

Από τις αρχικές μελέτες για την διερεύνηση του μηχανισμού δράσης (Μ.Δ.), φάνηκε ότι τα καρβοξαμικά (τότε) μυκητοκτόνα είχαν σημαντική επίδραση στην αναπνευστική αλυσίδα (Mathre 1970, Ragsdale and Sisler 1970) και ελάχιστα αργότερα προτάθηκε ως πιθανός στόχος το σύμπλοκο II της αναπνευστικής αλυσίδας (Mathre 1971, Ulrich and Mathre 1972). Σχεδόν αμέσως η υπόθεση αποδείχθηκε αληθής, καθώς βρέθηκαν στελέχη *Ustilago maydis* ανθεκτικά στο carboxin, τα οποία έφεραν μεταλλάξεις στα γονίδια των SDH υπομονάδων (Georgopoulos et al. 1972).

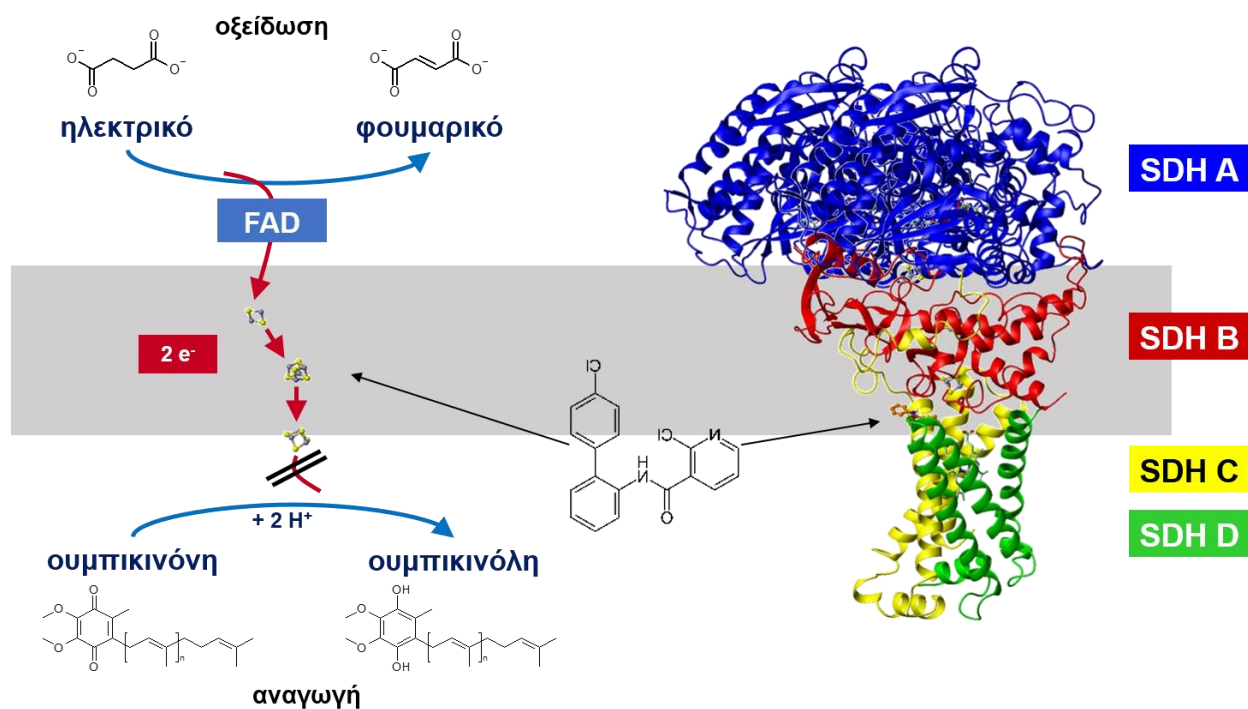
Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι οι SDHs διακόπτουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του συμπλέγματος [3Fe-4S] προς την ουβικινόνη, καθώς και ότι συνδέονται στην υπομονάδα C και D του συμπλόκου II (Ackrell et al. 1977, Ramsay et al. 1981), υποδεικνύοντας τον θύλακα πρόσδεσης της ουβικινόνης (**§1.2.1.2**) ως τον πιθανό βιοχημικό στόχο. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ του συμπλέγματος II (Yankovskaya et al. 2003, Huang et al. 2006), ενώ πειράματα πρόσδεσης έδειξαν ότι οι SDHs συνδέονται βαθύτερα στον θύλακα πρόσδεσης σε σχέση με την ουβικινόλη, με έναν πανομοιότυπο μηχανισμό.



Εικόνα 13: Οι χημικές δομές μερικών εκπροσώπων της ομάδας των SDHIs (**a**) και η δομική τους ευθυγράμμιση (**b**) φανερώνουν κοινά χημικά χαρακτηριστικά απαραίτητα για τη μυκητοκτόνο τους δράση. Η ευθυγράμμιση υποδεικνύει πανομοιότυπο τρόπο δέσμευσης στο SDH ένζυμο. Προσαρμογή από *Stammli et al. 2015*

Με αυτές τις μελέτες αποκαλύφθηκε ο Μ.Δ. (**Εικόνα 14**), σύμφωνα με τον οποίο με την πρόσδεσή τους στον θύλακα σύνδεσης της ουβικινόνης, διακόπτεται η μεταφορά προς αυτήν ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό, συσσωρεύοντάς το και εν τέλει παρεμποδίζοντας τον κύκλο του Krebs. Με την διακοπή αυτή αναστέλλεται η αναγωγή του FAD, αλλά και

του μεγαλύτερου μέρους του NAD. Τόσο η συσσώρευση του ηλεκτρικού οξέος, όσο και η έλλειψη NADH₂ προκαλεί ταυτόχρονα αναστολή έως και παύση του συμπλόκου I, οπότε και διακόπτεται η λειτουργία των αντλιών πρωτονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Έτσι η δράση των SDHs έχει ως τελικό αποτέλεσμα την παύση της παραγωγής ενέργειας των κυττάρων (Ζιώγας and Μαρκόγλου 2010).



Εικόνα 14: Τρισδιάστατη δομή και χωροθέτηση του μηχανισμού δράσης των παρεμποδιστών της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος, σε αντιδιαστολή με την δομή του ενζύμου. Απεικονίζεται η χημική δομή του boscalid, το σημείο πρόσδεσής του στο ένζυμο και στην πορεία των ηλεκτρονίων. Προσαρμογή από Stammler et al. 2015

Αξίζει να αναφερθεί ότι ενώ ο θύλακας σύνδεσης της ουβικινόνης, που σχηματίζεται μεταξύ των B, C και D υπομονάδων του συμπλόκου II, αποτελεί αρκετά συντηρημένο κομμάτι πολλών οργανισμών (Horsefield et al. 2004), εντούτοις το φάσμα δράσης των SDHs είναι πολύ εξειδικευμένο έναντι των μυκήτων. Το γεγονός αυτό φαίνεται να σχετίζεται με τη μειωμένη συγγένεια μεταξύ του παρεμποδιστή και του τοξικού μορίου (White and Thorn 1980, White and Georgopoulos 1986, Avenot and Michailides 2010).

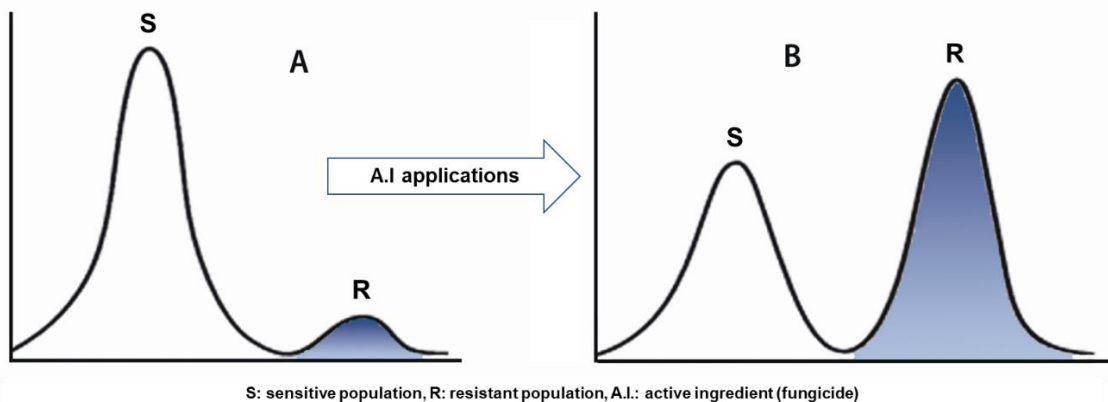
1.3 Ανθεκτικότητα μυκήτων στα μυκητοκτόνα

Ως ανθεκτικότητα των φυτοπαρασίτων στις Φ.Π., ορίζεται «*Η σταθερή και κληρονομούμενη στους απογόνους προσαρμογή ενός οργανισμού, στην παρουσία μιας τοξικής ένωσης, που έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ευαισθησίας του πληθυσμού, στον συγκεκριμένο παρεμποδιστή*» (Delp and Dekker 1985, FRAC 2016).

Η ανθεκτικότητα όντας φαινόμενο επιλογής, είναι συνδεδεμένη με την εκλεκτικότητα της δράσης των φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων. Ιστορικά και μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 60, στην φυτοπροστασία χρησιμοποιούνταν μη εκλεκτικές δ.ο., καθιστώντας το πρόβλημα της ανθεκτικότητας αρκετά σπάνιο. Άλλωστε τέτοιες μη εξειδικευμένες δ.ο. χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα, δίχως να χάνεται η αποτελεσματικότητά τους.

Αργότερα όμως η εφαρμογή εξειδικευμένων διασυστηματικών Φ.Π., παρά τις σημαντικές νέες δυνατότητες που πρόσθεσαν στην φαρέτρα της φυτοπροστασίας, όπως είναι η αυξημένη αποτελεσματικότητα και η καταπολέμηση παθογόνων που ήδη έχουν μολύνει και βρίσκονται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών, ανέδωσε και το πρόβλημα της ανθεκτικότητας. Τα προϊόντα αυτά έπρεπε να είναι αρκετά εξειδικευμένα όσον αφορά την δράση τους σε υποκυττάριο επίπεδο, ώστε να μπορούν να κινηθούν εντός των φυτών, δίχως να εμφανίζουν τοξικότητα σε αυτά. Αυτή τους όμως η εξειδίκευση εμπεριέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας, καθώς και μόνο ένα συστατικό και αν μεταβληθεί, τότε μπορεί να προκύψει κάποιο ανθεκτικό στέλεχος.

Παρόλα αυτά αξίζει να αναφερθεί ότι η εμφάνιση της ανθεκτικότητας αποτελεί τον κανόνα, παρά την εξαίρεση. Πριν την εισαγωγή ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε μια περιοχή, ο πληθυσμός του στοχευμένου φυτοπαρασίτου είναι πολυμορφικός και θεωρητικά υπάρχουν άτομα που μπορεί να επιβιώσουν παρουσία του φυτοπροστατευτικού προϊόντος. Η πίεση επιλογής από την παρουσία του φυτοπροστατευτικού προϊόντος έχει ως αποτέλεσμα η συχνότητα των γονοτύπων που δεν επηρεάζονται από την έκθεση σε αυτό, να αυξάνει και να αλλάζει η κατανομή του πληθυσμού (Ζιώγας and Μαρκόγλου 2010) (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση της εξέλιξης της πορείας της ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού παθογόνου σε σχέση με τις επεμβάσεις με την υπό μελέτη δ.ο.. Φαίνεται ότι ανθεκτικότητα είναι αποτελεί μια εξελικτική διαδικασία. Το μυκητοκτόνο ασκεί πίεση επιλογής στον παθογόνο πληθυσμό, καθώς θανατώνει τον αρχικό ευαίσθητο (άγριου τύπου) πληθυσμό, αλλά όχι τον προσαρμοσμένο (ανθεκτικό) πληθυσμό

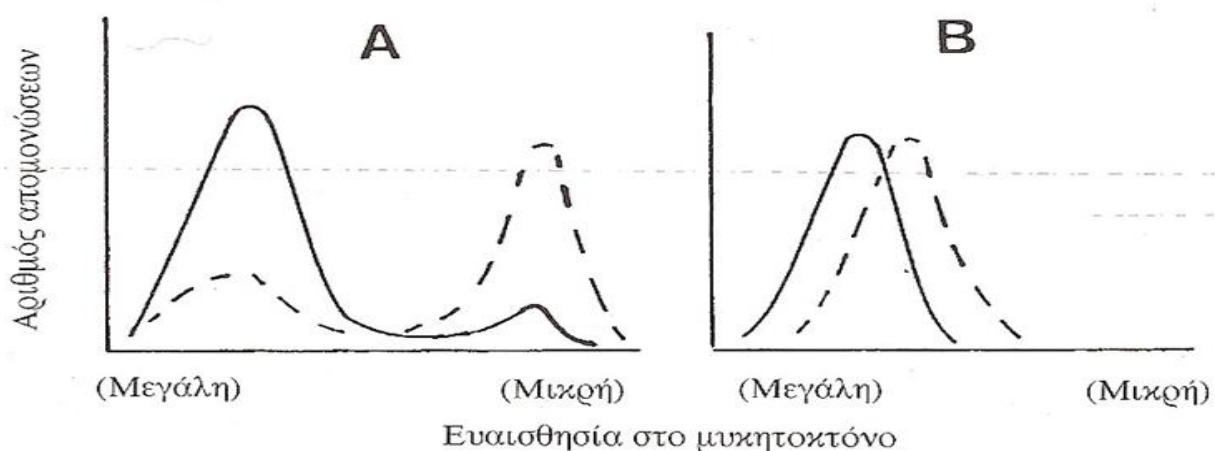
1.3.1 Γενετικός έλεγχος της ανθεκτικότητας

Για την πλήρη κατανόηση του φαινομένου της ανθεκτικότητας, είναι απαραίτητη η εις βάθος γνώση του γενετικού ελέγχου της ανθεκτικότητας, καθώς και των βιοχημικών μηχανισμών, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια ανθεκτικότητας και είναι υπεύθυνα για τη μείωση της ευαισθησίας των οργανισμών στα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα.

Όσον αφορά τον γενετικό έλεγχο η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται στη μεταλλαγή χρωμοσωματικών ή εξωχρωματικών γονιδίων. Κατά κανόνα στους μύκητες οφείλεται σε μεταλλαγές γονιδίων που βρίσκονται στον πυρήνα, έχοντας κάποιες ελάχιστες περιπτώσεις που οφείλεται σε μιτοχονδριακά γονίδια όπως είναι η περίπτωση της ανθεκτικότητας της ομάδας των στρομπιλουρινών. Αντιθέτως στα βακτήρια κυρίως η ανθεκτικότητά ελέγχεται από γονίδια που εδράζονται στα μιτοχόνδρια.

Αναλόγως του αριθμού των γονιδίων που πρέπει να μεταλλαχθούν για να εμφανιστεί ανθεκτικότητα, προκύπτει είτε ολιγονοική ανθεκτικότητα, είτε πολυγονική ανθεκτικότητα, όπου πολλά γονίδια μετέχουν στην εκδήλωση της ανθεκτικότητας (Γεωργόπουλος and Ζιώγας 1992) (**Εικόνα 16**). Στην ολιγονική ή μείζονων γόνων ανθεκτικότητα, η μεταλλαγή

ενός ή λίγων μόνο γονιδίων δίχως αθροιστική επίδραση, οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Αυτή αποτελεί και την κυριότερη κατηγορία. για το σύνολο σχεδόν των μυκητοκτόνων. Στην πολυγονική ανθεκτικότητα το επίπεδο της ανθεκτικότητας είναι αποτέλεσμα της αθροιστικής επίδρασης πολλών γονιδίων, κάθε ένα εκ των οποίων συμβάλει δίνει μικρό επίπεδο, συνήθως μη ανιχνεύσιμο στον αγρό (Georgopoulos and Ziogas 1977, Crute and Harisson 1988). Παραδείγματα πολυγονικής έχουν υπάρξει στην περίπτωση των παρεμποδιστών της απομεθυλάσης του C14 (DMIs) και του dodine. Το αν η ανθεκτικότητα θα είναι ολιγονικού ή πολυγονικού τύπου, εξαρτάται αποκλειστικά από το μυκητοκτόνο.



Εικόνα 16: Κατανομή πληθυσμού σε ολιγονικού τύπου ανθεκτικότητα με απότομη μετάπτωση σε πληθυσμό υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας (A) και πολυγονικού τύπου ανθεκτικότητα, με σταδιακή μετάβαση προς μία κατάσταση μέσης ανθεκτικότητας (B) (Γεωργόπουλος και Ζιώγας 1992)

1.3.2 Βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Οι βιοχημικοί μηχανισμοί με τους οποίους οι μύκητες μπορούν να αναπτύξουν ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα είναι κυρίως πέντε και μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στους μηχανισμούς που δίνουν εξειδικευμένη (έναντι δ.ο. που ανήκουν στην ίδια ομάδα) και σε αυτούς που δίνουν γενική ανθεκτικότητα (FRAC 2016)

Ο σημαντικότερος μηχανισμός εξειδικευμένης ανθεκτικότητας είναι η σημειακή μετάλλαξη του βιοχημικού στόχου του μυκητοκτόνου, μέσω της οποίας μειώνεται η χημική

του συγγένεια με την δ.ο., οπότε και χάνεται η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου (Ma and Michailides 2005). Δεύτερος μηχανισμός εξειδικευμένης ανθεκτικότητας είναι η υπερέκφραση του γονιδίου στόχου, αυξάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την πιθανότητα να υπάρχει υπερεπάρκεια υποστρώματος, μέρος του οποίου θα αντιδράσει με την δ.ο., ενώ το υπόλοιπο θα είναι σε θέση να συνεχίσει τη βιολογική του δραστηριότητα, ξεπερνώντας σε κάποιο βαθμό τις τοξικές επιδράσεις του μυκητοκτόνου (Hamamoto et al. 2000). Τρίτος μηχανισμός εξειδικευμένης ανθεκτικότητας είναι η λειτουργία εναλλακτικών βιοχημικών μονοπατιών ώστε να παρακαμφθεί η δυσμενής επίδραση της δ.ο. (Albury et al. 1996, Ziogas et al. 1997, Joseph-Horne et al. 2001, Miguez et al. 2004)

Ένας μηχανισμός μη εξειδικευμένης ανθεκτικότητας αποτελεί η αποτοξικοποίηση της δ.ο. μέσω μηχανισμών του μεταβολισμού του κυττάρου, καθώς και η μη τοξικοποίησή του όπως συμβαίνει στην περίπτωση των προ-μυκητοκτόνων (Billard et al. 2011). Ο σημαντικότερος όμως μηχανισμός μη εξειδικευμένης ανθεκτικότητας αποτελεί η αυξημένη απέκκριση της δ.ο. από το κύτταρο, μέσω της δράσης μη εξειδικευμένων απεκκριτικών πρωτεϊνικών μεταφορέων, κυρίως των ATP-binding cassette (ABC) μεταφορέων, οι οποίοι αντλώντας ενέργεια από την υδρόλυση του ATP, απομακρύνουν ξένες και τοξικές για το κύτταρο ουσίες (De Waard and Van Nistelrooy 1979, Del Sorbo et al. 1997, Andrade, Del Sorbo, et al. 2000, Del Sorbo et al. 2000, Hahn and Leroch 2015).

1.3.3 Αντιμετώπιση ανθεκτικότητας

Η εμφάνιση και το μέγεθος του προβλήματος της ανθεκτικότητας στον αγρό εξαρτάται *i)* από την ανάπτυξη και επικράτηση των ανθεκτικών στελεχών, *ii)* την ταχύτητα επιλογής τους, ώστε σύντομο χρονικό διάστημα να μπορούν να καταλαμβάνουν την θέση των ευαίσθητων στελεχών, *iii)* την σταθερότητα της ανθεκτικότητας, ώστε τα ανθεκτικά στελέχη να είναι σε θέση να συναγωνίζονται τα ευαίσθητα στελέχη απουσία του τοξικού παρεμποδιστή και *iv)* η φυτοπαθογόνο προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών, καθώς όσο λιγότερο επηρεάζουν οι αλλαγές που προσδίδουν ανθεκτικότητα, χαρακτηριστικά όπως τον ρυθμό αύξησης του παθογόνου, τη δυνατότητα μόλυνσης, την ικανότητα παραγωγής αναπαραγωγικών οργάνων και γενικότερα την επιβίωση του

παθογόνου, τόσο γρηγορότερα έχουμε την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας (Brent and Hollomon 2007a, FRAC 2016).

Καθίσταται σαφές ότι σε βιοχημικό επίπεδο είναι απαραίτητη η εις βάθος μελέτη του γενετικού ελέγχου της ανθεκτικότητας, των βιοχημικών μηχανισμών ανάπτυξης και της επιδημιολογίας των ανθεκτικών στελεχών. Ταυτόχρονα καθίσταται επιτακτική η λήψη μέτρων για την αποφυγή ανάπτυξης αλλά και αντιμετώπισης του προβλήματος της ανθεκτικότητας στον αγρό (Γεωργόπουλος and Ζιώγας 1992, Brent and Hollomon 2007a). Περιληπτικά τα μέτρα αυτά είναι (Καλαμπόκης 2012):

- 1) Αποφυγή χρήσης μυκητοκτόνων, που μπορεί να οδηγήσουν προς ανθεκτικότητα, σε περιπτώσεις όπου καθίσταται δυνατή η καταπολέμηση με άλλους τρόπους
- 2) Εφαρμογή του μυκητοκτόνου μόνο στον χώρο που χρειάζεται, και με τις δόσεις και την ποσότητα που απαιτείται (και όχι με υπερβολική χρήση), ώστε ένα μέρος του ευαίσθητου πληθυσμού να μην εκτίθεται στην επίδραση του φαρμάκου κατά την επιλογή.
- 3) Εφαρμογή των αρχών της ολοκληρωμένης καταπολέμησης, ώστε να απαιτείται η χρήση της ελάχιστης ποσότητας εκλεκτικού φαρμάκου, για την επίτευξη καλής παραγωγής.
- 4) Αναζήτηση ενώσεων που να αντιστρέφουν την επίδραση των μεταλλαγών της ανθεκτικότητας. Για παράδειγμα η χρήση μυκητοκτόνων που εμφανίζουν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα, ή παρουσιάζουν συνεργιστική δράση.
- 5) Χρήση μείγματος δύο μυκητοκτόνων, από τα οποία το ένα να είναι χαμηλού κινδύνου (χαλκούχα, διθειοκαρβαμιδικά, κτλ).
- 6) Εναλλαγή εκλεκτικών μυκητοκτόνων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, ώστε η πίεση επιλογής στο καθ' ένα να είναι ασυνεχής.
- 7) Ο καλύτερος τρόπος φαίνεται να είναι ένας συνδυασμός μιγμάτων και εναλλαγής, έτσι ώστε να έχουμε συνεχή παρουσία σε όλες τις επεμβάσεις του μη εκλεκτικού και να διακόπτεται η εφαρμογή μόνο του εκλεκτικού.
- 8) Έρευνα για τη διερεύνηση των παραγόντων που καθορίζουν το μέγεθος της ανθεκτικότητας (έλεγχος κατανομής του πληθυσμού, γνώση του γενετικού ελέγχου της προσαρμοστικότητας, της φύσης του παθογόνου, της πίεσης επιλογής, των περιβαλλοντικών συνθηκών)

- 9) Παρακολούθηση (monitoring) του πληθυσμού του παθογόνου πριν και μετά την εφαρμογή του φαρμάκου, για αξιολόγηση της ακολουθούμενης στρατηγικής.
- 10) Έρευνα για την ανακάλυψη ενώσεων με νέους μηχανισμούς δράσης, που δε θα εμφανίζουν το πρόβλημα της διασταυρωτής ανθεκτικότητας με τα ήδη κυκλοφορούντα προϊόντα, ή με μηχανισμούς δράσης, που δεν ευνοούν το πρόβλημα της ανθεκτικότητας, όπως είναι οι αντιπαθογονικές ενώσεις.

Τελικός στόχος όλων των ανωτέρω είναι η προστασία των υφιστάμενων χρησιμοποιούμενων δ.ο., από το να μην χάσουν την αποτελεσματικότητά τους, λόγω της εμφάνισης και τελικώς της επικράτησης φυτοπαρασίτων, ανθεκτικών σε αυτά.

1.3.4 Προβλήματα Ανθεκτικότητας στους SDHIs

Παρά το ότι τα παθογόνα στόχοι της πρώτης γενιάς SDHIs θεωρούνταν μύκητες χαμηλού κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας, ελάχιστα χρόνια μετά την διάθεση του carboxin στην αγορά, εμφανίστηκαν ανθεκτικοί πληθυσμοί (Yerphet et al. 1975, Leroux and Berthier 1988). Αυτό κατέστησε την πρώτη γενιά SDHIs μαζί με τα βενζιμιδαζολικά τις πρώτες ουσίες στις οποίες αναπτύχθηκε ανθεκτικότητα.

Μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας έδειξαν ότι κυρίως υπεύθυνες είναι σημειακές μεταλλάξεις του ενζύμου στόχου (Keon et al. 1991, Matsson et al. 1998, Skinner et al. 1998, Matsson and Hederstedt 2001, Ito et al. 2004). Αναλύσεις εργαστηριακών μεταλλαγμένων στελεχών *Mycosphaerella graminicola* (Skinner et al. 1998, Stammler et al. 2011, Fraaije et al. 2012, Scalliet et al. 2012), αλλά κυρίως απομονώσεων αγρού ανθεκτικών στελεχών παθογόνων όπως τα *Botrytis cinerea* (Veloukas et al. 2011), *Alternaria alternata* (Avenot and Michailides 2007), *A. solani* (Miles et al. 2014), *Didymella bryoniae* (Avenot et al. 2012) και *Sclerotinia sclerotiorum* (Glättli et al. 2009), έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με τις υπομονάδες B, C και D του ενζύμου. Αυτές κατά κανόνα οδηγούν σε διασταυρωτή ανθεκτικότητα εντός της ομάδας των SDHIs, αλλά έχουν αναφερθεί και εξαιρέσεις του κανόνα αυτού (Ishii et al. 2011, Veloukas et al. 2013).

Οι κυριότερες σημειακές μεταλλάξεις που απαντώνται στα ανθεκτικά στελέχη αφορούν τα αμινοξέα H272 και P225, τα οποία βρίσκονται αρκετά κοντά στο σύμπλοκο [3Fe-4S]. Η προλίνη της θέσης 255 αποτελεί δομικό στοιχείο της περιοχής σύνδεσης της ουβικινόλης, μετέχοντας στην πρόσδεσή της μέσω υδροφοβικών αντιδράσεων. Αντικατάσταση της προλίνης από ογκωδέστερο αμινοξύ όπως η φαινυλαλανίνη ή η λευκίνη έχει ως αποτέλεσμα μια δραματική μείωση της ικανότητας πρόσδεσης. Ταυτόχρονα οι SDHIs προσδένονται βαθύτερα σε σχέση με την ουβικινόλη, οπότε βρίσκονται σε άμεση επαφή με την ιστιδίνη της θέσης 272. Ομοίως μετάλλαξη της θέσης 272 μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης των SDHIs. Η θέση των δύο αμινοξέων στο ένζυμο, έχει ως αποτέλεσμα η μετάλλαξή τους να επηρεάζει και τη μεταφορά των ηλεκτρονίων.

Παρόλα αυτά οι μεταλλάξεις αυτές, όντας παράκαμψη της κανονικότητας που είναι αποτέλεσμα της φυσικής εξέλιξης των οργανισμών, έχουν ως αποτέλεσμα το ένζυμο να υπολειπургεί σε σχέση με τα φυσιολογικά, αλλά ευαίσθητα στελέχη. Πράγματι έχει καταγραφεί μειωμένη δράση του συμπλόκου II, σε στελέχη με διαφορετικές μεταλλάξεις (Li et al. 2006, Scalliet et al. 2012), και μειωμένης ζωτικότητας και επιβιωσιμότητας (Veloukas et al. 2014).

Σε αντίθεση με την έρευνα για την επίδραση της αλλαγής της θέσης δράσης, εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η μελέτη του ρόλου πρωτεϊνικών μεταφορέων στην ανθεκτικότητα στους SDHIs, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Σε καλλιέργειες φράουλας βρέθηκαν πληθυσμοί *B. cinerea* με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα τριαζολικά, της στρομπιλουρίνες και το boscalid (Leroux et al. 1999). Μετέπειτα μελέτες έδειξαν την ύπαρξη τριών ανθεκτικών πληθυσμών (Kretschmer et al. 2009, Leroux et al. 2013). Στον MDR1 πληθυσμό βρέθηκε ότι η πολλαπλή ανθεκτικότητα οφείλετε σε μετάλλαξη του *mrr1* ρυθμιστικού γονιδίου, ελέγχει που μεταξύ άλλων την έκφραση του BcatrB μεταφορέα. Η ανθεκτικότητα του MDR2 οφείλετε στην επικόλληση retrotransposon μεταθετού στοιχείου στον εκκινήτη του *mfsM2* γονιδίου. Τέλος στον πληθυσμό MDR3 με τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας ανήκουν στελέχη που μέσω γενετικού ανασυνδυασμού συνυπάρχουν και οι δύο μεταλλάξεις. Σύμφωνα και με μετέπειτα μελέτες στα φυτοπαθογόνα *A. carbonarius* (Crespo-Sempere et al. 2014), *Sclerotinia homoeocarpa* (Sang et al. 2015) και *Claviceps homoeocarpa* (Sang and Lee 2020), φαίνεται ότι η πολλαπλή ανθεκτικότητα που αφορά και τους SDHIs, οφείλεται κατά κύριο λόγο στην

δράση MFS μεταφορέων και δευτερευόντως ABC, μια παρατήρηση που βρίσκεται σε αντίθεση με τον κανόνα.

1.4 Ο πρότυπος οργανισμός *Aspergillus nidulans*

1.4.1 Το γένος *Aspergillus*

Τα Φ.Π. τα οποία παραδοσιακά υπήρξαν ο κύριος πυλώνας της φυτοπροστασίας, βρίσκονται υπό συνεχή πίεση από προβλήματα όπως μεταξύ άλλων, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας παρασίτων και παθογόνων, η παρουσία καταλοίπων στα τρόφιμα και το περιβάλλον, η τοξικότητα σε οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο και οι αυξανόμενες ανησυχίες του κοινού και των διεθνών οργανισμών σχετικά με τις τυχόν δυσμενείς επιπτώσεις τους στο περιβάλλον (Damalas and Eleftherohorinos 2011, Hillocks 2012, Fisher et al. 2018, Schäfer et al. 2019, Zikankuba et al. 2019). Παρά τις εξελίξεις στην έρευνα και ανάπτυξη Φ.Π., τα ζιζάνια, τα παράσιτα και τα φυτοπαθογόνα προκαλούν σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές απώλειες της φυτικής παραγωγής. Αρκετά είδη φυτοπαθογόνων μυκήτων, προκαλούν σημαντική υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων, εξαιτίας της επιμόλυνσής τους με τοξικούς μεταβολίτες, αποτελώντας έτσι σοβαρή απειλή για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων (Bennett and Klich 2003, Alonso et al. 2013, Marin et al. 2013, Alshannaq and Yu 2017, Didwania and Trivedi 2018).

Μεταξύ τέτοιων μυκήτων, είναι εκείνοι του γένους *Aspergillus*, το οποίο περιέχει περισσότερα από 350 είδη, με παγκόσμια κατανομή (Patttron 2006, Bennett 2007, Varga et al. 2011, Samson et al. 2014, Frisvad and Larsen 2015). Τα είδη αυτά είναι σε θέση να προσαρμόζονται και να επιβιώνουν σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, ακόμη και σε συνθήκες διαστήματος (Gilke et al. 2019). Δεν είναι τυχαίο ότι οι ασπέργιλλοι είναι πανταχού παρόντες, με εφαρμογές υψηλής σημασίας σε πολλούς τομείς, όπως η ιατρική, η βιοτεχνολογία και η φυτοπροστασία (Perrone et al. 2007, Brakhage and Schroeckh 2011, Knuf and Nielsen 2012, Kniemeyer et al. 2016, Brandl and Andersen 2017).

Διάφορα είδη έχουν αξιοποιηθεί στη βιοτεχνολογία για την παραγωγή βιοδραστικών μεταβολιτών, συστατικών τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων ή ενζύμων (Meyer et al. 2011). Επιπλέον, είδη ασπεργίλλων είναι σημαντικά φυτοπαθογόνα, καθώς μολύνουν πολλά προϊόντα όπως, δημητριακά, καλαμπόκι, ξηροί καρποί, φιστίκια, ρύζι και αποξηραμένα φρούτα καθώς και ζωικά προϊόντα (Rustom 1997, Kusumaningtyas et al. 2006, Bennett et al. 2007, Ramírez-Camejo et al. 2012). Είδη όπως τα *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nidulans*, *A. fumigatus* και *A. niger*, είναι σημαντικά, όχι μόνο λόγω των οικονομικών απωλειών που προκαλούν, αλλά και λόγω του ρόλου τους ως μοντέλα βιολογικών συστημάτων και των κινδύνων που ενέχουν υγεία των ανθρώπων και των ζώων λόγω της μόλυνσης των μολυσμένων τροφίμων από μυκοτοξίνες. Μεταξύ αυτών, οι ομάδες αφλατοξινών (AF) και ωχρατοξινών είναι οι πιο σημαντικές μυκοτοξίνες που προέρχονται από ασπεργίλλους (Mishra and Das 2003).

Το είδος *A. flavus* (*Aspergillus* sect *Flavi*), είναι ένα σαπρόφυτο εδάφους με παγκόσμια κατανομή, το οποίο επιβιώνει σε ένα ευρύ φάσμα φυσικών υποστρωμάτων και κλιματικών συνθηκών (Gourama and Bullerman 1995, Scheidegger and Payne 2003). Ωστόσο, μέσω της εναέριας διασποράς των κονιδίων του, αποτελεί ένα ευκαιριακό ανθρώπινο παθογόνο, αποτελώντας το δεύτερο αίτιο της ασπεργίλλωσης μετά τον *A. fumigatus* (Kan et al. 2000, Brakhage 2005, Segal 2009, Paulussen et al. 2017). Επιπλέον, ως ευκαιριακό φυτικό παθογόνο, μολύνει προσυλλεκτικά αλλά και μετασυλλεκτικά πολλά γεωργικά προϊόντα όπως, δημητριακά, καλαμπόκι, ρύζι και ξηρούς καρπούς (Amaiike and Keller 2011). Μέσω της ικανότητάς του να συνθέτει αφλατοξίνες, κυκλοπιαζονικό οξύ, ασπεροξίνη, aflatrem, ασπεργιλικό οξύ και άλλες μυκοτοξίνες, προκαλεί προβλήματα στη βιομηχανία γεωργικών τροφίμων ήδη από το 1960 (Wogan and Goldblatt 1969, Klich 2007, Wu 2015). Έχοντας χαρακτηριστεί ως ένας “μανιώδης” μυκοτοξικογόνος οργανισμός, έχει καταβληθεί μεγάλη προσπάθεια από την επιστημονική κοινότητα για την εις βάθος κατανόηση της βιολογίας, της οικολογίας και του δευτερογενούς μεταβολισμού του. Ως αποτέλεσμα, το γονιδίωμά του έχει αλληλουχηθεί (Payne et al. 2006) και η βιοσύνθεση της αφλατοξίνης συγκαταλέγεται μεταξύ των καλύτερων χαρακτηρισμένων δευτερογενών μεταβολικών οδών στους νηματοειδείς μύκητες (Payne et al. 2007). Ο *A. parasiticus* είναι συγγενής του *A. flavus* (Horn et al. 2009), ο οποίος ανήκει επίσης στην ενότητα *Flavi*. Έχει προσαρμοστεί σε

τροπικά κλίματα και απαντάται συνήθως στο έδαφος, αποτελώντας μια σημαντική απειλή για προϊόντα όπως τα φιστίκια (Gourama and Bullerman 1995). Ο μύκητας παράγει ειδικές κατασκευές για την επιβίωσή του τα σκληρώτια, των οποίων η κατασκευή ελέγχεται από το γονίδιο *neA*, το οποίο επηρεάζει επιπλέον τη βιοσύνθεση αφλατοξινών (Calvo et al. 2004).

Ο *A. fumigatus* είναι ένας σαπροφυτικός εδαφόβιος μύκητας, με ρόλο στην ανακύκλωση του άνθρακα και του αζώτου στο περιβάλλον (Mullins et al. 1976, Latgé 1999, Tekaiia and Latgé 2005). Ωστόσο, μετά την απελευθέρωσή τους στον αέρα, τα κονίδια του εισπνέονται από τον άνθρωπο και λόγω του μικρού τους μεγέθους, μπορούν να παρακάμψουν τις βλεννογόνους και να καταλήξουν στην κάτω αναπνευστική οδό, οδηγώντας σε λοιμώξεις, προκαλώντας την ασθένεια γνωστή ως διηθητική ασπεργίλλωση (Segal 2009, Tischler and Hohl 2019). Για το λόγο αυτό, ο *A. fumigatus* θεωρείται ως ο σημαντικότερος αερομεταφερόμενος παθογόνος μύκητας. Σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια, παρατηρούνται συχνά αλλεργικές αντιδράσεις, αλλά μπορεί επίσης να προκαλέσει συστηματική μολυσματική λοίμωξη των πνευμόνων. Περισσότερες από 200.000 περιπτώσεις αναφέρονται κατά μέσο όρο ετησίως, συχνά με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, φτάνοντας έως και το 90% (Lin et al. 2001, Brakhage and Langfelder 2002, Dagenais and Keller 2009, Brown et al. 2012, Bongomin et al. 2017).

Παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των κονιδίων του *A. fumigatus* και του ανθρώπινου αναπνευστικού συστήματος, στοιχεία της βιολογίας του μύκητα, όπως το εκτενές δευτερογενές μεταβολικό του δίκτυο, που παράγει τοξικούς ή βιοτεχνολογικά χρήσιμους μεταβολίτες, οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας έναντι των αντιμυκητιακών φαρμάκων και η θερμοανεκτικότητα του μύκητα που συμβάλλει στη μόλυνση του ανθρώπινου αναπνευστικού βλεννογόνου, είναι ακόμη σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι (Fedorova et al. 2007).

Ο *A. niger* (*Aspergillus* sect. *Nigri*), όπως και οι υπόλοιποι ασπέργιλλοι, είναι ένα εδαφόβιο είδος, με παγκόσμια κατανομή, που συμμετέχει στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης και θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους μύκητες που χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία και την παραγωγή προσθετικών τροφίμων (Schuster et al. 2002, Nielsen et al. 2009). Έχει έναν εκτενή μεταβολισμό, ο οποίος επιτρέπει τη βιοσύνθεση ενός τεράστιου αριθμού δευτερογενών μεταβολιτών, σε τέτοιο

βαθμό, που θεωρείται ως βιομηχανικό κυτταρικό εργοστάσιο για την παραγωγή σημαντικών οργανικών οξέων και ενζύμων, με βιοτεχνολογική εφαρμογή (Pel et al. 2007, Andersen et al. 2011). Για παράδειγμα, σχεδόν όλη η παραγωγή κίτρικου οξέος, η οποία είναι το δεύτερο πιο άφθονο χημικό προϊόν της βιοχημικής βιομηχανίας μετά την αιθανόλη, είναι προϊόν ζύμωσης βιοκαλλιεργειών *A. niger* (Sauer et al. 2008).

Ωστόσο, ο *A. niger* είναι γνωστό ότι μπορεί να βιοσυνθέτει σημαντικές μυκοτοξίνες. Μαζί με τους *A. carbonarius* και *A. sclerotiumniger*, δύο πολύ σημαντικούς εκπροσώπους του κλάδου *Nigri*, είναι ένας σημαντικός παραγωγός ωχρατοξίνης A (OTA), ενώ μπορεί επιπλέον να παράγει φουμονισίνες, όπως διάφορα είδη *Fusarium* (Abarca et al. 1994, Frisvad, Smedsgaard, et al. 2007, Nielsen et al. 2009), καθιστώντας το ένα σημαντικό είδος στην ασφάλεια των τροφίμων. Μολύνει τρόφιμα και ζωοτροφές όπως λαχανικά, προϊόντα με βάση το σταφύλι, ξηρούς καρπούς, φασόλια, ξηρούς καρπούς δημητριακών και καφέ (Frisvad, Larsen, et al. 2007, Frisvad, Smedsgaard, et al. 2007, Perrone et al. 2007, Nielsen et al. 2009).

1.4.2 Σημασία ως πρότυπος οργανισμός

Ο *A. nidulans* (τέλεια μορφή *Emericella nidulans*) είναι ίσως ο πλέον σημαντικός εκπρόσωπος των ασπεργίλλων. Ήδη από την κομβική δημοσίευση του Pontecorvo τη δεκαετία του 1950 (Pontecorvo et al. 1953), φάνηκε η σημασία του μύκητα και ο ρόλος που παίζει ως πρότυπος οργανισμός (Brandl and Andersen 2017). Χαρακτηριστικά του όπως *i*) ο γρήγορος ρυθμός ανάπτυξης με ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις, *ii*) η ύπαρξη διακριτών φαινοτύπων, επιτρέποντας τη αξιολόγηση διαφορετικών στελεχών μέσω απλών βιοδοκιμών (Arst Jr 1981), *iii*) την ύπαρξη φυλετικού (σεξουαλικού), αφυλετικού (ασεξουαλικού) και παραφυλετικού (παρασεξουαλικού) κύκλους διευκολύνοντας τη γενετική διασταύρωση μεταξύ των στελεχών (Pontecorvo et al. 1953), *iv*) το πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμα (Galagan et al. 2005), *v*) η ευκολία γενετικού μετασχηματισμού (Tilburn et al. 1983, Koukaki et al. 2003, Yu et al 2004), *vi*) η αυτογονιμότητα (Paoletti et al. 2007), *vii*) η διαθεσιμότητα χρήσιμων πλασμιδιακών φορέων και βιβλιοθηκών DNA (www.fgsc.net), και *viii*) το εκτεταμένο μεταβολικό δίκτυο (Nierman et al. 2005), έχουν

καταστήσει τον μύκητα ένα από τα καλύτερα μελετημένα ευκαρυωτικά γενετικά συστήματα.

Έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες που σχετίζονται με την έκφραση γονιδίων, τη ρύθμιση του μεταβολισμού, την αναπτυξιακή ρύθμιση, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη βιολογία των κυττάρων, την ενδοκύττωση και τη σίγαση RNA (Goldman and Osmani 2007, Ray, Debashish 2013, Dimou and Diallinas 2020). Επιπλέον, χρησιμοποιείται για την διερεύνηση νέων ερευνητικών ζητημάτων, όπως ο ρόλος των μεταθετών στοιχείων και η χρήση τους ως γενετικών εργαλείων (Evangelinos et al. 2015), ο δευτερογενής μεταβολισμός των μυκήτων και η ρύθμιση των εμπλεκόμενων γονιδίων (Bok et al. 2006, David et al. 2006, Bergmann et al. 2007, Panagiotou et al. 2007, Bergmann et al. 2010, Chiang et al. 2010, James 2011, Soukup et al. 2012, Palmer et al. 2013, Ribeiro et al. 2019), η κατανόηση της μικροβιακής επικοινωνίας (Nützmann et al. 2011, Netzker et al. 2015) και η ανακάλυψη νέων ενώσεων μέσω μεταβολικής μηχανικής (Bok et al. 2006, Giles et al. 2011). Επιπλέον, ο *A. nidulans* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διερεύνηση της δομής και της λειτουργίας των διαμεμβρανικών μεταφορέων (Amillis et al. 2004, Diallinas 2008a, Gournas et al. 2010, Kryptou et al. 2012, Leung et al. 2013, Kryptou and Diallinas 2014, Diallinas 2016, Diallinas 2017, Diallinas and Martzoukou 2019, Mikros and Diallinas 2019).

Επιπλέον, ο *A. nidulans* έχει διαδραματίσει ουσιαστικό ρόλο στην κατανόηση των μηχανισμών πολλαπλής ανθεκτικότητας στα αντιμυκητιακά φάρμακα, λόγω της δράσης των μεταφορέων αυξημένης απέκκρισης ABC, γνωστών και ως αντλιών και των MFS (De Waard and Van Nistelrooy 1979, Del Sorbo et al. 1997, Andrade 2000, Andrade, Del Sorbo, et al. 2000, do Nascimento et al. 2002, de Waard et al. 2006, Balaska et al 2017). Χρησιμοποιώντας τον μύκητα αποκαλύφθηκε ένας πιθανός νέος μηχανισμός αντοχής, στον οποίο οι μεταφορείς νουκλεοβάσεων μεσολαβούν στην ενεργή πρόσληψη του boscalid, σε έναν μηχανισμού επί της ουσίας αντίθετου της αυξημένης απέκκρισης (Kalampokis et al. 2018). Όλα τα παραπάνω, δικαιολογούν τον χαρακτηρισμό του *A. nidulans* ως “πρωταθλητή των μεταφορέων” (Diallinas 2008b).

Εξίσου σημαντική, είναι η χρήση του *A. nidulans* ως γενετικού συστήματος στη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση αφλατοξινών. Είναι γνωστό ότι διαθέτει σχεδόν όλα τα στάδια της βιοσυνθετικής της οδού και είναι σε θέση να παράγει

στρεμιγματοκυστίνη, τον άμεσο πρόδρομο των τελικών αφλατοξινών τύπου Β και G. Έχει αναφερθεί ότι η συστοιχία γονιδίων του μονοπατιού των αφλατοξινών είναι αρκετά συντηρημένο και τα εμπλεκόμενα γονίδια, εκτός του ότι συντηρούνται λειτουργικά μεταξύ των *A. nidulans*, *A. flavus* και *A. parasiticus*, ρυθμίζονται με παρόμοιο μηχανισμό (Keller and Adams 1995). Με βάση συγκριτικές μελέτες μεταξύ των *A. nidulans*, *A. flavus* και *A. parasiticus*, είναι δεκτό ότι η βιοσυνθετική οδός των αφλατοξινών είναι μια από τις πλέον μελετημένες μυκητολογικές βιοσυνθετικές οδούς (Brown et al. 1996, Keller et al. 1997, Feng and Leonard 1998, Yu et al. 2004b, Yu and Ehrlich 2011, Yu 2012).

1.4.3 Συστηματική ταξινόμηση

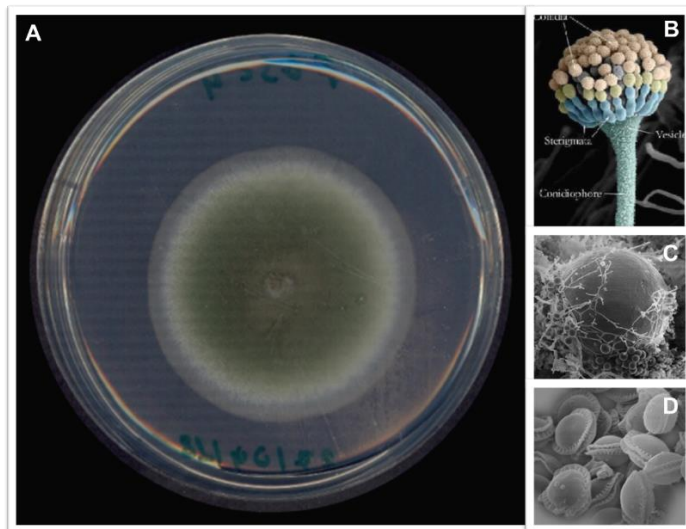
Βάσει των δεδομένων από τη διαδικτυακή βάση mycocosm η συστηματική ταξινόμηση του είδους *A. nidulans* παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1**:

Πίνακας 1: Συστηματική ταξινόμηση του είδους *A. nidulans*

Superregnum	Eukaryota
Regnum	Fungi
Subregnum	Dikarya
Divisio	Ascomycota
Subdivisio	Pezizomycotina
Classis	Eurotiomycetes
Subclassis	Eurotiomycetidae
Ordo	Eurotiales
Familia	Aspergillaceae
Genus	<i>Aspergillus</i>
Species	<i>Aspergillus nidulans</i>

1.4.3.1 Μορφολογία

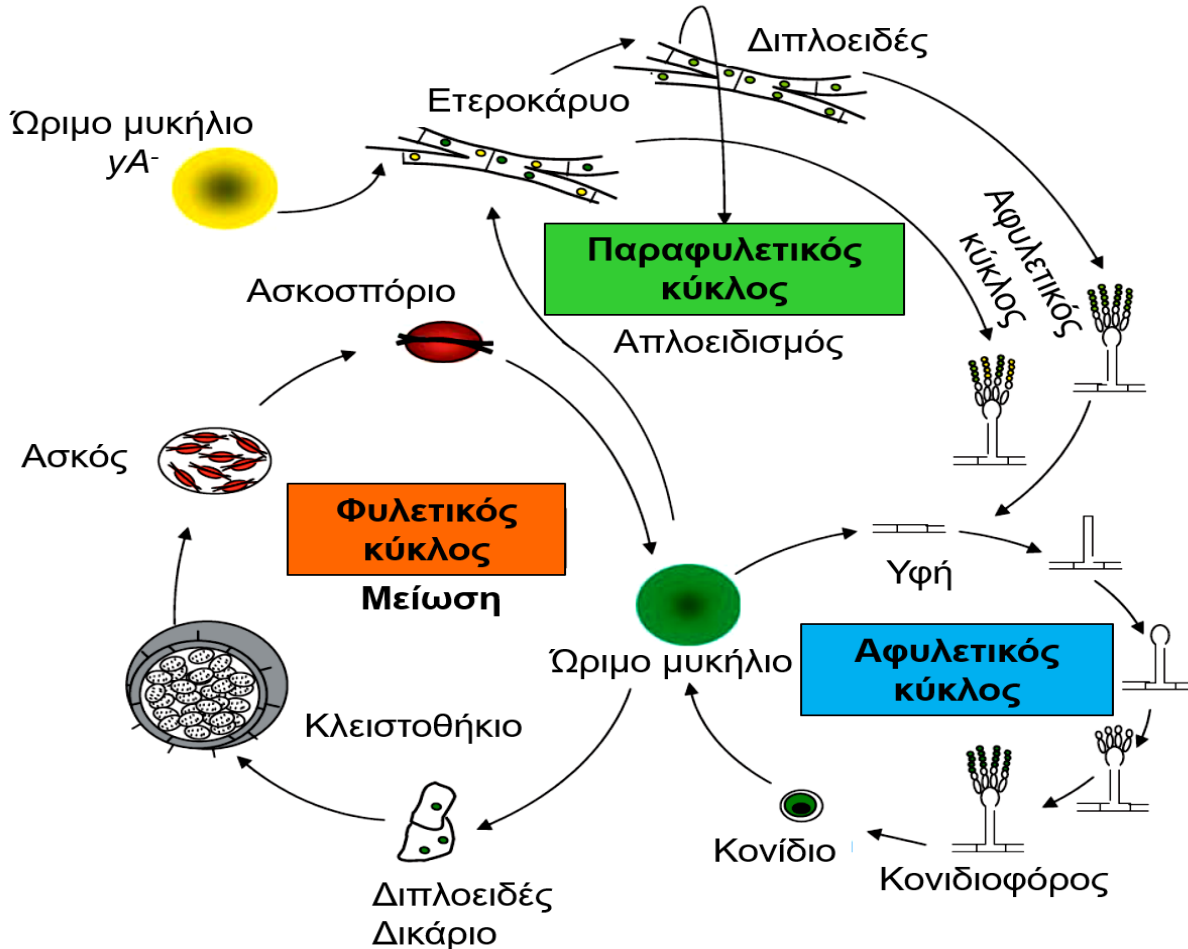
Ο *A. nidulans* (τέλεια μορφή *Emericella nidulans*) αποτελεί ομοθαλλικό σαπροφυτικό εδαφόβιο μύκητα, όπως η πλειοψηφία των ειδών του γένους *Aspergillus*. Όταν καλλιεργείται σε θρεπτικά υλικά φέρει λευκό μυκήλιο, το οποίο εξαιτίας της άφθονης παραγωγής κονιδιοσπορίων αποκτά σκούρο πράσινο χρώμα και κίτρινο-πορτοκαλί στις περιοχές που σχηματίζονται τα κλειστοθήκια (**Εικόνα 17 A**). Οι κονιδιοφορείς είναι χρώματος καφέ, μήκους 60-150 μm με λεία τοιχώματα. Τα κυστίδια είναι ημισφαιρικά, διαμέτρου 8-12 μm και στην κορυφή τους φέρουν μετούλες και φιαλίδια (**Εικόνα 17 B**). Τα κονιδιοσπόρια είναι σφαιρικά, με τραχιά επιφάνεια, διαμέτρου 3-4 μm. Παράγει σκούρου χρώματος (καφέ-μαύρο) κλειστοθήκια, διαμέτρου 100-250 μm, τα οποία περιβάλλονται από σφαιρικά κύτταρα με την ονομασία Hülle (**Εικόνα 17 C**). Τα ασκοσπόρια είναι κόκκινα-καφέ φακοειδή, διαμέτρου 4-5 μm, με δύο διαμήκεις κορυφές (**Εικόνα 17 D**).



Εικόνα 17: **A)** Καλλιέργεια *A. nidulans* σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα. **B)** Απεικόνιση κονιδιοφορέα του *A. nidulans* με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και ψευδοχρωματισμό (Γουρνάς 2011). **C)** Απεικόνιση κλειστοθηκείου με μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης. **D)** Απεικόνιση ασκοσπορίων με μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης (C & D are courtesy of Professor Reinhard Fischer, Institut für Angewandte Biowissenschaften Abt. für Angewandte Mikrobiologie der Universität Karlsruhe, with whom copyright remains, <https://www.aspergillus.org.uk/>)

1.4.4 Βιολογικός κύκλος

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο *A. nidulans* φέρει αγενή, και εγγενή κύκλο, ενώ ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του είναι η ύπαρξη παραφυλετικού κύκλου (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση του βιολογικού κύκλου του *A. nidulans*. Διακρίνονται και οι τρεις σεξουαλικοί κύκλοι (αφυλετικός/αγενής, εγγενής/φυλετικός και παραφυλετικός κύκλος). Στον αγενή κύκλο μέσω των εναέριων υφών θα σχηματιστούν έπειτα από συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις οι κονιδιοφορείς, που παράγουν τα κονιδιοσπόρια. Στον εγγενή κύκλο εντός ειδικών κατασκευών (κλειστοθήκια) οι δύο πυρήνες του δικάρου μυκηλίου θα ενωθούν σε διπλοειδές που θα υποστεί μείωση. Στον *A. nidulans*, όντας ομοθαλικός μύκητας, οποιαδήποτε μυκηλιακή υφή μπορεί να σχηματίσει γόνιμα κλειστοθήκια. Στον παραφυλετικό κύκλο οι πυρήνες συνυπάρχουν στο μυκήλιο δίνοντας διπλοειδή υφή που δεν υπόκειται σε μείωση, αλλά διαιρείται ως διπλοειδές. Θα ακολουθήσει μειωτικός ανασυνδυασμός και απλοειδισμός, ώστε τελικά να προκύψει η απλοειδία. Τόσο τα διπλοειδή όσο και τα ετεροκάρυα μπορούν να δώσουν αφυλετικό κύκλο. Προσαρμογή και μετάφραση από Scazzocchio 2019

Η μετάβαση στον εκάστοτε αναπαραγωγικό κύκλο ελέγχεται από τον δευτερογενή μεταβολισμό του μύκητα. Από τους πλέον σημαντικούς παράγοντες που τον επηρεάζουν είναι το φως. Φυσιολογικά υπό συνθήκες σκότους ο *A. nidulans* δεν παράγει κονιδιοσπόρια. Το ρυθμιστικό γονίδιο που ελέγχει την απόκριση στο φως είναι το *veA*, καθώς απουσία φωτός προάγει την εγγενή αναπαραγωγή, μειώνοντας την ικανότητα παραγωγής κονιδιοσπορίων (Kim et al. 2002, Kato et al. 2003, Bayram et al. 2008, Calvo 2008, Bayram and Braus 2012). Για τον λόγο αυτό, η πλειοψηφία των στελεχών που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο φέρουν την *veA1* μετάλλαξη, με την οποία τα στελέχη είναι σε θέση να παράγουν άφθονα κονιδιοσπόρια ακόμη και σε συνθήκες σκότους.

Αγενής κύκλος:

Ο αγενής κύκλος του *A. nidulans* ξεκινά με την ανταπόκριση των αδρανών κονιδιοσπορίων του στα διάφορα επαγωγικά περιβαλλοντικά σήματα. Με την έναρξη της κονιδιακής εκβλάστησης δημιουργείται η υφή εκβλάστησης και μυκηλιακή ανάπτυξη. Μέσω της επάκριας αύξησης και τις δημιουργίας διακλαδώσεων, η μυκηλιακή υφή σχηματίζει ένα πολύπλοκο δίκτυο υφών που αποτελούν το μυκήλιο. Η όλη διαδικασία είναι ταχεία, καθώς υπό ιδανικές συνθήκες μέσα σε περίπου 16 μόλις ώρες θα παραχθούν οι πρώτες οπτικά εμφανείς υφές (Wu and Miller 1997). Από το κέντρο της αποικίας θα σχηματιστούν εναέριες υφές, που έπειτα από συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις τους σε πολυπύρηνους κονιδιοφορείς, θα σχηματιστούν τα καινούρια κονιδιοσπόρια, τα οποία μέσω της απελευθέρωσής τους συνεχίζουν τον αγενή κύκλο (Todd et al. 2007, Bayram et al. 2010). Το σύνολο των κατασκευών αυτών αποτελεί την αρχή της αποικίας του *A. nidulans*, η οποία αναπτύσσεται με ρυθμό 0.5 mm/h (Adams et al. 1998).

Εγγενής κύκλος:

Ο *A. nidulans* ανήκει στους ασπεργίλλους οι οποίοι μπορούν να πραγματοποιήσουν και εγγενή κύκλο, όπως αντίστοιχα συμβαίνει και με άλλους ασκομύκητες. Ο εγγενής κύκλος λαμβάνει χώρα όταν επικρατούν δυσμενείς συνθήκες για τη μυκηλιακή ανάπτυξη, με κύριους υπεύθυνους την θερμοκρασία και την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, ενώ φαίνεται ότι και ουσίες που μοιάζουν με ορμόνες, κυρίως τερπενοειδή και στεροειδή, ελέγχουν τον εγγενή κύκλο (Wu and Miller 1997).

Αρχικά λαμβάνει χώρα αναστόμωση των μυκηλιακών υφών δύο διαφορετικών στελεχών και ανάμιξη του κυτταροπλασματικού υλικού και των πυρήνων τους. Ορισμένα εκ των ετεροκάρυων μυκηλίων θα σχηματίσουν ασκογόνες υφές, η οποίες με τη σειρά τους σχηματίζουν τους ασκούς (Swart et al. 2001, Braus et al. 2002, Bruggeman et al. 2003). Οι ασκογόνες αυτές υφές περικλείονται εντός των κλειστοθηκίων, τα οποία σχηματίζονται στην περιφέρεια της δικαρυωτικής υφής. Εντός των ασκογόνων υφών πραγματοποιείται η σύντηξη των δύο πυρήνων σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο διπλοειδή πυρήνα, και με την άμεση επακόλουθη μείωσή του προκύπτουν τέσσερις πυρήνες. Αυτοί μέσω μίτωσης διαιρούνται σε οκτώ πυρήνες, οι οποίοι περικλείονται σε κάθε ένα από τα ασκοσπόρια που περιέχει ο ασκός (Todd et al. 2007). Με αυτήν την διαδικασία κάθε κλειστοθήκιο μπορεί να περιέχει περισσότερα από 10.000 ασκοσπόρια (Todd et al. 2007, Bayram et al. 2010).

Αξίζει να αναφερθεί ότι ο *A. nidulans* αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ομοθαλλικού μύκητα. Σε αντίθεση με τους ετεροθαλλικούς ασπεργίλλους και ασκομύκητες γενικότερα, που μόνο πυρήνες που προέρχονται από αντίθετους συζευκτικούς τύπους μπορούν να συντηχθούν, στον *A. nidulans* δύο γενετικά πανομοιότυποι πυρήνες μπορούν να συντηχθούν και να δώσουν διπλοειδή πυρήνα, ο οποίος άμεσα θα υποστεί μείωση.

Παραφυλετικός κύκλος:

Ο παραφυλετικός κύκλος στους μύκητες ανακαλύφθηκε χρησιμοποιώντας τον *A. nidulans*, αποτελώντας χαρακτηριστικό που συνέβαλε στην εγκαθίδρυση του μύκητα ως έναν άκρως σημαντικό πρότυπο οργανισμό (Pontecorvo et al. 1953). Όπως και στον εγγενή κύκλο δύο ομοθαλλικές υφές από διαφορετικά στελέχη μπορούν να αναστομωθούν και να δώσουν διπλοειδές ετεροκάρυο μυκήλιο. Αντίθετα όμως με τον εγγενή κύκλο, σε σπάνιες περιπτώσεις ο διπλοειδής πυρήνας δεν υπόκειται μείωση. Μπορεί να είναι σταθερός και να πολλαπλασιαστεί μιτωτικά, μέσω του μιτωτικού ανασυνδυασμού των ομόλογων χρωμοσωμάτων και στη συνέχεια να υποστεί απλοειδοποίηση. Σύμφωνα με αυτήν, ο πυρήνας δύναται να αποσταθεροποιηθεί και έπειτα από μείωση να σχηματιστούν κονίδια με $2n-1$ και $2n+1$ χρωμοσώματα. Αυτή η κατάσταση ανευπλοειδίας είναι μη σταθερή και οι δύο πυρήνες θα χάσουν από ένα

χρωμόσωμα μέχρι σταδιακά το μεν πρώτο επέλθει στην κατάσταση απλοειδίας, το μεν δεύτερο να επαναφερθεί στην διπλοειδή (Deacon 2013).

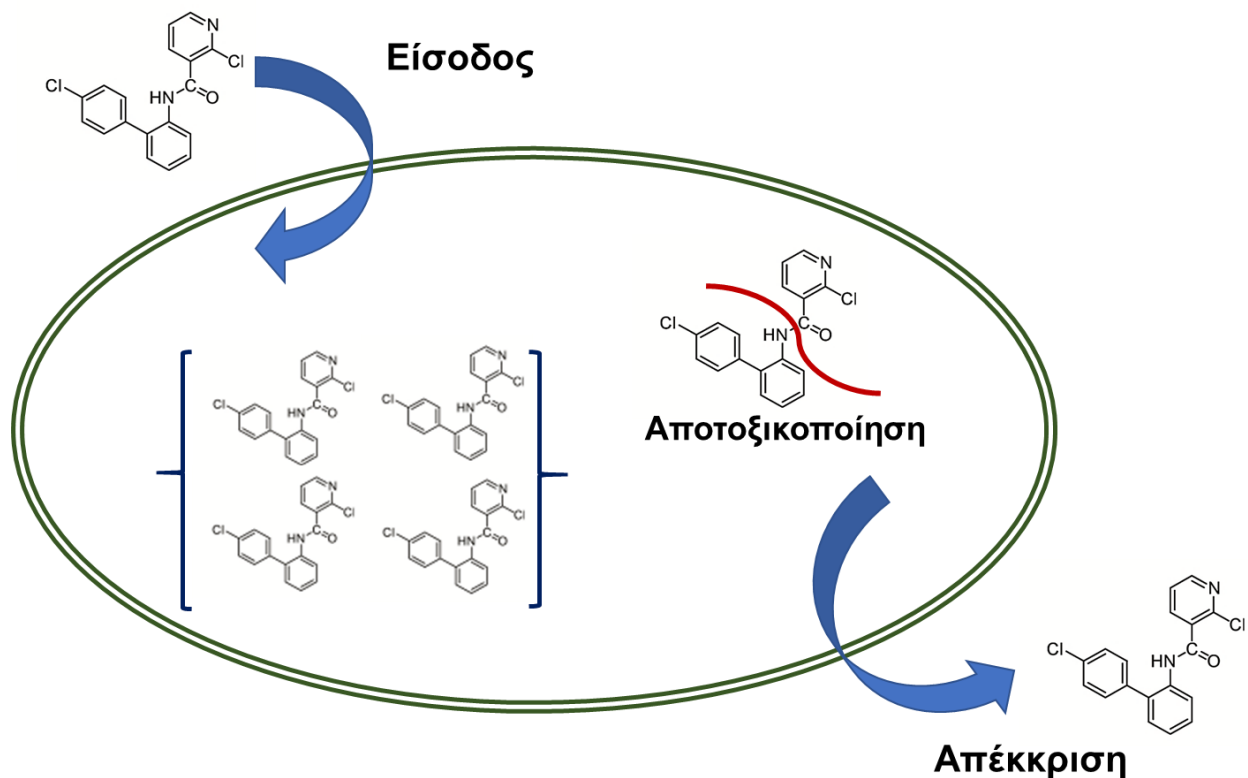
Παρότι πρόκειται για σπάνιο φαινόμενο, το οποίο δεν αποτελεί υποκατάστατο του εγγενή κύκλου, το τελικό αποτέλεσμα είναι παρόμοιο. Αφού σχηματιστεί ο διπλοειδής πυρήνας από την σύντηξη των δύο απλοειδών, τα αρχικά γονίδια μπορούν να ανασυνδυαστούν, όπως είναι ο στόχος της εγγενούς αναπαραγωγής.

1.5 Διαμεμβρανικοί μεταφορείς

1.5.1 Μηχανισμοί ελέγχου εισόδου και απέκκρισης

Σύμφωνα με την ρήση του Παράκελσου (1493-1541), του πατέρα της τοξικολογίας, *“τα πάντα είναι δηλητήριο και μόνο η δόση κάνει το δηλητήριο”*. Με άλλα λόγια κάθε ουσία μπορεί να είναι τοξική, εφόσον επαρκής συγκέντρωσή της και για ορισμένο χρονικό διάστημα βρίσκεται εντός των κυττάρων, ώστε να εκφράσει την τοξικότητά της αλληλοεπιδρώντας με τον υποκυτταρικό της στόχο. Αυτή η παρουσία είναι αποτέλεσμα της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ της εισόδου της εντός των κυττάρων και της ποσότητας που θα απομείνει έπειτα από την πιθανή απέκκρισή της και αποτοξικοποίησής της από τους μεταβολικούς μηχανισμούς του κυττάρου (**Εικόνα 19**).

Προκειμένου μια δ.ο. αλλά και οποιοδήποτε χημική ουσία γενικότερα, να μπορέσει να εισέλθει εντός των κυττάρων ενός μύκητα, θα πρέπει να ξεπεράσει το εμπόδιο του κυτταρικού τοιχώματος. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί το προστατευτικό όριο των κυττάρων, εντός του οποίου περικλείονται όλα τα απαραίτητα οργανίδια του κυττάρου. Παρόλα αυτά τα κύτταρα πρέπει να είναι σε θέση να επικοινωνούν με το περιβάλλον τους και να προσλαμβάνουν με ελεγχόμενο τρόπο τα απαραίτητα συστατικά για την επιβίωση και ανάπτυξή του, όπως είναι διάφοροι μεταβολίτες, ιόντα και θρεπτικές ουσίες. Η είσοδος τέτοιων μορίων αλλά και η απέκκρισή τους ελέγχεται από τους μηχανισμούς της διαμεμβρανικής μεταφοράς (Stein and Litman 2014).

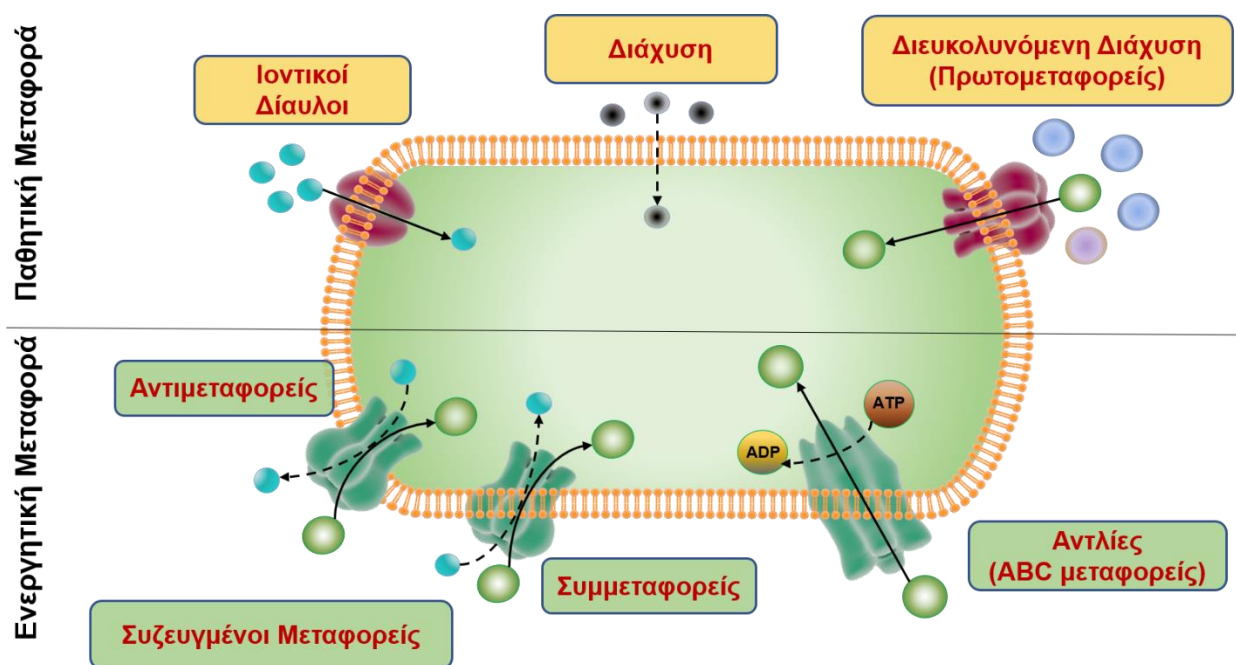


Εικόνα 19: Μηχανισμοί που επηρεάζουν την παρουσία μιας δ.ο. στον υποκυτταρικό της στόχο και κατά συνέπεια την δραστηριότητά της

Οι κύριοι μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς μπορούν να διακριθούν στην παθητική μεταφορά, όπου η μεταφορά των ουσιών πραγματοποιείται καθοδικά, δηλαδή προς τη μικρότερη συγκέντρωση, και στην ενεργητική μεταφορά όπου η μεταφορά πραγματοποιείται ανεξαρτήτως της διαφοράς δυναμικού, με κατανάλωση ενέργειας (Conde et al. 2010) (**Εικόνα 20**).

Η απλή διάχυση μικρών και μη πολικών μορίων μεμβράνης αποτελεί τον απλούστερο μηχανισμό παθητικής μεταφοράς. Η ροή θα συνεχιστεί μέχρις ότου υπάρξει ομοιογενής κατανομή της κινούμενης ουσίας, η οποία θα διατηρηθεί σε κατάσταση ισορροπίας (Berg et al. 2012). Δια της διευκολυνόμενης διάχυσης ιόντα και πολικά μόρια, μπορούν να κινηθούν καθοδικά δίχως να απαιτείται κατανάλωση ενέργειας μέσω ιοντικών διαύλων και μονομεταφορέων αντίστοιχα. Αυτές οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ενεργοποιούνται και μεταβάλλουν τη μοριακή τους δομή, μεταφέροντας τα δεσμευμένα μόρια διαμέσου των μεμβρανών (Voet and Voet 2011). Χαρακτηριστικό των ιοντικών διαύλων είναι ότι

επιτρέπουν την διάχυση των ιόντων για ορισμένο και βραχύτατο χρόνο, ενώ οι μονομεταφορείς έχουν κινητική συμπεριφορά ανάλογη των ενζύμων. Βασικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν την διευκολυνόμενη διάχυση από την απλή διάχυση είναι *i)* η εξειδίκευση των φορέων για ορισμένες ουσίες ή ομάδες ουσιών, *ii)* ο ανταγωνισμός μεταξύ δομικώς όμοιων μορίων όσον αφορά την σύνδεσή τους στον φορέα και *iii)* ο αριθμός των μορίων που δύναται να μεταφέρει ο φορέας είναι περιορισμένος (Nelson and Cox 2008).



Εικόνα 20: Μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς. Για λόγους ευκρίνειας παρουσιάζονται μόνο μηχανισμοί εισόδου, και παραλήφθηκε ο μηχανισμός της ενδοκύτωσης. Για τους μηχανισμούς απέκκρισης αντιστοιχούν ανάλογοι μηχανισμοί

Η ενεργή μεταφορά ουσιών, μέσω της οποίας ιοντικά ή πολικά μπορούν να κινούνται ανοδικά απαιτεί κατανάλωση ενέργειας. Η ενέργεια αυτή μπορεί να προέλθει είτε μέσω της διάσπασης του ATP ή άλλων μορίων υψηλής χημικής ενέργειας οπότε και οι μεταφορείς ονομάζονται αντλίες (πρωτογενής ενεργητική μεταφορά) (Davidson et al. 2008, Lamping et al. 2010), είτε μέσω της κατανάλωσης ενέργειας που προκύπτει από την διαφορά δυναμικού διαφόρων ιόντων (κυρίως H^+ , Na^+ , K^+), τα οποία θα μετακινηθούν μαζί με το υπόστρωμα, οπότε και οι μεταφορείς ονομάζονται συζευγμένοι μεταφορείς

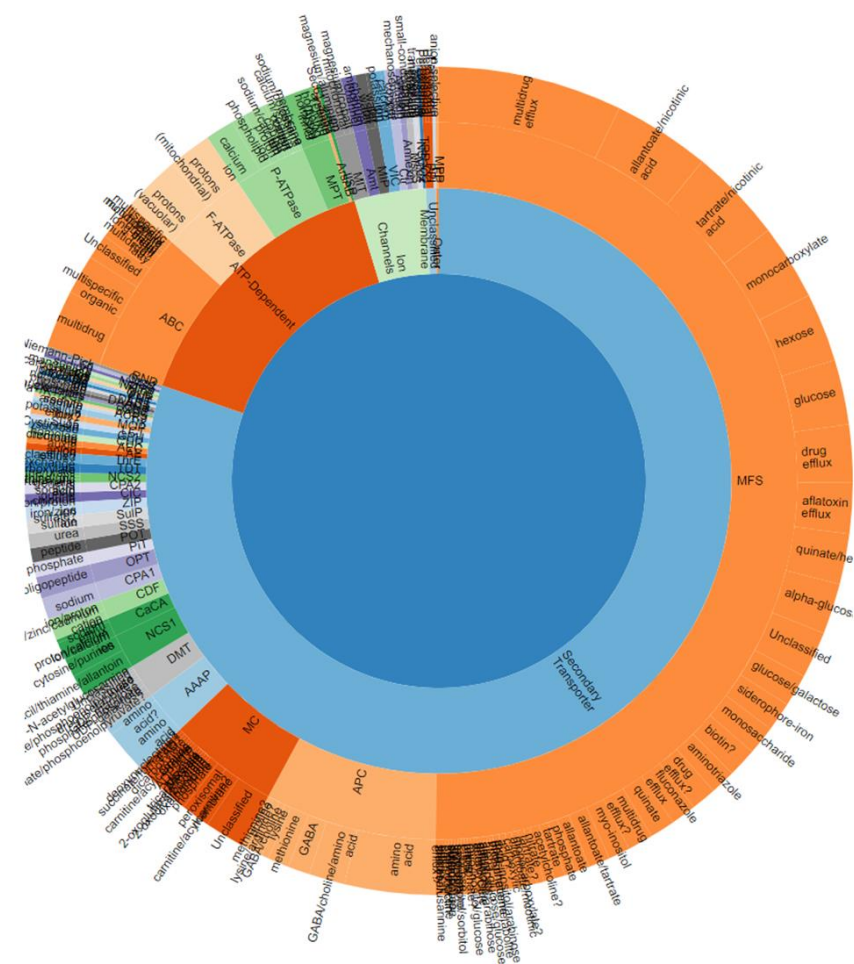
(δευτερογενής ενεργητική μεταφορά). Οι συζευγμένοι μεταφορείς μπορούν με την σειρά τους να διαχωριστούν στους συμμεταφορείς ή αντιμεταφορείς, όταν η μεταφορά του ιόντος πραγματοποιείται προς την ίδια ή αντίθετη κατεύθυνση σε σχέση με τη μεταφερόμενη ουσία (Perland and Fredriksson 2017).

1.5.2 Ρόλος και σημασία διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων

Από τα προηγούμενα γίνεται σαφές ότι οι διαμεμβρανικοί πρωτεϊνικοί μεταφορείς αποτελούν θεμελιώδεις κατασκευές καθώς συμβάλλουν στην εκλεκτική διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Με αυτόν τον τρόπο συμβάλλουν στην ανάπτυξη και επιβίωση των κυττάρων, μέσω της ενεργούς πρόσληψης θρεπτικών ουσιών από το περιβάλλον. Ελέγχοντας την ταχεία απέκκριση τοξικών ουσιών αποτελούν το κύριο αίτιο ανάπτυξης πολλαπλής ανθεκτικότητας έναντι σε αντιμυκητιακούς και αντιβακτηριακούς παράγοντες, με διαφορετικό μηχανισμό δράσης (§1.3.2). Επιπλέον παίζουν ρόλο στην κατανομή των διαφόρων μεταβολιτών εντός των διαφορετικών οργανιδίων των κυττάρων, αλλά και μεταξύ των διαφορετικών κυττάρων. Μέσω της κατανομής αυτής ελέγχουν ουσιαστικά στην επικοινωνία του κυττάρου με το περιβάλλον του, συμβάλλοντας σε σειρά λειτουργιών, όπως στη μεταφορά νευρικών ερεθισμάτων μέσω της μεταφοράς νευροδιαβιβαστών στους υποδοχής των νευρικών κυττάρων, στη μεταφορά και κατανομή διαφόρων αντιοξειδωτικών και αντιβιοτικών, αλλά στην διαφοροποίηση των ειδών μέσω της ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ διαφορετικών κυττάρων.

Η σημασία τους γίνεται εύκολα κατανοητή από το γεγονός ότι ένα σημαντικό μέρος, περίπου το 8–10%, του γονιδιώματος των οργανισμών κωδικοποιεί μεταφορείς, ενώ στην περίπτωση των υφομυκήτων το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 10–12% (Diallinas 2008b). Στον *A. nidulans*, σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία της βάσης δεδομένων TransportDB 2.0 (Elbourne et al. 2016), 711 γονίδια κωδικοποιούν πρωτεϊνικούς μεταφορείς, εκ των οποίων 570 δευτερογενείς ενεργούς μεταφορείς, 107 πρωτογενείς ενεργούς μεταφορείς, 28 ιοντικούς διαύλους, 1 πορίνη, 1 Ca⁺ δίαυλο και 4 μη χαρακτηρισμένους μεταφορείς (**Εικόνα 21**) (ηλεκτρονικό παράρτημα III, access date 01/10/2020).

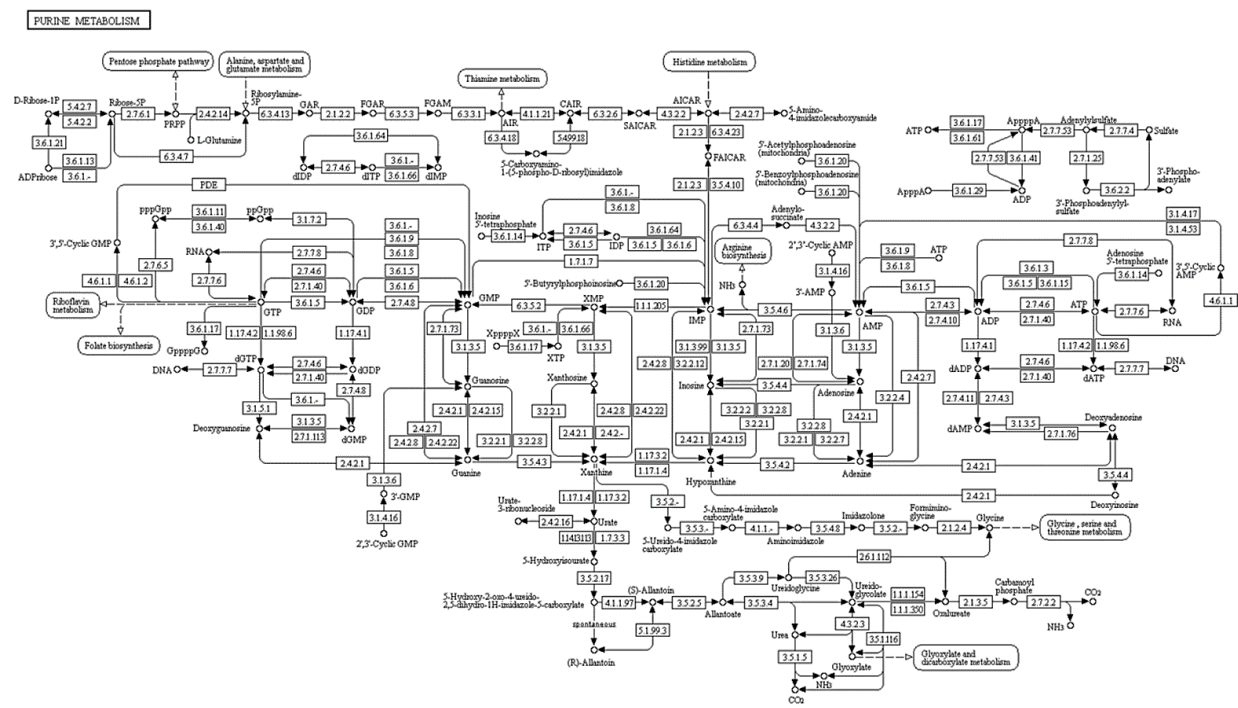
Δεδομένου του ρόλου των διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων στην ανάπτυξη και επιβίωση του κυττάρου, δεν προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια η αποτελούν έναν πολλά υποσχόμενο βιοχημικό στόχο για την ανάπτυξη καινούριων αντιμυκητιακών δ.ο. (Giacomini et al. 2010, Rask-Andersen et al. 2013). Στόχος είναι η δημιουργία ουσιών που να αναγνωρίζονται από μεταφορείς βελτιώνοντας την πρόσληψή τους (Tsuji 2005, Dobson et al. 2009, Kell et al. 2011, Huber et al. 2012, Kell and Oliver 2014), ουσιών που αναστέλλουν την δράση μεταφορέων που μετέχουν στην πρόσληψη θρεπτικών ουσιών (Koning and Diallinas 2000, Köse and Schiedel 2009), αλλά και ουσιών που αναστέλλουν την δράση απεκκριτικών μεταφορέων, συμβάλλοντας έτσι τόσο στην αντιμετώπιση του προβλήματος της πολλαπλής ανθεκτικότητας (Pidcock 2006, Russel 2010, Leroux and Walker 2012, Nigam 2015).



Εικόνα 21: Κατάταξη μεταφορέων του *A. nidulans* βάσει των στοιχείων της βάσης *transportdb 2.0*

1.5.3 Μεταφορείς Νουκλεοτιδικών Βάσεων

Στην χημική ομάδα των πουρινών ανήκουν σημαντικότερα μόρια για την επιβίωση των κυττάρων. Η αδενίνη με την γουανίνη αποτελούν τις δύο εκ των πέντε συνολικά βάσεις του DNA και του RNA. Επιπλέον διάφορες πουρίνες αποτελούν δομικά στοιχεία σημαντικότερων βιομορίων όπως τα ATP, GTP, NADH και το συνένζυμο A (Kumari 2018, Frenguelli and Dale 2020), ενώ έχουν αναφερθεί και ως νευροδιαβιαστές, δρώντας σε πουρινεργικούς υποδοχείς (Di Virgilio and Adinolfi 2017, Ali et al. 2020). Στην φύση αποτελούν την πλέον διαδεδομένη ομάδα αζωτούχων ετεροκυκλικών μορίων (Rosemeyer 2004) και αρκετές όπως η υποξανθίνη και η ξανθίνη, μέσω του μονοπατιού του μεταβολικού μονοπατιού των πουρινών (**Εικόνα 22**) αξιοποιούνται ως πηγές αζώτου από τα φυτά και πολλούς μικροοργανισμούς (Vogels and Van der Drift 1976, Smith and Atkins 2002), μεταξύ των οποίων και ο *A. nidulans*, ο οποίος φέρει πλήρως λειτουργικό το μονοπάτι του καταβολισμού των πουρινών προς ουρία και αμμωνία.



Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού του μεταβολισμού των πουρινών (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00230)

Η ελεγχόμενη είσοδος των πουρινών στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την δράση εξειδικευμένων δευτερογενών ενεργών μεταφορέων νουκλεοσιδίων. Αυτοί απαντώνται στο σύνολο σχεδόν των οργανισμών και τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια να χαρακτηριστούν (Pantazopoulou and Diallinas 2007, Gournas et al. 2008, Diallinas 2014, Galanopoulou et al. 2014, Siourouli et al. 2016, Gavriil et al. 2018). Στον *A. nidulans* έχουν χαρακτηριστεί 7 μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων, που με την σειρά τους κατηγοριοποιούνται σε 4 οικογένειες.

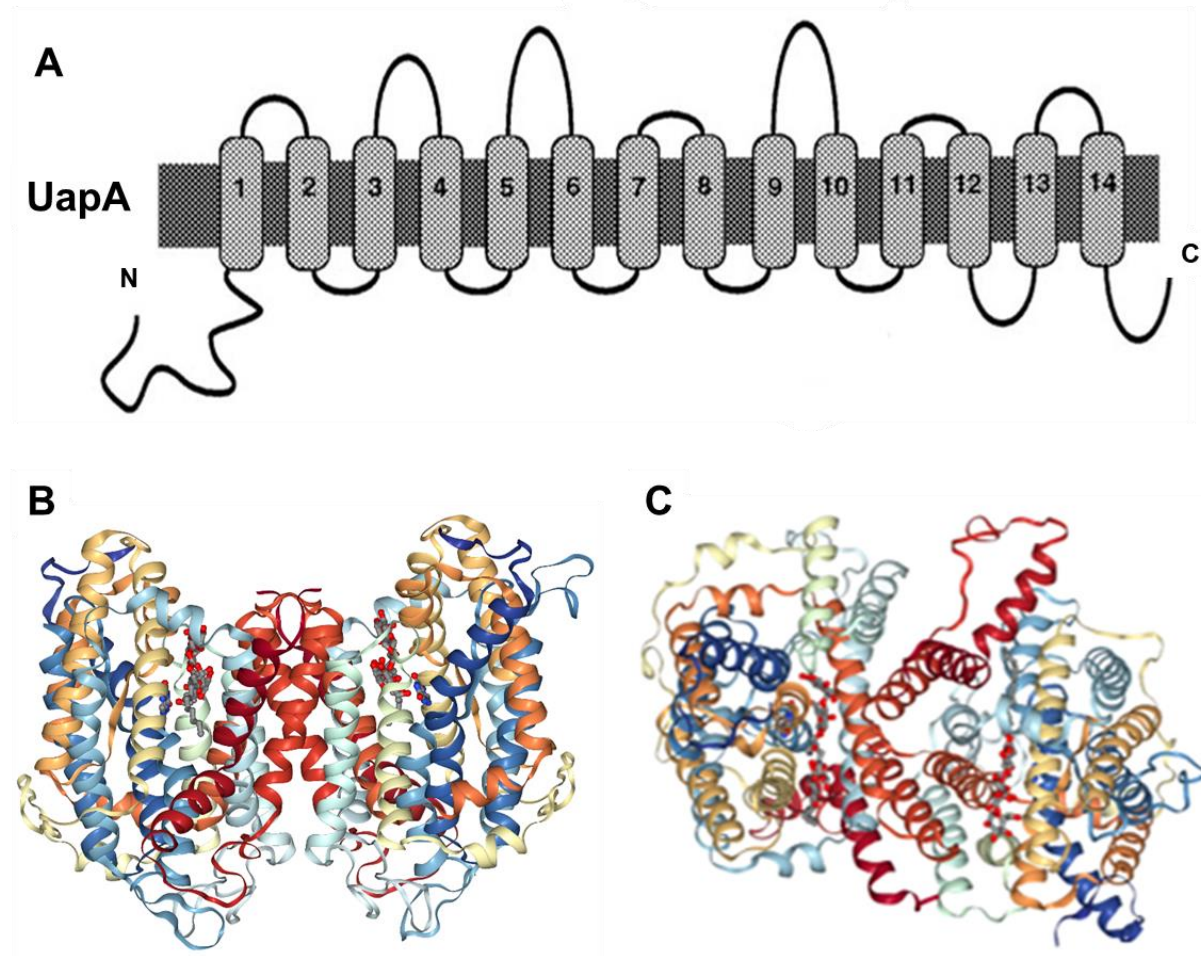
Η πλέον σημαντική είναι η οικογένεια των συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων κατιόντος 2 (Nucleobase Cation Symporters 2, **NCS2**), γνωστή και ως οικογένεια των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού οξέος (Nucleobase Ascorbate Transporters, **NAT**), καθώς είναι η μόνη από τις οικογένειες μεταφορέων νουκλεοβάσεων που είναι ευρέως διαδεδομένη (Gournas et al. 2008, Frillingos 2012). Περισσότερες από 1000 πρωτεΐνες από βακτήρια, αρχαία, μύκητες, φυτά και ζώα αποτελούν μέλη της οικογένειας, με εξαίρεση τον *Saccharomyces cerevisiae* που δε διαθέτει κάποιον μεταφορέα της οικογένειας NAT/NCS2.

Στην ομάδα ανήκουν αρκετοί μεταφορείς που ως υπόστρωμα αναγνωρίζουν τόσο πουρίνες και πυριμιδίνες, αλλά και μεταφορείς εξειδικευμένοι στις πουρίνες. Έχουν μήκος 414-650 αμινοξέων και φέρουν 14 διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας με ενδοκυτταρικά αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα. Με εξαίρεση τους NAT μεταφορείς των θηλαστικών που είναι συμμεταφορείς Na^+ , αυτοί των φυτών μυκήτων και βακτηρίων είναι συμμεταφορείς H^+ .

Σημαντικοί εκπρόσωποι της NAT/NCS2 οικογένειας που απαντώνται στον *A. nidulans*, είναι οι **UapA** και **UapC**, που αποτελούν τους πρώτους κλωνοποιημένους και μελετημένους μεταφορείς ουρικού οξέος στους οργανισμούς (Gorfinkiel et al. 1993, Diallinas et al. 1995). Ο UapA είναι ένας συμμεταφορέας H^+ υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας ουρικού οξέος κυρίως αλλά και ξανθίνης, καθώς και των τοξικών τους αναλόγων οξυπουρινόλη και αλλοπουρινόλη (Goudela et al. 2005). Ο UapC είναι και αυτός ένας συμμεταφορέας H^+ , υψηλής συγγένειας αλλά μέσης μεταφορικής ικανότητας ουρικού οξέος και ξανθίνης (Kryptou and Diallinas 2014). Επιπλέον είναι λιγότερο εκλεκτικός συγκριτικά με τον UapA, καθώς εμφανίζει χαμηλή μεταφορική

ικανότητα και στις πουρίνες αδενίνη, γουανίνη και υποξανθίνη και τα ανάλογά τους (Diallinas et al. 1995, Goudela et al. 2008).

Επιπλέον του χαρακτηρισμού των μεταφορέων αυτών, αρκετά πρόσφατα κατέστη εφικτή η τρισδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής μορφής του UapA (**Εικόνα 23**), η οποία αποκάλυψε ότι οι NAT διμερίζονται, με το διμερές να αποτελεί την λειτουργική τους μονάδα, παίζοντας ρόλο στην εκλεκτικότητα των μεταφορέων (Alguet et al. 2016).



Εικόνα 23: Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση του UapA μεταφορέα στην οποία διακρίνονται οι 14 διαμεμβρανικές α-έλικες, το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο (**A**). Τρισδιάστατη δομή κατακόρυφης τομής (**B**) και οριζόντιας τομής (**C**) του UapA μεταφορέα

Ιδιαίτερης σημασίας είναι η οικογένεια που ορίζεται από τον μεταφορέα πουρινών **AzgA**, που απαντάται κυρίως σε μύκητες βακτήρια και ορισμένα φυτά. Παρά το ότι δεν υπάρχουν φυλογενετικά στοιχεία για κοινή προέλευση με την οικογένεια των NAT μεταφορέων, οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με AzgA διαθέτουν επίσης 14 TMS και είναι δομικά ομόλογα με τους NATs. Στον *A. nidulans* ο **AzgA** είναι συμμεταφορέας H⁺, υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας αδενίνης, γουανίνης, υποξανθίνης και του τοξικού ανάλογου 8-αζαγουανίνης (Cecchetto et al. 2004, Goudela et al. 2008, Krypotou et al. 2014).

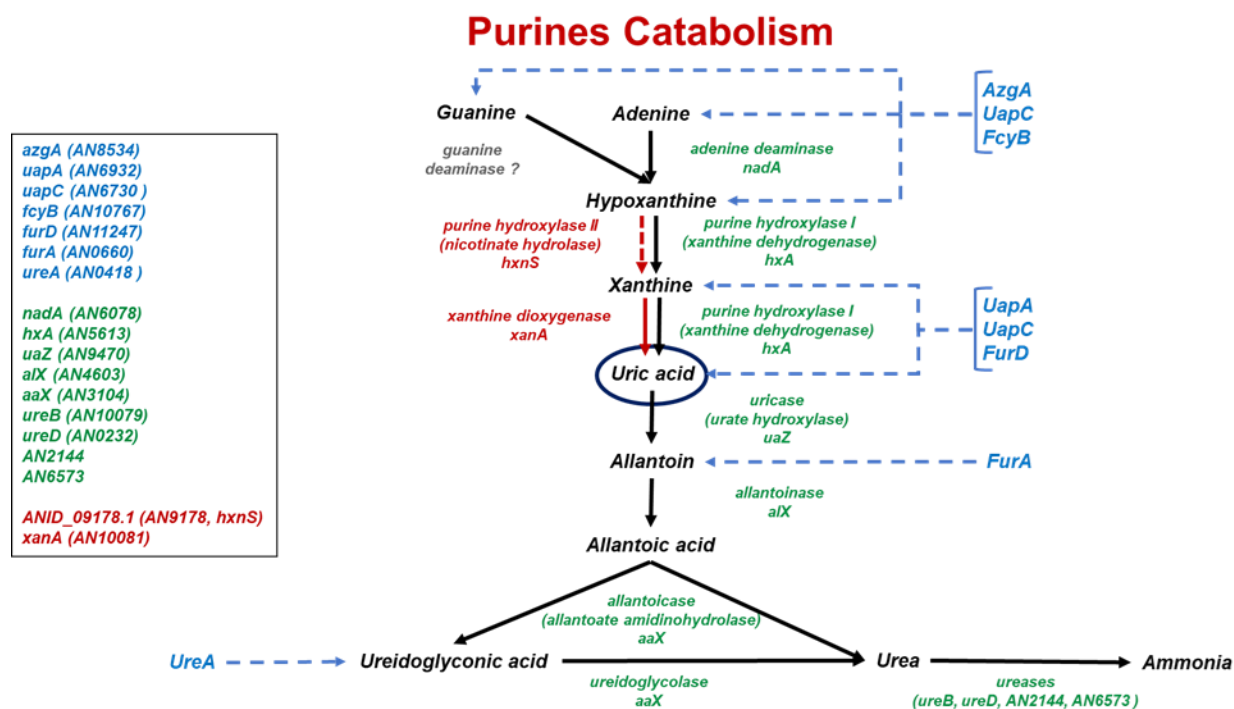
Η δεύτερη πολύ σημαντική οικογένεια νουκλεοτιδικών βάσεων με σημαντικό ρόλο στην ενεργή προσρόφηση πουρινών, πυριμιδινών και συναφών μεταβολιτών είναι η **PRT** ή **NCS1** (Purine Related Transporters, Nucleobase Cation Symporters 1) (Krypotou et al. 2012). Περισσότερες από 1000 πρωτεΐνες έχουν χαρακτηρησθεί στα βακτήρια, τα αρχαία, τους μύκητες και τα φυτά. Η πλειοψηφία των εκπροσώπων της οικογένειας είναι συμμεταφορείς H⁺, και λαμβανομένου υπόψιν και της εκλεκτικότητας του υποστρώματος, θεωρείται ότι οι οικογένειες NCS1 και NAT/NCS2 έχουν κοινή εξελικτική προέλευση προερχόμενες από κοινή υπεροικογένεια, πριν τον διαχωρισμό των κυρίως βασιλείων των οργανισμών (Krypotou et al. 2015, Siourouli et al. 2016, Papadaki et al. 2017). Έχουν μήκος 419-635 αμινοξέων και φέρουν 12 διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας.

