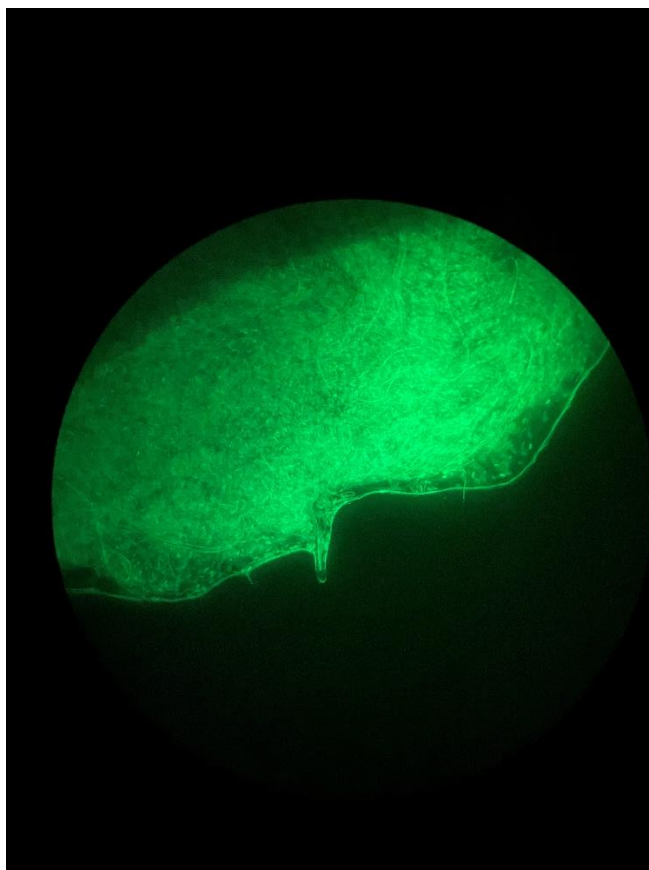


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 για γονιδιακή
μεταλλαξιγένεση στον διαγονιδιακό μύκητα *Fusarium solani*
F9a

Use of the CRISPR/Cas9 technology for gene mutagenesis in the transgenic fungus
Fusarium solani F9a



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΑΓΓΕΛΟΣ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2024

Τριμελής Επιτροπή

Παπαδοπούλου Καλλιόπη (επιβλέπουσα)

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Γιακουντής Αντώνιος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Γονιδιωματικής

Καρπούζας Δημήτριος

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Πρώτα απ' όλα, ευχαριστώ την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, για την πολύτιμη καθοδήγησή της, την αδιάκοπη υποστήριξή της και την πίστη της στις δυνατότητές μου κατά τη διάρκεια της έρευνας και συγγραφής της εργασίας. Οι συμβουλές της ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση αυτού του έργου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Αντώνιο Γιακουντή και τον κ. Δημήτρη Καρπούζα που δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στη Αντωνία Αργύρη, η οποία ολοκλήρωσε πρόσφατα το μεταπτυχιακό της και υπήρξε πολύτιμη συνεργάτιδα καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνάς μου. Η καθοδήγησή της, η υπομονή της και οι γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου ήταν καθοριστικές για την επιτυχή ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συνολική πρόοδο της εργασίας μου. Όπως φυσικά και η συμβολή όλων των παιδιών στο εργαστήριο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους φίλους και συμφοιτητές μου για την ενθάρρυνση και την κατανόησή τους κατά τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Η συντροφικότητα και η στήριξή τους έκαναν αυτή την πορεία πιο ευχάριστη.

Τέλος, ιδιαίτερη μνεία και ευγνωμοσύνη οφείλω στην οικογένειά μου, που με στήριξε αδιάκοπα με την αγάπη, την κατανόηση και την υπομονή της σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Σε όλους εσάς, ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Περιεχόμενα

Abstract.....	6
Περίληψη.....	6
Εισαγωγή.....	7
Μύκητες.....	7
1.1 Ενδοφυτικοί Μύκητες	7
1.2 <i>Fusarium solani</i> στέλεχος K.....	8
Συνθετική Βιολογία	8
2.1 Συνθετική Βιολογία στους Μύκητες.....	9
2.2 GoldenBraid-FungalBraid.....	10
3. Διαμεσολαβούμενος από Αγροβακτήρια σταθερός μετασχηματισμός	12
4. Τεχνολογίες Γενετικής Τροποποίησης.....	13
4.1 Σύστημα CRISPR/Cas	15
4.2 Σύστημα CRISPR/Cas9	16
Σκοπός της Εργασίας	17
Μέθοδοι-Υλικά	18
1. Κλωνοποίηση.....	18
1.1 One-pot dig-lig.....	18
1.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E.coli DH5a.....	18
1.3 Απομόνωση πλασμιδίου από μετασχηματισμένα E.coli DH5a	19
1.4 Έλεγχος κατασκευών	19
2. Μετασχηματισμός <i>A.tumefaciens</i> AGL-1 μέσω ηλεκτροδιάτρησης.....	19
3. Μετασχηματισμός κονιδίων <i>Fusarium solani</i> K-F9a μέσω <i>A. tumefaciens</i> AGL-1..	20
4. Επιλογή θετικών κλώνων F9a παρουσία αντιβιοτικού	20
5. Επιβεβαίωση θετικών κλώνων	21
5.1 Απομόνωση DNA	21
5.2 Μικροσκοπία Φθορισμού	21
5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	22
Αποτελέσματα	22
1. Κατασκευή των CRISPR/Cas9 φορέων για μετασχηματισμό του F9a.....	22
1.1 Κατασκευή των alpha vectors	25
1.2 Κατασκευή των omega vectors	25
1.3 Κατασκευή των final alpha vectors.....	26
2. Μετασχηματισμός του μύκητα με CRISPR δυαδικούς φορείς	27
2.1 Επιλογή θετικών κλώνων	27
2.2 Μικροσκοπία φθορισμού για ανίχνευση φθορισμού από το γονίδιο αναφοράς.	28

2.3 PCR για επιβεβαίωση ένθεσης του T-DNA.....	29
Συζήτηση	31
Βιβλιογραφία	32

Abstract

Endophytic fungi are a particularly important category of fungi as they coexist with plants and provide them with numerous benefits. The K strain of *Fusarium solani* is an endophytic fungus that is involved in protecting plants from both biotic and abiotic factors. Research into the genes of this fungus and the functioning of its pathways is of great interest. In this particular thesis, the CRISPR/Cas9 technology was applied to the transgenic fungus *Fusarium solani* F9a, with the aim of inducing mutations and consequently disrupting the function of the gene that produces the GFP protein. To achieve this, the GoldenBraid/FungalBraid cloning system was used. This advanced system allowed for the creation of complex DNA constructs and the transformation of the fungus using *Agrobacterium tumefaciens*.

Περίληψη

Οι ενδοφυτικοί μύκητες αποτελούν μια ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία μυκήτων, καθώς συμβιώνουν με φυτά και τους προσφέρουν πολλά οφέλη. Το στέλεχος K του *Fusarium solani* είναι ένας ενδοφυτικός μύκητας, ο οποίος εμπλέκεται στην προστασία των φυτών τόσο από βιοτικούς όσο και από αβιοτικούς παράγοντες. Η έρευνα στα γονίδια του μύκητα αλλά και στον τρόπο λειτουργίας των μονοπατιών του παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, η τεχνολογία CRISPR/Cas9 εφαρμόστηκε στον διαγονιδιακό μύκητα *Fusarium solani* F9a, με στόχο τη μεταλλαξιγένεση και κατ' επέκταση την διακοπή λειτουργίας του γονιδίου που παράγει την πρωτεΐνη GFP. Για να πραγματοποιηθεί αυτό έγινε χρήση του συστήματος κλωνοποίησης GoldenBraid/FungalBraid. Το προηγμένο αυτό σύστημα επέτρεψε τη δημιουργία πολύπλοκων DNA κατασκευών και τον μετασχηματισμό του μύκητα με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens*.

Εισαγωγή

Μύκητες

Οι μύκητες συνιστούν ένα από τα πιο ποικιλόμορφα αλλά και ανεξερευνήτα βασίλεια. Αποτελούν τεράστια κατηγορία ευκαρυωτικών οργανισμών και μπορούν να είναι τόσο μονοκύτταροι (ζυμομύκητες) όσο και πολυκύτταροι (υφές) [1]. Σύμφωνα με εκτιμήσεις ο συνολικός αριθμός των μυκητιακών ειδών παγκοσμίως κυμαίνεται μεταξύ 2,2 και 3,8 εκατομμυρίων. Ωστόσο, μόνο περίπου 100.000 είδη έχουν περιγραφεί [2]. Οι μύκητες χωρίζονται σε πολλά φύλα με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά και τις μεθόδους αναπαραγωγής τους. Μερικά από τα κύρια φύλα είναι οι Ασκομύκητες (που περιλαμβάνουν την πλειονότητα των μυκήτων, όπως ζύμες και μούχλες), Βασιδιομύκητες (που περιλαμβάνουν τα μανιτάρια), Ζυγομύκητες, Χυτριομύκητες και Γκλομερομύκητες [3].

Οι μύκητες είναι απαραίτητοι στα οικοσυστήματα λόγω των ρόλων τους ως αποικοδομητές, συμβιωτικοί οργανισμοί και παθογόνα. Ως αποικοδομητές, οι μύκητες διασπούν την οργανική ύλη, όπως νεκρά φυτά και ζώα, καθώς και δύσκολες ουσίες όπως η λιγνίνη και η κυτταρίνη, τις οποίες οι περισσότεροι οργανισμοί δυσκολεύονται να αποικοδομήσουν [4], παίζοντας έτσι μοναδικό ρόλο στην κυκλοφορία του άνθρακα [1], του αζώτου και του φωσφόρου [3]. Ως συμβιωτικοί οργανισμοί, οι μύκητες δημιουργούν αμοιβαία επωφελείς σχέσεις με τα φυτά, κυρίως μέσω μυκόρριζων, συνδέονται με δέντρα των δασών, συμβάλλοντας στην υγεία και την ανθεκτικότητα τους [1].

Μορφολογικά οι μύκητες εντάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τους ζυμομύκητες και τους νηματοειδείς. Οι μύκητες τύπου ζύμης αναπτύσσονται συνήθως ως μονοκύτταροι οργανισμοί και αναπαράγονται κυρίως μέσω εκβλάστησης (budding) ή διχοτόμησης (fission). Αντίθετα οι νηματοειδείς μύκητες αναπτύσσονται ως πολυκύτταρες, νηματοειδείς δομές που ονομάζονται υφές, οι οποίες σχηματίζουν συλλογικά ένα μυκήλιο [5].

Η αναπαραγωγή των μυκήτων είναι εξαιρετικά ποικιλόμορφη, με τους μύκητες να παρουσιάζουν μια σειρά στρατηγικών αναπαραγωγής τόσο εγγενώς όσο και αγενώς [1]. Στην εγγενή αναπαραγωγή, οι μύκητες μπορούν να παράγουν εξειδικευμένες αναπαραγωγικές δομές, όπως ασκίδια ή βασίδια [6] και ένα από τα κύρια στάδια στη παραγωγή σπορίων πραγματοποιείται μέσω της μείωσης. Η αγενής αναπαραγωγή είναι επίσης συνηθισμένη στους μύκητες και περιλαμβάνει την παραγωγή σπορίων μέσω μίτωσης. Τα κονίδια, τα σπογγιοσπόρια και τα χλαμυδοσπόρια είναι μερικά παραδείγματα αγενών σπορίων [4].

1.1 Ενδοφυτικοί Μύκητες

Οι ενδοφυτικοί μύκητες είναι μύκητες που ζουν μέσα στους φυτικούς ιστούς χωρίς να προκαλούν άμεσα ασθένειες [7]. Δημιουργούν αμοιβαία επωφελείς σχέσεις με τις

ρίζες περίπου του 90% των φυτικών ειδών [4]. Οι ενδοφυτικοί μύκητες ενισχύουν την απορρόφηση βασικών θρεπτικών συστατικών, παράγουν ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών αλλά προσφέρουν επίσης αντοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις (ξηρασία, αλατότητα, τοξικότητα βαρέων μετάλλων) και προστατεύουν τα φυτά από παθογόνους οργανισμούς, παράσιτα και φυτοφάγα έντομα [8]. Οι ενδοφυτικοί μύκητες έχουν αποδειχθεί ότι αποτελούν πλούσια πηγή φυσικών ενώσεων με ευρύ φάσμα βιολογικών εφαρμογών, κεντρίζοντας έτσι το ενδιαφέρον τόσο ερευνητών όσο και των βιομηχανιών [9].

1.2 *Fusarium solani* στέλεχος K

Οι μύκητες του γένους *Fusarium solani* ανήκουν στο φύλο των Ασκομυκήτων, είναι νηματοειδείς και αποτελούν μέρος μιας μεγαλύτερης ομάδας γνωστής ως *Fusarium solani* species complex (FSSC), το οποίο περιλαμβάνει πάνω από 60 φυλογενετικά είδη [10]. Είναι γνωστά για την παθογένειά τους σε ένα ευρύ φάσμα ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων φυτών, ζώων και ανθρώπων (ιδιαίτερα σε ανοσοκατασταλμένα άτομα), τα οποία είναι κατά κύριο λόγο παθογόνα, ωστόσο υπάρχουν και μη παθογόνα. Μελετήθηκε ότι παράγουν μιας ευρείας ποικιλίας δευτερογενών μεταβολιτών, μερικοί από τους οποίους σχετίζονται με χρωστικές, ενώ άλλοι διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση ή φυτοτοξικότητα [11].

