

Ἡθία τῆς Γεωργίας Διμήτρα.

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΗΡΑΚΛΗΣ Ν. ΜΠΟΥΜΠΟΥΡΑΚΑΣ

Ιοειδές του λανθάνοντος μοσαϊκού της ροδακινιάς
(*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) και ιοειδή των μηλοειδών
στην Ελλάδα

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Έρζον Βιολύλα

ΑΘΗΝΑ 2010

Γ. Χ. Μιχαήλ
1933.

Εικόνα εξώφυλλου:

Η θεά της γεωργίας Δήμητρα,

Θεόφιλος Χατζημιχαήλ, Μουσείο Θεόφιλου, Βαρεία Μυτιλήνης.

**Ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς
(*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) και ιοειδή των
μηλοειδών στην Ελλάδα**

ΗΡΑΚΛΗΣ Ν. ΜΠΟΥΜΠΟΥΡΑΚΑΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβλήθηκε στο Τμήμα Φυτικής Παραγωγής
του
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παναγιώτα Η. Κυριακοπούλου	Καθηγήτρια	Επιβλέπουσα
Νικόλαος Ι. Κατής	Καθηγητής	Μέλος
Επαμεινώνδας Παπλωματάς	Αναπληρωτής Καθηγητής	Μέλος

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παναγιώτα Η. Κυριακοπούλου	Καθηγήτρια	Επιβλέπουσα
Νικόλαος Ι. Κατής	Καθηγητής	Μέλος
Επαμεινώνδας Παπλωματάς	Αναπληρωτής Καθηγητής	Μέλος
Ελισάβετ Χατζηβασιλείου	Επίκουρος Καθηγήτρια	Μέλος
Κωνσταντίνος Φασσέας	Καθηγητής	Μέλος
Ευστάθιος Χατζηλουκάς	Αναπληρωτής Καθηγητής	Μέλος
Χριστίνα Βαρβέρη	Ερευνήτρια Α	Μέλος

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2010

*Στο τυχερό μου άστρο,
τη γυναίκα μου...*

*«Βλέπω συχνά άτομα που
δεν τα καταφέρνουν, αλλά σπάνια βλέπω
κάποιον που δεν μπορεί να τα καταφέρει»
Z. Ziglar*

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α), υπό την επίβλεψη της Ομότιμης Καθηγήτριας κας. Π. Η. Κυριακοπούλου. Η διατριβή διακρίνεται σε πέντε μέρη. Στο πρώτο (Α) μέρος γίνεται ανασκόπηση της βιβλιογραφίας γενικά για τα ιοειδή και ειδικά για το ιοειδές της εσχάρωσης του φλοιού του μήλου (*Apple scar skin viroid*, ASSVd), το ιοειδές του εξανθηματικού έλκους της αιδιάς (*Pear blister cancer viroid*, PBCVd) και το ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd), ενώ αναλύονται επίσης οι στόχοι της διατριβής. Το δεύτερο (Β) μέρος αφορά την προκαταρκτική επισκόπηση για την παρουσία των ASSVd, PBCVd και PLMVd σε καλλιεργούμενα και αυτοφυή είδη μηλοειδών, πυρηνοκάρπων στην Ελλάδα, ενώ το τρίτο (Γ) αφορά αποκλειστικά το PLMVd στο οποίο επικεντρώθηκε η ερευνητική εργασία λόγω της μεγάλης του σημασίας. Το μέρος αυτό διακρίνεται σε δύο επιμέρους κεφάλαια. Το πρώτο πραγματεύεται τη ροδακινιά και άλλα είδη πυρηνοκάρπων και μηλοειδή ως ξενιστές του PLMVd, καθώς και την παρουσία του ιοειδούς στο φυτωριακό πολλαπλασιαστικό υλικό ροδακινιάς, ενώ το δεύτερο ασχολείται με το μοριακό χαρακτηρισμό των ελληνικών παραλλαγών του ιοειδούς. Στο τέταρτο (Δ) μέρος αναλύεται η εφαρμογή καινοτόμων και πρωτοποριακών τεχνικών, όπως η αντίστροφη μεταγραφική-ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση θηλειάς (Reverse Transcription-Loop mediated isothermal AMPLification, RT-LAMP) (Κεφάλαιο 1^ο) και η υγρής φάσεως επιτόπια αντίστροφη μεταγραφική-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Liquid Phase *in situ* Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, Liquid Phase IS RT-PCR) (Κεφάλαιο 2^ο) στη διάγνωση των ιοειδών και ειδικότερα του PLMVd. Η διατριβή ολοκληρώνεται με τη παράθεση των γενικών συμπερασμάτων στο πέμπτο (Ε) μέρος.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, θεωρώ πως είναι η κατάλληλη στιγμή να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που άμεσα ή έμμεσα συνέβαλαν στο να πάρει η προσπάθειά μου σάρκα και οστά και να ολοκληρωθεί.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια κα. Παναγιώτα Η. Κυριακοπούλου, Εισηγήτρια του θέματος και Επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής, για την καθοδήγηση, το ειλικρινές ενδιαφέρον, την άριστη συνεργασία και την αμέριστη υποστήριξη και κατανόηση που απλόχερα μου προσέφερε από την έναρξη έως και την περάτωση της διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Γεωπονίας στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ.) κ. Νικόλαο Ι. Κατή και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Γ.Π.Α) κ. Επαμεινώνδα Ι. Παπλωματά για τη συμμετοχή τους στη τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή αυτής της διατριβής, για την πολύ καλή συνεργασία, για τις υποδείξεις τους στην εκτέλεση των πειραμάτων και τις συμβουλές τους στη παρουσίαση του κειμένου. Ιδιαίτερες όμως ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή κ. Νικόλαο Ι. Κατή για τη μύηση μου στην επιστήμη της Ιολογίας Φυτών, όντας επί σειρά ετών καθηγητής μου στο Τμήμα Γεωπονίας του (Α.Π.Θ) και επιβλέπων της εκεί μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας στο Γ.Π.Α. κ. Κωνσταντίνο Φασσέα, την Επίκουρη Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας στο Γ.Π.Α κα. Ελισάβετ Χατζηβασιλείου τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων κ. Ευστάθιο Χατζηλουκά και την Ερευνήτρια Α και Διευθύντρια του Τμήματος Φυτοπαθολογίας και του Εργαστηρίου Ιολογίας Φυτών του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου κα. Χ. Βαρβέρη για την κριτική ανάγνωση της παρούσας διατριβής και τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Βαθύτατες ευχαριστίες οφείλω στον Dr. A. Hadidi, Ομότιμο Ερευνητή της Υπηρεσίας Αγροτικής Έρευνας του Αμερικανικού Υπουργείου Γεωργίας (USDA-ARS) στο Maryland των Η.Π.Α., για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές, στους Drs. M. Barba και F. Faggioli Ερευνητές στο Ινστιτούτο CRA (Centro di Ricerca per la Pathologia Vegerale) στη Ρώμη της Ιταλίας, στον Dr. S. Fukuta Ερευνητή στο Ινστιτούτο Βιοτεχνολογίας AARC (Aichi Agricultural Research Centrer) στη Nagoya της Ιαπωνίας και στην Dr. H. Koltai, Ερευνήτρια στο Ινστιτούτο Φυτικών Επιστημών του Agricultural Research Organization (A.R.O.), Volcani Centrer στο Ισραήλ, για τη τιμή που μου έκαναν να

συνεργαστώ μαζί τους, για τη φιλοξενία που μου παρείχαν στα αντίστοιχα ερευνητικά ιδρύματά τους και την καθοδήγηση κατά την εκτέλεση των εκεί πειραμάτων μου.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή και μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής επιτροπής κ. Κωνσταντίνο Φασσέα καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής στο Γ.Π.Α., κ. Ανδρέα Βολουδάκη για τις συμβουλές και την άψογη συνεργασία μας κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων της *liquid phase in situ* RT-PCR και τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας στο Γ.Π.Α., κ. Ελευθέριο Τζάμο για τη φιλοξενία που μου παρείχε στους χώρους του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους φυτωριούχους κ. Λάκη Μίλλη, κ. Χαράλαμπο Τσεσμελή και κ. Γεώργιο Παναγιωτόπουλο, στους παραγωγούς κ. Αθανάσιο Μαυραγάνη, κ. Νικόλαο Καλλάρα, κ. Κουρούνη, κ. Παναγιώτη Ρεκκλίκη, κ. Κωνσταντίνο Σακελλαρίου, κ. Αναστάσιο Τσάκωνα, κ. Κωνσταντίνο Χατζηβασιλείου και σε πολλούς ανώνυμους παραγωγούς, για την προμήθεια (συλλογή και αποστολή) του πολύτιμου φυτικού υλικού στο οποίο βασίστηκε η παρούσα διατριβή καθώς και στον κ. Βασίλειο Λιάπη και στην κα. Ολυμπία Χαλδαίου, Προϊσταμένους των Διευθύνσεων Γεωργίας και Προσωπικού αντίστοιχα της Νομαρχίας Πειραιά για τη πολύτιμη συμβολή τους στην παροχή της εκπαιδευτικής άδειας διάρκειας ενάμιση έτους, χάρις την οποία ολοκληρώθηκε η παρούσα διατριβή.

Ευχαριστώ ακόμη τους Λέκτορες του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής στο Γ.Π.Α., κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη και κ. Σωτήριο Τζάμο, τους Διδάκτορες κα. Μαρία Καπώνη και κα. Αλίκη Τζίμα, τον Γεωπόνο Βασίλειο Δημητρακά και την προπτυχιακή φοιτήτρια κ. Ειρήνη Παλυβάκου για τη βοήθεια και τη συνεργασία.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ αρμόζει στη σύζυγό μου Ευφημία, για την υπομονή που έκανε όλα αυτά τα χρόνια, τη συνεχή εμπύχωση, την αμέριστη συμπαράσταση και την προτροπή να γίνομαι συνεχώς καλύτερος, στα παιδιά μου Γιάννη και Ελένη για τις ευχάριστες στιγμές που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια του επίπονου αυτού έργου και τους γονείς μου και τον αδελφό μου γιατί ήταν πάντα δίπλα μου και με ενθάρρυναν σε κάθε σημαντική στιγμή.

Ηρακλής Ν. Μπουμπουράκας

Περιεχόμενα		Σελίδα
Πρόλογος		ii
Ευχαριστίες		iii
Περιεχόμενα		v
Συντομογραφίες		xi
Περίληψη		xv
Abstract		xvii
Κατάλογος εικόνων		xix
Κατάλογος πινάκων		xxvi
Μέρος Α. Βιβλιογραφική ανασκόπηση		1
1. Φυτοπαθολογία και ασθένεια		2
2. Ιοειδή γενικά		3
2.1. Ανακάλυψη		3
2.2. Βιολογία		4
2.3. Δομή		6
2.4. Αναπαραγωγή		7
2.5. Ταξινόμηση		8
2.6. Ονοματολογία		9
2.7. Προέλευση-εξέλιξη		9
2.8. Αντιμετώπιση		10
2.9. Διάγνωση		11
2.9.1. Βιοδοκιμές		11
2.9.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμίδης (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)		12
2.8.3. Μοριακός υβριδισμός (molecular hybridization)		12
2.8.4. Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)		14
3. Η καλλιέργεια των μηλοειδών και πυρηνοκάρπων στην Ελλάδα		15
3.1. Η καλλιέργεια της ροδακινιάς στην Ελλάδα		15
4. Ιολογικές και άλλες εμβολιομεταδιδόμενες ασθένειες των σημαντικότερων μηλοειδών και πυρηνοκάρπων		17
4.1. Ιοειδές της εσχάρωσης του φλοιού του μήλου (<i>Apple scar skin viroid</i> , ASSVd)		18

4.2.	Ιοειδές του εξανθηματικού έλκους της απιδιάς (<i>Pear blister cancer viroid</i> , PBCVd)	20
4.3.	Ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (<i>Peach latent mosaic viroid</i> , PLMVd)	23
4.3.1.	Ιστορία	23
4.3.2.	Συμπτώματα	23
4.3.3.	Ξενιστές	24
4.3.4.	Μετάδοση	26
4.3.5.	Γεωγραφική εξάπλωση	26
4.3.6.	Οικονομικές ζημιές	27
4.3.7.	Διάγνωση	27
4.3.8.	Αντιμετώπιση	28
4.3.9.	Μοριακά χαρακτηριστικά	28
5.	Σκοπός της εργασίας	30
Μέρος Β.	Προκαταρκτική επισκόπηση της παρουσίας των ASSVd, PBCVd και PLMVd σε καλλιεργούμενα και αυτοφυή είδη μηλοειδών, και πυρηνοκάρπων	32
1.	Περίληψη	33
2.	Εισαγωγή	34
3.	Υλικά και μέθοδοι	34
3.1.	Φυτικό υλικό	34
3.2.	Μεταχειρίσεις για την αδρανοποίηση των ριβονουκλεασών (ribonucleases, RNases)	35
3.3.	Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	36
3.3.1.	Εκμαγείο	36
3.3.1.1.	Εκχύλισμα φυτικού χυμού	38
3.3.1.2.	Εκχύλιση ολικού RNA (total RNA, tRNA)	38
3.3.2.	Εκκινητές	40
3.3.3.	Δοκιμές RT-PCR	40
3.3.4.	Ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR	43
3.4.	Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας προϊόντων RT-PCR	44
3.4.1.	Καθαρισμός των προϊόντων της RT-PCR	44
3.4.2.	Αλληλούχηση προϊόντων PCR	44
4.	Αποτελέσματα	45

4.1.	ASSVd	45
4.1.1.	Εκκινητές	45
4.1.2.	Βελτιστοποίηση της RT-PCR	46
4.1.3.	Έλεγχος δειγμάτων	47
4.1.4.	Αλληλούχηση προϊόντων PCR	49
4.2.	PBCVd	51
4.2.1.	Εκκινητές-έλεγχος δειγμάτων	51
4.2.2.	Αλληλούχηση προϊόντων PCR	52
4.3.	PLMVd	53
4.3.1.	Εκκινητές-πρωτόκολλο RT-PCR-έλεγχος δειγμάτων	53
4.3.2.	Αλληλούχηση προϊόντων PCR	54
5.	Συζήτηση	54
Μέρος Γ. Η παρουσία του PLMVd στην Ελλάδα		62
Κεφάλαιο 1. Η ροδακινιά και άλλα είδη πυρηνοκάρπων και μηλοειδών ως ξενιστές του PLMVd στην Ελλάδα και η παρουσία του στο φυτωριακό πολλαπλασιαστικό υλικό ροδακινιάς		63
1.	Περίληψη	64
2.	Εισαγωγή	65
3.	Υλικά και μέθοδοι	66
3.1.	Φυτικό υλικό	66
3.1.1.	Δείγματα αγρού	66
3.1.2.	Φυτώρια ροδακινιάς	68
3.2.	Μεταχειρίσεις για την αδρανοποίηση των ριβονουκλεασών	69
3.3.	Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	70
3.3.1.	Εκμαγείο	70
3.3.2.	Εκκινητές	72
3.3.3.	RT-PCR ενός σωλήνα δύο σταδίων (one tube two step RT-PCR)	72
3.3.4.	Ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR	72
3.4.	Μοριακός υβριδισμός	72
3.4.1.	Υβριδισμός στυπώματος κηλίδας RNA	73
3.4.1.1.	Προετοιμασία και τοποθέτηση δειγμάτων	73
3.4.1.2.	Υβριδισμός κατά Southern (Southern blot)	73
3.4.1.3.	Σύνθεση ανιχνευτών dsDNA	74
3.4.1.4.	Προ-υβριδισμός/υβριδισμός	74

3.4.1.5.	Πλύσεις και ανίχνευση των προϊόντων	75
3.5.	Διαδοχική ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμίδης (Sequential Polyacrylamide Gel Electrophoresis analysis, S-PAGE)	76
3.5.1.	Εκχύλιση ολικού RNA	76
3.5.2.	Πρωτόκολλο S-PAGE	77
3.5.3.	Χρώση πήγματος με νιτρικό άργυρο	77
3.6.	Ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time RT-PCR)	77
3.6.1.	Εκκινητές και ανιχνευτής (probe) <i>TaqMan</i>	78
3.6.2.	Σύνθεση συμπληρωματικού RNA (cRNA) του PLMVd	78
3.6.3.	Καμπύλη αναφοράς	79
3.6.4.	Πρωτόκολλο real time RT-PCR ενός σταδίου (one step real time RT-PCR)	79
4.	Αποτελέσματα	80
4.1.	Εκμαγείο one tube-two step RT-PCR	80
4.2.	Δείγματα αγρού	80
4.3.	Φυτωριακό υλικό	85
4.4.	Υβριδισμός κατά Southern (Southern blot)	87
4.5.	Δοκιμή sequential PAGE (S PAGE)	87
4.6.	Ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time RT-PCR)	88
4.6.1.	Δοκιμές εξειδίκευσεως	88
4.6.2.	Καμπύλη αναφοράς (Standard curve)	89
4.6.3.	Ποσοτική ανίχνευση του PLMVd σε άγνωστα δείγματα ροδακινιάς και άλλων Rosaceae	90
5.	Συζήτηση	90
Κεφάλαιο 2.	Μοριακός χαρακτηρισμός των ελληνικών απομονώσεων του PLMVd	97
1.	Περίληψη	98
2.	Εισαγωγή	99
3.	Υλικά και μέθοδοι	101
3.1.	Φυτικό υλικό	101
3.2.	Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	101
3.3.	Εκχύλιση DNA από πήγμα αγαρόζης	103

3.4.	Κλωνοποίηση	104
3.4.1.	Διαδικασία A-tailing	104
3.4.2.	Ένθεση του προϊόντος της PCR στον πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση λιγάσης)	105
3.4.3.	Μετασχηματισμός επιδεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων	105
3.4.4.	Επιλογή και ανάλυση λευκών αποικιών	105
3.4.5.	Εκχύλιση πλασμιδιακού DNA	106
3.5.	Αλληλούχηση	106
3.6.	Φυλογενετική ανάλυση	107
3.7.	Δευτεροταγής δομή	107
4.	Αποτελέσματα και συζήτηση	108
4.1.	Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής	108
4.2.	Φυλογενετική ανάλυση	112
4.3.	Δευτεροταγής δομή	125
Μέρος Δ.	Εφαρμογή νέων τεχνικών στη διάγνωση του PLMVd	128
Κεφάλαιο 1.	Αντίστροφη μεταγραφή-ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση θηλειάς (Reverse Transcription-Loop mediated isothermal AMPlification, RT-LAMP)	129
1.	Περίληψη	130
2.	Εισαγωγή	131
3.	Υλικά και μέθοδοι	133
3.1.	Φυτικό υλικό	133
3.2.	Προετοιμασία των δειγμάτων για την RT-LAMP και RT-PCR	133
3.3.	Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	134
3.4.	Αντίστροφη μεταγραφή-ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση θηλειάς (Reverse Transcription-Loop mediated isothermal AMPlification, RT-LAMP)	134
3.4.1.	Σχεδιασμός εκκινητών	134
3.4.2.	Πρωτόκολλο RT-LAMP	136
3.4.3.	Ανάλυση των προϊόντων RT-LAMP	137
3.4.3.1.	Ανάλυση με την χρήση περιοριστικών ενζύμων (restriction enzyme analysis)	138
3.4.3.1.1.	Πρωτόκολλο πέψης	138
3.5.	Εφαρμογή της RT-LAMP στον αγρό	139

4.	Αποτελέσματα	140
4.1.	Δοκιμές RT-PCR	140
4.2.	Δοκιμές RT-LAMP	141
4.2.1.	Εκκινητές (F3, FIP, B3, BIP)	141
4.2.2.	Εκκινητές θηλειάς (loop primers)	141
4.2.3.	Βελτιστοποίηση της μεθόδου RT-LAMP	142
4.2.4.	Δοκιμές εξειδικεύσεως	145
4.2.5.	Ανάλυση με την χρήση περιοριστικών ενζύμων	146
4.3.	Ανίχνευση του PLMVd με τη δοκιμή RT-LAMP σε ροδακινιά και άλλα φυτικά είδη	146
4.4.	Εφαρμογή της RT-LAMP στον αγρό	147
5.	Συζήτηση	147
6.	Συμπεράσματα-προοπτικές	152
Κεφάλαιο 2.	Υγρής φάσεως επιτόπια αντίστροφη μεταγραφική-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Liquid Phase <i>in situ</i> Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, Liquid Phase <i>in situ</i> RT-PCR)	153
1.	Περίληψη	154
2.	Εισαγωγή	155
3.	Υλικά και μέθοδοι	157
3.1.	Φυτικό υλικό	157
3.2.	Καθήλωση ιστών και τομές (tissue fixation and sectioning)	157
3.3.	Μεταχείριση των τομών με πρωτεάση (protease) και δεοξυριβονουκλεάση (deoxybironuclease, DNase)	159
3.4.	Εκκινητές	160
3.5.	RT-PCR ενός σταδίου (one step RT-PCR)	160
3.6.	Επιτόπια (<i>in situ</i>) ανίχνευση των προϊόντων της RT-PCR	161
4.	Αποτελέσματα και συζήτηση	161
5.	Συμπεράσματα-προοπτικές	166
Μέρος Ε.	Γενικά συμπεράσματα	168
	Βιβλιογραφία	175
	Παράρτημα	194
	Βιογραφικό σημείωμα	211

Συντομογραφίες ιοειδών – ιών

ASBVd	<i>Avocado sunblotch viroid</i> , ιοειδές του ηλιοεγκαύματος του αβοκάντο
ASSVd	<i>Apple scar skin viroid</i> , ιοειδές της εσχάρωσης του φλοιού του μήλου
BPYV	<i>Beet pseudo-yellow virus</i> , ιός του ψευδο-ικτέρου των τεύτλων
CABYV	<i>Cucurbit aphid-born yellows virus</i> , ιός του αφιδομεταδιδόμενου ίκτερου των κολοκυνθοειδών
CCCVd	<i>Coconut cadang cadang viroid</i> , ιοειδές της φθίσεως του κοκοφοίνικα
CChMVd	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i> , ιοειδές του χλωρωτικής ποικιλοχλωρώσεως του χρυσανθέμου
CEVd	<i>Citrus exocortis viroid</i> , ιοειδές της εξωκόρτιδας των εσπεριδοειδών
CSVd	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> , ιοειδές του νανισμού του χρυσανθέμου
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i> , ιός της τριστέτσας των εσπεριδοειδών
CVdIII	<i>Citrus viroid III</i> , ιοειδές III των εσπεριδοειδών
CYSDV	<i>Cucuber yellow stunting disorder virus</i> , ιός του χλωρωτικού νανισμού με παραμόρφωση της αγγουριάς
DAVd	<i>Dapple apple viroid</i> , ιοειδές του παρδαλού μήλου
ELVd	<i>Eggplant latent viroid</i> , λανθάνον ιοειδές της μελιτζάνας
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> , ιός της ανθρώπινης ανοσολογικής ανεπάρκειας
HLVd	<i>Hop latent viroid</i> , λανθάνον ιοειδές του λυκίσκου
PBCVd	<i>Pear blister cancer viroid</i> , ιοειδές του εξανθηματικού έλκους της απιδιάς
PLMVd	<i>Peach latent mosaic viroid</i> , ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς
PPV	<i>Plum pox potyvirus</i> , ιός της ευλογιάς της δαμασκηιάς
PRSVd	<i>Pear rusty skin viroid</i> , ιοειδές του σκουριασμένου φλοιού της απιδιάς
PSTVd	<i>Potato spindle tuber viroid</i> , ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας
PVY	<i>Potato virus Y</i> , ιός Y της πατάτας
SARS	<i>Severe acute respiratory syndrome virus</i> , ιός του σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου
TASVd	<i>Tomato apical stunt viroid</i> , ιοειδές του νανισμού του ακραίου μεριστώματος της τομάτας
TPMVd	<i>Tomato planta macho viroid</i> , ιοειδές των αρσενικών φυτών της τομάτας
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i> , ιός του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας

Άλλες συντομογραφίες

A	adenine, αδενίνη
ACt	average threshold cycle, μέση τιμή οριακού κύκλου
AMV	RTase avian myeloblastosis virus, ένζυμο αντίστροφης μεταγραφής του

	ρετροϊού <i>Avian myeloblastosis virus</i>
APS	ammonium persulfate, υπερθειικό αμμώνιο
BIP	backward inner primer, εσωτερικός οπίσθιος εκκινητής
C	cytosine, κυτοσίνη
CCR	central conserved region, κεντρική συντηρημένη περιοχή
cDNA	complementary DNA, συμπληρωματικό DNA
CLSM	confocal laser scanning microscope, συνεστιακό μικροσκόπιο σαρώσεως με ακτίνες Laser
cRNA	complementary RNA, συμπληρωματικό RNA
CSPD	disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2dioxetane-3,2'-(5'-chlolo)triclo[3.3.1.13,7] decan}-4-yl) phenyl phosphate
DAPI	4', 6-diamino-2-phenylindone
DdRp II	DNA dependent RNA polymerase II, DNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II
DEPC	di-ethyl-pyro-carbonic acid, διαίθυλο-πυρανθρακικό οξύ
Dig	digoxigenin, διγοξιγενίνη
DMSO	dimethyl sulfoxide, διμεθυλο σουλφοξειδίο
DNase	deoxybironuclease, δεοξυριβονουκλεάση
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphates, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
dsDNA	double stranded DNA, δινηματιδιακό DNA
DTT	dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη
E	efficiency, αποδοτικότητα
EBI	European Bio-informatics Institute
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, αιθυλνο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, άνοσο-ενζυμική δομική
Et-Br	ethidium bromide, βρωμιούχου αιθίδιο
FIP	forward inner primer, εσωτερικός πρόσθιος εκκινητής
G	guanine, γουανίνη
GAIL	grossly symmetric interior loops: μεικτές ασύμμετρες εσωτερικές θηλιές
IS RT-PCR	<i>in situ</i> reverse transcription-polymerase chain reaction. επιτόπια αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
LAMP	Loop mediated isothermal amplification, ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση θηλειάς
M-MLV	RTase <i>Moloney murine leukemia virus</i> , ένζυμο αντίστροφης μεταγραφής του ιού <i>Moloney murine leukemia virus</i>
ME	minimum evolution, ελάχιστη εξέλιξη
MFE	minimum free energy, ελάχιστη ελεύθερη ενέργεια

MP	maximum parsimony, μέγιστη φειδωλότητα-οικονομία
mRNA	messenger RNA, αγγελιαφόρο RNA
MW	molecular weight, μοριακό βάρος
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEP	nuclear encoded DNA depended-RNA polymerase: , DNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II κωδικευόμενη στον πυρήνα
nt	nucleotides, νουκλεοτίδια
OCT	optimum cutting temperature compound
OD	optical density, οπτική πυκνότητα
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμίδης
PBS	phosphate buffer saline, φωσφορικό διάλυμα
PC	peach calico, λεύκανση της ροδακινιάς
PEG-6000	polyethylene glycol-6000, πολυ-αιθυλενο-γλυκόλη, MB 6000
PVP-40	polyvinylpyrrolidone-40, πολυ-βινυλο-πυρρολιδόνιο
R-PAGE	return PAGE, PAGE επιστροφής
<i>rbcL</i>	<i>rubisco</i> large sub-unit gene, πλαστιδιακό γονίδιο της μεγάλης <i>rubisco</i>
RNA	ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ
RNAse	ribonuclease, ριβονουκλέαση
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction, αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
S-PAGE	sequential PAGE, διαδοχική PAGE
SDS	sodium dodecyl sulfate, θειικό δωδεκυλικό νάτριο
SOC	super optimum broth with catabolite repression, υπεράριστος ζωμός με καταβολική καταστολή
SSC	saline-sodium citrate, φυσιολογικός ορός-κιτρικού νατρίου
ssRNA	single stranded RNA, μονοηματιδιακό RNA
STE	sodium chloride-tris-EDTA, χλωριούχο νάτριο τρις-EDTA
T	thymine, θυμίνη
TAE	tris-acetate EDTA
TBE	tris-borate EDTA
TCR	terminal conserved region, τερματική συντηρημένη περιοχή
TCH	terminal conserved hairpin, τερματική συντηρημένη φουρκέτα
T _m	melting temperature, θερμοκρασία τήξεως
TMSO	tetramethylene sulfoxide, τετραμεθυλο σουλφοξείδιο
tRNA	total RNA, ολικό RNA

U	uracil, ουρακίλη
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic mean, ομαδοποίηση αστάθμητων ζευγών με αριθμητικούς μέσους όρους
UV	ultra violet irradiation, υπεριώδης ακτινοβολία
WU-BLAST	washington university basic logical alignment tool
ζβ	ζεύγη βάσεων

Περίληψη

Το ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) έχει ιδιαίτερη επιστημονική και φυτοπαθολογική σημασία μεταξύ των ιοειδών. Έχει μοναδικά μοριακά χαρακτηριστικά, είναι ευρέως διαδεδομένο σοβαρό φυτοπαθογόνο διεθνώς και έχει ένα αμφισβητούμενο από κάποιους ερευνητές κύκλο ξενιστών πέραν της ροδακινιάς. Τα μηλοειδή και πυρηνόκαρπα, εξ άλλου, βασικές καλλιέργειες μεγάλης οικονομικής σημασίας διεθνώς και για την Ελλάδα, πέραν του PLMVd, προσβάλλονται και από άλλα σοβαρά φυτοπαθογόνα ιοειδή, όπως το ιοειδές της εσχάρωσης του φλοιού του μήλου (*Apple scar skin viroid*, ASSVd) και το ιοειδές του εξανθηματικού έλκους της απιδιάς (*Pear blister cancer viroid*, PBCVd). Οι πληροφορίες όμως σχετικά με την παρουσία των ανωτέρω ιοειδών σε καλλιεργούμενα αλλά και αυτοφυή είδη μηλοειδών και πυρηνοκάρπων και άλλων Rosaceae στην Ελλάδα είναι περιορισμένες.

Η παρούσα έρευνα άρχισε με μία προκαταρκτική επισκόπηση στη Χώρα μας για την παρουσία των τριών αυτών ιοειδών στα μηλοειδή, πυρηνόκαρπα και αυτοφυή Rosaceae. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε η αναλυτική μελέτη του PLMVd ως κύριο αντικείμενο της διατριβής, λόγω της ιδιαίτερης σημασίας του, ενώ τα άλλα ιοειδή των μηλοειδών και πυρηνοκάρπων στην Ελλάδα αποτέλεσαν αντικείμενο άλλης διδακτορικής διατριβής.

Το ASSVd ανιχνεύθηκε σε απιδιές και άγριες απιδιές, καθώς και σε μηλιές και άγριες μηλιές (*Malus sylvestris*). Στα δύο τελευταία είδη αναφέρεται για πρώτη φορά στην Ελλάδα και διεθνώς, αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις οι καρποί των φυτών έφεραν τη χαρακτηριστική συμπτωματολογία. Ως προς το PBCVd, καταγράφηκε υψηλή συχνότητα παρουσίας του σε φυτά καλλιεργούμενης και άγριας απιδιάς στη φύση, με χαρακτηριστικά συμπτώματα εξανθηματικών ελκών στο φλοιό του κορμού και των βραχιόνων, ενώ ανιχνεύθηκε επίσης στην κυδωνιά και τον κράταιγο, στον οποίο η παρουσία του PBCVd μέχρι σήμερα είχε καταγραφεί μόνο πειραματικά.

Η αναλυτική μελέτη του PLMVd στην Ελλάδα περιλάμβανε την καταγραφή της παρουσίας του στη ροδακινιά και άλλα Rosaceae στον αγρό και στη φύση, καθώς και στο φυτωριακό πολλαπλασιαστικό υλικό ροδακινιάς της Χώρας, τον μοριακό χαρακτηρισμό των ελληνικών απομονώσεων και τη μελέτη των φυλογενετικών τους σχέσεων και, τέλος, την υιοθέτηση, προσαρμογή, βελτίωση και εφαρμογή στην ανίχνευση του PLMVd πρωτοποριακών διαγνωστικών τεχνικών.

Ο έλεγχος δειγμάτων ροδακινιάς από τις κυριότερες ροδακινοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας αποκάλυψε την παρουσία του PLMVd σε ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό (>75%) και σε αυτό σημαντικό ρόλο φάνηκε να διαδραματίζει το πολλαπλασιαστικό υλικό. Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε η παρουσία του PLMVd στην άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά, ενώ καταγράφηκε, για πρώτη φορά στην Ελλάδα, η παρουσία του στη βερικοκιά, στη δαμασκηλιά και στην κερασιά και, για πρώτη φορά διεθνώς στην κυδωνιά. Με τη βοήθεια μάλιστα της

RT-PCR πραγματικού χρόνου (real time RT-PCR), υπολογίστηκε ότι η ανιχνεύσιμη συγκέντρωση του ιοειδούς στα παραπάνω είδη ήταν κατά μέσο όρο 99.6 % μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση του ιοειδούς στη ροδακινιά, εξού και η δυσκολία ανιχνεύσεως του PLMVd στα είδη αυτά.

Επίσης, προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία 66 συνολικά κλώνων του PLMVd, το μέγεθος των οποίων κυμάνθηκε μεταξύ 337 και 340 nt, ενώ 62 από αυτούς αποτελούν νέες παραλλαγές του. Κατά την φυλογενετική ανάλυση δεν καταγράφηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού ομολογίας-βαθμού συγγένειας των ελληνικών παραλλαγών (variants) του PLMVd με την ποικιλία, το φυτικό είδος και τη γεωγραφική τους προέλευση. Παρόλ' αυτά, οι παραλλαγές που δεν προήλθαν από ροδακινιές συναθροίστηκαν σε ξεχωριστή ομάδα, ενώ όλες μαζί οι ελληνικές παραλλαγές του PLMVd συναθροίστηκαν στην ομάδα III κατά Ambros. Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής έδειξε ότι η διαμόρφωση των παραλλαγών του PLMVd ήταν διακλαδωτή (branched conformation), πλησιάζοντας εκείνη της πρότυπης παραλλαγής M835451 και διατηρώντας στις περισσότερες περιπτώσεις έναν βασικό πυρήνα με διάφορες δομικές παραλλαγές. Προσδιορίστηκαν, μεταξύ άλλων, οι περιοχές του γενώματος του PLMVd με τις λιγότερες και τις περισσότερες μεταλλάξεις καθώς και η επίδραση αυτών στη διαμόρφωση των δομών που συμμετέχουν στην διαδικασία αυτο-σχάσης κατά τον πολλαπλασιασμό του ιοειδούς.

Στη συνέχεια, το ενδιαφέρον της μελέτης επικεντρώθηκε στην εφαρμογή της διαγνωστικής τεχνικής RT-LAMP. Μετά το σχεδιασμό και την αξιολόγηση διαφόρων ομάδων εκκινητών LAMP και τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου, ήταν δυνατή η ανίχνευση του PLMVd στη ροδακινιά και άλλα Rosaceae σε μόλις 30 λεπτά, τόσο στο εργαστήριο όσο και στον αγρό.

Τέλος, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά διεθνώς στη διάγνωση φυτοπαθογόνων, μια νέα τεχνική, η υγρής φάσεως *in situ* RT-PCR (liquid phase IS RT-PCR) βασισμένη στη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green*, με τη βοήθεια της οποίας το PLMVd εντοπίστηκε στους χλωροπλάστες φύλλων ροδακινιάς όπου άλλωστε είναι γνωστό ότι το PLMVd πολλαπλασιάζεται και συσσωρεύεται.

Abstract

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) is of high phytopathological and scientific significance among viroids. It shows very unique molecular characteristics among viroids and is a serious pathogen widely spread internationally, while its host range Apart from peach is questioned by some researchers. Pome and stone fruits, on the other hand, basic crops of great economical significance, in Greece and internationally, are also affected by other serious viroid pathogens, such as *Apple scar skin viroid* (ASSVd) and *Pear blister cancer viroid* (PBCVd). In Greece, our information about the presence of PLMVd, ASSVd and PBCVd in cultivated and wild pome and stone fruits and other Rosaceae is limited.

This doctorate thesis started with a preliminary survey in Greece for the presence of the above mentioned three viroids in pome and stone fruit and spontaneous woody Rosaceae. Later, the analytical study of PLMVd was selected as the subject of this research, due to the particular significance of the viroid, while the other viroids of cultivated and wild pome and stone fruits species became the subject of another doctorate thesis.

ASSVd was detected in pears and wild pears, as well as in apples and wild apples (*M. sylvestris*), in the last two species for the first time in Greece and internationally, respectively. In all cases, the fruits of the plants examined showed the characteristic scar skin symptomatology. With respect to PBCVd, high frequency was recorded in nature in cultivated and wild pear with characteristic blister canker symptomatology on the bark of the trunk and branches, while it was also detected in quince and *Crataegus*; its presence in *Crataegus* in nature is recorded for first time, while previous reports referred to experimental transmission.

The analytical study of PLMVd included the recording of its presence in peach, other Rosaceae in the field and in nature as well as in peach nurseries in various parts of Greece, the molecular characterization of its local isolates and the study of their phylogenetic relationships, and finally, the adoption/adjustment/improvement and practical application in the detection of PLMVd of novel and advanced diagnostic techniques.

The examination of peach samples coming from the most important peach-producing regions in Greece revealed a high (75%) incidence of PLMVd, and, to this, peach germplasm seemed to play an important role. At the same time the presence of PLMVd in wild and cultivated pear was confirmed, while its presence in apricot, plum and sweet cherry was recorded for the first time in Greece, and in quince for the first time internationally. Moreover using the real time RT-PCR, it was estimated that the detectable viroid concentration in non-peach samples was in average 99.6 % lower than in peach. This finding may explain the difficulty to detect PLMVd in species other than peach.

Sixty six (66) different PLMVd clones were obtained sizing 337 to 340 nt, and their sequence were identified. Sixty two (62) of these clones were identified as new PLMVd

variants. Phylogenetic analysis did not reveal any correlation between the homology of PLMVd Greek variants and their variety, host species or geographical origin. Nevertheless, almost all PLMVd variants of non-peach samples were grouped in a separate cluster, whereas all Greek variants obtained classified together in group III according to Ambros classification. Secondary structure analysis showed that the conformation of the PLMVd variants was branched and close to that of the type variant, M835451, having in most cases a basic core with some local structural differences. Among others, the regions of PLMVd genome of lower and higher sequence variation were estimated, as well as their influence in conformations which take part in the self-cleavage mechanism during viroid replication.

Later, the interest of the study was focused on the application of the diagnostic technique called RT-LAMP. After the design and evaluation of several sets of LAMP primers and the improvement of the protocol, the detection of PLMVd in peach and other rosaceous species, both in the lab and in the field, within 30 min only, was possible.

Finally, a new technique called liquid phase *in situ* RT-PCR, based on the use of the *SYBR Green* fluorescent dye, was applied in PLMVd detection. PLMVd was detected in the chloroplasts of infected peach leaves where, it is known to multiply and concentrate. To our knowledge, the above technique is used for the first time internationally for the detection of plant pathogens.

Κατάλογος εικόνων

Σελίδα

Μέρος Α.

Εικόνα 1.	Κατηγορίες βιοτικών παραγόντων που προκαλούν μολυσματικές ασθένειες στα φυτά	3
Εικόνα 2.	Σχηματική αναπαράσταση της δομής των ιοειδών των οικογενειών <i>Pospiviroidae</i> και των μελών της οικογένειας <i>Avsunviroidae</i>	7
Εικόνα 3.	Σχηματική αναπαράσταση των δύο τύπων της αναλύσεως σε πήγμα πολυακρυλαμίδης (PAGE), της διαδοχικής (sequential, S-PAGE) και εκείνης της επιστροφής (return, R-PAGE)	13
Εικόνα 4.	Δευτεροταγής δομή ραβδίου της πρότυπης παραλλαγής Y00435 του ASSVd.	19
Εικόνα 5.	Χαρακτηριστικά συμπτώματα του ASSVd σε καρπούς μηλιάς των ποικιλιών Belchard και Braeburn και καρπούς απιδιάς των ποικιλιών Κοντούλα και Passacrassana.	19
Εικόνα 6.	Δευτεροταγής δομή σταυροειδούς ραβδίου της πρότυπης παραλλαγής D1823 του PBCVd	21
Εικόνα 7.	Συμπτώματα εξανθηματικών ελκών που προκαλούνται από το PBCVd στον φυτοδείκτη απιδιάς A20 και σε απιδιά ποικιλίας Κοντούλα.	22
Εικόνα 8.	Χαρακτηριστικά συμπτώματα που προκαλούνται σε φυτά ροδακινιάς από το PLMVd	25
Εικόνα 9.	Νουκλεοτιδική αλληλουχία και προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας δύο παραλλαγών του PLMVd, της Peach Calico (PC-40) και της τυπικής	30

Μέρος Β.

Εικόνα 1.	Συμπτώματα έντονης και ήπιας εσχάρωσης του φλοιού καρπών απιδιάς και άγριας απιδιάς	37
Εικόνα 2.	Εξανθηματικά έλκη σε κορμούς, βραχίονες και κλάδους απιδιάς, άγριας απιδιάς και κυδωνιάς	37
Εικόνα 3.	Συμπτώματα σχισμών στη ραφή των καρπών και κιτρινοπράσινου μωσαϊκού στα φύλλα ροδακινιάς	38
Εικόνα 4.	Κυτίο YM-100 (Microcon) και στάδια καθαρισμού DNA	44
Εικόνα 5.	Φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000	45
Εικόνα 6.	Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για	46

- την ανίχνευση του ASSVd, χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών ASSVdc/ASSVdh (Hadidi and Yang 1990) και ASSVdr4/ASSVdf3
- Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του ASSVd με το ζεύγος εκκινητών ASSVdr4/ASSVdf3 χρησιμοποιώντας στο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής την AMV (Finnzymes) ή την M-MLV (Invitrogen) χωρίς ή με την παρουσία 5% (o/o) του αποδιατακτικού DMSO 46
- Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του ASSVd με το ζεύγος εκκινητών ASSVdr4/ASSVdf3 χρησιμοποιώντας στο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής τα αποδιατακτικά DMSO, μεταΐνη και TMSO 47
- Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του ASSVd με το ζεύγος εκκινητών ASSVdr4/ASSVdf3, χρησιμοποιώντας στο στάδιο της PCR τα αποδιατακτικά DMSO και TMSO 47
- Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του ASSVd με το ζεύγος εκκινητών ASSVdr4/ASSVdf3, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο διαδοχικές αραιώσεις ολικού RNA (Rott and Jelkmann, 2001), εκχυλίσματος φυτικού χυμού (Rowhani *et al.*, 1995) και ολικού RNA (Coffin and Coutts 1992) 48
- Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του ASSVd, χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών ASSVdr4/ASSVdf3 48
- Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του PBCVd, χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών PBCVdc/PBCVdh (Shamlou *et al.*, 2002), και PBCVdr6/PBCVdf5 51
- Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του PBCVd, χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών PBCVdc/PBCVdh (Shamlou *et al.*, 2002) 51
- Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της two tube-two step RT-PCR και one tube-two step RT-PCR για την ανίχνευση του PLMVd χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών PLMVdcL/PLMVdhL (Loreti *et al.*, 1999), PLMVdc/PLMVdh (Shamlou *et al.*, 1995) και PLMVdr6/PLMVdf5 53
- Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων one tube-two 54

	step RT-PCR για την ανίχνευση του PLMVd, χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών PLMVdcL/PLMVdhL (Loreti et al., 1999)	
Εικόνα 16.	Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της πρότυπης παραλλαγής Y00435 του ASSVd, με το λογισμικό πρόγραμμα mFold (Zuker, 2003) στους 50 °C	56
Εικόνα 17.	Υπολογισμός του προφίλ αποδιατάξεως του προϊόντος RT-PCR του ιοειδούς ASSVd με τους εκκινητές ASSVdf3/ASSVdr4, του PBCVd με τους εκκινητές PBCVdh/PBCVdc και του PLMVd με τους εκκινητές PLMVdhL/PLMVdcL με τη χρήση του λογάριθμου Poland (Steger 1994)	58
Εικόνα 18.	Συμπτώματα προσβολής καρπών μηλιάς από τον μύκητα <i>Venturia inaequalis</i>	60

Μέρος Γ.

Κεφάλαιο 1^ο

Εικόνα 1.	Συμπτώματα προσβολής φυτών ροδακινιάς από το PLMVd	69
Εικόνα 2.	Συμπτώματα που πιθανότατα σχετίζονται με την παρουσία του PLMVd σε φυτά δαμασκηνιάς και βερικοκιάς	69
Εικόνα 3.	Σχηματική παράσταση της μεθόδου τριχοειδούς μεταφοράς DNA από το πήγμα πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη υβριδισμού	74
Εικόνα 4.	Χάρτης του πλασμιδίου pCR2.1* TOPO	79
Εικόνα 5.	Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της one tube-two step RT-PCR για την ανίχνευση του PLMVd χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο διαδοχικές αραιώσεις ολικού RNA	81
Εικόνα 6.	Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων RT-PCR για τη διάγνωση του PLMVd σε ροδακινιά	81
Εικόνα 7.	Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων RT-PCR για τη διάγνωση του PLMVd σε διάφορα είδη πυρηνοκάρπων και μηλοειδών	81
Εικόνα 8.	Υβριδισμός ίχνους κηλίδας RNA (dot blot hybridization) διαφόρων δειγμάτων t-RNA ροδακινιάς, βερικοκιάς, δαμασκηνιάς, κερασιάς, απιδιάς και κυδωνιάς για την ανίχνευση του PLMVd	82
Εικόνα 9.	Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης προϊόντων RT-PCR για τη διάγνωση του PLMVd σε μητρικά δένδρα της ποικιλίας May Crest	85
Εικόνα 10.	Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα πολυακρυλαμίδης 5% (A) και υβριδισμός κατά Southern (B) προϊόντων RT-PCR για την ανίχνευση του	87

	PLMVd	
Εικόνα 11.	Ηλεκτροφορητική ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε σύστημα διαδοχικής PAGE (Sequential PAGE, S PAGE)	88
Εικόνα 12.	Γραφική παράσταση καμπυλών ενισχύσεως προϊόντων real time RT-PCR κατά την εφαρμογή δομικής εξειδικεύσεως	88
Εικόνα 13.	Γραφική παράσταση καμπυλών ενισχύσεως διαδοχικών φθινουσών ανά 10 φορές αραιώσεων μεταγραφημάτων (transcripts) του PLMVd	89
Εικόνα 14.	Γραφική παράσταση καμπύλης αναφοράς της δοκιμής real time RT-PCR	90
Εικόνα 15.	Γραφική παράσταση καμπυλών ενισχύσεως προϊόντων real time RT-PCR για την ποσοτική ανίχνευση του PLMVd σε ροδακινιά και άλλα Rosaceae	91
Εικόνα 16.	Προσδιορισμός της συγκεντρώσεως (αριθμός αντιγράφων /μl) του PLMVd στη ροδακινιά και άλλα Rosaceae με την ποσοτική πραγματικού χρόνου RT-PCR (quantitative real time RT-PCR)	91
Εικόνα 17.	Μολυσμένα με PLMVd δένδρα ροδακινιάς και δαμασκηλιάς που βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση μεταξύ τους	93
Κεφάλαιο 2^ο		
Εικόνα 1.	Σύγκριση κατά ζεύγη (pairwise comparison) των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των ελληνικών παραλλαγών και της πρότυπης παραλλαγής (M835451) του PLMVd	109-110
Εικόνα 2.	Ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των ελληνικών παραλλαγών και της πρότυπης παραλλαγής (M835451) του PLMVd	113-117
Εικόνα 3.	Πρωτοταγής και δευτεροταγής δομή της προτυπης παραλλαγής (M835451) του PLMVd έτσι όπως προβλέφθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου CLC RNA Workbench (CLC bio)	118
Εικόνα 4.	Φυλογενετικά δένδρα ταξινομήσεως των ελληνικών παραλλαγών με τη μέθοδο UPGMA (A) και minimum evolution (B)	120
Εικόνα 5.	Φυλογενετικό δένδρο ταξινομήσεως των ελληνικών παραλλαγών με τη μέθοδο maximum parsimony	121
Εικόνα 6.	Φυλογενετικά δένδρα ταξινομήσεως των ελληνικών παραλλαγών κατά Ambros με τη μέθοδο UPGMA (A) και minimum evolution (B)	122
Εικόνα 7.	Φυλογενετικό δένδρο (δίχως ρίζα) (unrooted) ταξινομήσεως των ελληνικών παραλλαγών κατά Ambros	123
Εικόνα 8.	Φυλογενετικό δένδρο ταξινομήσεως των ελληνικών παραλλαγών κατά Ambros με τη μέθοδο maximum parsimony	124

Εικόνα 9.	Τύποι διαμόρφωσης του σφυροκέφαλου βραχίονα και της θηλειάς A	126
Εικόνα 10.	Σφυροκέφαλες δομές της θετικής και αρνητικής αλυσίδας των ελληνικών παραλλαγών του PLMVd	127
Μέρος Δ		
Κεφάλαιο 1^ο		
Εικόνα 1.	Λήψη με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα ίχνους φυτικού ιστού από το έλασμα φύλλου ροδακινιάς και μεταφορά του για εξέταση	134
Εικόνα 2.	Σχηματική παράσταση των εκκινητών της RT-LAMP	136
Εικόνα 3.	Συσκευή μετρήσεως θολότητας σε πραγματικό χρόνο (Real Time turbiditymeter) LA-200 (Teramecs Co., Ltd, Kyoto, Japan)	137
Εικόνα 4.	Νουκλεοτιδική αλληλουχία της απομονώσεως PL101 του PLMVd που χρησιμοποιήθηκε για την σχεδίαση των εκκινητών της ομάδας OLD1 και του ζεύγους Floor/Bloor και σχηματική παράσταση, σε γραμμική μορφή, της δομής (συστάσεως) των αναμενόμενων προϊόντων της ομόλογης (i) και της συμπληρωματικής (ii) αλυσίδας του PLMVd	139
Εικόνα 5.	Εργαστήριο RT-LAMP αγρού	140
Εικόνα 6.	Ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR, με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του PLMVd σε διάφορα είδη πυρηνοκάρπων και μηλοειδών	141
Εικόνα 7.	Παρακολούθηση της θολότητας στο διάλυμα αντιδράσεως για την επιλογή της καταλληλότερης ομάδας εκκινητών RT-LAMP	142
Εικόνα 8.	Επίδραση της χρήσεως εκφυλισμένων και μη εκκινητών θηλειάς (loop primers) στην RT-LAMP	142
Εικόνα 9.	Επίδραση της συγκέντρωσης μεταΐνης και της θερμοκρασίας στην αντίδραση RT-LAMP	143
Εικόνα 10.	Ευαισθησία της RT-LAMP κάτω από συνθήκες 62.5 °C και 0.8 M μεταΐνη	143
Εικόνα 11.	Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-LAMP χρησιμοποιώντας ως αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) την AMV (Promega) και την Thermoscript (Invitrogen)	144
Εικόνα 12.	Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης προϊόντων RT- LAMP που προέρχονται από τη χρήση διαφορετικών τύπων εκμαγείου	144
Εικόνα 13.	Παρακολούθηση διακυμάνσεως της θολότητας του διαλύματος RT-	145

	LAMP ανάλογα με το είδος του εκμαγείου	
Εικόνα 14.	Επίδραση της θερμικής αποδιατάξεως του εκμαγείου	145
Εικόνα 15.	Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-LAMP απομονώσεων των ιοειδών PLMVd, PBCVd, ASSVd, HSVd, και PSTVd	146
Εικόνα 16.	Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-LAMP προερχόμενων από την ανίχνευση των PLMVd και PSTVd μετά από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο <i>RsaI</i> (Promega)	146
Εικόνα 17.	Παρακολούθηση της θολότητας αντιδράσεων RT-LAMP κατά τον έλεγχο παρουσίας του PLMVd σε διάφορα είδη ξενιστών	147
Εικόνα 18.	Ανίχνευση του PLMVd σε δείγματα ροδακινιάς, βερικοκιάς, απιδιάς και δαμασκηνιάς στον αγρό	148
Εικόνα 19.	Προσανατολισμός εκκινητών RT-LAMP της ομάδας NEW και όλων των υπολοίπων (OLD, OLD1, FUKUTA)	148
Εικόνα 20.	Δευτεροταγής δομή των εκκινητών FIP και BIP των ομάδων OLD1 και FUKUTA	149

Κεφάλαιο 2^ο

Εικόνα 1.	Συμπτώματα που προκαλούνται στη ροδακινιά από το PLMVd και την παραλλαγή του Peach Calico (PC)	157
Εικόνα 2.	Τμήματα φύλλων ροδακινιάς που έχουν υποστεί καθήλωση με FAA εμβαπτισμένα σε πήγμα αγαρόζης εντός πλαστικών τρυβλίων petri	158
Εικόνα 3.	Κρυοτόμος Leica CM 1850 Cryostat	158
Εικόνα 4.	Απομάκρυνση αγαρόζης από τις τομές με τη βοήθεια μυκητολογικών βελονών	159
Εικόνα 5.	Φωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου τομών πράσινων ασυμπτωματικών και με συμπτώματα λευκάνσεως φύλλων ροδακινιάς μολυσμένων με το κοινό PLMVd και την παραλλαγή του Peach Calico (PC), αντίστοιχα	162
Εικόνα 6.	Φωτογραφία μικροσκοπίου επι-φθορισμού τομών φύλλων ροδακινιάς με συμπτώματα λευκάνσεως που δεν είχαν υποστεί μεταχείριση με DNAση και πεψίνη, μετά την εφαρμογή <i>in situ</i> RT-PCR απουσία εκκινητών IB Rev/Ib Fw και μετά από χρώση με DAPI	163
Εικόνα 7.	Φωτογραφίες μικροσκοπίας επι-φθορισμού τομών φύλλων ροδακινιάς μετά την εφαρμογή <i>in situ</i> RT-PCR για τον εντοπισμό του γονιδίου <i>rbcl</i> και του PLMVd	164

- Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων PCR με 166 εκμαγείο 2μl διαλύματος *in situ* RT-PCR (2-6) ή one tube RT-PCR
- Εικόνα 9. Φωτογραφίες μικροσκοπίας επι-φθορισμού τομών φύλλων 166 ροδακινιάς GF-305 καθηλωμένων με FAA

Κατάλογος πινάκων

Μέρος Α.		Σελίδα
Πίνακας 1.	Ονόματα, μεγέθη, κύριοι ξενιστές, συντομογραφίες και γένη των ιοειδών	5
Πίνακας 2.	Οι σημαντικότερες ποικιλίες ροδακινιάς και νεκταρινιάς στην Ελλάδα	16
Πίνακας 3.	Ιοί, ιοειδή και φυτοπλάσματα των σημαντικότερων μηλοειδών (απιδιά, μηλιά) και πυρηνοκάρπων (βερικοκιά, δαμασκηλιά, κερασιά, ροδακινιά)	17
Πίνακας 4.	Συμπτώματα και ευπάθεια διαφόρων ποικιλιών μηλιάς στο ASSVd	20
 Μέρος Β.		
Πίνακας 1.	Δείγματα καλλιεργούμενων και αυτοφυών μηλοειδών και πυρηνοκάρπων που ελέγχθηκαν για την παρουσία των ASSVd, PBCVd και PLMVd	36
Πίνακας 2.	Ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των ASSVd, PBCVd και PLMVd	41
Πίνακας 3.	Αποτελέσματα RT-PCR για την παρουσία των ASSVd, PBCVd και PLMVd σε καλλιεργούμενα και αυτοφυή είδη μηλοειδών και πυρηνοκάρπων	49
Πίνακας 4.	Σχέση των παραλλαγών ASSVd που αποκτήθηκαν στη παρούσα εργασία μεταξύ τους καθώς και με άλλες ήδη καταχωρημένες στη βάση δεδομένων	50
Πίνακας 5.	Σχέση των παραλλαγών PBCVd που αποκτήθηκαν στη παρούσα εργασία μεταξύ τους καθώς και με άλλες ήδη καταχωρημένες στη βάση δεδομένων	52
Πίνακας 6.	Σχέση των παραλλαγών PLMVd που αποκτήθηκαν στη παρούσα εργασία μεταξύ τους καθώς και με άλλες ήδη καταχωρημένες στη βάση δεδομένων	55
 Μέρος Γ.		
Κεφάλαιο 1^ο		
Πίνακας 1.	Δείγματα ροδακινιάς και άλλων πυρηνοκάρπων και μηλοειδών που εξετάστηκαν για την παρουσία του PLMVd	67
Πίνακας 2.	Πολλαπλασιαστικό υλικό ροδακινιάς/νεκταρινιάς που εξετάστηκε	70

	για την παρουσία του PLMVd	
Πίνακας 3.	Συχνότητα παρουσίας του PLMVd σε δείγματα ροδακινιάς και άλλων πυρηνοκάρπων και μηλοειδών όπως καταγράφηκε με τη βοήθεια των διαγνωστικών μεθόδων RT-PCR και υβριδισμό dot-blot	83
Πίνακας 4.	Αποτελέσματα ελέγχου πολλαπλασιαστικού υλικού ροδακινιάς και νεκταρινιάς που εξετάστηκε για την παρουσία του PLMVd	86
Κεφάλαιο 2^ο		
Πίνακας 1.	Αναλυτικός κατάλογος των ελληνικών παραλλαγών PLMVd	102
Μέρος Δ.		
Κεφάλαιο 1^ο		
Πίνακας 1.	Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές RT-LAMP και των εκκινητών της RT-PCR	135

ΜΕΡΟΣ Α

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. Φυτοπαθολογία και ασθένεια

Φυτοπαθολογία είναι η μελέτη των μικροοργανισμών και των περιβαλλοντικών παραγόντων που προσβάλλουν τα φυτά καθώς και των μηχανισμών μέσω των οποίων προκαλείται μια ασθένεια και βασικός της σκοπός είναι η ανάπτυξη μεθόδων, εξοπλισμού και υλικών, μέσω των οποίων θα είναι δυνατή η πρόληψη και η αντιμετώπιση μιας ασθένειας (Agiros 2005). Ένα φυτό θεωρείται υγιές όταν οι φυσιολογικές του λειτουργίες πραγματοποιούνται στο βέλτιστο σύμφωνα με το γενετικό του υλικό. Αντίθετα, όταν σε ένα φυτό παρατηρείται διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων ή των ιστών του λόγω συνεχούς ή μακράς διάρκειας ερεθισμού από κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό ή περιβαλλοντικό παράγοντα, η οποία εκδηλώνεται με φυσιολογικές ή μορφολογικές αλλοιώσεις, τότε λέγεται ότι το φυτό ασθενεί. Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί περισσότερες από δέκα χιλιάδες ασθένειες των καλλιεργούμενων φυτών. Μάλιστα έχει υπολογιστεί ότι κάθε καλλιέργεια προσβάλλεται κατά μέσο όρο από 100 ή και περισσότερες ασθένειες. Η κατάταξη των φυτικών ασθενειών μπορεί να γίνει με βάση τα συμπτώματα που προκαλούνται, το φυτικό όργανο που προσβάλλεται ή τις ταξινομικές ομάδες των προσβαλλομένων φυτών. Συνήθως όμως η κατάταξη των ασθενειών γίνεται με βάση το αίτιο. Το πλεονέκτημα αυτού του τρόπου είναι ότι ασθένειες που οφείλονται σε παθογόνα της ίδιας ομάδας ακολουθούν περίπου την ίδια εξέλιξη και η αντιμετώπισή τους θεμελιώνεται στις ίδιες βασικές αρχές. Με βάση τα παραπάνω οι ασθένειες διακρίνονται σε:

A) Μεταδοτικές ή μολυσματικές ασθένειες που οφείλονται σε βιοτικούς παράγοντες (Εικόνα

1)

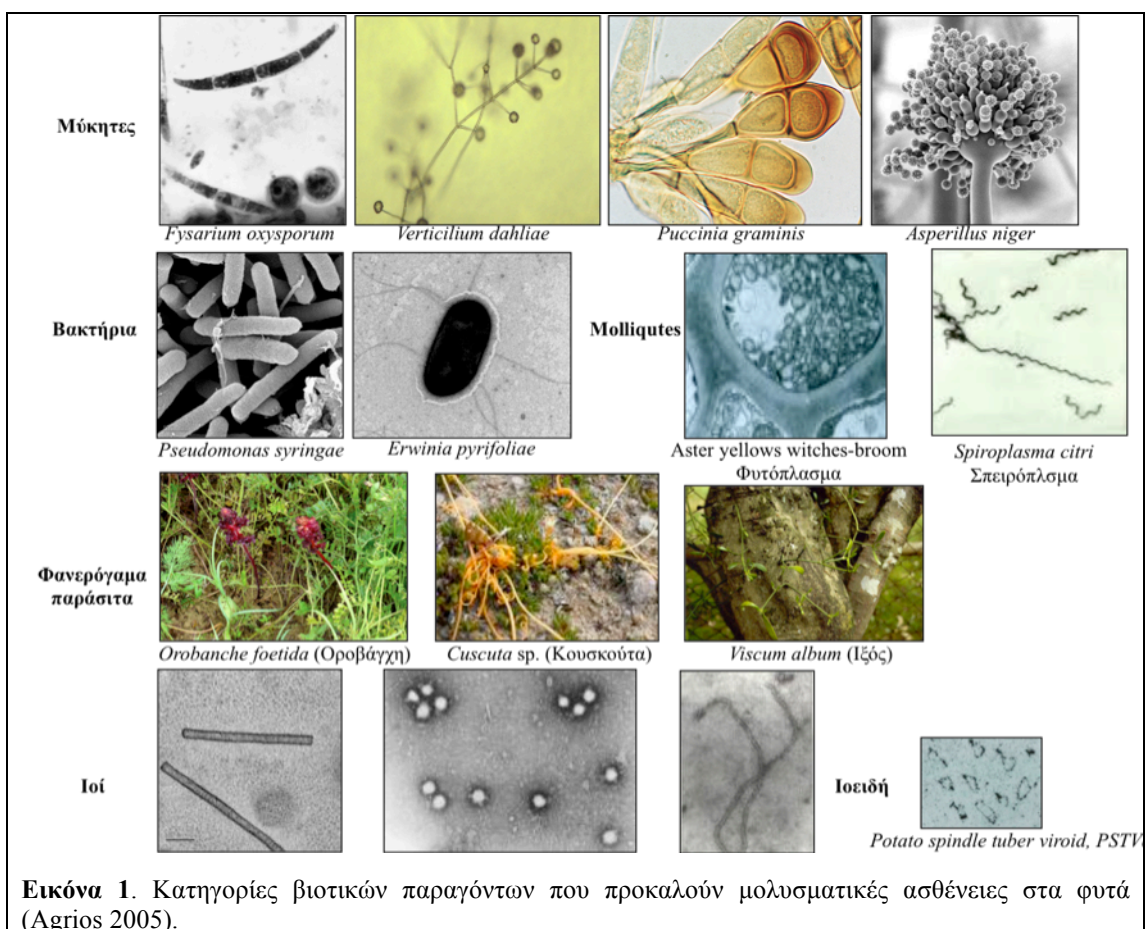
- i) Ασθένειες που οφείλονται σε μύκητες
- ii) Ασθένειες που οφείλονται σε προκαρυωτικούς οργανισμούς (βακτήρια, φυτοπλάσματα)
- iii) Ασθένειες που οφείλονται σε ιούς και ιοειδή
- iv) Ασθένειες που προκαλούνται κατά τον παρασιτισμό από ανωτέρα φυτά (φανερόγαμα παράσιτα)

B) Μη μεταδοτικές ή μη μολυσματικές ασθένειες που οφείλονται σε αβιοτικούς παράγοντες

- i) Ασθένειες που οφείλονται σε δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος
- ii) Ασθένειες που οφείλονται στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων

Τα ιοειδή θεωρούνται τα μικρότερα φυτοπαθογόνα μόρια RNA, με μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 250 και 401 νουκλεοτιδίων. Βέβαια, δεν θα πρέπει να λησμονούνται και τα prions με μέγεθος πολύ μικρότερο των ιοειδών. Τα prions όμως δεν αποτελούνται από νουκλεϊκό οξύ άλλα από μια σialo-γλυκοπρωτεΐνη (sialo-glycoprotein) PrP 27-30 (μοριακού βάρους 27000-30000 daltons) και έχει βρεθεί ότι προκαλούν τρεις τουλάχιστον εκφυλιστικές ασθένειες του ανθρώπου και την ασθένεια 'scapie' στα πρόβατα, ενώ δεν προσβάλλουν τα φυτά. Βασικά, όμως, τα prions δεν είναι αυτόνομα πολλαπλασιαζόμενα και δεν περιέχουν

γενετικό υλικό, ενώ τα ιοειδή είναι γενετικό υλικό.



2. Ιοειδή γενικά

2.1. Ανακάλυψη

Τα ιοειδή ως φυτοπαθογόνα αναγνωρίστηκαν μόλις στα τέλη της δεκαετίας του 1960 από τους Diener και Raymer (1967) κατά την προσπάθεια διερεύνησης του αιτίου της ασθένειας των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (potato spindle tuber disease). Επί πολλά χρόνια η ασθένεια αυτή θεωρούνταν ιολογικής φύσεως. Όμως, η χαμηλή ταχύτητα καθιζήσεως (μικρότερη από τους ιούς), η ευαισθησία στις ριβονουκλεάσες (ribonucleases), αλλά όχι στις δεοξυ-ριβονουκλεάσες (deoxy-ribonucleases), τη φαινόλη, το χλωροφόρμιο, την αιθανόλη και την n-βουτανόλη, οδήγησε στο συμπέρασμα πως αίτιο της ασθένειας αυτής είναι κάποιο μικρού μεγέθους ελεύθερο ριβονουκλεϊκό οξύ (ribonucleic acid, RNA) δίχως πρωτεϊνικό καψίδιο, στο οποίο αργότερα δόθηκε το όνομα ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd). Σε παρόμοια συμπεράσματα οδηγήθηκαν και οι Semancik και Weathers (1968) για το παθογόνο αίτιο της εξωκορτίδας των εσπεριδοειδών (*citrus exocortis*). Λίγα χρόνια μετά, το 1971, ο Diener (1971) πρότεινε τον όρο ιοειδές (*viroid*) για να περιγράψει μια νέα ομάδα φυτοπαθογόνων στην οποία ανήκουν μεταξύ άλλων

το PSTVd και το ιοειδές της εξωκορτίδας των εσπεριδοειδών (*Citrus exocortis viroid*, CEVd).

Τα ιοειδή είναι μικρά μονονηματοειδή μόρια RNA, μοριακού βάρους (molecular weight, MW) $0.8-1.3 \times 10^5$ daltons και μήκους 246-401 νουκλεοτιδίων (nucleotides, nt), κυκλικά (ομοιοπολικά κλειστά), με υψηλό βαθμό ενδομοριακής συμπληρωματικότητας που τους προσδίδει χαρακτηριστική δευτεροταγή δομή ψευδοδινηματικού ραβδίου, ελεύθερα (δίχως πρωτεϊνικό καψίδιο, coat protein) και αυτόνομα πολλαπλασιαζόμενα (δίχως την ανάγκη βοηθού ιού [helper virus]), υποχρεωτικά παράσιτα των ανωτέρων φυτών στα οποία προκαλούν ασθένειες (Κυριακοπούλου, 1991). Σε σχέση με τους ιούς, πέραν του μικρού τους μεγέθους, της χαρακτηριστικής τους δομής και της ελλείψεως πρωτεϊνικού καψιδίου διαφέρουν και ως προς την αδυναμία κωδικοεύσεως πρωτεϊνών (δεν έχουν δραστηριότητα αγγελιαφόρου RNA [messenger RNA, mRNA]). Ως εκ τούτου, σε αντίθεση με τους ιούς που θεωρούνται παράσιτα του μηχανισμού μεταφράσεως (translation apparatus) του φυτικού κυττάρου, τα ιοειδή θεωρούνται παράσιτα του μηχανισμού μεταγραφής (transcription apparatus) (Gora-Sochacka, 2004).

2.2. Βιολογία

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1960 μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί πολλά ιοειδή ως παθογόνα αίτια ασθενειών που προσβάλλουν μεγάλης οικονομικής σημασίας ποώδη και ξυλώδη φυτά, όπως πατάτα, αγγούρι, λυκίσκο, τομάτα, εσπεριδοειδή, αμπέλι, κοκκοφοίνικα, οπωροφόρα δένδρα όπως αβοκάντο, ροδακινιά, δαμασκηνιά, βερικοκιά, αχλαδιά, μηλιά και καλλωπιστικά όπως το χρυσάνθεμο και το ωραιόφυλλο (*Coleus* sp.) (Singh *et al.*, 2003β) (Πίνακας. 1).

Ορισμένα από αυτά έχουν καταστρεπτικές επιπτώσεις, όπως αποδείχθηκε στην περίπτωση του ιοειδούς της φθίσεως του κοκκοφοίνικα, *Coconut cadang cadang viroid* (CCCVd), που υπολογίζεται ότι από το 1930 ευθύνεται για τον θάνατο περισσότερων από 30 εκατομμύρια δένδρα κοκκοφοίνικα στις Φιλιππίνες, με τις απώλειες να ξεπερνούν τα 40 εκατομμύρια δολάρια ετησίως (Randles and Rodriguez 2003). Τα ιοειδή προκαλούν επιναστία (epinasty), τραχύτητα (rugosity), χλώρωση και νέκρωση των φύλλων, σπάσιμο του χρώματος των πετάλων, βραχυγονάτωση, νανισμό, εξανθηματικό έλκος και σχισμές στον κορμό, παραμόρφωση, μεταχρωματισμό στους καρπούς, καθυστέρηση της εκπτώξεως των φύλλων, της ανθήσεως και της ωριμάνσεως των καρπών, καθώς και πρόωρη γήρανση (Flores *et al.*, 2006, Lawson 1987, Roistacher *et al.*, 1977, Koganezawa *et al.*, 2003, Kyriakopoulou *et al.*, 2001). Ορισμένα ιοειδή προκαλούν πολύ ήπια συμπτώματα, κάποια παραμένουν ασυμπτωματικά επί μεγάλο χρονικό διάστημα π.χ. ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) (Hernandez and Flores 1992), ενώ κάποια

άλλα δεν προκαλούν καθόλου συμπτώματα στους φυσικούς τους ξενιστές, π.χ. λανθάνον ιοειδές του λυκίσκου (*Hop latent viroid*, HLVd) (Puchta *et al.*, 1988).

Πίνακας 1. Ονόματα, συντομογραφίες, γένη, οικογένειες, μεγέθη, και κύριοι ξενιστές, των ιοειδών (Flores 2001, Gora-Sochacka 2004, Singh *et al.*, 2003)

Οικογένεια <i>Avsunviroidae</i>				
Όνομα είδους	Συντομογραφία	Γένος	Μέγεθος	Ξενιστής
<i>Avocado sunblotch viroid</i>	ASBVd	<i>Avsunviroid</i>	246-250	Αβοκάντο
<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>	CChMVd	<i>Pelamoviroid</i>	398-401	Χρυσάνθεμο
<i>Peach latent mosaic viroid</i>	PLMVd		335-351	Ροδακινιά
<i>Eggplant latent viroid</i>	ELVd	<i>Elaviroid</i>	332-335	Μελιτζάνα
Οικογένεια <i>Pospiviroidae</i>				
<i>Apple dimple fruit viroid</i>	ADFVd		306	Μηλιά
<i>Apple scar skin viroid</i>	ASSVd		329-334	Μηλιά
<i>Apple fruit crinkle viroid</i>	AFCVd		368-375	Μηλιά
<i>Australian grapevine viroid</i>	AGVd		369	Αμπέλι
<i>Citrus bent leaf viroid</i>	CBLVd		315-329	Αβοκάντο
<i>Citrus viroid I LSSI</i>	CVd-LSS	<i>Apscaviroid</i>	325-330	Εσπεριδοειδή
<i>Citrus viroid III</i>	CVd-III		291-297	Εσπεριδοειδή
<i>Citrus viroid OS</i>	CVd-OS		326-331	Εσπεριδοειδή
<i>Grapevine yellow speckle viroid-1</i>	GYSVd-1		361-363	Αμπέλι
<i>Grapevine yellow speckle viroid-2</i>	GYSVd-2		363	Αμπέλι
<i>Japanese citrus viroid I</i>	JCVd		331	Εσπεριδοειδή
<i>Pear blister canker viroid</i>	PBCVd		314-316	Απιδιά
<i>Coleus blumei viroid</i>	CbVd		295	Ωραιόφυλλο
<i>Coleus blumei viroid-1</i>	CbVd-1	<i>Coleviroid</i>	248-251	Ωραιόφυλλο
<i>Coleus blumei viroid-2</i>	CbVd-2		295-301	Ωραιόφυλλο
<i>Coleus blumei viroid-3</i>	CbVd-3		361-364	Ωραιόφυλλο
<i>Citrus viroid IV</i>	CVd IV		284-286	Εσπεριδοειδή
<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>	CCCVd		246-301	Κοκκοφοίνικας
<i>Coconut tinangaja viroid</i>	CTiVd	<i>Cocadviroid</i>	254	Κοκκοφοίνικας
<i>Hop latent viroid</i>	HLVd		255-256	Λυκίσκος
<i>Hop stunt viroid</i>	HSVd	<i>Hostuviroid</i>	292-303	Λυκίσκος
<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	CSVd		354, 356	Χρυσάνθεμο
<i>Citrus exocortis viroid</i>	CEVd		370-375	Εσπεριδοειδή/ Τομάτα
<i>Columnea latent viroid</i>	CLVd		370, 372	Κολουμνέα
<i>Iresine viroid</i>	IRVd		370	Iresine
<i>Mexican papita viroid</i>	MPVd	<i>Pospiviroid</i>	359, 360	Τομάτα
<i>Potato spindle tuber viroid</i>	PSTVd		356-360	Πατάτα
<i>Tomato apical stunt viroid</i>	TASVd		360-363	Τομάτα
<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	TCDVd		360	Τομάτα
<i>Tomato planta macho viroid</i>	TPMVd		360	Τομάτα

Ο πολλαπλασιασμός και η έκφραση των συμπτωμάτων στα ιοειδή ευνοείται από υψηλή θερμοκρασία και ένταση φωτός, γι' αυτό και προκαλούν ασθένειες σε φυτά τροπικών και υπο-τροπικών περιοχών, καθώς και σε φυτά θερμοκηπίου (Singh *et al.*, 2003, Singh 1989, Schlemmer *et al.*, 1985).

Το εύρος ξενιστών μπορεί να διαφέρει σημαντικά από ιοειδές σε ιοειδές, με ορισμένα να προσβάλλουν και να προκαλούν ασθένεια σε μεγάλο αριθμό ειδών, όπως τα CEVd και PSTVd (Singh *et al.*, 2003), ενώ άλλα σε ορισμένα μόνο συγγενή είδη του ίδιου γένους ή οικογένειας, π.χ. PLMVd (προσβάλλει μόνο είδη της οικογένειας Rosaceae) (Singh *et al.*, 2003). Γενικά τα μέλη της οικογένειας *Pospiviroidae* έχουν πολύ μεγαλύτερο εύρος ξενιστών από εκείνα της οικογένειας *Avsunviroidae*.

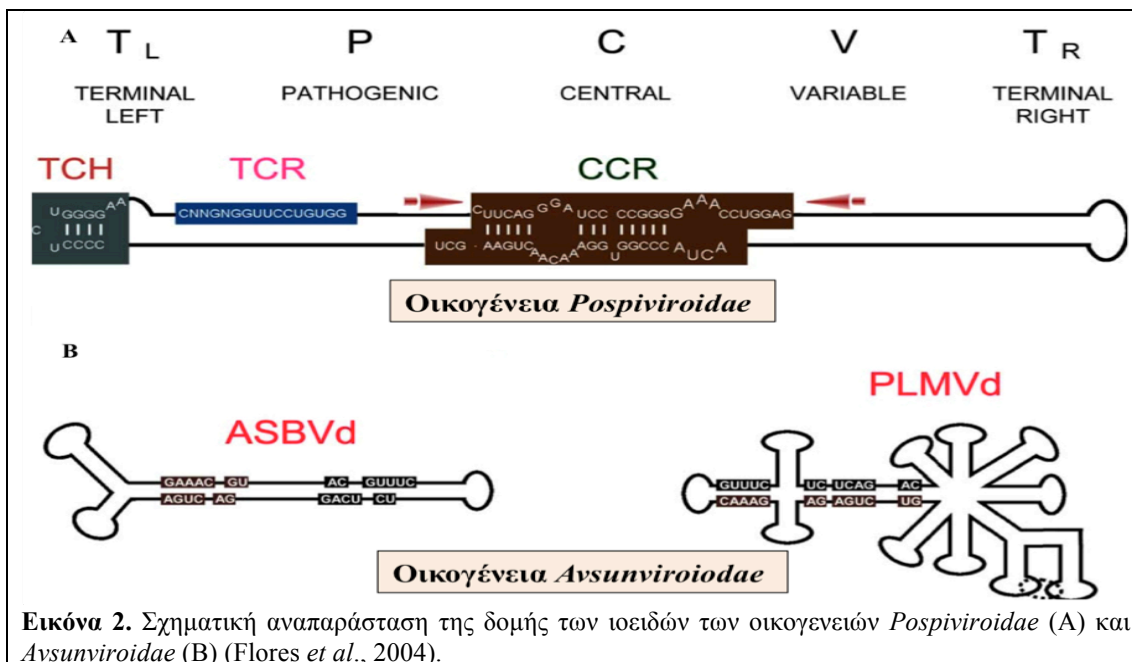
Τα ιοειδή στη φύση μεταδίδονται κυρίως με τον εμβολιασμό, συμπεριλαμβανομένου του φυσικού ριζοεμβολιασμού, και μηχανικά με κοπτικά εργαλεία, εξαπλώνονται δε με τον άνθρωπο μέσω της διακινήσεως και χρήσεως μολυσμένου αγενούς πολλαπλασιαστικού υλικού (Hadidi *et al.*, 1997, Konganezawa *et al.*, 2003). Ορισμένα ιοειδή μεταδίδονται με το σπόρο και τη γύρη, όπως τα PSTVd (Hunter *et al.*, 1969, Singh *et al.*, 1992) και το ιοειδές του ηλιοεγκαύματος του αβοκάντο (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) (Allen *et al.*, 1981), ενώ έχει αναφερθεί και η μετάδοση με αφίδες στις περιπτώσεις των ιοειδών του νανισμού του κορυφαίου μεριστώματος της τομάτας (*Tomato apical stunt viroid*, TASVd) και των αρσενικών φυτών της τομάτας (*Tomato planta macho viroid*, TPMVd) και συγκεκριμένα με τα είδη *Myzus persicae* και *Aphis craccivora* αντίστοιχα (Galindo *et al.*, 1986, Walter 1987).

Όσον αφορά τη μετακίνηση των ιοειδών σε απόσταση εντός του ξενιστή τους αναφέρεται ότι αυτή πραγματοποιείται, όπως και στην περίπτωση των ιών, μέσω του φλοιώματος, μαζί με τα προϊόντα φωτοσυνθέσεως, ενώ για τη μετακίνησή τους από κύτταρο σε κύτταρο χρησιμοποιούν τα πλασμοδέσματα (Ding and Owens 2003).

2.3. Δομή

Σύγκριση των αλληλουχιών των ραβδόμορφων ιοειδών οδήγησε στη δημιουργία μιας πρότυπης δομής που αφορά όλα τα ιοειδή-μέλη της οικογένειας *Pospiviroidae* (Εικόνα 2). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, υπάρχουν πέντε ξεχωριστές δομικές-λειτουργικές περιοχές: Η κεντρική (central, C), η παθογένειας (pathogenicity, P), η ποικίλλουσα (variable, V) που παρουσιάζει το μικρότερο βαθμό ομολογίας μεταξύ συγγενών ειδών, και η δεξιά και αριστερή τερματικές περιοχές (terminal right, TR, terminal left, TL). Η κεντρική συντηρημένη περιοχή (central conserved region, CCR) βρίσκεται εντός του τμήματος C, ενώ η τερματική συντηρημένη περιοχή (terminal conserved region, TCR) και η τερματική συντηρημένη φουρκέτα (terminal conserved hairpin, TCH) εντός της περιοχής TL. Η κεντρική περιοχή και το άνω τμήμα της CCR συμμετέχουν στην αναπαραγωγή, η περιοχή P σχετίζεται με την παθογένεια και την έκφραση των συμπτωμάτων (Baumstark *et al.*, 1997), ενώ οι περιοχές TR και TL ίσως παίζουν ρόλο στη μετακίνηση των ιοειδών (Hammond 1994, Maniatakis *et al.*, 2003). Τα μέλη της οικογένειας *Avsunviroidae* έχουν σχεδόν ραβδόμορφη δομή (ASBVd και ELVd) ή έντονα διακλαδισμένη (PLMVd, CChMVd) (Εικόνα 2),

στερούνται CCR αλλά φέρουν συντηρημένα τμήματα που συμμετέχουν στο σχηματισμό των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων (hammerhaed riboenzymes) (Gora-Sochacka, 2004).



2.4. Αναπαραγωγή

Τα ιοειδή πολλαπλασιάζονται στα κύτταρα του ξενιστή αυτόνομα, δίχως την ανάγκη βοηθού ιού. Λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους δεν φέρουν γενετικές πληροφορίες για τη σύνθεση πρωτεϊνών και κυρίως της πολυμεράσης-ρεπλικάσης του εαυτού τους. Ως εκ τούτου, η αναπαραγωγή τους βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη συμμετοχή του γενετικού υλικού του ξενιστή. Λόγω της κυκλικής τους δομής, θεωρείται ότι η αναπαραγωγή τους λαμβάνει χώρα μέσω ενός μηχανισμού κυλιόμενου κύκλου (rolling cycle), ο οποίος διακρίνεται σε δύο τύπους τον ασύμμετρο (asymmetric) και τον συμμετρικό (symmetric) (Branch and Robertson 1984, Grill and Semancik, 1978). Στον πρώτο τύπο, ο οποίος συναντάται στα μέλη της οικογένειας *Pospiviroidae*, το ιοειδικό μόριο θετικής πολικότητας (+RNA) αντιγράφεται συνεχώς με τη βοήθεια DNA εξαρτώμενης-RNA πολυμεράσης II (DNA depended-RNA polymerase II) του φυτού ξενιστή, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή συμπληρωματικής αλυσίδας (-RNA) μήκους πολλαπλάσιου (ολιγομερή, oligomeric) της μονάδας μήκους του ιοειδούς (μονομερές, monomeric). Στη συνέχεια, η ολιγομερής συμπληρωματική αλυσίδα αποτελεί με τη σειρά της το εκμαγείο για την σύνθεση της ολιγομερούς ομόλογης αλυσίδας (+RNA), η οποία υφίσταται, σε ειδικές θέσεις, σχάση από μια επίσης φυτικής προελεύσεως RNase ενδονουκλεάση (endonuclease). Οι μονάδες μήκους της ομόλογης αλυσίδας, στη συνέχεια, μετατρέπονται στο αρχικό κυκλικό μόριο του ιοειδούς με τη βοήθεια μιας RNA λιγάσης (RNA ligase) (Baumstark *et al.*, 1997, Branch *et al.*, 1982). Η παραπάνω διαδικασία λαμβάνει χώρα στον πυρήνα των κυττάρων. Αντίθετα, ο μηχανισμός του συμμετρικού κυλιόμενου κύκλου που υιοθετείται από τα μέλη της οικογένειας *Avsunviroidae* λαμβάνει

χώρα στους χλωροπλάστες. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό υπάρχουν δύο κύκλοι (Daros *et al.*, 1994). Στον πρώτο κύκλο, όπως και στην περίπτωση του ασύμμετρου κύκλου, παράγονται ολιγομερή της συμπληρωματικής αλυσίδας (-RNA) με μόνη διαφορά ότι η διαδικασία καταλύεται από την NEP πολυμεράση (nuclear encoded DNA depended-RNA polymerase) (Navarro *et al.*, 2000). Στη συνέχεια, τα ολιγομερή αυτά υφίστανται σε ειδικές θέσεις αυτοσχάση με τη μεσολάβηση σφυροκέφαλων ριβοενζύμων (Hutchins *et al.*, 1986, Forster and Symons, 1987), οδηγώντας στην παραγωγή μονομερών αρνητικής πολικότητας. Αυτά με τη σειρά τους στο δεύτερο κύκλο αντιγράφονται σε ολιγομερή θετικής πολικότητας τα οποία υφίστανται και αυτά αυτοσχάση σε μονομερή και τελικά, μετά την ένωσή τους με την βοήθεια κάποιας φυτικής προελεύσεως RNA λιγάσης, οδηγούν στην παραγωγή αντιγράφων του αρχικού μορίου.

2.5. Ταξινόμηση

Σύμφωνα με τις οδηγίες της Διεθνούς Επιτροπής για την Ταξινόμηση των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), τα ιοειδή με βάση i) τη παρουσία κεντρικής συντηρημένης περιοχής (central conserved region, CCR), ii) την ικανότητα αυτοσχάσης (self-cleavage) με τη μεσολάβηση ριβοενζύμων iii) τον μηχανισμό και τη θέση πολλαπλασιασμού, διακρίνονται σε δύο οικογένειες:

1) Οικογένεια *Pospiviroidae* το όνομα της οποίας προέρχεται από το τυπικό της μέλος PSTVd, στην οποία κατατάσσονται τα περισσότερα ιοειδή (30, βλ. Πίνακα 1) (Flores *et al.*, 2004). Τα μέλη της οικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται από την παρουσία CCR, την απουσία ριβοενζύμων και τον πολλαπλασιασμό τους μέσω του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου (asymmetric rolling cycle) στους πυρήνες. Εντός της οικογένειας *Pospiviroidae* διακρίνονται πέντε γένη με βάση τη φύση της CCR, την απουσία ή παρουσία της τερματικής συντηρημένης περιοχής (terminal conserved region, TCR) (υπάρχει στα μέλη των γενών *Pospiviroid* και *Apscaviroid*) και της τερματικής συντηρημένης φουρκέτας (terminal conserved hairpin, TCH) (υπάρχει στα μέλη των γενών *Hostuviroid* και *Cocaviroid*) (Elena *et al.*, 2001, Kotunow and Rezaian, 1988, Flores *et al.*, 1997).

2) Οικογένεια *Avsunviroidae*, το όνομα της οποίας προέρχεται από το ιοειδές του ηλιοεγκαύματος του αβοκάντο (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) που αποτελεί το τυπικό της μέλος, η οποία περιλαμβάνει μόνο τέσσερα είδη (Πίνακας 1). Η οικογένεια αυτή, σε αντίθεση με την *Pospiviroidae*, χαρακτηρίζεται από την απουσία CCR, την αυτοσχάση μέσω ριβοενζύμων και τον πολλαπλασιασμό μέσω του συμμετρικού κυλιόμενου κύκλου στους χλωροπλάστες. Στην οικογένεια *Avsunviroidae* ανήκει το γένος *Avsunviroid* με μοναδικό μέλος το ιοειδές ASBVd και το γένος *Pelamoviroid* με μέλη το PLMVd και το ιοειδές του χλωρωτικής ποικιλοχρώσεως του χρυσανθέμου (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd), με κοινά χαρακτηριστικά την υψηλή περιεκτικότητα σε G-C, την ιδιαίτερα

διακλαδισμένη δευτεροταγή δομή που σταθεροποιείται από έναν ψευδο-δεσμό (pseudoknot) (Flores 2001) και την αδιαλυτότητα σε διάλυμα υψηλής αλατότητας LiCl 2 M (Navarro and Flores 2000). Τέλος, για το λανθάνον ιοειδές της μελιτζάνας (*Eggplant latent viroid*, ELVd), με χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των δύο προηγούμενων γενών, προτάθηκε η κατάταξή του στο γένος *Elaviroid* (Flores *et al.*, 1995).

Γενικά για τα ιοειδή, βασικό κριτήριο για την διάκριση διαφορετικών ειδών εντός ενός γένους αποτελεί το ποσοστό ομοιότητας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (συνήθως < 90%) και οι διάφορες βιολογικές ιδιότητες, μεταξύ των οποίων το εύρος ξενιστών και τα συμπτώματα (Flores *et al.*, 2003γ). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ιοειδών είναι ότι απαντώνται εντός των ξενιστών τους ως μίγμα πληθυσμών (από τους οποίους ένας είναι ο κυρίαρχος) συγγενών αλλά όχι πανομοιότυπων μεταξύ τους παραλλαγών (variants), οι οποίες συνθέτουν το λεγόμενο 'σχεδόν είδος' (quasi species) (Eigen, 1977). Το φαινόμενο αυτό πιθανότατα οφείλεται στα λάθη που κάνουν οι RNA πολυμεράσες φυτικής προελεύσεως που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των ιοειδών (Domingo *et al.*, 1996), ενώ επίσης μπορεί να προκύπτει ως αποτέλεσμα ανασυνδυασμού RNA ή πολλαπλών μολύνσεων ενός φυτού ξενιστή, όπως συμβαίνει στα πολυετή οπωροφόρα είδη μέσω των διαφόρων καλλιεργητικών εργασιών που διευκολύνουν τις επαναμολύνσεις π.χ. του εμβολιασμού (Flores *et al.*, 2003γ).

2.6. Ονοματολογία

Η ονοματολογία των ιοειδών, όπως και των ιών, βασίζεται στο αγγλικό τριώνυμο, του οποίου την πρώτη λέξη αποτελεί το όνομα του ξενιστή στον οποίο αναφέρθηκε για πρώτη φορά το ιοειδές, τη δεύτερη το χαρακτηριστικό σύμπτωμα που προκαλεί και την τρίτη η λέξη ιοειδές (viroid) η οποία στη συντομογραφία του ιοειδούς που αποτελείται από τα αρχικά γράμματα των παραπάνω λέξεων, αντιπροσωπεύεται από τα γράμματα Vd αντί του V (virus) για τους ιούς. Έτσι, το επίσημο όνομα του ιοειδούς του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς είναι *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd). Σημειώνεται ότι, όπως και στους ιούς, το τελικό, επίσημο αποφασισμένο όνομα ενός ιοειδούς γράφεται με πλάγιους χαρακτήρες (italics) ενώ το αρκτικόλεξό του (συντομογραφία, συντομογράφημα) με όρθιους. Αντίστοιχα, τα γένη των ιοειδών παίρνουν το όνομά τους το οποίο βέβαια είναι μονολεκτικό, από τα αρχικά γράμματα του τυπικού είδους ακολουθούμενα από την κατάληξη viroid και, σε αντίθεση με τα κλασικά της ταξινομικής ονοματολογίας γράφονται με πλάγιους χαρακτήρες, π.χ. *Pelamoviroid* (*Peach latent mosaic viroid*) (Flores *et al.*, 2000).

2.7. Προέλευση-εξέλιξη

Το RNA θεωρείται πως προϋπήρχε του DNA και των πρωτεϊνών, λόγω της ιδιότητας του να αποθηκεύει και να εκφράζει γενετικές πληροφορίες (ριβοένζυμα). Έτσι λοιπόν τα ιοειδή, ως μόρια RNA, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους (κυκλικό μόριο RNA

μικρού μεγέθους με υψηλή περιεκτικότητα σε G:C) και κυρίως λόγω της ικανότητάς τους να δρουν ως ριβοένζυμα (μέλη της οικογένειας *Avsunviroidae*), θεωρείται ότι έχουν προέλευση ανεξάρτητη από τους ιούς και αρκετά πρωτόγονη, γι' αυτό καλούνται ζωντανά απολιθώματα ενός προ-κυτταρικού κόσμου (Diener, 2001). Παράλληλα το γεγονός ότι συχνά αυτοφυή είδη μολύνονται ασυμπτωματικά από ιοειδή, υποδεικνύει τα είδη αυτά ως πιθανές πηγές των ιοειδών απ' όπου αυτά μολύνουν στην συνέχεια τα καλλιεργούμενα είδη (Gora-Sochacka 2004).

2.8. Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση των ιοειδών όπως και των ιών βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην εφαρμογή προληπτικών μέτρων. Η αποφυγή χρήσεως και διαδόσεως μολυσμένων φυτών/πολλαπλασιαστικού υλικού, μέσω της εφαρμογής συστημάτων πιστοποίησης, αποτελεί θεμελιώδες μέτρο. Η επιτυχία αυτής της πρακτικής οφείλεται στο ότι τα ιοειδή δεν διαθέτουν φορείς, τουλάχιστον αποτελεσματικούς, και η διάδοσή τους επιτυγχάνεται βασικά από τον ίδιο τον άνθρωπο με τη χρησιμοποίηση και διάκίνηση μολυσμένου αγρούς πολλαπλασιαστικού υλικού (φυτών, εμβολίων) και μηχανικά με τα κοπτικά εργαλεία, εξαρτάται δε από την εφαρμογή αποτελεσματικών διαγνωστικών μεθόδων που θα συμβάλουν στην έγκαιρη διάγνωση του παθογόνου, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις ξενιστών με λανθάνουσα μόλυνση. Ομοίως, η εξυγίανση του πολλαπλασιαστικού υλικού, η οποία αποτελεί το πρώτο στάδιο στο σχήμα παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού και η οποία επιτυγχάνεται με την εφαρμογή θερμο-θεραπείας ή κρυο-θεραπείας σε συνδυασμό με την καλλιέργεια ακραίου μεριστώματος (meristem tip culture) ή τον μικρο-εμβολιασμό (shoot tip grafting) (Postman and Hadidi, 1995, Howell *et al.*, 1998, Barba *et al.*, 2003, Navarro *et al.*, 1981) εξαρτάται βασικά από την εφαρμογή αποτελεσματικών διαγνωστικών μεθόδων, με τις οποίες επιλέγονται τα αμόλυντα φυτικά άτομα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, εφαρμόζονται και νομοθετικά μέτρα, φυτοϋγειονομικά (καραντίνα), όπως η απαγόρευση εισόδου ενός παθογόνου σε μία χώρα, η θέσπιση περιοχών καραντίνας για την αποφυγή μεταδόσεως του παθογόνου σε νέες περιοχές και η εξάλειψη του παθογόνου όταν εντοπισθεί σε μία περιοχή. Η απολύμανση των κοπτικών εργαλείων (εμβολιαστήρια, κλαδευτήρια) συνιστά σημαντικό μέτρο πρόληψης και επιτυγχάνεται με εμβάπτιση σε διάλυμα 2-10 % υποχλωριώδους νατρίου ή ασβεστίου μεταξύ μεταχειρίσεων ατομικών φυτών (Roistacher *et al.*, 1969). Σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμόζεται η σταυροειδής προστασία (cross protection) με προ-εμβολιασμό των φυτών με κάποιο ήπιο στέλεχος ενός ιοειδούς με σκοπό την προστασία (συνήθως μείωση της εντάσεως των συμπτωμάτων) από την προσβολή με κάποιο ισχυρά παθογόνο στέλεχος του ιοειδούς αυτού π.χ. PSTVd (Fernow, 1967, Niblett *et al.*, 1978). Επίσης, έχει εφαρμοστεί πειραματικά η βελτίωση ποικιλιών με εισαγωγή γόνων ανθεκτικότητας από άγρια συγγενή είδη, η επαγωγή επίκτητης ανοχής με χημικούς

(ribavirin, amantadin) ή βιολογικούς (*Agrobacterium*) παράγοντες και η χρήση του μηχανισμού σιγήσεως γόνων (gene silencing) (Singh *et al.*, 2003α, 2003β, Sano *et al.*, 2003).

2.9. Διάγνωση

Η ανίχνευση, η ταυτοποίηση, ο διαχωρισμός των συμπτωμάτων που προκαλεί ένα ιοειδές από εκείνα άλλων αιτιών, π.χ. ιών, η καταπολέμηση και ιδιαιτέρως η εφαρμογή προγραμμάτων παραγωγής υγιούς και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού απαιτούν την εφαρμογή δύο ή περισσότερων διαγνωστικών μεθόδων. Στα ιοειδή, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους, όπως η έλλειψη πρωτεϊνικού καψιδίου και το πολύ μικρό τους μέγεθος, αποκλείεται ή καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη, αντίστοιχα, η εφαρμογή μεθόδων όπως η ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) και η ηλεκτρονική μικροσκοπία που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στους ιούς.

