

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
Εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού

## **Διδακτορική διατριβή**

**Αξιοποίηση μοριακών μεθόδων στη βελτίωση  
ανθεκτικότητας των εσπεριδοειδών στο *Citrus  
exocortis viroid*, στον έλεγχο της υγείας των  
εσπεριδοειδών υπό εξυγίανση και στη μελέτη  
διαφορικής έκφρασης γονιδίων ποικιλιών λεμονιάς**

**Ευαγγελία Μ. Κουτσιουμάρη**



**ΑΘΗΝΑ 2016**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
Εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού

## **Διδακτορική διατριβή**

**Αξιοποίηση μοριακών μεθόδων στη βελτίωση  
ανθεκτικότητας των εσπεριδοειδών στο *Citrus  
exocortis viroid*, στον έλεγχο της υγείας των  
εσπεριδοειδών υπό εξυγίανση και στη μελέτη  
διαφορικής έκφρασης γονιδίων ποικιλιών λεμονιάς**

**Ευαγγελία Μ. Κουτσιουμάρη**

**ΑΘΗΝΑ 2016**

# **Διδακτορική διατριβή**

**Αξιοποίηση μοριακών μεθόδων στη βελτίωση  
ανθεκτικότητας των εσπεριδοειδών στο *Citrus  
exocortis viroid*, στον έλεγχο της υγείας των  
εσπεριδοειδών υπό εξυγίανση και στη μελέτη  
διαφορικής έκφρασης γονιδίων ποικιλιών λεμονιάς**

**Ευαγγελία Μ. Κουτσιουμάρη**

## **Επιβλέπων Καθηγητής**

**Σκαράκης Γεώργιος, Καθηγητής Γ.Π.Α.**

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Σκαράκης Γεώργιος, Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**Ρούσσος Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**Παυλή Ουρανία, Λέκτορας Π.Θ.**

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Σκαράκης Γεώργιος, Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**Ρούσσος Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**Παυλή Ουρανία, Λέκτορας Π.Θ.**

**Μπεμπέλη Πηνελόπη, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.**

**Χατζηβασιλείου Ελισσάβετ, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α.**

**Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**Τάνη Ελένη, Λέκτορας Γ.Π.Α.**

**ΑΘΗΝΑ 2016**

## Περίληψη

Τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται για εμπορική χρήση σε μια μεγάλη ποικιλία εδαφικών και κλιματικών συνθηκών, με αποτέλεσμα να υπόκεινται σε καταπονήσεις από πολλούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες οι οποίοι περιορίζουν την παραγωγή και σε ορισμένες περιπτώσεις, καθιστούν απαγορευτική τη χρήση συγκεκριμένων υποκειμένων και ποικιλιών. Το ιοειδές της εξωκορτίδας των εσπεριδοειδών (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) προκαλεί έντονα συμπτώματα στα δένδρα που είναι εμβολιασμένα στο υποκείμενο *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. και τα υβρίδιά του τα οποία, λόγω της ανθεκτικότητάς τους στην ίωση τριστέσσα, αξιοποιούνται τα τελευταία χρόνια προς αντικατάσταση της νεραντζιάς (*Citrus aurantium* L.). Η πλέον αποτελεσματική προσέγγιση για την αντιμετώπιση των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων στα φυτά είναι η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. Παρόλα αυτά, η έλλειψη φυσικών πηγών ανθεκτικότητας στις περισσότερες επιζήμιες ασθένειες, σε συνδυασμό με την έλλειψη βασικής γνώσης σχετικά με τον τρόπο κληρονομησης των κυριότερων αγρονομικών χαρακτηριστικών, καθιστά επιτακτική την ανάγκη αξιοποίησης της γενετικής μηχανικής στη βελτίωση των εσπεριδοειδών. Προς την κατεύθυνση αυτή, η ευχερής εφαρμογή της γενετικής μηχανικής προϋποθέτει την ύπαρξη ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου ιστοκαλλιέργειας για κάθε είδος και ποικιλία εσπεριδοειδούς, προκειμένου να εξασφαλιστεί η αναγέννηση ικανοποιητικού αριθμού μετασηματισμένων φυτών. Στα πλαίσια αυτά, η παρούσα μελέτη αρχικά επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό του καταλληλότερου πρωτόκολλου γενετικού μετασηματισμού για καθένα από τα: *P. trifoliata*, Carrizo citrange (*C. sinensis* × *P. trifoliata*), Citrumelo 1452 (*P. trifoliata* × *C. paradisi*), νεραντζιά και «Μαγληνή» λεμονιά (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) (Κεφάλαιο 1).