Το *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) αποτελεί ένα μη παθογόνο στέλεχος το οποίο συμβιώνει με φυτά προσφέροντας πολλά οφέλη. Το στέλεχος απομονώθηκε από ριζικούς ιστούς φυτών τομάτας που καλλιεργήθηκαν σε κομπόστ [12]. Περαιτέρω έρευνα στο συγκεκριμένο στέλεχος έδειξε την ικανότητα του να προσφέρει άμυνα στα φυτά τόσο σε επίπεδο βιοτικών (ακάρεα [13], παθογόνα φυλλώματος και ρίζας [14], έντομα [15]) όσο και αβιοτικών (ξηρασία, αλατότητα) καταπονήσεων [12].

Συνθετική Βιολογία

Ο στόχος του τομέα της συνθετικής βιολογίας είναι η κατασκευή και η τροποποίηση βιολογικών συστημάτων [16]. Τα βιολογικά συστήματα μπορούν να διασπαστούν σε μικρότερες μονάδες (βιομέρη) και έτσι στη συνέχεια να συνδυαστούν με διάφορες διαμορφώσεις για να δημιουργήσουν σύνθετα συστήματα [17]. Τέτοια βιομέρη αποτελούν τα γονίδια, οι προαγωγείς και οι ρυθμιστικές αλληλουχίες. Κάθε μέρος μπορεί να αντικατασταθεί από ένα άλλο της ίδιας κατηγορίας με αυτό (interchangeable units) [18]. Οι ερευνητές επιδιώκουν να δημιουργήσουν βιολογικά συστήματα του τύπου "plug-and-play" όπου τα μέρη τους μπορούν να ανταλλάσσονται και να εφαρμόζονται εύκολα [19].

Για να δημιουργηθούν αυτά τα τεχνητά βιολογικά συστήματα, η συνθετική βιολογία ενσωματώνει στοιχεία από πολλές άλλες επιστήμες, όπως η γενετική μηχανική, η πληροφορική και η μηχανολογία [16]. Ο κύκλος Design-Build-Test-Learn (DBTL) είναι

μια βασική έννοια στη συνθετική βιολογία που αντικατοπτρίζει τις παραδοσιακές μηχανικές πρακτικές. Ο κύκλος ξεκινά με τη φάση του σχεδιασμού, όπου δημιουργείται ένα μοντέλο ή σχέδιο. Αυτό το σχέδιο στη συνέχεια κατασκευάζεται και δοκιμάζεται, και τα αποτελέσματα καθοδηγούν τους επόμενους σχεδιασμούς. Κάθε επανάληψη αυτού του κύκλου φέρνει το σύστημα πιο κοντά στο επιθυμητό αποτέλεσμα, παρέχοντας παράλληλα γνώσεις για τη βασική βιολογία [17].

Σε σύγκριση με άλλα συστήματα, τα βιολογικά συστήματα δε λειτουργούν τόσο ως μονάδες καθώς τα συστατικά τους συχνά αλληλεπιδρούν με απρόβλεπτους τρόπους [18]. Για να αυξηθεί η αποδοτικότητα τους και να μειωθεί η εξάρτηση από την τύχη, είναι απαραίτητο να ενσωματωθούν προηγμένα εργαλεία σχεδιασμού και επιταχυνόμενες μέθοδοι δοκιμών [16]. Η επιτυχία της συνθετικής βιολογίας βασίζεται στις προόδους σε τεχνολογίες όπως η αλληλούχηση DNA, η σύνθεση και η μοντελοποίηση μέσω χρήσης υπολογιστή. Η αυτοματοποίηση είναι επίσης σημαντικός παράγοντας, μειώνοντας τα ανθρώπινα λάθη και επιταχύνοντας τη διαδικασία σχεδιασμού, δοκιμής και βελτιστοποίησης [17].

2.1 Συνθετική Βιολογία στους Μύκητες

Η συνθετική βιολογία στους μύκητες αποτελεί έναν αναπτυσσόμενο τομέα που αξιοποιεί την γενετική και την μεταβολική μηχανική για την παραγωγή φυσικών προϊόντων, εξειδικευμένων χημικών ουσιών και ενζύμων, από αυτούς. Ο συγκεκριμένος ερευνητικός τομέας επικεντρώνεται στην τροποποίηση των γονιδιωμάτων και των βιοσυνθετικών οδών των μυκήτων, με στόχο την αύξηση της παραγωγής πολύτιμων ουσιών και την αναζήτηση νέων μορίων.

Ειδικά οι ζυμομύκητες και οι νηματοειδείς μύκητες, είναι ένα εξαιρετικά ευπροσάρμοστο σύστημα για τη συνθετική βιολογία λόγω των μοναδικών μεταβολικών τους ικανοτήτων και της ανθεκτικότητάς τους σε βιομηχανικές συνθήκες. Οι ίδιοι μπορούν να αντέξουν διάφορες πιέσεις όπως αλλαγές στο pH, τη θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, καθιστώντας τους ιδανικούς υποψήφιους για βιομηχανική βιοτεχνολογία [20]. Επιπλέον αποτελούν πολλές φορές και τις ιδανικούς φορείς για ετερόλογη παραγωγή πρωτεϊνών. Ζυμομυκήτες όπως οι *Saccharomyces cerevisiae* και *Pichia pastoris* χρησιμοποιούνται για την έκφραση λυγνολυτικών ενζύμων από άλλα είδη μυκήτων. Αυτοί οι ξενιστές προτιμώνται λόγω των ρυθμών ανάπτυξής τους, της εύκολης γενετικής τροποποίησης και τις ικανότητάς τους να πραγματοποιούν τις απαραίτητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις [21].

Η όλο και αυξανόμενη διαθεσιμότητα μυκητιακών γονιδιωμάτων, έχει βελτιώσει σημαντικά την ικανότητά χειρισμού και εξερεύνησης των συμπλεγμάτων βιοσυνθετικών γονιδίων (BGCs) στους μύκητες [22]. Οι εφαρμογές της CRISPR/Cas τεχνολογίας για την επεξεργασία των γονιδιωμάτων των μυκήτων επιτρέπει την ακριβή τροποποίηση των BGC που ελέγχουν την παραγωγή πολύτιμων ενώσεων,

οδηγώντας σε καλύτερο έλεγχο της σύνθεσης και της σταθερότητας των προϊόντων. Οι περαιτέρω εξελίξεις στην τεχνολογία CRISPR/Cas, σε συνδυασμό με την αλληλούχηση νέας γενιάς, θα διευκολύνουν την γονιδιακή τροποποίηση, οδηγώντας σε βελτιστοποιημένα στελέχη μυκήτων για βιομηχανικές εφαρμογές [21].

Η ικανότητα σχεδιασμού και ανάπτυξης βιοσυνθετικών οδών για την παραγωγή τόσο φυσικών όσο και μη φυσικών προϊόντων προσφέρει σημαντικά εφόδια για το μέλλον της φαρμακευτικής έρευνας [23]. Η εξερεύνηση των ανεκμετάλλευστων BGC ενισχύει σημαντικά την έρευνα των φυσικών προϊόντων και ανοίγει νέους δρόμους για την ανακάλυψη νέων βιοδραστικών ενώσεων [24].

2.2 GoldenBraid-FungalBraid

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες τύπου IIS είναι αναντικατάστατα εργαλεία στη συνθετική βιολογία και κατ' επέκταση στη μοριακή κλωνοποίηση. Λόγω της μοναδικής τους ιδιότητας να κόβουν το DNA σε καθορισμένες θέσεις έξω από τις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν [25], τις καθιστά ιδανικές για τη συναρμολόγηση σύνθετων κατασκευών DNA, την προσθήκη πρωτεϊνικών ετικετών (χωρίς τη προσθήκη περιττών βάσεων) και την κλωνοποίηση.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες τύπου IIs αναγνωρίζουν ασύμμετρες αλληλουχίες DNA, συνήθως μήκους 4-7 ζευγών βάσεων. Διαφέρουν από τα ένζυμα τύπου I, τα οποία αναγνωρίζουν παλίνδρομες αλληλουχίες και κόβουν το DNA εντός ή εκατέρωθεν αυτών. Αντίθετα, αυτές κόβουν το DNA σε μια συγκεκριμένη απόσταση από την αλληλουχία αναγνώρισης, συχνά αρκετές βάσεις εκατέρωθεν αυτής. Συνήθως λειτουργούν ως μονομερή, αναγνωρίζουν και συνδέονται με την αλληλουχία στόχο στο DNA, κόβοντας και τις δύο αλυσίδες του [26].

Το GoldenGate (GG) αποτελεί μια μέθοδο κλωνοποίησης/συναρμολόγησης τμημάτων DNA (DNA parts) που βασίζεται στη χρήση περιοριστικών ενζύμων τύπου IIS για τη δημιουργία μονόκλωνων άκρων (sticky ends) (Bird et al., 2022). Το σύστημα χρησιμοποιήθηκε αρχικά στη βιολογία φυτών. Επιτρέπει τη συναρμολόγηση θραυσμάτων DNA χωρίς να αφήνονται ανεπιθύμητες αλληλουχίες στη τελική κατασκευή, όπως συμβαίνει με τη χρήση άλλων μεθόδων κλωνοποίησης [27]. Αυτή η προσέγγιση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για εφαρμογές στη συνθετικής βιολογίας, όπου απαιτείται η δημιουργία σύνθετων γενετικών κατασκευών [28].

Το GoldenBraid (GB) είναι ένα σύστημα μοριακής κλωνοποίησης που βασίζεται στην τεχνολογία GoldenGate. Τα κύρια πλεονέκτημα του GoldenBraid είναι ότι επιτρέπει στους ερευνητές να κατασκευάζουν όλο και πιο σύνθετες γονιδιακές κατασκευές, τα στοιχεία των οποίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλες κατασκευές και επιπλέον το σύστημα GoldenBraid (GB) είναι συμβατό και με άλλα συστήματα (GoldenGate/GG) [29].

Το σύστημα GoldenBraid βασίζεται στη χρήση ενζύμων περιορισμού τύπου IIS, ιδιαίτερα των BsaI και BsmBI. Με την εναλλαγή της χρήσης των BsaI και BsmBI σε

διαφορετικά επίπεδα συναρμολόγησης, το σύστημα GoldenBraid δημιουργεί έναν συνεχόμενο κύκλο, όπου το αποτέλεσμα ενός κύκλου συναρμολόγησης γίνεται η είσοδος για τον επόμενο. Η προσέγγιση αυτή είναι που κάνει το σύστημα GoldenBraid εξαιρετικά ευέλικτο, επιτρέποντας την κατασκευή όλο και πιο περίπλοκων γενετικών μονοπατιών [29].

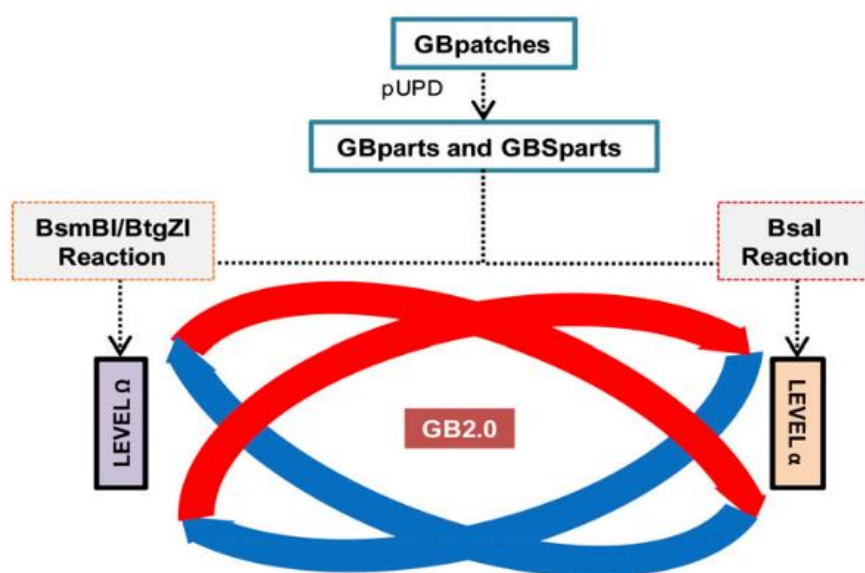
Το σύστημα GoldenBraid χρησιμοποιεί την ακόλουθη στρατηγική κλωνοποίησης [29]:

Domestication: Αυτό το στάδιο περιλαμβάνει την προσαρμογή των τμημάτων DNA με την αφαίρεση περιοχών αναγνώρισης των ενζύμων του GB και την προσθήκη κατάλληλων κάθε φορά άκρων 4 νουκλεοτιδίων (overhangs) που τα καθιστούν συμβατά με το σύστημα GoldenBraid. Τα τμήματα κλωνοποιούνται στον φορέα pUPD2, ώστε να προκύψουν GB parts.

Συναρμολόγηση Μεταγραφικής Μονάδας (α φορείς): Τα GB parts (όπως προαγωγείς, κωδικές αλληλουχίες και τερματιστές) συναρμολογούνται σε μια μονάδα μεταγραφής (TU) ύστερα από κλωνοποίηση σε α φορέα μέσω του ενζύμου περιορισμού BsaI.

Συναρμολόγηση Πολυγονιδιακών Κατασκευών (Ω φορείς): Πολλαπλές μεταγραφικές μονάδες συνδυάζονται σε πιο πολύπλοκες κατασκευές. Δύο α φορείς κλωνοποιούνται σε έναν Ω φορέα μέσω πέψης από το ένζυμο BsmBI.

Ο παραπάνω κύκλος επαναλαμβάνεται, μέσω συνεχών εναλλαγών από Ω σε α φορείς έως τη δημιουργία της τελικής κατασκευής.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος κλωνοποίησης GoldenBraid 2.0 [30]

FungalBraid ονομάζεται η προσαρμογή του GoldenBraid στη συνθετική βιολογία των μυκήτων. Ενώ το GB σχεδιάστηκε αρχικά για φυτικά συστήματα, το σύστημα FungalBraid αναπτύχθηκε ειδικά για νηματοειδείς μύκητες. Προκειμένου να καταστεί αυτό εφικτό, το σύστημα GB επεκτάθηκε μέσω της ενσωμάτωσης ειδικών για μύκητες

υποκινητές, τερματικών αλληλουχιών, δεικτών επιλογής και λοιπά. Η προσέγγιση αυτή καθιστά πιο εύκολη τη μελέτη, την τροποποίηση και την εκμετάλλευση των μυκήτων για διάφορες εφαρμογές (παραγωγή πολύτιμων μεταβολιτών) [31].

