



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη μίας νέας μετάλλαξης σχετιζόμενης με την Πολλαπλή
Ανθεκτικότητα στον *Botrytis cinerea* και δημιουργία μεταλλαγμάτων με
χρήση του συστήματος CRISPR/Cas»**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΡΑΟΓΛΑΝΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ρήγα Βασιλεία του Νικολάου

ΛΑΡΙΣΑ 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

BACHELOR'S THESIS

"Insights on a newly found Multidrug Resistance correlated mutation in *Botrytis cinerea* and generation of mutants using the CRISPR/Cas approach"

SUPERVISING PROFESSOR: KARAOGLANIDIS GEORGIOS

PROFESSOR OF PHYTOPATHOLOGY

CO-SUPERVISING PROFESSOR: KARPOYZAS DIMITRIOS

PROFESSOR OF ENVIROMENTAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Riga Vasileia

LARISA 2022

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καραογλανίδης Γεώργιος

Καθηγητής Φυτοπαθολογίας, Τμήμα Γεωπονίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (επιβλέπων).

Καρπούζας Δημήτριος

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (συνεπιβλέπων).

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (μέλος).

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και του Τμήματος Γεωπονίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυτοπαθολογίας κ. Καραογλανίδη Γεωργίου, το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2021 – Ιούλιος 2022.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές που αποτελούν την τριμελή μου επιτροπή, τον επιβλέποντα μου κ. Καραογλανίδη Γεώργιο, τον συνεπιβλέποντα μου κ. Καρπούζα Δημήτριο καθώς και την κα. Παπαδοπούλου Καλλιόπη που δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς επιτροπής. Τους ευχαριστώ για την βοήθεια, την καθοδήγηση και τον χρόνο που αφιέρωσαν καθώς χάρη σε αυτούς τέθηκαν οι βάσεις για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας κ. Καρπούζα Δημήτριο, ο οποίος μου προσέφερε απλόχερα την βοήθεια του από την πρώτη στιγμή. Με καθοδήγησε και με έφερε σε επαφή με συναδέλφους του στο Τμήμα Γεωπονίας του ΑΠΘ ενώ παράλληλα μοιράστηκε μαζί μου πληροφορίες και απόψεις σχετικά με τα διαθέσιμα ερευνητικά αντικείμενα έτσι ώστε να μπορέσω να πραγματοποιήσω μια αξιόλογη μελέτη. Ήταν πάντα διαθέσιμος να δώσει απαντήσεις στις απορίες που μου προέκυπταν και αποτέλεσε την βάση για την πραγμάτωση της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω επίσης να εκφράσω στον Καθηγητή Φυτοπαθολογίας κ. Καραογλανίδη Γεώργιο ο οποίος, παρότι δεν υπήρξα φοιτήτρια του Τμήματος Γεωπονίας, δέχτηκε με μεγάλη χαρά να συνεργαστούμε και με καλωσόρισε στο εργαστήριο φυτοπαθολογίας. Ήταν τιμή μου να τον γνωρίσω και να μου επιτρέψει να εργαστώ για σχεδόν ένα χρόνο δίπλα του καθώς αποτελούσε μόνιμη πηγή γνώσης για όλους τους συνεργάτες του εργαστηρίου όπως και για μένα. Χάρη στον κ. Καραογλανίδη είχα πρόσβαση στον απαραίτητο εξοπλισμό για την εκτέλεση των πειραμάτων μου και φυσικά η πόρτα του ήταν πάντα ανοιχτή για τυχόν απορίες και ανησυχίες μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και ευγνωμοσύνη οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Σοφιανό ο οποίος υπήρξε εξαιρετικός συνεργάτης, και μετέπειτα φίλος, καθ' όλη την πορεία της εργασίας

μου. Μοιραστήκαμε απόψεις, γνώσεις και εμπειρίες κατορθώνοντας τελικά το επιθυμητό αποτέλεσμα. Αποτέλεσε έναν άψογο συνάδελφο του οποίου η στήριξη και η καθοδήγηση ήταν απαραίτητα συστατικά για την επιτυχημένη ολοκλήρωση της εργαστηριακής μου πορείας και ελπίζω να συνεργαστούμε ξανά στο μέλλον.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για την άψογη συνεργασία, την ευγένεια τους και την ευχάριστη ατμόσφαιρα που επικρατούσε σε όλη την διάρκεια της παραμονής μου εκεί.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη που μου χάρισαν απλόχερα. Η απεριόριστη κατανόηση και υπομονή που μου έδειχναν καθημερινά αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη μου.

Περίληψη

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* είναι ένα αερομεταφερόμενο παθογόνο των φυτών του οποίου η νεκροτροφική φύση αποτελεί απειλή για περισσότερα από 200 είδη καλλιεργητικών φυτών παγκοσμίως. Αν και υπάρχει πλήθος μυκητοκτόνων για τον έλεγχο εξάπλωσής του, πολλές κατηγορίες των σκευασμάτων αυτών έχουν αποδειχτεί μη αποτελεσματικές κυρίως λόγω της γενετικής του πλαστικότητας. Με τις φθορές των καλλιεργειών να αγγίζουν πολύ υψηλά ποσοστά, ο *B. cinerea* αποδείχθηκε ως μία υπολογίσιμη απειλή η οποία χρήζει αντιμετώπισης. Την λύση στο πρόβλημα αυτό έρχεται να δώσει η γενετική μηχανική μέσω του συστήματος CRISPR/Cas. Το σύστημα CRISPR/Cas αποτελεί μία τεχνολογία επεξεργασίας του γονιδιώματος η οποία έχει ανοίξει νέες διεξόδους στην Λειτουργική Βιολογία. Πλέον έχουν αναπτυχθεί πολλά πρωτόκολλα για χρήση του συστήματος CRISPR/Cas και σε μικροοργανισμούς όπως οι μύκητες με μεγάλα ποσοστά επιτυχίας. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήσαμε ένα πρωτόκολλο το οποίο αξιοποιεί τις ικανότητες της τεχνολογίας αυτής με στόχο την προσθήκη μίας νέας μετάλλαξης, V575G, στο γονιδίωμα του μύκητα *B. cinerea*. Η μετάλλαξη αυτή φαίνεται να συμμετέχει στον φαινότυπο MDR1 ο οποίος παρατηρείται συχνά στον μύκητα. Οι φαινότυποι MDR (Multidrug Resistance), δηλαδή η εμφάνιση στελεχών με ανθεκτικότητα σε πολλαπλά μυκητοκτόνα, αποτελούν ένα αρκετά σημαντικό εμπόδιο στην καταπολέμηση του *B. cinerea* καθώς καθιστούν την αντιμετώπιση του ιδιαίτερα απαιτητική. Η επιτυχημένη εισαγωγή της μετάλλαξης στο γονιδίωμα του μύκητα την κατέδειξε ως υπαίτια για την εμφάνιση ανθεκτικότητας στο σκεύασμα fludioxonil ενώ παράλληλα αναπτύχθηκε ένας οργανισμός που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για την λεπτομερέστερη μελέτη του MDR1 φαινοτύπου.

Abstract

The fungus *Botrytis cinerea* is an airborne plant pathogen whose necrotrophic nature poses a threat to more than 200 species of crop plants worldwide. Although there are a number of fungicides to control its spread, many classes of these formulations have proven ineffective mainly due to its genetic plasticity. With crop damage reaching very high rates, *B. cinerea* has proven to be a considerable threat that needs to be addressed. The solution to this problem could be provided by genetic engineering through the CRISPR/Cas system. The CRISPR/Cas system is a genome editing technology that has opened new avenues in Functional Biology. Several protocols have now been developed to use the CRISPR/Cas system in microorganisms such as fungi with high success rates. In this particular study we used a protocol that exploits the capabilities of this technology with the aim of adding a new mutation, V575G, to the genome of the fungus *B. cinerea*. This mutation appears to be involved in the MDR1 phenotype that is frequently observed in the fungus. MDR (Multidrug Resistance) phenotypes, i.e. the emergence of strains with resistance to multiple fungicides, are a key obstacle in the fight against *B. cinerea* as they make its treatment particularly demanding. The successful introduction of the mutation into the genome of the fungus showed it to be responsible for the emergence of resistance to the fungicide fludioxonil while at the same time we developed a model-organism that can be used for the more detailed study of the MDR1 phenotype.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή.....	11
1. Βοτρύτης (<i>Botrytis cinerea</i>).....	11
1.1 Βασικά χαρακτηριστικά του μύκητα <i>B. cinerea</i>	11
1.2 Βιολογία Παθογόνου.....	12
1.3 Επιδημιολογία Παθογόνου.....	15
1.3.1 Ανάπτυξη Σκληρωτίων.....	17
1.3.2 Κονιδιοποίηση.....	17
1.4 Καταπολέμηση.....	18
1.4.1 Βιολογική Καταπολέμηση.....	18
1.4.2 Χημική Καταπολέμηση.....	20
2. Ανθεκτικότητα.....	23
2.1 Ανθεκτικότητα του <i>Botrytis cinerea</i> σε μυκητοκτόνα.....	24
2.2 Ανάπτυξη και μηχανισμός ανθεκτικότητας στα DFCs.....	25
2.3 Ανάπτυξη και μηχανισμός ανθεκτικότητας στα QoIs.....	25
2.4. Ανάπτυξη και μηχανισμός ανθεκτικότητας στα SDHIs.....	26
2.5. Ανάπτυξη και μηχανισμός ανθεκτικότητας στα PPs.....	26
2.6. Ανάπτυξη και μηχανισμός ανθεκτικότητας στις APs.....	27
2.7. Πολλαπλή ανθεκτικότητα (MLR, MULTIPLE RESISTANCE).....	28
2.8. Multidrug Resistance (MDR).....	28
3. CRISPR/Cas9.....	32
3.1 Τα στοιχεία-κλειδιά του συστήματος CRISPR/Cas9.....	32

3.2. Το σύστημα CRISPR/Cas.....	32
3.3. Ταξινόμηση του συστήματος CRISPR/Cas.....	33
3.4. Γενετική τροποποίηση μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9.....	34
4. Εφαρμογές του συστήματος CRISPR/Cas9.....	36
4.1. Επεξεργασία Γονιδιώματος.....	36
4.2. Ρύθμιση της Μετάφρασης.....	37
4.3. Γονιδιακή Θεραπεία.....	38
5. Γενετική τροποποίηση του <i>B. cinerea</i> μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9.....	39

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. Στόχος Πτυχιακής Εργασίας.....	41
7. Υλικά και Μέθοδοι.....	42
7.1 Στελέχη <i>B. cinerea</i>	42
7.2 Σχεδιασμός και Επιλογή του sgRNA.....	42
7.2.1 Σύνθεση sgRNA με χρήση του HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit	42
7.3 In vitro παραγωγή sgRNA.....	44
7.3.1 Προετοιμασία του καλουπιού DNA για τη σύνθεση του gRNA.....	45
7.3.2. Καθαρισμός των small RNAs.....	46
7.4 Σχεδιασμός και επιλογή repair/donor template.....	47
7.5 Προετοιμασία και μετασχηματισμός πρωτοπλαστών.....	48
7.5.1 Πρωτόκολλο προετοιμασίας πρωτοπλαστών.....	49
7.5.2 Πρωτόκολλο μετασχηματισμού πρωτοπλαστών.....	50
7.6. Πρωτόκολλο δράσης της Cas9.....	51

8. Αποτελέσματα.....	52
9. Συζήτηση.....	57
10. Βιβλιογραφία.....	59

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Βοτρύτης (*Botrytis cinerea*)

1.1 Βασικά χαρακτηριστικά του μύκητα *B. cinerea*

Ο *Botrytis cinerea* αποτελεί ένα νεκροτροφικό παθογόνο ασκομύκητα ο οποίος προκαλεί σημαντικές απώλειες σε περισσότερα από 200 διαφορετικά είδη καλλιεργούμενων φυτών παγκοσμίως. Το όνομα *Botrytis cinerea* έχει προέλευση από την λατινική φράση «σταφύλια σαν στάχτες», με τα σταφύλια να αναφέρονται στην χαρακτηριστική δομή των κονιδιοφόρων του μύκητα ενώ οι στάχτες στην τεφρά σήψη (gray rot, gray mold), την ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας στα φυτά που μολύνει (Williamson et al., 2007).

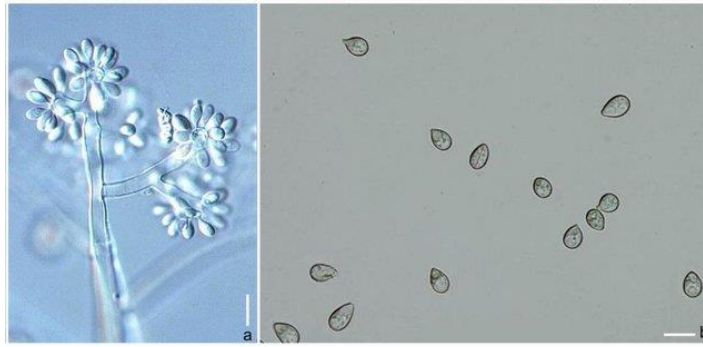
Ως είδος περιγράφηκε πρώτη φορά το 1794 από τον Christiaan Hnedrik Persoon και ανήκει στο φύλο Ascomycota, τάξη Leotiomycetes και οικογένεια Sclerotiniaceae. Το γένος *Botrytis* αποτελείται από 32 είδη οπού σχεδόν όλα είναι νεκροτροφικά παθογόνα τα οποία δρουν προωθώντας τον κυτταρικό θάνατο και την κυτταρική λύση ώστε να έχουν πρόσβαση στα θρεπτικά συστατικά του κυττάρου. Στην πλειοψηφία τους, τα είδη που ανήκουν στο γένος *Botrytis* θεωρούνται εξειδικευμένα παθογόνα καθώς έχουν ένα πολύ στενό φάσμα ξενιστών μολύνοντας ένα είδος ή μια μικρή ομάδα συγγενικών ειδών. Παρόλα αυτά υπάρχουν εξαιρέσεις, με μία από αυτές να αποτελεί το είδος *Botrytis cinerea* καθώς προκαλεί την ασθένεια της τεφράς σήψης σε πάνω από 500 διαφορετικά είδη φυτών, περισσότερα εκ των οποίων είναι δικότυλα. Επιπλέον ο *B. cinerea* παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τόσο από περιβαλλοντική όσο και από επιστημονική άποψη, εξαιτίας της τάσης του να εμφανίζει ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα (Cheung et al., 2020).



Εικόνα 1. Τεφρά σήψη (gray mold) σε καρπούς φράουλας

1.2 Βιολογία Παθογόνου

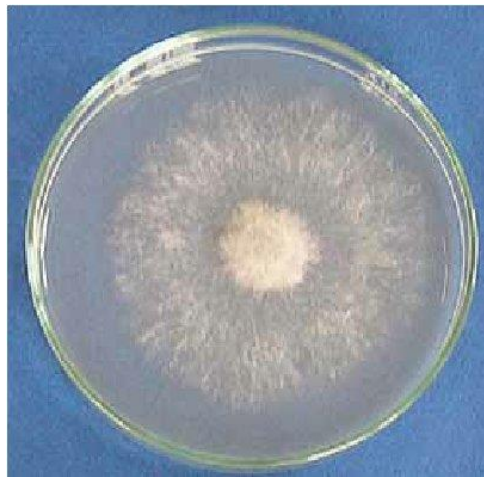
Ο *Botrytis cinerea* είναι ένα νεκροτροφικό φυτόπαθογόνο το οποίο μεταφέρεται μέσω του αέρα. Η επιτυχία του ως παθογόνο οφείλεται στους ευέλικτους τρόπους μόλυνσης, τον υψηλό ρυθμό αναπαραγωγής, το ευρύ φάσμα ξενιστών και την μεγάλη ικανότητα επιβίωσης του. Ο μύκητας μεταφέρεται κυρίως μέσω του αέρα και μπορεί να επιβιώσει για μεγάλες χρονικές περιόδους υπό την μορφή κονιδίων ή και σε μικρές σκληρές μάζες μυκηλίων που ονομάζονται σκληρώτια. Η μόλυνση των φυτών ξενιστών μπορεί να ξεκινήσει είτε από πληγωμένους ιστούς είτε από φυσικά ανοίγματα στην επιφάνεια των φυτών, τα οποία επιτρέπουν στον μύκητα να ξεκινήσει την διαδικασία επιμόλυνσης. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι οι ιστοί που μολύνθηκαν πρώτοι παρουσιάζουν περιορισμένες καταστροφές όμως η τεράστια παραγωγή κονιδίων οδηγεί σε αύξηση της εξάπλωσης της μόλυνσης. Όσον αφορά τα φυτά με καρπούς, βασικά σημεία μόλυνσης αποτελούν τα ανθικά όργανα και μάλιστα ο μύκητας διαθέτει εξειδικευμένους μηχανισμούς μόλυνσης διαφορετικούς για τα διάφορα είδη φυτών (Viret et al., 2004). Για παράδειγμα, στα μούρα και τις φράουλες, το στιγματικό υγρό λειτουργεί τόσο ως κολλητικός παράγοντας όσο και ως θρεπτικό μέσο για τα αερομεταφερόμενα κονίδια (McNicol et al., 1985). Έπειτα τα κονίδια βλαστάνουν και αναπτύσσουν υφές. Τα μυκήλια τότε μπορούν να αναπτυχθούν σύμφωνα με το μονοπάτι που φυσιολογικά καταλαμβάνει η γύρη, μπαίνοντας στο καρπόφυλλο και εισβάλλοντας έτσι στις ωοθήκες του φυτού. Μετά την αρχική μόλυνση, ο μύκητας εισέρχεται σε μία σύντομη φάση κατά την οποία δημιουργεί μία βιοτροφική σχέση με το φυτό-ξενιστή. Η φάση αυτή δεν έχει μεγάλη διάρκεια και ακολουθείται από μία επιθετική νεκροτροφική φάση η οποία πυροδοτείται από βιοχημικές αλλαγές όπως αύξηση των επιπέδων των πτητικών οργανικών ενώσεων, της ζάχαρης και του αζώτου στους φυτικούς ιστούς που έχουν ωριμάσει. Στο στάδιο αυτό, ο μύκητας εκκρίνει τοξικούς παράγοντες όπως οξαλικό οξύ (OA), ένζυμα που καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα (CWDEs) και ανάλογα φυτικών ορμονών. Αποτέλεσμα των διαδικασιών αυτών είναι η διατάραξη του μεταβολισμού, του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και της κυτταρικής δομής του φυτού. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των τοξικών αυτών παραγόντων στα φυτά ξενιστές είναι το σάπισμα των καρπών προκαλώντας μαύρισμα και αλλοίωση της επιφάνειάς τους. Συγκεκριμένα, ο *B. cinerea* υφίσταται ταχύτατη ανάπτυξη μυκηλίων στις επιφάνειες του φυτού και δημιουργεί μεγάλες γκρι μάζες κονιδίων οι οποίες μπορούν να εξαπλωθούν τόσο σε ολόκληρη την επιφάνεια του φυτού όσο και στα διπλανά φυτά. Αφού σκοτώσει τους φυτικούς ιστούς, ο *B. cinerea* μπορεί να συνεχίσει να αναπτύσσεται σαπροφυτικά στα κατάλοιπα του φυτού υπό την μορφή μυκηλίων και σκληρωτίων (Cheung et al., 2020).



Εικόνα 2a. Μάζες κονιδίων προσκολλημένα στα άκρα κονιδιοφόρων

Εικόνα 2b. Πολυπύρηννα ελλειψοειδή κονίδια

Jayawardena et al., 2018

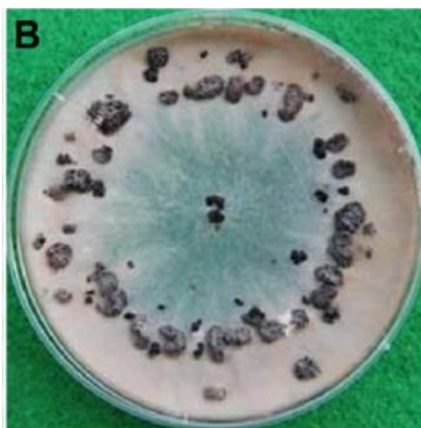


Εικόνα 3. Λευκό ομοιόμορφο μυκήλιο του *B. cinerea*

Milica Mihajlovic et al., 2014

Η σημαντικότερη κατασκευή επιβίωσης του μύκητα είναι τα σκληρώτια, τα οποία μπορεί να ποικίλουν σε σχήμα και μέγεθος, ανάλογα με το στέλεχος του παθογόνου και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτές οι ειδικές κατασκευές επιβίωσης του μύκητα σχηματίζονται σε αντίξοες συνθήκες και όταν είναι ώριμες μπορούν να βλαστήσουν προς κονιδιοφόρους αν επικρατούν θερμοκρασίες 3-27 °C (Jarvis et al., 1977). Μπορούν επίσης να βλαστήσουν προς αποθήκια ή μυκήλιο (Holz G et al., 2004). Στον αγρό, τα σκληρώτια βλαστάνουν κυρίως την άνοιξη και το φθινόπωρο (Vanev et al., 1966, Kublitskaya and Ryabtseva et al., 1970). Η βλάστησή τους, σύμφωνα με τους Hsiang και Chastagner (1992), αποτελεί την πηγή μόλυσματος για τις πρωτογενείς μολύνσεις στην αρχή της καλλιεργητικής περιόδου (Grant-Downton et al., 2016). Η μελανίνη που περιέχεται στο περίβλημά τους και οι β-γλυκάνες που

περικλύουν το εσωτερικό μυκήλιο, προστατεύουν τα σκληρώτια από αφυδάτωση, UV ακτινοβολία αλλά και μικροβιακές απειλές για μεγάλο χρονικό διάστημα (Backhouse, D. & Willets, H.J. et al., 1984).