Μέλη της NCS1 οικογένειας στον *A. nidulans* αποτελούν ο συμμεταφορέας **FcyB** με υψηλή συγγένεια στην αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη και κυτοσίνη, αλλά χαμηλής μεταφορικής ικανότητας όσον αφορά την αδενίνη και υποξανθίνη (Vlanti and Diallinas 2008), ο συμμεταφορέας **FurD** με υψηλή συγγένεια σε θυμίνη και ουρακίλη αλλά μέτριας συγγένειας στο ουρικό οξύ και την ξανθίνη (Amillis et al. 2007) και τέλος ο **FurA** με εξειδίκευση στην αλλαντοΐνη (Hamari et al. 2009, Krypotou et al. 2015). Επιπλέον έχουν αναφερθεί κρυπτικοί Fur και Fcy μεταφορείς με διαφορετικά υποστρώματα, οι οποίοι ωστόσο δεν συμβάλλουν στην πρόσληψη νουκλεοβάσεων υπό εργαστηριακές συνθήκες (Siourouli et al. 2016, Papadaki et al 2017, Papadaki et al 2019)

Μία ακόμη σημαντική οικογένεια που απαντάται με έναν εκπρόσωπο στον *A. nidulans* είναι η οικογένεια συγκεντρωτικών μεταφορέων νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων (Concentrative Nucleoside Transporter, **CNT**). Έχουν βρεθεί στα βακτήρια, τους μύκητες στα οποία είναι συμμεταφορείς H⁺ και τα θηλαστικά που είναι συμμεταφορείς

Na⁺. Οι μεταφορείς της οικογένειας αυτής έχουν μήκος 600-700 αμινοξέων και αποτελούνται από 10-14 διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας. Ο μοναδικός εκπρόσωπος της οικογένειας στον *A. nidulans* είναι ο ευρείας εξειδίκευσης, υψηλής συγγένειας συμμεταφορέας νουκλεοσιδίων, **CntA** (Amillis et al. 2007, Hamari et al. 2009).

Στην ακόλουθη εικόνα (**Εικόνα 24**) παρουσιάζεται σε απλοποιημένη μορφή το μονοπάτι του καταβολισμού των πουρινών στον *A. nidulans*, καθώς και οι υπεύθυνοι για την ενεργή προσρόφησή τους, επτά μεταφορείς.



Εικόνα 24: Απλοποιημένη αναπαράσταση του μονοπατιού του καταβολισμού των πουρινών του *A. nidulans*. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι μεταφορείς που αναγνωρίζουν τις αντίστοιχες πουρίνες ως υπόστρωμα, και των μεταφορέων νουκελοσιδίων. Με πράσινο χρώμα τα υπεύθυνα ένζυμα κάθε αντίδρασης και με κόκκινο χρώμα τα υπεύθυνα ένζυμα του ενναλακτικού μονοπατιού του καταβολισμού της υποξανθίνης σε ξανθίνη και ουρικό οξύ. Στο πλαίσιο δίνονται τα υπεύθυνα γονίδια με την ανάλογη χρωματική απεικόνιση βάσει των στοιχείων της βάσης *Aspergillus genome database* (<http://www.aspgd.org/>)

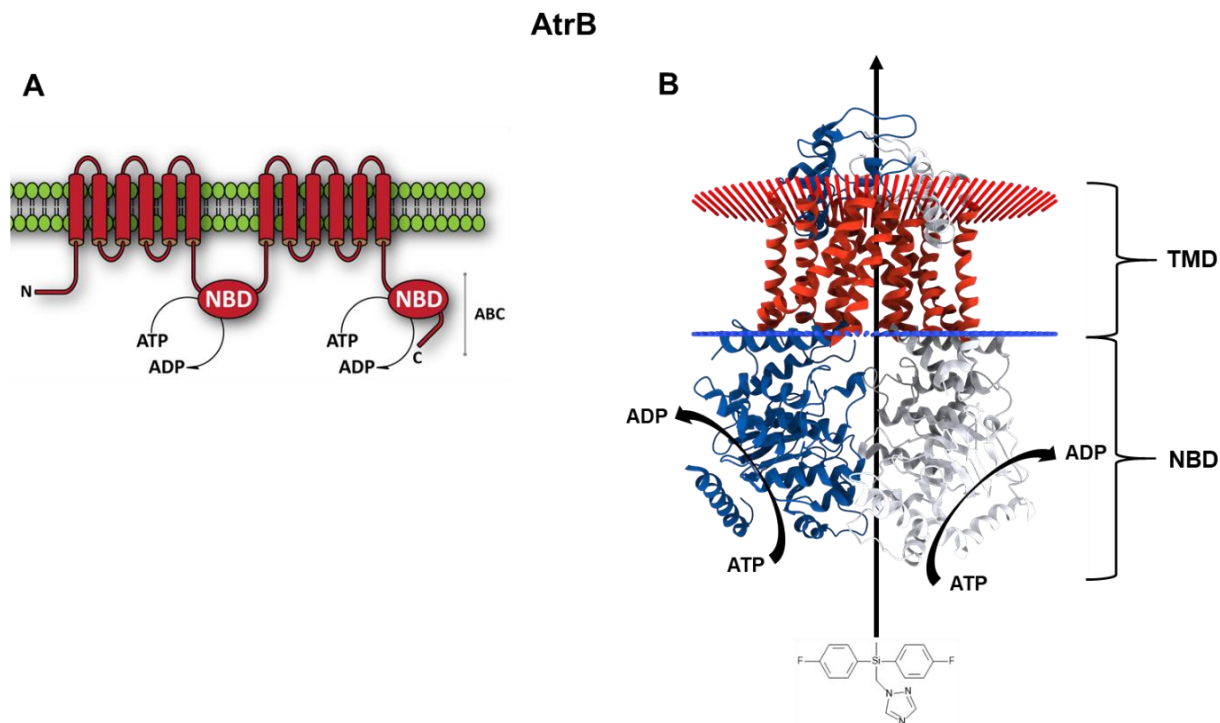
1.5.4 ATP-binding Cassette (ABC) μεταφορείς

Η υπεροικογένεια των ABC μεταφορέων (ATP-binding Cassette transporters) αποτελεί τη μεγαλύτερη καταγεγραμμένη οικογένεια πρωτεϊνών, και οι μεταφορείς που ανήκουν σε αυτήν αποτελούν τους πιο σημαντικούς ενεργούς πρωτεϊνικούς μεταφορείς των οργανισμών (Higgins 2001, Theodoulou and Kerr 2015). Οι ABC μεταφορείς μπορούν να διακριθούν σε αυτούς που εισάγουν («εισαγωγείς») και αυτούς που απεκκρίνουν («εξαγωγείς») ουσίες (Dassa and Bouige 2001, Schmitt and Tampé 2002). Φυλογενετική ανάλυσή των δύο αυτών ομάδων έχει δείξει, ότι με ελάχιστες εξαιρέσεις αυτές συσχετίζονται στενά (Saurin et al. 1999, Bouige et al. 2002, Schuller et al. 2003). Οι ABC «εισαγωγείς» μεταφέρουν κυρίως υδατοδιαλυτά θρεπτικά συστατικά, ενώ αντιθέτως οι ABC «εξαγωγείς» είναι λιγότερο εκλεκτικοί όσον αφορά το υπόστρωμά τους, καθώς μπορούν να μεταφέρουν λιπαρά οξέα, λιπίδια και πρωτεΐνες (ter Beek et al. 2014).

Οι ABC μεταφορείς αποτελούνται από την διαμεμβρανική περιοχή (**TransMembrane Domain, TMD**) και την περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (**Nucleotide Binding Domain, NBD**). Στην τελευταία πραγματοποιείται η υδρόλυση του ATP, μέσω της οποίας αντλείται η απαραίτητη ενέργεια για τη μεταφορά του υποστρώματος, ανεξαρτήτως της διαφοράς δυναμικού του (**Εικόνα 25**). Κάθε TMD περιοχή αποτελείται από 6 έως 10 α-ελικάσες, οι οποίες διαπερνώντας τη μεμβράνη, δημιουργούν πόρο, μέσω του οποίου μετακινούνται τα υποστρώματα (Wilkins 2015). Ο αριθμός των NBD περιοχών ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών υποοικογενειών των ABC μεταφορέων. Παρόλα αυτά σε αντίθεση με ότι ισχύει για την TMD περιοχή, η περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (NBD) είναι πολύ συντηρημένη, χρησιμεύοντας έτσι στον φυλογενετικό διαχωρισμό των διαφόρων μεταφορέων (ter Beek et al., 2014).

Η εύρυθμη λειτουργία των ABC μεταφορέων αποτελεί το σημαντικότερο σύστημα ταχείας απέκκρισης τοξικών ουσιών από τα κύτταρα (Rees et al. 2009). Έτσι τυχόν δυσλειτουργία τους οδηγεί συνήθως σε μια σειρά δυσμενών επιπτώσεων της ζωτικότητας και εν τέλει επιβίωσης των κυττάρων (Theodoulou and Kerr 2015). Επιπλέον στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα έχει βρεθεί ότι υπερέκφρασή τους, όχι μόνο είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντικαρκινικά σκευάσματα εξαιτίας της απέκκρισής τους (Lepper et al. 2005, Kathawala et al. 2015, Robey et al. 2018), αλλά και βοηθά την συνεχή ανάπτυξη των κυττάρων, παίζοντας κύριο ρόλο στην εμφάνιση και εξάπλωση των καρκινικών όγκων (Fletcher et al. 2010, Domenichini et al. 2019). Ταυτόχρονα τυχόν

παρεμπόδιση της λειτουργίας τους μπορεί να μετατρέψει καλοήθεις όγκους σε κακοήθεις (Fletcher et al. 2016). Δυσλειτουργίες των ABC μεταφορέων συμβάλουν και στην ανάπτυξη σειράς σημαντικών ανθρώπινων ασθενειών, όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος Tangier, η κυστική ίνωση και καρδιολογικές παθήσεις, (Borst and Elferink 2002, Abuznait and Kaddoumi 2012, Morita and Imanaka 2012, Pereira et al. 2018).



Εικόνα 25: Απλοποιημένη (A) και τρισδιάστατη (B) σχηματική αναπαράσταση του AtrB απεκκριτικού μεταφορέα. Διακρίνονται το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο, οι δύο διαμεμβρανικές περιοχές αποτελούμενες από 6 α-έλικες, και οι δύο περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων στις οποίες υδρολύεται το ATP σε ADP προς παραγωγή της απαραίτητης για τη μεταφορά ενέργειας

Υπερέκφραση των ABC μεταφορέων, παίζει σημαντικότατο ρόλο, όπως έχει ήδη αναφερθεί (§1.3.2), στην ανάπτυξη πολλαπλής ανθεκτικότητας, εξαιτίας της αυξημένης απέκκρισης αντιμυκητιακών ενώσεων, πριν αυτές προλάβουν να συσσωρευτούν σε τοξικές συγκεντρώσεις στα κύτταρα. Υπερέκφραση των μεταφορέων AtrF του *A. fumigatus*, του CnAFR1 του *Cryptococcus neoformans* και των CDR1 και CDR2 του *Candida albicans* οδηγούν σε ανθεκτικότητα έναντι των χρησιμοποιούμενων αζολών

(Sanglard et al. 1997, Slaven et al. 2002, Posteraro et al. 2003, Sanguinetti et al. 2006, Kumar and Jha 2017, Sturm et al. 2020).

Ταυτόχρονα η υπερέκφρασή του αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς ανάπτυξης ανθεκτικότητας και στους φυτοπαθόνους μύκητες (Dekker and Georgopoulos 1982, de Waard et al. 2006, Brent and Hollomon 2007b, Hahn and Leroch 2015). Επιπλέον μπορούν να επηρεάσουν την φυτοπαθογόνο ικανότητα των μυκήτων. Για παράδειγμα ο μεταφορέας FgABC1 βοηθά τη μόλυνση του σιταριού και κριθαριού από το *Fusarium culmorum* (Skov et al. 2004) και ο ATR1 είναι απαραίτητος για την απέκκριση της τοξικής κερκοσπορίνης, που υποβοηθά τη μόλυνση του καπνού από το παθογόνο *Cercospora nicotianae* (Amnuaykanjanasin and Daub 2009). Στην περίπτωση ειδικά της κερκοσπορίνης είναι γνωστό πως υπερέκφραση της Crd1p κυκλικής νουκλεοτιδικής φωσφοδιεστεράσης και του Snq2p ABC μεταφορέα οδηγεί στην αυξημένη της απέκκριση και συνεπακόλουθη ανθεκτικότητα στον *S. cerevisiae* (Ververidis et al. 2001).

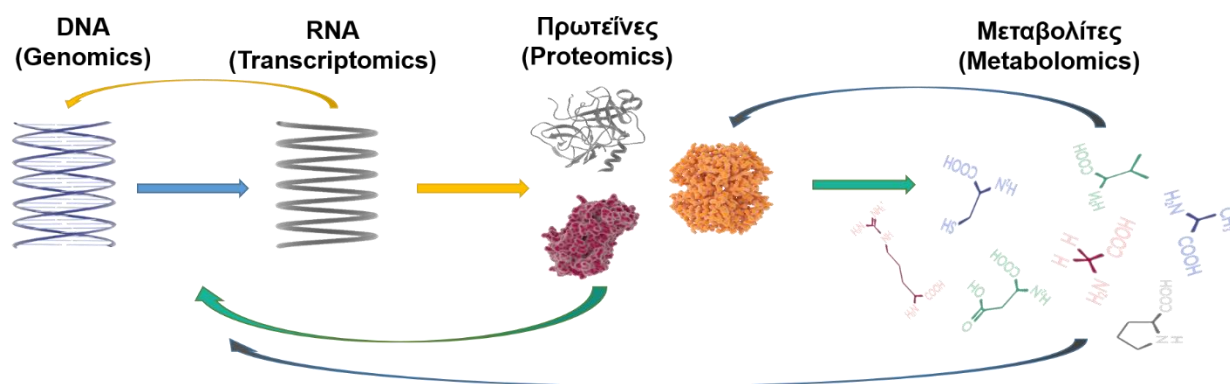
Δεδομένης της σημασίας των μεταφορέων, η διερεύνηση της δομής και λειτουργίας τους, αποτελεί σημαντική αποτελεί έναν διαρκή και σημαντικό στόχο της επιστημονικής κοινότητας. Η μελέτη τους στηρίζεται στη χρήση οργανισμών μοντέλων, καθώς η γνώση των βιολογικών τους συστημάτων, αλλά και τα διαθέσιμα εργαλεία είναι εκτενής. Δύο από τους σημαντικότερους τέτοιους οργανισμούς αποτελεί η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (Egner et al. 1995, Leighton and Schatz 1995, Decottignies and Goffeau 1997, Jungwirth and Kuchler 2006, Rutledge et al. 2011, Prasad et al. 2016, Karamanou and Aliferis 2020) και ο υφομύκητας *A. nidulans* (Andrade 2000, Andrade, Del Sorbo, et al. 2000, Andrade, Van Nistelrooy, et al. 2000, do Nascimento et al. 2002, Kumar and Jha 2017).

1.6 Μεταβολομική ανάλυση

Σύμφωνα με το δόγμα της βιολογίας το DNA μεταγράφεται σε RNA, το RNA μεταφράζεται σε πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες αποτελούν τους βιολογικούς καταλύτες των βιοχημικών αντιδράσεων ενός οργανισμού. Οι βιοχημικές αυτές αντιδράσεις συντελούνται μεταξύ

μορίων μικρού συνήθως μοριακού βάρους, προϊόντων του μεταβολισμού των οργανισμών, τα οποία ονομάζονται μεταβολίτες (**Εικόνα 26**).

Με την εξέλιξη της επιστήμης και της συνεχόμενης βελτίωσης της ευαισθησίας του διαθέσιμου εργαστηριακού εξοπλισμού και μηχανημάτων, έχουν αναπτυχθεί “ομικές” τεχνικές, που αξιοποιούν το κάθε στάδιο της βιολογικής πληροφορίας. Καινοτόμες μέθοδοι γενετικού ανασυνδυασμού, αλληλούχισης DNA, αλλά και σύγχρονου λογισμικού βιοπληροφορικής, επιτρέπει τη μελέτη του συνόλου των γονιδίων ενός οργανισμού, στα πλαίσια αυτού που καλείται γονιδιωματική (**genomics**). Η διάθεση εργαλείων, όπως κασετών μικροσυστοιχιών γονιδίων, που χρησιμοποιούνται στη μελέτη της έκφρασης ακόμη και του συνόλου των γονιδίων ενός οργανισμού, οδήγησε στην ανάπτυξη της μεταγραφωματικής (**transcriptomics**), της μελέτης δηλαδή του συνόλου των μεταγραφημάτων (mRNA) που παράγονται σε έναν οργανισμό, ως απόκριση ενός βιοτικού ή αβιοτικού ερεθίσματος. Σύγχρονα αναλυτικά εργαλεία, όπως η ανακάλυψη των ανιχνευτών μάζας τύπου orbitrap, με την πολύ υψηλή διαχωριστική του ικανότητα και ευαισθησία ανάλυσης, καθώς και διάθεση κατάλληλων λυτικών ενζύμων που διασπούν τις πρωτεΐνες σε απλούστερες αμινοξικές αλυσίδες, καθιστώντας ευκολότερη την ανάλυση τους, οδήγησε στην ανάπτυξη της πρωτεομικής (**proteomics**), της ανάλυσης δηλαδή του συνόλου των πρωτεϊνών και πεπτιδίων που παράγονται κατά την κωδικοποίηση του γονιδιώματος ενός οργανισμού. Στόχος της πρωτεομικής είναι ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών ενός οργανισμού, αλλά και η μελέτη της αλληλεπίδρασής τους και του ρόλου τους στην κυτταρική λειτουργία.



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση της ροής της γενετικής πληροφορίας και των αντίστοιχων “ομικών” τεχνικών

Η ανακάλυψη των γονιδιακών προϊόντων, μέσω της μελέτης της γονιδιακής έκφρασης και της πρωτεομικής ανάλυσης, που αποτελούν κομμάτι της κυτταρικής λειτουργίας συνήθως δεν απεικονίζουν πάντα σωστά την φυσιολογία ενός οργανισμού. Για παράδειγμα η συχνή αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδίων (Oliver et al. 2002), η αναντιστοιχία μεταξύ των επιπέδων mRNA και των πρωτεϊνών (Gygi et al. 1999) και η πιθανή αδρανοποίηση των πρωτεϊνών μετά τη μετάφραση (Horgan and Kenny 2011, Lambert 2013), καθιστούν τις τεχνικές αυτές συχνά ανεπαρκείς για την ολοκληρωμένη απεικόνιση του φαινοτύπου ενός βιολογικού συστήματος. Οι μεταβολίτες όμως όντας τα τελικά ή και ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού ενός οργανισμού, δίνουν μια άμεση απεικόνιση της φυσιολογίας ενός οργανισμού. Έτσι ενώ η γονιδιακή έκφραση και η πρωτεομική ανάλυση απεικονίζουν τον γονότυπο, η μελέτη των μεταβολιτών δίνει την εικόνα του φαινοτύπου.

Καθίσταται έτσι σαφές πως συνδυασμός των γονιδιωματικών, μεταγραφωματικών και πρωτεομικών πληροφοριών, με αυτή των μεταβολιτών συμβάλει στην πλέον ολοκληρωμένη γνώση των πληροφοριών ενός βιολογικού συστήματος. Προς αυτήν την κατεύθυνση καθίσταται σαφής η κρισιμότητα της ανάπτυξης τεχνικών που να επιτρέπουν τη μελέτη του συνόλου των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος.

1.6.1 Κατηγορίες μεταβολομικών αναλύσεων

Λύση στο προηγούμενο ζήτημα δίνει η ανάπτυξη κατά τα τελευταία χρόνια της μεταβολομικής, που ορίζεται ως η *“ενδεδεχής ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του μεταβολόματος (**metabolome**) υπό συγκεκριμένες συνθήκες”* (Fiehn 2001). Το μεταβόλομα αποτελείται από το σύνολο των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος (κύτταρο, ιστό, όργανο ή οργανισμό), (Oliver 1996).

Όπως αναφέρθηκε ήδη, οι μεταβολίτες αποτελούν ενδιάμεσα αλλά και τελικά προϊόντα του μεταβολισμού ενός βιολογικού συστήματος, αντικατοπτρίζοντας την αλληλεπίδραση γονιδίων-περιβάλλοντος. Πρόκειται για μόρια μεγέθους μικρότερου συνήθως του 1-1.5 kDa, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις όπως είναι η περίπτωση των αλμπουμινών.

Ως προς τον ρόλο τους στον μεταβολισμό, οι μεταβολίτες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) στους κύριους μεταβολίτες, αποτελώντας τον κύριο μεταβολισμό (**primary metabolism**) των οργανισμών, με άμεση επίδραση στην ανάπτυξη, αναπαραγωγή και επιβίωση τους και β) στους δευτερεύοντες μεταβολίτες που αποτελούν των δευτερεύοντα μεταβολισμό (**secondary metabolism**) και αν και δε μετέχουν άμεσα στην επιβίωση, ανάπτυξη και αναπαραγωγή, έχουν σημαντικό οικολογικό ρόλο. Παραδείγματα δευτερευόντων μεταβολιτών αποτελούν τα αντιβιοτικά που παράγονται από βακτήρια, τυχόν τοξικοί μεταβολίτες όπως οι μυκοτοξίνες και οι χρώσεις. Μεταβολίτες που απεκκρίνονται από τους οργανισμούς αποτελούν το εξωμεταβολομά τους και η ανάλυσή τους αποτελεί στόχο εξωμεταβολομικής (**exometabolomics/metabolic footprinting**) (Kell et al. 2005), ενώ μεταβολίτες που δεν παράγονται από το υπό μελέτη βιολογικό σύστημα, όπως για παράδειγμα φάρμακα και δ.ο., ονομάζονται ξενομεταβολίτες (**xenometabolites**) (de Raad et al. 2016, Johnson et al. 2016, Bloszies and Fiehn 2018, Hautbergue et al. 2018, Ivanisevic and Thomas 2018).

Αναλόγως του τύπου της ανάλυσης η μεταβολομική μπορεί να διαχωριστεί σε στοχευμένη (**targeted**) και μη στοχευμένη (**untargeted**) ανάλυση (Cambiaghi et al. 2016). Όπως δηλώνει το όνομά της στόχος της στοχευμένης ανάλυσης είναι η ανίχνευση και όσο το δυνατόν ακριβέστερη ποσοτικοποίηση ενός υποσυνόλου γνωστών μεταβολιτών, που ανήκουν με συγκεκριμένα βιοχημικά μονοπάτια, που σχετίζονται με την υπό μελέτη πειραματική υπόθεση. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η στοχευμένη μελέτη του μονοπατιού των μυκοτοξινών, όταν το παθογόνο βρίσκεται υπό την επήρεια μιας δ.ο. (Karaoglanidis et al. 2011, Markoglou et al. 2011, Malandrakis et al. 2013). Απαραίτητη προϋπόθεση της στοχευμένης ανάλυσης είναι να είναι γνωστοί εκ των προτέρων οι υπό μελέτη μεταβολίτες και διαθέσιμοι σε καθαρή μορφή, ώστε να χρησιμοποιηθούν στην κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης που χρησιμεύουν για την ποσοτικοποίησή τους. Λαμβάνοντας υπόψιν όμως ότι προς το παρόν ελάχιστοι μεταβολίτες είναι διαθέσιμοι ως αναλυτικά πρότυπα, η στοχευμένη ανάλυση αδυνατεί να χρησιμοποιηθεί για την εις βάθος και ολοκληρωμένη κατά το δυνατόν ανάλυση του μεταβολισμού ενός οργανισμού. Αντιθέτως στόχος της στοχευμένης ανάλυσης είναι η πλήρης (κατά το δυνατόν) ανάλυση του μεταβολισμού ενός οργανισμού, δίχως να λαμβάνεται εκ των προτέρων υπόψιν η όποια πειραματική υπόθεση. Οι διαφορές στα επίπεδα των μεταβολιτών μεταξύ των

διαφορετικών δειγμάτων καταγράφονται μεταβολές του χρωματογραφικού τους προφίλ, δίχως να απαιτείται προηγούμενη γνώση των υπό μελέτη ενώσεων. Επομένως, με τη μη στοχευμένη ανάλυση δεν ποσοτικοποιούνται με ακρίβεια όλοι οι ανιχνευθέντες μεταβολίτες ενός δείγματος.

Επιπλέον σε αντίθεση με το μεταβολικό προφίλ (**metabolic profiling**), που χρησιμοποιείται όταν στόχος είναι “η ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος σε μια δεδομένη στιγμή”, στην περίπτωση της ταχείας λήψης ενός στιγμιότυπου των μεταβολιτών, δίχως να είναι απαραίτητος ο ακριβής ποσοτικός τους προσδιορισμός, γίνεται λόγος για λήψη μεταβολικού δακτυλικού αποτυπώματος (**metabolic fingerprinting**), όρος ο οποίος σχετίζεται με τη μη στοχευμένη ανάλυση (Ellis et al. 2007).

Στη μεταβολομική, όντας αρκετά καινούρια επιστήμη, έχουν συνταχθεί αρκετοί υποορισμοί, ώστε να καλυφθούν διαφορετικές αρχές και τεχνικές της. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο ορισμός της μεταβονομικής (*metabonomics*), ο οποίος αν και πλέον ορίζεται ως “η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μεταβολιτών σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα” (Nicholson and Lindon 2008), αρχικά χρησιμοποιούνταν έχοντας ταυτόσημη έννοια με αυτήν της μεταβολομικής (Dunn and Ellis 2005). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ακόμη και σήμερα να χρησιμοποιείται εναλλακτικά της τελευταίας προκαλώντας αρκετές φορές σύγχυση (Neto et al. 2020).

1.6.2 Αρχές ανάπτυξης μεταβολομικών πρωτοκόλλων – Αναλυτικά μηχανήματα

Από τα προηγούμενα καθίσταται σαφές πως συνδυασμός της μεταβολομικής με αναλύσεις βιοπληροφορικής μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη απόκριση του μεταβολισμού σε βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες, αποτελώντας την πλέον κατάλληλη μέθοδο για τη μελέτη και συσχέτιση του φαινοτύπου με το μεταβολισμό του (Sumner et al. 2003). Παρόλα αυτά εφαρμογή της μεταβολομικής εμφανίζει σημαντικές προκλήσεις, εξαιτίας της ανάγκης ανάλυσης του συνόλου του μεταβολόματος και επεξεργασίας του

τεράστιου όγκου των παραγόμενων δεδομένων (Villas-Bôas et al. 2005, Ohashi et al. 2008).

Η έντονη χημική διαφοροποίηση των μεταβολιτών που απαιτεί διαφορετικά πρωτόκολλα εκχυλίσεων, αλλά και η αδυναμία μίας μόνο αναλυτικής μεθόδου να δώσει επαρκείς πληροφορίες για το σύνολο του μεταβολόματος, καθιστά απαραίτητη τη χρησιμοποίηση δύο ή και περισσότερων μεταβολομικών πρωτοκόλλων για την ενδελεχή κάλυψη του μεταβολόματος (Roessner et al. 2007, Biais et al. 2009, Agnolet et al. 2010, Aliferis and Jabaji 2010b). Επίσης η διαφορά του δυναμικού συγκέντρωσης των μεταβολιτών του ίδιου συστήματος θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν, ώστε μεταβολίτες που παράγονται σε μικρές συγκεντρώσεις να μην επικαλύπτονται κατά την ανάλυση από μεταβολίτες υψηλότερης συγκέντρωσης (Roessner et al. 2007).

Επιπλέον ο μεταβολισμός ενός οργανισμού χαρακτηρίζεται από έντονη διαφοροποίηση μεταξύ διαφορετικών βιολογικών συστημάτων, αλλά και εντός ακόμη του ίδιου κυττάρου με την πάροδο του χρόνου εξεναντίας της παραγωγής ή παύσης τους σε συγκεκριμένα στάδια του βιολογικού κύκλου, είτε εξαιτίας της επίδρασης του περιβάλλοντος στον γονότυπο, είτε ακόμη κάποιου εξωμεταβολίτη ή τοξικού παράγοντα (Sato et al. 2008).

Αλλά ακόμη και συγκρινόμενη με τις υπόλοιπες “ομικές” τεχνικές, η μεταβολομική παρουσιάζει ιδιαιτερότητες. Οι μεταβολίτες, αντιθέτως από τις πρωτεΐνες και τα μεταγραφόμενα, δεν εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς τον οργανισμό (Hollywood et al. 2006). Εκτός αυτού, σε σύγκριση με τα γονίδια και τις πρωτεΐνες που αποτελούνται από αλληλουχίες μόλις τεσσάρων βάσεων και 20 διαφορετικών αμινοξέων αντίστοιχα, οι μεταβολίτες δε χαρακτηρίζονται από κάποια αλληλουχία, καθιστώντας δύσκολη την εφαρμογή μιας γενικής μεθόδου ταυτοποίησής τους (Nielsen and Jewett 2007).

Η σημαντικότερη πρόκληση όμως που πρέπει να αντιμετωπίσει η μεταβολομική είναι το εύρος των μεταβολιτών που έχουν ήδη ταυτοποιηθεί και είναι διαθέσιμοι στις μεταβολομικές βιβλιοθήκες. Παρότι ο αριθμός των ενώσεων με βιολογική λειτουργία εκτιμάται στις 1-2 εκατομμύρια (Aksenon et al. 2017), σε ελάχιστες μελέτες έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από το 20% του συνόλου των ανιχνευμένων μεταβολιτών (Blaženović et al. 2018). Κύρια αιτία είναι η αδυναμία ή το υψηλό κόστος παραγωγής και διάθεσης καθαρών πρότυπων αναλυτικών ουσιών διαφόρων αρκετά εξειδικευμένων

μεταβολιτών, αλλά και η αποφυγή ή αδυναμία ταυτοποίησης άγνωστων μεταβολιτών που δεν υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων, από τους ερευνητές κατά τη διεξαγωγή μιας μεταβολομικής ανάλυσης (Viant et al. 2017).

Επιπλέον αν και η επιλογή μεταξύ στοχευμένης ή μη μεταβολομικής ανάλυσης αποτελεί κρίσιμο παράγοντα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά την ανάπτυξη κατάλληλων μεταβολομικών πρωτοκόλλων, για την όσο το δυνατόν ευρεία κάλυψη του μεταβολόματος είναι απαραίτητη η μελέτη τόσο των ενδοκυττάρων όσο και εξωκυττάρων μεταβολιτών (Čuperlović-Culf et al. 2010).

Ιδανικά μια ιδανική μεταβολομική ανάλυση θα πρέπει να είναι σε θέση να δώσει ένα ακαριαίο στιγμιότυπο του συνολικού μεταβολόματος ενός βιολογικού συστήματος (Fiehn 2002). Έτσι πρέπει να αξιοποιεί αναλυτικές τεχνικές και μεθόδους, που χαρακτηρίζονται από υψηλή ανακτησιμότητα και επαναληψιμότητα, υψηλή διαχωριστική ικανότητα και ευαισθησία και να είναι ευρείας - αν όχι καθολικής – εφαρμογής (Fiehn 2001). Στόχος είναι η διασφάλιση μιας σαφούς ποσοτικής ταυτοποίησης των μεταβολιτών που επηρεάστηκαν από την υπό μελέτη συνθήκη και της ενσωμάτωσής τους σε μοντέλα βιοχημικών δικτύων, για την πληρέστερη κατανόηση της μεταβολικής διαταραχής του οργανισμού (Khoo and Al-Rubeai 2007).

Καθώς όμως οι μεταβολικές διεργασίες συνήθως είναι αρκετά γρήγορες, διάρκειας ακόμη και λίγων χιλιοστών του δευτερολέπτου (Gerdtzen et al. 2004), το πρώτο απαραίτητο βήμα είναι η ταχεία παύση της ενζυμικής δραστηριότητας, που μπορεί να επιφέρει ανεπιθύμητες αλλαγές στα επίπεδα των μεταβολιτών, που δε σχετίζονται με την υπό μελέτη συνθήκη. Ο ευκολότερος τρόπος διακοπής της ενζυμικής δραστηριότητας είναι η κατάψυξη σε υγρό άζωτο, υπό την προϋπόθεση ότι δεν επιτρέπεται στα κύτταρα ή στους ιστούς να ξεπαγώσουν έστω εν μέρει, πριν από την εκχύλιση των μεταβολιτών (Viant et al. 2005). Για την εκχύλιση των μεταβολιτών ακολουθεί είτε απευθείας προσθήκη των κυττάρων στο εκχυλιστικό διάλυμα, είτε θραύση τους με εφαρμογή μηχανικής τριβής με χρήση προψυγμένων γουδιών ή κατάλληλων ομογενοποιητών και εφαρμογής υπερήχων, και μετέπειτα έκχυσή τους (Orth et al. 1999, Fiehn et al. 2000).

Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών χρησιμοποιούνται σύγχρονες πλατφόρμες ενόργανης ανάλυσης, οι οποίες ιδανικά πρέπει να χαρακτηρίζονται από την εξαιρετική ευαισθησία και ικανότητα ποσοτικοποίησης διαφορετικών μορίων

διαφορετικών μοριακών τύπων, την ικανότητα χειρισμού μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων, την ικανότητα να ολοκληρώνουν την ανάλυση σε σύντομο χρονικό διάστημα με ικανοποιητική επαναληψιμότητα και της αποφυγής της αποδόμησης των δειγμάτων κατά την διάρκεια των μετρήσεων (Dudzic et al. 2018). Δεδομένου όμως ότι μία μόνο αναλυτική πλατφόρμα δε μπορεί να παράσχει επαρκείς πληροφορίες σε ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών, γίνεται αντιληπτό πως για τη μεταβολομική ανάλυση πρέπει να εφαρμόζονται ολοκληρωμένες αναλυτικές μέθοδοι με εφαρμογή περισσότερων από μία αναλυτικών πλατφορμών. (Biais et al. 2009, Agnolet et al. 2010, Aliferis and Jabaji 2010b). Κυρίως χρησιμοποιούνται είτε συστήματα διασυνδεδεμένα με ανιχνευτές μάζας, όπως αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC/MS), υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC/MS) και LC-Orbitrap/MS, είτε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011, Aliferis and Jabaji 2011) (**Πίνακας 2**).

Πίνακας 2: Συνοπτική καταγραφή των κυριότερων πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC/MS), υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC/MS) και φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Υψηλή ευαισθησία, - Ιδανική για πολύπλοκα δείγματα - Χαμηλό κόστος εξοπλισμού - Ύπαρξη μεταβολομικών βιβλιοθηκών ευρείας εφαρμογής - Σχεδόν τυποποιημένη μεθοδολογία 	<ul style="list-style-type: none"> - Ανάλυση πτητικών μορίων μικρού μοριακού βάρους - Απαραίτητη παραγωγοποίηση στην περίπτωση μη πτητικών μορίων - Απαιτητική προετοιμασία των δειγμάτων

LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Υψηλή ευαισθησία - Υψηλή διακριτική ικανότητα - Εφαρμογή σε μεγάλο εύρος μεταβολιτών διαφορετικών χημικών ομάδων 	<ul style="list-style-type: none"> - Υψηλό κόστος αναλυτικών μηχανημάτων - Μεγάλη επίδραση του υποστρώματος στην ανάλυση, Απαιτητική προετοιμασία των δειγμάτων - Μη ύπαρξη μεταβολομικών βιβλιοθηκών ευρείας εφαρμογής
NMR	<ul style="list-style-type: none"> - Εύκολη προετοιμασία δειγμάτων με χαμηλό κόστος - Δομικές πληροφορίες των μεταβολιτών - Ποσοτική ταυτοποίηση των μεταβολιτών - Ύπαρξη μεταβολομικών βιβλιοθηκών ευρείας εφαρμογής - Σχεδόν τυποποιημένη μεθοδολογία 	<ul style="list-style-type: none"> - Πολύ υψηλό κόστος αναλυτικών μηχανημάτων - Χαμηλή ευαισθησία και διακριτική ικανότητα

Η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC/MS) είναι μια αναλυτική πλατφόρμα, υψηλής ευαισθησίας και επαναληψιμότητας, έχοντας ταυτόχρονα το επιπρόσθετο πλεονέκτημα της ύπαρξης ολοκληρωμένων βάσεων μεταβολιτών, όπως η Golm Metabolome Database (Korcka et al. 2005, Hummel et al. 2013). Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα της ανάλυσης GCMS είναι ότι εφαρμόζεται κυρίως για την ανάλυση θερμικά σταθερών και πτητικών μικρού σχετικά μοριακού βάρους μορίων ή τουλάχιστον μορίων που μέσω παραγωγοποίησης μπορούν να δώσουν εύκολα σταθερά παράγωγα.

Εξαιτίας της ικανότητάς της να διαχωρίζει και να ανιχνεύει ένα διαφορετικό εύρος μεταβολιτών με υψηλή ευαισθησία, η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC/MS) είναι η πλέον διαδεδομένη πλατφόρμα στη μεταβολική ανάλυση (Dunn and Ellis 2005). Όπως και στην αέρια χρωματογραφία, μπορούν να ενσωματωθούν διαφορετικοί ανιχνευτές (LC /MS/MS, LC-TOF/MS, LC-orbitrap/MS) (Shen et al. 2005, Lu et al. 2008,

Zhou et al. 2012). Η μη ανάγκη παραγωγοποίησης των δειγμάτων και η δυνατότητα ανάλυσης ακόμη και μακρομορίων, αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα της υγρής χρωματογραφίας σε σχέση με την αέρια. Αντιθέτως, η μη ύπαρξη μεταβολικών βιβλιοθηκών καθολικής εφαρμογής, παρά τις διαρκείς προσπάθειες, αποτελεί το σημαντικότερο της μειονέκτημα (Noteborn et al. 2000, Vinaixa et al. 2016, Shimizu et al. 2018).

Εναλλακτική της χρήσης συστημάτων που φέρουν ανιχνευτές μάζας, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί μια εξαιρετική πλατφόρμα για μεταβολομικές αναλύσεις, εξαιτίας των ελάχιστων απαιτήσεων της για την προετοιμασία των δειγμάτων και της υψηλής της επαναληψιμότητας (Grivet et al. 2003, Viant et al. 2008, Kim et al. 2011). Το υψηλό όμως κόστος λειτουργίας σε σύγκριση με τα συστήματα μάζας, καθώς και η χαμηλότερη ευαισθησία των NMR ανιχνευτών, τους καθιστά μη κατάλληλους για να χρησιμοποιηθούν αυτόνομα στις μεταβολομικές αναλύσεις. Η NMR όμως παραμένει ένα ισχυρό εργαλείο, ειδικά όταν συνδυάζεται με συστήματα που βασίζονται σε ανιχνευτές μάζας (Aliferis and Jabaji 2010a, Bingol and Brüscheweiler 2017, May 2017, Zampieri et al. 2017, Boiteau et al. 2018, Aliferis 2020).

1.6.3 Προ-επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων μεταβολομικής μεγάλης κλίμακας (large scale data analysis)

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τη μεταβολομική περιλαμβάνουν συνήθως ένα μεγάλο αριθμό μεταβολιτών, με αποτέλεσμα η εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών από τα μεταβολικά προφίλ να καθίσταται δυσχερής. Σε αυτό συμβάλει και η χημική πολυπλοκότητα των αναλυμένων δειγμάτων. Καθίσταται σαφές ότι πρέπει να γίνει μια προσπάθεια για να μειωθεί η πολυπλοκότητα των δεδομένων ώστε να διευκολυνθεί η βιολογική ερμηνεία των δεδομένων (Afendi et al. 2013, Cambiaghi et al. 2016, Gorrochategui et al. 2016, Fenaille et al. 2017, Barupal et al. 2018, Forsberg et al. 2018, Li et al. 2018, Navarro-Muñoz et al. 2020)

Κατά την προεπεξεργασία των δεδομένων, αρχικά για να μπορέσουν να συγκριθούν μεταξύ τους τα δείγματα θα πρέπει να διορθωθεί η γραμμή βάσης των

χρωματογραφημάτων (**baseline correction**) ώστε να αποφευχθούν τυχόν σφάλματα από την εσφαλμένη ποσοτικοποίηση των εκάστοτε κορυφών και ακολουθεί η αποσυνέλιξη των δεδομένων (**data deconvolution**), ώστε να διαχωριστούν τυχόν συνεκλούμενοι μεταβολίτες (Godzien et al. 2015). Έπειτα οι κορυφές των δειγμάτων ευθυγραμμίζονται (**peak alignment**), για να διασφαλιστεί ότι κάθε κορυφή που αντιπροσωπεύει ένα μεταβολικό χαρακτηριστικό ομαδοποιείται στον ίδιο χρόνο σε όλα τα δείγματα (Lange et al. 2008).

Για να μπορέσουν να συγκριθούν τα διαφορετικά μεταβολικά χαρακτηριστικά μεταξύ των δειγμάτων, πραγματοποιείται κανονικοποίηση τους (**data normalization**), κυρίως με διαίρεση της κάθε κορυφής με αυτή ενός εσωτερικού προτύπου ή του συνολικού αθροίσματος των κορυφών ενός φάσματος (Wu and Li 2016). Τέλος για την αντιμετώπιση ανεπιθύμητων βιολογικών ή και πειραματικών διακυμάνσεων, εφαρμόζεται συνήθως μετασχηματισμός των δεδομένων (**data transformation**) κυρίως στον δυαδικό ή δεκαδικό τους αλγόριθμο για να αποκτήσουν κανονική κατανομή, και τέλος κλιμακοποίησή τους (**data scaling**) είτε μοναδιαίας διακύμανσης (**unit variance//autoscale**), είτε Pareto (**Pareto scaling**) (van den Berg et al. 2006).

Είναι προφανές ότι η μεταβολική ανάλυση και ειδικά όταν συνδυάζονται πολλαπλά εργαλεία ανάλυσης, οδηγεί στην παραγωγή ενός τεράστιου όγκου δεδομένων. Η κύρια στατιστική προσέγγιση για την ανάλυση αυτών των δεδομένων είναι η πολυπαραγοντική ανάλυση, που επιτρέπει την ανάλυση περισσότερων των μίας μεταβλητής ταυτόχρονα (Worley and Powers 2013). Η μέθοδος της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (**PCA**) μαζί με την ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (**HCA**) αποτελούν τα κύρια εργαλεία για τον εντοπισμό των τάσεων και ακραίων τιμών σημαντικής στατιστικής σημασίας. Χρησιμοποιούνται συχνά και επιβλεπόμενες πολυπαραγοντικές μέθοδοι όπως η διακρίνουσα ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (**PLS-DA**) και η ορθογώνια-ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (**OPLS-DA**) (Pierens et al. 2005, Boroczky et al. 2006, Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011).

Η παραγωγή του τεράστιου όγκου δεδομένων που προκύπτει από τη μεταβολομική ανάλυση, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού διαθέσιμων βάσεων δεδομένων για την προ-επεξεργασία δεδομένων, τις αναλύσεις, την οπτικοποίηση και τη βιολογική τους ερμηνεία. Μερικές από τις κυριότερες πλατφόρμες και λογισμικά είναι τα

Msdial (Tsugawa et al. 2020), MzMine (Pluskal et al. 2010), Tagfinder (Luedemann et al. 2012), Metalign (Lommen 2009), KNApSAcK (Shinbo et al. 2006), MetaboAnalyst (Chong et al. 2019) και XCMS (Huan et al. 2017). Μερικές από τις δωρεάν διαθέσιμες διαδικτυακές μεταβολικές βάσεις δεδομένων είναι οι BiGG (Schellenberger et al. 2010), BioCyc (Karp et al. 2017), ChemDB (Chen et al. 2005), Golm Metabolome Database (Hummel et al. 2013), Human Metabolome Database (Wishart et al. 2018), KEGG (Kanehisa et al. 2020), MassBank (Horai et al. 2010), και METLIN (Domingo-Almenara et al. 2018), ενώ για την οπτικοποίηση των μεταβολομικών δικτύων αξιοποιούνται λογισμικά όπως τα Vanted (Rohn et al. 2012), Mapman (Usadel et al. 2009) και το Cytoscape (Shannon et al. 2003).

1.6.4 Εφαρμογές μεταβολομικής

1.6.4.1 Γενικές εφαρμογές της μεταβολομικής

Όπως αναλύθηκε προηγουμένως η ειδική συσχέτιση και διασύνδεση της μεταβολομικής με τις υπόλοιπες “ομικές” τεχνικές αποκαλύπτει τις δυνατότητές της. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες περίπου, οπότε και πρωτοεμφανίστηκε, έχει εφαρμοστεί σε σειρά βιολογικών πεδίων, όπως την ιατρική (Lindon et al. 2007, Bouhifd et al. 2013, Ramautar et al. 2013, Anderson and Kodukula 2014, Armitage and Barbas 2014), την φαρμακευτική (Beyoğlu and Idle 2013, Armitage and Barbas 2014, Fillet and Frédérick 2015, Puchades-Carrasco and Pineda-Lucena 2015), τη μικροβιολογία (Aldridge and Rhee 2014, Pinu and Villas-Boas 2017, Pinu et al. 2017, Netzker et al. 2018, Pinu et al. 2018), τη βιοτεχνολογία φυτών (Gomez-Casati et al. 2013, Cox et al. 2014, Shimizu et al. 2018, Watanabe et al. 2018, Aliferis and Bernard-Perron 2020) και την τεχνολογία τροφίμων (Cubero-Leon et al. 2014, Capozzi and Trimigno 2015, Manach et al. 2015, Pinu 2015).

Η μεταβολομική τα τελευταία χρόνια έχει εφαρμοστεί και σε διάφορους τομείς των γεωπονικών επιστημών (Sumner et al. 2003, Dixon et al. 2006, Hegeman 2010, Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011, Aliferis and Jabaji 2011) όπως την ανακάλυψη του μηχανισμού δράσης Φ.Π. (Aranibar et al. 2001, Yi et al. 2007, Yu et al. 2007, Guo et al.

2009, Liu et al. 2010), στην οικοτοξικολογία και εκτίμηση του κινδύνου σε οργανισμούς μη στόχους των Φ.Π. (Ekman et al. 2006, Miller 2007, Van Ravenzwaay et al. 2007, Bundy et al. 2009), στην εις βάθος μελέτη του μεταβολισμού των φυτών ως αντίδραση σε διάφορα βιοτικά ερεθίσματα, (Aliferis and Jabaji 2011), στην εκτίμηση του κινδύνου των γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών (Manetti et al. 2006, García-Villalba et al. 2008, Leon et al. 2009, Zhou et al. 2009) και στη χημειοταξινόμηση των ειδών (Fischedick et al. 2010, Stadler et al. 2010, Aliferis et al. 2013b, Bhatia et al. 2013, Fotakis et al. 2013, He et al. 2014).

1.6.4.2 Αξιολόγηση της επίπτωσης της χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων και του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε αυτά στη μυκοτοξικογόνο ικανότητα των μυκήτων

Η επιμόλυνση των τροφίμων από τις μυκοτοξίνες αποτελεί από τις σημαντικότερες προκλήσεις που αντιμετωπίζει σήμερα ο τομέας των γεωργικών τροφίμων (FAO 2004), απειλώντας τον εφοδιασμό και την ασφάλεια των τροφίμων. Αν και μέτρα όπως, ο βιολογικός έλεγχος και η αποδόμηση των μυκοτοξινών, έχουν προοπτικές στη φυτοπροστασία (Rustom 1997, Mishra and Das 2003, Adebo et al. 2017), η χρήση χημικών Φ.Π., παραμένει η πλέον αποτελεσματική στρατηγική (Brent and Hollomon 2007a). Ωστόσο, οι πληροφορίες σχετικά με την επίδραση των Φ.Π. στη μυκοτοξικογόνο ικανότητα των μυκήτων, αν και σημαντικές, παραμένουν λιγοστές.

Μυκητοκτόνα που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες, όπως τα DMI, οι στρομπιλουρίνες και τα φαινυλοπυρολικά μπορούν να ελέγξουν αποτελεσματικά τους ασπεργίλλους (D'Mello et al. 2000, Markoglou et al. 2008). Ωστόσο, η εφαρμογή τους μπορεί επηρεάζει με ποικίλο τρόπο τη μυκοτοξικογόνο ικανότητά τους. Μελέτες έχουν δείξει τόσο μία αυξημένη βιοσύνθεση μυκοτοξινών έπειτα από εφαρμογές μυκητοκτόνων (Badii and Moss 1988, Bayman and Cotty 1990) και άλλες αντιθέτως σημαντική της μείωση (D'Mello et al. 2000, Mellon and Moreau 2004). Τέτοιες αναφορές είναι ιδιαίτερα κρίσιμες και πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν κατά την έρευνα και ανάπτυξη καινοτόμων Φ.Π., αλλά και στον σωστό σχεδιασμό στρατηγικών φυτοπροστασίας, με στόχο τη μείωση της μόλυνσης των τροφίμων από τις μυκοτοξίνες.

Μια πρόσθετη πρόκληση τα χρήσης Φ.Π. είναι το γεγονός ότι οι μυκοτοξινογόνοι μύκητες, όπως και οι υπόλοιποι μύκητες, μπορούν να αναπτύξουν ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα (D'Mello and Macdonald 1997). Στην περίπτωση τους όμως μια επιπλέον ανησυχία είναι ο αντίκτυπος που θα μπορούσε να έχει αυτή η προσαρμογή στη βιοσύνθεση μυκοτοξινών. Ο κύριος κίνδυνος είναι η εμφάνιση και επικράτηση ανθεκτικών στελεχών υψηλής μυκοτοξιγόνου ικανότητας και αυξημένης προσαρμοστικότητας.

Υπό κατάλληλες εργαστηριακές συνθήκες, τα μυκητοκτόνα miconazole και fenpropimorph αυξάνουν την παραγωγή αφλατοξινών από τον *A. parasiticus* (Felix D'Mello et al. 1998). Στο ίδιο είδος έχει αναφερθεί η ύπαρξη αφλατοξικογόνων και μη-αφλατοξικογόνων στελεχών, ανθεκτικών στο fludioxonil (Markoglou et al. 2008). Σε αυτήν τη μελέτη, τα περισσότερα από τα αφλατοξικογόνα μεταλλαγμένα στελέχη βρέθηκε ότι παράγουν την αφλατοξίνη B1 σε παραπλήσιες ή ακόμη και υψηλότερες συγκεντρώσεις από το μητρικό στέλεχος άγριου τύπου. Σε άλλη μελέτη της ίδιας ομάδας, βρέθηκε ότι τα περισσότερα από τα μεταλλαγμένα *A. parasiticus* με υψηλή ανθεκτικότητα στις ανιλινοπυριμιδίνες, είχαν σημαντικά αυξημένη αφλατοξικογόνο ικανότητα σε σχέση με το μητρικό στέλεχος άγριου τύπου, σε αντίθεση με ένα δεύτερο λιγότερο ανθεκτικό πληθυσμό (Markoglou et al. 2011). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, τέτοια αποτελέσματα είναι ενδεικτικά μιας πιθανής συσχέτισης μεταξύ της φυτοπαθογόνου προσαρμοστικότητας και της αφλατοξικογόνου ικανότητας του *A. parasiticus*. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν σε μελέτες με άλλα μυκοτοξιγόνα είδη όπως το *Fusarium* και το *Penicillium*, στις οποίες η ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα είχε ποικίλες επιπτώσεις στη μυκοτοξικογόνο τους ικανότητα (Zhang et al. 2009, Karaoglanidis et al. 2010, Karaoglanidis et al. 2011, Malandrakis et al. 2013, Malandrakis et al. 2014, Malandrakis et al. 2017, Sevastos et al. 2018).

Αναφορές σαν τις προηγούμενες υπογραμμίζουν τη σημασία της σε βάθος μελέτη της σχέσης μεταξύ της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα Φ.Π. και της μυκοτοξικογόνου ικανότητας. Η μεταβολική μπορεί να διαδραματίσει βασικό ρόλο με τη μελέτη του μεταβολισμού των ασπεργίλλων και της απόκρισης του μονοπατιού της βιοσύνθεσης μυκοτοξινών, έπειτα από επεμβάσεις με διάφορα μυκητοκτόνα ή άλλους βιοδραστικούς παράγοντες. Στόχος είναι η ανακάλυψη τέτοιων βιοδραστικών παραγόντων που εκτός

από την αναστολή της μυκητιακής ανάπτυξης να αναστέλλουν και τη βιοσύνθεση μυκοτοξινών.

Παρά τη σημασία της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα (§1.3), η εφαρμογή της μεταβολικής στη μελέτη των μηχανισμών ανάπτυξης ανθεκτικότητας στους μύκητες, βρίσκεται ακόμη στα αρχικά στάδια. Παρόλα αυτά σύγχρονες μελέτες δείχνουν ότι η μεταβολομική μπορεί να δώσει πληροφορίες που να αξιοποιηθούν στην έρευνα και ανάπτυξη καινοτόμων Φ.Π. (Sevastos et al. 2018), χρησιμοποιώντας είδη ασπεργίλλων ως πρότυπους οργανισμούς (Kalampokis et al. 2018).

1.6.4.3 Χημειοταξινόμια του γένους *Aspergillus*

Η μεταβολομική μπορεί να χρησιμεύσει εναλλακτικά ή συμπληρωματικά με τις παραδοσιακές και καθιερωμένες μοριακές μεθόδους στην ταυτοποίηση των μικροοργανισμών (Tedersoo and Lindahl 2016, Raja et al. 2017). Μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να βασίζεται στις διαφορές τόσο του ενδο- και εξω-μεταβολόματος των υπό μελέτη ειδών μυκήτων, καθώς και στις διατροφικές τους ανάγκες. Ο μεταβολισμός των μυκήτων, εκτός από τον γονότυπό τους μπορεί να επηρεαστεί και από παράγοντες όπως η σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων, το pH, τη θερμοκρασία, το φως, καθώς και τυχόν επίδρασης βιοτικών ή αβιοτικών παραγόντων.

Μέχρι σήμερα, η μεταβολική έχει εφαρμοστεί με αρκετή επιτυχία στη χημειοταξινόμια των μυκήτων (Frisvad et al. 2008, Aliferis et al. 2013a). Μάλιστα ως ορισμός ορίστηκε σε μελέτη που αφορούσε τον κλάδο *Fumigati* του γένους *Aspergillus* (Frisvad and Samson 1990), όπου χρησιμοποιήθηκαν δευτερεύοντες μεταβολίτες για τη διάκριση μεταξύ των διαφόρων ειδών. Για το γένος *Aspergillus*, με τα περισσότερα από 350 είδη και το εκτενές βιοχημικό τους δίκτυο με τη σημαντική εξειδίκευσή του, η χημειοταξινόμια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό των διαφορετικών ειδών (Frisvad and Larsen 2015). Εκτός του ενδο- ή εξω-μεταβολόματος, έχουν χρησιμοποιηθεί και μυκητιακές πτητικές ενώσεις (**volatome**) για χημειοταξονομικούς σκοπούς (Costa et al. 2016). Σε αυτήν τη μελέτη, προτάθηκε ένα σύνολο 16 πτητικών μεταβολιτών που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν περαιτέρω στην ανίχνευση και διάκριση στελεχών *A. niger*.

Μέσω της χημειοταξινομίας εκτός από τη διάκριση των διαφόρων ειδών, μπορούν να αντληθούν πολύτιμες πληροφορίες για τις διαφορές στον μεταβολισμό των ειδών, που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν περαιτέρω στην ανακάλυψη φυσικών προϊόντων ή στη βιοτεχνολογία (Frisvad 2015b, Frisvad 2015a), την κατανόηση της επιγενετικής (Henrikson et al. 2009, Frisvad 2015a) και της επίπτωσης των αντιμυκητιακών επεμβάσεων στη μυκοτοξικογόνο ικανότητα των ασπεργίλλων (Frisvad et al. 2019).

1.7 Βιοπληροφορική και διαδικτυακοί πόροι στην έρευνα των Ασπεργίλλων

Στη μετα-γονιδιωματική εποχή, η μεταβολική έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό, ευέλικτο βιοαναλυτικό εργαλείο που επιτρέπει τη μελέτη του μεταβολισμού των βιολογικών συστημάτων και της απόκρισής του στα διάφορα βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα (Madsen et al. 2010, Mastrangelo et al. 2014). Ωστόσο, μια τέτοια προσπάθεια απαιτεί τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής και μεταβολομικών βάσεων δεδομένων (Shulaev 2006, Manach 2016, Misra and van der Hooft 2016, Vinaixa et al. 2016, Wang, Dash, et al. 2017, Barupal et al. 2018). Η ανάπτυξη και χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής και διαδικτυακών πόρων αποτελεί κρίσιμο συστατικό των μεταβολομικών αναλύσεων.

Η *de novo* κατασκευή μεταβολικών δικτύων που βασίζεται σε διαφορετικά “ομικά” δεδομένα, συμβάλει στην αποκρυπτογράφηση του μεταβολισμού των μυκήτων. Μια τέτοια προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της απόκρισης της βιοσυνθετικής ικανότητας του *A. niger* σε διαφορετικές πηγές άνθρακα (David et al. 2003). Ακολουθώντας μια παρόμοια προσέγγιση, μελετήθηκε η ικανότητα του *A. niger* να βιοσυνθέτει γνωστά αλλά και καινούρια βιοχημικά προϊόντα, μέσω της μεταβολικής μηχανικής (Andersen et al. 2008).

Η Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) είναι ένας πολύτιμος διαδικτυακός πόρος, που διευκολύνει τη δημιουργία μεταβολικών δικτύων και τη βιολογική των δεδομένων, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τη διασύνδεση γονιδίου-πρωτεΐνης-μεταβολίτη (Kanehisa 2016). Η συλλογή βάσεων δεδομένων BioCyc αποτελεί ακόμη ένας σημαντικό πόρο ανοιχτής πρόσβασης για την ερμηνεία των αναλύσεων

μεταβολομικής (Karp et al. 2005). Ακόμη και αυτόνομες πηγές μικρότερης κλίμακας, όπως η βάση δευτερογενών μεταβολιτών ειδών ασπεργίλλων *Aspergillus* Secondary Metabolites (A2MDB) (Vadlapudi et al. 2017), είναι πολύτιμες πηγές πληροφοριών.

Πίνακας 3: Διαθέσιμα βιοπληροφοριακά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή

Resources	Web address
<i>Aspergillus</i> Secondary Metabolites Database (A2MDB)	http://www.iictindia.org/A2MDB
KEGG (7 species)	https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?category=Fungi
BIOCYC (76 species)	https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=ORGANISM&object=TAX-5052
The <i>Aspergillus</i> Genome Database (AspGD)	http://www.aspgd.org/
FungiDB	https://fungidb.org/fungidb/
Mycocosm (JGI)	https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home
Fungal Genetics Stock Center	http://www.fgsc.net/
Mycocosm	https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm/home
Biomodels	https://www.ebi.ac.uk/biomodels/
Pathway commons	http://www.pathwaycommons.org/
Omicsnet	https://www.omicsnet.ca/faces/home.xhtml
MassBank of North America	http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/
Massbank	http://massbank.jp/
Golm Metabolome Database	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/
Uniprot	https://www.uniprot.org/
Computational Mass Spectrometry (CompMS)	http://prime.psc.riken.jp/compms/index.html
MZmine 2	http://mzmine.github.io/
R	https://www.r-project.org/
Transporter Classification Database	http://www.tcdb.org/

TransportDB

<http://www.membranetransport.org/transportDB2/index.html>

**Orientations of Proteins in
Membranes**

<https://opm.phar.umich.edu/>

2 Υλικά και Μεθοδολογία

2.1 Στελέχη *Aspergillus* sp.

Τα μυκητιακά στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

***Aspergillus flavus*:** Χαρακτηρισμένο στέλεχος φυσικού τύπου *A. flavus*, από την NRRL συλλογή με κωδικό NRRL-3357

***Aspergillus niger*:** Χαρακτηρισμένο στέλεχος φυσικού τύπου *A. niger*, από την NRRL συλλογή με κωδικό NRRL-326

***Aspergillus ochraceus*:** Χαρακτηρισμένο στέλεχος φυσικού τύπου *A. ochraceus*, από την NRRL συλλογή με κωδικό NRRL-5175

***Aspergillus parasiticus*:** Χαρακτηρισμένο στέλεχος φυσικού τύπου *A. flavus*, από την NRRL συλλογή με κωδικό ATCC-15517

FGSC A4: Χαρακτηρισμένο και αλληλουχημένο στέλεχος φυσικού τύπου *A. nidulans* από τη συλλογή του Fungal Genetics Stock Culture.

wt (*pabaA1*): Στέλεχος *A. nidulans* φυσικού τύπου αυξότροφο για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ, από τη συλλογή του Fungal Genetics Stock Culture.

Δ7 (*ΔuapA ΔuapC::AfpYrG ΔazgA ΔfcyB::argB ΔfurD::riboB ΔfurA::riboB ΔcntA::riboB pantoB100 pabaA1*): Στέλεχος *A. nidulans* με διαγεγραμμένα τα γονίδια που κωδικοποιούν τους 7 μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρινών, πυριμιδινών και αλλαντοΐνης). Αυξότροφο για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ και παντοθενικό οξύ.

Δ7::*uapA*⁺ (*ΔuapA ΔuapC::AfpYrG ΔazgA ΔfcyB::argB ΔfurD::riboB ΔfurA::riboB ΔcntA::riboB pantoB100 pabaA1 [pBS 510p uapA-GFP argB]*): Στέλεχος με υπερεκφρασμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον UapA μεταφορέα. Αυξότροφο για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ και παντοθενικό οξύ.

Δ7::*uapC*⁺ (*ΔuapA ΔuapC::AfpYrG ΔazgA ΔfcyB::argB ΔfurD::riboB ΔfurA::riboB ΔcntA::riboB pantoB100 pabaA1 [pBS uapC-GFP]*): Στέλεχος με υπερεκφρασμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον UapC μεταφορέα. Αυξότροφο για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ και παντοθενικό οξύ.

Δ7::*furA*⁺ (*ΔuapA ΔuapC::AfpYrG ΔazgA ΔfcyB::argB ΔfurD::riboB ΔfurA::riboB ΔcntA::riboB pantoB100 pabaA1 [pGEM-gpdAp furA-GFP pantoB+]*): Στέλεχος με υπερεκφρασμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον FurA μεταφορέα. Αυξότροφο για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ.

Δ7::furD⁺ (*ΔuapA ΔuapC::AfpyrG ΔazgA ΔfcyB::argB ΔfurD::riboB ΔfurA::riboB ΔcntA::riboB pantoB100 pabaA1 [pGEM-gpdAp-furD pantoB+]*): Στέλεχος με υπερεκφρασμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον FurD μεταφορέα. Αυξότροφο για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ.

Δ7:: fcyB⁺ (*ΔuapA ΔuapC::AfpyrG ΔazgA ΔfcyB::argB ΔfurD::riboB ΔfurA::riboB ΔcntA::riboB pantoB100 pabaA1 [exp fcyB paba]*): Στέλεχος με υπερεκφρασμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον FcyB μεταφορέα. Αυξότροφο για παντοθενικό οξύ.

Δ7::azgA⁺ (*ΔuapA ΔuapC::AfpyrG ΔazgA ΔfcyB::argB ΔfurD::riboB ΔfurA::riboB ΔcntA::riboB pantoB100 pabaA1 [pBS 510p azgA argB]*): Στέλεχος με υπερεκφρασμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον AzgA μεταφορέα. Αυξότροφο για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ και παντοθενικό οξύ.

Δ7::cntA⁺ (*ΔuapA ΔuapC::AfpyrG ΔazgA ΔfcyB::argB ΔfurD::riboB ΔfurA::riboB ΔcntA::riboB pantoB100 pabaA1 [pGEM-gpdAp-cntA pantoB+]*): Στέλεχος με υπερεκφρασμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον CntA μεταφορέα. Αυξότροφο για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ.

TNO2A7 (*ΔnkuA::argB pyroA4 riboB2 pyrG89*): Στέλεχος με έλλειψη του γονιδίου της NkuA DNA ελικάσης. Αυξότροφο για πυριδοξίνη, ριβοφλαβίνη και ουρακίλη-ουριδίνη.

TNO (*ΔfcyD::AFpyrG ΔnkuA::argB pyroA4 riboB2 pyrG89*). Κατασκευάστηκε με ομόλογη ενσωμάτωση στο TNO2A7 στέλεχος του *AFpyrG* στο *fcyD*. Αυξότροφο για πυριδοξίνη και ριβοφλαβίνη

AQYΔ/AN10902Δ (*ΔAN10902::AFpyrG ΔnkuA::argB pyroA4 riboB2 pyrG89 [pGEM-T]*): Κατασκευάστηκε με ολική διαγραφή του γονιδίου *AN10902* που κωδικοποιεί ακουαπορίνη του *A. nidulans*, χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος TNO2A7. Αυξότροφο για πυριδοξίνη, και ριβοφλαβίνη

atrBΔ/AN8489Δ (*atrBΔ(AN8489Δ)::AFpyrG ΔnkuA::argB pyroA4 riboB2 pyrG89 [pGEM-T]*): Κατασκευάστηκε με μερική διαγραφή του γονιδίου *atrB*, που κωδικοποιεί τον AtrB ABC μεταφορέα του *A. nidulans*, χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος TNO2A7. Αυξότροφο για πυριδοξίνη, και ριβοφλαβίνη

atrDΔ/AN2300Δ (*atrDΔ(AN2300Δ)::AFpyrG ΔnkuA::argB pyroA4 riboB2 pyrG89 [pGEM-T]*): Κατασκευάστηκε με μερική διαγραφή του γονιδίου *atrD*, που κωδικοποιεί τον AtrD ABC μεταφορέα του *A. nidulans*, χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος TNO2A7. Αυξότροφο για πυριδοξίνη, και ριβοφλαβίνη

atrBΔ atrDΔ (*atrBΔ(AN8489Δ)::AFpyrG atrDΔ(AN2300Δ)::AFpyrG nkuAΔ::argB pyroA4 riboB2 pyrG89 [pGEM-T]*). Κατασκευάστηκε με μερική διαγραφή του γονιδίου *atrD*, που κωδικοποιεί τον AtrD ABC μεταφορέα του *A. nidulans*, χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος *ΔatrB/ΔAN8489*. Αυξότροφο για πυριδοξίνη, και ριβοφλαβίνη

gpdA-atrB(AN8489) (*gpdA::atrB(AN8489)::AFpyrG ΔnkuA::argB pyrG89 riboB2 pyroA4*). Κατασκευάστηκε με ένθεση του GpdA εκκινήτη στο γονίδιο *atrB*, χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος TNO2A7. Αυξότροφο για πυριδοξίνη, και ριβοφλαβίνη.

gpdA-atrD(AN2300) (*gpdA::atrD(AN2300)::AFpyrG ΔnkuA::argB pyrG89 riboB2 pyroA4*). Κατασκευάστηκε με ένθεση του GpdA εκκινήτη στο γονίδιο *atrD*, χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος TNO2A7. Αυξότροφο για πυριδοξίνη, και ριβοφλαβίνη.

gpdA-atrB(AN8489) gpdA-atrD(AN2300) (*gpdA::atrB(AN8489)::AFpyrG gpdA::atrD(AN2300)::AFpyrG ΔnkuA::argB pyrG89 riboB2 pyroA4*) Κατασκευάστηκε με ένθεση του GpdA εκκινήτη στο γονίδιο *atrD*, χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος *gpdA-atrB(AN8489)*. Αυξότροφο για πυριδοξίνη, και ριβοφλαβίνη

Η μεταλλαγή *rabaA1* προκαλεί αυξοτροφία για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ, λόγω απώλειας λειτουργίας της συνθετάσης του παρα-αμινο-βενζοϊκού οξέος (Vlanti and Diallinas 2008). Η μεταλλαγή *pantoB100* προκαλεί αυξοτροφία για παντοθενικό οξύ, λόγω μεταλλαγής απώλειας λειτουργίας της συνθετάσης του παντοθενικού οξέος (Kurtov et al. 1999). Η μεταλλαγή *pyroA4* προκαλεί αυξοτροφία για πυριδοξίνη, λόγω μεταλλαγής απώλειας λειτουργίας του ενζύμου PyroA (Osmani et al. 1999). Η μεταλλαγή *riboB2*

προκαλεί αυξοτροφία για ριβοφλαβίνη, λόγω μεταλλαγής απώλειας λειτουργείας της GTP κυκλουδρολάσης (Oakley, Weil, et al. 1987, Nayak et al. 2006). Η μεταλλαγή *gyrG89* προκαλεί αυξοτροφία για ουρακίλη-ουριδίνη, λόγω μεταλλαγής απώλειας του ενζύμου της αποκαρβοξυλάσης της 5-φωσφορικής οροτιδίνης (Oakley, Rinehart, et al. 1987). Η μεταλλαγή *argB2* οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου της τρανσκαρβαμοϋλάσης της ορνιθίνης (Buxton et al. 1985).

Η κατασκευή των στελεχών περιγράφεται σε ακόλουθο κεφάλαιο (§2.7.9).

2.2 Βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli*

Στα πειράματα κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5a του βακτηρίου *Escherichia coli* με γονότυπο [F- (Φ80d *lacZΔM15*) Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*rk⁻*, *mk⁺*) *supE44*, *thi1*, *gyrA*, *relA1*] (Diallinas et al. 1995)

2.3 Θρεπτικά Υποστρώματα

2.3.1 Θρεπτικά υποστρώματα μυκήτων

Οι καλλιέργειες των μυκήτων πραγματοποιήθηκαν σε Πλήρη (CM) και Ελάχιστα (MM) Θρεπτικά Υποστρώματα, με συγκεντρώσεις πηγών άνθρακα και αζώτου, καθώς και σε συνθήκες ανάπτυξης, όπως έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Cove 1966, Scazzocchio and Arst 1978). Η προσθήκη των απαραίτητων αυξοτροφιών έγινε βάσει των ενδεδειγμένων συγκεντρώσεων από το Fungal Genetic Stock Center (www.fgsc.net). Η σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων περιγράφεται στους **πίνακες 4-7**.

Πίνακας 4: Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

	Πλήρες θρεπτικό Υπόστρωμα (1 L)	Ελάχιστο Θρεπτικό Υπόστρωμα (1 L)	Ισο-ωσμωτικό Ελάχιστο Υπόστρωμα (1 L)
H ₂ O distilled	975 mL	980 mL	980 mL
Δ/μα Αλάτων	20 mL	20 mL	20 mL
Δ/μα Βιταμινών	5 mL	-	-
Casamino acids	1 g	-	-
Yeast extract	1 g	-	-
Bactopeptone	2 g	-	-
D-Γλυκόζη	10 g	10 g	10 g
Σακχαρόζη	-	-	342.3 g

Πίνακας 5: Σύσταση κλασικού και τροποποιημένου διαλύματος αλάτων που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων

	Διάλυμα Αλάτων (1 L)	Τροποποιημένο Διάλυμα Αλάτων δίχως KH_2PO_4 (1 L)
H ₂ O distilled	948 mL	948 mL
KCl	26 g	26 g
MgSO ₄	26 g	26 g
KH ₂ PO ₄	76 g	
Χλωροφόρμιο	2 mL	2 mL
Δ/μα Ιχνοστοιχείων	50 mL	50 mL

Πίνακας 6: Σύσταση διαλυμάτων βιταμινών και ιχνοστοιχείων που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων

Διάλυμα Βιταμινών (1 L)		Διάλυμα Ιχνοστοιχείων (1 L)		
p-Aminobenzoic acid (<i>paba</i>)	20 mg	Na ₂ B ₄ O ₇ 10H ₂ O		40 mg
Aneurin (<i>vitamin b1</i>)	50 mg	CuSO ₄ 5H ₂ O		400 mg
Biotin (<i>bio</i>)	10 ml	FeO ₄ S 4H ₂ O		714 mg
Nicotinic acid	100 mg	MnSO ₄ 1H ₂ O		728 mg
Pantothenic acid (<i>panto</i>)	200 mg	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O		800 mg
Pyridoxine (<i>pyro</i>)	50 mg	ZnSO ₄ 7H ₂ O		8 g
Riboflavin (<i>ribo</i>)	100 mg			
H ₂ O distilled	1 L			1 L

Πίνακας 7: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 0.1M για τη ρύθμιση του pH στο τροποποιημένο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα

Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικού Νατρίου 0.1M

pH	1M Na ₂ HPO ₄ (mL)	1M NaH ₂ PO ₄ (mL)
5.8	7.9	92.1
6	12	88
6.2	17.8	82.2
6.4	25.5	74.5
6.6	35.2	64.8
6.8	46.3	53.7
7	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6
7.6	84.5	15.5
7.8	89.6	10.4
8	93.2	6.8

Η προσθήκη των απαραίτητων για κάθε πείραμα αυξοτροφιών στα ελάχιστα θρεπτικά υποστρώματα, πραγματοποιήθηκε στις προβλεπόμενες συγκεντρώσεις που αναγράφονται στη σύσταση του διαλύματος βιταμινών (**Πίνακας 6**). Στα στερεά πλήρη και ελάχιστα θρεπτικά υποστρώματα πραγματοποιήθηκε προσθήκη άγαρ 2% (w/v).

Η αποστείρωση των θρεπτικών έγινε με χρήση κλιβάνου αποστείρωσης στους 121°C για 15 λεπτά. Η προσαρμογή του pH έγινε με χρήση διαλύματος NaOH (3 N) και HCl (1 N) στις κατάλληλες για κάθε πείραμα τιμές. Εξαιτίας της σημαντικής επίδρασης του pH στη λειτουργία των μεταφορέων πουρινών πυριμιδινών και ουρακίλης, στα συγκριτικά πειράματα των στελεχών που σχετίζονται με τους συγκεκριμένους μεταφορείς, χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένο διάλυμα αλάτων (**Πίνακες 4, 5**), και η προσαρμογή του pH πραγματοποιήθηκε με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 0.1 M (**Πίνακας 7**), στις κατάλληλες για κάθε πείραμα τιμές.

Η σύσταση των ελάχιστων θρεπτικών υποστρωμάτων συμπληρώθηκε με την προσθήκη πηγής αζώτου, όπως 10 mM νιτρικού νατρίου [Sodium nitrate (NaNO_3)], 10 mM τρυγικού αμμωνίου [Ammonium tartrate ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$)] ή 5 mM ουρίας (NH_4) σύμφωνα με τις συστάσεις της Fungal Genetic Stock Center (www.fgsc.net). Η χρήση νιτρικού νατρίου ως πηγή αζώτου πραγματοποιήθηκε στα συγκριτικά πειράματα των στελεχών που εκφράζουν τους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνες, πυριμιδίνες και ουρακίλη) ($\Delta 7$ και $\Delta 7^+$ στελέχη), καθώς είναι γνωστό ότι η παρουσία αμμωνιακών καταστέλλει τη λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα AreA, που ελέγχει την έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Στα υπόλοιπα πειράματα καθώς και στη διατήρηση των στελεχών χρησιμοποιήθηκε τρυγικό αμμώνιο.

2.3.2 Θρεπτικά υποστρώματα βακτηρίων

Η καλλιέργεια των βακτηρίων του στελέχους DH5a έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani (LB) (Σύσταση στο λίτρο: Bacto Tryptone 10 g, NaCl 10 g, BactoYeast Extract 5 g, pH 7.0) (Sambrook et al. 1989). Η προσαρμογή του pH έγινε με διαλύματα NaOH (1 N) και HCl (1 N). Σε περιπτώσεις παρασκευής στερεού θρεπτικού υποστρώματος, προστέθηκε 1.5% άγαρ μετά την προσαρμογή του pH. Στις περιπτώσεις τις οποίες χρειάστηκε η προσθήκη αντιβιοτικού επιλογής, σε υγρό ή στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Sambrook et al. 1989). Τα βακτηριακά στελέχη διατηρήθηκαν στους -80°C σε γλυκερόλη: αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1:1, v/v)

2.4 Συντήρηση μυκητιακών στελεχών

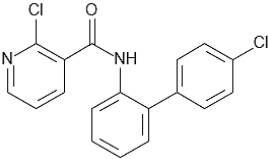
Για τη μακροχρόνια διατήρηση των διαφόρων μυκητιακών στελεχών συλλέχθηκαν φρέσκα κονιδιοσπόρια σε σωλήνα τύπου Eppendorf (1.5 mL) που περιέχει 0.7 mL αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂PO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, H₂O distilled 1 L, pH 7.4 με 1 N HCl) και ίσο όγκο 100% αποστειρωμένης γλυκερόλης. Έπειτα από καλή ανάδευση τα εναιωρήματα αποθηκευτήκαν στους -80°C.

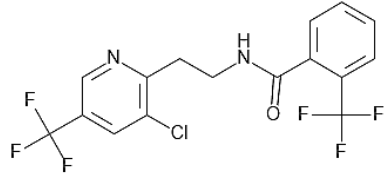
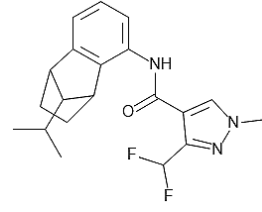
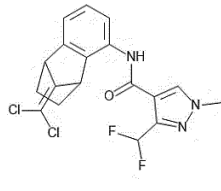
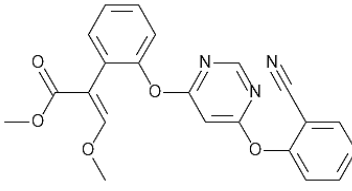
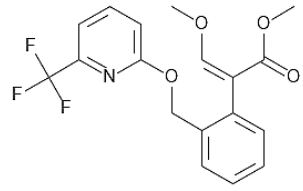
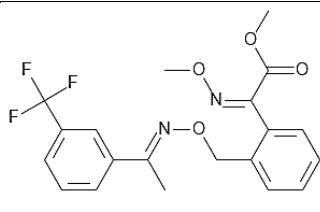
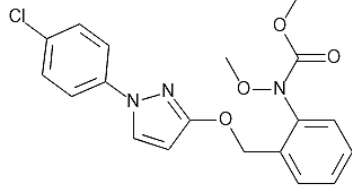
2.5 Δραστικές ουσίες μυκητοκτόνων

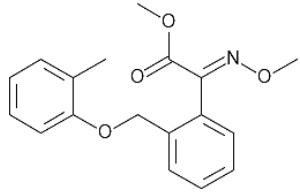
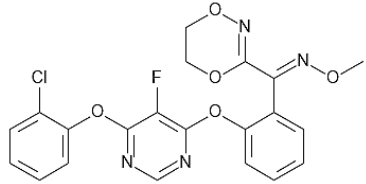
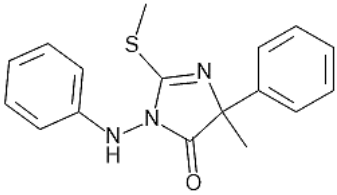
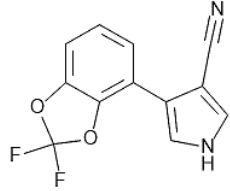
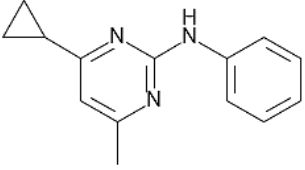
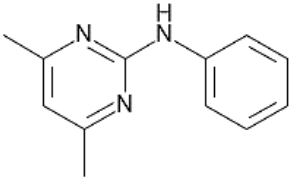
Όλες οι δ.ο. που χρησιμοποιήθηκαν στην Διατριβή, ήταν της υψηλότερης δυνατής καθαρότητας (*analytical grade*). Η ονομασία της δ.ο., ο στερεοχημικός της τύπος, η χημική ομάδα στην οποία ανήκουν και η εταιρία προέλευσης, των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, παρουσιάζονται στον **πίνακα 8**.

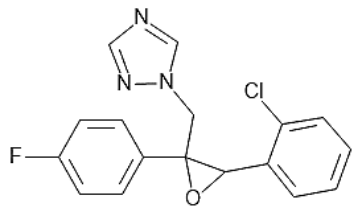
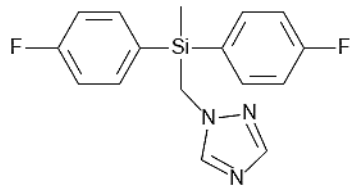
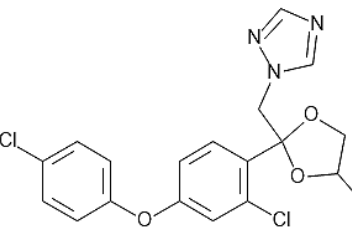
Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των αρχικών διαλυμάτων (*working stock solutions*), ήταν υψηλής καθαρότητας (GC/MS grade, 99.9%), σε συγκεντρώσεις 10, 100, 1000 και 10.000 μg mL⁻¹ και αποθηκεύονταν στους -20°C έως τη χρήση τους. Η τελική συγκέντρωση των διαλυτών στο υλικό καλλιέργειας δεν ξεπέρασε το 1% (v/v) και το ίδιο ποσοστό προσθέτονταν και στο μάρτυρα (*control*)

Πίνακας 8: Κατάλογος με τις δ.ο. που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή

Δραστική	Εταιρεία	Χημικός τύπος
Σύμπλοκο II της αναπνευστικής αλυσίδας		
SDHI's (Παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος)		
Boscalid (99% w/w)	BASF	

Fluopyram (99% w/w)	Bayer CropScience AG	
Isopyrazam (99.4% w/w)	Syngenta	
Benzovindiflupyr (99% w/w)	Syngenta	
Σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας		
QoI's (Παρεμποδιστές του κυτοχρώματος <i>bc1</i>, στην Qo θέση)		
Υπερομάδα τύπου Στρομπιλουρίνης		
Azoxystrobin (99.7% w/w)	Syngenta	
Picoxystrobin (99,9% w/w)	Syngenta	
Trifloxystrobin (99.9% w/w)	Bayer CropScience AG	
Pyraclostrobin	BASF	

Kresoxym-methyl (92% w/w)	BASF	
Fluoxastrobin (99% w/w)	Bayer CropScience AG	
Αζολόνες		
Fenamidone (99% w/w)	Bayer CropScience AG	
Αποδιοργανωτές κυτταρικών μεμβρανών		
Φαινυλοπυρρολικά (Protein kinases inhibitors)		
Fludioxonil (99% w/w)	Syngenta	
Ανιλινοπυριμιδίνες (Παρεμποδιστές Μεθιονίνης)		
Cyprodinil (99% w/w)	Sigma Aldrich	
Pyrimethanil (99% w/w)	Sigma Aldrich	
Παρεμποδιστές Βιοσύνθεσης Στερολών		

DMI's (Παρεμποδιστές της απομεθυλάσης του C14)		
Epoxiconazole (95.5% w/w)	BASF	
Flusilazole (99% w/w)	Du-Pont	
Difenoconazole (99.3% w/w)	Syngenta	

2.6 Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **πίνακα 9**

Πίνακας 9: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται αλληλουχία υποβοήθησης (CGCG) και με μπλε η αλληλουχία αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων. Με το σύμβολο “|” δίνεται το σημείο τομής των ενζύμων

	Εκκινητής	Αλληλουχία
1	AN8489 5' check	CCTCTGGAATAAACCTACGCCTG
2	AN8489 5' ApaI F	CGCGGGGCC CCCGTATAGTTGCATCTGGCTGCGG
3	AN8489 5' SpeI R	CGCGA CTAGTGGTGGCGTACTAATCACAAAGCCGG

4	<i>AN8489</i> ORF3' SpeI F	CGCGA CTAGTGGTTTGGAAAGCTTCTCCAGAGC
5	<i>AN8489</i> 3' NotI R:	CGCGGC GGCCGCATCCTTCCCGTGCTATGACTCGC
6	<i>AN2300</i> 5' check:	CCGCACAGGTTACCGAAACCGTG
7	<i>AN2300</i> 5' ApaI F	CGCGGGGCC CCTGCGTGTCAGCTGAATCTCACC
8	<i>AN2300</i> 5' SpeI R	CGCGA CTAGTGCTAAGCCCCTGCCGAATTAGGAAAC
9	<i>AN2300</i> ORF3' SpeI F	CGCGA CTAGTGACGACTGTTCGACCGAAAGCCAC
10	<i>AN2300</i> 3' NotI R	CGCGGC GGCCGCGAAGCTCAAATTGCCGACATACGGG
11	<i>AFpyrG</i> SpeI F:	CGCGA CTAGTGCCTCAAACAATGCTCTTCACCCTC
12	<i>AFpyrG</i> SpeI R	CGCGA CTAGTCTGTCTGAGAGGAGGCACTGATG
13	<i>AFpyrG</i> XbaI F	CGCGT CTAGAGCCTCAAACAATGCTCTTCACCC
14	GAGFP SpeIF	GCGCAC TAGTGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAG
15	<i>AN10902</i> 5' ApaI F	CGCGGGGCC CCGCCATAGGGATGGGTGAGCTTG
16	<i>AN10902</i> 5' SpeI R	CGCGA CTAGTCCAACTCTTCGCCATGGCTCTGCC
17	<i>AN10902</i> 5' ApaI F2	GAAGAGTTGGCGGGCC CGATCGATG
18	<i>AN10902</i> ORFs SpeI R	CGCGA CTAGTCACCTGCTCTTCTCCCGGCGGC
19	<i>AN10902</i> 3' SpeI F	CGCGA CTAGTCAGGTGTAGCTGCGTGATCGACTG
20	<i>AN10902</i> 3' NotI R	CGCGGC GGCCGCCCTCGCTCATATGCACGCAGGAATC
21	<i>gpdA1000</i> XbaI F	CGCGT CTAGAGGTTGACCGGTGCCTGGATC
22	<i>gpdA1000</i> SpeI R	CGGCA CTAGTCATGATGTCTGCTCAAGCGGGGTAG

2.7 Μέθοδοι γενετικής μηχανικής

2.7.1 Προετοιμασία βακτηρίων δεκτών πλασμιδίων

Για την προετοιμασία δεκτικών βακτηρικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένο πρωτόκολλο (Sambrook et al. 1989). Απομονωμένη αποικία του βακτηρίου *E. coli* (DH5a) χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος Luria Bertoni (LB). Ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C με ανάδευση στις 220 rpm. Από την πυκνή καλλιέργεια που προέκυψε, χρησιμοποιήθηκαν 0.5 mL για τον εμβολιασμό 400 mL φρέσκου υγρού LB. Η καινούρια καλλιέργεια επωάστηκε στους 37°C υπό ανάδευση στις 260 rpm, έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας φτάσει το 0.45-0.55 σε μήκος κύματος 600 nm.

Έπειτα τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 6.000 rpm για 5 λεπτά υπό θερμοκρασία 4°C. Απερρίφθη το υπερκείμενο και επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα σε 160 mL ψυχρού διαλύματος TFB I (30 mM CH₃COOK; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl₂; 15% γλυκερόλη, pH 5,8 με 1 M CH₃COOH). Το αιώρημα επωάστηκε για 5 λεπτά στον πάγο και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 6.000 rpm για 5 λεπτά υπό θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απερρίφθη και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 20 mL ψυχρού διαλύματος TFB II (10 mM MOPS pH 6.5; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl₂; 15% γλυκερόλη, pH 6.5 με 1 M KOH). Το εναιώρημα επωάστηκε για 15-60 λεπτά στον πάγο και διαμοιράστηκε σε φιαλίδια τύπου Eppendorf (1.5 mL). Για τη μακροχρόνια αποθήκευσή τους, τα φιαλίδια αποθηκεύτηκαν στους -80°C, όπου μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον έξι μήνες, δίχως να χάσουν τη δεκτικότητά τους.

2.7.2 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Για τον μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E. coli*, χρησιμοποιήθηκε παραλλαγή του πρωτοκόλλου όπως αναφέρεται στους Sambrook et al. 1989. Συγκεκριμένα σε 200 μL βακτηριακών κυττάρων προστέθηκε 0.01-0.5 μg πλασμιδιακού DNA. Το μίγμα αναδεύτηκε ελαφρώς και επωάστηκε για περίπου 20-30 λεπτά στον πάγο. Για τη χαλάρωση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων και τη διευκόλυνση της εισαγωγής των πλασμιδίων, ακολούθησε θερμικό σοκ των δεκτικών κυττάρων, με απότομη μεταφορά τους από τον πάγο στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα και απότομη επαναφορά τους στον πάγο, όπου και παρέμειναν για 2 λεπτά. Εν συνεχεία τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα στους 37°C σε 1 mL υγρού θρεπτικού LB, ώστε να επανέλθουν στους κανονικούς ρυθμούς ανάπτυξης και να εκφραστεί το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο εκάστοτε αντιβιοτικό επιλογής. Για να επιλεχθούν μόνο τα βακτήρια που προέρχονται από τα μετασχηματισμένα κύτταρα, και όχι όσα προήλθαν από τη διαίρεσή τους, ο χρόνος επώασης στο LB δεν πρέπει να ξεπερνά τη 1 ώρα. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση και επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB, που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 16 ώρες.

2.7.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα *E. coli* υψηλής καθαρότητας, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως περιγράφεται στο kit Nucleospin της εταιρείας Macherey-Nagel. Για την απομόνωση μικρής συγκέντρωσης και μέτριας καθαρότητας πλασμιδιακού DNA, για διαγνωστικές εφαρμογές χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο πρωτόκολλο που αποτελεί παραλλαγή προηγούμενου (Sambrook et al. 1989).

Συλλέχθηκε 1 mL υγρής κορεσμένης καλλιέργειας βακτηρίων μετασχηματισμένων με πλασμίδιο σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf (1.5 mL) και φυγοκεντρήθηκε στις 12.0000 rpm για 1 λεπτό. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 200 μL διαλύματος 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA. Έπειτα από πολύ καλή ανάδευση έως

της πλήρους εναιωρηματοποίησης των κυτάρων, προστέθηκαν 200 μL λυτικού διαλύματος (200 mM NaOH, 1% SDS) με ελαφρά ανάδευση. Σε αυτό το στάδιο το κυτταρικό τοίχωμα και οι μεμβράνες διαρρηγνύονται και εξαιτίας του βασικού pH το DNA μετουσιώνεται. Ταυτόχρονα εξαιτίας της ύπαρξης του χηλικού παράγοντα EDTA και της απουσίας ελεύθερων κατιόντων (Ca^{2+} , Mg^{2+}) η δράση των νουκλεασών αναστέλλεται. Ακολούθησε προσθήκη 200 μL διαλύματος ουδετεροποίησης (3 M CH_3COONa pH 5.5), που προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών. Ταυτόχρονα η απότομη αλλαγή του pH οδηγεί στον βίαιο σχηματισμό διπλών δεσμών στο DNA. Σε αυτό το στάδιο μόνο μικρού μήκους DNA, όπως τα πλασμίδια είναι σε θέση να αναδιαταχθεί σωστά. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 12.000 rpm για 5 λεπτά.

Έπειτα το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούριο φιαλίδιο τύπου Eppendorf (1.5 mL) και προστέθηκαν 500 μL ισοπροπανόλης. Έπειτα από ελαφρά ανάδευση, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 rpm για 5 λεπτά, ώστε να κατακρημνισθεί το πλασμιδιακό DNA. Απερρίφθη η ισοπροπανόλη και το ίζημα εκπλύθηκε με προσθήκη 200 μL αιθανόλης 70% (v/v) και ελαφρά ανακίνηση. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 12.000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα το υπερκείμενο απερρίφθη και το φιαλίδιο παρέμεινε ανοιχτό στους 50°C, έως της πλήρους εξάτμισης της αιθανόλης. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μL ddH₂O που περιείχε RNAase (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) και επωάστηκε για 30 λεπτά στους 37°C.

2.7.4 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA του *A. nidulans*

Για την απομόνωση μικρής συγκέντρωσης γονιδιωματικού DNA, χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο που αποτελεί παραλλαγή αυτού που περιγράφεται στο Fungal Genetic Stock Center (www.fgsc.net).

Το εκάστοτε στέλεχος επωάστηκε για 3-4 ημέρες σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα στους 37°C. Τα σχηματισμένα κονιδιοσπόρια συλλέχθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα Tween80 0.01 % (v/v) και χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 25 mL υγρής καλλιέργειας ελάχιστου θρεπτικού ($\sim 3 \times 10^9$ κονιδιοσπόρια σε 10 mL tween) εμπλουτισμένης με 5 mM ουρία και τις απαραίτητες αυξοτροφίες. Ακολούθησε επώαση για περίπου 16 ώρες στους 25°C και 140 rpm, ώστε να δημιουργηθεί νέο μυκήλιο. Το

μυκήλιο φιλτραρίστηκε με ειδική γάζα Blutex και στέγνωσε μέσω πίεσης με διηθητικό χαρτί. Βυθίστηκε σε υγρό άζωτο και θρυμματίστηκε σε αποστειρωμένο μικρογουδί. 200 mg από το θρυμματισμένο μυκήλιο μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf (1.5 mL) και προστέθηκαν 800 μ L διαλύματος απομόνωσης DNA (0.2 M Tris-HCl pH 8; 1% SDS; 1 mM EDTA pH 8). Το παρασκεύασμα αναδεύθηκε καλά μέχρι να ομογενοποιηθεί και επωάστηκε για περίπου 20 λεπτά στον πάγο.

Το παρασκεύασμα καθαρίστηκε με φαινόλη και χλωροφόρμιο. Συγκεκριμένα προστέθηκαν 800 μ L ουδέτερης φαινόλης (pH 7-7.5). Ακολούθησε καλή ανάδευση για περίπου 1 λεπτό και φυγοκέντριση στις 12.000 rpm για 5 λεπτά. Με το πέρας της φυγοκέντρισης σχηματίστηκε μία οργανική φάση που περιείχε φαινόλες, πρωτεΐνες και υπολείμματα κυτταρικών τοιχωμάτων και μία υδατική που περιείχε DNA, RNA, ρυθμιστικό διάλυμα και κάποιες πρωτεΐνες. Από τις δύο μεταφέρθηκε πολύ προσεκτικά η ανώτερη υδατική σε καινούριο φιαλίδιο τύπου Eppendorf (1.5 mL). Εν συνεχεία προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου (800 μ L) και ακολούθησε ανάδευση (περίπου 1 λεπτό) και φυγοκέντριση στις 12.000 rpm για 5 λεπτά, όπως προηγουμένως.

Από τις δύο φάσεις, συλλέχθηκε η ανώτερη σε νέο φιαλίδιο τύπου Eppendorf (1.5 mL) και ακολούθησε η κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 1/10 (v/v) του όγκου οξικού νατρίου (CH_3COONa) 3 M pH 5.3 και ίσου όγκου ισοπροπανόλης. Το αιώρημα ανακινήθηκε ομαλά με το χέρι και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 12.000 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απερρίφθη, στο ίζημα προστέθηκαν 200 μ L αιθανόλης 70% και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 12.000 rpm για 5 λεπτά. Η αιθανόλη εξατμίστηκε έως ξηρού στους 50°C για περίπου 5 - 10 λεπτά (max). Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 50 μ L dH_2O που περιείχε RNase (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

2.7.5 Μετασχηματισμός στελεχών *A. nidulans*

Για τον μετασχηματισμό των στελεχών του *A. nidulans* εφαρμόστηκε τροποποιημένη μέθοδος του μετασχηματισμού πρωτοπλαστών από κονιδιοσπόρια όπως περιγράφεται από τους (Koukaki et al. 2003).