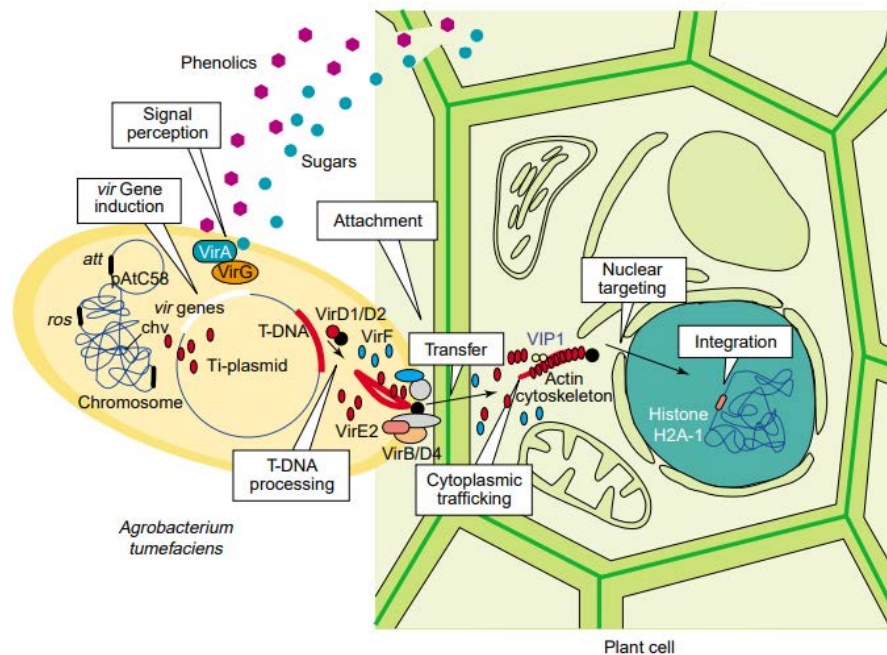
Τα συστήματα GoldenBraid και FungalBraid έχουν σχεδιαστεί για να είναι συμβατά μεταξύ τους, πράγμα που σημαίνει ότι τα γενετικά μέρη μπορούν να ανταλλάσσονται μεταξύ φυτικών και μυκητιακών συστημάτων, αρκεί να είναι λειτουργικά συμβατά [32].

3. Διαμεσολαβούμενος από Αγροβακτήρια σταθερός μετασχηματισμός

Διαμεσολαβούμενος από *Agrobacterium tumefaciens* μετασχηματισμός (ATMT) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για γενετική τροποποίηση, η οποία αναπτύχθηκε αρχικά για τα φυτά, αλλά πλέον εφαρμόζεται και σε μύκητες.

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα βακτήριο του εδάφους γνωστό για την ικανότητά του να μεταφέρει το DNA του σε φυτά. Αυτή η διαδικασία ευθύνεται κυρίως για την ασθένεια της κορωνοτού κάλου (crown gall), όπου το βακτήριο εισάγει ένα τμήμα του DNA του (γνωστό ως T-DNA) στο γονιδίωμα του φυτού, προκαλώντας τον σχηματισμό όγκων [33].

Το Tι πλασμίδιο είναι απαραίτητο στοιχείο του *A. tumefaciens*. Περιέχει διάφορα βασικά στοιχεία: (1) Γονίδια Vir που διευκολύνουν τη μεταφορά του T-DNA, (2) το ίδιο το T-DNA, το οποίο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του φυτού για να προκαλέσει σχηματισμό όγκων, (3) γονίδια για τον καταβολισμό των οπινών, που επιτρέπουν στο βακτήριο θρεπτικά συστατικά και (4) γονίδια για τη μεταφορά που επιτρέπουν την εξάπλωση του πλασμιδίου μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων [34].



Εικόνα 2: Απεικόνιση μεταφοράς του τμήματος T-DNA από το πλασμίδιο του *A. tumefaciens* σε ένα φυτικό κύτταρο και ένθεσής του στο γονιδίωμα αυτού [35].

Αυτό το σύστημα λοιπόν, έχει προσαρμοστεί σε ένα εύχρηστο εργαλείο για γενετικό μετασχηματισμό, επιτρέποντας τη σταθερή ενσωμάτωση επιθυμητών κατασκευών σε πολλά είδη φυτών. Το Ti πλασμίδιο έχει τροποποιηθεί ώστε να αφαιρεθούν τα Vir γονίδια, διατηρώντας ταυτόχρονα τον μηχανισμό μεταφοράς T-DNA, καθιστώντας το χρήσιμο εργαλείο στη γενετική μηχανική [34]. Αυτό έχει επιτρέψει τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων (GM) καλλιεργειών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά [36] [37].

Με την εμφάνιση τεχνολογιών επεξεργασίας γονιδιωμάτων, όπως το CRISPR/Cas9, ο μετασχηματισμός μέσω *Agrobacterium* έχει βρει νέες εφαρμογές στην τροποποίηση γονιδιωμάτων με ακρίβεια. Το *Agrobacterium* χρησιμοποιείται για την ενσωμάτωση γενετικών στοιχείων που συντελούν σε στοχευμένες ενθέσεις, απαλοιφές ή αντικαταστάσεις γονιδίων, σε φυτικά ή ακόμα και σε μυκητιακά κύτταρα [36].

4. Τεχνολογίες Γενετικής Τροποποίησης

Η γενετική τροποποίηση είναι μια τεχνολογία που επιτρέπει ακριβείς τροποποιήσεις στο DNA ζωντανών οργανισμών. Αυτή η τεχνολογία παρέχει μεγάλο εύρος εφαρμογών, που ποικίλουν από βελτιώσεις στη γεωργία [39] έως θεραπευτικές παρεμβάσεις για ανθρώπινες ασθένειες [40]. Η ανάπτυξη διαφόρων εργαλείων γονιδιακής επεξεργασίας, όπως τα CRISPR/Cas9, TALENs και ZFNs, έχει προωθήσει σημαντικά τον τομέα, επιτρέποντας στοχευμένες γενετικές τροποποιήσεις με υψηλή ακρίβεια και αποτελεσματικότητα.

Οι ZFNs είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω ψευδοδακτυλίων προκαλώντας δίκλωνες ρήξεις στην αλυσίδα DNA. Οι TALENs λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο. Κάθε TALEN αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA μέσω μιας σειράς επαναλαμβανόμενων δομών, γεγονός που τις καθιστά πιο ευέλικτες από τις ZFNs. Η τεχνολογία CRISPR/Cas9 βασίζεται στη χρήση ενός οδηγού RNA (gRNA) που κατευθύνει το ένζυμο της Cas9 σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA, όπου εισάγει μία δίκλωνη ρήξη [41] [42]. Οι δίκλωνες ρήξεις στο DNA χρησιμοποιούνται προκειμένου μέσω των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA να πραγματοποιηθούν στοχευμένες μεταλλάξεις.

Αφού προκληθεί μια δίκλωνη ρήξη (DSB) στο γονιδίωμα, ένας εκ των δύο κυτταρικών μηχανισμών επιδιόρθωσης ενεργοποιείται για να αποκαταστήσει τη βλάβη, η μη ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ) ή η επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR). Η μη ομόλογη σύνδεση άκρων είναι η πιο συνηθισμένη και λειτουργεί καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Λειτουργεί ενώνοντας απευθείας τα δύο σπασμένα άκρα του DNA χωρίς να απαιτείται μία ομόλογη αλληλουχία. Παρόλο που η μη ομόλογη σύνδεση άκρων μπορεί να είναι ακριβής, συχνά οδηγεί σε μικρές ενθέσεις ή απαλοιφές (indels) λόγω των επαναλαμβανόμενων επιδιορθώσεων της ίδιας δίκλωνης ρήξης. Αυτά οδηγούν στην παραγωγή μη λειτουργικών πρωτεϊνών είτε στην καταστολή έκφρασης των γονιδίων [43].

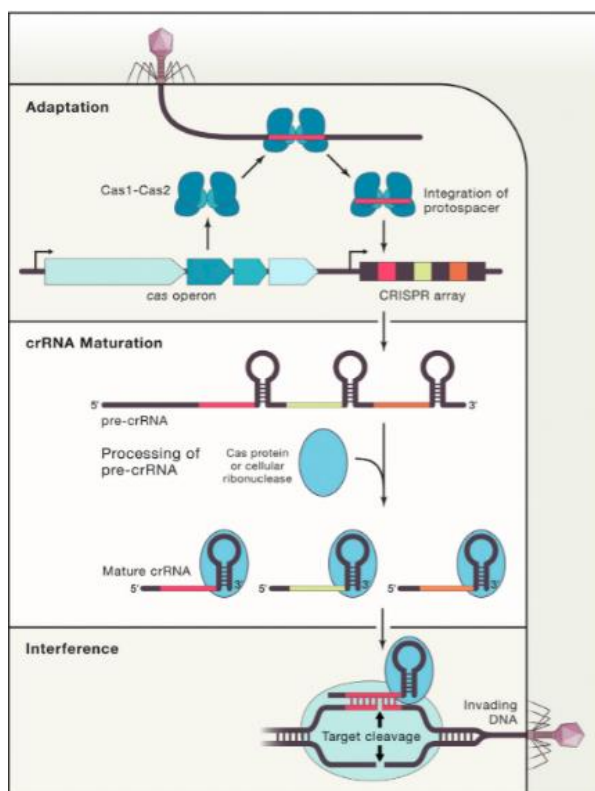
Από την άλλη πλευρά, η HDR είναι μια διαδικασία που οδηγείται από ομόλογες αλληλουχίες και εμφανίζεται κυρίως κατά τις φάσεις S/G2 του κυτταρικού κύκλου, όπου χρησιμοποιείται μια ομόλογη αλληλουχία για να καθοδηγήσει την επιδιόρθωση. Αυτή η οδός επιτρέπει την ακριβή γονιδιακή επιδιόρθωση, καθιστώντας την κρίσιμη για εφαρμογές που απαιτούν ακριβή αποκατάσταση της γονιδιακής λειτουργίας ή την εισαγωγή επιθυμητών γονιδιακών αλληλουχιών. [43].

Το CRISPR/Cas9 αντιπροσωπεύει την πιο πρόσφατη και ευέλικτη εξέλιξη στην επεξεργασία γονιδιώματος. Σε αντίθεση με τα συστήματα στόχευσης που βασίζονται σε πρωτεΐνες, όπως οι ZFNs και TALENs, η τεχνολογία CRISPR/Cas9 χρησιμοποιεί gRNAs, γεγονός που την καθιστά πιο εύχρηστη στην στοχευμένη τροποποίηση. Αποτελεί λοιπόν πιο ευέλικτο, αποδοτικό και οικονομικό μηχανισμό σε σχέση με τους προκατόχους του. Είναι πλέον το κυρίαρχο εργαλείο στη γενετική τροποποίηση, με ευρεία εφαρμογή τόσο στην έρευνα όσο και στον θεραπευτικό τομέα [44].

Η γενετική τροποποίηση έχει φέρει επανάσταση και στον τομέα της έρευνας των μυκήτων. Παρέχει ισχυρά εργαλεία για τη διερεύνηση της γενετικής βάσης των ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες όπως και της ανθεκτικότητας τους σε φάρμακα. Η δυνατότητα επεξεργασίας των γονιδιωμάτων των μυκήτων με ακρίβεια ανοίγει νέους ορίζοντες για την ανάπτυξη θεραπειών, τη βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων και μια βαθύτερη κατανόηση της βιολογίας των μυκήτων όπως επίσης είναι ζωτικής σημασίας για βιομηχανικές και γεωργικές εφαρμογές (βελτιστοποίηση της παραγωγής ενζύμων, βελτίωση των παραγόντων βιολογικού ελέγχου) [45].

4.1 Σύστημα CRISPR/Cas

Το σύστημα CRISPR/Cas λειτουργεί ως ένας προσαρμοστικός αμυντικός μηχανισμός που ανακαλύφθηκε στους προκαρυώτες, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων και αρχαίων. Η κύρια λειτουργία του συστήματος είναι να προστατεύει τα κύτταρα από ιικές επιθέσεις, ενσωματώνοντας τμήματα ιικού DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή (spacer). Τα τμήματα αυτά αποθηκεύονται σε περιοχές CRISPR, που λειτουργούν ως ένα αρχείο μνήμης [46] [47].