Εικόνα 4. Σκληρώτια του *B. cinerea* σε άγαρ δεξτρόζης πατάτας

Kwon et al., 2011

Σε περιπτώσεις μη ευνοϊκών συνθηκών μικρότερης διάρκειας, το παθογόνο σχηματίζει ένα άλλο όργανο επιβίωσης, τα χλαμυδοσπόρια. Περιγράφηκαν από τους Price (1911) και Brierley (1918) σε καλλιέργειες του μύκητα *B. cinerea*. Είναι μικρότερα από τα μακροκονίδια, απαντώνται σε διάφορα σχήματα και μεγέθη και είναι υαλώδη με λεπτά τοιχώματα (Urbasch et al., 1983). Σχηματίζονται σε επιμολυσμένες ή γηρασμένες υφές του μύκητα και σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και επάρκειας θρεπτικών συστατικών στις φυτικές επιφάνειες μπορούν να βλαστήσουν προς μυκηλιακή υφή ή κονίδια (Holz G et al., 2004). Ο μύκητας μπορεί επίσης να επιβιώσει και σαν μυκήλιο σε νεκρούς προσβεβλημένους ιστούς του ξενιστή, που μπορεί να υφίστανται υπό την μορφή φυτικών υπολειμμάτων στον αγρό (Strömeng et al., 2009) αλλά και μέσα σε ορισμένους σπόρους.

Ο *Botrytis cinerea* αναπαράγεται τόσο αγενώς όσο και εγγενώς. Όσον αφορά την αγενή αναπαραγωγή, αυτή πραγματοποιείται με παραγωγή κονιδίων (μακροκονίδια) πάνω στους κονιδιοφόρους που σχηματίζονται από τις μυκηλιακές υφές. Τα κονίδια είναι γενικά βραχύβια σπόρια των οποίων η επιβίωση εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τη διαθέσιμη υγρασία, τη μικροβιακή δραστηριότητα και την έκθεση στο ηλιακό φως (Holz et al., 2004) με σημαντικότερο παράγοντα την έκθεση στην υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία. Είναι υαλώδη, ελλειψοειδή ή σφαιρικά και συνήθως συνεχόμενα (Jarvis et al., 1977). Σε συνθήκες καταπόνησης, αντί για κονίδια παράγονται τα μικροκονίδια, τα οποία είναι υδρόφιλα και συναντώνται συνήθως σε παλιές καλλιέργειες του μύκητα (Elad et al., 2007). Τα μικροκονίδια προκύπτουν από τη

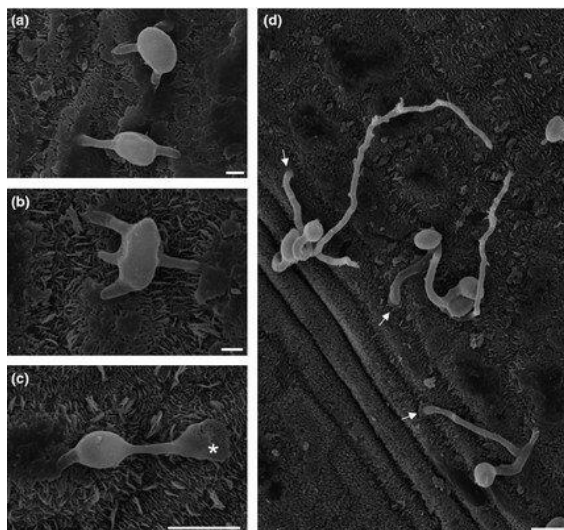
βλάστηση των μυκηλιακών υφών, των μακροκονιδίων, από τα απρεσσόρια και τα σκληρώτια (Jarvis et al., 1980; Lorenz and Eichhorn et al., 1983).

Η αγενής αναπαραγωγή είναι πιο διαδεδομένη στη φύση, ενώ η εγγενής μορφή του μύκητα *Botryotinia fuckeliana* σπάνια συναντάται, ωστόσο μπορεί να αναπαραχθεί στο εργαστήριο. Οι πρώτοι που ανέπτυξαν in vitro τεχνικές ήταν οι Faretra και Antonacci (Dewey and Grant-Downton et al., 2016). Μετά από πειράματα, επιβεβαίωσαν ότι τα περισσότερα είδη Βοτρύτη είναι ετερόθαλλα. Συγκεκριμένα, ο τύπος σύζευξης του *B. fuckeliana* έχει βρεθεί ότι ελέγχεται από τα αλληλόμορφα γονίδια MAT 1-1 MAT 1-2, ενώ υπάρχουν άλλα στελέχη του μύκητα τα οποία είναι δευτερογενώς ομόθαλλα και περιέχουν και τα δύο αλληλόμορφα γονίδια (Pollastro et al., 1993; Faretra et al., 1988). Η τέλεια μορφή *B. fuckeliana* μπορεί να σχηματίσει αποθήκια, τα οποία είναι εγγενείς καρποφορίες και περιέχουν ασκούς με ασκοσπόρια (Elad et al., 2007). Ορισμένα σκληρώτια επίσης δε βλαστάνουν σχηματίζοντας κονιδιοφόρους αλλά αποθήκια, τα οποία μπορούν να είναι βιώσιμα στους 3°C για 20-30 μέρες, ενώ στους 23°C για 3 μέρες (Jarvis et al., 1977).

1.3. Επιδημιολογία Παθογόνου

Ο βιολογικός κύκλος της ασθένειας που προκαλείται από τον *Botrytis cinerea* ξεκινάει με τη βλάστηση των κατασκευών διαχείμασης του παθογόνου, του μυκηλίου και των σκληρωτίων που βρίσκονται σε νεκρά φυτικά υπολείμματα. Στη συνέχεια διασπείρεται το μολύσμα που αποτελείται από κονίδια ή ασκοσπόρια. Τα κονίδια που σχηματίζονται στους κονιδιοφόρους, θα διασπαρθούν μέσω του αέρα, του νερού ή μέσω εντόμων (Louis et al., 1996; Holz G et al., 2004). Σημαντικότερο μέσο διασποράς αποτελεί ο αέρας, ενώ τα κονίδια θεωρούνται το σπουδαιότερο τμήμα του θαλλού για τη διασπορά μολύσματος. Ωστόσο οποιοδήποτε άλλο τμήμα μπορεί εξίσου να αποτελέσει όργανο διασποράς και μόλυνσης των ξενιστών (Holz G et al., 2004).

Αρχικά η απελευθέρωση του μολύσματος, δηλαδή των κονιδίων, προκαλείται από την αλλαγή της σχετικής υγρασίας και τη συμβολή του αέρα ή σταγόνων νερού (Fitt et al., 1985). Ακολούθως, το μολύσμα μεταφέρεται με τη βοήθεια του ανέμου σε κοντινές αποστάσεις. Η απόσταση διασποράς του μολύσματος εξαρτάται από τη θέση των κονιδιοφόρων στον ξενιστή και από την ένταση του αέρα. Συνεπώς, εκτεθειμένα κονίδια σε ψηλά σημεία που δέχονται μεγαλύτερες εντάσεις ανέμων, θα διασπαρθούν πιο μακριά (Fitt et al, 1985). Τέλος, σύμφωνα με τον Aylor (1987) η προσγείωση των κονιδίων στους νέους ξενιστές απαρτίζεται από τις διαδικασίες της καθίζησης και πρόσκρουσης.



Εικόνα 5. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου της κονιδιακής βλάστησης του *B. cinerea* σε φύλλα ευκαλύπτου.

a και b. κονίδια με 2 έως 4 σωλήνες βλάστησης

c. σχηματισμός μιας δομής μόλυνσης που ομοιάζει μαξιλάρι (αστερίσκος)

d. απευθείας διείσδυση του μύκητα στο φύλλο

Caires et al., 2014

Μετά τη διασπορά, το μόλυσμα που έχει προσκρούσει στην επιφάνεια του ξενιστή προσκολλάται και έπειτα βλαστάνει και εισχωρεί στους φυτικούς ιστούς. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εισχώρηση του μύκητα είναι η υψηλή σχετική υγρασία (>93%) ή η ύπαρξη σταγόνων νερού (Williamson et al., 1995). Επιπλέον χρειάζεται να υπάρχουν διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά έτσι ώστε μετά τη μόλυνση του φυτικού ιστού τα κονίδια να διογκωθούν και να βλαστήσουν (Verhoeff et al., 1995). Στο τέλος του βλαστικού σωλήνα του κονιδίου σχηματίζεται απρεσσόριο για την είσοδο του μύκητα στο φυτικό ιστό. Η είσοδος πραγματοποιείται είτε άμεσα από φυσικά ανοίγματα όπως τα στόματα και οι πληγές, είτε έμμεσα με παραγωγή ενζύμων, όπως λιπάσες και κουτινάσες για τη διάσπαση της επιδερμίδας του φυτού (Verhoeff et al., 1995; van der Vlugt-Bergmans et al., 1997).

Το παθογόνο έχει την ικανότητα να παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση στο εσωτερικό του φυτού και να μολύνει αργότερα τους ιστούς προκαλώντας τη γήρανσή τους καθώς και την πρόωμη ωρίμανση των καρπών μετασυλλεκτικά λόγω μεταβολής της συγκέντρωσης σακχάρων (Williamson et al., 1995; Elad et al., 1997; Simona M. Sanzania et al., 2012). Μετά τη λανθάνουσα κατάσταση, όταν η άμυνα του φυτού έχει εξασθενήσει ξεκινάει η ταχεία ανάπτυξη

του παθογόνου, με αποτέλεσμα την κατάρρευση των φυτικών ιστών πάνω στους οποίους ο μύκητας παράγει σπόρια, το καινούριο μόλυσμα (Van Kan et al., 2005). Η εμφάνιση καφέ ή γκρι συστάδας κονιδίων στην επιφάνεια του μολυσμένου καρπού ή φυτού είναι ένα χαρακτηριστικό σύμπτωμα δευτερογενών μολύνσεων (Khazaeli P. et al., 2010).

1.3.1 Ανάπτυξη Σκληρωτίων

Τα σκληρώτια, υπό φυσιολογικές συνθήκες, σχηματίζονται στους ιστούς του ξενιστή που βρίσκονται σε αποσύνθεση. Κατά την περίοδο της άνοιξης οι αυξημένες θερμοκρασίες και η υγρασία που επικρατούν, δημιουργούν τις ιδανικές συνθήκες στις οποίες τα σκληρώτια ξεκινούν την ανάπτυξη και παραγωγή των κονιδιοφόρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο τα μυκήλια όσο και τα κονίδια μπορούν να λειτουργήσουν ως μολυσματικοί παράγοντες και να ξεκινήσουν μία νέα μόλυνση (Hua et al., 2018).



Εικόνα 6. Σκληρώτια του *B. cinerea* σε βλαστό φράουλας σε αποσύνθεση

Ridge et al., 2012

1.3.2. Κονιδοποίηση

Η απελευθέρωση αγενών σπορίων από τα κονιδιοφόρα ονομάζεται σπορίωση κονιδίων και αποτελεί τον βασικό τρόπο μόλυνσης του μύκητα *B. cinerea*. Τα κονιδιοφόρα είναι δομές που αναπτύσσονται από τα σκληρώτια και τα μυκήλια κατά το πρώτο μισό της άνοιξης και βασίζονται κυρίως στην αερομεταφορά για την απελευθέρωση τους. Επίσης, εκτός από τις αλλαγές στα ρεύματα του αέρα, απαραίτητες κρίνονται και οι διαβαθμίσεις του φωτός καθώς ο σχηματισμός των κονιδίων αλλά και η σπορίωση εξαρτώνται από το φως. Η κονιδοποίηση απαιτεί μεγάλες ποσότητες ενέργειας και άρα θρεπτικών συστατικών τα οποία πρέπει να αποκτηθούν μέσω της εισβολής του μύκητα στους ιστούς του ξενιστή (Hua et al., 2018; Holz et

al., 2004). Σε συνθήκες καταπόνησης, αντί για κονίδια παράγονται τα μικροκονίδια, τα οποία είναι υδρόφιλα και συναντώνται συνήθως σε παλιές καλλιέργειες του μύκητα (Elad et al., 2007). Τα μικροκονίδια προκύπτουν από τη βλάστηση των μυκηλιακών υφών, των μακροκονιδίων, από τα απρεσσόρια και τα σκληρώτια (Jarvis et al., 1980; Lorenz and Eichhorn et al., 1983).

1.4 Καταπολέμηση

Η ασθένεια που προκαλείται από τους μύκητες του γένους *Botrytis*, ειδικότερα του *B. cinerea*, αποτελεί την πιο διαδεδομένη και συχνή ασθένεια των διακοσμητικών φυτών, των φρούτων και των λαχανικών. Οι απώλειες και οι καταστροφές που προκαλούνται στις διάφορες καλλιέργειες έχουν τεράστιο οικονομικό κόστος που ξεπερνά τα 10 δισεκατομμύρια και φτάνει έως και τα 100 δισεκατομμύρια δολάρια παγκοσμίως κάθε χρόνο καθιστώντας έτσι απαραίτητη την αντιμετώπιση του. Δυστυχώς όμως η καταπολέμηση του κρίνεται ιδιαίτερα δύσκολη και περίπλοκη κυρίως λόγω της ικανότητας του μύκητα να μολύνει όλα τα μέρη του φυτού σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης. Η χημική καταπολέμηση με την εφαρμογή οργανικών μυκητοκτόνων αποτελεί τον σημαντικότερο τρόπο καταπολέμησης αν και τα τελευταία χρόνια είναι αρκετά διαδεδομένη και η βιολογική καταπολέμηση. Η στροφή προς την βιολογική καταπολέμηση οφείλεται κυρίως στην ανθεκτικότητα που παρουσίασε ο μύκητας στα γεωργικά φαρμακευτικά σκευάσματα. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντική ήταν και η προτίμηση των καταναλωτών σε ένα πιο ασφαλές και φιλικό προς το περιβάλλον μέσου αντιμετώπισης (Hua et al., 2018).

1.4.1. Βιολογική Καταπολέμηση

Έχει διαπιστωθεί ότι ποικίλοι βιολογικοί παράγοντες, ζωντανοί μικροοργανισμοί και ουσίες ή συστατικά φυσικής προέλευσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών στα πλαίσια της βιολογικής καταπολέμησης. Όσον αφορά το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* έχουν βρεθεί λίγα βιολογικά σκευάσματα που να είναι αποτελεσματικά στην καταπολέμησή του (Nicot et al., 2016). Ωστόσο μπορούν να ομαδοποιηθούν στις κατηγορίες: α) φυτικά εκχυλίσματα, τα οποία περιλαμβάνουν εκχύλισμα όπως *Melaleuca alternifolia*, *Reynoutria sachalinensis* κ.ά, β) ζωντανούς μικροοργανισμούς όπως βακτήρια (*Bacillus*, *Pseudomonas*), ακτινομύκητες (πχ *Streotimycetes*), ζύμες (πχ *Aureobasidium*, *Candida*) και μύκητες (πχ *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Chlonostachys*,

Ulocladium), γ) ορυκτέλαια και οργανικά οξέα (πχ παραφινικό έλαιο) (Fillinger & Walker et al., 2016).

Ο κάθε βιολογικός παράγοντας παρουσιάζει διαφορετικό τρόπο δράσης έναντι των παθογόνων και έτσι καθίσταται ικανή η καταπολέμηση. Οι μικροοργανισμοί, όπως το βακτήριο *Pseudomonas* spp., βρέθηκε ότι μπορούν να μεταβάλλουν τη διαβρεξιμότητα της φυτικής επιφάνειας, γεγονός που επηρεάζει την προσκόλληση και ανάπτυξη του μύκητα *Botrytis cinerea* (Elad & Stewart et al., 2007). Επιπρόσθετα, η ικανότητα προσκόλλησης των βιολογικών παραγόντων στο μύκητα αναστέλλει την ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών ή επηρεάζει την απελευθέρωση κονιδίων, όπως λόγω χάριν η δράση του *Candida pulcherrima*, μειώνοντας τη διασπορά του μολύσματος του μύκητα (Elad & Stewart et al., 2007).

Ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά και χώρο μεταξύ του παθογόνου και των βιολογικών παραγόντων όπως είναι τα φύκη, τα βακτήρια και οι μύκητες, αποτελεί έναν ακόμη μηχανισμό δράσης (Elad & Stewart et al., 2007). Μεγάλη αποτελεσματικότητα βρίσκει ο τρόπος αυτός έναντι του μύκητα *B.cinerea* καθώς οι ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί (πχ *Bacillus* spp., *Pseudomonas* sp.) έχουν την ικανότητα να αποικίζουν πιο γρήγορα τη φυτική επιφάνεια αποτρέποντας την εγκατάσταση του μύκητα. Επιπλέον, η δυνατότητα των βιολογικών παραγόντων να αποικίζουν και τις πληγές στην επιδερμίδα των καρπών έχει διερευνηθεί ως πιθανός τρόπος αντιμετώπισης μετασυσλλεκτικών προσβολών (Haidar et al., 2016).

Η έκκριση ανασταλτικών ουσιών από τους βιολογικούς παράγοντες έχει βρεθεί επίσης ότι λειτουργεί ως αντιβίωση στις μολύνσεις από το μύκητα *B.cinerea*. Οι βιολογικοί παράγοντες *Trichoderma* spp. και *Gliocladium* spp έχουν αναφερθεί σε πολλές έρευνες για τη δράση τους μέσω έκκρισης αντιβιοτικών ουσιών (Elad & Stewart et al., 2007). Η κατασταλτική δράση των *Bacillus subtilis* και *Bacillus pumillus* για την αντιμετώπιση του *B.cinerea* έχει αποδοθεί στο μηχανισμό της «αντιβίωσης», όπως ακόμη η μείωση βλάστησης των κονιδίων του *B.fabae* προκύπτει από την έκκριση ανασταλτικών ουσιών του *Penicillium chrysogenum* (Elad & Stewart et al., 2007). Μεταβολίτες όπως ένζυμα (κιτινάσες, γλουκανάσες, λιπάσες, σελουλάσες, πρωτεάσες) που προέρχονται από βακτήρια ή φύκη μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των παθογόνων μυκήτων. Σύμφωνα με τους Essghaier et al., (2009) πολλά είδη βακτηρίων όπως *Bacillus subtilis*, *B.licheniformis*, *B.pumilis*, *Halomonas elongate*, *Staphylococcus* sp. βρέθηκε ότι με την έκκριση λυτικών ενζύμων κατέστειλαν την ανάπτυξη του μύκητα *B.cinerea* (Haidar et al., 2016).

Τέλος, ο μηχανισμός της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (ISR) προκύπτει από τη δράση πολλών μικροοργανισμών, αντιμετωπίζοντας έτσι παθογόνα εδάφους και φυλλώματος (Paulitz & Matta et al., 1999). Οι μικροοργανισμοί που επάγουν αυτό το μηχανισμό μπορεί να είναι μη παθογόνοι, σαπροφυτικοί ή ακόμη και μη μολυσματικά στελέχη του παθογόνου (Elad & Stewart et al., 2007). Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί για τον τρόπο δράσης του *Trichoderma* spp.. Βρέθηκε ότι προκαλεί την επαγωγή γονιδίων που συνδέονται με το σαλικιλικό και ιασμονικό οξύ ενεργοποιώντας την άμυνα του φυτού (Hermosa et al., 2012). Ωστόσο η ενεργοποίηση των γονιδίων επηρεάζεται από την ηλικία του φυτού ξενιστή, τον τύπο του ιστού και τον τρόπο εφαρμογής της θεραπείας (Nicot et al., 2016). Σύμφωνα με έρευνα των Elad et al. (2000), βρέθηκε ότι η χρήση του *Trichoderma harzianum* T39 μείωσε την εμφάνιση της τεφράς σήψης κατά 35-44% και έπειτα από σύγκριση με χημικά σκευάσματα προέκυψε παρόμοια ικανότητα καταπολέμησης. Την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή των φυτών έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν επίσης οι μικροοργανισμοί *Micromonospora*, *Saccharothrix algeriensis* και *P. fluorescens* αντιμετωπίζοντας το μύκητα *Botrytis cinerea* (Haidar et al., 2016).

1.4.2 Χημική Καταπολέμηση

Η χημική καταπολέμηση του μύκητα *B. cinerea* αποτελεί τον βασικό και αποτελεσματικότερο τρόπο αντιμετώπισης του. Πολλά σύνθετα οργανικά μυκητοκτόνα έχουν βγει στην αγορά τις τελευταίες δεκαετίες, όπως φθαλμίδια (captan, folpet), διθειοκαρβαμινικά (thiram), σουλφαμίδια (dichlofluanid) (Fillinger & Walker et al., 2016). Δυστυχώς όμως η ανθεκτικότητα που παρουσιάζει ο μύκητας στα σκευάσματα αυτά έχει μειώσει σημαντικά την χρήση τους τα τελευταία χρόνια.

Τα μυκητοκτόνα, ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: α) μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στη μίτωση και την κυτταροδιαίρεση, β) μυκητοκτόνα που επηρεάζουν τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών, γ) αναστολείς βιοσύνθεσης αμινοξέων, δ) αναστολείς βιοσύνθεσης στερολών και ε) μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στην αλυσίδα της αναπνοής (Leroux et al., 2007).

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι ομάδες των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων (benomyl, carbendazim, thiabendazole, fuberidazole, thiophanate-methyl), των φαινυλοκαρβαμινικών (diethofencarb) και των βενζαμιδίων (zoxamide). Δρουν παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό των μικροσκληρωτίων της μιτωτικής ατράκτου λόγω προσκόλλησής τους στη β-τουμπουλίνη, αναστέλλοντας τον πολυμερισμό της (Davidse and Flach et al., 1978). Τα μυκητοκτόνα αυτά

είναι ευρέως φάσματος, διασυστηματικά, με προστατευτική και θεραπευτική δράση (Μαρκόγκλου & Ζιώγας, 2007).

Στα μυκητοκτόνα που προκαλούν βλάβες στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών ανήκει η υποομάδα των δικαρβοξαμιδικών (dichlozoline), τα οποία εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του '70 και χρησιμοποιούνταν προστατευτικά για την καταπολέμηση των μυκήτων *Sclerotinia*, *Monilinia*, *Alternaria*, *Botrytis* (Brent et al., 1995). Ωστόσο εμφανίστηκαν ανθεκτικά στελέχη του *Botrytis cinerea* με αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων μυκητοκτόνων (iprodione, procymidone, chlozolinat, vinclozolin) που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά και προστατευτικά παρεμποδίζοντας τη μυκηλιακή ανάπτυξη και βλάστηση των κονιδίων. Στην ομάδα αυτή ανήκουν επίσης οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες (dicloran, quintozen, tolclofos-methyl) και τα φαινυλοπυρρολικά (fludioxonil) (Leroux et al., 2004) που δρουν στις πρωτεϊνικές κινάσες (PK-II&c-AMP-PKA) οι οποίες ελέγχουν το ωσμωτικό δυναμικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα την παραγωγή γλυκερόλης και τη πρόκληση βλαβών στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών (Μαρκόγκλου & Ζιώγας, 2007).

