



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας



Διπλωματική Εργασία

“Ανάλυση μεταλλάξεων βιοσυνθετικών γονιδίων τριτερπενίων στο φυτό *Lotus japonicus* και φαινοτυπική ανάλυση των μεταλλαγμάτων κατά την αποίκιση από ενδοφυτικό μύκητα”

“Mutation Analysis of Triterpene Biosynthesis Genes in *L. japonicus* and Phenotypic Analysis of the Mutants during Root Colonization by an Endophytic Fungus”

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος

Παπανικόλας Θεόδωρος του Φωτίου

Λάρισα, 2025

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της κ. Παπαδοπούλου Κ., καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών και της κ. Κουκάρας Ε., υποψήφια διδάκτορας του εργαστηρίου.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βασιλειάδης Σωτήριος,, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας και Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να γράψω το κείμενο αυτό, βάζοντας μια προσωπική και, πιθανόν, όχι τόσο επίσημη πινελιά σε άλλο ένα κομμάτι αυτής της πτυχιακής εργασίας και αυτού του πτυχίου.

Το μονοπάτι που ακολούθησα μπορεί να μην ήταν ελκυστικό σε πολλούς, όμως αντιμετωπίστηκε με στήριξη σε κάθε βήμα του. Για αυτό τον λόγο, θα ήθελα από τα βάθη της καρδιάς μου να ευχαριστήσω την κ. Παπαδοπούλου, ιδιαίτερα επειδή εκείνη την ημέρα που σας γνωστοποίησα ότι ψάχνω ένα εργαστήριο για να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία, με ρωτήσατε με τι θα ήθελα να ασχοληθώ. Δυστυχώς, ακόμα, δεν έχω την απάντηση σε αυτό το ερώτημα, ωστόσο γίνομαι καλύτερος στο να αναγνωρίζω ποιό είναι το επόμενο βήμα.

Αυτή την εκτεταμένη περίοδο διεξαγωγής αυτής της πτυχιακής εργασίας, είχα την ευκαιρία να βρεθώ εντός ερευνητικού περιβάλλοντος, εκτός του και μετά, ξανά, εντός του. Η αλλαγή σκηνής με έκανε να συνειδητοποιήσω πως το ήθος, η περιέργεια και η εργατικότητα ενός ερευνητή αποτελούν οι αόρατοι τίτλοι με την μεγαλύτερη σημασία. Γι' αυτό θα ήθελα, πρωτίστως να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ, Ευγενία Κουκάρα, που μου έδειξε την αξία της αφοσίωσης.

Δεν θα ήταν σωστό εκ μέρους μου να μην αναφέρω τα υπόλοιπα άτομα του εργαστηρίου, που, και πάλι, λόγω της αλλαγής περιβάλλοντος που έκανα, μπόρεσα να φτάσω στο συμπέρασμα πως οι φιλίες θα σε κάνουν να ξεχάσεις κάθε ψυχική και σωματική επιβάρυνση μιας δύσκολης ρουτίνας. Μάριε, Λουκία, Παναγιώτη, ελπίζω το θετικό μου πνεύμα να σας βοήθησε, όσο βοηθήσατε εσείς εμένα.

Καθόλη την διάρκεια των σπουδών μου, είχα την ευκαιρία να αλληλεπιδράσω με ανθρώπους που θεωρώ περίφημους, καθένας με τον δικό του τρόπο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής που μου επιτρέψανε να δουλέψω μαζί τους στο τελευταίο κεφάλαιο αυτού του κύκλου σπουδών.

Τέλος, σημαντικότερο απ' όλα, θα ήθελα να αποτυπώσω σε αυτή την παράγραφο τις ευχαριστίες μου προς την οικογένεια μου, χωρίς την βοήθεια της οποίας δεν θα είχα φτάσει στο σημείο που βρίσκομαι. Σας χρωστάω ότι είμαι σήμερα και ότι θα είμαι αύριο και κάθε βήμα μου αποτελεί ένα λιθαράκι της ευγνωμοσύνης μου.

Περίληψη

Το *Lotus japonicus* είναι ένα πρότυπο ψυχανθές φυτό γνωστό για τον εξειδικευμένο μεταβολισμό του και την ικανότητά του να συμμετέχει σε συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις με διάφορους οργανισμούς. Τα τριτερπένια, μια σημαντική υποομάδα της υπεροικογένειας των τερπενίων των εξειδικευμένων μεταβολιτών των φυτών, προκύπτουν από το οξειδοσκουαλένιο με τη βοήθεια των κυκλάσεων του οξειδοσκουαλένιου και καταλύονται σε διάφορες ενεργές μορφές από τα κυτοχρώματα P450. Έχουν προσελκύσει την επιστημονική κοινότητα για τη φαρμακευτική τους αξία και, πρόσφατα, για την ικανότητά τους να επηρεάζουν τις συμβιωτικές σχέσεις. Ένα μη παθογόνο στέλεχος του *Fusarium solani* (στέλεχος K - FsK) που αποικίζει το ψυχανθές δεν αποτελεί εξαίρεση του κανόνα, καθώς η ενδοφυτική του ικανότητα φαίνεται να συνδέεται με σημαντικά βιοσυνθετικά γονίδια τριτερπενίων. Αποφασίσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση του *AMY2*, μιας κυκλάσης οξειδοσκουαλένιου, και του *CYP71D353*, ενός κυτοχρώματος P450, στη συμβίωση του FsK, δημιουργώντας μια συλλογή μετασχηματισμένων ριζών, στερημένων των εν λόγω γονιδίων. Η σίγηση επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ένα βελτιστοποιημένο σύστημα CRISPR/Cas9 για το *L. japonicus* με διαφορετικούς οδηγούς RNA που στοχεύουν τα δύο γονίδια. Το γενετικό σύστημα εισήχθη στα φυτά μέσω μετασχηματισμού “Hairy Root” μεσολαβούμενη από το *R. rhizogenes*. Μετά τον εμβολιασμό των μετασχηματισμένων ριζών με τον ενδοφυτικό FsK, στοχεύσαμε στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μετάλλαξης κάθε οδηγού RNA που στοχεύει το γονίδιο και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αποικισμού συγκρίνοντας το μεταλλαγμένο προφίλ με το μη (μεταλλαγμένο).

Λέξεις-Κλειδιά

Lotus japonicus, FsK, αποικισμός, τριτερπένια, γονιδιακή συστοιχία *AMY2*, CRISPR/Cas9, Hairy Root

Abstract

Lotus japonicus is a model legume plant better known for its specialized metabolism and ability to participate in symbiotic interactions with various organisms. Triterpenes, a major subgroup of the terpene superfamily of plant specialized metabolites, arise from oxidosqualene with the help of oxidosqualene cyclases and get catalyzed into different active forms by P450 cytochromes. They have attracted the scientific community for their medicinal values and, recently, for their ability to affect symbiotic relationships. Evidently, a non-pathogenic strain of *Fusarium solani* (strain K – FsK) that colonizes the legume is not an exception, as its endophytic ability seems to be interlinked with major triterpene biosynthetic genes. We decided to investigate the effect of *AMY2*, an oxidosqualene cyclase, and *CYP71D353*, a P450 cytochrome, on FsK symbiosis by generating a collection of mutant plants, deprived of said genes. The knock-out was achieved utilizing an optimized CRISPR/Cas9 system for *L. japonicus* with different gRNAs targeting the two genes. The genetic system was introduced to the plants via *R. rhizogenes*-mediated hairy root transformation. After infecting the transformed hairy roots with the endophytic FsK, we aimed to evaluate the mutation efficacy of each gene-targeting gRNA and assess colonization effects by comparing the mutated profile with the non (mutated).

Keywords

Lotus japonicus, FsK, colonisation, triterpenes, *AMY2* gene cluster, CRISPR/Cas9, Hairy Root

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	11
1.1 Τα ψυχανθή και το φυτό μοντέλο <i>Lotus japonicus</i>	11
1.2 Οι Δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών.....	12
1.2.1 Ο δευτερογενής μεταβολισμός στα φυτά.....	12
1.2.2 Βιοσύνθεση Τερπενίων και Τριτερπενίων στα φυτά.....	13
1.2.3 Η γονιδιακή συστοιχία του AMY2.....	15
1.3 Το ενδόφυτο <i>Fusarium solani</i> , στέλεχος K ή FsK.....	16
1.4 Η τεχνολογία CRISPR/Cas9.....	17
1.5 Μετασηματισμός “Hairy Root” διαμεσολαβούμενος από το αγροβακτήριο <i>Rhizobium rhizogenes</i>	20
2. Σκοπός της Πτυχιακής Εργασίας	23
3. Υλικά και Μέθοδοι	24
3.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης.....	24
3.2 Πείραμα “Hairy Root”	24
3.2.1 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων	24
3.2.2 Προετοιμασία στελεχών <i>Rhizobium rhizogenes</i> LBA1334	24
3.2.3 Μετασηματισμός “Hairy Root” και μεταφορές	25
3.3 Προετοιμασία του ενδόφυτου <i>Fusarium solani</i> (strain K-FsK)	26
3.3.1 Συλλογή κονιδίων FsK.....	26
3.3.2 Μέτρηση κονιδίων και εμβολιασμός με FsK.....	26
3.4 Δειγματοληψία	27
3.4.1 Συγκομιδή.....	27
3.4.2 Υπολογισμός μήκους φυτού	27
3.5 Έλεγχος για μεταλλάξεις.....	27
3.5.1 Απομόνωση ολικού DNA	27
3.5.2 Έλεγχος ένθεσης T-DNA	28
3.5.3 Έλεγχος παρουσίας μεταλλάξεων μέσω της ενδονουκλεάσης T7.....	29
3.5.4 Επιβεβαίωση μεταλλάξεων με αλληλούχηση κατά Sanger	31
3.6 Έλεγχος αποικισμού.....	32
3.6.1 Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA.....	32
3.6.2 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR).....	32
3.7 Θρεπτικά υποστρώματα	33
4. Αποτελέσματα.....	35
4.1 Μεταλλαξιγένεση του γονιδίου AMY2.....	35
4.1.1 Μοριακή στόχευση χρησιμοποιώντας την συσκευή AMY2:gRNA1.....	35
4.1.2 Μοριακή στόχευση χρησιμοποιώντας την συσκευή AMY2:gRNA4-gRNA5	37
4.2 Μεταλλαξιγένεση του γονιδίου CYP71D353	41

4.2.2 Μοριακή στόχευση χρησιμοποιώντας την συσκευή CYP71D353:gRNA1-gRNA2...	42
5. Συμπεράσματα και Συζήτηση.....	50
6. Βιβλιογραφία.....	52
7. Παράρτημα.....	56
7.1 Χάρτες πλασμιδιακών φορέων	56
7.2 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εκκινητών	59

1. Εισαγωγή

1.1 Τα ψυχανθή και το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*

Η οικογένεια των ψυχανθών αποτελεί την τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια αγγειόσπερμων φυτών με παραπάνω από 700 διαφορετικά γένη και συνοδεύει την ανθρωπότητα από την νεολιθική εποχή με την έναρξη των γεωργικών πρακτικών. Εξημερώθηκε, μαζί με τα αγρωστώδη φυτά, περίπου 10.000 χρόνια πριν και, έκτοτε, χαρακτηρίζεται ως ένας από τους ακρογωνιαίους λίθους των ανθρώπινων πολιτισμών. Τα ψυχανθή κατανέμονται σε όλες τις ηπείρους, εκτός της Ανταρκτικής, και σχεδόν σε όλους τους οικοτόπους. Από λίμνες γλυκού νερού, σε τροπικά και υποτροπικά δάση, σε ερήμους και αρκτικές-αλπικές εκτάσεις της εύκρατης ζώνης, εμφανίζουν μια από τις ευρύτερες γεωγραφικές κατανομές (Ambika et al. 2022).

Διαχρονικά, η σόγια, το μπιζέλι, το ρεβύθι, η φακή, το φασόλι, μέλη της οικογένειας, αποτελούν σημαντικές πηγές ανθρώπινης τροφής, ζωτροφών και πρώτων υλών. Παρέχουν μεγάλη διατροφική αξία λόγω των διαιτητικών ινών, των βιταμινών και των ανόργανων συστατικών τους και είναι από τις σημαντικότερες φυτικές πηγές πρωτεϊνών στην ανθρώπινη διατροφή (Ambika et al. 2022). Παράλληλα, ο ισχυρός δευτερογενής μεταβολισμός τους καθιστά ικανούς να παράγουν ένα τεράστιο φάσμα εξειδικευμένων μεταβολιτών, υπεύθυνων για επικοινωνία και προστασία από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Τα φυσικά, αυτά, προϊόντα έχουν αποτελέσει παραδοσιακά φάρμακα, θεραπείες και φίλτρα χωρίς καμία γνώση για τους βιολογικούς μηχανισμούς δράσης τους (Bernardini et al. 2018). Πλέον, αποτελούν αναγνωρισμένοι στόχοι της βιομηχανίας λόγω της φαρμακευτικής σημασίας τους (Hasanuzzaman et al. 2020). Τέλος, αναπτύσσουν εξειδικευμένα οργανίδια, τα φυμάτια. Αυτά προσελκύουν συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, συλλογικά αποκαλούμενα Ριζόβια, και βοηθούν στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Η αλληλεπίδραση συμβάλλει στον βιολογικό εμπλουτισμό των φυσικών οικοσυστημάτων με αζωτούχες ενώσεις αφού εκμεταλλεύεται το ατμοσφαιρικό N₂ και το διοχετεύει στο έδαφος σε μορφές αξιοποιήσιμες από τα φυτά. Υπολογίζεται πως κάθε χρόνο περισσότερο από 25 εκατομμύρια τόνους αζώτου δεσμεύεται παγκοσμίως, χωρίς αυτό να περιλαμβάνει τις καλλιεργήσιμες ζώνες, λόγω της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης (Yao et al. 2024).

Η αναγνώριση της τεράστιας οικονομικής σημασίας τους κατέφτασε με την πρόταση για εύρεση του κατάλληλου φυτού-μοντέλου προς διερεύνηση αυτών των ιδιαιτεροτήτων. Τα καλλιεργούμενα φυτά της οικογένειας ήταν τα πρώτα που εξετάστηκαν λόγω της αγρονομικής σημασίας τους. Η δύσκολη μοριακή μεταχείριση, ο πολύπλοκος μετασχηματισμός και η αναγέννηση διαγονιδιακών στελεχών τους, το μεγάλο μέγεθος και η πολυπλοειδία του γονιδιώματός τους αποδείχθηκαν ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά για ένα φυτό-μοντέλο (Handberg and Stougaard 1992).

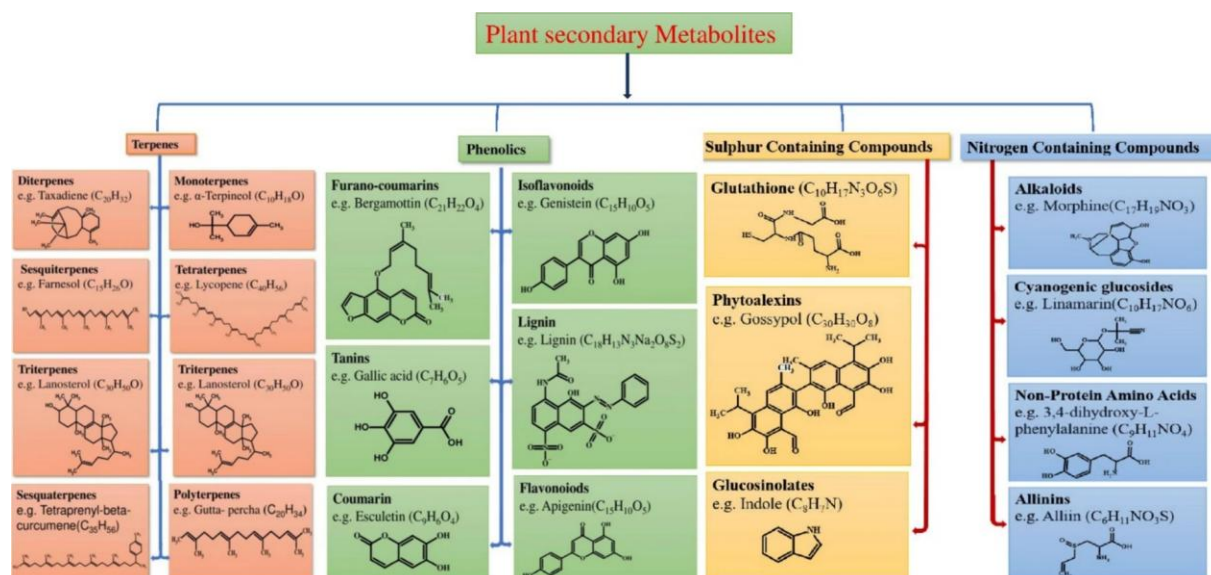
Το φυτό *Lotus japonicus* εμφανίζει πληθώρα επιθυμητών χαρακτηριστικών για ένα φυτό-μοντέλο. Το μικρό και διπλοειδές γονιδιώμα του (470 μεγαβάσεις), οργανωμένο σε έξι ζεύγη χρωμοσωμάτων, ο ταχύς χρόνος γενιάς (2-3 μήνες), η παραγωγή μεγάλου αριθμού σπόρων μικρών σε μέγεθος, η ικανότητα αυτογονιμοποίησης και επιλεκτικής διασταύρωσης λόγω του

μεγάλου μεγέθους ανθέων και το γεγονός ότι είναι ευπρόσβλητο σε μετασχηματισμούς από αγροβακτήρια αποτελούν μερικά από τα κριτήρια επιλογής του (Stougaard 2017). Το φυτό προέρχεται από την Ανατολική Ασία και εμφανίζεται στα Ιαπωνικά νησιά, την χερσόνησο της Κορέας, κάποια ανατολικά και κεντρικά σημεία της Κίνας, ενώ έχει αναγνωριστεί και σε περιοχές της Ινδίας, του Πακιστάν και του Αφγανιστάν. Δυο οικότυποι είναι ευρέως χρησιμοποιούμενοι. Ο οικότυπος Gifu που παίρνει το όνομά του από την περιοχή που πρώτα απομονώθηκε (όχθες του ποταμού Gifu) και παρομοίως με τον οικότυπο MG-20 (Miyakojima, το όνομα του Ιαπωνικού νησιού που βρέθηκε) (Kawaguchi 2000).

1.2 Οι Δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών

1.2.1 Ο δευτερογενής μεταβολισμός στα φυτά

Ο διαχωρισμός των φυσικών μεταβολιτών των φυτών σε αυτών, απαραίτητων για την επιβίωση και των παραπροϊόντων του κύριου μεταβολισμού ξεκίνησε στο δεύτερο μισό του 19ου αιώνα. Σήμερα γνωρίζουμε πως, ενώ ο πρωτογενής μεταβολισμός μπλέκεται σε διεργασίες απαραίτητες για την ζωή, δηλαδή την αναπνοή, την αφομοίωση θρεπτικών στοιχείων, την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση, ο δευτερογενής μεταβολισμός έχει εξίσου βασική σημασία, προσδίδοντας προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον κάθε φυτικού οργανισμού. Σε γενικά πλαίσια, θεωρείται πως η σύνθεση και αποθήκευση των εξειδικευμένων μεταβολιτών αποτελεί στρατηγική άμυνας και επικοινωνίας των φυτών. Οι φυσικοί, αυτοί, μεταβολίτες εμφανίζουν αμυντικό ρόλο ενάντιας παθογόνων, προστατευτική δράση ενάντιας βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων και επικοινωνιακό ρόλο μεταξύ των φυτών (αλληλοπάθεια), επικοινωνιών και Ριζοβίων. Χωρίζονται σε κατηγορίες σύμφωνα με τα βιοσυνθετικά μονοπάτια τους. Τρεις είναι οι πιο βασικές, οι φαινολικές ενώσεις που έχουν και την μεγαλύτερη διασπορά στο φυτικό βασίλειο, τα τερπένια και στεροειδή που περιέχουν τους αριθμητικά περισσότερους μεταβολίτες και τα αλκαλοειδή που, αντίθετα, έχουν την μικρότερη διασπορά στο φυτικό βασίλειο, με την παραγωγή τους να συσχετίζεται με συγκεκριμένα γένη (Ranner et al. 2023; Bourgaud et al. 2001; Hartmann 2007; Wink 2013).