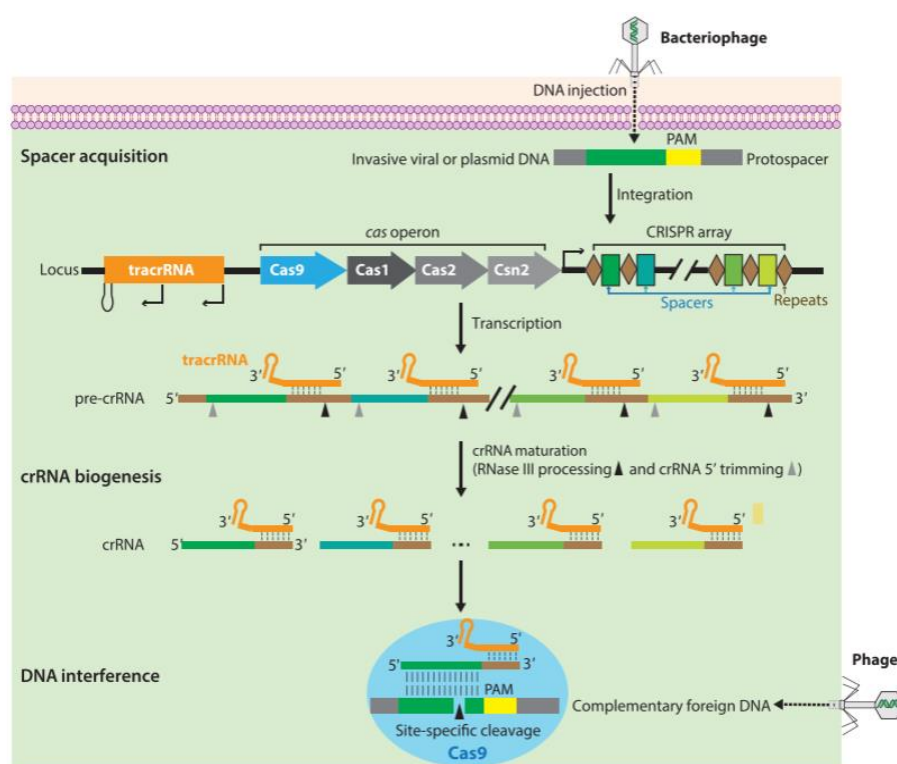
Εικόνα 3: Αναπαράσταση λειτουργίας του συστήματος CRISPR/Cas ως άμυνα έναντι σε ική εισβολή [48]

Όταν ένα βακτήριο δέχεται επίθεση από έναν ιό, συλλέγει μια μικρή αλληλουχία DNA από τον εισβολέα και την ενσωματώνει στο δικό του γονιδίωμα μέσα σε μια ειδική περιοχή που ονομάζεται CRISPR. Το DNA του εισβολέα, γνωστό ως spacer, αποθηκεύεται ανάμεσα σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στην περιοχή CRISPR. Η CRISPR αλληλουχία, που περιέχει αποθηκευμένες αλληλουχίες από προηγούμενους εισβολείς, μεταγράφεται σε ένα μακρύ μόριο RNA (pre-crRNA). Αυτό το RNA στη συνέχεια κόβεται σε μικρότερα θραύσματα που ονομάζονται CRISPR RNAs (crRNAs). Κάθε crRNA περιέχει μια αλληλουχία spacer που ταιριάζει με το DNA ενός συγκεκριμένου εισβολέα. Αυτά λειτουργούν ως οδηγοί, βοηθώντας τις πρωτεΐνες Cas να αναγνωρίσουν και να στοχεύσουν οποιονδήποτε εισβολέα με την ίδια αλληλουχία DNA. Όταν το βακτήριο συναντά ξανά τον ίδιο εισβολέα, το crRNA καθοδηγεί τις πρωτεΐνες Cas στην αντίστοιχη αλληλουχία DNA μέσα στο γονιδίωμα του εισβολέα, οι οποίες κόβουν το DNA του εισβολέα, καταστρέφοντάς τον [48].

Μέσα από μια σειρά σημαντικών μετατροπών το σύστημα CRISPR/Cas μετατράπηκε από έναν φυσικό αμυντικό μηχανισμό σε ένα εργαλείο γενετικής τροποποίησης που έχει συμβάλει στην ιατρική, την γεωργία αλλά και τη βιοτεχνολογία [49], [50].

4.2 Σύστημα CRISPR/Cas9

Το σύστημα CRISPR/Cas9 προέρχεται από έναν μηχανισμό προσαρμοστικής ανοσίας στα βακτήρια και τα αρχαία, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Όταν εκτεθούν σε έναν γνωστό εισβολέα, οι αποθηκευμένες αλληλουχίες του spacer μεταγράφονται σε CRISPR RNA (crRNA). Το crRNA σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το tracrRNA και το ένζυμο Cas9 το οποίο καθοδηγείται να κόψει την αλληλουχία DNA που ταιριάζει με το crRNA. Η αλληλουχία PAM είναι απαραίτητη για την αναγνώριση και στόχευση του ξένου DNA. Πρόκειται για μια σύντομη, διατηρημένη αλληλουχία DNA δίπλα στον στόχο, επιτρέποντας στο Cas9 να διακρίνει μεταξύ του DNA του ξενιστή και του εισβολέα [51].



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του συστήματος CRISPR/Cas9 ως άμυνα έναντι σε ιική εισβολή [51]

Η δράση της Cas9 ξεκινά με την αλληλουχία PAM, η οποία είναι απαραίτητη για τη δέσμευση της Cas9 στο DNA. Αφού δεσμευτεί στο guide RNA (συνδυασμός crRNA και tracrRNA) ενώνεται με τον στόχο DNA. Αυτό σχηματίζει ένα υβρίδιο RNA-DNA γνωστό ως R-loop. Το ένζυμο Cas9 στη συνέχεια δημιουργεί μία δίκλωνη ρήξη (DSB) στο DNA, ακριβώς τρία νουκλεοτίδια πριν από την αλληλουχία PAM. Στην Cas9 του *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), η αλληλουχία "5'-NGG-3'" λειτουργεί ως PAM αλληλουχία. Η διάσπαση γίνεται από δύο επικράτειες (domains) εντός του Cas9: η επικράτεια HNH κόβει την αλυσίδα που είναι συμπληρωματική με το οδηγό RNA, ενώ η επικράτεια RuvC κόβει την αλυσίδα που δεν είναι συμπληρωματική [52].

Η δίκλωνη ρήξη που προκαλείται μπορεί να επιδιορθωθεί με δύο κύριους μηχανισμούς: Μη ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ) και επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR). Με την παρουσία ενός προτύπου επιδιόρθωσης (συνήθως πλασμιδίου ή μονόκλωνου DNA), τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιήσουν την HDR για να επιδιορθώσουν με ακρίβεια τη δίκλωνη ρήξη επιτρέποντας την εισαγωγή συγκεκριμένων μεταλλάξεων, την εισαγωγή νέων αλληλουχιών ή τη διόρθωση γενετικών σφαλμάτων [52] [53]. Οι νηματοειδείς μύκητες συνήθως επιδιορθώνουν τις ρήξεις της αλυσίδας DNA μέσω NHEJ, το οποίο είναι λιγότερο ακριβές αλλά αποτελεσματικό για την διακοπή έκφρασης γονιδίων [54].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το gRNA αποτελείται από δύο στοιχεία: το crRNA και το tracrRNA. Ένα συνθετικό μόριο RNA, συνδυάζει τις λειτουργίες των cr- και tracrRNA, ονομάζεται sgRNA (Single-GuideRNA). Το sgRNA περιέχει μια scaffold αλληλουχία, στην οποία οφείλεται η σύνδεση της Cas9 με το sgRNA. Πέρα από την scaffold αλληλουχία, περιέχει και μια guide αλληλουχία, η οποία είναι συμπληρωματική με τον εκάστοτε στόχο [55], [56].

Το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε διαφορετικούς νηματοειδείς μύκητες, ωστόσο για την εφαρμογή του ήταν απαραίτητες ορισμένες τροποποιήσεις. Χρησιμοποιήθηκε μια codon optimized κωδική αλληλουχία, δηλαδή το γονίδιο της Cas9 βελτιστοποιήθηκε ως προς τα κωδικόνια για να ταιριάζει με το είδος που υποβάλλεται σε επεξεργασία, προκειμένου να μεταφραστεί περισσότερο αποδοτικά σε πρωτεΐνη [54] (*Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* [57]). Η έκφραση του gRNA είναι σημαντικός παράγοντας και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται υποκινητές RNA πολυμεράσης III όπως ο U6 [57] και ο υποκινητής SNR52 [54]. Με τη χρήση αυτών σημειώνονται ικανοποιητικά ποσοστά έκφρασης των gRNAs.

Το σύστημα CRISPR-Cas9 έχει γίνει ένα βασικό εργαλείο με ευρείες εφαρμογές στην έρευνα, τη βιοτεχνολογία, την ιατρική [58], τη λειτουργική γονιδιωματική και τη γεωργία [59]. Ειδικότερα, αποτελεσματικές γενετικές τροποποιήσεις σε μύκητες οδήγησε σε πετυχημένη παραγωγή ενζύμων (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus oryzae*), φαρμάκων αλλά και βιταμινών (*Ashbya gossypii*) [57].

Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία ενός λειτουργικού συστήματος CRISPR/Cas9 στον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK). Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιήθηκε το διαγονιδιακό στέλεχος F9a το οποίο εκφράζει τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP. Το σύστημα CRISPR/Cas9 εφαρμόστηκε στον F9a αποσκοπώντας στη μεταλλαξιγένεση του γονιδίου GFP. Έτσι με τη χρήση της τεχνολογίας GoldenBraid δημιουργήθηκαν τέσσερις κατασκευές που στοχεύουν το γονίδιο eGFP σε διαφορετικές θέσεις. Η ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα του μύκητα έγινε μέσω σταθερού μετασχηματισμού με τη χρήση *Agrobacterium tumefaciens*. Για τον έλεγχο εισαγωγής των κασετών, οι μύκητες παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού και ακολούθησε μοριακός έλεγχος μέσω αλυσιδωτής

αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η ύπαρξη ενός αποδοτικού συστήματος CRISPR/Cas9, θα ανοίξει τον δρόμο για την έρευνα στα γονίδια του μύκητα και τον ρόλο τους στην αλληλεπίδραση του με το φυτό ξενιστή.

Μέθοδοι-Υλικά

1. Κλωνοποίηση

1.1 One-pot dig-lig

Προκειμένου να δημιουργηθούν οι κασέτες για την έκφραση του συστήματος CRISPR/Cas9, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις One-pot dig-lig. Η αντίδραση θα πρέπει να έχει ως τελικό όγκο τα 10 μl και να τηρείται ο λόγος 3:1 μεταξύ των ενθεμάτων και του φορέα. Ο υπολογισμός των απαιτούμενων ng είτε ενθέματος είτε φορέα έγινε μέσω του εργαλείου NEBioCalculator. Πιο συγκεκριμένα αξιοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

Απαιτούμενη μάζα ενθέματος = επιθυμητός λόγος ενθέματος/φορέα x μάζα φορέα x λόγος μήκους ενθέματος/φορέα

Ως ένθεμα λαμβάνεται κάθε τμήμα που αποτελεί μέρος της κασέτας (υποκινητής, αλληλουχία gRNA, κωδική αλληλουχία γονιδίου αναφοράς, γονίδιο επιλογής, Cas9) και ως φορέας, ο αντίστοιχος alpha ή omega vector. Η αντίδραση περιέχει επίσης 1μl T4 DNA λιγάση, 1μl 10x T4 DNA ligase Buffer, 0,5 μl TpeIIIS enzyme (BsaI-HF για alpha clonings/ BsmBI-HF για omega clonings) και ddH₂O έως ο συνολικός όγκος να φτάσει τα 10 μl. Το πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

-37° C για 5 λεπτά

-16° C για 5 λεπτά

-Επανάληψη των 2 προηγούμενων για άλλους 49 κύκλους

-80° C για 10 λεπτά

1.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a

Τα κύτταρα *E. coli* DH5a είναι δεκτικά κύτταρα κατάλληλα για μετασχηματισμό. Απαιτείται πρώτα απόψυξή τους (20 λεπτά στον πάγο) και ανάμειξη 100 μl αυτών μαζί με 5 μl DNA (που προέκυψε από την αντίδραση one-pot dig-lig). Το μείγμα αναδεύεται ελαφρά και επωάζεται στον πάγο για 20 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιείται

Θερμικό σοκ για 1 λεπτό στους 42° C και αμέσως τοποθετούνται σε πάγο για 2-5 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 400 μL LB και επωάζονται στους 37° C και στα 210 rpm για 1 ώρα. Τέλος τα κύτταρα στρώνονται σε LB agar παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (καναμυκίνη ή σπεκτινομυκίνη για alpha ή omega φορείς αντίστοιχα) και με 40 μL X-gal 40 μg/mL και επωάζονται για 16 ώρες στους 37° C.

1.3 Απομόνωση πλασμιδίου από μετασχηματισμένα *E.coli* DH5a

Τα πλασμίδια-φορείς είτε alpha είτε omega περιέχουν το γονίδιο LacZ που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση, η οποία διασπά το X-gal απελευθερώνοντας μπλε χρώμα. Προκειμένου να ενσωματωθεί το ένθεμα (δηλαδή η κασέτα που κατασκευάζεται) σε κάποιον από τους φορείς (α ή Ω), είναι απαραίτητο να γίνει με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων. Οι αλληλουχίες-στόχοι των περιοριστικών ενζύμων βρίσκονται μέσα στο γονίδιο LacZ και έτσι μια επιτυχής ένθεση διακόπτει τη λειτουργία του. Επομένως τα επιτυχώς μετασχηματισμένα κύτταρα αδυνατούν να μεταβολίσουν το X-gal και έτσι παράγουν λευκές αποικίες. Οι αποικίες αυτές συλλέγονται και επωάζονται σε 5 ml υγρής καλλιέργειας LB για 16 ώρες. Τα πλασμίδια εν τέλει απομονώνονται με τη χρήση του σκευάσματος Macherey Nagel, NucleoSpin Plasmid - Miniprep σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

1.4 Έλεγχος κατασκευών

Προκειμένου να ελεγχθούν περεταίρω οι κατασκευές πραγματοποιείται πέψη με ένζυμα περιορισμού (BamHI-HF (New England BioLabs, USA), SspI-HF (NEB, USA), XmnI (NEB, USA), BbsI (NEB, USA), SapI (NEB, USA), BsmBI (NEB, USA), HindIII-HF (NEB, USA), EcoRV-HF (NEB, USA), rCutSmart Buffer (NEB, USA)) και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων αυτής σε πηκτή αгарόζης 1%. Τα προϊόντα με το σωστό πρότυπο ζώνωσης (το οποίο βρέθηκε μέσω του προγράμματος Benchling) αποστέλλονται για αλληλούχηση κατά Sanger. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αποτιμήθηκαν μέσω του προγράμματος Benchling. Οι επιθυμητές αποικίες αποθηκεύονται στους -80° C ως glycerol stock (700 μL 50% γλυκερόλη και 700 μL καλλιέργειας).