2.9.1. Βιοδοκιμές

Οι βιοδοκιμές αποτελούν την παλαιότερη, κλασική και επί πολλές δεκαετίες μοναδική διαγνωστική μέθοδο ιοειδών, η οποία χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα, κυρίως σε συνδυασμό με διάφορες μοριακές μεθόδους (Raymer and O' Brien, 1962, Hodgson *et al.*, 1998). Κατά την εφαρμογή των βιοδοκιμών υπάρχουν πολλοί παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, όπως το εύρος ξενιστών και το είδος των συμπτωμάτων που προκαλεί το υπό μελέτη ιοειδές, το είδος ή είδη των φυτών-δεικτών που θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν, η ύπαρξη εργαστηριακών και κυρίως ποωδών ξενιστών που περιορίζουν τον χρόνο εμφάνισης των συμπτωμάτων, το γεγονός ότι συχνά ήπια στελέχη του ιοειδούς δεν προκαλούν συμπτώματα ενώ σε άλλες περιπτώσεις ισχυρά παθογόνα στελέχη μπορεί να μην προκαλέσουν τα αναμενόμενα συμπτώματα, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, ένταση, διάρκεια και ποσότητα του φωτός), τις συνθήκες θρέψης και την ταυτόχρονη παρουσία άλλων παθογόνων (ιών ή ιοειδών) που επηρεάζουν το είδος και την ένταση των συμπτωμάτων (Singh and Ready, 2003). Η μετάδοση των ιοειδών στις βιοδοκιμές μπορεί να γίνει με μολυσμένο φυτικό χυμό (μηχανικά), με καθαρό παρασκεύασμα RNA ή συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA), καθώς και με τις μονομερείς ή διμερείς δομές του ιοειδούς (Diener *et al.*, 1972, Martinez *et al.*, 2008). Ο εμβολιασμός, σε αντίθεση με τη μετάδοση με το φυτικό χυμό, θεωρείται γενικά ο πιο αποτελεσματικός τρόπος μεταδόσεως, μαζί με τις τομές και τους ξυραφισμούς (Hadidi *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 2006). Βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η υψηλή ευαισθησία. Οι βιοδοκιμές έχουν και αρκετά μειονεκτήματα τα οποία συνέβαλαν στο περιορισμό της χρήσεως της στις ημέρες μας. Τα κυριότερα μειονεκτήματα είναι η μεγάλη χρονική διάρκεια (κυμαίνεται από μερικές εβδομάδες έως έτη) που απαιτείται για την εμφάνιση των συμπτωμάτων, η αδυναμία εφαρμογής της μεθόδου σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, και η ανάγκη χρήσεως θερμοκηπιακών

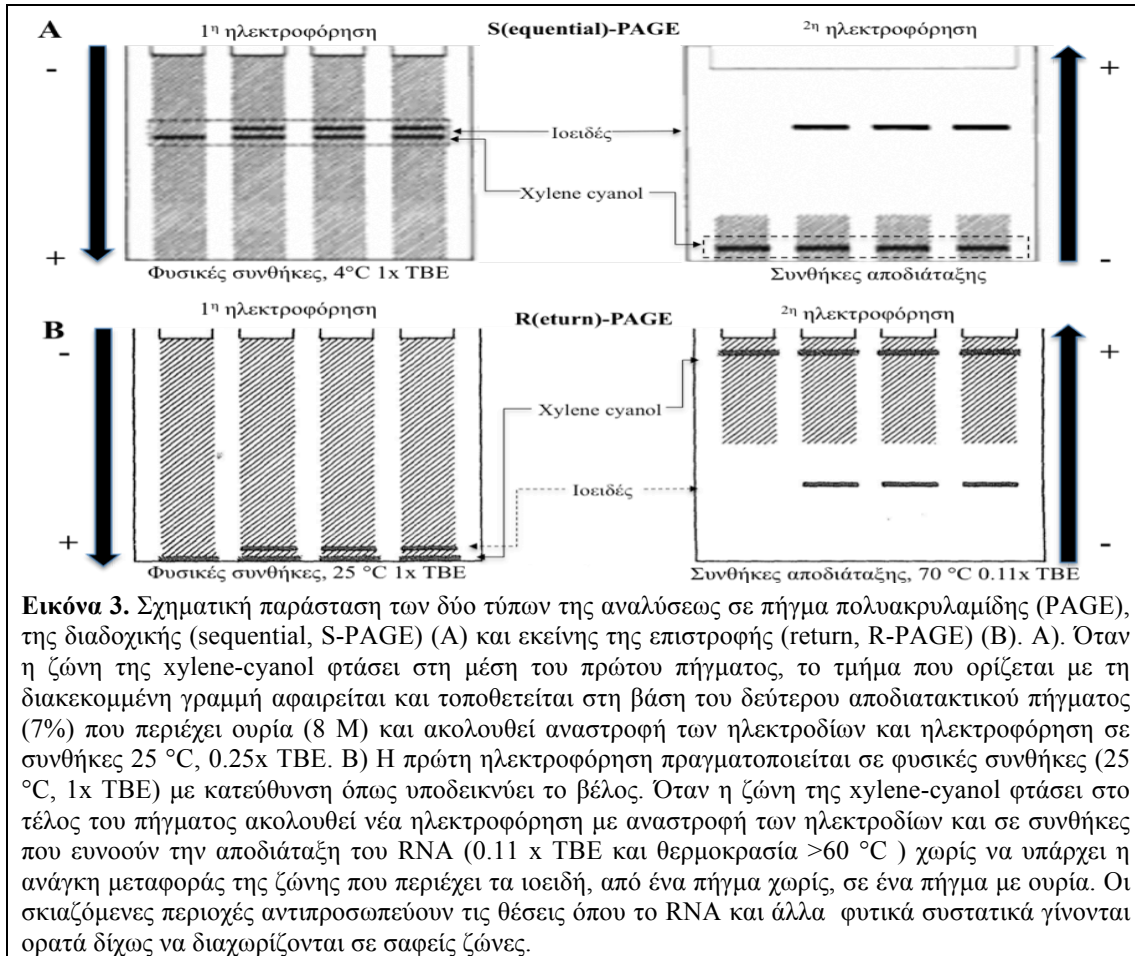
εγκαταστάσεων και εξειδικευμένου προσωπικού που αυξάνουν σημαντικά το κόστος εφαρμογής της μεθόδου (Singh and Ready 2003).

2.9.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμίδης (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)

Η τεχνική της ηλεκτροφορήσεως σε πήγμα πολυακρυλαμίδης έχει παίξει σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη των ιοειδών (Diener 1971, Semancik and Weathers 1972). Τα ιοειδή, λόγω της μοναδικής τους δευτεροταγούς δομής, μπορούν να διαχωριστούν από άλλα RNA με την ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμίδης κάτω από συνθήκες χημικής (ουρία, φορμαμίδη) ή θερμικής (70-80 °C) αποδιατάξεως. Στις συνθήκες αυτές τα ιοειδή περνούν από την υψηλής ενδομοριακής συμπληρωματικότητας δομή ραβδίου στον ανοιχτό κύκλο, με αποτέλεσμα να κινούνται πολύ πιο αργά από τα αντίστοιχου μεγέθους γραμμικά μόρια RNA και έτσι να διαχωρίζονται από αυτά (Schumacher *et al.*, 1986). Συνδυάζοντας, σε ένα σύστημα δύο διαστάσεων (two dimensional), ή δύο κατευθύνσεων (two directional) την ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμίδης κάτω από φυσικές συνθήκες (20 °C, 1x TBE) με την ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες χημικής ή θερμικής αποδιατάξεως, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των ιοειδών από τα μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους RNA φυτικής προελεύσεως και από τις χρωστικές. Η τεχνική αυτή ονομάζεται διπλή ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμίδης (double-PAGE, d-PAGE) και στην περίπτωση των δύο κατευθύνσεων διακρίνεται σε δύο τύπους, τη διαδοχική (sequential, S-PAGE) (Rivera-Bustamante *et al.*, 1986) και την επιστροφής (return, R-PAGE) (Schumacher *et al.*, 1986, Singh and Boucher 1987) (Εικόνα 3).

2.9.3. Μοριακός υβριδισμός (molecular hybridization)

Ο μοριακός υβριδισμός αποτελεί μια εύχρηστη, όχι ιδιαίτερα χρονοβόρα (απαιτούνται δύο περίπου ημέρες) και ικανής ευαισθησίας (pg ή λιγότερο) (Owens and Deiner 1981, Singh *et al.*, 1994) τεχνική που χρησιμοποιείται ευρύτατα στη διάγνωση των ιοειδών, καθώς προσφέρει τη δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων (Shamloul *et al.*, 1995, Κυριακοπούλου *et al.*, 2001, Mandic *et al.*, 2008). Σήμερα, σε αντίθεση με το παρελθόν, χρησιμοποιούνται κυρίως μη ραδιενεργοί ιχνηλάτες (probes) cRNA, cDNA ή dsDNA (Palacio *et al.*, 2000), καθώς παρέχουν ασφάλεια χρήσεως και αποθηκευτικότητα μεγάλης διάρκειας χωρίς να υστερούν ιδιαίτερα σε ευαισθησία (Astruc *et al.*, 1996, Podleckis *et al.*, 1993).



Η σήμανση των ιχνηλατών γίνεται συνήθως με τις χημικές ενώσεις biotin και digoxigenin και για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιούνται υποστρώματα (substrates) χρωμογόνα (chromogenic) π.χ. 5-bromo-4chloro-3-indonyl phosphate ή χημειοφωτογόνα (chemiluminescent) π.χ. CSPD. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση του μοριακού υβριδισμού επηρεάζεται από το βαθμό 'αυστηρότητας' (stringency) των συνθηκών της αντιδράσεως (θερμοκρασία, παρουσία και συγκέντρωση αποδιατακτικών παραγόντων π.χ. φορμαμίδη [formamide], συγκέντρωση αλάτων), ο οποίος καθορίζεται με τη σειρά του από το είδος του ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές RNA έχουν το πλεονέκτημα δημιουργώντας πιο σταθερά υβρίδια να επιτρέπουν την εφαρμογή αυστηρότερων συνθηκών υβριδισμού σε σχέση με τους ανιχνευτές DNA (Muhlbach *et al.*, 2003, Sano *et al.*, 1988). Ανάλογα με το σκοπό για τον οποίο χρησιμοποιείται, ο μοριακός υβριδισμός εφαρμόζεται με τη μορφή στυπώματος κηλίδας φυτικού χυμού ή RNA (dot-blot hybridization) ή ιστού (tissue blot ή imprint hybridization) όταν σκοπός είναι ο μαζικός έλεγχος μεγάλου αριθμού δειγμάτων για την παρουσία του ιοειδούς π.χ. PSTVd, HSVd, PLMVd (Mandic *et al.*, 2008, Torres *et al.*, 2004, Pallas *et al.*, 2003, Podleckis *et al.*, 1993), ή ως μεταφορά κατά Northern ή Southern (Northern ή Southern hybridization) για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση ιοειδών με παρόμοια ηλεκτροφορητική ικανότητα (Di Serio *et al.*, 2001, Owens and Deiner, 1982) ή για τη μελέτη

του μηχανισμού αναπαραγωγής (Hadidi *et al.*, 1981). Ο επιτόπιος μοριακός υβριδισμός (*in situ* hybridization) είναι ένας ακόμη τύπος μοριακού υβριδισμού ο οποίος επιτρέπει τον εντοπισμό συγκεκριμένων νουκλεοξικών αλληλουχιών σε κυτταρικό επίπεδο με μεγάλη εξειδίκευση. Το τύπος αυτός έχει χρησιμοποιηθεί για το εντοπισμό του PSTVd και άλλων μελών της οικογένειας *Pospiviroidae* στην περιοχή του πυρήνα (Harders *et al.*, 1989, Bonfiglioli *et al.*, 1996) ή του ASBVd και του PLMVd στους χλωροπλάστες φύλλων αβοκάντο και ροδακινιάς αντίστοιχα (Lima *et al.*, 1994, Bussiere *et al.*, 1999).

2.9.4. Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain reaction, RT-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) (Mullis *et al.*, 1986, Saiki *et al.*, 1985), χάρις την ακρίβεια, ευαισθησία, ταχύτητα και εξειδίκευση που παρέχει, αποτελεί την πιο διαδεδομένη μοριακή τεχνική διαγνώσεως φυτοπαθολόγων και ειδικότερα των ιοειδών. Η τεχνική αυτή απαιτεί τη γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του στόχου και όπως στους ιούς RNA έτσι και στα ιοειδή (κυκλικά μόρια RNA) προηγείται της PCR η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) του RNA σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA). Η αντίστροφη μεταγραφή επιτυγχάνεται με τη χρήση δύο κυρίων αντίστροφων μεταγραφασών (reverse transcriptase, RTase), της AMV (*Avian myeloblastosis virus* RTase) και της M-MLV (*Moloney murine leukemia virus* RTase). Συνήθως, της αντίστροφης μεταγραφής, η οποία πραγματοποιείται στους 37-60 °C ανάλογα με το είδος της αντίστροφης μεταγραφάσης, προηγείται η αποδιάταξη του RNA. Η RT μπορεί να πραγματοποιηθεί στον ίδιο (one tube) (Loreti *et al.*, 1999) ή διαφορετικό (two tube) (Kyriakopoulou *et al.*, 2001) μικροσωλήνα με την PCR, ταυτόχρονα (one step) (Raghozzino *et al.*, 2004) ή σε διαφορετικό στάδιο (two step) (Fekih-Hassen *et al.*, 2006). Σε όλες τις περιπτώσεις δίδεται ιδιαίτερη σημασία στην απομάκρυνση των πολυσακχαριτών, φαινολών και άλλων ουσιών που απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους ξυλώδεις ξενιστές, καθώς και των ριβονουκλεασών (ribonuclease, RNase) που δρουν ανασταλτικά της RT και της PCR. Στα πρωτόκολλα RT-PCR που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα χρησιμοποιείται ως εκμαγείο ολικό RNA (total RNA, tRNA) και σε ορισμένες περιπτώσεις εκχύλισμα φυτικού χυμού σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (Fekih-Hassen *et al.*, 2006). Στην περίπτωση των ιοειδών, για την ολική ενίσχυση του γενώματός τους, οι εκκινητές λόγω της κυκλικής φύσεως των ιοειδών δεν θα πρέπει να πληρούν μόνο τις βασικές αρχές σχεδιασμού τους, π.χ. να προέρχονται από υψηλά συντηρημένες περιοχές, αλλά τα 3' άκρα τους να αφίστανται αλλήλων (Hadidi and Yang, 1990, Pallas *et al.*, 2001). Όσον αφορά την ευαισθησία της μεθόδου αναφέρεται πως είναι 2500 φορές πιο ευαίσθητη από την R-PAGE και 10-100 από τον μοριακό υβριδισμό (Hadidi and Yang, 1990), ενώ οι παραλλαγές RT-PCR ELISA (Shamloul *et al.*, 2002) και RT-PCR πραγματικού χρόνου (real

time RT-PCR) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009) είναι 100 και 1000 αντίστοιχα φορές πιο ευαίσθητες από την κλασική PCR. Πρόσφατα εφαρμόστηκε και σε ιοειδή (ASSVd) (Zhao and Niu 2008) η επιτόπια (*in situ*) RT-PCR η οποία επιτρέπει την ανίχνευση του ιοειδούς στο κυτταρικό επίπεδο, όπως και ο *in situ* υβριδισμός αλλά με μεγαλύτερη ευαισθησία.

3. Η καλλιέργεια των μηλοειδών και πυρηνοκάρπων στην Ελλάδα

Στην οικογένεια των ροδοειδών (Rosaceae), μια από τις σημαντικότερες του φυτικού βασιλείου με περισσότερα από 100 γένη και 3000 είδη, ανήκουν οι υποοικογένειες *Amygdalae* (πρώην *Amygdaloideae* ή *Prunoideae*) και *Pygeae* (πρώην *Maloideae* ή *Pomoideae*) ή αλλιώς τα πυρηνόκαρπα και τα μηλοειδή αντίστοιχα. Πρόκειται για φυλλοβόλα δένδρα χαμηλού ως μέτριου μεγέθους ή θάμνους, με φύλλα απλά οδοντωτά, με ή χωρίς παράφυλλα, άνθη ερμαφρόδιτα, πενταμερή, περίγυνα (πυρηνόκαρπα) ή επίγυνα (μηλοειδή) και καρπούς δρύπες (γένος *Prunus*, πυρηνόκαρπα) ή ραγοειδείς (μηλοειδή) (Βαρδαβάκης, 1993).

Η καλλιέργεια των μηλοειδών και των πυρηνοκάρπων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ελληνική οικονομία, καθώς περιλαμβάνει 46 εκατομμύρια δένδρα, εκτείνεται σε 1.3 εκατομμύρια στρέμματα σε όλη σχεδόν την Ελληνική επικράτεια και αποδίδει περίπου 1.2 εκατομμύρια τόνους παραγόμενων καρπών (4% της Ευρωπαϊκής παραγωγής). Ένα μεγάλο ποσοστό της παραγωγής αυτής εξάγεται, αποδίδοντας μεγάλο οικονομικό όφελος για τη χώρα μας. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι μόνον οι εξαγωγές μεταποιημένων ροδάκινων απέδωσαν το 2007 περίπου 230 εκατομμύρια ευρώ (ΕΣΥΕ, 2008).

3.1. Η καλλιέργεια της ροδακινιάς στην Ελλάδα

Η ροδακινιά (*Prunus persica* L.) είναι πυρηνόκαρπο, φυλλοβόλο σπωροφόρο δέντρο που ανήκει στο γένος *Prunus* (προύμνη), με καταγωγή από τη Κίνα όπου ακόμα και σήμερα υπάρχει ως αυτοφυής. Στη συνέχεια η καλλιέργεια της επεκτάθηκε προς τις χώρες της Μεσογείου τον 4^ο π.Χ. αιώνα χάρη στον Μέγα Αλέξανδρο που την έφερε από την Περσία (εξ ου και το όνομα του είδους). Η ροδακινιά πολλαπλασιάζεται με εμβολιασμό της επιθυμητής ποικιλίας πάνω σε διάφορα υποκείμενα, όπως σπορόφυτα ροδακινιάς (ποικιλίες Elberta, Halford, Lovell και Nemaeguard) ή υβριδίων ροδακινιάς και αμυγδαλιάς (GF 677, GF 557) και κλώνους ηλικίας 1-2 ετών ροδακινιάς (GF 305) ή δαμασκηνιάς (GF 43, Damas 1869 ή GF 1869, St. Julien GF 655/2). Σε παραγωγή μπαίνει από το 2^ο ως το 4^ο έτος και ζει περίπου 25 έτη, αν και στις εντατικές καλλιέργειες τα δέντρα αντικαθίστανται με νέα κάθε 10-15 χρόνια. Οι ποικιλίες της ροδακινιάς διακρίνονται με βάση την εμπορική τους χρήση σε επιτραπέζιες (εκπύρηνες) και κονσερβοποιήσιμες (συμπύρηνες) που καλλιεργούνται κυρίως για την παρασκευή κομπόστας, ή με βάση το χρώμα της σάρκας τους σε κιτρινόσαρκες ή λευκόσαρκες. Επίσης, διακρίνονται με βάση την εποχή ωριμάσεως τους σε υπερπρώιμες

(τέλος Μαΐου με αρχές Ιουνίου), πρώιμες (μέσα Ιουνίου με αρχές Ιουλίου), μεσοπρώιμες (Ιούλιος), κανονικής ωριμάσεως (τέλος Ιουλίου με αρχές Αυγούστου) και όψιμες (Αύγουστος και μετά). Οι σπουδαιότερες ποικιλίες ροδακινιάς που καλλιεργούνται στην Ελλάδα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Οι σημαντικότερες ποικιλίες ροδακινιάς και νεκταρινιάς στην Ελλάδα (ΥΑΑΤ, 2007).

Πρωιμότητα	Ποικιλίες ροδακινιάς		Ποικιλίες νεκταρινιάς
	Επιτραπέζιες	Συμπύρηνες	
Πρώιμες	Early Crest	Κατερίνα	Adriana
	Early May Crest	Fortuna	Rita Star
	Franciose		Rose Diamond
	June Gold		
	May Crest		
	Rich May		
	Spring Bell		
	Spring Crest Spring Lady		
Μέσοπρώιμες	Red Haven	I.Φ.Δ. 1842	Big Top
	Royal Glory		Spring Red
	Ruby Rich		
	Sun Crest		
Όψιμες	Crest Haven	Everts	California
	Hall		Fantasia
	Honey Dew		Orion
	Fayette		Sweet Lady
	O' Henry		Tasty Free
	Symphony		Venus

Η ροδακινιά αποτελεί για τη χώρα μας τη δεύτερη σε σπουδαιότητα δενδροκομική καλλιέργεια με πρώτη τα εσπεριδοειδή και τρίτη την μηλιά. Σήμερα, στη χώρα μας καλλιεργούνται περισσότερα από 400.000 στρέμματα ροδακινιάς και 50.000 στρέμματα νεκταρινιάς. Το 95% της εγχώριας παραγωγής είναι επικεντρωμένο στη Μακεδονία (Ημαθία, Πέλλα, Κοζάνη κ.ά.), ενώ αξιόλογες εκτάσεις υπάρχουν στο Νομό Λαρίσης. Η εγχώρια ετήσια παραγωγή ανέρχεται γύρω στους 800.000 - 950.000 τόνους, από τα οποία το 1/3 είναι επιτραπέζια και τα 2/3 για παραγωγή κομπόστας. Επιπλέον η παραγωγή νεκταρινιών, που καλλιεργείται εντατικά από τη δεκαετία του '80, κυμαίνεται στους 100.000 τόνους ετησίως. Στην Ευρώπη, τα πρωτεία στην παραγωγή κατέχει η Ιταλία, με την Ισπανία και την Ελλάδα

να ακολουθούν. Η χώρα μας είναι πρώτη στην εμπορία ροδάκινου κομπόστας και πέμπτη σε εξαγωγές επιτραπέζιου ροδάκινου (ΥΑΑΤ 2007, Τσιπουρίδης 2009).

4. Ιολογικές και άλλες εμβολιομεταδιδόμενες ασθένειες των σημαντικότερων μηλοειδών και πυρηνοκάρπων

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί περισσότερες από 35 εμβολιομεταδιδόμενες ασθένειες μηλοειδών (απιδιά, μηλιά) και πυρηνοκάρπων (βερικοκιά, δαμασκηλιά, κερασιά, ροδακινιά). Από αυτές 29 οφείλονται σε ιούς, επτά σε φυτοπλάσματα και έξι σε ιοειδή, με σημαντικότερα τα ASSVd, PBCVd και PLMVd (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Ιοί, ιοειδή και φυτοπλάσματα των σημαντικότερων μηλοειδών (απιδιά, μηλιά) και πυρηνοκάρπων (βερικοκιά, δαμασκηλιά, κερασιά, ροδακινιά), (Desvignes, 1999)

Φυτικό είδος	Ιοί	Ιοειδή	Φυτοπλάσματα/ Φυτοπλάσματώσεις
Απιδιά	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Apple stem grooving capillovirus</i>, ASGV • <i>Pear yellow vein virus</i>, PeYVV • <i>Apple chlorotic leaf spot trichovirus</i>, ACLSV • 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Peach latent mosaic viroid</i>, PLMVd • <i>Apple scar skin viroid</i>, ASSVd • <i>Pear blister canker viroid</i>, PBCVd • <i>Hop stunt viroid</i>, HSVd 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma pyri</i>
Μηλιά	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Apple chlorotic leaf spot trichovirus</i>, ACLSV • <i>Apple mosaic ilarvirus</i>, ApMV • <i>Apple stem pitting foveavirus</i>, ASPV • <i>Apple stem grooving capillovirus</i>, ASGV • <i>Cherry rasp leaf nepovirus</i>, CRLV • <i>Tulare apple mosaic ilarvirus</i>, TAMV • <i>Tomato ringspot nepovirus</i>, ToRSV 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Apple fruit crinkle viroid</i>, AFCVd • <i>Apple scar skin viroid</i>, ASSVd • <i>Apple dimple fruit viroid</i>, ADFVd 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma mali</i>
Ροδακινιά/ Νεκταρινιά	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Peach enation nepovirus</i>, PEV • <i>Apple chlorotic leaf spot trichovirus</i>, ACLSV • <i>Prunus necrotic ringspot ilarvirus</i>, PNRSV • <i>Apple mosaic ilarvirus</i>, ApMV • <i>Plum pox potyvirus</i>, PPV • <i>Tomato ringspot nepovirus</i>, ToRSV • <i>Prune dwarf ilarvirus</i>, PDV • <i>Peach rosette mosaic nepovirus</i>, PRMV • <i>Tomato black ring nepovirus</i>, TBRSV • <i>Strawberry latent ringspot nepovirus</i>, SLRSV • <i>Cherry mottle leaf trichovirus</i>, CMLV • <i>Plum bark necrosis and stem pitting associated closterovirus</i>, PBNSPV • <i>Peach mosaic virus</i>, PMV 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Peach latent mosaic viroid</i>, PLMVd • <i>Hop stunt viroid</i>, HSVd 	<ul style="list-style-type: none"> • Apricot chlorotic leaf roll, ACLR ή Enroulement chlorotique de l'abricotier, ECA ή European stone fruit yellows ή <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma prunorum</i> • Peach vein clearing, PVC • Peach yellow leaf roll, PYLR ή Peach X • Peach yellows phytoplasma • <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma phoenicium</i>
Βερικοκιά	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Strawberry latent ringspot nepovirus</i>, SLRSV • <i>Apricot latent foveavirus</i>, ApLV • <i>Prunus necrotic ringspot ilarvirus</i>, PNRSV • <i>Plum pox potyvirus</i>, PPV • <i>Tomato ringspot nepovirus</i>, ToRSV • <i>Apple chlorotic leaf spot trichovirus</i>, ACLSV 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Peach latent mosaic viroid</i>, PLMVd • <i>Hop stunt viroid</i>, HSVd 	<ul style="list-style-type: none"> • Apricot chlorotic leaf roll, ACLR ή Enroulement chlorotique de l'abricotier, ECA ή European stone fruit yellows ή <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma prunorum</i> • Peach vein clearing, PVC • Peach yellows

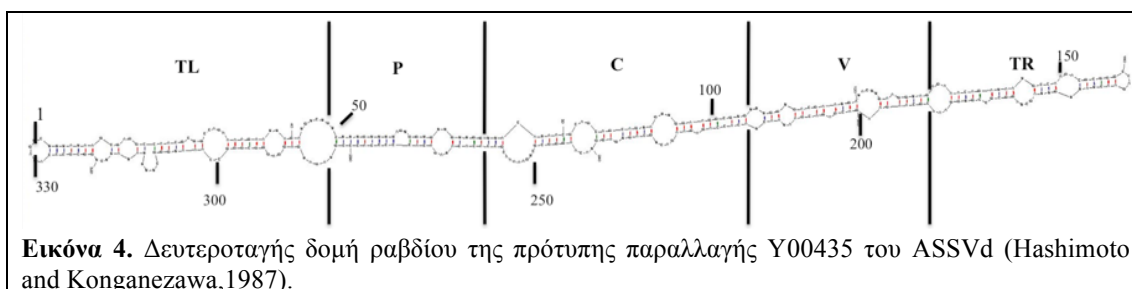
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Prune dwarf ilarvirus</i>, PDV • <i>Cherry mottle leaf trichovirus</i>, CMLV • <i>Cherry green ring mottle foveavirus</i>, CGRMV • <i>Cherry twisted leaf virus</i>, ChTLV • <i>Plum bark necrosis and stem pitting associated closterovirus</i>, PBNSPV • <i>Peach mosaic virus</i>, PMV 		<ul style="list-style-type: none"> • phytoplasma • <i>Candidatus</i> Phytoplasma phoenicium
Δαμασκηλιά	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Raspberry ringspot nepovirus</i>, RRSV • <i>Prune dwarf ilarvirus</i>, PDV • <i>Plum pox potyvirus</i>, PPV • <i>Prunus necrotic ringspot ilarvirus</i>, PNRSV • <i>Tomato bushy stunt tombusvirus</i>, TBSV • <i>Plum bark necrosis and stem pitting associated closterovirus</i>, PBNSPV 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Peach latent mosaic viroid</i>, PLMVd • <i>Hop stunt viroid</i>, HSVd 	<ul style="list-style-type: none"> • Apricot chlorotic leaf roll, ACLR ή Enroulement chlorotique de l'abricotier, ECA ή European stone fruit yellows ή <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum • Peach vein clearing, PVC • Peach yellow leaf roll, PYLR ή Peach X • Peach yellows phytoplasma
Κερασιά	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Raspberry ringspot nepovirus</i>, RRSV • <i>Apple chlorotic leaf spot trichovirus</i>, ACLSV • <i>Prunus necrotic ringspot ilarvirus</i>, PNRSV • <i>Apple mosaic ilarvirus</i>, ApMV • <i>Prune dwarf ilarvirus</i>, PDV • <i>Tomato bushy stunt tombusvirus</i>, TBSV • <i>Cherry leafroll nepovirus</i>, CLRV • <i>Tomato ringspot nepovirus</i>, ToRSV • <i>Cherry rasp leaf nepovirus</i>, CRLV • <i>Cherry green ring mottle foveavirus</i>, CGRMV • <i>Cherry necrotic rusty mottle foveavirus</i>, CNRMV • <i>Cherry capillovirus A</i>, CVA • <i>Little cherry closterovirus 1</i>, LChV-1 • <i>Little cherry closterovirus 2</i>, LChV-2 • <i>Cherry rusty mottle trichovirus</i>, CRMV • <i>Cherry twisted leaf virus</i>, ChTLV • <i>Plum bark necrosis and stem pitting associated closterovirus</i>, PBNSPV • <i>Cherry mottle leaf trichovirus</i>, CLMV 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Peach latent mosaic viroid</i>, PLMVd • <i>Hop stunt viroid</i>, HSVd 	<ul style="list-style-type: none"> • Peach yellow leaf roll, PYLR ή Peach X • European stone fruit yellows ή <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum

4.1. Ιοειδές της εσχάρωσης του φλοιού του μήλου (*Apple scar skin viroid*, ASSVd)

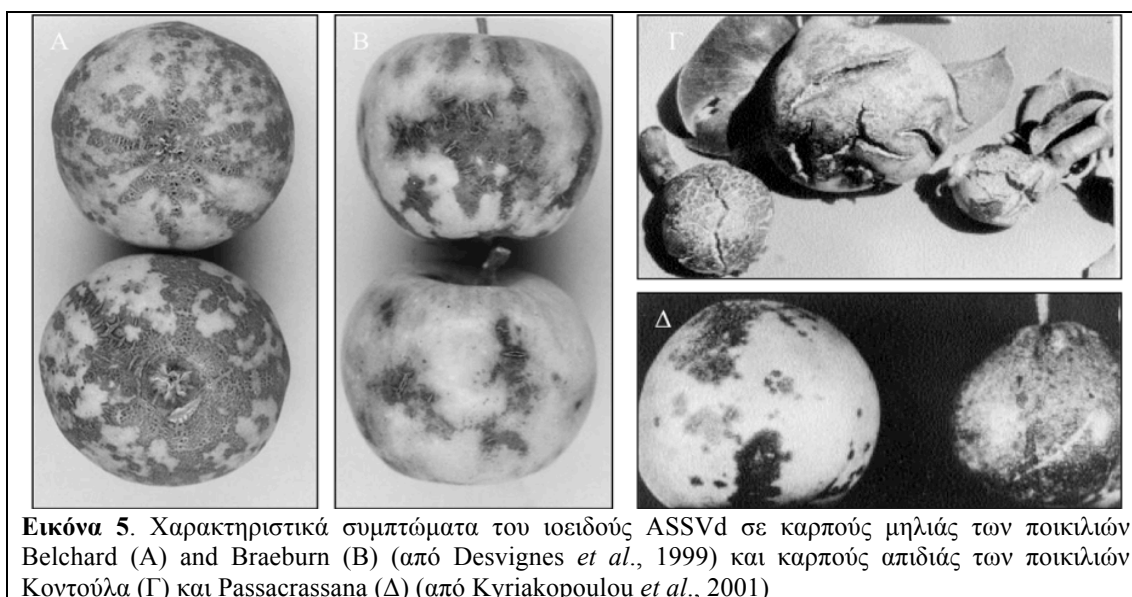
Η ασθένεια εσχάρωση του φλοιού του μήλου περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1935 στην επαρχία Manchuria της Κίνας (Ohtsuka 1935) και περίπου 50 χρόνια μετά προσδιορίστηκε ως αίτιό της το ιοειδές της εσχάρωσης του φλοιού του μήλου (*Apple scar skin viroid*, ASSVd) (Hashimoto and Koganezawa 1987). Το ιοειδές αυτό έχει ραβδόμορφη δευτεροταγής δομή (Εικόνα 4) με μέγεθος γενώματος που κυμαίνεται μεταξύ 329-334 nt και μαζί με τα υποείδη, ιοειδές του παρδαλού μήλου (*Dapple apple viroid*, DAVd) (331 nt) και ιοειδές του σκουριασμένου φλοιού της απιδιάς (*Pear rusty skin viroid* PRSVd) (334 nt) αποτελούν μέλη του γένους *Aprscaviroid* του οποίου ο ASSVd αποτελεί και τυπικό μέλος

(Hashimoto and Konganezewa 1987, Puchta *et al.*, 1990, Yang *et al.*, 1992, Zhu *et al.*, 1995, Koganazewa *et al.*, 2003).

Ξενιστές του ιοειδούς αυτού αποτελούν καλλιεργούμενα αλλά και αυτοφυή είδη των γενών *Malus*, *Pyrus*, *Sorbus*, *Cydonia Chaenomeles* και *Pyronia* (Desvignes *et al.*, 1999), ενώ πρόσφατα απομονώθηκε και από πυρηνόκαρπα όπως βερικοκιά και ροδακινιά στην Κίνα (Zhao and Niu 2006, 2008) και κερασιά στην Ελλάδα (Καπώνη 2009).



Συμπτώματα όπως ουλές, σχισμές, πράσινες κηλιδώσεις ή ποικιλοχρωωτικά σχέδια αφορούν ως επί των πλείστων τους καρπούς διαφόρων ποικιλιών μηλιάς και εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή του κάλυκα (Εικόνα 5). Εξάιρεση αποτελούν ορισμένες ποικιλίες Ιαπωνικής αχλαδιάς (*Pyrus pyrifolia* Brum) και η ελληνική ποικιλία Κοντούλα, στις οποίες το ASSVd προκαλεί παραμόρφωση και εσχάρωση των καρπών, καθώς και ορισμένες ποικιλίες κινέζικης αχλαδιάς (*P. ussuriensis* L.) όπου το υποείδος PRSVd προκαλεί σκωριόχρωμες ταινίες και μπαλώματα στους καρπούς (Zhu *et al.*, 1995, Ozaki *et al.*, 1996, Hadidi and Yang 1990, Zhu *et al.*, 1995). Η προσβολή από το ιοειδές επηρεάζει αρνητικά όχι μόνο την εξωτερική εμφάνιση των καρπών αλλά επίσης το μέγεθος και τη γεύση αυτών, με αποτέλεσμα την μείωση της εμπορικής του αξίας. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται ο βαθμός ευαισθησίας και τα συμπτώματα που προκαλεί το ASSVd στις κυριότερες ποικιλίες μηλιάς.



Το ASSVd είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στην Ανατολική Ασία, δηλαδή στην Κίνα και Ιαπωνία, όπου προκαλεί μια από τις πιο καταστρεπτικές ασθένειες της μηλιάς, ενώ πρόσφατα αναφέρθηκε στην Ινδία και Νότιο Κορέα (Behl *et al.*, 1998, Kwon *et al.*, 2002). Η παρουσία του έχει ακόμη αναφερθεί στη Βόρειο Αμερική (Η.Π.Α. και Καναδά), Ευρώπη (Αγγλία, Γαλλία, Ελλάδα, Ιταλία) (Smith *et al.*, 1956, Welsh and Keen 1961, Campbell and Sparks 1976, Loreti *et al.*, 1998, Desvignes *et al.*, 1999β, Kyriakopoulou *et al.*, 2001) και άλλες Μεσογειακές χώρες όπου εξαπλώνεται κυρίως μέσω της διακινήσεως μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Στον αγρό μεταδίδεται κυρίως μέσω του εμβολιασμού, ενώ στο εργαστήριο έχει διαπιστωθεί μετάδοση του μέσω ξυραφισμών, κλαδευτικών εργαλείων και του αγροβακτηρίου (*Agrobacterium*) (Koganezawa 1985, Zhu *et al.*, 1998, Desvignes *et al.*, 1999β, Kim *et al.*, 2006). Στον αγρό επίσης μπορεί πιθανότατα να μεταδοθεί με τον φυσικό εμβολιασμό ριζών μεταξύ γειτονικών δένδρων (Koganezawa *et al.*, 2003). Όσον αφορά το σπόρο, έχει αναφερθεί παρουσία του στο περισπέρμιο (seed coat) και στο ενδοσπέρμιο (sub coat) όχι όμως η σπορομετάδοσή του (Howell *et al.*, 1998).

Πίνακας 4. Συμπτώματα και ευπάθεια διαφόρων ποικιλιών μηλιάς στο ιοειδές ASSVd (Desvignes 1999)

Ομάδα ευπάθειας	Συμπτώματα καρπών	Ποικιλίες μηλιάς
A. Ανεκτική	Σπάνια ή καθόλου κηλίδωση	Golden Delicious, Smoothee, Granny Smith, Pink Lady
B1. Ελαφρώς ευαίσθητη	Περιορισμένοι αποχρωματισμοί	Akane, Embassy, Redwinter, Spukoop
B2. Σχεδόν ευαίσθητη	Έντονοι αποχρωματισμοί	Elstar, Festival, Querina, Sunrise
C. Ευαίσθητη	Νεκρώσεις και αποχρωματισμοί	Red Delicious, Starkrimson, Charden
D. Πολύ ευαίσθητη	Νεκρώσεις, σχισμές στους καρπούς	Braebum, Hillel, Belchard

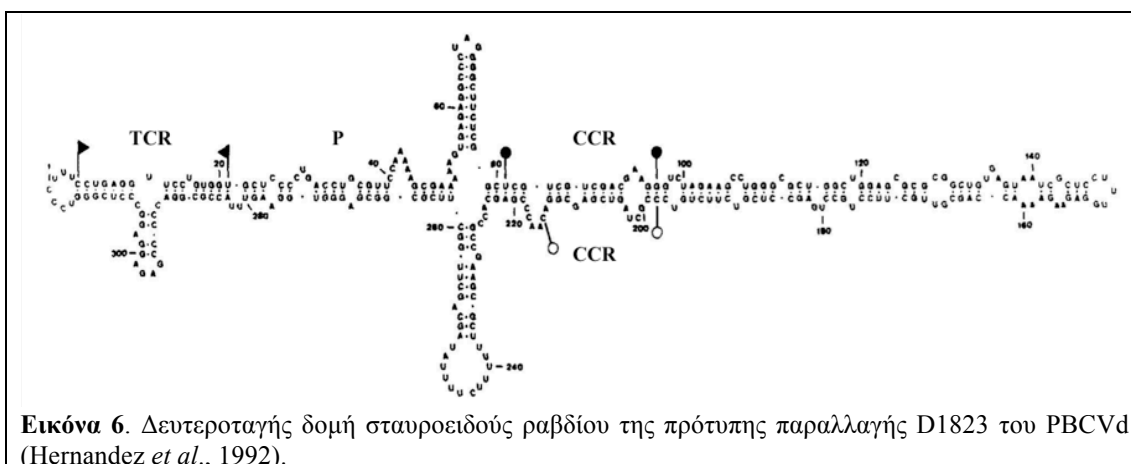
Για την αντιμετώπισή του συστήνονται κυρίως προληπτικά μέτρα, όπως η παραγωγή, διακίνηση και χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (Hurt *et al.*, 1992). Εξυγίανση διαφόρων καλλιεργούμενων ποικιλιών έχει πραγματοποιηθεί στο παρελθόν με το συνδυασμό θερμοθεραπείας (thermotherapy) και της τεχνικής του εμβολιασμού ακραίου μεριστώματος (shoot tip grafting) φυτών που είχαν προηγουμένως υποστεί στάδιο λήθαργου (Howell *et al.*, 1998), καθώς και με το συνδυασμό θερμοθεραπείας ή κρυοθεραπείας με την καλλιέργεια *in vitro* (Postman and Hadidi 1995).

4.2. Ιοειδές του εξανθηματικού έλκους της απιδιάς (*Pear blister cancer viroid*, PBCVd)

Στην Ευρώπη και Αμερική από το 1960 έχουν περιγραφεί διάφορες ασθένειες που

σχετίζονται με την εμφάνιση στο φλοιό του κορμού διαφόρων ευπαθών ποικιλιών απιδιάς συμπτωμάτων όπως φλύκταινες, σχισίματα, ρωγμές και νεκρώσεις (Cropley 1960, Cordy and MacSwan 1961, Kelger 1965). Η ασθένεια που σχετίζεται με το σύμπτωμα του εξανθηματικού φλοιού στην απιδιά-δείκτη Α20 αρχικά συσχετίστηκε (Flores *et al.*, 1991) και στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι προκαλείται από το ιοειδές *Pear blister cancer viroid*, PBCVd (Hernandez *et al.*, 1992α, 1992β, Ambros *et al.*, 1995).

Πρόκειται για ένα ιοειδές με μέγεθος γενώματος που κυμαίνεται μεταξύ 312 και 316 nt με ελάχιστη παραλλακτικότητα μεταξύ των παραλλαγών του (Hernandez *et al.*, 1995α, Ambros *et al.*, 1995). Η δευτεροταγής δομή με την μικρότερη ελεύθερη ενέργεια (free energy) είναι εκείνη του διακλαδισμένου ή σταυροειδούς ραβδίου (Hernandez *et al.*, 1992α, Lolic *et al.*, 2007) (Εικόνα 6). Το PBCVd έχοντας τμήματα του γενώματός του που εμφανίζουν ομολογία με τμήματα άλλων ιοειδών (τουλάχιστον πέντε), μεταξύ των οποίων το PLMVd και το ASBVd, θεωρείται ανασυνδυασμένο RNA (Hernandez *et al.*, 1992α). Ως μέλος της οικογένειας *Aprscaviroidae* περιέχει τη συντηρημένη CCR και αριστερή TCR περιοχή (Hernandez *et al.*, 1992α) (Εικόνα 6).



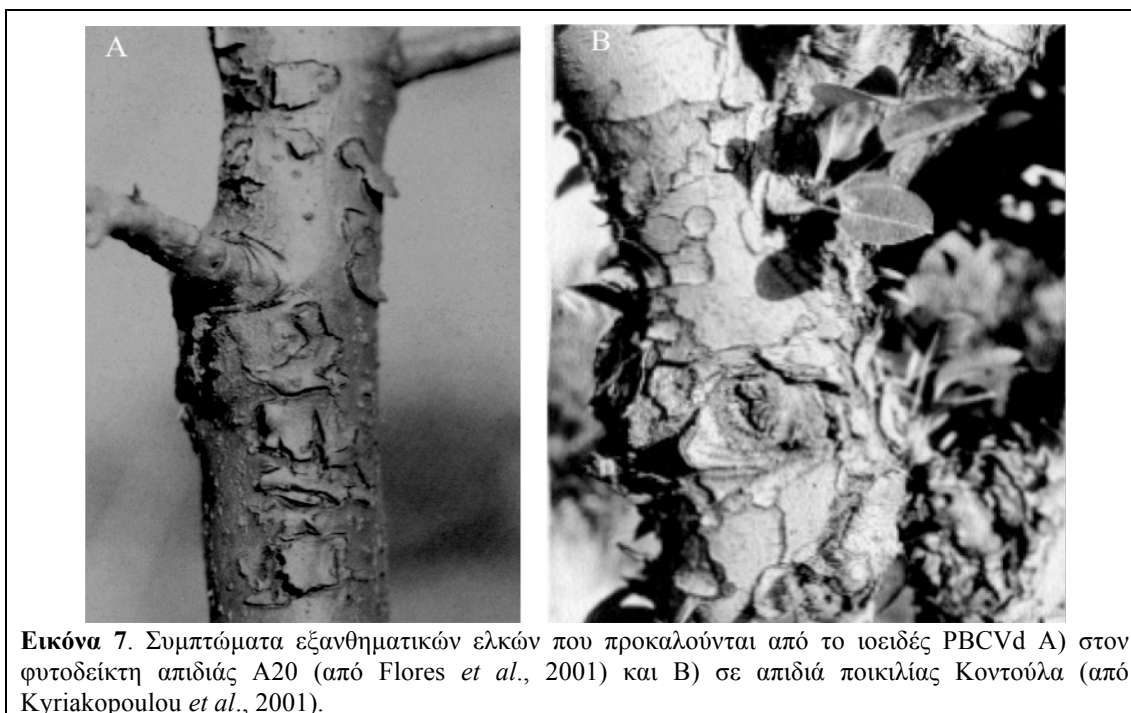
Εικόνα 6. Δευτεροταγής δομή σταυροειδούς ραβδίου της πρότυπης παραλλαγής D1823 του PBCVd (Hernandez *et al.*, 1992).

Η απιδιά (*Pyrus communis* L.) και η κυδωνιά (*Cydonia oblonga* Mill.) θεωρούνταν επί χρόνια ως οι μοναδικοί ξενιστές του PBCVd (Flores *et al.*, 2003α). Πρόσφατα αναφέρθηκε η παρουσία του και σε άλλα μηλοειδή όπως η μηλιά (*Malus domestica* L.), η άγρια μηλιά (*M. baccata* L.), η άγρια απιδιά (*P. amygdaliformis* Vili) και η Κορέατικη απιδιά ή απιδιά nashi (*P. serotina* Rehd.) (Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Joyce *et al.*, 2006, Καπώνη 2009). Στο εργαστήριο έχει επιτευχθεί η μετάδοση του PBCVd σε αγγουριά (*Cucumis sativus* L.) (Flores *et al.*, 1991), σε πέντε είδη *Malus* (από τα 13 που εξετάστηκαν), σε 15 είδη *Pyrus* και 16 εμπορικές ποικιλίες απιδιάς, καθώς επίσης και σε ορισμένα είδη των γενών *Chaenomeles*, *Pyronia*, *Sorbus* και *Crataegus*, ενώ δεν ήταν δυνατή η μετάδοσή του σε είδη των γενών *Amelanchier*, *Aronia* και *Cotoneaster* (Desvignes *et al.*, 1999α). Οι ποικιλίες απιδιάς Williams, Comice, Laxton's Superb και 'Κοντούλα' θεωρούνται από τις πλέον

ευπαθείς (Giunchedi 1990, Kyriakopoulou *et al.*, 2001).

Το PBCVd δεν προκαλεί συμπτώματα στην κυδωνιά και στις περισσότερες εμπορικές ποικιλίες απιδιάς (Desvignes 1999a). Γενικά η συμπτωματολογία των ασθενών δένδρων επηρεάζεται από την εποχή του έτους και την ηλικία των δένδρων. Έτσι, νωρίς την άνοιξη παρατηρούνται στο φλοιό διετών βλαστών μικρές επιφανειακές φλύκταινες οι οποίες εξελίσσονται σε σχισμές, ρωγμές και έλκη που οδηγούν τελικά σε νέκρωση του φλοιού ακόμη και όλου του δένδρου (Εικόνα 7). Τα μολυσμένα δένδρα εμφανίζουν μειωμένη ανάπτυξη, ανθοφορία και τελικά παραγωγή χωρίς να εμφανίζονται συνήθως συμπτώματα στους καρπούς (Flores *et al.*, 1991, Kyriakopoulou *et al.*, 2001). Προσβολή του φυτού-δείκτη A20 από το PBCVd οδηγεί στο θάνατο του δένδρου πέντε έως οκτώ χρόνια μετά την αρχική μόλυνση (Flores *et al.*, 1991).

Η χρήση μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού και ειδικότερα μολυσμένων υποκειμένων κυδωνιάς αποτελεί το κυριότερο μέσο μεταδόσεως του PBCVd στον αγρό. Φυσικά, στο εργαστήριο, όπως όλα τα ιοειδή, μεταδίδεται με τον εμβολιασμό-ενοφθαλμισμό και τους ξυραφισμούς, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει και η μετάδοσή του μηχανικά με χυμό σε φυτά αγγουριάς (Flores *et al.*, 1991). Το PBCVd δεν μεταδίδεται με το σπόρο (Flores *et al.*, 2003a).



Εικόνα 7. Συμπτώματα εξανθηματικών ελκών που προκαλούνται από το ιοειδές PBCVd A) στον φυτοδείκτη απιδιάς A20 (από Flores *et al.*, 2001) και B) σε απιδιά ποικιλίας Κοντούλα (από Kyriakopoulou *et al.*, 2001).

Το PBCVd είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στην λεκάνη της Μεσογείου (Βοσνία και Ερζεγοβίνη, Γαλλία, Ελλάδα, Ισπανία, Ιταλία, Μάλτα και Τυνησία) (Desvignes 1970, Hernandez *et al.*, 1992a, Loreti *et al.*, 1998, Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Fekih-Hassen *et al.*, 2006, Afechtall *et al.*, 2007), καθώς και σε άλλες χώρες όπως η Αυστραλία (Joyce *et al.*, 2006), η Ιαπωνία (Sano *et al.*, 1997), η Κίνα και η Αμερική (Flores *et al.*, 2003a). Στη Γαλλία

μάλιστα έχει βρεθεί πως περισσότερο από το 10 % 150 παλαιών ποικιλιών απιδιάς βρεθηκαν μολυσμένες με το ιοειδές αυτό (Desvignes *et al.*, 1999α). Το γεγονός αυτό συνδέεται με το ότι οι περισσότερες ποικιλίες απιδιάς και κυδωνιάς είναι ανεκτικές, με αποτέλεσμα να μην εμφανίζονται συμπτώματα και, σε συνδυασμό με το ότι τα συμπτώματα που προκαλούνται στις ευπαθείς ποικιλίες συγχέονται με εκείνα που προκαλούνται από βακτήρια και μύκητες, οδήγησε πιθανότατα στην υποεκτίμηση της εξαπλώσεως και της παθογόνου ικανότητας του ιοειδούς αυτού (Desvignes *et al.*, 1999α).

Τα προληπτικά μέτρα που συστήνονται για τον έλεγχο του PBCVd συνίστανται κυρίως στη χρήση υγιούς και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού, καθώς και στην απολύμανση των κοπτικών εργαλείων. Προσπάθειες εξυγιάνσεως πολλαπλασιαστικού υλικού με θερμοθεραπεία υπήρξαν άκαρπες (Flores *et al.*, 2003α).

4.3. Ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd)

4.3.1. Ιστορία

Το 1976 στη Γαλλία ο Desvignes περιέγραψε για πρώτη φορά την ασθένεια του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς μετά από φυτουγειονομικό έλεγχο ρουτίνας, με βιοδοκιμές στον φυτοδείκτη GF-305, σε πολλαπλασιαστικό υλικό ροδακινιάς που είχε εισαχθεί από τις Η.Π.Α. και την Ιαπωνία (Desvignes 1976). Στις χώρες αυτές είχαν προηγουμένως περιγραφεί ασθένειες με ανάλογη συμπτωματολογία, όπως το μωσαϊκό της ροδακινιάς (Hutchins, 1932, Hutchins *et al.*, 1937) στις Η.Π.Α. και το κίτρινο μωσαϊκό της ροδακινιάς στην Ιαπωνία (Kishi *et al.*, 1973), χωρίς να είναι γνωστή η πραγματική φύση του αιτίου που τις προκαλούσε, δεδομένου ότι αρχικά θεωρήθηκε πως ήταν κάποιος ιός. Αργότερα όμως οι Monsion *et al.*, 1988, οι Flores και Llacer, (1988) και οι Flores *et al.*, (1990) απέδειξαν πως πρόκειται για ένα μικρού μοριακού βάρους κυκλικό μόριο RNA με χαρακτηριστικά όμοια με εκείνα των ιοειδών. Το παθογόνο αυτό ονομάστηκε ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) και η ασθένεια που προκαλεί αποτελεί διεθνώς την σημαντικότερη ιοειδικής αιτιολογίας ασθένεια της ροδακινιάς. Εξ άλλου, θα πρέπει να επισημανθεί ότι, πλέον, ως αίτιο του αμερικάνικου μωσαϊκού της ροδακινιάς δεν θα πρέπει να θεωρείται το PLMVd, άλλα κάποιος πιθανότατα Clostero ιός (Shamloul *et al.*, 1995, EPPO 2008).

4.3.2. Συμπτώματα

Ο όρος ‘λανθάνον’ (latent) στο όνομα του PLMVd και της αντίστοιχης ασθένειας (Desvignes, 1976, 1980) προέρχεται από το γεγονός ότι στην πλειονότητα των φυσικών μολύνσεων ροδακινιάς δεν παρατηρούνται εμφανή συμπτώματα στα φύλλα ή, στην περίπτωση που εμφανίζονται, αυτά είναι ασταθή και συχνά εξαφανίζονται με το χρόνο.

Επίσης, ο όρος αυτός σχετίζεται και με το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την έναρξη εμφανίσεως των συμπτωμάτων. Το PLMVd προκαλεί στη ροδακινιά μια πλειάδα διαφορετικών συμπτωμάτων πολλά από τα οποία είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται στον αγρό δύο χρόνια τουλάχιστον από τη μόλυνση ως ολιγοήμερη καθυστέρηση (4-6 ημέρες) της ενάρξεως εκπτώξεως των φύλλων, της ανθοφορίας και της ωριμάσεως των καρπών σε σχέση με τα υγιή δένδρα (Fideghelli *et al.*, 2002). Η καθυστέρηση αυτή είναι πιο εμφανής στις πρώιμες ποικιλίες και αυξάνεται με τον χρόνο (Desvignes 1986, Faggioli and Barba 2008) (Εικόνα 8Α-Γ). Επίσης, παρατηρείται σπάσιμο του χρώματος των πετάλων, παραμορφώσεις και μεταχρωματισμός των καρπών οι οποίοι επίσης συχνά παρουσιάζουν σχισμές στο σημείο της ραφής και φέρουν ευμεγέθη και σφαιρικά σπέρματα (Flores *et al.*, 1990, Flores *et al.*, 2006) (Εικόνα 8Δ-Ζ). Ανάλογα με τον κυρίαρχο απλότυπο (haplotype) στον πληθυσμό των γενετικά συγγενών παραλλαγών του PLMVd σε ένα δένδρο ροδακινιάς, παρατηρούνται στα φύλλα συμπτώματα χλωρώσεως, αποχρωματισμού κατά μήκος της περιμέτρου του ελάσματος ή μωσαϊκού (Εικόνα 8Η) (Xu *et al.*, 2008). Χαρακτηριστική μάλιστα είναι η περίπτωση ορισμένων παραλλαγών του PLMVd που φέρουν μια ένθεση 12-13 nt, η οποία αναδιπλώνεται σε δομή φουρκέτας (hairpin) με θηλιά (loop) πλούσια σε ουρακίλες (uracil, U) και είναι υπεύθυνη για την έντονη χλώρωση (λεύκανση) μέρους ή του συνόλου του ελάσματος των φύλλων (Εικόνα 8Θ). Το παραπάνω σύμπτωμα καλείται peach calico (PC), όπως και η παραλλαγή του ιοειδούς που το προκαλεί (Malfitano *et al.*, 2003). Συχνά το PLMVd προκαλεί νέκρωση των οφθαλμών και των νεαρών βλαστών, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζεται και βοθρίωση του ξύλου (stem pitting) (Desvignes 1986) (Εικόνα 8Ι). Τα προσβεβλημένα δένδρα παρουσιάζουν ακόμη φυλλόπτωση, αποκτούν ‘ανοιχτή δομή’ (Εικόνα 8ΙΑ) και γηράσκουν πρόωρα, ενώ επίσης αυξάνεται η ευπάθειά τους σε άλλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Στο θερμοκήπιο οι φυσικές απομονώσεις του PLMVd διακρίνονται σε λανθάνουσες και σε ισχυρά παθογόνες ανάλογα με την ένταση των συμπτωμάτων που προκαλούν στον φυτοδείκτη ροδακινιάς GF-305 (Desvignes 1976, 1980).

4.3.3. Ξενιστές

Επί περισσότερα από 20 χρόνια η ροδακινιά/νεκταρινιά θεωρούνταν ο αποκλειστικός ξενιστής του PLMVd, καθώς διάφορες προσπάθειες ανιχνεύσεως (Desvignes 1982, Skrzeczkowski *et al.*, 1996) ή μεταδόσεως με εμβολιασμό (Desvignes 1976, 1982) σε διάφορα φυτικά είδη, κυρίως του γένους *Prunus* υπήρξαν ανεπιτυχείς. Όμως τα τελευταία 15 χρόνια ερευνητές από διάφορες χώρες, χρησιμοποιώντας διαφορετικές διαγνωστικές μεθόδους, υπέδειξαν ως ξενιστές του και άλλα είδη όπως η αμυγδαλιά (*P. dulcis* Mill), η καλλιεργούμενη (*P. communis* L.) και άγρια απιδιά (*P. amygdaliformis* L.), η βερικοκιά (*P. armeniaca* L.), η δαμασκηλιά (*P. domestica* L.), η Ιαπωνική δαμασκηλιά (*P. salicina* Lindl.),

η βερικοκιά (*P. mume* Sieb & Zucc.) και η κερασιά (*P. avium* L.), όλα μέλη της οικογένειας Rosaceae (Faggioli *et al.*, 1997, Hadidi *et al.*, 1997, Giunchedi *et al.*, 1998, Osaki *et al.*, 1999, Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Fekih-Hassen 2006, 2007).



Εικόνα 8. Χαρακτηριστικά συμπτώματα που προκαλούνται σε φυτά ροδακινιάς από το PLMVd. Καθυστερήση ανθήσεως (Α), εκπτώξεως φύλλων (Β) και ωριμάνσεως των καρπών (Γ), σπάσιμο καρπών (ΣΤ), σφαιρικά και ευμεγέθη σπέρματα (Ζ), μωσαϊκό (Η) και λεύκανση των ελάσματος των φύλλων (Θ), βοθρίωση ή γλυφές του ξύλου (Ι), πρόωρη γήρανση και ανοιχτή δομή φυτών (από: Flores *et al.*, 2006, Desvignes 1999, αρχείο F. Faggioli).

Στις περισσότερες από τις παραπάνω περιπτώσεις η προσβολή από το PLMVd είναι λανθάνουσα, με εξαίρεση την ποικιλία δαμασκηνιάς Angelino στην Ιταλία, όπου προκαλείται η ασθένεια του κηλιδωτού καρπού της δαμασκηνιάς (plum spotted fruit disease) (Giunchedi *et al.*, 1998). Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολυάριθμων αποχρωματισμένων περιοχών με ισοδιαμετρικό σχήμα (1-2 mm διαμέτρου) και αόριστη περίμετρο, διάσπαρτων στους καρπούς, ιδιαίτερα στην περιοχή του κάλυκα. Οι περιοχές αυτές συνενώνονται σε κηλίδες διαμέτρου 6-8 mm και είναι περισσότερο εμφανείς την περίοδο Ιουλίου-Αυγούστου.

4.3.4. Μετάδοση

Το PLMVd μεταδίδεται στον αγρό κυρίως με τον εμβολιασμό-ενοφθαλμισμό μέσω της χρήσεως μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού (Desvignes 1986) και ενδεχομένως μολυσμένων κοπτικών εργαλείων καθώς στο εργαστήριο κατέστη δυνατή η μετάδοσή του σε υγιή φυτά με τη χρήση λεπίδων που είτε προηγουμένως είχαν εμβαπτιστεί σε καθαρό παρασκεύασμα (Flores *et al.*, 1990), είτε είχαν επιμολυνθεί με φυτικό χυμό κόβοντας μολυσμένα φυτά (Hadidi *et al.*, 1997). Όσον αφορά τη μετάδοσή του με φορείς, έχει αναφερθεί από τους Flores *et al.*, (1992) και Desvignes, (1986) μετάδοσή του, αν και σε μικρό ποσοστό, με την πράσινη αφίδα της ροδακινιάς (*Myzus persicae* Sulzer), όχι όμως και με τα είδη *Aphis spiraecola* Patch και *A. gossypii* Glover. Σύμφωνα με τους Barba *et al.*, (2007), στον ετήσιο ρυθμό εξαπλώσεως του ιοειδούς, που κυμαίνεται μεταξύ 5 και 10% (Desvignes 1986), πέραν της χρήσεως μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού και ίσως κοπτικών εργαλείων, συμβάλλει και η γυρεομετάδοση, ενώ δεν φαίνεται να υπάρχει σπορομετάδοση ούτε με τον φυσικό ριζοεμβολιασμό.

4.3.5. Γεωγραφική εξάπλωση

Η παγκοσμιοποίηση της γεωργίας και ειδικότερα η ανταλλαγή και διακίνηση πολλαπλασιαστικού υλικού, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το PLMVd δεν προκαλεί συχνά συμπτώματα στα φύλλα των μολυσμένων ποικιλιών, καθώς και το υψηλό ποσοστό (>50%) παρουσίας του στο φυτωριακό πολλαπλασιαστικό υλικό ροδακινιάς και νεκταρινιάς πολλών χωρών (Shamloul *et al.*, 1995, Hadidi *et al.*, 1997, Loreti *et al.*, 1998, Flores and Llacer 1998), οδήγησαν στην ευρύτατη εξάπλωση του ιοειδούς αυτού σε όλο τον κόσμο. Από το 1976 μέχρι σήμερα, η παρουσία του PLMVd έχει αναφερθεί σε πολλές χώρες της Βορείου και Νοτίου Αμερικής, στην Αυστραλία, Αυστρία, Γαλλία, Ελλάδα, Ιαπωνία, Ισπανία, Ιταλία, Κίνα, Κροατία, Λίβανο, Μαρόκο, Νεπάλ, Ρουμανία, Σερβία και Τυνησία (Desvignes 1986, Flores and Llacer, 1988, Shamloul *et al.*, 1995, Hadidi *et al.*, 1997, Ozaki *et al.*, 1999, Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Fiore *et al.*, 2003, Abou Ghanem and Choueiri 2003, Fekih-Hassen *et al.*, 2006, Mandic *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2008, Nieto *et al.*, 2008).

4.3.6. Οικονομικές ζημιές

Οι ζημιές που προκαλούνται στην καλλιέργεια ροδακινιάς και νεκταρινιάς από το PLMVd είναι μεγάλες. Η μετατόπιση της εποχής ωριμάνσεως των καρπών στις προσβεβλημένες ποικιλίες δημιουργεί προβλήματα στην συγκομιδή, ενώ η πρόωρη γήρανση των δένδρων αυξάνει το κόστος διαχείρισεως και εγκαταστάσεως της καλλιέργειας. Παράλληλα παρατηρείται μείωση 20-40% της ποσότητας αλλά και της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων (Desvignes 1999). Οι προσβεβλημένοι καρποί είναι συνήθως παραμορφωμένοι, με σχισμές στη ραφή, μαλακοί, άγευστοι και χωρίς άρωμα και συνεπώς μη εμπορεύσιμοι ή μειωμένης εμπορικής αξίας.

4.3.7. Διάγνωση

Όπως είναι γνωστό, τα ιοειδή δεν κωδικούν πρωτεΐνες, δεν φέρουν λοιπόν πρωτεϊνικό καψίδιο (coat protein) και ως εκ τούτου δεν μπορούν να εφαρμοστούν στη διάγνωση τους πρωτεϊνικές μέθοδοι όπως η ELISA που αντίθετα χρησιμοποιείται ευρύτατα στη διάγνωση των ιών. Η διάγνωση του PLMVd όπως και των περισσότερων ιοειδών βασίστηκε και ακόμη βασίζεται στον συνδυασμό βιολογικών, βιοχημικών και μοριακών μεθόδων. Η δοκιμή της σταυροειδούς προστασίας στον φυτοδείκτη ροδακινιάς GF-305 αποτέλεσε την μέθοδο με την οποία διαγνώστηκε για πρώτη φορά η ασθένεια του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (Desvignes 1976). Η διάρκεια της δοκιμής αυτής είναι περίπου τρεις μήνες και χρησιμοποιήθηκε αρκετά κατά τα πρώτα χρόνια από την ανακάλυψη της ασθένειας και την ταυτοποίηση ως αιτίου του PLMVd μέχρι την ανάγνωση της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας (Hernandez and Flores 1992), οπότε και ανοίχτηκε ο δρόμος για την εφαρμογή των μοριακών μεθόδων. Η ηλεκτροφόρηση δύο κατευθύνσεων (συνθήκες αποδιατάξεως και μη αποδιατάξεως) σε πήγμα πολυακρυλαμίδης και η χρώση με νιτρικό άργυρο νουκλεϊκών οξέων αποτέλεσε στο παρελθόν (και λιγότερο στις μέρες μας) την κύρια βιοχημική μέθοδο διαγνώσεως του PLMVd (Flores *et al.*, 1992, Faggioli *et al.*, 1997). Η μικρή ευαισθησία της μεθόδου αυτής σε συνδυασμό με το γεγονός ότι, με εξαίρεση τη ροδακινιά, ο τίτλος του PLMVd στα υπόλοιπα είδη ξενιστών είναι πιθανότατα πιο χαμηλός (Flores *et al.*, 1990, 1992) την καθιστούν ακατάλληλη για γενική χρήση (Flores *et al.*, 2003β). Σήμερα η διάγνωση του PLMVd βασίζεται κυρίως στη χρήση διαφόρων μοριακών μεθόδων και τεχνικών. Η μέθοδος του μοριακού υβριδισμού στυπώματος κηλίδας (RNA ή φυτικού χυμού) (dot blot) ή ιστού (tissue print) με τη χρήση ραδιενεργών ή μη ανιχνευτών (probes) cRNA ή cDNA χρησιμοποιείται ευρύτατα, καθώς επιτρέπει την ανίχνευση του ιοειδούς σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων ταυτόχρονα με ικανοποιητική ευαισθησία και εξειδίκευση (Hernandez and Flores 1992, Shamloul *et al.*, 1995, Loreti *et al.*, 1999, Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Mandic *et al.*, 2008). Πέραν του κλασικού μοριακού υβριδισμού, η παραλλαγή του ‘επιτόπιος υβριδισμός’ (*in situ* hybridization) έχει χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό του

ιοειδούς στους ιστούς των φυτών-ξενιστών (πασσαλώδες παρέγχυμα, ακραίο μερίστωμα) αλλά και σε υπο-κυτταρικό επίπεδο (χλωροπλάστες, πλαστίδια) (Bussiere *et al.*, 1999, Rodio *et al.*, 2007). Το 1995 οι Shamloul *et al.*, (1995) εφάρμοσαν για πρώτη φορά στη διάγνωση του PLMVd την RT-PCR, μια νέα τότε τεχνική με κύρια χαρακτηριστικά την υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση, χρησιμοποιώντας για τον σχεδιασμό των εκκινητών την νουκλεοτιδική αλληλουχία αναφοράς των Hernandez and Flores (1992). Από τότε μέχρι σήμερα που η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη, έχουν χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση του PLMVd πολλές παραλλαγές της κλασικής RT-PCR όπως η πολλαπλή (multiplex) (Raggozino *et al.*, 2004), η RT-PCR ενός σταδίου (one tube) (Loreti *et al.*, 1999) και η RT-PCR ELISA η οποία προσφέρει 100 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία (Shamloul *et al.*, 2002).

4.3.8. Αντιμετώπιση

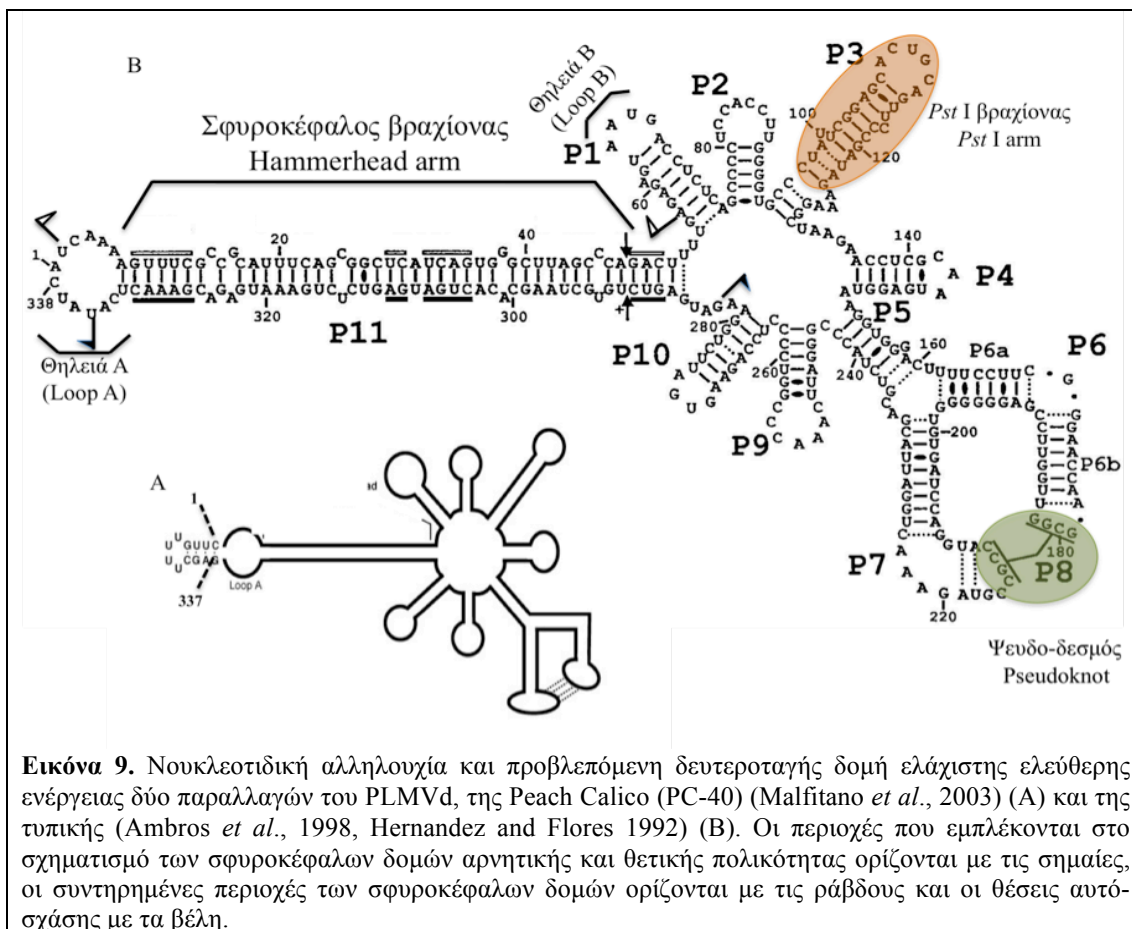
Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κανένα χημικό προϊόν ή άλλο μέσο θεραπείας με δράση αντι-ιοειδική που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για το έλεγχο του PLMVd στον αγρό. Η διάδοση της ασθένειας που προκαλεί μπορεί να περιοριστεί μόνο με την εφαρμογή προληπτικών μέτρων, με κυριότερο τη χρήση υγιούς και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Έτσι λοιπόν, σύμφωνα με το παράρτημα IV της υπ' αριθμ. 289718 αποφάσεως του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (ΥΑΑΤ), Φ.Ε.Κ 201952 Α. φύλλου 1952 (23/9/2008), θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για τον αποκλεισμό από τα μητρικά δένδρα ροδακινιάς και των ειδών ή υβριδίων που προορίζονται ως υποκείμενά της, μεταξύ άλλων και του PLMVd. Προς την κατεύθυνση αυτή η εξυγίανση και παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού αποτελεί το πρώτο βήμα. Εξυγίανση μολυσμένου από τον PLMVd, υλικού ροδακινιάς έχει επιτευχθεί με το συνδυασμό θερμοθεραπείας (37 °C επί 35-45 ημέρες) και εμβολιασμού ακραίου μεριστώματος (Desvignes 1986) καθώς και με τον *in vitro* εμβολιασμό σε σπόροφυτα Nemaguard (Barba *et al.*, 1995). Στην τελευταία περίπτωση ο βαθμός επιτυχίας της μεθόδου εξαρτάται από την ποικιλία και κυρίως από το μέγεθος του ακραίου μεριστώματος (shoot tip apex) (Barba *et al.*, 1995). Η διάδοση της ασθένειας θα μπορούσε επίσης να περιοριστεί με την παρακολούθηση των καλλιεργειών ροδακινιάς, με σκοπό τον έγκαιρο εντοπισμό εστιών μόλυνσεως και εξάλειψη, καθώς και με την αποφυγή χρησιμοποίησεως εμβολίων αγνώστου υγείας και με την υιοθέτηση από τους παραγωγούς ορισμένων καλλιεργητικών πρακτικών όπως η απολύμανση των κοπτικών και άλλων εργαλείων ή ο έλεγχος του πληθυσμού των αφίδων (Flores *et al.*, 2003β). Βασικής σημασίας, επίσης, είναι τα φυτουγειονομικά μέτρα, αναφερόμενα κυρίως στην αποφυγή εισαγωγής στη χώρα μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού.

4.3.9. Μοριακά χαρακτηριστικά

Το PLMVd ανήκει στην οικογένεια *Avsunviroidae* και μαζί με το CChMVd

συνιστούν το γένος *Pelamoviroid* (Navarro and Flores 1997). Το ιοειδές αυτό όπως και άλλα (PSTVd, HSVd, CEVd και ASBVd) (Visvader *et al.*, 1985, Elena *et al.*, 1991, Herold *et al.*, 1992, Polivka *et al.*, 1996), πολλαπλασιάζεται στον ξενιστή του ως ένας πληθυσμός παρόμοιων αλλά όχι πανομοιότυπων μεταξύ τους μοριακών παραλλαγών (molecular variants), πλησιάζοντας το μοντέλο του ‘σχεδόν είδους’ (quasi species) που προτάθηκε από τον Eigen (1993). Οι περισσότερες από τις παραλλαγές αυτές έχουν μέγεθος γενώματος που κυμαίνεται μεταξύ 336 και 341 nt (Ambros *et al.*, 1998, Ambros *et al.*, 1999, Pelchat *et al.*, 2000, Hernandez and Flores 1999, Fekih-Hassen *et al.*, 2007). Χαρακτηριστική όμως είναι η περίπτωση ορισμένων απομονώσεων, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται μεταξύ 346 και 351 nt καθώς φέρουν μια ένθεση 12-13 nt που σχηματίζει μια φουρκέτα (hairpin) στο άκρο της θηλειάς A του σφυροκέφαλου βραχίονα (hammerhead arm) (Ambros *et al.*, 1998, Rodio *et al.*, 2006). Οι παραλλαγές αυτές είναι γνωστές με το όνομα Peach Calico (PC) καθώς σχετίζονται με την εμφάνιση του χαρακτηριστικού συμπτώματος της λευκάνσεως των φύλλων της ροδακινιάς (Malfitano *et al.*, 2003). Έχει αποδειχθεί ότι υπεύθυνη για το σύμπτωμα calico είναι η θηλειά (loop) τεσσάρων U (uracils) στην κορυφή της πρόσθετης αυτής φουρκέτας (Εικόνα 9A) (Rodio *et al.*, 2006). Η διακύμανση στο μέγεθος του γενώματος μεταξύ των παραλλαγών του PLMVd είναι ένα ξεχωριστό χαρακτηριστικό, κοινό όμως και σε άλλα ιοειδή όπως τα PSTVd, HSVd, CEVd και ASBVd (Elena *et al.*, 1991, Herold *et al.*, 1992, Polivka *et al.*, 1996, Visvader *et al.*, 1985). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η περίπλοκα διακλαδισμένη δευτεροταγής δομή (διαμόρφωση) του PLMVd, η οποία πέραν του σφυροκέφαλου σχηματισμού που λειτουργεί ως ριβοένζυμο απαραίτητο κατά τον πολλαπλασιασμό του (Hernandez and Flores 1999), φέρει και έναν έως τρεις ψευδοδεσμούς (pseudo-knots) (Ambros *et al.*, 1998, Pelchat *et al.*, 2000, Bussiere *et al.*, 2000) οι οποίοι σταθεροποιούν την παραπάνω χαρακτηριστική διαμόρφωση που ευθύνεται για την αδιαλυτότητα του PLMVd σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (2 M LiCl) (Pelchat *et al.*, 2000). Η διατήρηση των παραπάνω δομικών χαρακτηριστικών φαίνεται να συμβάλλει στην εξισορρόπηση της υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας του PLMVd. Όσον αφορά την νουκλεοτιδική παραλλακτικότητα και την δευτεροταγή δομή, αναφέρεται ότι το μόριο RNA του PLMVd διακρίνεται σε δύο περιοχές: α) την αριστερή περιοχή (P1, P2, P10, P11 ή P1, P6-P11) η οποία περιλαμβάνει τα σφυροκέφαλα μοτίβα αυτο-σχάσης (hammerhead self-cleaving RNA motifs) και εμφανίζει συντηρημένη μεν δευτεροταγή δομή (σφυροκέφαλος βραχίονας) όχι όμως και αλληλουχία και β) την δεξιά περιοχή (P3-P9 ή P2-P5) η οποία αντίθετα, εμφανίζει συντηρημένη αλληλουχία όχι όμως και δευτεροταγή δομή. Οι δύο παραπάνω περιοχές πιθανότατα έχουν και διαφορετικό ρόλο, με την αριστερή να συμμετέχει ενεργά στον πολλαπλασιασμό του ιοειδούς και την δεξιά πιθανότατα στην παθογένεια (Pelchat *et al.*, 2000, Fekih-Hassen *et al.*, 2007) (Εικόνα 9B). Το PLMVd όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας *Avsunvirodae* εντοπίζονται σε υπο-κυτταρικό επίπεδο στους

χλωροπλάστες, όπου και πολλαπλασιάζονται μέσω του συμμετρικού κυλιόμενου κύκλου (symmetric rolling cycle), όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Bussiere *et al.*, 1999).



Στο μηχανισμό αυτό συμμετέχουν από πλευράς ιοειδούς τα σφυροκέφαλα μοτίβα (hammerhead motifs) που λειτουργώντας ως ριβοένζυμα καταλύουν τη σχάση του μορίου, και από την πλευρά του φυτού ξενιστή μια NEP πολυμεράση κωδικευόμενη στον πυρήνα (nuclear encoded polymerase) που υπάρχει στους χλωροπλάστες (Delgado *et al.*, 2005) καθώς και μια RNA λήγαση (RNA ligase) (Kibestris *et al.*, 1985).

5. Σκοπός της εργασίας

Ο μικρός αριθμός πληροφοριών σχετικά με την παρουσία ιοειδών σε καλλιέργειες μηλοειδών και πυρηνοκάρπων στην Ελλάδα, σε συνδυασμό με τη σπουδαιότητα των καλλιεργειών αυτών για την ελληνική οικονομία, συνέβαλε στο να προσδιοριστεί αρχικά ως βασικός σκοπός της παρούσας διατριβής η καταγραφή και μελέτη της παρουσίας στην Ελλάδα των σημαντικότερων διεθνώς ιοειδών που προσβάλλουν τις καλλιέργειες αυτές, δηλαδή των ASSVd, PBCVd και PLMVd. Τα πρώτα αποτελέσματα από την καταγραφή των παραπάνω ιοειδών στην Ελλάδα και ιδιαίτερα εκείνα που αφορούσαν τον PLMVd, σε συνδυασμό με την διεθνώς εξέχουσα επιστημονική και οικονομική σημασία του και την

έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την παρουσία του στην καλλιέργεια της ροδακινιάς στην Ελλάδα, την δεύτερη πιο σημαντική μετά από αυτή των εσπεριδοειδών στην χώρα μας, οδήγησαν στην αλλαγή του αρχικού αντικείμενου της διατριβής που ήταν πλέον το ιοειδές PLMVd, ενώ τα υπόλοιπα ιοειδή των μηλοειδών και πυρηνοκάρπων στην Ελλάδα αποτέλεσαν το αντικείμενο άλλης διατριβής (Καπώνη, 2009).

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στη λεπτομερή καταγραφή της παρουσίας του PLMVd στη χώρα μας, στο μοριακό χαρακτηρισμό των ελληνικών απομονώσεων, και στη μελέτη των φυλογενετικών τους σχέσεων καθώς και στη διαγνωστική του τεχνολογία.

Λόγω της διχογνωμίας που υπάρχει διεθνώς μεταξύ σημαντικών ερευνητών στον χώρο των ιοειδών, όπως οι R. Flores και A. Hadidi, σχετικά με την παρουσία ή όχι του PLMVd και σε άλλα φυτικά είδη πέραν της ροδακινιάς και των υβριδίων αυτής, ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην απομόνωση και τον χαρακτηρισμό τέτοιων απομονώσεων.

Μέχρι σήμερα η ταυτοποίηση του PLMVd σε φυτικά είδη πέραν της ροδακινιάς, όπως η καλλιεργούμενη και άγρια απιδιά, η βερικοκιά, η δαμασκηλιά και η κερασιά βασίστηκε κυρίως στην χρήση του μοριακού υβριδισμού (Faggioli *et al.*, 1997, Hadidi *et al.*, 1997, Ozaki *et al.*, 1999) και της RT-PCR (Giunchedi *et al.*, 1998, Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Fekih-Hassen *et al.*, 2006, 2007), μέσω της οποίας έγινε γνωστή η αλληλουχία καθώς και τα χαρακτηριστικά των απομονώσεων αυτών. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία, με εξαίρεση την ροδακινιά, η παρουσία του PLMVd στα παραπάνω είδη είναι περιστασιακή γεγονός που μπορεί να συνδεθεί με την ανομοιόμορφη κατανομή και τον χαμηλό τίτλο του ιοειδούς σε αυτά τα είδη, δίχως όμως αυτό να έχει ποτέ προσδιοριστεί ποσοτικά (Flores *et al.*, 2003β, Mandic *et al.*, 2008). Έτσι λοιπόν, ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκεντρώσεως του PLMVd στη ροδακινιά και άλλους ξενιστές αποτέλεσε έναν ακόμη στόχο.

Σήμερα, πολλή συζήτηση γίνεται γύρω από το πολλαπλασιαστικό υλικό και ιδιαίτερα για την αναγκαιότητα της χρήσεως υγιούς και πιστοποιημένου υλικού. Κάτι τέτοιο δεν θα μπορούσε να μην αφορά και την περίπτωση του PLMVd ενός ιδιαίτερα σοβαρού φυταπαθογόνου. Αν και γνωρίζουμε αρκετά για την παρουσία του στο φυτωριακό πολλαπλασιαστικό υλικό άλλων χωρών (Shamloul *et al.*, 1995, Hadidi *et al.*, 1997, Loreti *et al.*, 1998, Flores and Llacer 1998), πλήρης άγνοια επικρατεί για το ποια είναι η κατάσταση στη χώρα μας. Γι' αυτό λοιπόν, ο έλεγχος πολλαπλασιαστικού υλικού ροδακινιάς και νεκταρινιάς ελληνικών φυτωρίων αποτέλεσε επίσης στόχο της παρούσας διατριβής.

Τέλος, στόχος ήταν και η υιοθέτηση, προσαρμογή και εφαρμογή στην διάγνωση του PLMVd νέων και πρωτοποριακών τεχνικών, που αφ' ενός θα βελτιώναν τις γνώσεις μας σχετικά με την βιολογία όχι μόνο του συγκεκριμένου ιοειδούς αλλά των ιοειδών γενικά, καθώς και τις μεθόδους εξυγιάνσεως (μικρο-εμβολιασμός, καλλιέργεια ακραίου μεριστώματος), ενώ ευελπιστούμε πως οι πρωτοποριακές αυτές τεχνικές θα συμβάλουν στην εξέλιξη των συστημάτων ελέγχου και πιστοποίησης του πολλαπλασιαστικού υλικού.

ΜΕΡΟΣ Β

**ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΩΝ ASSVd, PBCVd ΚΑΙ PLMVd
ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΥΤΟΦΥΗ ΕΙΔΗ ΜΗΛΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΠΥΡΗΝΟΚΑΡΠΩΝ**

1. Περίληψη

Το ιοειδές της εσχάρωσης του φλοιού του μήλου (*Apple scar skin viroid*, ASSVd), το ιοειδές του εξανθηματικού έλκους της απιδιάς (*Pear blister cancer viroid*, PBCVd) και το ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) έχουν εξέχουσα φυτοπαθολογική σημασία διεθνώς για τα μηλοειδή και πυρηνόκαρπα, οι πληροφορίες όμως σχετικά με την παρουσία τους σε καλλιεργούμενα αλλά και αυτοφυή είδη μηλοειδών και πυρηνοκάρπων στην Ελλάδα είναι περιορισμένες. Η προκαταρκτική επισκόπηση της παρουσίας των παραπάνω ιοειδών στη χώρα μας βασίστηκε στην εφαρμογή της μεθόδου RT-PCR, η οποία για τον σκοπό αυτό βελτιστοποιήθηκε όσον αφορά τους εκκινητές, το είδος του εκμαγείου, την αντίστροφη μεταγραφάση και την προσθήκη αποδιατακτικών. Χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών ASSVdr4/ASSVdf3, PBCVdc/PBCVdh και PLMVdhL/PLMVdcL, ολικό RNA (μέθοδος εξαγωγής SiO₂) ως εκμαγείο και TMSO ή DMSO ως αποδιατακτικά, η παρουσία των παραπάνω ιοειδών στη χώρα μας επιβεβαιώθηκε και παράλληλα καταγράφηκε σε νέες περιοχές της Βόρειας, Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας, καθώς και σε νέα φυτικά είδη. Το PBCVd αποτέλεσε το πιο συχνά απαντώμενο ιοειδές και η παρουσία του καταγράφηκε σε δείγματα απιδιάς, άγριας απιδιάς, κυδωνιάς και κράταιγου με χαρακτηριστικά συμπτώματα εξανθηματικών ελκών στο φλοιό του κορμού. Το ASSVd ήταν το δεύτερο σε συχνότητα ιοειδές και η παρουσία του ήταν σχεδόν ταυτόσημη με το σύμπτωμα της εσχάρωσης του φλοιού των καρπών απιδιάς, άγριας απιδιάς, καθώς και μηλιάς και άγριας μηλιάς, τα τελευταία δύο είδη αναφερόμενα εδώ για πρώτη φορά ως ξενιστές του ιοειδούς αυτού στην Ελλάδα και διεθνώς, αντίστοιχα. Όσον αφορά το PLMVd επιβεβαιώθηκε η παρουσία του στην άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά και καταγράφηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα η παρουσία του στη ροδακινιά και μάλιστα σε ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό (66 %), καθώς και στη βερικοκιά. Τέλος, η παρουσία των παραπάνω ιοειδών σε ορισμένα νέα είδη ξενιστών επιβεβαιώθηκε με την απ' ευθείας αλληλούχηση των προϊόντων της PCR.

2. Εισαγωγή

Τα ιοειδή είναι πολύ μικρά (246-401 νουκλεοτίδια) μονονηματιδιακά, ομοιοπολικά κλειστά (κυκλικά) μόρια RNA με υψηλό βαθμό ενδομοριακής συμπληρωματικότητας που τους προσφέρει χαρακτηριστική ραβδοειδή ή διακλαδισμένη δευτεροταγή δομή. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί περισσότερα από 30 είδη ιοειδών τα οποία ταξινομούνται στις οικογένειες *Pospiviroidae* και *Ansunviroidae*, με την πρώτη να περιέχει τα περισσότερα μέλη. Μεταξύ των ξενιστών των ιοειδών συγκαταλέγονται και οπωροφόρα είδη, όπως η απιδιά (*Pyrus communis* L.), η βερικοκιά (*Prunus armeniaca* L.), η δαμασκηλιά (*P. domestica* L.), η μηλιά (*Malus pumila* Mill.), η ροδακινιά (*Prunus persica* L.), η κερασιά (*P. avium* L.) κ.ά., στα οποία προκαλούνται ασθένειες οικονομικής σημασίας (Randles 2003). Το ιοειδές της εσχάρωσης του φλοιού του μήλου (*Apple scar skin viroid*, ASSVd), το ιοειδές του εξανθηματικού έλκους της απιδιάς (*Pear blister cancer viroid*, PBCVd) και το ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) ξεχωρίζουν φυτοπαθολογικά, λόγω του ότι η παρουσία τους σχετίζεται με την υποβάθμιση της ποιότητας (σχισμές, ρωγμές, παραμόρφωση κ.τ.λ.) και τη μείωση της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων, καθώς και με την εξασθένηση, πρόωρη γήρανση ακόμη και θάνατο των προσβεβλημένων δένδρων με συνέπεια σημαντικές απώλειες. Τα ASSVd και PBCVd αποτελούν μέλη του γένους *Apescaviroid* της οικογένειας *Pospiviroidae* και προσβάλλουν, αντίστοιχα, κυρίως τη μηλιά και την απιδιά, ενώ το PLMVd ανήκει στο γένος *Pelamoviroid* της οικογένειας *Ansunviroidae* και έχει ως βασικό του ξενιστή τη ροδακινιά. Από την ανακάλυψη των παραπάνω ιοειδών μέχρι το 2006, έτος ενάρξεως της παρούσας διατριβής, πολλές ήταν οι διεθνείς μελέτες με αντικείμενο τα παραπάνω ιοειδή. Αντίθετα, όσον αφορά τη χώρα μας οι μοναδικές πληροφορίες προέρχονται από τους Kyriakopoulou and Hadidi (1997) και Kyriakopoulou *et al.*, (1998, 2001) και σχετίζονταν με την παρουσία των παραπάνω ιοειδών στην άγρια (*P. amygdaliformis* Vill.) και καλλιεργούμενη απιδιά. Έτσι λοιπόν οι περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με την παρουσία των ASSVd, PBCVd και PLMVd σε καλλιεργούμενα αλλά και αυτοφυή είδη μηλοειδών και πυρηνοκάρπων στην Ελλάδα, σε συνδυασμό με τη σπουδαιότητα των καλλιεργειών αυτών στην ελληνική οικονομία, ώθησε στο να αποτελέσει η καταγραφή, στη χώρα μας, της παρουσίας των ιοειδών αυτών βασικό στόχο του παρόντος κεφαλαίου. Παράλληλα αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε η τεχνική RT-PCR με σκοπό την αποτελεσματικότερη μελέτη της παρουσίας των παραπάνω ιοειδών και τη συμβολή στη ανίχνευσή τους.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Φυτικό υλικό

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια πρώτη καταγραφή της παρουσίας των ιοειδών

ASSVd, PBCVd και PLMVd στη χώρα μας, πραγματοποιήθηκαν κατά τη χρονική περίοδο Απρίλιος 2004-Σεπτέμβριος 2005 δειγματοληψίες καλλιεργούμενων και ορισμένων αυτοφυών ειδών μηλοειδών και πυρηνοκάρπων από περιοχές της Βόρειας, Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας (Πίνακας 1). Συλλέχθηκαν συνολικά 131 δείγματα φύλλων, καρπών και κλαδίσκων από απιδιές, άγριες απιδιές, άγριες κορομηλιές (*P. spinosa*), άγριες μηλιές (*M. sylvestris* Mill.), βερικοκιές, δαμασκηνιές, κερασιές, κράταιγους (*Crataegus* sp.), μηλιές, και ροδακινιές με συμπτώματα όπως περιγράφονται στον Πίνακα 1. Σε κάθε δένδρο τοποθετήθηκε μεταλλικό καρτελάκι με κωδικό αριθμό ο οποίος αναγράφηκε και στο πλαστικό σακουλάκι που περιείχε τα δείγματα από το συγκεκριμένο δένδρο. Τα δείγματα μετά τη συλλογή τους μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου αποθηκεύτηκαν μέχρι την εξέτασή τους στους -80 °C απ' ευθείας ή στους 4 °C μετά από προηγούμενη λυοφυλίωση τους. Ως θετικοί μάρτυρες του ASSVd χρησιμοποιήθηκαν φύλλα και κλαδίσκοι απιδιάς της ποικιλίας cv spy 277 μολυσμένης με την απομόνωση ASSVdBel προερχόμενα από τη συλλογή του Πανεπιστημίου Gembloux Faculté Universitaire des Sciences Agronomique, Unité di Phytopathologie, με την ευγενική προσφορά της Dr. S. Roussel. Όσον αφορά τα PBCVd και PLMVd, ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν, αντίστοιχα, φύλλα/κλαδίσκοι του φυτοδείκτη απιδιάς A20 μολυσμένου με την ιταλική απομόνωση PBCVd P8 και φύλλα του φυτοδείκτη ροδακινιάς GF-305 μολυσμένου με την επίσης ιταλική απομόνωση PLMVd P31. Οι ιταλικές απομονώσεις προήλθαν από τη συλλογή του Ινστιτούτου CRA (Centro di Ricerca per la Pathologia Vegetale) στη Ρώμη μετά από ευγενική προσφορά των Dr. M. Barba και Dr. F. Faggioli.

3.2. Μεταχειρίσεις για την αδρανοποίηση των ριβονουκλεασών (ribonucleases, RNases)

Για την προστασία του RNA από τη δράση των ριβονουκλεασών (ribonucleases, RNases) ελήφθησαν τα παρακάτω μέτρα: i) Όλα τα γυάλινα σκεύη αποστειρώθηκαν στους 180 °C ή επώαστηκαν μαζί με τα επαναχρησιμοποιηθέντα πλαστικά σκεύη επί 12 ώρες στους 37 °C σε διάλυμα 0.1 % (o/o) διαιθυλο-πυρανθρακικού οξέος (di-ethyl-pyrgo-carbonic acid, DEPC) και ακολούθησε αποστείρωση. ii) Όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC (νερό DEPC): Σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό προστέθηκε 0.1 % (o/o) DEPC, ακολούθησε επώαση στους 37 °C επί οχτώ ώρες και τελικά αποστείρωση στους 121 °C επί 25-30 λεπτά. iii) Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν προορίζονταν αποκλειστικά για τη μεταχείριση RNA. iv) Απαραίτητη σε όλα τα στάδια ήταν η χρήση και η συχνή αλλαγή εξεταστικών γαντιών προς αποφυγή των RNAσων που προέρχονται από το δέρμα (Sambrook *et al.*, 1989).

Πίνακας 1. Δείγματα καλλιεργούμενων και αυτοφυών μηλοειδών και πυρηνοκάρπων που ελέγχθηκαν για την παρουσία των ιοειδών ASSVd, PBCVd και PLMVd

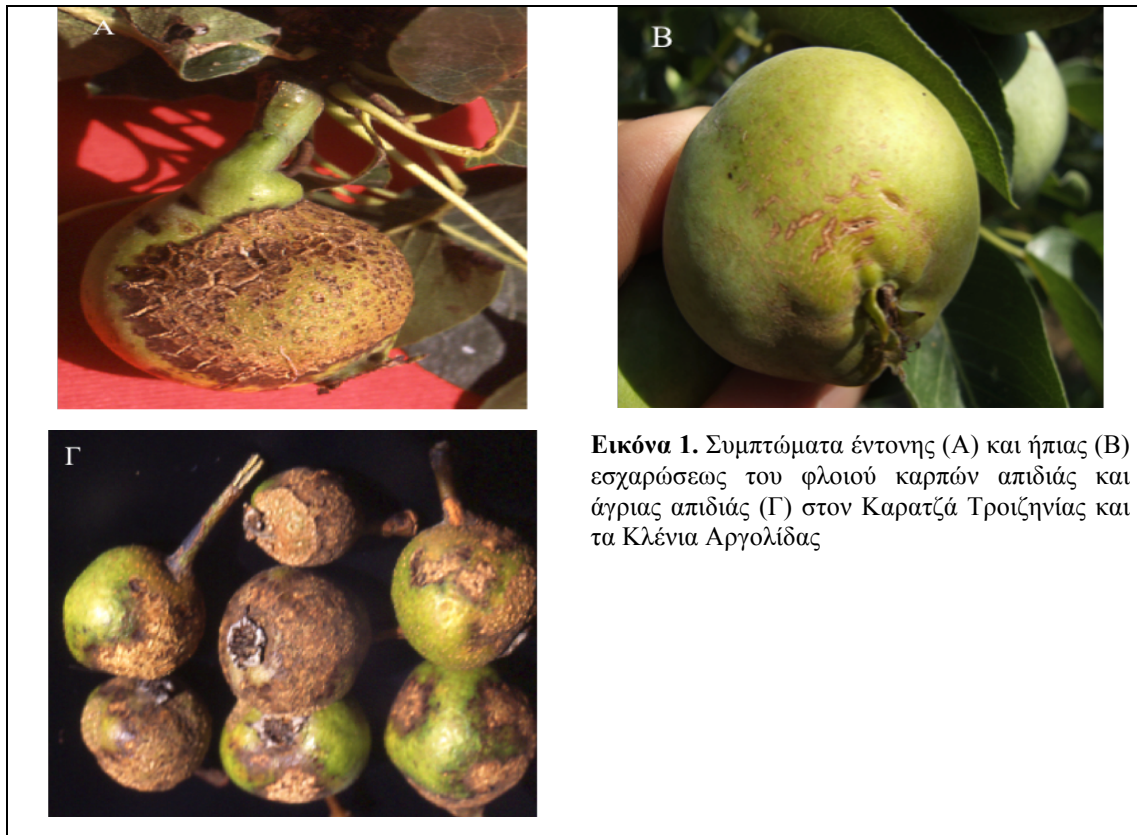
Φυτικό είδος	Ποικιλία	Αριθμός δειγμάτων	Περιοχή (αριθμός δειγμάτων)	Συμπτώματα
Μηλιά (<i>Malus pumila</i> Mill.)	Red Delicious Golden Delicious Starking Delicious	16	Μάννα Κορινθίας (5), Ανδρίτσαϊνα (3) Ηλείας, Ασσεα Αρκαδίας (4), Ζαγορά Μαγνησίας (4)	Κομμίωση κορμών, βραχιόνων, κλάδων Εσχάρωση, σχισμές καρπών
Απιδιά (<i>Pyrus communis</i> L.)	Κρυστάλλια Κοντούλα Άγνωστη	20	Καρατζάς (5) και Βλαχέϊκα (2) Τροιζηνίας, Κλένια Κορινθίας (4), Καρύταινα Αρκαδίας (3), Στρούτζα Ναυπακτίας (3), Ζαγορά Μαγνησίας (3)	Εσχάρωση, σχισμές καρπών (Εικόνα 1Α,Β) Εξανθηματικά έλκη κορμών, βραχιόνων, κλάδων (Εικόνα 2Α,Β) Ξήρανση κλάδων
Κυδωνιά (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.)	Υποκείμενο	4	Καρατζάς Τροιζηνίας (4)	Εξανθηματικά έλκη κορμών και κλάδων (2Δ)
Άγρια μηλιά (<i>Malus sylvestris</i> Mill.)	Αυτοφύες	8	Σκρα Κυκλίας (8)	Εσχάρωση, σχισμές καρπών Εξανθηματικά έλκη κορμών, βραχιόνων, κλάδων
Άγρια απιδιά (<i>Pyrus amygdaliformis</i> Vill.)	Υποκείμενο Αυτοφύες	36	Καρατζάς (4), Βλαχέϊκα (2) Τροιζηνίας, Ανδρίτσαϊνα Ηλείας (6), Καρύταινα Αρκαδίας (4), Σκρα Κυκλίας (11), Στρούτζα Ναυπακτίας (9)	Εσχάρωση, σχισμές καρπών (Εικόνα 1Γ) Εξανθηματικά έλκη κορμών, βραχιόνων, κλάδων (Εικόνα 2Γ)
Βερικοκιά (<i>Prunus armeniaca</i> L.)	Διαμαντοπούλου Άγνωστη	12	Κλένια (3), Μάννα (9) Κορινθίας	Κομμίωση Κίτρινη κηλίδωση φύλλων Νέκρωση οφθαλμών Δερμάτωση καρπών
Ροδακινιά (<i>Prunus persica</i> L.)	Spring Crest May Crest Άγνωστη	15	Άγιος Βασίλειος (6), Κλένια (3), Μάννα (5) Κορινθίας	Κομμίωση Σχισμές, παραμόρφωση καρπών (Εικόνα 3Α) Κιτρινοπράσινο μωσαϊκό ορισμένων φύλλων (Εικόνα 3Β)
Κερασιά (<i>Prunus avium</i> L.)	Άγνωστη	4	Ζαγορά Μαγνησίας (4)	Κομμίωση Ξήρανση κλαδίσκων Ερυθρές, νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα
Κράταιγος (<i>Crataegus</i> sp.)	Αυτοφύες	12	Σκρα Κυκλίας (7) Στρούτζα Ναυπακτίας (5)	Εξανθηματικά έλκη κορμών
Άγρια κορομηλιά (<i>Prunus spinosa</i> L.)	Αυτοφύες	4	Σκρα Κυκλίας (2) Στρούτζα Ναυπακτίας (2)	Κομμίωση

3.3. Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

3.3.1. Εκμαγείο

Η RT-PCR αποτέλεσε στο παρόν κεφάλαιο τη βασική διαγνωστική μέθοδο των τριών ιοειδών. Για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι εκμαγείου: i) Εκχύλισμα φυτικού χυμού σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και ii) ολικό RNA (total RNA, t-RNA) η εκχύλιση του οποίου έγινε με δύο μεθόδους διαφέρουσες μεταξύ τους ως προς τη

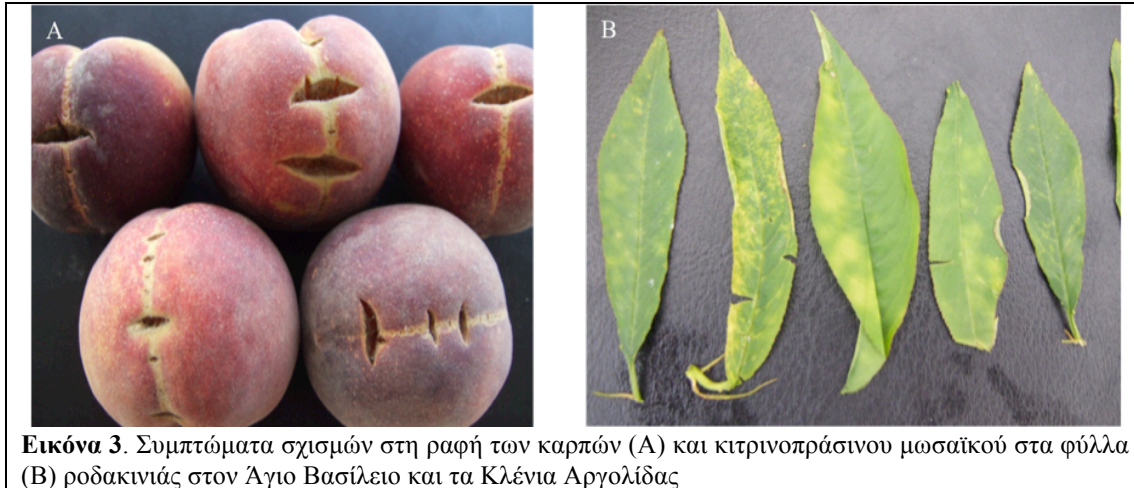
χρήση ή όχι επικίνδυνων οργανικών διαλυτών όπως η φαινόλη και το χλωροφόρμιο. Οι τρεις μέθοδοι περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.



