

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ
ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΦΑΙΟΦΥΚΩΝ
ΑΠΟ ΩΟΜΥΚΗΤΕΣ**

Διδακτορική διατριβή

**Αμέρσα Ν. Τσιριγώτη
Βιολόγος**

ΑΘΗΝΑ 2015

**NATIONAL AND KAPODISTRIAN
UNIVERSITY OF ATHENS
FACULTY OF BIOLOGY
DEPARTMENT OF BOTANY**

**Structure and development of host-pathogen system during
the infection of brown algae by oomycetes**

PhD thesis

**Amerssa N. Tsirigoti
Biologist**

ATHENS 2015

Η έγκρισις διδακτορικής διατριβής υπό της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλοί αποδοχήν των γνωμών του συγγραφέως.

N. 5343/1932, άρθρο 202

Συμβουλευτική επιτροπή:

Χ. Κατσαρός, Καθηγητής

C. Gachon, Ερευνήτρια

B. Γαλάτης, Καθηγητής

Εξεταστική επιτροπή:

Χ. Κατσαρός, Καθηγητής

C. Gachon, Ερευνήτρια

B. Γαλάτης, Καθηγητής

Π. Αποστολάκος, Καθηγητής

Σ. Δεληβόπουλος, Καθηγητής

I. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια

E. Παντερός, Επίκουρος Καθηγητής

Στην οικογένεια και τους φίλους μου

Πρόλογος

Σχεδόν τέσσερα χρόνια μετά την έναρξη της διδακτορικής μου διατριβής και πλησιάζοντας προς το τέλος της, συνειδητοποιώ πόσο γεμάτα ήταν αυτά τα χρόνια. Γεμάτα από γνώση, προσπάθεια, άγχος, ικανοποίηση, επιτυχίες, δυσκολίες, ταξίδια και στόχους. Η τελική αποτίμηση της συνολικής εμπειρίας είναι με βεβαιότητα θετική και σ' αυτό συνέβαλαν σημαντικοί άνθρωποι που με βοήθησαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και να ευχαριστήσω θερμά για την καθοδήγηση, την κατανόηση και την υποστήριξη που μου προσέφερε, τον επιβλέποντα της διατριβής μου, Καθηγητή κ. Χρ. Κατσαρό. Μάλιστα, οφείλω να αναφέρω την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, όταν ούσα ακόμη τελειόφοιτη του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α., με συμπεριέλαβε στο Ευρωπαϊκό επιστημονικό πρόγραμμα «Biodiversity of Brown algae in Eastern Mediterranean Sea», επιδοτούμενο από το Ίδρυμα «TOTAL Foundation». Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνήτρια του S.A.M.S. Δρ. Claire Gachon για την επιστημονική, ψυχολογική, αλλά και οικονομική υποστήριξη που μου προσέφερε ως μέλος της τριμελούς επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους Καθηγητές κ. Β. Γαλάτη και Π. Αποστολάκο για τη βοήθεια, την καθοδήγηση και τα σχόλια επί της ουσίας που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου του Aberdeen κ. Frithjof Küpper, τον λέκτορα του Πανεπιστημίου του Newcastle Δρ. Gordon Beakes και την ερευνήτρια του Σταθμού Βιολογίας του Roscoff Δρ. Cécile Hervé για τις πολύτιμες γνώσεις και την καθοδήγηση που μου προσέφεραν τόσο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή των δημοσιεύσεων. Τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου του Leeds κ. Paul Knox και τον Δρ. Thomas Torode τους ευχαριστώ για την ευγενική χορηγία μέρους των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διατριβής. Ακόμη, ευχαριστώ τον Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Κώστα Φασσέα για τη βοήθειά του με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Επίσης, για τη συμπαράσταση, τις επικοινωνιακές συζητήσεις, την παρέα και τη βοήθειά τους θα ήθελα να

ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους Δρ. Παντελή Λιβανό, Δρ. Ελένη Γιαννούτσου, Δρ. Πηνελόπη Σωτηρίου και Μαρία Κουταλιανού.

Στη μητέρα μου Σοφία, τον πατέρα μου Νίκο, τον αδερφό μου Γιάννη, τον παππού μου Γιάννη, καθώς και τους αγαπημένους μου φίλους θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου για την αγάπη, τη βοήθεια και τη συμπαράσταση που μου προσφέρουν απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη μου Μυρτώ για την επιμέλεια του εξωφύλλου της διδακτορικής διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ τις εταιρείες F.E.M.S. (Federation of European Microbiological Societies), B.P.S. (British Phycological Society), ASSEMBLE (Association of European Marine Biological Laboratories) και ΕΛ.Φ.Ε. (Ελληνική Φυκολογική Εταιρεία) για την οικονομική υποστήριξη που μου επέτρεψε να ολοκληρώσω την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς και το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για την οικονομική ενίσχυση που μου προσέφερε για την κάλυψη των εξόδων εκτύπωσης της διδακτορικής μου διατριβής.

Περιεχόμενα

I. Εισαγωγή	1
I.1. Φύκη	1
I.1.1. Γενικά.....	1
I.1.2. Φαιοφύκη	3
I.1.2.1. Η δομή του κυττάρου των φαιοφυκών	5
I.1.2.1.1. Κυτταρικό τοίχωμα φαιοφυκών	6
I.1.2.1.2. Κυτταροσκελετός φαιοφυκών	8
I.1.2.1.2.α. Μικροσωληνίσκοι	8
I.1.2.1.2.β. Μικρονημάτια ακτίνης-Ενδιάμεσα νημάτια	13
I.1.2.2. Τάξεις και είδη φαιοφυκών που μελετήθηκαν	15
I.1.2.2.1. Ectocarpales	16
I.1.2.2.1.1. <i>Ectocarpus siliculosus</i>	17
I.1.2.2.1.2. <i>Acinetospora crinita</i>	19
I.1.2.2.1.3. <i>Pylaiella littoralis</i>	20
I.1.2.2.2. Laminariales	21
I.1.2.2.2.1. <i>Laminaria digitata</i>	22
I.1.2.2.2.2. <i>Macrocystis pyrifera</i>	22
I.1.2.2.3. Discosporangiales	23
I.1.2.2.3.1. <i>Choristocarpus tenellus</i>	23
I.1.2.2.4. Tilopteridales	24
I.1.2.2.4.1. <i>Tilopteris mertensii</i>	24
I.2. Φύκη και παθογένεια.....	25
I.2.1. Γενικά.....	25
I.2.2. Φαιοφύκη και παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	33
I.2.2.1. Φαιοφύκη και μολύνσεις από ιούς και κερκόζωα	33
I.2.2.2. Φαιοφύκη και μολύνσεις από ενδοφυτικά φύκη, βακτήρια και μύκητες	40
I.2.3. Ωομύκητες: δομή, μορφολογία και ταξινόμηση.....	45
I.2.3.1. Ωομύκητες και θαλάσσια φύκη	53
I.2.3.2. <i>Eurychasma dicksonii</i>	55

I.3. Βιοτική καταπόνηση φυκών: μηχανισμοί αναγνώρισης-αμυντική απόκριση	63
I.3.1. Μηχανισμοί αναγνώρισης του παράσιτου από το φύκος.....	63
I.3.2. Μηχανισμοί αναγνώρισης του φύκου από το παράσιτο	66
I.3.3. Αμυντική απόκριση φυκών στη μόλυνση	68
I.4. Αντικείμενο μελέτης	76
II. Υλικά και μέθοδοι.....	78
II.1. Φυτικό υλικό	78
II.1.1. Είδη και στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν	78
II.1.2. Καλλιέργεια πειραματικού υλικού.....	78
II.1.3. Μέσο καλλιέργειας	80
II.1.4. Ανακαλλιέργειες.....	80
II.2. Οπτική μικροσκοπία	82
II.2.1. Ειδικές χρώσεις.....	82
II.2.1.1. Χρώση κυτταρικού τοιχώματος	82
II.2.1.2. Χρώση των μικρονηματίων ακτίνης (MA)	82
II.2.1.2.1. Σταθεροποίηση MA-στερέωση ξενιστή και παράσιτου	84
II.2.1.2.2. Ενζυμική επώαση	84
II.2.1.2.3. Εκχύλιση χρωστικών – επίστρωση πειραματικού υλικού σε καλυπτρίδες	84
II.2.1.2.4. Χρώση των MA-κάλυψη των κυττάρων	85
II.2.1.3. Χρώση του DNA	85
II.2.2. Ανοσοφθορισμός.....	86
II.2.2.1. Ανοσοφθορισμός σωληνικής.....	86
II.2.2.1.1. Στερέωση των θαλλών	86
II.2.2.1.2. Ενζυμική επώαση-εκχύλιση χρωστικών	86
II.2.2.1.3. Επίστρωση σε καλυπτρίδες-επώαση με πρώτο αντίσωμα	87
II.2.2.1.4. Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα-κάλυψη των κυττάρων.....	87
II.2.2.2. Ανοσοεντόπιση υδατανθράκων του κυτταρικού τοιχώματος	87
II.2.2.2.1. Στερέωση πειραματικού υλικού	87
II.2.2.2.2. Επίστρωση πειραματικού υλικού σε καλυπτρίδες-κάλυψη μη ειδικών θέσεων	88
II.2.2.2.3. Επώαση με το πρώτο αντίσωμα	89

II.2.2.2.4. Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα-κάλυψη υλικού	89
II.3. Ηλεκτρονική μικροσκοπία	90
II.3.1. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (ΗΜΔ).....	90
II.3.1.1. Στερέωση θαλλών.....	90
II.3.1.2. Μεταστερέωση	90
II.3.1.3. Έγκλειση πειραματικού υλικού σε αγαρόζη	91
II.3.1.4. Αφυδατώσεις	91
II.3.1.5. Εμπότιση-Έγκλειση	91
II.3.1.6. Τμήση	92
II.3.1.7. Χρώση	92
II.3.2. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (ΗΜΣ).....	93
II.3.2.1. Στερέωση-Μεταστερέωση πειραματικού υλικού	93
II.3.2.2. Επώαση με ταννικό οξύ	93
II.3.2.3. Μετα-μεταστερέωση	93
II.3.2.4. Αφυδατώσεις	93
II.4. Επιδράσεις σε μολυσμένους θαλλούς φαιοφυκών	94
II.4.1. Επίδραση με υδατάνθρακες.....	94
II.4.2. Επίδραση με ορμόνες.....	94
II.4.3. Έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων	95
II.5. Μικροσκοπία παρατήρησης-Λογισμικά φωτογράφισης	95
II.5.1. Οπτικά μικροσκόπια.....	95
II.5.2. Ηλεκτρονικά μικροσκόπια.....	96
III. Αποτελέσματα	97
III.1. Στάδια μόλυνσης φαιοφυκών από τον ωομύκητα <i>Euruchasma dicksonii</i>: Μελέτη λεπτής δομής-μηχανισμός προσκόλλησης και διείσδυσης	97
III.1.1. Γενικά.....	97
III.1.2. Εγκύστωση και προσκόλληση του <i>E. dicksonii</i>	102
III.1.3. Διείσδυση του <i>E. dicksonii</i> στο κύτταρο-ξενιστή	106
III.1.4. Λεπτή δομή κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου κατά τη διάρκεια των τελικών σταδίων της μόλυνσης	112
III.2. Κυτταροσκελετός.....	114
III.2.1. Μικροσωληνίσκοι (ΜΣ)	114

III.2.2. Οργάνωση της ακτίνης στον ωομύκητα <i>E. dicksonii</i>	122
III.3. Μηχανισμοί αναγνώρισης ξενιστή και παράσιτου-απόκριση φύκους στη μόλυνση.....	124
III.3.1. Μελέτη κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου	124
III.3.1.1. Κυτταρικό τοίχωμα ξενιστή	125
III.3.1.2. Κυτταρικό τοίχωμα παράσιτου	131
III.3.2. Πειράματα ανάσχεσης της μόλυνσης	133
III.3.2.1. Επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει μονοσακχαρίτες.....	133
III.3.2.2. Επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει ορμόνες.....	138
IV. Συζήτηση	148
IV.1. Μηχανισμός μόλυνσης του ωομύκητα <i>Eurychasma dicksonii</i>: λεπτή δομή αρχικών σταδίων και ζωοσποριάγγελου	148
IV.1.1. Γενικά.....	148
IV.1.2. Λεπτή δομή του κυτταρικού τοιχώματος πρωτογενών σπορίων και ώριμου ζωοσποριάγγελου	149
IV.1.3. Εγκύστωση του ζωοσπορίου και προσκόλληση στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή.....	151
IV.1.4. Διαφοροποίηση πλάκας προσκόλλησης και μηχανισμός διείσδυσης του <i>E. dicksonii</i> στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή.....	154
IV.2. Συμμετοχή του κυτταροσκελετού ξενιστή και παρασίτου στον μηχανισμό μόλυνσης	158
IV.2.1. Κυτταροσκελετός <i>E. dicksonii</i>	158
IV.2.2. Κυτταροσκελετός του ξενιστή	164
IV.3. Μηχανισμοί αναγνώρισης μεταξύ <i>E. dicksonii</i> και φαιοφυκών-αμυντική απόκριση φύκους στη μόλυνση.....	166
IV.3.1. Μελέτη κυτταρικού τοιχώματος	166
IV.3.1.1. Κυτταρικό τοίχωμα φαιοφυκών.....	167
IV.3.1.2. Κυτταρικό τοίχωμα του ωομύκητα <i>E. dicksonii</i>	169
IV.3.2. Πειράματα ανάσχεσης της μόλυνσης με υδατάνθρακες.....	171
IV.3.3. Πειράματα επώασης μολυσμένων καλλιεργειών με ορμόνες	172
V. Περίληψη	175
VI. Βιβλιογραφία	183
VII. Δημοσιεύσεις.....	214

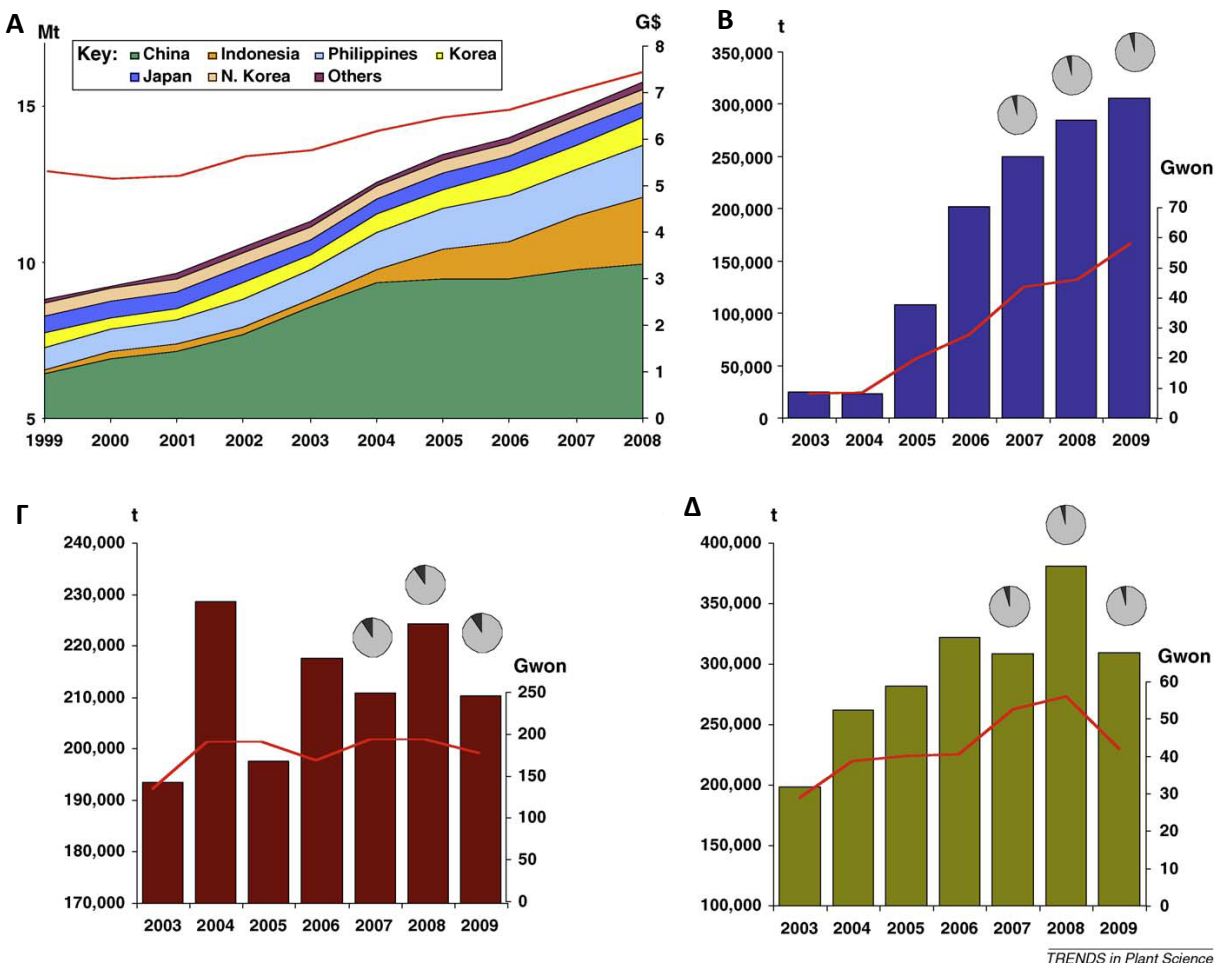
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1. Φύκη

I.1.1. Γενικά

Τα φύκη είναι μια ετερογενής πολυφυλετική ομάδα κατά βάση φωτοσυνθετικών, υδρόβιων ή ημιυδρόβιων οργανισμών που περιλαμβάνει είδη ποικίλου μεγέθους, από τα μικροσκοπικά μονοκύτταρα, ως τα γιγαντιαία φαιοφύκη (κελποφύκη, kelps). Τα μικροσκοπικά φύκη ονομάζονται μικροφύκη, ενώ τα ορατά με γυμνό οφθαλμό μακροφύκη. Τα φύκη ορίζονται ως οργανισμοί που φέρουν χλωροφύλλη ως βασική φωτοσυνθετική χρωστική και τα αναπαραγωγικά τους όργανα στερούνται άγονου κυτταρικού περιβλήματος (Graham και συν. 2009). Το κυτταρικό σώμα των φυκών (θαλλός) διαφέρει σαφώς από αυτό των χερσαίων φυτικών οργανισμών διότι δεν περιλαμβάνει ρίζα, βλαστό και φύλλα (Graham και συν. 2009).

Ο οικολογικός ρόλος των φυκών κρίνεται καθοριστικός, αφού μόνο στο φυτοπλαγκτόν αποδίδεται το 95% της πρωτογενούς παραγωγής στους ωκεανούς και το 50% της δέσμευσης άνθρακα παγκοσμίως (Woodward 2007). Η επί δισεκατομμύρια χρόνια φωτοσυνθετική τους δράση αποδίδει τον κύριο όγκο οξυγόνου στην ατμόσφαιρα (περισσότερο από 50%), γεγονός που, εκτός των άλλων, συμβάλλει στη δημιουργία του στρώματος του όζοντος. Ακόμη, η συμμετοχή των φυκών στους βιογεωχημικούς κύκλους του άνθρακα και του θείου επιδρά στο παγκόσμιο κλίμα, εμποδίζοντας την υπερθέρμανση του πλανήτη. Πιο συγκεκριμένα, το φυτοπλαγκτόν χρησιμοποιεί θειϊκά άλατα του ωκεανού για την παραγωγή διμεθυλοσουλφονιοπροπιονικού ιόντος (DMSP), ενός αναγκαίου για τους φυτοπλαγκτικούς οργανισμούς συστατικού με αντιοξειδωτική δράση (Sunda και συν. 2002). Η διάσπαση του DMSP των νεκρών φυτοπλαγκτικών οργανισμών σε διμεθυλοσουλφίδιο (DMS) οδηγεί σε έκλυση του αερίου στην ατμόσφαιρα. Το DMS λειτουργεί με έμμεσο τρόπο ως ψυκτικό και συμβάλλει στη διατήρηση της θερμοκρασίας της ατμόσφαιρας σε χαμηλά επίπεδα (Steffels και συν. 2007). Ακόμη, σύγχρονες έρευνες τονίζουν την πρωταρχικής σημασίας συμβολή των φυκών στην ελάττωση του φαινομένου του θερμοκηπίου μέσω της δέσμευσης και ιζηματοποίησης μεγάλων ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα (Alvain και συν. 2008).



Εικόνα. Ι.1. Διαγραμματική απεικόνιση της παγκόσμιας παραγωγής καλλιεργούμενων φυκών και των απωλειών λόγω ασθενειών. Α. Παραγωγή των υδρόβιων φυτικών οργανισμών ανά χώρα (σε μεγατόνους νωπού βάρους, Mt). Η κόκκινη καμπύλη υποδηλώνει την αξία της παγκόσμιας παραγωγής σε δισεκατομμύρια US\$. Β-Δ. Παραγωγή φυκών στην Κορέα κατά τα έτη 2003-2009 σε τόνους (t) νωπού βάρους. Η κόκκινη καμπύλη δείχνει την αξία της σοδειάς σε δισεκατομμύρια γουόν (Gwon- ισοδυναμεί αδρά με εκατομμύρια US\$). Τα γκρι κυκλικά διαγράμματα δείχνουν το ποσοστό των απωλειών σοδειάς που οφείλονται σε ασθένειες των φυκών της Κορέας. Β. *Laminaria* spp. Γ. *Porphyra* spp. Δ. *Undaria pinnatifida* (τροποποιημένο σχήμα από Gachon και συν. 2010).

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, πολλές επιστημονικές μελέτες έχουν ως αντικείμενο τη βελτίωση της καλλιέργειας φυκών με σκοπό την εμπορική αξιοποίησή τους. Καλλιεργούμενα είδη χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή φαρμακευτικών σκευασμάτων, συμπληρωμάτων διατροφής και προϊόντων κοσμητολογίας. Επιπλέον, η καλλιέργεια φυκών φαίνεται να αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη λύση στο συνεχώς αυξανόμενο πρόβλημα κορεσμού των χερσαίων πηγών ενέργειας και τροφής (Hemaiswarya και συν. 2011). Από τις αρχές της δεκαετίας του '80, η καλλιέργεια φυκών στην Ασία αυξάνεται εκθετικά, γεγονός που οδηγεί στον διπλασιασμό της παγκόσμιας παραγωγής φυκών ανά δεκαετία (Εικόνα Ι.1Α). Τα

καλλιεργούμενα αυτά φύκη χρησιμοποιούνται είτε απ'ευθείας ως τροφή για τον άνθρωπο είτε ως τροφή για λοιπά εκτρεφόμενα είδη, όπως δίθυρα, εχινόδερμα, ιχθύες κ.τ.λ. Από το 1997 ως το 2006 η παραγωγή υδρόβιων φυτικών οργανισμών αυξήθηκε από τους 8 στους 15 μεγατόνους και ο διπλασιασμός αυτός μεταφράζεται σε αύξηση του κέρδους κατά 2,5 δισεκατομμύρια δολάρια US\$ (Εικόνα I.1A). Ακόμη, σύγχρονες εργασίες προτείνουν τη χρήση φυκών ως βιοκαύσιμη ύλη, δηλαδή ως πιθανή μορφή ανανεώσιμης ενέργειας (Singh και συν. 2011). Συνεπώς, ο συνδυασμός του οικολογικού αλλά και του εμπορικού ενδιαφέροντος που συγκεντρώνουν τα φύκη είναι ο λόγος που όλο και περισσότερες ερευνητικές ομάδες παγκοσμίως ασχολούνται με αυτό το ως τώρα αποσπασματικά μελετημένο επιστημονικό πεδίο. Πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι παρά τη συνεχή αύξηση της καλλιέργειας φυκών, προκαλούνται σημαντικές απώλειες της παραγωγής λόγω ασθενειών (Εικόνες I.1.B-Δ), γεγονός που άπτεται της παρούσας μελέτης, όπως αναφέρεται παρακάτω.

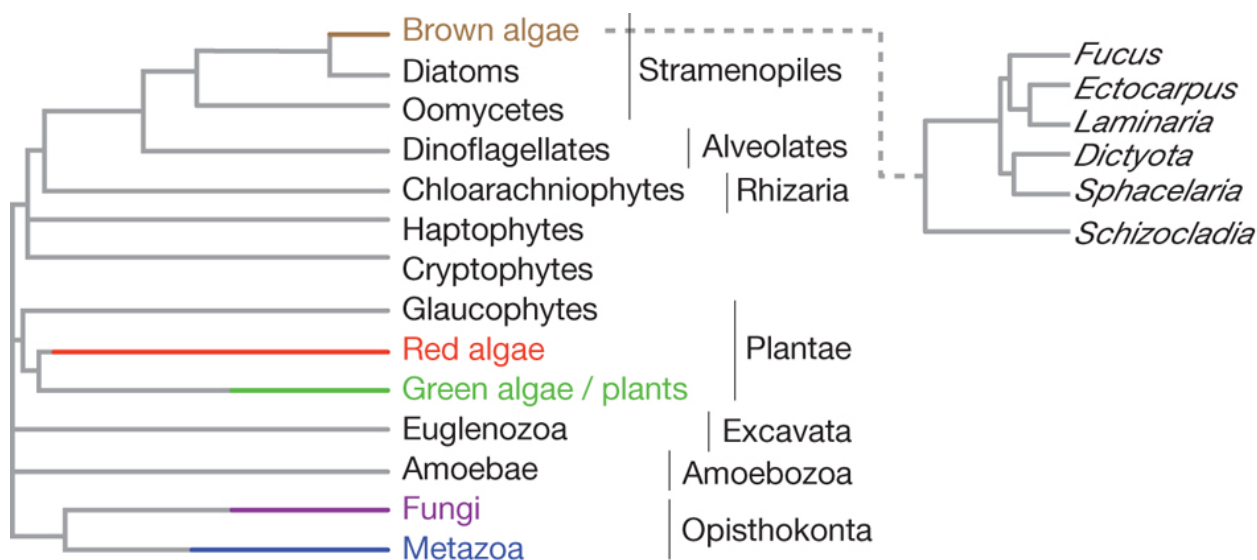
I.1.2. Φαιοφύκη

Τα φύκη ταξινομούνται αδρά σε δέκα εξελικτικές σειρές, συχνά αποκαλούμενες ως φύλα ή διαιρέσεις (rhyla ή divisions) και η ομαδοποίηση γίνεται με βάση τις φωτοσυνθετικές χρωστικές, τις αποταμιευτικές ουσίες και τον τύπο κυτταρικού περιβλήματος. Τα φαιοφύκη (phaeophyceae ή brown algae) αποτελούν κλάση του αθροίσματος ετερόκοντα (heterokonts) ή σταχυομαστιγωτά (stramenopiles) (Sorhannus 2001· βλέπε επίσης Εικόνα I.2). Είναι φωτοσυνθετικοί, πολυκύτταροι οργανισμοί υψηλής μορφολογικής και ανατομικής διαφοροποίησης, οι οποίοι εξελικτικά σχετίζονται με τις τρεις πιο έντονα μελετημένες ομάδες ευκαρυωτικών οργανισμών, τα ζώα, τους μύκητες και τα φυτά (Baldauf 2003). Έχει υποτεθεί ότι η ομάδα αυτή ευκαρυωτικών οργανισμών προέκυψε πριν από 1 δισεκατομμύριο χρόνια, από μία δευτερογενή ενδοσυμβίωση, κατά την οποία ένα μονοκύτταρο ροδοφύκος εγκολπώθηκε από ένα αρχέγονο πρωτίστο (Reyes-Prieto και συν. 2007). Τα φαιοφύκη φέρουν ένα χαρακτηριστικό καφέ-φαιό χρώμα, το οποίο οφείλεται στην παρουσία μεγάλων ποσοτήτων του καροτενοειδούς φουκοξανθίνη (fucoxanthin) στους χλωροπλάστες τους, σε συνδυασμό με διάφορες ταννίνες (Lee 1999). Οι πιο απλές μορφές αποτελούνται από

μικροσκοπικά διακλαδιζόμενα νήματα με μια σειρά κυττάρων, ενώ οι πιο σύνθετες από πολύπλοκους φυλλοειδείς θαλλούς, μήκους μεγαλύτερου των 50 μέτρων (κελποφύκη, kelps).

Όσον αφορά στη γεωγραφική εξάπλωση, τα φαιοφύκη συνιστούν το 70% της βιομάζας των βραχιδών υποστρωμάτων σε εύκρατα και κρύα υδάτινα ενδιαιτήματα. Τα 250 γένη (1500-2000 είδη) φαιοφυκών που έχουν καταγραφεί, είναι κατά κύριο λόγο θαλάσσιοι οργανισμοί που προτιμούν χαμηλής αλμυρότητας θάλασσες (Norton και συν. 1996). Παρ'όλα αυτά έχουν βρεθεί πέντε είδη του γλυκού νερού, αλλά κανένα χερσαίο. Εντοπίζονται τόσο σε αβιοτικά υποστρώματα (βράχοι, ξύλο, πλαστικό, πλοία, πέτρες), όσο και επιφυτικά σε μακρόφυτα ή ελεύθερα στο νερό. Λόγω της τάσης να καλύπτουν βραχώδεις περιοχές και πλοία είναι ευρέως γνωστά και ως fouling algae, δηλαδή «ρυπαίνοντα» φύκη (Graham και συν. 2009).

Τα φαιοφύκη, όπως προαναφέρθηκε, προέκυψαν από ένα ανεξάρτητο γεγονός δευτερογενούς ενδοσυμβίωσης και για το λόγο αυτόν ακολούθησαν διαφορετική εξελικτική γραμμή από τα οπισθόκοντα (opisthokonts), δηλαδή τα ζώα και τους μύκητες, καθώς και από τα αρχαιοπλαστιδωτά (archaeplastida), δηλαδή τα ανώτερα φυτά, τα χλωροφύκη και τα ροδοφύκη (Grosberg και Strathmann 2007· βλέπε επίσης Εικόνα 1.2). Η ανεξάρτητη εξελικτική πορεία των φαιοφυκών προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι οδήγησε στη δημιουργία νέων



Εικόνα 1.2. Απλοποιημένο σχήμα που αναπαριστά τις φυλογενετικές σχέσεις των βασικών ευκαρυωτικών ομάδων (από Cock και συν. 2010).

μεταβολικών, φυσιολογικών, κυτταρικών και οικολογικών χαρακτηριστικών. Το ενδιαφέρον αυτό συνέβαλε στην τελική χαρτογράφηση του DNA του φαιοφύκου *Ectocarpus siliculosus* το 2010 και στη χρήση αυτού ως το πρώτο φύκος-γενετικό μοντέλο (Cock και συν. 2010).

1.1.2.1. Η δομή του κυττάρου των φαιοφυκών

Τα βασικά χαρακτηριστικά του κυττάρου των φαιοφυκών είναι αυτά ενός ευκαρυωτικού κυττάρου (βλέπε Εικόνα 1.3). Ορισμένα στοιχεία, όπως τα πλαστίδια, το κυτταρικό τοίχωμα και τα φυσώδη παρουσιάζουν ιδιαίτερα γνωρίσματα με οικολογική και οικονομική σημασία (Graham και συν. 2009). Παρακάτω παρατίθενται πληροφορίες για τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και του κυτταροσκελετού των φαιοφυκών, που άπτονται του επιστημονικού ενδιαφέροντος της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

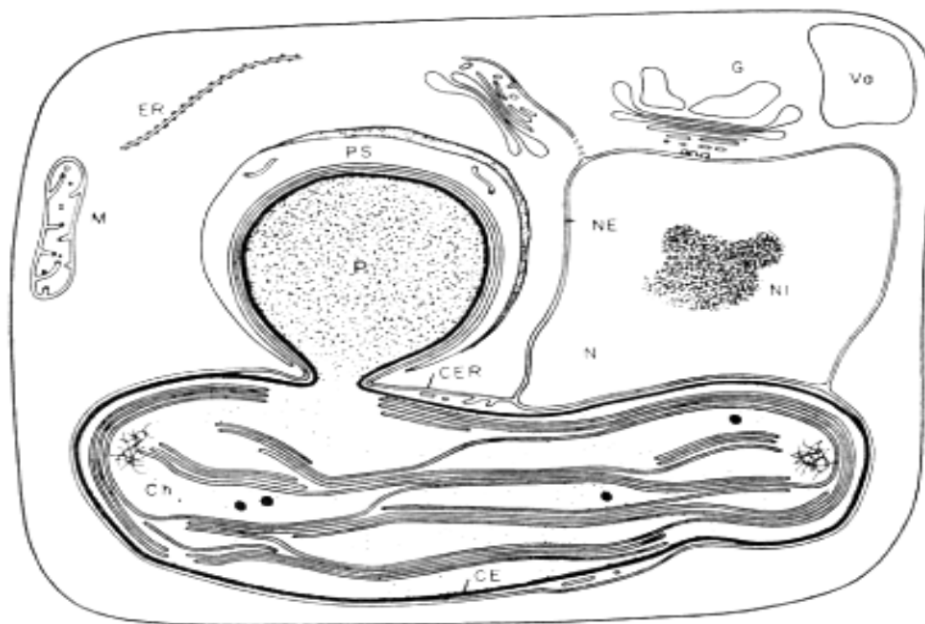
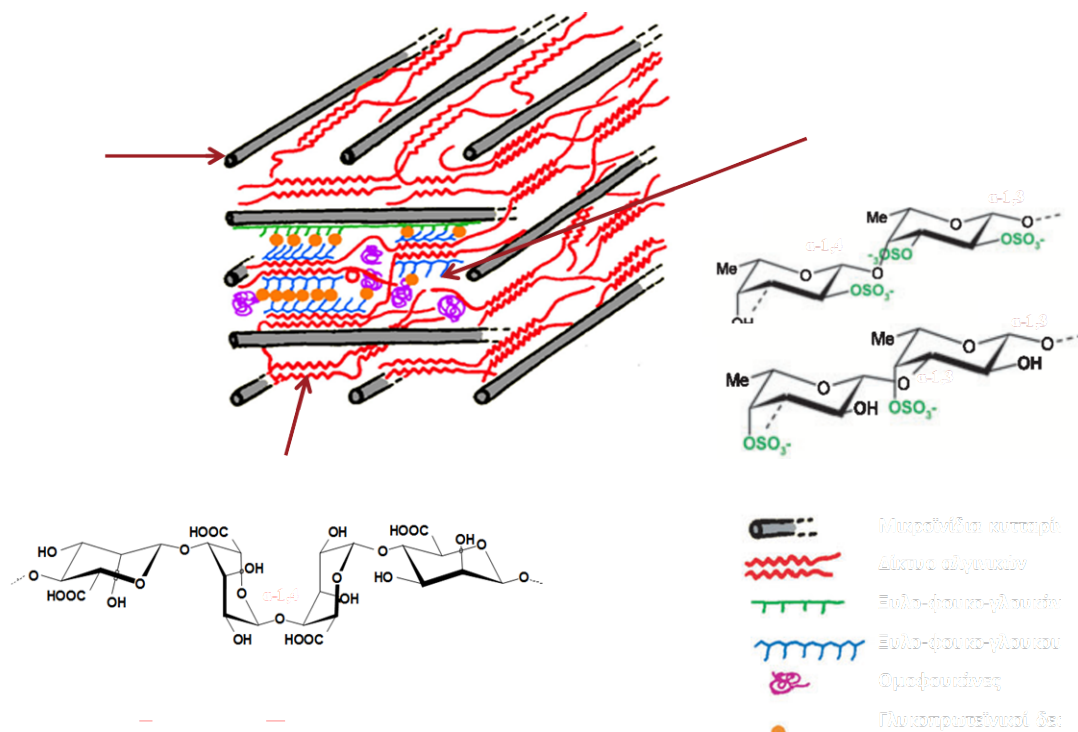


FIG. 1.9. A diagram of a hypothetical brown algal cell to illustrate some of the organelle associations. The outer chloroplast envelope (CER) is seen to be an extension of the nuclear envelope (NE). Around the pyrenoid (P) is a thick polysaccharide cap (P.S.). Reproduced, with permission, from Bouck (1965).

Εικόνα 1.3. Διάγραμμα τυπικού κυττάρου φαιοφύκου στο οποίο παρουσιάζονται οι θέσεις των βασικών οργανιδίων. Ch: χλωροπλάστης, CE: πλαστιδιακός φάκελος, CER: χλωροπλαστικό ενδοπλασματικό δίκτυο, P: πυρηνοειδής, PS: πολυσακχαριτικό κάλυμμα, N: πυρήνας, NE: πυρηνικός φάκελος, NI: πυρηνίσκος, M: μιτοχόνδριο, ER: ενδοπλασματικό δίκτυο, G: δικτυοσωμάτιο, Vo: χυμοτόπιο (Dodge 1973' τροποποιημένο από Bouck 1965).

1.1.2.1.1. Κυτταρικό τοίχωμα φαιοφυκών

Το κυτταρικό τοίχωμα των φαιοφυκών (Εικόνα 1.4) έχει κοινά χαρακτηριστικά τόσο με το κυτταρικό τοίχωμα των ανώτερων φυτών όσο και με τα εξωκυτταρικά περιβλήματα των ζωικών κυττάρων (Kloareg και Quatrano 1988). Παράλληλα, διαθέτει ορισμένα μοναδικά γνωρίσματα, τα οποία προσδίδουν στα φαιοφύκη ιδιαίτερη οικολογική και οικονομική αξία. Το κυτταρικό τοίχωμα των φαιοφυκών, όπως και εκείνο των ανώτερων φυτών, περιέχει κυτταρίνη, σε μικρότερο όμως ποσοστό, το οποίο αποτελεί μόλις το 1-8 % του ξηρού βάρους του θαλλού (Cronshaw και συν. 1958· Εικόνα 1.4). Τα βασικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των φαιοφυκών είναι τα αλγινικά οξέα και οι φουκοϊδάνες (Kloareg και Quatrano 1988· Michel και συν. 2010α). Το αλγινικό οξύ, ως πρωταρχικό στοιχείο του κυτταρικού τοιχώματος, φτάνει συχνά το 35 % του ξηρού βάρους του. Αποτελείται από εναλλασσόμενες αλυσίδες μανουρονικού και γουλουρονικού οξέος (Εικόνα 1.4), ενώ παρουσία δισθενών κατιόντων αποκτά μορφή πηκτώματος. Οι λειτουργίες του συστατικού αυτού είναι κυρίως



Εικόνα 1.4. Υποθετικό μοντέλο της μοριακής οργάνωσης των κυτταρικών τοιχωμάτων φαιοφυκών (τροποποιημένο από Michel και συν. 2010α).

μηχανικές ενώ δεν αποκλείεται να παρέχει στα φαιοφύκη τη δυνατότητα προσαρμογής σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Kraemer και Charman 1991). Παρατηρήσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας με την τεχνική του ανοσοχρυσού αποκαλύπτουν ότι η ύπαρξη αλγινικού οξέος συνδέεται αποκλειστικά με τα χρωμιστά (chromista), στα οποία ανήκουν τα φαιοφύκη, ενώ αντίθετα ο εν λόγω πολυσακχαρίτης απουσιάζει από τα ροδοφύκη και τα χλωροφύκη (Chi και συν. 1999). Όσον αφορά στις φουκοϊδάνες, πρόκειται για πολυμερή θειικών ή σουλφιδιωμένων (sulfated) πολυσακχαριτών που περιέχουν μονομερή α-L-φουκόζης (α-L-fucose) και συναντώνται στα φαιοφύκη αλλά και στα εχινόδερμα. Στην περίπτωση των εχινόδερμων οι φουκοϊδάνες είναι γραμμικά επαναλαμβανόμενα πολυμερή, ενώ στα φαιοφύκη εμφανίζονται με μεγάλη ετερογένεια και πολυπλοκότητα ως προς το βαθμό σουλφιδίωσης, τις διακλαδώσεις, τους υποκαταστάτες και τα πρόσθετα μονομερή (ξυλόζη, γαλακτόζη, μαννόζη) (Michel και συν. 2010α). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος των φαιοφυκών και ειδικά το αλγινικό οξύ, παρουσιάζουν εμπορικό ενδιαφέρον και χρησιμοποιούνται στη μαγειρική, την κοσμητολογία, καθώς και την ιατρική (Stengel και συν. 2011).

Τα αλγινικά, οι φουκοϊδάνες και η κυτταρίνη βρίσκονται σε αναλογία 3:1:1 στα περισσότερα είδη φαιοφυκών (Kloareg και Mabeau 1987). Ακόμη, σε μικρά ποσοστά περιέχονται στα κυτταρικά τοιχώματα φλωροταννίνες και πρωτεΐνες (Εικόνα 1.4). Έχει περιγραφεί η συμμετοχή των φλωροταννινών στην ανάπτυξη του κυτταρικού τοιχώματος σε έμβρυα των Fucales (Schoenwaelder και Wiencke 2000). Ακόμη, ο αριθμός των στιβάδων του κυτταρικού τοιχώματος, καθώς και ο προσανατολισμός των μικροϊνιδίων κυτταρίνης ποικίλουν μεταξύ των ειδών, καθώς και μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων του ίδιου είδους (Karyophyllis και συν. 2000). Τα μικρονημάτια ακτίνης παίζουν καθοριστικό ρόλο στον προσανατολισμό των μικροϊνιδίων κυτταρίνης στα φαιοφύκη (Karyophyllis και συν. 2000· Bisgrove και Kropf 2001· Katsaros και συν. 2002). Επιπλέον, στην πλασματική μεμβράνη των φαιοφυκών υπάρχουν γραμμικοί πρωτεϊνικοί σχηματισμοί που ονομάζονται τερματικά σύμπλοκα (linear terminal complexes) και συμμετέχουν στη βιοσύνθεση και τον προσανατολισμό των μικροϊνιδίων κυτταρίνης (Katsaros και συν. 1996). Συγκεκριμένα, στα φαιοφύκη, κάθε τερματικό σύμπλοκο αποτελείται από μία στιβάδα μορίων σε σειρά και κάθε

ένα μόριο από δύο υπομονάδες (Schüssler και συν. 2003). Όσον αφορά στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος σε νεαρά κύτταρα, η εναπόθεση τοιχωματικού υλικού κατά τη μορφογένεση του κυττάρου έχει μελετηθεί επισταμένα σε ζυγώτες των *Fucales*. Κατά τη βλάστηση του ζυγώτη εναποτίθεται στο κυτταρικό τοίχωμα αρχικά φουκάνη και ακολούθως κυτταρίνη, η οποία λειτουργεί ενισχυτικά (Kropf και συν. 1988, Bisgrove και Kropf 2001). Τέλος, παρ' ότι τα φαιοφύκη απέχουν εξελικτικά από τα ανώτερα φυτά, διαθέτουν σύνθετη οργάνωση της διακυτταρικής επικοινωνίας που περιλαμβάνει τη σύνδεση γειτονικών πρωτοπλαστών μέσω των πλασμοδεσμών, δηλαδή ειδικών πρωτοπλασματικών διαύλων που διασχίζουν το κυτταρικό τοίχωμα και λειτουργούν ως γέφυρες επικοινωνίας μεταξύ των γειτονικών πρωτοπλαστών (Katsaros και συν. 2009, Terauchi και συν. 2012).

1.1.2.1.2. Κυτταροσκελετός φαιοφυκών

Κυτταρικός σκελετός ή κυτταροσκελετός (cytoskeleton) είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο ινωδών πρωτεϊνικών σχηματισμών, που εκτείνονται στο κυτόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων, και είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση του σχήματος του κυττάρου, τις ενδοκυτταρικές κινήσεις, την κυτοπλασματική ροή, την κατανομή των οργανιδίων, τη μίτωση, την κυτοκίνηση και τη στήριξη των κυττάρων (Alberts και συν. 1994, Lodish και συν. 2000, Cooper και Hausman 2004, Katsaros και συν. 2006). Ο κυτταροσκελετός περιλαμβάνει τρία στοιχεία: τους μικροσωληνίσκους (ΜΣ), τα μικρονημάτια ακτίνης (ΜΑ) και τα ενδιάμεσα νημάτια (ΕΝ).

1.2.1.2.α. Μικροσωληνίσκοι

Γενικά

Οι μικροσωληνίσκοι (ΜΣ) είναι ευθύγραμμοι, μεγάλου μήκους, πρωτεϊνικοί σχηματισμοί των ευκαρυωτικών κυττάρων, που διασχίζουν μεμονωμένοι ή σε δέσμες το κυτόπλασμα. Στο φυτικό κύτταρο συμμετέχουν σε μια σειρά από λειτουργίες, όπως η μορφογένεση του κυττάρου, ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης κλπ. Η εξωτερική διάμετρός τους είναι περίπου 24 nm ενώ το μήκος τους ποικίλλει. Οι ΜΣ δομούνται από την πρωτεΐνη σωληνίνη (tubulin), η οποία είναι ένα ετεροδιμερές παράγωγο δυο μονομερών υπομονάδων, της α-σωληνίνης και της β-σωληνίνης. Τα μονομερή α- και β-σωληνίνης

συνδέονται στενά μεταξύ τους για τη δημιουργία των ετεροδιμερών. Τα αβ-ετεροδιμερή έχουν καθορισμένη συμμετρία και εκφρασμένη πολικότητα, ενώ εντός του κυττάρου υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στα αβ-ετεροδιμερή σωληνίνης και τους ΜΣ. Τα ετεροδιμερή συνδέονται με κατάλληλο τρόπο μεταξύ τους και δημιουργούν επιμήκεις σχηματισμούς, τα πρωτονημάτια. Η σύνδεση γίνεται πάντοτε με τέτοιο τρόπο ώστε η α-σωληνίνη του ενός ετεροδιμερούς να συνδέεται με τη β-σωληνίνη του επόμενου ετεροδιμερούς. Τα πρωτονημάτια διευθετούνται το ένα δίπλα στο άλλο σε κυλινδρικό σχηματισμό συγκροτώντας τον φλοιό των ΜΣ, συνδεόμενα με τέτοιο τρόπο ώστε τα μονομερή της σωληνίνης να διατάσσονται ελικοειδώς στον φλοιό των ΜΣ. Ως αποτέλεσμα, οι ΜΣ εμφανίζουν πολικότητα, καθόσον στα δύο άκρα τους εντοπίζονται διαφορετικά μονομερή σωληνίνης. Στη συνέχεια, η αύξηση και σμίκρυνση του μικροσωληνίσκου γίνεται με προσθήκη ή αφαίρεση διμερών υπομονάδων στα άκρα του. Σε έναν πλήρη μικροσωληνίσκο στις περισσότερες περιπτώσεις καταμετρούνται 13 πρωτονημάτια (για βιβλιογραφία βλέπε Alberts και συν. 2002).

Ο πολυμερισμός και αποπολυμερισμός των ΜΣ είναι μια πολύπλοκη, διαρκής και σημαντική από βιολογικής άποψης διαδικασία. Αρχικά εμφανίζεται μια αργή φάση πολυμερισμού, η οποία είναι γνωστή ως πυρήνωση (nucleation). Όσο διαρκεί αυτή, μεμονωμένες υπομονάδες σωληνίνης ενώνονται μεταξύ τους δημιουργώντας ολιγομερή. Ακολουθεί μια φάση επιμήκυνσης, όπου η υψηλή συγκέντρωση ελεύθερης σωληνίνης έχει ως συνέπεια οι ΜΣ να πολυμερίζονται πιο γρήγορα από ό,τι αποπολυμερίζονται. Με την ελάττωση της ελεύθερης σωληνίνης, το μήκος των ΜΣ σταθεροποιείται, μιας και πλέον οι ρυθμοί πολυμερισμού και αποπολυμερισμού είναι ίσοι. Η συγκέντρωση της ελεύθερης σωληνίνης, στην οποία η ταχύτητα προσθήκης διμερών αντισταθμίζεται από την απώλεια υπομονάδων ονομάζεται κρίσιμη συγκέντρωση (critical concentration) (Mandelkow και Mandelkow 1992). Ο σχηματισμός και προσανατολισμός των ΜΣ στο κύτταρο σχετίζονται με συγκεκριμένα «κέντρα ελέγχου», τα κέντρα οργάνωσης μικροσωληνίσκων (ΚΟΜ). Αυτά ελέγχουν τη θέση και τον χρόνο εμφάνισης των ΜΣ, καθώς και τον αριθμό και τον προσανατολισμό του. Επιπλέον, τα ΚΟΜ καλύπτοντας το (-) άκρο των ΜΣ, που είναι λιγότερα σταθερό, παρέχουν προστασία από τον αποπολυμερισμό.

Μικροσωληνίσκοι φαιοφυκών

Τα κύτταρα διαθέτουν συχνά ασύμμετρη κατανομή οργανιδίων, πρωτεϊνών και κυτταροσκελετικών στοιχείων ως προς έναν συγκεκριμένο άξονα, δηλαδή παρουσιάζουν πολικότητα (Cove 2000). Οι ζυγώτες των Fucales διαθέτουν πολική οργάνωση και λειτουργούν ως πρότυπα για τη μελέτη του φαινομένου. Οι ΜΣ παίζουν έμμεσο ρόλο σε αυτό, αφού ο αποπολυμερισμός τους δεν επηρεάζει την εγκαθίδρυση της πολικότητας του ζυγώτη και την εμφάνιση του ριζοειδούς (Brawley και Quatrano 1979). Ωστόσο, οι ΜΣ ελέγχουν την ασύμμετρη διαίρεση που ακολουθεί και στην περίπτωση της αποδιοργάνωσής τους προκύπτει μη φυσιολογικό έμβρυο (Bisgrove και Kropf 1998). Σε αντίθεση με τα γένη των Fucales που εμφανίζουν πολικότητα κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, ορισμένα φαιοφύκη των τάξεων Sphacelariales και Dictyotales διαθέτουν μόνιμα πολική οργάνωση που συνδέεται ως επί το πλείστον με τα ακραία κύτταρα (Katsaros 1995). Μελέτη σε μεσοφασικά ακραία κύτταρα του είδους *Sphacelaria rigidula* δείχνει ότι οι ΜΣ οργανώνονται από δύο κεντροσωμάτια και συνθέτουν ένα δίκτυο από πολλές λεπτές δέσμες στην κορυφή του κυττάρου και λίγες παχύτερες στη βάση του (Katsaros 1992). Φαίνεται δηλαδή, ότι ο κυτταροσκελετός των ΜΣ συμμετέχει στην πολική οργάνωση του κυττάρου, καθώς και στη μηχανική στήριξη των κυτοπλασματικών λωρίδων που παρεμβάλλονται μεταξύ των χυμοτοπίων και πιθανώς σχηματίζονται από το σύμπλεγμα της ακτινομουσίνης (Katsaros 1992· βλέπε επίσης Panteris και συν. 2004). Η συμμετοχή του κυτταροσκελετού στην πολικότητα έχει μελετηθεί και κατά τη δημιουργία των διακλαδώσεων στα νηματοειδή φαιοφύκη, όπως τα *S. rigidula*, *Ectocarpus siliculosus* και *Macrocystis pyrifera* (Katsaros 1992, 1995 Varvarigos και συν. 2004).

Κατά τη μίτωση και την κυτοκίνηση κυττάρων φαιοφυκών, κυτταρικά στοιχεία φαίνεται να δεσμεύονται σε ειδικές θέσεις των ΜΣ προκειμένου να μεταφερθούν σε συγκεκριμένες περιοχές του κυττάρου, μηχανισμός ο οποίος έχει διαπιστωθεί και σε ζωικά κύτταρα, ενώ η πολική οργάνωση των ΜΣ εξακολουθεί να υφίσταται, υποβοηθώντας τη διαδικασία διαίρεσης του ακραίου κυττάρου του φαιοφύκου (Katsaros 1992· Felerbach και συν. 2004). Ειδικά κατά την κυτοκίνηση, όπως είναι γνωστό και από άλλα είδη φαιοφυκών, κυστίδια προερχόμενα από τη συσκευή Golgi διευθετούνται μέσω των ΜΣ στο επίπεδο διαίρεσης (Nagasato και Motomura

2002). Επίσης, επίδραση σε ακραία κύτταρα του *S. rigidula* με ταξόλη, η οποία σταθεροποιεί τους ΜΣ, προκαλεί ανάσχεση της μίτωσης και της κυτοκίνησης, επιβεβαιώνοντας τη σημασία των ΜΣ στη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης και στο διαχωρισμό των οργανιδίων στα δυο θυγατρικά κύτταρα, καθώς και στο σχηματισμό του θυγατρικού κυτταρικού τοιχώματος κατά την κυτοκίνηση (Katsaros και Galatis 1992' Dimitriadis και συν. 2001).

Η απουσία περιφερειακής διάταξης ΜΣ, προ-προφασικής ζώνης ΜΣ και φραγμοπλάστη σε συνδυασμό με την ύπαρξη κεντροσωματίων στα φαιοφύκη, τα καθιστούν ένα ενδιαφέρον πρότυπο μελέτης της οργάνωσης των ΜΣ κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Katsaros και συν. 2006). Παρ' όλα αυτά, οι ερευνητές που εφαρμόζουν ηλεκτρονική μικροσκοπία αντιμετωπίζουν συχνά δυσκολίες στη διατήρηση της λεπτής δομής των φαιοφυκών, με αποτέλεσμα την αποσπασματική μελέτη της οργάνωσης των ΜΣ (Neushul και Dahl 1972' Galatis και συν. 1973, 1977' Katsaros και συν. 1983' Katsaros και Galatis 1985, 1988, 1990' Katsaros 1995). Επιπλέον, η ιδιαίτερη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος αποτέλεσε αρχικά τροχοπέδη για την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου του ανοσοσθήμανσης της σωληνίνης κι έτσι οι περισσότερες λεπτομερείς εργασίες μελέτης του κυτταροσκελετού των ΜΣ πραγματοποιήθηκαν τη δεκαετία του '90 (Katsaros 1992' Katsaros και Galatis 1992' Rusig και συν. 1993, 1994' Karyophyllis και συν. 1997' Katsaros και Sala 1997). Η οργάνωση των ΜΣ κατά τη διάρκεια της μίτωσης παρουσιάζει ορισμένες διαφοροποιήσεις μεταξύ κυττάρων με ακραία αύξηση, όπως τα ακραία κύτταρα του *S. rigidula*, και κυττάρων με διάχυτη αύξηση, όπως τα υποακραία κύτταρα του *S. rigidula* ή τα ακραία κύτταρα του *Dictyota dichotoma* (Katsaros 1992' Katsaros και Galatis 1992' Rusig και συν. 1993, 1994). Παρ' ότι ο ρόλος του κυτταροσκελετού των ΜΣ στη μίτωση των φαιοφυκών έχει πλέον αποσαφηνιστεί, η συμμετοχή του στον μηχανισμό της κυτοκίνησης παραμένει υπό συζήτηση (Katsaros και συν. 1983' Nagasato και Motomura 2002' Bisgrove και Kropf 2004).

Αναφορικά με τη συμμετοχή του κυτταροσκελετού των ΜΣ στη μορφογένεση του κυτταρικού τοιχώματος των φαιοφυκών, έχει προταθεί ότι λειτουργεί συνεργιστικά με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, εν αντιθέσει με τα ανώτερα φυτά στα οποία παίζει τον κύριο ρόλο (Katsaros και συν. 2006). Πιο συγκεκριμένα, η απουσία περιφερειακών ΜΣ από τα κύτταρα των φαιοφυκών υποδεικνύει την ύπαρξη κάποιου εναλλακτικού μηχανισμού

μορφογένεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Πράγματι, πειράματα ανάσχεσης της οργάνωσης των ΜΣ σε κύτταρα του *Sphacelaria rigidula* οδηγούν σε μη φυσιολογική ανάπτυξη του νέου κυτταρικού τοιχώματος, ενώ αντίστοιχα πειράματα σε ζυγώτες των *Fucales* δεν προκαλούν καμία μεταβολή (Karyophyllis και συν. 1997' Bisgrove και Quatrano 1998).

Το κεντροσωμάτιο των φαιοφυκών, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φυτικά και ζωικά κύτταρα, διακρίνεται και λειτουργεί ως κέντρο οργάνωσης των ΜΣ (ΚΟΜ) καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Katsaros και συν. 2006). Αποτελείται από δύο κυλινδρικές δομές, οι οποίες βρίσκονται η μία σε γωνία με την άλλη, δημιουργώντας έναν σχηματισμό μορφής «L», και ονομάζονται κεντρούλλια (centrioles). Το κεντροσωμάτιο έχει την ιδιότητα να διπλασιάζεται κατά τη διαίρεση του κυττάρου. Κάθε ζεύγος κεντρουλλίων περιβάλλεται από μια περιοχή κυτοπλάσματος, η οποία στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται σκοτεινή και είναι γνωστή ως περικεντρουλλιακό υλικό (pericentriolar material). Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του πυρήνα πολυμερισμού των ΜΣ και η σύστασή της δεν είναι απόλυτα γνωστή. Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται πολλές πρωτεΐνες, όπως η κεντρίνη και η γ-σωληνίνη (Moritz και Agard 2001).

Η κεντρίνη έχει εντοπιστεί σε πληθώρα ευκαρυωτικών κυττάρων και σχετίζεται με τα βασικά σωμάτια, τη μιτωτική άτρακτο, τους πόλους της μιτωτικής ατράκτου, την κυτταρική πλάκα και τα κεντροσωμάτια (Del Vecchio και συν. 1997' Stoppin-Mellet και συν. 2000). Στα φαιοφύκη, η κεντρίνη εντοπίζεται στο βασικό σωμάτιο των ζωοσπορίων (αρσενικών κινητών γαμετών), όπου ενώνει τα δύο βασικά σωμάτια μεταξύ τους καθώς και με τον πυρήνα (Melkonian και συν. 1992' Katsaros και συν. 1993). Ακόμη, η κεντρίνη έχει εντοπισθεί σε αναπτυσσόμενα γαμετάγγεια, ζυγώτες και βλαστητικά κύτταρα φαιοφυκών (Katsaros και συν. 1991' Katsaros και Galatis 1992' Bisgrove και συν. 1997' Nagasato και συν. 2000). Στα βλαστητικά κύτταρα, σχετίζεται άμεσα με το κεντροσωμάτιο καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και πιθανώς λειτουργεί ως σύνδεσμος μεταξύ κεντροσωματίου και πυρήνα. Επιπλέον, έρευνες σε κύτταρα κατώτερων εξελικτικά ζωικών οργανισμών δείχνουν ότι η κεντρίνη συμμετέχει στον προσανατολισμό των κεντροσωματίων και στον έλεγχο του διπλασιασμού των κεντρουλλίων (Salisbury 2004). Δεν αποκλείεται να ισχύει κάτι ανάλογο και στα φαιοφύκη, αφού ανάλυση του γονιδίου της κεντρίνης από το *Scytosiphon lomentaria*

αποκαλύπτει την κατά 84 % ομολογία του με το αντίστοιχο γονίδιο του *Chlamydomonas* sp. (Nagasato και συν. 2004).

Μία ακόμη πρωτεΐνη του κεντροσωματίου, η γ-σωληνίνη, η οποία συνδέεται με τους πόλους της μιτωτικής ατράκτου και τα KOM σε ποικίλους τύπους κυττάρων, συμμετέχει στην πυρήνωση των ΜΣ (Oakley και συν. 1990, 2000· Vaughn και Harper 1998· Panteris και συν. 2000). Μελέτες ανοσοφθορισμού με χρήση αντισώματος έναντι της γ-σωληνίνης επιβεβαιώνουν την παρουσία της πρωτεΐνης αυτής στην περιοχή γύρω από το κεντροσωμάτιο του φαιοφύκου *S. rigidula*, ενώ η εντόπισή της στο χώρο προσομοιάζει στην αντίστοιχη ορισμένων ζώων και μυκήτων (Oakley 2000· Karyophyllis και συν. 2005). Η ένταση του σήματος ανοσοφθορισμού της γ-σωληνίνης παρουσιάζει διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της μίτωσης, με τη μέγιστη ένταση να σημειώνεται στη μετάφαση. Η γ-σωληνίνη, μαζί με άλλες πρωτεΐνες, συσσωρεύονται υπό μορφή δακτυλίων στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου, συμβάλλοντας στην πυρήνωση των ΜΣ του κεντροσωματίου (Blagden και Glover 2003). Το γεγονός αυτό συνάδει με παρατηρήσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από κύτταρα του *D. dichotoma*, που υπογραμμίζουν τη σημαντική αύξηση του αριθμού των ΜΣ κατά τη μίτωση, σε σχέση με τη μεσόφαση (Katsaros και Galatis 1992). Τέλος, ο εντοπισμός της γ-σωληνίνης σε κύτταρα φαιοφυκών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τις φυλογενετικές σχέσεις των ευκαρυωτικών οργανισμών.

1.2.1.2.β. Μικρονημάτια ακτίνης - Ενδιάμεσα νημάτια

Ο ρόλος των μικρονηματίων ακτίνης (MA) στη δημιουργία και τη διατήρηση της πολικότητας του κυττάρου έχει υπογραμμιστεί σε πολλές εργασίες που αφορούν κατά βάση στη βλάστηση γυρεοκόκκων και την αύξηση των ριζικών τριχιδίων σε ανώτερα φυτά, την αύξηση των υφών σε μύκητες και την ανάπτυξη των αμοιβαδοζώνων (Panteris και συν. 1992· Heath 2000· Wasteneys και Galway 2003). Οι πρώτες πληροφορίες για τον ρόλο που διαδραματίζουν τα MA στα κύτταρα φαιοφυκών προέρχονται από έρευνες σε φύκη της οικογένειας Fucales και συγκεκριμένα στα γένη *Fucus* και *Silvetia* (πρώην *Pelvetia*) (Nelson και Jaffe 1973· Quatrano 1973).

Η απουσία παρατηρήσεων MA με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο συνδέεται με δυσκολίες κατά τη στερέωση του πειραματικού υλικού, λόγω της ευαισθησίας της F-ακτίνης σε αλδεΐδες και άλλες χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται κατά την επεξεργασία του δείγματος (Miller και συν. 1996). Για το λόγο αυτό, οι πρώτες μελέτες του ρόλου της ακτίνης στην ανάπτυξη Φαιοφυκών ήταν έμμεσες, με χρήση ουσιών που αποπολυμερίζουν τα MA (Brawley και Robinson 1985). Ωστόσο, η χρώση της ακτίνης με φαλλοϊδίνη σημασμένη με φθοριοχρώματα αποτελεί μία αρκούντως αποτελεσματική μέθοδο σήμανσης MA και με τη βοήθεια αυτής έχουν προκύψει πολλά αποτελέσματα που αφορούν στον κυτταροσκελετό της ακτίνης των φαιοφυκών (Kropf και συν. 1989, 1998; Alessa και Kropf 1999; Pu και συν. 2000). Τέτοιες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μεσοφασικά κύτταρα των περισσότερων φαιοφυκών εμφανίζουν έναν πολύ καλά οργανωμένο κυτταροσκελετό από MA. Πιο συγκεκριμένα, σχεδόν όλα τα είδη που έχουν ελεγχθεί χαρακτηρίζονται από το ίδιο πρότυπο οργάνωσης της ακτίνης, που περιλαμβάνει περιφερειακές, ενδοπλασματικές και περιπυρηνικές δέσμες MA (Karyophyllis και συν. 2000α; Katsaros και συν. 2006). Ακόμη, έρευνες σε κύτταρα του φαιοφύκου *Sphacelaria rigidula* και του γαμετόφυτου του *Macrocystis pyrifera* δείχνουν ότι ο κυτταροσκελετός της ακτίνης συμμετέχει στη μίτωση και την κυτοκίνηση, λειτουργώντας πιθανώς συνεργιστικά με τους ΜΣ (Karyophyllis και συν. 2000α; Varvarigos και συν. 2005). Μάλιστα, πειράματα επίδρασης με τον αναστολέα του πολυμερισμού των MA, κυτοχαλασίνη B, προκαλούν αναστολή της κυτοκίνησης, ενώ εμποδίζουν την ολοκλήρωση της μιτωτικής διαδικασίας (Karyophyllis και συν. 2000α). Επιπλέον, ένας εξίσου σημαντικός ρόλος του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα φαιοφύκη είναι η ρύθμιση της πολικότητας του κυττάρου. Η GTPάση FdRac1 ανήκει στα σηματοδοτικά μόρια της οικογένειας Rho, τα οποία είναι υπεύθυνα για την εγκαθίδρυση της πολικότητας του κυττάρου μέσω της ακτίνης και εντοπίζεται τοπικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην κορυφή των ριζοειδών του *Fucus distichous* (Fowler και συν. 2004). Πράγματι, μελέτες μικροσκοπίας σε ζυγώτες των γενών *Fucus* και *Pelvetia* δείχνουν ότι κατά τη βλάστηση δημιουργείται μία δακτυλιοειδής διάταξη MA στην υποακραία περιοχή του αναπτυσσόμενου ριζοειδούς (Pu και συν. 2000). Τα αποτελέσματα της επίδρασης με κυτοχαλασίνη ή λατρουνκουλίνη, που καταστρέφουν τα MA, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η φωτοπολικότητα (photopolarization) των ζυγωτών των Fucales εξαρτάται από

τον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Quatrano 1997, Hable και Kropf 1998, Ρυ και συν. 2000). Κάτι ανάλογο παρατηρείται στα γένη *Sphacelaria*, *Halopteris* και *Syringoderma*, τα οποία χαρακτηρίζονται από μόνιμη ακραία αύξηση και ο κυτταροσκελετός της ακτίνης φαίνεται να συμμετέχει στην εγκαθίδρυση της πολικότητας του ακραίου κυττάρου (Karyophyllis και συν. 2000α). Σημαντικός είναι, επίσης, ο ρόλος της ακτίνης στη δημιουργία των διακλαδώσεων στα νηματοειδή φαιοφύκη (Varvarigos και συν. 2007). Κατά την αναγέννηση πρωτοπλαστών του φαιοφύκους *Macrocystis pyrifera*, τα αρχικά διάχυτα MA αποκτούν ακτινωτή διάταξη γύρω από τη σχηματιζόμενη προεκβολή του κυττάρου, ενώ επίδραση με λατρουνκουλίνη B προκαλεί ανάσχεση της βλάστησης και της δημιουργίας διακλάδωσης, γεγονός που υπογραμμίζει τη συμμετοχή της ακτίνης στον μηχανισμό (Varvarigos και συν. 2004). Τέλος, ο προσανατολισμός των MA είναι άμεσα συνδεδεμένος με αυτόν των μικροϊνιδίων κυτταρίνης (Karyophyllis και συν. 2000β, Katsaros και συν. 2002). Μελέτες με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία σε κύτταρα των *Choristocarpus tenellus*, *Sphacelaria rigidula* και *Dictyota dichotoma* αποκάλυψαν ότι τα μικροϊνίδια κυτταρίνης του κυτταρικού τοιχώματος είναι πάντα προσανατολισμένα παράλληλα με τα περιφερειακά MA και οι συγγραφείς προτείνουν ότι η συσχέτιση της μορφογένεσης του κυτταρικού τοιχώματος με τα MA αποτελεί γενικευμένο φαινόμενο στα περισσότερα φαιοφύκη (Katsaros και συν. 2002).

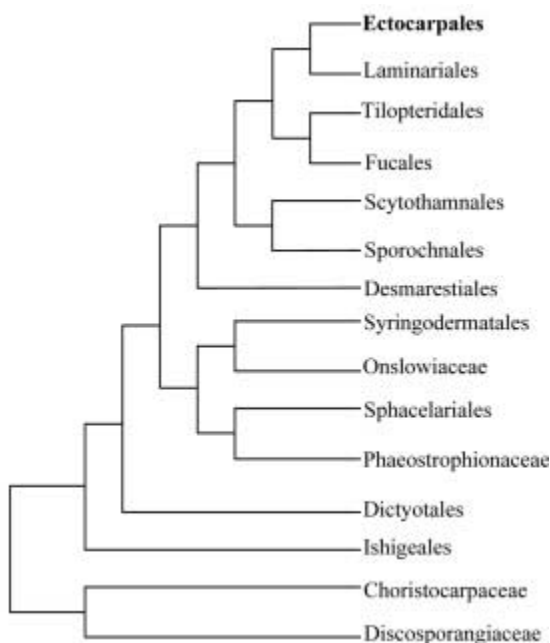
Πληροφορίες για την παρουσία ενδιάμεσων νηματίων σε φαιοφύκη δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα.

Ι.1.2.2. Τάξεις και είδη φαιοφυκών που μελετήθηκαν

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν 12 αντιπροσωπευτικοί κλώνοι (strains) από 4 τάξεις φαιοφυκών: Ectocarpales, Laminariales, Discosporangiales και Tilopteridales (βλέπε επίσης Πίνακα 1 από Υλικά και Μεθόδους). Οι θαλλοί τους είναι νηματοειδείς και αποτελούνται από μονόσειρα νήματα. Να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της τάξης Laminariales, μελετήθηκαν τα γαμετόφυτα των κλώνων, τα οποία είναι επίσης νηματοειδή. Παρακάτω παρατίθενται χαρακτηριστικά γνωρίσματα και πληροφορίες για τις τάξεις και τα είδη φαιοφυκών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

I.1.2.2.1. Ectocarpales

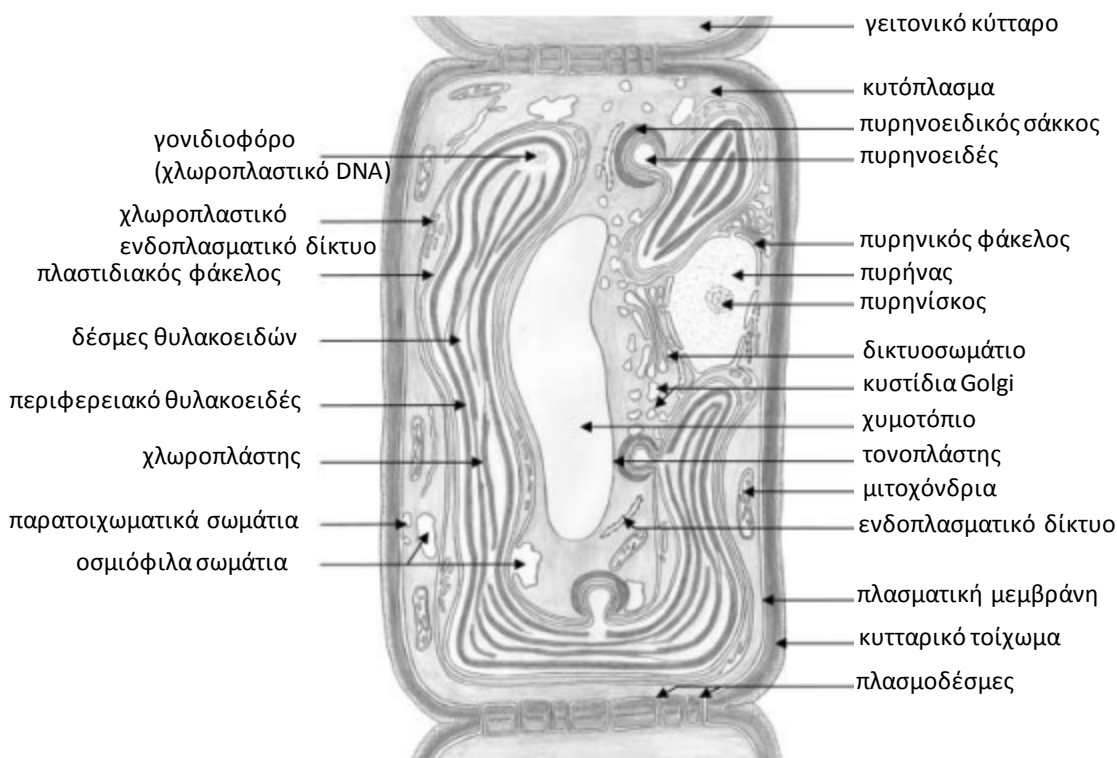
Η τάξη αυτή προτάθηκε για πρώτη φορά το 1922 από τους Oltmanns, Setchell και Gardner, με βασικό γνώρισμα των εκπροσώπων της την παρεμβόλιμη (intercalary) αύξηση, ενώ εξαίρεση αποτελεί η ακραία αύξηση (apical). Ωστόσο, από τότε έχουν πραγματοποιηθεί πολλές πρόσθετες μελέτες που οδήγησαν σε ταξινομικές αλλαγές. Πιό συγκεκριμένα, στα Ectocarpales ανήκουν τα περισσότερα από τα νηματοειδή φαιοφύκη, τα οποία εμφανίζουν χαμηλή μορφολογική διαφοροποίηση και αρχικά θεωρούντο φυλογενετικά πρωτόγονα. Σύγχρονες μοριακές μελέτες, όμως, έδειξαν ότι η ομάδα εξελίχθηκε πρόσφατα, ενώ είδη που ανήκαν στα Chordariales, Dictyosiphonales και Scytosiphonales έχουν περιληφθεί στην τάξη Ectocarpales (Rousseau και de Reviers 1999). Τα Ectocarpales είναι φύκη της παράκτιας ζώνης που συγγενεύουν με τα Laminariales (βλέπε Εικόνα 1.5). Χαρακτηρίζονται από διακλαδισμένα νήματα, των οποίων τα κύτταρα φέρουν ένα ή περισσότερα ταινιοειδή πλαστίδια. Ακόμη, οι ιστοί είναι είτε ψευδοπαρεγχυματικοί ή παρεγχυματικοί. Η εγγενής αναπαραγωγή είναι ισογαμία ή ανισογαμία και περιλαμβάνει εναλλαγή γενεών. Μελετήθηκαν οι εξής εκπρόσωποι της τάξης: *Ectocarpus siliculosus*, *Acinetospora crinita* και *Pylaiella littoralis*.



Εικόνα 1.5. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ φαιοφυκών (από Charrier και συν. 2008).

I.1.2.2.1.1. *Ectocarpus siliculosus*

Το είδος *Ectocarpus siliculosus* είναι το πρώτο φύκος του οποίου το γονιδίωμα έχει χαρτογραφηθεί πλήρως (Cock και συν. 2010). Το 2004 προτάθηκε η χρήση του ως γενετικό πρότυπο (Peters και συν. 2004) διότι χαρακτηρίζεται από μικρό μέγεθος, ταχύ ρυθμό ανάπτυξης, αυξημένη γονιμότητα, μικρό γονιδίωμα και κύκλο ζωής που μπορεί να ολοκληρωθεί σε ένα τρυβλίο Petri υπό εργαστηριακές συνθήκες. Το γονιδίωμά του αποτελείται από μία αλληλουχία 214 Mbp η οποία αποκαλύπτει ενδιαφέροντα δεδομένα που σχετίζονται με την εξέλιξη της πολυκυτταρικότητας από τα φύκη ως τα ζώα και τα ανώτερα φυτά. Πλέον, το *Ectocarpus siliculosus* χρησιμοποιείται ως γενετικό πρότυπο, παρέχοντας τη δυνατότητα εξαγωγής νέων πληροφοριών για τα φαιοφύκη μέσω γενετικών αναλύσεων.

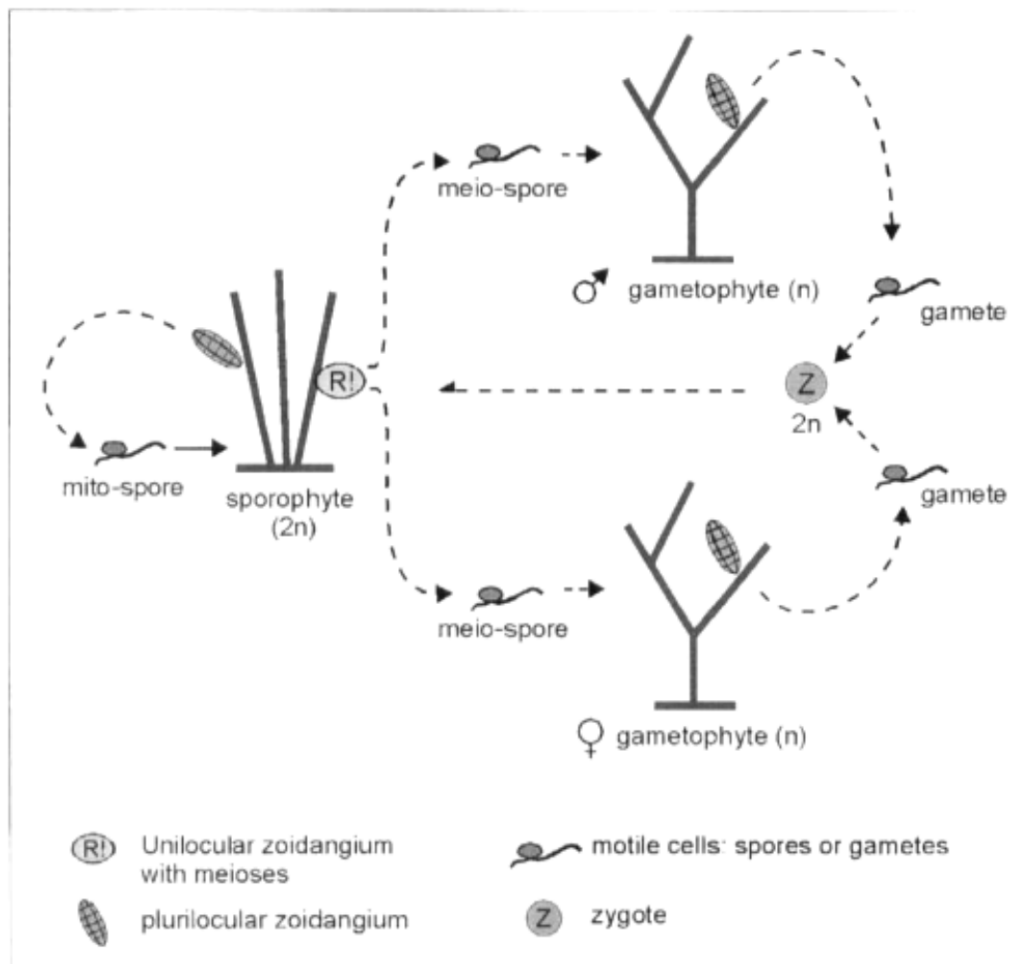


Εικόνα I.6. Κατανομή οργανιδίων σε βλαστικό κύτταρο του φαιοφύκου *Ectocarpus siliculosus* (τροποποιημένο από Charrier και συν. 2008).

Τα κύτταρα του θαλλού του *E. siliculosus* έχουν μικρό μέγεθος, ορθογώνιο σχήμα σε κατά μήκος τομή και φέρουν τα οργανίδια ενός τυπικού κυττάρου φαιοφύκου όπως αναλύθηκαν παραπάνω (βλέπε Εικόνα I.6). Ανάλογα με τον τύπο και την ηλικία, το μέγεθος

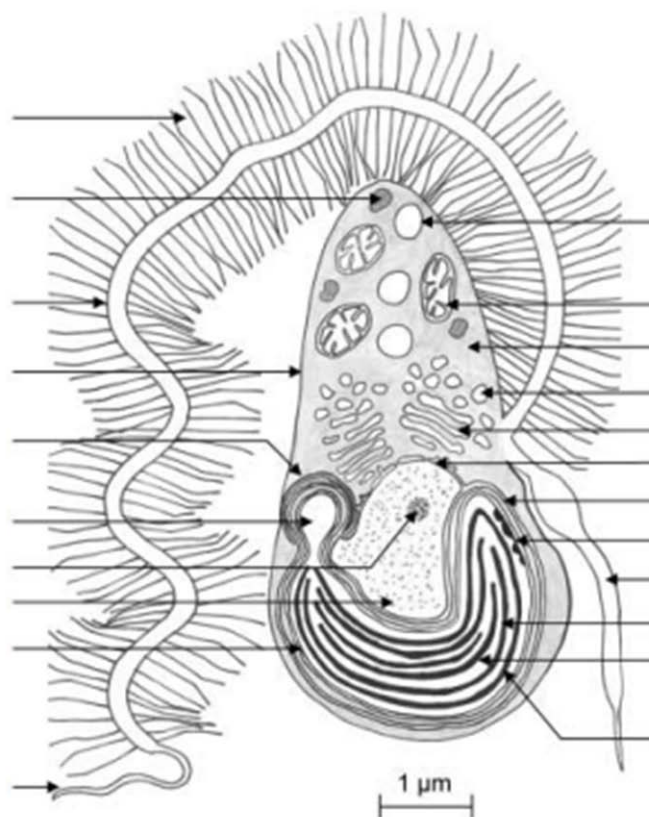
των βλαστητικών κυττάρων του *E. siliculosus* ποικίλλει από 10 έως 35 μm σε μήκος και από 5 έως 15 μm σε πλάτος, σε εργαστηριακές συνθήκες. Είναι κοσμοπολίτικο είδος, με μεγάλο εύρος ανοχής σε διαφορετικά ενδιαιτήματα, ενώ αναπτύσσεται σε βράχους ή επιφυτικά σε μεγαλύτερα φύκη. Μάλιστα, πολλές φορές η υπερβολική ανάπτυξή του δημιουργεί προβλήματα στις καλλιέργειες θαλάσσιων οργανισμών.

Ο κύκλος ζωής του χαρακτηρίζεται από εναλλαγή γενεών, η οποία περιλαμβάνει τη δημιουργία σποριόφυτου ($2n$) και γαμετόφυτου (n) (βλέπε επίσης Εικόνα 1.7). Τα κινητά κύτταρα ή ζωοσπόρια του *E. siliculosus* έχουν την τυπική δομή των ζωοσπορίων των



Εικόνα 1.7. Διαγραμματική απεικόνιση του κύκλου ζωής του είδους *Ectocarpus siliculosus* που περιλαμβάνει εναλλαγή γενεών. Sporophyte: σποριόφυτο, gametophyte: γαμετόφυτο, unilocular: μονόχωρο, plurilocular: πολύχωρο, zoidangium: ζωοσποριάγγειο, zygote: ζυγώτης, gamete: γαμέτης (από Müller και συν. 1998).

φαιοφυκών, με δύο άνισα μαστίγια, οφθαλμική κηλίδα και νεφροειδές σχήμα (Müller και Falk 1973' βλέπε επίσης Εικόνα 1.8). Έως τώρα, έχουν καταγραφεί περίπου 330 διαφορετικοί κλώνοι του *E. siliculosus*, που προκύπτουν από συνεχείς έρευνες ταυτοποίησης βάσει διαφορετικών μορφολογικών και γενετικών γνωρισμάτων.



Εικόνα 1.8. Σχηματική απεικόνιση και κατανομή οργανιδίων ζωοσπορίου του Φαιοφύκου *Ectocarpus siliculosus* (τροποποιημένο από Charrier και συν. 2008).

1.1.2.2.1.2. *Acinetospora crinita*

Το όνομα του γένους *Acinetospora* εισήχθη από τον Bornet (1891) για τα φύκη εκείνα που απελευθερώνουν ακίνητα σπόρια («ακίνητοσπόρια») από πολύχρωμα σποριαγγεία. Μάλιστα, ο Bornet πρότεινε την κατάταξη των φυκών αυτών σε μία ξεχωριστή ομάδα, την οποία ονόμασε «Acinetosporées», και η οποία κατά τη γνώμη του θα έβρισκε μία φυσική θέση μεταξύ των Ectocarpaceae και των Tilopteridaceae. Από τότε έχουν αναφερθεί διάφορα μορφολογικά γνωρίσματα και αναπαραγωγικές δομές ή διαδικασίες για το είδος *Acinetospora crinita*

(Harvey) Kornmann. Πράγματι, το είδος χαρακτηρίζεται από τους ταξινομιστές ως αινιγματικό, κυρίως λόγω των διαφορετικών αναπαραγωγικών διαδικασιών που έχουν αναφερθεί σε κλώνους του είδους *A. crinita*, όπως: α) φυτά με πολύχρωρα σποριάγγεια (ακίνητοσποριάγγεια) και μονόχρωρα σποριάγγεια (Bornet 1891), β) φυτά με πολύχρωρα σποριάγγεια (ακίνητοσποριάγγεια και σχετικά λίγα μεγασποριάγγεια) και μονόχρωρα σποριάγγεια, στα οποία τα ζωοσπόρια αναπτύσσονται σε φυτά που ομοιάζουν με το είδος *Feldmannia lebelli* (Areschough) Hamel (Müller 1986), γ) φυτά με μονόχρωρα σποριάγγεια (απομειωτικά) και μονοσποριάγγεια (Müller 1986), δ) φυτά μόνο με μονοσποριάγγεια (Rosenvinge και Lund 1941), ε) φυτά μόνο με πολύχρωρα σποριάγγεια (ακίνητοσποριάγγεια και μεγασποριάγγεια) (Müller 1986), στ) φυτά που αναπαράγονται μόνο αγενώς με τεμαχισμό (Amsler 1984). Η ετερογένεια αυτή προκαλεί δυσκολίες στην ταξινόμηση των ειδών, ενώ το κύριο ερώτημα που προκύπτει είναι εάν οι διαφορετικές αναπαραγωγικές διαδικασίες σχετίζονται με την προσαρμογή ενός είδους σε ποικίλα ενδιαιτήματα ή με την ύπαρξη πολλών ειδών που φέρουν στενά όρια ανοχής (Pedersen και Kristiansen 2001). Τέλος, η γεωγραφική εξάπλωση του είδους περιλαμβάνει και τα δύο ημισφαίρια και συνεπώς ένα ευρύ φάσμα αλατότητας και θερμοκρασίας.

I.1.2.2.1.3. *Pylaiella littoralis*

Το είδος *Pylaiella littoralis* ανήκει και αυτό στην ομάδα «Acinetosporées». Κοσμοπολίτικο είδος, χαρακτηριστικό της ανώτερης υποπαράλιας ζώνης, το οποίο αναπτύσσεται είτε επιφυτικά σε μεγαλύτερα φύκη, είτε σε βράχους, ή βρίσκεται ελεύθερο στην μεσοπαλιρροϊκή ζώνη. Αποτελείται από νηματοειδή θαλλό που φτάνει σε μήκος μέχρι τα 40 cm (Loiseaux-de Goër και Noailles 2008). Χαρακτηρίζεται από ακανόνιστες διακλαδώσεις και από περιστασιακές κατά μήκος κυτταρικές διαιρέσεις. Κάθε κύτταρο περιέχει πολλούς δισκοειδείς χλωροπλάστες. Είναι διπλοειδής οργανισμός με τυπικά μονόχρωρα ζωοσποριάγγεια που δημιουργούνται επί του θαλλού. Έχει μελετηθεί εκτενώς το μιτοχονδριακό γονιδίωμα του είδους, το οποίο χαρτογραφήθηκε πλήρως και φαίνεται να συνδυάζει τόσο αρχέγονα όσο και εξελικτικά ανώτερα χαρακτηριστικά (Oudot-Le Secq και συν. 2001).

I.1.2.2.2. Laminariales

Η τάξη Laminariales αποτελείται από διπλοειδείς οργανισμούς, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από άτομα με μακροσκοπική σποριοφυτική γενιά και μικροσκοπικό γαμετόφυτο. Τα σποριόφυτα έχουν ύψος πάνω από 1 m ενώ μπορούν να φτάσουν έως και τα 60 m, δικαιολογώντας έτσι τον όρο γιγαντιαία κελποφύκη (kelps). Ο θαλλός του σποριόφυτου αποτελείται από έναν κυλινδρικό στύπο (stipe), απλό ή διακλαδιζόμενο, φυλλοειδή ελάσματα (blades), στα οποία αναπτύσσονται τα αναπαραγωγικά όργανα και μία βάση στήριξης (holdfast) που υποβοηθά την προσκόλληση του φύκου στο υπόστρωμα (βλέπε Εικ. I.9α). Οι πνευματοκύστες (pneumatocysts ή floats) είναι τυπικές διογκώσεις στον στύπο ή τα ελάσματα των Laminariales που υποβοηθούν την επίπλευση του ανορθωμένου θαλλού. Το γαμετόφυτο των κελποφυκών είναι μικροσκοπικό, νηματοειδές και διακλαδιζόμενο (Graham και συν. 2009· βλέπε επίσης Εικόνα I.9β).

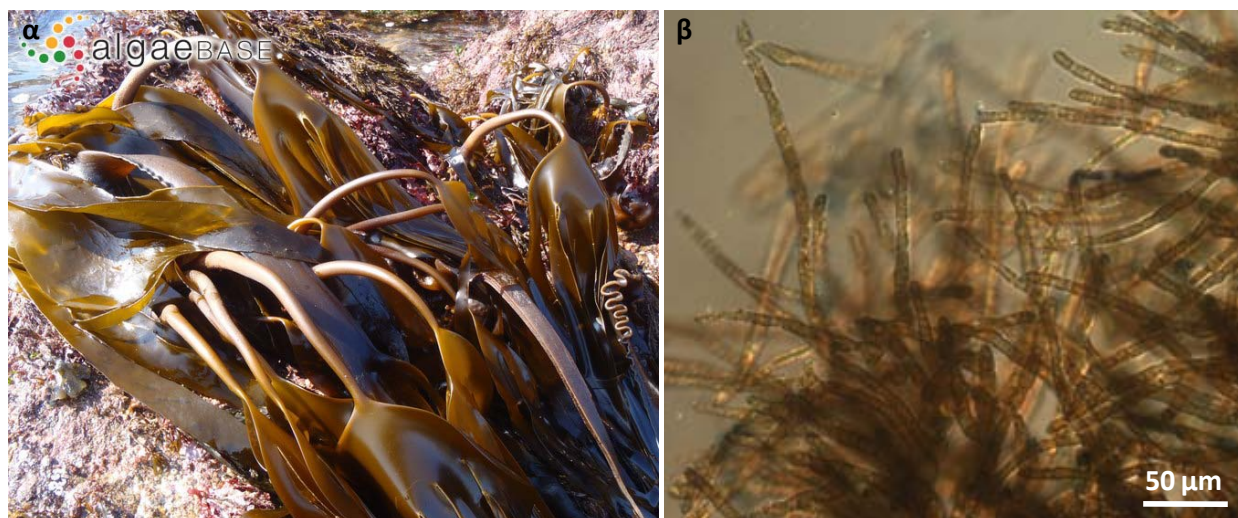
Πιστεύεται ότι τα Laminariales εμφανίστηκαν κατά το Μειόκαινο, δηλαδή 5-23 εκ. χρόνια πριν. Οι οργανισμοί αυτοί απαιτούν πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά νερό και θερμοκρασίες μεταξύ 6 και 14 °C. Είδη της τάξης Laminariales συναντώνται στη βορειοδυτική Ευρώπη, στις ακτές της Δυτικής Αμερικής και στη νότια Αυστραλία, όπου σχηματίζουν πυκνά θαλάσσια δάση. Τα οικοσυστήματα που δημιουργούν χαρακτηρίζονται από υψηλή παραγωγικότητα και βιοποικιλότητα, ενώ ο οικολογικός τους ρόλος βασίζεται κυρίως στο γεγονός ότι παρέχουν καταφύγιο σε χιλιάδες άλλους οργανισμούς όπως είναι οι σπόγγοι, τα βρυόζωα, οι ιχθύες και διάφορα είδη ασπονδύλων (Graham και συν. 2009). Ακόμη, τα κελποφύκη είναι σημαντικά λόγω της ικανότητάς τους να συσσωρεύουν ιώδιο. Μάλιστα, στο παρελθόν αποτελούσαν πηγή ιωδίου για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής που προλαμβάνουν παθήσεις του θυρεοειδούς αδένος. Πρόσφατα,δείχθηκε ότι η συσσώρευση ιωδίου στα κελποφύκη παρέχει εξωκυτταρική προστασία έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης και αποτελεί το πρώτο ανόργανο αντιοξειδωτικό στοιχείο που έχει ανακαλυφθεί έως τώρα σε ζωντανό οργανισμό (Kürper και συν. 2008).

Πολλά είδη της τάξης Laminariales είναι εδώδιμα ή χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φαρμακευτικών και καλλυντικών σκευασμάτων, και τα τελευταία χρόνια αποτελούν πεδίο έρευνας για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Adams και συν. 2011).

Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι της τάξης Laminariales είναι τα είδη *Laminaria digitata* και *Macrocystis pyrifera*.

1.1.2.2.1. *Laminaria digitata*

Πρόκειται για κοινό είδος με παγκόσμια εξάπλωση, το οποίο συναντάται κυρίως σε εύκρατες και βόρειες βραχώδεις ακτές. Το έλασμα είναι ακέραιο (βλέπε Εικόνα 1.9α). Όπως όλα τα Laminariales, φέρει αποκλειστικά μονόχωρα (ή μονοθάλαμα) αναπαραγωγικά όργανα, τα οποία είναι δυνατό να σχηματιστούν σε οποιαδήποτε θέση πάνω στο έλασμα (Graham και συν. 2009). Χαρακτηρίζεται από έντονους ρυθμούς ανάπτυξης, όμως επηρεάζεται σημαντικά από αβιοτικούς παράγοντες όπως η αλατότητα, η θερμοκρασία και ο υδροδυναμισμός. Ακόμη, το είδος *L. digitata* καλλιεργείται εκτενώς σε Ασιατικές κυρίως χώρες, όπου χρησιμοποιείται για την παραγωγή αλγινικού οξέος και λοιπών φαρμακευτικών σκευασμάτων.



Εικόνα 1.9. Εικόνες θαλλών του είδους *Laminaria digitata*. Εικ. 1.9α. Θαλλός σποριόφυτου όπου απεικονίζονται ο στύπος και τα ελάσματα. (Η εικόνα προέρχεται από το <http://www.algaebase.org/> και ανήκει στον Καθηγητή κ. Ignacio Bárbara). Εικ. 1.9β. Θαλλός του γαμετόφυτου του μακροφύκου αναπτυσσόμενου σε καλλιέργεια.

1.1.2.2.2. *Macrocystis pyrifera*

Το είδος *M. pyrifera* είναι ένα ευμέγεθες κελποφύκος, του οποίου ο θαλλός μπορεί να φτάσει έως και τα 60 m. Συστάδες από *M. pyrifera* σχηματίζουν πυκνά θαλάσσια δάση και σε αυτά βρίσκουν καταφύγιο πολλά θαλάσσια είδη. Για παράδειγμα, οι θαλάσσιες ενυδρίδες (sea

otters) κοιμούνται προστατευμένες μέσα σε δάση του είδους, τυλίγοντας το σώμα τους γύρω από τα ελάσματα του φύκους. Ο θαλλός του σποριόφυτου αποτελείται από έναν διακλαδιζόμενο στύπο με πολλαπλά ελάσματα. Η ανάπτυξη του διακλαδιζόμενου θαλλού προκύπτει από μία οπή στη βάση νεαρών ελασμάτων, η οποία οδηγεί στην επιμήκη σχάση του μονού αρχικού ελάσματος σε δύο. Η διαδικασία συνεχίζεται και εν τέλει προκύπτουν τα πολλαπλά ελάσματα (Graham και συν. 2009).

Το είδος *M. pyrifera* αναπτύσσεται κυρίως σε βόρειες ακτές λόγω της ευαισθησίας του σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 20 °C. Επιπλέον, το είδος αυτό συλλέγεται για την παραγωγή αλγινικών αλάτων. Μελέτες δείχνουν ότι η συλλογή του υλικού δεν δημιουργεί οικολογικά προβλήματα εφόσον αυτή πραγματοποιείται με τρόπο που δεν επηρεάζει την ακεραιότητα των πληθυσμών (North 1994).

I.1.2.2.3. Discosporangiales

Η τάξη Discosporangiales περιλαμβάνει μόνο την οικογένεια Choristocarpaceae, η οποία αποτελείται από δύο γένη (*Choristocarpus* και *Discosporangium*) με ένα είδος στο κάθε γένος: το *Choristocarpus tenellus* και το *Discosporangium mesarthrocarpum*. Η βασική μορφολογία του βλαστητικού θαλλού των δύο ειδών είναι παρόμοια. Σύγχρονες μοριακές μελέτες αλλά και μελέτες μορφολογικών χαρακτηριστικών δείχνουν ότι τα εν λόγω είδη, όπως και πολλά είδη φαιοφυκών, μοιράζονται τα εξής κοινά στοιχεία: 1) επάκρια και διάχυτη αύξηση, 2) μονόσειρα νήματα με διακλαδώσεις στις υποακραίες περιοχές, 3) πολλαπλούς χλωροπλάστες χωρίς πυρηνοειδή και 4) απουσία τριχών φαιοφυκών (Kawai και συν. 2007). Ταξινομικά ανήκουν στις κατώτερες εξελικτικά τάξεις φαιοφυκών, λόγω κάποιων αρχέγονων χαρακτηριστικών τους (όπως η απουσία τριχών φαιοφυκών και η διάχυτη αύξηση).

I.1.2.2.3.1. *Choristocarpus tenellus*

Το είδος *C. tenellus*, όπως αναφέρθηκε, είναι το μοναδικό είδος του γένους *Choristocarpus*. Ο θαλλός του χαρακτηρίζεται από διακλαδιζόμενα νήματα μικρού μεγέθους, με ανοιχτό καφέ χρώμα και επάκρια καθώς και διάχυτη αύξηση. Ο πολλαπλασιασμός γίνεται με αγενή αναπαραγωγή μέσω χαρακτηριστικών αναπαραγωγικών οργάνων (propagules) που

σχηματίζονται σε μητρικά κύτταρα. Παρ'όλα αυτά δεν αποκλείεται αρχικά το είδος να περιλάμβανε εναλλαγή γενεών, και κατ' επέκταση την ύπαρξη σταδίου εγγενούς αναπαραγωγής, όπως συναντάται στα περισσότερα φαιοφύκη (Kawai και συν. 2007). Έχει βρεθεί στις ακτές της Μεγάλης Βρετανίας και στη Μεσόγειο Θάλασσα.

I.1.2.2.4. Tilopteridales

Στην τάξη Tilopteridales ανήκουν νηματοειδή φαιοφύκη που αναπαράγονται συνήθως με ισομορφική εναλλαγή γενεών. Αναπτύσσονται κυρίως σε εύκρατα και πολικά ύδατα και για αυτό τον λόγο συναντώνται κυρίως στον Βόρειο Ατλαντικό και στον Αρκτικό Ωκεανό.

I.1.2.2.4.1. Tilopteris mertensii

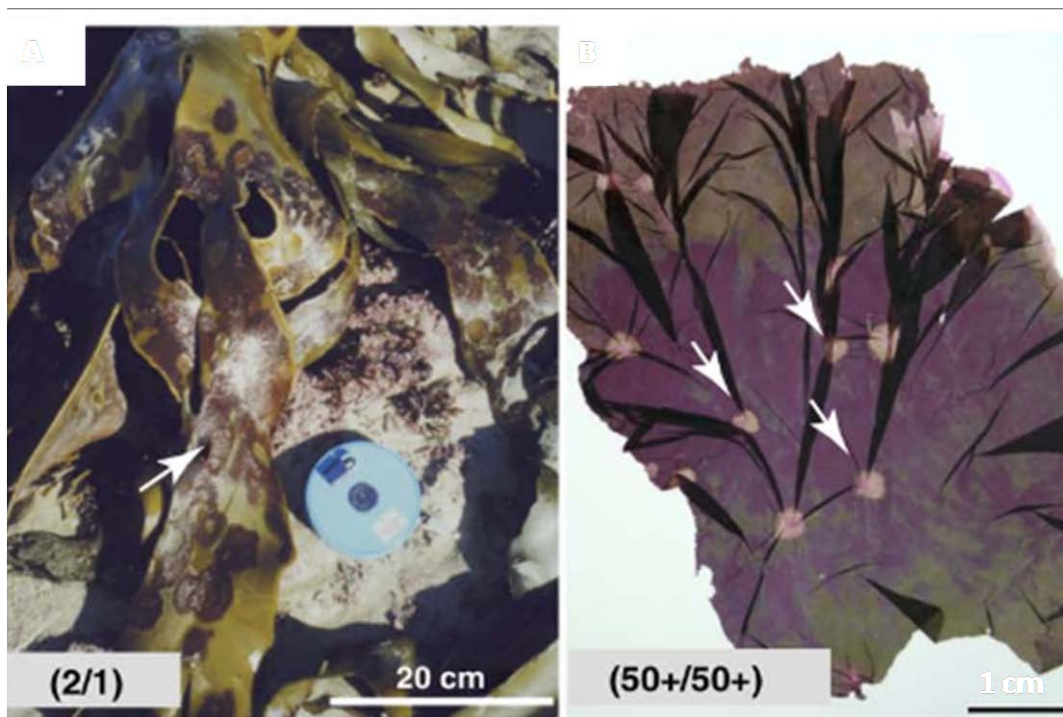
Ο θαλλός του *T. mertensii* είναι νηματοειδής και διακλαδιζόμενος, με τυπικό φαιό χρώμα. Το είδος εμφανίζεται μόνο με τη μορφή γαμετόφυτου και διαθέτει δύο τύπους αναπαραγωγικών κυττάρων: τα μονοσπόρια και τα σπερματοζωίδια. Τα κινητά κύτταρα δεν λειτουργούν ως γαμέτες αφού δεν σημειώνεται σύζευξη. Το είδος *T. mertensii* αναπαράγεται αγενώς παρ' ότι διαθέτει ωογόνια, που παράγουν ωοκύτταρα, και ανθηρίδια που παράγουν σπερματοζωίδια (Kuhlenkamp και Müller 1985). Ακόμη, από υπετροφικές περιοχές των ανθηριδίων απελευθερώνονται ειδικές ακίνητες δομές που θυμίζουν σπόρια, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της πολικότητας των κυττάρων κατά την αύξηση (Katsaros και Salla 1997).

1.2. Φύκη και παθογένεια

1.2.1. Γενικά

Τα φύκη, όπως όλοι οι οργανισμοί, προσβάλλονται από παθογόνους μικροοργανισμούς και παράσιτα, στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι ιοί, τα βακτήρια, οι μύκητες ή ακόμη και άλλα φύκη (Potin και συν. 2002). Οι προσβολές αυτές πλήττουν τους φυσικούς πληθυσμούς στο πεδίο, συχνά υπό μορφή επιδημιών (Kürper και συν. 1999), ενώ προκαλούν σημαντικές απώλειες, κόστους πολλών δισεκατομμυρίων δολαρίων ετησίως, στην παραγωγή καλλιεργούμενων φυκών (Gachon και συν. 2010). Για παράδειγμα, το ροδοφύκος *Porphyra* sp. με την κοινή ονομασία nori, καλλιεργείται κατά κόρον στις Ασιατικές χώρες και χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή του γνωστού ασιατικού φαγητού “sushi”. Αποτελεί μία από τις πιο κερδοφόρες καλλιέργειες φυκών στον κόσμο, αποδίδοντας ετησίως κέρδη αξίας 1,5 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Πρόσφατες εκτιμήσεις δείχνουν ότι μόνο στην Ιαπωνία και την Κορέα, κατά μέσο όρο το 10% της ετήσιας σοδειάς καταστρέφεται λόγω μαζικών επιδημιών που οφείλονται κυρίως στους παθογόνους ωομύκητες *Pythium* sp. και *Olpidiopsis* sp. (Gachon και συν. 2010· βλέπε επίσης Εικόνα 1.1Γ). Παρόμοιες καταστροφές σημειώνονται και σε άλλα καλλιεργούμενα είδη, όπως στα φαιοφύκη *Laminaria digitata* και *Undaria pinnatifida* (βλέπε επίσης Εικόνες 1.1.Β, Γ). Είναι φανερό ότι η εντατική καλλιέργεια των φυκών σε κλειστά συστήματα αυξάνει την ευπάθεια των οργανισμών και κατ’ επέκταση την εκδήλωση ασθενειών συγκριτικά με το πεδίο. Τα προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι καλλιεργητές των φυκών, όταν αυτά επιμολύνονται από παθογόνους μικροοργανισμούς, οφείλονται κυρίως στη μείωση της ποιότητας του προϊόντος λόγω του αποχρωματισμού και των αλλοιώσεων με τη μορφή κηλίδων που σχηματίζονται επί των θαλλών των φυκών (βλέπε Εικόνα 1.10). Είναι χαρακτηριστικό ότι, παρ’ ότι προκαλούνται τεράστιες απώλειες με σημαντικά κόστη για τους θαλάσσιους καλλιεργητές, οι ασθένειες των φυκών δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Μάλιστα, έως τώρα, η μόνη γνωστή και αποτελεσματική λύση για την πρόληψη των ασθενειών του nori είναι το συχνό ράντισμα των θαλλών του φύκου *Porphyra* sp. με διάλυμα οξέος. Επιπλέον, είναι γεγονός ότι οι μετακινήσεις των πλοίων συμβάλλουν στη μεταφορά και διάδοση των

παθογόνων μικροοργανισμών. Έτσι, η είσοδος αλλόχθονων παράσιτων σε μία θαλάσσια περιοχή, σε συνδυασμό με την ανθρωπογενή ρύπανση, πυροδοτεί συχνά την εκδήλωση επιδημιών με καταστροφικές επιπτώσεις στους πληθυσμούς των ενδημικών φυκών (Ruiz και συν. 2000). Κατά συνέπεια, καθίσταται σαφές ότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί των φυκών κατέχουν σημαντικό οικολογικό αλλά και οικονομικό ρόλο.



Εικόνα I.10. Μακροσκοπικές εικόνες θαλλών από φύκη που έχουν μολυνθεί από παρασιτικούς οργανισμούς. Εικ. I.10A. Το βέλος δείχνει συμπτώματα ασθένειας που έχει προκληθεί στο φαιοφύκος *Durvillaea antarctica* από το υποχρεωτικό παράσιτο *Herpodiscus durvillaea*. Εικ. I.10B. Τα βέλη δείχνουν αποχρωματισμένες κηλίδες στον θαλλό του είδους *Porphyra* sp. ύστερα από επιμόλυνση από τον παθογόνο ωομύκητα *Pythium* sp. (τροποποιήθηκε από Gachon και συν. 2010).