2.7.5.1 Παραγωγή πρωτοπλαστών

(Από Σωτήρη Αμίλλη)

Το εκάστοτε στέλεχος επωάστηκε για 3-4 ημέρες σε στέρεο πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα στους 37°C. Τα σχηματισμένα κονιδιοσπόρια συλλέχθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα Tween80 0.01 % (v/v). Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για να διαχωριστούν τα κονιδιοσπόρια από τις μυκηλιακές υφές. Ακολούθησε φιλτράρισμα με ειδική γάζα Blutex και εμβολιασμός 100 mL υγρής καλλιέργειας ελάχιστου θρεπτικού (περίπου 3×10^9 κονιδιοσπόρια σε 10 mL tween) εμπλουτισμένης με 5 mM ουρία και τις κατάλληλες αυξοτροφίες. Ακολούθησε επώαση στους 37°C υπό ανάδευση στις 130 rpm για 4 ώρες, έως ότου η μικροσκοπική παρατήρηση δείξει πως τα κονιδιοσπόρια εισήλθαν στην ισοτροπική τους φάση (μόλις αρχίσουν να εκβλαστάνουν).

Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 5-10 λεπτά στις 4.000 rpm. Το υπερκείμενο απερρίφθη και τα κονίδια επαναιωρήθηκαν σε 20 mL διαλύματος I (**Πίνακας 10**) σε καινούρια και αποστειρωμένη κωνική των 250 mL. Ακολούθησε λύση του κυτταρικού τοιχώματος των κονιδιοσπορίων και δημιουργία των πρωτοπλαστών, με προσθήκη 200 mg ενζύμου Glucanex. Το εναιώρημα επωάστηκε για 5 λεπτά στον πάγο και έπειτα για 1.5 – 2 ώρες στους 30°C υπό ανάδευση στις 60 rpm.

Εν συνεχεία το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 4.000 rpm, απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Το ίζημα των πρωτοπλαστών επαναιωρήθηκε με ισχυρή ανάδευση σε 10 mL διαλύματος II (**Πίνακας 10**). Οι πρωτοπλάστες ξεπλύθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν όπως πριν. Ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 4 mL δ/τος II, 1 mL PEG 6000 (polyethylene glycol) 60% και 40 μ L DMSO (αντιοξειδωτικός ρόλος). Έπειτα το αιώρημα με τους πρωτοπλάστες αποθηκεύτηκε στους -80°C.

2.7.5.2 Μετασχηματισμός πρωτοπλαστών

Από το προηγούμενο στάδιο της παραγωγής πρωτοπλαστών, είναι απαραίτητη ποσότητα 200 μL πρωτοπλαστών για κάθε μετασχηματισμό. Σε αυτά προστέθηκαν 0.5 – 3 μg DNA και ακολούθησε καλή ανάδευση και επώαση για 15 λεπτά στον πάγο. Στα δείγματα συμπεριλήφθη και αρνητικός μάρτυρας που φέρει σκέτους πρωτοπλάστες δίχως DNA. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL PEG 60%, ακολούθησε καλό ανακάτεμα του μίγματος και επώασή του για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 6.000 rpm. Το υπερκείμενο απερρίφθη και το ίζημα πλύθηκε με την προσθήκη σε αυτό 1 mL $\delta/\text{τος II}$, δίχως να διαλυθεί το ίζημα και φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά στις 6.000 rpm. Το υπερκείμενο απερρίφθη και το ίζημα των πρωτοπλαστών επαναιωρήθηκε σε 400 μL διαλύματος II. Το διάλυμα απλώθηκε σε τρυβλία με ισο-ωσμωτικό θρεπτικό υπόστρωμα (**Πίνακας 4**), τα οποία επωάστηκαν στους 37°C για 3 – 4 ημέρες.

Πίνακας 10: Σύσταση διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται κατά τον μετασχηματισμό πρωτοπλαστών

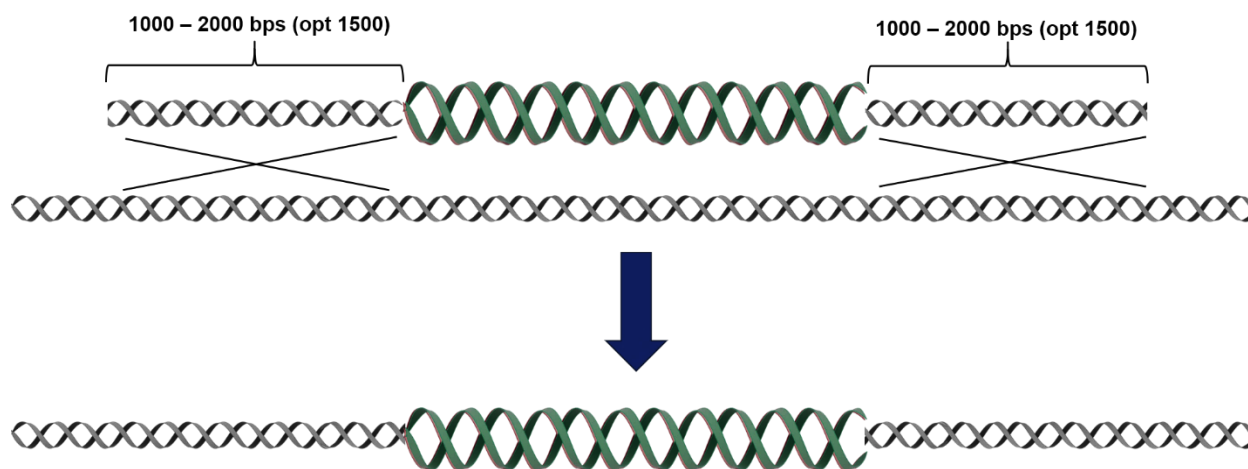
Διάλυμα I (100 mL)	Διάλυμα II (100 mL)
1.2 M MgSO_4 (60 mL)	1 M Sorbitol (50 mL)
10 mM Orthophosphate pH 5.8 (1 mL)	10 mM CaCl_2 (1 mL)
	10 mM Tris-HCl pH 7.5 (1 mL)
H_2O (39 mL)	H_2O (48 mL)

Χαρακτηριστικά DNA για επιτυχή ομόλογο ανασυνδυασμό στον *A. nidulans*.

Στον *A. nidulans* όντας νηματοειδής μύκητας, προκρίνεται ο ετερόλογος ανασυνδυασμός. Για να καταστεί επιτυχής ο ομόλογος ανασυνδυασμός, μέσω του οποίου είναι δυνατή η στοχευμένη σε συγκεκριμένο γενετικό τόπο ένθεση του DNA, πρέπει να συμβάλουν δύο προϋποθέσεις.

Η πρώτη είναι η ύπαρξη στελέχους με διαγεγραμμένο το γονίδιο *nkuA*, το οποίο κωδικοποιεί υπομονάδα της ελικάσης II Ku70/Ku80. Τέτοια στελέχη χάνουν την ικανότητα ετερόλογου ανασυνδυασμού, αυξάνοντας αντίθετα κατακόρυφα την ικανότητα ομόλογου ανασυνδυασμού. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος TNO2A7 (*ΔnkuA::argB pyrO44 riboB2 pyrG89*) (Nayak et al. 2006), ως γενετικό υπόβαθρο για την κατασκευή των *ΔAN10902*, *ΔatrB*, *ΔatrD* και των υπερεκφρασμένων ABC στελεχών.

Η δεύτερη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη ομόλογων τμημάτων περίξ του ενθέματος, μέσω κατασκευής που ονομάζεται γενετική κασέτα. Στον *A. nidulans* η ύπαρξη ομόλογων τμημάτων μεγέθους 1000-2000 βάσεων (με άριστο περί τις 1500), αυξάνουν σημαντικά την επιτυχία ομόλογου ανασυνδυασμού (**Εικόνα 27**).



Εικόνα 27: Χαρακτηριστικά γενετικής κασέτας για ομόλογο ανασυνδυασμό στον *A. nidulans*. Το ένθεμα παρουσιάζεται μεγεθυμένο σε σχέση με το υπόλοιπο DNA

2.7.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

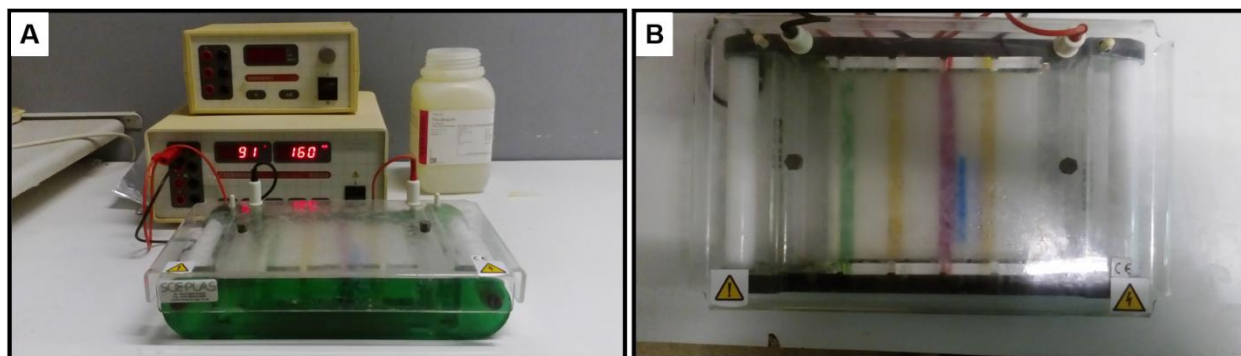
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction) χρησιμοποιήθηκε όπου ήταν απαραίτητο να ενισχυθούν συγκεκριμένα τμήματα DNA για διάγνωση ή κλωνοποίηση. Χρησιμοποιήθηκε κυρίως KAPA Taq (Kapa Biosystems) πολυμεράση εκτός από τις περιπτώσεις που ήταν αναγκαία υψηλή ευαισθησία, οπότε και χρησιμοποιήθηκε η proof reading KAPA HiFi πολυμεράση (Kapa Biosystems). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή, υπολογισμένες για 20 μ L αντίδρασης με 1 ng DNA εκμαγείου. Η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στη DNA μήτρα υπολογίστηκε βάσει του τύπου $Tm(^{\circ}C) = 69.3 + 0.41(GC\%) - 650/L$, όπου GC% το ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης που φέρει ο εκκινητής και L ο αριθμός των νουκλεοτιδικών του βάσεων. Τόσο το L όσο και το GC% αναφέρονται στο τμήμα του εκκινητή, ο οποίος παρουσιάζει συμπληρωματικότητα με τη DNA μήτρα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί με PCR.

2.7.7 Ηλεκτροφόρηση

Το DNA όντας αρνητικά φορτισμένο με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, θα κινηθεί προς τη θετική πλευρά του. Εφόσον μίγμα DNA (π.χ. προϊόντα PCR ή πέψης) τοποθετηθεί εντός πηκτώματος αγαρόζης, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου θα διαχωριστεί αναλόγως του μεγέθους των εκάστοτε κομματιών, καθώς μικρότερου μήκους τμήματα μπορούν να μετακινηθούν εντός του πηκτώματος ευκολότερα σε σχέση με μεγαλύτερα κομμάτια. Η ικανότητα διαχωρισμού του πηκτώματος σχετίζεται με την ποσότητα της αγαρόζης που προστίθεται σε αυτό. 2% (w/v) χρησιμοποιείται στην περίπτωση που απαιτείται διαχωρισμός μικρών κομματιών DNA (0.2-1 kb), 0.8% (w/v) χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μεγάλων κομματιών (5-10 kb), ενώ 1% θεωρείται ένας χρυσός μέσος όρος με συχνή εφαρμογή.

Η ηλεκτροφόρηση εφαρμόστηκε για να διαχωριστεί το DNA σε πηκτώματα αγαρόζης, μετά από πέψη ή PCR. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένο πρωτόκολλο όπως περιγράφεται στους (Sambrook et al. 1989). 1% αγαρόζης προστέθηκε σε

ρυθμιστικό TAE 1X (Tris-acetate 0.04 M, EDTA 0.001 M) και θερμάνθηκε μέχρι πλήρους διάλυσής. Προστέθηκαν $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ βρωμιούχου αιθυλίου το οποίο προσδένεται στην αλυσίδα του DNA και φωσφορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Το διάλυμα εκχύθηκε σε μήτρα και τοποθετήθηκε ειδική “χτένα”, ώστε να σχηματιστούν τα πηγαδάκια φόρτωσης των δειγμάτων. Μετά το στέγνωμα το πήκτωμα, τοποθετήθηκε στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης (**Εικόνα 28**) και καλύφθηκε με ρυθμιστικό TAE 1X, μέχρι την επιφανειακή κάλυψή του. Στα δείγματα προστέθηκε χρωστική ηλεκτροφόρησης και γλυκερόλη ώστε να κατακάτσουν στον πάτο των πηγαδιών ένθεσης. Ακολούθησε εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στις συνιστώμενες ρυθμίσεις. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης τα δείγματα παρατηρήθηκαν υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Όπου χρειάστηκε, το DNA απομονώθηκε με χρήση του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Εικόνα 28: Οργανολογία ηλεκτροφόρησης (A), δεξαμενή ηλεκτροφόρησης (B)

2.7.8 Κλωνοποίηση

2.7.8.1 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Για την πραγματοποίηση των απαραίτητων πέψεων σε πλασμιδιακό ή γονιδιωματικό DNA και προϊόντα PCR, η ποσότητα περιοριστικού ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε για κάθε πέψη, εξαρτήθηκε από τη συγκέντρωση DNA του υποστρώματος. Η αντιδράσεις

έλαβαν χώρα υπό τις συνθήκες που ορίζονται από τον κατασκευαστή των περιοριστικών ενζύμων (NEB, Fermentas, Takara). Για κάθε πέψη χρησιμοποιήθηκαν 12 μL ddH₂O, 5 μL DNA, 2 μL Buffer (10X) και 1 μL περιοριστικού ενζύμου. Η αντίδραση έλαβε χώρα για περίπου 16 ώρες.

2.7.8.2 Κλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Για τη διεξαγωγή των απαραίτητων κλωνοποιήσεων, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο για κάθε περίπτωση πλασμίδιο (φορέας κλωνοποίησης) και ένθεμα σε αναλογία 1/3. Τόσο το πλασμίδιο όσο και το ένθεμα ήταν υψηλής καθαρότητας.

Στην περίπτωση αποκυκλωποίησης του πλασμιδίου, έπειτα από πέψη με μοναδικό περιοριστικό ένζυμο, προστέθηκε 1 μL αλκαλικής φωσφατάσης και αφέθηκε να δράσει για 15 λεπτά ακριβώς. Η αλκαλική φωσφατάση αποφωσφορυλιώνει το 5' άκρο του πλασμιδίου, εμποδίζοντας την επανένωση των δύο άκρων του DNA, διατηρώντας το γραμμικό. Έπειτα ακολούθησε διήθηση υπό ειδική κολόνα, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, ώστε να απομακρυνθούν τα διαλύματα της πέψης και περιοριστικά ένζυμα. Με την προσθήκη του ενθέματος ακολούθησε η επικόλλησή του στον πλασμιδιακό φορέα με προθήκη 10 μL διαλύματος επικόλλησης (7 μL ολικού DNA), 1 μL κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε ένζυμο, 1 μL πλασμιδίου, 1 μL ενζύμου NEB T4 ligase TM). Ακολούθησε επώαση στους 22°C για τουλάχιστον 1 ώρα.

Σε κάθε κλωνοποίηση υπήρχε και δείγμα μάρτυρας, το οποίο δεν έφερε ένθεμα. ώστε να φανεί τυχόν ατελής πέψη, είτε ατελής δράση της αλκαλικής φωσφατάσης, οδηγώντας σε ύπαρξη συμβατών άκρων στον πλασμιδιακό φορέα.

2.7.9 Κατασκευή πλασμιδίων

2.7.9.1 Στελέχη που εκφράζουν τους μεταφορείς πουρινών, πυριμιδινών και αλλαντοΐνης

Η κατασκευή του στελέχους Δ7 περιγράφεται αναλυτικά σε προηγούμενες εργασίες (Kryptou and Diallinas 2014, Kryptou et al. 2015). Τα στελέχη που υπερεκφράζουν τον κάθε ένα από τους 7 μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων αποτελούν προϊόν μετασχηματισμού του Δ7 στελέχους με τα γονίδια που κωδικοποιούν τους μεταφορείς αυτούς. Η κατασκευή των πλασμιδίων που φέρουν τα γονίδια αυτά και χρησιμοποιήθηκαν κατά τον μετασχηματισμό, έχουν περιγραφεί σε προηγούμενες εργασίες (**Πίνακας 11**). Η αναλυτική περιγραφή της κατασκευής των στελεχών αυτών παρουσιάζεται στο μεταπτυχιακό του υπ. Διδάκτορα Γεώργιου Καπετανάκη (Καπετανάκης 2017, Kalampokis et al. 2018).

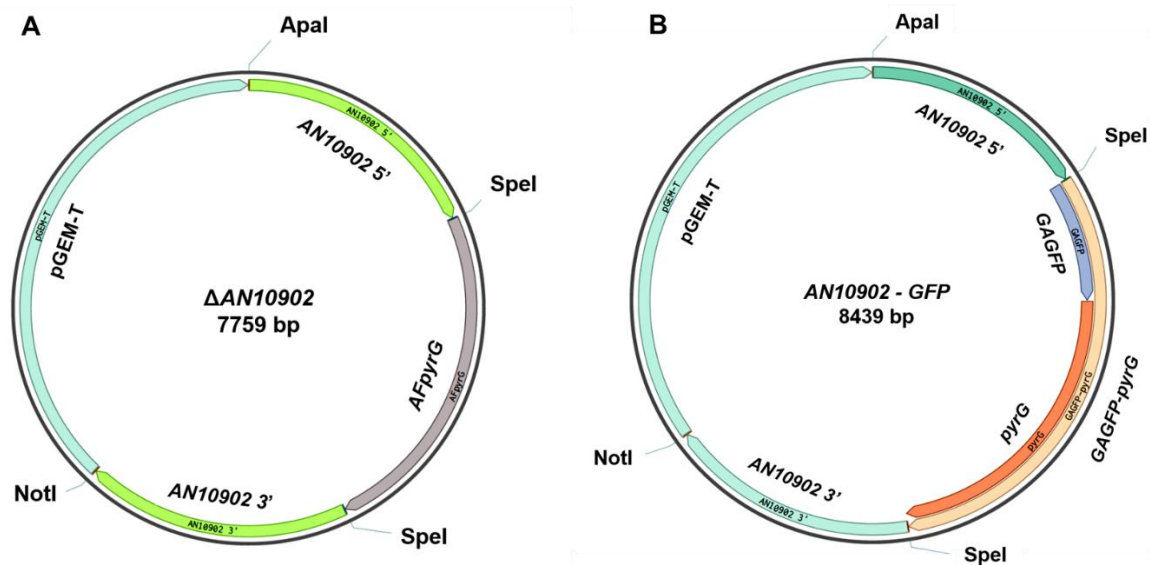
Πίνακας 11: Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των στελεχών που κωδικοποιούν τους μεταφορείς πουρινών, πυριμιδινών και αλλαντοΐνης.

Πλασμίδια	Αναφορά
<i>[pBS 510p uapA-GFP argB]</i>	(Pantazopoulou et al. 2007)
<i>[pBS uapC-GFP]</i>	(Valdez-Taubas et al. 2000)
<i>[pGEM-gpdAp furA-GFP pantoB+]</i>	(Kryptou et al. 2015).
<i>[pGEM-gpdAp-furD pantoB+]</i>	(Kryptou et al. 2015)
<i>[exp fcyB paba]</i>	(Vlanti and Diallinas 2008)
<i>[pBS 510p azgA argB]</i>	(Kryptou et al. 2014)
<i>[pGEM-gpdAp-cntA pantoB+]</i>	(Καπετανάκης 2017, Kalampokis et al. 2018)

2.7.9.2 Κατασκευή της αλληλουχίας απαλοιφής του AN10902 και της αλληλουχίας AN10902-gfp

Εξαιτίας του μικρού μεγέθους του γονιδίου AN10902, αντικαταστάθηκε ολόκληρο το ORF. Για τις κλωνοποιήσεις χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 11, 12, 15, 16, 19 και 20 (Πίνακας 9), τα περιοριστικά ένζυμα Apal, SpeI, NotI, και το πλασμίδιο pGEM T Easy. Η σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδίου δίνεται στην **εικόνα 29 A**.

Η κατασκευή της αλληλουχίας AN10902-gfp πραγματοποιήθηκε από τον Σωτήρη Αμίλλη. Δεν αντικαταστάθηκε κάποιο τμήμα του AN10902 γονιδίου, αλλά κλωνοποιήθηκε εμβόλιμα το *GAGFP::AFpyrG* μεταξύ των ORF και 3' τμημάτων του. Για τις κλωνοποιήσεις χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές, 11, 12, 14, 17, 18, 19 και 20 (Πίνακας 9), τα περιοριστικά ένζυμα Apal, SpeI, NotI, και το πλασμίδιο pGEM T Easy. Η σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδίου δίνεται στην **εικόνα 29 B**.



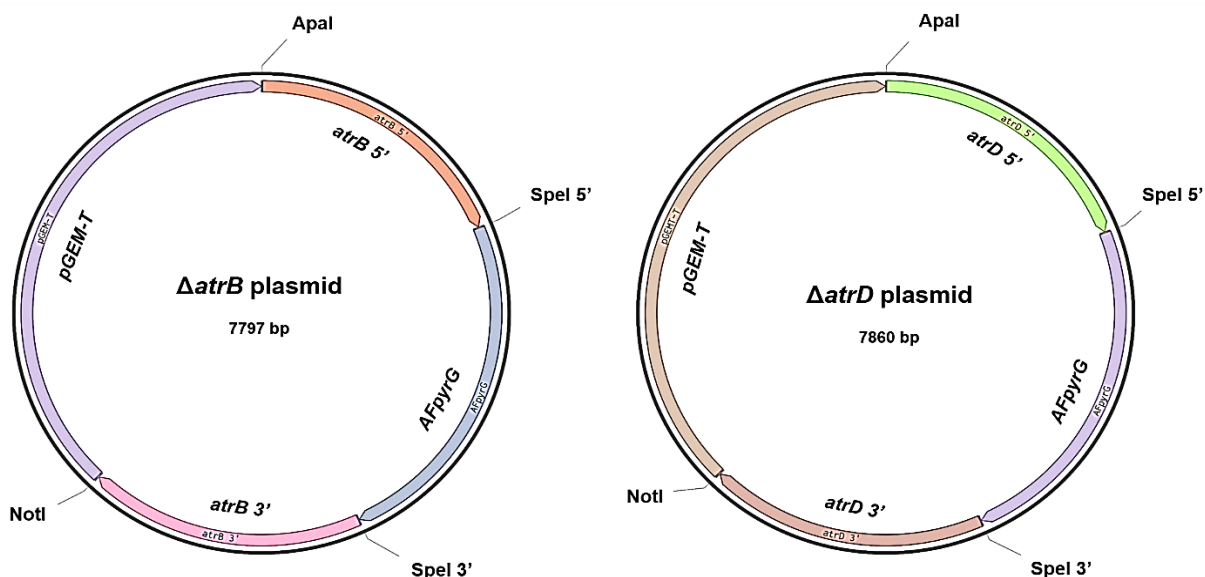
Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδίου με την κασέτα απαλοιφής του AN10902 (**A**) και του πλασμιδίου με την κασέτα ένθεσης του GFP στο γονίδιο AN10902 (**B**). Η κατασκευή του τελευταίου πραγματοποιήθηκε από τον Σωτήρη Αμίλλη

2.7.9.3 Κατασκευή της αλληλουχίας απαλοιφής των *atrB* και *atrD*

Εξαιτίας του πολύ μεγάλου μήκους των γονιδίων *atrB* και *atrD*, καθίσταται μη αποτελεσματική η ολική διαγραφή τους. Για τον λόγο αυτό διεγράφη περιοχή που αντιστοιχεί τουλάχιστον στα 2/3 – 3/4 των γονιδίων, ώστε να αποφευχθεί τυχόν υποτυπωδώς λειτουργική πρωτεΐνη. Για τις κλωνοποιήσεις, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 1-12 (Πίνακας 9), τα περιοριστικά ένζυμα *ApaI*, *SpeI*, *NotI*, και το πλασμίδιο *pGEM T Easy*.

Πραγματοποιήθηκε PCR σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο να κατασκευάστηκε το πλασμίδιο που φέρει τα 5' και 3'-UTR ομόλογα κομμάτια της κασέτας. Η επιλογή των εκκινητών έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να σηκωθούν τμήματα DNA μήκους κοντά στο ιδανικό (1480 -1522 ζεύγη βάσεων), ώστε να διασφαλισθεί η επιτυχία του ομόλογου ανασυνδυασμού. Μεταξύ τους τα 5' και 3'-UTR κομμάτια συνδέθηκαν με την αλληλουχία ACTAGT που αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο *SpeI* (**A|CTAGT**). Η αλληλουχία αυτή χρησίμευσε ως «γέφυρα» μέσω της οποίας εισήχθη το γονίδιο *pyrG* του *A. fumigatus* (*AFpyrG*). Το συνολικό DNA κατέστη γραμμικό με πέψη *ApaI/NotI*, και χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους TNO2 A7.

Η σχηματική αναπαράσταση των δύο πλασμιδίων δίνεται στην **εικόνα 30**.



Εικόνα 30: Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με την αλληλουχία διαγραφής των *atrB* και *atrD* γονιδίων

2.7.9.4 Κατασκευή αλληλουχίας υπερέκφρασης των *atrB* και *atrD* υπό τον έλεγχο του *gpdA* υποκινητή

Για την κατασκευή των στελεχών που υπερεκφράζουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τους AtrB και AtrD ABC μεταφορείς, χρησιμοποιήθηκε ο ισχυρός υποκινητής *gpdA* χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος TNO2 A7.

Για την κατασκευή της αλληλουχίας, ώστε να επιτευχθεί η εμβόλιμη ένθεσή του μετά τον υποκινητή του *atrB* γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 2, 3, 12, 13, 21 και 22, ενώ αντίστοιχα για το *atrD* οι 7, 8, 12, 13, 21 και 22 (**Πίνακας 9**) και τα περιοριστικά ένζυμα ApaI, SspI και XbaI. Στην περίπτωση των στελεχών που υπερεκφράζουν τους δύο μεταφορείς, εξαιτίας του μεγέθους των αλληλουχιών, δεν κατασκευάστηκαν χιμαιρικά πλασμίδια. Ο μετασχηματισμός των πρωτοπλαστών έλαβε χώρα αμέσως μετά την επικόλληση των διαφορετικών τμημάτων της αλληλουχίας.

2.8 Αξιολόγηση ευαισθησίας ειδών Ασπεργίλλων σε μυκητοκτόνα διαφορετικών χημικών ομάδων

Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας των διαφόρων μυκητιακών στελεχών έγινε με τη μελέτη της επίδρασης του κάθε μυκητοκτόνου στη γραμμική αύξηση του μυκηλίου σε τρυβλία που περιείχαν ελάχιστο θρεπτικό υλικό, συμπληρωμένο με τις όποιες τυχόν απαραίτητες αυξοτροφίες και πηγές αζώτου. Οι συγκεντρώσεις των τυχών απαραίτητων αυξοτροφιών, πηγών αζώτου και η διάρκεια επώασης για κάθε πείραμα αναφέρεται στα αποτελέσματα.

Έλαβε χώρα σημειακός εμβολιασμός του εκάστοτε στελέχους σε τρυβλία με το θρεπτικό υλικό, που περιείχαν το εκάστοτε μυκητοκτόνο στις επιθυμητές συγκεντρώσεις, χρησιμοποιώντας τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Προσοχή δόθηκε, ώστε η τελική συγκέντρωση των διαλυτών από τα αρχικά διαλύματα χρήσης (working stock solutions) στο υλικό καλλιέργειας να μην ξεπερνά το 1% (v/v), ενώ το ίδιο ποσοστό προσθέτονταν και στον μάρτυρα (control). Τα εμβολιασμένα τρυβλία μεταφέρθηκαν για

επώαση στους 37°C υπό συνθήκες σκότους στην περίπτωση των στελεχών του είδους *A. nidulans*, ενώ τα υπόλοιπα είδη επώασθηκαν στους 28°C υπό συνθήκες σκότους.

Έπειτα από επώαση για κατάλληλο χρονικό διάστημα, μετρήθηκαν οι δύο κάθετοι διάμετροι της αποικίας κάθε επανάληψης και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των απαραίτητων συγκρίσεων. Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες παρεμπόδισης, και βρέθηκε η EC_{50} κάθε στελέχους, εκείνη δηλαδή η συγκέντρωση φαρμάκου που προκάλεσε το 50% της ανάπτυξής του σε σχέση με αυτήν απουσία φαρμάκου, με εφαρμογή της μεθόδου probit με χρήση του στατιστικού προγράμματος JMP (SAS Institute Inc).

Εξαίρεση αποτέλεσαν τα συγκριτικά πειράματα αξιολόγησης της ευαισθησίας των στελεχών που φέρουν διαγεγραμμένα ή υπερεκφρασμένα τα υπεύθυνα γονίδια των υπό μελέτη μεταφορέων. Η σύγκριση σε αυτά πραγματοποιήθηκε μέσω της ποιοτικής σύγκρισης της μυκηλιακής τους ανάπτυξης σε συγκέντρωση δ.ο. που παρεμποδίζει το άγριο.

2.9 Ποσοτικοποίηση της ανταγωνιστικής πρόσληψης του μυκητοκτόνου boscalid από μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων

Για την ποσοτικοποίηση της ανταγωνιστικής πρόσληψης του μυκητοκτόνου boscalid από τους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων στον *A. nidulans*, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη μεταξύ του ανθεκτικού λόγω μη επαρκούς προσρόφησης της δ.ο. στελέχους $\Delta 7::uarA^+$ και του ευαίσθητου $\Delta 7::uarC^+$, εφαρμόζοντας προηγούμενο πρωτόκολλο (Kryrotou and Diallinas 2014) με ελαφρές τροποποιήσεις.

Τα στελέχη επώαστηκαν για 3-4 ημέρες σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα στους 37°C. Τα σχηματισμένα κονιδιοσπόρια συλλέχθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα Tween80 0.01 % (v/v) και χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 25 mL υγρής καλλιέργειας ελάχιστου θρεπτικού (περίπου 3×10^9 κονιδιοσπόρια σε 10 mL tween) εμπλουτισμένης με 10 mM νιτρικού νατρίου και τις απαραίτητες αυξοτροφίες. Τα εναιωρήματα επώαστηκαν για 4-5 ώρες μέχρι τα κονιδιοσπόρια εισέλθουν στο μορφολογικό στάδιο μετά την

εγκατάσταση της πολικότητας και ακριβώς πριν την εμφάνιση της υφής εκβλάστησης, η οποία συνήθως απαιτεί επώαση των κονιδιοσπορίων για 4-5 ώρες στους 37°C (Amillis et al. 2004, Vlanti and Diallinas 2008, Kryptou and Diallinas 2014). Τα κονιδιοσπόρια συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 4.000 rpm στους 15-25°C. Επαναιωρήθηκαν σε 4 mL υγρού ελάχιστου θρεπτικού και διαιρέθηκαν σε κλάσματα των 75 μL (10^8 κονιδιοσπόρια μL^{-1}).

Πριν την προσθήκη των ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων τα εναιωρήματα καλλιεργήθηκαν για 5-10 λεπτά στους 37°C. Προστέθηκαν 25 μL ραδιοσημασμένης ξανθίνης (τελική συγκέντρωση 0.2 μM), που αποτελεί υπόστρωμα των UapA και UapC μεταφορέων. Η σύγκριση έγινε με εναιωρήματα που προστέθηκε το διάλυμα ανταγωνισμού που περιείχε ραδιοσημασμένη ξανθίνη και 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ μη ραδιοσημασμένου boscalid (1:1 v/v). Έπειτα από ακριβώς ένα λεπτό, τερματίστηκε η δράση των μεταφορέων με προσθήκη ίσου όγκου (100 μL) παγωμένης μη ραδιενεργούς ξανθίνης (συγκέντρωσης 100-1000X σε σχέση με τη ραδιενεργή), ανάδευση των εναιωρημάτων και τοποθέτησής τους στον πάγο. Τα κονιδιοσπόρια συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση για 3-5 λεπτά στις 12.000 rpm στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου. Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με ψυχρό υγρό ελάχιστο θρεπτικό, ανάδευση και φυγοκέντριση όπως προηγουμένως. Το ίζημα ομογενοποιήθηκε σε 1 mL διαλύματος σπινθηρισμού (666 mL τολουόλιο, 333 mL Triton X-100, 2.66 g PPO, 0.66 POPOP). Η μέτρηση της πρόσληψης της ραδιενεργού ξανθίνης πραγματοποιήθηκε σε ειδικό φωτόμετρο σπινθηρισμού.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις για κάθε επέμβαση και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών τους. Για την απόρριψη εσφαλμένων αποτελεσμάτων εξαιτίας ραδιενεργών μετρήσεων που δεν οφείλονται στη δράση των μεταφορέων (πχ θόρυβος υποστρώματος, απλή διάχυση κτλ.) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τα οποία έφεραν διάλυμα ραδιενεργούς ξανθίνης και μη ραδιοσημασμένης ξανθίνης (1:1000). Ο μέσος όρος των μετρήσεων των δειγμάτων αυτών αφαιρέθηκαν από τις τιμές που ελήφθησαν από τα δύο στελέχη.

2.10 Αξιολόγηση της επίδρασης πηγών άνθρακα, αζώτου και της υδρόλυσης της τρεχαλόζης στην κονιδιακή εκβλάστηση

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο ρόλος των ενδογενών πηγών άνθρακα κατά τη διάρκεια της κονιδιακής εκβλάστησης, σε πλάκες των 12 microwell που περιείχαν i) ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, ii) τροποποιημένο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς γλυκόζη, iii) απεσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O, iv) απεσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, και v) απεσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O με γλυκόζη και νιτρικό νάτριο ως πηγές άνθρακα και αζώτου αντίστοιχα, προστέθηκε φρέσκο παρασκευασμένο αιώρημα (10⁸ κονιδιοσπόρια mL⁻¹) (§2.11.2.2). Επιπρόσθετα, για την εκτίμηση της επίπτωσης της ενδογενούς υδρόλυσης της τρεχαλόζης από την τρεχαλάση (E.C. 3.2.1.28) στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων, σε εναιώρημα κονιδιοσπορίων προστέθηκε το αντιβιοτικό validamycin A (20 μg mL⁻¹), ένας αναστολέας της τρεχαλάσης. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις ανά επέμβαση. Η κονιδιακή εκβλάστηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο αντίστροφης φάσης (Olympus CK40, Japan) 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις.

Επιπλέον, για να ελεγχθεί εάν ο *A. nidulans* μπορεί να αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας α,α-τρεχαλόζη και γλυκερόλη ως πηγές άνθρακα, τρυβλία petri Με στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, συμπληρωμένο με 1% γλυκόζη, ή α,α-τρεχαλόζη ή γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα και 10 mM τρυγικό αμμώνιο ή νιτρικό νάτριο ως πηγή αζώτου, εμβολιάσθηκαν σημειακά. Παρατηρήσεις έγιναν έπειτα από 5 ημέρες επώασης στους 37°C στο σκοτάδι.

2.11 Μεταβολομικές αναλύσεις

2.11.1 Μελέτη της επίδρασης του boscalid στον *A. nidulans*

2.11.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

Για τη διεξαγωγή της μεταβολομικής ανάλυσης για τη μελέτη της επίδρασης του boscalid στον μεταβολισμό του αγρίου τύπου στελέχους και τις συγκριτικής μελέτης μεταξύ των wt, Δ7, Δ7::uarA⁺ και Δ7::uarC⁺ στελεχών (§2.1), όλα τα αντιδραστήρια ήταν της υψηλότερης δυνατής καθαρότητας. Συγκεκριμένα για την παρασκευή του διαλύματος εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν οξικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη {99.9% GC/MS grade, Carlo Erba Reagents (val de Reuil, France)} ριβιτόλη {Sigma-Aldrich Ltd (Steinheim, Germany)} ως εσωτερικό πρότυπο, και για την παραγωγοποίηση των δειγμάτων άνυδρη πυριδίνη (99.8%, v/v), υδροχλωρική μεθοξυαμίνη (MeOX, 98%, w/w), N-μεθυλο-N-(τριμεθυλο-πυριτιο) τριφθοροακεταμίδη (MSTFA) (Sigma-Aldrich Ltd). Τέλος όλα τα αναλυτικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich Ltd.

2.11.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Το αγρίου τύπου στέλεχος wt raba καθώς και τα Δ7, Δ7::uarA⁺ και Δ7::uarC⁺ επωάστηκαν για 3 ημέρες σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα στους 37°C για την παραγωγή φρέσκου αρχικού μολύσματος. Τρυβλία petri (9 cm ø) με 25 mL πλήρους θρεπτικού υλικού, συμπληρωμένα με υποθανάσιμη δόση (1 µg mL⁻¹) του μυκητοκτόνου boscalid επιμολύνθηκαν σημειακά με το στέλεχος FGSC A4. Αντίστοιχα τρυβλία petri (9 cm ø) με 25 mL ελάχιστου θρεπτικού υλικού, συμπληρωμένο με τις απαραίτητες αυξοτροφίες (παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ, πανθοθενικό οξύ), 10 mM νιτρικού νατρίου ως πηγή αζώτου και υποθανάσιμη δόση (0.5 µg mL⁻¹) του μυκητοκτόνου boscalid, επιμολύνθηκαν σημειακά με τα στελέχη wt, Δ7, Δ7::uarA⁺ και Δ7::uarC⁺. Η προσαρμογή

του pH των θρεπτικών υλικών πραγματοποιήθηκε με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 0.1 M. Τρυβλία χωρίς φάρμακο χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control). Για τον διαχωρισμό των μυκηλιακών υφών από το θρεπτικό υπόστρωμα, στην επιφάνεια του στέρεου θρεπτικού υλικού και πριν την επιμόλυνση, απλώθηκε αποστειρωμένη ημιπερατή βιολογική μεμβράνη (500PUT; Futamura USA Inc., Atlanta, GA, USA). Για κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν δεκαοκτώ βιολογικές επαναλήψεις, οι οποίες συνδυάστηκαν σε ομάδες των τριών, ώστε τελικά να προκύψουν έξι συνδυασμένες επαναλήψεις για κάθε επέμβαση. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37°C για 6 ημέρες στην περίπτωση του στελέχους FGSC A4 και υπό συνθήκες σκότους για 7 ημέρες στην περίπτωση των υπόλοιπων στελεχών.

Το μυκήλιο συλλέχθηκε με χρήση αποστειρωμένης σπάτουλας σε φιαλίδια τύπου Eppendorf (1.5 mL) και βυθίστηκε σε υγρό άζωτο ώστε να διακοπεί ο μεταβολισμός (**quenching**). Ακολούθησε θρυμματισμός σε αποστειρωμένο μικρογουδί και αποθήκευση του ιστού στους -80°C. 25 mg από τον ιστό συλλέχθηκε σε φιαλίδια τύπου Eppendorf (1.5 mL). Επιπλέον δείγματα αναφοράς (quality control) ετοιμάστηκαν με συνδυασμό ιστού όλων των επαναλήψεων κάθε επέμβασης. Επιπρόσθετα αναλυθήκαν και δείγματα δίχως ιστό (τυφλά) προκειμένου να ανιχνευθεί πιθανή επιμόλυνση που προέρχεται από το χειρισμό και την προετοιμασία του δείγματος, τα αντιδραστήρια, τη στήλη ή τον χρωματογράφο.

Η εκχύλιση και παραγωγοποίηση των μεταβολιτών στηρίχθηκε σε ήδη δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Aliferis et al. 2013b, Kalampokis et al. 2018). Συγκεκριμένα 0.5 mL διαλύματος εκχύλισης (μεθανόλη – οξικός αιθυλεστέρας; 50:50, v/v) προστέθηκαν στα δείγματα. Τα εκχυλίσματα φορτίστηκαν με 20 μL διαλύματος ριβιτόλης (0.2 mg mL⁻¹ σε μεθανόλη). Έπειτα από ελαφρά ανάδευση τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 20 λεπτά σε υδατόλουτρο υπερήχων (Branson 1210, Connecticut, NE, USA), και φυγοκεντρήθηκαν για 2 ώρες στις 200 rpm 24°C. Για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων, τα εκχυλίσματα φιλτραρίστηκαν με χρήση 0.2 μm PTFE φίλτρων (Macherey-Nagel, Duren, Germany) και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου Eppendorf (2 mL). Τα φιλτραρισμένα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν έως ξηρού χρησιμοποιώντας αντλία κενού ψύξης (Labconco, Kansas City MO, USA).

Ακολούθησε παραγωγοποίηση δύο σταδίων. Στο πρώτο στάδιο προστέθηκαν 80 μL διαλύματος υδροχλωρικής μεθοξυαμίνης (MeOX ; 20 mg mL^{-1} σε άνυδρη πυριδίνη) στα αποξηραμένα δείγματα και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 30°C για 120 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο αναστέλλεται ο σχηματισμός δακτυλίου των αναγωγικών σακχάρων μέσω της προστασίας των αλδεϋδών και κετονών, αυξάνοντας τον επιτυχή τους διαχωρισμό, κατά τη χρήση του αέριου χρωματογράφου. Ακολούθησε το δεύτερο στάδιο με την προσθήκη 80 μL MSTFA και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 90 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο αυξάνεται η σταθερότητα και πτητικότητα των μεταβολιτών μέσω της αντικατάστασης του H^+ στα $-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$ με το $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ (τριμεθυλοπυρίτιο (TMS)). Τα παραγωγοποιημένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε 200 μL υάλινους μικροϋποδοχείς (Macherey-Nagel), τα οποία τοποθετήθηκαν σε υάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη (2 mL).

2.11.1.3 Αέρια Χρωματογραφία

Για την αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε ο Agilent 6890 αέριος χρωματογράφος, εφοδιασμένος με τον 5973 ανιχνευτή μαζών (MSD) και τον 7683 αυτόματο δειγματολήπτη (Agilent Technologies Inc.). Ήδη δημοσιευμένα πρωτόκολλα χρησιμοποιήθηκαν, με ελάχιστες τροποποιήσεις (Aliferis et al. 2013b, Kalampokis et al. 2018)

Ποσότητα 1 μL από τα δείγματα εγχύθηκαν σε χρωματογραφική στήλη χαρακτηριστικών HP-5MS, μήκους 30 μέτρων, διαμέτρου 0.25 mm, και πάχους πληρωτικού υλικού 0.25 μm (Agilent Technologies Inc.). Ο αυτόματος εγχυτής ρυθμίστηκε σε διαχωρισμό 1:10 (split mode) και σε θερμοκρασία 230°C . Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο, ροής 1 mL min^{-1} . Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα προγραμματίστηκε ως εξής: Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίστηκε στους 70°C όπου και παρέμεινε για 5 λεπτά. Ακολούθησε αύξηση στους 295°C , με ρυθμό 5°C min^{-1} όπου και παρέμεινε σταθερή για 2 λεπτά. Εφαρμόστηκε θετικός ιονισμός ηλεκτρονίων ρυθμισμένος στα 70 eV. Πλήρη φάσματα μάζας σάρωσης ελήφθησαν σε εύρος μαζών 50–800 Da με ρυθμό 2 scans s^{-1} . Οι θερμοκρασίες της πηγής της μάζας και του τετράπολου ρυθμίστηκαν στους 230°C και 150°C αντίστοιχα. Για προστασία του

ανιχνευτή από τυχόν πλατό που οφείλεται στην παρουσία του διαλύτη, εφαρμόστηκε καθυστέρηση καταγραφής του σήματος για 10 λεπτά (**solvent delay**).

2.11.1.4 Ταυτοποίηση μεταβολιτών και κατασκευή μεταβολομικού προφίλ

Τα αποκτηθέντα χρωματογραφήματα αποσυνελίχθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό AMDIS v.2.66 (NIST; Gaithersburg, MD, USA). Η πιθανή ταυτοποίηση των μεταβολιτών βασίστηκε στην αντιστοίχιση των φασμάτων μάζας τους (>95% αντιστοίχιση) με τις καταχωρήσεις της βιβλιοθήκης μεταβολιτών του National Institute of Standards and Technology, NIST 08 (NIST; Gaithersburg, MD, USA) και της Golm Metabolite Database (Kopka et al. 2005).

Οι κορυφές που υπήρχαν στα τυφλά δείγματα απομακρύνθηκαν από τις περαιτέρω αναλύσεις. Για επιλεγμένους μεταβολίτες, πραγματοποιήθηκε απόλυτη ταυτοποίηση, συγκρίνοντας τα φάσματα μάζας και τους χρόνους κατακράτησης με αυτά αναλυτικών προτύπων που αναλύθηκαν στον ίδιο χρωματογράφο ακολουθώντας την ίδια μέθοδο, όπως προτείνεται από τη Metabolomics Standards Initiative (MSI) (Fiehn et al. 2007, Sansone et al. 2007)

Δεδομένου ότι οι περισσότεροι από τους μεταβολίτες συμμετέχουν σε περισσότερα από ένα βιοσυνθετικά μονοπάτια, προκειμένου να αποκτηθεί μια ολιστική άποψη της συμμετοχής τους στο πλαίσιο του ολικού μεταβολισμού ενός δεδομένου βιολογικού συστήματος, η συμμετοχή αυτή πρέπει να ληφθεί υπόψη. Εδώ, η συμμετοχή ενός μεταβολίτη σε μια βιοσυνθετική οδό περιγράφεται με τον όρο "**instance**", και για σκοπούς τυποποίησης, το σύστημα κωδικοποίησης και την ταξινόμηση της KEGG για βιοσυνθετικές οδούς (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?menu_type=pathway_maps&org=ani) προσαρμόστηκε όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (Aliferis et al. 2014, Kalampokis et al. 2018). Η κατασκευή του μεταβολικού δικτύου βασίστηκε σε πληροφορίες που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων KEGG. Επιπλέον κατασκευάστηκε μια ελεύθερη προσβάσιμη διαδικτυακή βάση δεδομένων για τον *A. nidulans*.

2.11.1.5 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Για την προεπεξεργασία δεδομένων GC/EI/MS για τη μεταβολομική, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MSDIAL εφαρμόζοντας τις συνιστώμενες ρυθμίσεις για ανάλυση δεδομένων GC / EI / MS (Tsugawa et al. 2015, Tsugawa et al. 2019).

Προκειμένου να ενισχυθεί η ομοιομορφία των δεδομένων, μεταβολικά χαρακτηριστικά που εμφανίζονται σε ποσοστό μικρότερο από 50% μεταξύ των επαναλήψεων της ίδιας επέμβασης αποκλείστηκαν από τις περαιτέρω αναλύσεις. Η παραχθείσα μήτρα δεδομένων εξήχθη στο MS Excel® και εξετάστηκε περαιτέρω για τυχόν ασυνέπειες. Τέλος, προστέθηκαν πληροφορίες για τους μεταβολίτες και η μήτρα εισήχθη στο λογισμικό SIMCA-P v.12.0 (Umetrics, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umeå, Sweden) για πολυπαραγοντική στατιστική επεξεργασία.

Για τη διάκριση των επεμβάσεων, την ταξινόμηση των στελεχών του *A. nidulans* και την ανακάλυψη τυχόν τάσεων και των αντίστοιχων μεταβολιτών βιοδεικτών πραγματοποιήθηκαν **PCA**, **OPLS-DA** και **HCA** στατιστικές αναλύσεις.

Η ανακάλυψη των μεταβολιτών βιοδεικτών της επίδρασης του boscalid στον μεταβολισμό των στελεχών του *A. nidulans* βασίστηκε σε συντελεστές παλινδρόμησης OPLS και τα τυπικά σφάλματα υπολογίστηκαν με εφαρμογή jack-knifing με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (Efron and Gong 1983). Η απόδοση των παραγόμενων μοντέλων εκτιμήθηκε έσω του σωρευτικού κλάσματος της ολικής μεταβολής των X 's που θα μπορούσαν να προβλεφθούν από τα εξαγόμενα συστατικά (Q_{cum}^2) και του κλάσματος του αθροίσματος των τετραγώνων όλων των X και Y που εξηγούνται από τον τρέχον παράγοντα (R^2X and R^2Y , αντίστοιχα).

2.11.2 Μελέτη του μηχανισμού κονιδιακής εκβλάστησης

2.11.2.1 Χημικά αντιδραστήρια

Για την GC/EI-TOF/MS μεταβολομική ανάλυση του μηχανισμού της κονιδιακής εκβλάστησης όλα τα αντιδραστήρια ήταν της υψηλότερης δυνατής καθαρότητας. Συγκεκριμένα για την εκχύλιση του ενδο-μεταβολόματος των κονιδιοσποριών,

χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εκχύλισης οξικού αιθυλεστέρα: μεθανόλης (1:1, v/v) (99.9% GC/MS grade, Carlo Erba Reagents (val de Reuil, France)), ριβιτόλη (Sigma-Aldrich Ltd), και για την παραγωγοποίηση των δειγμάτων άνυδρη πυριδίνη (99.8%, v/v; Merck Darmstadt, Germany; cat. no. CAS 110-86-1), υδροχλωρική μεθοξυαμίνη (MeOX, 98%, w/w; (Sigma-Aldrich Ltd; cat. no. CAS 593-56-6)), N,O-δισ(τιμεθυλοπυριτο)τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA, Macherey and Nagel; cat. no. CAS 25561-30-2). Μίγμα από n-αλκάνια (C₁₀, C₁₂, C₁₅, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₈, C₃₀, C₃₆) (Sigma-Aldrich Ltd; cat. no. CAS 110-86-1) διαλυμένο σε άνυδρη πυριδίνη τελικής συγκέντρωσης 0.22 mg mL⁻¹ το καθένα, χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα πρότυπου δείκτη κατακράτησης (RI). Τέλος όλα τα αναλυτικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich Ltd.

2.11.2.2 Βιολογικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας για την παραγωγή κονιδιοσπορίων

Για να εξασφαλιστεί η βέλτιστη παραγωγή κονιδιοσπορίων, καλλιέργειες του αγρίου στελέχους FGSC A4 επωάστηκαν για 5 ημέρες σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 9 cm) που περιείχαν 25 mL CM, στους 37°C στο σκοτάδι. Το pH του θρεπτικού υλικού προσαρμόστηκε στα 6.8 με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 0.1 M.

Χρησιμοποιώντας μεταλλική αποστειρωμένη σπάτουλα τα κονιδιοσπόρια συλλέχθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα Tween80 0.01 % (v/v). Το διάλυμα αναδεύθηκε διεξοδικά για να διαχωριστούν τα κονιδιοσπόρια από τις μυκηλιακές υφές. Ακολούθησε φιλτράρισμα με ειδικό nylon πλέγμα (μέγεθος πόρων $\geq 50\mu\text{m}$) και 10 mL από το συλλέχθηκε σε 50 mL falcon tubes. Το φιλτραρισμένο εναιώρημα αραιώθηκε σε 90 mL υγρού πλήρους θρεπτικού υλικού (1/10 αραιώση) προκειμένου να προσαρμοστεί η πυκνότητά του σε 10⁸ κονιδιοσπόρια mL⁻¹. Η πυκνότητα του εναιωρήματος μετρήθηκε με χρήση αιματοκυτόμετρου (Brand GMBH, Germany).

2.11.2.3 Συνθήκες ανάπτυξης

Για να εξασφαλιστεί η πλήρης κάλυψη του μηχανισμού εκβλάστησης (**I, PE, PM, TE**), πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία ανά μία ώρα, έως τις 6 ώρες (0, 1, 2, 3, 4, 6 ώρες).

Για κάθε χρονική δειγματοληψία το εναιώρημα διαιρέθηκε σε δείγματα 1 mL σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf των 2 mL. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό επωαστήριο (ZHWHY-211B, Zhicheng, China), στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$ στις 150 rpm στο σκοτάδι. Η τελευταία δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 24 ώρες, όταν τα περισσότερα από τα κονιδιοσπόρια είχαν βλαστήσει. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν έξι βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δειγματοληψία.

2.11.2.4 Δειγματοληψία και προετοιμασία δειγμάτων για GC/EI-TOF/MS ανάλυση

Προκειμένου να απομακρυνθούν πιθανές πηγές μόλυνσης που προέρχονται από τα μέσα καλλιέργειας και να εξασφαλιστεί αποτελεσματική παύση (**quenching**) του μεταβολισμού των κονιδιοσπορίων, εφαρμόστηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο, το οποίο συνδυάζει καθαρισμό δείγματος και παύση του μεταβολισμού σε ένα μόνο στάδιο (Canelas et al. 2008, Karamanou and Aliferis 2020).

Συγκεκριμένα, τα εναιωρήματα κονιδιοσπορίων (1 mL) φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 8000 rpm στους -3°C και τα υπερκείμενα απορρίφθηκαν. Στη συνέχεια, 1 mL παγωμένης μεθανόλης (-40°C) προστέθηκε αμέσως στο ίζημα των κονιδιοσπορίων για ταυτόχρονο καθαρισμό και παύση του μεταβολισμού των δειγμάτων, ακολουθούμενη από καλή ανάδευση με χρήση vortex και δεύτερη φυγοκέντριση όπως πριν (5 λεπτά, 8000 rpm, -3°C). Τα υπερκείμενα απορρίφθηκαν και η διαδικασία επαναλήφθηκε μία φορά.

Η εκχύλιση του ενδο-μεταβολόματος των κονιδιοσπορίων πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 500 μL διαλύματος εκχύλισης μεθανόλης: οξικού αιθυλεστέρα (50:50, v/v) (GC/MS grade, 99,9% καθαρότητας; Carlo Erba, Reuil, France) στο ίζημα των κονιδιοσπορίων, ακολουθούμενη από ισχυρή ανάδευση με χρήση vortex (Aliferis and Jabaji 2010a, Aliferis and Jabaji 2012, Aliferis et al. 2013a, Kalampokis et al. 2018). Τα εναιωρήματα τοποθετήθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο για 5 λεπτά, ακολουθούμενα από

επώαση επί 5 λεπτά σε πάγο. Ο κύκλος υγρού αζώτου-πάγου, επαναλήφθηκε δύο φορές (3 φορές συνολικά), εξασφαλίζοντας τη λύση των κυττάρων και τη βέλτιστη ανάκτηση του ενδο-μεταβολόματος (Karamanou and Aliferis 2020).

Μετά τη λύση, στα εναιωρήματα προστέθηκαν 20 μL διαλύματος ριβιτόλης (0.2 mg mL^{-1} σε μεθανόλη), που αρχικά στόχο είχε να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο (§2.11.2.6). Τοποθετήθηκαν για 20 λεπτά σε λουτρό υπερήχων (Branson 1210, Connecticut, NE, U.S.A.) και αναδεύθηκαν για 2 ώρες στις 200 rpm στους 24°C σε αναδευτήρα GFL 3006 (Burgwedel, Germany). Εν συνεχεία τα εναιωρήματα φιλτραρίστηκαν με φίλτρα PTFE $0.2 \mu\text{m}$ (Macherey-Nagel, Duren, Germany) και μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια τύπου Eppendorf safe lock (1.5 mL). Τα φιλτραρισμένα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού χρησιμοποιώντας έναν συμπυκνωτή κενού VR Maxi (Jouan Nordic, Allerod, Denmark).

Τα αποξηραμένα εκχυλίσματα παραγωγοποιήθηκαν με προσθήκη 40 μL υδροχλωρικής μεθοξυαμίνης (Sigma-Aldrich Ltd, Steinheim, Germany; cat. no. CAS 593-56-6) [20 mg mL^{-1} σε άνυδρη πυριδίνη (Merck Darmstadt, Germany; cat. no. CAS 110-86-1), αναμίχθηκαν καλά με χρήση vortex, και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο για 90 λεπτά στους 30°C . Στη συνέχεια προστέθηκαν 80 μL N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, Germany; cat. no. CAS 25561-30-2), που περιείχε πρότυπο διάλυμα δείκτη κατακράτησης (RI) αναλογίας 7:1 (v/o). Αναμίχθηκαν καλά με χρήση vortex, και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο 30 λεπτά στους 37°C . Ένα μίγμα από n-αλκάνια (C_{10} , C_{12} , C_{15} , C_{18} , C_{19} , C_{22} , C_{28} , C_{30} , C_{36}) (Sigma-Aldrich Ltd; cat. no. CAS 110-86-1) τελικής συγκέντρωσης 0.22 mg mL^{-1} εκάστου, χρησιμοποιήθηκε ως το πρότυπο διάλυμα δείκτη κατακράτησης (RI). Τα παραγοντοποιημένα δείγματα μεταφέρθηκαν τελικά σε μικροϋποδοχείς σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη των 2 mL για τις GC/EI/TOF αναλύσεις.

2.11.2.5 Αναλυτικές συνθήκες GC/EI-TOF/MS ανάλυσης

Χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Agilent 6890N (Agilent, Böblingen, Germany) εξοπλισμένος με φασματόμετρο μάζας Pegasus III TOF (LECO Instrumente GmbH,

Mönchengladbach, Germany) και αυτόματο δειγματολήπτη CTC Combi PAL με λογισμικό PAL cycle composer software v1.5.0 (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Εφαρμόστηκαν προηγούμενα αναλυτικά πρωτόκολλα, με μικρές τροποποιήσεις (Dethloff et al. 2014, Watanabe et al. 2018).

Τα δείγματα αναλύθηκαν τόσο με διαχωρισμό (**split**) (1:30) όσο και χωρίς διαχωρισμό (**splitless**) με θερμοκρασία έγχυσης 250°C. Τα δείγματα (1 μL) εγχύθηκαν σε low bleeding τριχοειδή στήλη (5 %-phenyl–95 %-dimethylpolysiloxane fused silica), μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0.25 mm και πάχος πληρωτικού υλικού 0.25 μm , με ενσωματωμένη προ-στήλη μήκους 10 m. Χρησιμοποιήθηκε ήλιο ως φέρον αέριο με ρυθμό ροής 0.6 mL min^{-1} . Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίστηκε στους 70°C σταθερή για 1 λεπτό, ακολουθούμενη από αύξηση με ρυθμό 9°C min^{-1} στους 350°C, και στη συνέχεια διατηρήθηκε σταθερή για 5 λεπτά. Εφαρμόστηκε θετικός ιονισμός ηλεκτρονίων στα 70eV και η θερμοκρασία της πηγής ιόντων ρυθμίστηκε στους 250°C. Η τάση του ανιχνευτή βελτιστοποιήθηκε ανάλογα με της ηλικίας και κατάστασης του ανιχνευτή σε περίπου 1.500-1.950 V. Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στην περιοχή μάζας 70-600 Da, με ρυθμό 20 σαρώσεις s^{-1} . Για προστασία του ανιχνευτή από τυχόν πλατό που οφείλεται στην παρουσία του διαλύτη, εφαρμόστηκε καθυστέρηση καταγραφής του σήματος για 7.5 λεπτά (solvent delay).

2.11.2.6 Επεξεργασία δεδομένων και ταυτοποίηση μεταβολιτών

Τα GC/EI-TOF/MS χρωματογραφήματα ολικού ιόντος (**TIC**) αποκτήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ChromaTOF (LECO). Η προ-επεξεργασία και δημιουργία της μήτρας δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τα λογισμικά AMDIS v.2.66 (NIST, Gaithersburg, MD, ΗΠΑ), Tagfinder (Luedemann et al. 2008, Luedemann et al. 2012) και MSDIAL εφαρμόζοντας τις συνιστώμενες ρυθμίσεις για GC/EI-TOF/MS μεταβολομική ανάλυση (Tsugawa et al. 2015, Lai et al. 2017, Tsugawa et al. 2019). Κορυφές που υπήρχαν στα τυφλά δείγματα που είχαν παρασκευαστεί ακολουθώντας το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο και χρησίμευαν για την παρακολούθηση πιθανής χημικής μόλυνσης π.χ. χειρισμός και προετοιμασία δειγμάτων, αντιδραστήρια, αιμορραγία

στήλης, όργανο) αφαιρέθηκαν από τις περαιτέρω αναλύσεις και για να ενισχυθεί η ομοιομορφία των δεδομένων. Μεταβολικά χαρακτηριστικά που εμφανίζονται σε ποσοστό μικρότερο από 40% μεταξύ των επαναλήψεων της ίδιας επέμβασης αποκλείστηκαν από περαιτέρω αναλύσεις.

Η ληφθείσα μήτρα δεδομένων εξήχθη στο MS Excel®, προσαρμόστηκε και προστέθηκαν πληροφορίες για τους μεταβολίτες. Οι εντάσεις του σήματος, αρχικά καταγεγραμμένες ως ύψη κορυφών, κανονικοποιήθηκαν ως προς την ποσότητα των κονιδιοσπορίων (10^8 κονιδιοσπόρια mL^{-1}), σε κάθε δείγμα και του εσωτερικού προτύπου. Τα πειράματα έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις πολλών μυκητιακών πολυολών μεταβάλλονταν κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων. Για να αποφευχθούν σφάλματα κατά την κανονικοποίηση από τυχόν ενδογενή μυκητιακή ριβιτόλη ή δυνητικά συν-εκλούόμενα ισομερή πεντιτόλης, δε χρησιμοποιήθηκε τελικά η ριβιτόλη ως εσωτερικό πρότυπο για την αριθμητική κανονικοποίηση. της τρέχουσας μελέτης. Για τους λόγους αυτούς, η χρήση του C_{22} η-αλκανίου ως εσωτερικού προτύπου επελέγη για κανονικοποίηση.

Η πιθανή ταυτοποίηση των μεταβολιτών βασίστηκε στην αντιστοίχιση των φασμάτων μάζας τους (>95% αντιστοίχιση) με τις καταχωρήσεις της βιβλιοθήκης μεταβολιτών του National Institute of Standards and Technology, NIST 08 (NIST; Gaithersburg, MD, USA), της Golm Metabolite Database (Korcka et al. 2005) και της βάσης δεδομένων μεταβολιτών του *A. nidulans* PMG *A. nidulans* v1.0 (https://www.aua.gr/pesticide-metabolomicsgroup/Resources/libraries/Aspergillus_nidulans_PMG_data_sets/PMG_Aspergillus_nidulans_metabolite_library_list.html) (Kalampokis et al. 2018). Για επιλεγμένους μεταβολίτες, πραγματοποιήθηκε απόλυτη ταυτοποίηση, συγκρίνοντας τα φάσματα μάζας και τους χρόνους κατακράτησης με αυτά αναλυτικών προτύπων που αναλύθηκαν στον ίδιο χρωματογράφο ακολουθώντας την ίδια μέθοδο, όπως προτείνεται από τη Metabolomics Standards Initiative (**MSI**) (Fiehn et al. 2007, Sansone et al. 2007).

Τέλος, η μήτρα εισήχθη στα λογισμικά SIMCA-P v.12.0 (Umetrics, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umeå, Sweden), Multiple Experiment Viewer (Wang, Kutnetsov, et al. 2017) για στατιστική ανάλυση. Για την ανακάλυψη των τάσεων και των αντίστοιχων μεταβολιτών βιοσημαντών, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις **PCA**, **OPLS-DA** και **HCA**

όπως περιεγράφηκε προηγουμένως (Aliferis et al. 2013b). Για τη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων υιοθετήθηκε προσέγγιση που περιεγράφηκε προηγουμένως (§2.11.1.4) (Kalampokis et al., 2018). Η κατασκευή του μεταβολικού δικτύου βασίστηκε σε πληροφορίες που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων KEGG, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Vanted v.2.6.5 (Junker et al. 2006, Rohn et al. 2012).

2.11.3 Μελέτη της επίδρασης του boscalid στην κονιδιακή εκβλάστηση του *A. nidulans*

2.11.3.1 Χημικά και αντιδραστήρια

Η δ.ο. boscalid υψηλής καθαρότητας (99%, w/w.) παρασχέθηκε από την εταιρία BASF Crop Protection (Ludwigshafen, Germany). Παρασκευάστηκαν αρχικά διαλύματα 10, 100, 1000 και 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σε μεθανόλη (GC/MS grade, 99.9%) και αποθηκεύτηκαν στους -30°C μέχρι την περαιτέρω χρήση. Για τη μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια όπως περιγράφονται στην §2.11.2.1.

2.11.3.2 Βιολογικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας

Προκειμένου να αναλυθεί η επίδραση του boscalid στον μεταβολισμό της κονιδιακής εκβλάστησης, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη χρησιμοποιώντας το ανθεκτικό στο boscalid $\Delta 7$ στέλεχος και το ευαίσθητο $\Delta 7::uapC^+$ στέλεχος, το οποίο υπερεκφράζει τον μεταφορέα UapC και προσροφά ενεργά τη δ.ο. (Kalampokis et al. 2018).

Πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα (CM) χρησιμοποιήθηκε για τη συντήρηση των στελεχών και την παραγωγή κονιδιοσπορίων. Για τη συγκριτική μεταβολομική μελέτη χρησιμοποιήθηκε υγρό ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα (MM), συμπληρωμένο με τις απαραίτητες αυξοτροφίες, στις συνιστώμενες συγκεντρώσεις από το Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net/>) και υποθανάσιμης ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) συγκέντρωσης

boscalid. Δείγματα δίχως προσθήκη boscalid αποτέλεσαν τους μάρτυρες. Η γλυκόζη συμπληρώθηκε στα μέσα σε τελική συγκέντρωση 1% (w/v). Εξαιτίας της ρύθμισης της μεταγραφής του *uarC* από τις διαθέσιμες πηγές αζώτου, ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκαν 10 mM νιτρικού νατρίου. Το pH των θρεπτικών υποστρωμάτων ρυθμίστηκε στο 6.8, χρησιμοποιώντας 0.1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου. Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν στους 37°C στο σκοτάδι.

Προκειμένου να καθοριστούν τα κατάλληλα χρονικά σημεία για τη δειγματοληψία, ελήφθησαν υπόψη τα αποτελέσματα από την προηγούμενη μεταβολομική μελέτη της κονιδιακής εκβλάστησης του στελέχους FGSC A4 §2.11.2 (Kalampokis et al. 2020). Επιπρόσθετα, το γονίδιο *uarC* είναι γνωστό ότι μεταγράφεται σε μέγιστο βαθμό και εκφράζεται ανεξάρτητα από εξειδικευμένους μεταγραφικούς παράγοντες, σε μορφολογικό στάδιο μετά την εγκατάσταση της πολικότητας και ακριβώς πριν από την εμφάνιση της υψής εκβλάστησης, η οποία συνήθως απαιτεί επώαση 4-5 ωρών των κονιδιοσπορίων στους 37°C (Amillis et al. 2004, Vlanti and Diallinas 2008, Krypotou and Diallinas 2014). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η δ.ο. προστέθηκε σε κλάσμα 1 mL του κονιδιακού εναιωρήματος των στελεχών Δ7 και Δ7::*uarC*+, 4 ώρες μετά την επώασή τους στους 37±1°C και 150 rpm σκοτάδι. Η δειγματοληψία για την εκτέλεση αναλύσεων μεταβολομικής πραγματοποιήθηκε 5 ώρες μετά την προσθήκη (συνολικά επώαση 9 ωρών). Για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις.

Η μεταβολομική αναλυτική διαδικασία, η ανάλυση των δεδομένων, η διεξαγωγή των μεταβολομικών μελετών, και η ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφονται προηγουμένως (§2.11.2.4 – 2.11.2.6).

2.11.4 Μελέτη της επίδρασης των boscalid και isopyrazam στο μεταβολισμό του στελέχους FGSC A4

2.11.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τα χημικά αντιδραστήρια και την προετοιμασία των δειγμάτων ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες και τα πρωτόκολλα όπως περιγράφονται στις παραγράφους §2.11.1.1 και §2.11.1.2.

Για τη μελέτη της επίδρασης των μυκητοκτόνων το αγρίου τύπου FGSC A4 στέλεχος επωάστηκε για 4 ημέρες σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα στους 37°C. Τα σχηματισμένα κονιδιοσπόρια συλλέχθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα Tween80 0.01 % (v/v). Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για να διαχωριστούν τα κονιδιοσπόρια από τις μυκηλιακές υφές. Ακολούθησε φιλτράρισμα του κονιδιακού εναιωρήματος (10^8 κονίδια mL^{-1}) με ειδικό αποστειρωμένο φίλτρο (0.2 μm). 200 μL από το αιώρημα απλώθηκε σε τρυβλία με πλήρες θρεπτικό υλικό που περιείχε συγκέντρωση των μυκητοκτόνων boscalid και isopyrazam ίση περίπου με την EC_{50} (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Καλλιέργειες δίχως δ.ο. χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (controls). Για τον διαχωρισμό των μυκηλιακών υφών από το θρεπτικό υπόστρωμα, στην επιφάνεια του στέρεου θρεπτικού υλικού απλώθηκε αποστειρωμένη ημιπερατή βιολογική μεμβράνη (500PUT; Futamura USA Inc., Atlanta, GA, USA). Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37°C για 3 και 6 ημέρες σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών. Το μυκήλιο συλλέχθηκε με χρήση αποστειρωμένης σπάτουλας, βυθίστηκε σε υγρό άζωτο και θρυμματίστηκε σε αποστειρωμένο μικρογουδί. Ο θρυμματισμένος ιστός αποθηκεύτηκε στους -80°C. Συνολικά για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις.

2.11.4.2 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της μεταβολομικής, μέχρι και την εξαγωγή της τελικής μήτρας, ακολουθήθηκαν τα στάδια όπως περιγράφονται στην παράγραφο §2.11.1.5 με μικρές τροποποιήσεις. Συνοπτικά κατά την προεπεξεργασία των

δεδομένων, έπειτα από την ευθυγράμμιση (**alignment**) και διόρθωση της γραμμής βάσης (**baseline correction**), ακολούθησε κανονικοποίηση ως προς τη συνολική ένταση των μεταβολιών κάθε δείγματος (**total sum normalization**). Για τη διόρθωση της μη ομοιογενούς κατανομής των δεδομένων και στην απομάκρυνση της όποιας ετεροεκκλησιμότητάς τους, τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν στον δυαδικό λογάριθμό τους (**log2 transformation**).

Για τον καθορισμό του στατιστικού βάρους κάθε μεταβλητής ακολούθησε κλιμακοποίηση (**scaling**) των μετασχηματισμένων τιμών. Αρχικά για την απομάκρυνση της όποιας μετατόπισης των δεδομένων (**data offset**) πραγματοποιήθηκε μεσοστάθμιση των μετασχηματισμένων δειγμάτων (**mean-centering**), σύμφωνα με την οποία αφαιρέθηκε από κάθε μεταβολίτη ο μέσος όρος των εντάσεων του συγκεκριμένου μεταβολίτη σε όλα τα δείγματα. Ακολούθησε κλιμακοποίηση μοναδιαίας διακύμανσης (**unit/auto scale**) των μεσοσταθμισμένων τιμών κάθε μεταβολίτη, όπου κάθε τιμή διαιρέθηκε με την τυπική απόκλιση των εντάσεων του συγκεκριμένου μεταβολίτη σε όλα τα δείγματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι κλιμακοποίηση **Pareto** κατά την οποία ο κάθε μεταβολίτης διαιρείται με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης των εντάσεων του συγκεκριμένου μεταβολίτη σε όλα τα δείγματα, έδωσε ίδια αποτελέσματα. Συνοπτικά ο τύπος της κλιμακοποίησης των δεδομένων για την κλιμακοποίηση μοναδιαίας διακύμανσης είναι ο $\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i}$ και για την Pareto κανονικοποίηση ο $\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{\sqrt{s_i}}$, όπου i η σειρά της μήτρας που αντιστοιχεί στους διαφορετικούς μεταβολίτες και j οι στήλες της μήτρας που αντιστοιχούν στα διαφορετικά δείγματα (van den Berg et al. 2006).

2.12 Πρωτεομική ανάλυση της επίδρασης του boscalid

2.12.1 Συνθήκες καλλιέργειας

Για την πρωτεομική ανάλυση της επίδρασης του boscalid στο FGSC A4 στέλεχος, χρησιμοποιήθηκε αποθηκευμένος στους -80°C ιστός από 4 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο §2.11.4. Η προετοιμασία των δειγμάτων, η ανάλυση με σύστημα LC/Orbitrap-ms και η μετέπειτα στατιστική επεξεργασία στηρίχθηκε σε ήδη δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Kniemeyer et al. 2016, Amarsaikhan et al. 2017, Conrad et al. 2018)

2.12.2 Απομόνωση πρωτεϊνών

Σε 100 mg που θρυμματισμένου ιστού, προστέθηκαν 300 μL ρυθμιστικού λυτικού διαλύματος (1% SDS, 150 mM NaCl, 100 mM TEAB (triethyl ammonium bicarbonate), 1 ταμπλέτα από Complete Ultra Protease Inhibitor Cocktail, 1 ταμπλέτα PhosSTOP; σε υπερκάρθαρo και αποστειρωμένο H_2O), και τα δείγματα αναμίχθηκαν καλά με χρήση vortex. Προστέθηκαν 0.4 μL benzonase ($250 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) και ακολούθησε επώασμός σε υδατόλουτρο για 30 min στους 37°C . Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 14.000 rpm στους 4°C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο σε καινούριο αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου Eppendorf (1.5 mL).

Ακολούθησε εκτίμηση της ολικής ποσότητας των πρωτεϊνών κάθε δείγματος με χρήση του Merck Millipore Direct Detect[®] υπέρυθρου φασματομέτρου (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε καινούρια αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου Eppendorf (1.5 mL), μεταφέρθηκε ποσότητα που αντιστοιχεί σε 100 μg πρωτεΐνης και συμπληρώθηκε με 100 mM TEAB, έως τελικού όγκου 100 μL .

Στα δείγματα προστέθηκαν 2 μL διαλύματος απομείωσης (500 mM TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine σε 100 mM TEAB. και αναδεύθηκαν. Ακολούθησε προσθήκη 2 μL φρέσκου παρασκευασμένου ρυθμιστικού διαλύματος αλκυλίωσης (0.0292 g 2-

χλωροακεταμιδίου σε 500 μL 100 mM TEAB), ανάδευση όπως πριν και επώαση στους 70°C και 500 rpm υπό συνθήκες σκότους, για 30 λεπτά.

Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C για 15 λεπτά και ακολούθησε η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα προστέθηκαν 400 μL παγωμένης μεθανόλης (-20°C) και τα δείγματα αναμίχθηκαν καλά με χρήση vortex, ώστε να τηχθούν. Ακολούθησε διαχωρισμός των λιπιδίων με προσθήκη 100 μL παγωμένου χλωροφορμίου (-20°C) και ανάμιξη με χρήση vortex. Έπειτα προστέθηκαν 300 μL υπερκάθαρου και αποστειρωμένου παγωμένου νερού (-20°C) και ανάμιξη με χρήση vortex, ώστε να υποβοηθηθεί ο διαχωρισμός των φάσεων και η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Το τριφασικό σύστημα τοποθετήθηκε στους -20°C για 5 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 14.000 rpm στους 4°C και απερρίφθη η ανώτερη φάση, με προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί η πρωτεϊνική μεσόφαση. Προστέθηκαν 400 μL παγωμένης μεθανόλης -20°C και τα δείγματα αναμίχθηκαν καλά με χρήση vortex. Ακολούθησε φυγοκέντριση όπως πριν, απερρίφθη το υπερκείμενο και τα δείγματα εξατμίστηκαν μέχρι σχεδόν ξηρού με χρήση αντλίας κενού SpeedVac, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην ξηραθούν.

Το πρωτεϊνικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μL διαλύματος ένυδρης 2,2,2-τριφθοροεθανόλης (5% σε 100 mM TEAB). Ακολούθησε πρωτεϊνική πέψη στους 37°C για 18 ώρες με προσθήκη 2 μL διαλύματος τρυψίνης/λυσίνης (100 μg σε 50 μL of ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης, Promega), με αναλογία πρωτεΐνης/πρωτεάση 25:1. Τα δείγματα εξατμίστηκαν έως ξηρού με χρήση συμπυκνωτή κενού (Eppendorf), δίχως να ξεπεράσει ο ολικός χρόνος τις 2 ώρες, και επαναιωρήθηκαν σε 30 μL διαλύματος 0.05% TFA (σε 2% ακετονουτρίλιο σε νερό). Ακολούθησε διεξοδική ανάδευση και επώαση για 15 λεπτά σε υδατόλουτρο υπερήχων. Τα δείγματα φιλτραρίστηκαν με χρήση 0.2 μm φίλτρου φυγοκέντρισης (Merck Millipore UltrafreeR-MC, hydrophilic PTFE membrane) και φυγοκέντριση στις 14.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Τα φιλτραρισμένα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την LC-MS/MS ανάλυση.

2.12.3 Αναλυτικές συνθήκες LC-MS/MS (orbitrap)

Οι 3 βιολογικές επαναλήψεις κάθε επέμβασης μετρήθηκαν εις τριπλούν (3 αναλυτικές επαναλήψεις των 3 βιολογικών επαναλήψεων κάθε επέμβασης) ενώ η τέταρτη παρέμεινε αποθηκευμένη στους -80°C .

Για την LC-MS/MS ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Ultimate 3000 nano RSLC συνδεδεμένο με ένα φασματόμετρο μάζας QExactive HF (και τα δύο Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Η παγίδευση πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε σε στήλη Acclaim Pep Map 100 (2 cm x 75 μm , 3 μm) στα 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ για 5 λεπτά και ακολούθησε διαχωρισμός σε αναλυτική νανο στήλη Acclaim Pep Map RSLC (50 cm x 75 μm , 2 μm). Πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτή έκλουση της κινητής φάσης με διαλύτη A (0,1% (v/v) μυρμηκικό οξύ σε νερό) και διαλύτη B (0,1% (v/v) μυρμηκικό οξύ σε 90/10 ακετονιτρίλιο/νερό) χρησιμοποιώντας την ακόλουθη βαθμίδα: 0-4 λεπτά σε 4% B, 60 λεπτά σε 12% B, 120 λεπτά σε 16% B, 150 λεπτά σε 25% B, 175 λεπτά σε 35% B, 200 λεπτά σε 60% B, 210-215 λεπτά σε 96% B, 215.1-240 λεπτά σε 4% B.

Ακολούθησε θετικός ιονισμός με τάση ψεκασμού 2,2 kV χρησιμοποιώντας πομπό από ανοξείδωτο ατσάλι συνδεδεμένο στην πηγή ιονισμού Nanospray Flex Ion Source (Thermo Fisher Scientific). Το τετράπολο/orbitrap λειτούργησε σε Full MS / data-dependent MS2 Top15 mode. Τα πρόδρομα ιόντα παρακολουθήθηκαν σε m/z 300-1500 σε ανάλυση 120.000 FWHM (full width at half maximum) χρησιμοποιώντας μέγιστο χρόνο έγχυσης (ITmax) 120 ms και στόχο AGC (automatic gain control) $3e6$. Τα πρόδρομα ιόντα με κατάσταση φόρτισης $z = 2-5$ φιλτραρίστηκαν σε πλάτος απομόνωσης m/z 1,6 amu για περαιτέρω HCD κατακερματισμό σε 30% κανονικοποιημένης ενέργειας σύγκρουσης (NCE).

Τα MS2 ιόντα σαρώθηκαν στα 15.000 FWHM (ITmax = 100 ms, AGC = $2e5$) χρησιμοποιώντας σταθερή πρώτη μάζα m/z 120 amu. Ο δυναμικός αποκλεισμός των προδρόμων ιόντων ορίστηκε στα 30 s και ο ελάχιστος στόχος AGC για τα πρόδρομα ιόντα που επιλέχθηκαν για τον κατακερματισμό HCD ορίστηκε σε $1e3$. Για τον έλεγχο του LC-MS/MS συστήματος χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chromeleon 7.2, QExactive HF Tune 2.8 και Xcalibur 4.0.

2.12.4 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Για την αναζήτηση των φασμάτων μάζας χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων UniProt (2019/11/12 (YYYY/MM/DD); <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000560>) του *A. nidulans* FGSC A4 χρησιμοποιώντας το Proteome Discoverer (PD) 2.4 (Thermo) και τους αλγόριθμους Mascot 2.4.1 (Matrix Science, UK), Sequest HT (έκδοση PD2.4) και MS Amanda 2.0. Δύο χαμένες σχάσεις από την τρυπτική πέψη έγιναν αποδεκτές. Η ανοχή μάζας του πρόδρομου ιόντος ορίστηκε στα 10 ppm και η ανοχή του θραύσματος στα 0,02 Da.

Αυστηρός λόγος ψευδούς ανακάλυψης (FDR) <1% (επίπεδο πεπτιδίων και πρωτεϊνών) και βαθμολογία μηχανών αναζήτησης > 30 (μασκότ), > 4 (Sequest HT) ή > 300 (MS Amanda) απαιτήθηκαν για τη θετική ταυτοποίηση των πρωτεϊνών. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μη σημασμένων πρωτεϊνών βασίστηκε στον αλγόριθμο Minora του PD2.4 χρησιμοποιώντας την καταγραφή των προδρόμων με βάση την ένταση και η αναλογία του σήματός τους προς θόρυβο να είναι τουλάχιστον μεγαλύτερη του 5.

Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Για τις μηδενικές τιμές χρησιμοποιήθηκε το 75% της χαμηλότερης καταγεγραμμένης έντασης κάθε δείγματος. Ως σημαντική διαφορά των επιπέδων μεταξύ των δειγμάτων ορίστηκε μεταβολή > 4, (pvalue <0,05) των εντάσεων και στις 3 επαναλήψεις κάθε δείγματος.

3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

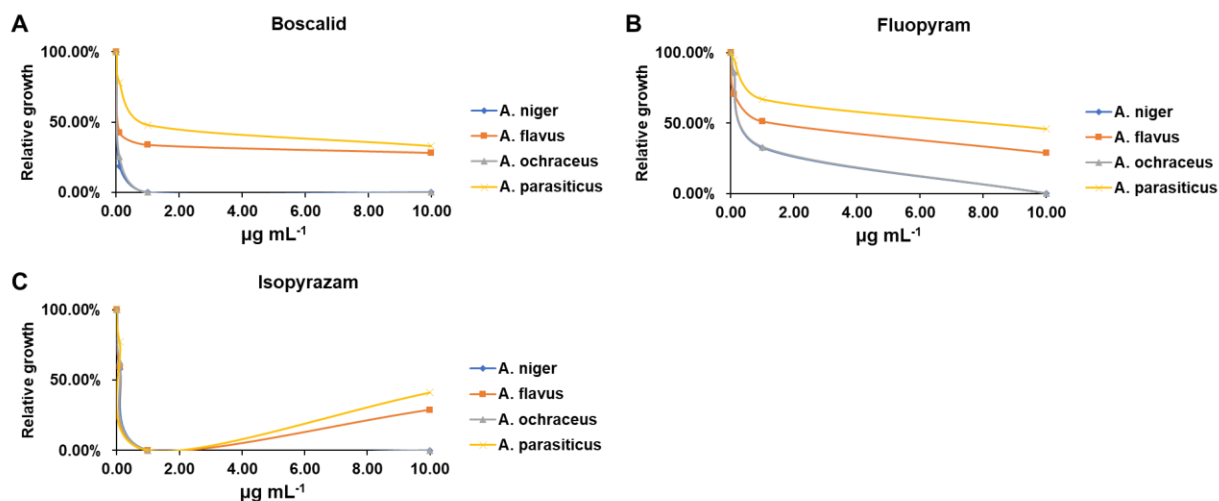
3.1 Τοξικότητα μυκητοκτόνων διαφορετικών χημικών ομάδων σε Ασπεργίλλους

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ευαισθησίας σε μυκητοκτόνα από διαφορετικές χημικές ομάδες, των σημαντικών για τη φυτοπροστασία ειδών *A. flavus* (NRRL-3357), *A. niger* (NRRL-326), *A. ochraceus* (NRRL-5175) και *A. parasiticus* (ATCC-15517), τα οποία είναι διαθέσιμα στη συλλογή του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας (Γ.Π.Α.). Τα μυκητοκτόνα που αξιολογήθηκαν ήταν τα boscalid, fluopyram και isopyrazam που ανήκουν στους SDHIs, τα azoxystrobin picoxystrobin, trifloxystrobin, pyraclostrobin, kresoxim methyl και fenamidone της ομάδας των παρεμποδιστών του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς και τα fludioxonil και cyprodinil. Για την αξιολόγηση της ευαισθησίας των στελεχών στις δ.ο. αυτές, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0.1, 1 και 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 9 cm, που περιείχαν στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, εμπλουτισμένο με νιτρικό νάτριο για πηγή αζώτου. Οι αποικίες καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, για 5 ημέρες, στους 25°C που αποτελεί την ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξής τους. Αποτελέσματα ελήφθησαν με μέτρηση της διαμέτρου της αποικίας και σύγκρισή της με την αντίστοιχη διάμετρο αποικιών που δεν προστέθηκε δ.ο. και χρησίμευσαν ως μάρτυρες, οπότε και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες τις σχετικής (%) ανάπτυξης

3.1.1 Αξιολόγηση ευαισθησίας σε παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHIs)

Η αποτελεσματικότητα των boscalid, fluopyram και isopyrazam παρουσιάζεται στις ακόλουθες καμπύλες σχετικής ανάπτυξης:

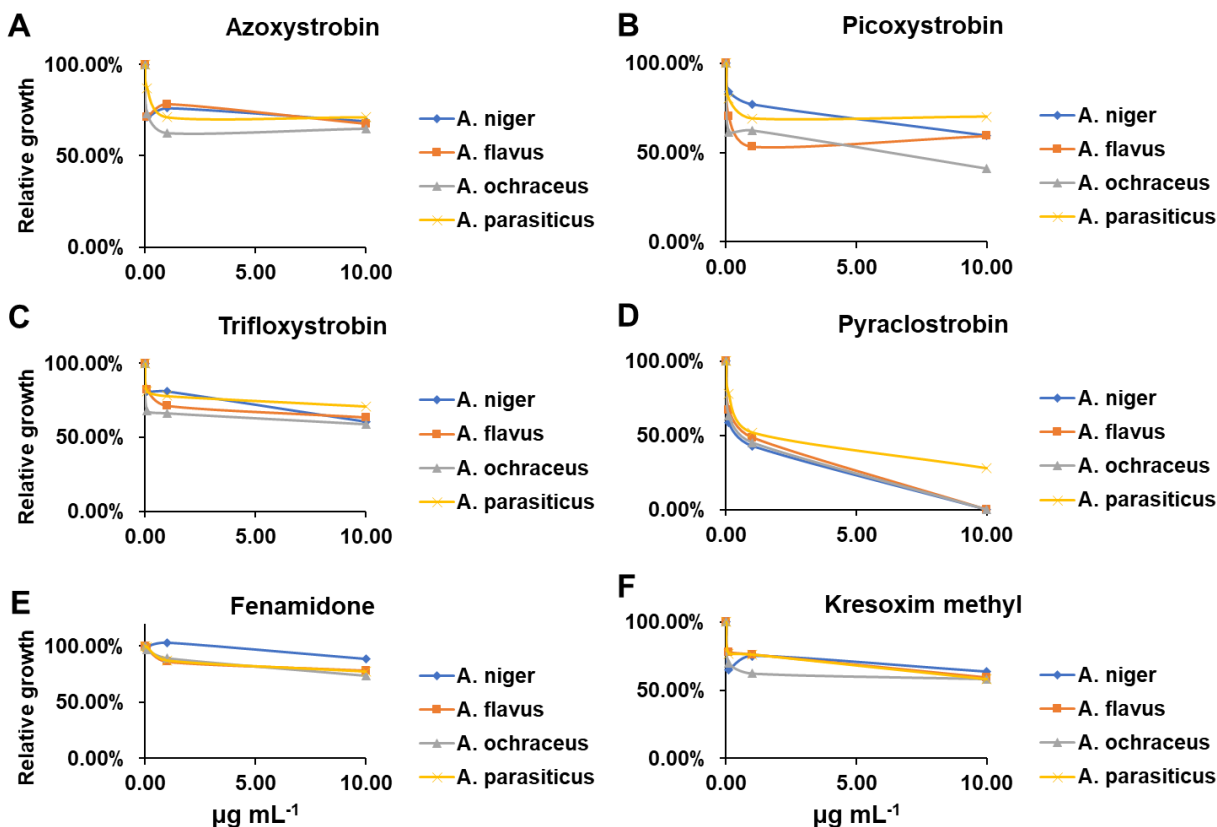


Εικόνα 31: Καμπύλες ανάπτυξης των *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* και *A. parasiticus* έπειτα από καλλιέργεια 5 ημερών παρουσία boscalid (A), fluopyram (B) και isopyrazam (C)

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι SDHIs είναι αποτελεσματικοί ακόμη και σε συγκέντρωση της τάξης των $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, αν και εν συνεχεία φαίνεται η αποτελεσματικότητα να βαίνει μειούμενη, έχοντας ως χαρακτηριστικό την ύπαρξη “πλατό” ανάπτυξης τουλάχιστον στην περίπτωση του boscalid. Όσον αφορά τα στελέχη φαίνεται πως ο *A. parasiticus* είναι ο λιγότερο ευαίσθητος, σε αντίθεση με τους *A. niger* και *A. ochraceus* που εμφανίζονται ιδιαίτερα ευαίσθητοι. Τέλος ο *A. flavus* εμφανίζει μια ενδιάμεση ευαισθησία.

3.1.2 Αξιολόγηση ευαισθησίας σε παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας

Η ευαισθησία των στελεχών στις στρομπιλουρίνες και το fenamidone παρουσιάζεται στις ακόλουθες καμπύλες σχετικής ανάπτυξης:

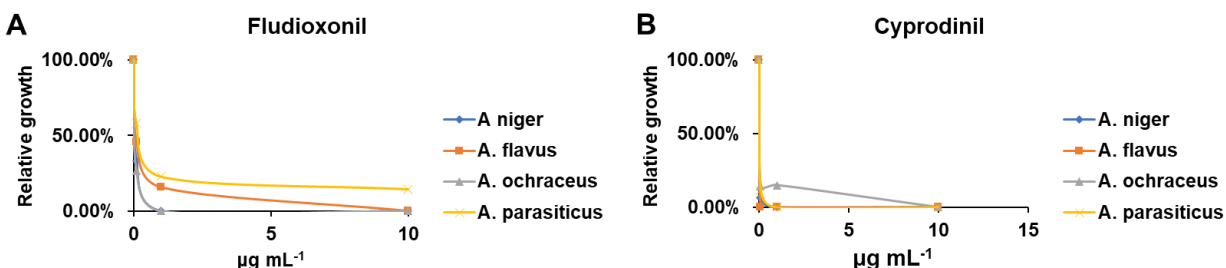


Εικόνα 32: Καμπύλες ανάπτυξης των *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* και *A. parasiticus* έπειτα από καλλιέργεια 5 ημερών παρουσία azoxystrobin (A), picoxystrobin (B), trifloxystrobin (C), pyraclostrobin (D), fenamidone (E) και kresoxym methyl (F)

Από τα αποτελέσματα γίνεται εμφανές πως οι παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας δεν είναι αποτελεσματικοί στα συγκεκριμένα είδη. Όπως έχουν δείξει προηγούμενες μελέτες (Zehentgruber et al. 1980, Molnár et al. 2018, Tian et al. 2020), οι ασπέργιλλοι φέρουν ενεργό το μονοπάτι της εναλλακτικής οξειδάσης. Με αυτόν τον τρόπο παρακάμπτεται η επίδραση των παρεμποδιστών και παρατηρείται η υψηλή ανάπτυξη των στελεχών.

3.1.3 Αξιολόγηση ευαισθησίας στα fludioxonil και cyprodinil

Η αποτελεσματικότητα των fludioxonil (δράση μέσω αποδιοργάνωσης των κυτταρικών μεμβρανών) και του cyprodinil (πιθανή δράση μέσω παρεμπόδισης βιοσύνθεσης μεθειονίνης) παρουσιάζεται στις ακόλουθες καμπύλες σχετικής ανάπτυξης:



Εικόνα 33: Καμπύλες ανάπτυξης των *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* και *A. parasiticus* έπειτα από καλλιέργεια 5 ημερών παρουσία fludioxonil (A) και cyprodinil (B)

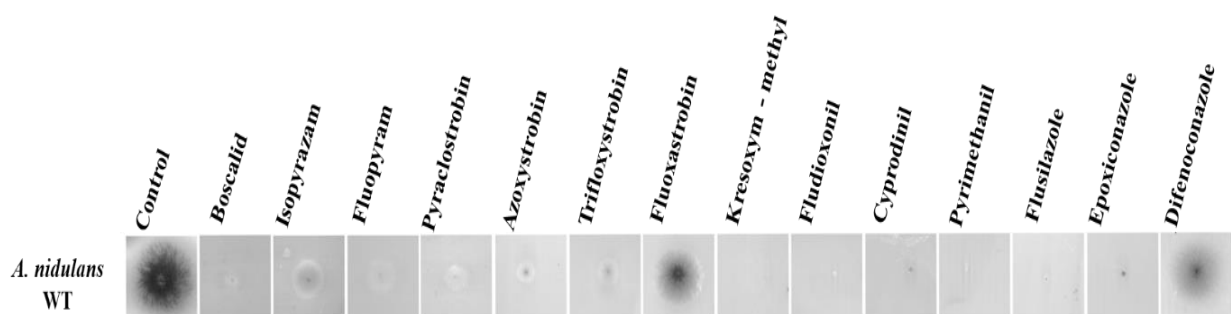
Παρατηρείται ότι πρόκειται για πολύ αποτελεσματικές δ.ο. έναντι των αξιολογούμενων στελεχών. Ιδιαίτερα αποτελεσματικό είναι το cyprodinil, το οποίο αποδείχθηκε ως η αποτελεσματικότερη δ.ο. από όσες εξετάστηκαν.

3.2 Οι SDHIs παρουσιάζουν δραστηριότητα έναντι του *A. nidulans*

Λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα αποτελέσματα, αξιολογήθηκαν μυκητοκτόνα εγκεκριμένα και που χρησιμοποιούνται συνήθως στη φυτοπροστασία, για την τοξικότητά τους έναντι του στελέχους *A. nidulans* αγρίου τύπου (*wt*) (§2.1) που καλλιεργήθηκε στους 37°C σε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, εμπλουτισμένο με γλυκόζη και νιτρικό νάτριο ως πηγές άνθρακα και αζώτου, και τις απαραίτητες αυξοτροφίες (παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ) (Εικόνα 34).