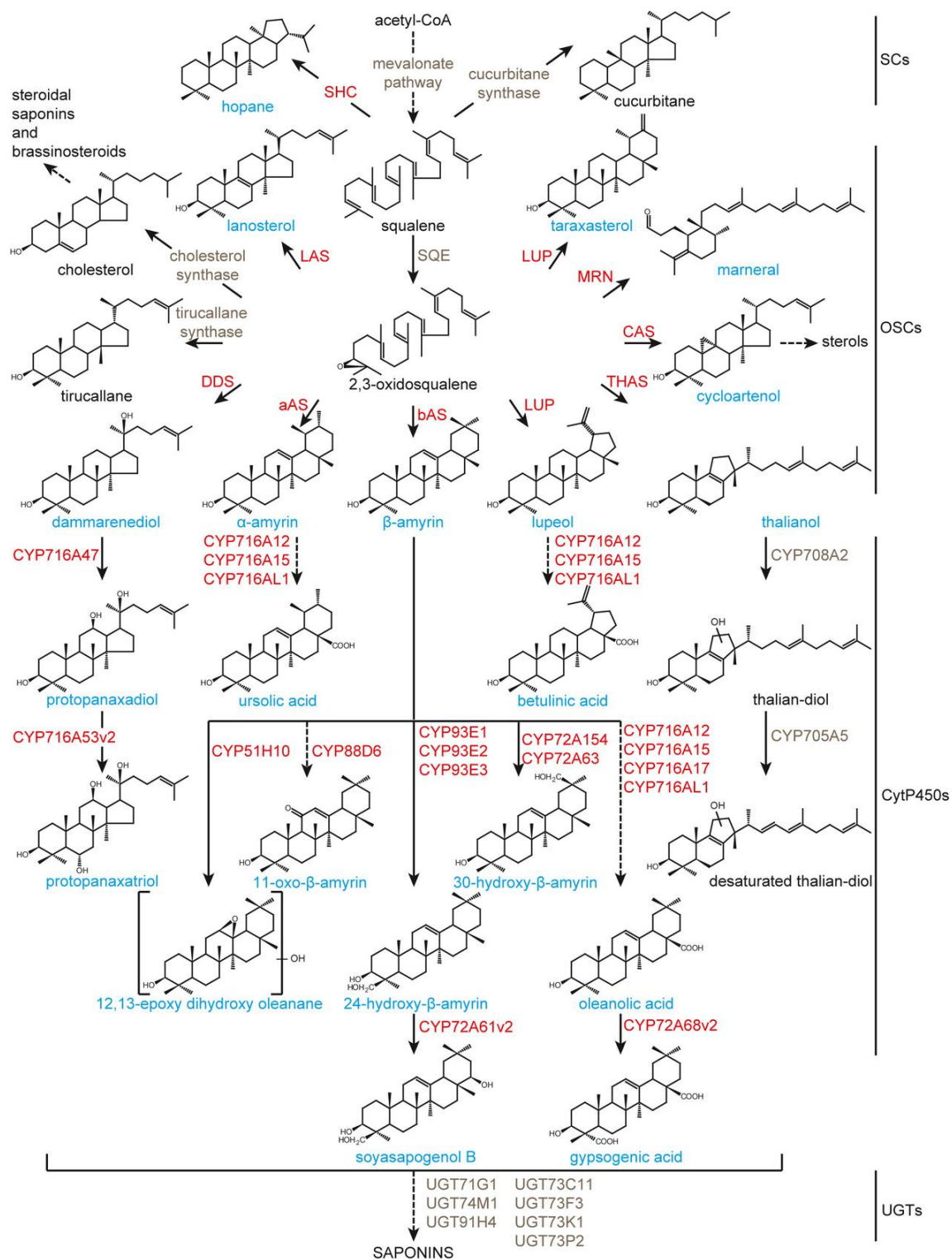


Εικόνα 01. Οι διαφορετικές κατηγορίες των εξειδικευμένων μεταβολίτων (Uradhyay et al. 2025)

1.2.2 Βιοσύνθεση Τερπενίων και Τριτερπενίων στα φυτά

Η κατηγορία των τερπενίων περιέχει περισσότερους από 30.000 εξειδικευμένους μεταβολίτες. Αποτελούν βασικά βιοσυνθετικά μόρια καθοδικών ενώσεων, μεσολαβητές οικολογικών αλληλεπιδράσεων, ενώ παράλληλα προστατεύουν από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Δυο μονοπάτια του πρωτογενή μεταβολισμού συμβάλλουν στην βιοσύνθεσή τους, το μονοπάτι του μεβαλονικού, MVA, και το μονοπάτι της φωσφορικής μεθυλοερυθριτόλης, MEP. Αυτά οδηγούν στην παραγωγή του διφωσφορικού ισοπεντανυλίου (isopentenyl diphosphate, IPP) και του διφωσφορικού διμεθυλλάλληλου (dimethylallyl diphosphate, DMAPP), τα οποία χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό και τον πολυμερισμό μορίων ισοπρενίου (Uradhyay et al. 2025; Khanam et al. 2025; Ranner et al. 2023).

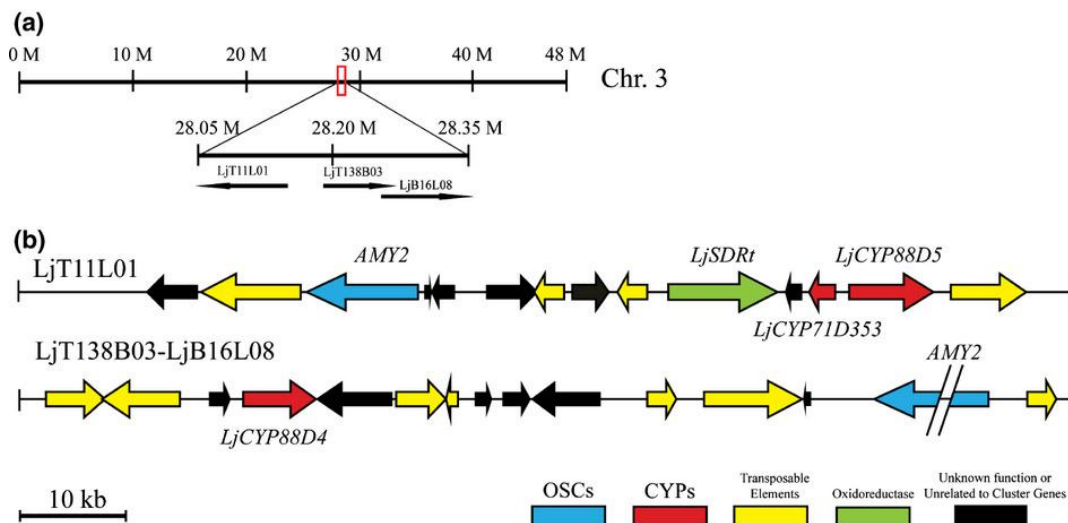
Για την βιοσύνθεση τριτερπενίων απαιτείται η μετατροπή του IPP και του DMAPP σε 2,3 οξειδοσκουαλένιο. Συνοπτικά, το ενεργό IPP προστίθεται επανειλημμένα στο DMAPP σε μια αντίδραση συμπύκνωσης. Τα τριτερπένια είναι μόρια με τριάντα άνθρακες στην βασική αλυσίδα τους. Συνεπώς, σε διαδοχικά βήματα προσθήκης του IPP γίνεται η μετάβαση από μία ένωση με πέντε άνθρακες (5C) σε μία με δεκαπέντε (15C), το πυροφωσφορικό φαρνεσόλιο, σε τριάντα (30C), το σκουαλένιο και το 2,3 οξειδοσκουαλένιο. Η μετάβαση από το οξειδοσκουαλένιο στις, επερχόμενες, κυκλικές ενώσεις οριοθετεί τον βασικό μεταβολισμό τριτερπενίων από τον εξειδικευμένο. Σε γενικό επίπεδο, η κυκλοποίηση καταλύεται από κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου ή OSCs, ενώ ο βασικός σκελετός τροποποιείται, περαιτέρω, από μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450, μέσω τοποειδικής οξείδωσης (Thimmappa et al. 2014; Moses et al. 2014.; Ranner et al. 2023).



Εικόνα 02. Παραγωγή διαφορετικών ενώσεων του μεταβολισμού τριτερπενίων από τις τέσσερις βασικές κατηγορίες βιοσυνθετικών ενζύμων, τα διακεκομμένα βέλη υποδεικνύουν πολλαπλά βήματα, τα ένζυμα επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα ενώ οι ενώσεις με μπλε (Moses et al. 2013)

1.2.3 Η γονιδιακή συστοιχία του *AMY2*

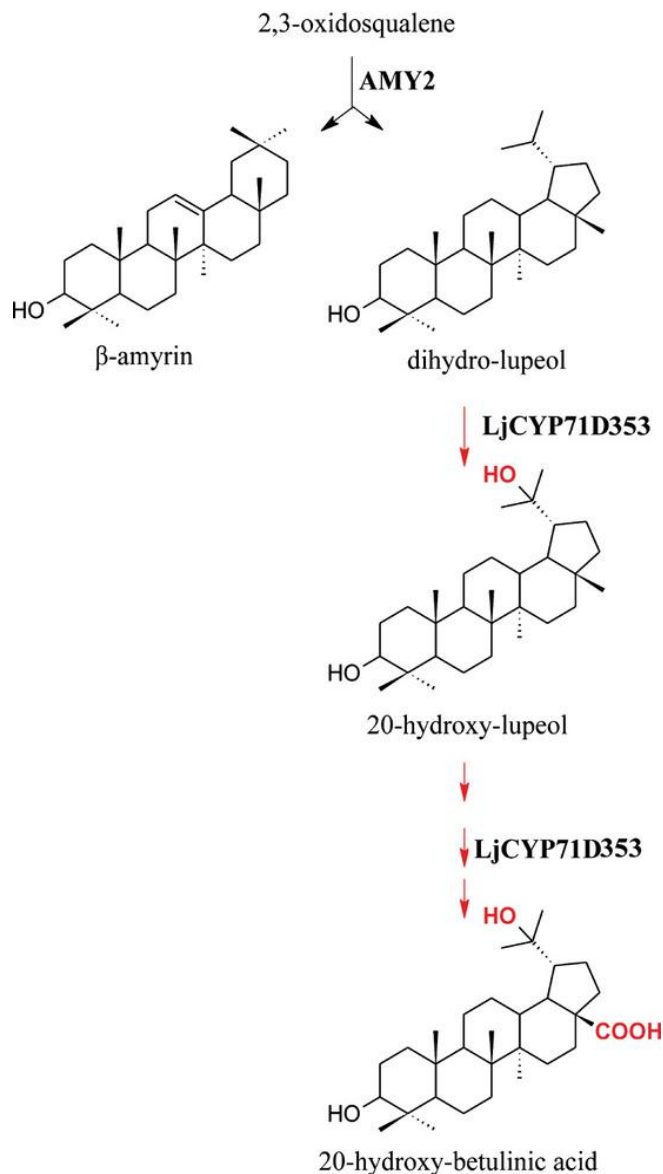
Μελέτη γονιδιωματικής οργάνωσης της οικογένειας γονιδίων *OSC*, αποκάλυψε μια γονιδιακή συστοιχία στο μέσο του τρίτου χρωμοσώματος του φυτού *Lotus japonicus*, που περιέχει βασικά γονίδια του εξειδικευμένου μεταβολισμού των τριτερπενίων. Ειδικότερα, η συστοιχία περιλαμβάνει μια κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου, την *AMY2* και τρεις κυτοχρωμικές μονοξυγενάσες P450, της οικογένειας *CYP71D* και *CYP88D*.



Εικόνα 03. Γονιδιακή συστοιχία του γονιδίου *AMY2* στο τρίτο χρωμόσωμα του *Lotus japonicus* (Krokida et al. 2013)

Το γονίδιο *LjAMY2* αντιπροσωπεύει μια κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου που δρα σε αυτό με σκοπό την παραγωγή του τριτερπενίου, β-αμυρίνη. Η έκφραση του γονιδίου στο φυτό *N. benthamiana* αποκάλυψε ότι εκτός από τη β-αμυρίνη, το ένζυμο παρήγαγε επίσης διυδρολουπεόλη, το υπόστρωμα των υπόλοιπων μονοξυγενάσεων της συστοιχίας.

Το γονίδιο *LjCYP71D353* αντιπροσωπεύει ένα νέο ένζυμο του κυτοχρώματος P450 που δρα σε έναν ασυνήθιστο ανθρακικό σκελετό, την διυδρολουπεόλη. Παράγει μέσω διαδοχικών αντιδράσεων 20-υδροξυ-λουπεόλη και 20-υδροξυ-μπετουλινικό οξύ (Krokida et al. 2013).



Εικόνα 04. Προτεινόμενο μονοπάτι της βιοσυνθετικής οδού της συστοιχίας AMY2 (Krokida et al. 2013)

1.3 Το ενδόφυτο *Fusarium solani*, στέλεχος K ή FsK

Το στέλεχος K του μύκητα *Fusarium solani* (FsK) είναι ένας ενδοφυτικός συμβιώτης, που απομονώθηκε πρώτα από δείγματα ντομάτας, και έχει την ικανότητα προστασίας του φυτού-ξενιστή από βιοτικούς (Κανρουλάκης et al., 2007; Pappas et al. 2018; Garantonakis et al. 2018) και αβιοτικούς παράγοντες (Κανρουλάκης et al. 2018). Αποτελεί εξαίρεση στον κανόνα, αφού τα περισσότερα είδη του γένους *Fusarium* έχουν χαρακτηριστεί ως ισχυρά φυτοπαθογόνοι και σαπροφυτικοί μύκητες. Το ενδόφυτο φέρει την ικανότητα αποικισμού του ψυχανθούς *Lotus japonicus*, αύξηση της υπόγειας βιομάζας του φυτού σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης αλλά

και της υπέργειας παρουσία συνθηκών έλλειψης σιδήρου (Anvramidou et al. 2024). Παράλληλα, φαίνεται πως στα μεταγενέστερα στάδια του αποικισμού, υπάρχει μετανάστευση του ενδόφυτου από το υπόγειο, στο υπέργειο τμήμα του φυτού (Skiada et al. 2019).

Μη δημοσιευμένα ευρήματα, συσχετίζουν το βιοσυνθετικό μονοπάτι της κυκλάσης AMY2 με την αλληλεπίδραση του φυτού *L. japonicus* και του ενδοφύτου *FsK*. Η έκφραση του AMY2 επάγεται σε φυτά που έχουν αποικιστεί από *FsK* σε πρώιμα στάδια (Αβραμίδου, Διδακτορική Διατριβή). Αυτή η επαγωγή φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά τον αποικισμό του ενδόφυτου, καθώς μεταλλάγματα σίγησης των γονιδίων AMY2 και CYP71D353 παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα αποικισμού.

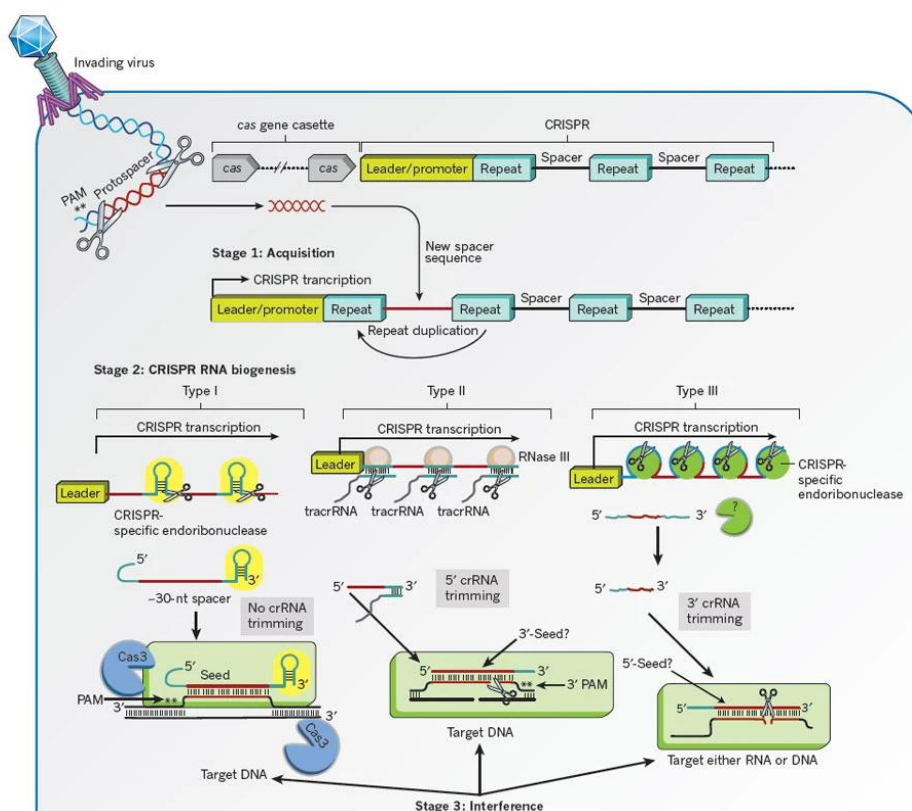
1.4 Η τεχνολογία CRISPR/Cas9

Η γενετική μηχανική έχει περάσει από ένα ευρύ πλήθος φάσεων. Από την ενσωμάτωση ιικού DNA σε βλαστοκύστες ποντικών, στην εισαγωγή των διαγονιδίων και των διαγονιδιακών ζώων, στην ανακάλυψη του ομόλογου ανασυνδυασμού, στην χρήση μοριακών ψαλιδιών και την δημιουργία δίκλωνων ρήξεων, από το 1974 έχουν γίνει τερατώδη άλματα προς την επιτυχή επεξεργασία του γονιδιώματος. Ωστόσο με την ραγδαία εξέλιξη της τελευταίας δεκαετίας, ο κλάδος της γενετικής μηχανικής έχει περάσει από το επίπεδο της τυχαίας, αναποτελεσματικής και χρονοβόρας γενετικής μεταχείρισης σε εργαλεία ακριβούς και ευπροσάρμωσης τροποποίησης κάθε νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Η μελέτη ισομερισμού μιας αλκαλικής φωσφατάσης ήταν αυτή που έθεσε τον δρόμο για την ανακάλυψη της τεχνολογίας CRISPR. Το CRISPR, ή αλλιώς Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, ανακαλύφθηκε πρώτα σε αλληλουχίες DNA του βακτηρίου *E. coli*, το 1987, όταν οι Ishino et al. παρατήρησαν ένα σύνολο νουκλεοτιδικών επαναλήψεων στο 3' άκρο του γονιδίου που μελετούσαν. Με την ανάπτυξη προηγμένων τεχνικών αλληλούχισης, δεκατρία χρόνια αργότερα, οι Mojica et al. συνειδητοποίησαν πως οι επαναλήψεις είχαν καθορισμένη δομή και εμφανίζονταν όχι μόνο σε άλλα βακτήρια αλλά και στα περισσότερα αρχαία, υποδεικνύοντας πιθανόν σημαντικό λόγο ύπαρξης. Η τελική ευθεία ήρθε με την επίδειξη ότι μεταξύ των επαναλαμβανόμενων τμημάτων εντοπιζόνταν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες όμοιες με αυτές φάγων και ιών (Mojica et al. 2005; Pourcel, Salvignol, and Vergnaud 2005; Bolotin et al. 2005). Έκτοτε, αποκαλύφθηκε πως το σύστημα λειτουργεί ως μια προσαρμοστική ανοσία των βακτηρίων και των αρχαίων έναντι των αρκετά πολυπληθέστερων και επικίνδυνων ιών (Barrangou et al. 2007).

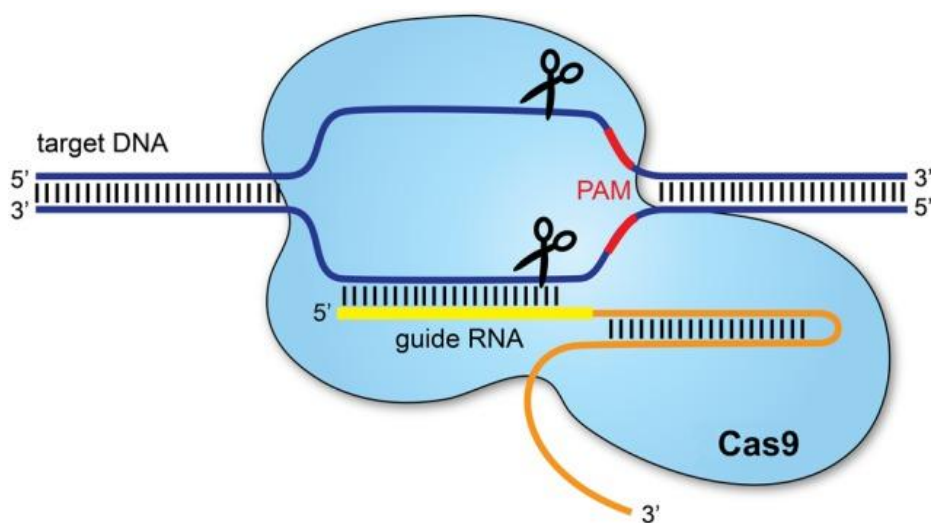
Η ανοσοαπόκριση του συστήματος περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια. Πρωταρχικά, για την απαραίτητη προσαρμοστικότητα του συστήματος σε κάθε εισβολέα, απαιτείται η πρόσληψη, ο τεμαχισμός και η αποθήκευση τμημάτων του ιικού γονιδιώματος. Η διαδικασία αυτή δεν είναι τυχαία. Φαίνεται πως υπάρχουν μηχανισμοί διάκρισης του ξένου ιικού γενετικού υλικού, ωστόσο αυτοί ακόμα δεν έχουν διαλευκανθεί. Το σίγουρο είναι πως οι αποκαλούμενες ως αλληλουχίες protospacers του ιικού γονιδιώματος κατέχουν στο άκρο τους ένα σύντομο μοτίβο PAM (Protospacer Adjacent Motif), το οποίο αναγνωρίζεται από διαφορετικές πρωτεΐνες Cas (CRISPR associated proteins). Η αναγνώριση οδηγεί σε αποκοπή και ενσωμάτωση των τμημάτων στην

συστοιχία CRISPR του γονιδιώματος του ξενιστή. Η συστοιχία CRISPR φέρει ρόλο μνήμης στην ανοσία. Αποτελείται από διαδοχικές, συντηρημένες, νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που χωρίζουν την περιοχή σε μικρά τμήματα. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται spacers, εμφανίζουν παρόμοιο μέγεθος και έχουν τον ρόλο αποθήκευσης τμημάτων, protospacers, του ιικού γονιδιώματος. Συνεχίζοντας, μια επιτυχής προστασία από τον εισβολέα απαιτεί την έκφραση της συστοιχίας και την μετατροπή σε ενεργά CRISPR RNA (crRNA). Οι μηχανισμοί ωρίμανσης του πρόδρομου crRNA (pre-crRNA) διαφέρουν ανάλογα με τις πρωτεΐνες Cas που συμμετέχουν και, επομένως, την κατηγορία CRISPR που χρησιμοποιείται. Η βασική ιδέα είναι η μετατροπή των μεγάλων μεταγραφών της συστοιχίας σε μικρότερα crRNAs. Για τα συστήματα τύπου I και III, ενδονουκλεάσες είναι υπεύθυνες για την αποκοπή ενώ, για το σύστημα τύπου II, απαιτείται η αποκοπή του νοηματικού μη κωδικοποιητικού crRNA μαζί με το αντινοηματικό tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) από την νουκλεάση RNase III. Για την ολοκλήρωση της παρεμβολής απαιτείται η συναρμολόγηση του ενεργού συμπλόκου. Μέχρι τώρα περιγράφηκε η διαδικασία για την παραγωγή ενός μη κωδικοποιητικού RNA. Ρόλος του αποτελεί η στόχευση μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Η εύρεση του στόχου δεν είναι αρκετή για την παρεμβολή. Πρωτεΐνες Cas είναι υπεύθυνες για την συναρμολόγηση και την τελική κοπή των εισερχόμενων νουκλεϊκών οξέων. Συνεπώς, το RNA έχει ρόλο οδηγού και χρειάζεται τις πρωτεΐνες Cas για να δημιουργηθούν δίκλωνες ρίζες στην αλληλουχία-στόχο (Wiedenheft, Sternberg, and Doudna 2012; Redman et al. 2016; Tröder and Zevnik 2022; Xu and Li 2020).