Εικόνα 1. Συμπτώματα έντονης (Α) και ήπιας (Β) εσχάρωσης του φλοιού καρπών απιδιάς και άγριας απιδιάς (Γ) στον Καρατζά Τροιζηνιάς και τα Κλένια Αργολίδα



Εικόνα 2. Εξανθηματικά έλκη σε κορμούς, βραχίονες και κλάδους απιδιάς (Α, Β), άγριας απιδιάς (Γ) και κυδωνιάς (Δ) στον Καρατζά Τροιζηνιάς



Εικόνα 3. Συμπτώματα σχισμών στη ραφή των καρπών (A) και κιτρινοπράσινου μωσαϊκού στα φύλλα (B) ροδακινιάς στον Άγιο Βασίλειο και τα Κλένια Αργολίδας

3.3.1.1. Εκχύλισμα φυτικού χυμού

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Rowhani *et al.*, (1995). Σύμφωνα με αυτό, ποσότητα 0.1 gr φυτικού ιστού (φύλλο, φλοιός ή σάρκα καρπού, ξύσμα καμβίου κλαδίσκων) τοποθετήθηκε σε πλαστικό σακουλάκι που περιείχε 2 ml διαλύματος ομογενοποίησης (500 mM Tris-HCl pH: 8.3, 2 % [β/ο] Polyvinylpyrrolidone-40 [PVP-40], 1 % [β/ο] polyethylene glycol-6000 [PEG-6000], 1.4 mM NaCl και 0.05 % [ο/ο] Tween-20). Στη συνέχεια, 500 μl του ομογενοποιημένου μεταφέρθηκαν σε μικροσωλήνα 1.5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) και ακολούθησε φυγοκέντρηση (30 RF, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) στις 10000 στροφές ανά λεπτό (revolutions per minute, rpm) επί 10 λεπτά. Διακόσια (200) μl του υπερκειμένου μεταφέρθηκαν σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml (Eppendorf) και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

3.3.1.2. Εκχύλιση ολικού RNA (total RNA, tRNA)

α) Μέθοδος χλωροφορμίου-φαινόλης (Coffin and Coutts, 1992)

Σε ιγδίο που περιείχε μικρή ποσότητα υγρού αζώτου ομογενοποιήθηκαν 0.1 gr φυτικού ιστού (φύλλο, φλοιός ή σάρκα καρπού, ξύσμα καμβίου κλαδίσκων) παρουσία 2 ml διαλύματος εκχυλίσεως A (1 M Tris-HCl pH: 7.5, 1 M sucrose, 500 mM MgOAc, 500 mM KCl και 10 % [β/ο] SDS). Στη συνέχεια, 1 ml του ομογενοποιημένου μεταφέρθηκε σε μικροσωλήνα 1.5 ml (Eppendorf) και φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm επί 10 λεπτά. Πεντακόσια (500) μl υπερκειμένου μεταφέρθηκαν σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml και προστέθηκε ίσος όγκος μίγματος 1/1 (ο/ο) χλωροφορμίου-φαινόλης (κορεσμένης με νερό, pH: 7.0). Μετά από έντονη ανάδευση (vortex), το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14000 rpm επί 15 λεπτά και το υπερκείμενο (υδατική φάση) μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml, στον οποίο προστέθηκαν επίσης 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100 % (ο/ο) και διάλυμα 2.5 M

NaOAc pH: 5.7 σε αναλογία 1/10 (o/o). Το μίγμα αναδεύτηκε και η κατακρήμιση των νουκλεϊκών οξέων έλαβε χώρα στους -20 °C επί 12-18 ώρες ή στους -80 °C επί τουλάχιστον μια ώρα. Στη συνέχεια, μετά από φυγοκέντρηση στις 14000 rpm επί 20 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα νουκλεϊκών οξέων ξεπλύθηκε με 1 ml 70 % (o/o) αιθανόλης και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 7000 rpm επί πέντε λεπτά. Οι μικροσωλήνες έπειτα τοποθετήθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής προκειμένου να στεγνώσει το ίζημα, το οποίο στη συνέχεια αναδιαλύθηκε σε 50 μl νερό DEPC.

β) Μέθοδος οξειδίου του πυριτίου (silica dioxide SiO₂) (Rott and Jelkmann, 2001)

Ποσότητα 0.1 gr φυτικού ιστού (φύλλο, φλοιός ή σάρκα καρπού, ξύσμα καμβίου κλαδίσκων) κορνιοτοποιήθηκε με τη βοήθεια υγρού αζώτου και ομογενοποιήθηκε με 2 ml διαλύματος εκχυλίσεως B (4 M guanidine thiocyanate, 0.2 M NaOAc pH: 5.2, 25 mM EDTA pH: 8.0, 1 mM KOAc και 2.5 % [β/o] PVP-40). Στη συνέχεια, 1 ml ομογενοποιημένου μεταφέρθηκε σε μικροσωλήνα 1.5 ml (Eppendorf) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1000 rpm επί πέντε λεπτά. Σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml (Eppendorf) μεταφέρθηκαν 500 μl υπερκειμένου και προστέθηκαν 100 μl διαλύματος 10 % (β/o) *N*-lauryl sarkosyl και 5 μl 2-mercaptoethanol. Ακολούθως, το διάλυμα επώαστηκε επί 10 λεπτά στους 70 °C με δυο ενδιάμεσες αναδεύσεις, τοποθετήθηκε επί πέντε λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm επί 10 λεπτά. Έπειτα, 300 μl υπερκειμένου μεταφέρθηκαν σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml που περιείχε 150 μl διαλύματος 6 M NaI και 25 μl υδατικού αιωρήματος SiO₂. Το διάλυμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου επί 10 λεπτά με δύο ενδιάμεσες αναδεύσεις και φυγοκεντρήθηκε στις 6000 rpm επί ένα λεπτό. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500 μl διαλύματος πλύσεως (10 mM Tris-HCl pH: 7.5, 0.5 mM EDTA pH: 8.0, 50 mM NaCl, 50% [o/o] αιθανόλη) και φυγοκεντρήθηκε στις 6000 rpm για ένα λεπτό. Το στάδιο πλύσης επαναλήφθηκε ακόμη δύο φορές και το ίζημα στέγνωσε με τοποθέτηση των μικροσωλήνων στο θάλαμο νηματικής ροής πριν την επαναδιάλυσή του σε 150 μl νερό DEPC. Το διάλυμα στη συνέχεια επώαστηκε επί τέσσερα λεπτά στους 70 °C και φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm επί τρία λεπτά. Έπειτα το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml και ακολούθησε κατακρήμιση των νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη και NaOAc όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τελικά το ίζημα νουκλεϊκών οξέων επαναδιαλύθηκε σε 50 μl νερό DEPC.

Για την παρασκευή του διαλύματος, 6 M NaI 0.75 gr Na₂SO₃ και 36 gr NaI διαλύθηκαν σε 40 ml νερού DEPC και το τελικό διάλυμα αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό δοχείο στους 4 °C. Η προετοιμασία του υδατικού αιωρήματος SiO₂ έγινε με την προσθήκη 60 gr SiO₂ σε 500 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Το SiO₂ αναδεύτηκε καλά και αφέθηκε προς καθίζηση σε θερμοκρασία δωματίου επί 24 ώρες. Στη συνέχεια, το

υπερκειμένο απομακρύνθηκε (470 ml περίπου) και προστέθηκαν εκ νέου 500 ml νερού. Το αιώρημα αναδεύτηκε καλά και αφέθηκε προς καθίζηση επί πέντε περίπου ώρες. Τελικά, 440 ml περίπου του υπερκειμένου απορρίφθηκαν και τα εναπομείναντα 60 ml του αιωρήματος ρυθμίστηκαν σε pH 2.0 με HCl και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C.

3.3.2. Εκκινητές

Στο παρόν κεφάλαιο, για τη διάγνωση των ιοειδών ASSVd, PBCVd και PLMVd με την τεχνική RT-PCR, χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers) που προήλθαν από τη διεθνή βιβλιογραφία ή σχεδιάστηκαν στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 2). Ο σχεδιασμός του ζεύγους εκκινητών για κάθε ιοειδές βασίστηκε στην χρήση υψηλά συντηρημένων περιοχών του γενώματός του, οι οποίες αναγνωρίστηκαν μετά από ευθυγράμμιση (alignment) και σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών όλων σχεδόν των διαθέσιμων στις βάσεις δεδομένων απομονώσεων κάθε ιοειδούς, με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος WU-BLAST2 (Washington University Basic Logical Search Alignment Tool Version 2.0) (Altschul *et al.*, 1990) (EMBL-EBI: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast/nucleotide.htm>). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν στη παρούσα εργασία προήλθαν από συντηρημένες περιοχές του γενώματος του κάθε ιοειδούς, αλλά με βασική προϋπόθεση, ιδιαίτερα για την περιοχή σχεδιασμού των καθοδικών εκκινητών, τη χαμηλού βαθμού δευτεροταγή δομή κυρίως της θέσεως που αντιστοιχεί στο άκρο 3'. Η με βάση το παραπάνω κριτήριο επιλογή των εκκινητών έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος προβλέψεως δευτεροταγούς δομής RNA, mFold (Zuker 2003) (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1-2.3.cgi>). Τα ζεύγη εκκινητών σχεδιάστηκαν με αντίθετο εξωτερικό προσανατολισμό (αντιπαράλληλη κατεύθυνση) έχοντας υπόψη πως τα ιοειδή είναι ομοιοπολικά κλειστά (κυκλικά) μόρια RNA. Ο προσδιορισμός των ιδιοτήτων κάθε ζεύγους εκκινητών έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator (Kibbe 2007) (Northwestern University: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Η πλειονότητα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία ενίσχυναν το σύνολο του γενώματος του ιοειδούς-στόχου, με εξαίρεση τους εκκινητές ASSVdf3/ASSVdr4 και PBCVdf5/PBCVdr6. Οι εκκινητές προήλθαν από την εταιρεία Invitrogen χωρίς να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην καθαρότητά τους (desalted) και μετά τη παραλαβή τους επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε νερό DEPC.

3.3.3. Δοκιμές RT-PCR

Στο παρόν κεφάλαιο εφαρμόστηκαν δύο τύποι RT-PCR: Η RT-PCR δύο σταδίων σε δύο μικροσωλήνες (two step-two tubes) για την ανίχνευση των ASSVd, PBCVd και PLMVd

και η RT-PCR δύο σταδίων σε κοινό μικροσωλήνα (two step-one tube) για τη ανίχνευση του PLMVd.

Πίνακας 2. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των ιοειδών ASSVd, PBCVd και PLMVd.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Θέση	Προϊόν (ζβ)	Βιβλιογραφική αναφορά
ASSVdc	CCTTCGTCGACGACGA	82-97	330	Hadidi and Yang, 1990
ASSVdh	CCGGTGAGAAAGGAGCTGCCAGCAC	98-122		
ASSVdr4	GGTGAGTTCCTTCTTCTCCTCGTTTTTC	53-79	272	Παρούσα εργασία
ASSVdf3	CTCGCACCAGTTCCGCTGTG	139-158		
PBCVdc	CCTTCGTCGACGACGA	82-97	315	Shamloul <i>et al.</i> , 2002
PBCVdh	GTCTAGAAGCCTGGGCGCTGGCTGG	98-121		
PBVCdr6	CACCACAGGAACCTCAGGAAAGGGA	1-22	187	Παρούσα εργασία
PBCVdf5	GGAGAAGAAAACCAGCGTTGCTTCC	155-179		
PLMVdc	AACTGCAGTGCTCCGT	100-115	337	Shamloul <i>et al.</i> , 1995
PLMVdh	CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG	116-139		
PLMVdcL	AACTGCAGTGCTCCGAATAGGGCAC	92-116	337	Loreti <i>et al.</i> , 1999
PLMVdhL	CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG	117-141		
PLMVdr6	ACACCCCCTCGGAACCAACC	180-200	337	Παρούσα εργασία
PLMVdf5	GATCCAGGTACCGCCGTAGAAACT	201-224		

α) RT-PCR δύο σταδίων σε δύο μικροσωλήνες (two step-two tubes)

Για την ενίσχυση του στόχου με την PCR έπρεπε να προηγηθεί το στάδιο της μεταγραφής του RNA σε μονονηματιδικό συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στον πρώτο μικροσωλήνα παρουσία του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcriptase, RTase). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωλήνα 0.2 ml (Costar Corporation, Cambridge MA, USA) σε τελικό όγκο 15 μ l, με τη χρησιμοποίηση τριών μ l εκμαγείου (ολικό RNA ή εκχύλισμα φυτικού χυμού) το οποίο αποδιατάχθηκε παρουσία του καθοδικού εκκινητή (1 μ l, 100 μ M), με θέρμανση στους 90 °C επί πέντε λεπτά, τοποθετήθηκε στο πάγο επί πέντε λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε στο διάλυμα της αντιδράσεως το οποίο αποτελούταν από 50 mM Tris-HCl pH: 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.25 mM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο (dNTP), 10 mM DTT, 60 μονάδες αντίστροφης μεταγραφής M-MLV (Invitrogen Ltd., Paisley, England, UK), 8 μονάδες αναστολέα ριβονουκλεασών Human Placental Ribonuclease Inhibitor (HT Biotechnology, Ltd., Cambridge, England, UK), 5% (o/o) DMSO και νερό DEPC μέχρι του τελικού όγκου. Στη συνέχεια οι μικροσωλήνες τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή PTC-200 (MJ-Research, Waltham, Massachusetts, USA) και η

αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με επώαση του διαλύματος της αντιδράσεως επί 55 λεπτά στους 42 °C και πέντε λεπτά στους 92 °C.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίστροφης μεταγραφής, δύο μl cDNA προστέθηκαν σε μικροσωλήνες 0.2 ml (Costar) που περιείχαν το διάλυμα της αντιδράσεως PCR με τελικό όγκο 20 μl. Το διάλυμα αντιδράσεως PCR αποτελείτο από 20 mM Tris-HCl pH: 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5 μM από κάθε ανοδικό και 0,5 μM από κάθε καθοδικό εκκινητή, 0.2 mM dNTPs, 5% (o/o) DMSO, δύο μονάδες *Taq* DNA πολυμεράσης (Invitrogen) και νερό DEPC μέχρι του τελικού όγκου. Στη συνέχεια οι μικροσωλήνες τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή PTC-200 (MJ-Research) όπου επώαστηκαν σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

i). Αρχική αποδιάταξη εκμαγείου RNA-DNA: Επώαση διαλύματος αντιδράσεως PCR στους 94 °C επί πέντε λεπτά.

ii). Αποδιάταξη του δινηματιδιακού DNA-εκμαγείου: Επώαση διαλύματος αντιδράσεως PCR στους 94 °C επί 45 δευτερόλεπτα.

iii). Επανασύνδεση του εκμαγείου με τους εκκινητές: Υβριδοποίηση των εκκινητών με το εκμαγείο με επώαση διαλύματος αντιδράσεως στους 60 °C επί 45 δευτερόλεπτα.

iv). Επιμήκυνση δεσμευμένων εκκινητών με επώαση του διαλύματος της αντιδράσεως στους 72 °C επί 45 δευτερόλεπτα.

Ο κύκλος των σταδίων 2, 3, 4 επαναλήφθηκε 32 φορές και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με επώαση του διαλύματος της αντιδράσεως στους 72 °C επί επτά λεπτά για την επιμήκυνση όλων των ημιτελών αλυσίδων.

β) RT-PCR δύο σταδίων σε κοινό μικροσωλήνα (two step-one tube)

Το πρωτόκολλο της RT-PCR σε κοινό μικροσωλήνα εφαρμόστηκε για τη ανίχνευση του PLMVd με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών PLMVdcL/PLMVdhL (Loretí *et al.*, 1999) (Πίνακας 2). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, 1.5 μl ολικού RNA αποδιάτάχθηκε παρουσία του καθοδικού εκκινητή PLMVdcL (1μl, 100 μl) με θέρμανση στους 100 °C επί πέντε λεπτά, τοποθετήθηκε επί πέντε λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια προστέθηκε στο διάλυμα της αντιδράσεως τελικού όγκου 15 μl. Το διάλυμα της αντιδράσεως αποτελείτο από 50 mM Tris-HCl pH: 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, 10 mM DTT, 60 μονάδες M-MLV (Invitrogen), 8 μονάδες Human Placental Ribonuclease Inhibitor (HT, Biotechnology), 5 % (o/o) DMSO και νερό DEPC μέχρι του τελικού όγκου. Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με επώαση του διαλύματος της αντιδράσεως στους 42 °C επί 55 λεπτά και 92 °C επί πέντε λεπτά στον θερμοκυκλοποιητή PTC-200 (MJ-Research). Μετά το πέρας της αντιδράσεως σε κάθε μικροσωλήνα 0.2 ml (Costar) που περιείχε το προϊόν της RT προστέθηκαν 60 μl του διαλύματος αντιδράσεως PCR το οποίο αποτελείτο από 20 mM Tris-

HCl pH: 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.4 μM ανοδικό εκκινητή, δύο μονάδες *Taq* DNA πολυμεράση (Invitrogen) και νερό DEPC μέχρι του τελικού όγκου. Στη συνέχεια οι μικροσωλήνες τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή PTC-200 (MJ-Research) όπου και επωάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε παραπάνω.

Η πρώτη μέθοδος two tube-two step RT-PCR εφαρμόστηκε αρχικά για τη διάγνωση του ASSVd ξεκινώντας με την επιλογή του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ολικό RNA. Στη συνέχεια ακολούθησε βελτιστοποίηση της μεθόδου όσον αφορά τον τύπο της αντίστροφης μεταγραφάσης (0.4 μονάδες AMV [Finnzymes, Oy, Espoo, Finland] ή M-MLV (Invitrogen), το είδος και τη συγκέντρωση των αποδιατακτικών στην RT (DMSO 5% [o/o], betaine 1 M, tetramethylene sulfoxide [TMSO] 0.4, 0.5, 0.6 M) και την PCR (DMSO 5% [o/o], betaine 1 M, tetramethylene sulfoxide [TMSO] 0.6 M) και το είδος του εκμαγείου (εκχύλισμα φυτικού χυμού ή t-RNA [μέθοδος φαινόλης-χλωροφορμίου, μέθοδος οξειδίου του πυριτίου). Στη συνέχεια το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε για τη ανίχνευση των PBCVd και PLMVd με σκοπό την επιλογή εκκινητών και τον έλεγχο δειγμάτων.

3.3.4. Ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR

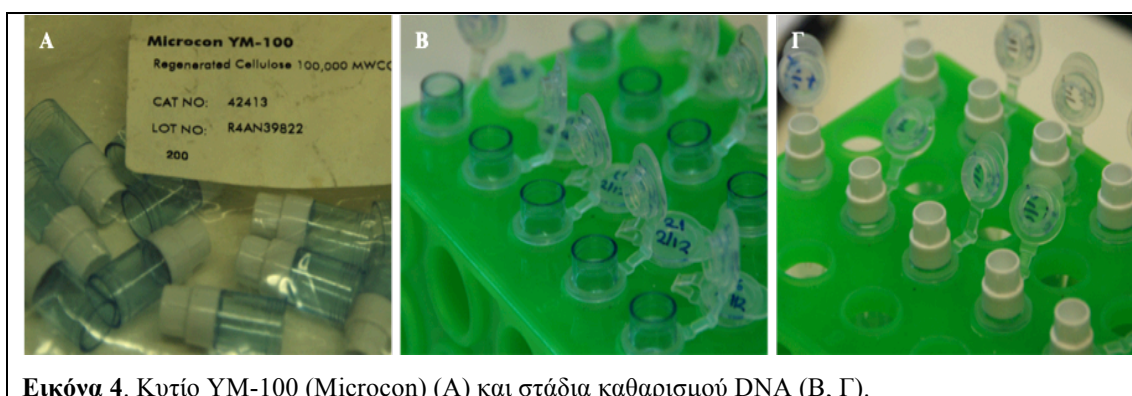
Για την ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφορήσεως σε ουδέτερο πήγμα αγαρόζης. Για την παρασκευή του πήγματος, αγαρόζη υψηλής καθαρότητας UltraPure™ (Invitrogen) προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 1.5 % (β/ο) σε διάλυμα 1xTAE (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA pH: 8.3). Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού και αφού κρύωσε (50 °C) επιστρώθηκε σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφορήσεως Wide Mini-Sub cell GT Gell (Biorad Laboratories Inc., California, USA) όπου με τη βοήθεια ειδικών χτενιών δημιουργήθηκαν τα φρεάτια εφαρμογής των δειγμάτων. Μετά την πλήρη πήξη του πήγματος, η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα 1xTAE και εν συνεχεία 10 μl του προϊόντος της αντιδράσεως PCR αναμίχθηκαν με 2 μl διαλύματος εφαρμογής δειγμάτων (loading buffer) (0.2 % [β/ο] xylene cyanol, 0.32 % [β/ο] bromophenol blue και 60 % [o/o] γλυκερόλη) και τοποθετήθηκαν στα φρεάτια. Σε κάθε πήγμα πέραν των δειγμάτων τοποθετήθηκε και ένας δείκτης μοριακών βαρών (molecular weight marker) που περιείχε τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους (100 ή 250 bp DNA ladder, New England Biolabs, Hertfordshire, England, UK). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε τάση 100 volt επί περίπου 50 λεπτά. Στη συνέχεια το πήγμα εμβαπτίστηκε σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium bromide, Et-Br) συγκεντρώσεως 0.5 mg/ml και επωάστηκε επί περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της επώσεως το βρωμιούχο αιθίδιο εισχωρεί μεταξύ των επάλληλων βάσεων του DNA. Η θέση του DNA γινόταν ορατή με τοποθέτηση του πήγματος κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία σε τράπεζα φθορισμού (UV Transilluminator,

Life Technologies, MD, USA). Το μέγεθος των τμημάτων DNA καθορίστηκε μετά από σύγκρισή τους με το δείκτη μοριακών βαρών.

3.4. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας προϊόντων RT-PCR

3.4.1. Καθαρισμός των προϊόντων της RT-PCR

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί απ' ευθείας προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της RT-PCR (δινηματιδιακό DNA), έπρεπε να προηγηθεί καθαρισμός αυτών από διμερή εκκινητών (primer dimers), dNTPs, *Taq* DNA πολυμεράση και άλλα συστατικά της PCR. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το κυτίο Microcon YM-100 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) (Εικόνα 4), το οποίο βασίζεται στη χρήση ειδικά σχεδιασμένων στηλών που περιέχουν εγκάρσια μεμβράνη που επιτρέπει την απομάκρυνση προϊόντων δινηματιδιακού DNA ή RNA (double stranded, ds DNA ή RNA) μεγέθους μέχρι και 125 ζευγών βάσεων (ζβ). Το πρωτόκολλο είχε αναλυτικά ως εξής: Αρχικά το διάλυμα κάθε αντιδράσεως PCR μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml (Eppendorf) (Εικόνα 4A) και προστέθηκε νερό DEPC μέχρι τελικού όγκου 500 μl. Στη συνέχεια, το νέο διάλυμα μεταφέρθηκε με προσοχή ώστε να μη διαταραχθεί η μεμβράνη εντός της στήλης (διαφανές τμήμα προς τα επάνω (Εικόνα 4B), η οποία προηγουμένως είχε προσαρμοστεί σε ειδικό μικροσωλήνα 1.5 ml τύπου eppendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 5000 g επί 12 λεπτά. Το διήθημα απορρίφθηκε και η στήλη αντιστράφηκε (λευκό τμήμα προς τα επάνω), τοποθετήθηκε σε νέο μικροσωλήνα (Εικόνα 4Γ) και ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση στα 1000 g επί τρία λεπτά. Στο καθαρό προϊόν που παραλήφθηκε με το διήθημα προστέθηκε νερό DEPC μέχρι τελικού όγκου 15 μl και 2 μl από αυτά χρησιμοποιήθηκαν για το προσδιορισμό της συγκεντρώσεως (οπτική πυκνότητα, optical density, OD) και της ποιότητας του DNA με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) (Εικόνα 5).



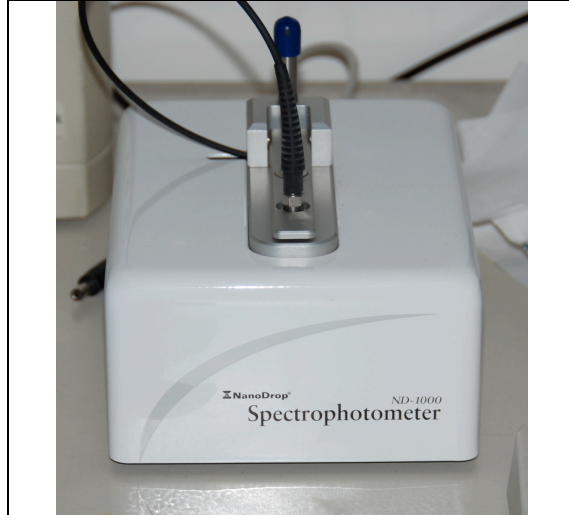
Εικόνα 4. Κυτίο YM-100 (Microcon) (A) και στάδια καθαρισμού DNA (B, Γ).

3.4.2. Αλληλούχηση προϊόντων PCR

Ο απ' ευθείας προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR έγινε με τη μέθοδο αλληλούχησης Sanger *et al.*, (1977), στο γενετικό αναλυτή ABI

3730 xi (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 96 θέσεων της εταιρείας Lark (Lark Technologies, Hope End, Essex, England, UK). Για την αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση 50 ng/μl (10 μl τουλάχιστον) ή 50 ng καθαρού προϊόντος PCR και 0.8 μM (10 μl) κάθε εξειδικευμένου εκκινητή. Η ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγινε και προς τις δύο κατευθύνσεις χρησιμοποιώντας και τους δύο εκκινητές κάθε ζεύγους.

Για την αλληλούχηση των παραλλαγών των ιοειδών ASSVd PBCVd και PLMVd χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα οι εκκινητές ASSVdf3/ASSVdr4, PBCVdh/PBCVdc και PLMVdhL/PLMVdcL. Οι αλληλουχίες εξετάστηκαν για ομοιότητες με τις ήδη καταχωρημένες στη βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) με την εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



Εικόνα 5. Φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA).

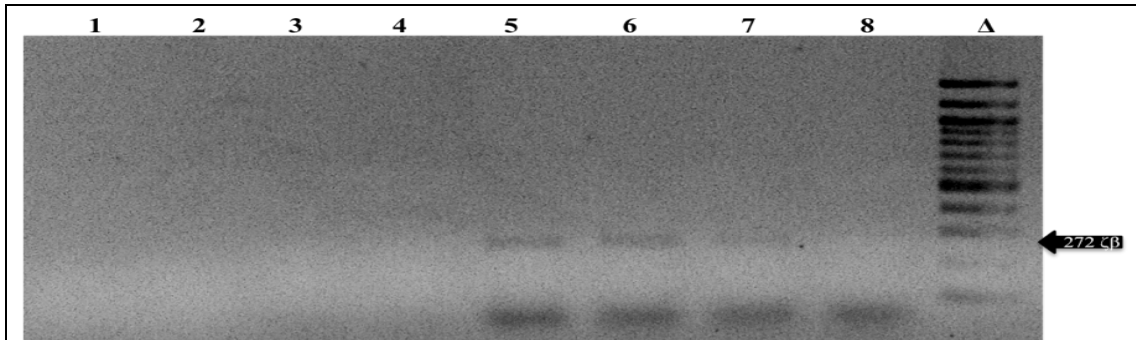
4. Αποτελέσματα

Στόχο του παρόντος κεφαλαίου αποτέλεσε ο έλεγχος της παρουσίας των ιοειδών ASSVd, PBCVd και PLMVd στην Ελλάδα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ως κύριο διαγνωστικό μέσο η RT-PCR. Ο έλεγχος των δειγμάτων ξεκίνησε με το ASSVd και ακολούθησε για τα PBCVd και PLMVd αφού προηγήθηκε η επιλογή του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών και η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου two tube-two step RT-PCR όσον αφορά την αντίστροφη μεταγραφάση, τη χρήση αποδιατακτικών και το είδος του εκμαγείου. Ο έλεγχος των δειγμάτων ολοκληρώθηκε με την επιβεβαίωση ορισμένων εκ των αποτελεσμάτων της RT-PCR με απ' ευθείας αλληλούχηση των προϊόντων αυτής.

4.1. ASSVd

4.1.1. Εκκινητές

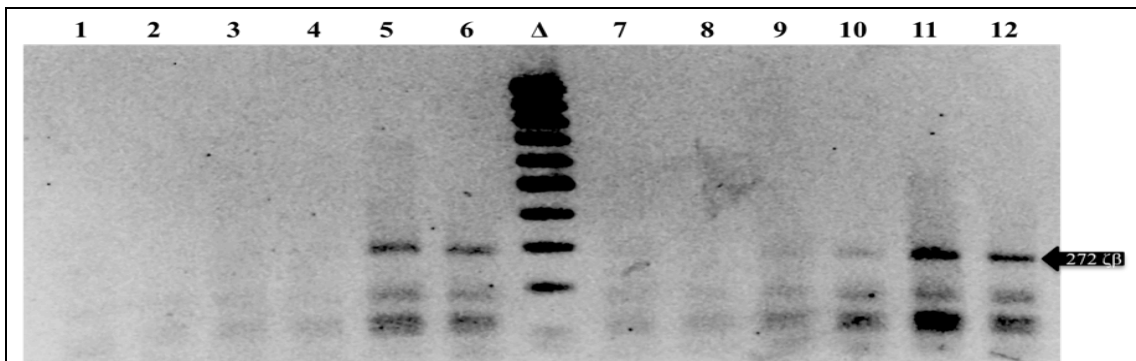
Από τα δύο ζεύγη εκκινητών που επιλέχθηκαν εδώ για τη διάγνωση του ASSVd με τη βοήθεια της RT-PCR, τα ASSVdh/ASSVdc (Hadidi and Yang 1990) και ASSVdf3/ASSVdr4, μόνο το δεύτερο έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα τόσο για το θετικό όσο και για τον αρνητικό μάρτυρα. Αντίθετα, το ζεύγος ASSVdh/ASSVdc δεν αντέδρασε καθόλου (Εικόνα 6).



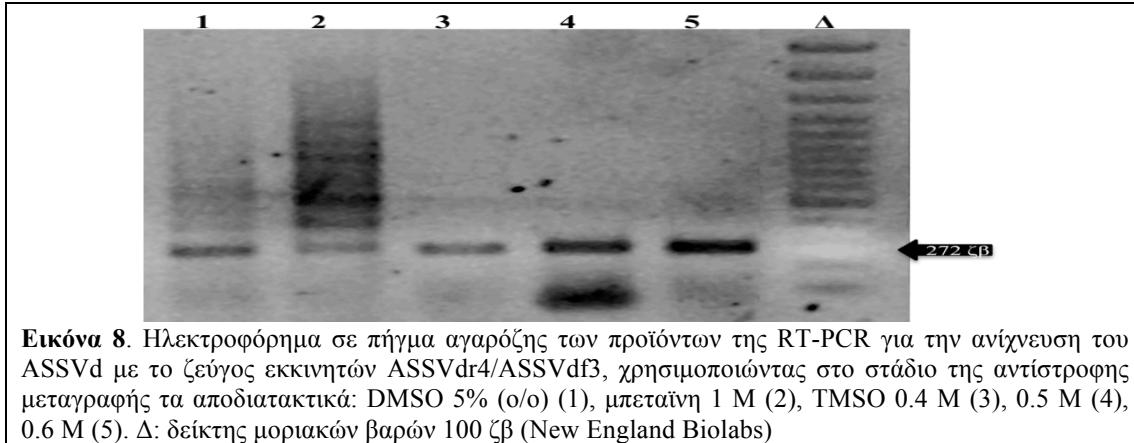
Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αгарόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του ASSVd χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών ASSVdc/ASSVdh (Hadidi and Yang 1990 (1-4), και ASSVdr4/ASSVdf3 (5-8). Διαδρομές 1-3 και 5-7: ολικό RNA (tRNA) θετικού μάρτυρα ASSVd, διαδρομές 4, 8: αρνητικός μάρτυρας, Δ: δείκτης μοριακών βαρών 100 ζβ (New England Biolabs)

4.1.2. Βελτιστοποίηση της RT-PCR

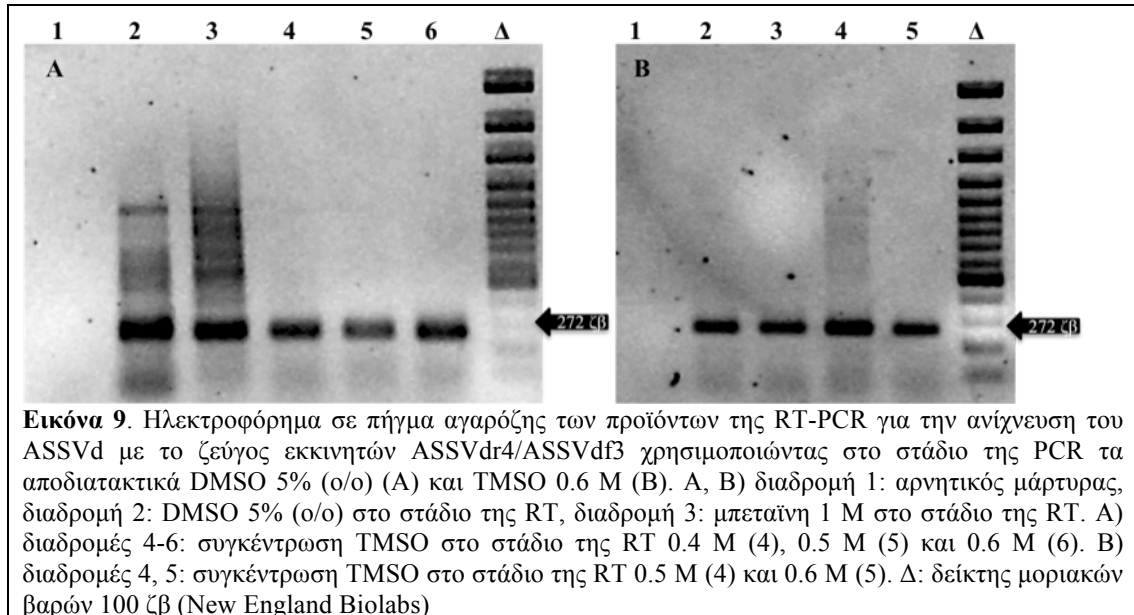
Μπορεί το ζεύγος ASSVdf3/ASSVdr4 να αντέδρασε θετικά, η ένταση όμως του σήματος ήταν χαμηλή και γι' αυτό κρίθηκε σκόπιμη η βελτιστοποίηση της μεθόδου, επικεντρώνοντας στο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής. Αρχικά, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα των αντίστροφων μεταγραφασών AMV και M-MLV με ή χωρίς την παρουσία 5 % (ο/ο) του αποδιατακτικού DMSO. Σύμφωνα με την Εικόνα 7, η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της M-MLV έναντι της AMV ήταν σαφής, ιδιαίτερα παρουσία του αποδιατακτικού το οποίο φάνηκε να βελτιώνει, εν μέρει όμως, και τη δράση της AMV. Δεδομένης της θετικής επιδράσεως που είχε στην παραπάνω δοκιμή η προσθήκη αποδιατακτικού στην RT, αξιολογήθηκε η επίδραση της προσθήκης δύο ακόμη αποδιατακτικών, της betaine σε συγκέντρωση 1 M και του TMSO στις συγκεντρώσεις 0.4, 0.5 και 0.6 M σε σύγκριση με αυτή του 5 % (ο/ο) DMSO. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8, η προσθήκη TMSO στο διάλυμα αντιδράσεως RT και ιδιαίτερα η συγκέντρωση 0.6 M βελτίωσε σημαντικά την αποτελεσματικότητα της μεθόδου για την ανίχνευση του ASSVd σε σχέση με τα άλλα αποδιατακτικά. Η προσθήκη TMSO συνέβαλε όχι μόνο στην εξαφάνιση των μη-ειδικών προϊόντων αλλά και στην αύξηση της εντάσεως του σήματος.



Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αгарόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του ASSVd με το ζεύγος εκκινητών ASSVdr4/ASSVdf3 χρησιμοποιώντας στο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής την AMV (Finnzymes) (1-3, 7-9) ή την M-MLV (Invitrogen) (4-6, 10-11), χωρίς (1-6) ή με (7-12) την παρουσία 5% (ο/ο) του αποδιατακτικού DMSO. Δ: δείκτης μοριακών βαρών 100 ζβ (New England Biolabs)



Όταν το TMSO (0.6 M) χρησιμοποιήθηκε στην PCR, τα αποτελέσματα ήσαν ιδιαίτερα ικανοποιητικά, ανεξάρτητα από το είδος του αποδιατακτικού που είχε προηγουμένως χρησιμοποιηθεί στην RT (Εικόνα 9).

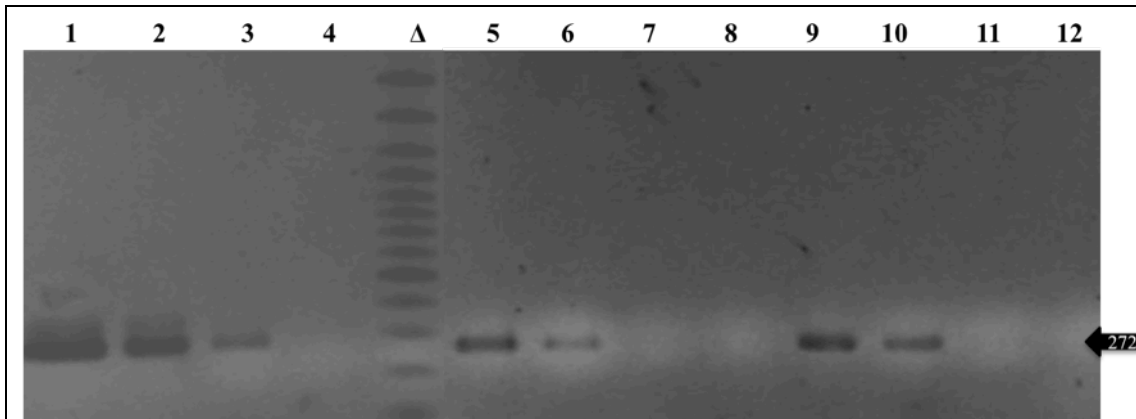


Η ανίχνευση του ASSVd ήταν δυνατή ανεξάρτητα από το είδος του εκμαγείου. Η χρήση εκχυλίσματος φυτικού χυμού ήταν ικανοποιητική και επέτρεψε την ανίχνευση του ιοειδούς μέχρι την αραιώση 10^{-1} , αποτέλεσμα παρόμοιο με εκείνο της χρήσεως ολικού RNA που εκχυλίστηκε με τη μέθοδο των Coffin and Coutts (1992). Μεγαλύτερη ευαισθησία της μεθόδου καταγράφηκε στην περίπτωση χρήσεως ολικού RNA που εκχυλίστηκε με τη μέθοδο Rott and Jelkmann (2001) (Εικόνα 10).

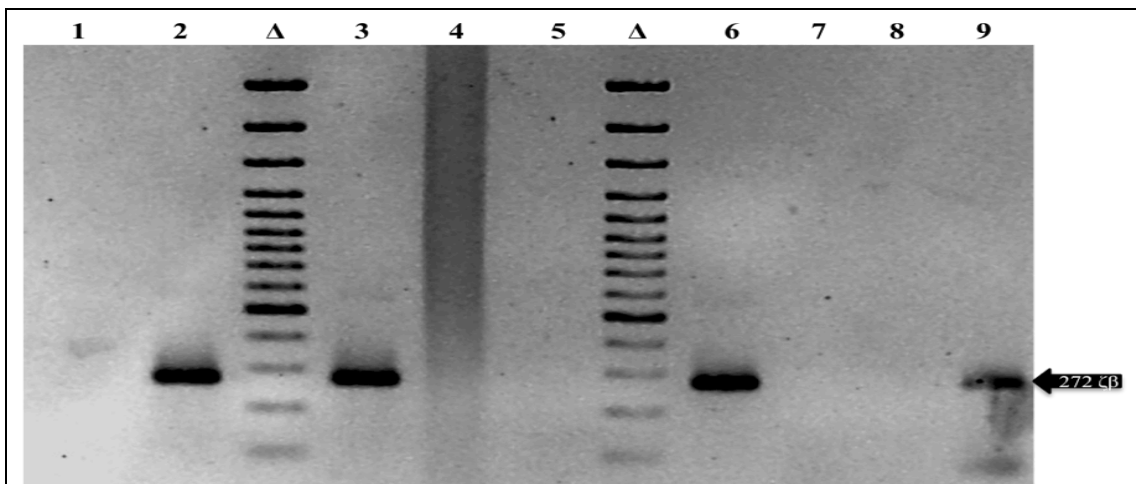
4.1.3. Έλεγχος δειγμάτων

Στον έλεγχο των δειγμάτων για την παρουσία του ASSVd που έγινε με το παραπάνω βελτιωμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ASSVdf3/ASSVdr4,

M-MLV αντί της AMV και TMSO 0.6 M στην RT και την PCR, θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα με μέγεθος προϊόντων ανάλογο με το αναμενόμενο (272-275 ζβ) (Εικόνα 11).



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του ASSVd με το ζεύγος εκκινητών ASSVdr4/ASSVdf3 χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο διαδοχικές αραιώσεις: ολικού RNA (Rott and Jelkmann, 2001) (1-4), εκχυλίσματος φυτικού χυμού (Rowhani *et al.*, 1995) (5-8) και ολικού RNA (Coffin and Coutts 1992) (9-12). Διαδρομές 1, 5, 9: αραιώση 10^0 , διαδρομές 2, 6, 10: αραιώση 10^{-1} , διαδρομές 3, 7, 11: αραιώση 10^{-2} , διαδρομές 4, 8, 12: αραιώση 10^{-3} . Δ: δείκτης μοριακών βαρών 100 ζβ (New England Biolabs)



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του ASSVd χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών ASSVdr4/ASSVdf3. Διαδρομή 1: αρνητικός μάρτυρας, διαδρομή 2: θετικός μάρτυρας, διαδρομή 3-4: μηλιά, διαδρομή 5-6: απιδιά, διαδρομή 7: κυδωνιά, διαδρομή 8: άγρια απιδιά και διαδρομή 9: άγρια μηλιά. Δ: δείκτης μοριακών βαρών 100 ζβ (New England Biolabs)

Το ASSVd ανιχνεύθηκε συνολικά σε 29 από τα 131 ελεγχθέντα δείγματα, που αντιστοιχεί σε ποσοστό 22 %. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκε σε επτά μηλιές (σύνολο 16, 45 %), οχτώ απιδιές (σύνολο 20, 40 %), έξι άγριες μηλιές (σύνολο 8, 75%) και οχτώ άγριες απιδιές (σύνολο 36, 22 %), ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα καλλιεργούμενα ή αυτοφυή είδη πυρηνοκάρπων (Πίνακας 3). Όλα τα δείγματα που έφεραν στους καρπούς τους χαρακτηριστικά συμπτώματα εσχάρωσης του φλοιού (Εικόνα 1) βρέθηκαν θετικά, με εξαίρεση δύο δείγματα μιας άγνωστης πράσινης ποικιλίας μηλιάς από την περιοχή Ανδρίτσεινας Ηλείας. Η μηλιά βρέθηκε ξενιστής του ASSVd στην Κορινθία (Μάννα),

Αρκαδία (Ασσέα) και Μαγνησία (Ζαγορά), η απιδιά στην Τροιζηνία (Καρατζάς), Κορινθία (Κλένια), Αρκαδία (Καρύταινα) και Μαγνησία (Ζαγορά), η άγρια απιδιά στην Τροιζηνία (Καρατζάς), το Κιλκίς (Σκρα) και την Αρκαδία (Καρύταινα) και, τέλος, η άγρια μηλιά στο Κιλκίς (Σκρα).

Πίνακας 3. Αποτελέσματα RT-PCR για την παρουσία των ιοειδών ASSVd, PBCVd και PLMVd σε καλλιεργούμενα και αυτοφυή είδη μηλοειδών και πυρηνοκάρπων

Φυτικό είδος	Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν	Αριθμός δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά (%)		
		ASSVd	PBCVd	PLMVd
Μηλιά	16	7 (43%)	0	0
Απιδιά	20	8 (40%)	8 (40%)	2 (10%)
Κυδωνιά	4	0	4 (100%)	0
Άγρια μηλιά	8	6 (75%)	0	0
Άγρια απιδιά	36	8 (22%)	20 (55%)	2 (5%)
Βερικοκιά	12	0	0	3 (25%)
Ροδακινιά	15	0	0	10 (66%)
Κερασιά	4	0	0	0
Κράταιγος	12	0	2 (16%)	0
Άγρια κορομηλιά	4	0	0	0
Σύνολο	131	29 (22%)	44 (35%)	17 (13%)

4.1.4. Αλληλούχηση προϊόντων PCR

Απ' ευθείας προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων RT-PCR των δειγμάτων μηλιάς (No. 77, Ζαγορά), απιδιάς (No. 41, Καρατζάς), άγριας μηλιάς (No. 14, Σκρα), άγριας απιδιάς (No. 42, Καρατζάς) και μηλιάς (No. 84, Ασσέα) και σύγκρισή της με τις γνωστές και ήδη δημοσιευμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ελληνικών και διεθνών απομονώσεων του ASSVd έδειξε πως πρόκειται για παραλλαγές του ιοειδούς αυτού. Χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ASSVdf3/ASSVdr4 δεν αλληλουχήθηκε το σύνολο του γενώματος του ιοειδούς αλλά μέρος του το οποίο αποτελείτο από τα τμήματα 1°-79° ή 80° νουκλεοτίδιο (nucleotide, nt) και 138°-329° ή 330° ή 332° nt (Πίνακας 4). Οι παραλλαγές του ASSVd που αλληλουχήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσίασαν ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους (100-99 %) όσο και με την πρότυπη παραλλαγή Y00435 του ιοειδούς (Hashimoto and Koganezawa, 1987) (99-98 %). Όσον αφορά τις ήδη γνωστές ελληνικές παραλλαγές, το υψηλότερο ποσοστό ομολογίας (99 %) καταγράφηκε με την FJ974104 (599 άγρια μηλιά, Πέλλα, Karoni *et al.*, 2009). Οι αλληλουχίες ASSVd που προσδιορίστηκαν παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

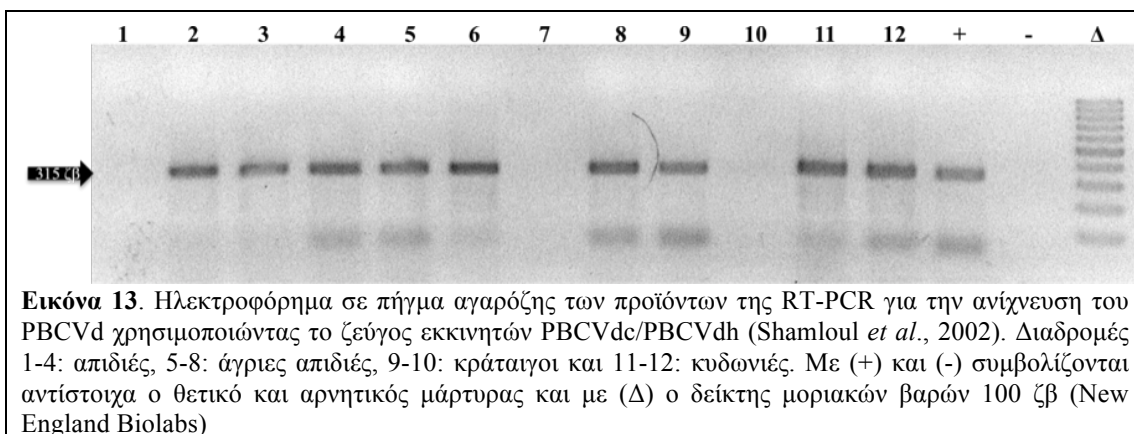
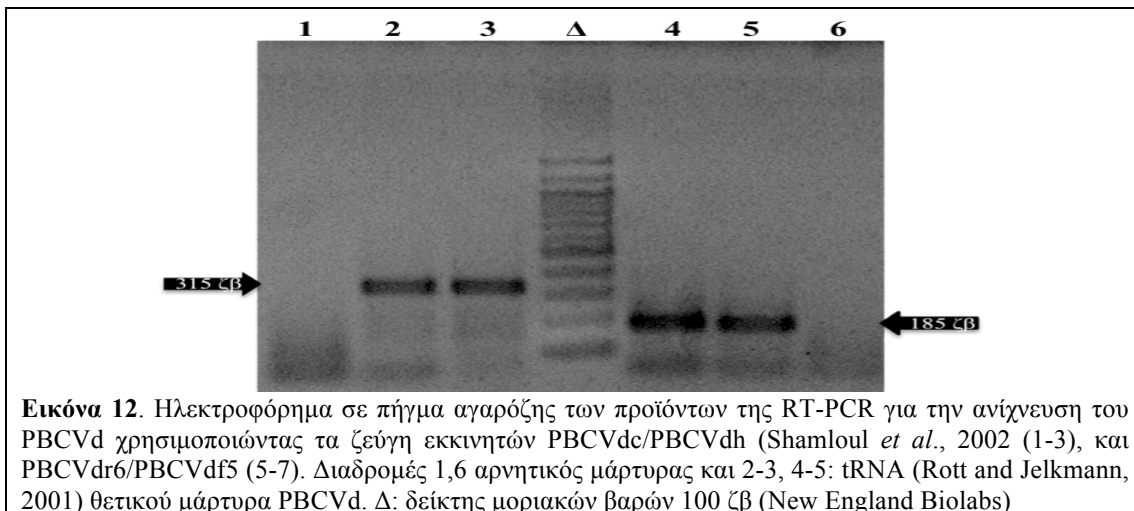
Πίνακας 4. Σχέση των παραλλαγών ASSVd που αποκτήθηκαν στη παρούσα εργασία μεταξύ τους καθώς και με άλλες ήδη καταχωρημένες στη βάση δεδομένων

Παραλλαγές ASSVd	Μήκος (nt)	Αριθμός νουκλεοτιδικών διαφορών / % ομολογίας					
		ASSVd77apple	ASSVd41pear	ASSVd14w.apple	ASSVd42w.pear	ASSVd82apple	ASSVd14w.apple
ASSVd77apple (μηλιά Ζαγορά)	271 (1-80, 138-329)	-	2 / 99	1 / 99	3 / 98	4 / 98	4 / 98
ASSVd41pear (απιδιά Καρατζάς)	271 (1-80, 138-329)		-	1 / 99	3 / 98	4 / 98	4 / 98
ASSVd14w.apple (άγρια μηλιά Σκρρα)	272 (1-80, 138-330)			-	2 / 99	3 / 98	3 / 98
ASSVd42w.pear (άγρια απιδιά Καρατζάς)	271 (1-79, 138-330)				-	4 / 98	4 / 98
ASSVd82apple (μηλιά Ασσέα)	275 (1-80, 138-333)					-	-
Y00435 (Hashimoto and Konganezawa 1987)	330 (1-330)	3 / 98	3 / 98	2 / 99	3 / 98	5 / 98	5 / 98
FJ974101 (μηλιά Πελλά, Kaponi et al., 2009)	330 (1-330)	1 / 99	1 / 99	0 / 100	2 / 99	3 / 98	3 / 98

4.2. PBCVd

4.2.1. Εκκινητές-έλεγχος δειγμάτων

Χρησιμοποιώντας το βελτιωμένο πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω έγινε η επιλογή του ζεύγους εκκινητών για την ανίχνευση του PBCVd. Από τα ζεύγη εκκινητών PBCVdh/PBCVdc (Shamloul *et al.*, 2002) και PBCVdf5/PBCVdr6 που εξετάστηκαν, αν και παρουσίασαν παρόμοια αποτελεσματικότητα, επιλέχθηκε το πρώτο καθώς παρέχει επιπλέον τη δυνατότητα ενισχύσεως όλου του γενώματος του ιοειδούς (315 nt) (Εικόνα 12). Εξετάστηκαν συνολικά 131 δείγματα καλλιεργούμενων και αυτοφυών μηλοειδών και πυρηνοκάρπων από τα οποία τα 44 (35 %) βρέθηκαν μολυσμένα. Αναλυτικά το ιοειδές ανιχνεύθηκε σε οχτώ δείγματα (40 %) απιδιάς στην Τροιζηνία (Καρατζάς), Κορινθία (Κλένια), Αρκαδία (Καρύταινα) και Ναυπακτία (Στρούτζα), σε τέσσερα (100 %) δείγματα κυδωνιάς στη Τροιζηνία (Καρατζάς), σε 20 (50 %) δείγματα άγριας απιδιάς σε όλες τις περιοχές δειγματοληψίας (Αδρίτσαίνα, Καρατζάς, Καρύταινα, Σκρα, Στρούτζα) και σε δύο δείγματα κράταιγου στο Κιλκίς (Σκρα) και τη Ναυπακτία (Στρούτζα) αντίστοιχα (Εικόνα 13). Όλα τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά στο ιοειδές έφεραν στον κεντρικό κορμό και τους κλάδους χαρακτηριστικά συμπτώματα εξανθηματικού φλοιού (Εικόνα 2).



4.2.2. Αλληλούχηση προϊόντων PCR

Απ' ευθείας προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων RT-PCR των δειγμάτων απιδιάς (No. 40, Καρατζάς), κυδωνιάς (No. 40, Καρατζάς) και κράταιγου (No. 23, Στρούτζα) και σύγκρισή της με τις ήδη γνωστές αλληλουχίες ελληνικών και διεθνών παραλλαγών του PBCVd έδειξε ότι πρόκειται για παραλλαγές του ιοειδούς αυτού. Με τη βοήθεια των εκκινητών PBCVdh/PBCVdc αποκτήθηκε το σύνολο του γενώματος μεγέθους 314 περίπου νουκλεοτιδίων. Μεταξύ των τριών παραπάνω παραλλαγών η ομολογία κυμάνθηκε από 98 έως 95 %. Οι παραλλαγές PBCVd40pear και PBCVd23crataegus ήσαν οι πιο απομακρυσμένες (17 διαφορές νουκλεοτιδίων, 95 % ομολογία), ενώ οι PBCVd40quince και PBCVd23crataegus οι πιο συγγενείς (6 διαφορές, 98 % ομολογία). Επίσης οι παραλλαγές διαφοροποιήθηκαν σημαντικά από την αλληλουχία αναφοράς D12823 (Hernandez *et al.*, 1992) και η ομολογία κυμάνθηκε μεταξύ 90 % (PBCVd23crataegus) και 93 % (PBCVd40pear). Η παραλλαγή PBCVd40pear εμφάνισε υψηλό βαθμό ομολογίας με την ελληνική παραλλαγή FJ974083 (290 απιδιά, Τροιζηνία) ενώ, οι παραλλαγές PBCVd40quince και PBCVd23crataegus με την επίσης ελληνική παραλλαγή FJ974084 (292 κυδωνιά, Καρατζάς) (Karoni *et al.*, 2009) (Πίνακας 5). Οι αλληλουχίες PBCVd που προσδιορίστηκαν παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

Πίνακας 5. Σχέση των παραλλαγών PBCVd που αποκτήθηκαν στην παρούσα εργασία μεταξύ τους και με άλλες ήδη καταχωρημένες στη βάση δεδομένων

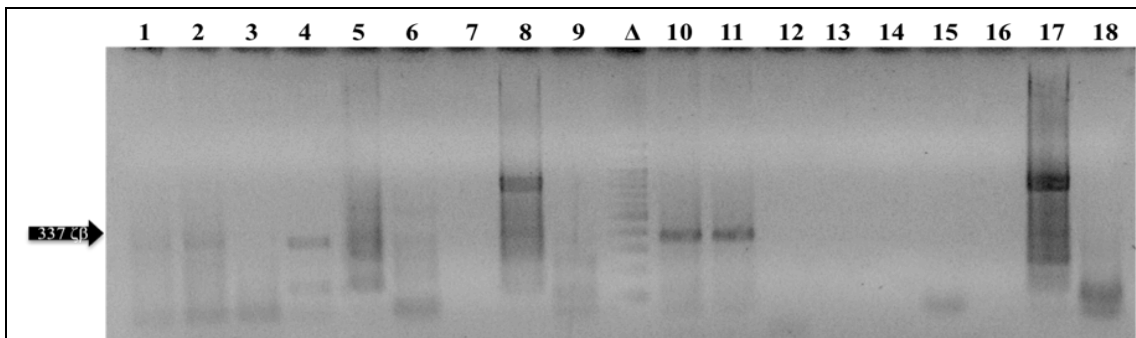
Παραλλαγές PBCVd	Μήκος (nt)	Αριθμός νουκλεοτιδικών διαφορών / % ομολογίας		
		PBCVd40pear	PBCVd40quince	PBCVd23crataegus
PBCVd40pear (απιδιά Καρατζάς)	314	-	11 / 97	17 / 95
PBCVd40quince (κυδωνιά Καρατζάς)	314	-	-	6 / 98
PBCVd23crataegus (Κράταιγος Στρούτζα)	314	-	-	-
D12823 (απιδιά Ισπανία, Hernandez <i>et al.</i> , 1992)	315	22 / 93	24 / 92	30 / 90
FJ974083 (απιδιά 290 Τροιζηνία, Karoni <i>et al.</i> , 2009)	314	1 / 99	12 / 96	18 / 94
FJ974084 (κυδωνιά Καρατζάς, Karoni <i>et al.</i> , 2009)	314	12 / 96	1 / 99	7 / 98

4.3. PLMVd

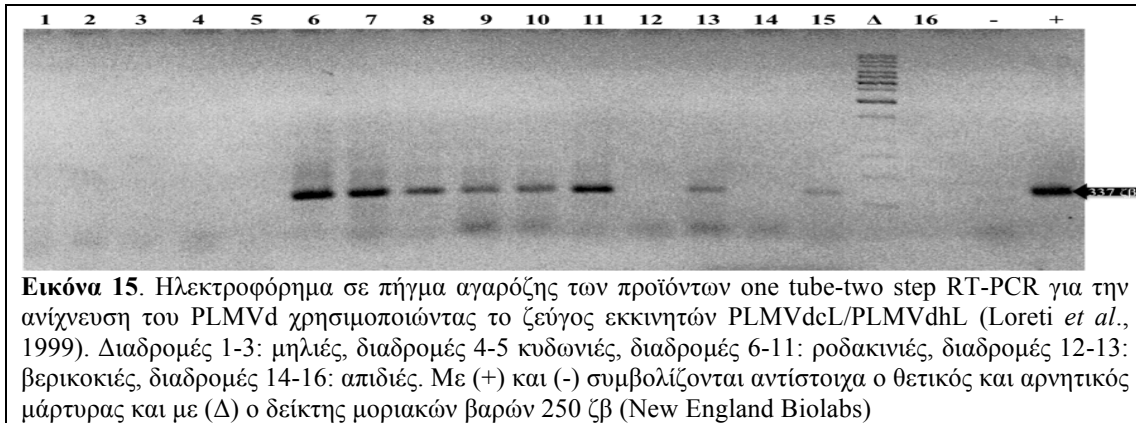
4.3.1. Εκκινητές-πρωτόκολλο RT-PCR-έλεγχος δειγμάτων

Στο παρόν κεφάλαιο, για την επιλογή του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών μεταξύ των τριών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, εφαρμόστηκαν δύο ξεχωριστά πρωτόκολλα RT-PCR. Στο πρώτο (two-tube-two step), τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά για κανένα ζεύγος εκκινητών. Στο πρωτόκολλο αυτό, το ζεύγος εκκινητών PLMVdhL/PLMVdcL (Loreti *et al.*, 1999) έδωσε για τον θετικό μάρτυρα προϊόν μεγέθους ανάλογου με το αναμενόμενο (337 ζβ), με την ένταση των ζωνών να είναι χαμηλή, ενώ πολλά ήταν τα παραπροϊόντα στην περίπτωση των εκκινητών PLMVdh/PLMVdc (Shamloul *et al.*, 1995) και PLMVdf3/PLMVdf4 (Εικόνα 14). Όταν εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο RT-PCR σε κοινό μικροσωλήνα (one tube-two step) η απόδοση του ζεύγους PLMVdhL/PLMVdcL βελτιώθηκε σημαντικά, κάτι το οποίο όμως δεν συνέβη και για τα άλλα δύο ζεύγη (Εικόνα 14). Χρησιμοποιώντας το παραπάνω ζεύγος εκκινητών και το πρωτόκολλο σε κοινό μικροσωλήνα ελέγχθηκαν συνολικά 131 δείγματα, από τα οποία το PLMVd ανιχνεύθηκε στα 17 (Πίνακας 3, Εικόνα 15). Το υψηλότερο ποσοστό 66 % (10/15) θετικών καταγράφηκε στα δείγματα ροδακινιάς, ενώ επίσης θετικά βρέθηκαν τρία δείγματα βερικοκιάς (σύνολο 12, 25 %), δύο απιδιάς (σύνολο 20, 10 %) και δύο άγριας απιδιάς (σύνολο 36, 5%).

Όσον αφορά τα συμπτώματα των θετικών δειγμάτων, ορισμένες ροδακινιές έφεραν στους καρπούς τους σχισμές στις ραφές και κάποιες άλλες κιτρινοπράσινο μωσαϊκό στα φύλλα (Εικόνα 3). Οι καλλιεργούμενες και άγριες απιδιές προήλθαν από την περιοχή Καρατζά Τροιζηνιάς, ενώ οι βερικοκιάς και ροδακινιές από οπωρώνες των περιοχών Κλένια, Μάννα και Άγιος Βασίλειος Κορινθίας.



Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της two tube-two step RT-PCR (1-9) και one tube-two step RT-PCR (10-18) για την ανίχνευση του PLMVd χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών PLMVdcL/PLMVdhL (Loreti *et al.*,1999) (1-3, 10-12), PLMVdc/PLMVdh (Shamlou *et al.*,1995) (4-6, 13-15) και PLMVdr6/PLMVdf5 (7-9, 16-18). Διαδρομές 1-2, 4-5, 7-8, 10-11, 13-14, 16-17: tRNA (Rott and Jelkmann, 2001) θετικού μάρτυρα PLMVd. Διαδρομές 3, 6, 9, 12, 15, 18: αρνητικός μάρτυρας, Δ: δείκτης μοριακών βαρών 100 ζβ (New England Biolabs)



4.3.2. Αλληλούχηση προϊόντων PCR

Απ' ευθείας προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων RT-PCR των δειγμάτων βερικοκιάς (No. 8, Κλένια), απιδιάς (No. 41, Καρατζάς), ροδακινιάς (No. 61, Κλένια), ροδακινιάς (No. 1, Άγιος Βασίλειος) και άγριας απιδιάς (No. 3, Καρατζάς) και σύγκρισή της με τις ήδη γνωστές αλληλουχίες ελληνικών και διεθνών παραλλαγών του PLMVd έδειξε πως πρόκειται για παραλλαγές του ιοειδούς αυτού. Με τη βοήθεια των εκκινητών PLMVdhL/PLMVdcL αποκτήθηκαν πλήρεις αλληλουχίες του ιοειδούς μήκους το οποίο κυμάνθηκε μεταξύ 338 και 342 nt. Εξαίρεση αποτέλεσε η παραλλαγή PLMVd3wildpear, η οποία κάλυπτε τμήμα του γενώματος του PLMVd από το 117^ο ως και το 338^ο νουκλεοτίδιο. Η ομολογία μεταξύ των παραπάνω παραλλαγών κυμάνθηκε από 85 έως 96 %, με τις παραλλαγές PLMVd41pear, PLMVd61peach και PLMVd1peachKal να εμφανίζουν τον υψηλότερο βαθμό ομολογίας μεταξύ τους. Εξ άλλου, οι παραλλαγές PLMVd3wildpear και ιδιαίτερα η PLMVd8arpicot ήταν οι πιο απομακρυσμένες. Μάλιστα η τελευταία παρουσίασε ποσοστό ομολογίας με την τυπική παραλλαγή M835445 (Hernandez and Flores 1992) μόνο 83 % (> 60 διαφορές), ενώ οι υπόλοιπες 88-94 % (Πίνακας 6). Σύγκριση των νουκλεοτιδικών μας αλληλουχιών με ήδη καταχωρημένες στη βάση δεδομένων έδειξε πως πιο συγγενής με την παραλλαγή PLMVd8arpicot ήταν η EU708823 (νεκταρινιά cv. Independence, Τουρκία) (Gazel *et al.*, 2008) με ποσοστό ομολογίας 88 %. Οι διεθνείς παραλλαγές που παρουσίασαν τον υψηλότερο βαθμό ομολογίας με τις αποκτηθείσες στη παρούσα εργασία παρουσιάζονται στο Πίνακα 6. Οι αλληλουχίες PLMVd που προσδιορίστηκαν παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

5. Συζήτηση

Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ιοειδών ανεξάρτητα της ταξινομικής ομάδας στην οποία αυτά ανήκουν είναι ο υψηλός βαθμός ενδομοριακής συμπληρωματικότητας, ο οποίος τους προσφέρει χαρακτηριστική δομή ευθύγραμμου ή διακλαδισμένου δινηματιδιακού ραβδίου.

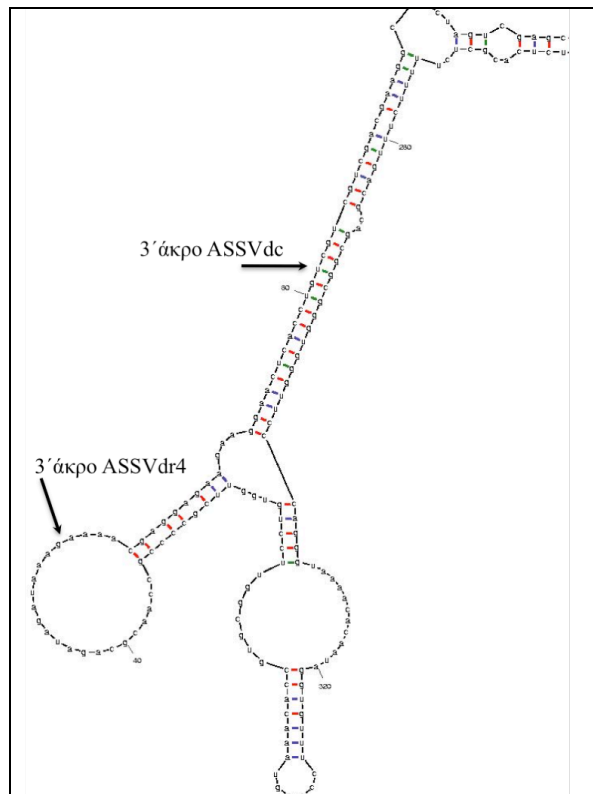
Πίνακας 6. Σχέση των παραλλαγών PLMVd που αποκλήθηκαν στη παρούσα εργασία, μετάξυ τους καθώς και με άλλες ήδη καταχωρημένες στη βάση δεδομένων

Παραλλαγές PLMVd	Μήκος (nt)	Ξένες παραλλαγές με υψηλό Αριθμός νουκλεοτιδικών διαφορών / % ομολογίας						
		% ομολογίας με τις αποκλιθήσεις	PLMVd8apricot	PLMVd41pear	PLMVd61peach	PLMVdKal	PLMVd3wildpear	
PLMVd8apricot (βερικοκιά Κλένια)	340	EU708823 (νεκταρινιά cv.Independence, Τουρκία) 88%	-	50 / 85	47 / 86	52 / 85	32 / 85	
PLMVd41pear (απιδιά Καρσάζας)	342	AF170511 (ροδακινιά cv. Harrow Beauty, Β. Αμερική) 97%	-	-	16 / 95	18 / 95	26 / 88	
PLMVd61peach (ροδακινιά Κλένια)	338	DQ680722 (ροδακινιά Plate de Chine, Τωνησία) 98%	-	-	-	14 / 96	21 / 91	
PLMVd1Kal (ροδακινιά Άγιος Βασίλειος)	339	GQ872129 (ροδακινιά cv. Crimson Lady, Ιταλία) 98%	-	-	-	-	21 / 91	
PLMVd3wildpear (απιδιά Καρσάζας)	221 (117-338)	EU708818 (ροδακινιά cv.Karacabey, Τουρκία) 92%	-	-	-	-	-	
M83545 (Hernandez and Flores 1992)	337		60 / 83	25 / 92	22 / 93	20 / 94	24 / 89	

Συχνά όμως η δευτεροταγής δομή δημιουργεί προβλήματα στην RT όταν εμποδίζει την πρόσβαση και τον επιτυχή υβριδισμό του καθοδικού εκκινητή. Το πρόβλημα γίνεται ακόμη πιο οξύ όταν η δευτεροταγής δομή εμποδίζει τον υβριδισμό του άκρου 3' του εκκινητή. Με βάση λοιπόν τα παραπάνω έγινε προσπάθεια, με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος προβλέψεως της δευτεροταγούς δομής mFold (Zuker 2003), να σχεδιαστούν εκκινητές από περιοχές των ιοειδών με ανοιχτή δομή (Εικόνα 16) σε θερμοκρασία περίπου 50 °C ώστε να εξασφαλιστεί ο υβριδισμός του καθοδικού εκκινητή και ιδιαίτερα του άκρου του 3'. Στην περίπτωση του ASSVd, η τακτική αυτή σε συνδυασμό με τη χρήση αποδιατακτικών φαίνεται να απέδωσε καρπούς, καθώς το ζεύγος εκκινητών ASSVdf3/ASSVdr4 έδωσε θετικό αποτέλεσμα σε αντίθεση με το ζεύγος ASSVdh/ASSVdc (Hadidi and Yang 1990). Αιτία φαίνεται να είναι ότι στη θερμοκρασία των 50 °C το τμήμα που υβριδίζεται ο καθοδικός εκκινητής ASSVdc παραμένει δινηματιδιακό (Εικόνα 16).

Σχετικά με τη χρησιμοποίηση των αντίστροφων μεταγραφασών AMV και M-MLV, φάνηκε πως η δεύτερη είναι περισσότερο αποτελεσματική (Εικόνα 7). Εκτός από τη δραστηριότητα πολυμεράσης, τα ένζυμα αυτά έχουν και ακόμη μια ανεξάρτητη δραστηριότητα, εκείνης της RNA-άσης 'H', η οποία εξειδικευμένα αποικοδομεί το RNA σε ένα υβρίδιο RNA/DNA (DeStefano *et al.*, 1991, Wisniewski *et al.*, 2000).

Ένα ακόμη πρόβλημα κατά την αντίστροφη μεταγραφή με τη χρησιμοποίηση ενζύμων (RTases) που προέρχονται από ρετροϊούς είναι οι παύσεις της μεταγραφής που κάνουν σε περιοχές δευτεροταγούς δομής του RNA, με επακόλουθο την αποδέσμευσή τους από το εκμαγείο με παράλληλη δράση RNA-άσης 'H' (Harrison *et al.*, 1998). Ορισμένες από τις παύσεις αυτές είναι μοναδικές για κάθε RTase (DeStefano *et al.*, 1991). Η AMV παρουσιάζει σημαντική δραστηριότητα RNA-άσης 'H', ενώ η M-MLV όχι. Η M-MLV έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα ανιχνεύσεως, πιθανώς γιατί συνεχίζει τη μεταγραφή σε περιοχές δευτεροταγούς δομής του RNA όπου η AMV RTase ίσως κάνει παύσεις.



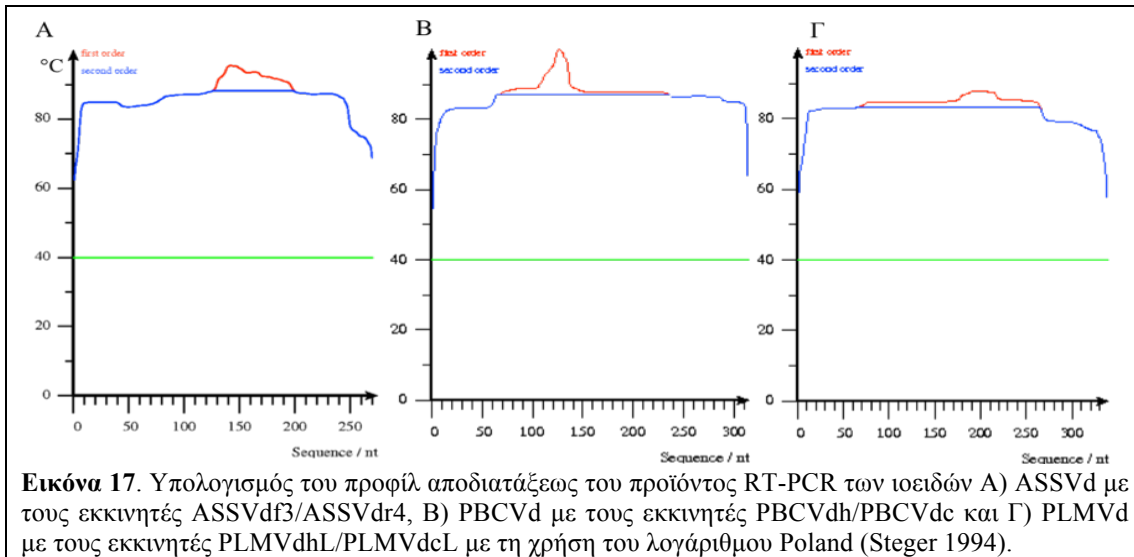
Εικόνα 16. Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της πρότυπης παραλλαγής του ASSVd Y00435, με το λογισμικό πρόγραμμα mFold (Zuker, 2003) στους 50 °C. Με βέλη υποδεικνύεται η θέση του άκρου 3' των καθοδικών εκκινητών ASSVdr4, ASSVdc.

Επίσης, πιθανές παύσεις της μεταγραφής και αποδέσμευση του μορίου από το υβρίδιο RNA/DNA σε περιοχές δευτεροταγούς δομής του RNA στην περίπτωση της M-MLV δεν ακολουθούνται από παράλληλη δράση RN-άσης 'H', σε αντίθεση με την AMV όπου η αποικοδόμηση του RNA εμποδίζει τη συνέχιση της αντίστροφης μεταγραφής από ένα επόμενο μόριο ενζύμου το οποίο θα δεσμευτεί στο σημείο αποδεσμεύσεως του προηγούμενου μορίου. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν καταγραφεί και από τους Ragozzino *et al.*, (2004).

Συχνά προβλήματα μειωμένης αποδόσεως της PCR και παραγωγής μη ειδικών προϊόντων συναντώνται στις περιπτώσεις εκμαγείων με υψηλό βαθμό δευτεροταγούς δομής και περιεκτικότητας σε G:C (MacDowell *et al.*, 1998, Roux 1995) όπως τα ιοειδή. Το προφίλ αποδιατάξεως των προϊόντων RT-PCR των ASSVd, PBCVd και σε μικρότερο βαθμό του PLMVd, τα οποία υπολογίστηκαν με τη χρήση του αλγόριθμου Poland (Steger 1994) (http://www.biophys.uniduesseldorf.de/local/POLAND/_poland.html), δείχνει ότι υπάρχουν περιοχές δινηματιδιακού DNA (με υψηλό ποσοστό % σε G:C) με τοπικά υψηλή θερμοκρασία τήξεως (melting temperature, T_m), με αναμενόμενη συνέπεια την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού του DNA στην PCR (MacDowell *et al.*, 1998) (Εικόνα 17). Δηλαδή, πιθανότατα οι περιοχές αυτές δεν αποδιατάσσονται πλήρως, με αποτέλεσμα τη μείωση της αποδόσεως της PCR. Στην περίπτωση του ASSVd όπου έγινε η μελέτη της επιδράσεως των αποδιατακτικών, διαπιστώθηκε ότι προσθήκη DMSO (Εικόνα 7) συνέβαλε στη βελτίωση της αποδόσεως της PCR αποσταθεροποιώντας τη δευτεροταγή δομή του DNA, κάτι το οποίο ισχύει και για την μπεταϊνη που δρα με παρόμοιο τρόπο, όπως φάνηκε και στη περίπτωση μας (Rees *et al.*, 1993, Geiduschek and Herskovitz 1961) (Εικόνα 10A). Παρ' όλη τη χρήση των δύο παραπάνω αποδιατακτικών παραγόντων, τα αποτελέσματα δεν ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικά και γι' αυτό ανατρέξαμε στη βιβλιογραφία, όπου το TMSO αναφέρεται ως ένα νέο είδος σουλφοξειδίου (sulfoxide) με αποτελεσματικότητα δράσεως σε εκμαγεία με υψηλό ποσοστό % σε G:C πολύ καλύτερη της μπεταϊνης και του DMSO (Chakrabarti and Schutt 2002). Πράγματι, η προσθήκη 0.6 M TMSO στην PCR βελτίωσε σημαντικά την απόδοση της, όχι μόνο εξαφανίζοντας τα μη ειδικά προϊόντα, αλλά αυξάνοντας παράλληλα και την ένταση του σήματος (Εικόνα 10B). Όσον αφορά το PLMVd, η παρουσία τμημάτων δινηματιδιακού DNA με λιγότερο υψηλή T_m σύμφωνα με το προφίλ αποδιατάξεως του προϊόντος RT-PCR (Εικόνα 17Γ), σε σχέση με τα άλλα δύο ιοειδή, δικαιολογεί το γεγονός ότι στην περίπτωση του η χρήση 5% (o/o) DMSO ήταν επαρκής.

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν και συγκρίθηκαν τρεις μέθοδοι εξαγωγής, δύο ολικού RNA (μέθοδος χλωροφορμίου-φαινόλης, μέθοδος οξειδίου του πυριτίου) και μια εκχυλίσματος φυτικού χυμού. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ξεκάθαρα ότι πιο αποτελεσματική μέθοδος ήταν αυτή της εξαγωγής ολικού RNA με τη χρήση SiO_2 (Rott and

Jelkmann 2001), με τις άλλες δύο να παρουσιάζουν παρόμοια μεταξύ τους αλλά μικρότερη ευαισθησία.



Η εξαγωγή ολικού RNA με τη μέθοδο των Coffin and Coutts (1992) αν και είχε δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην περίπτωση ιών ποωδών ξενιστών, όπως ο ιός του ψευδο-ίκτηρου των τεύτλων (*Beet pseudo-yellow virus*, BPYV), (Coffin and Coutts 1992), ο ιός του αφιδομεταδιδόμενου ίκτηρου των κολοκυνθοειδών (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) και ο ιός του χλωρωτικού νανισμού με παραμόρφωση της αγγουριάς (*Cucumber yellow stunting disorder virus*, CYSDV) (Boubourakas *et al.*, 2006), στη περίπτωση μας δεν απέδωσε τα αναμενόμενα. Αυτό πιθανότατα σχετίζεται αφ' ενός με την παρουσία στους ξυλώδεις ξενιστές *Malus*, *Pyrus* και *Prunus* ουσιών όπως οι πολυσακχαρίτες και οι πολυφαινόλες που δρουν ανασταλτικά κατά των ενζύμων της RT-PCR (Fang *et al.*, 1992, Pierpont 1996) και αφ' έτερου με την αδυναμία των μεθόδων που χρησιμοποιούν φαινόλη και SDS, όπως η παραπάνω, να απομακρύνουν τις ουσίες αυτές οι οποίες δεσμεύονται στα νουκλεϊκά οξέα (Van Driessche *et al.*, 1984). Αντίθετα στην περίπτωση του πρωτοκόλλου Rowhani *et al.*, (1995), αν και πρόκειται για εκχύλισμα φυτικού χυμού και όχι για ολικό RNA, τα αποτελέσματα ήσαν παρόμοια με εκείνα του πρωτοκόλλου των Coffin and Coutts (1992). Αυτό συνέβη προφανώς επειδή το διάλυμα ομογενοποίησης περιέχει συστατικά όπως το PVP-40 και το Tween-20 τα οποία, αντίστοιχα, προσροφούν τις πολυφαινόλες (Pierpoint 1996) και αναστέλλουν τη δράση των όξινων πολυσακχαριτών, που αποδεδειγμένα δρουν ανασταλτικά στη δράση των ενζύμων της RT-PCR (Demeke and Adams 1992). Το πρωτόκολλο αυτό έχει εφαρμοστεί στο παρελθόν με επιτυχία στη διάγνωση πολλών ιών ξυλωδών ξενιστών όπως το αμπέλι (Rowhani *et al.*, 1995) και η ροδακινιά (Manganaris *et al.*, 2003). Παρ' όλη την ταχύτητα και την ευκολία που προσέφερε το παραπάνω πρωτόκολλο, η ευαισθησία του ήταν 10 φορές μικρότερη εκείνης του πρωτοκόλλου εξαγωγής ολικού RNA των Rott and Jelkmann (2001). Στο τελευταίο συνδυάζεται μεταξύ άλλων η χρήση του PVP-

40 και της ρητίνης ανταλλαγής κατιόντων (cation exchange resin) δηλαδή οξειδίου του πυριτίου (SiO₂, silica) που δεσμεύει μη-αντιστρεπτά τους παρεμποδιστικούς παράγοντες, όπως συμβαίνει με τα πολυμερή υλικά των κυτίων π.χ. RNeasy (Qiagen Inc., Valencia CA, USA), αλλά με πολύ μικρότερο κόστος. Έτσι λοιπόν το πρωτόκολλο αυτό, προσφέροντας ευαισθησία και χαμηλό κόστος και αποφεύγοντας τη χρήση επικίνδυνων οργανικών διαλυτών και φαινόλης, επιλέχθηκε για την εξαγωγή ολικού RNA από τα φυτικά είδη του Πίνακα 1, με σκοπό τον έλεγχο της παρουσίας των ASSVd, PBCVd και PLMVd.

Η παρουσία των ASSVd, PBCVd και PLMVd στην Ελλάδα είχε ήδη καταγραφεί από το 1997, 1998 και 2001 κατά τον έλεγχο δειγμάτων άγριας και καλλιεργούμενης απιδιάς που προήλθαν από περιοχές της Πελοποννήσου (Kyriakopoulou and Hadidi 1997, Kyriakopoulou *et al.*, 1998, 2001). Στην παρούσα μελέτη, επιβεβαιώθηκε η παρουσία των παραπάνω ιοειδών στη χώρα μας και παράλληλα καταγράφηκε σε νέες περιοχές της Βόρειας, Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας, καθώς και σε νέα είδη, κάποια από τα οποία αναφέρονται ως ξενιστές των ιοειδών αυτών για πρώτη φορά διεθνώς. Η παρουσία τους διαπιστώθηκε με τη βοήθεια της RT-PCR και επιβεβαιώθηκε σε ορισμένα νέα είδη με την απ' ευθείας αλληλούχηση των προϊόντων της PCR.

Το PBCVd αποτέλεσε το πιο συχνά απαντώμενο ιοειδές, καθώς ανιχνεύθηκε στο 35 % των δειγμάτων. Ιδιαίτερα υψηλή ήταν η συχνότητα παρουσίας του σε φυτά καλλιεργούμενης και άγριας απιδιάς (αυτοφυής ή υποκείμενο) που έφεραν χαρακτηριστικά συμπτώματα εξανθηματικών ελκών στο φλοιό του κορμού και των βραχιόνων (Εικόνα 2), σχεδόν σε όλες τις περιοχές δειγματοληψίας. Στις περισσότερες περιπτώσεις μολυσμένων με PBCVd φυτών απιδιάς εμβολιασμένων σε άγρια απιδιά, το ιοειδές ανιχνεύθηκε και στο υποκείμενο και στο εμβόλιο, όπως αναμενόταν άλλωστε λόγω της διασυστηματικότητας των ιοειδών. Το ίδιο συνέβη και στην περίπτωση των τεσσάρων δειγμάτων κυδωνιάς που ως υποκείμενα μολυσμένων απιδιών βρέθηκαν επίσης μολυσμένα. Η παρουσία του PBCVd στην απιδιά αλλά και την κυδωνιά και η εξάπλωσή του στην Ελλάδα σχετίζεται με τη παρουσία του στην άγρια απιδιά η οποία απαντάται συχνά σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές της χώρας και επί αιώνες αποτελούσε το υποκείμενο ποικιλιών απιδιάς πριν αντικατασταθεί πρόσφατα από άλλα είδη μεταξύ των οποίων και η κυδωνιά (Kyriakopoulou *et al.*, 2001). Στο παρελθόν έχει διαπιστωθεί πειραματικά στο εργαστήριο η παρουσία του PBCVd σε είδη του γένους *Crataegus* (Desvignes *et al.*, 1999), ποτέ όμως μέχρι σήμερα δεν είχε καταγραφεί φυσική μόλυνση. Έτσι λοιπόν, η ανίχνευση του PBCVd στον κράταιγο στην ορεινή Ναυπακτία και στο Κιλκίς είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς αποτελεί την πρώτη διεθνώς αναφορά. Το αυτοφυές αυτό δασικό είδος όπως και τα είδη των ξενιστών που αναφέρθηκαν παραπάνω ανήκουν στην υποοικογένεια Maloideae (μηλοειδή). Αντίθετα, το PBCVd δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα εξετασθέντα είδη πυρηνοκάρπων επιβεβαιώνοντας προηγούμενες μελέτες (Καπώνη, 2009).

Το ASSVd ήταν το δεύτερο σε συχνότητα ιοειδές μετά το PBCVd. Ανιχνεύθηκε σε αρκετές περιοχές της χώρας σε απιδιές και άγριες απιδιές, είδη στα οποία η παρουσία του είχε διαπιστωθεί και στο παρελθόν (Kyriakopoulou *et al.*, 1997, 2001), καθώς και σε μηλιές και άγριες μηλιές (*M. sylvestris*) τα οποία αναφέρονται για πρώτη φορά ως ξενιστές του ιοειδούς αυτού στην Ελλάδα και διεθνώς, αντίστοιχα.

Η παρουσία του ASSVd αλλά και του PBCVd σε αυτοφυή είδη (*M. sylvestris*, *P. amygdaliformis*, *Crataegus* sp.) σε ορεινές και απομακρυσμένες περιοχές μακριά από την ανθρώπινη επίδραση αποτελεί ένδειξη ότι τα ιοειδή αυτά είναι γηγενή στη χώρα μας και ότι συνυπάρχουν με τα άγρια είδη Rosaceae επί μακρόν, ίσως επί χιλιετίες.

Όσον αφορά τα συμπτώματα, η παρουσία του ASSVd ήταν σχεδόν ταυτόσημη με το σύμπτωμα της εσχάρωσης του φλοιού των καρπών των ύποπτων δένδρων, με εξαίρεση την περίπτωση δύο δειγμάτων μηλιάς που αν και φαινομενικά έφεραν τέτοιου είδους σύμπτωμα βρέθηκαν υγιή. Η πιο πιθανή εξήγηση που μπορεί να δοθεί στο τελευταίο είναι ότι ορισμένες φορές συμπτώματα στους καρπούς φελλωδών κηλίδων που συνοδεύονται από ρωγμές και προκαλούνται από τον μύκητα *Venturia inaequalis* συγχέονται σε κάποιο βαθμό με εκείνα του ASSVd (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Συμπτώματα προσβολής καρπών μηλιάς από τον μύκητα *Venturia inaequalis* από Wikipedia (<http://commons.wikimedia.org/wiki>).

Μέχρι σήμερα στη χώρα μας δεν έχει γίνει καμία συστηματική μελέτη για την παρουσία του PLMVd, ενός εκ των πιο σημαντικών ιοειδών, επιστημονικά και φυτοπαθολογικά. Το μόνο που γνωρίζαμε και επιβεβαιώθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η σε μικρό ποσοστό παρουσία του στην άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά στην οποία δεν προκαλεί κάποιο εμφανές σύμπτωμα (Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Fekih-Hassen *et al.*, 2006). Ιδιαίτερη σημασία όμως, έχει η καταγραφή του ιοειδούς αυτού για πρώτη φορά στην Ελλάδα στη βερικοκιά στην οποία η παρουσία του επίσης δεν συνδέεται πιθανότατα με κάποιο συγκεκριμένο σύμπτωμα (Hadidi *et al.*, 1997) και κυρίως στη ροδακινιά σε ιδιαίτερα μάλιστα υψηλό ποσοστό (66 %). Η παρουσία του PLMVd διαπιστώθηκε σε όλα τα δείγματα ροδακινιάς που έφεραν στη ραφή των καρπών σχισμές, σύμπτωμα που έχει συνδεθεί με την

παρουσία του ιοειδούς αυτού (Flores *et al.*, 2006). Πρόκειται για ένα ιοειδές με ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά, παγκόσμια εξάπλωση και μεγάλη οικονομική σημασία, τόσο λόγω των συμπτωμάτων που προκαλεί (ποιοτική και ποσοτική υποβάθμιση της παραγωγής, πρόωρη γήρανση του δένδρου και αύξηση της ευπάθειάς του σε άλλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες), όσο και λόγω της σπουδαιότητας για την παγκόσμια αλλά και την ελληνική οικονομία του βασικού του ξενιστή, της ροδακινιάς. Έτσι λοιπόν, η καταγραφή του PLMVd για πρώτη φορά στην Ελλάδα στη ροδακινιά ώθησε στη διεξοδική μελέτη, στο τρίτο και κύριο μέρος της παρούσας διατριβής, της παρουσίας του ιοειδούς αυτού σε οπωρώνες-φυτώρια ροδακινιάς και σε άλλα είδη Rosaceae, καθώς και των μοριακών χαρακτηριστικών των ελληνικών απομονώσεών του. Εξ άλλου, η εξάπλωση στην Ελλάδα και ο μοριακός χαρακτηρισμός των ASSVd και PBCVd αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης μιας άλλης διδακτορικής διατριβής (Μ. Καπώνη, 2009).

ΜΕΡΟΣ Γ.

Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ PLMVd ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Η ΡΟΔΑΚΙΝΙΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΕΙΔΗ ΠΥΡΗΝΟΚΑΡΠΩΝ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΜΗΛΟΕΙΔΩΝ ΩΣ ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΤΟΥ PLMVd ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΣΤΟ ΦΥΤΩΡΙΑΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΡΟΔΑΚΙΝΙΑΣ

1. Περίληψη

Η οικονομική σημασία του PLMVd καθώς και του βασικού του ξενιστή, της ροδακινιάς, το εύρος ξενιστών του, η παγκόσμια εξάπλωσή του και τα ιδιαίτερα μοριακά του χαρακτηριστικά καθιστούν το PLMVd, από επιστημονική και φυτοπαθολογική άποψη, ένα από τα σημαντικότερα και πλέον μελετημένα ιοειδή. Στη χώρα μας όμως οι πληροφορίες σχετικά με το ιοειδές αυτό είναι ελάχιστες. Δεν γνωρίζουμε ποια είναι η διάδοση του ιοειδούς, τι συμβαίνει με την παρουσία του σε φυτικά είδη πέραν της ροδακινιάς, πόσο συχνά απαντάται στο πολλαπλασιαστικό υλικό ροδακινιάς/νεκταρινιάς στα ελληνικά φυτώρια και σε ποιές ποικιλίες. Με τη βοήθεια της RT-PCR και του υβριδισμού στυπώματος κηλίδας (dot-blot hybridization) βρέθηκε ιδιαίτερα υψηλή (>75 %) συχνότητα παρουσίας του PLMVd στη χώρα μας, ξεπερνώντας το 85 % στην περίπτωση ορισμένων πρώιμων επιτραπέζιων ποικιλιών ροδακινιάς όπως η May Crest και η Spring Crest. Η ευρεία διάδοση του PLMVd στους οπωρώνες ροδακινιάς πιθανότατα σχετίζεται με την ικανότητα μεταδόσεως του μέσω των εργαλείων κοπής και ενδεχομένως των αφίδων-φορέων. Όμως, ιδιαίτερα σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος του πολλαπλασιαστικού υλικού, καθώς από τις 29 ποικιλίες φυτωριακού υλικού ροδακινιάς/νεκταρινιάς που εξετάστηκαν καμία δεν βρέθηκε ελεύθερη του ιοειδούς, αντίθετα, περισσότερο από το 50 % των συνολικών δειγμάτων που εξετάστηκαν βρέθηκαν μολυσμένα, με το ποσοστό να φτάνει σε ορισμένες ποικιλίες το 86 % ή ακόμη και το 100 %. Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε η παρουσία του PLMVd στην άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά και τη βερικοκιά, ενώ καταγράφηκε, για πρώτη φορά στην Ελλάδα η παρουσία του στη δαμασκηλιά, στην κερασιά και στην κυδωνιά. Η τελευταία μάλιστα αναφέρεται εδώ για πρώτη φορά ως ξενιστής του PLMVd. Τέλος, την υπόθεση του μικρότερου φορτίου PLMVd στα παραπάνω φυτικά είδη, σε σχέση με τη ροδακινιά, επιβεβαίωσε η εφαρμογή της ποσοτικής πραγματικού χρόνου RT-PCR (quantitative real time RT-PCR), με τη βοήθεια της οποίας υπολογίστηκε ότι η συγκέντρωση του ιοειδούς σε αυτά ήταν κατά μέσο όρο 99.6 % μικρότερη από τη συγκέντρωση του ιοειδούς στη ροδακινιά.

2. Εισαγωγή

Η ασθένεια του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (peach latent mosaic) αναφέρθηκε για πρώτη φορά στη Γαλλία το 1976 κατά το φυτοϋγειονομικό έλεγχο πολλαπλασιαστικού υλικού ροδακινιάς που είχε εισαχθεί από τις Η.Π.Α. και την Ιαπωνία (Desvignes, 1976). Η ασθένεια αυτή έχει μεγάλη οικονομική σημασία για τη ροδακινιά και είναι υπεύθυνη για τη μείωση της ποσότητας (20-40%) και της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων, τη μείωση της ζωτικότητας των δένδρων και την αύξηση της ευπάθειάς τους σε άλλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Desvignes, 1986, Flores and Llacer 1988, Mandic *et al.*, 2008, Ozaki *et al.*, 1999, Shamloul *et al.*, 1995). Αίτιο της ασθένειας αυτής αποτελεί το ομώνυμο ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) (Flores and Llacer, 1988) το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Avsunviroidae* και το γένος *Pelamoviroid* (Navarro and Flores, 1997) και χαρακτηρίζεται από έντονα διακλαδισμένη δευτεροταγή δομή και ικανότητα αυτο-σχάσεως (self-cleavage) κατά τον πολλαπλασιασμό του με τη μεσολάβηση σφυροκέφαλων (hammerhead) μοτίβων του μορίου του που δρουν ως ριβοένζυμα. Το μέγεθος του γενώματος στις περισσότερες παραλλαγές (variants) κυμαίνεται μεταξύ 335 και 341 νουκλεοτιδίων (nucleotides, nt) (Flores *et al.*, 2003), ενώ ορισμένες φέρουν επιπλέον μια ένθεση 12-13 nt (348-351nt) η οποία είναι υπεύθυνη για το σύμπτωμα της λευκάνσεως του ελάσματος των φύλλων της ροδακινιάς γνωστό ως Peach Calico (PC) (Ambros *et al.*, 1998, Rodio *et al.*, 2006).

Ο όρος 'λανθάνον' στο όνομα του ιοειδούς σχετίζεται με το γεγονός ότι στην πλειονότητα των φυσικών μολύνσεων δεν παρατηρούνται εμφανή συμπτώματα στα φύλλα της ροδακινιάς, ή, στην περίπτωση που αυτά εμφανίζονται, είναι ασταθή και εξαφανίζονται με το χρόνο, επίσης δε, σχετίζεται με το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την έναρξη της εμφανίσεώς τους. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα θεωρείται η καθυστέρηση ενάρξεως του σταδίου της ανθήσεως, βλαστήσεως και ωριμάσεως των καρπών, η πρόωρη γήρανση των δένδρων, η νέκρωση των οφθαλμών, το σπάσιμο του χρώματος των πετάλων και οι σχισμές στη ραφή των καρπών (Flores *et al.*, 2006).