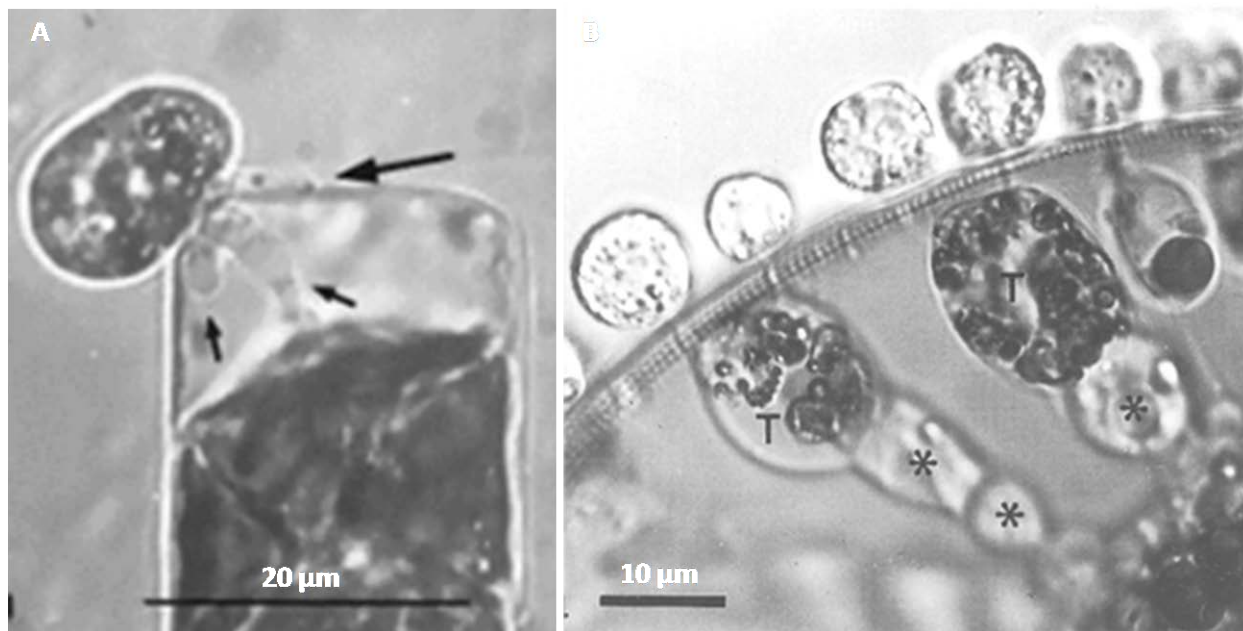
Η βιοποικιλότητα των παθογόνων μικροοργανισμών και παράσιτων των φυκών είναι τεράστια. Η δράση των ιών στους ωκεανούς έχει μελετηθεί επισταμένως, καθώς οι ιοί συνιστούν μία ανεξάντλητη δεξαμενή γενετικής ποικιλότητας για τους θαλάσσιους οργανισμούς, επηρεάζουν τη σύνθεση των θαλάσσιων πληθυσμών, καθοδηγούν την εξέλιξη και συμμετέχουν δυναμικά στους βιογεωχημικούς κύκλους. Εκτιμάται ότι υπάρχουν περίπου 10^{30} διαφορετικά στελέχη ιών, τα οποία προκαλούν περίπου 10^{23} επιμολύνσεις ανά δευτερόλεπτο, προσβάλλοντας όλους τους θαλάσσιους οργανισμούς, από τα κατώτερα

εξελικτικά μονοκύτταρα φύκη ως τα θαλάσσια θηλαστικά (Suttle και συν. 2007). Πράγματι, πολλές από τις σημαντικότερες ομάδες πρωτογενών παραγωγών της θάλασσας, όπως τα διάτομα, τα κρυπτοφύκη, τα μονοκύτταρα χλωροφύκη, τα δινομαστιγωτά και τα κυανοβακτήρια, προσβάλλονται από ιούς (Nagasaki 2008). Το 1999 ο Suttle και οι συνεργάτες του διήθησαν θαλασσινό νερό πεδίου και περισυνέλλεξαν μόνο τα συστατικά μεγέθους 0,002-0,2 μm , τα οποία και πρόσθεσαν σε καλλιέργεια μικροφυκών. Μετά την προσθήκη των συστατικών αυτών, παρατήρησαν, μέσω της ενσωμάτωσης ραδιενεργού ισότοπου του άνθρακα ^{14}C , μείωση της πρωτογενούς παραγωγικότητας κατά 78% και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μολύνσεις από ιούς μειώνουν αισθητά τους πληθυσμούς των μικροφυκών και την πρωτογενή παραγωγικότητα του συστήματος. Ακόμη, έχει διαπιστωθεί ότι οι ιοί παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή τους, δηλαδή συγκεκριμένο στέλεχος μολύνει αποκλειστικά συγκεκριμένο είδος μικροφύκους. Το γεγονός αυτό επιδρά καταλυτικά στη δυναμική του φυτοπλαγκτού, αφού περιορίζει την πιθανότητα κυριαρχίας καιροσκοπικών ειδών. Παράλληλα, η καταστροφή των κυττάρων που οφείλεται στην ιική δράση επηρεάζει εμμέσως τη ροή ενέργειας και θρεπτικών στην υδάτινη στήλη (Brussaard 2004).

Τα βακτήρια αποτελούν μία ακόμη βασική ομάδα παθογόνων μικροοργανισμών των φυκών. Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες πάνω στα είδη βακτηρίων που μολύνουν φύκη, κύριοι εκπρόσωποι των οποίων είναι κατά βάση gram-αρνητικά είδη που ανήκουν στα γένη *Alteromonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Saprospira* και *Vibrio* (Gachon και συν. 2010). Έχουν καταγραφεί μαζικές επιδημίες που οφείλονται στη δράση βακτηρίων, όπως αυτή τον Ιούνιο του 2004 σε καλλιέργειες *Laminaria japonica* στην Κίνα (Wang και συν. 2008). Τα συμπτώματα της ασθένειας των φυκών από βακτήρια είναι συνήθως η πρόκληση σήψης και διογκώσεων επί του θαλλού. Ακόμη, ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί στη μόλυνση από βακτήρια των ροδοφυκών των κοραλλιογενών υφάλων, λόγω του σημαντικού οικολογικού τους ρόλου στη δημιουργία των τελευταίων. Ορισμένα έτη πριν, η καταστροφική «πορτοκαλί ασθένεια» (orange disease), όπως αποκαλείται, προκάλεσε σημαντικές βλάβες σε κοραλλιογενείς υφάλους του Νοτίου Ειρηνικού, ενώ πρόσφατα σημειώθηκαν κρούσματα και στη Χαβάη (Aeby 2007). Επιπλέον, σύγχρονες μοριακές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αποσαφήνιση του ρόλου των

επιφυτικών βακτηρίων στα φύκη, ο οποίος προς το παρόν δεν έχει χαρακτηριστεί ως αμιγώς συμβιωτικός ή παρασιτικός (Staufenberger και συν. 2008).

Μία ακόμη σημαντική ομάδα παθογόνων οργανισμών των φυκών είναι τα κερκόζωα (cercozoa). Πρόκειται για ένα ετερογενές φύλο που περιλαμβάνει μονοκύτταρα μαστιγωτά παρασιτικά είδη, που απομυζούν θρεπτικά συστατικά από τον ξενιστή τους με ειδικές δομές (Cavalier-Smith και Chao 2003). Τα περισσότερα από αυτά έχουν χαρακτηριστική αμοιβαδοειδή κίνηση που υποβοηθείται από κυτοπλασματικές προεκβολές, τα φιλοπόδια (filopodia). Το είδος *Cryothecomonas longipes* είναι, όπως και τα περισσότερα είδη του γένους, ένα θαλάσσιο παράσιτο των διατόμων, το οποίο στην ενήλικη μορφή του εμφανίζεται ως μία μαστιγωτή τροφοκύστη (trophont) που προσκολλάται στον ξενιστή (Εικόνα Ι.11Α). Με τη βοήθεια ψευδοποδίων (pseudopodia) απομυζά θρεπτικά συστατικά από τον πρωτοπλάστη του διατόμου, τα οποία μεταφέρει και αποθηκεύει σε ειδικά χυμοτόπια (food vacuoles) της τροφοκύστης (Schnerpf και Kühn 2000· βλέπε επίσης Εικόνα Ι.11Α).



Εικόνα Ι.11. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου από παράσιτα διατόμων του φύλου κερκόζωα. Εικ. Ι.11Α. Τροφοκύστη (trophont) του *Cryothecomonas longipes* που βρίσκεται προσκολλημένη στο διάτομο *Thalassiosira rotula*. Τα βέλη δείχνουν τα ψευδοπόδια (pseudopodia) (από Schnepf και Kühn 2000). Εικ. Ι.11Β. Αυξοσώματα (auxosomes) του *Pirsonia diadema* προσκολλημένα στο διάτομο *Coscinodiscus granii*. T: τροφόσωμα (trophosome), αστερίσκος: μεταφορά κυτοπλάσματος ξενιστή.

Το γένος *Pirsonia* είναι ένα ακόμη χαρακτηριστικό θαλάσσιο παράσιτο του φύλου κερκόζωα, το οποίο μολύνει με εξαιρετική εξειδίκευση είδη κεντρικών διατόμων. Αρχικά, με τη βοήθεια δύο μαστιγίων το κύτταρο πλησιάζει χημειοτακτικά τον ξενιστή, στον οποίο εν συνεχεία προσκολλάται αφού απορροφήσει τα δύο μαστίγια. Σε αυτή τη φάση, το προσκολλημένο, πλέον, κύτταρο ονομάζεται αυξόσωμα (auxosome) (Εικόνα I.11B). Έπειτα, σχηματίζει ψευδοπόδια και διεισδύει στο εσωτερικό του κυττάρου του διατόμου. Εκεί δημιουργείται το τροφόσωμα (trophosome), δηλαδή μία δομή που αποτελείται από ένα χυμοτόπιο αποθήκευσης τροφής (food vacuole) περιβαλλόμενο από κυτόπλασμα, απουσία οργανιδίων (Εικόνα I. 11B). Το τροφόσωμα, μέσω φαγοκυττάρωσης, προσροφά μέρος του κυτοπλάσματος του ξενιστή, το οποίο σταδιακά καταβολίζει. Καθ' όλη τη διάρκεια, το αυξόσωμα παραμένει εξωτερικά του κυττάρου-ξενιστή, μόνιμα συνδεδεμένο με το τροφόσωμα μέσω μίας κυτοπλασματικής γέφυρας που του παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για να διαιρεθεί εκ νέου (Schnerf και Schweikert 1997).

Ακόμη, στα κερκόζωα ανήκει η κλάση Phytomyxea που περιλαμβάνει τις τάξεις Plasmodiophorida και Phagomyxida, με μερικούς από τους πιο σημαντικούς παθογόνους μικροοργανισμούς των φυτών (βλέπε Εικόνα I.12). Τα γένη *Plasmodiophora*, *Polymyxa* και *Spongospora* έχουν μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν παράσιτα υψηλής οικονομικής σημασίας. Οι ασθένειες που προκαλούν σε ρίζες εδώδιμων καλλιεργούμενων φυτών, ιδίως της οικογένειας Brassicaceae, γνωστές με τον διεθνή όρο “clubroot”, οδηγούν σε τεράστιες καταστροφές και σε σημαντικές απώλειες για τους καλλιεργητές (Qu και Christ 2007, Donald και Porter 2009). Ορισμένοι αντιπρόσωποι της κλάσης Phytomyxea αποτελούν υποχρεωτικά βιοτροφικά παράσιτα των φαιοφυκών, των διατόμων και των θαλάσσιων αγγειοσπέρμων (Neuhauser και συν. 2011). Ωστόσο, οι έρευνες σε ανώτερα καλλιεργούμενα φυτά έχουν μονοπωλήσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων, με αποτέλεσμα την αποσπασματική και ελλιπή μελέτη των φυκών που επιμολύνονται από τα εν λόγω παράσιτα. Στην Εικόνα I.12 παρουσιάζονται τα θαλάσσια παράσιτα της κλάσης που είναι έως τώρα γνωστά, καθώς και οι ξενιστές τους. Παρατηρείται ο πολύ μικρός αριθμός των μελετημένων μικροοργανισμών. Ακόμη, είναι γεγονός ότι η αναγνώριση των συμπτωμάτων σε φύκη που νοσούν αποτελεί δύσκολο εγχείρημα, διότι τα υποχρεωτικά παράσιτα της κλάσης Phytomyxea δε δημιουργούν

Species name	Host species	Reference
Parasites of Seagrasses		
<i>Plasmodiophora halophilae</i> Ferd. et Winge	<i>Halophila</i> spp.	Karling (1968)
<i>Pl. bicaudata</i> Feldmann	<i>Zostera</i> spp.	den Hartog (1989)
<i>Pl. diplantherae</i> (Ferd. et Winge)	<i>Diplanthera</i> spp.	Karling (1968)
Ivimery Cook		
<i>Pl. maritime</i> Feldm.-Maz.	<i>Triglochin</i> spp.	Karling (1968)
<i>Tetramyxa parasitica</i> K I Goebel	<i>Zanichiella</i> spp. <i>Ruppia</i> spp.	Karling (1968)
Parasites of Diatoms		
<i>Phagomyxa bellerochaeta</i> Schnepf	<i>Bellerochaeta malleus</i> (Brightwell) Van Heurck	Schnepf et al. (2000)
<i>Ph. odontellae</i> Kühn, Schnepf et Bulman	<i>Odontella sinensis</i> (Greville) Grunow	Schnepf et al. (2000)
Parasites of Brown algae		
<i>Ph. algarum</i> Karling	<i>Bachelotia antillarum</i> (Grunow) Gerloff <i>Hincksia mitchelliae</i> (Harvey) Silva	Karling (1944)
<i>Maulinia ectocarpus</i> I Maier et al.	<i>Ectocarpus siliculosus</i> (Dillwyn) Lyngbye	Maier et al. (2000)

Εικόνα 1.12. Πίνακας με τα ονόματα των θαλάσσιων ειδών των παράσιτων της κλάσης Phytomyxea και των ξενιστών τους (από Neuhauser και συν. 2012).

πάντοτε εμφανείς διογκώσεις (galls) και σχετικές αλλοιώσεις στον θαλλό του ξενιστή (Neuhauser 2012). Αξίζει να τονισθεί ότι τα παράσιτα της κλάσης Phytomyxea προκαλούν τροποποιήσεις στη βιομάζα του ξενιστή και επηρεάζουν τον μεταβολισμό και τη χημική σύσταση των ιστών. Αυτό οδηγεί σε αλλαγές στη δυναμική των τροφικών σχέσεων. Συνεπώς, η μεγάλη οικολογική αξία των παράσιτων αυτών έγκειται στη δυνατότητα μεταβολής των τροφικών αλυσίδων στα θαλάσσια, και όχι μόνο, οικοσυστήματα (Neuhauser και συν. 2011).

Ο αριθμός των θαλάσσιων μυκήτων (fungi) εκτιμάται στα 12.000 είδη περίπου, με βασικό ρόλο τη συμμετοχή τους σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες του θαλάσσιου περιβάλλοντος, όπως η αποικοδόμηση νεκρής οργανικής ύλης (Gleason και συν. 2012). Ορισμένοι από αυτούς πλήττουν τους πληθυσμούς φυκών. Σε παλαιότερες επισκοπήσεις αναφέρονται ασθένειες φυκών από ασκομύκητες (ascomycetes) και χυτριομύκητες (chytridiomycetes) (Andrews 1976). Λεπτομερέστερα, στο φύλο χυτριομύκητες των μυκήτων ανήκει ένας σημαντικός αριθμός παθογόνων μυκήτων των φυκών, οι οποίοι έχουν εντοπιστεί σε συστήματα αλμυρού και γλυκού νερού, όπου προσβάλλουν αντιπροσώπους των

χλωροφυκών, των φαιοφυκών, των διατόμων, αλλά και άλλων οργανισμών (Εικόνα Ι.13). Ωστόσο, οι παθογόνοι μύκητες των φυκών δεν έχουν λάβει τη δέουσα προσοχή και μόλις λίγες δημοσιευμένες εργασίες σχετίζονται με τη μελέτη τους, παρέχοντας πληροφορίες κυρίως για τα γένη *Olpidium*, *Rhizophyidium*, *Thalassochytrium*, *Zygorhizidium* και *Chytridium* (Beakes και συν. 1992· Gleason και συν. 2011). Τα παράσιτα του φύλου chytridiomycetes αναπαράγονται με ζωοσπόρια και γι' αυτό αρχικά είχαν ταξινομηθεί ως κατώτεροι μύκητες και είχαν ενταχθεί στην ομάδα φυκομύκητες (phycomycetes), πλησίον των ωομυκήτων (oomycetes) (Sparrow 1960). Σύγχρονες μοριακές μελέτες δείχνουν ότι οι οργανισμοί που ανήκουν στα chytridiomycetes είναι γνήσιοι μύκητες με μαστιγωτά ζωοσπόρια (zoosporic true fungi) και απέχουν εξελικτικά από τους ωομύκητες (Sekimoto και συν. 2011). Να σημειωθεί ότι οι ωομύκητες αποτελούν ακόμη μία βασική ομάδα παθογόνων μικροοργανισμών των φυκών, η οποία ως βασικό πεδίο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα αναλυθεί εκτενώς παρακάτω (βλέπε υποκεφάλαιο Ι.2.3. στην Εισαγωγή).

Τέλος, τα φύκη μπορεί να αποτελούν ξενιστές άλλων ενδοφυτικών φυκών, υποχρεωτικών ή προαιρετικών παράσιτων. Τέτοιο είναι το ενδοφυτικό χλωροφύκος *Acrochaete operculata* ή τα ενδοφυτικά φαιοφύκη *Laminariocolax* sp. (Weinberger και συν. 2005) και *Herpodiscus durvillaeae* (Heesch και συν. 2008) που προκαλούν μορφολογικές αλλοιώσεις στον θαλλό του ξενιστή, όπως διογκώσεις (galls) (βλέπε επίσης Εικόνα Ι.10Α) ή νέκρωση. Πρόσφατα βρέθηκε το διάτομο *Pseudogomphonema* sp. να ζεί στο εσωτερικό του Ροδοφύκου *Neoabbottiella* sp. (Klochkova και συν. 2014). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι ένα στα δέκα Ροδοφύκη εκ του συνόλου των μέχρι τώρα περιγραφέντων ειδών, είναι ενδοφυτικά ή παρασιτικά (Zuccarello και συν. 2004).

Απ' όλα τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί των φυκών παίζουν σημαντικό οικολογικό και οικονομικό ρόλο, ενώ ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από τεράστια βιοποικιλότητα, η οποία παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητη. Έως τώρα, το επιστημονικό ενδιαφέρον μονοπωλούσε η μελέτη των καλλιεργούμενων φυτών και των παράσιτών τους. Ο Andrews (1976) χαρακτηριστικά αναφέρει: "pathological investigations by algologists have been more the result of coincidence than design", δηλαδή οι έρευνες των φυκολόγων για την παθογένεια των φυκών οφείλονται κυρίως σε συμπτώσεις παρά σε

σχεδιασμό. Πράγματι, μόλις τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί ορισμένες αποσπασματικές μελέτες των παράσιτων των φυκών, γεγονός που συν τοις άλλοις οφείλεται στη δυσκολία συλλογής και ταυτοποίησής τους. Η ανάπτυξη σύγχρονων μοριακών μεθόδων σε συνδυασμό με το συνεχώς αυξανόμενο εμπορικό και οικολογικό ενδιαφέρον των φυκών, είναι οι λόγοι που όλο και περισσότερες επιστημονικές ομάδες ανά τον κόσμο στρέφονται, πλέον, στη μελέτη των παθογόνων μικροοργανισμών των φυκών.

Species name	Ecotype	Mode of nutrition	Host genus	Reference
<i>Rhizophydium littoreum</i>	Probably estuarine	Facultative parasite	<i>Bryopsis</i> , <i>Codium</i>	Amon (1984)
<i>Rhizophydium littoreum</i>	Marine	Facultative parasite	<i>Cancer</i>	Shields (1990)
<i>Thalassochytrium gracilariopsis</i>	Marine	Probable biotroph	<i>Gracilariopsis</i>	Nyvall et al. (1999)
<i>Chytridium polysiphoniae</i>	Marine	Probable biotroph	<i>Pyaiella</i> , other genera of brown algae	Küpper and Müller (1999), Müller et al. (1999)
<i>Chytridium polysiphoniae</i>	Marine	Probable biotroph	<i>Centroceras</i> , <i>Polysiphonia</i>	Johnson (1966), Raghukumar (1986a)
<i>Olpidium rostriferum</i> , <i>Olpidium</i> sp.	Marine	Probable biotroph	<i>Cladophora</i> , <i>Pseudo-nitzschia</i>	Raghukumar (1987), Elbrächter and Schnepf (1998)
<i>Rhizophydium</i> sp.	Marine	Probable biotroph	<i>Pseudo-nitzschia</i> , <i>Bellerrochea</i> , <i>Cylindrotheca</i>	Elbrächter and Schnepf (1998), Hanic et al. (2009)
<i>Rhizophydium</i> sp.	Probably estuarine	Probable biotroph	<i>Rhizoctonium</i> , <i>Ulothrix</i>	Huth (1974)
<i>Coenomyces</i> sp.	Probably estuarine	Probable biotroph	<i>Cladophora</i> , <i>Rhizoctonium</i>	Raghukumar (1986b)
<i>Phlyctochytrium mangrovis</i> (now <i>Spizellomyces</i>)	Probably estuarine	Saprotroph	Pine pollen	Ulken (1978)
Unknown (obligate anaerobes)	Marine	Mutualist	<i>Endocardium</i> , <i>Amblyrhynchus</i>	Thorsen (1999), Mackie et al. (2004)

Εικόνα 1.13. Πίνακας στον οποίο παρουσιάζονται σαπροφυτικοί και παρασιτικοί μύκητες και οι αντίστοιχοι ξενιστές τους σε θαλάσσια και εκβολικά οικοσυστήματα (από Gleason και συν. 2012).

Ι.2.2. Φαιοφύκη και παθογόνοι μικροοργανισμοί

Τα φαιοφύκη μολύνονται και αυτά, όπως όλα τα φύκη, από ιούς, βακτήρια, μύκητες, ωομύκητες, κερκόζωα και ενδοφυτικά φύκη (Gachon και συν. 2010). Ωστόσο, οι περισσότερες πληροφορίες που αφορούν στα παράσιτα των μακροφυκών και ειδικά των φαιοφυκών έχουν εξαχθεί προ δεκαετιών, κυρίως από μελέτες πεδίου και για το λόγο αυτό περιορίζονται σε παρατηρήσεις οπτικής μικροσκοπίας και μορφολογικές ταξινομήσεις. Για παράδειγμα, η εργασία του Sparrow (1960) σε θαλάσσιους μύκητες και συγγενικά είδη των μυκήτων, όπως οι ωομύκητες, παραμένει, παρά το πέρασ μισού αιώνα από τη δημοσίευσή της, η μόνη μορφολογική μελέτη ενός σημαντικού αριθμού παράσιτων των φυκών.

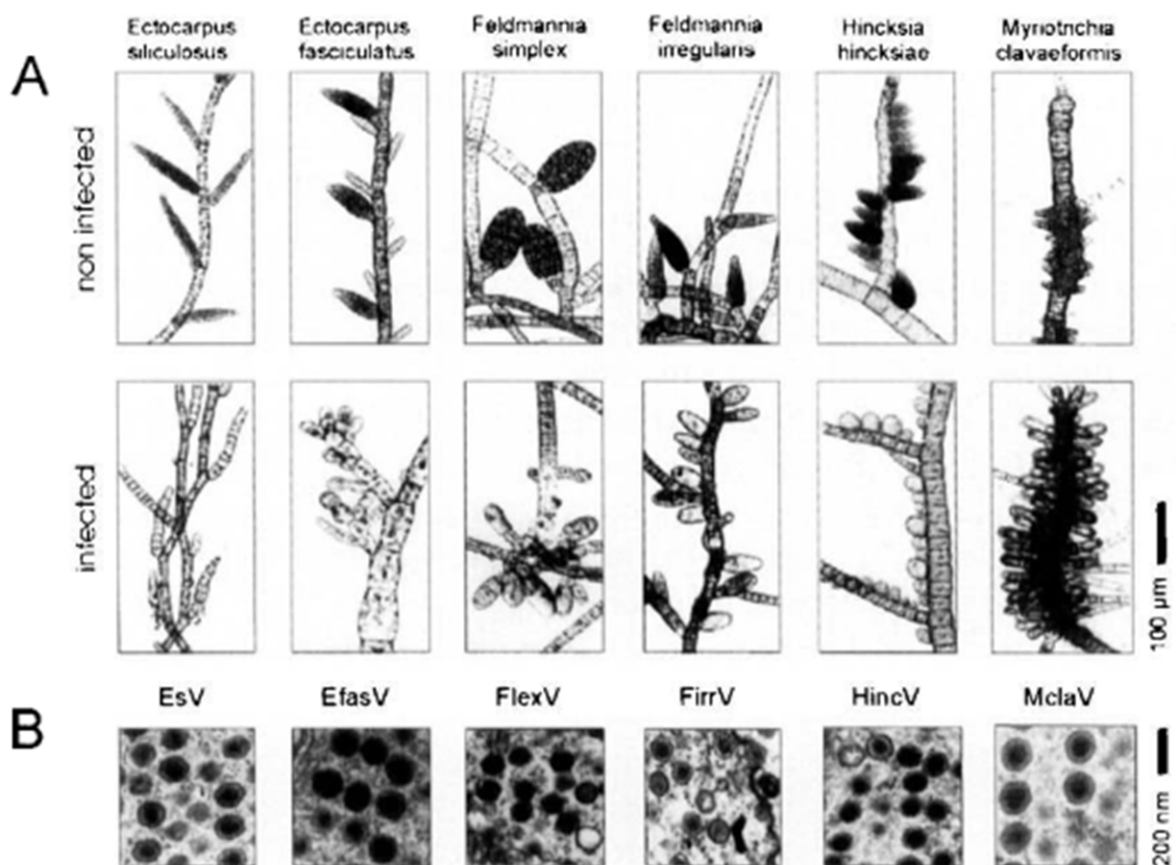
Οι βασικοί λόγοι που οδήγησαν στην ως τώρα ελλιπή επιστημονική γνώση πάνω στους παθογόνους μικροοργανισμούς των μακροφυκών είναι δύο. Αρχικά, η δυσκολία εντοπισμού των παράσιτων. Κι αυτό διότι τα παράσιτα των μακροφυκών είναι στην πλειονότητά τους ολοκαρπικά και υποχρεωτικά ενδοπαρασιτικά. Μάλιστα, πολλές φορές η συμπτωματολογία δεν περιλαμβάνει εμφανείς αλλοιώσεις στα οργανίδια του κυττάρου-ξενιστή κι έτσι η παρατήρηση επιμολυσμένου υλικού με οπτικό μικροσκόπιο μπορεί να οδηγήσει λανθασμένα στο συμπέρασμα μίας μη παθολογικής κατάστασης του φύκου. Από την άλλη, παρ' ότι πλήθος επιστημονικών εργασιών τονίζουν την οικολογική αλλά και οικονομική σημασία των παράσιτων στα υδάτινα οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων οργανισμών των φυκών (Sime-Ngando και συν. 2001), ο κύριος όγκος πληροφορίας αφορά στον παρασιτισμό του φυτοπλαγκτού και όχι των μακροφυκών. Στο γεγονός αυτό συμβάλλει το έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για τη δυναμική των διατόμων, των κοκκολιθοφόρων, καθώς και τις ανθίσεις δινομαστιγωτών οι οποίες φαίνεται να καταστέλλονται από επιδημίες παράσιτων (Chambouvet και συν. 2008, Ibelings και συν. 2011). Κατά συνέπεια, η παθογένεια των φαιοφυκών αποτελεί, προς το παρόν, ένα ανεπαρκώς μελετημένο επιστημονικό πεδίο.

Ι.2.2.1. Φαιοφύκη και μολύνσεις από ιούς και κερκόζωα

Είναι γνωστό ότι οι ιοί βρίσκονται σε αφθονία στα υδάτινα οικοσυστήματα και ο αριθμός τους υπολογίζεται περίπου στα 10^6 - 10^9 σωματίδια ιών/ml νερού (Børshheim και συν. 1990). Οι ιώσεις σε θαλάσσιους οργανισμούς, και κατ' επέκταση σε φύκη, έχουν αποτελέσει αντικείμενο

μελέτης αρκετών ερευνητικών ομάδων (Suttle 2005, 2007). Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των φαιοφυκών, όπου οι ιώσεις έχουν μελετηθεί εκτεταμένα κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες (Müller και συν. 1990, 1992, 1998· Delaroque και συν. 2001). Πιο συγκεκριμένα, 120 χρόνια περίπου πριν, ο Γάλλος φυκολόγος Sauvageau (1896) περιέγραψε μη φυσιολογικά σποριάγγεια σε θαλλούς του γένους *Ectocarpus*, οι οποίοι είχαν συλλεχθεί από ακτές της Ευρώπης (βλέπε επίσης Εικόνα I.14A). Ο ίδιος αναφέρει ότι πιθανώς οι αλλοιώσεις να οφείλονταν σε κάποιο άγνωστο παράσιτο. Ωστόσο, η παρατήρηση μη φυσιολογικών θαλλών *Ectocarpus* συνέβαινε κατ' εξακολούθηση κι έτσι μεταγενέστεροι φυκολόγοι θεώρησαν ότι επρόκειτο για υποείδη τα οποία ονόμασαν *Ectocarpus variabilis* και *Ectocarpus dimorphus* (Müller και συν. 1998). Αργότερα, με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικές, δίστρωμες εξαγωνικές δομές στο εσωτερικό των σποριαγγείων του *Ectocarpus* και διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για σωματίδια ιών που επιμολύνουν τον θαλλό του φύκου (βλέπε επίσης Εικόνα I.14B). Επιπλέον, η ανάπτυξη τεχνικών απομόνωσης και διατήρησης καλλιεργειών φυκών, και ειδικά του γένους *Ectocarpus* το οποίο λόγω του κύκλου ζωής του ενδείκνυται για καλλιέργεια στο εργαστήριο, συνέβαλλαν στην αποτελεσματική μελέτη των ιώσεων στα φύκη (Müller και συν. 1990, 1992, 1998).

Οι περισσότερες μελέτες στις ιώσεις φαιοφυκών αφορούν τα νηματοειδή *Ectocarpus siliculosus*, *Ectocarpus fasciculatus*, *Feldmannia simplex*, *Feldmannia irregularis*, *Hincksia hincksiae*, *Myriotrichia clavaeformis* και *Pylaiella littoralis* (Wolf και συν. 1998· Maier και συν. 2002· Βλέπε επίσης Εικόνα I.14). Ύστερα από τη μόλυνση του φύκου από τον ιό, τα συμπτώματα της ασθένειας εκδηλώνονται στα αναπαραγωγικά όργανα, δηλαδή σε γαμετάγγεια ή σποριάγγεια, και όχι στα βλαστητικά κύτταρα (Müller και συν. 1998). Τα πολύχρωρα σποριάγγεια του *E. siliculosus* αποτελούνται από πολλά κύτταρα που διαχωρίζονται μεταξύ τους με εγκάρσια και επιμήκη κυτταρικά τοιχώματα, ως αποτέλεσμα πολλαπλών κυτταροδιαϊρέσεων. Η παθολογική όψη των πολύχρωμων σποριαγγείων οφείλεται στον μη φυσιολογικό σχηματισμό των επιμήκων κυτταρικών τοιχωμάτων κατά τη διάρκεια των πολλαπλών διαϊρέσεων (Εικόνα I.14A). Τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί σταδιακά αποχρωματίζονται και εν τέλει παρατηρείται στο εσωτερικό τους μία άμορφη λευκή μάζα



Εικόνα I.14. Ιώσεις Φαιοφυκών. Εικ. I.14A. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας από υγιή και μολυσμένα είδη Φαιοφυκών. Εικ. I.14B. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από τομές μολυσμένων φαιοφυκών, στις οποίες εικονίζονται τα σωματίδια των ιών (από Müller και συν. 1998).

(Εικόνα I.14A). Χρώση του DNA με τη χρωστική 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) δείχνει, αρχικά, διόγκωση των πυρήνων του ξενιστή και ακολούθως διάρρηξη του πυρηνικού φακέλου και έντονο διάχυτο φθορισμό στο εσωτερικό των κυττάρων του φύκου (Müller και συν. 1990). Επιπλέον, εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από μολυσμένα κύτταρα του *E. siliculosus* αποκαλύπτουν εικοσαεδρικά σωματίδια του ιού EsV, διαμέτρου 130-150 nm, τα οποία αποτελούνται από ένα εξωτερικό δίστρωμο περίβλημα και μία κεντρική ηλεκτρονιόπυκνη περιοχή (Εικόνα I.14B). Αντίστοιχη δομή σωματιδίου, με παραπλήσιες διαμέτρους, έχουν οι ιοί EfasV, FlexV, FirrV, HincV και Mclav που μολύνουν άλλα είδη φαιοφυκών (Εικόνα I.14B).

Οι Müller και Stache (1992) διαπίστωσαν ότι οι ιοί που πλήττουν νηματοειδή φαιοφύκη έχουν παγκόσμια εξάπλωση. Χαρακτηριστικά αναφέρουν παραδείγματα εμφάνισης ιώσεων

στα γένη *Ectocarpus*, *Feldmannia* και *Leptonematella* από Ιρλανδία, Ανταρκτική, Νότιο Αμερική και Νορβηγία, καλύπτοντας έτσι ένα εύρος εύκρατων, υποαρκτικών και υποανταρκτικών περιοχών. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί τόσο σε φυσικούς πληθυσμούς στο πεδίο όσο και σε εργαστηριακές καλλιέργειες ότι μολυσμένοι από τον ιό θαλλοί του *Ectocarpus siliculosus* επιδεικνύουν υψηλά ποσοστά επιβίωσης και αναπαραγωγής (Müller 1991, Müller και Stache 1992). Λεπτομερέστερα, ελεύθερα ζωοσπόρια του *E. siliculosus* μολύνονται από τον ιό και κατά συνέπεια το ιικό γονιδίωμα μεταφέρεται μέσω των μιτώσεων σε όλα τα κύτταρα του αναπτυσσόμενου θαλλού του ξενιστή. Τα σωματίδια του ιού σχηματίζονται εντός παθολογικών γαμεταγγείων ή σποριαγγείων. Ενίοτε, μολυσμένα γαμετόφυτα παράγουν λειτουργικούς γαμέτες, παρ' ότι εκφράζουν το ιικό γονιδίωμα. Η σύζευξη υγιούς θηλυκού γαμέτη με μολυσμένο αρσενικό γαμέτη καταλήγει στη δημιουργία ενός παθολογικού σποριόφυτου με εμφανή τα συμπτώματα της ίωσης. Παραδόξως, η διαδικασία μείωσης στο μολυσμένο σποριόφυτο φαίνεται φυσιολογική και διαπιστώθηκε ότι μολυσμένα μειοσποριάγγεια παράγουν ίσο αριθμό υγιών και παθολογικών μειοσπορίων (Müller 1991, για κύκλο ζωής του *E. siliculosus* βλέπε επίσης Εικόνα 1.7). Το γεγονός αυτό πιθανώς δείχνει ότι μεταξύ ξενιστή και παράσιτου έχουν αναπτυχθεί εξελικτικά τόσο παρασιτικές όσο και συμβιωτικές σχέσεις. Ταυτόχρονα, οι ιώσεις αποτελούν μία σημαντική διαδικασία αγενούς μεταφοράς γονιδίων, με ποικίλες εξελικτικές επιδράσεις επί του φυσικού πληθυσμού. Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι το γονιδίωμα του ιού EsV1 του *E. siliculosus* φέρει τη μεγαλύτερη DNA αλληλουχία ιού που έχει χαρτογραφηθεί έως σήμερα (Delaroque και συν. 2001).

Ectocarpales:
Acinetospora crinita, New Zealand
Feldmannia simplex, Ireland
Ectocarpus fasciculatus, France, with virus
E. siliculosus, Chile, original host
E. siliculosus, New Zealand
Hincksia hincksiae, France
H. mitchelliae, Argentina
H. mitchelliae, Japan
H. mitchelliae, USA
Kuckuckia spinosa, Norway

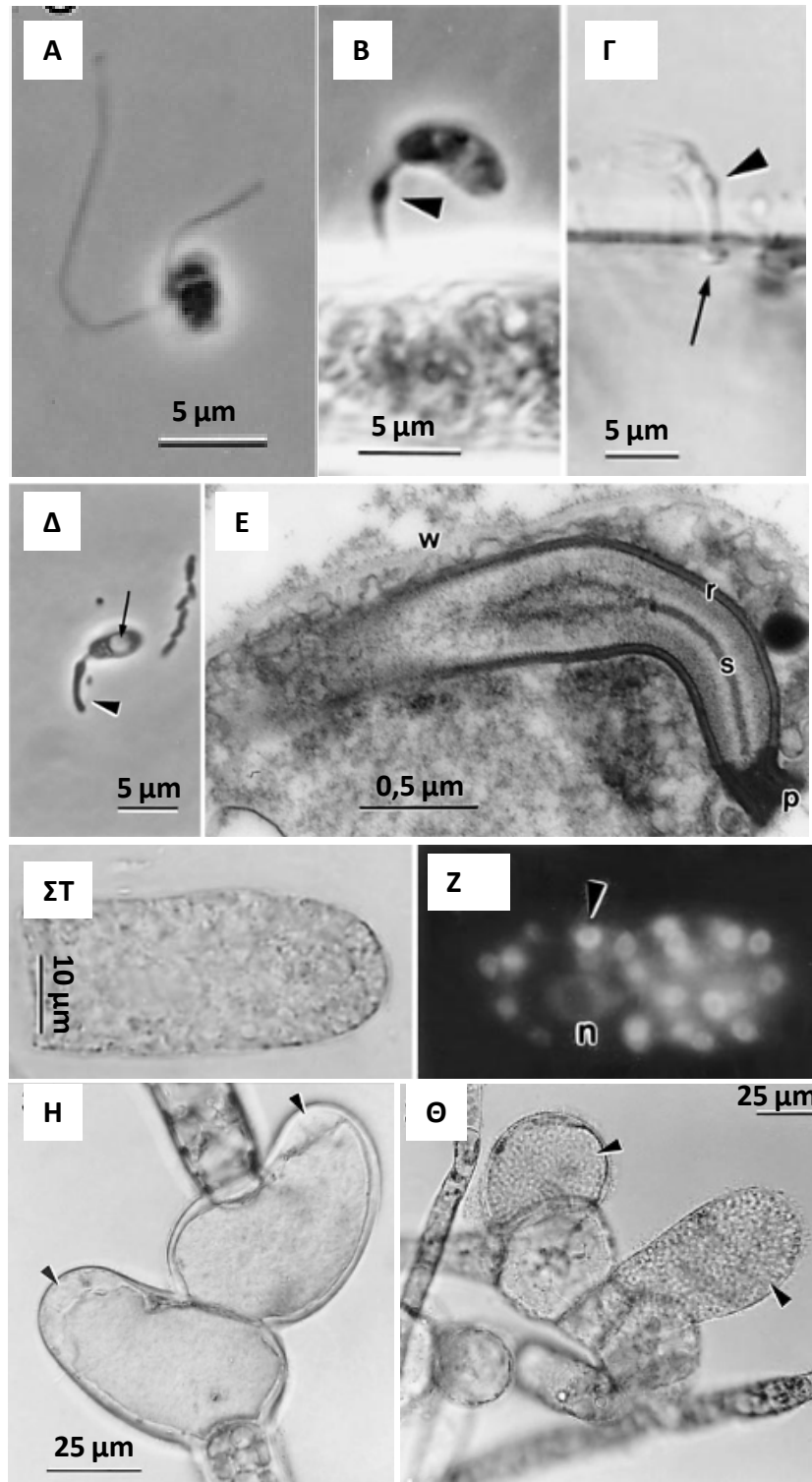
Scytothamnales:
Splachnidium rugosum, Tasmania

Desmarestiales:
Desmarestia munda, Canada
D. distans, Chile

Laminariales:
Macrocystis pyrifera, Chile

Εικόνα 1.15. Είδη φαιοφυκών που μολύνονται σε εργαστηριακές συνθήκες από το παράσιτο *Maullinia ectocarpii* (από Maier και συν. 2000).

Από τα παραπάνω, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η υπάρχουσα γνώση επί των ιώσεων των φαιοφυκών αυξάνεται συνεχώς. Από την άλλη, οι πληροφορίες που αφορούν σε ασθένειες φαιοφυκών που πλήττονται από κερκόζωα είναι λιγοστές. Έως σήμερα, έχουν αναφερθεί μόνο τρία είδη της κλάσης Phytomyxea που προκαλούν ασθένειες σε φαιοφύκη. Η κλάση Phytomyxea, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτελείται από δύο τάξεις: την Plasmodiophorida και την Phagomyxida (Karling 1968). Η πρώτη περιλαμβάνει παράσιτα που μολύνουν ανώτερα φυτά ενώ η δεύτερη έχει εντοπιστεί να μολύνει διάτομα και φαιοφύκη (Goecke και συν. 2012). Το 2000 οι Maier και συν. παρατήρησαν τυχαία σε υλικό *E. siliculosus* από τη Χιλή, την εμφάνιση συμπτωμάτων μόλυνσης σε εργαστηριακές συνθήκες και καλλιέργησαν τον ξενιστή και το παράσιτο με σκοπό την περεταίρω μελέτη του συστήματος. Μάλιστα, κατάφεραν να μολύνουν με το άγνωστο, έως τότε, παράσιτο δέκα ακόμη είδη φαιοφυκών, που προέρχονταν από διαφορετικά μέρη της Γής, γεγονός που καθιστά σαφές το μεγάλο εύρος ξενιστών που προσβάλλει δυνητικά το εν λόγω παράσιτο (βλέπε Εικόνα Ι.15). Μελέτες οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο είδος της τάξης Phagomyxida το οποίο ονομάστηκε *Maullinia ectocarpii*. Πιο συγκεκριμένα, ζωοσπόρια του υποχρεωτικά ενδοπαρασιτικού *M. ectocarpii* κολυμπούν προς τα κύτταρα του ξενιστή (Εικόνα Ι.16Α), εγκυστώνονται, δηλαδή δημιουργούν κυτταρικό τοίχωμα και προσκολλώνται στο κυτταρικό τοίχωμα του φύκους με τη βοήθεια μίας προσκολλητικής συσκευής (adhesorium) (κεφαλές βελών στις Εικόνες Ι.16Β, Δ' βέλος στην Εικόνα Ι.16Γ). Ακολούθως, το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή διαρρηγνύεται και το παράσιτο μεταφέρει τον πρωτοπλάστη του στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή (η κεφαλή βέλους στο Εικόνα Ι.16Β δείχνει τη μεταφορά του πρωτοπλάστη), με ταυτόχρονη διαστολή της προσκολλητικής συσκευής (κεφαλή βέλους στο Εικόνα Ι.16Γ). Σε εγκυστωμένα σπόρια του παράσιτου που βρίσκονται προσκολλημένα σε καλυπτρίδα, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ενός μεγάλου χυμοτοπίου (βέλος στο Εικόνα Ι.16Δ). Επιπλέον, εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου παρουσιάζει τη λεπτή δομή της προσκολλητικής συσκευής (Εικόνα Ι.16Ε), η οποία περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα, αποτελείται από έναν επιμήκη σχηματισμό (Rohr) κεντρικά του οποίου παρατηρείται μία ηλεκτρονιόπυκνη δομή (Stachel) και καταλήγει σε ένα

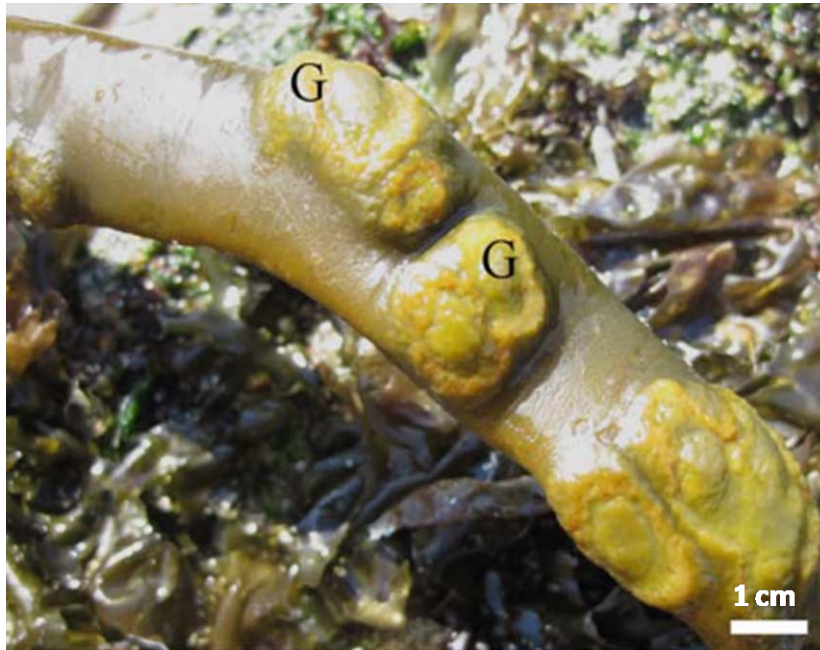


Εικόνα I.16. Εικόνες οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας οι οποίες παρουσιάζουν δομές του παράσιτου *Maullinia ectocarpii*. Εικ. I.16Α. Ζωοσπόριο του παράσιτου με δύο μαστίγια. Εικ. I.16Β-Γ. Σπόρια του παράσιτου προσκολλημένα μέσω της προσκολλητικής συσκευής (κεφαλές βελών) στο κύτταρο του ξενιστή, μεταφέρουν τον πρωτοπλάστη τους στο εσωτερικό του φύκους (βέλη). Εικ. I.16Δ. Σπόριο του παράσιτου προσκολλημένο σε καλυπτρίδα. Το βέλος δείχνει το σχηματισμένο χυμοτόπιο. Η κεφαλή βέλους δείχνει την προσκολλητική συσκευή. Εικ. I.16Ε. Λεπτή δομή της προσκολλητικής συσκευής. R: Rohr, S: Stachel, P: Plug, W: cell wall (για επεξήγηση

βλέπε κείμενο). Εικ. I.16ΣΤ. DIC εικόνα πλασμοδιακού θαλλού παράσιτου. Εικ. I.16Ζ. Ίδιο κύτταρο με Εικ. I.16ΣΤ. Χρώση πυρήνων με DAPI. Η κεφαλή βέλους δείχνει τους πυρήνες του παράσιτου. n: πυρήνας ξενιστή. Εικ. I.16Η. Ανώριμο ζωοσποριάγγειο παράσιτου. Οι κεφαλές βελών δείχνουν ειδικές διαμορφώσεις στην κορυφή των ζωοσποριαγγείων (βλέπε κείμενο για επεξήγηση). Εικ. I.16Θ. Ώριμα ζωοσποριάγγεια παράσιτου γεμάτα με ζωοσπόρια (κεφαλές βελών) (από Maier και συν. 2000).

ηλεκτρονιόπυκνο πώμα (Plug). Στη συνέχεια, σύγχρονες διαιρέσεις του πυρήνα του παράσιτου οδηγούν στη δημιουργία ενός κοινοκυτταρικού, πλασμοδιακού θαλλού του παράσιτου εντός του ξενιστή, το κύτταρο του οποίου διογκώνεται (Εικόνες I.16ΣΤ, Ζ). Οι πυρήνες του παράσιτου, με συνεχείς διαιρέσεις, σταδιακά κατακλύζουν το κύτταρο του ξενιστή. Σε αυτό το στάδιο το παράσιτο *M. ectocarpii* σχηματίζει κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει τον πρωτοπλάστη του. Ακολουθεί η διαδικασία ζωοσποριογένεσης του παράσιτου. Σχηματίζεται αρχικά ένα ανώριμο ζωοσποριάγγειο, στην κορυφή του οποίου δημιουργούνται ειδικές διαμορφώσεις, που σε επόμενο στάδιο ανοίγουν και επιτρέπουν στα ζωοσπόρια να απελευθερωθούν (κεφαλές βελών στην Εικόνα I.16Η). Πραγματοποιείται κυτταροποίηση του ζωοσποριάγγειου και τελικά το ώριμο ζωοσποριάγγειο κατακλύζεται από πλήθος απελευθερωμένων ζωοσπορίων (κεφαλές βελών στην Εικόνα I.16Θ). Ο παραπάνω μηχανισμός μόλυνσης όπως περιγράφηκε για το παράσιτο *M. ectocarpii* συναντάται με παραλλαγές σε πολλά συστήματα υποχρεωτικών ενδοπαρασιτικών και βιοτροφικών παθογόνων μικροοργανισμών. Μάλιστα, για σημαντικό χρονικό διάστημα, κυριαρχούσε σύγχυση στην επιστημονική κοινότητα λόγω της ομοιότητας των παράσιτων της κλάσης Phytomyxea με άλλα πρώτιστα και μύκητες, ενώ η πρώτη ταξινομική θέση που τους είχε δοθεί ήταν μεταξύ των κατώτερων μυκήτων (Braselton 2001).

Ένα δεύτερο είδος της τάξης Phagomyxida που επιμολύνει φαιοφύκη είναι το είδος *Maullinia* sp.. Σε φυσικούς πληθυσμούς *Durvillae antarctica* (Fucales) στη Χιλή, εντοπίστηκαν επί των θαλλών χαρακτηριστικές υποκίτρινες διογκώσεις (yellowish galls) (Εικόνα I.17). Παρατήρηση των διογκώσεων με οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φανερώνει την ύπαρξη ευκαρυωτικών ενδοφυτικών οργανισμών που χαρακτηρίζονται από την τυπική πλασμοδιακή ανάπτυξη των Phytomyxea (Goetze και συν. 2012). Περεταίρω μοριακή ανάλυση του 18S rDNA του παράσιτου το τοποθετεί στην τάξη Phagomyxida. Να σημειωθεί ότι τα λιβάδια *D. antarctica* παίζουν σπουδαίο οικολογικό αλλά και οικονομικό ρόλο, αφού χρησιμοποιούνται ευρέως ως τροφή πλούσια σε φυτικές ίνες καθώς και για την παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων και προϊόντων κοσμητολογίας. Κατά συνέπεια, η μελέτη των



Εικόνα Ι.17. Διογκώσεις επί των θαλλών του *Durvillaea antarctica* που οφείλονται στο παράσιτο *Maullinia* sp. (τροποποιημένο από Goecke και συν. 2012)

ασθενειών που πλήττουν το είδος *D. antarctica*, όπως και άλλα εμπορικά είδη φυκών, καθίσταται απαραίτητη.

Τέλος, υπάρχει ακόμη μία αναφορά παράσιτου της κλάσης Phytomyxea που μολύνει φαιοφύκη. Πρόκειται για το είδος *Phagomyxa algarum*, το οποίο βρέθηκε να πλήττει τα είδη *Bachelotia antillarum* (πρώην *Pylaiella fulvescens*) και *Hincksia mitchelliae* (πρώην *Ectocarpus mitchelliae*) στη Βόρεια Καρολίνα των Η.Π.Α. (Karling 1944). Ο Karling (1944) αναφέρει ότι τα πλαστίδια, ο πυρήνας και άλλα οργανίδια του ξενιστή εγκολπώνονται από το πολυπύρρηνο, κοινοκυτικό πλασμώδιο του παράσιτου. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται κυτταροποίηση του πλασμωδίου, από την οποία προκύπτουν σπόρια, δηλαδή εγκυστωμένα ζωοσπόρια. Στη συνέχεια, τα ζωοσπόρια απελευθερώνονται και με τη βοήθεια δύο μαστιγίων διαφεύγουν από το σποριάγγειο μέσω ειδικών ανοιγμάτων εξόδου (exit apertures) που βρίσκονται στην περιφέρειά του (Karling 1944).

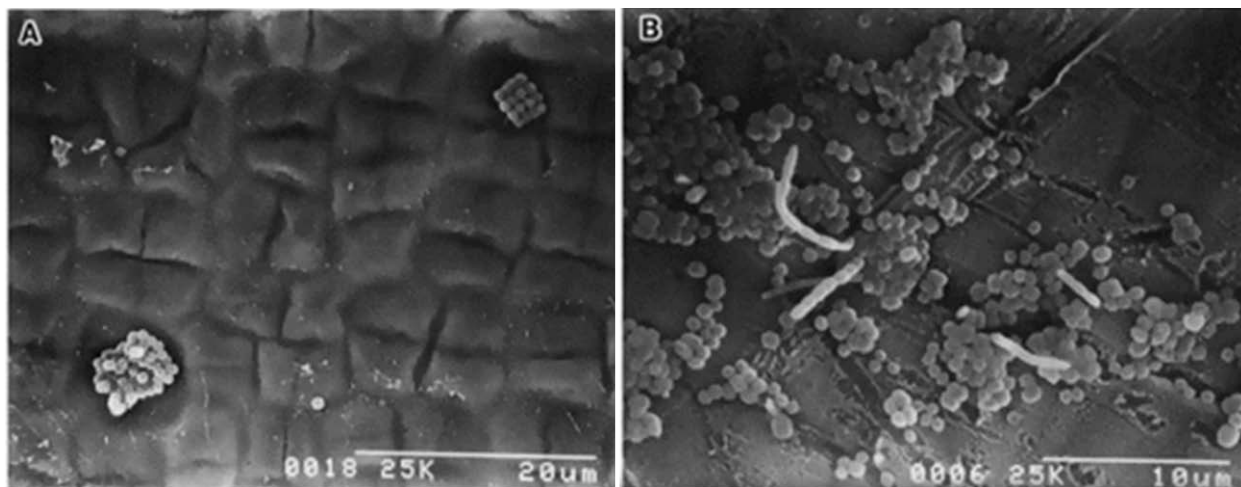
Ι.2.2.2. Φαιοφύκη και μολύνσεις από ενδοφυτικά φύκη, βακτήρια και μύκητες

Πληθώρα ενδοφυτικών φυκών εντοπίζονται στο εσωτερικό φαιοφυκών μεγάλης οικολογικής και οικονομικής σημασίας και σχετίζονται με μορφολογικές αλλοιώσεις στον θαλλό του ξενιστή, δηλαδή με ενδοφυτικές ασθένειες (endophytic diseases) (βλέπε επίσης Εικόνα Ι.10Α).

Το είδος *Herpodiscus durvillaeae* είναι ένας υποχρεωτικά ενδοφυτικός οργανισμός που πλήττει ενδημικούς πληθυσμούς του κελποφύκου *Durvillaea antarctica* στη Νέα Ζηλανδία (Heesch και συν. 2008). Ακόμη, τα γένη *Laminariocolax* και *Microsporangium* περιλαμβάνουν πολλά είδη ενδοφυτικών οργανισμών σε κελποφύκη, με παγκόσμιες αναφορές κρουσμάτων από τη Βαλτική έως την Ανταρκτική και τη Νότιο Αφρική (Peters 2003). Το διάτομο *Navicula endophytica* αναπτύσσεται στους μεσοκυττάριους χώρους αναπαραγωγικών οργάνων (receptacles) των *Fucales* του βορείου ημισφαιρίου. Έως τώρα, έχει καταγραφεί στα *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *F. serratus*, *F. spiralis*, *F. ceranoides*, *F. evanescens*, *Furcellaria lumbricalis* και *Pelvetia canaliculata* (Armstrong και συν. 2000). Επιπροσθέτως, ορισμένοι αντιπρόσωποι της τάξης *Ectocarpales* εμφανίζουν παρασιτική δράση, παρ' ότι δεν χαρακτηρίζονται ως αμιγώς ενδοφυτικοί, αφού διαθέτουν τόσο επιφυτική όσο και ενδοφυτική φάση. Για παράδειγμα, το *Elachista fucicola* είναι ένα υποχρεωτικό επίφυτο του φαιοφύκου *Fucus vesiculosus* (Rindi και Guiry 2004). Αναπτύσσεται, επίσης, επί του *Ascophyllum nodosum*, όπου διατρυπά το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή και διεισδύει στο εσωτερικό του κυττάρου με τη βοήθεια ριζοειδών (rhizoids) (Deckert και Garbary 2005). Κατά συνέπεια, ο ενδοφυτικός παρασιτισμός αποτελεί ακόμη ένα σημαντικό κεφάλαιο στην παθογένεια των φαιοφυκών, με ιδιαίτερη οικολογική και οικονομική σημασία. Η δυσκολία εντοπισμού παρασιτικών οργανισμών που ζουν αποκλειστικά στο εσωτερικό φαιοφυκών φαίνεται να καλύπτεται με τις σύγχρονες μοριακές αναλύσεις που επιτρέπουν την ταυτοποίηση και ταξινόμησή τους (Peters 2003).

Ορισμένα από τα βακτήρια συγκαταλέγονται στους παθογόνους μικροοργανισμούς που προκαλούν σοβαρές ασθένειες στα φαιοφύκη. Τα κελποφύκη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, παίζουν εξέχοντα οικολογικό αλλά και οικονομικό ρόλο, αφού αποφέρουν κέρδη δισεκατομμυρίων δολαρίων στους υδατοκαλλιεργητές (Gachon και συν. 2010). Οι ασθένειες που προκαλούνται στα κελποφύκη από βακτήρια συνδέονται με την εκδήλωση συμπτωμάτων, όπως παραμορφώσεις και διογκώσεις στο θαλλό του ξενιστή. Για τον λόγο αυτό συγκεντρώνουν το επιστημονικό ενδιαφέρον, ενώ πληθώρα εργασιών στοχεύουν στην εύρεση λύσεων αποφυγής των βακτηριακών επιδημιών σε καλλιεργούμενα είδη φυκών (Wang και συν. 2014). Τα περισσότερα βακτήρια που επιδρούν στα κελποφύκη ανήκουν στο φύλο

πρωτεοβακτήρια (proteobacteria). Τα γένη *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* και *Vibrio* μολύνουν διάφορα κελποφύκη, μεταξύ των οποίων τα καλλιεργούμενα είδη *Saccharina japonica* στην Κίνα και *Laminaria religiosa* στην Ιαπωνία (Vairappan και συν. 2001, Wang και συν. 2014). Τα βακτήρια αυτά συσσωρεύονται στην επιφάνεια του θαλλού (Εικόνα I.18) και διασπούν το αλγινικό οξύ του κυτταρικού τοιχώματος. Ως αποτέλεσμα αυτού, παρατηρείται η δημιουργία κακώσεων και ανοιγμάτων επί του θαλλού, καθώς και σήψη του φύκους (rot disease).



Εικόνα I.18. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης που παρουσιάζει την ύπαρξη βακτηρίων και την σχετική κατάσταση των κυττάρων της επιφανειακής στιβάδας του φαιοφύκους *Laminaria religiosa* σε Α) υγιή και Β) μολυσμένο θαλλό (τροποποιημένο από Vairappan και συν. 2001).

Είναι γνωστό ότι ένας μεγάλος αριθμός της ταξινομικά ετερογενούς ομάδας των μυκήτων χρησιμοποιεί ως ενδιαίτημα θαλλούς φυκών, αναπτύσσοντας με τον ξενιστή συμβιωτικές, παρασιτικές και σαπροφυτικές σχέσεις. Οι μύκητες που σχετίζονται με τα φύκη ονομάζονται “algicolous fungi” και η μελέτη τους ξεκίνησε στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, δηλαδή 30 χρόνια μετά την πρώτη αναφορά θαλάσσιου μύκητα από τον Montagne (1856) (Zuccaro και Mitchell 2005). Για πολλά χρόνια, οι έρευνες με αντικείμενο μύκητες που μολύνουν φύκη υπήρξαν σποραδικές και προέκυπταν από τυχαίες παρατηρήσεις υλικού που είχε συλλεχθεί από το πεδίο. Η χρήση της οπτικής και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε συνδυασμό με σύγχρονες μεθόδους, όπως οι μοριακές αναλύσεις, έχουν συμβάλει στην αύξηση των πληροφοριών που αφορούν στις μυκητιάσεις των φυκών.

Οι ασκομύκητες (ascomycetes) και οι χυτριομύκητες (chytridiomycetes) είναι οι δύο επικρατέστερες κλάσεις μυκήτων που μολύνουν τα φαιοφύκη (Andrews 1976). Ο ασκομύκητας *Phycomelaina laminariae* μολύνει διάφορα είδη φαιοφυκών της τάξης Laminariales, προκαλώντας μία ασθένεια, γνωστή με τον όρο “stipe blotch disease”, η οποία εκφράζεται με τη δημιουργία χαρακτηριστικών κηλίδων στον στύπο του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, ο *P. laminariae* έχει βρεθεί να μολύνει τα φαιοφύκη *Alaria esculenta*, *Saccharina latissima*, *S. longicruris* και *Laminaria digitata* (Schatz 1983, 1984). Οι υφές του μύκητα διεισδύουν στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή και οδηγούν σε νέκρωση του θαλλού, καθώς και σε γενική μείωση της λειτουργικότητάς του (Schatz 1983, 1984). Επιπλέον, πληθώρα κρουσμάτων από ασθένειες άλλων ασκομυκήτων σε κελποφύκη έχουν καταγραφεί ανά τον κόσμο. Ενδεικτικά αναφέρονται ο *Pontogeneia erikae*, ο οποίος έχει βρεθεί να παρασιτεί επί του κελποφύκου *Egregia menziesii* στην Καλιφόρνια (Kohlemeyer και Demoulin 1981), ο *Sigmoidea marina* που προκαλεί βλάβες στην επιφάνεια του θαλλού του *Saccharina latissima* στις ακτές της Βρετανίας (Haythorn και συν. 1980), ο *Ophiobolus laminariae* που σχηματίζει σκουρόχρωμα συσσωματώματα στον στύπο του *Laminaria digitata* στη Σκωτία (Sutherland 1915) και ο *Asteromyces cruciatus* που επιμολύνει το *Egregia menziesii* στην Καλιφόρνια (Nolan 1972). Επίσης, αντιπρόσωποι της τάξης Fucales των φαιοφυκών αποτελούν συχνά ξενιστές των ασκομυκήτων. Το γένος του ασκομύκητα *Haloguignardia* είναι ευρέως διαδεδομένο και διαθέτει ευρύ φάσμα ξενιστών, που περιλαμβάνει τα Fucales *Cystoseira osmundea*, *C. balearica*, *Cystoseira* sp., *Halidrys dioica*, *Halidrys* sp., *Sargassum decipiens*, *S. fallax*, *S. fluitans*, *S. natans* και *S. sinclairii* (Cribb και Herbert 1954· Tokida 1958· Kohlmeyer 1979· Apt 1988· Alongi και συν. 1999). Επιπροσθέτως, μέθοδοι απομόνωσης και μοριακές τεχνικές συμβάλλουν στον εντοπισμό και την ταυτοποίηση νέων ειδών ασκομυκήτων που πλήττουν τα φαιοφύκη. Οι Zuccaro και συν. (2003, 2008) έχουν καταφέρει να απομονώσουν και να ταυτοποιήσουν έναν σημαντικό αριθμό ασκομυκήτων που βρίσκονται να παρασιτούν στο φαιοφύκος *Fucus serratus*.

Οι χυτριομύκητες (chytridiomycetes) αποτελούν άλλη μία σημαντική ομάδα παθογόνων μικροοργανισμών των φυκών. Χαρακτηρίζονται από μεγάλο εύρος ξενιστών και μολύνουν διαφορετικά είδη χλωροφυκών, ροδοφυκών, φαιοφυκών και διατόμων τόσο στο

πεδίο όσο και σε εργαστηριακές συνθήκες. Παρουσιάζουν παραπλήσια μορφολογικά χαρακτηριστικά και μηχανισμούς μόλυνσης με τους ωομύκητες (oomycetes) και γι' αυτό παλαιότερα και οι δύο ταξινομικές ομάδες ανήκαν σε μία κοινή ομάδα παθογόνων μικροοργανισμών των φυκών, με το όνομα φυκομύκητες (rhycomycetes) (Sparrow 1960). Σήμερα, η ταξινόμηση αυτή δεν υφίσταται και έχει αποσαφηνιστεί ότι οι χυτριομύκητες εντάσσονται στο βασίλειο των μυκήτων (fungi), ενώ οι ωομύκητες σε αυτό των χρωμοκυψελιδωτών (chromalveolata) (Gleason και συν. 2008· Beakes και συν. 2012). Ωστόσο, ένα γεγονός που δυσκολεύει συχνά τους αναγνώστες είναι ότι σύγχρονες έρευνες αναφέρουν ακόμη κάποια γένη των ωομυκήτων ως χυτριομύκητες, όπως συμβαίνει για παράδειγμα με το γένος *Olpidiopsis* το οποίο μολύνει ροδοφύκη (Ding και Ma 2005· Sekimoto και συν. 2009). Συνεπώς, ακολουθώντας τον σύγχρονο διαχωρισμό των φύλων, εκτενής αναφορά στα είδη των ωομυκήτων που προσβάλλουν φύκη θα πραγματοποιηθεί σε επόμενο υποκεφάλαιο (βλέπε υποκεφάλαιο 1.2.3).

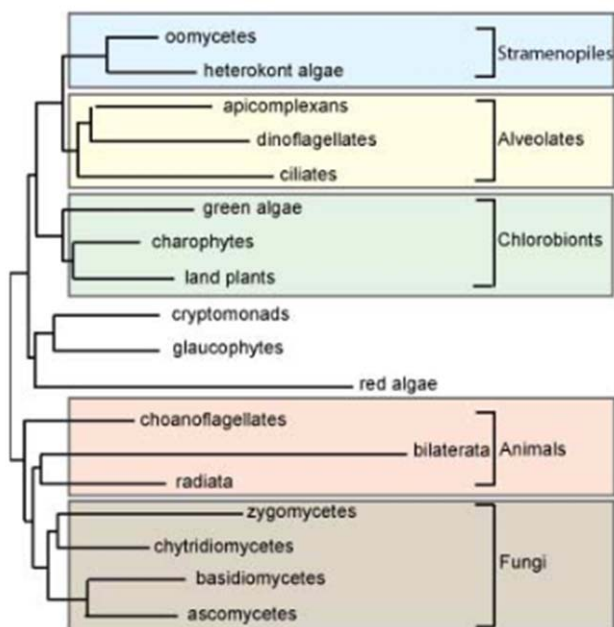
Το *Chytridium polysiphoniae* είναι ένα είδος ολοκαρπικού χυτριομύκητα ο οποίος μολύνει φαιοφύκη στο πεδίο, όπως για παράδειγμα το είδος *Pylaiella littoralis* (Sparrow 1960). Μάλιστα, σε ορισμένα από αυτά αναφέρονται μαζικές επιδημίες (Kürper και Müller 1999). Ύστερα από πειράματα μόλυνσης φαιοφυκών με το *C. polysiphoniae*, διαπιστώθηκε ότι σε εργαστηριακές συνθήκες ο εν λόγω χυτριομύκητας προσβάλλει 23 είδη φαιοφυκών, γεγονός που επισημαίνει το μεγάλο εύρος δυνητικών ξενιστών (Müller και συν. 1999). Το παράσιτο έρχεται σε επαφή με το κύτταρο του ξενιστή με τη βοήθεια ενός μυζητήρα (haustorium). Ακολούθως, το κύτταρο του φύκου καταστρέφεται. Συχνά παρατηρούνται πολλαπλές επιμολύνσεις στο ίδιο κύτταρο του ξενιστή (κεφαλές βελών στην Εικόνα 1.19.A). Επιπλέον, το παράσιτο σχηματίζει χαρακτηριστικά σφαιρικά σποριάγγεια, με μεγέθη που ποικίλουν ανάλογα με το είδος του ξενιστή (Εικόνες 1.19B, Γ).



Εικόνα 1.19. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου που απεικονίζουν μολύνσεις του *Chytridium polysiphoniae* σε διαφορετικά είδη φαιοφυκών. Εικ. 1.19Α. Σποριάγγεια παράσιτου σε νήμα *Pylaiella littoralis*. Το ίδιο κύτταρο επιμολύνεται από δύο ή τρία παράσιτα (κεφαλές βελών). Εικ. 1.19Β. Σποριάγγειο σε κύτταρο του *Harpospora globosa*. Εικ. 1.20Γ. Σποριάγγειο σε κύτταρο του *Carpomitra costata*. Η κλίμακα των 100 μm ισχύει για τις εικόνες Α-Γ (τροποποιημένο από Müller και συν. 1999)

1.2.3. Ωομύκητες: δομή, μορφολογία και ταξινόμηση

Οι ωομύκητες (oomycetes) είναι ετερότροφοι οργανισμοί με ευρεία διάδοση σε υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα που προσομοιάζουν μορφολογικά στους μύκητες (fungi) (Sparrow 1960, Karling 1981, Dick 2001). Πράγματι, ο σχηματισμός υφών και μυκηλίων, η έκκριση ενζύμων για διάσπαση σύνθετων ενώσεων, η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών με ωσμωτικούς μηχανισμούς και ο οικολογικός ρόλος είναι μερικά από τα κοινά στοιχεία που μοιράζονται οι ωομύκητες με ορισμένους μύκητες (Richards και συν. 2006). Από την άλλη, τα βασικά βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τους ωομύκητες από τους γνήσιους μύκητες είναι: 1) η κυτταρίνη ως βασικό δομικό συστατικό των κυτταρικών τους τοιχωμάτων, έναντι της χιτίνης που συναντάται αντίστοιχα στους μύκητες (Mélida και συν. 2013), 2) η μεγάλη ποικιλία κυστιδίων με έγκλειστα, όπως τα πυκνά σωματίδια (dense bodies)

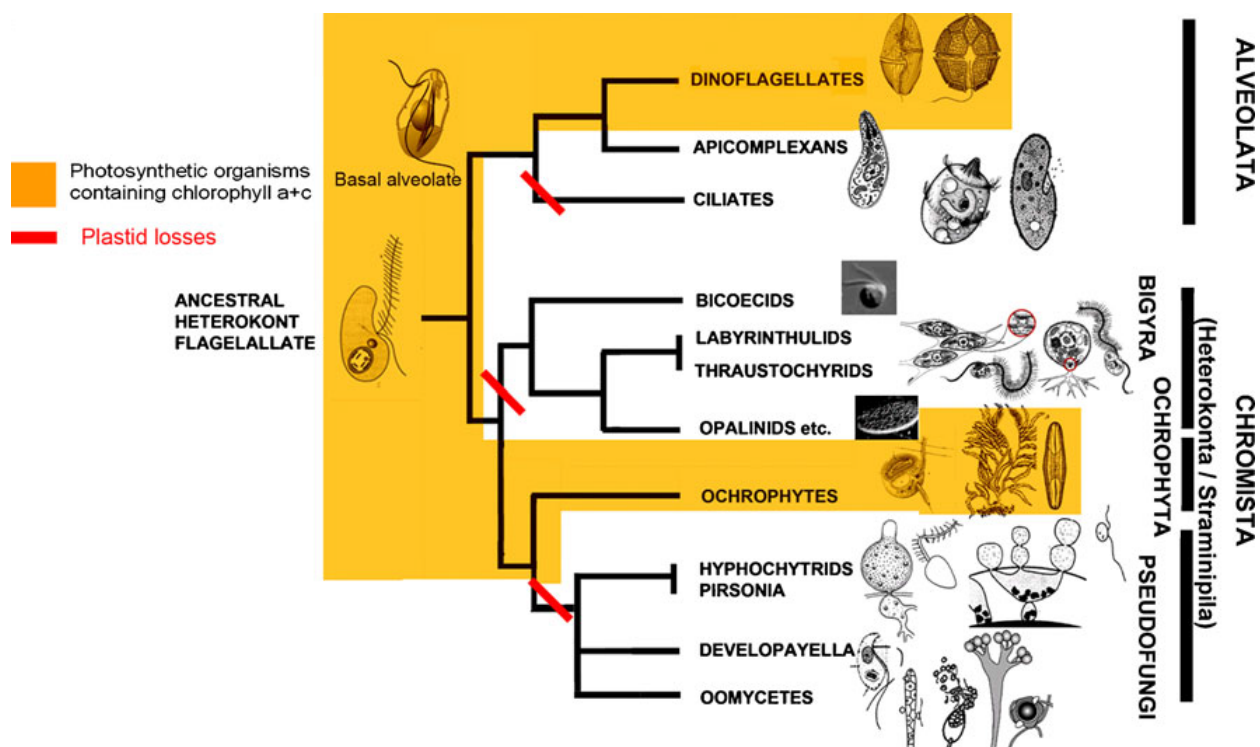


Εικόνα 1.20. Φυλογενετικό δέντρο το οποίο απεικονίζει την εξελικτική σχέση μεταξύ μυκήτων και ωομυκήτων (από Hardham 2005).

που περιέχουν φωσφορυλιωμένη β-1, 3-μυκολαμιναρίνη, 3) οι διπλοειδείς θαλλοί, που στην περίπτωση μείωσης παράγουν γαμέτες, 4) τα μιτοχόνδρια με σωληνοειδείς αναδιπλώσεις εσωτερικής μεμβράνης (cristae) και 5) το βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης της λυσίνης μέσω α-ε-διαμινοπιμελικού οξέος (Beakes 1987· Beakes και συν. 2012). Συνεπώς, οι ωομύκητες, παρ' ότι μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά με τους μύκητες, κατά βάση διαφέρουν σημαντικά από αυτούς και μάλιστα, η εξελικτική τους απόσταση είναι τεράστια (Εικόνα Ι.20).

Η θέση των ωομυκήτων στο φυλογενετικό δέντρο της ζωής είναι στο φύλο των διμαστιγωτών ετερόκοντων ή ετεροκοντόφυτων (heterokonts ή heterokontophyta), που είναι επίσης γνωστό με το όνομα σταχυομαστιγωτά (stramenopiles) και συμπεριλαμβάνεται στο βασίλειο χρωμιστά (chromista) (Εικόνα Ι.21). Μαζί με τα συγγενικά είδη που ταξινομούνται στο βασίλειο κυψελιδωτά (alveolata), όπως τα δινομαστιγωτά και τα βλεφαριδοφόρα (βλέπε επίσης Εικόνα Ι.21), συνιστούν το υπερ-βασίλειο χρωμοκυψελιδωτά (chromalveolata), το οποίο όρισαν πρώτοι οι Baldauf και συν. (2000). Τα ετερόκοντα αποτελούν μία ετερογενή ομάδα οργανισμών, η οποία περιλαμβάνει πληθώρα αυτότροφων φυκών που φέρουν χλωροφύλλη-γ, δηλαδή διάτομα, φαιοφύκη, χρυσοφύκη και ξανθοφύκη, καθώς και μία σειρά ετερότροφων οργανισμών (Cavallier-Smith και Chao 2006). Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται βακτηριοφάγα μαστιγωτά (bicoecids), παράσιτα του ανθρώπου, αλλά και μυκητόμορφοι οργανισμοί των κλάσεων θραυστοχυτρίδια (thraustochytrids), λαβυρινθουλίδια (labyrinthulids), υφοχυτρίδια (hyphochytrids) και ωομύκητες (Εικόνα Ι.21). Η εντυπωσιακή ετερογένεια του φύλου ετερόκοντα διαπιστώθηκε πρόσφατα, όταν οι Tsui και συν. (2006) ανέλυσαν έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων και κατέληξαν στην περιγραφή των φυλογενετικών σχέσεων που απεικονίζεται στην Εικόνα Ι.21. Όπως φαίνεται, οι ωομύκητες αποκαλούνται και ψευδομύκητες, γεγονός που τονίζει για ακόμη μία φορά την ομοιότητά τους με τους γνήσιους μύκητες. Νέα στοιχεία που προκύπτουν ύστερα από σύγκριση γονιδιωμάτων, ενισχύουν την άποψη ότι οι ωομύκητες προέρχονται από μία φωτοσυνθετική προγονική μορφή, ενώ το γένος *Phytophthora* (ωομύκητες) φέρει κοινά γονίδια με τα διάτομα (Lamour και συν. 2007).

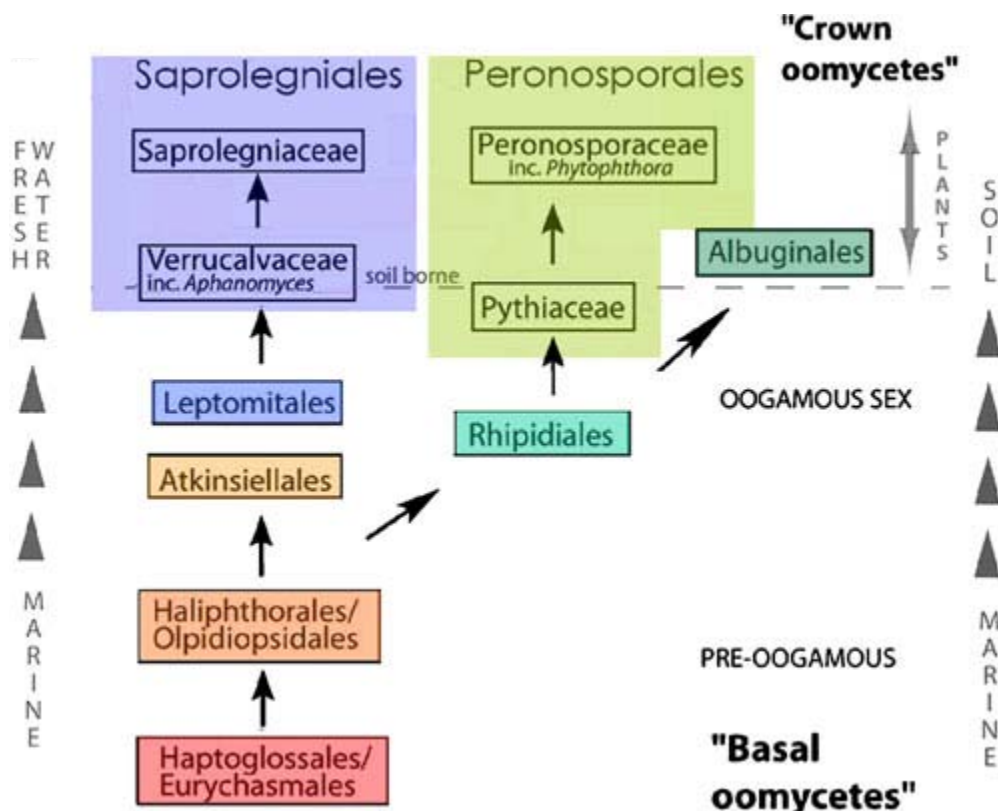
Η ταξινόμηση των γενών των ωομυκήτων βασίζεται σε μοριακές μελέτες των τελευταίων ετών (Kürper και συν. 2006· Sekimoto και συν. 2007, 2008α, 2008β, 2009). Πιο συγκεκριμένα, ανάλυση SSU και LSU rDNA και μιτοχονδριακών cox2 γονιδίων δείχνει ότι οι



Εικόνα 1.21. Σχηματική απεικόνιση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ομάδων που ανήκουν στο υπερ-βασίλειο χρωμοκυψελιδωτά (chromalveolates). Με πορτοκαλί χρώμα δείχνονται οι φωτοσυνθετικοί κλάδοι, ενώ με κόκκινη γραμμή υποδεικνύεται η απώλεια πλαστιδίου (από Beakes και συν. 2012).

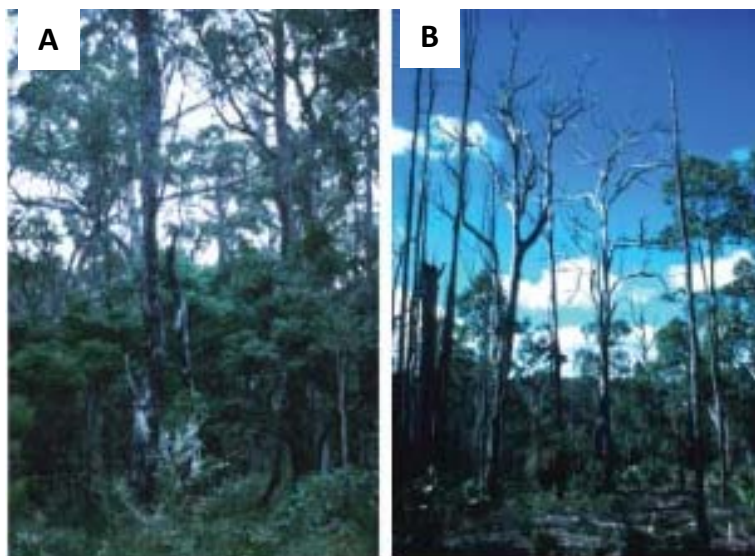
οικογένειες των ωμοκήτων κατηγοριοποιούνται σε τρεις μεγάλες ταξινομικές ομάδες: τα Saprolegniales, τα Peronosporales και τους κατώτερους ωμούκητες (basal oomycetes) (Εικ. 1.22). Οι κατώτεροι εξελικτικά ωμούκητες, όπως οι τάξεις Harptoglossales και Eurychasmatales, περιλαμβάνουν στην πλειονότητα θαλάσσια παράσιτα, ενώ οι ανώτερες εξελικτικές τάξεις των Peronosporales και Saprolegniales αποτελούν παράσιτα των φυτών της χέρσου και των ζώων του γλυκού νερού. Επιπρόσθετα, οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των τριών βασικών ομάδων δείχνουν ότι οι κατώτεροι ωμούκητες οδήγησαν στη δημιουργία της εξελικτικής γραμμής των Saprolegniales (saprolegnialian line), ενώ ο κλάδος των Peronosporales αποκλίνει σημαντικά από τους άλλους δύο (Εικόνα 1.22). Πράγματι, οι ωμούκητες της τάξης Peronosporales αδυνατούν να συνθέσουν τις στερόλες που συμμετέχουν στην εγγενή αναπαραγωγή και ακολουθούν διαφορετικό πρότυπο ωογένεσης (Dick 2001). Ακόμη, τα αναπτυξιακά στάδια των ωμοκήτων φέρουν ορισμένα μοναδικά χαρακτηριστικά, τα οποία συμβάλλουν καθοριστικά στην επιτυχία τους ως παθογόνων μικροοργανισμών. Η εγγενής αναπαραγωγή συναντάται στις ανώτερες εξελικτικές τάξεις των ωμοκήτων (Εικόνα 1.22). Ωστόσο, ένα κοινό στοιχείο είναι ότι

οι περισσότεροι ωομύκητες απελευθερώνουν από σποριάγγεια, μονοπύρρηνα ζωοσπόρια με δύο μαστίγια τα οποία κολυμπούν και προσεγγίζουν τον ξενιστή (Beakes και συν. 2012).



Εικόνα 1.22. Διαγραμματική απεικόνιση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ τάξεων και οικογενειών των ωομυκήτων, όπως προκύπτουν από σύγχρονα μοριακά δεδομένα (από Beakes και συν. 2010).

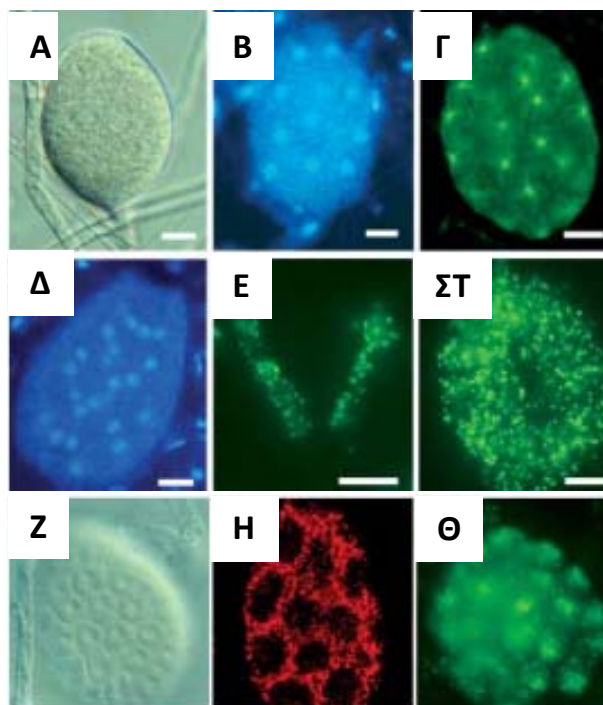
Οι ωομύκητες είναι ως επί το πλείστον γνωστοί ως παθογόνοι μικροοργανισμοί των ανώτερων φυτών, αφενός λόγω των επιδημιών σε καλλιεργούμενα είδη και αφετέρου λόγω των ασθενειών σε φυσικούς πληθυσμούς. Το γένος *Phytophthora* περιλαμβάνει μερικούς από τους πιο σημαντικούς ωομύκητες για τον άνθρωπο. Στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, η ασθένεια της πατάτας που οφείλεται στον ωομύκητα *Phytophthora infestans* (potato blight), οδήγησε στον μεγάλο λιμό της Ιρλανδίας, εξαναγκάζοντας τον γηγενή πληθυσμό σε μετανάστευση. Σήμερα, ο *P. infestans* εξακολουθεί να επηρεάζει την παγκόσμια γεωργία, προκαλώντας τεράστιες οικονομικές καταστροφές στις σοδειές της πατάτας, το τέταρτο πιο ευρέως καλλιεργούμενο φυτό στον πλανήτη, αλλά και σε δημητριακά, οι οποίες ζημιές υπολογίζονται, μόνο για την πρώτη, στα 6,7 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως (Haas και συν. 2009).



Εικόνα 1.23. Εικόνες Α) υγιών δέντρων *Eucalyptus marginata* και Β) μολυσμένων από των ωομύκητα *Phytophthora cinnamomi* από την περιοχή Perth της Δυτικής Αυστραλίας (τροποποιημένο από Hardham 2005).

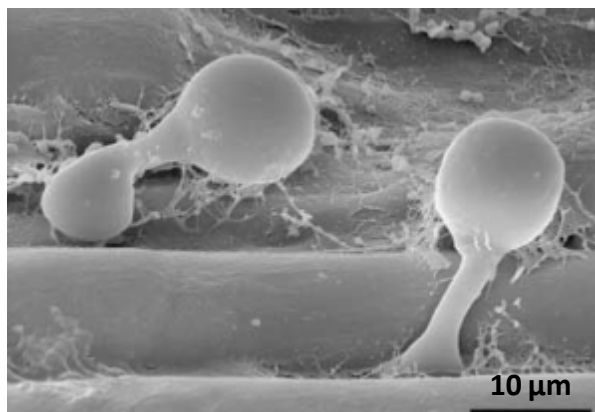
Ο *P. cinnamomi* έχει, επίσης, απασχολήσει έντονα επιστήμονες και καλλιεργητές. Προκαλεί τεράστιες καταστροφές σε καλλιεργούμενα φυτά, καθώς και σε φυσικά οικοσυστήματα, όπως για παράδειγμα την ερήμωση ολόκληρων δασικών εκτάσεων του *Eucalyptus marginata* (Εικόνα 1.23). Ο *P. cinnamomi* αναπτύσσεται σαπροτροφικά στο χώμα, όπου παραμένει σε ληθαργική μορφή σχηματίζοντας χλαμυδοσπόρια ή σπανιότερα ωοσπόρια (Hardham 2005). Σε ιδανικές συνθήκες, το παράσιτο εισέρχεται στον αγενή κύκλο αναπαραγωγής, όπου δημιουργούνται πολυπύρηνια σποριαγγεία επί των σωματικών υφών, τα οποία ακολούθως κυτταροποιούνται και απελευθερώνουν 20-30 διμαστιγωτά ζωοσπόρια (Εικόνα 1.24). Κατά την ωρίμανση του σποριαγγείου και καθ' όλη τη διαδικασία της ζωοσποριογένεσης, ο κυτταροσκελετός του παράσιτου παίζει σημαντικό ρόλο (Hardham 2005· βλέπε επίσης Εικόνα 1.24). Τα ελευθερωμένα ζωοσπόρια πλησιάζουν το κύτταρο του ξενιστή, σχηματίζουν κυτταρικό τοίχωμα και δημιουργούν μία χαρακτηριστική προεκβολή, στην κορυφή της οποίας παρατηρείται μία διόγκωση που υποβοηθά τη διαδικασία προσβολής (appressoria-like swelling) (Εικόνα 1.25). Δύο μέρες αφού τα σπόρια του ωομύκητα διατρυπήσουν το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή και μολύνουν το κύτταρό του, εμφανίζονται σποριαγγεία πάνω στο φυτικό σώμα. Ο αγενής αναπαραγωγικός κύκλος του παράσιτου επαναλαμβάνεται πολλές φορές, αυξάνοντας εκθετικά τον αριθμό των μολύνσεων στον ξενιστή, μέσα σε λίγες μόνο μέρες (Hardham 2005). Επιπρόσθετα, μαζικές επιδημίες του *P. ramorum* οδηγούν πολλά είδη κωνοφόρων δέντρων σε ξαφνικό θάνατο, ενώ έχουν

καταγραφεί καταστροφές δασικών εκτάσεων σε Ευρώπη, Ασία και Αμερική (Brasier και Weber 2010). Οι ωομύκητες, παρ' ότι διαθέτουν κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά με τους μύκητες, δεν συγγενεύουν μαζί τους εξελικτικά (βλέπε Εικόνα 1.20). Αυτός είναι ο λόγος που τα αντιμυκητοκτόνα του εμπορίου αδυνατούν να καταπολεμήσουν ασθένειες που οφείλονται σε ωομύκητες, αφού οι χημικές ουσίες που εξολοθρεύουν τους μύκητες αποδεικνύονται συχνά



Εικόνα 1.24. Ωρίμανση σποριαγγείου και ζωοσποριογένεση στον ωομύκητα *Phytophthora cinnamomi*. Εικ. 1.24Α. Εικόνα μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC) ενός ώριμου σποριαγγείου πριν την έναρξη της κυτοκίνησης. Εικ. 1.24Β. Χρώση των πυρήνων με DAPI. Απεικονίζεται η κανονική διάταξη των πυρήνων στο εσωτερικό του σποριαγγείου. Εικ. 1.24Γ. Ανοσοσθήμανση σωληνίνης. Απεικονίζεται η οργάνωση των μικροσωληνίσκων σε κεντροσωμάτια πλησίον των πυρήνων στο εσωτερικό του σποριαγγείου. Εικ. 1.24Δ. Αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων ύστερα από επίδραση με ορυζαλίνη οδηγεί σε ακανόνιστη διάταξη των πυρήνων στο εσωτερικό του σποριαγγείου. Εικ. 1.24Ε-ΣΤ. Ανοσοσθήμανση κοιλιακών κυστιδίων (ventral vesicles) με μονόκλωνο αντίσωμα Vsv-1. Εικ. 1.24Ε. Υφές του παράσιτου. Εικ. 1.24ΣΤ. Σποριάγγειο πριν την κυτταροποίηση. Εικ. 1.24Ζ. Εικόνα DIC που απεικονίζει σποριάγγειο κατά την κυτταροποίηση. Εμφανές είναι το περίγραμμα των σχηματιζόμενων ζωοσπορίων. Εικ. 1.24Η. Χρώση ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη σε σποριάγγειο κατά την κυτταροποίηση. Εικ. 1.24Θ. Ανοσοσθήμανση πλευρικών

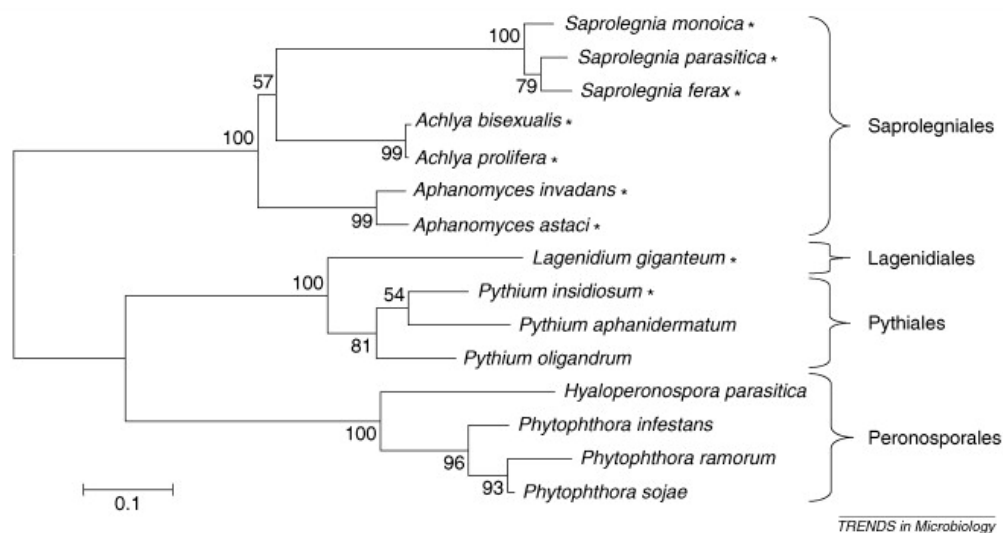
κυστιδίων σε σποριάγγειο κατά την κυτοκίνηση. Σε αυτό το στάδιο, τα πλευρικά κυστίδια συγκεντρώνονται στην κοιλιακή πλευρά των μελλοντικών ζωοσπορίων. Οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 10 μm (τροποποιημένο από Hardham 2005).



Εικόνα 1.25. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, η οποία απεικονίζει δύο σπόρια του *Phytophthora cinnamomi* με χαρακτηριστική προεκβολή, που βρίσκονται προσκολλημένα στο κυτταρικό τοίχωμα της ρίζας της μηδικής. Παρατηρείται η διόγκωση στην κορυφή της προεκβολής που υποβοηθά την προσβολή (appressorium-like swelling) (από Hardham 2005).

ανίκανες να θανατώσουν τους ωομύκητες. Έτσι, επί σειρά ετών, οι καλλιεργητές χρησιμοποιούσαν λανθασμένες τακτικές ελέγχου των επιδημιών, ενώ μόλις κατά τις τελευταίες δεκαετίες προέκυψαν δεδομένα που αφορούν στον μηχανισμό μόλυνσης και στη δομή σημαντικών αντιπροσώπων των παθογόνων ωομυκήτων (Beakes και συν. 2012).

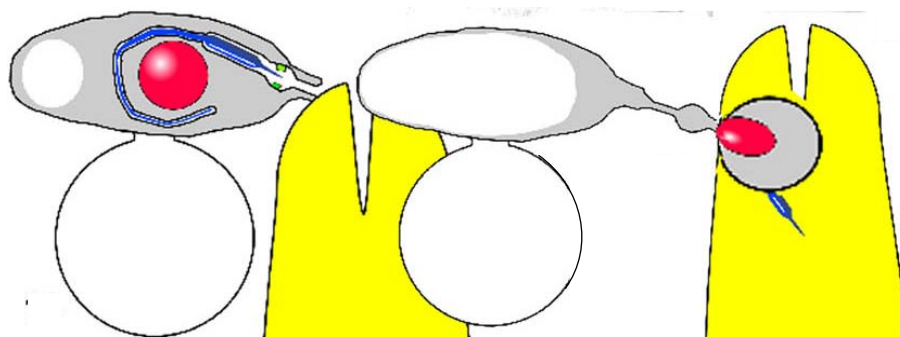
Παράλληλα, οι ωομύκητες προσβάλλουν και ζωικούς οργανισμούς. Τα γένη *Saprolegnia*, *Aphanomyces*, *Lagenidium*, *Achlya* και *Pythium* έχουν βρεθεί να μολύνουν ιχθύες, καρκινοειδή, γάτες, σκύλους, ακόμη και τον άνθρωπο (Εικόνα 1.26). Το γένος *Saprolegnia* περιλαμβάνει μερικούς ιδιαίτερος μολυσματικούς παθογόνους μικροοργανισμούς των ιχθύων του γλυκού νερού, ζημιώνοντας εκατομμύρια δολάρια ετησίως στους υδατοκαλλιεργητές (van West 2006, Phillips και συν. 2008). Λεπτομερέστερα, το είδος *Saprolegnia parasitica* μολύνει τον σολωμό και ο κύκλος ζωής του περιέχει στάδια αγενούς και εγγενούς αναπαραγωγής. Η μείωση των θρεπτικών στο περιβάλλον αποτελεί το ερέθισμα για το σχηματισμό σποριαγγείων επί των υφών του παράσιτου (van West 2006). Πρωτογενή ζωοσπόρια απελευθερώνονται από το σποριάγγειο στο νερό και αφού κολυπήσουν για μικρό χρονικό διάστημα, δημιουργούν εκ νέου τοίχωμα (επανεγκυστώνονται). Σε αυτό το στάδιο αποκαλούνται δευτερογενή σπόρια (secondary cysts). Από αυτά απελευθερώνονται δευτερογενή ζωοσπόρια, τα οποία κολυμπούν και αφού πλησιάσουν τον ξενιστή δημιουργούν κυτταρικό τοίχωμα και προσκολλώνται στην



Εικόνα 1.26. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ ωομυκήτων που μολύνουν φυτά και ζώα. Με αστερίσκο επισημαίνονται τα είδη που προσβάλλουν ζώα (από Phillips και συν. 2008).

επιφάνειά του για να προβούν σε νέα επιμόλυνση. Σε περίπτωση που δεν καταφέρουν να προσεγγίσουν τον ξενιστή, τα δευτερογενή ζωοσπόρια επανεγκυστώνονται. Ο κύκλος των επανειλημμένων εγκυστώσεων και απελευθερώσεων ζωοσπορίων είναι ένα συχνό φαινόμενο σε γένη ωομυκήτων, ονομάζεται “πολυπλανητισμός” (“polyplanetism”) και εικάζεται ότι παρέχει στο παράσιτο τη δυνατότητα να εντοπίσει τον κατάλληλο ξενιστή (van West 2006). Το σπόριο που επιτυγχάνει να προσκολληθεί στον ξενιστή φέρει ειδικές τρίχες που είναι γνωστές με τον όρο “boat hooks” και μία σωληνοειδή προεκβολή η οποία υποβοηθά τη διαδικασία προσβολής. Όσον αφορά στην εγγενή αναπαραγωγή του *S. parasitica*, περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός θηλυκού και ενός αρσενικού γαμετάγγειου, δηλαδή ενός ωογονίου και ενός ανθηριδίου αντίστοιχα. Αυτά συζεύγνυνται με τη βοήθεια υφών γονιμοποίησης και προκύπτουν ζυγώτες, οι οποίοι ονομάζονται ωοσπόρια.

Οι κατώτεροι ωομύκητες, στους οποίους συγκαταλέγεται το είδος *Eurychasma dicksonii* που αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, έχουν αναπτύξει και εκείνοι με τη σειρά τους αξιοσημείωτες προσαρμογές στον παρασιτισμό. Ενδεικτικά περιγράφεται το γένος *Haptoglossa*, συγγενικό του *E. dicksonii*, το οποίο δημιουργεί χαρακτηριστικά, εξειδικευμένα επιμολυντικά κύτταρα για την προσβολή νηματωδών. Τα κύτταρα αυτά ονομάστηκαν κύτταρα-όπλα (gun cells) από τους Robb και Barron (1982) και προσομοιάζουν, ως προς τον τρόπο λειτουργίας τους, στα επιμολυντικά κύτταρα των ζωικών μικροοργανισμών plasmodiophorids και microsporidia (Beakes και Glockling 1998, 2002). Λεπτομερέστερα, τα κύτταρα-όπλα χαρακτηρίζονται από ασυνήθιστες, σύνθετες δομές. Αυτές περιλαμβάνουν έναν ανάστροφο σωλήνα (inverted tube) στο εσωτερικό του οποίου βρίσκεται μία βελονοειδής δομή. Ειδικοί κωνοειδείς σχηματισμοί κυτταρικού τοιχώματος σταθεροποιούν τη βελονοειδή δομή σε συγκεκριμένη θέση και στην κορυφή της συναντάται ένας δακτύλιος στεγανοποίησης. Ο ανάστροφος σωλήνας συσπειρώνεται γύρω από τον πυρήνα του κυττάρου-όπλου και περιβάλλεται από ένα δίκτυο μιτοχονδρίων. Όταν το παράσιτο έρθει σε φυσική επαφή με τον ξενιστή τότε ο ανάστροφος σωλήνας εκτοξεύεται από μέσα προς τα έξω, η βελονοειδής δομή τρυπά την επιδερμίδα του ξενιστή και το κύτταρο-όπλο εκκενώνεται, δηλαδή μεταφέρεται ο πρωτοπλάστης του παράσιτου στο εσωτερικό του



Εικόνα 1.27. Σχηματική απεικόνιση της εκτόξευσης του ανάστροφου σωλήνα και της βελονοειδούς δομής κατά την προσβολή νηματώδους από το παράσιτο *Haptoglossa* (τροποποιημένο από Beakes και συν. 2012).

κυττάρου-ξενιστή (Εικόνα 1.27' Glockling και Beakes 2000' Beakes και συν. 2012). Να σημειωθεί ότι η μελέτη της λεπτής δομής σε διάφορα είδη του γένους *Haptoglossa* αποκαλύπτει μεγάλη μορφολογική ποικιλομορφία στις δομές των κυττάρων-όπλων. Ωστόσο, κανένας από αυτούς τους ασυνήθιστους τύπους κυττάρων-όπλων δεν έχει εντοπιστεί να προσβάλλει νηματώδη, γεγονός που πιθανώς σημαίνει ότι οι διαφορετικές αυτές μορφές έχουν δημιουργηθεί για την επιμόλυνση άλλων, άγνωστων έως τώρα, ξενιστών (Beakes και συν. 2012).

1.2.3.1. Ωομύκητες και θαλάσσια φύκη

Τα θαλάσσια φύκη μολύνονται κατά κύριο λόγο από αντιπροσώπους των κατώτερων ωομυκήτων, οι οποίοι εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων είναι θαλάσσιοι (βλέπε επίσης Εικόνα 1.22). Η μελέτη του Sparrow (1960) πάνω στους υδρόβιους φυκομύκητες (aquatic phycomycetes), όπως τους είχε ονομάσει ο ίδιος, αποτελεί ακόμη και σήμερα τη μοναδική έρευνα για έναν σημαντικό αριθμό ωομυκήτων που προσβάλλουν φύκη. Η δυσκολία εντοπισμού και ταυτοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών σε υδάτινα οικοσυστήματα είναι ο βασικός λόγος που οι ασθένειες των ωομυκήτων στα φύκη δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Ορισμένες αποσπασματικές μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, παλαιότερων ετών, αφορούν είδη ωομυκήτων που εντοπίστηκαν να προσβάλλουν φύκη, όπως το *Ectrogella perforans* που επιμολύνει το θαλάσσιο διάτομο *Licmophora hyalina* (Raghukumar 1980α, 1980β), το *Petersenia palmariae* που παρασιτεί στο θαλάσσιο ροδοφύκος *Palmaria mollis* (Pueschel και van der Meer 1985) και το *Lagenisma coscinodisci* που επιμολύνει το θαλάσσιο διάτομο *Coscinodiscus granii* (Schnepf και συν. 1978). Σύγχρονες έρευνες συνδυάζουν την ηλεκτρονική

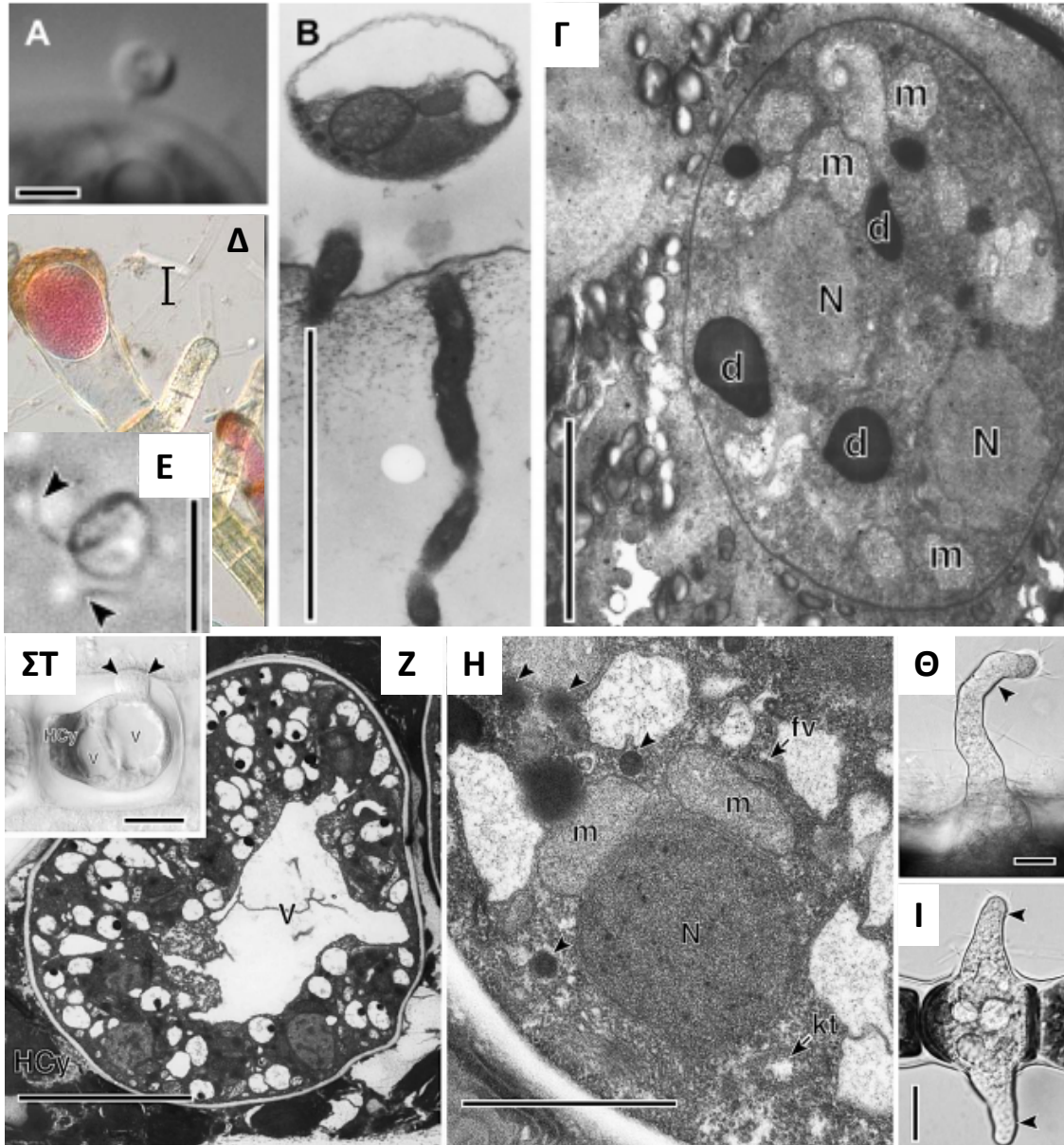
μικροσκοπία με μοριακές αναλύσεις και έτσι νέες πληροφορίες συγκεντρώνονται σχετικά με τους ωομύκητες που πλήττουν τα φύκη, ενώ νέα είδη προκύπτουν συνεχώς.