Στους αναστολείς βιοσύνθεσης αμινοξέων υπάγονται οι δραστικές cyprodinil, pyrimethanil, mepanipyrim (ανιλινοπυριμιδίνες) που έχουν κυρίως προστατευτική δράση και είναι διασυστηματικά μυκητοκτόνα (Fillinger & Walker et al., 2016). Επιδρούν στην έκκριση λυτικών ενζύμων (πρωτεάσες, κουτινάσες, κυτταρινάσες) που απαιτούνται στην παθογένεση για τη λύση και αποδιοργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Η επίδραση αυτή οφείλεται στην παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης (Μαρκόγκλου & Ζιώγας, 2007).

Στα μυκητοκτόνα που δρουν ως αναστολείς βιοσύνθεσης στερολών και καταπολεμούν το μύκητα *Botrytis cinerea* ανήκουν οι ομάδες Τριαζολικά, Ιμιδαζολικά και Υδροξυανιλίδια. Τα Τριαζολικά και Ιμιδαζολικά παρεμποδίζουν την απομεθυλίωση του C¹⁴ στο μόριο της λανοστερόλης κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης, με αναστολή του ενζύμου 14^α-απομεθυλάση. Δραστικές ουσίες αυτής της κατηγορίας είναι το tebuconazole με προστατευτική και θεραπευτική δράση και τα imazalil και prochloraz με ευρύ φάσμα δράσης σε διάφορες καλλιέργειες. Τα υδροξυανιλίδια, στα οποία ανήκει η δραστική ουσία fenhexamid, αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου C⁴-απομεθυλάση που ελέγχει τις δύο διαδοχικές αντιδράσεις απομεθυλίωσης της 4,4-διμεθυλοφεκοστερόλης σε φεκοστερόλη (Μαρκόγκλου & Ζιώγας, 2007).

Τέλος, στην ομάδα που παρεμβαίνει στην αλυσίδα της αναπνοής διακόπτοντας την παροχή ενέργειας ATP στα κύτταρα ανήκουν οι εξής κατηγορίες: 1) πολυθεσικά μυκητοκτόνα, 2)

παρεμποδιστές της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και 3) αναστολείς των συμπλόκων II και III της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων (Leroux et al., 2007).

1. Στα πολυθεσικά μυκητοκτόνα ή αλλιώς πολλαπλής δράσης, περιλαμβάνονται οργανικές προστατευτικές ενώσεις οι οποίες δεν είναι φυτοτοξικές (Μαρκόγκλου & Ζιώγας, 2007). Το 1934 ανακαλύφθηκαν τα διθειοκαρβαμιδικά με δραστικές ουσίες thiram, maneb, mancozeb που αποτελούν σημαντικά προστατευτικά προϊόντα για ασθένειες προκαλούμενες από το παθογόνο *Botrytis cinerea*. Δύο ακόμη κατηγορίες πολυθεσικών μυκητοκτόνων είναι τα φθαλμίδια (captan, folpet, captafol) και τα φαινυλοσουλφαμίδια (dichlofluanid, tolylfluanid) (Leroux et al., 2007).
2. Το μυκητοκτόνο fluazinam ανήκει στις Φαινυλοπυριδαμίνες, είναι προστατευτικό με μικρή διασυστηματική κίνηση και ευρύ φάσμα δράσης εναντίον παθογόνων που ανήκουν και στις τέσσερις κλάσεις των μυκήτων, όπως ο *Botrytis cinerea*. Προκαλεί απόζευξη (uncoupling) της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από το κυτοχρωμικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων με συνέπεια να εξαντλούνται τα αναπνευστικά υποστρώματα χωρίς την αντίστοιχη παραγωγή ενέργειας ATP (Μαρκόγκλου & Ζιώγας, 2007).
3. Όσον αφορά τους αναστολείς του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας, τα πιο γνωστά μυκητοκτόνα carboxin και oxycarboxin (Καρβοξαμιδικά), άρχισαν να χρησιμοποιούνται στα τέλη της δεκαετίας του '60 (Leroux et al., 2007). Τα τελευταία χρόνια για την καταπολέμηση της τεφράς σήψης, που προκαλείται από το μύκητα *Botrytis cinerea*, χρησιμοποιούνται οι δραστικές ουσίες τα boscalid και fluopyram (Fillinger & Walker et al., 2016). Η ομάδα των καρβοξαμιδικών αναστέλλει τη δράση του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (σύμπλοκο II), με αποτέλεσμα την αναστολή μεταφοράς ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στην ουμπικινόνη, συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος και παρεμπόδιση του κύκλου του Krebs (Μαρκόγκλου & Ζιώγας, 2007).

Η ομάδα των παρεμποδιστών του συμπλόκου III της αναπνοής περιλαμβάνει τους Qo εξωτερικούς παρεμποδιστές της κινόνης (Quinone outside Inhibitors – Qols) στους οποίους ανήκουν οι στρομπιλουρίνες. Στην ομάδα αυτή υπάγονται τα μυκητοκτόνα azoxystrobin και picoxystrobin τα οποία είναι ευρέως φάσματος και χρησιμοποιούνται προστατευτικά και θεραπευτικά για την καταπολέμηση πολλών παθογόνων μυκήτων (Μαρκόγκλου & Ζιώγας, 2007). Οι παρεμποδιστές Qo διακόπτουν τη μεταφορά

ηλεκτρονίων στο επίπεδο του συμπλόκου των κυτοχρωμάτων bc₁ (σύμπλοκο III) της αναπνευστικής αλυσίδας, με συνέπεια την παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής αναπνοής και της παραγωγής ATP (Bartlett et al., 2002).

Ωστόσο, έχουν παρουσιαστεί δύο βασικά προβλήματα όσον αφορά την εφαρμογή των μυκητοκτόνων. Πρώτον και κυριότερον, ο Βοτρύτης χαρακτηρίζεται από συνεχείς γενετικές αλλαγές κατά την πάροδο των γενεών, γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη πολυπύρηνων κονιδίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συχνή ανακάλυψη στελεχών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων. Δεύτερον, η χρήση συνθετικών μυκητοκτόνων αποτελεί μία ιδιαίτερα πολυδάπανη επιλογή ειδικά όταν απαιτούνται μεγάλες ποσότητες σκευασμάτων, όπως κατά την καταπολέμηση του *B. cinerea*. Πιο συγκεκριμένα, το κόστος για τον έλεγχο της μόλυνσης του Βοτρύτη και συγγενικών του ειδών αποτελεί το 8% της παγκόσμιας αγοράς μυκητοκτόνων παγκοσμίως (Hua et al., 2018).

2. Ανθεκτικότητα

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα αποτελεί ίσως το βασικότερο πρόβλημα της χημικής καταπολέμησης. Ως ανθεκτικότητα ορίζεται από τους Ma & Michailides et al., 2005, η σταθερή και κληρονομήσιμη προσαρμογή ενός μύκητα σε ένα μυκητοκτόνο με αποτέλεσμα την μειωμένη του ευαισθησία σε αυτό. Απόρροια αυτού είναι η μειωμένη αποτελεσματικότητα ορισμένων μυκητοκτόνων που φτάνει μέχρι και την ολική απώλεια αποτελεσματικότητας μίας δραστικής ουσίας.

Κυριότερος μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι η τροποποίηση της πρωτεΐνης-στόχου του παθογόνου στην οποία ασκεί τη δράση του το μυκητοκτόνο. Αυτό επιτυγχάνεται με σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Ανθεκτικά στελέχη των παθογόνων προϋπάρχουν πάντα στη φύση όμως η συχνότητά τους εξαρτάται τόσο από την πίεση επιλογής που προκαλείται από τις συνεχείς επεμβάσεις όσο και από την προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών σε σχέση με τα ευαίσθητα (Ma and Michailides et al., 2005).

2.1. Ανθεκτικότητα του *Botrytis cinerea* σε μυκητοκτόνα

Η βασική στρατηγική για την καταπολέμηση του *B. cinerea* βασίζεται στην εφαρμογή μυκητοκτόνων τόσο πριν όσο και μετά την άνθηση των καρπών. Ο *Botrytis cinerea* ανήκει την κατηγορία παθογόνων υψηλού κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως κάποια χαρακτηριστικά της βιολογίας του παθογόνου. Τα κυριότερα από αυτά είναι η μεγάλη γενετική του παραλλακτικότητα, ο σύντομος βιολογικός κύκλος, ο ραγδαίος ρυθμός αναπαραγωγής και ο τρόπος διασποράς του παθογόνου (Myresiotis et al., 2007). Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζουν και οι ίδιοι οι παραγωγοί καθώς με τη μη ορθολογική χρήση μυκητοκτόνων και με τις υπέρ του μέτρου συχνές επεμβάσεις ασκούν ιδιαίτερη πίεση επιλογής, με αποτέλεσμα να κυριαρχούν τα ανθεκτικά στελέχη του μύκητα. Οι πρώτες περιπτώσεις ανθεκτικότητας του *B.cinerea* στα μυκητοκτόνα εμφανίστηκαν μετά την είσοδο των βενζιμιδαζολικών στην αγορά, στα τέλη της δεκαετίας του '60, καθώς αναφέρθηκαν στελέχη με μεταλλάξεις σε δύο θέσεις στο γονίδιο της β-τουμπουλίνης (Farettra & Pollastro et al., 1991).

Η επί χρόνια χρήση μυκητοκτόνων που στοχεύουν ορισμένα γονίδια του μύκητα, είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν οδηγήσει στην απευαισθητοποίηση του παθογόνου στα φάρμακα και κατ'επέκταση στην μείωση της μυκητοκτόνου δράσης τους (Shao et al., 2020). Μερικές από τις κατηγορίες τέτοιων μυκητοκτόνων είναι:

- Anilinopyrimidines (Aps)
- Benzimidazole
- Demethylation inhibitors (DMIs):
- Dicarboxamides (DFCs)
- Hydroxyanilide
- Quinone outside inhibitor (QoI)
- Succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI)
- Phenylpyrroles (PPs)

2.2. Ανάπτυξη και μηχανισμός ανθεκτικότητας στα DFCs

Τα Δικαρβοξυμιδικά (DFCs) μυκητοκτόνα άρχισαν να χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για την καταπολέμηση της τεφράς σήψης από τα τέλη του 1970 και για δύο ολόκληρες δεκαετίες. Ωστόσο, ο *B. cinerea* δεν άργησε να εμφανίσει ανθεκτικότητα στα φάρμακα αυτά, οδηγώντας έτσι στη μείωση της αποτελεσματικότητάς τους (Shao et al., 2020).

Τα DFCs μπορεί να έβρισκαν εφαρμογή για πολλά χρόνια, όμως ο ακριβής τρόπος δράσης τους δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί προτείνουν ότι η βασική γραμμή δράσης των φαρμάκων είναι η μη φυσιολογική φωσφορυλίωση της γλυκερόλης 1 της πρωτεϊνικής κινάσης MAPK. Ο βασικός όμως στόχος τους δεν έχει καθοριστεί ακόμα (Fillinger et al. 2012).

2.3. Ανάπτυξη και μηχανισμός ανθεκτικότητας στα QoIs

Οι εξωτερικοί αναστολείς της κινόνης είναι μια κατηγορία μυκητοκτόνων τα οποία χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια με στόχο τον έλεγχο πολλών διαφορετικών παθογόνων στην γεωργία (Shao et al., 2020). Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας σκευασμάτων είναι τα azoxystrobin και pyraclostrobin τα οποία προέρχονται από φυσικά προϊόντα και έχουν χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση της τεφράς σήψης, κυρίως σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα. Το έτος 2009, εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στελέχη *B. cinerea* ανθεκτικά στα QoIs, με συχνότητα εμφάνισης 0,56% (Jiang et al. 2009). Μέσα στα επόμενα χρόνια, παρατηρήθηκε τεράστια αύξηση στο ποσοστό του πληθυσμού που εμφάνιζε αντοχή, με ποσοστό εμφάνισης που άγγιζε το 100% σε ορισμένες περιοχές, με αποτέλεσμα την παύση της χρήσης των συγκεκριμένων μυκητοκτόνων, καθώς δεν παρείχαν πλέον επαρκή προστασία (Xiao et al. 2017).

Ο τρόπος δράσης των QoIs είναι γνωστός, διακόπτουν την μεταφορά ηλεκτρονίων στο κυτόχρωμα β μέσω της σύνδεσής τους στη θέση Qo. Η θέση Qo βρίσκεται στην, θετικά φορτισμένη, εξωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης και εκεί λαμβάνει χώρα η οξειδωση της ουμπικινόλης. Υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα που έχει αναπτυχθεί στο φάρμακο αυτό είναι η μετάλλαξη G143A (GGT σε GCT) (Jiang et al. 2009; Zhang et al. 2011). Έχει μάλιστα προταθεί ότι η μετάλλαξη αυτή επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την διαδικασία ματίσματος κατά την ωρίμανση του pre-mRNA σε ώριμο mRNA (Grasso et al. 2006).

2.4. Ανάπτυξη και μηχανισμός ανθεκτικότητας στα SDHIs

Οι αναστολείς της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHIs) είναι μία κατηγορία ενώσεων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο εξάπλωσης και μόλυνσης των καλλιεργειών από μύκητες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν σκευάσματα όπως τα fluopyram, thifluzamide, carboxin και boscalid, τα οποία δρουν αναστέλλοντας την ενζυμική δραστηριότητα της αφυδρογονάσης εμποδίζοντας έτσι την διαδικασία της μιτοχονδριακής αναπνοής (Kim and Xiao et al., 2011). Το πιο διαδεδομένο φάρμακο αυτής της κατηγορίας για την αντιμετώπιση της τεφράς σήψης είναι το boscalid, του οποίου η χρόνια χρήση οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών που εντοπίστηκαν σε διάφορες καλλιέργειες όπως σταφύλια, φράουλες και μήλα (Bardas et al., 2010; Kim & Xiao 2011; Lerouch et al., 2011).

Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στα φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία των SDHIs έχει μελετηθεί εκτενώς. Σε γενικές γραμμές, πολυάριθμες μεταλλάξεις στις υπομονάδες SfhB, SdhC και SdhD του γονιδίου της αφυδρογονάσης (Sdh) οδηγούν στην επιβίωση των μυκήτων από τα μυκητοκτόνα αυτά. Όσον αφορά τον *B. cinerea*, οι μεταλλάξεις που χαρακτηρίζουν την ανθεκτικότητα στο boscalid παρατηρούνται κυρίως στην υπομονάδα SdhB (Amiri et al. 2014; Veloukas et al. 2013). Έχει βρεθεί μάλιστα, ότι οι διαφορετικές μεταλλάξεις μεμονωμένων βάσεων που έχουν παρατηρηθεί στην υπομονάδα SdhB παρέχουν και διαφορετικά επίπεδα αντοχής στο boscalid (Leroux et al. 2010).

2.5. Ανάπτυξη και μηχανισμός ανθεκτικότητας στα PPs

Στην κατηγορία αυτή των Φαινυλοπυρρολών ανήκουν σκευάσματα όπως τα fenpiclonil και fludioxonil, τα οποία προέρχονται από τη πυρρολιντρίνη, ένα αντιμυκητιακό αντιβιοτικό που παράγεται από διάφορα είδη *Pseudomonas* (Gehmann et al. 1990). Πιο συγκεκριμένα, το fludioxonil αποτελεί ένα εξαιρετικό εκπρόσωπο αυτής της τάξης μυκητοκτόνων καθώς ασκεί έντονη ανασταλτική δράση ενάντια σε πολλούς φυτοπαθογόνους μύκητες. Ένας από τους στόχους του φαρμάκου είναι και ο *B. cinerea* και μάλιστα έχει βρεθεί ότι το ρίσκο ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο φάρμακο είναι χαμηλό προς μέτριο (Shao et al., 2020). Παρόλα αυτά, μετά από χρόνια χρήση, εντοπίστηκαν κάποια ανθεκτικά στελέχη κυρίως σε καλλιέργειες φράουλας και βατόμουρων (Fernández-Ortuño et al. 2014). Είναι αρκετά ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ανάπτυξη υψηλού βαθμού αντοχής στο fludioxonil έχει αρκετά μεγάλο κόστος προσαρμοστικότητας για το μύκητα. Στις περισσότερες περιπτώσεις ανθεκτικότητας, οι μύκητες παρουσίασαν μειωμένη ανάπτυξη μυκηλίων, μολυσματικότητα και σποριοποίηση

υποδηλώνοντας έτσι ότι η ανθεκτικότητα στο μυκητοκτόνο δρα αρνητικά στην προσαρμοστικότητα του οργανισμού. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα που προαναφέρθηκαν, η ανθεκτικότητα στα οποία δεν έχει βρεθεί ότι έχει κάποιο ιδιαίτερο κόστος για τον μύκητα (Sang et al. 2018).

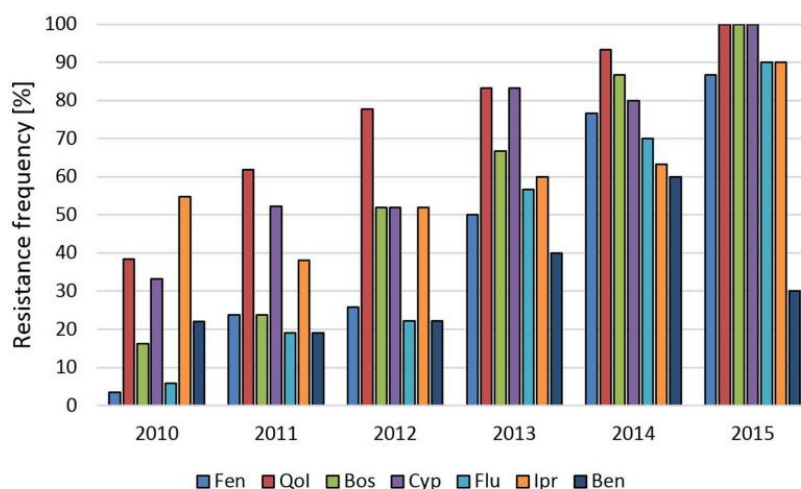
Ο μηχανισμός δράσης του fludioxonil μοιάζει με αυτόν των Dicarboximides, δηλαδή δρα στον μονοπάτι της οσμωρύθμισης που εξαρτάται από την MAPK οδηγώντας έτσι σε υπεροσμωτικότητα η οποία ακολουθείται από συσσώρευση μορίων γλυκερόλης και αναστολή της ανάπτυξης (Kojima et al. 2004; Vignutelli et al. 2002).

2.6. Ανάπτυξη και μηχανισμός ανθεκτικότητας στις APs

Οι Ανιλινοπυριμιδίνες είναι μια κατηγορία μυκητοκτόνων που βρίσκουν εφαρμογή για την αντιμετώπιση της τεφράς σήψης από το 1992 και στην οποία ανήκουν φάρμακα όπως τα pyrimethanil, cyprodinil και mepanipyrim (Masner et al. 1994). Στελέχη *B. cinerea* με ανθεκτικότητα έχουν εντοπιστεί και για αυτά τα φάρμακα, λίγα χρόνια μετά την έναρξη της χρήσης τους σε καλλιέργειες. Οι ενώσεις αυτές έχουν κοινό τρόπο δράσης, αναστέλλουν την βιοσύνθεση της μεθειονίνης και εμποδίζουν την έκκριση ενζύμων υπεύθυνων για την διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος, ένζυμα απαραίτητα για την διαδικασία της μόλυνσης από τον μύκητα. Λόγω του κοινού τρόπου δράσης, στελέχη ανθεκτικά στο pyrimethanil βρέθηκε ότι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα και στο cyprodinil (Fan et al. 2017). Με περισσότερα από 150 γεωργικά σκευάσματα που περιέχουν ως ενεργή ουσία pyrimethanil ή/και cyprodinil, η ανάπτυξη μιας στρατηγικής για την καταπολέμηση της ανθεκτικότητας κρίνεται απαραίτητη (Shao et al., 2020).

Μπορεί η αντίσταση στις Ανιλινοπυριμιδίνες να αποτελεί συχνό φαινόμενο στο *B. cinerea*, οι ακριβείς μηχανισμοί ανθεκτικότητας όμως δεν έχουν ακόμα προσδιοριστεί. Για να ερευνηθούν οι μηχανισμοί αυτοί χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές όπως αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (whole-genome sequencing) και προσεγγίσεις reverse genetic, τόσο σε ανθεκτικά όσο και σε ευαίσθητα στελέχη. Οι μελέτες αυτές υπέδειξαν την ύπαρξη μεταλλάξεων σε 9 διαφορετικά γονίδια τα οποία θεωρούνται ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι και τα 9 γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στον μεταβολισμό των μιτοχονδρίων (Mosbach et al. 2017). Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η επιπλέον διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας αλλά και την σύνδεσης των γονιδίων

αυτών με την βιοσύνθεση της μεθειονίνης, η οποία αποτελεί και τον στόχο των Ανιλινοπυριμιδινών (Shao et al., 2020).



Εικόνα 7. Αλλαγές στη συχνότητα ανθεκτικότητας στελεχών *B. cinerea* ενάντια σε επτά μυκητοκτόνα Σε διάρκεια 6 ετών σε καλλιέργεια μούρων στην Βόρεια Γερμανία
Rupp et al., 2017

2.7. Πολλαπλή ανθεκτικότητα (MLR, MULTIPLE RESISTANCE)

Η εξάπλωση της ασθένειας που προκαλεί ο *B. cinerea* έχει οδηγήσει στην τακτική εφαρμογή διαφορετικών μυκητοκτόνων στις καλλιέργειες με στόχο την προστασία τους. Η εξελικτική πίεση όμως που ασκείται στους μύκητες, οδήγησε στην εμφάνιση στελεχών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε πολλαπλά φάρμακα. Για παράδειγμα, μετά από μελέτη σε καλλιέργειες σταφυλιών στη Shandong το 2016, βρέθηκαν 69 στελέχη *B. cinerea* τα οποία παρουσίαζαν ανθεκτικότητα σε 5 χημικές τάξεις μυκητοκτόνων (carbendazim, procymidone, iprodione, pyrimethanil και boscalid) με συχνότητα 79.07%, έπειτα από συσσώρευση σημειακών μεταλλαγών σε γονίδια στόχους (Zheng et al. 2019).