Επί περισσότερες από δύο δεκαετίες η ροδακινιά και τα υβρίδια αυτής θεωρήθηκαν ως οι μοναδικοί ξενιστές του PLMVd (Desvignes 1986, Flores *et al.*, 2003). Σχετικά πρόσφατα, όμως, η παρουσία του ιοειδούς αναφέρθηκε και σε άλλα είδη πυρηνοκάρπων, όπως η βερικοκιά, η δαμασκηνιά, η κερασιά και η αμυγδαλιά, αλλά και μηλοειδή όπως η καλλιεργούμενη και η άγρια απιδιά (Hadidi *et al.*, 1997, Faggioli *et al.*, 1997, Giunchedi *et al.*, 1998, Ozaki *et al.*, 1999, Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Fekih-Hassen *et al.*, 2005, 2006). Παρόλ' αυτά, ορισμένοι ερευνητές όπως οι F. Flores και F. Di Serio συνεχίζουν να αμφιβάλλουν για τον κύκλο ξενιστών του PLMVd πέραν της ροδακινιάς (F. Flores και F. Di Serio, προσωπική επικοινωνία). Επιπλέον, το PLMVd παρουσιάζει ευρύτατη διάδοση σε όλο τον κόσμο και σ' αυτό συνέβαλε τα μέγιστα η ανταλλαγή, διακίνηση και χρήση μολυσμένου

πολλαπλασιαστικού υλικού ροδακινιάς και υβριδίων αυτής σε συνδυασμό με τη συχνή απουσία εμφανών συμπτωμάτων στα φύλλα.

Η οικονομική σημασία του PLMVd καθώς και του βασικού του ξενιστή, της ροδακινιάς, το εύρος ξενιστών του, η παγκόσμια εξάπλωσή του και τα ιδιαίτερα μοριακά του χαρακτηριστικά καθιστούν το PLMVd, από επιστημονική και φυτοπαθολογική άποψη, ένα από τα σημαντικότερα και πλέον μελετημένα ιοειδή. Στη χώρα μας όμως οι πληροφορίες σχετικά με το ιοειδές αυτό είναι ελάχιστες και περιορίζονται στην πρώτη αναφορά του στην άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά (Kyriakoroulou *et al.*, 1998, 2001). Τι ισχύει όμως για τη ροδακινιά; Ήδη, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, διαπιστώθηκε η παρουσία του PLMVd στη ροδακινιά σε υψηλό ποσοστό. Ο αριθμός όμως των δειγμάτων ροδακινιάς που εξετάστηκε ήταν μικρός και προερχόταν μόνο από την Πελοπόννησο. Ποια είναι όμως η πραγματική κατάσταση σε εθνική κλίμακα; Πόσο διαδεδομένο είναι το PLMVd στη χώρα μας; Επιπλέον, δεδομένου ότι η αντιμετώπιση του PLMVd ως γνωστόν θεμελιώνεται στην εφαρμογή προληπτικών μέτρων με βασικότερο τη χρήση πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού, γεννάται ένα ακόμη ερώτημα. Πόσο συχνά απαντάται το PLMVd στο πολλαπλασιαστικό υλικό ροδακινιάς-νεκταρινιάς στα ελληνικά φυτώρια και σε ποιες ποικιλίες; Αν και γνωρίζουμε αρκετά για την κατάσταση στο φυτωριακό πολλαπλασιαστικό υλικό άλλων χωρών (Flores and Llacer 1988, Shamloul *et al.*, 1995, Hadidi *et al.*, 1997, Loreti *et al.*, 1998,), πλήρης άγνοια επικρατεί για την κατάσταση στη χώρα μας. Αναφέρεται ότι η παρουσία του PLMVd σε φυτικά είδη πέραν της ροδακινιάς, όσα αναφέρθηκαν παραπάνω και ενδεχομένως νέα, είναι περιστασιακή (Mandic *et al.*, 2008), γεγονός που αποδίδεται στην ανομοιόμορφη κατανομή και στο χαμηλό τίτλο του ιοειδούς στα είδη αυτά (Flores *et al.*, 2003), δίχως όμως αυτό να έχει ποτέ προσδιοριστεί ποσοτικά. Έτσι λοιπόν, στόχος του παρόντος κεφαλαίου ήταν να δοθούν απαντήσεις στα ερωτήματα που τέθηκαν παραπάνω, επίσης δε να προσδιοριστεί ποσοτικά, με τη βοήθεια της ποσοτικής πραγματικού χρόνου RT-PCR (quantitative real time RT-PCR) η συγκέντρωση του PLMVd στον κύριο (ροδακινιά) αλλά και στους άλλους ξενιστές του (άλλα πυρηνόκαρπα-μηλοειδή).

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Φυτικό υλικό

3.1.1. Δείγματα αγρού

Κατά τα έτη 2006-2008 πραγματοποιήθηκε ευρείας κλίμακας δειγματοληψία δειγμάτων ροδακινιάς και άλλων πυρηνόκαρπων όπως βερικοκιάς, δαμασκηνιάς και κερασιάς, καθώς και ορισμένων μηλοειδών όπως απιδιάς, κυδωνιάς και άγριας απιδιάς, από οπωρώνες της Μακεδονίας, της Θεσσαλίας και της Πελοποννήσου. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά την εποχική χρονική περίοδο Φεβρουάριος-Οκτώβριος. Τα δείγματα αποτέλεσαν φύλλα, άνθη και καρποί που συλλέχθηκαν τυχαία από συμπτωματικά

δένδρα (Πίνακας 1), τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια που έφεραν κωδικό αριθμό και αυτά αμέσως σε φορητό ψυγείο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο όπου αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους. Συνολικά συλλέχθηκαν 370 δείγματα, από τα οποία 203 ροδακινιάς (10 ποικιλίες), 35 βερικοκιάς (τέσσερις ποικιλίες), 49 δαμασκηινιάς (πέντε ποικιλίες), 27 κερασιάς (τέσσερις ποικιλίες), 30 απιδιάς (μια ποικιλία), 23 κυδωνιάς, και τρία άγριας απιδιάς.

Πίνακας 1. Δείγματα ροδακινιάς και άλλων πυρηνοκάρπων και μηλοειδών που εξετάστηκαν για την παρουσία του PLMVd

Φυτικό είδος	Ποικιλία	Αριθμός δειγμάτων (κωδικοί)	Περιοχή	Συμπτώματα
Ροδακινιά	Spring Crest	16 (1-16)	Κλένια Αργολίδας	
	May Crest	9 (17-25)	Κλένια Αργολίδας	
	Sun Crest	20 (26-45)	Κλένια Αργολίδας	
	Sun Crest	18 (46-63)	Νάουσα Ημαθίας	
	Λευκόσαρκα (ποικιλία άγνωστη)	15 (64-78)	Επισκοπή Ημαθίας	Ερυθρίαση, μωσαϊκό, χλωρωτικές κηλίδες φύλλων, νέκρωση νεύρων,
	June Gold	7 (79-85)	Επισκοπή Ημαθίας	σπάσιμο χρώματος των πετάλων,
	Symphony	12 (86-97)	Μονόσπιτα Ημαθίας	παραμόρφωση, μεταχρωματισμός,
	Red Haven	21 (98-118)	Μονόσπιτα Ημαθίας	σχισμές στη ραφή των καρπών,
	Fortuna	13 (119-131)	Νάουσα Ημαθία	κομμίωση (Εικόνα 1)
	Red Haven	16 (132-147)	Μεγαπλάτανος Πέλλας	
	May Crest	21 (148-168)	Τύρναβος Λάρισας	
	Sun Cloud	23 (169-191)	Βελβεντός Κοζάνης	
	Άγνωστη	12 (192-203)	Άνω Λεχώνια Πηλίου Μαγνησίας	
	Σύνολο	203		
Βερικοκιά	Διαμαντοπούλου	13 (1-13)	Κλένια Αργολίδας	
	Αδαμοπούλου	10 (14-23)	Κλένια Αργολίδας	
	Μπεμπέκου	8 (24-31)	Κυλλήνη Ηλείας	Γενική χλώρωση, νεκρωτικές κηλίδες, χλωρωτικά στίγματα
	Άγνωστη	4 (32-35)	Άνω Λεχώνια Πηλίου Μαγνησίας	φύλλων, αποφύλλωση, κομμίωση
		Σύνολο	35	
Δαμασκηινιά	Angelino	4 (1-4)	Κλένια Αργολίδας	
	Άγνωστη	20 (5-24)	Άνω Λεχώνια Πηλίου Μαγνησίας	Ερυθρίαση, μωσαϊκό φύλλων,
	Angelino	6 (25-30)	Μεγαπλάτανος Πέλλας	μικροφυλλία, έλκη, κομμίωση,
	Angelino	11 (31-41)	Νάουσα Ημαθίας	μικρές και ανοιχτόχρωμες κηλίδες
	President	5 (42-46)	Νάουσα Ημαθίας	στους καρπούς (Εικόνα 2)
	Black Gold	3 (47-49)	Νάουσα Ημαθίας	
		Σύνολο	49	

Η ΡΟΔΑΚΙΝΙΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΕΙΔΗ ΠΥΡΗΝΟΚΑΡΠΙΩΝ ΚΑΙ ΜΗΛΟΕΙΔΩΝ ΩΣ ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΤΟΥ
PLMVd ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΣΤΟ ΦΥΤΩΡΙΑΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΡΟΔΑΚΙΝΙΑΣ

Κερασιά	Verona	6 (1-6)	Μεγαπλάτανος Πέλλας	Ερυθρίαση φύλλων, έλκη
	Τραγανό Εδέεσης	4 (7-10)	Μεγαπλάτανος Πέλλας	
	Burla	8 (11-18)	Μεγαπλάτανος Πέλλας	
	Άγνωστη	9 (19-27)	Άνω Λεχώνια Πηλίου Μαγνησίας	
	Σύνολο	27		
Απιδιά	Κοντούλα	9 (1-5)*, (6-9)	Καρατζάς Τροιζηνίας Πειραιάς	Εξανθηματικά έλκη στον κορμό
		12 (10, 11)*, (12-21)	Κλένιας Αργολίδας	
		9 (22-30)	Άνω Λεχώνια Πηλίου Μαγνησίας	
	Σύνολο	30		
Κυδωνιά	Υποκείμενο	4 (1-4)*	Καρατζάς Τροιζηνίας	Παραμόρφωση φύλλων μικροφυλλία
	Άγνωστη	3 (5-7)	Πειραιάς	
	Άγνωστη	16 (8-23)	Άνω Λεχώνια Πηλίου Μαγνησίας	
	Σύνολο	23		
Άγρια απιδιά	Υποκείμενο	2 (1,3)*	Καρατζάς Τροιζηνίας, Πειραιάς	Εξανθηματικά έλκη στον κορμό
	Αυτοφυές	1 (4)*	Καρατζάς Τροιζηνίας, Πειραιάς	
	Σύνολο	3		

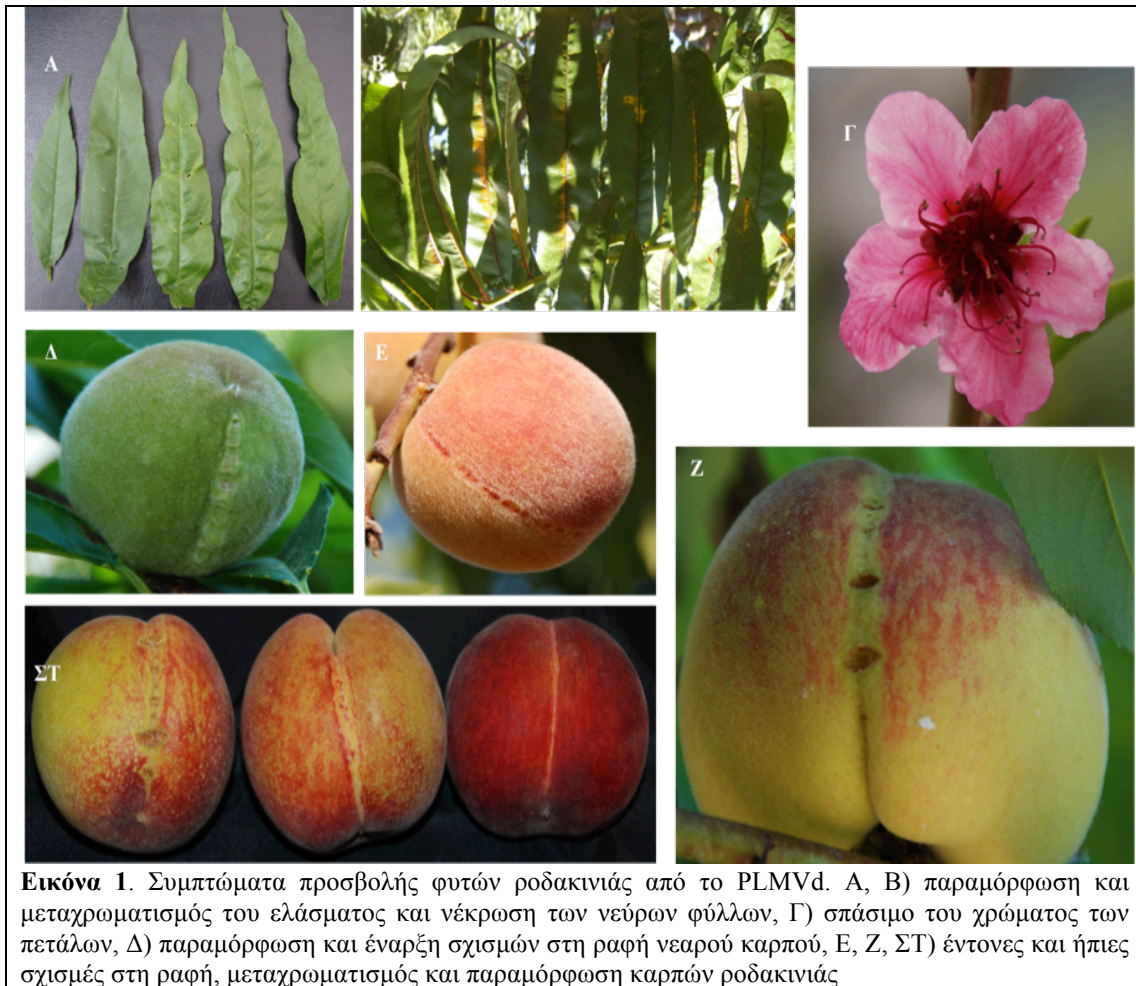
*: Τα δείγματα αυτά είχαν ελεγχθεί για την παρουσία του PLMVd (βλ. Πίνακα 1 στο Β μέρος της παρούσας διατριβής).

3.1.2. Φυτώρια ροδακινιάς

Για τον έλεγχο της παρουσίας του PLMVd στο πολλαπλασιαστικό υλικό επιλέχθηκαν τρεις μεγάλες φυτωριακές μονάδες, δύο στα Μονόσπιτα Ημαθίας και μια στο Νέο Φθιώτιδας. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά τα έτη 2008-2009. Τα δείγματα ροδακινιάς/νεκταρινιάς προήλθαν είτε από έτοιμα προς πώληση φυτά ενός έτους εμβολιασμένα στο υποκείμενο GF-677, είτε από μητρικά δένδρα ηλικίας 8-10 ετών επίσης εμβολιασμένα στο υποκείμενο GF-677. Από κάθε ποικιλία συλλέχθηκαν τουλάχιστον 20 δείγματα τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια που έφεραν κωδικό αριθμό και στη συνέχεια σε φορητό ψυγείο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Συνολικά συλλέχθηκαν 711 δείγματα, 353 από φυτά ενός έτους και 358 από μητρικά δένδρα, που προήλθαν από 23 ποικιλίες ροδακινιάς και έξι νεκταρινιάς (Πίνακας 2).

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φύλλα φυτών του φυτοδείκτη GF-305 μολυσμένων με τις ιταλικές απομονώσεις P31, P42, P34 (απομόνωση Peach Calico) του PLMVd, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες φύλλα υγιών φυτών GF-305. Επιπλέον, ως αρνητικοί μάρτυρες στις δοκιμές εξειδικεύσεως της real time RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι επίσης ιταλικές απομονώσεις των ιοειδών ASSVd, PBCVd, HSVd, και PSTVd. Όλες οι ιταλικές

απομονώσεις προήλθαν από τη συλλογή του ινστιτούτου CRA (Centro per la Pathologia Vegetale) στη Ρώμη μετά από ευγενική προσφορά των Dr. M. Barba και Dr. F. Faggioli.



3.2. Μεταχειρίσεις για την αδρανοποίηση των ριβονουκλεασών

Ισχύει ότι αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.2 του Β μέρους. Επιπλέον, διαλύματα ευαίσθητα στις υψηλές θερμοκρασίες αποστειρώθηκαν με τη διέλευσή τους από φίλτρο μιας χρήσεως 0.45 μm Minisart (Santorius Stedim Biotech SA, Aubagne, France).

3.3. Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

3.3.1. Εκμαγείο

Προ της εφαρμογής του πρωτοκόλλου one tube-two step RT-PCR για το μαζικό έλεγχο των παραπάνω δειγμάτων με σκοπό την ανίχνευση του PLMVd, πραγματοποιήθηκε σύγκριση διαφόρων πρωτοκόλλων εκχύλισης RNA με σκοπό να βρεθεί το καταλληλότερο. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά πέντε μέθοδοι, οι δύο αφορούσαν την εκχύλιση φυτικού χυμού σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και οι τρεις την εκχύλιση ολικού RNA (total RNA, t-RNA). Από τις παραπάνω μεθόδους, τα πρωτόκολλα εκχύλισης φυτικού χυμού των Rowhani *et al.*, (1995) και t-RNA των Rott and Jelkmann (2001) (μέθοδος οξειδίου του πυριτίου) περιγράφονται στις παραγράφους 3.3.1.1. και 3.3.1.2. του Β μέρους. Οι υπόλοιπες τρεις μέθοδοι περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

Πίνακας 2. Πολλαπλασιαστικό υλικό ροδακινιάς και νεκταρινιάς που εξετάστηκε για την παρουσία του PLMVd

Ποικιλίες	Δενδρύλλια ενός έτους				Μητρικά δένδρα 8-10 ετών			
	Φυτόριο 1 ^{o*}		Φυτόριο 2 ^{o**}		Φυτόριο 3 ^{o***}			
	2008	2009	2008	2009	2009	2009	2009	2009
	Ποικιλία	Αριθμός δειγμάτων	Ποικιλία	Αριθμός δειγμάτων	Ποικιλία	Αριθμός δειγμάτων	Ποικιλία	Αριθμός δειγμάτων
Ροδακινιές	Spring Crest	20	O' Henry	20	Άνδρος	20	Hall	20
	Κατερίνα	24	Glantis	20	Spring Crest	20	Red Haven	20
	A-37	21	Fayette	20	May Crest	20	May Rich	20
	May Crest	30	Spring	20	Royal Glory	20	Λεμονάτα	20
			Bell				Βόλου	
	Sun Crest	22	Fire Top	20			Cardinal	20
	Spring Bell	20					July Lady	20
	Άνδρος	28					Rubi du	20
	François	20					Spring Crest	20
	Fayette	20					Early Crest	20
						Honey	20	
Νεκταρινιές	Tasty Free	28	Orion	20	Big Top	20		
					Reg Gold	20		
					Galtezi	20		
					Adrianna	18		

*: Φυτόριο Μίλη στα Μονόσπιτα Ημαθίας, **: Φυτόριο Τσεσμελή στα Μονόσπιτα Ημαθίας,

***: Φυτόριο Παναγιωτόπουλος στο Νέο Φθιώτιδας

α) Εκχύλισμα φυτικού χυμού (SSC)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Fekih-Hassen *et al.*, (2006). Σύμφωνα με αυτό, ποσότητα 0.1 gr φυτικού ιστού τοποθετήθηκε σε πλαστικό σακουλάκι που περιείχε 2 ml διαλύματος ομογενοποίησης (2x SSC: 0.3 M NaCl, 0.03 M Na₃C₆H₅O₇ [sodium citate], pH: 7.0 και 1 % [β/ο] Na₂SO₃). Στη συνέχεια 500 μl του ομογενοποιημένου μεταφέρθηκαν σε μικροσωλήνα 1.5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 στροφές ανά λεπτό (revolution per minute, rpm) επί 10 λεπτά και 200 μl υπερκειμένου μεταφέρθηκαν σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

β) Εκχύλιση t-RNA, μέθοδος φαινόλης (Faggioli *et al.*, 2001)

Ποσότητα 0.2 gr φυτικού ιστού κονιορτοποιήθηκε με τη βοήθεια υγρού αζώτου και ομογενοποιήθηκε με 927.5 ml διαλύματος εκχύλισης (900 μl 0.2 M Tris-HCl pH: 8.2, 17.5 μl 5 M NaCl, 8 μl 10% [o/o] Triton X-100 και 2 μl β-mercaptoethanol). Στη συνέχεια το ομογενοποίημα μεταφέρθηκε σε μικροσωλήνα 1.5 ml και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 9000 rpm στους 4° C επί 20 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml και προστέθηκαν 500 μl κορεσμένης με νερό φαινόλης (water saturated phenol pH: 7.0), 100 μl 5% (β/ο) SDS και 100 μl 0.1 M EDTA pH: 7.0. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση του διαλύματος στις 9000 rpm στους 4° C επί 20 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα και ακολούθησε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με παγωμένη αιθανόλη 100 % και NaOAc όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3.1.2. του Β μέρους, και τελικά, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl νερό DEPC.

γ) Εκχύλιση ολικού RNA (t-RNA), μέθοδος TRIZOL (Invitrogen)

Ποσότητα 0.1 gr φυτικού χυμού τοποθετήθηκε σε πλαστικό σακουλάκι και ομογενοποιήθηκε παρουσία 0.2 ml διαλύματος (500 mM Tris-HCl pH: 8.3 , 2% [β/ο] PVP-40, 1 % [β/ο] PEG-6000, 1.4 mM NaCl και 0.05% [o/o] Tween 20). Στη συνέχεια 200 μl ομογενοποιημένου προστέθηκαν σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml που περιείχε 750 μl TRIZOL (Invitrogen), το μίγμα αναδεύτηκε καλά, επώαστηκε επί πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl χλωροφορμίου. Το μίγμα αναδεύτηκε καλά και επώαστηκε επί δύο λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 12000 rpm επί 15 λεπτά στους 4 °C. Έπειτα το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα που περιείχε 1 μl γλυκερόλης και 500 μl ίσο-προπανόλης και το μίγμα αφού αναδεύτηκε καλά επώαστηκε επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 12000 rpm επί 10 λεπτά στους 4 °C, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα των νουκλεϊκών οξέων ξεπλύθηκε με 750 μl αιθανόλης 70% (o/o).

Το διάλυμα αναδεύτηκε έντονα, φυγοκεντρήθηκε στις 8500 rpm επί επτά λεπτά στους 4 °C και αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα νουκλεϊκών οξέων αφήθηκε να στεγνώσει επί 10-15 λεπτά στο θάλαμο νηματικής ροής και επαναδιαλύθηκε σε 50 µl νερό DEPC.

3.3.2. Εκκινήτες

Για την ανίχνευση του PLMVd με την RT-PCR στο παρόν κεφάλαιο χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά οι εκκινήτες PLMVdhL/PLMVdcL (Loreti *et al.*, 1999).

3.3.3. RT-PCR ενός μικροσωλήνα δύο σταδίων (one tube two step RT-PCR)

Το πρωτόκολλο RT-PCR δύο σταδίων σε κοινό μικροσωλήνα που περιγράφεται στη παράγραφο 3.3.3. του Β μέρους υιοθετήθηκε στο παρόν κεφάλαιο για την ανίχνευση του PLMVd στα δείγματα αγρού και στο φυτωριακό υλικό.

3.3.4. Ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR

Η ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση 10 µl προϊόντος της αντιδράσεως σε πήγμα αγαρόζης (Invitrogen) 1.5 % (β/ο) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE και εν συνέχεια εμβάπτιση και επώαση επί 20 λεπτά σε διάλυμα 0.5 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.3.4. του Β μέρους.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να εφαρμοστεί η τεχνική του μοριακού υβριδισμού κατά Southern πραγματοποιήθηκε ανάλυση των προϊόντων RT-PCR σε πήγμα πολυακρυλαμίδης 5% (ο/ο). Για την παρασκευή του πηγματος, 2.5 ml μίγματος acrylamide/bis-acrylamide 23:1 40 % (β/ο) (Fisher Scientific Inc., PA Pittsburg, USA) αναμίχθηκε με 4 ml διαλύματος 5x TBE (Tris-Borate-EDTA: 450 mM Tris-Borate, 5 mM EDTA pH: 8.3), 20 µl TEMED (Biorad Laboratories Inc., California, USA) και 200 µl 10% (β/ο) APS (ammonium persulfate). Το διάλυμα αναμίχθηκε και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης Mini-Protean Tetra (Biorad Laboratories Inc., California, USA), όπου με τη βοήθεια ειδικών χτενιών δημιουργήθηκαν τα φρεάτια εφαρμογής των δειγμάτων. Μετά την πλήρη πήξη του πηγματος, η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα 1x TBE και εν συνέχεια 10 µl των προϊόντων της αντιδράσεως αναμίχθηκαν με 2 µl διαλύματος εφαρμογής δειγμάτων (loading buffer) και τοποθετήθηκαν στα φρεάτια. Η ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα επί μια ώρα σε σταθερή ένταση 40 mA.

3.4. Μοριακός υβριδισμός

Για τον μαζικό έλεγχο δειγμάτων αγρού ροδακινιάς και άλλων Rosaceae για την ανίχνευση του PLMVd χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του μοριακού υβριδισμού. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε τόσο με τη μορφή στυπώματος κηλίδας RNA (dot ή spot blot hybridization), όσο και ως μεταφορά κατά Southern (Southern hybridization)

χρησιμοποιώντας ανιχνευτές (probes) dsDNA σημασμένους με διγοξιγενίνη (digoxigenin, dig).

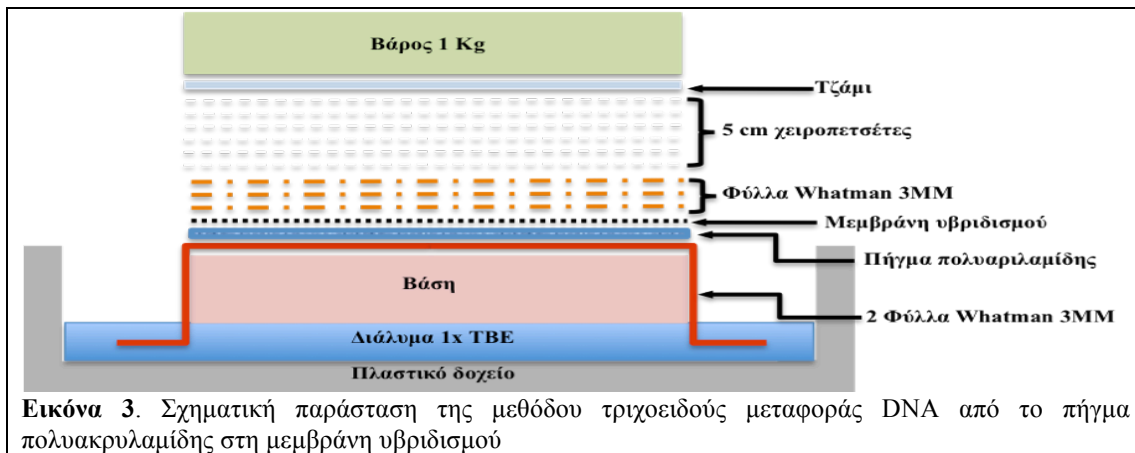
3.4.1. Υβριδισμός στυπώματος κηλίδας RNA

3.4.1.1. Προετοιμασία και τοποθέτηση δειγμάτων

Πέντε μl ολικού RNA από κάθε δείγμα προστέθηκαν σε μικροσωλήνα 0.2 ml (Costar Corporation, Cambridge MA, USA) που περιείχε 5 μl μίγματος αποδιατάξεως (denaturation mixture: 3/2 [o/o] 37% [o/o] formaldehyde, 20x SSC). Μετά την ανάδευση των διαλυμάτων, οι μικροσωλήνες τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή PTC-200 (MJ-Research, Waltham, Massachusetts, USA) και ακολούθησε αποδιάταξη του RNA με θέρμανση στους 65 °C επί 30 λεπτά. Αμέσως μετά οι μικροσωλήνες μεταφέρθηκαν στον πάγο όπου και παρέμειναν μέχρι την στύπωση των διαλυμάτων στην ενεργοποιημένη και θετικά φορτισμένη νάυλον μεμβράνη (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Η ενεργοποίηση της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση της αρχικά σε απεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό επί 20 λεπτά και στη συνέχεια σε διάλυμα 2x SSC επί άλλα 20 λεπτά. Όλες οι επώσεις ενεργοποιήσεως της μεμβράνης έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, πάνω στη μεμβράνη, σε προσχεδιασμένες θέσεις ανά δείγμα, διαστάσεων 1x1 cm, τοποθετήθηκε εις διπλούν ποσότητα πέντε μl διαλύματος αποδιαταγμένου RNA και ακολούθησε δέσμευση-προσήλωση των νουκλεϊκών οξέων επ' αυτής με σταυροδέσμωση (cross-linking) σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας (ultra violet, UV) Spectrolinker XL-1000UV (Spectronic Corporation, New York, USA) επί 30-45 δευτερόλεπτα σε 1200 x 100 μJoule/cm². Μετά οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σακουλάκι και στη συνέχεια στο ψυγείο στους 4° C μέχρι την επαναχρησιμοποίησή τους. Σε κάθε δοκιμή πέραν των δειγμάτων συμπεριλαμβάνονταν ένας ή περισσότεροι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες.

3.4.1.2. Υβριδισμός κατά Southern (Southern blot)

Δέκα μl προϊόντος RT-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα πολυακρυλαμίδης 5% όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.3.4. του παρόντος κεφαλαίου, δίχως να ακολουθήσει χρώση σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Στη συνέχεια το πήγμα εμβάπτιστηκε δύο φορές επί 15 λεπτά η κάθε μια σε διάλυμα αποδιατάξεως (denaturation buffer: 0.5 M NaOH, 1 M NaCl) προκειμένου να λάβει χώρα η αποδιάταξη του DNA και δύο φορές επί 15 λεπτά η κάθε μια σε διάλυμα ουδετεροποίησης (naturalization buffer: 0.5 M Tris-HCl pH: 7.5, 1.5 mM NaCl). Ακολούθησε τριχοειδής μεταφορά του αποδιαταγμένου DNA σε ενεργοποιημένη και θετικά φορτισμένη νάυλον μεμβράνη (Roche) όπως δείχνει η Εικόνα 3. Μετά το πέρας της διαδικασίας που έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου επί 8-10 ώρες, ακολούθησε σταυροδέσμωση των νουκλεϊκών οξέων.



3.4.1.3. Σύνθεση ανιχνευτών dsDNA

Η σύνθεση των ανιχνευτών έγινε με τη βοήθεια της PCR με ενσωμάτωση του ανιχνευτή digoxigenin (dig) ως dig-dUTP περιεχόμενης στο μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων Dig labeling mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) στο προϊόν της PCR. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε κλωνοποιημένο πλασμίδιο pCRII⁺ TOPO (Invitrogen Ltd., Paisley, England, UK) που περιείχε μονομερές DNA του συνολικού γενώματος της ιταλικής απομονώσεως PLMVd P42, ευγενική προσφορά των Drs. M. Barba και F. Faggioli του ινστιτούτου CRA (Centro di Ricerca per la Pathologia Vegetale) στη Ρώμη. Η σύνθεση των ανιχνευτών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 100 μl με τη χρήση ενός μl αραιώσεως 1/10 του πλασμιδιακού DNA (15 ng/μl). Το διάλυμα της αντιδράσεως αποτελείτο από 20 mM Tris-HCl pH: 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5 μM εκκινητή PLMVdhL/PLMVdcL, 0.2 mM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, 0.19 mM dTTP και 0.01 mM digoxigenin-11-dUTP (Dig-11-dUTP) (Roche), 5 % (o/o) DMSO, δύο μονάδες ενζύμου *Taq* DNA πολυμεράση (Invitrogen) και νερό DEPC μέχρι του τελικού όγκου. Στη συνέχεια και αφού προηγήθηκε ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του από διμερή εκκινητών (primer dimers), dNTPs, *Taq* DNA πολυμεράση και άλλα συστατικά της PCR με τη χρήση του κυτίου Microcon YM-100 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) και ακολούθησε προσδιορισμός της συγκεντρώσεως (οπτική πυκνότητα, optical density, OD) του ανιχνευτή (probe) με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA).

3.4.1.4. Προ-υβριδισμός/υβριδισμός

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου των Palacio-Bielsa *et al.*, (1999). Σύμφωνα με αυτό, του υβριδισμού προηγήθηκε προ-υβριδισμός των νάυλων μεμβρανών που έφεραν τις κηλίδες των προς έλεγχο δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε γυάλινους περιέκτες που περιείχαν 20 ml διαλύματος

προ-υβριδισμού (pre-hybridization buffer: 50 % απιοντισμένη φορμαμίδη [formamide], 6x SSC, 1 % [β/ο] SDS, 10 % [ο/ο] 50x Denhard's και 100 μg/ml αποδιαταγμένου [100 °C, 10 λεπτά] Herring sperm DNA [Promega, Madison, USA]) που είχε προθερμανθεί στους 50 °C και αποστειρωθεί με διέλευσή του από φίλτρο 0.45 nm Minisart (Santorius). Στη συνέχεια, οι περιέκτες μεταφέρθηκαν στο θάλαμο υβριδισμού Problot (Labnet International Inc., Edison, NY, USA) και ο προ-υβριδισμός έλαβε χώρα στους 50° C επί τουλάχιστον δύο ώρες. Μετά την ολοκλήρωση του παραπάνω σταδίου, το διάλυμα προ-υβριδισμού απορρίφθηκε και αντικαταστάθηκε με 20 ml προθερμασμένου στους 50 °C διαλύματος υβριδισμού (hybridization buffer: 50% formamide, 6x SSC, 1 % [ο/ο] SDS και 100 μg/ αποδιαταγμένου [100 °C, 10 λεπτά] Herring sperm DNA που περιέχει 20 ng/cm² μεμβράνης αποδιαταγμένου στους 100° C επί πέντε λεπτά ανιχνευτή dig dsDNA). Ο υβριδισμός έλαβε χώρα στο θάλαμο υβριδισμού επί 18 περίπου ώρες στους 50 °C.

3.4.1.5. Πλύσεις και ανίχνευση των προϊόντων

Μετά την ολοκλήρωση του υβριδισμού, οι μεμβράνες επώαστηκαν, με ταυτόχρονη ανάδευση, σε 20 ml διαλύματος πλύσεως 1 (wash buffer 1: 20x SSC, 0.1 % [β/ο] SDS) δύο φορές επί 15 λεπτά η κάθε μια σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε μια πλύση σε 20 ml διαλύματος πλύσεως 2 (wash buffer 2: 0.1x SSC, 0.1 % [β/ο] SDS) επί μια ώρα στους 60 °C. Στη συνέχεια οι μεμβράνες επώαστηκαν σε διάλυμα 1 (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH:7.5) που περιείχε 0.3 % (ο/ο) Tween-20 επί δύο λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και οι πλύσεις ολοκληρώθηκαν με την επώαση των μεμβρανών σε 20 ml διαλύματος 2 (10 % [ο/ο] πυκνού διαλύματος καλύψεως [stock blocking reagent buffer] σε διάλυμα 1) επί 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την ανίχνευση των θέσεων δεσμεύσεως των ανιχνευτών dsDNA, οι μεμβράνες επώαστηκαν επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα 2 (0.2 ml/cm² μεμβράνης) που περιείχε σε αναλογία 1/5000 συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση αντίσωμα (anti-Dig-AP Conjugate) (Roche). Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος ακολούθησε εξισορρόπηση των μεμβρανών με επώασή τους επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα εξισορροπήσεως (equilibration buffer: 0.01 M Tris-HCl pH: 7.5, 0.05 M MgCl₂, 0.1 M NaCl). Στη συνέχεια και αφού απομακρύνθηκε η περίσσεια του διαλύματος εξισορροπήσεως, οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν με μέτωπο προς τα κάτω σε διαφάνεια που έφερε σταγόνες του χημειοφωτογόνου υποστρώματος CSPD (Roche). Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος και των φυσαλίδων, οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο στους 37 °C επί 15 λεπτά. Ο εντοπισμός των θέσεων υβριδισμού έγινε με τοποθέτηση φιλμ ακτινογραφίας Amersham Hyperfilm (GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Germany) επί των μεμβρανών και έκθεσή τους στις αντιδράσεις

χημειοφωταύγειας (chemiluminescence) επί μια ώρα στους 37-42 °C εντός κασέτας αυτοραδιογραφίας Amersham Hypercassette Neutral (GE Healthcare). Η εμφάνιση έγινε σε σκοτεινό θάλαμο με διαδοχική εμβάπτιση των φιλμ σε διάλυμα εμφανίσεως και στερεώσεως αντινογραφιών (Kodak rapid access dental developer, fixer) (Kodak, Chalon S/Saone, France) και έκπλυση τους με απεσταγμένο νερό.

3.5. Διαδοχική ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμίδης (Sequential Polyacrylamide Gel Electrophoresis analysis, S-PAGE)

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ιοειδική φύση του παθογόνου, ολικό RNA που εκχυλίστηκε από επιλεγμένα δείγματα ροδακινιάς (No 21, 9), δαμασκηνιάς (No 1, 27), βερικοκιάς (No 2) και απιδιάς (No 3) αναλύθηκε σε σύστημα διαδοχικής ηλεκτροφορήσεως δύο κατευθύνσεων σε πήγμα πολυακρυλαμίδης (Sequential PAGE) καθώς η τεχνική αυτή επιτρέπει την εξειδικευμένη ανίχνευση κυκλικών μορίων RNA όμοιων με αυτά των ιοειδών. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν RNA των ιοειδών ASBVd, CEVd, PSTVd, PLMVd P51 και PLMVd P34 (Peach Calico), ευγενική προσφορά των Drs. M. Barba και F. Faggioli του ινστιτούτου CRA στη Ρώμη.

3.5.1. Εκχύλιση ολικού RNA

Για την εφαρμογή της τεχνικής S-PAGE πραγματοποιήθηκε εκχύλιση t-RNA από ποσότητα 5 gr φυτικού ιστού (φύλλα ή φλοιός καρπών) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Flores and Llacer (1988) με ορισμένες τροποποιήσεις. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, ο φυτικός ιστός κονιορτοποιήθηκε με τη βοήθεια υγρού αζώτου και ομογενοποιήθηκε με διάλυμα εκχύλισεως (1/1 [o/o] 0.2 M Tris-HCl pH: 8.9, 1/4 [o/o] 5 % SDS, 1/4 [o/o] 0.1 M EDTA pH: 7.0, 1/8 [o/o] β-mercaptoethanol και 4/1 [o/o] water saturated phenol pH: 7.0). Ακολούθησε έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 7000 rpm επί 15 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο περιέκτη (falcon 50 ml). προστέθηκε φαινόλη ίση με το 1/2 του όγκου του υπερκειμένου και το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στις 7000 rpm επί 15 λεπτά. Στο νέο υπερκείμενο προστέθηκε 10 % (o/o) διάλυμα 10x STE (1 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH: 7.5, 10 mM EDTA pH: 7.0), αιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 35 % (o/o) και 6.25 % (β/o) μη ιοντική κυτταρίνη (non ionic cellulose) CF-11 (Whatman International Ltd., Kent UK). Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου επί περίπου δύο ώρες, φυγοκέντρησή του στις 7000 rpm επί 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 15 ml διαλύματος πλύσεως (1x STE, 35 % [o/o] αιθανόλη) και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 7000 rpm επί 10 λεπτά. Το στάδιο πλύσεως επαναλήφθηκε ακόμη δύο φορές και ακολούθησε έκπλυση των νουκλεϊκών οξέων από την κυτταρίνη με 1.66 ml διαλύματος 1x STE (το στάδιο αυτό

επαναλήφθηκε τρεις φορές). Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη και NaOAc και επαναδιάλυσή τους σε 100 μl νερό DEPC.

3.5.2. Πρωτόκολλο S-PAGE

Κατά την εφαρμογή της τεχνικής S-PAGE, εκχύλισμα ολικών νουκλεϊκών οξέων αναλύθηκε ηλεκτροφορητικά σε δύο διαδοχικά πήγματα πολυακρυλαμίδης, το πρώτο 5 % σε συνθήκες μη αποδιατάξεως RNA και το δεύτερο 7% σε συνθήκες χημικής αποδιατάξεως (παρουσία ουρίας), σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Schumacher *et al.*, (1983) και Rivera-Bustamante *et al.*, (1986) με ορισμένες τροποποιήσεις. Για την παρασκευή του πρώτου πηγματος ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.4. του παρόντος κεφαλαίου. Οι μόνες διαφορές ήταν ότι χρησιμοποιήθηκε η συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης Protean II (Biorad Laboratories Inc., California, USA) και ότι σε κάθε πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 15 μl δείγματος RNA τα οποία αναμείχθηκαν με 5 μl διαλύματος εφαρμογής δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή ένταση ρεύματος 40 mA επί δύο ώρες στους 4 °C, χρονικό διάστημα αρκετό για την μετακίνηση της χρωστικής xylene-cyanol στο μέσο περίπου του πηγματος (Εικόνα 3A, Γενικό μέρος). Στη συνέχεια, τμήμα του πηγματος 4 cm πάνω και 4 cm κάτω από τη ζώνη xylene-cyanol απομακρύνθηκε και μεταφέρθηκε στη βάση του δεύτερου πηγματος που περιείχε 48% (β/ο) ουρία. Τα ηλεκτρόδια αντιστράφηκαν και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ένταση ρεύματος 37 mA επί 8-10 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

3.5.3. Χρώση πηγματος με νιτρικό άργυρο

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήγμα εμβαπτίστηκε επί 30 λεπτά σε διάλυμα σταθεροποίησης (fixation buffer: 1% acetic acid, 10% [o/o] C₂H₂O). Ακολούθησε επώαση επί 30 λεπτά σε διάλυμα χρώσεως (coloration buffer: 0.2 % [β/ο] ArNO₃), ξέπλυμα του πηγματος τρεις φορές με απεσταγμένο νερό και τελικά εμφάνιση των ζωνών με εμβάπτιση σε διάλυμα εμφάνισης (developing buffer: 2 % [β/ο] KOH, 0.4 % [o/o] 37 % HCOH) επί 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3.6. Ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time RT-PCR)

Στο πλαίσιο του παρόντος κεφαλαίου αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε ένα πρωτόκολλο real time RT-PCR για την ανίχνευση του PLMVd, με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκεντρώσεώς του στη ροδακινιά καθώς και σε άλλα είδη ξενιστών του ιοειδούς αυτού.

3.6.1. Εκκινητές και ανιχνευτής (probe) *TaqMan*

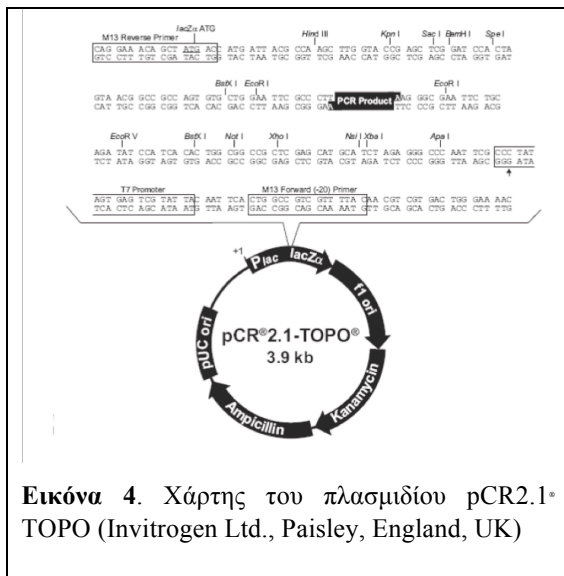
Η σχεδίαση των εκκινητών και του ανιχνευτή *TaqMan* για την εξειδικευμένη ανίχνευση του PLMVd βασίστηκε στην αλληλουχία της πρότυπης παραλλαγής του ιοειδούς M835451 (GeneBank accession number) (Hernandez and Flores 1992) και του λογισμικού σχεδίασεως εκκινητών Primer Express software (Applied Biosystems Inc., Foster city, CA, USA). Η αλληλουχία του ανοδικού και του καθοδικού εκκινητή και του ανιχνευτή ήταν αντίστοιχα: PLMVdF: 5'-CTCGCAATGAGGTAAGGTG-3' (αντιστοιχεί στις θέσεις: 138-156), PLMVdR: 5'-ACGTCGTAATCCAGTTTCTAC-3' (αντιστοιχεί στις θέσεις: 217-327) και PLMVd probe: 5'-CTTCTGGAACCAACGGG-3' (αντιστοιχεί στις θέσεις: 166-182). Ο ανιχνευτής σημάνθηκε στο άκρο 5' με τη φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (reporter dye) FAM (6-carboxyfluorescein) και το άκρο 3' με τη χρωστική σβέσεως (quenching dye) TAMRA (6-carboxyl-tetra-methylrhodamine). Οι εκκινητές και ο ανιχνευτής προήλθαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich, Saint Luis, MO, USA.

3.6.2. Σύνθεση συμπληρωματικού RNA (cRNA) του PLMVd

Για τις ανάγκες κατασκευής της καμπύλης αναφοράς (standard curve) χρησιμοποιήθηκαν εις τριπλούν διαδοχικές αραιώσεις μεταγραφημάτων συμπληρωματικού RNA (cRNA transcripts) γνωστής συγκεντρώσεως, η σύνθεση των οποίων έγινε *in vitro* από το κλωνοποιημένο πλασμίδιο pCR2.1* TOPO (Invitrogen) που περιείχε μονομερές DNA του συνολικού γενώματος της ιταλικής απομονώσεως PLMVd P42 με τη χρήση του κυτίου SP6/T7 transcription kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Η διαδικασία αυτή περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Για την γραμμικοποίηση (linearization) του πλασμιδίου με σκοπό τη μεταγραφή του ιοειδικού DNA (ένθεση πλασμιδίου) σε συμπληρωματικό RNA, επιλέχθηκε από το χάρτη αυτού (Εικόνα 4) το περιοριστικό ένζυμο *Hind* III (New England Biolabs, Hertfordshire, England, UK). Αφού επιβεβαιώθηκε ότι το ένζυμο αυτό δεν κόβει σε καμία θέση την ένθεση (ιοειδές), πραγματοποιήθηκε η διαδικασία πέψεως επί τρεις ώρες στους 37 °C.

Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος μίγματος 25/24/1 φαινόλη /χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη και το μίγμα αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 12000 rpm επί 10 λεπτά. Η υδατική φάση (40 μl) μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα 0.2 ml (Costar) που περιείχε 2.5 όγκους παγωμένης αιθανόλης, το μίγμα τοποθετήθηκε επί μια ώρα στους -80 °C και ακολούθησε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων και επαναδιάλυσή τους σε 15 μl νερό DEPC. Η αντίδραση μεταγραφής πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1 μg DNA σε μικροσωλήνα 0.2 ml που περιείχε το διάλυμα της αντιδράσεως (1 mM ολιγονουκλεοτιδίων dNTPs, 1x transcription buffer, 20 μονάδες ενζύμου Protector RNase Inhibitor και 40 μονάδες ενζύμου T7 RNA πολυμεράση, νερό DEPC μέχρι τελικού όγκου 20 μl) και επώαση του διαλύματος επί μία ώρα στους 37 °C.



Μετά το πέρας της αντιδράσεως ακολούθησε πέψη με 20 μονάδες ενζύμου DNase I για την απομάκρυνση της περίσσειας DNA και κατακρήμνιση του RNA με 4 M χλωριούχο λίθιο (Sambrook *et al.*, 1989). Το ίζημα των νουκλεϊκών οξέων αναδιαλύθηκε σε 15 μl νερό DEPC που περιείχαν 20 μονάδες του ενζύμου Protector RNase Inhibitor (Roche) για την αποφυγή αποδομήσεως του RNA από τις ριβονουκλεάσες. Δύο μl του τελικού

προϊόντος χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκεντρώσεως και της ποιότητας του RNA με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

3.6.3. Καμπύλη αναφοράς

Για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς (standard curve) με σκοπό την απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantitation) αντιγράφων PLMVd σε άγνωστα δείγματα, προετοιμάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις (10^0 - 10^{-10}), σε νερό DEPC, μεταγραφημάτων RNA του PLMVd, που συντέθηκαν παραπάνω, αρχικής συγκεντρώσεως 10 ng/μl. Για τη μετατροπή των ng μονόκλωνου RNA αρχικά σε picomole και στην συνέχεια σε αριθμό αντιγράφων (copies) χρησιμοποιήθηκε ο μαθηματικός τύπος: Αριθμός αντιγράφων (c)=(ssRNA/Nbx340)xAc. Όπου ssRNA: gr/μl μονονηματιδιακό RNA (προϊόν μεταγραφής), Nb: μήκος μεταγραφήματος (338 nt [PLMVd] + 150 nt [τμήμα του πλασμιδίου]), 340: μοριακό βάρος σε gr κάθε ριβονουκλεοτιδίου, Ac: 6.023×10^{23} , σταθερά Avogardo (Avogardo 1811). Η χάραξη της καμπύλης αναφοράς έγινε με ανάλυση γραμμικής παλινδρομήσεως (linear regression analysis) της μέσης τιμής οριακού κύκλου (average threshold cycle, ACT) των τριών επαναλήψεων των πρότυπων αραιώσεων σε σχέση με το δεκαδικό λογάριθμο (log) του συνολικού αριθμού αντιγράφων που υπήρχαν σε κάθε δείγμα. Η λήψη των δεδομένων και η ανάλυση αυτών έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος SDS 1.2.3 (Applied Biosystems). Ο βαθμός αποδόσεως της real time RT-PCR υπολογίστηκε με βάση τον μαθηματικό τύπο $E = e^{10/s} - 1$. Όπου s: κλίση (slope) της καμπύλης αναφοράς.

3.6.4. Πρωτόκολλο real time RT-PCR ενός σταδίου (one step real time RT-PCR)

Οι αντιδράσεις real time έγιναν σε πλάκα πολυπροπυλενίου (polypropylene plate) MicroAmp optical reaction plates (Applied Biosystems) 96 θέσεων χρησιμοποιώντας το κυτίο

TaqMan One Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems) σε τελικό όγκο 25 μ l. Σύμφωνα με τις οδηγίες, το διάλυμα αντιδράσεως αποτελείτο από 12.5 μ l 2x *ampliTaq gold DNA polymerase mix*, 0.625 μ l *multiscribe RNase inhibitor mix*, 0.75 μ l ανοδικού (PLMVdF) και 0.75 μ l καθοδικού εκκινητή (PLMVdR) (10 μ M), 0.75 μ l ανιχνευτή PLMVd *TaqMan probe* (5 μ M), 1 μ l ολικό RNA ή cRNA transcripts και νερό DEPC μέχρι τελικού όγκου 25 μ l. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα στον θερμοκυκλοποιητή πραγματικού χρόνου (real time thermocycler) ABI 7000 DNA sequence system (Applied Biosystems) σύμφωνα με το προφίλ: 30 λεπτά στους 48 °C (στάδιο αντίστροφης μεταγραφής), 10 λεπτά στους 94 °C και 40 κύκλοι των 15 δευτερολέπτων στους 94 °C ενός λεπτού στους 60 °C.

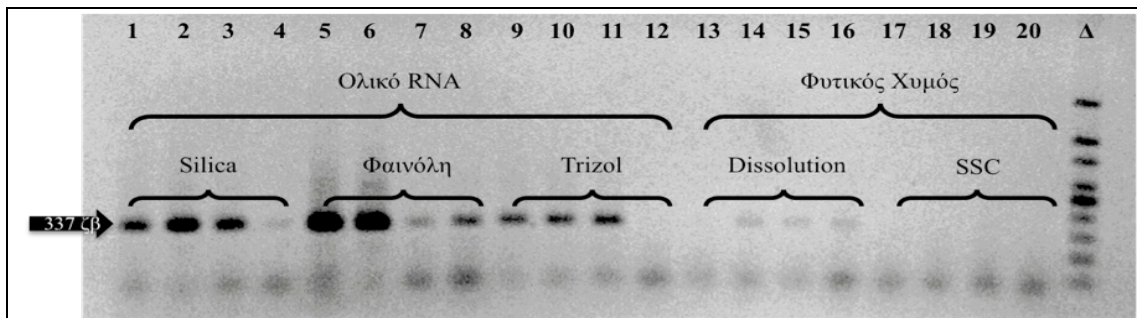
4. Αποτελέσματα

4.1. Εκμαγείο one tube-two step RT-PCR

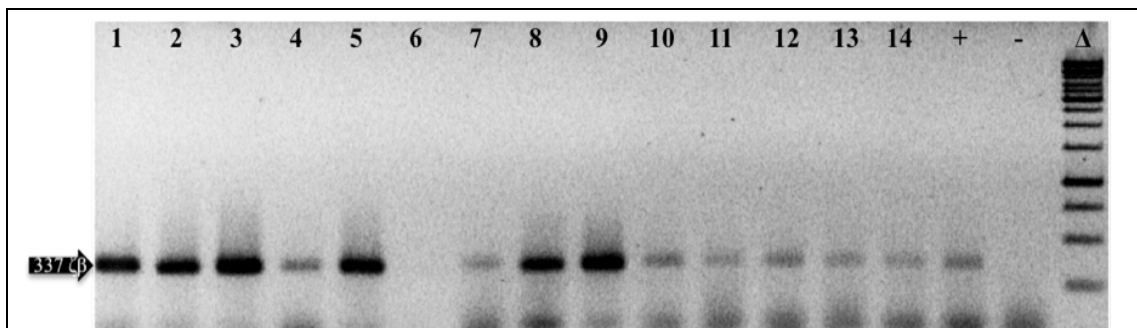
Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το πρωτόκολλο της one tube-two step RT-PCR για το μαζικό έλεγχο δειγμάτων για την παρουσία του PLMVd, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποτελεσματικότητας-ευαισθησίας πέντε διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης, χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις (10^0 - 10^{-3}) ολικού RNA ή εκχύλισματος φυτικού χυμού σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Σύμφωνα με την Εικόνα 5, το πρωτόκολλο εκχύλισης ολικού RNA των Faggioli *et al.*, (2001) (μέθοδος φαινόλης) παρουσίασε την υψηλότερη ευαισθησία, με τα πρωτόκολλα silica (Rott and Jelkmann, 2001) και TRIZOL (Invitrogen) να ακολουθούν. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η ανίχνευση του ιοειδούς ακόμη και στην αραιώση 10^{-3} με εκμαγείο εκχύλιση φυτικού χυμού σε dissolution buffer. Μειονέκτημα στην μέθοδο ήταν η χαμηλή ένταση του σήματος. Σε αντίθεση με τα παραπάνω πρωτόκολλα, εκείνο της χρήσεως του ρυθμιστικού διαλύματος SCC + Na₂SO₃ αποδείχθηκε ανεπαρκές για την ανίχνευση του ιοειδούς.

4.2. Δείγματα αγρού

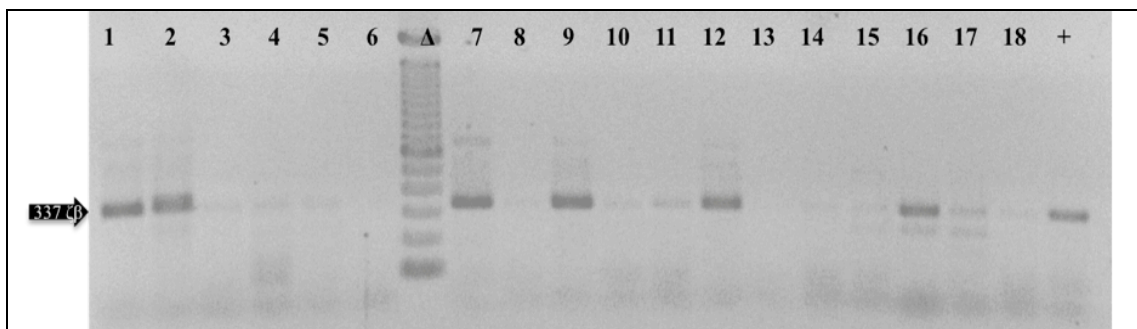
Η RT-PCR και ο μοριακός υβριδισμός στυπώματος κηλίδας RNA χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα για τον έλεγχο του συνόλου των δειγμάτων αγρού για την ανίχνευση του PLMVd. Στην RT-PCR ανιχνεύθηκαν προϊόντα, το μέγεθος των οποίων ήταν παρόμοιο με εκείνο των θετικών μαρτύρων (337-340 ζβ) (Εικόνα 6) και η ένταση του σήματος ήταν υψηλή στις περισσότερες περιπτώσεις θετικών δειγμάτων ροδακινιάς, αλλά χαμηλή έως πολύ χαμηλή όταν επρόκειτο για δείγματα άλλων πυρηνοκάρπων (βερικοκιά, δαμασκηλιά, κερασιά) ή δείγματα μηλοειδών (απιδιά, άγρια απιδιά, κυδωνιά) (Εικόνα 7). Παρόμοια ήταν η κατάσταση και στο μοριακό υβριδισμό, με τα δείγματα ροδακινιάς να δίνουν υψηλότερης εντάσεως σήμα σε σχέση με τα άλλα είδη (Εικόνα 8).



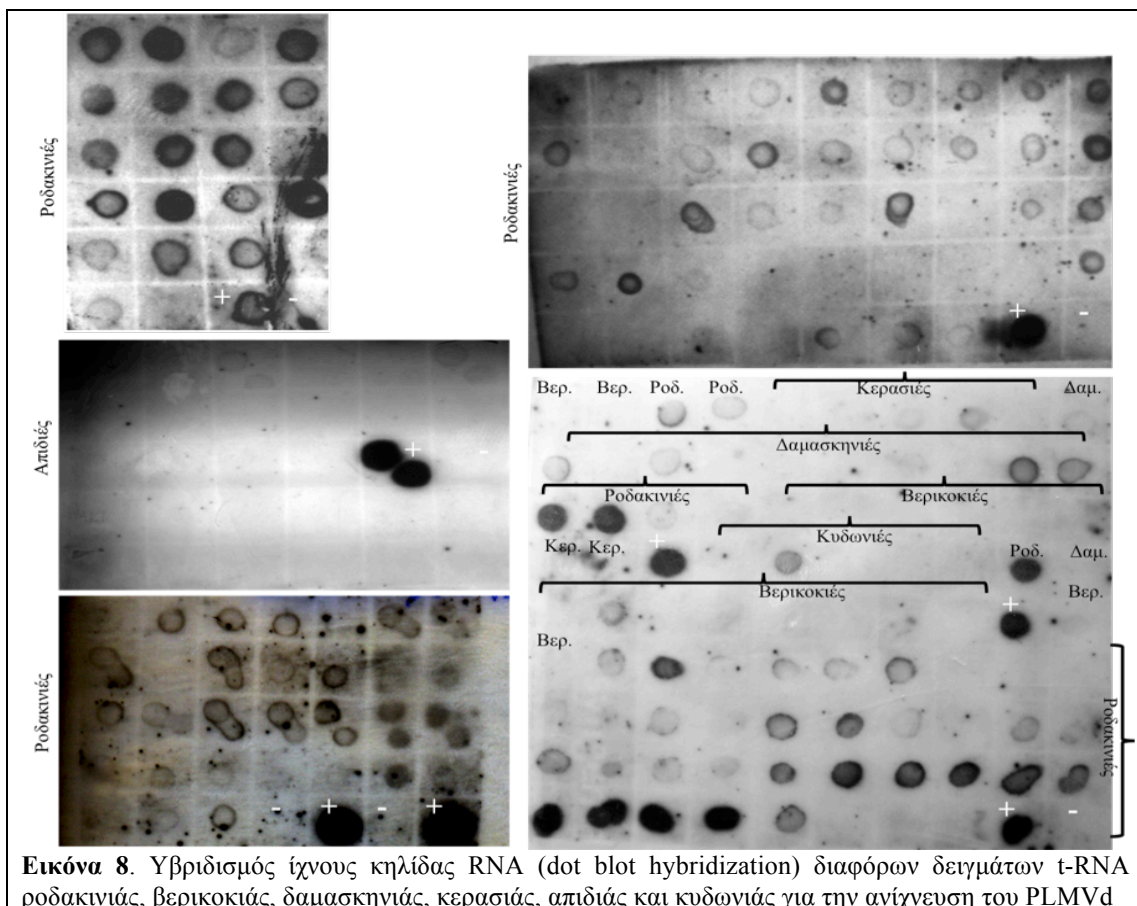
Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων one tube-two step RT-PCR για την ανίχνευση του PLMVd χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο διαδοχικές αραιώσεις ολικού RNA: πρωτόκολλο silica (διαδρομές 1-4), πρωτόκολλο φαινόλη (διαδρομές 5-8), πρωτόκολλο TRIZOL (διαδρομές 9-12) ή εκχυλίσματος φυτικού χυμού σε ρυθμιστικό διάλυμα dissolution (διαδρομές 13-16) και SSC (διαδρομές 17-20). Διαδρομές 1, 5, 9, 13, 17: αραιώση 10^0 , Διαδρομές 2, 6, 10, 14, 18: αραιώση 10^{-1} , Διαδρομές 3, 7, 11, 15, 19: αραιώση 10^{-2} , Διαδρομές 4, 8, 12, 16, 20: αραιώση 10^{-3} . Με (Δ) συμβολίζεται ο δείκτης μοριακών βαρών 100 ζβ (New England Biolabs)



Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων RT-PCR για τη διάγνωση του ιοειδούς PLMVd σε ροδακινιές. Οι κωδικοί των δειγμάτων από το 1-14 είναι: No 8, 9, 42, 47, 52, 54, 133, 135, 140, 162, 167, 195, 198, 201. Με έντονη γραφή συμβολίζονται τα θετικά δείγματα, με (+), (-) ο θετικός μάρτυρας και ο αρνητικός μάρτυρας και με (Δ) ο δείκτης μοριακών βαρών 250 ζβ (New England Biolabs, Hertfordshire, England, UK)



Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων RT-PCR για τη διάγνωση του PLMVd σε διάφορα είδη πυρηνοκάρπων και μηλοειδών. Διαδρομές 1, 2, 6, 7, 9, 12: ροδακινιές (No 21, 23, 25, 26, 29, 34), διαδρομές 3-5: βερικοκιές (No 2, 6, 9), διαδρομές 8, 10, 11: δαμασκηινιές (No 1, 3, 4), διαδρομές 13, 16, 17: απιδιές (No 6, 15, 2) διαδρομές 14, 15: άγριες απιδιές (No 3, 4) και διαδρομή 18: κυδωνιά (No 4). Με έντονη γραφή συμβολίζονται τα θετικά δείγματα, με (+) συμβολίζεται ο θετικός μάρτυρας και με (Δ) ο δείκτης μοριακών βαρών 100 ζβ (New England Biolabs, Hertfordshire, England, UK)



Εικόνα 8. Υβριδισμός ίχνους κηλίδας RNA (dot blot hybridization) διαφόρων δειγμάτων t-RNA ροδακινιάς, βερικοκιάς, δαμασκηνιάς, κερασιάς, απιδιάς και κυδωνιάς για την ανίχνευση του PLMVd

Όσον αφορά τα 203 δείγματα ροδακινιάς, αυτά ανήκαν σε 11 διαφορετικές ποικιλίες και το ιοειδές ανιχνεύθηκε στα 158 (77.8%) με την RT-PCR και στα 130 (64%) με υβριδισμό στυπώματος κηλίδας (dot-blot) (Εικόνα 6, 8, Πίνακας 3). Το ιοειδές ανιχνεύθηκε και στις 11 ποικιλίες ροδακινιάς, με την May Crest να παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό προσβολής, 86.6 % (26/30) και τη Symphony το χαμηλότερο, 66% (8/12). Όλα τα δείγματα που προήλθαν από ροδακινιές με συμπτώματα σχισμών στη ραφή των καρπών βρέθηκαν μολυσμένα με το PLMVd (Εικόνα 1). Θετικά βρέθηκαν επίσης δείγματα με μωσαϊκό ή παραμόρφωση του ελάσματος των φύλλων και σπάσιμο του χρώματος των πετάλων των ανθέων ή και ακόμη δείγματα δίχως εμφανή συμπτώματα (Εικόνα 1). Τα τελευταία προήλθαν από δενδρύλλια δύο-τριών ετών που είχαν πρόσφατα φυτευτεί. Το σύμπτωμα της λευκάνσεως του ελάσματος των φύλλων καθώς και προϊόν PCR μεγέθους περίπου 350 ζβ που παραπέμπουν στην παρουσία της παραλλαγής Peach Calico (PLMVd-PC) δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα παραπάνω δείγματα ροδακινιάς. Πέραν όμως από τη ροδακινιά, η παρουσία του ιοειδούς καταγράφηκε και σε άλλα είδη πυρηνοκάρπων (20/111, 18 %) και μηλοειδών (8/56, 14 %) τόσο με την RT-PCR (28/168, 16.6%) όσο και με τον υβριδισμό dot-blot, αλλά σε μικρότερο ποσοστό 8.3% (14/168).

Πίνακας 3. Συχνότητα παρουσίας του ιοειδούς PLMVd σε δείγματα ροδακινιάς και άλλων πυρηνοκάρπων και μηλοειδών έτσι όπως καταγράφηκε με τη βοήθεια των διαγνωστικών μεθόδων RT-PCR και μοριακό υβριδισμό dot-blot

Φυτικό είδος	Ποικιλία	Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν	Θετικά (%)		Περιοχή
			RT-PCR	Υβριδισμός dot-blot	
Ροδακινιά	Spring Crest	16	14	12	Κλένια, Αργολίδα
	May Crest	9	8	8	Κλένια, Αργολίδα
	Sun Crest	20	16	15	Κλένια, Αργολίδα
	Sun Crest	18	14	14	Νάουσα, Ημαθία
	Λευκόσαρκα (ποικιλία άγνωστη)	15	12	10	Επισκοπή, Ημαθία
	June Gold	7	5	5	Επισκοπή, Ημαθία
	Symphony	12	8	5	Μονόσπιτα, Ημαθία
	Red Haven	21	16	12	Μονόσπιτα, Ημαθία
	Fortuna	13	10	8	Νάουσα, Ημαθία
	Red Haven	16	11	7	Μεγαπλάτανος, Πέλλα
	Sun Cloud	23	17	13	Βελβεντός, Κοζάνη
	May Crest	21	18	15	Τύρναβος, Λάρισα
	Άγνωστη	12	9	6	Άνω Λεχώνια Πηλίου, Μαγνησία
	Σύνολο	203	158 (77,8%)	130 (64%)	
Βερικοκιά	Διαμαντοπούλου	13	4	2	Κλένια, Αργολίδα
	Αδαμοπούλου	10	1	0	Κλένια, Αργολίδα
	Μπεμπέκου	8	1	1	Κυλλήνη, Ηλεία
	Άγνωστη	4	0	0	Άνω Λεχώνια Πηλίου, Μαγνησία
	Σύνολο	35	6 (17%)	3 (8,5%)	
Δαμασκηνιά	Angelino	4	4	3	Κλένια, Αργολίδα
	Άγνωστη	20	3	1	Άνω Λεχώνια Πηλίου, Μαγνησία
	Angelino	6	1	0	Μεγαπλάτανος, Πέλλα
	Angelino	11	2	1	Νάουσα, Ημαθία
	President	5	1	0	Νάουσα, Ημαθία
	Black Gold	3	0	0	Νάουσα, Ημαθία
	Σύνολο	49	11 (22%)	5 (5%)	
Κερασιά	Verona	6	0	0	Μεγαπλάτανος, Πέλλα
	Τραγανό Εδέσσης	4	1	1	Μεγαπλάτανος, Πέλλα
	Burla	8	1	1	Μεγαπλάτανος, Πέλλα
	Άγνωστη	9	1	0	Άνω Λεχώνια Πηλίου, Μαγνησία
	Σύνολο	27	3 (11%)	2 (7%)	
Απιδιά	Κοντούλα	9 (2/5)*	2	2	Καρατζάς Τροιζηνίας, Πειραιάς

Η ΡΟΔΑΚΙΝΙΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΕΙΔΗ ΠΥΡΗΝΟΚΑΡΠΩΝ ΚΑΙ ΜΗΛΟΕΙΔΩΝ ΩΣ ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΤΟΥ
PLMVd ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΣΤΟ ΦΥΤΩΡΙΑΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΡΟΔΑΚΙΝΙΑΣ

		12 (0/4)*	1	0	Κλένια, Αργολίδα
		9	1	0	Άνω Λεχώνια Πηλίου, Μαγνησία
	Σύνολο	30	4 (13%)	2 (6.6%)	
Κυδωνιά	Υποκείμενο	4 (0/4)*	1	1	Καρατζάς Τροιζηνίας,
	Άγνωστη	3	0	0	Πειραιάς
	Άγνωστη	16	1	1	Άνω Λεχώνια Πηλίου, Μαγνησία
	Σύνολο	23	2 (8,7%)	2 (8,7%)	
Άγρια απιδιά	Υποκείμενο	2 (1/2)*	1	-	Καρατζάς Τροιζηνίας, Πειραιάς
	Αυτοφυές	1 (1/1)*	1	-	Καρατζάς Τροιζηνίας, Πειραιάς
	Σύνολο	3	2	-	
Σύνολο		370	186 (50%)	144 (38,9%)	

*: Τα αποτελέσματα ελέγχου της παρουσίας του PLMVd των δειγμάτων αυτών στο Β μέρος (σελ. 49)

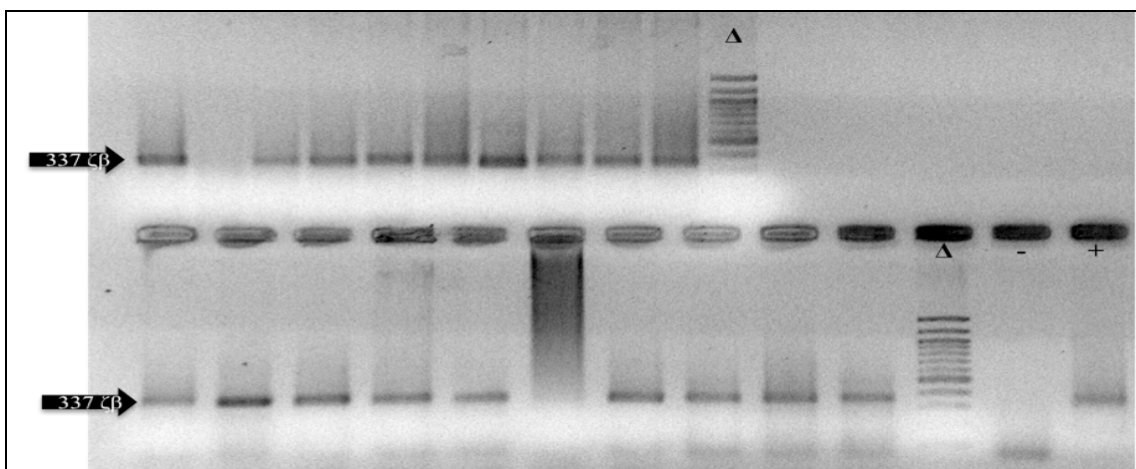
Όσον αφορά τη βερικοκιά, το PLMVd ανιχνεύθηκε σε έξι δείγματα (σύνολο 35, 17 %) των ποικιλιών Αδαμοπούλου (No 17), Διαμαντοπούλου (No 2, 6, 8, 9) και Μπεμπέκου (No 28) στις περιοχές Κλένια Αργολίδας και Κυλλήνη Ηλείας, ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα από την περιοχή Άνω Λεχώνια Πηλίου. Το υψηλότερο ποσοστό παρουσίας του PLMVd σε είδος διαφορετικό της ροδακινιάς καταγράφηκε με τη βοήθεια της RT-PCR στην περίπτωση της δαμασκηνιάς (22%, 11/49). Αντίθετα το ποσοστό ήταν μόνο 5 % (5/49) όταν χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός υβριδισμός. Η πλειονότητα των θετικών δειγμάτων (επτά) προήλθε από δείγματα της ποικιλίας Angelino (No 1, 21, 3, 4, 27, 33, 36) και μόλις ένα από την ποικιλία President. Ιδιαίτερα υψηλό (100%) ήταν το ποσοστό προσβολής των δένδρων δαμασκηνιάς στη περιοχή Κλένια Αργολίδας. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα δείγματα δαμασκηνιάς, στην περίπτωση αυτή, προήλθαν από οπωρώνα με ροδακινιές May Crest που παρουσίασαν υψηλό ποσοστό προσβολής (8/9, 90%). Σε γειτνίαση με τον παραπάνω οπωρώνα ροδακινιάς βρισκόταν και ο οπωρώνας βερικοκιάς Αδαμοπούλου, στον οποίο καταγράφηκε το υψηλότερο ποσοστό (4/13, 30%) μολυσμένων με PLMVd δένδρων βερικοκιάς (Πίνακας 3). Το ιοειδές ανιχνεύθηκε επίσης και σε τρία δείγματα κερασιάς (σύνολο 27, 11%) των ποικιλιών Τραγανό Εδέσσης (1/4, No 9) και Burla (1/8, No 11) στο Μεγαπλάτανο Αριδαίας και σε ένα δείγμα μιας άγνωστης ποικιλίας στα Άνω Λεχώνια Πηλίου, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στην ποικιλία Verona.

Όσον αφορά τον έλεγχο μηλοειδών, το ιοειδές ανιχνεύθηκε με την RT-PCR σε τέσσερα δείγματα απιδιάς ποικιλίας Κοντούλα (σύνολο 30, 13 %) στις περιοχές Καρατζάς Τροιζηνίας (No 2, 3), Κλένια Κορινθίας (No 15) και Άνω Λεχώνια Πηλίου (No 29). Με τον μοριακό υβριδισμό dot-blot, θετικά βρέθηκαν μόνο τα δείγματα No 2 και 3 στα οποία είχε ανιχνευθεί το PLMVd κατά τον έλεγχο δειγμάτων απιδιάς που παρουσιάζεται στο Β μέρος (Πίνακας 3, σελ. 49). Το ιοειδές εντοπίστηκε επίσης τόσο με RT-PCR όσο και με υβριδισμό

dot-blot σε δύο δείγματα κυδωνιάς (σύνολο 23, 8.7%) στον Καρατζά Τροιζηνιάς (No 4) και στα Άνω Λεχώνια Πηλίου (No 12). Τέλος, όσον αφορά τα δείγματα άγριας απιδιάς, επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Β μέρος. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι όλα τα θετικά δείγματα που δεν ανήκαν στη ροδακινιά συλλέχθηκαν από οπωρώνες που γειτνιάζαν με οπωρώνες ροδακινιάς στους οποίους ανιχνεύθηκε το PLMVd, με εξαίρεση τον οπωρώνα στο Καρατζά Τροιζηνιάς που ήταν απομονωμένος.

4.3. Φυτωριακό υλικό

Ο έλεγχος του φυτωριακού υλικού (δενδρύλλια ενός έτους και μητρικά δένδρα 8-10 ετών) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της δοκιμής RT-PCR (Εικόνα 9). Συνολικά εξετάστηκαν 711 δείγματα ροδακινιάς (585) και νεκταρινιάς (126), τα οποία βρέθηκαν μολυσμένα με το PLMVd σε ποσοστό 68.3 % (σύνολο 486: 404 ροδακινιάς, 82 νεκταρινιάς) (Πίνακας 4, Εικόνα 9). Αναλυτικά, όσον αφορά τα δενδρύλλια ενός έτους, η παρουσία του ιοειδούς καταγράφηκε σε 181 δείγματα (σύνολο 353, 51.2 %), από τα οποία τα 172 ροδακινιάς (σύνολο 305, 53 %) και τα 9 νεκταρινιάς (σύνολο 48, 18.8 %) Το PLMVd ανιχνεύθηκε σε όλες τις ποικιλίες, με την Spring Bell (81.2 %), την A37 (86 %) και την Fayette (80 %) να παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά προσβολής και τις Orion (5 %) και May Crest (13.6 %) τα χαμηλότερα (Πίνακας 4). Ιδιαίτερο φυτοπαθολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό προσβολής των μητρικών δένδρων που ξεπερνά το 85 % (305/358). Στο δεύτερο μάλιστα φυτώριο ελεύθερα του ιοειδούς βρέθηκαν μόλις έξι φυτά ροδακινιάς και τέσσερα νεκταρινιάς από τα 158 συνολικά ελεγχθέντα, που αντιστοιχεί σε ποσοστό υγιών μόλις 6 %. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί πως, από τις 16 ποικιλίες ροδακινιάς και νεκταρινιάς, μητρικά δένδρα των οποίων εξετάστηκαν για την παρουσία του PLMVd, οι 14 βρέθηκαν μολυσμένες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70 %, εξ αυτών δε οι τέσσερις σε ποσοστό 100 % (Πίνακας 4).



Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης προϊόντων RT-PCR για τη διάγνωση του PLMVd σε μητρικά δένδρα της ποικιλίας May Crest. Με (+) και (-) συμβολίζονται ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα και με (Δ) ο δείκτης μοριακών βαρών 100 ζβ (New England Biolabs)

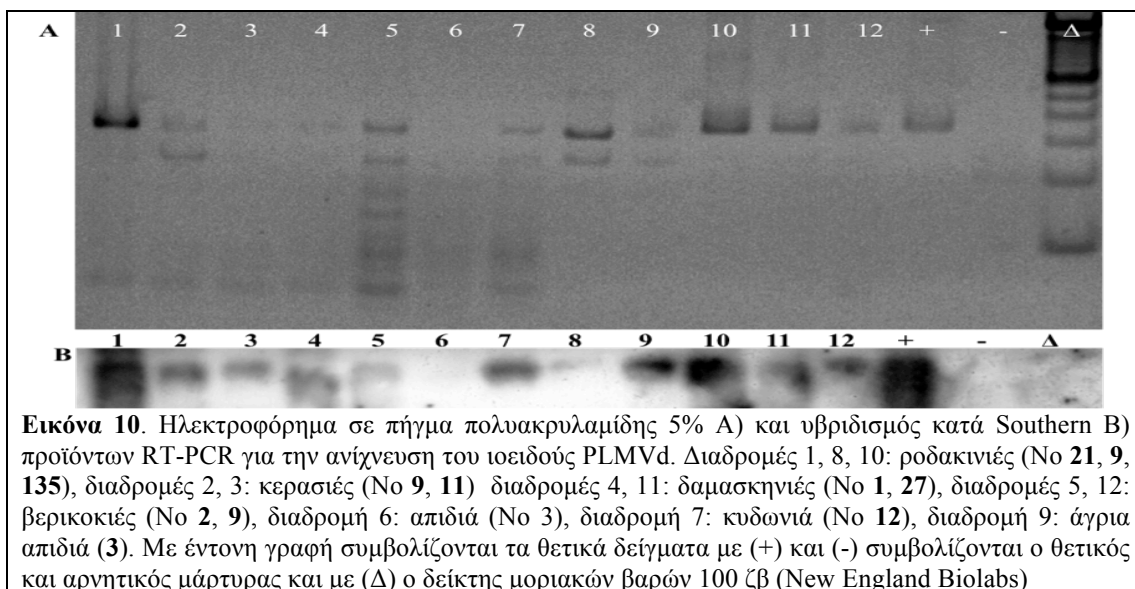
Πίνακας 4. Αποτελέσματα ελέγχου πολλαπλασιαστικού υλικού ροδακινιάς και νεκταρινιάς που εξετάστηκε για την παρουσία του ιοειδούς PLMVd

	Μητρικά δένδρα 8-10 ετών							
	Δενδρύλλια ενός έτους		Φυτώριο 2 ^ο		Φυτώριο 3 ^ο			
	2008	2009	2009	2009	2009	2009		
	Φυτώριο 1 ^ο	Φυτώριο 2 ^ο	Φυτώριο 3 ^ο	Φυτώριο 1 ^ο	Φυτώριο 2 ^ο	Φυτώριο 3 ^ο		
	Ποικιλία	Θ/Σ (%)	Ποικιλία	Θ/Σ (%)	Ποικιλία	Θ/Σ (%)		
	Spring Crest	10/20 (50%)	O' Henry	14/20 (70%)	Άνδρος	18/20 (90%)	Hall	16/20 (80%)
	Κατερίνα	10/24 (41,6%)	Glantis	14/20 (70%)	Spring Crest	17/20 (85%)	Red Haven	19/20 (95%)
	A-37	18/21 (86%)	Fayette	18/20 (90%)	May Crest	19/20 (95%)	May Rich	18/20 (90%)
	May Crest	3/22 (13,6%)	Spring Bell	20/20 (100%)	Royal Glory	20/20 (100%)	Λεμονάτα Βόλου	16/20 (80%)
	Sun Crest	8/30 (26%)	Fire Top	6/20 (30%)			Cardinal	14/20 (70%)
Ροδακινιές	Spring Bell	13/20 (65%)					July Lady	10/20 (50%)
	Άνδρος	19/28 (67,8%)					Rubi du	14/20 (70%)
	François	5/20 (25%)					Spring Crest	10/20 (50%)
	Fayette	14/20 (70%)					Early Crest	20/20 (100%)
	Σύνολο	100/205 (48%)	Σύνολο	72/100 (72%)	Σύνολο	74/80 (82,5%)	Σύνολο	157/200 (78,5%)
Νεκταρινιές	Tasty Free	8/28 (28,5%)	Orion	1/20 (5%)	Big Top	18/20 (90%)		
					Reg Gold	19/20 (95%)		
					Galtezi	20/20 (100%)		
					Adrianna	17/18 (94%)		
	Σύνολο	8/28 (28,5%)	Σύνολο	1/20 (5%)	Σύνολο	74/78 (95%)		
Σύνολο	181/353 (51,2%)		305/358 (85%)					

Θ/Σ: Αριθμός θετικών/Συνολικός αριθμός ελεγχθέντων δειγμάτων

4.4. Υβριδισμός κατά Southern (Southern blot)

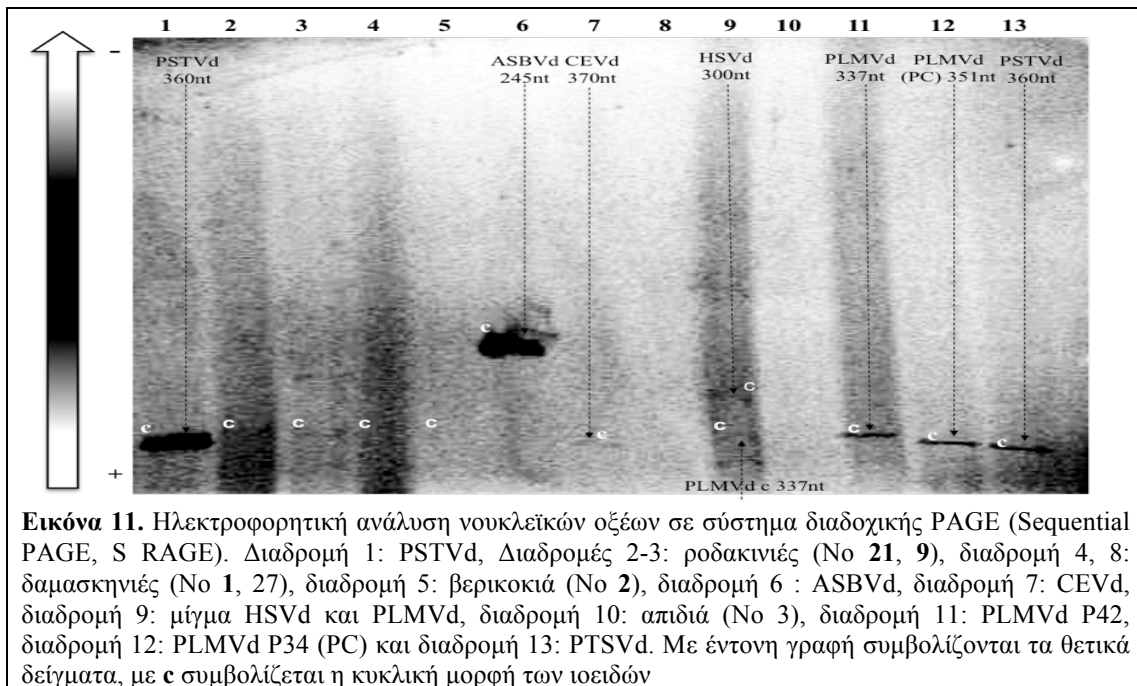
Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήγμα πολυακρυλαμίδης 5 %, προϊόντων RT-PCR με τη χρήση των εκκινητών PLMVdhL/PLMVdcL (Loreti *et al.*, 1999) σε δείγματα ροδακινιάς (No 21, 9, 35), βερικοκιάς (No 2, 3), δαμασκηνιάς (No 1, 27), κερασιάς (9, 11), απιδιάς (No 3), κυδωνιάς (No 12) και άγριας απιδιάς (No 3) έδειξε την παρουσία μιας κύριας ζώνης μεγέθους περίπου 340 ζβ, η ένταση της οποίας με εξαίρεση τα δείγματα ροδακινιάς (Εικόνα 10Α διαδρομές 1, 8, 10) ήταν χαμηλή έως πολύ χαμηλή, όπως για παράδειγμα στα δείγματα που αντιστοιχούν στις διαδρομές 3 (κερασιά No 11) και 4 (δαμασκηνιά No 1). Υβριδισμός κατά Southern με τη χρήση του ιχνηλάτη dsDNA PLMVd-dig έδειξε πως τα προϊόντα της RT-PCR, όχι μόνο εκείνα των δειγμάτων ροδακινιάς αλλά και των άλλων φυτικών ειδών, αντιστοιχούν στο PLMVd (Εικόνα 10Β). Εξαίρεση αποτέλεσε το δείγμα απιδιάς No 3 (διαδρομή 6) για το οποίο δεν καταγράφηκε σήμα υβριδισμού πιθανότατα λόγω απουσίας ή πολύ μικρής συγκεντρώσεως του προϊόντος της RT-PCR.



4.5. Δοκιμή Sequential PAGE (S-PAGE)

Ηλεκτροφορητική ανάλυση εκχυλίσματος νουκλεϊκών οξέων δειγμάτων ροδακινιάς (No 21, 9), δαμασκηνιάς (No 1, 27), βερικοκιάς (No 2) και απιδιάς (No 3) παρουσία θετικών μαρτύρων (PSTVd, ASBVd, CEVd, HSVd, PLMVd P42, PLMVd P34 [PC]) αρχικά σε πήγμα πολυακρυλαμίδης 5 % (συνθήκες μη αποδιατάξεως) και στη συνέχεια σε πήγμα 7 % κάτω από συνθήκες χημικής αποδιατάξεως, αποκάλυψε μετά από χρώση του πηγματος με νιτρικό άργυρο (AgNO₃) την παρουσία, σε ορισμένα από τα υπό μελέτη δείγματα, ζωνών που πιθανότατα αντιστοιχούν στο PLMVd. Σαφής ήταν η ζώνη που αντιστοιχούσε στην κυκλική πιθανότατα μορφή του PLMVd στα δείγματα ροδακινιάς No 21 και 9 (Εικόνα 11 διαδρομές 2, 3). Αντίθετα, πολύ δύσκολα διακριτή ήταν η αντίστοιχη ζώνη των δειγμάτων δαμασκηνιάς

No 1 (διαδρομή 4) και βερικοκιάς 2 (διαδρομή 5). Καμία ζώνη δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα δαμασκηνιά No 27 (διαδρομή 8) και απιδιά No 3 (διαδρομή 10).

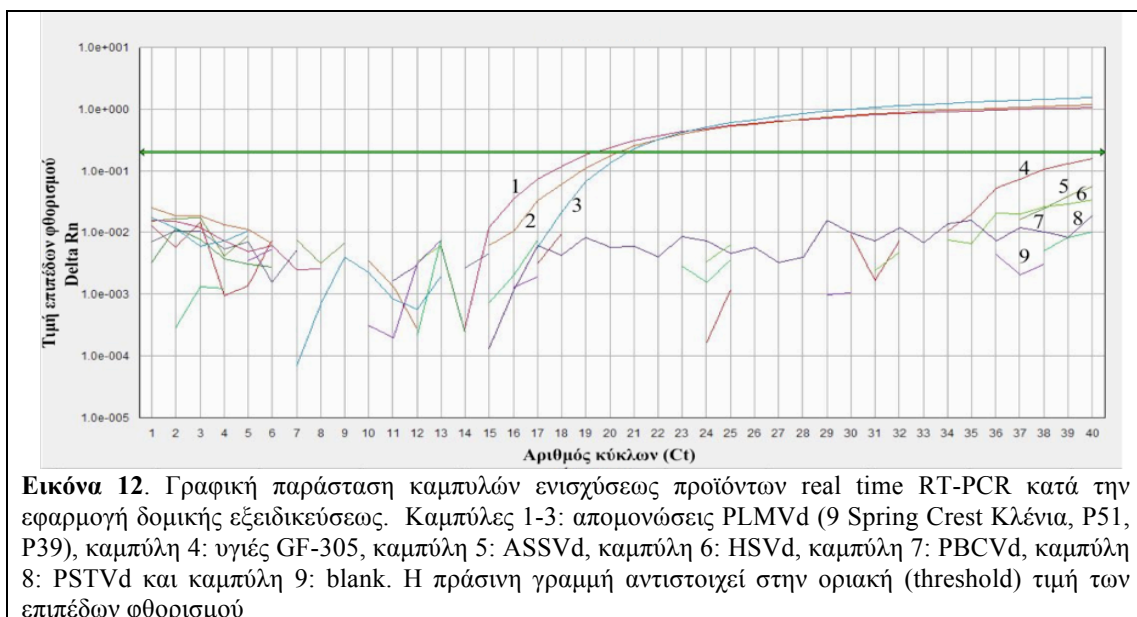


Εικόνα 11. Ηλεκτροφορητική ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε σύστημα διαδοχικής PAGE (Sequential PAGE, S RAGE). Διαδρομή 1: PSTVd, Διαδρομές 2-3: ροδακινίες (No 21, 9), διαδρομή 4, 8: δαμασκηνιές (No 1, 27), διαδρομή 5: βερικοκιά (No 2), διαδρομή 6 : ASBVd, διαδρομή 7: CEVd, διαδρομή 9: μίγμα HSVd και PLMVd, διαδρομή 10: απιδιά (No 3), διαδρομή 11: PLMVd P42, διαδρομή 12: PLMVd P34 (PC) και διαδρομή 13: PTSVd. Με έντονη γραφή συμβολίζονται τα θετικά δείγματα, με c συμβολίζεται η κυκλική μορφή των ιοειδών

4.6. Ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time RT-PCR)

4.6.1. Δοκιμές εξειδικεύσεως

Κατά την εφαρμογή δοκιμών εξειδικεύσεως της real time RT-PCR, σύμφωνα με την Εικόνα 12 σήμα φθορισμού καταγράφηκε μόνο στις περιπτώσεις του δείγματος ροδακινιάς No 9 (Spring Crest, Κλένια) και των ιταλικών απομονώσεων P51 και P39 (PC) του PLMVd. Αντίθετα, σήμα δεν καταγράφηκε όταν ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε RNA άλλων ιοειδών όπως το ASSVd, HSVd, PBCVd και PSTVd, καθώς και στην περίπτωση του υγιούς δείγματος GF-305 και του Blank.

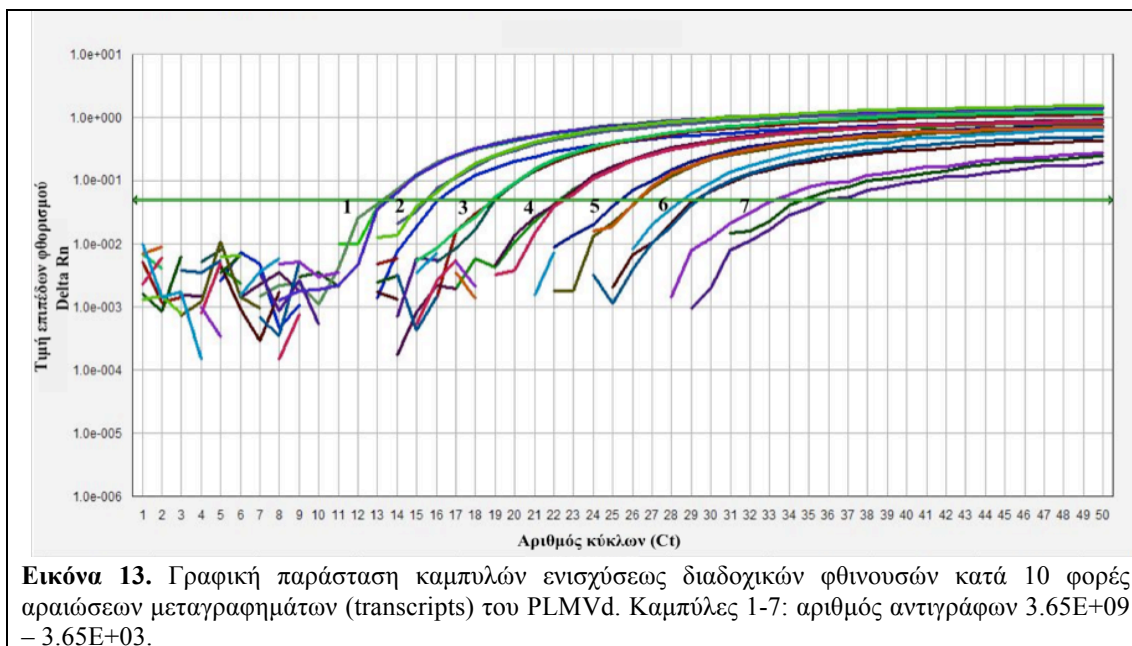


Εικόνα 12. Γραφική παράσταση καμπυλών ενισχύσεως προϊόντων real time RT-PCR κατά την εφαρμογή δομικής εξειδικεύσεως. Καμπύλες 1-3: απομονώσεις PLMVd (9 Spring Crest Κλένια, P51, P39), καμπύλη 4: υγιές GF-305, καμπύλη 5: ASSVd, καμπύλη 6: HSVd, καμπύλη 7: PBCVd, καμπύλη 8: PSTVd και καμπύλη 9: blank. Η πράσινη γραμμή αντιστοιχεί στην οριακή (threshold) τιμή των επιπέδων φθορισμού

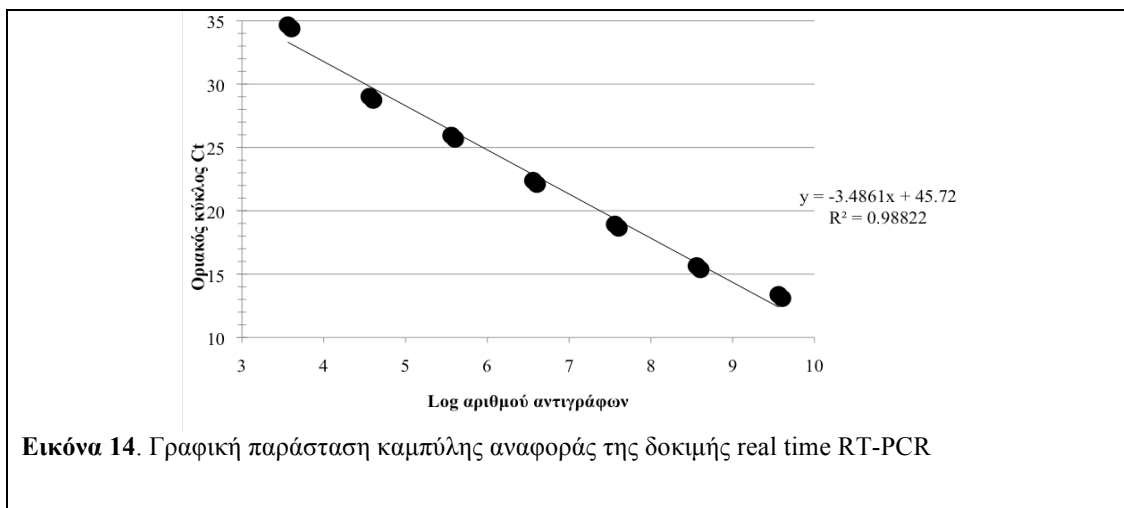
4.6.2. Καμπύλη αναφοράς (standard curve)

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της δοκιμής real time RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν εις τριπλούν διαδοχικές, φθίνουσες ανά 10 φορές, αραιώσεις συμπληρωματικών μεταγραφημάτων RNA του PLMVd (PLMVd cRNA transcripts) που περιείχαν από 3.65×10^{10} (3.65×10^{10}) έως 3.65 αντίγραφα (copies). Τα αποτελέσματα έδειξαν γραμμικότητα μεταξύ τιμής οριακού κύκλου (Ct) και log του αριθμού αντιγράφων από τον 13^ο έως τον 35^ο κύκλο που αντιστοιχούσε σε 3.65×10^9 και 3.65×10^3 αντίγραφα, αντίστοιχα. Χαρακτηριστικές γραφικές παραστάσεις των καμπυλών ενισχύσεως και της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς παρουσιάζονται στην Εικόνα 13 και 14. Από την ανάλυση παλινδρομήσεως (regression analysis) προέκυψε συντελεστής συσχετίσεως (R^2) με τιμή 0.9822, κλίση (slope, s) με τιμή -3.4861 και σημείο τομής της γραμμικής εξίσωσης με τιμή 45.72. Με βάση την κλίση της καμπύλης αναφοράς, η τιμή E (efficiency) 1.868 αντιστοιχεί σε αποδοτικότητα της δοκιμής real time RT-PCR 93.4 %.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ήταν δυνατή η ανίχνευση έως και 3.65×10^2 αντιγράφων του PLMVd. Όμως, η ποσοτικοποίηση τόσο μικρού αριθμού αντιγράφων δεν ήταν αξιόπιστη διότι αντιστοιχούσε στο μη γραμμικό τμήμα της καμπύλης αναφοράς, κάτι το οποίο ίσχυε και για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (3.65×10^{10} αντίγραφα/μl). Έτσι τα 3.65×10^3 αντίγραφα θεωρήθηκαν ως το όριο ανιχνεύσεως της μεθόδου με τιμή οριακού κύκλου (Ct value) 35. Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα των οποίων ο παρατηρούμενος φθορισμός (fluorescent signal) ξεπέρασε την οριακή τιμή (threshold) και η τιμή οριακού κύκλου (Ct) ήταν μικρότερη ή ίση του 35.



Εικόνα 13. Γραφική παράσταση καμπυλών ενισχύσεως διαδοχικών φθίνουσών κατά 10 φορές αραιώσεων μεταγραφημάτων (transcripts) του PLMVd. Καμπύλες 1-7: αριθμός αντιγράφων 3.65×10^9 – 3.65×10^3 .