Τα μυκητοκτόνα τα οποία δοκιμάστηκαν, ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες με βάση τον μηχανισμό δράσης τους (Πίνακας 8). Βρέθηκε ότι είναι πολύ τοξικά για τον μύκητα στη

συγκέντρωση των $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, ενώ αντίθετα τα fluoxastrobin και difenoconazole είναι οι λιγότερο αποτελεσματικές (**Εικόνα 34**)

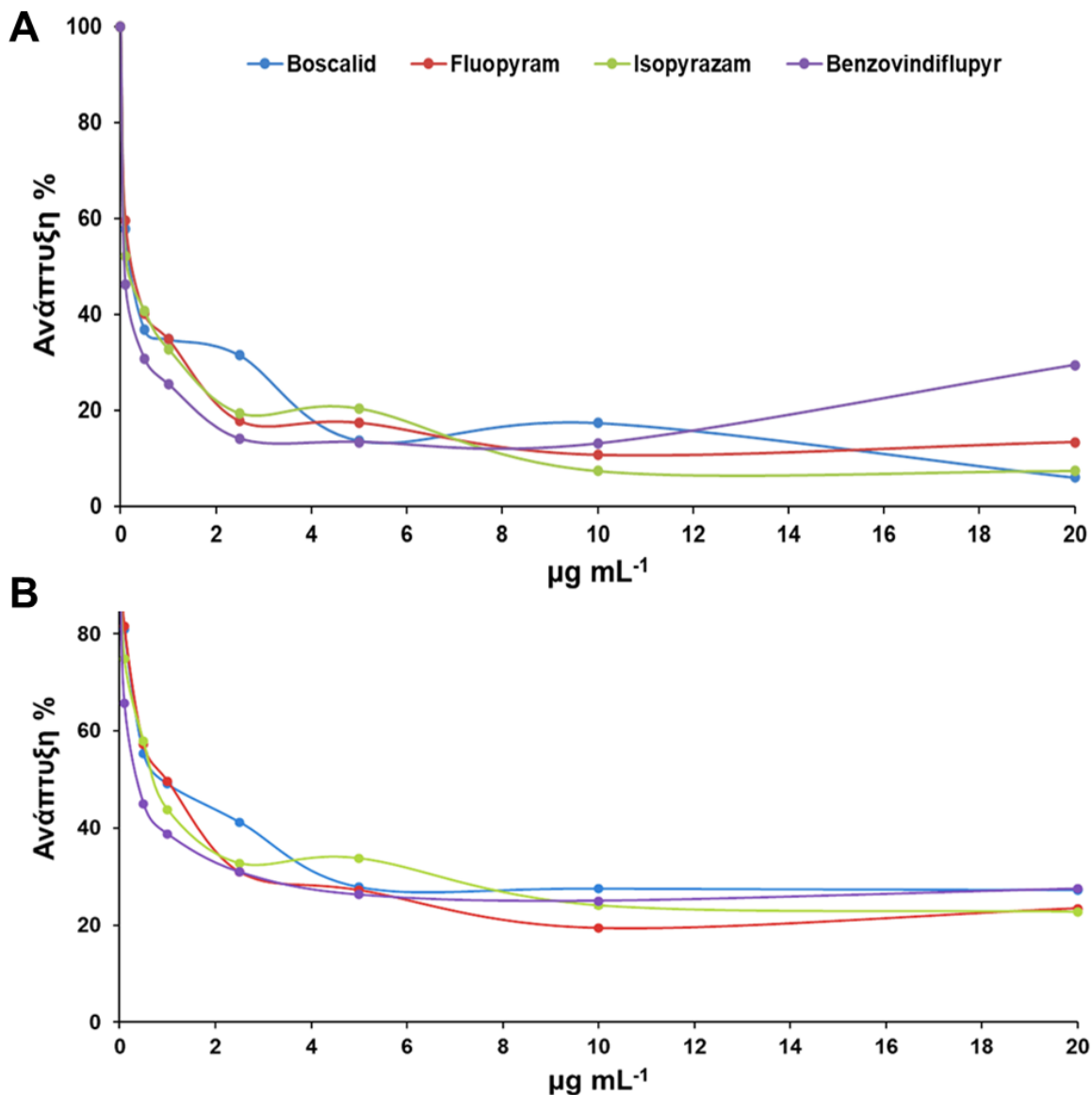


Εικόνα 34: Εκτίμηση της ευαισθησίας του άγριου τύπου στελέχους *A. nidulans* (WT) σε μυκητοκτόνα με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης σε συγκέντρωση $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ με βάση την ακτινωτή ανάπτυξη καλλιεργειών που αναπτύσσονται σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, συμπληρωμένο με NO_3^- ως πηγή N στους 37°C και $\text{pH } 6,8$.

Βάσει των προηγούμενων αποτελεσμάτων, διερευνήθηκε σε βάθος η ευαισθησία του αγρίου τύπου στελέχους FGSC A4 σε τέσσερις εκπροσώπους των SDHIs. Πέραν των boscalid, fluopyram και isopyrazam αξιολογήθηκε και η αποτελεσματικότητα του benzonindiflupyr, του νεότερου εκπροσώπου των SDHIs. Για τη μελέτη της ευαισθησίας του στελέχους, χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0.1 , 0.5 , 1 , 2.5 , 5 και $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες σχετικής ανάπτυξης.

Το στέλεχος αναπτύχθηκε σε τρυβλία διαμέτρου 9 χιλιοστών, που περιείχαν στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με νιτρικό νάτριο για πηγή αζώτου. Οι αποικίες καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, για 3 και 6 ημέρες, στους 37°C που αποτελεί την ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξής του. Αποτελέσματα ελήφθησαν με μέτρηση της διαμέτρου της αποικίας και σύγκρισή της με την αντίστοιχη διάμετρο αποικιών που δεν προστέθηκε δ.ο. και χρησίμευσαν ως μάρτυρες, οπότε και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες τις σχετικής (%) ανάπτυξης. Με εφαρμογή probit ανάλυσης χρησιμοποιώντας το λογισμικό JMP (ver 11), υπολογίστηκε η τιμή της μέσης θανατηφόρου δόσης (EC_{50}), για κάθε δ.ο..

Η ευαισθησία του στελέχους FGSC A4 στους SDHIs στις 3 και 6 ημέρες παρουσιάζεται στις ακόλουθες καμπύλες σχετικής ανάπτυξης:



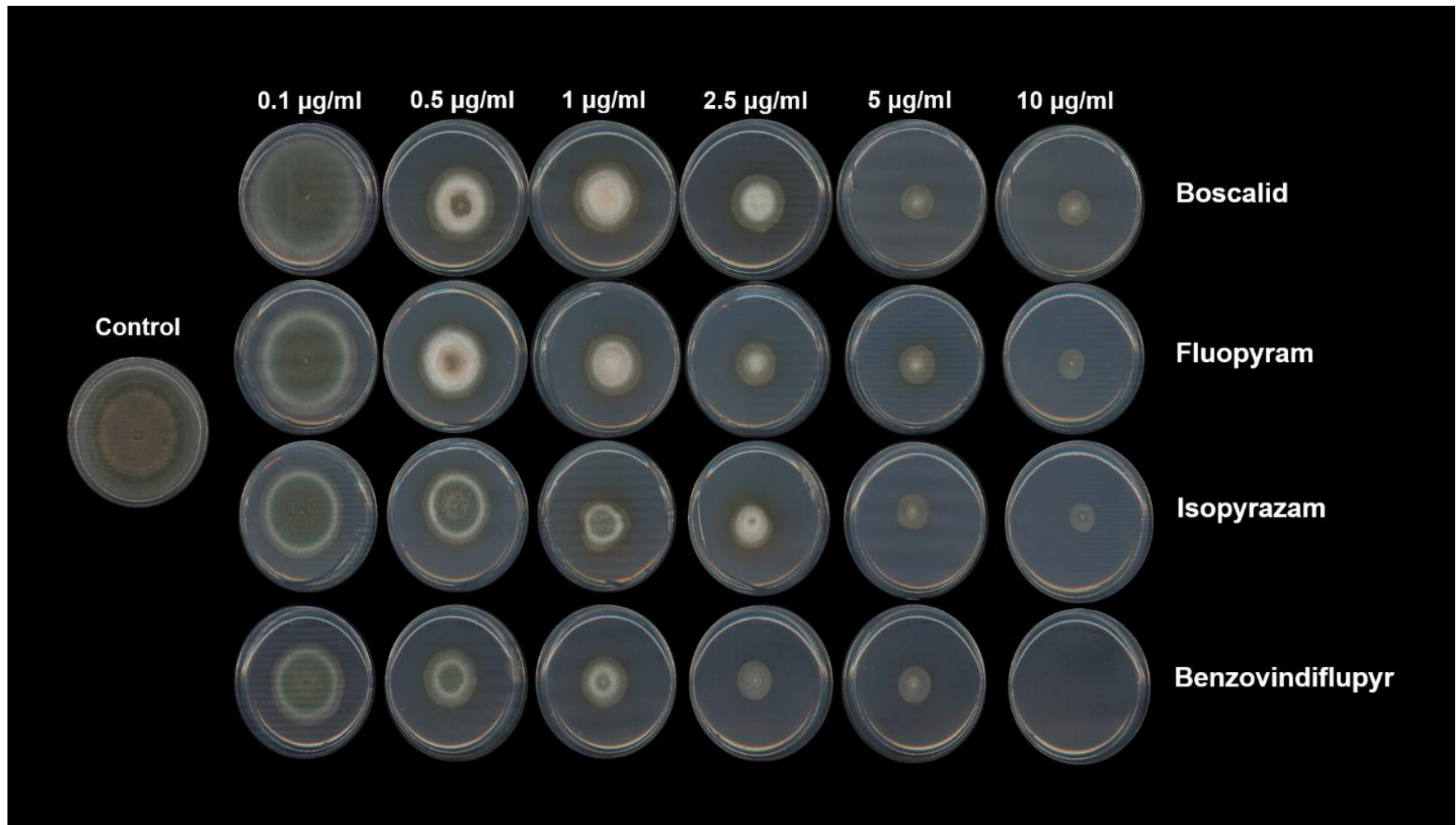
Εικόνα 35: Καμπύλες σχετικής ανάπτυξης του στελέχους FGSC A4 στα boscalid, fluopyram, isopyrazam και benzovindiflupyr, έπειτα από 3 (A) και 6 (B) ημέρες ανάπτυξης σε στερεό ελάχιστο θρεπτικό υλικό στους 37°C και pH 6,8

Επιπλέον στον **πίνακα 12** παρουσιάζεται η EC₅₀ του αγρίου στελέχους στους παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος στις 3 και 6 ημέρες.

Πίνακας 12: Υπολογισμός της EC_{50} του αγρίου στελέχους FGSC A4, στους παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων με εφαρμογή probit ανάλυσης

Δραστική Ουσία	3 Ημέρες Ανάπτυξης (EC_{50})	6 Ημέρες Ανάπτυξης (EC_{50})
Boscalid	0.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.16 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Fluopyram	0.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.97 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Isopyrazam	0.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.86 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Benzovindiflupyr	0.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.37 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Είναι εμφανές ότι και στις δύο μετρήσεις η ευαισθησία του στελέχους FGSC A4 στα boscalid, fluopyram και isopyrazam παρουσιάζει παρόμοιο επίπεδο, ενώ αντιθέτως στο benzovindiflupyr εμφανίζει αρκετά υψηλότερη τοξικότητα. Αυτή η αυξημένη αποτελεσματικότητα του benzovindiflupyr, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν για πιθανή έγκρισή του και εφαρμογή έναντι προσβολών που οφείλονται σε επιμολύνσεις των αγροτικών προϊόντων από είδη Ασπεργίλλων. Επιπλέον από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η αποτελεσματικότητα και των τεσσάρων δ.ο. μειώνεται σημαντικά μεταξύ των δύο μετρήσεων. Αυτή η σημαντική διαφοροποίηση πιθανότατα οφείλεται στη δράση πιθανών βιοχημικών μηχανισμών άμυνας του κυττάρου, που έχουν ως συνέπεια τη μείωση των τοξικών τους συγκεντρώσεων εντός αυτού (§3.7). Παρόλα αυτά η παρεμπόδιση παραμένει σημαντική. Επιπλέον χαρακτηριστική είναι η ύπαρξη “πλατό” ανάπτυξης και στην περίπτωση του *A. nidulans*, αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα είδη *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* (§3.1.1).



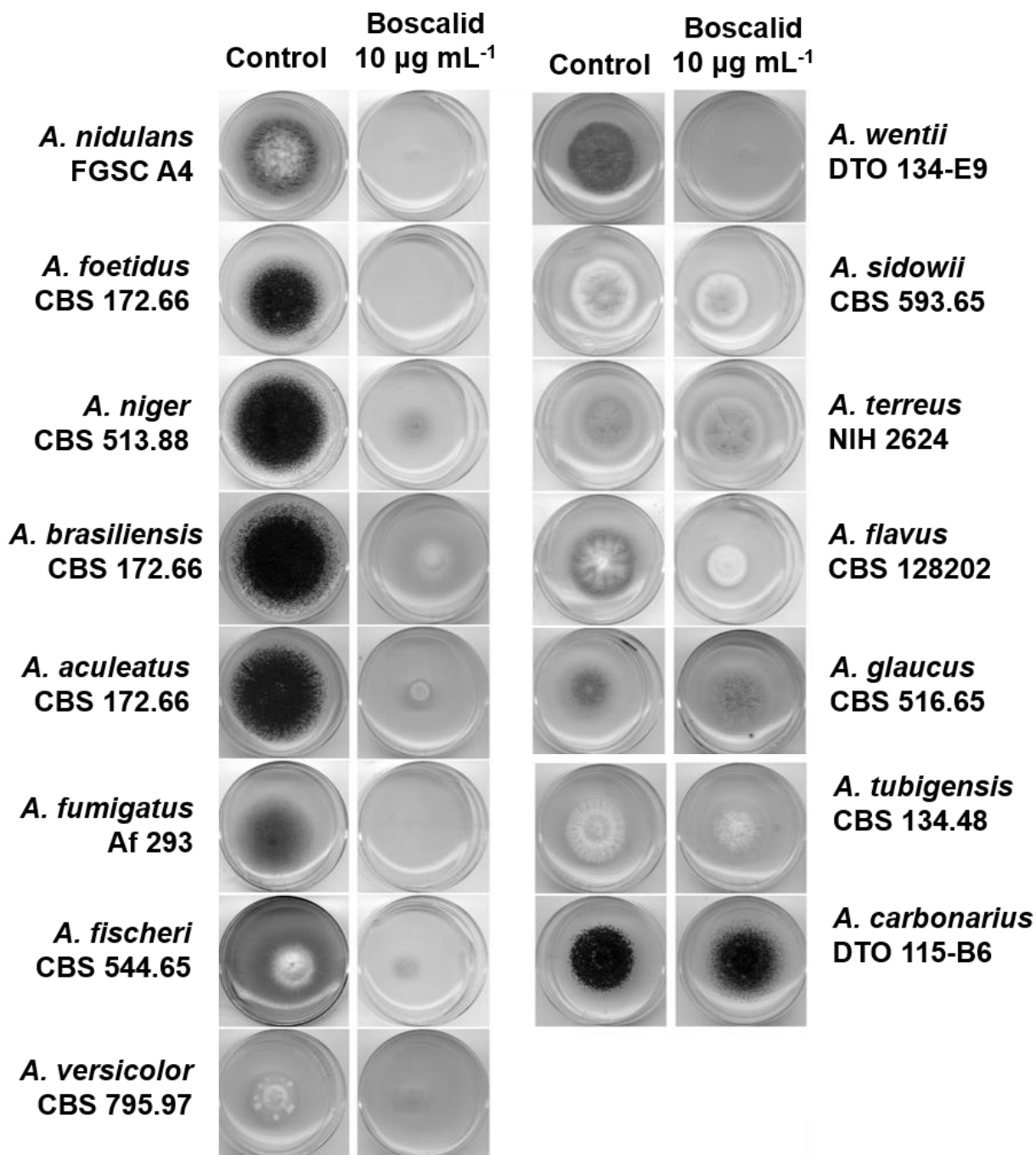
Εικόνα 36: Απεικόνιση της επίδρασης των *boscalid*, *fluopyram*, *isopyrazam* και *benzovindiflupyr* στο αγρίου τύπου FGSC A4 στέλεχος του *A. nidulans*, έπειτα από ανάπτυξη 6 ημερών σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υλικό και καλλιέργεια στους 37°C

3.3 Το boscalid είναι αποτελεσματικό για σημαντικά είδη ασπεργίλλων

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα προηγούμενα αποτελέσματα, αλλά και τη σημασία που κατέχει στη σύγχρονη φυτοπροστασία, αποφασίστηκε το boscalid να αποτελέσει επίκεντρο του διδακτορικού.

Αρχικά, ερευνήθηκε κατά πόσο η δ.ο. έχει ευρεία κυτταροτοξική επίδραση σε άλλα είδη ασπεργίλλων πέραν των αρχικών, που ήταν διαθέσιμα στη συλλογή του Εργαστηρίου Γενετικής του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, χρησιμοποιώντας ως δόση αναφοράς τα 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Το μυκητοκτόνο βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματικό έναντι πολλών ειδών που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένου του κύριου ανθρώπινου παθογόνου *A. fumigatus*, ενώ άλλα είδη αποδείχθηκαν λιγότερο ευαίσθητα σε αυτό (**Εικόνα 37**). Συγκεκριμένα, το *A. tubingensis* ήταν εν μέρει μόνο ευαίσθητο, ενώ τα *A. sydowii*, ένα κύριο παθογόνο κοραλλιών, *A. terreus*, *A. glaucus* και *A. carbonarius* φάνηκαν μη ευαίσθητα στο boscalid.

Σύμφωνα με τις έως τώρα αναφορές, η ανθεκτικότητα στο μυκητοκτόνο boscalid οφείλεται κυρίως σε σημειακές μεταλλαγές του ενζύμου στόχου (αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (SDH)) (Avenot and Michailides 2010, Sierotzki and Scalliet 2013, Wang et al. 2015), ή σχετίζεται με την έκφραση ABC και MFS απεκκριτικών μεταφορέων (Kretschmer et al. 2009, Leroux et al. 2010, Omrane et al. 2015). Είναι αξιοσημείωτο όμως ότι όλα τα είδη ασπεργίλλων που ελέγχθηκαν φέρουν συντηρημένο το τμήμα της αμινοξικής αλυσίδας της SDH, που αποτελεί τον στόχο του boscalid. Αυτό αποτέλεσε μια πρώτη ένδειξη ότι οι διαφορές στην ευαισθησία του boscalid μεταξύ των διαφορετικών ειδών ασπεργίλλων, είναι πολύ πιθανό να οφείλονται σε μηχανισμό διαφορετικό της τροποποίησης στόχου, πιθανώς με βάση διαφορετικούς μεταφορείς για πρόσληψη ή απέκκριση.



Εικόνα 37: Εκτίμηση της ευαισθησίας διαφόρων ειδών ασπεργίλλων σε 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid με βάση την ακτινωτή ανάπτυξη των καλλιεργειών. Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα συμπληρωμένο με NO_3^- ως πηγή N στους 25°C, και pH 6,8. Τα δύο λιγότερο ευαίσθητα είδη είναι τα *A. tubigensis* και *A. carbonarius*

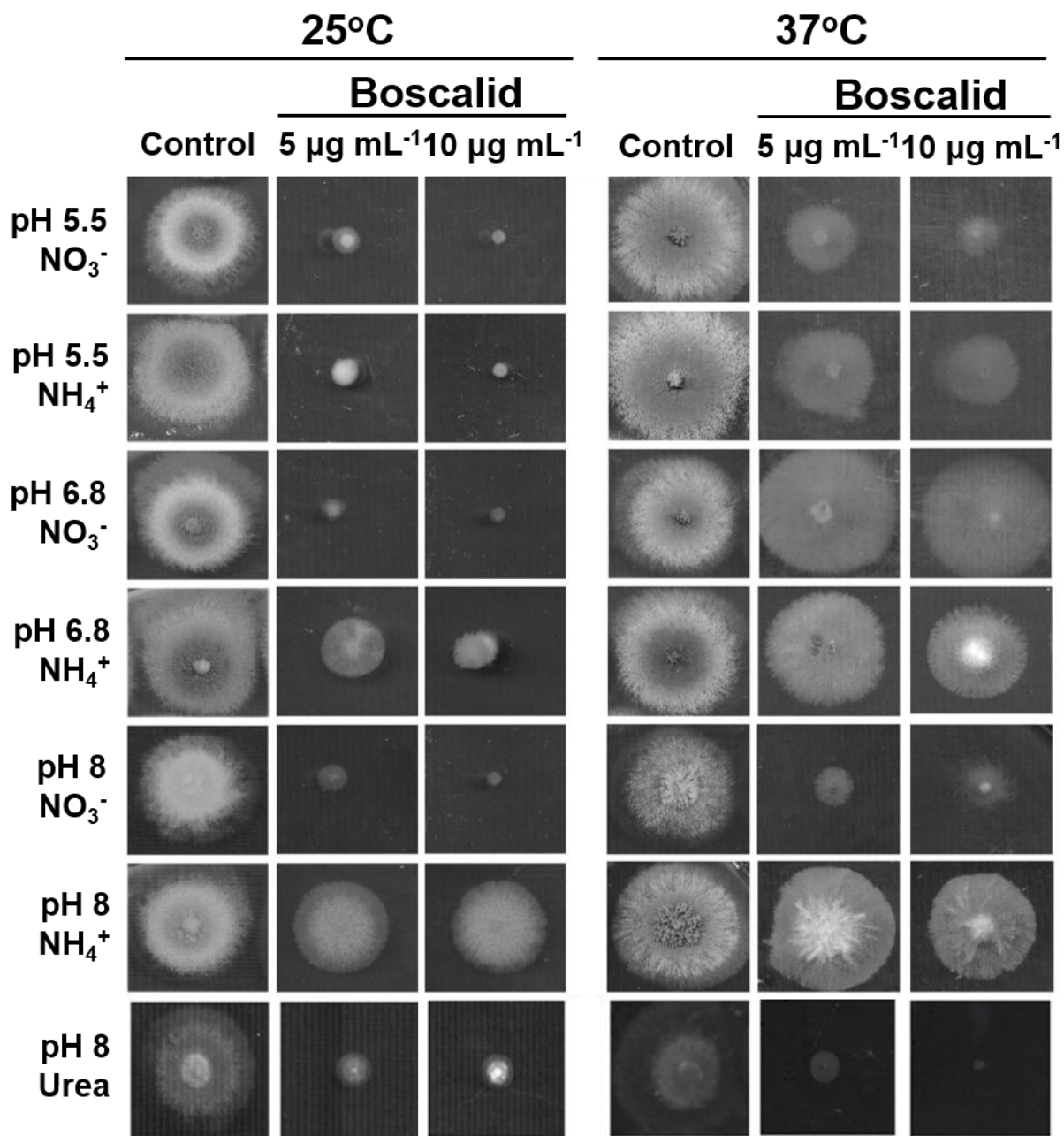
3.4 Ο ρόλος των μεταφορέων πουρινών/ νουκλεοβάσεων στην τοξικότητα του boscalid

3.4.1 Η δράση του boscalid επηρεάζεται από φυσιολογικές συνθήκες που ελέγχουν μεταφορείς

Η ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα συχνά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις φυσιολογικές συνθήκες κατά τις δοκιμές για τον έλεγχο της τοξικότητας κυτταροτοξικότητας, ειδικά όταν αυτή επηρεάζεται από τη δράση πρωτεϊνικών μεταφορέων. Αυτό συμβαίνει επειδή η *de novo* και/ή μετα-μεταφραστική έκφραση των μεταφορέων, μπορεί να μεταβληθεί δραματικά ως απόκριση στην πηγή αζώτου ή άνθρακα που χρησιμοποιείται στο μέσο ανάπτυξης.

Συνήθως, οι περισσότεροι μεταφορείς δευτερευόντων πηγών αζώτου και άνθρακα καταστέλλονται ή/και απενεργοποιούνται παρουσία αμμωνίου/γλουταμίνης ή γλυκόζης αντίστοιχα. Επιπλέον, η δράση των μεταφορέων ρυθμίζονται σε απόκριση του pH και της θερμοκρασίας, το πρώτο επηρεάζοντας τη συμμεταφορά H^+ και η δεύτερη τη ρευστότητα της μεμβράνης και άρα τη σταθερότητα των μεταφορέων (Pantazoulou and Diallinas 2007, Diallinas 2008b). Καθίσταται σαφές ότι στην περίπτωση που ένα μυκητοκτόνο μεταφέρεται εντός των μυκητιακών κυττάρων μέσω δράσης τέτοιου μεταφορέα, μπορεί να παρουσιάζεται διαφορετικός βαθμός ευαισθησίας, αναλόγως των φυσιολογικών συνθηκών που εφαρμόζονται στην πειραματική διαδικασία. Τουναντίον, εάν ένα μυκητοκτόνο προσροφηθεί με απλή διάχυση, η δράση του αναμένεται να επηρεαστεί μόνο από τη θερμοκρασία.

Έτσι, για να ληφθεί μια πρώτη ένδειξη για το αν το boscalid, ένα μυκητοκτόνο που είναι γνωστό ότι έχει κυτταροπλασματικό στόχο, εισέρχεται στα κύτταρα του *A. nidulans* μέσω ειδικών μεταφορέων ή απλής διάχυσης, ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητά του υπό διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες, όπως διαφορετικές πηγές αζώτου ή άνθρακα, pH και θερμοκρασία (**Εικόνα 38**).



Εικόνα 38: Επίδραση διαφορετικών φυσιολογικών συνθηκών στην ευαισθησία του άγριου τύπου στελέχους *A. nidulans* (WT) στο boscalid. Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε παρουσία boscalid στα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης που περιείχαν NH_4^+ ή NO_3^- ως μοναδικές πηγές N, σε διαφορετικές τιμές pH, στους 25 ή 37°C. Η μεγάλη διαφορά στον φαινότυπο ανάπτυξης μεταξύ NO_3^- και NH_4^+ παρατηρείται σε pH 8 και στις δύο θερμοκρασίες

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δράση του boscalid επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη χρησιμοποιούμενη πηγή αζώτου, καθώς και το pH και τη θερμοκρασία (**Εικόνα 38**). Συγκεκριμένα, φαίνεται να είναι πολύ τοξικό στους 25°C, σε όλες τις τιμές pH που ελέγχθηκαν, όταν ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε νιτρικό νάτριο. Αντίθετα, η τοξικότητά του μειώνεται σε μέσα που περιέχουν αμμώνιο, ειδικά σε pH 6.8-8.0, στους 25°C. Στους 37°C, η τοξικότητα του boscalid είναι γενικά μειωμένη, με εξαίρεση όταν αναπτύχθηκε σε pH 8.0 και μόνο όταν το νιτρικό νάτριο αποτέλεσε τη μοναδική πηγή αζώτου, όπου και εμφανίστηκε σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η συσώρευση του boscalid εντός των κυττάρων είναι σημαντικά υψηλότερη *i*) παρουσία δευτερεύουσας, μη κατασταλτικής, πηγής αζώτου (π.χ. νιτρικό νάτριο) και όχι παρουσία αμμωνίου που αναστέλλει αρκετούς μεταφορείς και *ii*) σε υψηλότερο pH, όπως φαίνεται ειδικά στους 37°C (**Εικόνα 38**). Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας, φαίνεται ότι η συσώρευση του boscalid είναι υψηλότερη στους 25°C σε σύγκριση με τους 37°C. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι η συσώρευση boscalid εξαρτάται από τη δράση μεταφορέων που ρυθμίζονται διαφορεικά αναλόγως του pH και της θερμοκρασίας, πιθανά ως δευτερεύοντας μηχανισμός της απευθείας διάχυσης της δ.ο., κυρίως σε όξινες τιμές pH (π.χ. pH 5.5).

Επίσης σημαντικό εύρημα ήταν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με χρήση ουρίας ως πηγής αζώτου, καθώς ήταν ταυτόσημα με εκείνα της χρήσης νιτρικού νατρίου. Αυτά επιβεβαίωσαν ότι δευτερογενείς, μη κατασταλτικές πηγές αζώτου επιτρέπουν τη μέγιστη, τοξικότητα του boscalid που πιθανώς οφείλεται στη δράση πρωτεϊνικών μεταφορέων. Αντίθετα της επίδρασης των πηγών αζώτου στην τοξικότητα του boscalid, δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση διαφορετικών πηγών άνθρακα.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα προηγούμενα αποτελέσματα, αλλά και τη φυσιολογία του *A. nidulans*, τα υπόλοιπα πειράματα που αφορούν τη μελέτη της επίδρασης των πρωτεϊνικών μεταφορέων νουκλεοβάσεων πραγματοποιήθηκαν στους 37°C, σε pH 8.0 χρησιμοποιώντας νιτρικό νάτριο σαν μοναδική πηγή αζώτου.

3.4.2 Μεταλλαγές σε μεταφορείς πουρινών και των σχετικών ρυθμιστικών γονιδίων, επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του *boscalid*

Δεδομένου ότι τα προηγούμενα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι μεταφορείς που ρυθμίζονται από πηγές αζώτου μπορεί να εμπλέκονται στη συσσώρευση του *boscalid*, ως επόμενο βήμα ελέγχθηκε η ευαισθησία στο *boscalid* i) μεταλλαγμένων στελεχών με πλήρη διαγραφή επιλεγμένων μεταφορέων, που είναι γνωστό ότι ρυθμίζονται ως απόκριση στην υπάρχουσα πηγή αζώτου και ii) μεταλλαγμένων στελεχών σε μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση μεταφορέων ως απόκριση σε πηγή αζώτου.

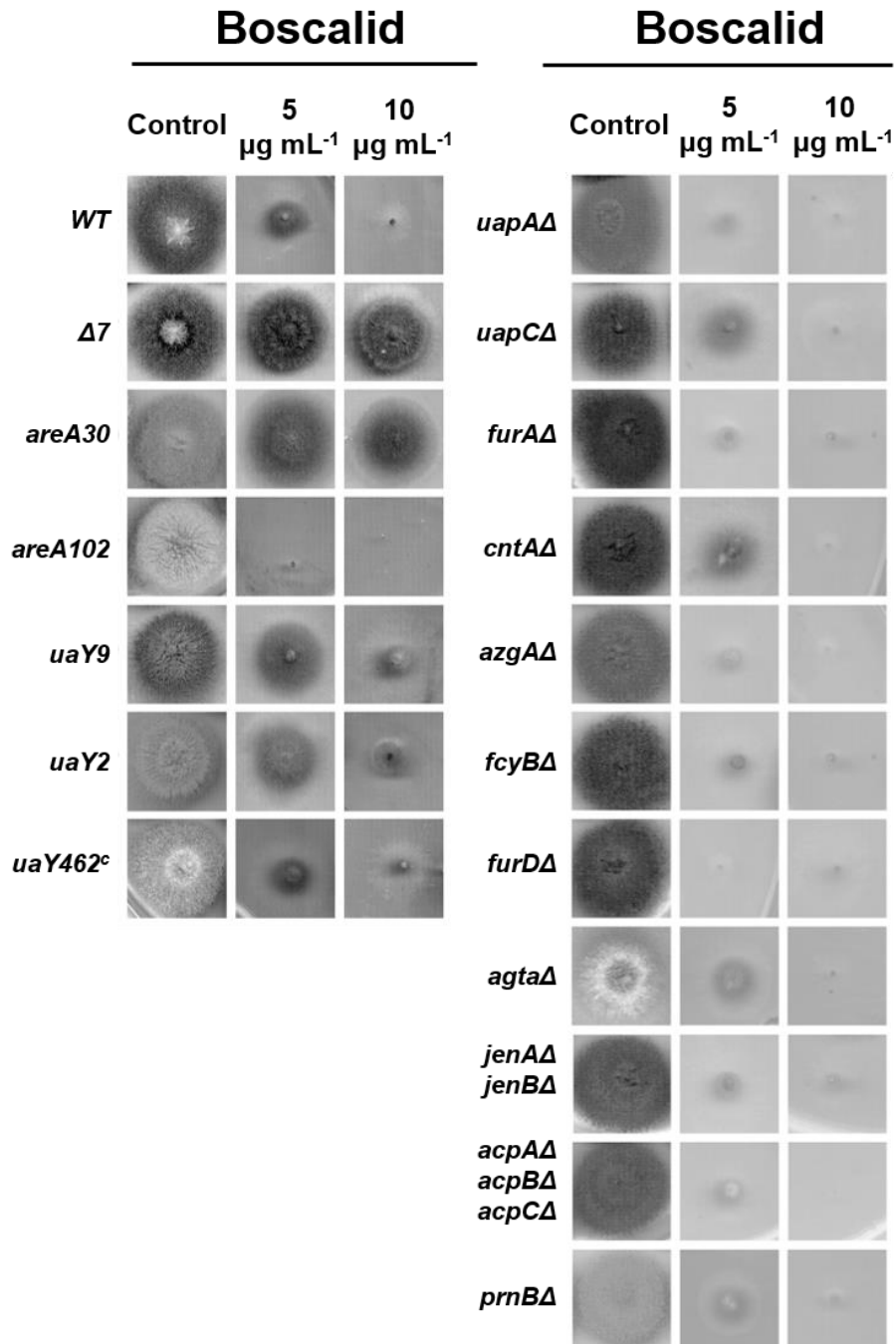
Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν μεταλλαγμένα στελέχη με πλήρη διαγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν και τους επτά μεταφορείς που σχετίζονται με νουκλεοβάσεις/νουκλεοσίδια (*UapA*, *UapC*, *AzgA*, *FcyB*, *FurA*, *FurD* και *CntA*) και δύο καλά μελετημένους μεταφορείς αμινοξέων (*PrnB* και *AgtA*), όλοι τους είναι μεταφορείς που εκφράζονται απουσία κύριας πηγής αζώτου, αλλά καταστέλλονται μεταγραφικά και απενεργοποιούνται παρουσία αμμωνίου ή γλουταμίνης (Pantazopoulou and Diallinas 2007, Diallinas 2008b, Gournas et al. 2016).

Επίσης εξετάστηκαν στελέχη με διαγεγραμμένους ή υπερεκφρασμένους τους μεταγραφικούς παράγοντες *AreA* (Ravagnani et al. 1997, Wilson and Arst 1998) και *UaY* (Oestreicher and Scazzocchio 1993). Ο πρώτος είναι ένας GATA παράγοντας που ρυθμίζει θετικά όλα τα γονίδια υπό τον έλεγχο πηγής αζώτου και ο *UaY* είναι ένας ειδικός Zn-finger ενεργοποιητής, απαραίτητος για την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη πουρινών και τον καταβολισμό τους. Όσον αφορά τα μεταλλαγμένα *AreA* στελέχη, χρησιμοποιήθηκαν τα *areA102* και *areA30*, καθώς οι σχετικές μεταλλάξεις μπορούν να αποκαλύψουν τον μεταφορέα που μπορεί να εμπλέκεται στην πρόσληψη του *boscalid*, καθώς η μετάλλαξη *AreA102* προκαλεί απώλεια έκφρασης του *UapA*, αλλά ο *UapC* μεταφορέας μπορεί και εκφράζεται. Την αντίστροφη εικόνα παρουσιάζει η *AreA30* μετάλλαξη, καθώς είναι λειτουργική για τον *UapA*, αλλά όχι για την έκφραση του *UapC* (Ravagnani et al. 1997).

Ως πιθανοί θετικοί μάρτυρες, εξετάστηκαν πέντε μεταφορείς καρβοξυλικών οξέων (JenA, JenB, AcpA, AcpB και AcpC), οι οποίοι ρυθμίζονται από την υπάρχουσα πηγή άνθρακα, αντί της πηγής αζώτου. Ελήφθησαν αρκετά σημαντικά ευρήματα και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην **εικόνα 39**.

Αρχικά φάνηκε ότι το στέλεχος Δ7, με διαγεγραμμένα και τα 7 γονίδια που εκφράζουν τους μεταφορείς που σχετίζονται με νουκλεοβάσεις/νουκλεοσιδία, παρουσίασε σημαντική ανθεκτικότητα στο boscalid. Το μεταλλαγμένο στέλεχος *areA30*, το οποίο επηρεάζει διαφορετικά μεταφορείς που εμπλέκονται στην πρόσληψη δευτερογενών πηγών αζώτου (Wilson and Arst 1998), παρουσίασε και αυτό σημαντική αντοχή στο boscalid. Επιπλέον, τα μεταλλαγμένα στελέχη με απώλεια λειτουργίας του *uaY* [*uaY2* και *uaY9*; (Oestreicher and Scazzocchio 1993)] παρουσιάζουν μερική ανθεκτικότητα στο boscalid, η οποία είναι κυρίως εμφανής στη συγκέντρωση των 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Αρκετά σημαντικό εύρημα είναι ότι κανένα μεταλλαγμένο στέλεχος με πλήρη διαγεγραμμένο μεταφορέα νουκλεοβάσεων/νουκλεοσιδίων δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα στο boscalid, αν και τα UapC και CntA στελέχη παρουσιάζουν ανεκτικότητα στη συγκέντρωση των 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Τέλος, κανένας μεταφορέας καρβοξυλικών δε φαίνεται να συμβάλλει στην τοξικότητα του boscalid.

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι κάτω από τις συνθήκες που ελέγχθηκαν, αρκετοί μεταφορείς που σχετίζονται με νουκλεοβάσεις/νουκλεοσιδίων και ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες *AreA* και/ή *UaY* συμβάλλουν στην πρόσληψη του boscalid.



Εικόνα 39: Η ευαισθησία του *A. nidulans* στο boscalid εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα *AreA* και με μεταφορές που σχετίζονται με νουκλεοβάσεις. Βιοδοκιμή του αγρίου τύπου (WT) και μεταλλαγμένων στους μεταγραφικούς παράγοντες *AreA* και *UaY* και επιλεγμένων μεταφορέων στελεχών, που πραγματοποιήθηκε σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, συμπληρωμένο με NO_3^- ως πηγή N σε pH 8 και 37°C. Τα μεταλλαγμένα Δ7 και *areA30* φαίνεται να είναι σημαντικά πιο ανθεκτικά στο boscalid σε σύγκριση με το WT

3.4.3 Πέντε μεταφορείς πουρινών συμβάλουν στην ευαισθησία έναντι του boscalid

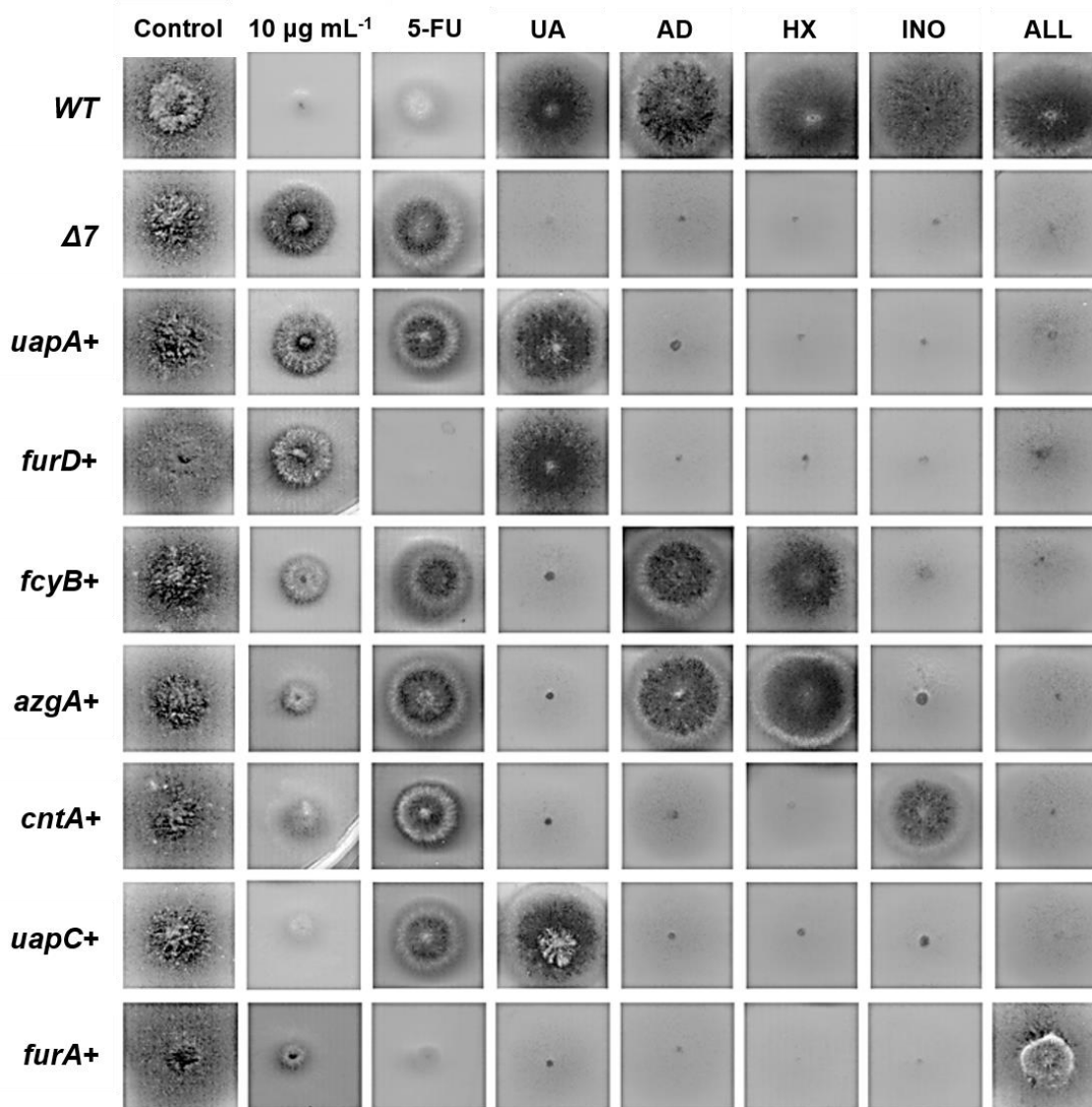
Προκειμένου να προσδιοριστεί με ακρίβεια ποιος ή ποιοι μεταφορέας/εις που σχετίζεται με νουκλεοβάσεις/νουκλεοσίδια συνεισφέρει/ουν στην πρόσληψη του boscalid, καθώς και να αποκλειστεί η πιθανότητα η ανθεκτικότητα στο boscalid του στελέχους Δ7 να οφείλεται σε κρυπτική μετάλλαξη, εισήχθη με κλασικό γενετικό μετασχηματισμό, στο Δ7, κάθε ένας από τους επτά μεταφορείς που σχετίζονται με νουκλεοβάσεις/νουκλεοσίδια.

Δεδομένου ότι το Δ7 στέλεχος στερείται οποιασδήποτε ανιχνεύσιμης δραστηριότητας των μεταφορέων που σχετίζονται με νουκλεοβάσεις, νουκλεοσίδια ή την αλλαντοΐνη, η επανεισαγωγή οποιουδήποτε γονιδίου που σχετίζεται με αυτούς τους μεταφορείς, επιτρέπει τον άμεσο λειτουργικό χαρακτηρισμό του αντίστοιχου μεταφορέα, σε ένα «καθαρό» γενετικό υπόβαθρο που στερείται όλων των άλλων σχετικών μεταφορέων που μπορεί να έχουν επικαλυπτόμενη λειτουργία και εξειδίκευση υποστρώματος. Με αυτήν την προσέγγιση κατασκευάστηκαν επτά ισογεννητικά στελέχη, που έκαστο εκφράζει έναν μοναδικό μεταφορέα νουκλεοβάσεων, με μετασχηματισμό του στελέχους Δ7 με επτά διαφορετικά πλασμίδια (§2.7.9.1), καθένα από τα οποία φέρει γονίδιο που κωδικοποιεί έναν από τους επτά μεταφορείς που πρόκειται να αναλυθούν. Με αυτόν τον τρόπο, κατέστη δυνατή η μελέτη της συνεισφοράς καθενός από τους επτά αυτούς μεταφορείς που εκφράζονται σε ένα πλήρως ισογονεννητικό και καθαρό από άλλους παρόμοιους μεταφορείς γενετικό υπόβαθρο.

Ο έλεγχος της συμβολής του εκάστοτε μεταφορέα πραγματοποιήθηκε με έλεγχο της ευαισθησίας των wt, Δ7 και των στελεχών που υπερεκφράζουν τους μεταφορείς, σε 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid. Επιπλέον αναπτύχθηκαν παρουσία τοξικής 5-φθοροουρακίλης (5-FU), ουρικό οξύ (UA), αδενίνη (AD), υποξανθίνη (HX), ινοσίνη (INO) και αλλαντοΐνη (ALL), που αποτελούν υποστρώματα των μεταφορέων. Καλλιεργήθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, συμπληρωμένο με τις απαραίτητες αυξοτροφίες (παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ, παντοθενικό οξύ) και νιτρικό νάτριο ως πηγή αζώτου στους 37°C, σε pH 8 ρυθμισμένο με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1 M.

Τα αποτελέσματα (**Εικόνα 40**) δείχνουν ότι τουλάχιστον πέντε μεταφορείς συμβάλουν στην ευαισθησία του boscalid, (FurA, AzgA, UapC> CntA> FcyB). Αντιθέτως οι UapA και

FurD φαίνεται να έχουν μικρή έως αμελητέα συμβολή. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τέσσερις από τους πέντε μεταφορείς που μεταφέρουν το boscalid (AzgA, UapC, CntA και FcyB) είναι σε θέση να αναγνωρίσουν αρκετές πουρίνες και πυριμιδίνες, ενώ ο πέμπτος (FurA) εμφανίζει εξειδίκευση για αλλαντοΐνη, που παρουσιάζει μια μικρή δομική ομοιότητα με boscalid.

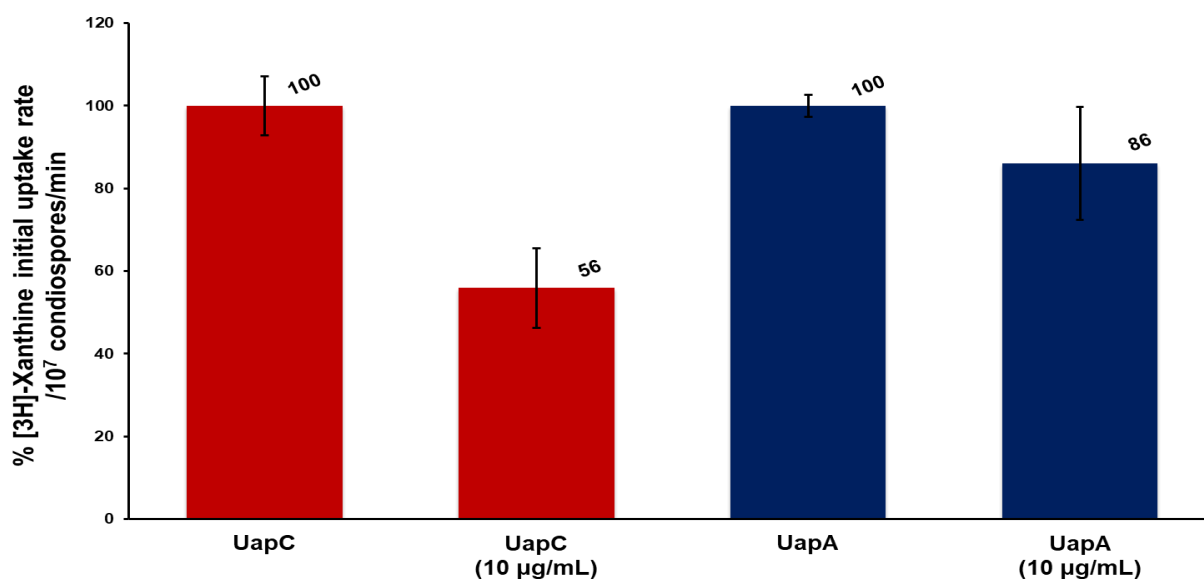


Εικόνα 40: Ταυτοποίηση των μεταφορέων που συμβάλλουν στην ευαισθησία του *A. nidulans* στο boscalid. Βιοδοκιμές των WT, Δ7 και στελεχών που υπερεκφράζουν τους μεταφορείς *UapA*, *UapC*, *FurD*, *FcyB*, *AzgA*, *CntA* ή *FurA* σε γενετικό υπόβαθρο Δ7, σε ουρικό οξύ (UA), αδενίνη (AD), υποξανθίνη (HX), ινοσίνη (INO) ή αλλαντοΐνη (ALL) ως μοναδικές πηγές N, ή παρουσία 5-FU ή boscalid με NO₃⁻ ως πηγές αζώτου, στους 37°C, και pH 8. Οι περισσότεροι μεταφορείς συμμετέχουν στην κυτταροτοξικότητα του boscalid, εκτός των *UapA* και *FurD*

3.4.4 Ο μεταφορέας UapC αναγνωρίζει το boscalid με μέτρια συγγένεια

Προκειμένου να βρεθεί μια άμεση απόδειξη ότι οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων συμβάλουν στην πρόσληψη του boscalid, πραγματοποιήθηκε πείραμα παρεμπόδισης πρόσληψης ραδιενεργούς ξανθίνης (Kryotou and Diallinas 2014) (§2.9) παρουσία boscalid. Λόγω κόστους, εξετάστηκαν τα στελέχη $\Delta 7::uapA^+$ και $\Delta 7::uapC^+$, που κωδικοποιούν τους UapA και UapC μεταφορείς αντίστοιχα, καθώς τα προηγούμενα πειράματα έδειξαν ότι οι μεταφορείς αυτοί συμβάλλουν διαφορετικά στην ευαισθησία του boscalid, καθώς ο UapA φάνηκε να μην αναγνωρίζει τη δ.ο., σε αντίθεση με τον UapC.

Η **εικόνα 41** απεικονίζει την επίδραση της παρουσίας $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid στη μεταφορά ραδιοσημασμένης ξανθίνης με τη μεσολάβηση των UapA και UapC μεταφορέων. Φαίνεται ότι ο μεταφορέας UapC πράγματι αναγνωρίζει το boscalid με μέτρια συγγένεια ($K_i = \sim 30 \mu\text{M}$). Αντιθέτως ο UapA φαίνεται να μην αναγνωρίζει τη δ.ο.. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε πλήρη αντιστοιχία με τα γενετικά και μεταβολομικά αποτελέσματα (§3.4.5).



Εικόνα 41: Αποτέλεσμα της βιοδοκιμής ανταγωνιστικής πρόσληψης μη ραδιοσημασμένου boscalid ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) παρουσία ραδιενεργούς [^3H]-ξανθίνης με μεσολάβηση των μεταφορέων UapA ή UapC. Η τυπική απόκλιση ήταν $<14\%$ σε όλες τις περιπτώσεις. Παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση [^3H]-ξανθίνης στο στέλεχος UapC σε σχέση με το UapA

3.4.5 Η μεταβολομική επιβεβαιώνει την επίδραση της πρόσληψης του boscalid μέσω μεταφορέων στον μεταβολισμό του *A. nidulans*

Με βάση την ανακάλυψη ότι αρκετοί μεταφορείς πουρινών του *A. nidulans* σχετίζονται με την ευαισθησία στο boscalid, ακολούθησε η μελέτη του ρόλου τους στον μεταβολισμό του μύκητα και της απόκρισής του παρουσία ή απουσία της δ.ο.. Σύμφωνα με τα έως τώρα δεδομένα, δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τον ρόλο του πρωτογενούς μεταβολισμού στις απόκριση των μυκήτων στα μυκητοκτόνα και στην ανθεκτικότητα που οφείλεται στη δράση πρωτεϊνικών μεταφορέων.

Με βάση αυτή το δεδομένο και το γεγονός ότι ο πρωταρχικός στόχος του μυκητοκτόνου είναι η SDH, η αναστολή της οποίας έχει άμεση επίδραση στον πρωτογενή μεταβολισμό των μυκήτων (Yankovskaya et al. 2003, Horsefield et al. 2006, Rutter et al. 2010), επελέγη αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC/EI/MS) για τη μεταβολική ανάλυση (§2.11.1). Επιπλέον, αν και ο δευτερογενής μεταβολισμός των μυκήτων είναι καλά μελετημένος, κυρίως λόγω του ενδιαφέροντος για τις διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές των δευτερογενών μεταβολιτών (Brakhage 2013), η γνώση σχετικά με το ρόλο του στην ανθεκτικότητα των μυκητοκτόνων παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη.

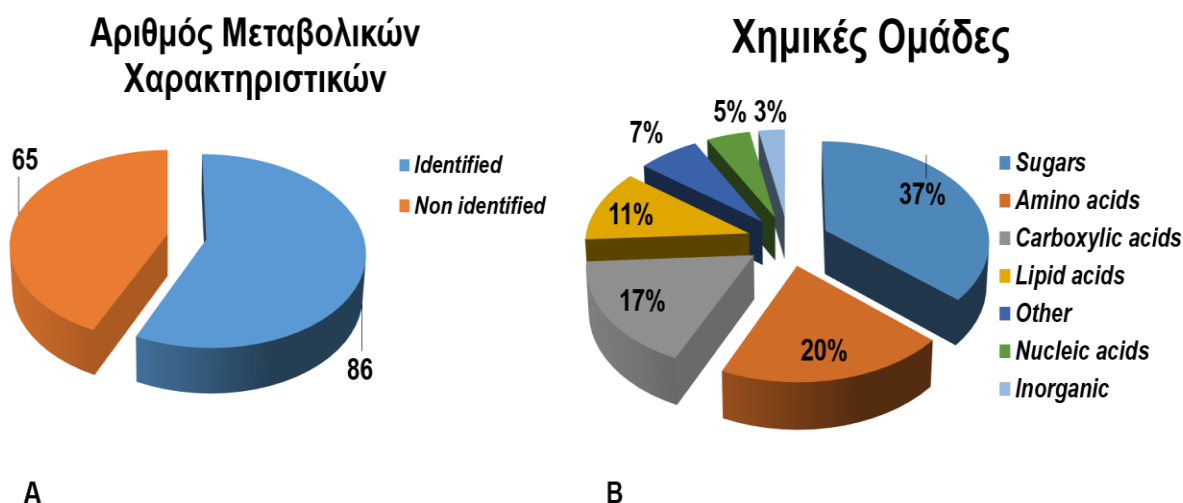
Για τον λόγο αυτό, τα στελέχη που εκφράζουν είτε τον UapA (μεταφορέας με χαμηλή, αν υπάρχει, συμβολή στην πρόσληψη boscalid) είτε τον UapC (μεταφορέας με υψηλή συμβολή στην πρόσληψη boscalid), το Δ7 (με διαγεγραμμένους και τους επτά μεταφορείς νουκλεοβάσεων) και το φυσικού τύπου στέλεχος wt, μελετήθηκαν συγκριτικά με την απουσία ή παρουσία του boscalid προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συμμετοχή των αντίστοιχων μεταφορέων στην πρόσληψη και η επίδραση στον μεταβολισμό του μύκητα.

Τα ευρήματα των αναλύσεων της συγκριμένης μεταβολομικής ανάλυσης θα αναλυθούν σε σχέση με την επίδραση του μυκητοκτόνου στον μεταβολισμό του WT και των μεταλλαγμένων στελεχών και όχι ως εις βάθους μεταβολομική μελέτη.

3.4.5.1 Επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης

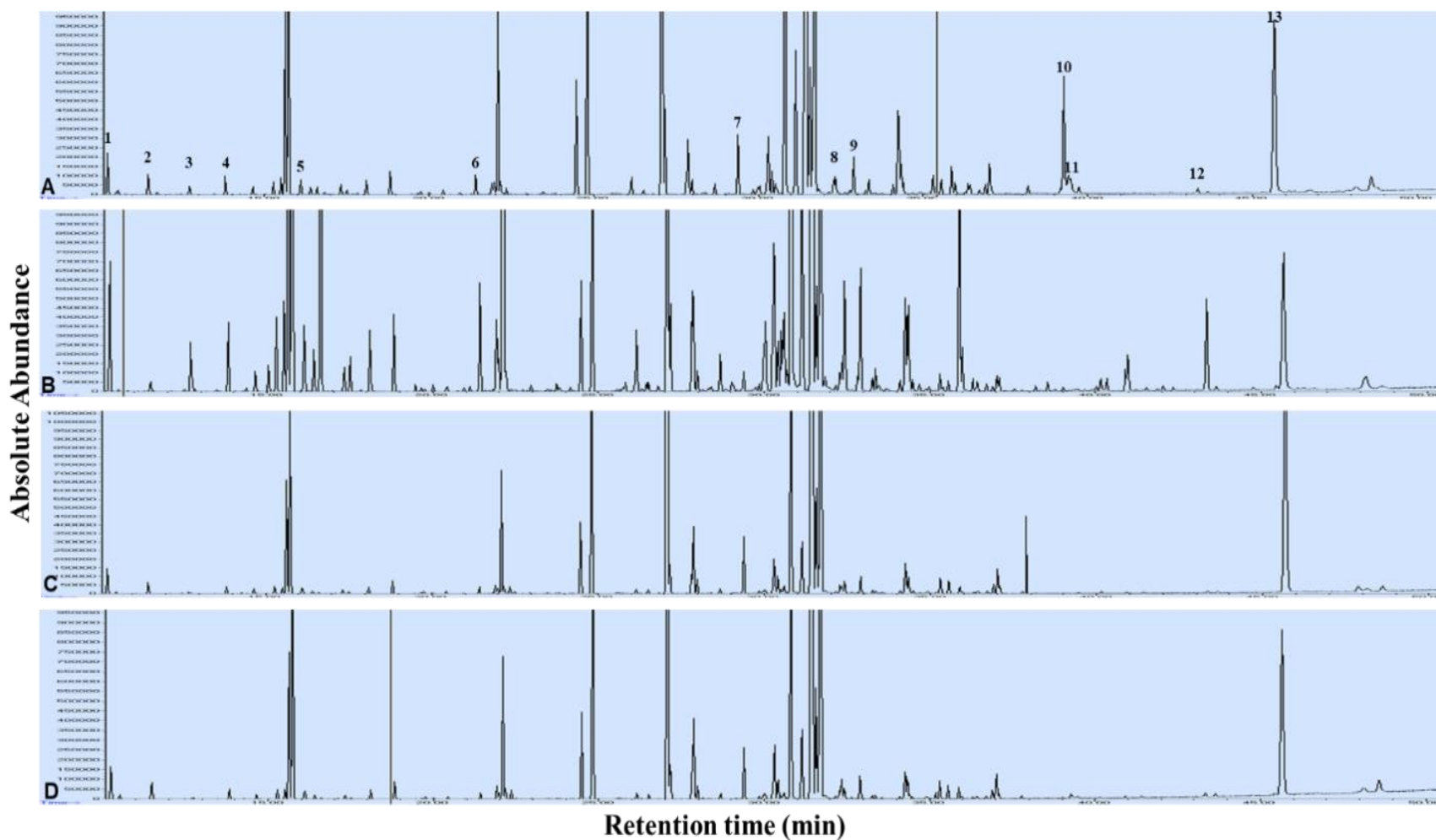
Με βάση την αποσυνέλιξη των αποκτηθέντων χρωματογραφήματων, καταγράφηκαν 151 μεταβολικά χαρακτηριστικά, εκ των οποίων τα 86 ταυτοποιήθηκαν είτε πιθανά είτε απόλυτα (**Εικόνα 42**). Η μεγάλη πλειοψηφία των ταυτοποιημένων μεταβολιτών ανήκει στους υδατάνθρακες, τα αμινοξέα και τα καρβοξυλικά και λιπιδικά οξέα (**Εικόνα 42**).

Κατασκευάστηκε GC/EI/MS μεταβολομική βάση δεδομένων [PMG *A. nidulans* GC/EI/MS metabolite library (PMG-AN-03-17 v.1.0)] και τα χρωματογραφήματα (*A. nidulans* data set PMG-02-17) είναι ελεύθερα προσβάσιμα από την ιστοσελίδα της ομάδας *Pesticide Metabolomics Group* (<http://www.aua.gr/pesticide-metabolomicsgroup/Resources/default.html>).

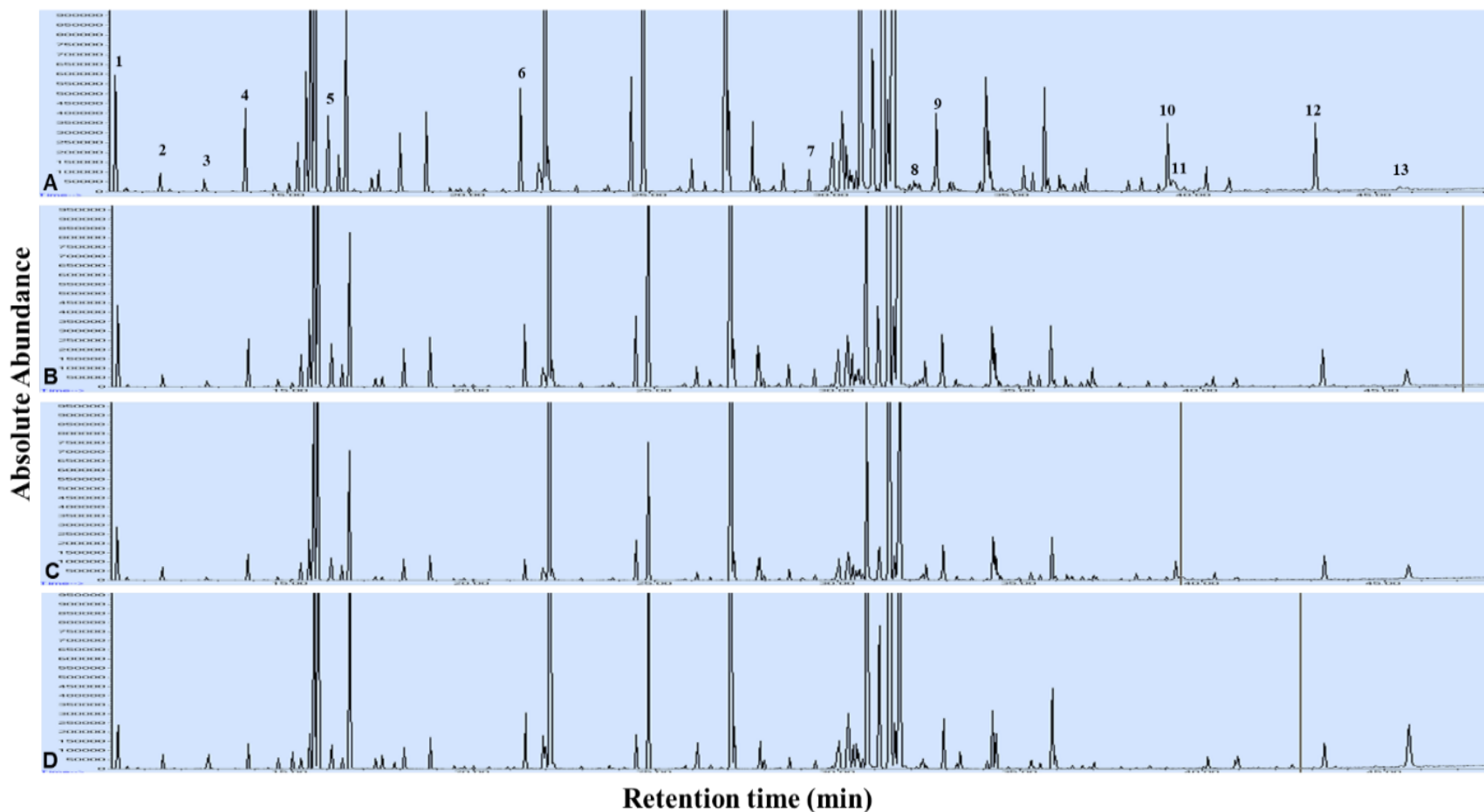


Εικόνα 42: Αριθμός μεταβολικών χαρακτηριστικών που ανιχνεύθηκαν από το εφαρμοσμένο βιοαναλυτικό πρωτόκολλο (**A**) και σύνθεση (% ποσοστό) του καταγεγραμμένου μεταβολικού προφίλ στις χημικές ομάδες (**B**) του *A. nidulans*

Η καταλληλότητα και επαναληψιμότητα των εφαρμοσμένων πειραματικών και βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων, επιβεβαιώθηκαν από την ποιότητα των ληφθέντων χρωματογραφήματων (**Εικόνα 43** **Εικόνα 44**) την καλή ομαδοποίηση των βιολογικών επαναλήψεων και των score plots της OPLS-DA ανάλυσης (**Εικόνα 45**), και της παρατηρούμενης ομαδοποίησης του cluster heat map (**Εικόνα 46**).

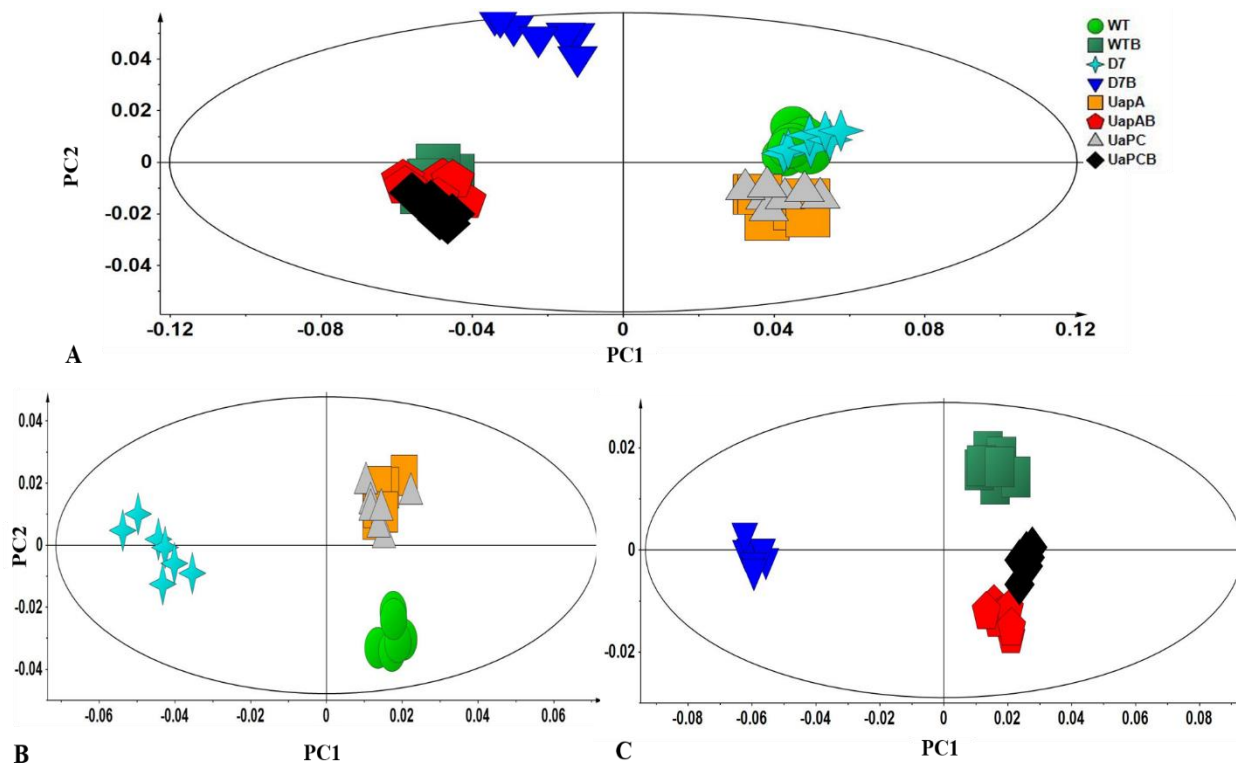


Εικόνα 43: Αντιπροσωπευτικά GC/ΕΙ/MS χρωματογραφήματα των *A. nidulans* WT (**A**), $\Delta 7::uarA^+$ (**B**), $\Delta 7::uarC^+$ (**C**) και $\Delta 7$ (**D**) στελεχών, 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Δίνονται χαρακτηριστικοί μεταβολίτες 1. L-alanine, 2. b-lactate, 3. 2-aminobutanoate, 4. L-valine, 5. succinate, 6. malate, 7. adenine, 8. pantothenate, 9. xanthine, 10. uridine, 11. cytidine, 12. adenosine, 13. a,a-trehalose

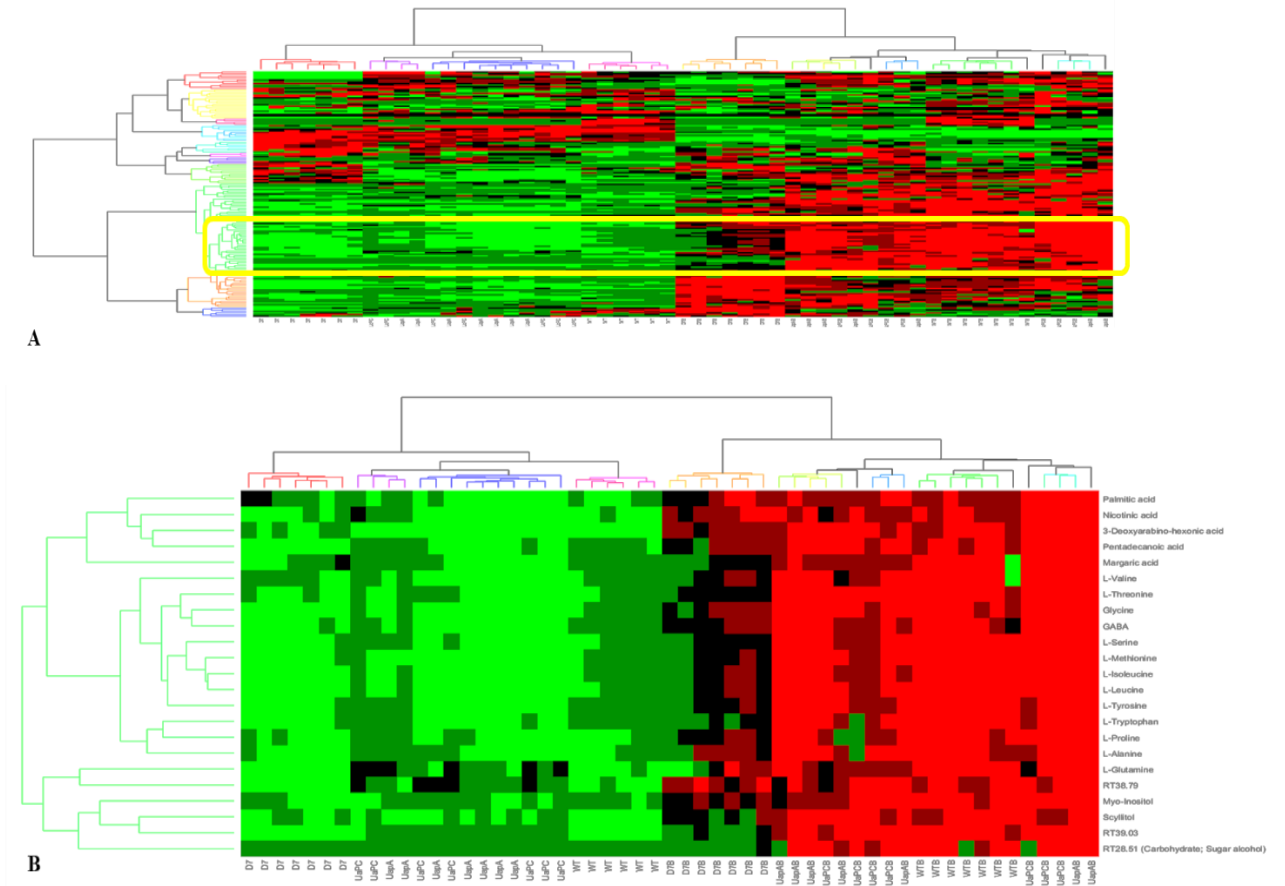


Εικόνα 44: Αντιπροσωπευτικά GC/ΕΙ/MS χρωματογραφήματα των *A. nidulans* WT (**A**), $\Delta 7::uarA^+$ (**B**), $\Delta 7::uarC^+$ (**C**) και $\Delta 7$ (**D**) στελεχών, 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό υπό την επίδραση $0.5\mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid. Δίνονται χαρακτηριστικοί μεταβολίτες 1. L-alanine, 2. b-lactate, 3. 2-aminobutanoate, 4. L-valine, 5. succinate, 6. malate, 7. adenine, 8. pantothenate, 9. xanthine, 10. uridine, 11. cytidine, 12. adenosine, 13. α,α -trehalose

Με εφαρμογή OPLS-DA και HCA, βρέθηκε μια ιδανική διάκριση μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολομικών προφίλ των στελεχών που αναλύθηκαν, καθώς επίσης και μεταξύ των επεμβάσεων boscalid ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) και των αντίστοιχων μαρτύρων (**Εικόνα 45 A**). OPLS-DA και HCA για τα στελέχη που εκτέθηκαν στο boscalid, οδήγησε σε μια ελαφρώς διαφορετική ομαδοποίηση σε σύγκριση με αυτή που παρατηρήθηκε για τους αντίστοιχους μάρτυρες μη υποβληθέντα σε αγωγή, με τα στελέχη UapA και UapC να μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους (**Εικόνα 45 B, C**). Η γενική επισκόπηση των διαφορών μεταξύ των μεταβολομικών προφίλ των στελεχών wt, UapA, UapC και Δ7, που είναι υπεύθυνες για τις παρατηρούμενες διακρίσεις, δίνεται στο cluster heat map της **εικόνας 46**.

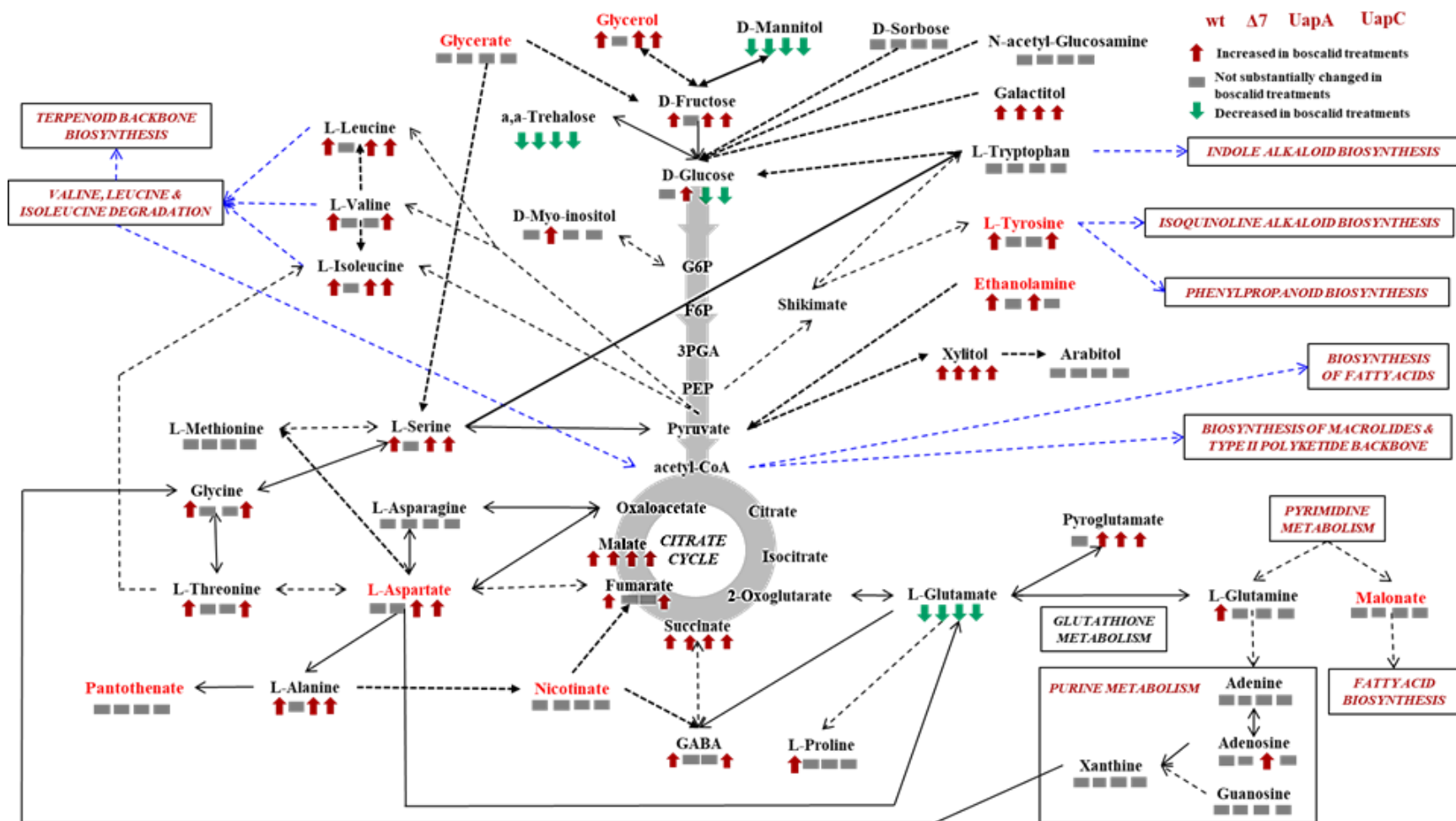


Εικόνα 45: PC1/PC2 διαγράμματα συντεταγμένων ορθογώνιας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA) των GC/EI/MS μεταβολομικών προφίλ των στελεχών *A. nidulans*, 7 ημέρες μετά την επέμβαση. Απεικονίζεται το διάγραμμα όλων των συνθηκών (**A**), των μαρτύρων (**B**) και όσων αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid (**C**). Έξι ομαδοποιημένα δείγματα και ένα ποιοτικού ελέγχου αναλύθηκαν ανά επέμβαση. Συνολικά, τρεις βιολογικές επαναλήψεις ενώθηκαν για να παρέχουν κάθε ομαδοποιημένο δείγμα



Εικόνα 46: Cluster heat map (A) και μεγέθυνση επιλεγμένων περιοχών (B) των καταγεγραμμένων μεταβολομικών προφίλ των μαρτύρων και καλλιεργημένων σε *boscalid* ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) στελεχών *A. nidulans*, έπειτα από καλλιέργεια 7 ημερών. Η ιεραρχική ανάλυση συμπλέγματος (HCA) πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο σύνδεσης Ward. Οι σειρές αντιπροσωπεύουν μεταβολίτες ή μεταβολικά χαρακτηριστικά και οι στήλες τα διαφορετικά δείγματα. Κάθε κελί έχει χρωματική κωδικοποίηση με βάση τις αλλαγές της σχετικής συγκέντρωσης του αντίστοιχου μεταβολίτη ή του μεταβολικού χαρακτηριστικού, χρησιμοποιώντας μια κλίμακα χρώματος που κυμαίνεται από -3 (ανοιχτό πράσινο), υποδεικνύοντας χαμηλές τιμές, έως 3 (ανοιχτό κόκκινο) που υποδεικνύουν υψηλές τιμές

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα και με πληροφορίες και δεδομένα που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), κατασκευάστηκε ένα μεταβολικό δίκτυο για τον *A. nidulans* παρουσιάζοντας τις διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των αντίστοιχων επεμβάσεων (Εικόνα 47).



Εικόνα 47: Μεταβολικό δίκτυο στελεχών *A. nidulans* με τις διαφορές μεταξύ των επιπέδων των μεταβολιτών, των μαρτύρων και όσων αναπτύχθηκαν παρουσία *boscalid*, έπειτα από καλλιέργεια 7 ημερών. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν βιοσυνθετική πορεία πολλαπλών βημάτων ή όχι πλήρως διευκρινισμένης και οι σταθερές γραμμές διαδοχικούς μεταβολίτες μιας βιοσυνθετικής οδούς. Τα σύμβολα κάτω από τα ονόματα των μεταβολιτών αντιστοιχούν, κατά σειρά, στα στελέχη WT, Δ7, Δ7::uapA⁺ και Δ7::uapC⁺ που αναπτύχθηκαν παρουσία *boscalid*, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Για την κατασκευή του δικτύου, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τη βάση δεδομένων KEGG

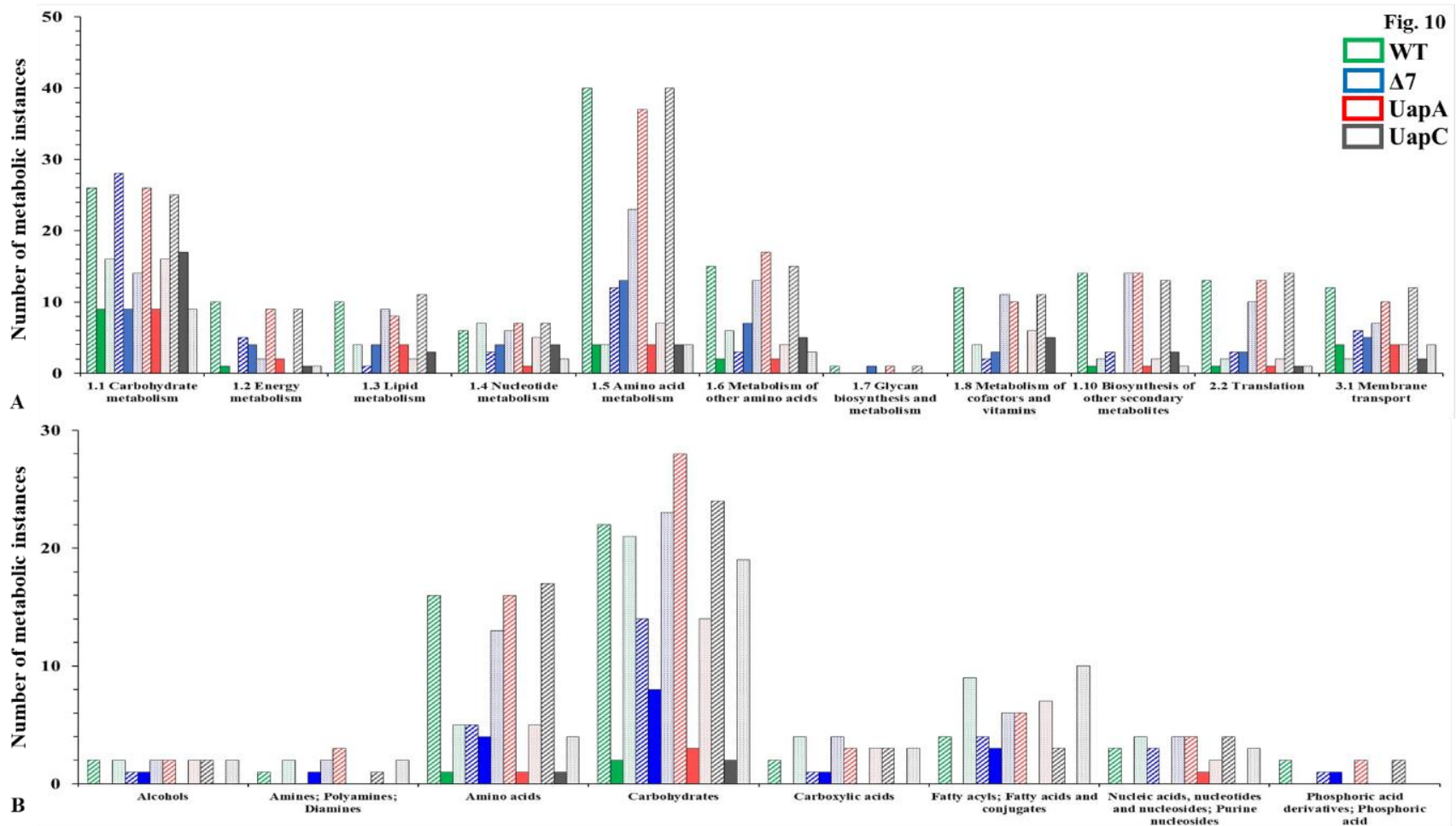
3.4.5.2 Οι μεταφορείς πουρινών/ νουκλεοβάσεων έχουν σημαντικό αντίκτυπο στον μεταβολισμό του *A. nidulans* και της απόκρισής του στο boscalid

Η μεταβολομική επαλήθευσε τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της πρόσληψης του boscalid στο μεταβολισμό του WT και των μεταλλαγμένων στελεχών, καθώς και της στενής συσχέτισης της επίδρασης αυτής σχετικά με τους 2 υπό μελέτη μεταφορείς (UapA – UapC) (**Εικόνες 45 – 48**).

Εφαρμογή της δ.ο. είχε ως αποτέλεσμα στα ευαίσθητα στο boscalid στελέχη WT και UapC, να επηρεάσει σημαντικά τον μεταβολισμό τους, σε αντίθεση με τα ανθεκτικά στελέχη Δ7 και UapA, των οποίων ο μεταβολισμός επηρεάστηκε σε μικρότερο βαθμό (**Εικόνα 45**), όπως βεβαιώνεται από τις διαφορετικές διακυμάνσεις των μεταβολιτών και βιοσυνθετικών οδών έπειτα από εφαρμογή της δ.ο..

Όπως ήδη αναφέρθηκε (**§1.2.1.2**) η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (SDH), παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην αναπνευστική αλυσίδα όσο και στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) (Yankovskaya et al. 2003, Horsefield et al. 2006, Rutter et al. 2010). Συνεπώς, αναστολή της από το boscalid διαταράσσει τον κύκλο TCA προκαλώντας συσσώρευση ηλεκτρικού και διαταραχή της μεταφοράς ηλεκτρονίων από ηλεκτρικό προς την ουβικινόνη (Avenot and Michailides 2010). Όντας και οι δύο αυτοί βιοχημικοί μηχανισμοί κομμάτι του κύριου μεταβολισμού, η αναστολή αυτή αναμένεται να έχει σημαντική επίδραση στην ενεργειακή ισορροπία και τον μεταβολισμό του *A. nidulans*. Αυτό βρίσκεται σε πλήρη αντιστοίχιση με τα αποτελέσματα της μεταβολομικής, τα οποία αποκάλυψαν μια γενική, επηρεασμένη όμως αναλόγως της μετάλλαξης των στελεχών, διαταραχή του μεταβολισμού των μυκήτων, σε απόκριση της επέμβασης με το boscalid.

Βρέθηκε ότι η πλειονότητα των μεταβολιτών που συμμετέχουν σε μονοπάτια που σχετίζονται με τον μεταβολισμό κυρίως των αμινοξέων και δευτερευόντως των υδατανθράκων είναι και αυτά που επηρεάστηκαν στον μέγιστο βαθμό (**Εικόνα 48 A, B**). Για τα ευαίσθητα στελέχη WT και UapC, καταγράφηκε μία σημαντική αύξηση της σχετικής περιεκτικότητας των αμινοξέων L-λευκίνη, L-βαλίνη και L-ισολευκίνη, που ανήκουν στην ομάδα των πυροσταφυλικών και η αρωματική L-τυροσίνη, ως απόκριση σε στην εφαρμογή boscalid (**Εικόνα 46 Εικόνα 47**).



Εικόνα 48: Ταξινόμηση των μεταβολιτών των μαρτύρων και όσων καλλιεργήθηκαν παρουσία *boscalid* με βάση τη συμμετοχή τους σε μυκητιακές μεταβολικές οδούς/λειτουργίες, μετρούμενοι ως αποτυπώματα, καθώς κάθε μεταβολίτης μπορεί να εμπλέκεται σε πολλαπλές οδούς (A) και σύμφωνα με τη χημική τους κατηγορία (B), βάσει του συστήματος κωδικοποίησης της βάσης δεδομένων KEGG. Για κάθε στέλεχος, η πρώτη ράβδος (διαγώνιες λωρίδες) αντιστοιχεί σε μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωση αυξήθηκε σε απόκριση της παρουσίας *Boscalid*, το δεύτερο (στερεό χρώμα) σε αυτούς μειώθηκαν και το τρίτο (διακεκομμένο) σε μεταβολίτες, των οποίων η σχετική συγκέντρωση δεν άλλαξε σημαντικά

Το μυκητοκτόνο έχει σημαντικό αντίκτυπο στην παραγωγή ενέργειας, η οποία χρησιμοποιείται στις βιοσυνθέσεις μεταβολιτών και πρωτεϊνών. Δεδομένου ότι τα προαναφερθέντα αμινοξέα παρέχουν δομές άνθρακα για τη βιοσύνθεση των τερπενοειδών και των φαινυλοπροπανοειδών (**Εικόνα 48**) και των πρωτεϊνών, τα παρατηρούμενα αυξημένα επίπεδα τους μετά από επέμβαση με boscalid στα στελέχη WT και UapC είναι πιθανά μια ένδειξη της μειωμένης λειτουργίας του μυκητιακού βιοσυνθετικού μηχανισμού. Αυτή η παρατήρηση βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της προσρόφησης του boscalid (§3.4.4) από τα ευαίσθητα στελέχη.

Επιπλέον, δεδομένου ότι οι βιοσυνθετικές οδοί των αλκαλοειδών, φαινυλοπροπανοειδών και τερπενοειδών καταλήγουν στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών που παίζουν βασικό ρόλο στη μυκητιακή φυσιολογία και επιβίωση (Dixon and Paiva 1995, Griffin et al. 1999, Gershenzon and Dudareva 2007, Korkina 2007, Minami et al. 2008, Schmidt-Dannert 2015), είναι πιθανό ότι λαμβάνει χώρα μια μειωμένη δραστηριότητα αυτών των οδών και ως εκ τούτου μειωμένη φυσιολογική δυναμική των ευαίσθητων στελεχών, ως απόκριση της τοξικότητας που προκλήθηκε από το boscalid.

Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα των αναλύσεων για το Δ7 στέλεχος δείχνουν μια διαφορετική απόκριση του μεταβολισμού του, στην επέμβαση με το boscalid, καθώς για τη μεγάλη πλειονότητα των ταυτοποιημένων μεταβολιτών δεν παρατηρήθηκαν ουσιαστικές διαφορές σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα (**Εικόνες 45 – 47**). Φαίνεται ότι η μειωμένη πρόσληψη του boscalid έχει ως αποτέλεσμα μια ελάχιστη επίδραση στο μεταβολισμό του. Επιπλέον, τα αποτελέσματα για το στέλεχος UapA αποκαλύπτουν μια διακριτή επίδραση του boscalid στο μεταβολισμό του, υποδεικνύοντας μια μέση επίδρασή του, ενδιάμεσης αυτής που παρατηρήθηκε για τα στελέχη Δ7 και WT-UapC.

Η υπόθεση της μειωμένης λειτουργίας του μυκητιακού βιοσυνθετικού μηχανισμού εξαιτίας της επίδρασης του boscalid, θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί περαιτέρω από τα παρατηρούμενα μειωμένα επίπεδα υδατανθράκων όπως ο δισακχαρίτης α-α τρεχαλόζη, η D-γλυκόζη (με εξαίρεση το στέλεχος Δ7) και η D-μαννιτόλη, τα οποία, μεταξύ άλλων, συσχετίζονται θετικά με την ανθεκτικότητα των κυττάρων και επιβίωσή τους (Stoor et al. 1996, Elbein et al. 2003, Purvis et al. 2005, Khakimov et al. 2012, Moradi et al. 2017).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος σε όλα τα στελέχη ως απόκριση της επέμβασης με boscalid, ωστόσο δεν καταγράφηκε ουσιαστική διαφορά στα

επίπεδα φουμαρικού στα στελέχη UarA και Δ7 (**Εικόνα 47**). Δεδομένου ότι το boscalid δρα παρεμποδίζοντας τον κύκλο TCA, στο στάδιο της οξειδωσης ηλεκτρικού προς φουμαρικό, τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά μιας μειωμένης επίδρασης του μυκητοκτόνου λόγω της μειωμένης πρόσληψης του από αυτά τα δύο στελέχη

Τέλος, όλα τα παραπάνω επιβεβαιώνουν τη σημασία του μεταφορέα UarC, η οποία είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών, επιβεβαιώνοντας την εμπλοκή του και τον ρόλο του στην πρόσληψη του boscalid από τον *A. nidulans*.

3.5 Μεταβολομική μελέτη της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων του *A. nidulans*

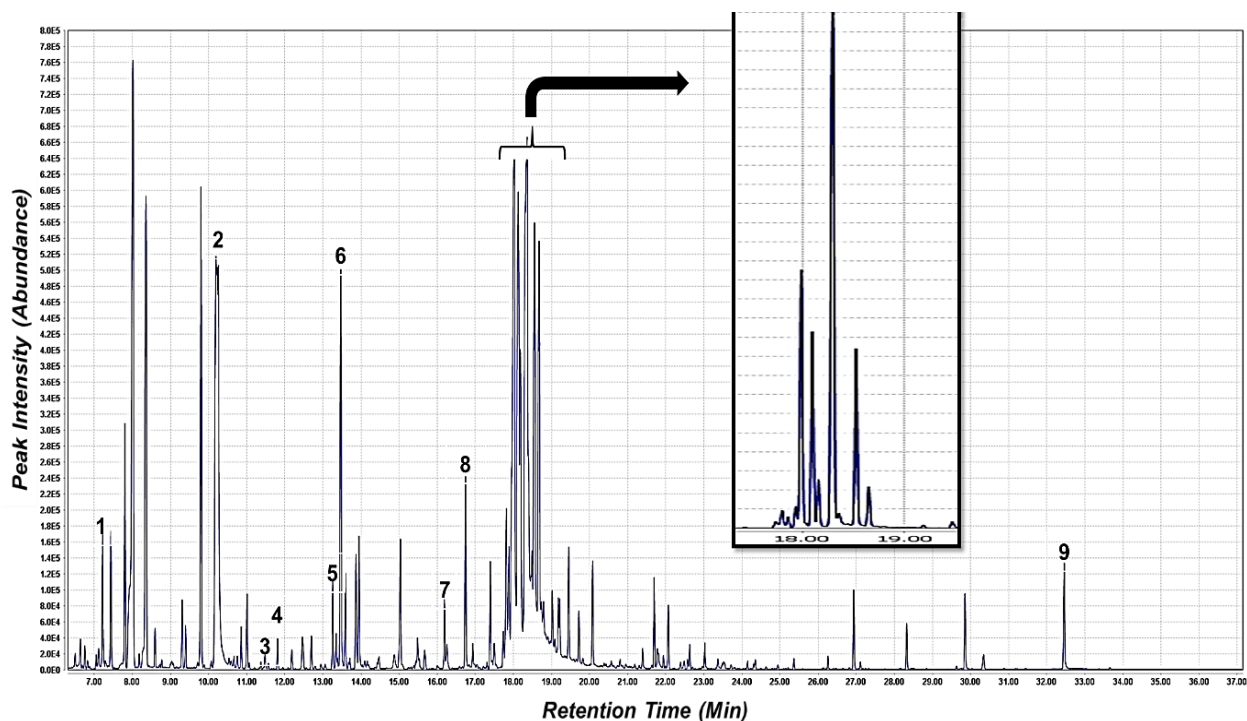
Με βάση τα αρχικά αυτά αποτελέσματα και λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο των υπό μελέτη μεταφορέων ως πιθανών transeptors κατά την κονιδιακή εκβλάστηση, ακολούθησε μελέτη της επίδρασης του boscalid στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων του *A. nidulans*. Προκειμένου να καθορισθεί ο ακριβής χρόνος προσθήκης boscalid έλαβε χώρα προκαταρκτικό πείραμα μελέτης της φυσιολογίας της χρονικής εξέλιξης της κονιδιακής εκβλάστησης.

3.5.1 Επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης

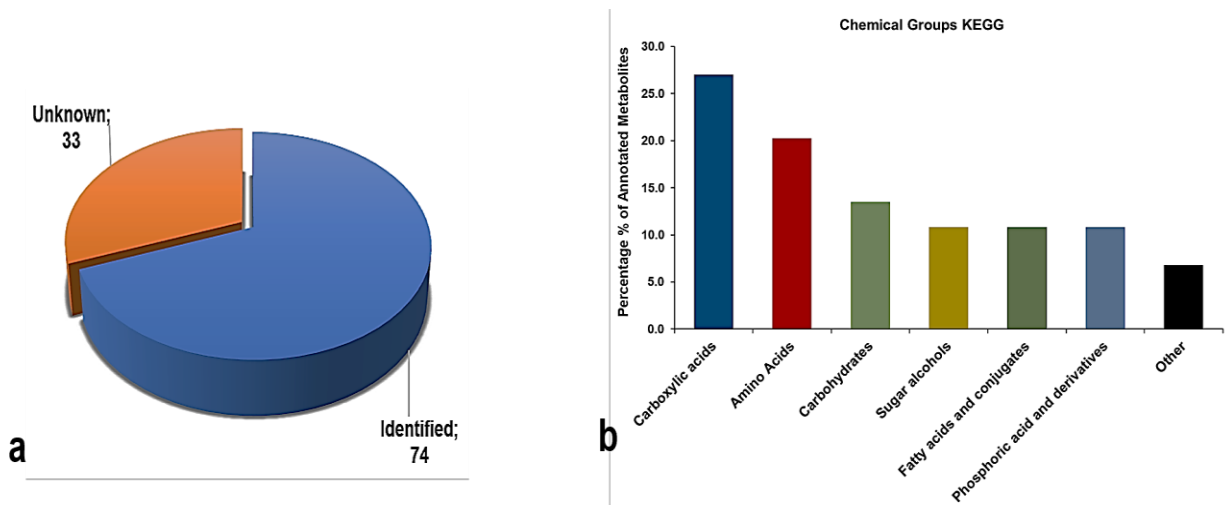
Προκειμένου να εξασφαλισθεί μια ευρεία κάλυψη του ενδομεταβολόματος των κονιδιοσπορίων, εφαρμόστηκε μη στοχευμένη GC/EI-TOF/MS μεταβολομική ανάλυση του πρωτογενούς μεταβολισμού. Για να διασφαλιστεί η όσο το δυνατόν πληρέστερη κάλυψη του και να αμβλυνθούν οι όποιες διαφορές αφορούν το δυναμικό του, που οφείλονται σε τυχόν μεγάλες διαφορές των συγκεντρώσεων μεταξύ των ενδογενών μυκητιακών μεταβολιτών, εγχύθηκαν δείγματα τόσο με διαχωρισμό (**split**) (1:30) όσο και χωρίς διαμοιρασμό (**splitless mode**). Αυτή η προσέγγιση επέτρεψε αφενός την καταγραφή χαμηλού επιπέδου μεταβολικών χαρακτηριστικών, τα οποία διαφορετικά θα

μπορούσαν ενδεχομένως να παραμείνουν μη ανιχνεύσιμα (**Εικόνα 50**). Επιπλέον συνέβαλλε στον επαρκή διαχωρισμό και αποσυνέλιξη των χρωματογραφικών περιοχών με έντονη αλληλοεπικάλυψη (**Εικόνα 49**). Η ποιότητα των ληφθέντων μεταβολομικών προφίλ είναι ενδεικτική της αξιοπιστίας και της επαναληψιμότητας των εφαρμοσμένων πειραματικών και βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων.