Το γένος *Olpidiopsis* ανήκει στην τάξη Lagenidiales των ωομυκήτων (Sparrow 1960) και περιλαμβάνει είδη υποχρεωτικών ενδοπαρασιτικών παθογόνων μικροοργανισμών που επιμολύνουν διάτομα, χλωροφύκη, ροδοφύκη και φαιοφύκη στα περισσότερα γεωγραφικά πλάτη της Γης (Dick 2001, Sekimoto και συν. 2009). Μάλιστα, ορισμένα *Olpidiopsis* sp., μαζί με είδη του γένους *Pythium*, προκαλούν τις γνωστές καταστροφικές επιδημίες σε καλλιέργειες του ροδοφύκου *Porphyra* sp. (nori), που στοιχίζουν δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως στους υδατοκαλλιεργητές (Ding και Ma 2005, Gachon και συν. 2010, βλέπε επίσης Εικόνες I.1B, Γ, Δ, 10B). Σε γενικές γραμμές, ο μηχανισμός μόλυνσης των κατώτερων ωομυκήτων, όπως δηλαδή τα είδη *Olpidiopsis* sp. και *Eurychasma dicksonii*, είναι κοινός και περιγράφεται συνοπτικά ως εξής: διμαστιγωτά ζωοσπόρια (Εικόνα I.28E) απελευθερώνονται από ειδικές δομές του σποριαγγείου, τους σωλήνες απελευθέρωσης (discharge/exit tubes) (Εικόνες I.28Θ, Ι), και κολυμπούν προς τον ξενιστή, όπου και εγκυστώνονται, δηλαδή δημιουργούν κυτταρικό τοίχωμα. Αφού εγκυστωθούν, προσκολλώνται στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή (Εικόνες I.28Α, Β) και το τρυπούν. Η διάτρηση και κατ' επέκταση η διείσδυση του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή υποβοηθείται συνήθως από χαρακτηριστικές δομές διάτρησης, οι οποίες φέρουν δομικές διαφορές μεταξύ των ειδών των ωομυκήτων (βλέπε επίσης Εικόνα I.28). Στη συνέχεια, μεταφέρεται ο πρωτοπλάστης ή μέρος αυτού στο κύτταρο του φύκου και σταδιακά σχηματίζεται ένας ατοιχωματικός, κοινοκυτικός θαλλός, με συνεχείς διαιρέσεις των πυρήνων του παράσιτου (Εικόνα I.28Γ). Σε αυτό το στάδιο, ο θαλλός του ωομύκητα χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό πυρήνων, μιτοχονδρίων και κυστιδίων με έγκλειστα (Εικόνα I.28Γ). Παράλληλα, οι συνεχείς διαιρέσεις των πυρήνων και η αύξηση του θαλλού του παράσιτου οδηγούν σε διόγκωση του κυττάρου του φύκου (Εικόνα I.28Δ). Ακολούθως, ο παθογόνος μικροοργανισμός σχηματίζει κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει τον πρωτοπλάστη του και εισέρχεται στη φάση ζωοσποριογένεσης. Στο κέντρο του ανώριμου σποριαγγείου σχηματίζονται ένα ή δύο χυμοτόπια και τα οργανίδια διατάσσονται περιφερειακά, ενώ αρχίζει η δημιουργία του σωλήνα απελευθέρωσης (Εικόνες I.28Ζ, ΣΤ). Ο θαλλός του παράσιτου σε αυτό το στάδιο περιέχει μιτοχόνδρια, πυρήνες, κυστίδια που

φέρουν μαστιγονημάτια και κινητοσώματα, ενώ το κυτόπλασμα του ξενιστή καταστρέφεται και παραγκωνίζεται στην περιφέρεια (Εικόνες I.28ΣΤ, Η). Εν συνεχεία, πραγματοποιείται κυτταροποίηση του σποριαγγείου από την οποία προκύπτουν εγκυστωμένα ζωοσπόρια. Τέλος, τα ζωοσπόρια απελευθερώνονται από έναν, δύο ή και περισσότερους σωλήνες απελευθέρωσης (Εικόνες I.28Θ, Ι) του ώριμου, πλέον, σποριαγγείου προς αναζήτηση νέων ξενιστών.

I.2.3.2. *Eurychasma dicksonii*

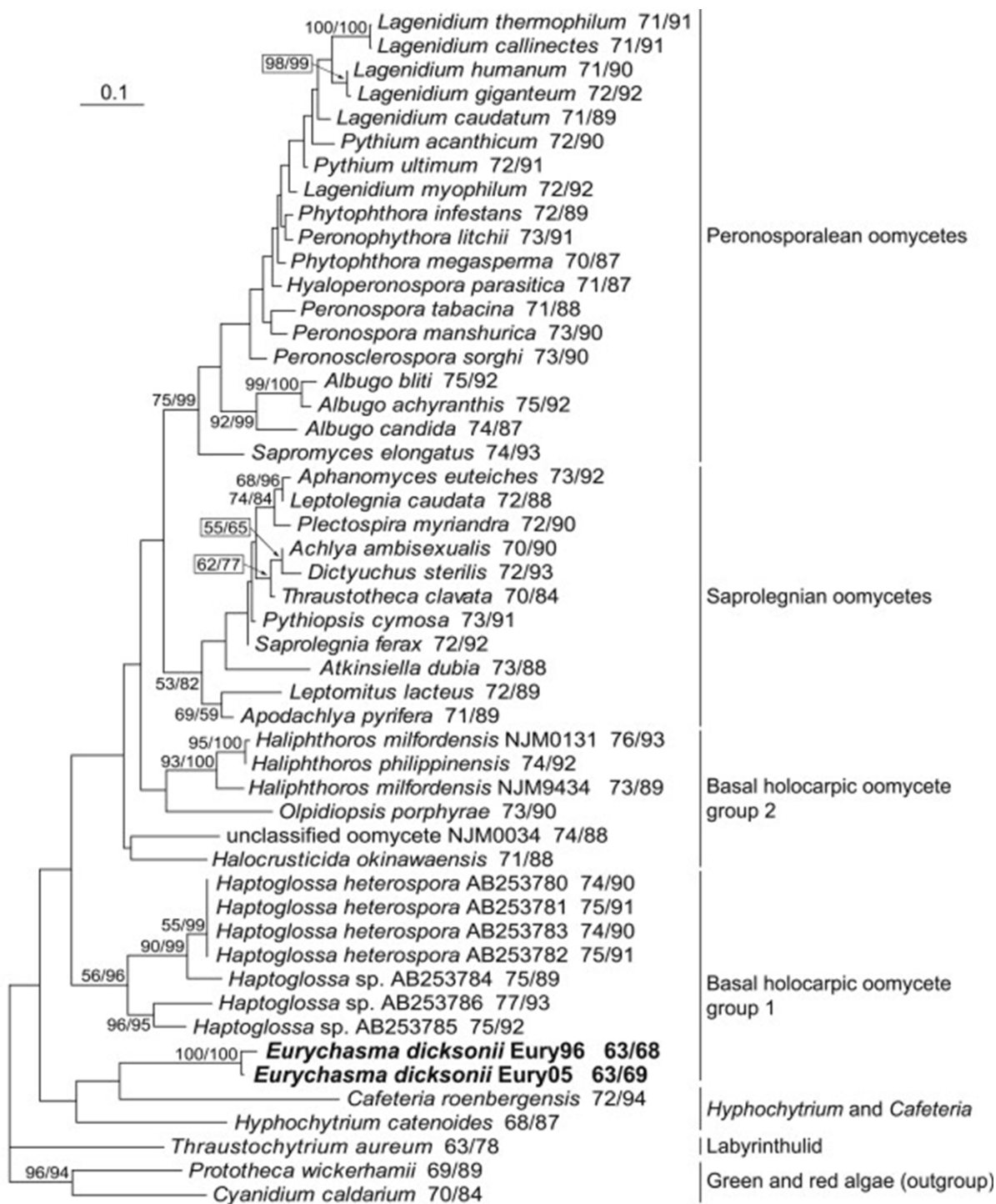
Το είδος *Eurychasma dicksonii* είναι ένας μονοκύτταρος θαλάσσιος υποχρεωτικά ενδοπαρασιτικός ωομύκητας, ο οποίος ταξινομικά κατατάσσεται στην τάξη Myzocytiosporidiales και την οικογένεια Eurychasmataceae (Strittmatter και συν. 2009). Πρόκειται για έναν ευρέως διαδεδομένο παθογόνο μικροοργανισμό των θαλάσσιων φυκών, με πλήθος καταγραφών σε κρύες και εύκρατες θάλασσες (Sparrow 1960· Gachon και συν. 2009). Πράγματι, πληθώρα ερευνητών αναφέρουν κρούσματα σε Ευρώπη, Ασία, Αφρική, Αμερική και Αυστραλία, γεγονός που καθιστά το *E. dicksonii* το πιο κοινό ευκαρυωτικό παράσιτο των φυκών (Petersen 1905· Aleem 1950· Jenneborg 1977· Sparrow 1960· Strittmatter 2013). Ειδικότερα, το *E. dicksonii* προσβάλλει σημαντικό αριθμό φαιοφυκών στο πεδίο, ενώ υπάρχουν αναφορές μαζικών επιδημιών σε ορισμένα είδη, όπως στο *Pylaiella littoralis* (Sparrow 1960· Jenneborg 1977· Kürper και Müller 1999). Το μεγάλο εύρος ξενιστών επαληθεύτηκε στο εργαστήριο με πειράματα μόλυνσης σε καλλιέργειες φαιοφυκών (Müller και συν. 1999). Πιο συγκεκριμένα, οι Müller και συν. (1999) προκειμένου να εξετάσουν την ευπάθεια φαιοφυκών απέναντι στο *E. dicksonii*, μόλυναν με τον παθογόνο ωομύκητα υγιείς καλλιέργειες 48 ειδών από 13 διαφορετικές τάξεις φαιοφυκών. Τα πειράματα έδειξαν ότι 45 από τα 48 είδη προσβάλλονται από το *E. dicksonii* σε εργαστηριακές συνθήκες. Το ευρύ φάσμα ξενιστών του παράσιτου σε συνδυασμό με τις εξάρσεις ασθενειών που επιδρούν στη λειτουργικότητα των φυσικών πληθυσμών, επισημαίνουν την οικολογική σημασία του παθογόνου ωομύκητα (Strittmatter και συν. 2009).



Εικόνα 1.28. Εικόνες οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας στις οποίες απεικονίζονται δομές των ωομυκήτων που μολύνουν φύκη. Εικ. Α-Γ. Δομές του *Oplidiopsis porphyrae* που μολύνει το ροδοφύκος *Porphyra* sp. Εικ. Α. Εγκυστωμένο ζωοσπόριο προσκολλημένο στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Εικ. Β. Εικόνα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που παρουσιάζει λεπτομέρειες εγκυστωμένου ζωοσπορίου. Εικ. Γ. Νεαρός θαλλός του ωομυκήτα με μιτοχόνδρια (m), πυρήνες (N) και πυκνά κυστίδια με έγκλειστα (d). Κλίμακα για Α-Γ: 2 μ m (τροποποιημένο από Sekimoto και συν. 2008α). Εικ. Δ. Χρώση με 0,2% (w/v) ακετοκαρμίνη. Μόλυνση ακραίου κυττάρου του φαιοφύκου *Sphacelaria* sp. από τον ωομύκητα *Anisoplidium sphacellarum* με εμφανή διόγκωση του κυττάρου-ξενιστή. Κλίμακα: 50 μ m (τροποποιημένο από Strittmatter και συν. 2013). Εικ. Ε-Ι. Δομές του *Oplidiopsis bostrychia* που μολύνει το ροδοφύκος *Bostrychia* και άλλα ροδοφύκη. Εικ. Ε. Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου που παρουσιάζει ένα ελεύθερο ζωοσπόριο. Οι κεφαλές βελών δείχνουν τα δύο μαστίγια. Κλίμακα: 5 μ m. Εικ. ΣΤ. Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου που απεικονίζει ένα ανώριμο σποριαγγείο με δύο κεντρικά χυμοτόπια (V), ενώ το κυτόπλασμα του ξενιστή βρίσκεται παραγκωνισμένο στην περιφέρεια (HCy). Οι κεφαλές βελών δείχνουν τον αναπτυσσόμενο σωλήνα απελευθέρωσης του σποριαγγείου. Κλίμακα: 20 μ m. Εικ. Ζ. Λεπτή δομή ενός ανώριμου σποριαγγείου με περιφερειακή διάταξη οργανιδίων. Κεντρικά παρατηρείται ένα χυμοτόπιο (V). Κλίμακα: 5 μ m. Εικ. Η. Μεγαλύτερη μεγέθυνση σε ανώριμο σποριαγγείο. Παρατηρούνται πυρήνες (N) και μιτοχόνδρια (m) τα

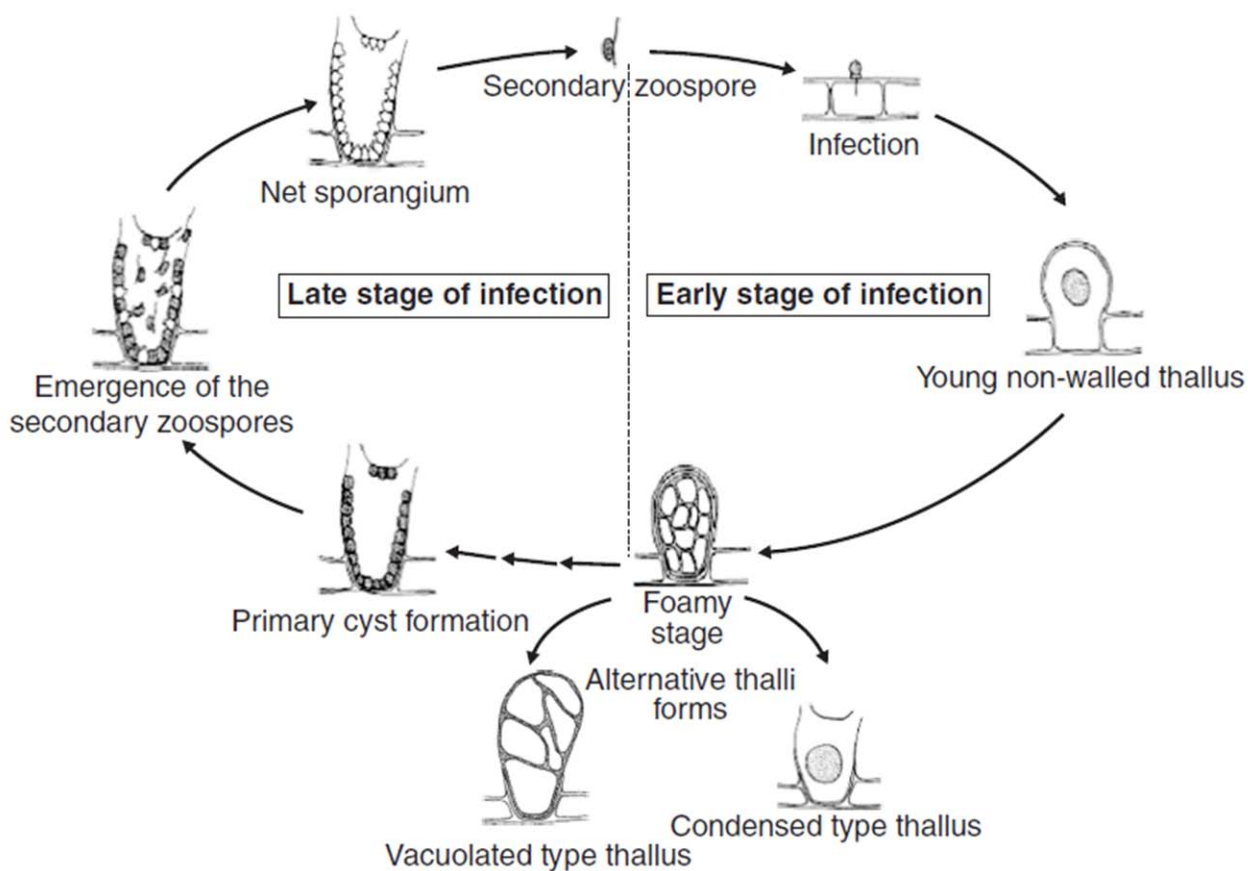
οποία σχετίζονται με κινητοσώματα (k) και κυστίδια που φέρουν μαστιγονημάτια (fv). Οι κεφαλές βελών δείχνουν περιφερειακά πυκνά κυστίδια. Κλίμακα: 1 μm . Εικ. Θ. Εικόνα οπτικής μικροσκοπίας που απεικονίζει μονό σωλήνα απελευθέρωσης (κεφαλή βέλους). Κλίμακα: 10 μm . Εικ. Ι. Εικόνα οπτικής μικροσκοπίας που απεικονίζει διπλό σωλήνα απελευθέρωσης (κεφαλή βέλους). Κλίμακα: 20 μm (τροποποιημένο από Sekimoto και συν. 2009).

Παρά το οικολογικό ενδιαφέρον του *E. dicksonii*, τα πρώτα αποτελέσματα που αφορούν στη λεπτή δομή και τη φυλογενετική κατάταξη του είδους προέκυψαν σχετικά πρόσφατα (Kürper και συν. 2006· Sekimoto και συν. 2008β· Grenville-Briggs και συν. 2011). Μοριακή ανάλυση του SSU rRNA του παράσιτου αποκαλύπτει τη χαμηλή φυλογενετική του θέση στην κλάση των ωομυκήτων και το κατατάσσει στην ομάδα των κατώτερων εξελικτικά ολοκαρπικών ωομυκήτων (basal holocarpic oomycetes) (Kürper και συν. 2006· Εικόνα Ι.30). Το γεγονός αυτό προσδίδει ιδιαίτερη αξία στο αρχέγονο *E. dicksonii*, η μελέτη του οποίου συντελεί στην εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για τους μηχανισμούς μόλυνσης ανώτερων ωομυκήτων με μεγάλη οικονομική σημασία, όπως τα προαναφερθέντα γένη *Phytophthora* και *Saprolegnia*. Πράγματι, η διαδικασία της ζωοσποριογένεσης, καθώς και η δομή του ζωοσπορίου του *E. dicksonii* φέρουν κοινά χαρακτηριστικά με αυτά των αντιπροσώπων του κλάδου Saprolegniales (Sekimoto και συν. 2008β). Ακόμη, περαιτέρω φυλογενετικές και κυτταρολογικές μελέτες δείχνουν ότι το *E. dicksonii* παρουσιάζει δομικές και αναπτυξιακές ομοιότητες με τα συγγενικά του γένη *Haptoglossa*, *Haliphthoros* και *Olpidiopsis* (Sekimoto και συν. 2008β· βλέπε επίσης Εικόνα Ι.29 για εξελικτικές σχέσεις). Έτσι, νέες πληροφορίες για τους μηχανισμούς παθογένειας του παράσιτου συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση της κλάσης των ωομυκήτων στο σύνολό της. Ωστόσο, το 57% των αλληλουχιών του *E. dicksonii* δεν παρουσιάζει καμμία ομοιότητα με δημοσιευμένα δεδομένα αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε άλλους οργανισμούς (Grenville-Briggs και συν. 2011). Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν σημαντικοί παράγοντες παθογένειας που είναι μοναδικοί για το εν λόγω παράσιτο και δεν συναντώνται σε κανέναν άλλο ωομύκητα ή οργανισμό γενικότερα. Τέτοιοι παράγοντες είναι ορισμένα ένζυμα αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή, πρωτεΐνες τύπου κυκλοφιλίνης με δυνατότητα πρόσδεσης σε ανοσοκατασταλτικά γονίδια, που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο, και πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος που συμμετέχουν στη μεταγωγή σημάτων και την προστασία του παράσιτου (Grenville-Briggs και συν. 2011).



Εικόνα 1.29. Φυλογενετικό δέντρο, όπως προκύπτει ύστερα από ανάλυση 50 αλληλουχιών του COII από δύο κλώνους *Eurychasma dicksonii* (Eu96 και Eu05). Παρουσιάζονται οι εξελικτικές σχέσεις του είδους με τους λοιπούς κατώτερους ολοκαρπικούς ωομύκητες, τους κλάδους των Peronosporales και Saprolegniales και άλλα Ετερόκοντα. Τα χλωροφύκη και τα ροδοφύκη χρησιμοποιούνται ως εξωμάδα (outgroup) (από Sekimoto και συν. 2008β).

Παλαιότερες αλλά και πιο σύγχρονες μελέτες οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας περιγράφουν τα βασικά στάδια του κύκλου ζωής του *E. dicksonii*, τα οποία συνοψίζονται στην Εικ. 1.30 (Petersen 1905· Aleem 1950· Sparrow 1960· Sekimoto και συν. 2008). Ένας πλήρης κύκλος μόλυνσης διαρκεί κατά μέσο όρο 14 ημέρες, με μικρές διακυμάνσεις στη διάρκεια που σχετίζονται κυρίως με το είδος του ξενιστή (Müller και συν. 1999). Οι μολύνσεις των φυκών προκαλούνται όταν απελευθερωμένα ζωοσπόρια από σποριαγγεία του παράσιτου μετατρέπονται, μετά τη δημιουργία κυτταρικού τοιχώματος, σε σπόρια και προσκολλώνται στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή, προκειμένου να το τρυπήσουν και να το προσβάλουν.



Εικόνα 1.30. Διαγραμματική απεικόνιση του κύκλου ζωής του *Eurychasma dicksonii* (από Strittmatter και συν. 2009).

Λεπτομερέστερα, μονοπύρηννα ζωοσπόρια, με δύο άνισα μαστίγια στην κορυφή, απελευθερώνονται από ειδικές δομές του σποριαγγείου που ονομάζονται σωλήνες

απελευθέρωσης (discharge tubes). Τα ζωοσπόρια αυτά αναφέρονται βιβλιογραφικά ως δευτερογενή ζωοσπόρια (secondary zoospores, βλέπε Εικόνα Ι.30) για να διακριθούν από τα πρωτογενή ζωοσπόρια (primary zoospores) τα οποία, σύμφωνα με παρατηρήσεις των Petersen (1905) και Sparrow (1960) εμφανίζονται σε προηγούμενο στάδιο του κύκλου (βλέπε παρακάτω). Τα δευτερογενή ζωοσπόρια κολυμπούν ελεύθερα έως ότου συναντήσουν κάποιον πιθανό ξενιστή. Τότε, αφού πλησιάσουν το κύτταρο του φύκους εγκυστώνονται, δηλαδή σχηματίζουν κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει τον πρωτοπλάστη τους και μετατρέπονται σε δευτερογενή σπόρια (secondary cysts). Στη συνέχεια, τα δευτερογενή σπόρια προσκολλώνται στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή με τη βοήθεια μίας πλάκας προσκόλλησης (adhesorium pad), που δημιουργείται προς την πλευρά του σπορίου που εφάπτεται στον ξενιστή. Το δευτερογενές σπόριο τρυπά με τη χρήση ειδικής συσκευής διείσδυσης (penetration peg) το κυτταρικό τοίχωμα του φύκους και μεταφέρει οργανίδια και κυτοπλασματικό υλικό στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Το πρώτο ενδοκυτταρικό στάδιο ανάπτυξης του *E. dicksonii* που έχει παρατηρηθεί ως τώρα, συνίσταται από έναν πλασμοδιακό, πολυπύρηνο, κοινοκυτικό θαλλό. Πιο συγκεκριμένα, διαδοχικές διαιρέσεις των πυρήνων του παράσιτου οδηγούν στον σχηματισμό ενός πολυπύρηνου θαλλού, ο οποίος σε αυτό το στάδιο περιβάλλεται από διπλή πλασματική μεμβράνη, απουσία κυτταρικού τοιχώματος. Η μία εκ των δύο μεμβρανών φαίνεται να ανήκει στον ξενιστή και η άλλη στον ωομύκητα. Λόγω των συνεχών διαιρέσεων των πυρήνων του παράσιτου, αυξάνεται ο όγκος του θαλλού του ωομύκητα και ο πρωτοπλάστης του ξενιστή ωθείται προς τα έξω. Ολόκληρο το κύτταρο του φύκους διογκώνεται παράλληλα με την αύξηση του θαλλού του ωομύκητα, ενώ σταδιακά ο πρωτοπλάστης του εξωθείται από το παράσιτο στα άκρα και εν τέλει βρίσκεται παραγκωνισμένος στην περιφέρεια του κυττάρου. Ο ωομύκητας εξακολουθεί να αναπτύσσεται, πολλαπλασιάζοντας τα οργανίδια του, δηλαδή τους πυρήνες, τα μιτοχόνδρια και τα κυστίδια. Ακολούθως, οι συνεχείς διαιρέσεις των πυρήνων του παράσιτου διακόπτονται και ο πρωτοπλάστης του καταλαμβάνει σχεδόν εξ ολοκλήρου το εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Ο πυρήνας και τα πλαστίδια του φύκους εμφανίζονται πλέον αποδιοργανωμένα. Σε αυτό το στάδιο, το *E. dicksonii* χαρακτηρίζεται από πλήθος χυμοτοπίων (foamy stage, βλέπε Εικόνα Ι.30), ενδιάμεσα των οποίων υπάρχουν πρωτοπλασματικές γέφυρες, δημιουργώντας

άτυπες μονάδες που θεωρούνται πρόδρομες μορφές σπορίων και κάθε μία περιλαμβάνει κυτοπλασματικό υλικό, έναν πυρήνα, μιτοχόνδρια και κυστίδια. Παράλληλα, σχηματίζεται κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει εξωτερικά το σύνολο του θαλλού του παράσιτου. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί τη μετάβαση του ωομύκητα από τη βλαστητική στην αναπαραγωγική φάση. Η διαδικασία της ζωοσποριογένεσης διαρκεί λιγότερο από 6 h επί της συνολικής διάρκειας των 14 ημερών ενός ολοκληρωμένου κύκλου μόλυνσης του *E. dicksonii*. Στη μικρή διάρκεια του σταδίου αποδίδεται η έλλειψη λεπτομερειών που αφορούν στις ενδιάμεσες φάσεις δημιουργίας και κυτταροποίησης του σποριαγγείου. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, η υπερδιόγκωση του θαλλού του παράσιτου προκαλεί την έκταση του κυττάρου του ξενιστή. Κατά τον σχηματισμό του σποριαγγείου ή και λίγο νωρίτερα, το παράσιτο έχει λάβει τις τελικές διαστάσεις, οι οποίες ποικίλλουν ανάλογα με τον κλώνο του ωομύκητα, τον κλώνο του ξενιστή και πιθανώς τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Όταν η αύξηση του θαλλού του ωομύκητα υπερβεί το όριο έκτασης του κυττάρου ξενιστή, τότε το κυτταρικό τοίχωμα του φύκους διαρρηγνύεται. Τα θραύσματά του παραμένουν εξωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος του ωομύκητα, περιβάλλοντας ένα τμήμα της βάσης του θαλλού του παράσιτου. Έτσι, στα πρώτα στάδια της ζωοσποριογένεσης, σχηματίζεται ένα αρχικά ανώριμο σποριάγγειο, το οποίο ορθώνεται κατά τμήμα περίπου έξω από το κύτταρο του φύκους, ενώ η βάση του παραμένει βυθισμένη στο κύτταρο του ξενιστή και περιβάλλεται εν μέρει από το κυτταρικό τοίχωμα που έχει διαρρηχθεί. Στην κορυφή του ανώριμου σποριαγγείου εμφανίζονται οι σωλήνες απελευθέρωσης οι οποίοι παραμένουν προς το παρόν κλειστοί. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται κυτταροποίηση του θαλλού και αυτή οδηγεί στον σχηματισμό πρωτογενών σπορίων, ενώ ταυτόχρονα ανοίγουν οι σωλήνες απελευθέρωσης του σποριαγγείου. Το ώριμο σποριάγγειο καταλαμβάνεται από περιφερειακά διατεταγμένα πρωτογενή σπόρια και διαθέτει δύο ανοιχτούς σωλήνες απελευθέρωσης. Κάθε διαφοροποιημένο πρωτογενές σπόριο περιλαμβάνει έναν πυρήνα, μιτοχόνδρια, κυστίδια με έγκλειστα και ένα ζεύγος κινητοσωμάτων. Σε παλαιότερες εργασίες (Petersen 1905, Sparrow 1960) αναφέρεται ότι, πριν τη διαφοροποίηση των πρωτογενών σπορίων, εμφανίζονται ελεύθερα πρωτογενή ζωοσπόρια στο εσωτερικό του ανώριμου σποριαγγείου. Ωστόσο, οι Sekimoto και συν. (2008β) δεν παρατήρησαν ελεύθερα πρωτογενή ζωοσπόρια πριν τη διαφοροποίηση των πρωτογενών

σπορίων και συνεπώς θεωρούν ότι η κυτταροποίηση του κοινοκυτικού ανώριμου σποριαγγείου οδηγεί απ' ευθείας στη δημιουργία διαφοροποιημένων πρωτογενών σπορίων. Τα κινητοσώματα στο εσωτερικό των πρωτογενών σπορίων συντελούν στον σχηματισμό δύο μαστιγίων. Εν συνεχεία, κάθε πρωτογενές σπόριο σχηματίζει στο κυτταρικό του τοίχωμα μία οπή με προσανατολισμό προς το κέντρο του σποριαγγείου, που λειτουργεί ως πόρος απελευθέρωσης των δευτερογενών ζωοσπορίων. Τέλος, αυτά εξέρχονται από το σποριάγγειο δια μέσου των ανοιχτών σωλήνων απελευθέρωσης προς αναζήτηση νέων ξενιστών. Μετά την απελευθέρωση των δευτερογενών ζωοσπορίων, εντός του σποριαγγείου παρατηρείται ένα δίκτυο από κυτταρικά τοιχώματα άδειων πρωτογενών σπορίων, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστική δομή του είδους, γνωστή με τον όρο "net sporangium". Να σημειωθεί ότι έχουν περιγραφεί δύο ακόμη εναλλακτικές μορφές θαλλών στη βλαστητική φάση: ένας συμπυκνωμένος τύπος (condensed type thallus) και ένας τύπος με πλήθος χυμοτοπίων (vacuolated type thallus). Κανένας, όμως, από τους δύο τύπους δεν έχει παρατηρηθεί να εισέρχεται στην αναπαραγωγική φάση και να παράγει ζωοσπόρια (Sekimoto και συν. 2008β).

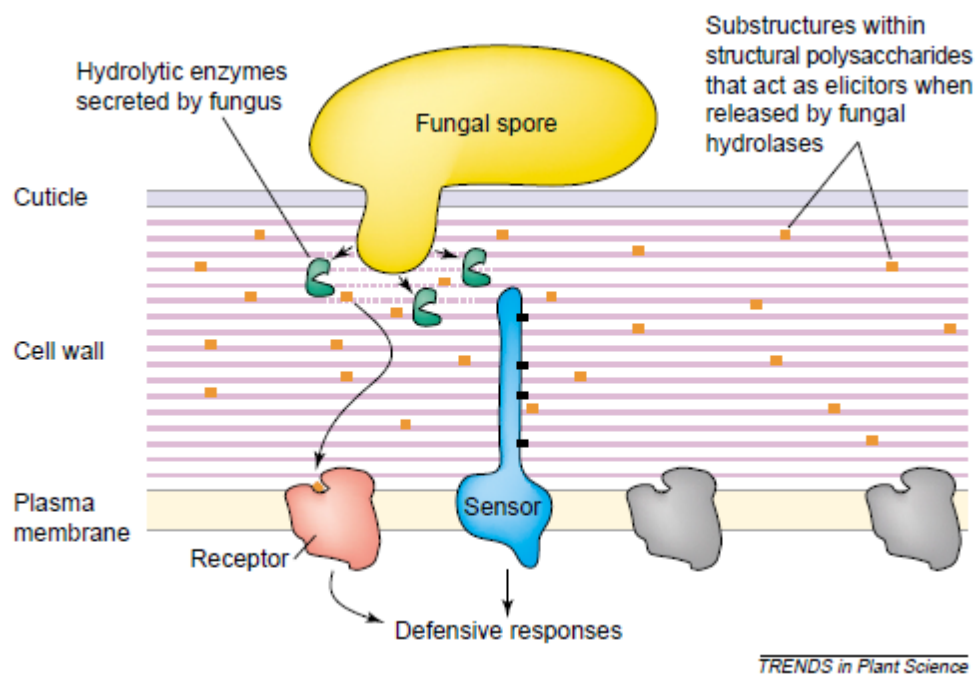
I.3 Βιοτική καταπόνηση φυκών: μηχανισμοί αναγνώρισης - αμυντική απόκριση

Όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο, οι θαλάσσιοι, όπως και οι χερσαίοι φυτικοί οργανισμοί, πλήττονται αδιαλείπτως από παθογόνους οργανισμούς, με καταστροφικές συνέπειες για τους φυσικούς και καλλιεργούμενους πληθυσμούς. Σε ένα έντονα ανταγωνιστικό περιβάλλον, όπου τα παράσιτα εμφανίζουν εντυπωσιακή ποικιλομορφία τρόπων μόλυνσης, τα φύκη έχουν καταφέρει να αναπτύξουν επιτυχείς μηχανισμούς επιβίωσης (Potin και συν. 2002). Είναι γεγονός ότι η μελέτη της βιοτικής καταπόνησης των φυκών και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ξενιστή και παράσιτου βρίσκεται σε εμβρυικό στάδιο, ειδικά αν αναλογιστεί κανείς τις σχετικές δημοσιευμένες εργασίες σε ανώτερα φυτά. Ωστόσο, η πρόσφατη αναγνώριση της οικολογικής και οικονομικής αξίας των φυκών συντελεί στο συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη μελέτη του παρασιτισμού και των βιοτικών αλληλεπιδράσεων. Έρευνες των τελευταίων ετών σε μοριακό, βιοχημικό και κυτταρικό επίπεδο αποκαλύπτουν νέα δεδομένα για τη φυσική ανοσία (natural immunity) των φυκών και εν γένει για την εξέλιξη του ανοσοποιητικού συστήματος στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Uppalapati και συν. 2000, 2001α, 2001β· Potin και συν. 2002· Klochkova και συν. 2011).

I.3.1. Μηχανισμοί αναγνώρισης του παράσιτου από το φύκος

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας των φυτικών οργανισμών απέναντι στα παράσιτα, όπως ακριβώς συμβαίνει με την επιδερμίδα στους ζωικούς οργανισμούς. Πολλοί παθογόνοι μικροοργανισμοί, μεταξύ των οποίων οι μύκητες και οι ωομύκητες, τρυπούν το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή και διεισδύουν στο εσωτερικό του κυττάρου, προκειμένου να αποκτήσουν άμεση πρόσβαση στα απαραίτητα για την ανάπτυξή τους θρεπτικά συστατικά (Bellincampi και συν. 2014). Η διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή πραγματοποιείται με άσκηση μηχανικής πίεσης και ταυτόχρονη έκκριση υδρολυτικών ενζύμων από το παράσιτο (Εικόνα I.31). Γενετικές μελέτες, στις οποίες τα γονίδια των παράσιτων που κωδικοποιούν υδρολυτικά ένζυμα έχουν απενεργοποιηθεί, δείχνουν ότι πολλά από αυτά τα ένζυμα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες παθογένειας (pathogenicity factors) (Vorwerk και συν. 2004). Σε όλα τα συστήματα παθογένειας, η επιτυχία της αμυντικής απόκρισης του

ξενιστή στη μόλυνση κρίνεται από τη δυνατότητα έγκαιρης αναγνώρισης των παραγόντων αυτών, οι οποίοι αποτελούν το ερέθισμα ενεργοποίησης του γενικού αμυντικού μηχανισμού (non-host resistance) (Εικόνα Ι.31). Στα ανώτερα φυτά, οι χημικές ουσίες που δραστηριοποιούν την αμυντική απόκριση είναι κατά κύριο λόγο ολιγοσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες και γλυκοπεπτίδια (Boller 1995· Heath M.C. 2000). Ο υδατάνθρακας χιτίνη, βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, ενεργοποιεί εντός 10 min την έκφραση ενός καταρράκτη αμυντικών γονιδίων σε κύτταρα του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Ramonell και συν. 2002). Επιπλέον, η πρόκληση τραυματισμού σε φύλλα ορισμένων φυτών οδηγεί στην έκκριση μίας πολυπεπτιδικής ορμόνης, της συστεμίνης (systemin), η οποία μεταφέρεται μέσω του αγγειακού συστήματος του φυτού και ελέγχει την έκφραση 15 αμυντικών γονιδίων (Ryan και Pearce 1998). Ακόμη, ορισμένα φυτά εκκρίνουν υπό βιοτική καταπόνηση πτητικές οργανικές ενώσεις που λειτουργούν με έμμεσο τρόπο προστατευτικά. Οι ενώσεις αυτές αποτρέπουν την εναπόθεση αυγών από φυτοφάγα ζώα, ενώ παράλληλα προσελκύουν σαρκοφάγους θηρευτές (Kessler και Baldwin 2001).



Εικόνα Ι. 31. Διαγραμματική απεικόνιση των γεγονότων που συνδέονται με τη δράση παθογόνων παραγόντων μυκήτων στο κυτταρικό τοίχωμα ανώτερων φυτών. Η διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος από το παράσιτο με τη βοήθεια υδρολυτικών ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση πολυσακχαριτικών θραυσμάτων που λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια. Τα ολιγομερή των πολυσακχαριτών προσδένονται σε υποδοχείς του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή και ενεργοποιούν την αμυντική απόκριση του φυτού (από Vorwerk και συν. 2004).

Μόλις πρόσφατα περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε θαλάσσια φύκη μηχανισμοί αναγνώρισης παράσιτου που περιλαμβάνουν την ενδογενή απελευθέρωση ολιγοσακχαριτών. Πιο συγκεκριμένα, η διάσπαση του αλγινικού οξέος σε επιμέρους ολιγομερή, λόγω της ενζυμικής δράσης παθογόνων μικροοργανισμών, προκαλεί σε κύτταρα του σποριόφυτου του φαιοφύκου *Laminaria digitata* αναπνευστική και οξειδωτική έκρηξη (Kürper και συν. 2001). Η ανίχνευση των ολιγοσακχαριτών από το φαιοφύκος οδηγεί σε εκροή στο κυτταρικό τοίχωμα ιόντων καλίου, υπερπαραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και υπεροξειδίου του υδρογόνου και ενεργοποίηση μίας σειράς βιοχημικών μονοπατιών (Kürper και συν. 2001). Βέβαια, μελέτες σε 45 είδη από 11 τάξεις φαιοφυκών έδειξαν ότι η ικανότητα αναγνώρισης ολιγομερών αλγινικού οξέος, στα πλαίσια της άμυνας του οργανισμού, περιορίζεται σε ορισμένους μόνο αντιπροσώπους των Laminariales, Desmaretiales, Ectocarpales και Fucales (Kürper και συν. 2002). Παρόμοιες παρατηρήσεις προκύπτουν από μελέτες στο ροδοφύκος *Gracilaria conferta*. Το κυτταρικό τοίχωμα του ροδοφύκου συνίσταται, μεταξύ άλλων, από άγαρ, το οποίο διασπάται σε επιμέρους ολιγομερή ύστερα από ενζυμική δράση επιφυτικών βακτηρίων. Το ροδοφύκος αντιδρά με οξειδωτική έκρηξη στην εμφάνιση ολιγομερών συστατικών του κυτταρικού του τοιχώματος (Weinberger και συν. 1999). Μάλιστα, η ένταση της απόκρισης φαίνεται να εξαρτάται τόσο από το μέγεθος όσο και από τη στερεοδομή της υδατανθρακικής αλυσίδας, με τα υψηλότερα ποσοστά οξειδωτικής ενεργοποίησης να σημειώνονται σε ολιγοσακχαρίτες δώδεκα-δεκαέξι σακχάρων με ελικοειδή διάταξη (Weinberger και συν. 2001). Σαφής συσχέτιση μεταξύ δομής και δραστηριότητας παρατηρείται επίσης στα ολιγομερή αλγινικού οξέος και την ένταση της οξειδωτικής έκρηξης στο φαιοφύκος *L. digitata* (Kürper και συν. 2001). Αυτός ο μηχανισμός αναγνώρισης του παράσιτου σε φύκη συμφωνεί με αντίστοιχους σε ανώτερα φυτά, όπου γλυκάνες και πηκτίνες λειτουργούν ως ερέθισμα ενεργοποίησης των αμυντικών αποκρίσεων του φυτού (Benhamou 1996). Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαμόρφωση του πολυ-α-1,4-L-γουλουρονικού οξέος στο αλγινικό οξύ των φυκών είναι παρόμοια με αυτή του πολυ-α-1,4-L-γαλακτουρονικού οξέος στις πηκτίνες των φυτών.

Στην προσπάθειά τους να προστατευτούν από τις επιθέσεις θαλάσσιων φυτοφάγων θηρευτών, τα φαιοφύκη έχουν αναπτύξει εξειδικευμένους μηχανισμούς αμυντικής απόκρισης (Pavia και Toth 2000· Amsler 2001). Σε ειδικά κυστίδια, τα φυσώδη, συσσωρεύονται

φαινολικές ενώσεις που είναι γνωστές με τον όρο φλωροταννίνες. Οι φλωροταννίνες εμφανίζουν ισχυρή τοξικότητα όταν διεγείρονται και έχουν ενεργό ρόλο στη θωράκιση του θαλλού έναντι των φυτοφάγων οργανισμών (Ragan και Glombitza 1986). Λεπτομερέστερα, μελέτη σε δείγματα *Ascophyllum nodosum* από το πεδίο αποκαλύπτει ότι τα επίπεδα των φαινολικών ενώσεων αυξάνονται σημαντικά σε πληθυσμούς που αποτελούν τροφή για τα σαλιγκάρια, ενώ αντίθετα τα ποσοστά των φαινολικών ενώσεων παραμένουν χαμηλά σε περιπτώσεις μη προσβεβλημένων πληθυσμών (Pavia και Toth 2000). Η στρατηγική παραγωγής φαινολικών ενώσεων δε φαίνεται να σχετίζεται με την πρόκληση μηχανικής βλάβης στο κυτταρικό τοίχωμα των φαιοφυκών (Pavia και Toth 2000). Ορισμένα μαλάκια διαθέτουν ένζυμα διάσπασης του αλγινικού οξέος, τα οποία διευκολύνουν τη διαδικασία της πέψης (Potin και συν. 1999). Η ενεργοποίηση του μηχανισμού συσσώρευσης φαινολικών ενώσεων αποδίδεται πιθανώς στην ικανότητα των φαιοφυκών να αναγνωρίζουν αυτά τα ένζυμα (Potin και συν. 2002). Ωστόσο, ορισμένες τάξεις φαιοφυκών αδυνατούν να αναγνωρίσουν τον παθογόνο μικροοργανισμό και ως εκ τούτου να αμυνθούν έναντι αυτού. Το κελποφύκος *Laminaria hyperborea* δεν εμφανίζει αύξηση των φλωροταννινών ως απόκριση στη θήρευση από τα γαστερόποδα *Ansates pellucida* και *Lacuna vincta* και αυτό υποδηλώνει είτε ότι το φύκος δεν αναγνωρίζει εγκαίρως τα δύο φυτοφάγα ζώα ή ότι, σε αντίθεση με τα Fucales, τα Laminariales δε χρησιμοποιούν τις φλωροταννίνες ως αμυντικό μέσο (Toth και Pavia 2002). Όντως, το φαιοφύκος *Dictyota menstrualis* δε βασίζεται στη χρήση φαινολικών ενώσεων για την άμυνα έναντι των αμφίποδων, αλλά εκκρίνει διτερπένια τα οποία αποτρέπουν τη θήρευση του φύκους (Cronin και Hay 1996).

1.3.2. Μηχανισμοί αναγνώρισης του φύκους από το παράσιτο

Η αρχιτεκτονική των μορίων και η σύσταση της εξωτερικής επιφάνειας ξενιστή και παράσιτου παίζουν πρωτεύοντα ρόλο σε μία σειρά γεγονότων αναγνώρισης που λαμβάνουν χώρα κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης. Το πρώτο γεγονός αναγνώρισης μεταξύ ανώτερων φυτών και ωομυκήτων είναι η χημειοτακτική μετακίνηση των ζωοσπορίων προς την περιοχή του ξενιστή, γεγονός που συνδέεται με την ύπαρξη ειδικών υποδοχέων στην πλασματική μεμβράνη των ζωοσπορίων (Hardham 1989, 1992). Ακολουθώντας τη βαθμιαία μεταβολή της συγκέντρωσης

των χημικών ουσιών, τα ζωοσπόρια του ωομύκητα κατευθύνονται προς την εγγύς περιοχή του φυτού, όπου και εγκυστώνονται, δηλαδή αποκτούν κυτταρικό τοίχωμα (Hardham 1989). Η διαδικασία της εγκύστωσης πυροδοτείται όταν υποδοχείς που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη και την επιφάνεια των μαστιγίων του ζωοσπορίου, οι οποίοι προσδένονται σε υδατάνθρακες ή πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (Hardham 1985, 1989, 1992, Kerwin και συν. 1991). Στην ειδική αυτή πρόσδεση οφείλεται η ικανότητα των ωομυκήτων να μολύνουν αποκλειστικά συγκεκριμένα είδη ξενιστών (Petersen και συν. 1997). Μετά την εγκύστωση των ζωοσπορίων, ακολουθεί ο σχηματισμός μίας προσκολλητικής πλάκας (adhesorium pad ή appressorium), που διευκολύνει την πρόσδεση του σπορίου στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Οι ολιγοσακχαρίτες, οι κηροί και οι γλυκοπρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος των ανώτερων φυτών λειτουργούν ως μόρια σηματοδότησης για το σχηματισμό των προσκολλητικών αυτών δομών, τόσο σε μύκητες όσο και σε ωομύκητες (Kolattukudy και συν. 1995, Knogge 1998).

Αντίστοιχοι μηχανισμοί αναγνώρισης του ξενιστή από το παράσιτο έχουν αναφερθεί προσφάτως και στα φύκη. Το ροδοφύκος *Chondrus crispus* προσβάλλεται από το χλωροφύκος *Acrochaete operculata* με έναν ιδιόμορφο τρόπο: το σποριόφυτο του ξενιστή μολύνεται, παρουσιάζοντας πλήρη ευπάθεια ως προς το παράσιτο, σε αντίθεση με το γαμετόφυτο το οποίο εμφανίζει πλήρη αντίσταση στη μόλυνση (Bouarab και συν. 1999, 2001). Οι Bouarab και συν. (1999) έδειξαν ότι η επιλεκτική παθογένεια οφείλεται στον μηχανισμό αναγνώρισης του ξενιστή από το παράσιτο, ο οποίος εξαρτάται από την εκάστοτε σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του φύκου. Πιο συγκεκριμένα, το κυτταρικό τοίχωμα του ροδοφύκου περιέχει τον πολυσακχαρίτη καραγενάνη (carrageenan), ο οποίος εμφανίζεται με διαφορετικό βαθμό σουλφιδίωσης στις δύο φάσεις του κύκλου ζωής, δηλαδή το σποριόφυτο διαθέτει λ-κααραγενάνη, ενώ το γαμετόφυτο κ-κααραγενάνη. Το παράσιτο, κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης, διασπά το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή με τη βοήθεια υδρολυτικών ενζύμων. Τα ολιγομερή λ-κααραγενάνης που απελευθερώνονται από το κυτταρικό τοίχωμα του σποριόφυτου διεγείρουν την πρωτεϊνοσύνθεση και την παραγωγή παθογενετικών πολυπεπτιδίων στο παράσιτο (Bouarab και συν. 1999, 2001). Αντίθετα, τα ολιγομερή κ-κααραγενάνης πυροδοτούν την αναγνώριση του παράσιτου από το γαμετόφυτο και την

ενεργοποίηση αμυντικών γονιδίων που το καθιστούν ανθεκτικό στη μόλυνση (Bouarab και συν. 1999, 2001).

Έχει περιγραφεί ένα ακόμη παράδειγμα, όπου η σουλφιδίωση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος φαίνεται να εμπλέκεται στον μηχανισμό αναγνώρισης του φύκου από το παράσιτο. Η πορφυράνη (porphyran) είναι το άγαρ στη σουλφιδιωμένη του μορφή και αποτελεί κοινό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των ροδοφυκών της τάξης Bangiales. Ο πολυσακχαρίτης αυτός διεγείρει την εγκύστωση και το σχηματισμό της πλάκας προσκόλλησης του ωομύκητα *Pythium porphyrae* κατά τη μόλυνση του ροδοφύκου *Porphyr a yezoensis* (Urralapati και συν. 2000, 2001α, 2001β). Πειράματα επώασης μολυσμένων φυκών με το ουδέτερο μόριο της αγαρόζης αποκαλύπτουν ότι ο σχηματισμός της πλάκας προσκόλλησης του ωομύκητα δεν ολοκληρώνεται απουσία της θειικής ομάδας, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία της σουλφιδίωσης στο μηχανισμό αναγνώρισης του ξενιστή από το παράσιτο (Urralapati και συν. 2000, 2001α, 2001β).

Νέα δεδομένα υποστηρίζουν τη συμμετοχή της αλληλεπίδρασης λεκτίνης-μονοσακχαρίτη στο μηχανισμό της αναγνώρισης ροδοφυκών από τον ωομύκητα *Olpidiopsis* sp., ο οποίος μολύνει τα ακραία κύτταρα του ροδοφύκου *Heterosiphonia japonica* (Klochkova και συν. 2011). Πειράματα χρώσης με τη συμπληρωματική της μαννόζης λεκτίνη ConA παρουσιάζουν έντονο φθορισμό στα ακραία κύτταρα του ροδοφύκου και το εύρημα συσχετίζει τον μηχανισμό αναγνώρισης του ξενιστή από το παράσιτο με τον τύπο του κυττάρου. Οι Klochkova και συν. (2011) έδειξαν ότι επώαση με α-μαννοσιδάση εμποδίζει την προσκόλληση του ζωοσπορίου στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή και προτείνουν την ύπαρξη ενός υποδοχέα λεκτίνης (lectin receptor) στην πλασματική μεμβράνη του ζωοσπορίου που προσδένεται με τη μαννόζη του κυτταρικού τοιχώματος του φύκου.

1.3.3. Αμυντική απόκριση φυκών στη μόλυνση

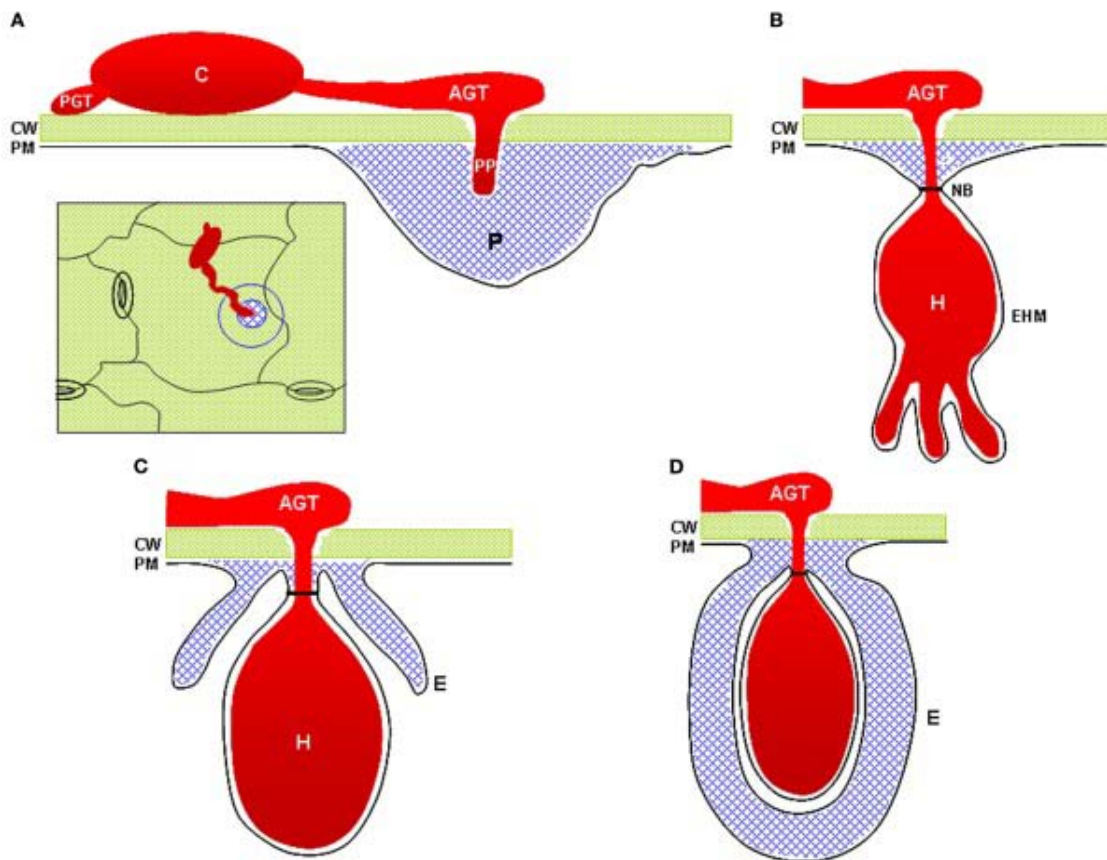
Η αναγνώριση του παθογόνου οργανισμού από τον ξενιστή ενεργοποιεί μία σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων στο εσωτερικό των κυττάρων του, δηλαδή διεγείρει την αμυντική απόκριση του ξενιστή έναντι της μόλυνσης. Στο ανοσοποιητικό σύστημα των ανώτερων φυτών και των μεταζώων, η πρώτη αμυντική αντίδραση που ενεργοποιείται αμέσως μετά την αναγνώριση

του παράσιτου είναι συνήθως η συσσώρευση ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS). Οι ROS έχουν διπλό ρόλο: αφενός εκδηλώνουν τοξική δράση η οποία καταπολεμά άμεσα τους παθογόνους μικροοργανισμούς και αφετέρου λειτουργούν ως σηματοδότες για την ενεργοποίηση ποικίλων βιοχημικών μονοπατιών με έμμεσο τρόπο. Σύγχρονες μελέτες σε ανώτερα φυτά δείχνουν ότι οι κυριότερες πρωτεΐνες για την παραγωγή των ROS είναι οι προσδεδεμένες στο πλασμαλήμμα υπεροξειδάσες (peroxidase) και η NADPH οξειδάση (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate – NADPH oxidase) (Bolwell 1999). Μόλις πρόσφατα, έρευνες σε μεγάλο αριθμό φυκών καταγράφουν την εμφάνιση οξειδωτικής έκρηξης ως αποτέλεσμα της αμυντικής απόκρισης του οργανισμού στη βιοτική καταπόνηση, γεγονός που υποδηλώνει τον συντηρητικό χαρακτήρα του εν λόγω μηχανισμού (Potin 2008). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στο φαιοφύκος *L. digitata* ενεργοποιείται η οξειδωτική έκρηξη ύστερα από ανίχνευση ολιγομερών αλγινικού οξέος (Kürper και συν. 2001). Πειράματα ανάσχεσης της NADPH οξειδάσης με τη χρήση του αναστολέα diphenylene iodonium (DPI) οδηγούν σε μείωση της οξειδωτικής έκρηξης στο *L. digitata* (Kürper και συν. 2001). Ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται σε πολλές ακόμη περιπτώσεις φυκών, όπως στο φαιοφύκος *Fucus* sp., στο δινομαστιγωτό *Peridinium gatunense* και στα ροδοφύκη *Gracilaria conferta* και *Chondrus crispus* (Bouarab και συν. 1999· Vardi και συν. 1999· Nikaïdo και συν. 2000· Coelho και συν. 2002). Επιπλέον, στο *C. crispus* έχει εντοπιστεί το γονίδιο *Ccrboh* το οποίο είναι ομόλογο του *gp91^{phox}* του ανθρώπινου γονιδιώματος και κωδικοποιεί μία πρωτεϊνική υπομονάδα της NADPH οξειδάσης. Όταν το ροδοφύκος μολύνεται από το παράσιτο *A. operculata*, το *Ccrboh* διεγείρεται και εκφράζεται για τις πρώτες 24 ώρες της μόλυνσης (Hervé και συν. 2006). Επιπρόσθετα, φαρμακολογικές έρευνες στα *L. digitata*, *G. conferta* και *C. crispus* δείχνουν ότι η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης συνδέεται με την ενεργοποίηση ιοντικών καναλιών (Na^+ , K^+ , H^+ , ρίζες αλογόνου), τη μεταφορά ασβεστίου και τη δράση φωσφολιπασών και πρωτεϊνικών κινασών (Bouarab και συν. 1999· Kürper και συν. 2001· Weinberger και συν. 2005). Από το σύνολο των παραπάνω προκαταρκτικών αποτελεσμάτων προκύπτει ότι το ανοσοποιητικό σύστημα των φυκών μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά με αυτό των θηλαστικών, των εντόμων και των ανώτερων φυτών, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα

αμυντικά συστήματα εμφανίστηκαν ήδη από τα πρώτα εξελικτικά στάδια των ευκαρυωτικών οργανισμών (Potin και συν. 2002).

Στα φύκη, η οξειδωτική έκρηξη ως απάντηση σε ποικίλες καταπονήσεις, συνδέεται με την αυξημένη παραγωγή ιωδιούχων, βρωμιούχων ή χλωριούχων οργανικών ενώσεων, οι οποίες αναφέρονται με τον όρο «πτητικές αλογονούχες οργανικές ενώσεις» (volatile halogenated organic compounds - VHOCs) (Mtolera και συν. 1996). Οι VHOCs προκύπτουν από την οξείδωση ριζών αλογόνου (X[·]) σε υποαλογονώδη οξέα (HXO), μία αντίδραση η οποία καταλύεται από τις αλογονο-υπεροξειδάσες βαναδίου (vanadium haloperoxidases) (Butler 1998). Τα ροδο- και τα φαιοφύκη διαθέτουν πληθώρα τέτοιων υπεροξειδασών με ιωδιούχο και βρωμιούχο δράση (Butler 1998). Οι VHOCs θεωρούνται μέρος της χημικής άμυνας των φυκών έναντι στη μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ η δράση των αλογονο-υπεροξειδασών βαναδίου σχετίζεται με την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (Cosse και συν. 2007).

Η δημιουργία τραύματος στο κυτταρικό τοίχωμα των ανώτερων φυτών λόγω της προσβολής από παρασιτικούς οργανισμούς διεγείρει ποικίλους μηχανισμούς άμυνας. Ορισμένα βιοχημικά μονοπάτια των ανώτερων φυτών περιλαμβάνουν τη δράση λιπαρών οξέων και οξυλιπιδίων, όπως οι προσταγλανδίνες. Αντίστοιχες αμυντικές αποκρίσεις αναφέρονται σε διάφορα είδη φυκών (Potin και συν. 2002· Cosse και συν. 2007· Potin 2008· Thomas και συν. 2014). Ωστόσο, η πιο κοινή αμυντική στρατηγική που συναντάται σε ανώτερα φυτά είναι η εναπόθεση τοιχωματικού υλικού και ο σχηματισμός χαρακτηριστικής θηλής (papilla) στην περιοχή κάτω από το τραύμα της προσβολής από μύκητες ή ωομύκητες (Underwood 2012). Η καλλόζη είναι ένα πολυμερές β-1,3 γλυκάνης και αποτελεί το συνηθέστερο τοιχωματικό υλικό που αποτίθεται σε αφθονία στο σημείο της προσβολής, στην προσπάθεια του φυτού να εμποδίσει τη διείσδυση του παράσιτου στο εσωτερικό του (Underwood 2012). Η ταχύτητα αντίδρασης του φυτού στην μόλυνση σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα του μηχανισμού άμυνας. Έτσι, παρατηρούνται επιτυχείς αποκρίσεις όπου η δημιουργία θηλής στο σημείο διείσδυσης του παράσιτου εμποδίζει πλήρως την είσοδο των δομών με τις οποίες μολύνει το εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή, αλλά και ανεπιτυχείς αποκρίσεις που εντέλει δεν αποτρέπουν την μόλυνση (Εικόνα Ι.32). Έως τώρα, η στρατηγική

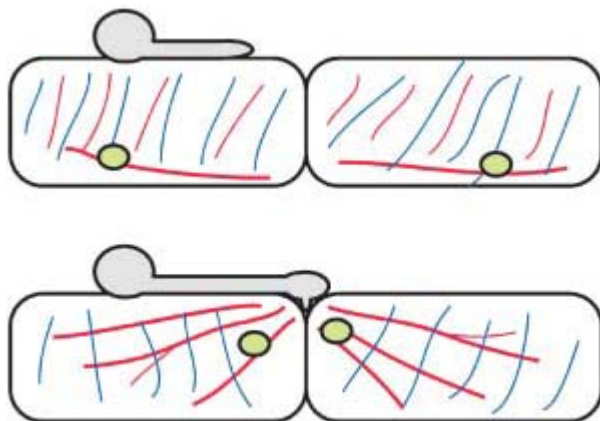


Εικόνα 1.32. Δομές του κυτταρικού τοιχώματος που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση μεταξύ ανώτερων φυτών και μυκήτων ή ωομυκήτων. Α. Εναπόθεση τοιχωματικού υλικού (μπλε χρώμα) εμποδίζει τη διείσδυση του μύκητα στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Η ένθετη εικόνα δείχνει την περιοχή της προσβολής σε κάτοψη. Β. Μία επιτυχής διείσδυση του παράσιτου όπου η απομυζητική δομή (haustorium) έχει εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Η εναπόθεση τοιχωματικού υλικού περιβάλλει μόνο ένα μικρό τμήμα του μίσχου της απομυζητικής δομής. Γ. Μερική εναπόθεση τοιχωματικού υλικού γύρω από απομυζητική δομή μύκητα που έχει διεισδύσει επιτυχώς στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή. Δ. Θηλή περιβάλλει πλήρως την απομυζητική δομή του μύκητα, εμποδίζοντας την προσβολή. CW: κυτταρικό τοίχωμα, PM: πλασματική μεμβράνη, C: κονιδιοσπόριο, PGT: πρωτογενής σωληνοειδής προεκβολή (δεν αναπτύσσονται σε όλα τα είδη ωομυκήτων ή μυκήτων), AGT: προσκολλητική σωληνοειδής δομή, PP: δομή διείσδυσης, H: απομυζητική δομή, EHM: εξωτερική μεμβράνη απομυζητικής δομής, NB: μίσχος απομυζητικής δομής, P: θηλή (εναπόθεση τοιχωματικού υλικού), E: εναπόθεση τοιχωματικού υλικού υπό μορφή έγκλεισης του παράσιτου (τροποποιημένο από Underwood 2012).

εναπόθεσης τοιχωματικού υλικού ως αμυντική απόκριση στον τραυματισμό δεν έχει καταγραφεί σε φύκη.

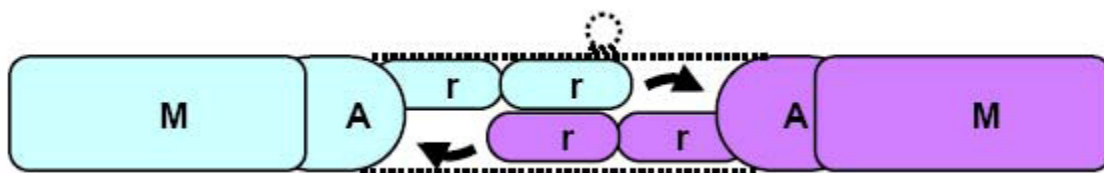
Πριν από το σχηματισμό της θηλής, πραγματοποιείται ταχεία μετατόπιση των υποκυτταρικών στοιχείων του φυτού προς την πλευρά της προσβολής. Η συσώρευση κυτοπλασματικού υλικού (cytoplasmic aggregation) στο σημείο της μόλυνσης, αποτελεί έναν ακόμη κοινό αμυντικό μηχανισμό των ανώτερων φυτών έναντι της βιοτικής καταπόνησης

(Takemoto και συν. 2003). Ο κυτταροσκελετός συμμετέχει καθοριστικά στη μετατόπιση των οργανιδίων και ο ρόλος του στην εν λόγω αμυντική απόκριση έχει μελετηθεί επισταμένως (Takemoto και Hardham 2004, Kobayashi και Kobayashi 2008). Λεπτομερέστερα, η αλλαγή στη διάταξη των ΜΑ του φυτού κατά την προσπάθεια διείσδυσης του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή υποβοηθά στη μετακίνηση του πυρήνα του ξενιστή προς το σημείο της προσβολής (Εικόνα 1.33, βλέπε επίσης Takemoto και Hardham 2004). Πειράματα με χρήση του αναστολέα της ακτίνης κυτοχλασίνη Β αποκαλύπτουν τον πρωταγωνιστικό ρόλο της ακτίνης στο μηχανισμό συσσώρευσης κυτοπλασματικού υλικού, στο σχηματισμό θηλής, καθώς και στην απόκριση υπερευαίσθησίας του φυτού (Takemoto και Hardham 2004). Αντίθετα, ο ρόλος του κυτταροσκελετού των ΜΣ στην αμυντική απόκριση των ανώτερων φυτών δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Κατά τη διαδικασία της μόλυνσης, αναφέρεται μεγάλη ποικιλομορφία στην οργάνωση των ΜΣ, όπως για παράδειγμα ο αποπολυμερισμός των ΜΣ και η κάθετη ή ακτινωτή αναδιάταξή τους προς το σημείο της προσβολής (Kobayashi και Kobayashi 2008). Σε κάποια συστήματα η οργάνωση των ΜΣ παραμένει ανεπηρέαστη μετά την προσβολή (Εικόνα 1.33), ενώ έχουν αναφερθεί περιπτώσεις πλήρους αποδιοργάνωσης των ΜΣ (Takemoto και Hardham 2004). Όσον αφορά στα φύκη, ως τώρα υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα που υποστηρίζουν τη μετατόπιση οργανιδίων προς το σημείο της προσβολής, όπως για παράδειγμα η πρόσφατη αναφορά ενός γονιδίου του *E. siliculosus* που σχετίζεται με τη μετανάστευση του πυρήνα προς τον θαλλό του *E. dicksonii* στα πρώτα στάδια της μόλυνσης (Grenville-Briggs και συν. 2011), ενώ η συμμετοχή του κυτταροσκελετού στο μηχανισμό παραμένει άγνωστη.



Εικόνα 1.33. Διαγραμματική απεικόνιση της συμμετοχής του κυτταροσκελετού στον μηχανισμό κυτοπλασματικής συσσώρευσης σε ανώτερα φυτά που πλήττονται από μύκητες ή ωομύκητες. Η επάνω εικόνα δείχνει τη δομή του κυτταροσκελετού πριν την προσπάθεια διείσδυσης του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Η κάτω εικόνα παρουσιάζει τη μετατόπιση του πυρήνα (πράσινο), την αναδιάταξη των μικρονηματίων ακτίνης (κόκκινο) και την οργάνωση των μικροσωληνίσκων (μπλε), η οποία παραμένει ανεπηρέαστη (τροποποιημένο από Takemoto και Hardham 2004).

Μία ακόμη έκφραση αντίστασης των ανώτερων φυτών στην παθογένεια είναι η απόκριση υπερευαίσθησίας (ΥΑ – hypersensitive response), μία μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ο οποίος επάγεται σε κύτταρα της μολυσμένης περιοχής του φυτού και διακόπτει την εξάπλωση της ασθένειας (Heath M.C. 2000). Η ανίχνευση παθογενετικών παραγόντων του παράσιτου από το φυτικό κύτταρο, διεγείρει την έκφραση γονιδίων αντίστασης (resistance genes – R genes), τη ροή ιόντων, την οξειδωτική έκρηξη και την υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Goodman και Novacky 1994, Heath 2000). Το σύνολο των αλυσιδωτών αντιδράσεων πυροδοτεί εντέλει την ΥΑ, η οποία συνοδεύεται από θανάτωση του κυττάρου και απόθεση καλλόξης περιμετρικά των τραυματισμών (Vleeshouwers και συν. 2000). Η ΥΑ είτε αποτελεί μέρος της γενικευμένης άμυνας του φυτού έναντι ποικίλων παράσιτων, όπως αντίστοιχα η πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος ή ο σχηματισμός θηλής στο σημείο της προσβολής, είτε σχετίζεται με τη στοχευμένη απόκριση του ξενιστή έναντι συγκεκριμένων παθογόνων οργανισμών (Vleeshouwers και συν. 2000). Στα φύκη υπάρχουν ως τώρα ελάχιστες αναφορές έκφρασης της ΥΑ. Ωστόσο, τα δεδομένα αφορούν κυρίως σε αντιπροσώπους των Ετερόκοντων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ΥΑ αποτελεί έναν συντηρημένο αμυντικό μηχανισμό του φύλου. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι το διάτομο *Asterionella formosa* επάγει την ΥΑ ως απάντηση στην μόλυνση από χυτρινδιομύκητες (Ibelings και συν. 2004). Ακόμη, φαιοφύκη των τάξεων Ectocarpales, Laminariales, Tilopteridales και Discosporangiales επιδεικνύουν μερική αντίσταση στον ωομύκητα *Eurychasma dicksonii* μέσω της ΥΑ (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα Gachon και συν.). Οι Gachon και συν. αναφέρουν ότι μετά τη θανάτωση του κυττάρου ακολουθεί μία διαδικασία αναγέννησης (regeneration) του



Εικόνα 1.34. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας αναγέννησης του νεκρού κυττάρου του θαλλού ύστερα από την έκφραση ΥΑ. Η εικόνα παρουσιάζει το πρότυπο που ακολουθούν τα γειτονικά κύτταρα κατά τη βλάστηση προς την περιοχή του νεκρού κυττάρου. Μ: μητρικό κύτταρο, Α: ακραίο κύτταρο, r: ριζοειδές κύτταρο. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της αύξησης του κυττάρου (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα – Gachon και συν.).

θαλλού στις απονεκρωμένες περιοχές, η οποία πραγματοποιείται με βλάστηση των γειτονικών κυττάρων προς τα νεκρά κύτταρα (Εικόνα Ι.34). Σύμφωνα με το πρότυπο αναγέννησης της Εικόνας Ι.34, τα δύο κύτταρα που βρίσκονται εκατέρωθεν των νεκρών κυττάρων (μητρικά), διαιρούνται ασύμμετρα και δίνουν δύο ακραία κύτταρα. Εάν η απονεκρωμένη περιοχή του νήματος είναι μικρή, τότε τα δύο ακραία κύτταρα που προέκυψαν από την κυτταρική διαίρεση καταλαμβάνουν το σύνολο του προϋπάρχοντος κενού χώρου. Σε αντίθετη περίπτωση, δηλαδή όταν η απονεκρωμένη περιοχή του νήματος αποτελείται από πολλά νεκρά κύτταρα σε σειρά, τα δύο ακραία κύτταρα διαιρούνται ασύμμετρα και δίνουν δύο ριζοειδή κύτταρα. Τα ριζοειδή κύτταρα διαιρούνται εκ νέου αρκετές φορές έως ότου καλυφθεί πλήρως ο κενός χώρος που καταλάμβαναν προηγουμένως τα νεκρά κύτταρα. Έτσι, επάγεται η αναγέννηση των κυττάρων λόγω του τραυματισμού από τον κυτταρικό θάνατο.

Τέλος, πλήθος εργασιών υπογραμμίζει τη σημασία φυτοορμονών και συναφών βιομοριών με ορμονική δράση στην άμυνα των φυτικών οργανισμών έναντι της βιοτικής καταπόνησης (για λεπτομέρειες βλέπε την ανασκόπηση Bari και Jones 2009). Οι χημικές ουσίες αυξίνη, σαλικυλικό οξύ, ιασμονικό οξύ, αιθυλένιο, αμπισισικό οξύ, γιββεριλίνη και κυτοκινίνη εμπλέκονται σε ποικίλα βιοχημικά μονοπάτια των φυτικών κυττάρων και ρυθμίζουν τη διαδικασία της ανάπτυξης, καθώς και την άμυνα του φυτού σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Bari και Jones 2009). Όπως έχει δειχθεί μόλις πρόσφατα, αντίστοιχοι αμυντικοί μηχανισμοί φαίνεται ότι υπάρχουν και στα φύκη, όπου οι φυτοορμόνες ενεργοποιούν την έκφραση αμυντικών γονιδίων. Λεπτομερέστερα, ανάλυση της έκφρασης γονιδίων με μικροσυστοιχίες στο ροδοφύκος *Chondrus crispus* ύστερα από επίδραση με μεθυλ-ιασμονικό οξύ αποκαλύπτει την ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του οργανισμού απέναντι στη βιοτική καταπόνηση (Collén και συν. 2006). Επιπλέον, οι Küpper και συν. (2009) αναφέρουν ότι επίδραση με μεθυλ-ιασμονικό οξύ σε θαλλούς του *Laminaria digitata* επάγει την οξειδωτική έκρηξη στα κύτταρα του φαιοφύκους. Ωστόσο, η προσπάθεια ενεργοποίησης αμυντικών αποκρίσεων μέσω επίδρασης με ιασμονικό και μεθυλ-ιασμονικό οξύ στα φαιοφύκη *Dictyota dichotoma*, *Colpomenia peregrina*, *Ectocarpus fasciculatus*, *Fucus vesiculosus*, *Himanthalia elongata*, *Saccharina latissima* και *Sargassum muticum* δεν απέδωσε θετικά αποτελέσματα (Weisemeir και συν. 2008). Συνεπώς, καθίσταται σαφές ότι τα ελλιπή δεδομένα που αφορούν

στις αμυντικές αποκρίσεις των φυκών και στη συμμετοχή των φυτοορμονών, δεν επιτρέπουν προς το παρόν την εύκολη εξαγωγή συμπερασμάτων και τη γενίκευση αμυντικών προτύπων στα φύκη. Είναι γεγονός ότι η μεγάλη ποικιλία των εμπλεκόμενων βιοχημικών μονοπατιών, μερικά από τα οποία πιθανώς να λειτουργούν ανταγωνιστικά μεταξύ τους, παραμένει ως επί το πλείστον ανεξερεύνητη.

Ι.4 Αντικείμενο μελέτης

Από όλα τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι οι πληροφορίες που αφορούν στην παθογένεια των φυκών, και ειδικότερα των φαιοφυκών, παραμένουν ως τώρα ελλιπείς και αποσπασματικές. Ταυτόχρονα, η όλο και μεγαλύτερη αναγνώριση της οικολογικής και οικονομικής αξίας των θαλάσσιων φυκών δημιουργεί την επιτακτική ανάγκη επισταμένης μελέτης των σχετικών παθογενετικών συστημάτων. Ο ωομύκητας *Eurychasma dicksonii* είναι ένας παθογόνος μικροοργανισμός των φυκών, ο οποίος λόγω του μεγάλου εύρους ξενιστών έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Ωστόσο, παρά τις πρώτες έρευνες που αφορούν στη μορφολογία, τη δομή και τη φυλογενετική του κατάταξη, ένας σημαντικός αριθμός χρήσιμων πληροφοριών τόσο για το συγκεκριμένο είδος όσο και για την κλάση των ωομυκήτων στο σύνολό της, παραμένει ανεξερεύνητος. Ο μηχανισμός μόλυνσης, η διαδικασία ζωοσποριογένεσης, η συμμετοχή του κυτταροσκελετού και οι αλληλεπιδράσεις του θαλάσσιου ωομύκητα με τους ξενιστές του, είναι μερικά μόνο από τα κεφάλαια που χρήζουν περαιτέρω μελέτης.

Για το λόγο αυτό, η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει επικεντρωθεί στην αποσαφήνιση βασικών σημείων του μηχανισμού μόλυνσης του *E. dicksonii*, καθώς και στη διερεύνηση πιθανών αποκρίσεων του ξενιστή στην προσβολή. Οι αμυντικές αντιδράσεις του ξενιστή ελέγχθηκαν σε 12 κλώνους φαιοφυκών, οι οποίοι μολύνονται από τον ωομύκητα *E. dicksonii* και αποτελούν αντιπροσώπους 4 τάξεων της κλάσης. Ακόμη, ένας εκ των 12 κλώνων είναι ο *Ectocarpus siliculosus* (Culture Collection of Algae and Protozoa - CCAP 1310/4), του οποίου το γονιδίωμα έχει χαρτογραφηθεί πλήρως (Cock και συν. 2010). Η επιλογή των εν λόγω κλώνων επιτρέπει αφενός την εξαγωγή συμπερασμάτων για την πιθανή εξελικτική πορεία των αμυντικών αποκρίσεων στην κλάση των φαιοφυκών και αφετέρου την μοριακή διασταύρωση των μικροσκοπικών ευρημάτων, χάρη στα υπάρχοντα δεδομένα που προκύπτουν από τις αλληλουχίες του *E. siliculosus*. Συνεπώς, ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής εργασίας συνοψίζεται στα εξής βασικά σημεία:

- Μικροσκοπική μελέτη των σταδίων μόλυνσης του *E. dicksonii* με σκοπό την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού προσβολής του παράσιτου. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στα

αρχικά στάδια και τη διαδικασία εγκύστωσης, προσκόλλησης και διείσδυσης του παθογόνου μικροοργανισμού στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή.

- Διερεύνηση της συμμετοχής του κυτταροσκελετού (ΜΣ και ΜΑ) στη διαδικασία της μόλυνσης και μελέτη του ρόλου του ως εργαλείου άμυνας του ξενιστή έναντι της προσβολής από τον ωομύκητα.
- Μελέτη της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου και πειράματα ανάσχεσης της προσβολής με μονοσακχαρίτες, με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν σε πιθανούς μηχανισμούς αναγνώρισης μεταξύ φύκους και ωομύκητα.
- Πειράματα επίδρασης με φυτοορμόνες σε καλλιέργειες φαιοφυκών που μολύνονται από τον ωομύκητα *E. dicksonii* και αποσκοπούν στην έρευνα των πιθανών αμυντικών αποκρίσεων του ξενιστή έναντι της προσβολής.

Εν κατακλείδι, η παρούσα διδακτορική εργασία βασίζεται στη μελέτη της δομής και της ανάπτυξης ξενιστή και παράσιτου κατά τη διαδικασία μόλυνσης φαιοφυκών από τον ωομύκητα *E. dicksonii* και αποσκοπεί στη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών προσβολής, αναγνώρισης και αμυντικής απόκρισης.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1. Φυτικό υλικό

II.1.1. Είδη και στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

Για τις ανάγκες των πειραμάτων χρησιμοποιούνται δώδεκα στελέχη φαιοφυκών που ανήκουν σε 4 διαφορετικές τάξεις και τρία στελέχη του ωομύκητα *Eurychasma dicksonii* (Πίνακας 1). Η επιλογή των συγκεκριμένων στελεχών βασίζεται σε προηγούμενα πειραματικά δεδομένα (Müller και συν. 1999, Gachon και συν. 2009). Όπως έχει βρεθεί, σε εργαστηριακές συνθήκες ο ωομύκητας *Eurychasma dicksonii* μολύνει πάνω από 45 είδη φαιοφυκών που προέρχονται από 13 τάξεις (Müller και συν. 1999). Μάλιστα, το εύρος της συμπτωματολογίας περιλαμβάνει από πλήρως ευπαθείς έως πλήρως ανθεκτικές στην μόλυνση καλλιέργειες φυκών (Gachon και συν. 2009). Κατά συνέπεια, η επιλογή στελεχών πραγματοποιείται με σκοπό την αντιπροσώπευση διαφορετικών τάξεων φαιοφυκών και την κάλυψη ευρέος φάσματος παθογένειας.

Όλα τα στελέχη χορηγήθηκαν από τη Συλλογή Καλλιεργειών Φυκών και Πρωτοζώων (Culture Collection of Algae and Protozoa - CCAP, Oban, Σκωτία) με τη χρηματοδότηση του Συνδέσμου Ευρωπαϊκών Θαλάσσιων Βιολογικών Εργαστηρίων (Association of European Marine Biological Laboratories, ASSEMBLE). Τα είδη διατηρούνται υπό μορφή μονοκαλλιέργειας σε θαλάμους καλλιεργειών του Τομέα Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι καλλιέργειες περιλαμβάνουν τόσο μη μολυσμένο υλικό φαιοφυκών (μάρτυρας) όσο και μολυσμένο από τον *E. dicksonii*.

II.1.2. Καλλιέργεια πειραματικού υλικού

Η καλλιέργεια του πειραματικού υλικού πραγματοποιείται σε δοχεία τύπου φλάσκα (flasks) των 50, 250 και 600 ml. Στα δοχεία μεγαλύτερου όγκου διατηρούνται είδη μη μολυσμένων φαιοφυκών, των οποίων το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται μία φορά τον μήνα και λειτουργούν, έτσι, ως καλλιέργειες ασφαλείας (stock). Στις φλάσκες των 50 και 250 ml τοποθετούνται μολυσμένα και μη μολυσμένα φύκη τα οποία ανακαλλιεργούνται ανά εβδομάδα (βλέπε II.1.4).

Πίνακας 1. Σύνολο κλώνων φαιοφυκών και ωομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω διδακτορική διατριβή.

Φαιοφύκη	CCAP strain	Τάξη	Οικογένεια
<i>Pylaiella littoralis</i> (Linnaeus) Kjellman	1330/3	Ectocarpales	Acinetosporaceae
<i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) C.Agardh	1323/1	Laminariales	Laminariaceae
<i>Ectocarpus siliculosus</i> (Dillwyn) Lyngbye	1310/4	Ectocarpales	Ectocarpaceae
<i>Ectocarpus crouniorum</i> Thuret	1310/300	Ectocarpales	Ectocarpaceae
<i>Ectocarpus siliculosus</i> (Dillwyn) Lyngbye	1310/56	Ectocarpales	Ectocarpaceae
<i>Ectocarpus siliculosus</i> (Dillwyn) Lyngbye	1310/214	Ectocarpales	Ectocarpaceae
<i>Ectocarpus fasciculatus</i> Harvey	1310/13	Ectocarpales	Ectocarpaceae
<i>Ectocarpus siliculosus</i> (Dillwyn) Lyngbye	1310/299	Ectocarpales	Ectocarpaceae
<i>Tilopteris mertensii</i> (Turner) Kützinger		Tilopteridales	Tilopteridaceae
<i>Choristocarpus tenellus</i> Zanardini		Discosporangiales	Choristocarpaceae
<i>Acinetospora crinite</i> (Carmichael) Sauvageau		Ectocarpales	Acinetosporaceae
<i>Laminaria digitata</i> (Hudson) J.V.Lamouroux		Laminariales	Laminariaceae
Ωομύκητες			
<i>Eurychasma dicksonii</i> (E.P. Wright) Magnus	4018/1	Myzocytiosidales	Eurychasmataceae
<i>Eurychasma dicksonii</i> (E.P. Wright) Magnus	4018/2	Myzocytiosidales	Eurychasmataceae
<i>Eurychasma dicksonii</i> (E.P. Wright) Magnus	4018/3	Myzocytiosidales	Eurychasmataceae

Ο επωαστικός θάλαμος όπου διατηρούνται διαθέτει σταθερές συνθήκες: 12 °C, φωτοπερίοδο 12:12 (φως:σκοτάδι) και ένταση φωτός 10-15 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Να σημειωθεί, ότι η ένταση φωτός των 10 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ενώ ευνοεί την ανάπτυξη του *E. dicksonii*, θεωρείται χαμηλή για την ανάπτυξη των φαιοφυκών. Για τον λόγο αυτό, οι μολυσμένες καλλιέργειες τοποθετούνται σε

συγκεκριμένο χώρο του θαλάμου, όπου η λάμπα φωτισμού καλύπτεται μερικώς με αλουμινόχαρτο έτσι ώστε να αποδίδει ένταση ίση με $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

II.1.3. Μέσο καλλιέργειας

Το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των παραπάνω ειδών είναι 1% κ.ο. διαλύμα Provasoli σε θαλασσινό νερό (PES - Provasoli Enriched Seawater, Andersen και συν. 2005). Πιο συγκεκριμένα, θαλασσινό νερό συλλέγεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα από ακτές της Αττικής και διατηρείται σε πλαστικά δοχεία και θερμοκρασία 20°C . Το τελικό μέσο καλλιέργειας προετοιμάζεται σε γυάλινα δοχεία Duran του 1L για πρακτικούς λόγους. Έτσι, με τη βοήθεια ενός απλού διηθητικού χαρτιού και ενός χωνιού, διηθούνται 990 ml θαλασσινού νερού και προστίθενται 10 ml διαλύματος Provasoli. Στη συνέχεια, τα μπουκάλια Duran μεταφέρονται στο αυτόκαυστο για αποστείρωση.

Για την παρασκευή του διαλύματος Provasoli ετοιμάζονται αρχικά τα τέσσερα διαλύματα του Πίνακα 2. Το τελικό διάλυμα προκύπτει από τη μίξη των τεσσάρων διαλυμάτων σύμφωνα με τις αναλογίες του Πίνακα 2. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH του τελικού διαλύματος στο 7,8 και αποστειρώνεται. Να σημειωθεί ότι η προσθήκη του διαλύματος Provasoli στο διηθημένο θαλασσινό νερό κατά τη διαδικασία παρασκευής του μέσου καλλιέργειας πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow) και ότι το διάλυμα Provasoli μπορεί να αποστειρώνεται πολλές φορές χωρίς να προκαλούνται μεταβολές στη σύστασή του (Starr 1978).

II.1.4. Ανακαλλιέργειες

Όλες οι μονοκαλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για τα πειράματα ανακαλλιεργούνται σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής προκειμένου να αποφεύγονται τυχόν μολύνσεις από βακτήρια και λοιπούς μικροοργανισμούς. Για το λόγο αυτό τηρούνται αυστηρές διαδικασίες που περιλαμβάνουν: αποστείρωση βελονών και γυάλινων πιπετών, καθαρισμό της επιφάνειας εργασίας με υδατικό διάλυμα 70% κ.ο. αιθανόλης, χρήση λύχνου Bunsen. Κάθε μία εβδομάδα το μέσο καλλιέργειας της φλάσκας ανανεώνεται ενώ πραγματοποιείται

Πίνακας 2. Σύσταση του θρεπτικού διαλύματος Provasoli (Andersen και συν.2005).

Συστατικά	Μοριακότητα	gr συστατικού σε τελικό όγκο 5 l
Διάλυμα Α		
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,00 μM	0,585
TITRIPLEX III	5,40 μM	0,500
Διάλυμα Β		
H_3BO_3	61,40 μM	0,950
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,60 μM	0,041
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,20 μM	0,136
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,26 μM	0,018
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,06 μM	0,004
TITRIPLEX III	8,95 μM	0,833
Διάλυμα Γ		
BITAMINH B ₁₂	44,27 nM	0,0003
ΘΕΙΑΜΙΝΗ	9,49 μM	0,0160
BIOTINH	1,23 μM	0,0015
TRIS	0,55 μM	16,670
Διάλυμα Δ		
NaNO_3	0,55 μM	11,670
$\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	21,80 μM	1,660

τεμαχισμός των θαλλών με τη χρήση βελονών. Ο τεμαχισμός που προκαλείται από μηχανική πίεση οδηγεί τους νηματοειδείς θαλλούς σε βλαστητική αναπαραγωγή. Ανά περιόδους (30-40 ημέρες), οι θαλλοί μεταφέρονται σε καινούριες φλάσκες με τη βοήθεια γυάλινων πιπετών. Όσον αφορά στις μολυσμένες καλλιέργειες, η μόλυνση των ξενιστών γίνεται με τη χρήση ήδη μολυσμένων θαλλών-εμβολίων (inoculum). Ως βασικό μέσο εμβολιασμού του παράσιτου στις προς μόλυνση καλλιέργειες-στόχους χρησιμοποιείται το γαμετόφυτο του είδους *Macrocystis pyrifera* (CCAP 1323/1), το οποίο δεν παράγει κινητά ζωοσπόρια και παρουσιάζει πλήρη

συμβατότητα με τα τρία στελέχη *E. dicksonii* που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή (Gachon και συν. 2009).

II.2. Οπτική μικροσκοπία

II.2.1. Ειδικές χρώσεις

II.2.1.1. Χρώση κυτταρικού τοιχώματος

Για τη χρώση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου χρησιμοποιούνται οι χρωστικές κυανούν της ανιλίνης (aniline blue – Sigma, Taufkirchen, Germany) και Calcofluor White (Sigma).

Το κυανούν της ανιλίνης χρησιμοποιείται για τη χρώση β-1, 3 γλυκανών όπως για παράδειγμα η καλλόζη των ανωτέρων φυτών (Currier 1957). Ζωντανοί θαλλοί μεταφέρονται σε διάλυμα 150 μL KOH (1 mol. L^{-1}) και στη συνέχεια επωάζονται για 5 min στους 95 °C. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και επωάζονται σε διάλυμα κυανούν της ανιλίνης 0,025% κ.β. διαλυμένο σε KOH ή αιθανόλη (EtOH). Τα δείγματα τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και καλύπτονται με διάλυμα κατά της αλλοίωσης του φθορισμού (Slowfade, Invitrogen) (για πρωτόκολλο χρώσης βλέπε Navares και συν. 2007).

Το Calcofluor White είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μπλε φθορίζουσα χρωστική ουσία που προσδένεται σε γραμμικές β-1,4 γλυκάνες, δηλαδή κυρίως σε κυτταρίνη και χιτίνη (Wood 1980). Για τη χρώση των θαλλών, χρησιμοποιείται διάλυμα 1:10 Calcofluor White σε θαλασσινό νερό από το απόθεμα 0,25% κ.β. Fluorescent Brightener 28 σε απεσταγμένο νερό (Sigma). Αφήνονται για 3 min στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ακολουθούν τρεις πλύσεις των πέντε λεπτών με θαλασσινό νερό και κάλυψη με διάλυμα κατά της αλλοίωσης του φθορισμού (Slowfade).

II.2.1.2. Χρώση των μικρονηματίων ακτίνης (MA)

Η παρατήρηση των MA σε φύκη αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία, τόσο λόγω της ευαισθησίας των δομών όσο και της ιδιομορφίας των κυτταρικών τοιχωμάτων. Έτσι, αρχικά δοκιμάστηκαν ήδη δημοσιευμένα πρωτόκολλα που αφορούν είδη φαιοφυκών (Karyophyllis

και συν. 2000, Varvarigos και συν. 2005), τα οποία δεν είχαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό έγιναν αρκετές δοκιμές στους χρόνους των επωάσεων, τις συγκεντρώσεις των ενζύμων και του διαλύματος N'-ηλεκτριμίδυλο εστέρα του 3'-μηλεϊμιδοβενζοϊκού οξέος (3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimidylester - MBS, Sigma), το οποίο σταθεροποιεί τα MA (Sonobe και Shibaoka 1989, Karyophyllis και συν. 2000α), προκειμένου να βρεθεί το ιδανικό πρωτόκολλο για την παρατήρηση MA σε ξενιστή και παράσιτο. Η τροποποιημένη μορφή του πρωτοκόλλου Karyophyllis και συν. (2000α) που ακολουθεί, έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στη χρώση των MA του *E. dicksonii* κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, αλλά όχι σε μολυσμένα φαιοφύκη.

Πίνακας 3. Σύσταση του διαλύματος MTB.

Συστατικά	Μοριακότητα (σε 500 ml)	gr συστατικού (σε 500 ml)
PIPES	50 mM	7,560
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 mM	0,659
EGTA	5 mM	0,951
KCl	25 mM	0,930
NaCl	4 % κ.β.	20,000
Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP)	2,5 % κ.β.	12,500

Πίνακας 4. Σύσταση του διαλύματος PBS.

Συστατικά	Μοριακότητα (σε 500 ml)	gr συστατικού (σε 500 ml)
NaCl	137,0 mM	8,000
KCl	0,7 mM	0,052
Na ₂ HPO ₄	5,1 mM	0,720
KH ₂ PO ₄	1,7 mM	0,220
NaN ₂	0,01 % κ.β.	0,100

II.2.1.2.1. Σταθεροποίηση MA – στερέωση ξενιστή και παράσιτου

Οι παρακάτω διαδικασίες πραγματοποιούνται σε σωλήνες errendorf του 1ml. Νήματα των μολυσμένων από τον ωομύκητα θαλλών επωάζονται αρχικά σε σταθεροποιητικό διάλυμα 300 μM MBS σε ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης μικροσωληνίσκων (microtubule stabilizing buffer – MTB, Πίνακας 3) που περιλαμβάνει 0,1% κ.ο. Triton X-100 (Sigma), για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Ακολουθούν τρεις δεκάλεπτες πλύσεις με MTB. Στη συνέχεια, οι θαλλοί στερεώνονται σε διάλυμα 4% κ.β. παραφορμαλδεΐδης (Sigma), 0,2% κ.ο. γλουταραλδεΐδης (Sigma) και 2 U/ml της χρωστικής φαλλοϊδίνης Alexa Fluor® 568 (AFP 568, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) σε MTB για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις με MTB, MTB:ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer saline – PBS, Πίνακας 4) και PBS που διαρκούν δέκα min η κάθε μία.

II.2.1.2.2. Ενζυμική επώαση

Η ενζυμική επώαση πραγματοποιείται με διάλυμα που περιέχει 5% κ.β. abalone acetone powder (Sigma, discontinued), 3% κ.β. cellulase Onozuka R-10 (Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan), 1% κ.β. macerozyme R-10 (Yakult), 2% κ.β. hemicellulase (Sigma) σε PBS. Το διάλυμα αυτό φυγοκεντρείται και χρησιμοποιείται μόνο το διαυγές υπερκείμενο έτσι ώστε να αποφευχθούν τα υπολείμματα των ενζύμων. Σ' αυτό προστίθενται 5U/ml AFP 568 και οι θαλλοί επωάζονται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις πεντάλεπτες πλύσεις με PBS.

II.2.1.2.3. Εκχύλιση χρωστικών – επίστρωση πειραματικού υλικού σε καλυπτρίδες

Η εκχύλιση των χρωστικών γίνεται με τη χρήση διαλύματος 1% κ.ο. Triton X-100 για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το πειραματικό υλικό πλένεται 3 φορές με PBS για 10 min. Έως αυτό το σημείο, οι διαδικασίες πραγματοποιούνται σε σωλήνες errendorf του 1 ml. Παρατηρήθηκε ότι η χρήση Triton X-100 σε επιστρωμένα σε καλυπτρίδες φαιοφύκη οδηγεί στην αποκόλλησή τους από την καλυπτρίδα με αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικής ποσότητας υλικού σε κρίσιμο πειραματικό στάδιο. Έτσι, ενώ σε άλλα πρωτόκολλα η εκχύλιση

των χρωστικών ολοκληρώνεται μετά την επίστρωση του υλικού σε καλυπτρίδες, στο εν λόγω πρωτόκολλο η διαδικασία της εκχύλισης γίνεται σε σωλήνες erpendorf.

Ακολούθως, το εκχυλισμένο από τις χρωστικές πειραματικό υλικό μεταφέρεται σε καλυμμένες με πολυ-L-λυσίνη καλυπτρίδες. Με τη χρήση βελονών και γυάλινης ράβδου τα νήματα των θαλλών διαχωρίζονται και απλώνονται σε όλη την επιφάνεια της καλυπτρίδας, γεγονός που διευκολύνει αργότερα στην παρατήρηση των κυττάρων. Το πειραματικό υλικό αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει πλήρως.

II.2.1.2.4. Χρώση των MA – κάλυψη των κυττάρων

Μετά τη μεταφορά του υλικού στις καλυπτρίδες, γίνεται η χρώση των MA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται διάλυμα 10 U/ml AFP 568 σε PBS και η επώαση πραγματοποιείται είτε για 2 ώρες σε σκοτάδι και θερμοκρασία περιβάλλοντος ή προτιμότερα για όλη τη νύχτα στους 4°C.

Η περίσσεια της φθορίζουσας χρωστικής απομακρύνεται με τρεις δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και τα δείγματα τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες με υγρό κάλυψης (0,0024 gr P-PDA; p-phenylen-diamine, Sigma σε 1ml γλυκερόλη και 0,5 ml PBS). Στην περίπτωση που είναι αναγκαία η χρώση των πυρήνων ταυτόχρονα με τη χρώση των MA αυτή είναι εφικτή και πραγματοποιείται με διάλυμα Hoechst 33258 (βλέπε II.2.1.3.).

II.2.1.3. Χρώση του DNA

Για την παρατήρηση των πυρήνων ξενιστή και παράσιτου πραγματοποιείται χρώση του γενετικού υλικού με Hoechst 33258 (Molecular Probes) ή 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma). Για την ουσία Hoechst 33258 προετοιμάζεται ένα διάλυμα που λειτουργεί ως αποθεματικό, συγκέντρωσης 100 µg/ml σε PBS και για τη χρώση χρησιμοποιείται διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 5 µg/ml σε PBS το οποίο εφαρμόζεται στο πειραματικό υλικό για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι. Για την ουσία DAPI, ως αποθεματικό χρησιμοποιείται διάλυμα συγκέντρωσης 5 µg/ml, ενώ η τελική συγκέντρωση κατά τη χρώση είναι 5 µl/ml PBS για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι. Η διαδικασία πραγματοποιείται τόσο σε νωπό όσο και σε στερεωμένο υλικό. Στην περίπτωση του νωπού υλικού, οι τελικές αραιώσεις των διαλυμάτων πραγματοποιούνται με μέσο καλλιέργειας αντί του PBS.

II.2.2. Ανοσοφθορισμός

Για την ανοσοεντόπιση μικροσωληνίσκων και υδατανθράκων του κυτταρικού τοιχώματος, χρησιμοποιούνται τεχνικές έμμεσου ανοσοφθορισμού.

II.2.2.1. Ανοσοφθορισμός σωληνίνης

Για την ανοσοσήμανση της σωληνίνης ξενιστή και παράσιτου δοκιμάστηκαν πρωτόκολλα που έχουν εφαρμοστεί σε φαιοφύκη και επελέγη το ιδανικό για το πειραματικό σύστημα φαιοφυκών-ωομυκήτων. Το παρακάτω πρωτόκολλο αναφέρεται στο άρθρο Tsirigoti και συν. (2014) και αποτελεί μια προσαρμοσμένη στο πειραματικό υλικό της εν λόγω διατριβής μορφή του πρωτοκόλλου Katsaros και Galatis (1992).

II.2.2.1.1. Στερέωση των θαλλών

Για την ανοσοσήμανση της σωληνίνης, στερεώνονται θαλλοί φαιοφυκών μολυσμένοι από τον ωομύκητα *E. dicksonii* με 4% κ.β. παραφορμαλδεΐδη σε ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης μικροσωληνίσκων MTB για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν πλύσεις των δειγμάτων με MTB και στη συνέχεια με βαθμιαία αντικατάσταση του MTB, πραγματοποιούνται πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

II.2.2.1.2. Ενζυμική επώαση - εκχύλιση χρωστικών

Μετά τις πλύσεις, τα δείγματα μεταφέρονται σε ενζυμικό διάλυμα που περιέχει 6% κ.β. abalone acetone powder (Sigma, discontinued) 4% κ.β. κυτταρινάση (cellulase Onozuka R-10, Yakult), 5% κ.β. limpet acetone powder (Sigma, discontinued), 5% κ.β. ημικυτταρινάση (hemicellulase - Sigma), 2% κ.β. macerozyme R-10 (Yakult) και 2% κ.β. πηκτινάση (pectinase - Sigma) σε PBS και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h. Μετά την ενζυμική επώαση, τα δείγματα πλένονται με PBS και ακολουθεί εκχύλιση των χρωστικών με διάλυμα 4% κ.ο. Triton X-100 (Sigma) σε PBS για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου.

II.2.2.1.3. Επίστρωση σε καλυπτρίδες - επώαση με το πρώτο αντίσωμα

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιούνται πλύσεις με PBS που περιέχει 1% κ.β. αλβουμίνη (Bovine Serum Albumin - BSA). Όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλέπε επίστρωση σε καλυπτρίδες II.2.1.2.3.), οι θαλλοί μεταφέρονται σε καλυπτρίδες καλυμμένες με πολυ-L-λυσίνη και αφήνονται να στεγνώσουν. Ακολούθως, τα δείγματα επωάζονται καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας σε θερμοκρασία δωματίου και ατμόσφαιρα κεκορεσμένων υδρατμών με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της α-σωληνίνης (MAS 078 rat IgG clone YOL 1/34 Serotec) διαλυμένο σε PBS - 1% κ.β. BSA με αραιώση 1:40. Το πρώτο αντίσωμα ξεπλένεται την επόμενη μέρα με PBS-1% κ.β. BSA (3 πλύσεις των 10 min).

II.2.2.1.4. Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα - κάλυψη των κυττάρων

Τα δείγματα επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα αραιωμένο 1:40 σε PBS - 1% BSA (fluorescein isothiocyanate (FITC) – conjugated anti-rat IgG, Sigma) για δύο ώρες στους 37 °C σε ατμόσφαιρα κεκορεσμένων υδρατμών. Το επιπλέον φθορίζον αντίσωμα απομακρύνεται με πλύσεις με PBS και η διαδικασία συνεχίζεται με την κάλυψη των δειγμάτων (βλέπε II.2.1.2.4.). Πριν από την κάλυψη των κυττάρων, είναι δυνατή η χρώση των πυρήνων (βλέπε II.2.1.3.).

II.2.2.2. Ανοσοεντόπιση υδατανθράκων του κυτταρικού τοιχώματος

Για την ανοσοεντόπιση υδατανθράκων του κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου πραγματοποιούνται πειράματα ανοσοφθορισμού με δέκα αντισώματα έναντι διαφορετικών υδατανθρακικών ομάδων (Πίνακας 5). Ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο, που ισχύει και για τα δέκα αντισώματα.

II.2.2.2.1. Στερέωση πειραματικού υλικού

Μολυσμένοι και μη θαλλοί φαιοφυκών στερεώνονται με διάλυμα 4% κ.β. παραφορμαλδεΐδη σε MTB για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολουθούν τρεις πλύσεις των πέντε min έκαστη με διάλυμα MTB το οποίο βαθμιαία αντικαθίσταται από PBS.

II.2.2.2.2. Επίστρωση πειραματικού υλικού σε καλυπτρίδες – κάλυψη μη ειδικών θέσεων

Μετά τις πλύσεις των θαλλών, το υλικό επιστρώνεται σε καλυπτρίδες και αφήνεται να στεγνώσει πλήρως (βλέπε II.2.1.2.3.). Ακολουθεί επώαση με διάλυμα 5% κ.β. σκόνης αποβουτυρωμένου γάλακτος σε PBS για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου και περιβάλλον κεκορεσμένων υδρατμών. Η σκόνη γάλακτος καλύπτει μη ειδικές θέσεις ενισχύοντας έτσι την ακρίβεια της στόχευσης των αντισωμάτων που θα εφαρμοστούν στη συνέχεια.

Πίνακας 5. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή για την ανοσοεντόπιση υδατανθράκων του κυτταρικού τοιχώματος.

Αντίσωμα	Ανοσογόνο-ειδικότητα	Οργανισμός παραγωγής	Αραίωση	Πηγή προέλευσης
Πρώτο αντίσωμα				
Fu 1	Φουκάνες	επίμυς	1:10	Καθηγητής Paul Knox και υποψήφιος διδάκτορας Thomas Torode (Πανεπιστήμιο Leeds, Μεγάλη Βρετανία) και Dr Cecile Hervé (Σταθμός Βιολογίας Ροσκόφ, Γαλλία)
Fu 2	Θειϊκές φουκάνες	επίμυς	1:10	
Fu 3	Θειϊκές φουκάνες	επίμυς	1:10	
Fu 4	Θειϊκές φουκάνες	επίμυς	1:10	
Fu 5	Φουκάνες	επίμυς	1:10	
GIN 1	Αλγινικά οξέα πλούσια σε γουλουρονικό οξύ	επίμυς	1:10	Cecile Hervé (Σταθμός Βιολογίας Ροσκόφ, Γαλλία)
LM 7	Αλγινικά οξέα λούσια σε μανουρονικό οξύ	επίμυς	1:10	
Αντί-μαννάνη	Μαννάνη	επίμυς	1:10	Plant Probes, Leeds, UK
CBM3a	β-1, 4 γλυκάνη	ποντίκι	2,5 μg/ml	Plant Probes, Leeds, UK
Anti-His			1:1000	

Αντί-β-1, 3 γλυκάνη	β-1, 3 γλυκάνη	ποντίκι	1:100	Biosupplies Australia Ltd, Parkville, Australia
Δεύτερο αντίσωμα				
Anti-Mouse IgG-FITC conjugated	Αντίσωμα ποντικού	πρόβατο	1:100	Sigma, Taufkirchen, Germany
Anti-Rat IgG- FITC conjugated	Αντίσωμα επίμυος	γίδα	1:100	Sigma, Taufkirchen, Germany

II.2.2.2.3. Επώαση με το πρώτο αντίσωμα

Αφού πλυθούν οι καλυπτρίδες με PBS τρεις φορές για πέντε min, επωάζονται με το πρώτο αντίσωμα (για αναλογίες ανά αντίσωμα βλέπε Πίνακα 5) σε 5% κ.β. σκόνη γάλακτος σε PBS για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και περιβάλλον κεκορεσμένων υδρατμών. Μετά ακολουθούν τρεις πλύσεις με PBS για πέντε min η κάθε μία.

II.2.2.2.4. Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα – κάλυψη υλικού

Μετά την απομάκρυνση του πρώτου αντισώματος με πλύσεις με διάλυμα PBS, το πειραματικό υλικό επωάζεται με το δεύτερο αντίσωμα (για αναλογίες βλέπε Πίνακα 5) σε 5% κ.β. σκόνη γάλακτος σε PBS για μία ώρα στο σκοτάδι. Τέλος, οι καλυπτρίδες με το υλικό πλένονται με PBS τρεις φορές για πέντε λεπτά και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες με υγρό διάλυμα κάλυψης CITIFLUOR AF2/Glycerol (Agar Scientific, Essex, UK).

II.3. Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Η μελέτη της λεπτής δομής ξενιστή και παράσιτου πραγματοποιείται με τεχνικές Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (ΗΜΔ) και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (ΗΜΣ).

II.3.1. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (ΗΜΔ)

Λόγω της ιδιομορφίας του πειραματικού υλικού, δοκιμάστηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα ΗΜΔ προσαρμοσμένα σε φαιοφύκη. Πραγματοποιήθηκε στερέωση και εμπότιση σε ρητίνη Spurr σύμφωνα με τους Karnovsky (1965) και Katsaros και Salla (1997), με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το πρωτόκολλο που απέδωσε καλύτερα για το πειραματικό υλικό της παρούσας διατριβής παρατίθεται παρακάτω και βασίζεται σε αυτό των Sekimoto και συν. (2008β) με μικρές τροποποιήσεις.

II.3.1.1. Στερέωση θαλλών

Θαλλοί μολυσμένων και μη φαιοφυκών στερεώνονται με 2,5% κ.ο. γλουταρική αλδεΐδη σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που περιέχει 50% κ.ο. μέσο καλλιέργειας. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελείται από κακωδυλικό νάτριο 0,1 M (pH 7.2), 3% κ.β. NaCl, 0,1% κ.β. CaCl₂ και 0,5% κ.β. καφεΐνη. Η διαδικασία της στερέωσης διαρκεί τρεις h και πραγματοποιείται στους 4°C. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των δεκαπέντε min με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε θερμοκρασία δωματίου.

II.3.1.2. Μεταστερέωση

Η μεταστερέωση γίνεται σε διάλυμα 1% κ.β. τετροξειδίου του οσμίου (OsO₄, Sigma) διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή βελτιώνει την ποιότητα της τελικής εικόνας παρατήρησης του δείγματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις των δεκαπέντε min με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας το οποίο αντικαθίσταται βαθμιαία απο απεσταγμένο νερό.

II.3.1.3. Έγκλειση πειραματικού υλικού σε αγαρόζη

Οι θαλλοί φαιοφυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή αποτελούνται από κύτταρα μήκους της τάξεως των 15 μm σε σειρά, τα οποία σχηματίζουν νήματα. Η τμήση και η παρατήρηση ενός τόσο μικρού σε μέγεθος υλικού στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διευκολύνεται με τον προσανατολισμό των νημάτων σε ένα επίπεδο. Για το λόγο αυτό το υλικό εγκλείεται σε αγαρόζη. Πιο συγκεκριμένα, οι θαλλοί φυγοκεντρώνται σε χαμηλές στροφές και τα συσσωματώματα των νημάτων που προκύπτουν, μεταφέρονται με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας και βελονών, σε σταγόνες διαλύματος 1% κ.β. αγαρόζης (Ultralow-gelling agarose, Seakem GTG agarose, FMC, USA). Η εν λόγω αγαρόζη είναι χαμηλού σημείου πήξεως και γι' αυτό πριν χρησιμοποιηθεί για την έγκλειση του υλικού, θερμαίνεται για λίγα min σε θερμοκρασία 70-80 °C ώστε να υγροποιηθεί. Μετά την έγκλειση το δείγμα μεταφέρεται στους 4 °C όπου η αγαρόζη στερεοποιείται υπο μορφή πηκτώματος.