Εικόνα 05. Οι τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί ανοσίας του συστήματος CRISPR σε βακτήρια και αρχαία. Στην εικόνα φαίνονται τα βήματα της απόκρισης, 1. Πρόσληψη και αποθήκευση των γενετικών τμημάτων του ιικού γονιδιώματος, 2. Δημιουργία του CRISPR RNA, 3. Παρεμβολή του στόχου (Wiedenheft, Sternberg, and Doudna 2012)

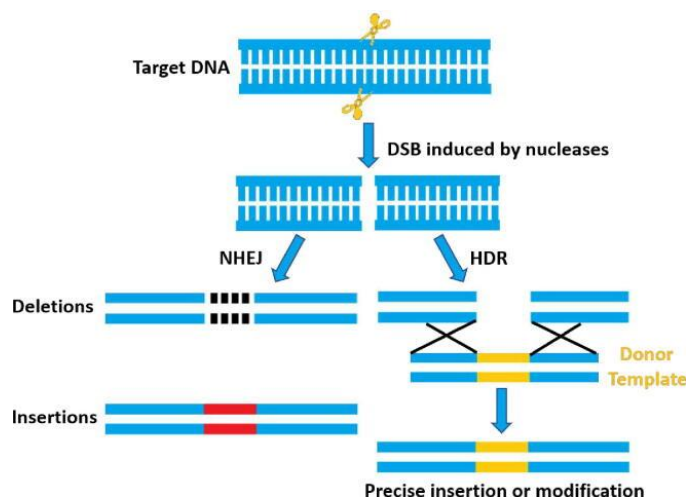
Η εμφανώς απεριόριστη προσαρμοστικότητα και ειδικότητα του συστήματος αποδείχθηκε περιζήτητη, με αποτέλεσμα να επιτευχθεί η προσαρμογή του για χρήση σε πειράματα γενετικής τροποποίησης. Η απλότητα του συστήματος τύπου II που απαιτεί μόνο μια πρωτεΐνη Cas, την Cas9, για την συναρμολόγηση του ενεργού συμπλόκου το κατέστησε την πρώτη επιλογή. Παράλληλα, αποδείχθηκε πως η ένωση του crRNA με το tracrRNA σε ένα μοναδικό οδηγό RNA, ή αλλιώς sgRNA (single guide RNA) δεν επέφερε αλλαγές στην λειτουργικότητα του συστήματος. Τέλος, η ανάπτυξη βιοπληροφορικών εργαλείων για την πρόβλεψη των κατάλληλων αλληλουχιών οδηγών RNA για στόχευση συγκεκριμένων γονιδίων, σε συνδυασμό με την προσαρμογή των γενετικών κασετών έκφρασης των βασικών γενετικών στοιχείων ανάλογα με τον οργανισμό-ξενιστή που χρησιμοποιείται στο πείραμα, έκανε την ιδέα πραγματικότητα. Επί της ουσίας, η τεχνολογία έχει την δυνατότητα να εντοπίζει τον επιθυμητό νουκλεοτιδικό στόχο με την βοήθεια του οδηγού RNA και να προκαλεί δίκλωνη ρήξη στην αλυσίδα του, μερικά νουκλεοτίδια ανοδικά της αλληλουχίας PAM (Jinek et al. 2012; Lei et al. 2014; Naito et al. 2015; Barrangou and Horvath 2017).



Εικόνα 06. Το ενεργό σύμπλοκο Cas9/οδηγού RNA στην νουκλεοτιδική αλληλουχία-στόχο του (Redman et al. 2016)

Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλάβης στο DNA είναι αυτοί που εισάγουν μεταλλάξεις στην αλληλουχία. Συγκεκριμένα, η μη ομόλογη σύνδεση άκρων (Non Homologous End Joining - NHEJ) μετά την δίκλωνη ρήξη είναι γνωστό πως είναι επιρρεπής σε λάθη, προκαλώντας ελλείμματα ή εισαγωγές νουκλεοτιδίων. Παράλληλα, ο ομόλογος ανασυνδυασμός (Homology

Directed Repair - HDR), που επιδιορθώνει με ακρίβεια την δίκλωνη ρήξη, απαιτεί την παρουσία ομόλογης περιοχής είτε με φυσικούς τρόπους κατά την διαίρεση είτε με εισαγωγή ξένου DNA για την ενσωμάτωση περαιτέρω επιθυμητών γονιδιακών τμημάτων.



Εικόνα 07. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης δίκλωνων ρήξεων, αριστερά εντοπίζεται η μη ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ) και δεξιά ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HDR) (Xu and Li 2020)

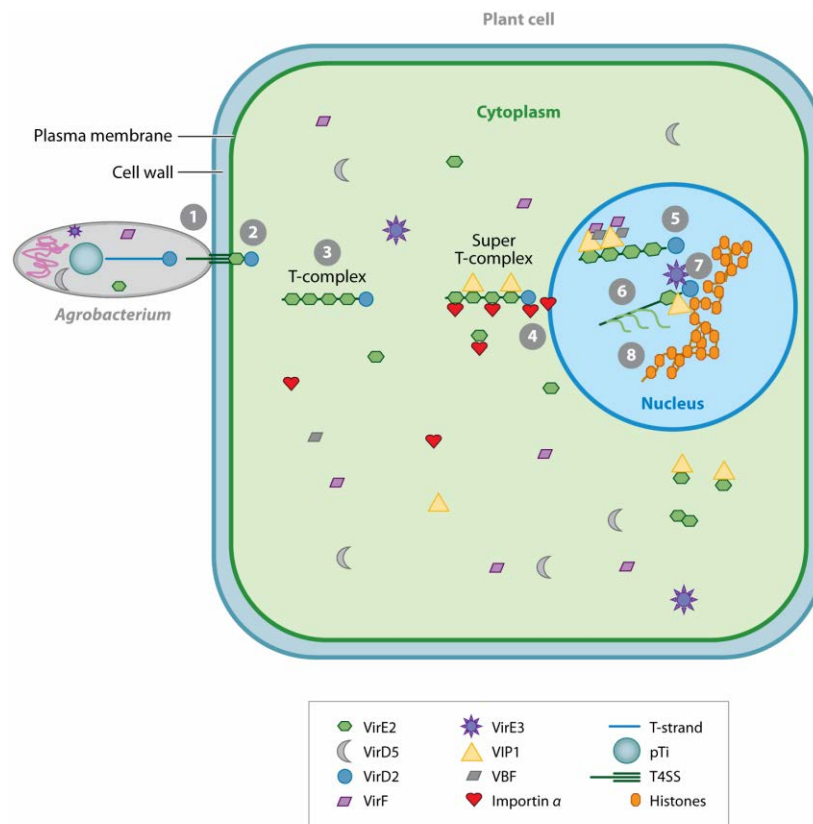
1.5 Μετασχηματισμός “Hairy Root” διαμεσολαβούμενος από το αγροβακτήριο *Rhizobium rhizogenes*

Το σύνδρομο του “Hairy Root” ξεκίνησε να ταλανίζει ερευνητές λόγω του παθογενή φαινοτύπου που προκαλούσε σε σοδειές, αμπελώνες, οπωρώνες και φυτώρια λαχανικών. Σήμερα, μισό αιώνα μετά την ανακάλυψη του αιτιογενή παράγοντα πίσω από την νεοπλασματική ασθένεια, η τεχνολογία “Hairy Root” και το αγροβακτήριο *Rhizobium rhizogenes* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών ικανών για την σύνθεση πληθώρας πολύπλοκων ενώσεων (Gutierrez-Valdes et al. 2020; Hooykaas and Hooykaas 2021).

Επί της ουσίας, η μόλυνση λαμβάνει χώρα με την εισαγωγή συγκεκριμένων τμημάτων πλασμιδιακού γενετικού υλικού (T-DNA, Transferred-DNA) στο φυτικό κύτταρο. Οι περιοχές αυτές ενσωματώνονται στο φυτικό γονιδίωμα, μεταφέροντας ένα σύνολο γονιδίων υπεύθυνων για την παθογένεια. Η έκφρασή τους οδηγεί στον ανεξέλεγκτο και ακανόνιστο πολλαπλασιασμό των ριζών και, τελικά, την εμφάνιση των χαρακτηριστικών “Hairy Roots” (HR).

Αναλυτικότερα, ο γενετικός μετασχηματισμός ξεκινάει με την σύνδεση του αγροβακτηρίου στο φυτικό κύτταρο. Συνήθως, αυτή σηματοδοτείται από την παρουσία φαινολικών ενώσεων, όπως η ακετοσυριγκόνη (Acs-Acetosyringone), που καθοδηγούν τα βακτήρια προς την πληγή του φυτού, επάγοντας την ενεργοποίηση των γονιδίων της περιοχής *vir* (*vir* - virulence) (Joubert et al. 2002). Με την προσκόλληση των βακτηρίων ακολουθεί η επεξεργασία του πλασμιδίου Ri (Ri - Root inducing). Το πλασμίδιο αποτελείται από 200 κιλοβάσεις DNA που περιέχουν τα απαραίτητα γενετικά στοιχεία για την εκδήλωση της

ασθένειας. Κατά την μόλυνση, μέρος του πλασμιδίου (T-DNA) μεταφέρεται στα φυτικά κύτταρα και ενσωματώνεται στο φυτικό γονιδίωμα (Bevan and Chilton 1982). Η διαδικασία αυτή ξεκινάει με την ξετύλιξη και αποκοπή του T-DNA στις δυο συνοριακές του περιοχές (TL-DNA και TR-DNA) από τις πρωτεΐνες D1 και D2, γονιδίων της περιοχής *vir* του πλασμιδίου Ri. Έπειτα, οι πρωτεΐνες E1 και E2, πάλι γονιδίων της περιοχής *vir* του πλασμιδίου Ri, προστατεύουν την, ευπρόσβλητη σε νουκλεάσες, αλυσίδα του T-DNA και βοηθούν στην μεταφορά προς το φυτικό κύτταρο (Gelvin 2010). Η μεταφορά από το βακτήριο στο φυτικό κύτταρο γίνεται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου IV, ενώ για την μεταφορά και την εισχώρηση στον πυρήνα απαιτείται η συναρμολόγηση του συμπλέγματος T (ακόμα υποθετικό) (Gelvin 2010). Η αριστερή συνοριακή περιοχή, TL-DNA, είναι αυτή που χρειάζεται να ενσωματωθεί για να εμφανιστεί ο φαινότυπος των HR, με τα γονίδια *rolABCD* να έχουν τον κυριότερο ρόλο. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης είναι ακόμη άγνωστος αλλά το προϊόν του γονιδίου *rolB* θεωρείται το σημαντικότερο διότι η απώλεια λειτουργίας του οδηγεί σε εξαφάνιση του φαινοτύπου ενώ, γενικότερα, τα γονίδια *rol* θεωρούνται ρυθμιστές της κυτταρικής διαφοροποίησης αλλά και της φυτικής ανάπτυξης (Georgiev et al. 2010). Τέλος, στα μετασχηματισμένα, πλέον, κύτταρα παράγονται ειδικές ενώσεις, οι οπίνες, από ένζυμα κωδικοποιούμενα στο T-DNA. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να καταβολιστούν από τα αγροβακτήρια και να υποστηρίξουν την ανάπτυξή τους (Dessaux et al. 1993). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως υπάρχουν αποκλίσεις από τον βασικό μηχανισμό που περιγράφηκε και βασίζονται στο στέλεχος αγροβακτηρίου που χρησιμοποιείται, το πλασμίδιο Ri που φέρει, καθώς και το φυτό-ξενιστή που χρησιμοποιείται.



Εικόνα 08. Αναπαράσταση της διαδικασίας μετασχηματισμού ενός φυτικού κυττάρου από ένα αγροβακτήριο. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τα ακόλουθα βήματα: 1. Προσκόλληση του βακτηρίου στο φυτικό κύτταρο, 2. Μεταφορά του T-DNA και των κατάλληλων πρωτεϊνών μέσω της πλασματικής μεμβράνης του φυτού στο φυτικό κύτταρο, 3. Σχηματισμός του συμπλέγματος, 4. Πυρηνική στόχευση, 5. Στόχευση της χρωματίνης, 6. Απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το σύμπλεγμα πριν από την ενσωμάτωση του T-DNA, 7. Ενσωμάτωση του T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα, 8. Έκφραση του διαγονιδίου, T4SS = εκκριτικό σύστημα τύπου IV (Gelvin 2010)

Το αγροβακτήριο *R. rhizogenes* αποπλίστηκε για να αξιοποιηθεί σε πειράματα γενετικής μηχανικής. Λόγω του μεγέθους του πλασμιδίου Ri προτιμήθηκε η ανάπτυξη ενός νέου συστήματος δυαδικού φορέα για την πιο αποτελεσματική μεταφορά γονιδίων μέσω του T-DNA. Η γονιδιακή συσκευή συναρμολογείται και κλωνοποιείται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και εισάγεται στο επιλεγμένο στέλεχος του αγροβακτηρίου που περιέχει δεύτερο πλασμίδιο με τα απαραίτητα γονίδια για την μεταφορά και ενσωμάτωση του T-DNA στα φυτικά κύτταρα. Τα φυτά που προκύπτουν δεν είναι διαγονιδιακά αφού το υπέργειο τμήμα τους είναι αγρίου τύπου, ωστόσο κάποιες από τις ρίζες τους είναι μετασχηματισμένες.

Από την δεκαετία του 80 μέχρι και σήμερα η χρήση των HR έχει πολλαπλασιαστεί. Το χαμηλό κόστος καλλιέργειας σε συνδυασμό με την ασφάλεια, την ικανότητα παραγωγής σύνθετων ενώσεων και γλυκοζυλίωσης τους έχει προσελκύσει ερευνητικές ομάδες, εταιρείες βιοτεχνολογίας και φαρμακευτικές. Σήμερα, η τεχνολογία χρησιμοποιείται για την παραγωγή μορίων φυτικής προέλευσης όπως δευτερογενείς μεταβολήτες, ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών όπως ακετυλοχολινεστεράσες, για βιοαποκατάσταση αλλά και την διαλεύκανση φυσιολογικών διεργασιών και βιοσυνθετικών μονοπατιών (Gutierrez-Valdes et al. 2020).

2. Σκοπός της Πτυχιακής Εργασίας

Η διερεύνηση της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του φυτού-μοντέλου *L. japonicus* και του ενδοφυτικού μη-παθογόνου μύκητα FsK υπέδειξε μια σειρά μηχανισμών που την ρυθμίζουν. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων, β-αμυρίνης και διυδρολουπεόλης, παράγωγα της κυκλάσης AMY2, φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση των συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων στις ρίζες του ψυχανθούς (Krokida et al. 2013; Delis et al. 2011). Για την κατανόηση το τρόπου επιρροής του βιοσυνθετικού μονοπατιού της κυκλάσης AMY2 στις συμβιωτικές σχέσεις, είναι απαραίτητη η σταθερή σίγηση των γονιδίων του μονοπατιού. Ήδη στο εργαστήριο, έχουν δημιουργηθεί φορείς, με την βοήθεια της τεχνολογίας κλωνοποίησης Golden Gate, για την αποσιώπηση των γονιδίων αξιοποιώντας ένα προσαρμοσμένο σύστημα CRISPR/Cas9. Στόχος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας αποτελεί η αξιολόγηση των προσχεδιασμένων οδηγών RNA ως προς την ικανότητά τους να εισάγουν μεταλλάξεις στα γονίδια-στόχους, χρησιμοποιώντας τις καλλιέργειες “Hairy Root” ως ένα σύστημα ταυτόχρονης μελέτης τυχόν φαινοτυπικών αλλαγών στον αποικισμό των τροποποιημένων ριζών από τον ενδοφυτικό FsK.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων “Hairy Root” χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *Lotus japonicus* (οικότυπος Gifu και MG20), για τον μετασχηματισμό το αγροβακτήριο *Rhizobium rhizogenes* (στέλεχος LBA1334) και, τέλος, ως συμβιώτης το ενδόφυτο *Fusarium solani* (στέλεχος K-FsK).

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ένα σύνολο θρεπτικών μέσων ($\frac{1}{2}$ MS, 0,8% Άγαρ, άμμο εμπλουτισμένη με διάλυμα Hoagland, βλέπε “Θρεπτικά υποστρώματα”), ανάλογα με το στάδιο του πειράματος, ενώ τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης 23°C με φωτοπερίοδο 16/8 ώρες (εκτός εξαιρέσεων, βλέπε “Πείραμα “Hairy Root””).

Προτού τον μετασχηματισμό, τα αγροβακτήρια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό LB Άγαρ (βλέπε “Θρεπτικά υποστρώματα”) με τα κατάλληλα αντιβιοτικά στους 28°C.

Πριν τον εμβολιασμό, ο ενδοφυτικός FsK αναπτύχθηκε σε PD Άγαρ (βλέπε “Θρεπτικά υποστρώματα”) στους 26°C.

3.2 Πείραμα “Hairy Root”

3.2.1 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων

Πρώτο βήμα της μεθόδου αποτελεί ο τραυματισμός του περιβλήματος των σπορίων και η αποστείρωση τους. Τα σπόρια χωρίζονται σε διαφορετικά σωληνάκια erpendorf (40-60 σπόρους σε σωληνάκια 2 mL) και εμβαπτίζονται σε πυκνό διάλυμα H_2SO_4 υπό ανάδευση για 15-20 λεπτά. Με τον αποχρωματισμό τους αφαιρείται το πυκνό θειικό και γίνονται 5 πλύσεις με παγωμένο και αποστειρωμένο dH_2O . Την αφαίρεση του σκληρού περιβλήματος των σπόρων του ψυχανθούς ακολουθεί η αποστείρωση, με μείγμα 20% χλωρίνης (NaOCl) και 0,1% Tween20, για 15-20 λεπτά. Ακολουθεί η πλύση των σπορίων με παγωμένο dH_2O , σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων και ύστερα τα σωληνάκια τυλίγονται με αλουμινόχαρτο και τοποθετούνται για τουλάχιστον 24 ώρες στους 4°C.

Επόμενο βήμα είναι η εκβλάστηση των σπορίων σε θρεπτικό μέσο $\frac{1}{2}$ MS (με 0,5% σουκρόζη). Τοποθετούνται 30-60 σπόρια σε κάθε στρογγυλό τρυβλίο Petri, ενώ η διαδικασία συνεχίζεται να γίνεται σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Τα τρυβλία τυλίγονται με αλουμινόχαρτο και τοποθετούνται στους 23°C και σκοτάδι για 2 ημέρες και ύστερα τοποθετούνται σε κανονική φωτοπερίοδο μέχρι να γίνει ο μετασχηματισμός.

3.2.2. Προετοιμασία στελεχών *Rhizobium rhizogenes* LBA1334

Στην προκειμένη περίπτωση, χρειάστηκε να γίνει μετασχηματισμός των στελεχών με τους, προηγουμένως, κατασκευασμένους και αλληλουχιμένους δυαδικούς φορείς του εργαστηρίου

(“Cas9-only”, “CYP71D353:gRNA1-gRNA2”, “AMY2:gRNA1” και “AMY2:gRNA4-gRNA5”, βλέπε Παράρτημα για περισσότερες λεπτομέρειες). Η μέθοδος παρατίθεται παρακάτω:

Τα πλασμίδια αραιώνονται σε τελική συγκέντρωση 5 ng/μL και προστίθενται από 5-10 νανογρ. πλασμιδίου σε ηλεκτροδεκτικά αγροβακτήρια αφού αυτά ξεπαγώσουν (διατηρούνται σε ψυγεία με θερμοκρασία -80°C). Μετά την διάχυση του πλασμιδίου στο μίγμα γίνεται η μεταφορά του σε κατάλληλες παγωμένες και αποστειρωμένες κυψελίδες που τοποθετούνται στο μηχάνημα (Biorad Micropulser) για την εφαρμογή ρεύματος και την ολοκλήρωση της ηλεκτροδιάτρησης. Μετά τον παλμό, ακολουθεί η ταχεία προσθήκη υγρού θρεπτικού μέσου (LB Broth), ήπια επαναδιαλυτοποίηση, μεταφορά σε σωληνάκια erpendorf και επώαση στους 28°C/160rpm (1.5-2 ώρες) χωρίς κατάλληλο αντιβιοτικό για την ανάκαμψη των στρεσαρισμένων κυττάρων και την έκφραση των γονιδίων υπεύθυνων για την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Τέλος, γίνεται η επιστροφή του μίγματος σε τρυβλία Petri με θρεπτικό με τα κατάλληλα αντιβιοτικά (Καναμυκίνη, 50 μικρογρ./mL και Ριφαμπικίνη, 25 μικρογρ./mL) και επώαση για 2 μέρες στους 28°C.