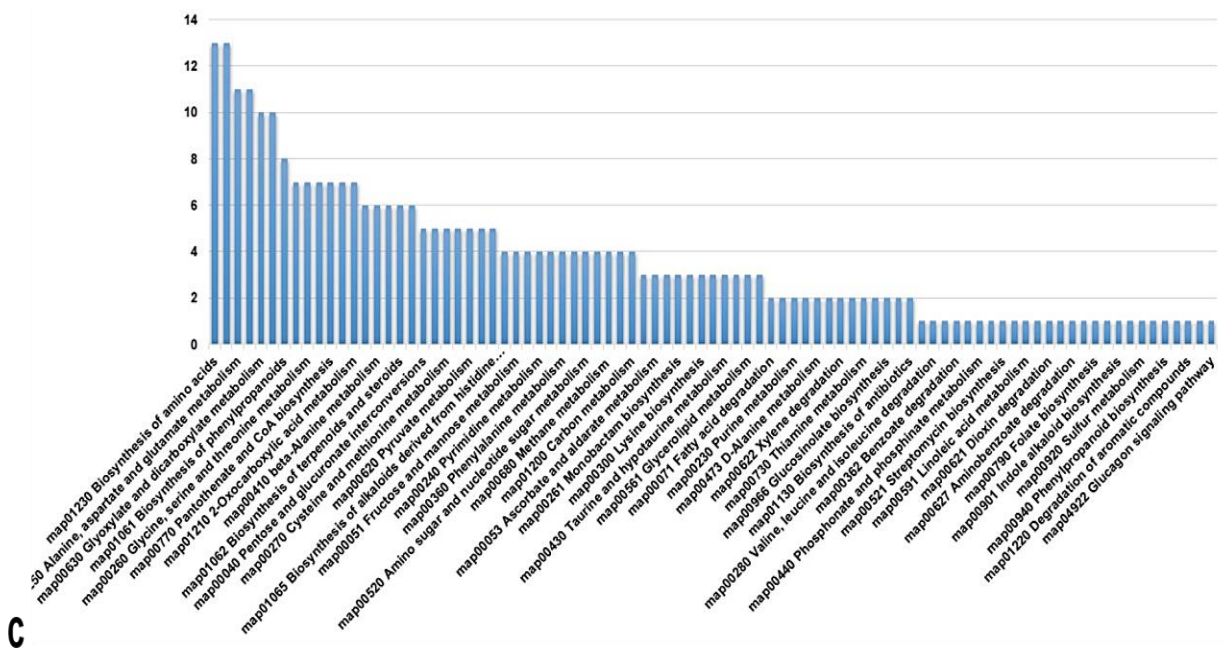
Έπειτα από αποσυνέλιξη των χρωματογραφημάτων, η ταυτοποίηση των μεταβολιτών βασίστηκε σε αναζήτηση των μεταβολομικών βάσεων NIST και GOLM χρησιμοποιώντας μίγμα η-αλκανίων ως πρότυπο δείκτη κατακράτησης (RI). Συνολικά καταγράφηκαν 107 μεταβολικά χαρακτηριστικά (MST), εκ των οποίων 74 ταυτοποιήθηκαν. (**Εικόνα 50 A**) Η πλειονότητα των ταυτοποιημένων μεταβολιτών ανήκουν στα καρβοξυλικά οξέα (27%), αμινοξέα (20.3%), υδατάνθρακες (13.5%), σάκχαρα (10.8%), λιπαρά οξέα (10.8%) και φωσφορικά παράγωγα (10.8%) (**Εικόνες 50 B, 51**).



Εικόνα 49: Αντιπροσωπευτικό GC/EI-TOF/MS χρωματογράφημα ολικού ιόντος (TIC) εκβλαστημένων κονιδιοσπορίων του αγρίου τύπου FGSC A4 στελέχους *A. nidulans*, που αποκτήθηκε σε *splitless* λειτουργία. Στην εκτεταμένη περιοχή δίνεται η αντίστοιχη περιοχή του TIC που αποκτήθηκε από το ίδιο δείγμα εφαρμόζοντας αναλογία *split* 1:30. Δίνονται αντιπροσωπευτικοί μεταβολίτες: 1. β -lactate, 2. glycerol, 3. proline, 4. threonine, 5. malate, 6. erythritol, 7. arabitol, 8. glycerol -3 -phosphate, 9. α, α -trehalose



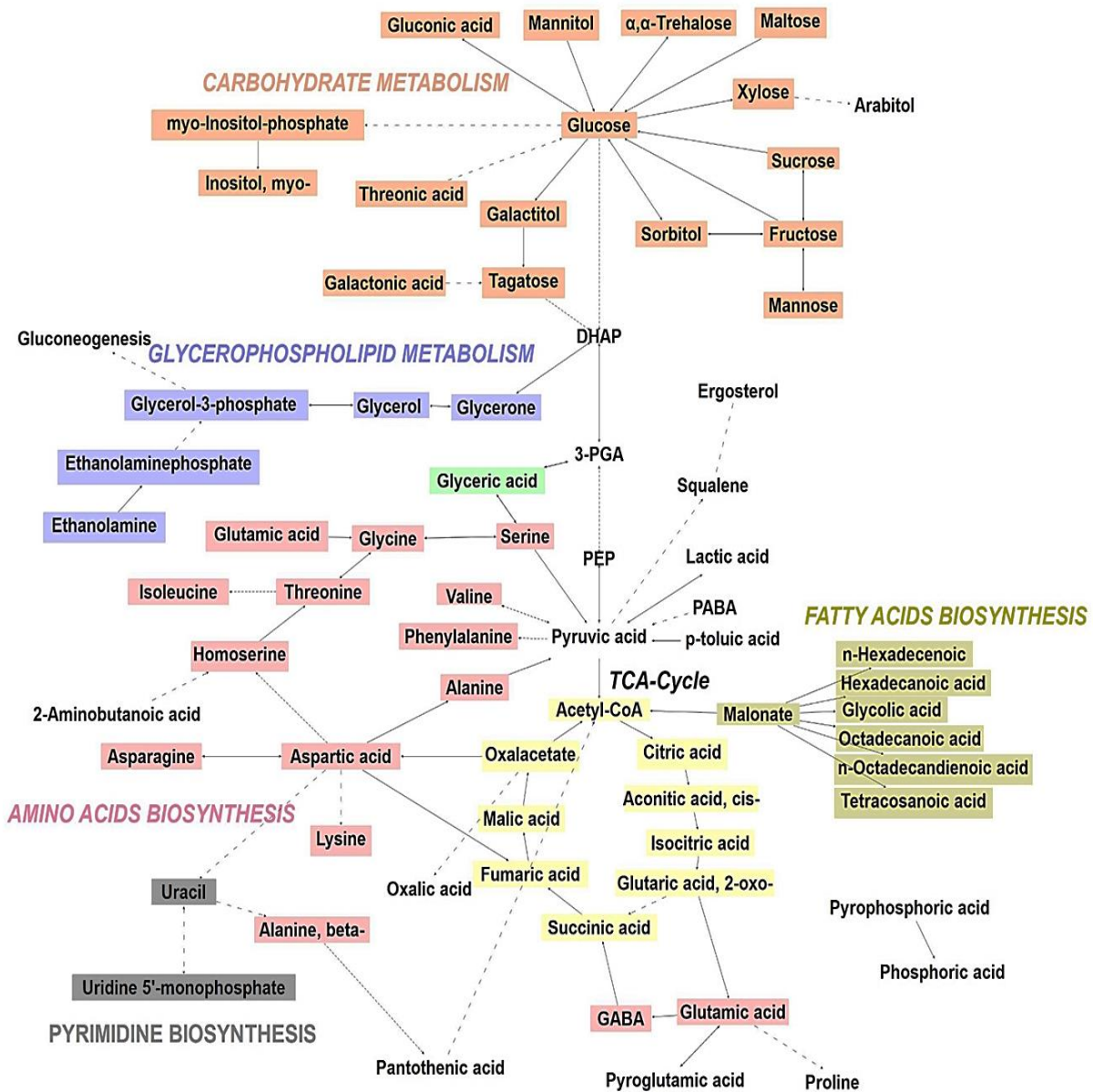
Εικόνα 50: Αριθμός ταυτοποιημένων και άγνωστων μεταβολικών χαρακτηριστικών των κονιδιοσπορίων του FGSC A4 (a), και ταξινόμηση των πρώτων σε χημικές ομάδες (b)



Εικόνα 51: Επίπτωση των ταυτοποιημένων μεταβολικών χαρακτηριστικών στις διάφορες μεταβολικές οδούς. Για λόγους τυποποίησης, προσαρμόστηκε το σύστημα της KEGG

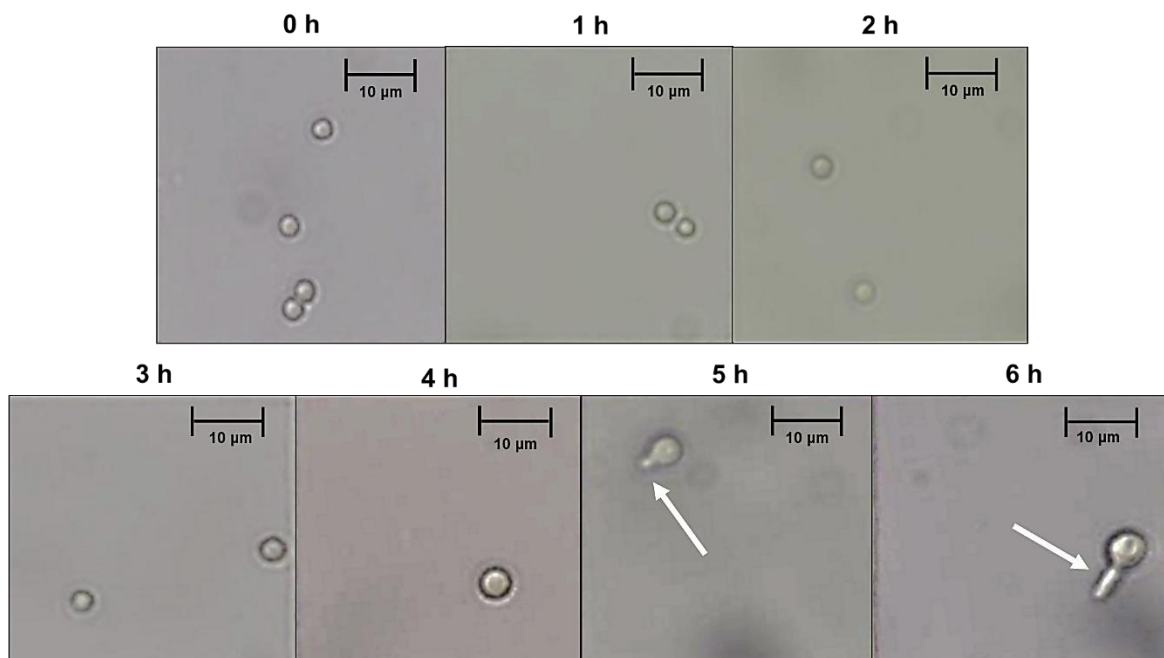
Χρησιμοποιώντας πληροφορίες που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων KEGG για τους ταυτοποιημένους μεταβολίτες, κατασκευάστηκε *de novo* ένα απλοποιημένο μεταβολικό δίκτυο χρησιμοποιώντας το λογισμικό Vanted (**Εικόνα 52**). Τα αποτελέσματα

των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω επεξεργασία και επέκταση της ελεύθερα προσβάσιμης βιβλιοθήκης PMG *A. nidulans* metabolite library v.01 (<http://www.aua.gr/pesticide-metabolomicsgroup/Resources/default.html>) (Kalampokis et al. 2018).



Εικόνα 52: De novo κατασκευασμένο μεταβολικό δίκτυο των κοιτιδιοσπορίων του FGSC A4 στελέχους κατά την εκβλάστησή τους. Για την κατασκευή του δικτύου των καταγεγραμμένων μεταβολιτών, ανακτήθηκαν δεδομένα από τη βάση δεδομένων της KEGG. Διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύουν διαφορετικές μεταβολικές οδούς. Τα βέλη υποδεικνύουν μία ή περισσότερες αντιδράσεις μεταξύ των μεταβολιτών

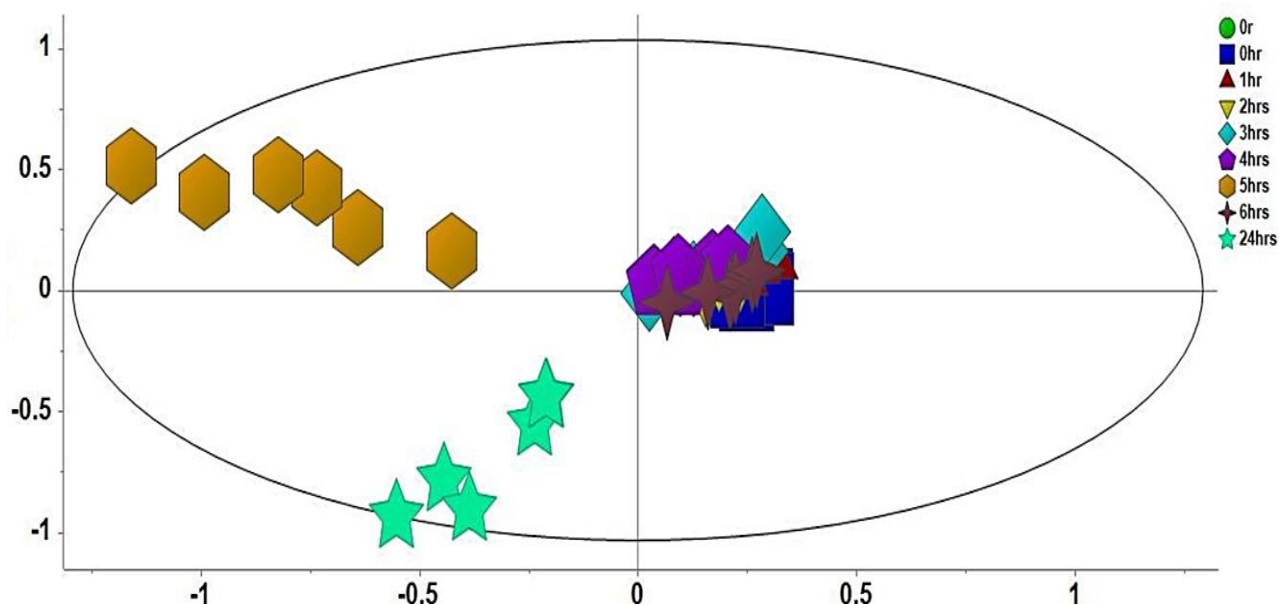
Υπό τις καθορισμένες πειραματικές συνθήκες (§2.11.2), παρατηρήθηκε διόγκωση των κονιδιοσπορίων μετά από επώαση 2 ωρών, αύξηση της διαμέτρου τους από 3 μm στα 2 ώρες σε 5 μm περίπου μετά από 4 ώρες και ο σχηματισμός της υψής εκβλάστησης 5 ώρες μετά την επώαση (**Εικόνα 53**). Αυτή παρατήρηση δείχνει ότι μεταξύ 4 και 5 ωρών υπάρχει μεταστροφή της φυσιολογίας/μεταβολισμού των κονιδιοσπορίων προς όφελος της βλαστικής ανάπτυξης



Εικόνα 53: Εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων του άγριου τύπου *A. nidulans*. Για την παρακολούθηση της εκβλάστησής τους, τα δείγματα ελήφθησαν σε διαστήματα μιας ώρας έως 6 ώρες εκβλάστησης, με επιπλέον δειγματοληψία 24 ώρες αργότερα (μυκηλιακή φάση). Στις 4 ώρες τα κονιδιοσπόρια έχουν διπλάσιο μέγεθος, σηματοδοτώντας το τέλος της ισοτροπικής φάσης. Στις 5 ώρες μπαίνουν στην εγκαθίδρυση της πολικότητας και είναι εμφανής η εμφάνιση υψής εκβλάστησης (λευκό βέλος). Στις 6 ώρες, επιμηκύνεται η υψή εκβλάστησης (λευκό βέλος)

Οι φάσεις της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων χαρακτηρίστηκαν επαρκώς από τα καταγεγραμμένα μεταβολώματα και τις αντίστοιχες τάσεις όπως φαίνονται από τις OPLS-DA και HCA αναλύσεις. Τα μεταβολώματα των κονιδιοσπορίων των πρώτων πέντε

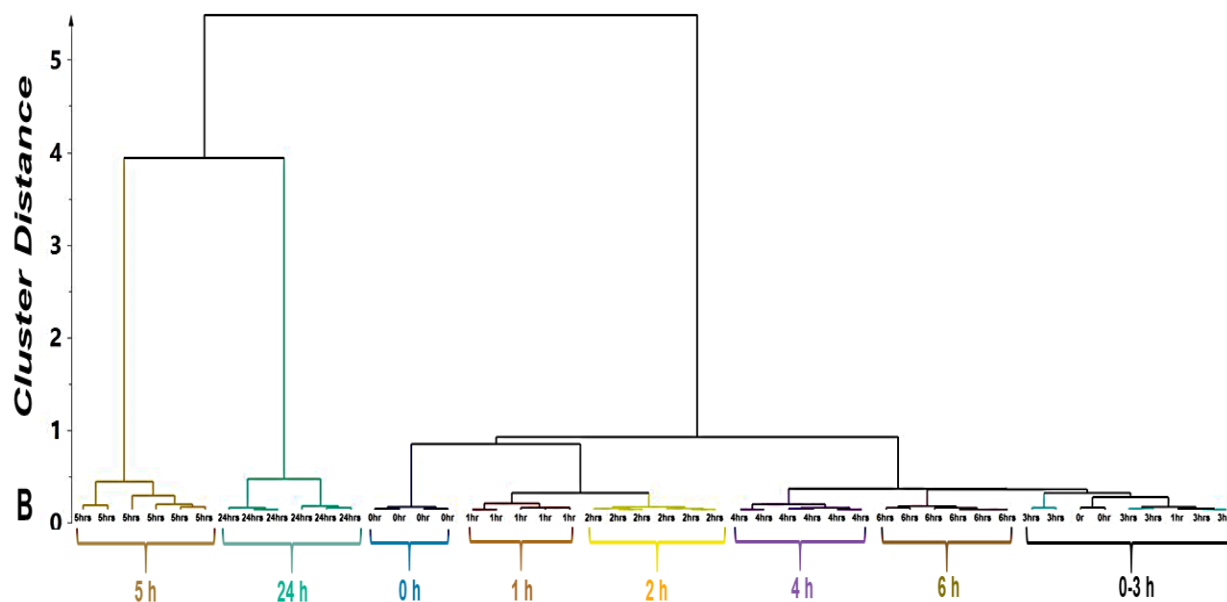
χρονικών σημείων (0-4 ώρες) και εκείνα έπειτα από επώαση 6 ωρών ομαδοποιούνται κοντά και αλληλοεπικαλύπτονται σε κάποιο βαθμό (Εικόνες 54, 55).



Εικόνα 54: PC1/PC2 διαγράμματα συντεταγμένων ορθογώνιας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA) των GC/EI-Tof/MS μεταβολομικών προφίλ των κονιδιοσπορίων του FGSC A4 στελέχους κατά την εκβλάστησή τους. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το T2 του Hotelling με διάστημα εμπιστοσύνης 95%

Αυτή η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των πρώτων ωρών της κονιδιακής εκβλάστησης μπορεί αφενός να αποδοθεί στην τοπική κατανάλωση θρεπτικών από το υπόστρωμα των αρχικών καλλιεργειών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα, έχοντας ως αποτέλεσμα την παραγωγή κονιδιοσπορίων διαφορετικής ηλικίας και με διαφορετική χημική σύσταση (Bleichrodt et al. 2013). Επιπλέον είναι γνωστό ότι όχι μόνο κονιδιοσπόρια που προέρχονται από κονιδιοφόρους που βρίσκονται στο κέντρο της αποικίας είναι μεγαλύτερης ηλικίας από εκείνα της περιφέρειας, αλλά ακόμη και αυτά που βρίσκονται στο άκρο της κονιδιακής αλυσίδας είναι μεγαλύτερης ηλικίας από αυτά της βάσης της ίδιας κονιδιοφόρου. Ο συνδυασμός των προηγούμενων έχει ως αποτέλεσμα, τα κονιδιοσπόρια των ασπεργίλλων, όπως ήδη είναι γνωστό, να βρίσκονται σε διαφορετική φάση ωρίμανσης. Σε μια συγκριτική μελέτη του ρυθμού εκβλάστησης στον *A. niger*, βρέθηκε ότι νεότερα κονίδια έχουν την τάση να εκβλαστάνουν ταχύτερα

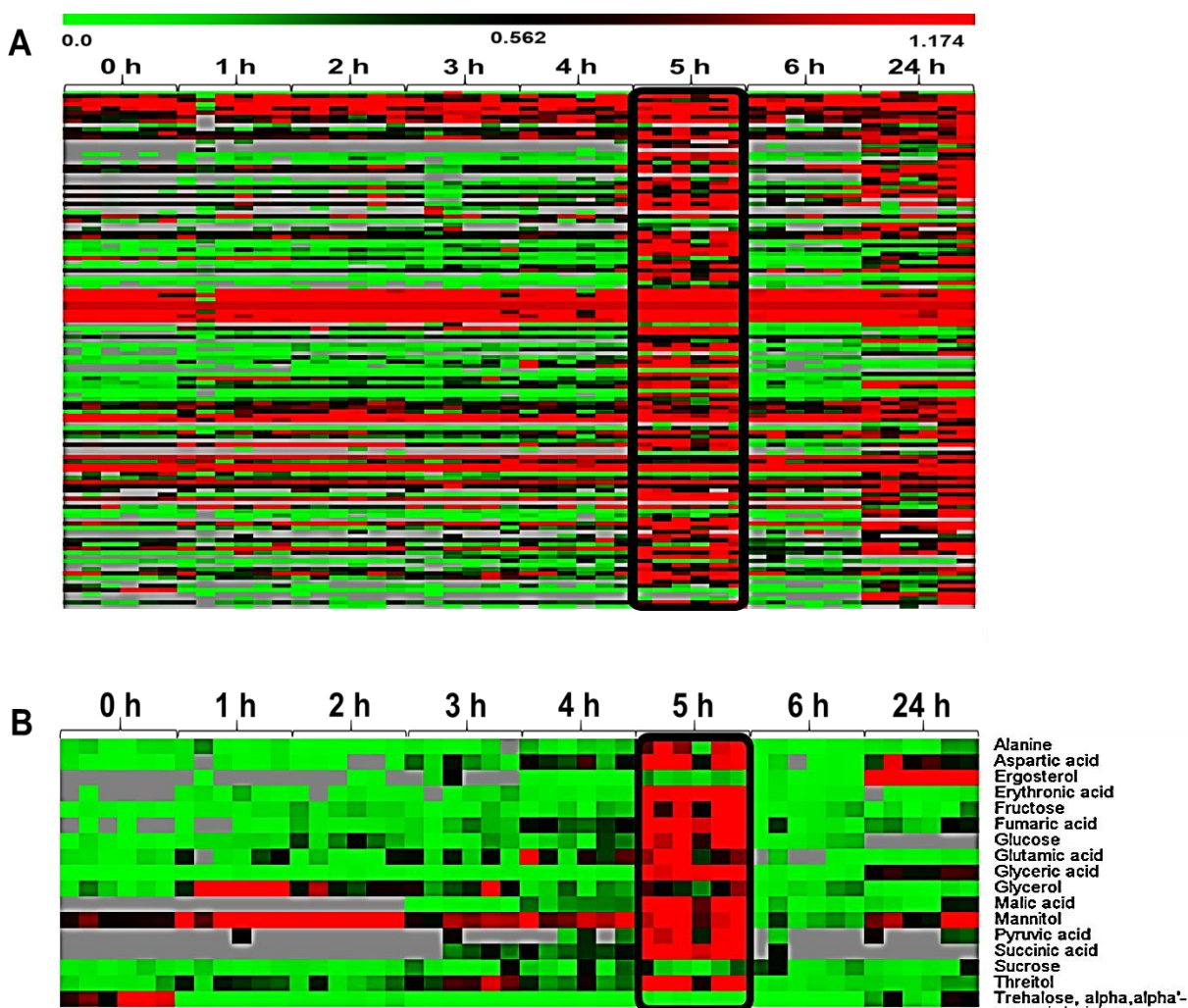
(Teertstra et al. 2017). Αυτή η διαφορά του ρυθμού εκβλάστησης που οφείλεται στη διαφορετική κατάσταση ωρίμανσης, φαίνεται να εξηγεί και την ομαδοποίηση που παρατηρείται κατά τις πρώτες ώρες της εκβλάστησης.



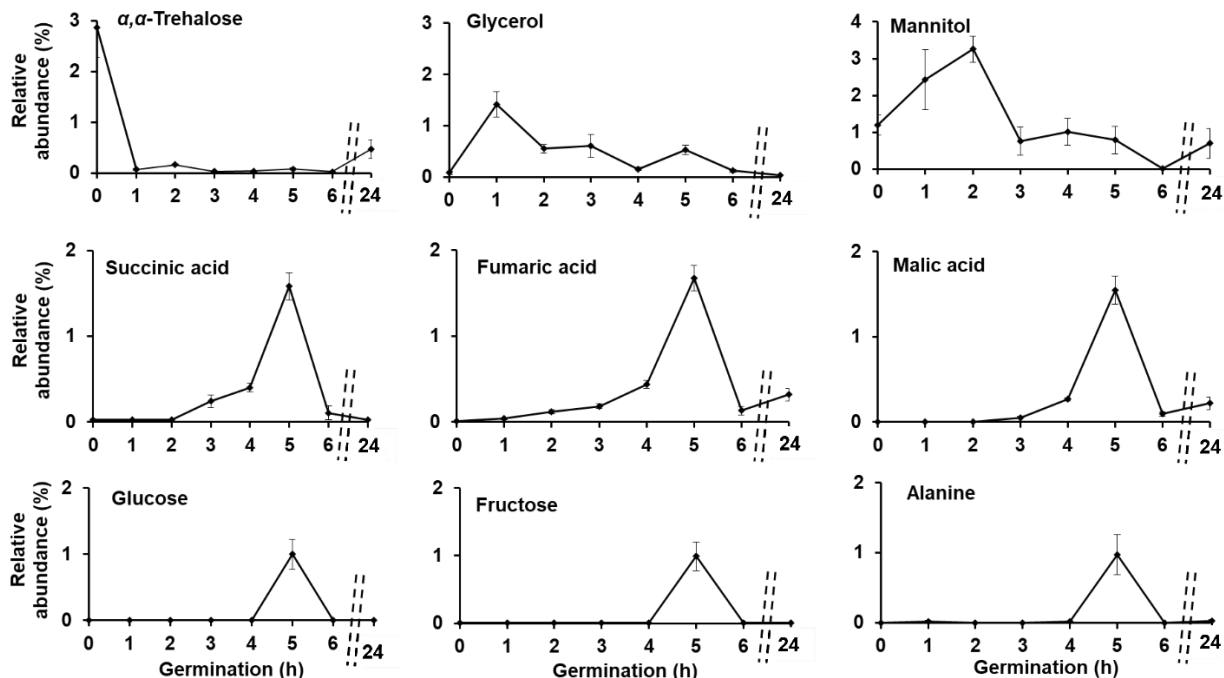
Εικόνα 55: Ιεραρχική ανάλυση συστάδων (HCA) με *Pearson correlation* και *average linkage clustering*, των GC/EI-ToF/MS μεταβολομικών προφίλ των κονιδιοσπορίων του FGSC A4 στελέχους κατά την εκβλάστησή τους. Παρατηρείται μη επαρκής διαχωρισμός των δειγμάτων που εκβλάστησαν τις πρώτες τρεις ώρες

Ένα δεύτερο σημαντικό εύρημα είναι ότι για την πλειοψηφία των ταυτοποιημένων μεταβολιτών φάνηκε να ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα έπειτα από 5 ώρες εκβλάστησης (Εικόνες 56, 57). Αυτή η παρατήρηση ενδεχομένως υποδηλώνει μια διέγερση του συνόλου σχεδόν του πρωτογενούς μεταβολισμού, καθώς η πλειονότητα των ανιχνευθέντων μεταβολιτών της συγκεκριμένου σταδίου, καταγράφηκαν σε αυξημένα επίπεδα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι πιθανόν να πρόκειται για ένα μεταβολικό φαινόμενο το οποίο συμπίπτει σχεδόν χρονικά με την εγκαθίδρυση της πολικότητας και την εμφάνιση της υψής εκβλάστησης (Εικόνα 53). Παρατηρείται μια γενική διαταραχή του μεταβολισμού των κονιδιοσπορίων, με διάφορους υδατάνθρακες, αλκοόλες, σάκχαρα και ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου Krebs (KCI), να ανακαλύπτονται ως πιθανοί μεταβολίτες

βιοσημαντές αυτής της συγκεκριμένης και πιθανώς βραχείας μεταβατικής φάσης κατά τη διάρκεια της κονιδιακής εκβλάστησης (§3.5.4) (Εικόνες 56, 57).



Εικόνα 56: Cluster heat map (a), και μεγέθυνση επιλεγμένων περιοχών (b) των GC/EI-ToF/MS μεταβολομικών προφίλ των κονιδιοσπορίων του FGSC A4 στελέχους κατά την εκβλάστησή τους. Οι επιλεγμένες περιοχές εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα της συντριπτικής πλειονότητας των καταγεγραμμένων μεταβολομάτων στις 5 ώρες εκβλάστησης. Οι σειρές αντιπροσωπεύουν ταυτοποιημένους μεταβολίτες ή μεταβολικά χαρακτηριστικά και οι στήλες τα επιλεγμένα χρονικά σημεία και βιολογικές επαναλήψεις. Κάθε κελί κωδικοποιείται βάσει των αλλαγών των καταγεγραμμένων επιπέδων των αντίστοιχων μεταβολιτών χρησιμοποιώντας χρωματική κλίμακα που κυμαίνεται από 0 (ανοιχτό πράσινο), που δείχνει χαμηλή, έως 1.174 (ανοιχτό κόκκινο) που δείχνει υψηλή. Έξι ομαδοποιημένα δείγματα αναλύθηκαν για κάθε χρονικό σημείο



Εικόνα 57: Καταγεγραμμένα επίπεδα επιλεγμένων μεταβολιτών των κονιδιοσπορίων του FGSC A4 κατά την εκβλάστησή τους. Η α,α -τρεχαλόζη μεταβολίζεται ταχέως κατά τη διάρκεια της πρώτης ώρας, πιθανότατα ενεργώντας ως πηγή άνθρακα (C) για τη γλυκερόλη που βιοσυντίθεται αμέσως μετά από 1 ώρα και καταναλώνεται κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης. Παρόμοιες αλλαγές στα επίπεδα της μαννιτόλης υποδηλώνουν έναν πιθανό οσμορυθμιστικό ρόλο των πολυολών κατά τη πρώιμη εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων. Τα σάκχαρα και τα ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου Krebs συσσωρεύονται παροδικά κατά την καθιέρωση πολικότητας και την εμφάνιση της υψής εκβλάστησης στις 5-6 ώρες. Έξι ομαδοποιημένα δείγματα αναλύθηκαν για κάθε χρονικό σημείο

Παρότι καταγράφηκε ένα σημαντικό μέρος του μεταβολόματος των κονιδιοσπορίων, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ερμηνεία του ρόλου του δισακχαρίτη α,α -τρεχαλόζη και των σακχάρων γλυκερόλη και μαννιτόλη, τα επίπεδα των οποίων μεταβλήθηκαν σημαντικά κατά τα πρώτα στάδια της κονιδιακής εκβλάστησης (**Εικόνα 57**).

3.5.2 Η υδρόλυση της τρεχαλόζης έχει κομβικό ρόλο στην κονιδιακή εκβλάστηση του στελέχους FGSC A4

Η ταχεία υδρόλυση της τρεχαλόζης κατά την έναρξη της βλάστησης του κονιδιοσπορίου αποτελεί κύριο εύρημα της ανάλυσης (**Εικόνα 57**), καθώς φαίνεται να σχετίζεται με τον τερματισμό του ληθάργου των κονιδιοσπορίων και προηγείται της ισότροπης φάσης της εκβλάστησής τους. Επιπλέον όντας γνωστή η προσπάθεια της βιομηχανίας αγροχημικών κατά τα τελευταία χρόνια για ανακάλυψη νέων, εναλλακτικών στόχων για τα Φ.Π.Π, ώστε να δοθούν λύσεις σε μείζονα ζητήματα που αντιμετωπίζει ο τομέας τη φυτοπροστασίας, η υδρόλυση της τρεχαλόζης, μπορεί να αποτελέσει έναν πολλά υποσχόμενο στόχο.

Η ύπαρξη ύδατος και η απορρόφηση και η αποικοδόμηση της πηγής ή των πηγών άνθρακα, κυρίως της γλυκόζης, είναι γνωστό ότι είναι απαραίτητα στοιχεία για τη διακοπή του ληθάργου και την έναρξη της εκβλάστησης στον *A. nidulans* (Osheron and May 2000). Μεταγενέστερες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η χρήση των ενδοκυττάρων πηγών άνθρακα παίζει σημαντικό ρόλο, το οποίο παρόλα αυτά δεν έχει μελετηθεί εκτενώς (Novodvorska et al. 2016). Σε αντίθεση με την κινητοποίηση του άνθρακα, η πρόσληψη και χρήση πηγών αζώτου και βιταμινών δεν είναι απαραίτητες για την έναρξη της εκβλάστησης (Amillis et al. 2004).

Η σημασία της ύπαρξης ύδατος για την παύση του κονιδιακού ληθάργου έχει διερευνηθεί στον *A. niger*. Σε αυτό το είδος, το νερό ξεκινά την εκβλάστηση συνοδευόμενη από τη χρήση των διαθέσιμων πηγών άνθρακα (Novodvorska et al. 2016). Στον *A. fumigatus*, η αλκοολική ζύμωση έχει αποδειχθεί ότι παίζει βασικό ρόλο κατά τη διάρκεια της διακοπής του ληθάργου ή κατά την έναρξη της εκβλάστησης (Teutschbein et al. 2010). Στο ίδιο είδος, μειώθηκε δραστικά η έκφραση γονιδίων που συνδέονται με τον εγκαθιδρυμένο λήθαργο, όπως για παράδειγμα τα *afu2g16840*, *afu2g15630*, *afu5g13790* και *afu5g12620*, κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ωρών κονιδιακής εκβλάστησης (Baltussen et al. 2018). Στον *A. niger*, γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό λειτουργικών μεταβολιτών όπως η τρεχαλόζη, είχαν υψηλά επίπεδα μεταγραφής σε αδρανή κονιδιοσπόρια και οι πρώτες 2 ώρες βλάστησης χαρακτηρίζονται από μια μεγάλη μεταγραφική μετάβαση (van Leeuwen et al. 2013). Παρομοίως, έχει αναφερθεί υψηλή δραστηριότητα των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της τρεχαλόζης σε αδρανή

κονιδιοσπóρια (Novodvorska et al. 2013). Όλα τα προηγούμενα υποδεικνύουν έναν βασικό ρόλο της τρεχαλόζης στον μηχανισμό dormancy και εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων των Ασπεργίλλων.

Η τρεχαλόζη είναι ένας δισακχαρίτης με γνωστή προστατευτική δράση έναντι διαφόρων καταπονήσεων και αντιδραστικών ειδών οξειγόνου (ROS). Επιπλέον αποτελεί και το κύριο υδατοδιαλυτό απόθεμα υδατάνθρακα, καθώς υδρολύεται σε δύο μόρια α-D-γλυκόζης μέσω δράσης του ενζύμου της ουδέτερης τρεχαλάσης (E.C. 3.2.1.28) (d'Enfert et al. 1999, Iturriaga et al. 2009). Αποτελεί έναν εκ των πλέον κοινών μεταβολιτών που απαντώνται στα κονιδιοσπóρια διαφόρων ειδών μυκήτων και ιδίως των ασπεργίλλων (Horikoshi and Ikeda 1966), καθώς είναι γνωστός ο πολύ σημαντικός ρόλος της στη φυσιολογία τους. Για παράδειγμα στον *A. niger* η ικανότητα αποικοδόμησης ενδοκυτταρικής τρεχαλόζης επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη φυσιολογική ανάπτυξη των κονιδιοφόρων κι την αντοχή των κονιδιοσπορίων στις θερμοκρασιακές καταπονήσεις (Svanström and Melin 2013).

Με βάση τα προηγούμενα, τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης υποδεικνύουν ότι η υδρόλυση τρεχαλόζης προς γλυκόζη χρησιμεύει ως αρχική πηγή άνθρακα και ενέργειας που μπορεί να είναι απαραίτητη για την έναρξη της έκφρασης γονιδίων και πρωτεϊνών κλειδιά κατά τη διάρκεια της κονιδιακής εκβλάστησης. Η ταχεία χρήση της γλυκόζης δεικνύεται από την απουσία συσσώρευσης γλυκόζης και φρουκτόζης στην πρώτη φάση της εκβλάστησης (**Εικόνα 57**). Η γλυκόζη δε συσσωρεύεται στην αρχική φάση, υποδεικνύοντας τον άμεσο καταβολισμό της. 5 ώρες μετά την έναρξη της εκβλάστησης, φάνηκε μια σύντομη διακοπή του καταβολισμού της, όπως φάνηκε από την παροδική συσσώρευση γλυκόζης και φρουκτόζης

3.5.3 Η γλυκερόλη και η μαννιτόλη παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της εκβλάστησης

Ακόμη ένα σημαντικό εύρημα είναι η διακύμανση των επιπέδων των σακχάρων γλυκερόλη και μαννιτόλη κατά τη διάρκεια της κονιδιακής εκβλάστησης (**Εικόνα 57**).

Αποτελεί ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι η αυξημένη βιοσύνθεση πολυολών λαμβάνει χώρα αμέσως μετά τη μείωση της τρεχαλόζης. Παρατηρείται μέγιστο των επιπέδων της γλυκερόλης μία ώρα μετά την επώαση, ενώ έπειτα από ακόμη μια ώρα ακολουθεί η μέγιστη συσσώρευση μαννιτόλης. Στη συνέχεια παρατηρείται μια προοδευτική μείωση των επιπέδων τους, έως τις 4 ώρες εκβλάστησης. Αυτές οι διακυμάνσεις στα επίπεδα των δύο αυτών μεταβολιτών φαίνεται πως συμπίπτουν με την ισοτροπική φάση, κατά την οποία η πρόσληψη νερού οδηγεί σε διόγκωση σπορίων και διπλασιασμό μεγέθους (Εικόνα 53).

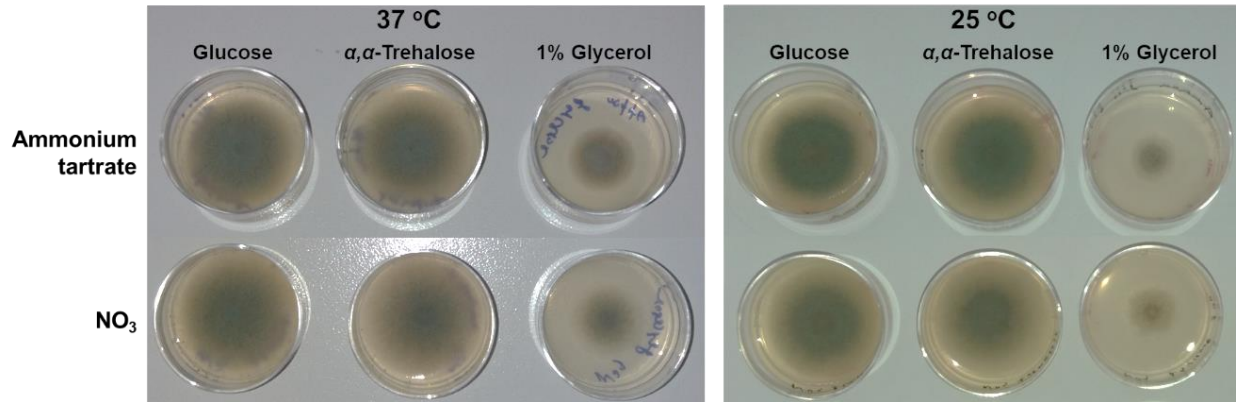
Η γλυκερόλη και η μαννιτόλη είναι δύο μεταβολίτες, με γνωστό ρόλο στην οσμоруθμιση των κυττάρων (Nevoigt and Stahl 1997, Prior and Hohmann 1997, Shen et al. 1999, Ruijter et al. 2003, Bougouffa et al. 2014). Είναι γνωστό πως όταν τα κύτταρα βρίσκονται υπό ωσμωτική καταπόνηση, προκειμένου να αντιμετωπίσουν την απώλεια ύδατος όταν εκτίθενται σε εξωτερικά υπερτονικά περιβάλλοντα, συσσωρεύουν ενδο-μεταβολίτες όπως διάφορα σάκχαρα, και ιδίως τη γλυκερόλη (Reed et al. 1987, Blomberg and Adler 1992).

Τα παρατηρούμενα αυξημένα επίπεδα γλυκερόλης αμέσως μετά τη διάσπαση της τρεχαλόζης υποδεικνύουν τον ρόλο της τρεχαλόζης ως αρχικής πηγής άνθρακα για τη βιοσύνθεσή της. Αυτή η παρατήρηση, βρίσκεται σε πλήρη αντιστοιχία με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών των d'Enfert et. al. (d'Enfert 1997, d'Enfert et al. 1999). Σύμφωνα με τις δουλειές αυτές φάνηκε ότι η γλυκερόλη δε βιοσυντίθενται μέσω του καταβολισμού μιας εξωκυτταρικής πηγής άνθρακα, αλλά αντιθέτως δια της γλυκολυτικής οδού από γλυκόζη που προέρχεται από ενδογενή τρεχαλόζη. Επιπρόσθετα, οι παρατηρούμενες διακυμάνσεις των επιπέδων της τρεχαλόζης και της γλυκερόλης κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενες αναφορές (d'Enfert and Fontaine 1997).

Φαίνεται πως αυτή η σημαντική αύξηση των επιπέδων της γλυκερόλης κατά τις πρώτες ώρες της εκβλάστησης και η ταχεία ελάττωση της στη συνέχεια, οδηγεί σε μια απότομη αύξηση της ενδοκυτταρικής ωσμωτικής πίεσης εντός των κονιδιοσπορίων. Αυτά, προκειμένου να αντισταθμιστεί η ωσμωτική διαφορά μεταξύ του ενδοκυττάρου χώρου τους και του περιβάλλοντος, απορροφούν τάχιστα νερό. Αυτή η ταχεία είσοδος του νερού προκαλεί με τη σειρά της, την αύξηση του φυσικού μεγέθους των κονιδιοσπορίων.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο μηχανισμός αυτός συμπίπτει με την αύξηση του φυσικού μεγέθους των κονιδιοσπορίων που παρατηρείται κατά τη ισοτροπική φάση, όταν τα κονιδιοσπόρια σχεδόν διπλασιάζονται σε μέγεθος, η παρατηρούμενη διακύμανση των επιπέδων γλυκερόλης φαίνεται να αποτελεί και τον κύριο μηχανισμό ρύθμισης της διόγκωσης των κονιδιοσπορίων. Ένας παρόμοιος μηχανισμός έχει αναφερθεί στην περίπτωση ειδών *Phycomyces* (van Laere and Hulsmans 1987). Επιπλέον, η γλυκερόλη δεν ανιχνεύθηκε σε αδρανή κονιδιοσπόρια του *A. niger*, αλλά παρουσίασε σημαντική διακύμανση των επιπέδων της κατά τη χρονική εξέλιξη της εκβλάστησής τους (Novodvorska et al. 2013), παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε εδώ, υποδεικνύοντας τη λειτουργία ενός ανάλογου ρυθμιστικού μηχανισμού, τουλάχιστον στην περίπτωση των ασπεργίλλων.

Η υπόθεση ότι η γλυκερόλη χρησιμεύει ως ωσμωρυθμιστής που οδηγεί σε διόγκωση των κονιδιοσπόρων και όχι πρωτίστως ως ενδοκυτταρική πηγή άνθρακα επιβεβαιώνεται περαιτέρω από τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών, κατά τα οποία υπήρξε σημειακή επιμόλυνση τρυβλίων με ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές άνθρακα και αζώτου και τα οποία καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες (§2.10). Φάνηκε ότι η γλυκερόλη δεν αξιοποιείται σε σημαντικό βαθμό ως πηγή άνθρακα κατά τη διάρκεια της φάσης της μυκηλιακής ανάπτυξης των εκβλαστημένων κονιδιοσπορίων, σε αντίθεση με την τρεχαλόζη, η οποία δρα σαν εξαιρετική εναλλακτική πηγή έναντι της γλυκόζης. Αυτό επιβεβαίωσε περαιτέρω την υπόθεση ότι η γλυκερόλη δρα κυρίως ωσμωρυθμιστικά, αντί ως πηγή αξιοποιήσιμου άνθρακα. Επιπλέον φάνηκε ότι η πηγή αζώτου και η θερμοκρασία δε φαίνεται να επηρεάζουν την εκβλάστηση των κονιδίων και μετέπειτα μυκηλιακή ανάπτυξη του *A. nidulans* δείχνοντας ότι κύριος παράγοντας είναι η ύπαρξη κατάλληλης πηγής άνθρακα (**Εικόνα 58**).



Εικόνα 58: Μυκηλιακή ανάπτυξη εκβλαστημένων κονιδιοσπορίων του στελέχους FGS A4 σε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, συμπληρωμένο με 1% πηγών άνθρακα (γλυκόζη, α,α-τρεχαλόζη, γλυκερόλη) και 10 mM τρυγικού αμμωνίου ή νιτρικού νατρίου ως πηγές αζώτου, έπειτα από επώαση 5 ημερών στους 37°C και 25°C στο σκοτάδι.

Όσον αφορά τη μαννιτόλη, η εμπλοκή της σε πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες (Ruijter et al. 2003, Solomon et al. 2007) (π.χ. πηγή C, αντιοξειδωτικός ρόλος, κτλ.) δεν επιτρέπει να συναχθούν σαφή συμπεράσματα σχετικά με τον ρόλο της βάσει των υπάρχοντων δεδομένων.

Τα προαναφερθέντα υποδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο των δύο σακχάρων κατά τη διαδικασία εκβλάστησης των κονιδιοσπόρων του *A. nidulans*, ιδίως κατά τη διάρκεια της ιστροπικής φάσης

3.5.4 Ο σχηματισμός της υψής εκβλάστησης είναι καθοριστικός για τον μεταβολισμό και τη χημική ομοίωση των κονιδιοσπορίων

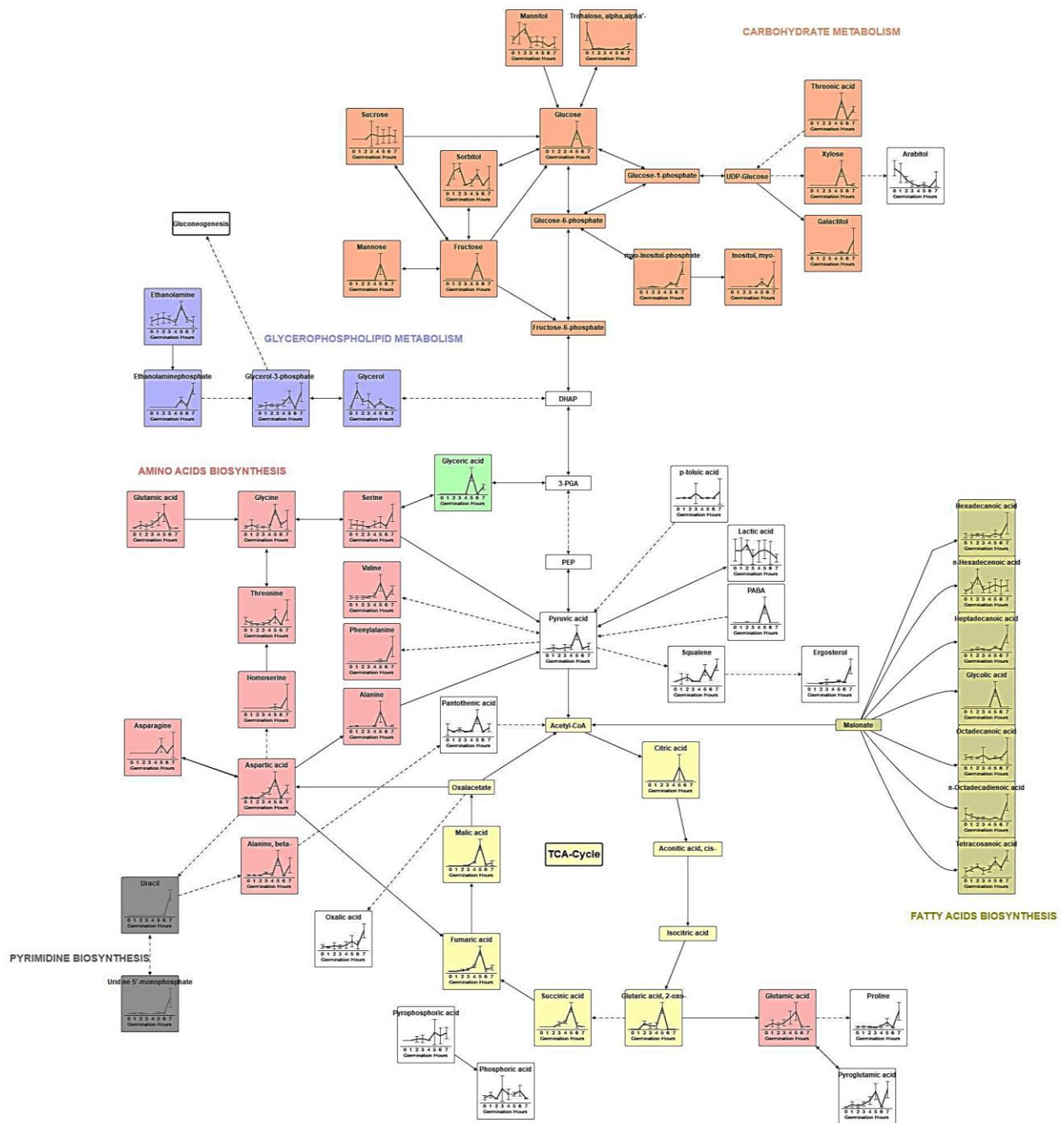
Υπό τις καθορισμένες συνθήκες, το χρονικό σημείο των 5 ωρών μετά την επώαση των κονιδιοσπορίων (σχηματισμός υψής εκβλάστησης), βρέθηκε ότι έχει παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην όλη διαδικασία της κονιδιακής εκβλάστησης. Αυτό φαίνεται από τις σημαντικές διακυμάνσεις στα επίπεδα των περισσότερων από τους αναγνωρισμένους μεταβολίτες, όπως τα ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου Krebs (KCI) (π.χ. ηλεκτρικό, φουμαρικό, μηλικό οξύ), αμινοξέα (π.χ. βαλίνη, αλανίνη, ασπαραγίνη, θρεονίνη, γλυκίνη), και υδατάνθρακες (π.χ. φρουκτόζη, γλυκόζη) (**Εικόνες 57, 59**).

Είναι γνωστό ότι ο κύκλος Krebs κατέχει κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό και την ενεργειακή ομοιοστάση των κυττάρων. Χρησιμεύει στη σύνθεση δομικών στοιχείων για τη βιοσύνθεση των προδρόμων μορίων όπως το οξαλοξικό και το α-κετογλουταρικό οξύ, που χρησιμοποιούνται μεταξύ άλλων στην αφομοίωση πηγών αζώτου και τη βιοσύνθεση αμινοξέων (Akram 2014). Επιπλέον, τα αμινοξέα αποτελούν δομικά στοιχεία πρωτεϊνών (Bayram et al. 2016) που χρησιμοποιούνται ως δομικά στοιχεία σε ταχέως αναπτυσσόμενα βιολογικά συστήματα όπως ο σχηματισμός της υψής εκβλάστησης και η μετέπειτα μυκηλιακή ανάπτυξη ενός εκβλαστημένου κονιδιοσπορίου.

Είναι ενδιαφέρον ότι 5 ώρες μετά την έναρξη της κονιδιακής εκβλάστησης, που συμπίπτει με το σχηματισμό και ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα, το κυτταρικό τοίχωμα των κονιδιοσπορίων χάνει την πυκνότητά του, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητά τους (Koukaki et al. 2003). Επιπρόσθετα έχει αποδειχθεί ότι κατά τη διάρκεια του σχηματισμού της υψής εκβλάστησης, γονίδια που κωδικοποιούν μεταφορείς πουρίνης, ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση, υπερεκφράζονται ανεξάρτητα από τα περιβαλλοντικά ή/και φυσιολογικά ερεθίσματα (Amillis et al. 2004, Baltussen et al. 2018). Μια τέτοια παρατήρηση μπορεί να αποδοθεί στη λειτουργία μεταφορέων “αισθητήρων”, γνωστών ως transceptors, που έχει ως αποτέλεσμα μια αυξημένη εισροή θρεπτικών στοιχείων στο κύτταρο (Diallinas 2017, Steyfkens et al. 2018).

Η λειτουργία ενός τέτοιου μηχανισμού μπορεί να παρέχει στα κονιδιοσπόρια τα απαραίτητα δομικά στοιχεία για τη βιοσύνθεση των μεταβολιτών και των πρωτεϊνών, τα οποία είναι κρίσιμα για την περαιτέρω ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα και την επιμήκυνση των μυκηλιακών υφών. Με βάση τα προηγούμενα, είναι εύλογο να υποστηριχθεί η αύξηση των επιπέδων του μεταβολισμού των κονιδιοσπορίων και η αυξημένη εισροή τέτοιων ενώσεων, που καταλήγουν στη διέγερση των μεταβολικών διεργασιών των κονιδιοσπορίων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων των πρωτογενών μεταβολιτών.

Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης, μπορούν να υποστηρίξουν τη θεωρία ότι πιθανόν εμπλέκεται ένα μεταβολικό σήμα, ώστε να καλυφθούν οι εκθετικά αυξανόμενες βιοσυνθετικές ανάγκες με ταυτόχρονη αποφυγή κατανάλωσης απαραίτητων μεταβολιτών εξαιτίας πρόωρης ή υπερβολικά γρήγορης ανάπτυξης.



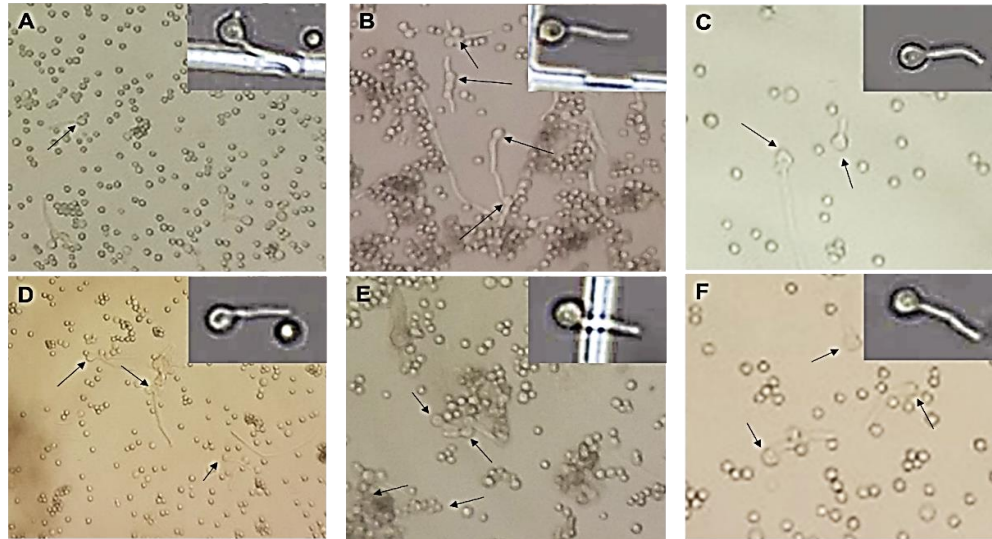
Εικόνα 59: Μεταβολικό δίκτυο της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων του FGSC A4 στελέχους με βάση τους ταυτοποιημένους μεταβολίτες. Για την κατασκευή του δικτύου, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τη βάση KEGG

3.5.5 Η τρεχαλόζη δρα ως ενδογενής πηγή άνθρακα κατά την έναρξη της κονιδιακής εκβλάστησης.

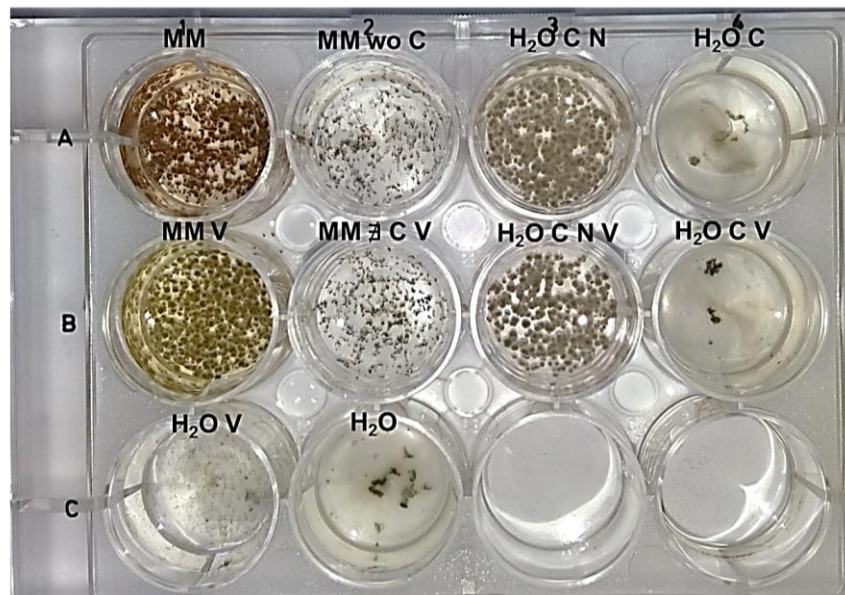
Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, ακολούθησε διερεύνηση του πιθανού ρόλου της διαταραχής του μεταβολισμού της τρεχαλόζης στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων του *A. nidulans*. Επιπλέον, για να διασαφηνιστεί ο ρόλος της ενδογενούς τρεχαλόζης ως πηγής άνθρακα και της υδρόλυσης της από την ενδογενή τρεχαλάση (EC 3.2.1.28), αξιολογήθηκε τυχόν τοξικότητα του αντιβιοτικού validamycin A, ενός γνωστού αναστολέα της τρεχαλάσης, με υψηλή εκλεκτικότητα έναντι εδαφογενών φυτοπαθογόνων όπως το *Rhizoctonia solani* (Ishikawa et al. 2005, Guirao-Abad et al. 2013), παρουσία ή απουσία επιλεγμένων πηγών άνθρακα (§2.10).

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών έδειξαν ότι έπειτα από καλλιέργεια 24 ωρών στους 37°C σε υγρό ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα και νερό, συμπληρωμένα με πηγές άνθρακα και αζώτου, τα κονιδιοσπόρια όχι μόνο εκβλαστάνουν αλλά και σχηματίζουν μυκηλιακές υφές. Παρόλα αυτά, όταν απουσιάζουν οι πηγές άνθρακα ή/και αζώτου και στα δύο μέσα, η εκβλάστηση εξακολουθεί να λαμβάνει χώρα, σε μικρότερο βαθμό, αλλά τα εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια αποτυγχάνουν να εισέλθουν στη μυκηλιακή φάση (Εικόνες 60, 61).

Ενδιαφέρον εύρημα είναι η διαφαινόμενη μη αποτελεσματικότητα του validamycin A στην κονιδιακή εκβλάστηση του *A. nidulans*. Blast alignment της ενδογενούς τρεχαλάσης του *A. nidulans* (acc. nr O42777.2) με τις εξωγενείς και ενδογενείς τρεχαλάσες του *R. solani* (acc. nr. CCO37001.1 και AGM46812.1 αντίστοιχα) έδειξε πολύ χαμηλή συσχέτιση (<55,4%), υποδεικνύοντας ότι η χαμηλή χημική συγγένεια μεταξύ της ουδέτερης τρεχαλάσης του *A. nidulans* και του validamycin A μπορεί να αποτελεί πιθανή εξήγηση για την παρατηρούμενη χαμηλή τοξικότητα. Παρόλα αυτά απαιτείται περαιτέρω μελέτη για τη διερεύνηση της επίδρασης των αντιβιοτικών που ανήκουν στην ομάδα των validamycins στην κονιδιακή εκβλάστηση (Chen et al. 2017)



Εικόνα 60: Εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια σε υγρό ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα (MM) (a), ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς πηγή άνθρακα (b) και H₂O συμπληρωμένο με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα (c). Στην επάνω δεξιά γωνία κάθε κελιού, εμφανίζεται μια μεγεθυμένη εικόνα των κονιδιοσπορίων. Στη δεύτερη σειρά εμφανίζονται οι αντίστοιχες επεμβάσεις με 20 µg mL⁻¹ validamycin A (d-f).



Εικόνα 61: Ενωρήματα κονιδιοσπορίων του FGSC A4 στελέχους σε καλλιέργεια 24 ωρών σε υγρό ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα (MM) ή αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό (H₂O), με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα (C), NaNO₃ ως πηγή αζώτου (N) και 20 µg mL⁻¹ validamycin A (V). Φαίνεται η επίδραση των κατάλληλων πηγών C και N στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων

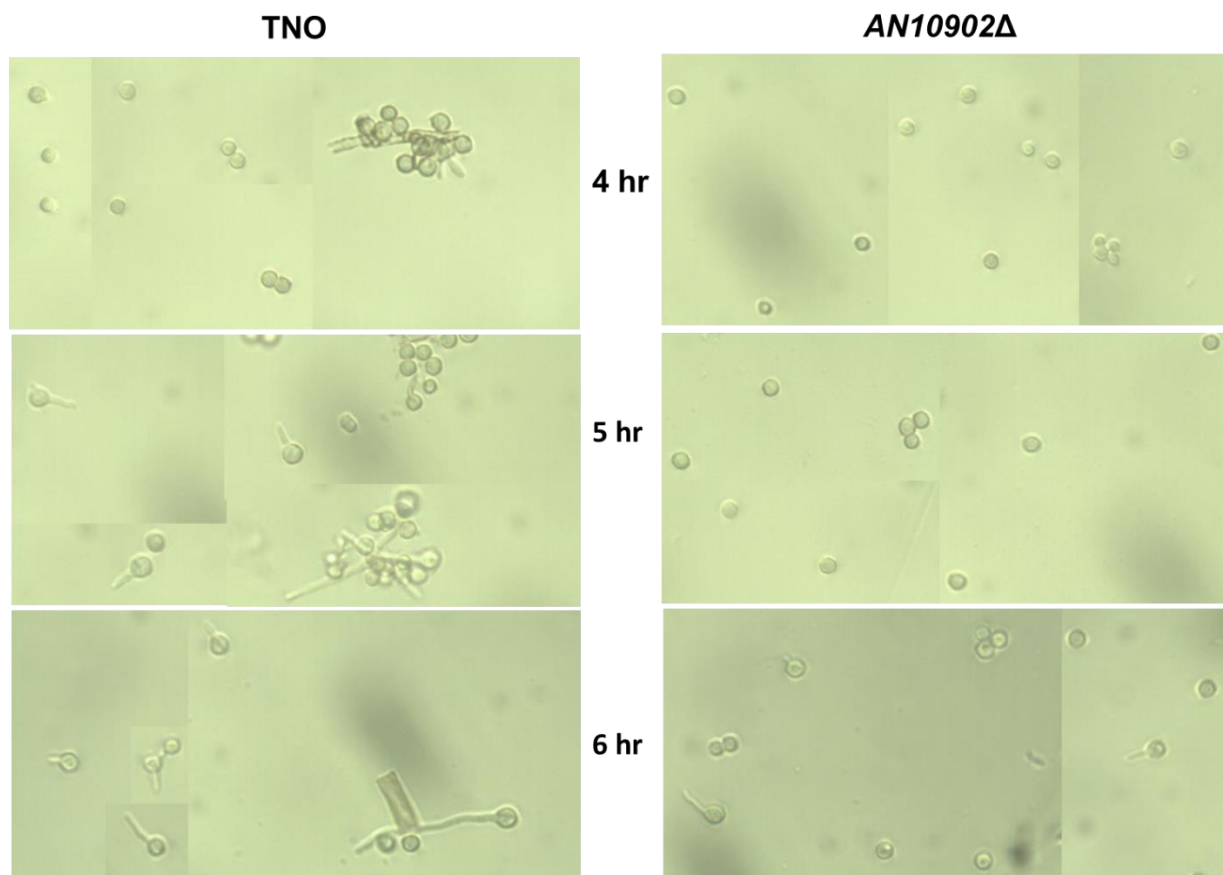
3.5.6 Η ταχεία είσοδος νερού μέσω ακουαπορίνης επηρεάζει την κονιδιακή εκβλάστηση

Σύμφωνα με τα δεδομένα της μεταβολομικής, η υδρόλυση της τρεχαλόζης και χρήση της ως ενδοκυττάρια πηγή άνθρακα, φαίνεται να αποτελεί παράγοντα διακοπής του λήθαργου των κονιδιοσπορίων του *A. nidulans*. Προκειμένου να υδρολυθεί ταχέως η τρεχαλόζη, είναι επιτακτική η λειτουργία ενός μηχανισμού εναλλακτικού της απευθείας διάχυσης του νερού δια των μεμβρανών, που να ρυθμίζει την ταχεία απορρόφησή του από τα κονιδιοσπόρια: Το νερό μπορεί να εισέρχεται ταχέως μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών διαύλων, τις αποκαλούμενες "ορθόδοξες-ακουπορίνες", μια υποομάδα της υπεροικογένειας των ακουαπορινών (Takata et al. 2004, Verkman et al. 2008, Gomes et al. 2009, Soveral et al. 2011, Verkman 2011, Verkman 2013, Kitchen et al. 2015, Kreida and Törnroth-Horsefield 2015). Η ρύθμιση του pH των ακουαπορινών του *Rhizopus delemar* μπορεί να επηρεάσει την αρχική φάση της βλάστησης του κονιδιοσπορίου, ακολουθούμενη από επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα (Turgeman et al. 2016), δείχνοντας πως τουλάχιστον σε αυτό το είδος η ταχεία είσοδος του νερού επηρεάζει την κονιδιακή εκβλάστηση.

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι μία μόνο "ορθόδοξη ακουαπορίνη" έχει καταγραφεί για τον *A. nidulans* (Pettersson et al. 2005). Για να μελετηθεί τυχόν επίδρασή της στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων του, κατασκευάστηκε στέλεχος AN10902Δ με διαγεγραμμένη την ακουαπορίνη, και πραγματοποιήθηκε σύγκριση του ρυθμού εκβλάστησης με το ισογεννητικό αγρίου τύπου στέλεχος TNO. Βάσει των προηγούμενων αποτελεσμάτων (§3.5.5) και για να διασφαλιστεί ότι η μοναδική διαθέσιμη πηγή άνθρακα είναι η ενδοκυττάρια τρεχαλόζη, τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε υγρό ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα δίχως πηγή άνθρακα και αζώτου και με μόνη προσθήκη τις απαραίτητες για την ανάπτυξη αυξοτροφίες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που φαίνονται στην **εικόνα 62**, φαίνεται ότι η απουσία της ακουαπορίνης έχει ως αποτέλεσμα τη βραδεία εξέλιξη της κονιδιακής εκβλάστησης στο AN10902Δ στέλεχος, συγκριτικά και αυτήν του αγρίου στελέχους. Αν και μειωμένη η εκβλάστηση δε σταματά εντελώς, πιθανώς εξαιτίας του γεγονότος ότι ακόμη και μικρές ποσότητες νερού που εισρέουν στα κύτταρα δίχως τη βοήθεια ακουαπορινών, μπορούν

να υδρολύσουν τη διαθέσιμη τρεχαλόζη. Παρόλα αυτά η ύπαρξή τους υποβοηθά σε σημαντικό βαθμό την εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων, τουλάχιστον στον *A. nidulans*. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι στον *Saccharomyces cerevisiae* βρέθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου *tpk2* που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα 2 του PKA, ρυθμίζει ταυτόχρονα την έκφραση της ακουαπορίνης AQY2 και της ουδέτερης τρεχαλάσης (Robertson et al. 2000), βάσει των αποτελεσμάτων μπορεί να υποτεθεί ότι και στην περίπτωση του *A. nidulans* δρα παρόμοιος μηχανισμός.



Εικόνα 62: Κονιδιακή εκβλάστηση στις 4, 5 και 6 ώρες των TNO και AN10902Δ στελεχών του *A. nidulans*, σε νερό δίχως προσθήκη πηγών άνθρακα και αζώτου. Παρατηρείται καθυστέρηση στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων του AN1092Δ συγκριτικά με το άγριου τύπου ισογεννητικό στέλεχος TNO

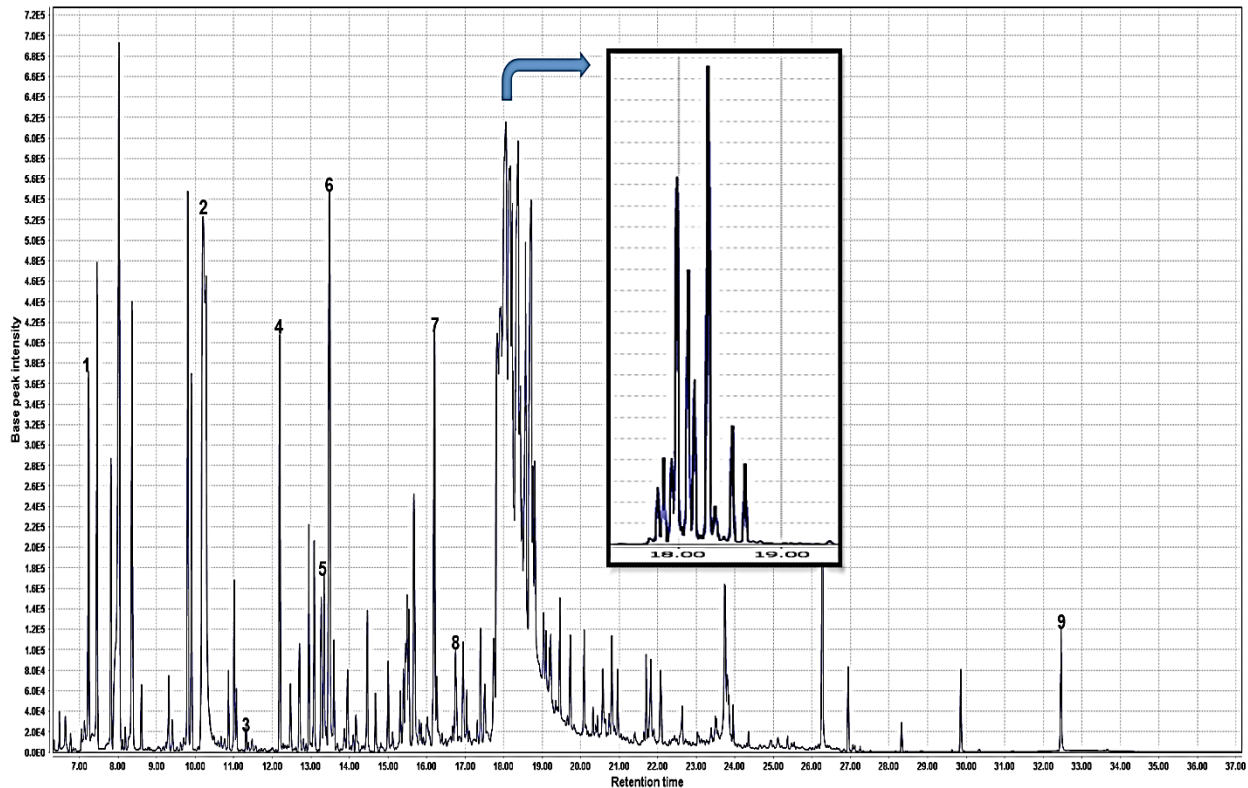
3.6 Μεταβολομική μελέτη της επίδρασης του boscalid στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων

Για τον προσδιορισμό του χρονικού σημείου της προσθήκης του boscalid και της μετέπειτα δειγματοληψίας, ελήφθησαν υπόψη τα αποτελέσματα από την προηγούμενη μελέτη της εξέλιξης μεταβολικής ρύθμισης της εκβλαστήσεως των κονιδιοσπορίων του στελέχους FGSC A4. Επιπλέον, το γονίδιο *uarC* είναι γνωστό ότι μεταγράφεται σε μέγιστο βαθμό και εκφράζεται ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές/φυσιολογικές συνθήκες, σε μορφολογικό στάδιο μετά την εγκατάσταση πολικότητας και λίγο πριν την εμφάνιση της υφής εκβλάστησης, η οποία συνήθως απαιτεί μεταξύ 4 και 5 ωρών επώασης των κονιδιοσπορίων στους 37°C (Amillis et al. 2004, Vlanti and Diallinas 2008, Kryrotou and Diallinas 2014).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα προηγούμενα, προστέθηκε boscalid στην υποθανάσιμη δόση του 1 μg mL⁻¹ σε 1 mL αιωρήματος κονιδιοσπορίων (10⁸ mL⁻¹) των στελεχών Δ7 και Δ7::*uarC*⁺, 4 ώρες μετά την επώασή τους στους 37±1°C και 150 rpm στο σκοτάδι. Η δειγματοληψία για την εκτέλεση των μεταβολομικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε 5 ώρες μετά την επέμβαση (συνολική επώαση 9 ωρών). Για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις.

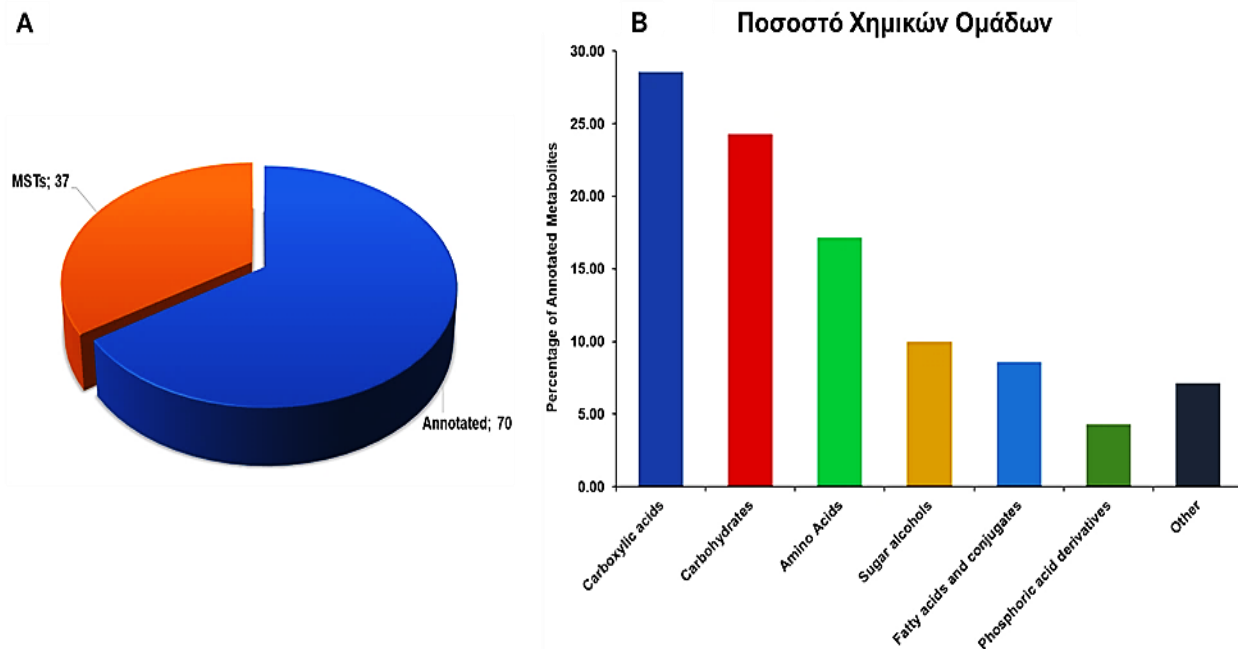
3.6.1 Επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης

Δεδομένου ότι τα κονίδια περιέχουν ελάχιστη ποσότητα μεταβολιτών, μόνο για να εξασφαλιστεί η επιβιωσιμότητα και η αρχική εξάπλωση των μυκήτων, πραγματοποιήθηκε μεταβολομική ανάλυση με χρήση συνθηκών GC/EI/TOF όπως περιεγράφηκε προηγουμένως, τόσο σε διαχωρισμό (**split**) (1:30) όσο και σε μη διαχωρισμό (**splitless mode**). Όπως και πριν, η ποιότητα των αποκτηθέντων χρωματογραφημάτων (**Εικόνα 63**) δείχνει την αξιοπιστία και την επαναληψιμότητα των εφαρμοσμένων βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων.



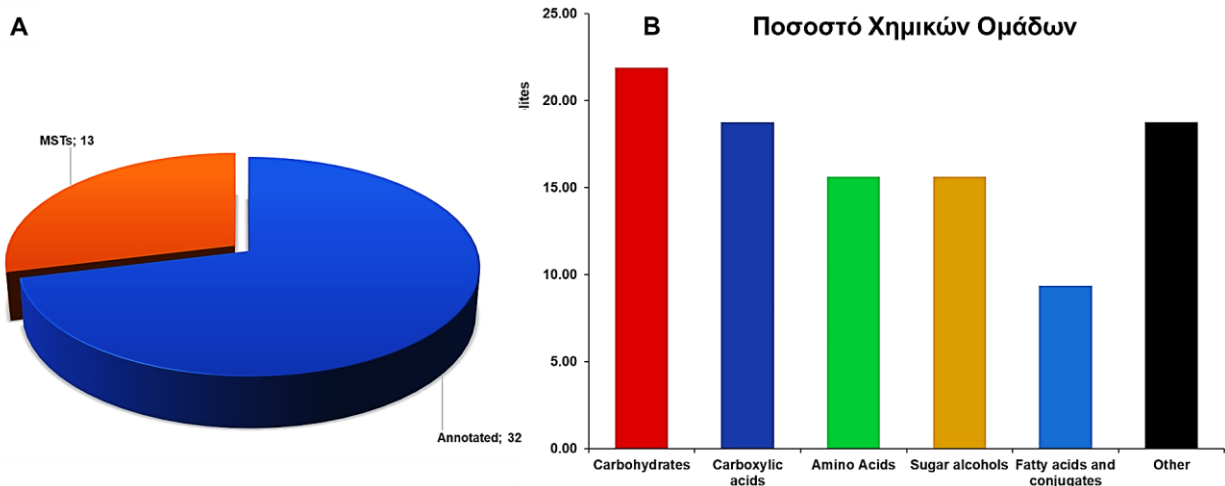
Εικόνα 63: Αντιπροσωπευτικό GC/TOF/MS χρωματογράφημα ανάπτυξης 9 ωρών των στελεχών Δ7 και Δ7::uarC⁺ έπειτα από προσθήκη 1 μg mL⁻¹ boscalid, 4 μετά τον εμβολιασμό. Δίνονται αντιπροσωπευτικοί μεταβολίτες: 1. b-lactate, 2. glycerol, 3. proline, 4. threonine, 5. malate, 6. erythritol, 7. arabitol, 8. glycerol -3 -phosphate, 9. a,a-trehalose.

Έπειτα από αποσυνέλιξη των αποκτηθέντων χρωματογραφημάτων, η ταυτοποίηση των μεταβολιτών βασίστηκε στην αναζήτηση των βάσεων δεδομένων NIST και GOLM χρησιμοποιώντας μίγμα η-αλκανίων ως πρότυπο δείκτη κατακράτησης. Συνολικά καταγράφηκαν 118 μεταβολικά χαρακτηριστικά (MST), από τα οποία ταυτοποιήθηκαν τα 70 (**Εικόνα 64 A**). Περισσότεροι από το 90 % των ταυτοποιημένων μεταβολιτών ανήκουν στα καρβοξυλικά οξέα (28.5 %), υδατάνθρακες (24,3 %), αμινοξέα (17 %), σάκχαρα (10 %), λιπαρά οξέα και παράγωγά τους (8,5 %) και παράγωγα φωσφορικού οξέος (4,3 %) (**Εικόνα 64 B**).



Εικόνα 64: Αριθμός μεταβολικών χαρακτηριστικών του καταγεγραμμένου μεταβολικού προφίλ των στελεχών Δ7 και Δ7::uarC+ που ταυτοποιήθηκαν από το εφαρμοσμένο GC/TOF/MS βιοαναλυτικό πρωτόκολλο. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πληροφορίες από τη βάση δεδομένων GOLM. 70 μεταβολίτες ταυτοποιήθηκαν, ενώ 37 παρέμειναν άγνωστοι (A). Ταξινόμηση των μεταβολιτών βάσει του ποσοστού του συνολικού μεταβολόματος. Για λόγους τυποποίησης προσαρμόστηκε το σύστημα κωδικοποίησης της βάσης δεδομένων KEGG (B).

Έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία της μήτρας των δεδομένων, και με εφαρμογή Students t-Test με P value = 5%, βρέθηκαν 45 μεταβολικά χαρακτηριστικά να επηρεάζονται από την παρουσία της δ.ο.. Από αυτά 35 ταυτοποιήθηκαν και 13 παρέμειναν άγνωστα. Όπως και πριν η πλειοψηφία των ταυτοποιημένων μεταβολιτών ανήκουν στους υδατάνθρακες (22 %), τα καρβοξυλικά οξέα (19 %), τα αμινοξέα (16 %), σάκχαρα (16 %), και παράγωγα φωσφορικού οξέος (9 %) (Εικόνα 65).



Εικόνα 65: Αριθμός μεταβολικών χαρακτηριστικών του καταγεγραμμένου μεταβολικού προφίλ των στελεχών Δ7 και Δ7::uarC⁺ που ταυτοποιήθηκαν από το εφαρμοσμένο GC/TOF/MS βιοαναλυτικό πρωτόκολλο και εμφάνισαν σημαντική επίπτωση από την εφαρμογή 1 μg mL⁻¹ boscalid. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πληροφορίες από τη βάση δεδομένων GOLM. 32 μεταβολίτες ταυτοποιήθηκαν, ενώ 17 παρέμειναν άγνωστοι (A). Ταξινόμηση των μεταβολιτών βάσει του ποσοστού του συνολικού μεταβολόματος. Για λόγους τυποποίησης προσαρμόστηκε το σύστημα κωδικοποίησης της βάσης δεδομένων KEGG (B).

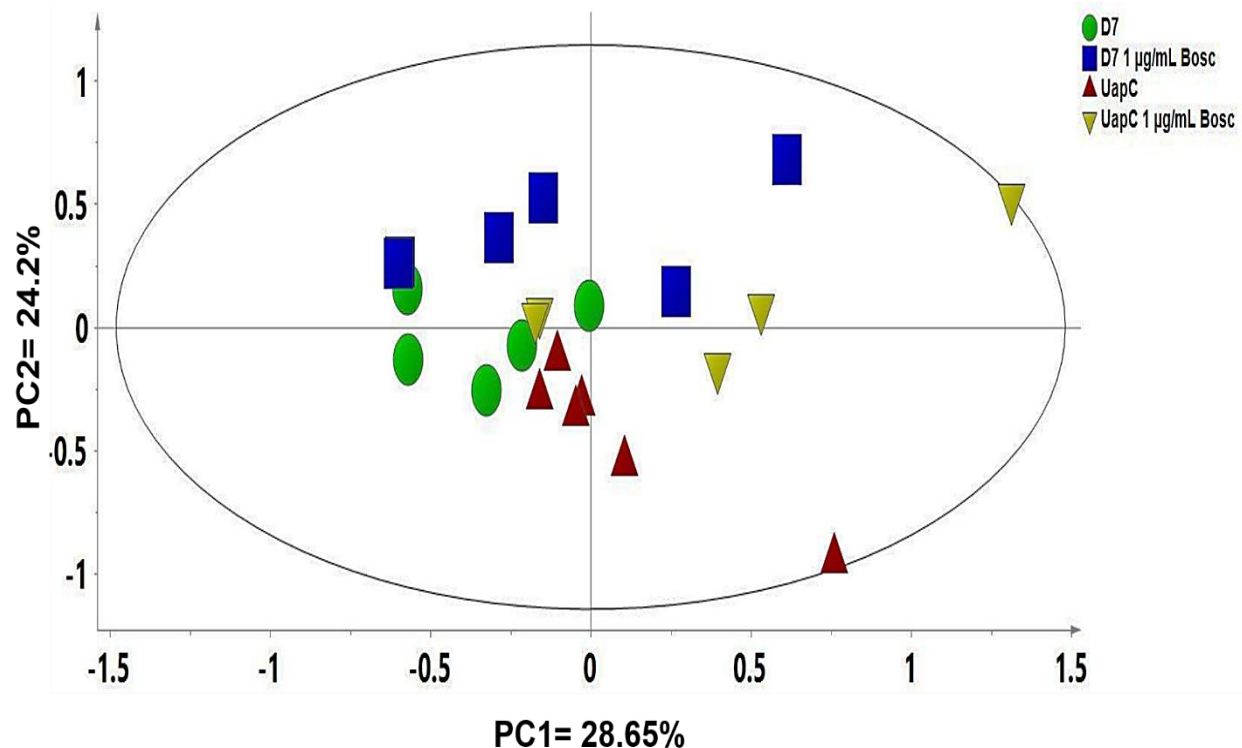
Χρησιμοποιώντας τις διαθέσιμες πληροφορίες που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων KEGG για κάθε ταυτοποιημένο μεταβολίτη, κατασκευάστηκε ένα γενικό απλουστευμένο μεταβολικό δίκτυο χρησιμοποιώντας το λογισμικό Vanted, το οποίο ήταν σε μεγάλο βαθμό ταυτόσημο ίδιο με αυτό της ανάλυσης της κονιδιακής.

Τα αποτελέσματα αυτά συνέβαλαν στη διεύρυνση της ελεύθερης προσβάσιμης GC/EI/MS μεταβολομική βάση του *A. nidulans*, η οποία βρίσκεται στην ιστοσελίδα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (AUA)-Pesticide Metabolomics Group (PMG) (<http://www.aua.gr/pesticide-metabolomicsgroup/Resources/default.html>) (Kalampokis et al. 2018).

3.6.2 Μεταβολομική απόκριση των στελεχών στο boscalid

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από τη μεταβολομική διερεύνηση του μηχανισμού της κονιδιακής εκβλάστησης, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο υπό εξέταση μεταφορέας (UapC) είναι γνωστό ότι μεταγράφεται στο μέγιστο, κατά τη διάρκεια 4-5 ωρών κονιδιακής εκβλάστησης, προστέθηκε boscalid κατά τη διάρκεια 4 ωρών βλάστησης κονιδίων και η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε έπειτα από 5 ώρες (9 ώρες συνολικής κονιδιακής εκβλάστησης).

Σαν πρώτο στάδιο και για να εκτιμηθεί η καταλληλότητα της ανάλυσης, εφαρμόστηκε PCA (Εικόνα 66).



Εικόνα 66: PC1/PC2 διαγράμματα συντεταγμένων PCA της επίδρασης $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid στα στελέχη Δ7 και Δ7::uapC⁺

Το διάγραμμα των συντεταγμένων, φανερώνει έναν επαρκή διαχωρισμό μεταξύ των επεμβάσεων, γεγονός που αποτελεί ένδειξη της επαναληψιμότητας της ανάλυσης (εικόνα 66). Επιπλέον γίνεται εμφανές ότι η εφαρμογή του boscalid αποτελεί τον κύριο

παράγοντα διαχωρισμού των δειγμάτων, καθώς ήταν σε θέση να ερμηνεύσει το 28.65% της παρατηρούμενης διαφοροποίησης του συνόλου των μεταβολικών χαρακτηριστικών (PC1). Αμέσως επόμενος είναι ο γονότυπος καθώς ερμηνεύει το 24.2% της παρατηρούμενης διαφοροποίησης του συνόλου των μεταβολιτών (PC2).

Το γεγονός ότι τα στελέχη $\Delta 7$ και $\Delta 7::uapC^+$ ομαδοποιούνται σχετικά κοντά απουσία φαρμάκου, οφείλεται στο γεγονός ότι το $\Delta 7$ αποτέλεσε το γενετικό υπόβαθρο $\Delta 7::uapC^+$. Έτσι απουσία επέμβασης με τη δ.ο., που αποτελεί και το ερέθισμα που θα τα διαφοροποιήσει, δεν αναμένονται ουσιαστικές διαφοροποιήσεις όσον αφορά τη φυσιολογία τους. Παρόλα αυτά παρουσία υποθανάσιμης δόσης boscalid το $\Delta 7::uapC^+$ διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες επεμβάσεις, ενώ το $\Delta 7$ βρίσκεται σε μία ενδιάμεση κατάσταση, αλλά ομαδοποιείται εγγύτερα με τους μάρτυρες (**Εικόνα 66**). Αυτό φαίνεται να οφείλεται στην πολύ μικρότερη ποσότητα δ.ο. που προσροφάται από το $\Delta 7$, όπως φάνηκε από τα προηγούμενα αποτελέσματα, που απέδειξαν ότι ο μεταφορέας UAPC αναγνωρίζει το boscalid με μέτρια συγγένεια και μπορεί να απορροφήσει ενεργά τη δ.ο., ένας μηχανισμού συμπληρωματικού αυτής της άμεσης διάχυσης (Kalampokis et al. 2018).

Προκειμένου να διαφοροποιηθούν πλήρως οι επεμβάσεις, να βρεθούν τυχόν μεταβολικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην ομαδοποίηση των επεμβάσεων και να εξαλειφθεί η τυχόν μη συσχετισμένη παραλλακτικότητα εντός του συνόλου των δεδομένων, εφαρμόστηκε OPLS-DA και HCA. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών, φανέρωσαν μια εξαιρετική διάκριση των μεταβολικών προφίλ των στελεχών $\Delta 7$ και $\Delta 7::uapC^+$ μεταξύ των επεμβάσεων με boscalid και των αντίστοιχων μαρτύρων (**Εικόνες 67, 68**). Επιπρόσθετα γίνεται εμφανέστερη η μικρότερη επίδραση της δ.ο. στον μεταβολισμό του $\Delta 7$ στελέχους, σε αντίθεση με την περίπτωση του $\Delta 7::uapC^+$, στο οποίο παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση του μεταβολικού προφίλ μεταξύ της επέμβασης και του μάρτυρα.

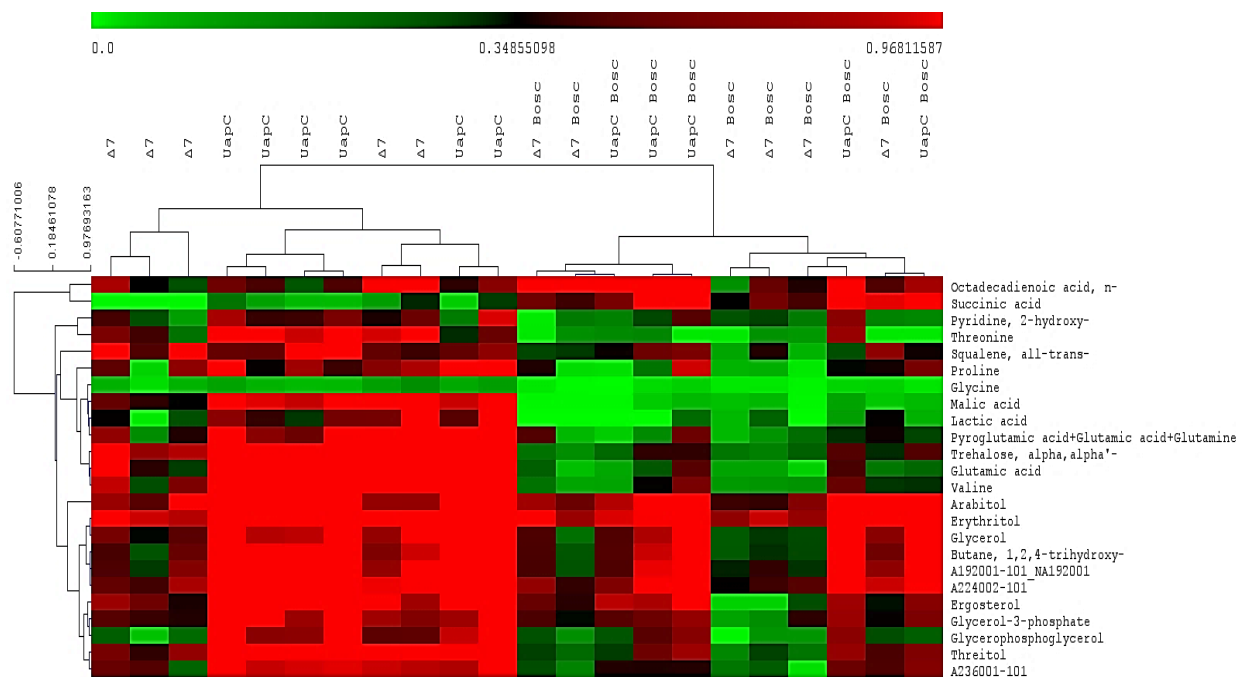
Η συνολική επισκόπηση των διαφορών στο μεταβολικό προφίλ των στελεχών, φαίνεται στο cluster heat map της **εικόνας 69**. Και σε αυτήν την περίπτωση είναι εμφανής η διαφορετική ομαδοποίηση των επεμβάσεων, αναλόγως της παρουσίας ή μη της δ.ο..