II.3.1.4. Αφυδατώσεις

Η αφυδάτωση του υλικού πραγματοποιείται με τη βαθμιαία αντικατάσταση του απεσταγμένου νερού από διάλυμα απόλυτης ακετόνης. Έτσι, οι εγκλεισμένοι σε αγαρόζη θαλλοί τοποθετούνται σε διάλυμα 20% κ.ο. ακετόνης σε απεσταγμένο νερό για δεκαπέντε min και θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν αλλαγές διαλυμάτων ανά δεκαπέντε λεπτά, με αυξανόμενη κατά 10% κ.ο. τη συγκέντρωση απόλυτης ακετόνης. Στο διάλυμα 70% προστίθεται 4% κ.β. οξικό ουρανύλιο (Sigma) και το υλικό αφήνεται για όλη τη νύχτα στους 4°C. Την επόμενη ημέρα συνεχίζονται οι δεκαπεντάλεπτες αφυδατώσεις των 80%, 90% και 100% κ.ο. ακετόνης. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με επανάληψη του σταδίου αφυδάτωσης σε διάλυμα απόλυτης ακετόνης, όπου το πειραματικό υλικό αφήνεται για όλη τη νύχτα στους 4 °C.

II.3.1.5. Εμπότιση-Έγκλειση

Μετά τις αφυδατώσεις, πραγματοποιείται σταδιακή εμπότιση των θαλλών με συνθετική ρητίνη Quetol 651 (Nisshin EM, Tokyo, Japan). Έτσι, τα δείγματα μεταφέρονται αρχικά σε διάλυμα 2:1 ακετόνη:ρητίνη για τρεις ώρες υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, οι θαλλοί τοποθετούνται σε διάλυμα 1:1 ακετόνη:ρητίνη για δύο h σε

θερμοκρασία δωματίου και 1:2 ακετόνη:ρητίνη για όλη τη νύχτα στους 4 °C. Την επόμενη ημέρα, οι θαλλοί επωάζονται σε διάλυμα καθαρής ρητίνης και αφήνονται για όλη τη νύχτα στους 4°C. Η εμποτίση έχει ολοκληρωθεί.

Το υλικό που βρίσκεται στην υγρή, ακόμη, ρητίνη, τοποθετείται σε ειδικές θήκες και έπειτα σε κλίβανο θερμοκρασίας 60 °C, τουλάχιστον για 48 h. Αυτό οδηγεί στον πολυμερισμό της ρητίνης. Στην περίπτωση που δεν πραγματοποιηθεί έγκλειση σε αгарόζη (βλέπε II.3.1.3.), η έγκλειση των δειγμάτων γίνεται με τη βοήθεια του υλικού Aclar (Embedding slide, Plano, Wetzlar, Germany). Πιο συγκεκριμένα, σταγόνες ρητίνης που περιέχουν εμποτισμένους θαλλούς μεταφέρονται σε κομμάτι Aclar. Με τη χρήση βελονών και στερεοσκοπίου, τα νήματα φαιοφυκών διαχωρίζονται και προσανατολίζονται σε ένα επίπεδο. Τέλος, τοποθετείται ένα ακόμη κομμάτι Aclar ως κάλυμμα και ακολουθεί η διαδικασία του πολυμερισμού σε ρητίνη.

II.3.1.6. Τμήση

Πρίν απο την παρατήρηση στο ΗΜΔ, τα δείγματα κόβονται σε λεπτές τομές πάχους 60-200 nm με τη βοήθεια των υπερμικροτόμων LKB Ultratome III microtome και Reichert Ultracut E ultramicrotome. Χρησιμοποιώντας γυάλινα μαχαίρια, λαμβάνονται αρχικά λεπτές τομές πάχους 0,5-2 μm οι οποίες χρωματίζονται με διάλυμα 1% κ.β. κυανού της τολουϊδίνης και παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει την επιλογή απο το δείγμα των κυττάρων με μεγαλύτερο ενδιαφέρον για παρατήρηση στο ΗΜΔ. Στη συνέχεια, λαμβάνονται τομές για το ΗΜΔ. Αυτές συλλέγονται σε πλέγματα χαλκού διαμέτρου 3,05 mm τα οποία έχουν προηγουμένως καλυφθεί από ένα λεπτό υμένιο στήριξης Pioloform.

II.3.1.7. Χρώση

Η χρώση των λεπτών τομών πραγματοποιείται σε δύο φάσεις: α) Χρώση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών και β) έντονη χρώση νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων. α) Σε ειδικές θήκες τοποθετείται διάλυμα οξικού ουρανυλίου 4 % κ.β. σε αιθανόλη 70 % κ.ο. και πάνω σε αυτό τοποθετούνται πλέγματα, με την επιφάνεια που φέρει τις τομές να εφάπτεται στο διάλυμα. Η διάρκεια της χρώσης είναι 45 min και πραγματοποιείται στους 4 °C., στο σκοτάδι και σε ατμόσφαιρα κεκορεσμένης αιθανόλης. Ακολουθεί πλύση των πλεγμάτων με

διάλυμα 50% κ.ο. αιθανόλης και στέγνωμα με διηθητικό χαρτί. β) Τα πλέγματα τοποθετούνται σε διάλυμα κιτρικού μολύβδου σε νερό για 15 min, στους 4 °C, στο σκοτάδι και σε ατμόσφαιρα κεκορεσμένων υδρατμών (Reynolds 1963). Ακολουθεί πλύση των πλεγμάτων με απεσταγμένο νερό και στέγνωμα με διηθητικό χαρτί.

II.3.2. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (ΗΜΣ)

Για την παρατήρηση του πειραματικού υλικού με ΗΜΣ ακολουθείται το πρωτόκολλο των Urralapati και συν. (2001β) με ορισμένες τροποποιήσεις.

II.3.2.1. Στερέωση-Μεταστερέωση πειραματικού υλικού

Οι διαδικασίες στερέωσης και μεταστερέωσης του πειραματικού υλικού πραγματοποιούνται ακριβώς όπως οι αντίστοιχες της ΗΜΔ (βλέπε II.3.1.1., II.3.1.2).

II.3.2.2. Επώαση με ταννικό οξύ

Μετά το τέλος της μεταστερέωσης και την απομάκρυνση του τετροξειδίου του οσμίου με ρυθμιστικό διάλυμα και απεσταγμένο νερό, οι θαλλοί επωάζονται με διάλυμα 2% κ.β. ταννικού οξέος σε απεσταγμένο νερό για μισή h, σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό τη διατήρηση των μικροσωληνίσκων. Τα δείγματα πλένονται, ακολούθως, τρεις φορές για δεκαπέντε min με απεσταγμένο νερό.

II.3.2.3. Μετα-μεταστερέωση

Η διαδικασία της μεταστερέωσης επαναλαμβάνεται. Οι θαλλοί τοποθετούνται σε διάλυμα 1 % κ.β. τετροξειδίου του οσμίου σε απεσταγμένο νερό για μισή h, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το πειραματικό υλικό πλένεται με απεσταγμένο νερό όπως παραπάνω.

II.3.2.4. Αφυδατώσεις

Η αφυδάτωση των θαλλών πραγματοποιείται με τη βοήθεια απόλυτης ακετόνης, όπως και στην περίπτωση της ΗΜΔ (βλέπε II.3.1.4.). Τα δείγματα μεταφέρονται ανά δεκαπέντε λεπτά σε διαλύματα 10-100 % αυξανόμενης συγκέντρωσης ακετόνης σε απεσταγμένο νερό. Τέλος,

ακολουθεί η διαδικασία αποξήρανσης κρίσιμου σημείου (critical point dried) η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθήνας με τη βοήθεια του καθηγητή κ. Κώστα Φασσέα.

II.4. Επίδρασεις σε μολυσμένους θαλλούς φαιοφυκών

Για τα πειράματα ανάσχεσης της μόλυνσης των φαιοφυκών από τον *E. dicksonii* χρησιμοποιούνται υδατάνθρακες και ορμόνες.

II.4.1. Επίδραση με υδατάνθρακες

Μη μολυσμένοι θαλλοί φαιοφυκών επωάζονται με καλλιέργεια-εμβόλιο και ένας νέος κύκλος μόλυνσεων πυροδοτείται (βλέπε II.1.4.). Οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν για δυο εβδομάδες σε μέσο καλλιέργειας Provasoli (βλέπε II.1.3.) που περιέχει 0,025, 0,05 ή 0,1 M υδατάνθρακα. Παράλληλα, η ίδια διαδικασία ακολουθείται για μία επιπλέον καλλιέργεια η οποία αναπτύσσεται σε μέσο καλλιέργειας Provasoli που δεν περιέχει υδατάνθρακα, λειτουργώντας ως συνθήκη ελέγχου (control condition). Μετά το πέρας των δύο εβδομάδων, το πειραματικό υλικό παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο και ελέγχεται για τυχόν μεταβολές στα ποσοστά μόλυνσεων, ύστερα από τη χρήση υδατανθράκων στο μέσο καλλιέργειας.

Κάθε πείραμα επαναλαμβάνεται 5-10 φορές και τα αποτελέσματα προκύπτουν από τον μέσο όρο των μετρήσεων. Οι υδατάνθρακες που χρησιμοποιούνται είναι: D-γαλακτόζη (Sigma), L-φουκόζη (Sigma), D-γλυκόζη (Alfa aesar, Karlsruhe, Germany), D-μαννόζη (Sigma), N-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη (Sigma), N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (Sigma) και D-φρουκτόζη (Sigma).

II.4.2. Επίδραση με ορμόνες

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε για την επίδραση με υδατάνθρακες (βλέπε II.4.1.). Μη μολυσμένες καλλιέργειες επωάζονται με καλλιέργεια-εμβόλιο και αφήνονται να αναπτυχθούν σε μέσο καλλιέργειας Provasoli (βλέπε II.1.3.) που περιέχει 50 μ M ορμόνης για δύο εβδομάδες. Παράλληλα, αναπτύσσεται πειραματικό υλικό σε μέσο καλλιέργειας χωρίς ορμόνη ως συνθήκη ελέγχου. Στη συνέχεια, οι θαλλοί παρατηρούνται

στο οπτικό μικροσκόπιο και ελέγχονται για τυχόν μεταβολές στα ποσοστά μολύνσεων από τον *E. dicksonii*.

Η επίδραση ορμονών ελέγχεται και σε μη μολυσμένες καλλιέργειες. Στην περίπτωση αυτή, μη μολυσμένοι θαλλοί φαιοφυκών αναπτύσσονται για τέσσερις ημέρες σε μέσο καλλιέργειας Provasoli με προσθήκη ορμόνης. Οι ορμόνες που χρησιμοποιούνται είναι: salicylic acid (σαλικυλικό οξύ, SA, Sigma), indole-3-acetic acid (IAA, Sigma) και 1-Naphthaleneacetic acid (NAA, Sigma).

II.4.3. Έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων

Για την καταμέτρηση μολυσμένων κυττάρων, νεκρών και μη, ύστερα από τις παραπάνω επιδράσεις, πραγματοποιείται χρώση των θαλλών με κυανούν της ανιλίνης ή Evans Blue. Το κυανούν της ανιλίνης χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό κυττάρων με ΥΑ λόγω των β-1, 3 γλυκανών που εναποτίθενται στα κυτταρικά τοιχώματα των κυττάρων. Το Evans Blue χρησιμοποιείται ευρέως για τη χρώση νεκρών κυττάρων.

Για τη χρώση με Evans Blue, παρασκευάζεται διάλυμα αποθέματος 4 % κ.β. σε απεσταγμένο νερό. Οι θαλλοί επωάζονται με 1 μL Evans Blue/100 μL μέσου καλλιέργειας Provasoli για δεκαπέντε min. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με μέσο καλλιέργειας για την απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής.

II.5. Μικροσκόπια παρατήρησης-Λογισμικά φωτογράφισης

II.5.1. Οπτικά μικροσκόπια

Τα οπτικά μικροσκόπια και τα αντίστοιχα λογισμικά φωτογράφισης που χρησιμοποιούνται στα πλαίσια της παρούσας διατριβής είναι τα εξής:

- 1) Μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioplan™ (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), λογισμικό AxioVision™ software και κάμερα AxioCam Mrc 5 (Zeiss).
- 2) Μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX60, λογισμικό Volocity software και κάμερα EX1 Aqua (Qimaging, Canada).
- 3) Ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Observer™ Z.1 (Zeiss) με λέιζερ LSM 510 laser™ (Zeiss) και κάμερα AxioCam HRc™ (Zeiss).

- 4) Ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 (Leica Instruments, Heidelberg, Germany) με λογισμικό LAS AF SP5 software (Leica).

II.5.2. Ηλεκτρονικά μικροσκόπια

Τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια που χρησιμοποιούνται είναι:

- 1) ΗΜΔ Philips CM 100
- 2) ΗΜΔ Philips 300
- 3) ΗΜΣ JSM-6360 (JEOL, Japan)

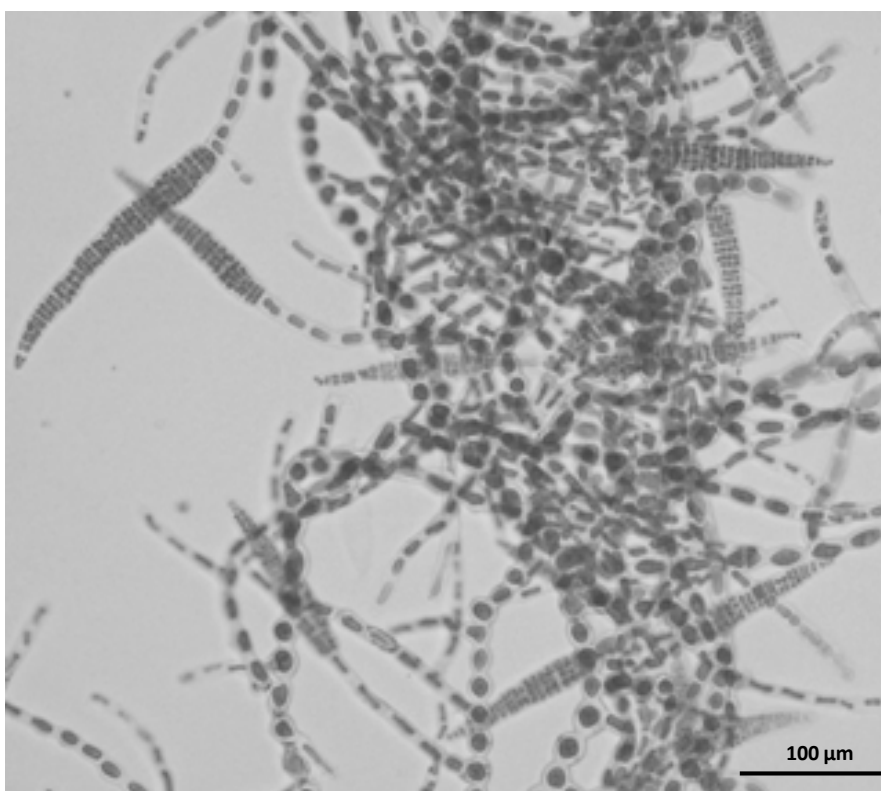
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1. Στάδια μόλυνσης φαιοφυκών από τον ωομύκητα *Eurychasma dicksonii*:

Μελέτη λεπτής δομής – μηχανισμός προσκόλλησης και διείσδυσης

III.1.1. Γενικά

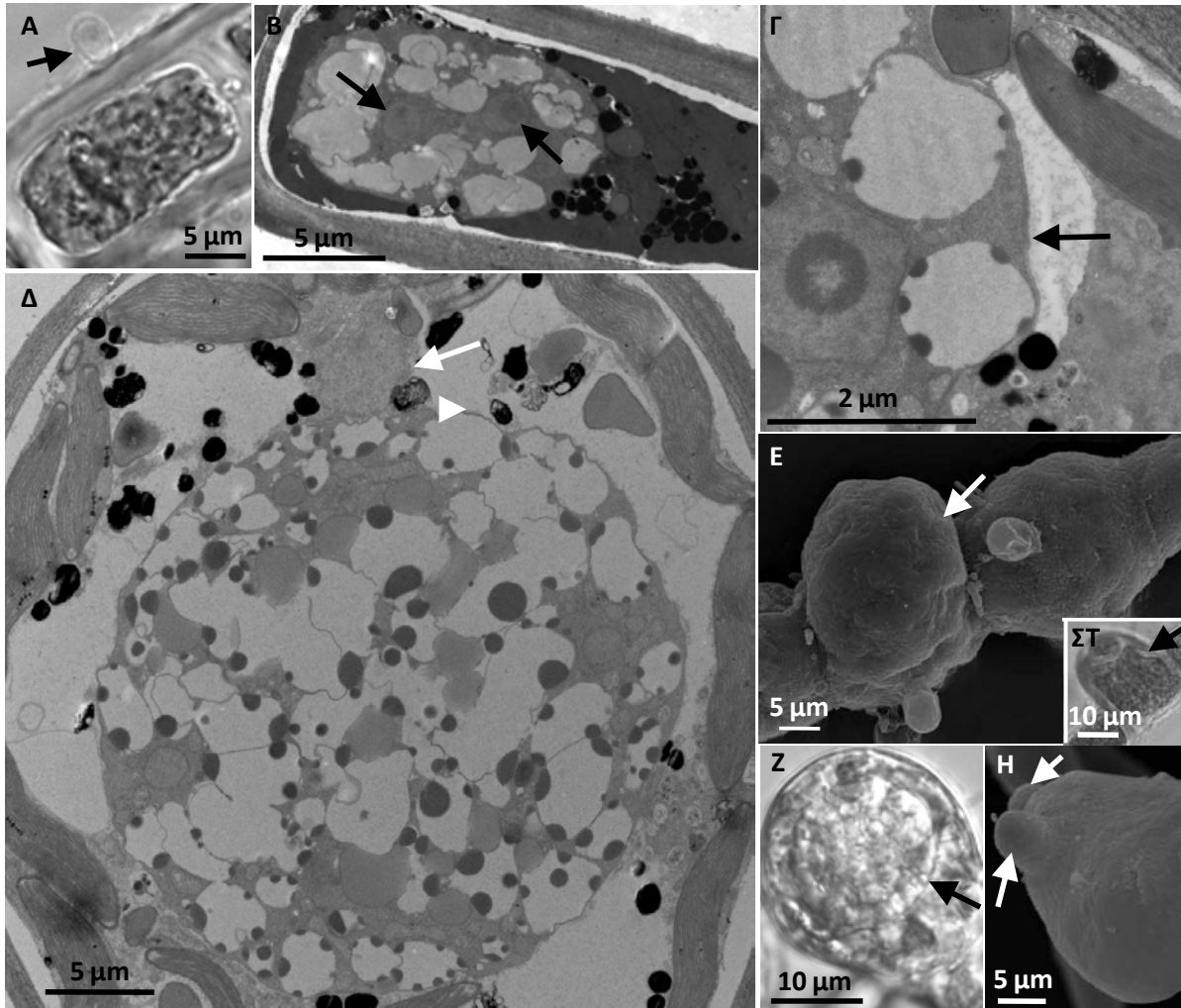
Όλα τα είδη φαιοφυκών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας διατριβής (βλέπε Πίνακα 1, II.1.1.) είναι μονόσειρα, διακλαδιζόμενα νήματα, δηλαδή οι θαλλοί αποτελούνται από απλές σειρές κυττάρων (Εικ. III.1).



Εικόνα III.1. Εικόνα μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC) φυσιολογικού υλικού. Νηματοειδής μη μολυσμένος θαλλός *Ectocarpus cruaniorum*.

Τα βασικά στάδια της μόλυνσης των φαιοφυκών *Ectocarpus siliculosus* και *Pylaiella littoralis* από τον ωομύκητα *Eurychasma dicksonii* έχουν προηγουμένως περιγραφεί από τους

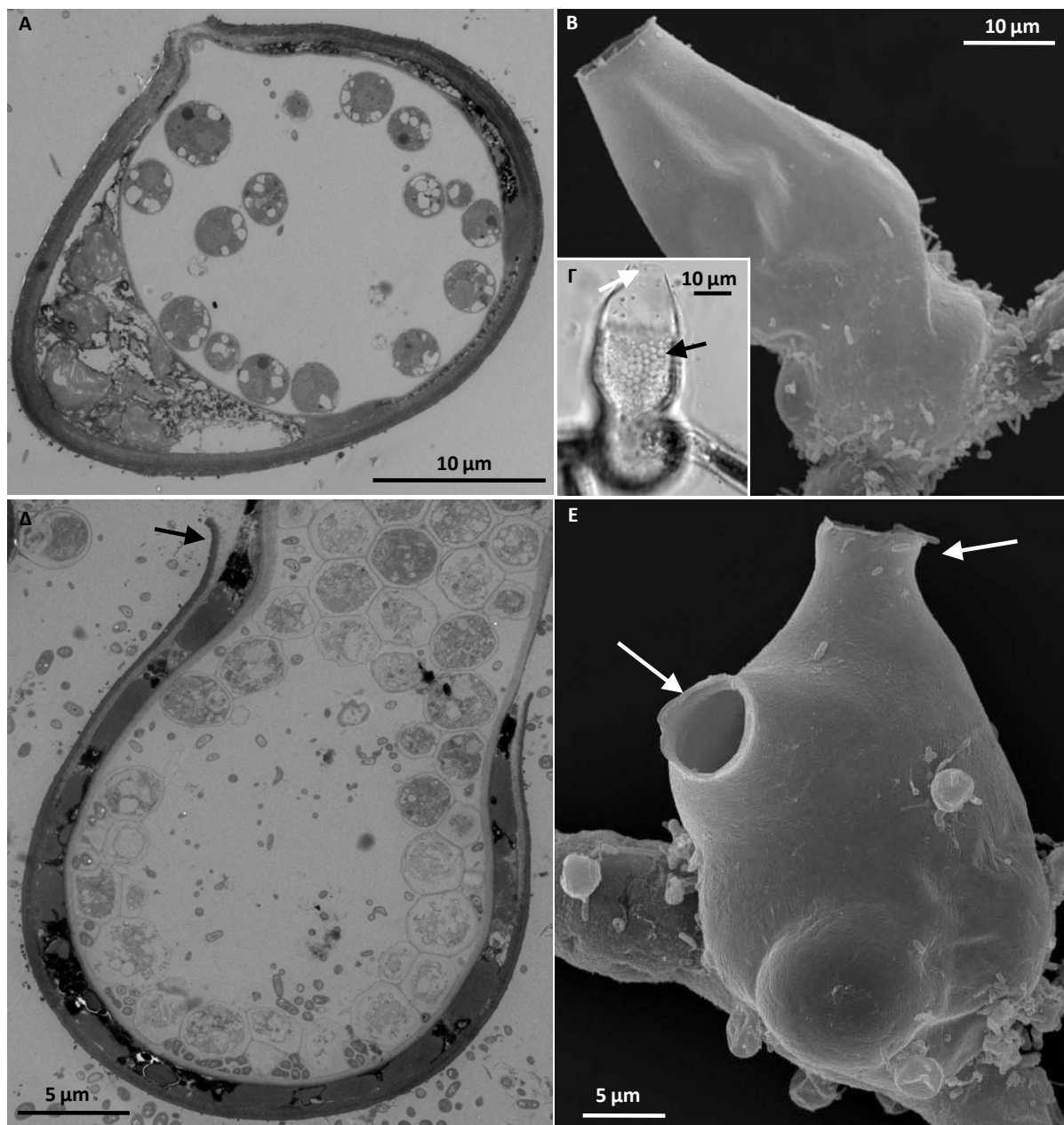
Sekimoto και συν. (2008β) (βλέπε επίσης υποκεφάλαιο 1.2.3.2 Εισαγωγής). Προς διευκόλυνση του αναγνώστη, παρακάτω συνοψίζονται τα κύρια σημεία της διαδικασίας ενός κύκλου μόλυνσης: 1) Ελεύθερα ζωοσπόρια *E. dicksonii* κινούνται προς τα νήματα του φαιοφύκους ξενιστή και αφού εγκυστωθούν, δηλαδή αφού σχηματιστεί κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει το πλασμαλήμμα του ζωοσπορίου, προσκολλώνται στην επιφάνεια ενός κυττάρου-ξενιστή μέσω ειδικής προσκολλητικής δομής που δημιουργείται στο τμήμα του σπορίου το οποίο έρχεται σε επαφή με τον ξενιστή (βέλος στην Εικ. III.2.A). Η δομή αυτή ονομάζεται πλάκα προσκόλλησης (βλέπε όρο “adhesorium pad” σε Sekimoto και συν. 2008β) και το εγκυστωμένο ζωοσπόριο στη φάση αυτή δευτερογενές σπόριο. 2) Ακολούθως, το δευτερογενές σπόριο του παράσιτου τρυπά με τη βοήθεια μίας βελονοειδούς δομής (βλέπε “peg-like structure” σε Sekimoto και συν. 2008β) το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή και μεταφέρει μέρος του πρωτοπλάστη του (πυρήνας, μιτοχόνδρια, κυστίδια και κυτοπλασματικό υλικό) στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. 3) Στη συνέχεια, διαδοχικές διαιρέσεις του πυρήνα του παράσιτου οδηγούν στον σχηματισμό ενός πολυπύρηνου πλασμοδιακού θαλλού του ωομύκητα (Εικόνα III.2.B). Ο πρωτοπλάστης του *E. dicksonii* καταλαμβάνει κεντρική θέση εσωτερικά του κυττάρου-ξενιστή, παραγκωνίζοντας τα οργανίδια του φαιοφύκους στην περιφέρεια και αποτελείται από πυρήνες που διαιρούνται συνεχώς, μιτοχόνδρια και διάφορες μορφές κυστιδίων που φέρουν έγκλειστα (Εικόνα III.2.B). Στη φάση αυτή ο θαλλός του ωομύκητα διαχωρίζεται με διπλή μεμβράνη από τον πρωτοπλάστη του ξενιστή (Εικόνα III.2.Γ). Η προέλευση της διπλής μεμβράνης δεν έχει διευκρινιστεί, αλλά οι Sekimoto και συν. (2008β) υποθέτουν ότι η μία μεμβράνη αποτελεί το πλασμαλήμμα του *E. dicksonii*, ενώ η δεύτερη τμήμα του πλασμαλήμματος του φαιοφύκους. 4) Ο θαλλός του *E. dicksonii* διογκώνεται λόγω των συνεχών διαιρέσεων μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, το οποίο και καταλαμβάνει σταδιακά σχεδόν εξ ολοκλήρου (κεφαλή βέλους στην Εικ. III.2.Δ). Οι χλωροπλάστες και ο πυρήνας του ξενιστή βρίσκονται στην περιφέρεια του κυττάρου και παρουσιάζουν φυσιολογική εικόνα (Εικ. III.Δ). Καθώς η διαδικασία της προσβολής συνεχίζεται, η αύξηση του όγκου του παράσιτου οδηγεί σε περαιτέρω διόγκωση του κυττάρου-ξενιστή (Εικ. III.2.E, ΣΤ). 5) Σε επόμενο στάδιο, οι διαιρέσεις των πυρήνων του παράσιτου σταματούν και ο θαλλός του ωομύκητα χαρακτηρίζεται από πληθώρα χυμοτοπίων (βλέπε όρο “foamy stage” στο Sekimoto και συν.



Εικόνα III.2. Εικόνες οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας απεικονίζουν βασικά στάδια μόλυνσης φαιοφυκών από τον ωμούκητα *Eurychasma dicksonii*. Α. Εικόνα μικροσκοπίας DIC. Το βέλος δείχνει ένα προσκολλημένο δευτερογενές σπώριο *E. dicksonii* στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Β. Εικόνα ΗΜΔ. Αρχικό στάδιο μόλυνσης όπου εμφανίζεται ο πλασμοδιακός θαλλός του παράσιτου εσωτερικά του κυττάρου-ξενιστή. Τα βέλη δείχνουν τους πυρήνες του παράσιτου. Γ. Εικόνα ΗΜΔ. Τα βέλη δείχνουν τη διπλή μεμβράνη που περιβάλλει τον θαλλό του παράσιτου (αριστερά) και τον διαχωρίζει από τον πρωτοπλάστη του ξενιστή (δεξιά). Δ. Εικόνα ΗΜΔ. Η κεφαλή βέλους δείχνει τον κοινοκυτικό διογκωμένο θαλλό του ωμούκητα εντός του κυττάρου-ξενιστή. Το βέλος δείχνει τον πυρήνα του ξενιστή ο οποίος παραμένει φυσιολογικός παρ' ότι παραγκωνισμένος στην περιφέρεια. Ε. Εικόνα ΗΜΣ. Σπώρια του *E. dicksonii* έχουν προσβάλλει δύο κύτταρα του ξενιστή τα οποία παρουσιάζουν χαρακτηριστική διόγκωση. Το βέλος δείχνει την υπερδιόγκωση του κυττάρου-ξενιστή καθώς ο ωμούκητας εισέρχεται σταδιακά στη φάση της ζωοσποριογένεσης. ΣΤ. Εικόνα DIC. Οι συνεχείς διαιρέσεις των πυρήνων του παράσιτου προκαλούν διόγκωση του κυττάρου-ξενιστή. Το βέλος δείχνει τον πρωτοπλάστη του ωμούκητα στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Ζ. Εικόνα DIC. Το βέλος δείχνει το κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει τον θαλλό του ωμούκητα λίγο πριν την κυτταροποίησή του. Η. Εικόνα ΗΜΣ. Τα βέλη δείχνουν τους κλειστούς σωλήνες απελευθέρωσης στην κορυφή ενός ανώριμου ζωοσποριάγγελιου του *E. dicksonii*.

2008β). Παράλληλα, σχηματίζεται τυπικό κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει τον θαλλό του *E. dicksonii* (βέλος στην Εικ. III.2.Ζ), ενώ οι χλωροπλάστες και ο πυρήνας του φαιοφύκου αποδιοργανώνονται πλήρως. 6) Η δημιουργία του κυτταρικού τοιχώματος που περιβάλλει το

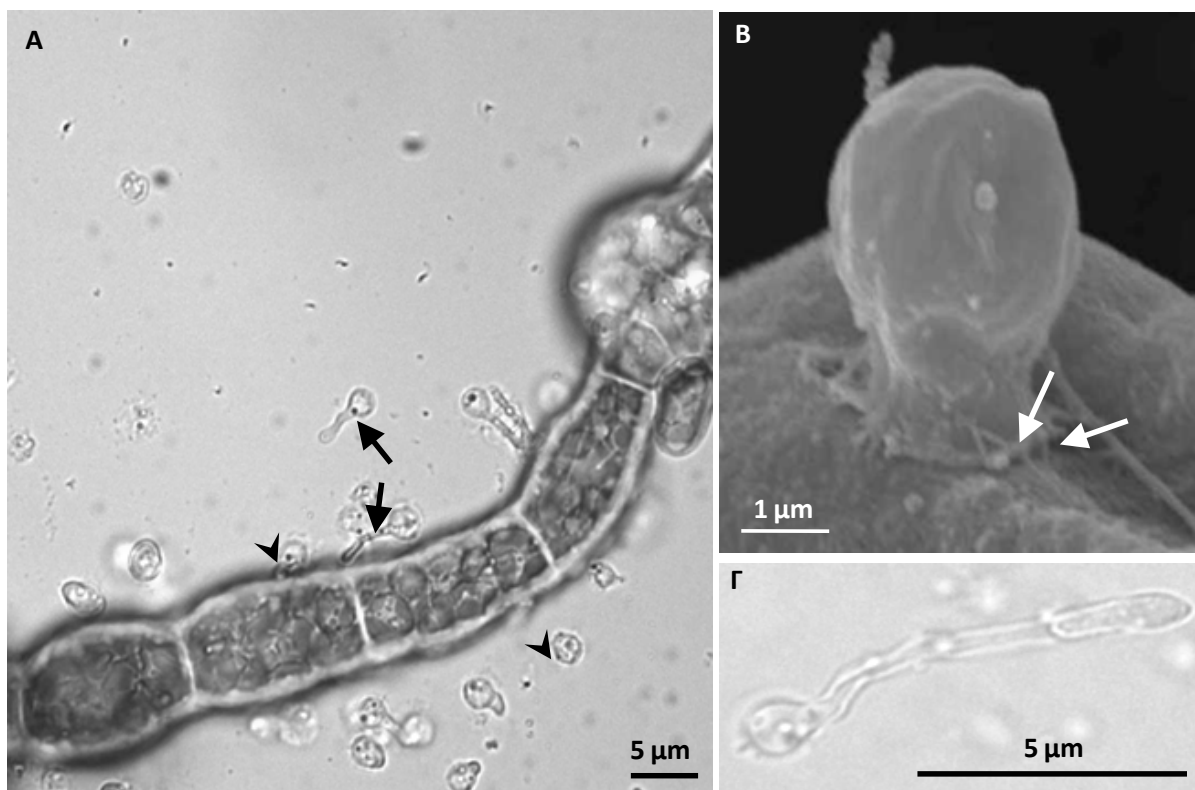
πλασμαλήμμα του θαλλού του παράσιτου σηματοδοτεί τη μετάβαση του ωομύκητα από τη βλαστητική στην αναπαραγωγική φάση. Η διαδικασία της ζωοσποριογένεσης περιλαμβάνει την κυτταροποίηση του θαλλού του παράσιτου, τον μετασχηματισμό του σε ζωοσποριαγγείο και τη διαφοροποίηση των πρωτογενών σπορίων. Πριν από την κυτταροποίηση, τα οργανίδια του ωομύκητα διατάσσονται περιφερειακά σε άτυπες μονάδες, κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από έναν πυρήνα, ένα ζεύγος κινητοσωμάτων, μιτοχόνδρια και κυστίδια. Ακολουθεί κυτταροποίηση του θαλλού και ταυτόχρονη διαφοροποίηση του ζωοσποριάγγελιου. Κατά τη διαφοροποίηση, στην κορυφή του ζωοσποριάγγελιου σχηματίζονται σωλήνες απελευθέρωσης (discharge tubes), οι οποίοι αρχικά παραμένουν κλειστοί (ανώριμο ζωοσποριάγγειο, βέλη στην Εικ. III.2.Η). Πρόκειται για χαρακτηριστικές δομές στην κορυφή του σποριαγγείου που επιτρέπουν στα ζωοσπόρια του ωομύκητα να διαφύγουν. 7) Η ωρίμανση του ζωοσποριάγγελιου σηματοδοτείται από τη διάνοιξη ενός (Εικ. III.3.Β, Γ) ή δύο σωλήνων απελευθέρωσης (Εικ. III.3.Ε). Παράλληλα, η κυτταροποίηση του θαλλού οδηγεί στο σχηματισμό διαφοροποιημένων, πρωτογενών σπορίων (Εικ. III.3.Α), καθ' ένα από τα οποία αποτελείται από έναν πυρήνα, ένα ζεύγος κινητοσωμάτων, μιτοχόνδρια και κυστίδια με έγκλειστα, όπως ακριβώς οι άτυπες μονάδες πριν την κυτταροποίηση του θαλλού. Τα πρωτογενή σπόρια διατάσσονται περιφερειακά στο εσωτερικό του ζωοσποριάγγελιου (μαύρο βέλος στην Εικ. III.3.Γ, Εικ. III.3.Δ). Να σημειωθεί ότι κατά την ωρίμανση του ζωοσποριάγγελιου του *E. dicksonii*, η υπερδιόγκωση της δομής οδηγεί σε διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (βέλος στην Εικ. III.3.Δ). 8) Στη συνέχεια, και αφού ολοκληρωθεί η ωρίμανση του ζωοσποριάγγελιου, το κυτταρικό τοίχωμα των πρωτογενών σπορίων διαρρηγνύεται τοπικά και δημιουργείται ένας ανοιχτός πόρος δια μέσου του οποίου απελευθερώνονται διμαστιγωτά ζωοσπόρια. Αυτά διασχίζουν το ζωοσποριάγγειο και εν τέλει διαφεύγουν από τον ανοιχτό σωλήνα απελευθέρωσης στην κορυφή του ζωοσποριάγγελιου (Εικ. III.3.Β, Γ, Ε). 9) Μετά την απελευθέρωση των ζωοσπορίων, εσωτερικά του ζωοσποριάγγελιου παρατηρείται ένα πλέγμα από κυτταρικά τοιχώματα των άδειων πρωτογενών σπορίων, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστική μορφολογική δομή για το γένος (βλέπε όρο “net sporangium”, Sekimoto και συν. 2008β).



Εικόνα III.3. Εικόνες οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζουν δομές του ωομύκητα *Eurychasma dicksonii*. Α. Εικόνα ΗΜΔ. Ζωοσποριάγγειο του ωομύκητα με διαφοροποιημένα πρωτογενή σπόρια. Διακρίνεται ο αποδιοργανωμένος πρωτοπλάστης του φαιοφύκους. Β. Εικόνα ΗΜΣ. Ωριμο ζωοσποριάγγειο με ανοιχτό σωλήνα απελευθέρωσης στην κορυφή. Γ. Εικόνα DIC. Ωριμο ζωοσποριάγγειο *E. dicksonii*. Το λευκό βέλος δείχνει τον ανοιχτό σωλήνα απελευθέρωσης στην κορυφή του ζωοσποριάγγειου. Το μαύρο βέλος δείχνει τα περιφερειακά διατεταγμένα πρωτογενή σπόρια στο εσωτερικό του ζωοσποριάγγειου. Δ. Εικόνα ΗΜΔ. Ωριμο ζωοσποριάγγειο του ωομύκητα. Το βέλος δείχνει το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή το οποίο έχει διαρρηχθεί. Ε. Εικόνα ΗΜΣ. Ωριμο ζωοσποριάγγειο του ωομύκητα. Τα βέλη δείχνουν δύο ανοιχτούς σωλήνες απελευθέρωσης στην κορυφή της δομής.

III.1.2. Εγκύστωση και προσκόλληση του *E. dicksonii*

Τα ζωοσπόρια του *E. dicksonii* που απελευθερώνονται από το ζωοσποριάγγειο κινούνται προς τα νήματα των φαιοφυκών με σκοπό την μόλυνσή τους. Η συγκέντρωση ζωοσπορίων είναι αυξημένη στην εγγύς περιοχή του νήματος (Εικ. III.4.A), γεγονός που δηλώνει την προσέλκυσή τους από τον ξενιστή. Ακολουθεί εγκύστωση των ζωοσπορίων με δημιουργία κυτταρικού τοιχώματος (κεφαλή βέλους στην Εικ. III.4.A, Εικ. III.5.A) και διαφοροποίηση σε δευτερογενή σπόρια. Τα δευτερογενή σπόρια προσδένονται σταθερά στο κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου-ξενιστή μέσω μιας ειδικής δομής που σχηματίζεται στο τμήμα του σπορίου που έρχεται σε επαφή με τον ξενιστή (βάση σπορίου) και ονομάζεται πλάκα προσκόλλησης (Εικ. III.4.B' βλέπε όρο "adhesorium pad" σε Sekimoto και συν. 2008β). Το κυτταρικό τοίχωμα των δευτερογενών σπορίων αποτελείται εξωτερικά από ένα λεπτό ηλεκτρονιόπυκνο στρώμα και εσωτερικά από ένα ινώδες υλικό (Εικ. III.5.A, B). Σταδιακά, παρατηρείται πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος,



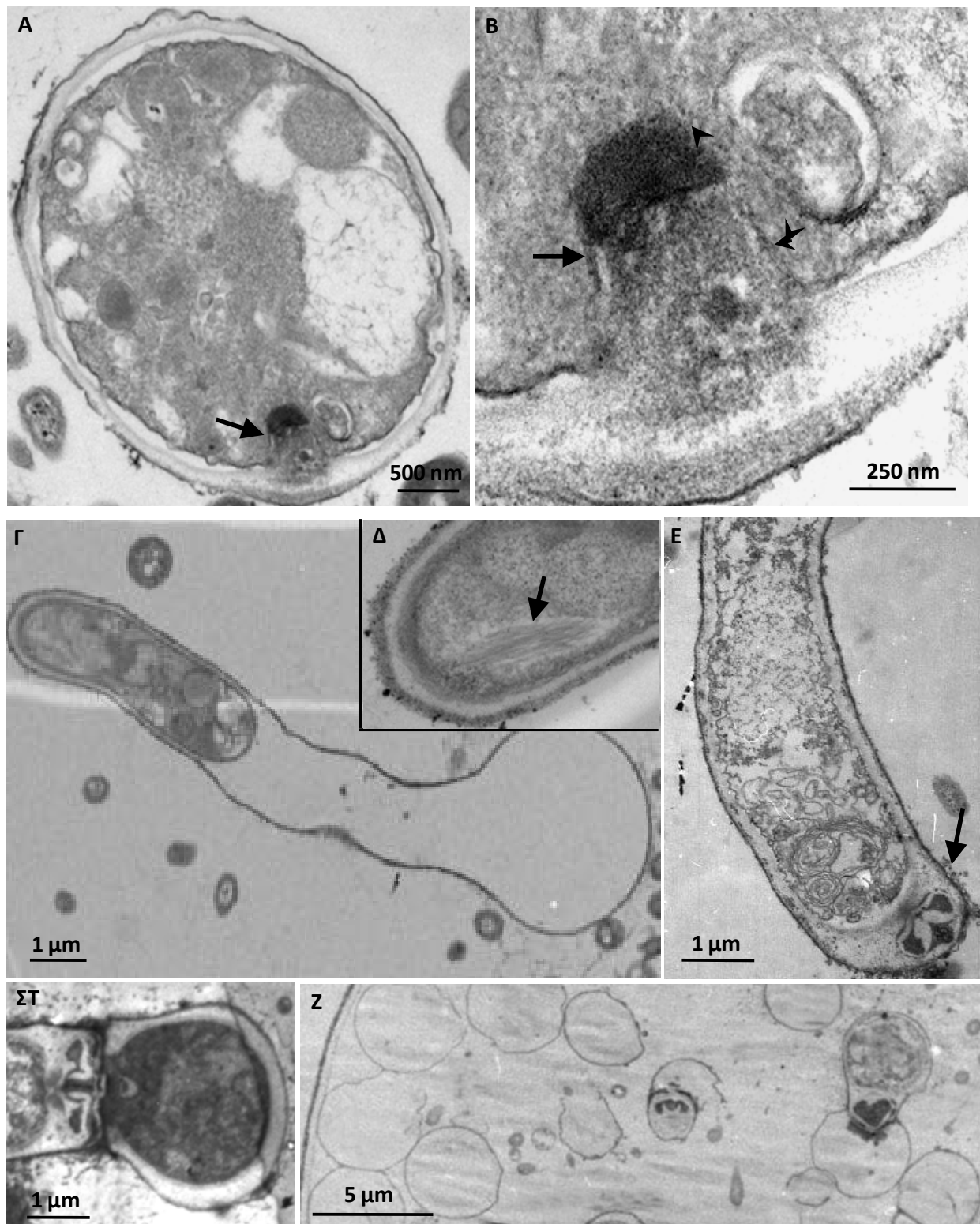
Εικόνα III.4. Εγκύστωση και σχηματισμός σωληνοειδούς προεκβολής σε δευτερογενή σπόρια *E. dicksonii*. Α. Εικόνα φωτεινού πεδίου από αξενική καλλιέργεια *E. crouaniorum* μολυσμένου από *E. dicksonii* 4018/3 που παρουσιάζει τη συσώρευση των δευτερογενών σπορίων του παράσιτου στην περιοχή γύρω από το φύκος. Τα βέλη δείχνουν τη σωληνοειδή προεκβολή σε δευτερογενή σπόρια *E. dicksonii*. Οι κεφαλές βελών δείχνουν εγκυστωμένα ζωοσπόρια *E. dicksonii* κοντά στο νήμα του φύκους. Β. Εικόνα ΗΜΣ παρουσιάζει ένα

προσκολλημένο δευτερογενές σπόριο *E. dicksonii* στο κυτταρικό τοίχωμα του φαιοφύκους. Τα βέλη δείχνουν το ινώδες υλικό που περιβάλλει το δευτερογενές σπόριο. Γ. Εικόνα φωτεινού πεδίου που παρουσιάζει ένα δευτερογενές σπόριο του ωμούκητα με σωληνοειδή προεκβολή.

το οποίο κατά τα πρώτα στάδια της εγκύστωσης έχει πάχος ~200 nm (Εικ. III.5.A, B), ενώ τελικά, μετά την προσκόλληση αποκτά πάχος ~400 nm (Εικ. III.6).

Ορισμένα ζωοσπόρια του *E. dicksonii* εγκυστώνονται στην εγγύς περιοχή του φύκους χωρίς να έχουν άμεση επαφή με αυτό ή ενίοτε προσδένονται χαλαρά στο κύτταρο του ξενιστή (κεφαλές βελών στην Εικ. III.4.A, Εικ. III.5.A). Ακόμη, κάποια δευτερογενή σπόρια σχηματίζουν μια σωληνοειδή προεκβολή, χωρίς ταυτόχρονη πρόσδεση στο κύτταρο του ξενιστή (βέλη στην Εικ. III.4.A, Εικ. III.4.Γ, III.5.Γ). Αυτά τα δευτερογενή σπόρια περιέχουν ένα μεγάλου μεγέθους χυμοτόπιο, το οποίο είναι ορατό στο οπτικό μικροσκόπιο και περιέχει έγκλειστα (Εικ. III.4.A), όπως ακριβώς και τα δευτερογενή σπόρια χωρίς σωληνοειδή προεκβολή. Η σωληνοειδής προεκβολή που σχηματίζεται έχει πάχος ~1μm, ενώ το μήκος της ποικίλλει και φτάνει τα 10 μm (Εικ. III.4.Γ, III.5.Γ, III.5.E). Ο πυρήνας του δευτερογενούς σπορίου με σωληνοειδή προεκβολή, ενώ αρχικά παραμένει στο κύριο σώμα του κυττάρου, σταδιακά μεταφέρεται μαζί με τον υπόλοιπο πρωτοπλάστη προς το ακραίο τμήμα της προεκβολής (Εικ. III.5.Γ). Επιπλέον, στο εσωτερικό του κυτοπλάσματος παρατηρήθηκαν επιμήκη κυστίδια που περικλείουν μαστιγονημάτια (βέλος στην Εικ. III.5.Δ). Κάποιες από τις σωληνοειδείς προεκβολές καταλήγουν σε πλάκα προσκόλλησης (Εικ. III.5.E).

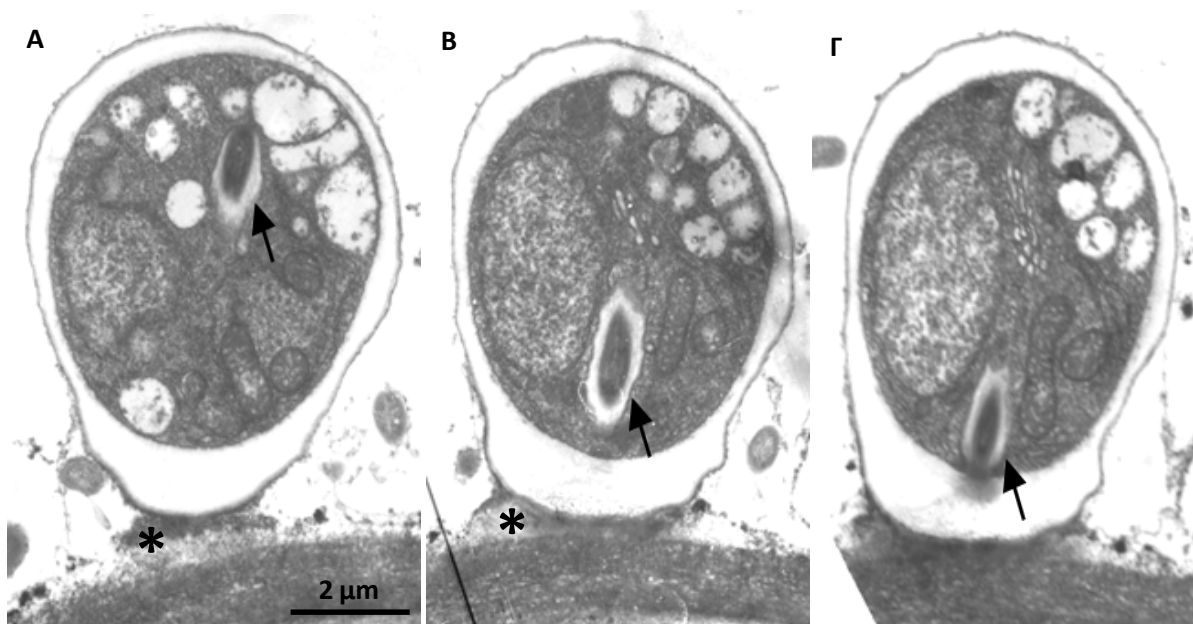
Σε μολυσμένες καλλιέργειες ηλικίας άνω των τριών εβδομάδων, παρατηρείται τακτικά το φαινόμενο της προσκόλλησης μεταξύ δυο δευτερογενών σπορίων του *E. dicksonii* και ο σχηματισμός πλάκας προσκόλλησης, ενώ εντοπίζεται και βελονοειδής δομή διάτρησης (Εικ. III.5.ΣΤ). Οι εν λόγω καλλιέργειες θεωρούνται ηλικιωμένες, αφού υπερβαίνουν σημαντικά τις 14 ημέρες που απαιτούνται για την ολοκλήρωση ενός κύκλου μόλυνσεων του παράσιτου. Το φαινόμενο αυτό δεν αποτελεί σύντηξη αφού δεν εντοπίστηκε μεταφορά πρωτοπλάστη ή γενετικού υλικού μεταξύ των προσκολλημένων σπορίων.



Εικόνα III.5. Εγκύστωση και προσκόλληση μεταξύ δευτερογενών σπορίων *E. dicksonii* (ΗΜΔ). Α. Ραβδοειδής σχηματισμός σε δευτερογενές σπόριο. Β. Μεγέθυνση του ραβδοειδούς σχηματισμού (διπλή κεφαλή βελών), όπου το βέλος δείχνει την πλασματική μεμβράνη και η κεφαλή βέλους το ηλεκτρονιόπυκνο, κορυφαίο τμήμα της δομής. Γ. Δευτερογενές σπόριο με μακριά σωληνοειδή προεκβολή. Δ. Πρωτοπλάστης του δευτερογενούς σπορίου

με σωληνοειδή προεκβολή εμφανίζει σωληνοειδές κυστίδιο που περικλείει μαστιγονημάτια (βέλος). Ε. Ακραίο τμήμα σωληνοειδούς προεκβολής με σχηματισμένη πλάκα προσκόλλησης (βέλος). ΣΤ. Προσκόλληση μεταξύ δυο ελεύθερων δευτερογενών σπορίων. Ζ. Ωριμο ζωοσποριάγγειο *E. dicksonii* στο οποίο εντοπίζεται προσκόλληση σπορίων στο κυτταρικό τοίχωμα άδειων σπορίων.

Τα δευτερογενή σπόρια του *E. dicksonii* που προσδένονται άμεσα στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή αποκτούν βαθμιαία ασύμμετρη οργάνωση, που χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό της πλάκας προσκόλλησης, η οποία βρίσκεται σε άμεση επαφή με το φύκος (Εικ. ΙΙΙ.4.Β, ΙΙΙ.6). Σε αυτό το στάδιο, το τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος του σπορίου που βρίσκεται σε επαφή με τον ξενιστή παχύνεται όπως περιγράφηκε παραπάνω (Εικ. ΙΙΙ.6) και ένα συνδετικό στρώμα ηλεκτρονιόπυκνου υλικού φαίνεται να προσδένει το δευτερογενές σπόριο του παράσιτου με το κυτταρικό τοίχωμα του φύκους (αστερίσκος στις Εικ. ΙΙΙ.6.Α, ΙΙΙ.6.Β). Το υλικό αυτό εντοπίζεται και σε μετέπειτα στάδια της διαφοροποίησης του δευτερογενούς σπορίου (αστερίσκοι στις Εικ. ΙΙΙ.7.Β, Γ, ΙΙΙ.8.Α). Επιπρόσθετα, ινώδες υλικό εντοπίζεται μεταξύ της πλάκας προσκόλλησης του σπορίου και του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (κεφαλή βέλους στην Εικ. ΙΙΙ.8.Α). Το υλικό αυτό σχηματίζει ένα είδος προσκολλητικού στρώματος, το οποίο έχει μήκος έως και τρεις φορές μεγαλύτερο από τη διάμετρο του σπορίου, παράλληλα με το κυτταρικό τοίχωμα του φύκους (βλέπε επίσης Εικ. ΙΙΙ.18.Α). Αυτό το ινώδες υλικό εμφανίζεται και σε εικόνες ΗΜΣ σπορίου του *E. dicksonii* προσκολλημένου στο φύκος (βέλη στην Εικ. ΙΙΙ.4.Β). Παρατηρείται, επίσης, ότι κάποια δευτερογενή σπόρια σχηματίζουν πλάκα προσκόλλησης και προσδένονται μέσω αυτής με το κυτταρικό τοίχωμα άδειων σπορίων εντός του σποριαγγείου (Εικ. ΙΙΙ.5.Ζ). Πρόκειται για ζωοσπόρια που δεν διέφυγαν από το σποριάγγειο, εγκυστώνονται στο εσωτερικό του και προσκολλώνται στο κυτταρικό τοίχωμα άδειων πρωτογενών σπορίων (Εικ. ΙΙΙ.5.Ζ). Το γεγονός αυτό πιθανότατα φανερώνει ότι η διαφοροποίηση της πλάκας προσκόλλησης του σπορίου του *E. dicksonii* δεν συνδέεται αποκλειστικά με την αναγνώριση του ξενιστή από το παράσιτο.



Εικόνα III.6. Αρχικά στάδια διαφοροποίησης της βελονοειδούς δομής στο εσωτερικό ενός σπορίου *E. dicksonii* προσκολλημένου στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Σειρά τομών ΗΜΔ δείχνουν ότι η βελονοειδής δομή εκτείνεται κατά μήκος του κεντρικού άξονα του σπορίου (βέλη).

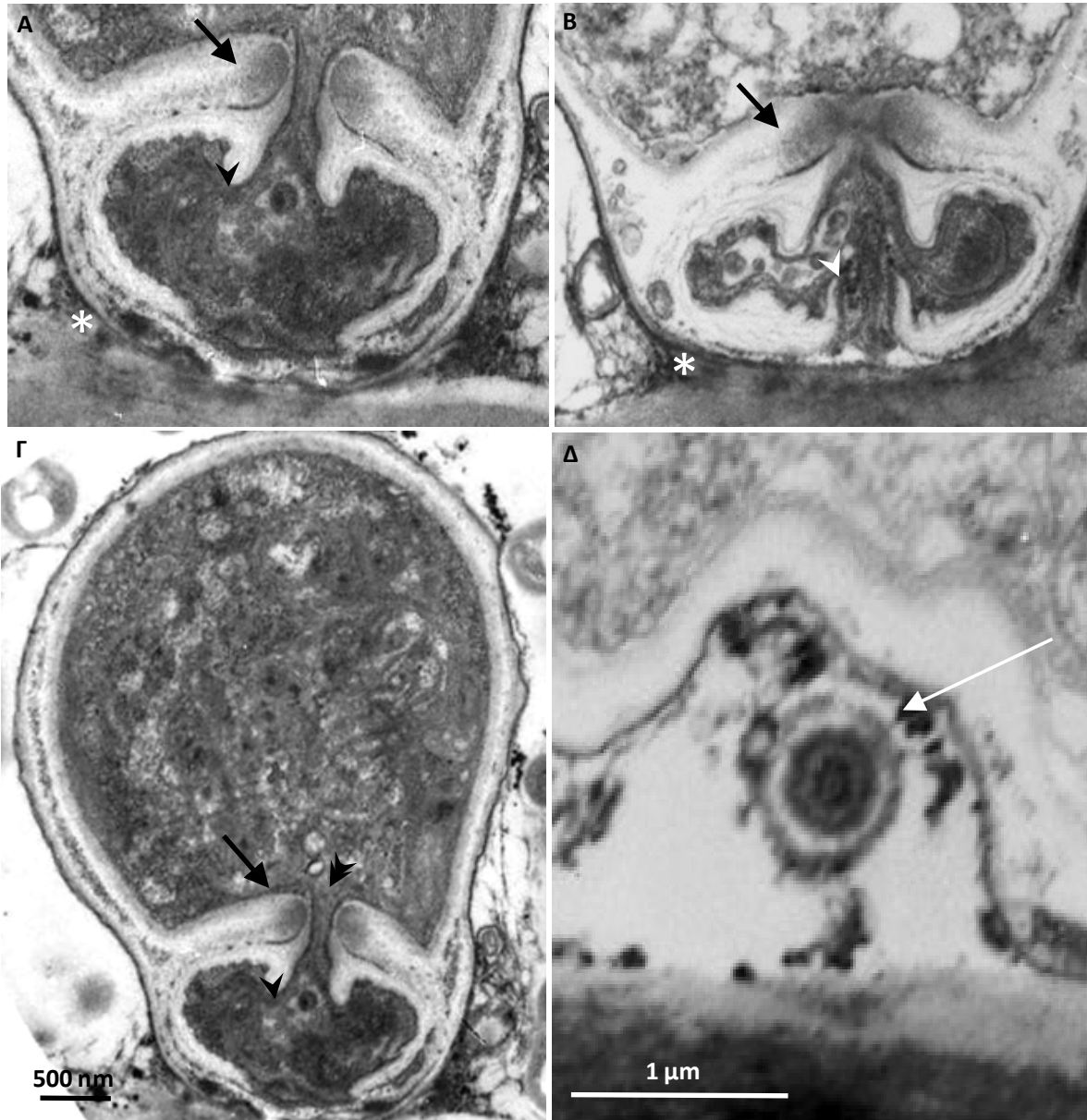
III.1.3. Διείσδυση του *E. dicksonii* στο κύτταρο-ξενιστή

Το δευτερογενές σπόριο που βρίσκεται προσκολλημένο στο κυτταρικό τοίχωμα του φύκους, περιλαμβάνει ηλεκτρονικά πυκνό κυτόπλασμα, έναν πυρήνα τοποθετημένο πλευρικά, ένα ενεργό δικτυοσωμάτιο και μια ομάδα μιτοχονδρίων στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα (Εικ. III.6). Το κορυφαίο τμήμα του σπορίου, δηλαδή αυτό που βρίσκεται απέναντι από το κύτταρο του ξενιστή, καταλαμβάνουν πολυάριθμα ευμεγέθη κυστίδια με ηλεκτρονιόπυκνα έγκλειστα (Εικ. III.6). Επιπλέον, παρατηρείται μια συμπαγής ηλεκτρονιόπυκνη βελονοειδής δομή, η οποία εκτείνεται κατά μήκος του κεντρικού άξονα του σπορίου. Ύστερα από παρατήρηση σειράς τομών ΗΜΔ, διαπιστώθηκε ότι αυτή η δομή διασχίζει κατά μήκος ολόκληρο το σπόριο, το μήκος της είναι ~4 μm και το πλάτος της ~400 nm (Εικ. III.6). Ένα πιθανό αρχικό στάδιο ανάπτυξης της δομής αυτής παρουσιάζεται στις εικόνες III.5.A και III.5.B, οι οποίες δείχνουν ένα ελεύθερο, μη προσκολλημένο δευτερογενές σπόριο *E. dicksonii* στο οποίο εντοπίζεται χαρακτηριστική απόθεση τοιχωματικού υλικού (βέλος στην Εικ. III.5.A). Πιο συγκεκριμένα, τοιχωματικό υλικό φαίνεται να αποτίθεται από την περιφέρεια του σπορίου προς την κεντρική περιοχή αυτού, δημιουργώντας έναν ραβδοειδή σχηματισμό. Ο σχηματισμός αυτός χαρακτηρίζεται από μια πυκνή κοκκιώδη ζώνη (διπλή κεφαλή βέλους στην Εικ. III.5.B), ενώ

στην κορυφή βρίσκεται μία έντονα ηλεκτρονιόπυκνη και σαφώς διαχωρισμένη από τη βάση περιοχή (κεφαλή βέλους στην Εικ. III.5.B). Η πλασματική μεμβράνη του σπορίου περιβάλλει τον ραβδοειδή σχηματισμό και γίνεται σαφές ότι το τοιχωματικό υλικό αποτίθεται έξω από το πλασμαλήμμα (βέλος στην Εικ. III.5.B).

Σε επόμενο στάδιο και μετά τον σχηματισμό της, η βελονοειδής δομή εξακολουθεί να περιβάλλεται από την πλασματική μεμβράνη του σπορίου και βρίσκεται σε άμεση επαφή με μια ηλεκτρονιόπυκνη ζώνη στη βάση του δευτερογενούς σπορίου (Εικ. III.6.Γ). Αυτή η ζώνη πιθανώς αντιστοιχεί στην ηλεκτρονιόπυκνη περιοχή που αποτυπώνεται στην Εικ. III.5.B. Η βελονοειδής δομή χαρακτηρίζεται από τρεις στρώσεις υλικών τοιχωματικής προέλευσης και διαφορετικής υφής. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από ένα κεντρικό τμήμα το οποίο στο ΗΜΔ εμφανίζεται ως μια συμπαγής πυκνή μάζα (Εικ. III.5.B). Γύρω από την κεντρική περιοχή παρατηρείται ένα λιγότερο ηλεκτρονιόπυκνο στρώμα, το οποίο περιβάλλεται από μια λεπτή εξωτερική στρώση ηλεκτρονικά διαφανούς υλικού (Εικ. III.6, III.7.Δ). Οι τρεις στιβάδες της πολύστρωμης βελονοειδούς δομής διακρίνονται εμφανώς σε εγκάρσια τομή παρεκκλίνοντας από το κύτταρο-στόχο δευτερογενούς σπορίου, το οποίο φαίνεται πως απέτυχε να προσκολληθεί στο κύτταρο του ξενιστή και ως εκ τούτου η συσκευή διάτρησης του κυτταρικού τοιχώματος εμφανίζεται σε εγκάρσια τομή ελεύθερη (Εικ. III.7.Δ).

Ακολούθως, πραγματοποιούνται διαφοροποιήσεις του κυτταρικού τοιχώματος στη βάση του προσκολλημένου δευτερογενούς σπορίου, οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία μίας διαφοροποιημένης κοιλότητας που ορίζεται ως πλάκα προσκόλλησης (*adhesorium pad*). Η πλάκα προσκόλλησης βρίσκεται σε άμεση επαφή με το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή (Εικ. III.7Α, Β, Γ). Λεπτομερέστερα, τοιχωματικές προεκβολές προς το εσωτερικό του δευτερογενούς σπορίου (βέλη στις Εικ. III.7Α, Β, Γ) το διαμερισματοποιούν, διαχωρίζοντάς το σε δύο τμήματα: το άνω τμήμα, το οποίο καταλαμβάνει περίπου τα 2/3 του συνολικού όγκου και περιλαμβάνει τον πρωτοπλάστη του παράσιτου και το κάτω τμήμα, το οποίο αποτελεί μία κοιλότητα στη βάση του δευτερογενούς σπορίου (Εικ. III.7Α, Β, Γ). Τα δύο τμήματα συνδέονται με έναν κεντρικό ανοιχτό πόρο που επιτρέπει την κυτοπλασματική συνέχεια (διπλή κεφαλή βέλους στις Εικ. III.7Α, Β), ενώ σε επόμενο στάδιο η βελονοειδής δομή διέρχεται μέσω του ανοιχτού



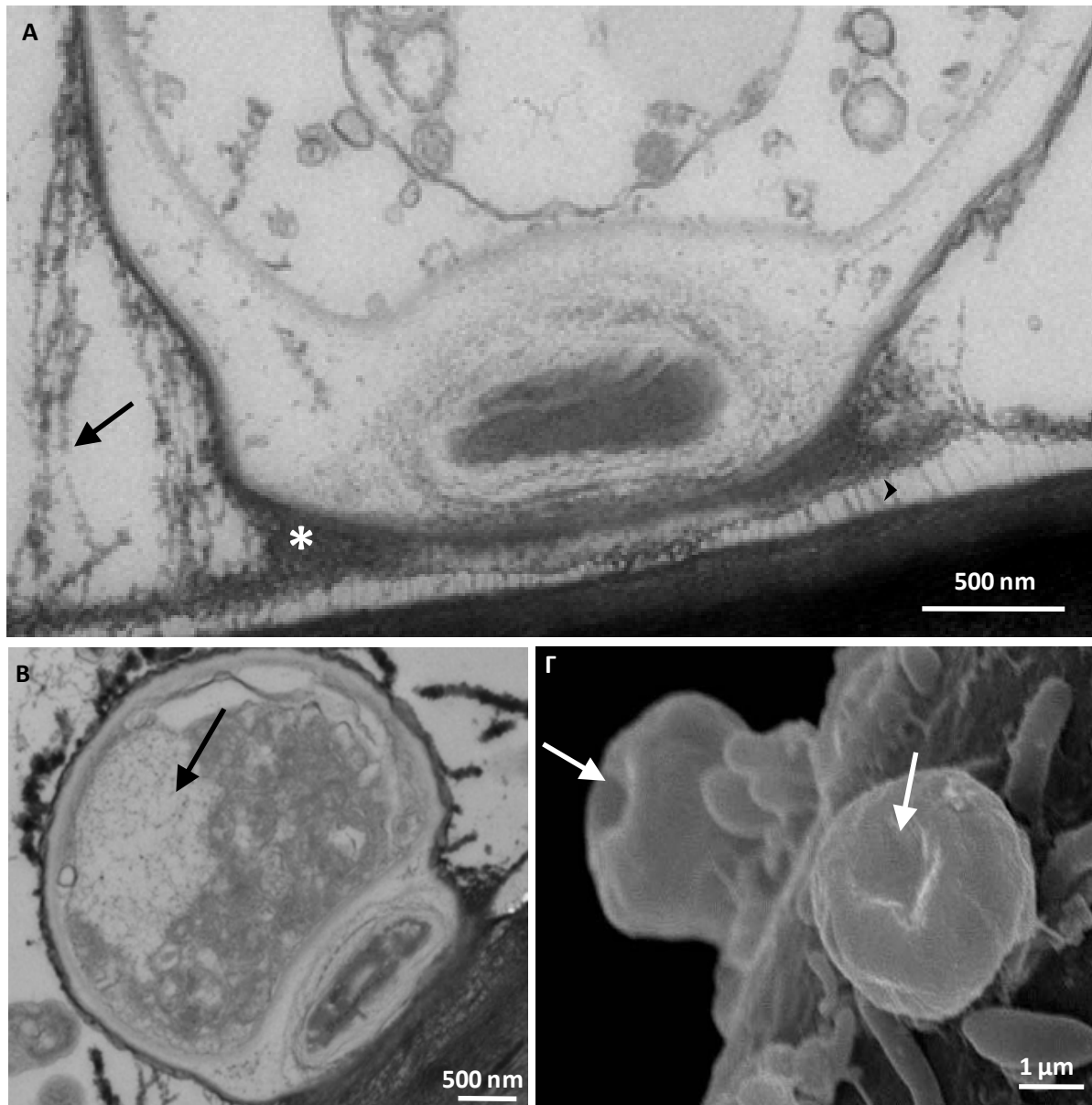
Εικόνα III.7. Διαφοροποίηση κυτταρικού τοιχώματος στην πλάκα προσκόλλησης του σπορίου *E. dicksonii* (ΗΜΔ). Α. Μεγέθυνση του σπορίου της Εικ. Γ που παρουσιάζει την πλάκα προσκόλλησης. Το βέλος δείχνει τις εσωτερικές προεκβολές του κυτταρικού τοιχώματος και η κεφαλή βέλους το ηλεκτρονικά διαφανές υλικό που καλύπτει εσωτερικά την πλάκα προσκόλλησης. Ο αστερίσκος δείχνει το συνδετικό στρώμα ηλεκτρονιόπυκνου υλικού. Β. Πλάκα προσκόλλησης σπορίου σε μεγέθυνση που δείχνει τις χαρακτηριστικές πτυχώσεις του κυτταρικού τοιχώματος. Ισχύουν οι αντίστοιχες ενδείξεις της Εικ. Α. Γ. Το βέλος δείχνει τις τοιχωματικές προεκβολές, η κεφαλή βέλους το ηλεκτρονικά διαφανές, εσωτερικό υλικό και η διπλή κεφαλή βέλους τον κεντρικό ανοιχτό πόρο. Δ. Το βέλος δείχνει τη βελονοειδή δομή του σπορίου σε εγκάρσια τομή.

αυτού πόρου με κατεύθυνση κάθετη προς το κύτταρο του ξενιστή προκειμένου να το τρυπήσει (Εικ. III.9.Α-Γ). Η εσωτερική επιφάνεια της κοιλότητας καλύπτεται από ένα στρώμα τοιχωματικού υλικού, το οποίο εμφανίζεται λιγότερο ηλεκτρονιόπυκνο από το εξωτερικό

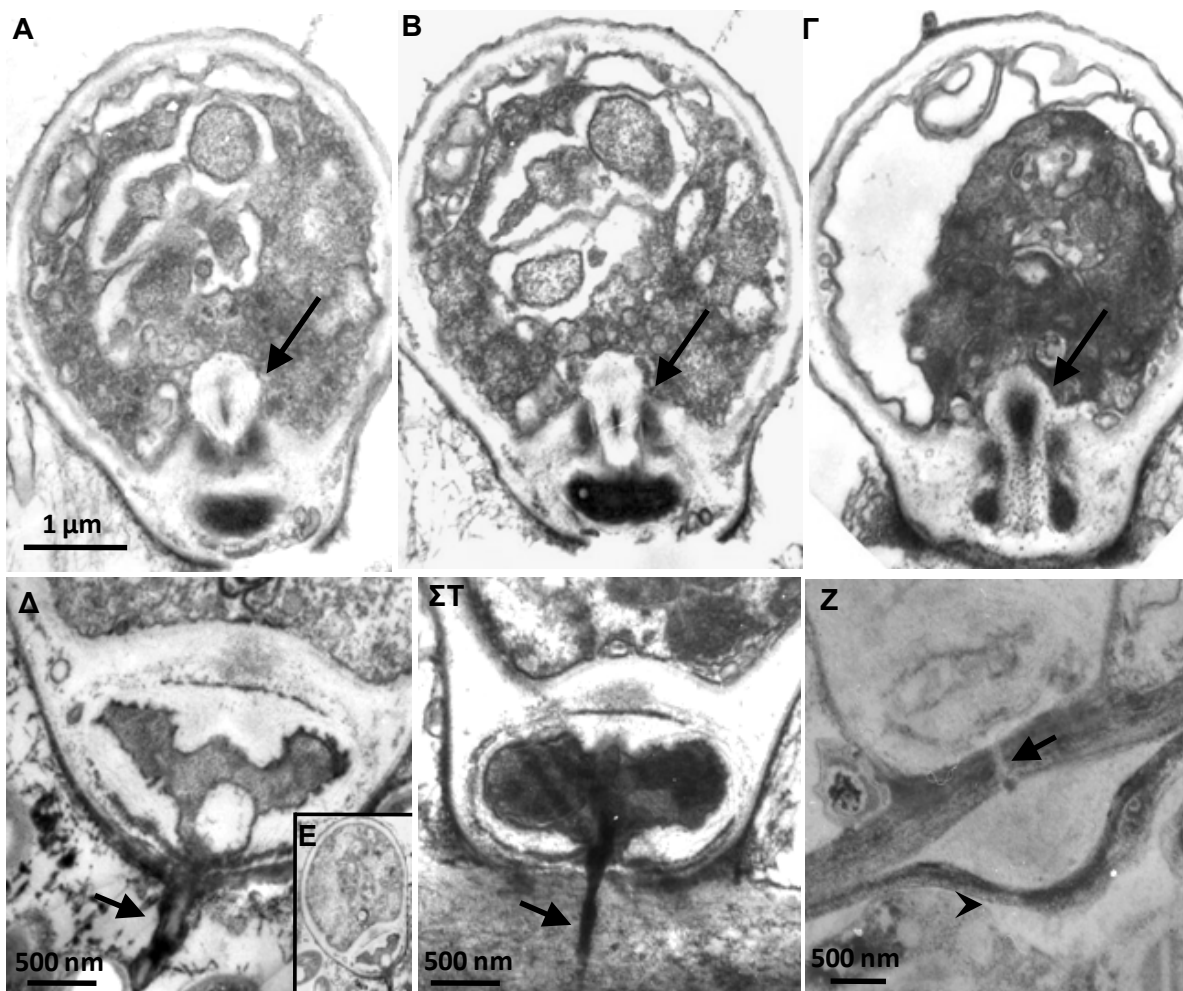
στρώμα και σχηματίζει χαρακτηριστικές εγκολπώσεις (κεφαλή βελών στις Εικ. III.7A, B). Η απόθεση του εσωτερικού στρώματος τοιχωματικού υλικού πιθανότατα ξεκινά από την κορυφή της κοιλότητας, όπου σχηματίζονται δύο εγκολπώσεις εκατέρωθεν του ανοιχτού πόρου, και στη συνέχεια επεκτείνεται στο υπόλοιπο διαμέρισμα (κεφαλή βέλους στην Εικ. III.7A). Ήδη από προηγούμενα στάδια, παρατηρείται ότι το κυτταρικό τοίχωμα στη βάση του σπορίου παραμένει λεπτό, ενώ σε συγκεκριμένες τομές ΗΜΔ φαίνεται να απουσιάζει τελείως από το σημείο επαφής παράσιτου-ξενιστή (Εικ. III.7A). Να σημειωθεί ότι το κυτόπλασμα του παράσιτου έρχεται σε άμεση επαφή με το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή στα σημεία όπου δεν παρεμβάλλεται το κυτταρικό τοίχωμα του παράσιτου. Τέλος, η απόθεση του εσωτερικού στρώματος τοιχωματικού υλικού ολοκληρώνεται στη βάση της κοιλότητας του σπορίου με τη δημιουργία πτυχώσεων (κεφαλή βέλους στην Εικ. III.7.B).

Σε ώριμα δευτερογενή σπόρια εντοπίζεται στην κορυφή του πρωτοπλάστη ένα ευμέγεθες χυμοτόπιο (βέλος στις Εικ. III.8.B, III.9.Γ). Επιπροσθέτως, σε εικόνες ΗΜΣ προσκολλημένων σπορίων εμφανίζονται κοιλότητες στην κορυφή (βέλη στην Εικ. III.8.Γ), παρ' ότι δεν παρατηρούνται αντίστοιχες εσοχές του κυτταρικού τοιχώματος σε εικόνες ΗΜΔ (Εικ. III.9.A-Γ).

Σε επόμενη φάση, η βελονοειδής δομή φαίνεται να διέρχεται μέσω του ανοιχτού διαύλου και, οδηγούμενη από τις τοιχωματικές εγκολπώσεις της πλάκας προσκόλλησης, κατευθύνεται κάθετα προς το επίπεδο του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή με σκοπό να το τρυπήσει. Το κεντρικό συμπαγές τμήμα της βελονοειδούς δομής εκτοξεύεται έξω από το σπόριο και προκαλεί τη ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (βέλη στις Εικ. III.9.Δ-ΣΤ). Μετά τη διάτρηση, μέρος του πρωτοπλάστη του παράσιτου (πυρήνας, μιτοχόνδρια, κυστίδια και κυτοπλασματικό υλικό) μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή διαμέσου της προκαλούμενης από τη βελονοειδή δομή οπής στο κυτταρικό τοίχωμα του φύκους (Εικ. III.9.Z).



Εικόνα III.8. Δευτερογενή σπόρια *E. dicksonii* προσκολλημένα στο κυτταρικό τοίχωμα του φύκους. Α. Ινώδες υλικό καλύπτει το δευτερογενές σπόριο του παράσιτου (βέλος) και εναπόθεση προσκολλητικού στρώματος ινώδους υλικού παρατηρείται στη βάση του σπορίου (κεφαλή βέλους). Αστερίσκος: Συνδετικό στρώμα (ΗΜΔ). Β. Σχηματισμός χυμοτοπίου στο κορυφαίο τμήμα δευτερογενούς σπορίου (ΗΜΔ). Εικ. Γ. Κοιλότητες στο κορυφαίο τμήμα προσκολλημένων στο φύκος δευτερογενών σπορίων (βέλη, ΗΜΣ).

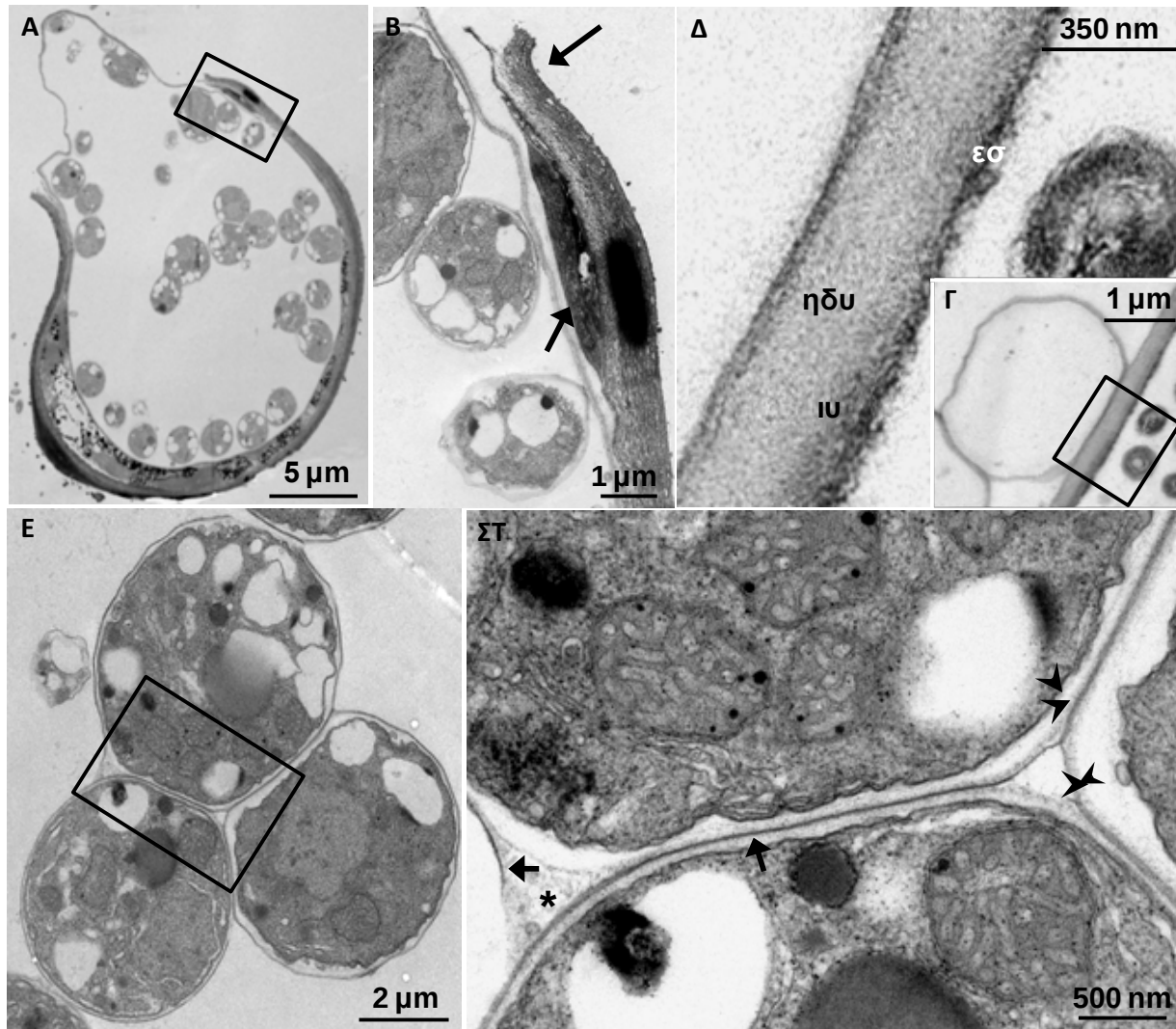


Εικόνα III.9. Βελονοειδής δομή του *E. dicksonii* και διείσδυση του παράσιτου στον ξενιστή (ΗΜΔ). Α-Γ. Σειρά τομών του ίδιου δευτερογενούς σπορίου. Τα βέλη δείχνουν τη βελονοειδή δομή να διέρχεται μέσω του ανοιχτού πόρου του σπορίου. Δ. Το βέλος δείχνει την κεντρική ηλεκτρονιόπυκνη περιοχή της βελονοειδούς δομής, αφού έχει εκτοξευτεί από το σπόριο. Ε. Μικρότερη μεγέθυνση του σπορίου της Εικ. Δ. ΣΤ. Κεντρική ηλεκτρονιόπυκνη περιοχή της βελονοειδούς δομής αφού εξέλθει από το σπόριο (βέλος). Ζ. Διάτρηση κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή στην περιοχή της προσβολής από το παράσιτο (βέλος) και εναπόθεση υλικού υπό μορφή θηλής στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή (κεφαλή βέλους).

III.1.4. Λεπτή δομή κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου κατά τη διάρκεια των τελικών σταδίων της μόλυνσης

Τα διαφοροποιημένα πρωτογενή σπόρια στο εσωτερικό του ώριμου σποριαγγείου του *E. dicksonii* εμφανίζουν χαρακτηριστική περιφερειακή διάταξη (Εικ. III.10.A). Σε αυτό το στάδιο, ο ώριμος θαλλός του παράσιτου διογκώνεται περαιτέρω και, αφού διαρρήξει το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή, λαμβάνει το τελικό σχήμα του σποριαγγείου με τη διάνοιξη του(ων) σωλήνα(ων) απελευθέρωσης (Εικ. III.10.A). Ο πρωτοπλάστης του φύκους που βρίσκεται πλέον πλήρως απωθημένος στην περιφέρεια του σποριαγγείου (Εικ. III.10.A), περιέχει αποδιοργανωμένους χλωροπλάστες (αριστερό βέλος στην Εικ. III.10.B). Το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή στο σημείο της ρήξης εμφανίζεται λεπτότερο και ελαφρώς παραμορφωμένο (δεξιό βέλος στην Εικ. III.10.B). Το κυτταρικό τοίχωμα του σποριαγγείου του παράσιτου αποτελείται από τρεις εμφανείς ζώνες: ένα λεπτό εξωτερικό ηλεκτρονιόπυκνο στρώμα (~50 nm πάχος), ένα ινώδες ενδιάμεσο υλικό (~100 nm πάχος) και μια παχειά εσωτερική και λιγότερο ηλεκτρονιόπυκνη περιοχή (~250 nm πάχος) (Εικ. III.10.Γ, Δ).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά τα πρώτα στάδια ωρίμανσης του ζωοσποριάγγειου τα οργανίδια του κοινοκυττικού θαλλού του *E. dicksonii* καταλαμβάνουν περιφερειακή διάταξη (Sekimoto και συν. 2008β, βλέπε επίσης Εικ. III.11.Γ) και ακολουθεί κυτταροποίηση του κοινοκυττικού θαλλού με τελικό αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των πρωτογενών σπορίων (Εικ. III.10.A). Μάλιστα, σε εικόνα ΗΜΔ (Εικ. III.11.Γ) δείχνεται ότι κατά την αρχή της ωρίμανσης του ζωοσποριάγγειου ο θαλλός καταλαμβάνεται κεντρικά από ένα ευμέγεθες χυμοτόπιο (βλέπε εξήγηση στο υποκεφάλαιο III.2.1 των Αποτελεσμάτων). Τα πρωτογενή σπόρια βρίσκονται διατεταγμένα περιφερειακά εντός του ώριμου σποριαγγείου, όπου ορισμένα από αυτά έχουν αποκολληθεί μεταξύ τους ενώ άλλα παραμένουν σε επαφή, ως αποτέλεσμα της διαδικασίας κυτταροποίησης που προήγηθηκε (Εικ. III.10.A, Ε). Νέα δεδομένα που προκύπτουν από βελτιωμένες τεχνικές στερέωσης ΗΜΔ, επιτρέπουν λεπτομερέστερη μελέτη της δομής του κυτταρικού τοιχώματος των πρωτογενών σπορίων του *E. dicksonii* (Εικ. III.10.E, ΣΤ). Σε προηγούμενη εξέταση της λεπτής δομής αναφέρεται ότι τα πρωτογενή σπόρια περιβάλλονται από ένα διακριτό εξωτερικό ηλεκτρονιόπυκνο στρώμα (Εικ. III.10.E, βέλος στην Εικ. III.10.ΣΤ' Sekimoto και συν. 2008β) και μία λεπτή εσωτερική ινώδη ζώνη (διπλή κεφαλή βέλους στην Εικ.



Εικόνα III.10. Εικόνες ΗΜΔ δομών του ζωοσποριάγγελιου *E. dicksonii*. Α. Ζωοσποριάγγειο (ώριμος θαλλός) με περιφερειακά διατεταγμένα πρωτογενή σπόρια. Β. Μεγαλύτερη μεγέθυνση της σημασμένης περιοχής της Εικ. Α. Τα βέλη δείχνουν το διαρρηγμένο κυτταρικό τοίχωμα (δεξί) και τον αποδιοργανωμένο πρωτοπλάστη του ξενιστή (αριστερό). Γ. Άδεια πρωτογενή σπόρια προσκολλημένα στο κυτταρικό τοίχωμα του ζωοσποριάγγελιου. Δ. Μεγαλύτερη μεγέθυνση της σημασμένης περιοχής της Εικ. Γ, η οποία παρουσιάζει το κυτταρικό τοίχωμα του ζωοσποριάγγελιου. ηδυ: ηλεκτρονικά διαφανές υλικό, ιυ: ινώδες υλικό, εσ: εξωτερικό στρώμα. Εικ. Ε. Πρωτογενή σπόρια σε επαφή. Εικ. ΣΤ. Μεγαλύτερη μεγέθυνση της σημασμένης περιοχής της Εικ. Ε, η οποία παρουσιάζει την αρχιτεκτονική του κυτταρικού τοιχώματος πρωτογενών σπορίων σε επαφή. Βέλη: εξωτερικό, ηλεκτρονιόπυκνο υλικό. Κεφαλές βελών: ηλεκτρονικά διαφανής ζώνη. Διπλή κεφαλή βελών: λεπτή, ινώδης ζώνη. Αστερίκος: Ινώδες υλικό μεταξύ των πρωτογενών σπορίων που βρίσκονται σε επαφή.

III.10.ΣΤ). Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται ένα επιπλέον στρώμα ηλεκτρονικά διαφανούς υλικού που βρίσκεται εσωτερικά της ινώδους ζώνης (κεφαλές βέλους στην Εικ. III.10.ΣΤ). Ακόμη, εντοπίζεται υλικό με ινώδη υφή μεταξύ των κυτταρικών τοιχωμάτων γειτονικών πρωτογενών σπορίων (αστερίκος στην Εικ. III.10.ΣΤ). Τέλος, το εξωτερικό, ηλεκτρονιόπυκνο

στρώμα που περιβάλλει τα πρωτογενή σπόρια που βρίσκονται ακόμη σε άμεση επαφή εμφανίζει ασυνέχεια σε συγκεκριμένα σημεία, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στη διαδικασία αποκόλλησης των πρωτογενών σπορίων (αριστερό βέλος στην Εικ. III.10.ΣΤ).

III.2. Κυτταροσκελετός

III.2.1. Μικροσωληνίσκοι (ΜΣ)

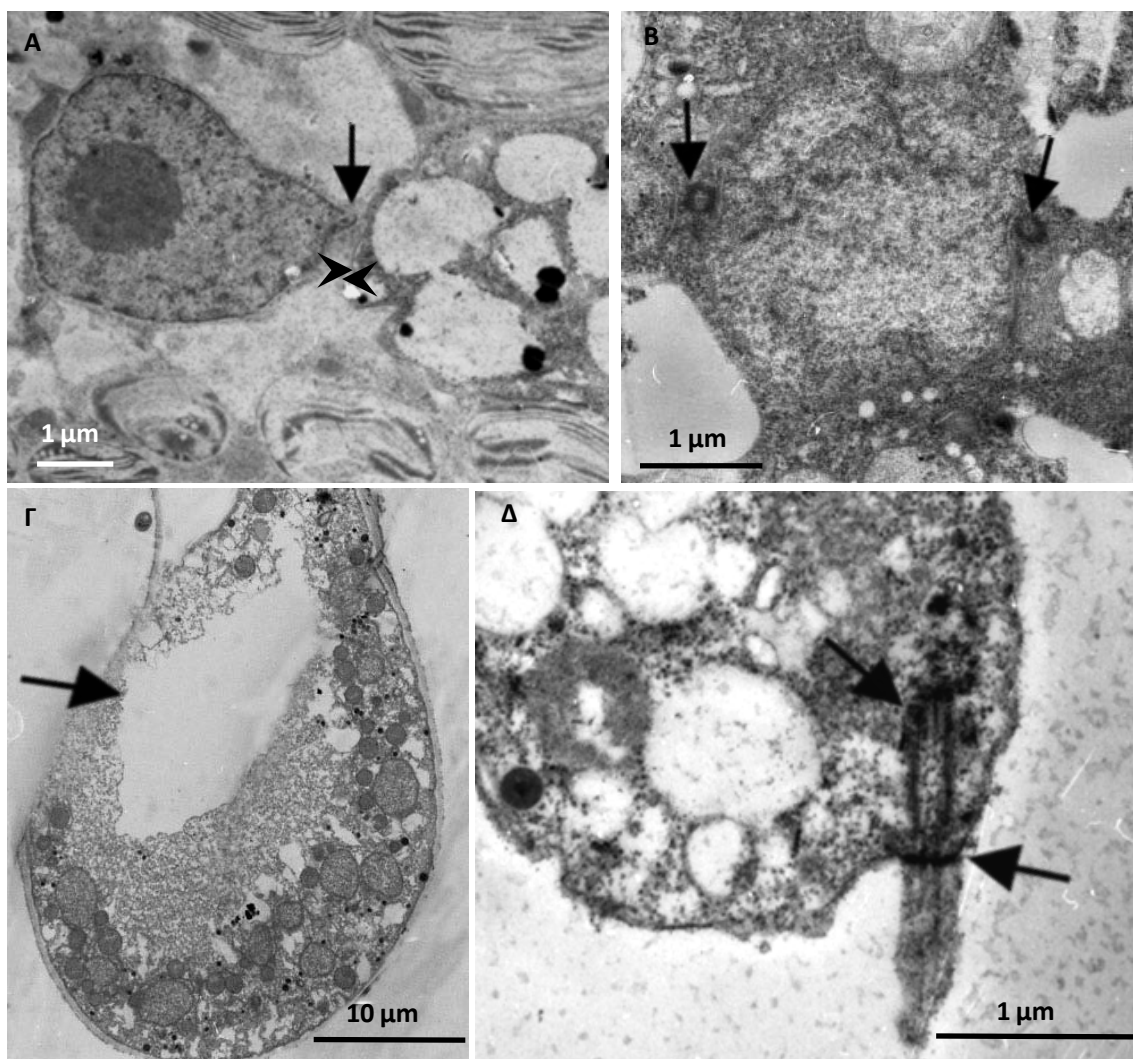
Η οργάνωση των ΜΣ σε βλαστητικά κύτταρα των *E. siliculosus*, *E. crouaniorum* και *P. littoralis* ομοιάζει με τις περιγραφές σε υπάρχουσες μελέτες κυτταροσκελετού διαφορετικών ειδών φαιοφυκών (Katsaros 1995· Katsaros και συν. 1991, 1992, 2006). Για λόγους σύγκρισης, παρατίθεται η οργάνωση των ΜΣ σε μεσοφασικό βλαστητικό κύτταρο του *E. siliculosus* (Εικ. III.13.A, Β). Ο κυτταροσκελετός των ΜΣ αποτελείται από δέσμες ΜΣ που εκτείνονται από ένα σημείο κοντά στον πυρήνα (Εικ. III.13.A, Β), όπου βρίσκεται το κεντροσωμάτιο (βέλος στην Εικ. III.13.A), ως την περιφέρεια του κυττάρου, ενώ κάποιες δέσμες ΜΣ περιβάλλουν τον πυρήνα.

Αρχικά στάδια μόλυνσης και δημιουργία βλαστητικού θαλλού

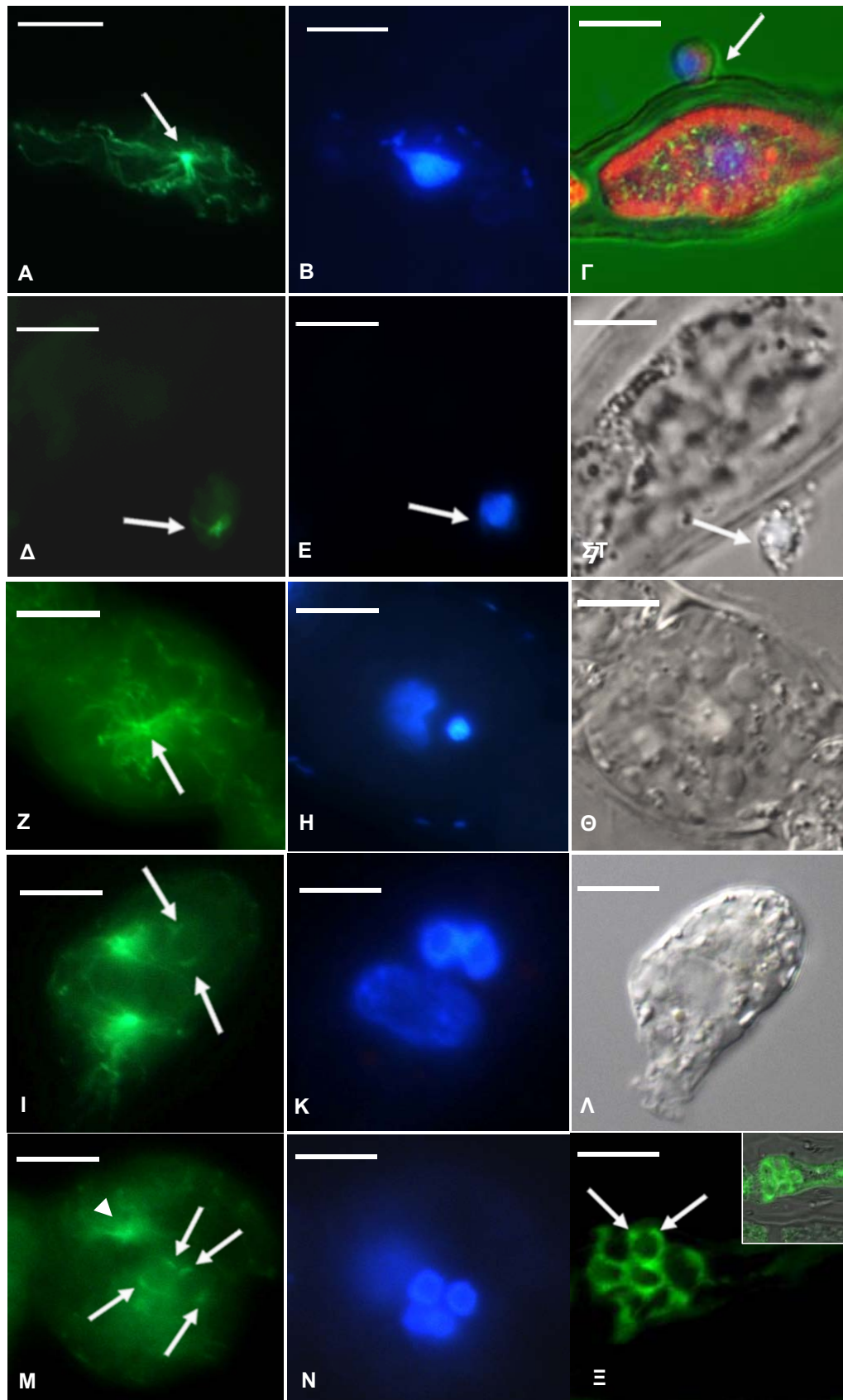
Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, η έναρξη της μόλυνσης σηματοδοτείται από την προσκόλληση ενός δευτερογενούς σπορίου *E. dicksonii* στο κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου-ξενιστή, με σκοπό τη διάτρησή του και τη μεταφορά μέρους του πρωτοπλάστη του στο εσωτερικό του φύκους. Να σημειωθεί ότι δεν έχει διευκρινιστεί από τους Sekimoto και συν. (2008β) ποιά ακριβώς οργανίδια του παράσιτου μεταφέρονται στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Ωστόσο, σε αρχικά στάδια μόλυνσης, ο βλαστητικός θαλλός του *E. dicksonii* περιέχει μιτοχόνδρια, πυρήνα και κυστίδια με έγκλειστα (βλέπε επίσης Εικ. III.2.Β, Γ). Συνεπώς εικάζεται ότι ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια, τα κυστίδια και κυτοπλασματικό υλικό μεταφέρονται από το δευτερογενές σπόριο του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή.

Κατά το αρχικό στάδιο της προσβολής, όπου το δευτερογενές σπόριο βρίσκεται προσκολλημένο στο κυτταρικό τοίχωμα του φύκους, ο κυτταροσκελετός των ΜΣ του κυττάρου-ξενιστή φαίνεται ανεπηρέαστος και φέρει την τυπική οργάνωση που χαρακτηρίζει ένα υγιές κύτταρο (Εικ. III.13.A), με δέσμες ΜΣ να οργανώνονται από το κεντροσωμάτιο που γειτνιάζει με τον πυρήνα και να εκτείνονται από το σημείο αυτό προς όλες τις κατευθύνσεις του

κυττάρου. Ας σημειωθεί, ωστόσο, ότι το μικρό μέγεθος των δευτερογενών σπορίων του παράσιτου (3-5 μm) δεν επιτρέπει την υψηλής ανάλυσης αποτύπωση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού με μικροσκόπιο φθορισμού. Παρ' όλα αυτά, τα πειράματα ανοσοεντόπισης σωληνίνης δείχνουν περιπυρηνικό διάχυτο φθορισμό (Εικ. III.13.Γ) και ένα έντονα φθορίζον κοκκίο πλησίον του πυρήνα του δευτερογενούς σπορίου του παράσιτου (βέλος στην Εικ. III.13.Δ). Μετά τη διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος του φύκου από το δευτερογενές σπόριο του παράσιτου, ο πυρήνας του ξενιστή εκτείνεται προς το σημείο προσκόλλησης του *E.*



Εικόνα III.12. Α. Κυτοπλασματική περιοχή του ξενιστή που περιλαμβάνει τον πυρήνα με χαρακτηριστική προεκβολή (βέλος) προς τον πρωτοπλάστη του παράσιτου (διπλή κεφαλή βέλους). Β. Πυρήνας παράσιτου με διπλασιασμένα κεντροσώματα. Τα βέλη δείχνουν δύο πολικά τοποθετημένα κεντρώλλια. Γ. Αρχικό στάδιο ωρίμανσης ζωοσποριάγγελιου. Το βέλος δείχνει το ευμέγεθες κεντρικό χυμοτόπιο. Δ. Ζωοσπόριο του παράσιτου. Το αριστερό βέλος δείχνει το κινητόσωμα και το δεξί βέλος δείχνει την τελική πλάκα του μαστιγίου.



Εικόνα III.13. Αρχικά στάδια μόλυνσης του *E. siliculosus* από το παράσιτο *E. dicksonii* 4018/1. Α, Δ, Ζ, Ι, Μ, Ξ: ανοσοσθήμανση ΜΣ. Β, Ε, Η, Κ, Ν: χρώση DNA με Hoechst 33258. Θ, Λ, ένθετη Εικ. Ξ: εικόνες οπτικής μικροσκοπίας DIC. Α-Β. Οργάνωση ΜΣ σε μεσοφασικό κύτταρο φύκους. Το βέλος δείχνει το κεντροσωμάτιο. Γ. Εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας που παρουσιάζει ένα δευτερογενές σπόριο του παράσιτου (βέλος) προσκολλημένο στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Συνδυασμός ανοσοσθήμανσης σωληνίνης με ροδαμίνη (διάχυτος περιπυρηνικός φθορισμός κόκκινου χρώματος στο δευτερογενές σπόριο) και χρώσης DNA με DAPI (μπλέ χρώμα σε δευτερογενές σπόριο και κύτταρο ξενιστή). Το διάχυτο, κόκκινο χρώμα στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή οφείλεται σε αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης. Δ-ΣΤ. Δευτερογενές σπόριο παράσιτου προσκολλημένο σε κύτταρο ξενιστή. Δ. Οργάνωση ΜΣ σε δευτερογενές σπόριο παράσιτου προσκολλημένο σε κύτταρο ξενιστή. Ε. Πυρήνας του ίδιου σπορίου. ΣΤ. Εικόνα DIC που δείχνει το προσκολλημένο δευτερογενές σπόριο (βέλος) στο κυτταρικό τοίχωμα του φύκους. Ζ-Θ. Κύτταρο ξενιστή σε αρχικό στάδιο μόλυνσης. Ζ. Οργάνωση ΜΣ ξενιστή σε αρχικό στάδιο της μόλυνσης. Το βέλος δείχνει το κεντροσωμάτιο. Η. Πυρήνας του παράσιτου πλησίον του πυρήνα του ξενιστή με χαρακτηριστική εγκόλπωση. Θ. DIC εικόνα του ίδιου κυττάρου. Ι-Λ. Κύτταρο ξενιστή μολυσμένο από το παράσιτο. Ι. Οργάνωση ΜΣ σε προφασικό κύτταρο του *E. siliculosus*. Τα βέλη δείχνουν τα πολικά τοποθετημένα ΚΟΜ του παράσιτου. Κ. Προφασικός πυρήνας του ίδιου κυττάρου και δύο πυρήνες του *E. dicksonii* που προέκυψαν από πρόσφατη διαίρεση. Το σχήμα του πυρήνα, η συμπύκνωση της χρωματίνης και ο έντονος φθορισμός των ΜΣ στους δύο πόλους είναι χαρακτηριστικά γνωρίσματα προφασικών κυττάρων φαιοφυκών. Λ. DIC εικόνα του ίδιου κυττάρου δείχνει τον προφασικό πυρήνα του φαιοφύκους. Μ. Η κεφαλή βέλους δείχνει το κεντροσωμάτιο του ξενιστή. Τα βέλη δείχνουν τα πολικά έντονα φθορίζοντα κοκκία του παράσιτου. Ν. Ομάδα τεσσάρων πυρήνων του παράσιτου στο πρώτο επίπεδο εστίασης του μικροσκοπίου και πυρήνας του ξενιστή στο δεύτερο επίπεδο εστίασης. Ξ. Εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας. Τα βέλη δείχνουν δύο έντονα φθορίζοντα κοκκία, τα οποία βρίσκονται τοποθετημένα μη πολικά. Ένθετη εικόνα: συνδυασμός DIC και ανοσοσθήμανσης ΜΣ του ίδιου κυττάρου. Οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 5 μm .

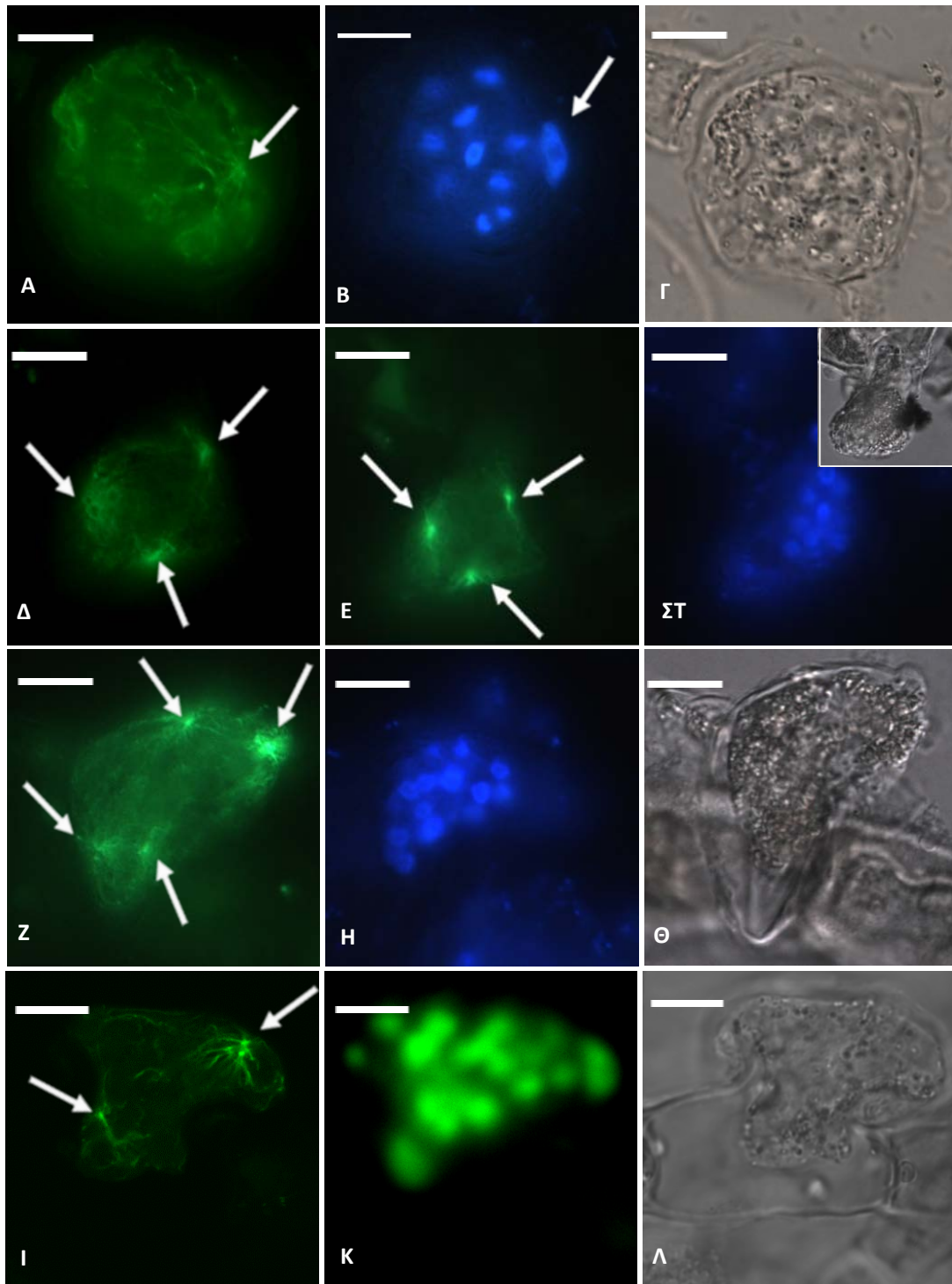
dicksonii, σχηματίζοντας συχνά μια προεκβολή, η οποία εντοπίζεται σε εικόνες ΗΜ και σε μεταγενέστερο στάδιο (Εικ. III.12.Α). Αφού μεταφερθεί μέρος του πρωτοπλάστη του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή, ο πυρήνας του παράσιτου κινείται προς το κέντρο του κυττάρου και καταλαμβάνει θέση πλησίον του πυρήνα του ξενιστή, ο οποίος παρουσιάζει χαρακτηριστική μεταβολή σχήματος (εγκόλπωση) στο εν λόγω στάδιο (Εικ. III.13.Η). Ωστόσο, η οργάνωση των ΜΣ του φύκους από το κεντροσωμάτιο παραμένει φυσιολογική και εμφανίζει την εικόνα που περιγράφεται παραπάνω (βέλος στην Εικ. III.13.Ζ). Εν συνεχεία, ο πυρήνας του παράσιτου υπόκειται σε συνεχείς διαιρέσεις (Εικ. III.13.Κ, Ν), οι οποίες οδηγούν στον σχηματισμό ενός πολυπύρηνου βλαστητικού θαλλού του *E. dicksonii*. Σε αυτή τη φάση της μόλυνσης, παρατηρούνται παχιές δέσμες ΜΣ του *E. dicksonii*, οι οποίες κατανέμονται περιπυρηνικά και συγκλίνουν σε δύο έντονα φθορίζοντα σημεία, με πολική διάταξη ως προς τον πυρήνα (βέλη στις Εικ. III.13.Ι, Μ). Παρατήρηση με ΗΜ αποκάλυψε στις θέσεις αυτές την παρουσία δύο κεντρυλλίων (Εικ. III.12.Β, βέλη). Επιπλέον, μετά από ανοσοφθορισμό σωληνίνης, παρατηρήθηκαν δύο έντονα φθορίζουσες ράβδοι σε μη πολικές θέσεις ($<180^\circ$), στις οποίες συγκλίνουν παχιές δέσμες ΜΣ (Εικ. III.13.Ξ). Οι διαιρέσεις των πυρήνων του *E. dicksonii* είναι πιθανώς σύγχρονες, γεγονός που προκύπτει από την

ταυτόχρονη εμφάνιση πολυάριθμων πυρήνων με πολικά έντονα φθορίζοντα κοκκία (Εικ. ΙΙΙ.13.Ι-Ξ). Παράλληλα, ο πυρήνας και η οργάνωση των ΜΣ του ξενιστή εμφανίζονται χωρίς σημάδια καταστροφής ή μεταβολής. Μάλιστα, ο πυρήνας του φύκους διατηρεί τη λειτουργικότητά του και εμφανίζει φυσιολογική εικόνα κατά τη διάρκεια της μίτωσης (πυρήνας σε πρόφαση στην Εικ. ΙΙΙ.13.Κ). Τέλος, και σε αυτό το στάδιο παρατηρείται η σύγκλιση των ΜΣ του φύκους στο κεντροσωμάτιο, όπως ακριβώς συμβαίνει σε μη μολυσμένα κύτταρα (κεφαλή βέλους στην Εικ. ΙΙΙ.13.Μ).