Ο τελικός σκοπός της διαδικασίας είναι να δημιουργηθεί ένα πυκνό μίγμα μετασχηματισμένων αγροβακτηρίων. Για την βέλτιστη απόδοση μετασχηματισμού της διαδικασίας, ακολουθεί ένα βήμα επιλογής μοναδιαίας, θετικής αποικίας και πολλαπλασιασμού της σε υγρή καλλιέργεια (ίδιες συνθήκες, για 2 μέρες) και, τελικά, επανεπίστρωση ενός mL της σε στερεό θρεπτικό μέσο. Το τελικό τρυβλίο πρέπει να είναι έτοιμο την ημέρα του μετασχηματισμού “Hairy Root”.

3.2.3 Μετασχηματισμός “Hairy Root” και μεταφορές

Από την δέκατη έως την δέκατη πέμπτη ημέρα των φυτών πρέπει να γίνει ο μετασχηματισμός, μιας και τότε είναι πιο εύκολος ο εντοπισμός του υποκοτύλιου των φυτών και, παράλληλα, η απόδοση του μετασχηματισμού είναι μέγιστη. Ειδικότερα, για την διαδικασία επιλέγονται τα φυτά με ανάπτυξη ρίζας, τουλάχιστον, ενός εκατοστού και την πιο υγιή εμφάνιση (αποφεύγονται φυτά με ξεραμένα ή κομμένα φύλλα καθώς και λεπτό βλαστό ή ρίζα). Ακολουθεί η κοπή της ρίζας στο σημείο του υποκοτύλιου, εμβάπτιση σε εναιώρημα αγροβακτηρίων και μεταφύτευση σε τετράγωνο τρυβλίο με θρεπτικό μέσο ½ MS (10-15 φυτά ανά πιάτο).

Ακολουθεί μια διήμερη ανάπτυξη σε σκοτάδι έτσι ώστε την πέμπτη ημέρα μετά τον μετασχηματισμό, τρεις μέρες αφού μεταφερθούν σε κανονική φωτοπερίοδο, να γίνει εκ νέου μεταφορά των φυτών σε πιάτα με ½ MS και το κατάλληλο αντιβιοτικό για την αναστολή της ανάπτυξης των αγροβακτηρίων (Σεφταζιδίμη, 300 μικρογρ./mL). Από εκεί και ύστερα, γίνονται μεταφορές όπου κρίνεται απαραίτητο είτε για την αραιώση των φυτών (από 15 φυτά ανά πιάτο σε 10 ή και 5 φυτά ανά πιάτο) είτε για την ελάττωση εξάπλωσης επιμολύνσεων.

Στο τέλος, κατά τον εμβολιασμό που θα περιγραφεί παρακάτω γίνεται μια τελική μεταφορά σε δοχεία magenta με μίγμα άμμου όπως περιγράφηκε παρακάτω (βλέπε “Θρεπτικά υποστρώματα”) και πότισμα, μία φορά, με 35 mL διαλύματος Hoagland. Τα δοχεία κλείνονται με καπάκι, αεροστεγώς, και δεν χρειάζεται εκ νέου πότισμα για το πέρασ της υπόλοιπης πειραματικής διαδικασίας μέχρι την δειγματοληψία.

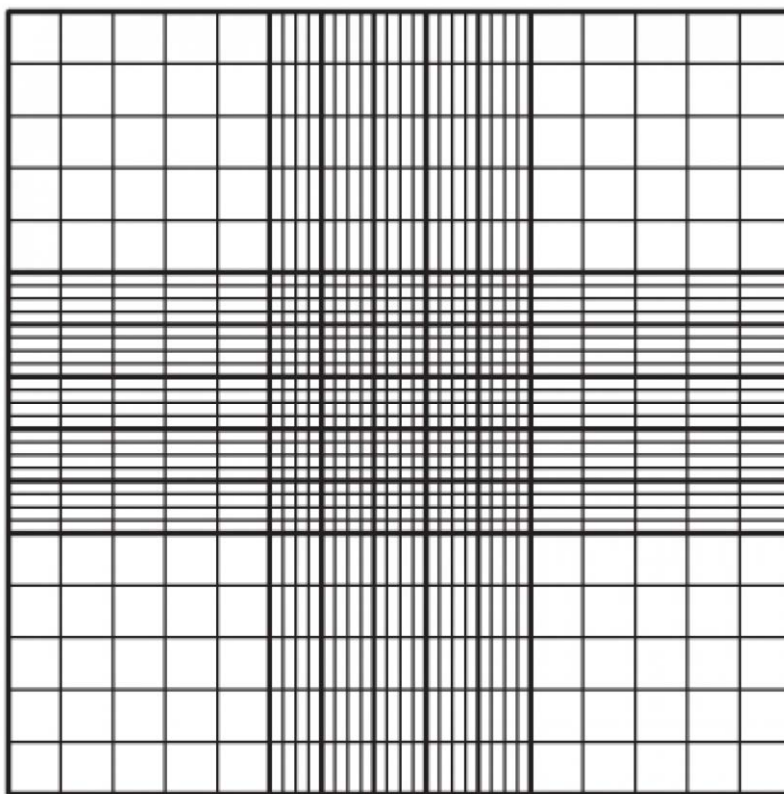
3.3 Προετοιμασία του ενδόφυτου *Fusarium solani* (strain K-FsK)

3.3.1 Συλλογή κονιδίων FsK

Όπως προαναφέρθηκε, ο μύκητας καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο PD Άγαρ (26°C) για 2 ημέρες και ακολούθησε η μεταφορά του σε υγρό θρεπτικό μέσο PD Broth για 5-7 ημέρες (26°C/160 rpm) για την δημιουργία του εμβολίου. Για την συλλογή των κονιδίων απαιτείται η απομάκρυνση των μυκηλίων από το μέσο (διήθηση του θρεπτικού) και δυο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (6500 rpm, 16°C για 5 λεπτά) για την απόρριψη του θρεπτικού μέσου και αντικατάστασή του με διάλυμα NaCl (0,85% w/v). Η τελική επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος γίνεται σε 5 mL του διαλύματος.

3.3.2 Μέτρηση κονιδίων και εμβολιασμός με FsK

Για την καταμέτρηση των κονιδίων και την δημιουργία ενός εμβολίου με τελική συγκέντρωση 1000 κονίδια ανά mL απαιτείται η δημιουργία αραιώσεων με dH₂O (1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000) διότι η αρχική ποσότητα είναι συνήθως αρκετά πυκνή. Η παρατήρηση των κονιδίων γίνεται με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου και της αιμοκυτταρομετρικής πλάκας Neubauer.



Εικόνα 09. Ο σταυρός της πλάκας Neubauer, η καταμέτρηση κονιδίων γίνεται στις γωνιακές περιοχές του σχεδίου.

Για τον ακριβέστερο υπολογισμό των κονιδίων των αραιώσεων επιλέγεται η παρατήρηση της αραιώσης που θα περιέχει από πέντε μέχρι δεκαπέντε κονίδια σε κάθε κουτάκι της πλάκας, ενώ ο χειρισμός του εμβολίου κατά την δημιουργία των αραιώσεων είναι κατάλληλος για την αποφυγή κατακρήμνιση των κονιδίων και λανθασμένου πιπεταρίσματος. Ο τελικός εμβολιασμός γίνεται με 100 ανά ρίζα και η δειγματοληψία γίνεται 5-7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

3.4 Δειγματοληψία

3.4.1 Συγκομιδή

Πριν τη συγκομιδή των φυτών και την δειγματοληψία των ριζών τους γίνεται η επιλογή των μετασχηματισμένων με την βοήθεια του στερεοσκοπίου (Leica MZ10F). Οι διαγονιδιακές ρίζες φθορίζουν κόκκινο χρώμα λόγω της έκφρασης της φθορίζουσας πρωτεΐνης turboRFP (tRFP, μήκος κύματος παρακολούθησης ~ 600-660 νανόμετρα, βλέπε Παράρτημα για περισσότερες πληροφορίες).

Μετά την επιλογή, ακολουθεί ένα βήμα πλύσης των ριζών του κάθε φυτού με χλωρίνη 10%, για τον εξωτερικό καθαρισμό τους από το ενδόφυτο και η αποκοπή και ταχεία ψύξη της κάθε φθορίζουσας ρίζας (με υγρό άζωτο). Ο ιστός αποθηκεύεται στους -80°C για την βέλτιστη διατήρησή του.

3.4.2 Υπολογισμός μήκους φυτού

Κατά την δειγματοληψία λήφθηκαν και φωτογραφίες για την σύγκριση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών όπως το μήκος της ρίζας και του βλαστού μεταξύ των φυτών “Cas9 only” και των μετασχηματισμένων “CYP71D353”. Οι μετρήσεις του μήκους ολοκληρώθηκαν με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ και του πακέτου “shiny” του RStudio. Για την στατιστική ανάλυση έγινε αξιολόγηση της κανονικότητας των κατανομών με τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov. Αφού κρίθηκε πως δεν ακολουθείται κανονική κατανομή και από τα δύο ειδών δεδομένα ακολούθησε μια μη παραμετρική μέθοδος αξιολόγησης της στατιστικής σημαντικότητας με την βοήθεια του ελέγχου Mann-Whitney U.

3.5 Έλεγχος για μεταλλάξεις

3.5.1 Απομόνωση ολικού DNA

Τα αποθηκευμένα δείγματα λειοτριβήθηκαν με την βοήθεια του μηχανήματος Tissuelyser και ακολούθησε η εκχύλιση του DNA με την μέθοδο CTAB. Λεπτομερέστερα, προσθέτονται 300 μ L προθερμασμένου CTAB (65°C) σε κάθε δείγμα, αυτά αναδεύονται και επωάζονται στους 65°C για 15 λεπτά σε υδατόλουτρο. Ακολουθεί η προσθήκη 150 μ L ισοαμυλικής αλκοόλης:χλωροφορμίου, ανάδευση για 10-15 δευτ. μέχρι να δημιουργηθεί γαλάκτωμα και

φυγοκέντρωση για να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (11.000 g για 5 λεπτά). Ύστερα, συλλέγεται η υδατοδιαλυτή και προστίθενται, 0,7x του όγκου της, κρύα ισοπροπανόλη, γίνεται ήπια ανάδευση μέχρι να γίνει το μίγμα διαυγές και τοποθετούνται στους -20°C για 10 λεπτά. Με την δεύτερη φυγοκέντρωση (11.000 g για 15 λεπτά), γίνεται ταχεία απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του αμυδρού ιζήματος σε 500 μL παγωμένης αιθανόλης 70%. Μια τρίτη φυγοκέντρωση (11.000 g για 5 λεπτά) οδηγεί στην δεύτερη απόρριψη του υπερκειμένου και στο στέγνωμα του ιζήματος με θέρμανση στους 50°C (εως και 10 λεπτά, υπολείμματα αιθανόλης μπορούν επηρεάσουν τις επερχόμενες μοριακές αναλύσεις). Η τελική επαναδιάλυση πραγματοποιήθηκε σε ddH₂O με RNase (50:1 αναλογία). Για τις μοριακές αναλύσεις που επέρχονται, με εξαίρεση την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR), ήταν επαρκής η ποσοτικοποίηση του DNA αξιοποιώντας το μηχάνημα Nanodrop.

3.5.2 Έλεγχος ένθεσης T-DNA

Σε μερικά δείγματα χρειάστηκε να επιβεβαιωθεί μοριακά ο μετασχηματισμός των φυτών. Συνεπώς, για τον έλεγχο της ένθεσης του T-DNA σχεδιάστηκε αντίδραση Kapa Taq PCR με εκκινητές κατάλληλους για 2 διαγονίδια των σχεδιασμένων συσκευών (tRFP και Bar, βλέπε Παράρτημα). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν όμοιες εκτός από το σημείο της τήξης των εκκινητών (βλέπε Παράρτημα).

Πίνακας 1. Συστατικά αντίδρασης Kapa Taq PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
DNA	10 μg
Ρυθμιστικό A (10x)	2 μL
Ευθύς εκκινητής (10 pmol/ μL)	0,8 μL
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmol/ μL)	0,8 μL
dNTPs (10 mM)	0,4 μL
Kapa Taq (5 U/ μL)	0,08 μL
ddH ₂ O	Προσθήκη μέχρι τα 20 μL

Πίνακας 2. Συνθήκες αντίδρασης Kapa Taq PCR

35 κύκλοι αντίδρασης	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	95	3:00

Αποδιάταξη	98	0:30
Υβριδισμός εκκινητών	65	0:25
Επέκταση	72	1:00
Τελική επέκταση	72	2:00

Τα ενισχυμένα δείγματα παρατηρήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% μετά την ηλεκτροφόρησή τους.

3.5.3 Έλεγχος παρουσίας μεταλλάξεων μέσω της ενδονουκλεάσης T7

Η συγκεκριμένη μέθοδος απαιτεί ταχύτητα λόγω της επιρρέπειας της ενδονουκλεάσης να κάνει λάθη όταν βρεθεί σε υποδεέστερες του βέλτιστου συνθήκες. Προτού πραγματοποιηθεί η αντίδραση απαιτείται η ενίσχυση του μοριακού στόχου, δηλαδή τις περιοχές στόχευσης των οδηγών RNA (ειδικές και μη, γονίδια *AMY2* και *CYP71D353*). Χρειάστηκε, λοιπόν, ο σχεδιασμός ειδικών, γι' αυτές, ζευγών εκκινητών (βλέπε Παράρτημα) και την αξιοποίηση της πολυμεράσης Q5 λόγω της ειδικότερης ενίσχυσης της και των χαμηλότερων ποσοστών εισαγωγής λάθους. Προφανώς, οι συνθήκες της αντίδρασης διέφεραν μεταξύ εκκινητών για την θερμοκρασία υβριδισμού και τον χρόνο επέκτασης, όμως εκτός αυτών οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια φαίνονται παρακάτω:

Πίνακας 3. Συστατικά αντίδρασης Q5

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
DNA	25 µg
Q5 MasterMix (2x)	12,5 µL
Ευθύς εκκινητής (10 pmol/µL)	1,25 µL
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmol/µL)	1,25 µL
ddH ₂ O	Προσθήκη μέχρι τα 25 µL

Πίνακας 4. Συνθήκες αντίδρασης Q5

30 κύκλοι αντίδρασης	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	98	3:00

Αποδιάταξη	98	0:05
Υβριδισμός εκκινητών	65	0:25
Επέκταση	72	0:20-0:30/κιλοβάση
Τελική επέκταση	72	2:00

Ένα μικρό μέρος της αντίδρασης (2 μL) ηλεκτροφορήθηκε για την επιβεβαίωση της πραγματοποίησής της και ύστερα ακολούθησε η αντίδραση με την ενδονουκλεάση T7.

Απαιτείται μία προεργασία των δειγμάτων με σκοπό την υβριδοποίηση αλυσίδων με διαφορετική αλληλουχία λόγω της παρουσίας μεταλλάξεων. Η αντίδραση ξεκινάει με την θερμική αποδιάταξη και την αργή επαναφορά της θερμοκρασίας σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η ταχεία προσθήκη 0,7 μL της ενδονουκλεάσης και επώαση στους 37°C για 30 λεπτά όπου, έπειτα, γίνεται και η διακοπή της αντίδρασης με την προσθήκη 1 μL EDTA. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Πρέπει να αναφερθεί πως για την καλύτερη οπτικοποίηση της αντίδρασης και των αποτελεσμάτων της υπάρχει ένα αρνητικό δείγμα της αντίδρασης, που δεν περιέχει την ενδονουκλεάση, δίπλα από κάθε θετικό.

Πίνακας 5. Συστατικά αντίδρασης ενδονουκλεάσης T7

Συστατικά	Ποσότητες
Ρυθμιστικό 2	2 μL
Ενισχυμένο προϊόν	10 μL
ddH ₂ O	Προσθήκη μέχρι τα 19 μL
Ενδονουκλεάση T7	0,7 μL
EDTA	1 μL

Πίνακας 6. Συνθήκες αρχικής αποδιάταξης και επαναφοράς

Θερμοκρασία	Χρόνος (λεπτά)	Ρυθμός μεταλλαγής της θερμοκρασίας
95°C	5:00	3°C/δευτ.
85°C	0:01	2°C/δευτ.
75°C	0:01	0,1°C/δευτ.

65°C	0:01	0,1°C/δευτ.
55°C	0:01	0,1°C/δευτ.
45°C	0:01	0,1°C/δευτ.
35°C	0:01	0,1°C/δευτ.
25°C	0:01	0,1°C/δευτ.

3.5.4 Επιβεβαίωση μεταλλάξεων με αλληλούχιση κατά Sanger

Σε περίπτωση που η διαδικασία πετύχει και ανιχνευτούν μεταλλάξεις τότε ακολουθεί ένα βήμα επιβεβαίωσης μέσω αλληλούχισης των δειγμάτων που τις φέρουν. Αναλυτικότερα, γίνεται ενίσχυση της περιοχής που φέρει την μετάλλαξη με την βοήθεια της πολυμεράσης Q5.

Πίνακας 7. Συστατικά αντίδρασης Q5

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
DNA	25 µg
Q5 MasterMix (2x)	25 µL
Ευθύς εκκινητής (10 pmol/µL)	2,5 µL
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmol/µL)	2,5 µL
ddH ₂ O	Προσθήκη μέχρι τα 50 µL

Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση και ο καθαρισμός του προϊόντος μέσω ενός κιτ καθαρισμού αντίδρασης PCR από πηκτή αγαρόζης (Macherey-Nagel) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Με την απομόνωση των επιθυμητών αλληλουχιών υπάρχουν δύο διαφορετικές μεθοδολογίες που μπορούν να ακολουθηθούν για την αλληλούχιση. Είτε η αποστολή των ενισχυμένων αλληλουχιών με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση (βλέπε Παράρτημα), είτε η κλωνοποίησή τους μέσα σε φορείς (κιτ κλωνοποίησης PCR CloneJET). Στη δεύτερη περίπτωση, οι αντιδράσεις κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό δεκτικών *E. coli* DH5a, έγινε επιλογή 6 μοναδιαίων αποικιών, πολλαπλασιασμός τους σε υγρές, απομόνωση των πλασμιδίων και διαγνωστική πέψη για κάθε κλώνο. Τα αποτελέσματα ήταν αποδεκτά σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 8. Συστατικά για την αντίδραση λιγάσης του κιτ

Συστατικά	Ποσότητες (μL)
Ρυθμιστικό Αντίδρασης (2x)	5
Καθαρισμένο προϊόν PCR	0,5
Γραμμικό πλασμίδιο pJET1.2 (50 νανογρ./μL)	0,5
Λιγάση T4	0,5
ddH ₂ O	Προσθήκη μέχρι τα 10 μL

Σε κάθε περίπτωση τα δείγματα στάλθηκαν στην εταιρία Cemia για αλληλούχηση κατά Sanger (σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας) και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα οπτικοποίησης SnapGene και το πρόγραμμα στοίχισης Geneious Prime.

3.6 Έλεγχος αποικισμού

3.6.1 Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA

Για την συγκεκριμένη διαδικασία απαιτείται ακρίβεια και ομοιογένεια μεταξύ την συγκέντρωση των δειγμάτων, επομένως, η ποσοτικοποίηση μέσω του μηχανήματος Nanodrop δεν είναι αρκετή για την εξασφάλιση αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Η ποσοτικοποίηση με το μηχάνημα Qubit είναι αρκετά πιο ακριβής. Για την μέτρηση ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή.

3.6.2 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR)

Για την μέθοδο στοχεύθηκε ένα ενδογενές, ιδιοσύστατο γονίδιο του *FsK* (Translation Elongation Factor 1a-TEF, βλέπε Παράρτημα για περισσότερες πληροφορίες). Η ανάλυση απαιτεί την δημιουργία πρότυπης καμπύλης για τον ακριβή προσδιορισμό των αντιγράφων και παράλληλα, λόγω της ευαισθησίας της, χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές επαναλήψεις για κάθε δείγμα και τρεις για την καμπύλη και τους αρνητικούς μάρτυρες. Τα συστατικά της αντίδρασης φαίνονται παρακάτω:

Πίνακας 9. Συστατικά της ποσοτικής PCR

Συστατικά	Ποσότητες (μL)
-----------	----------------

Δείγμα (10 ng/μL)	1
SYBR	5
Ευθύς εκκινητής (10 pmol/μL)	0,2
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmol/μL)	0,2
ddH ₂ O	Προσθήκη μέχρι τα 10 μL

3.7 Θρεπτικά υποστρώματα

Οι συνταγές των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται παρακάτω.

LB Άγαρ: Για τελικό όγκο 1 λίτρο προστίθενται 10 γρ. πειπτόνη, 10 γρ. NaCl, 5 γρ. εκχύλισμα μυκήτων και 15 γρ. Άγαρ (στην περίπτωση υγρού LB παραλείπεται αυτό το βήμα) και συμπληρώνεται η κατάλληλη ποσότητα dH₂O

½ MS: Για τελικό όγκο 1 λίτρο προστίθενται 2,2 γρ. αλάτι Murashige & Skoog, 20 γρ. Σουκρόζη, 8 γρ. Άγαρ και συμπληρώνεται ο κατάλληλος όγκος dH₂O

PD Άγαρ: Το συγκεκριμένο αποτελεί ένα εμπειρικό θρεπτικό μέσο μιας και ένα μεγάλο μέρος των συστατικών του το παίρνει από το βράσιμο πατάτας. Πιο συγκεκριμένα, για την παρασκευή 1 λίτρου του θρεπτικού μέσου απαιτείται ο βρασμός και διήθηση 400 γρ. καθαρισμένων πατατών, η συλλογή του διηθήματος και προσθήκη 20 γρ. Σουκρόζης, 15 γρ. άγαρ (για την παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου αποφεύγεται αυτό το βήμα) και η συμπλήρωση του υπόλοιπου όγκου με dH₂O.