Εικόνα 69: Cluster heat map των καταγεγραμμένων GC/TOF/MS μεταβολικών προφίλ των μαρτύρων και όσων καλλιιεργήθηκαν παρουσία boscalid ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) των Δ7 και Δ7::uapC⁺ στελεχών. Οι σειρές αντιπροσωπεύουν μεταβολίτες ή μεταβολικά χαρακτηριστικά και τις στήλες τα διαφορετικά δείγματα. Κάθε κελί κωδικοποιείται με βάση

τις αλλαγές της σχετικής συγκέντρωσης του αντίστοιχου μεταβολίτη ή του μεταβολικού χαρακτηριστικού χρησιμοποιώντας χρωματική κλίμακα που κυμαίνεται από 0 (ανοιχτό πράσινο), υποδεικνύοντας χαμηλές τιμές, έως 1 (ανοιχτό κόκκινο) που υποδεικνύει υψηλές τιμές. Έξι ομαδοποιημένα δείγματα αναλύθηκαν για κάθε δείγμα

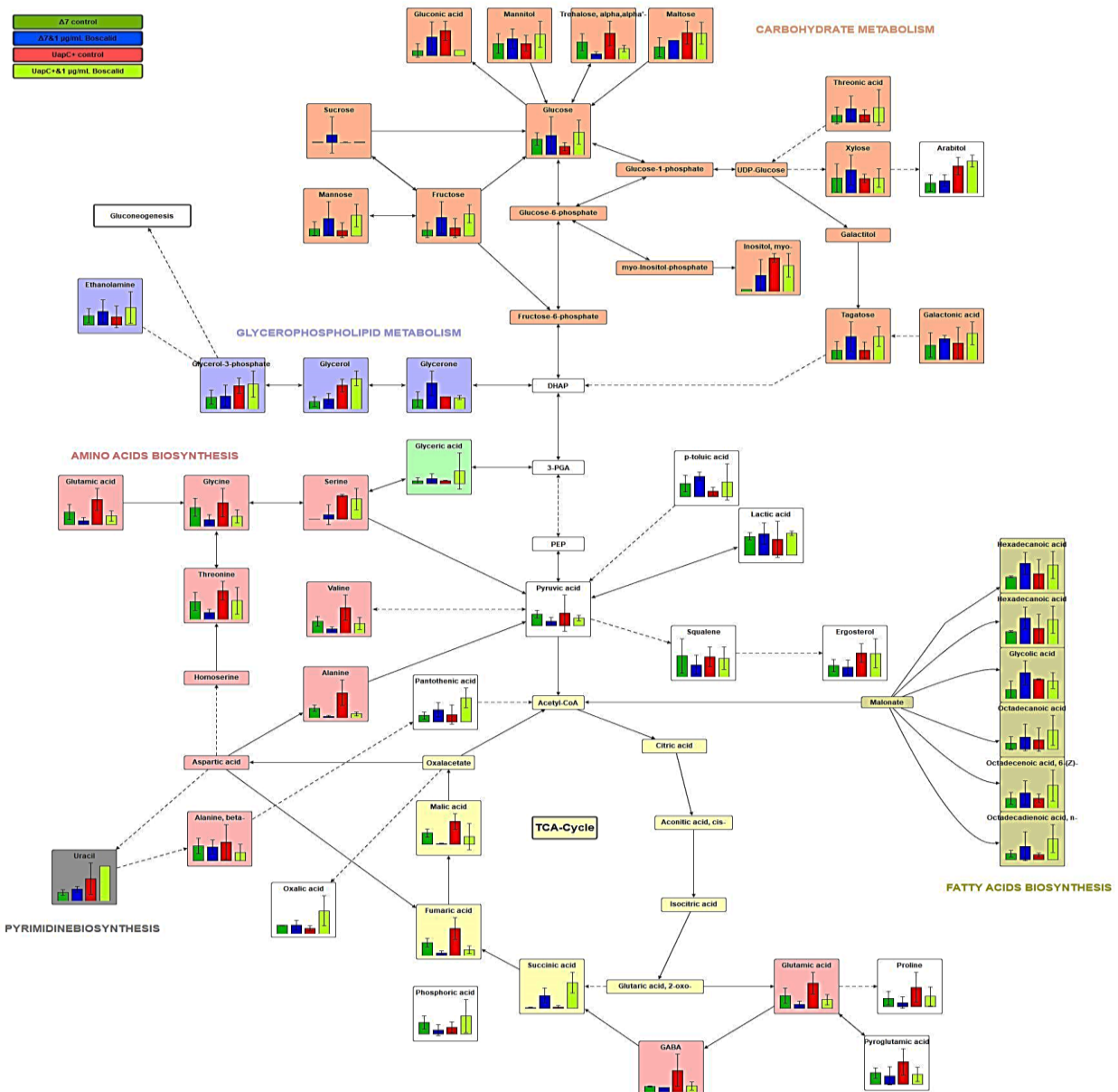
Στο στο cluster heatmap της εικόνας 70 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεταβολιτών που βρέθηκαν να έχουν επηρεαστεί σημαντικά, από την παρουσία της δ.ο. (§3.6.1) Και σε αυτό γίνεται εμφανές ότι ο κύριος παράγοντας βάσει του οποίου κατηγοριοποιούνται οι διαφορετικές επεμβάσεις, είναι η παρουσία του boscalid και δευτερευόντως οι διαφορές στον γονότυπο των δύο στελεχών.



Εικόνα 70: Cluster heatmap των μεταβολιτών των Δ7 και Δ7::uapC⁺ στελεχών που επηρεάστηκαν σε σημαντικό βαθμό από την παρουσία boscalid (1 μg mL⁻¹), έπειτα από επεξεργασία ANNOVA. Οι σειρές αντιπροσωπεύουν μεταβολίτες ή μεταβολικά χαρακτηριστικά και τις στήλες τα διαφορετικά δείγματα. Κάθε κελί κωδικοποιείται με βάση τις αλλαγές της σχετικής συγκέντρωσης του αντίστοιχου μεταβολίτη ή του μεταβολικού χαρακτηριστικού χρησιμοποιώντας χρωματική κλίμακα που κυμαίνεται από 0 (ανοιχτό πράσινο), υποδεικνύοντας χαμηλές τιμές, έως 1 (ανοιχτό κόκκινο) που υποδεικνύει υψηλές τιμές. Έξι ομαδοποιημένα δείγματα αναλύθηκαν για κάθε δείγμα

Τα αποτελέσματα δείχνουν συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος και μειωμένα επίπεδα φουμαρικού και μηλικού οξέος στις επαναλήψεις με την υποθανάσιμη δόση boscalid, με μεγαλύτερη επίδραση στο ευαίσθητο $\Delta 7::uarC^+$, σε σύγκριση με το λιγότερο ευαίσθητο $\Delta 7$. Άλλα σημαντικά ευρήματα είναι η συσσώρευση α,α-τρεχαλόζης, γλυκερόλης, γλουταμικού οξέος και αμινοξέων όπως της προλίνης, γλυκίνης, βαλίνης, θρεονίνης και αλανίνης, στα δείγματα μάρτυρες, με μεγαλύτερη επίδραση στο ευαίσθητο στέλεχος, στο οποίο το boscalid έχει μεγαλύτερη επίδραση. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίζονται καλά με τα προηγούμενα αποτελέσματα του μεταβολικού αντίκτυπου του Boscalid στις μυκηλιακές υφές (§3.4.5.2) (Kalampokis et al. 2018)

Μία οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων ώστε να γίνει πιο κατανοητή η βιολογική τους ερμηνεία παρουσιάζεται στο ακόλουθο μεταβολικό δίκτυο:



Εικόνα 71: De novo κατασκευή του μεταβολικού δικτύου των στελεχών Δ7 και Δ7::uapC⁺ που παρουσιάζει τις διαφορές στο μεταβολικό προφίλ των μαρτύρων σε σχέση με την επέμβαση με boscalid (1 μg mL⁻¹). Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν βιοσυνθετική πορεία πολλαπλών βημάτων ή όχι πλήρως διευκρινισμένης και οι συνεχείς γραμμές διαδοχικούς μεταβολίτες μιας βιοσυνθετικής οδούς. Για την κατασκευή του δικτύου, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τη βάση δεδομένων KEGG

3.7 Μελέτη της επίδρασης του boscalid στον μεταβολισμό του *A. nidulans* με εφαρμογή μεταβολομικής και πρωτεομικής

Με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων μεταβολομικών αναλύσεων, αποφασίστηκε να μελετηθεί η επίδραση του boscalid στη φυσιολογία του *A. nidulans*, με χρήση μεταβολομικής και πρωτεομικής ανάλυσης. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι τα έως τώρα χρησιμοποιημένα στελέχη χαρακτηρίζονται από τη μετάλλαξη *veA1*, αποφασίστηκε να μελετηθεί η επίδραση του boscalid στο αλληλουχημένο αγρίου τύπου FGSC A4 στέλεχος.

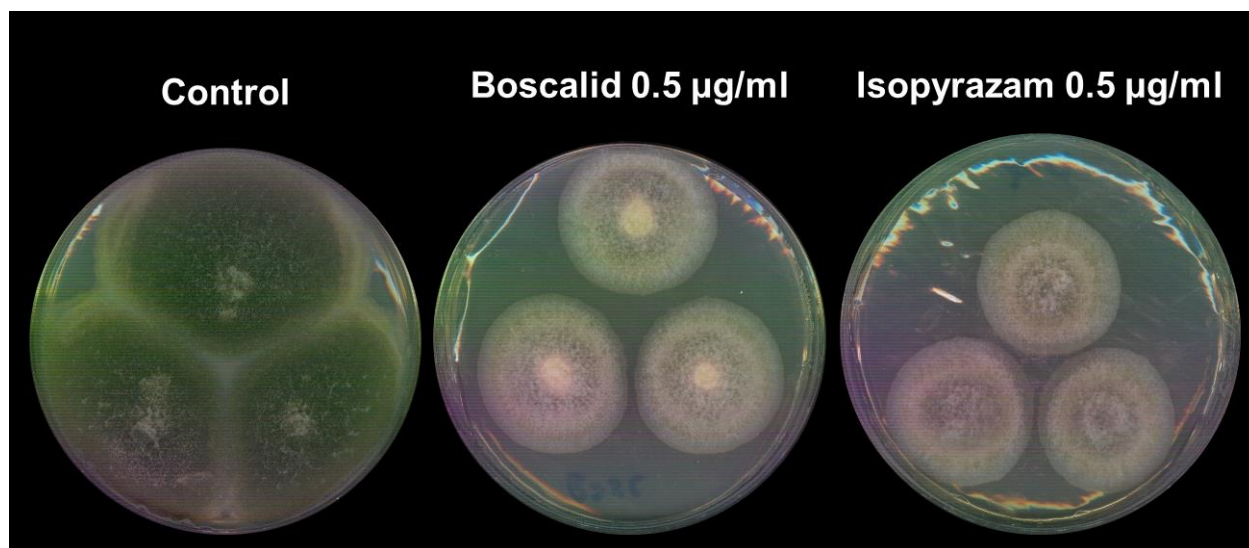
Συνοπτικά το γονίδιο *veA* μαζί με τα *ve1B* και *laeA*, αποτελεί κομμάτι του συμπλόκου του velvet μεταγραφικού παράγοντα, που ρυθμίζει την ανάπτυξη και βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών σε απόκριση στο φως (Bayram et al. 2008, Bayram and Braus 2012, Bayram et al. 2016). Στελέχη που φέρουν τη *veA1* μετάλλαξη δεν έχουν πλέον την ανάγκη φωτός για την παραγωγή κονιδιοσπορίων. Αυτή τους η ικανότητα να παράγουν πληθώρα κονιδιοσπορίων στο σκοτάδι, αποτελεί τον λόγο για τον οποίο τα στελέχη αυτά έχουν επικρατήσει να χρησιμοποιούνται στις διάφορες εργαστηριακές μελέτες (Calvo 2008).

Παρόλα αυτά έχει βρεθεί ότι το *veA* εμπλέκεται μεταξύ άλλων και στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των αφλατοξινών (Kato et al. 2003), ελέγχοντας την έκφραση του ρυθμιστικού παράγοντα *afIR*, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί το βιοσυνθετικό μονοπάτι των αφλατοξινών (Payne and Brown 1998, Yu et al. 2004a, Cary et al. 2007, Payne et al. 2007). Παρότι η μετάλλαξη φαίνεται να μην αναστέλλει πλήρως τη βιοσύνθεση αφλατοξινών και πενικιλίνης των *veA1* στελεχών, η μυκοτοξικογόνος ικανότητά τους υπολείπεται σημαντικά αυτής των *veA*⁺ στελεχών (Stinnett et al. 2007). Αυτή η κατά πολύ μειωμένη βιοσύνθεση στεριγματοκουστίνης από των *veA1* στελεχών, αποτέλεσε και τον λόγο που επιλέχθηκε το στέλεχος FGSC A4 για τις περαιτέρω μεταβολομικές και πρωτεομικές αναλύσεις.

3.7.1 Μεταβολομική μελέτη της επίδρασης των boscalid και isopyrazam

3.7.1.1 Γενική επισκόπηση της ανάλυσης

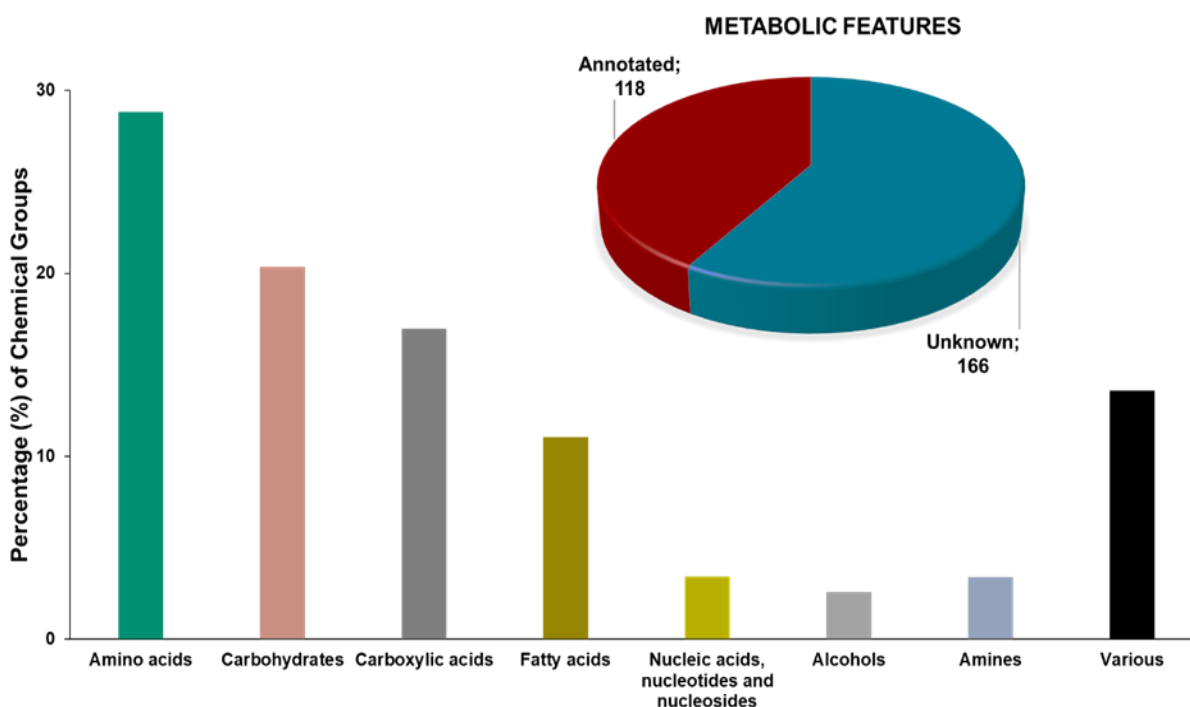
Στην **εικόνα 72** παρουσιάζεται η ανάπτυξη του αγρίου FGSCA4 στελέχους στην υποθανάσιμη δόση των $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid και isopyrazam και του μάρτυρα, κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, έπειτα από καλλιέργεια 6 ημερών.



Εικόνα 72: Ανάπτυξη του αγρίου στελέχους FGSC A4 σε υποθανάσιμη δόση boscalid και isopyrazam. Οι αποικίες καλλιεργήθηκαν για 3 και 6 ημέρες στους 37°C σε στέρεο πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα. Για τη διευκόλυνση της απομόνωσης του μυκηλίου από το θρεπτικό υπόστρωμα, στην επιφάνεια του τελευταίου απλώθηκε κατάλληλη βιολογική μεμβράνη

Όπως αναλύθηκε στις προηγούμενες μεταβολομικές μελέτες, για την ευρεία κατά το δυνατόν κάλυψη του ενδομεταβολόματος των μυκηλιακών υφών, εφαρμόστηκε μη στοχευμένη GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση του πρωτογενούς μεταβολισμού, εγχέοντας τα δείγματα τόσο σε διαχωρισμό (**split**) (1:5) όσο και σε μη διαχωρισμό **splitless mode**.

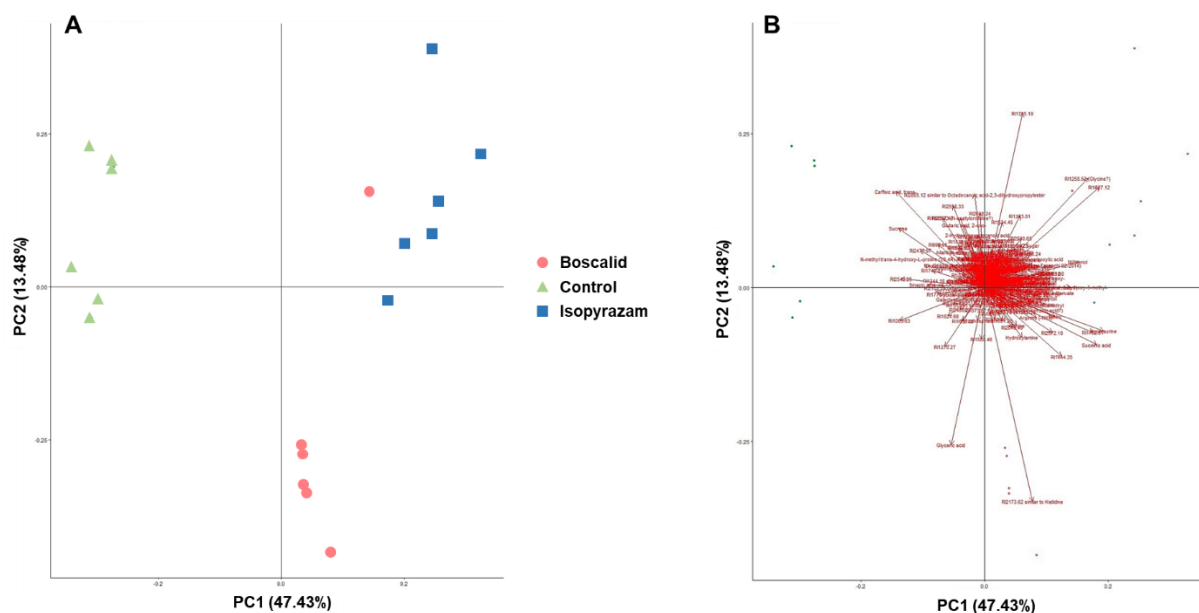
Έπειτα από αποσυνέλιξη των αποκτηθέντων χρωματογραφημάτων, η ταυτοποίηση των μεταβολιτών βασίστηκε σε αναζήτηση των μεταβολομικών βάσεων NIST και GOLM χρησιμοποιώντας μίγμα η-αλκανίων ως πρότυπο δείκτη κατακράτησης (RI). Συνολικά καταγράφηκαν 284 μεταβολικά χαρακτηριστικά (MST), εκ των οποίων τα 118 ταυτοποιήθηκαν. Η πλειονότητα των ταυτοποιημένων μεταβολιτών (> 77%) ανήκει στα αμινοξέα (28.8%), υδατάνθρακες (20.3%), καρβοξυλικά οξέα (16.6%) και λιπαρά οξέα (11%) (**Εικόνα 73**).



Εικόνα 73: Αριθμός ταυτοποιημένων και μη μεταβολικών χαρακτηριστικών από το εφαρμοσμένο βιοαναλυτικό πρωτόκολλο και σύνθεση (% ποσοστό) του καταγεγραμμένου μεταβολικού προφίλ στις χημικές ομάδες. Συνολικά 284 μεταβολικά χαρακτηριστικά ανιχνεύθηκαν εκ των οποίων 118 ταυτοποιήθηκαν. Η πλειοψηφία των ταυτοποιημένων μεταβολιτών ανήκει στα αμινοξέα, τους υδατάνθρακες, τα καρβοξυλικά οξέα και τα λιπαρά οξέα

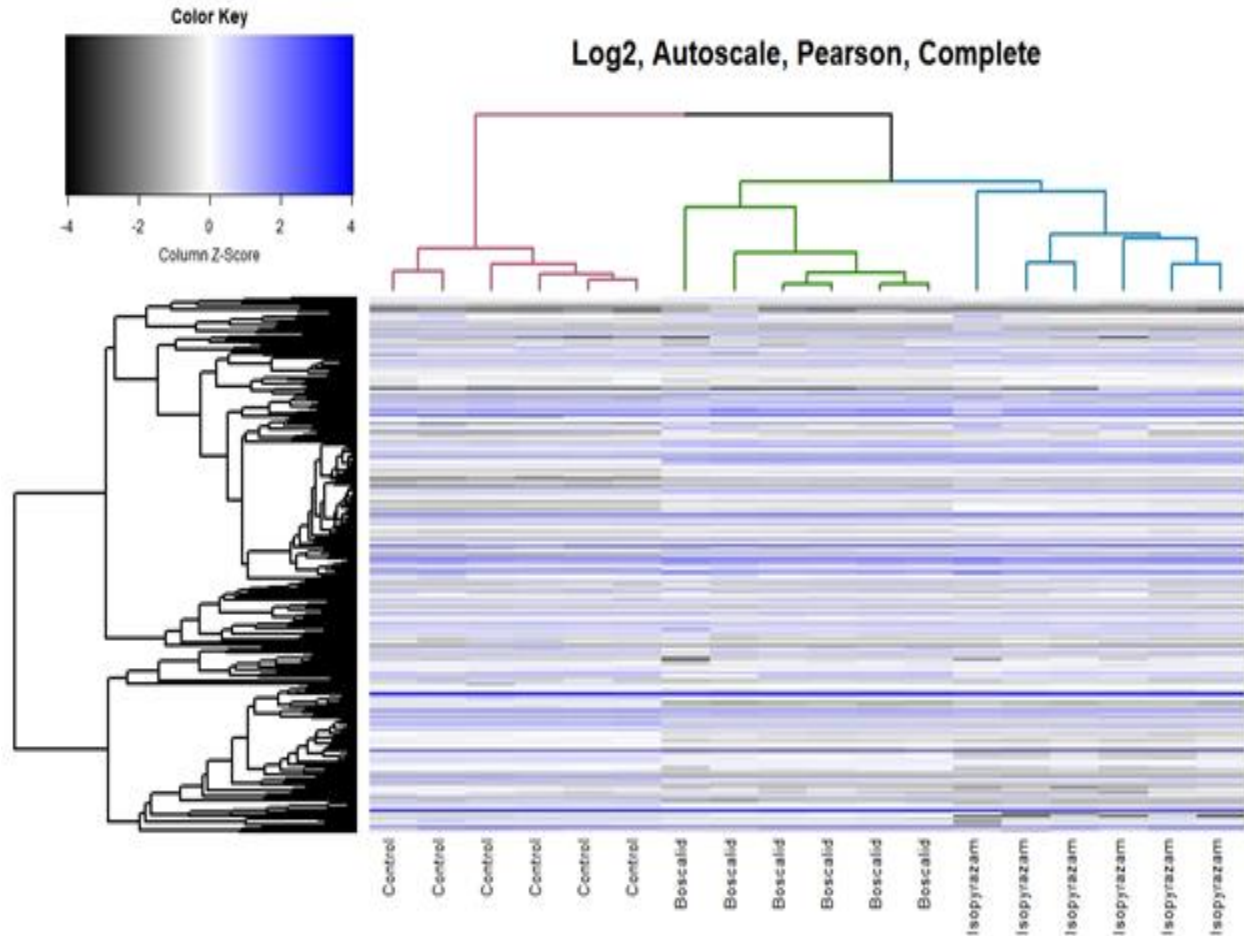
Έπειτα από κατάλληλη στατιστική επεξεργασία της μεταβολομικής μήτρας (§2.11.4.2) εφαρμόστηκε PCA (**Εικόνα 74**). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα δείγματα διαχωρίστηκαν βάσει των επεμβάσεων, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα και την καλή επαναληψιμότητα των εφαρμοσμένων πειραματικών και βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων. Κύριος παράγοντας που εξηγεί την παρατηρούμενη παραλλακτικότητα σε ποσοστό

47.73% είναι η επέμβαση ή μη με τις δ.ο., καθώς από το διάγραμμα συντεταγμένων (**Εικόνα 74 A**) είναι εμφανής η διαφορετική ομαδοποίηση των δειγμάτων που αντιστοιχούν στους μάρτυρες (control) σε σχέση με αυτά των επεμβάσεων



Εικόνα 74: PC1/PC2 PCA διάγραμμα συντεταγμένων (**A**) και του αντίστοιχου διαγράμματος φορτίου (**B**) της επίδρασης boscalid και isopyrazam στο μεταβολικό προφίλ του FGSC A4 στελέχους. Παρατηρείται πολύ ικανοποιητικός διαχωρισμός των επεμβάσεων

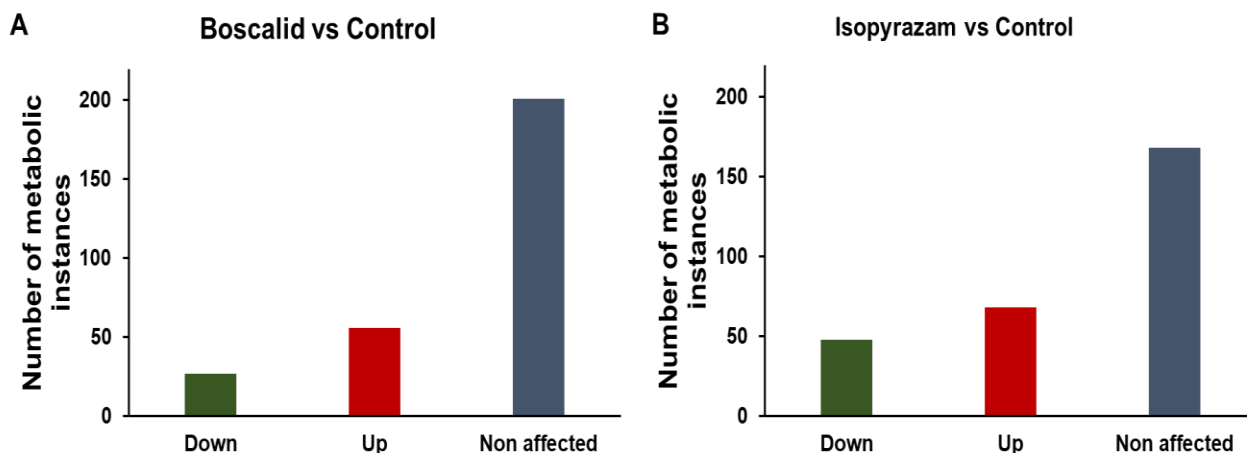
Παρόμοια ομαδοποίηση παρατηρήθηκε έπειτα από εφαρμογή HCA με συσχέτιση κατά Pearson, όπως φαίνεται στο αντίστοιχο cluster heat map της **εικόνας 75**. Και σε αυτήν την περίπτωση τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με τις επεμβάσεις, με τους μάρτυρες να διαχωρίζονται σημαντικά.



Εικόνα 75: Cluster heat map των καταγεγραμμένων GC/EI/MS μεταβολομικών προφίλ των μαρτύρων και καλλιεργημένων σε υποθανάσιμη συγκέντρωση ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) boscalid και isopyrazam του FGSC A4 στελέχους, έπειτα από καλλιέργεια 6 ημερών σε στέρεο πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα στους 37°C . Εφαρμόστηκε Ιεραρχική ανάλυση συστάδων (HCA; pearson correlation, complete distance). Είναι εμφανής ο διαχωρισμός μεταξύ των επεμβάσεων. Κάθε σειρά αντιπροσωπεύει διαφορετικά μεταβολικά χαρακτηριστικά και οι στήλες διαφορετικά δείγματα. Σε κάθε κελί εφαρμόστηκε χρωματική κλίμακα βάσει της συγκέντρωσης κάθε μεταβολικού χαρακτηριστικού, με -4 (μαύρο) να αντιπροσωπεύει χαμηλές συγκεντρώσεις έως $+4$ (μπλε) τις υψηλές τιμές

3.7.1.2 Οι SDHIs επηρεάζουν σειρά βιοσυνθετικών μονοπατιών με κυριότερο αυτό της βιοσύνθεσης αμινοξέων

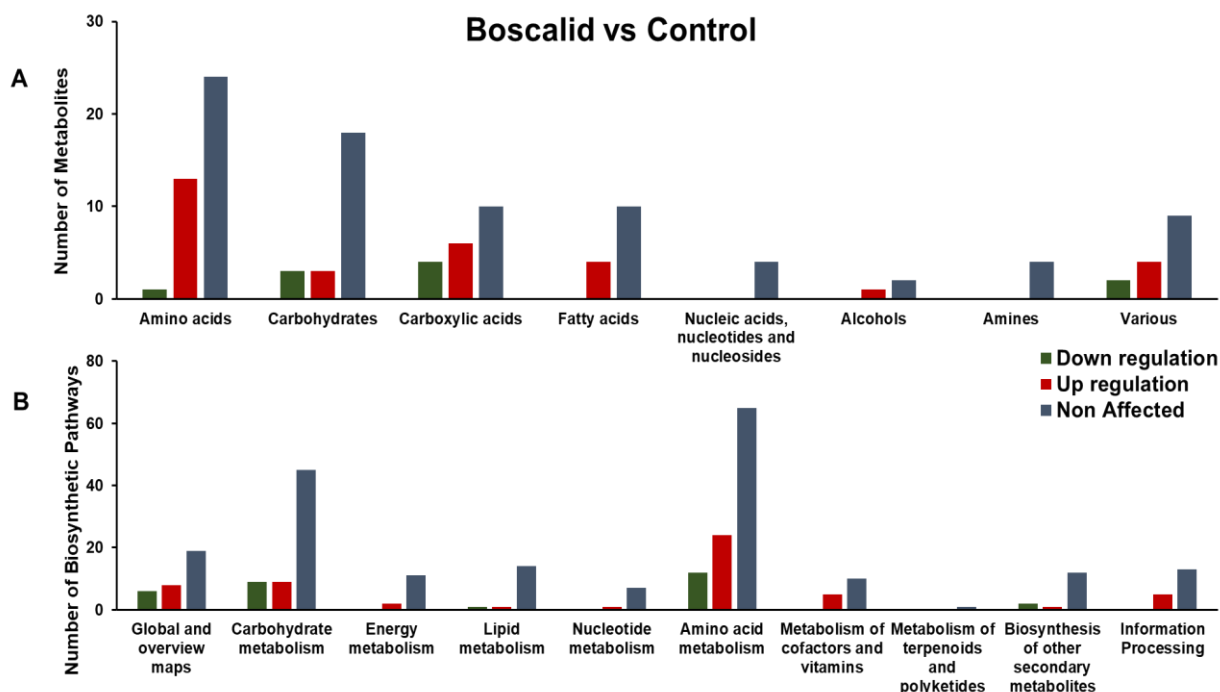
Ακολούθησε σύγκριση των καταγεγραμμένων επιπέδων των μεταβολικών χαρακτηριστικών μεταξύ των επεμβάσεων και των μαρτύρων. Παρουσία boscalid επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα 27 μεταβολικών χαρακτηριστικών, για 56 θετικά, ενώ σε 201 δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τους μάρτυρες (**Εικόνα 76 A**). Αντίστοιχα παρουσία isopyrazam επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα 48 μεταβολικών χαρακτηριστικών, τα επίπεδα 68 επηρεάστηκαν θετικά, ενώ για 168 δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφοροποίηση (**Εικόνα 76 B**). Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι το isopyrazam επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό τη φυσιολογία του αγρίου στελέχους. Το αποτέλεσμα αυτό και για τη δόση αναφοράς ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) βρίσκεται σε αντιστοιχία με τα πειράματα αξιολόγησης της δραστηριότητας των SDHIs, στα οποία βρέθηκε ότι το isopyrazam είναι περισσότερο δραστικό έναντι του boscalid (§3.2).



Εικόνα 76: Αριθμός μεταβολικών χαρακτηριστικών που επηρεάστηκαν αρνητικά (πράσινο ραβδόγραμμα), θετικά (κόκκινο ραβδόγραμμα) ή όχι σε σημαντικό βαθμό (μπλε ραβδόγραμμα) boscalid (**A**) και isopyrazam (**B**). Είναι εμφανές ότι παρουσία isopyrazam περισσότερα μεταβολικά χαρακτηριστικά επηρεάστηκαν συγκριτικά της παρουσίας boscalid

Από τη σύγκριση των ανιχνευμένων επιπέδων των ταυτοποιημένων μεταβολιτών, παρουσία boscalid τα επίπεδα κυρίως των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων και σε

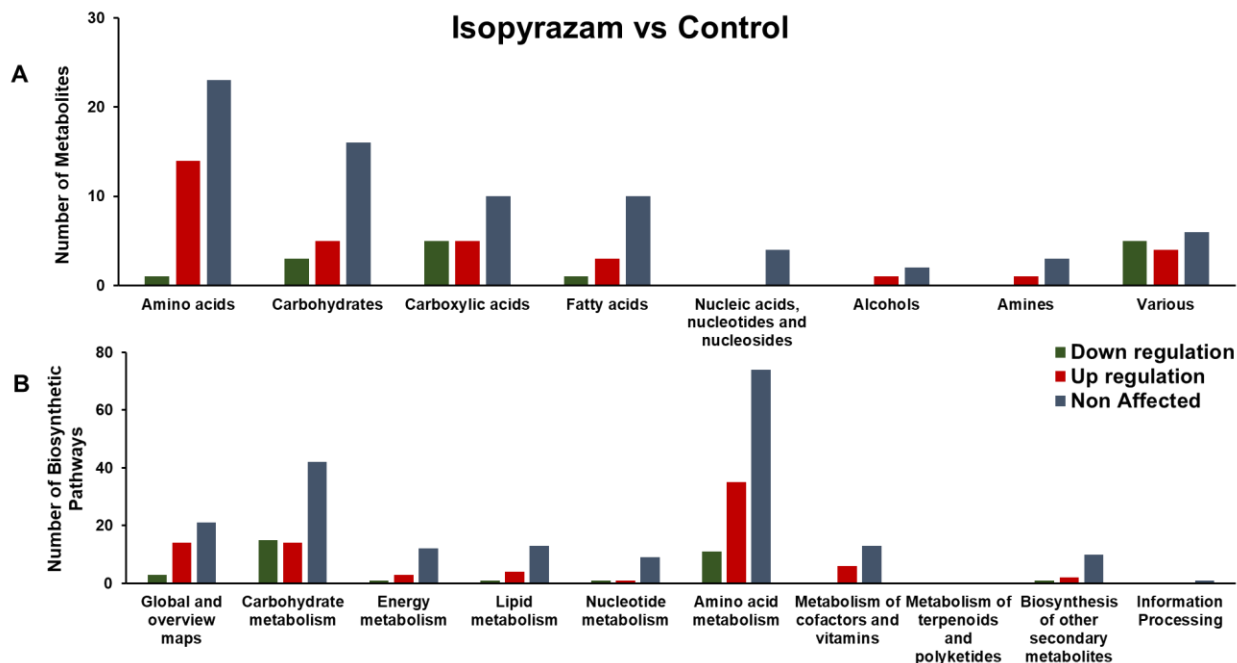
μικρότερο βαθμό των καρβοξυλικών οξέων, ανιχνεύθηκαν κυρίως σε υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τους μάρτυρες (**Εικόνα 77 A**). Μέσω των πληροφοριών που αντλήθηκαν από τη βάση KEGG, βρέθηκε η βιοσύνθεση των αμινοξέων να επηρεάζεται σημαντικά και σε θετικό βαθμό από την παρουσία της δ.ο. και σε μικρότερο βαθμό η βιοσύνθεση βιταμινών (**Εικόνα 77 B**).



Εικόνα 77: Ομαδοποίηση των ταυτοποιημένων μεταβολιτών του FGSC A4 στελέχους που επηρεάστηκαν αρνητικά (πράσινο ραβδόγραμμα), θετικά (κόκκινο ραβδόγραμμα) ή όχι σε σημαντικό βαθμό (μπλε ραβδόγραμμα) στην παρουσία ή μη υποθανάσιμης δόσης ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) boscalid, σύμφωνα με τη χημική ομάδα που ανήκουν (**A**) και με βάση τη συμμετοχή τους σε διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια, μετρούμενοι ως περιπτώσεις, καθώς κάθε μεταβολίτης μπορεί να εμπλέκεται σε πολλαπλές οδούς (**B**). Είναι εμφανές ότι παρουσία των δ.ο. κυρίως επηρεάζεται θετικά η χημική ομάδα των αμινοξέων και λιπαρών οξέων και από βιοσυνθετικά μονοπάτια κυρίως η βιοσύνθεση των αμινοξέων

Αντίστοιχα αποτελέσματα βρέθηκαν και στην περίπτωση του isopyrazam, καθώς και σε αυτήν την περίπτωση τα αμινοξέα και λιπαρά οξέα ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στις επεμβάσεις βρέθηκαν σε επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες (**Εικόνα 78**

A) και αντίστοιχα η βιοσύνθεση των αμινοξέων επηρεάζεται σημαντικά και σε θετικό βαθμό από την παρουσία της δ.ο. (**Εικόνα 78 B**).



Εικόνα 78: Ομαδοποίηση των ταυτοποιημένων μεταβολιτών του *FGSC A4* στελέχους που επηρεάστηκαν αρνητικά (πράσινο ραβδόγραμμα), θετικά (κόκκινο ραβδόγραμμα) ή όχι σε σημαντικό βαθμό (μπλε ραβδόγραμμα) στην παρουσία ή μη υποθανάσιμης δόσης ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) *isopyrazam*, σύμφωνα με τη χημική ομάδα που ανήκουν (**A**) και με βάση τη συμμετοχή τους σε διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια, μετρούμενοι ως περιπτώσεις, καθώς κάθε μεταβολίτης μπορεί να εμπλέκεται σε πολλαπλές οδούς (**B**). Είναι εμφανές ότι παρουσία των δ.ο. κυρίως επηρεάζεται θετικά η χημική ομάδα των αμινοξέων και λιπαρών οξέων και από βιοσυνθετικά μονοπάτια κυρίως η βιοσύνθεση των αμινοξέων

Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως η παρουσία SDHIs, τουλάχιστον για στην περίπτωση του *A. nidulans* επηρεάζει θετικά τη βιοσύνθεση των αμινοξέων αυξάνοντας τα επίπεδά τους. Πρόκειται για μια παρατήρηση που βρίσκεται σε πλήρη αντιστοιχία με αυτά των προηγούμενων μεταβολομικών αναλύσεων της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

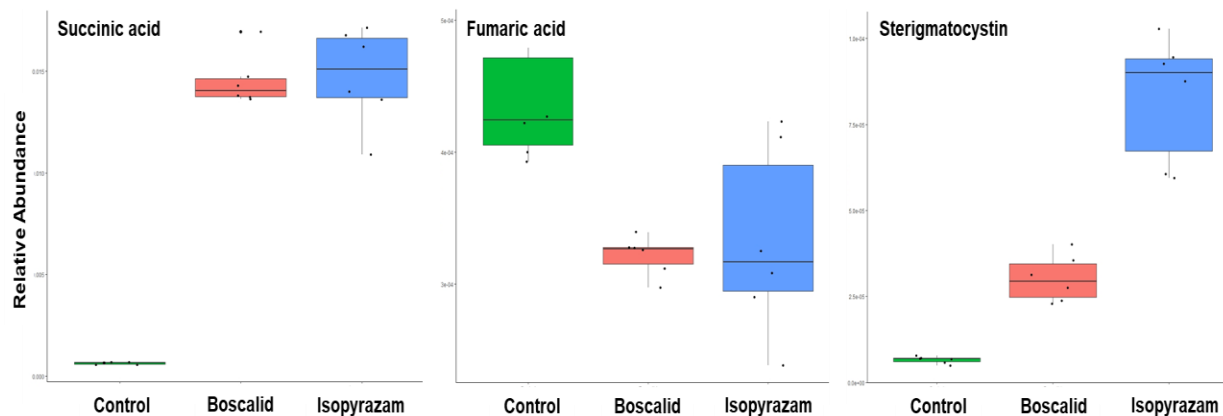
3.7.1.3 Παρουσία SDHs συσσωρεύεται ηλεκτρικό οξύ, στεριγματοκυστίνη και αμινοξέα με ρόλο στην αποτοξικοποίηση εξωγενών τοξικών μορίων

Λαμβάνοντας υπόψη το μηχανισμό δράσης των SDHs, αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των δ.ο. boscalid και isopyrazam στα επίπεδα του ηλεκτρικού και φουμαρικού οξέος. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι παρουσία των δ.ο. συσσωρεύεται ηλεκτρικό οξύ, ενώ αντιθέτως τα επίπεδα του φουμαρικού μειώνεται (**Εικόνα 79**). Είναι εμφανές ότι με την αναστολή της δράσης της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος συσσωρεύεται το ηλεκτρικό οξύ καθώς δεν οξειδώνεται σε φουμαρικό. Το γεγονός ότι το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε πλήρη αντιστοιχία με αυτά των προηγούμενων μεταβολομικών μελετών της παρούσας διατριβής, καθώς και της εξήγησής του βάσει του μηχανισμού δράσης των δύο δ.ο., φανερώνει τη δυνατότητα εφαρμογής μεταβολομικών αναλύσεων για τη διερεύνηση του βιοχημικού μηχανισμού δράσης βιοδραστικών μορίων.

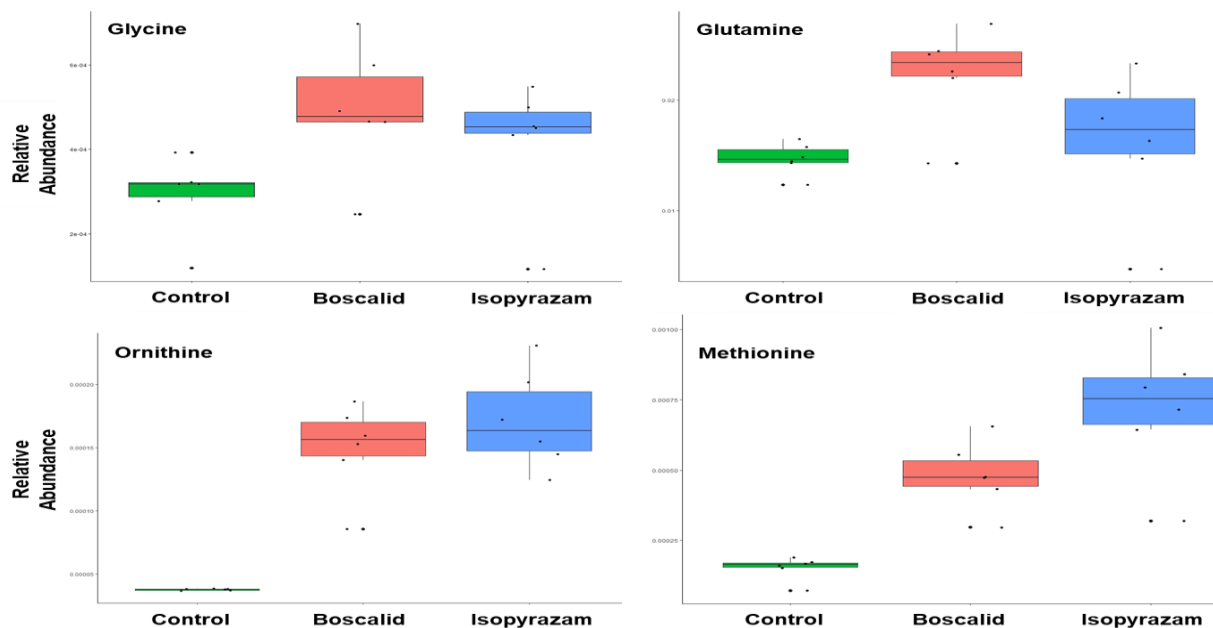
Ένα πολύ ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι παρουσία των δ.ο. τα επίπεδα της στεριγματοκυστίνης αυξάνονται σε σχέση με τους μάρτυρες (**Εικόνα 79**). Είναι γνωστό ότι η στεριγματοκυστίνη εκτός από μυκοτοξίνη αποτελεί και πρόδρομη ένωση των αφλατοξινών B1 και G1, που αποτελούν τις πλέον τοξικές φυσικές ενώσεις (Payne and Brown 1998, Rank et al. 2011, Díaz Nieto et al. 2018). Αυτό είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα πολύ πρόσφατης μελέτης στην οποία μεταγραφωματική ανάλυση της επίδρασης υποθανάσιμης δόσης boscalid σε ανθεκτικά στελέχη *A. flavus*, φανέρωσε αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που μετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των αφλατοξινών (Masiello et al. 2020).

Όπως αναφέρθηκε ήδη παρουσία των δ.ο. παρατηρείται μια σχετική αύξηση των επιπέδων των αμινοξέων και του μεταβολισμού τους. Τα αμινοξέα εκτός από δομικές πηγές σύνθετων μεταβολιτών και πηγής άνθρακα χρησιμεύουν και ως πρόσθετα κατά τη δεύτερη φάση της αποτοξικοποίησης εξωγενών τοξικών ουσιών και φαρμάκων. Από τα ταυτοποιημένα αμινοξέα, αυτά με ιδιαίτερο ρόλο στην αποτοξικοποίηση αποτελούν η γλουταμίνη και γλυκίνη που μέσω δράσης των n-acyltransferases αποτοξικοποιούν σειρά εξωγενών τοξικών μεταβολιτών, η ορνιθίνη και η μεθειονίνη που αποτελεί το πρόδρομο μόριο της S-Adenosyl methionine, με σημαντικό ρόλο στη δεύτερη φάση της αποτοξικοποίησης (Chen 2020). Τα αποτελέσματα δείχνουν μια συσσώρευση των

αμινοξέων αυτών παρουσία των δ.ο. (**Εικόνα 80**), δείχνοντας πιθανότατα τη δράση μηχανισμών αποτοξικοποίησης των κυττάρων (§3.7.2.3).



Εικόνα 79: Κυτιογράμματα των επιπέδων του ηλεκτρικού οξέος, του φουμαρικού οξέος και της στεριγματοκυστίνης. Οι αποικίες καλλιεργήθηκαν για 6 ημέρες στους 37°C σε στέρεο πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα. Είναι εμφανής η συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος και στεριγματοκυστίνης και η μείωση των επιπέδων του φουμαρικού οξέος παρουσία των δ.ο.



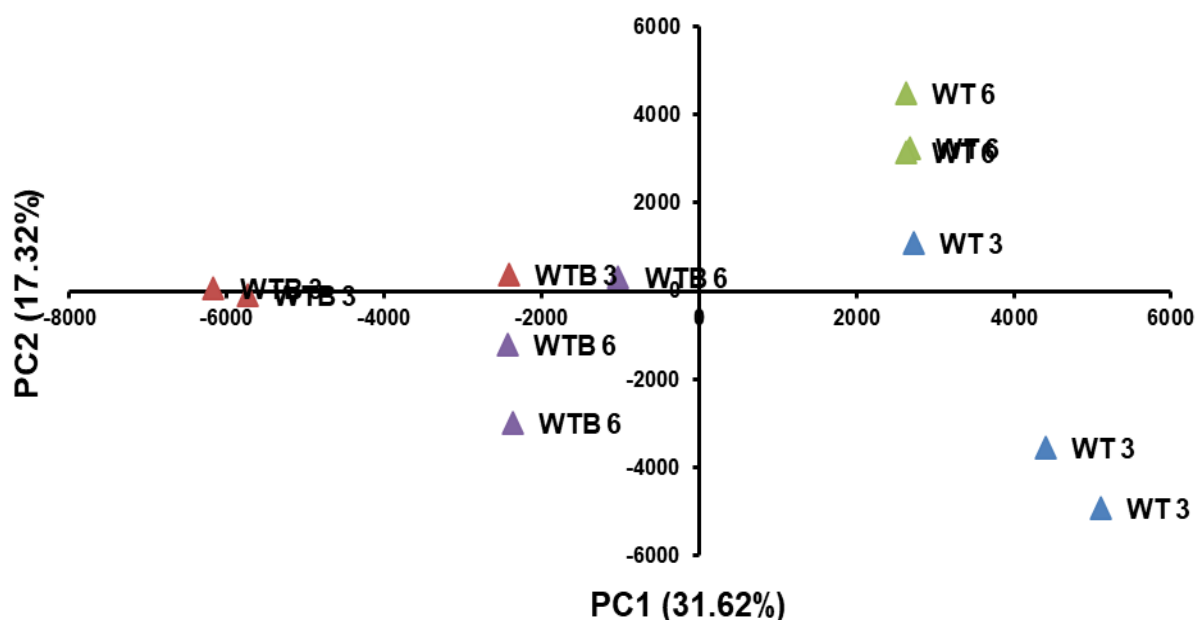
Εικόνα 80: Κυτιογράμματα των επιπέδων των αμινοξέων που χρησιμεύουν ως πρόσθετα κατά την αποτοξικοποίηση. Οι αποικίες καλλιεργήθηκαν για 6 ημέρες στους 37°C σε στέρεο πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα. Είναι εμφανής η συσσώρευση μεταβολιτών που σχετίζονται με την αποτοξικοποίηση τοξικών ουσιών, παρουσία των δ.ο.

3.7.2 Πρωτεομική ανάλυση της επίδρασης του boscalid

3.7.2.1 Γενική επισκόπηση της ανάλυσης

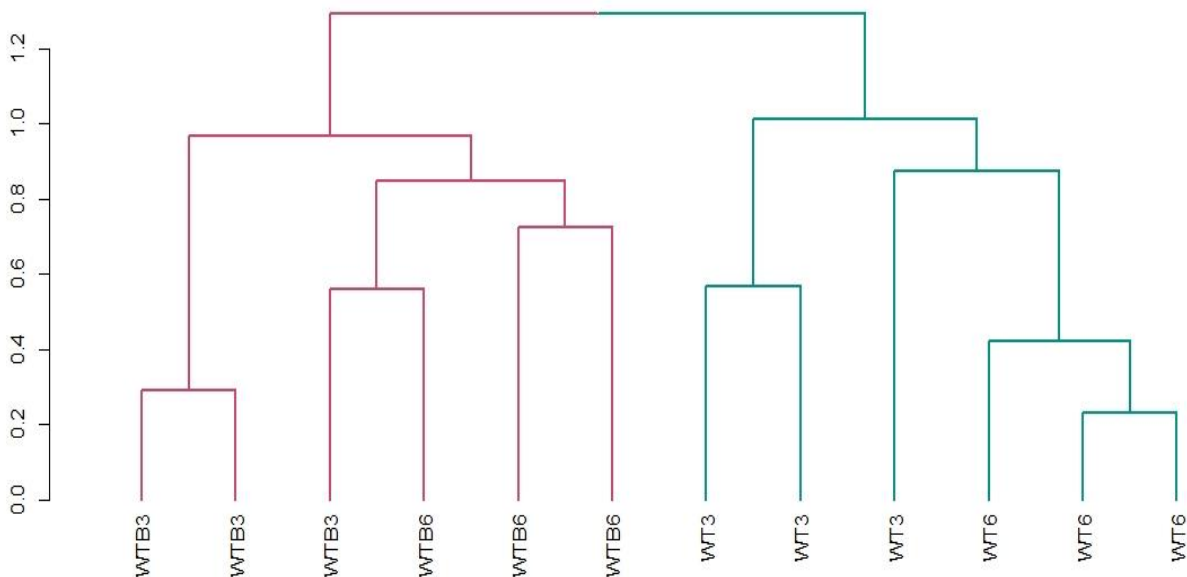
Για την πρωτεομική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε αποθηκευμένος στους -80°C ιστός, του στελέχους FGSC A4, που καλλιεργήθηκε σε στερεό ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, παρουσία ή απουσία δ.ο., για 3 και 6 ημέρες στους 37°C .

Με τη βοήθεια της πρωτεομικής βάσης Uniprot (§2.12.4), ταυτοποιήθηκαν 4767 συνολικά πρωτεΐνες. Αρχικά και για να εκτιμηθεί η καταλληλότητα της ανάλυσης, εφαρμόστηκε εντελώς τυχαίοποιημένη πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Αυτή έδειξε επαρκή διαχωρισμό των δειγμάτων κυρίως λόγω της επίδρασης ή μη της δ.ο. και δευτερευόντως βάσει των ημερών ανάπτυξης (Εικόνα 81).



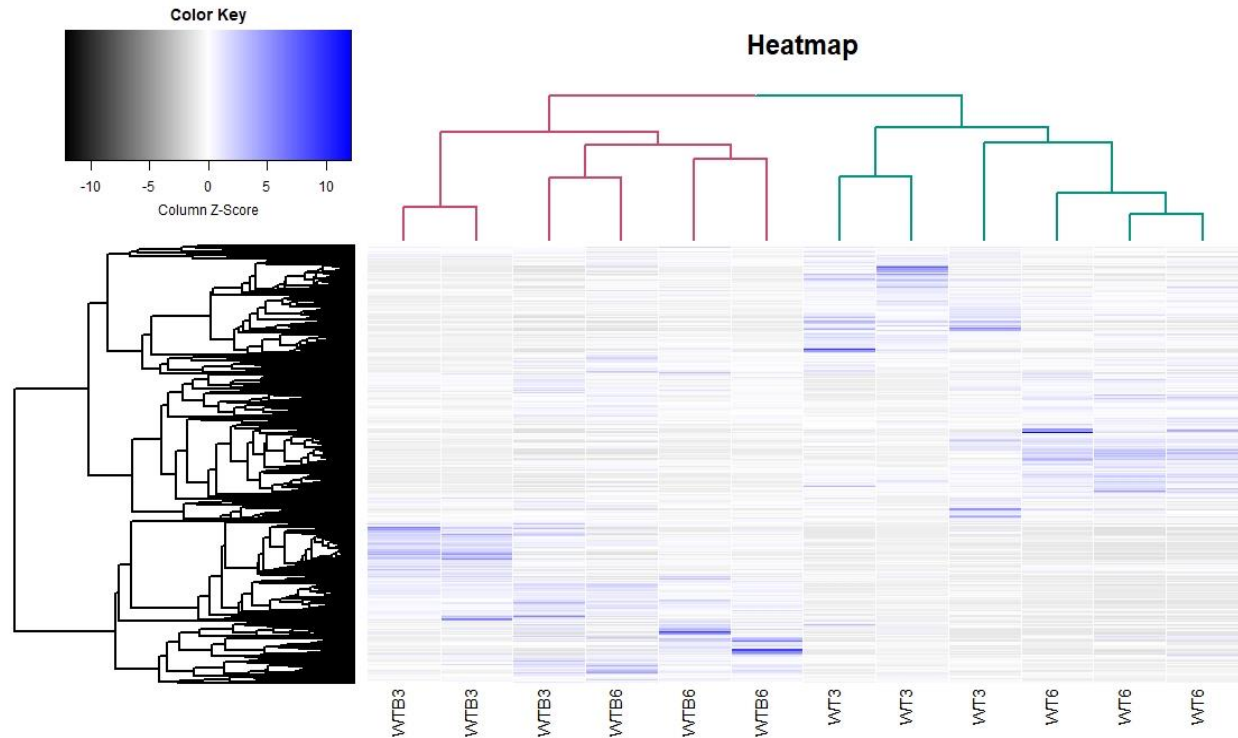
Εικόνα 81: PC1/PC2 PCA διάγραμμα συντεταγμένων της πρωτεομικής ανάλυσης της επίδρασης του boscalid στη φυσιολογία του στελέχους FGSC A4. Με WTB3 και WTB6 ορίζονται καλλιέργειες 3 και 6 ημερών ανάπτυξης αντίστοιχα υπό την επίδραση $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid, και με WT3 και WT6 καλλιέργειες 3 και 6 ημερών ανάπτυξης δίχως την παρουσία δ.ο.. Παρατηρείται διαχωρισμός των δειγμάτων βάσει της παρουσίας ή μη της δ.ο. και δευτερευόντως βάσει των ημερών ανάπτυξης

Ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της πρωτεομικής μήτρας όπως περιγράφονται στο κεφάλαιο §2.12.4. HCA (pearson correlation, average distance) κατά αντιστοιχία των αποτελεσμάτων της PCA, δείχνει επαρκή διαχωρισμό των δειγμάτων βάσει της εφαρμογής ή μη της δ.ο., και δευτερευόντως των ημερών ανάπτυξης τους (**Εικόνα 82**).



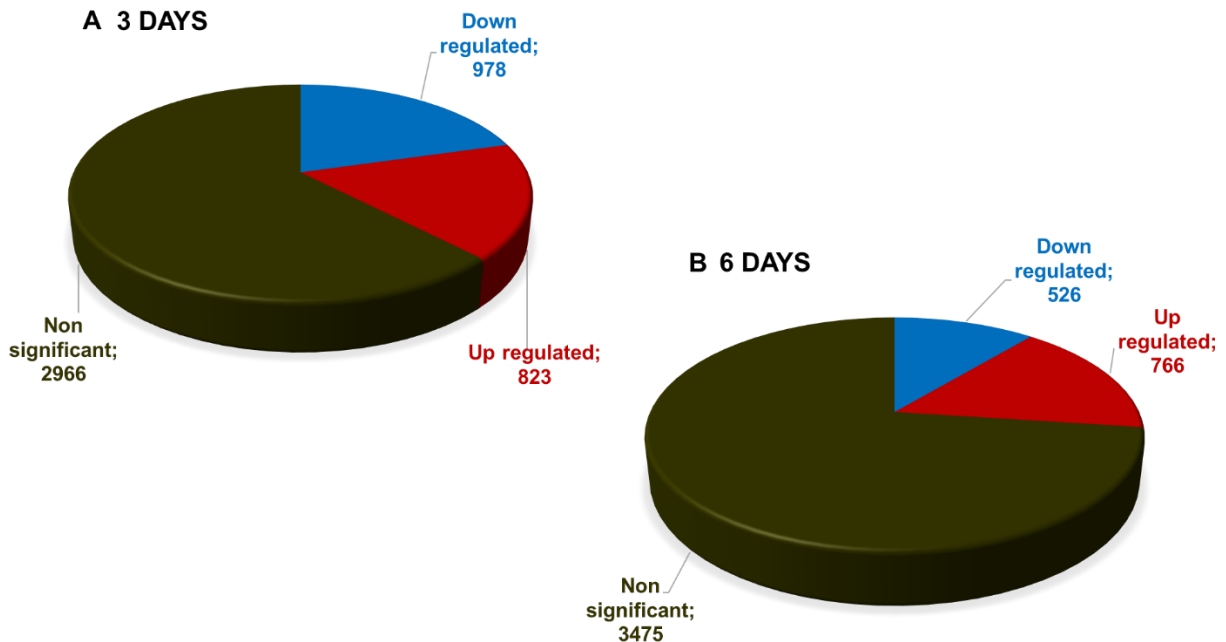
Εικόνα 82: Ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (HCA; pearson correlation, average distance) των δειγμάτων της πρωτεομικής. Με WT3 και WT6 ορίζονται καλλιέργειες 3 και 6 ημερών ανάπτυξης αντίστοιχα υπό την επίδραση $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid, και με WT3 και WT6 καλλιέργειες 3 και 6 ημερών ανάπτυξης δίχως την παρουσία δ.ο.. Παρατηρείται επαρκής διαχωρισμός των δειγμάτων βάσει της παρουσίας ή μη της δ.ο. και δευτερευόντως βάσει των ημερών ανάπτυξης

Με τις πληροφορίες από τη μήτρα της πρωτεομικής κατασκευάστηκε Cluster heat map ώστε να απεικονιστούν οι τάσεις στα καταγεγραμμένα πρωτεομικά προφίλ των επεμβάσεων (**Εικόνα 83**). Από αυτό είναι εμφανής ο διαχωρισμός των δειγμάτων κυρίως βάσει της παρουσίας ή μη της δ.ο. και δευτερευόντως βάσει των ημερών ανάπτυξης.



Εικόνα 83: Cluster heat map του πρωτεομικού προφίλ των δειγμάτων υπό την επίδραση $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid ή μη, έπειτα από καλλιέργεια 3 και 6 ημερών. Εφαρμόστηκε Ιεραρχική ανάλυση συστάδων (HCA; pearson correlation, average distance). Είναι εμφανής ο διαχωρισμός μεταξύ των επεμβάσεων. Κάθε σειράς αντιπροσωπεύουν διαφορετικές πρωτεΐνες και οι στήλες διαφορετικά δείγματα. Σε κάθε κελί εφαρμόστηκε χρωματική κλίμακα βάσει της συγκέντρωσης κάθε πρωτεΐνης, με -12 (μαύρο) να αντιπροσωπεύει χαμηλές συγκεντρώσεις έως +12 (μπλε) να αντιπροσωπεύει υψηλές τιμές

Η εκτίμηση της επίδρασης του boscalid στις πρωτεΐνες των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε μέσω της σύγκρισης των επιπέδων τους στις επεμβάσεις σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Θεωρήθηκε σημαντική όταν στις επεμβάσεις ήταν αυξημένα ή μειωμένα κατά 4 φορές ($r_f = \pm 4$) σε σχέση με τους μάρτυρες. Στις 3 ημέρες ανάπτυξης **1801** πρωτεΐνες εμφάνισαν σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασής τους, εκ των οποίων **978** ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα και **823** σε υψηλότερα επίπεδα στις επεμβάσεις σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίστοιχα στις 6 ημέρες, σε σύνολο **1292** πρωτεϊνών με σημαντική επίδραση, **526** πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα και **766** σε υψηλότερα (**Εικόνα 84**).

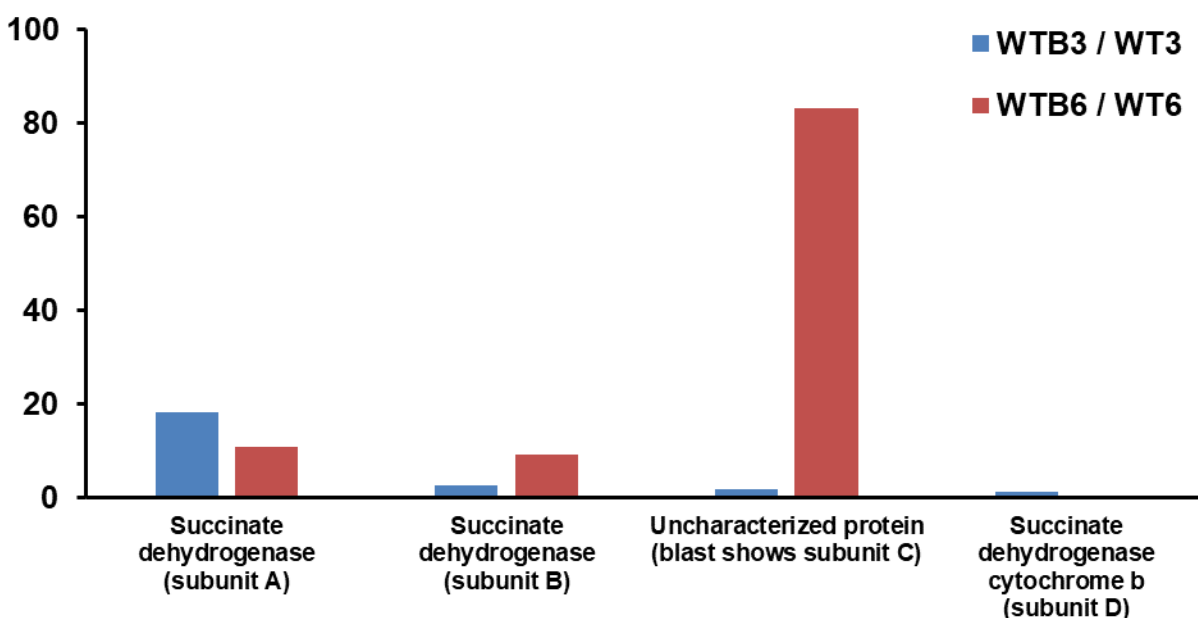


Εικόνα 84: Αριθμός πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν στην πρωτεομική ανάλυση. Στις 3 ημέρες 978 ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα στις επεμβάσεις και 823 σε υψηλότερα (A). Στις 6 ημέρες ο αντίστοιχος αριθμός είναι 526 και 766 αντίστοιχα (B)

Μια παρατήρηση με ιδιαίτερο ενδιαφέρον που προκύπτει από όλα τα προηγούμενα αποτελέσματα είναι ότι τα δείγματα που αναπτύχθηκαν για 6 ημέρες υπό την επίδραση του boscalid ομαδοποιούνται κοντά σε αυτά των μαρτύρων, ενώ και ο συνολικός αριθμός των πρωτεϊνών που φαίνεται να είναι μειωμένος. Αυτό πιθανόν να υποδηλώνει ότι στο ενδιαμέσο διάστημα η επίδραση της δ.ο. φθίνει, λόγω πιθανών μηχανισμών άμυνας του παθογόνου, όπως είναι η δράση μηχανισμών αποτοξικοποίησης ή/και μηχανισμών/μεταφορέων που αυξάνουν την απέκκριση της δ.ο..

3.7.2.2 Η παρουσία του boscalid οδηγεί στην υπερέκφραση υπομονάδων της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος

Ένα σημαντικό εύρημα της πρωτεομικής είναι η έκφραση των τεσσάρων υπομονάδων της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος, ως απόκριση στην παρουσία της δ.ο.. Συγκεκριμένα αν και η υπομονάδα D φάνηκε να μην επηρεάζεται από τη δ.ο., οι υπομονάδες B και C ανιχνεύτηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις έπειτα από 6 ημέρες ανάπτυξης παρουσία δ.ο. (Εικόνα 85).



Εικόνα 85: Επίδραση υποθανάσιμης δόσης ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) boscalid στις 4 υπομονάδες του ενζύμου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος, έπειτα από καλλιέργεια 3 (μπλε ραβδόγραμμα) και 6 ημέρων (κόκκινο ραβδόγραμμα). Παρατηρείται συσσώρευση των υπομονάδων A B και C ιδιαίτερα έπειτα από 6 ημέρες ανάπτυξης παρουσία δ.ο.

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο (§1.3.4) είναι γνωστό ότι σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν προς ανθεκτικότητα στους SDHIs απαντώνται στις υπομονάδες B, C και D (Pearce et al. 2019, Sang and Lee 2020). Παρότι είναι γνωστό ότι οι SDHIs προσδένονται εντός του θύλακα της ουβικινόνης που βρίσκεται στο σημείο ένωσης των τριών αυτών υπομονάδων, ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι αρκετές από τις υπεύθυνες μεταλλάξεις φαίνεται να μην συσχετίζονται άμεσα με τη θέση πρόσδεσης των

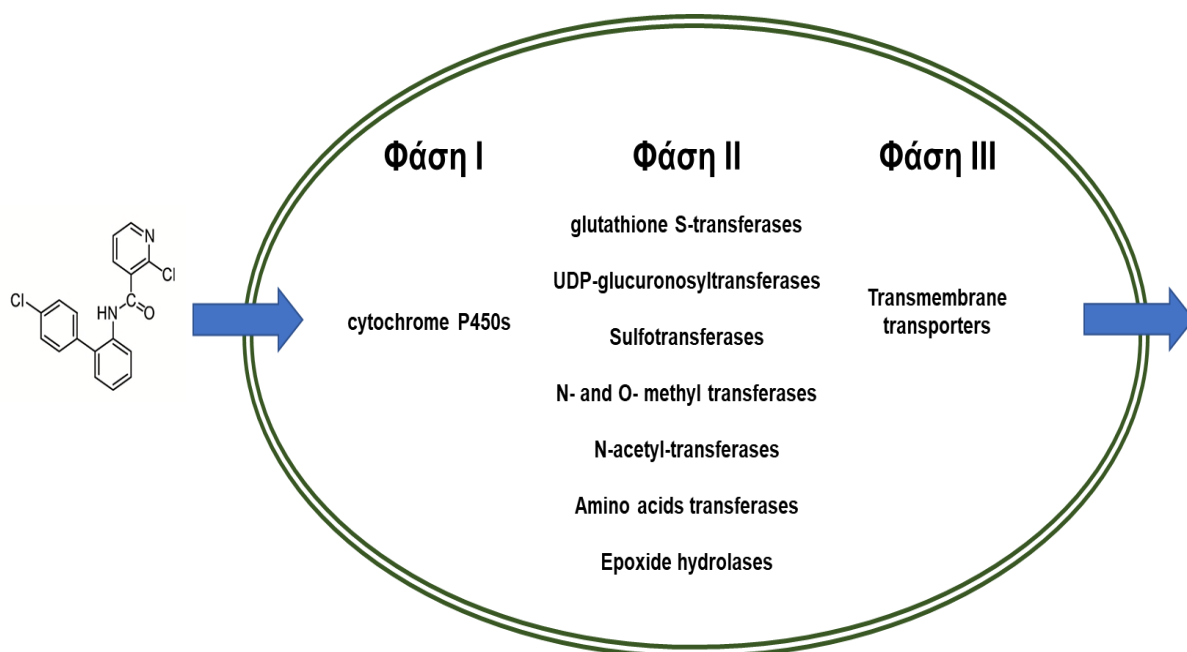
SDHIs (Stammlier et al. 2015). Πρόσφατη μελέτη με εφαρμογή θεωρητικού μοντέλου έδρασης των δ.ο. benzovindiflupyr, isopyrazam, fluxapyroxad, pydiflumetofen, fluopyram, thifluzamide και boscalid, που ανήκουν σε διαφορετικές υποομάδες των SDHIs έδειξε, ότι προσδένονται πλησιέστερα στη θέση έδρασης της υπομονάδας C. Μάλιστα η συγγένεια πρόσδεσης των δ.ο. στην υπομονάδα C ήταν τόσο υψηλή, ώστε οι συγγραφείς προτείνουν ότι αυτή θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά τον σχεδιασμό νέας γενιάς δ.ο. που ανήκουν στους SDHIs (Gao et al. 2020).

Η υψηλότερη συγκέντρωση της υπομονάδας C σε σχέση με την υπομονάδα B που ανιχνεύθηκε στην πρωτεομική ανάλυση, φαίνεται να επαληθεύει πειραματικά το προηγούμενο θεωρητικό μοντέλο. Ο συνδυασμός του συγκεκριμένου αποτελέσματος της παρούσας διατριβής και της έως τώρα διαθέσιμης βιβλιογραφικής πληροφορίας επεξηγούν πληρέστερα τον βιοχημικό μηχανισμό δράσης των SDHIs. Το boscalid φαίνεται πως προσκολλάται πλησίον της θέσης έδρασης της υπομονάδας C, οδηγώντας στη μη επιτυχή ολοκλήρωση της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος. Ως αποτέλεσμα ο μύκητας υπερπαράγει την υπομονάδα C ώστε να μπορέσει να ανταπεξέλθει στην τοξική επίδραση της δ.ο.. Αυτή όμως η μη επιτυχής ολοκλήρωση του ενζύμου οδηγεί στην αναστολή της λειτουργίας του. Ακολούθως η αναπνευστική αλυσίδα αναστέλλεται, καταλήγοντας στη διακοπή της παραγωγής ATP και τελικά στην κατάρρευση της παραγωγής ενέργειας.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αυξημένη παραγωγή της υπομονάδας A στις 3 και 6 ημέρες ανάπτυξης παρουσία της δ.ο.. Η παρούσα διατριβή αποτελεί την πρώτη αναφορά της επίδρασης των SDHIs σε αυτήν, καθώς δεν έχουν βρεθεί μελέτες που να συνδέουν τον βιοχημικό μηχανισμό των SDHIs με αυτήν, ή τυχόν μεταλλάξεις της που να οδηγούν σε κάποιες μορφής ανθεκτικότητας, παρά μόνο συσχέτιση της λειτουργικότητάς της και της εμφάνισης καρκίνου στον άνθρωπο (Bardella et al. 2011, Hwang et al. 2014). Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών καθίσταται σαφές πως πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω τυχόν ρόλος της στην ευαισθησία του συμπλόκου στους SDHIs.

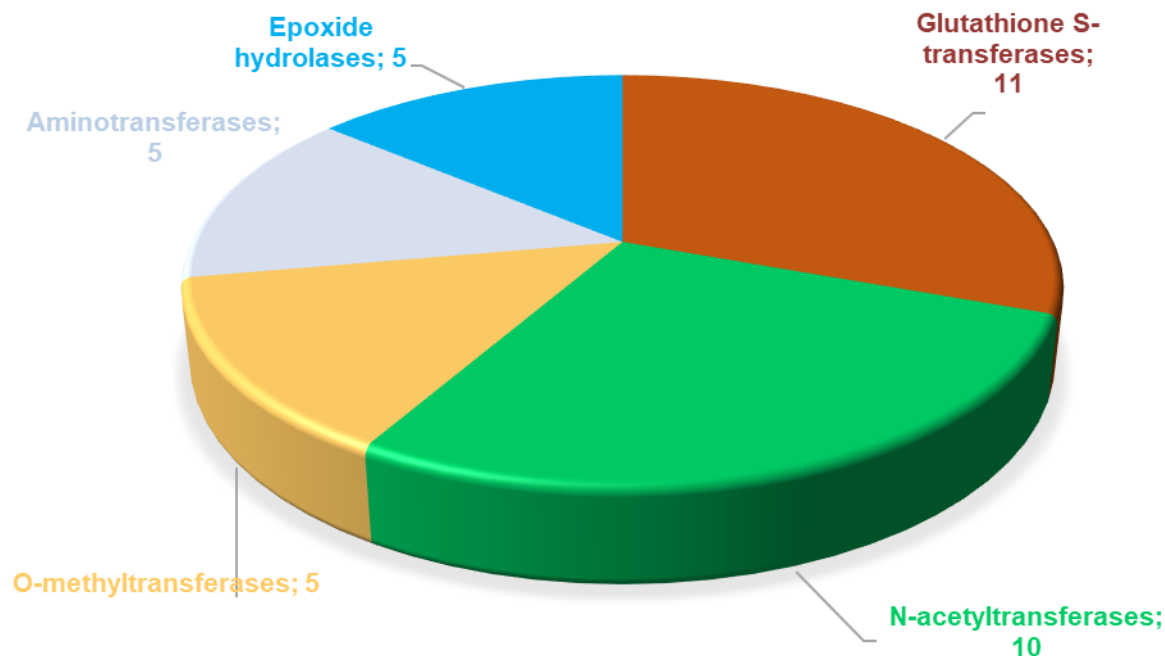
3.7.2.3 Η παρουσία boscalid ενεργοποιεί μονοπάτια αποτοξικοποίησης

Συνοπτικά η αποτοξικοποίηση εξωγενών τοξικών ουσιών λαμβάνει χώρα σε 3 φάσεις (Chen 2020) (**Εικόνα 86**). Κατά την πρώτη φάση ενεργοποιούνται δυνητικά τοξικές λιπόφιλες ενώσεις, αυξάνοντας ταυτόχρονα την υδροφιλικότητά τους, κυρίως μέσω της δράσης κυτοχρωμικών P450 οξειδασών, χρησιμοποιώντας οξυγόνο και NADH ως συπαραγόντα. Στη δεύτερη φάση, οι ενώσεις που ενεργοποιήθηκαν προηγουμένως είτε θα αποτοξικοποιηθούν από ένζυμα όπως quinone reductases και epoxide hydrolases, είτε θα συζευχθούν με ουσίες που θα τις κάνουν πιο υδατοδιαλυτές, μέσω της δράσης ενζύμων όπως UDP-glucuronosyltransferases (UGT), sulfotransferases (SULT), glutathione S-transferases (GSTs) και N-acetyl-transferases (NAT). Στόχοι των ενζύμων αποτοξικοποίησης αποτελούν πλήθος λειτουργικών ομάδων όπως φαινόλες, πολυφαινόλες, καρβοξυλικά οξέα, και αμινοξέα. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης, μεταβολίτες όπως το γλυκουρονικό οξύ, τοθειικό άλας, η γλυκίνη, η γλουταμίνη, η ταυρίνη, η ορνιθίνη και η γλουταθειόνη χρησιμεύουν ως συζευκτικές ουσίες. Στη τρίτη και τελευταία φάση οι συζευγμένες υδατοδιαλυτές ενώσεις απεκκρίνονται τελικά μέσω της δράσης ABC διαμεμβρανικών μεταφορέων (Sánchez-Gómez et al. 2016).



Εικόνα 86: Συνοπτική σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών αποτοξικοποίησης του κυττάρου και των κυριότερων ενζύμων κάθε φάσης

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 87** ταυτοποιήθηκαν 36 ένζυμα με ρόλο στην αποτοξικοποίηση των ουσιών, ενώ 21 από αυτά επηρεάστηκαν σημαντικά από την παρουσία της δ.ο. (**Πίνακας 13**).



Εικόνα 87: Αριθμός ενζύμων που ταυτοποιήθηκαν και με δράση στην αποτοξικοποίηση τοξικών μορίων. Κυρίως ταυτοποιήθηκαν glutathione S-transferases (11) και N-acetyltransferases (10)

Στην ομάδα των glutathione S-transferases, ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η έκφραση των **Q5AQY1** και **C8VIB9** πρωτεϊνών, με την έκφραση της πρώτης να μειώνεται από τις 3 στις 6 ημέρες, ενώ στη δεύτερη ακολουθεί αντίστροφη πορεία, εμφανίζοντας την υψηλότερη έκφραση από όλες τις πρωτεΐνες. Στις υπόλοιπες αν και παρατηρείται μια αύξηση των επιπέδων τους, αυτά παραμένουν σε μικρότερο επίπεδο στις επεμβάσεις σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντιθέτως, αν και παρατηρείται μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών και στην ομάδα των N-acetyltransferases, αυτή παραμένει σε υψηλότερο επίπεδο στις επεμβάσεις σε σχέση με τους μάρτυρες. Εξαιρέσεις αποτελούν οι πρωτεΐνες **C8V829** και **Q5B8G8** των οποίων η έκφραση στις 6 ημέρες υπολείπεται σε σχέση με τους μάρτυρες, αλλά ιδίως η πρωτεΐνη **Q5B9N5** της οποίας η έκφραση στις 6 ημέρες αυξάνεται

εντυπωσιακά (>40 φορές). Στις ομάδες των O-methyltransferases και aminotransferases εξαιρουμένης της πρωτεΐνης **Q5AXN5**, παρατηρείται μια αύξηση της έκφρασής τους κατά τις 6 ημέρες

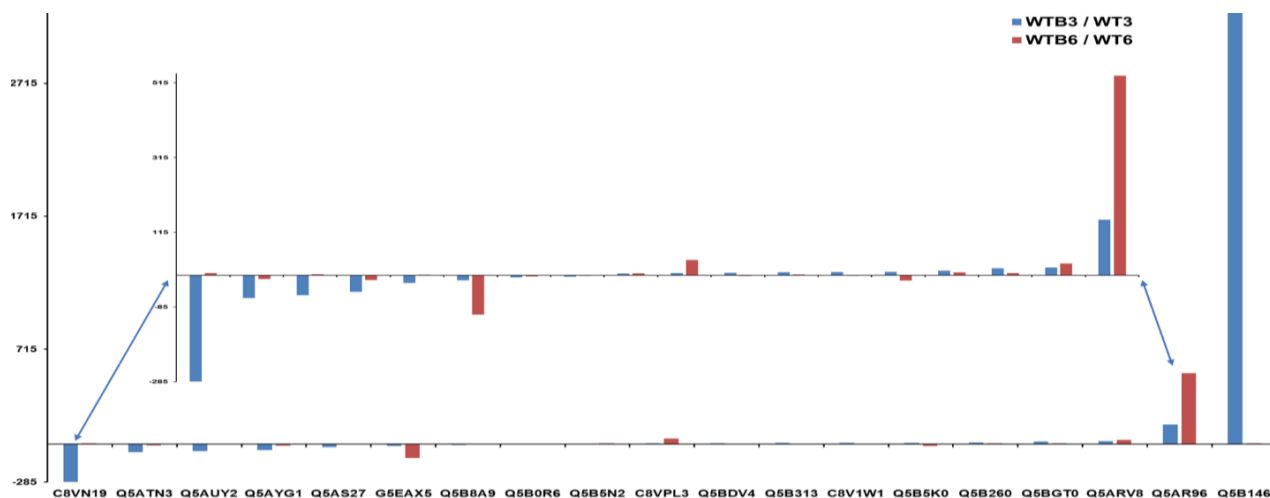
Πίνακας 13: Αναλογία έκφρασης των ενζύμων με ρόλο στην αποτοξικοποίηση, που επηρεάστηκαν από την παρουσία της δ.ο.. Παρατηρείται μια γενική μείωση των επιπέδων έκφρασης των N-acetyltransferases στις 6 ημέρες. Αντιθέτως η έκφραση των O-methyltransferases φαίνεται να αυξάνει

Accession	Description	Fold Change	
		WTB3 / WT3	WTB6 / WT6
C8VIB9	Glutathione S-transferase (Eurofung)	→ -2.698	↑ 20.285
Q5B831	Glutathione S-transferase, putative (AFU_ortholog)	↓ -5.334	→ -1.591
C8VMV2	Glutathione synthetase, putative (AFU_ortholog)	↓ -54.62	↓ -12.66
Q5AQY1	Glutathione transferase (Eurofung)	↑ 18.313	→ 1.6505
Q5B9N5	N-acetyltransferase (Nat5), putative (AFU_ortholog)	↓ -35.33	↑ 17.427
C8V829	N-acetyltransferase domain-containing	→ 2.2404	↓ -5.461
C8VPP7	N-acetyltransferase domain-containing	↑ 7.6561	→ 2.8923
Q5AUT6	N-acetyltransferase domain-containing	↑ 4.5696	→ 1.2411
Q5B8G8	N-acetyltransferase domain-containing	→ -3.739	↓ -40.63
Q5BCV9	N-acetyltransferase domain-containing	↑ 14.806	↑ 4.6472
C8V8V2	N-acetyltransferase family protein, putative (AFU_ortholog)	↑ 57.959	↑ 10.488
Q5BEP3	N-acetyltransferase, GNAT family, putative (AFU_ortholog)	↑ 23.069	↑ 9.7798
Q5AZ33	O-methyltransferase, putative (AFU_ortholog)	↓ -28.94	↓ -24.54
Q5B215	O-methyltransferase, putative (AFU_ortholog)	↑ 4.7473	↑ 5.372
Q5BB73	O-methyltransferase, putative (AFU_ortholog)	↓ -4.449	→ -3.415
C8VI69	O-methyltransferase, putative (AFU_ortholog)	→ 1.0019	↑ 5.0403
Q5AXN5	O-methyltransferase, putative (AFU_ortholog)	→ 1.8194	↓ -6.343
Q5B0H3	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, putative (AFU_ortholog)	→ 3.22	↑ 4.67
Q5B1I9	Aminotransferase, classes I and II, putative (AFU_ortholog)	↓ -4.66	→ -1.98
Q5BFA0	Aminotransferase, hypothetical (Eurofung)	↓ -4.95	→ -1.24
Q5BF92	Epoxide hydrolase, putative (AFU_ortholog)	↑ 4.5911	→ 1.3435

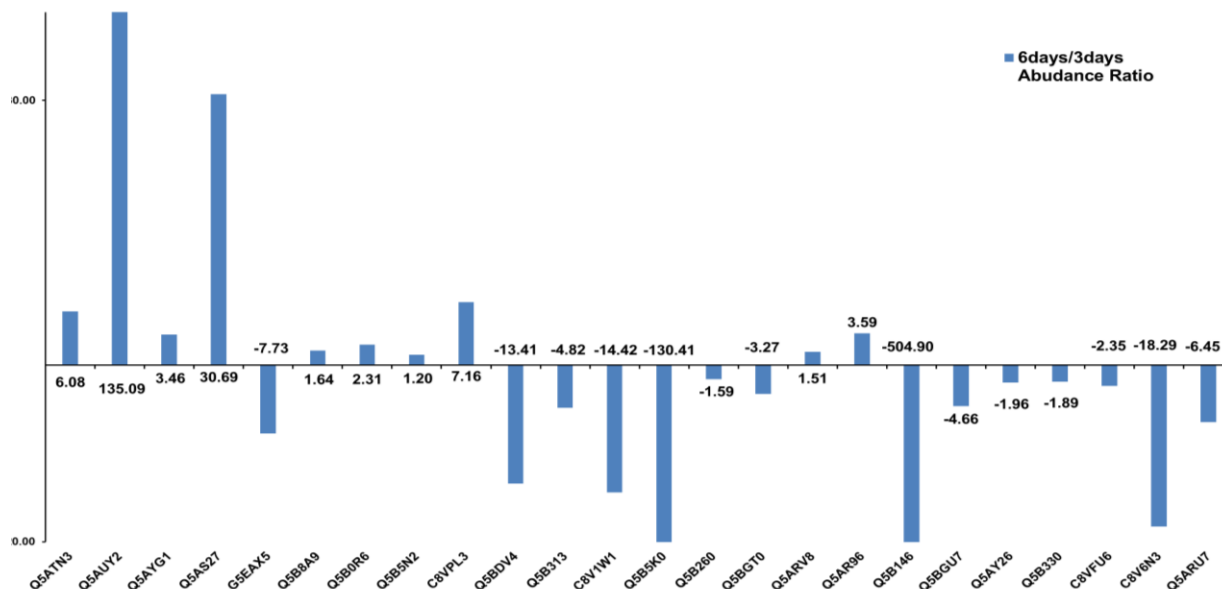
Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών μπορεί να υποθεθεί ότι παρουσία boscalid μια σειρά ενζύμων που μετέχουν στη δεύτερη φάση της αποτοξικοποίησης ουσιών εκφράζονται κυρίως στις 3 ημέρες, ώστε να αντιμετωπιστεί η τοξική επίδραση της δ.ο.. Φαίνεται κατά κανόνα να μειώνεται η έκφρασή τους στις 6 ημέρες, καθώς σημαντικό κομμάτι της δ.ο. φαίνεται να έχει αποτοξικοποιηθεί και απεκκριθεί από το κύτταρο. Παρόλα αυτά αυξημένο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έκφραση των **C8VIB9**, **Q5B9N5** και **C8VI69** πρωτεϊνών.

3.7.2.4 Η παρουσία boscalid ενεργοποιεί διαμεμβρανικούς μεταφορείς

Από τους 41 MFS μεταφορείς που ανιχνεύθηκαν στην πρωτεομική ανάλυση, 19 παρουσίασαν σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων τους στις επεμβάσεις σε σχέση με τους μάρτυρες (**Εικόνα 88**). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η πλειοψηφία εξ αυτών, εξαιρουμένων κυρίως των G5EAX5, Q5B313, C8V1W1 και Q5B5K0, παρουσιάζουν μια αύξηση των επιπέδων τους έπειτα από 6 ημέρες υπό την επήρεια του boscalid, όπως φαίνεται από τη σύγκριση των επιπέδων τους μεταξύ των 6 και 3 ημερών (**Εικόνα 89**)

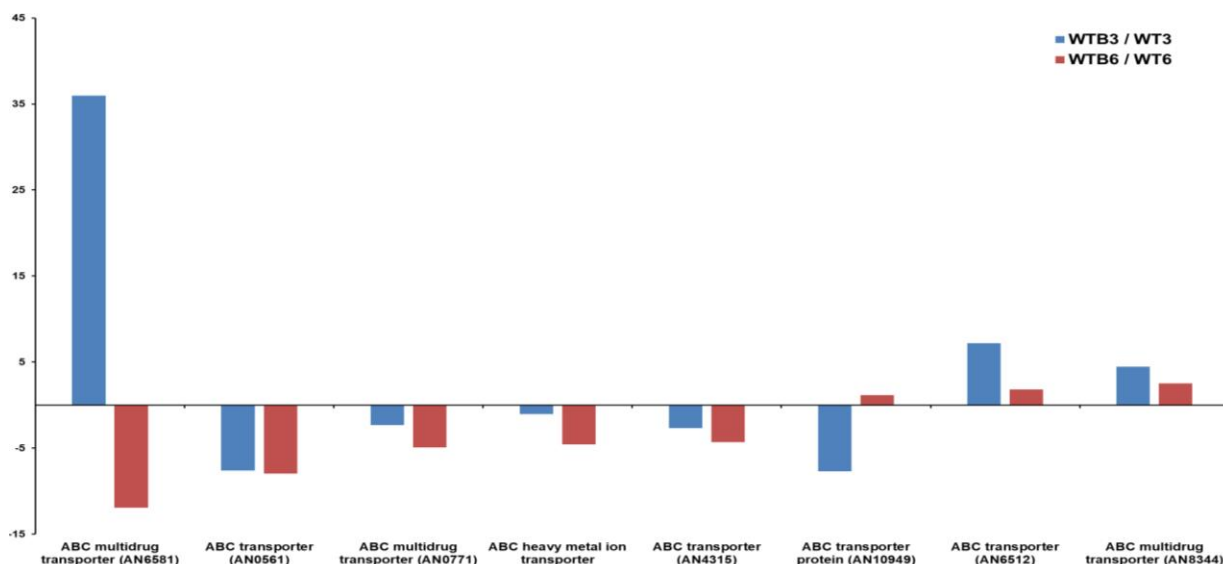


Εικόνα 88: Επίδραση υποθανάσιμης δόσης ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) boscalid στην έκφραση των MFS μεταφορέων που ταυτοποιήθηκαν από την πρωτεομική ανάλυση έπειτα από καλλιέργεια 3 (μπλε ραβδόγραμμα) και 6 ημερών (κόκκινο ραβδόγραμμα). Για λόγους ευκρίνειας στο μεγεθυμένο πλαίσιο απεικονίζεται η έκφραση όλων εκτός του Q5B146 μεταφορέα

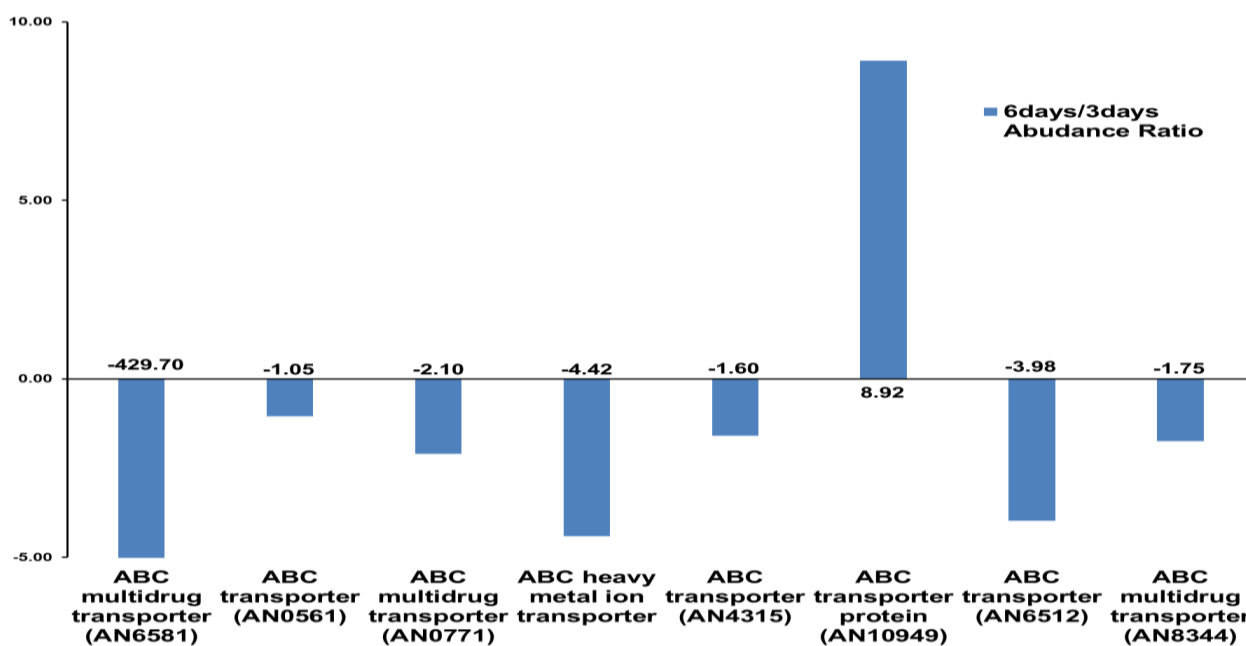


Εικόνα 89: Σχηματική απεικόνιση της αναλογίας της έκφρασης των σημαντικά διαφοροποιημένων MFS μεταξύ των 3 και 6 ημερών ανάπτυξης υπό την επίδραση υποθανάσιμης δόσης ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) boscalid. Θετικές τιμές δείχνουν αυξημένη έκφραση στις 6 ημέρες συγκριτικά με τις 3

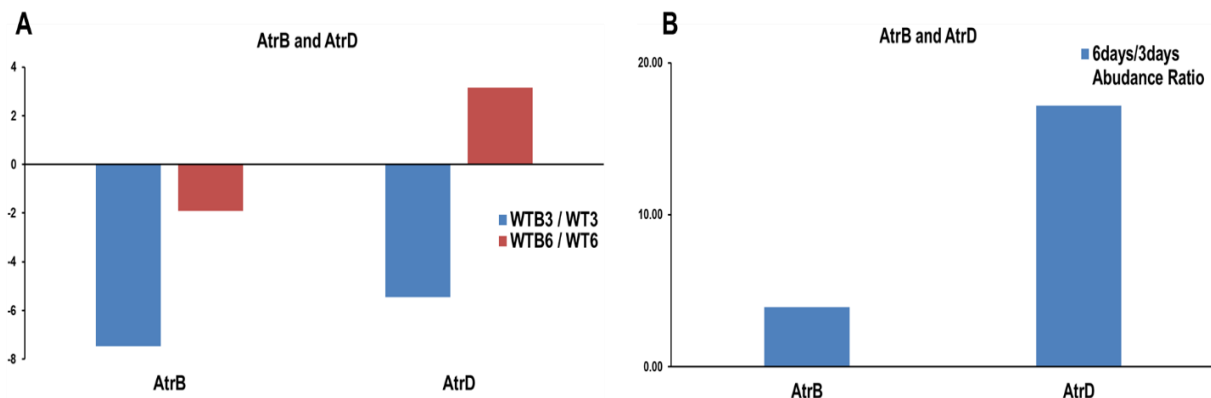
Αντίστοιχα 10 από τους συνολικά 18 εκ των ανιχνευμένων ABC μεταφορέων παρουσίασαν σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων τους μεταξύ των επεμβάσεων και των μαρτύρων (**Εικόνα 90**). Γενικά με την εξαίρεση του AN10949 και των AtrB και AtrD η έκφραση των υπόλοιπων ABC μεταφορέων με σημαντικότερη αυτής του AN6581, φαίνεται να είναι αντίθετη αυτής των MFS μεταφορέων καθώς μειώνεται στις 6 ημέρες (**Εικόνα 91**). Ειδικά η διαφοροποίηση στα επίπεδα των AtrB και AtrD, δύο μεταφορέων με σημαντικό ρόλο στην απέκκριση τοξικών ορίων, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (**Εικόνα 92 A**), καθώς ιδίως για την περίπτωση του AtrB υπερέκφραση του οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε έναν μεγάλο αριθμό μυκητοκτόνων και αντιβιοτικών (Andrade, Del Sorbo, et al. 2000). Είναι χαρακτηριστικό ότι ενώ στις 3 ημέρες η έκφραση και των δύο παρουσία φαρμάκου είναι αρκετά χαμηλή, στις 6 ημέρες φαίνεται να λαμβάνει χώρα ενεργοποίησή τους, έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασής τους κατά 4 και 17 φορές για τον AtrB και AtrD αντίστοιχα (**Εικόνα 92 B**), ακολουθώντας ανάλογη έκφραση αυτής του AN10949. Παρόλα αυτά παραμένουν σε χαμηλότερα του αγρίου επίπεδα.



Εικόνα 90: Επίδραση υποθανάσιμης δόσης ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) boscalid στην έκφραση των ABC μεταφορέων που ταυτοποιήθηκαν από την πρωτεομική ανάλυση έπειτα από καλλιέργεια 3 (μπλε ραβδόγραμμα) και 6 ημερών (κόκκινο ραβδόγραμμα)



Εικόνα 91: Σχηματική απεικόνιση της αναλογίας της έκφρασης των σημαντικά διαφοροποιημένων ABC μεταφορέων μεταξύ των 3 και 6 ημερών ανάπτυξης υπό την επίδραση υποθανάσιμης δόσης ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) boscalid. Θετικές τιμές δείχνουν αυξημένη έκφραση στις 6 ημέρες συγκριτικά με τις 3



Εικόνα 92: Επίδραση υποθανάσιμης δόσης ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) boscalid στην έκφραση των *AtrB* και *AtrD* μεταφορέων που ταυτοποιήθηκαν από την πρωτεομική ανάλυση έπειτα από καλλιέργεια 3 (μπλε ραβδόγραμμα) και 6 ημέρων (κόκκινο ραβδόγραμμα) (A) και της αναλογίας της έκφρασής τους, με θετικές τιμές δείχνουν αυξημένη έκφραση στις 6 ημέρες συγκριτικά με τις 3 (B)

Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με την έκφραση των ενζύμων αποτοξικοποίησης και της δράσης του boscalid, υποδεικνύουν μια πως εκφράζεται σειρά μεταφορέων, ώστε να απεκκριθούν τόσο η ίδια η δ.ο., όσο και τα προϊόντα της αποτοξικοποίησής της. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (§1.2.2.2), δράση των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης του ηλεκτρικού οξέος, διαταράσσει την παραγωγή H^+ μειώνοντας την παραγωγή ATP από την αναπνευστική αλυσίδα. Κατά τα αρχικά στάδια φαίνεται ότι η απώλεια πρωτονίων από τη δράση του boscalid, που μπορούν χρησιμοποιηθούν από τους MFS μεταφορείς οδηγεί στην έκφραση ABC μεταφορέων, που χρησιμοποιώντας τις διαθέσιμες πηγές ATP απεκκρίνουν τη δ.ο. και τα πιθανά αποτοξικοποιημένα προϊόντα της. Με την πάροδο του χρόνου όμως και καθώς η παραγωγή ATP καταρρέει, πραγματοποιείται μια στροφή ειδικά προς multidrug MFS μεταφορείς όπως ο C8VPL3. Παρόλα αυτά δεδομένης της σημασίας των *AtrB* και *AtrD* μεταφορέων, φαίνεται ότι προάγεται η έκφρασή τους στις 6 ημέρες, ακόμη και αν στερηθεί η ενέργεια από αλλού, ώστε να απεκκριθεί ο τοξικός παράγοντας.