Εικόνα 14. Γραφική παράσταση καμπύλης αναφοράς της δοκιμής real time RT-PCR

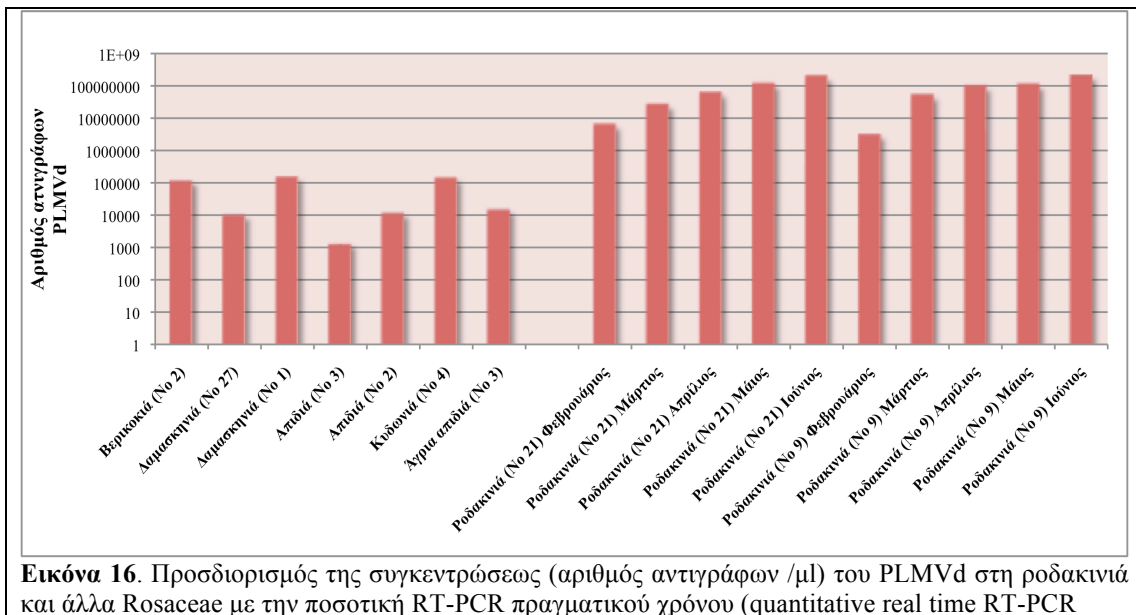
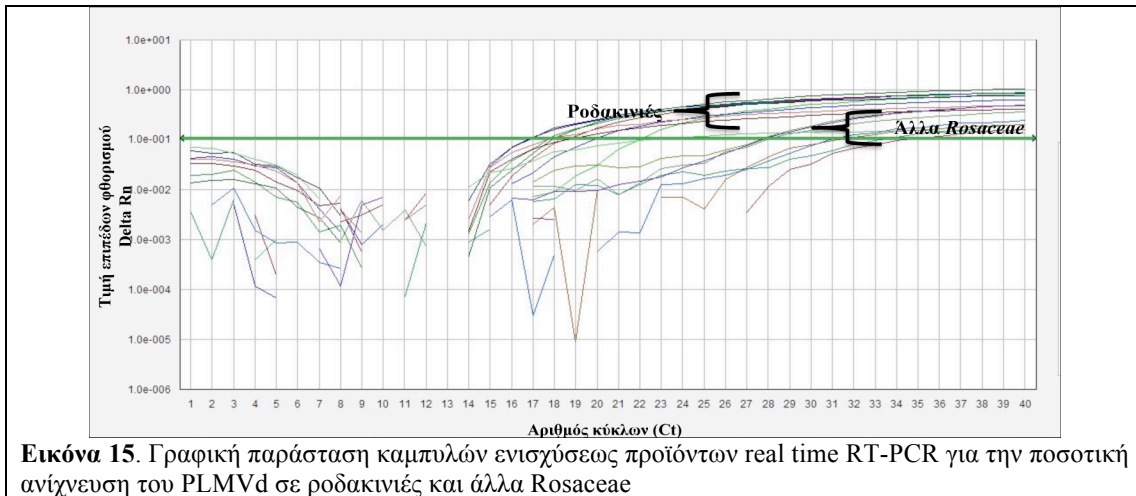
4.6.3. Ποσοτική ανίχνευση του PLMVd σε άγνωστα δείγματα ροδακινιάς και άλλων Rosaceae.

Μετά την ανάπτυξη της καμπύλης αναφοράς, πραγματοποιήθηκε real time RT-PCR με σκοπό την ποσοτική ανίχνευση του PLMVd σε δείγματα βερικοκιάς (No 3), δαμασκηνιάς (No1, No 27), απιδιάς (No 2, 3), κυδωνιάς (No 4) και άγριας απιδιάς (No 3), που συλλέχθηκαν κατά τον μήνα Ιούνιο και στα οποία είχε ήδη διαπιστωθεί η παρουσία του ιοειδούς με RT-PCR, υβριδισμό dot-blot και Southern και, σε ορισμένα, με S-PAGE, συμπεριλαμβανομένων των δειγμάτων ροδακινιάς 9 και 21 τα οποία συλλέχθηκαν κατά τους μήνες Φεβρουάριο, Μάρτιο, Απρίλιο, Μάιο και Ιούνιο του 2009. Η τιμή οριακού κύκλου για τα δείγματα ροδακινιάς No 9 και No 21 κυμάνθηκε αντίστοιχα από 22.17 έως 17.01 και 23.26 έως 16.91 για τους μήνες από Φεβρουάριο έως Ιούνιο (Εικόνα 15). Με βάση τον τύπο της γραμμικής εξισώσεως της καμπύλης αναφοράς, οι παραπάνω τιμές Ct αντιστοιχούν σε $5.68 \text{ E}+06$ έως $1.72 \text{ E}+08$ αντίγραφα PLMVd για το δείγμα 21 (May Crest, Κλένια) και $2.77 \text{ E}+06$ έως $1.83 \text{ E}+08$ για το δείγμα No 9 (Spring Crest, Κλένια) από τον Φεβρουάριο έως τον Ιούνιο, αντίστοιχα. Αντίθετα, η τιμή Ct για τα υπόλοιπα δείγματα κυμάνθηκε μεταξύ 27.83 (δαμασκηνιά No 1) και 34.99 (απιδιά No 3) που αντιστοιχούσε σε $1.3 \text{ E}+05$ και 1196 αντίγραφα, αντίστοιχα. Ο μεγαλύτερος αριθμός αντιγράφων προσδιορίστηκε στα δείγματα δαμασκηνιά No 1 ($1.3 \text{ E}+05$), κυδωνιά No 4 ($1.28 \text{ E}+05$) και βερικοκιά No 2 ($1.05 \text{ E}+05$) ενώ, ο μικρότερος στο δείγμα απιδιάς No 3 (1196) (Εικόνα 16).

5. Συζήτηση

Μελέτες για τη συχνότητα εμφάνισης του PLMVd έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορες χώρες. Με εργαλείο συνήθως τον μοριακό υβριδισμό στυπώματος κηλίδας φυτικού χυμού-RNA ή ιστού (dot-blot ή tissue print hybridization) και σε ένα βαθμό της RT-PCR διαπιστώθηκε ευρεία διάδοση του PLMVd στη ροδακινιά σε πολλές χώρες της Μεσογείου,

όπως η Ισπανία (88 %, Flores *et al.*, 1992), η Ιταλία (70 %, Faggioli and Barba, 2008), Αλβανία (52 %, Torres *et al.*, 2004), η Τυνησία (70 %, Fekih-Hassen *et al.*, 2007) και η Σερβία (54 %, Mandic *et al.*, 2008).



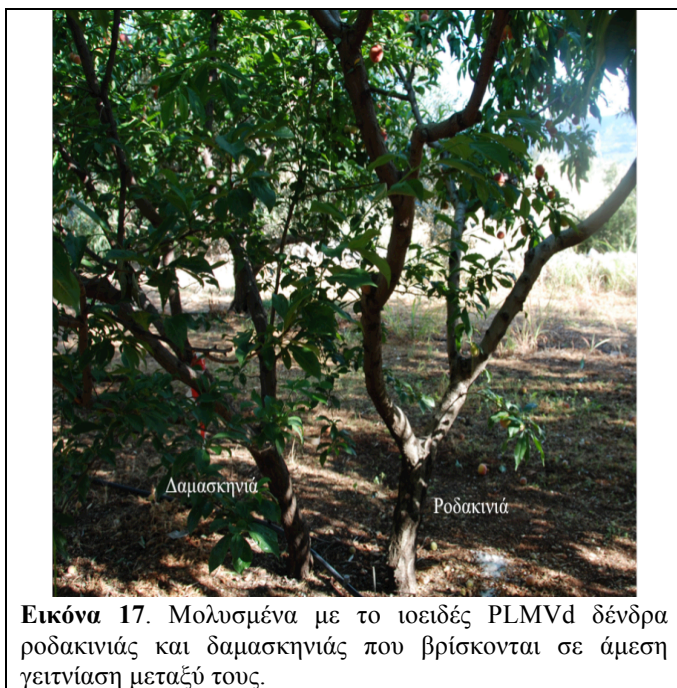
Στο παρόν κεφάλαιο, για τη μελέτη της συχνότητας εμφάνισης του ιοειδούς PLMVd στην Ελλάδα εφαρμόστηκε, στο σύνολο των δειγμάτων, πέραν του μοριακού υβριδισμού (dot-blot) και η τεχνική της RT-PCR χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της φαινόλης για την εκχύλιση t-RNA και το ζεύγος εκκινητών PLMVdhL/PLMVdcL τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν για την ανίχνευση του ιοειδούς (Loreti *et al.*, 1999, Faggioli *et al.*, 2001). Η συχνότητα παρουσίας του PLMVd στη χώρα μας ήταν ιδιαίτερα υψηλή (>75 %) και στην περίπτωση ορισμένων πρώιμων επιτραπέζιων ποικιλιών ροδακινιάς όπως η May Crest και η Spring Crest ξεπέρασε το 85 %. Η ευρεία διάδοση του PLMVd στους οπωρώνες ροδακινιάς πιθανώς σχετίζεται με την ικανότητα μεταδόσεως του με τα εργαλεία κοπής (κλαδευτικά ψαλίδια) (Hadidi *et al.*, 1997), ενώ δεν θα πρέπει να αγνοηθεί

και η ενδεχόμενη συμβολή των αφίδων *M. persicae* (Giunchedy *et al.*, 1998, Flores *et al.*, 1992, Desvignes 1986). Ο Desvignes (1999) μάλιστα αναφέρει ότι το PLMVd αποτελεί ένα ιδιαίτερα ενδημικό ιοειδές σε ακτίνα 20-30 μέτρων από ένα μολυσμένο δέντρο ροδακινιάς εάν λάβουμε υπόψη και τη δυνατότητα μεταδόσεώς του μέσω της γύρεως (Barba *et al.*, 2007). Μήπως όμως η αιτία της συχνότατης παρουσίας του PLMVd δεν κρύβεται μόνο στο τρόπο μεταδόσεως του στον αγρό, και κυρίως, ένα βήμα πιο πριν, στο φυτώριο; Μήπως τα δενδρύλλια που χρησιμοποιούν οι παραγωγοί είναι εξ αρχής μολυσμένα σε υψηλό ποσοστό και απλά η μετάδοση με τα εργαλεία και ενδεχομένως με τις αφίδες απλά συμβάλλει στη περαιτέρω αύξηση του ποσοστού αυτού; Τα αποτελέσματα του ελέγχου φυτωριακού υλικού ροδακινιάς-νεκταρινιάς επιβεβαίωσαν την υπόθεση αυτή, καθώς από τις 29 ποικιλίες που εξετάστηκαν καμία δεν βρέθηκε ελεύθερη του ιοειδούς, αντίθετα, περισσότερο από το 50 % των συνολικών δειγμάτων που εξετάστηκαν βρέθηκαν μολυσμένα, με το ποσοστό να φτάνει σε ορισμένες περιπτώσεις το 86 % ή ακόμη και το 100 %, όπως για παράδειγμα στις ποικιλίες A37 και Spring Bell, αντίστοιχα. Η άκρη όμως του νήματος βρίσκεται ακόμη ένα βήμα πριν, στις μητρικές φυτείες που χρησιμοποιούνται ως πηγή των εμβολίων. Η παρούσα εργασία έδειξε πως ακόμη και σε υπερσύγχρονες κατά τ' άλλα φυτωριακές μονάδες έλειπε το βασικό συστατικό, το υγιές μητρικό πολλαπλασιαστικό υλικό, καθώς το 85 % των μητρικών δένδρων βρέθηκε μολυσμένο. Επομένως, αναπόφευκτα, τίθεται η ανάγκη άμεσης εξυγιάνσεως του πολλαπλασιαστικού υλικού ροδακινιάς/νεκταρινιάς και παράλληλα ενημερώσεως των παραγωγών για την σημασία χρήσεως υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, καθώς και της εφαρμογής τεχνικών αποφυγής του PLMVd μέσω της απολυμάνσεως των κοπτικών εργαλείων, της παρακολούθησεως των πληθυσμών των αφίδων και του εντοπισμού των πρώτων εστιών μόλυνσεως.

Πολύ υψηλή συσχέτιση καταγράφηκε μεταξύ της παρουσίας του ιοειδούς και του συμπτώματος των σχισμών στη ραφή καρπών ροδακινιάς, σύμπτωμα το οποίο σε συνδυασμό με το μεταχρωματισμό και τη παραμόρφωση των καρπών ευθύνεται για την υποβάθμιση της ποιότητας και της εμπορικής τους αξίας. Όσον αφορά το μωσαϊκό ή την παραμόρφωση του ελάσματος των φύλλων καθώς και το σπάσιμο του χρώματος των πετάλων, αυτά μπορούν να αποδοθούν και σε άλλα αίτια κυρίως ιολογικής φύσεως, όπως ο ιός της ευλογιάς της δαμασκηνιάς (*Plum pox potyvirus*, PPV), οποίος άλλωστε σε προκαταρκτικά πειράματα περιορισμένης εκτάσεως ανιχνεύθηκε σε αρκετά δείγματα (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Το PLMVd όμως ανιχνεύθηκε πέραν της ροδακινιάς και σε άλλα είδη, όπως η βερικοκιά, η δαμασκηνιά, η κερασιά, η άγρια και καλλιεργούμενη αιδιά και η κυδωνιά. Η κυδωνιά μάλιστα, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα είδη, δεν είχε αναφερθεί διεθνώς ως ξενιστής του PLMVd στο παρελθόν. Η βερικοκιά έχει αναφερθεί ως ξενιστής του PLMVd στην Ιαπωνία, Ιταλία (2 %), Αλβανία (3.3 %) και Αλγερία (17.7 %) (Hadidi *et al.*, 1997, Torres *et*

al., 2004, Ferretti *et al.*, 2004), η δαμασκηλιά στην πρώην Γιουγκοσλαβία (33%), τη Ρουμανία (33%), την Ιταλία (0.4 %), και την Αλβανία (Hadidi *et al.*, 1997, Faggioli *et al.*, 1997, Ferretti *et al.*, 2004), ενώ η κερασιά στην Ιαπωνία και την Ιταλία (Ozaki *et al.*, 1999, Crescenzi *et al.*, 2002). Η απιδιά και η άγρια απιδιά έχουν επίσης αναφερθεί ως ξενιστές του PLMVd στην Ελλάδα και την Τυνησία από τους Kyriakopoulou *et al.* (1998, 2001) και Fekih-Hassen *et al.* (2007) αντίστοιχα. Σε αντίθεση με τη ροδακινιά, η παρουσία του PLMVd στα υπόλοιπα Rosaceae στην Ελλάδα ήταν τυχαία, δεδομένου ότι η δειγματοληψία δεν συνδυάστηκε με κάποιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα, με τη σημείωση όμως ότι στην πλειονότητά τους τα δείγματα προήλθαν από δένδρα διάσπαρτα εντός ροδακινεών στους οποίους ανιχνεύθηκε το ιοειδές ή ήσαν σε επαφή με μολυσμένες ροδακινιές (π.χ. δαμασκηνιές No 1, 2, 3, 4, Κλένια Κορινθίας) ή προέρχονταν από γειτονικούς της ροδακινιάς οπωρώνες. Η προσβολή των παραπάνω δένδρων μπορεί να αποδοθεί στη χρήση μολυσμένων εργαλείων ή ακόμη και στη μετάδοση μέσω των αφίδων-φορέων.



Από την άλλη πλευρά, η πιθανή μετάδοση του ιοειδούς μέσω των ριζών, όπως μπορεί κανείς να υποθέσει στην περίπτωση των τεσσάρων δένδρων δαμασκηνιάς (No 1-4 Κλένια Κορινθίας) που βρίσκονταν σε επαφή με μολυσμένα δένδρα ροδακινιάς (No 3, 4, 5, 6) (Εικόνα 17) δεν φαίνεται να ισχύει, καθώς πειράματα των Barba *et al.*, (2007) έχουν αποδείξει την αδυναμία μεταδόσεως του PLMVd μέσω του ριζοεμβολιασμού.

Όσον αφορά τη μετάδοση μέσω της γύρεως μολυσμένων δένδρων ροδακινιάς είναι γνωστό ότι η ροδακινιά δεν σταυρογονιμοποιείται με άλλα είδη πυρηνοκάρπων, δεν μπορεί όμως να αποκλειστεί η πιθανότητα μεταδόσεως μέσω της βλαστήσεως του γυρεοσωλήνα στο άνθος του φυτού δέκτη. Η παρουσία του PLMVd σε απομονωμένους από ροδακινιές οπωρώνες, όπως στον οπωρώνα απιδιάς επί υποκειμένων άγριας απιδιάς και κυδωνιάς στον Καρατζά Τροιζηνιάς, μπορεί να εξηγηθεί με τη χρησιμοποίηση μολυσμένων εμβολίων ή/και μολυσμένων υποκειμένων. Αλλωστε, τόσο η άγρια απιδιά (Kyriakopoulou *et al.*, 1998), όσο και η κυδωνιά (παρούσα εργασία) έχουν βρεθεί φυσικοί ξενιστές του ιοειδούς αυτού. Όσον αφορά την προέλευση του PLMVd στην Ελλάδα, σύμφωνα με τους Kyriakopoulou *et al.*

(2001), ενδεχομένως το PLMVd μεταδόθηκε πολλά χρόνια πριν μέσω των αφίδων από τα είδη *Prunus* spp. στην άγρια απιδιά, δεδομένης της φυσικής παρουσίας του σε αυτή στα δάση και από αυτή στην απιδιά, λαμβανομένου υπ' όψη ότι η άγρια απιδιά αποτελούσε το υποκείμενο της απιδιάς στην Ελλάδα επί αιώνες ή χιλιετηρίδες, μέχρι πρόσφατα που στην εμπορική δενδροκομία αντικαταστάθηκε από τη κυδωνιά. Πρέπει να σημειωθεί, βέβαια, ότι και η απιδιά είναι προϊόν εξημερώσεως (επιλογής διά μέσου των χιλιετηρίδων) από την άγρια απιδιά. Έτσι, εναλλακτικά, το PLMVd μπορεί να προήλθε από την απιδιά ή την άγρια απιδιά και στη συνέχεια να μεταδόθηκε στα πυρηνόκαρπα και ειδικότερα στη ροδακινιά όπου και προσαρμόστηκε ή ακόμη και να προήλθε από έναν άγνωστο ξενιστή.

Η διαπίστωση της παρουσίας του PLMVd σε άλλα είδη πέραν της ροδακινιάς στην παρούσα διατριβή έρχεται να επιβεβαιώσει τα ευρήματα άλλων ερευνητών, να προσθέσει στον κατάλογο των φυσικών ξενιστών την κυδωνιά και να καταστήσει σαφές και επιτακτικό πως είναι πλέον καιρός για τη χώρα μας καθώς και για τις άλλες ευρωπαϊκές χώρες να συμπεριλάβουν το PLMVd στα συστήματα πιστοποίησης και άλλων πυρηνόκαρπων πέραν της ροδακινιάς καθώς και των μηλοειδών απιδιάς και κυδωνιάς, διότι αναμφισβήτητα τα είδη αυτά μπορεί να λειτουργούν ως πηγές μόλυνσεως για τον βασικό ξενιστή, την ροδακινιά, η οποία άλλωστε υφίσταται και τις μεγαλύτερες ζημιές.

Η περίπτωση του PLMVd που προσβάλλει φυτικά είδη που ανήκουν σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες δεν είναι μοναδική στα ιοειδή. Αυτό ισχύει γενικώς για τα ιοειδή της οικογένειας *Pospiviroidae*, τα μέλη της οποίας πολλαπλασιάζονται μέσω του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων του ξενιστή. Για παράδειγμα, οι ξενιστές του ιοειδούς του νανισμού του λυκίσκου (*Hop stunt viroid*, HSVd) ανήκουν στα πυρηνόκαρπα (*Amygdaleae*), εσπεριδοειδή (*Rutaceae*), μηλοειδή (*Pygeae*) και αμπελοειδή (*Vitaceae*). Αντίθετα, τα μέλη της οικογένειας *Avsunviroidae*, στην οποία ανήκει το PLMVd, πολλαπλασιάζονται στους χλωροπλάστες μέσω του συμμετρικού κυλιόμενου κύκλου και θεωρούνται ότι έχουν έναν ιδιαίτερα στενό κύκλο ξενιστών (Singh *et al.*, 2003). Έτσι, το αβοκάντο αποτελεί τον μοναδικό φυσικό ξενιστή του ASBVd (Desjardins, 1980), ενώ σε εργαστηριακό επίπεδο έχει αναφερθεί η μετάδοσή του και σε άλλα είδη, τα οποία όμως ανήκουν αποκλειστικά στην οικογένεια *Lauraceae* (Da Graca and Van Vuuren, 1980). Κατ' αναλογία όλα τα είδη φυσικών ξενιστών του PLMVd που αναφέρθηκαν παραπάνω ανήκουν αποκλειστικά στην οικογένεια *Rosaceae*.

Εκείνοι που αμφισβητούν την παρουσία του PLMVd σε άλλα είδη πέραν της ροδακινιάς αποδίδουν τα θετικά αποτελέσματα της έρευνας σε επιμολύνσεις κατά την εφαρμογή της RT-PCR ή σε μη εξειδικευμένες αντιδράσεις στην περίπτωση του μοριακού υβριδισμού και θέτουν ως βασική προϋπόθεση, για την απόδειξη της υπάρξεως ξενιστών πέραν της ροδακινιάς, την εφαρμογή βιοδοκιμών. Μπορεί βέβαια κατά τη διάρκεια των πρώτων ετών από την ανακάλυψη του PLMVd πειράματα μεταδόσεως με ενοφθαλμισμό

(chip budding) σε άλλα είδη, όπως βερικοκιά (Luisset), αμυγδαλιά (Ferragnes), κερασιά (Sam, Bing, P12-1), δαμασκηλιά (St. Julien, Damat, Krikon), κυδωνιά (C7-1) και απιδιά (Comice) να απέτυχαν (Desvignes, 1986), στη συνέχεια όμως αναφέρθηκε μετάδοση του PLMVd με εμβολιασμό από μολυσμένα δένδρα δαμασκηλιάς των ποικιλιών Angelino και Black Diamond στο φυτοδείκτη GF-305 (Faggioli *et al.*, 1997), από μολυσμένα δένδρα κερασιάς σε κερασιά καθώς και από κερασιά σε GF-305 (Crescenzi *et al.*, 2002). Εξ άλλου, η παρουσία του PLMVd σε άλλα είδη πέραν της ροδακινιάς διαπιστώθηκε από έμπειρους ερευνητές (Hadidi *et al.*, 1997, Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Faggioli *et al.*, 1997, Ozaki *et al.*, 1999, Ferretti *et al.*, 2004, Torres *et al.*, 2004, Crescenzi *et al.*, 2002, Fekih-Hassen *et al.*, 2006, 2007) χρησιμοποιώντας διαφορετικά πρωτόκολλα RT-PCR και μοριακού υβριδισμού (dot-blot, tissue print, Southern και Northern), σε ανεξάρτητα μεταξύ τους εργαστήρια. Μπορεί ο μοριακός υβριδισμός στυπώματος κηλίδας φυτικού χυμού (dot-blot) ή ιστού (imprint) να αφήνει υπόνοιες μη ειδικών αντιδράσεων λόγω πιθανής μη εξειδικευμένης δεσμεύσεως του ανιχνευτή σε φυτικής προελεύσεως πρωτεΐνες όταν δεν λαμβάνονται μέτρα για την απομάκρυνσή τους (WenXing *et al.*, 2009), κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει στη περίπτωση που χρησιμοποιείται RNA.

Σε αντίθεση με τη ροδακινιά, η ανίχνευση του PLMVd στα άλλα είδη θεωρείται περιστασιακή (occasional) (Mandic *et al.*, 2008) και αποδίδεται στην ανομοιόμορφη κατανομή και τη χαμηλή συγκέντρωση του ιοειδούς στα είδη αυτά (Flores *et al.*, 2003). Κάτι τέτοιο υποδεικνύει στην παρούσα μελέτη και το χαμηλής εντάσεως σήμα στην RT-PCR, στο μοριακό υβριδισμό dot-blot και Southern και στην S-PAGE, καθώς και τα χαμηλότερα επίπεδα φθορισμού στην real time RT-PCR στην περίπτωση ανιχνεύσεως του PLMVd σε άλλα Rosaceae πλην της ροδακινιάς. Την υπόθεση του μικρότερου φορτίου PLMVd στα είδη αυτά επιβεβαίωσε η εφαρμογή της ποσοτικής πραγματικού χρόνου RT-PCR (quantitative real time RT-PCR), με τη βοήθεια της οποίας υπολογίστηκε ότι η συγκέντρωση του ιοειδούς στη ροδακινιά ήταν 99.6 % μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή στα άλλα βοτανικά είδη. Πρόσφατα διαπιστώθηκε για το ιοειδές των εσπεριδοειδών III (*Citrus viroid III*, CVdIII), με τη χρήση της quantitative real time RT-PCR πως τόσο ο ρυθμός αναπαραγωγής όσο και η συγκέντρωση του ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του ξενιστή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Barbosa *et al.*, 2002, Rizza *et al.*, 2009). Επίσης καταγράφηκε αύξηση της συγκεντρώσεως του ιοειδικού φορτίου στη ροδακινιά στο τέλος της Ανοίξεως και τον Ιούνιο, περίοδο που οι αυξημένες θερμοκρασίες ευνοούν το πολλαπλασιασμό του ιοειδούς, όπως είναι άλλωστε αναμενόμενο λαμβανομένου υπ' όψη ότι τα ιοειδή είναι θερμόφιλα.

Με την real time RT-PCR να αποτελεί ένα σύστημα κλειστό που επιτρέπει τη καταγραφή της συγκεντρώσεως των παραγόμενων προϊόντων σε πραγματικό χρόνο, αποφεύχθηκε η ανάγκη για ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων και η πιθανότητα επιμολύνσεων, εξασφαλίζοντας έτσι την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων τα οποία συμπίπτουν

με εκείνα της συμβατικής RT-PCR. Άλλωστε με σκοπό την αυξημένη εξειδίκευση της μεθόδου επιλέχθηκε η εφαρμογή της real time RT-PCR στηριζόμενης στη χημεία *TaqMan* και όχι *SYBR Green* που σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκεντρώσεως της αλληλουχίας στόχου (Vandesompele *et al.*, 2002) λόγω μη εξειδικευμένης προσδέσεως των μορίων *Sybr Green* σε όλα τα δινηματιδικά μόρια DNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ PLMVd

1. Περίληψη

Με σκοπό την επιβεβαίωση, σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, της παρουσίας του PLMVd στη ροδακινιά και άλλα Rosaceae και τον μοριακό χαρακτηρισμό των παραλλαγών των ελληνικών απομονώσεων του ιοειδούς, προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία 66 κλώνων. Το μέγεθος του γενώματος των κλώνων κυμάνθηκε μεταξύ 337 και 340 nt και 62 από αυτούς αποτέλεσαν νέες παραλλαγές του PLMVd. Κατά την ανάλυση των αλληλουχιών διαπιστώθηκε η ύπαρξη 110 πολυμορφικών θέσεων που αντιστοιχούν στο 32 % των 343 θέσεων της ευθυγραμμίσωσης, με τις περισσότερες να εντοπίζονται στον σφυροκέφαλο βραχίονα (hammerhead arm) και στους κορμούς (stems) P1, P2, P3. Αντίθετα, στο τμήμα που περιέχονται οι κορμοί (stems) P4-P10 το 80 % των θέσεων είναι συντηρημένες. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού ομολογίας-βαθμού συγγένειας των ελληνικών παραλλαγών του PLMVd με τη ποικιλία, το φυτικό είδος και τη γεωγραφική προέλευση. Παρόλ' αυτά όμως, εκείνες που δεν προήλθαν από ροδακινιές συναθροίζονται σε ξεχωριστή ομάδα, ενώ όλες μαζί στην ομάδα III κατά Ambros. Η διαμόρφωση των ελληνικών παραλλαγών του PLMVd ήταν διακλαδωτή (branched conformation) πλησιάζοντας εκείνη της πρότυπης παραλλαγής M835451 (Hernandez and Flores 1992) διατηρώντας στις περισσότερες περιπτώσεις έναν βασικό πυρήνα με διάφορες δομικές παραλλαγές. Παρόλο το μεγάλο αριθμό αλλαγών στη περιοχή του σφυροκέφαλου βραχίονα, η διαμόρφωση ραβδίου διατηρήθηκε και διακρίθηκε σε τρεις τύπους. Διαπιστώθηκε, επίσης, διατήρηση των σφυροκέφαλων δομών στις αλυσίδες και των δύο πολικοτήτων, ακόμη και στην περίπτωση μεταλλάξεων αντικατοπτρίζοντας το σπουδαίο τους ρόλο στην αναπαραγωγή του ιοειδούς μέσω της διαδικασίας αυτο-σχάσεως (self-cleavage) που καταλύουν. Τέλος, οι πλούσιες σε G:C περιοχές $_{178}GGCG_{183}$ και $_{213}CCGC_{216}$, οι οποίες εμπλέκονται στο σχηματισμό του ψευδοδεσμού (pseudo-knot) P8, με εξαίρεση την παραλλαγή PLpear29.5, βρέθηκαν συντηρημένες στο σύνολο των ελληνικών παραλλαγών.

2. Εισαγωγή

Τα ιοειδή είναι μικρού μεγέθους (240-401 νουκλεοτίδια), κυκλικά (ομοιοπολικά κλειστά) μόρια μονονηματιδιακού RNA, τα οποία προσβάλλουν διάφορα φυτικά είδη προκαλώντας ασθένειες, μερικές από τις οποίες έχουν μεγάλη οικονομική σημασία (Daros *et al.*, 2006). Επιπλέον, τα ιοειδή θεωρούνται ασταθείς οντότητες με μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα και πλαστικότητα. Πολλά ιοειδή, μεταξύ των οποίων και το PLMVd, πολλαπλασιάζονται στους ξενιστές τους ως ένας πληθυσμός παρόμοιων όχι όμως και πανομοιότυπων μεταξύ τους παραλλαγών (variants), προσεγγίζοντας το μοντέλο του 'σχεδόν είδους' (quasi species) που εισήγαγε ο Eigen (1993).

Για τα ιοειδή, ως μόρια RNA που δεν κωδικεύουν πρωτεΐνες, η δομή τους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογική τους λειτουργία. Για πολλά ιοειδή της οικογένειας *Posriviroidae* έχουν καταγραφεί στη δευτεροταγή τους δομή θέσεις αναγνώρισης (recognition sites) οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις φυτικής προελεύσεως DNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες II (DNA dependent RNA polymerases II, DdRp II) ή λιγάσες (Ligases) που εμπλέκονται στο πολλαπλασιασμό τους (Gross *et al.*, 1982). Στην περίπτωση των ιοειδών της οικογένειας *Ansunviroidae*, η ίδια η δευτεροταγής δομή αποκτά τη δομή σφυροκέφαλου ριβοενζύμου (hammerhead ribozyme) που μεσολαβεί στη διαδικασία πολλαπλασιασμού τους (Flores *et al.*, 2005). Έχει επίσης διαπιστωθεί για πολλά ιοειδή συσχέτιση της δευτεροταγούς δομής με την παθογένεια (Keese and Symons 1985). Είναι λοιπόν προφανές ότι η σωστή λειτουργία κάθε ιοειδούς εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τη κατάλληλη διαμόρφωση του γενώματός του. Γι' αυτό, συχνά, η φυσική παραλλακτικότητα περιλαμβάνει αντισταθμιστικές νουκλεοτιδικές αλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της δευτεροταγούς δομής (Sanjuan *et al.*, 2006).

Το καλύτερο μέσο μελέτης της επιδράσεως της δομής ενός μορίου RNA στις βιολογικές του λειτουργίες είναι η τρισδιάστατη απεικόνισή της. Κάτι τέτοιο όμως είναι δύσκολο, χρονοβόρο και υψηλού κόστους (Shapiro *et al.*, 2007) και γι' αυτό καταφεύγουμε συνήθως στη μελέτη της δευτεροταγούς δομής. Η δευτεροταγής δομή καθορίζεται από τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των τριφωσφορικών βάσεων (A, U, C, G), εντός του RNA, που έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό χαρακτηριστικών δομών, όπως κορμοί (stems), αναδιπλώσεις φουρκέτας (hairpin loops), εσωτερικές θηλιές (internal loops) κ.ά. Μια από τις πιο γνωστές προσεγγίσεις προβλέψεως της δευτεροταγούς δομής ενός μορίου RNA είναι εκείνη της ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας (minimum free energy, MFE). Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή, η σταθερότητα μιας δομής καθορίζεται από τη ποσότητα της ελεύθερης ενέργειας που χρησιμοποιείται (ή ελευθερώνεται) κατά το σχηματισμό της. Όσο πιο αρνητική είναι η τιμή αυτή τόσο πιο πιθανός είναι ο σχηματισμός της συγκεκριμένης δομής, καθώς ελευθερώνεται περισσότερη αποθηκευμένη ενέργεια κατά το γεγονός (CLC RNA Workbench

manual). Τα περισσότερα λογισμικά προγράμματα προβλέψεως της δευτεροταγούς δομής βασίζονται στον αλγόριθμο του Zuker (Zuker 1989).

Το ιοειδές PLMVd ένα από τα τέσσερα μέλη της οικογένειας *Ansunviroidae*, πολλαπλασιάζεται και συσσωρεύεται στους χλωροπλάστες του φυτού ξενιστή μέσω του μηχανισμού του συμμετρικού κυλιόμενου κύκλου (symmetric rolling cycle) με τη μεσολάβηση σφυροκέφαλων μοτίβων (hammerhead motifs) που δρουν ως ριβοένζυμα και συμβάλλουν στην αυτοσχάση του μορίου RNA (Bussiere *et al.*, 2000). Πρόκειται για ένα ιοειδές με παγκόσμια εξάπλωση που προσβάλλει κυρίως τη ροδακινιά (Hadidi *et al.*, 1997, Pelchat *et al.*, 2000, Flores *et al.*, 2003, Fekih-Hassen *et al.*, 2006), ενώ περιστασιακά η παρουσία του έχει αναφερθεί και σε άλλα Rosaceae (βερικοκιά, δαμασκηλιά, κερασιά, απιδιά) (Faggioli *et al.*, 1997, Hadidi *et al.*, 1997, Kyriakopoulou *et al.*, 1998, 2001, Osaki *et al.*, 1999). Μοριακές παραλλαγές (molecular variants) Μεσογειακής (Ισπανία, Ιταλία, Σερβία, Τουρκία, Τυνησία) και Βορειοαμερικανικής προελεύσεως, το μέγεθος των οποίων κυμάνθηκε μεταξύ 335 και 351 nt, παρουσίασαν υψηλό φυσικό πολυμορφισμό ακόμη και στην περίπτωση που προέρχονταν από την ίδια απομόνωση (isolate) (Hernandez and Flores 1992, Shamloul *et al.*, 1995, Ambros *et al.*, 1998, Pelchat *et al.*, 2000, Malfitano *et al.*, 2003, Fekih-Hassen *et al.*, 2007 Mandic *et al.*, 2008). Η ετερογένεια αυτή πιθανότατα οφείλεται στην εκ νέου (*de novo*) εμφάνιση νέων παραλλαγών ως αποτέλεσμα των επιρρεπών σε λάθη RNA πολυμερασών του φυτικού κυττάρου που χρησιμοποιούν τα ιοειδή (Domingo and Holland 1994) και στην ικανότητα του μορίου να συσσωρεύει τις αλλαγές αυτές και σε μικρότερο βαθμό στις επαναλαμβανόμενες φυσικές μολύνσεις του ίδιου ατόμου ιδιαίτερα στις περιπτώσεις των ξυλωδών ξενιστών όπως τα Rosaceae (Ambros *et al.*, 1999). Δομικά χαρακτηριστικά όπως ο σχηματισμός σταθερών σφυροκέφαλων δομών (hammerhead structures) στις αλυσίδες και των δύο πολικιοτήτων (plus-minus strands), η διατήρηση της διακλαδισμένης διαμορφώσεως (branched conformation) ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας και η παρουσία ενός ψευδο-δεσμού (pseudo-knot) μεταξύ των μονονηματιδιακών αλληλουχιών $_{179}GCGG_{182}$ (κορμός, stem P6a) και $_{212}CCGC_{213}$ (κορμός P7) (Εικόνα 9, Α μέρος) περιορίζουν την επίδραση της υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μόριο του PLMVd και εμποδίζουν έτσι την απώλεια σημαντικών λειτουργιών του (Ambros *et al.*, 1998, Bussiere *et al.*, 2000).

Φυλογενετική ανάλυση μοριακών παραλλαγών τριών απομονώσεων του PLMVd που διαφοροποιούνται ως προς το φαινότυπο των συμπτωμάτων οδήγησε στη κατάταξή τους σε τρεις ομάδες (clusters) (Ambros *et al.*, 1998). Το παραπάνω πρότυπο ομαδοποίησης υιοθετήθηκε και από άλλους ερευνητές, με την πλειονότητα των παραλλαγών να ανήκει στην ομάδα III κατά Ambros (Mandic *et al.*, 2008, Gazel *et al.*, 2008).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου, ιδιαίτερα συχνή και σε υψηλό ποσοστό ήταν η παρουσία του PLMVd σε διάφορες ποικιλίες ροδακινιάς στην

Ελλάδα, ενώ για πρώτη φορά καταγράφηκε ταυτόχρονη παρουσία του ιοειδούς σε πολλά διαφορετικά είδη Rosaceae όπως η βερικοκιά, η δαμασκηλιά, η κερασιά, η άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά και η κυδωνιά. Ένας από βασικούς σκοπούς του παρόντος κεφαλαίου ήταν η επιβεβαίωση της παρουσίας του PLMVd στα παραπάνω είδη και σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Ταυτόχρονα επιχειρήθηκε, όσο αυτό ήταν δυνατό, μοριακός χαρακτηρισμός των παραλλαγών των ελληνικών απομονώσεων όσον αφορά την πρωτοταγή και τη δευτεροταγή τους δομή και την κατάταξή τους σύμφωνα με το πρότυπο Ambros *et al.*, (1998).

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Φυτικό Υλικό

Για τις ανάγκες του παρόντος κεφαλαίου, συλλέχθηκαν φύλλα από 19 δένδρα ροδακινιάς 13 διαφορετικών ποικιλιών, δύο δένδρα βερικοκιάς των ποικιλιών Αδαμοπούλου και Διαμαντοπούλου αντίστοιχα, δύο δένδρα κερασιάς των ποικιλιών Burla και Τραγανό Εδέσσης αντίστοιχα, ένα δένδρο δαμασκηλιάς ποικιλίας Angelino, ένα δένδρο απιδιάς ποικιλίας Κοντούλα και από ένα δένδρο άγριας απιδιάς και κυδωνιάς στα οποία σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου διαπιστώθηκε η παρουσία του PLMVd. Τα παραπάνω δείγματα προήλθαν τόσο από οπωρώνες όσο και από τα τρία φυτώρια στα οποία διεξήχθη η μελέτη για την παρουσία του ιοειδούς. Αναλυτικά, τα χαρακτηριστικά των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν σκέλος της διατριβής παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

3.2. Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Με εκμαγείο ολικό RNA που εξάχθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο TRISOL (Invitrogen Ltd., Paisley, England, UK), πραγματοποιήθηκαν δοκιμές RT-PCR δύο σταδίων σε κοινό μικροσωλήνα (παράγραφος 3.3.3., Β μέρος) χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών PLMVdhL/PLMVdcL (Loreti *et al.*, 1999) και δύο μονάδες του ενζύμου *Taq* DNA πολυμεράση (Invitrogen). Εξαιρέση αποτέλεσαν τα δείγματα ροδακινιάς Spring Bell 18 και Galtezi 10 που προήλθαν αντίστοιχα από το 1^ο και το 2^ο φυτώριο, για τα οποία η PCR επιπλέον πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας, αντί του ενζύμου *Taq* DNA πολυμεράση, 2.5 μονάδες του ενζύμου *Pfu* DNA πολυμεράση (Fermentas Vinlius, Lithuania) το οποίο ανήκει στη κατηγορία των ενζύμων διορθωτικής αναγνώσεως (proof-reading enzymes). Ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε μικροσωλήνας που αντί ολικού RNA περιείχε νερό DEPC, με σκοπό τον έλεγχο των αντιδράσεων για τυχόν επιμολύνσεις. Μετά το πέρας των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε ανάλυση της συνολικής ποσότητας (75-

100 µl) των προϊόντων της RT-PCR σε πήγμα αγαρόζης 1.5 % σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE (παράγραφος 3.3.4., Β μέρος).

Πίνακας 1. Αναλυτικός κατάλογος των ελληνικών παραλλαγών PLMVd.

A/A	Παραλλαγή (Variant)	Μέγεθος (nt)	Πολυμεράση (Taq/Pfu)	Φυτικό είδος	Ποικιλία	Αριθμός δείγματος	Προέλευση
1	PLSprBel.pfu18.2	338					
2	PLSprBel.pfu18.4	338	<i>Pfu</i>				
3	PLSprBel.pfu18.9	338					
4	PLSprBel18.1	338		Ροδακινιά	Spring Bell	18	Φυτόριο 1 ^ο
5	PLSprBel18.5	339	<i>Taq</i>				
6	PLSprBel18.6	339					
7	PLGalt.pfu10.2	339					
8	PLGalt.pfu10.3	339	<i>Pfu</i>				
9	PLGalt.pfu10.4	339					
10	PLGalt.pfu10.9	338		Ροδακινιά	Galtezi	10	Φυτόριο 2 ^ο
11	PLGalt10.1	339					
12	PLGalt10.7	337	<i>Taq</i>				
13	PLGalt10.8	339					
14	PLFayet8.2	339					
15	PLFayet8.3	339	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Fayette	8	Φυτόριο 1 ^ο
16	PLFayet8.4	339					
17	PLFayet8.2G	339					
18	PLRedGol8.3	339	<i>Taq</i>	Νεκταρινιά	Red Gold	8	Φυτόριο 2 ^ο
19	PLRedGol8.4	339					
20	PLLemVol12.1	339					
21	PLLemVol12.2	338	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Λεμονάτα Βόλου	12	Φυτόριο 3 ^ο
22	PLLemVol12.5	339					
23	PLRedHav5.1	339					
24	PLRedHav5.5	338	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Red Haven	5	Φυτόριο 3 ^ο
25	PLRedHav5.6	339					
26	PLGlant18.1	339					
27	PLGlant18.2	338	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Glantis	18	Φυτόριο 1 ^ο
28	PLGlant18.3	339					
29	PLSCres42.1	338					
30	PLSCres42.2	339	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Sun Crest	42	Κλένια
31	PLSCres42.3	337					
32	PLSprCres9.2B	339	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Spring Crest	9	Κλένια
33	PLSprCres9.2A	339					
34	PLSCres34.1.2	338					
35	PLSCres34.1.1	338	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Sun Crest	34	Κλένια
36	PLSCres34.2	338					
37	PLAndros11.1	339	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Άνδρος	11	Φυτόριο 1 ^ο
38	PLMCres21.1	339	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	May Crest	21	Κλένια

39	PLA-37 5.1	339	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	A-37	5	Φυτόριο 1 ^ο
40	PLSCres15.1	340	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Sun Crest	15	Φυτόριο 1 ^ο
41	PLRedHav135.1	339	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Red Haven	135	Μεγαπλάτανος
42	PLpeach195.1	338	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Άγνωστη	195	Άνω Λεχώνια
43	PLSCres51.1	338	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	Sun Crest	51	Νάουσα
44	PLMCres162.1	338	<i>Taq</i>	Ροδακινιά	May Crest	162	Τύρναβος
45	PLTastFr5.1	339	<i>Taq</i>	Νεκταρινιά	Tasty Free	5	Φυτόριο 1 ^ο
46	PLapricot2.1	338	<i>Taq</i>	Βερικοκιά	Διαμαντοπούλου	2	Κλένια
47	PLapricot2.1.1	337					
48	PLapricot17.1	339	<i>Taq</i>	Βερικοκιά	Αδαμοπούλου	17	Κλένια
49	PLapricot17.2	339					
50	PLplum1.1	339	<i>Taq</i>	Δαμασκηνιά	Angelino	1	Κλένια
51	PLplum1.2	339					
52	PLplum1.3	339					
53	PLpear29.1	339	<i>Taq</i>	Απιδιά	Κοντούλα	29	Άνω Λεχώνια
54	PLpear29.4	339					
55	PLpear29.5	339					
56	PLcherry11.1	338	<i>Taq</i>	Κερασιά	Burla	11	Μεγαπλάτανος
57	PLcherry11.2	338					
58	PLcherry11.5	338					
59	PLcherry9.3	338	<i>Taq</i>	Κερασιά	Τραγανό Εδέσσης	9	Μεγαπλάτανος
60	PLcherry9.4	338					
61	PLcherry9.5	338					
62	PLw pear4.1	339	<i>Taq</i>	Άγρια απιδιά	Αυτοφυές	4	Καρατζάς
63	PLw pear4.2	339					
64	PLwpear4.3	339					
64	PLquince4.1	339	<i>Taq</i>	Κυδωνιά	Υποκείμενο	4	Καρατζάς
66	PLquince4.2	339					

3.3. Εκχύλιση DNA από πήγμα αγαρόζης

Για την εκχύλιση του προϊόντος DNA της RT-PCR από το πήγμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το κυτίο Qiaquick gel extraction (Qiagen, Alameda, CA, USA). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η επιθυμητή ζώνη DNA απομακρύνθηκε με αποστειρωμένη λεπίδα και τοποθετήθηκε σε μικροσωλήνα 1.5 ml (Eppendorf, AG, Hamburg, Germany) που περιείχε τρεις όγκους διαλύματος QG. Στη συνέχεια, ο μικροσωλήνας τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο όπου επώαστηκε στους 50 °C επί 10-15 λεπτά, με ενδιάμεσα διαλείμματα έντονης αναδεύσεως μέχρι πλήρους διαλυτοποίησεως της αγαρόζης. Μετά από οπτική παρατήρηση της τιμής pH του διαλύματος και ρύθμισή του στη περίπτωση που ήταν >7.5 με την προσθήκη 10 μl διαλύματος 3 M οξικού νατρίου, για κάθε 100 mg πήγματος αγαρόζης προστέθηκαν 100 μl ισοπροπανόλης. Το διάλυμα αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε σε στήλη κυτταρίνης Qiaquick spin. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm επί ένα λεπτό και

απόρριψη του διηθήματος. Για την απομάκρυνση κάθε ίχνους αгарόζης, προστέθηκαν επιπλέον 0.5 ml διαλύματος QG και η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πλύση της στήλης με προσθήκη 0.75 ml διαλύματος PE και φυγοκέντρωση δύο φορές στις 13000 rpm επί ένα λεπτό. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα 1.5 ml (Eppendorf) και ακολούθησε η έκλυση του DNA με 30 µl διαλύματος EB (10 mM Tris-HCl pH: 8.5). Μετά το πέρας της διαδικασίας εκχυλίσεως, 2 µl DNA χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκεντρώσεως (οπτική πυκνότητα, optical density, OD) και της ποιότητας του, με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA).

3.4. Κλωνοποίηση

Η παραγωγή ιοειδικών κλώνων ενός αρχικού μορίου cDNA πλήρους αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με το σύστημα κλωνοποίησης θυμιδίνης-αδενοσίνης (Thymidine-Adenosine, TA) pGEM[®]-T easy (Promega, Madison, WI, USA), το οποίο βασίζεται στη μη εξαρτώμενη από το εκμαγείο ιδιότητα της *Taq* DNA πολυμεράσης να προσθέτει μια βάση τριφωσφορικής αδενοσίνης (A) σε κάθε ένα από τα δύο άκρα του προϊόντος της PCR που συνθέτει (Mead *et al.*, 1991). Επίσης, ο πλασμιδιακός φορέας pGEM[®]-T easy παρέχεται σε γραμμική μορφή με μια βάση τριφωσφορικής θυμιδίνης (T) σε κάθε άκρο του με σκοπό την εξειδικευμένη υβριδοποίησή του με τα προϊόντα της PCR. Όταν όμως χρησιμοποιούνται στη PCR πολυμεράσες διορθωτικής αναγνώσεως (proof-reading polymerases) όπως η *pfu* DNA πολυμεράση, τότε τα τελικά προϊόντα έχουν άκρα 'τυφλά' (blunt ends). Στη περίπτωση αυτή, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το σύστημα TA, προηγείται της κλωνοποίησης η διαδικασία τοποθέτησεως μιας βάσεως αδενοσίνης (A) σε κάθε άκρο του προϊόντος PCR, γνωστή ως A-tailing (Kobs 1996) η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

3.4.1. Διαδικασία A-tailing

Σε μικροσωλήνα PCR 0.2 ml (Costar) που περιείχε 10 µl προϊόντος PCR, μετά την εκχύλισή του από το πήγμα αгарόζης, προστέθηκαν 10 µl διαλύματος αντιδράσεως αποτελούμενου από 20 mM Tris-HCl pH: 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, πέντε μονάδες *Taq* DNA πολυμεράση (Invitrogen), 0.2 mM dATP και νερό DEPC μέχρι του τελικού όγκου και το διάλυμα τοποθετήθηκε επί 30 λεπτά στον θερμοκυκλοποιητή PTC-200 (MJ-Research) στους 70 °C, προκειμένου να γίνει η τοποθέτηση από την *Taq* DNA πολυμεράση της βάσεως A στα άκρα του προϊόντος της PCR.

3.4.2. Ένθεση του προϊόντος της PCR στον πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση λιγάσης)

Προ της πραγματοποίησης της διαδικασίας υπολογίστηκε σε ng η βέλτιστη ποσότητα (x) του προϊόντος PCR σύμφωνα με τον τύπο $x \text{ (ng)} = [\text{ng φορέα (50 ng)}] \times \text{μέγεθος σε Kb της ενθέσεως-προϊόντος PCR (0.34 Kb)} / \text{μέγεθος σε Kb του φορέα (3Kb)}$. Η ένθεση του προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα pGEM⁺-T easy (Promega) πραγματοποιήθηκε σε μικροσωλήνα 1.5 ml (Eppendorf) με τη προσθήκη 5 µl 2x διαλύματος λιγάσης (ligation buffer), 50 ng φορέα, 0.53 ng προϊόντος PCR και νερό DEPC μέχρι τελικού όγκου 10 µl. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 4 °C επί τουλάχιστον οχτώ ώρες.

3.4.3. Μετασχηματισμός επιδεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων

Αρχικά, για κάθε αντίδραση λιγάσης προετοιμάστηκαν δύο τρυβλία petri που περιείχαν 20-25 ml θρεπτικό διάλυμα LB (Luria Bertani: 1 % [β/ο] τρυπτόνη, 0.5 % [β/ο] εκχύλισμα ζύμης, 1 % [β/ο] NaCl, pH: 7.0, 1.5 % [β/ο] άγαρ) συγκεντρώσεως 0.1 mg/ml σε αμπικιλίνη (Sigma-Aldrich, Saint Luis, Missouri, USA). Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώσεως επί περίπου 30 λεπτά στους 37 °C, επιστρώθηκαν με 100 µl IPTG (100 mM) και 25 µl X-Gal (100 mg/ml) προκειμένου να γίνει οπτική διάκριση των αποικιών μετασχηματισμένων βακτηρίων από μη μετασχηματισμένα και επώστηκαν στους 37 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους. Παράλληλα, σε μικροσωλήνα που περιείχε 25 µl επιδεκτικών κυττάρων J109 (Promega), προστέθηκαν 2 µl αντιδράσεως λιγάσης και μετά από ήπια ανάδευση το διάλυμα επώστηκε στον πάγο επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια, ο μικροσωλήνας τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 42 °C επί 30 δευτερόλεπτα χωρίς ανάδευση και αμέσως μετά στον πάγο επί δύο λεπτά. Στον μικροσωλήνα προστέθηκαν 950 µl θρεπτικού διαλύματος SOC (Super Optimum broth with Catabolite repression) (Sigma-Aldrich) θερμοκρασίας δωματίου και κατόπιν ο σωλήνας μεταφέρθηκε σε οριζόντιο αναδευτήρα (150 rpm) εντός θαλάμου επώσεως στους 37 °C επί δύο ώρες. Μετά το πέρας της επώσεως, 50 και 100 µl διαλύματος μετασχηματισμένων βακτηρίων επιστρώθηκαν, με τη βοήθεια κυρτής γυάλινης ράβδου, στα δύο τρυβλία ανά αντίδραση λιγάσης. Στη συνέχεια τα τρυβλία επώστηκαν αντεστραμμένα στους 37 °C επί 18 ώρες.

3.4.4. Επιλογή και ανάλυση λευκών αποικιών

Μετά την ολοκλήρωση της επώσεως και την εμφάνιση των αποικιών, επιλέχθηκαν ανά αντίδραση λιγάσης πέντε λευκές αποικίες (το λευκό χρώμα υποδηλώνει την εισαγωγή του πλασμιδίου στο βακτήριο) οι οποίες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένους πλαστικούς περιέκτες 50 ml (Falcon) που περιείχαν 15 ml θρεπτικό υγρό LB συγκεντρώσεως 0.1 mg/ml

σε αμπικιλίνη. Στη συνέχεια, οι περιέκτες τοποθετήθηκαν σε οριζόντιο αναδευτήρα (250 rpm) στους 37 °C επί 18 ώρες.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ένθεση του ιοειδικού cDNA στο πλασμίδιο, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο 2 µl υγρής καλλιέργειας μετά από βρασμό στους 95 °C επί πέντε λεπτά (Holmes and Quigley 1981). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν έτσι όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.3.3. του Β μέρους χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών PLMVdhL/PLMVdcL (Loreti *et al.*, 1999). Η ανάλυση των προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης (1.5 % σε 1x TAE) και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Για τη συντήρηση των επιλεγμένων κλώνων επί μεγάλο χρονικό διάστημα προστέθηκαν σε μικροσωλήνες 1.5 ml (Eppendorf) 500 µl γλυκερόλης και 500 µl υγρής καλλιέργειας του κάθε κλώνου και ακολούθησε αποθήκευσή τους στους -80 °C.

3.4.5. Εκχύλιση πλασμιδιακού DNA

Η εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με το σύστημα (κυτίο) NucleoSpin® Plasmid Quick Pure (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Η διαδικασία περιελάμβανε αρχικά τη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων που περιείχονταν σε τρία ml υγρής καλλιέργειας, με φυγοκέντρηση στις 9200 rpm επί 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε με έντονη ανάδευση σε 250 ml διαλύματος A1. Ακολούθησε προσθήκη 250 ml διαλύματος A2 (διάλυμα λύσεως κυττάρων, lysis buffer) που περιείχε RNase I, οι σωλήνες αναδευτήκαν ήπια και αφέθηκαν επί πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν προστέθηκαν 300 ml διαλύματος A3 (διάλυμα ουδετεροποίησης, naturalization buffer). Οι μικροσωλήνες αναδευτήκαν ήπια και τα συστατικά των βακτηριακών κυττάρων διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση στις 9500 rpm επί πέντε λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη όπου το DNA δεσμεύτηκε ειδικά, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση στις 9500 rpm επί ένα λεπτό. Ακολούθησε πλύση της στήλης με 450 µl διαλύματος AQ (διάλυμα πλύσεως, wash buffer), φυγοκέντρηση στις 9500 rpm επί τρία λεπτά και έκλυση του πλασμιδιακού DNA με 50 µl διαλύματος AE.

3.5. Αλληλούχηση

Μετά την εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA, ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε στον γενετικό αναλυτή ABI 3730 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) 48 θέσεων της εταιρείας Biogenomica (Χαλάνδρι, Ελλάδα) με τη μέθοδο τερματισμού των διδεοξυ-αναλόγων του Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Για την αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση 80 ng/µl (τουλάχιστον 900 ng) καθαρού

πλασμιδιακού DNA. Για την ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής T7.

3.6. Φυλογενετική ανάλυση

Η πολλαπλή ευθυγράμμιση (multi alignment) των αλληλουχιών και η σύγκρισή τους ανά ζεύγος (pairwise comparison) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου CLC RNA Workbench 4.3 (CLC bio, Katinebjerg, Denmark) καθώς και με το λογισμικό πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγραμμίσεως αλληλουχιών ClustalW2 (Thompson *et al.*, 1994), διαθέσιμο στο διαδίκτυο από το Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιο-πληροφορικής (European Bioinformatics Institute, EBI: www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2). Τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης του λογισμικού ClustalW2 χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου (input data) για τη φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών με το λογισμικό πρόγραμμα Molecular Evolutionary Genetic Analysis, MEGA 4.0.2 (Kumar *et al.*, 2008, Tamura *et al.*, 2007), χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους ομαδοποίησης αστάθμητων ζευγών με αριθμητικούς μέσους όρους (Unweighted Pair Group method with Arithmetic Mean, UPGMA) (Sneath and Sokal 1973) και ελάχιστης εξελίξεως (Minimum Evolution, ME) (Saitou and Imanishi 1989, Rzhetsky and Nei 1992) που ακολουθούν το μοντέλο των γενετικών αποστάσεων, ή ιεραρχικής ομαδοποίησης (hierarchical clustering) και τον αλγόριθμο μέγιστης φειδωλότητας-οικονομίας (Maximum Parsimony, MP) (Sourdis and Nei 1988, Camin and Sokal 1965, Swofford 1993) που ακολουθεί το μοντέλο των διακριτών χαρακτήρων. Προκειμένου να προσδιοριστούν οι φυλογενετικές σχέσεις των αλληλουχιών με τη μεγαλύτερη δυνατή αξιοπιστία, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση της δυναμικής των κόμβων (bootstrap analysis), που περιελάμβανε την κατασκευή ενός πιθανού αριθμού δένδρων όπου κάθε κόμβος εμφανιζόταν 1000 φορές (bootstrap value 1000), από τα οποία τελικά επιλέχθηκε το συναινετικό δένδρο (consensus tree).

Με βάση τον βαθμό νουκλεοτιδικής ομολογίας και τις φυλογενετικές σχέσεις, αποκλείστηκαν από τις ελληνικές παραλλαγές του PLMVd που αποκτήθηκαν στη παρούσα διατριβή οι πανομοιότυπες και εκείνες με υψηλό βαθμό συγγένειας μεταξύ τους. Οι υπόλοιπες αναλύθηκαν εκ νέου χρησιμοποιώντας παράλληλα αντιπροσωπευτικές παραλλαγές PLMVd των ομάδων I (ls18b, ls 17b, ls14b, ls6b), II (esc10, esc14, esc8, ls16b) και III (gds18, gds6, gds19, gds13) κατά Ambros (Ambros *et al.*, 1998), προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποια ή ποιες από τις παραπάνω ομάδες κατατάσσονται οι ελληνικές παραλλαγές του PLMVd.

3.7. Δευτεροταγής δομή

Οι δευτεροταγείς δομές των ελληνικών παραλλαγών (variants) του PLMVd προσδιορίστηκαν με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος προβλέψεως δευτεροταγούς

δομής RNA που περιέχεται στο πακέτο CLC RNA Workbench (CLC bio) και βασίζεται στη βελτιωμένη έκδοση του αλγόριθμου του Zuker (Zuker 1989). Κατά τη ρύθμιση των παραμέτρων του προγράμματος επιλέχθηκε i) η αποφυγή απομονωμένων ζευγών βάσεων (isolated base pairs), ii) η εφαρμογή διαφορετικών κανόνων για τις μεικτές ασύμμετρες εσωτερικές θηλειές (Grossly symmetric Interior Loops, GAIL) και iii) η χρήση κανόνων ομοαξονικού στοιβάγματος (coaxial stacking energy rules).

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1. Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής

Για τις ανάγκες του παρόντος κεφαλαίου, σκοπός του οποίου ήταν η μελέτη των μοριακών χαρακτηριστικών των ελληνικών παραλλαγών (variants) του PLMVd, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φύλλων διαφόρων ποικιλιών ροδακινιάς και άλλων Rosaceae (άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά, βερικοκιά, δαμασκηνιά, κερασιά, κυδωνιά), στα οποία ανιχνεύθηκε το ιοειδές σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου, από διάφορες περιοχές της χώρας, ώστε να αποκτηθεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για το PLMVd στην Ελλάδα.

Με τη βοήθεια της RT-PCR η παρουσία του PLMVd διαπιστώθηκε για ακόμη μια φορά σε όλα τα επιλεγέντα δείγματα (Πίνακας 1). Όπως στα προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διατριβής έτσι και σε αυτό, η δοκιμή RT-PCR εφαρμόστηκε χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών PLMVdhL (117-141 nt) / PLMVdcL (92-116 nt) (Loreti *et al.*, 1999). Το συγκεκριμένο ζεύγος επιλέχθηκε διότι, όπως διαπιστώθηκε μετά από σύγκριση των αλληλουχιών αυτών με τις αντίστοιχες όλων σχεδόν των διαθέσιμων στο διαδίκτυο παραλλαγών του PLMVd, με το λογισμικό πρόγραμμα BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), το ζεύγος αυτό προέρχεται από μια από τις πλέον συντηρημένες περιοχές του γενόματος του ιοειδούς.

Από τις διαθέσιμες DNA πολυμεράσες που δοκιμάστηκαν στο παρόν κεφάλαιο, χρησιμοποιήθηκε σχεδόν αποκλειστικά η *Taq*. Η συγκεκριμένη πολυμεράση επιλέχθηκε για δύο κυρίως λόγους: i) Η *Taq*, παρ' όλη τη μεγαλύτερη συχνότητα λαθών ($8.0E-06$ bp/cycle) στα οποία υποπίπτει σε σχέση με τη διορθωτικής αναγνώσεως *Pfu* DNA πολυμεράση ($1.3E-06$ bp/cycle) (Cline *et al.*, 1996), προσφέρει μεγαλύτερη ταχύτητα και ευκολία στη κλωνοποίηση μέσω του συστήματος TA. Αντίθετα η *Pfu* DNA πολυμεράση λόγω της συνθέσεως προϊόντων με 'τυφλά' άκρα (blunt ends) απαιτεί είτε την εφαρμογή επιπλέον σταδίων (A tailing) προκειμένου να εφαρμοστεί το παραπάνω σύστημα, είτε την εφαρμογή του συστήματος κλωνοποίησης τυφλών άκρων το οποίο συχνά χαρακτηρίζεται από μειωμένη αποτελεσματικότητα (Promega pGEM® T easy vector system technical manual), ii) Η *Taq* έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν σε πληθώρα μελετών γενετικής παραλλακτικότητας και δομής πληθυσμών διαφόρων ιών και ιοειδών, μεταξύ των οποίων και το PLMVd, όπου

αποδείχθηκε ότι η συχνότητα μεταλλάξεων που οφείλονται σ' αυτή δεν είχε καμία επίδραση στα τελικά αποτελέσματα (Szychowski *et al.*, 1998, Palacio and Duran-Vila 1999, Kong *et al.*, 2000, Pelchat *et al.*, 2000, Palacio-Biesla *et al.*, 2003, Fekih-Hassen *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2008). Η πολυμεράση *Pfu* όμως χρησιμοποιήθηκε παράλληλα με την *Taq* DNA πολυμεράση στην περίπτωση των απομονώσεων PLSprBell18 και PLGalt10. Τα αποτελέσματα ήταν ανεξάρτητα από το είδος της πολυμεράσης. Για παράδειγμα, το ποσοστό ομολογίας των παραλλαγών PLGalt.pfu10.2, 10.3, 10.4 και 10.9, για τη σύνθεση των οποίων χρησιμοποιήθηκε η *Pfu* DNA πολυμεράση, ήταν 96-93 %, ενώ στην περίπτωση των παραλλαγών PLGalt10.1, 10.7 και 10.8, όπου χρησιμοποιήθηκε η *Taq* ήταν 99.7-98.8 % (Πίνακας 1, Εικόνα 1). Πιθανότατα λοιπόν η παρατηρηθείσα νουκλεοτιδική παραλλακτικότητα δεν οφείλεται σε τεχνικά αίτια (είδος DNA πολυμεράσης), αλλά είναι φυσική.

Ένας έως οχτώ κλώνοι αλληλουχήθηκαν για κάθε μια από τις 27 απομονώσεις του PLMVd που χρησιμοποιήθηκαν. Συνολικά προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία 66 κλώνων (Πίνακας 1, Παράρτημα I) οι οποίοι στο σύνολό τους αποδείχθηκε ότι αποτελούν παραλλαγές του PLMVd. Το μέγεθος του γενώματος των κλώνων αυτών ήταν 337 (τρεις κλώνοι), 338 (18 κλώνοι), 339 (44 κλώνοι) ή 340 (ένας κλώνος). Σε κανένα ελληνικό κλώνο δεν ανιχνεύθηκε η ένθεση 12-14 νουκλεοτιδίων που διαμορφώνονται στην κορυφή του σφυροκέφαλου βραχίονα (hammerhead arm) ως φουρκέτα με θηλειά (hairpin loop) χαρακτηριστική των απομονώσεων Peach Calico (PC) (Malfitano *et al.*, 2003, Rodio *et al.*, 2006). Ακόμη και κλώνοι της ίδιας απομονώσεως (π.χ. PLGalt10) διέφεραν ως προς το μέγεθος του γενώματός τους (Πίνακας 1). Τα παραπάνω υποδεικνύουν για ακόμη μια φορά πως η παραλλακτικότητα και όχι η διατήρηση ενός συγκεκριμένου μεγέθους γενώματος αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του PLMVd (Mandic *et al.*, 2008, Ambros *et al.*, 1998, Fekih-Hassen *et al.*, 2007, Gazel *et al.*, 2008).

Η ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των 66 κλώνων της παρούσας διατριβής με τις ήδη καταχωρημένες στη βάση δεδομένων του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής με το λογισμικό πρόγραμμα ClustalW έδειξε ότι οι 62 κλώνοι αποτελούν νέες παραλλαγές του PLMVd. Επιπλέον, σύγκριση των παραπάνω αλληλουχιών με την πρότυπη (M835451, GenBank accession number) (Hernandez and Flores 1992), με το λογισμικό πακέτο CLC RNA Workbench (CLC bio), έδειξε την ύπαρξη 110 πολυμορφικών θέσεων που αντιστοιχούν στο 32 % των 343 θέσεων της ευθυγραμμίσεως (Εικόνα 2), ενώ οι υπόλοιπες 233 ήσαν υψηλά συντηρημένες. Από τις 110 πολυμορφικές θέσεις, οι 48 (43.6 %) αφορούσαν την απλή αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου με ένα άλλο. Οι περισσότερες (90) από τις παραπάνω θέσεις εντοπίστηκαν στα τμήματα 1-136 nt και 284-343 nt που αντιστοιχούν στο σφυροκέφαλο βραχίονα (hammerhead arm) και στους κορμούς (stems) P1, P2, P3 (Εικόνα 3).

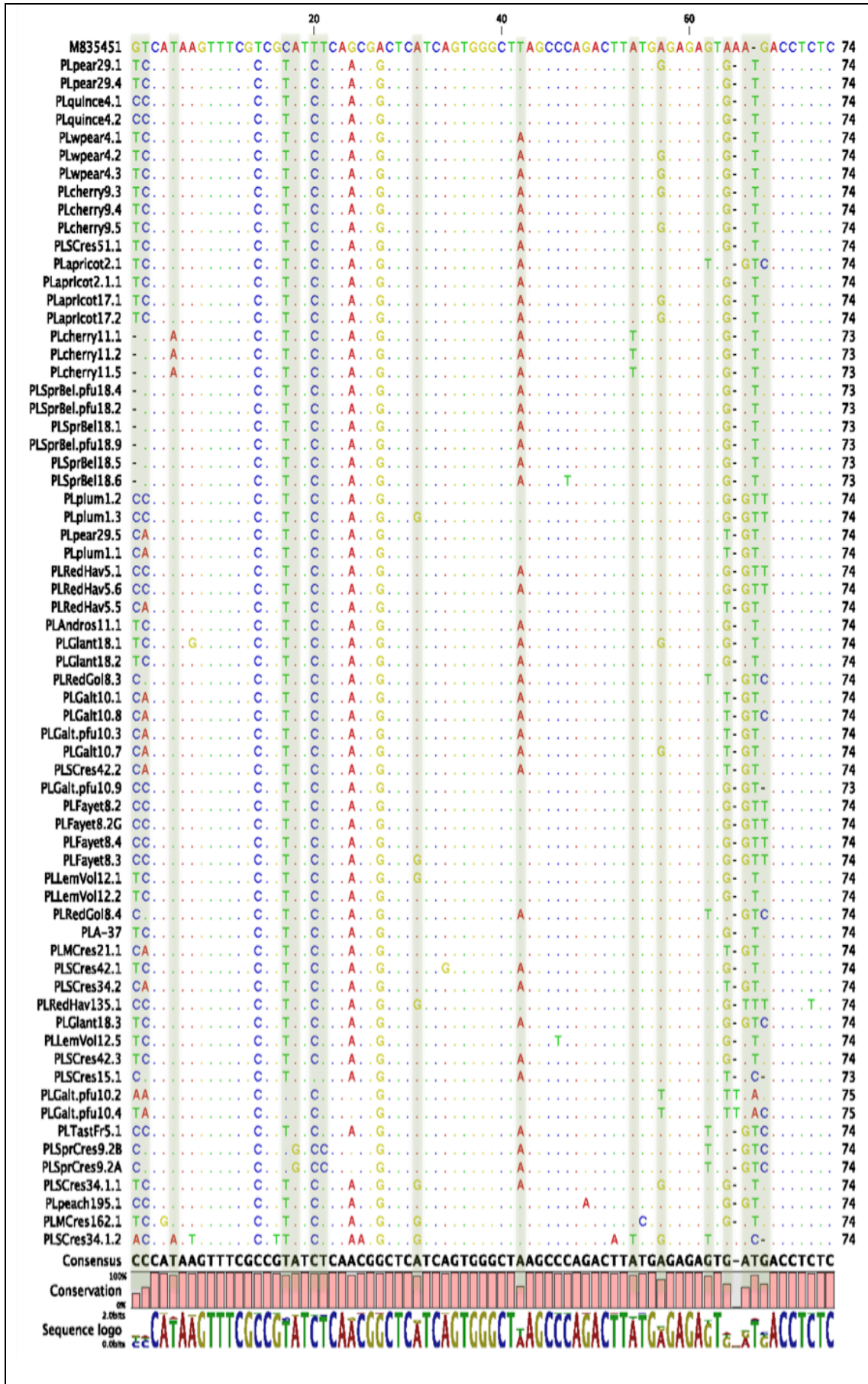
	6	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	
M835451	1	21	22	23	24	20	21	27	24	21	28	25	30	26	18	18	28	24	24	24	27	26	29
PLpear29.1	2	15	10	9	13	10	12	11	15	13	19	11	16	24	19	19	19	19	19	19	19	13	16
PLpear29.4	3	12	11	10	13	7	9	11	12	12	14	12	16	22	20	17	16	19	19	14	13	16	28
PLquince4.1	4	12	11	14	15	11	11	13	14	12	16	16	20	24	23	21	18	21	21	16	15	18	29
PLquince4.2	5	11	12	11	12	8	8	12	11	15	13	17	21	20	18	15	18	18	15	12	17	28	
PLpear4.1	6	17	12	11	16	12	16	9	15	15	13	16	21	22	22	18	21	20	15	18	20	33	
PLpear4.2	7	20	15	14	17	15	17	11	16	18	18	16	17	24	24	22	18	21	21	14	19	34	
PLpear4.3	8	20	15	14	17	15	17	11	16	18	18	16	17	24	24	22	18	21	21	14	19	34	
PLcherry9.3	9	15	14	13	16	14	16	10	15	17	17	15	17	23	23	23	21	20	20	13	18	33	
PLcherry9.4	10	16	11	10	15	11	15	8	14	14	14	12	15	20	21	21	16	19	19	14	17	32	
PLcherry9.5	11	18	17	16	16	13	16	13	15	17	16	18	18	22	25	23	17	22	15	18	23	32	
PLScrest51.1	12	14	13	12	15	9	13	12	14	14	14	20	20	24	27	23	13	16	16	19	20	30	
PLRpear2.1	13	17	16	13	15	13	14	18	14	14	17	13	15	20	20	19	17	15	13	17	18	32	
PLSpr.Bell18.2	14	17	16	13	15	12	15	10	13	17	17	17	17	23	25	18	21	21	15	19	25	32	
PLSpr.Bell18.5	15	18	17	16	16	13	16	13	15	18	18	18	18	22	25	22	22	22	15	18	21	32	
PLSpr.Crest7.1	16	21	18	17	19	16	19	19	19	19	19	19	17	25	26	26	20	23	16	21	21	35	
PLSpr.Crest7.2	17	18	15	14	15	14	16	12	15	16	17	16	18	22	21	24	20	19	19	17	21	30	
PLcherry11.1	18	18	15	14	15	14	16	12	15	16	17	16	18	22	21	24	20	19	19	17	21	30	
PLcherry11.2	19	19	15	14	16	15	17	12	16	17	18	16	19	21	23	24	19	20	18	20	23	31	
PLSpr.Bell18.4	20	17	13	12	16	13	15	12	14	15	18	14	17	21	19	22	18	18	16	20	21	33	
PLSpr.Bell18.5	21	16	12	11	13	12	12	10	11	14	17	13	15	20	20	19	17	15	13	17	18	32	
PLSpr.Bell18.9	22	16	12	11	13	12	12	10	11	14	17	13	15	20	20	19	17	15	13	17	18	32	
PLSpr.Bell18.9	23	15	15	14	13	12	11	13	10	15	16	16	16	19	22	20	16	16	14	16	20	31	
PLSpr.Bell18.5	24	20	17	16	17	17	17	15	16	18	21	18	20	22	20	21	21	19	19	18	21	35	
PLSpr.Bell18.6	25	21	18	17	18	18	18	16	17	19	22	19	21	23	21	22	22	20	20	19	22	34	
PLplum1.2	26	15	19	18	19	17	17	20	20	15	18	20	26	27	27	25	22	25	24	19	23	34	
PLplum1.3	27	8	11	14	24	18	18	24	25	11	17	16	29	32	28	31	19	28	28	25	17	35	
PLpear29.5	28	18	18	17	19	17	13	19	16	17	22	19	25	23	23	23	23	23	24	17	24	36	
PLplum1.1	29	17	17	16	18	16	12	18	15	16	21	18	24	22	16	19	22	22	22	23	16	35	
PLRedHav5.1	30	12	18	17	10	14	12	14	11	12	13	19	20	25	22	13	16	16	17	15	21	31	
PLRedHav5.6	31	11	17	16	11	15	13	15	12	13	12	18	20	21	26	23	12	17	17	18	16	32	
PLRedHav5.5	32	11	14	13	12	10	4	16	7	12	17	15	19	20	18	16	15	16	16	17	12	19	
PLAndros11.1	33	9	6	5	18	8	12	13	13	9	7	16	23	23	24	12	20	20	15	20	15	29	
PLClient3.1	34	13	10	9	8	20	12	14	14	17	17	13	11	19	27	26	25	14	22	22	15	34	
PLClient3.2	35	15	9	8	20	12	16	12	19	17	13	10	20	27	25	27	15	24	24	19	24	38	
PLRedHav5.3	36	14	20	19	4	16	12	16	11	16	13	21	21	20	25	21	9	10	10	16	25	30	
PLGalt10.1	37	18	20	19	15	17	11	14	10	18	20	21	17	19	20	23	14	14	14	19	19	36	
PLGalt10.8	38	18	21	20	14	18	12	15	11	18	19	22	18	19	21	22	13	13	13	20	20	36	
PLGalt10.10	39	18	21	20	15	17	11	15	10	19	20	22	18	19	21	23	14	15	15	20	19	26	
PLGalt10.7	40	20	23	22	17	19	13	17	12	21	22	24	20	21	22	24	16	17	17	20	21	28	
PLScrest4.2	41	17	21	20	15	17	12	14	11	17	19	22	15	16	24	22	14	15	15	21	19	26	
PLCalt10.9	42	6	11	10	18	11	10	12	12	12	12	24	24	26	24	22	22	22	23	17	26	34	
PLFayre8.2	43	6	12	11	18	12	10	12	12	12	12	12	12	24	24	22	22	22	23	17	26	34	
PLFayre8.2C	44	4	10	9	16	10	8	20	15	10	11	11	23	24	25	22	10	20	20	21	15	19	
PLFayre8.4	45	7	13	12	19	13	11	23	18	13	14	26	27	26	25	13	23	23	24	18	22	34	
PLFayre8.3	46	7	10	18	11	11	22	18	8	11	12	25	26	26	25	12	22	22	20	17	18	29	
PLLemna12.1	47	7.94	5	24	10	14	17	21	11	15	7	22	19	24	24	18	26	26	17	22	14	31	
PLLemna12.2	48	7.05	98.53	23	9	35	34	20	14	14	6	20	28	23	23	17	25	35	20	21	17	34	
PLRedHav5.4	49	4.69	92.92	93.22	20	136	30	15	20	17	25	25	24	29	25	13	14	23	19	29	34		
PLRedHav5.4	50	6.76	97.05	97.35	94.10	12	17	17	15	15	11	20	25	23	23	18	24	24	18	17	19	31	
PLK-37	51	6.76	95.87	96.17	95.28	96.46	20	11	14	17	15	23	22	22	22	20	15	20	20	21	16	17	
PLMCre21.1	52	3.51	94.99	94.86	94.10	94.99	94.10	19	20	18	15	24	27	26	19	20	20	20	21	16	17	31	
PLMCre21.2	53	4.69	93.81	94.10	95.58	94.99	96.76	94.40	19	20	22	22	23	25	23	18	19	19	10	19	26	28	
PLMCre21.3	54	7.64	96.76	95.87	94.10	95.58	95.87	94.10	94.40	19	16	23	25	24	25	20	22	22	18	19	18	28	
PLRedHav13.1	55	6.76	95.58	95.87	94.99	95.58	94.99	94.10	94.10	94.40	16	25	28	31	28	12	23	23	22	23	26	38	
PLClient3.3	56	6.46	97.94	98.23	95.63	96.76	95.58	94.09	93.11	95.28	95.28	23	20	25	19	27	27	22	23	19	36		
PLLemna12.3	57	2.63	93.11	94.10	92.63	94.10	95.58	93.11	93.22	92.63	93.22	20	31	31	31	23	23	22	22	27	26	41	
PLScrest5.1	58	2.38	91.90	91.79	92.96	92.67	91.55	92.96	93.24	92.67	91.79	91.20	92.08	92.11	10	32	27	29	25	30	35		
PLScrest5.1	59	2.35	92.94	93.24	91.47	93.24	93.53	92.06	92.65	92.94	90.88	92.65	92.65	92.65	10	32	27	29	25	30	35		
PLCalt10.2	60	2.65	92.94	93.24	92.65	93.24	92.35	93.24	92.65	91.76	92.65	90.88	92.08	97.05	28	35	25	27	23	20	37		
PLCalt10.4	61	6.46	94.09	94.09	96.17</																		

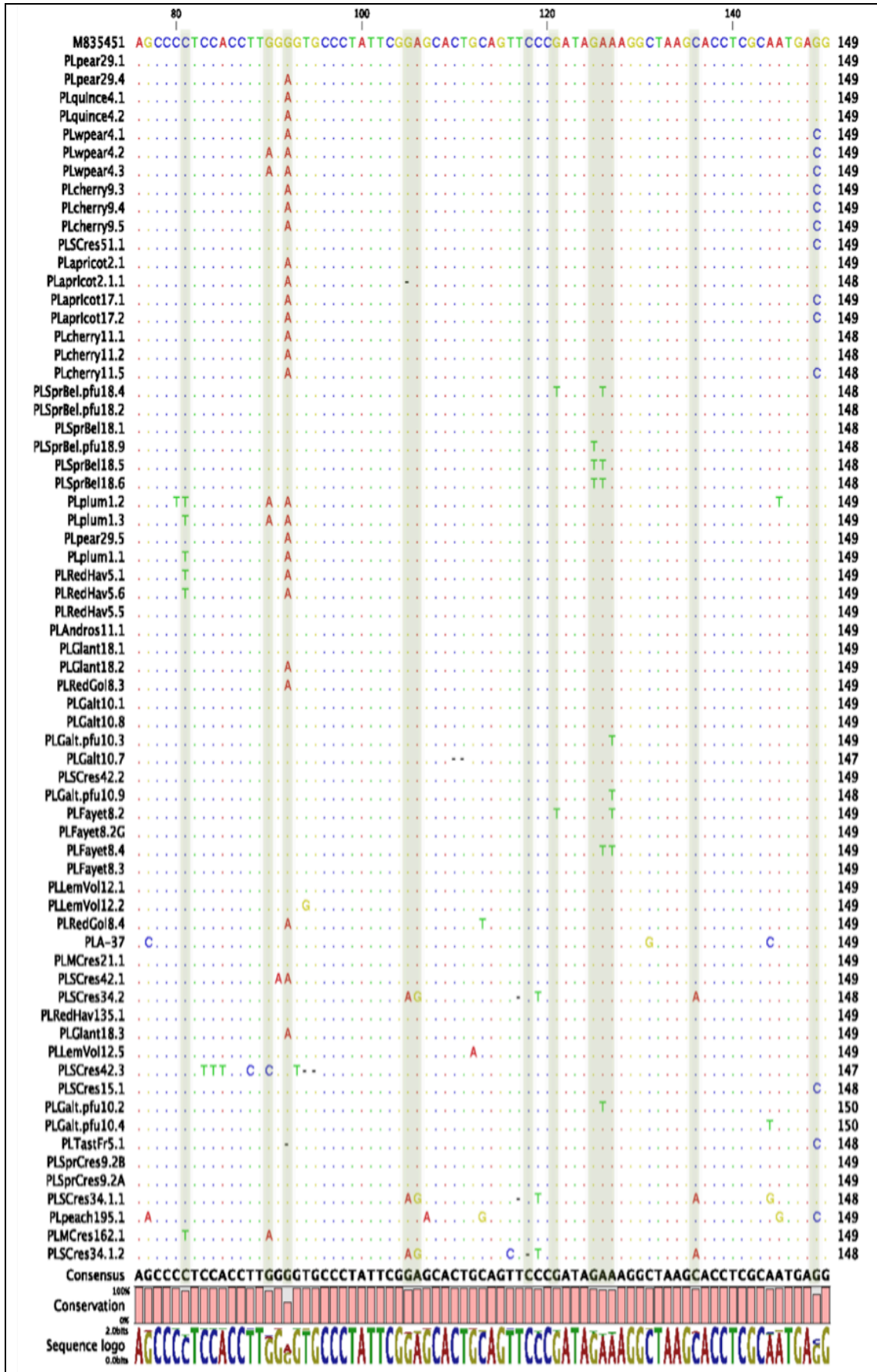
παραλλακτικότητα των ελληνικών πληθυσμών του PLMVd συμφωνεί με τα αποτελέσματα πρότερων μελετών άλλων πληθυσμών (Ambros *et al.*, 1998, Pelchat *et al.*, 2000, Fekih-Hassen *et al.*, 2007, Mandic *et al.*, 2008, Gazel *et al.*, 2008) και, σε συνδυασμό με αυτές, επιβεβαιώνει την υιοθέτηση του μοντέλου ‘σχεδόν είδους’ (quasi species) (Eigen 1993) για το PLMVd.

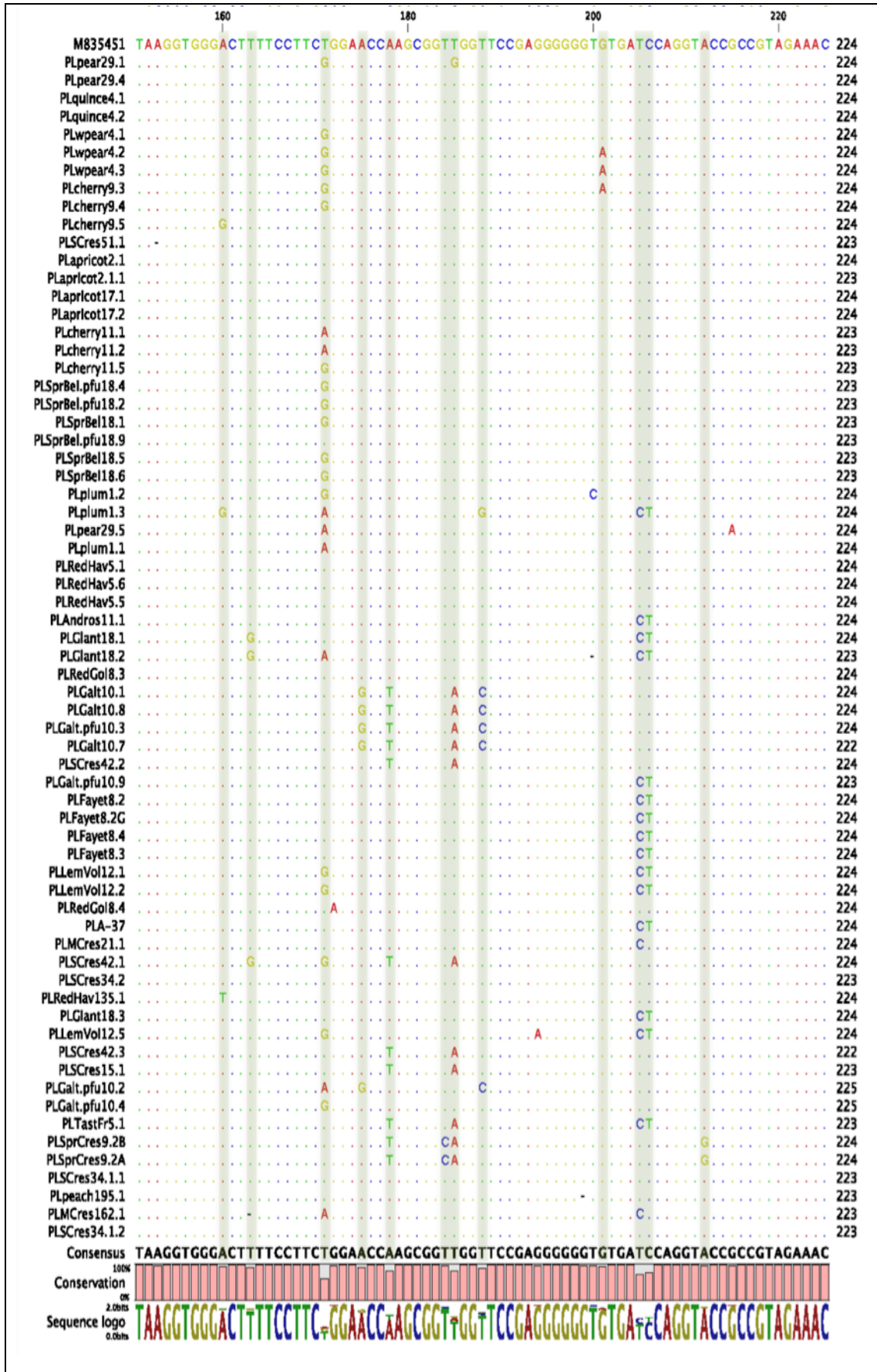
Η σύγκριση των ελληνικών παραλλαγών με την πρότυπη (M835451) (Hernandez and Flores 1992) έδειξε πως το ποσοστό ομολογίας κυμάνθηκε μεταξύ 95 % (PLRedHav5.5) και 91.2 % (PLSCrest34.1.2, PLSCrest42.3), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό μεταξύ των ελληνικών παραλλαγών, που προερχόνταν από διαφορετικές απομονώσεις, κυμάνθηκε μεταξύ 99.71 % (μια αλλαγή) έως 87.98 % (41 αλλαγές). Υψηλό ποσοστό ομολογίας καταγράφηκε μεταξύ παραλλαγών που προήλθαν από διαφορετικές ποικιλίες ροδακινιάς και διαφορετικές περιοχές (PLRedHav5.5 [Red Haven, Νέο Φθιώτιδας] - PLMCrest21.1 [May Crest, Κλένια Κορινθίας]: 99.8 %, PLAndros11.1 [Andros, Μονόσπιτα Ημαθίας] - PLLemVol12.1,12.5 [Λεμονάτα Βόλου, Νέο Φθιώτιδας]: 98.23 %) ή μεταξύ διαφορετικών ειδών που προήλθαν από διαφορετικές περιοχές (PLSpr.Bell18 [ροδακινιά Spring Bell, Μονόσπιτα Ημαθίας] - PLcherry11 [κερασιά Burla, Μεγαπλάτανος Αριδαίας]: 98.5 %, PLplum1.1 [δαμασκηνιά Angelino, Κλένια Κορινθίας] - PLquince4.1 (κυδωνιά, Καρατζάς Τροιζηνίας): 97 %, PLw.pear4 [άγρια απιδιά, Καρατζάς Τροιζηνίας] - PLcherry9.4 [Κερασιά Τραγανό Εδέσσης, Μεγαπλάτανος Αριδαίας]: 99.71 %). Από την άλλη πλευρά, πολύ χαμηλά ποσοστά ομολογίας καταγράφηκαν μεταξύ παραλλαγών που προήλθαν από την ίδια ποικιλία και οπωρώνα π.χ. PLSCrest34.1.2–PLSCrest42.3 (87.8 %) ή συγγενών ειδών που προήλθαν από γειτονικούς οπωρώνες π.χ. PLplum1.3 (δαμασκηνιά) - PLapricot17.2 (βερικοκιά) (92 %). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι πιθανότατα δεν υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού ομολογίας/βαθμού συγγένειας των παραλλαγών με τη ποικιλία, το φυτικό είδος και τη γεωγραφική τους προέλευση. Παρόλ’ αυτά, όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια, η φυλογενετική ανάλυση έδειξε πως οι παραλλαγές που δεν προήλθαν από ροδακινίες συναθροίστηκαν, με ορισμένες εξαιρέσεις, σε ξεχωριστή ομάδα από εκείνες που προήλθαν από ροδακινίες.

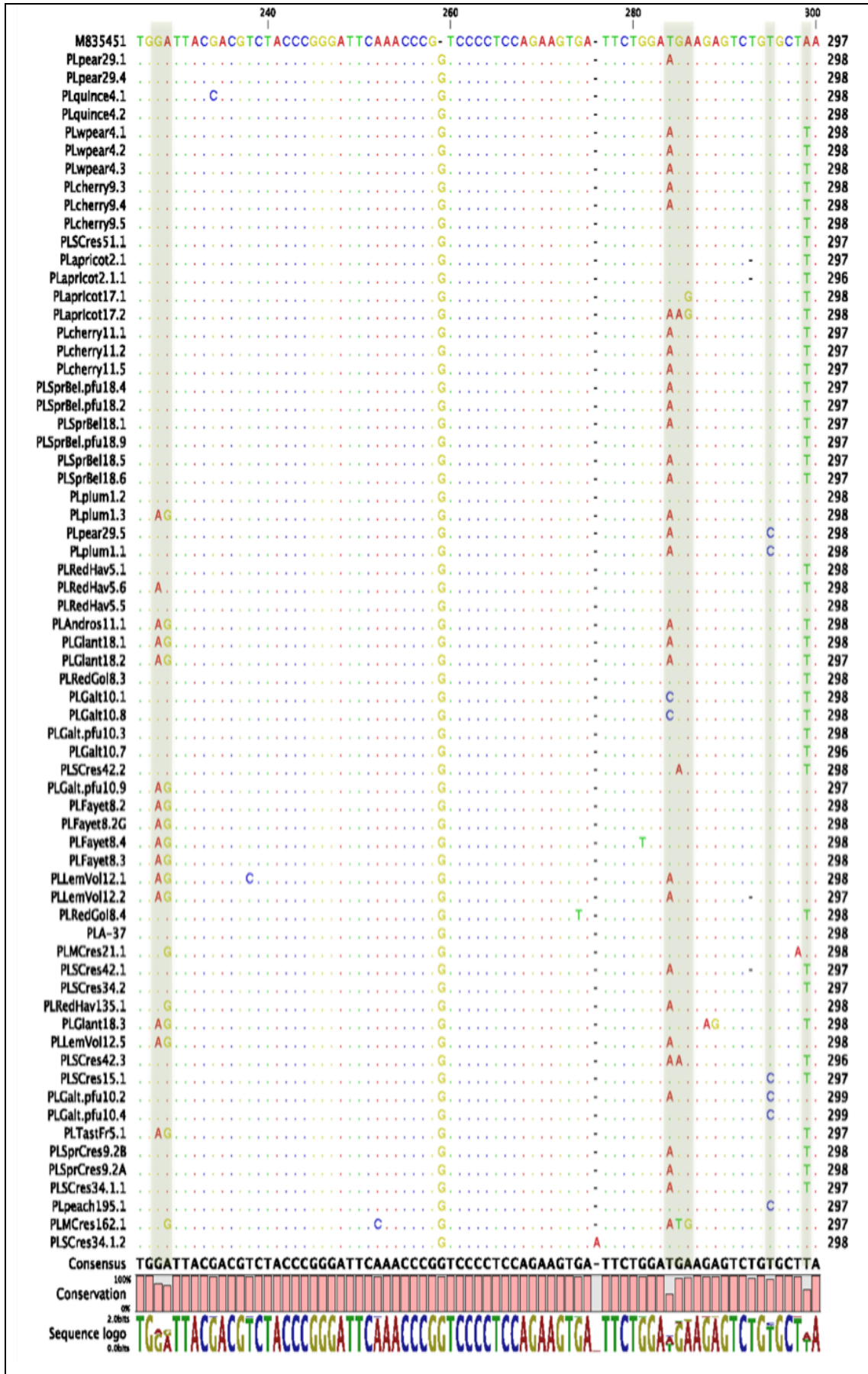
4.2. Φυλογενετική ανάλυση

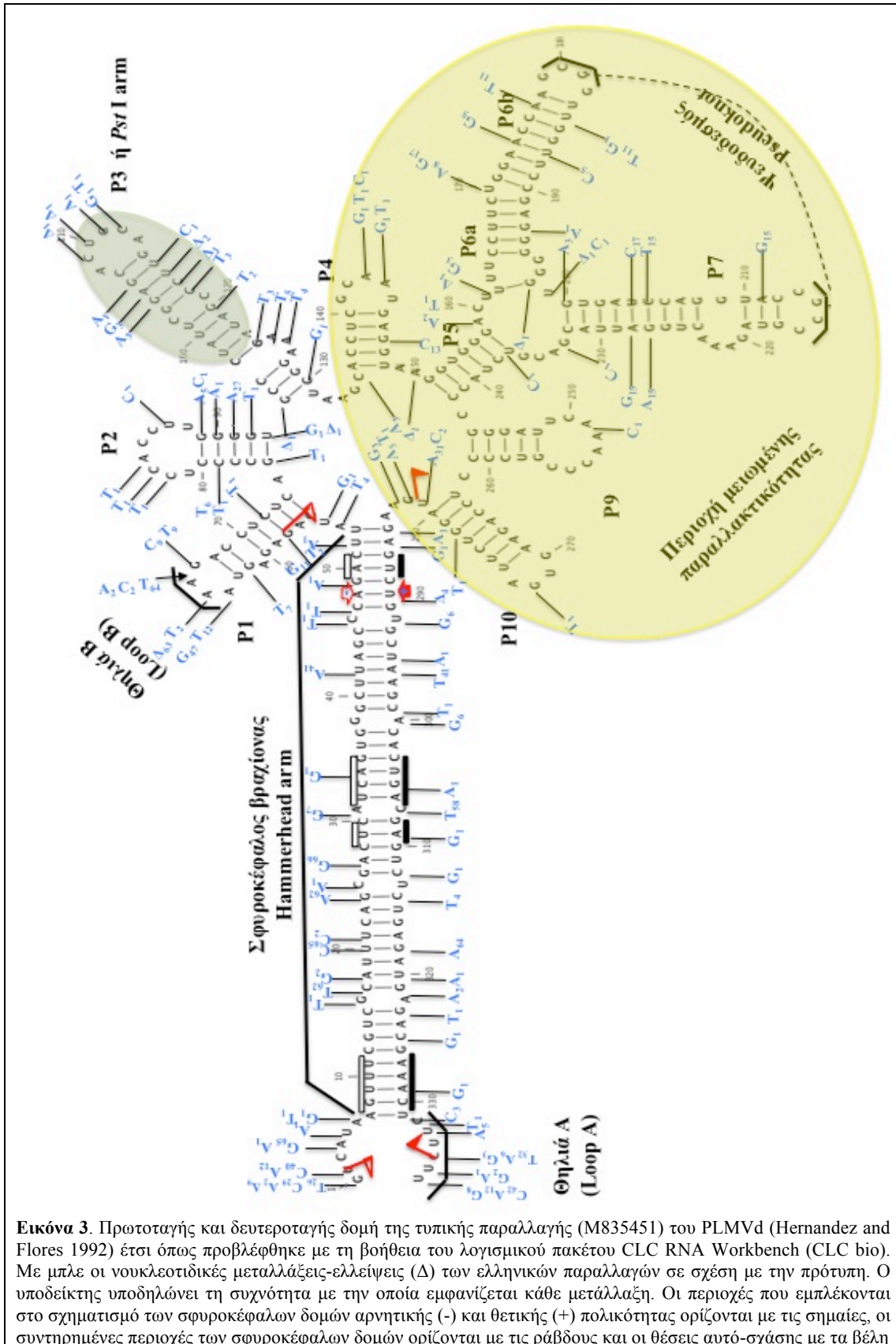
Η φυλογενετική ανάλυση του συνόλου των παραλλαγών που αποκτήθηκαν πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αφενός τους αλγόριθμους UPGMA και Minimum Evolution (ME) οι οποίοι βασίζονται στη γενετική απόσταση και αφ’ έτερου τον αλγόριθμο Maximum Parsimony (MP) που στηρίζεται στη χρήση διακριτών χαρακτήρων.