Μίγμα άμμου εμπλουτισμένο με διάλυμα Hoagland: Η τελική επιθυμητή ποσότητα περιέχει ένα συνδυασμό παχιάς και λεπτής άμμου με βερμικουλίτη σε αναλογίες 2:1:1. Η τελική σύσταση του διαλύματος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 10. Θρεπτικό διάλυμα Hoagland

Διάλυμα Hoagland					
Stock	Συγκέντρωση (M)	Όγκος (L)	Βάρος (g)	Μοριακό Βάρος	Τελική Συγκέντρωση (mL/L)
MgSO ₄ 7H ₂ O	1	0,4	98,596	246,49	1
NH ₄ H ₂ PO ₄	1	0,4	46,012	115,03	2
FeEDTA	0,02	0,045	0,330345	367,05	1

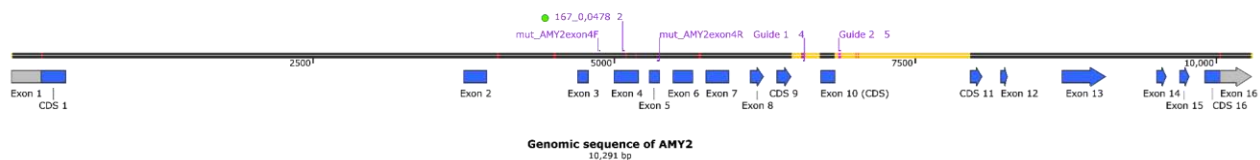
KNO ₃	1	0,4	40,44	101,1	6
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1	0,4	94,464	236,16	4
Microelements stock					6
H ₃ BO ₃	0,025	0,4	0,6184	61,84	1
MnSO ₄ H ₂ O	0,002	0,4	0,135208	169,01	1
ZnSO ₄ H ₂ O	0,002	0,4	0,14356	179,45	1
CuCl ₂ 5H ₂ O	0,0005	0,4	0,034096	170,48	1
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,0005	0,4	0,04839	241,95	1
KCl	0,05	0,4	1,491	74,55	1

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως μετά την παρασκευή του κάθε παραπάνω θρεπτικού μέσου ακολούθησε και η αποστείρωση σε κλίβανο στους 121°C για 20 λεπτά.

4. Αποτελέσματα

4.1 Μεταλλαξιγένεση του γονιδίου AMY2

Για το συγκεκριμένο γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μοριακές κατασκευές. Σκοπός αποτέλεσε η εισαγωγή δύο διαφορετικών ειδών μεταλλάξεων. Η πρώτη, AMY2:gRNA1, έχει ένα μοριακό στόχο στο τέταρτο εξόνιο του γονιδίου και σκοπός της αποτελεί την μεταβολή του μεταφραστικού πλαισίου. Η δεύτερη, AMY2:gRNA4-gRNA5, έχει δύο μοριακού στόχους, στο ιντρόνιο 9 και το ιντρόνιο 10 και σκοπός της αποτελεί η απώλεια ολόκληρου γενετικού τμήματος του δέκατου εξονίου. Η απώλεια αντιστοιχεί στην περιοχή DCTAE της πρωτεΐνης, υπεύθυνη για την δέσμευση του υποστρώματος. Για την επιβεβαίωση μη λειτουργικότητας της πρωτεΐνης Cas9 απουσία οδηγών RNA, δημιουργήθηκε και μία τρίτη συσκευή, πανομοιότυπη στα στοιχεία της, εκτός της αλληλουχίας των οδηγών RNA (βλέπε Παράρτημα για τους χάρτες των πλασμιδιακών φορέων)



Εικόνα 10. Γονιδιωματική αλληλουχία του βιοσυνθετικού γονιδίου της β-αμυρίνης, AMY2. Ο μοριακός στόχος του πρώτου οδηγού RNA εντοπίζεται εν μέσω του τέταρτου εξονίου. Τα επόμενα δύο μόρια οδηγού RNA στοχεύουν το ένατο ιντρόνιο και το δέκατο ιντρόνιο. Εκατέρωθεν των στόχων μπορούν να παρατηρηθούν οι εκκινήτες που θα χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση.

4.1.1 Μοριακή στόχευση χρησιμοποιώντας την συσκευή AMY2:gRNA1

Η συγκεκριμένη συσκευή περιέχει ένα μοναδικό οδηγό RNA και σκοπός είναι η αλλαγή του μεταφραστικού πλαισίου με την βοήθεια του Μη Ομόλογου Ανασυνδυασμού μετά την εισαγωγή δίκλωνων ρήξεων. Η τροποποίηση έχει την δυνατότητα να επηρεάσει περίπου 1.700 νουκλεοτίδια της μεταφραζόμενης περιοχής ή περίπου το 75% της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η δειγματοληψία των μετασχηματισμένων ριζών πραγματοποιήθηκε πέντε εβδομάδες μετά τον μετασχηματισμό και τέσσερις μέρες μετά τον εμβολιασμό (100 μ L εμβολίου ανά φυτό). Για τον προσδιορισμό της απόδοσης του μετασχηματισμού, παρατηρήθηκαν οι ρίζες σε μικροσκόπιο φθορισμού (στερεοσκόπιο). Μετρήθηκε ένας επιτυχής μετασχηματισμός, κάθε φορά που παρατηρούνταν μια φθορίζουσα ρίζα στο φυτό (κόκκινη, tRFP - μήκος κύματος διέγερσης: 553 nm, μήκος κύματος εκπομπής: 574 nm). Ο συγκεκριμένος κύκλος μετασχηματισμού απέδωσε 11, από τα 53, μετασχηματισμένα φυτά (ή περίπου 20% απόδοση μετασχηματισμού).

Ανάλυση δραστηριότητας οδηγού RNA 1

Η εισαγωγή μεταλλάξεων με το συγκεκριμένο σύστημα απαιτεί ευαισθησία στην μέθοδο ανίχνευσης. Μια απλή ενίσχυση της περιοχής του μοριακού στόχου δεν είναι αρκετή για τον εντοπισμό εισαγωγών και διαγραφών νουκλεοτιδίων, επακόλουθων της στόχευσης του συστήματος CRISPR/Cas9.

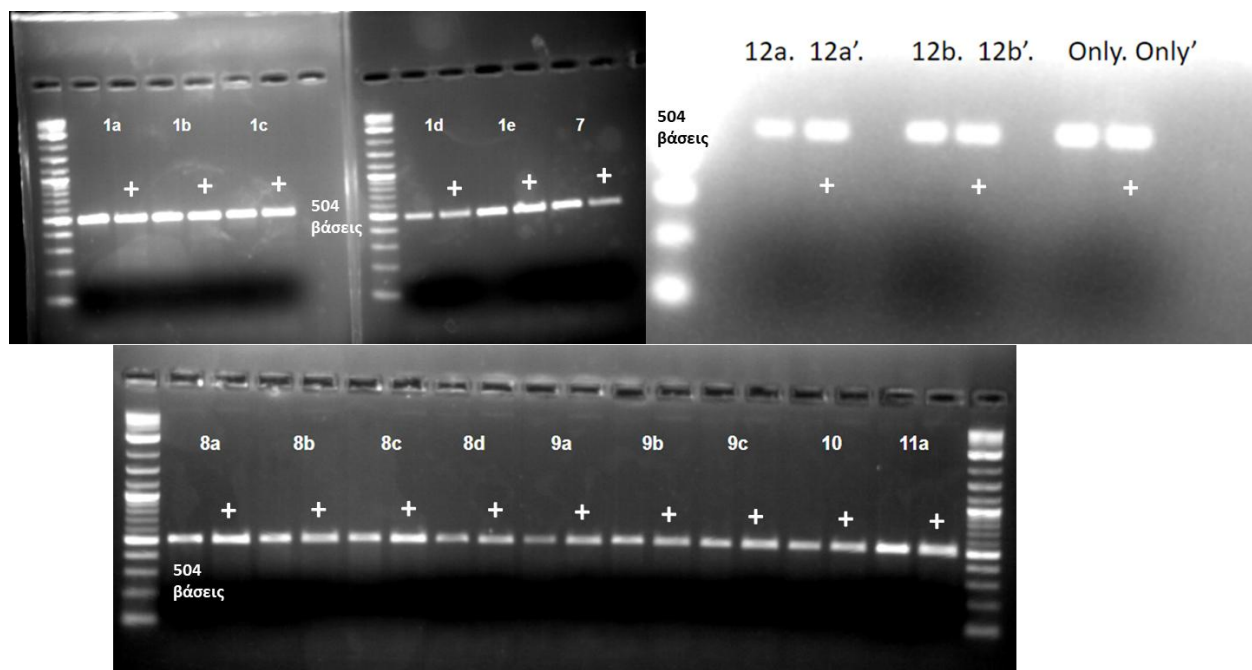
Πίνακας 11. Οι εκκινητές και το προϊόν ενίσχυσης για την ανίχνευση της μετάλλαξης

Ονομασία εκκινητών	Προϊόν ενίσχυσης
mut_AMY2Exon4F	506 βάσεις
mut_AMY2Exon4R	

Για την ταχεία και, σχετικά, φθηνή διαλογή μεταξύ των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ενδονουκλεάσης T7E1. Η δοκιμασία απαιτεί την ενίσχυση της περιοχής-στόχου και την εισαγωγή βρόγχων στην διάταξη του DNA. Αυτό πραγματοποιείται με την αποδιάταξη των αλυσίδων και την σταδιακή επαναφορά τους, με σκοπό την υβριδοποίηση μεταξύ μιας αλυσίδας αγρίου τύπου και μιας αλυσίδας που περιέχει την μετάλλαξη και, συνεπώς, την εισαγωγή βρόγχων. Η ενδονουκλεάση έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τους βρόγχους και να εισάγει δίκλωνες κοπές, με τελικό αποτέλεσμα την ύπαρξη διαφορετικού μεγέθους αλληλουχιών DNA στην ακόλουθη πηκτή αγαρόζης.

Ανίχνευση μεταλλάξεων

Στην προκειμένη περίπτωση το μήκος της ενισχυμένης περιοχής αντιστοιχεί σε 506 βάσεις, ενώ σε περίπτωση λειτουργικού οδηγού RNA αναμένεται η ύπαρξη δύο παραπάνω προϊόντων μεγέθους 300 και 200, περίπου, βάσεων.



Εικόνα 11. Ανίχνευση μεταλλάξεων με την βοήθεια της δοκιμασίας T7E1 σε δείγματα φυτών μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο AMY2:gRNA1 σε πηκτή αγαρόζης 2%. Το νούμερο στην ονομασία αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο φυτό ενώ το γράμμα, στην ρίζα του φυτού που συλλέχθηκε. Κάθε διαφορετική ρίζα που προκύπτει από τον κάλο αποτελεί ένα καινούργιο μεμονωμένο επεισόδιο γενετικής τροποποίησης. Ο σταυρός κάτω από την ονομασία αποτελεί το δείγμα θετικό στην ενδονουκλεάση T7. Ως “Only” ονομάζεται το δείγμα ελέγχου χωρίς οδηγούς RNA.

Δυστυχώς, η ανάλυση υποδεικνύει πως ο συγκεκριμένος οδηγός RNA δεν είναι λειτουργικός.

4.1.2 Μοριακή στόχευση χρησιμοποιώντας την συσκευή AMY2:gRNA4-gRNA5

Η συγκεκριμένη συσκευή περιέχει δύο οδηγούς RNA που εντοπίζονται εκατέρωθεν του δέκατου εξονίου, στις ιντρονικές περιοχές. Επιτυχής λειτουργία και των δύο οδηγών μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ολόκληρου του γενωμικού τμήματος του δέκατου εξονίου και, συνεπώς απώλεια της ικανότητας δέσμευσης του υποστρώματος, υποθέτοντας ότι η τροποποίηση δεν θα επηρεάσει το μεταφραστικό πλαίσιο. Πριν την μεταφορά των φυτών σε δοχεία magenta για τον εμβολιασμό και τρεις εβδομάδες μετά το Hairy Root, επιλέχθηκαν κάποια φυτά με οπτικά εμφανή πρότυπο «Hairy Root» και παρατηρήθηκαν στο στερεοσκόπιο για κόκκινο φθορισμό. Παρόλο που πολλαπλά φυτά εμφάνισαν κάλους και πολυάριθμες ρίζες, κανένα από αυτά δεν είχε κόκκινες φθορίζουσες ρίζες. Με μία πρώτη ματιά, η απόδοση του μετασχηματισμού είναι 0%.

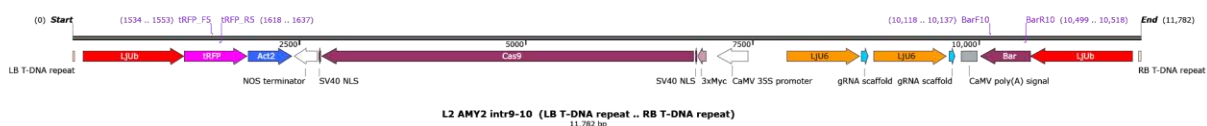


Εικόνα 12. Τα τροποποιημένα, με AMY2:grNA4-grNA5, φυτά, 3 εβδομάδες μετά τον μετασχηματισμό. Υπογραμμίζεται η, εμφανώς, μη φυσιολογική ανάπτυξη ριζών που αποδίδεται στον φαινότυπο Hairy Root.

Επιβεβαίωση ένθεσης T-DNA

Πριν τον μετασχηματισμό των φυτών πραγματοποιείται η επιβεβαίωση του μετασχηματισμού των αγροβακτηρίων με την βοήθεια επιλογής. Ειδικότερα, τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και ακολούθησε η επιλογή μοναδιαίας αποικίας.

Λόγω της ύπαρξης του φαινοτύπου Hairy Root, θεωρήθηκε πως ο μετασχηματισμός πρέπει να πέτυχε και για την επιβεβαίωση αυτού έγινε μια πρώτη δειγματοληψία μερικών φυτών με εμφανές πρότυπο Hairy Root και, επακόλουθη, ενίσχυση του T-DNA. Επιλέχθηκαν δύο διαγονίδια για την ανάλυση, ένα στο αριστερό άκρο του T-DNA, το *tRFP*, και ένα στο δεξι, το *Bar*. Η ενσωμάτωση του ενός άκρου δεν σημαίνει απαραίτητα και την ενσωμάτωση του άλλου μιας και φαίνεται να υπάρχουν διαφορετικοί μηχανισμοί για την μεταφορά και ενσωμάτωση του κάθε άκρου (Chandra 2012).



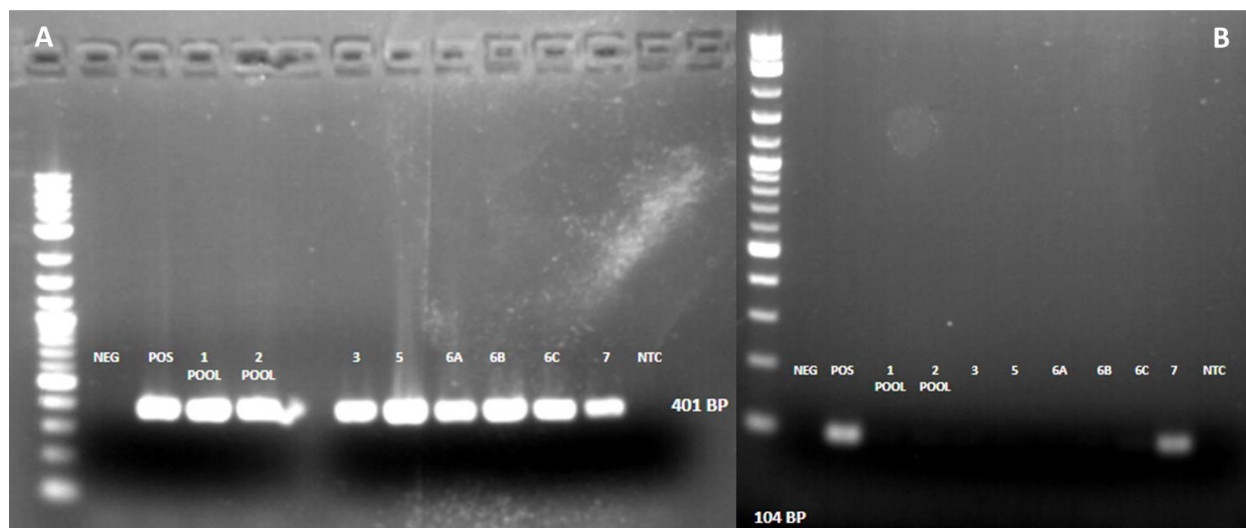
Εικόνα 13. Η αλληλουχία του T-DNA της συγκεκριμένης συσκευής, στο δεξι και αριστερό άκρο μπορούν να παρατηρηθούν τα δύο διαγονίδια με τους εκκινήτές τους.

Ο σχεδιασμός των εκκινήτων για την ενίσχυση των δύο περιοχών έγινε με την βοήθεια του προγράμματος PrimerBlast. Επιλέχθηκε ο σχεδιασμός εκκινήτων που να στοχεύουν εσωτερικά της αλληλουχίας των διαγονιδίων, λόγω της απουσίας τους από το φυτό αγρίου τύπου.

Πίνακας 12. Οι εκκινήτες και τα προϊόντα ενίσχυσης των διαγονιδίων

Ονομασία εκκινήτων	Προϊόν ενίσχυσης
Bar10F	401 βάσεις
Bar10R	
tRFP_F5	104 βάσεις
tRFP_R5	

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν δύο μάρτυρες. Ως θετικό χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα ρίζας προηγούμενου πειράματος που φέρει την συγκεκριμένη συσκευή και ως αρνητικός δείγμα ρίζας φυτού αγρίου τύπου.



Εικόνα 14. Μοριακή ενίσχυση των διαγονιδίων *Bar* (A, αριστερά) και *tRFP* (B, δεξιά) στα γενετικά τροποποιημένα φυτά. Ο αρνητικός (NEG, στην εικόνα) και ο θετικός (POS, στην εικόνα) φαίνονται στην αρχή της πηκτής και ακολουθούν τα δείγματα. Ως “POOL” έχει ονομαστεί η συλλογή όλων των μετασχηματισμένων ριζών ενός φυτού, ενώ στην περίπτωση χωρισμού τους έχουν δοθεί διαφορετικά γράμματα για κάθε ρίζα (παραδειγματος χάριν, 6A, 6B, 6C). Ως “NTC” (Non Template Control) έχει ονομαστεί ο αρνητικός μάρτυρας που δεν περιέχει δείγμα.

Παρατηρείται πως το διαγονίδιο του αριστερού συνοριακού, *tRFP*, δεν ανιχνεύεται σε όλα τα δείγματα, εκτός του τελευταίου, κάτι που αποδεικνύει πως τα φυτά δεν θα έπρεπε να φθορίζουν στο στερεοσκόπιο. Ωστόσο, όσον αφορά το δεξι συνοριακό, και το διαγονίδιο *bar*, η τελείως αντίθετη εικόνα παρουσιάζεται, με όλα τα δείγματα να δίνουν σήμα. Τα ευρήματα υπογραμμίζουν μία δυνατή απώλεια τμήματος του αριστερού συνοριακού. Δεδομένου του διαφορετικού μηχανισμού μεταφοράς και ένθεσης μεταξύ των δύο συνοριακών (Chandra 2012), πιθανόν να υπάρχει βλάβη στο σύστημα μεταφοράς ή ενσωμάτωσης του αριστερού συνοριακού του στελέχους. Παράλληλα, έχουν παρατηρηθεί τυχαίες απώλειες τμημάτων πλασμιδίων κατά την βίαιη διαδικασία μετασχηματισμού βακτηρίων με ηλεκτροπόρωση.

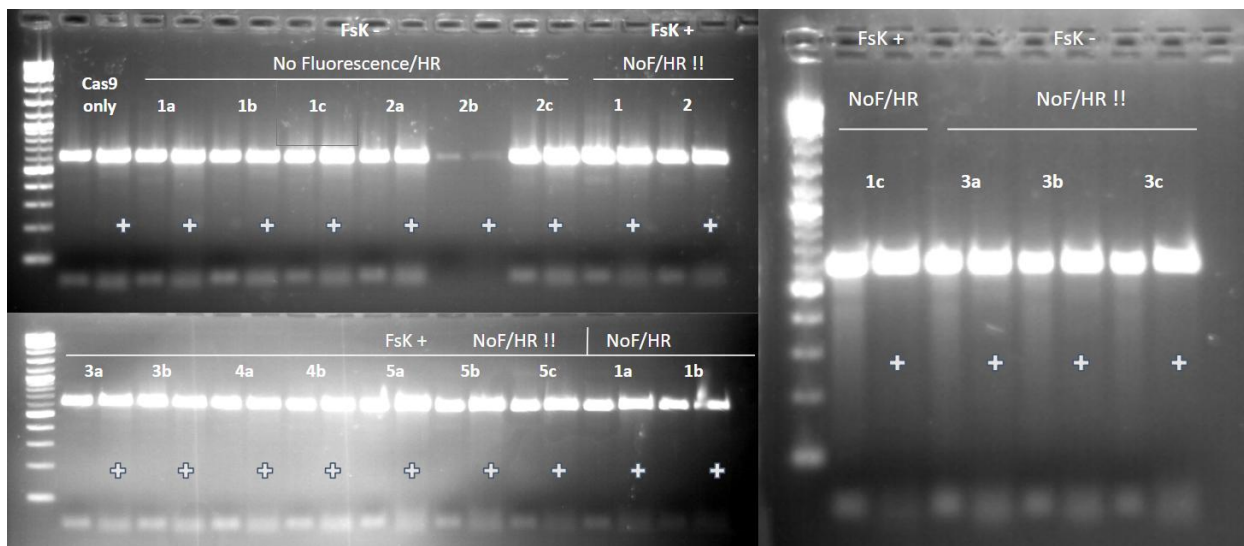
Ανάλυση δραστικότητας οδηγών RNA 4 και 5

Παρόλη την απώλεια ενός διαγονιδίου, αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα πως χάθηκαν από το T-DNA παραπάνω τμήματα με αποτέλεσμα να καταστραφούν και οι υπόλοιπες γενετικές κασέτες. Δεδομένου ότι το πείραμα έγινε για την ανάλυση των οδηγών RNA, κρίθηκε πως το πείραμα μπορούσε να συνεχιστεί με την μοριακή ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής-στόχου και εφαρμογή της δοκιμασίας T7E1, για την διαπίστωση λειτουργικότητας του συστήματος. Ακολούθησε δεύτερη δειγματοληψία έξι μέρες μετά τον εμβολιασμό (εμβόλιο 500 μ L) και συνολικά επτά εβδομάδες μετά το Hairy Root. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε αυτά που εμφάνιζαν ισχυρό φαινότυπο Hairy Root (σημειωμένα ως “HR!!” στην εικόνα 15) και αυτά που εμφάνιζαν λιγότερο εμφανή (σημειωμένα ως “HR” στην εικόνα 15). Και πάλι, επαναλήφθηκε έλεγχος φθορισμού στο στερεοσκόπιο και δεν εντοπίστηκε ρίζα που να φθορίζει.