3.8 Οι AtrB και AtrD μεταφορείς συμβάλλουν στην ευαισθησία στο boscalid

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ένα από τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα που έδειξε η πρωτεομική ανάλυση ήταν ο πιθανός ρόλος των AtrB και AtrD μεταφορέων στην απέκκριση του boscalid. Για τον λόγο αυτό ακολούθησε η διερεύνηση του πιθανού αυτού ρόλου, ο οποίος μπορεί να αποτελέσει έναν μηχανισμό ανθεκτικότητας έναντι στους SDHIs, που μέχρι και σήμερα δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς για τη συγκεκριμένη ομάδα μυκητοκτόνων.

Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος TNO2A7 και τους εκκινητές 1-13 (§2.6), στελέχη με διαγεγραμμένα τα γονίδια *atrB* (*atrBΔ*) και *atrD* (*atrDΔ*) και υπερεκφρασμένα με χρήση του ισχυρού υποκινητή *GpdA*, *gpdA-atrB* και *gpdA-atrD* αντίστοιχα. Εν συνεχεία, χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος *atrBΔ* κατασκευάστηκε το διπλά διαγεγραμμένο στέλεχος *atrBΔ/atrDΔ*, ενώ αντίστοιχα με χρήση του *gpdA-atrB* κατασκευάστηκε το διπλά υπερεκφρασμένο *gpdA-atrB/gpdA-atrD*.

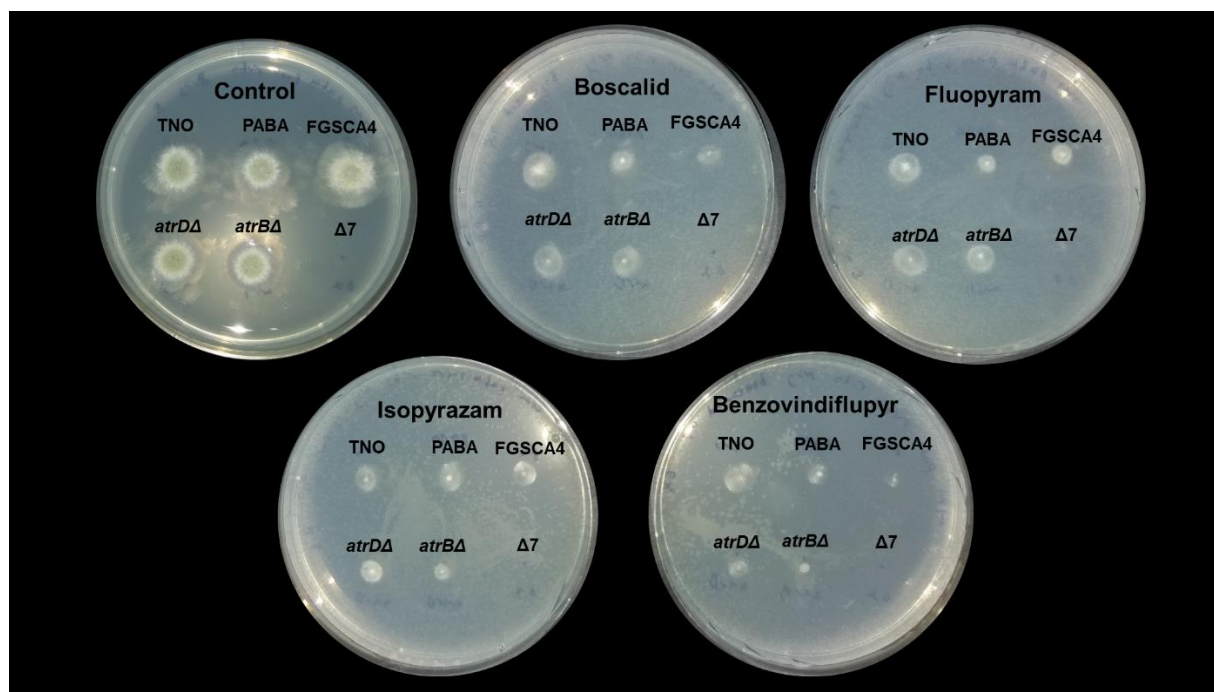
3.8.1 Επίδραση του boscalid στα διαγεγραμμένα στελέχη

Για να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος των AtrB και AtrD μεταφορέων στην απέκκριση του boscalid αρχικά εξετάστηκε τυχόν διαφορά της ευαισθησίας σε αυτό των διαγεγραμμένων στελεχών, με το ισογεννητικό αγρίου τύπου στέλεχος TNO (§2.1).

Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, συμπληρωμένο με τις απαραίτητες αυξοτροφίες και αμμωνιακά ως πηγή αζώτου, προστέθηκαν υποθανάσιμες δόσεις τεσσάρων αντιπροσωπευτικών δ.ο. που ανήκουν σε διάφορες υποκατηγορίες της υπερομάδας των SDHIs. Συγκεκριμένα πέραν του boscalid (pyridine-carboxamides) αξιολογήθηκαν και το fluopyram (pyridinyl-ethyl-benzamides), το isopyrazam (pyrazole-4-carboxamides) καθώς και ο νεότερος εκπρόσωπός τους το benzonidiflupyr (pyrazole-4-carboxamides). boscalid (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Αποτελέσματα ελήφθησαν έπειτα από καλλιέργεια 3 ημερών στους 37°C σε συνθήκες σκότους. Για

μάρτυρες εκτός του ισογεννητικού στελέχους TNO χρησιμοποιήθηκαν και τα wt (paba) που χρησιμοποιήθηκε στην αξιολόγηση των $\Delta 7^+$ στελεχών καθώς και το αλληλουχημένο FGSC A4.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (**Εικόνα 93**), τα στελέχη με εξαίρεση το fluopyram, έδειξαν μια αυξημένη υπερευαισθησία στους υπόλοιπους εκπροσώπους των SDHIs. Ακόμη πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι το *atrD* Δ στέλεχος φάνηκε να είναι σημαντικά υπερευαίσθητο στην ομάδα των pyrazole-4-carboxamides και ιδίως στο benzonidiflupyr.

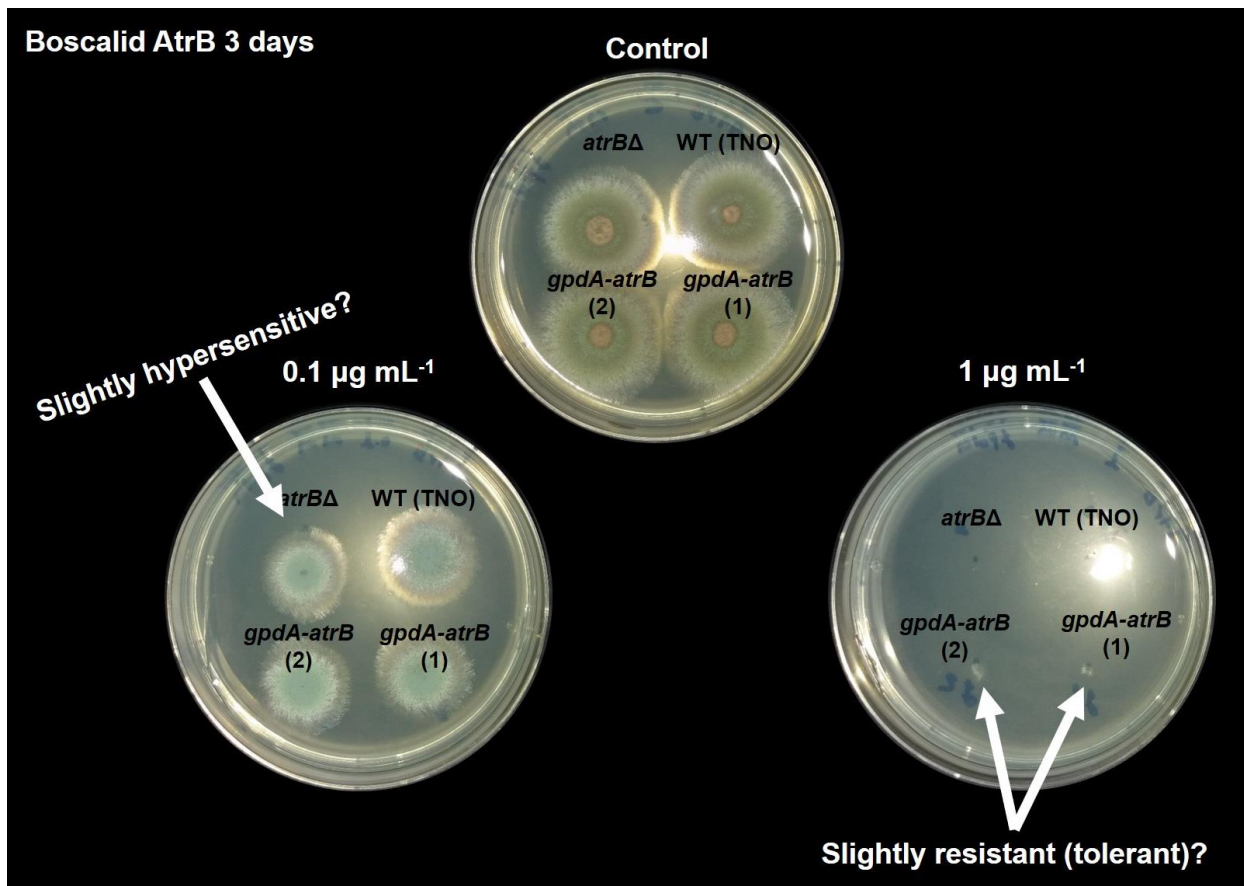


Εικόνα 93: Αξιολόγηση της ευαισθησίας των *atrB* Δ και *atrD* Δ στελεχών σε υποθανάσιμες δόσεις των δ.ο. boscalid, fluopyram, isopyrazam και benzonidiflupyr, που ανήκουν στην ομάδα των παρεμποδιστών της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, εμπλουτισμένου με τις κατάλληλες αυξοτροφίες και NaNO_3 ως πηγή N, στους 37°C και pH 6,8

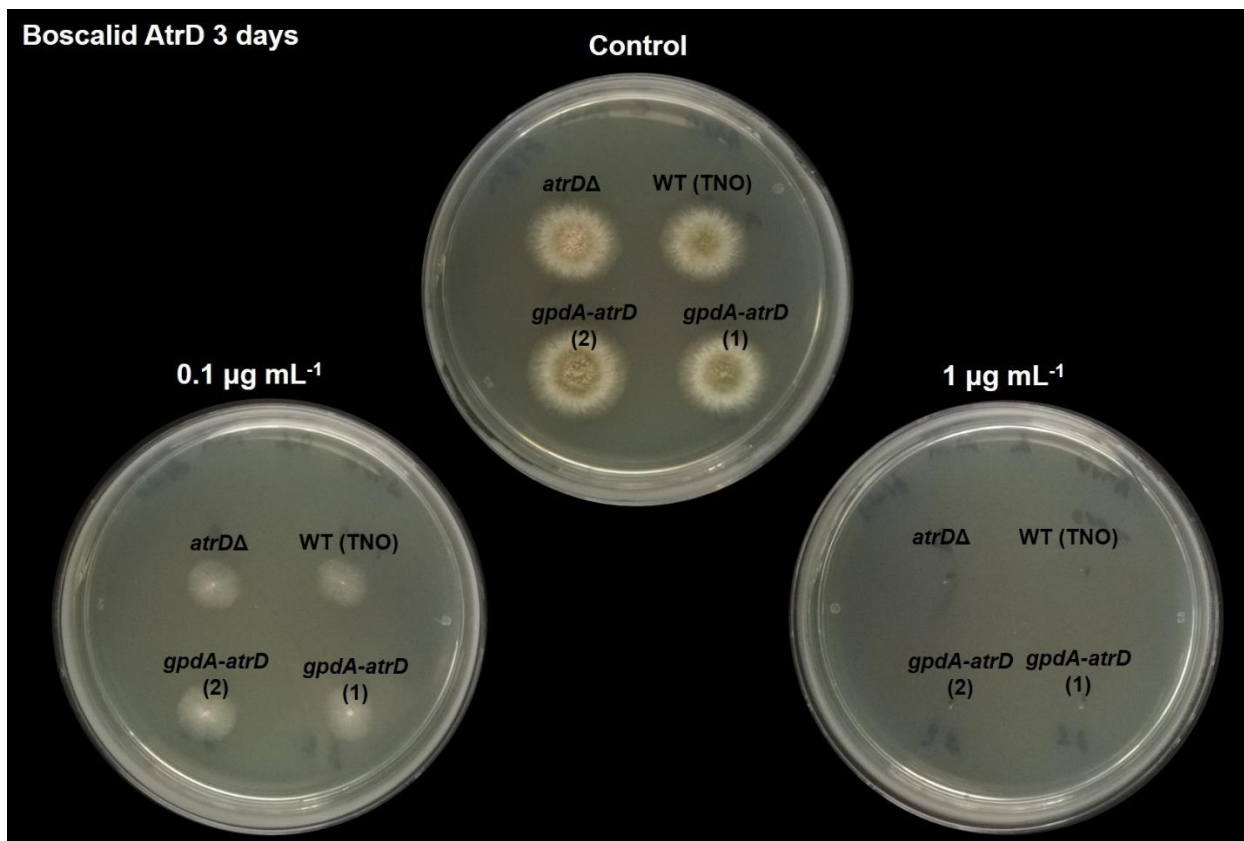
3.8.2 Επίδραση boscalid στα υπερεκφρασμένα στελέχη

Εν συνεχεία, επιλέχθηκαν από δύο από τα στελέχη που υπερεκφράζουν τους AtrB και AtrD μεταφορείς και αξιολογήθηκε η ευαισθησία τους σε 0,1 και 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid σε σχέση με το ισογεννητικό TNO στέλεχος και με το αντίστοιχο διαγεγραμμένο, έπειτα από καλλιέργεια 3 και 6 ημερών σε ελάχιστο στέρεο θρεπτικό υπόστρωμα συμπληρωμένου με τις κατάλληλες αυξοτροφίες και πηγή αζώτου, στους 37°C υπό συνθήκες σκότους.

Στις **εικόνες 94** και **95** απεικονίζεται η επίδραση των AtrB και AtrD μεταφορέων αντίστοιχα, στην ευαισθησία του μύκητα στο boscalid, έπειτα από 3 ημέρες ανάπτυξης.

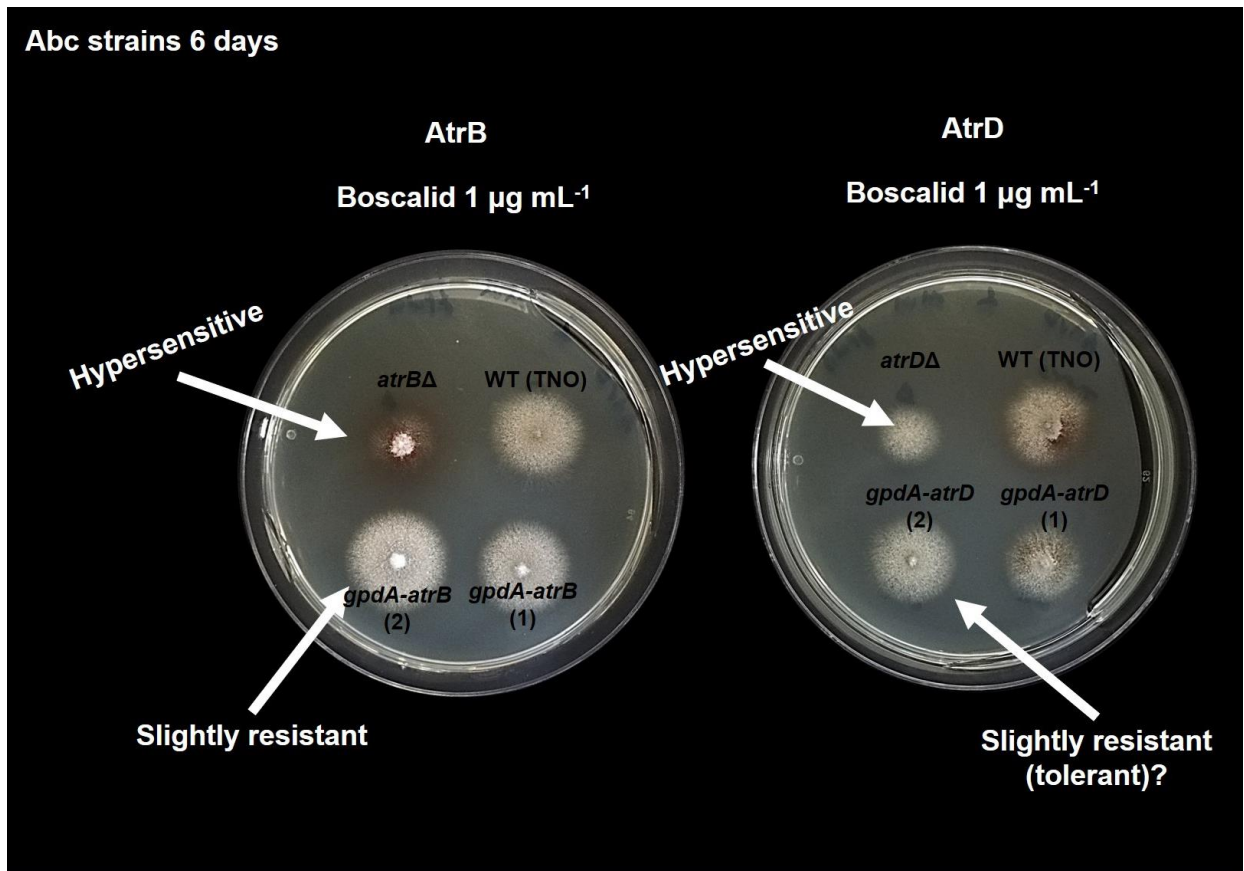


Εικόνα 94: Επίδραση υποθανάσιμων συγκέντρώσεων¹ boscalid στην ανάπτυξη του διαγεγραμμένου *atrBΔ* και των υπερεκφρασμένων *gpdA-atrB* στελεχών έπειτα από καλλιέργεια 3 ημερών σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, εμπλουτισμένου με τις κατάλληλες αυξοτροφίες και NaNO_3 ως πηγή N, στους 37°C και pH 6,8. Είναι εμφανής η υπερευαισθησία του διαγεγραμμένου και η μειωμένη ευαισθησία των ανθεκτικών στελεχών



Εικόνα 95: Επίδραση υποθανάσιμων συγκεντρώσεων boscalid στην ανάπτυξη του διαγεγραμμένου *atrDA* και των υπερεκφρασμένων *gpdA-atrD* στελεχών έπειτα από καλλιέργεια 3 ημερών σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, εμπλουτισμένου με τις κατάλληλες αυξοτροφίες και NaNO_3 ως πηγή N, στους 37°C και pH 6,8. Στην περίπτωση του *AtrD* μεταφορέα η υπερευαισθησία του διαγεγραμμένου και η μειωμένη ευαισθησία των ανθεκτικών στελεχών είναι λιγότερο εμφανής

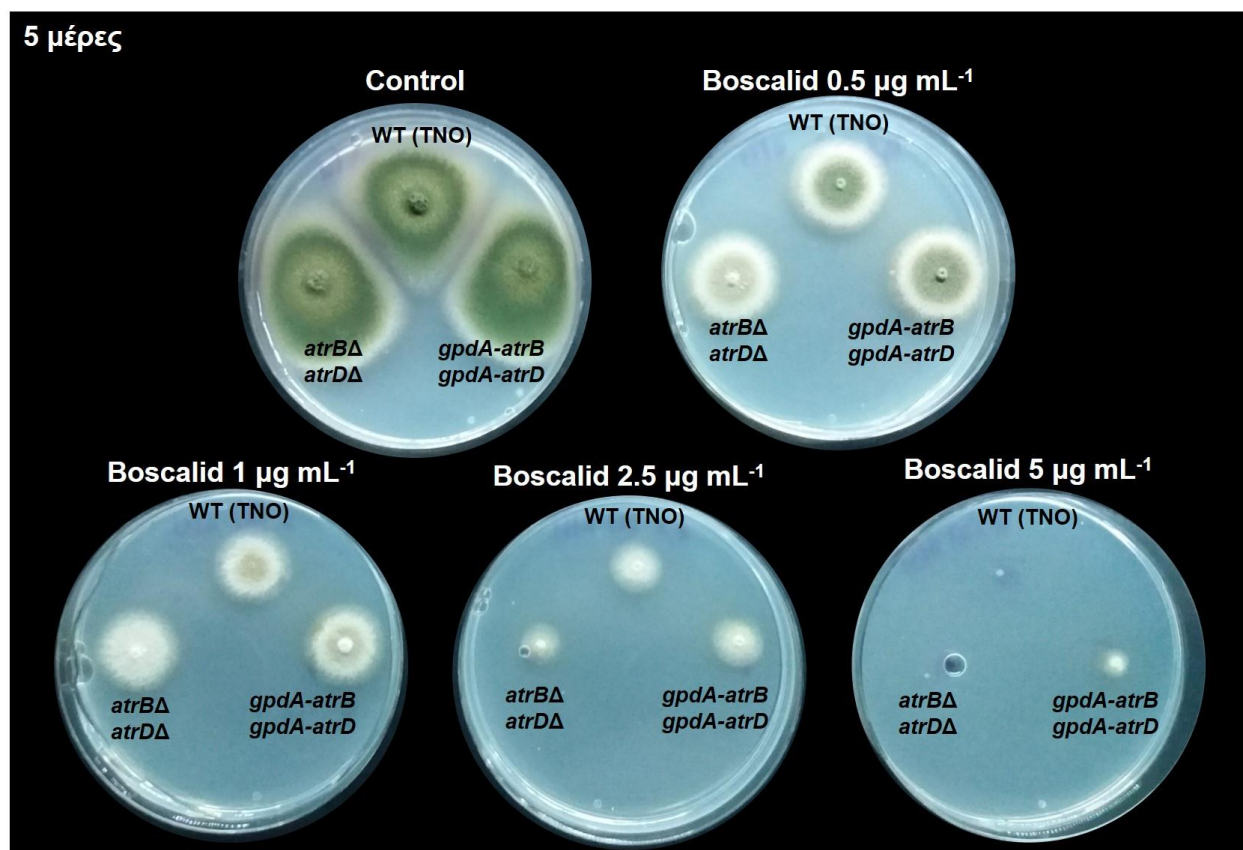
Στην περίπτωση του *AtrB* μεταφορέα είναι εμφανές ότι ήδη από τις 4 ημέρες παίζει ρόλο στην απέκκριση της δ.ο.. Το διαγεγραμμένο στέλεχος είναι περισσότερο ευαίσθητο από το μητρικό στέλεχος, ενώ και τα δύο στελέχη που υπερεκφράζουν τον μεταφορέα εμφανίζονται πιο ανθεκτικά. Στην περίπτωση του *AtrD* όμως δεν παρουσιάζεται τέτοια εικόνα στις 3 ημέρες. Αντιθέτως στις 6 ημέρες φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο, όπως και ο *AtrB* (**Εικόνα 96**). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το boscalid αποτελεί δυνητικό υπόστρωμα των δύο μεταφορέων, οπότε και απεκκρίνονται από αυτούς.



Εικόνα 96: Επίδραση υποθανάσιμης συγκέντρωσης ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) boscalid στην ανάπτυξη των διαγεγραμμένων *atrB* Δ και *atrD* Δ και των υπερεκφρασμένων *gpdA-atrB* και *gpdA-atrD* στελεχών έπειτα από καλλιέργεια 6 ημερών σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, εμπλουτισμένου με τις κατάλληλες αυξοτροφίες και NaNO_3 ως πηγή N, στους 37°C και pH 6,8. Είναι εμφανής ο ρόλος και των δύο μεταφορέων στην ευαισθησία στο boscalid

Για να φανεί αν οι δύο μεταφορείς μπορούν να δράσουν συνεργιστικά, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ευαισθησίας των διπλά διαγεγραμμένων και διπλά υπερεκφρασμένων στελεχών σε σχέση με το μητρικό TNO. Πράγματι τα αποτελέσματα (**Εικόνα 97**) δείχνουν μια σημαντική μείωση της ευαισθησίας του διπλά διαγεγραμμένου από τη συγκέντρωση των $0.5\mu\text{g mL}^{-1}$, στην οποία παρατηρείται μειωμένη ικανότητα παραγωγής κονιδιοσπορίων, ενώ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του $1\mu\text{g mL}^{-1}$ παρατηρείται και μειωμένος ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης συγκριτικά με το ισογεννητικό αγρίου τύπου στέλεχος TNO. Αντιθέτως το διπλά υπερεκφρασμένο στέλεχος όχι μόνο

δεν υστερεί στην ικανότητα σποριογέννησης, αλλά συνεχίζει να αναπτύσσεται και σε συγκεντρώσεις που αναστέλλουν την ανάπτυξη του αγρίου στελέχους ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$).



Εικόνα 97: Μελέτη της ευαισθησίας του διπλά διαγεγραμμένου στελέχους *atrBΔ atrDΔ* και του υπερεκφρασμένου *gpdA-atrB gpdA-atrD* στην παρουσία *boscalid* έπειτα από καλλιέργεια 5 ημερών σε στέρεο ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, εμπλουτισμένου με τις κατάλληλες αυξοτροφίες και NaNO_3 ως πηγή N, στους 37°C και pH 6,8. Η εμφανής υπεραισθησία του διπλά διαγεγραμμένου στελέχους και η σημαντική μειωμένη ευαισθησία του διπλά υπερεκφρασμένου

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών δείχνουν ότι οι AtrB και AtrD μεταφορείς αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα τη δ.ο., με μικρή προς μέτρια συγγένεια. Τα εύρημα αυτό βρίσκεται σε συνάφεια με αυτά της πρωτεομικής (§3.7.2.4) όπου η έκφραση των δύο μεταφορέων αρχικά υπολείπεται απουσία δ.ο., εν συνεχεία όμως φαίνεται να ενεργοποιούνται. Το γεγονός όμως ότι αφενός στο άγριο στέλεχος η έκφραση των μεταφορέων παρουσία δ.ο. υπολείπεται αυτής των μαρτύρων, αλλά και ότι τα μεν

διαγεγραμμένα στελέχη είναι σημαντικά υπερευαίσθητα, ενώ δεν παρατηρείται η αντίστοιχη ανθεκτικότητα στα υπερεκφρασμένα, πιθανότατα οφείλεται στον μηχανισμό δράσης του boscalid και του τρόπου λειτουργίας των ABC μεταφορέων. Συνοπτικά όπως ήδη αναφέρθηκε στην εισαγωγή, το boscalid παρεμποδίζοντας το σύμπλοκο II της αναπνευστικής αλυσίδας οδηγεί στη μείωση των παραγόμενων πρωτονίων και εν τέλει κατάρρευση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από όπου παράγεται ATP. Το ATP όμως αποτελεί το μόριο μέσω του οποίου οι ABC μεταφορείς βρίσκουν την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία τους.

Από τα αποτελέσματα της διατριβής μπορεί να εξαχθεί η υπόθεση ότι αν και το boscalid αναγνωρίζεται από τους δύο αυτούς μεταφορείς, φαίνεται πως με την κατάρρευση της αναπνευστικής αλυσίδας, δεν υπάρχουν διαθέσιμα τα απαραίτητα μόρια ATP που θα χρησιμοποιηθούν για τη δράση των μεταφορέων. Έτσι μπορεί να εξηγηθεί το γεγονός ότι η πολλαπλή ανθεκτικότητα έναντι του boscalid, οφείλεται στη δράση MFS κυρίως και δευτερευόντως ABC μεταφορέων (Leroux et al. 2010, Leroch et al. 2013, Hahn and Leroch 2015) εξαιτίας κυρίως της μη ύπαρξης της απαραίτητης συγκέντρωσης ATP. Τα παρόμοια αποτελέσματα της διαφοράς της έκφρασης μεταξύ των 3 και 6 ημερών και στους υπόλοιπους ABC μεταφορείς που ταυτοποιήθηκαν κατά την πρωτεομική (§3.7.2.4) υποστηρίζουν ακόμη περισσότερο τη προτεινόμενη θεωρία.

4 Συμπεράσματα - Προοπτικές

4.1 Σύνοψη αποτελεσμάτων

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε προσπάθεια με εφαρμογή προηγμένων τεχνικών μοριακής βιολογίας, πρωτεομικής και μεταβολομικής, να μελετηθούν οι μηχανισμοί που επηρεάζουν την είσοδο, αποτοξικοποίηση και απέκκριση μιας δ.ο., από τους βιοχημικούς μηχανισμούς του κυττάρου.

Αρχικά, με εφαρμογή γενετικής μηχανικής και μεταβολομικής ανακαλύφθηκε ότι το boscalid, που ανήκει στην ομάδα SDHI, προσλαμβάνεται από μεταφορείς νουκλεοβάσεων του *A. nidulans*, συμπληρωματικά της παθητικής διάχυσης του δια του κυτταρικού τοιχώματος. Η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τους αντίστοιχους μεταφορείς, βρέθηκε να συμβάλλει σημαντικά στη μειωμένη ευαισθησία του παθογόνου στο μυκητοκτόνο. Αντίστοιχα, υπερέκφραση του μεταφορέα UapC επανάφερε σε σημαντικό βαθμό την αρχική ευαισθησία, δείχνοντας το ρόλο που διαδραματίζει στην ενεργή προσρόφηση της υπό μελέτη δ.ο.. Η εφαρμογή της μεταβολικής επιβεβαίωσε τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις και τις επιπτώσεις των μεταφορέων που μελετήθηκαν στη μειωμένη ευαισθησία του *A. nidulans* στο boscalid, με βάση την επίδρασή της σε διάφορες βιοσυνθετικές οδούς και της διακύμανσης των μεταβολιτών που σχετίζονται με τη θέση-στόχο της δ.ο.. Παρατηρήθηκε βιοσυσσώρευση του ηλεκτρικού και μειωμένα επίπεδα φουμαρικού οξέος, που αποτελεί την αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο-στόχο. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα αμινοξέων στις επεμβάσεις σε σχέση με τους μάρτυρες.

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά και λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο των υπό μελέτη μεταφορέων ως πιθανών “transeptors” κατά την κονιδιακή εκβλάστηση, ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης του boscalid στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων του *A. nidulans*. Από τα αποτελέσματα μπορεί να υποστηριχθεί ότι, τουλάχιστον στην περίπτωση του *A. nidulans*, το εξωκυτταρικό νερό απορροφάται ταχέως μέσω των ακουαπορινών, υδρολύοντας την ενδοκυτταρική τρεχαλόζη κατά τη διάρκεια των πρώτων ωρών της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων, σηματοδοτώντας το σπάσιμο του λήθαργου. Ακολουθεί ταχεία βιοσύνθεση γλυκερόλης και μαννιτόλης, προκαλώντας σημαντικές ωσμωτικές αλλαγές κατά τα αρχικά στάδια της εκβλάστησης. Για την εξισορρόπηση των ωσμωτικών αλλαγών, πραγματοποιείται ταχεία είσοδος του νερού στο

κονιδιοσπόριο έχοντας ως αποτέλεσμα τη διόγκωση και διπλασιασμό του μεγέθους του κατά τη διάρκεια της ιστροπικής φάσης. Είναι ενδιαφέρον ότι, κατά την ίδια περίοδο, πραγματοποιείται *de novo* βιοσύνθεση μεταφορέων που μεταφέρουν θρεπτικές ουσίες προκειμένου το κονιδιοσπόριο να “δισθανθεί” το περιβάλλον ανάπτυξης και να βιοσυνθέσει τα ανάλογα μεταβολικά σήματα για την περαιτέρω εκβλάστηση και κατασκευή της μυκηλιακής υφής. Καθώς τα κονιδιοσπόρια εισέρχονται στη φάση καθορισμού της πολικότητάς τους (PE) και του σχηματισμού της υφής εκβλάστησης, συσσωρεύονται προϊόντα του κύκλου του Krebs και αμινοξέα, πιθανότατα για τροφοδοσία με μεταβολίτες, που θα υποστηρίξουν τις εκθετικά αυξανόμενες βιοσυνθετικές και ενεργειακές απαιτήσεις της μυκηλιακής ανάπτυξης. Φαίνεται έτσι πως ο βασικός ρόλος της υδρόλυσης της τρεχαλόζης και της συσσώρευσης γλυκερόλης στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων, αποτελούν νέους πολλά υποσχόμενους βιοχημικούς στόχους για την ανακάλυψη νέας γενιάς καινοτόμων αντιμυκητιακών δ.ο..

Ακολούθησε η μελέτη της επίπτωσης του boscalid στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων μεταξύ του στελέχους Δ7 που δεν εισάγει σε ικανοποιητικό βαθμό τη δ.ο. και αυτού που υπερεκφράζει τον μεταφορέα UapC που την αναγνωρίζει. Προκειμένου να καθοριστεί ο ακριβής χρόνος της προσθήκης boscalid στο αιώρημα των κονιδιοσπορίων, ελήφθη υπόψη ότι στις 4-5 ώρες παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα του μεταβολισμού των κονιδιοσπορίων. Στο ίδιο χρονικό διάστημα το γονίδιο *uapC* είναι γνωστό πως μεταγράφεται σε μέγιστο βαθμό και εκφράζεται ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές και φυσιολογικές συνθήκες. Το στάδιο αυτό συμπίπτει με το μορφολογικό στάδιο μετά την εγκατάσταση πολικότητας και λίγο πριν την εμφάνιση της υφής εκβλάστησης. Προστέθηκε boscalid 4 ώρες μετά την επώαση των κονιδιοσπορίων και η δειγματοληψία για την εκτέλεση των μεταβολομικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε 5 ώρες μετά την επέμβαση (συνολική επώαση 9 ωρών). Η μεταβολομική έδειξε παρόμοια επίδραση της δ.ο. στο μεταβόλομα των κονιδιοσπορίων σε σχέση με τις μυκηλιακές υφές.

Τα αποτελέσματα των προηγούμενων μεταβολομικών μελετών έδειξαν ότι πιθανότητα υπάρχει ένα κοινό μοτίβο της επίδρασης του boscalid στη φυσιολογία του *A. nidulans*. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η επίδραση των SDHIs στην φυσιολογία του μύκητα, διεξήχθη πείραμα μεταβολομικής και πρωτεομικής. Επιπλέον με δεδομένο ότι τα έως τώρα χρησιμοποιημένα στελέχη χαρακτηρίζονται από τη μετάλλαξη *veA1* και του ρόλου

του *veA* γονιδίου στη φυσιολογία των μυκήτων (§3.7), αποφασίστηκε να μελετηθεί η επίδραση του boscalid στο αλληλουχημένο αγρίου τύπου FGSC A4 στέλεχος

Γνωρίζοντας ότι στόχος των SDHIs, είναι η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος, μέσω της οποίας το ηλεκτρικό μετατρέπεται σε φουμαρικό οξύ, ιδιαίτερης σημασίας είναι η μελέτη των επιπέδων των δύο μεταβολιτών και του ενζύμου. Για ακόμη μια φορά από τα αποτελέσματα της μεταβολομικής παρατηρήθηκε συσσώρευση ηλεκτρικού και μειωμένα επίπεδα φουμαρικού οξέος παρουσία υποθανάσιμων συγκεντρώσεων δ.ο., ενώ αντίστοιχα η πρωτεομική φανέρωσε αυξημένα επίπεδα τριών εκ των τεσσάρων υπομονάδων του ενζύμου (SDHA,SDHB, SDHC). Βάσει των μοντέλων έδρασης των SDHIs στο ένζυμο, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι εξαιτίας της έδρασης των μορίων του boscalid στο θύλακα της ουβικινόνης, γίνεται μια προσπάθεια από τον μύκητα να υπερπαραράξει το ένζυμο ώστε να ανταπεξέλθει της τοξικής επίδρασης. Παρόλα αυτά η υπερπαραγωγή αυτή δεν είναι αρκετή για την απρόσκοπτη κάλυψη των αναγκών του μύκητα, και έτσι εξηγείται τόσο η βιοσυσσώρευση του ηλεκτρικού οξέος, όσο και η τοξικότητα που παρατηρήθηκε κατά τις βιοδοκιμές.

Ακόμη ένα σημαντικό εύρημα είναι η συσσώρευση στεριγοματοκουστίνης παρουσία SDHIs, καθώς δείχνει ότι θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή αυξημένης βιοσύνθεσης και απέκκρισης μυκοτοξινών έπειτα από εφαρμογή με SDHIs αλλά και για να αποφευχθεί η επικράτηση τυχόν ανθεκτικών στελεχών. Ήδη αναφέρονται περιπτώσεις που η βιοσύνθεση μυκοτοξινών αυξάνει εξαιτίας της εφαρμογής μυκητοκτόνων, καθώς και η επικράτηση ανθεκτικών στελεχών με αυξημένη μυκοτοξικογόνο ικανότητα (§1.6.4.2).

Επιπλέον ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων του πειράματος αξιολόγησης της ευαισθησίας του αγρίου στελέχους FGSC A4 στους SDHIs (§3.7.1), της μεταβολομικής (§3.7.1.3) και της πρωτεομικής (§3.7.2.3) φανέρωσε τη λειτουργία πιθανών μηχανισμών αποτοξικοποίησης της δ.ο. από τον μύκητα. Παρουσία boscalid με εφαρμογή μεταβολομικής παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων αμινοξέων όπως η γλυκίνη, η γλουταμίνη και η ορνιθίνη που δρουν ως συνθετικά της δεύτερης φάσης της αποτοξικοποίησης, και της μεθειονίνης που αποτελεί πρόδρομο μόριο σημαντικών μορίων με αποτοξικοποιητική δράση. Αντίστοιχα μέσω της πρωτεομικής βρέθηκε μια υπερέκφραση των ενζύμων που μετέχουν στη δεύτερη φάση της αποτοξικοποίησης,

όπως glutathione S-transferases, N-acetyltransferases, O-methyltransferases και aminotransferases. Βάσει των αποτελεσμάτων της διατριβής μπορεί να υποστηριχθεί ότι παρουσία boscalid μια σειρά ενζύμων που μετέχουν στη δεύτερη φάση της αποτοξικοποίησης εκφράζονται ώστε να αντιμετωπιστεί η τοξική επίδραση της δ.ο..

Επιπλέον κατά κανόνα παρατηρήθηκε στις 3 ημέρες μια αυξημένη έκφραση πρωτεϊνικών μεταφορέων με ρόλο στην τρίτη φάση της αποτοξικοποίησης, και μια ακόλουθη μείωσή της στις 6 ημέρες. Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με την έκφραση των ενζύμων αποτοξικοποίησης και της δράσης του boscalid, υποδεικνύει πως εκφράζεται σειρά μεταφορέων, ώστε να απεκκριθεί η δ.ο. και τα προϊόντα της αποτοξικοποίησής της. Σημαντική διαφοροποίηση είναι η εικόνα της έκφρασης των AtrB και AtrD μεταφορέων, στους οποίους φαίνεται ότι προάγεται η έκφρασή τους στις 6 ημέρες. Πρόκειται για δύο ABC μεταφορείς με γνωστή δράση στην απέκκριση τοξικών ουσιών και φαρμάκων, καθώς ο μεταφορέας AtrB αποτελεί έναν από τους πλέον καλά μελετημένους απεκκριτικούς μεταφορείς με σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα διαφορετικών χημικών ομάδων και ο AtrD φαίνεται να παίζει ρόλο στην απέκκριση της στεριγματοκυστίνης.

Για να μελετηθεί τυχόν συσχέτιση της δράσης των δύο αυτών μεταφορέων με την ευαισθησία στο boscalid, με εφαρμογή μοριακών τεχνικών κατασκευάστηκαν στελέχη με διαγεγραμμένα και υπερεκφρασμένα τα αντίστοιχα γονίδια. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών αλλά και της πρωτεομικής δείχνουν ότι η έκφραση των δύο μεταφορέων ενεργοποιείται σημαντικά μετά τις 3 ημέρες ανάπτυξης παρουσία δ.ο.. Το γεγονός όμως ότι αφενός στο άγριο στέλεχος η έκφραση των μεταφορέων παρουσία δ.ο. υπολείπεται αυτής των μαρτύρων, αλλά και ότι τα μεν διαγεγραμμένα στελέχη είναι σημαντικά υπερευαίσθητα, ενώ δεν παρατηρείται η αντίστοιχη ανθεκτικότητα στα υπερεκφρασμένα, πιθανότατα οφείλεται στον μηχανισμό δράσης του boscalid και του τρόπου λειτουργίας των ABC μεταφορέων. Συνοπτικά το boscalid παρεμποδίζοντας το σύμπλοκο II της αναπνευστικής αλυσίδας οδηγεί στη μείωση των παραγόμενων πρωτονίων και εν τέλει κατάρρευση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από όπου παράγεται ATP. Το ATP όμως αποτελεί το μόριο μέσω του οποίου οι ABC μεταφορείς βρίσκουν την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία τους. Όντως τα αποτελέσματα της διατριβής δείχνουν ότι αν και το boscalid αναγνωρίζεται από τους δύο αυτούς μεταφορείς, δεν υπάρχουν διαθέσιμα τα

απαραίτητα μόρια ATP που θα χρησιμοποιηθούν για τη δράση των μεταφορέων. Φαίνεται ότι ο λόγος που η πολλαπλή ανθεκτικότητα έναντι του boscalid, οφείλεται στη δράση MFS κυρίως και δευτερευόντως ABC μεταφορέων (Leroux et al. 2010, Leroch et al. 2013, Hahn and Leroch 2015) είναι πιθανότατα η μη ύπαρξη της απαραίτητης συγκέντρωσης ATP.

4.2 Σημασία αποτελεσμάτων και μελλοντικές προοπτικές

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί την πρώτη προσπάθεια ολοκληρωμένης μελέτης των μηχανισμών που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα μιας αντιμυκητιακής ένωσης, με τη συνδυαστική εφαρμογή τεχνικών πολλαπλών ομικών επιπέδων.

Για πρώτη φορά ανακαλύφθηκαν διαμεμβρανικοί μεταφορείς που ελέγχουν, συμπληρωματικά προς την παθητική διάχυση, την ενεργή προσρόφηση μυκητοκτόνων εντός των κυττάρων των φυτοπαθογόνων. Το εύρημα αυτό μπορεί να αποτελεί τη βάση ώστε στο μέλλον να αναγνωριστούν διαφορετικοί μεταφορείς με πιθανό ρόλο στην ενεργητική προσρόφηση των μυκητοκτόνων. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι η μελέτη του μηχανισμού αλληλεπίδρασης και “αναγνώρισης” μεταφορέων – δ.ο., ώστε να κατασκευαστούν καινοτόμες αντιμυκητιακές ενώσεις. Αυτές μπορούν είτε να αποτελούν υποστρώματα μεταφορέων που απαντώνται αποκλειστικά σε μύκητες και βακτήρια (ιδανικά μόνο σε παθογόνα), είτε να αναγνωρίζουν μεταφορείς ως υποκυτταρικό στόχο και να αναστέλλουν τη δράση τους. Μέσω αυτής της εξειδίκευσης, στόχο αποτελεί η ανακάλυψη και ανάπτυξη ασφαλέστερων και πιο αποτελεσματικών Φ.Π.

Η μελέτη της επίδρασης υποθανάσιμης δόσης του boscalid στον μεταβολισμό του *A. nidulans*, με συνδυαστική εφαρμογή GC/EI/MS μεταβολομικής και LC/Orbitrap MS πρωτεομικής αποδείχθηκε μια ισχυρή μέθοδος για την αποκάλυψη των επιπτώσεων της τοξικότητας των μυκητοκτόνων στον μεταβολισμό των μυκήτων, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για τους υπό εξέταση βιοχημικούς μηχανισμούς και την αντίστοιχη διαταραχή του μεταβολισμού των μυκήτων. Παρότι παρατηρήθηκε συσσώρευση των τριών εκ των τεσσάρων υπομονάδων της αφυδρογονάσης, τα αυξημένα επίπεδα ηλεκτρικού με τα χαμηλότερα φουμαρικού, δείχνουν μια προσπάθεια αντιμετώπισης της τοξικής επίδρασης της δ.ο., μέσω της υπερπαραγωγής του ενζύμου, δίχως όμως αυτή να

είναι επαρκής. Επιπλέον παρουσία boscalid παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα μεταβολιτών και ενζύμων με ρόλο κατά τη δεύτερη φάση της αποτοξικοποίησης τοξικών ουσιών καθώς και ABC κυρίως μεταφορέων που απεκκρίνουν αποτοξικοποιημένα παράγωγα κατά την τρίτη και τελευταία φάση της αποτοξικοποίησης. Η λειτουργία τέτοιων συστημάτων αποτοξικοποίησης μπορεί να αποτελεί στόχο καινοτόμων δ.ο.. Από τους απεκκριτικούς μεταφορείς που βρέθηκε να αυξάνει η έκφρασή τους παρουσία δ.ο., ιδιαίτερης σημασίας είναι οι AtrB και AtrD. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αν και αναγνωρίζουν τη δ.ο. ως υπόστρωμα, στα μεταλλαγμένα στελέχη δεν εμφανίζονται τα αναμενόμενα επίπεδα ανθεκτικότητας. Πιθανότητα αυτό οφείλεται βιοχημικό μηχανισμό του μυκητοκτόνου. Παρόλα αυτά η έκφραση άλλων μεταφορέων κατά την επίδραση της δ.ο., καθώς και το γεγονός ότι αρκετοί εξ' αυτών είναι μη χαρακτηρισμένοι, καθιστά επιτακτικό τόσο τον χαρακτηρισμό τους, όσο και την περαιτέρω μελέτη της επίδρασής τους στην ευαισθησία των παθογόνων έναντι των αντιμυκητιακών ενώσεων.

Η ανακάλυψη μεταφορέων που συμμετέχουν στην ενεργή προσρόφηση αντιμυκητιακών ενώσεων, αλλά και απεκκριτικών μεταφορέων είτε μη επαρκώς μελετημένων, είτε ακόμη και μη χαρακτηρισμένων, καθιστά πολύ πιθανή την ανακάλυψη νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας. Αυτοί οι νέοι μηχανισμοί που σχετίζονται με τη δράση μη μελετημένων έως τώρα μεταφορέων, μπορεί να εξηγήσουν περιπτώσεις απομονώσεων ανθεκτικών παθογόνων, στα οποία ο μηχανισμός ανθεκτικότητας παραμένει άγνωστος.

Με βάση τα αποτελέσματα της εφαρμογής μη-στοχευμένης μεταβολομικής ανάλυσης για τη μελέτη φυσιολογίας της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων του μύκητα, επιβεβαιώθηκε η δυνατότητά της ως εργαλείο με πολλά υποσχόμενες εφαρμογές στην έρευνα και την ανακάλυψη καινοτόμων Φ.Π.. Η ανάπτυξη ισχυρών βιοδραστικών ουσιών που επηρεάζουν τον ενδοκυτταρικό μεταβολισμό της τρεχαλόζης, έχει σαφώς τη δυνατότητα να αποδώσει αποτελεσματικά καινούρια Φ.Π.. Φαίνεται έτσι πως ο βασικός ρόλος της υδρόλυσης της τρεχαλόζης και της συσσώρευσης γλυκερόλης στην εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων, αποτελούν νέους πολλά υποσχόμενους βιοχημικούς στόχους για την ανακάλυψη νέας γενιάς καινοτόμων αντιμυκητιακών δ.ο..

Τέλος τα αποτελέσματα των πρωτεομικών και μεταβολομικών αναλύσεων, της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αποτελούν την πρώτη ύλη για την κατασκευή και

ολοκλήρωση του μεταβολικού δικτύου του *A. nidulans*, από την ομάδα Pesticide Metabolomics Group (PMG) του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α. Στόχος είναι τόσο το δίκτυο αλλά και η βιβλιοθήκη των μεταβολιτών να εμπλουτίζονται και να ανανεώνονται διαρκώς και να είναι ελεύθερης πρόσβασης στην επιστημονική κοινότητα.

Τα πρωτόκολλα και οι μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για αντίστοιχες μελέτες σχετικές με τη μελέτη των μηχανισμών που ελέγχουν την αποτελεσματικότητα των Φ.Π., με χρήση καινοτόμων “ομικών” τεχνικών, έχοντας ως τελικό στόχο την ανακάλυψη νέων πηγών δραστηριότητας που μπορούν να αξιοποιηθούν από τη φαρμακευτική βιομηχανία για την ανάπτυξη νέας γενιάς Φ.Π.

5 Βιβλιογραφία

- Abarca, M. L., M. R. Bragulat, G. Castellá, and F. J. Cabañes. 1994. "Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*." *Applied and environmental microbiology* 60 (7):2650-2652. doi: <http://doi.org/10.1128/AEM.60.7.2650-2652.1994>.
- Abuznait, Alaa H., and Amal Kaddoumi. 2012. "Role of ABC Transporters in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease." *ACS Chemical Neuroscience* 3 (11):820-831. doi: <https://doi.org/10.1021/cn300077c>.
- Ackrell, Brian AC, Edna B Kearney, CJ Coles, Thomas P Singer, Helmut Beinert, Yieh-Ping Wan, and Karl Folkers. 1977. "Kinetics of the reoxidation of succinate dehydrogenase." *Archives of biochemistry and biophysics* 182 (1):107-117.
- Adams, Thomas H., Jenny K. Wieser, and Jae-Hyuk Yu. 1998. "Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (1):35-54. doi: <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.35-54.1998>.
- Adebo, O. A., P. B. Njobeh, S. Gbashi, O. C. Nwinyi, and V. Mavumengwana. 2017. "Review on microbial degradation of aflatoxins." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57 (15):3208-3217. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1106440>.
- Afendi, Farit M., Naoaki Ono, Yukiko Nakamura, Kensuke Nakamura, Latifah K. Darusman, Nelson Kibinge, Aki Hirai Morita, Ken Tanaka, Hisayuki Horai, Md Altaf-Ul-Amin, and Shigehiko Kanaya. 2013. "DATA MINING METHODS FOR OMICS AND KNOWLEDGE OF CRUDE MEDICINAL PLANTS TOWARD BIG DATA BIOLOGY." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 4 (5):e201301010. doi: <https://doi.org/10.5936/csbj.201301010>.
- Agnolet, Sara, Jerzy W Jaroszewski, Robert Verpoorte, and Dan Staerk. 2010. "¹H NMR-based metabolomics combined with HPLC-PDA-MS-SPE-NMR for investigation of standardized *Ginkgo biloba* preparations." *Metabolomics* 6 (2):292-302. doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0195-x>.
- Akram, Muhammad. 2014. "Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism." *Cell Biochemistry and Biophysics* 68 (3):475-478. doi: <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9750-1>.
- Aksenov, Alexander A., Ricardo da Silva, Rob Knight, Norberto P. Lopes, and Pieter C. Dorrestein. 2017. "Global chemical analysis of biology by mass spectrometry." *Nature Reviews Chemistry* 1:0054. doi: <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0054>.
- Albury, Mary S, Penelope Dudley, Felicity Z Watts, and Anthony L Moore. 1996. "Targeting the plant alternative oxidase protein to *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria confers cyanide-insensitive respiration." *Journal of Biological Chemistry* 271 (29):17062-17066. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17062>.

- Aldridge, Bree B, and Kyu Y Rhee. 2014. "Microbial metabolomics: innovation, application, insight." *Current Opinion in Microbiology* 19:90-96. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.009>.
- Alguel, Yilmaz, Sotiris Amillis, James Leung, George Lambrinidis, Stefano Capaldi, Nicola J. Scull, Gregory Craven, So Iwata, Alan Armstrong, Emmanuel Mikros, George Diallinas, Alexander D. Cameron, and Bernadette Byrne. 2016. "Structure of eukaryotic purine/H⁺ symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity." *Nat Commun* 7. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11336>.
- Ali, Amira A. H., Gayaneh Avanes Avakian, and Charlotte von Gall. 2020. "The Role of Purinergic Receptors in the Circadian System." *International journal of molecular sciences* 21 (10):3423. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21103423>.
- Aliferis, K. A., and S. Jabaji. 2010a. "¹H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia." *Metabolomics* 6 (1):96-108. doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0180-4>.
- Aliferis, KA, and S Jabaji. 2010b. "¹H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia." *Metabolomics* 6 (1):96-108. doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0180-4>.
- Aliferis, Konstantinos A, and Maria Chrysayi-Tokousbalides. 2011. "Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives." *Metabolomics* 7 (1):35-53.
- Aliferis, Konstantinos A, and Suha Jabaji. 2011. "Metabolomics—A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100 (2):105-117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.03.004>.
- Aliferis, Konstantinos A. 2020. "Chapter 6 - Metabolomics in plant protection product research and development: discovering the mode(s)-of-action and mechanisms of toxicity." In *Environmental Metabolomics*, edited by Diana Álvarez-Muñoz and Marinella Farré, 163-194. Elsevier.
- Aliferis, Konstantinos A., and David Bernard-Perron. 2020. "Cannabinomics: Application of Metabolomics in Cannabis (*Cannabis sativa* L.) Research and Development." *Frontiers in plant science* 11:554-554. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00554>.
- Aliferis, Konstantinos A., Marc A. Cubeta, and Suha Jabaji. 2013a. "Chemotaxonomy of fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex performing GC/MS metabolite profiling." *Metabolomics* 9 (1):159-169. doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0340-1>.

- Aliferis, Konstantinos A., Denis Faubert, and Suha Jabaji. 2014. "A Metabolic Profiling Strategy for the Dissection of Plant Defense against Fungal Pathogens." *PLoS ONE* 9 (11):e111930. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111930>.
- Aliferis, Konstantinos A., and Suha Jabaji. 2012. "FT-ICR/MS and GC-EI/MS Metabolomics Networking Unravels Global Potato Sprout's Responses to *Rhizoctonia solani* Infection." *PLoS ONE* 7 (8):e42576. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042576>.
- Aliferis, Konstantinos A., Marc A. Cubeta, and Suha Jabaji. 2013b. "Chemotaxonomy of fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex performing GC/MS metabolite profiling." *Metabolomics* 9 (1):159-169. doi: [10.1007/s11306-011-0340-1](https://doi.org/10.1007/s11306-011-0340-1).
- Alonso, V. A., C. M. Pereyra, L. A. Keller, A. M. Dalcero, C. A. Rosa, S. M. Chiacchiera, and L. R. Cavaglieri. 2013. "Fungi and mycotoxins in silage: an overview." *J Appl Microbiol* 115 (3):637-43. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12178>.
- Alshannaq, Ahmad, and Jae-Hyuk Yu. 2017. "Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food." *International journal of environmental research and public health* 14 (6):632-652. doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>.
- Amaike, Saori, and Nancy P. Keller. 2011. "*Aspergillus flavus*." *Annual Review of Phytopathology* 49 (1):107-133. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221>.
- Amarsaikhan, Nansalmaa, Daniela Albrecht-Eckardt, Christoph Sasse, Gerhard H. Braus, Zumrut B. Ogel, and Olaf Kniemeyer. 2017. "Proteomic profiling of the antifungal drug response of *Aspergillus fumigatus* to voriconazole." *International Journal of Medical Microbiology* 307 (7):398-408. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.011>.
- Amillis, S., Z. Hamari, K. Roumelioti, C. Scazzocchio, and G. Diallinas. 2007. "Regulation of expression and kinetic modeling of substrate interactions of a uracil transporter in *Aspergillus nidulans*." *Mol Membr Biol* 24 (3):206-14. doi: <http://doi.org/10.1080/09687860601070806>.
- Amillis, Sotiris, Gianna Cecchetto, Vicky Sophianopoulou, Marina Koukaki, Claudio Scazzocchio, and George Diallinas. 2004. "Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia." *Molecular Microbiology* 52 (1):205-216. doi: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03956.x>.
- Amnuaykanjanasin, Alongkorn, and Margaret E. Daub. 2009. "The ABC transporter ATR1 is necessary for efflux of the toxin cercosporin in the fungus *Cercospora nicotianae*." *Fungal Genetics and Biology* 46 (2):146-158. doi: <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.11.007>.

- Andersen, Mikael R, Margarita P Salazar, Peter J Schaap, Peter JI Van De Vondervoort, David Culley, Jette Thykaer, Jens C Frisvad, Kristian F Nielsen, Richard Albang, and Kaj Albermann. 2011. "Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88." *Genome research* 21 (6):885-897. doi: <https://doi.org/10.1101/gr.112169.110>.
- Andersen, Mikael Rørdam, Michael Lyng Nielsen, and Jens Nielsen. 2008. "Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*." *Molecular Systems Biology* 4 (1):178. doi: <https://doi.org/10.1038/msb.2008.12>.
- Anderson, DC, and Krishna Kodukula. 2014. "Biomarkers in pharmacology and drug discovery." *Biochemical Pharmacology* 87 (1):172-188. doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.bcp.2013.08.026>.
- Andrade, A. C., J. G. M. Van Nistelrooy, R. B. Peery, P. L. Skatrud, and M. A. De Waard. 2000. "The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production." *Molecular and General Genetics MGG* 263 (6):966-977. doi: <https://doi.org/10.1007/PL00008697>.
- Andrade, Alan C., Giovanni Del Sorbo, Johannes G. M. Van Nistelrooy, and Maarten A. De Waard. 2000. "The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds." *Microbiology* 146 (8):1987-1997. doi: <http://doi.org/10.1099/00221287-146-8-1987>.
- Andrade, Alan Carvalho. 2000. "ABC transporters and multidrug resistance in *Aspergillus nidulans*." PhD PhD, Hoogleraar in de Fytopathologie, Wageningen Universiteit (63879).
- Araníbar, Nelly, Bijay K Singh, Gerald W Stockton, and Karl-Heinz Ott. 2001. "Automated mode-of-action detection by metabolic profiling." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286 (1):150-155. doi: <https://doi.org/doi:10.1006/bbrc.2001.5350>.
- Armitage, Emily G, and Coral Barbas. 2014. "Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 87:1-11. doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jpba.2013.08.041>.
- Arst Jr, HN. 1981. "Aspects of the control of the gene expression in fungi." *Genetics as a tool in Microbiology*:131-160.
- Atteia, Ariane, Robert van Lis, Jaap J. van Hellemond, Aloysius G. M. Tielens, William Martin, and Katrin Henze. 2004. "Identification of prokaryotic homologues indicates an endosymbiotic origin for the alternative oxidases of mitochondria (AOX) and chloroplasts (PTOX)." *Gene* 330:143-148. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.01.015>.

- Au, Harry C., Deena Ream-Robinson, Liz Anne Bellew, P. L. Elaine Broomfield, Michael Saghbini, and Immo E. Scheffler. 1995. "Structural organization of the gene encoding the human iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase." *Gene* 159 (2):249-253. doi: [http://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00162-Y](http://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00162-Y).
- Avenot, Herve F, and Themis J Michailides. 2007. "Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California." *Plant Disease* 91 (10):1345-1350. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1345>.
- Avenot, Hervé F, Anna Thomas, Ronald D Gitaitis, David B Langston Jr, and Katherine L Stevenson. 2012. "Molecular characterization of boscalid-and penthiopyrad-resistant isolates of *Didymella bryoniae* and assessment of their sensitivity to fluopyram." *Pest management science* 68 (4):645-651. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.2311>.
- Avenot, Hervé F., and Themis J. Michailides. 2010. "Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi." *Crop Protection* 29 (7):643-651. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.019>.
- Avila-Adame, Cruz, and Wolfram Köller. 2003. "Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *Magnaporthe grisea* to Qo-inhibiting fungicides." *Pest Management Science* 59 (3):303-309. doi: <http://doi.org/10.1002/ps.638>.
- Badii, F, and MO Moss. 1988. "The effect of the fungicides tridemorph, fenpropimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare." *Letters in Applied Microbiology* 7 (2):37-39. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1988.tb01247.x>.
- Balaska, Sofia, Vassilios Myrianthopoulos, Martha Tselika, Dimitris G. Hatzinikolaou, Emmanuel Mikros, and George Diallinas. 2017. "NmeA, a novel efflux transporter specific for nucleobases and nucleosides, contributes to metal resistance in *Aspergillus nidulans*." *Molecular Microbiology*. doi: <http://doi.org/10.1111/mmi.13708>.
- Balsa, Eduardo, Ricardo Marco, Ester Perales-Clemente, Radek Szklarczyk, Enrique Calvo, Manuel O Landázuri, and José Antonio Enríquez. 2012. "NDUFA4 Is a Subunit of Complex IV of the Mammalian Electron Transport Chain." *Cell Metabolism* 16 (3):378-386. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.015>.
- Baltussen, Tim J. H., Jordy P. M. Coolen, Jan Zoll, Paul E. Verweij, and Willem J. G. Melchers. 2018. "Gene co-expression analysis identifies gene clusters associated with isotropic and polarized growth in *Aspergillus fumigatus* conidia." *Fungal Genetics and Biology* 116:62-72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.04.013>.

- Bardella, Chiara, Patrick J. Pollard, and Ian Tomlinson. 2011. "SDH mutations in cancer." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807 (11):1432-1443. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.07.003>.
- Barupal, Dinesh Kumar, Sili Fan, and Oliver Fiehn. 2018. "Integrating bioinformatics approaches for a comprehensive interpretation of metabolomics datasets." *Current Opinion in Biotechnology* 54:1-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.010>.
- Bayman, P, and PJ Cotty. 1990. "Triadimenol stimulates aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in vitro." *Mycological Research* 94 (8):1023-1025. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81327-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81327-0).
- Bayram, Ö., and G. H. Braus. 2012. "Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins." *FEMS Microbiol Rev* 36. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x>.
- Bayram, O., S. Krappmann, M. Ni, J. W. Bok, K. Helmstaedt, O. Valerius, S. Braus-Stromeyer, N. J. Kwon, N. P. Keller, and J. H. Yu. 2008. "VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism." *Science* 320. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1155888>.
- Bayram, Özgür, Gerhard H. Braus, Reinhard Fischer, and Julio Rodriguez-Romero. 2010. "Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems." *Fungal Genetics and Biology* 47 (11):900-908. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.008>.
- Bayram, Özgür, Kirstin Feussner, Marc Dumkow, Cornelia Herrfurth, Ivo Feussner, and Gerhard H Braus. 2016. "Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during light-dependent *Aspergillus nidulans* development." *Fungal Genetics and Biology* 87:30-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.01.004>.
- Bennett, and Klich. 2003. "Mycotoxins." *Clinical Microbiology Reviews* 16 (3):497-516. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>.
- Bennett, Joan W. 2007. "An overview of the genus *Aspergillus*." In *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, edited by Gustavo H. Goldman and Stephen A. Osmani, 23-34. Caiser Academic Press, Portland.
- Bennett, JW, S Kale, and Juijiang Yu. 2007. "Aflatoxins: background, toxicology, and molecular biology." In *Foodborne diseases*, 355-373. Springer.
- Berg, JM, JL Tymoczko, L Stryer, and GJ Gatto. 2012. *Biochemistry*. New York: WH Freeman and Company.
- Bergmann, S., J. Schümann, K. Scherlach, C. Lange, A. A. Brakhage, and C. Hertweck. 2007. "Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from

- Aspergillus nidulans*." *Nat Chem Biol* 3 (4):213-217. doi: <https://doi.org/10.1038/nchembio869>.
- Bergmann, Sebastian, Alexander N. Funk, Kirstin Scherlach, Volker Schroeckh, Ekaterina Shelest, Uwe Horn, Christian Hertweck, and Axel A. Brakhage. 2010. "Activation of a Silent Fungal Polyketide Biosynthesis Pathway through Regulatory Cross Talk with a Cryptic Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Cluster." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (24):8143-8149. doi: <https://doi.org/10.1128/aem.00683-10>.
- Berthold, Deborah A., Martin E. Andersson, and Pär Nordlund. 2000. "New insight into the structure and function of the alternative oxidase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1460 (2):241-254. doi: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00149-3).
- Beyoğlu, Diren, and Jeffrey R. Idle. 2013. "Metabolomics and its potential in drug development." *Biochemical Pharmacology* 85 (1):12-20. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.013>.
- Bhatia, Anil, Santosh K. Bharti, Shri K. Tewari, Om P. Sidhu, and Raja Roy. 2013. "Metabolic profiling for studying chemotype variations in *Withania somnifera* (L.) Dunal fruits using GC-MS and NMR spectroscopy." *Phytochemistry* 93 (0):105-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.03.013>.
- Biais, Benoit, J William Allwood, Catherine Deborde, Yun Xu, Mickael Maucourt, Bertrand Beauvoit, Warwick B Dunn, Daniel Jacob, Royston Goodacre, and Dominique Rolin. 2009. "¹H NMR, GC- EI-TOFMS, and Data Set Correlation for Fruit Metabolomics: Application to Spatial Metabolite Analysis in Melon." *Analytical Chemistry* 81 (8):2884-2894. doi: <https://doi.org/10.1021/ac9001996>.
- Billard, A. , S. Fillinger, P. Leroux, J. Bach, C. Lanen, H. Lachaise, R. Beffa, and D. Debieu. 2011. "Fenhexamid Resistance in the *Botrytis* Species Complex, Responsible for Grey Mould Disease." In *Fungicides - Beneficial and Harmful Aspects*, edited by Nooruddin Thajuddin. InTech.
- Bingol, Kerem, and Rafael Brüscheweiler. 2017. "Knowns and unknowns in metabolomics identified by multidimensional NMR and hybrid MS/NMR methods." *Current Opinion in Biotechnology* 43 (Supplement C):17-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.07.006>.
- Blaženović, Ivana, Tobias Kind, Jian Ji, and Oliver Fiehn. 2018. "Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics." *Metabolites* 8 (2):31. doi: <http://doi.org/10.3390/metabo8020031>.
- Bleichrodt, R., A. Vinck, P. Krijgsheld, M. R. van Leeuwen, J. Dijksterhuis, and H. A. B. Wösten. 2013. "Cytosolic streaming in vegetative mycelium and aerial structures of *Aspergillus niger*." *Studies in Mycology* 74:31-46. doi: <https://doi.org/10.3114/sim0007>.

- Blomberg, Anders, and Lennart Adler. 1992. "Physiology of osmotolerance in fungi." In *Advances in microbial physiology*, edited by A.H. Rose, 145-212. Elsevier.
- Bloszies, Clayton S., and Oliver Fiehn. 2018. "Using untargeted metabolomics for detecting exposome compounds." *Current Opinion in Toxicology* 8:87-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.03.002>.
- Boiteau, Rene M., David W. Hoyt, Carrie D. Nicora, Hannah A. Kinmonth-Schultz, Joy K. Ward, and Kerem Bingol. 2018. "Structure Elucidation of Unknown Metabolites in Metabolomics by Combined NMR and MS/MS Prediction." *Metabolites* 8 (1):8. doi: <http://doi.org/10.3390/metabo8010008>.
- Bok, Jin Woo, Dirk Hoffmeister, Lori A. Maggio-Hall, Renato Murillo, Jeremy D. Glasner, and Nancy P. Keller. 2006. "Genomic Mining for *Aspergillus* Natural Products." *Chemistry & Biology* 13 (1):31-37. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.10.008>.
- Bongomin, Felix, Sara Gago, Rita O. Oladele, and David W. Denning. 2017. "Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision." *Journal of Fungi* 3 (4):221-231. doi: <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.
- Boroczky, Katalin, Hartmut Laatsch, Irene Wagner-Dobler, Katja Stritzke, and Stefan Schulz. 2006. "Cluster analysis as selection and dereplication tool for the identification of new natural compounds from large sample sets." *Chem Biodiversity* 3:622-634. doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200690065>.
- Borst, P, and R. Oude Elferink. 2002. "Mammalian ABC Transporters in Health and Disease." *Annual Review of Biochemistry* 71 (1):537-592. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055>.
- Bougouffa, Salim, Aleksandar Radovanovic, Magbubah Essack, and Vladimir B. Bajic. 2014. "DEOP: a database on osmoprotectants and associated pathways." *Database* 2014. doi: <https://doi.org/10.1093/database/bau100>.
- Bouhifd, Mounir, Thomas Hartung, Helena T Hogberg, Andre Kleensang, and Liang Zhao. 2013. "Review: toxicometabolomics." *Journal of Applied Toxicology* 33 (12):1365-1383. doi: <https://doi.org/10.1002/jat.2874>.
- Bouige, P., D. Laurent, L. Piloyan, and E. Dassa. 2002. "Phylogenetic and functional classification of ATP-binding cassette (ABC) systems." *Curr Protein Pept Sci* 3. doi: <http://doi.org/10.2174/1389203023380486>.
- Brakhage, Axel A. 2005. "Systemic Fungal Infections Caused by *Aspergillus* Species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Determinants." *Current Drug Targets* 6 (8):875-886. doi: <https://doi.org/10.2174/138945005774912717>.
- Brakhage, Axel A. 2013. "Regulation of fungal secondary metabolism." *Nat Rev Micro* 11 (1):21-32. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>.

- Brakhage, Axel A., and Kim Langfelder. 2002. "Menacing Mold: The Molecular Biology of *Aspergillus fumigatus*." *Annual Review of Microbiology* 56 (1):433-455. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160625>.
- Brakhage, Axel A., and Volker Schroeckh. 2011. "Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters." *Fungal Genetics and Biology* 48 (1):15-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.004>.
- Brandl, Julian, and Mikael R. Andersen. 2017. "*Aspergilli*: Models for systems biology in filamentous fungi." *Current Opinion in Systems Biology* 6:67-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.09.005>.
- Brandt, Ulrich 2006. "Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I)." *Annual Review of Biochemistry* 75 (1):69-92. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142539>.
- Braus, Gerhard H, Sven Krappmann, and Sabine E Eckert. 2002. "Sexual development in ascomycetes: fruit body formation of *Aspergillus nidulans*." *Mycology Series* 15:215-244.
- Brent, Keith J, and Derek W Hollomon. 2007a. *Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? 2nd edition*: GIFAP Brussels.
- Brent, KJ, and DW Hollomon. 2007b. *Fungicide Resistance: The Assessment of Risk. Fungicide Resistance Action Committee, Monograph 2, Global Crop Protection Federation*.
- Brown, D. W., J. H. Yu, H. S. Kelkar, M. Fernandes, T. C. Nesbitt, N. P. Keller, T. H. Adams, and T. J. Leonard. 1996. "Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1418-1422. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.4.1418>.
- Brown, Gordon D., David W. Denning, Neil A. R. Gow, Stuart M. Levitz, Mihai G. Netea, and Theodore C. White. 2012. "Hidden Killers: Human Fungal Infections." *Science Translational Medicine* 4 (165):165rv13-165rv13. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>.
- Bruggeman, Judith, Alfons J. M. Debets, Pieter J. Wijngaarden, J. Arjan G. M. deVisser, and Rolf F. Hoekstra. 2003. "Sex Slows Down the Accumulation of Deleterious Mutations in the Homothallic Fungus *Aspergillus nidulans*." *Genetics* 164 (2):479-485.
- Bundy, Jacob G, Matthew P Davey, and Mark R Viant. 2009. "Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives." *Metabolomics* 5 (1):3-21. doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0152-0>.

- Buxton, Frank P, David I Gwynne, and R Wayne Davies. 1985. "Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*." *Gene* 37 (1-3):207-214. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90274-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90274-4).
- Calvo, A. M. 2008. "The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi." *Fungal Genet Biol* 45. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.03.014>.
- Calvo, A. M., J. Bok, W. Brooks, and N. P. Keller. 2004. "veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*." *Appl Environ Microbiol* 70. doi: <https://doi.org/10.1128/aem.70.8.4733-4739.2004>.
- Cambiaghi, Alice, Manuela Ferrario, and Marco Masseroli. 2016. "Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration." *Briefings in Bioinformatics* 18 (3):498-510. doi: <http://doi.org/10.1093/bib/bbw031>.
- Canelas, André B., Cor Ras, Angela ten Pierick, Jan C. van Dam, Joseph J. Heijnen, and Walter M. van Gulik. 2008. "Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics." *Metabolomics* 4 (3):226-239. doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0116-4>.
- Capozzi, F., and A. Trimigno. 2015. "Using metabolomics to describe food in detail." In *Metabolomics as a Tool in Nutrition Research*, edited by J. L. SébédioL Brennan, 203-229. Woodhead Publishing.
- Cary, J. W., O. B. GR, D. M. Nielsen, W. Nierman, P. Harris-Coward, J. Yu, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, G. A. Payne, and A. M. Calvo. 2007. "Elucidation of veA-dependent genes associated with aflatoxin and sclerotial production in *Aspergillus flavus* by functional genomics." *Appl Microbiol Biotechnol* 76. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1081-y>.
- Cecchetto, Gianna, Sotiris Amillis, George Diallinas, Claudio Scazzocchio, and Christine Drevet. 2004. "The AzgA Purine Transporter of *Aspergillus nidulans*: CHARACTERIZATION OF A PROTEIN BELONGING TO A NEW PHYLOGENETIC CLUSTER." *Journal of Biological Chemistry* 279 (5):3132-3141. doi: <http://doi.org/10.1074/jbc.M308826200>.
- Chen, Chang-Hwei. 2020. "Detoxifying Metabolism: Detoxification Enzymes." In *Xenobiotic Metabolic Enzymes: Bioactivation and Antioxidant Defense*, 71-81. Cham: Springer International Publishing.
- Chen, J., S. J. Swamidass, J. Bruand, and P. Baldi. 2005. "ChemDB: a public database of small molecules and related chemoinformatics resources." *Bioinformatics* 21. doi: [10.1093/bioinformatics/bti683](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti683).
- Chen, Xiaolong, Yuele Lu, Yongxian Fan, and Yinchu Shen. 2017. "Bioactivities of Validamycins and Related Natural Compounds." In *Validamycin and its*

Derivatives, edited by Xiaolong Chen, Yuele Lu, Yongxian Fan and Yinchu Shen, 115-164. Elsevier.

- Chiang, YM, E Szewczyk, AD Davidson, R Entwistle, NP Keller, CCC Wang, and BR Oakley. 2010. "Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster." *Appl Environ Microbiol* 76 (7):2067–74. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.02187-09>.
- Chong, Jasmine, David S. Wishart, and Jianguo Xia. 2019. "Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis." *Current Protocols in Bioinformatics* 68 (1):e86. doi: <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>.
- Conde, Artur, George Diallinas, François Chaumont, Manuela Chaves, and Hernâni Gerós. 2010. "Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (6):857-868. doi: <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.12.012>.
- Conrad, T., O. Kniemeyer, S. G. Henkel, T. Krüger, D. J. Mattern, V. Valiante, R. Guthke, I. D. Jacobsen, A. A. Brakhage, S. Vlais, and J. Linde. 2018. "Module-detection approaches for the integration of multilevel omics data highlight the comprehensive response of *Aspergillus fumigatus* to caspofungin." *BMC systems biology* 12 (1):88-88. doi: 10.1186/s12918-018-0620-8.
- Costa, Carina Pedrosa, Diogo Gonçalves Silva, Alisa Rudnitskaya, Adelaide Almeida, and Sílvia M Rocha. 2016. "Shedding light on *Aspergillus niger* volatile exometabolome." *Scientific reports* 6:27441.
- Cove, D. J. 1966. "The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation* 113 (1):51-56. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0926-6593\(66\)80120-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0926-6593(66)80120-0).
- Cox, Daniel G, Joonseok Oh, Adam Keasling, Kim L Colson, and Mark T Hamann. 2014. "The utility of metabolomics in natural product and biomarker characterization." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1840 (12):3460-3474.
- Crespo-Sempere, A., P. V. Martínez-Culebras, and L. González-Candelas. 2014. "The loss of the inducible *Aspergillus carbonarius* MFS transporter MfsA leads to ochratoxin A overproduction." *International Journal of Food Microbiology* 181:1-9. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.014>.
- Crofts, Antony R. . 2004. "The Cytochrome bc1 Complex: Function in the Context of Structure." *Annual Review of Physiology* 66 (1):689-733. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251>.
- Crute, IR, and Judith M Harisson. 1988. "Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Bremia lactucae* and on the stability and fitness of field isolates." *Plant*

pathology 37 (2):231-250. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02069.x>.

- Cubero-Leon, Elena, Rosa Peñalver, and Alain Maquet. 2014. "Review on metabolomics for food authentication." *Food Research International* 60 (0):95-107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.041>.
- Čuperlović-Culf, Miroslava, David A. Barnett, Adrian S. Culf, and Ian Chute. 2010. "Cell culture metabolomics: applications and future directions." *Drug Discovery Today* 15 (15):610-621. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.012>.
- d'Enfert, Christophe. 1997. "Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*." *Fungal Genetics and Biology* 21 (2):163-172. doi: <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.0975>.
- d'Enfert, Christophe, Beatriz M. Bonini, Pio D. A. Zapella, Thierry Fontaine, Aline M. Da Silva, and Héctor F. Terenzi. 1999. "Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*." *Molecular Microbiology* 32 (3):471-483. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01327.x>.
- d'Enfert, Christophe, and Thierry Fontaine. 1997. "Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose." *Molecular Microbiology* 24 (1):203-216. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3131693.x>.
- D'Mello, J. P. F., A. M. C. Macdonald, and L. Briere. 2000. "Mycotoxin production in a carbendazim-resistant strain of *Fusarium sporotrichioides*." *Mycotoxin Research* 16 (2):101-111. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02946109>.
- D'Mello, J.P.F., and A.M.C. Macdonald. 1997. "Mycotoxins." *Animal Feed Science Technology* (69):155-166.
- Dagenais, Taylor R. T., and Nancy P. Keller. 2009. "Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis." *Clinical Microbiology Reviews* 22 (3):447-465. doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.00055-08>.
- Damalas, C. A., and I. G. Eleftherohorinos. 2011. "Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators." *Int J Environ Res Public Health* 8 (5):1402-19. doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph8051402>.
- Dassa, E., and P. Bouige. 2001. "The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms." *Res Microbiol* 152. doi: [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01194-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01194-9).
- David, H., M. Åkesson, and J. Nielsen. 2003. "Reconstruction of the central carbon metabolism of *Aspergillus niger*." *Eur J Biochem* 270. doi: [10.1046/j.1432-1033.2003.03798.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03798.x).

- David, H., G. Hofmann, A. P. Oliveira, H. Jarmer, and J. Nielsen. 2006. "Metabolic network driven analysis of genome-wide transcription data from *Aspergillus nidulans*." *Genome Biol* 7:R108. doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-11-r108>.
- Davidson, Amy L., Elie Dassa, Cedric Orelle, and Jue Chen. 2008. "Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems." *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 72 (2):317-364. doi: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-07>.
- de Raad, Markus, Curt R. Fischer, and Trent R. Northen. 2016. "High-throughput platforms for metabolomics." *Current Opinion in Chemical Biology* 30:7-13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.012>.
- De Waard, MA, and JGM Van Nistelrooy. 1979. "Mechanism of resistance to fenarimol in *Aspergillus nidulans*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 10 (2):219-229. doi: [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(79\)90025-7](https://doi.org/10.1016/0048-3575(79)90025-7).
- de Waard, Maarten A., Alan C. Andrade, Keisuke Hayashi, Henk-jan Schoonbeek, Ioannis Stergiopoulos, and Lute-Harm Zwiars. 2006. "Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence." *Pest Management Science* 62 (3):195-207. doi: <http://doi.org/10.1002/ps.1150>.
- Deacon, Jim W. 2013. *Fungal biology*. John Wiley & Sons.
- Decottignies, A., and A. Goffeau. 1997. "Complete inventory of the yeast ABC proteins." *Nat Genet* 15. doi: <http://doi.org/10.1038/ng0297-137>.
- Dekker, J, and SG Georgopoulos. 1982. "Fungicide resistance in crop protection."
- Del Sorbo, G, Alan C Andrade, JGM Van Nistelrooy, JAL Van Kan, E Balzi, and MA De Waard. 1997. "Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters." *Molecular and General Genetics MGG* 254 (4):417-426. doi: <https://doi.org/10.1007/s004380050434>.
- Del Sorbo, Giovanni, Henk-jan Schoonbeek, and Maarten A De Waard. 2000. "Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides." *Fungal Genetics and Biology* 30 (1):1-15. doi: <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1206>.
- Delp, C. J., and J. Dekker. 1985. "Fungicide resistance: definitions and use of terms." *EPPO Bulletin* 15 (3):333-335. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1985.tb00237.x>.
- Denniston, Katherine, Joseph Topping, Kim Woodrum, and Robert Caret. 2013. *General, organic, and biochemistry*. McGraw-Hill Higher Education.
- Dethloff, Frederik, Alexander Erban, Isabel Orf, Jessica Alpers, Ines Fehrle, Olga Beine-Golovchuk, Stefanie Schmidt, Jens Schwachtje, and Joachim Kopka. 2014. "Profiling methods to identify cold-regulated primary metabolites using gas

- chromatography coupled to mass spectrometry." In *Plant Cold Acclimation*, edited by Hinch D. and Zuther E., 171-197. Springer.
- Di Virgilio, F., and E. Adinolfi. 2017. "Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth." *Oncogene* 36 (3):293-303. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2016.206>.
- Diallinas, G. 2016. "Dissection of Transporter Function: From Genetics to Structure." *Trends in Genetics* 32 (9):576-590. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2016.06.003>.
- Diallinas, George. 2008a. "An Almost-Complete Movie." *Science* 322 (5908):1644-1645. doi: <http://doi.org/10.1126/science.1168107>.
- Diallinas, George. 2008b. "Aspergillus Transporters." In *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, edited by Gustavo H. Goldman and Stephen A. Osmani, 301-320. Taylor & Francis Group.
- Diallinas, George. 2014. "Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters." *Frontiers in Pharmacology* 5:207. doi: <http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00207>.
- Diallinas, George. 2017. "Transceptors as a functional link of transporters and receptors." *Microbial Cell* 4 (3):69-73. doi: <http://doi.org/10.15698/mic2017.03.560>.
- Diallinas, George, Lisette Gorfinkiel, Arst Herbert, N., Gianna Cecchetto, and Claudio Scazzocchio. 1995. "Genetic and Molecular Characterization of a Gene Encoding a Wide Specificity Purine Permease of *Aspergillus nidulans* Reveals a Novel Family of Transporters Conserved in Prokaryotes and Eukaryotes." *Journal of Biological Chemistry* 270 (15):8610-8622. doi: <http://doi.org/10.1074/jbc.270.15.8610>.
- Diallinas, George, and Olga Martzoukou. 2019. "Transporter membrane traffic and function: lessons from a mould." *The FEBS Journal* 286 (24):4861-4875. doi: <https://doi.org/10.1111/febs.15078>.
- Díaz Nieto, César Horacio, Adrian Marcelo Granero, María Alicia Zon, and Héctor Fernández. 2018. "Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered." *Food and Chemical Toxicology* 118:460-470. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.057>.
- Didwania, Nidhi, and P.C. Trivedi. 2018. "Mycotoxins: A Review of Toxicity, Metabolism and Biological Approaches to Counteract the Production in Food." *MR International Journal of Engineering & Technology* (2):38-42%V 6.
- Dimou, Sofia, and George Diallinas. 2020. "Life and Death of Fungal Transporters under the Challenge of Polarity." *International journal of molecular sciences* 21 (15):5376. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21155376>.

- Dixon, R. A., and N. L. Paiva. 1995. "Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism." *The Plant Cell* 7 (7):1085-1097. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>.
- Dixon, Richard A., David R. Gang, Adrian J. Charlton, Oliver Fiehn, Harry A. Kuiper, Tracey L. Reynolds, Ronald S. Tjeerdema, Elizabeth H. Jeffery, J. Bruce German, William P. Ridley, and James N. Seiber. 2006. "Applications of Metabolomics in Agriculture." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (24):8984-8994. doi: <https://doi.org/10.1021/jf061218t>.
- do Nascimento, A. M., M. H. Goldman, and G. H. Goldman. 2002. "Molecular characterization of ABC transporter-encoding genes in *Aspergillus nidulans*." *Genet Mol Res* 1 (4):337-349.
- Dobson, Paul, D. , Karin. Lanthaler, Stephen Oliver, G. , and Douglas Kell, B. . 2009. "Implications of the Dominant Role of Transporters in Drug Uptake by Cells." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 9 (2):163-181. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/156802609787521616>.
- Domenichini, Alice, Aleksandra Adamska, and Marco Falasca. 2019. "ABC transporters as cancer drivers: Potential functions in cancer development." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1863 (1):52-60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.019>.
- Domingo-Almenara, Xavier, J. Rafael Montenegro-Burke, Julijana Ivanisevic, Aurelien Thomas, Jonathan Sidibé, Tony Teav, Carlos Guijas, Aries E. Aisporna, Duane Rinehart, Linh Hoang, Anders Nordström, María Gómez-Romero, Luke Whiley, Matthew R. Lewis, Jeremy K. Nicholson, H. Paul Benton, and Gary Siuzdak. 2018. "XCMS-MRM and METLIN-MRM: a cloud library and public resource for targeted analysis of small molecules." *Nature Methods* 15 (9):681-684. doi: [10.1038/s41592-018-0110-3](https://doi.org/10.1038/s41592-018-0110-3).
- Dudzik, Danuta, Cecilia Barbas-Bernardos, Antonia García, and Coral Barbas. 2018. "Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 147:149-173. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.044>.
- Dunn, Warwick B., and David I. Ellis. 2005. "Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24 (4):285-294. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>.
- Efremov, Rouslan G., Rozbeh Baradaran, and Leonid A. Sazanov. 2010. "The architecture of respiratory complex I." *Nature* 465 (7297):441-445. doi: <https://doi.org/10.1038/nature09066>.
- Efron, Bradley, and Gail Gong. 1983. "A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation." *The American Statistician* 37 (1):36-48. doi: <https://doi.org/10.1080/00031305.1983.10483087>.

- Egner, Ralf, Yannick Mahé, Rudy Pandjaitan, Veronika Huter, Andrea Lamprecht, and Karl Kuchler. 1995. "ATP binding cassette transporters in yeast: From mating to multidrug resistance." In *Membrane Protein Transport*, edited by S. Rothman Stephen, 57-96. JAI.
- Ekman, Drew R, Hector C Keun, Charles D Eads, Carrie M Furnish, Rachel N Murrell, John C Rockett, and David J Dix. 2006. "Metabolomic evaluation of rat liver and testis to characterize the toxicity of triazole fungicides." *Metabolomics* 2 (2):63-73. doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-006-0020-8>.
- Elbein, Alan D., Y. T. Pan, Irena Pastuszak, and David Carroll. 2003. "New insights on trehalose: a multifunctional molecule." *Glycobiology* 13 (4):17R-27R. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwg047>.
- Elbourne, Liam D. H., Sasha G. Tetu, Karl A. Hassan, and Ian T. Paulsen. 2016. "TransportDB 2.0: a database for exploring membrane transporters in sequenced genomes from all domains of life." *Nucleic Acids Research* 45 (D1):D320-D324. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1068>.
- Ellis, David I, Warwick B Dunn, Julian L Griffin, J William Allwood, and Royston Goodacre. 2007. "Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool." *Pharmacogenomics* 8 (9):1243-1266. doi: 10.2217/14622416.8.9.1243.
- Evangelinos, Minoas, Gerasimos Anagnostopoulos, Iliana Karvela - Kalogeraki, Panagiota M. Stathopoulou, Claudio Scazzocchio, and George Diallinas. 2015. "Minos as a novel Tc1/mariner-type transposable element for functional genomic analysis in *Aspergillus nidulans*." *Fungal Genetics and Biology* 81:1-11. doi: <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.05.007>.
- FAO. 2004. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO
- Fedorova, Natalie D, William C Nierman, Geoffrey Turner, Vinita Joardar, Rama Maiti, Michael J Anderson, David W Denning, and Jennifer R Wortman. 2007. "A Comparative View of the Genome of *Aspergillus fumigatus*." In *The Aspergilli*, 45-62. CRC Press.
- Felix D'Mello, J. P., AnnM C. Macdonald, David Postel, WilkoT P. Dijkma, Aude Dujardin, and CristinaM Placinta. 1998. "Pesticide Use and Mycotoxin Production in *Fusarium* and *Aspergillus* Phytopathogens." *European Journal of Plant Pathology* 104 (8):741-751. doi: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008621505708>.
- Fenaille, François, Pierre Barbier Saint-Hilaire, Kathleen Rousseau, and Christophe Junot. 2017. "Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand?" *Journal of Chromatography A* 1526:1-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.043>.

- Feng, Guo Hong, and Thomas J Leonard. 1998. "Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*." *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (6):2275-2277.
- Fiehn, O., J. Kopka, P. Dormann, T. Altmann, R. N. Trethewey, and L. Willmitzer. 2000. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nat Biotechnol* 18. doi: 10.1038/81137.
- Fiehn, Oliver. 2001. "Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks." *Comparative and Functional Genomics* 2 (3):155-168. doi: <https://doi.org/10.1002/cfg.82>.
- Fiehn, Oliver. 2002. "Metabolomics — the link between genotypes and phenotypes." In *Functional Genomics*, edited by Chris Town, 155-171. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Fiehn, Oliver, Don Robertson, Jules Griffin, Mariet van der Werf, Basil Nikolau, Norman Morrison, Lloyd W. Sumner, Roy Goodacre, Nigel W. Hardy, Chris Taylor, Jennifer Fostel, Bruce Kristal, Rima Kaddurah-Daouk, Pedro Mendes, Ben van Ommen, John C. Lindon, and Susanna-Assunta Sansone. 2007. "The metabolomics standards initiative (MSI)." *Metabolomics* 3 (3):175-178. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>.
- Fillet, Marianne, and Michel Frédérick. 2015. "The emergence of metabolomics as a key discipline in the drug discovery process." *Drug Discovery Today: Technologies* 13:19-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2015.01.006>.
- Fischedick, Justin Thomas, Arno Hazekamp, Tjalling Erkelens, Young Hae Choi, and Rob Verpoorte. 2010. "Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes." *Phytochemistry* 71 (17–18):2058-2073. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.10.001>.
- Fisher, Matthew C., Nichola J. Hawkins, Dominique Sanglard, and Sarah J. Gurr. 2018. "Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security." *Science* 360 (6390):739-742. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aap7999>.
- Fletcher, Jamie I., Michelle Haber, Michelle J. Henderson, and Murray D. Norris. 2010. "ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps." *Nature Reviews Cancer* 10 (2):147-156. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc2789>.
- Fletcher, Jamie I., Rebekka T. Williams, Michelle J. Henderson, Murray D. Norris, and Michelle Haber. 2016. "ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology." *Drug Resistance Updates* 26:1-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.03.001>.

Forsberg, Erica M., Tao Huan, Duane Rinehart, H. Paul Benton, Benedikt Warth, Brian Hilmers, and Gary Siuzdak. 2018. "Data processing, multi-omic pathway mapping, and metabolite activity analysis using XCMS Online." *Nature Protocols* 13:633. doi: 10.1038/nprot.2017.151

<https://www.nature.com/articles/nprot.2017.151#supplementary-information>.

Fotakis, Charalambos, Dionysis Christodouleas, Katerina Kokkotou, Maria Zervou, Panagiotis Zoumpoulakis, Panagiotis Moulos, Maria Liouni, and Antony Calokerinos. 2013. "NMR metabolite profiling of Greek grape marc spirits." *Food Chemistry* 138 (2–3):1837-1846. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.128>.

Fraaije, Bart A, Carlos Bayon, Sarah Atkins, Hans J Cools, John A Lucas, and Marco W Fraaije. 2012. "Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control *Septoria* leaf blotch in wheat." *Molecular Plant Pathology* 13 (3):263-275. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00746.x>.

FRAC. 2016. <http://www.frac.info/resistance-overview>.

Freguelli, Bruno G., and Nicholas Dale. 2020. "Purines: From Diagnostic Biomarkers to Therapeutic Agents in Brain Injury." *Neuroscience Bulletin*. doi: <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00529-z>.

Frillingos, Stathis. 2012. "Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ." *International journal of biochemistry and molecular biology* 3 (3):250-272.

Frisvad, J. C., B. Andersen, and U. Thrane. 2008. "The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi." *Mycol Res* 112. doi: 10.1016/j.mycres.2007.08.018.

Frisvad, J. C., T. O. Larsen, R. de Vries, M. Meijer, J. Houbraken, F. J. Cabañes, K. Ehrlich, and R. A. Samson. 2007. "Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins." *Studies in Mycology* 59:31-37. doi: <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2007.59.04>.

Frisvad, JC, and RA Samson. 1990. "Chemotaxonomy and morphology of *Aspergillus fumigatus* and related taxa." In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*, 201-208. Springer.

Frisvad, Jens C. 2015a. "Fungal Chemotaxonomy." In *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2*, 103-121. Springer.

Frisvad, Jens C. 2015b. "Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species." *Frontiers in Microbiology* 5 (773). doi: 10.3389/fmicb.2014.00773.

- Frisvad, Jens C., and Thomas O. Larsen. 2015. "Chemodiversity in the genus *Aspergillus*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (19):7859-7877. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6839-z>.
- Frisvad, Jens C., Jørn Smedsgaard, Robert A. Samson, Thomas O. Larsen, and Ulf Thrane. 2007. "Fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (23):9727-9732. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0718906>.
- Frisvad, Jens Christian, V Hubka, CN Ezekiel, S-B Hong, A Nováková, AJ Chen, M Arzanlou, TO Larsen, F Sklenář, and W Mahakarnchanakul. 2019. "Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins." *Studies in mycology* 93:1-63.
- Galagan, James E, Sarah E Calvo, Christina Cuomo, Li-Jun Ma, Jennifer R Wortman, Serafim Batzoglou, Su-In Lee, Meray Baştürkmen, Christina C Spevak, and John Clutterbuck. 2005. "Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*." *Nature* 438 (7071):1105-1115. doi: <https://doi.org/10.1038/nature04341>.
- Galanopoulou, Katerina, Claudio Scazzocchio, Maria Eleftheria Galinou, Weiwei Liu, Fivos Borbolis, Mayia Karachaliou, Nathalie Oestreicher, Dimitris G. Hatzinikolaou, George Diallinas, and Sotiris Amillis. 2014. "Purine utilization proteins in the Eurotiales: Cellular compartmentalization, phylogenetic conservation and divergence." *Fungal Genetics and Biology* 69 (Supplement C):96-108. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.005>.
- Gao, Yangyang, Lifei He, Jiamei Zhu, Jiagao Cheng, Beixing Li, Feng Liu, and Wei Mu. 2020. "The relationship between features enabling SDHI fungicide binding to the Sc-Sdh complex and its inhibitory activity against *Sclerotinia sclerotiorum*." *Pest Management Science* 76 (8):2799-2808. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.5827>.
- García-Villalba, Rocio, Carlos León, Giovanni Dinelli, Antonio Segura-Carretero, Alberto Fernández-Gutiérrez, Virginia Garcia-Cañas, and Alejandro Cifuentes. 2008. "Comparative metabolomic study of transgenic versus conventional soybean using capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1195 (1):164-173. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.018>.
- Gavriil, Efthymios-Spyridon, Spyridon Dimitrakis, Georgia Papadaki, Sophia Balaska, George Lambrinidis, Nikolaos Lougiakis, Panagiotis Marakos, George Diallinas, Nicole Pouli, and Emmanuel Mikros. 2018. "Structure-activity relationships in fungal nucleobases transporters as dissected by the inhibitory effects of novel purine analogues." *European Journal of Medicinal Chemistry* 156:240-251. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.038>.