Παρατηρώντας τα φυλογενετικά δένδρα που αποκτήθηκαν με τους παραπάνω αλγόριθμους (Εικόνα 4Α, Β, Εικόνα 5) διαπιστώθηκε ότι σε γενικές γραμμές οι παραλλαγές που δεν

προήλθαν από ροδακινιές αλλά από άλλα είδη Rosaceae (non reach) συναθροίζονται σε κοινή ομάδα στην οποία ανήκουν και οι παραλλαγές PLSpr.Bell18. Εξαιρέση αποτέλεσαν οι παραλλαγές PLplum1.1, 2, 3 και PLpear29.5 στα φυλογενετικά δένδρα UPGMA και ME και το σύνολο των παραλλαγών των απομονώσεων PLplum1 (έκτος του PLplum1.2), PLquince4 και PLpear29 στο φυλογενετικό δένδρο MP (Εικόνες 4A, B, Εικόνα 5).

Κατά τη πολλαπλή ευθυγράμμιση διαπιστώθηκε η παρουσία 46 πληροφοριακών θέσεων, έξι από τις οποίες φαίνεται να συνδέονται με τα παραπάνω αποτελέσματα. Οι πληροφοριακές θέσεις και το περιεχόμενο αυτών περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

Θέση 2: C/T στο σύνολο των παραλλαγών non reach έκτος από τις πιο απομακρυσμένες PLplum1.1 και PLpear29.5 που φέρουν A.

Θέση 42: A στο σύνολο των παραλλαγών non reach, εκτός από το σύνολο των παραλλαγών των απομονώσεων PLpear29, PLquince4 και PLplum1 που φέρουν T.

Θέση 66: A στο σύνολο των παραλλαγών non reach, εκτός από τις PLplum1.1 και PLpear29.5 που φέρουν G.

Θέση 92: A στο σύνολο των παραλλαγών non reach, εκτός από τη PLpear29.1 που φέρει G.

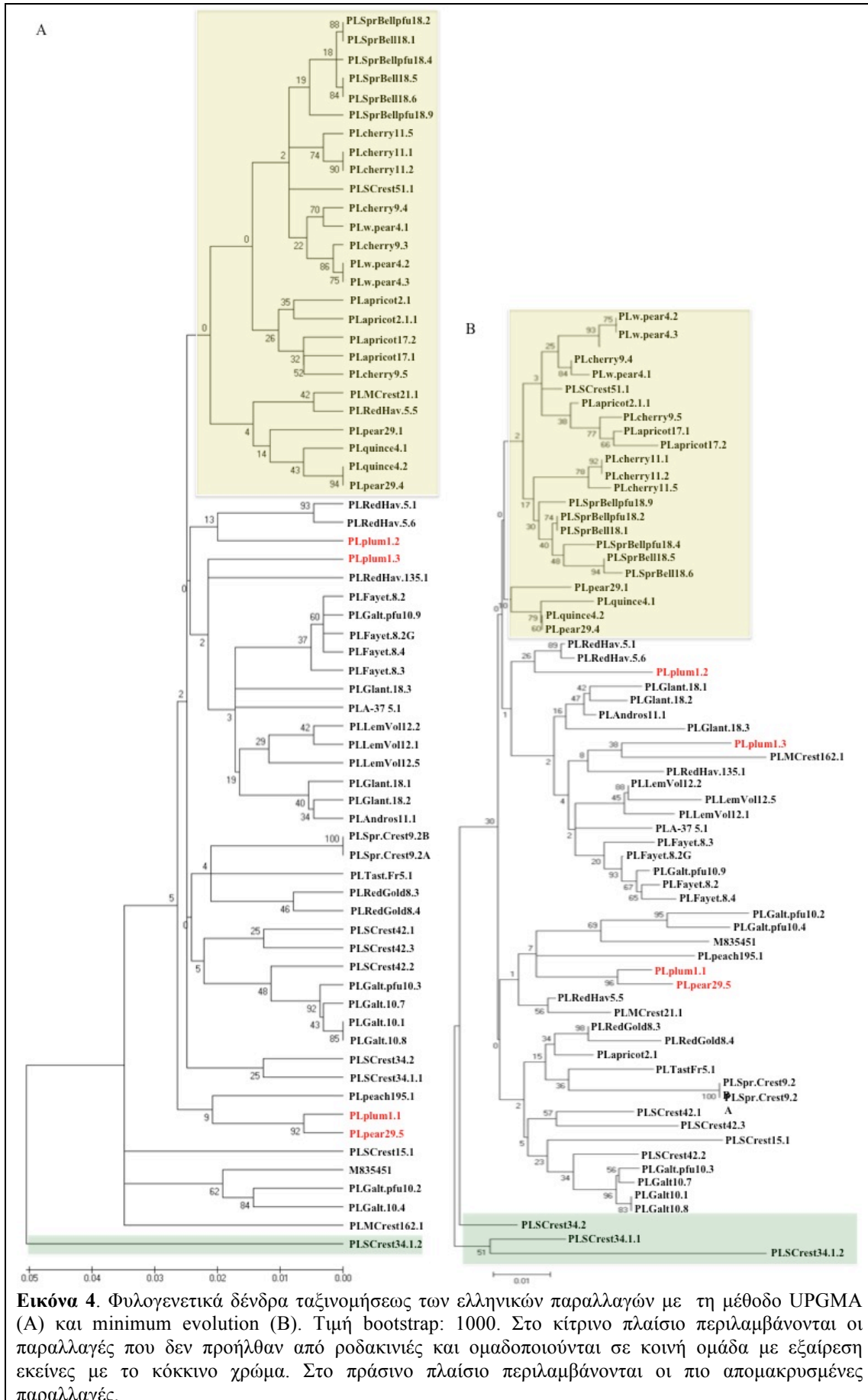
Θέση 298: T στο σύνολο των παραλλαγών non reach, εκτός από το σύνολο των παραλλαγών των απομονώσεων PLpear29, PLquince4 και PLplum1 που φέρουν A.

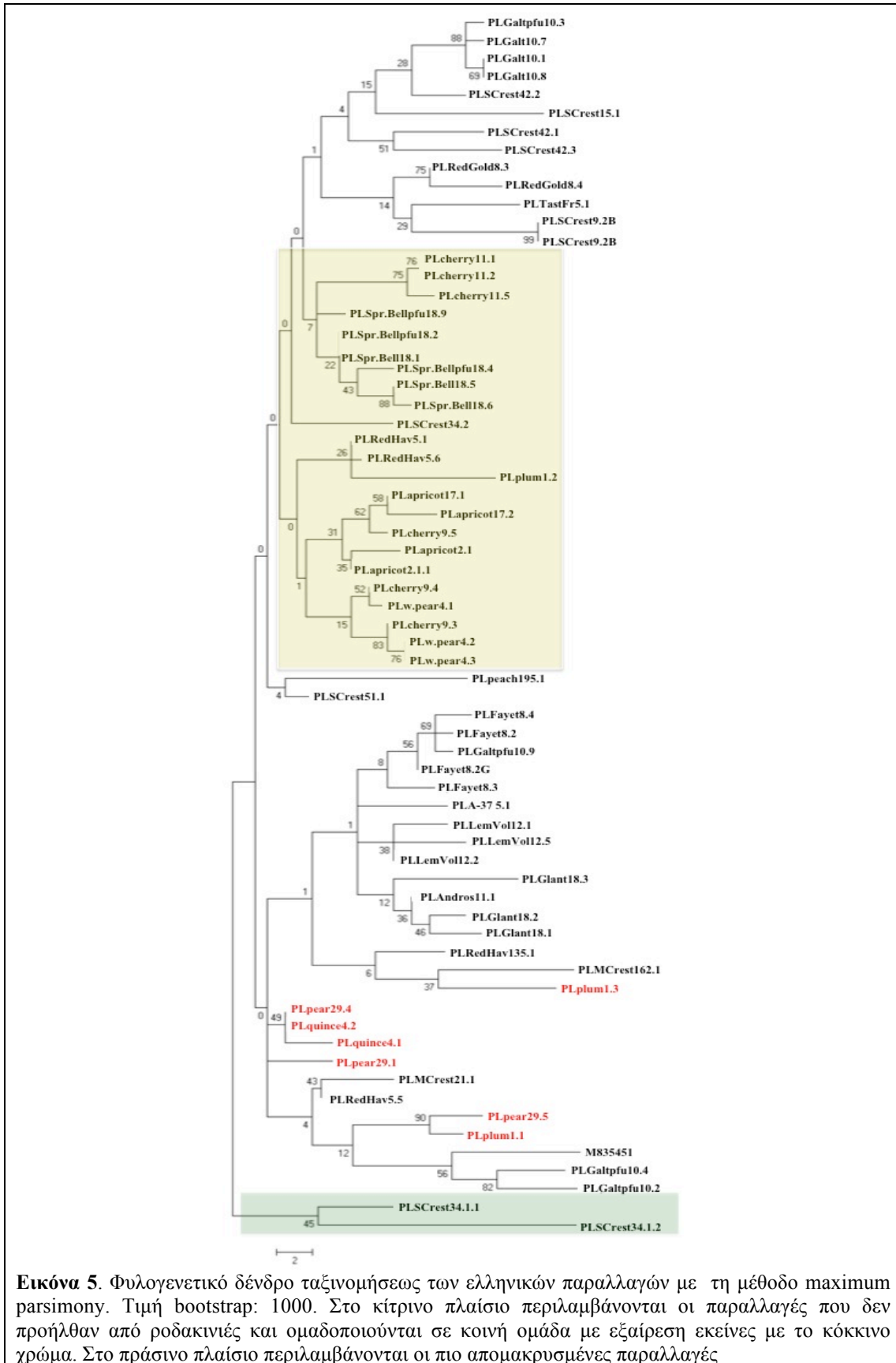
Θέση 340: C στο σύνολο των παραλλαγών non reach, εκτός από PLplum1.1 και PLplum1.2 που φέρουν A.

Επίσης διαπιστώθηκε πως οι παραλλαγές της απομονώσεως PLSCerst34 ήταν οι πλέον απομακρυσμένες (Εικόνες 4, 5).

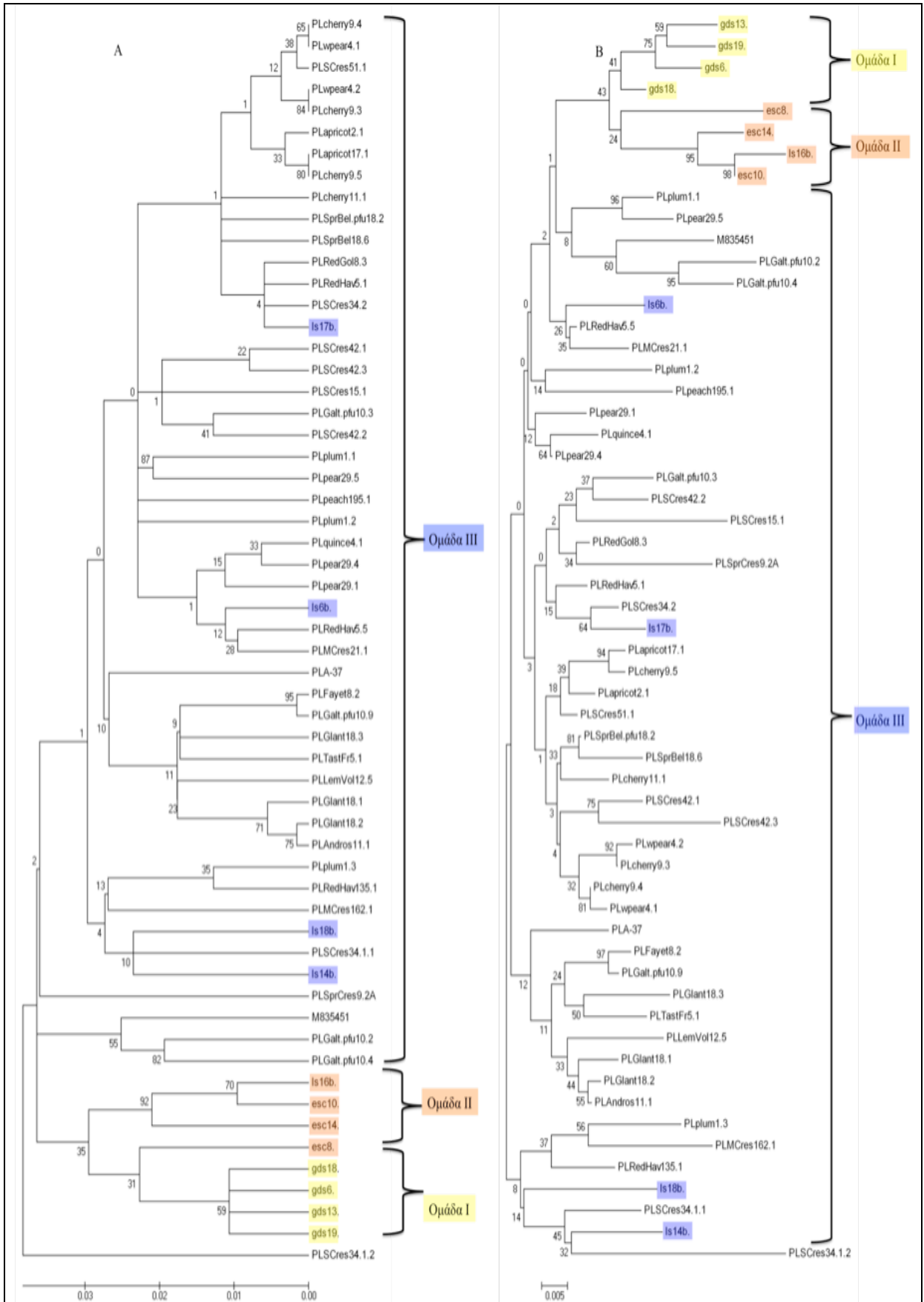
Με εξαίρεση την κοινή ομαδοποίηση των περισσοτέρων παραλλαγών που δεν προήλθαν από ροδακινιές, δεν προέκυψε μέσω της φυλογενετικής ανάλυσεως συσχέτιση μεταξύ φυλογενετικής σχέσεως των παραλλαγών ροδακινιάς με τη ποικιλία ή τη γεωγραφική προέλευση.

Από τις 66 αποκτηθείσες παραλλαγές, επιλέχθηκαν με βάση το ποσοστό ομολογίας και το βαθμό φυλογενετικής σχέσεως οι 45 πιο απομακρυσμένες οι οποίες αναλύθηκαν φυλογενετικά εκ νέου συμπεριλαμβάνοντας επιλεγμένες παραλλαγές-αντιπροσωπευτικά μέλη των ομάδων I, II και III κατά Ambros (Ambros *et al.*, 1998). Η φυλογενετική ανάλυση, και πάλι ανεξάρτητα από τον τύπο του αλγορίθμου που χρησιμοποιήθηκε, έδειξε ότι οι ελληνικές παραλλαγές ομαδοποιούνται στο σύνολό τους στην ομάδα III (Εικόνα 6A, B, Εικόνα 7, Εικόνα 8). Στην συγκεκριμένη ταξινομική ομάδα, η οποία αποτελεί και την πολυπληθέστερη, ταξινομήθηκε επίσης το σύνολο των πρόσφατα αποκτηθεισών παραλλαγών του PLMVd δύο γειτονικών μας χωρών, της Σερβίας (Mandic *et al.*, 2008) και της Τουρκίας (Gazel *et al.*, 2008) υποδεικνύοντας πιθανή κοινή προέλευση των παραλλαγών αυτών με τις ελληνικές.

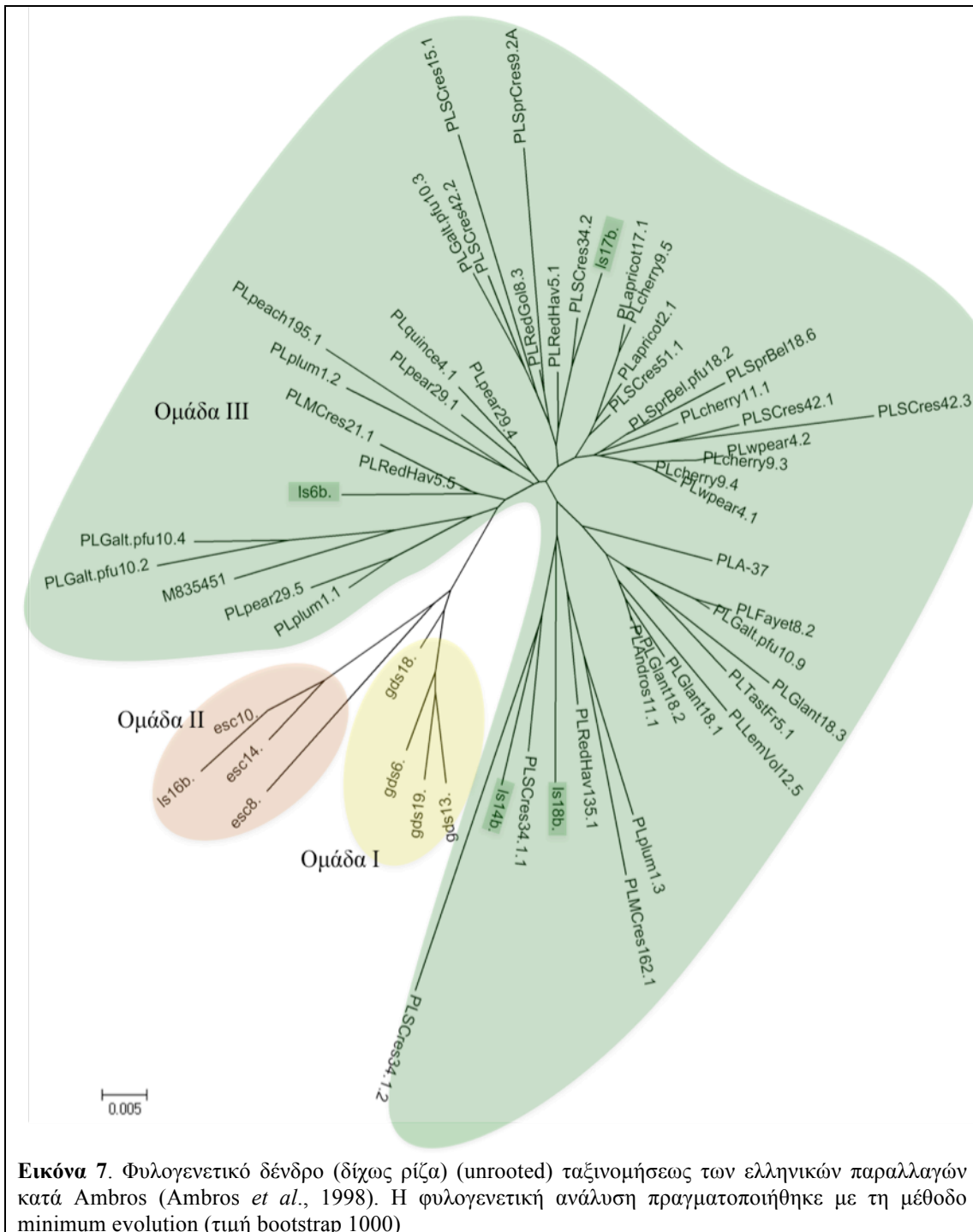


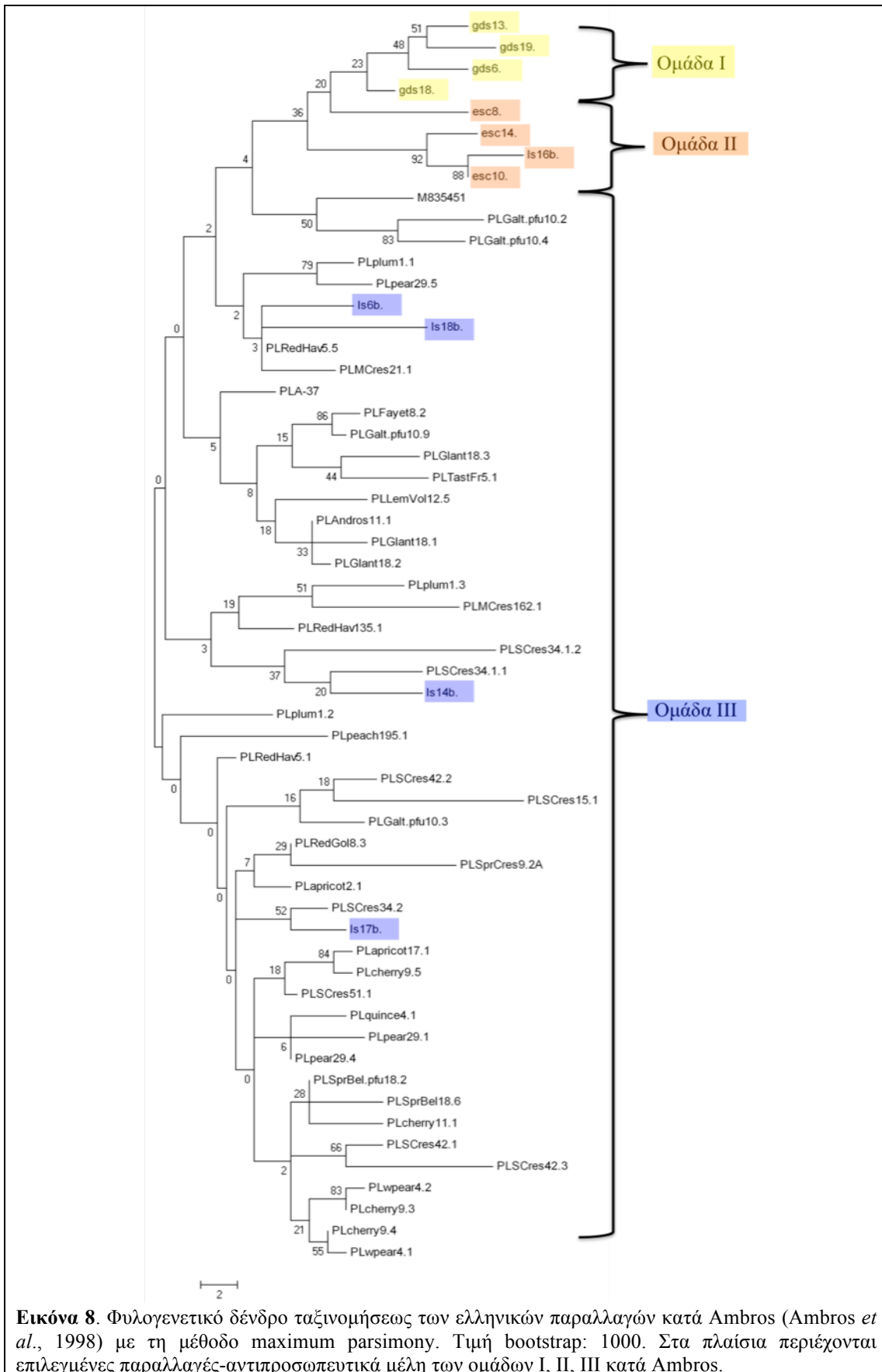


Εικόνα 5. Φυλογενετικό δένδρο ταξινομήσεως των ελληνικών παραλλαγών με τη μέθοδο maximum parsimony. Τιμή bootstrap: 1000. Στο κίτρινο πλαίσιο περιλαμβάνονται οι παραλλαγές που δεν προήλθαν από ροδακινιές και ομαδοποιούνται σε κοινή ομάδα με εξαίρεση εκείνες με το κόκκινο χρώμα. Στο πράσινο πλαίσιο περιλαμβάνονται οι πιο απομακρυσμένες παραλλαγές



Εικόνα 6. Φυλογενετικά δένδρα ταξινομήσεως των ελληνικών παραλλαγών κατά Ambros (Ambros *et al.*, 1998) με τη μέθοδο UPGMA (A) και minimum evolution (B). Τιμή bootstrap: 1000. Στα πλαίσια περιέχονται επιλεγμένες παραλλαγές-αντιπροσωπευτικά μέλη των ομάδων I, II, III κατά Ambros





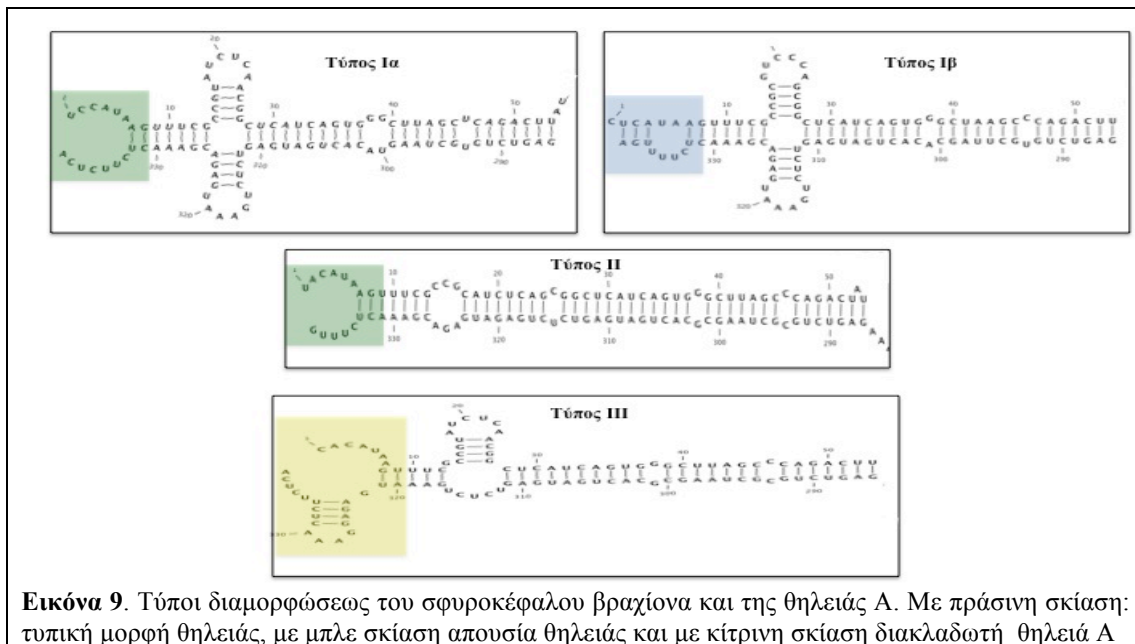
Εν τούτοις, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι πληροφοριακές αλλαγές (informative changes) που χαρακτηρίζουν την ομάδα III (θέση 2: A/C, θέση 5: T, θέση 340: T) (Ambros *et al.*, 1998), όπως συνέβη και στο παρελθόν (Mandic *et al.*, 2008, Gazel *et al.*, 2008), δεν διατηρήθηκαν, στο ακέραιο, στις ελληνικές παραλλαγές. Στη θέση 2 των περισσότερων παραλλαγών υπήρχε C/A με εξαίρεση τις PLSCrest15.1, PLRedGold8.3, 8.4, PLScrest9.4A, 9.2B, PLSpr.Bell1pfu8.4, 18.9, 18.2 και PLcherry11.1, 11.2, 11.5 στις οποίες υπήρχε T. Αντίθετα, η παρουσία T στη θέση 5 διατηρήθηκε σε όλες τις παραλλαγές έκτος των PLcherry11.1, 11.2, 11.5 και της PLSCrest34.1.2 όπου υπήρχε A. Τέλος μεγάλη παραλλακτικότητα καταγράφηκε στη θέση 338 όπου 21 παραλλαγές έφεραν T, 17 C, τέσσερις A (χαρακτηριστικό της ομάδας II) και τρεις G (χαρακτηριστικό της ομάδας I).

4.3. Δευτεροταγής δομή

Η δευτεροταγής δομή ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας προβλέφθηκε για όλες τις παραλλαγές με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου CLC RNA Workbench (CLC bio). Η διαμόρφωση των παραλλαγών του PLMVd ήταν διακλαδωτή (branched conformation) πλησιάζοντας εκείνη της πρότυπης παραλλαγής M835451 (Hernandez and Flores 1992) (Εικόνα 3) διατηρώντας στις περισσότερες περιπτώσεις έναν βασικό πυρήνα με διάφορες δομικές παραλλαγές. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τον βασικό πυρήνα αποτελούσαν πέραν του σφυροκέφαλου βραχίονα (hammerhead arm), οι κορμοί (stems) P1 (παρών στο 84.5 % των παραλλαγών), P7 (παρών στο 92 % των παραλλαγών), P9 (παρών στο 87.5 % των παραλλαγών) και P10 (παρών στο 97 % των παραλλαγών). Αντίθετα, ποικίλος ήταν ο τύπος αναδιπλώσεως για τους κορμούς (stems) P2-P6. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι οι κορμοί P2 και P4 προβλέφθηκαν μόνο στο 22 και 26 % των παραλλαγών αντίστοιχα. Όσον αφορά το κορμό P8 δεν ήταν δυνατή η πρόβλεψή του διότι το λογισμικό πακέτο CLC RNA Workbench (CLC bio) δεν υποστήριζε την πρόβλεψη ψευδο-δεσμών (pseudo-knots), για τη διαπίστωση της παρουσίας των οποίων άλλωστε απαιτούνται ειδικά λογισμικά προγράμματα ή δόκιμες nuclease probing (Bussiere *et al.*, 2000).

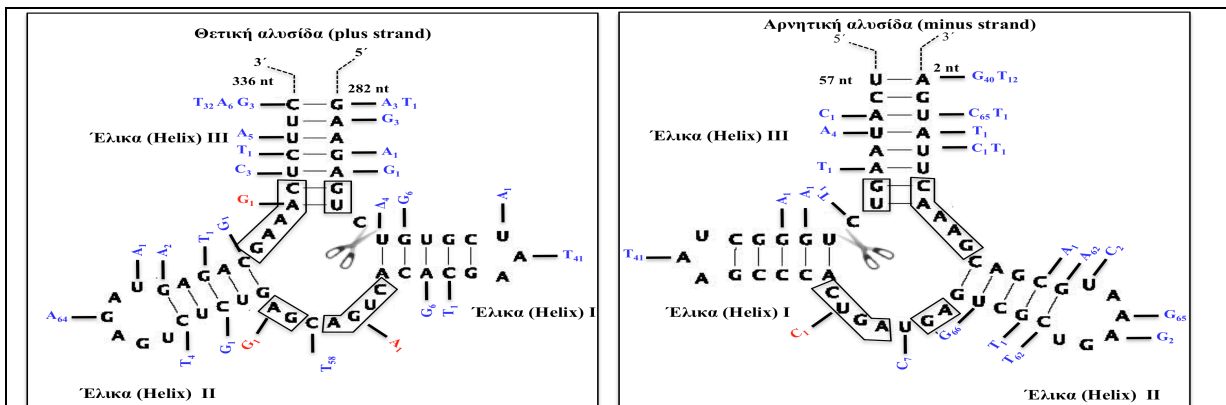
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο μεγαλύτερος αριθμός πολυμορφικών θέσεων καταγράφηκε στις περιοχές 1-136 nt και 284-343 nt, στις περιοχές δηλαδή οι οποίες εμπλέκονται στο σχηματισμό των θετικής και αρνητικής πολικότητας σφυροκέφαλων δομών και ειδικότερα στις μονοηματιδιακές περιοχές των θηλειών (loops) A και B καθώς και στο βραχίονα *Pst I* (*Pst I* arm) (Εικόνα 3). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την παρουσία στο μόριο του PLMVd περιοχών όπως οι παραπάνω, οι οποίες ανέχονται μεγάλο αριθμό νουκλεοτιδικών αλλαγών (Ambros *et al.*, 1998). Ειδικότερα για την θηλειά A, ο αριθμός νουκλεοτιδίων από τα οποία αποτελείτο στις παραλλαγές μας, εποίκιλλε αρκετά. Στις περισσότερες (49) παραλλαγές, η θηλειά A αποτελείτο από 12-13 nt, ενώ καταγράφηκαν επίσης περιπτώσεις με 15, 14, 11, επτά, ακόμη και τρία νουκλεοτίδια. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον

είχε η περίπτωση των παραλλαγών PLSCrest 9.2A, 9.2B, PLRedGold8.3, 8.4 και PL plum1.1. Οι πρώτες τέσσερις παραλλαγές δεν έφεραν καθόλου θηλειά A, ενώ στην τελευταία η θηλειά είχε μετατραπεί σε διακλάδωση παρόμοια με εκείνη του ASBVd (Εικόνα 9, τύπος III) (Flores *et al.*, 2000). Παρόλο το μεγάλο αριθμό αλλαγών στη περιοχή του σφυροκέφαλου βραχίονα, η βασική του διαμόρφωση (ραβδίο) διατηρήθηκε και διακρίθηκε σε τρεις τύπους: i) σταυροειδής (τύπος I, 56 παραλλαγές), ii) μη σταυροειδής (τύπος II, οχτώ παραλλαγές) και iii) διακλαδωτός (τύπος III, PLplum1.1). Ο σταυροειδής τύπος με τη σειρά του διακρίθηκε στον α) απλό τύπο Ia με θηλειά στο άκρο (52 παραλλαγές) και β) τον τύπο Ib δίχως θηλειά στο άκρο (PLSCrest9.2A, 9.2B, PLRedGold8.3, 8.4) (Εικόνα 9).



Με εξαίρεση τις παραλλαγές PLSCrest42.1, PLpear29.5, PLwpear4.1, οι μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν εντός των αλληλουχιών που σχηματίζουν τις θετικής και αρνητικής πολικότητας σφυροκέφαλες δομές δεν επηρέασαν τα συντηρημένα νουκλεοτίδια μεταξύ των άλλων γνωστών φυσικών σφυροκέφαλων δομών (Εικόνα 3, 10) (Bruening 1989, Di Serio *et al.*, 1997, Hernandez and Flores 1992, Hernandez *et al.*, 1992, Hatchins *et al.*, 1986). Αυτό συνέβαλε στη διατήρηση των σφυροκέφαλων δομών (Εικόνα 10) αντικατροπιζόντας το σπουδαίο τους ρόλο στην αναπαραγωγή του ιοειδούς μέσω της διαδικασίας αυτοσχάσης (self-cleavage) που καταλύουν (Bussiere *et al.*, 2000, Pelchat *et al.*, 2000, Fekih-Hassen *et al.*, 2007). Στην περίπτωση της θετικής αλυσίδας οι μεταλλάξεις στη θέση 308 (G⇒A), 333 (A⇒G) (παραλλαγή PLpear29.5) και 312 (A⇒G) (PLw.pear4.1) δεν αλλοίωσαν τη διαμόρφωση (Εικόνα 10). Το ίδιο συνέβη και στην αρνητικής πολικότητας αλυσίδα στη περίπτωση της παραλλαγής PLSCrest42.1, η οποία στη θέση 34 έφερε τη μετάλλαξη A⇒G (Εικόνα 10). Στο παρελθόν έχει επίσης αναφερθεί, σε περιορισμένο αριθμό παραλλαγών PLMVd, η παρουσία μεταλλάξεων στα συντηρημένα νουκλεοτίδια τόσο της θετικής όσο και

της αρνητικής πολικότητας αλυσίδας των σφυροκέφαλων δομών (Ambros *et al.*, 1998, Xu *et al.*, 2008, Gazel *et al.*, 2008, Mandic *et al.*, 2008, Rodio *et al.*, 2006, Malfitano *et al.*, 2003). Κάποιες από τις μεταλλάξεις αυτές, όπως για παράδειγμα στη θέση 12 (G⇒U), επηρέασαν αρνητικά την ικανότητα αυτο-σχάσεως (Ambros *et al.*, 1998), όπως και η αλλαγή στη θέση 307 (U⇒A/G), σε αντίθεση με την αλλαγή U⇒C στην ίδια θέση, που δεν είχε καμία απολύτως επίδραση (Ambros and Flores 1998). Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έλλειψη στη θέση 293 (U) στις παραλλαγές PLapricot2.1, 2.1.1, PLquince4.1 και PLLemVol12.2. Σύμφωνα με τους Ambros *et al.* (1998), η παραπάνω μετάλλαξη μειώνει την ικανότητα αυτο-σχάσεως, ενώ σύμφωνα με τους Fekih-Hassen *et al.* (2007) έχει ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα. Είναι, επίσης, γνωστό ότι η έλλειψη στη θέση 293 επηρεάζει, στις παραλλαγές gds2 και gds16, αρνητικά την παθογένεια, παρόλο που αυτές προέρχονται από την ισχυρά παθογόνο απομόνωση D168 (Ambros *et al.*, 1998). Προκειμένου να διαπιστωθεί όμως η ακριβής επίδραση όλων των παραπάνω μεταλλάξεων στην περίπτωση των ελληνικών παραλλαγών, απαιτείται η εφαρμογή δοκιμών αυτό-σχάσης (self-cleavage assays) καθώς και βιοδοκιμών.



Εικόνα 10. Σφυροκέφαλες δομές της θετικής και της αρνητικής αλυσίδας των ελληνικών παραλλαγών του PLMVd. Με μπλε οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις-ελλείψεις (Δ) των ελληνικών παραλλαγών σε σχέση με την πρότυπη M835451 (Hernandez and Flores 1992). Ο υποδείκτης υποδηλώνει τη συχνότητα με την οποία εμφανίζεται κάθε μετάλλαξη. Εντός των πλαισίων βρίσκονται οι συντηρημένες περιοχές των σφυροκέφαλων δομών. Με το ψαλίδι συμβολίζονται οι θέσεις αυτο-σχάσης (self-cleavage sites)

Οι πλούσιες σε GC περιοχές: $178GGCG_{183}$ και $213CCGC_{216}$ οι οποίες εμπλέκονται στο σχηματισμό του ψευδοδεσμού (pseudo-knot) P8 (Ambros *et al.*, 2000), ήταν συντηρημένες στο σύνολο των ελληνικών παραλλαγών. Εξάιρεση αποτέλεσε μόνο η περίπτωση της παραλλαγής PLpear29.5 η οποία έφερε στη θέση 214 τη μετάλλαξη C⇒A. Ο υψηλός βαθμός συντηρήσεως των παραπάνω αλληλουχιών υποδηλώνει τη σπουδαιότητα του σχηματισμού του ψευδοδεσμού. Από την άλλη πλευρά, το γεγονός ότι στο παρελθόν, παρόμοια μετάλλαξη ($214C⇒U$) δεν επηρέασε αρνητικά τον σχηματισμό του ψευδοδεσμού (Gago *et al.*, 2005) δείχνει την αναγκαιότητα της παρουσίας του στο μόριο του PLMVd, διότι συμβάλλει στη σταθεροποίηση της δομής του (Pelchat *et al.*, 2000).

ΜΕΡΟΣ Δ.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΝΕΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ PLMVd

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ-ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΘΗΛΕΙΑΣ

REVERSE TRANSCRIPTION-LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION, RT-LAMP

1. Περίληψη

Η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής ισόθερμης ενισχύσεως με τη μεσολάβηση θηλειάς (Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal AMPLification RT-LAMP) αναπτύχθηκε για την ανίχνευση του ιοειδούς του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς, (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd). Η RT LAMP είναι μια νέα και αρκετά απλή μέθοδος ενισχύσεως νουκλεϊκών οξέων, που πραγματοποιείται σε ισοθερμικές συνθήκες (60-65°C) με τη χρήση τεσσάρων διαφορετικών εκκινητών οι οποίοι αναγνωρίζουν έξι διαφορετικές περιοχές της αλληλουχίας-στόχου. Αρχικά, σχεδιάστηκαν τέσσερις ομάδες εκκινητών (OLD, OLD1, NEW, FUCUTA) και με βάση προκαταρκτικά πειράματα επιλέχθηκε η ομάδα OLD1 για περαιτέρω αξιολόγηση. Επίσης, πραγματοποιήθηκε η απλή (δίχως εκκινητές θηλειάς) και η επιταχυνόμενη παραλλαγή της μεθόδου με τη χρήση μη εκφυλισμένων και εκφυλισμένων εκκινητών θηλειάς (F-Loop και B-Loop) οι οποίοι και επιλέχθηκαν ως οι καταλληλότεροι. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου παρουσία των εκκινητών θηλειάς, στις βέλτιστες συνθήκες 0.8 M μπεταΐνης και 62.5 °C και με εκμαγείο τόσο ολικό RNA (t-RNA) όσο και ίχνος φυτικού ιστού, το οποίο λήφθηκε με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα, το PLMVd ανιχνεύθηκε σε μόλις 30 λεπτά αντί των 180 λεπτών που απαιτούνται για την RT-PCR. Επίσης, διαπιστώθηκε πως η RT-LAMP είναι μέθοδος απλή, πρακτική, φθηνή, 100 φορές πιο ευαίσθητη από την RT-PCR, ταχεία και με υψηλό βαθμό εξειδικεύσεως. Εφαρμογή της μεθόδου τόσο στο εργαστήριο όσο και στον αγρό οδήγησε στην ανίχνευσή του PLMVd στη ροδακινιά, βερικοκιά, δαμασκηλιά, άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά και κυδωνιά.

2. Εισαγωγή

Το ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) αποτελεί μέλος της οικογένειας *Avsunviroidae* και του γένους *Pelamoviroid* (Navarro and Flores 1997) και αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Γαλλία το 1976 από τον Desvignes (1976) κατά τον έλεγχο πολλαπλασιαστικού υλικού ροδακινιάς που είχε εισαχθεί από τις Η.Π.Α. και την Ιαπωνία. Ο όρος λανθάνον που υπάρχει στο όνομα του ιοειδούς αυτού υποδεκνύει πως πρόκειται για ένα παθογόνο που στην πλειονότητα των φυσικών μολύνσεων δεν προκαλεί εμφανή συμπτώματα στα φύλλα. Είναι επίσης γνωστό ότι ακόμη και στην περίπτωση που εμφανίζονται συμπτώματα αυτά είναι ασταθή και συχνά εξαφανίζονται με τον χρόνο. Επίσης, ο όρος ‘λανθάνον’ σχετίζεται και με το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την έναρξη εμφάνισης των συμπτωμάτων (Flores *et al.*, 2006). Το παραπάνω χαρακτηριστικό του PLMVd, σε συνδυασμό με την παγκοσμιοποίηση της γεωργίας και ειδικότερα την ανταλλαγή και διακίνηση πολλαπλασιαστικού υλικού, οδήγησαν στην ευρύτατη διάδοση του σε όλο τον κόσμο (Hadidi *et al.*, 1997, Flores και Llacer 1998, Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Desvignes 1986, Mandi *et al.*, 2008, Ozaka *et al.*, 1999, Shamloul *et al.*, 1995, Fekih-Hassen *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2008, Nieto *et al.*, 2008, Fiore *et al.*, 2003, Abou-Ghanem *et al.*, 2003, Gazel *et al.*, 2008).

Έχοντας λοιπόν υπόψιν ότι η μετάδοση και διάδοση του PLMVd γίνεται κυρίως μέσω του μολυσμένου αγενούς πολλαπλασιαστικού υλικού, θα πρέπει το σχέδιο αντιμετώπισης του να στηριχθεί σχεδόν αποκλειστικά στην χρήση υγιούς και πιστοποιημένου αγενούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Για να καταστεί αυτό εφικτό, πέραν της αποτελεσματικής μεθόδου εξυγιάνσεως απαιτείται και η ύπαρξη κατάλληλων διαγνωστικών μεθόδων που θα καταστήσουν το σύστημα πιστοποίησης ασφαλές. Κατάλληλη θεωρείται μια διαγνωστική μέθοδος όταν συνδυάζει χαρακτηριστικά όπως ευαισθησία, αποτελεσματικότητα, αξιοπιστία, εξειδίκευση, ταχύτητα, ικανότητα μαζικών ελέγχων και οικονομικότητα, τα τελευταία χαρακτηριστικά σημαντικό για τις αναπτυσσόμενες και όχι μόνο χώρες, ιδιαίτερα σήμερα λόγω οικονομικής κρίσεως.

Από τις μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα στη διάγνωση του PLMVd, η ηλεκτροφόρηση δύο κατευθύνσεων νουκλεϊκών οξέων σε πήγμα πολυακρυλαμίδης (d-PAGE) (Flores *et al.*, 1992, Faggioli *et al.*, 1997) και ο μοριακός υβριδισμός (Hernandez and Flores 1992, Shamloul *et al.*, 1995, Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Mandic *et al.*, 2008) μπορεί να χαρακτηρίζονται αντίστοιχα από χαμηλό κόστος και δυνατότητα μαζικών ελέγχων αλλά αποτελούν παράλληλα χρονοβόρα πρωτόκολλα με σχετικά μικρή ευαισθησία. Η RT-PCR, και συγκεκριμένα οι παραλλαγές multiplex και one tube (Shamloul *et al.*, 1995, Loreti *et al.*, 1999, Raggozino *et al.*, 2004) και ιδιαίτερα η RT-PCR ELISA (Shamloul *et al.*, 2002) συνδυάζουν από την μία πλευρά την ευαισθησία με την

εξειδίκευση, αλλά από την άλλη απαιτούν για την εφαρμογή τους δαπανηρό και εξειδικευμένο εξοπλισμό π.χ. θερμοκυκλοποιητές και δεν μπορούν να εφαρμοστούν στον αγρό.

Στις αρχές του 2000, στην Ιαπωνία και συγκεκριμένα στα εργαστήρια της Eiken Chemical Ltd., οι Notomi *et al.*, (2000) εφηύραν μια νέα μοριακή διαγνωστική τεχνική, την ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση θηλειάς (Loop Mediated Isothermal AMPLification, LAMP), η οποία αποτελεί μέθοδο πολλαπλασιασμού DNA, ή RNA όταν συνδυαστεί προηγουμένως με την εφαρμογή αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) οπότε και ονομάζεται RT-LAMP. Στη μέθοδο αυτή, με την χρήση μιας πολυμεράσης με δράση εκτοπισμού αλυσίδας (strand displacement activity) χωρίς να υπάρχει ανάγκη θερμικής αποδιατάξεως του εκμαγείου (όπως στην περίπτωση της κλασικής PCR) και τεσσάρων εκκινητών που αναγνωρίζουν όμως έξι περιοχές στην αλληλουχία-στόχο, είναι δυνατός, σε ισοθερμικές συνθήκες (60-65°C) και σε χρονικό διάστημα 20-60 λεπτών, ο αναδιπλασιασμός της αλληλουχίας-στόχου 10^9 - 10^{10} φορές (Notomi *et al.*, 2000, Moriguchi *et al.*, 2001). Τα προϊόντα της μεθόδου είναι μόρια δινηματιδιακού DNA με χαρακτηριστική μορφή κορμών (stems) με θηλειές (loops) που περιέχουν ανάστροφες επαναλήψεις της αλληλουχίας-στόχου και κατά τη διάρκειά της παράγονται υψηλές ποσότητες άλατος πυροφωσφορικού μαγνησίου (magnesium pyrophosphate) που συμβάλλουν στη θολότητα του τελικού διαλύματος της αντιδράσεως (Nagamine *et al.*, 2002, Notomi *et al.*, 2000). Η μέθοδος αυτή είναι πραγματικά ξεχωριστή, καθώς συνδυάζει την υψηλή εξειδίκευση (χρησιμοποιούνται τέσσερις έως έξι εκκινητές) και ευαισθησία που σε ορισμένες περιπτώσεις είναι παρόμοια με εκείνη της Real Time RT-PCR (Vargas and James 2006, Dukes *et al.*, 2006, Fukuda *et al.*, 2006) με την ταχύτητα (20-60 λεπτά), το χαμηλό κόστος (μισό από το κόστος της RT-PCR [S. Fukuda προσωπική επικοινωνία]) καθώς δεν απαιτούνται ακριβά αντιδραστήρια και εξειδικευμένος εξοπλισμός, αντίθετα ένα απλό υδατόλουτρο ή θερμοαντιστατική πλάκα (heatblock) είναι αρκετό (Pham *et al.*, 2005) και την εύκολη και γρήγορη καταγραφή των αποτελεσμάτων, με οπτική παρατήρηση της θολότητας του τελικού διαλύματος ή την χρήση εσωτερικών φθορίζουσών χρωστικών (internal fluorescent dyes) (Nagamine *et al.*, 2002, Notomi *et al.*, 2000). Μέχρι σήμερα, η RT-LAMP έχει χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση σημαντικών ιών (*Human immunodeficiency virus* HIV, *Severe acute respiratory syndrome virus*, SARS) και βακτηρίων (*Salmonella enterica*) που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα ζώα, αλλά και ορισμένων φυτοπαθογόνων όπως ο ιός του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), ο ιός Y της πατάτας (*Potato virus Y*, PVY) και το βακτήριο *Liberibacter asiaticus* υπεύθυνο για την ασθένεια citrus greening (πρασίνισμα των εσπεριδοειδών) και ενός ιοειδούς αυτού του νανισμού του χρυσανθέμου (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) (Okuda *et al.*, 2005, Ohtsuka *et al.*, 2005, Curtis *et al.*, 2008, Nie., 2005, Fukuda *et al.*, 2004, Minekawa *et al.*, 2004, Fukuda *et al.*, 2005). Με βάση τα παραπάνω, η τεχνική RT-LAMP συνδυάζει πολλά

από τα βασικά χαρακτηριστικά μιας διαγνωστικής μεθόδου ‘κατάλληλης’ για ένα σύστημα πιστοποίησης.

Σκοπό του κεφαλαίου αυτού της ερευνητικής αυτής ενότητας της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και υιοθέτηση της τεχνικής RT-LAMP στη διάγνωση του PLMVd στη ροδακινιά και άλλους ξενιστές. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αναλυτικά τα κάτωθι:

- i) Σχεδιασμός και σύγκριση - αξιολόγηση διαφόρων ομάδων εκκινητών.
- ii) Ανάπτυξη – εφαρμογή απλού και επιταχυνόμενου πρωτοκόλλου RT-LAMP με τη χρήση εκκινητών θηλειάς (loop primers).
- iii) Αξιολόγηση της επιδράσεως διαφόρων παραγόντων της αντιδράσεως (εκμαγείο, τύπος αντίστροφης μεταγραφάσης, συγκέντρωση μπεταΐνης κ.ά.
- iv) Εκτίμηση ευαισθησίας και εξειδικεύσεως της μεθόδου.
- v) Εφαρμογή της τεχνικής RT-LAMP στη διάγνωση του PLMVd στην ροδακινιά και άλλα είδη στο εργαστήριο και στον αγρό.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Φυτικό υλικό

Για τις ανάγκες του παρόντος κεφαλαίου χρησιμοποιήθηκαν οι ελληνικές απομονώσεις PLMVd 8 και 9 (βλ. Πίνακα 1 Κεφάλαιο 1, Γ μέρος) οι οποίες προήλθαν από φυσικά μολυσμένα δένδρα ροδακινιάς ποικιλίας Spring Crest με χαρακτηριστικές σχισμές στις ραφές των καρπών καθώς και οι Ιταλικές απομονώσεις PLMVd P31 και P39 (απομόνωση Peach Calico) στον φυτοδείκτη ροδακινιάς GF-305. Προκειμένου να εκτιμηθεί η εξειδίκευση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν ακόμη ιταλικές απομονώσεις των ιοειδών ASSVd, HSVd, PBCVd και PSTVd καθώς και υγιή φυτά GF-305. Οι Ιταλικές απομονώσεις προήλθαν από την συλλογή του Ινστιτούτου CRA (Centro di Ricerca per la Pathologia Vegetale) στην Ρώμη μετά από ευγενική προσφορά των Dr. M. Barba και Dr. F. Faggioli. Τέλος, με σκοπό την ανίχνευση του PLMVd με τη τεχνική RT-LAMP και σε άλλα φυτικά είδη πέραν της ροδακινιάς (No 1, 6, 8, 9, 11, 15), χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φύλλων ή καρπών από άγρια (No 3, 4) και καλλιεργούμενη απιδιά (No 2, 3), βερικοκιά (No 2 ,8), δαμασκηνιά (No 1, 4) και κυδωνιά (No 4) που συλλέχθηκαν από οπωρώνες στις περιοχές Καρατζάς Τροιζηνίας και Κλένια Κορινθίας (βλ. Πίνακα 1 Κεφάλαιο 1, Γ μέρος).

3.2. Προετοιμασία των δειγμάτων για την RT-LAMP και RT-PCR

Αρχικά ως εκμαγείο για την ανίχνευση του PLMVd με τη RT-LAMP και την RT-PCR χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA (total RNA, t-RNA), το οποίο εκχυλίστηκε με την μέθοδο των Rott and Jelkmann (2001) που χρησιμοποιεί διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂), έτσι όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3.1.2 του Β μέρους. Επίσης δοκιμάστηκε η

αποτελεσματικότητα δύο ακόμη τύπων εκμαγείου: i) ακατέργαστο (crude) εκχύλισμα φυτικού χυμού σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (dissolution buffer ή SSC) έτσι όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3.1. του Γ μέρους και ii) ίχνος φυτικού ιστού από το έλασμα φύλλων των προς έλεγχο φυτών το οποίο μεταφέρθηκε στο διάλυμα της αντιδράσεως με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας (Εικόνα. 1).



Εικόνα 1. Λήψη με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα ίχνους φυτικού ιστού από το έλασμα φύλλου ροδακινιάς (Α) και μεταφορά του σε μικροσωλήνα για εξέταση.

3.3. Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της μεθόδου RT-LAMP εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της RT-PCR δύο σταδίων σε ένα μικροσωλήνα (one tube two step RT-PCR) με το ζεύγος εκκινητών Loreti c/Loreti h, (Πίνακας 1), έτσι όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.3. του Β μέρους.

3.4. Αντίστροφη μεταγραφή-ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση θηλειάς (Reverse Transcription-Loop mediated isothermal AMPlification, RT-LAMP)

3.4.1. Σχεδιασμός εκκινητών

Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας της μεθόδου RT-LAMP, απαιτείται ο σχεδιασμός τουλάχιστον δύο ζευγών εκκινητών, σε αντίθεση με το ένα της μεθόδου RT-PCR. Το πρώτο ζεύγος αποτελούν οι εκκινητές πρόσθιος εξωτερικός (outer forward, F3) και οπίσθιος εξωτερικός (outer backward, B3) και το δεύτερο ζεύγος οι εκκινητές πρόσθιος εσωτερικός (forward inner primer, FIP) και οπίσθιος εσωτερικός (backward inner primer, BIP), καθένας από τους οποίους αποτελείται από δύο επιμέρους εκκινητές τους F1c, F2 και B1, B2c αντίστοιχα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι τέσσερις εκκινητές στην RT-LAMP να αναγνωρίζουν όχι τέσσερις αλλά έξι περιοχές στην αλληλουχία-στόχο (Notomi *et al.*, 2000). Συχνά, προκειμένου να αυξηθεί ο βαθμός εξειδίκευσεως της μεθόδου και να μειωθεί ο συνολικός χρόνος της αντιδράσεως, είναι δυνατή η χρήση ενός επιπλέον ζεύγους εκκινητών, των εκκινητών θηλειάς (loop primers) (Nagamine *et al.*, 2002).

Στον σχεδιασμό των εκκινητών επιλέχθηκε τυχαία ως αλληλουχία αναφοράς η σερβική απομόνωση PL101 (GenBank Accession no EF151296) (Mandic *et al.*, 2008).

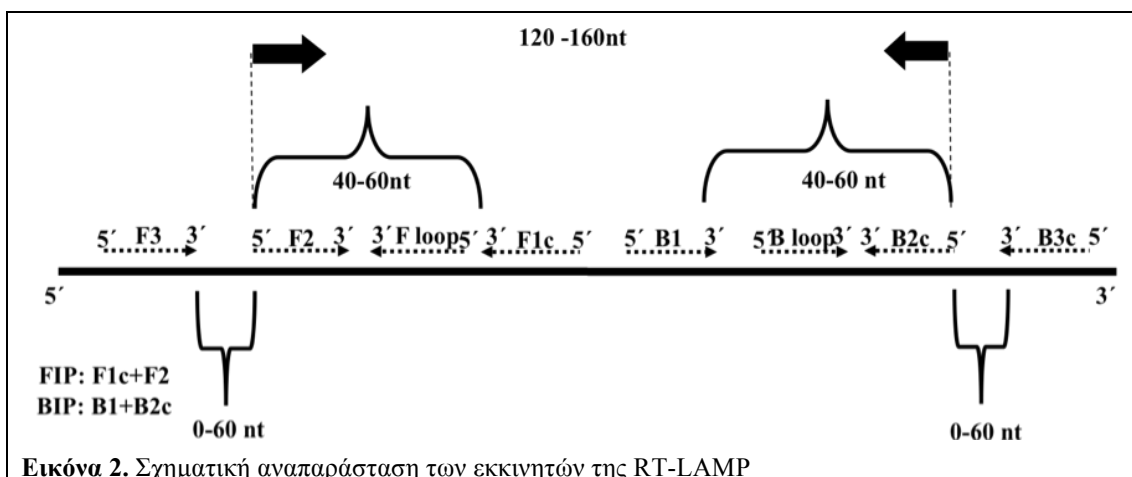
Πίνακας 1. Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές RT-LAMP και των εκκινητών της RT-PCR

Όνομα εκκινητή	Μήκος (nt)	Θέση	Αλληλουχία
PLMVdc	25 nt	92-116	AACTGCAGTGCTCCGAATAGGGCAC
PLMVdh	25 nt	117-141	CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG
F3 OLD	23 nt	29-51	TCATCAGTGGGCTAAGCCCAGAC
B3 OLD	25 nt	226-249	TGAATCCCGGGTAGACGTCGTAATC
FIP OLD	45 nt	123-146, 69-89	TCATTGGCGAGGTTCTTAGCCTTTC CTCTCAGCCCCTCCACCTTG
BIP OLD	43 nt	151-175, 201-223	AGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAAC CCTACGGCGGTACCTGGAT
F3 NEW	24 nt	110-133	CTTAGCCTTTCTATCGGAACTGCA
B3 NEW	23 nt	196-218	GGTGTGATCCAGGTACCGCCGTA
FIP NEW	44 nt	28-51, 70-89	CTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGAC CAAGGTGGAGGGGCTGAGAG
BIP NEW	50 nt	255-279, 219-243	CCAGAATCACTTCTGGAGGGGACCG GAAACTGGATTACGACGTCTACCCG
F3 OLD1	18 nt	32-49	TCAGTGGGCTAAGCCCAG
B3 OLD1	19 nt	232-249	TGAATCCCGGGTAGACGTC
FIP OLD1	36 nt	123-141, 71-88	GCGAGGTGCTTAGCCTTTC TCTCAGCCCCTCCACCT
BIP OLD1	38 nt	153-173, 201-217	GTGGGACTTTTCCTTCTGGAA ACGGCGGTACCTGGATC
F3 FUKUTA	20 nt	7-26	AGTTTCGCCGTATCTCAACG
B3 FUKUTA	19 nt	227-245	CCCGGGTAGACGTCGTAAT
FIP FUKUTA	38 nt	80-99, 36-53	TAGGGCACCCCAAGGTGGAG- TGGGCTAAGCCCAGACTT
BIP FUKUTA	40 nt	135-156, 198-215	ACCTCGCAATGAGGTAAGGTGG- GGCGGTACCTGGATCACA
Loop F	20 nt	104-120	TCGAGACTGCAGTGCCTCGA
Loop B	19 nt	176-194	AAGCGGTTGGTTCGAGGG
Loop F degenerated	21 nt	89-109	GTGCYYCGAATAGGGCACYCC
Loop B degenerated	21 nt	176-196	AAGCGGTTGGTTCGAGGGGG

Σχεδιάστηκαν συνολικά τέσσερις ομάδες εκκινητών (F3, FIP, B3, BIP) και δύο ομάδες ζευγών εκκινητών θήλειας (Πίνακας 1). Ο σχεδιασμός των εκκινητών που ανήκουν στις ομάδες OLD, NEW και OLD1 καθώς και των δύο εκκινητών θηλειάς έγινε από συντηρημένες περιοχές του γενώματος του PLMVd με βάση τα κριτήρια θερμοκρασία τήξεως, σταθερότητα άκρου 3', ποσοστό % των εκκινητών σε γουανίνη (guanine, G) και κυτοσίνη (cytosine, C), δευτεροταγής δομή, αποστάσεις μεταξύ των εκκινητών, που

περιγράφονται αναλυτικά στον οδηγό σχεδιάσεως εκκινητών LAMP της Eiken Chemical Ltd. (2006).

Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στη θερμοκρασία τήξεως, με αυτή να κυμαίνεται για τους εκκινητές F2, B2, F3, B3 και loop μεταξύ 59 και 61 °C και τους F1c, B1 τέσσερις έως πέντε °C υψηλότερη. Επίσης, έμφαση δόθηκε και στην τήρηση του ορίου των αποστάσεων μεταξύ των εκκινητών, με τα άκρα 5' των F2 και B2 να απέχουν μεταξύ τους 120-180 νουκλεοτίδια (nucleotides, nt), τους εκκινητές F3-F2 ή B3c-B2c να απέχουν μεταξύ τους 0-60 nt και τα άκρα 5' F2-3' F1c ή 5' B2c-3' B1 να απέχουν μεταξύ τους 40-60 nt. Από το τελευταίο τμήμα έπρεπε στη συνέχεια να επιλεγεί η αλληλουχία των εκκινητών loop (Εικόνα 2). Στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών loop σε συνδυασμό με την ομάδα OLD1. Το πρώτο ζεύγος LoopF/LoopB αντιστοιχούσε στις θέσεις 104-120 nt και 174-197 nt και το δεύτερο LoopFdeg/LoopBdeg στις θέσεις 82-109 nt και 176-196 nt. Ο εκκινητής LoopFdeg φέρει στις θέσεις 5, 6 και 21 εκφυλισμό τύπου Y (C/T) (Πίνακας 1). Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στη καθαρότητα των εκκινητών οι οποίοι στο σύνολό τους προήλθαν από την εταιρεία Intergraded DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA). Οι εκκινητές κατά την παραλαβή τους επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.



3.4.2. Πρωτόκολλο RT-LAMP

Με σκοπό την επιλογή της καταλληλότερης ομάδας εκκινητών (F3, FIP, B3, BIP) και τη μελέτη της επιδράσεως των εκκινητών θήλειας, η αντίδραση RT-LAMP πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες των Mori *et al.* (2001), Nagamine *et al.* (2002), Notomi *et al.* (2000). Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 25 μl με τη χρησιμοποίηση ενός μl εξάγατος t-RNA. Κάθε μικροσωλήνας 0.2 ml (Costar) περιείχε 20 mM Tris HCl pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgSO₄, 0.8 M Betaine (Sigma-Aldrich, Saint Luis, Missouri, USA), 0.8 mM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο dNTP, 5 mM DTT, 1.6 μM από κάθε

εκκινητή FIP, BIP, 0.2 μM από κάθε εκκινητή F3, B3 και 0.8 μM από κάθε εκκινητή loop, 8 μονάδες αναστολέα ριβονουκλεασών (Ribonuclease inhibitor) (Promega, Madison, USA), 4 μονάδες αντίστροφης μεταγραφάσης AMV (*Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase*) (Promega, Madison, USA), 8 μονάδες *Bst*-DNA πολυμεράση (New England Biolabs, Hertfordshire, England, UK) και νερό DEPC μέχρι τελικού όγκου 25 μl .



Εικόνα 3. Συσκευή μετρήσεως θολότητας σε πραγματικό χρόνο (Real Time turbidimeter) LA-200 (Teramecs Co., Ltd, Kyoto, Japan).

Οι μικροσωλήνες στην συνέχεια τοποθετήθηκαν στην θερμαινόμενη πλάκα της συσκευής μετρήσεως θολότητας σε πραγματικό χρόνο (Real Time turbidimeter) LA-200 (Teramecs Co., Ltd, Kyoto, Japan) (Εικόνα 3) ή στον θερμοκυκλοποιητή PTC-200(MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA) όπου επωάστηκαν στους 63 °C επί μια ώρα και στη συνέχεια στους 80 °C επί δύο λεπτά προκειμένου να τερματιστεί η αντίδραση.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μικροσωλήνας που περιείχε μόνο το διάλυμα της αντιδράσεως (blank).

Μετά την επιλογή των κατάλληλων εκκινητών έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της τεχνικής ως προς τη συγκέντρωση της μεταΐνης (betaine) (0.2, 0.4, 0.8 M), τη θερμοκρασία επώσεως (60, 62.5, 65, 67 °C), τον τύπο της αντίστροφης μεταγραφάσης [4 μονάδες AMV (Promega) ή 4 μονάδες Thermoscript (Invitrogen Ltd, Paisley, England, UK)], το είδος του εκμαγείου (t-RNA, φυτικός χυμός, φυτικός ιστός) καθώς και την ανάγκη ή όχι θερμικής αποδιατάξεως του εκμαγείου πριν από την προσθήκη του στο διάλυμα της αντιδράσεως. Σε όλα τα πειράματα βελτιστοποίησης χρησιμοποιήθηκε η ομάδα εκκινητών OLD1 σε συνδυασμό με το ζεύγος εκκινητών θηλειάς LoopFdeg/LoopBdeg.

3.4.3. Ανάλυση των προϊόντων RT-LAMP

Η καταγραφή και ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση των παρακάτω μεθόδων:

i) Μέτρηση σε πραγματικό χρόνο (real time) της θολότητας του διαλύματος της αντιδράσεως με την συσκευή LA-200. Η θολότητα υπολογίζεται ως εξής: Θολότητα = ένταση προσπίπτοντος φωτός/ένταση εκπεμπόμενου φωτός (Fukuta *et al.*, 2004).

ii) Οπτική παρατήρηση της θολότητας ή του ιζήματος πυροφωσφορικού μαγνησίου μετά από φυγοκέντρηση στις 6000 rpm (30RF, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) επί δύο λεπτά.

iii) Προσθήκη ενός μl της παρεμβαλλόμενης (intercalating) φθορίζουσας χρωστικής loopamp fluorescent dye (Eiken Chemical Ltd, Tochigi, Japan) και παρατήρηση πράσινου φθορισμού μετά από έκθεση των μικροσωλήνων σε υπεριώδη ακτινοβολία (Ultra Violet, UV). Το αντιδραστήριο αυτό περιέχει τον χηλικό παράγοντα calcein, ο οποίος εξουδετερώνεται κατά την προσθήκη του στο διάλυμα της αντιδράσεως από τα κατιόντα μαγνησίου (Mg^{++}). Καθώς όμως η αντίδραση εξελίσσεται, παράγονται μεγάλες ποσότητες πυροφωσφορικών ανιόντων που δεσμεύουν τα κατιόντα μαγνησίου για να σχηματίσουν πυροφωσφορικό μαγνήσιο, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του χηλικού παράγοντα και την εμφάνιση πράσινου φθορισμού μετά από έκθεση σε φως UV (Boehme *et al.*, 2007).

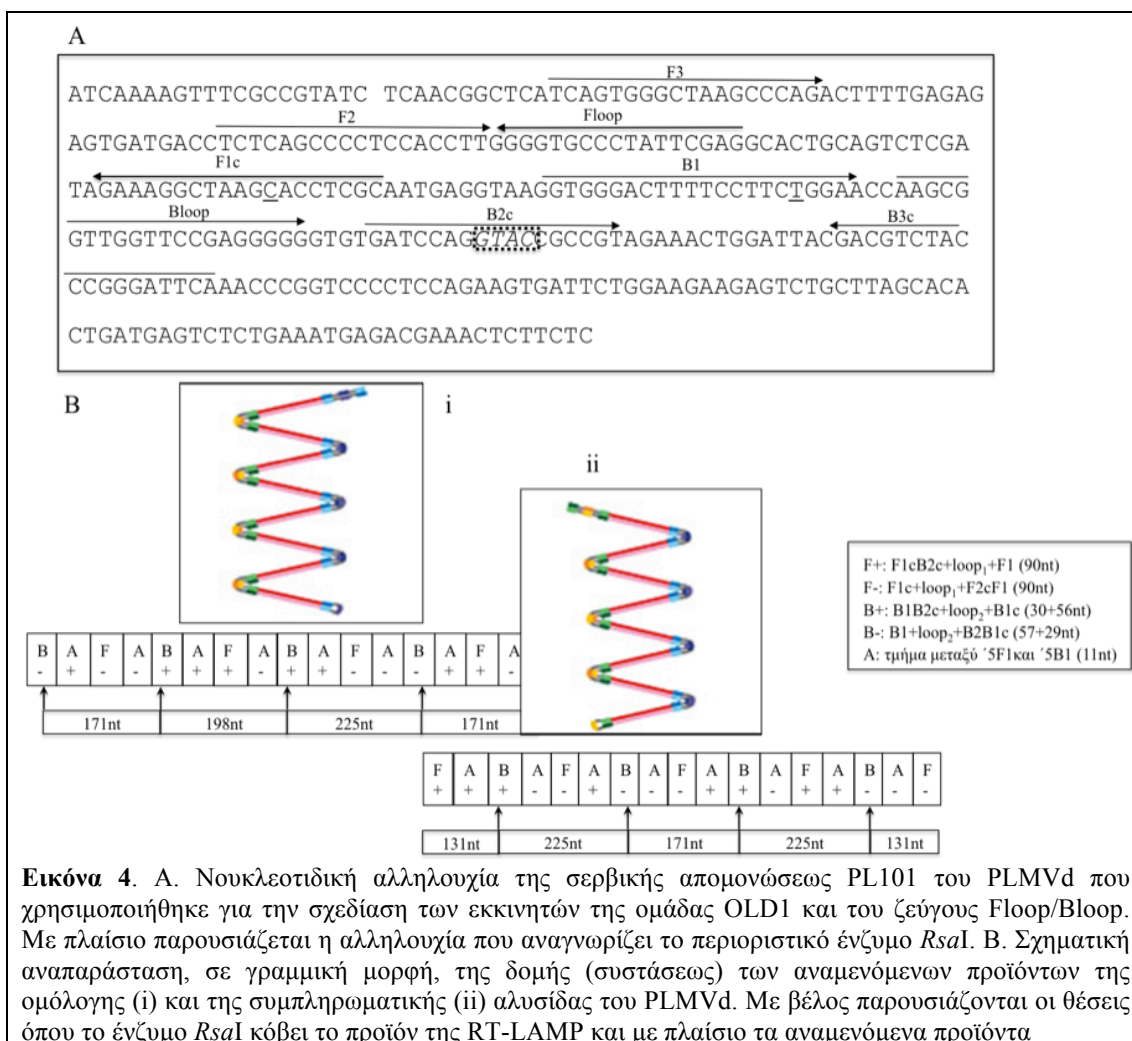
iv) Ηλεκτροφόρηση ποσότητας πέντε μl προϊόντος της αντιδράσεως RT-LAMP σε πήγμα αγαρόζης (Invitrogen) 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE (Tris-acetate-EDTA) και εν συνεχεία εμβάπτιση και επώαση επί 20 λεπτά σε διάλυμα 0.5 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr) όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.3.4. του Β μέρους. Η θέση του DNA γίνεται ορατή μετά από τοποθέτηση του πηγματος κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία σε τράπεζα φθορισμού (UV transilluminator) (Life Technologies, MD, USA).

3.4.3.1. Ανάλυση με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων (restriction enzyme analysis)

Προκειμένου να εξακριβωθεί εάν τα παραγόμενα προϊόντα ήταν τα αναμενόμενα, επιλέχθηκε η τεχνική αναλύσεως που βασίζεται στη χρήση περιοριστικών ενζύμων. Με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος NEBCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) (New England Biolabs, Hertfordshire, England, UK), επιλέχθηκε το περιοριστικό ένζυμο *RsaI* το οποίο αναγνωρίζει τη θέση GT¹AC εντός του εκκινήτη B2c και τεμαχίζει τα προϊόντα της RT-LAMP σε επιμέρους τμήματα με μέγεθος 131, 171, 198 και 225 nt (Εικόνα 4).

3.4.3.1.1. Πρωτόκολλο πέψεως

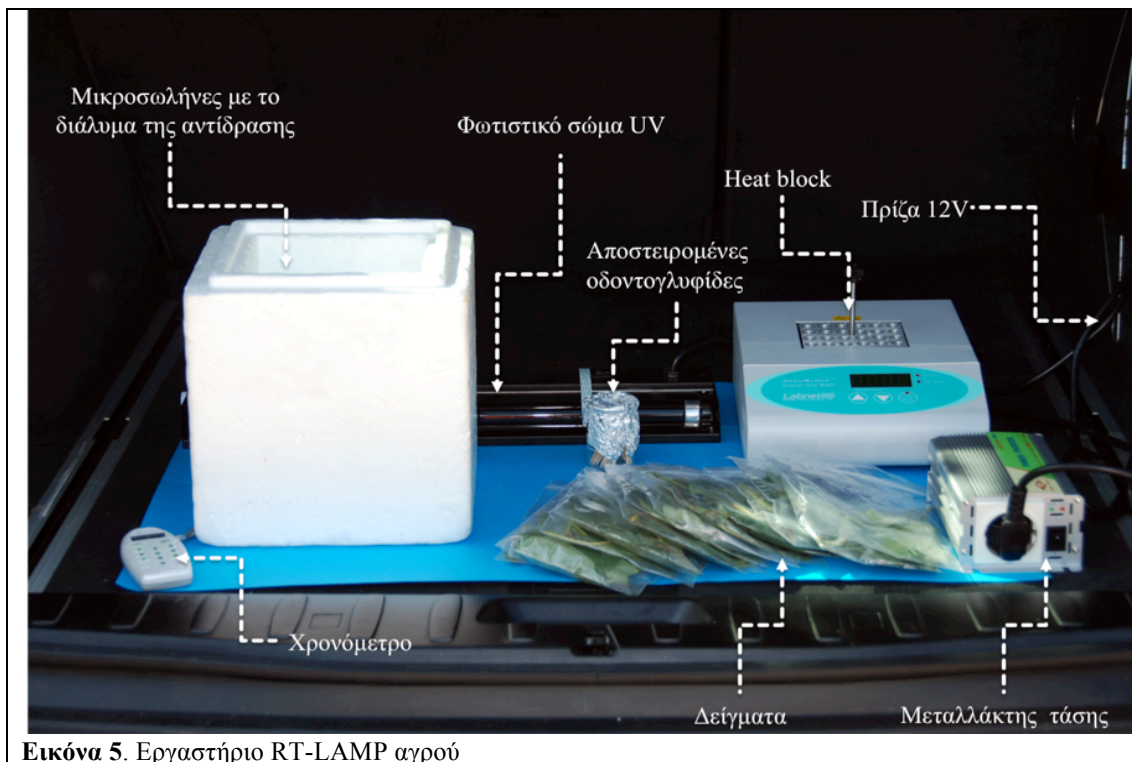
Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 10 μl με τη χρησιμοποίηση τριών μl προϊόντος RT-LAMP. Κάθε μικροσωλήνας (Costar) 0.2 ml περιείχε 20 mM Tris HCl pH: 9.0, 50 mM KCl, 0.1% TritonX-100, 10 μονάδες περιοριστικού ενζύμου *RsaI* (Promega, Madison, USA) και νερό DEPC μέχρι τελικού όγκου 10 μl. Στη συνέχεια, οι μικροσωλήνες τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή PTC-200 στους 37 °C επί μια ώρα και στη συνέχεια στους 65 °C επί 20 λεπτά προκειμένου να τερματιστεί η αντίδραση. Ακολούθησε ανάλυση των προϊόντων σε πήγμα αγαρόζης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE. Το προϊόν θετικής αντιδράσεως RT-LAMP για την ανίχνευση του ιοειδούς PSTVd σε πατάτα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.



3.5. Εφαρμογή της RT-LAMP στο αγρό

Προκειμένου να διαπιστωθεί η δυνατότητα εφαρμογής της RT-LAMP στον αγρό οργανώθηκε το παρακάτω πείραμα. Αρχικά, στο εργαστήριο προετοιμάστηκαν 15 μικροσωλήνες 1.5 ml (Eppendorf AG Hamburg Germany) που περιείχαν 25 μl διαλύματος της αντιδράσεως - όπως περιγράφηκε παραπάνω συν ένα μl φθορίζουσας χρωστικής loopamp fluorescent dye (Eiken Chemical Ltd)] - χωρίς το εκμαγείο, με εξαίρεση τους δύο θετικούς μάρτυρες που περιείχαν ο πρώτος t-RNA και ο δεύτερος φυτικό χυμό, από μολυσμένο με PLMVd δένδρο ροδακινιάς. Οι μικροσωλήνες αμέσως μετά τοποθετήθηκαν σε θρυμματισμένο πάγο εντός κυτίου διογκωμένης πολυστερίνης (φελιζόλ, styrofoam) που κλείστηκε ερμητικά μέχρι και την άφιξη στον αγρό δύο ώρες αργότερα. Κατά την άφιξη στον αγρό όπου προηγουμένως είχε διαπιστωθεί η παρουσία του ιοειδούς, έγινε αρχικά συλλογή και τοποθέτηση σε πλαστικά σακουλάκια δειγμάτων ροδακινιάς (No 1, 6, 11, 15), βερικοκιάς (No 8, 9), δαμασκηλιάς (No 1, 3, 4) και απιδιάς (No 15) (βλ. Πίνακα 1 Κεφάλαιο 1, Γ μέρος) και στη συνέχεια στήθηκε το υπαίθριο «κινητό εργαστήριο» στο χώρο αποσκευών του αυτοκινήτου. Το εργαστήριο αποτελείτο από: i) πρίζα 12 V αυτοκινήτου, ii) θερμική πλάκα

(heat block) Accublock (Labnet,, International Inc., Edison, NJ, USA), iii) χρονόμετρο, iv) μεταλλάκτη τάσεως 12 V DC-230 150 Watt GP-12-150 (Drow Entreprise Co. Ltd., Taoyuan, Taiwan), v) φωτιστικό σώμα με λαμπτήρα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) 15 Watt και vi) ποτήρι ζέσεως με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Εργαστήριο RT-LAMP αγρού

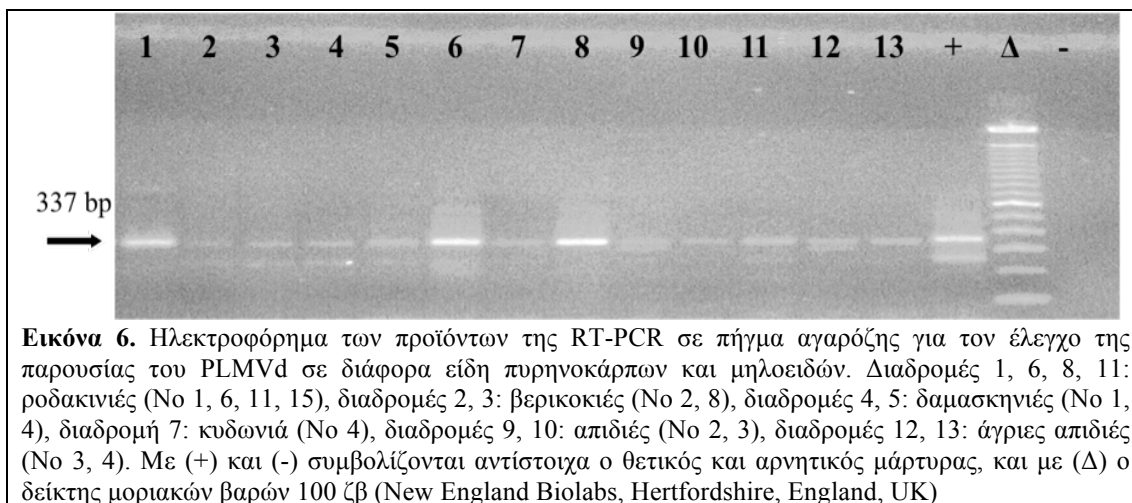
Η θερμική πλάκα ρυθμίστηκε στους 63 °C και το χρονόμετρο στα 60 λεπτά και, μετά την μεταφορά ίχνους φυτικού ιστού με τη βοήθεια αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων στους αντίστοιχους μικροσωλήνες, άρχισε η αντίστροφη μέτρηση. Ως υγιείς μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ένας μικροσωλήνας που περιείχε μόνο το διάλυμα της αντιδράσεως (blank) και δύο ακόμη στους οποίους είχε μεταφερθεί ίχνος φυτικού ιστού από υγιή φυτοδείκτη GF-305. Με την ολοκλήρωση των 60 λεπτών οι μικροσωλήνες απομακρύνθηκαν από τη θερμική πλάκα και τοποθετήθηκαν σε λαμπτήρα υπεριώδους ακτινοβολίας για την παρατήρηση φθορισμού.

4. Αποτελέσματα

4.1 Δοκιμές RT-PCR

Κατά τον έλεγχο των δειγμάτων ροδακινιάς, άγριας και καλλιεργούμενης απιδιάς, βερικοκιάς, δαμασκηνιάς και κυδωνιάς που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο καταγράφηκε η παρουσία ζώνης μεγέθους περίπου 337 ζβ, με εξαίρεση τον αρνητικό μάρτυρα (GF-305) όπως αναμενόταν (Εικόνα 6). Χαρακτηριστική ήταν η υψηλότερη ένταση

της ζώνης στην περίπτωση των δειγμάτων ροδακινιάς σε σχέση με τα υπόλοιπα θετικά δείγματα.



4.2. Δοκιμές RT-LAMP

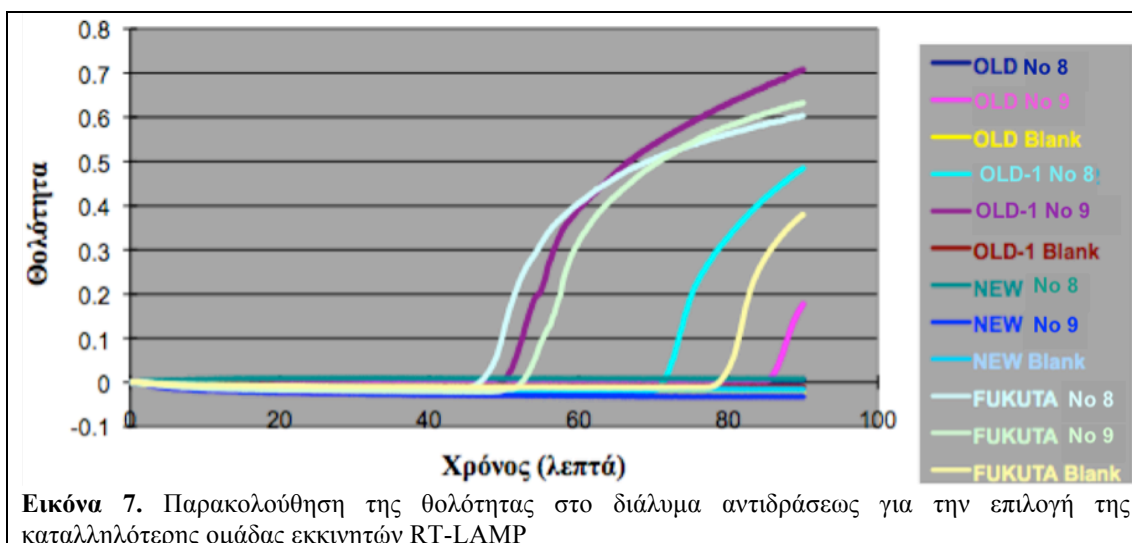
4.2.1. Εκκινητές (F3, FIP, B3, BIP)

Η επιλογή της κατάλληλης ομάδας εκκινητών (F3, FIP, B3, BIP) έγινε μετά από σύγκριση τεσσάρων ομάδων σε πρότυπες συνθήκες αντιδράσεως, έτσι όπως περιγράφονται από τους Notomi *et al.* (2000), Nagamine *et al.* (2002), Mori *et al.* (2001), Fukuta *et al.* (2004) με την χρήση του Real Time turbidimeter LA-200 το οποίο για κάθε δείγμα κατέγραφε την τιμή θολότητας ανά έξι δευτερόλεπτα μέχρι και το ενενηκοστό λεπτό της αντιδράσεως. Για κάθε ομάδα εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν δύο θετικά δείγματα ροδακινιάς (No 8, No 9, βλ. Πίνακας 1, Κεφάλαιο 1, Γ μέρος) και ένας αρνητικός μάρτυρας (blank) που περιείχε μόνο το διάλυμα της αντιδράσεως. Θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα με τιμή θολότητας μεγαλύτερη ή ίση του 0.1. Στην Εικόνα 7 διακρίνεται ότι στην περίπτωση των εκκινητών NEW κανένα δείγμα δεν αντέδρασε θετικά, ενώ στην ομάδα OLD η θολότητα αυξήθηκε άνω του 0.1 για έναν από τους δύο θετικούς μάρτυρες (No 9). Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκαν οι ομάδες εκκινητών FUKUTA και OLD1, η θολότητα στο διάλυμα της αντιδράσεως και των δύο θετικών δειγμάτων ξεπέρασε την τιμή 0.1. Αυτό συνέβη για την ομάδα FUKUTA μετά το 48^ο και 53^ο λεπτό για τα δείγματα No 8 και No 9 αντίστοιχα, ενώ για την ομάδα OLD1 μετά το 51^ο και 72^ο λεπτό. Όσον αφορά τον αρνητικό μάρτυρα η τιμή θολότητάς του παρέμεινε σε όλες τις περιπτώσεις κοντά στο μηδέν με εξαίρεση την περίπτωση των εκκινητών FUKUTA μετά το 80^ο λεπτό.

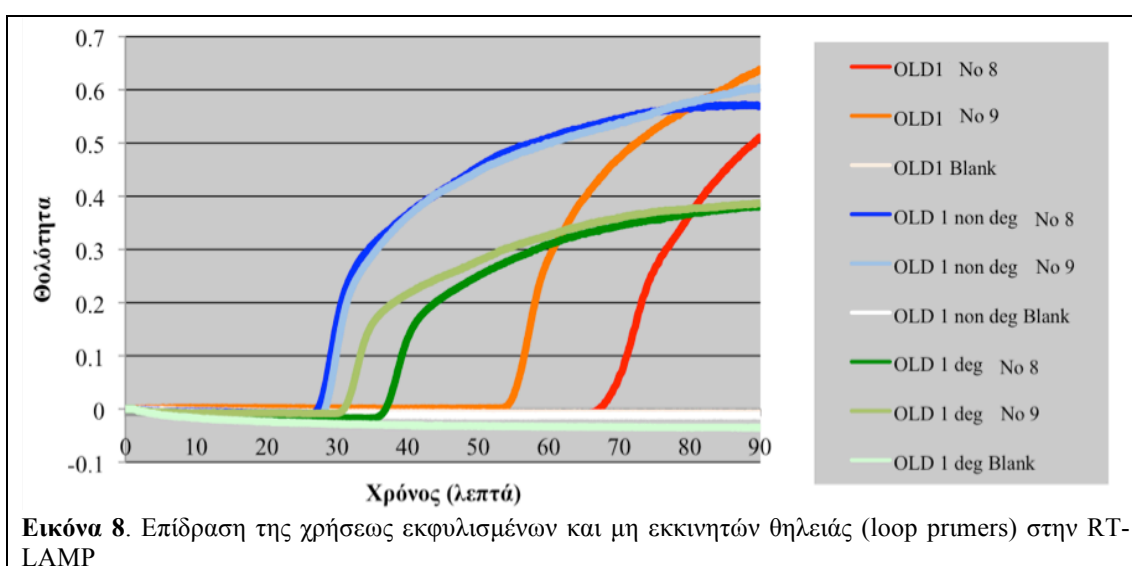
4.2.2 Εκκινητές θηλειάς (loop primers)

Οι εκκινητές θηλειάς LoopF/LoopB (χωρίς εκφυλισμό) και LoopFdeg/LoopBdeg (με εκφυλισμό) σχεδιάστηκαν με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με την ομάδα εκκινητών OLD1 (Εικόνα 4A). Ο προσδιορισμός της επιδράσεως τους και η επιλογή του

καταλληλότερου ζεύγους έγινε κάτω από τις ίδιες πρότυπες συνθήκες με την επιλογή των ομάδων εκκινητών (F3, FIP, B3, BIP).



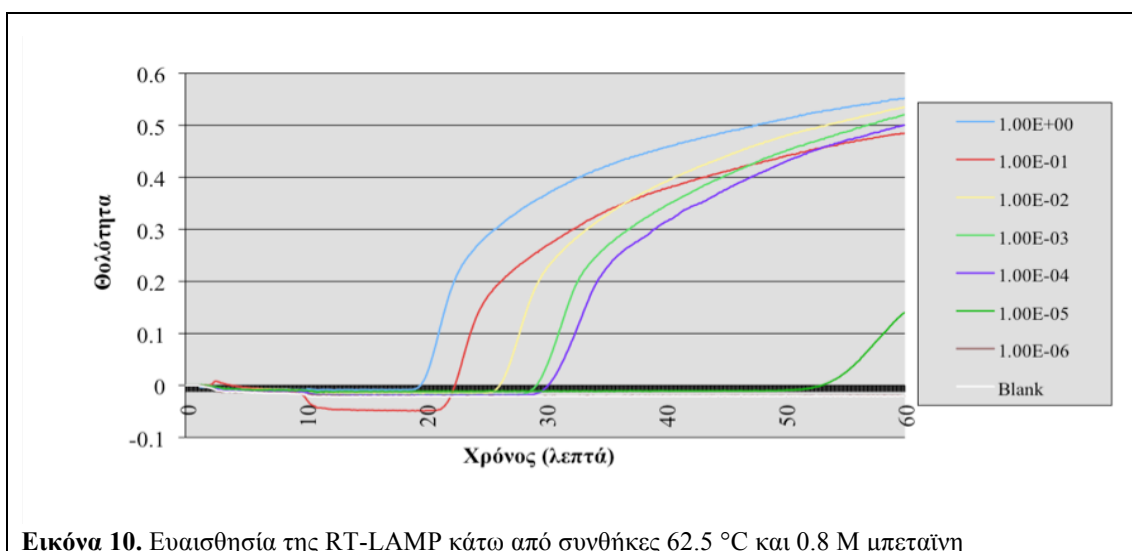
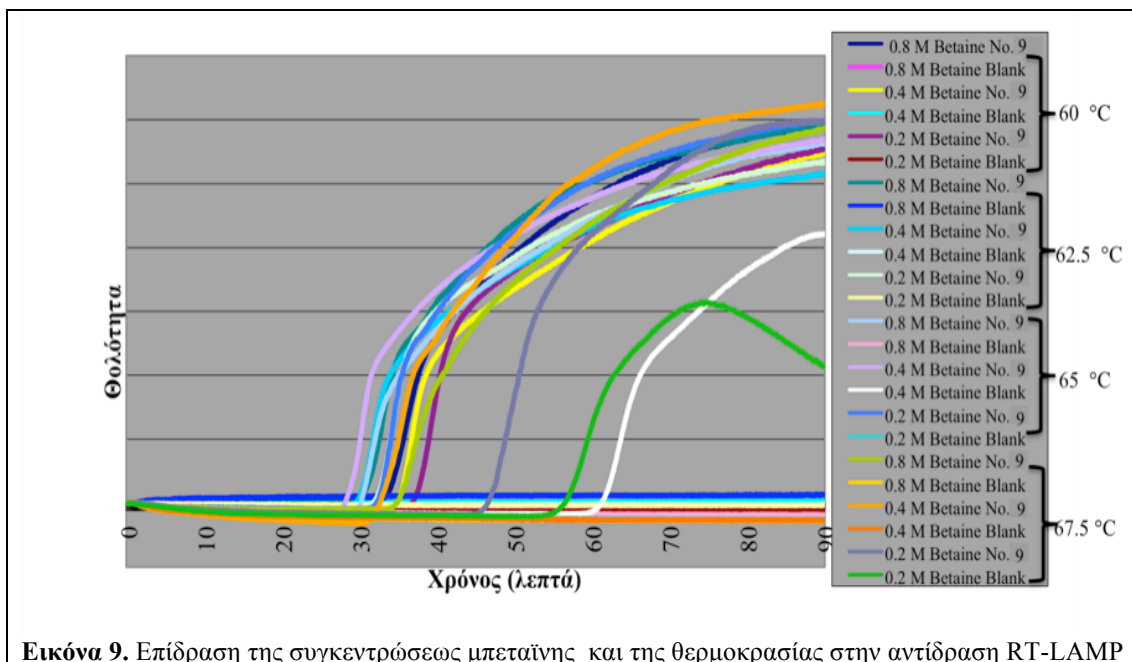
Σύμφωνα με την Εικόνα 8, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές θηλειάς, η θολότητα του διαλύματος της αντιδράσεως ξεπέρασε την τιμή 0.1 σε μόλις περίπου 30 λεπτά, χρόνο υποδιπλάσιο από εκείνον (55 λεπτά) που χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι εκκινητές OLD1.



4.2.3. Βελτιστοποίηση της μεθόδου RT-LAMP

α) Συγκέντρωση μπεταΐνης και θερμοκρασία επώσεως

Ο συνδυασμός των συγκεντρώσεων μπεταΐνης 0.4 και 0.8 M με τις θερμοκρασίες 62.5 και 65 °C έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα (Εικόνα 9). Στη συνέχεια, χρήση διαδοχικών αραιώσεων tRNA (10^0 - 10^{-6}) στους παραπάνω συνδυασμούς υπέδειξε ως όριο ανιχνεύσεως της μεθόδου την αραιώση $1.00E-05$ όταν συνδυάστηκαν συγκέντρωση μπεταΐνης 0.8 M και θερμοκρασία επώσεως 62.5 °C (Εικόνα 10).



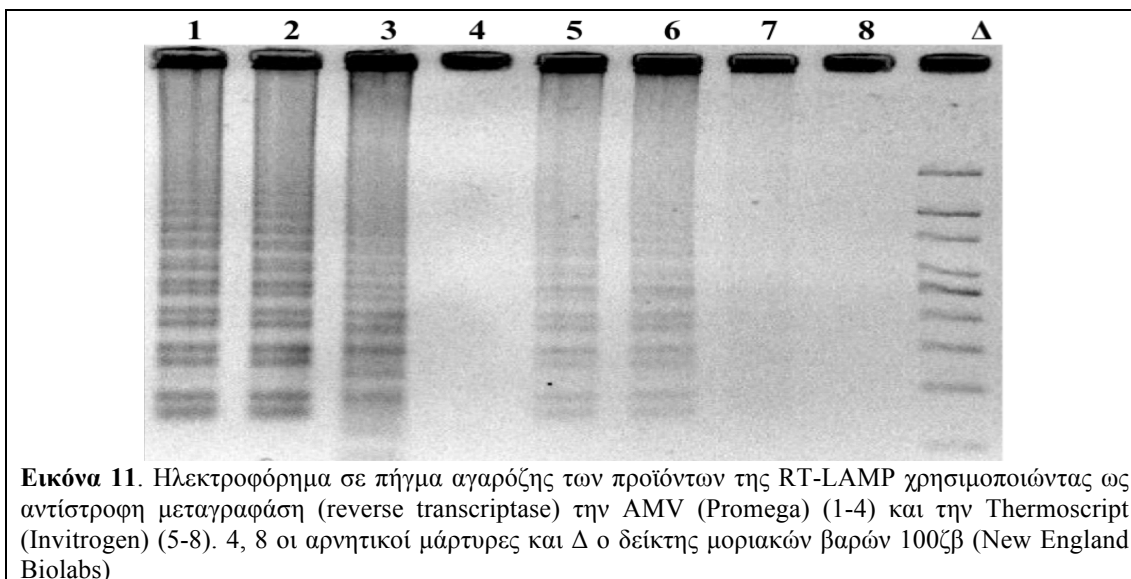
β) Αντίστροφη μεταγραφάση

Στην περίπτωση χρήσεως της αντίστροφης μεταγραφάσης AMV (Promega) καταγράφηκε επαναληψιμότητα ανιχνεύσεως και υψηλότερη ένταση σήματος του τυπικού μοτίβου τύπου ανεμόσκαλας (ladder-like pattern) των προϊόντων της RT-LAMP κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πήγμα αγαρόζης, σε σύγκριση με την περίπτωση χρήσεως της Thermoscript (Invitrogen) (Εικόνα 11).

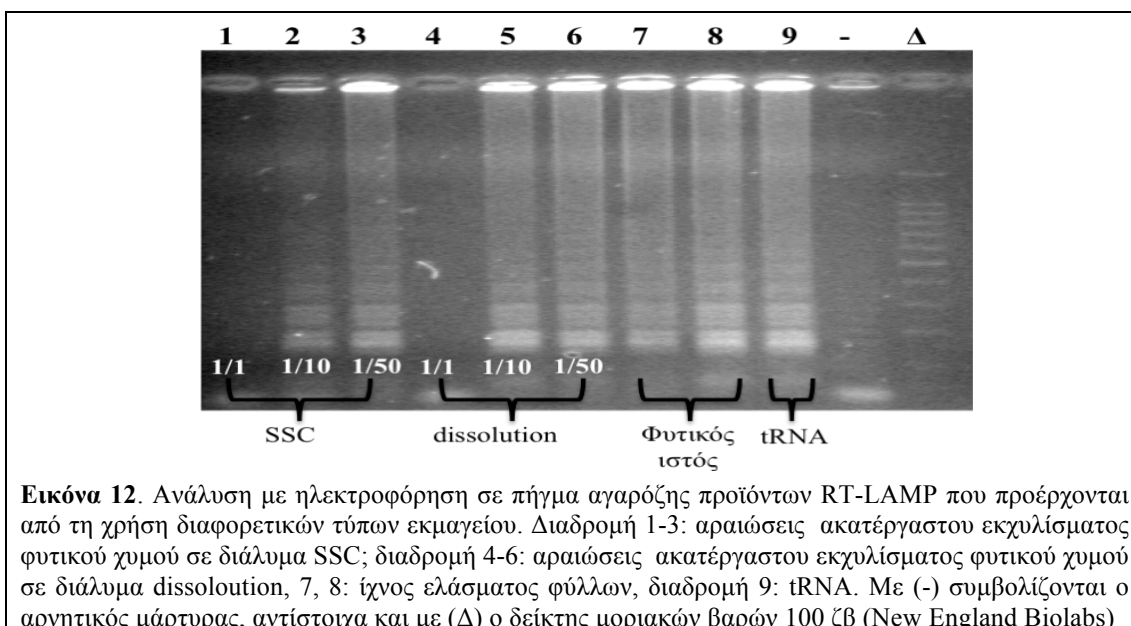
γ) Εκμαγείο

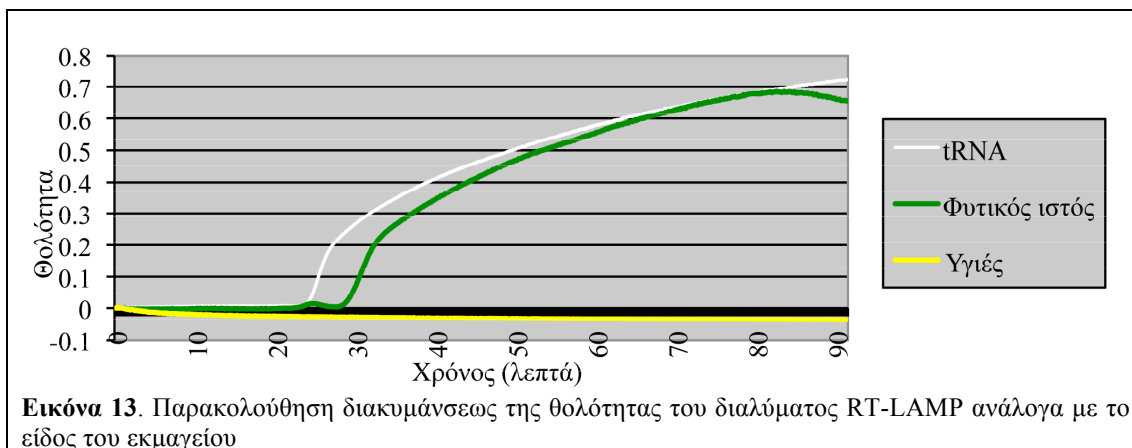
Η ανίχνευση του PLMVd ήταν δυνατή ανεξάρτητα από τον τύπο του εκμαγείου (Εικόνα 12). Όταν χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστος φυτικός χυμός, τα αποτελέσματα ήταν

παρόμοια και για τα δύο είδη ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (SSC και dissolution).