2.8. Multidrug Resistance (MDR)

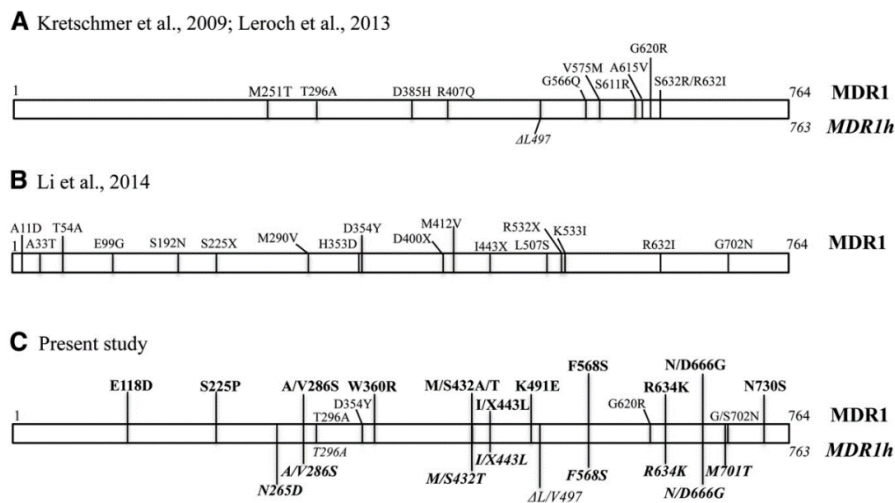
Η πολλαπλή ανθεκτικότητα σε φάρμακα που έχει παρατηρηθεί σε στελέχη *B. cinerea*, οφείλεται στην υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με μεταφορείς εκροής (efflux transporters) και είναι υπεύθυνα για την αυξημένη αποβολή των μυκητοκτόνων από τον οργανισμό (Shao et al., 2020). Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί 3 βασικοί τύποι MDR:

- MDR1: στελέχη που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα fludioxonil, cyprodinil και tolnaftate (Hahn 2014).

Στελέχη MDR1 παρουσιάζουν μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας στον μεταγραφικό παράγοντα Mrr1 ο οποίος ελέγχει το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ABC μεταφορέα AtrB (Kretschmer et al., 2009).

Μία νέα μετάλλαξη έχει εντοπιστεί στο γονίδιο Mrr1 η οποία μπορεί να συμμετέχει στην δημιουργία του φαινότυπου MDR1 (unpublished data). Η μετάλλαξη ονομάστηκε V575G και είναι αυτή η οποία θα μελετηθεί στην συγκεκριμένη πειραματική διπλωματική εργασία.

- MDR1h: στελέχη που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα ίδια μυκητοκτόνα με τα MDR1. Τα στελέχη MDR1h παρουσιάζουν ισχυρότερη ανθεκτικότητα από τα στελέχη MDR1 και διαθέτουν μία μετάλλαξη, διαγραφή 3-bp στη θέση 497 του γονιδίου Mrr1 (Fernández-Ortuño et al., 2015).



Εικόνα 8. Διαγραφές και μεταλλάξεις στον μεταγραφικό παράγοντα Mrr1 που σχετίζονται με τους φαινότυπους MDR1 και MDR1h.

A. Παραλλαγές αμινοξέων που έχουν βρεθεί σε απομονώσεις *B. cinerea* από σταφύλια στην Γαλλία και την Γερμανία και φράουλες στην Γερμανία.

B. Παραλλαγές αμινοξέων που βρέθηκαν σε βατόμουρα και φράουλες στην Καρολίνα και την Βιρτζίνια.

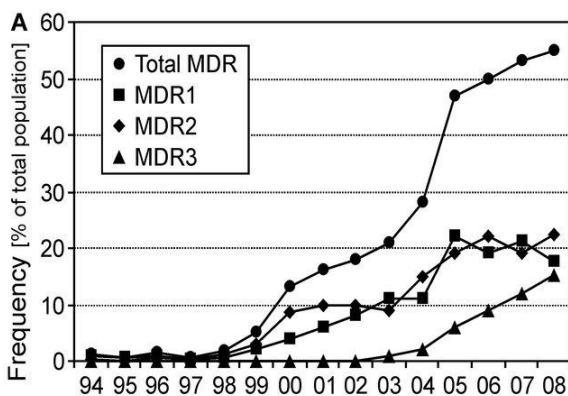
C. Παραλλαγές αμινοξέων που σχετίζονται με τους φαινότυπους MDR1 και MDR1h (2015)

Fernández-Ortuño et al., 2015

- MDR2: στελέχη με ανθεκτικότητα στα fenhexamid, tolnaftate, cycloheximide και cyprodinil (Hahn 2014).

Τα στελέχη MDR2 έχουν υποβληθεί σε μία μοναδική αναδιάταξη στην περιοχή του εκκινητή στο γονίδιο ενός σημαντικού μεταφορέα (mfsM2). Η αναδιάταξη αυτή προκλήθηκε από εισαγωγή μίας ακολουθίας προερχόμενης από ρετροτρανσποζόνια (Kretschemer et al., 2009).

- MDR3: στελέχη της κατηγορίας αυτής παρουσιάζουν το μεγαλύτερο εύρος ανθεκτικότητας έναντι στα περισσότερα χρησιμοποιούμενα μυκητοκτόνα (Hahn 2014). Τα στελέχη MDR3 είναι ανασυνδυασμοί των MDR1 x MDR2 και για αυτό διαθέτουν και την μικρότερη ευαισθησία στα μυκητοκτόνα (Kretschemer et al., 2009).



Εικόνα 9. Συχνότητες των απομονώσεων από MDR στελέχη *B. cinerea* από αμπέλια στη Γερμανία και στην Γαλλία.

A. Η πρώτη εμφάνιση των στελεχών MDR1 και MDR2 έγινε το 1994.

Στελέχη MDR3 εμφανίστηκαν το 2001.

B. Συχνότητες των MDR στελεχών στη περιοχή German Wine Road

Kretschemer et al., 2009

Year	MDR1	MDR2	MDR3	Total MDR
2006	17%	4%	2%	23%
2007	31%	1%	1%	33%
2008	28%	8%	2%	38%

Ο μηχανισμός του MDR είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την ανθεκτικότητα που συναντάται σε παθογόνα μικρόβια του ανθρώπου και στα καρκινικά κύτταρα και έχει συνδεθεί με τη δραστηριότητα των μεταφορέων εκροής οι οποίοι εξαρτώνται από την πλασματική μεμβράνη. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε υπερέκφραση μεμονωμένων μεταφορέων μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού εκροής και κατά συνέπεια την μείωση της ευαισθησίας σε μια ποικιλία φαρμακευτικών μορίων (Nikaido et al., 2009 ; Gulshan et al., 2007; Perez-Toma's et al., 2006).

Όσον αφορά τους μύκητες, οι βασικές κατηγορίες των πρωτεϊνών-μεταφορέων εκροής είναι οι μεταφορείς ATP binding cassette (ABC) και οι μεταφορείς της major facilitator superfamily (MFS) (Gbelska et al., 2008).

Στους νηματοειδείς μύκητες, ο ρόλος των μεταφορέων ABC και MFS στην αποβολή των φυσικών και συνθετικών τοξικών ουσιών είναι πολύ καλά μελετημένος. Για παράδειγμα, αναλύσεις σε μεταλλάγματα knock-out έδειξαν ότι ο ABC μεταφορέας AtrB από τον μύκητα *Aspergillus nidulans* και ο ορθόλογος AtrB από τον *Botrytis cinerea*, μεταφέρουν μια μεγάλη ποικιλία από μυκητοκτόνα όπως και τοξίνες φυτικής και μικροβιακής προέλευσης (De Waard et al., 2006; Andrade et al., 2000 ; Vermeulen et al., 2001).

Επιπλέον, ο MFS μεταφορέας Mfs1 του *B. cinerea* βρέθηκε ότι συμμετέχει στην αποβολή πολλών μυκητοκτόνων τοξινών προερχόμενων από φυτά και μικροοργανισμούς (Hayashi et al., 2002). Κάποιοι ABC μεταφορείς φαίνεται ότι εμπλέκονται και στη παθογένεση των φυτών (Stergiopoulos et al., 2003; Sun et al., 2006). Αυτό το φαινόμενο κυρίως οφείλεται στην αποβολή των ενώσεων που χαρακτηρίζουν την άμυνα των φυτών, για παράδειγμα η φυτοαλεξίνη camalexin του φυτού *Arabidopsis* στην περίπτωση του μεταφορέα AtrB του *B. cinerea* (Stefanato et al., 2009).

Επί χρόνια, πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες και αναφορές για φαινότυπους MDR σε εργαστηριακά μεταλλάγματα *B. cinerea* (Hayashi et al., 2002) και σε άγρια στελέχη των *Penicillium digitatum* και *Mycosphaerella graminicola* (Roohparvar et al., 2008). Παρόλα αυτά, δεν είχε βρεθεί κάποιος αξιοσημείωτος ρόλος του MDR σε αγροτικά περιβάλλοντα όσον αφορά τα παθογόνα των φυτών. Ωστόσο, μία μακράς διάρκειας παρακολούθηση της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα στο μύκητα *B. cinerea*, που έλαβε μέρος σε αμπέλια της Γαλλίας, αποκάλυψε ότι πέρα από εξειδικευμένους μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε φάρμακα, εμφανίστηκαν και στελέχη με διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε χημικώς άσχετα μεταξύ τους μυκητοκτόνα (Chapeland et al., 1999; Leroux et al., 1999).

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι στελέχη που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο φάρμακο fludioxonil δεν διαθέτουν κάποια εξειδικευμένη μετάλλαξη σε ένα συγκεκριμένο target site αλλά παρουσιάζουν μόνο MDR1 και MDR1h μηχανισμούς. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει τη σημασία των MDR φαινοτύπων καθώς μόνο η ύπαρξή τους σε ένα στέλεχος είναι επαρκής συνθήκη για τη δημιουργία ανοσίας ακόμα και σε μυκητοκτόνα που έως τώρα δεν συναντούσαν αντίσταση. Επίσης, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στις επιπτώσεις που μπορεί να έχει μια συνδυαστική χρήση των δύο αυτών μηχανισμών. Η ανάπτυξη ανασυνδυασμένων στελεχών τα οποία θα συνδυάζουν τόσο συγκεκριμένες target site μεταλλάξεις όσο και MDR μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσει σε ένα είδος υπέρ-αντοχής

αγγίζοντας ακόμα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας και δημιουργώντας αξεπέραστα εμπόδια για την αντιμετώπιση του προβλήματος.

3. CRISPR/Cas9

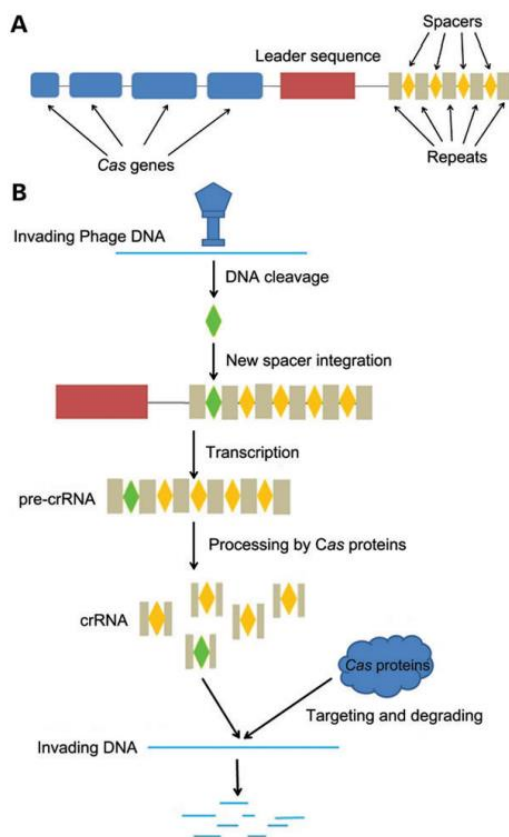
3.1 Τα στοιχεία-κλειδιά του συστήματος CRISPR/Cas9

Η CRISPR/Cas9 είναι μία τεχνολογία η οποία χρησιμοποιεί ομαδοποιημένες τακτικά διακεκομμένες σύντομες παλινδρομικές επαναλήψεις (CRISPR). Το πρώτο μόριο-κλειδί του συστήματος είναι ένα τμήμα RNA το οποίο ονομάζεται RNA-οδηγός (gRNA). Το μόριο αυτό είναι ένα προσχεδιασμένο τμήμα RNA που αποτελείται από περίπου 20 βάσεις και αποτελεί κομμάτι ενός μεγαλύτερου τμήματος RNA. Το τμήμα που δεν αποτελεί το gRNA προσδέεται στο DNA και το προσχεδιασμένο τμήμα, το gRNA, οδηγεί την Cas9 στο σωστό κομμάτι του γονιδιώματος. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η εξειδίκευση και η ακρίβεια του κοψίματος του γονιδιώματος στο σωστό σημείο από τη Cas9. Η Cas9 αποτελεί το δεύτερο μόριο-κλειδί αυτού του συστήματος και πρόκειται για μία νουκλεάση που χρησιμοποιεί τις αλληλουχίες CRISPR ως οδηγό για την αναγνώριση και διάσπαση συγκεκριμένων κλώνων DNA οι οποίοι εμφανίζουν συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία CRISPR. Ουσιαστικά το ένζυμο αυτό λειτουργεί ως ένα «μοριακό ψαλίδι» το οποίο έχει την ικανότητα να κόβει συγκεκριμένα σημεία του δίκλωνου DNA, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα προσθήκης ή αφαίρεσης τμημάτων DNA (Jinek et al., 2012).

3.2. Το σύστημα CRISPR/Cas

Στα βακτήρια και τα αρχαία, το σύστημα CRISPR/Cas ανακαλύφθηκε ως ένα επίκτητο σύστημα ανοσίας ενάντια σε ιούς και φάγους το οποίο λειτουργούσε με βάση την αναγνώριση του DNA τους μέσω του CRISPR RNA (crRNA) και το κόψιμο του από Cas νουκλεάσες (Jinek et al., 2012; Gasiunas et al., 2012). Η ύπαρξη του CRISPR/Cas έχει επιβεβαιωθεί περίπου στο 40% των βακτηριακών γονιδιωμάτων που έχουν αλληλουχηθεί και στο 90% των αλληλουχημένων γονιδιωμάτων από αρχαία (Grissa et al., 2007). Η γενετική περιοχή CRISPR αποτελείται από μία σειρά συντηρημένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών οι οποίες διακόπτονται στα ενδιάμεσα διαστήματα από διακριτές, μη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που ονομάζονται

spacers. Στο σύστημα αυτό, το ξένο DNA που θέλει να εισέλθει στον οργανισμό υπόκειται σε επεξεργασία από τη νουκλεάση Cas η οποία το σπάει σε μικρά θραύσματα. Έπειτα, τα θραύσματα αυτά ενσωματώνονται στο γενετικό τόπο CRISPR του γονιδιώματος του ξενιστή και είναι αυτά που θα αποτελέσουν τα τμήματα spacers. Μετά από κάποια μόλυνση από ιό ή φάγο, οι spacers χρησιμοποιούνται ως μεταγραφικές μήτρες για την παραγωγή crRNA το οποίο θα οδηγήσει την Cas στο να κόψει τις αλληλουχίες-στόχους στο DNA των παθογόνων (Zhang et al., 2014).



Εικόνα 10. Σύνοψη του βακτηριακού ανοσοποιητικού συστήματος CRISPR/Cas

A. Τυπική δομή του γενετικού τόπου CRISPR

B. Απεικόνιση της απόκτησης νέου spacer και της καταστροφής του ξένου DNA

Zhang et al., 2014

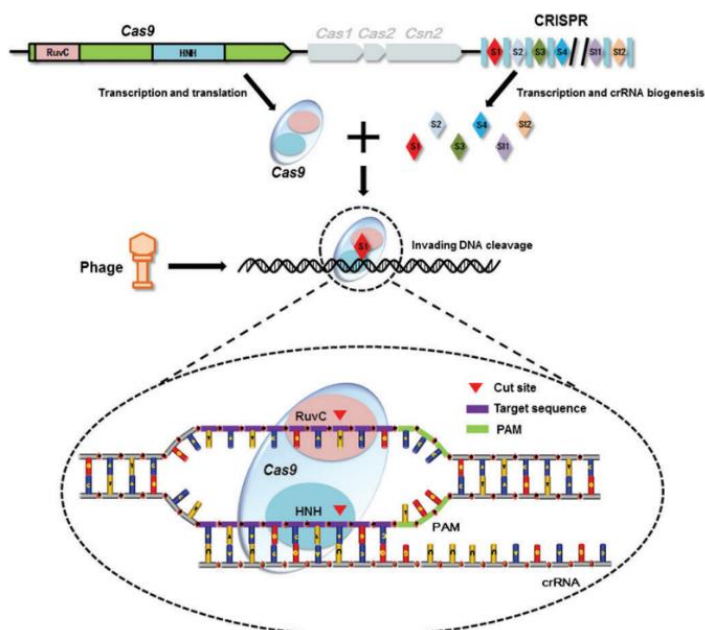
3.3. Ταξινόμηση του συστήματος CRISPR/Cas

Έχουν καταγραφεί περισσότερες από 40 διαφορετικές Cas πρωτεΐνες (Haft et al., 2005) οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στην βιογένεση των crRNA, την ενσωμάτωση των αλληλουχιών spacers και το κόψιμο του DNA που προσπαθεί να εισέλθει στον οργανισμό. Φαίνεται λοιπόν ότι η Cas εκτελεί ένα καίριο ρόλο και με βάση την αλληλουχία και την δομή της πρωτεΐνης αυτής, το σύστημα CRISPR/Cas ταξινομείται σε τρεις βασικούς τύπους I, II, III (Makarova et al., 2011). Το σύστημα CRISPR/Cas τύπου II χρειάζεται μόνο μία πρωτεΐνη Cas, την Cas9, η οποία περιέχει μια περιοχή νουκλεάσης HNH και μία περιοχή νουκλεάσης που

μοιάζει με RuvC περιοχή. Η περιοχή HNH είναι υπεύθυνη για το κόψιμο της συμπληρωματικής με το RNA οδηγό αλυσίδας του DNA. Αντίθετα, η περιοχή RuvC κόβει την μη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα απλό και αποτελεσματικό εργαλείο για την τροποποίηση του γονιδιώματος (Jinek et al., 2012).

3.4. Γενετική τροποποίηση μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9

Η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 για την τροποποίηση του γονιδιώματος βασίζεται στο κόψιμο και των δύο κλώνων του DNA (double-strand break/DSB) και στην μετέπειτα διαδικασία της επιδιόρθωσης του DNA. Στα ενδογενή συστήματα CRISPR/Cas9, το ώριμο crRNA συνδυάζεται με το trans-κωδικοποιημένο crRNA, tracrRNA, για να σχηματίσει ένα σύμπλεγμα tracrRNA:crRNA το οποίο καθοδηγεί την Cas9 στο σημείο-στόχο. Μάλιστα, το tracrRNA είναι μερικώς συμπληρωματικό προς το crRNA και συμμετέχει στην ωρίμανση του. Στο σημείο-στόχο, το εξειδικευμένο κόψιμο που πραγματοποιείται μέσω CRISPR/Cas9 λόγω της αλληλουχίας απαιτεί μια DNA αλληλουχία πρωτοδιαχωριστή (protospacer), η οποία θα ταιριάζει με το crRNA και μία ακόμα σύντομη αλληλουχία γειτονική σε αυτήν η οποία ονομάζεται PAM (Protospacer Adjacent Motif). Όταν προσδεθούν στο σημείο-στόχο, ο κλώνος του DNA που είναι συμπληρωματικός με το crRNA και ο συμπληρωματικός του κλώνος κόβονται από την περιοχή νουκλεάσης HNH και την περιοχή νουκλεάσης που μοιάζει με RuvC της Cas9, αντίστοιχα. Η διαδικασία αυτή, οδηγεί στην δημιουργία ενός διπλού σπασίματος στον διπλό κλώνο της αλληλουχίας-στόχου (Zhang et al., 2014).



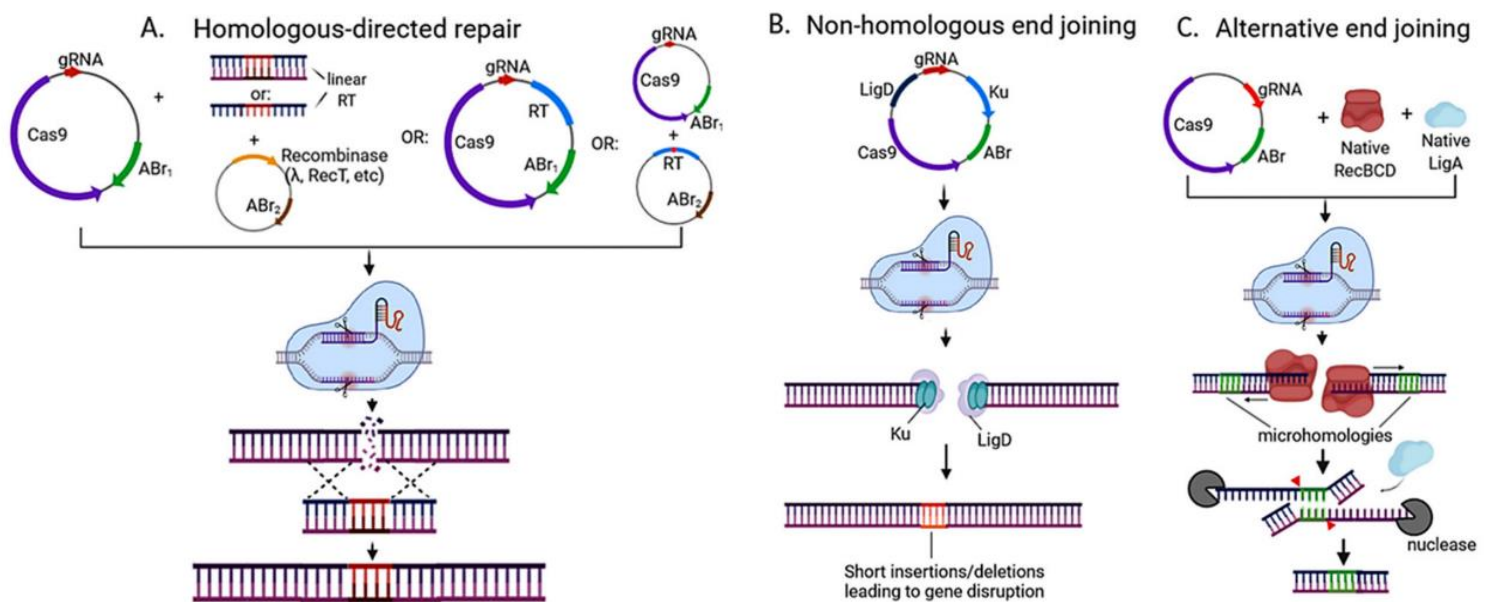
Εικόνα 11. Απεικόνιση του συστήματος CRISPR/Cas9.