2. Μετασχηματισμός *A.tumefaciens* AGL-1 μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Για τη δημιουργία ηλεκτροδεκτικών *A.tumefaciens* AGL-1, τα κύτταρα καλλιεργούνται μέσα σε θρεπτικό LB για 16 ώρες έως ότου η οπτική πυκνότητα να λάβει τιμές OD=0,5-0,8. Στις επόμενες μέρες η καλλιέργεια μπαίνει στους 4° C προκειμένου να σταματήσει η ανάπτυξη των κυττάρων. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται (4000g) και στη συνέχεια γίνεται έκπλυσή τους με πολύ κρύο ddH₂O και επαναδιάλυση σε 10% γλυκερόλη. Τα κύτταρα αποθηκεύονται στους -80° C.

Η ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιείται με τη χρήση της συσκευής Biorad-Micropulser. Γίνεται ανάμειξη 10ng DNA πλασμιδίων με 50 μL ηλεκτροδεκτικών AGL-1. Το μείγμα μεταφέρεται σε ειδικές κυψελίδες (cuvette), οι οποίες βρίσκονται στον πάγο. Ύστερα από ηλεκτρικό σοκ στο μείγμα, προστίθενται γρήγορα 1000 μL LB και ακολουθεί ελαφριά ανάδευση. Το μείγμα επωάζεται στους 25° C και στα 160 rpm για περίπου 3 ώρες. Ακολουθεί το στρώσιμο των μετασχηματισμένων πλέον κυττάρων με κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη) και επώαση στους 25° C για 48 ώρες.

3. Μετασχηματισμός κονιδίων *Fusarium solani* K-F9a μέσω *A. tumefaciens* AGL-1

Πρώτα είναι απαραίτητη η καλλιέργεια του μύκητα FsK-F9a σε θρεπτικό PDB (Potato Dextrose Broth) για 3-4 ημέρες στους 25° C και στα 160 rpm. Μια μέρα πριν τον μετασχηματισμό προετοιμάζεται το υγρό θρεπτικό IM (Induction Medium) όπως επίσης και πιάτα IM (στερεό θρεπτικό) που περιέχει ακετοσυριγκόνη (Acs200 μg/ml), προκειμένου να διευκολυνθεί ο μετασχηματισμός. Το απόγευμα της ίδιας μέρας ακολουθεί φυγοκέντρηση των AGL1 και επαναδιαλυτοποίησή τους σε 1 mL IM. Προστίθεται ριφαμπικίνη και καναμυκίνη και επωάζεται στους 25° C μέχρι να εμφανιστεί OD στα 0,5 (περίπου 16 ώρες).

Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται απομόνωση των κονιδίων του F9a μέσω διήθησης της υγρής καλλιέργειας από διπλό αποστειρωμένο τουλουπάνι, φυγοκέντρηση των κονιδίων (5500 rpm, 6 λεπτά) και εκπλύσεων με 0,85% NaCl. Ύστερα γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 10⁶ κονίδια/ mL. Έτσι γίνεται συν-καλλιέργεια (co-cultivation) των AGL1 και των κονιδίων, με ίσους όγκους (1:1, 700 μl από το καθένα) και επώαση για 1 ώρα.

Μία ώρα αργότερα τα κονίδια τοποθετούνται σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης που βρίσκονται πάνω σε πιάτα με θρεπτικό IM (Induction Medium)-Acs200. Οι καλλιέργειες αφήνονται να επωαστούν στους 28° C για 48-72 ώρες.

4. Επιλογή θετικών κλώνων F9a παρουσία αντιβιοτικού

Η επιλογή του θετικού κλώνου γίνεται μέσω συνεχών μεταφορών της μεμβράνης σε νέο θρεπτικό παρουσία αντιβιοτικού. Πιο συγκεκριμένα η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρεται δύο φορές σε πιάτα με θρεπτικό PDA (Potato Dextrose Agar) και αντιβιοτικά, κεφταζιδίμη 250 μg/mL (βακτηριοστατικό) και G418 75 μg/mL. Οι μεταφορές μεταξύ τους απέχουν σχεδόν ένα μήνα. Έπειτα από τη δεύτερη μεταφορά της μεμβράνης και αφού δίνεται επαρκής χρόνος στους μύκητες να αναπτυχθούν (περίπου οκτώ ημέρες), με τη χρήση βελόνας που αποστειρώνεται μέσω φλόγας, λαμβάνονται τμήματα αποικιών μύκητα και τοποθετούνται σε πιάτα PDA (χωρισμένο σε 9 τμήματα) με μειωμένη παρουσία αντιβιοτικού (Ceft 200μg/mL και G418 40 μg/mL). Μετά το πέρας μίας εβδομάδας, ακολουθεί επιπλέον μεταφορά σε πιάτα

PDA (ξανά χωρισμένο στα 9) με ακόμα μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού (Ceft 250μg/mL και G418 35 μg/mL). Σε διάστημα λιγότερο του ενός μήνα, οι αποικίες μεταφέρονται σε νέα πιάτα PDA (χωρισμένο στα 4) παρουσία μόνο του αντιβιοτικού G418 με συγκέντρωση 20μg/mL. Μια εβδομάδα αργότερα πραγματοποιείται και η τελευταία μεταφορά, όπου κάθε μύκητας είναι σε ξεχωριστό πιάτο PDA απουσία αντιβιοτικού.

5. Επιβεβαίωση θετικών κλώνων

5.1 Απομόνωση DNA

Πρώτο βήμα για την απομόνωση DNA στον μύκητα, είναι η απομόνωση του μυκηλίου του, οι λεγόμενες υφές. Αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού παρουσία φλόγας. Ο ιστός που συλλέγεται τοποθετείται σε σωλήνες Eppendorf και καταψύχεται σε υγρό άζωτο. Ακολουθεί η κονιορτοποίηση του ιστού με χρήση του μηχανήματος Tissue Lyser (Qiagen).

Σε επόμενα βήματα, προστίθενται 300 μL CTAB buffer και 3 μL μερκαπταιθανόλης τα οποία έχουν θερμανθεί στους 65° C, στους ιστούς. Ύστερα από έντονη ανάδευση (μέσω vortex) τα δείγματα επώάζονται για 20 λεπτά στους 65° C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (5' στα 13.000 rpm) και μεταφορά της άνω φάσης και ανάμειξή της με 350μL χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ξανά φυγοκέντρηση (5' στα 13.000 rpm). Η άνω φάση της οποίας συλλέγεται και αναμειγνύεται με ισοπροπανόλη, 0,7 επί του όγκου της (άνω φάσης). Διατηρείται για 10 λεπτά στους -20° C και ακολουθεί φυγοκέντρηση (15' στα 13.000 rpm). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται με 500μL 70% αιθανόλη (-20° C). Έπειτα από μία ακόμη φυγοκέντρηση (15' στα 13.000 rpm), το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 15 λεπτά στους 50° C. Τέλος στα δείγματα εισάγονται 15μL ddH₂O με RNase A (1 μL RNase A για 50μL ddH₂O) και αφού επωαστούν για 10 λεπτά στον πάγο, αναδεύονται μέσω vortex και γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA μέσω του NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

5.2 Μικροσκοπία Φθορισμού

Οι μύκητες παρατηρούνται στο μικροσκόπιο με σκοπό τον εντοπισμό της χρωστικής αντίστοιχης των γονιδίων αναφοράς είτε mCherry είτε tRFP, τα οποία προκαλούν την παραγωγή κόκκινης χρωστικής, που υποδηλώνει και την ύπαρξη του T-DNA. Στόχος ήταν η μεταλλαξιγένεση του γονιδίου eGFP που ευθύνεται για την παραγωγή πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, στους μύκητες F9a. Η παρατήρηση των παραπάνω έγινε μέσω του μικροσκοπίου φθορισμού Leica DM2000 και φίλτρα για την ανίχνευση

πράσινου (Excitation filter: BP 450-490, Dichromatic mirror: 510, Suppression filter: LP 515) και κόκκινου (Excitation filter: BP 515-560 BP, Dichromatic mirror: 580, Suppression filter: LP 590) φθορισμού.

5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η PCR πραγματοποιήθηκε μέσω του ενζύμου Kapa Taq πολυμεράσης, προκειμένου να διαπιστωθεί αν έχει πραγματοποιηθεί όντως η ένθεση του T-DNA στους κλώνους μύκητα. Ο ένας εκ των δύο εκκινητών, ο forward στοχεύει στον υποκινητή του γονιδίου ανθεκτικότητας NPTII (προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418), ενώ ο reverse στοχεύει μέσα στο γονίδιο NPTII. Ως θετικός μάρτυρας αξιοποιήθηκε ένα πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο NPTII, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ddH₂O και ένας μη-μετασχηματισμένος μύκητας F9a. Επιλέχθηκε το παρακάτω πρόγραμμα για τη PCR:

-95° C για 3 λεπτά

-95° C για 30 δευτερόλεπτα

-52° C για 30 δευτερόλεπτα

-72° C για 15 δευτερόλεπτα

-72° C για 2 λεπτά

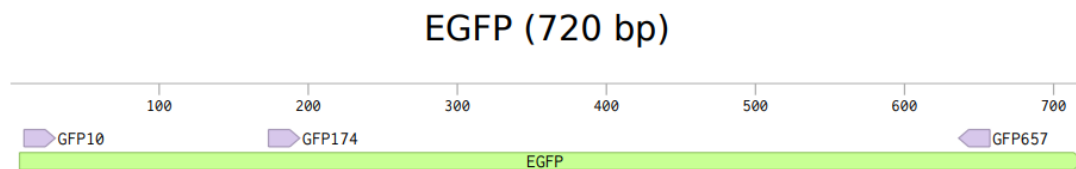
Το συγκεκριμένο πρόγραμμα εκτελέστηκε συνολικά για 35 κύκλους

Αποτελέσματα

1. Κατασκευή των CRISPR/Cas9 φορέων για μετασχηματισμό του F9a

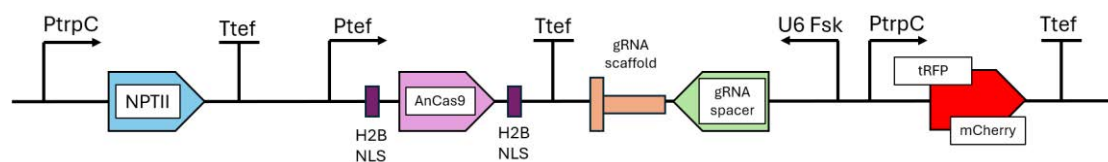
Στόχος του συστήματος CRISPR/Cas9 στη συγκεκριμένη πτυχιακή είναι η επιτυχής γονιδιακή μεταλλαξιογένεση του γονιδίου που παράγει η χρωστική eGFP. Για να επιτευχθεί αυτό έγινε σχεδιασμός 4 τύπων κασετών, η κάθε μία από τις οποίες περιέχει διαφορετικό gRNA, στοχεύει δηλαδή σε διαφορετική περιοχή στο γονίδιο της GFP. Επιπλέον ως guide χρησιμοποιήθηκε και μια τυχαία αλληλουχία, η οποία ονομάζεται scramble (scr) και δεν στοχεύει πουθενά μέσα στο γονιδίωμα αντίθετα χρησιμοποιείται ως αρνητικό control για το πείραμα. Σε κάθε guide (εκτός του scr) έχει δοθεί ένα όνομα-αριθμός με βάση το πρώτο νουκλεοτίδιο στο οποίο γίνεται υβριδισμός από τα guides. Έτσι τα 3 αυτά guides ονομάστηκαν GFP10, GFP174, GFP657.

Παρακάτω φαίνονται οι περιοχές που στοχεύουν τα τρία εκ των τεσσάρων gRNAs (10, 174 και 657) στο GFP:



Εικόνα 5: Απεικόνιση του γονιδίου του GFP και των περιοχών που κόβεται ανάλογα με το κάθε gRNA (Benchling)

Ακολουθεί το πρότυπο δομής της τελικής κατασκευής των κασετών:



Εικόνα 6: Βασικός σκελετός όλων των τελικών κατασκευών (final vectors)

Τα μέρη της κατασκευής είναι τα ακόλουθα:

PtrpC: συστατικός υποκινητής του γονιδίου *trpC*

NPTII: γονίδιο ανθεκτικότητας που εκφράζει την φωσφοτρανσφεράση, προσφέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418

Ttef1: τερματική αλληλουχία του *tef1a* του *A. nidulans*

Ptef1: υποκινητής του *tef1a* του *A. nidulans*

H2B-NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού της ιστόνης H2B

AnCas9: προέρχεται από την *SpCas9* (*Streptococcus pyogenes*) στην οποία έχει γίνει βελτιστοποίηση κωδικονίων για έκφραση στον μύκητα *Aspergillus niger* (codon-optimization)

gRNA scaffold: συνδέεται με το gRNA και προσδένεται με τη Cas9 και λειτουργεί ως τερματιστής

Fsk U6: ενδογενής υποκινητής που ελέγχει την έκφραση του U6 RNA

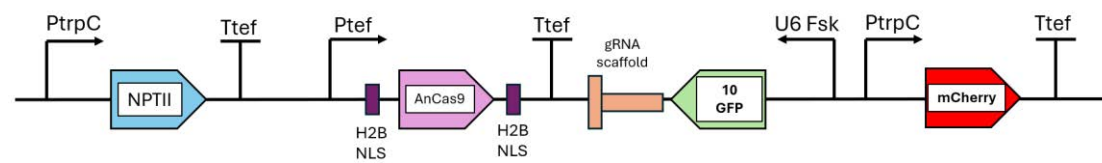
turboRFP(tRFP): γονίδιο αναφοράς υπεύθυνο για τη παραγωγή κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης

mCherry: γονίδιο αναφοράς υπεύθυνο για τη παραγωγή κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης

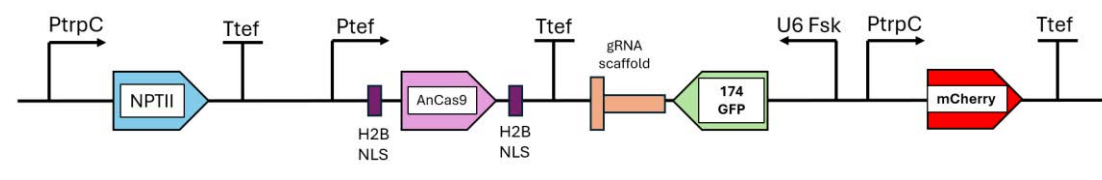
Και οι τέσσερις κασέτες που δημιουργήθηκαν έχουν τον παραπάνω κοινό σκελετό, ωστόσο διαφέρουν σε κάποια επιμέρους τμήματα. Στόχος ήταν η δημιουργία κασετών με διαφορετικά guides και γονίδια αναφοράς προκειμένου να ελεγχθεί η

αποτελεσματικότητα της κάθε κασέτας. Οι κασέτες που κατασκευάστηκαν φαίνονται παρακάτω.