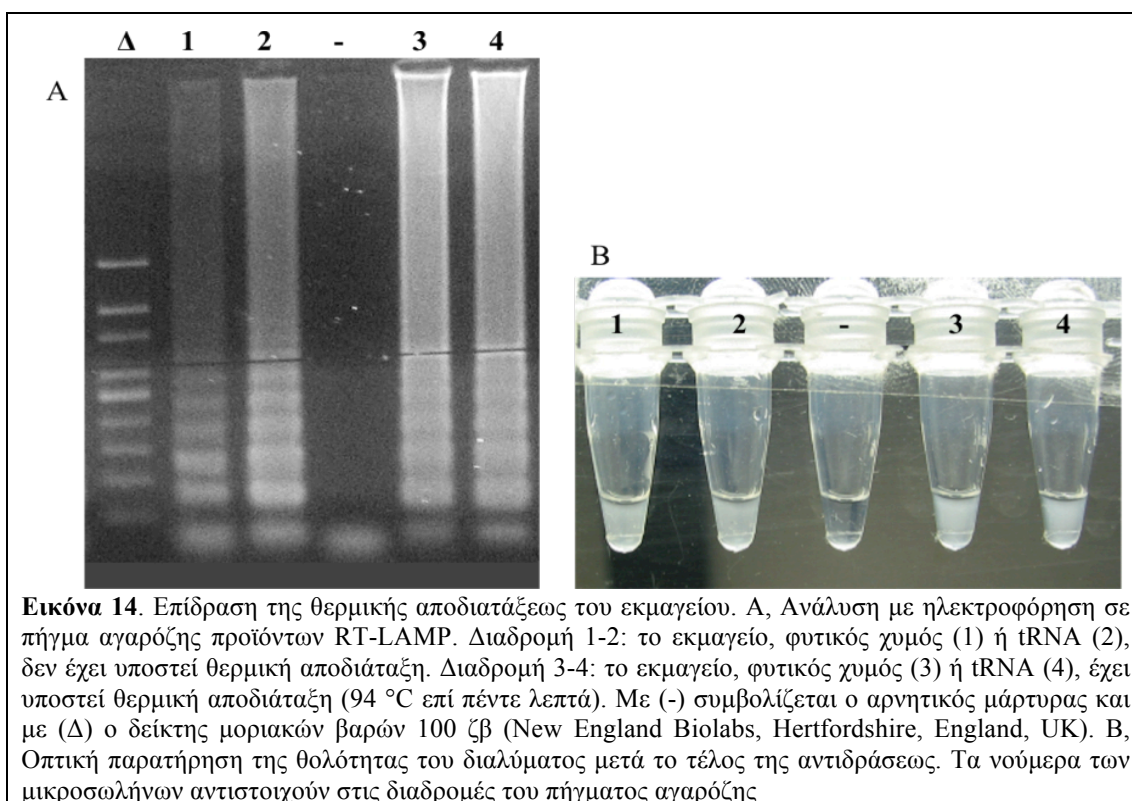
Κοινό χαρακτηριστικό και των δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων ήταν η αδυναμία ανιχνεύσεως του ιοειδούς στην αραιώση 1/1 (β/ο). Αντίθετα, τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά μετά από αραιώση του φυτικού χυμού με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Στην περίπτωση του SSC αραιώση του φυτικού χυμού 50 φορές βελτίωσε την ένταση του σήματος. Επιτυχής ήταν η αντίδραση της RT-LAMP ακόμη και στην περίπτωση που ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε ίχνος φυτικού ιστού (έλασμα φύλλου) το οποίο μεταφέρθηκε στο διάλυμα της αντιδράσεως με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα. Η ένταση του σήματος στην περίπτωση αυτή ήταν παρόμοια με εκείνη της χρήσεως t-RNA (Εικόνα 12), ενώ από την Εικόνα 13 είναι εμφανής μια χρονοκαθυστέρηση όσον αφορά τη χρονική στιγμή που η τιμή της θολότητας ξεπέρασε την τιμή 0.1 στην περίπτωση της χρήσεως ίχνους φυτικού ιστού.





δ) Βρασμός εκμαγείου

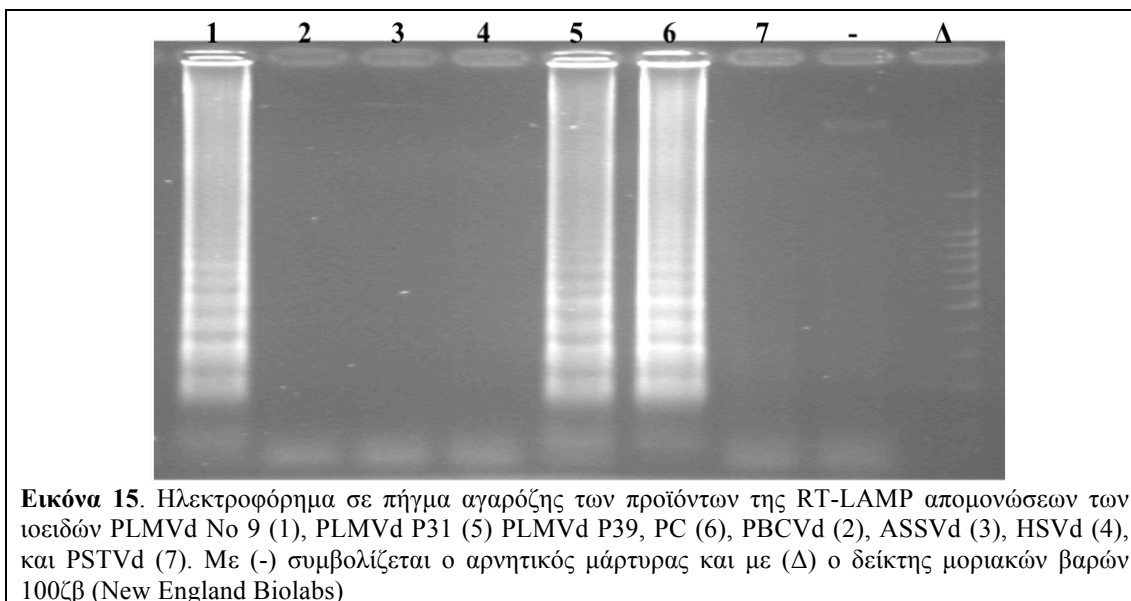
Σύμφωνα με την Εικόνα 14, η θερμική αποδιάταξη του εκμαγείου (εκχύλισμα φυτικού χυμού σε dissolution ή tRNA) δεν διαφοροποίησε σημαντικά το αποτέλεσμα της RT-LAMP σε σχέση με την περίπτωση της μη αποδιάταξης.



4.2.4. Δοκιμές εξειδικεύσεως

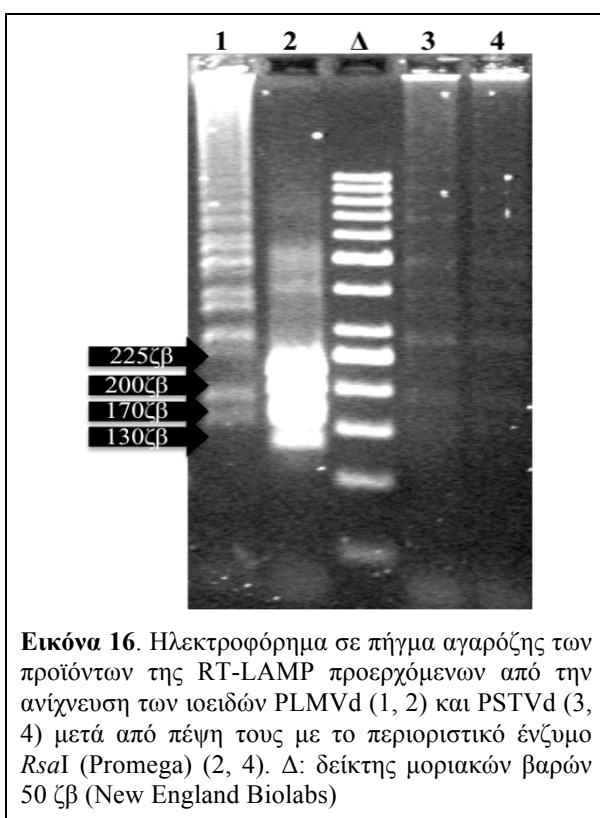
Χαρακτηριστικό μοτίβο τύπου ανεμόσκαλας καταγράφηκε μετά από ηλεκτροφόρηση προϊόντων RT-LAMP, όταν ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν απομονώσεις του PLMVd από την Ελλάδα (Εικόνα 15, διαδρομή 1) και την Ιταλία (διαδρομή 5, 6), συμπεριλαμβανομένης της παραλλαγής που είναι υπεύθυνη για το σύμπτωμα calico (διαδρομή 6). Όπως αναμενόταν,

αρνητική ήταν η αντίδραση όταν ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε RNA άλλων ιοειδών όπως τα ASSVd, HSVd, PBCVd και PSTVd (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-LAMP απομονώσεων των ιοειδών PLMVd No 9 (1), PLMVd P31 (5) PLMVd P39, PC (6), PBCVd (2), ASSVd (3), HSVd (4), και PSTVd (7). Με (-) συμβολίζεται ο αρνητικός μάρτυρας και με (Δ) ο δείκτης μοριακών βαρών 100ζβ (New England Biolabs)

4.2.5. Ανάλυση με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων



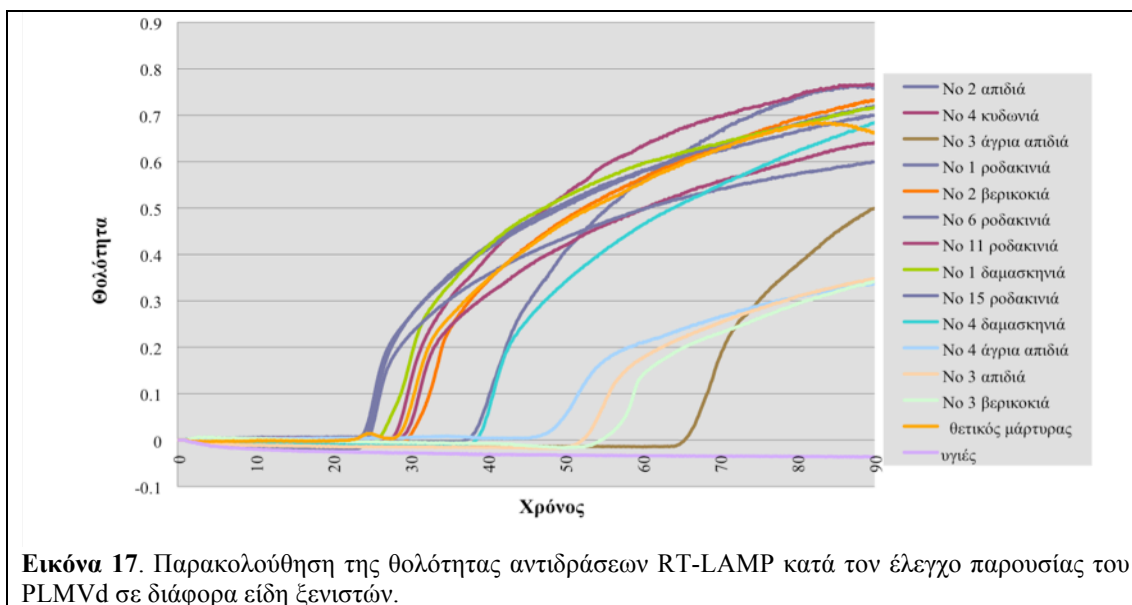
Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρημα σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-LAMP προερχόμενων από την ανίχνευση των ιοειδών PLMVd (1, 2) και PSTVd (3, 4) μετά από πέψη τους με το περιοριστικό ένζυμο *RsaI* (Promega) (2, 4). Δ: δείκτης μοριακών βαρών 50 ζβ (New England Biolabs)

Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήγμα αγαρόζης 2 % των προϊόντων της RT-LAMP τα οποία προηγουμένως είχαν υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *RsaI*, που αναγνωρίζει την αλληλουχία GTAC εντός του εκκινήτη B2c, έδειξε την παρουσία τεσσάρων ζωνών αντί του μοτίβου τύπου ανεμόσκαλας (Εικόνα 16). Το μέγεθος των τεσσάρων νέων ζωνών, που προσδιορίστηκε με τη βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (50 ζβ New England Biolabs, Hertfordshire, England, UK), ήταν 130, 170, 200 και 255 ζβ, αντίστοιχα. Αντίθετα, η πέψη με το ένζυμο *RsaI* δεν είχε καμία επίδραση στον αρνητικό μάρτυρα (προϊόν RT-LAMP, PSTVd).

4.3. Ανίχνευση του PLMVd με τη δοκιμή RT-LAMP σε ροδακινιά και άλλα φυτικά είδη

Η ανίχνευση του PLMVd με την δοκιμή RT-LAMP κατέστη δυνατή σε όλα τα εξετασθέντα δείγματα ροδακινιάς (No 1, 6, 11, 15), αλλά και άλλων Rosaceae, όπως η άγρια

(No 3, 4) και η καλλιεργούμενη (No 2, 3) απιδιά, η βερικοκιά (No 2, 8), η δαμασκηλιά (No 1, 4) και η κυδωνιά (No 4). Τα αποτελέσματα αυτά ήσαν σε συμφωνία με εκείνα της RT-PCR που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για τα περισσότερα δείγματα η θολότητα ξεπέρασε την τιμή 0.1 μεταξύ 25⁰⁰ και 40⁰⁰ λεπτού, με εξαίρεση τα δείγματα άγριας απιδιάς (No 3, 4), απιδιάς (No 3) και βερικοκιάς (No 8), όπου η θολότητα ξεπέρασε την τιμή 0.1 μετά το 50⁰ λεπτό (Εικόνα 17), υποδεικνύοντας την μικρότερη ενδεχομένως συγκέντρωση του ιοειδούς στα δείγματα αυτά.



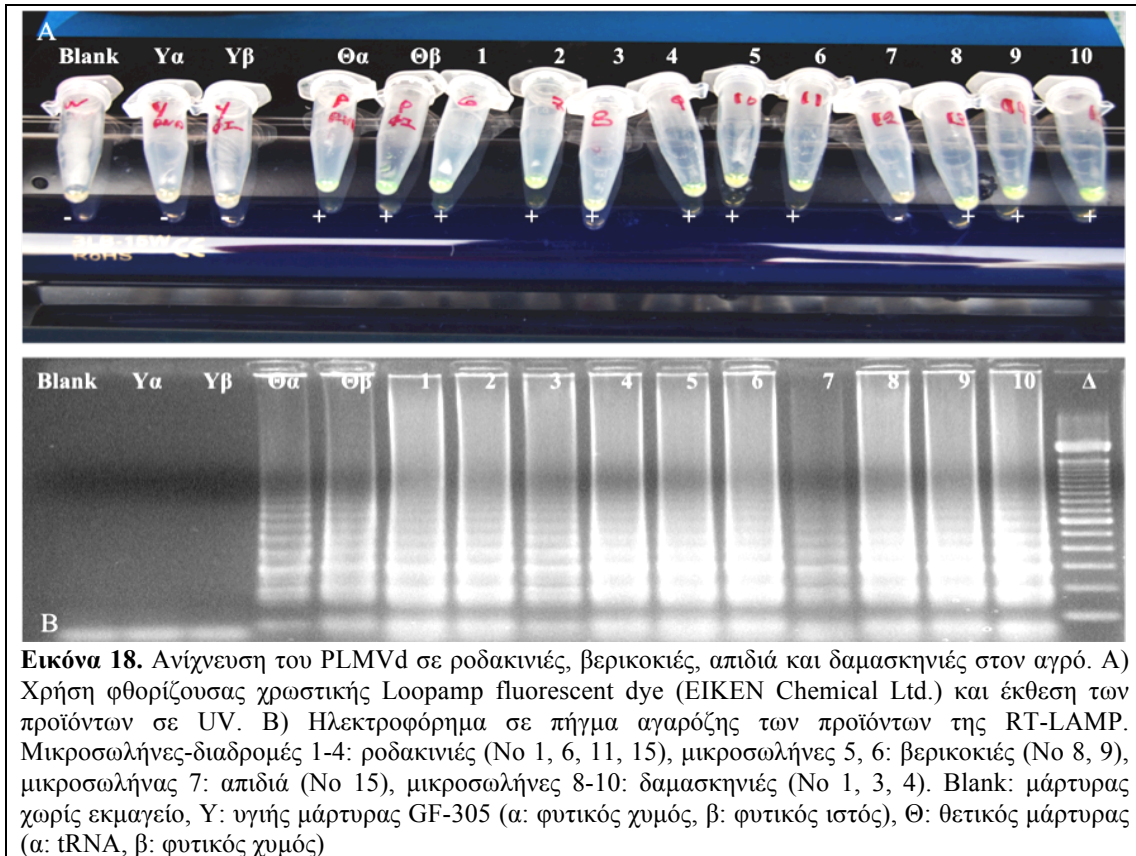
Εικόνα 17. Παρακολούθηση της θολότητας αντιδράσεων RT-LAMP κατά τον έλεγχο παρουσίας του PLMVd σε διάφορα είδη ξενιστών.

4.4. Εφαρμογή της RT-LAMP στον αγρό

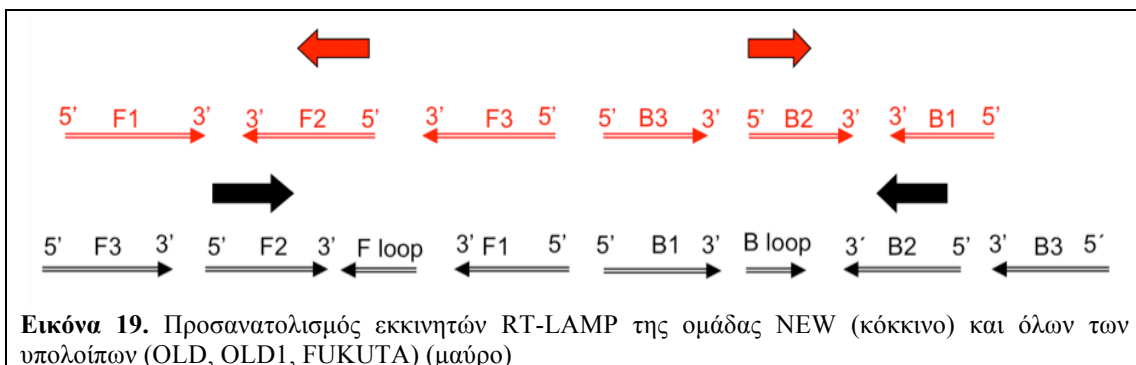
Κατά την εφαρμογή της τεχνικής RT-LAMP στον αγρό, με τη βοήθεια της φθορίζουσας χρωστικής Loopamp fluorescent dye (Eiken) και με έκθεση των μικροσωλήνων σε υπεριώδη ακτινοβολία μετά το πέρας της αντιδράσεως, το PLMVd ανιχνεύθηκε σε όλα τα αναμενόμενα δείγματα, με εξαίρεση το δείγμα απιδιάς (No 15) που θεωρήθηκε αρνητικό (Εικόνα 18A). Στη συνέχεια όμως ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων σε πήγμα αгарόζης έδειξε την παρουσία του χαρακτηριστικού μοτίβου τύπου ανεμόσκαλας και στο δείγμα αυτό με αποτέλεσμα να θεωρηθεί και αυτό θετικό (Εικόνα 18B).

5. Συζήτηση

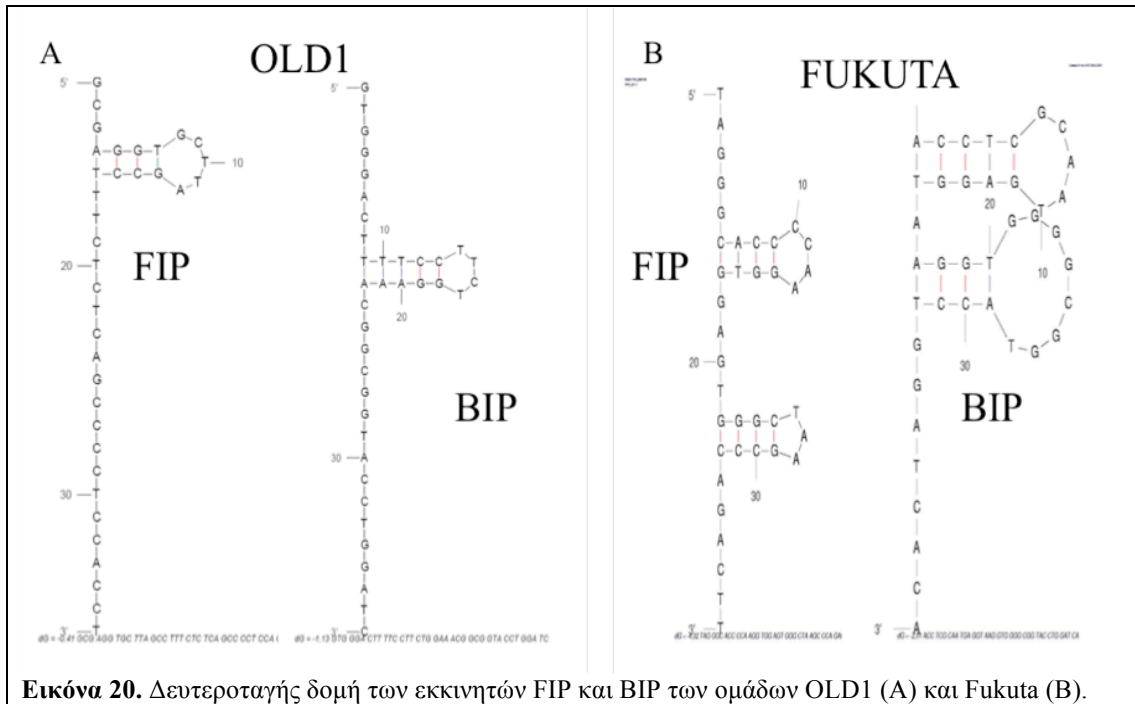
Η μέθοδος RT-LAMP έτσι όπως περιγράφηκε στο εισαγωγικό μέρος του παρόντος κεφαλαίου αποτελεί την ιδανική υποψήφια διαγνωστική μέθοδο για το σύστημα πιστοποιήσεως πολλαπλασιαστικού υλικού, καθώς φέρει πολλά από τα χαρακτηριστικά εκείνα που καθιστούν μια διαγνωστική μέθοδο κατάλληλη για έναν τέτοιο σκοπό, όπως η ευαισθησία, η εξειδίκευση, η αξιοπιστία, η αποτελεσματικότητα, η ταχύτητα, η πρακτικότητα και η οικονομικότητα. Στο παρόν κεφάλαιο αναφέρεται η προσπάθεια βελτιστοποίησης και εφαρμογής της τεχνικής RT-LAMP στην διάγνωση του PLMVd.



Ο σχεδιασμός και η επιλογή της κατάλληλης ομάδας εκκινητών LAMP αποτελεί διαδικασία επίπονη αλλά θεμελιώδους σημασίας για την επιτυχία της μεθόδου (Notomi *et al.*, 2000, Fukuta *et al.*, 2003, Parida *et al.*, 2004). Στην προσπάθεια ανευρέσεως των κατάλληλων εκκινητών, σχεδιάστηκαν τέσσερις ομάδες οι οποίες στο σύνολο τους θα μπορούσαν θεωρητικά να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση του PLMVd, αλλά μόνο μια, η ομάδα OLD1, αποδείχθηκε κατάλληλη. Οι ομάδες NEW και OLD οι οποίες σχεδιάστηκαν κατά τα πρώιμα στάδια εφαρμογής της μεθόδου δεν απέδωσαν τα αναμενόμενα. Η αποτυχία της ομάδας NEW μπορεί πιθανότατα να αποδοθεί στον λάθος προσανατολισμό των εκκινητών, καθώς ακολουθήθηκε, αντί του προβλεπόμενου μοντέλου (Notomi *et al.*, 2000), η αρχή σχεδιασμού εκκινητών RT-PCR για τα ιοειδή, σύμφωνα με την οποία οι εκκινητές έχουν αντίθετο εξωτερικό προσανατολισμό (αντιπαράλληλη κατεύθυνση) (Εικόνα 19).



Η αποτυχία της ομάδας OLD συνδέθηκε με το μεγαλύτερο μήκος και την υψηλότερη κατά 4-5 °C θερμοκρασία τήξεως (T_m) των εκκινητών-μελών της ομάδας αυτής σε σχέση με αντίστοιχους της ομάδας OLD1. Από την άλλη πλευρά, ο υψηλότερος βαθμός δευτεροταγούς δομής των FIP και BIP εκκινητών της ομάδας FUKUTA (Εικόνα 20), σε σχέση με αντίστοιχους της ομάδας OLD1, ευθύνεται πιθανότατα, εάν εξαιρέσουμε την πιθανότητα επιμολύνσεως, για την μη-ειδική αύξηση της θολότητας του αρνητικού μάρτυρα που οδήγησε τελικά στην απόρριψη και αυτής της ομάδας εκκινητών.



Όσον αφορά τους εκκινητές θηλειάς (loop primers), η χρήση τους (επιταχυνόμενο πρωτόκολλο, accelerated protocol) δεν συνέβαλε μόνο στην αύξηση της εξειδικεύσεως (λόγω της προσθήκης ενός ακόμη ζεύγους εκκινητών) αλλά και στον υποδιπλασιασμό του χρόνου αντιδράσεως (25-30 αντί για 50-55 λεπτά), μέσω της αυξήσεως των θέσεων της ενάρξεως συνθέσεως DNA, επιβεβαιώνοντας έτσι τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών σχετικά με την επίδρασή τους (Nagamine *et al.*, 2002, Fukuta *et al.*, 2004, Vargas and James 2006, Kubota *et al.*, 2008). Όλοι οι εκκινητές των παραπάνω ομάδων προήλθαν από υψηλά συντηρημένες περιοχές του γενώματος του PLMVd, κάτι το οποίο δεν ισχύει και στην περίπτωση της περιοχής 5'F2-3F1c απ' όπου θα σχεδιάζόταν ο εκκινητής LoopF. Έτσι σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών loop, από τα οποία το ένα έφερε τρεις εκφυλισμούς τύπου Y στις θέσεις 5, 6 και 21 (εκκινητής LoopFdeg). Με δεδομένη την μη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ζευγών εκκινητών σύμφωνα με την Εικόνα 8 ως προς αποτελεσματικότητα ανίχνευσης του PLMVd, επιλέχθηκε το ζεύγος LoopFdeg/LoopBdeg με σκοπό την ανίχνευση περισσότερων απομονώσεων του ιοειδούς.

Πέραν από τους εκκινητές των οποίων η νουκλεοτιδική αλληλουχία εξασφαλίζει την εξειδίκευση της μεθόδου και η δομή τους την παραγωγή προϊόντων χαρακτηριστικής μορφής, σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της μεθόδου παίζουν αναμφισβήτητα, μεταξύ άλλων, η θερμοκρασία υβριδισμού, η μεταϊν, το εκμαγείο και η αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase RTase) (Notomi *et al.*, 2000). Οι παραπάνω παράγοντες αποτέλεσαν αντικείμενο βελτιστοποίησης του επιταχυνόμενου (accelerated) πρωτοκόλλου με τη χρήση της ομάδας εκκινητών OLD1 και το ζεύγος εκκινητών loop LoopFdeg/LoopBdeg. Ο συνδυασμός 0.8 M μεταϊνης και 62.5 °C έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και αύξησε σημαντικά το όριο ανιχνεύσεως της μεθόδου σε σχέση με τους άλλους συνδυασμούς. Η προσθήκη μεταϊνης κρίνεται απαραίτητη γιατί σύμφωνα με τους Rees *et al.*, (1993) συμβάλλει στην αποσταθεροποίηση του ζεύγους βάσεων G:C και δυσχεραίνει το σχηματισμό δευτεροταγούς δομής σε περιοχές με υψηλό ποσοστό G:C (Henke *et al.*, 1997) και αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα επιτυχούς υβριδισμού των εκκινητών και ειδικότερα των FIP και BIP (Notomi *et al.*, 2000). Όσον αφορά τη θερμοκρασία, η βέλτιστη τιμή των 62.5 °C συμπίπτει με το βέλτιστο δράσεως της *Bst* DNA πολυμεράσης. Η RT-LAMP αποδείχθηκε τουλάχιστον 100 φορές πιο ευαίσθητη από την μέθοδο one step-two tube RT-PCR που χρησιμοποιήθηκε στην παράγραφο 4.1, Κεφάλαιο 1^ο, μέρος Γ, συμφωνώντας με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών κατά τα οποία η RT-LAMP ήταν περισσότερο ευαίσθητη από την RT-PCR (Fukuta *et al.*, 2004), εξίσου ή περισσότερο ευαίσθητη από την εστιασμένη (nested) RT-PCR (Kono *et al.*, 2004, Gunimalavedi *et al.*, 2005) και, σε ορισμένες περιπτώσεις, αντίστοιχης ευαισθησίας με την πραγματικού χρόνου (Real time) RT-PCR (Vargas and James 2006).

Έχει βρεθεί πως η *Bst* DNA πολυμεράση και κατ' επέκταση η RT-LAMP είναι λιγότερο ευαίσθητη σε παρεμποδιστές σε σχέση με την RT-PCR. Δεν υπάρχουν όμως πληροφορίες σχετικά με την ευαισθησία της σε πολυφαινόλες και πολυσακχαρίτες φυτικής προελεύσεως που δρουν επίσης ανασταλτικά της RT-PCR (Demeke and Adams 1992). Σύμφωνα λοιπόν με την Εικόνα 12, πυκνό (1/1 β/ο) παρασκεύασμα φυτικού χυμού μολυσμένων φύλλων ροδακινιάς και με τα δύο είδη ρυθμιστικών διαλυμάτων (SSC και dissolution) δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα. Αντίθετα, η αντίδραση ήταν θετική μετά από αραιώση του φυτικού χυμού 10-50 φορές. Αυτό πιθανότατα λόγω αραιώσεως των παρεμποδιστών. Η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου με τη χρήση ακατέργαστου φυτικού χυμού ως εκμαγείου σε συνδυασμό με την μη αναγκαιότητα θερμικής αποδιατάξεως του μειώνει ακόμη περισσότερο τον συνολικό χρόνο της αντιδράσεως καθώς δεν απαιτείται εξαγωγή ολικού RNA. Παρ' όλα αυτά, η χρήση φυτικού χυμού δεν μπορεί να συγκριθεί σε ευκολία με την εφαρμογή απλά ίχνους φυτικού ιστού που μεταφέρεται στον μικροσωλήνα της αντιδράσεως με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Το γεγονός αυτό το οποίο συνδέεται με την υψηλή ευαισθησία της RT-LAMP, σε συνδυασμό με την χρήση απλώς

θερμαντικής πλάκας αντί θερμοκυκλοποιητή, την καθιστά εφαρμόσιμη ακόμη και στον αγρό, δηλαδή ιδιαίτερα πρακτική

Συνήθως για το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής σε μια αντίδραση RT-LAMP επιλέγεται η αντίστροφη μεταγραφή AMV λόγω της μεγαλύτερης θερμικής της σταθερότητας έναντι της M-MLV. Στην παρούσα έρευνα η AMV χρησιμοποιήθηκε σε σύγκριση με την Thermoscript (γενετικά τροποποιημένη AMV αντίστροφη μεταγραφή με μειωμένη δράση RNAase H) και βρέθηκε πιο αποτελεσματική. Το γεγονός αυτό συνδέεται πιθανότατα με την δράση RNAase H της AMV, που καταλύει την αποικοδόμηση της αλυσίδας RNA του υβριδίου RNA-DNA απελευθερώνοντας την αρνητική αλυσίδα DNA (DNA minus strand) η οποία αποτελεί το εκμαγείο για το επόμενο στάδιο (Krug and Berger 1988).

Η τεχνική της RT-LAMP που περιγράφηκε στο παρόν κεφάλαιο, με την χρήση της ομάδας εκκινητών OLD1 και το ζεύγος LoopFdeg/LoopBdeg, χαρακτηρίζεται, πέρα από την ταχύτητα (25-30 λεπτά) και την ευαισθησία, από ένα ακόμη βασικό πλεονέκτημα, την υψηλή εξειδίκευση καθώς έδωσε θετικά αποτελέσματα μόνο με το PLMVd (συμπεριλαμβανομένης και μιας από τις πλέον απομακρυσμένες του απομονώσεις την Peach Calico, PC) και με κανένα άλλο από τα εξετασθέντα είδη ιοειδών. Το χαρακτηριστικό μοτίβο τύπου ανεμόσκαλας των προϊόντων της RT-LAMP σε αντίθεση με τη μια και μοναδική συγκεκριμένου μεγέθους ζώνη στην RT-PCR, δημιουργεί μια αμφιβολία σχετικά με την ορθότητα των αποτελεσμάτων. Γι' αυτό το λόγο σε ορισμένες περιπτώσεις ακολουθείται η διαδικασία πέψης των προϊόντων με περιοριστικά ένζυμα (Parida *et al.*, 2004, Kubota *et al.*, 2008, Curtis *et al.*, 2008). Στην περίπτωσή μας, η πέψη με το *RsaI* οδήγησε στην παραγωγή προϊόντων συγκεκριμένων μεγεθών σύμφωνων με τα αναμενόμενα, υποδεικνύοντας την εξειδίκευση της μεθόδου η οποία οφείλεται στην καταλληλότητα των εκκινητών.

Η ικανότητα της RT-LAMP να πραγματοποιείται απλά με τη χρήση μιας θερμαντικής πλάκας, με εκμαγείο ίχνος φυτικού ιστού, καθώς και η εύκολη καταγραφή των αποτελεσμάτων με οπτική παρατήρηση της θολότητας ή την χρήση φθορίζουσών χρωστικών, οδήγησε στην ιδέα εφαρμογής της τεχνικής αυτής στον αγρό για την ανίχνευση του PLMVd σε ροδακινιά και άλλα είδη. Η προσπάθεια αυτή στέφθηκε από επιτυχία, με εξαίρεση το δείγμα No. 15 (απιδιά) το οποίο βρέθηκε θετικό μόνο μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης στο εργαστήριο, προφανώς λόγω μικρής συγκεντρώσεως του ιοειδούς στο δείγμα. Η περίπτωση αυτή δείχνει την ανάγκη χρήσεως μιας χρωστικής πιο ευαίσθητης από την loopamp fluorescent dye (Eiken), όπως η hydroxynaphthol blue (Sigma-Aldrich, Saint Luis, Missouri, USA) η οποία παρέχει επίσης την δυνατότητα καταγραφής των αποτελεσμάτων δίχως την ανάγκη χρήσης υπεριώδους ακτινοβολίας (Tomita *et al.*, 2008).

Έχοντας στην διάθεσή μας ένα τέτοιο διαγνωστικό εργαλείο είναι δυνατή η γρήγορη και εξειδικευμένη ανίχνευση του PLMVd στο πολλαπλασιαστικό υλικό στα φυτώρια και σε

ύποπτα δένδρα σε οπωρώνες, συμβάλλοντας έτσι στον περιορισμό της διαδόσεως και μεταδόσεως του ιοειδούς κι ως εκ τούτου στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή του.

6. Συμπεράσματα – προοπτικές

Στο παρόν κεφάλαιο κατέστη δυνατή η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και εφαρμογή ενός εξειδικευμένου και υψηλής ευαισθησίας (100 φορές πιο ευαίσθητου της RT-PCR) επιταχυνόμενου πρωτοκόλλου RT-LAMP για την διάγνωση του PLMVd σε ροδακινιά και άλλα είδη, στο εργαστήριο και τον αγρό σε μόλις 25-50 λεπτά, με μικρό κόστος και δίχως την ανάγκη ακριβού και εξειδικευμένου εξοπλισμού. Η μελέτη αυτή, τμήματα της οποίας δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό *Journal of Virological Methods* 160 (2009) με τίτλο: Sensitive and rapid detection of *Peach latent mosaic viroid* by the reverse trascription loop-mediated isothermal amplification, και στο *Berichte aus dem JKI (Julius Kunh Institut)* με τίτλο: Improvement of the everse trascription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Peach latent mosaic viroid*, αποτελεί την πρώτη διεθνώς διεξοδική εφαρμογή της τεχνικής RT-LAMP σε ιοειδή και ανοίγει το δρόμο για την εφαρμογή της μεθόδου και σε άλλα ιοειδή και γενικώς σε άλλα φυτοπαθογόνα στη χώρα μας, στην οποία εφαρμόζεται για πρώτη φορά. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι επίσης για πρώτη φορά εφαρμόστηκε εδώ η τεχνική RT-LAMP με επιτυχία στον αγρό για την διάγνωση κάποιου φυτοπαθογόνου, γεγονός που ενδεχομένως να αποτελέσει τη βάση πάνω στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί ένα νέο διαγνωστικό κυτίο ασθενειών πολύ σημαντικών για την γεωργία όπως για παράδειγμα της τριστέτσας των εσπεριδοειδών (*Citrus tristeza virus*, CTV), κατ' αναλογία με το κυτίο για την υψηλής υγειονομικής σημασίας ασθένεια της σαλμονέλας (*Salmonella* detection kit, Eiken, Japan).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

**ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΕΩΣ ΕΠΙΤΟΠΙΑ ΑΝΤΙΣΤΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ-ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ
ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (LIQUID PHASE *IN SITU* REVERSE TRANSCRIPTION
POLYMERASE CHAIN REACTION, LIQUID PHASE *IN SITU* RT-PCR**

1. Περίληψη

Με απώτερο σκοπό τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του ιοειδούς του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) με τη ροδακινιά και την εξακρίβωση της παρουσίας του στα κορυφαία τμήματα των μεριστωματικών ιστών αναπτύχθηκε μια νέα τεχνική, η υγρής φάσεως *in situ* RT-PCR (liquid phase IS RT-PCR), βασισμένη στη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green* για την ανίχνευση του PLMVd στη ροδακινιά. Χρησιμοποιήθηκαν φύλλα υγιών και μολυσμένων με το PLMVd φυτών ροδακινιάς συμπεριλαμβανομένου ενός φυτού GF-305 με χαρακτηριστικά συμπτώματα λευκάνσεως των φύλλων, μολυσμένου με την παραλλαγή Peach Calico (PC). Όλα τα στάδια της μεθόδου, με εξαίρεση εκείνο της ανιχνεύσεως του σήματος πραγματοποιήθηκαν σε υγρή φάση εντός μικροσωλήνων PCR. Η φθορίζουσα χρωστική *SYBR Green* χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με την αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) σε τομές καθλωμένων με φορμόλη (formalin) φύλλων ροδακινιάς που είχαν υποστεί μεταχείριση με πεψίνη (pepsin) και DNase I. Παρατήρηση των τομών με μικροσκόπιο επιφθορισμού οδήγησε στην καταγραφή σήματος έντονου πράσινου φθορισμού στη περιοχή των κυττάρων του πασσαλώδους παρεγχύματος. Σε κυτταρικό επίπεδο το σήμα εντοπίστηκε στους χλωροπλάστες, τα οργανίδια όπου ως γνωστό το PLMVd συσσωρεύεται και πολλαπλασιάζεται. Αν και η μέθοδος αποδείχθηκε αποτελεσματική για την ανίχνευση του ιοειδούς, ένα κιτρινο-πράσινο υπόβαθρο (background), που οφειλόταν πιθανότατα σε μικρής εκτάσεως αυτο-φθορισμό λόγω χλωροφύλλης, καταγράφηκε στην περίπτωση των πράσινων ιστών, σε αντίθεση με την περίπτωση ιστών με λεύκανση. Αυτή είναι η πρώτη διεθνώς αναφορά εφαρμογής της τεχνικής *SYBR Green* IS RT-PCR για την ανίχνευση φυτοπαθογόνου οργανισμού.

2. Εισαγωγή

Το ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) ανήκει στο γένος *Pelamoviroid* της οικογένειας *Avsunviroidae* και προσβάλλει κυρίως τη ροδακινιά (*Prunus persica* L.), ως ένα σύμπλεγμα παρόμοιων όχι όμως και πανομοιότυπων μεταξύ τους παραλλαγών (variants), οι περισσότερες από τις οποίες αποτελούνται από 335-351 νουκλεοτίδια (nucleotides, nt) (Flores *et al.*, 2003). Ορισμένες από τις παραλλαγές αυτές φέρουν μια ένθεση 12-13 νουκλεοτιδίων που διαμορφώνεται σε φουρκέτα (hairpin) με μια θηλειά (loop) πλούσια σε ουρακίλες (uracils, U) στην κορυφή της. Η διαμόρφωση αυτή είναι υπεύθυνη για το σύμπτωμα της λευκάνσεως των φύλλων της ροδακινιάς (Peach Calico, PC) από το οποίο παίρνει το όνομα της η συγκεκριμένη παραλλαγή (Ambros *et al.*, 1998, Malfitano *et al.*, 2003, Rodio *et al.*, 2006). Η προσβολή της ροδακινιάς από το PLMVd έχει μεγάλη οικονομική σημασία, λόγω κυρίως των συμπτωμάτων που προκαλούνται στους καρπούς (παραμόρφωση, σχισμές στη ραφή κ.τ.λ.), της πρόωρης γηράνσεως και της αυξημένης ευπάθειας του φυτού σε άλλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Flores *et al.*, 2006). Η αντιμετώπιση του ιοειδούς συνίσταται στην εφαρμογή προληπτικών μέτρων, με βασικότερο τη χρήση υγιούς και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Προσπάθειες εξυγίανσεως πολλαπλασιαστικού υλικού ροδακινιάς μέσω της τεχνικής του *in vitro* εμβολιασμού ακραίου μεριστώματος (shoot tip apex) σε σπορόφυτα Nemaguard έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαρτάται από την ποικιλία και, κυρίως, από το μέγεθος του χρησιμοποιούμενου ακραίου μεριστώματος. Η εξυγίανση ήταν δυνατή όταν χρησιμοποιήθηκαν μικρού μεγέθους (0.3-0.4 mm) ακραία μεριστώματα, αλλά αρκετά δύσκολη ή αδύνατη όταν το μέγεθός τους κυμάνθηκε μεταξύ 0.6 και 0.8 mm (Barba *et al.*, 1995). Τα παραπάνω αποτελέσματα συνδέονται με τα ευρήματα των Rodio *et al.*, (2007) σύμφωνα με τα οποία το PLMVd, με τη βοήθεια του επιτόπιου υβριδισμού (*in situ* hybridization), εντοπίστηκε στη περιοχή του ακραίου μεριστώματος συμπεριλαμβανομένων των πρώτων φυλλικών καταβολών (leaf primordia), με εξαίρεση ορισμένα στρώματα κυττάρων στην κορυφή του ακραίου μεριστώματος. Τα κύτταρα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή υγιών φυτών, όμως η παρουσία του PLMVd δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί εάν προηγουμένως δεν χρησιμοποιηθεί μια επιτόπια (*in situ*) διαγνωστική τεχνική μεγαλύτερης ευαισθησίας από αυτή του *in situ* υβριδισμού (Rodio *et al.*, 2007). Ο *in situ* υβριδισμός είναι μια τεχνική η οποία, βασιζόμενη στην άμεση οπτική παρατήρηση σήματος, επιτρέπει τον εξειδικευμένο εντοπισμό σε κυτταρικό επίπεδο νουκλεοξικών αλληλουχιών, με μειωμένη όμως ευαισθησία, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις περιορίζει την αποτελεσματικότητά της (O' Leary *et al.*, 1996). Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, αναπτύχθηκαν αρχικά σε ζωικούς (Nuono 2001) και στη συνέχεια σε φυτικούς ιστούς (Urbanczyk-Wochniak *et al.*, 2002) *in situ* τεχνικές διαγνώσεως που βασίζονται στην εφαρμογή της αλυσιδωτής αντιδράσεως της

πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Η επιτόπια αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (*in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction, IS RT-PCR) αποτελείται από το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής του στόχου ακολουθούμενο από το στάδιο της ενισχύσεως με PCR του παραγόμενου συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA), με αποτέλεσμα την ανίχνευση ακόμη και πολύ μικρού αριθμού αντιγράφων του στόχου, αλλά αυτό επί τόπου (*in situ*) στο κύτταρο. Η τεχνική αυτή διακρίνεται σε δύο τύπους: i) την άμεση (direct) όπου η σήμανση του προϊόντος π.χ. με διγοξυγενίνη (digoxigenin) γίνεται κατά τη διάρκεια της PCR (Koltai and Bird 2001) και ii) την έμμεση (indirect) όπου μετά το πέρας της PCR ακολουθεί ανίχνευση του προϊόντος με υβριδισμό του με σημασμένο ανιχνευτή (probe) (Steinhoff *et al.*, 2001). Στον πρώτο τύπο (άμεσο) η σήμανση του προϊόντος μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση: i) σημασμένων με digoxigenin ολιγονουκλεοτιδίων (Pesquet *et al.*, 2004), ii) σημασμένων εκκινητών (Koltai και Bird 2001) και iii) φθορίζουσών χρωστικών (Gal *et al.*, 2006, Gray-Mitsumune *et al.*, 2003). Σε αντίθεση με τη συνήθη εφαρμογή της IS RT-PCR επί αντικειμενοφόρων πλακών ('on slide' method), η εφαρμογή της τεχνικής σε υγρή φάση εντός των μικροσωλήνων της PCR έχει αρκετά πλεονεκτήματα όπως: i) δεν είναι αναγκαίοι ειδικά σχεδιασμένοι θερμοκυκλοποιητές (*in situ* thermocyclers), ii) ο αριθμός των τομών που τοποθετούνται εντός των μικροσωλήνων μπορεί να είναι μεγάλος, iii) δεν υπάρχουν επιπρόσθετα στάδια μετά την καθήλωση (fixation) των ιστών (οι καθηλωμένοι ιστοί θα πρέπει απλά να εμβαπτιστούν σε αгарόζη πριν την πραγματοποίηση των τομών και στη συνέχεια είναι έτοιμοι προς χρήση). Τα παραπάνω συμβάλλουν στον περιορισμό του συνολικού χρόνου που απαιτείται για την αντίδραση και στην αύξηση του αριθμού και των τύπων των προς ανάλυση ιστών και των γόνων-στόχων.

Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι για τον κυτταρικό εντοπισμό ιοειδών. Οι περισσότερες από τις μεθόδους αυτές ήταν παραλλαγές του *in situ* υβριδισμού (PLMVd, [Bussiere *et al.*, 1999, Rodio *et al.*, 2007], ASBVd και CCCVd [Bonfiglioli *et al.*, 1994, 1996]), της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διελεύσεως (transmission electron microscopy, TEM) (CCCVd και CEVd [Bonfiglioli *et al.*, 1996]) και της on slide IS RT-PCR (ASSVd [Zhao and Niu 2008]). Δεδομένου ότι οι περισσότερες από τις παραπάνω μεθόδους είναι επίπονες, χρονοβόρες, υψηλού κόστους και ορισμένες μικρής ευαισθησίας, σε συνδυασμό με την αναγκαιότητα για πρωτόκολλα *in situ* ανιχνεύσεως ιοειδών, π.χ. για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων φυτού-ξενιστή και ιοειδούς και την εξακρίβωση της παρουσίας ή μη ιοειδών στα κορυφαία τμήματα των μεριστωματικών ιστών με σκοπό την παραγωγή υγιών φυτών, αναπτύχθηκε στο παρόν κεφάλαιο μια νέα τεχνική υγρής φάσεως *in situ* RT-PCR (liquid phase IS RT-PCR) βασιζόμενη στην χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green για την ανίχνευση του PLMVd στη ροδακινιά.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Φυτικό υλικό

Για τις ανάγκες του παρόντος κεφαλαίου χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές PLMVd i) ασυμπτωματικά φύλλα ροδακινιάς που προήλθαν από φυσικά μολυσμένα, με την απομόνωση Νο 9 του PLMVd (βλ. Πίνακας 1 κεφάλαιο 1^ο, Γ μέρος), δένδρα ποικιλίας Spring Crest με χαρακτηριστικές σχισμές στη ραφή των καρπών (Εικόνα 1) και ii) φύλλα με χαρακτηριστικά συμπτώματα λευκάνσεως του φυτοδείκτη ροδακινιάς GF-305 μολυσμένου με την ιταλική απομόνωση P39 του PLMVd PC. Η απομόνωση αυτή επιλέχθηκε προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν προβλήματα λόγω αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης (chlorophyll auto-fluorescence) των πράσινων ιστών. Τα δείγματα PC προήλθαν από τη συλλογή του Ινστιτούτου CRA (Centro per la Pathologia Vegetale) στη Ρώμη μετά από ευγενική προσφορά των Dr. M. Barba και Dr. F. Faggioli. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φύλλα υγιών φυτών GF-305.

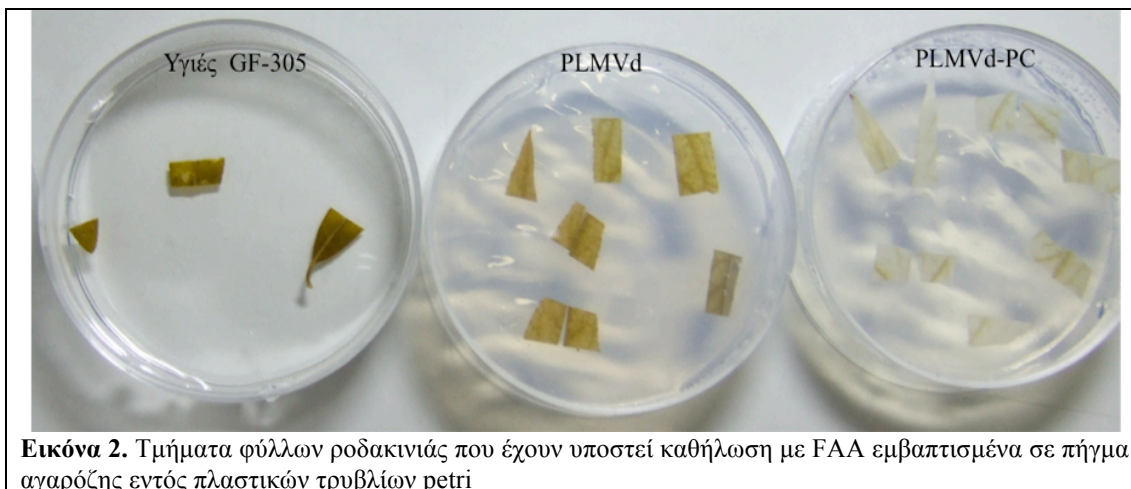


Εικόνα 1. Συμπτώματα που προκαλούνται στη ροδακινιά από το PLMVd (A) και την παραλλαγή του Peach Calico (PC) (B). A) Ροδακινιά ποικιλίας Spring Crest με σχισμές στην ραφή του καρπού και ασυμπτωματικά φύλλα. B) Ροδακινιά GF-305 με συμπτώματα λευκάνσεως των φύλλων

3.2. Καθήλωση ιστών και τομές (tissue fixation and sectioning)

Η καθήλωση των ιστών έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Koltai and Bird (2001), με ορισμένες τροποποιήσεις. Τα φύλλα ροδακινιάς, αμέσως μετά την κοπή τους από το δένδρο, τεμαχίστηκαν σε μικρά τεμάχια διαστάσεων 1x1 cm και τοποθετήθηκαν σε φρέσκο υδατικό διάλυμα καθήλωσεως (fixation buffer) FAA (63% [o/o] αιθανόλη [ethanol], 5% [o/o] οξικό οξύ [acetic acid], και 2% [o/o] φορμαλίνη [formalin]) όπου και παρέμειναν επί 24-48 ώρες στους 4 °C. Στη συνέχεια, οι καθηλωμένοι ιστοί, αφού εμβαπτίστηκαν σε φρέσκο υδατικό διάλυμα πλύσεως (washing buffer) (63% [o/o] αιθανόλη [ethanol], 5% [o/o] οξικό οξύ [acetic acid]) τρεις φορές επί 15 λεπτά, ή εναλλακτικά, παρέμειναν στο διάλυμα πλύσεως επί 72-96 ώρες, τοποθετήθηκαν επί 10 λεπτά σε φωσφορικό διάλυμα 1x PBS (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH7.4). Τελικά οι ιστοί μεταφέρθηκαν σε πλαστικά τρυβλία petri και καλύφθηκαν με θερμό διάλυμα 6% (β/ο)

αγαρόζης (Invitrogen Ltd, Paisley England, UK) σε 1x PBS (Εικόνα 2). Μετά την σταθεροποίηση (πήξη) της αγαρόζης τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 4 °C όπου και παρέμειναν μέχρι και επί μια εβδομάδα μέχρι την χρησιμοποίηση των ιστών.



Εικόνα 2. Τμήματα φύλλων ροδακινιάς που έχουν υποστεί καθήλωση με FAA εμβαπτισμένα σε πήγμα αγαρόζης εντός πλαστικών τρυβλίων petri

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι τομές, μικροί κύβοι αγαρόζης που περιείχαν φυτικό ιστό αποκόπηκαν από το τρυβλίο petri με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού και προσκολλήθηκαν στην τράπεζα-δίσκο δειγμάτων (specimen disk) του κρυο-μικροτόμου (freezing microtome) Leica CM1850 Cryostat (Leica Microsystems Nussloch GmbH Heidelberg, Germany) (Εικόνα 3) με τη βοήθεια της προσκολλητικής ουσίας OCT (Optimum cutting temperature compound).

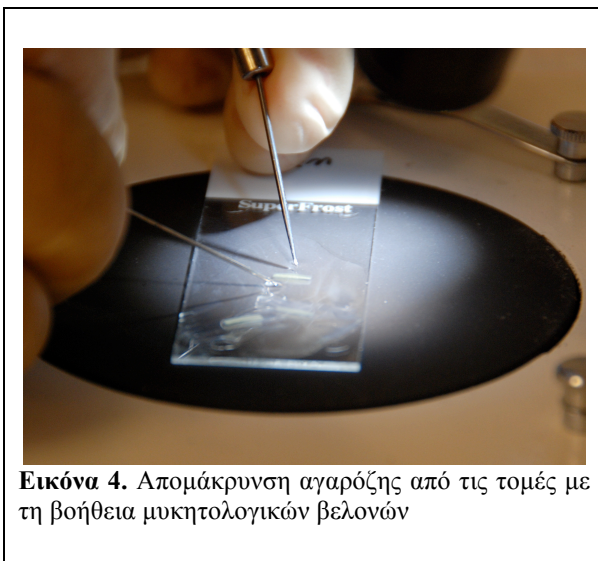


Εικόνα 3. Κρυοτόμος Leica CM 1850 Cryostat (Leica Microsystems Nussloch GmbH Heidelberg Germany)

Κάθε τομή πάχους 20-25 μm συλλέχθηκε με αποστειρωμένη τσιμπίδα και μεταφέρθηκε πάνω σε μερικές σταγόνες 1x PBS σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη συνέχεια 4-5 τομές, από τις οποίες είχε προηγουμένως απομακρυνθεί η αγαρόζη με τη βοήθεια αποστειρωμένων μυκητολογικών βελονών (Εικόνα 4), μεταφέρθηκαν σε μικροσωλήνες PCR 0.2 ml (Costar Corporation, Cambridge MA, USA) που είχαν πληρωθεί με 150-200 μl διαλύματος 1x PBS και παρέμειναν εκεί σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επόμενη μεταχείριση.

Στο στάδιο αυτό και πριν από την εφαρμογή της IS RT-PCR έγινε εκτίμηση της συνοχής και μορφολογίας των τομών με χρώση αυτών με διάλυμα 0.1% (β/ο) μπλε της τολουιδίνης (tolouidine blue) και παρατήρησή τους με το οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX-

60. Παραλλήλως, σε τομές που δεν είχαν υποβληθεί σε PCR (αμεταχειρίστες τομές), προκειμένου να εντοπιστεί η θέση των πυρήνων έγινε χρώση επί 30 λεπτά με 100 μl 0.3 μM



Εικόνα 4. Απομάκρυνση αγαρόζης από τις τομές με τη βοήθεια μυκητολογικών βελονών

διαλύματος 4', 6-diamino-2-phenylindone (DAPI) (Molecular probes, Poottgebouw, Netherlands) σε 1x PBS και παρατήρηση αυτών με φίλτρο υπεριώδους ακτινοβολίας (ultra violet, UV). Επίσης, αμεταχειρίστες τομές παρατηρήθηκαν με το φίλτρο WBS (420 nm διέγερση [excitation], >500 nm εκπομπή [emission]), προκειμένου να εκτιμηθεί ο βαθμός αυτοφθορισμού λόγω χλωροφύλλης (chlorophyll auto-fluorescence).

3.3. Μεταχείριση των τομών με πρωτεάση (protease) και δεοξυριβονουκλεάση (deoxybironuclease, DNase)

Προκειμένου να επιτευχθεί η πρόσβαση της DNAσης και των αντιδραστηρίων της RT-PCR στο στόχο εντός του κυττάρου, έπρεπε να προηγηθεί μεταχείριση των τομών με μία πρωτεάση. Πέψη των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με επώαση των τομών επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37 °C με 100 μl διαλύματος πεψίνης (pepsin) (Applichem, GmbH, Darmstad, Germany) συγκεντρώσεως 2 mg/ml σε διάλυμα 0.01 M HCl. Μετά το πέρας της μισής ώρας η αντίδραση τερματίστηκε με πλύση των τομών δύο φορές επί 15 λεπτά με διάλυμα 1x PBS.

Στη συνέχεια έγινε πέψη του γενωμικού DNA με επώαση των τομών με DNAase I (Fermentas, Vilnius, Lithuania) στους 37 °C επί 12 ώρες. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 30 μl και κάθε μικροσωλήνας περιείχε 3 μl διαλύματος αντιδράσεως 10x (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂), 20 μονάδες ενζύμου DNase I και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC μέχρι του τελικού όγκου. Μετά το πέρας της αντιδράσεως το περίσσιο ένζυμο απομακρύνθηκε με πλύση των τομών τρεις φορές επί 10 λεπτά με διάλυμα 1x PBS.

3.4. Εκκινητές

Για την ανίχνευση του PLMVd με τη μέθοδο της IS RT-PCR, σχεδιάστηκε από συντηρημένες περιοχές ένα νέο ζεύγος εκκινητών: IB-Rev (5' -GGT TTG AAT CCC GGG TAG A-3') (αντιστοιχεί στις θέσεις 236-254 nt) και IB-Fw (5'-ACC TCG CAA TGA GGT AAG GT-3') (αντιστοιχεί στις θέσεις 136-155 nt) που ενισχύει τμήμα του γενώματος του ιοειδούς μεγέθους 118 ζβ. Παράλληλα, προκειμένου να εκτιμηθεί η αξιοπιστία της μεθόδου,

χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ο πλαστιδιακός γόνος της πρωτεΐνης μεγάλη *rubisco* (*rbcL* plastid gene) για την ανίχνευση του οποίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *rbcL*-Rev (5' -ATA AAC TGC TCT ACC GTA ATT CTT AGC G-3') και *rbcL*-Fw (5' -ACT GAC GGG CTT ACT TAC TAG TC TTG AC-3') που περιγράφονται από τους Rodio *et al.*, (2007) και ενισχύουν τμήμα του γόνου μεγέθους 360 ζβ.

3.5. RT-PCR ενός σταδίου (one step RT-PCR)

Μετά την επεξεργασία των τομών με πεψίνη και DNAαση I ακολούθησε η RT-PCR. Αντί της κλασσικής RT-PCR δύο σταδίων (two step RT-PCR), επιλέχθηκε αυτή του ενός σταδίου (one step RT-PCR) με απώτερο σκοπό τον περιορισμό του απαιτούμενου χρόνου αλλά κυρίως τον περιορισμό των μεταχειρίσεων που συμβάλλει στη διατήρηση των τομών σε καλύτερη κατάσταση. Η εφαρμογή της IS RT-PCR έγινε με χρήση του κυτίου Power *SYBR Green RNA-to-Ct-1 step* (Applied Biosystems, Foster City USA). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 20 μl και σύμφωνα με τις οδηγίες περιείχαν 10 μl 2x *Power SYBR Green mix*, 0.16 μl αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase, RTase), 0.75 μl ανοδικού εκκινητή (IB-Fw ή *rbcL*-Fw) συγκεντρώσεως 10 μM, 0.75 μl καθοδικού εκκινητή (IB-Rev ή *rbcL*-Rev) συγκεντρώσεως 10 μM και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC μέχρι του τελικού όγκου. Στη συνέχεια οι μικροσωλήνες μεταφέρθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή PTC-200 (MJ Reseach, Waltham, Massachusetts, USA) όπου επώαστηκαν επί 30 λεπτά στους 50 °C (στάδιο RT). Ακολούθησε επώαση ενός κύκλου στους 95 °C επί 10 λεπτά και 40 κύκλοι των 15 δευτερολέπτων στους 95 °C και ενός λεπτού στους 60 °C (στάδιο PCR). Μετά το τέλος της IS RT-PCR, το διάλυμα της αντιδράσεως μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα PCR 0.2 ml και 1-2 μl αυτού χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο σε νέα αντίδραση PCR. Στόχος αυτής ήταν η διαπίστωση τυχόν διαχύσεως των προϊόντων της IS RT-PCR από τα κυτταρικά τοιχώματα, περίπτωση κατά την οποία θα ήταν επιπλέον δυνατή η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της IS RT-PCR και μέσω ηλεκτροφορητικής αναλύσεως των προϊόντων της νέας PCR σε πήγμα αγαρόζης 2% (β/ο) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.4. του Β μέρους.

3.6. Επιτόπια (*in situ*) ανίχνευση των προϊόντων της RT-PCR

Μετά το τέλος της IS RT-PCR και την μεταφορά του διαλύματος της αντιδράσεως σε νέο μικροσωλήνα, ακολούθησε πλύση των τομών με 150 μl διαλύματος 1x PBS και μεταφορά τους προσεχτικά με μυκητολογικές βελόνες σε μια-δύο σταγόνες 1x PBS πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα αποψύξεως (super-frost). Οι πλάκες σκεπάστηκαν με καλυπτρίδες, σφραγίστηκαν με διάφανο βερνίκι νυχιών και τοποθετήθηκαν σε υγρό θάλαμο-κυτίο (humid

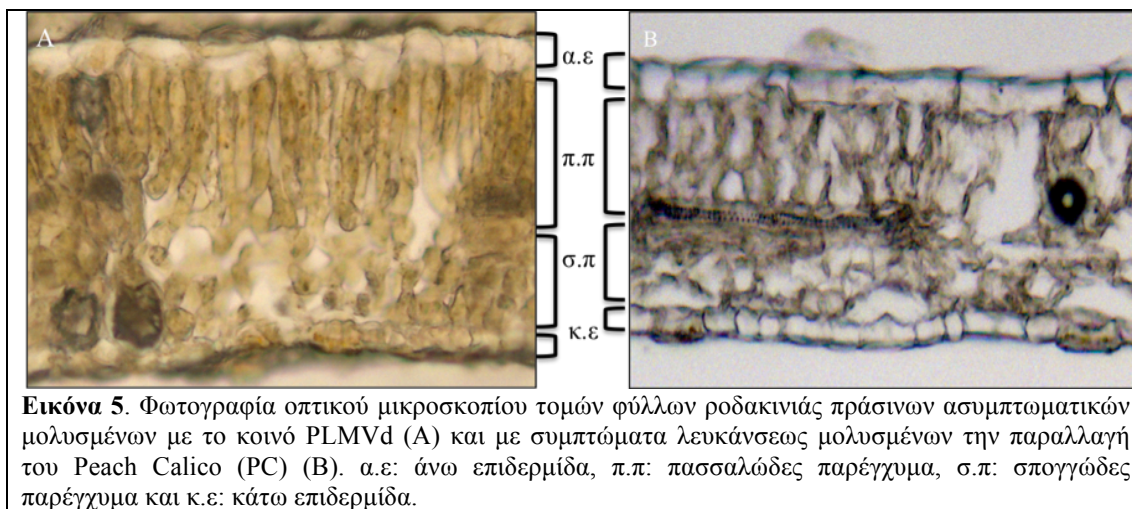
box) όπου και παρέμειναν το πολύ επί μια ώρα. Στη συνέχεια, ακολούθησε παρατήρηση των τομών με το μικροσκόπιο Olympus BX-60 εξοπλισμένο με το σύστημα επί-φθορισμού BX-FLA (epi- fluorescence microscopic system) και το φίλτρο WBS και φωτογράφησή τους με την ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Olympus DP-71 αναλύσεως 1024x708 pixels. Το συγκεκριμένο φίλτρο επιλέχθηκε καθώς είναι το κατάλληλο για την παρατήρηση του σήματος φθορισμού της χρωστικής *SYBR Green* με τις μέγιστες τιμές διεγέρσεως και εκπομπής της 497 και 520 nm αντίστοιχα.

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η τεχνική της IS RT-PCR που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε στο παρόν κεφάλαιο βασίστηκε στην υγρής φάσεως (liquid phase) *in situ* RT-PCR που περιγράφεται από τους Koltai and Bird (2001) με βασική διαφορά την αντικατάσταση της διγοξεγενίνης (digoxigenin) από την χρωστική *SYBR Green* για την σήμανση του προϊόντος της PCR. Η ανάγκη της αντικαταστάσεως αυτής σχετίζεται με τα αυξημένα στάδια που απαιτεί η χρήση της digoxigenin, δηλαδή αυξημένες μεταχειρίσεις (πλύσεις, προσθήκη διαλύματος καλύψεως [blocking buffer], αντισώματος [anti dig IgG] κ.ά.), που συχνά οδηγούν σε καταστροφή των τομών καθώς και σε επιμολύνσεις. Επίσης, στο παρελθόν η χρήση digoxigenin έχει συνδεθεί με προβλήματα σχετικά με την παρουσία αυξημένου υπόβαθρου (background) (Nuovo 1995) και μη ειδικών αντιδράσεων (Rodio *et al.*, 2007). Αντίθετα, η φθορίζουσα χρωστική *SYBR Green* προσφέρει ευκολία χρήσεως και ανιχνεύσεως των προϊόντων και παράλληλα δίνει τη δυνατότητα αναλύσεως των αποτελεσμάτων σε φωτογραφίες υψηλής ευκρίνειας όταν συνδυαστεί με συν-εστιακό μικροσκόπιο σαρώσεως ακτίνων Laser (confocal laser scanning microscope, CLSM) (Gray-Mitsumune *et al.*, 2004). Είναι γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις ανάλογων τεχνικών χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά το CLSM, καθώς επιτρέπει την τρισδιάστατη παρατήρηση τομών με πάχος μεγαλύτερο των 50 μm (Claxton *et al.*, 2008). Παρ' όλα αυτά, επειδή στην περίπτωσή μας δεν ήταν διαθέσιμο ενός τέτοιου είδους μικροσκόπιο, χρησιμοποιήθηκαν τομές πάχους μικρότερου των 25 μm και η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε με μικροσκόπιο, επιφθορισμού με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Πριν από την εφαρμογή της IS RT-PCR, παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο τομών φύλλων ροδακινιάς του ίδιου σταδίου αναπτύξεως με σκοπό να διαπιστωθεί ο βαθμός συνεκτικότητας και η μορφολογία των τομών, έδειξε ότι φύλλα με συμπτώματα λευκάνσεως (λόγω προσβολής από την παραλλαγή PC του PLMVd) είχαν μικρότερο πάχος σε σχέση με εκείνα που προήλθαν από υγιή ή μολυσμένα με το κοινό PLMVd φυτά (Εικόνα 5). Αυτό συσχετίστηκε με τη διαφοροποίηση στο σχήμα (πιο κοντά και παχειά) των κυττάρων που συνιστούν το πασσαλώδες (δρυφρακτοειδές) παρέγχυμα (palisade parenchyma) στα φύλλα με συμπτώματα λευκάνσεως, γεγονός το οποίο αποδίδεται σύμφωνα με τους Rodio *et al.*, (2007)

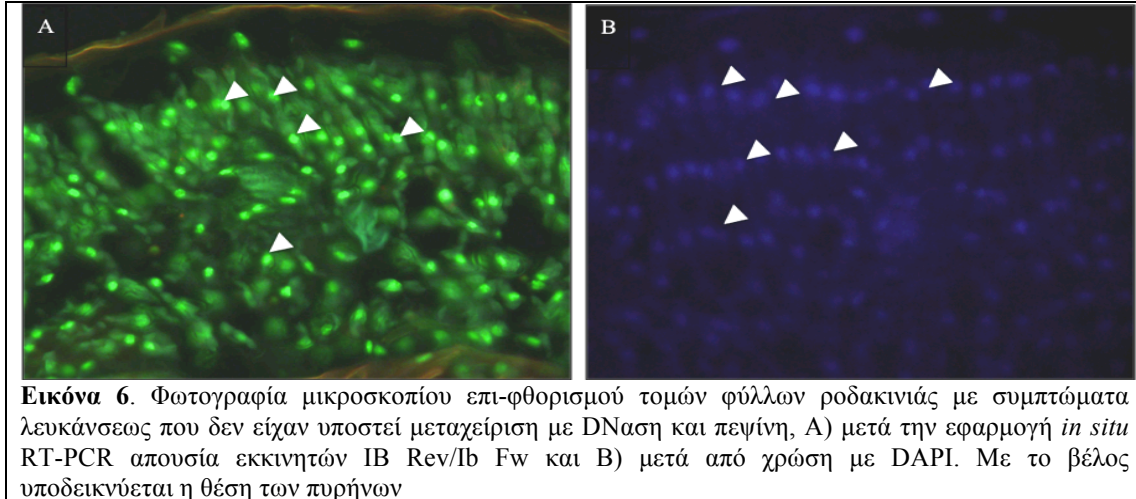
στο ότι τα κύτταρα αυτά περιέχουν χλωροπλάστες η ανάπτυξη των οποίων αναστέλλεται σε πρώιμο στάδιο λόγω της προσβολής από την παραλλαγή PC.



Αναλύοντας αρχικά ένα προς ένα τα στάδια της IS RT-PCR αναφέρουμε ότι, για την καθήλωση των ιστών επιλέχθηκε το διάλυμα 2% (ο/ο) φορμαλίνης (formalin), λόγω της ιδιότητας της να σταυρο-συνδέει (cross-link) τις αμινο-ομάδες (amino-groups) των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων δημιουργώντας ένα φυσικό φράγμα (barrier) που εμποδίζει την διάχυση αφ' ενός των συστατικών του κυττάρου και αφ' έτερου των προϊόντων της PCR που σε διαφορετική περίπτωση θα οδηγούσαν σε μη ειδικά αποτελέσματα (Johansen 1997, Nuovo 1996).

Όσον αφορά τη μεταχείριση των ιστών με DNAση I και πρωτεάση, διαπιστώθηκε ότι, στην περίπτωση του αρνητικού μάρτυρα που δεν περιείχε εκκινητές IB, παράλειψη από τη διαδικασία του σταδίου της DNAσης I οδήγησε στην εμφάνιση χαρακτηριστικών σημάτων πράσινου φθορισμού (Εικόνα 6A) που παραπέμπουν σε θέσεις πυρήνων. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στις εντομές (nicks) του γενωματικού DNA λόγω της μεταχειρίσεως με φορμόλη (formalin) (O' Leary *et al.*, 1996), οι οποίες από τη στιγμή που δεν έχουν τυφλά άκρα λειτουργούν ως θέσεις ενάρξεως (priming sites) δράσεως της *Taq* πολυμεράσης οδηγώντας έτσι στη σύνθεση μη ειδικών προϊόντων. Αυτό καθιστά την πέψη του γενωματικού DNA απολύτως απαραίτητη για τη μελέτη μας. Η επιβεβαίωση πως πρόκειται για θέσεις που αντιστοιχούν σε πυρήνες έγινε μετά από χρώση τομών με την χρωστική DAPI (δεσμεύεται ισχυρά στο DNA) (Εικόνα 6B). Το γεγονός ότι το παραπάνω αποτέλεσμα αφορούσε την περίπτωση που πέραν της DNAσης παραλείφθηκε και η μεταχείριση με πρωτεάση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το τρισδιάστατο δίκτυο που δημιουργήθηκε από τη δράση της φορμόλης, είναι πιθανότατα διαπερατό στα συστατικά της RT-PCR (O' Leary *et al.*, 1996). Παρ' όλα αυτά, κρίθηκε σκόπιμη και στην περίπτωσή μας, όπως συνηθίζεται άλλωστε, η εφαρμογή της μεταχειρίσεως με πρωτεάση, λόγω της σπουδαιότητας που έχει για την επιτυχία της μεθόδου η εξασφάλιση της διαπερατότητας του κυττάρου στα συστατικά της RT-PCR και στην

απαραίτητη για την πέψη του γενωματικού DNA DNAσης I (Johansen 1997, Nuono 1996, Pesquet *et al.*, 2004). Η διαπερατότητα των κυττάρων στην περίπτωση μας επιτεύχθηκε με μεταχείριση των τομών με την πρωτεάση πεψίνη (pepsin) αντί της πρωτεάσης K διότι η δεύτερη οδηγεί συνήθως σε υπερβολική πέψη των τομών (Nuono 1996).

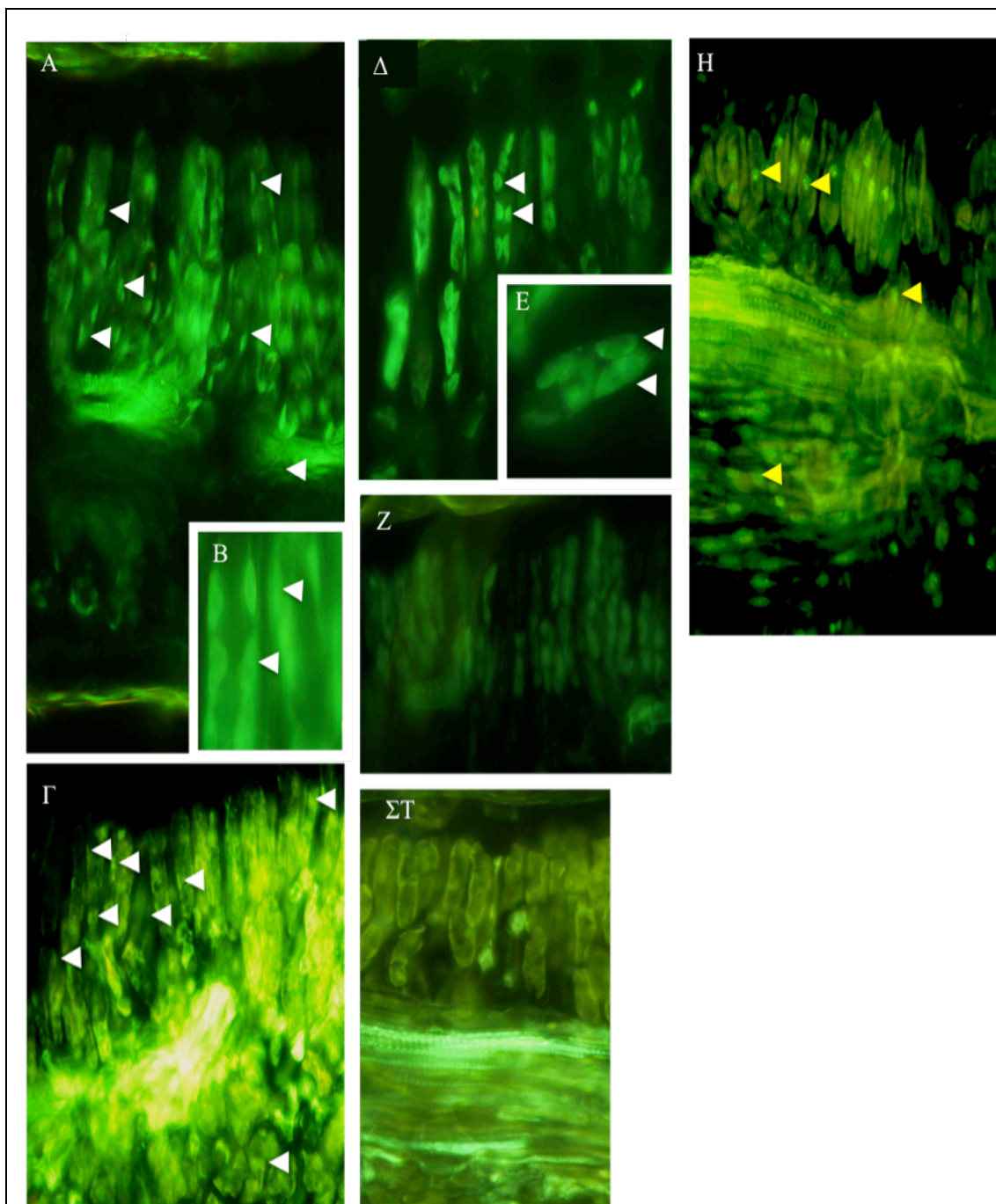


Εικόνα 6. Φωτογραφία μικροσκοπίου επι-φθορισμού τομών φύλλων ροδακινιάς με συμπτώματα λευκάνσεως που δεν είχαν υποστεί μεταχείριση με DNAση και πεψίνη, A) μετά την εφαρμογή *in situ* RT-PCR απουσία εκκινητών IB Rev/Ib Fw και B) μετά από χρώση με DAPI. Με το βέλος υποδεικνύεται η θέση των πυρήνων

Συχνά κατά την εφαρμογή πειραμάτων τύπου *in situ* (hybridization, PCR) η αιτία αρνητικών αποτελεσμάτων δεν είναι ξεκάθαρη, καθώς μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες. Το πιθανότερο αίτιο είναι συνήθως η απουσία του στόχου ή η παρουσία του σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, χωρίς να αποκλείεται η αποτυχία λόγω περιορισμένης προσβάσεως των συστατικών της RT-PCR (Pesquet *et al.*, 2004). Έτσι, κρίθηκε απαραίτητο να συμπεριληφθεί στα πειράματα της IS RT-PCR ένας θετικός μάρτυρας. Τον ρόλο αυτό κλήθηκε να παίξει ο γόνος *rbcL*, αφ' ενός διότι πρόκειται για ένα βασικό δομικό (λειτουργικό) γόνο των φυτικών κυττάρων και αφ' ετέρου λόγω της κοινής με το PLMVd θέσεως εντοπισμού της έκφρασής του εντός του φυτικού κυττάρου στους χλωροπλάστες (Johansen 1997, Bussiere *et al.*, 1999).

Η ενσωμάτωση χρωστικής *SYBR Green*, κατά τη διάρκεια της IS RT-PCR, στα προϊόντα συνθέσεως των εκκινητών IB-Rev/IB-Fw, για τον PLMVd, και *rbcL*-Rev/*rbcL*-Fw για τον γόνο *rbcL* οδήγησε στην καταγραφή σήματος έντονου πράσινου φθορισμού που εντοπίστηκε κυρίως στη περιοχή των κυττάρων του πασσαλώδους παρεγχύματος (Εικόνα 7A-E). Σε κυτταρικό επίπεδο το σήμα εντοπίστηκε στους χλωροπλάστες οι οποίοι διακρίνονται από τα λοιπά κυτταρικά οργανίδια λόγω του μεγέθους τους και του χαρακτηριστικού τους σχήματος (Pallardy 2008). Το παραπάνω αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα *in situ* υβριδισμού σχετικά με τη θέση εντοπισμού του PLMVd (Bussiere *et al.*, 1999, Rodio *et al.*, 2007). Στην περίπτωση των πράσινων ιστών καταγράφηκε φθορίζον σήμα που συνοδευόταν όμως από κιτρινο-πράσινο υπόβαθρο (Εικόνα 7Γ) που οφειλόταν πιθανότατα σε μικρής εκτάσεως αυτο-φθορισμό λόγω χλωροφύλλης (Gal *et al.*, 2006). Σε ορισμένες περιπτώσεις η ένταση του υποβάθρου ήταν αυξημένη λόγω υπερ-

εκθέσεως (over-exposure) της φωτογραφίας.



Εικόνα 7. Φωτογραφίες μικροσκοπίας επι-φθορισμού τομών φύλλων ροδακινιάς μετά την εφαρμογή *in situ* RT-PCR για τον εντοπισμό του γόνου *rbcL* (Α, Β) και του PLMVd (Γ-Ε, ΣΤ). Α, Β: ο γόνος *rbcL* εντοπίστηκε στους χλωροπλάστες μολυσμένου φύλλου ροδακινιάς με συμπτώματα λευκάνσεως, Γ: το PLMVd εντοπίστηκε στους χλωροπλάστες πράσινου φύλλου ροδακινιάς, Δ, Ε: το PLMVd εντοπίστηκε στους χλωροπλάστες φύλλου ροδακινιάς GF-305 με συμπτώματα λευκάνσεως, Ζ: αρνητικός μάρτυρας (απουσία εκκινητών IB), η τομή προέρχεται από φύλλο ροδακινιάς GF-305 μολυσμένο με την παραλλαγή PC του PLMVd, ΣΤ: αρνητικός μάρτυρας, η τομή προέρχεται από υγιές φύλλο ροδακινιάς GF-305, Η: αρνητικός μάρτυρας (απουσία εκκινητών IB), η τομή προέρχεται από πράσινο φύλλο ροδακινιάς μολυσμένο με το PLMVd. Τα λευκά βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις χλωροπλαστών, ενώ τα κίτρινα θέσεις πυρήνων. Η μεγέθυνση των φωτογραφιών Α, Γ, Δ, Ζ-Η είναι 20 x, ενώ των Β, Ε είναι 100 x.

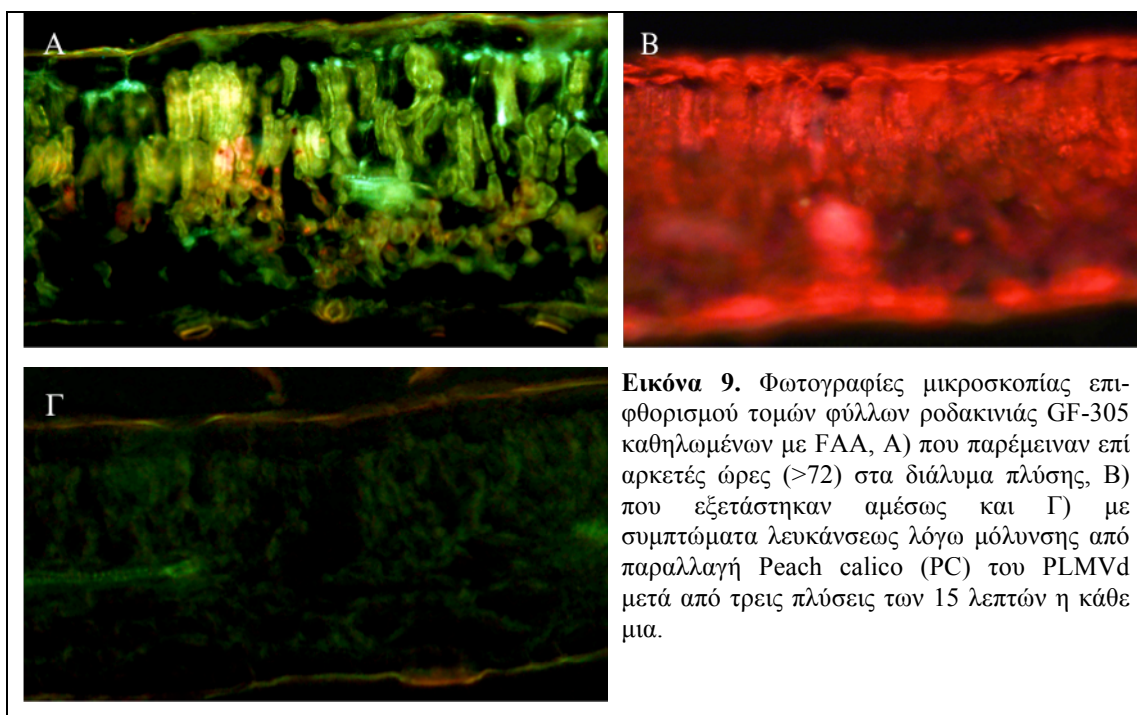
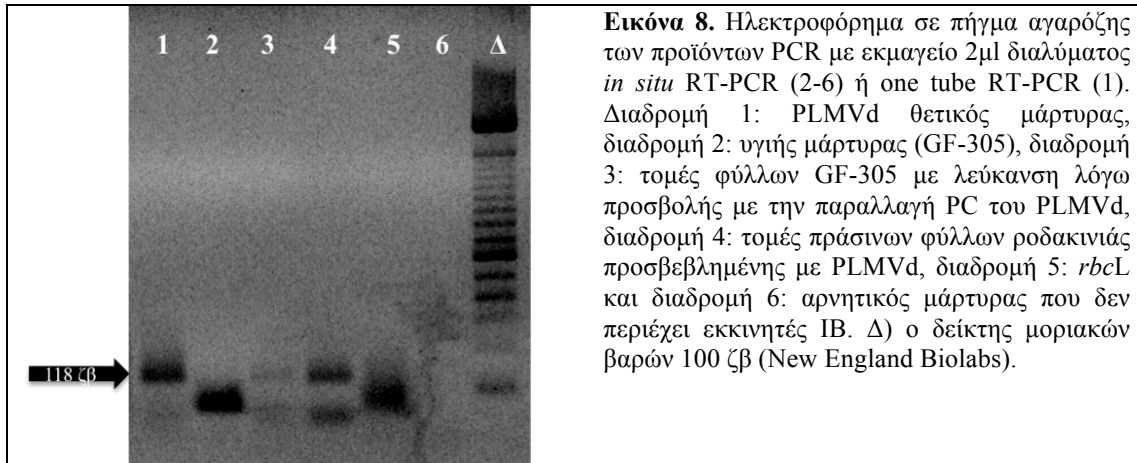
Αντίθετα, στην περίπτωση ιστών με λεύκανση (απουσία χλωροφύλλης) δεν καταγράφηκαν προβλήματα έστω και μειωμένης εντάσεως, όπως στην παραπάνω περίπτωση και η παρουσία του PLMVd στους χλωροπλάστες ήταν σαφής (Εικόνα 7Δ-Ε).

Όσον αφορά τους αρνητικούς μάρτυρες που περιείχαν i) τομές φύλλων ροδακινιάς GF-305 με συμπτώματα λευκάνσεως στις οποίες δεν είχε προστεθεί το ζεύγος εκκινητών IB (Εικόνα 7Ζ) και ii) τομές πράσινων φύλλων από υγιή φυτά GF-305 με εκκινητές IB (Εικόνα 7ΣΤ), δεν καταγράφηκε σε καμία περίπτωση φθορίζον σήμα. Εξαίρεση αποτέλεσε μία και μοναδική περίπτωση αρνητικού μάρτυρα που περιείχε τομές πράσινων φύλλων μολυσμένων με το PLMVd χωρίς την παρουσία εκκινητών, στην οποία διαπιστώθηκε η παρουσία φθορίζοντος σήματος σε θέσεις που αντιστοιχούν σε πυρήνες. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν μεμονωμένο και πιθανότατα συνδέεται με ανεπαρκή πέψη του γενοματικού DNA από την DNAση I.

Στην Εικόνα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR με εκμαγείο 2 μl του διαλύματος αντιδράσεως της IS RT-PCR. Με βάση αυτά (διαδρομές 3, 4) επιβεβαιώνονται τα θετικά αποτελέσματα της IS RT-PCR σχετικά με τον εντοπισμό στους ιστούς των PLMVd-PC και PLMVd. Το παραπάνω αποτέλεσμα σχετίζεται πιθανότατα με την υπερβολική πέψη των ιστών αυτών με πεψίνη ή την ανεπαρκή καθήλωση αυτών που οδήγησε στη δημιουργία ημιτελούς φράγματος με αποτέλεσμα την διάχυση των προϊόντων της RT-PCR στο διάλυμα της αντιδράσεως, κάτι το οποίο δεν φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση του *rbcL*. Το αποτέλεσμα αυτό, δεδομένου ότι όλοι οι ιστοί είχαν υποστεί τις ίδιες μεταχειρίσεις, αποδίδεται πιθανότατα στην αδυναμία του προϊόντος της IS RT-PCR να περάσει από τους πόρους του φράγματος λόγω μεγέθους (360 ζβ, τρεις φορές μεγαλύτερο από εκείνο του PLMVd [118 ζβ]).

Σχετικά με τους πράσινους ιστούς που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της IS RT-PCR, παρατηρήθηκε ότι ιστοί ροδακινιάς που παρέμειναν επί αρκετές ώρες (>72) στο διάλυμα πλύσεως παρουσίασαν σημαντικά μικρότερης εντάσεως αυτο-φθορισμό (Εικόνα 9Α) λόγω χλωροφύλλης, σε σχέση με τους ιστούς που εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα πλύσεως τρεις φορές επί 15 λεπτά η κάθε μια (Εικόνα 9Β). Το γεγονός αυτό συνδέεται με την υψηλή περιεκτικότητα (65% [o/o]) του διαλύματος πλύσεως σε αιθανόλη στην οποία είναι ευδιάλυτη η χλωροφύλλη, με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή της από τους ιστούς με το διάλυμα πλύσεως. Η παραπάνω παρατήρηση αξιοποιήθηκε καθιστώντας δυνατή την χρήση και πράσινων ιστών για τον εντοπισμό του PLMVd με το σύστημα *SYBR Green* IS RT-PCR, χωρίς να υπάρχει σημαντικό πρόβλημα λόγω αυτο-φθορισμού (Εικόνα 7Γ). Αντίθετα με τους πράσινους ιστούς δεν παρατηρήθηκε ούτε ίχνος αυτο-φθορισμού στην περίπτωση τομών φύλλων με συμπτώματα λευκάνσεως (Εικόνα 9Γ). Επίσης, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεριστωματικούς ιστούς για την επιβεβαίωση ή όχι των αποτελεσμάτων των Rodio *et al.*, (2007) σχετικά με την παρουσία του PLMVd στα

κορυφαία στρώματα κυττάρων του ακραίου μεριστώματος, χωρίς προβλήματα αυτοφθορισμού, λόγω της πολύ μικρής συγκεντρώσεως αυτού σε χλωροφύλλη (Albrechtova *et al.*, 2001).



5. Συμπεράσματα – προοπτικές

Στο παρόν κεφάλαιο κατέστη δυνατή με επιτυχία η εφαρμογή της τεχνικής liquid phase IS RT-PCR για την ανίχνευση του PLMVd και της παραλλαγής του PC σε ιστούς φύλλων ροδακινιάς. Η τεχνική αυτή, η οποία εφαρμόστηκε εδώ για πρώτη φορά διεθνώς στην ανίχνευση φυτοπαθογόνου οργανισμού, προσφέρει ταχύτητα, με τον καθαρό χρόνο για την εφαρμογή της να υπολογίζεται στα 180 λεπτά, μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τον υβριδισμό *in situ*, οικονομικότητα λόγω της δυνατότητας που προσφέρει να μην είναι

αναγκαία η χρήση εξειδικευμένου θερμοκυκλοποιτή και δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού σε πραγματικό χρόνο (real time) της συγκεντρώσεως του στόχου αξιοποιώντας τη χρήση του *SYBR Green*. Τέλος, η τεχνική αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό και τη μελέτη της μετακινήσεως άλλων ιοειδών αλλά και ιών στα φυτά-ξενιστές και τους φορείς τους. Η μελέτη αυτή έγινε πρόσφατα δεκτή για δημοσίευση στο περιοδικό *Plant Pathology* με τίτλο: Cellular localization of *Peach latent mosaic viroid* in peach sections by liquid phase *in situ* RT-PCR.

ΜΕΡΟΣ Ε

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα 30 και πλέον ιοειδή που έχουν μέχρι σήμερα καταγραφεί διεθνώς, στα μηλοειδή και τα πυρηνόκαρπα ξεχωριστή θέση κατέχουν λόγω της φυτοπαθολογικής τους σημασίας το ιοειδές της εσχαρώσεως του φλοιού του μήλου (*Apple scar skin viroid*, ASSVd), το ιοειδές του εξανθηματικού έλκους της απιδιάς (*Pear blister cancer viroid*, PBCVd) και το ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd). Η παρουσία των παραπάνω ιοειδών σχετίζεται συχνά με την υποβάθμιση της ποιότητας (σχισμές, ρωγμές, παραμόρφωση κ.τ.λ.) και τη μείωση της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων, καθώς και με την εξασθένηση, πρόωρη γήρανση ακόμη και θάνατο των προσβεβλημένων δένδρων, με συνέπεια σημαντικές απώλειες (Randles 2003). Από την ανακάλυψη των παραπάνω ιοειδών, οι μοναδικές πληροφορίες που αφορούν την παρουσία τους στη χώρα μας προέρχονται από τους Kyriakopoulou and Hadidi (1997) και Kyriakopoulou *et al.*, (1998, 2001) και σχετίζονται με την παρουσία των ιοειδών αυτών στην άγρια (*P. amygdaliformis* Vill.) και καλλιεργούμενη απιδιά.

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά έγινε μια επισκόπηση για την παρουσία των παραπάνω ιοειδών στη χώρα μας και στη συνέχεια αντικείμενό της αποτέλεσε το PLMVd λόγω της μεγάλης του σημασίας. Η παρουσία τους στην Ελλάδα επιβεβαιώθηκε και παράλληλα καταγράφηκε σε νέες περιοχές της Βόρειας, Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας, καθώς και σε νέα είδη, κάποια από τα οποία αναφέρονται ως ξενιστές των ιοειδών αυτών για πρώτη φορά διεθνώς.

Το σύμπτωμα της εσχαρώσεως του φλοιού των καρπών συνδέθηκε με την παρουσία του ASSVd τόσο διότι αποτελεί κλασικό σύμπτωμα στη μηλιά, όσο και διότι το ιοειδές ανιχνεύθηκε σε όλα τα συμπτωματικά δείγματα μηλοειδών. Το ιοειδές αυτό ανιχνεύθηκε σε Αρκαδία, Κορινθία, Κιλκίς, Μαγνησία και Τροιζηνία, σε απιδιές και άγριες απιδιές, είδη στα οποία η παρουσία του είχε διαπιστωθεί και στο παρελθόν (Kyriakopoulou *et al.*, 1997, 2001), καθώς και σε μηλιές και άγριες μηλιές (*M. sylvestris*) που αναφέρονται για πρώτη φορά ως ξενιστές του ιοειδούς αυτού στην Ελλάδα και διεθνώς αντίστοιχα. Η παρουσία του ASSVd αλλά και του PBCVd σε αυτοφυή είδη (*M. sylvestris*, *P. amygdaliformis*, *Crataegus* sp.) σε ορεινές και απομακρυσμένες περιοχές μακριά από την ανθρώπινη επίδραση αποτελεί ένδειξη ότι τα ιοειδή αυτά είναι γηγενή στη χώρα μας και ότι συνυπάρχουν με τα άγρια είδη Rosaceae επί μακρόν, ίσως επί χιλιετίες.

Ιδιαίτερα υψηλή ήταν η συχνότητα παρουσίας του PBCVd σε φυτά καλλιεργούμενης και άγριας απιδιάς με χαρακτηριστικά συμπτώματα εξανθηματικών ελκών στο φλοιό του κορμού και των βραχίωνων, ενώ ανιχνεύθηκε επίσης στην κυδωνιά και τον κράταιγο, στον οποίο η παρουσία του PBCVd μέχρι σήμερα είχε καταγραφεί μόνο πειραματικά (Desvignes *et al.*, 1999). Η παρουσία του PBCVd στην απιδιά αλλά και την κυδωνιά και η εξάπλωσή του στην Ελλάδα σχετίζεται με τη παρουσία του στην άγρια απιδιά η οποία απαντάται συχνά σε

ορεινές και ημιορεινές περιοχές της χώρας και η οποία επί αιώνες αποτελούσε το υποκείμενο ποικιλιών απιδιάς πριν αντικατασταθεί πρόσφατα από άλλα είδη μεταξύ των οποίων και η κυδωνιά (Kyriakopoulou *et al.*, 2001).

Όσον αφορά το PLMVd, όπως αναφέρεται στο Β μέρος της διατριβής αυτής, αρχικά επιβεβαιώθηκαν οι αναφορές του στην άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά (Kyriakopoulou and Hadidi 1997, Kyriakopoulou *et al.*, 2001, Fekih-Hassen *et al.*, 2006), ενώ για πρώτη φορά καταγράφηκαν ως ξενιστές του στην Ελλάδα η βερικοκιά και η ροδακινιά, η δεύτερη μάλιστα σε ποσοστό 66% των εξετασθέντων δειγμάτων (ροδακινιάς). Η μεγάλη οικονομική σημασία του PLMVd καθώς και του βασικού του ξενιστή, της ροδακινιάς, το εύρος ξενιστών του, η παγκόσμια εξάπλωσή του και τα ιδιαίτερα μοριακά του χαρακτηριστικά ώθησαν στο να αποτελέσει το PLMVd το βασικό αντικείμενο της παρούσας διατριβής. Η εξέταση δειγμάτων συνεχίστηκε και η παρουσία του PLMVd καταγράφηκε σε νέες, κατ' εξοχή ροδακινοπαραγωγικές περιοχές, όπως η Ημαθία, η Κοζάνη, η Λάρισα και η Πέλλα.