Το ώριμο crRNA οδηγεί την Cas9 στο σημείο-στόχο όπου το DNA του φάγου προσπαθεί να εισβάλλει. Ο κλώνος του DNA που ταιριάζει με το crRNA και ο απέναντι κλώνος κόβονται κατ'εξακολούθηση από την περιοχή νουκλεάσης HNH και την περιοχή νουκλεάσης που μοιάζει με RuvC, της Cas9 δημιουργώντας ένα DSB στο σημείο-στόχο. Η εκλεξιμότητα του κοψίματος μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 απαιτεί αντιστοιχία της με το crRNA και μία αλληλουχία PAM 3 νουκλεοτιδίων τοποθετημένη καθοδικά από την αλληλουχία στόχο.

Zhang et al., 2014

Με στόχο την διευκόλυνση γενετικής τροποποίησης, οι μελετητές σχεδίασαν ένα ευαίσθητο τμήμα RNA που λειτουργεί ως οδηγός RNA και ονομάζεται gRNA. Η αλυσίδα αυτή αποτελεί ένα χμιαϊκό RNA το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά από τα crRNA και tracrRNA (Jinek et al., 2012). Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες παραλλαγές του συστήματος CRISPR/Cas9, που αναγνωρίζουν αλληλουχίες 20 ή 24 νουκλεοτιδίων οι οποίες ταιριάζουν με κατασκευασμένο gRNA και αλληλουχίες PAM 2 έως 4 νουκλεοτιδίων στα σημεία στόχους (Zhang et al., 2014).

Το σπάσιμο στο διπλό κλώνο που δημιουργείται από το CRISPR/Cas9 πυροδοτεί τις διαδικασίες επιδιόρθωσης του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων της σύνδεσης μη-ομόλογων ελεύθερων άκρων (NHEJ) που έχει έφεση στα σφάλματα και του ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR) χωρίς σφάλματα. Η επιδιόρθωση του DNA μέσω NHEJ είναι ταχύτατη και μπορεί να επιδιορθώσει άμεσα τη δίκλωνη ρήξη, όμως παράλληλα μπορεί να προκαλέσει ενθέσεις ή απαλοιφές στα σημεία-στόχους. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να εμποδίσουν ή να καταργήσουν κάποια λειτουργία των γονιδίων στόχων ή κάποιων γενομικών στοιχείων (Zhang et al., 2014).



Εικόνα 12. Στρατηγικές για επεξεργασία του γονιδιώματος με τη χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 σε βακτήρια.

A. Επεξεργασία μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού: ο ανασυνδυασμός με ένα καλούπι γραμμικού DNA ακολουθείται από αντι-επιλογή με νουκλεάσες CRISPR. Μία ετερόλογη ρεκομπινάση εισάγεται στο κύτταρο μέσω πλασμιδίου (ή φάγου) και συν-μεταφέρεται με το γραμμικό DNA και το πλασμίδιο CRISPR-νουκλεάσης που διαθέτει αντίσταση σε αντιβιοτικό ως δείκτη (ABr). Επεξεργασία γονιδιώματος μπορεί να επιτευχθεί και μέσω repair template (RT) και ενδογενούς ή εξωγενούς ρεκομπινάσης.

B. Επεξεργασία μέσω του μονοπατιού non-homologous end-joining (NHEJ).

C. Το μονοπάτι εναλλακτικής σύνδεσης άκρων (alternative end-joining) μπορεί να βρεθεί σε πολλά βακτηριακά είδη που δεν έχουν ολοκληρωμένο το μονοπάτι NHEJ.

Η ανακάλυψη και καθιέρωση του συστήματος CRISPR/Cas9 για την τροποποίηση του γονιδιώματος αποτέλεσε ένα εξαιρετικά σπουδαίο επίτευγμα καθώς αποτελεί έναν σχετικά εύκολο, γρήγορο και ελεγχόμενο τρόπο για γενετική τροποποίηση. Επιπλέον, μπορεί να γίνει χρήση ενός ενζύμου Cas9 και διάφορων gRNA καθένα από τα οποία θα έχει και ξεχωριστό σημείο-στόχο, καθώς το CRISPR/Cas9 έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει γονιδιωματικές αλλαγές ταυτόχρονα σε ανεξάρτητα μεταξύ τους σημεία-στόχους (Cong et al., 2013). Με τη βοήθεια της τεχνολογίας αυτής, μπορεί να επιταχυνθεί η παραγωγή διαγονιδιακών οργανισμών με πολλαπλές γονιδιακές μεταλλάξεις και να καταργηθούν πολλά από αυτά τα γονίδια ή ακόμα και ολόκληρες οικογένειες γονιδίων ώστε να μελετηθούν οι λειτουργίες των γονιδίων αυτών αλλά και η επιστατική τους σχέση (Wang et al., 2013).

4. Εφαρμογές του συστήματος CRISPR/Cas9

4.1. Επεξεργασία Γονιδιώματος

Το σύστημα CRISPR/Cas9 προσφέρει ένα ιδιαίτερα χρηστικό και ευέλικτο εργαλείο επεξεργασίας, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα για εξειδικευμένο και λεπτομερή χειρισμό συγκεκριμένων γενομικών στοιχείων, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την μελέτη της δράσης γονιδίων στόχων. Μέσω της χρήσης πλασμιδίων που εκφράζουν ταυτόχρονα Cas9 και crRNA, το CRISPR/Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί για να εισάγει συγκεκριμένες γενετικές τροποποιήσεις σε ανθρώπινα κύτταρα (Cong et al., 2013 ; Cho et al., 2013 ; . Hou et al., 2013). Ενσωματώνοντας πολλαπλά διαφορετικά μεταξύ τους gRNA με Cas9 σε μια συστοιχία CRISPR, το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να προκαλέσει ταυτόχρονα πολλές μεταλλάξεις σε κύτταρα θηλαστικών (Cong et al., 2013). Πέραν όμως της χρηστικότητας του σε γονιδιώματα θηλαστικών, το σύστημα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την επεξεργασία γονιδιωμάτων άλλων οργανισμών όπως του zebrafish (Auer et al., 2014; Chang et al., 2013), του ποντικού (Wang et al., 2013; Shen et al., 2013), της δροσόφιλα (Bassett et al., 2013; Yu et al., 2013), του καινοραβδίτη elegance (Friedland et al., 2013) αλλά και βακτηρίων (Jiang et al., 2013; DiCarlo et al., 2013).

4.2. Ρύθμιση της Μετάφρασης

Η ρύθμιση της μετάφρασης των γονιδίων αποτελεί μία βασική και ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Με το να διαταράσσει τις αλληλουχίες του γονιδιώματος που σχετίζονται με την μετάφραση, το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να συμμετέχει στην ρύθμιση της μετάφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Παρόλα αυτά, η διαδικασία αυτή είναι μη αναστρέψιμη καθώς οι τροποποιήσεις που υφίσταται το DNA είναι μόνιμες. Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί ένα τροποποιημένο σύστημα CRISPR/Cas9 το οποίο ονομάστηκε CRISPR inference (CRISPRi) και χρησιμοποιείται για την ρύθμιση της μετάφρασης καθοδηγούμενη από RNA (Cheng et al., 2013 ; Qi et al., 2013).

Ο Qi και η ομάδα του δημιούργησε ένα καταλυτικά δυσλειτουργικό μετάλλαγμα Cas9 (dCas9) από το οποίο απουσίαζε η δράση νουκλεάσης. Αυτή η dCas9 λοιπόν συν-εκφράστηκε μαζί με ένα gRNA έτσι ώστε να σχηματίσει ένα σύμπλοκο αναγνώρισης το οποίο θα μπορούσε να παρέμβει στην επιμήκυνση κατά την μετάφραση, την RNA πολυμεράση και τους παράγοντες προσκόλλησης κατά τη μετάφραση (Qi et al., 2013). Χρησιμοποιώντας δύο gRNA ένα εκ των οποίων στόχευε ένα γονίδιο κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (RFP) ενώ το δεύτερο το γονίδιο μίας πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP), οι ερευνητές παρατήρησαν ότι το CRISPRi μπορούσε να καταστείλλει ταυτόχρονα τα RFP και GFP χωρίς αυτά να παρεμβάλλονται σε *Escherichia coli* (Qi et al., 2013).

Μία άλλη ομάδα ερευνητών συνένωσε κατασταλτικές ή ενεργοποιητικές περιοχές δράσης (effector domains) στη dCas9, η οποία σε συνδυασμό με το gRNA μπορούσε να εφαρμόσει ακριβή και σταθερό μεταφραστικό έλεγχο σε γονίδια-στόχους όπως καταστολή ή ενεργοποίηση της μετάφρασης (Gilbert et al., 2013).

Τέλος, ο Cheng και οι συνεργάτες του, απέδειξαν ότι το σύστημα CRISPRi μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεμονωμένη ή ταυτόχρονη ρύθμιση της μετάφρασης πολλαπλών γονιδίων (Cheng et al., 2013). Η ανάπτυξη λοιπόν του συστήματος CRISPRi αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο για την εναλλαγή της γονιδιακής έκφρασης χωρίς να είναι απαραίτητο να τροποποιηθεί γενετικά η αλληλουχία του DNA-στόχου (Zhang et al., 2014).

4.3. Γονιδιακή Θεραπεία

Η εξειδικευμένη επεξεργασία του γονιδιώματος έχει τις δυνατότητες να θεραπεύσει μόνιμα ασθένειες, μέσω διακοπής γονιδίων που ευθύνονται για τις ασθένειες αυτές. Αυτό μπορεί να γίνει είτε διορθώνοντας μεταλλάξεις που οδηγούν στο μη φυσιολογικό φαινότυπο είτε εισάγοντας νέα γονίδια με προστατευτικό ρόλο (Zou et al., 2011; Yusa et al., 2011; Soldner et al., 2011). Η χρήση των πιο σύγχρονων γενετικά τροποποιημένων νουκλεασών καθιέρωσε το σύστημα CRISPR/Cas9 ως ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό και εξειδικευμένο εργαλείο επεξεργασίας για τη μελέτη του τομέα της γονιδιακής θεραπείας. Για παράδειγμα, μία ομάδα ερευνητών χρησιμοποίησε το CRISPR/Cas9 για να διακόψει τον υποκινητή του γονιδίου HIV-1 οδηγώντας έτσι σε αξιοσημείωτη μείωση της έκφρασης του HIV-1 σε ανθρώπινα μολυσμένα κύτταρα (Ebina et al., 2013).

Ένας τομέας που έχει βρει τεράστια ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια είναι η τεχνολογία των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPS) και στον οποίο βρίσκουν χρήση οι τροποποιημένες νουκλεάσες για την γενετική επεξεργασία των βλαστοκυττάρων (Hockemeyer et al., 2009; Ding et al., 2013). Η αστείρευτη δυνατότητα αυτό-ανανέωσης και η πολυδύναμη ικανότητα διαφοροποίησης τους, καθιστά τα κύτταρα iPS ιδιαίτερος χρήσιμα για την μοντελοποίηση ασθενειών και τη γονιδιακή θεραπεία. Το σύστημα CRISPR/Cas9 σε συνδυασμό με κύτταρα iPS έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για αντιμετώπιση ασθενειών όπως το σύνδρομο ICF (Immunodeficiency, Centromeric region instability, Facial anomalies) το οποίο προκαλείται από μια μετάλλαξη στο γονίδιο DNMT3B (Horii et al., 2013). Η μέθοδος αυτή έδωσε αρκετά ελπιδοφόρα αποτελέσματα, παρόλα αυτά απέχει πολύ η στιγμή που θα γίνει αποδεκτή η κλινική εφαρμογή της CRISPR/Cas9 για γονιδιακή θεραπεία. Βασικά σημεία τα οποία αξίζουν ιδιαίτερη προσοχή είναι η στοχοποίηση μόνο των επιθυμητών σημείων-στόχων από το σύστημα CRISPR/Cas9, χωρίς τον κίνδυνο στοχοποίησης άλλων περιοχών ρισκάροντας έτσι την δημιουργία μεταλλάξεων με αρνητικές επιπτώσεις. Επίσης, πολύ σημαντικά στάδια αποτελούν, η επιλογή της αλληλουχίας-στόχου, ο σχεδιασμός του gRNA αλλά και η μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος έτσι ώστε να ταυτοποιηθούν πιθανά σημεία που ίσως αποτελέσουν λανθασμένους στόχους του συστήματος λόγω ομοιότητας στην αλληλουχία με το σημείο-στόχο (Zhang et al., 2014).

5. Γενετική τροποποίηση του *B. cinerea* μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9

Ο μύκητας *B. cinerea* απελευθερώνει μικρά RNAs (sRNAs) τα οποία μπορούν να καταστείλλουν την έκφραση γονιδίων στο φυτό ξενιστή που σχετίζονται με την προστασία από παθογόνα (Weiberg et al., 2013). Αντίστοιχα, τα φυτά επίσης απελευθερώνουν sNRAs τα οποία στοχεύουν στην καταστολή της μολυσματικής ικανότητας των μυκήτων (Cai et al., 2018). Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη μεθόδων και εργαλείων με στόχο την γενετική τροποποίηση του *B. cinerea*. Έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα μεταμόρφωσης με τη χρήση *Agrobacterium* αλλά και βασιζόμενα σε πρωτοπλάστες (Hamada et al., 1994 ; Giesbert et al., 2012 ; Espino et al., 2014). Μάλιστα, υπάρχει πλήθος διαθέσιμων φορέων οι οποίοι διευκολύνουν την ανάπτυξη μεταλλαγμάτων και στελεχών που εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες, ιδιαίτερα σημαντικές για κυτταρολογικές μελέτες (Schumacher et al., 2012). Δυστυχώς όμως η παραγωγή μεταλλαγμάτων παραμένει μία αρκετά χρονοβόρα διαδικασία, κυρίως λόγω της πολυπύρηνης φύσης του *B. cinerea*, εξαιτίας της οποίας απαιτούνται πολλαπλοί γύροι καλλιέργειας σε μέσα επιλογής ώστε να επιτευχθεί ομοκαρύωση (Leisen et al., 2020).

Η εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 έχει οδηγήσει σε μία επανάσταση της γενετικής επεξεργασίας του γονιδιώματος και έχει διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό τη γενετική τροποποίηση ενός μεγάλου εύρους ειδών (Wright et al., 2016). Το CRISPR/Cas9 βασίζεται στην δημιουργία δίκλωνων σπασιμάτων από την ενδονουκλεάση Cas9 στο γονιδίωμα του οργανισμού (Leisen et al., 2020). Η στοχευμένη δράση της Cas9 βασίζεται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες του μονόκλωνου sgRNA, το οποίο καθοδηγεί την ενδονουκλεάση σε μία γενομική αλληλουχία-στόχο μέσω μίας ομόλογης αλληλουχίας 20 βάσεων (Cong Le. Et al., 2013; Mali et al., 2013; Jinek et al., 2012). Όσον αφορά την Cas9 από τον *Streptococcus pyogenes*, μία ακόμα προϋπόθεση σχετικά με την αλληλουχία κρίνεται απαραίτητη για την δράση της και αυτή αφορά την παρουσία του μοτίβου PAM, που είναι μία τριπλέτα NGG τοποθετημένη ακριβώς στο 3' άκρο της αλληλουχίας-στόχου (Sternberg et al., 2014). Στη συνέχεια τα σπασίματα επιδιορθώνονται μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού (NHEJ), γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μικρές προσθήκες ή απαλοιφές. Όταν όμως γίνει χρήση μίας αλληλουχίας repair template (RT) η οποία είναι ομόλογη με τις αλληλουχίες στα άκρα του σπασίματος, τότε μπορεί να πραγματοποιηθεί και ομόλογος ανασυνδυασμός ο οποίος και επιτρέπει την δημιουργία συγκεκριμένων επιθυμητών τροποποιήσεων στο γονιδίωμα (Leisen et al., 2020).

Το CRISPR/Cas9 έχει βρει εφαρμογή σε πλήθος διαφορετικών ειδών μυκήτων χρησιμοποιώντας όμως διαφορετικές στρατηγικές για την εισαγωγή της ενδονουκλεάσης Cas9 και του sgRNA (Schuster et al., 2019). Στις περισσότερες περιπτώσεις, γονίδια που κωδικοποιούν για Cas9 τροποποιούνται με τη χρήση βελτιστοποιημένων κωδικονίων και εισάγονται είτε με σταθερή χρωμοσωμική ενσωμάτωση είτε ενσωματώνονται παροδικά με τη χρήση φορέων. Για να επιτευχθεί έντονη έκφραση και αποτελεσματική στόχευση της Cas9 πυρηνικά, χρησιμοποιούνται πρακτικές όπως, ισχυροί εκκινητές μυκητιακής προέλευσης, γονίδια με βελτιστοποιημένα κωδικόνια και κατάλληλα πυρηνικά σήματα εντοπισμού (Leisen et al., 2020). Όσον αφορά την μεταφορά των sgRNAs, αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω πλασμιδιακών φορέων είτε μέσω *in vitro* σύνθεσης των sgRNAs. Πρόσφατα, μετασχηματισμός με τη χρήση συμπλέγματος Cas9-sgRNA ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP) έχει πραγματοποιηθεί σε πολλά είδη μυκήτων (Al Abdallah et al., 2017; Foster et al., 2018; Wang et al., 2018).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. Στόχος Πτυχιακής Εργασίας

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν ο μετασχηματισμός στελεχών του μύκητα *B. cinerea* με εισαγωγή της μετάλλαξης V575G. Αφού διαπιστώθηκε η επιτυχημένη εισαγωγής της μετάλλαξης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της στην ανάπτυξη του μύκητα. Ως δεύτερος στόχος της εργασίας ορίστηκε η παρατήρηση και καταγραφή των επιπτώσεων της μετάλλαξης στην ανθεκτικότητα των στελεχών στο σκεύασμα fludioxonil. Τρίτο και τελευταίο στόχο αποτέλεσε η δημιουργία και απομόνωση σε καθαρή μορφή στελεχών που διαθέτουν τη νέα μετάλλαξη V575G έτσι ώστε να συνεχιστεί η περαιτέρω μελέτη τους και να γίνει εκμετάλλευση τους ως οργανισμούς μοντέλα για σειρές πειραμάτων σχετιζόμενων με την ανθεκτικότητα του οργανισμού αυτού.

Εξαιρετικά ελκυστικό στοιχείο για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής αποτέλεσε το γεγονός ότι το fludioxonil αποτελεί ένα μυκητοκτόνο για το οποίο δεν υπάρχει εξειδικευμένος μηχανισμός αντιμετώπισης από τους μύκητες. Ο μηχανισμός που χρησιμοποιείται βασίζεται στο Multidrug Resistance (MDR), ένα φαινόμενο που αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εμπόδιο για την αντιμετώπιση των μυκητών. Επίσης, καθώς προσφάτως αναφέρθηκε η ύπαρξη μίας νέας μετάλλαξης που σχετίζεται με τον φαινότυπο MDR1, θεωρείται απαραίτητη προϋπόθεση ο μετασχηματισμός της για την ολοκληρωμένη μελέτη των χαρακτηριστικών της.

7. Υλικά και Μέθοδοι

7.1 Στελέχη *B. cinerea*

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *B. cinerea* από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Τμήματος του ΑΠΘ. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος B05.10 το οποίο χρησιμοποιείται σε πειράματα ως οργανισμός μοντέλο και του οποίου το γονιδίωμα έχει πλήρως αλληλουχηθεί.

7.2 Σχεδιασμός και Επιλογή του sgRNA

Ο σχεδιασμός και η επιλογή του sgRNA έγιναν με τη βοήθεια της μηχανής αναζήτησης – λογισμικού CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). Όταν γίνεται χρήση αυτού του εργαλείου, δίνεται σημασία στο γονιδίωμα του οργανισμού-στόχου αποκλείοντας έτσι τα off-target σκορ και συμπεριλαμβάνοντας μόνο τα on-target σκορ. Έπειτα γίνεται επιλογή των sgRNAs που παρουσιάζουν τα καλύτερα on-target σκορ εντός της επιθυμητής περιοχής του γονιδιώματος. Για να απορριφθεί η πιθανότητα τα sgRNAs να προσδένονται σε κάποια εκτοπική τοποθεσία του γονιδιώματος, πραγματοποιήθηκε blastn χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Ensembl (http://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea/Info/Index).