Πίνακας 13. Οι εκκινητές και το προϊόν ενίσχυσης για την ανίχνευση της μετάλλαξης

Ονομασία εκκινητών	Προϊόν ενίσχυσης
mut_AMY2-intron9_F	610 βάσεις
mut_AMY2-intron10_R	

Σε περίπτωση λειτουργικότητας του τέταρτου οδηγού RNA, τα ενισχυμένα προϊόντα θα είχαν μέγεθος 500 και 100 βάσεων. Σε περίπτωση λειτουργίας του πέμπτου, 400 και 200 βάσεων.



Εικόνα 15. Ανίχνευση μεταλλάξεων με την βοήθεια της δοκιμασίας T7E1 σε δείγματα φυτών μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο AMY2:gRNA4-gRNA5 σε πηκτή αγαρόζης 2%. Το νούμερο στην ονομασία των φυτών αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο μετάλλαγμα ενώ το γράμμα στην ρίζα που συλλέχθηκε. Κάθε διαφορετική ρίζα που προκύπτει από τον κάλο αποτελεί ένα καινούργιο μεμονωμένο επεισόδιο γενετικής τροποποίησης. Ο σταυρός κάτω από την ονομασία αποτελεί το δείγμα θετικό στην ενδονουκλεάση T7. Ως “Cas9 only” ονομάζεται το δείγμα ελέγχου χωρίς οδηγούς RNA. Κάθε δείγμα που δεν φθόριζε σημειώθηκε ως “No Fluorescence/NoF”.

Η ανάλυση δεν επέφερε καρποφόρα αποτελέσματα. Ωστόσο, το συμπέρασμα δεν είναι ακόμα απολύτως ξεκάθαρο. Το ένα ενδεχόμενο είναι πως και οι δύο οδηγοί RNA είναι μη αποδοτικοί και, συνεπώς, η εύρεση μεταλλάγματος είναι αρκετά δυσκολότερη. Το δεύτερο ενδεχόμενο είναι πως χάθηκε μεγαλύτερο κομμάτι του ενθέματος με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της γενετικής κασέτας της πρωτεΐνης Cas9, αφού του αμέσως επόμενο διαγονιδίου που θα επηρεαζόταν είναι της πρωτεΐνης (βλέπε Παράρτημα). Είναι αρκετά πιθανό, λοιπόν, να χάθηκε μέρος της κασέτας και αυτό να επιφέρει αδυναμία παραγωγής της πρωτεΐνης.

4.2 Μεταλλαξιγένεση του γονιδίου *CYP71D353*

Για το συγκεκριμένο γονίδιο χρησιμοποιήθηκε μία μοριακή συσκευή (*CYP71D353:gRNA1-gRNA2*). Σκοπός αποτέλεσε η απώλεια ολόκληρου γενετικού τμήματος, χρησιμοποιώντας, και πάλι, δύο διαφορετικούς οδηγούς RNA που στοχεύουν μία ενδιάμεση γονιδιακή περιοχή του πρώτου εξωνίου. Δεδομένης της θέσης των οδηγών RNA, λειτουργικότητα ακόμη και ενός εκ των δύο τους μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή του μεταφραστικού πλαισίου επηρεάζοντας περίπου 1.400 νουκλεοτιδικά κατάλοιπα ή περίπου το 65% της αμινοξικής αλληλουχίας. Σε περίπτωση λειτουργικότητας και των δύο, η απώλεια της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε μέγεθος περίπου 500 νουκλεοτιδίων ή περίπου του 30% της αμινοξικής αλληλουχίας. Για την επιβεβαίωση μη λειτουργικότητας της πρωτεΐνης Cas9 απουσία οδηγών

RNA, δημιουργήθηκε και μία τρίτη συσκευή, πανομοιότυπη σε όλα εκτός της αλληλουχίας των οδηγών RNA (βλέπε Παράρτημα)



Εικόνα 16. Γενωμική αλληλουχία του γονιδίου *CYP71D353*. Ο μοριακός στόχος του πρώτου οδηγού RNA εντοπίζεται εν μέσω της πρώτης κωδικής περιοχής και του δεύτερου στο τέλος της. Εκατέρωθεν των στόχων μπορούν να παρατηρηθούν οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση.

4.2.2 Μοριακή στόχευση χρησιμοποιώντας την συσκευή CYP71D353:gRNA1-gRNA2

Οι μοριακοί στόχοι εντοπίζονται στην πρώτη κωδική περιοχή, μετά το τέλος του πρώτου εξονίου, και οδηγούν σε απώλεια 492 βάσεων που αντιστοιχούν σε 162 αμινοξέα. Η δειγματοληψία έγινε πέντε εβδομάδες μετά τον μετασχηματισμό και τέσσερις μέρες μετά τον εμβολιασμό (100 μ L εμβολίου). Η τεχνική απέδωσε 7, από τα 55, μετασχηματισμένα φυτά (ή περίπου 12% αποδοτικότητα μετασχηματισμού).

Ανάλυση δραστηρότητας των οδηγών RNA 1 και 2

Μια απλή ενίσχυση της περιοχής γύρω από τους μοριακούς στόχους είναι αρκετή για την ανίχνευση της απώλειας μεγάλου τμήματος, ωστόσο σκοπός της διεργασίας είναι να κριθεί η απόδοση των δύο οδηγών RNA και ατομικά, όχι μόνο συλλογικά. Συνεπώς, ακολουθήθηκε παρόμοια μεθοδολογία.

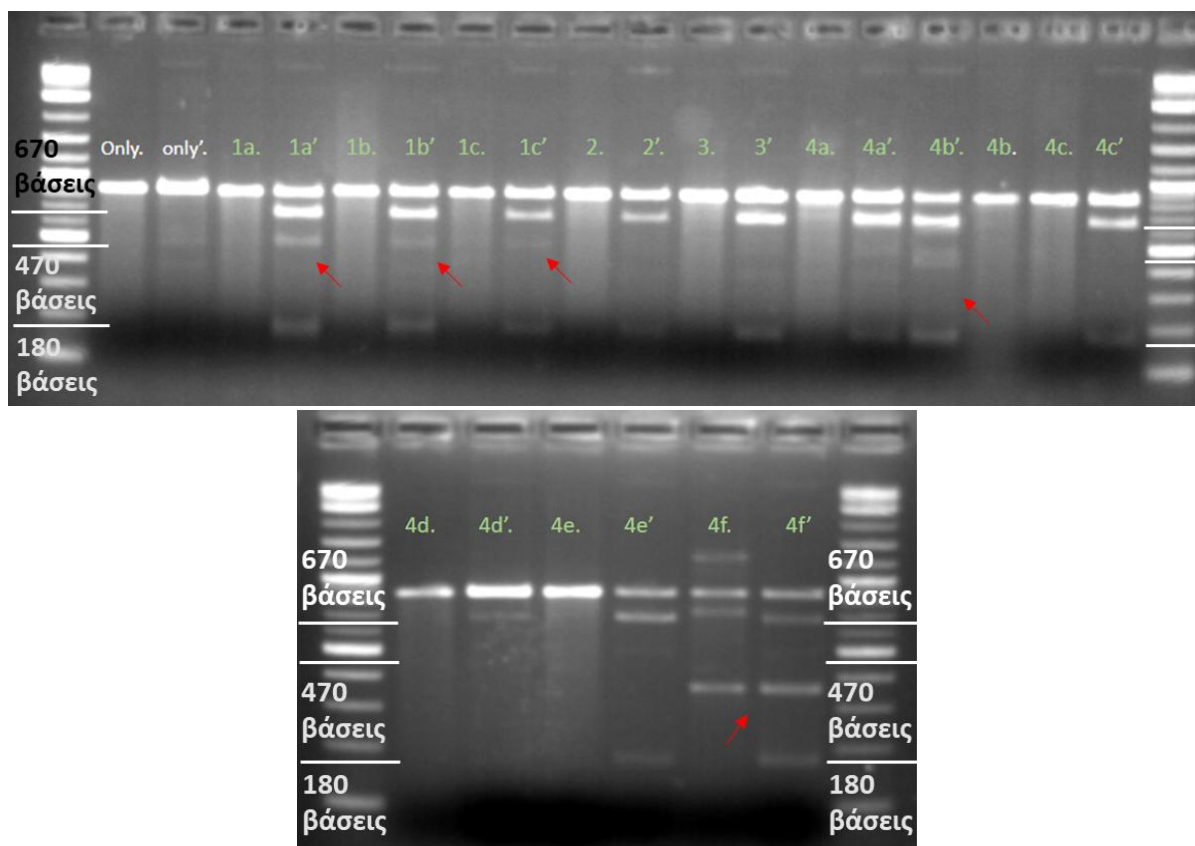
Πίνακας 14. Οι εκκινητές και το προϊόν ενίσχυσης για την ανίχνευση της μετάλλαξης

Ονομασία εκκινητών	Προϊόν ενίσχυσης
mut_CYP71D353_F	851 βάσεις
mut_CYP71D353_R	

Ανίχνευση μεταλλάξεων

Στην προκειμένη περίπτωση το μήκος της ενισχυμένης περιοχής αντιστοιχεί σε 851 βάσεις, ενώ σε περίπτωση λειτουργικού οδηγού RNA αναμένεται η ύπαρξη παραπάνω προϊόντων.

Συγκεκριμένα, σε περίπτωση λειτουργίας μόνο του πρώτου, τα αναμενόμενα προϊόντα θα έχουν μέγεθος 650 και 200, περίπου, βάσεων. Σε περίπτωση λειτουργίας μόνο του δεύτερου, τα προϊόντα θα έχουν μέγεθος 700 και 150 βάσεων, ενώ σε περίπτωση λειτουργίας και των δύο, θα εμφανιστούν 3 προϊόντα μεγέθους 450, 200 και 150, περίπου, βάσεων. Ωστόσο, η τελευταία περίπτωση μπορεί να είναι εμφανής και από την ενίσχυση της αλληλουχίας.

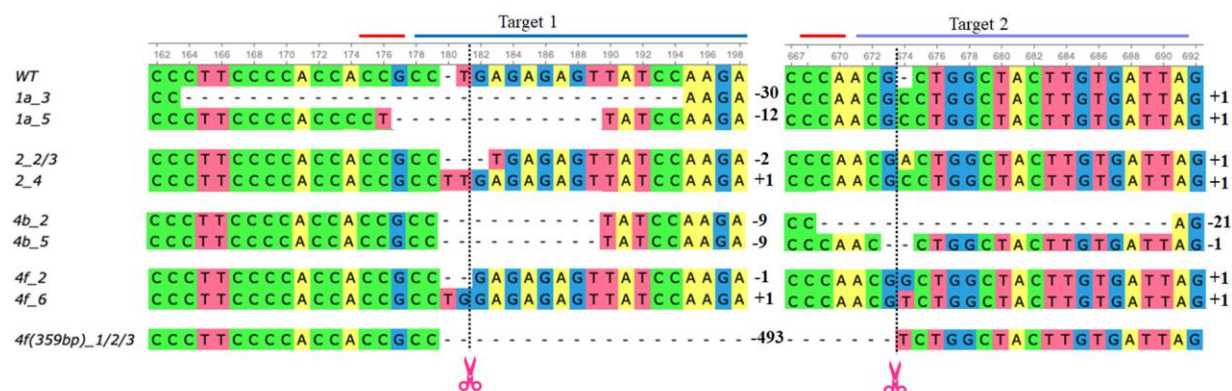


Εικόνα 17. Ανίχνευση μεταλλάξεων με την βοήθεια της δοκιμασίας T7E1 σε δείγματα φυτών μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο CYP71D353:gRNA1-gRNA2. Το νούμερο στην ονομασία των φυτών αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο μετάλλαγμα ενώ το γράμμα στην ρίζα που συλλέχθηκε. Κάθε διαφορετική ρίζα που προκύπτει από τον κάλο αποτελεί ένα καινούργιο μεμονωμένο επεισόδιο γενετικής τροποποίησης. Ο τόνος στην ονομασία υποδεικνύει το δείγμα θετικό στην ενδονουκλεάση T7.

Με μία πρώτη ματιά, φαίνεται πως ο συνδυασμός των δύο οδηγών RNA επέφερε μεταλλάξεις και, μάλιστα, σε μια μοναδική περίπτωση οδήγησαν στην απώλεια ολόκληρου γενετικού τμήματος. Με μεγαλύτερη λεπτομέρεια, είναι δύσκολο να διακριθεί ποιο από τα δύο μόρια είναι πιο αποδοτικό, δεδομένου ότι τα αναμενόμενα προϊόντα δεν έχουν μεγάλη διαφορά στο μέγεθος και η διαδικασία μη ομόλογου ανασυνδυασμού (NHEJ) δεν είναι ακριβής και μπορεί να οδηγήσει σε διαγραφές ή και εισαγωγές.

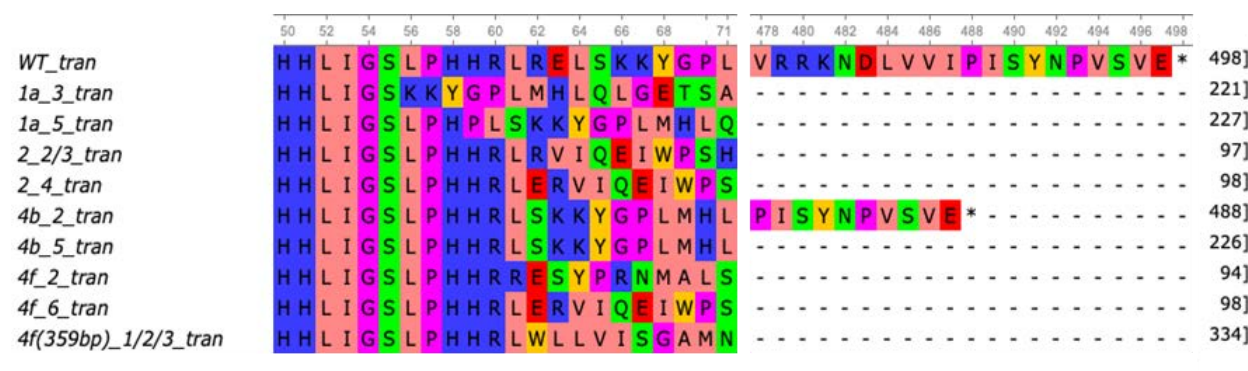
Επιβεβαίωση μεταλλάξεων

Για την καλύτερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, επιλέχθηκε η αλληλούχιση κατά Sanger των παραπάνω θετικών δειγμάτων. Η διαδικασία απαιτήσε ενίσχυση της περιοχής στόχου, διαχωρισμού του προϊόντος σε πηκτή αгарόζης, επιλογή των επιθυμητών μπάντων για καθαρισμό και αποστολή τους με έναν από τους δύο εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση.



Εικόνα 18. Αποτελέσματα αλληλούχισης, κατά Sanger, των δειγμάτων του τελευταίου πειράματος. Στο αριστερό τμήμα της εικόνας μπορούν να εντοπιστούν τα ονόματα των δειγμάτων, με την πρώτη αλληλουχία να αποτελεί αυτή του αγίου τύπου. Σημειώνονται οι περιοχές αναγνώρισης των οδηγών RNA στην κορυφή της εικόνας καθώς και τα αναμενόμενα σημεία κοπής

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, και οι δύο μοριακοί στόχοι έχουν υποστεί αλλαγές στην αλληλουχία τους. Στα συγκεκριμένα δείγματα φαίνεται πως υπάρχει μία προτίμηση προς την διαγραφή νουκλεοτιδίων, όσον αφορά τον πρώτο στόχο και προς την εισαγωγή, όσον αφορά τον δεύτερο.



Εικόνα 19. Αντίκτυπος των μεταλλάξεων στην παραγόμενη πρωτεΐνη, στο αριστερό άκρο εντοπίζονται τα ονόματα των δειγμάτων ενώ στο δεξιό το αντίστοιχο μέγεθος της πρωτεΐνης που προκύπτει.

Τέλος, οι αλλαγές αυτές οδήγησαν σε μεταβολή του μεταφραστικού πλαισίου και η τελική, προβλεπόμενη, αμινοξική αλληλουχία εμφανίζει λιγότερο από 20% ομοιότητα με αυτή του αγρίου τύπου.

Εντοπισμός μη ειδικής στόχευσης

Η ανάλυση δεν ολοκληρώνεται με απλή επιβεβαίωση λειτουργικότητας. Κάθε, *in silico*, σχεδιασμένος οδηγός RNA κατέχει πιθανές θέσεις μη ειδικής στόχευσης. Το λεγόμενο off-score παρέχεται από κάθε βιοπληροφορικό εργαλείο σχεδιασμού οδηγών RNA και χρησιμοποιείται για την εύρεση πιθανών ανεπιθύμητων στόχων στο γονιδίωμα. Η ανάλυση, έπειτα, είναι μία απλή επανάληψη της προαναφερθέντας μεθοδολογίας, προσαρμόζοντας μόνο τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση.

Με την βοήθεια του προγράμματος CRISPR-p έγινε ανάλυση των δύο οδηγών RNA και πρόβλεψη των περιοχών μη ειδικής στόχευσης.

gRNA1_71D					
number of offtarget sites: 19					
top 20 genome-wide off-target sites					
Sequence	Off-score ⑦	MMs⑦	Locus	Gene	Region
TCTTGGAAAACTTCTCAGGAGG	0.398	4MMs	chr0:+184197755		Intergenic
TCTTGGAAAACTTCTCAGGAGG	0.398	4MMs	chr0:-5922119		Intergenic
TCTTGGATAA TACTC ACAGG TGG	0.224	3MMs	chr0:+152805310		Intergenic
TCTTGGATAACTTTCCACACCGG	0.196	4MMs	chr1:+35988761	Lj1g3v3172190	CDS
TCTTCGATTACTCTATCAGGAGG	0.105	3MMs	chr4:+31700503		Intergenic
TGTTGGATCTCACTCTCAGG CAG	0.073	4MMs	chr0:+119417864	Lj0g3v0230519	CDS
TGTTGGATCTCACTCTCAGG CAG	0.073	4MMs	chr4:+37523970	Lj4g3v2803800	CDS
TCATGGATCACTCTCCAGG CAG	0.071	3MMs	chr0:+54542494	Lj0g3v0122049	intron
TCTTTGAAAACTCTCTCAGG AAG	0.062	2MMs	chr0:-78759263	Lj0g3v0165859	exon
TTTTTGAAAACTCTCTCAGG CAG	0.045	4MMs	chr4:-17486500	Lj4g3v1166630	CDS
TCTTTGATAACTCTCACCGTCGG	0.036	4MMs	chr1:-26475076		Intergenic
TGATGGAAAACTCTCTGAGGGGG	0.023	4MMs	chr0:-81221363		Intergenic
TTTGGGATAACTCTTTCAGCCGG	0.016	4MMs	chr0:-140483388	Lj0g3v0271209	CDS
TCATGGCTAACTCTTG CAGGAGG	0.007	4MMs	chr2:+1277260	Lj2g3v0059400	exon
TCATGGCTAACTCTTG CAGGAGG	0.007	4MMs	chr0:+180843150		Intergenic
TCATGGCTAACTCTTG CAGGAGG	0.007	4MMs	chr2:-1364115		Intergenic
TCTTGGAGAA TTCCTGAGGAGG	0.004	4MMs	chr3:+9129473		Intergenic
TCTTGGAAAACTATGTCGGCGG	0.003	4MMs	chr4:-34572284	Lj4g3v2578190	exon
TCTTCGATTACTCGTTCAGGGGG	0.000	4MMs	chr0:-179246837	Lj0g3v0341919	exon