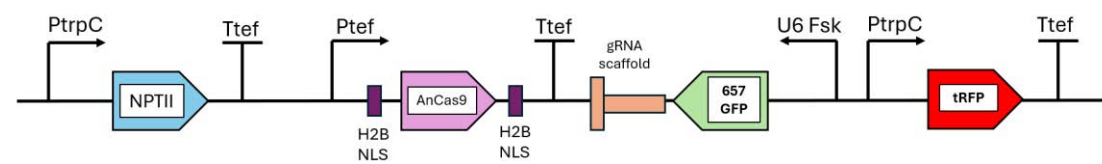
A) Final a2 vector NPTII-AnCas9-GFP10-mCherry



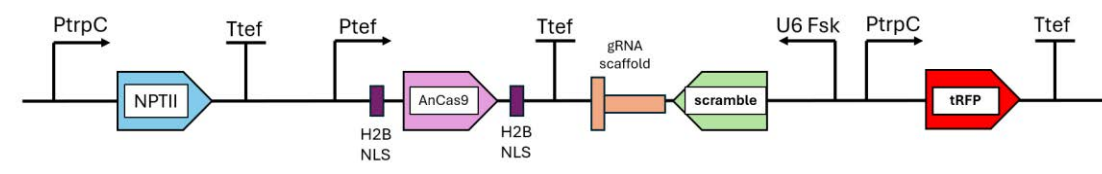
B) Final a2 vector NPTII-AnCas9-GFP174-mCherry



Γ) Final a2 vector NPTII-AnCas9-GFP657-tRFP



Δ) Final a2 vector NPTII-AnCas9-scramble-tRFP



Εικόνα 7: Αναλυτική αναπαράσταση όλων των τελικών α2-κατασκευών

Από τις τέσσερις αυτές κατασκευές, επιλέχτηκε μία για τον μετασχηματισμό πρώτα του *A. tumefaciens* και στη συνέχεια του F9a. Η κασέτα αυτή είναι η Final a2 vector NPTII-AnCas9-GFP174-mCherry (Εικόνα 7B).

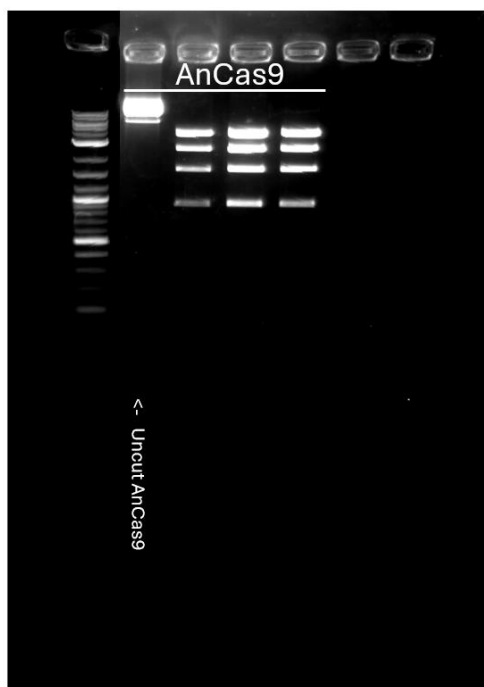
1.1 Κατασκευή των alpha vectors

Οι α φορείς (alpha vectors) περιέχουν είτε την κασέτα έκφρασης gRNAs είτε την κασέτα έκφρασης της πρωτεΐνης Cas9. Η κατασκευή τους πραγματοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης One-pot dig-lig και της δράσης του ενζύμου BsaI. Συνδυάστηκαν τα παρακάτω:

pDGB3_a1R vector + FsK U6 + gRNA + gRNA scaffold

pDGB3_a2 vector + Ptef + H2B + AnCas9 + H2B + Ttef

Έπειτα από μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων DH5a με τους παραπάνω φορείς, έγινε απομόνωση αυτών των πλασμιδίων-φορέων και ακολούθησε πέψη τους με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα κάθε φορά, τα προϊόντα των οποίων ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%.



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης από τα ένζυμα *XmnI*, *SspI* σε πηκτή αγαρόζης 1%, του κλώνου a2-Ptef-AnCas9-Ttef. Αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης: 5856, 3326, 2001, 1095.

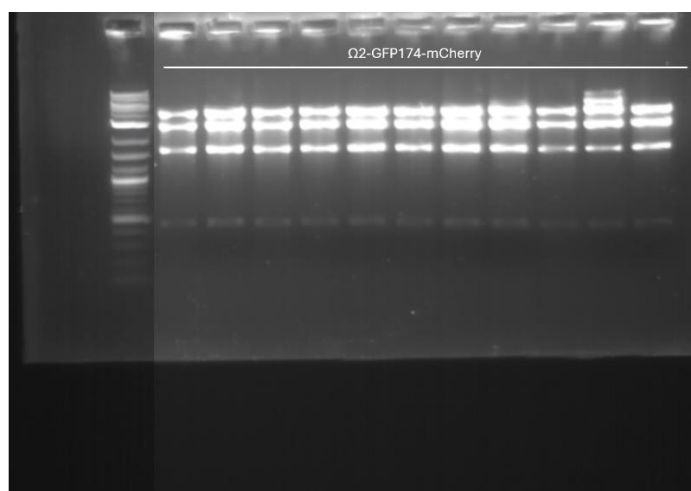
1.2 Κατασκευή των omega vectors

Από την άλλη πλευρά οι Ω φορείς (omega vectors) περιλαμβάνουν είτε τις κασέτες έκφρασης των γονιδίων αναφοράς και με τις κασέτες έκφρασης των gRNAs είτε κασέτες έκφρασης των γονιδίων επιλογής και τη κασέτα έκφρασης της Cas9. Η ένωση έγινε μέσω της αντίδρασης One-pot dig-lig και με τη χρήση του ενζύμου BsmBI.

pDGB3_Ω1 vector + a1-NPTII vector + a2-AnCas9 vector

pDGB3_Ω2 vector + a1R gRNA vector + a2 reporter gene vector

Ομοίως ακολουθήθηκε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων DH5a, απομόνωση των πλασμιδίων φορέων και πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%.



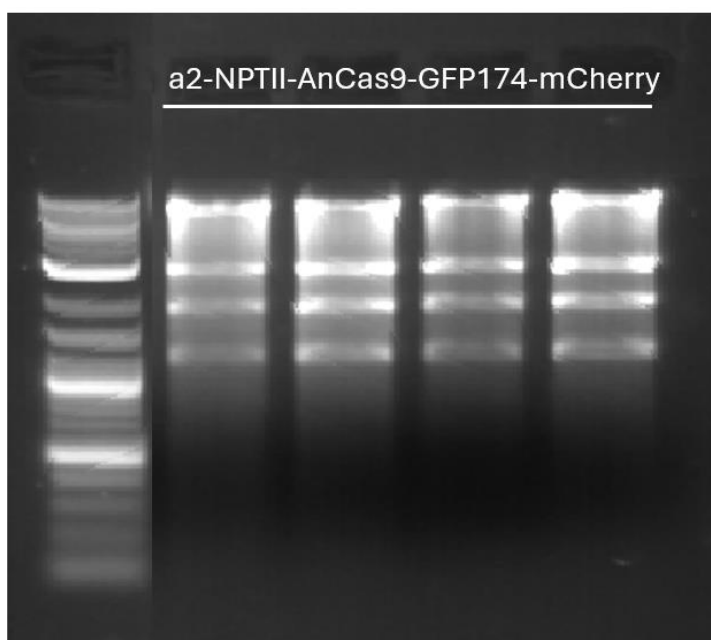
Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης από το ένζυμο *SspI* σε πηκτή αгарόζης 1%, του κλώνου Ω2-GFP174-mCherry. Αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης: 4090, 2762, 1652, 475.

1.3 Κατασκευή των final alpha vectors

Οι τελικοί φορείς (final vectors) περιλαμβάνουν όλα τα απαραίτητα κομμάτια της κατασκευής, δηλαδή τις κασέτες έκφρασης των gRNAs, τις κασέτες έκφρασης των γονιδίων αναφοράς (NPTII), τις κασέτες έκφρασης του γονιδίου επιλογής και την κασέτα έκφρασης της AnCas9. Ο σχηματισμός των φορέων έγινε μέσω της αντίδρασης One-pot dig-lig με τη δράση του ενζύμου BsaI.

pDGB3_a2 vector + Ω1-NPTII-AnCas9 vector + Ω2-gRNA-reporter gene vector

Ακολουθεί μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων DH5a με τους τελικούς φορείς, απομόνωση των πλασμιδίων και πέψη αυτών μέσω συγκεκριμένων ενζύμων. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πηκτή αгарόζης 1%.

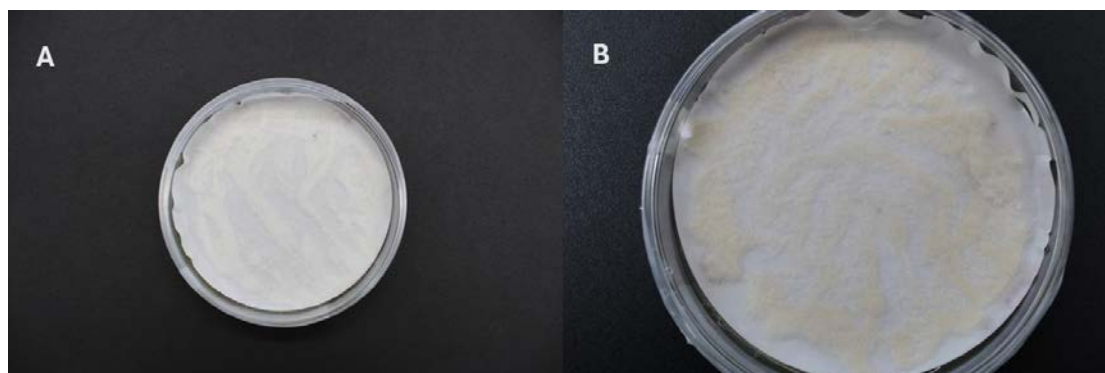


Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης από τα ένζυμα *SacI* και *SspI* σε πηκτή αγαρόζης 1%, του κλώνου *final-a2-NPTII-AnCas9-GFP174-mCherry*. Αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης: 10.077, 2951, 1931, 1227.

2. Μετασχηματισμός του μύκητα με CRISPR δυαδικούς φορείς

Οι τελικοί φορείς χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων αγροβακτηρίων, *A.tumefaciens* AGL1, μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Στη συνέχεια τα αγροβακτήρια αυτά αξιοποιούνται για τον μετασχηματισμό κονιδίων του μύκητα F9a[60] (πρόκειται για τον μύκητα *F.solani* Κ στον οποίον έχει ήδη εισαχθεί το γονίδιο GFP). Όπως αναφέρθηκε η κασέτα που επιλέχθηκε για τον μετασχηματισμό όλων των παραπάνω είναι αυτή που έχει ως gRNA το GFP174 και ως γονίδιο αναφοράς το mCherry (*final a2 vector NPTII-AnCas9-GFP174-mCherry*).

2.1 Επιλογή θετικών κλώνων



Εικόνα 11: Καλλιέργειες F9a σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε θρεπτικό PDA παρουσία αντιβιοτικού G418. Α) Πρώτη μεταφορά της μεμβράνης. Β) Δεύτερη μεταφορά μεμβράνης

Προκειμένου να γίνει η επιλογή των ανασυνδυασμένων μυκήτων, είναι απαραίτητη η ανακαλλιέργεια των μυκήτων με τα σωστά αντιβιοτικά και στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Για τον λόγο αυτόν έγινε έλεγχος ανάπτυξης του μύκητα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, προκειμένου να διαπιστωθεί η ιδανική ώστε ο μύκητας να μπορεί να αναπτύσσεται, χωρίς όμως να δημιουργείται και ο κίνδυνος επιλογής μη μετασχηματισμένων κλώνων.