Η δομή των συγκεκριμένων sgRNA φαίνεται παρακάτω:

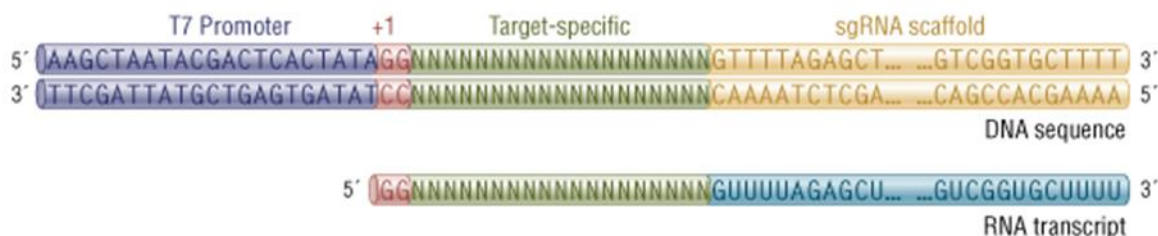
AAGCTAATACGACTCACTATAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG

T7 promoter G: Start of transcription Protospacer Constant part of sgRNA

7.2.1 Σύνθεση sgRNA με χρήση του HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit

Τα μονόκλωνα RNAs (sgRNAs) είναι ενσωματωμένα σε συμπλέγματα ριβονουκλεοπρωτεΐνης Cas9 (RNPs) και λειτουργούν οδηγώντας σε πρόσδεση του DNA εξαρτώμενη από την αλληλουχία του. Ο συνδυασμός Cas9 RNPs που προκύπτει μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το κόψιμο δίκλωνου DNA (dsDNA). Το HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit είναι σχεδιασμένο για γρήγορη παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων RNA in vitro. Η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με συνδυασμό του NTP Buffer Mix, του μείγματος T7 RNA Polymerase και του κατάλληλου καλουπιού DNA.

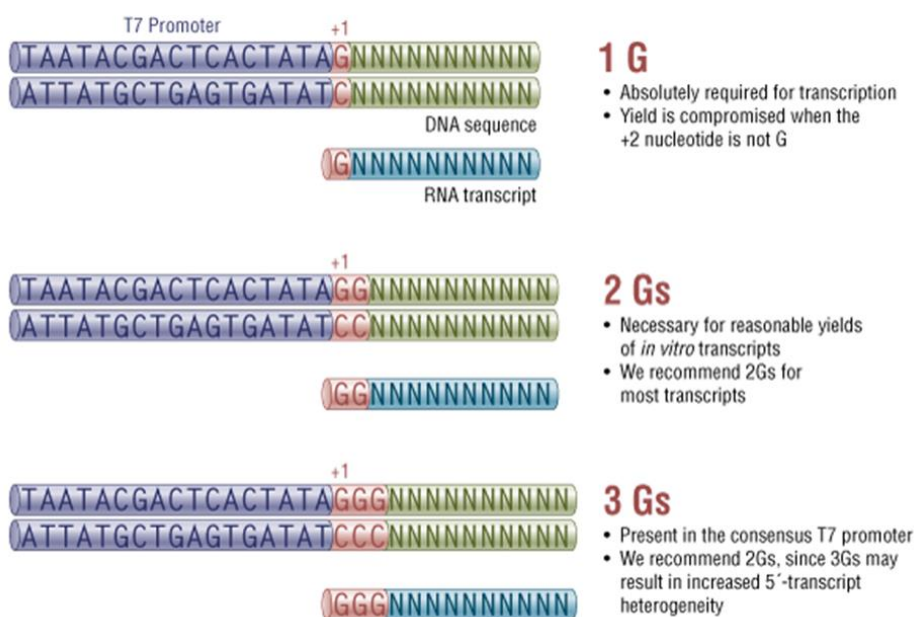
Για την προετοιμασία του sgRNA χρησιμοποιούνται καλούπια μεταγραφής sgRNA τα οποία αποτελούνται από αλληλουχίες DNA που περιέχουν έναν εκκινητή RNA πολυμεράσης T7 ο οποίος ακολουθείται από μία εξειδικευμένη, για τον εκάστοτε στόχο, αλληλουχία (target specific) μήκους περίπου 20 νουκλεοτιδικών βάσεων και μία σταθερή περιοχή μήκους περίπου 80 βάσεων.



Εικόνα 13. Σχεδιασμός καλουπιού RNA

Οι περιοχές που είναι εξειδικευμένες για την αλληλουχία-στόχο μπορούν να προβλεφθούν με τη βοήθεια online εργαλείων όπως το CHOPCHOP, Desktop Genetics ή Benchling. Η σταθερή περιοχή του sgRNA αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αλληλεπίδραση του μορίου με την πρωτεΐνη Cas9.

Πρέπει να σημειωθεί ότι εξαιτίας των προϋποθέσεων για τον εκκινητή της RNA πολυμεράσης T7, προτείνεται τα πρώτα 2 νουκλεοτίδια του μεταγράφου sgRNA να είναι GG. Αυτό συμβαίνει καθώς εάν μια περιοχή του sgRNA που είναι εξειδικευμένη για τον στόχο ξεκινάει με ένα ή παραπάνω Gs, αυτά μπορούν να πάρουν τη θέση των προτεινόμενων 2 Gs του επιθυμητού μεταγράφου RNA.

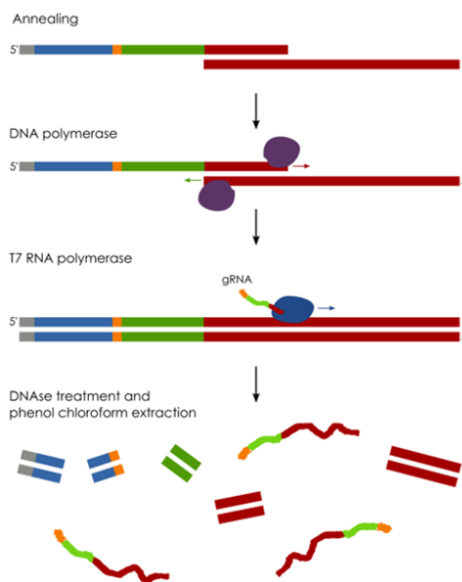


Εικόνα 14. Ο αριθμός των βάσεων γουανίνης (G) αποτελεί βασικό παράγοντα σχεδιασμού του sgRNA

7.3 In vitro παραγωγή sgRNA

In vitro gRNA production

- Annealing of oligos
- DNA polymerase fills up strands
- gRNA production via T7 RNA polymerase
- DNase treatment to remove DNA



Εικόνα 15. Απεικόνιση των βασικών βημάτων κατά την διαδικασία της *in vitro* παραγωγής gRNA

Για την *in vitro* παραγωγή του sgRNA χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- 10 x NEB buffer 2.1
- 500 mM NaCl
- 100 mM Tris-HCl, pH 7.9
- 100 mM MgCl₂
- 1 mg/ml BSA
- Στήλες καθαρισμού του προϊόντος της PCR (e.g. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey & Nagel)
- HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB)
- RNA Clean & Concentrator 25 (Zymo Research, Catalog No R1017 & R1018)

Όλες οι εργασίες πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον καθαρό από RNase (χρήση γαντιών και αιθανόλης, απολύμανση των tips και των tubes και απολύμανση του νερού).

7.3.1 Προετοιμασία του καλουπιού DNA για τη σύνθεση του gRNA

1. Ανάμειξη των ολιγονουκλεοτιδίων
 - a. 1 μ l (specific) protospacer oligo 100 pmol stock
 - b. 1 μ l constant gRNA oligo 100 pmol stock
 - c. 8 μ l H₂O
 - d. **10 μ l Total**

2. Θέρμανση των ολιγονουκλεοτιδίων σε θερμοκυκλοποιητή (95°C για 5 λεπτά, 95°C σε 85°C με 2°C/δευτερόλεπτο, 85°C σε 25°C με -0.1°C/δευτερόλεπτο, συνολικός χρόνος 15 λεπτά)

3. Προετοιμασία του T4 DNA mix (περιέχει την DNA πολυμεράση) για συμπλήρωση των προεξοχών:
 - a. 2.5 μ l dNTPs (DNA!) 10mM stock
 - b. 2 μ l (!) NEB buffer 2.1 10x buffer stock
 - c. 5 μ l H₂O
 - d. 0.5 μ l T4 DNA polymerase
 - e. **10 μ l Total**

4. Προσθήκη 10 μ l of T4 DNA mix στα θερμά ολιγονουκλεοτίδια

5. Επώαση στους 12°C για 20 λεπτά

6. Καθαρισμός με στήλη PCR, έκλουση με 30 μ l H₂O. Υπολογισμός της συγκέντρωσης με Nanodrop. Επιβεβαίωση του μεγέθους της μπάντας σε gel αγαρόζης 3-4% (TBE) (η μπάντα θα πρέπει να είναι μεγέθους περίπου 120 bp).

7. Χρήση του HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit ([NEB](#) manual: Protocol for small RNAs)
 - a. 6 μ l NTPs (RNA) 25 mM stock
 - b. 1.5 μ l T7 Buffer 10 X buffer stock
 - c. 1.5 μ l T7 Polymerase
 - x μ l H₂O

d. y μ l Template => 1-2 μ g DNA
e. **20 μ l** **Total**

8. Επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 37°C
9. Προσθήκη 14 μ l DEPC-H₂O, 4 μ l DNase 1 buffer (10 X), 2 μ l DNase 1. Επώαση για 30 λεπτά στους 37°C
10. Καθαρισμός του guide RNA (gRNA)

7.3.2. Καθαρισμός των small RNAs

*Όλα τα βήματα φυγοκέντρησης πραγματοποιήθηκαν σε 10,000-16,000 x g

1. Προετοιμασία του προσαρμοσμένου RNA Binding Buffer (80 μ l ανά δείγμα). Ανάμειξη ίσων ποσοτήτων buffer και αιθανόλης (π.χ. 40 μ l buffer και 40 μ l αιθανόλη)
2. Προσθήκη 2 φορές τον όγκο του προσαρμοσμένου buffer στο δείγμα και ανάμειξη
3. Μεταφορά του μίγματος σε στήλη Zymo-Spin και φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα
4. Προσθήκη 400 μ l RNA Prep Buffer στη στήλη, φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του υπερκείμενου.
5. Προσθήκη 700 μ l RNA Wash Buffer στη στήλη, φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του υπερκείμενου.
6. Προσθήκη 400 μ l RNA Wash Buffer στη στήλη, φυγοκέντρηση για 2 λεπτά ώστε να αποβληθεί τελείως το Wash Buffer

7. Προσεκτική μεταφορά της στήλης σε tube των 1,5ml που έχει απολυμανθεί για RNase
8. Προσθήκη 50 μl νερού απαλλαγμένο από DNase / RNase απευθείας πάνω στη στήλη και φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα
9. Το εκλουσμένο RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας ή να αποθηκευτεί στους -80°C
10. Έλεγχος της ακεραιότητας του gRNA σε μετουσιωμένο PAA gel

7.4 Σχεδιασμός και επιλογή repair/donor template

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην χρήση πλασμιδιακών φορέων για την πρόκληση δίκλωνου σπασίματος (Double-Strand Break/DSB) εκμεταλλεύονται τον ομόλογο ανασυνδυασμό για γενετική τροποποίηση. Οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs), νουκλεάσες τύπου TALEN (TALENs) και η CRISPR αποτελούν μεθόδους που μπορούν να κατευθύνουν μία νουκλεάση να προκαλέσει ένα συγκεκριμένο σπάσιμο στην διπλή έλικα του DNA (Hahn et al., 2021).

Τα Homology Directed Repair (HDR) templates, δηλαδή τα καλούπια που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία ή την εισαγωγή νέων στοιχείων μέσα σε ένα γονίδιο, απαιτούν την παρουσία ενός ορισμένου ποσοστού ομολογίας γύρω από την αλληλουχία-στόχο η οποία θα τροποποιηθεί. Μεγαλύτερη επιτυχία έχει παρατηρηθεί με την χρήση homology arms που ξεκινούν από το σημείο του DSB που προκαλείται μέσω CRISPR. Γενικότερα, η θέση εισαγωγής της εκάστοτε τροποποίησης θα πρέπει να είναι σε πολύ μικρή απόσταση από το DSB, ιδανικά θα πρέπει να απέχει λιγότερο από 10bp εφόσον αυτό είναι εφικτό (Leisen et al., 2020).

Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι υπάρχει η πιθανότητα τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κατά τη μέθοδο CRISPR να συνεχίσουν τη δράση τους κόβοντας το DNA ακόμα και αφού ένα διπλό σπάσιμο έχει ήδη δημιουργηθεί και επιδιορθωθεί. Εφόσον η αλληλουχία PAM/αλληλουχία στόχος gRNA παραμένουν άθικτες, η ενδονουκλεάση Cas9 θα συνεχίσει να κόβει και να επιδιορθώνει DNA. Αυτή η συνεχόμενη επεξεργασία του γονιδιώματος είναι προβληματική σε περιπτώσεις όπου ο ερευνητικός στόχος είναι η εισαγωγή μίας συγκεκριμένης μετάλλαξης ή αλληλουχίας. Για να αποφευχθεί το φαινόμενο αυτό, ο σχεδιασμός του HDR template θα πρέπει

να γίνει με τέτοιο τρόπο ώστε να εμποδίζει την περαιτέρω δράση της Cas9 έπειτα από την επιδιόρθωση του αρχικού σπασίματος. Δύο από τους πιο συνηθεις τρόπους για την αποφυγή αυτής της ανεπιθύμητης επεξεργασίας είναι η προσθήκη κάποιας σιωπηλής μετάλλαξης είτε στην αλληλουχία PAM είτε στην αλληλουχία του gRNA (Hahn et al., 2021).

Ο σχεδιασμός των εκκινητών του sgRNA πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) ενώ για τους εκκινητές του Repair Template χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Geneious (<https://www.geneious.com/features/primer-design/>) και οι εκκινητές φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

	Forward Primer	Reverse Primer
sgRNA	5'-AAG CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGC AAC CGC AAT TAC ATG CCA GTT TTA GAG CTA GAA ATA GCA AG-3'	5'-AAA AGC ACC GAC TCG GTG CCA CTT TTT CAA GAT AAC GGA CTA GCC TTA TTT TAA CTT GCT ATT AGC TCT AAA AC-3'
	5'-AAG CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGT CTT TCA AAG TTA TGT GCC GGT TTT AGA GCT AGA AAT AGC AAG-3'	
Repair Template	5'-ATG GCA TTC CTA AAT TTG GCG GAA GAA ATA CAA TAT GAA CCT TCA AAG GGA TGG TTC TGG TTC CAA AGT TAT GGG CCC TGG CAT GTA ATT GCG-3'	5'-CTC CCA AGC TTG ATC GGC AAG AGG GCC AGT TTC CGC ACA AAG CTC AGC TAA AGC AAC CGC AAT ATG CCA GGG CCC ATA ACT TTG AAA GAA CCA-3'

Πίνακας 1. Αλληλουχίες των πρόσθιων και οπίσθιων εκκινητών που σχεδιάστηκαν για τα sgRNA και Repair Template

7.5 Προετοιμασία και μετασχηματισμός πρωτοπλαστών

Οι πρωτοπλάστες, δηλαδή τα απαλλαγμένα από το κυτταρικό τους τοίχωμα κύτταρα που διαθέτουν την πλασματική τους μεμβράνη άθικτη, αποτελούν χρήσιμα εργαλεία μίας εναλλακτικής μεθόδου γενετικής τροποποίησης (Ning et al., 2022). Η ανάπτυξη πρωτοπλαστών υψηλής ποιότητας αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα και απαιτητικά στάδια κατά της διαδικασίας της μεταμόρφωσης στους μύκητες. Κάθε μύκητας αποτελεί έναν ξεχωριστό οργανισμό του οποίου το κυτταρικό τοίχωμα διαθέτει μοναδικές ιδιότητες. Είναι λοιπόν πασιφανές ότι απαιτούνται διαφορετικοί συνδυασμοί ενζύμων τα οποία καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα με στόχο την αφαίρεση του (Díaz et al., 2019). Το κυτταρικό τοίχωμα δεν συμβάλλει μόνο στην δημιουργία της άκαμπτης και σταθερής δομής του μύκητα, αλλά λειτουργεί και ως μέσο προστασίας από τους εξωτερικούς παράγοντες για αυτό και η αφαίρεση του θα πρέπει να

πραγματοποιείται με την ύψιστη προσοχή έτσι ώστε να μην δημιουργηθούν βλάβες στην πλασματική μεμβράνη και να σχηματιστεί ένας άθικτος πρωτοπλάστης. Ένας βιώσιμος πρωτοπλάστης μπορεί να επανασυνθέσει το κυτταρικό τοίχωμα, να υποστεί πολλαπλασιασμό και να αναγεννήσει ολόκληρο το κύτταρο σε θρεπτικό μέσο (Ning et al., 2022).

7.5.1 Πρωτόκολλο προετοιμασίας πρωτοπλαστών

1. Συλλογή των σπορίων και εμβολιασμός 100ml θρεπτικού μέσου HA με 1×10^8 σπόρια
2. Ολονύκτια επώαση με παράλληλη ανακίνηση σε φλασκί Erlenmeyer χωρητικότητας 500ml στους 22°C (διάρκεια επώασης \approx 17-18 ώρες)
3. Μεταφορά υγρού σε Falcon tubes των 50ml και φυγοκέντρηση σε 125000g/ 2000rpm για 8 λεπτά
4. Απόρριψη του υπερκείμενου, συνδυασμός των πελετών που έχουν σχηματιστεί και πλύση του μυκηλίου με 40ml KCl 0.6 M/ Na(Pi) 0.1 M και ανακίνηση χειροκίνητα με πιπέτα
5. Φυγοκέντρηση για 8 λεπτά σε 2000rpm
6. Απόρριψη του υπερκείμενου και πλύση της πελέτας όπως στο βήμα 4
7. Φυγοκέντρηση για 8 λεπτά σε 2000rpm
8. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναιώρηση της πελέτας σε 20ml 0.6 M KCl/Na (Pi) 0.1 M με 0.2 g (1%) σκόνη Glucanex
9. Επώαση σε κινούμενο 3D shaker (ένταση: 4.5-5) στους 28°C για συνολικά 2-3 ώρες με χειροκίνητη ανακίνηση ανά 30 λεπτά.
10. Φιλτράρισμα των πρωτοπλαστών με τη χρήση αποστειρωμένου Nylon υφάσματος (πάχος 30 μ m) μέσα σε 50ml Falcon tube το οποίο περιέχει 10ml παγωμένο buffer TMS. Συμπλήρωση με κρύο buffer TMS μέχρι τα 40ml. Όλα τα υλικά πρέπει να παραμένουν σε πάγο.
11. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C σε 1500rpm (στο στάδιο αυτό θα πρέπει να είναι ορατή μία λευκή πελέτα)
12. Απόρριψη του υπερκείμενου και απομάκρυνση του υπολειπόμενου υγρού με τη χρήση πιπέτας. Συμπλήρωση με κρύο διάλυμα buffer TMS έως τα 5ml, μεταφορά 10 μ l aliquot για

καταμέτρηση των πρωτοπλαστών σε θάλαμο Neubauer, συμπλήρωση μέχρι τα 40-50 ml με TMS buffer

13. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4°C σε 1500rpm

14. Επαναδιαλυτοποίηση πρωτοπλαστών σε 100μl κρούου TMSC buffer στην επιθυμητή συγκέντρωση

7.5.2 Πρωτόκολλο μετασχηματισμού πρωτοπλαστών

1. Κατανομή 100μl aliquots που περιέχουν $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ πρωτοπλάστες σε tubes των 1.5 ml

2. Επώαση για 10 λεπτά σε πάγο

3. Προσθήκη 5-15 μg DNA σε 60μl Tris-EDTA + 40mM CaCl₂ και ανακίνηση με χρήση vortex

4. Μίξη των πρωτοπλαστών με το DNA. Χρήση πιπέτας για ανάμιξη ώστε να υποβοηθηθεί η ένωση των RNPs με το Repair Template (RP)

5. Επώαση για 10 λεπτά σε πάγο με σκοπό την αναγέννηση. Έπειτα από 3 λεπτά επώασης, γίνεται απομάκρυνση του διαλύματος PEG3350 από τον θάλαμο για πτώση της θερμοκρασίας του για 5-7 λεπτά

6. Στο δείγμα των 160μl γίνεται προσθήκη 10μl PEG 60% σε MS, pH 6.3 και ανάμιξη με τη χρήση πιπέτας

7. Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ειδάλλως υπάρχει ο κίνδυνος να καθιζάνει η PEG

8. Προσθήκη 680 μl TMSC (RT), ανάμιξη και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 3500 rpm

9. Αφαίρεση της PEG με τη χρήση πιπέτας και έπειτα επαναιώρηση της πελέτας σε 200μl TMSC (RT)

10. Προσθήκη fludioxonil (0,5 ppm) σε 10-100 ml υγρού SH-άγαρ. Ανάμιξη με προσοχή για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων αέρα

11. Προσθήκη των πρωτοπλαστών με βύθισμα στο υγρό άγαρ, καλή ανάμιξη και επάλειψη σε δύο τρυβλία

12. Οι ανθεκτικές αποικίες μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με άγαρ που περιείχαν θρεπτικό μέσο με HA και fludioxonil

7.6. Πρωτόκολλο δράσης της Cas9

Η Cas9 και το μονόκλωνο guide RNA, προ-επωάζονται σε cleavage buffer σε αναλογία 1:1 με σκοπό να σχηματιστεί το σύμπλεγμα Cas9-guide RNA (RNP) πριν την προσθήκη του DNA-στόχου. Η αντίδραση του «κοψίματος» από την Cas9 εκκινείται από την προσθήκη του DNA στο σύμπλεγμα RNP. Το σύμπλεγμα της πρωτεΐνης και του RNA πρέπει να βρίσκεται σε πλεόνασμα συγκριτικά με το υπόστρωμα DNA. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μοριακή αναλογία $\geq 5:1$. (Anders et al., 2014).