gRNA2_71D

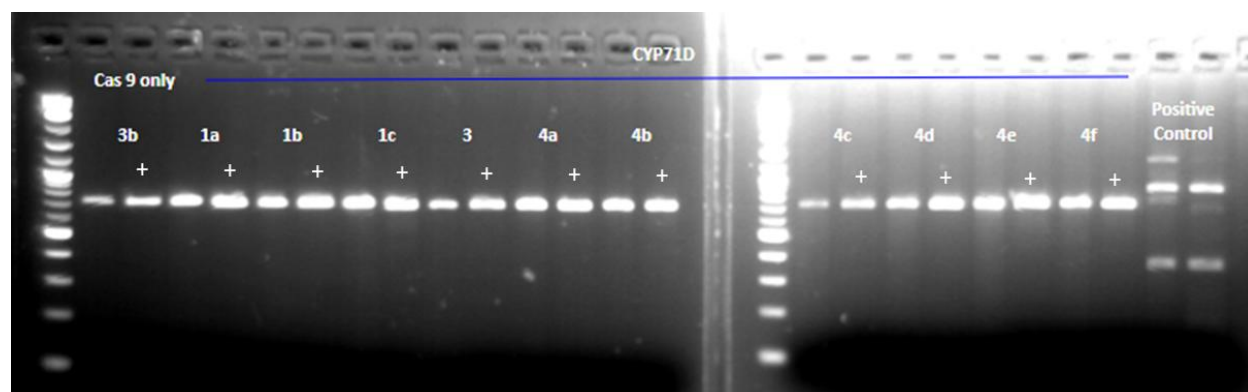
number of offtarget sites: 12

top 20 genome-wide off-target sites

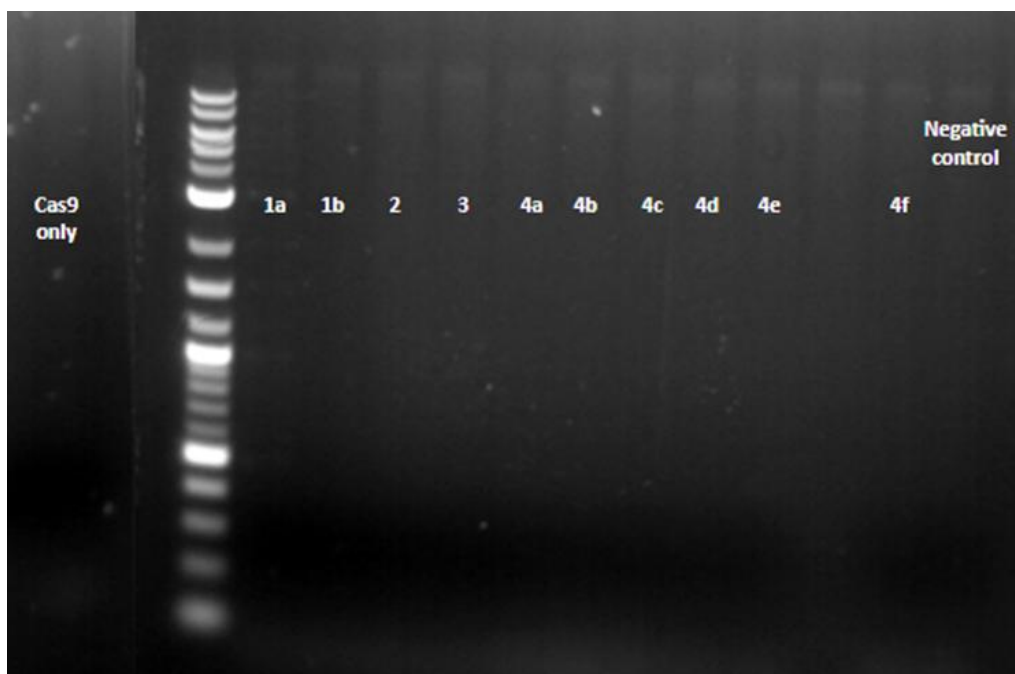
Sequence	Off-score ⑦	MMs⑦	Locus	Gene	Region
TAA CC ACATGTAGCCA ACGT TGG	0.362	3MMs	chr0:-140483880	Lj0g3v0271219	CDS
TAATCA TA AGTAGCCA ATGA AGG	0.274	4MMs	chr0:+1054671	Lj0g3v0002899	intron
TAATCA TA AGTAGCCA ATGA AGG	0.274	4MMs	chr0:+130310854	Lj0g3v0251229	exon
TAATCA TA AGTAGCCA ATGA AGG	0.274	4MMs	chr0:+83549127		Intergenic
TAATCA TA AGTAGCCA ATGA AGG	0.274	4MMs	chr0:+1047784		Intergenic
TAATCA TA AGTAGCCA ATGA AGG	0.274	4MMs	chr0:-35743474	Lj0g3v0087789	intron
TAAT TA CAAGTAGCCA TTAT TGG	0.073	4MMs	chr4:+26251627	Lj4g3v1880940	intron
CAAT CACAGGTAGCC GGTGT GGG	0.071	4MMs	chr0:+139854352	Lj0g3v0269919	exon
CAAT CACAGGTAGCC GGTGT GGG	0.071	4MMs	chr0:-160897793	Lj0g3v0308209	exon
TAA AC ACAAGTAGCC GACCT TAG	0.010	4MMs	chr0:-70179157	Lj0g3v0150739	intron
TTCT CACAAGTAGCTAGCG CTAG	0.000	4MMs	chr1:+4023115		Intergenic
TTCT CACAAGTAGCTAGCG CTAG	0.000	4MMs	chr1:+3990350	Lj1g3v0318800	intron

Εικόνα 20. Ανάλυση της μη ειδικής στόχευσης με την βοήθεια του προγράμματος CRISPR-p, στην κορυφή φαίνονται οι στόχοι του πρώτου οδηγού RNA και από κάτω του δεύτερου, ως χρωμόσωμα 0 ορίζονται οι περιοχές του γονιδιώματος του *L. japonicus* που ακόμα δεν είναι γνωστό που ανήκουν. Η στήλη “MMs” περιγράφει τον αριθμό αναντιστοιχιών (mismatches) που έχει ο κάθε οδηγός RNA με την αλληλουχία του μη ειδικού-στόχου.

Για τον έλεγχο ύπαρξης μεταλλάξεων στους μη ειδικούς στόχους, επιλέχθηκαν οι δύο πρώτες περιοχές στόχοι για τον πρώτο και τον δεύτερο οδηγό RNA.



Εικόνα 21. Δοκιμασία ανίχνευσης μεταλλάξεων στην πρώτη περιοχή μη ειδικής στόχευσης του πρώτου οδηγού RNA με την βοήθεια της δοκιμασίας T7E1. Στην προκειμένη περίπτωση, ο σταυρός ορίζει το δείγμα θετικό στην ενδονουκλεάση. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 4f της ανάλυσης με τους εκκινητές της μεταλλαγμένης περιοχής του γονιδίου *CYP71D353*



Εικόνα 22. Δοκιμασία ανίχνευσης μεταλλάξεων στην πρώτη περιοχή μη ειδικής στόχευσης του δευτέρου οδηγού RNA μετά την ενίσχυση της στοχευμένης αλληλουχίας. Η δοκιμασία επαναλήφθηκε πολλαπλές φορές και κάθε φορά η ενίσχυση απέτυχε.

Σε κάθε περίπτωση δεν ανιχνεύτηκε μη ειδική στόχευση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως οι περιοχές που κατατάσσονται στο χρωμόσωμα 0 δεν ενισχύονται πάντα. Το τεχνητό χρωμόσωμα αποτελείται από μη συναρμολογημένες περιοχές του γονιδιώματος που προκύπτουν από κενά στα δεδομένα αλληλούχησης. Τα κενά αυτά οφείλονται συνήθως στην δυσκολία σωστής ενίσχυσης των περιοχών κατά την αλληλούχηση λόγω της φύσεώς τους (Mun et al. 2016).

Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλάξεων

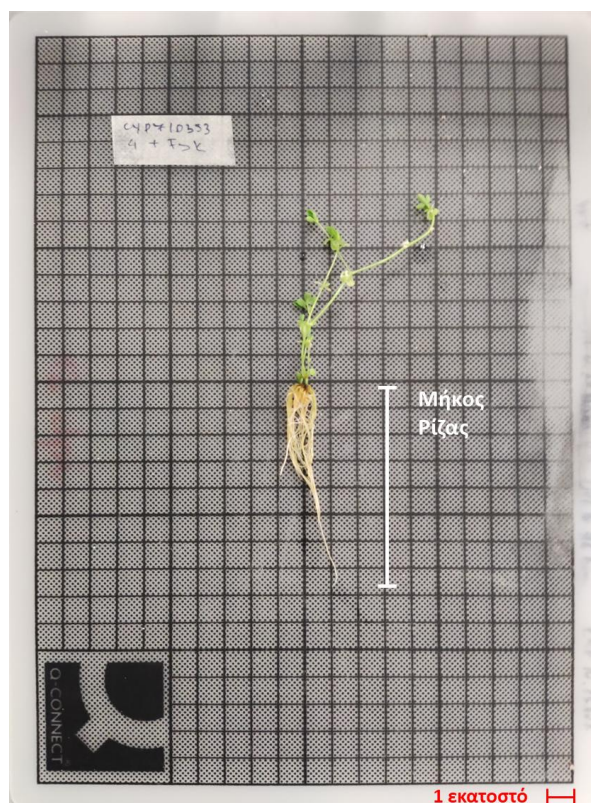
Όσον αφορά το ριζικό σύστημα του *Lotus japonicus*, προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως σε πειράματα σίγησης του γονιδίου *AMY2*, στα οποία υπήρχε χαμηλότερη ποσότητα β-αμυρίνης και διυδρολουπεόλης, υπήρχε μικρότερη ανάπτυξη του υπόγειου τμήματος (Krokida et al 2013). Παράλληλα, ο αποικισμός του φυτού από το ενδόφυτο *FsK* οδηγεί σε αύξηση της ανάπτυξης των ριζών (Avramidou et al. 2024). Τέλος, φαίνεται πως στα αρχικά στάδια του αποικισμού παρουσιάζεται αυξημένη έκφραση του γονιδίου *AMY2*, που πιθανόν έχει αρνητική επίδραση στον αποικισμό αφού μεταλλάγματα *amy2* και *cyp71d353* εμφανίζουν αύξηση του αποικισμού (μη δημοσιευμένα δεδομένα). Με βάση τα παραπάνω, κρίθηκε εύλογη η σύγκριση των επιπέδων αποικισμού και, ταυτόχρονα, η μελέτη του μεγέθους του φυτού μεταξύ των μετασχηματισμένων ριζών.

Ανίχνευση αποικισμού

Έγινε μελέτη του αποικισμού στις μετασχηματισμένες ρίζες. Για την ανίχνευσή του στοχεύτηκε ένα ενδογενές, ιδιοσύστατο γονίδιο του FsK, που κωδικοποιεί για τον παράγοντα Translation Elongation Factor 1a-TEF. Η ανάλυση έγινε με την βοήθεια ποσοτικής PCR. Για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις πλασμιδιακού φορέα που φέρει το προϊόν ενίσχυσης TEF. Η ανάλυση δεν απέδωσε διαφορετικές τιμές μεταξύ των εμβολιασμένων δειγμάτων και μη, ενώ όλες οι τιμές ήταν αρκετά χαμηλές, υποδεικνύοντας πως ο αποικισμός των ριζών δεν πέτυχε.

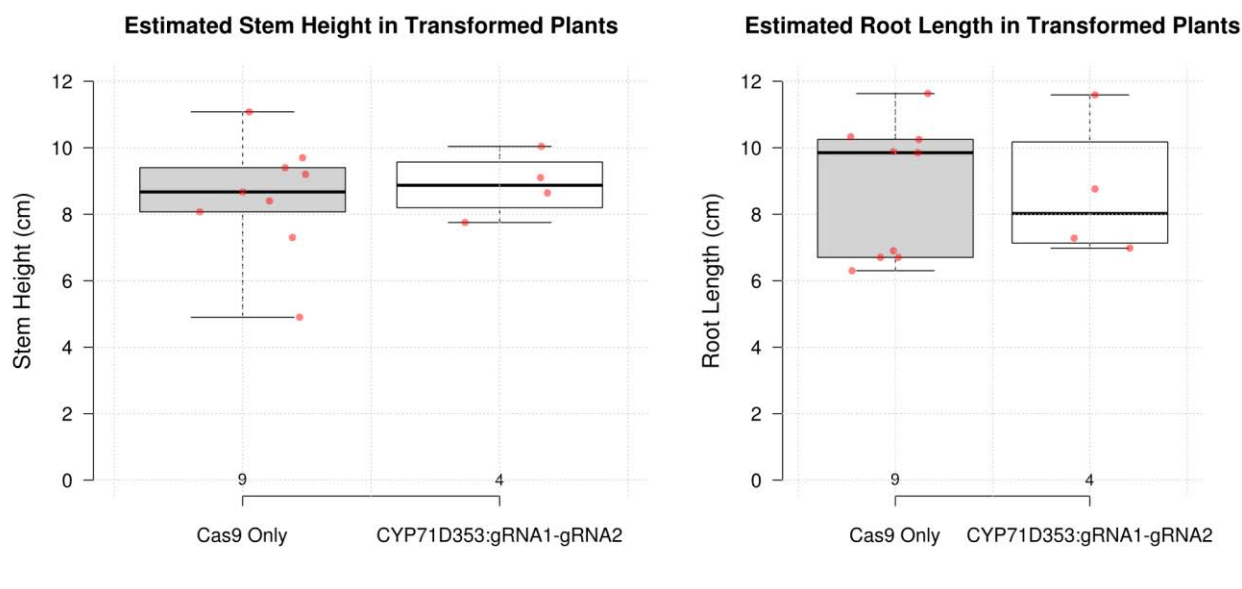
Μέτρηση μεγέθους φυτών

Πριν την δειγματοληψία, λήφθηκαν φωτογραφίες των φυτών. Αρχικός σκοπός, αποτέλεσε η σύγκριση μετασχηματισμένων ριζών-μαρτύρων με ρίζες KO (knock-out) για το γονίδιο *CYP71D353*, παρουσία και απουσία του ενδόφυτου. Ωστόσο, δεδομένου επιπλοκών στα πειράματα -ύπαρξη πολλών επιμολύνσεων που οδήγησαν σε μικρό αριθμό φυτών και αδυναμίας αποικισμού των ριζών από το ενδόφυτο- δεν έγινε σύγκριση παρουσία και απουσία FsK και έγινε μόνο των φυτών-ελέγχου “Cas9 only” με εκείνων που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο. Η μέτρηση αξιολογεί το μέγεθος του μεγαλύτερου βλαστού και της μεγαλύτερης ρίζας του φυτού.



Εικόνα 23. Ανάλυση του μεγέθους της ρίζας σε κάθε φυτό, κάθε κουτάκι αντιστοιχεί σε ένα εκατοστό μεγέθους, ως μέγεθος ρίζας υπολογίστηκε το μέγεθος της μεγαλύτερης ρίζας του φυτού

Για την εύρεση στατιστικών διαφορών αξιοποιήθηκε ο έλεγχος Mann-Whitney U. Η ανάλυση δεν υπέδειξε κάποια, στατιστικά, σημαντική απόκλιση μεταξύ των φυτών και στις δύο περιπτώσεις.



Εικόνα 24. Σύγκριση του μεγέθους του βλαστού (αριστερά, $p = 0.49$) και του μεγέθους της μεγαλύτερης ρίζας (δεξιά, $p = 0.28$) ανάμεσα στα φυτά ελέγχου “Cas9 only” και τα φυτά “CYP71D353” σε εκατοστά, οι ακραίες τιμές της ανάλυσης εμφανίζονται ως τα όρια του Boxplot, με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι τιμές

5. Συμπεράσματα και Συζήτηση

Η οικογένεια των ψυχανθών φέρει τεράστια οικονομική σημασία από τα βάθη της νεολιθικής εποχής μέχρι και σήμερα. Με το πέρας της πράσινης επανάστασης και την εξάπλωση του δυτικού προτύπου διατροφής, ο άνθρωπος κατέφυγε στην μαζική παραγωγή των ορυκτών λιπασμάτων, την χρήση χημικών για την προστασία από βιοτικούς παράγοντες και την απλοποίηση σε μονοκαλλιέργειες, αποφεύγοντας την θετική συμβολή των ψυχανθών στις σοδειές, την διατροφή και το περιβάλλον. Ως αποτέλεσμα, φαινόμενα όπως η κλιματική αλλαγή, η μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα και ο ευτροφισμός να απειλούν την βιοποικιλότητα των οικοσυστημάτων και να θέτουν πολλά ερωτήματα για την βιωσιμότητα των παραπάνω μεθόδων.

Τα τελευταία χρόνια, με την αποκάλυψη των περιβαλλοντικών, ηθικών και διατροφικών επιπλοκών του τωρινού συστήματος, η καλλιέργεια των ψυχανθών έχει αρχίσει να ανακάμπτει. Το 2020, αξιοποιήθηκαν 930.000 τετραγωνικά χιλιόμετρα που απέδωσαν περίπου 90 εκατομμύρια τόνους όγκο παραγωγής (Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2020). Τα ψυχανθή εμφανίζουν την μοναδική ικανότητα να πραγματοποιούν συμβιωτικές σχέσεις όχι μόνο με μυκορριζικούς και ενδοφυτικούς μύκητες αλλά και με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Οι αλληλεπιδράσεις του ριζικού συστήματος με συμβιωτικούς οργανισμούς συμβάλλουν στον βιολογικό εμπλουτισμό του εδάφους με ατμοσφαιρικό N₂ (Yao et al. 2024), προστατεύουν από βιοτικές (Kavroulakis et al., 2007; Pappas et al. 2018; Garantonakis et al. 2018) και αβιοτικές καταπονήσεις (Kavroulakis et al. 2018; Upadhyay et al. 2025) και οδηγούν στην κινητοποίηση μακρο- και μικροστοιχείων στην ριζόσφαιρα (Avramidou et al. 2024). Η εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης φαίνεται να συνδέεται με εξειδικευμένους μεταβολίτες της κατηγορίας των τριτερπενίων (Krokida et al. 2013; Delis et al. 2011). Τα τριτερπένια είναι μια μεγάλη οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών γνωστών για την αντικαρκινική δράση τους (Moses, Papadopolou, and Osbourn 2014). Η διαλεύκανση και εμποροποίηση των μηχανισμών που καθιστούν τα ψυχανθή ιδιαίτερα είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη βιώσιμων γεωργικών πρακτικών, ενώ, παράλληλα μπορεί να αποδώσει καινούργιους φαρμακευτικούς στόχους με θεραπευτικές δράσεις.

Η διερεύνηση της θετικής συμβιωτικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του φυτού-μοντέλου *L. japonicus* και του ενδόφυτου, FsK, υπέδειξε μια σειρά μηχανισμών που την ρυθμίζουν. Βιοσυνθετικά μονοπάτια της β-αμυρίνης και της διυδρολουπεόλης φαίνονται να εμπλέκονται στη ρύθμιση διαφόρων πτυχών των συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων. Με σκοπό την αποσαφήνιση, αυτών των μηχανισμών, σχεδιάστηκαν πειράματα αποσιώπησης των βιοσυνθετικών γονιδίων *AMY2* και *CYP71D353*.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των οδηγών RNA να εισάγουν μεταλλάξεις στα παραπάνω δύο γονίδια. Όσον αφορά το γονίδιο της κυκλάσης οξειδοσκουαλενίου, *AMY2*, καμία από τις δύο σχεδιασμένες μοριακές συσκευές δεν φάνηκε να φέρει λειτουργικότητα. Ωστόσο, αυτό δεν συμφωνεί με προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, που στην περίπτωση της μοριακής στόχευσης χρησιμοποιώντας την συσκευή *AMY2:gRNA4-gRNA5*, οι δύο οδηγοί RNA βρέθηκαν να είναι λειτουργικοί. Συνεπώς, είναι εύλογη η υπόθεση πως δεν ήταν η απουσία λειτουργικότητας των οδηγών RNA, που έδωσε

αρνητικά αποτελέσματα κατά την δοκιμασία T7E1 αλλά η απώλεια μεγαλύτερου τμήματος του T-DNA κατά τον μετασχηματισμό.

Παράλληλα, όσον αφορά το γονίδιο της μονοξυγενάσης του κυτοχρώματος P450, *CYP71D353*, βρέθηκαν λειτουργικοί και οι δύο οδηγοί RNA της συσκευής *CYP71D353:gRNA1-gRNA2*, χωρίς, ταυτόχρονα, να εντοπιστεί μη ειδική στόχευση. Η αλληλούχιση κατά Sanger έδειξε πως οι μεταλλάξεις μετέβαλαν το μεταφραστικό πλαίσιο, οδηγώντας σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης, με αποτέλεσμα οι παραγόμενες πρωτεΐνες να έχουν λιγότερο από 20% ομοιότητα με την αλληλουχία αγρίου τύπου. Προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου, έδειξαν πως τα επίπεδα αποικισμού του ενδοφυτικού *FsK* αυξάνονται σε μεταλλάγματα *amy2* και *cyp71d353*. Θεωρήθηκε, λοιπόν, εύλογος ο έλεγχος των επιπέδων αποικισμού στις μετασχηματισμένες ρίζες του πειράματος. Ο αποικισμός των φυτών-ελέγχου, των φυτών αγρίου τύπου και των διαγονιδιακών ριζών, δεν πέτυχε. Την δεδομένη χρονική περίοδο διεξαγωγής της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, υπήρχαν αρκετές δυσκολίες στην επίτευξη του αποικισμού λόγω προβληματικού στελέχους *FsK*. Τέλος, προηγούμενες μελέτες έδειξαν δυσκολία ανάπτυξης του ριζικού συστήματος μετά από σίγηση του γονιδίου *AMY2*, κατά την μειωμένη παραγωγή β-αμυρίνης και διυδρολουπεόλης, κάτι που υποδεικνύει πιθανό ρόλο αυτού του μονοπατιού στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης, προχωρήσαμε σε σύγκριση του μήκους βλαστού και ρίζας μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων. Η φαινοτυπική ανάλυση του μεγέθους της ρίζας, αλλά και του βλαστού, δεν απέδωσε, στατιστικώς, σημαντική απόκλιση των φυτών που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *CYP71D353* από αυτά που δεν φέρουν. Ωστόσο, ο αριθμός των φυτών που έφεραν την μετάλλαξη ήταν αρκετά μικρός, τρία φυτά με μετασχηματισμένες ρίζες, ενώ παράλληλα η ανάλυση μετράει το μέγεθος της μέγιστης ρίζας. Ο αριθμός αυτός μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικός, διότι μπορεί να έχει μεγάλη απόκλιση από την μέση τιμή των υπόλοιπων ριζών. Μια πιθανή ερμηνεία αυτής της απόκλισης αποτελεί ότι δεν είναι κάθε ρίζα που προκύπτει από τον κάλο μετασχηματισμένη. Συνεπώς, επιλέγοντας για την μεγαλύτερη σε μέγεθος, και όχι για την μέση τιμή, εμφανίζεται μια ελαφριά προκατάληψη προς τις μη μετασχηματισμένες.