Η συχνότητα παρουσίας του PLMVd στη ροδακινιά βρέθηκε ιδιαίτερα υψηλή (>75 %), ενώ στην περίπτωση ορισμένων πρώιμων επιτραπέζιων ποικιλιών όπως η May Crest και η Spring Crest βρέθηκε ανώτερη του 85 %. Πολύ υψηλή συσχέτιση καταγράφηκε και στην παρούσα μελέτη μεταξύ της παρουσίας του ιοειδούς και του συμπτώματος των σχισμών στη ραφή καρπών ροδακινιάς, σε βαθμό που θα μπορούσε να θεωρείται πλέον παθογνωμονικό σύμπτωμα. Η ευρεία διάδοση του PLMVd στους οπωρώνες ροδακινιάς αποδόθηκε θεωρητικά, εν μέρει, στην ικανότητα μεταδόσεώς του με τα εργαλεία κοπής (κλαδευτικά ψαλίδια) (Hadidi *et al.*, 1997) και σε κάποιο βαθμό στη μετάδοσή του μέσω των πιθανών του φορέων, των αφίδων *M. persicae* (Desvignes 1986, Flores *et al.*, 1992, Giunchedy *et al.*, 1998). Διαπιστώθηκε, όμως, πως η συχνότατη παρουσία του PLMVd στους ελληνικούς ροδακινεώνες συνδέεται άρρηκτα με έναν βασικό παράγοντα, το πολλαπλασιαστικό υλικό. Καμία από τις 29 ποικιλίες ροδακινιάς-νεκταρινιάς που ελέγχθηκαν δεν βρέθηκε ελεύθερη του ιοειδούς, αντίθετα, περισσότερο από το 50 % των δενδρυλλίων ενός έτους που εξετάστηκαν βρέθηκαν μολυσμένα, με το ποσοστό να φτάνει το 86 % ή ακόμη και το 100 %, όπως στις ποικιλίες A37 και Spring Bell (φυτώριο 1^ο, 2009), αντίστοιχα. Η κατάσταση αποδείχθηκε ακόμη πιο τραγική στην περίπτωση των μητρικών δένδρων, όπου από τα 358 που εξετάστηκαν συνολικά το 85% βρέθηκε μολυσμένο. Έτσι, γίνεται καταφανής η ανάγκη άμεσης εξυγιάνσεως του πολλαπλασιαστικού υλικού ροδακινιάς/νεκταρινιάς και παράλληλα ενημερώσεως των παραγωγών για τη σημασία χρησιμοποίησεως υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού.

Με τη βοήθεια της RT-PCR πραγματικού χρόνου καταγράφηκε αύξηση της συγκεντρώσεως του ιοειδικού φορτίου στη ροδακινιά στο τέλος της ανοίξεως και τον Ιούνιο, περίοδο που οι αυξημένες θερμοκρασίες ευνοούν το πολλαπλασιασμό του ιοειδούς, όπως είναι άλλωστε αναμενόμενο λαμβανομένου υπ' όψη ότι τα ιοειδή είναι θερμοφιλά.

Με σκοπό την επιβεβαίωση, σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, της παρουσίας του PLMVd στη ροδακινιά και άλλα Rosaceae, και τον μοριακό χαρακτηρισμό των παραλλαγών των ελληνικών απομονώσεων του, προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία 66 κλώνων του PLMVd, από τους οποίους οι 62 αποτέλεσαν νέες παραλλαγές. Το μέγεθος του γενώματος αυτών κυμάνθηκε μεταξύ 337 και 340 nt. Επισημαίνεται πως σε πολλές περιπτώσεις κλώνοι της ίδιας απομονώσεως διέφεραν ως προς το μέγεθος του γενώματος υποδεικνύοντας για ακόμη μια φορά πως η παραλλακτικότητα ως προς το μέγεθος και όχι η διατήρηση ενός συγκεκριμένου μεγέθους γενώματος αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του PLMVd (Ambros *et al.*, 1998, Fekih-Hassen *et al.*, 2007, Mandic *et al.*, 2008, Gazel *et al.*, 2008).

Το ποσοστό ομολογίας μεταξύ των ελληνικών παραλλαγών κυμάνθηκε από 100 έως 87.98 %. Η γενετική παραλλακτικότητα που καταγράφηκε μεταξύ κλώνων των ίδιων απομονώσεων, ανεξάρτητα από το είδος της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε (διορθωτικής αναγνώσεως ή μη), συμφωνεί με τα αποτελέσματα πρότερων μελετών (Ambros *et al.*, 1998, Pelchat *et al.*, 2000, Fekih-Hassen *et al.*, 2007, Mandic *et al.*, 2008, Gazel *et al.*, 2008) και σε συνδυασμό με αυτές επιβεβαιώνει την υιοθέτηση του μοντέλου ‘σχεδόν είδος’ (quasi species) (Eigen 1993) για το PLMVd.

Σε αρκετές περιπτώσεις υψηλό ποσοστό ομολογίας καταγράφηκε μεταξύ παραλλαγών που προήλθαν από διαφορετικές ποικιλίες ροδακινιάς και διαφορετικές περιοχές της χώρας, ενώ πολύ χαμηλά ποσοστά καταγράφηκαν μεταξύ παραλλαγών που προήλθαν από την ίδια ποικιλία και τον ίδιο οπωρώνα, υποδηλώνοντας ότι πιθανότατα δεν υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού ομολογίας ή του βαθμού συγγένειας των παραλλαγών με τη ποικιλία, το φυτικό είδος και τη γεωγραφική τους προέλευση.

Φυλογενετική ανάλυση με βάση τη γενετική απόσταση (UPGMA, Minimum Evolution) και τους διακριτούς χαρακτήρες (Maximum Parsimony) κατέταξε το σύνολο των ελληνικών παραλλαγών του PLMVd στην ομάδα III κατά Ambros (Ambros *et al.*, 1998). Παρόμοιο ήταν το αποτέλεσμα των φυλογενετικών αναλύσεων των πρόσφατα αποκτηθεισών παραλλαγών του PLMVd δύο γειτονικών μας χωρών, της Σερβίας (Mandic *et al.*, 2008) και της Τουρκίας (Gazel *et al.*, 2008), υποδεικνύοντας πιθανή κοινή προέλευση των παραλλαγών αυτών με τις ελληνικές.

Η διαμόρφωση των παραλλαγών του μορίου του PLMVd ήταν διακλαδωτή (branched conformation), πλησιάζοντας εκείνη της πρότυπης παραλλαγής M835451 (Hernandez and Flores 1992), διατηρώντας στις περισσότερες περιπτώσεις έναν βασικό πυρήνα τον οποίο αποτελούσαν πέραν του σφυροκέφαλου βραχίονα (hammerhead arm), οι κορμοί (stems) P1, P7, P9 και P10. Οι περισσότερες πολυμορφικές θέσεις εντοπίστηκαν στις περιοχές που εμπλέκονται στο σχηματισμό των θετικής και αρνητικής πολικότητας

σφυροκέφαλων δομών και ειδικότερα στις μονονηματιδιακές περιοχές των θηλειών (loops) A και B καθώς και στο βραχίονα *Pst* I (*Pst* I arm).

Παρόλο τον μεγάλο αριθμό αλλαγών στη περιοχή του σφυροκέφαλου βραχίονα, η διαμόρφωση ραβδίου του βραχίονα αυτού διατηρήθηκε και διακρίθηκε σε τρεις τύπους. Στην περίπτωση μάλιστα των παραλλαγών PLSCrest9.2A, 9.2B, PLRedGold8.3 και 8.4 που ανήκαν στον διακλαδωτό τύπο σφυροκέφαλου βραχίονα, αναφέρθηκε για πρώτη φορά διεθνώς η απουσία της θηλειάς A. Διαπιστώθηκε επίσης διατήρηση των σφυροκέφαλων δομών στις αλυσίδες και των δυο πολικιοτήτων, ακόμη και στην περίπτωση μεταλλάξεων, αντικατροπτίζοντας το σπουδαίο τους ρόλο στην αναπαραγωγή του ιοειδούς μέσω της διαδικασίας αυτο-σχάσεως (self-cleavage) που καταλύουν. Βέβαια, η επίδραση των μεταλλάξεων εντός των συντηρημένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των σφυροκέφαλων δομών είναι άγνωστη, διότι η πρόβλεψή τους απαιτεί την εφαρμογή δοκιμών αυτο-σχάσεως (self-cleavage assays) καθώς και βιοδοκιμών. Τέλος, οι πλούσιες σε GC περιοχές $_{178}GGCG_{183}$ και $_{213}CCGC_{216}$ οι οποίες εμπλέκονται στο σχηματισμό του ψευδοδεσμού (pseudo-knot) P8, με εξαίρεση την παραλλαγή PLpear29.5, ήσαν συνηρημένες στο σύνολο των ελληνικών παραλλαγών υποδηλώνοντας τη σπουδαιότητα του ψευδοδεσμού για τη διατήρηση της χαρακτηριστικής διακλαδισμένης διαμορφώσεως του PLMVd. Η διαμόρφωση αυτή μαζί με τον σφυροκέφαλο σχηματισμό που λειτουργεί ως ριβοένζυμο απαραίτητο κατά τον πολλαπλασιασμό του συμβάλλουν στην εξισορρόπηση της υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας του PLMVd (Pelchat *et al.*, 2000).

Με τη συνδυασμένη χρήση της RT-PCR, του υβριδισμού (hybridization) στυπώματος κηλίδας RNA (dot blot RNA) και Southern blot και της d-DAGE, επιβεβαιώθηκε η παρουσία του PLMVd στην άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά και καταγράφηκε, για πρώτη φορά στην Ελλάδα, στη βερικοκιά, στη δαμασκηλιά, στην κερασιά και στην κυδωνιά. Η κυδωνιά μάλιστα, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα είδη, καταγράφηκε για πρώτη φορά διεθνώς ως φυσικός ξενιστής του PLMVd. Παράλληλα η παρουσία του PLMVd στη βερικοκιά, τη δαμασκηλιά, την άγρια και καλλιεργούμενη απιδιά και την κυδωνιά επιβεβαιώθηκε μέσω της real time RT-PCR. Τα αποτελέσματα της real time RT-PCR υποδεικνύουν ότι πιθανότατα η περιστασιακή ανίχνευση του ιοειδούς στα είδη αυτά, έτσι όπως καταγράφεται μέσα από τη διεθνή βιβλιογραφία, σχετίζεται με την πολύ χαμηλή συγκέντρωση του ιοειδούς στα είδη αυτά σε σύγκριση με τη ροδακινιά. Κάτι ανάλογο, άλλωστε υποδεικνύει και το χαμηλής εντάσεως σήμα της RT-PCR, του μοριακού υβριδισμού και των άλλων μεθόδων που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση του PLMVd. Η παρουσία βέβαια του PLMVd στα παραπάνω είδη επικυρώθηκε τέλος με τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η φυλογενετική ανάλυση μάλιστα του συνόλου των παραλλαγών του PLMVd που αποκτήθηκαν στην παρούσα διατριβή έδειξε πως οι παραλλαγές που δεν προήλθαν από ροδακινιές αλλά από άλλα είδη Rosaceae (non peach)

συναθροίζονται σε κοινή ομάδα. Έτσι έγινε ένα σημαντικό βήμα για την κατανόηση του εύρους των φυσικών ξενιστών του PLMVd. Είναι πλέον δεδομένο ότι στην ομάδα των φυσικών ξενιστών του ιοειδούς αυτού πέραν της ροδακινιάς η οποία επί μακρόν εθεωρείτο επιμόνως από κάποιους ερευνητές ως ο μοναδικός φυσικός ξενιστής, ανήκουν και άλλα Rosaceae, τόσο πυρηνόκαρπα (βερικοκιά, δαμασκηνιά, κερασιά) όσο και μηλοειδή (απιδιά, άγρια απιδιά, κυδωνιά). Παράλληλα, γίνεται σαφές πως πλέον είναι καιρός για τη χώρα μας, καθώς και για τις άλλες ευρωπαϊκές χώρες, να συμπεριλάβουν το PLMVd στα συστήματα πιστοποίησης και άλλων πυρηνοκάρπων πέραν της ροδακινιάς καθώς και των μηλοειδών απιδιάς και κυδωνιάς, διότι αναμφισβήτητα τα είδη αυτά μπορεί να λειτουργούν ως πηγές μόλυνσεως για τον βασικό ξενιστή, τη ροδακινιά, η οποία βέβαια υφίσταται και τις μεγαλύτερες ζημιές.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής υιοθετήθηκαν, προσαρμόστηκαν και εφαρμόστηκαν στη διάγνωση του PLMVd νέες και πρωτοποριακές τεχνικές. Η μέθοδος RT-LAMP, σύμφωνα με τα ευρήματα που αναφέρονται στο αντίστοιχο κεφαλαίο, αποτελεί την ιδανική υποψήφια διαγνωστική μέθοδο για το σύστημα πιστοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού, καθώς φέρει πολλά από τα χαρακτηριστικά εκείνα που καθιστούν μια μέθοδο κατάλληλη για έναν τέτοιο σκοπό, όπως η ευαισθησία, η εξειδίκευση, η αξιοπιστία, η αποτελεσματικότητα, η ταχύτητα, η πρακτικότητα και η οικονομικότητα. Με το σχεδιασμό και την επιλογή της κατάλληλης ομάδας εκκινητών (F3, B3, FIP, BIP, LoopF, LoopB) να αποτελεί τη βασική πρόκληση, η εφαρμογή της RT-LAMP οδήγησε στην ανίχνευση του PLMVd σε μόλις 30 λεπτά, με ευαισθησία 100 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της RT-PCR. Επίσης, η ικανότητα της RT-LAMP να πραγματοποιείται απλά με τη χρήση μιας θερμοαντικτικής πλάκας, με εκμαγείο ίχνος μόνο φυτικού ιστού, καθώς και η εύκολη καταγραφή των αποτελεσμάτων με οπτική παρατήρηση της θολότητας ή την χρήση φθορίζουσών χρωστικών, οδήγησε στην εφαρμογή της τεχνικής αυτής στον αγρό, όπου το PLMVd ανιχνεύθηκε με επιτυχία στη ροδακινιά, βερικοκιά, δαμασκηνιά και απιδιά. Η RT-LAMP μπορεί συνεπώς να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του PLMVd στο πολλαπλασιαστικό υλικό στα φυτώρια και σε ύποπτα δένδρα σε οπωρώνες, εύκολα, γρήγορα, αποτελεσματικά και οικονομικά, συμβάλλοντας έτσι στον περιορισμό της διαδόσεως και μεταδόσεως του ιοειδούς και ως εκ τούτου στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή του.

Για την αντιμετώπιση του PLMVd, η εξυγίανση του πολλαπλασιαστικού υλικού αποτελεί βασική προϋπόθεση. Από τις μεθόδους που έχουν εφαρμοστεί, η τεχνική του *in vitro* εμβολιασμού ακραίου μεριστώματος (shoot tip apex) (Barba *et al.*, 1995) εξαρτάται από το μέγεθος του ακραίου μεριστώματος. Αυτό συνδέθηκε με τα ευρήματα των Rodio *et al.*, (2007), σύμφωνα με τα οποία το PLMVd εντοπίζεται ακόμη και στο ακραίο μερίστωμα συμπεριλαμβανομένων των πρώτων φυλλικών καταβολών (leaf primordia). Εξαιρέση αποτέλεσαν ορισμένα στρώματα κυττάρων στην κορυφή του ακραίου μεριστώματος, τα

οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή υγιών φυτών, αφού προηγουμένως χρησιμοποιηθεί μια διαγνωστική τεχνική περισσότερο ευαίσθητη από τον *in situ* υβριδισμό (Rodio *et al.*, 2007). Η *in situ* RT-PCR προσφέρει τη δυνατότητα αυτή, αλλά με την μορφή που εφαρμόζεται σήμερα στην φυτοπαθολογία επί αντικειμενοφόρου (on slide), είναι επίπονη, χρονοβόρα και υψηλού κόστους. Λύση φαίνεται να αποτελεί η παραλλαγή της *in situ* RT-PCR (IS RT-PCR) που πραγματοποιείται σε υγρή φάση (διάλυμα RT-PCR) εντός μικροσωλήνων, με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green* αντί της διγοξιγενίνης (digoxigenin). Η μέθοδος *SYBR Green liquid phase IS RT-PCR* φάνηκε πως αποδίδει ικανοποιητικά σε μολυσμένα με το PLMVd φύλλα ροδακινιάς, καθώς σήμα έντονου πράσινου φθορισμού καταγράφηκε στην περιοχή των κυττάρων του πασσαλώδους παρεγχύματος και υποκυτταρικά στους χλωροπλάστες, τα οργανίδια όπου ως γνωστόν το PLMVd πολλαπλασιάζεται και συσσωρεύεται. Αυτό που υπολείπεται πλέον είναι η εφαρμογή της μεθόδου στην περιοχή του ακραίου μεριστώματος. Η τεχνική *SYBR Green liquid phase IS RT-PCR*, η οποία εφαρμόστηκε εδώ για πρώτη φορά διεθνώς στην ανίχνευση φυτοπαθογόνου οργανισμού, προσφέρει ταχύτητα, με τον καθαρό χρόνο για την εφαρμογή της να υπολογίζεται στα 180 λεπτά, μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τον *in situ* υβριδισμό, οικονομικότητα λόγω της δυνατότητας που προσφέρει να μην είναι αναγκαία η χρήση εξειδικευμένων θερμοκυκλοποιητών και δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού σε πραγματικό χρόνο (real time) της συγκεντρώσεως του στόχου αξιοποιώντας τη χρήση του *SYBR Green*.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Βαρδαβάκης Ε., 1993. Συστηματική Βοτανική, τόμος Ι (έκδοση 4^η). Εκδόσεις Σαλονικίδης, Θεσσαλονίκη σελ. 810.
- Εθνική Στατιστική Υπηρεσία της Ελλάδας (ΕΣΥΕ), 2008. Συνοπτική στατιστική επετηρίδα της Ελλάδος 2007. Υπουργείο Οικονομίας και Οικονομικών – Γενική Γραμματεία Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας της Ελλάδας, Πειραιάς, σελ. 311.
- Καπώνη Μ., 2009. Ιοειδή μηλοειδών και πυρηνοκάρπων στην Ελλάδα. Διδακτορική Διατριβή Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, σελ. 239.
- Κυριακοπούλου Π.Η., 1991. Ιοειδή. Δελτίο ΕΦΕ 2 (4): 91-164.
- Τσιπουρίδης Κ., 2009. Φυλλοβόλα οπωροφόρα στην Ελλάδα και προοπτικές για το μέλλον. 24^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, Βέροια, 20+23 Οκτωβρίου 2009. Περιλήψεις σελ. 60.
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Γραφείο Γενικού Γραμματέα, 9/2007. Προοπτικές Τομέα Οπωροφόρων (Με βάση προτάσεις και συμπεράσματα περιφερειακών μελετών νέας ΚΑΠ). Ελληνική Δημοκρατία, σελ. 33.

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Choueiri E., 2003. Presence of *Peach latent mosaic* and *Hop stunt viroid* in Lebanon. In: Options Méditerranéennes Number 45, Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region (Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V., Eds). CIHEAM, Valenzano (IT), pp. 139-141.
- Agrios G. N., 2005. Plant Pathology. 5th edition, Academic Press, CA, USA, pp. 990.
- Afechtal M., Lolic B., Zammar S., Matic S., Attard D., Myrta A., Di Serio F., 2007. Identification and characterization of *Pear blister canker viroid* in Malta and in Bosnia AND Herzegovina. Journal of Plant Pathology 89: S27.
- Albrechtova J. T. P., Metzger C. S., Wagner E., 2001. pH-patterning at the shoot apical meristem as related to time of day during different light treatments. Plant Physiology and Biochemistry 39: 115-120.
- Allen R. N., Palukaitis P., Symons R. H., 1981. Purified *Avocado Sunblotch Viroid* Causes Disease in Avocado Seedlings. Australasian Plant Pathology 10 (2): 31-32.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.
- Ambrós S., Desvignes J.C., Llácer G., Flores R., 1995. *Pear blister canker viroid*: sequence variability and causal role in pear blister canker disease. Journal of General Virology 76: 2625-2629.
- Ambros S., Flores R., 1998. *In vitro* and *in vivo* self-cleavage of a viroid RNA with a mutation in the hammerhead catalytic pocket. Nucleic Acids Research 26: 1877-1883.
- Ambros S., Hernandez C., Desvignes J.C., Flores R., 1998. Genomic structure of three phenotypically different isolates of *Peach latent mosaic viroid*: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi-species. Journal of Virology 72: 7397-7406.
- Ambros S., Hernandez C., Flores R., 1999. Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies

- from individual cDNA clones of *Peach latent mosaic viroid* in its natural host. *Journal of General Virology* 80: 2239-2252.
- Astruc N., Marcos J. F., Macquaire G., Candresse T., Pallas V., 1996. Studies on the diagnosis of *Hop stunt viroid* in fruit trees: Identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *European Journal of Plant Pathology* 102: 837–846.
- Avogadro, A., 1811. Essai d'une manière de déterminer les masses relatives des molécules élémentaires des corps, et les proportions s'élon lesquelles elles entrent dans ces combinaisons. *Journal of Physics* 73: 58.
- Barba M., Cupidi A., Loreti S., Faggioli F., Martino L., 1995. In vitro micrografting: A technique to eliminate Peach latent mosaic viroid from peach. *Acta Horticulturae* 386: 531–535.
- Barba M., Ragozzino E., Faggioli F., 2007. Pollen transmission of *Peach latent mosaic viroid*. *Journal. Plant Pathology* 89: 287-289.
- Barba M., Regozzino E., Navarro L., 2003 Viroid elimination by thermotherapy and tissue culture In: Viroids (Hadidi H., Flores R., Randies J. W., Semancik J. S., Eds), CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp 318-326.
- Barbosa C.J., Pina J.A., Navarro L., Duran-Vila N., 2002, Replication/accumulation and symptom expression of citrus viroids on some species of citrus and related genera. In: Duran-Vila N, Milne RG, da Graça JV, (Eds), Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 2001. Riverside, CA, USA, IOCV, pp. 264–77.
- Baumstark T., Schröder A. R. W., Riesner, D., 1997. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO Journal* 16: 599–610.
- Behl M. K., Parakh D. B., Khurana S. M. P., 1998. Bumpy fruit and other viroid and viroid-like diseases of apple in HP, India. *Acta Horticulturae* 472: 627-630.
- Boehme C. C., Nabeta P., Henostroza G., Raqib R., Rahim Z., Gerhardt M., Sanga E., Hoelscher M., Notomi, T., Hase T., Perkins M. D., 2007. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 1936–1940.
- Bonfiglioli R. G., McFadden G. I., Symons R. H., 1994. *In situ* hybridization localizes *Avocado sunblotch viroid* on chloroplast thylakoid membranes and *Coconut cadang cadang viroid* in the nucleus. *The Plant Journal* 6: 99–103.
- Bonfiglioli R. G., Webb D. R., Symons R. H., 1996. Tissue and intracellular distribution of *Coconut cadang cadang viroid* and *Citrus exocortis viroid* determined by in situ hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *The Plant Journal* 9: 457–465.
- Boubourakas I. N., Avgelis A. D., Kyriakopoulou P. E., Katis, N. I., 2006. Occurrence of yellowing viruses (*Beet pseudo-yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucurbit aphid-borne yellows virus*) affecting cucurbits in Greece. *Plant Pathology* 55: 276-283.
- Branch A. D., Robertson H. D., 1984. A replication cycle for viroids and other small infectious RNA"s. *Science* 223: 450–455.
- Branch A. D., Robertson H. D., Greer C., Gegenheimer P, Peebles C., Abelson, J., 1982. Cell-free

- circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science* 217, 1147-1149.
- Bruening G., 1989. Compilation of self-cleaving sequences from plant virus satellite RNAs and other sources. *Methods in Enzymology* 180: 546-558.
- Bussiere F., Lehoux J., Thompson D. A., Skrzeczkowski L. J., Perreault J. P., 1999. Subcellular localization and rolling circle replication of *Peach latent mosaic viroid*: Hallmarks of group A viroids. *Journal of Virology* 73: 6353–6360.
- Bussiere F., Ouellet J., Cote' F., Levesque D., Perreault J. P., 2000. Mapping in solution shows the *Peach latent mosaic viroid* to possess a new pseudo-knot in a complex, branched secondary structure. *Journal of Virology* 74: 2647–2654.
- Camin, J. H., and R. R. Sokal. 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution* 19: 311-326
- Swofford, D.L. 1993. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Campbell A. I., Sparks T. R., 1976. Experiments with *Dapple apple virus*. *Acta Horticulturae* 67: 261-264.
- Chakrabarti R. Schutt, C. E. 2002. Novel sulfoxides facilitate GC-rich template amplification. *Biotechniques* 33: 866-874.
- Claxton, N.S., Fellers, T.J., Davidson, M.W., 2008. Laser scanning confocal microscopy. 37 pp. <http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf>.
- CLC bio, Katinebjerg, Denmark, 2010. CLC RNA Workbench user manual 1-328.
- Cline J., Braman J. C., Hogrefe H. H., 1996. PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases, *Nucleic Acid Research* 24: 3546-3551.
- Coffin, R., S., Coutts R. H. A., 1992. DsRNA cloning and diagnosis of *Beet pseudo-yellow virus* by PCR and nucleic acid hybridization. *Intervirology* 33: 197-203.
- Cordy C. B., MacSwan I. C., 1961. Some evidence that pear bark measles is seed-borne. *Plant Disease Reporter* 45: 891.
- Crescenzi A, Piazzola P, and Hadidi A, 2002. First report of *Peach latent mosaic viroid* in sweet cherry in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 84 (2): 168.
- Cropley R., 1960. Pear blister canker: a virus disease. *Annual Report of the East Malling Research Station* 43: 104.
- Curtis KA, Rudolph DL, Owen S. M., 2008. Rapid detection of HIV-1 by reversetranscription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods*. 151: 164-270.
- Da Graga J. V., van Vuuren S. P., 1980. Transmission of avocado sunblotch disease to cinnamon. *Plant Disease* 64: 475.
- Daros J. A., Elena S., Flores R., 2006. Viroids an Ariadne' thread into the RNA labyrinth. *EMBO Reports* 7: 593-598.
- Daròs JA. Marcos J. F., Hernandez C., Flores R., 1994. Replication of *Avocado sunblotch viroid*: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91: 12813–12817.

- Delgado S., Martínez de Alba E., Hernández C., Flores R., 2005 A short double-stranded RNA motif of *Peach latent mosaic viroid* contains the initiation and the self-cleavage sites of both polarity strands. *Journal of Virology* 79: 12934–12943.
- Demeke T., Adams R. P., 1992. The effect of plant polysaccharides and buffer additives of PCR. *BioTechniques* 12: 332-334.
- Desjardins P. R., Drake R. J., Swiecki S. A., 1980. Infectivity studies of avocado sunblotch disease causal agent, possibly a viroid rather than a virus. *Plant Disease* 64: 313-315.
- DeStefano J. J., Buiser R. G., Mallaber L. M., Bambara R. A., Fay P. J., 1991. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase displays a partially processive 3' to 5' endonuclease activity. *Journal of Biological Chemistry* 266 (36): 24295–24301
- Desvignes J. C., 1970. Les maladies a virus du poisier et leur detection. *Ctifl-Documents* 26: 12.
- Desvignes J. C., 1976. The virus diseases detected in greenhouse and field by the peach seedlings GF-305 indicator. *Acta Horticulturae* 67: 315–323.
- Desvignes J. C., 1980. Different symptoms of the peach latent mosaic. *Acta Phytopathological Academia of Sciences Hungaria* 15: 183–190.
- Desvignes J. C., 1982. Resistance to some Prunus species to *Peach latent mosaic virus* disease. *Acta Horticulturae* 130: 89-91.
- Desvignes J. C., 1986. Peach latent mosaic and its relation to peach mosaic and peach yellow mosaic virus diseases. *Acta Horticulturae* 193: 51–57.
- Desvignes J. C., 1999. Virus diseases of fruit trees. CTIFL, Paris (FR).
- Desvignes J.C., Cornaggia D., Grasseau N., Ambrós S., Flores R., 1999a. *Pear blister canker viroid*: Host range and improved bioassay with two new pear indicators, Fieud 37 and Fieud 110. *Plant Disease* 83: 419-422.
- Desvignes J.C., Grasseau N., Boye R., Cornaggia D., Aparicio F., Di Serio F., Flores R., 1999β. Biological properties of *Apple scar skin viroid*: Isolates, host range, different sensitivity of apple cultivars, elimination, and natural transmission. *Plant Disease* 83: 768- 772.
- Di Serio F., Daros J. A., Ragozzino A., Flores R., 1997. A 451- nucleotide circular RNA from cherry with hammerhead ribozymes in its strands of both polarities. *Journal of Virology* 71: 6603-6610.
- Di Serio F., Malfitano M., Ragozzino A., Desvignes J.C., Flores R., 2001. *Apple dimple fruit viroid*: fulfillment of Koch postulates and symptom characteristics. *Plant Disease* 85: 179-182.
- Diener T. O., Raymer W. B., 1967. *Potato spindle tuber virus*: a plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science* 158:3 78-381.
- Diener, T. O., 1971. Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating low molecular weight RNA. *Virology* 45: 411-428.
- Diener T. O., Smith D. R., O'Brien, M. J., 1972. *Potato spindle tuber viroid*. VII. Susceptibility of several solanaceous plant species to infection with low molecular-weight RNA. *Virology* 48: 844–846.
- Diener T. O., 2001. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? *Advances in Virus Research* 57: 137–84.

- Ding B., Owens R., 2003. Movement. In: Viroids (Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Semancik J. S., Eds.) CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 49–54.
- Domingo E., Escarmis C., Sevilla N., 1996. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB Journal* 10: 859–864.
- Domingo E., Holland J. J., 1994. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In *The Evolutionary Biology of Viruses*, Morse S. S., (Eds). New York: Raven Press, pp. 161-184
- Dukes J.P., King D.P., Alexandersen S., 2006. Novel reverse transcription loopmediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Archives of Virology* 151: 1093–1106.
- Eiken Chemical Ltd, Tochigi, Japan, 2006. A guide to LAMP primer designing (Primer Explorer V3).pp 1-50.
- Eigen M., 1993. The origin of genetic information: virus as models. *Gene* 135: 37-47.
- Elena S. Dopazo F. J., Flores R., Diener T. O., Moya A., 1991. Phylogeny of viroids, viroidlike satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis d virus RNA. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* 88:5631–5634.
- Elena S. F., Dopazo J., de la Peña M., Flores R., Diener T.O., Moya A., 2001. Phylogenetic analysis of viroid and viroid-like satellite RNAs from plants: a reassessment. *Journal of Molecular Evolution* 53: 155–9.
- EPPO data sheets on quarantine pests, 2008. Peach mosaic ?closterovirus. *EPPO Bulletin* 29: 459-463.
- Faggioli F, and Barba M, 2008. Peach latent mosaic viroid: major findings of our studies over a period of fifteen years in Italy. *Acta horticulturae* 781: 529-534.
- Faggioli F., Loreti S., Barba M., 1997. Occurrence of *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) on plum in Italy. *Plant Disease* 81: 423.
- Faggioli F., Ragozzino E., Barba M., 2001. Simultaneous detection of stone or pome fruit viroid by single tube-RT-PCR. *Acta Horticulturae* 550: 59-63.
- Fang G., Hammar S., Grumet R., 1992) A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *BioTechniques* 13: 52-56.
- Fekih Hassen I., Massart J., Roussel S., Parisi O., Kummert J., Fakhfakh H., Marrakchi M., Perreault J.P., Jijakli M.H., 2007. Molecular features of new *Peach latent mosaic viroid* variants suggest that recombination may have contributed to the evolution of this infectious RNA. *Virology* 360: 50-57.
- Fekih Hassen I., Roussel S., Kummert J., Fakhfakh H., Marrakchi M., Jijakli M. H., 2006. Development of a rapid RT-PCR test for the detection of *Peach latent mosaic viroid*, *Pear blister canker viroid*, *Hop stunt viroid* and *Apple scar skin viroid* in fruit trees from Tunisia. *Journal of Phytopathology* 153: 37–45.
- Fekih Hassen I.F., Roussel S., Kummert J., Fakhfakh H., Marrakchi M., Jijakli M.H., 2005. *Peach latent mosaic viroid* detected for the first time on almond trees in Tunisia. *Plant Disease* 89: 1244.
- Fernow K. H., 1967. Tomato as test plant for detecting mild strains of *Potato spindle tuber virus*. *Phytopathology* 57: 1347-1352.

- Ferretti L., Faggioli F., Ragozzino E., Pasquini G., Barba M., 2001. Diffusione di virus e viroidi in germoplasma di drupacee nell'Italia centro-meridionale. Atti Progetto POM A32 "Norme fitosanitarie e commercializzazione delle produzioni vivaistiche" Locorotondo, 4-7 dicembre 2001, 1: 667-673
- Fideghelli C., G. Della Strada, R. Pavia, M. Barba, F. Faggioli, E. Ragozzino, 2002: Effetti del Viroide del *Mosaico Latente del Pesco* (PLMVd) sul comportamento fenologico e agronomico di cultivar di pesco e nettarine. Atti VI Giornate Scientifiche SOI; Spoleto 23-25 Aprile 2002, pp. 117-118.
- Fiore N., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Infante R., Myrta A., Pallas V., 2003. Detection of Peach latent mosaic viroid in stone fruits from Chile. In Options Méditerranéennes Number 45, Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region (Eds Myrta A, Di Terlizzi B, and Savino V), CIHEAM, Valenzano (IT), pp. 143-145.
- Flores R., 2001. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. C.R. Académie Sciences Paris. Sciences de la Vie/ Life Sciences 324:943-952.
- Flores R., Ambròs S., Llácer G., Hernández C., 2003a. *Pear blister canker viroid*. In: Viroids (Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S. Eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 153-155.
- Flores R., Daròs J. A., Hernández C., 2000. The *Avsunviroidae* family: viroids containing hammerhead ribozymes. Advances in Virus Research 55: 271-323.
- Flores R., Delgado S., Gas M. E., Carbonell A., Molina D., Gago S., de la Peña M., 2004. Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. FEBS Letters 567: 42-48.
- Flores R., Delgado S., Rodio M. E., Ambros S., Hernandez C., Di Serio F., 2006. *Peach latent mosaic viroid*: Not so latent. Molecular Plant Pathology 7: 209-221.
- Flores R., Di Serio F., Hernández C., 1997. Viroids: the non-encoding genomes. Seminars in Virology 8: 65-73.
- Flores R., Hernandez C., Avident L., Hermoso A., Llacer G., Juarez J., Arregui J.M., Navarro L., Desvignes, J.C., 1992. Studies on the detection, transmission and distribution of *Peach latent mosaic viroid* in peach trees. Acta Horticulturae 309, 325-330.
- Flores R., Hernández C., Desvignes J. C., Llácer G., 1990. Some properties of the viroid inducing the peach latent mosaic disease. Research in virology 141: 109-118.
- Flores R., Hernandez C., Llacer G., Desvignes J. C., 1991. Identification of a new viroid as the putative causal agent of pear blister canker disease. Journal of General Virology 72: 1199-1204.
- Flores R., Hernández C., Llácer G., Shamloul A.M., Giunchedi L., Hadidi A., 2003b. *Peach latent mosaic viroid* in peach. In: Viroids, (Hadidi, A., Flores, R., Randles J.W., Semacik, J.S. Eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 156-160.
- Flores R., Hernandez C., Martinez de Alba E., Daros J. A., Di Serio F., 2005. Viroids and viroid-host interactions. Annual Report of Phytopathology 43: 117-39.
- Flores R., Llácer G., 1988. Isolation of a viroid-like RNA associated with peach latent mosaic disease. Acta Horticulturae 235: 325-332.
- Flores R., Randles J. W., Bar-Joseph M., Diener T. O., 2000. Viroids. In: Virus taxonomy (van

- Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB Eds.). Academic Press, San Diego pp. 1009–1024.
- Flores R., Randles J. W., Bar-Joseph M., Diener T. O., 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology*; 143: 623–9.
- Flores R., Randles J. W., Owens R. A., 2003. Classification, In: *Viroids*, (Hadidi, A., Flores, R., Randles J.W., Semacik, J.S. Eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 156-160.
- Forster A. C., Symons R. H., 1987. Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* 50: 9–16.
- Fukuda S., Takao S., Kuwayama M., Shimazu Y., Miyazaki K., 2006. Rapid detection of *Norovirus* from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 1376–1381.
- Fukuta S., Niimi Y., Oishi Y., Yoshimura Y., Anai N., Hotta, M., Fukaya M., Kato, T., Oya T., Kambe M., 2005. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method for detection of two viruses and chrysanthemum stunt viroid. *Annual Report of The Kansai Plant Protection Society* 47: 31-36.
- Fukuta S., Ohishi, K., Yoshida K., Mizukami Y., Ishida, A., Kanbe M., 2004. Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Tomato spotted wilt virus* from chrysanthemum. *Journal of Virological Methods* 121: 49-55.
- Gago S., De la Peña, M., Flores R., 2005. A kissing-loop interaction in a hammerhead viroid RNA critical for its in vitro folding and in vivo viability. *RNA* 11: 1073-1083.
- Gal T. Z., Aussenberg R., Burdman S., Kapulnik Y., Koltai H., 2006. Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. *Planta* 224: 15-162.
- Galindo J., Lopez M., Aguilar T., 1986. Significance of *Myzus persicae* in the spread of *Planta macho viroid*. *Fitopatologia Brasileira* 11: 400-410.
- Gazel M., Ulubas Serce C., Caglayan K., Luigi M., Faggioli F., 2008. Incidence and genetic diversity of *Peach latent mosaic viroid* isolates in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 90: 495-503.
- Geiduschek E. P., Herskovits T. T., 1961. Nonaqueous solutions of DNA. Reversible and irreversible denaturation in methanol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95:114–129.
- Giunchedi L., 1990. Le nuilattie virali e simili del pero: situazione attuale in Italia. *Fnitticoltura* 8-9: 55-59.
- Giunchedi L., Gentit P., Nemchinov L., Poggi Pollini, C., Hadidi A., 1998. Plum spotted fruit: a disease associated with *Peach latent mosaic viroid*. *Acta Horticulturae* 472: 571-579.
- Gora-Sochacka, A., 2004. Viroids: Unusual small pathogenic RNAs. *Acta Biochimica Polonica*, 51: 587-607.
- Gray-Mitsumune M., Abe H., Takahashi J., Sundberg B., Mellerowicz E. J., 2004. Liquid phase fluorescence in situ RT-PCR analysis for gene expression analysis in woody stems. *Plant Biology* 6: 47-54.
- Grill L. K., and Semancik J. S., 1978. RNA sequences complementary to Citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of USA 75: 896–900.
- Gross H. J., Krupp G., Domdey H., Raba M., Jank P., Lossow C., Alberty H., Ramm K., Sanger H., 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of *Citrus exocortis* and *Chrysanthemum stunt viroid*. European Journal of Biochemistry 121: 249-257.
- Gunimalavedi I., Kono T., Lapatra S. E., Sakai M., 2005. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of Virology 150: 899– 909.
- Hadidi A., Cress D. E., Diener T. O., 1981. Nuclear DNA from uninfected or *Potato spindle tuber viroid*-infected tomato plants contains no detectable sequences complementary to cloned double-stranded viroid cDNA (third edition), Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 78: 6932–6935.
- Hadidi A., Giunchedi L., Shamloul A.M., Poggi-Pollini C., Amer M.A., 1997. Occurrence of *Peach latent mosaic viroid* in stone fruits and its transmission with contaminated blades. Plant Disease 81: 154-158.
- Hadidi A., Yang X., 1990. Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. Journal of Virological Methods 30: 261–270.
- Hammond R. W., 1994. Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effects of apparently lethal mutations. Virology 201: 36–45
- Harders J., Lukacs N., Robert-Nicoud M., Jovin, T. M., Riesner D., 1989. Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. EMBO Journal 8: 3941–3949.
- Harrison G. P.; Mayo, M. S., Hunter E., Leve, A. M. L., 1998. Pausing of reverse transcriptase on retroviral RNA templates is influenced by secondary structures both 5 and 3 of the catalytic site. Nucleic Acids Research 26: 3433-3442.
- Hashimoto J., Koganezawa H., 1987. Nucleotide sequence and secondary structure of *Apple scar skin viroid*. Nucleic Acids Research 15: 7045-7052.
- Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S. A., 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. Nucleic Acids Research 25 (19): 3957–3958.
- Hernández C., Daròs J. A., Elena S. F., Moya A., Flores R., 1992. The strands of both polarities of a small circular RNA from carnation self-cleave in vitro through alternative double- and single-hammerhead structures. Nucleic Acids Research 20: 6323-6329.
- Hernandez C., Elena, S. F., Moya A., Flores, R. 1992α. *Pear blister canker viroid* is a member of the apple scar skin subgroup (*Apscaviroids*) and also has sequence homology with viroids from other subgroups. Journal of General Virology 73: 2503-2507.
- Hernandez C., Flores R., 1992. Plus and minus RNAs of *Peach latent mosaic viroid* self cleave in vitro via hammerhead structures. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89: 3711-3715.
- Hernández C., Llácer G., Desvignes J. C., Flores R., 1992β. Evidence supporting a viroid etiology for *Pear blister canker viroid*. Acta Horticulturae 309: 319-324.
- Herold T., B. Haas R. P. Singh A. Boucher H., Sanger L., 1992. Sequence analysis of five new field

- isolates demonstrates that the chain length of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant Molecular Biology* 19:329–333.
- Hodgson R. A. J., Wall G. C., Randles J. W., 1998. Specific identification of *Coconut tinangaja viroid* for differential diagnosis of viroids in coconut palm. *Phytopathology* 88: 774-781.
- Holmes D. S., Quigley M., 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical biochemistry* 114: 193-197.
- Howell W. E., Burgess J., Mink G. I., Skrzeczkowsky L. J., Zhang Y. P., 1998. Elimination of apple fruit and bark deforming agents by heat therapy *Acta Horticulturae* 472: 641-646.
- Hunter D. E., Darling H. M., Beale W. L., 1969. Seed transmission of *Potato spindle tuber virus*. *American Potato Journal* 46: 247-250.
- Hurt S., Pdleckis E. W., Hadidi A., Ibrachim L. M., 1992. Early detection of *Apple scar skin* group viroids from imported pear germplasm. *Acta Horticulturae* 309: 311-318.
- Hutchins C. J., Rathjen P. D., Forste, A. C., Symons R. H., 1986. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of *Avocado sunblotch viroid*. *Nucleic Acids Research* 14: 3627-3640.
- Hutchins L M, Bodine E. W., Thornberry H. H., 1937. Peach mosaic, its identification and control. US Department of Agriculture Circular no. 427.
- Hutchins L. M., 1932. Peach mosaic - a new virus disease. *Science* 76: 123.
- Johansen B., 1997. *In situ* PCR on plant material with sub-cellular resolution. *Annals of Botany* 80: 697–700.
- Joyce P. A., Constable F. E., Crosslin J., Eastwell K., Howell W.E., Rodoni B.C., 2006. Characterisation of *Pear blister canker viroid* isolates from Australian pome fruit orchards. *Australasian Plant Pathology* 35: 465-471.
- Kaneko T., Kawana T., Fukushima E., Suzutani T., 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochemical and Biophysical Methods* 70: 499-501.
- Kaponi M., Fagioli F., Luuigi M., Brba M., Kyriakopoulou P., 2009. Molecular characterization of Hellenic variants of *Apple Scar skin viroid* and *Pear blister canker viroid* in pome fruits. 21st international conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops. Abstracts pp. 75. Neustadt, Germany 5-10 July, 2009.
- Keese P., Symons R. H., 1985. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA* 82: 4582-4586.
- Kegler H., 1965. Bark split and decline in Beurre Hardy pear trees. *Zastita Bilja* 16: 311-316.
- Kibbe W. A., 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator *Nucleic Acids Research* 35: 43-46.
- Kiberstis P.A., Haseloff J. and Zimmern D., 1985. 2' Phosphomonoester, 3'-5 phosphodiester bond at a unique site in a circular viral RNA. *EMBO Journal* 4: 817–822.
- Kim H. R., Lee S. H., Lee D. H., Kim J. S., Park J. W., 2006. Transmission of ASSVd by grafting, using contaminated pruning equipment, and planting infected seeds. *Plant Pathology Journal* 22: 63-67.

- Kishi K., Takanashi K., Abiko, K. 1973. New virus diseases of peach, yellow mosaic, oil blotch and star mosaic. Bulletin Horticulture Research Station of Japan, Series A, 12: 197–208.
- Kobs G., 1997. Cloning blunt-end DNA fragments into the pGEM®-T vector systems. Promega Notes Magazine 62: 15.
- Koganezawa H., 1985. Transmission to apple seedlings of low molecular weight RNA from apple scar skin diseased trees. Annual Phytopathological Society of Japan 5: 176-182.
- Koganezawa H., Ito T., 2003. *Apple fruit crinkle viroid*. In: Viroids, (Hadidi A, Flores R, Randles J. W, Semancik J. S., Eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 150–152)..
- Koganezawa H., Yang X., Zhu S. F., Hashimoto J., Hadidi A., 2003. Apple scar skin viroid in apple. In: Viroids, (Hadidi A., Flores R., Randles J. W., and Semancik J. S., Eds). CSIRO Publishing , Collingwood, Australia, pp. 137-141.
- Koltai H., Bird D. M., 2000. High throughput cellular localization of specific plant mRNAs by liquid-phase in situ reverse transcription- polymerase chain reaction of tissue sections. Plant Physiology 123: 1203–1212.
- Kong P., Rubio L., Polek M., Falk B. W., 2000. Population structure and genetic diversity within California *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. Virus Genes 21: 139–145.
- Kono T., Savan R., Sakai M., Itami T., 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. Journal of Virological Methods 115: 59–65.
- Kotunow A. M., Rezaian M. A., 1988. *Grapevine yellow speckle viroid*. Structural features of a new viroid group. Nucleic Acids Research 16: 849-864.
- Krug. S. M., Berger L. S., 1989. Ribonuclease H activities associated with viral reverse transcriptases are endonucleases. Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA 86: 3539-3543
- Kubota R., Vine B.G., Alvarez A.M., Jenkins, D.M., 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loopmediated isothermal amplification. Phytopathology 98: 1045–1051.
- Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K., 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in Bioinformatics 9: 299-306.
- Kwon M. J., Hwang S. L., Lee S. J., Lee D. H., Lee, J. Y., 2002. Detection and distribution of the *Apple scar skin viroid*- Korean strain (ASSVd-K) from apples cultivated in Korea. Korean Journal of Plant Pathology 18:342-344.
- Kyriakopoulou P.E., Giunchedi L., Hadidi, A., 2001. *Peach latent mosaic viroid* and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear *Pyrus communis* and wild pear *P. amygdaliformis*: implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region. Journal of Plant Pathology 83: 51-62.
- Kyriakopoulou P. E., Hadidi A., 1997. Natural infection of wild and cultivated pears with *Apple scar skin viroid* in Greece. Acta Horticulturae 472:617-625.
- Kyriakopoulou P. E., Hadidi A., DougDoug K., Giunchedy L., 1998. Natural infection of wild and cultivated pears in Greece with *Peach latent mosaic viroid* and pome fruit viroids. ICPP98 Paper number 3.7.49.
- Lawson R. H., 1987. *Chrysanthemum stunt viroid*. In: The viroids, (T.O. Diener Eds). Plenum Press, New York and London, pp. 247-259.

- Lima M. I., Fonseca M. E. N., Flores R., Kitajima E. W., 1994. Detection of *Avocado sunblotch viroid* in chloroplasts of avocado leaves by *in situ* hybridization. *Archives of Virology* 138: 385–390.
- Lolic B., Afechtal M., Matic S., Myrta A., Di Serio F., 2007. Detection by tissue-printing of pome fruit viroids and characterization of *Pear blister canker viroid* in Bosnia and Herzegovina. *Journal of Plant Pathology* 89: 369-375.
- Loreti S., Faggioli F., Barrale R., Barba M., 1998. Occurrence of viroids in temperate fruit trees in Italy. *Acta Horticulturae* 472: 555-559.
- Loreti S., Faggioli F., Cardoni M., Mordenti G., Babini A.R., Poggi Pollini C., Barba M., 1999. Comparison of different diagnostic methods for detection of *Peach latent mosaic viroid*. *Bulletin EPPO/EPPO Bulletin* 29: 433-438.
- Malfitano M., Di Serio F., Covelli L., Ragozzino A., Hernandez C., Flores R., 2003. *Peach latent mosaic viroid* variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology*, 313: 492–501.
- Mandic C., Al Rwahnih M., Myrta A., Gomez G., Pallas V., 2008. Incidence and genetic diversity of *Peach latent mosaic viroid* and *Hop stunt viroid* in stone fruits in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 120: 167-176.
- Manganaris G. A., Ekonomou A. S., Boubourakas I. N., Katis N. I., 2003. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports* 22:195–200.
- Maniataki E., Tabler M., Tsagris M., 2003. Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with host protein VirP1. *RNA* 9: 346–54.
- Martinez G., Pallás V., Gómez G., 2008. Analysis of the symptoms developed in *N. benthamiana* plants expressing dimeric forms of the *Hop stunt viroid*. *Journal of Plant Pathology* 90: 121–124.
- McDowell D. G., Burns N. A. Parkes, H. C., 1998. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Research* 26: 3340–3347.
- Mead D., Pey N., Herrstadt C., Marlic R. A., Smith L. M., 1991. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Biotechnology* 9: 657-663.
- Minekawa H., Notomi T., 2004. Quick test method of SARS - Examination using LAMP method. *Modern Medical Laboratory* 32: 297-299.
- Monsion M., Bachelier J.C., Candresse T., Desvignes J.C., Macquaire G., Dunez, J., 1988. Investigations on the infectious agent responsible for peach latent mosaic disease. *Acta Horticulturae* 235: 247–255.
- Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T., 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289: 150-154
- Muhlbach H. P., Weber U., Gomez G., Pallas V., Duran-Vila N. and Hadidi, A., 2003. Detection of viroids by molecular hybridization. In: *Viroids* (Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Semancik, J. S., Eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia, pp. 103–114.

- Mullis K., Faloan, F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 51: 263–273.
- Nagamine K., Kuzihara Y., Notomi T., 2002. Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. Biochemical and Biophysical Research Communications 290: 1195-1198.
- Navarro L., 1981. Citrus shoot-tip grafting in vitro (STG) and its applications: a review. Proceedings of the International Society of Citriculture1: 452.
- Navarro J.A., Flores R., 2000. Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. EMBO Journal 19: 2662–2670.
- Navarro J. A., Verta A., Flores R., 2000. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of *Avocado sunblotch viroid*. Virology 268: 218-225.
- Niblett C. L., Dickson E., Fernow K. H., Horst R. K., Zaitlin M., 1978. Cross protection among four viroids. Virology 91:198-203.
- Nie X., 2005. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of *Potato virus Y*. Plant Disease 89: 605-610.
- Nieto A. M., Di Feo L., Nome C. F., 2008. First Report of *Peach latent mosaic viroid* in peach trees in Argentina, Plant Disease 92: 1137.
- Notomi T., Okayama H., Masubucki H., Yonekawa T., Watanabe, K., Amino N., Hase T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28: E63.
- Nuovo G. J., 1995. *In situ* PCR: protocols and applications. Genome Research 4: 151-167.
- Nuovo G. J., 1996. The foundation of successful RT *in situ* PCR. Frontiers in Bioscience 1: 4–15.
- Nuovo G.J., 2001. Co-labeling using *in situ* PCR: a review. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 49: 1329–1339.
- O' Leary J. J., Chetty R., Graham A. K., Mc Gee JO'D., 1996. *In situ* PCR: pathologist's dream or nightmare? Journal of Pathology, 178: 11-20.
- Ohtsuka K., Yanagawa K., Takatori K, Hara-Kudo Y., 2005. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of Salmonella isolates. Applied Environmental Microbiollogy 71(11): 6730-5.
- Ohtsuka Y., 1935. A new disease of apple on the abnormality of the fruit. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 6: 44-53.
- Okuda M, Matsumoto M, Tanaka Y, Subandiyah S., Iwanami T., 2005. Characterization of the tuf B-secE-nusG-rplKAJL-rpoB Gene Cluster of the Citrus Greening Organism and Detection by Loop-Mediated Isothermal Amplification. Plant Disease: 89:705–711.
- Osaki H., Kudo A., Ohtsu Y., 1996. Japanese pear fruit dimple disease caused by *Apple scar skin viroid*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 62: 379-385.
- Owens R. A., Diener T. O., 1981. Sensitive and rapid diagnosis of *Potato spindle tuber viroid* by nucleic acid hybridization, Science 213: 670–672.
- Owens R. A., Diener T. O., 1982. RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 79:113-117.

- Ozaki H., Yamamucki Y., Sato Y., Tomita Y., Kawai Y., Miyamoto Y., Ohtsu Y., 1999. *Peach latent mosaic viroid* from stone fruits in Japan. *Annual Phytopathological Society Japan* 65: 3-8.
- Palacio A., Duran-Vila N., 1999. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for viroid characterization. *Journal of Virological Methods* 77: 27–36.
- Palacio A., Foissac X., Duran-Vila N., 2000. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. *European Journal of Plant Pathology*. 105: 897-903.
- Palacio-Bielsa A., Romero-Durban J., Duran-Vila N., 2003. Characterization of citrus HSVd isolates. *Archives of Virology* 149: 537–552.
- Pallardy S.G., 2008. *Physiology of Woody Plants*, 3rd edn., Academic Press, San Diego, 441 pp..
- Pallas V., Sanchez –Navarro J. A., Mas P., Canizares M. C., Aparicio F., Marcos J. F., 2001. Molecular diagnostic techniques and their potential role in stone fruit certification schemes. In *Options Méditerranéennes Number 19, Stone Fruit Viruses and Certification in the Mediterranean Countries: Problems and Prospects*, (Di Terlizzi B., Myrta A., Savino V., Eds.), CIHEAM, Valenzano (IT) pp. 192-208.
- Pallás V., Torres H., Myrta A., Gomez G., 2003. Validation of the 'tissue-printing' technique for detecting stone fruit viroids In *Options Méditerranéennes Number 45, Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region* (Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V., Eds), CIHEAM, Valenzano (IT), pp. 135-138.
- Parida M., Inoue G. P. S., Hasebe F. Morita K., 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *West Nile virus*. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 257–263.
- Pelchat M., Levesque D., Ouellet J., κ.α., 2000. Sequencing of *Peach latent mosaic viroid* variants from nine North American peach cultivars shows that this RNA folds into a complex secondary structure. *Virology* 271:
- Pesquet E., Barbier O., Ranocha P., Jauneau A., Goffner D., 2004. Multiple gene detection by *in-situ* RT-PCR in isolated plant cells and tissues. *The Plant Journal* 39: 947–959.
- Pham H. M., Nakajima C., Ohashi K., Onuma M., 2005. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1646-1650.
- Pierpoint W.S., 1996. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. In: *Methods in Molecular Biology* vol. 59, (Doonan S., Eds.). Humana Press, Totowa, NJ, pp. 69–80.
- Podleckis E. V., Hammond R. W., Hurtt S. S., Hadidi A., 1993. Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labeled dot blot and tissue blot hybridization *Journal of Virological Methods* 43: 147–158.
- Polivka H., Staub U., Gross H. J., 1996. Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel *Grapevine yellow speckle viroid* 1 mutants show alteration of hairpin I. *Journal of General Virology* 77:155–161.
- Promega, Madison, WI, USA, 2009, pGEM⁺-T and pGEM⁺-T easy vector systems technical manual pp. 1-28.
- Postman J. D, Hadidi A., 1995. Elimination of *Apple scar skin viroid* from pears by in vitro thermo-

- therapy and apical meristem culture. *Acta Horticulturae* 386: 536-543.
- Puchta H., Luckinger R., Yang X., Hadidi A., Sanger H. L., 1990. Nucleotide sequence and secondary structure of *Apple scar skin viroid* (ASSVd) from China. *Plant Molecular Biology* 14: 1065-1067.
- Puchta H., Ramm K., Sanger, H.L., 1988. The molecular structure of *Hop latent viroid* (HLV), a new viroid occurring world-wide in hops. *Nucleic Acids Research* 16: 4197-4216.
- Ragozzino E., Faggioli F., Barba M., 2004. Development of an one-tube RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid* and *Pospiviroid*. *Journal of Virological Methods* 121: 25-29
- Randles J. W., Rodriguez, M. J. B., 2003. *Coconut cadang-cadang viroid* In: *Viroids* (Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Semancik J. S., Eds). CSIRO Publishing, Australia, pp 233-241.
- Randles, J. W., 2003. Economic impact of viroid diseases. In *Viroids*, (Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Semancik J. S., Eds). Collingwood, Australia: CSIRO Press pp. 3-11.
- Raymer W. B., O' Brien M. J., 1962. Transmission of *Potato spindle tuber virus* in tomato. *American Potato Journal* 39: 401-408.
- Rees, W.A., Yager, T.D., Korte, J. and von Hippel, P.H., 1993. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* 32, pp. 137-144.
- Rivera-Bustamante R., Gin R., Semancik, J. S., 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Analytical Biochemistry* 156: 91-95.
- Rizza S., Nobile G., Tessitori A., Catara A., Conte E., 2009. Real time RT-PCR for quantitative detection of *Citrus viroid III* in plant tissues. *Plant Pathology* 58: 181-185.
- Rodio M. E., Delgado S., Flores R., Di Serio F., 2006. Variants of *Peach latent mosaic viroid* inducing peach calico: uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *Journal of General Virology* 87: 231-240.
- Rodio M. E., Delgado S., De Stradis A., Gomez M. D., Flores R., Di Serio F., 2007. A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *The Plant Cell* 1: 3610-3626.
- Roistacher C. N., Calavan E. C., Blue R. L., Navarro L., Gontales R., 1977. A new more sensitive citron indicator for detection of mild isolates of *Citrus exocortis viroid* (CEV). *Plant Disease Reporter* 53: 333-336.
- Roistacher C. N., Calavan F. C., Blue R., L., 1969. Citrus exocortis virus-chemical inactivation on tools, tolerance to heat and separation of isolates. *Plant Diseases Reporter* 52: 333.
- Rott M.E., Jelkmann W., 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107: 411-420.
- Roux K. H., 1995. Optimization and troubleshooting in PCR in: *PCR methods and applications*. Cold spring Harbor laboratory 5185-5194.
- Rowhani A., Maningas M. A., Lile L. S., Daubert, S. D., Golino D. A., 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology* 85: 347-352.

- Ruiz-Ruiz S., Ambros S., Vives M.C, Navarro L., Moreno P., Guerri J., 2009. Detection and quantification of *Citrus leaf blotch virus* by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 160: 57-62.
- Rzhetsky A., Nei M., 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Molecular Biology and Evolution* 9: 945-967.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 230: 1350–1354.
- Saitou N., Imanishi T., 1989. Relative efficiencies of the Fitch- Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Molecular Biology and Evolution* 6:514-525.
- Sambrook J, Fritch FF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, Vols 1-3, 2nd eds. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 74: 1927-1931.
- Sanjuan R., Forment J., Elena S. F., 2006. *In silico* predicted robustness of viroids RNA secondary structures. I. The effect of single mutations. *Molecular Biology and Evolution* 23 (7): 1427-1436.
- Sano T., Li S. F., Ogata T., Ochiai M., Suzuki C., Ohnuma S., Shikata E., 1997. *Pear blister canker viroid* isolated from European pear in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 63: 89-94.
- Sano T., Hammond R. W., Owens R. A., 2003. Biotechnological approaches for controlling viroid diseases. In: *Viroids* (Hadidi H., Flores R., Randies J. W., Semancik J. S., Eds). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp 343-349.
- Sano T., Kudo J., Sugimoto T., Shikata E., 1988. Synthetic oligonucleotide hybridisation probes to diagnose *Hop stunt viroids* strains and *Citrus exocortis virus* *Journal of Virological Methods* 19: 109–120.
- Schlemmer A., Roistacher C. N., Semancik J. S., 1985. A unique infectious RNA associated with citron showing symptoms typical of citrus exocortis disease. *Phytopathology* 75: 946-949.
- Schumacher J., Meyer N., Riesner D., & Weidemann H. L., 1986. Routine technique for diagnosis of viroids and viruses with circular RNAs by 'return' gel electrophoresis. *Journal of Phytopathology* 115: 332-343
- Semancik J. S, Weathers L. G., 1972. Exocortis disease: evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biology* 237(77): 242–244.
- Shamloul A. M., Faggioli F., Keith J.M., Hadidi A., 2002. A novel multiplex RT-PCR probe capture hybridizain (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid* and *Pospiviroid*. *Journal of Virological Methods* 105 115-121.
- Shamloul A., Minafra A., Hadidi A., Giunchedi L., Waterworth H., Allam E.K., 1995. *Peach latent mosaic viroid* nucleotide sequence of an Italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and

- geographic distribution. *Acta Horticulturae* 386: 522-530.
- Shapiro B., Yingling Y.G., Kaszpak W., Bindewald E., 2007. Bridging the gap in RNA structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology* 17 (2): 157-165.
- Singh R. P., 1989. Techniques in the viroid study of diseases of tropical and sub tropical plants. *Review of Tropical Plants Pathology* 6: 81-118.
- Singh R. P., Boucher A., 1987. Electrophoretic separation of severe from mild strains of *Potato spindle tuber viroid*. *Phytopathology* 77: 1588-1591.
- Singh R. P., Boucher A., Lakshman, D. K., Tavantzis, S. M., 1994. Multimeric non-radioactive cRNA probes improve detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). *Journal of Virological Methods* 49: 221-234.
- Singh R. P., Randles J. W., Hadidi A., 2003 α . Strategies for the control of viroid diseases. In: *Viroids*, (Hadidi H., Flores R., Randles J. W., Semancik J. S., Eds). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp 295-302.
- Singh R. P., Ready K. F. M., Nie, X., 2003 β . Biology In: *Viroids*, (Hadidi H., Flores R., Randles J. W., Semancik J. S., Eds). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 30-48.
- Singh R.P., Boucher A., Sommersville T.H., 1992. Detection of *Potato spindle tuber viroid* in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease* 76: 951-953.
- Singh R.P., Ready K. F. M., 2003. Biological Indexing. In: *Viroids* (Hadidi H., Flores R., Randles J. W., Semancik J. S., Eds). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp 89-94.
- Skrezeckowski L. J., Howell W. E., Mink, G. I., 1996. Occurrence of *Peach latent mosaic viroid* in commercial peach and nectarine cultivars in the US. *Plant Disease* 80: 823.
- Smith W. W., Barrat, J. G., Rich, A. E., 1956. Dapple apple, unusual fruit symptom of apples in New Hampshire. *Plant Disease Reporter* 40: 765-766.
- Sneath P. H. A., Sokal R. R., 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, CA.
- Sourdis J., Nei M., 1988. Relative efficiencies of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution* 5:298-311.
- Steger G., 1994. Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 22: 2760-2768.
- Steinhoff M., Hesse H., Goke B., Steinhoff A., Eissele R., Slater E. P., 2001. Indirect RT-PCR *in-situ* hybridization: a novel non-radioactive method for detecting glucose-dependent insulinotropic peptide. *Regulatory Peptides* 97: 187-194.
- Szychowski J. A., Credi R., Reanwarakorn K., Semancik J. S., 1998. Population diversity in *Grapevine yellow speckle viroid-1* and the relationship to disease expression. *Virology* 248: 432-444.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thompson J. D, Higgins D. G, Gibson T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22: 4673-4680.

- Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products Nature Protocols 3: 877 – 882.
- Torres H., Gómez G., Pallás V., Stamo B., Shalaby A., Aouane B., Gavriel I., Kominek P., Caglayan K., Sipahioğlu M., Michelutti R., Myrta A., Fiore N., 2004. Detection by tissue printing of stone fruit viroids, from Europe, the Mediterranean and North and South America. Acta Horticulturae 657: 379-383.
- Urbanczyk-Wochniak E., Filipecki M., Przybecki Z., 2002. A useful protocol for in situ RT-PCR on plant tissues. Cellular and Molecular Biology Letters 7: 7–18.
- Van Driessche E., Beeckmans S., Dejaegere R., Kanarek L., 1984. Thiourea: the antioxidant of choice for the purification of proteins from phenol-rich tissues. Analytical Biochemistry 141: 184-188.
- Vandesompele J., De Paepe A., Speleman FG., 2002. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR Green I Real Time RT-PCR. Analytical Biochemistry 303: 95–98.
- Varga A., James D., 2006. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. Journal of Virological Methods 138: 184-190.
- Visvader J. E., R. H. Symons. 1985. Eleven new sequences variants of *Citrus exocortis viroid* and the correlation of sequence with the pathogenicity. Nucleic Acids Research 13:2907–2920.
- Walter B., 1987. Tomato apical stunt. in: The The viroids, (Diener T.O., Eds). Plenum Press, New York and London, pp. 321-328.
- Welsh M. F., Keene F. W. L., 1961. Diseases of apple in British Columbia that are caused by viruses or have characteristics of virus diseases. Canadian Plant Disease Survey. 41: 123–147.
- WenXing X., Ni H., QiuTing J., Farooq A. B., ZeQiong W., YanSu S., ChengChun W., LiPing W., GuoPing W., 2009. Probe binding to host proteins: a cause for false positive signals in viroid detection by tissue hybridization. Virus Research 145(1): 26-3.
- Wisniewski M., BalakrishnanM., C.Palaniappan C., Fay P., H., Bambara R. A., 2000. The Sequential Mechanism of HIV Reverse Transcriptase RNase H. Journal of Biological Chemistry 275: 37664-37671.
- Xu W., Hong N., Wang G., Fan X., 2008. Population structure and genetic diversity within *Peach latent mosaic viroid* field isolates from peach showing three symptoms. Journal of Phytopathology 156: 565-572.
- Yang X., Hadidi A., Hammond R. W., 1992 Nucleotide sequence of *Apple scar skin viroid* reverse transcribed in host extracts and amplified by the polymerase chain reaction. Acta Horticulturae 309: 305-309.
- Zhao Y., Niu H., 2008. Apricot is a new host of *Apple scar skin viroid*. Australasian Plant Disease Notes, 3: 98-100.
- Zhao Y., Niu J. X., 2006. Cloning and sequencing of Sinkiang isolate of *Apple scar skin viroid* (ASSVd). Journal of Fruit Science 23, 896--898.
- Zhu S. F., Hadidi A., Hammond R. W., Yang X., Hansen A. J., 1995. Nucleotide sequence and secondary structure of pome fruit viroids from dapple apple diseased apples, pear rusty skin diseased pears and apple scar skin symptomless pears. Acta Horticulturae 386: 554-559.

- Zhu S. F., Hammond R. W., Hadidi A., 1998. Agroinfection of pear and apple with *Dapple apple viroid* results in systemic infection. *Acta Horticulturae* 472: 613-616.
- Zuker M., 1989. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science*, 244: 48–52.
- Zuker M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31: 3406-3415.

Αλληλουχίες ASSVd

1.>ASSVd77apple (271 nt)

GGTAAACACCGTGCGGTTCCCTGTGGTTCGCCCCGCCAACGCAGATAGATAAAGAAAACGA
 GGAGAAGAAGGAACTCACCCTCGCACCAGTTCGCTGTGGGTTCGCCTACAAGAACGTA
 CGGTGTTGAGGCCCTGTCCGCCGCTGCGCTGCCCTACTCTCGCGCCGCTAGTCGAGCGGA
 CTCGGGTGGAGCCCCCTGTTCTCTCACGCTCTTTTTCTTTGACGCAGCGGCGGGTGGGT
 CCCAGGGTAAAACACAATAGGTGTTTCCC

2.>ASSVd41pear (271 nt)

GGTAAACACCGTGCGGTTCCCTGTGGTTCGCCCCGCCAACGCAGATAGATAAAGAAAACGA
 GGAGAAGAAGGAACTCACCCTCGCACCAGTTCGCTGTGGGTTCGCCTACAAGAACTAC
 GGTGTTGAGGCCCTGTCCGCCGCTGCGCTGCCACCTACTCTCGCGCCGCTAGTCGAGCGGA
 CTCGGGTGGAGCCCCCTGTTCTCTCACGCTCTTTTTCTTTGACGCAGCGGCGGGTGGGT
 CCCAGGGTAAAACACAATAGGTGTTTCCC

3.>ASSVd14wildapple (272 nt)

GGTAAACACCGTGCGGTTCCCTGTGGTTCGCCCCGCCAACGCAGATAGATAAAGAAAACGA
 GGAGAAGAAGGAACTCACCCTCGCACCAGTTCGCTGTGGGTTCGCCTACAAGAACGTA
 CGGTGTTGAGGCCCTGTCCGCCGCTGCGCTGCCACCTACTCTCGCGCCGCTAGTCGAGCGG
 ACTCCGGGTGGAGCCCCCTGTTCTCTCACGCTCTTTTTCTTTGACGCAGCGGCGGGTGGGT
 TCCCAGGGTAAAACACAATAGGTGTTTCCC

4.>ASSVd42wildpear (271 nt)

GGTAAACACCGTGCGGTTCCCTGGTTCGCCCCGCCAACGCAGATAGATAAAGAAAACGAG
 GAGAAGAAGGAACTCACCCTCGCACCAGTTCGCTGTGGGTTCGCCTACAAGAACGTAC
 GGTGTTGAGGCCCTGTCCGCCGCTGCGCTGCCACCTACTCTCGCGCCGCTAGTCGAGCGGA
 CTCGGGTGGAGCCCCCTGTTCTCTCACGCTCTTTTTCTTTGACGCAGCGGCGGGTGGGT
 CCCAGGGTAAAACACAATAGGTGTTTCCC

5.>ASSVd84apple (275)

GGTAAACACCGTGCGGTTCCCTGTGGTTCGCCCCGCCAACGCAGATAGATAAAGAAAACGA
 GGAGAAGAAGGAACTCACCCTCGCACCAGATTCGCTGTGGGTTCGCCTACAAGTAACG
 TACGGTGTGAGGCCCTGTCCGCCGCTGCGCTGCCACCTACTCTCGCGCCGCATAGTCGAG
 CGGACTCCGGGTGGAGCCCCCTGTTCTCTCACGCTCTTTTTCTTTGACGCAGCGGCGGGTG
 GGTCCCAGGGTAAAACACAATAGGTGTTTCCC

Αλληλουχίες PBCVd

1.>PBCVd41pear (314 nt)

CTTTCCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCCCCTGACCTGCATTCCAAAACGCAAAAAAAGTGAG
 AGGCCCTAGGGGCTTCTCGGCTCGTCGTCGACGAAGGGTCTAGAAGCCTGGGCTGGCTGG

AGCGCGGGCTGCGCAGTGATCGCTCCTCTGGAGAAGAAAACCAGCGTTGCTTCCTGCCT
GAGCCTCGTCTTCTGTCCCGCTAGTCGAGCGGACAACCCGAGCACCGCCGAAGGCCTTTTT
TCTTTTAAGCTGCTTGGTGGTGC GGCGAGGGTGGAAGTCTCCGCGGATCTCCTAGAAGGA
GGCCCTCGGGTC

2.>PBCVd40quince (314 nt)

CTTTCCTTGAGGTTCTGTGGTACTCCCCTGACCTGCATTCCAAAACGCAAAAAAAGTGAG
AGGCCCTAGGGGCTTCTCGGCTCGTCGTCGACGAAGGGTCTAGAAGCCAGGGCGCTGGCG
GAGCGCGGGCTGTGGGTAATTGCTCCTCTGGAGAAGAAAACCAGCGTTGCTTCCCGCCT
GAGCCTCGTCTTCTGTCCCGCTAGTCGAGCGGACAACCCGAGCACCGCCGAAGGCCTTTTT
TCTTTTAAGCTGCTTGGTGGTGC GGCGAGGGTGGAAGTCTCCGCGGATCTCCTAGAAGGA
GGCCCTCGGGTC

3.>PBCVd23crataegus (314 nt)

CTTTCCTTGAGGTTCTGTGGTACTCCACTGACCTGCATTCCAAAACGCAAAAAAAGTGAG
AGGCCCTAGGGGCTTCTCGGCTCGTCGTCGACGAAGGGTCTAGAAGCCAGGGCGCTGGCG
GAGCGCGGGCTGTGGGTAATTGCTCCTCTGGAGAAGAAAACCTGCGTCTGCTTCCCGCCT
GAGCCTCGTCTTCTGTCCCGCTAGTCGAGCGGACAACCCGAGCACCGCCGATGGCCTTTTT
TCTTTTAAGCTGCTTGGTGGTGC GGCGAGGGTGGAAGTCTCGGCGGATCTCCTAGAAGGA
GGCCACGGGTC

Αλληλουχίες PLMVd

A) Απ' ευθείας αλληλούχιση των RT-PCR προϊόντων

1.>PLMVd8apricot (340 nt)

TAAGTTTCGCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTTTAAAAAATGAT
GACCCTCTACCCCCCCCCCTGGGGTGGCCCAATTCGAACACTGGCATTACCCGATAGA
AAGGGTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGGGGGAATTTTCCTTTCGGAACCAAGCGGTTG
GTTTCGAGGGGGGTGTGGTCCCGGGACCCCGTAGAAAATGGAATAAGAAGTTTACCCGG
GGTCAAACCCGGTCCCCTCCCGAAGTGAATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTAAGCACAC
TGATGAGTTTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCATCA

2.>PLMVd61peach (338 nt)

TCATAAGTTTCGCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTTTGAGAGAG
TGATGACCTCTCAGCCCTCCACCTTGGGGTGCCTATTTCGGAGCACTGCAGTTCCCGATA
GAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGGT
TGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGGGCTTAGCCCC
CTGATGAGTCTCTGAAATGAAACGAAACTCTTTTCA

3.>PLMVd41pear (342 nt)

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAAACCTTATGAGAGA
 GTGATGACCTCTCACCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
 AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCGAGGCG
 GCTTGGATTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGTCT
 ACCCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAG
 CACACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

4.>PLMVd52peach (339 nt)

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
 GTTGTGACCTCTCAGCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
 AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
 TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGGTACGACGTCTACC
 CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTTTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
 ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

5.>PLMVd3wild pear (221nt)

TCCCGATAGAAAGGGTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTTTGGAAC
 CAAGCGTTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGAC
 GTTACCCGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGAAATTTGGGAGAAGGGTTTGTGCT
 TAGCCCATGATGAGTTTTTGAATGGGGCGAAACTTTTT

B) Κλωνοποίηση και αλληλούχιση

1.>PLSprBel.pfu18.2

TCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
 GTGATGACCTCTCAGCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
 AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
 TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGTCTACC
 CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
 ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

2.>PLSprBel.pfu18.4

TCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
 GTGATGACCTCTCAGCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCTAT
 AGTAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
 TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGTCTACC
 CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
 ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

3.>PLSprBel.pfu18.9

TCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
ATAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

4.>PLSprBel18.1

TCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

5.>PLSprBel18.5

TCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
ATTAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

6.>PLSprBel18.6

TCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCtAGACTTATGAGAGAG
TGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGATA
TTAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGGT
TGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCACA
CTGATGAGTCTcTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

7.>PLGalt.pfu10.2

AACATAAGTTTCGCCGCATCTCAGCGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGTGAGA
GTTTAAGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGA
TAGTAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCAGGAGCCAAGCG
GTTGGCTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTAC
CCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGCGCTAAGCG
CACTGATGAGTCTCTGAGATGAGACGAAACTCTTCTT

8.>PLGalt.pfu10.3

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAG
AGTTGTGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGA
TAGATAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAGCCTAGCG
GTAGGCTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTAC
CCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCA
CACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

9.>PLGalt.pfu10.4

TACATAAGTTTCGCCGCATCTCAGCGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGTGAGA
GTTTAACACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGA
TAGAAAGGCTAAGCACCTCGCTATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCCGGAACCAAGCG
GTTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTAC
CCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGCGCTAAGCG
CACTGATGAGTCTCTGAGATGAGACGAAACTCTTTGT

10.>PLGalt.pfu10.9

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGGTACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGATA
GATAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGGT
TGGTTCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCACA
CTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTATAA

11.>PLGalt10.1

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAG
AGTTGTGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGA
TAGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAGCCTAGCG
GTAGGCTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTAC
CCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGACGAAGAGTCTGTGCTTAGCA
CACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

12.>PLGalt10.7

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGGGAG
AGTTGTGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCAGCAGTTCCCGATA
GAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAGCCTAGCGGT
AGGCTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCACA
CTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

13.>PLGalt10.8

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAG
AGTTGTACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGA
TAGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAGCCTAGCG
GTAGGCTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTAC
CCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGACGAAGAGTCTGTGCTTAGCA
CACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

14.>PLFayet8.2

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGGTTACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCTAT
AGATAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTAA

15.>PLFayet8.3

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCGTCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGGTTACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGACGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTGA

16.>PLFayet8.4

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGGTTACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGTTAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTTGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTAA

17.>PLFayet8.2G

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGGTTACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTAA

18.>PLRedGol8.3

CTCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
TTAGTCACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTGA

19.>PLRedGol8.4

CTCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
TTAGTCACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGTAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTAGAACCAAGCGG
TTGGTTCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTTATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCACA
CTGATGAGTCTCTGAAAAGAGACGAAACTCTTTTGA

20.>PLLemVol12.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCGTCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTTCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGCCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGACGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

21.>PLLemVol12.2

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGGGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTTCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCGTGCTAAGCACA
CTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

22.>PLLemVol12.5

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCTCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTACAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTTCGGAAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTAAGTAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

23.>PLRedHav5.1

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAG
AGTGGTTACCTCTCAGCCCTTCCACCTTGGAGTGCCCTATTTCGGAGCACTGCAGTTCCCGA
TAGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCG
GTTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGTCTAC
CCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCA
CACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTAA

24.>PLRedHav5.5

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTTGTGACCTCTCAGCCCTTCCACCTTGGGGTGCCCTATTTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

25.>PLRedHav5.6

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAG
AGTGGTTACCTCTCAGCCCTTCCACCTTGGAGTGCCCTATTTCGGAGCACTGCAGTTCCCGA
TAGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCG
GTTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGAATTACGACGTCTAC
CCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCA
CACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTAA

26.>PLGlant18.1

TCCATAGGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGGGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCTTCCACCTTGGGGTGCCCTATTTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTGTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

27>PLGlant18.2

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCTTCCACCTTGGAGTGCCCTATTTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTGTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAAACTGAGTTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCACA
CTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

28.>PLGlant18.3

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGGTCACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAAGGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACCTTTCTGA

29.>PLSCres42.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCGGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGAAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTGTTCCCTTCGGGAACCTAGCGG
TAGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCGTGCTTAGCACA
CTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTGTC

30.>PLSCres42.2

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAG
AGTTGTGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGA
TAGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCTAGCG
GTAGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTAC
CCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATAAAGAGTCTGTGCTTAGCA
CACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTGAAA

31.>PLSCres42.3

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTTTTCCTCGGTCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGATAG
AAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCTAGCGGTA
GGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACCCG
GGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAAAAGAGTCTGTGCTTAGCACAC
TGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTGTC

32.>PLSprCres9.2B

CTCATAAGTTTCGCCGCGTCCCAGCGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAG
ATTAGTCACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGA
TAGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCTAGCG
GCAGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTGCCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTAC
CCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCA
CACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTGA

33.>PLSprCres9.2A

CTCATAAGTTTCGCCGCGTCCCAGCGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAG
ATTAGTCACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGAGGACTGCAGTTCCCGA
TAGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCTAGCG
GCAGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTGCCCGGTAGAACTGGATTACGACGTCTAC
CCGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCA
CACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTGA

34.>PLSCres34.1.2

ACCAAATGTTTCGCCTTATCTCAAAGGCTCGTCAGTGGGCTTAGCCCAGACATTTGGGAGA
TTAAACACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGAGGACTGCAGCTTCGATA
GAAAGGCTAAGAACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGGT
TGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGAATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGACGAGTCTTTGAAATAAGACGAAACTCTTCTA

35.>PLSCres34.1.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCGTCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGGGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGAGGACTGCAGTCTCGATA
GAAAGGCTAAGAACCTCGCGATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGGT
TGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCACA
CTGACGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACCCTTTTCA

36.>PLSCres34.2

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAG
AGTTGTGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGAGGACTGCAGTCTCGAT
AGAAAGGCTAAGAACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

37.>PLAndros11.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

38.>PLMCres21.1

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTTGTGACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGACCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCAAAGCAC
ACTGATGAGTCTTTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

39>PLA-37 5.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCACCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGTAAGCACCTCGCCATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

40.>PLScres15.1

CTCATAAGTTTCGCCGTATTTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTTACACCTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGATA
GAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCTAGCGGT
AGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGCGCTTAGCGCA
CTGATGAGTCTTTGAAATAAGACGAAACTCTTCGATTT

41.>PLRedHav135.1

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCGTCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGTTTACCTTTTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGTCTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGACGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTAA

42.>PLpeach195.1

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCCAACTTATGAGAGA
GTGGTGACCTCTCAACCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAACACTGGAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAGTGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGCGCTAAGCGCA
CTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTGA

43.>PLSCres51.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGGT
TGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCACA
CTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

44.>PLMCres162.1

TCCGTAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCGTCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTACGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTAGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTACAGGAACCAAGCGGT
TGGTTCCGAGGGGGGTGTGACCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGGTTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAATGAGAGTCTGTGCTAAGCACA
CTGACGAGTCTTTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

45.>PLTastFr5.1

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAG
ATTAGTCACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCTAGCGG
TAGGTTCCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTGA

46.>PLapricot2.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
TTAGTCACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCGTGCTTAGCACA
CTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCATATCA

47.>PLapricot2.1.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGAGCACTGCAGTTCCCGATA
GAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGGT
TGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGTCTACCC
GGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCGTGCTTAGCACAC
TGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCATATCA

48.>PLapricot17.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGGGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGGAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCATATCA

49.>PLapricot17.2

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGGGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAAGAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTGTCTGAAATGAGACGAAACTCATATCA

50>PLplum1.1

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTTGTGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCAGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGCGCTAAGCGC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGAGGAAACTCTTCTCA

51.>PLplum1.2

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGGTTACCTCTCAGCCCTTCCACCTTAGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCATTGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGCGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACCCTTCTAA

52.>PLplum1.3

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCGTCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGGTTACCTCTCAGCCCTTCCACCTTAGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGGCTTTTCCTTCAGGAACCAAGCGG
TTGGGTCCGAGGGGGGTGTGACTCAGGTACCGCCGTAGAACTGAGTTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGACGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTAA

53.>PLpear29.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGGGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

54.>PLpear29.4

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

55.>PLpear29.5

CACATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTTGTGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCAGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCACCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGCGCTAAGCGC
ACTAATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAGCTCTTCTCA

56.>PLcherry11.1

TCAAAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTTTGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCAGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

57.>PLcherry11.2

TCAAAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTTTGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCAGGAACCAAGCGG
TTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

58.>PLcherry11.5

TCAAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTTTGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

59.>PLcherry9.3

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGGGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTATGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

60.>PLcherry9.4

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

61.>PLcherry9.5

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGGGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGGCTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCATATCA

62.>PLw pear4.1

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGGGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTCTCA

63.>PLw pear4.2

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGGGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTAGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTATGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

64.>PLwpear4.3

TCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGGGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTAGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCGGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTATGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGAAGAAGAGTCTGTGCTTAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

65.>PLquince4.1

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACCACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGACGAGTCTCTGAAATGATACGAAACTCTTTTCA

66.>PLquince4.2

CCCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTATGAGAGA
GTGATGACCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGAGTGCCCTATTCGGAGCACTGCAGTTCCCGAT
AGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGAGGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACCAAGCGG
TTGGTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACTGGATTACGACGTCTACC
CGGGATTCAAACCCGGTCCCCTCCAGAAGTGATTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTAAGCAC
ACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTCA

Προσωπικά στοιχεία

Επώνυμο:	Μπουμπουράκας
Όνομα:	Ηρακλής
Ημερομηνία γεννήσεως:	11-3-1976
Τόπος γεννήσεως:	Λάρισα
Διεύθυνση κατοικίας:	Γούναρη 17 Άνω Γλυφάδα, Αττική
Τηλέφωνο:	210-9650692 / 697 3220194
Οικογενειακή κατάσταση:	Έγγαμος
E-Mail:	ibuburakas@yahoo.com

Εκπαίδευση & προσόντα

- 1990 - 1993 2^ο Γενικό Λύκειο Λάρισας, Βαθμός Απολυτηρίου 18 'Πολύ Καλά'.
- 1993 - 1998 Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών
Κατεύθυνση Φυτοπροστασίας, Βαθμός Πτυχίου: 8.53 'Άριστα'
- 1998 - 2001 Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας της Σχολής Γεωτεχνικών
Επιστημών, Ειδίκευση: Επιστημών Φυτοπροστασίας, Βαθμός: 8.89 'Άριστα'
- 2006-2010 Υποψήφιος Διδάκτορας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Τμήμα Φυτικής
Παραγωγής με θέμα διατριβής «Ιοειδές του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach
latent mosaic viroid*, PLMVd) και ιοειδή των μηλοειδών στην Ελλάδα».

Ξένες γλώσσες-Γνώση Η/Υ

Αγγλικά: Πτυχίο First Certificate University of Cambridge

Ιταλικά: Πτυχίο Celli 3 του Università per Stranieri Perugia

Ηλεκτρονικοί Υπολογιστές: Πιστοποίηση γνώσης χειρισμού των προγραμμάτων Microsoft Outlook 2000, M Word 2000, M. Excell 2000, M. Access 2000 και M. Power Point 2000, Official Certification Microsoft Office specialist.

Ένταξη στο Εισαγωγικό Μητρώο Ενηλίκων ΕΚΕΠΙΣ με κωδικό: Α 16385

Υποτροφίες-Διακρίσεις

- 1993-1998 Υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)
- 1998 Αποφοίτηση με βραβείο αριστείας (I.K.Y)
- 1998 Εισαγωγή στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας της
Σχολής Γεωτεχνικών Επιστημών του ΑΠΘ με υποτροφία (ΕΠΕΑΕΚ)

Διατριβές

1. Διπλωματική διατριβή με θέμα: «Ταυτοποίηση των αυτοφυών φυτών-ξενιστών του ιού του κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας (TSWV)». Βαθμός 10.
2. Μεταπτυχιακή διατριβή με θέμα: «Διερεύνηση του αιτίου της εσωτερικής αποσύνθεσης και χλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων της καρπουζιάς». Βαθμός 10.

Δημοσιεύσεις

Διεθνή περιοδικά

1. E.K. Chatzivassiliou, **I.N. Boubourakas**, E. Drossos, I. Eleftherohorinos, G. Jenser, D. Peters, N. I. Katis (2000) Weeds in greenhouses and tobacco fields are differentially infected by *Tomato spotted wilt virus* and infested by its vector species. *Plant Disease*, **85**: 40-45.
2. G.A. Manganaris, A.S. Economou, **I.N. Boubourakas**, N.I. Katis (2003). Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports*, **22**, 195-200.
3. G.A. Manganaris, A.S. Economou, **I.N. Boubourakas**, N.I. Katis (2003). Production of virus-free propagation material from infected nectarine trees. *Acta Horticulturae* **616**, pp. 501-505.
4. **I.N. Boubourakas**, E. Hatziloukas, Y. Antignus, N.I. Katis (2004). Etiology of leaf chlorosis and deterioration of the fruit interior of watermelon plants. *Journal of Plant Pathology* **152**, pp. 580-588.
5. L. C. Papayiannis, N. Ioannou, **I. N. Boubourakas**, C. I. Dovas, N. I. Katis and B. W. Falk (2005). Incidence of Viruses Infecting Cucurbits in Cyprus. *Journal of Phytopathology* **153**, pp 1-6.
6. **I.N. Boubourakas**, A.D. Avgelis, N.I. Katis (2006). Occurrence of *Criniviruses* affecting cucurbits in Greece and development of multiplex Polymerase Chain Reaction method for their detection. *Plant Pathology*, **55**, pp: 276-284.
7. **I.N. Boubourakas**, C. Arambatzis, C. Dovas and P.E. Kyriakopoulou, 2008. Amelioration of RT-PCR method for the detection of ASSVd, PBCVd and PLMVd viroids, and their presence in cultivated and wild pome and stone fruits in Greece. *Acta Horticulturae* **781**, pp. 519-527.
8. **I.N. Boubourakas**, S. Fukuta and P.E. Kyriakopoulou 2009. Sensitive and rapid detection of *Peach latent mosaic viroid* by the Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of Virological Methods*. 160. pp. 63-68.
9. **N. Boubourakas**, A. E. Voloudakis, T. Agorastou, G. Magripis, P. E. Kyriakopoulou, and G. Vidalakis 2009. Pilot Survey of Citrus Mother Trees in Greece for the Presence of Viruses and Viroids. In: Proceedings of the 17th Conference International Organization of Citrus Virologists, October 22-26, 2007, Adana, Turkey. pp.

10. **I.N. Boubourakas**, A.E. Voloudakis, K. Fasseas, N. Resnick, H. Koltai and P.E. Kyriakopoulou, 2010. Cellular localization of *Peach latent mosaic viroid* in peach sections by liquid phase *in situ* RT-PCR. *Plant Pathology*, in press.

Εκλαϊκευτικά περιοδικά

1. Π. Κυριακοπούλου, Ν. Κατής, Α. Αυγελής, Χ. Παπαβασιλείου, **Η. Μπουμπουράκας** (2002). Ιολογικές ασθένειες των κολοκυνθοειδών στην Ελλάδα. *Γεωργία και Κτηνοτροφία*, **10**, 108-144.

Ανακοινώσεις

1. Ε.Κ. Χατζηβασιλείου, **Η.Ν. Μπουμπουράκας**, Ε. Δρόσος, Η. Γ. Ελευθεροχωρινός, Ν. Ι. Κατής. (1999). Ζιζάνια ξενιστές του ιού του κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV). 10^ο Πανελλήνιο Ζιζανιολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη. Περίληψεις σελ. 50.
2. **Η.Ν. Μπουμπουράκας**, Ε. Χατζηλουκάς, Χ. Ι. Δόβας, Α. Γλιάτης, Ν. Ι. Κατής. (2000). Διερεύνηση του αιτίου της χλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων και της εσωτερικής αποσύνθεσης των καρπών της καρπουζιάς. 10^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Καλαμάτα. Περίληψεις σελ. 72.
3. Ε.Κ. Χατζηβασιλείου, **Η.Ν. Μπουμπουράκας**, Ε. Δρόσος, Η. Γ. Ελευθεροχωρινός, G. Jensen, D. Peters, Ν. Ι. Κατής. (2000). Αυτοφυή φυτά ως πιθανές πηγές του ιού του κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV) και των θριπών φορέων του σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες κηπευτικών και καλλωπιστικών καθώς και σε καλλιέργειες καπνού. 10^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Καλαμάτα. Περίληψεις σελ. 75.
4. Ν. Ι. Katis, C. Ι. Dovas, **I.N. Boubourakas**, A.D. Avgelis, P.E. Kyriakopoulou (2001) Epidemics of *Criniviruses* in tomato and cucumber crops in Greece. Peto Jugoslovensko Savetovanje o Zastiti Bilja, Zlabibor 3-8 Decembar 2001.
5. Α.Κ. Παπαγιάννης, **Η.Ν. Μπουμπουράκας**, Χ.Ι. Δόβας, Ν. Ιωάννου, Ν.Ι. Κατής (2002). Συχνότητα εμφάνισης εντομομεταδιδόμενων ιών σε καλλιέργειες κολοκυνθοειδών στην Κύπρο. 11^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Πρέβεζα. Περίληψεις σελ. 143.
6. Η.Ν. Μπουμπουράκας, Α.Δ. Αυγελής, Π.Η. Κυριακοπούλου, Α. Παρασκευόπουλος, Κ. Παπαχρήστου, Ν.Ι. Κατής (2002). Παρουσία ιών του γένους *Crinivirus* σε καλλιέργειες κολοκυνθοειδών στην Ελλάδα. 11^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Πρέβεζα. Περίληψεις σελ. 144.
7. G.A. Manganaris, A.S. Economou, I. Boubourakas, Ν. Katis (2003). Production of virus-free plant propagation material from infected nectarine trees. I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. Sani-Halkidiki, Macedonia, Greece

8. **H.N. Μπουμπουράκας** και Π. Η. Κυριακοπούλου, 2004. Η παρουσία των ιοειδών ASSVd, PBCVd και PLMVd σε καλλιεργούμενα και αυτοφυή είδη μηλοειδών, πυρηνοκάρπων και άλλων Rosaceae στη χώρα μας. 12^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο Καστορια, σελ 64.
9. **I.N. Boubourakas**, C. Arambatzis, C. Dovas and P.E. Kyriakopoulou, 2006. Improvement of RT-PCR method for the detection of ASSVd, PBCVd and PLMVd viroids, and their presence in cultivated and wild pome and stone fruits in Greece. XX International Symposium of Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Antalya, Turkey pp. 74.
10. **I.N. Boubourakas**, G.E. Vidalakis, A. Voloudakis, T. Agorastou, G. Magripis and P.E. Kyriakopoulou, 2006. Pilot survey of citrus mother trees in Greece for the presence of viruses and viroids 12th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Rhodes, Greece.
11. Γ. Βιδαλάκης, **H. N. Μπουμπουράκας**, Α. Βολουδάκης, Θ. Αγοραστό, Χ. Μαγριπής και Π. Η. Κυριακοπούλου 2006. Παρουσία ιών και ιοειδών σε μητρικές φυτείες εσπεριδοειδών στην Ελλάδα. 13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο Αθήνα, Περιλήψεις.
12. Μπερμπάτη Μ.Γ., Ο.Γ. Μελιτά, Ι.Ε. Τζανετάκης, **H.N. Μπουμπουράκας**, Μ.Ε. Γρατσία, Μ.Σ. Καπώνη, Α.Ε. Βολουδάκης και Π.Η. Κυριακοπούλου, 2006 Μελέτη ελληνικών απομονώσεων του ιού του μωσαϊκού του γογγυλιού (*Turnip mosaic virus*, TuMV). 13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο Αθήνα, Περιλήψεις
13. **H.N. Μπουμπουράκας**, F. Faggioli, S. Fucuta και Π.Η. Κυριακοπούλου. 2008 Η παρουσία του ιοειδούς του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) στην Ελλάδα. 14^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο Δαλαμανάρα Αργολίδας, Περιλήψεις, σελ. 56.
14. **H.N. Μπουμπουράκας**, S. Fucuta και Π.Η. Κυριακοπούλου. 2008 Ανίχνευση του ιοειδούς του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς, (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd), με την υψηλής ευαισθησίας και ταχύτητας διαγνωστική μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής ισοθερμικής ενίσχυσης με τη μεσολάβηση θηλιάς, (Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification, RT-LAMP). 14^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο Δαλαμανάρα Αργολίδας, Περιλήψεις, σελ. 57.
15. **H.N. Μπουμπουράκας**, S. Fucuta και Π.Η. Κυριακοπούλου. 2008 Αντίστροφη μεταγραφή ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση θηλιάς, (Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification, RT-LAMP) μια νέα μέθοδος για την ανίχνευση του ιοειδούς του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς, (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd), 9^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Ιολογίας, Αθήνα, Περιλήψεις, σελ. 67.
16. **I.N. Boubourakas**, S. Fukuta, and P.E. Kyriakopoulou 2009. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP): A novel method for the detection of *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd). XXI International Symposium of Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops. 5-10 July, Neustadt, Germany, pp 28.

Εικονογραφημένες Εργασίες

1. E. K. Chatzivassiliou, **I.N. Boubourakas**, E. Drossos, I. Eleftherohorinos, G. Jenser, D. Peters, N. I. Katis. (1998) A different prevalence of weeds susceptible to *Tomato spotted wilt tospovirus* in tobacco and greenhouse crops in Greece. 4TH International Symposium on Tospoviruses and Thrips in Floral and Vegetable Crops.
2. N. I. Katis, I. Livieratos, S. Winter, **I.N. Boubourakas**, J. A. Tsitsipis. 2001. Epidemics of *Beet – pseudo yellows virus* in glasshouse melon and cucumber crops in Greece. 1st European Whitefly symposium, Ragusa (Italia). pp.: 50.
3. E.K. Χατζηβασιλείου, **H.N. Μπουμπουράκας**, S. Winter, D.E. Lesemann, A.Δ. Αυγελής, N.I. Κατής (2002). Ιοί που προσβάλλουν τον αρακά *Pisum sativum* L. στη χώρα μας. 11^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Πρέβεζα.
4. **H. N. Μπουμπουράκας**, X. Αραμπατζής, X. I. Δόβας και Π. H. Κυριακοπούλου (2004). Βελτίωση της αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντιδράσεως της πολυμεράσης (RT-PCR) για την ανίχνευση των ιοειδών ASSVd, PBCVd και PLMVd. 12^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο Καστοριά.
5. Π.H. Κυριακοπούλου, M. Γρατσία, **H.N. Μπουμπουράκας** και A. Γρηγορίου (2004). Σπορομεταδιδόμενοι ιοί του γένους *Tobamovirus* και σφαιρικοί σε καλλιέργεια σπανακιού στο Μαραθώνα, 12^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Καστοριά, σελ.83.
6. Σ.-M. Γκίργκις, Π.H. Κυριακοπούλου και **H.N. Μπουμπουράκας** (2004). Πράσινη ταινίωση της αμπέλου, μια νέα ίωση σχετιζόμενη με *Ilarvirus*. 12^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Καστοριά, σελ. 79.
7. C.I. Dovas, **I.N. Boubourakas**, V. Maliokga, A.D. Avgelis, N.I. Katis (2004). Epidemics of whitefly-borne viruses in tomato and cucurbit crops in Greece. 2nd European Whitefly Symposium. Cavtat, Croatia 5th - 9th October 2004, pp: 29.
8. **I.N. Boubourakas** F. Faggioli, M. Luigi, M. Barba, S. Fukuta and P.E. Kyriakopoulou 2009 The presence of *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) in Greece. XXI International Symposium of Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops. 5-10 July, Neustadt, Germany.

Επαγγελματική δραστηριότητα

- 1998-1999 Συμμετοχή στο πρόγραμμα κατάρτισης (κωδικός 3087) με τίτλο: Αναδιάρθρωση και ενίσχυση του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας του Α.Π.Θ.
- 2000-2001 Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα «Βελτίωση της ποιότητας και μείωση του κόστους παραγωγής ελληνικού πατατόσπορου με χρήση καινοτομικών βιοτεχνολογικών

- μεθόδων παραγωγής, πιστοποίησης και δημιουργίας νέων γενοτύπων πατάτας»
- 2004-2005 Γεωπόνος πρακτικής άσκησης στον Οργανισμό Ο.Γ.Ε.Ε.Κ.Α. «ΔΗΜΗΤΡΑ» με αντικείμενο εργασίας την κατάρτιση προγραμμάτων εκπαίδευσης αγροτών.
- 2005-2007 Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών: «Επισκόπηση, ανίχνευση και μελέτη ιών και ιοειδών των εσπεριδοειδών στην Ελλάδα».
- 2005- Γεωπόνος της Διεύθυνσης Γεωργίας Πειραιά στο Τμήμα Παραγωγής και Ελέγχου Ποιότητας με αντικείμενα Φυτοπροστασίας και Βιολογικής Γεωργίας.