Επιπρόσθετα, χρώση του DNA των πυρήνων του *E. dicksonii* με Hoechst 33258 αποκαλύπτει μεταβολή στο μέγεθος του πυρήνα του παράσιτου κατά τα πρώτα στάδια της προσβολής. Λεπτομερέστερα, αμέσως μετά τη διείσδυση του ωομύκητα στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή, ο πυρήνας του παράσιτου παρουσιάζει σημάδια συμπύκνωσης, ενώ παρατηρείται σαφής μείωση του όγκου του (Εικ. ΙΙΙ.13.Η). Η σύγκριση του όγκου του πυρήνα του δευτερογενούς σπορίου (Εικ. ΙΙΙ.13.Ε) με αυτόν του νεαρού βλαστητικού θαλλού (Εικ. ΙΙΙ.13.Η) δείχνει ότι το μέγεθος του πυρήνα κατά τη μεταφορά του πρωτοπλάστη μειώνεται. Στη συνέχεια, ο πυρήνας του παράσιτου φαίνεται να επανακτά τον αρχικό του όγκο (Εικ. ΙΙΙ.13.Κ).

Μεταβατικό στάδιο του παράσιτου από τη βλαστητική στην αναπαραγωγική φάση

Οι συνεχείς σύγχρονες διαιρέσεις των πυρήνων του *E. dicksonii* οδηγούν σε διόγκωση του κυττάρου-ξενιστή, το οποίο είναι τώρα γεμάτο από πυρήνες του παράσιτου (Εικ. ΙΙΙ.14.Α-Γ). Αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται από πληθώρα χυμοτοπίων στο εσωτερικό του κυτοπλάσματος, γεγονός στο οποίο αποδίδεται ο όρος “foamy stage”, που δόθηκε από τους Sekimoto και συν. (2008β) για το εν λόγω στάδιο. Παράλληλα, ο πυρήνας του ξενιστή απωθείται στην περιφέρεια του κυττάρου (βέλος στην Εικ. ΙΙΙ.14.Β). Όμως, παρά το γεγονός ότι το *E. dicksonii* δείχνει να κυριαρχεί στο εσωτερικό του κυττάρου του φαιοφύκους, οι ΜΣ του ξενιστή εμφανίζουν ακόμη και σε αυτό το στάδιο την τυπική οργάνωση συγκλίνοντας στο κεντροσωμάτιο (βέλος στην Εικ. ΙΙΙ.14.Α). Ταυτόχρονα, γύρω από τους πυρήνες του παράσιτου εκτείνονται ΜΣ όπως δείχνεται στις Εικ. ΙΙΙ.13.Ι-Ξ.

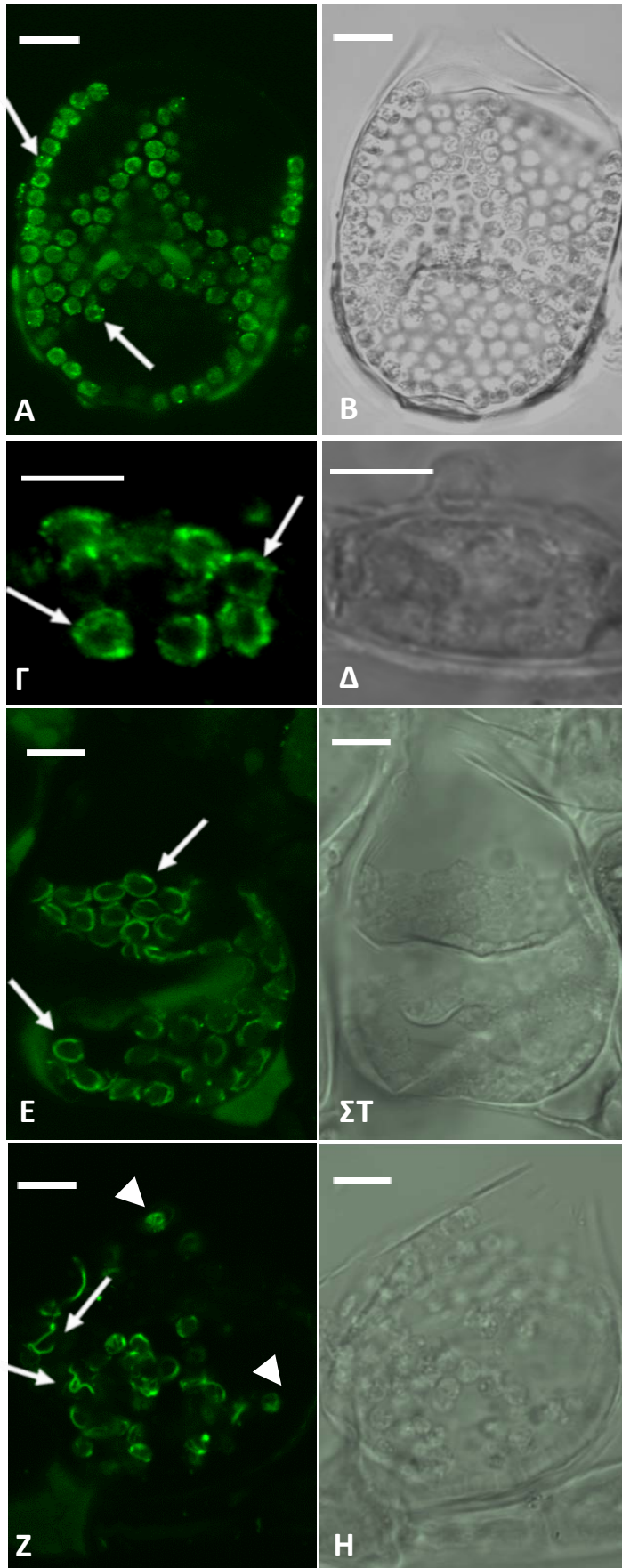


Εικόνα III.14. Μετάβαση από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση του ωομύκητα - αρχικά στάδια ωρίμανσης του ζωοσποριόγγειου. Α-Γ. *E. crouaniorum* μολυσμένο από *E. dicksonii* 4018/3 κατά την φάση “foamy” (βλέπε κείμενο για όρο). Α. Οργάνωση ΜΣ ξενιστή. Το βέλος δείχνει το απωθημένο στην περιφέρεια του κυττάρου κεντροσώματιο. Β. Χρώση του DNA του ίδιου κυττάρου με Hoechst 33258. Διογκωμένο κύτταρο γεμάτο από πυρήνες του παράσιτου. Το βέλος δείχνει τον πυρήνα του ξενιστή απωθημένο στην περιφέρεια του κυττάρου. Γ.

DIC εικόνα του ίδιου κυττάρου. Δ-ΣΤ. *P. littoralis* μολυσμένο από το *E. dicksonii* 4018/2 σε αρχικό στάδιο ωρίμανσης του ζωοσποριάγγελιου. Δ. Ανοσοσθήμανση ΜΣ του παράσιτου κατά την αρχή της ζωοσποριογένεσης. Το αριστερό βέλος δείχνει περιπυρηνικές δέσμες ΜΣ υπό αποδιοργάνωση ενώ τα δύο δεξιά βέλη δείχνουν έντονα φθορίζοντα σημεία στο περιφερειακό κυτόπλασμα. Ε. Ανοσοσθήμανση ΜΣ του ίδιου κυττάρου σε διαφορετικό επίπεδο εστίασης του μικροσκοπίου. Τα βέλη δείχνουν τρία έντονα φθορίζοντα σημεία στην περιφέρεια του κυτοπλάσματος. ΣΤ. Χρώση του DNA του ίδιου κυττάρου με Hoechst 33258. Να σημειωθεί ότι ο πυρήνας του ξενιστή δεν είναι πλέον ορατός. Ένθετη εικόνα: DIC του ίδιου κυττάρου. Ζ-Θ. *P. littoralis* μολυσμένο από το *E. dicksonii* 4018/2. Ζ. Ανοσοσθήμανση ΜΣ του παράσιτου κατά την ωρίμανση του ζωοσποριάγγελιου. Δέσμες ΜΣ διασχίζουν το ζωοσποριάγγειο. Τα βέλη δείχνουν έντονα φθορίζοντα σημεία στην περιφέρεια του ζωοσποριάγγελιου. Η. Χρώση του DNA με Hoechst 33258. Θ. DIC του ίδιου κυττάρου. Ι-Λ. *E. siliculosus* μολυσμένο από *E. dicksonii* 4018/3. Ι. Εικόνα συνεστιακού μικροσκοπίου παρουσιάζει δέσμες ΜΣ να συγκλίνουν σε περιφερειακά έντονα φθορίζοντα σημεία (βέλη). Κ. Χρώση των πυρήνων του ίδιου κυττάρου με DAPI. Το πράσινο χρώμα οφείλεται σε αυτόματη ρύθμιση του λογισμικού προγράμματος λήψης και επεξεργασίας ηλεκτρονικών φωτογραφιών και δεν αντικατοπτρίζει το κανονικό χρώμα της φθορίζουσας χρωστικής (μπλε). Λ. DIC του ίδιου κυττάρου. Οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 10 μm.

Ανώριμο ζωοσποριάγγειο - στάδιο πριν την κυτταροποίηση του ζωοσποριάγγελιου

Η απόθεση κυτταρικού τοιχώματος γύρω από το πλασμαλήμμα του παράσιτου σηματοδοτεί τον βαθμιαίο μετασχηματισμό του βλαστητικού θαλλού σε ζωοσποριάγγειο. Οι συνεχείς διαιρέσεις των πυρήνων του παράσιτου σταματούν και το στάδιο αυτό συμπίπτει με τις διαδικασίες πριν την κυτταροποίηση του ζωοσποριάγγελιου (βλέπε όρο “pre-cleavage stage” σε Tsirigoti και συν. 2014α). Στη φάση αυτή το ζωοσποριάγγειο θεωρείται ανώριμο και συνδέεται με τη βαθμιαία εξαφάνιση των περιπυρηνικών ΜΣ και των σημείων όπου αυτοί συγκλίνουν (περιπυρηνικά έντονα φθορίζοντα κοκκία). Δέσμες ΜΣ διασχίζουν το ανώριμο ζωοσποριάγγειο και συγκλίνουν σε διακριτά, έντονα φθορίζοντα σημεία (βέλη στις Εικ. III.14.Δ, Ε, Ζ, Ι). Επανειλημμένες παρατηρήσεις έδειξαν ότι αυτά τα έντονα φθορίζοντα σημεία είναι συνήθως τέσσερα ή πέντε σημεία σύγκλισης των ΜΣ, βρίσκονται κυρίως περιφερειακά του ανώριμου ζωοσποριάγγελιου (βέλη στις Εικ. III.14.Δ, Ε, Ζ, Ι) και διατάσσονται συμμετρικά γύρω από ένα μεγάλο κεντρικό χυμοτόπιο (βέλος στην Εικ. III.12.Γ). Λεπτομερέστερα, εικόνες ΗΜΔ που αντιστοιχούν σε αρχικό στάδιο ωρίμανσης του ζωοσποριάγγελιου, λίγο πριν την κυτταροποίησή του, δείχνουν ότι στο ανώριμο ζωοσποριάγγειο οι πυρήνες λαμβάνουν περιφερειακή διάταξη και ο κεντρικός χώρος καταλαμβάνεται από ένα μεγάλο χυμοτόπιο (Εικ. III.12.Γ). Γύρω από κάθε πυρήνα παρατάσσονται τα οργανίδια που θα συντελέσουν στον μετέπειτα σχηματισμό των πρωτογενών σπορίων (Εικ. III.12.Γ). Στην Εικ. III.14.Δ παρουσιάζεται η συνύπαρξη των χαρακτηριστικών έντονα φθορίζοντων σημείων στην περιφέρεια και των πλέον αποδιοργανωμένων περιπυρηνικών ΜΣ. Ταυτόχρονα, κατά το σχηματισμό του



Εικόνα III.15. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ώριμων ζωοσποριάγγειων *E. dicksonii*. Α, Γ, Ε, Ζ: ανοσοσθήμανση ΜΣ. Β, Δ, ΣΤ, Η: εικόνα DIC του ίδιου ζωοσποριάγγειου. Α, Β. *E. crouaniorum* μολυσμένο από *E. dicksonii* 4018/3. Α. Τα βέλη δείχνουν έντονο περιπυρηνικό φθορισμό εσωτερικά των πρωτογενών σπορίων. Γ, Δ. *E. crouaniorum* μολυσμένο από *E. dicksonii* 4018/3. Πρωτογενή σπόρια που προκύπτουν από την κυτταροποίηση του ζωοσποριάγγειου. Γ. Τα βέλη δείχνουν έντονα φθορίζουσες δέσμες που αντιστοιχούν σε μαστίγια. Ε, ΣΤ. *P. littoralis* μολυσμένο από *E. dicksonii* 4018/2. Πρωτογενή σπόρια. Ε. Τα βέλη δείχνουν παχιές δέσμες ΜΣ που αντιστοιχούν σε σχηματισμένα μαστίγια και οι οποίες εκτείνονται από έντονα φθορίζοντα σημεία (κινητοσώματα μαστιγίων). Ζ, Η. *E. crouaniorum* μολυσμένο από *E. dicksonii* 4018/3. Ζ. Απελευθερωμένα ζωοσπόρια, καθένα από τα οποία φέρει δύο άνισου μήκους μαστίγια προσανατολισμένα προς αντίθετες κατευθύνσεις (βέλη). Οι κεφαλές βελών δείχνουν παχιές δέσμες ΜΣ σε δευτερογενή σπόρια που φέρουν επανεγκυστωμένα ζωοσπόρια. Οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 5 μm .

ζωοσποριάγγειου του παράσιτου, το κύτταρο του ξενιστή διογκώνεται επιπλέον, ενώ ο πυρήνας και ο αντίστοιχος κυτταροσκελετός ΜΣ έχουν πλέον αποδιοργανωθεί (Εικ. ΙΙΙ.14.Δ-Λ).

Όριμο ζωοσποριάγγειο:

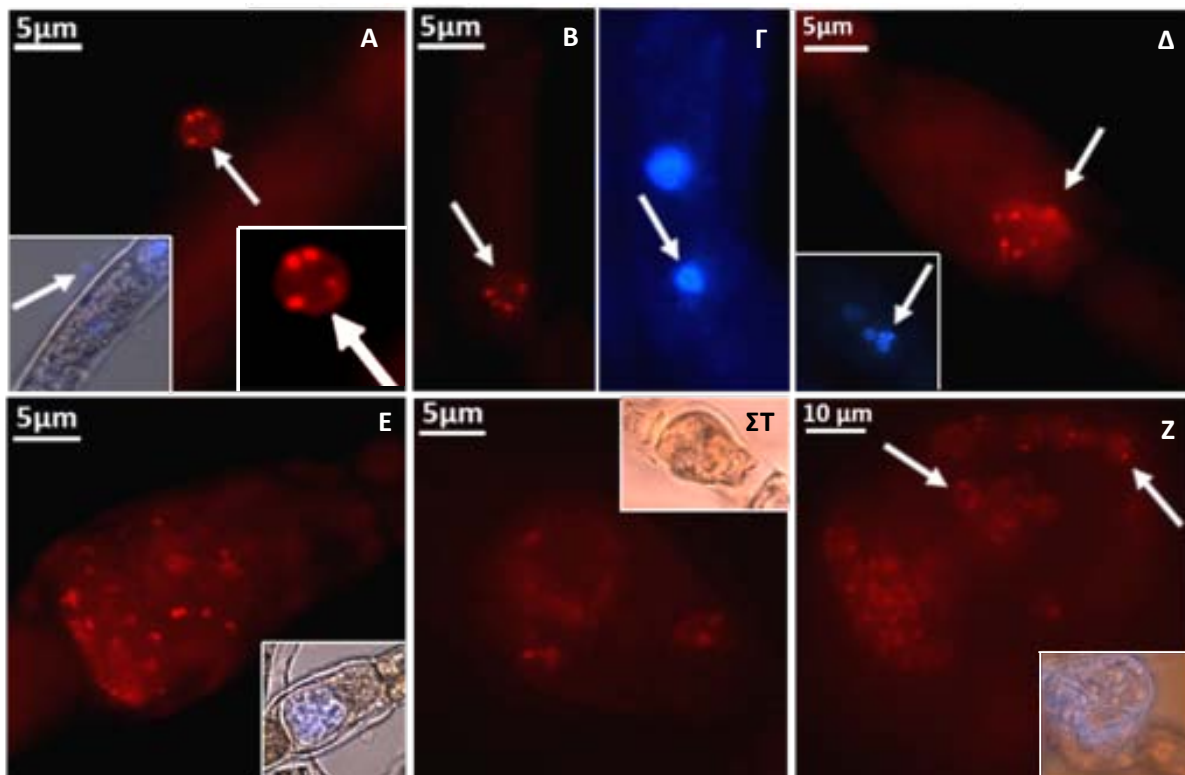
Το ώριμο ζωοσποριάγγειο προκύπτει ύστερα από τη διαδικασία κυτταροποίησης και χαρακτηρίζεται από πλήθος διαφοροποιημένων πρωτογενών σπορίων και ανοιχτούς σωλήνες απελευθέρωσης στην κορυφή του (Εικ. ΙΙΙ.15.Α, Β). Τα πολυάριθμα πρωτογενή σπόρια έχουν καταλάβει το χώρο του ώριμου ζωοσποριάγγειου, διατεταγμένα κυρίως περιφερειακά και στη βάση της δομής (Εικ. ΙΙΙ.15.Β, Δ). Ο ανοσοφθορισμός σωληνίνης δείχνει μια παχιά φθορίζουσα δέσμη να περιβάλλει κάθε πυρήνα (βέλη στις Εικ. ΙΙΙ.15.Α, Γ). Ακολούθως, η παχιά αυτή δέσμη εμφανίζεται ακόμη πιο έντονη και συμπαγής, ενώ δεν παρατηρούνται μεμονωμένες ακτίνες ΜΣ. Οι εν λόγω δέσμες ΜΣ περιβάλλουν τον πυρήνα, όχι όμως τελείως, αφήνοντας ένα μικρό ενδιάμεσο κενό (αριστερό βέλος στην Εικ. ΙΙΙ.15.Ε). Λεπτομερής εξέταση των εικόνων ανοσοφθορισμού σε διαφορετικά επίπεδα εστίασης, αποδεικνύει ότι η δέσμη αυτή αποτελείται από δυο μέρη που προέρχονται από ένα ισχυρά φθορίζον σημείο (δεξί βέλος στην Εικ. ΙΙΙ.15.Ε).

Σε επόμενο στάδιο, από τα πρωτογενή σπόρια απελευθερώνονται τα ζωοσπόρια. Κάθε ζωοσπόριο του *E. dicksonii* φέρει δυο άνισα σε μήκος και έντονα φθορίζοντα μαστίγια, προσανατολισμένα σε αντίθετες μεταξύ τους κατευθύνσεις (βέλη στην Εικ. ΙΙΙ.15.Ζ). Κάθε μαστίγιο εκτείνεται από το κινητόσωμα του ζωοσπορίου στο τέλος του οποίου διακρίνεται η τελική πλάκα (βέλη στην Εικ. ΙΙΙ.12.Δ). Τέλος, στο εσωτερικό του ώριμου ζωοσποριάγγειου, σε αυτή τη φάση, συνυπάρχουν ελεύθερα ζωοσπόρια (βέλη στην Εικ. ΙΙΙ.15.Ζ) και γεμάτα πρωτογενή σπόρια, τα οποία δεν έχουν ακόμη απελευθερώσει το περιεχόμενό τους (κεφαλές βελών στην Εικ. ΙΙΙ.15.Ζ).

ΙΙΙ.2.2. Οργάνωση της ακτίνης στον ωομύκητα *E. dicksonii*

Η χρώση με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη δυστυχώς δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα στη χρώση του κυτταροσκελετού των ΜΑ του ξενιστή, ακόμη και σε δοκιμές φυσιολογικού μη μολυσμένου υλικού. Συνεπώς, η δυσκολία εντοπισμού των ΜΑ του φύκου οφείλεται σε παράγοντες της

πειραματικής διαδικασίας και όχι σε αποπολυμερισμό της ακτίνης λόγω της μόλυνσης. Παρ' όλα αυτά, η χρώση με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη μας επέτρεψε να ακολουθήσουμε την οργάνωση της F-ακτίνης του παράσιτου *E. dicksonii* καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής του. Στα σπόρια του ωομύκητα, η ακτίνη εμφανίζεται κυρίως με τη μορφή πλακών. Πιο συγκεκριμένα, κατά το πρώτο στάδιο μόλυνσης, κατά το οποίο τα σπόρια του ωομύκητα προσκολλώνται στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή, η ακτίνη κάθε σπορίου αποτελείται από έντονα φθορίζοντα σημεία (βέλος στην Εικ. III.16.A), ενώ παρατηρείται ένας διάχυτος φθορισμός στη βάση του σπορίου (βέλος στη δεξιά ένθετη εικόνα στην Εικ. III.16.A). Μετά την είσοδο του κυτοπλάσματος του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή, η οργάνωση της ακτίνης στον ωομύκητα παραμένει η ίδια. Πλάκες ακτίνης συναντώνται στην περιφέρεια του κυτοπλάσματος του παράσιτου (βέλος στην Εικ. III.16.B). Παρατηρείται ότι οι πλάκες ακτίνης συνδέονται με δέσμες MA που διασχίζουν το κυτόπλασμα. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ οι δέσμες MA ήταν ευδιάκριτες κατά την παρατήρηση με το μικροσκόπιο, δεν ήταν πάντα εφικτή η αποτύπωσή τους κατά τη λήψη φωτογραφιών. Οι συνεχείς διαιρέσεις των πυρήνων του παράσιτου ακολούθως συνοδεύονται από τον πολλαπλασιασμό των πλακών ακτίνης (βέλος στην Εικ. III.16.Δ). Πιο συγκεκριμένα, κάθε πυρήνας συνοδεύεται από αντίστοιχες πλάκες ακτίνης. Καθώς αυξάνεται ο αριθμός των πυρήνων στο εσωτερικό του κυτοπλάσματος του παράσιτου, αυξάνεται ο αριθμός των αντίστοιχων πλακών ακτίνης (σύγκριση Εικ. III.16.B, Δ). Στη συνέχεια, το παράσιτο καταλαμβάνει τον κύριο όγκο του κυττάρου-ξενιστή και οι πυρήνες αυξάνονται επιπλέον σε αριθμό (ένθετη εικόνα στην Εικ. III.16.E). Οι πλάκες ακτίνης πολλαπλασιάζονται σε αριθμό αναλόγως (Εικ. III.16.E). Έπειτα, αρχίζει ο σχηματισμός του ανώριμου ζωοσποριάγγελιου (ένθετη εικόνα στην Εικ. III.16.ΣΤ). Κατά τη φάση αυτή ο κυτταροσκελετός της ακτίνης του παράσιτου αποτελείται κυρίως από διάχυτα MA, δηλαδή παρατηρείται μειωμένος αριθμός πλακών ακτίνης (Εικ. III.16.ΣΤ). Τέλος, μετά το σχηματισμό του ώριμου ζωοσποριάγγελιου, κάθε πρωτογενές σπόριο στο εσωτερικό του σποριαγγελίου εμφανίζει την τυπική εικόνα οργάνωσης της ακτίνης, δηλαδή αποτελείται κυρίως από πλάκες ακτίνης και ορισμένες συμπαγείς δέσμες MA όπως προαναφέρεται παραπάνω (βέλη στην Εικ. III.16.Z).



Εικόνα III.16. Σήμανση της ακτίνης του παράσιτου *E. dicksonii* 4018/2 κατά την μόλυνση του φαιοφύκου *P. littoralis*. Α. Πλάκες ακτίνης σε δευτερογενές σπόριο του παράσιτου προσκολλημένου στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή (βέλος). Ένθετη εικόνα αριστερά: συνδυασμός DIC και χρώσης DNA με Hoechst 33258 του ίδιου δευτερογενούς σπορίου. Το βέλος δείχνει το δευτερογενές σπόριο του παράσιτου. Ένθετη εικόνα δεξιά: Μεγέθυνση του δευτερογενούς σπορίου. Το βέλος δείχνει διάχυτο φθορισμό στη βάση του σπορίου. Β. Το βέλος δείχνει την κατανομή της ακτίνης σε πλάκες ακτίνης αμέσως μετά την μεταφορά του κυτοπλάσματος του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή. Γ. Το βέλος δείχνει τον πυρήνα του παράσιτου ύστερα από χρώση του DNA με Hoechst 33258. Δ. Φθορίζουσες πλάκες ακτίνης στο κυτόπλασμα του παράσιτου (βέλος). Ένθετη εικόνα: το βέλος δείχνει τους αντίστοιχους τρεις πυρήνες του *E. dicksonii* ύστερα από χρώση του DNA με Hoechst 33258. Ε. Χρώση ακτίνης κατά το αρχικό στάδιο κυτταροποίησης του θαλλού του παράσιτου. Ένθετη εικόνα: συνδυασμός DIC και χρώσης του DNA με Hoechst 33258. ΣΤ. Δέσμες MA διασχίζουν το ανώριμο ζωοσποριόγειο. Ένθετη εικόνα: DIC του ίδιου κυττάρου. Ζ. Πλάκες ακτίνης σε πρωτογενή σπόρια (βέλη). Ένθετη εικόνα: συνδυασμός DIC και χρώσης DNA με Hoechst 33258.

III.3. Μηχανισμοί αναγνώρισης ξενιστή και παράσιτου-απόκριση φύκους στη μόλυνση

III.3.1. Μελέτη κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου

Τεχνικές χρώσης και ανοσοσήμανσης συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την εξέταση της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου. Η σύγκριση φυσιολογικού και μολυσμένου φυτικού υλικού δίνει τη δυνατότητα εξαγωγής συμπερασμάτων για τυχόν τοιχωματικές μεταβολές κατά τη διάρκεια

της μόλυνσης. Ταυτόχρονα, εικόνες ΗΜΔ παρέχουν πληροφορίες που αφορούν στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος του μολυσμένου φύκους από τον ωομύκητα *E. dicksonii*.

III.3.1.1. Κυτταρικό τοίχωμα ξενιστή

Δέκα αντισώματα έναντι διαφορετικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος εφαρμόστηκαν σε δώδεκα κλώνους νηματοειδών φαιοφυκών που αποτελούν ξενιστές του *E. dicksonii* (βλέπε Πίνακα 5 σε II.2.2.2.). Αρχικά, ελέγχθηκε το φυσιολογικό φυτικό υλικό. Παρατηρήθηκε ποικιλομορφία μεταξύ των κλώνων στην ανοσοσήμανση του κυτταρικού τοιχώματος (Πίνακας 6).

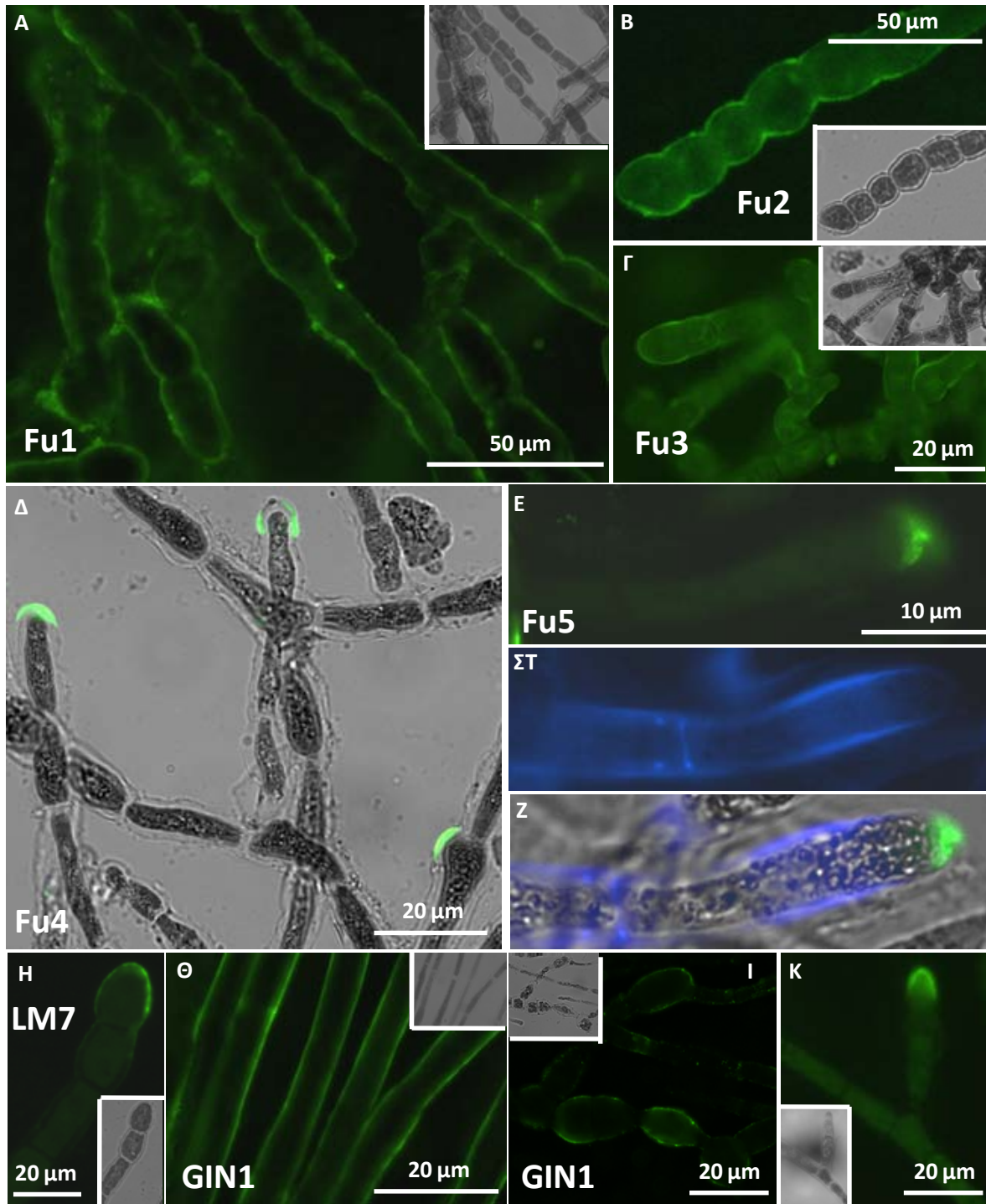
Πίνακας 6. Συνοπτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ανοσοσήμανσης του κυτταρικού τοιχώματος σε δώδεκα κλώνους φαιοφυκών (για διευκρίνιση των Fu1, Fu2 κ.τ.λ. βλέπε Πίνακα 5, σελ. Χ). +: παρουσία, -: απουσία, *: παρουσία μόνο σε ακραία κύτταρα.

CCAP κλώνοι	Είδη Φαιοφυκών	Fu1	Fu2	Fu3	Fu4	Fu5	GIN1	LM7	Anti-mannan	Anti-β-1,3glucan	Anti-β-1,4glucan
1330/3	<i>Pylaiella littoralis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	*	+
1323/1	<i>Macrocystis pyrifera</i>	+	+	+	+	+	++	++	-	*	+
1310/4	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	*	+
1310/300	<i>Ectocarpus croauaniorum</i>	-	-	-	*	*	-	-	-	*	+
1310/56	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	-	-	-	*	*	*	*	-	*	+
1310/214	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	-	-	-	*	*	*	*	-	*	+
1310/13	<i>Ectocarpus fasciculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	*	+
1310/299	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	*	+
	<i>Tilopteris mertensii</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	*	+
	<i>Choristocarpus tenellus</i>	+	-	-	*	-	++	+	-	*	+
	<i>Acinetospora crinita</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	*	+
	<i>Laminaria digitata</i>	*	-	*	-	-	++	+	-	*	+

Όπως είναι γνωστό, το κυτταρικό τοίχωμα των φαιοφυκών συνίσταται κατά βάση από κυτταρίνη, φουκάνες και αλγινικό οξύ (Michel και συν. 2010α). Στην παρούσα εργασία δείχνεται με τη βοήθεια των πέντε αντισωμάτων έναντι διαφορετικών φουκανών και των δυο αντισωμάτων έναντι διαφορετικών αλγινικών οξέων (βλέπε Πίνακα 5 σε II.2.2.2.), ότι πράγματι αυτές οι ενώσεις αποτελούν βασικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των φαιοφυκών, αλλά τονίζεται η σαφής ποικιλία των μορίων και της διάταξης αυτών στο κυτταρικό τοίχωμα, ακόμη και σε κλώνους του ίδιου είδους φαιοφύκους (Πίνακας 6). Πράγματι, οι φουκάνες συναντώνται είτε σε ολόκληρη την επιφάνεια των εξωτερικών κυτταρικών τοιχωμάτων του

φύκους (Εικ. III.17.A-Γ) είτε στην κορυφή αναπτυσσόμενων ακραίων κυττάρων του νήματος ή πλάγιου κλάδου (Εικ. III.17.Δ-Z). Στην περίπτωση ακραίων κυττάρων σε αναπτυσσόμενα νήματα, παρατηρείται συσσώρευση φουκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα του κορυφαίου τμήματος του κυττάρου (Εικ. III.17.E, Z), εκεί ακριβώς απ' όπου απουσιάζει η κυτταρίνη (Εικ. III.17.ΣΤ, Ζ). Αντίστοιχα, ανοσοσθήμανση αλγινικού οξέος έδειξε ότι αυτό εντοπίζεται είτε τοπικά στο εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα ακραίων κυττάρων (Εικ. III.17.H) είτε σε ολόκληρη την επιφάνεια των εξωτερικών κυτταρικών τοιχωμάτων του νήματος, ανάλογα με τον κλώνο του φαιοφύκου (Εικ. III.17.Θ). Ακόμη, στα κυτταρικά τοιχώματα των κλώνων *C. tenellus* (Discosporangiales), *L. digitata* και *M. pyrifera* (Laminariales) παρατηρήθηκε εντονότερο σήμα αλγινικού οξέος (Εικ. III.17.H, Θ) συγκριτικά με αντιπροσώπους των Ectocarpales και Tilopteridales που ελέγχθηκαν (Εικ. III.17.I, Πίνακας 6). Το αντίσωμα GIN1 προσδένεται σε περιοχές του κυτταρικού τοιχώματος πλούσιες σε γουλουρονικό οξύ και το σήμα φθορισμού που προκύπτει από τα πειράματα ανοσοφθορισμού σε δώδεκα κλώνους φαιοφυκών είναι εντονότερο από αυτό του LM7 το οποίο προσδένεται σε περιοχές πλούσιες σε μανουρονικό οξύ (σύγκριση Εικ. III.17.H και III.17.Θ Πίνακας 6). Επιπρόσθετα, παρατηρείται απόθεση β-1,3 γλυκάνης (καλλόζη) στην κορυφή ακραίων αναπτυσσόμενων κυττάρων φαιοφυκών (Εικ. III.17.K). Το αντίσωμα έναντι β-1,3 γλυκάνης εμφανίζει θετικό σήμα στο σύνολο των δώδεκα κλώνων φαιοφυκών που ελέγχθηκαν (Πίνακας 6). Τέλος, το αντίσωμα έναντι β-1,4 γλυκάνης (κυτταρίνης) και η χρωστική calcofluor white σημαίνουν το κυτταρικό τοίχωμα των δώδεκα κλώνων φαιοφυκών που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό υλικό (Εικ. III.17.E-Z' Πίνακας 6), εν αντιθέσει με το αντίσωμα έναντι μαννάνης που δεν εμφανίζει θετικό σήμα στα φαιοφύκη.

Εν συνεχεία, ελέγχεται το μολυσμένο υλικό, δηλαδή δώδεκα κλώνοι φαιοφυκών που προσβάλλονται από τρεις κλώνους του ωομύκητα *E. dicksonii*. Στο σύνολο των μολυσμένων καλλιεργειών εφαρμόζονται δέκα αντισώματα έναντι διαφορετικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Από τα πειράματα ανοσοφθορισμού προκύπτει ότι τα κυτταρικά τοιχώματα των ξενιστών εμφανίζουν ακριβώς την ίδια σύσταση με αυτή του μη μολυσμένου υλικού που περιγράφεται παραπάνω, εκτός από την περίπτωση της β-1,3 γλυκάνης. Στο κυτταρικό τοίχωμα μολυσμένων φυκών, όπου βρίσκεται προσκολλημένο δευτερογενές σπόριο του *E. dicksonii*, παρατηρείται απόθεση β-1,3 γλυκάνης. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται από

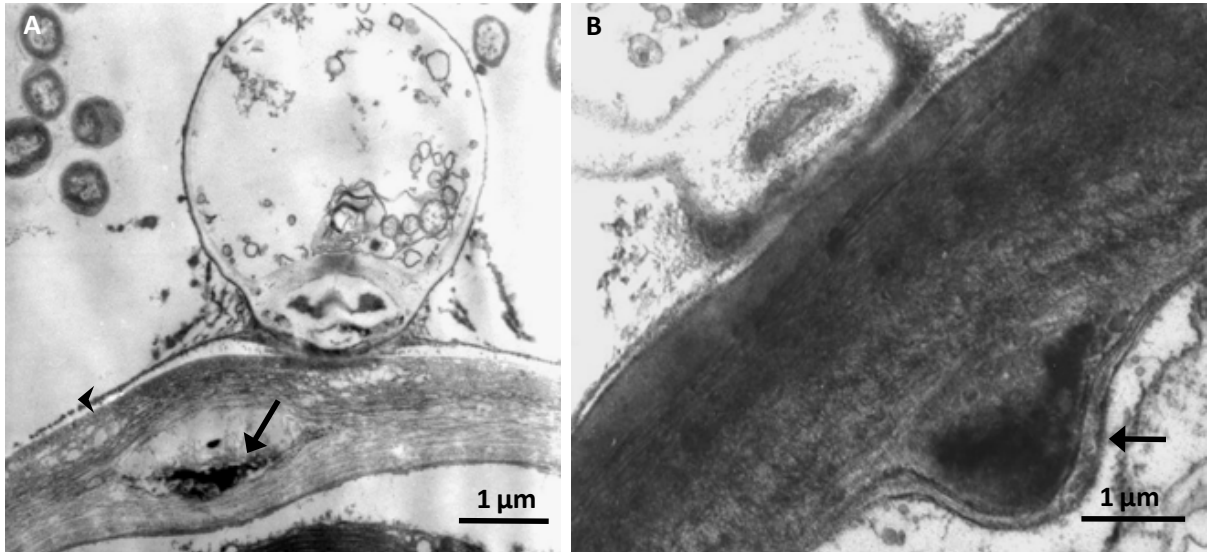


Εικόνα III.17. Σήμανση κυτταρικού τοιχώματος μη μολυσμένων κλώνων φαιοφυκών. Α. Ανοσοφθορισμός σε νήματα *M. pyrifera* με αντίσωμα Fu1 έναντι φουκανών. Ένθετη εικόνα: DIC των ίδιων νημάτων. Β. Ανοσοφθορισμός σε νήμα *M. pyrifera* με αντίσωμα Fu2 έναντι θειϊκών φουκανών. Ένθετη εικόνα: DIC του ίδιου νήματος. Γ. Ανοσοφθορισμός σε νήματα *M. pyrifera* με αντίσωμα Fu3 έναντι θειϊκών φουκανών. Ένθετη εικόνα: DIC των ίδιων νημάτων. Δ. Ανοσοφθορισμός σε νήματα *E. siliculosus* 1310/56 με αντίσωμα Fu4 έναντι θειϊκών φουκανών. Συνδυασμός φθορισμού και DIC. Ε-Ζ. Σήμανση κυτταρικού τοιχώματος σε ακραίο κύτταρο του *E. siliculosus* 1310/214. Ε. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα Fu5 έναντι φουκανών. ΣΤ. Χρώση κυτταρικού τοιχώματος

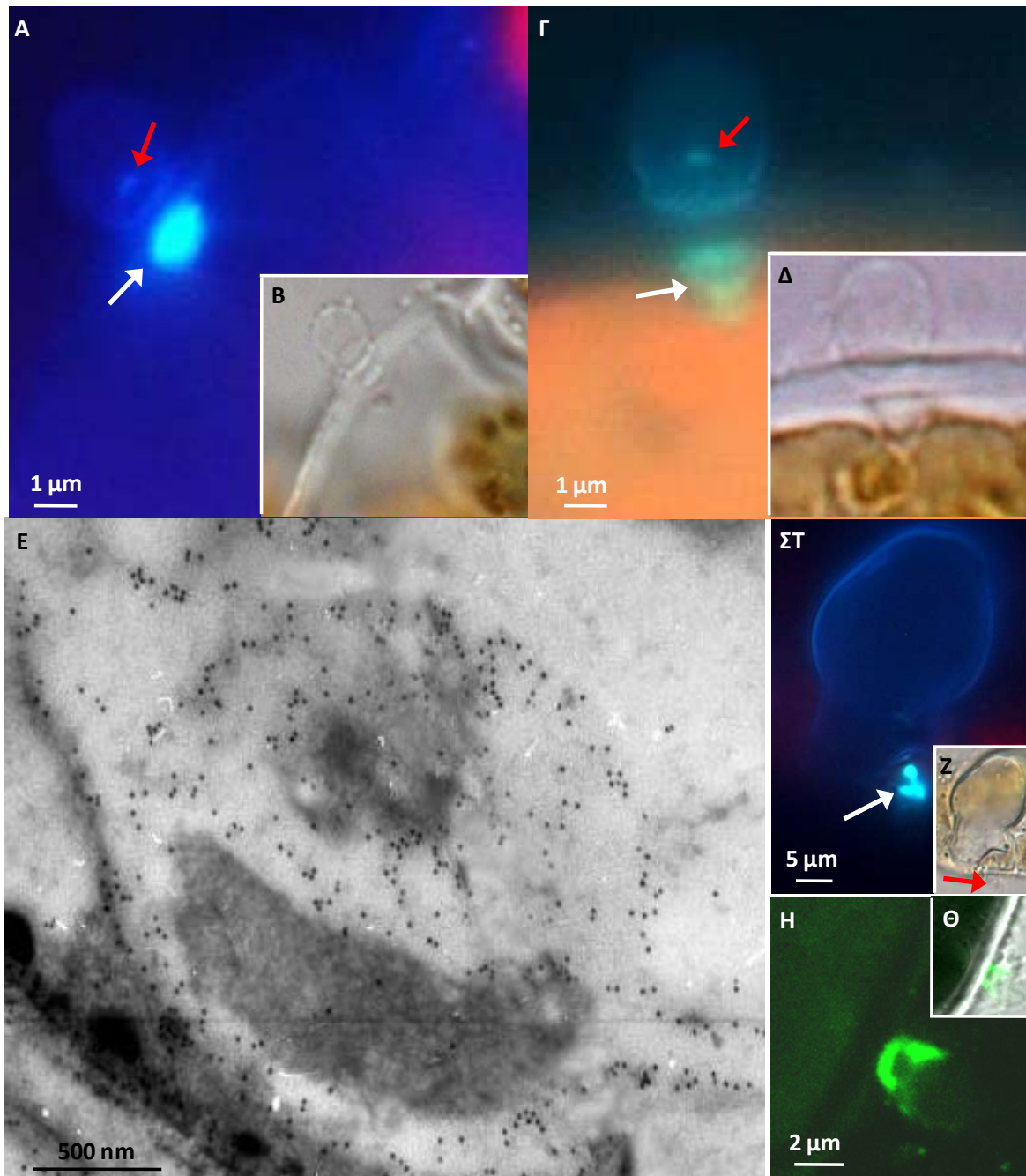
με calcofluor white. Ζ. Συνδυασμός ανοσοφθορισμού με Fu5, χρώσης με calcofluor white και DIC στο ίδιο κύτταρο. Η. Ανοσοφθορισμός σε νήμα *L. digitata* με αντίσωμα LM7 έναντι αλγινικού οξέος. Έντονος φθορισμός στο κορυφαίο τμήμα του ακραίου κυττάρου του νήματος. Ένθετη εικόνα: DIC του ίδιου νήματος. Θ. Ανοσοφθορισμός σε νήματα του *C. tenellus* με αντίσωμα GIN1 έναντι αλγινικού οξέος. Ένθετη εικόνα: DIC των ίδιων νημάτων. Ι. Ανοσοφθορισμός σε νήματα του *E. siliculosus* 1310/4 με αντίσωμα GIN1 έναντι αλγινικού οξέος. Ένθετη εικόνα: DIC των ίδιων νημάτων. Κ. Ανοσοφθορισμός σε διακλαδιζόμενο νήμα *P. littoralis* με αντίσωμα έναντι β-1,3 γλυκανών. Έντονος φθορισμός στο κορυφαίο τμήμα του ακραίου κυττάρου του κλαδίσκου. Ένθετη εικόνα: DIC του ίδιου νήματος.

εικόνες ΗΜΔ, καθώς και με χρώση νωπού υλικού με κυανούν της ανιλίνης (Tsirigoti και συν. 2014β). Λεπτομερέστερα, το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή κάτω από την περιοχή προσκόλλησης του σπορίου του παράσιτου εμφανίζεται σε εικόνες ΗΜΔ μερικώς αποδιοργανωμένο (Εικ. ΙΙΙ.18.Α, Β). Η ινώδης δομή, που πιθανώς αντιστοιχεί σε κυτταρίνη, διαταράσσεται και ένα μεγάλο ρήγμα εντοπίζεται εσωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (βέλος στην Εικ. ΙΙΙ.18.Α). Παράλληλα, παρατηρείται τοπική πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή στο σημείο της προσβολής, με εναπόθεση άμορφου τοιχωματικού υλικού (βέλος στην Εικ. ΙΙΙ.18.Β, βλέπε επίσης κεφαλή βέλους στην Εικ. ΙΙΙ.9.Ζ) υπό μορφή θηλής (βλέπε όρο «papilla-like structure» σε Tsirigoti και συν. 2014β).

Συμπληρωματικά, με τη βοήθεια της χρωστικής κυανούν της ανιλίνης δείχνεται συσσώρευση β-1,3 γλυκάνης στην τοιχωματική πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (άσπρα βέλη στις Εικ. ΙΙΙ.19.Α, Γ, ΣΤ). Επιπλέον, οι εικόνες φθορισμού επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι τα πολυμερή β-1,3 γλυκάνης τοποθετούνται σε σχήμα θηλής ακριβώς κάτω από το σημείο της προσβολής από το παράσιτο (Εικ. ΙΙΙ.19.Α, Γ, ΣΤ). Αξίζει να σημειωθεί ότι η εναπόθεση β-1,3 γλυκάνης είναι επίσης ορατή σε κύτταρα του ξενιστή που μολύνονται επιτυχώς από το παράσιτο και μάλιστα βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο μόλυνσης, όπως η δημιουργία του ζωοσποριάγγειου (Εικ. ΙΙΙ.19.ΣΤ). Τα αποτελέσματα εντοπισμού θηλών β-1,3 γλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή αφορούν το σύνολο των δώδεκα μολυσμένων κλώνων φαιοφυκών που ελέγχθηκαν.



Εικόνα III.18. Μεταβολές στο κυτταρικό τοίχωμα του *P. littoralis* ύστερα από μόλυνση από το *E. dicksonii* 4018/2 (ΗΜΔ). Α. Το βέλος σημειώνει μια ηλεκτρονιόπυκνη περιοχή στο εσωτερικό του ρήγματος στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Η κεφαλή του βέλους δείχνει ένα είδος υλικού, πιθανώς προσκολλητικού, του σπορίου του παράσιτου το οποίο εκτείνεται παράλληλα με το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Β. Το βέλος δείχνει τη συσσώρευση άμορφου υλικού υπό μορφή θηλής στο κύτταρο του ξενιστή και σε σημείο κάτω από την περιοχή προσκόλλησης του σπορίου του παράσιτου.



Εικόνα III.19. Εντοπισμός β-1,3 γλυκανών σε διαφορετικούς κλώνους φαιοφυκών και *E. dicksonii*. Α-Δ. *E. crouaniorum* 1310/300 μολυσμένο από το *E. dicksonii* 4018/3. Α, Γ. Χρώση κυτταρικού τοιχώματος με κυανούν της ανιλίνης. Το κόκκινο βέλος δείχνει το φθορισμό στο άνω τμήμα της πλάκας προσκόλλησης του παράσιτου. Το λευκό βέλος δείχνει την εναπόθεση β-1,3 γλυκανών υπό μορφή θηλής στο κύτταρο του ξενιστή. Β, Δ. DIC εικόνα των ίδιων κυττάρων. Ε. *P. littoralis* 1330/3 μολυσμένο από *E. dicksonii* 4018/2. Σήμανση με ανοσοχρυσό δείχνει συσσώρευση β-1,3 γλυκανών στο κυτταρικό τοίχωμα της πλάκας προσκόλλησης του *E. dicksonii*. ΣΤ. Το λευκό βέλος δείχνει την εναπόθεση β-1,3 γλυκανών σε κύτταρο του *M. pyrifera* 1323/1 που έχει μολυνθεί από το *E. dicksonii* 4018/1. Να σημειωθεί ότι πρόκειται για προχωρημένο στάδιο μόλυνσης αφού παρατηρείται σχηματισμός ζωοσποριάγγειου. Ζ. DIC εικόνα του ίδιου κυττάρου. Το κόκκινο βέλος δείχνει το άδειο δευτερογενές σπόριο του παράσιτου που έχει μολύνει το φύκος. Η. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι β-1,3

γλυκανών δείχνει έντονο σήμα στη βάση του σπορίου του *E. dicksonii* 4018/3 το οποίο βρίσκεται προσκολλημένο στο κυτταρικό τοίχωμα του *M. Pyrifera*. Θ. Συνδυασμός DIC και ανοσοφθορισμού.

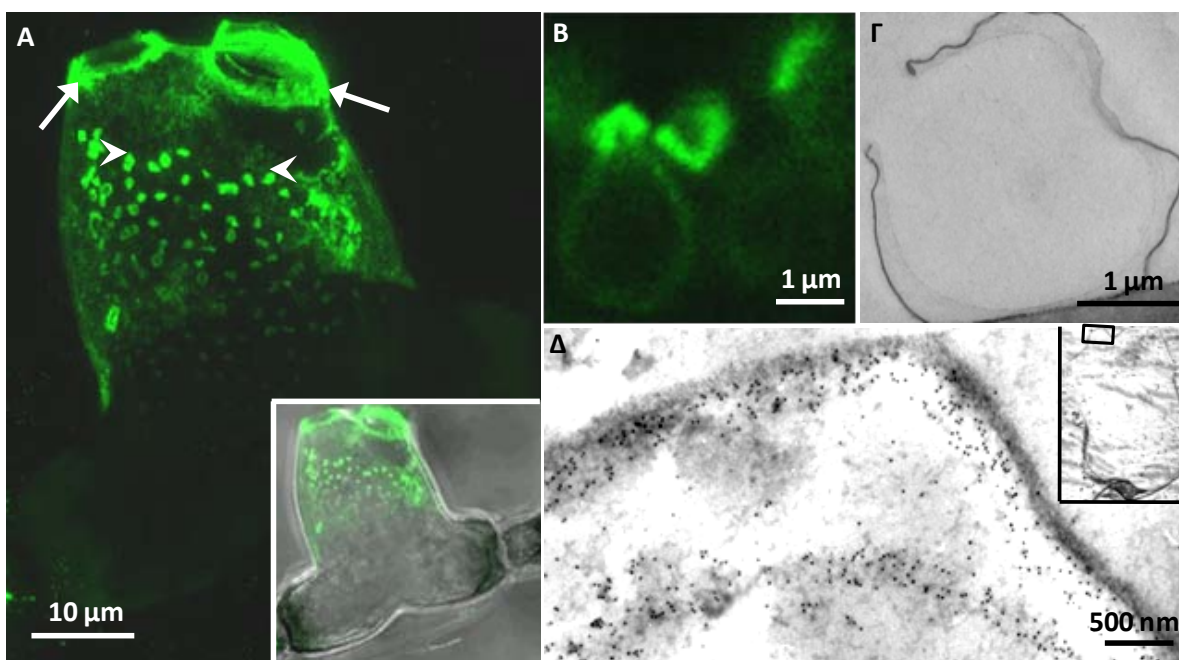
III.3.1.2. Κυτταρικό τοίχωμα παράσιτου

Η μελέτη του κυτταρικού τοιχώματος του *E. dicksonii* με τεχνικές ΗΜΔ, φθορισμού και χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι διαφορετικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος αποκαλύπτει τόσο αναμενόμενα όσο και μη αποτελέσματα για τη σύστασή του (Πίνακας 7).

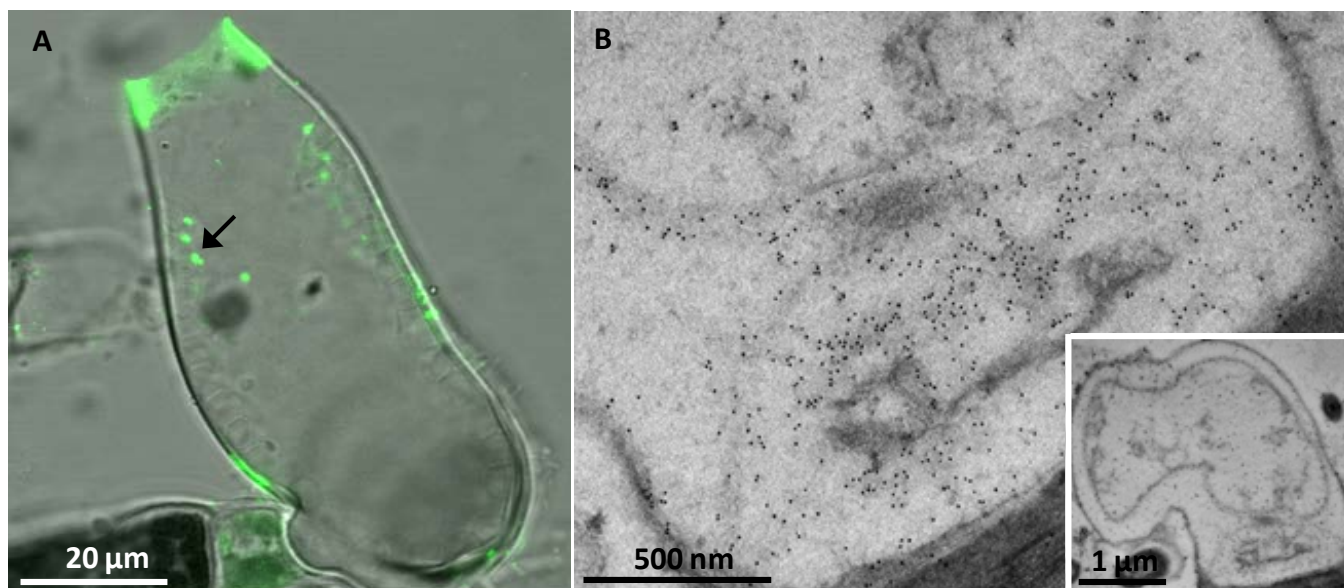
Ειδικότερα, πειράματα εντοπισμού β-1,3 γλυκάνης με τη φθορίζουσα χρωστική κυανού της ανιλίνης δίνουν θετικό αποτέλεσμα για το κυτταρικό τοίχωμα του παράσιτου (Εικ. III.19.A, Γ, ΣΤ). Το σήμα φθορισμού είναι εντονότερο στην πλάκα προσκόλλησης του σπορίου και πιο συγκεκριμένα στο άνω τμήμα αυτής, δηλαδή στις τοιχωματικές προεξοχές που διαχωρίζουν τη βασική κυτοπλασματική περιοχή από τη βάση του σπορίου (κόκκινα βέλη στις Εικ. III.19.A, Γ). Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται με χρήση ειδικού αντισώματος έναντι β-1,3 γλυκανών. Με την τεχνική του ανοσοχρυσού παρουσιάζεται η συσσώρευση κοκκίων χρυσού στο κυτταρικό τοίχωμα της πλάκας προσκόλλησης (Εικ. III.19.E), ενώ με την τεχνική του ανοσοφθορισμού σημαίνεται ειδικά η βάση του σπορίου (Εικ. III.19.H, Θ). Επιπροσθέτως, πολυμερή β-1,3 γλυκάνης σημαίνονται στο κυτταρικό τοίχωμα του ζωοσποριαγγείου και των πρωτογενών σπορίων (Εικ. III.19.ΣΤ, III.20.A). Είναι χαρακτηριστικό γεγονός ότι οι β-1,3 γλυκάνες συσσωρεύονται κυρίως στην περιοχή του σωλήνα απελευθέρωσης του σποριαγγείου (βέλη στην Εικ. III.20.A, Δ) και των πρωτογενών σπορίων (κεφαλή βέλους στην Εικ. III.20.A, Β). Η ειδική πρόσδεση του αντισώματος έναντι των β-1,3 γλυκανών στο εσωτερικό του σποριαγγείου αντιστοιχεί σε ανοιχτούς πόρους απελευθέρωσης πρωτογενών σπορίων (κεφαλή βέλους στην Εικ. III.20.A), οι οποίοι απεικονίζονται στην Εικ. III.20.B σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Ακόμη, η μελέτη λεπτής δομής των άδειων πρωτογενών σπορίων αποκαλύπτει ότι το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από μία εξωτερική ηλεκτρονιόπυκνη και μία εσωτερική ηλεκτρονικά διαφανή ζώνη (Εικ. III.20.Γ).

Εν συνεχεία, στους τρεις κλώνους του *E. dicksonii* εφαρμόζονται τα υπόλοιπα εννέα αντισώματα έναντι συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος (βλέπε Πίνακα 5 σε II.2.2.2.). Από τα πειράματα ανοσοφθορισμού φαίνεται ότι το κυτταρικό τοίχωμα του παράσιτου διαθέτει εκτός από β-1,3 γλυκάνη και β-1,4 γλυκάνη (κυτταρίνη), ενώ απουσιάζουν η μαννάνη και το

αλγινικό οξύ (Πίνακας 7). Επιπλέον, το κυτταρικό τοίχωμα του *E. dicksonii* παρουσιάζει θετική αντίδραση με το αντίσωμα Fu4 έναντι θεϊκής φουκάνης. Ειδικότερα, το σήμα φθορισμού δείχνει συσσώρευση αυτού του πολυσακχαρίτη κυρίως στους ανοιχτούς σωλήνες απελευθέρωσης του σποριάγγειου (Εικ. III.21.A) και στους πόρους απελευθέρωσης των πρωτογενών σπορίων (βέλος στην Εικ. III.21.A). Τέλος, με τη βοήθεια της τεχνικής του ανοσοχρυσού εντοπίζεται θεϊκή φουκάνη σε όλη την επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος σε προσκολλημένο δευτερογενές σπόριο στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή (Εικ. III.21.B). Τα κοκκία χρυσού, ωστόσο, φαίνεται να συσσωρεύονται έντονα στο κυτταρικό τοίχωμα της πλάκας προσκόλλησης (Εικ. III.21.Γ).



Εικόνα III.20. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι β-1,3 γλυκανών σε δομές του *E. dicksonii*. Α. Ζωοσποριάγγειο (ώριμος θαλλός) του παράσιτου. Τα βέλη δείχνουν έντονο σήμα στους ανοιχτούς σωλήνες απελευθέρωσης του ζωοσποριάγγειου. Οι κεφαλές βελών δείχνουν συσσώρευση β-1,3 γλυκανών στα στόμια των ανοιχτών πόρων απελευθέρωσης των πρωτογενών σπορίων. Ένθετη εικόνα: συνδυασμός DIC και ανοσοφθορισμού. Β. Μεγαλύτερη μεγέθυνση των πρωτογενών σπορίων, στους ανοιχτούς πόρους απελευθέρωσης των οποίων εντοπίζεται συσσώρευση β-1,3 γλυκανών. Γ. Εικόνα ΗΜΔ που παρουσιάζει ένα άδειο πρωτογενές σπόριο με ανοιχτό πόρο. Δ. Σήμανση με ανοσοχρυσό δείχνει τη συσσώρευση β-1,3 γλυκανών σε σωλήνα απελευθέρωσης ζωοσποριάγγειου του παράσιτου. Ένθετη εικόνα: μικρότερη μεγέθυνση ολόκληρου του ζωοσποριάγγειου. Το τετράγωνο σημειώνει την περιοχή που δείχνεται στην Εικ. Δ.



Εικόνα III.21. Ανοσοσήμανση συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος του *E. dicksonii*. Α. Συνδυασμός εικόνας DIC και ανοσοφθορισμού. Σήμανση κυτταρικού τοιχώματος ζωοσποριάγγελιου και έντονος φθορισμός στον ανοιχτό σωλήνα απελευθέρωσης με αντίσωμα Fu4 έναντι θειϊκών φουκανών. Το βέλος δείχνει τον έντονο φθορισμό στο στόμιο του ανοιχτού πόρου απελευθέρωσης των πρωτογενών σπορίων. Β. Σήμανση με ανοσοχρυσό και αντίσωμα Fu4 έναντι θειϊκών φουκανών. Δευτερογενές σπόριο του παράσιτου προσκολλημένο στο κύτταρο του ξενιστή. Ένθετη εικόνα: Μικρότερη μεγέθυνση του ίδιου δευτερογενούς σπορίου δείχνει την συσσώρευση κοκκίων χρυσού στην πλάκα προσκόλλησης.

III.3.2. Πειράματα ανάσχεσης της μόλυνσης

III.3.2.1. Επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει μονοσακχαρίτες

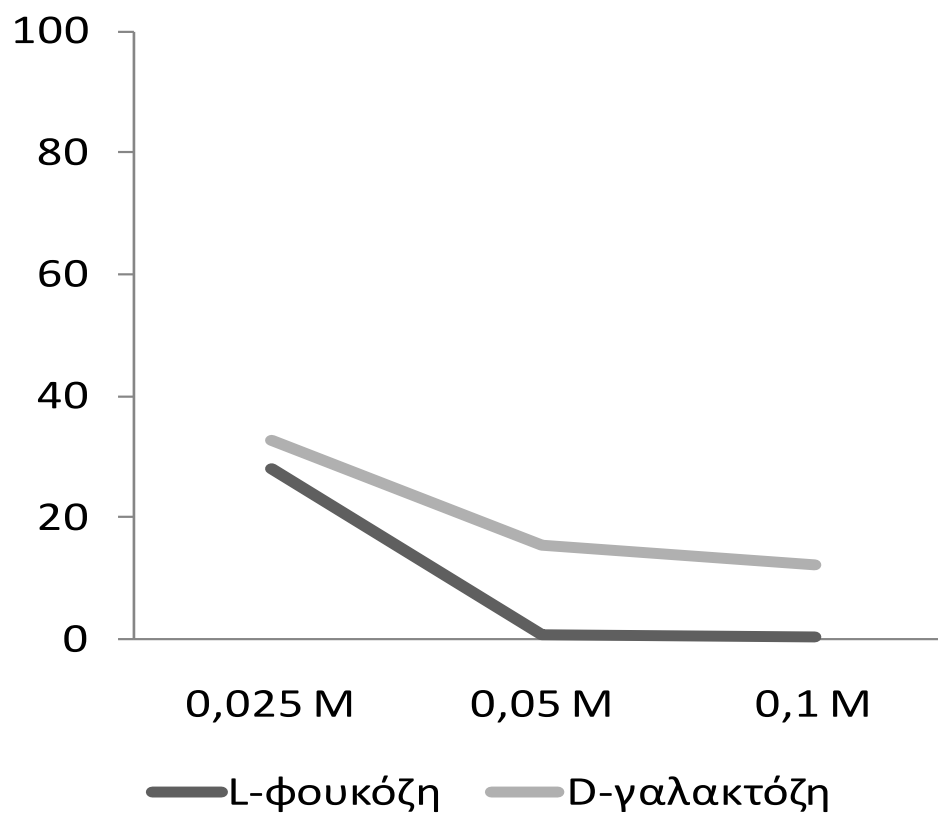
Φαιοφύκη μολυσμένα από τον *E. dicksonii* αναπτύσσονται σε μέσο καλλιέργειας στο οποίο προστίθενται διαλύματα 0,05 M διαφόρων μονοσακχαριτών (βλέπε II.4.1.). Για λόγους σύγκρισης, μολυσμένες καλλιέργειες αναπτύσσονται παράλληλα σε μέσο καλλιέργειας που δεν περιέχει πρόσθετους μονοσακχαρίτες (μάρτυρας). Μετά το πέρας 14 ημερών, χρονικό διάστημα που ισοδυναμεί με έναν πλήρη κύκλο μόλυνσεων, οι καλλιέργειες ελέγχονται με οπτικό μικροσκόπιο για πιθανή ανάσχεση της μόλυνσης λόγω της παρουσίας των μονοσακχαριτών. Τα εμφανή συμπτώματα της προσβολής, δηλαδή τα διογκωμένα κύτταρα-ξενιστή, στο εσωτερικό των οποίων εντοπίζεται ο θαλλός του *E. dicksonii*, καθώς και τα ζωοσποριάγγεια του παράσιτου, αποτελούν τις παραμέτρους της μόλυνσης. Ύστερα από παρατήρηση με οπτικό μικροσκόπιο, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού μόλυνσης σε καλλιέργειες που επώαστηκαν με 0,05 M D-γαλακτόζης και L-φουκόζης. Ακολούθησαν μετρήσεις μολυσμένων κυττάρων επί του συνολικού αριθμού των κυττάρων, σε

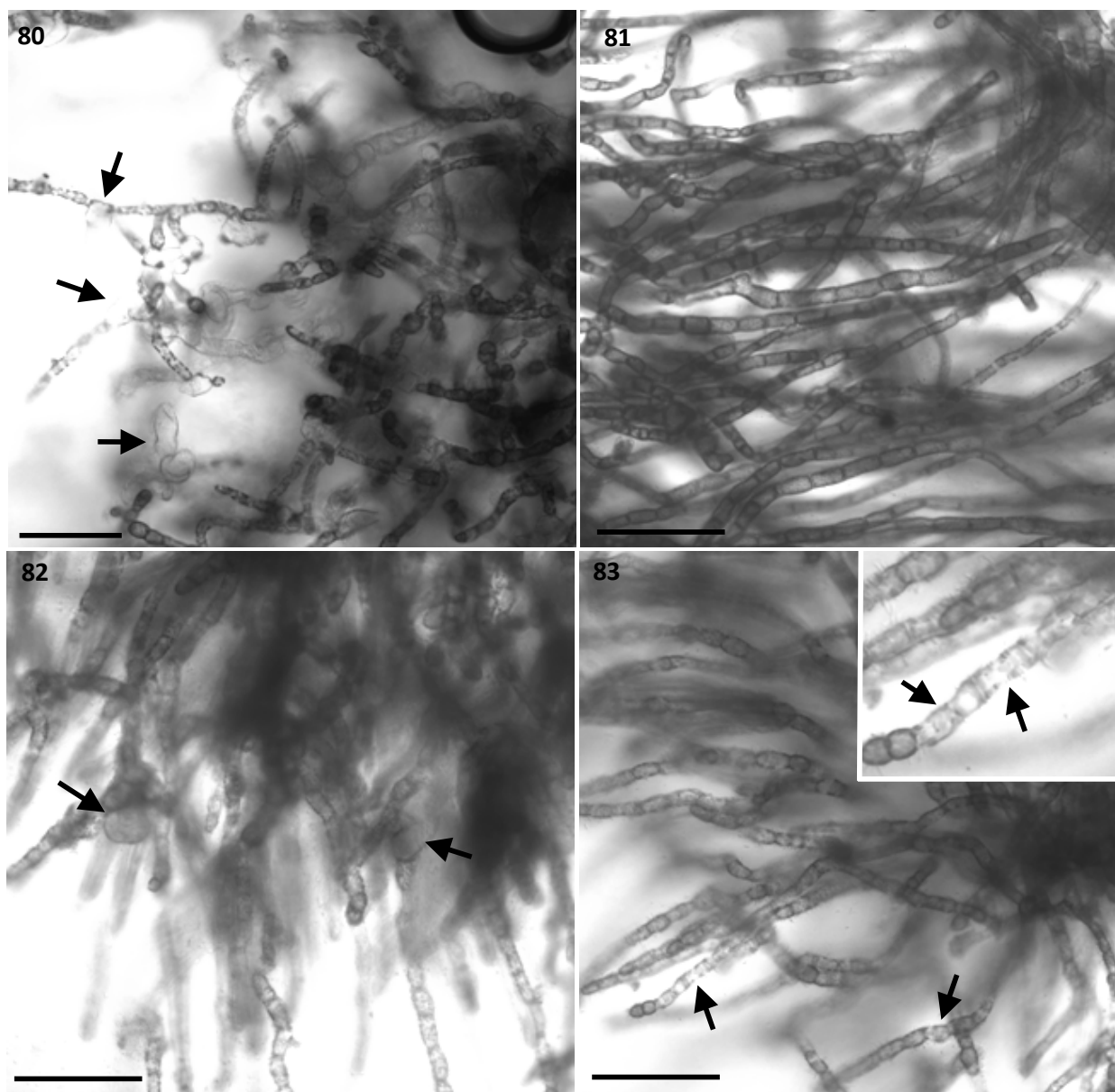
επιμέρους δείγματα κάθε καλλιέργειας (Πίνακας 8). Οι πειραματικές διαδικασίες ανάσχεσης της μόλυνσης με προσθήκη μονοσακχαριτών επαναλήφθηκαν 10 φορές. Από τον μέσο όρο των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων φαιοφυκών που αναπτύσσονται σε μέσο καλλιέργειας με προσθήκη 0,05 M D-γαλακτόζης μειώνεται σημαντικά συγκριτικά με την καλλιέργεια μάρτυρα, ενώ στην περίπτωση προσθήκης 0,05 M L-φουκόζης σχεδόν μηδενίζεται (Πίνακας 8· Εικ. III.22). Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι με την προσθήκη 0,05 M N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης, σημαντικός αριθμός κυττάρων του ξενιστή εντοπίζονται νεκρά ή αποδιοργανωμένα, χωρίς αυτό να οφείλεται στη συνήθη έκφραση της συμπτωματολογίας λόγω της μόλυνσης από το παράσιτο. Τα συγκεκριμένα κύτταρα του ξενιστή φαίνεται να υπόκεινται σε ΥΑ (Εικ. III.22.Δ). Στη συνέχεια, η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθείται χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις D-γαλακτόζης και L-φουκόζης (0,025 M, 0,05 M, 0,1 M). Και στις δύο περιπτώσεις μονοσακχαριτών, η χαμηλότερη συγκέντρωση (0,025 M) αντιστοιχεί σε υψηλότερα ποσοστά μολυσμένων κυττάρων φαιοφυκών από τον *E. dicksonii* σε σχέση με την συγκέντρωση 0,05 M, ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση (0,1 M) δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντικές διαφορές συγκριτικά με αυτή του 0,05 M (Γράφημα 1). Αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη μονοσακχαριτών στο μέσο καλλιέργειας οδηγεί σε αύξηση των βακτηρίων. Μάλιστα, αυτά αυξάνονται ακόμη περισσότερο με την προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης μονοσακχαριτών.

Πίνακας 8. Μετρήσεις μολυσμένων κυττάρων επί του συνολικού αριθμού των κυττάρων σε μολυσμένες καλλιέργειες φαιοφυκών από κλώνους του ωομύκητα *E. dicksonii*, ύστερα από προσθήκη μονοσακχαριτών στο μέσο καλλιέργειας για 14 ημέρες.

Μετρήσεις μολυσμένων κυττάρων/συνολικό αριθμό κυττάρων			
	Μάρτυρας	Φουκόζη	Γαλακτόζη
<i>M. pyrifera</i> + Eu 05	72/360	0/300	8/250
	60/290	2/320	2/300
	82/310	0/280	6/280
	75/300	1/290	12/320
	65/280	0/310	18/300
Μέσος όρος μολύνσεων (%)	22,98	0,2	3,17
<i>M. pyrifera</i> + Eu 96	90/300	0/250	9/310
	85/310	0/300	12/300
	75/300	0/280	5/280
Μέσος όρος μολύνσεων (%)	27,47	0	2,92
<i>L. digitata</i> + Eu 05	12/300	0/310	5/300
	15/290	0/250	6/250
	16/300	0/300	9/310
Μέσος όρος μολύνσεων (%)	4,83	0	2,33
<i>P. littoralis</i> + Eu 96	80/300	0/260	5/250
	78/250	0/250	8/200
	65/300	0/220	10/320
Μέσος όρος μολύνσεων (%)	26,24	0	2,99
<i>E. siliculosus</i> 1310/56 + Eu 06	42/510	1/320	15/350
	65/350	1/300	9/300
	55/280	1/500	10/300
Μέσος όρος μολύνσεων (%)	14,21	0,27	3,58

Γράφημα 1. Διαγραμματική απεικόνιση της μείωσης του ποσοστού (%) μόλυνσης σε καλλιέργειες που αναπτύσσονται σε μέσο καλλιέργειας ύστερα από προσθήκη μονοσακχαριτών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.





Εικόνα III.22. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας μολυσμένου *M. pyrifera* από τον *E. dicksonii* 4018/1 ύστερα από προσθήκη μονοσακχαριτών στο μέσο καλλιέργειας για 14 ημέρες. Α. Καλλιέργεια ανεπτυγμένη σε μέσο καλλιέργειας χωρίς την προσθήκη μονοσακχαρίτη (μάρτυρας). Τα βέλη δείχνουν ζωοσποριάγγεια του ωομύκητα, γεγονός που καταδεικνύει ότι η καλλιέργεια έχει μολυνθεί. Β. Καλλιέργεια ανεπτυγμένη σε μέσο καλλιέργειας με προσθήκη 0,05 M L-φουκόζης. Εμφανής είναι η ανάσχεση της μόλυνσης συγκριτικά με την Εικ. Α. Γ. Καλλιέργεια ανεπτυγμένη σε μέσο καλλιέργειας με προσθήκη 0,05 M D-γαλακτόζης. Τα βέλη δείχνουν ζωοσποριάγγεια του ωομύκητα. Δ. Καλλιέργεια ανεπτυγμένη σε μέσο καλλιέργειας με προσθήκη 0,05 M N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης. Τα βέλη δείχνουν νεκρά κύτταρα ως έκφραση ΥΑ. Ένθετη εικόνα: Μεγέθυνση τμήματος της Εικ. Δ. Τα βέλη δείχνουν τα νεκρά κύτταρα. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 100 μm .

III.3.2.2. Επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει ορμόνες

Φαιοφύκη μολυσμένα από τον *E. dicksonii* αναπτύσσονται σε μέσο καλλιέργειας στο οποίο προστίθενται 50 μ M salicylic acid (σαλικυλικού οξέος, SA) ή indole-3-acetic acid (IAA) ή 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) (βλέπε II.4.2.). Για λόγους σύγκρισης, μολυσμένες καλλιέργειες αναπτύσσονται παράλληλα σε μέσο καλλιέργειας που δεν περιέχει πρόσθετες ορμόνες (μάρτυρας). Μετά το πέρας τουλάχιστον 14 ημερών, χρονικό διάστημα που ισοδυναμεί με έναν πλήρη κύκλο μόλυνσεων, οι καλλιέργειες ελέγχονται με οπτικό μικροσκόπιο για πιθανές μεταβολές στην μόλυνση λόγω της παρουσίας των ορμονών. Τα εμφανή συμπτώματα της προσβολής, δηλαδή τα διογκωμένα κύτταρα-ξενιστή όπου στο εσωτερικό εντοπίζεται ο θαλλός του *E. dicksonii*, καθώς και τα ζωοσποριάγγεια του παράσιτου, αποτελούν τις παραμέτρους της μόλυνσης. Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση με τις τρεις ορμόνες για 14 ημέρες είναι: *E. siliculosus* 1310/4 + Eu96, *E. siliculosus* 1310/299 + Eu96, *C. tenellus* + Eu05, *C. tenellus* + Eu06, *E. crouaniorum* + Eu96, *A. crinita* + Eu96, *A. crinita* + Eu05 και *M. pyrifera* + Eu96. Παρατηρήθηκαν κοινές αντιδράσεις στην επίδραση των ορμονών με μικρές ποσοτικές διαφορές στο σύνολο των οκτώ παραπάνω περιπτώσεων. Λεπτομερέστερα, η προσθήκη IAA στο μέσο καλλιέργειας φαίνεται ότι οδηγεί σε αύξηση των μολύνσεων (σύγκριση Εικ. III.23.A, B). Το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων μετά την προσθήκη IAA στην καλλιέργεια διπλασιάζεται (Πίνακας 9), ενώ παράλληλα εντοπίζονται μεταβολές στην μορφογένεση των φυκών. Διαπιστώθηκε αύξηση του αριθμού των πλάγιων κλάδων και συσσωματοποίηση του θαλλού. Παρόμοιες παρατηρήσεις προκύπτουν ύστερα από επώαση με NAA. Το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων αυξάνεται σε σχέση με την καλλιέργεια-μάρτυρα, ωστόσο το ποσοστό της αύξησης παραμένει χαμηλότερο από αυτό του IAA (Σύγκριση Εικ. III.23.A-Γ Πίνακας 9). Επιπρόσθετα, παρατηρείται αύξηση της γονιμότητας του φύκους, η οποία εκδηλώνεται με αύξηση των αναπαραγωγικών οργάνων και των σπορίων (λευκό βέλος στην Εικ. III.23.Γ). Η επίδραση του SA στη μόλυνση από τον *E. dicksonii* παρουσιάζει ποσοτικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών κλώνων φαιοφυκών που δοκιμάστηκαν (Πίνακας 10).

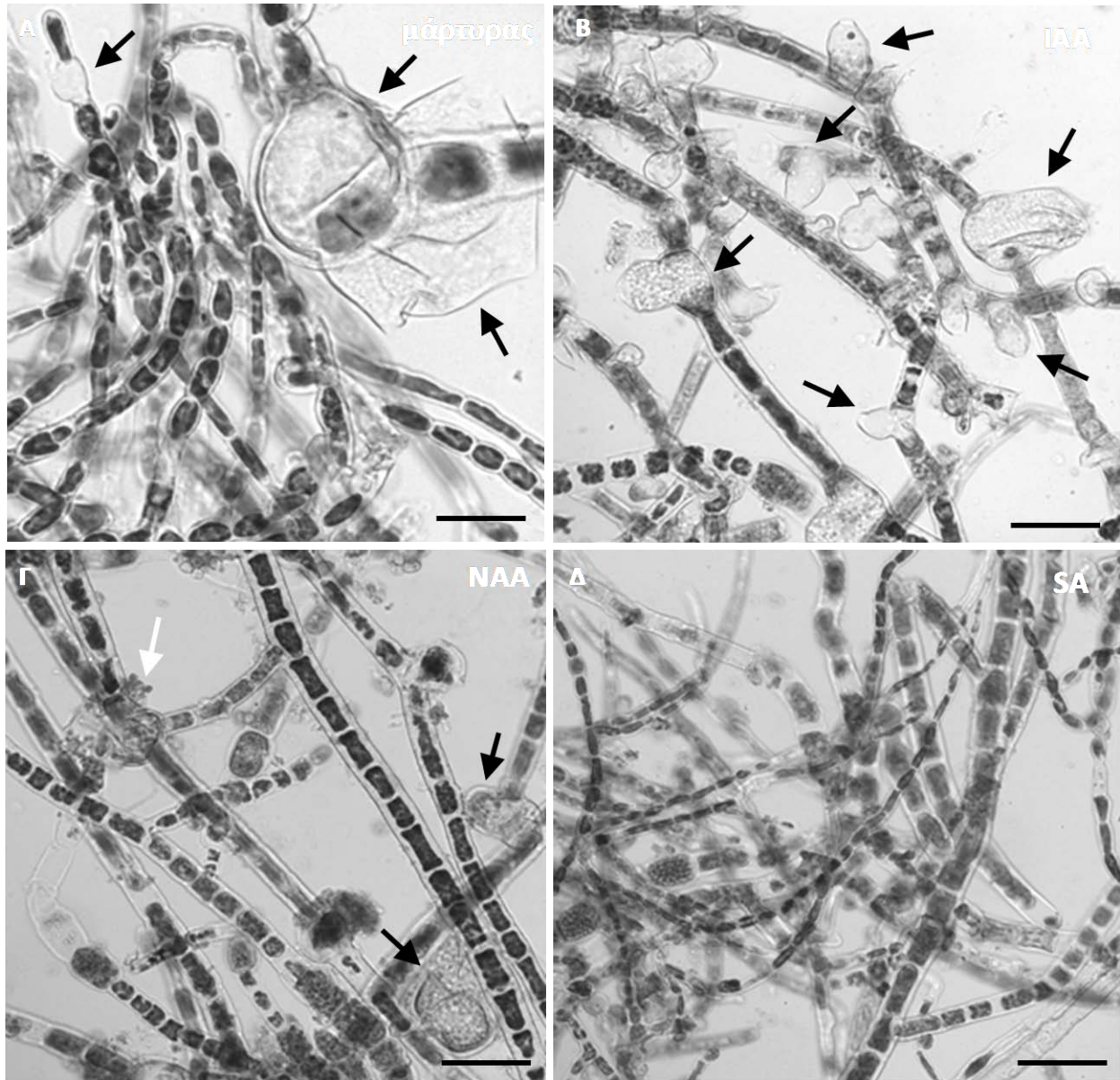
Πίνακας 9. Ποσοτική μέτρηση επίδρασης ορμονών σε καλλιέργεια *P. littoralis* + Eu96.

Επώαση με 50 μ M ορμόνης για 3 εβδομάδες	
Ορμόνη	Ποσοστό (%) μολύνσεων (n=σύνολο κυττάρων που καταμετρήθηκαν)
μάρτυρας	38% (n=1583)
IAA	51% (n=1450)
NAA	44% (n=1520)
SA	6% (n=1552)

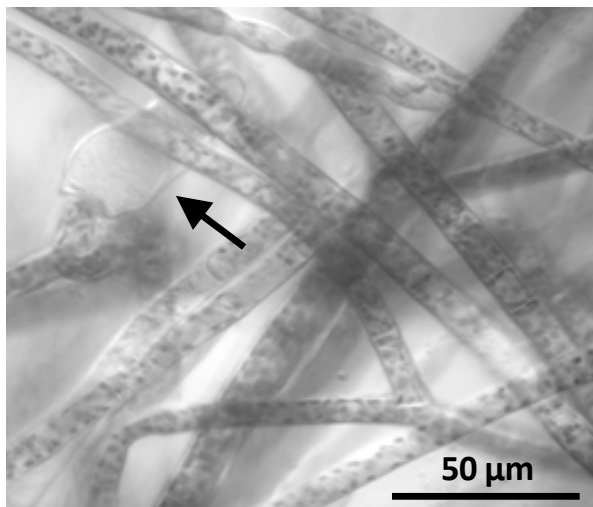
Πίνακας 10. Ποσοτική μέτρηση επίδρασης SA σε διαφορετικούς μολυσμένους κλώνους φαιοφυκών.

	<i>P. littoralis</i> + Eu96	<i>A. crinita</i> + Eu96	<i>E. siliculosus</i> + Eu05	<i>M. pyrifera</i> + Eu96
Ποσοστό μολύνσεων χωρίς SA	38%	22%	15%	35%
Ποσοστό μολύνσεων με 50 μ M SA	6%	0,5%	4%	1%

Ακόμη, κατά την επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει SA παρατηρούνται βακτηριακές ανθίσεις (βλέπε θολερότητα Εικ. III.24), ενώ ο θαλλός των φαιοφυκών αποκτά χλωρωτική όψη. Η μακρά επώαση με SA που απαιτείται για την ολοκλήρωση του κύκλου μολύνσεων του *E. dicksonii* κατά τις πειραματικές διαδικασίες, οδηγεί σε βλάβες των κυττάρων του ξενιστή όπως πλασμόλυση και αποδιοργάνωση των πλαστιδίων (Εικ. III.24).



Εικόνα III.23. Καλλιέργεια *P. littoralis* μολυσμένη από το *E. dicksonii* 4018/2 επωάζεται με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μM ορμόνης (IAA, NAA ή SA) για 25 ημέρες. Α. Επώαση με μέσο καλλιέργειας χωρίς την προσθήκη ορμόνης (μάρτυρας). Τα βέλη δείχνουν εμφανή συμπτώματα της μόλυνσης (ζωοσποριάγγεια). Β. Επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μM IAA. Τα βέλη δείχνουν εμφανή συμπτώματα της μόλυνσης (ζωοσποριάγγεια). Να σημειωθεί ότι στην Εικ. Β σε σχέση με την Εικ. Α που αντιστοιχεί στον μάρτυρα, η εμφάνιση συμπτωμάτων μόλυνσης είναι πολύ πιο έντονη. Γ. Επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μM NAA. Τα μαύρα βέλη δείχνουν εμφανή συμπτώματα της μόλυνσης (ζωοσποριάγγεια). Το λευκό βέλος δείχνει σπόρια του φύκους σε συσσωματώματα. Δ. Επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μM SA. Δεν παρατηρούνται εμφανή συμπτώματα της μόλυνσης. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 50 μm .

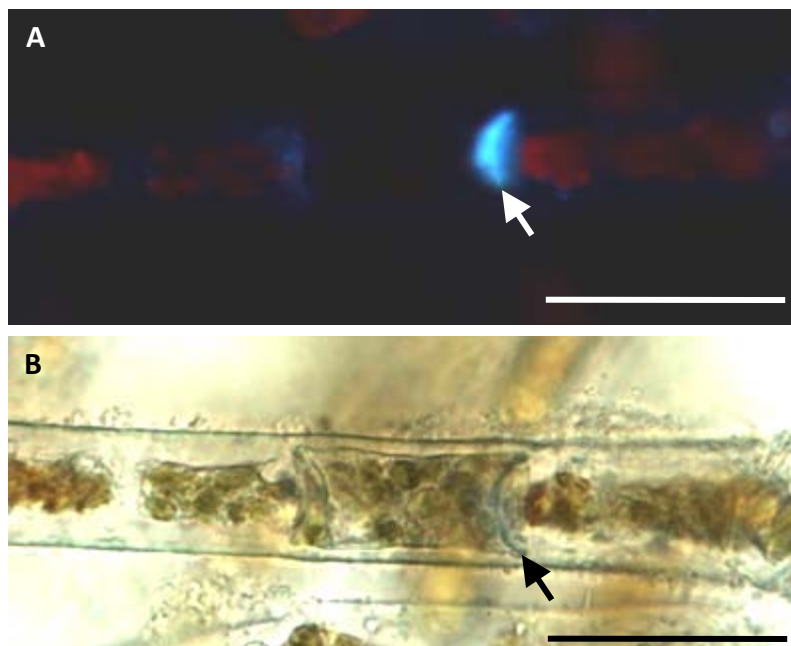


Εικόνα III.24. Καλλιέργεια *P. littoralis* μολυσμένη από το *E. dicksonii* 4018/2 επωάζεται με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μM SA για 3 μήνες. Παρατηρείται ένα άδειο ζωοσποριόγγειο του παράσιτου και σχετική αποδιοργάνωση των πλαστιδίων του φαιοφύκου.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα με σκοπό την πιθανή συσχέτιση της μείωσης των ποσοστών μόλυνσης με μηχανισμούς απόκρισης του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, κλώνοι φαιοφυκών μολυσμένοι από το *E. dicksonii* επωάζονται για 14 ημέρες με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μM SA και στη συνέχεια χρωματίζονται είτε με κυανούν της ανιλίνης (βλέπε II.2.1.1.) ή με Evans Blue (βλέπε II.4.3.). Το δείγμα παρατηρείται σε οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού, όπου πραγματοποιείται καταμέτρηση νεκρών κυττάρων ως εξής: σε υποπεριοχές του δείγματος συνολικού αριθμού 300 κυττάρων, καταμετράται το σύνολο των νεκρών κυττάρων. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 10 φορές. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο μέσος όρος των νεκρών κυττάρων ανά 300 περίπου κύτταρα και κατ' επέκταση το % ποσοστό νεκρών κυττάρων. Επιβεβαιώνεται η μείωση των ποσοστών μόλυνσης, ενώ ταυτόχρονα εντοπίζεται αυξημένος, σε σχέση με την καλλιέργεια-μάρτυρα, αριθμός νεκρών κυττάρων στα οποία αποτίθεται β -1, 3 γλυκάνη (Εικ. III.25.A, B Πίνακας 11). Το φαινόμενο της ΥΑ (βλέπε υποκεφάλαιο I.3.3. Εισαγωγής) φαίνεται ότι σχετίζεται με τοιχωματικές μεταβολές που περιλαμβάνουν εναπόθεση β -1, 3 γλυκάνης (Εικ. III.25.A, B) και πιθανώς με αμυντικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται το SA. Να σημειωθεί ότι ΥΑ εμφανίζεται και σε καλλιέργειες χωρίς προσθήκη ορμονών (μάρτυρας), όπως είναι ήδη γνωστό από προηγούμενες μελέτες (Gachon και συν. μη δημοσιευμένα δεδομένα· βλέπε επίσης υποκεφάλαιο I.3.3. Εισαγωγής).

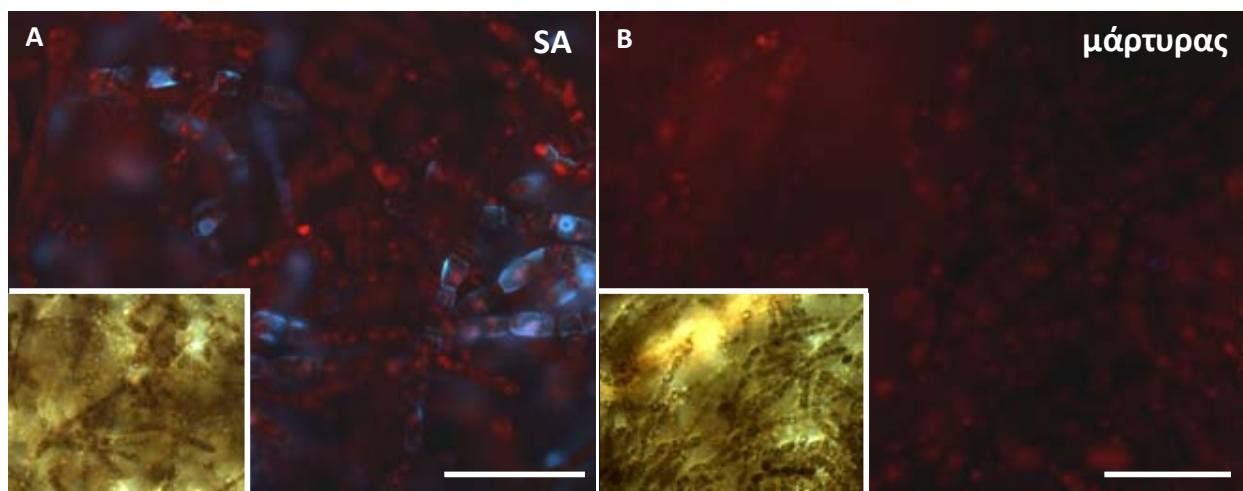
Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή συμμετοχή του SA στο φαινόμενο της ΥΑ επαναλαμβάνεται η ίδια πειραματική διαδικασία (βλέπε II.4.2.) απουσία του ωομύκητα. Έτσι, μη μολυσμένες καλλιέργειες 12 διαφορετικών κλώνων φαιοφυκών επωάζονται με μέσο

καλλιέργειας που περιέχει 50 μM SA για 4 ημέρες, δηλαδή τον ελάχιστο χρόνο για την εμφάνιση ΥΑ (Gachon και συν. μη δημοσιευμένα δεδομένα). Στη συνέχεια, το υλικό χρωματίζεται είτε με κυανούν της ανιλίνης (βλέπε II.2.1.1.) ή με Evans Blue (βλέπε II.4.3.) και ελέγχεται σε οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού. Παρατηρείται αύξηση της εμφάνισης ΥΑ μετά την προσθήκη SA στο σύνολο των 12 κλώνων φαιοφυκών (Πίνακας 12). Είναι σημαντικό ότι μεταξύ των κλώνων υπάρχουν ποσοτικές διακυμάνσεις στην ένταση της εμφάνισης του φαινομένου, σε ορισμένους από τους οποίους εντοπίζεται σημαντική αύξηση της ΥΑ συγκριτικά με καλλιέργειες που λειτουργούν ως μάρτυρες (Πίνακας 12). Αυτό επαληθεύεται με χρώση του υλικού με κυανούν της ανιλίνης, όπου δείχνεται ότι κατά την ΥΑ πραγματοποιείται εναπόθεση β -1,3 γλυκανών στο κυτταρικό τοίχωμα των νεκρών κυττάρων (Εικ. III.26.A, B). Επιπλέον, οι διακυμάνσεις ανάλογα με τον κλώνο στην ένταση της εμφάνισης ΥΑ ύστερα από επώαση με SA φαίνονται και σε οπτικό μικροσκόπιο με χρώση νεκρών κυττάρων με Evans Blue (Εικ. III.27.). Πράγματι, στους κλώνους *E. siliculosus* 1310/214, *E. fasciculatus* 1310/13 και *L. digitata* παρατηρείται έντονη εμφάνιση ΥΑ λόγω SA (σύγκριση Εικ. III.27.A-Δ' Πίνακας 12). Στις Εικ. III.27.E, ΣΤ παρουσιάζονται νεκρά κύτταρα φαιοφυκών με ΥΑ. Παρατηρείται ότι τα υγιή



Εικόνα III.25. Χρώση με κυανούν της ανιλίνης καλλιέργειας *P. littoralis* μολυσμένης από *E. dicksonii* 4018/1 (Eu05) ύστερα από επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μM SA για 14 ημέρες. Παρατηρούνται δύο νεκρά κύτταρα (κεντρικά) και τα υγιή γειτονικά τους. Α. Το βέλος δείχνει έντονο φθορισμό στο αντικλινές κυτταρικό τοίχωμα του γειτονικού κυττάρου καθώς αυτό εκβλαστάνει προς το νεκρό κύτταρο. Β. DIC των ίδιων κυττάρων. Το βέλος δείχνει το αντικλινές κυτταρικό τοίχωμα. Κλίμακες: 15 μm .

γειτονικά τους προεκβάλουν προς την πλευρά των νεκρών κυττάρων, αναπληρώνοντας έτσι την ασυνέχεια του νήματος. Να τονισθεί η χαρακτηριστική μεταβολή των αντικλινών κυτταρικών τοιχωμάτων, που αποκτούν ένα κυρτό σχήμα κατά τη διάρκεια της προεκβολής, στο οποίο όπως έχει ήδη δειχθεί παραπάνω αποτίθενται β-1,3 γλυκάνες (Εικ. III.25.A, III.27.E, ΣΤ). Η διαδικασία προεκβολής των ενδιάμεσων κυττάρων του νήματος προσομοιάζει με την διαδικασία της ακραίας αύξησης των κορυφαίων κυττάρων του νήματος, κατά την οποία επίσης αποτίθενται β-1,3 γλυκάνες στο αναπτυσσόμενο, κορυφαίο τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος (βλέπε Εικ. III.17.K).



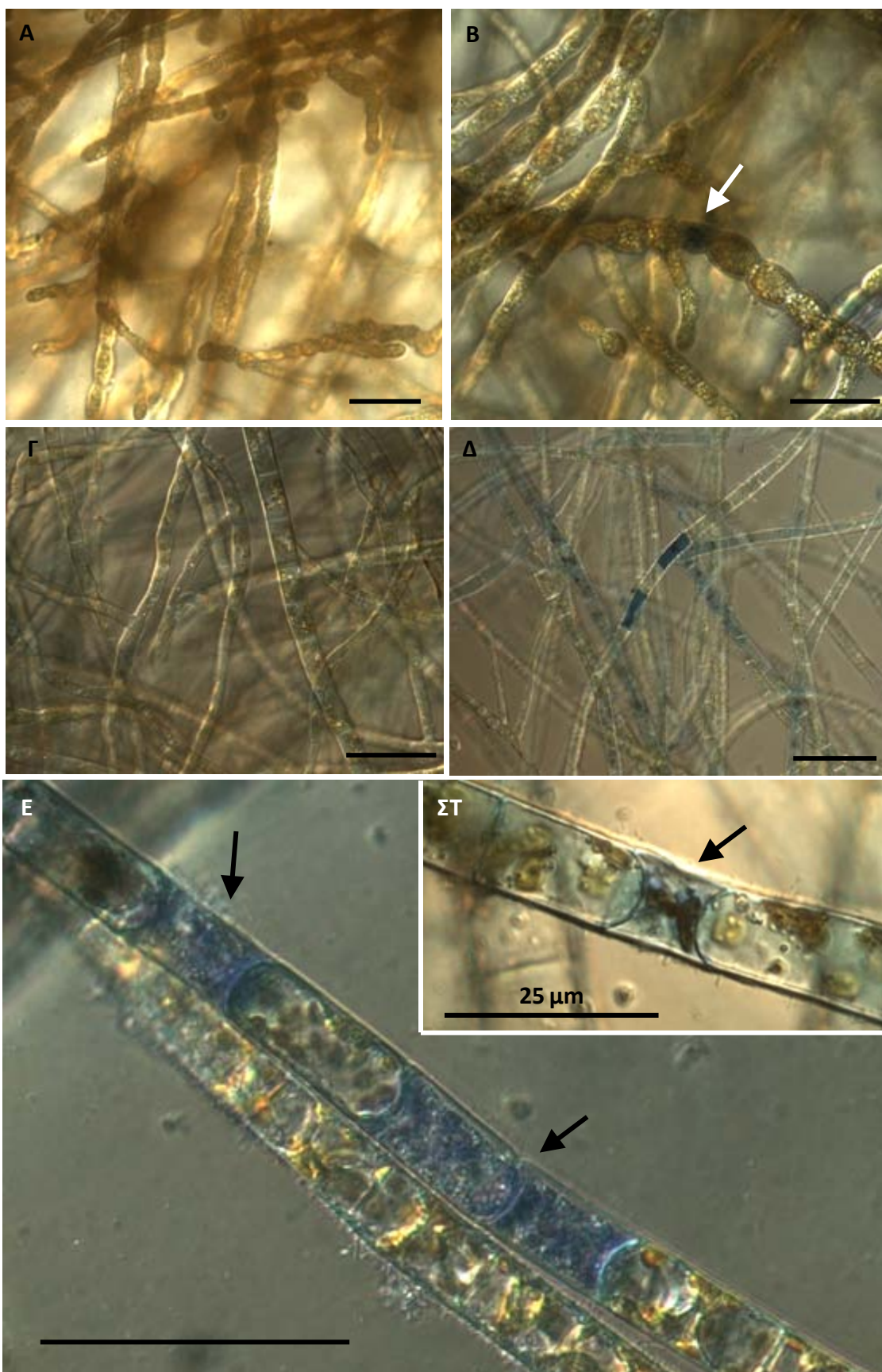
Εικόνα III.26. Χρώση με κυανούν της ανιλίνης σε καλλιέργεια *L. digitata*. Α. Φθορισμός ύστερα από επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μM SA για 4 ημέρες. Εντοπισμός β-1,3 γλυκάνης σε κύτταρα. Ένθετη εικόνα: DIC των ίδιων κυττάρων. Β. Φθορισμός καλλιέργειας-μάρτυρα. Απουσία εναπόθεσης β-1,3 γλυκάνης. Ένθετη εικόνα: DIC των ίδιων κυττάρων. Κλίμακες: 50 μm .

Πίνακας 11. Σύνοψη παρατηρήσεων επίδρασης του SA σε μολυσμένες καλλιέργειες φαιοφυκών. ↓: μείωση, ↑: αύξηση, ΥΑ: υπερευαίσθητη απόκριση

50 μM SA/ 14 μέρες σε μολυσμένο υλικό	
Κλώνοι φυκών	Με SA
<i>P. littoralis</i> + Eu96	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
<i>P. littoralis</i> + Eu05	↑ ΥΑ
<i>L. digitata</i> + Eu96	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
<i>L. digitata</i> + Eu05	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
<i>M. pyrifera</i> + Eu05	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
<i>M. pyrifera</i> + Eu96	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
1310/300 + Eu05	↑ ΥΑ
1310/300 + Eu06	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
1310/300 + Eu96	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
1310/4 + Eu96	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
1310/4 + Eu05	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
1310/13 + Eu96	↑ ΥΑ
1310/299 + Eu96	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
<i>C. tenellus</i> + Eu06	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
<i>C. tenellus</i> + Eu05	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ
<i>A. crinita</i> + Eu96	↓ μολύνσεων, ↑ ΥΑ

Πίνακας 12. Σύνοψη παρατηρήσεων επίδρασης του SA σε μη μολυσμένες καλλιέργειες φαιοφυκών. ΥΑ: υπερευαίσθητη απόκριση, *: εμφάνιση ΥΑ, **: έντονη εμφάνιση ΥΑ.

50 μ M SA/4 μέρες σε μη μολυσμένο υλικό	
Κλώνοι φυκών	Με SA
<i>E. siliculosus</i> 1310/4	* ΥΑ
<i>E. siliculosus</i> 1310/299	* ΥΑ
<i>E. siliculosus</i> 1310/214	** ΥΑ
<i>E. siliculosus</i> 1310/56	* ΥΑ
<i>E. fasciculatus</i> 1310/13	** ΥΑ
<i>E. crouaniorum</i> 1310/300	* ΥΑ
<i>P. littoralis</i> 1330/3	** ΥΑ
<i>M. pyrifer</i> 1323/1	* ΥΑ
<i>L. digitata</i>	** ΥΑ
<i>A. crinita</i>	* ΥΑ
<i>T. mertensii</i>	* ΥΑ
<i>C. tenellus</i>	* ΥΑ



Εικόνα III.27. Χρώση φαιοφυκών με Evans Blue ύστερα από επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μ M σαλικυλικό οξύ (SA) για 4 ημέρες. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας. Α, Β. Καλλιέργεια *E. crouaniorum* 1310/300. Α. Καλλιέργεια που αναπτύσσεται σε μέσο καλλιέργειας χωρίς προσθήκη SA (μάρτυρας). Β. Καλλιέργεια που αναπτύσσεται σε μέσο καλλιέργειας με προσθήκη 50 μ M SA. Το βέλος δείχνει ένα νεκρό κύτταρο με ΥΑ που έχει χρωματιστεί μπλε. Γ, Δ. Καλλιέργεια *E. fasciculatus* 1310/13. Γ. Νήματα από καλλιέργεια-μάρτυρα. Δ. Καλλιέργεια που αναπτύσσεται σε μέσο καλλιέργειας με προσθήκη 50 μ M SA. Ε. Νήματα *P. littoralis* 1330/3 ύστερα από επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μ M SA. Τα βέλη δείχνουν τα νεκρά κύτταρα με ΥΑ. Παρατηρείται η προεκβολή των υγιών γειτονικών κυττάρων προς την πλευρά των νεκρών κυττάρων. ΣΤ. Κύτταρα *E. fasciculatus* 1310/133 ύστερα από επώαση με μέσο καλλιέργειας που περιέχει 50 μ M SA. Το βέλος δείχνει ένα χρωματισμένο μπλέ νεκρό κύτταρο με ΥΑ. Παρατηρείται η προεκβολή των υγιών γειτονικών προς την πλευρά του νεκρού κυττάρου. Η κλίμακα στις Εικ. Α-Ε αντιστοιχεί σε 50 μ M.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

IV.1. Μηχανισμός μόλυνσης φαιοφυκών από τον ωομύκτη *Eurychasma dicksonii*: λεπτή δομή αρχικών σταδίων και ζωοσποριάγγελιου

IV.1.1. Γενικά

Ο υποχρεωτικά ενδοπαρασιτικός ωομύκτης *Eurychasma dicksonii* συγκεντρώνει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των φυκολόγων, κυρίως λόγω του εντυπωσιακά μεγάλου εύρους ξενιστών που δύναται να μολύνει (περισσότερα από 45 είδη φαιοφυκών σε εργαστηριακές συνθήκες – Müller και συν. 1999), καθώς και λόγω των μαζικών επιδημιών που προκαλεί σε φυσικούς πληθυσμούς φυκών (Kaper και Müller 1999). Τα τελευταία έξι χρόνια, οι δημοσιευμένες εργασίες που αφορούν σε φαιοφύκη μολυσμένα από τον *E. dicksonii* περιέχουν αποκλειστικά μοριακά δεδομένα (Gachon και συν. 2009· Grenville-Briggs και συν. 2011· Strittmatter και συν. 2013). Αντίθετα, τα ευρήματα οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παραμένουν λιγοστά. Η πιο πρόσφατη μικροσκοπική μελέτη του εν λόγω παθογενετικού συστήματος είναι αυτή των Sekimoto και συν. (2008β), η οποία αναντίρρητα προσέθεσε σημαντικές πληροφορίες στην κατανόηση του μηχανισμού μόλυνσης του παράσιτου, αλλά ταυτόχρονα άφησε αναπάντητα ερωτήματα. Τα δύο βασικά κενά γνώσης γύρω από τον μηχανισμό προσβολής του *E. dicksonii* είναι: 1) η διαδικασία εγκύστωσης, προσκόλλησης και διείσδυσης του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή και 2) η διαδικασία ωρίμανσης του ζωοσποριάγγελιου, δηλαδή τα στάδια πριν, κατά τη διάρκεια και λίγο μετά την κυτταροποίησή του.