Συνοψίζοντας, η επιβεβαίωση λειτουργικότητας της συσκευής *CYP71D353:gRNA1-gRNA2*, χωρίς την ύπαρξη μη ειδικής στόχευσης, επιτρέπει την μετάβασή της στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης. Ακολουθεί η παραγωγή σταθερών μεταλλαγμάτων *Lotus japonicus*, με τελικό σκοπό την διερεύνηση των φαινομένων αποικισμού από ριζόβια και ενδοφυτικούς μύκητες και, συνεπώς, επανάληψη των φαινοτυπικών μελετών.

6. Βιβλιογραφία

- Ambika, Muraleedhar S. Aski, Gayacharan, Aladdin Hamwieh, Akshay Talukdar, Santosh Kumar Gupta, Brij Bihari Sharma, et al. 2022. "Unraveling Origin, History, Genetics, and Strategies for Accelerated Domestication and Diversification of Food Legumes." *Frontiers in Genetics* 13 (July):932430. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.932430>.
- Avramidou, Marianna, Vasileios Balaktsis, Olga Tsiouri, Moez Maghrebi, Gianpiero Vigani, Antonios Sergiou, Nikolaos Ntelkis, Constantinos Ehaliotis, and Kalliope K. Papadopoulou. 2024. "A Fungal Endophyte Increases Plant Resilience to Low Nutrient Availabilities: A Case of Fe Acquisition in Legumes." *Physiologia Plantarum* 176 (5). <https://doi.org/10.1111/ppl.14577>.
- Barrangou, Rodolphe, and Philippe Horvath. 2017. "A Decade of Discovery: CRISPR Functions and Applications." *Nature Microbiology* 2 (7): 17092. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.92>.
- Bernardini, S., A. Tiezzi, V. Laghezza Masci, and E. Ovidi. 2018. "Natural Products for Human Health: An Historical Overview of the Drug Discovery Approaches." *Natural Product Research* 32 (16): 1926–50. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1356838>.
- Bevan, Michael Webster, and Mary-Dell Chilton. 1982. "T-DNA OF THE AGROBACTERIUM TI AND RI PLASMIDS." *Annual Review of Genetics* 16 (1): 357–84. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.16.120182.002041>.
- "Bolotin et al. - 2005 - Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome r.Pdf." n.d.
- Bourgau, F., A. Gravot, S. Milesi, and E. Gontier. 2001. "Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective." *Plant Science* 161 (5): 839–51. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3).
- Chandra, Sheela. 2012. "Natural Plant Genetic Engineer Agrobacterium Rhizogenes: Role of T-DNA in Plant Secondary Metabolism." *Biotechnology Letters* 34 (3): 407–15. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0785-3>.
- Delis, Costas, Afrodite Krokida, Sofia Georgiou, Luis M. Peña-Rodríguez, Nektarios Kavroulakis, Efstathia Ioannou, Vassilios Roussis, Anne E. Osbourn, and Kalliope K. Papadopoulou. 2011. "Role of Lupeol Synthase in *Lotus Japonicus* Nodule Formation." *New Phytologist* 189 (1): 335–46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03463.x>.
- Garantonakis, Nikolaos, Maria L. Pappas, Kyriaki Varikou, Vasiliki Skiada, George D. Broufas, Nektarios Kavroulakis, and Kalliope K. Papadopoulou. 2018. "Tomato Inoculation With the Endophytic Strain *Fusarium Solani* K Results in Reduced Feeding Damage by the Zoophytophagous Predator *Nesidiocoris Tenuis*." *Frontiers in Ecology and Evolution* 6 (August):126. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00126>.
- Gelvin, Stanton B. 2010. "Plant Proteins Involved in *Agrobacterium* -Mediated Genetic Transformation." *Annual Review of Phytopathology* 48 (1): 45–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081852>.
- "Gutierrez-Valdes et al. - 2020 - Hairy Root Cultures – A Versatile Tool With Multiple.Pdf." n.d.
- Gutierrez-Valdes, Noemi, Suvi T. Häkkinen, Camille Lemasson, Marina Guillet, Kirsi-Marja Oksman-Caldentey, Anneli Ritala, and Florian Cardon. 2020. "Hairy Root Cultures – A Versatile Tool With Multiple Applications." *Frontiers in Plant Science* 11 (March):33. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00033>.
- Handberg, Kurt, and Jens Stougaard. 1992. "*Lotus Japonicus* , an Autogamous, Diploid Legume Species for Classical and Molecular Genetics." *The Plant Journal* 2 (4): 487–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.00487.x>.

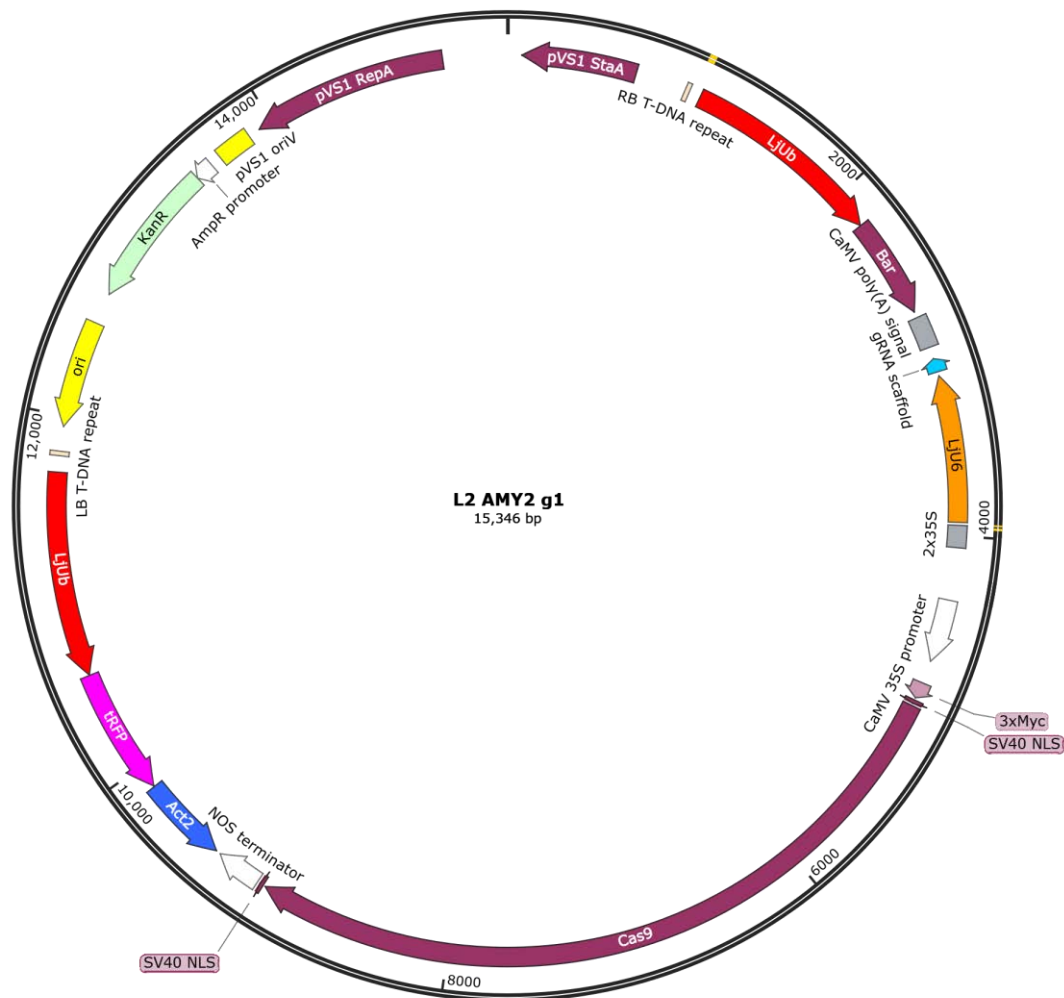
- Hartmann, Thomas. 2007. "From Waste Products to Ecochemicals: Fifty Years Research of Plant Secondary Metabolism." *Phytochemistry* 68 (22–24): 2831–46.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>.
- "Hasanuzzaman et al. - 2020 - The Plant Family Fabaceae Biology and Physiologic.Pdf." n.d.
- Hooykaas, Marjolein J. G., and Paul J. J. Hooykaas. 2021. "The Genome Sequence of Hairy Root *Rhizobium Rhizogenes* Strain LBA9402: Bioinformatics Analysis Suggests the Presence of a New Opine System in the Agropine Ri Plasmid." *MicrobiologyOpen* 10 (2): e1180.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.1180>.
- Ishino, Y, H Shinagawa, K Makino, M Amemura, and A Nakata. 1987. "Nucleotide Sequence of the Iap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia Coli*, and Identification of the Gene Product." *Journal of Bacteriology* 169 (12): 5429–33.
<https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." *Science* 337 (6096): 816–21.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Joubert, Philippe, Daniel Beaupère, Philippe Lelièvre, Anne Wadouachi, Rajbir S Sangwan, and Brigitte S Sangwan-Norreel. 2002. "Effects of Phenolic Compounds on *Agrobacterium* Vir Genes and Gene Transfer Induction – a Plausible Molecular Mechanism of Phenol Binding Protein Activation." *Plant Science* 162 (5): 733–43.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00012-2).
- Kavroulakis, Nektarios, Georgios Doupis, Ioannis E. Papadakis, Constantinos Ehaliotis, and Kalliope K. Papadopoulou. 2018. "Tolerance of Tomato Plants to Water Stress Is Improved by the Root Endophyte *Fusarium Solani* FsK." *Rhizosphere* 6 (June):77–85.
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.04.003>.
- Kawaguchi, Masayoshi. 2000. "Lotus Japonicus 'Miyakojima' MG-20: An Early-Flowering Accession Suitable for Indoor Handling." *Journal of Plant Research* 113 (4): 507–9.
<https://doi.org/10.1007/pl00013961>.
- Khanam, Sheeba, Pooja Mishra, Tabrez Faruqui, Pravej Alam, Thamer Albalawi, Faiza Siddiqui, Zeeshan Rafi, and Salman Khan. 2025. "Plant-Based Secondary Metabolites as Natural Remedies: A Comprehensive Review on Terpenes and Their Therapeutic Applications." *Frontiers in Pharmacology* 16 (May):1587215. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1587215>.
- Krokida, Afrodite, Costas Delis, Katrin Geisler, Constantine Garagounis, Daniela Tsikou, Luis M. Peña-Rodríguez, Dimitra Katsarou, Ben Field, Anne E. Osbourn, and Kalliope K. Papadopoulou. 2013. "A Metabolic Gene Cluster in *L Otus Japonicus* Discloses Novel Enzyme Functions and Products in Triterpene Biosynthesis." *New Phytologist* 200 (3): 675–90. <https://doi.org/10.1111/nph.12414>.
- Lei, Yang, Li Lu, Hai-Yang Liu, Sen Li, Feng Xing, and Ling-Ling Chen. 2014. "CRISPR-P: A Web Tool for Synthetic Single-Guide RNA Design of CRISPR-System in Plants." *Molecular Plant* 7 (9): 1494–96. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu044>.
- "Mojica et al. - 2005 - Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryo.Pdf." n.d.
- Mojica, Francisco J. M., Cesar Díez-Villaseñor, Elena Soria, and Guadalupe Juez. 2000. "Biological Significance of a Family of Regularly Spaced Repeats in the Genomes of Archaea, Bacteria and Mitochondria." *Molecular Microbiology* 36 (1): 244–46.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.
- Moses, Tessa, Kalliope K. Papadopoulou, and Anne Osbourn. 2014. "Metabolic and Functional Diversity of Saponins, Biosynthetic Intermediates and Semi-Synthetic Derivatives."

- Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 49 (6): 439–62.
<https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628>.
- Moses, Tessa, Jacob Pollier, Johan M. Thevelein, and Alain Goossens. 2013. "Bioengineering of Plant (Tri)Terpenoids: From Metabolic Engineering of Plants to Synthetic Biology *in Vivo* and *in Vitro*." *New Phytologist* 200 (1): 27–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12325>.
- Mun, Terry, Asger Bachmann, Vikas Gupta, Jens Stougaard, and Stig U. Andersen. 2016. "Lotus Base: An Integrated Information Portal for the Model Legume *Lotus Japonicus*." *Scientific Reports* 6 (1): 39447. <https://doi.org/10.1038/srep39447>.
- Naito, Yuki, Kimihiro Hino, Hidemasa Bono, and Kumiko Ui-Tei. 2015. "CRISPRdirect: Software for Designing CRISPR/Cas Guide RNA with Reduced off-Target Sites." *Bioinformatics* 31 (7): 1120–23. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>.
- Pappas, Maria L., Maria Liapoura, Dimitra Papantoniou, Marianna Avramidou, Nektarios Kavroulakis, Alexander Weinhold, George D. Broufas, and Kalliope K. Papadopoulou. 2018. "The Beneficial Endophytic Fungus *Fusarium solani* Strain K Alters Tomato Responses Against Spider Mites to the Benefit of the Plant." *Frontiers in Plant Science* 9 (November):1603. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01603>.
- Pourcel, C., G. Salvignol, and G. Vergnaud. 2005. "CRISPR Elements in *Yersinia Pestis* Acquire New Repeats by Preferential Uptake of Bacteriophage DNA, and Provide Additional Tools for Evolutionary Studies." *Microbiology* 151 (3): 653–63. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>.
- Ranner, Josef L., Sabrina Schalk, Cindy Martyniak, Martin Parniske, Caroline Gutjahr, Timo D. Stark, and Corinna Dawid. 2023. "Primary and Secondary Metabolites in *Lotus Japonicus*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 71 (30): 11277–303. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c02709>.
- Redman, Melody, Andrew King, Caroline Watson, and David King. 2016. "What Is CRISPR/Cas9?" *Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition* 101 (4): 213–15. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310459>.
- Skiada, Vasiliki, Antonella Faccio, Nektarios Kavroulakis, Andrea Genre, Paola Bonfante, and Kalliope K. Papadopoulou. 2019. "Colonization of Legumes by an Endophytic *Fusarium Solani* Strain FsK Reveals Common Features to Symbionts or Pathogens." *Fungal Genetics and Biology* 127 (June):60–74. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.03.003>.
- Stougaard, J. 2017. "Lotus Japonicus : A Model Plant for the Legume Family ☆." In *Reference Module in Life Sciences*, B9780128096338066619. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06661-9>.
- Tröder, Simon E, and Branko Zevnik. 2022. "History of Genome Editing: From Meganucleases to CRISPR." *Laboratory Animals* 56 (1): 60–68. <https://doi.org/10.1177/0023677221994613>.
- Upadhyay, R., R. Saini, P. K. Shukla, and K. N. Tiwari. 2025. "Role of Secondary Metabolites in Plant Defense Mechanisms: A Molecular and Biotechnological Insights." *Phytochemistry Reviews* 24 (1): 953–83. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-09976-2>.
- Wiedenheft, Blake, Samuel H. Sternberg, and Jennifer A. Doudna. 2012. "RNA-Guided Genetic Silencing Systems in Bacteria and Archaea." *Nature* 482 (7385): 331–38. <https://doi.org/10.1038/nature10886>.
- Wink, M. 2013. "Evolution of Secondary Metabolites in Legumes (Fabaceae)." *South African Journal of Botany* 89 (November):164–75. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.006>.
- Xu, Yuanyuan, and Zhanjun Li. 2020. "CRISPR-Cas Systems: Overview, Innovations and Applications in Human Disease Research and Gene Therapy." *Computational and*

Structural Biotechnology Journal 18:2401–15. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>.
Yao, Yanzhong, Bingbing Han, Xunzhuo Dong, Yunyao Zhong, Shuli Niu, Xiping Chen, and
Zhaolei Li. 2024. "Disentangling the Variability of Symbiotic Nitrogen Fixation Rate and
the Controlling Factors." *Global Change Biology* 30 (3): e17206.
<https://doi.org/10.1111/gcb.17206>.

7. Παράρτημα

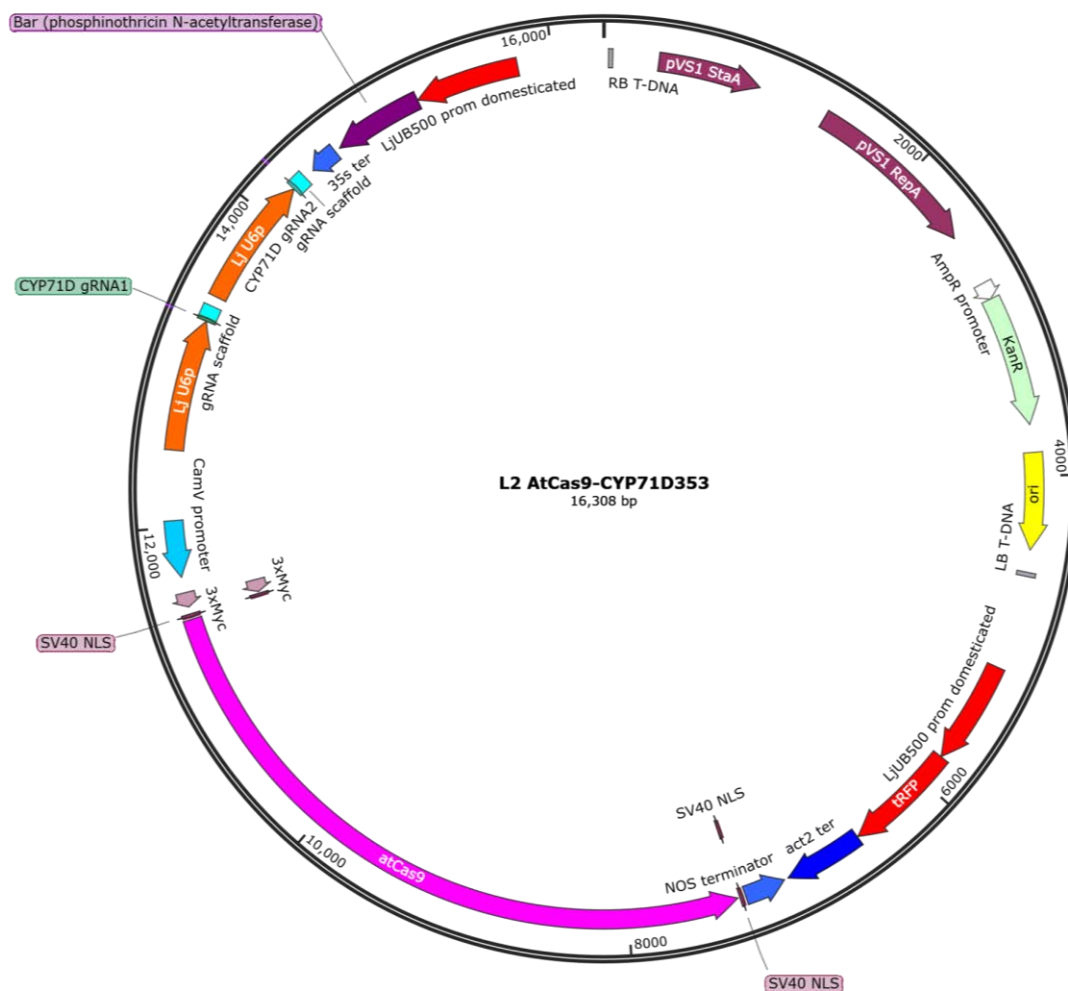
7.1 Χάρτες πλασμιδιακών φορέων



Εικόνα 25. Πλασμιδιακός χάρτης της συσκευής CYP71D353:gRNA1-gRNA2



Εικόνα 26. Πλασμιδιακός χάρτης της συσκευής CYP71D353:gRNA1-gRNA2



Εικόνα 27. Πλασμιδιακός χάρτης της συσκευής CYP71D353:gRNA1-gRNA2

7.2 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εκκινητών

Λόγος ύπαρξης		Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος	Θερμοκρασία τήξης (°C)
Ανίχνευση μεταλλάξεων συσκευής AMY2:gRNA1	Ευθύς	CGGATGGAATTGTTATCCAAG	21	61
	Ανάστροφος	CTGGATGCATAGGAAGAAATG	21	60
Ανίχνευση μεταλλάξεων συσκευής AMY2: gRNA4-gRNA5	Ευθύς	TCAAGAATTCTCAGGTCTGCTT	22	63
	Ανάστροφος	GCACAGCACAAAAAAGAATT	21	60
Ενίσχυση του διαγονιδίου <i>tRFP</i> του T-DNA	Ευθύς	TGGTGTCTCACCCTACTC	20	64
	Ανάστροφος	GCATCACAGGTCCGTTGCTA	20	65
Ενίσχυση του διαγονιδίου <i>Bar</i> του T-DNA	Ευθύς	AGCAGCTCTAAGCATTCCCC	20	65
	Ανάστροφος	TGCCTGCTGTGTGCACTATT	20	65
Ανίχνευση μεταλλάξεων συσκευής CYP71D353: gRNA1-gRNA2	Ευθύς	GATGGAGGATCATTTCTTATCC	22	60
	Ανάστροφος	TGATGGTCAAATGAAATTCAGG	22	60
Ανίχνευση πρώτου μη ειδικού στόχου, συσκευής CYP71D353: gRNA1-gRNA2	Ευθύς	CCCTGTTTAGTGGCTTTTCCC	21	64
	Ανάστροφος	ATGTGCTCTACCCTCTTCCG	20	64
Ανίχνευση δεύτερου μη ειδικού στόχου, συσκευής CYP71D353: gRNA1-gRNA2	Ευθύς	CAGTGGAGCTGTTGAGTGCTTA	22	65
	Ανάστροφος	CTTCAGCATTTCTGAGAACGCC	22	65