	Συγκέντρωση stock	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μl)
DEPC-H ₂ O	-	-	11
Cleavage buffer	5 x	1 x	4.4
Cas9	15 μM (2.4 μg/μl)	1.5 μM	2.2
Guide RNA	15 μM (0.5 μg/μl)	1.5 μM	2.2
Επώαση για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα γίνεται προσθήκη του DNA.			
DNA-στόχος	100 ng/μl	10 ng/μl	2.2
Συνολικός όγκος			22

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις μίγματος RNP και δότη DNA in vitro

8. Αποτελέσματα

Πραγματοποιήθηκε επίστρωση των διαλυμάτων σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα ώστε να δοθεί η δυνατότητα στους μύκητες να αναπτυχθούν. Στο υπόστρωμα είχε γίνει προσθήκη του μυκητοκτόνου fludioxonil, ανθεκτικότητα στο οποίο προσδίδει η υπό μελέτη μετάλλαξη. Ορίστηκαν δύο δείγματα ως αρνητικά control, για τα οποία εφαρμόστηκαν τα ίδια πειραματικά βήματα χωρίς όμως την δημιουργία μετάλλαξης, δηλαδή τα στελέχη παρέμειναν αγρίου τύπου. Η ύπαρξη δειγμάτων control αποτελεί απαραίτητο βήμα σε κάθε πειραματική διαδικασία και στοχεύει στην επιβεβαίωση της επιτυχίας του πειράματος. Παρατηρήθηκε έντονη ανάπτυξη αποικιών στα τρυβλία γεγονός που αποτελεί την πρώτη επιβεβαίωση για την επιτυχημένη έκβαση του πειράματος. Το σύστημα CRISPR/Cas αποδείχθηκε λειτουργικό και οδήγησε στην επιτυχημένη εισαγωγή της μετάλλαξης V575G η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα στο *B. cinerea* ενάντια στο σκεύασμα fludioxonil. Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε μηδενική ανάπτυξη στα τρυβλία με τα δείγματα control. Γεγονός που επιβεβαιώνει τα εξής:

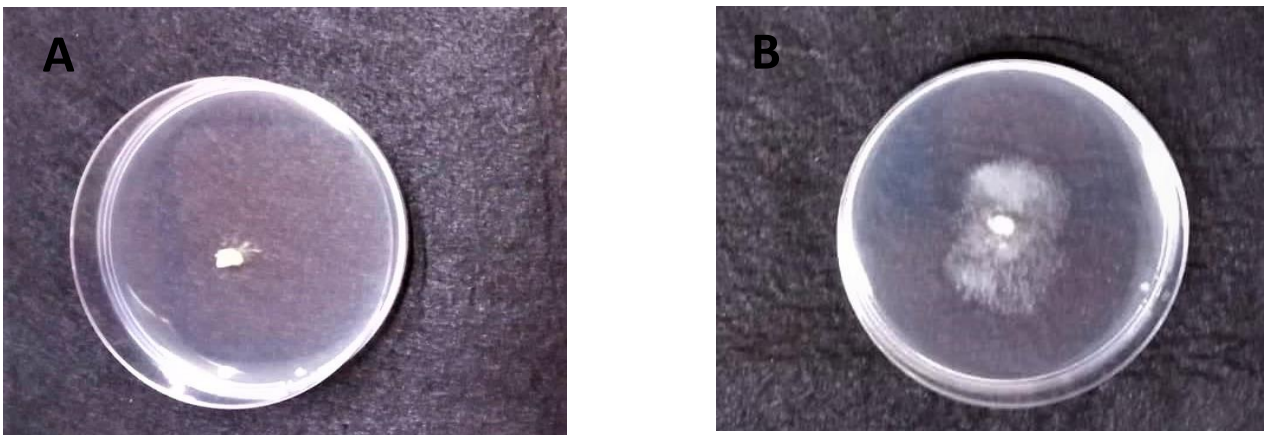
- a. Τα στελέχη αγρίου τύπου που χρησιμοποιήθηκαν δεν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο fludioxonil
- b. Δεν υπήρξαν σημαντικές επιμολύνσεις κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας
- c. Το σκεύασμα fludioxonil που χρησιμοποιήθηκε είναι λειτουργικό και διαθέτει μυκητοκτόνο δράση.

Το επόμενο χρονικό διάστημα αφιερώθηκε στην ανάπτυξη των αποικιών και την φροντίδα των τρυβλίων. Πραγματοποιήθηκαν ανανεώσεις του θρεπτικού μέσου και μεταφορές σε νέα τρυβλία ανά τακτά χρονικά διαστήματα και όποτε αυτό κρινόταν απαραίτητο, ανάλογα με την ανάπτυξη των αποικιών. Η διαδικασία ανανέωσης-μεταφοράς έλαβε χώρα τουλάχιστον τρεις φορές. Πρωταρχικός στόχος της διαδικασίας αυτής ήταν η επίτευξη ομοκαρύωσης. Σκοπός ήταν οι αποικίες να απαλλαχθούν στον μέγιστο δυνατό βαθμό από πυρήνες αγρίου τύπου, έτσι ώστε τα τρυβλία να περιέχουν σχεδόν κατά αποκλειστικότητα πυρήνες που περιέχουν την νέο-εισερχόμενη μετάλλαξη.

Μετά το πέρας των ανανεώσεων, επιλέχθηκαν κάποια δείγματα τα οποία φάνηκαν να έχουν ικανοποιητική ανάπτυξη στο θρεπτικό υλικό. Τα δείγματα αυτά μεταφέρθηκαν σε τρυβλία των οποίων το θρεπτικό μέσο περιείχε το σκεύασμα fludioxonil σε υψηλότερη συγκέντρωση. Στην εικόνα 15 φαίνονται σε φωτογραφίες οι δύο διαφορετικές εκβάσεις του πειράματος. Στην εικόνα 15Α, παρατηρείται σχεδόν μηδαμινή ανάπτυξη του μύκητα. Αυτό υποδηλώνει ότι δεν έχει γίνει πραγματοποιηθεί η εισαγωγή της μετάλλαξης με αποτέλεσμα ο μύκητας να

μην διαθέτει ανθεκτικότητα στο μυκητοκτόνο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δόση του φαρμάκου δεν είναι ιδιαίτερος υψηλή, καθώς μια πολύ υψηλή δόση ίσως οδηγούσε σε ακαριαίο θάνατο των αποικιών. Αυτό εξηγεί και την λιγοστή ανάπτυξη που διακρίνεται στην φωτογραφία.

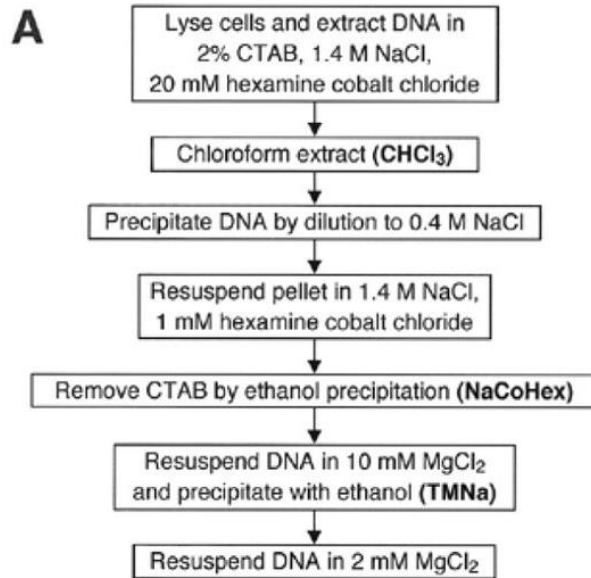
Αντίθετα, στην φωτογραφία 15B φαίνεται μια τελείως διαφορετική εικόνα. Η αποικία παρουσιάζει έντονη ανάπτυξη στο θρεπτικό μέσο, γεγονός που προϋποθέτει την ύπαρξη ανθεκτικότητας και άρα επιβεβαιώνει την επιτυχημένη εισαγωγή της μετάλλαξης. Σε δείγμα που προήλθε από το συγκεκριμένο τρυβλίο η ύπαρξη της επιθυμητής μετάλλαξης επιβεβαιώθηκε μέσω αλληλούχησης.



Εικόνα 15. Φωτογραφίες από αποικίες *B. cinerea* σε θρεπτικό υλικό που περιέχει fludioxonil

- A.** Δεν παρατηρείται ανάπτυξη του μύκητα στο τρυβλίο. Το πείραμα δεν έχει πετύχει στο συγκεκριμένο δείγμα
- B.** Παρατηρείται ανάπτυξη των στελεχών, γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχημένη έκβαση του πειράματος στο συγκεκριμένο δείγμα

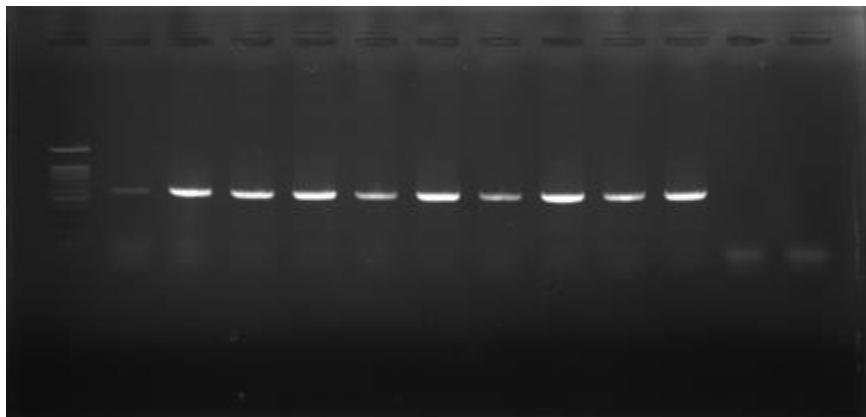
Εφόσον οι αποικίες βρίσκονταν στην επιθυμητή φάση ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της επιλογής. Λήφθηκαν δείγματα από τα τρυβλία και έγινε απομόνωση του DNA με τη χρήση του πρωτοκόλλου CTAB.



Εικόνα 16. Σχεδιάγραμμα ενός βασικού πρωτοκόλλου CTAB για εξαγωγή DNA.

Lichten et al., 2000

Στη συνέχεια, η επιθυμητή αλληλουχία DNA απομονώθηκε και πολλαπλασιάστηκε μέσω PCR και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel πηκτή αгарόζης 2%.



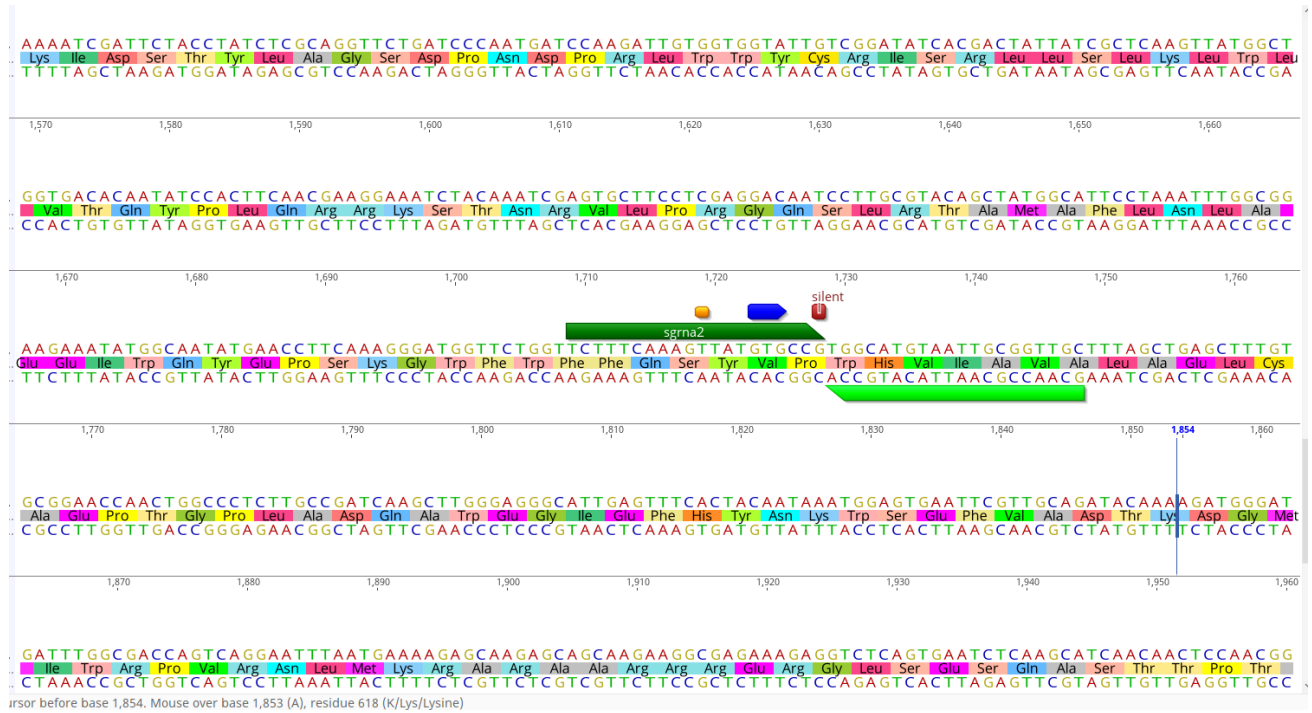
Εικόνα 17. Φωτογραφία από πηκτή αгарόζης 2%.

Στην εικόνα φαίνεται το προϊόν της PCR κατά την οποία ενισχύθηκε τμήμα του επιθυμητού γονιδίου, *Mtr1*.

Οι φωτεινές μάντες υποδηλώνουν την επιτυχημένη ενίσχυση της περιοχής ενδιαφέροντος του γονιδίου.

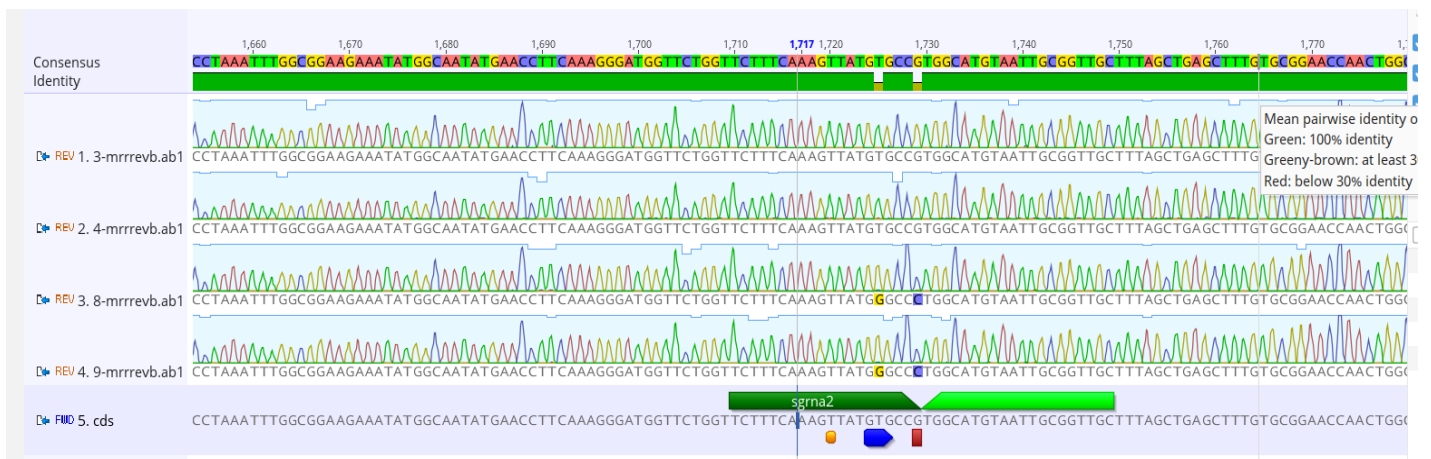
Τα δύο τελευταία δείγματα από δεξιά αποτελούν τα negative control .

Τελευταίο βήμα της ερευνητικής διαδικασίας αποτέλεσε η αποστολή των δειγμάτων για αλληλούχιση κατά Sanger με στόχο την ολοκληρωτική επιβεβαίωση για την επιτυχημένη εισαγωγή της επιθυμητής μετάλλαξης στο γονιδίωμα των στελεχών *B. cinerea*.



Εικόνα 18. Σχεδιασμός των δύο RNA στην πλατφόρμα Geneius.

Για την προβολή του σχεδιασμού και των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα Geneius έτσι ώστε να είναι οπτικοποιημένα σε κατανοητή μορφή. Στην εικόνα 18 φαίνεται τμήμα της αλληλουχίας του Mrr1 γονιδίου και τα βασικά στοιχεία του πειραματικού σχεδιασμού. Οι δύο πράσινες μπάρες απεικονίζουν τις 2 αλληλουχίες RNA που σχεδιάστηκαν ώστε να είναι συμπληρωματικές με αλληλουχίες που γειτνιάζουν με την θέση εισαγωγής της μετάλλαξης. Η θέση αυτή αποτελεί την τριπλέτα **GTG** η οποία συμβολίζεται με την μπλέ μπάρα στην εικόνα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η τριπλέτα **TGG** που εμφανίζεται πριν την έναρξη του RNA αποτελεί την αλληλουχία PAM. Η θέση εισαγωγής της μετάλλαξης και η αλληλουχία PAM απέχουν μόλις λίγες βάσεις πάνω στο γονίδιο με αποτέλεσμα το κόσμημα του DNA να πραγματοποιηθεί σε πολύ μικρή απόσταση από την θέση-στόχο. Επίσης στο σχήμα φαίνεται και η θέση εισαγωγής της σιωπηλής μετάλλαξης, η ύπαρξη της οποίας είναι απαραίτητη κατά τον σχεδιασμό και συνηθίζεται να εισάγεται σε κοντινή απόσταση από την αλληλουχία PAM. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η σιωπηλή μετάλλαξη δεν θα μπορούσε να μπει στην τριπλέτα **TGG** (αλληλουχία PAM), καθώς η τριπλέτα **TGG** είναι η μοναδική που κωδικοποιεί το αμινοξύ τρυπτοφάνη και άρα οποιαδήποτε αλλαγή θα επέφερε και σοβαρή αλλαγή στην αλληλουχία του πρωτεϊνικού προϊόντος. Για τον λόγο αυτό έγινε εισαγωγή της σιωπηλής μετάλλαξης στην αμέσως γειτονική τριπλέτα όπου έγινε αλλαγή του **CCG**, το οποίο θα δώσει και πάλι προλίνη. Τέλος, η κίτρινη μπάρα συμβολίζει την θέση περιοριστικού ενζύμου.



Εικόνα 19. Αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger στην πλατφόρμα Geneious.

Στα τελικά αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger (εικόνα 19) φαίνεται η αλληλούχηση τεσσάρων δειγμάτων, δύο εκ των οποίων περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Η αλληλουχία cds αποτελεί τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου *Mtr1* του *B. cinerea* όπως αυτό έχει καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων. Για τα υπόλοιπα τέσσερα δείγματα πραγματοποιήθηκε στοίχιση των ακολουθιών τους (sequence alignment) έτσι ώστε να είναι πιο εύκολη η σύγκριση τους. Τα δείγματα 1 και 2 δεν παρουσιάζουν καμία διαφορά σε σχέση με την αλληλουχία cds, συμπεραίνοντας έτσι ότι η πειραματική διαδικασία δεν στέφθηκε με επιτυχία στα δείγματα αυτά. Τα δείγματα 3 και 4 όμως παρουσιάζουν τις δύο επιθυμητές διαφορές. Αρχικά, έχει γίνει επιτυχημένη εισαγωγή της μετάλλαξης V575G, το υπογραμμισμένο με κίτρινο χρώμα G βρίσκεται στη μέχρι πρότινος θέση της βάσης T στην τριπλέτα GGG. Επιπλέον, υπογραμμισμένη με μπλε χρώμα είναι η βάση C, η τελευταία βάση της τριπλέτας CCC επιβεβαιώνοντας την εισαγωγή της σιωπηλής μετάλλαξης στην τριπλέτα CCG.

9. Συζήτηση

Η εφαρμογή μυκητοκτόνων αποτελεί την πιο απλή και αποτελεσματική μέθοδο για τον έλεγχο των φυτικών ασθενειών που προκαλούνται από παθογόνους μύκητες. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα που παρατηρείται στις καλλιέργειες αποτελεί πλέον ένα σημαντικό πρόβλημα της αγροτικής παραγωγής. Το fludioxonil αποτελεί ένα μυκητοκτόνο το οποίο δρα ενάντια σε πολλούς παθογόνους μύκητες, ο ακριβής τρόπος δράσης του όμως παραμένει άγνωστος στο μεγαλύτερο βαθμό. Ο μύκητας υπαίτιος για την ασθένεια της τεφράς σήψης, *B. cinerea*, αποτελεί έναν μικροοργανισμό με ιδιαίτερη οικονομική σημασία ο οποίος φαίνεται να έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σε μια πληθώρα μυκητοκτόνων στα οποία συμπεριλαμβάνεται και το fludioxonil. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Rupp και η ομάδα της (2017), παρατήρησαν, το έτος 2010, αρχική συχνότητα ανθεκτικότητας στο fludioxonil κάτω του 10%, χαμηλότερη από όλα τα υπόλοιπα υπό μελέτη μυκητοκτόνα. Στα επόμενα 5 χρόνια, από το 2010 έως το 2015, τα επίπεδα ανθεκτικότητας παρουσίασαν ιλιγγιώδη αύξηση αγγίζοντας το 85%. Η ανθεκτικότητα αυτή του *B. cinerea* έχει συσχετιστεί με τους φαινότυπους Πολλαπλής Ανθεκτικότητας MDR1 και MDR1h, καθώς και οι δύο φαινότυποι συνδέονται με την υπερ-έκφραση του γονιδίου *atrB* και με μεταλλάξεις στον μεταγραφικό παράγοντα Mtr1. Η Πολλαπλή Ανθεκτικότητα αποτελεί ένα αναδυόμενο πρόβλημα στον αγώνα για την αντιμετώπιση της μόλυνσης από τον *B. cinerea* καθώς αφορά στην ανάπτυξη μηχανισμών δράσης που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε πολλαπλά φάρμακα και όχι την ύπαρξη ενός συγκεκριμένου στόχου δράσης. Πιο συγκεκριμένα, ο Kretschemer και η ομάδα του (2009) έπειτα από μελέτες σε καλλιέργειες της Γαλλίας και της Γερμανίας παρατήρησαν μία αύξηση ύψους 55% στην συχνότητα εμφάνισης των φαινοτύπων MDR από το 1994 μέχρι το 2009 ενώ από το έτος 2006 έως το 2009 υπήρξε άνοδος στην συχνότητα από 23% σε 38%. Ένα νέο κίνδυνο μάλιστα μπορεί να αποτελέσει ο συνδυασμός Πολλαπλής Ανθεκτικότητας με την ανθεκτικότητα σε ένα συγκεκριμένο target site. Η κατάληξη του συνδυασμού αυτού είναι άγνωστη, όμως σαφώς θα αποτελέσει ένα ιδιαίτερα περίπλοκο αντίπαλο στον αγώνα για την καταπολέμηση του *B. cinerea*.