Είναι γεγονός ότι τα μολυσμένα φαιοφύκη από τον *E. dicksonii* αποτελούν ένα απαιτητικό σύστημα μελέτης και η παρατήρηση στο ηλεκτρονικό και το οπτικό μικροσκόπιο δεν είναι πάντα εύκολη. Ο ωομύκτης έχει πάρα πολύ μικρό μέγεθος σπορίου (3-5 μm) και αναπτύσσεται υποχρεωτικά ενδοπαρασιτικά (Sekimoto και συν. 2008β), δηλαδή είναι αδύνατο να καλλιεργηθεί και να μελετηθεί ανεξάρτητα από τον ξενιστή του. Στους παραπάνω περιορισμούς προστίθεται και η δυσκολία επαγωγής της απελευθέρωσης των ζωοσπορίων από τα ζωοσποριάγγεια του *E. dicksonii*, μέθοδος η οποία έχει συντελέσει στην επιτυχή μελέτη του μηχανισμού μόλυνσης σε ανώτερους ωομύκτες. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής έγιναν προσπάθειες επίτευξης της διαδικασίας επαγωγής της απελευθέρωσης ζωοσπορίων του *E. dicksonii*, εφαρμόζοντας διαφορετικά

δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Hardham και συν. 1991). Ωστόσο, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν απέδιδαν μικρή αύξηση της απελευθέρωσης των ζωοσπορίων, της τάξης του 10-20%. Συνεπώς, δεν επετεύχθη μαζική αύξηση των μολύνσεων στις καλλιέργειες, γεγονός που θα διευκόλυνε την παρατήρηση τόσο στο οπτικό όσο και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ακόμη, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (βλέπε υποκεφάλαιο II.3.1 στα Υλικά και Μέθοδοι), για τη μελέτη της λεπτής δομής ξενιστή και παράσιτου πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός δοκιμών (διαφορετικά στερεωτικά μέσα, ποικίλοι χρόνοι επώασης, ρητίνες με διαφορετικό ιξώδες), προκειμένου να βελτιωθεί το πρωτόκολλο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των Sekimoto και συν. (2008β). Έτσι, τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής αποτελούν τα μόνα πρόσφατα δημοσιευμένα δεδομένα μικροσκοπίας που αφορούν στα φαιοφύκη που μολύνονται από το *E. dicksonii* (Tsirigoti και συν. 2013, 2014α, 2014β) και αποσκοπούν να συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας της προσβολής.

IV.1.2. Λεπτή δομή του κυτταρικού τοιχώματος πρωτογενών σπορίων και ώριμου ζωοσποριάγγελιου

Κατά την ωρίμανση του ζωοσποριάγγελιου πραγματοποιείται η κυτταροποίησή του, από την οποία προκύπτουν περιφερειακά διατεταγμένα πρωτογενή σπόρια. Η περιφερειακή αυτή διάταξη των πρωτογενών σπορίων του *E. dicksonii* στο εσωτερικό του ζωοσποριάγγελιου αποτελεί μοναδικό μορφολογικό χαρακτηριστικό του γένους (Sekimoto και συν. 2008β). Το εξωτερικό λεπτό ηλεκτρονιόπυκνο στρώμα κυτταρικού τοιχώματος που περιβάλλει τα πρωτογενή σπόρια του *E. dicksonii* προσομοιάζει με το αντίστοιχο των Saprolegniales (Beakes 1983, 1989). Το τοιχωματικό υλικό του στρώματος αυτού στα Saprolegniales προέρχεται από μικρά κυστίδια που διατάσσονται στην περιφέρεια των πρωτογενών ζωοσπορίων (Beakes 1983, 1989). Τα ζωοσπόρια των ωομυκήτων περιλαμβάνουν περιφερειακά διατεταγμένα κυστίδια, τα οποία κατά την εγκύστωση απελευθερώνουν τα υλικά που συνθέτουν το εξωτερικό στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος και την προσκολλητική πλάκα των σπορίων (Beakes 1987· Gubler και Hardham 1988· Lehnem και Powell 1989· Burr και Beakes 1994· Hardham 2005). Τα κυστίδια αυτά αποτελούν βασικά στοιχεία της διαφοροποίησης του σποριαγγελίου και χρησιμοποιούνται ως ταξινομικό εργαλείο της κλάσης των ωομυκήτων (Beakes και συν. 2012). Τα K-κυστίδια (K-bodies), τα οποία συναντώνται στα Leptomitales και Saprolegniales, σχετίζονται με τα κινητοσώματα (kinetosomes) (Lehnem και Powell 1989· Burr και Beakes 1994). Στη *Saprolegnia*, τα K-κυστίδια απελευθερώνουν κατά την εγκύστωση υδατάνθρακες που περιέχουν N-

ακετυλο-γλυκοζαμίνη, η οποία προσδένεται με τη λεκτίνη αγλουτινίνη σπέρματος σίτου (wheat-germ agglutinin) (Lehnen και Powell 1989· Burr και Beakes 1994). Μορφολογικά παρόμοια Κ-κυστίδια έχουν αναφερθεί και σε κατώτερα εξελικτικά είδη, όπως στα *Olpidiopsis porphyrae*, *O. saprolengiae*, αλλά και στον *E. dicksonii* (Bortnick και συν. 1985· Sekimoto και συν. 2008α, 2008β). Στα Albuginales και Peronosporales τα Κ-κυστίδια έχουν αντικατασταθεί από μικρότερα κυστίδια, τα οποία περιέχουν υδατάνθρακες που προσδένονται με τη λεκτίνη αγλουτινίνη σόγιας (soybean agglutinin), δηλαδή αποτελούνται από Ν-ακετυλο-γαλακτοζαμίνη (Gubler και Hardham 1988). Πιθανότατα, τα Κ-κυστίδια που έχουν εντοπιστεί στον *E. dicksonii* να συμμετέχουν στον σχηματισμό του εξωτερικού ηλεκτρονιόπυκνου υλικού που περιβάλλει τα πρωτογενή σπόρια. Ακόμη, το διακριτό αυτό εξωτερικό στρώμα τοιχωματικού υλικού φαίνεται ότι έχει προσκολλητικό ρόλο, διατηρώντας τα γειτονικά πρωτογενή σπόρια του *E. dicksonii* συνδεδεμένα μεταξύ τους. Η ασυνέχεια του εξωτερικού στρώματος σε συγκεκριμένα σημεία και η παρατήρηση πρωτογενών σπορίων εντός του ζωοσποριάγγελιου που δεν βρίσκονται σε άμεση επαφή υποδηλώνει ότι, μετά την κυτοκίνηση και τη διαφοροποίηση των πρωτογενών σπορίων, ακολουθεί η αποκόλληση όλων ή μερικών εξ' αυτών. Έτσι, το εξωτερικό ηλεκτρονιόπυκνο στρώμα προσομοιάζει στη μέση πλάκα (middle lamella) που δημιουργείται μεταξύ δύο θυγατρικών κυττάρων, αμέσως μετά τη μίτωση σε ανώτερα φυτά (Κnox 1992). Συνεπώς, η παρούσα μελέτη λεπτής δομής αποκαλύπτει κοινά χαρακτηριστικά του κυτταρικού τοιχώματος πρωτογενών σπορίων του *E. dicksonii* με άλλα γένη ωομυκήτων, ειδικά της τάξης των Leptomitales και Saprolegniales, υπογραμμίζοντας ότι το τοιχωματικό περίβλημα των πρωτογενών σπορίων αποτελεί μία εξελικτικά συντηρημένη δομή των ωομυκήτων (Beakes 1989· Beakes και συν. 2012).

Επιπλέον, η εσωτερική ηλεκτρονικά διαφανής ζώνη β-1,3 γλυκανών που περιγράφηκε για πρώτη φορά στα πρωτογενή σπόρια του *E. dicksonii*, δεν έχει αναφερθεί έως τώρα σε κανέναν άλλον ωομύκητα. Στον *Saprolegnia parasitica*, το αντίστοιχο εσωτερικό τοιχωματικό υλικό που συναντάται αποτελείται από Ν-ακετυλο-γλυκοζαμίνη, δηλαδή από το μονομερές της χιτίνης (Burr και Beakes 1994). Ωστόσο, δεν είναι ακόμη σαφές αν αυτό το υλικό παίζει κάποιον ρόλο στη διαδικασία απελευθέρωσης του ζωοσπορίου από το πρωτογενές σπόριο. Σε ότι αφορά στο κυτταρικό τοίχωμα του ζωοσποριάγγελιου του *E. dicksonii*, αυτό ομοιάζει μορφολογικά με περιγραφές κυτταρικών τοιχωμάτων από ζωοσποριάγγελια άλλων ωομυκήτων (Beakes 1989). Οι υποχρεωτικά ενδοπαρασιτικοί *Olpidiopsis porphyrae* και *Petersenia palmariae* σχηματίζουν σε μεταγενέστερο στάδιο της μόλυνσης πολύστρωμο

κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει το πλασμαλήμμα του θαλλού, όπως ακριβώς και ο *E. dicksonii* (Pueschel και van der Meer 1985· Sekimoto και συν. 2008α).

IV.1.3. Εγκύστωση του ζωοσπορίου και προσκόλληση στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή

Τα ζωοσπόρια του *E. dicksonii*, αφού απελευθερωθούν από τα ζωοσποριάγγεια, κολυμπούν με τη βοήθεια δύο μαστιγίων με κατεύθυνση προς τα κύτταρα του ξενιστή (Sekimoto και συν. 2008β). Όταν βρεθούν σε κοντινή απόσταση από το φύκος, σχηματίζουν κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει το πλασμαλήμμα τους, δηλαδή εγκυτώνονται και μετασχηματίζονται σε δευτερογενή σπόρια. Τα δευτερογενή σπόρια εμφανίζουν ορισμένες διαφορές σε σχέση με τα πρωτογενή σπόρια τα οποία συναντώνται στο εσωτερικό του ζωοσποριάγγελιου αμέσως μετά την κυτταροποίησή του. Τα δευτερογενή όπως και τα πρωτογενή σπόρια του ωομύκητα περιβάλλονται από ένα εξωτερικό διακριτό λεπτό ηλεκτρονιόπυκνο στρώμα τοιχωματικού υλικού και μία εσωτερική ινώδη ζώνη. Παρ' ότι η ινώδης ζώνη τοιχωματικού υλικού παρουσιάζει παρόμοια δομή και στις δύο μορφές σπορίων, μία βασική διαφορά είναι ότι στα δευτερογενή σπόρια παχύνεται σταδιακά, ενώ η αντίστοιχη των πρωτογενών σπορίων παραμένει λεπτή (σύγκριση Εικ. III.5A και III.10E). Ακόμη μία διαφορά που εντοπίζεται είναι ότι τα δευτερογενή σπόρια στερούνται της τρίτης, ηλεκτρονικά διαφανούς στρώσης τοιχωματικού υλικού που παρατήρηθηκε για πρώτη φορά στα πρωτογενή σπόρια στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

Τα δευτερογενή σπόρια που βρίσκονται στην εγγύς περιοχή του φύκους έχουν σφαιρικό σχήμα (Εικ. III.5A). Τα περισσότερα εξ' αυτών προσκολλώνται απ' ευθείας στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Αμέσως μετά την προσκόλληση, το δευτερογενές σπόριο διαφοροποιείται και το σχήμα του γίνεται πιο επίμηκες. Στη βάση του σπορίου, δηλαδή στο τμήμα που έρχεται σε άμεση επαφή με το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή, δημιουργείται σταδιακά μία προσκολλητική πλάκα. Ανάμεσα στην προσκολλητική πλάκα και το κυτταρικό τοίχωμα του φύκους αποτίθεται ένα συνδετικό στρώμα ινώδους τοιχωματικού υλικού, το οποίο ενισχύει την πρόσδεση του δευτερογενούς σπορίου στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Οι Sekimoto και συν. (2008β) έδειξαν ότι τα ελεύθερα ζωοσπόρια του *E. dicksonii* περιέχουν δύο τύπους περιφερειακών κυστιδίων: ένα μικρό σφαιρικό κυστίδιο που φέρει ηλεκτρονιόπυκνα έγκλειστα και ένα μεγαλύτερο σε μέγεθος (Κ-κυστίδιο), με διάχυτο περιεχόμενο. Έχει βρεθεί ότι αντίστοιχα κυστίδια των Leptomitales και Saprolegniales παίζουν σημαντικό ρόλο στην

εγκύστωση του ζωοσπορίου (Beakes 1989· Lehnem και Powell 1989· Burr και Beakes 1994). Ακόμη, στον ωομύκητα *Phytophthora cinnamomi* ειδικά, μεγάλα κυστίδια φέρουν την πρωτεΐνη PcVsv1 (Robold και Hardham 2005). Η PcVsv1 διαθέτει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αμινοξέων που είναι ομόλογες με τις αλληλουχίες θρομβοσπονδίνης τύπου 1 (thrombospondin type 1 repeats), οι οποίες αποτελούν βασικό συστατικό μίας σειράς προσκολλητικών πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών οργανισμών (Robold και Hardham 2005). Απ' όλα τα παραπάνω οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι το ινώδες τοιχωματικό υλικό που λειτουργεί ως συνδετικό στρώμα μεταξύ του δευτερογενούς σπορίου του *E. dicksonii* και του κυττάρου-ξενιστή προέρχεται πιθανώς από τα μεγάλα σε μέγεθος Κ-κυστίδια των ζωοσπορίων που περιέγραψαν οι Sekimoto και συν. (2008β).

Σε μικρό αριθμό δευτερογενών σπορίων, που βρίσκονται πλησίον του ξενιστή, εντοπίστηκε ο σχηματισμός σωληνοειδών προεκβολών (Εικ. III.5Γ). Παρόμοιες σωληνοειδείς προεκβολές έχουν περιγραφεί σε είδη των Saprolegniales και Peronosporales (Bimprong και Hickman 1975· Overton και συν. 1983· Burr και Beakes 1994). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι σε ορισμένα είδη της τάξης Saprolegniales, όπως για παράδειγμα στο *Saprolegnia parasitica*, ο πυρήνας του κυττάρου μεταναστεύει άμεσα προς το ακραίο τμήμα της προεκβολής (Willoughby 1977· Heath 1995). Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από δευτερογενή σπόρια του *E. dicksonii* που διαθέτουν σωληνοειδή προεκβολή δείχνουν ότι σε ορισμένες περιπτώσεις ο πρωτοπλάστης μετακινείται προς την υποακραία περιοχή της σωληνοειδούς προεκβολής. Ταυτόχρονα, πειράματα χρώσης του πυρήνα με τη φθορίζουσα χρωστική SYBR-Green σε δευτερογενή σπόρια του *E. dicksonii* που φέρουν σωληνοειδή προεκβολή, δείχνουν ότι ο πυρήνας δεν μεταναστεύει πάντα προς το κορυφαίο τμήμα της προεκβολής (Tsirigoti και συν. 2014β). Συνεπώς, η διαδικασία μετακίνησης του πρωτοπλάστη ενεργοποιείται πιθανώς υπό συγκεκριμένες συνθήκες.

Ο λειτουργικός ρόλος των σωληνοειδών προεκβολών στα δευτερογενή σπόρια του *E. dicksonii* παραμένει αδιευκρίνιστος. Επισταμένες παρατηρήσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποκαλύπτουν ότι στο ακραίο τμήμα της σωληνοειδούς προεκβολής σχηματίζεται συχνά μία προσκολλητική πλάκα, η οποία δεν φαίνεται να διαφέρει δομικά ή μορφολογικά από τις προσκολλητικές πλάκες των δευτερογενών σπορίων που προσκολλώνται απ' ευθείας στο κύτταρο-ξενιστή και το ιμολύνουν. Επιπλέον, οι σωληνοειδείς προεκβολές των δευτερογενών σπορίων του *E. dicksonii* σχηματίζονται και επιμηκύνονται κατά κύριο λόγο με κατεύθυνση προς τα κύτταρα του

ξενιστή. Η πληροφορία αυτή, σε συνδυασμό με την συχνή εμφάνιση προσκολλητικής πλάκας στην κορυφή της προεκβολής, υποδηλώνει την πιθανή εμπλοκή της σωληνοειδούς δομής στο μηχανισμό μόλυνσης του ωομύκητα. Ωστόσο, έως τώρα δεν έχουν εντοπιστεί δευτερογενή σπόρια με σωληνοειδή προεκβολή που να προσκολλώνται στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή και να ολοκληρώνουν τη μόλυνση επιτυχώς. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ηλικιωμένες καλλιέργειες, όπου το φύκος συνυπάρχει με το *E. dicksonii* στο ίδιο θρεπτικό μέσο για μεγάλο χρονικό διάστημα, βρίσκονται συχνά δευτερογενή σπόρια με σωληνοειδή προεκβολή προσκολλημένα μεταξύ τους. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν δεδομένα που να στοιχειοθετούν τη μεταφορά γενετικού υλικού από το ένα σπόριο στο άλλο. Όμως, το φαινόμενο της προσκόλλησης μεταξύ δύο σπορίων σε ωομύκητες έχει αναφερθεί μόνο κατά την εγγενή αναπαραγωγή. Χαρακτηριστικά, το *Lagenisma coscinodisci* διαθέτει ένα πρότυπο εγγενούς αναπαραγωγής, στα πλαίσια του οποίου πραγματοποιείται σύζευξη προσκολλημένων σπορίων, η οποία υποβοηθάται από τις σωληνοειδείς προεκβολές (Schnerpf και συν. 1977). Τέλος, όλα τα δευτερογενή σπόρια του *E. dicksonii* περιέχουν ένα μεγάλο χυμοτόπιο με ηλεκτρονιόπυκνα έγκλειστα. Ακριβώς η ίδια δομή περιγράφηκε πρόσφατα στον ωομύκητα *Chlamydomyzium dictyuchoides* (Beakes και συν. 2014).

Και στις δύο μεγάλες εξελικτικές γραμμές των ωομυκήτων, τους Peronosporales και τους Saprolegniales, η β-1,3 γλυκάνη αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταρικού τους τοιχώματος (Mélida και συν. 2013). Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έδειξαν ότι η β-1,3 γλυκάνη αποτελεί επίσης βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος του *E. dicksonii*. Λεπτομερέστερα, πειράματα ανοσοσήμανσης παρουσιάζουν την παρουσία β-1,3 γλυκανών στην περιοχή γύρω από το στόμιο του ανοιχτού πόρου των πρωτογενών σπορίων και στους σωλήνες απελευθέρωσης του ζωοσποριάγγελιου. Επιπλέον, έντονο σήμα εντοπίστηκε στο κυτταρικό τοίχωμα της προσκολλητικής πλάκας σε δευτερογενή σπόρια του ωομύκητα. Η συσσώρευση β-1,3 γλυκανών στους ανοιχτούς πόρους των πρωτογενών σπορίων και στους σωλήνες απελευθέρωσης του ζωοσποριάγγελιου πιθανόν να συνδέεται με τη συμμετοχή του υδατάνθρακα στη διαδικασία απελευθέρωσης των ζωοσπορίων. Η ενζυμική διάσπαση μέρους των λοιπών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος ίσως επιτρέπει την ειδική σήμανση των β-1,3 γλυκανών στα συγκεκριμένα σημεία εντοπισμού τους. Σε πολλά είδη ωομυκήτων, η απελευθέρωση των ζωοσπορίων διαμέσου των ανοιχτών πόρων των πρωτογενών σπορίων και των σωλήνων απελευθέρωσης του ζωοσποριάγγελιου, υποβοηθάται από την τοπική

δράση ενζύμων (Dick 2002). Τέλος, οι β-1,3 γλυκάνες παρέχουν ασθενέστερη μηχανική υποστήριξη σε σχέση με τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης (Bacic και συν. 2009) και εικάζεται ότι η παρουσία τους στην προσκολλητική πλάκα των δευτερογενών σπορίων του *E. dicksonii* διευκολύνει τις μεταβολές που πραγματοποιούνται στο κυτταρικό τοίχωμα κατά τη διάρκεια της προσκόλλησης και διείσδυσης του παράσιτου στο κύτταρο του ξενιστή.

IV.1.4. Διαφοροποίηση πλάκας προσκόλλησης και μηχανισμός διείσδυσης του *E. dicksonii* στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή

Ένα από τα κύρια ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάλυση της λεπτής δομής των αρχικών σταδίων της προσβολής, με ιδιαίτερη έμφαση στη διαδικασία διαφοροποίησης της πλάκας προσκόλλησης του δευτερογενούς σπορίου και στο μηχανισμό διείσδυσης του *E. dicksonii* στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Ο μηχανισμός μόλυνσης περιλαμβάνει την εκτόξευση από το δευτερογενές σπόριο του *E. dicksonii* μίας συσκευής διάτρησης του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή και προσομοιάζει με αντίστοιχους μηχανισμούς άλλων παράσιτων. Ωστόσο, η διαφοροποιημένη πλάκα προσκόλλησης του *E. dicksonii* αποτελεί μία σύνθετη δομή, με μοναδικά χαρακτηριστικά, τα οποία δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως σε ανάλογη συσκευή ωομύκητα. Η ύπαρξη της βελονοειδούς δομής διείσδυσης (needle-like penetration tool) αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Sekimoto και συν. (2008β). Οι συγγραφείς παρουσίασαν τη δομή σε μία χαμηλής ανάλυσης εικόνα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, χωρίς λεπτομερή περιγραφή, εικάζοντας ότι πρόκειται περί μίας συσκευής διάτρησης του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή. Η παρούσα μελέτη της λεπτής δομής του δευτερογενούς σπορίου του *E. dicksonii* επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση των Sekimoto και συν. (2008β), παρουσιάζοντας εικόνες της βελονοειδούς δομής διείσδυσης πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την εκτόξευσή της από το δευτερογενές σπόριο. Παρόμοιες βελονοειδείς συσκευές διάτρησης του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή έχουν εντοπιστεί σε δύο ακόμη πρώτιστα: 1) στο παράσιτο *Plasmodiophora brassicae* που επιμολύνει ρίζες των φυτών της οικογένειας Brassicaceae (Temminck και Campbell 1969· Aist και Williams 1971) και 2) στον ωομύκητα *Haptoglossa* ο οποίος παρασιτεί επί νηματοζώων (Robb και Barron 1982· Beakes και Glockling 1998, 2000· Hakariya και συν. 2002). Και οι δύο προαναφερθέντες οργανισμοί ανήκουν στα πρώτιστα, όμως απέχουν μεταξύ τους φυλογενετικά. Παρ' όλη την εξελικτική απόσταση, η βελονοειδής δομή διάτρησης και στους δύο

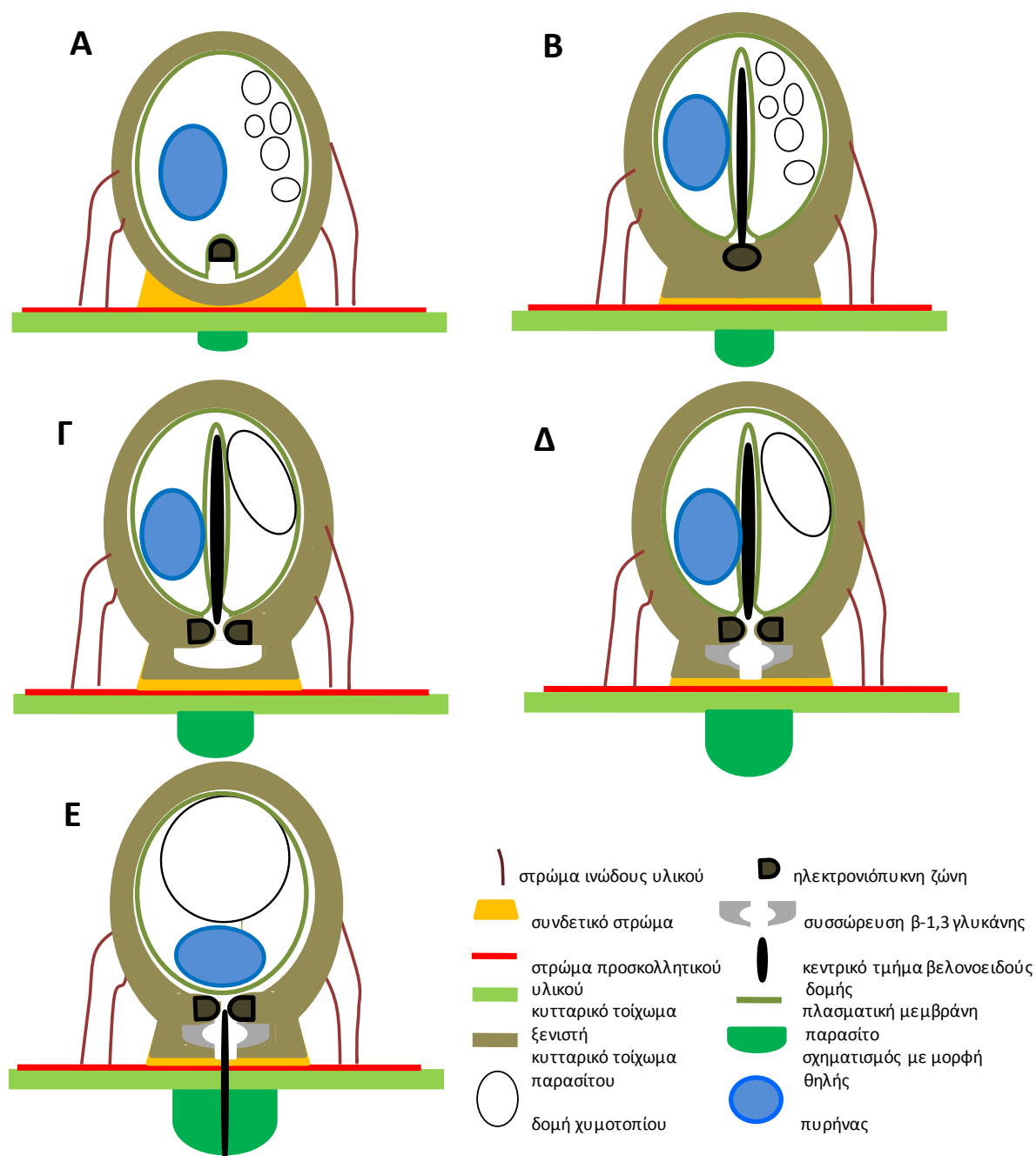
οργανισμούς σχηματίζεται με τον ίδιο τρόπο, ενώ παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά με την αντίστοιχη συσκευή διείσδυσης του *E. dicksonii* (Tsirigoti και συν. 2014β). Συνεπώς, η βελονοειδής δομή φαίνεται να αποτελεί ένα συντηρημένο στοιχείο του παρασιτικού μηχανισμού μόλυνσης στα πρώτιστα. Πιο συγκεκριμένα, τοιχωματικό υλικό αποτίθεται από την περιφέρεια του σπορίου του *E. dicksonii* προς την κεντρική περιοχή αυτού, δημιουργώντας έναν ραβδοειδή σχηματισμό (Εικ. III.5.A). Στην κορυφή του ραβδοειδούς σχηματισμού συσσωρεύεται ηλεκτρονιόπυκνο τοιχωματικό υλικό, το οποίο προσομοιάζει στην αρχική αδιαφοροποίητη δομή της μετέπειτα συσκευής διείσδυσης του παράσιτου *Haptoglossa* sp. (Beakes και Glockling 1998, 2000). Έτσι, κατ' αντιστοιχία με τον ωομύκητα *Haptoglossa*, πιστεύεται ότι ο συγκεκριμένος ραβδοειδής σχηματισμός αποτελεί το αρχικό στάδιο διαφοροποίησης της βελονοειδούς δομής του *E. dicksonii*. Περαιτέρω απόθεση τοιχωματικού υλικού οδηγεί στην επιμήκυνση του ραβδοειδούς σχηματισμού και στην τελική διαφοροποίηση της συμπαγούς βελονοειδούς δομής. Να σημειωθεί ότι η βελονοειδής δομή του *E. dicksonii* έχει εξαιρετικά απλή μορφολογία. Αποτελείται από ένα κεντρικό τμήμα, το οποίο στο ΗΜΔ εμφανίζεται ως μια συμπαγής πυκνή μάζα, ένα λιγότερο ηλεκτρονιόπυκνο στρώμα και μια λεπτή εξωτερική στρώση ηλεκτρονικά διαφανούς υλικού (Εικ. III.7.Δ). Αντίθετα, η βελονοειδής δομή του *Haptoglossa* sp. είναι πιο πολύπλοκη, με πολλούς μεμβρανώδεις και τοιχωματικούς σχηματισμούς να την περιβάλλουν (για λεπτομέρειες βλέπε Beakes και Glockling 1998, 2000).

Η διαφοροποιημένη πλάκα προσκόλλησης αποτελεί αδιαμφισβήτητα μία μοναδική και χαρακτηριστική για το είδος *E. dicksonii* δομή. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας συλλέχθηκαν επαρκείς πληροφορίες οι οποίες επιτρέπουν την εξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων γύρω από τη διαδικασία διαφοροποίησης της πλάκας προσκόλλησης, καθώς και του μηχανισμού διείσδυσης εν γένει. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, είναι πιθανό ότι η πλάκα προσκόλλησης προκύπτει από την κεντρομόλο απόθεση δύο στρώσεων τοιχωματικού υλικού στη βάση του δευτερογενούς σπορίου, δηλαδή στο σημείο επαφής του με το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Όπως προκύπτει από τη μελέτη λεπτής δομής της πλάκας προσκόλλησης, η εξωτερική στρώση των τοιχωματικών προεκβολών είναι παχύτερη της εσωτερικής, λεπτής και ηλεκτρονικά διαφανούς στρώσης τοιχωματικού υλικού. Επιπλέον, οι τοιχωματικές προεκβολές σχηματίζονται προς το κέντρο του σπορίου, αφήνοντας έναν ανοιχτό πόρο (Εικ. III.9.Γ), ο οποίος φαίνεται να συγκρατεί τη βελονοειδή δομή κάθετα προς το επίπεδο της επιφάνειας του κυττάρου-ξενιστή. Καθώς η διαδικασία

διείσδυσης του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή προχωρά, εμφανίζεται ένα ευμέγεθες χυμοτόπιο στην κορυφή του δευτερογενούς σπορίου. Εικάζεται ότι το χυμοτόπιο προκύπτει από τη σύντηξη κυστιδίων με ηλεκτρονιόπυκνα έγκλειστα, τα οποία σε προηγούμενο στάδιο καταλαμβάνουν την κορυφαία περιοχή του δευτερογενούς σπορίου. Πιστεύεται ότι η διαστολή του χυμοτοπίου ασκεί στη βελονοειδή δομή την απαραίτητη πίεση, με αποτέλεσμα την εκτόξευσή της έξω από το δευτερογενές σπόριο και τη διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή. Σε αυτή τη φάση, καθοριστικό ρόλο παίζουν οι εσωτερικές πτυχώσεις του κυτταρικού τοιχώματος της πλάκας προσκόλλησης, καθοδηγώντας τη βελονοειδή δομή να μετακινηθεί διαμέσου του ανοιχτού πόρου προς το κυτταρικό τοίχωμα του φύκους (III.9.Γ). Παρόμοιος μηχανισμός έχει περιγραφεί στους οργανισμούς *Rozella allomycis* (Held 1973) και *Haptoglossa* sp. (Beakes και Glockling 1998, 2000).

Στους παθογόνους μικροοργανισμούς *Plasmodiophora* sp. και *Haptoglossa* sp. η εκτόξευση της βελονοειδούς δομής και η διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή διαρκούν μόλις λίγα δευτερόλεπτα (περίπου 6 s) (Aist και Williams 1971· Robb και Barron 1982· Hakariya και συν. 2002). Το γεγονός ότι σπάνια παρατηρούνται ενδιάμεσα στάδια της διαδικασίας εισόδου οδηγεί στην υπόθεση ότι η διαδικασία εκτόξευσης και διείσδυσης έχει παρόμοιο χρόνο διάρκειας και στο *E. dicksonii*. Μετά από την επιτυχή είσοδο του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή, ο πρωτοπλάστης του *E. dicksonii* περιβάλλεται από διπλή πλασματική μεμβράνη, ακριβώς όπως συμβαίνει και στο *Plasmodiophora* sp. (Aist και Williams 1971· Sekimoto και συν. 2008β). Όσον αφορά στην προέλευση της διπλής μεμβράνης που περιβάλλει τον πρωτοπλάστη του νεαρού θαλλού, μετά την είσοδο στο εσωτερικό του φύκους, εικάζεται ότι η μία πλασματική μεμβράνη ανήκει στο *E. dicksonii* και η δεύτερη στον ξενιστή. Έως τώρα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ποια οργανίδια του πρωτοπλάστη μεταφέρονται κατά τη μόλυνση. Όμως, η σύγκριση του περιεχομένου των πρωτοπλαστών του δευτερογενούς σπορίου, λίγο πριν την προσβολή και του νεαρού θαλλού αμέσως μετά την μόλυνση, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μεταφέρονται πάντοτε τα μιτοχόνδρια, ο πυρήνας και ορισμένα κυστίδια με έγκλειστα. Τέλος, το σύνολο του μηχανισμού εκτόξευσης, διάτρησης και διείσδυσης του *E. dicksonii* παρουσιάζει σημαντικές μορφολογικές ομοιότητες με τον αντίστοιχο του παράσιτου *Haptoglossa* sp., γεγονός που υποδεικνύει ότι ο γενικός μηχανισμός προσβολής είναι κοινός για τους εξελικτικά κατώτερους ωομύκητες. Τα στάδια της διαφοροποίησης της πλάκας προσκόλλησης και της εκτόξευσης

της βελονοειδούς δομής για το *E. dicksonii* απεικονίζονται σχηματικά στο συνοπτικό διάγραμμα της Εικόνας IV.1.



Εικόνα IV.1. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού προσβολής του *E. dicksonii* και της αμυντικής απόκρισης του φύκου. Α. Αρχικό στάδιο διαφοροποίησης της βελονοειδούς δομής διείσδυσης - εναπόθεση τοιχωματικού υλικού στη βάση του προσκολλημένου σπορίου. Β. Διαφοροποίηση του τμήματος της βάσης του σπορίου, η οποία οδηγεί στη διαμόρφωση της πλάκας προσκόλλησης. Γ. Κεντρομόλος πόθεση τοιχωματικού υλικού και διαμερισματοποίηση του σπορίου. Εμφάνιση χυμοτοπίου. Δ. Περαιτέρω διαφοροποίηση της πλάκας προσκόλλησης με εναπόθεση ηλεκτρονικά διαφανούς τοιχωματικού υλικού εσωτερικά. Στο κέντρο αφήνεται ένας ανοιχτός πόρος. Ε. Διαστολή του χυμοτοπίου και εκτόξευση της βελονοειδούς δομής με σκοπό τη διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος του φύκου. Δείχνεται η εμφάνιση της θηλής (εναπόθεση β-1,3 γλυκανών) στο σημείο διείσδυσης ως αποτέλεσμα της αμυντικής απόκρισης του φύκου.

IV.2. Συμμετοχή του κυτταροσκελετού ξενιστή και παράσιτου στον μηχανισμό μόλυνσης

IV.2.1. Κυτταροσκελετός *E. dicksonii*

Ένα ακόμη εύρημα της εν λόγω διδακτορικής διατριβής με ιδιαίτερη σημασία είναι η οργάνωση του κυτταροσκελετού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. dicksonii* κατά τη διάρκεια των βασικών σταδίων της μόλυνσης. Ο κυτταροσκελετός, όπως έχει ήδηδειχθεί σε πληθώρα παρασιτικών συστημάτων, παίζει πρωτεύοντα ρόλο στη διαδικασία της προσβολής. Ειδικότερα, η διευθέτηση των ΜΣ τροποποιείται ανάλογα με την εκάστοτε φάση της μόλυνσης, υποβοηθώντας την επικράτηση του παθογόνου μικροοργανισμού στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή, καθώς και τη μορφογένεση των ζωοσπορίων του (Holloway και Heath 1977· Hardham 2009). Η οργάνωση του κυτταροσκελετού των ΜΣ του *E. dicksonii* φέρει κοινά χαρακτηριστικά με την τυπική οργάνωση ΜΣ των ετερόκοντων, όπως έχει περιγραφεί σε λοιπούς αυτότροφους και ετερότροφους αντιπροσώπους της ομάδος (Katsaros 1980· Jelke και συν. 1987· Katsaros και Galatis 1992). Σε δευτερογενή σπόρια του *E. dicksonii* που βρίσκονται προσκολλημένα στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή, οι δέσμες ΜΣ περιβάλλουν τον πυρήνα του ωομύκητα και συγκλίνουν σε ένα συγκεκριμένο σημείο πλησίον του. Το σημείο αυτό πιστεύεται ότι είναι το κεντροσωμάτιο, το οποίο λειτουργεί πιθανώς ως ΚΟΜ. Μετά την είσοδο του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή, παρατηρείται ακριβώς η ίδια διευθέτηση ΜΣ κατά τη μεσόφαση. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με μελέτες ΗΜΔ, οι οποίες αποκαλύπτουν την παρουσία δυο κεντρογυλίων (κινητοσώματα) σε μικρή απόσταση μεταξύ τους και υπό γωνία μικρότερη των 90° (Sekimoto και συν. 2008β). Κατά τη μίτωση του παράσιτου, παχιές περιπυρηνικές δέσμες ΜΣ συγκλίνουν σε δύο πολικά έντονα φθορίζοντα κοκκία. Εικόνα ΗΜ δείχνει ότι ο πυρήνας του παράσιτου, ο οποίος πιθανώς εισέρχεται σε μιτωτική φάση, περιβάλλεται από δύο πολικά κεντρογύλια. Συνεπώς, τα έντονα φθορίζοντα σημεία που παρατηρούνται σε πειράματα ανοσοεντόπισης σωληνίνης κατά τη

μίτωση του παράσιτου, ταυτίζονται πιθανώς με τα δύο πολικά τοποθετημένα κεντροσωμάτια. Εικάζεται ότι πριν από κάθε διαίρεση, το κεντροσωμάτιο διπλασιάζεται και κάθε θυγατρικό κεντροσωμάτιο (αποτελούμενο από δύο κεντρώγια) μεταναστεύει σε έναν από τους αντίθετους πόλους του πυρήνα. Η διαδικασία της μετανάστευσης των κεντροσωματίων απεικονίζεται στην Εικ. III.13.Ξ, όπου παρατηρούνται δύο έντονα φθορίζουσες ράβδοι, οι οποίες βρίσκονται σε μη πολική θέση και στις οποίες συγκλίνουν ακτινωτά παχιές δέσμες ΜΣ. Ωστόσο, κατά την κυτταροποίηση του ζωοσποριάγγειου του *E. dicksonii*, δηλαδή κατά την κυτοκίνηση, δεν παρατηρείται σύγκλιση των ΜΣ σε περιπυρηνικά σημεία και το γεγονός αυτό υποδηλώνει την πιθανή απενεργοποίηση της λειτουργίας των κεντροσωματίων ως περιπυρηνικών ΚΟΜ κατά το συγκεκριμένο στάδιο της διαίρεσης. Το φαινόμενο αυτό είναι ήδη γνωστό από άλλα συστήματα, όπως για παράδειγμα το χλωροφύκος *Uronema* sp., στο οποίο το κεντροσωμάτιο λειτουργεί ως ΚΟΜ κατά τη διάρκεια της μίτωσης αλλά όχι κατά την κυτοκίνηση και τη μεσόφαση (Katsaros και συν. 2011).

Η ανάπτυξη του βλαστητικού θαλλού του ωομύκητα χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες διαιρέσεις πυρήνων, οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν σύγχρονες, αφού το σύνολο των πυρήνων του παράσιτου συναντάται πάντοτε στην ίδια μιτωτική φάση. Είναι γεγονός ότι σε ευκαρπικούς ωομύκητες έχει γίνει αναφορά του φαινομένου των ασύγχρονων διαιρέσεων των πυρήνων, όπως για παράδειγμα στο *Saprolegnia ferax* (Heath 1980). Παρ' όλα αυτά, οι σύγχρονες διαιρέσεις των πυρήνων εμφανίζονται ως γενικό φαινόμενο στους ολοκαρπικούς ωομύκητες (Martin και Miller 1986), καθώς και κατά την ζωοσποριογένεση άλλων οργανισμών, όπως του φαιοφύκου *Halopteris filicina* (Katsaros και Galatis 1990). Να σημειωθεί ότι προς το παρόν δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα ΗΜΔ που να επιβεβαιώνουν τη υπόθεση αυτή για το *E. dicksonii*. Πριν την κυτταρική διαίρεση, το κεντροσωμάτιο διπλασιάζεται και ακολούθως δυο πολικά ζεύγη κεντρώγων που συνδέονται με ΜΣ σχηματίζουν τη μιτωτική άτρακτο. Η γωνία μεταξύ των κεντρώγων είναι μικρότερη των 90° , γεγονός που αποτελεί σημαντική διαφορά του *E. dicksonii* και λοιπών ωομυκήτων όπως οι *Lagenisma coscinodisci*, *Olpidiopsis bostrychia*, *Saprolegnia*, *Dictyuchus*, *Thraustotheca*, *Albugo*, στους οποίους τα κεντρώγια βρίσκονται ευθυγραμμισμένα κατά 180° (Heath 1974· Schnepf και συν. 1978· Sekimoto και συν. 2009). Αντίθετα, τα κεντρώγια των φαιοφυκών σχηματίζουν γωνία 90° , όπως συμβαίνει και στα ζωικά κύτταρα (Katsaros 1980· Katsaros και Galatis 1992).

Το τέλος της βλαστητικής φάσης του ωομύκητα σηματοδοτείται από το σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος γύρω από το πλασμαλήμμα του θαλλού και τον τερματισμό των σύγχρονων διαιρέσεων των πυρήνων. Κατά τα αρχικά στάδια της ζωοσποριογένεσης και πριν τη διαδικασία της κυτταροποίησης, παρατηρείται περιφερειακή διάταξη των πυρήνων στο εσωτερικό του κοινοκυτικού θαλλού (Sekimoto και συν. 2008β). Παράλληλα, εικόνες ΗΜΔ παρουσιάζουν την εμφάνιση ενός ευμεγέθους χυμοτοπίου στο κέντρο του κυττάρου, παρόμοιου με εκείνο που έχει περιγραφεί στην μόλυνση του ροδοφύκου *Palmaria mollis* από τον θαλάσσιο ωομύκητα *Petersenia palmariae* (Pueschel και Van Der Meer 1985). Και σε αυτό το στάδιο, ο ρόλος των ΜΣ κρίνεται καθοριστικός. Όπως έχει προταθεί, ακτινωτές δέσμες ΜΣ που συνδέονται με την πυρηνική μεμβράνη είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της θέσης των πυρήνων σε κατώτερα και ανώτερα φυτά, μύκητες και φύκη που δεν φέρουν κεντροσωμάτιο (Wick 1985· Menzel 1986· Brown και Lemmon 1988· Brown και συν. 1994· Lowry και Roberson 1997). Στους ωομύκητες, αστεροειδείς δέσμες ΜΣ που εκτείνονται από συγκεκριμένη περιοχή πλησίον του πυρήνα κατευθύνουν τη μετατόπιση των πυρήνων στην περιφέρεια, καθώς και τη μετέπειτα διαμόρφωση των ζωοσπορίων (Gotelli 1974· Jelke και συν. 1987· Hyde και συν. 1991α). Επιπλέον, στον ωομύκητα *Phytophthora cinnamomi* οι αστεροειδείς δέσμες ΜΣ που εκτείνονται από συγκεκριμένο σημείο, που μετέπειτα αποτελεί το βασικό σωματίο, σταθεροποιούν το περιπυρηνικό κυτόπλασμα και καθορίζουν το επίπεδο διαίρεσης των σπορίων (Heath και Harold 1992). Μάλιστα, οι συγγραφείς αναφέρουν ότι κατά την κυτταροποίηση το επίπεδο δημιουργίας του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ δύο γειτονικών σπορίων ταυτίζεται με τις θέσεις όπου συμβάλουν οι αστεροειδείς διατάξεις ΜΣ. Παρόμοιος μηχανισμός έχει περιγραφεί και κατά την κυτοκίνηση φαιοφυκών (Katsaros και Galatis 1992). Σε αντίθεση με τις παραπάνω περιπτώσεις, ο ρόλος του κυτταροσκελετού ΜΣ στην αρχική φάση της ζωοσποριογένεσης του *E. dicksonii* φαίνεται πολύ διαφορετικός. Λεπτομερέστερα, δεν συλλέχθηκαν δεδομένα για την ύπαρξη κάποιας ακτινωτής, αστεροειδούς ή σχετικής με τον πυρήνα διάταξης ΜΣ στο στάδιο λίγο πριν την κυτταροποίηση του ζωοσποριάγγελιου. Οι περιπυρηνικές δέσμες ΜΣ σε σχήμα κλωβού (cage-like MT bundles), που σχημάτιζαν την μιτωτική άτρακτο, αντικαθίστανται από έναν διάχυτο περιπυρηνικό φθορισμό, ο οποίος σταδιακά εξαφανίζεται πλήρως. Συνδυάζοντας, λοιπόν, όλα τα παραπάνω στοιχεία συμπεραίνουμε ότι η αρχική φάση ζωοσποριογένεσης του *E. dicksonii* προσομοιάζει περισσότερο με την αντίστοιχη διαδικασία του ωομύκητα *Saprolegnia*, δηλαδή θεωρούμε ότι η περιφερειακή

τοποθέτηση των πυρήνων πριν την κυτταροποίηση υποβοηθάται από τη δημιουργία του κεντρικού χυμοτοπίου, ενώ η οργάνωση των ΜΣ δε φαίνεται να συμμετέχει καθοριστικά στην εν λόγω διαδικασία (Gay και Greenwood 1966· Heath και Greenwood 1971).

Ακολουθεί ο μετασχηματισμός του πολυπύρηνου κοινοκυτικού θαλλού σε ώριμο ζωοσποριάγγειο μέσω της κυτταροποίησης. Η κυτταροποίηση αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία και η σημασία των ΜΣ έχει επισημανθεί σε πολλούς οργανισμούς, όπως στο ενδοσπέρμιο του κριθαριού (Brown και συν. 1994), το Χλωροφύκος *Acetabularia* sp. (Menzel 1986) και τον ωομύκητα *Phytophthora* sp. (Hyde και συν. 1991α, β). Στο *E. dicksonii* οι πυρήνες, τα οργανίδια και το κυτόπλασμα καταλαμβάνουν χώρο πλευρικά, λόγω του μεγάλου κεντρικού χυμοτοπίου. Στο στάδιο αυτό παρατηρήθηκε ένας διαφορετικός τύπος οργάνωσης των ΜΣ, όπου 4-5 έντονα φθορίζοντα σημεία εμφανίζονται στην περιφέρεια του ζωοσποριάγγειου. Πολυάριθμες παχιές δέσμες ΜΣ εκτείνονται από αυτά τα έντονα φθορίζοντα σημεία στην περιφέρεια, διασχίζοντας το σποριάγγειο προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ιδιαιτερότητα αυτής της ενδιαφέρουσας παρατήρησης είναι ότι τα εν λόγω έντονα φθορίζοντα σημεία δεν σχετίζονται με τους πυρήνες του παράσιτου. Άλλωστε, σε αυτό το στάδιο καταμετρούνται 50-100 πυρήνες, σε αντίθεση με τα έντονα φθορίζοντα σημεία τα οποία είναι συνήθως 4-5 σε ολόκληρο το ζωοσποριάγγειο. Στον ωομύκητα *Phytophthora*, sp. κατά την κυτταροποίηση του σποριαγγείου, οι δέσμες ΜΣ εκτείνονται από ένα διακριτό σημείο πλησίον του πυρήνα, το οποίο αντιστοιχεί στο βασικό σωματίο (Hyde και συν. 1991α, β). Μία πιθανή εξήγηση γι' αυτή τη βασική διαφορά μεταξύ των δύο ωομυκήτων είναι ότι το κεντροσωμάτιο του *E. dicksonii* λειτουργεί ως ΚΟΜ αποκλειστικά κατά τη μίτωση. Πράγματι, πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι οι δέσμες ΜΣ που σχετίζονται με το κεντροσωμάτιο παρατηρούνται μόνο στη μιτωτική φάση. Κατά συνέπεια, θεωρούμε ότι τα κεντροσωμάτια του *E. dicksonii* χάνουν τη λειτουργικότητά τους ως ΚΟΜ και τα κεντρώγια μετατρέπονται σε βασικά σωματία (κινητοσώματα). Επιπρόσθετα, ο λειτουργικός ρόλος των περιφερειακών ΚΟΜ δεν έχει διευκρινιστεί. Ο χρόνος και η θέση εμφάνισής τους οδηγεί στην υπόθεση ότι τα 4-5 έντονα φθορίζοντα σημεία στην περιφέρεια του ζωοσποριάγγειου θα μπορούσαν να λειτουργούν ως ΚΟΜ, συμμετέχοντας στη διαμόρφωση της δομής του ώριμου ζωοσποριάγγειου και των σωλήνων απελευθέρωσης των ζωοσπορίων του *E. dicksonii*.

Όσον αφορά στο βασικό σωματίο του *E. dicksonii*, αυτό σχηματίζεται χρονικά πριν από τη διαμόρφωση των μαστιγίων, όπως σε όλα τα συγγενικά του είδη (Dick 1997). Διακρίνεται από την

τελική πλάκα (βασική πλάκα), δηλαδή από μία συμπαγή περιοχή στη βάση του και από μία χαρακτηριστική δομή που προσομοιάζει σε τροχό με ακτίνες (cartwheel) (βλέπε επίσης Sekimoto και συν. 2008β). Σημειώνεται ότι η μετατροπή των κεντρυλλίων του *E.dicksonii* σε βασικά σωματίδια ξεκινά σχετικά νωρίς, δηλαδή αρκετά πριν από τον πλήρη σχηματισμό των ζωοσπορίων. Η εικόνα του βασικού σωματίου του *E.dicksonii* βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με μελέτες σε άλλους ωομύκητες, ανώτερα φυτά και πρωτόζωα, γεγονός που αποδεικνύει ότι πρόκειται περί μίας συντηρημένης εξελικτικά δομής (Munn 1970· Jelke και συν. 1987· Dick 1997· Letcher και συν. 2008).

Τα τελευταία στάδια της ζωοσποριογένεσης του *E. dicksonii* περιλαμβάνουν την εγκαθίδρυση των ορίων ανάμεσα στα πρωτογενή σπόρια και την πλήρη διαφοροποίησή τους. Εικόνες ανοσοφθορισμού σωληνίνης παρουσιάζουν έντονα φθορίζοντα κοκκία στην περιπυρηνική κυτοπλασματική περιοχή των διαφοροποιημένων πρωτογενών σπορίων του *E. dicksonii*. Τα ευρήματα αυτά θυμίζουν τα διακεκομμένα κοκκία β-σωληνίνης (β-tubulin punctate dots) που εντοπίζονται στον χερσαίο μύκητα *Trichoderma hyphae* και πιθανώς αποτελούν τελικά τμήματα ανεξάρτητων δεσμών ΜΣ (Czymmek και συν. 1996). Αν και η εμφάνιση του βασικού σωματίου είναι πρώιμη, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη πότε ακριβώς ξεκινά ο σχηματισμός των μαστιγίων. Τα μοναδικά πειστικά αποτελέσματα που αφορούν στον πιθανό χρόνο εμφάνισής τους προκύπτουν από πειράματα ανοσοφθορισμού της σωληνίνης, τα οποία παρουσιάζουν παχιές δέσμες ΜΣ στο εσωτερικό διαφοροποιημένων πρωτογενών σπορίων. Οι δέσμες αυτές αντιστοιχούν στα αξονήματα των μαστιγίων. Άρα, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα μαστίγια του *E. dicksonii* εκτείνονται από τα δύο βασικά σωματίδια παράλληλα με τη διαδικασία κυτταροποίησης του ζωοσποριάγγελιου και για το λόγο αυτό εντοπίζονται τα αξονήματα περιφερειακά των διαφοροποιημένων πρωτογενών σπορίων. Η υπόθεση αυτή συνάδει με το παράδειγμα του ωομύκητα *Phytophthora cinnamomi*, ο οποίος ακολουθεί ακριβώς την ίδια διαδικασία σχηματισμού των μαστιγίων (Heath και Harold 1992). Ωστόσο, τα ζωοσπόρια του *E. dicksonii* απελευθερώνονται από τα πρωτογενή σπόρια και, αν δεν καταφέρουν να διαφύγουν από τους ανοιχτούς σωλήνες απελευθέρωσης του ζωοσποριάγγελιου, επανεγκυστώνονται στο εσωτερικό του (Sekimoto και συν. 2008β). Δεν αποκλείεται λοιπόν, η Εικόνα III.15.Z να αντιστοιχεί σε ζωοσπόρια, τα οποία επανεγκυστώθηκαν διατηρώντας τα μαστίγια τους. Σε αυτήν την περίπτωση, εικάζεται ότι ο σχηματισμός των μαστιγίων στο *E. dicksonii* πραγματοποιείται

μετά την ολοκλήρωση της κυτταροποίησης του ζωοσποριάγγελιου, όπως έχει προταθεί και για τον ωομύκητα *Saprolegnia* (Heath και Greenwood 1971).

Τέλος, ακολουθεί η απελευθέρωση των ζωοσπορίων, τα οποία φέρουν δυο μαστίγια και νεφροειδούς σχήματος πυρήνα (Sekimoto και συν. 2008β). Έχει καταγραφεί ότι η αλλαγή στο σχήμα του πυρήνα, που παρατηρείται μεταξύ του εγκυστωμένου και ελεύθερου ζωοσπορίου από σφαιρικό σε νεφροειδές, οφείλεται σε κυτοπλασματικούς ΜΣ που εκτείνονται από το βασικό σωματίο (Cerenius και συν. 1984). Συμπερασματικά, η ποικιλία στην οργάνωση των ΜΣ καθ' όλη τη διάρκεια της επιμόλυνσης, υπογραμμίζει τον σημαντικό ρόλο των ΜΣ στην ανάπτυξη του παράσιτου.

Όσον αφορά στον κυτταροσκελετό της F-ακτίνης του *E. dicksonii*, οι χαρακτηριστικές πλάκες MA αποτελούν αναμενόμενες παρατηρήσεις και έχουν βρεθεί και σε κύτταρα άλλων ωομυκήτων, όπως στους *Achlya bisexualis* και *Phytophthora cinnamomi* (Walker και συν. 2006). Αντίθετα, η τυπική οργάνωση της ακτίνης στα φαιοφύκη παρουσιάζει τελείως διαφορετική εικόνα, με προσανατολισμένα MA να διασχίζουν το κυτόπλασμα, απουσία των έντονα φθοριζόντων πλακών (Katsaros και συν. 2006). Επιπρόσθετα, σε δευτερογενή σπόρια του *E. dicksonii* προσκολλημένα στο κυτταρικό τοίχωμα του φύκους, παρατηρείται συσσώρευση διάχυτων MA στην πλάκα προσκόλλησης. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό ότι η ακτίνη συμμετέχει στις διαφοροποιήσεις του κυτταρικού τοιχώματος της πλάκας προσκόλλησης του σπορίου. Κατ' αντιστοιχία, στο σπόριο του ωομύκητα *Haptoglossa* sp., η ακτίνη συνδέεται με την πλασματική μεμβράνη της αναπτυσσόμενης σωληνοειδούς προεκβολής και υποβοηθά την επιμήκυνση της δομής (Beakes και Glockling 1998).

Οι μεταβολές στην κατανομή της ακτίνης, κατά τη διάρκεια της δημιουργίας του ζωοσποριάγγελιου του *E. dicksonii*, συμφωνούν με προηγούμενες παρατηρήσεις που αποκαλύπτουν ότι η ακτίνη συμμετέχει στη διαδικασία της ζωοσποριογένεσης των ωομυκήτων. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι στα αναπτυσσόμενα ζωοσποριάγγεια των *Saprolegnia* sp. και *Achlya* sp., εντοπίζονται περιφερειακά συμπαγείς δεσμίδες MA, ενώ σε επόμενα στάδια παρατηρούνται συμπλέγματα από πλάκες ακτίνης διασκορπισμένα στο κυτόπλασμα (Heath και Harold 1992). Στα ίδια συστήματα, η κυτταροποίηση του ζωοσποριάγγελιου πραγματοποιείται με το σχηματισμό διαφραγμάτων, τα οποία συνδέονται με περιφερειακές πλάκες ακτίνης του κυτοπλάσματος. Ακόμη, στον ωομύκητα *Phytophthora cinnamomi* πριν την κυτταροποίηση, η ακτίνη σχηματίζει πλάκες στην περιφέρεια του σποριαγγελίου (Jackson και Hardham 1998). Κατά την κυτταροποίηση, οι πλάκες ακτίνης εξαφανίζονται

και ΜΑ συσσωρεύονται γύρω από τους πυρήνες, στα επίπεδα της επικείμενης διαίρεσης. Παράλληλα, είναι γνωστό ότι η επίδραση με χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη φυσιολογική λειτουργία της ακτίνης, οδηγεί στην ακανόνιστη διαμερισματοποίηση του ζωοσποριάγγειου των ωομυκήτων (Hardham και Hyde 1997). Τέλος, εικάζεται ότι κατά την κυτταροποίηση του ζωοσποριάγγειου του *E. dicksonii*, η οργάνωση των ΜΣ ελέγχει τη διάταξη των πλακών ακτίνης στο επίπεδο διαίρεσης των σπορίων. Παρόμοιοι μηχανισμοί έχουν προταθεί για τη ζωοσποριογένεση του ωομύκητα *Phytophthora cinnamomi*, καθώς και για την κυτοκίνηση σε κύτταρα φαιοφυκών (Karyophyllis και συν. 2000· Katsaros και συν. 2012).

IV.2.2. Κυτταροσκελετός του ξενιστή

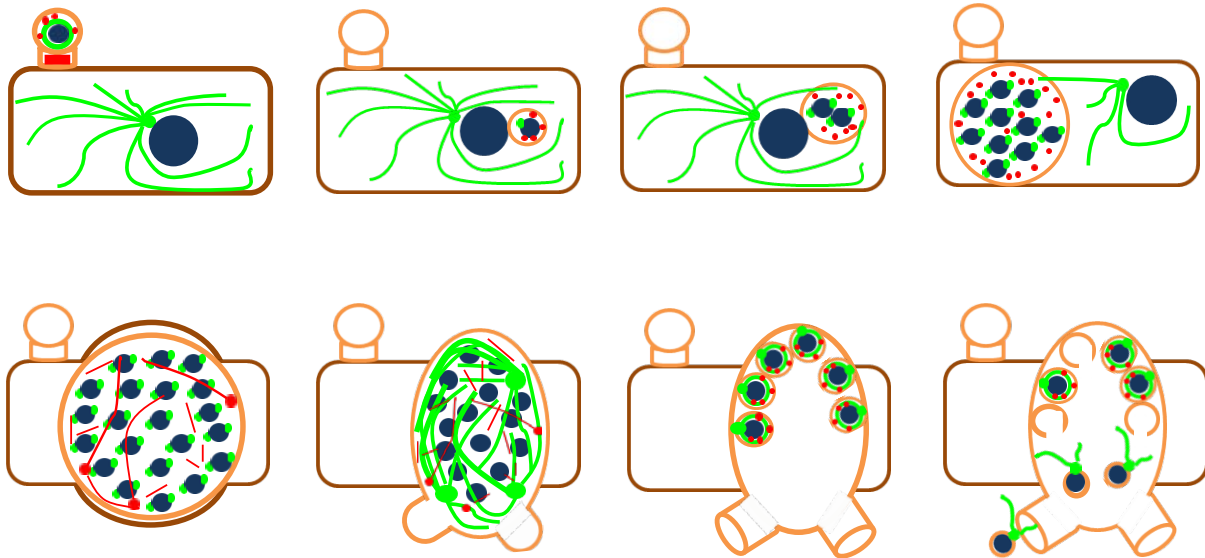
Στα ανώτερα φυτά, ο κυτταροσκελετός παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην αντίσταση των φυτικών κυττάρων έναντι σε μολύνσεις από μύκητες, καθώς και στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Μια ταχεία και συνήθης απόκριση, έναντι της προσπάθειας ενός παθογόνου μικροοργανισμού να διεισδύσει στο εσωτερικό του, αποτελεί η αναδιοργάνωση των κυτταροσκελετικών στοιχείων και η κυτοπλασματική μετατόπιση προς το σημείο της προσβολής (Hardham και συν. 2007). Από την άλλη, ο φυτικός κυτταροσκελετός αποτελεί στόχο για το παρασίτο, το οποίο στην προσπάθειά του να διαταράξει την αντίσταση του φυτού, παράγει αντι-κυτταροσκελετικά στοιχεία (Takemoto και συν. 2003· Hardham και συν. 2007· Kobayashi και Kobayashi 2008). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι πειράματα επίδρασης με κυτοχαλασίνη (Α, Β, Γ, Δ και Ε) και αναστολείς του πολυμερισμού/αποπολυμερισμού των ΜΣ του *Hordeum vulgare* προκαλούν την ευπάθεια του φυτού έναντι στον Ασκομύκητα *Erysiphe pisi*, ο οποίος καταφέρνει εντέλει να διεισδύσει στο εσωτερικό του κολεόπτιλου (Kobayashi και συν. 1997α, β). Για τους παραπάνω λόγους, η ανάγκη μελέτης της οργάνωσης του κυτταροσκελετού στα κύτταρα-ξενιστές των φαιοφυκών που μολύνονται από τον θαλάσσιο ωομύκητα *E. dicksonii* καθίσταται επιτακτική.

Οι Grenville-Briggs και συν. (2011) αναφέρουν στην εργασία τους την ύπαρξη ενός γονιδίου του φαιοφύκου *Ectocarpus siliculosus*, το οποίο πιθανώς να σχετίζεται με την μετατόπιση του πυρήνα του ξενιστή προς το σημείο της μόλυνσης από τον ωομύκητα *E. dicksonii*. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρατίθενται εικόνες ΗΜΔ και χρώσης του DNA με τη χρωστική Hoechst 33258 που απεικονίζουν τη μετατόπιση του πυρήνα του ξενιστή προς το σημείο της προσβολής από τον *E. dicksonii*, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση των Grenville-Briggs και συν. (2011). Το εύρημα συνάδει,

επίσης, με παρόμοιες παρατηρήσεις σε πολλά άλλα συστήματα μόλυνσης (Gross και συν. 2003· Takemoto και Hardham 2004). Επιπλέον, για πρώτη φορά αναφέρεται ότι η οργάνωση του κυτταροσκελετού των ευπαθών κλώνων *Ectocarpus siliculosus*, *E. crouaniorum* και *Pylaiella littoralis* παραμένει σχεδόν ανεπηρέαστη για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την μόλυνσή τους από το *E. dicksonii*. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες έρευνες σε ανώτερα φυτά που επιμολύνονται από ωομύκητες, όπως για παράδειγμα στην προσβολή της σόγιας από τον *Phytophthora sojae* ή του *Arabidopsis thaliana* από τον *Peronospora parasitica*. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις, έχει αποδειχθεί ότι οι ΜΣ του ξενιστή αποδιοργανώνονται και τεμαχίζονται σε πολύ αρχικό στάδιο της προσβολής (Cahill και συν. 2002· Takemoto και συν. 2003). Η βασική αυτή διαφορά μπορεί να αποδοθεί στην έλλειψη κεντροσωματίων στα μεσοφασικά φυτικά κύτταρα. Αντίθετα, και στα τρία είδη φαιοφυκών, τα κύτταρα διατηρούν την οργάνωση των δεσμών ΜΣ από το κεντροσωμάτιο για σχεδόν ολόκληρη τη βλαστητική φάση του *E. dicksonii*. Οι ΜΣ του ξενιστή αποδιοργανώνονται τελείως κατά τα τελικά στάδια της μόλυνσης, λίγο πριν την είσοδο του παράσιτου στη φάση της ζωοσποριογένεσης. Αυτό συμπίπτει χρονικά με την υπέρμετρη διόγκωση του κυτοπλάσματος του παράσιτου και το σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος γύρω από τον θαλλό, που οδηγούν στη διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (Sekimoto και συν. 2008β). Συνεπώς, τα φαιοφύκη φαίνεται ότι επιδεικνύουν μία μορφή αντίστασης έναντι στη μόλυνση από τον *E. dicksonii*, η οποία ενισχύεται από την οργάνωση των ΜΣ από το κεντροσωμάτιο.

Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διατήρηση της φυσιολογικής οργάνωσης του κυτταροσκελετού των φαιοφυκών κατά την μόλυνση από τον ωομύκητα *E. dicksonii*, σε συνδυασμό με την ύπαρξη ανθεκτικών κλώνων έναντι της προσβολής, ενισχύει την ιδέα της συνεξέλιξης ξενιστή και παράσιτου (Gachon και συν. 2009). Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο *E. dicksonii* μολύνει περισσότερα από 45 είδη φαιοφυκών, με μεγάλο εύρος στην εκδήλωση των συμπτωμάτων, από πλήρως ανθεκτικούς έως πλήρως ευπαθείς κλώνους (Gachon και συν. 2009).

Στην Εικόνα IV.2 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της μελέτης της οργάνωσης του κυτταροσκελετού σε ξενιστή και παράσιτο.



Εικόνα IV.2. Διαγραμματική απεικόνιση των βασικών σταδίων της μόλυνσης φαιοφυκών από τον ωομύκητα *E. dicksonii* παρουσιάζει τις μεταβολές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού ξενιστή και παράσιτου. Μπλε σφαιρικοί σχηματισμοί: πυρήνες, πράσινες γραμμές: δέσμες ΜΣ, πράσινα κοκκία: ΚΟΜ, κόκκινα κοκκία και γραμμές: πλάκες ακτίνης και ΜΑ, καφέ ορθογώνιο: μολυσμένο κύτταρο ξενιστή, πορτοκαλί χρώμα: πλασμαλήμμα και κυτταρικό τοίχωμα του *E. dicksonii*.

IV.3. Μηχανισμοί αναγνώρισης μεταξύ *E. dicksonii* και φαιοφυκών-αμυντική απόκριση φύκους στη μόλυνση

IV.3.1. Μελέτη κυτταρικού τοιχώματος

Το κυτταρικό τοίχωμα παραλληλίζεται συχνά με «πρώτη γραμμή του πεδίου μάχης», όπου εκεί κρίνεται η εξέλιξη της αλληλεπίδρασης παράσιτου και ξενιστή. Για το λόγο αυτό, η γνώση της σύστασης και της κατανομής των μορίων του κυτταρικού τοιχώματος αποτελεί βασικό εργαλείο για την περαιτέρω μελέτη των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους παθογόνους μικροοργανισμούς και τους ξενιστές τους. Όπως είναι γνωστό, τα σπόρια των ωομυκήτων επιτυγχάνουν την προσκόλλησή τους στο κυτταρικό τοίχωμα των ανώτερων φυτών με τη βοήθεια λεκτινών, υδατανθράκων και γλυκοπρωτεϊνών (Hardham 1989). Από την άλλη, τα ανώτερα φυτά έχουν αναπτύξει την ικανότητα αναγνώρισης των παράσιτων μέσω μορίων του κυτταρικού τοιχώματος, η οποία πυροδοτεί μία σειρά βιοχημικών μονοπατιών και αμυντικών αποκρίσεων έναντι της προσβολής (Heath M.C. 2000). Αναμφίβολα, η διερεύνηση των μηχανισμών αναγνώρισης και των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στους ωομυκήτες και τα ανώτερα φυτά έχει συμβάλει στον έλεγχο των εξάρσεων και των μαζικών επιδημιών. Έτσι, η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μακροφυκών και ωομυκήτων αποβλέπει στην εύρεση μεθόδων και λύσεων για την προστασία της παραγωγής των καλλιεργούμενων φυκών

από καταστροφικές ασθένειες (Klochkona και συν. 2011). Η παρούσα ανάλυση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου στοχεύει στην κατανόηση των πιθανών μηχανισμών αναγνώρισης κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης φαιοφυκών από τον ωομύκητα *E. dicksonii*. Παράλληλα, η πλήρης χαρτογράφηση του γονιδιώματος του φαιοφύκου *E. siliculosus* (Cock και συν. 2010) προσφέρει τη δυνατότητα συσχέτισης των μικροσκοπικών παρατηρήσεων με μοριακά δεδομένα.

IV.3.1.1. Κυτταρικό τοίχωμα φαιοφυκών

Πειράματα ανοσοφθορισμού, με αντισώματα έναντι διαφορετικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος σε μη μολυσμένα φαιοφύκη, δείχνουν ότι το κυτταρικό τοίχωμα και των δώδεκα κλώνων που ελέγχθηκαν συνίσταται κυρίως από κυτταρίνη, φουκάνη και αλγινικό οξύ. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με πρόσφατες μοριακές μελέτες και δεν αποτελεί νέο εύρημα (Michel και συν. 2010). Ωστόσο, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης ανοσοφθορισμού διαπιστώνονται σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές διακυμάνσεις του σήματος μεταξύ των διαφόρων κλώνων. Πιστεύεται ότι αυτές οι παρατηρήσεις σχετίζονται με την ποικιλομορφία της αρχιτεκτονικής, δηλαδή της διευθέτησης των μορίων στα κυτταρικά τοιχώματα των φαιοφυκών, και όχι με την απόλυτη απουσία ή παρουσία του εκάστοτε συστατικού. Για παράδειγμα, στο φαιοφύκος *Acinetospora crinite* δεν καταγράφεται σήμα φουκάνης και αλγινικού οξέος. Παρ' όλα αυτά, το αποτέλεσμα δεν ερμηνεύεται ως παντελής έλλειψη των δύο υδατανθράκων από το κυτταρικό τοίχωμα του φύκου, διότι, όπως είναι γνωστό, όλοι οι αντιπρόσωποι των Ectocarpales, συμπεριλαμβανομένου του *A. crinita*, φέρουν φουκάνη, αλγινικό οξύ και κυτταρίνη στο κυτταρικό τους τοίχωμα (Michel και συν. 2010α). Συνεπώς, το αρνητικό αποτέλεσμα της ανοσοσήμανσης σημαίνει ότι ο προσανατολισμός των μορίων στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος δεν επιτρέπει την πρόσδεση των φθορίζοντων αντισωμάτων στους συγκεκριμένους υδατάνθρακες. Να σημειωθεί ότι το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση των υδατανθράκων του κυτταρικού τοιχώματος δεν περιλαμβάνει ενζυμική επώαση, προκειμένου να διατηρηθεί ανέπαφη η δομή και η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος. Η παράλειψη αυτού του βήματος επιτρέπει τη μελέτη μόνο της επιφανειακής στρώσης υδατανθράκων, η οποία άπτεται του ενδιαφέροντος της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Τα νηματοειδή είδη φαιοφυκών, που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής, δεν χαρακτηρίζονται από τυπική ακραία αύξηση (Katsaros 1995). Βέβαια, το πρότυπο ανάπτυξης του *E. siliculosus* περιλαμβάνει τη διαίρεση και επιμήκυνση του ακραίου κυττάρου του νήματος με τρόπο που προσομοιάζει στην ακραία αύξηση (Le Bail και συν. 2008). Στο γεγονός αυτό αποδίδεται η συσσώρευση άμορφων υδατανθράκων, όπως β-1,3 γλυκάνες, η οποία παρατηρείται στην κορυφή του ακραίου κυττάρου των αναπτυσσόμενων ή διακλαδιζόμενων νημάτων. Ταυτόχρονα, το κορυφαίο θολωτό τμήμα των ακραίων κύτταρων στερείται κυτταρίνης. Στην Εικόνα III.17.2 απεικονίζεται ένα ακραίο κύτταρο σε αναπτυσσόμενο νήμα φαιοφύκους, με χαρακτηριστική συσσώρευση β-1,3 γλυκάνης στα σημεία όπου απουσιάζει η κυτταρίνη. Η απουσία κυτταρίνης έχει επίσης αναφερθεί στα ακραία κύτταρα του φαιοφύκου *Sphacelaria rigidula* (Karyophyllis και συν. 2000α). Αντιστοίχως, κατά την ανάπτυξη των ανώτερων φυτών, αποτίθεται πρώτα η β-1,3 γλυκάνη (καλλόζη), η οποία λειτουργεί ως μία άμορφη πηκτώδης μάζα που διευκολύνει τον επακόλουθο προσανατολισμό των μικροϊνιδίων κυτταρίνης (Waterkeyn 1981). Αξίζει να τονισθεί ότι η συσσώρευση άμορφων υδατανθράκων στο κορυφαίο τμήμα των ακραίων κυττάρων εντοπίστηκε και στους δώδεκα κλώνους φαιοφυκών που χρησιμοποιήθηκαν, τόσο σε μολυσμένο όσο και σε μη μολυσμένο υλικό. Κατά συνέπεια, η παρατήρηση αυτή σχετίζεται αποκλειστικά και μόνο με το πρότυπο ανάπτυξης των συγκεκριμένων κλώνων και όχι με κάποιο πιθανό αμυντικό μηχανισμό των φυκών έναντι στην προσβολή από τον *E. dicksonii*.

Τα πειράματα ανοσοσθήμανσης υδατανθράκων του κυτταρικού τοιχώματος πραγματοποιήθηκαν και σε μολυσμένο πειραματικό υλικό. Η μόνη διαφορά που σημειώθηκε στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ του μη μολυσμένου και του μολυσμένου υλικού είναι η εναπόθεση β-1,3 γλυκάνης στο σημείο της προσβολής από τον *E. dicksonii*, η οποία δεν παρατηρήθηκε σε υγιή φαιοφύκη. Τα μολυσμένα κύτταρα των φαιοφυκών αντιδρούν στην προσβολή από τον ωομύκητα αποθέτοντας β-1,3 γλυκάνες στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Λεπτομερέστερα, άμορφο κυτταρικό υλικό συσσωρεύεται υπό μορφή θηλής (papilla) στο σημείο όπου το παράσιτο προκαλεί τον τραυματισμό του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή, προκειμένου να διεισδύσει στο εσωτερικό του κυττάρου (Tsirigoti και συν. 2014β). Η διακριτή πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή, κάτω ακριβώς από το σημείο προσκόλλησης του δευτερογενούς σπορίου του *E. dicksonii*, είχε ήδη εντοπισθεί κατά τη διάρκεια προκαταρκτικών πειραμάτων με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής

κυανούν της ανιλίνης (Tsirigoti και συν. 2013). Η εναπόθεση β-1,3 γλυκάνης, και συγκεκριμένα καλλόζης υπό μορφή θηλής, αποτελεί κοινή απόκριση των ανώτερων φυτών στον τραυματισμό (Underwood 2012). Η ταχεία συσσώρευση τοιχωματικού υλικού στο σημείο της προσβολής λειτουργεί ως φυσικό φράγμα και εμποδίζει ή τουλάχιστον επιβραδύνει τη διέλευση του παθογόνου μικροοργανισμού προς στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου. Παράλληλα, η καθυστέρηση της μόλυνσης επιτρέπει την ενεργοποίηση αμυντικών γονιδίων του ξενιστή έναντι στην προσβολή (Voigt 2014). Έως τώρα, η ύπαρξη των β-1,3 γλυκανών στα φαιοφύκη είναι γνωστή κυρίως με τη μορφή του αποθηκευτικού πολυσακχαρίτη λαμιναρίνη. Αντίθετα, δεν υπάρχουν σαφείς αναφορές εντοπισμού του υδατάνθρακα σε κυτταρικά τοιχώματα φαιοφυκών. Ο Parker (1964) περιγράφει την πιθανή εναπόθεση β-1,3 γλυκανών στις ηθμώδεις πλάκες (sieve plates) των Laminariales. Ωστόσο, η παρατήρησή του βασίζεται σε μεθόδους χαμηλής ανάλυσης, ενώ η πληροφορία δεν έχει έκτοτε διασταυρωθεί. Στην παρούσα εργασία δείχνεται για πρώτη φορά η εναπόθεση β-1,3 γλυκανών ως απόκριση των φαιοφυκών στην μόλυνση από τον ωομύκητα *E. dicksonii*. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται από πρόσφατα μοριακά δεδομένα, που προκύπτουν από τη μελέτη του γονιδιώματος του φαιοφύκου *E. siliculosus* και αφορούν στην ταυτοποίηση γονιδίων με πιθανή συμμετοχή στο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης της καλλόζης (Michel και συν. 2010β· κλάδος C από την οικογένεια 48 των γλυκοσυλ-τρανσφερασών). Η βιοσύνθεση των β-1,3 γλυκανών αποτελεί ένα συντηρημένο μεταβολικό μονοπάτι των ευκαρυωτικών οργανισμών (Michel και συν. 2010β). Κατά συνέπεια, η ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή μέσω της εναπόθεσης β-1,3 γλυκανών, αποτελεί κοινή τακτική άμυνας, τόσο για τα ανώτερα φυτά όσο και για τα φαιοφύκη, ενώ εικάζεται ότι πρόκειται περί ενός συντηρημένου αμυντικού μηχανισμού, του οποίου η απαρχή χρονολογείται πριν από τα γεγονότα της πρώτης ενδοσυμβίωσης.

IV.3.1.2. Κυτταρικό τοίχωμα του ωομύκητα *E. dicksonii*

Η παρούσα ανάλυση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος του *E. dicksonii* αποσκοπεί αφενός στη διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής των μορίων στους μηχανισμούς αναγνώρισης ξενιστή και παράσιτου και αφετέρου στην εύρεση νέων δομικών και μορφολογικών στοιχείων του ωομύκητα. Η ανοσοσθήμανση υδατανθράκων του κυτταρικού τοιχώματος του *E. dicksonii* αποκαλύπτει την ύπαρξη N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης, β-1,4 γλυκάνης και β-1,3 γλυκάνης στην επιφάνεια του παράσιτου. Ο

εντοπισμός αυτών των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος του παράσιτου αποτελεί ένα αναμενόμενο αποτέλεσμα, καθ' ότι ήδη γνωστό από άλλους ωομύκητες (Aronson και συν. 1967). Πρόσφατα, οι Mérida και συν. (2013) επέλεξαν δέκα είδη ωομυκήτων από τις δύο πιο αντιπροσωπευτικές τάξεις της κλάσης, την Saprolegniales και την Peronosporales, για να αναλύσουν τη σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος. Από τη μελέτη προέκυψε ότι υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι κυτταρικού τοιχώματος στους ωομύκητες, οι οποίοι διαχωρίζονται κυρίως βάσει του ποσοστού N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης και γλυκανών που περιέχουν (Mérida και συν. 2013). Όμως, ο *E. dicksonii* δεν κατατάσσεται σε κανέναν από τους τρεις τύπους κυτταρικού τοιχώματος που έχουν προταθεί για την κλάση των ανώτερων ωομυκήτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, το κυτταρικό τοίχωμα του *E. dicksonii* συνίσταται από τους τρεις βασικούς υδατάνθρακες που προαναφέρθηκαν (N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη, β-1,4 γλυκάνη και β-1,3 γλυκάνη), καθώς και από θειϊκή φουκάνη. Ο εντοπισμός της θειϊκής φουκάνης αποτελεί ένα νέο και ενδιαφέρον εύρημα, το οποίο αναφέρεται για πρώτη φορά σε ωομύκητα. Επιπρόσθετα, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι η φθορίζουσα λεκτίνη *Ulex europaeus* agglutinin, η οποία φέρει την ιδιότητα πρόσδεσης στον μονοσακχαρίτη L-φουκόζη, δίνει θετικό σήμα στο κυτταρικό τοίχωμα της πλάκας προσκόλλησης και των σωλήνων απελευθέρωσης του *E. dicksonii*, όπως ακριβώς και η θειϊκή φουκάνη (Tsirigoti και συν. υπό προετοιμασία). Έως τώρα, η L-φουκόζη έχει εντοπιστεί μόνο στο κυτταρικό τοίχωμα του ζυγομύκητα *Zygorhynchus vuillemini* και σε ορισμένους αντιπροσώπους βασιδιομυκήτων, ενώ δεν υπάρχουν αναφορές σε ωομύκητες (Crook και Johnston 1962). Επίσης, οι θραυστοχυτριομύκητες (thraustochytrids) ανήκουν και αυτοί στα ετερόκοντα και περιλαμβάνουν θαλάσσια είδη με L-φουκόζη στο κυτταρικό τους τοίχωμα (Chamberlain και Moss 1988). Συνεπώς, η σημαντική αυτή διαφορά στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, μεταξύ του *E. dicksonii* και των ανώτερων ωομυκήτων, οφείλεται πιθανώς στην εξελικτική τους απόσταση, η οποία τεκμηριώνεται από πρόσφατα μοριακά δεδομένα (Sekimoto και συν. 2008β).

Σε ότι αφορά στον πιθανό ρόλο της θειϊκής φουκάνης του *E. dicksonii*, είναι γεγονός ότι οι θειϊκοί υδατάνθρακες εμπλέκονται στη διαδικασία της πρόσδεσης και της προσκόλλησης των παρασιτικών σπορίων στο κυτταρικό τοίχωμα των ξενιστών. Για παράδειγμα, θειϊκές γαλακτάνες δίνουν το χημικό έναυσμα για την εγκύστωση των ζωοσπορίων (μετασχηματισμός σε σπόρια), καθώς και την προσκόλληση των σπορίων του ωομύκητα *Pythium porphyrae* στο ροδοφύκος *Porphyra*

yezoensis (Urpalarati και συν. 2001β). Ακόμη, τα έμβρυα του φαιοφύκου *Fucus* sp., όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει θειϊκή φουκάνη, σχηματίζουν φυσιολογικά ριζοειδή, αλλά αποτυγχάνουν να προσκολληθούν στο υπόστρωμα (Percival 1979). Από τις παραπάνω παρατηρήσεις, σε συγγενικά είδη του *E. dicksonii*, συμπεραίνουμε ότι η συσσώρευση της θειϊκής φουκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα του παράσιτου και ειδικά στην πλάκα προσκόλλησης του δευτερογενούς σπορίου, πιθανώς να συνδέεται με την ικανότητα πρόσδεσης του παράσιτου στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή.

IV.3.2. Πειράματα ανάσχεσης της μόλυνσης με υδατάνθρακες

Πειράματα ανάσχεσης της μόλυνσης, με χρήση μονοσακχαριτών, αποκαλύπτουν ότι τα σπόρια του ωομύκητα *Olpidopsis* sp. αναγνωρίζουν το ροδοφύκος *Porphyra* sp. μέσω ειδικών λεκτινών του κυτταρικού τους τοιχώματος, με την ικανότητα πρόσδεσης στη μαννόζη του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (Klochkova και συν. 2011). Αντίστοιχα, επώαση μολυσμένων από τον *E. dicksonii* φαιοφυκών με D-γαλακτόζη και L-φουκόζη για 14 ημέρες (χρόνος ολοκλήρωσης ενός κύκλου μόλυνσης του παράσιτου), προκαλεί σημαντική μείωση της παθογένειας των φυκών. Είναι πιθανό ότι η μακρά επώαση των μολυσμένων καλλιεργειών με τους μονοσακχαρίτες D-γαλακτόζη και L-φουκόζη οδηγεί στην ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών των φυκών. Στα ανώτερα φυτά, τα ολιγομερή γαλακτουρονίδης, ενός πολυμερούς του γαλακτουρονικού οξέος που φέρει παρόμοια δομή με την πηκτίνη, πυροδοτούν την ενεργοποίηση μίας σειράς αμυντικών αποκρίσεων (Shibuya και Minami 2001). Παρόμοια φαινόμενα έχουν παρατηρηθεί και στα φύκη (Potin και συν. 2002). Για παράδειγμα, το κελποφύκος *Laminaria digitata* αναγνωρίζει τα ολιγομερή υδατανθράκων που προκύπτουν από την ενζυμική διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και ενεργοποιεί τον αμυντικό μηχανισμό της οξειδωτικής έκρηξης (Kürper και συν. 2001). Μάλιστα, τα πιο δραστικά ολιγομερή, δηλαδή εκείνα που προκαλούν υψηλότερα ποσοστά εκρόής καλίου, είναι τα ανάλογα της πηκτίνης των ανώτερων φυτών πολυμερή του γλυκουρονικού οξέος (Kürper και συν. 2001). Κατά συνέπεια, συμπεραίνουμε ότι η αναγνώριση των μονοσακχαριτών D-γαλακτόζη και L-φουκόζη, από τα είδη φαιοφυκών που χρησιμοποιήθηκαν, ενεργοποιεί πιθανότατα συγκεκριμένες αμυντικές αποκρίσεις που οδηγούν σε μείωση των μολύνσεων από τον ωομύκητα *E. dicksonii*. Η πλήρης χαρτογράφηση του γονιδιώματος

του φαιοφύκου *E. siliculosus* (Cock και συν. 2010), σε συνδυασμό με νέες μοριακές τεχνικές, αναμένεται να οδηγήσουν στην επιβεβαίωση ή την απόρριψη της παραπάνω υπόθεσης.

IV.3.3. Πειράματα επώασης μολυσμένων καλλιεργειών με ορμόνες

Πειράματα ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time qPCR), τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικούς κλώνους φαιοφυκών, έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική διαβάθμιση στην εκδήλωσης ευπάθειας ως προς την προσβολή από τον ωομύκητα *E. dicksonii* (Gachon και συν. 2009). Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι η αντίσταση συγκεκριμένων κλώνων φαιοφυκών έναντι της μόλυνσης οφείλεται στην έκφραση ΥΑ στο προσβεβλημένο κύτταρο (Gachon και συν. υπό προετοιμασία). Πιο συγκεκριμένα, νέα μη δημοσιευμένα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι η αντίσταση ορισμένων κλώνων στην μόλυνση επιτυγχάνεται όταν, κατά την προσβολή ενός κυττάρου του νήματος, ενεργοποιείται άμεσα ο μηχανισμός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η ταχεία νέκρωση του κυττάρου-ξενιστή εμποδίζει την ολοκλήρωση του κύκλου ανάπτυξης του *E. dicksonii*, δηλαδή την παραγωγή νέων σπορίων και συνεπώς προλαμβάνει τη διάδοση της ασθένειας. Μάλιστα, η ΥΑ εκδηλώνεται σε δέκα είδη φαιοφυκών, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται περί ενός συντηρημένου αμυντικού μηχανισμού της κλάσης (Gachon και συν. υπό προετοιμασία). Το φαινόμενο της νέκρωσης προσβεβλημένων από ωομύκητες κυττάρων είναι ήδη γνωστό από ανθεκτικούς φαινοτύπους ανώτερων φυτών (Kamoun και συν. 1999· Vleeshouwers και συν. 2000).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δείχνεται ότι η επώαση των φαιοφυκών με SA αυξάνει την εμφάνιση της ΥΑ, η οποία συνοδεύεται από την απόθεση β-1,3 γλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου-ξενιστή. Η τακτική της συσσώρευσης β-1,3 γλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα του μολυσμένου φαιοφύκου προσομοιάζει με την ανάλογη αμυντική απόκριση των ανώτερων φυτών, κατά την οποία η ΥΑ συνδυάζεται με την απόθεση καλλόζης και φυτοαλεξινών στο κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου-ξενιστή (Naton και συν. 1996· Luna και συν. 2011). Επιπλέον, το «αλτρουιστικό» παράδειγμα της ΥΑ παρατηρείται και σε μονοκύτταρους, πλαγκτικούς οργανισμούς (Bidle και Falkowski 2004· Nedelcu και συν. 2011). Ωστόσο, η ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος με β-1,3 γλυκάνες αναφέρεται για πρώτη φορά σε κατώτερους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Συνεπώς, η απόθεση β-1,3 γλυκάνης σε κύτταρα φαιοφυκών με ΥΑ αποτελεί ένα εύρημα ιδιαίτερης σημασίας, το οποίο υποδεικνύει ότι η εν λόγω αμυντική απόκριση είναι πιθανώς αρχέγονη. Να σημειωθεί ότι, μετά

τη νέκρωση του κυττάρου-ξενιστή λόγω ΥΑ, τα δύο γειτονικά κύτταρα βλαστάνουν προς τον κενό χώρο που καταλάμβανε προηγουμένως το νεκρό κύτταρο (βλέπε επίσης υποκεφάλαιο Ι.3.3. στην Εισαγωγή). Κατά τη βλάστηση, τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από ακραία αύξηση και προσομοιάζουν με τα ακραία κύτταρα των νεαρών αναπτυσσόμενων ή διακλαδιζόμενων νημάτων (Σύγκριση Εικ. ΙΙΙ.17.Κ και ΙΙΙ.25.Α). Στο κυρτό κορυφαίο τμήμα των ακραίων κυττάρων εντοπίζεται και στις δύο περιπτώσεις η συσσώρευση β-1,3 γλυκάνης (Εικ. ΙΙΙ.17.Κ και ΙΙΙ.25.Α).

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το SA αποτελεί το μέσο ενεργοποίησης μίας σειράς αμυντικών αποκρίσεων στους δώδεκα κλώνους φαιοφυκών που χρησιμοποιήθηκαν. Πράγματι, ύστερα από επώαση με SA παρατηρήθηκε αύξηση της ΥΑ, τόσο σε πειραματικό υλικό μολυσμένο από τον *E. dicksonii* όσο και σε μη μολυσμένες καλλιέργειες. Παρά την απουσία του παράσιτου, η επώαση μη μολυσμένων φαιοφυκών με την εν λόγω φυτοορμόνη προκαλεί αύξηση της ΥΑ. Το γεγονός αυτό ενισχύει την ιδέα ότι το SA λειτουργεί πιθανώς ως έναυσμα για την ενεργοποίηση συγκεκριμένων αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή. Σε ανώτερα φυτά έχει βρεθεί ότι το SA συμμετέχει σε αμυντικά βιοχημικά μονοπάτια, ενώ η δράση του συνδέεται συχνά με την εναπόθεση καλλόζης στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή (Conrath και συν. 2002· Halim και συν. 2007). Στα φύκη, αντίστοιχες αναφορές αφορούν στο μεθυλ-ιασμονικό οξύ, το οποίο ενεργοποιεί την κωδικοποίηση αμυντικών γονιδίων (Collén και συν. 2006· Küpper και συν. 2009). Για την επιβεβαίωση της πιθανής εμπλοκής του SA στο ανοσοποιητικό σύστημα των φαιοφυκών απαιτούνται περαιτέρω πειράματα και μοριακές αναλύσεις που θα αποδεικνύουν την ύπαρξη σχετικών γονιδίων.

Τέλος, πολλές δημοσιευμένες εργασίες υπογραμμίζουν τη σημασία των αυξινών στην άμυνα των φυτικών οργανισμών έναντι της βιοτικής καταπόνησης (Bari και Jones 2009). Οι αυξίνες, όπως το NAA και το IAA, ρυθμίζουν τη διαδικασία της αύξησης και της ανάπτυξης των ανώτερων φυτών (Woodward και Bartel 2005). Αυτό έχει βρεθεί και στα φαιοφύκη, με το IAA να παίζει σημαντικό ρόλο στο πρότυπο διακλάδωσης του θαλλού του *E. siliculosus* (Le Bail και συν. 2010). Ακόμη, οι αυξίνες ενεργοποιούν την κωδικοποίηση συγκεκριμένων οικογενειών αμυντικών γονιδίων έναντι της προσβολής από παράσιτα στο ρύζι, το *Arabidopsis thaliana* και σε λοιπά ανώτερα φυτά (για βιβλιογραφία βλέπε την ανασκόπηση Bari και Jones 2009). Μάλιστα, σε ορισμένες περιπτώσεις η αυξίνη λειτουργεί συνεργατικά με το SA, ενεργοποιώντας την αμυντική απόκριση του φυτού (Zhang και συν. 2007). Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έρχονται σε αντίθεση με τις

παραπάνω παρατηρήσεις σε ανώτερα φυτά. Επώαση μολυσμένων θαλλών φαιοφυκών από τον ωομύκητα *E. dicksonii* με NAA και IAA έδειξε σημαντική αύξηση των προσβολών. Έτσι, καθίσταται σαφές ότι οι αυξίνες NAA και IAA δεν λειτουργούν ως ερέθισμα για την κωδικοποίηση αμυντικών γονιδίων στους συγκεκριμένους κλώνους φαιοφυκών που χρησιμοποιήθηκαν, όπως συμβαίνει με το SA. Αντίθετα, η σημαντική αύξηση των μολύνσεων πιθανό να συνδέεται με την αύξηση της γονιμότητας που διαπιστώθηκε κατά την επώαση των μολυσμένων φυκών με τις αυξίνες. Σύμφωνα με επανειλημμένες μικροσκοπικές παρατηρήσεις, ο ωομύκητας *E. dicksonii*, ως υποχρεωτικά ενδοπαρασιτικός οργανισμός, φαίνεται να μολύνει επιλεκτικά τα νεαρά και υγιή κύτταρα της καλλιέργειας. Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί ότι ο συνολικός αριθμός των προσβολών σε ηλικιωμένες καλλιέργειες φαιοφυκών είναι σημαντικά χαμηλότερος από αυτόν σε νεαρούς θαλλούς του ξενιστή. Έτσι, συμπεραίνουμε ότι η αύξηση των μολύνσεων, ύστερα από επώαση με τις αυξίνες IAA και NAA, συνδέεται με την πιθανή αύξηση των μεταβολικών ρυθμών της καλλιέργειας του φύκου.

V. Περίληψη

Τα φύκη συγκεντρώνουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον κατά τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω του οικολογικού αλλά και του οικονομικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν. Οι φωτοσυνθετικοί αυτοί οργανισμοί αποτελούν τους βασικούς παραγωγούς των θαλάσσιων οικοσυστημάτων, βρίσκονται στη βάση όλων σχεδόν των θαλάσσιων τροφικών αλυσίδων και παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην παγκόσμια κλιματική αλλαγή. Ακόμη, από τη δεκαετία του '80 έως σήμερα τα ποσοστά παγκόσμιας καλλιέργειας φυκών αυξάνονται εκθετικά, ενώ το επενδυτικό ενδιαφέρον στρέφεται στη χρήση τους ως τροφή από τον άνθρωπο ή άλλα καλλιεργούμενα είδη (πχ. γαστερόποδα, ψάρια), βιοκαύσιμη ύλη και φαρμακευτικά προϊόντα.

Τα μακροφύκη, όπως όλοι οι χερσαίοι και θαλάσσιοι οργανισμοί, μολύνονται από μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των ιών, των βακτηρίων και των μυκήτων. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί προσβάλλουν τους πληθυσμούς φυκών προκαλώντας σημαντικές καταστροφές στο πεδίο αλλά και στις μονάδες εντατικής καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, οι καλλιεργητές αντιμετωπίζουν 10-30% μείωση της ετήσιας παραγωγής λόγω επιδημιών που προκαλούνται από θαλάσσιους παθογόνους μικροοργανισμούς και κυρίως από τους θαλάσσιους ωομύκητες. Τα ως τώρα αποσπασματικά μελετημένα θαλάσσια παράσιτα αποκτούν εμπορική σημασία ανάλογη των χερσαίων ομολόγων τους, ενώ απαραίτητη κρίνεται η μελέτη των αλληλεπιδράσεών τους με τα φύκη-ξενιστές.

Το είδος *Eurychasma dicksonii* είναι ένας ολοκαρπικός υποχρεωτικά ενδοπαρασιτικός θαλάσσιος ωομύκητας, ο οποίος προσβάλλει τουλάχιστον 45 είδη φαιοφυκών. Τα βασικά στάδια της μόλυνσης φαιοφυκών από τον *E. dicksonii* έχουν μελετηθεί και περιλαμβάνουν: εγκύστωση του ζωοσπορίου του ωομύκητα, προσκόλληση του σπορίου στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή, διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος και μεταφορά μέρους του πρωτοπλάστη στο εσωτερικό του ξενιστή, δημιουργία κοινοκυτικού πολυπύρηνου θαλλού και ζωοσποριογένεση. Ωστόσο, ως τώρα δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον μηχανισμό της εγκύστωσης και διείσδυσης του παράσιτου στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή, την οργάνωση του κυτταροσκελετού, τους μηχανισμούς αναγνώρισης ξενιστή-παθογόνου, τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις και πιθανούς αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή έναντι του παράσιτου.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο τη λεπτομερή ανάλυση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού τόσο του ξενιστή όσο και του παράσιτου, την απόκτηση επιπλέον γνώσεων που θα συμπληρώσουν τις ήδη υπάρχουσες πληροφορίες για τον μηχανισμό μόλυνσης, τις πιθανές αντιδράσεις των μελετώμενων ειδών φαιοφυκών έναντι της μόλυνσης από το *E. dicksonii* και λοιπούς μηχανισμούς αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παράσιτου. Τα κυριότερα ευρήματα της διατριβής περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω:

1. Μελέτη της λεπτής δομής αποκαλύπτει τον μηχανισμό προσκόλλησης και διείσδυσης του *E. dicksonii* στον ξενιστή.

Μελέτη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης και σάρωσης των επιμέρους σταδίων της προσκόλλησης και διείσδυσης αποκάλυψε ότι το σπόριο του *E. dicksonii* διαφοροποιείται κατά τα αρχικά στάδια της προσβολής. Το ζωοσπόριο εγκυστώνεται, δηλαδή σχηματίζει κυτταρικό τοίχωμα (ΚΤ) και μετασχηματίζεται σε ακίνητο σπόριο. Το σπόριο προσκολλάται στο ΚΤ του ξενιστή. Αμέσως μετά την επαφή με τον ξενιστή, το σπόριο εκκρίνει ένα ινώδες, προσκολλητικό υλικό με το οποίο φαίνεται να συνδέεται με την επιφάνεια του ξενιστή. Σ' αυτό το στάδιο, ο πρωτοπλάστης του σπορίου περιέχει έναν ευμεγέθη πυρήνα που γειτνιάζει με μια ομάδα μιτοχονδρίων. Στο κορυφαίο τμήμα του κυτοπλάσματος, στην αντίθετη πλευρά από τη βάση του σπορίου, κυριαρχούν κυστίδια με ηλεκτρονιόπυκνο υλικό και δικτυοσωμάτια.

Η λεπτομερής μελέτη της λεπτής δομής αποκάλυψε την ύπαρξη ενός ηλεκτρονιόπυκνου βελονοειδούς σχηματισμού (400 nm πλάτος, 4 μ m μήκος), που εκτείνεται παράλληλα με τον επιμήκη άξονα του σπορίου και διασχίζει όλο το μήκος του. Ο σχηματισμός αυτός περιβάλλεται από ηλεκτρονικά διαφανές τοιχωματικό υλικό και εφάπτεται με το αρχικά αδιαφοροποίητο ΚΤ, που βρίσκεται στο κάτω μέρος του σπορίου και ονομάζεται πλάκα προσκόλλησης (adhesorium pad). Τα μικρά κυστίδια της κορυφαίας περιοχής συντήκονται και σχηματίζουν ένα ευμέγεθες χυμοτόπιο. Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται η διαφοροποίηση του ΚΤ της πλάκας προσκόλλησης του σπορίου, με κεντρομόλο εναπόθεση τοιχωματικού υλικού προς το εσωτερικό του σπορίου. Οι τοιχωματικές προεκβολές διαμερισματοποιούν το σπόριο, αφήνοντας μια ανοιχτή οπή. Παρατήρηση σειράς τομών της

βελονοειδούς δομής έδειξε ότι αυτή διέρχεται μέσω της ανοιχτής οπής και εκτοξεύεται έξω από το σπόριο με κατεύθυνση προς το ΚΤ του ξενιστή, το οποίο ακολούθως διαρρηγνύει.

2. Η οργάνωση του κυτταροσκελετού εμπλέκεται στην αμυντική απόκριση του ξενιστή και στα βασικά αναπτυξιακά στάδια του *E. dicksonii*.

Η ανοσοσθήμανση της σωληνίνης στα μολυσμένα από τον *E. dicksonii* φαιοφύκη *Pylaiella littoralis*, *Ectocarpus siliculosus* και *Ectocarpus crouaniorum* έδειξαν ότι οι μικροσωληνίσκοι του ξενιστή παραμένουν φυσιολογικά οργανωμένοι γύρω από το κεντροσωμάτιο, ακόμη και σε προχωρημένα στάδια της μόλυνσης. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι παρ' ότι η μόλυνση από τον ωομύκητα οδηγεί σε σταδιακή αποδιοργάνωση των οργανιδίων του κυτοπλάσματος του ξενιστή, η οργάνωση των μικροσωληνίσκων παραμένει φυσιολογική μέχρι και τα αρχικά στάδια δημιουργίας του ζωοσποριάγγελιου του ωομύκητα, οπότε και διαταράσσεται. Παράλληλα, μελετήθηκε η οργάνωση του κυτταροσκελετού του *E. dicksonii*. Η ανοσοσθήμανση σωληνίνης αποκάλυψε την παρουσία ενός κέντρου σύγκλισης των μικροσωληνίσκων πλησίον του πυρήνα του παράσιτου, το οποίο πιθανόν αντιπροσωπεύει ένα κέντρο οργάνωσης μικροσωληνίσκων (ΚΟΜ). Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης διαπιστώθηκε ότι το ΚΟΜ αποτελείται από δυο κινητοσώματα. Κατά τη μίτωση, το ΚΟΜ διπλασιάζεται και κάθε ένα από τα δύο θυγατρικά ΚΟΜ μεταναστεύει στους δύο αντίθετους πόλους του πυρήνα. Στο στάδιο της δημιουργίας του ζωοσποριάγγελιου παρατηρούνται, ανάλογα με το μέγεθος της δομής, 4 ή 5 ΚΟΜ και δέσμες μικροσωληνίσκων διασχίζουν όλη την έκταση του ζωοσποριάγγελιου. Στο ώριμο ζωοσποριάγγειο εντοπίζονται περιφερειακά διατεταγμένα σπόρια, από τα οποία απελευθερώνονται τα ζωοσπόρια του ωομύκητα. Σε αυτό το στάδιο, οι μικροσωληνίσκοι συμμετέχουν στη δημιουργία των μαστιγίων τα οποία εκτείνονται από τα κινητοσώματα. Χρώση της ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη έδειξε ότι, στα σπόρια του ωομύκητα, ο κυτταροσκελετός της ακτίνης έχει τη μορφή πλακών και συμπαγών δεσμίδων μικρονηματίων ακτίνης (ΜΑ). Αρχικά, στα πρώτα στάδια της μόλυνσης, κάθε πυρήνας συνοδεύεται από πλάκες συμπαγούς ακτίνης και δεσμίδες ΜΑ. Σε επόμενο στάδιο, με την έναρξη της δημιουργίας του ζωοσποριάγγελιου, εντοπίζονται κυρίως διάχυτα ΜΑ και παρατηρείται μειωμένος αριθμός πλακών συμπαγούς ακτίνης.

3. Απόκριση του ξενιστή έναντι του παράσιτου με εναπόθεση β-1, 3 γλυκάνης στο σημείο προσκόλλησης του σπορίου του ωομύκητα.

Μελέτη της λεπτής δομής έδειξε τη διατάραξη της δομής και της σύστασης του ΚΤ του ξενιστή στη θέση εισόδου του παράσιτου. Διαπιστώθηκε εναπόθεση άμορφου υλικού υπό μορφή θηλής (papilla), το οποίο σημαίνεται με το αντίσωμα έναντι της β-1,3 γλυκάνης και είναι θετικό σε χρώση με κυανούν της ανιλίνης. Εικάζεται ότι η ενίσχυση του ΚΤ του ξενιστή στο σημείο της προσβολής αποτελεί αμυντική απόκριση του φύκους και συνδέεται με μηχανισμούς αναγνώρισης του *E. dicksonii*.

4. Ανάλυση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου: εντοπισμός θειωμένης φουκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα του *E. dicksonii*.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού με αντισώματα έναντι διαφορετικών συστατικών του ΚΤ των φαιοφυκών και του ωομύκητα, προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή συμμετοχή των υδατανθράκων σε μηχανισμούς αναγνώρισης ξενιστή-παράσιτου. Χρησιμοποιήθηκαν 12 κλώνοι φαιοφυκών, οι οποίοι μολύνονται από τον *E. dicksonii*. Στο μολυσμένο πειραματικό υλικό δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη σύσταση του ΚΤ. Η μόνη μεταβολή που παρατηρήθηκε και στους 12 κλώνους φαιοφυκών, είναι η εναπόθεση β-1,3 γλυκάνης στο σημείο της μόλυνσης, ως αντίδραση έναντι της προσβολής από τον ωομύκητα. Σε ότι αφορά στο ΚΤ του *E. dicksonii*, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά θετική αντίδραση μετά από χρήση αντισώματος έναντι της θειϊκής φουκάνης.

5. Επίδραση υδατανθράκων και ορμονών στην μόλυνση φαιοφυκών από το *E. dicksonii*.

Μολυσμένοι θαλλοί φαιοφυκών επώαστηκαν με μέσο καλλιέργειας που περιείχε επιλεγμένους μονοσακχαρίτες (D- γαλακτόζη, L- φουκόζη, D- γλυκόζη, D- μαnnόζη, N-ακετυλ-D- γαλακτοζαμίνη, N-ακετυλ-D-γλυκοσαμίνη, D- φρουκτόζη). Το υλικό παρατηρήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο μετά το πέρας 14 ημερών, το διάστημα που απαιτείται για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος μόλυνσης. Παρατηρήθηκε μείωση των μολύνσεων του *E. dicksonii* στην περίπτωση της D-γαλακτόζης και της L-φουκόζης, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή συμμετοχή των δύο

μονοσακχαριτών στους μηχανισμούς αναγνώρισης του παράσιτου από τον ξενιστή και της ενεργοποίησης αμυντικών μηχανισμών. Ακόμη, επώαση μολυσμένων θαλλών με μέσο καλλιέργειας που περιέχει σαλικυλικό οξύ προκαλεί ανάσχεση της μόλυνσης και αύξηση της υπερευαίσθητης απόκρισης του ξενιστή.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα της παρούσας διατριβής αποκάλυψαν για πρώτη φορά το ρόλο του κυτταροσκελετού, τόσο στην αντίσταση του ξενιστή έναντι της μόλυνσης όσο και στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του παράσιτου. Ακόμη, περιγράφηκε λεπτομερώς σε επίπεδο λεπτής δομής ο μηχανισμός προσκόλλησης και διείσδυσης του *E. dicksonii* στο κύτταρο του φύκου, αποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη κοινών μηχανισμών μόλυνσης μεταξύ των αντιπροσώπων της ομάδας των ωομυκήτων, αλλά και μοναδικά χαρακτηριστικά της μορφολογίας του εν λόγω παράσιτου. Επιπρόσθετα, η εναπόθεση β-1,3 γλυκανών στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή αποτελεί γνωστή αμυντική απόκριση των φυτών έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών και αναφέρεται για πρώτη φορά και στα φαιοφύκη. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος ξενιστή και παράσιτου, η οποία συμβάλλει, όπως είναι γνωστό και από άλλα συστήματα, στην κατανόηση πιθανών μηχανισμών αναγνώρισης. Διαπιστώθηκε, μεταξύ άλλων, η ύπαρξη θειϊκής φουκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα του *E. dicksonii*, εύρημα το οποίο αναφέρεται για πρώτη φορά στους ωομύκητες. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι οι μονοσακχαρίτες D-γαλακτόζη, L-φουκόζη αλλά και το σαλικυλικό οξύ πιθανόν να συμμετέχουν σε μονοπάτια αναγνώρισης του παράσιτου από τον ξενιστή και άμυνας των φαιοφυκών έναντι στην προσβολή από τον *E. dicksonii*.