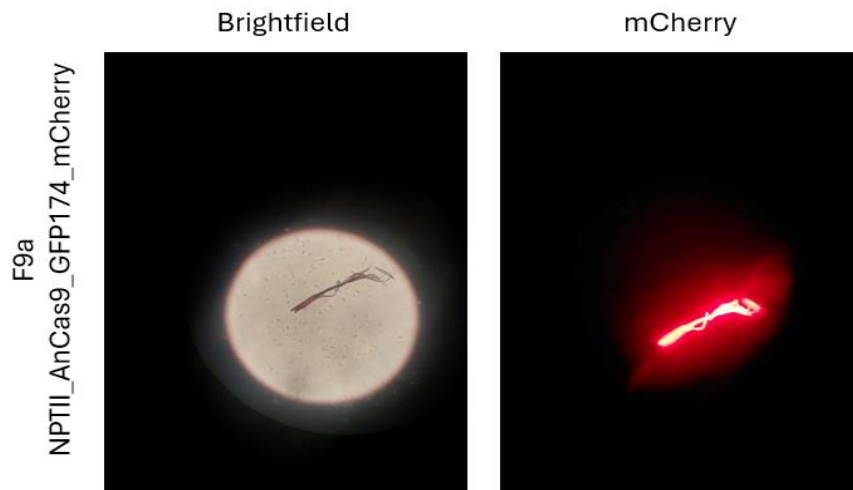
Από τη στιγμή της συν-καλλιέργειας κονιδίων-αγροβακτηρίου και για μερικές μεταφορές ακόμα το θρεπτικό στο οποίο μεγαλώνει ο μύκητας (PDA) περιέχει το αντιβιοτικό G418 και κεφαζιδίμη. Η ακετοσυριγκόνη χρησιμοποιείται προκειμένου να διευκολυνθεί ο μετασχηματισμός, ενώ το G418 συμβάλλει στην επιλογή των θετικών κλώνων (που έχουν το ένθεμα). Το γονίδιο NPTII προσφέρει ανθεκτικότητα έναντι στο G418, επομένως τα κύτταρα που επιβιώνουν στις ανακαλλιέργειες είναι τα μετασχηματισμένα.



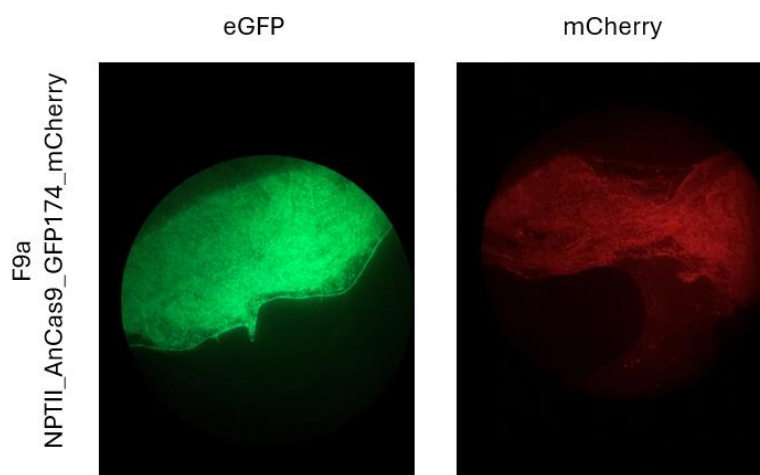
Εικόνα 12: Καλλιέργεια του F9a σε θρεπτικό PDA απουσία αντιβιοτικών.

2.2 Μικροσκοπία φθορισμού για ανίχνευση φθορισμού από το γονίδιο αναφοράς

Η μικροσκοπία φθορισμού γενικά αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο και ειδικά στη συγκεκριμένη πτυχιακή. Το γονίδιο αναφοράς (ανεξάρτητα αν είναι το mCherry ή το tRFP) της κασέτας παράγει κόκκινη φωσφορίζουσα πρωτεΐνη. Επιπλέον οι διαγονιδιακοί μύκητες F9a, έχουν ενσωματωμένο το γονίδιο που παράγει GFP και επομένως παράγουν πράσινη φωσφορίζουσα πρωτεΐνη. Έτσι λοιπόν η παρατήρηση στο μικροσκόπιο αυτό μπορεί να δώσει ποιοτικά αποτελέσματα και ενδείξεις για την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού. Με απλά λόγια αν το σύστημα CRISPR/Cas9 λειτουργεί όπως αναμένεται, οι μετασχηματισμένοι μύκητες δεν θα παράγουν πλέον την χρωστική GFP(πράσινο χρώμα), αλλά μόνο την χρωστική tRFP ή mCherry (κόκκινο χρώμα) που εκφράζονται από το γονίδιο αναφοράς.



Εικόνα 14: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο φθορισμού του κλώνου F9a NPTII-AnCas9-GFP174-mCherry. Αριστερά (Brightfield) φαίνεται ο μύκητας απουσία φίλτρου. Δεξιά (mCherry) ο μύκητας με κατάλληλο φίλτρο για την παρακολούθηση του mCherry.



Εικόνα 15: Παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού του κλώνου F9a NPTII-AnCas9-GFP174-mCherry. Αριστερά (eGFP), απεικονίζεται ο κλώνος με κατάλληλο φίλτρο για την ανίχνευση του GFP. Δεξιά (mCherry), παρουσιάζεται ο κλώνος με κατάλληλο φίλτρο για ανίχνευση του mCherry.

Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού έδειξε πως το T-DNA έχει πράγματι εισαχθεί στον μύκητα F9a. Ωστόσο, παρατηρεί κανείς ότι με τη χρήση κατάλληλου φίλτρου γίνεται η ανίχνευση της φωσφορίζουσας χρωστικής GFP. Αυτό δείχνει λοιπόν ότι παρόλο που το ένθεμα εισήχθη επιτυχώς, η μετάλλαξη του επιθυμητού γονιδίου πιθανώς δεν πραγματοποιήθηκε.

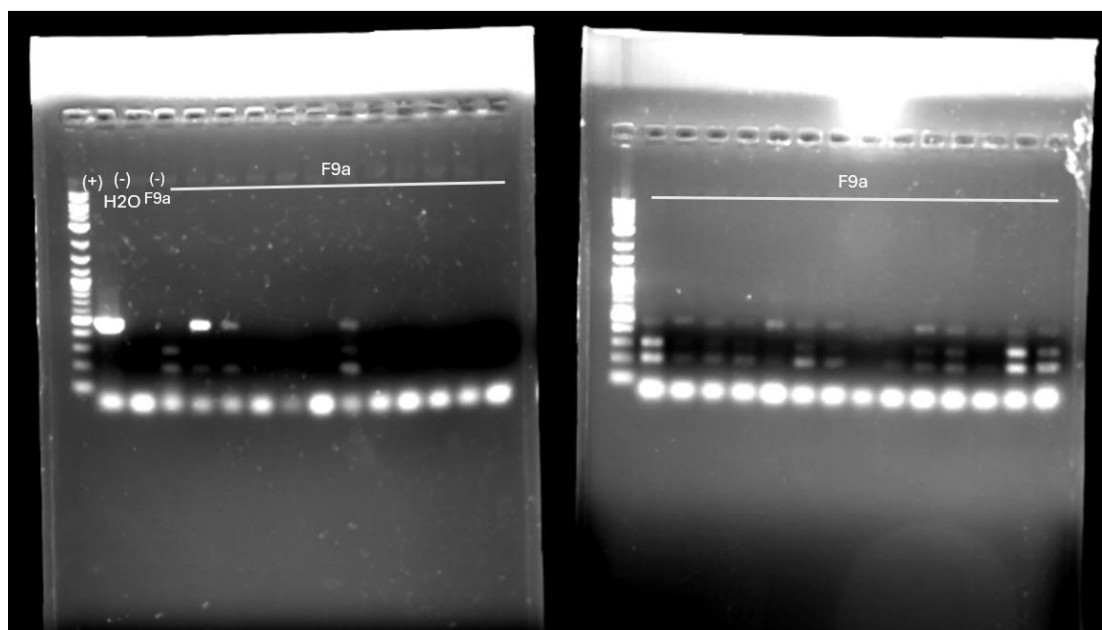
2.3 PCR για επιβεβαίωση ένθεσης του T-DNA

Κατά τον σταθερό μετασχηματισμό δια μέσου *A.tumefaciens* το T-DNA του αποκόπτεται από το πλασμίδιο και εισάγεται με συγκεκριμένο τρόπο στο γονιδίωμα

του εκάστοτε οργανισμού. Πρώτα γίνεται η ενσωμάτωση του δεξιού συνοριακού (RB) του T-DNA και μετά του αριστερού (LB). Κατά αυτόν τον τρόπο υπάρχει περίπτωση να μην ενσωματωθεί σωστά όλο το ένθεμα και συνεπώς το αριστερό τμήμα-άκρο να αποκοπεί [61][62].

Οι εκκινητές της PCR σχεδιάστηκαν έτσι ώστε ο forward να στοχεύει τον υποκινητή του γονιδίου NPTII (που προσδίδει ανθεκτικότητα στο G418) και ο reverse να στοχεύει στο γονίδιο NPTI, το οποίο εντοπίζεται στο αριστερό άκρο. Επομένως μέσω ενίσχυσης αυτού του τμήματος, θα μας επιβεβαιώσει αν έχει γίνει η ένθεση.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1%, όπως φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης 1%. Με τη σειρά διακρίνονται: θετικό (+) κοντρολ, αρνητικό (-) κοντρολ/ ddH₂O, αρνητικό (-) κοντρολ/ Μη μετασχηματισμένος F9a, F9a δείγματα προς επιβεβαίωση.

Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων είναι 492bp. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 13, στην πλειοψηφία των δειγμάτων παρατηρείται το αναμενόμενο προϊόν. Την ίδια ζώνωση παρατηρεί κανείς και στον θετικό μάρτυρα (+ control). Επομένως συμπεραίνεται ότι το ένθεμα πράγματι εισήχθη επιτυχώς στο γονιδίωμα του μύκητα. Η ηλεκτροφόρηση φανερώνει και δύο άλλες ζώνες μικρότερου μεγέθους. Οι ζώνες αυτές παρατηρούνται και στον αρνητικό μάρτυρα F9a, αλλά όχι σε αυτόν με ddH₂O. Πιθανότατα οι δύο αυτές ζώνες αντιπροσωπεύουν περιοχές μη-ειδικής ενίσχυσης (non-specific amplifications), δηλαδή περιοχές του γονιδιώματος που ενισχύθηκαν από τη PCR χωρίς να είναι εξ αρχής στόχοι ενίσχυσης. Βέβαια, ένας πιο ολοκληρωμένος έλεγχος του συστήματος, θα περιλάμβανε PCR και αλληλούχηση κατά Sanger στο γονίδιο eGFP καθώς και RT-qPCR. Αυτό θα μας παρείχε σαφώς μια πιο πλήρη εικόνα των αποτελεσμάτων.

Συζήτηση

Η συγκεκριμένη πτυχιακή είχε ως στόχο τη χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 προκειμένου να επιτευχθεί μεταλλαξινέυση στον διαγονιδιακό μύκητα F9a και πιο συγκεκριμένα στο γονίδιο του που εκφράζει GFP. Έτσι κατασκευάστηκαν με τη χρήση της τεχνολογίας GoldenBraid/FungalBraid, CRISPR κατασκευές με gRNAs που στόχευαν σε διαφορετικά σημεία το γονιδίου του GFP. Ακολούθησε πρώτα μετασχηματισμός με *A. tumefaciens* και στη συνέχεια, σταθερός μετασχηματισμός του μύκητα F9a. Η εργασία ολοκληρώθηκε τόσο με μοριακή όσο και οπτική ανάλυση- παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού έδειξε την συνεχιζόμενη έκφραση της πρωτεΐνης GFP παρά την εισαγωγή του T-DNA στο γονιδίωμα του. Η παρουσία του T-DNA επιβεβαιώθηκε με χρήση PCR. Η ύπαρξη του κόκκινου χρώματος, κάτω από κατάλληλο φίλτρο, υποδηλώνει και την παρουσία και έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Επομένως δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για το αν η μεταλλαξινέυση είναι επιτυχής.

Είναι πολύ σημαντικό να διερευνηθούν οι λόγοι για τους οποίους πιθανώς δεν επετεύχθη ο αρχικός στόχος. Παρόλο που τόσο το γονίδιο ανθεκτικότητας όσο και το αναφοράς εμφανίζουν έκφραση, πιθανότατα το πρόβλημα να υπάρχει στα άλλα δύο μέρη της κατασκευής. Μέσω της χρήσης RT-qPCR θα μπορέσει να αποσαφηνιστεί, ποιο κομμάτι της κατασκευής δεν είναι λειτουργικό, δηλαδή είτε η Cas9 είτε το gRNA. Και εφόσον αποδειχθεί ότι κάποιο εκ των τμημάτων δεν είναι λειτουργικό, τότε χρήζει περαιτέρω έρευνα στα ρυθμιστικά στοιχεία των κατασκευών (υποκινητές, τερματιστές) και ίσως της συμβατότητας της κατασκευής με τον οργανισμό στον οποίον έχει εισαχθεί. Επιπλέον, για την επιβεβαίωση της μεταλλαξινέωσης του eGFP είναι απαραίτητο να αποσταλεί το γονίδιο-στόχος για αλληλούχηση και να συγκριθεί με την αλληλουχία γονιδίων του αντίστοιχου γονιδίου του διαγονιδιακού μύκητα F9a στον οποίο δεν εφαρμόστηκε το CRISPR/Cas9.

Μακροπρόθεσμος στόχος της παρούσας πτυχιακής είναι η δημιουργία ενός αποτελεσματικού συστήματος CRISPR/Cas9 στον μύκητα *Fusarium solani* K, από τον οποίον προήλθε ο F9a, με σκοπό την περαιτέρω έρευνα. Ο συγκεκριμένος μύκητας (FsK) έχει αποδειχθεί ότι προσφέρει πολλαπλά οφέλη στα φυτά με τα οποία συμβιώνει κυρίως στο θέμα της άμυνας από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Η περαιτέρω μελέτη των γονιδίων και των μηχανισμών μέσω των οποίων αλληλεπιδρά με τα φυτά, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον.