Στην μάχη αυτή ωστόσο υπάρχουν πολλοί σύμμαχοι και έναν από αυτούς αποτελεί το σύστημα CRISPR/Cas. Τεχνολογίες CRISPR/Cas αναπτύσσονται πλέον με γοργούς ρυθμούς καθώς αποτελούν ένα εξαιρετικό σύστημα γενετικής μηχανικής του οποίου οι δυνατότητες είναι αστείρευτες. Το σύστημα αυτό βρίσκει εφαρμογή σε αμέτρητους επιστημονικούς τομείς οι οποίοι έχουν προαναφερθεί εκτενώς, όμως πλέον έχουν

δημιουργηθεί πρωτόκολλα για την εκμετάλλευση του και στην γενετική επεξεργασία των μυκητών. Διαφορετικές εκδοχές της νουκλεάσης Cas9 έχουν σχεδιαστεί ώστε το σύστημα αυτό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικροοργανισμούς με τη μεγαλύτερη δυνατή επιτυχία. Για παράδειγμα, ο Kleinstiver (2015) σχεδίασε μία ενδονουκλεάση Cas9 που διέθετε τροποποιημένο μοτίβο PAM (NGA ή NAG αντί του NGG) με στόχο την πιο εξειδικευμένη στοχοποίηση γενετικών τόπων. Παραμένουν βέβαια αρκετά ακόμα άλυτα προβλήματα για τη δημιουργία μίας πλατφόρμας μεταλλαξιγένεσης πραγματικά υψηλής-απόδοσης στον *B. cinerea*. Ένα βασικό εμπόδιο αποτελεί το αρκετά μεγάλο χρονικό περιθώριο που απαιτείται για την επίτευξη της ομοκαρύωσης στα στελέχη. Έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα που πραγματεύονται την εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas στον μύκητα *B. cinerea*, Hahn et al., (2021), Leisen et al., (2020), και τα οποία ανοίγουν τον δρόμο για την βελτιστοποίηση της γενετικής επεξεργασίας και της κατανόησης των μηχανισμών ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού αυτού.

Εκμεταλλεόμενοι τα διαθέσιμα πρωτόκολλά, στην συγκεκριμένη έρευνα προσπαθήσαμε να εισάγουμε επιτυχώς την νέα μετάλλαξη V575G στο γενετικό τόπο του γονιδίου Mrr1 με στόχο την μελέτη της επίπτωσης του σε στελέχη *B. cinerea* αγρίου τύπου. Η επιτυχημένη εφαρμογή του πρωτοκόλλου οδήγησε στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών τα οποία αναπτύχθηκαν φυσιολογικά υπό την παρουσία του μυκητοκτόνου σκευάσματος fludioxonil. Στη συνέχεια, ως τελικό βήμα, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση κατά Sanger η οποία επιβεβαίωσε την επιτυχημένη εισαγωγή της επιθυμητής μετάλλαξης στο γονιδίωμα των μυκητών. Η μετάλλαξη V575G κρίθηκε υπαίτια για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας ενάντια στο φάρμακο fludioxonil σε στελέχη *B. cinerea*. Ταυτόχρονα, η δημιουργία μεταλλαγμάτων που περιέχουν αποκλειστικά την μετάλλαξη αυτή αποτελεί προϋπόθεση για την μετέπειτα μελέτη της. Τα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη αποτελούν το πρώτο στάδιο για την έναρξη μίας νέας σειράς πειραμάτων τα οποία θα επικεντρωθούν στην λεπτομερέστερη μελέτη και παρατήρηση των επιπτώσεων και επιδράσεων της μετάλλαξης στην ανάπτυξη και δράση του *B. cinerea*. Ελπίζουμε τα αποτελέσματα αυτά να μας έφεραν ένα βήμα πιο κοντά στην κατανόηση του τρόπου δράσης αυτού του σημαντικού μικροοργανισμού και μελλοντικά να διαλευκανθεί το μυστήριο που τον περιτριγυρίζει οδηγώντας έτσι στην επιτυχημένη καταπολέμησή του.

10. Βιβλιογραφία

1. al Abdallah, Q., Ge, W., & Fortwendel, J. R. (2017). A Simple and Universal System for Gene Manipulation in *Aspergillus fumigatus*: In Vitro -Assembled Cas9-Guide RNA Ribonucleoproteins Coupled with Microhomology Repair Templates . *MSphere*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/msphere.00446-17>
2. Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569–573. <https://doi.org/10.1038/nature13579>
3. Anders, C., & Jinek, M. (2014). In vitro enzymology of Cas9. *Methods in Enzymology*, 546(C), 1–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00001-5>
4. Andrade, A. C., del Sorbo, G., van Nistelrooy, J. G. M., & de Waard, M. A. (2000). The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology*, 146(8), 1987–1997. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-8-1987>
5. Auer, T. O., Duroure, K., de Cian, A., Concordet, J. P., & del Bene, F. (2014). Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Research*, 24(1), 142–153. <https://doi.org/10.1101/gr.161638.113>
6. Backhouse, D., Willetts, H. J., & Adam, P. (1984). Electrophoretic studies of *Botrytis* species. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(4), 625–630. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80102-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80102-3)
7. Bardas, G. A., Veloukas, T., Koutita, O., & Karaoglanidis, G. S. (2010). Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science*, 66(9), 967–973. <https://doi.org/10.1002/ps.1968>
8. Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. In *Pest Management Science* (Vol. 58, Issue 7, pp. 649–662). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ps.520>
9. Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P., & Liu, J. L. (2013). Highly Efficient Targeted Mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System. *Cell Reports*, 4(1), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.020>
10. Billard, A., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R., & Debieu, D. (2012). Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Management Science*, 68(5), 684–691. <https://doi.org/10.1002/ps.2312>

11. Brent, D. A. (1995). Risk Factors for Adolescent Suicide and Suicidal Behavior: Mental and Substance Abuse Disorders, Family Environmental Factors, and Life Stress. *Suicide and Life-Threatening Behavior*, 25, 52–63. <https://doi.org/10.1111/j.1943-278X.1995.tb00490.x>
12. Cai, Q., He, B., Kogel, K. H., & Jin, H. (2018). Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi — nature’s blueprint for modern crop protection strategies. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 46, pp. 58–64). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.003>
13. Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., Xiong, J. W., & Xi, J. J. (2013). Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Research*, 23(4), 465–472. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.45>
14. Chapeland, F., Fritz, R., Lanen, C., Gredt, M., & Leroux, P. (1999). Pesticide Biochemistry and Physiology. In *Pesticide Biochemistry and Physiology* (Vol. 64). <http://www.idealibrary.comon>
15. Cheng, A. W., Wang, H., Yang, H., Shi, L., Katz, Y., Theunissen, T. W., Rangarajan, S., Shivalila, C. S., Dadon, D. B., & Jaenisch, R. (2013). Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Research*, 23(10), 1163–1171. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.122>
16. Cheung, N., Tian, L., Liu, X., & Li, X. (2020). The destructive fungal pathogen *Botrytis cinerea*—insights from genes studied with mutant analysis. In *Pathogens* (Vol. 9, Issue 11, pp. 1–46). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110923>
17. Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M., & Kim, J. S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31(3), 230–232. <https://doi.org/10.1038/nbt.2507>
18. de Waard, M. A., Andrade, A. C., Hayashi, K., Schoonbeek, H. J., Stergiopoulos, I., & Zwiery, L. H. (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. In *Pest Management Science* (Vol. 62, Issue 3, pp. 195–207). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ps.1150>
19. Díaz, A., Villanueva, P., Oliva, V., Gil-Durán, C., Fierro, F., Chávez, R., & Vaca, I. (2019). Genetic Transformation of the Filamentous Fungus *Pseudogymnoascus verrucosus* of Antarctic Origin. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02675>
20. Dicarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G. M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 41(7), 4336–4343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt135>
21. Ding, Q., Lee, Y. K., Schaefer, E. A. K., Peters, D. T., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D. L., Meissner, T. B., Hendriks, W. T., Trevisan, M., Gupta, R. M., Moisan, A., Banks, E., Friesen, M., Schinzel, R. T., Xia, F., Tang, A., Xia, Y., ... Cowan, C. A. (2013). A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*, 12(2), 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.011>

22. Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., & Koyanagi, Y. (2013). Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Scientific Reports*, 3. <https://doi.org/10.1038/srep02510>
23. Espino, J., González, M., González, C., & Brito, N. (2014). Efficiency of different strategies for gene silencing in *Botrytis cinerea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22), 9413–9424. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6087-7>
24. Fan, F., Hamada, M. S., Li, N., Li, G. Q., & Luo, C. X. (2017). Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in Hubei Province, China. *Plant Disease*, 101(4), 601–606. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1227-RE>
25. Faretra, F., & Pollastro, S. (1991). Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research*, 95(8), 943–951. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80091-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80091-9)
26. Fernández-Ortuño, D., Chen, F., & Schnabel, G. (2013). Resistance to cyprodinil and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry in North and South Carolina. *Plant Disease*, 97(1), 81–85. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-12-0539-RE>
27. Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Peres, N. A., & Schnabel, G. (2014). Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven Southern U.S. States. *Plant Disease*, 98(6), 825–833. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0970-RE>
28. Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Li, X., & Schnabel, G. (2015). Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 105(4), 424–432. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0161-R>
29. Fillinger, S., & Elad, Y. (2015). *Botrytis* - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. In *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
30. Fillinger, S., & Walker, A. S. (2015). Chemical control and resistance management of *Botrytis* diseases. In *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 189–216). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_10
31. Foster, A. J., Martin-Urdiroz, M., Yan, X., Wright, H. S., Soanes, D. M., & Talbot, N. J. (2018). CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein-mediated co-editing and counterselection in the rice blast fungus. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32702-w>
32. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
33. Gbelska, Y., Krijger, J. J., & Breunig, K. D. (2006). Evolution of gene families: The multidrug resistance transporter genes in five related yeast species. In *FEMS Yeast Research* (Vol. 6, Issue 3, pp. 345–355). <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00058.x>

34. Giesbert, S., Schumacher, J., Kupas, V., Espino, J., Segmüller, N., Haeuser-Hahn, I., Schreier, P. H., & Tudzynski, P. (2012). Identification of Pathogenesis-Associated Genes by T-DNA-Mediated Insertional Mutagenesis in *Botrytis cinerea*: A Type 2A Phosphoprotein Phosphatase and an SPT3 Transcription Factor Have Significant Impact on Virulence. / 481 MPMI, 25(4), 481–495. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
35. Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). XCRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>
36. Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A., & Gisi, U. (2006). Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science*, 62(6), 465–472. <https://doi.org/10.1002/ps.1236>
37. Grissa, I., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-172>
38. Gulshan, K., & Moye-Rowley, W. S. (2007). Multidrug resistance in fungi. In *Eukaryotic Cell* (Vol. 6, Issue 11, pp. 1933–1942). <https://doi.org/10.1128/EC.00254-07>
39. Habib, W., Saab, C., Malek, R., Kattoura, L., Rotolo, C., Gerges, E., Baroudy, F., Pollastro, S., Faretra, F., & de Miccolis Angelini, R. M. (2020). Resistance profiles of *Botrytis cinerea* populations to several fungicide classes on greenhouse tomato and strawberry in Lebanon. *Plant Pathology*, 69(8), 1453–1468. <https://doi.org/10.1111/ppa.13228>
40. Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., & Nelson, K. E. (2005). A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Computational Biology*, 1(6), e60. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>
41. Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. In *Journal of Chemical Biology* (Vol. 7, Issue 4, pp. 133–141). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
42. Hahn, M., & Scalliet, G. (n.d.). One cut to change them all: CRISPR/Cas, a groundbreaking tool for genome editing in.
43. Hahn, M., & Scalliet, G. (2021). One cut to change them all: CRISPR/Cas, a groundbreaking tool for genome editing in *botrytis cinerea* and other fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 111(3), 474–477. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0379-PER>
44. Haidar, R., & Fermaud, M. (2016). Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria Control of main diseases of grapes, peaches and nectarines in organic production systems View project Bacterial biological control agents against *Botrytis* bunch rot and their effects on grape berry microbiota View project. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18079

45. Haidar, R., Roudet, J., Bonnard, O., Dufour, M. C., Corio-Costet, M. F., Fert, M., Gautier, T., Deschamps, A., & Fermaud, M. (2016). Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. *Microbiological Research*, 192, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.003>
46. Hamada, W., Reignault, P., Bompeix, G., & Boccara, M. (1994). current Genetics Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, *hph*. In *Curr Genet* (Vol. 26).
47. Hayashi, K., Schoonbeek, H. jan, & de Waard, M. A. (2002). *Bcmfs1*, a novel major facilitator superfamily transporter from *Botrytis cinerea*, provides tolerance towards the natural toxic compounds camptothecin and cercosporin and towards fungicides. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4996–5004. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4996-5004.2002>
48. Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. In *Microbiology* (Vol. 158, Issue 1, pp. 17–25). <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
49. Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., Dekelver, R. C., Katibah, G. E., Amora, R., Boydston, E. A., Zeitler, B., Meng, X., Miller, J. C., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D., & Jaenisch, R. (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 27(9), 851–857. <https://doi.org/10.1038/nbt.1562>
50. Horii, T., Tamura, D., Morita, S., Kimura, M., & Hatada, I. (2013). Generation of an ICF syndrome model by efficient genome editing of human induced pluripotent stem cells using the CRISPR system. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19774–19781. <https://doi.org/10.3390/ijms141019774>
51. Hou, Z., Zhang, Y., Propson, N. E., Howden, S. E., Chu, L. F., Sontheimer, E. J., & Thomson, J. A. (2013). Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(39), 15644–15649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313587110>
52. Hu, M., & Chen, S. (2021). Non-target site mechanisms of fungicide resistance in crop pathogens: A review. In *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 3, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030502>
53. Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018a). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. In *Food Quality and Safety* (Vol. 2, Issue 3, pp. 111–119). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
54. Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018b). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and

- vegetables. In *Food Quality and Safety* (Vol. 2, Issue 3, pp. 111–119). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
55. Jiang, J., Ding, L., Michailides, T. J., Li, H., & Ma, Z. (2009). Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(2), 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.11.004>
 56. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3), 233–239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>
 57. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. <https://www.science.org>
 58. Khazaeli, P., Morid, B., & Bayat, H. (2010). Morphological and Molecular Identification of *Botrytis Cinerea* Causal Agent of Gray Mold in Rose Greenhouses in Central Regions of Iran Plant nutrition View project Designing of polyvalent detection systems for diagnosis of most important viruses in *Hippeastrum* plants. View project. www.SID.ir
 59. Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H. J., Pradier, J. M., Leroux, P., de Waard, M. A., & Hahn, M. (2009a). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>
 60. Leisen, T., Bietz, F., Werner, J., Wegner, A., Schaffrath, U., Scheuring, D., Willmund, F., Mosbach, A., Scalliet, G., & Hahn, M. (2020a). CRISPR/Cas with ribonucleoprotein complexes and transiently selected telomere vectors allows highly efficient marker-free and multiple genome editing in *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, 16(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008326>
 61. Leroch, M., Plesken, C., Weber, R. W. S., Kauff, F., Scalliet, G., & Hahn, M. (2013). Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 159–167. <https://doi.org/10.1128/AEM.02655-12>
 62. Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., & Gredt, M. (1999). Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. In *Crop Protection* (Vol. 18).
 63. Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M., & Walker, A. S. (2010). Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6615–6630. <https://doi.org/10.1128/AEM.00931-10>
 64. Li, X., Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., & Schnabel, G. (2014). Resistance to fludioxonil in *botrytis cinerea* isolates from blackberry and strawberry. *Phytopathology*, 104(7), 724–732. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-13-0308-R>

65. Ma, Z., & Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. In *Crop Protection* (Vol. 24, Issue 10, pp. 853–863). <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>
66. Maia, J. N., Beger, G., Pereira, W. V., May De Mio, L. L., & da Silva Silveira Duarte, H. (2021). Gray mold in strawberries in the Paraná state of Brazil is caused by *Botrytis cinerea* and its isolates exhibit multiple-fungicide resistance. *Crop Protection*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105415>
67. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
68. McNicol, R. J., & Dolan, A. (1985). Infection of red raspberry styles and carpels by *Botrytis cinerea* and its possible role in post-harvest grey mould. In *Ann. appl. Biol* (Vol. 106).
69. Morschhäuser, J. (2010). Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 47(2), 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.002>
70. Mosbach, A., Edel, D., Farmer, A. D., Widdison, S., Barchietto, T., Dietrich, R. A., Corran, A., & Scalliet, G. (2017a). Anilinopyrimidine resistance in *Botrytis cinerea* is linked to mitochondrial function. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02361>
71. Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S., & Tzavella-Klonari, K. (2007). Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 91(4), 407–413. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-4-0407>
72. Ning, Y., Hu, B., Yu, H., Liu, X., Jiao, B., & Lu, X. (2022). Optimization of Protoplast Preparation and Establishment of Genetic Transformation System of an Arctic-Derived Fungus *Eutypella* sp. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.769008>
73. Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
74. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
75. Roohparvar, R., Mehrabi, R., van Nistelrooy, J. G. M., Zwiers, L. H., & de Waard, M. A. (2008). The drug transporter MgMfs1 can modulate sensitivity of field strains of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* to the strobilurin fungicide trifloxystrobin. *Pest Management Science*, 64(7), 685–693. <https://doi.org/10.1002/ps.1569>

76. Rupp, S., Weber, R. W. S., Rieger, D., Detzel, P., & Hahn, M. (2017). Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02075>
77. Saito, S., & Xiao, C. L. (2018). Fungicide resistance in *botrytis cinerea* populations in California and its influence on control of gray mold on stored mandarin fruit. *Plant Disease*, 102(12), 2545–2549. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-18-0766-re>
78. Sang, H., Witte, A., Jacobs, J. L., Chang, H. X., Wang, J., Roth, M. G., & Chilvers, M. I. (2018). Fluopyram sensitivity and functional characterization of *sdhb* in the *Fusarium solani* species complex causing soybean sudden death syndrome. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02335>
79. Schumacher, J. (2012). Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genetics and Biology*, 49(6), 483–497. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.03.005>
80. Schuster, M., & Kahmann, R. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. In *Fungal Genetics and Biology* (Vol. 130, pp. 43–53). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.04.016>
81. Shao, W., Zhao, Y., & Ma, Z. (2021a). Advances in understanding fungicide resistance in *botrytis cinerea* in China. *Phytopathology*, 111(3), 455–463. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA>
82. Shen, B., Zhang, J., Wu, H., Wang, J., Ma, K., Li, Z., Zhang, X., Zhang, P., & Huang, X. (2013). Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. In *Cell Research* (Vol. 23, Issue 5, pp. 720–723). <https://doi.org/10.1038/cr.2013.46>
83. Soldner, F., Laganière, J., Cheng, A. W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., Khurana, V., Golbe, L. I., Myers, R. H., Lindquist, S., Zhang, L., Guschin, D., Fong, L. K., Vu, B. J., Meng, X., Urnov, F. D., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Zhang, H. S., & Jaenisch, R. (2011). Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset parkinson point mutations. *Cell*, 146(2), 318–331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.019>
84. Stefanato, F. L., Abou-Mansour, E., Buchala, A., Kretschmer, M., Mosbach, A., Hahn, M., Bochet, C. G., Métraux, J. P., & Schoonbeek, H. J. (2009). The ABC transporter *BcatrB* from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 58(3), 499–510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03794.x>
85. Stergiopoulos, I., Zwiers, L.-H., & de Waard, M. A. (2003). The ABC Transporter *MgAtr4* Is a Virulence Factor of *Mycosphaerella graminicola* that Affects Colonization of Substomatal Cavities in Wheat Leaves (Vol. 16, Issue 8).
86. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>

87. Strømeng, G. M., Hjeljord, L. G., & Stensvand, A. (2009). Relative contribution of various sources of *Botrytis cinerea* inoculum in strawberry fields in Norway. *Plant Disease*, 93(12), 1305–1310. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-12-1305>
88. Sun, C. B., Suresh, A., Deng, Y. Z., & Naqvi, N. I. (2006). A multidrug resistance transporter in *Magnaporthe* is required for host penetration and for survival during oxidative stress. *Plant Cell*, 18(12), 3686–3705. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037861>
89. Vermeulen, T., Schoonbeek, H., & de Waard, M. A. (2001). The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. *Pest Management Science*, 57(5), 393–402. <https://doi.org/10.1002/ps.309>
90. Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V. G., & Cole, F. M. (n.d.). *Botrytis cinerea* Infection of Grape Flowers: Light and Electron Microscopical Studies of Infection Sites.
91. Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>
92. Wang, Q., Cobine, P. A., & Coleman, J. J. (2018). Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Fungal Genetics and Biology*, 117, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.05.003>
93. Wang, R., Chen, B., Yue, M., Ding, W., & Li, Y. (2022). Multi-resistance of *Botrytis cinerea* isolates from ginseng growing regions in China to carbendazim, iprodione and pyrimethanil. *Crop Protection*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.105929>
94. Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 8, Issue 5, pp. 561–580). <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
95. Wright, A. v., Nuñez, J. K., & Doudna, J. A. (2016). Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering. In *Cell* (Vol. 164, Issues 1–2, pp. 29–44). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>
96. Yu, Z., Ren, M., Wang, Z., Zhang, B., Rong, Y. S., Jiao, R., & Gao, G. (2013). Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 195(1), 289–291. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.153825>
97. Yusa, K., Rashid, S. T., Strick-Marchand, H., Varela, I., Liu, P. Q., Paschon, D. E., Miranda, E., Ordóñez, A., Hannan, N. R. F., Rouhani, F. J., Darche, S., Alexander, G., Marciniak, S. J., Fusaki, N., Hasegawa, M., Holmes, M. C., di Santo, J. P., Lomas, D. A., Bradley, A., & Vallier, L. (2011). Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 478(7369), 391–394. <https://doi.org/10.1038/nature10424>
98. Zhang, C. Q., Liu, Y. H., Ding, L., & Zhu, G. N. (2011). Shift of sensitivity of *Botrytis cinerea* to azoxystrobin in greenhouse vegetables before and after exposure to the fungicide. *Phytoparasitica*, 39(3), 293–302. <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0159-3>

99. Zhang, F., Wen, Y., & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 23(R1). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>
100. Zou, J., Mali, P., Huang, X., Dowey, S. N., & Cheng, L. (2011). Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) bearing monogenic mutations have great potential for modeling disease phenotypes, screening candidate drugs. <https://doi.org/10.1182/blood-2011>