Abstract

During the last decades, the ecological and commercial interest of the algae has led to increased scientific research on this group of organisms. Algae are at the basis of most aquatic food webs, while their photosynthetic activity has impact on global climate. In parallel, global seaweed production in aquaculture systems has increased exponentially. Nowadays, seaweeds are harvested and cultivated for food, the pharmaceutical industry, and increasingly as a possible biofuel source.

Macroalgae, like all other terrestrial and marine organisms, face a constant onslaught from pathogens, including viruses, bacteria and fungi. It has been estimated that the seaweed culture industry sustains losses of annual production between 10 and 30 % as a result of diseases caused by pathogens and more specifically, partly by marine oomycetes. This provides a renewed incentive to the study of interactions between algae and these parasites, which had hitherto been largely ignored.

Eurychasma dicksonii is a biotrophic, intracellular marine oomycete, capable to infect at least 45 species of brown seaweeds in laboratory cultures. The main stages of *E. dicksonii* infection cycle have been described previously and include: zoospore encystment, attachment of the spore to the host cell wall, penetration of the host cell wall and transfer of the parasite's protoplast into the host cell, formation of a multinucleate, coenocytic thallus and zoosporogenesis. However, until now, there is no information related to the *E. dicksonii* infection mechanism during the encystment and penetration, the cytoskeleton organization, the cross-talk mechanisms between the parasite and its host and the potential algal defensive responses against the oomycete.

The present doctoral thesis aimed to present new findings on the cytoskeleton organization of both host and parasite, cover the gaps of knowledge on the *E. dicksonii* infection mechanism and shed light onto the potential host-parasite interactions and host defenses. The most important observations of the present study are summarized below:

1. Ultrastructural study of *E. dicksonii* attachment and penetration mechanism

The present part of the doctoral thesis focuses on the mechanism used by the pathogen to attach on the host cell wall and force its way into algal cells. Ultrastructural examination revealed a needle-like structure, which develops within the attached spore and extends along its main axis. Particular cell wall modifications are present at the basal part of the spore (adhesorium pad) and guide the needle-like tool to penetrate perpendicularly the host cell wall. The injection mechanism is shared with *Haptoglossa* sp. which suggests that this is an important characteristic of early diverging oomycetes. Furthermore, the encystment and adhesion mechanism of *E. dicksonii* shows significant similarities with other oomycetes, some of which are plant pathogens.

2. Cytoskeleton plays a key role in the algal defense and in *E. dicksonii* different developmental stages

Immunofluorescence imaging of tubulin revealed how the development of the intracellular biotrophic pathogen *E. dicksonii* impacts on microtubule (MT) organization of three brown algal species, *Pylaiella littoralis*, *Ectocarpus siliculosus*, and *Ectocarpus crouaniorum*. The host MT cytoskeleton remains normal and organized by the centrosome until the very late stages of the infection. Additionally, the organization of the parasite's cytoskeleton was examined. During mitosis of the *E. dicksonii* nucleus, the MT focal point (microtubule organization centre, MTOC, putative centrosome) duplicates and each daughter MTOC migrates to opposite poles of the nucleus. Moreover, actin labeling with rhodamine-phalloidin in *E. dicksonii* revealed typical images of actin dots connected by fine actin filament bundles in the cortical cytoplasm.

3. Host response to infection with β -1,3-glucan deposition on the host cell wall

Staining and immunolabeling techniques showed the deposition of β -1,3-glucans on the host cell wall at the pathogen penetration site, a strategy similar to physical responses previously described only in infected plant cells. It is assumed that the host defense in terms of callose-like deposition is an ancient response to infection.

4. Cell wall component analysis sheds light on the crosstalk between filamentous brown algae and *E. dicksonii*

In order to gain insight in the composition and plasticity of the algal and pathogen cell walls during infection, twelve host strains from four orders of Phaeophyceae (Ectocarpales, Laminariales, Discosporangiales, Tilopteridiales) and their pathogen *E. dicksonii*, were scanned by ten antibodies targeted at different cell wall components. The results revealed that there are no modifications occurred on the host cell wall, apart from the β -1,3 glucan deposition at the penetration site. Additionally, it was found that sulfated fucans exist on the *E. dicksonii* cell wall, which is a novel finding for oomycetes.

5. Incubation of infected material with medium including monosaccharides and hormones

Incubation of material infected by *E. dicksonii* with D-galactose and L-fucose during a complete, 14-day infection cycle, showed significant decrease of pathogenicity. It is assumed that, due to the long incubation with monosaccharides, host defensive strategies are triggered. In addition, incubation of infected algae with salicylic acid revealed significant decrease of the infections and increase of the algal hypersensitive response. Salicylic acid is known to play an important role in the defensive biochemical pathways of plants against oomycetes.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams J.M.M., Toop T.A., Donnison I.S., Gallagher J.A. 2011.** Seasonal variation in *Laminaria digitata* and its impact on biochemical conversion routes to biofuels. *Bioresource Technology*. 102: 9976-9984.
- Aeby G.S. 2007.** First record of coralline lethal orange disease (CLOD) in the Northwestern Hawaiian Islands. *Coral Reefs*. 26: 385.
- Aist J.R., Williams P.H. 1971.** The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmodiophora brassicae*. *Canadian Journal of Botany*. 49: 2023-2034.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 2002.** Molecular biology of the Cell, 4th Edition. Garland Publishing, Inc., New York and London.
- Aleem A.A. 1950.** The occurrence of *Eurychasma dicksonii* (Wright) Magnus in England and Sweden. *Meddedlanden fran Göteborgs botaniska trädgård*. 18: 239-245.
- Alessa L., Kropf D.L. 1999.** F-actin marks the rhizoid pole in living *Pelvetia compressa* zygotes. *Development*. 126: 201-209.
- Alongi G., Catra M., Cormaci M. 1999.** First record of *Haloguignardia cystoseirae* (Ascomycota) parasitic on *Cystoseira elegans* (Fucophyceae) from the Mediterranean Sea. *Botanica Marina*. 42: 33-35.
- Alvain S., Moulin C., Dandonneau Y., Loisel H. 2008.** Seasonal distribution and succession of dominant phytoplankton groups in the global ocean: A satellite view. *Global Biogeochemical Cycles*. 22: GB3001.
- Amsler C.D. 1984.** Culture and field studies of *Acinetospora crinita* (Carmichael) Sauvageau (Ectocarpaceae, Phaeophyceae) in North Carolina, USA. *Phycologia*. 23: 377-382.
- Amsler C.D. 2001.** Induced defenses in macroalgae: the herbivore makes a difference. *Journal of Phycology*. 37: 353-356.
- Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M. 2005.** Recipes for freshwater and seawater media. Appendix A. In: *Algal culturing techniques*. Andersen R.A. (ed). Academic, New York. pp. 501.
- Andrews J.H. 1976.** The pathology of marine algae. *Biological Reviews*. 51: 211-252.

- Apt K.E. 1988.** Morphology and development of hyperplasia on *Cystoseira osmundacea* (Phaeophyta) associated with *Haloguignardia irritans* (Ascomycotina). *American Journal of Botany*. 75: 979-984.
- Armstrong E., Rogerson A., Leftley J.W. 2000.** Utilisation of seaweed carbon by three surface-associated heterotrophic protists, *Stereomyxa ramosa*, *Nitzschia alba* and *Labyrinthula sp.* *Aquatic Microbial Ecology*. 21: 49-57.
- Aronson J.M., Cooper B.A., Fuller M.S. 1967.** Glucans of oomycete cell walls. *Science*. 155: 332-335.
- Bacic A., Fincher G.B., Stone B.A. 2009.** Chemistry, biochemistry and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides, 1st edn. Academic Press, Amsterdam.
- Baldauf, S.L. 2003.** The deep roots of eukaryotes. *Science*. 300: 1703-1706.
- Baldauf S.L., Roger A.J., Wenk-Siefert I., Doolittle W.F. 2000.** A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*. 290: 972-977.
- Bari R., Jones J.D.G. 2009.** Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*. 69: 473-488.
- Beakes G.W. 1983.** A comparative account of cyst coat ontogeny in saprophytic and fish-lesion (pathogenic) isolates of the *Saprolegnia diclina - parasitica* complex. *Canadian Journal of Botany*. 61: 603-625.
- Beakes G.W. 1987.** Oomycete phylogeny: ultrastructural perspectives. In: *Evolutionary biology of the fungi*. Rayner A.D.M., Brasier C.M., Moore D. (eds) Cambridge University Press: Cambridge, UK. pp. 405-421.
- Beakes G.W. 1989.** Oomycete fungi: their phylogeny and relationship to chromophyte algae. In: *The chromophyte algae: problems and perspectives*. J.C. Green, B.S.C. Leadbeater, W.L. Diver (eds). Oxford University Press, Oxford. pp. 325-342.
- Beakes G.W., Canter H.M., Jaworski G.H.M. 1992.** Comparative ultrastructural ontogeny of zoosporangia of *Zygorhizidium affluens* and *Z. planktonicum*, chytrid parasites of the diatom *Asterionella Formosa*. *Mycological Research*. 96: 1047-1059.
- Beakes G.W., Glockling S.L. 1998.** Injection tube differentiation in gun cells of a *Haptoglossa* species which infects nematodes. *Fungal Genetics and Biology*. 24: 45-68.

- Beakes G.W., Glockling S.L. 2000.** An ultrastructural analysis of organelle arrangement during gun (infection) cell differentiation in the nematode parasite *Haptoglossa dickii*. *Mycological Research*. 104: 1258-1269.
- Beakes G.W., Glockling S.L. 2002.** A comparative fine-structural study of dimorphic infection cells in the nematophagous parasite *Haptoglossa erumpens*. *Fungal Genetics and Biology*. 37: 250-262.
- Beakes G.W., Glockling S.L., Sekimoto S. 2012.** The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. *Protoplasma*. 249: 3-19.
- Beakes G.W., Glockling S., James T.Y. 2014.** A new oomycete species parasitic in nematodes, *Chlamydomyrium dictychoide* sp. nov.: Developmental biology and phylogenetic studies. *Fungal Biology*. DOI:10.1016/j.funbio.2014.04.005.
- Bellincampi D., Cervone F., Lionetti V. 2014.** Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*. DOI: 10.3389/fpls.2014.00228
- Benhamou N. 1996.** Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*. 1: 233-240.
- Bidle K.D., Falkowski P.G. 2004.** Cell death in planktonic, photosynthetic microorganisms. *Nature Review Microbiology*. 2: 643-655.
- Bimpong C.E., Hickman C.J. 1975.** Ultrastructural and cytochemical studies of zoospores, cysts, and germinating cysts of *Phytophthora palmivora*. *Canadian Journal of Botany*. 53: 1310-1327.
- Bisgrove S.R., Kropf D.L. 1998.** Alignment of centrosomal and growth axes is a late event during polarization of *Pelvetia compressa* zygotes. *Developmental Biology*. 194: 246-256.
- Bisgrove S.R., Nagasato C., Motomura T., Kropf D.L. 1997.** Immunolocalization of centrin during fertilization and the first cell cycle in *Fucus distichus* and *Pelvetia compressa* (Fucales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology*. 33: 823-829.
- Bisgrove S.R., Kropf D.L. 2001.** Cell wall deposition during morphogenesis in fucoid algae. *Planta*. 212: 648-658.
- Bisgrove S.R., Kropf D.L. 2004.** Cytokinesis in brown algae: studies of asymmetric division in fucoid zygotes. *Protoplasma*. 223: 163-173.

- Blagden S.P., Glover D.M. 2003.** Polar expeditions-provisioning the centrosome for mitosis. *Nature Cell Biology*. 5: 505-511.
- Boller T. 1995.** Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 46: 189-214.
- Bolwell G.P. 1999.** Role of active oxygen species and NO in plant defence response. *Current Opinion in Plant Biology*. 2: 287-294.
- Bornet E. 1981.** Note sur quelques *Ectocarpus*. *Bulletin de la Société Botanique de France*. 38: 1-20, pls VI-VIII.
- Børsheim K.Y., Bratbak G., Heldal M. 1990.** Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 352-356.
- Bortnick R.N., Powell M.J., Bangert T.N. 1985.** Zoospore fine-structure of the parasite *Olpidiopsis saprolegniae* (Oomycetes, Lagenidiales). *Mycologia*. 77: 861-879.
- Bouarab K., Potin P., Correa J., Kloareg B. 1999.** Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. *Plant Cell*. 11: 1635-1650.
- Bouarab K., Potin P., Weinberger F., Correa J., Kloareg B. 2001.** The *Chondrus crispus* *Acrochaete operculata* host-pathogen association, a novel model in glycobiology and applied phycopathology. *Journal of Applied Phycology*. 13: 185-193.
- Bouck G.B. 1965.** Fine structure and organelle associations in brown algae. *Journal of Cell Biology*. 26: 523-537.
- Bouck G.B. 1969.** Extracellular microtubules. The origin, structure and attachment of flagellar hairs in *Fucus* and *Ascophyllum* antherozoids. *Journal of Cell Biology*. 26: 523-537.
- Braselton J.P. 2001.** Plasmodiophoromycota. In: *The Mycota. VII Part A. Systematics and Evolution*. McLaughlin D.J., McLaughlin E.G., Lemke P.A. (eds.), Springer Verlag, Berlin. pp.81-91.
- Brasier C., Webber J. 2010.** Plant pathology: Sudden larch death. *Nature*. 466: 824-825.
- Brawley S., Quatrano R.S. 1979.** Effects of microtubule inhibitors on pronuclear migration and embryogenesis in *Fucus distichus* (Phaeophyta). *Journal of Phycology*. 15: 266-272.

- Brawley S.H., Robison K.R. 1985.** Cytochalasin treatment disrupts the endogenous currents associated with cell polarization in furoid zygotes: studies of the role of F-actin in embryogenesis. *The Journal of Cell Biology*. 100: 1173-1184.
- Brown R.C., Lemmon B.E. 1988.** Cytokinesis occurs at boundaries of domains delimited by nuclear-based microtubules in sporocytes of *Conocephalum conicum* (Bryophyta). *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 11: 139-146.
- Brown R.C., Lemmon B.E., Olsen O.A. 1994.** Endosperm development in barley: microtubule involvement in the morphogenetic pathway. *The Plant Cell*. 6: 1241-1252.
- Brussaard C.P.D. 2004.** Viral control of phytoplankton populations - a review. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 51: 125-138.
- Burr A.W., Beakes G.W. 1994.** Characterization of zoospore and cyst surface structure in saprophytic and fish pathogenic *Saprolegnia* species (oomycete fungal protists). *Protoplasma*. 181: 142-163.
- Butler A. 1998.** Vanadium haloperoxidases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2: 279-285.
- Cahill D., Rookes J., Michalczyk A., McDonald K., Drake A. 2002.** Microtubule dynamics in compatible and incompatible interactions of soybean hypocotyls cells with *Phytophthora sojae*. *Plant Pathology*. 51: 629-640.
- Cavalier-Smith T., Chao E.E.Y. 2003.** Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist*. 154: 341-358.
- Cavalier-Smith T., Chao E.E.Y. 2006.** Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (Kingdom Chromista). *Journal of Molecular Evolution*. 62: 388-420.
- Cerenius L., Olson L.W., Lange L., Soderhall K. 1984.** The secondary zoospore of *Aphanomyces astaci* and *A. laevis* (Oomycetes, Saprolegniales). *Nordic Journal of Botany*. 4: 697-706.
- Chamberlain A.H.L., Moss S.T. 1988.** The thraustochytrids: a protist group with mixed affinities. *Biosystems*. 21: 341-349.
- Chambouvet A., Morin P., Marie D., Guillou L. 2008.** Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers. *Science*. 322: 1254-1257.

- Charrier B., Coelho S.M., Le Bail A., Tonon T., Michel G., Potin P., Kloareg B., Boyen C., Peters A.F., Cock J.M. 2008.** Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research. *New Phytologist*. 177: 319-332.
- Chi E.S., Henry E.C., Kawai H., Okuda K. 1999.** Immunogold-labeling analysis of alginate distributions in the cell walls of chromophyte algae. *Phycological Research*. 47: 53-60.
- Cock J.M., Sterck L., Rouzé P., Scornet D., Allen A.E., Amoutzias G., Anthouard V., Artiguenave F., Aury J.M., Badger J.H., Beszteri B., Billiau K., Bonnet E., Bothwell J.H., Bowler C., Boyen C., Brownlee C., Carrano C.J., Charrier B., Cho G.Y., Coelho S.M., Collen J., Corre E., Da Silva C., Delage L., Delaroque N., Dittami S.M., Doulbeau S., Elias M., Farnham G. *et al.* 2010.** The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*. 465: 617-621. 177: 319-332.
- Coehlo S., Sousa-Pinto I., Brown M.T., Brownlee C. 2002.** Localized production of H₂O₂ underlies a propagating Ca²⁺ and subsequent mitochondrial Ca²⁺ and H₂O₂ elevation in *Fucus* rhizoid cells. *Plant Cell*. 14: 2369-2381.
- Collén J., Hervé C., Guisle-Marsollier I., Leger J.J., Boyen C. 2006.** Expression profiling of *Chondrus crispus* (Rhodophyta) after exposure to methyl jasmonate. *Journal of Experimental Botany*. 57: 3869-3881.
- Conrath U., Pieterse C.M.J., Mauch-Mani B. 2002.** Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*. 7: 210-216.
- Cooper G.M., Hausman R.E. 2004.** The Cell. A Molecular Approach. Third Edition. ASM Press and Sinauer Associates, Inc., Washington DC and Sunderland, Massachusetts.
- Cove D.J. 2000.** The generation and modification of cell polarity. *Journal of Experimental Botany*. 51: 831-838.
- Cronin G., Hay M.E. 1996.** Induction of seaweed chemical defenses by amphipod grazing. *Ecology*. 77: 2287-2301.
- Cronshaw J., Myers A., Preston R.D. 1958.** A chemical and physical investigation of the cell walls of some marine algae. *Biochimica Biophysica Acta*. 27: 89-103.
- Crook E.M., Johnston I.R. 1962.** The qualitative analysis of the cell walls of selected species of fungi. *Biochemistry Journal*. 83: 325.

- Czymmek K.J., Bourett T.M., Howard R.J. 1996.** Immunolocalization of tubulin and actin in thick-sectioned fungal hyphae after freeze-substitution fixation and methacrylate de-embedment. *Journal of Microbiology*. 181: 153-161.
- Deckert R.J., Garbary D.J., 2005.** *Ascophyllum* and its symbionts. VIII. Interactions among *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae), *Mycophycias ascophylli* (Ascomycetes) and *Elachista fucicola* (Phaeophyceae). *Algae*. 20: 363-368.
- Del Vecchio A.J., Harper J.D.I., Vaughn K.C., Baron A.T., Salisbury J.L. 1997.** Centrin homologues in plants are predominantly associated with the developing cell plate. *Protoplasma*. 196: 224-234.
- Delaroque N., Müller D.G., Bothe G., Pohl T., Knippers R., Boland W. 2001.** The complete DNA sequence of the *Ectocarpus siliculosus* virus EsV-1 genome. *Virology*. 287: 112-132.
- Dick M.W. 1997.** Fungi, flagella and phylogeny. *Mycological Research*. 101: 385-394.
- Dick M.W. 2001.** Straminipilous fungi. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 670 p.
- Dick M.W. 2002.** The Peronosporomycetes and other flagellate Fungi. In: *Pathogenic Fungi in Humans and Animals*. D.H. Howard (ed). Marcel Dekker, New York, USA. pp. 17-66.
- Dimitriadis I., Katsaros C., Galatis B. 2001.** The effect of taxol on centrosome function and microtubule organization in apical cells of *Sphacelaria rigidula* (Phaeophyceae). *Phycological Research*. 49: 23-34.
- Ding H., Ma J. 2005.** Simultaneous infection by red rot and chytrid diseases in *Porphyra yezoensis* Ueda. *Journal of Applied Phycology*. 17: 51-56.
- Dodge J.D. 1973.** The fine structure of algal cells. Academic Press. London, UK.
- Donald C., Porter I. 2009.** Integrated control of clubroot. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28: 289-303.
- Duarte C.M., Holmer M., Olsen Y., Soto D., Marba N., Guiu J., Black K., Karakassis I. 2009.** Will the oceans help feed humanity? *BioScience*. 59: 967-976.
- Felerbach B., Verde F., Chang F. 2004.** Regulation of a forming complex by the microtubule plus end protein tea 1p. *Journal of Cell Biology*. 165: 697-707.

- Fowler J.E., Vejlupkova Z., Goodner B.W., Lu G., Quatrano R.S. 2004.** Localization to the rizoid tip implicates a *Fucus distichus* Rho family GTPase in a conserved cell polarity pathway. *Planta*. 219: 856-866.
- Gachon C.M.M., Strittmatter M., Müller D.G., Kleinteich J., Küpper F.C. 2009.** Differential host susceptibility to the marine oomycete pathogen *Eurychasma dicksonii* detected by real-time PCR: not all algae are equal. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 322-328
- Gachon C.M.M., Sime-Ngando T., Strittmatter M., Chambouvet A., Kim G.H. 2010.** Algal diseases: spotlight on a black box. *Trends in Plant Science*. 15: 633-640.
- Gachon C.M.M., Müller D.G., Strittmatter M., Tsirigoti A., Wawra S., Katsaros C., van West P., Küpper F.C.** Hypersensitive cell death is a conserved disease resistance mechanism in brown algae (υπό προετοιμασία).
- Galatis B., Katsaros C., Mitrakos K. 1973.** Ultrastructure of the mitotic apparatus in *Dictyota dichotoma* (Lamour.). Rapports de Commission International pour l' Exploration de la Mer Meditterannée. 22: 53-54.
- Galatis B., Katsaros C., Mitrakos K. 1977.** Fine structure of vegetative cells of *Sphacelaria tribuloides* Menegh (Phaeophyceae, Sphacelariales) with special reference to some unusual proliferations of the plasmalemma. *Phycologia*. 16: 139-151.
- Gay J.L., Greenwood A.D. 1966.** Structural aspects of zoospore production in *Saprolegnia ferax* with particular reference to the cell and vacuolar membranes. In: *The fungus spore*. Madelin M.F. (ed.). Butterworths, London. pp. 95-110.
- Gleason F.H., Kagami M., Lefevre E., Sime-Ngando T. 2008.** The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biology Reviews*. 22: 17-25.
- Gleason F.H., Küpper F.C., Amon J.P., Picard K., Gachon C.M.M., Marano A.V., Sime-Ngando T., Lilje O. 2011.** Zoosporic true fungi in marine ecosystems: a review. *Marine and Freshwater Research*. 62:383-393.
- Gleason F.H., Küpper F.C., Glockling S.L. 2012.** In: *Marine Fungi and fungal-like organisms*. Jones E.B.G., Pang K.L. (Eds). De Gruyter, Berlin, Germany. pp. 103-116.

Glockling S.L., Beakes G.W. 2000. An ultrastructural study of sporidium formation during infection of a rhabditid nematode by large gun cells of *Haptoglossa heteromorpha*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 76: 208-215.

Goecke F., Wiese J., Núñez A., Labes A., Imhoff J.F., Neuhauser S. 2012. A novel Phytomyxean parasite associated with galls on the bull-kelp *Durvillaea Antarctica* (Chamisso) Hariot. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0045358.

Goodman R.N., Novacky A.J. 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens. St Paul, APS Press.

Gotelli D. 1974. The morphology of *Lagenidium callinectes* II. Zoosporogenesis. *Mycologia*. 66: 846-858.

Graham L.E., Graham J.E., Wilcox L.W. 2009. Algae, 2nd edition. Pearson Education, Inc, publishing as Benjamin Cummings, San Francisco, USA.

Grenville-Briggs L., Gachon C.M.M., Strittmatter M., Sterck L., Küpper F., van West P. 2011. A molecular insight into algal-oomycete warfare: cDNA analysis of *Ectocarpus siliculosus* infected with the basal oomycete *Eurychasma dicksonii*. *PLoS ONE*. 6: e24500.

Gubler F., Hardham A.R. 1988. Secretion of adhesive material during encystment of *Phytophthora cinnamomi* zoospores characterized by immunogold labeling with monoclonal antibodies to components of peripheral vesicles. *Journal of Cell Science*. 90: 225-235.

Gubler F., Hardham A.R., Duniec J. 1989. Characterising adhesiveness of *Phytophthora cinnamomi* zoospores during encystment. *Protoplasma*. 149: 24-30.

Haas B.J., Kamoun S. και συν. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*. 461: 393-398. DOI: 10.1038/nature08358.

Hable W., Kropf D.L. 1998. Roles of secretion and the cytoskeleton in cell adhesion and polarity establishment in *Pelvetia compressa* zygotes. *Developmental Biology*. 198: 45-56.

Hakariya M., Masuyama N., Tokumasu S. 2002. Shooting of sporidium by “gun” cells in *Haptoglossa heterosporea* and *H. zoospore* and secondary zoospore formation in *H. zoospore*. *Mycoscience*. 438: 119-125.

- Halim V.A., Eschen-Lippold L., Altmann S., Birschwilks M., Scheel D., Rosahl S. 2007.** Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20: 1346-1352.
- Hardham A.R. 1985.** Studies on the cell surface of zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomi*: The influence of fixation on patterns of lectin binding. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 33: 110-118.
- Hardham A.R. 1989.** Lectin and antibody labelling of surface components of spores of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Plant Physiology*. 16: 19-32.
- Hardham A.R. 1992.** Pre-penetration events at the host surface. In: *Cell biology of pathogenesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43: 497-508.
- Hardham A.R. 2005.** Pathogen profile: *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*. 6: 598-604.
- Hardham A.R. 2009.** The asexual life cycle. In: *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools*. Lamour K., Kamoun S. (eds). Wiley-Blackwell, Chichester. pp. 93-119.
- Hardham A.R., Gubler F., Duniec J., Elliott J. 1991.** A review of methods for the production and use of monoclonal antibodies to study zoosporic plant pathogens. *Journal of Microscopy*. 162: 305-318.
- Hardham A.R., Hyde G.J. 1997.** Asexual sporulation in the oomycetes. *Advances in Botanical Research*. 24: 353-398.
- Hardham A.R., Jones D.A., Takemoto D. 2007.** Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 342-348.
- Haythorn J.M., Jones E.B.G., Harrison J.L. 1980.** Observations on marine algicolous fungi, including the hyphomycete *Sigmoidea marina* sp.nov. *Transactions of the British Mycological Society*. 74: 615-623.
- Heath I.B., Greenwood A.D. 1971.** Ultrastructural observations on the kinetosomes and Golgi bodies during the asexual life cycle of *Saprolegnia*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 112: 371-389.
- Heath I.B. 1974.** Centrioles and mitosis in some Oomycetes. *Mycologia*. 66: 354-359.

- Heath I.B. 1980.** Behaviour of kinetochores during mitosis in the fungus *Saprolegnia ferax*. *Journal of Cell Biology*. 84: 531-546.
- Heath I.B. 1995.** The cytoskeleton. In: *The growing fungus*. N.A.R. Gow, G.M. Gadd (eds). Chapman and Hall, London. pp. 99-134.
- Heath I.B. 2000.** Organization and functions of actin in hyphal tip growth. In: *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions*. Staiger C.J., Baluska F., Volkman D., Barlow P.W., (eds). Dordrecht: Kluwer Academic. pp. 275-300.
- Heath M.C. 2000.** Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 315-319.
- Heath I.B., Greenwood A.D. 1971.** Ultrastructural observations on the kinetosomes and Golgi bodies during the asexual life cycle of *Saprolegnia*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 112: 371-389.
- Heath I.B., Harold R.L. 1992.** Actin has multiple roles in the formation and architecture of zoospores of the oomycetes, *Saprolegnia ferax* and *Achlya bisexualis*. *Journal of Cell Science*. 102: 611-627.
- Heesch S., Peters A.F., Broom J.E., Hurd C.L. 2008.** Affiliation of the parasite *Herpodiscus durvillaeae* (Phaeophyceae) with the Sphacelariales based on DNA sequence comparisons and morphological observations. *European Journal of Phycology*. 43: 283-295.
- Hemaiswarya S., Raja R., Kumar R.R., Ganesan V., Anbazhagan. C. 2011.** Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 1737-1746.
- Hervé C., Tonon T., Collén J., Corre E., Boyen C. 2006.** NADPH oxidases in eukaryotes: Red algae provide new hints! *Current Genetics*. 49: 190-204.
- Holloway S.A., Heath I.B. 1977.** Morphogenesis and the role of microtubules in synchronous populations of *Saprolegnia* zoospores. *Experimental Mycology*. 1: 9-29.
- Hyde G.J., Lancelle S., Hepler P.K., Hardham A.R. 1991α.** Freeze substitution reveals a new model for sporangial cleavage in *Phytophthora*, a result with implications for cytokinesis in other eukaryotes. *Journal of Cell Science*. 100: 735-746.

- Hyde G.J., Gubler F., Hardham A. R. 1991β.** Ultrastructure of zoosporogenesis in *Phytophthora cinnamomi*. *Mycological Research*. 95: 577-591.
- Ibelings B.W., De Bruin A., Kagami M., Rijkeboer M., Brehm M., Van Donk E. 2004.** Host parasite interactions between freshwater phytoplankton and chytrid fungi. *Journal of Phycology*. 40: 437-453.
- Ibelings B.W., Gsell A.S., Mooij W.M., Van Donk E., Van Den Wyngaert S., De Senerpont Domis L.N. 2011.** Chytrid infections and diatom spring blooms: paradoxical effects of climate warming on fungal epidemics in lakes. *Freshwater Biology*. 56: 754-766.
- Jackson S.L., Hardham A.R. 1998.** Dynamic rearrangement of the filamentous actin network occurs during zoosporogenesis and encystment in the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. *Fungal Genetics and Biology*. 24: 24-33.
- Jelke E., Oertel B., Böhm K.J., Unger E. 1987.** Tubular cytoskeletal elements in sporangia and zoospores of *Phytophthora infestans* (MONT.) De Bary (Oomycetes, Pythiaceae). *Journal of Basic Microbiology*. 27: 11-21.
- Jenneborg L.H. 1977.** *Eurychasma*-infection of marine algae. Changes in algal morphology and taxonomical consequences. *Botanica Marina*. 20: 499-507.
- Kamoun S., Huitema E., Vleeshouwers V. 1999.** Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends in Plant Science*. 4: 196-200.
- Karling J.S. 1944.** *Phagomyxa algarum* n. gen., n. sp., an unusual parasite with plasmodiophorean and proteomyxean characteristic. *American Journal of Botany*. 31: 38-52.
- Karling J.S. 1968.** The Plasmodiophorales, 2nd Completely revised edition. Hafner Publishing Company, New York.
- Karling J.S 1981.** Predominantly holocarpic and eucarpic simple biflagellate phycomycetes. Cramer, Vaduz, Lichtenstein. 252 p.
- Karnovsky M.J. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 27: 137A-138A.
- Karyophyllis D., Galatis B., Katsaros C. 1997.** Centrosome and microtubule dynamics in apical cells of *Sphacelaria rigidula* (Phaeophyceae) treated with nocodazole. *Protoplasma*. 199: 161-172.

- Karyophyllis D., Katsaros C., Dimitriadis I., Galatis B. 2000α.** F-actin organization during the cell cycle of *Sphacelaria rigidula* (Phaeophyceae). *European Journal of Phycology*. 35: 25-33.
- Karyophyllis D., Katsaros C., Galatis B. 2000β.** F-actin involvement in apical cell morphogenesis of *Sphacelaria rigidula* (Phaeophyceae): mutual alignment between cortical actin filaments and cellulose microfibrils. *European Journal of Phycology*. 35: 195-203.
- Karyophyllis D, Galatis B, Katsaros C. 2005.** g-Tubulin localization during the cell cycle in *Sphacelaria rigidula* (Phaeophyceae, Sphacelariales). *Journal of Biological Research*. 4: 151-156.
- Katsaros C. 1980.** An ultrastructural study on the morphogenesis of the thallus of five brown algal species. Ph.D. thesis, University of Athens, Athens, Greece.
- Katsaros C. 1992.** Immunofluorescence study of microtubule organization in some polarized cell types of selected brown algae. *Botanica Acta*. 105: 400-406.
- Katsaros C. 1995.** Apical cells of brown algae, with particular reference to Sphacelariales, Dictyotales, and Fucales. *Phycological Research*. 43: 43-59.
- Katsaros C., Galatis B., Mitrakos K. 1983.** Fine structural studies in the interphase and dividing apical cells of *Sphacelaria tribuloides* (Phaeophyta). *Journal of Phycology*. 19: 16-30.
- Katsaros C., Galatis B. 1985.** Ultrastructural studies on thallus development in *Dictyota dichotoma* (Phaeophyta, Dictyotales). *British Phycological Journal*. 20: 263-276.
- Katsaros C. Galatis B. 1988.** Thallus development in *Dictyopteris membranacea* (Phaeophyta, Dictyotales). *British Phycological Journal*. 23: 71-88.
- Katsaros C, Galatis B. 1990.** Thallus development in *Halopteris filicina* (Phaeophyceae, Sphacelariales). *British Phycological Journal*. 25: 63-74.
- Katsaros C., Kreimer G., Melkonian M. 1991.** Localization of tubulin and a centrin homologue in vegetative cells and developing gametangia of *Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngb. (Phaeophyceae, Ectocarpales): a combined immunofluorescence and confocal laser scanning microscope study. *Botanica Acta*. 104: 87-92.
- Katsaros C., Galatis B. 1992.** Immunofluorescence and electron microscope studies of microtubule organization during the cell cycle of *Dictyota dichotoma* (Phaeophyta, Dictyotales). *Protoplasma*. 169: 75-84.

- Katsaros C., Maier I., Melkonian M. 1993.** Immunolocalization of centrin in the flagellar apparatus of the male gametes of *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) and other brown algal motile cells. *Journal of Phycology*. 29: 787-797.
- Katsaros C., Reiss H.D., Schnepf E. 1996.** Freeze-fracture studies in brown algae: putative cellulose synthesizing complexes on the plasma membrane. *European Journal of Phycology*. 31: 41-48.
- Katsaros C., Salla C. 1997.** Ultrastructural changes during development, release, and germination of monospores of *Tilopteris mertensii* (Tilopteridales, Phaeophyta). *Phycologia*. 36: 60-67.
- Katsaros C.I., Karyophyllis D.A., Basil D.G. 2002.** Cortical F-actin underlies cellulose microfibril patterning in brown algal cells. *Phycologia*. 41: 178-183.
- Katsaros C., Karyophyllis D., Galatis B. 2006.** Cytoskeleton and Morphogenesis in brown algae. *Annals of Botany*. 97: 679-693.
- Katsaros C., Motomura T., Nagasato C., Galatis B. 2009.** Diaphragm development in cytokinetic vegetative cells of brown algae. *Botanica Marina*. 52: 150-161.
- Katsaros C., Varvarigos V., Gachon C., Brand J., Motomura T., Nagasato C., Küpper F. 2011.** Comparative immunofluorescence and ultrastructural analysis of microtubule organization in *Uronema* sp., *Klebsormidium flaccidum*, *K. subtilissimum*, *Stichococcus bacillaris* and *S. chloranthus* (Chlorophyta). *Protist*. 162: 315-331.
- Katsaros C., Nagasato C., Terauchi M., Motomura T. 2012.** Cytokinesis of brown algae. In: Advances in algal cell biology. Heimann K., Katsaros C. (eds). Walter De Gruyter, Berlin, Germany. pp. 143-160.
- Kawai H., Hanyuda T., Draisma S.G.A., Müller D.G. 2007.** Molecular phylogeny of *Discosporangium mesarthrocarpum*. *Journal of Phycology*. 43: 186-194.
- Kerwin J.L., Grant D.F., Berbee M.L. 1991.** Specific induction of encystment of *Lagenidium giganteum* zoospores by concanavalin A and derivatives of chitin and chitosan. *Protoplasma*. 161: 43-51.
- Kessler A., Baldwin I.T. 2001.** Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*. 291: 2141-2144.

- Kloareg B., Quatrano R.S. 1988.** Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. 26: 259-315.
- Klochkova T.A., Shim J.B., Hwang M.S., Kim G.H. 2011.** Host-parasite interaction and host species susceptibility of the marine oomycete parasite, *Olpidiopsis* sp., from Korea that infects red algae. *Journal of Applied Phycology*. 24: 135-144.
- Klochkova T.A., Pisareva N.A., Park J.S., Lee J.H., Han J.W., Klochkova N.G., Kim G.H. 2014.** An endophytic diatom, *Pseudogomphonema* sp. (Naviculaceae, Bacillariophyceae), lives inside the red alga *Neoabbottiella* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *Phycologia*. 53: 205-214.
- Knogge W 1998.** Fungal pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology*. 1: 324-328.
- Knox J.P. 1992.** Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis. *The Plant Journal*. 2: 137-141.
- Kobayashi Y., Kobayashi I., Funaki Y., Fujimoto S., Takemoto T., Kunoh H. 1997α.** Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of nonhost resistance in barley coleoptile cells. *The Plant Journal*. 11: 525-537.
- Kobayashi I., Kobayashi Y., Hardham A.R. 1997β.** Inhibition of rust-induced hypersensitive response in flax cells by the microtubule inhibitor oryzalin. *Australian Journal of Plant Physiology*. 24: 733-740.
- Kobayashi I., Kobayashi Y. 2008.** Microtubules and pathogen defence. In: *Plant Microtubules*. Peter N. (ed.). Springer Verlag, Berlin. pp. 121-140.
- Kohlmeyer J., Demoulin V. 1981.** Parasitic and symbiotic fungi on marine algae. *Botanica Marina*. 24: 9-18.
- Kolattukudy P.E., Rogers L.M., Li D., Hwang C.S., Flaishman M.A. 1995.** Surface signaling in pathogenesis. *PNAS*. 92: 4080-4087.
- Kraemer G.P., Chapman D.J. 1991.** Biomechanics and alginic acid composition during hydrodynamic adaptation by *Egregia menziesii* (Phaeophyta) juveniles. *Journal of Phycology*. 27: 47-53.
- Kropf D.L., Kloareg B., Quatrano R.S. 1988.** Cell wall is required for fixation of the embryonic axis in *Fucus* zygotes. *Science*. 239: 187-190.

- Kropf D.L., Berge S.K., Quatrano R.S. 1989.** Actin localization during *Fucus* embryogenesis. *The Plant Cell*. 1: 191-200.
- Kropf D.L., Bisgrove S.R., Hable W.E. 1998.** Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Current Opinion in Cell Biology*. 10: 117-122.
- Kuhlenkamp R., Müller D.G. 1985.** Culture studies on the life history of *Haplospora globosa* and *Tilopteris mertensii* (tilopteridales, phaeophyceae). *British Phycological Journal*. 20: 301-312.
- Küpper F.C., Müller D.G. 1999.** Massive occurrence of the heterokont and fungal parasites *Anisolpidium*, *Eurychasma* and *Chytridium* in *Pylaiella littoralis* (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Nova Hedwigia*. 69: 381-389.
- Küpper F.C., Kloareg B., Guern J., Potin P. 2001.** Oligoguluronates elicit an oxidative burst in brown algal kelp, *Laminaria digitata*. *Plant Physiology*. 125: 278-291.
- Küpper F.C., Müller D.G., Peters A.F., Kloareg B., Potin P. 2002.** Oligoalginate recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of Laminariales. *Journal of Chemical Ecology*. 28: 2057-2081.
- Küpper F.C., Carpenter L.J., McFiggans G.B., Palmer C.J., Waite T.J., Boneberg E.M., Woitsch S., Weiller M., Abela R., Grolimund D., Potin P., Butler A., Luther G.W., Kroneck P.M.H., Meyer-Klaucke W., Feiter M.C. 2008.** Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *PNAS*. 105: 6954-6958.
- Küpper F.C., Gaquerel E., Cosse A., Adas F., Peters A.F., Müller D.G., Kloareg B., Salaün J.P., Potin P. 2009.** Free fatty acids and methyl jasmonate trigger defense reactions in *Laminaria digitata*. *Plant and Cell Physiology*. 50: 789-800.
- Kutsuna N., Kumagai F., Sato M.H., Hasezawa S. 2003.** Three-dimensional reconstruction of tubular structure of vacuolar membrane throughout mitosis in living tobacco cells. *Plant and Cell Physiology*. 44: 1045-1054.
- Lamour K.H., Win J., Kamoun S. 2007.** Oomycete genomics: new insights and future directions. *FEMS Microbiology Letters*. 274: 1-8.
- Le Bail A., Billoud B., Maisonneuve C., Peters A.F., Cock J.M., Charrier B. 2008.** Early development of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) sporophyte. *Journal of Phycology*. 44: 1269-1281.

- Le Bail A., Billoud B., Kowalczyk N., Kowalczyk M., Gicquel M., Le Panse S., Stewart S., Scornet D., Cock J.M., Ljung K., Charrier B. 2010.** Auxin metabolism and function in the multicellular brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant Physiology*. 153: 128-144.
- Lee R.E. 1999.** Phycology- 3rd edition. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Lehnen Jr L.P., Powell M.J. 1989.** The role of kinetosome-associated organelles in the attachment of encysting secondary zoospores of *Saprolegnia ferax* to substrates. *Protoplasma*. 149: 163-174.
- Letcher P.M., Velez C.G., Barrantes M.E., Powell M.J., Churchill P.F., Wakefield W.S. 2008.** Ultrastructural and molecular analyses of Rhizophydiales (Chytridiomycota) isolates from North America and Argentina. *Mycological Research*. 112: 759-782.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. 2000.** Molecular Cell Biology. Fourth edition. Freeman W.H. and Company, New York.
- Loiseaux-de Goër S., Noailles M.C. 2008.** *Algues de Roscoff*. Roscoff: Editions de la Station Biologique de Roscoff.
- Lowry D.S., Roberson R.W. 1997.** Microtubule organization during zoosporogenesis in *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma*. 196: 45-54.
- Luna E., Pastor V., Robert J., Flors V., Mauch-Mani B., Ton J. 2011.** Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24: 183-193.
- Maier I., Parodi E., Westermeier R., Müller D.G. 2000.** *Maullinia ectocarpii* gen. et sp. nov. (Plasmodiophorea), an Intracellular Parasite in *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) and other Filamentous Brown Algae. *Protist*. 151: 225-238.
- Maier I., Müller D.G., Katsaros C. 2002.** Entry of the DNA virus, *Ectocarpus fasciculatus* virus type 1 (Phycodnaviridae), into host cell cytosol and nucleus. *Phycological Research*. 50: 227-231.
- Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. 1992.** Microtubule oscillations. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 22: 235-244.
- Martin R.W., Miller C.E. 1986.** Ultrastructure of mitosis in the endoparasite *Olpidiopsis varians*. *Mycologia*. 78: 11-21.

- Mélida H., Sandoval-Sierra J.V., Diéguez-Uribeondo J., Bulone V. 2013.** Analyses of extracellular carbohydrates in oomycetes unveil the existence of three different cell wall types. *Eukaryotic Cell*. 12: 194-203.
- Melkonian M., Beech P.L., Katsaros C., Schultze D. 1992.** Centrin-mediated cell motility. In: *Algal cell motility*. Melkonian M. (ed.). London: Chapman and Hall. pp. 179-221.
- Menzel D. 1986.** Visualization of cytoskeletal changes through the life cycle in *Acetabularia*. *Protoplasma*. 134: 30-42.
- Michel G., Tonon T., Scornet D., Cock J.M., Kloareg B. 2010α.** The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytologist*. 188: 82-97.
- Michel G., Tonon T., Scornet D., Cock J.M., Kloareg B. 2010β.** Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. *New Phytologist*. 188: 67-81.
- Miller D.D., Lancelle S.A., Hepler P.K. 1996.** Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips. *Protoplasma*. 195: 123-132.
- Moritz M., Agard D.A. 2001.** γ-Tubulin complexes and microtubule nucleation. *Current opinion in structural biology*. 11: 174-181.
- Mtolera M.S.P., Collen J., Pedersen M., Ekdahl A., Abrahamson K., Semesi A.K. 1996.** Stress-induced production of volatile halogenated organic compounds in *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) caused by elevated pH and high light intensities. *European Journal of Phycology*. 31: 89-95.
- Müller D.G. 1986.** Apomeiosis in *Acinetospora* (Phaeophyceae, Ectocarpales). *Helgoländer Meeresuntersungen*. 40: 219-224.
- Müller D.G. 1991.** Mendelian segregation of a virus genome during host meiosis in the marine brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Journal of Plant Physiology*. 137: 739-743.
- Müller D.G., Falk H. 1973.** Flagellar structure of the gametes of *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyta) as revealed by negative staining. *Archiv für Mikrobiologie*. 91: 313-322.
- Müller D.G., Kawai H, Stache B., Lanka S. 1990.** A virus infection in the marine brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *Botanica Acta*. 103: 72-82.

- Müller D.G., Stache B. 1992.** Worldwide occurrence of virus-infections in filamentous marine brown algae. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*. 46: 1-8.
- Müller D.G., Kapp M., Knippers R. 1998.** Viruses in marine brown algae. *Advances in Virus Research*. 50: 49-67.
- Müller D.G., Küpper F.C., Küpper H. 1999.** Infection experiments reveal broad host ranges of *Eurychasma dicksonii* (Oomycota) and *Chytridium polysiphoniae* (Chytridiomycota), two eukaryotic parasites of marine brown algae (Phaeophyceae). *Phycological Research*. 47: 217-223.
- Munn E.A. 1970.** Fine structure of basal bodies (kinetosomes) and associated components of *Tetrahymena*. *Tissue and Cell*. 2: 499-512.
- Nagasato C., Motomura T., Ichimura T. 2000.** Spindle formation in caryogamy-blocked zygotes of the isogamous brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *European Journal of Phycology*. 35: 339-347.
- Nagasato C., Motomura T. 2002.** Ultrastructural study on the mitosis and cytokinesis in *Scytosiphon lomentaria* zygotes (Scytosiphonales, Phaeophyceae) by freeze-substitution. *Protoplasma*. 219: 140-149.
- Nagasato C., Uemori C., Kato A., Motomura T. 2004.** Characterization of centrin genes from *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) and *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Phycological Research*. 52: 266-272.
- Nagasaki K. 2008.** Dinoflagellates, diatoms, and their viruses. *The Journal of Microbiology*. 46: 235-243.
- Naton B., Hahlbrock K., Schmelzer E. 1996.** Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiology*. 112: 433-444 .
- Díez-Navajas A.M., Greif C., Poutaraud A., Merdinoglu D. 2007.** Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. *Micron*. 38: 680-683.
- Nedelcu A.M., Driscoll W.W., Durand P.M., Herron M.D., Rashidi A. 2011.** On the paradigm of altruistic suicide in the unicellular world. *Evolution*. 65: 3-20.

- Nelson D.R, Jaffe L.F. 1973.** Cells without cytoplasmic movements respond to cytochalasin. *Developmental Biology*. 30: 206-208.
- Neuhauser S., Kirchmair M., Gleason F.H. 2011.** The ecological potentials of Phytomyxea ("plasmodiophorids") in aquatic food webs. *Hydrobiologia*. 659: 23-35.
- Neuhauser S., Gleason F.H., Kirchmair M. 2012.** Phytomyxea (Super-group Rhizaria). In: *Marine Fungi and fungal-like organisms*. Jones E.B.G., Pang K.L. (eds). De Gruyter, Berlin, Germany. pp. 245-252.
- Neushul M., Dahl A.L. 1972.** Zonation in the apical cell of *Zonaria*. *American Journal of Botany*. 59: 393-400.
- Nikaido I., Asamizu E., Nakajima M., Nakamura Y., Saga N., Tabata S. 2000.** Generation of 10,154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, *Porphyra yezoensis*. *DNA Research*. 7: 223-227.
- Nolan R.A. 1972.** *Asteromyces cruciatus* from North America. *Mycologia*. 64: 430-433.
- North W.J. 1994.** Review of *Macrocystis* biology. In: Akatsuka I. (ed.) *Biology of Economic Algae*, SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, pp. 447-528.
- Norton T.A., Melkonian M., Andersen R.A. 1996.** Algal biodiversity. *Phycologia*. 35: 308-326.
- Oakley B.R. 2000.** g-Tubulin. *Current Topics in Developmental Biology*. 49: 27-54.
- Oakley B.R., Oakley C.E., Yoon Y., Jung M.K. 1990.** g-Tubulin is a component of the spindle-pole-body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*. 61: 1289-1301.
- Overton S.V., Tharp T.P., Bland C.E. 1983.** Fine structure of swimming, encysting and germinating spores of *Haliphthoros milfordensis*. *Canadian Journal of Botany*. 61: 1165-1177.
- Oudot-Le Secq M.P., Fontaine J.M., Rousvoal S., Kloareg B., Loiseaux-de Goër S. 2001.** The complete sequence of a brown algal mitochondrial genome, the Ectocarpale *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *Journal of Molecular Evolution*. 53: 80-88.
- Panteris E., Apostolakos P., Galatis B. 1992.** The organization of F-actin in root tip cells of *Adiantum capillus-veneris* throughout the cell cycle: a double label fluorescence microscopy study. *Protoplasma*. 170: 128-137.

- Panteris E., Apostolakos P., Gräf R., Galatis B. 2000.** Gamma-tubulin colocalizes with microtubule arrays and tubulin paracrystals in dividing vegetative cells of higher plants. *Protoplasma*. 210: 179-187.
- Panteris E., Apostolakos P., Quader H., Galatis B. 2004.** A cortical cytoplasmic ring predicts the division plane in vacuolated cells of *Coleus*: the role of actomyosin and microtubules in the establishment and function of the division site. *New Phytologist*. 163: 271-286.
- Parker B.C. 1964.** Chemical nature of sieve tube callus in *Macrocystis*. *Phycologia*. 4: 27-28.
- Pavia H., Toth G. 2000.** Inducible chemical resistance in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology*. 81: 3212-3225.
- Pedersen P.M., Kristiansen A. 2001.** On the enigmatic brown alga *Acinetospora crinita* (Ectocarpales, Fucophyceae). *Cryptogamie Algologie*. 22: 209-218.
- Percival E. 1979.** The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal*. 14: 103-117.
- Peters A.F. 2003.** Molecular identification, distribution and taxonomy of brown algal endophytes, with emphasis on species from Antarctica. In: *Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium*. Chapman A. R. O., Anderson R. J., Vreeland V. J., Davison I. R. (eds). Cape Town, South Africa. pp. 293-301.
- Peters A.F., Marie D., Scornet D., Kloareg B., Cock J.M. 2004.** Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics. *Journal of Phycology*. 50: 1079-1088.
- Petersen E.E., Semon M.J., Kerwin J.L., Brower J.M. 1997.** Regulation of attachment, germination, and appressorium formation by zoospores of *Lagenidium giganteum* and related oomycetes by chitin, chitosan and catecholamines. *Protoplasma*. 197: 96-110.
- Petersen H.E. 1905.** Contributions à la connaissance des phycomycètes marins (Chytridinae Fischer). *Kgl Danske Videnskabernes Selskabs Forhandling*. 5: 439-488.
- Phillips A.J., Anderson V.L., Robertson E.J., Secombes C.J., van West P. 2008.** New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology*. 16: 13-19.

- Potin P., Bouarab K., Kuepper F.C., Kloareg B. 1999.** Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 2: 276-283.
- Potin P., Bouarab K., Salaün J.P., Pohnert G., Kloareg B. 2002.** Biotic interactions of marine algae. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 308-317.
- Potin P. 2008.** Oxidative burst and related responses in biotic interactions of algae. In: *Algal chemical ecology*. Springer Verlag, Berlin. pp. 245-271.
- Pu R., Wozniak M., Robinson K.R. 2000.** Cortical actin filaments form rapidly during photopolarization and are required for the development of calcium gradients in *Pelvetia compressa* zygotes. *Developmental Biology*. 222: 440-449.
- Pueschel C.M., van der Meer J.P. 1985.** Ultrastructure of the fungus *Petersenia palmariae* (Oomycota) parasitic on the alga *Palmaria molis* (Rhodophyceae). *Canadian Journal of Botany*. 63: 409-418.
- Qu X., Christ B.J. 2007.** In vitro culture of the obligate parasite *Spongospora subterranean* (Cercozoa; Plasmodiophorida) associated with root-inducing transferred-DNA transformed potato hairy roots *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 54: 465-467.
- Quatrano R.S. 1973.** Separation of process associated with differentiation of two-celled *Fucus* embryos. *Developmental Biology*. 30: 209-213.
- Quatrano R.S.. 1997.** Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. *Trends in Plant Science*. 2: 15-21.
- Ragan M.A., Glombitza K.W. 1986.** Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycological Research*. 4: 129-241.
- Raghukumar C. 1980α.** An ultrastructural study of the marine diatom *Licmophora hyalina* and its parasite *Ectrogella perforans*. I. Infection of host cells. *Canadian Journal of Botany*. 58: 1280-1290.
- Raghukumar C. 1980β.** An ultrastructural study of the marine diatom *Licmophora hyalina* and its parasite *Ectrogella perforans*. II. Development of the fungus in its host. *Canadian Journal of Botany*. 58: 2557-2574.

- Ramonell K.M., Zhang B., Ewing R.M., Chen Y., Xu D., Stacey G., Somerville S. 2002.** Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*. 3: 301-311.
- Reyes-Prieto A., Weber A.P., Bhattacharya D. 2007.** The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annual Review of Genetics*. 41: 147-168.
- Richards T.A., Dacks J.B., Jenkinson J.M., Thornton C.R., Talbot N.J. 2006.** Evolution of filamentous pathogens: gene exchange across eukaryote kingdoms. *Current Biology*. 16: 1857-1864.
- Rindi F., Guiry M.D., 2004.** Composition and spatio temporal variability of the epiphytic macroalgal assemblage of *Fucus vesiculosus* Linnaeus at Clare Island, Mayo, western Ireland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 311: 233-252.
- Robb E.J., Barron G.L. 1982.** Nature's ballistic missile. *Science*. 218: 1221-1222.
- Robold A.V., Hardham A.R. 2005.** During attachment *Phytophthora* spores secrete proteins containing thrombospondin type 1 repeats. *Current Genetics*. 47: 307-315.
- Rosenvigne L.K., Lund S. 1941.** The marine algae of Denmark. II. Phaeophyceae. I. Ectocarpaceae and Acinetosporaceae. Kongelige Danske Videnskabernes Selskab, Biologiske Skrifter. 1: 1-79.
- Rousseau F., de Reviers B. 1999.** Circumscription of the order Ectocarpales (Phaeophyceae): bibliographical synthesis and molecular evidence. *Cryptogamie Algologie*. 20: 5-18.
- Ruiz G.M., Rawlings T.K., Dobbs F.C., Drake L.A., Mullady T., Huq A., Colwell R.R. 2000.** Global spread of microorganisms by ships. *Nature*. 408: 49-50.
- Rusig A.M., Le Guyader H., Ducreux G. 1993.** Microtubule organization in the apical cell of *Sphacelaria* (Phaeophyceae) and its related protoplast. *Hydrobiologia*. 260/261: 167-172.
- Rusig A.M., Le Guyader H., Ducreux G. 1994.** Dedifferentiation and microtubule reorganization in the apical cell protoplast of *Sphacelaria* (Phaeophyceae). *Protoplasma*. 179: 83-94.
- Ryan C.A., Pearce G. 1998.** Systemin: A polypeptide signal for plant defensive genes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1998: 1-17.
- Salisbury J.L. 2004.** Centrosomes: Sfi1p and centrin unravel a structural riddle. *Current Biology*. 14: R27-R29.

- Schatz S. 1983.** The developmental morphology and life history of *Phycomelaina laminariae*. *Mycologia*. 75: 762-772.
- Schatz S. 1984.** Degradation of *Laminaria saccharina* by saprobic fungi. *Mycologia*. 76: 426-432.
- Schnepf E., Deichgräber G., Drebes G. 1977.** Development and ultrastructure of marine, parasitic oomycete, *Lagenisma coscinodisci* (Lagenidiales): sexual reproduction. *Canadian Journal of Botany*. 56: 1315-1325.
- Schnepf E., Deichgräber G., Drebes G. 1978.** Development and ultrastructure of the marine, parasitic oomycete, *Lagenisma coscinodisci* Drebes (Lagenidiales): the infection. *Archives of Microbiology*. 116: 141-150.
- Schnepf E., Schweikert M. 1997.** *Pirsonia*, phagotrophic nanoflagellates incertae sedis, feeding on marine diatoms: attachment, fine structure and taxonomy. *Archiv für Protistenkunde*. 147: 361-371.
- Schnepf E., Kühn S.F. 2000.** Food uptake and fine structure of *Cryothecomonas longipes* sp. nov., a marine nanoflagellate incertae sedis feeding phagotrophically on large diatoms. *Helgoland Marine Research*. 54: 18-32.
- Schoenwaelder M.E.A., Wiencke C. 2000.** Phenolic compounds in the embryo development of several northern hemisphere fucoids. *Plant Biology*. 2: 24-33.
- Schüssler A., Hirn S., Katsaros C. 2003.** Cellulose synthesizing terminal complexes and morphogenesis in tip-growing cells of *Syringoderma phinneyi* (Phaeophyceae). *Phycological Research*. 51: 35-44.
- Sekimoto S., Hatai K., Honda D. 2007.** Molecular phylogeny of an unidentified *Haliphthoros*-like marine oomycete and *Haliphthoros milfordensis* inferred from nuclear-encoded small and large subunit rDNA genes and mitochondrial-encoded cox2 gene. *Mycoscience*. 48: 212-221.
- Sekimoto S., Yokoo K., Kawamura Y., Honda D. 2008α.** Taxonomy, molecular phylogeny, and ultrastructural morphology of *Olpidiopsis porphyrae* sp. nov. (Oomycetes, stramenopiles), a unicellular obligate endoparasite of *Porphyra* spp. (Bangiales, Rhodophyta). *Mycological Research*. 112: 361-374.
- Sekimoto S., Beakes G.W., Gachon C.M.M., Müller D.G., Küpper F.C., Honda D. 2008β.** The development, ultrastructural cytology, and molecular phylogeny of the basal oomycete

Eurychasma dicksonii, infecting the filamentous phaeophyte algae *Ectocarpus siliculosus* and *Pylaiella littoralis*. *Protist*. 159: 401-412.

Sekimoto S., Klochkova T.A., West J.A., Beakes, G.W., Honda D. 2009. *Olpidiopsis bostrychia* sp. nov.: an endoparasitic oomycete that infects *Bostrychia* and other red algae (Rhodophyta). *Phycologia*. 48: 460-472.

Sekimoto S., Rochon D.A., Long J.E., Dee J.M., Berbee M.L. 2011. A multigene phylogeny of *Olpidium* and its implications for early fungal evolution. *BMC Evolutionary Biology*. 11: 331.

Shibuya N., Minami E. 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 59: 223-233.

Sime-Ngando T., Lefèvre E., Gleason F.H. 2011. Hidden diversity among aquatic heterotrophic flagellates: ecological potentials of zoosporic fungi. *Hydrobiologia*. 659: 5-22.

Singh A., Nigamb P.S., Murphya J.D. 2011. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*. 102: 10-16.

Sonobe S., Shibaoka H. 1989. Cortical fine actin filaments in higher plant cells visualized by rhodamine-phalloidin after pretreatment with m-maleimidobenzoyl N-hydroxysuccinimide ester. *Protoplasma*. 148: 80-86.

Sorhannus U., 2001. A “Total Evidence” Analysis of the Phylogenetic Relationships among the Photosynthetic Stramenopiles. *Cladistics*. 17: 227-241.

Sparrow F.K. 1960. Aquatic Phycomycetes, second edn. The University of Michigan Press, Ann Arbor, MI.

Starr R. 1978. The culture collection at University of Texas at Austin. *Journal of Phycology*. 14: 47-200.

Staufenberger T., Thiel V., Wiese J., Imhoff J.F. 2008. Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*. *FEMS Microbiology Ecology*. 64: 65-77.

Stefels J., Steinke M., Turner S., Malin G., Belviso S. 2007. Environmental constraints on the production and removal of the climatically active gas dimethylsulphide (DMS) and implications for ecosystem modelling. *Biogeochemistry*. 83: 245-275.

- Stengel D.B., Connan S., Popper Z.A. 2011.** Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology advances*. 29: 483-501.
- Stoppin-Mellet V., Peter C., Lambert A.M. 2000.** Distribution of g-tubulin in higher plant cells: cytosolic g-tubulin is part of a high molecular weight complex. *Plant Biology*. 2: 290-296.
- Strittmatter M., Gachon C.M.M., Küpper F.C. 2009.** Ecology of lower oomycetes. In: *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions and research tools*. Lamour K., Kamoun S. (eds). Hoboken: John Wiley and Sons Inc. pp. 25-46.
- Strittmatter M., Müller D.G., Gachon C.M.M., Kleinteich J., Heesch S., Tsirigoti A., Katsaros C., Kostopoulou-Karadanelli M., Küpper F.C. 2013.** New records of intracellular eukaryotic pathogens of brown macroalgae in the East Mediterranean Sea with emphasis on LSU rRNA data of the oomycete pathogen *Eurychasma dicksonii*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 104: 1-11.
- Sunda W., Kieber D.J., Kiene R.P., Huntsman S. 2002.** An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature*. 418: 317-320.
- Sutherland G.K. 1915.** New marine phycomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*. 5: 147-155.
- Suttle C.A. 2005.** Viruses in the sea. *Nature*. 437: 356-361.
- Suttle C.A. 2007.** Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*. 5: 801-812.
- Suttle, C.A., Chan A.M., Cottrell M.T. 1990.** Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature*. 347: 467-469.
- Takemoto D., Jones D.A., Hardham A.R. 2003.** GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of *Arabidopsis* by oomycete pathogens. *Plant Journal*. 33: 775-792.
- Takemoto D., Hardham A.R. 2004.** The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants. *Plant Physiology*. 136: 3864-3876.
- Temminck J.H.M., Campbell R.N. 1969.** The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. III. Infection of host roots. *Canadian Journal of Botany*. 47: 421-424.

- Terauchi M., Nagasato C., Kajimura N., Mineyuki Y., Okuda K., Katsaros C., Motomura T. 2012.** Ultrastructural Study on Plasmodesmata in the Brown Alga *Dictyota dichotoma* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Planta*. 236: 1013-1026.
- Thomas F., Cosse A., Le Panse S., Kloareg B., Potin P., Leblanc C. 2014.** Kelps feature systemic defense responses: insights into the evolution of innate immunity in multicellular eukaryotes. *New Phytologist*. DOI: 10.1111/nph.12925.
- Tokida J. 1958.** A review of galls in seaweeds. *Bulletin of the Japanese Society of Phycology*. 6: 93-99.
- Toth G.B., Pavia H. 2002.** Lack of phlorotannin induction in the kelp *Laminaria hyperborea* in response to grazing by two gastropod herbivores. *Marine Biology*. 140: 403-409.
- Tsirigoti A., Küpper, F.C., Gachon, C.M.M., Katsaros, C. 2013.** Filamentous brown algae infected by the marine, holocarpic oomycete *Eurychasma dicksonii*: first results on the organization and the role of cytoskeleton in both host and parasite. *Plant Signaling and Behavior*. 8 (11): e26367.
- Tsirigoti A., Küpper F.C., Gachon C.M.M., Katsaros C. 2014α.** Cytoskeleton organisation during the infection of three brown algal species, *Ectocarpus siliculosus*, *Ectocarpus crouaniorum* and *Pylaiella littoralis*, by the intracellular marine oomycete *Eurychasma dicksonii*. *Plant Biology*. 16: 272-281.
- Tsirigoti, A., Hervé, C., Beakes, G., Gachon, C.M.M., Katsaros, C. 2014β.** Attachment, penetration and early host defense mechanisms of *Eurychasma dicksonii* infecting filamentous brown algae. *Protoplasma*. DOI: 10.1007/s00709-014-0721-1.
- Tsirigoti A., Kariofili E., Hervé C., Gachon C.M.M., Katsaros C.** Cell wall components analysis and their contribution to the recognition mechanisms between filamentous brown algae and the marine pathogen *Eurychasma dicksonii* (υπό προετοιμασία).
- Tsui C.K.M., Marshall W., Yokoyama R., Honda D., Lippmeier J.C., Craven K.D., Berbee M.L. 2006.** Labryinthulomycetes phylgeneny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 50: 129-140.

- Underwood M. 2012.** The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*. DOI: 10.3389/fpls.2012.00085.
- Uppalapati S.R., Fujita Y. 2000.** Carbohydrate regulation of attachment, encystment, and appressorium formation by *Pythium porphyrae* (Oomycota) zoospores on *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 36: 359-366.
- Uppalapati S.R., Fujita Y. 2001α.** The relative resistances of *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta) to infection by *Pythium porphyrae* (Peronosporales, Oomycota). *Botanica Marina*. 44: 1-7.
- Uppalapati S.R., Kerwin J.L., Fujita Y. 2001β.** Epifluorescence and scanning electron microscopy of host-pathogen interactions between *Pythium porphyrae* (Peronosporales, Oomycota) and *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Botanica Marina*. 44: 139-145.
- Vairappan C.S., Suzuki M., Motomura T., Ichimura T. 2001.** Pathogenic bacteria associated with lesions and thallus bleaching symptoms in the Japanese kelp *Laminaria religiosa* Miyabe (Laminariales, Phaeophyceae). *Hydrobiologia*. 445: 183-191.
- Vardi A., Berman T., Frank I., Rozenberg T., Hadas O., Kaplan A., Levine A. 1999.** Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress. *Current Biology*. 9: 1061-1064.
- Varvarigos V., Katsaros C., Galatis B. 2004.** Radial F-actin configurations are involved in polarization during protoplast germination and thallus branching of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae, Laminariales). *Phycologia*. 43: 693-702.
- Varvarigos V., Galatis B., Katsaros C. 2005.** A unique pattern of F-actin organization supports cytokinesis in vacuolated cells of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae) gametophytes. *Protoplasma*. 226: 241-245.
- Varvarigos V., Galatis B., Katsaros C. 2007.** Radial endoplasmic reticulum arrays co-localize with radial F-actin in polarizing cells of brown algae. *European Journal of Phycology*. 42: 253-262.
- Vaughn K.C., Harper J.D.I. 1998.** Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. *International Review of Cytology*. 181: 75-149.

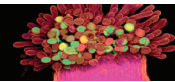
- Vleeshouwers V.G.A.A., van Dooijeweert W., Govers F., Kamoun S., Colon L.T. 2000.** The hypersensitive response is associated with host and non-host resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*. 210: 853-864.
- Voigt C.A. 2014.** Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science*. DOI: 10.3389/fpls.2014.00168.
- Vorwerk S., Somerville S., Somerville C. 2004.** The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*. 9: 203-209.
- Walker S.K., Chitcholtan K., Yu Y.P., Christenhusz G.M., Garrill A. 2006.** Invasive hyphal growth: an F-actin depleted zone is associated with invasive hyphae of the oomycetes *Achlya bisexualis* and *Phytophthora cinnamomi*. *Fungal Genetics and Biology*. 43: 357-365.
- Wang G., Shuai L., Li Y., Lin W., Zhao X., Duan D. 2008.** Phylogenetic analysis of epiphytic marine bacteria on Hole-Rotten diseased sporophytes of *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology*. 20: 403-409.
- Wang G., Lu B., Shuai L., Li D., Zhang R. 2014.** Microbial diseases of nursery and field-cultivated *Saccharina japonica* (Phaeophyta) in China. *Algological studies*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1127/1864-1318/2014/0167>.
- Wasteneys G.O., Galway M.E. 2003.** Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 691-722.
- Waterkeyn L. 1981.** Cytochemical localization and function of the 3-linked glucan callose in the developing cotton fibre cell wall. *Protoplasma*. 106: 49-67.
- Weinberger F., Friedlander M., Hoppe H.G. 1999.** Oligoagars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 35: 747-755.
- Weinberger F., Friedlander M. 2000.** Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading epiphytes. *Journal of Phycology*. 36: 1079-1086.
- Weinberger F., Richard C., Kloareg B., Kashman Y., Hoppe H.G., Friedlander M. 2001.** Structure-activity relationships of oligoagar elicitors towards *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 37: 418-426.

- Weinberger F., Pohnert G., Berndt M.L., Bouarab K., Kloareg B., Potin P. 2005.** Apoplastic oxidation of L-asparagine is involved in the control of the green algal endophyte *Acrochaete operculata* Correa & Nielsen by the red seaweed *Chondrus crispus* Stackhouse. *Journal of Experimental Botany*. 56: 1317-1326.
- Weisemeier T., Jahn K., Pohnert G. 2008.** No evidence for the induction of brown algal chemical defense by the phytohormones jasmonic acid and methyl jasmonate. *Journal of Chemical Ecology*. 34: 1523-1531.
- van West P. 2006.** *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist*. 20: 99-104.
- Wick S.M. 1985.** Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. III. Transition between mitotic/cytokinetic and interphase microtubule arrays. *Cell Biology International Reports*. 9: 357-371.
- Willoughby L.G. 1977.** An abbreviated life cycle in the salmonid fish *Saprolegnia*. *Transactions of the British Mycological Society*. 69: 133-135.
- Wolf S., Maier I., Katsaros C., Müller D.G. 1998.** Virus assembly in *Hincksia hincksiae* (Ectocarpales, Phaeophyceae). An electron and fluorescence microscope study. *Protoplasma*. 203: 153-167.
- Woodward A.W., Bartel B. 2005.** Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*. 95: 707-735.
- Woodward F.I. 2007.** Global primary production. *Current Biology*. 17: 269-273.
- Zhang Z.Q., Li Q., Li Z.M., Staswick P.E., Wang M., Zhu Y., He Z. 2007.** Dual regulation role of GH_{3.5} in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiology*. 145: 450-464.
- Zuccarello G.C., Moon D., Goff L.J. 2004.** A phylogenetic study of parasitic genera placed in the family Chlorellaceae (Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 40: 937-945.
- Zuccaro A., Sculz B., Mitchell J.I. 2003.** Molecular detection of ascomycetes associated with *Fucus serratus*. *Mycological Research*. 107: 1451-1466.

Zuccaro A., Mitchell J.I. 2005. Fungal communities of seaweeds. In: *The fungal community: its organization and role in the ecosystem, Third edition*. Dighton J., White J.F., Oudemans P. (eds). Taylor & Francis Group, U.S.A. pp. 533-580.

Zuccaro A., Schoch C.L., Spatafora J.W., Kohlmeyer J., Draeger S., Mitchell J.I. 2008. Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. *Applied Environmental Microbiology*. 74: 931-941.

VII. Δημοσιεύσεις



RESEARCH PAPER

Cytoskeleton organisation during the infection of three brown algal species, *Ectocarpus siliculosus*, *Ectocarpus crouaniorum* and *Pylaiella littoralis*, by the intracellular marine oomycete *Eurychasma dicksonii*

A. Tsirigoti¹, F. C. Küpper², C. M. M. Gachon³ & C. Katsaros¹

¹ Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Athens, Greece

² Oceanlab, University of Aberdeen, Newburgh, UK

³ Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), Scottish Association for Marine Science (SAMS), Oban, UK

Keywords

Actin; brown algae; cytoskeleton; host; infection; microtubule; oomycete.

Correspondence

C. Katsaros, Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 84, Greece.
E-mail: christos.katsaros@biol.uoa.gr

Editor

S. Wick

Received: 27 November 2012; Accepted: 20 March 2013

doi:10.1111/plb.12041

ABSTRACT

Oomycete diseases in seaweeds are probably widespread and of significant ecological and economic impact, but overall still poorly understood. This study investigates the organisation of the cytoskeleton during infection of three brown algal species, *Pylaiella littoralis*, *Ectocarpus siliculosus*, and *Ectocarpus crouaniorum*, by the basal marine oomycete *Eurychasma dicksonii*. Immunofluorescence staining of tubulin revealed how the development of this intracellular biotrophic pathogen impacts on microtubule (MT) organisation of its algal host. The host MT cytoskeleton remains normal and organised by the centrosome until very late stages of the infection. Additionally, the organisation of the parasite's cytoskeleton was examined. During mitosis of the *E. dicksonii* nucleus the MT focal point (microtubule organisation centre, MTOC, putative centrosome) duplicates and each daughter MTOC migrates to opposite poles of the nucleus. This similarity in MT organisation between the host and pathogen reflects the relatively close phylogenetic relationship between oomycetes and brown algae. Moreover, actin labelling with rhodamine-phalloidin in *E. dicksonii* revealed typical images of actin dots connected by fine actin filament bundles in the cortical cytoplasm. The functional and phylogenetic implications of our observations are discussed.

INTRODUCTION

Brown seaweeds represent an estimated 70% of the biomass on cold and temperate rocky seashores, and the commercial cultivation of brown algae continues to increase (Duarte *et al.* 2009). They are harvested and cultivated for food and the pharmaceutical industry, and increasingly as a possible biofuel source (Singh *et al.* 2011). This ecological and commercial interest has led to increased scientific research on brown algae, culminating in the recently accomplished *Ectocarpus* genome project (Cock *et al.* 2010). Indeed, *Ectocarpus* has become one of the most important experimental macroalgal models available (reviewed in Peters *et al.* 2004) and it can conveniently be cultured in small volumes of seawater-based and artificial media. Several hundred fully characterised strains are available in the public domain (Gachon *et al.* 2007) and both routine protocols for isolating into axenic culture (Müller *et al.* 2008) and cryopreservation (Heesch *et al.* 2012) have been developed.

Macroalgae, like all other terrestrial and marine organisms, face a constant onslaught from pathogens, including viruses, bacteria and fungi (Potin *et al.* 2002). Pathogens affect algal populations, impacting their reproduction or energy metabolism, and can also cause significant crop losses in intensive algal aquaculture (Gachon *et al.* 2010). The impact of viruses and various eukaryotic pathogens in the oceans are well-covered

subjects (Suttle 2005; Bidle & Vardi 2011). Even though oomycetes are well known for their ecological and economic impact in terrestrial and freshwater systems, oomycete pathogens affecting seaweeds remain poorly explored. Despite a substantial body of older work (e.g., Sparrow 1960; reviewed in Strittmatter *et al.* 2009), oomycetes parasitising marine brown algae have only been sparsely studied over the last two decades (Müller *et al.* 1999; Gachon *et al.* 2009), even though epidemic outbreaks have been reported (Küpper & Müller 1999).

Eurychasma dicksonii is an intracellular, holocarpic marine oomycete infecting at least 45 species of brown seaweeds (Müller *et al.* 1999). Molecular data support the basal phylogenetic position of *E. dicksonii* in the oomycete lineage (Küpper *et al.* 2006; Sekimoto *et al.* 2008). A study of the morphological development and ultrastructural cytology of *E. dicksonii* of Sekimoto *et al.* (2008) described the basic stages of the infection on *Ectocarpus siliculosus* and *Pylaiella littoralis*. However, the cytoskeleton organisation of both host and parasite remains unexplored.

Within this context, the present study aims to contribute new insights on the host and parasite cytoskeleton organisation and the possible reactions of the three brown algal host species studied, with the ultimate objective of further elucidating the physiological relationships between *E. dicksonii* and its brown algal hosts, especially within the Ectocarpaceae.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and culture conditions

Two clonal strains of *Ectocarpus siliculosus* (CCAP 1310/4, CCAP 1310/56), one strain of *Ectocarpus crouaniorum* (CCAP 1310/300; Peters *et al.* 2010) and one strain of *Pylaiella littoralis* (CCAP 1330/3) from the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) were used. Each unialgal strain was infected with a given strain of *E. dicksonii* (CCAP 4018/1, CCAP 4018/2, CCAP 4018/3). These *Eurychasma* strains are morphologically indistinguishable, but differ in their geographic origin and host range (Gachon *et al.* 2009). Accordingly, the susceptible cultures that were used originate from the following four combinations: 1310/4-4018/1, 1330/3-4018/2, 1310/300-4018/3, 1310/56-4018/3.

Female *Macrocystis pyrifera* (CCAP 1323/1) gametophytes do not release motile propagules and can be infected with all *Eurychasma* strains mentioned above. Hence, *M. pyrifera* was used as an inoculum to infect target hosts, as described in Gachon *et al.* (2009).

All cultures were grown in half-strength Provasoli medium (Starr & Zeikus 1987), at 12 °C, under a 12 h:12 h photoperiod with a light intensity of 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. All strains were provided by CCAP.

Cytoskeleton labelling

For tubulin immunolocalisation, thalli of *E. siliculosus*, *E. crouaniorum* and *P. littoralis* infected with *E. dicksonii* were fixed in 4% paraformaldehyde in microtubule (MT) stabilising buffer (MTB; 50 mM PIPES, 5 mM ethyleneglycolbis (aminoethyl ether)-tetraacetic acid (EGTA), 5 mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 mM KCl, 4% NaCl, 2.5% polyvinylpyrrolidone 25 (PVP), 1 mM DL-dithiothreitol (DTT), pH 7.4) for 1 h. The samples were then washed thoroughly with MTB, and the MTB was gradually replaced by phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 5.1 mM Na_2HPO_4 , 1.7 mM KH_2PO_4 , 0.01% NaN_2 , pH 7.4). After washing, the samples were transferred to a solution of 6% abalone acetone powder (Sigma, discontinued), 4% cellulase Onozuka R-10 (Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan), 5% limpet acetone powder (Sigma, discontinued), 5% hemicellulase (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2% macerozyme R-10 (Yakult) and 2% pectinase (Sigma) in PBS and incubated for 40 min at room temperature. After the enzyme treatment, the samples were washed with PBS and extracted for 45 min with 4% Triton X-100 in PBS. After washing with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA), the samples were incubated overnight at room temperature with a monoclonal anti-tubulin antibody (MAS 078 rat IgG clone YOL 1/34 Serotec) diluted 1:40 in PBS containing 1% BSA. After rinsing with PBS containing 1% BSA, the specimens were incubated for 2 h at 37 °C with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated IgG (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) diluted 1:40 in PBS-1% BSA. Washing with PBS followed, and then DNA staining for 15 min with 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in PBS. The samples were mounted with a solution of 1.6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ p-phenylen-diamine (Sigma) diluted in a solution containing 2:1 glycerol:PBS. For confocal laser scanning microscopy (CLSM), the secondary antibody was the Rhodamine conjugate ImmunoPure™ Goat Anti-Rat IgG, (H+L) (Thermo-Scientific, Pr. No. 31680); instead of FITC, the DNA staining was

accomplished with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) and the samples were mounted on a slide using anti-fading agent (Slowfade; Invitrogen, Paisley, UK).

The actin labelling in *E. dicksonii* spores was accomplished with a slightly modified version of the protocol used in Karyophyllis *et al.* (2000), *i.e.*, algal thalli infected by the oomycete were first incubated with a solution of 300 μM 3-maleimido-benzoic acid N-hydroxysuccinimide ester (MBS; Sigma) in MTB containing 0.1% Triton X-100, for 30 min at room temperature and the enzyme treatment was accomplished with a solution containing 5% abalone acetone powder, 1% macerozyme, 3% cellulase, 2% hemicellulase (Sigma). Actin staining was performed with 1% Rh-Ph (Molecular Probes; Invitrogen) for 1 h in the dark at room temperature.

Epifluorescence and confocal microscopy

The samples were examined under epifluorescence with a Zeiss Axioplan™ microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and the pictures were recorded with AxioCam Mrc 5 (Zeiss), using the AxioVision™ software. Confocal laser scanning microscopy was conducted with an inverted microscope Observer™ Z.1 (Zeiss), the LSM 510 laser™ (Zeiss) and pictures were captured with AxioCam HRC™ (Zeiss).

RESULTS

Both host and parasite reveal morphological modifications during the process of the infection. *E. dicksonii*, as a holocarpic species, passes from the immature, plasmodium-like vegetative thallus to the reproductive phase, represented by the formation of the walled zoosporangium. This transition, however, is part of a continuous life history, a fact that makes the distinction between the two phases complicated. In this study, the infection procedure is separated into four basic stages in order to facilitate understanding (see also Sekimoto *et al.* 2008). Images of living algal material in these basic stages of infection are presented in Figs 1–4.

Microtubule organisation

The MT cytoskeleton organisation in the vegetative cells of *E. siliculosus*, *E. crouaniorum* and *P. littoralis* is similar to that already described in a variety of studies on different brown algal species (Katsaros *et al.* 1991, 2006; Katsaros & Galatis 1992; Katsaros 1995). The MT organisation in a vegetative thallus cell of *Ectocarpus siliculosus* is presented in Fig. 5. The MT cytoskeleton consists of many MT bundles radiating out of a site close to the nucleus, which is the centrosome. Some of these MT bundles encircle the nucleus, and many others extend towards the cortical cytoplasm.

Early infection and the immature vegetative pathogen thallus stage

The first sign of infection is marked by the attachment of an *E. dicksonii* spore to the surface of the host cell, in order to penetrate the cell wall and transfer its cytoplasm (Figs 6, 7). The small size of the parasite spores, with a diameter of 3–5 μm , does not allow high resolution of the cell structure and cytoskeleton organisation. However, a positive reaction in tubulin immunofluorescence is visible in spores attached to



Figs 1–4. Images of living algal material in different stages of infection by *E. dicksonii*.

Fig. 1. The start of the infection; arrow marks attachment to the host cell.

Fig. 2. Formation of the parasite's walled thallus in the host cell.

Fig. 3. Pre-cleavage vacuolate stage of sporangial development.

Fig. 4. Mature zoosporangium full of cysts; arrow shows an opened discharge tube.

the host thallus (Figs 6, 7a). Just after spore penetration, the nucleus of the host cell seems to approach the spore attachment site, usually forming a protrusion towards the pathogen nucleus (not shown). After transfer of the spore cytoplasm into the host cell, the spore nucleus moves inwards and is located close to the host nucleus, which usually forms an invagination in which the pathogen's nucleus is partially engulfed (Fig. 8b). Nevertheless, the microtubules of the host remain organised by the centrosome (Fig. 8a). At this stage, the pathogen nucleus starts dividing (Fig. 9). The parasite MTs show a clear perinuclear distribution, radiating out of a point close to the nucleus, which is the oomycete microtubule organising centre (MTOC). Repeated divisions result in a multinucleate immature pathogen thallus. Before each division, the MTOC duplicates and each daughter MTOC migrates to opposite poles of the nucleus (Figs 9a, 10a). It is noteworthy that, despite difficulties in the observation of these minute cytoskeletal structures, in appropriate nucleus orientation the duplicated MTOCs can be observed as two almost parallel, densely fluorescent rods, from which MTs radiate out (arrows in Fig. 11). The divisions of the pathogen nuclei are synchronous, a fact evidenced by the observation of variable numbers of spore nuclei with duplicated MTOCs (Figs 9, 10, 11). The host–MT organisation and the host nucleus appear still normal, without any sign of damage. In parallel, the host nucleus is still functional and continues dividing (prophase shown in Fig. 9).

Vacuolated immature zoosporangium

The continuous, synchronised divisions of the *E. dicksonii* nuclei lead to expansion of the host cell, which is now filled with the parasite's nuclei (Fig. 12). This phase is called 'foamy' stage by Sekimoto *et al.* (2008), and represents the gradual transition of the vegetative thallus to an immature zoosporangium. At the same time, the algal nucleus is displaced and pushed to the periphery of the host cell (arrow in Fig. 12b). However, at this stage, despite the fact that the thallus of *E. dicksonii* appears to dominate, the host's MT cytoskeleton still exists, consisting of MT bundles radiating out of a perinuclear site (MTOC, arrow in Fig. 12a). At the same time, *E. dicksonii* nuclei continue dividing and have the typical perinuclear MT system similar to that shown in Figs 9–11.

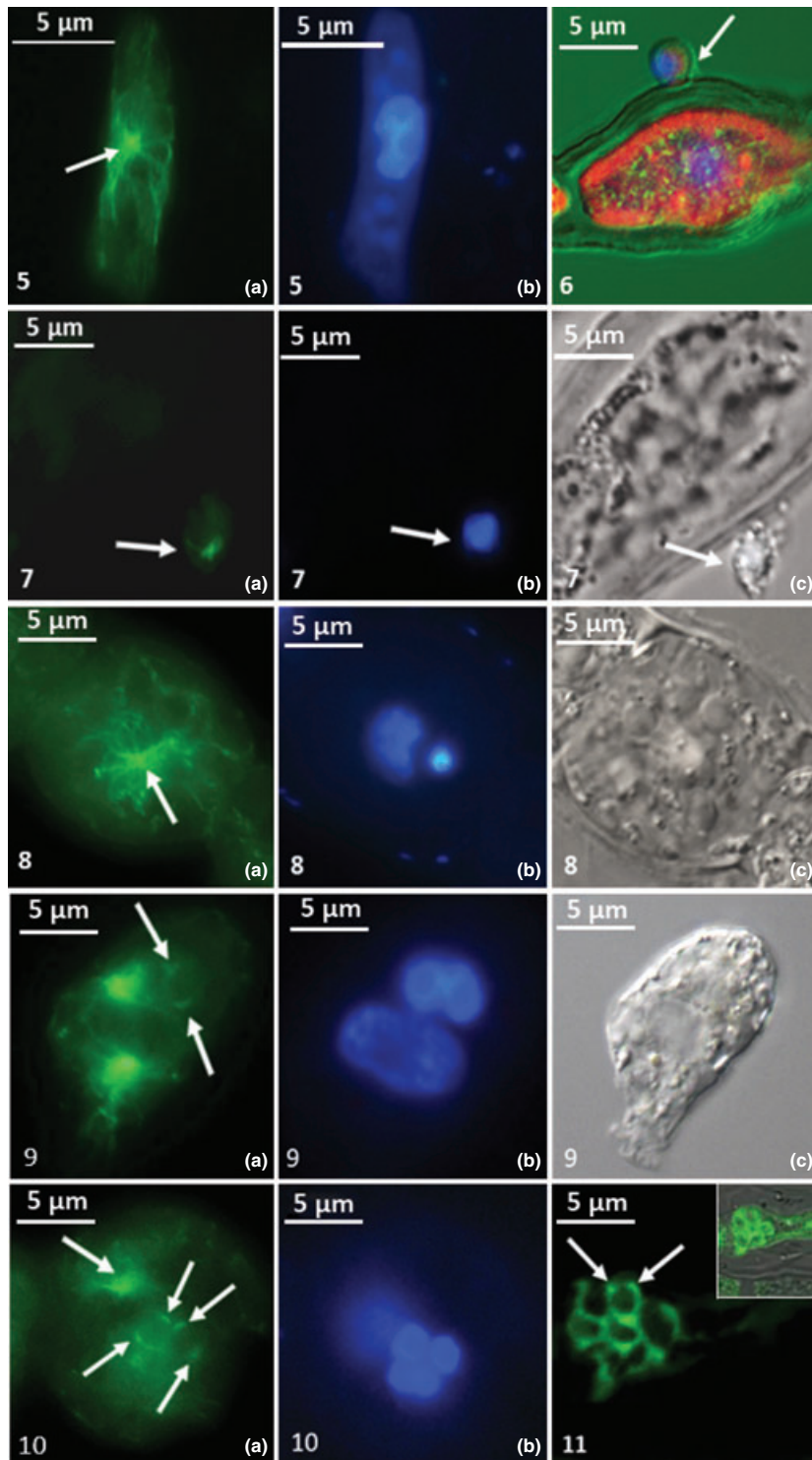
Thallus maturation and primary cyst development

The end of the pre-cleavage vacuolated stage is marked by termination of the continuous divisions of the *E. dicksonii* nuclei. This is accompanied by the gradual disappearance of the perinuclear MTs and the MT converging sites (perinuclear MTOCs). At this stage, bundles of MTs traverse the sporangium area, converging to distinct pointed sites (arrows in Figs 13–15). Repeated observations showed that these MTOCs are mainly peripherally distributed and more or less symmetrically located around the highly vacuolated cytoplasm of the parasite thallus. Fig. 13a shows the co-existence of these characteristic MTOCs at the periphery with the disorganised perinuclear MTs. The host nucleus and MT cytoskeleton have gradually disintegrated and are no longer visible.

The 'net sporangium' stage and the secondary spores

After this stage, zoosporangium formation is complete. Numerous primary cysts fill the sporangium space, arranged mainly at the bottom of the structure (Figs 16b, 17b). Tubulin immunofluorescence shows a thick fluorescent bundle surrounding each nucleus (arrows in Figs 16a, 17a). At this stage, each spore bears variable numbers of intensely fluorescent spots mainly arranged in cortical sites (arrows in Fig. 17a). Subsequently, this thick fluorescent bundle appears denser and more compact and no isolated MT arrays are observed. This MT bundle surrounds the nucleus, but not completely, leaving a short gap (Fig. 18). Detailed examination of the fluorescent images at different focal levels revealed that this bundle consists of two parts deriving from an intensely fluorescent dot, which represent the flagellar axonemes developing from the basal kinetosomes (arrows in Fig. 18a).

Anti-tubulin immunofluorescence revealed the existence of fully formed flagella at the subsequent stage. Each flagellum consists of two intensely fluorescent axonemes, unequal in length, oriented to opposite directions (Fig. 19a). At this stage, the spore cysts apparent in the zoosporangium are a mixture of empty ones, which have discharged their contents, and full ones with the still not discharged zoospores. For this reason, in Fig. 19a we note both rounded MT bundles around encysted spores and free flagellated zoospores in the same sporangium. Differential interference contrast (DIC) optics of the sporangium shows the opened discharge tube (Fig. 19b).



Figs 5–11. Early infection stages of *Ectocarpus siliculosus* by *Eurychasma dicksonii*. (a) MT labelling, (b) DNA staining with Hoechst 33258, (c) DIC images.

Fig. 5. (a) MT organisation in a vegetative cell of *E. siliculosus*; arrow marks the centrosome area.

Fig. 6. CLSM image of a spore (arrow) attached to the host cell wall, and double-stained with rhodamine (MTs, reddish colour in the spore) and Hoechst 33258 (DNA, blue); orange-red colour in host cells is chlorophyll autofluorescence.

Fig. 7. MT cytoskeleton of a spore attached to the host cell wall. Fig. 7b. Nucleus of the same spore. Fig. 7c. DIC of the same spore attached to the host cell wall.

Fig. 8. Host MT cytoskeleton in an early infection stage; arrow marks the host centrosome. Fig. 8b. Parasite nucleus close to invaginated host nucleus. Fig. 8c. DIC of the same cell.

Fig. 9. MT cytoskeleton of a prophase cell of *E. siliculosus*; arrows shows polar MTOCs of the parasite. Fig. 9b. Prophase nucleus of the same cell and two *E. dicksonii* nuclei derived from a recent division; shape of the nucleus, the condensed chromatin and the broad and intense fluorescence of the MTs in the poles are characteristic features of brown algal prophase. Fig. 9c. DIC of the same cell.

Fig. 10. Left arrow shows host centrosome and right arrow the *E. dicksonii* polar MTOCs. Fig. 10b. A cluster of four parasite nuclei of the cell at a higher, and the host nucleus at a lower focal level, respectively.

Fig. 11. CLSM image of apical *E. siliculosus* cell infected by *E. dicksonii*; arrows show the two more intense fluorescent spots, representing duplicated centrosomes of the dividing spores. *Inset*: DIC and MT labelling of the same cell.

Actin organisation in *E. dicksonii*

Rhodamine-phalloidin unfortunately did not result in good labelling of the host cytoskeleton, even in uninfected cells. Therefore, this was more likely due to an experimental artefact than actin depolymerisation caused by infection. However, rhodamine-phalloidin staining enabled us to follow the actin organisation of *E. dicksonii* throughout its development. In *E. dicksonii* spores, actin is distributed mainly in prominent

plaques and condensed bundles of actin filaments (AFs). In more detail, highlighted by arrows in Fig. 20, the actin cytoskeleton of each spore consists of densely fluorescent spots and more diffuse fibrils in the adhesorium-pad site. After the penetration of parasite cytoplasm into the host cell, the actin arrangement remains the same, with actin plaques in the periphery (Figs 21, 22). Fine AF bundles that connect the actin plaques were observed under the microscope, but not properly captured in the photos. It seems that during the synchronous

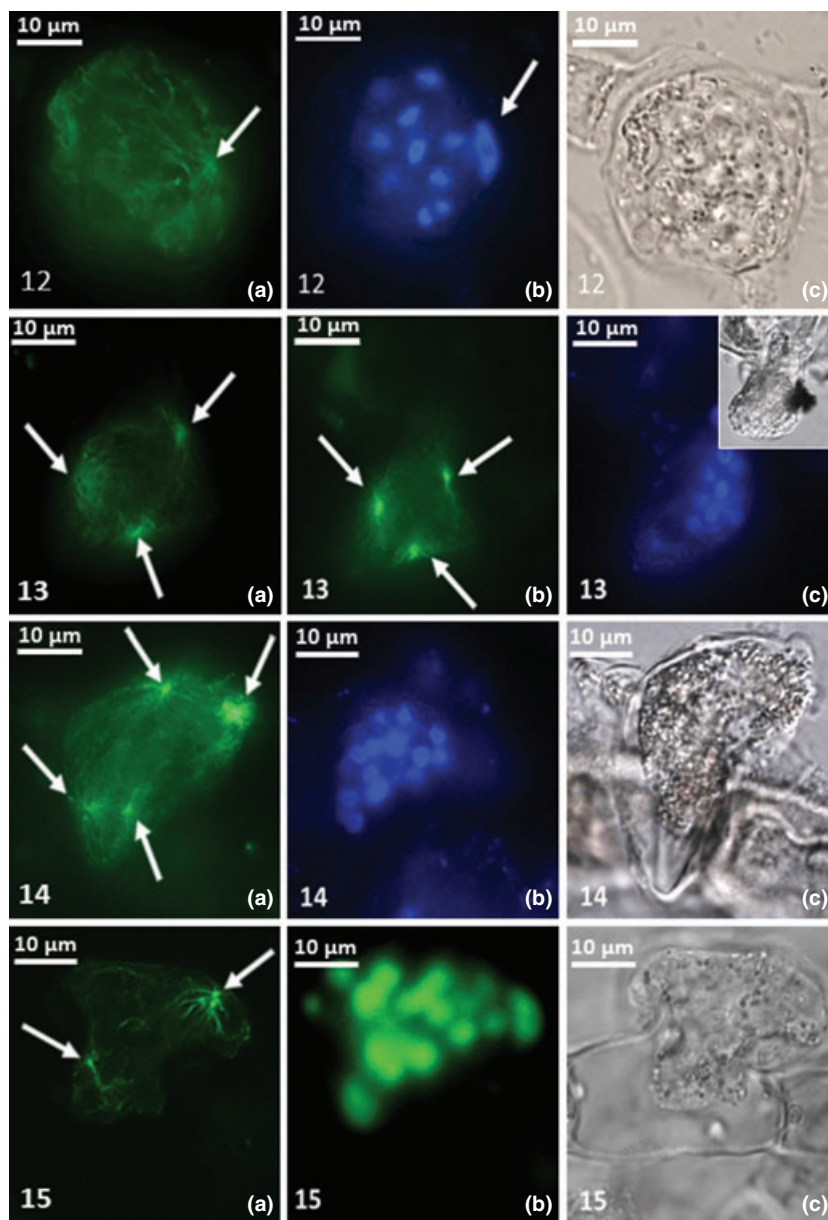
Figs 12–15. Host and parasite cells at the pre-cleavage, vacuolated stage of sporangial development and early zoosporogenesis. *Ectocarpus crouaniorum* 1310/300 infected by *Eurychasma dicksonii* 4018/3.

Fig. 12. (a) MT labelling of host cytoskeleton; MT bundles organised by a peripherally located centrosome (shown by arrow). (b) DNA staining of the same cell with Hoechst 33258; swollen cell, full of *E. dicksonii* nuclei; arrow shows the host nucleus in the periphery. (c) DIC of the same cell.

Fig. 13. *Pylaiella littoralis* 1330/3 infected by *E. dicksonii* 4018/2 at a pre-cleavage stage. (a) MT labelling of parasite MT cytoskeleton at early zoosporogenesis; left arrow shows some disorganised perinuclear MTs; the two right arrows mark two cortical MTOCs. (b) MT labelling of the same cell in a different focal plane; arrows show three dense MTOCs in the periphery of the cytoplasm. (c) DNA staining of the same cell with Hoechst 33258; note that the nucleus of the host is not present. *Inset*: DIC of the same cell.

Fig. 14. *P. littoralis* 1330/3 infected by *E. dicksonii* 4018/2. (a) MT labelling of parasite MT cytoskeleton during spore cleavage; dense MT bundles crossing the zoosporangium; arrows show four peripheral fluorescent MTOCs. (b) DNA staining of the same cell with Hoechst 33258. (c) DIC of the same cell.

Fig. 15. *Ectocarpus siliculosus* 1310/56 infected by *E. dicksonii* 4018/3. (a) CLSM image of MT bundles converging to MTOCs (marked by arrows). (b) DNA staining of the same cell with DAPI. (c) DIC of the same cell.



nuclear divisions in the pre-cleavage vacuolated stage, each nucleus is surrounded by plaques and filaments of actin (Fig. 23). At the following stage, when zoosporogenesis commences, the actin cytoskeleton is characterised by diffuse AFs. A reduced number of actin plaques are still visible (Fig. 24). Finally, after formation of the zoosporangium, each encysted spore shows the typical image of the actin cytoskeleton with plaques and condensed AFs, as mentioned above (Fig. 25). The cytoskeleton interactions between host and pathogen during the different stages of infection are summarised in an overall scheme (Fig. 26).

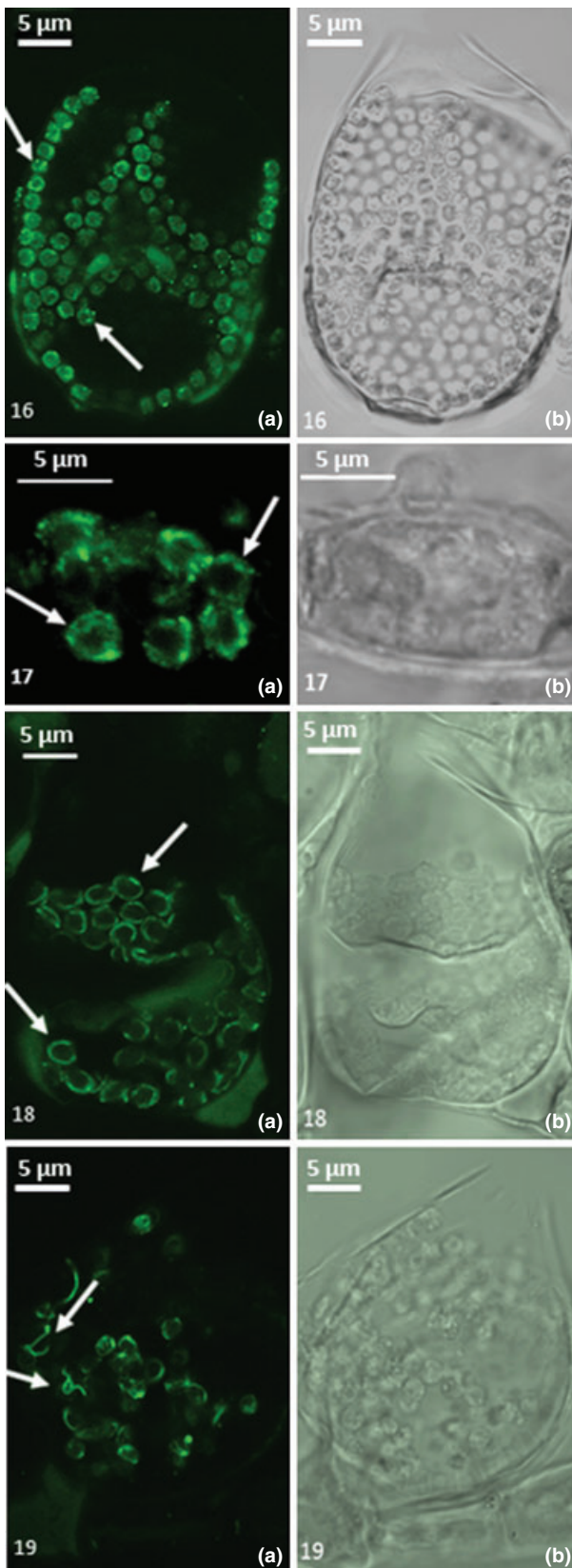
DISCUSSION

In plants, the cytoskeleton plays a basic role in the resistance of cells infected by intracellular pathogens (oomycetes or true fungi) and the possible interactions between them.

Reorganisation of cytoskeletal elements and cytoplasmic translocation towards the penetration site suggest a rapid plant response in order to avoid penetration by the parasite (Hardham *et al.* 2007). On the other hand, this indicates that the plant cytoskeleton could be the parasite's target by producing anti-cytoskeletal compounds in an effort to route plant resistance, a mechanism known in several fungal and oomycete pathogens of higher plants (Takemoto *et al.* 2003; Hardham *et al.* 2007; Kobayashi & Kobayashi 2008). Moreover, it was found that treatment with cytochalasins and microtubule polymerisation and depolymerisation inhibitors allowed the non-pathogen *Erysiphe pisi* to penetrate barley coleoptile cells, *i.e.*, to artificially develop pathogenicity (Kobayashi *et al.* 1997a,b). Therefore, we believe that addressing the existing gap in knowledge regarding cytoskeleton organisation in both the host brown algae and *E. dicksonii* will further illuminate the infection mechanism and open new routes for further studies.

The stages of infection through attachment and transfer of parasite cytoplasm in the algal host cell have been described previously. The attachment of *E. dicksonii* to the host surface

triggers a migration of the host nucleus towards the penetration site (Grenville-Briggs *et al.* 2011), in a way similar to a variety of other host–pathogen systems (Gross *et al.* 2003; Takemoto & Hardham 2004). However, we found that organisation of the host MTs remains surprisingly unaffected. Our observations contrast with previous studies on compatible interactions, e.g., soybean infected with *Phytophthora sojae* and *Arabidopsis* infected with *Peronospora parasitica*, where the host MTs were fragmented or disorganised at an early stage of infection (Cahill *et al.* 2002; Takemoto *et al.* 2003). This significant difference could be attributed to the lack of centrosomes of plant cells in interphase. In contrast to these higher plant systems, the brown algal species investigated here retain organisation of the MT bundles by the centrosome for almost the whole vegetative phase of *E. dicksonii*, even though they ultimately enter compatible interactions. The host MT cytoskeleton is finally completely disintegrated at the late pre-cleavage vacuolated stage. This is probably due to a significant increase in the cytoplasm size and the wall formation of the pathogen, which is accompanied by the rupture of the algal cell wall. Indeed, as already mentioned by Sekimoto *et al.* (2008), during the early stages of the thallus discharge tube formation, the host wall stretches around the immature zoosporangium and is subsequently destroyed. From the above, it can be hypothesised that the host cell cytoskeleton shows remarkable resistance to infection by the oomycete, despite the final dominance of the pathogen. The second significant finding of the present work is the organisation of the pathogen MT cytoskeleton, which was monitored throughout the basic infection stages. The critical role of the cytoskeleton during the infection has been also reported in other host–pathogen systems, and it has been underlined that the arrangement of MTs at each stage of infection is the cornerstone for its dominance in the host cell and the morphogenesis of zoospores (Holloway & Heath 1977; Hardham 2009). The typical cytoskeleton of an *E. dicksonii* spore during division is quite similar to that of related stramenopile species (Katsaros 1980; Jelke *et al.* 1987; Katsaros & Galatis 1992). Microtubule arrays encircle the nucleus and converge to one MTOC located close to the nucleus. These observations are consistent with ultrastructural analysis with transmission electron microscopy (TEM), which revealed the presence of two centrioles (kinetosomes), localised one next to the other at an angle of less than 90° and close to the nucleus, shown by Sekimoto *et al.* (2008). Therefore, we presume that the fluorescent spots from which MTs radiate out at the first infection stages correspond to one centrosome consisting of a pair of centrioles.



Figs 16–19. CLSM images of mature zoosporangia. (a) MT labelling in a median focal plane. (b) DIC of the same cell.

Fig. 16. *Ectocarpus crouaniorum* 1310/300 infected by *Euryschisma dicksonii* 4018/3; arrows mark tubulin fluorescence dots in the primary cysts.

Fig. 17. *E. crouaniorum* 1310/300 infected by *E. dicksonii* 4018/3; primary cysts just after the cleavage; arrows show thick MT bundles, representing the forming flagella.

Fig. 18. *Pylaiella littoralis* 1330/3 infected by *E. dicksonii* 4018/2; primary cysts; arrows show thick MT bundles (formed flagella) that converge to a dense spot (kinetosome).

Fig. 19. *E. crouaniorum* 1310/300 infected by *E. dicksonii* 4018/3; released secondary spores, each consisting of two of unequal length, intensely fluorescent axonemes oriented to opposite directions (marked by arrows).

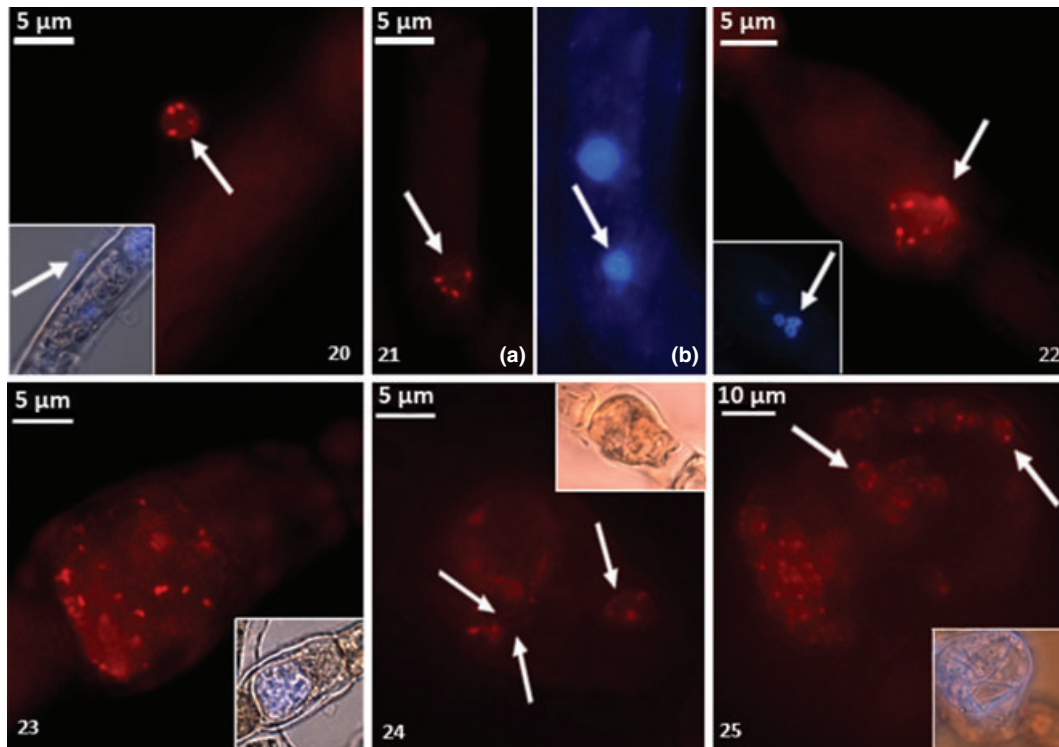


Fig 20–25. Actin labelling of *Eurychasma dicksonii* 4018/2 infecting *Pylaiella littoralis* 13303/3.

Fig. 20. Prominent plaques of actin in a pathogen spore attached to the host cell wall; arrow shows fine AFs accumulated in adhesorium-pad site. *Inset:* combination of DIC and DNA staining with Hoechst 33258 of the same spore.