Έχει αποδειχθεί πως ο FsK έχει λειτουργικό σύστημα RNAi, καθιστώντας ικανή την μεταφορά μικρών RNA στο φυτό-ξενιστή προκαλώντας έτσι γονιδιακή σίγηση και μεθυλίωση στο DNA του [63]. Η δημιουργία λοιπόν, μίας εργαλειοθήκης (toolbox) για τη γενετική επεξεργασία, είναι κρίσιμη και αποτέλεσε τον στόχο της παρούσας πτυχιακής. Τα εργαλεία που παρέχει, θα μπορέσουν να αξιοποιηθούν στην έρευνα του συγκεκριμένου μηχανισμού (RNAi) μέσω της δημιουργίας μεταλλαγμάτων στα

υπεύθυνα γονίδια, άλλα και στη περεταίρω έρευνα άλλων μηχανισμών ή και μεταβολικών μονοπατιών του συγκεκριμένου οργανισμού.

Γενικότερα, η χρήση του CRISPR/Cas9 συστήματος στη γενετική τροποποίηση των μυκήτων είναι ένα νέο σχετικά πεδίο, που απαιτεί όλο και περισσότερη έρευνα. Μέσω τέτοιων ερευνών ανοίγονται δρόμοι για την τροποποίηση και άλλων ειδών μυκήτων, οι οποίοι είναι ικανοί να προσφέρουν πολλαπλά οφέλη στον τομέα της υγείας, της γεωργίας, της βιοτεχνολογίας και φυσικά της έρευνας.

Βιβλιογραφία

- [1] C. R. L. and C. M. S. Lori M. Carris, “Introduction to Fungi,” *The Plant Health Instructor*, 2012.
- [2] K. D. Hyde *et al.*, “The numbers of fungi: is the descriptive curve flattening?,” *Fungal Divers*, vol. 103, no. 1, pp. 219–271, Jul. 2020, doi: 10.1007/s13225-020-00458-2.
- [3] N. Wijayawardene, “Outline of Fungi and fungus-like taxa,” *Mycosphere*, vol. 11, no. 1, pp. 1060–1456, 2020, doi: 10.5943/mycosphere/11/1/8.
- [4] J. E. Stajich *et al.*, “The Fungi,” *Current Biology*, vol. 19, no. 18, pp. R840–R845, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.cub.2009.07.004.
- [5] J. Wendland, “Comparison of Morphogenetic Networks of Filamentous Fungi and Yeast,” *Fungal Genetics and Biology*, vol. 34, no. 2, pp. 63–82, Nov. 2001, doi: 10.1006/fgbi.2001.1290.
- [6] I. Senanayake, “Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation,” *Mycosphere*, vol. 11, no. 1, pp. 2678–2754, 2020, doi: 10.5943/mycosphere/11/1/20.
- [7] R. J. Rodriguez, J. F. White Jr, A. E. Arnold, and R. S. Redman, “Fungal endophytes: diversity and functional roles,” *New Phytologist*, vol. 182, no. 2, pp. 314–330, Apr. 2009, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
- [8] N. C. Baron and E. C. Rigobelo, “Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture,” *Mycology*, vol. 13, no. 1, pp. 39–55, Jan. 2022, doi: 10.1080/21501203.2021.1945699.
- [9] S. Kaul, S. Gupta, M. Ahmed, and M. K. Dhar, “Endophytic fungi from medicinal plants: A treasure hunt for bioactive metabolites,” Dec. 2012. doi: 10.1007/s11101-012-9260-6.
- [10] H. J. Schroers, G. J. Samuels, N. Zhang, D. P. G. Short, J. Juba, and D. M. Geiser, “Epitypification of *Fusisporium* (*Fusarium*) *solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex,” *Mycologia*, vol. 108, no. 4, pp. 806–819, 2016, doi: 10.3852/15-255.

- [11] J. J. Coleman, "The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance," *Mol Plant Pathol*, vol. 17, no. 2, pp. 146–158, Feb. 2016, doi: 10.1111/mpp.12289.
- [12] N. Kavroulakis, G. Doupis, I. E. Papadakis, C. Ehaliotis, and K. K. Papadopoulou, "Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK," *Rhizosphere*, vol. 6, pp. 77–85, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.rhisph.2018.04.003.
- [13] M. L. Pappas *et al.*, "The beneficial endophytic fungus *Fusarium solani* strain K alters tomato responses against spider mites to the benefit of the plant," *Front Plant Sci*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fpls.2018.01603.
- [14] N. Kavroulakis, S. Ntougias, G. I. Zervakis, C. Ehaliotis, K. Haralampidis, and K. K. Papadopoulou, "Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain," *J Exp Bot*, vol. 58, no. 14, pp. 3853–3864, Nov. 2007, doi: 10.1093/jxb/erm230.
- [15] N. Garantonakis *et al.*, "Tomato inoculation with the endophytic strain *Fusarium solani* K results in reduced feeding damage by the zoophytophagous predator *nesidiocoris tenuis*," *Front Ecol Evol*, vol. 6, no. AUG, Aug. 2018, doi: 10.3389/fevo.2018.00126.
- [16] A. A. Cheng and T. K. Lu, "Synthetic biology: An emerging engineering discipline," Aug. 2012. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150118.
- [17] K. L. Garner, "Principles of synthetic biology," 2021, *Portland Press Ltd*. doi: 10.1042/EBC20200059.
- [18] J. C. Way, J. J. Collins, J. D. Keasling, and P. A. Silver, "Integrating biological redesign: Where synthetic biology came from and where it needs to go," Mar. 27, 2014, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.cell.2014.02.039.
- [19] S. Mukherji and A. Van Oudenaarden, "Synthetic biology: Understanding biological design from synthetic circuits," Dec. 2009. doi: 10.1038/nrg2697.
- [20] L. Martins-Santana, L. C. Nora, A. Sanches-Medeiros, G. L. Lovate, M. H. Murilo, and R. Silva-Rocha, "Systems and synthetic biology approaches to engineer fungi for fine chemical production," Oct. 03, 2018, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fbioe.2018.00117.
- [21] M. D. Asemoloye, M. A. Marchisio, V. K. Gupta, and L. Pecoraro, "Genome-based engineering of ligninolytic enzymes in fungi," Dec. 01, 2021, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s12934-021-01510-9.
- [22] V. Valiante, "Advances in Synthetic Biology of Fungi and Contributions to the Discovery of New Molecules," *ChemBioChem*, vol. 24, no. 11, Jun. 2023, doi: 10.1002/cbic.202300008.
- [23] K. Tsukada *et al.*, "Synthetic biology based construction of biological activity-related library of fungal decalin-containing diterpenoid pyrones," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15664-4.

- [24] Y. Morishita, T. Sonohara, T. Taniguchi, K. Adachi, M. Fujita, and T. Asai, "Synthetic-biology-based discovery of a fungal macrolide from: *Macrophomina phaseolina*," *Org Biomol Chem*, vol. 18, no. 15, pp. 2813–2816, Apr. 2020, doi: 10.1039/d0ob00519c.
- [25] E. Tóth *et al.*, "Restriction enzyme body doubles and PCR cloning: On the general use of Type IIS restriction enzymes for cloning," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, Mar. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0090896.
- [26] A. J. Bath, S. E. Milsom, N. A. Gormley, and S. E. Halford, "Many type IIs restriction endonucleases interact with two recognition sites before cleaving DNA," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 6, pp. 4024–4033, Feb. 2002, doi: 10.1074/jbc.M108441200.
- [27] C. Engler, R. Kandzia, and S. Marillonnet, "A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability," *PLoS One*, vol. 3, no. 11, Nov. 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0003647.
- [28] S. Marillonnet and R. Grützner, "Synthetic DNA Assembly Using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline," *Curr Protoc Mol Biol*, vol. 130, no. 1, Mar. 2020, doi: 10.1002/cpmb.115.
- [29] A. Sarrion-Perdigones *et al.*, "GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0021622.
- [30] A. Sarrion-Perdigones *et al.*, "Goldenbraid 2.0: A comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology," *Plant Physiol*, vol. 162, no. 3, pp. 1618–1631, 2013, doi: 10.1104/pp.113.217661.
- [31] M. Hernanz-Koers *et al.*, "FungalBraid: A GoldenBraid-based modular cloning platform for the assembly and exchange of DNA elements tailored to fungal synthetic biology," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 116, pp. 51–61, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.fgb.2018.04.010.
- [32] E. Moreno-Giménez *et al.*, "FungalBraid 2.0: expanding the synthetic biology toolbox for the biotechnological exploitation of filamentous fungi," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 11, 2023, doi: 10.3389/fbioe.2023.1222812.
- [33] P. Krenek, O. Samajova, I. Luptovciak, A. Doskocilova, G. Komis, and J. Samaj, "Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications," 2015, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.012.
- [34] P. J. B. Brown, J. H. Chang, and C. Fuqua, "Agrobacterium tumefaciens: a Transformative Agent for Fundamental Insights into Host-Microbe Interactions, Genome Biology, Chemical Signaling, and Cell Biology," Apr. 01, 2023, *American Society for Microbiology*. doi: 10.1128/jb.00005-23.
- [35] S. B. Gelvin, "Improving plant genetic engineering by manipulating the host," Mar. 01, 2003, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/S0167-7799(03)00005-2.

- [36] M. Torres, A. Jiquel, E. Jeanne, D. Naquin, Y. Dessaux, and D. Faure, "Agrobacterium tumefaciens fitness genes involved in the colonization of plant tumors and roots", doi: 10.1111/nph.17810i.
- [37] Veena, H. Jiang, R. W. Doerge, and S. B. Gelvin, "Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by Agrobacterium tumefaciens induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression," *Plant Journal*, vol. 35, no. 2, pp. 219–236, Jul. 2003, doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01796.x.
- [38] M. Cheng *et al.*, "Genetic Transformation of Wheat Mediated by Agrobacterium tumefaciens," 1997. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/plphys/article/115/3/971/6071321>
- [39] Y. Zhang, K. Massel, I. D. Godwin, and C. Gao, "Applications and potential of genome editing in crop improvement 06 Biological Sciences 0604 Genetics 06 Biological Sciences 0607 Plant Biology 07 Agricultural and Veterinary Sciences 0703 Crop and Pasture Production," Nov. 30, 2018, *BioMed Central Ltd.* doi: 10.1186/s13059-018-1586-y.
- [40] J. A. Doudna, "The promise and challenge of therapeutic genome editing," Feb. 13, 2020, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41586-020-1978-5.
- [41] D. D. Songstad, J. F. Petolino, D. F. Voytas, and N. A. Reichert, "Genome Editing of Plants," *CRC Crit Rev Plant Sci*, vol. 36, no. 1, pp. 1–23, Jan. 2017, doi: 10.1080/07352689.2017.1281663.
- [42] S. Vats *et al.*, "Genome editing in plants: Exploration of technological advancements and challenges," Nov. 01, 2019, *MDPI*. doi: 10.3390/cells8111386.
- [43] D. Benjamin, T. Cox, R. J. Platt, and F. Zhang, "Therapeutic genome editing: prospects and challenges," 2015. [Online]. Available: <http://omim.org/entry/147450>
- [44] H. Li, Y. Yang, W. Hong, M. Huang, M. Wu, and X. Zhao, "Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects," Dec. 01, 2020, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41392-019-0089-y.
- [45] S. Nargesi *et al.*, "Recent advances in genome editing tools in medical mycology research," Apr. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/jof7040257.
- [46] M. Zakrzewska and M. Burmistrz, "Mechanisms regulating the CRISPR-Cas systems," 2023, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmicb.2023.1060337.
- [47] D. Rath, L. Amlinger, A. Rath, and M. Lundgren, "The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications," Oct. 15, 2015, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.025.
- [48] F. Hille, H. Richter, S. P. Wong, M. Bratovič, S. Ressel, and E. Charpentier, "The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward," Mar. 08, 2018, *Cell Press*. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.032.

- [49] F. Zhang, "Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond," *Q Rev Biophys*, vol. 52, 2019, doi: 10.1017/s0033583519000052.
- [50] X. Xu *et al.*, "Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing," *Mol Cell*, vol. 81, no. 20, pp. 4333-4345.e4, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.008.
- [51] F. Jiang and J. A. Doudna, "CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms," vol. 217, p. 56, 2024, doi: 10.1146/annurev-biophys.
- [52] F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, and F. Zhang, "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system," *Nat Protoc*, vol. 8, no. 11, pp. 2281–2308, 2013, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
- [53] H. Wang, M. La Russa, and L. S. Qi, "CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond," *Annu Rev Biochem*, vol. 85, pp. 227–264, Jun. 2016, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607.
- [54] T. Q. Shi *et al.*, "CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: the state of the art," Oct. 01, 2017, *Springer Verlag*. doi: 10.1007/s00253-017-8497-9.
- [55] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier, "A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity One-Sentence Summary."
- [56] L. Cong *et al.*, "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems," *Science (1979)*, vol. 339, no. 6121, pp. 819–823, Feb. 2013, doi: 10.1126/science.1231143.
- [57] R. Song *et al.*, "CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective," Sep. 05, 2019, *Springer Verlag*. doi: 10.1007/s00253-019-10007-w.
- [58] P. D. Hsu, E. S. Lander, and F. Zhang, "Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering," Jun. 05, 2014, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010.
- [59] Y. Mao, J. R. Botella, Y. Liu, and J. K. Zhu, "Gene editing in plants: Progress and challenges," May 01, 2019, *Oxford University Press*. doi: 10.1093/nsr/nwz005.
- [60] V. Skiada, A. Faccio, N. Kavroulakis, A. Genre, P. Bonfante, and K. K. Papadopoulou, "Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 127, pp. 60–74, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.fgb.2019.03.003.
- [61] M. Dafny-Yelin, A. Tovkach, and T. Tzfira, "Integration of *Agrobacterium* T-DNA in Plant Cells," 2008. doi: 10.1007/7089_2008_28.
- [62] S. B. Gelvin, "Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome," Mar. 26, 2014, *Frontiers Research Foundation*. doi: 10.3389/fpls.2012.00052.

- [63] A. Dalakouras *et al.*, “A beneficial fungal root endophyte triggers systemic RNA silencing and DNA methylation of a host reporter gene,” *RNA Biol*, vol. 20, no. 1, pp. 20–30, 2023, doi: 10.1080/15476286.2022.2159158.