- Georgopoulos, SG, E Alexandri, and M Chrysayi. 1972. "Genetic evidence for the action of oxathiin and thiazole derivatives on the succinic dehydrogenase system of *Ustilago maydis* mitochondria." *Journal of bacteriology* 110 (3):809-817.
- Georgopoulos, SG, and BN Ziogas. 1977. "A new class of carboxin-resistant mutants of *Ustilago maydis*." *Netherlands Journal of Plant Pathology* 83 (1):235. doi: <https://doi.org/10.1007/BF03041438>.
- Gerdtzen, Ziomara P, Prodromos Daoutidis, and Wei-Shou Hu. 2004. "Non-linear reduction for kinetic models of metabolic reaction networks." *Metabolic engineering* 6 (2):140-154.
- Gershenzon, Jonathan, and Natalia Dudareva. 2007. "The function of terpene natural products in the natural world." *Nat Chem Biol* 3 (7):408-414. doi: <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>.
- Giacomini, Kathleen M., Shiew-Mei Huang, Donald J. Tweedie, Leslie Z. Benet, Kim L. R. Brouwer, Xiaoyan Chu, Amber Dahlin, Raymond Evers, Volker Fischer, Kathleen M. Hillgren, Keith A. Hoffmaster, Toshihisa Ishikawa, Dietrich Keppler, Richard B. Kim, Caroline A. Lee, Mikko Niemi, Joseph W. Polli, Yuichi Sugiyama, Peter W. Swaan, Joseph A. Ware, Stephen H. Wright, Sook Wah Yee, Maciej J. Zamek-Gliszczyński, and Lei Zhang. 2010. "Membrane transporters in drug development." *Nature reviews. Drug discovery* 9 (3):215-236. doi: <http://doi.org/10.1038/nrd3028>.
- Giles, Steve S., Alexandra A. Soukup, Carrie Lauer, Mona Shaaban, Alexander Lin, Berl R. Oakley, Clay C. C. Wang, and Nancy P. Keller. 2011. "Cryptic *Aspergillus nidulans* Antimicrobials." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (11):3669-3675. doi: <https://doi.org/10.1128/aem.02000-10>.
- Gilke, De Middeleer, Leys Natalie, Sas Benedikt, and De Saeger Sarah. 2019. "Fungi and Mycotoxins in Space—A Review." *Astrobiology* 19 (7):915-926. doi: <https://doi.org/10.1089/ast.2018.1854>.
- Glättli, A, G Stammler, and S Schlehuber. 2009. "Mutations in the target proteins of succinate-dehydrogenase inhibitors (SDHI) and 14 α -demethylase inhibitors (DMI) conferring changes in the sensitivity-structural insights from molecular modelling." Association Française de Protection des Plantes, 9ème conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, France, 8 et 9 Décembre 2009.
- Godzien, Joanna, Vanesa Alonso-Herranz, Coral Barbas, and Emily Grace Armitage. 2015. "Controlling the quality of metabolomics data: new strategies to get the best out of the QC sample." *Metabolomics* 11 (3):518-528. doi: 10.1007/s11306-014-0712-4.
- Goldman, Gustavo H, and Stephen A Osmani. 2007. *The Aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods*: CRC press.

- Gomes, D., A. Agasse, P. Thiébaud, S. Delrot, H. Gerós, and F. Chaumont. 2009. "Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788 (6):1213-1228. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.009>.
- Gomez-Casati, Diego F, Maria I Zanol, and María V Busi. 2013. "Metabolomics in plants and humans: applications in the prevention and diagnosis of diseases." *BioMed Research International* 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/792527>.
- Gorfinkiel, L, G Diallinas, and C Scazzocchio. 1993. "Sequence and regulation of the *uapA* gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*." *Journal of Biological Chemistry* 268 (31):23376-81.
- Gorrochategui, Eva, Joaquim Jaumot, Sílvia Lacorte, and Romà Tauler. 2016. "Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 82:425-442. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>.
- Goudela, Sophia, Panayiota Karatza, Marina Koukaki, Stathis Frilingos, and George Diallinas. 2005. "Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family." *Molecular Membrane Biology* 22 (3):263-275. doi: <https://doi.org/10.1080/09687860500093016>.
- Goudela, Sophia, Utz Reichard, Sotiris Amillis, and George Diallinas. 2008. "Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*." *Fungal Genetics and Biology* 45 (4):459-472. doi: <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.08.001>.
- Gourama, Hassan, and Lloyd B. Bullerman. 1995. "*Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feeds: A Review." *Journal of Food Protection* 58 (12):1395-1404. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-58.12.1395>.
- Gournas, Christos, Sotiris Amillis, Anna Vlanti, and George Diallinas. 2010. "Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease." *Molecular Microbiology* 75 (1):246-260. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06997.x>.
- Gournas, Christos, Ioannis Papageorgiou, and George Diallinas. 2008. "The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role." *Molecular BioSystems* 4 (5):404-416. doi: <http://doi.org/10.1039/B719777B>.
- Gournas, Christos, Martine Prévost, Eva-Maria Krammer, and Bruno André. 2016. "Function and Regulation of Fungal Amino Acid Transporters: Insights from Predicted Structure." In *Yeast Membrane Transport*, edited by José Ramos, Hana Sychrová and Maik Kschischo, 69-106. Cham: Springer International Publishing.

- Griffin, Shane G., S. Grant Wyllie, Julie L. Markham, and David N. Leach. 1999. "The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity." *Flavour and Fragrance Journal* 14 (5):322-332. doi: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199909/10\)14:5<322::AID-FFJ837>3.0.CO;2-4](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5<322::AID-FFJ837>3.0.CO;2-4).
- Grivet, Jean-Philippe, Anne-Marie Delort, and Jean-Charles Portais. 2003. "NMR and microbiology: from physiology to metabolomics." *Biochimie* 85 (9):823-840. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2003.08.004>.
- Guirao-Abad, José P., Ruth Sánchez-Fresneda, Eulogio Valentín, María Martínez-Esparza, and Juan-Carlos Argüelles. 2013. "Analysis of validamycin as a potential antifungal compound against *Candida albicans*." *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 16 (4):217-225. doi: <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.197>.
- Guo, Qi, Jasmin K Sidhu, Timothy MD Ebbels, Faisal Rana, David J Spurgeon, Claus Svendsen, Stephen R Stürzenbaum, Peter Kille, A John Morgan, and Jacob G Bundy. 2009. "Validation of metabolomics for toxic mechanism of action screening with the earthworm *Lumbricus rubellus*." *Metabolomics* 5 (1):72-83. doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0153-z>.
- Gygi, Steven P, Yvan Rochon, B Robert Franza, and Ruedi Aebersold. 1999. "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." *Molecular and Cellular Biology* 19 (3):1720-1730. doi: <https://doi.org/10.1128/MCB.19.3.1720>.
- Hahn, Matthias , and Michaela Leroch. 2015. "Multidrug Efflux Transporters." In *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*, edited by Ishii H. and Hollomon D.W.: Springer Japan.
- Hamamoto, Hiroshi, Koji Hasegawa, Ryoji Nakaune, Young Jin Lee, Yoshiyuki Makizumi, Katsumi Akutsu, and Tadaaki Hibi. 2000. "Tandem Repeat of a Transcriptional Enhancer Upstream of the Sterol 14 α -Demethylase Gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (8):3421-3426. doi: [10.1128/aem.66.8.3421-3426.2000](https://doi.org/10.1128/aem.66.8.3421-3426.2000).
- Hamari, Zsuzsanna, Sotiris Amillis, Christine Drevet, Angeliki Apostolaki, Csaba Vágvölgyi, George Diallinas, and Claudio Scazzocchio. 2009. "Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*." *Molecular Microbiology* 73 (1):43-57. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06738.x>.
- Hautbergue, T., E. L. Jamin, L. Debrauwer, O. Puel, and I. P. Oswald. 2018. "From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites." *Natural Product Reports* 35 (2):147-173. doi: <https://doi.org/10.1039/C7NP00032D>.

- He, Chunnian, Bing Peng, Yang Dan, Yong Peng, and Peigen Xiao. 2014. "Chemical taxonomy of tree peony species from China based on root cortex metabolic fingerprinting." *Phytochemistry* 107 (0):69-79. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.021>.
- Hegeman, Adrian D. 2010. "Plant metabolomics-meeting the analytical challenges of comprehensive metabolite analysis." *Briefings in Functional Genomics* 9 (2):139-148. doi: <https://doi.org/10.1093/bfgp/elp053>.
- Henrikson, J. C., A. R. Hoover, P. M. Joyner, and R. H. Cichewicz. 2009. "A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*." *Org Biomol Chem* 7. doi: 10.1039/b819208a.
- Higgins, Christopher F. 2001. "ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview." *Research in Microbiology* 152 (3):205-210. doi: [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01193-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01193-7).
- Hillocks, R. J. 2012. "Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture." *Crop Protection* 31 (1):85-93. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.08.008>.
- Hollomon, Derek W. 2015. "Fungicide resistance: facing the challenge-a review." *Plant Protection Science* 51 (4):170-176.
- Hollywood, Katherine, Daniel R Brison, and Royston Goodacre. 2006. "Metabolomics: current technologies and future trends." *Proteomics* 6 (17):4716-4723.
- Horai, Hisayuki, Masanori Arita, Shigehiko Kanaya, Yoshito Nihei, Tasuku Ikeda, Kazuhiro Suwa, Yuya Ojima, Kenichi Tanaka, Satoshi Tanaka, and Ken Aoshima. 2010. "MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences." *Journal of mass spectrometry* 45 (7):703-714.
- Horgan, Richard P., and Louise C. Kenny. 2011. "'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics." *The Obstetrician & Gynaecologist* 13 (3):189-195. doi: 10.1576/toag.13.3.189.27672.
- Horikoshi, K., and Y. Ikeda. 1966. "Trehalase in conidia of *Aspergillus oryzae*." *Journal of bacteriology* 91 (5):1883-1887.
- Horn, Bruce W., Jorge H. Ramirez-Prado, and Ignazio Carbone. 2009. "The sexual state of *Aspergillus parasiticus*." *Mycologia* 101 (2):275-280. doi: <https://doi.org/10.3852/08-205>.
- Horsefield, Rob, So Iwata, and Bernadette Byrne. 2004. "Complex II from a structural perspective." *Current Protein and Peptide Science* 5 (2):107-118. doi: <https://doi.org/10.2174/1389203043486847>.

- Horsefield, Rob, Victoria Yankovskaya, Graham Sexton, William Whittingham, Kazuro Shiomi, Satoshi Ōmura, Bernadette Byrne, Gary Cecchini, and So Iwata. 2006. "Structural and Computational Analysis of the Quinone-binding Site of Complex II (Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase): A Mechanism Of Electron Transfer And Proton Conduction During Ubiquinone Reduction." *Journal of Biological Chemistry* 281 (11):7309-7316. doi: <http://doi.org/10.1074/jbc.M508173200>.
- Huan, Tao, Erica M. Forsberg, Duane Rinehart, Caroline H. Johnson, Julijana Ivanisevic, H. Paul Benton, Mingliang Fang, Aries Aisporna, Brian Hilmers, Farris L. Poole, Michael P. Thorgersen, Michael W. W. Adams, Gregory Krantz, Matthew W. Fields, Paul D. Robbins, Laura J. Niedernhofer, Trey Ideker, Erica L. Majumder, Judy D. Wall, Nicholas J. W. Rattray, Royston Goodacre, Luke L. Lairson, and Gary Siuzdak. 2017. "Systems biology guided by XCMS Online metabolomics." *Nat Meth* 14 (5):461-462. doi: 10.1038/nmeth.4260
- <http://www.nature.com/nmeth/journal/v14/n5/abs/nmeth.4260.html#supplementary-information>.
- Huang, Li-shar, Gang Sun, David Cobessi, Andy C Wang, John T Shen, Eric Y Tung, Vernon E Anderson, and Edward A Berry. 2006. "3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme." *Journal of Biological Chemistry* 281 (9):5965-5972. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M511270200>.
- Huber, Vincent J., Mika Tsujita, and Tsutomu Nakada. 2012. "Aquaporins in drug discovery and pharmacotherapy." *Molecular Aspects of Medicine* 33 (5):691-703. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.01.002>.
- Hummel, Jan, Nadine Strehmel, Christian Bölling, Stefanie Schmidt, Dirk Walther, and Joachim Kopka. 2013. "Mass Spectral Search and Analysis Using the Golm Metabolome Database." In *The Handbook of Plant Metabolomics*, 321-343. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Hwang, Ming-Shih, Jakub Rohlena, Lan-Feng Dong, Jiri Neuzil, and Stefan Grimm. 2014. "Powerhouse down: Complex II dissociation in the respiratory chain." *Mitochondrion* 19:20-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.06.001>.
- Ishii, Hideo, and DW Hollomon. 2015. *Fungicide resistance in plant pathogens*. Vol. 10, Tokyo: Springer, doi.
- Ishii, Hideo, Takuya Miyamoto, Shingo Ushio, and Makoto Kakishima. 2011. "Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*." *Pest management science* 67 (4):474-482. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.2092>.
- Ishikawa, Ryo, Kentaro Shirouzu, Hideo Nakashita, Han-Young Lee, Takayuki Motoyama, Isamu Yamaguchi, Tohru Teraoka, and Tsutomu Arie. 2005. "Foliar

- spray of validamycin a or validoxylamine a controls tomato *fusarium* wilt." *Phytopathology* 95 (10):1209-1216. doi: <https://doi.org/10.1094/phyto-95-1209>.
- Ito, Y, H Muraguchi, Y Seshime, S Oita, and SO Yanagi. 2004. "Flutolanil and carboxin resistance in *Coprinus cinereus* conferred by a mutation in the cytochrome b 560 subunit of succinate dehydrogenase complex (Complex II)." *Molecular Genetics and Genomics* 272 (3):328-335. doi: <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1060-2>.
- Iturriaga, Gabriel, Ramón Suárez, and Barbara Nova-Franco. 2009. "Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling." *International journal of molecular sciences* 10 (9):3793-3810. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms10093793>.
- Ivanisevic, Julijana, and Aurelien Thomas. 2018. "Metabolomics as a Tool to Understand Pathophysiological Processes." In *Clinical Metabolomics: Methods and Protocols*, edited by Martin Giera, 3-28. New York, NY: Springer New York.
- James, Sanchez. 2011. "The Study of the *Aspergillus nidulans* Metabolome in the Post Genomic Era." DOCTOR OF PHILOSOPHY, PHARMACEUTICAL SCIENCES, UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA.
- Johnson, Caroline H., Julijana Ivanisevic, and Gary Siuzdak. 2016. "Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* advance online publication (17):451-459. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>.
- Jonckheere, An I., Jan A. M. Smeitink, and Richard J. T. Rodenburg. 2012. "Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 35 (2):211-225. doi: <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9382-9>.
- Joseph-Horne, Tim, Derek W. Hollomon, and Paul M. Wood. 2001. "Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1504 (2):179-195. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00251-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00251-6).
- Joseph-Horne, Tim, Paul M Wood, Carlton K Wood, Anthony L Moore, John Headrick, and Derek Hollomon. 1998. "Characterization of a split respiratory pathway in the wheat "take-all" fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*." *Journal of Biological Chemistry* 273 (18):11127-11133. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11127>.
- Jungwirth, Helmut, and Karl Kuchler. 2006. "Yeast ABC transporters – A tale of sex, stress, drugs and aging." *FEBS Letters* 580 (4):1131-1138. doi: <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.050>.
- Junker, Björn H., Christian Klukas, and Falk Schreiber. 2006. "VANTED: A system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks." *BMC Bioinformatics* 7 (1):109. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-109>.

- Kalampokis, Ioannis F., and Konstantinos A. Aliferis. 2020. "Metabolomics in *Aspergillus* Research: Potential and Applications in Biotechnology, Industry, Medicine, and Crop Protection." In *Aflatoxins: Biochemistry, Toxicology, Public Health, Policies and Modern Methods of Analysis*, edited by Spyridon Kintzios and Sofia Mavrikou, 346. Hauppauge, NY, 11788 USA: Nova Science Publishers, Inc.
- Kalampokis, Ioannis F., Alexander Erban, Sotirios Amillis, George Dhallinas, Joachim Kopka, and Konstantinos A. Aliferis. 2020. "Untargeted metabolomics as a hypothesis-generation tool in plant protection product discovery: Highlighting the potential of trehalose and glycerol metabolism of fungal conidiospores as novel targets." *Metabolomics* 16 (7):79. doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01699-7>.
- Kalampokis, Ioannis F., George C. Kapetanakis, Konstantinos A. Aliferis, and George Dhallinas. 2018. "Multiple nucleobase transporters contribute to boscalid sensitivity in *Aspergillus nidulans*." *Fungal Genetics and Biology* 115:52-63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.02.004>.
- Kan, Virginia L, Marc A Judson, Vicki A Morrison, Stephen Dummer, David W Denning, John E Bennett, Thomas J Walsh, Thomas F Patterson, and George A Pankey. 2000. "Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*." *Clinical Infectious Diseases* 30 (4):696-709.
- Kanehisa, Minoru. 2016. "KEGG bioinformatics resource for plant genomics and metabolomics." In *Plant Bioinformatics*, 55-70. Springer.
- Kanehisa, Minoru, Miho Furumichi, Yoko Sato, Mari Ishiguro-Watanabe, and Mao Tanabe. 2020. "KEGG: integrating viruses and cellular organisms." *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkaa970.
- Karamanou, Dimitra A., and Konstantinos A. Aliferis. 2020. "The yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) YCF1 vacuole transporter: Evidence on its implication into the yeast resistance to flusilazole as revealed by GC/EI/MS metabolomics." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 165. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.09.013>.
- Karaoglanidis, G. S., Y. Luo, and T. J. Michailides. 2010. "Competitive Ability and Fitness of *Alternaria alternata* Isolates Resistant to QoI Fungicides." *Plant Disease* 95 (2):178-182. doi: 10.1094/PDIS-07-10-0510.
- Karaoglanidis, George S., Anastasios N. Markoglou, George A. Bardas, Eleftherios G. Doukas, Sotiris Konstantinou, and John F. Kalampokis. 2011. "Sensitivity of *Penicillium expansum* field isolates to tebuconazole, iprodione, fludioxonil and cyprodinil and characterization of fitness parameters and patulin production." *International Journal of Food Microbiology* 145 (1):195-204. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.017>.

- Karp, Peter D, Richard Billington, Ron Caspi, Carol A Fulcher, Mario Latendresse, Anamika Kothari, Ingrid M Keseler, Markus Krummenacker, Peter E Midford, Quang Ong, Wai Kit Ong, Suzanne M Paley, and Pallavi Subhraveti. 2017. "The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways." *Briefings in Bioinformatics* 20 (4):1085-1093. doi: 10.1093/bib/bbx085.
- Karp, Peter D, Christos A Ouzounis, Caroline Moore-Kochlacs, Leon Goldovsky, Pallavi Kaipa, Dag Ahrén, Sophia Tsoka, Nikos Darzentas, Victor Kunin, and Núria López-Bigas. 2005. "Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes." *Nucleic acids research* 33 (19):6083-6089.
- Kathawala, Rishil J., Pranav Gupta, Charles R. Ashby, and Zhe-Sheng Chen. 2015. "The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade." *Drug Resistance Updates* 18:1-17. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drup.2014.11.002>.
- Kato, Naoki, Wilhelmina Brooks, and Ana M. Calvo. 2003. "The Expression of Sterigmatocystin and Penicillin Genes in *Aspergillus nidulans* Is Controlled by *veA*, a Gene Required for Sexual Development." *Eukaryotic Cell* 2 (6):1178-1186. doi: <https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1178-1186.2003>.
- Kell, Douglas B., Marie Brown, Hazel M. Davey, Warwick B. Dunn, Irena Spasic, and Stephen G. Oliver. 2005. "Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message." *Nat Rev Micro* 3 (7):557-565.
- Kell, Douglas B., Paul D. Dobson, and Stephen G. Oliver. 2011. "Pharmaceutical drug transport: the issues and the implications that it is essentially carrier-mediated only." *Drug Discovery Today* 16 (15):704-714. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.05.010>.
- Kell, Douglas B., and Stephen G. Oliver. 2014. "How drugs get into cells: tested and testable predictions to help discriminate between transporter-mediated uptake and lipoidal bilayer diffusion." *Frontiers in pharmacology* 5:231-231. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00231>.
- Keller, Nancy P., Clint Nesbitt, Bashir Sarr, Timothy D. Phillips, and Gloria B. Burow. 1997. "pH Regulation of Sterigmatocystin and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus* spp." *Phytopathology* 87 (6):643-648. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.6.643>.
- Keller, NP, and TH Adams. 1995. "Analysis of a mycotoxin gene cluster in *Aspergillus nidulans*." *SAAS bulletin, biochemistry and biotechnology* 8:14-21.
- Keon, John PR, Gordon A White, and John A Hargreaves. 1991. "Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*." *Current genetics* 19 (6):475-481. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00312739>.

- Khakimov, Bekzod, José Manuel Amigo, Søren Bak, and Søren Balling Engelsen. 2012. "Plant metabolomics: Resolution and quantification of elusive peaks in liquid chromatography–mass spectrometry profiles of complex plant extracts using multi-way decomposition methods." *Journal of Chromatography A* 1266 (0):84-94. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.023>.
- Khoo, Soo Hean Gary, and Mohamed Al-Rubeai. 2007. "Metabolomics as a complementary tool in cell culture." *Biotechnology and applied biochemistry* 47 (2):71-84.
- Kim, Hee-Seo, Kyu-Yong Han, Kyung-Jin Kim, Dong-Min Han, Kwang-Yeop Jahng, and Keon-Sang Chae. 2002. "The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*." *Fungal Genetics and Biology* 37 (1):72-80. doi: [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00029-4).
- Kim, Hye Kyong, Young Hae Choi, and Robert Verpoorte. 2011. "NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go?" *Trends in Biotechnology* 29 (6):267-275. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.02.001>.
- Kitchen, Philip, Rebecca E. Day, Mootaz M. Salman, Matthew T. Conner, Roslyn M. Bill, and Alex C. Conner. 2015. "Beyond water homeostasis: Diverse functional roles of mammalian aquaporins." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850 (12):2410-2421. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.023>.
- Klich, Maren A. 2007. "*Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin." *Molecular Plant Pathology* 8 (6):713-722. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x>.
- Kniemeyer, Olaf, Frank Ebel, Thomas Krüger, Petra Bacher, Alexander Scheffold, Ting Luo, Maria Strassburger, and Axel A. Brakhage. 2016. "Immunoproteomics of *Aspergillus* for the development of biomarkers and immunotherapies." *PROTEOMICS – Clinical Applications* 10 (9-10):910-921. doi: <https://doi.org/10.1002/prca.201600053>.
- Knuf, C., and J. Nielsen. 2012. "Aspergilli: systems biology and industrial applications." *Biotechnol J* 7 (9):1147-1155. doi: <https://doi.org/10.1002/biot.201200169>.
- Koning, Harry de, and George Diallinas. 2000. "Nucleobase transporters." *Molecular Membrane Biology* 17 (2):75-94. doi: <http://doi.org/v10.1080/09687680050117101>.
- Kopka, Joachim, Nicolas Schauer, Stephan Krueger, Claudia Birkemeyer, Björn Usadel, Eveline Bergmüller, Peter Dörmann, Wolfram Weckwerth, Yves Gibon, Mark Stitt, Lothar Willmitzer, Alisdair R. Fernie, and Dirk Steinhauser. 2005. "GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database." *Bioinformatics* 21 (8):1635-1638. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti236>.

- Korkina, LG. 2007. "Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health." *Cell Mol Biol* 53 (1):15-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1170/T772>
- Köse, Meryem, and Anke C. Schiedel. 2009. "Nucleoside/nucleobase transporters: drug targets of the future?" *Future Medicinal Chemistry* 1 (2):303-326. doi: <http://doi.org/10.4155/fmc.09.29>.
- Koukaki, Marina, Eleni Giannoutsou, Amalia Karagouni, and George Diallinas. 2003. "A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation." *Journal of Microbiological Methods* 55 (3):687-695. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00208-2).
- Kreida, Stefan, and Susanna Törnroth-Horsefield. 2015. "Structural insights into aquaporin selectivity and regulation." *Current Opinion in Structural Biology* 33:126-134. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.08.004>.
- Kretschmer, Matthias, Michaela Leroch, Andreas Mosbach, Anne-Sophie Walker, Sabine Fillinger, Dennis Mernke, Henk-Jan Schoonbeek, Jean-Marc Pradier, Pierre Leroux, Maarten A. De Waard, and Matthias Hahn. 2009. "Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*." *PLoS Pathog* 5 (12):e1000696. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>.
- Kryptou, E., T. Evangelidis, J. Bobonis, A. A. Pittis, T. Gabaldon, C. Scazzocchio, E. Mikros, and G. Diallinas. 2015. "Origin, diversification and substrate specificity in the family of NCS1/FUR transporters." *Mol Microbiol* 96 (5):927-50. doi: <http://doi.org/10.1111/mmi.12982>.
- Kryptou, E., G. Lambrinidis, T. Evangelidis, E. Mikros, and G. Diallinas. 2014. "Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA." *Mol Microbiol* 93 (1):129-45. doi: <http://doi.org/10.1111/mmi.12646>.
- Kryptou, Emilia, and George Diallinas. 2014. "Transport assays in filamentous fungi: Kinetic characterization of the UapC purine transporter of *Aspergillus nidulans*." *Fungal Genetics and Biology* 63:1-8. doi: <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.12.004>.
- Kryptou, Emilia, Vasiliki Kosti, Sotiris Amillis, Vassilios Myrianthopoulos, Emmanuel Mikros, and George Diallinas. 2012. "Modeling, Substrate Docking, and Mutational Analysis Identify Residues Essential for the Function and Specificity of a Eukaryotic Purine-Cytosine NCS1 Transporter." *Journal of Biological Chemistry* 287 (44):36792-36803. doi: <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.400382>.
- Kumar, Awanish, and Anubhuti Jha. 2017. "Chapter 5 - Multidrug Resistance and Transporters." In *Anticandidal Agents*, 49-54. Academic Press.

- Kumari, Asha. 2018. "Chapter 17 - Purine Structures." In *Sweet Biochemistry*, edited by Asha Kumari, 89-91. Academic Press.
- Kurtov, Daria, James R Kinghorn, and Shiela E Unkles. 1999. "The *Aspergillus nidulans panB* gene encodes ketopantoate hydroxymethyltransferase, required for biosynthesis of pantothenate and Coenzyme A." *Molecular and General Genetics MGG* 262 (1):115-120. doi: <https://doi.org/10.1007/s004380051065>.
- Kusumaningtyas, E, R Widiastuti, and R Maryam. 2006. "Reduction of aflatoxin B1 in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination." *Mycopathologia* 162 (4):307-311. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-006-0047-4>.
- Lai, Zijuan, Hiroshi Tsugawa, Gert Wohlgemuth, Sajjan Mehta, Matthew Mueller, Yuxuan Zheng, Atsushi Ogiwara, John Meissen, Megan Showalter, Kohei Takeuchi, Tobias Kind, Peter Beal, Masanori Arita, and Oliver Fiehn. 2017. "Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics." *Nature Methods* 15:53. doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4512>.
- Lambert, David G. 2013. "Proteomics and metabolomics." *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 14 (4):169-170. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpaic.2013.02.007>.
- Lamping, Erwin, Philippe V. Baret, Ann R. Holmes, Brian C. Monk, Andre Goffeau, and Richard D. Cannon. 2010. "Fungal PDR transporters: Phylogeny, topology, motifs and function." *Fungal Genetics and Biology* 47 (2):127-142. doi: <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.10.007>.
- Lange, E., R. Tautenhahn, S. Neumann, and C. Gropl. 2008. "Critical assessment of alignment procedures for LC-MS proteomics and metabolomics measurements." *BMC Bioinformatics* 9. doi: 10.1186/1471-2105-9-375.
- Latgé, J. P. 1999. "*Aspergillus fumigatus* and aspergillosis." *Clinical microbiology reviews* 12 (2):310-350. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.12.2.310>.
- Leighton, J., and G. Schatz. 1995. "An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast." *EMBO J* 14. doi: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb06989.x>.
- Leon, Carlos, Irene Rodriguez-Meizoso, Marianna Lucio, Virginia Garcia-Cañas, Elena Ibañez, Philippe Schmitt-Kopplin, and Alejandro Cifuentes. 2009. "Metabolomics of transgenic maize combining Fourier transform-ion cyclotron resonance-mass spectrometry, capillary electrophoresis-mass spectrometry and pressurized liquid extraction." *Journal of Chromatography A* 1216 (43):7314-7323. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.092>.
- Lepper, Erin R , Kees Nooter, Jaap Verweij, Milin R Acharya, William D Figg, and Alex Sparreboom. 2005. "Mechanisms of resistance to anticancer drugs: the role of the

- polymorphic ABC transporters ABCB1 and ABCG2." *Pharmacogenomics* 6 (2):115-138. doi: <https://doi.org/10.1517/14622416.6.2.115>.
- Leroch, Michaela, Cecilia Plesken, Roland WS Weber, Frank Kauff, Gabriel Scalliet, and Matthias Hahn. 2013. "Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*." *Applied and environmental microbiology* 79 (1):159-167.
- Leroux, P, and G Berthier. 1988. "Resistance to carboxin and fenfuram in *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr., the causal agent of barley loose smut." *Crop Protection* 7 (1):16-19. doi: [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(88\)90031-2](https://doi.org/10.1016/0261-2194(88)90031-2).
- Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch, and A. S. Walker. 2010. "Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold." *Appl Environ Microbiol* 76 (19):6615-30. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.00931-10>.
- Leroux, Pierre, Florence Chapeland, Denis Desbrosses, and Michel Gredt. 1999. "Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards." *Crop Protection* 18 (10):687-697. doi: [10.1016/S0261-2194\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00074-5).
- Leroux, Pierre, and Anne-Sophie Walker. 2012. "Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of *Botrytis cinerea* displaying multidrug resistance." *European Journal of Plant Pathology* 135 (4):683-693. doi: <http://doi.org/10.1007/s10658-012-0105-3>.
- Leung, James, Alexander D. Cameron, George Diallinas, and Bernadette Byrne. 2013. "Stabilizing the heterologously expressed uric acid-xanthine transporter UapA from the lower eukaryote *Aspergillus nidulans*." *Molecular Membrane Biology* 30 (1):32-42. doi: <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.690572>.
- Li, Jun, Mingguo Zhou, Hongxia Li, Changjun Chen, Jianxing Wang, and Yujun Zhang. 2006. "A study on the molecular mechanism of resistance to amicarbazol in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*." *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* 62 (5):440-445. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.1187>.
- Li, Zhucui, Yan Lu, Yufeng Guo, Haijie Cao, Qinhong Wang, and Wenqing Shui. 2018. "Comprehensive evaluation of untargeted metabolomics data processing software in feature detection, quantification and discriminating marker selection." *Analytica Chimica Acta*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.001>.
- Lin, Swu-Jane, Jennifer Schranz, and Steven M Teutsch. 2001. "Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature." *Clinical Infectious Diseases* 32 (3):358-366. doi: <https://doi.org/10.1086/318483>.

- Lindon, John C, Elaine Holmes, and Jeremy K Nicholson. 2007. "Metabonomics in pharmaceutical R & D." *FEBS* 274 (5):1140-1151. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05673.x>.
- Liu, Yi, Jie Wen, Yunduo Wang, Yan Li, and Weijia Xu. 2010. "Postulating modes of action of compounds with antimicrobial activities through metabolomics analysis." *Chromatographia* 71 (3-4):253-258. doi: <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1447-7>.
- Lommen, Arjen. 2009. "MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing." *Analytical Chemistry* 81 (8):3079-3086. doi: 10.1021/ac900036d.
- Lu, Wenyun, Bryson D Bennett, and Joshua D Rabinowitz. 2008. "Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics." *Journal of Chromatography B* 871 (2):236-242. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.031>.
- Lucas, John A., Nichola J. Hawkins, and Bart A. Fraaije. 2015. "The Evolution of Fungicide Resistance." In *Advances in Applied Microbiology*, edited by Sariaslani Sima and Gadd Geoffrey Michael, 29-92. Academic Press.
- Luedemann, Alexander, Katrin Strassburg, Alexander Erban, and Joachim Kopka. 2008. "TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments." *Bioinformatics* 24 (5):732-737. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn023>.
- Luedemann, Alexander, Luise von Malotky, Alexander Erban, and Joachim Kopka. 2012. "TagFinder: Preprocessing Software for the Fingerprinting and the Profiling of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Based Metabolome Analyses." In *Plant Metabolomics: Methods and Protocols*, edited by Nigel W. Hardy and Robert D. Hall, 255-286. Totowa, NJ: Humana Press.
- Ma, Zhonghua, and Themis J Michailides. 2005. "Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi." *Crop Protection* 24 (10):853-863. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>.
- Madsen, Rasmus, Torbjörn Lundstedt, and Johan Trygg. 2010. "Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis." *Analytica chimica acta* 659 (1-2):23-33.
- Malandrakis, A., K. Vattis, A. Markoglou, and G. Karaoglanidis. 2014. "Biological and molecular characterization of *Penicillium expansum* isolates with laboratory-induced resistance to Succinate Dehydrogenase Inhibitors (SDHIs)." Braunschweig.
- Malandrakis, Anastasios A., Anastasios N. Markoglou, Sotiris Konstantinou, Eleftherios G. Doukas, John F. Kalampokis, and George S. Karaoglanidis. 2013. "Molecular

- characterization, fitness and mycotoxin production of benzimidazole-resistant isolates of *Penicillium expansum*." *International Journal of Food Microbiology* 162 (3):237-244. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.014>.
- Malandrakis, Anastasios A., Konstantinos N. Vattis, Anastasios N. Markoglou, and George S. Karaoglanidis. 2017. "Characterization of boscalid-resistance conferring mutations in the SdhB subunit of respiratory complex II and impact on fitness and mycotoxin production in *Penicillium expansum* laboratory strains." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 138:97-103. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.03.009>.
- Manach, C., L. Brennan, and L. O. Dragsted. 2015. "Using metabolomics to evaluate food intake: applications in nutritional epidemiology." In *Metabolomics as a Tool in Nutrition Research*, edited by J. L. Sébédio L. Brennan, 167-196. Woodhead Publishing.
- Manach, Claudine. 2016. "Metabolomics databases." *Food Metabolomics*:8.
- Manetti, Cesare, Cristiano Bianchetti, Lorena Casciani, Cecilia Castro, Maria Enrica Di Cocco, Alfredo Miccheli, Mario Motto, and Filippo Conti. 2006. "A metabonomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids." *Journal of Experimental Botany* 57 (11):2613-2625. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl025>.
- Marin, S., A. J. Ramos, G. Cano-Sancho, and V. Sanchis. 2013. "Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment." *Food Chem Toxicol* 60:218-37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>.
- Markoglou, Anastasios N., Eleftherios G. Doukas, and Anastasios A. Malandrakis. 2011. "Effect of anilinopyrimidine resistance on aflatoxin production and fitness parameters in *Aspergillus parasiticus* Speare." *International Journal of Food Microbiology* 146 (2):130-136. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.009>.
- Markoglou, Anastasios N., Eleftherios G. Doukas, and Basil N. Ziogas. 2008. "Phenylpyrrole-resistance and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* Speare." *International Journal of Food Microbiology* 127 (3):268-275. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.020>.
- Masiello, M., S. Somma, M. Haidukowski, A. F. Logrieco, and A. Moretti. 2020. "Genetic polymorphisms associated to SDHI fungicides resistance in selected *Aspergillus flavus* strains and relation with aflatoxin production." *International Journal of Food Microbiology* 334:108799. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108799>.
- Mastrangelo, Annalaura, Emily G Armitage, Antonia García, and Coral Barbas. 2014. "Metabolomics as a tool for drug discovery and personalised medicine. A review." *Current topics in medicinal chemistry* 14 (23):2627-2636.

- Mathre, DE. 1970. "Mode of action of oxathiin systemic fungicides. I. Effect of carboxin and oxycarboxin on the general metabolism of several basidiomycetes." *Phytopathology* 60 (4):671-676. doi: <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-671>.
- Mathre, DE. 1971. "Mode of action of oxathiin systemic fungicides: III. Effect on mitochondrial activities." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1 (2):216-224. doi: [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(71\)90198-2](https://doi.org/10.1016/0048-3575(71)90198-2).
- Matsson, Mikael, Brian AC Ackrell, Bruce Cochran, and Lars Hederstedt. 1998. "Carboxin resistance in *Paracoccus denitrificans* conferred by a mutation in the membrane-anchor domain of succinate: quinone reductase (complex II)." *Archives of microbiology* 170 (1):27-37. doi: <https://doi.org/10.1007/s002030050611>.
- Matsson, Mikael, and Lars Hederstedt. 2001. "The carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate: quinone reductase identified by mutations." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 33 (2):99-105. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1010744330092>.
- Maxwell, Denis P., Yong Wang, and Lee McIntosh. 1999. "The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (14):8271-8276. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8271>.
- May, Mike. 2017. "Big data, big picture: Metabolomics meets systems biology." *Science* 356 (6338):646-648.
- McDonald, Allison E., and Greg C. Vanlerberghe. 2004. "Branched Mitochondrial Electron Transport in the Animalia: Presence of Alternative Oxidase in Several Animal Phyla." *IUBMB Life* 56 (6):333-341. doi: <https://doi.org/10.1080/1521-6540400000876>.
- Mellon, Jay E, and Robert A Moreau. 2004. "Inhibition of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by diferuloylputrescine and p-coumaroylferuloylputrescine." *Journal of agricultural and food chemistry* 52 (21):6660-6663.
- Meyer, Vera, Bo Wu, and Arthur F. J. Ram. 2011. "*Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives." *Biotechnology Letters* 33 (3):469-476. doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0473-8>.
- Miguez, Monica, Charlotte Reeve, Paul M Wood, and Derek W Hollomon. 2004. "Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides." *Pest Management Science* 60 (1):3-7. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.837>.
- Mikros, Emmanuel, and George Diallinas. 2019. "Tales of tails in transporters." *Open Biology* 9 (6):190083. doi: <https://doi.org/10.1098/rsob.190083>.

- Miles, TD, LA Miles, KL Fairchild, and PS Wharton. 2014. "Screening and characterization of resistance to succinate dehydrogenase inhibitors in *Alternaria solani*." *Plant pathology* 63 (1):155-164. doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12077>.
- Miller, Marion G. 2007. "Environmental metabolomics: a SWOT analysis (strengths, weaknesses, opportunities, and threats)." *Journal of Proteome Research* 6 (2):540-545. doi: <https://doi.org/10.1021/pr060623x>.
- Minami, Hiromichi, Ju-Sung Kim, Nobuhiro Ikezawa, Tomoya Takemura, Takane Katayama, Hidehiko Kumagai, and Fumihiko Sato. 2008. "Microbial production of plant benzyloisoquinoline alkaloids." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (21):7393-7398. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0802981105>.
- Mishra, H. N., and Chitragada Das. 2003. "A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43 (3):245-264. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10408690390826518>.
- Misra, Biswapriya B., and Justin J. J. van der Hoof. 2016. "Updates in metabolomics tools and resources: 2014–2015." *ELECTROPHORESIS* 37 (1):86-110. doi: <https://doi.org/10.1002/elps.201500417>.
- Molnár, Ákos P., Zoltán Németh, Erzsébet Fekete, Michel Flippi, Nancy P. Keller, and Levente Karaffa. 2018. "Analysis of the Relationship between Alternative Respiration and Sterigmatocystin Formation in *Aspergillus nidulans*." *Toxins* 10 (4):168. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins10040168>.
- Moradi, Parviz, Brian Ford-Lloyd, and Jeremy Pritchard. 2017. "Metabolomic approach reveals the biochemical mechanisms underlying drought stress tolerance in thyme." *Analytical Biochemistry* 527:49-62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.02.006>.
- Morita, Masashi, and Tsuneo Imanaka. 2012. "Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822 (9):1387-1396. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.009>.
- Mullins, J, R Harvey, and A Seaton. 1976. "Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres)." *Clinical & Experimental Allergy* 6 (3):209-217. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1976.tb01899.x>.
- Nützmann, HW, Y Reyes-Dominguez, K Scherlach, V Schroeckh, F Horn, A Gacek, J Schümann, C Hertweck, J Strauss, and AA Brakhage. 2011. "Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation." *Proc Natl Acad Sci USA*. 108 (34):14282–7. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1103523108>.
- Navarro-Muñoz, Jorge C., Nelly Selem-Mojica, Michael W. Mallowney, Satria A. Kautsar, James H. Tryon, Elizabeth I. Parkinson, Emmanuel L. C. De Los Santos, Marley

- Yeong, Pablo Cruz-Morales, Sahar Abubucker, Arne Roeters, Wouter Lokhorst, Antonio Fernandez-Guerra, Luciana Teresa Dias Cappelini, Anthony W. Goering, Regan J. Thomson, William W. Metcalf, Neil L. Kelleher, Francisco Barona-Gomez, and Marnix H. Medema. 2020. "A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity." *Nature Chemical Biology* 16 (1):60-68. doi: <http://doi.org/10.1038/s41589-019-0400-9>.
- Nayak, Tania, Edyta Szewczyk, C. Elizabeth Oakley, Aysha Osmani, Leena Ukil, Sandra L. Murray, Michael J. Hynes, Stephen A. Osmani, and Berl R. Oakley. 2006. "A Versatile and Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus nidulans*." *Genetics* 172 (3):1557-1566. doi: <https://doi.org/10.1534/genetics.105.052563>.
- Nelson, David L, and Michael M Cox. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*: WH Freeman Publishers and Company, New York.
- Neto, Filipe Tenorio Lira, Ronmilson Alves Marques, Alexandre de Freitas Cavalcanti Filho, Leslie Clifford Noronha Araujo, Salvador Vilar Correia Lima, Licarion Pinto, and Ricardo Oliveira Silva. 2020. "¹H NMR-based metabonomics for infertility diagnosis in men with varicocele." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 37 (9):2233-2247. doi: <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01896-2>.
- Netzker, Tina, Juliane Fischer, Jakob Weber, Derek J. Mattern, Claudia C. König, Vito Valiante, Volker Schroeckh, and Axel A. Brakhage. 2015. "Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters." *Frontiers in Microbiology* 6 (299). doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00299>.
- Netzker, Tina, Michal Flak, Mario K. C. Krespach, Maria C. Stroe, Jakob Weber, Volker Schroeckh, and Axel A. Brakhage. 2018. "Microbial interactions trigger the production of antibiotics." *Current Opinion in Microbiology* 45:117-123. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.002>.
- Nevoigt, Elke, and Ulf Stahl. 1997. "Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Microbiology Reviews* 21 (3):231-241. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00058-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00058-2).
- Nicholson, Jeremy K., and John C. Lindon. 2008. "Systems biology: Metabonomics." *Nature* 455 (7216):1054-1056. doi: 10.1038/4551054a.
- Nielsen, Jens, and Michael C Jewett. 2007. "The role of metabolomics in systems biology." In *Metabolomics*, 1-10. Springer.
- Nielsen, Kristian Fog, Jesper Mølgaard Mogensen, Maria Johansen, Thomas O. Larsen, and Jens Christian Frisvad. 2009. "Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395 (5):1225-1242. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3081-5>.

- Nierman, W. C., G. May, H. S. Kim, M. J. Anderson, D. Chen, and D. W. Denning. 2005. "What the *Aspergillus* genomes have told us." *Medical Mycology* 43 (Supplement_1):S3-S5. doi: <https://doi.org/10.1080/13693780400029049>.
- Nigam, Sanjay K. 2015. "What do drug transporters really do?" *Nat Rev Drug Discov* 14 (1):29-44. doi: <http://doi.org/10.1038/nrd4461>.
- Noteborn, Hub PJM, Arjen Lommen, Robert C van der Jagt, and Joop M Weseman. 2000. "Chemical fingerprinting for the evaluation of unintended secondary metabolic changes in transgenic food crops." *Journal of Biotechnology* 77 (1):103-114.
- Novodvorska, M., M. Stratford, M. J. Blythe, R. Wilson, R. G. Beniston, and D. B. Archer. 2016. "Metabolic activity in dormant conidia of *Aspergillus niger* and developmental changes during conidial outgrowth." *Fungal Genet Biol* 94:23-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.07.002>.
- Novodvorska, Michaela, Kimran Hayer, Steven T. Pullan, Raymond Wilson, Martin J. Blythe, Hein Stam, Malcolm Stratford, and David B. Archer. 2013. "Transcriptional landscape of *Aspergillus niger* at breaking of conidial dormancy revealed by RNA-sequencing." *BMC Genomics* 14 (1):246. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-246>.
- Oakley, Berl R, Janet E Rinehart, Brenda L Mitchell, C Elizabeth Oakley, Cynthia Cannona, Gregory L Gray, and Gregory S May. 1987. "Cloning, mapping and molecular analysis of the *pyrG* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*." *Gene* 61 (3):385-399. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90201-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90201-0).
- Oakley, C. Elizabeth, Clifford F. Weil, Patricia L. Kretz, and Berl R. Oakley. 1987. "Cloning of the *riboB* locus of *Aspergillus nidulans*." *Gene* 53 (2):293-298. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90019-9).
- Oestreicher, N, and C Scazzocchio. 1993. "Sequence, regulation, and mutational analysis of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*." *Journal of Biological Chemistry* 268 (31):23382-9.
- Ohashi, Yoshiaki, Akiyoshi Hirayama, Takamasa Ishikawa, Seira Nakamura, Kaori Shimizu, Yuki Ueno, Masaru Tomita, and Tomoyoshi Soga. 2008. "Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS." *Molecular BioSystems* 4 (2):135-147. doi: <https://doi.org/10.1039/b714176a>.
- Oliver, David J, Basil Nikolau, and Eve Syrkin Wurtele. 2002. "Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses." *Metabolic engineering* 4 (1):98-106.
- Oliver, S. G. 1996. "From DNA sequence to biological function." *Nature* 379. doi: [10.1038/379597a0](https://doi.org/10.1038/379597a0).

- Omrane, Selim, Hind Sghyer, Colette Audéon, Catherine Lanen, Clémentine Duplaix, Anne-Sophie Walker, and Sabine Fillinger. 2015. "Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zyoseptoria tritici* field isolates." *Environmental Microbiology* 17 (8):2805-2823. doi: <http://doi.org/10.1111/1462-2920.12781>.
- Orth, HCJ, C Rentel, and PC Schmidt. 1999. "Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L." *Journal of pharmacy and pharmacology* 51 (2):193-200.
- Osharov, Nir, and Gregory May. 2000. "Conidial Germination in *Aspergillus nidulans* Requires RAS Signaling and Protein Synthesis." *Genetics* 155 (2):647-656.
- Osmani, Aysha H, Gregory S May, and Stephen A Osmani. 1999. "The Extremely Conserved *pyroA* Gene of *Aspergillus nidulans* Is Required for Pyridoxine Synthesis and Is Required Indirectly for Resistance to Photosensitizers." *Journal of Biological Chemistry* 274 (33):23565-23569. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23565>.
- Oyedotun, Kayode S., and Bernard D. Lemire. 2004. "The Quaternary Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Succinate Dehydrogenase: HOMOLOGY MODELING, COFACTOR DOCKING, AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION STUDIES." *Journal of Biological Chemistry* 279 (10):9424-9431. doi: <http://doi.org/10.1074/jbc.M311876200>.
- Palmer, Jonathan M., Jeffrey M. Theisen, Rocio M. Duran, W. Scott Grayburn, Ana M. Calvo, and Nancy P. Keller. 2013. "Secondary Metabolism and Development Is Mediated by LlmF Control of VeA Subcellular Localization in *Aspergillus nidulans*." *PLoS Genet* 9 (1):e1003193. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003193>.
- Panagiotou, G., I. Kouskoumvekaki, S. Ó. Jónsdóttir, and L. Olsson. 2007. "Monitoring novel metabolic pathways using metabolomics and machine learning; induction of the phosphoketolase pathway in *Aspergillus nidulans* cultivations." *Metabolomics* 3 (4):503-516. doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0061-7>.
- Pantazopoulou, Areti, and George Diallinas. 2007. "Fungal nucleobase transporters." *FEMS Microbiology Reviews* 31 (6):657-675. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00083.x>.
- Pantazopoulou, Areti, Njimoh Dieudonné Lemuh, Dimitris G. Hatzinikolaou, Christine Drevet, Gianna Cecchetto, Claudio Scazzocchio, and George Diallinas. 2007. "Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*." *Fungal Genetics and Biology* 44 (7):627-640. doi: <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.10.003>.
- Paoletti, Mathieu, Fabian A. Seymour, Marcos J. C. Alcocer, Naveet Kaur, Ana M. Calvo, David B. Archer, and Paul S. Dyer. 2007. "Mating Type and the Genetic Basis of

- Self-Fertility in the Model Fungus *Aspergillus nidulans*." *Current Biology* 17 (16):1384-1389. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.012>.
- Papadaki, Georgia F., Sotiris Amillis, and George Diallinas. 2017. "Substrate Specificity of the FurE Transporter Is Determined by Cytoplasmic Terminal Domain Interactions." *Genetics*. doi: <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300327>.
- Papadaki, Georgia F., George Lambrinidis, Andreas Zamanos, Emmanuel Mikros, and George Diallinas. 2019. "Cytosolic N- and C-Termini of the *Aspergillus nidulans* FurE Transporter Contain Distinct Elements that Regulate by Long-Range Effects Function and Specificity." *Journal of Molecular Biology* 431 (19):3827-3844. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.013>.
- Patron, Deryck Damian. 2006. "*Aspergillus*, health implication & recommendations for public health food safety." *International Journal of Food Safety* 8:19-23.
- Paulussen, Caroline, John E. Hallsworth, Sergio Álvarez-Pérez, William C. Nierman, Philip G. Hamill, David Blain, Hans Rediers, and Bart Lievens. 2017. "Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species." *Microbial Biotechnology* 10 (2):296-322. doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>.
- Payne, G. A. , and M. P. Brown. 1998. "Genetics and Physiology of Aflatoxin Biosynthesis." *Annual Review of Phytopathology* 36 (1):329-362. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.329>.
- Payne, GA, WC Nierman, JR Wortman, BL Pritchard, D Brown, RA Dean, Deepak Bhatnagar, TE Cleveland, Masayuki Machida, and Jiujiang Yu. 2006. "Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*." *Medical Mycology* 44 (Supplement_1):S9-S11. doi: <https://doi.org/10.1080/13693780600835716>.
- Payne, Gary A., Jiujiang Yu, William C Nierman, Masayuki Machida, Deepak Bhatnagar, Thomas E Cleveland, and Ralph A Dean. 2007. "A First Glance into the Genome Sequence of *Aspergillus flavus*." In *The Aspergilli*, 35-44. CRC Press.
- Pearce, Tamiaka Lee, Calum Rae Wilson, David Hugh Gent, and Jason Barry Scott. 2019. "Multiple mutations across the succinate dehydrogenase gene complex are associated with boscalid resistance in *Didymella tanacetii* in pyrethrum." *PloS one* 14 (6):e0218569-e0218569. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218569>.
- Pel, Herman J, Johannes H De Winde, David B Archer, Paul S Dyer, Gerald Hofmann, Peter J Schaap, Geoffrey Turner, Ronald P De Vries, Richard Albang, and Kaj Albermann. 2007. "Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88." *Nature biotechnology* 25 (2):221. doi: <https://doi.org/10.1038/nbt1282>.

- Pereira, Cátia D., Filipa Martins, Jens Wiltfang, Odete A. B. da Cruz e Silva, and Sandra Rebelo. 2018. "ABC Transporters Are Key Players in Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 61:463-485. doi: <https://doi.org/10.3233/JAD-170639>.
- Perland, Emelie, and Robert Fredriksson. 2017. "Classification Systems of Secondary Active Transporters." *Trends in Pharmacological Sciences* 38 (3):305-315. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.008>.
- Perrone, G., A. Susca, G. Cozzi, K. Ehrlich, J. Varga, J. C. Frisvad, M. Meijer, P. Noonim, W. Mahakarnchanakul, and R. A. Samson. 2007. "Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products." *Studies in Mycology* 59:53-66. doi: <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>.
- Pettersson, Nina, Caroline Filipsson, Evren Becit, Lars Brive, and Stefan Hohmann. 2005. "Aquaporins in yeasts and filamentous fungi." *Biology of the Cell* 97 (7):487-500. doi: <https://doi.org/10.1042/BC20040144>.
- Piddock, L. J. 2006. "Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance." *Nat Rev Microbiol* 4. doi: <http://doi.org/10.1038/nrmicro1464>.
- Pierens, Gregory K, Meredith E Palframan, Carolyn J Tranter, Anthony R Carroll, and Ronald J Quinn. 2005. "A robust clustering approach for NMR spectra of natural product extracts." *Magnetic Resonance in Chemistry* 43 (5):359-365. doi: <https://doi.org/10.1002/mrc.1562>.
- Pinu, Farhana R. 2015. "Metabolomics-The new frontier in food safety and quality research." *Food Research International* 72 (0):80-81. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.028>.
- Pinu, Farhana R., Ninna Granucci, James Daniell, Ting-Li Han, Sonia Carneiro, Isabel Rocha, Jens Nielsen, and Silas G. Villas-Boas. 2018. "Metabolite secretion in microorganisms: the theory of metabolic overflow put to the test." *Metabolomics* 14 (4):43. doi: [10.1007/s11306-018-1339-7](https://doi.org/10.1007/s11306-018-1339-7).
- Pinu, Farhana R., and Silas G. Villas-Boas. 2017. "Extracellular Microbial Metabolomics: The State of the Art." *Metabolites* 7 (3):43. doi: [10.3390/metabo7030043](https://doi.org/10.3390/metabo7030043).
- Pinu, Farhana R., Silas G. Villas-Boas, and Raphael Aggio. 2017. "Analysis of Intracellular Metabolites from Microorganisms: Quenching and Extraction Protocols." *Metabolites* 7 (4):53. doi: [10.3390/metabo7040053](https://doi.org/10.3390/metabo7040053).
- Plimmer, Jack R. 2003. *Encyclopedia of agrochemicals*: Wiley-Interscience.
- Pluskal, Tomáš, Sandra Castillo, Alejandro Villar-Briones, and Matej Orešič. 2010. "MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data." *BMC Bioinformatics* 11 (395). doi: [10.1186/1471-2105-11-395](https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395).

- Pontecorvo, Gr, JA Roper, LM Chemmons, KD MacDonald, and AWJ Bufton. 1953. "The genetics of *Aspergillus nidulans*." In *Advances in genetics*, 141-238. Elsevier.
- Posteraro, B., M. Sanguinetti, D. Sanglard, S. M. La, S. Boccia, L. Romano, G. Morace, and G. Fadda. 2003. "Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole." *Mol Microbiol* 47. doi: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03281.x>.
- Prasad, Rajendra, Nitesh Kumar Khandelwal, and Atanu Banerjee. 2016. "Yeast ABC transporters in lipid trafficking." *Fungal Genetics and Biology* 93:25-34. doi: <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.05.008>.
- Prior, BA, and S Hohmann. 1997. "Glycerol production and osmoregulation." *Yeast sugar metabolism*:313-337.
- Puchades-Carrasco, Leonor, and Antonio Pineda-Lucena. 2015. "Metabolomics in pharmaceutical research and development." *Current Opinion in Biotechnology* 35:73-77. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.04.004>.
- Purvis, J. E., L. P. Yomano, and L. O. Ingram. 2005. "Enhanced Trehalose Production Improves Growth of *Escherichia coli* under Osmotic Stress." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (7):3761-3769. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.7.3761-3769.2005>.
- Ragsdale, Nancy N, and HD Sisler. 1970. "Metabolic effects related to fungitoxicity of carboxin." *Phytopathology* 60 (10):1422-1427.
- Raja, Huzefa A, Andrew N Miller, Cedric J Pearce, and Nicholas H Oberlies. 2017. "Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community." *Journal of natural products* 80 (3):756-770.
- Ramautar, Rawi, Ruud Berger, Jan van der Greef, and Thomas Hankemeier. 2013. "Human metabolomics: strategies to understand biology." *Current opinion in chemical biology* 17 (5):841-846. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.015>.
- Ramírez-Camejo, Luis A., Anabella Zuluaga-Montero, María Lázaro-Escudero, Verónica Hernández-Kendall, and Paul Bayman. 2012. "Phylogeography of the cosmopolitan fungus *Aspergillus flavus*: is everything everywhere?" *Fungal Biology* 116 (3):452-463. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2012.01.006>.
- Ramsay, Rona R, BA Ackrell, Christopher J Coles, Thomas P Singer, Gordon A White, and G Denis Thorn. 1981. "Reaction site of carboxanilides and of thenoyltrifluoroacetone in complex II." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (2):825-828. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.2.825>.

- Rank, Christian, Kristian F. Nielsen, Thomas O. Larsen, Janos Varga, Rob A. Samson, and Jens C. Frisvad. 2011. "Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi." *Fungal Biology* 115 (4–5):406-420. doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.013>.
- Rask-Andersen, Mathias, Surendar Masuram, Robert Fredriksson, and Helgi B. Schiöth. 2013. "Solute carriers as drug targets: Current use, clinical trials and prospective." *Molecular Aspects of Medicine* 34 (2):702-710. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.015>.
- Ray, Debashish, Hilal Kazan, Kate B. Cook, Matthew T. Weirauch, Hamed S. Najafabadi, Xiao Li, Serge Gueroussov, Mihai Albu, Hong Zheng, Ally Yang, Hong Na, Manuel Irimia, Leah H. Matzat, Ryan K. Dale, Sarah A. Smith, Christopher A. Yarosh, Seth M. Kelly, Behnam Nabet, Desirea Mecenas, Weimin Li, Rakesh S. Laishram, Mei Qiao, Howard D. Lipshitz, Fabio Piano, Anita H. Corbett, Russ P. Carstens, Brendan J. Frey, Richard A. Anderson, Kristen W. Lynch, Luiz O. F. Penalva, Elissa P. Lei, Andrew G. Fraser, Benjamin J. Blencowe, Quaid D. Morris, and Timothy R. Hughes. 2013. "A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation." *Nature* 499 (7457):172-177. doi: <https://doi.org/10.1038/nature12311>.
- Ravagnani, Adriana, Lisette Gorfinkiel, Timothy Langdon, George Diallinas, Elisabeth Adjadj, Stéphane Demais, Diana Gorton, Herbert N. Arst, and Claudio Scazzocchio. 1997. "Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA." *The EMBO Journal* 16 (13):3974-3986. doi: <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3974>.
- Reed, Robert H, JA Chudek, Roy Foster, and GM Gadd. 1987. "Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts." *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (9):2119-2123.
- Rees, Douglas C., Eric Johnson, and Oded Lewinson. 2009. "ABC transporters: the power to change." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (3):218-227. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm2646>.
- Ribeiro, Liliane F. C., Cynthia Chelius, Karthik R. Boppidi, Nisha S. Naik, Simin Hossain, Jessica J. J. Ramsey, Jyothi Kumar, Lucas F. Ribeiro, Marc Ostermeier, Bao Tran, Young Ah Goo, Leandro J. de Assis, Mevlut Ulas, Ozgur Bayram, Gustavo H. Goldman, Stephen Lincoln, Ranjan Srivastava, Steven D. Harris, and Mark R. Marten. 2019. "Comprehensive Analysis of *Aspergillus nidulans* PKA Phosphorylome Identifies a Novel Mode of CreA Regulation." *mBio* 10 (2):e02825-18. doi: <https://doi.org/10.1128/mBio.02825-18>.
- Robertson, L. S., H. C. Causton, R. A. Young, and G. R. Fink. 2000. "The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function." *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (11):5984-5988. doi: 10.1073/pnas.100113397.
- Robey, Robert W., Kristen M. Pluchino, Matthew D. Hall, Antonio T. Fojo, Susan E. Bates, and Michael M. Gottesman. 2018. "Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer." *Nature Reviews Cancer* 18 (7):452-464. doi: <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>.
- Roessner, Ute, Silas G Villas-Bôas, Michael AE Hansen, Jørn Smedsgaard, and Jens Nielsen. 2007. "The chemical challenge of the metabolome." In *Metabolome Analysis: An Introduction*, 15-38.
- Rohn, Hendrik, Astrid Junker, Anja Hartmann, Eva Grafahrend-Belau, Hendrik Treutler, Matthias Klapperstück, Tobias Czauderna, Christian Klukas, and Falk Schreiber. 2012. "VANTED v2: a framework for systems biology applications." *BMC Systems Biology* 6 (1):139. doi: <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-139>.
- Rosemeyer, Helmut. 2004. "The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products." *Chemistry & Biodiversity* 1 (3):361-401. doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200490033>.
- Ruijter, George J. G., Maarten Bax, Hema Patel, Simon J. Flitter, Peter J. I. van de Vondervoort, Ronald P. de Vries, Patricia A. vanKuyk, and Jaap Visser. 2003. "Mannitol Is Required for Stress Tolerance in *Aspergillus niger* Conidiospores." *Eukaryotic Cell* 2 (4):690-698. doi: <https://doi.org/10.1128/ec.2.4.690-698.2003>.
- Russel, Frans G. M. 2010. "Transporters: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal." In, 27-49.
- Rustom, Ismail Y. S. 1997. "Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods." *Food Chemistry* 59 (1):57-67. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00096-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00096-9).
- Rutledge, Robert M., Lothar Esser, Jichun Ma, and Di Xia. 2011. "Toward understanding the mechanism of action of the yeast multidrug resistance transporter Pdr5p: A molecular modeling study." *Journal of Structural Biology* 173 (2):333-344. doi: <http://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.10.012>.
- Rutter, Jared, Dennis R. Winge, and Joshua D. Schiffman. 2010. "Succinate Dehydrogenase-Assembly, Regulation and Role in Human Disease." *Mitochondrion* 10 (4):393-401. doi: <http://doi.org/10.1016/j.mito.2010.03.001>.
- Sambrook, Joseph, Edward F Fritsch, and Tom Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Samson, R. A., C. M. Visagie, J. Houbraeken, S. B. Hong, V. Hubka, C. H. W. Klaassen, G. Perrone, K. A. Seifert, A. Susca, J. B. Tanney, J. Varga, S. Kocsubé, G. Szigeti, T. Yaguchi, and J. C. Frisvad. 2014. "Phylogeny, identification and nomenclature

- of the genus *Aspergillus*." *Studies in mycology* 78:141-173. doi: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>.
- Sánchez-Gómez, Francisco J., Beatriz Díez-Dacal, Elena García-Martín, José A. G. Agúndez, María A. Pajares, and Dolores Pérez-Sala. 2016. "Detoxifying Enzymes at the Cross-Roads of Inflammation, Oxidative Stress, and Drug Hypersensitivity: Role of Glutathione Transferase P1-1 and Aldose Reductase." *Frontiers in Pharmacology* 7 (237). doi: 10.3389/fphar.2016.00237.
- Sang, Hyunkyū, Jon Hulvey, James T. Popko, John Lopes, Aishwarya Swaminathan, Taehyun Chang, and Geunhwa Jung. 2015. "A pleiotropic drug resistance transporter is involved in reduced sensitivity to multiple fungicide classes in *Sclerotinia homoeocarpa* (F.T. Bennett)." *Molecular Plant Pathology* 16 (3):251-261. doi: <http://doi.org/10.1111/mpp.12174>.
- Sang, Hyunkyū, and Hyang Burm Lee. 2020. "Molecular Mechanisms of Succinate Dehydrogenase Inhibitor Resistance in Phytopathogenic Fungi." *Research in Plant Disease* 26 (1):1-7. doi: <https://doi.org/10.5423/RPD.2020.26.1.1>.
- Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod, and J. Bille. 1997. "Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene." *Microbiology* 143. doi: <http://doi.org/10.1099/00221287-143-2-405>.
- Sanguinetti, M., B. Posteraro, S. M. La, R. Torelli, B. Fiori, R. Santangelo, G. Delogu, and G. Fadda. 2006. "Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*." *Infect Immun* 74. doi: <http://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1352-1359.2006>.
- Sansone, Susanna-Assunta, Teresa Fan, Royston Goodacre, Julian L Griffin, Nigel W Hardy, Rima Kaddurah-Daouk, Bruce S Kristal, John Lindon, Pedro Mendes, Norman Morrison, Basil Nikolau, Don Robertson, Lloyd W Sumner, Chris Taylor, Mariët van der Werf, Ben van Ommen, and Oliver Fiehn. 2007. "The Metabolomics Standards Initiative." *Nat Biotech* 25 (8):846-848. doi: <https://doi.org/10.1038/nbt0807-846b>.
- Sato, Shigeru, Masanori Arita, Tomoyoshi Soga, Takaaki Nishioka, and Masaru Tomita. 2008. "Time-resolved metabolomics reveals metabolic modulation in rice foliage." *BMC systems biology* 2 (1):51. doi: <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-51>.
- Sauer, Michael, Danilo Porro, Diethard Mattanovich, and Paola Branduardi. 2008. "Microbial production of organic acids: expanding the markets." *Trends in Biotechnology* 26 (2):100-108. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.11.006>.
- Saurin, William, Maurice Hofnung, and Elie Dassa. 1999. "Getting In or Out: Early Segregation Between Importers and Exporters in the Evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters." *Journal of Molecular Evolution* 48 (1):22-41. doi: <https://doi.org/10.1007/PL00006442>.

- Sazanov, Leonid A. 2015. "A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (6):375-388. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm3997>.
- Scalliet, Gabriel, Judith Bowler, Torsten Luksch, Lucy Kirchhofer-Allan, Diana Steinhauer, Keith Ward, Michael Niklaus, Andreas Verras, Michael Csukai, Antoine Daina, and Raymonde Fonné-Pfister. 2012. "Mutagenesis and Functional Studies with Succinate Dehydrogenase Inhibitors in the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*." *PLOS ONE* 7 (4):e35429. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035429>.
- Scazzocchio, Claudio. 2019. "Aspergillus: A Multifaceted Genus☆." In *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)*, edited by Thomas M. Schmidt, 262-292. Oxford: Academic Press.
- Scazzocchio, Claudio, and Herbert N Arst. 1978. "The nature of an initiator constitutive mutation in *Aspergillus nidulans*." *Nature* 274 (5667):177-179. doi: <https://doi.org/10.1038/274177a0>.
- Schäfer, Ralf B., Matthias Liess, Rolf Altenburger, Juliane Filser, Henner Hollert, Martina Roß-Nickoll, Andreas Schäfer, and Martin Scheringer. 2019. "Future pesticide risk assessment: narrowing the gap between intention and reality." *Environmental Sciences Europe* 31 (1):21. doi: <http://doi.org/10.1186/s12302-019-0203-3>.
- Scheidegger, KA, and GA Payne. 2003. "Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics." *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 22 (2-3):423-459. doi: <https://doi.org/10.1081/TXR-120024100>.
- Schellenberger, J., J. O. Park, T. M. Conrad, and B. O. Palsson. 2010. "BiGG: a Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions." *BMC Bioinforma* 11. doi: [10.1186/1471-2105-11-213](https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-213).
- Schmidt-Dannert, C. 2015. "Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 148:19-61. doi: https://doi.org/10.1007/10_2014_283.
- Schmitt, Lutz, and Robert Tampé. 2002. "Structure and mechanism of ABC transporters." *Current Opinion in Structural Biology* 12 (6):754-760. doi: [http://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00399-8](http://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00399-8).
- Schuller, C., B. E. Bauer, and K. Kuchler. 2003. "Inventory and evolution of fungal ABC protein genes." In *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, edited by I. B. Holland, S. P. C. Cole, K. Kuchler and C. F. Higgins.
- Schuster, E, N Dunn-Coleman, JC Frisvad, and PW Van Dijck. 2002. "On the safety of *Aspergillus niger*—a review." *Applied microbiology and biotechnology* 59 (4-5):426-435. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>.

- Segal, Brahm H. 2009. "Aspergillosis." *New England Journal of Medicine* 360 (18):1870-1884. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMra0808853>.
- Sevastos, A., I. F. Kalampokis, A. Panagiotopoulou, M. Pelecanou, and K. A. Aliferis. 2018. "Implication of *Fusarium graminearum* primary metabolism in its resistance to benzimidazole fungicides as revealed by ¹H-NMR metabolomics." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 148:50-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.015>.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker. 2003. "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." *Genome Res* 13. doi: [10.1101/gr.1239303](https://doi.org/10.1101/gr.1239303).
- Shen, Bo, Stefan Hohmann, Richard G. Jensen, and Hans J. Bohnert. 1999. "Roles of Sugar Alcohols in Osmotic Stress Adaptation. Replacement of Glycerol by Mannitol and Sorbitol in Yeast." *Plant Physiology* 121 (1):45-52. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.45>.
- Shen, Yufeng, Rui Zhang, Ronald J Moore, Jeongkwon Kim, Thomas O Metz, Kim K Hixson, Rui Zhao, Eric A Livesay, Harold R Udseth, and Richard D Smith. 2005. "Automated 20 kpsi RPLC-MS and MS/MS with chromatographic peak capacities of 1000-1500 and capabilities in proteomics and metabolomics." *Analytical chemistry* 77 (10):3090-3100. doi: <https://doi.org/10.1021/ac0483062>.
- Shimizu, Takafumi, Mutsumi Watanabe, Alisdair R. Fernie, and Takayuki Tohge. 2018. "Targeted LC-MS Analysis for Plant Secondary Metabolites." In *Plant Metabolomics: Methods and Protocols*, edited by Carla António, 171-181. New York, NY: Springer New York.
- Shinbo, Y, Y Nakamura, Md Altaf-Ul-Amin, H Asahi, K Kurokawa, M Arita, K Saito, D Ohta, D Shibata, and S Kanaya. 2006. "KNApSAcK: a comprehensive species-metabolite relationship database." In *Plant metabolomics*, 165-181. Springer.
- Shulaev, Vladimir. 2006. "Metabolomics technology and bioinformatics." *Briefings in Bioinformatics* 7 (2):128-139. doi: [10.1093/bib/bbl012](https://doi.org/10.1093/bib/bbl012).
- Sierotzki, Helge, and Gabriel Scalliet. 2013. "A Review of Current Knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides." *Phytopathology* 103 (9):880-887. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW>.
- Sioupouli, Georgia, George Lambrinidis, Emmanuel Mikros, Sotiris Amillis, and George Diallinas. 2016. "Cryptic purine transporters in *Aspergillus nidulans* reveal the role of specific residues in the evolution of specificity in the NCS1 family." *Molecular Microbiology*:n/a-n/a. doi: <http://doi.org/10.1111/mmi.13559>.

- Skinner, W., A. Bailey, A. Renwick, J. Keon, S. Gurr, and J. Hargreaves. 1998. "A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*." *Current Genetics* 34 (5):393-398. doi: <https://doi.org/10.1007/s002940050412>.
- Skov, J., M. Lemmens, and H. Giese. 2004. "Role of a *Fusarium culmorum* ABC transporter (FcABC1) during infection of wheat and barley." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64 (5):245-254. doi: <http://doi.org/10.1016/j.pmp.2004.09.005>.
- Slaven, J. W., M. J. Anderson, D. Sanglard, G. K. Dixon, J. Bille, I. S. Roberts, and D. W. Denning. 2002. "Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate." *Fungal Genet Biol* 36. doi: [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00016-6).
- Smith, P. M. C., and C. A. Atkins. 2002. "Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation." *Plant Physiol* 128. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.010912>.
- Solomon, Peter S., Ormonde D. C. Waters, and Richard P. Oliver. 2007. "Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi." *Trends in Microbiology* 15 (6):257-262. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.002>.
- Soukup, AA, YM Chiang, Bok JW, Y Reyes-Dominguez, Oakley. BR, CCC Wang, J Strauss, and NP Keller. 2012. "Overexpression of the *Aspergillus nidulans* histone 4 acetyltransferase EsaA increases activation of secondary metabolite production." *Mol Microbiol*. 86 (2):314–30. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08195.x>.
- Soveral, Graça, Catarina Prista, Teresa F. Moura, and Maria C. Loureiro-Dias. 2011. "Yeast water channels: an overview of orthodox aquaporins." *Biology of the Cell* 103 (1):35-54. doi: <https://doi.org/10.1042/bc20100102>.
- Stadler, Marc, Fabienne Flessa, Gerhard Rambold, Derek Peršoh, Marc Stadler, Jacques Fournier, Thomas Læssøe, Andrzej Chlebicki, Christian Lechat, and Derek Peršoh. 2010. "Chemotaxonomic and phylogenetic studies of *Thamnomycetes* (*Xylariaceae*)." *Mycoscience* 51 (3):189-207. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/S10267-009-0028-9>.
- Stammler, G, HD Brix, A Glättli, M Semar, and U Schoefl. 2007. "Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action." Proc. XVI Intional Plant Protection Congress, Glasgow.
- Stammler, G, HD Brix, B Nave, R Gold, and U Schoefl. 2008. "Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action." Modern fungicides and antifungal compounds V: 15th International Reinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany, May 6-10, 2007.

- Stammler, G, A Glättli, A Koch, and S Schlehuber. 2011. "Mutations in the target protein conferring resistance to SDHI fungicides." *Modern fungicides and antifungal compounds VI. 16th International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany, April 25-29, 2010.*
- Stammler, Gerd, Antje Wolf, Alice Glaettli, and Kristin Klappach. 2015. "Respiration inhibitors: complex II." In *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*, 105-117. Springer.
- Stein, Wilfred D, and Thomas Litman. 2014. *Channels, carriers, and pumps: an introduction to membrane transport*. Elsevier.
- Steyfkens, Fenella, Zhiqiang Zhang, Griet Van Zeebroeck, and Johan M. Thevelein. 2018. "Multiple Transceptors for Macro- and Micro-Nutrients Control Diverse Cellular Properties Through the PKA Pathway in Yeast: A Paradigm for the Rapidly Expanding World of Eukaryotic Nutrient Transceptors Up to Those in Human Cells." *Frontiers in Pharmacology* 9 (191). doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00191>.
- Stinnett, Suzanne M., Eduardo A. Espeso, Laura Cobeño, Lidia Araújo-Bazán, and Ana M. Calvo. 2007. "Aspergillus nidulans VeA subcellular localization is dependent on the importin α carrier and on light." *Molecular Microbiology* 63 (1):242-255. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05506.x>.
- Stoop, Johan M. H., John D. Williamson, and D. Mason Pharr. 1996. "Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress." *Trends in Plant Science* 1 (5):139-144. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80048-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80048-3).
- Storck, Veronika, Dimitrios G. Karpouzas, and Fabrice Martin-Laurent. 2017. "Towards a better pesticide policy for the European Union." *Science of The Total Environment* 575:1027-1033. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.167>.
- Sturm, Laura, Bernadette Geißel, Ronny Martin, and Johannes Wagener. 2020. "Differentially Regulated Transcription Factors and ABC Transporters in a Mitochondrial Dynamics Mutant Can Alter Azole Susceptibility of Aspergillus fumigatus." *Frontiers in microbiology* 11:1017-1017. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01017>.
- Sumner, Lloyd W., Pedro Mendes, and Richard A. Dixon. 2003. "Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era." *Phytochemistry* 62 (6):817-836. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00708-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00708-2).
- Sun, Fei, Xia Huo, Yujia Zhai, Aojin Wang, Jianxing Xu, Dan Su, Mark Bartlam, and Zihe Rao. 2005. "Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II." *Cell* 121 (7):1043-1057. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>.

- Svanström, Åsa, and Petter Melin. 2013. "Intracellular trehalase activity is required for development, germination and heat-stress resistance of *Aspergillus niger* conidia." *Research in Microbiology* 164 (2):91-99. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.10.018>.
- Swart, Klaas, Diana van Heemst, Marijke Slakhorst, Fons Debets, and Christa Heyting. 2001. "Isolation and Characterization of Sexual Sporulation Mutants of *Aspergillus nidulans*." *Fungal Genetics and Biology* 33 (1):25-35. doi: <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1266>.
- Takata, Kuniaki, Toshiyuki Matsuzaki, and Yuki Tajika. 2004. "Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane." *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 39 (1):1-83. doi: <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2004.03.001>.
- Tedersoo, Leho, and Björn Lindahl. 2016. "Fungal identification biases in microbiome projects." *Environmental microbiology reports* 8 (5):774-779.
- Teertstra, Wieke R., Martin Tegelaar, Jan Dijksterhuis, Elena A. Golovina, Robin A. Ohm, and Han A. B. Wösten. 2017. "Maturation of conidia on conidiophores of *Aspergillus niger*." *Fungal Genetics and Biology* 98:61-70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.12.005>.
- Tekaia, Fredj, and Jean-Paul Latgé. 2005. "*Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen?" *Current Opinion in Microbiology* 8 (4):385-392. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.017>.
- ter Beek, Josy, Albert Guskov, and Dirk Jan Slotboom. 2014. "Structural diversity of ABC transporters." *Journal of General Physiology* 143 (4):419-435. doi: <https://doi.org/10.1085/jgp.201411164>.
- Teutschbein, Janka, Daniela Albrecht, Maria Pötsch, Reinhard Guthke, Vishukumar Aimananda, Cécile Clavaud, Jean-Paul Latgé, Axel A Brakhage, and Olaf Knimeyer. 2010. "Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*." *Journal of Proteome Research* 9 (7):3427-3442. doi: <https://doi.org/10.1021/pr9010684>.
- Theodoulou, Frederica L., and Ian D. Kerr. 2015. "ABC transporter research: going strong 40 years on." *Biochemical Society Transactions* 43 (5):1033-1040. doi: <https://doi.org/10.1042/bst20150139>.
- Tian, Fei, Sang Yoo Lee, So Young Woo, and Hyang Sook Chun. 2020. "Alternative Oxidase: A Potential Target for Controlling Aflatoxin Contamination and Propagation of *Aspergillus flavus*." *Frontiers in Microbiology* 11 (419). doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00419>.
- Tilburn, Joan, Claudio Scazzocchio, Graham G. Taylor, Jaime H. Zabicky-Zissman, Robin A. Lockington, and R. Wayne Davies. 1983. "Transformation by integration in

- Aspergillus nidulans*." *Gene* 26 (2–3):205-221. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90191-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90191-9).
- Tischler, Benjamin Y., and Tobias M. Hohl. 2019. Menacing Mold: Recent Advances in *Aspergillus* Pathogenesis and Host Defense. *Journal of Molecular Biology* (21): 4229-4246. Accessed 2019/06/07/. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.027>.
- Todd, Richard B., Meryl A. Davis, and Michael J. Hynes. 2007. "Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction." *Nature Protocols* 2 (4):811-821. doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.112>.
- Tsugawa, Hiroshi, Tomas Cajka, Tobias Kind, Yan Ma, Brendan Higgins, Kazutaka Ikeda, Mitsuhiro Kanazawa, Jean VanderGheynst, Oliver Fiehn, and Masanori Arita. 2015. "MS-DIAL: Data Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive Metabolome Analysis." *Nature methods* 12 (6):523-526. doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>.
- Tsugawa, Hiroshi, Kazutaka Ikeda, Mikiko Takahashi, Aya Satoh, Yoshifumi Mori, Haruki Uchino, Nobuyuki Okahashi, Yutaka Yamada, Ipputa Tada, Paolo Bonini, Yasuhiro Higashi, Yozo Okazaki, Zhiwei Zhou, Zheng-Jiang Zhu, Jeremy Koelmel, Tomas Cajka, Oliver Fiehn, Kazuki Saito, Masanori Arita, and Makoto Arita. 2020. "A lipidome atlas in MS-DIAL 4." *Nature Biotechnology* 38 (10):1159-1163. doi: [10.1038/s41587-020-0531-2](https://doi.org/10.1038/s41587-020-0531-2).
- Tsugawa, Hiroshi, Aya Satoh, Haruki Uchino, Tomas Cajka, Makoto Arita, and Masanori Arita. 2019. "Mass Spectrometry Data Repository Enhances Novel Metabolite Discoveries with Advances in Computational Metabolomics." *Metabolites* 9 (6):119. doi: <https://doi.org/10.3390/metabo9060119>.
- Tsuji, Akira. 2005. "Influx transporters and drug targeting: Application of peptide and cation transporters." *International Congress Series* 1277:75-84. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ics.2005.02.013>.
- Tsukihara, T, H Aoyama, E Yamashita, T Tomizaki, H Yamaguchi, K Shinzawa-Itoh, R Nakashima, R Yaono, and S Yoshikawa. 1995. "Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å." *Science* 269 (5227):1069-1074. doi: <https://doi.org/10.1126/science.7652554>.
- Turgeman, Tidhar, Arava Shatil-Cohen, Menachem Moshelion, Paula Teper-Bamnolker, Christopher D. Skory, Amnon Lichter, and Dani Eshel. 2016. "The Role of Aquaporins in pH-Dependent Germination of *Rhizopus delemar* Spores." *PLoS one* 11 (3):e0150543-e0150543. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150543>.
- Ulrich, JT, and DE Mathre. 1972. "Mode of action of oxathiin systemic fungicides V. Effect on electron transport system of *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of bacteriology* 110 (2):628-632.

- Usadel, Björn, Fabien Poree, Axel Nagel, Marc Lohse, ANGELIKA CZEDIK-EYSENBERG, and Mark Stitt. 2009. "A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: a case study in the crop species, Maize." *Plant, cell & environment* 32 (9):1211-1229.
- Vadlapudi, Varahalarao, Nabajyoti Borah, Kanaka Raju Yellusani, Sriramy Gade, Prabhakar Reddy, Maheshwari Rajamanikyam, Lakshmi Narasimha Santosh Vempati, Satya Prakash Gubbala, Pankaj Chopra, and Suryanarayana Murty Upadhyayula. 2017. "Aspergillus Secondary Metabolite Database, a resource to understand the secondary metabolome of *Aspergillus* genus." *Scientific reports* 7 (1):7325.
- Valdez-Taubas, Javier, George Diallinas, Claudio Scazzocchio, and Alberto L. Rosa. 2000. "Protein Expression and Subcellular Localization of the General Purine Transporter UapC from *Aspergillus nidulans*." *Fungal Genetics and Biology* 30 (2):105-113. doi: <http://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1197>.
- van den Berg, R. A., H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, and M. J. van der Werf. 2006. "Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data." *BMC Genomics* 7. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>.
- van Laere, A. J., and E. Hulsmans. 1987. "Water potential, glycerol synthesis, and water content of germinating *Phycomyces* spores." *Archives of Microbiology* 147 (3):257-262. doi: <https://doi.org/10.1007/bf00463485>.
- van Leeuwen, M. R., P. Krijgsheld, R. Bleichrodt, H. Menke, H. Stam, J. Stark, H. A. B. Wösten, and J. Dijksterhuis. 2013. "Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles." *Studies in Mycology* 74:59-70. doi: <https://doi.org/10.3114/sim0009>.
- Van Ravenzwaay, B, G Coelho-Palermo Cunha, E Leibold, R Looser, W Mellert, A Prokoudine, T Walk, and J Wiemer. 2007. "The use of metabolomics for the discovery of new biomarkers of effect." *Toxicology letters* 172 (1):21-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.05.021>.
- Vanlerberghe, Greg C., and Lee McIntosh. 1997. "ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48 (1):703-734. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.703>.
- Varga, J., J. C. Frisvad, and R. A. Samson. 2011. "Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*." *Studies in Mycology* 69:57-80. doi: <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2011.69.05>.
- Veloukas, T, P Kalogeropoulou, AN Markoglou, and GS Karaoglanidis. 2014. "Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdh B* and the *cyt b G143A* mutations."

- Phytopathology* 104 (4):347-356. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0208-R>.
- Veloukas, T., P. Kalogeropoulou, A. N. Markoglou, and G. S. Karaoglanidis. 2013. "Fitness and Competitive Ability of *Botrytis cinerea* Field Isolates with Dual Resistance to SDHI and QoI Fungicides, Associated with Several *sdhB* and the *cytb* G143A Mutations." *Phytopathology* 104 (4):347-356. doi: 10.1094/PHYTO-07-13-0208-R.
- Veloukas, Thomas, Michaela Leroch, Matthias Hahn, and George S. Karaoglanidis. 2011. "Detection and Molecular Characterization of Boscalid-Resistant *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry." *Plant Disease* 95 (10):1302-1307. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0317>.
- Verkman, A. S. 2013. "Aquaporins." *Current Biology* 23 (2):R52-R55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.025>.
- Verkman, A. S., Mariko Hara-Chikuma, and Marios C. Papadopoulos. 2008. "Aquaporins—new players in cancer biology." *Journal of Molecular Medicine* 86 (5):523-529. doi: <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0303-9>.
- Verkman, Alan S. 2011. "Aquaporins at a glance." *Journal of Cell Science* 124 (13):2107-2112. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.079467>.
- Ververidis, P., F. Davrazou, G. Diallinas, D. Georgakopoulos, A.K. Kanellis, and N. Panopoulos. 2001. "A novel putative reductase (Cpd1p) and the multidrug exporter Sng2p are involved in resistance to cercosporin and other singlet oxygen-generating photosensitizers in *Saccharomyces cerevisiae*." *Current Genetics* 39 (3):127-136. doi: <https://doi.org/10.1007/s002940100189>.
- Viant, Mark R, Daniel W Bearden, Jacob G Bundy, Ian W Burton, Timothy W Collette, Drew R Ekman, Vilnis Ezernieks, Tobias K Karakach, Ching Yu Lin, and Simone Rochfort. 2008. "International NMR-based environmental metabolomics intercomparison exercise." *Environmental science & technology* 43 (1):219-225. doi: <https://doi.org/10.1021/es802198z>.
- Viant, Mark R, Bruce G Lyeth, Marion G Miller, and Robert F Berman. 2005. "An NMR metabolomic investigation of early metabolic disturbances following traumatic brain injury in a mammalian model." *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo* 18 (8):507-516.
- Viant, Mark R., Irwin J. Kurland, Martin R. Jones, and Warwick B. Dunn. 2017. "How close are we to complete annotation of metabolomes?" *Current Opinion in Chemical Biology* 36:64-69. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.01.001>.

- Villas-Bôas, Silas G, Sandrine Mas, Mats Åkesson, Jørn Smedsgaard, and Jens Nielsen. 2005. "Mass spectrometry in metabolome analysis." *Mass Spectrometry Reviews* 24 (5):613-646. doi: <https://doi.org/10.1002/mas.20032>.
- Vinaixa, Maria, Emma L. Schymanski, Steffen Neumann, Miriam Navarro, Reza M. Salek, and Oscar Yanes. 2016. "Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 78:23-35. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.005>.
- Vlanti, A., and G. Djalilinas. 2008. "The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis." *Mol Microbiol* 68 (4):959-77. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06198.x>.
- Voet, Donald, and Judith G Voet. 2011. "Biochemistry, 4th Edition." *New York: John Wiley & Sons Inc* 492.
- Vogels, G. D., and C. Van der Drift. 1976. "Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms." *Bacteriological reviews* 40 (2):403-468.
- Von Schmeling, B, and Marshall Kulka. 1966. "Systemic fungicidal activity of 1, 4-oxathiin derivatives." *Science* 152 (3722):659-660.
- Vurro, Maurizio, Cristina Miguel-Rojas, and Alejandro Pérez-de-Luque. 2019. "Safe nanotechnologies for increasing the effectiveness of environmentally friendly natural agrochemicals." *Pest Management Science* 0 (0). doi: [10.1002/ps.5348](https://doi.org/10.1002/ps.5348).
- Wang, Lin, Satyakam Dash, Chiam Yu Ng, and Costas D. Maranas. 2017. "A review of computational tools for design and reconstruction of metabolic pathways." *Synthetic and Systems Biotechnology* 2 (4):243-252. doi: <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.11.002>.
- Wang, Yaoyu E., Lev Kutnetsov, Antony Partensky, Jalil Farid, and John Quackenbush. 2017. "WebMeV: A Cloud Platform for Analyzing and Visualizing Cancer Genomic Data." *Cancer research* 77 (21):e11-e14. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0802>.
- Wang, Yong, Yabing Duan, Jianxin Wang, and Mingguo Zhou. 2015. "A new point mutation in the iron–sulfur subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to boscalid in *Sclerotinia sclerotiorum*." *Molecular Plant Pathology* 16 (7):653-661. doi: <https://doi.org/10.1111/mpp.12222>.
- Watanabe, Mutsumi, Takayuki Tohge, Salma Balazadeh, Alexander Erban, Patrick Giavalisco, Joachim Kopka, Bernd Mueller-Roeber, Alisdair R. Fernie, and Rainer Hoefgen. 2018. "Comprehensive Metabolomics Studies of Plant Developmental Senescence." In *Plant Senescence: Methods and Protocols*, edited by Yongfeng Guo, 339-358. New York, NY: Springer New York.

- White, G. A., and G. D. Thorn. 1980. "Thiophene carboxamide fungicides: Structure-activity relationships with the succinate dehydrogenase complex from wild-type and carboxin-resistant mutant strains of *Ustilago maydis*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 14 (1):26-40. doi: [http://doi.org/10.1016/0048-3575\(80\)90020-6](http://doi.org/10.1016/0048-3575(80)90020-6).
- White, GA, and SG Georgopoulos. 1986. "Thiophene carboxamide fungicides: Structure-activity relationships with the succinate dehydrogenase complex from wild-type and carboxin-resistant mutant strains of *Aspergillus nidulans*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 25 (2):188-204. doi: [http://doi.org/10.1016/0048-3575\(86\)90046-5](http://doi.org/10.1016/0048-3575(86)90046-5).
- Wikström, Mårten. 1984. "Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone." *FEBS Letters* 169 (2):300-304. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80338-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80338-5).
- Wilkens, Stephan. 2015. "Structure and mechanism of ABC transporters." *F1000prime reports* 7:14-14. doi: <https://doi.org/10.12703/P7-14>.
- Wilson, Richard A., and Herbert N. Arst. 1998. "Mutational Analysis of AREA, a Transcriptional Activator Mediating Nitrogen Metabolite Repression in *Aspergillus nidulans* and a Member of the "Streetwise" GATA Family of Transcription Factors." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3):586-596. doi: <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.586-596.1998>.
- Wishart, David S., Yannick Djoumbou Feunang, Ana Marcu, An Chi Guo, Kevin Liang, Rosa Vázquez-Fresno, Tanvir Sajed, Daniel Johnson, Carin Li, Naama Karu, Zinat Sayeeda, Elvis Lo, Nazanin Assempour, Mark Berjanskii, Sandeep Singhal, David Arndt, Yonjie Liang, Hasan Badran, Jason Grant, Arnau Serra-Cayuela, Yifeng Liu, Rupa Mandal, Vanessa Neveu, Allison Pon, Craig Knox, Michael Wilson, Claudine Manach, and Augustin Scalbert. 2018. "HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018." *Nucleic acids research* 46 (D1):D608-D617. doi: <http://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>.
- Wogan, GN, and LA Goldblatt. 1969. *Aflatoxin: Scientific Background, Control, and Implications*. Aflatoxin: Academic Press New York—London.
- Worley, Bradley, and Robert Powers. 2013. "Multivariate Analysis in Metabolomics." *Current Metabolomics* 1 (1):92-107. doi: [10.2174/2213235X11301010092](https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092).
- Wu, F. 2015. "Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health." *World Mycotoxin Journal* 8 (2):137-142. doi: <https://doi.org/10.3920/wmj2014.1737>.
- Wu, J, and B L Miller. 1997. "*Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression." *Molecular and Cellular Biology* 17 (10):6191-6201. doi: <https://doi.org/10.1128/mcb.17.10.6191>.

- Wu, Yiman, and Liang Li. 2016. "Sample normalization methods in quantitative metabolomics." *Journal of Chromatography A* 1430:80-95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.007>.
- Yang, XH, and BL Trumpower. 1986. "Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*." *Journal of Biological Chemistry* 261 (26):12282-12289.
- Yankovskaya, Victoria, Rob Horsefield, Susanna Törnroth, César Luna-Chavez, Hideto Miyoshi, Christophe Léger, Bernadette Byrne, Gary Cecchini, and So Iwata. 2003. "Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation." *Science* 299 (5607):700-704. doi: <http://doi.org/10.1126/science.1079605>.
- Yepfet, Ben, A Dinoor, and Y Henis. 1975. "The physiological basis of carboxin sensitivity and tolerance in *Ustilago hordei*." *Phytopathology*.
- Yi, Zhi-Biao, Yan Yu, Yi-Zeng Liang, and Bao Zeng. 2007. "Evaluation of the antimicrobial mode of berberine by LC/ESI-MS combined with principal component analysis." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44 (1):301-304. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.02.018>.
- Yu, J., P. K. Chang, K. C. Ehrlich, J. W. Cary, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, G. A. Payne, J. E. Linz, C. P. Woloshuk, and J. W. Bennett. 2004a. "Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3):1253-1262. doi: <https://doi.org/10.1128/aem.70.3.1253-1262.2004>.
- Yu, Jiujiang. 2012. "Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination." *Toxins* 4 (11):1024-1057. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins4111024>.
- Yu, Jiujiang, Perng-Kuang Chang, Kenneth C Ehrlich, Jeffrey W Cary, Deepak Bhatnagar, Thomas E Cleveland, Gary A Payne, John E Linz, Charles P Woloshuk, and Joan W Bennett. 2004b. "Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis." *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (3):1253-1262.
- Yu, Jiujiang, and Kenneth C Ehrlich. 2011. "Aflatoxin biosynthetic pathway and pathway genes." In *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*. InTech.
- Yu, Yan, Zhi-biao Yi, and Yi-Zeng Liang. 2007. "Main antimicrobial components of *Tinospora capillipes*, and their mode of action against *Staphylococcus aureus*." *FEBS letters* 581 (22):4179-4183.
- Yu, Jae-Hyuk, Zsuzsanna Hamari, Kap-Hoon Han, Jeong-Ah Seo, Yazmid Reyes-Domínguez, and Claudio Scazzocchio. 2004. "Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi." *Fungal Genetics and Biology* 41 (11):973-981. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.08.001>.

- Zampieri, Mattia, Karthik Sekar, Nicola Zamboni, and Uwe Sauer. 2017. "Frontiers of high-throughput metabolomics." *Current Opinion in Chemical Biology* 36:15-23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.006>.
- Zehentgruber, O., C. P. Kubicek, and M. Röhr. 1980. "Alternative respiration of *Aspergillus niger*." *FEMS Microbiology Letters* 8 (2):71-74. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05052.x>.
- Zhang, Yan-Jun, Jun-Jie Yu, Yan-Nan Zhang, Xiao Zhang, Chang-Jun Cheng, Jan-Xin Wang, Derek W. Hollomon, Ping-Sheng Fan, and Ming-Guo Zhou. 2009. "Effect of Carbendazim Resistance on Trichothecene Production and Aggressiveness of *Fusarium graminearum*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22 (9):1143-1150. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-9-1143>.
- Zhang, Zhaolei, Lishar Huang, Vladimir M. Shulmeister, Young-In Chi, Kyeong Kyu Kim, Li-Wei Hung, Antony R. Crofts, Edward A. Berry, and Sung-Hou Kim. 1998. "Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1." *Nature* 392 (6677):677-684. doi: <https://doi.org/10.1038/33612>.
- Zhou, Bin, Jun Feng Xiao, Leepika Tuli, and Habtom W Ressom. 2012. "LC-MS-based metabolomics." *Molecular BioSystems* 8 (2):470-481. doi: <https://doi.org/10.1039/c1mb05350g>.
- Zhou, Jia, Chenfei Ma, Honglin Xu, Kailong Yuan, Xin Lu, Zhen Zhu, Yongning Wu, and Guowang Xu. 2009. "Metabolic profiling of transgenic rice with *cryIAc* and *sck* genes: An evaluation of unintended effects at metabolic level by using GC-FID and GC-MS." *Journal of Chromatography B* 877 (8):725-732. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.040>.
- Zickermann, Volker, Christophe Wirth, Hamid Nasiri, Karin Siegmund, Harald Schwalbe, Carola Hunte, and Ulrich Brandt. 2015. "Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I." *Science* 347 (6217):44-49. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1259859>.
- Zikankuba, Vumilia Lwoga, Gaspary Mwanyika, Julius Edward Ntwenya, and Armachius James. 2019. "Pesticide regulations and their malpractice implications on food and environment safety." *Cogent Food & Agriculture* 5 (1):1601544. doi: <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1601544>.
- Ziogas, Basil N, Brian C Baldwin, and Jane E Young. 1997. "Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*." *Pesticide Science* 50 (1):28-34. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199705\)50:1<28::AID-PS555>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199705)50:1<28::AID-PS555>3.0.CO;2-1).
- Γεωργόπουλος, Σ; και Β Ζιώγας. 1992. *Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης Ασθενειών των φυτών*.

Γουρνάς, Χρήστος. 2011. "Ρύθμιση της έκφρασης και σχέσεις δομής-λειτουργίας μεταφορέων πουρινών." PhD, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Καλαμπόκης, Ιωάννης. 2012. "Διερεύνηση του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών (SBI's) και της επίδρασης στην παραγωγή μυκοτοξινών στο μύκητα *Fusarium graminearum* Schwabe." Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Καπετανάκης, Γεώργιος. 2017. "Μελέτη της δράσης και των κυτταρικών μηχανισμών ανθεκτικότητας αντιμυκητιακών φαρμάκων." MSc, Department of Biology, National and Kapoditrian University of Athens.

Ζιώγας, Β, και Α Μαρκόγλου. 2010. *Γεωργική Φαρμακολογία*. 2^η έκδοση.