Fig. 21. Arrow shows actin distribution in plaques and AFs just after penetration of the parasite cytoplasm into the host cell. Fig. 21b. Arrow shows the related parasite nucleus stained with Hoechst 33258.

Fig. 22. Fluorescent plaques of actin in the parasite cytoplasm (arrow). *Inset:* arrow shows three related *E. dicksonii* nuclei stained with Hoechst 33258.

Fig. 23. Actin cytoskeleton in pre-cleavage vacuolated stage. *Inset:* combination of DIC and DNA staining with Hoechst 33258.

Fig. 24. Arrows show bundles of AFs crossing the parasite cytoplasm in an early zoosporangium. *Inset:* DIC of the same image.

Fig. 25. Plaques of actin in encysted spores (arrows). *Inset:* combination of DIC and DNA staining with Hoechst 33258 of the formed zoosporangium and the encysted spores.

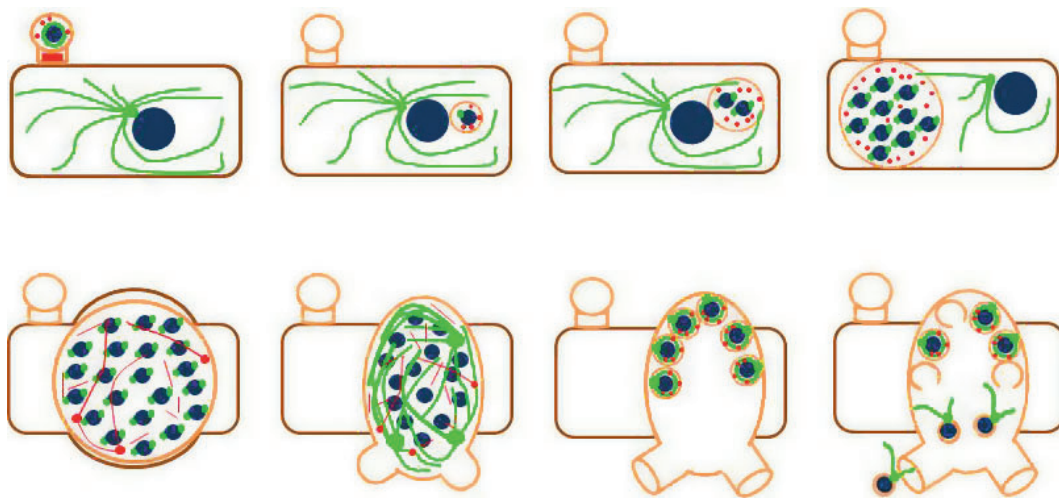


Fig. 26. Diagrammatic representation of the *Eurychasma dicksonii* infection stages, showing modifications of cytoskeleton organisation in both host and parasite. Blue filled circles: nuclei. Green lines: MT bundles. Green dots: MTOCs. Red dots and lines: actin plaques and filaments. Brown rectangle: infected algal cell. Orange: *E. dicksonii* plasmalemma and cell wall structures.

However, the fact that in *E. dicksonii* spores, during the cleavage stage, the tubulin localisation did not reveal MT convergence points, suggests that the perinuclear sites functioning as MTOCs during division are inactivated. A similar arrangement was also observed in other systems, e.g., in the chlorophyte alga *Uronema* sp., where the centrosome functions as a MTOC during mitosis, but not during cytokinesis and interphase (Katsaros *et al.* 2011).

The oomycete vegetative thallus development is characterised by repeated nuclear divisions that could be considered as synchronous, because the whole number of parasite's nuclei appear at the same division stage. Although an asynchronous behaviour of the system has been reported in eucarpic *Saprolegnia ferax* (Heath 1980), synchronous divisions seem to be a general phenomenon in holocarpic oomycetes (Martin & Miller 1986), even in brown algae, as during zoosporogenesis of *Halopteris flicina* (Katsaros & Galatis 1990). Of course, ultrastructural data, which are not currently available, are required in order to substantiate this hypothesis.

The end of the vegetative stage is marked by nuclear divisions ceasing and the shift from a multinucleate syncytium to a zoosporangium through cellularisation. Cellularisation of a syncytium is a complex process that involves the MT cytoskeleton in order to space the nuclei, organise the cytoplasm and place the cell walls between them, as found in a variety of organisms, e.g., barley endosperm (Brown *et al.* 1994), the giant unicellular green alga *Acetabularia* (Menzel 1986) and the oomycete *Phytophthora* (Hyde *et al.* 1991a,b). Radial MT arrays associated with the nuclear membrane have been proposed to maintain nuclear positioning during pre-cleavage in lower and higher plants, numerous algae and fungi, which do not possess centrosomes (Wick 1985; Menzel 1986; Brown & Lemmon 1988; Brown *et al.* 1994; Lowry & Roberson 1997). In oomycetes, aster-like arrays of MTs emanating from the region of the basal bodies are responsible for translocation of the nuclei to the periphery and subsequently for the formation and shape of zoospores (Gotelli 1974; Jelke *et al.* 1987; Hyde *et al.* 1991b). In *Phytophthora cinnamomi*, prior to cleavage in the sporangia, MTs form aster-like configurations radiating out of basal body-associated poles of the nuclei (Heath & Harold 1992). These MTs are proposed to stabilise the cytoplasm around the nucleus, thus directing the cleavage planes. The model suggested by these authors is that the cleavage plane is formed at the junction of the two opposite sets of MTs. A similar mechanism has been described in brown algal cytokinesis (Katsaros & Galatis 1992). In the case of *E. dicksonii* infection, the role of MTs in the cleavage process seems different from that reported above. No nuclear membrane-associated, radial or aster-like MTs were observed related to the parasite nuclei. The dense, cage-like fluorescent MT bundles organised by the centrosome are replaced at this stage by a diffuse signal of perinuclear fluorescence (shown in Fig. 13a) that gradually disappears. Consequently, the sporangium cleavage is not supported for that type of MT system.

In parallel, preliminary TEM observations show that the pre-cleavage stage is accompanied by the formation of a large central vacuole and that the nuclei are peripherally distributed, similar to that found during infection of the red alga *Palmaria mollis* by the oomycete *Petersenia palmariae* (Pueschel & Van Der Meer 1985). Combining all the above, we presume that sporangial cleavage in *E. dicksonii* seems to follow the *Saprolegnia* type, i.e.,

it involves the expansion of a central vacuole (Gay & Greenwood 1966; Heath & Greenwood 1971).

The process continues with the ensuing peripheral distribution of the nuclei. The cytoplasm takes a parietal position because of the large central vacuole. Around the highly vacuolated cytoplasm of the parasite thallus, a modified system of MTs was observed, consisting of MTOCs localised at the sporangium periphery. Numerous elongated MT bundles radiate out of these sites, crossing the zoosporangium in different directions. The MTs that used to converge to one perinuclear MTOC gradually disappear and are replaced by dense MT arrays that converge to the aforementioned cortical MTOCs. What is peculiar in this observation is that each MTOC is not directly related to each nucleus. However, in *Phytophthora cinnamomi* it was found that MT arrays in cleaving sporangia emanate from a distinct pole of each nucleus, which corresponds to the basal body (Hyde *et al.* 1991a,b). One possible explanation for this difference is that the centrosomes in *E. dicksonii* function as MTOCs only during mitosis. This is also supported by the fact that centrosome-associated MTs were found, using immunofluorescence, in spores only during their division, as mentioned above. A presumption about the role of these MTOCs that do not correspond to the nuclei is that they replace the centrosome-associated organisation of MTs and contribute to the final formation of the primary cysts.

The late stages of zoosporogenesis in *E. dicksonii* include establishment of the primary cyst domains and consequently their complete formation. It should be noted here that several perinuclear fluorescent dots were observed in the cytoplasm of the pathogen spores. These findings are comparable with similar dots found in the soil fungus *Trichoderma hyphae* as apparent MT termini, isolated structures or along tracks of MTs, not excluding the possibility of existence of non-nuclear-associated cytoplasmic MTOCs (Czymmek *et al.* 1996).

Despite the early appearance of the basal body, it is not yet clear when exactly flagella formation starts. The only convincing results in this respect originate from observations after the cleavage, when the tubulin immunofluorescence marks thick, dense bundles of MTs that correspond to the flagellar axonemes. The hypothesis that the flagella in *E. dicksonii* are assembled from the two basal bodies parallel to the cleavage process agrees with the example of *Phytophthora cinnamomi* (Heath & Harold 1992). However, the *E. dicksonii* primary zoospores can potentially encyst upon the thallus wall when not released through the discharge tubes (Sekimoto *et al.* 2008), suggesting that Fig. 20 could represent retracted flagellar axonemes. In this case, a post-cleavage formation of the flagella, as proposed for *Saprolegnia* (Heath & Greenwood 1971), is not excluded. Subsequently, the biflagellate zoospores are released, obtaining the typical pyriform shape of nuclei. It has been reported that cytoplasmic MTs radiating out of the kinetosomes are associated with modifications in the shape of nuclei (Cerenius *et al.* 1984). The variation in organisation of the involved cytoskeletal structures underlines their significant role in the infection process, as well as their correlation with the pathogen development during infection.

The prominent actin plaques and fine AFs were anticipated observations in consideration of actin distribution in other oomycetes, e.g., *Achlya bisexualis* and *Phytophthora cinnamomi* (Walker *et al.* 2006). In contrast, typical organisation of actin in brown algae reveals a completely different image, with

oriented AFs crossing the cytoplasm and without the existence of dense fluorescent spots or plaques (Katsaros *et al.* 2006). Moreover, the accumulation of diffuse AFs on the base of *E. dicksonii* spores attached to the host cell wall indicates the contribution of actin in injection of the cytoplasm. Beakes & Glockling (1998) mentioned the existence of actin-like material in the developing infection tube of *Haptoglossa* infecting nematodes. Modifications in actin distribution during the zoosporangium formation in *E. dicksonii* are in agreement with the fact that actin is considered to be involved in the cleavage processes in zoosporogenesis of oomycetes. Indeed, in the developing sporangia, peripheral plaques of actin were observed in *Saprolegnia* and *Achlya*, while in later stages spots were found dispersed in the cytoplasm, which formed clusters (Heath & Harold 1992). In the same systems, during cleavage, the developing cytokinetic septa were associated with peripheral plaques and diffuse cytoplasmic actin. In *Phytophthora cinnamomi* prior to cleavage, actin formed plaques in the periphery of the sporangia (Jackson & Hardham 1998). During cleavage, the plaques disappeared and F-actin began to accumulate along the developing cleavage planes and around the nuclei. Treatment with drugs interfering with actin leads to abnormal cleavage (Hardham & Hyde 1997). Combining the present observations of MT arrangement with those of Hyde &

Hardham (1992) on the role of actin in the final stages of sporangial development, it could be suggested that MTs regulate the positioning of the cleavage actin arrays. A similar system has been proposed for cytokinesis in brown algal cells (Karyophyllis *et al.* 2000; Katsaros *et al.* 2012).

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was supported by the TOTAL Foundation (Project "Brown algal biodiversity and ecology in the Eastern Mediterranean Sea") and the University of Athens. We gratefully acknowledge funding from the European Commission through the FP7 'capacities' specific programme, ASSEMBLE (grant no. 227788) for both AT and CK for their research visits to the Scottish Association for Marine Science (SAMS, Oban). The work of FCK received funding from the MASTS pooling initiative (The Marine Alliance for Science and Technology for Scotland) and their support is gratefully acknowledged. MASTS is funded by the Scottish Funding Council (grant no. HR09011) and contributing institutions. C.M.M.G. was supported by a New Investigator grant from the UK Natural Environment Research Council (NERC, grant NE/J00460X/1) and NERC - National Capability funding for the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP).

REFERENCES

- Beakes G.W., Glockling S.L. (1998) Injection tube differentiation in gun cells of a *Haptoglossa* species, which infects nematodes. *Fungal Genetics and Biology*, **24**, 45–68.
- Bidle K.D., Vardi A. (2011) A chemical arms race at sea mediates algal host–virus interactions. *Current Opinion in Microbiology*, **14**, 449–457.
- Brown R.C., Lemmon B.E. (1988) Cytokinesis occurs at boundaries of domains delimited by nuclear-based microtubules in sporocytes of *Conocephalum conicum* (Bryophyta). *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **11**, 139–146.
- Brown R.C., Lemmon B.E., Olsen O.A. (1994) Endosperm development in barley: microtubule involvement in the morphogenetic pathway. *The Plant Cell*, **6**, 1241–1252.
- Cahill D., Rookes J., Michalczyk A., McDonald K., Drake A. (2002) Microtubule dynamics in compatible and incompatible interactions of soybean hypocotyl cells with *Phytophthora sojae*. *Plant Pathology*, **51**, 629–640.
- Cerenius L., Olson L.W., Lange L., Soderhall K. (1984) The secondary zoospore of *Aphanomyces astaci* and *A. laevis* (Oomycetes, Saprolegniales). *Nordic Journal of Botany*, **4**, 697–706.
- Cock J.M., Sterck L., Rouzé P., Scornet D., Allen A.E., Amoutzias G., Anthouard V., Artiguenave F., Aury J.M., Badger J.H., Beszteri B., Billiau K., Bonnet E., Bothwell J.H., Bowler C., Boyen C., Brownlee C., Carrano C.J., Charrier B., Cho G.Y., Coelho S.M., Collen J., Corre E., Da Silva C., Delage L., Delaroque N., Dittami S.M., Doubeau S., Elias M., Farnham G., Gachon C.M., Gschloessl B., Heesch S., Jabbari K., Jubin C., Kawai H., Kimura K., Kloareg B., Küpper F.C., Lang D., Le Bail A., Leblanc C., Lerouge P., Lohr M., Lopez P.J., Martens C., Maumus F., Michel G., Miranda-Saavedra D., Morales J., Moreau H., Motomura T., Nagasato C., Napoli C.A., Nelson D.R., Nyvall-Collén P., Peters A.F., Pommier C., Potin P., Poulain J., Quesneville H., Read B., Rensing S.A., Ritter A., Rousvoal S., Samanta M., Samson G., Schroeder D.C., Ségurens B., Strittmatter M., Tonon T., Tregear J.W., Valentin K., von Dassow P., Yamagishi T., Van de Peer Y., Wincker P. (2010) The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*, **465**, 617–621.
- Czymmek K.J., Bourett T.M., Howard R.J. (1996) Immunolocalization of tubulin and actin in thick-sectioned fungal hyphae after freeze-substitution fixation and methacrylate de-embedding. *Journal of Microbiology*, **181**, 153–161.
- Duarte C.M., Holmer M., Olsen Y., Soto D., Marba N., Guiu J., Black K., Karakassis I. (2009) Will the oceans help feed humanity? *BioScience*, **59**, 967–976.
- Gachon C.M.M., Day J.G., Campbell C.N., Pröschold T., Saxon R.J., Küpper F.C. (2007) The culture collection of algae and protozoa (CCAP): a biological resource for protistan genomics. *Gene*, **406**, 51–57.
- Gachon C.M.M., Strittmatter M., Müller D.G., Kleintsch J., Küpper F.C. (2009) Detection of differential host susceptibility to the marine oomycete Pathogen *Eurychasma dicksonii* by real-time PCR: not all algae are equal. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 322–328.
- Gachon C.M.M., Sime-Ngando T., Strittmatter M., Chambouvet A., Kim G.H. (2010) Algal diseases: spotlight on a black box. *Trends in Plant Science*, **15**, 633–639.
- Gay J.L., Greenwood A.D. (1966) Structural aspects of zoospore production in *Saprolegnia ferax* with particular reference to the cell and vacuolar membranes. In: Madelin M.F. (Ed.), *The fungus spore*. Butterworths, London, pp 95–110.
- Gotelli D. (1974) The morphology of *Lagenidium callinectes* II. Zoosporogenesis. *Mycologia*, **66**, 846–858.
- Grenville-Briggs L., Gachon C.M.M., Strittmatter M., Sterck L., Küpper F., van West P. (2011) A molecular insight into algal–oomycete warfare: cDNA analysis of *Ectocarpus siliculosus* infected with the basal oomycete *Eurychasma dicksonii*. *PLoS ONE*, **6**, e24500.
- Gross P., Julius C., Schmeizer E., Hahlbrock K. (2003) Translocation of cytoplasm and nucleus to fungal penetration sites is associated with depolymerization of microtubules and defence gene activation in infected, cultured parsley cells. *The EMBO Journal*, **12**, 1735–1744.
- Hardham A.R. (2009) The asexual life cycle. In: Lamour K., Kamoun S. (Eds), *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools*. Wiley-Blackwell, Chichester, pp. 93–119.
- Hardham A.R., Hyde G.J. (1997) Asexual sporulation in the oomycetes. *Advances in Botanical Research*, **24**, 353–398.
- Hardham A.R., Jones D.A., Takemoto D. (2007) Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 342–348.
- Heath I.B. (1980) Behaviour of kinetochores during mitosis in the fungus *Saprolegnia ferax*. *Journal of Cell Biology*, **84**, 531–546.
- Heath I.B., Greenwood A.D. (1971) Ultrastructural observations on the kinetochores and Golgi bodies during the asexual life cycle of *Saprolegnia*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, **112**, 371–389.
- Heath I.B., Harold R.L. (1992) Actin has multiple roles in the formation and architecture of zoospores of the oomycetes, *Saprolegnia ferax* and *Achlya bisexualis*. *Journal of Cell Science*, **102**, 611–627.
- Heesch S., Day J.G., Yamagishi T., Kawai H., Müller D.G., Küpper F.C. (2012) Cryopreservation of the model alga *Ectocarpus* (Phaeophyceae). *Cryoletters*, **33**, 327–336.
- Holloway S.A., Heath I.B. (1977) Morphogenesis and the role of microtubules in synchronous populations of *Saprolegnia* zoospores. *Experimental Mycology*, **1**, 9–29.
- Hyde G.J., Hardham A.R. (1992) Confocal microscopy of microtubule arrays in cryosectioned sporangia of

- Phytophthora cinnamomi*. *Experimental Mycology*, **16**, 207–218.
- Hyde G.J., Gubler F., Hardham A.R. (1991a) Ultrastructure of zoosporogenesis in *Phytophthora cinnamomi*. *Mycological Research*, **95**, 577–591.
- Hyde G.J., Lancelle S., Hepler P.K., Hardham A.R. (1991b) Freeze substitution reveals a new model for sporangial cleavage in *Phytophthora*, a result with implications for cytokinesis in other eukaryotes. *Journal of Cell Science*, **100**, 735–746.
- Jackson S.L., Hardham A.R. (1998) Dynamic rearrangement of the filamentous actin network occurs during zoosporogenesis and encystment in the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. *Fungal Genetics and Biology*, **24**, 24–33.
- Jelke E., Oertel B., Böhm K.J., Unger E. (1987) Tubular cytoskeletal elements in sporangia and zoospores of *Phytophthora infestans* (MoNT.) De Bary (Oomycetes, Pythiaceae). *Journal of Basic Microbiology*, **27**, 11–21.
- Karyophyllis D., Katsaros C., Dimitriadis I., Galatis B. (2000) F-actin organization during the cell cycle of *Sphacelaria rigidula* (Phaeophyceae). *European Journal of Phycology*, **35**, 25–33.
- Katsaros C. (1980) An ultrastructural study on the morphogenesis of the thallus of five brown algal species. Ph.D. thesis, University of Athens, Athens, Greece.
- Katsaros C. (1995) Apical cells of brown algae with particular reference to Sphacelariales, Dictyotales and Fucales. *Phycological Research*, **43**, 43–59.
- Katsaros C., Galatis B. (1990) Thallus development in *Halopteris filicina* (Phaeophyceae, Sphacelariales). *British Phycological Journal*, **25**, 63–74.
- Katsaros C., Galatis B. (1992) Immunofluorescence and electron microscope studies of microtubule organization during the cell cycle of *Dictyota dichotoma* (Phaeophyta, Dictyotales). *Protoplasma*, **169**, 75–84.
- Katsaros C., Kreimer G., Melkonian M. (1991) Localization of tubulin and a centrin homologue in vegetative cells and developing gametangia of *Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngb. (Phaeophyceae, Ectocarpales): a combined immunofluorescence and confocal laser scanning microscope study. *Botanica Acta*, **104**, 87–92.
- Katsaros C., Karyophyllis D., Galatis B. (2006) Cytoskeleton and morphogenesis in brown algae. *Annals of Botany*, **97**, 679–693.
- Katsaros C., Varvarigos V., Gachon C., Brand J., Motomura T., Nagasato C., Küpper F. (2011) Comparative immunofluorescence and ultrastructural analysis of microtubule organization in *Uronema* sp., *Klebsormidium flaccidum*, *K. subtilissimum*, *Stichococcus bacillaris* and *S. chloranthus* (Chlorophyta). *Protist*, **162**, 315–331.
- Katsaros C., Nagasato C., Terauchi M., Motomura T. (2012) Cytokinesis of brown algae. In: Heilmann K., Katsaros C. (Eds) *Advances in algal cell biology*. Walter De Gruyter, Berlin, Germany, pp 143–160.
- Kobayashi I., Kobayashi Y. (2008) Microtubules and pathogen defence. In: Nick P. (Ed.), *Plant cell monographs: plant microtubules*. Springer, Berlin, Germany, pp. 121–140.
- Kobayashi Y., Kobayashi I., Funaki Y., Fujimoto S., Takemoto T., Kunoh H. (1997a) Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of nonhost resistance in barley coleoptile cells. *The Plant Journal*, **11**, 525–537.
- Kobayashi I., Kobayashi Y., Hardham A.R. (1997b) Inhibition of rust-induced hypersensitive response in flax cells by the microtubule inhibitor oryzalin. *Australian Journal of Plant Physiology*, **24**, 733–740.
- Küpper F.C., Müller D.G. (1999) Massive occurrence of the heterokont and fungal parasites *Anisopodium*, *Eurychasma* and *Chytridium* in *Pylaiella littoralis* (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Nova Hedwigia*, **69**, 381–389.
- Küpper F.C., Maier I., Müller D.G., Loiseaux-De Goer S., Guillou L. (2006) Phylogenetic affinities of two eukaryotic pathogens of marine macroalgae, *Eurychasma dicksonii* (Wright) Magnus and *Chytridium polysiphoniae* Cohn. *Cryptogamie Algologie*, **27**, 165–184.
- Lowry D.S., Roberson R.W. (1997) Microtubule organization during zoosporogenesis in *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma*, **196**, 45–54.
- Martin R.W., Miller C.E. (1986) Ultrastructure of mitosis in the endoparasite *Olpidiopsis varians*. *Mycologia*, **78**, 11–21.
- Menzel D. (1986) Visualization of cytoskeletal changes through the life cycle in *Acetabularia*. *Protoplasma*, **134**, 30–42.
- Müller D.G., Küpper F.C., Küpper H. (1999) Infection experiments reveal broad host ranges of *Eurychasma dicksonii* (Oomycota) and *Chytridium polysiphoniae* (Chytridiomycota), two eukaryotic parasites in marine brown algae (Phaeophyceae). *Phycological Research*, **47**, 217–223.
- Müller D.G., Gachon C.M.M., Küpper F.C. (2008) Axenic clonal cultures of filamentous brown algae: initiation and maintenance. *Cahiers de Biologie Marine*, **49**, 59–65.
- Peters A.F., Marie D., Scornet D., Kloareg B., Cock J.M. (2004) Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics. *Journal of Phycology*, **40**, 1079–1088.
- Peters A.F., van Wijk S.J., Cho G.Y., Scornet D., Hanyuda T., Kawai H., Schroeder D.C., Cock J.M., Boo S.M. (2010) Reinstatement of *Ectocarpus cruaniorum* Thuret in Le Jolis as a third common species of *Ectocarpus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) in Western Europe, and its phenology at Roscoff, Brittany. *Phycological Research*, **58**, 157–170.
- Potin P., Bouarab K., Salaün J.P., Pohnert G., Kloareg B. (2002) Biotic interactions of marine algae. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 308–317.
- Pueschel C.M., Van Der Meer J.P. (1985) Ultrastructure of the fungus *Peterseia palmariæ* (Oomycetes) parasitic on the alga *Palmaria mollis* (Rhodophyceae). *Canadian Journal of Botany*, **63**, 409–418.
- Sekimoto S., Beakes G.W., Gachon C.M.M., Müller D.G., Küpper F.C., Honda D. (2008) The development, ultrastructural cytology, and molecular phylogeny of the basal Oomycete *Eurychasma dicksonii*, infecting the filamentous Phaeophyte algae *Ectocarpus siliculosus* and *Pylaiella littoralis*. *Protist*, **159**, 299–318.
- Singh A., Nigamb P.S., Murphy J.D. (2011) Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, **102**, 10–16.
- Sparrow F.K. (1960) *Aquatic phycomycetes* 2nd edn. University of Michigan Press, Ann Arbor, MI.
- Starr R.C., Zeikus J.A. (1987) UTEX – the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology*, **23**, 1–47.
- Strittmatter M., Gachon C.M.M., Küpper F.C. (2009) Ecology of lower oomycetes. In: Lamour K., Kamoun S. (Eds), *Oomycete genetics and genomics: diversity, plant and animal interactions, and toolbox*. Wiley & Sons, Chichester, pp. 25–46.
- Suttle C.A. (2005) Viruses in the sea. *Nature*, **437**, 356–361.
- Takemoto D., Hardham A.R. (2004) The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants. *Plant Physiology*, **136**, 3864–3876.
- Takemoto D., Jones D.A., Hardham A.R. (2003) GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of *Arabidopsis* by oomycete pathogens. *The Plant Journal*, **33**, 775–792.
- Walker S.K., Chitcholtan K., Yu Y.P., Christenhusz G.M., Garrill A. (2006) Invasive hyphal growth: an F-actin depleted zone is associated with invasive hyphae of the oomycetes *Achlya bisexualis* and *Phytophthora cinnamomi*. *Fungal Genetics and Biology*, **43**, 357–365.
- Wick S.M. (1985) Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. III. Transition between mitotic/cytokinetic and interphase microtubule arrays. *Cell Biology International Reports*, **9**, 357–371.

Filamentous brown algae infected by the marine, holocarpic oomycete *Eurychasma dicksonii*

First results on the organization and the role of cytoskeleton in both host and parasite

Amerssa Tsirigoti¹, Frithjof C Kuepper², Claire MM Gachon³, and Christos Katsaros^{1*}

¹Department of Botany; Faculty of Biology; University of Athens; Panepistimiopolis, Athens, Greece; ²Oceanlab; University of Aberdeen; Newburgh, Scotland UK; ³Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP); Scottish Association for Marine Science (SAMS); Oban, Scotland UK

The important role of the cytoskeletal scaffold is increasingly recognized in host-pathogen interactions. The cytoskeleton potentially functions as a weapon for both the plants defending themselves against fungal or oomycete parasites, and for the pathogens trying to overcome the resisting barrier of the plants. This concept, however, had not been investigated in marine algae so far. We are opening this scientific chapter with our study on the functional implications of the cytoskeleton in 3 filamentous brown algal species infected by the marine oomycete *Eurychasma dicksonii*. Our observations suggest that the cytoskeleton is involved in host defense responses and in fundamental developmental stages of *E. dicksonii* in its algal host.

phylogenetic position in the oomycete lineage.^{5,6} The basic stages of the infection are known: the attachment of the parasite spore to the host cell wall, the penetration of its cytoplasm into the host cell, the formation of a multinucleated, unwallled thallus, and zoosporogenesis.⁶ Hitherto, though, there was no knowledge about the role of cytoskeleton in the context of infection, which stimulated our research.

In land plants, reorganization of the cytoskeleton is part of the reaction to infection by fungal pathogens. The rearrangement of the cytoplasm and the relocation of the nuclei and other organelles are accompanied by rapid rearrangements of the cytoskeletal elements.⁷ The plant cytoskeleton shows an extreme plasticity in order to serve the intracellular realignment.

At the same time, this indicates that the plant cytoskeleton could be the parasite's target by producing anti-cytoskeletal compounds in an effort to overcome plant resistance, a mechanism known in several fungal and oomycete pathogens of higher plants.^{8,9}

Consequently, the changes in microtubule (MT) organization are associated with both the plant defense and/or susceptibility toward oomycetes, respectively.¹⁰ Therefore, our research on the organization and role of cytoskeleton in the host and the parasite sheds some light into the enormous variability in the specificity of the recognition, defense, and infection mechanisms.

*Correspondence to: Christos Katsaros;
Email: christos.katsaros@biol.uoa.gr

Submitted: 08/21/2013; Revised:
08/28/2013; Accepted: 09/03/2013

Citation: Tsirigoti A, Kuepper FC, Gachon CMM, Katsaros C. Filamentous brown algae infected by the marine, holocarpic oomycete *Eurychasma dicksonii*: first results on the organization and the role of cytoskeleton in both host and parasite. *Plant Signaling & Behavior* 2013; 8:e26367; PMID: 24025487; <http://dx.doi.org/10.4161/psb.26367>

Addendum to: Tsirigoti A, Kuepper FC, Gachon CMM, Katsaros C. Cytoskeleton organisation during the infection of three brown algal species, *Ectocarpus siliculosus*, *Ectocarpus cruaniorum*, and *Pylaiella littoralis*, by the intracellular marine oomycete *Eurychasma dicksonii*. *Plant Biol* (Stuttg) 2013; PMID:23692049; <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12041>

Oomycetes are important plant and animal pathogens and are the cause of significant crop losses every year. Hence, a plethora of studies with different cultivated and model plant species investigate the diversity of parasite infection pathways and host defense responses.¹ However, little information is available on the interactions between algae and marine oomycetes, despite the epidemic outbreaks reported² and the huge impact on intensive algal aquaculture.³

Eurychasma dicksonii is a biotrophic, intracellular marine oomycete, capable to infect at least 45 species of brown seaweeds in laboratory cultures.⁴ Molecular data reveal that *E. dicksonii* has a basal

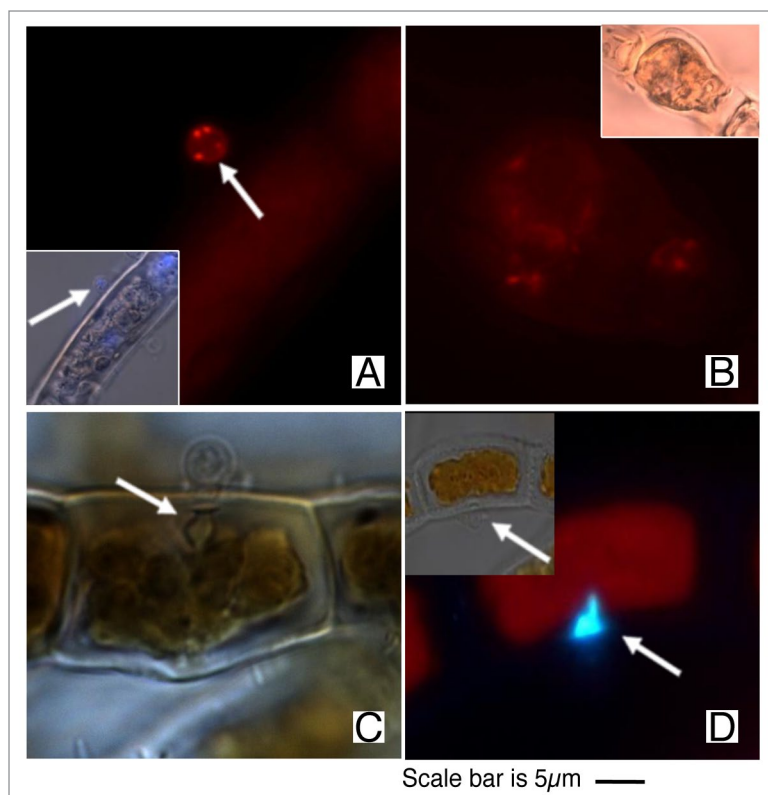


Figure 1. Actin labeling of *E. dicksonii* infecting *Pylaiella littoralis*. (A) Prominent plaques of actin in a pathogen spore attached to the host cell wall. Arrow shows fine AFs accumulated in adhesorium-pad site. Inset: combination of DIC and DNA staining with Hoechst 33258 of the same spore. (B) AFs crossing the parasite cytoplasm in an early zoosporangium. Inset: DIC of the related image. (C) DIC of *E. dicksonii* spore attached to the surface of *Macrocystis pyrifera*. Arrow shows the cell wall modifications. (D) Staining with Aniline Blue of *E. dicksonii* infecting *Ectocarpus cruaniorum*. Arrows show the attached spore and the accumulation of β -1,3glucans on the cell wall at the penetration site.

Organization of the Host MTs

Our experiments of tubulin immunolocalization in the 3 algal species *Ectocarpus siliculosus*, *Ectocarpus cruaniorum*, and *Pylaiella littoralis* unveiled the MT dynamics in reaction to the intracellular infection by *E. dicksonii*. The host retains a normal organization of the MT bundles by the centrosome for most of the infection cycle until the start of the parasite zoosporogenesis. This is a particularly surprising result in comparison with most studies led on compatible plant-pathogen interactions. Usually, the host MTs lose their central organization by the centrosome and gradually depolymerize.^{7,11} Despite the delayed disorganization of the MTs, the brown algal cells investigated here ultimately allowed the completion of *E. dicksonii* intracellular development. There is, however, stark variability in the severity of symptoms

across⁴ and within¹² the 45+ species of brown seaweeds infected by *E. dicksonii*. It would be enlightening to expand our study to this broader spectrum of interactions, in order to shed light into the possibly long-standing co-evolutionary relationship between *E. dicksonii* and its brown algal hosts.¹

Organization of the Parasite MTs

The arrangement of the MTs at each stage of infection underpins both the colonization of the host cell by the endoparasitic pathogen and the morphogenesis of the zoospores.^{13,14} In our recent publication, we analyze the typical cytoskeleton of a *E. dicksonii* spore during the different stages of infection.¹⁵ It is clear that the duplication of the MTOC of each spore nucleus precedes the repeated and synchronous divisions. In parallel, we hypothesize that the parasite MTs

participate actively in the compartmentalization of the *E. dicksonii* spores and the formation of the zoosporangium. A similar process was observed during sporangial cleavage in *Saprolegnia*, where the expansion of a central vacuole is combined with the role of MTs as a physical barrier.^{16,17}

The synoptic table below (Fig. 2) represents the fundamental modifications on the arrangement of the parasite MTs over the entire infection process.

Organization of Actin Filaments (AFs)

Staining with rhodamine-phalloidin (Rh-Ph) revealed the actin organization of *E. dicksonii*.¹⁵ In *E. dicksonii* spores, actin is organized mainly in the form of prominent plaques (Fig. 1A). At the stage of zoosporogenesis, the actin distribution is modified. Figure 1B shows a typical image, where diffuse AFs are accompanied by a reduced number of actin dots. The potential contribution of the cytoskeletal elements in the positioning of the cleavage planes has already been discussed in the case of *Phytophthora cinnamomi*,¹⁸ while in *Phytophthora infestans* the role of actin in hyphal growth has been examined.¹⁹ In combination with the MT modifications during the formation of the mature zoosporangium and the encystment of the primary cysts as explained above, we assume that the *E. dicksonii* cytoskeleton contributes to this fundamental procedure.

In some recent preliminary experiments, we applied Aniline Blue to stain β -1,3glucans such as callose. Interesting cell wall modifications are apparent at the penetration site under the light microscope (Fig. 1C). Thus, parallel to the cytoskeleton organization, the algal cell wall shows a distinct thickening just beneath the empty pathogen spore (Fig. 1D) similar to the cell wall papillae reported in plants.²⁰ Based on recent results by Hardham et al. (2008),²¹ we infer that the cytoskeleton plays a protag- onistic role and facilitates the accumulation of cell wall material in the wounded point.

The results from the experiments performed so far encourage further study of

the infection and defense mechanisms of the brown algae infected by the basal oomycete *E. dicksonii*. Could we ultimately crack the mysteries of algal immune systems?

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

1. Lebeda A, Pink DAC, Astley A. Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremialactuceae*). In: Spencer-Phillips PTN, Gisi U, Lebeda A, eds. *Advances in Downy Mildew Research*. Dordrecht: Kluwer, 2002:85-117.

2. Küpper FC, Müller DG. Massive occurrence of the heterokont and fungal parasites *Anisopodium*, *Euryschisma* and *Chytridium* in *Pylaiella littoralis* (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Nova Hedwigia* 1999; 69:381-9

3. Gachon CMM, Sime-Ngando T, Strittmatter M, Chambouvet A, Kim GH. Algal diseases: spotlight on a black box. *Trends Plant Sci* 2010; 15:633-40; PMID:20833575; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.005>

4. Müller DG, Küpper FC, Küpper H. Infection experiments reveal broad host ranges of *Euryschisma dicksonii* (Oomycota) and *Chytridium polysiphoniae* (Chytridiomycota), two eukaryotic parasites in marine brown algae (Phaeophyceae). *Phycological Res* 1999; 47:217-23; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1835.1999.tb00301.x>

5. Küpper FC, Maier I, Müller DG, Loiseux-De Goer S, Guillou L. Phylogenetic affinities of two eukaryotic pathogens of marine macroalgae, *Euryschisma dicksonii* (Wright) Magnus and *Chytridium polysiphoniae* Cohn. *Cryptogam, Algol* 2006; 27:165-84

6. Sekimoto S, Beakes GW, Gachon CMM, Müller DG, Küpper FC, Honda D. The development, ultrastructural cytology, and molecular phylogeny of the basal oomycete *Euryschisma dicksonii*, infecting the filamentous phaeophyte algae *Ectocarpus siliculosus* and *Pylaiella littoralis*. *Protist* 2008; 159:299-318; PMID:18243049; <http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2007.11.004>

7. Takemoto D, Jones DA, Hardham AR. GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of *Arabidopsis* by oomycete pathogens. *Plant J* 2003; 33:775-92; PMID:12609049; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01673.x>

8. Hardham AR, Jones DA, Takemoto D. Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr Opin Plant Biol* 2007; 10:342-8; PMID:17627866; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.001>

9. Kobayashi I, Kobayashi Y. Microtubules and pathogen defense. In: Nick P, ed. *Plant cell monographs: plant microtubules*. Berlin: Springer-Verlag, 2008:121-140.

10. Hardham AR. Microtubules and biotic interactions. *Plant J* 2013; 75:278-89; PMID:23480445; <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12171>

11. Cahill D, Rookes J, Michalczyk A, McDonald K, Drake A. Microtubule dynamics in compatible and incompatible interactions of soybean hypocotyl cells with *Phytophthora sojae*. *Plant Pathol* 2002; 51:629-40; <http://dx.doi.org/10.1046/j.0032-0862.2002.00758.x>

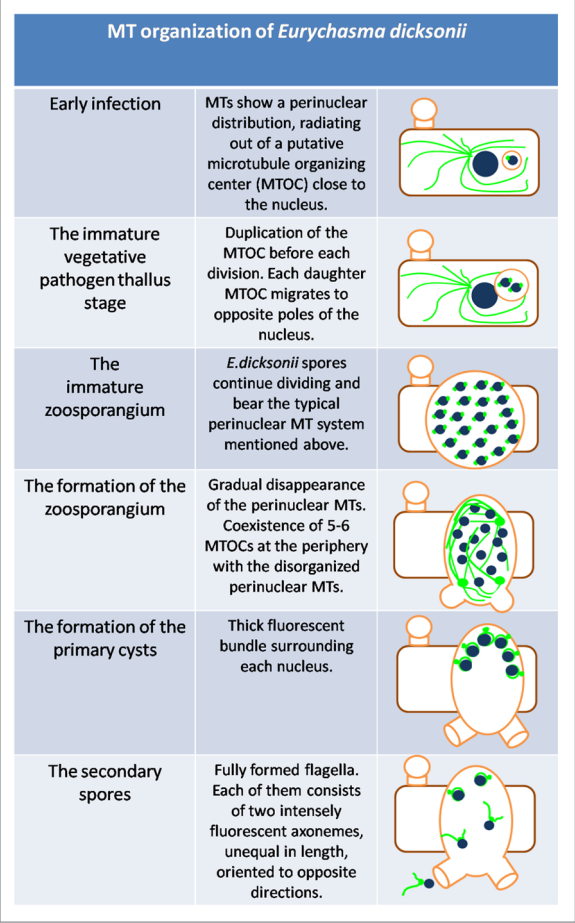


Figure 2. Diagrammatic representation of the *E. dicksonii* infection stages, showing modifications of MT. Organization in both host and parasite. Blue filled circles: nuclei. Green lines: MT bundles. Green dots: MTOCs. Brown rectangle: infected algal cell. Orange: *E. dicksonii* plasmalemma and cell wall structures.

12. Gachon CMM, Strittmatter M, Müller DG, Kleinteich J, Küpper FC. Detection of differential host susceptibility to the marine oomycete pathogen *Euryschisma dicksonii* by real-time PCR: not all algae are equal. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:322-8; PMID:19011072; <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01885-08>

13. Holloway SA, Heath IB. Morphogenesis and the role of microtubules in synchronous populations of *Saprolegnia* zoospores. *Exp Mycol* 1977; 1:9-29; [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-5975\(77\)80027-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-5975(77)80027-3)

14. Hardham AR. The Asexual Life Cycle. In: Lamour K, Kamoun S, eds. *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009:93-119.

15. Tsirigoti A, Küpper FC, Gachon CMM, Katsaros C. Cytoskeleton organisation during the infection of three brown algal species, *Ectocarpus siliculosus*, *Ectocarpus crouaniorum* and *Pylaiella littoralis*, by the intracellular marine oomycete *Euryschisma dicksonii*. *Plant Biol (Stuttg)* 2013; PMID:23692049; <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12041>

16. Gay JL, Greenwood AD. Structural aspects of zoospore production in *Saprolegnia ferax* with particular reference to the cell and vacuolar membranes. In: Madelin MF, ed. *The Fungus Spore*. London, UK: Butterworths, 1966:95-110.

17. Heath IB, Greenwood AD. Ultrastructural observations on the kinetosomes, and golgi bodies during the asexual life cycle of *Saprolegnia*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1971; 112:371-89; PMID:5542328; <http://dx.doi.org/10.1007/BF02584050>

18. Hyde GJ, Hardham AR. Confocal microscopy of microtubule arrays in cryosectioned sporangia of *Phytophthora cinnamomi*. *Exp Mycol* 1992; 16:207-18; [http://dx.doi.org/10.1016/0147-5975\(92\)90029-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0147-5975(92)90029-Q)

19. Ketelaar T, Meijer HJG, Spiekerman M, Weide R, Govers F. Effects of latrunculin B on the actin cytoskeleton and hyphal growth in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet Biol* 2012; 49:1014-22; PMID:23036581; <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.008>

20. Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact* 2011; 24:183-93; PMID:20955078; <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0149>

21. Hardham AR, Takemoto D, White RG. Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of *Arabidopsis* epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC Plant Biol* 2008; 8:63; PMID:18513448; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-8-63>

Attachment, penetration and early host defense mechanisms during the infection of filamentous brown algae by *Eurychasma dicksonii*

Amerssa Tsirigoti · Gordon W. Beakes · Cécile Hervé ·
Claire M. M. Gachon · Christos Katsaros

Received: 11 August 2014 / Accepted: 21 October 2014
© Springer-Verlag Wien 2014

Abstract *Eurychasma dicksonii* is one of the most common and widespread marine pathogens and attacks a broad spectrum of more than 45 brown algal species. The present study focuses on the mechanism used by the pathogen to attach on the host cell wall and force its way into algal cells. Ultrastructural examination revealed a needle-like structure which develops within the attached spore and extends along its main axis. Particular cell wall modifications are present at the basal part of the spore (adhesorium pad) and guide the needle-like tool to penetrate perpendicularly the host cell wall. The unique injection mechanism is shared with *Haptoglossa* species which suggests that this is an important characteristic of early diverging oomycetes. Furthermore, the encystment and adhesion mechanism of *E. dicksonii* shows significant similarities with other oomycetes, some of which are plant pathogens. Staining and immunolabelling techniques showed the deposi-

tion of β -1,3-glucans on the host cell wall at the pathogen penetration site, a strategy similar to physical responses previously described only in infected plant cells. It is assumed that the host defense in terms of callose-like deposition is an ancient response to infection.

Keywords Brown algae · *Eurychasma* · Host defense · Injection mechanism · Oomycete · Parasite

Introduction

In recent years, global seaweed production in aquaculture systems has increased exponentially. At the same time it has been estimated that the seaweed culture industry sustains losses of annual production between 10 and 30 % as a result of diseases caused partly by marine oomycetes (Gachon et al. 2010). Indeed, it is becoming apparent that oomycete pathogens are a serious threat to marine aquaculture as they are to terrestrial agriculture. This provides a renewed incentive to the study of interactions between algae and these parasites, which had hitherto been largely ignored (Potin et al. 2002; Klochkova et al. 2012).

One of the most common marine seaweed parasites is the oomycete *Eurychasma dicksonii* that infects a wide host spectrum of brown algae, can tolerate a broad temperature range (4–23 °C), and is geographically widespread (Müller et al. 1999). The main stages of the *E. dicksonii* infection cycle have been described previously by Sekimoto et al. (2008). To facilitate understanding of the key infection processes, an overview of the whole infection cycle will be briefly outlined. *E. dicksonii* zoospores are released from the mature thallus, which in this intracellular holocarpic organism (Suppl. Fig. 1a) is entirely transformed into a sporangium at maturity (Suppl. Fig. 1b). The released zoospores move towards uninfected host filaments where they encyst and become firmly

Handling Editor: Adrienne R. Hardham

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00709-014-0721-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Tsirigoti · C. Katsaros (✉)
Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis, Athens 157 84, Greece
e-mail: christos.katsaros@biol.uoa.gr

G. W. Beakes
Department of Biological and Nutritional Sciences, University of
Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne NE1 7RU, UK

C. Hervé
Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI,
CNRS, Integrative Biology of Marine Models, UMR 8227, Station
Biologique, Place George Teissier, F29688 Roscoff Cedex, France

C. M. M. Gachon
Culture Collection of Algae and Protozoa, Scottish Association for
Marine Science, Scottish Marine Institute, Oban, Argyll PA 37
1QA, Scotland, UK

attached to the host surface (Suppl. Fig. 1c). Subsequently, the parasite penetrates the host cell wall and transfers its cytoplasm into the algal cell. This leads to the formation of a multinucleate plasmodial thallus that is delimited by a double membrane envelope rather than the typical cell wall (arrow in Suppl. Fig. 1a). The thallus expands within the hyperplastic host cell until it almost completely fills it (Suppl. Fig. 1a). The mature plasmodial thallus then becomes walled and is converted into a sporangium. A peripheral layer of primary cysts is differentiated, which unusually remain firmly attached to the sporangium wall (Suppl. Fig. 1b). Biflagellate zoospores are eventually released from these primary cysts and escape through the, by then, open apical exit tube (Suppl. Fig. 1b). Following zoospore release the empty cyst walls form a residual net structure that is a characteristic morphological feature of this genus (Sekimoto et al. 2008).

Molecular phylogeny has shown that *E. dicksonii* is the earliest diverging known oomycete and a sister taxon of the nematode parasite *Haptoglossa* sp. (Sekimoto et al. 2008). Some cellular events resulting from infection have already been described in detail, in particular the dynamic changes in host cytoskeleton organization (Tsirigoti et al. 2014). Expression sequence tag libraries have revealed that *E. dicksonii* expresses pathogenicity genes which appear to be unique to this pathogen (Grenville-Briggs et al. 2011). However, the characterization of the earliest stages of infection and host responses has remained technically challenging thus far.

Oomycete cell walls are traditionally based on cellulose and β -1,3-glucans containing occasional β -1,6-linked branches. Recently, the detailed chemical analyses of various species have shown that their relative abundance may vary upon taxonomy and that additional cell wall polysaccharides may be found (Mélida et al. 2013). Although the detailed cell wall composition is not known, it is expected that β -1,3-glucans might also be major components in *E. dicksonii* cell walls.

This study focuses on the zoosporogenesis and the early stages of the interaction between *E. dicksonii* and its algal host. We describe in detail the ultrastructural cell wall modifications that occur in both the pathogen and the host during the parasite spore development, attachment and penetration. The similarities between the infection structures of *E. dicksonii* and other Oomycetes, Plasmodiophoromycetes and Chytridiomycetes are discussed. We further document the distribution of the β -1,3-glucans in the cell-walls of both actors. In the brown algal host, the formation of cell wall thickenings enriched in β -1,3-glucans are observed at the infection sites and in response to the attack by *E. dicksonii*, a property analogous to callose deposition during the papillae formation in land plants (Luna et al. 2011).

Materials and methods

Algal material and culture conditions

The host algae used in this study were *Ectocarpus crouaniorum* (CCAP 1310/300; Peters et al. 2010), *Pylaiella littoralis* (CCAP 1330/3) and female gametophyte of *Macrocystis pyrifera* (CCAP 1323/1). Each unialgal strain was infected by one of three strains of *E. dicksonii* (CCAP 4018/1, 4018/2, CCAP 4018/3). CCAP 4018/1 comes from Le Caro (Rade de Brest, Brittany, France) with original host *Ectocarpus siliculosus* CCAP 1310/299, CCAP 4018/2 from AithVoe (Bressay, Shetland, UK) and CCAP 4018/3 from Dunstaffnage (Oban, Scotland) with original host *E. crouaniorum* CCAP 1310/300. Female *M. pyrifera* (CCAP 1323/1) gametophytes do not release motile propagules and can be infected with all *E. dicksonii* strains mentioned above. Hence, *M. pyrifera* was used as an inoculum to infect target hosts, as described by Gachon et al. (2009). All cultures were grown in half-strength Provasoli medium (Andersen et al. 2005), at 12 °C, under a 12:12 photoperiod and a light intensity of 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Infection experiments were carried out as described by Müller et al. (1999). All algal cultures were clonal, and each *E. dicksonii* strain derived from a single developing intracellular thallus. They were cultivated with their naturally occurring bacterial flora, unless specified otherwise. Axenic *E. dicksonii*/algal combinations were generated and maintained as described in Müller et al. (2008). In all experiments, algal thalli were incubated with an inoculum of *E. dicksonii* for 2 weeks, which is the period required for a complete developmental cycle of the parasite (Müller et al. 1999). After that, the cultures were checked under the microscope for demonstrating all the different phases of the infection cycle.

Electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), different fixatives and embedding resins were tried in order to optimize the preservation of the material. The best image quality was obtained by infected algal thalli fixed and processed as described by Sekimoto et al. (2008) and a slightly modified protocol mentioned by Katsaros and Salla (1997). Therefore, those protocols were used thereafter. Briefly, they are based on fixative containing 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) including 50 % culture medium, 3 % NaCl, 0.1 % CaCl_2 , and 0.5 % caffeine. For scanning electron microscopy (SEM), infected thalli were processed using the protocol described by Uppalapati et al. (2001).

DNA staining

DNA was stained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) in phosphate buffer saline

(PBS; 137 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 5.1 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, 0.01 % NaN₃ pH 7.4) for 15 min. In an alternative protocol, DNA was stained with a 1000-fold dilution of a commercial SYBR-Green solution (Sigma, Taufkirchen, Germany). Since the bacterial load of older cultures tends to be high and hampered spore observation, an axenic *E. dicksonii*-*Ectocarpus* system was introduced. The use of 35-mm quartz-based Petri dishes (Iwaki, Asahi Glass Co, Japan) allowed non-invasive, high-quality imaging of live axenic cultures, with or without SYBR-Green DNA staining.

Aniline-blue staining

Infected algal thalli were incubated for 5 min at 95 °C in 1 M KOH and then washed with sterile seawater before incubation in 0.025 % aniline blue dissolved in 1 M KOH/EtOH. The samples were mounted on a slide in anti-fading agent (Slowfade, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Indirect immunofluorescence and immunogold electron microscopy

Mouse anti-(1,3)- β -D-glucan monoclonal antibody (Biosupplies Australia Ltd, Parkville, Australia), which recognizes linear (1–3)- β -oligosaccharide segments in (1–3)- β -glucans like callose, was used for both experimental procedures.

For indirect immunofluorescence, fully infected algal material was fixed in 4 % paraformaldehyde in microtubule stabilizing buffer [MTB; 50 mM; PIPES, 5 mM; ethyleneglycol bis (aminoethyl ether)-tetraacetic acid (EGTA), 5 mM; MgSO₄·7H₂O, 25 mM; KCl, 4 % NaCl, 2.5 %; polyvinylpyrrolidone 25 (PVP), 1 mM; DL-dithiothreitol (DTT), pH 7.4] for 1 h in room temperature. The samples were then washed thoroughly with MTB and the buffer was gradually replaced by PBS. The material was left to dry completely on cover slips treated with poly-L-lysine 1 mg/mL (Sigma). The samples were then incubated with 5 % milk powder in PBS for 45 min in humid atmosphere. Subsequently, the material was washed with PBS and incubated with a 100-fold dilution of mouse anti-(1, 3)- β -D-glucan monoclonal antibody (Biosupplies) in 5 % milk powder in PBS for 1 h in humid atmosphere. After washing with PBS, the material was incubated with a 100-fold dilution of fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse IgG (Sigma) in 5 % milk powder in PBS for 1 h. The material was finally washed with PBS and mounted in Citifluor AF2 glycerol solution (Agar Scientific, UK).

For immunogold staining, the protocol described by Apostolakis et al. (2010) was followed. Mouse anti-(1,3)- β -D-glucan monoclonal antibody (Biosupplies) and 10 nM

monodisperse colloidal gold-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) were diluted 1:40 and 1:10 in blocking buffer, respectively.

Equipment

For optical and immunofluorescence microscopy, the samples were observed with either a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Instruments, Heidelberg, Germany), a Zeiss Axioplan or a Zeiss Axioscope 2 microscope coupled with an AxioCam camera and the software AxioVision™ 4.7 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). For transmission electron microscopy (TEM), the samples were observed with a Philips 100 CM and a Philips 300 transmission electron microscopes (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA) and digital images were collected using an AMT CCD camera (Deben, Suffolk, UK). For scanning electron microscopy (SEM), the samples were observed under a JSM-6360 scanning electron microscope (JEOL, Japan).

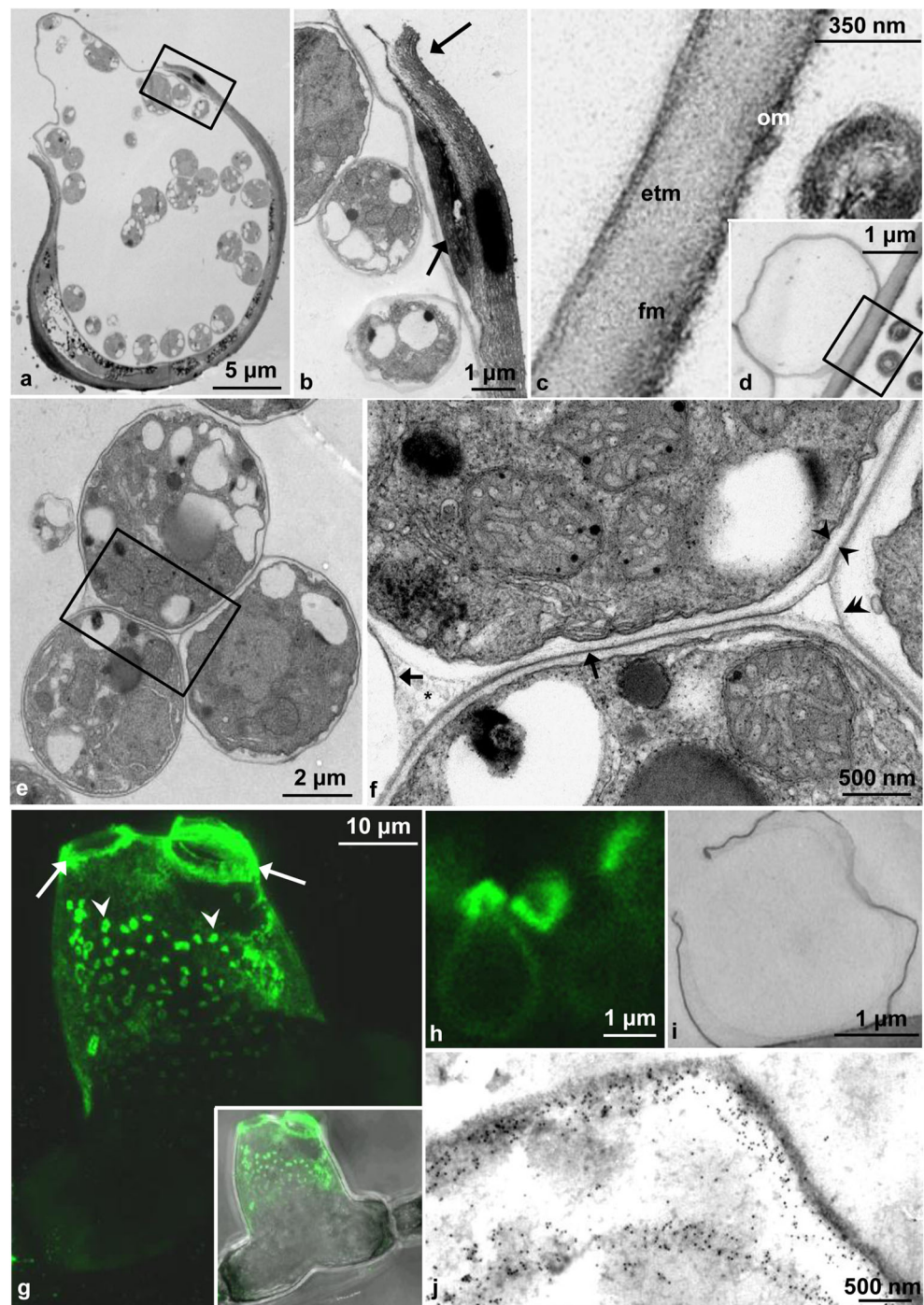
Results

E. dicksonii spore formation within the mature thallus (sporangium) and primary cyst walls

The oblique section of a mature sporangium of *E. dicksonii* shows the peripherally distributed differentiated primary cysts (Fig. 1a). The enlargement of the mature sporangium with its broad apical discharge tube (s) leads to the rupture of the host cell wall which forms a cup in which the parasite thallus sits, surrounded by the remnants of the disintegrated host cytoplasm (Fig. 1a, left arrow in Fig. 1b). At the point of rupture the fractured host cell wall appears stretched and tapered (right arrow in Fig. 1b). The cell wall of *E. dicksonii* sporangium consists of three zones: a thin outer electron-dense granular coat (~50 nm thickness), an intermediate zone of fibrillar material of moderate electron density (~100 nm thickness) and a thicker inner, more electron-transparent layer (~250 nm thickness) (Fig. 1c, d).

Improved sample fixation allowed us to refine our understanding of the cell wall of the primary cysts (Fig. 1e, f), which had previously been reported as composed of a discrete (not granular) outer electron-dense layer (Fig. 1e, arrows in Fig. 1f; Sekimoto et al. 2008) and a thin underlying fibrillar zone (double arrowheads in Fig. 1f). Below this, there is an electron-lucent layer, where the plasma membrane of the spore has pulled away from the wall (arrowheads in Fig. 1f). In addition, a layer of loose fibrillar (adhesive-like) material is observed between the

Fig. 1 Structure of *E. dicksonii* primary cyst and sporangial cell wall. **a** Sporangium (*mature thallus*) containing peripherally distributed primary cysts. **b** High magnification of the boxed area in Fig. 1a, showing the ruptured host cell wall and disintegrated host cytoplasm (arrows). **c** High magnification of the boxed area in Fig. 1d, illustrating the sporangial cell wall. *etm* electron-transparent material, *om* outer material, *fb* fibrillar material. **d** Empty primary cyst attached to the sporangial cell wall. **e** Adjacent, full primary cysts. **f** High magnification of the boxed area in Fig. 1e detailing the cell wall architecture of the adjacent primary cysts. Arrows: outer, electron-dense material; arrowheads: electron-lucent layer; double arrowheads: thin, fibrillar zone; asterisk: adhesive-like material between the cysts. **g–j** Indirect immunolabelling of β -1,3-glucan in *E. dicksonii* sporangial structures. **g** Indirect immunofluorescent labelling in sporangium (*mature thallus*). Arrows show the bright signal in the open, apical exit tube. Arrowheads show the labelling in the open discharge pores of the primary cysts. Inset: merged DIC image with fluorescent labelling. **h** High magnification of primary cysts with specific immunofluorescent detection of β -1,3-glucans in the open discharge pores. **i** TEM image of an empty primary cyst with open discharge pore. **j** Immunogold labelling of β -1,3-glucans in an exit tube of a sporangium



adjacent cell walls of primary cysts (asterisk in Fig. 1f), where the outer, electron-dense coat appears to be disrupted at the point of spore contact and seems to act as a connecting layer binding adjacent cysts together (left arrow in Fig. 1f).

Additionally, immunofluorescence and immunogold labelling show the detection of β -1,3-glucans in *E. dicksonii* cell walls in both the spores and the sporangia. The β -1,3-glucans were more abundantly

present in the rim of the opened discharge tubes of the mature zoosporangium (arrows in Fig. 1g, j). Localized β -1,3-glucan labelling inside the sporangium (arrowheads in Fig. 1g) corresponds to the primary cyst discharge pores which are illustrated at higher magnification in Fig. 1h. Additionally, fine structural examination of the empty cysts revealed a thick cell wall which consists of one outer zone of electron-dense material and a more transparent inner one (Fig. 1i).

Zoospore encystment, germination and attachment

After being discharged from the primary cysts, the biflagellate zoospores are released via the wide apical discharge tube (s) of the sporangium (Sekimoto et al. 2008; see also Suppl. Fig. 1b). Zoospores are attracted to the vicinity of the host filaments (Fig. 2a) where they encyst and firmly attach to the host cell wall through the formation of an adhesorium pad (Fig. 2e, f; Sekimoto et al. 2008). Secondary cysts appear to lack the electron-lucent inner layer found in discharged primary cysts (Fig. 2j). Moreover, the cell wall of secondary cysts is composed of a thin outer electron-dense layer (Fig. 2j, k) similar to that described in the primary cysts, although the inner granular wall layer becomes substantially thicker (~400 nm thickness) than in primary cysts. The thickening of the cell wall occurs gradually. At the very early stages of the encystment, the thickness of the inner cell wall material is approximately 200 nm (Fig. 2j, k) and eventually reaches the 400 nm after attachment (Fig. 3a–c).

Some *E. dicksonii* zoospores encyst close to the alga without making direct contact with the host filament or only loosely attach to it (arrows in Fig. 2a, arrowheads in Fig. 2d, j). Many secondary cysts further germinate without attachment to a host cell (Fig. 2b, c, arrows in Fig. 2d). Those germinated spores contain a large vacuole with an optically dense granular inclusion, exactly like the non-germinated secondary cysts (Fig. 2d). Moreover, a proportion of them form a 1- μ m-wide germ tube that can measure up to 10 μ m in length (Fig. 2b, c, h arrows in Fig. 2d). As revealed by staining with SYBR green, the nucleus is retained in the germinated cyst body (Fig. 2b, c), although eventually migrates along with the main cytoplasmic mass into the germ tube tip (Fig. 2h). Some of these germ tubes appear to be terminated by an adhesorium pad (Fig. 2i) which appears to have a similar architecture to those described in more detail below in secondary cysts attached to the host cell wall.

Although an infrequent event, the phenomenon of fusion between two *E. dicksonii* spores was consistently observed in relatively old cultures (arrow in Fig. 2g). However, no transfer of cytoplasmic material or DNA between the fused spores could be unequivocally detected with live SYBR-Green.

The *E. dicksonii* secondary cysts that attach directly to the host cell wall and acquire an asymmetric profile, with a flattened adhesorium pad closely appressed to the algal cell wall (Figs. 2e, f, and 3a–c). At this stage, the basal cell wall is thickened as described above (Fig. 3a–c) and a contact layer of electron-dense material seems to glue the parasite spore to the algal cell wall (asterisks in Fig. 3a, b). This material is also visible at later stages (asterisked in Fig. 3e, f, k). Moreover, further fine fibrils can be seen between the electron dense basal pad and the algal cell wall (arrowhead in Fig. 3k). This layer of material runs parallel to the algal cell wall and extends beyond the spore by two to three times its diameter

(arrowhead in Fig. 4k). In addition, a layer of stringy, mucus-like, material also coats the cyst (arrow in Fig. 3k) and seems to flow onto the surface of the host cell (Fig. 4k). This material is also detected in SEM images as a disc of material at the foot of the encysted spore (arrowed in Fig. 2e).

Host penetration

Each attached cyst is characterized by a dense cytoplasm, and contains a single laterally placed nucleus, an active dictyosome and a cluster of mitochondria close to the nucleus (Fig. 3a–c). The distal part of the spore cytoplasm is dominated by numerous large vesicles containing electron-dense material (Fig. 3a–c). In addition, a needle-like electron-opaque structure appears extending along the main axis of the cyst. Observation of serial sections revealed that this structure traverses the whole cytoplasm; its length is around 4 μ m and its width 400 nm (Fig. 3a–c). Whilst earlier stages of needle formation have not been observed, by comparison with gun cell development in *Haptoglossa* (Beakes and Glockling, 2000), it seems likely that the peg-like wall ingrowth shown in a detached cyst (arrow in Fig. 2j, k) could represent the initiation of needle development. The ingrowth is characterized by a dense, granular zone (double arrowhead in Fig. 2k) and a sharply delimited apical cap of high electron density (arrowhead in Fig. 2k). The plasma membrane follows the invagination of the cell wall and surrounds the peg-like structure (arrow in Fig. 2k).

At the more advanced stage illustrated in Fig. 3a–c, the needle appears to be bounded by the invaginated plasma membrane of the spore, and directly originates from an electron-dense zone in the thickened basal region of the cyst, adjacent to the point of host attachment (Fig. 3c). This could correspond to the dense granular wall region shown in Fig. 3a–c. The needle-like apparatus is composed of a central, fine core structure surrounded by a slightly less electron-dense zone and an outer, electron-transparent layer (Fig. 3a–c, i). The whole structure is delimited by the plasma membrane, and appears directly connected to cell exterior at the point it makes contact with the host cell wall. This layered structure is clearly shown by the cross section of the injection needle apparatus in Fig. 3i, which is interpreted as being a needle in aberrant infection cell that failed to penetrate the host cell wall.

In a next stage of infection, cysts formed an adhesorium chamber, probably as a result of the formation of a basal cavity by ingrowth of a septum-like cell wall (Fig. 3d–f). These inward cell wall protrusions separate the basal compartment from the main spore cytoplasm (double arrowheads in Fig. 3d), although there is still cytoplasmic continuity through a central channel pore open into which the needle apparatus passes (Fig. 3g). The internal surface of the cavity appears coated by a layer of slightly more electron-transparent material, which forms an annular lip-like collar (arrowheads in

Fig. 2 Encystment and germination of *E. dicksonii* zoospores. **a** Bright field image of an axenic 6-week-old culture of *Ectocarpus croutaniorum* infected by *E. dicksonii* 4018/3. The density of encysted spores (arrows) increases in the vicinity of the algal filament. **b–c** Germinated encysted spore (axenic culture). **b** DIC image. **c** DNA staining with SYBR Green. **d** Arrow shows one germinated spore close to the algal filament. Arrowheads show spores encysted close to the host or loosely attached on the host cell wall. **e** SEM image of an attached spore to the host cell wall. Arrows show the stringy material that coats the spore. **f** Spore attached to the host cell wall. Merged DIC image with DNA staining with Hoechst 33258. **g** Bright field image of a fusion between two germinated spores (axenic culture). **h–k** TEM images of *E. dicksonii* secondary cysts structures. **h** Secondary spore with well-developed germ tube. **i** Distal end of a germ tube with a formed adhesorium pad. **j** Peg-like invagination in a secondary cyst. **k** High magnification of a peg-like invagination (double arrowheads); arrow shows the plasma membrane and arrowhead shows the electron-dense cap

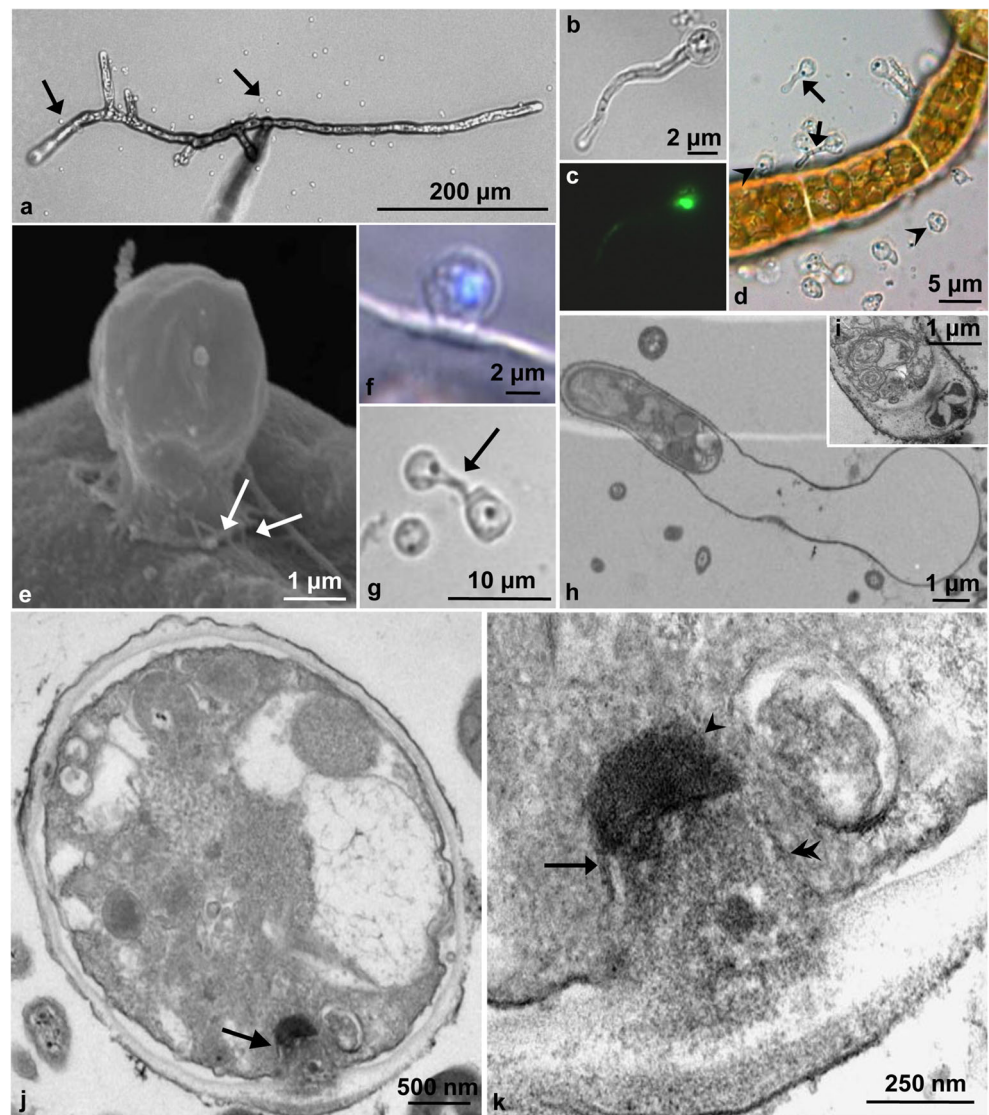


Fig. 3e, f). The deposition of this cell wall material appears to start with the development of the downward lips to the pore (arrowhead in Fig. 3e) and then is extended around the compartment. The cell wall at the base of the appressorium is much thinner than at earlier stage and indeed the wall appears completely eroded away where it makes contact with the host surface at this stage of development (Fig. 3e). The basal wall eventually folds back forming a flange which leaves a small portion of parasite cytoplasm in direct contact with the host wall (arrowhead in Fig. 3f).

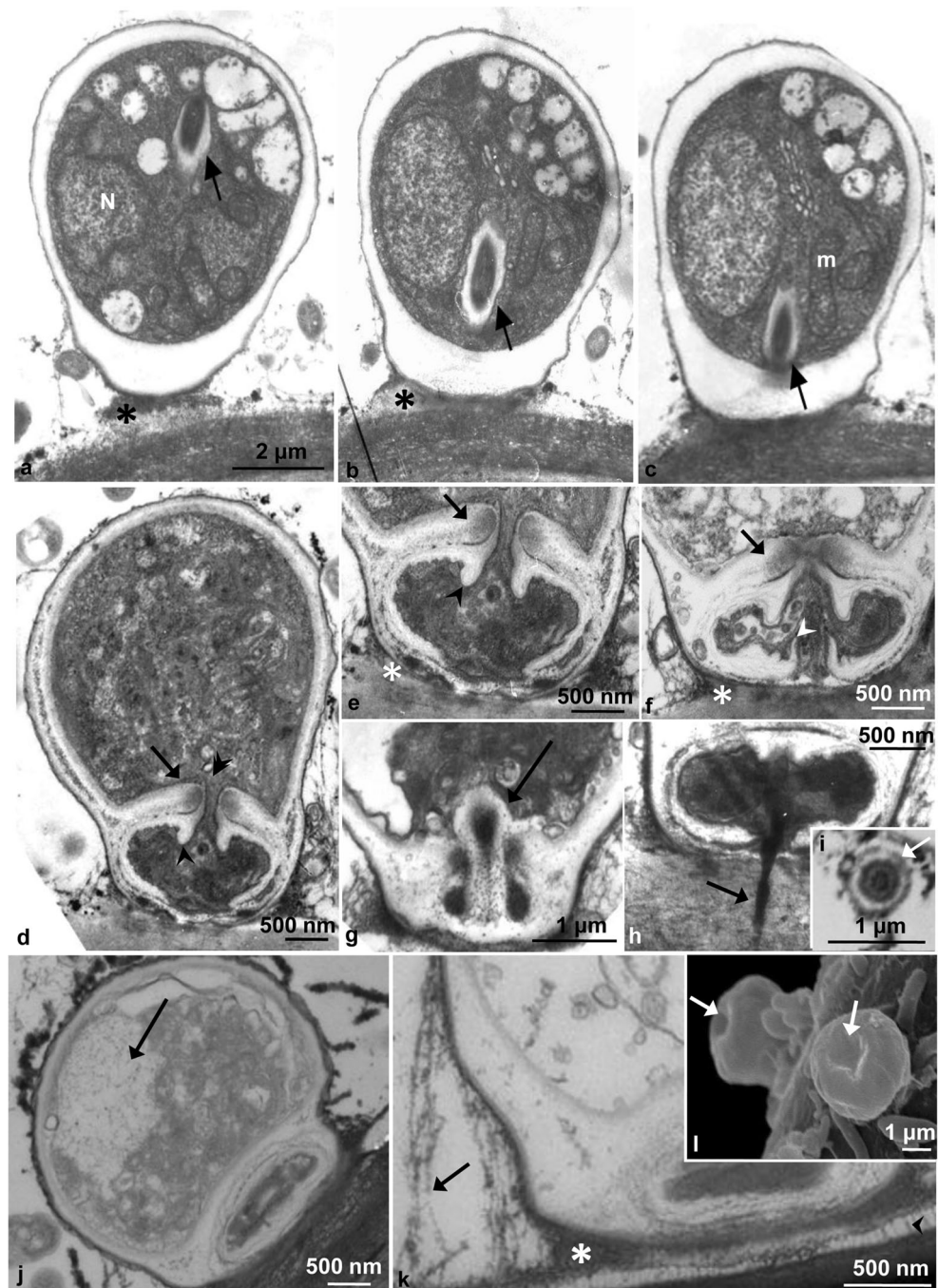
The mature spores are characterized by the presence of a large vacuole at the distal side of the spore away from the point of spore attachment (arrow in Fig. 3j). Additionally, SEM images of mature cysts reveal depressions on the top of attached spores (arrows in Fig. 3l), although similar changes in shape are not observed in thin-sectioned material (Fig. 3j).

Subsequently, it is suggested (although not directly observed) that the needle passes through the channel pore, and being directed by the surrounding cell wall structures of the adhesorium chamber cavity, penetrates perpendicularly the host surface. The central, fine core of the rod is expelled from the cyst and is forced to rupture the host cell wall (arrows in Fig. 3h). Once the host cell wall has been ruptured, the cytoplasm flows into a channel created by the needle (Fig. 4h). In the section of a discharged infection cell, a narrow channel can be seen in the host cell wall, presumably where the needle has punctured the wall (arrow in Fig. 4h).

Host-pathogen cell wall composition and host reaction against the infection

The aniline blue fluorochrome was used to detect β -1,3-glucans in walls during the infection process. The distribution of the polymer was further cross-checked by immunolabelling

Fig. 3 *E. dicksonii* attached spores to the host cell wall and cell wall differentiation in their adhesion chamber. **a–k** TEM images. **a–c** Early differentiation of the needle-like penetration structure within an *E. dicksonii* spore attached to the host cell wall. Serial TEM sections show the needle-like structure that extends along the main axis of the spore (*arrows*). *N* nucleus, *m* mitochondrion. **d** *Arrow* shows the lip-like cell wall protrusions, *arrowhead* shows the internal electron-lucent material and *double arrowheads* show the central channel pore. **e, f** High magnification of the adhesion chamber. *Arrow* shows the ingrowth of the basal cell wall, *arrowhead* shows the electron-lucent material coating the cavity internally. *Asterisk* shows the contact layer of electron-dense material. **g** *Arrow* shows the needle-like structure that extends through the channel pore of the cyst. **h** Central core of the rod coming out of the cyst (*arrow*). **i** *Arrow* shows the needle-like structure of the spore in cross section. **j** Vacuole formed at the apical part of the cyst. **k** Stringy material that coats the cyst (*arrow*), and fibrillar deposition at the base of the attached spore (*arrowhead*). *Asterisk*: contact layer. **l** Cavities on the top of attached spores (*arrows*, SEM)



techniques using a specific monoclonal antibody to β -1,3-glucans. The aniline blue fluorochrome showed the detection of β -1,3-glucans in the *E. dicksonii* adhesion chamber. The signal was particularly intense in the area of the upper lip-like structure (red arrows in Fig. 4a, c). The immunofluorescence and immunogold experiments confirmed the accumulation of β -1,3-glucans within the whole adhesion pad cell walls (Fig. 4g, i, j).

In infected algal cells of *M. pyrifera*, *E. crouaniorum* and *P. littoralis*, the host cell wall under the attached spore appears

partially disorganized. In more details, its fibrillar structure (likely representing cellulose) is disrupted and a large rupture with an electron-dense area is detected within it (arrow in Fig. 4k). Ultrastructural images confirm these observations demonstrating the accumulation of amorphous material and cell wall thickenings at the point of pathogen's interaction with the host cell (arrowhead in Fig. 4h, arrow in Fig. 4l). The detection of β -1,3-glucans showed that the polymers are also abundantly found within these cell-wall thickenings formed at the penetration site in all the three infected brown

algal strains used (white arrows in Fig. 4a, c, e). For confirmation of the above observation, uninfected materials of all strains included in the present study were also labelled by the anti- β -1,3-glucan antibody. Brown algal filaments that were not infected by the oomycete did not reveal β -1,3-glucan deposition on their cell walls (see negative control of *Macrocystis pyrifera* in Suppl. Fig. 2).

Discussion

Changes in the ultrastructure of the thallus/sporangium cell walls during advanced stages of development

The peripheral distribution of primary cysts of *E. dicksonii* and their attachment to the sporangium (thallus) wall is a unique morphological feature of this genus (Sekimoto et al. 2008). The presence of a thin outer electron-dense cyst wall layer is similar to what is reported on primary cysts throughout the Saprolegniales where this layer is derived from small vesicles that are distributed around the periphery of the primary zoospore (Beakes 1983, 1989). By analogy with the Saprolegniales (Beakes 1983; Burr and Beakes 1994), these vesicles in *E. dicksonii* are probably the origin of the thin outer layer of “adhesive” material which coats the primary cysts. In *E. dicksonii*, the electron-dense layer also seems to be partially disrupted at the point where adjacent cysts make contact, and may play a role in physically linking neighbouring cysts. The primary cyst coat is therefore a remarkably conserved structure in oomycetes, with similar structures in the marine diatom parasite *Lagenisma* (Schnepf et al. 1978) and the crustacean parasite *Haliphthoros* (Overton et al. 1983) and in genera throughout the Leptomitales and Saprolegniales (Beakes 1989). The inner electron-lucent layer described here in discharged primary cysts of *E. dicksonii*, which is enriched in β -1,3-glucans, has not been reported in any other oomycete, although *N*-acetyl-glucosamine binding sites have been found on the inner face of discharged primary cysts of *Saprolegnia parasitica* (Burr and Beakes 1994). Whether this material plays a role in excystment is uncertain.

The multi-layered sporangium/thallus wall appears morphologically similar to that described in sporangia and hyphae throughout the oomycetes (Beakes 1989). β -1,3-glucan has been reported as a cell wall component of both the two main lines of oomycetes, the Peronosporales and the Saprolegniales (Mélida et al. 2013). In this study, we showed that β -1,3-glucans are also components of *E. dicksonii* cell walls. More specifically, immunolabelling experiments demonstrated the localized presence of β -1,3-glucans around the rims of the discharge pores and the adhesorium chamber. The specific labelling of β -1,3-glucans on the rim region of the discharge tubes of mature sporangia and the individual exit tubes in the primary cysts suggests that they might be involved in the spore release. The mechanical properties of β -1,3-glucans

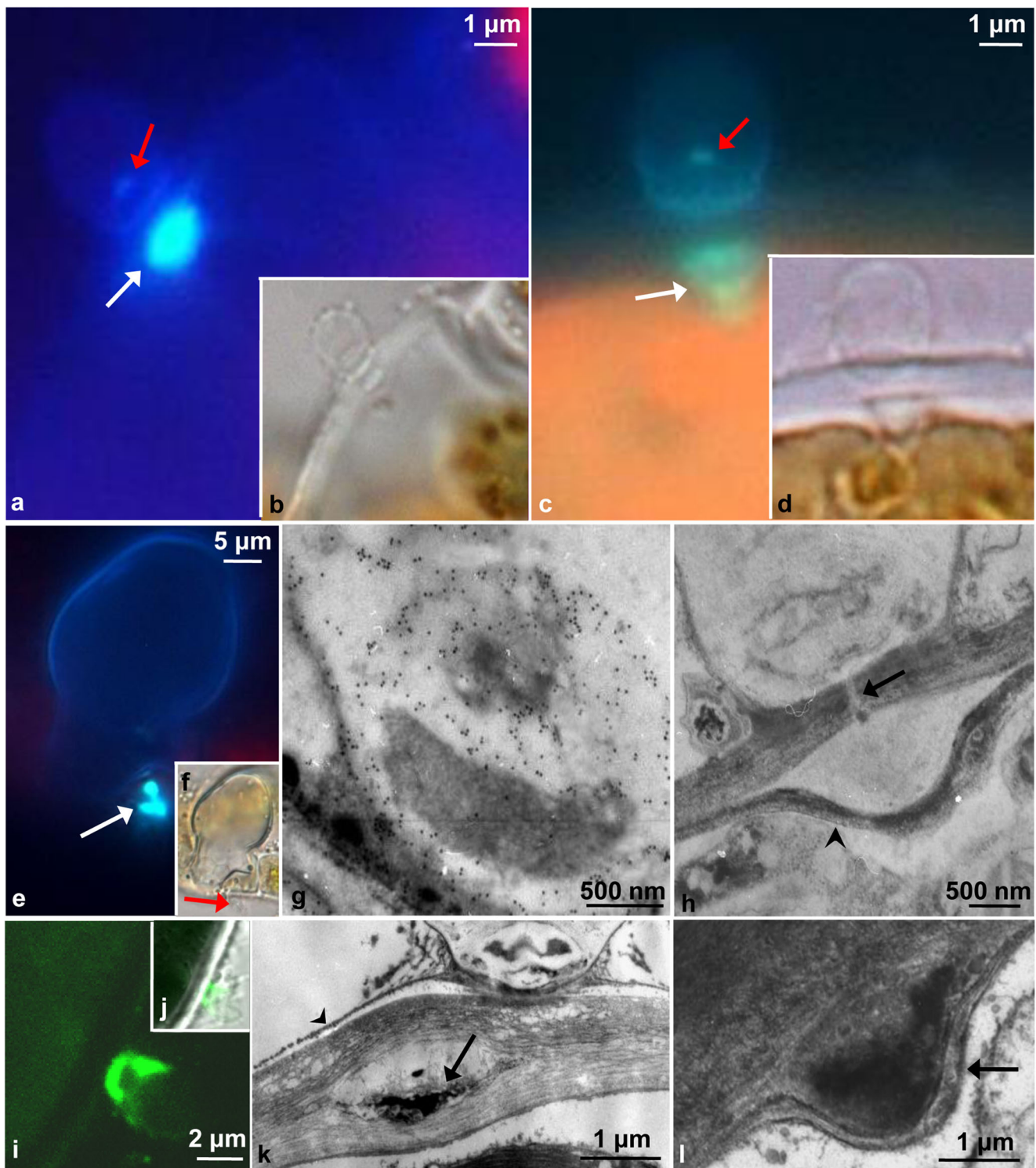
Fig. 4 Detection of β -1,3-glucans in different brown algal species and *Eurychasma dicksonii*. **h, k, l** illustrate ultrastructural host cell wall modifications during infection. **a–d** *Ectocarpus crouaniorum* 1310/300 infected by *E. dicksonii* 4018/3. **a, c** Aniline blue stains both the upper lip-like structure of *E. dicksonii* (red arrow) and the algal cell-wall reinforcements (white arrow). **b, d** Corresponding DIC images. **e** Cell-wall thickenings in a successfully infected *Macrocystis pyrifera* 1323/1 host cell, where *E. dicksonii* 4018/1 has differentiated a sporangium (white arrow, aniline blue). **f** Corresponding DIC image. Red arrow shows the attached empty cyst to the host cell. **g** *Pylaiella littoralis* 1330/3 infected by *E. dicksonii* 4018/2. Immunogold labelling in *E. dicksonii* secondary cyst demonstrates accumulation of β -1,3-glucans in the cell wall of the adhesorium pad. **h** *Macrocystis pyrifera* 1323/1 infected by *E. dicksonii* 4018/2. TEM image of ruptured host cell wall at the penetration site (arrow), and deposition of callose-like cell wall material by the host beneath (papilla-like, arrowhead; see also Fig. 4l). **i** Intense β -1,3-glucan labelling on the basal part of a *E. dicksonii* 4018/3 spore attached to a *Macrocystis pyrifera* cell (immunofluorescence). **j** DIC image merged with fluorescent labelling. **k, l** *Pylaiella littoralis* cell wall during infection by *Eurychasma dicksonii* 4018/2. **k** Large rupture of the host cell wall, containing an electron-dense area (arrow). Note also the adhesive-like material that extends around the *E. dicksonii* spore (arrowhead). **l** Accumulation of amorphous material in the host cell wall (papilla-like, arrow)

(Bacic et al. 2009) that provide weaker biochemical supports than cellulose fibres may ease the rapid cell wall modifications that occur during the attachment-penetration procedures.

Encystment and adhesion of cysts to host

The secondary cysts of *E. dicksonii*, which form as a result of the encystment of free-swimming zoospores (Sekimoto et al. 2008), show a number of differences from their primary counterparts. The spores which encyst away from host have a rounded morphology and produce narrow germ tubes similar to cysts of both the Saprolegniales and Peronosporales. Even the large vacuole with an optically dense granular inclusion appears virtually identical to that in a newly described nematode parasite, *Chlamydomyzium dictyuchoides* (Beakes et al. 2014). Like their primary counterparts, secondary cysts are also bounded by a thin electron-dense outer layer and coat of granular material. However, one obvious difference is that the inner carbohydrate wall layer tends to be much thicker than in young primary cysts (compare Figs. 1e and 2j), although the underlying structure appears similar.

Germinating cysts of *E. dicksonii* do differ slightly from their saprolegniaceous counterparts in that the nucleus does not appear to immediately migrate into the germ tube (Heath 1995). However, in other detached spores, the cytoplasm seems to migrate en masse out of spore body into the tip of the germ tube, in a way reminiscent of germlings of *Saprolegnia parasitica* undergoing microcyclic sporulation (Willoughby 1977). Furthermore, *E. dicksonii* germ tubes often appear to grow towards a potential host, and the observation of an adhesorium pad structure at the basal part of some of these germ tubes indicates that this is one of morphogenetic pathways of infection. Finally, in some of the older cultures,



adjacent cysts appear to be producing germ tubes that fuse with neighbouring secondary cysts. Although we did not obtain any direct evidence for nuclear transfer between these cysts, this pattern of development is reminiscent of sexual conjugation reported in *Lagenisma coscinodisci* by Schnepf et al. (1977).

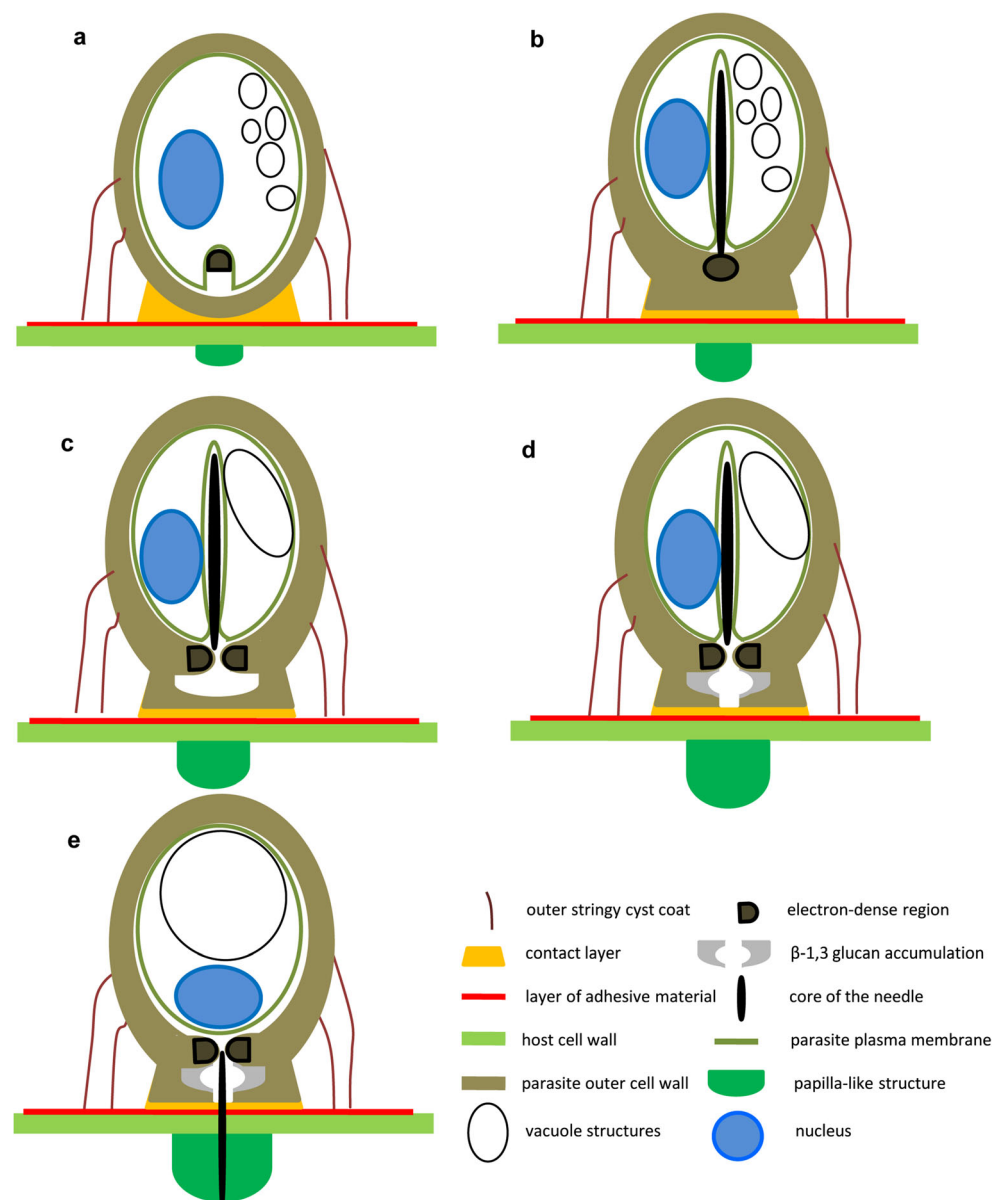
Zoospores which encyst upon the surface of the host alga, however, undergo quite a different pattern of morphogenesis. They quickly acquire an elongate profile with a clearly differentiated basal region that closely adheres to the host cell wall (as in Fig. 2f). Sekimoto et al. (2008) have shown that the free swimming zoospores of *E. dicksonii*

contain two types of peripheral vesicles, a small rounded vesicle with dense granular core, and a larger ventral vesicle, with more diffuse contents. These appear analogous to the dorsal encystment/bar body vesicles and larger ventral K-bodies that have been described throughout the Leptomitales and Saprolegniales (Beakes 1989, Lehen and Powell 1989; Burr and Beakes 1994). The ventral vesicle (vsv) population in *P. cinnamomi* appears to be the origin of the adhesive because it includes the PcVsv1 protein which resembles other eukaryote adhesive proteins in containing thrombospondin type 1 repeats (Robold and Hardham 2005). By analogy, in *E. dicksonii*, the pad of material in the contact zone which appears to spread out over the host surface, is presumed to be derived from the larger ventral vesicles described by Sekimoto et al. (2008).

Adhesorium development and the mechanism of host penetration

One of the main findings of this study is the ultrastructural analysis of the development of a complex penetration apparatus by *Eurychasma* that is unlike any structure so far described in the oomycetes. A needle-like element was first reported by Sekimoto et al. (2008) in a low power micrograph but without any detailed description. This study has confirmed the presence of a needle-like structure in attached secondary cysts of *E. dicksonii*, and has shown that its formation is also associated with the development of an adhesorium chamber at the point where the spore and host make contact. There are only two other examples of needle-like penetration structures produced by fungal-like protists, i.e. the root infecting club root

Fig. 5 Diagrammatic scheme of the *E. dicksonii* infection apparatus and the algal response. **a** Initiation of the needle-like tool formation in an attached spore to the host cell wall. The peg-like wall ingrowth is shown. **b** Differentiation of the basal part of the spore that eventually leads to the adhesorium-like chamber formation. **c** Ultrastructural modifications that occurred on the spore cell wall at the adhesorium-like compartment. Formation of a basal cavity by ingrowth of a septum-like cell wall and appearance of the vacuole. **d** Opening of a channel pore and further cell wall modifications of the adhesorium pad which is now coated internally by an electron-lucent flange. **e** Injection of the needle-like apparatus after the expansion of the vacuole. Note the presence of β -1,3-glucans in the host cell wall (papilla-like) at all stages



pathogen, *Plasmodiophora brassicae* (Temminck and Campbell 1969; Aist and Williams 1971) and the nematode infecting oomycete parasite *Haptoglossa* (Robb and Barron 1982; Beakes and Glockling 1998; Beakes and Glockling 2000; Hakariya et al. 2002). In both these phylogenetically unrelated organisms, a needle-like structure is produced in an inverted tube, formed by the invagination of the plasma-membrane. The dense-granular peg-like ingrowth of the secondary cyst wall and associated cap of electron-dense material shown in Fig. 2k is very similar to the structure that initiates infection tube development in *Haptoglossa* (Beakes and Glockling 1998; Beakes and Glockling 2000). Although some intermediate stages are missing, the electron-dense plaque at the point where the developing injection tube makes contact with the plasma membrane (shown in Fig. 3c) may be the residue of the electron-dense granular material, shown in Fig. 2k, and the electron dense cap might be the earliest stage in the formation of the penetration needle. However, there is no evidence for the formation of the elaborate chamber apparatus, with its restraining membrane systems observed in *Haptoglossa*. In *E. dicksonii*, the penetration apparatus simply seems to consist of a rigid electron-dense rod, with an electron-dense core surrounded by a layer of more electron-lucent material (Fig. 3i).

The structure that appears unique to *E. dicksonii* is the basal appressorial chamber. Unfortunately, some of the intermediate stages of development have not been found. The most likely explanation for this compartment would be by the centripetal insertion of a pored septum which later develops flanges and lips in order to lock the needle in a rigid orientation vertical to the host cell wall (see Fig. 3g). As the penetration procedure continues, a large vacuole appears. The electron-dense granules enclosed in the vesicles of the *E. dicksonii* spore may enlarge and fuse to form the distal vacuole, as described in the Cryptomycota *Rozella allomyces* (Held 1973) and *Haptoglossa* spp. (Beakes and Glockling 1998; Beakes and Glockling 2000). It is thought that the expansion of this vacuole provides the force required to inject the rigid needle through the host cell wall, guided by the collar-like adhesorium flanges (Fig. 3g).

In both *Plasmodiophora* and *Haptoglossa*, the firing of the needle occurs in a fraction of a second (Aist and Williams 1971; Robb and Barron 1982; Hakariya et al. 2002). It seems likely that a similar time frame would also be true for *E. dicksonii*. As in *Plasmodiophora*, the end result of a successful infection is the introduction of a naked protoplast, bounded by a double-membraned envelope, into the host cell (Aist and Williams 1971; Sekimoto et al. 2008). Although we do not have images of the needle actually penetrating the wall, a fact already shown by Sekimoto et al. (2008), we do present evidence of a narrow pore in the host cell wall, through which the spore cytoplasm appears to stream (arrowhead in Fig. 4h). These observations provide one of the few morphological

similarities between *E. dicksonii* and *Haptoglossa*, and suggest that the injection mode of infection is common to these early diverging oomycetes. The complex infection apparatus and a suggested morphogenetic sequence have been summarized in the schematic diagram in Fig. 5.

Reaction of host cells to infection

We document the formation of cell-wall thickenings enriched in β -1,3-glucans within the algal cell wall and as a response to the infection by *E. dicksonii*. In land plants, a similar structure is deposited within the cell-wall upon infection and known as the papillae, which contains callose (a β -1,3-glucan polymer) as the main component (Underwood 2012). Functioning as a physical barrier, the papilla blocks or leastwise slows the pathogen invasion in the plant cell, whilst this delay allows the host to further prepare its defense against the attack by the activation of genes involved in defense-responses (Voigt 2014). In brown algae, β -1,3-glucans are known to occur as a storage polysaccharide known as laminarin but have been poorly documented in cell-walls. The polymer has been previously reported to be present in the sieve plates of Laminariales as in land plants (Parker 1964) but the hypothesis was made on the basis of techniques of limited analytical performance and never confirmed this then. Here, we showed that β -1,3-glucans or callose can also be transiently deposited in the cell walls upon infection in brown algae. These observations are supported by the recent identification of genes putatively involved in callose synthesis within the entire genome sequence of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Michel et al. 2010; clade C of the glycosyl transferases family 48). The biosynthesis of β -1,3-glucans is an ancestral metabolism in eukaryotes (Michel et al. 2010). The formation of cell-wall reinforcements containing β -1,3-glucans upon infection in both land plants and brown algae might indicate that the fundamental basis of the papillae formation is also of an ancestral origin, predating the primary endosymbiosis event.

Acknowledgments We gratefully acknowledge funding from the British Phycological Society and the Federation of European Microbiological Societies (F.E.M.S.) for the short-term grants that enabled AT to work in Roscoff and Newcastle. AT's visit to Station Biologique de Roscoff (France) and the supply of the biological material by CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, Scotland) were supported by the European Commission through under the FP7 'capacities' specific program ASSEMBLE (grant no. 227799). We also acknowledge Prof. Kostas Fasseas (Agricultural University of Athens) for his precious help with SEM and Emily Olesin for technical support. This work was partially supported by TOTAL Foundation (project title "Brown algal biodiversity and ecology in the eastern Mediterranean sea"). CMMG is funded by a UK NERC grant No NE/J00460X/1.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aist JR, Williams PH (1971) The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmiodiophora brassicae*. *Can J Bot* 49:203–2034
- Andersen RA, Berges JA, Harrison PJ, Watanabe MM (2005) Recipes for freshwater and seawater media. Appendix A. In: Andersen RA (ed) *Algal culturing techniques*. Academic, New York, p 501
- Apostolakis P, Livanos P, Nikolakopoulou TL, Galatis B (2010) Callose implication in stomatal opening and closure in the fern *Asplenium nidus*. *New Phytol* 186:623–635
- Bacic A, Fincher GB, Stone BA (2009) Chemistry, biochemistry and biology of 1–3 beta glucans and related polysaccharides, 1st edn. Academic Press, Amsterdam
- Beakes GW (1983) A comparative account of cyst coat ontogeny in saprophytic and fish-lesion (pathogenic) isolates of the *Saprolegnia diclina*—*parasitica* complex. *Can J Bot* 61:603–625
- Beakes GW (1989) Oomycete fungi: their phylogeny and relationship to chromophyte algae. In: Green JC, Leadbeater BSC, Diver WL (eds) *The chromophyte algae: problems and perspectives*. Oxford University Press, Oxford, pp 325–342
- Beakes GW, Glockling SL (1998) Injection tube differentiation in gun cells of a *Haptoglossa* species, which infects nematodes. *Fungal Genet Biol* 24:45–68
- Beakes GW, Glockling SL (2000) An ultrastructural analysis of organelle arrangement during gun (infection) cell differentiation in the nematode parasite *Haptoglossa dickii*. *Mycol Res* 104:1258–1269
- Beakes GW, Glockling S, James TY (2014) A new oomycete species parasitic in nematodes, *Chlamydomyrium dictyuchoides* sp. nov.: Developmental biology and phylogenetic studies. *Fungal Biol*. doi:10.1016/j.funbio.2014.04.005
- Burr AW, Beakes GW (1994) Characterization of zoospore and cyst surface structure in saprophytic and fish pathogenic *Saprolegnia* species (oomycete fungal protists). *Protoplasma* 181:142–163
- Gachon CMM, Strittmatter M, Müller DG, Kleinteich J, Küpper FC (2009) Detection of differential host susceptibility to the marine oomycete pathogen *Eurychasma dicksonii* by real-time PCR: not all algae are equal. *Appl Environ Microbiol* 75:322–328
- Gachon CMM, Sime-Ngando T, Strittmatter M, Chambouvet A, Kim GH (2010) Algal diseases: spotlight on a black box. *Trends Plant Sci* 15: 633–640
- Grenville-Briggs L, Gachon CMM, Strittmatter M, Sterck L, Küpper F, van West P (2011) A molecular insight into algal-oomycete warfare: cDNA analysis of *Ectocarpus siliculosus* infected with the basal oomycete *Eurychasma dicksonii*. *PLoS One* 6:e24500
- Hakariya M, Masuyama N, Tokumasu S (2002) Shooting of sporidium by “gun” cells in *Haptoglossa heterospore* and *H. zoospore* and secondary zoospore formation in *H. zoospore*. *Mycoscience* 438:119–125
- Heath IB (1995) The cytoskeleton. In: Gow NAR, Gadd GM (eds) *The growing fungus*. Chapman and Hall, London, pp 99–134
- Held AA (1973) Encystment and germination of the parasitic chytrid *Rozella allomyces* on host hyphae. *Can J Bot* 51:1825–1835
- Katsaros C, Salla C (1997) Ultrastructural changes during development, release and germination of monospores of *Tilopteris mertensii* (Tilopteridales, Phaeophyta). *Phycologia* 36:60–67
- Klochova TA, Shim JB, Hwang MS, Kim GH (2012) Host-parasite interaction and host species susceptibility of the marine oomycete parasite, *Olpidiopsis* sp., from Korea that infects red algae. *J Appl Phycol* 24:135–144
- Lehnen LP Jr, Powell MJ (1989) The role of kinetosome-associated organelles in the attachment of encysting secondary zoospores of *Saprolegnia ferax* to substrates. *Protoplasma* 149:163–174
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J (2011) Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *APS* 24:183–193
- Mélida H, Sandoval-Sierra JV, Diéguez-Urbeondo J, Bulone V (2013) Analyses of extracellular carbohydrates in oomycetes unveil the existence of three different cell wall types. *Eukaryot Cell* 12:194–203
- Michel G, Tonon T, Scornet D, Cock JM, Kloareg B (2010) Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. *New Phytol* 188:67–81
- Müller DG, Küpper FC, Küpper H (1999) Infection experiments reveal broad host ranges of *Eurychasma dicksonii* (Oomycota) and *Chytridium polysiphoniae* (Chytridiomycota), two eukaryotic parasites in marine brown algae (Phaeophyceae). *Phycol Res* 47:217–223
- Müller DG, Gachon CMM, Küpper FC (2008) Axenic clonal cultures of filamentous brown algae: initiation and maintenance. *Cah Biol Mar* 49:59–65
- Overton SV, Tharp TP, Bland CE (1983) Fine structure of swimming, encysting and germinating spores of *Haliphthoros milfordensis*. *Can J Bot* 61:1165–1177
- Parker BC (1964) Chemical nature of sieve tube callus in *Macrocystis*. *Phycologia* 4:27–28
- Peters AF, van Wijk SJ, Cho GY, Scornet D, Hanyuda T, Kawai H, Schroeder DC, Cock JM, Boo SM (2010) Reinstatement of *Ectocarpus crouaniorum* Thuret in Le Jolis as a third common species of *Ectocarpus* (Ectocarpaceae, Phaeophyceae) in Western Europe, and its phenology at Roscoff, Brittany. *Phycol Res* 58: 157–170
- Potin P, Bouarab K, Salaün JP, Pohnert G, Kloareg B (2002) Biotic interactions of marine algae. *Curr Opin Plant Biol* 5:308–317
- Robb EJ, Barron GL (1982) Nature’s ballistic missile. *Sci* 218:1221–1222
- Robold AV, Hardham AR (2005) During attachment *Phytophthora* spores secrete proteins containing thrombospondin type 1 repeats. *Curr Genet* 47:307–315
- Schnepf E, Deichgräber G, Drebes G (1977) Development and ultrastructure of marine, parasitic oomycete, *Lagenisma coscinodisci* (Lagenidiales): sexual reproduction. *Can J Bot* 56:1315–1325
- Schnepf E, Deichgräber G, Drebes G (1978) Development and ultrastructure of the marine parasitic oomycete *Lagenisma coscinodisci* Drebes (Lagenidiales): Thallus, zoosporangium, mitosis and meiosis. *Arch Microbiol* 116:141–150
- Sekimoto S, Beakes GW, Gachon CMM, Müller DG, Küpper FC, Honda D (2008) The development, ultrastructural cytology, and molecular phylogeny of the basal Oomycete *Eurychasma dicksonii*, infecting the filamentous Phaeophyte algae *Ectocarpus siliculosus* and *Pylaiella littoralis*. *Protist* 159:299–318
- Temmink JHM, Campbell RN (1969) The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. III. Infection of host roots. *Can J Bot* 47:421–424
- Tsirigoti A, Küpper FC, Gachon CMM, Katsaros C (2014) Cytoskeleton organisation during the infection of three brown algal species, *Ectocarpus siliculosus*, *Ectocarpus crouaniorum* and *Pylaiella littoralis*, by the intracellular marine oomycete *Eurychasma dicksonii*. *Plant Biol* 16:272–281
- Underwood D (2012) The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Front Plant Sci* 3:1–6
- Uppalapati SR, Kerwin JL, Fujita Y (2001) Epifluorescence and scanning electron microscopy of host-pathogen interactions between *Pythium porphyrae* (Peronosporales, Oomycota) and *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Bot Mar* 44: 139–145
- Voigt CA (2014) Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Front Plant Sci*. doi:10.3389/fpls.2014.00168
- Willoughby LG (1977) An abbreviated life cycle in the salmonid fish *Saprolegnia*. *Trans Br Mycol Soc* 69:133–135