Τα τελευταία χρόνια, μία από τις πλέον αποτελεσματικές μεθόδους για την επίτευξη ανθεκτικότητας σε ιούς και ιοειδή είναι η αξιοποίηση των μηχανισμών της RNA σιώπησης (RNA silencing, RNAi). Στα πλαίσια αυτά, και δεδομένης της δυστροπίας που χαρακτηρίζει τα εσπεριδοειδή ως προς το μετασηματισμό και την αναγέννηση φυτών, στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη διαγονιδιακής ανθεκτικότητας έναντι του ιοειδούς CEVd στο φυτό-μοντέλο *N. benthamiana* που ωστόσο δεν αποτελεί ξενιστή του CEVd. Για το σκοπό αυτό, αρχικά επιχειρήθηκε η μόλυνση φυτών *N. benthamiana* μέσω δύο διαφορετικών προσεγγίσεων: α) αγροεμποτισμού και β) σταθερού γενετικού μετασηματισμού, με πλασμίδιο που φέρει

το διμερές μόριο του CEVd (Κεφάλαιο 2). Τα ευρήματα κατέδειξαν τον αργό ρυθμό πολλαπλασιασμού του CEVd στα αγρο-εμποτισμένα φυτά, σε αντίθεση με τα διαγονιδιακά φυτά που πολλαπλασίαζαν επιτυχώς το ιοειδές. Στα τελευταία ωστόσο, παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη και παραγωγή σπόρου σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά. Προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα διαφόρων τμημάτων του CEVd να επάγουν σιώπηση της έκφρασης του ιοειδούς και αναστολή του πολλαπλασιασμού του, πραγματοποιήθηκε μόλυνση των διαγονιδιακών φυτών με δύο τμήματα της αλληλουχίας του CEVd υπό μορφή φουρκέτας (Κεφάλαιο 3). Τα αποτελέσματα παρείχαν ισχυρές ενδείξεις ότι τα συγκεκριμένα τμήματα του CEVd μπορούν να προκαλέσουν σιώπηση στο ιοειδές περιορίζοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού του. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από αντίστοιχη δοκιμή παροδικής έκφρασης σε φυτά *N. benthamiana* αγρίου τύπου όπου η παρουσία του ιοειδούς προκάλεσε μειωμένη συσσώρευση των δύο τμημάτων του.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν ο φαινότυπος ανθεκτικότητας στο φυτό-μοντέλο *N. benthamiana* μπορεί να επιτευχθεί και στα εσπεριδοειδή, που αποτελούν φυσικούς ξενιστές του ιοειδούς, επιχειρήθηκε η ενσωμάτωση, μέσω γενετικού μετασχηματισμού, των δύο επιλεγμένων τμημάτων του CEVd σε γονότυπους εσπεριδοειδών (Κεφάλαιο 4). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε φυτά *P. trifoliata*, Carrizo citrange και Citrumelo 1452. Παράλληλο στόχο αποτέλεσε η ανάπτυξη διαγονιδιακής ανθεκτικότητας στην ασθένεια της ψώρωσης των εσπεριδοειδών, μέσω ένθεσης τμήματος της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού της ψώρωσης (*Citrus psorosis virus*, CPsV) σε Νεραντζιά και «Μαγληνή» λεμονιά (Κεφάλαιο 4).

Για την αντιμετώπιση των ασθενειών των εσπεριδοειδών είναι πολύ σημαντική η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Μια αποτελεσματική μέθοδος παραγωγής εξυγιασμένων φυτών είναι ο *in vitro* μικροεμβολιασμός κορυφαίων μεριστωμάτων. Από τον έλεγχο που διενεργήθηκε σε φυτά λεμονιάς, πορτοκαλιάς και μανταρινιάς που είχαν παραχθεί με την εφαρμογή της εν λόγω τεχνικής, διαπιστώθηκε η απουσία από αυτά των σημαντικότερων ιών και ιοειδών, υποδεικνύοντας ότι πλέον υπάρχει και στη χώρα μας η απαραίτητη τεχνογνωσία για την εξυγίανση του πολύτιμου πολλαπλασιαστικού υλικού των εσπεριδοειδών (Κεφάλαιο 5).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η μελέτη ορισμένων αλληλουχιών που υπερεκφράζονται στην ελληνική ποικιλία λεμονιάς «Αδαμοπούλου» σε σύγκριση με την πορτογαλική ποικιλία «Lisbon» (Κεφάλαιο 6). Η διαφορά των δύο ποικιλιών έγκειται στο γεγονός ότι η «Αδαμοπούλου» είναι ανεκτική στην κορυφοξήρα και το ψύχος σε αντίθεση με τη

«Lisbon». Αρκετές από τις υπό μελέτη αλληλουχίες παρουσίασαν ομολογία με πρωτεΐνες που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων, ενώ η διαφορά στην έκφραση μεταξύ των δύο ποικιλιών για επτά επιλεγμένα γονίδια κυμαίνεται σε διάφορα επίπεδα.

### **Λέξεις κλειδιά**

Εσπεριδοειδή; ιοειδές της εξωκορτίδας των εσπεριδοειδών; γενετική μηχανική; RNA σιώπηση; διαγονιδιακή ανθεκτικότητα; *N.benthamiana*; *in vitro* μικροεμβολιασμός; κατασταλτικός αφαιρετικός υβριδισμός

## **Exploitation of molecular methods in resistance improvement of citrus against *Citrus exocortis viroid*, health status testing of citrus under sanitation program, and studying differentially expressed genes in lemon cultivars.**

### **Abstract**

Citrus, commercially grown in a wide range of soil and climatic conditions, are subjected to substantial biotic and abiotic stresses which limit the production and in some cases, pose restrictions on the use of specific rootstocks and varieties. *Citrus exocortis viroid* (CEVd) causes severe symptoms in trees grafted on *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and its hybrids which, due to their tolerance to *Citrus tristeza virus*, are recently employed for the replacement of sour orange (*Citrus aurantium* L.). The most effective method of controlling both biotic and abiotic stresses in plants refers to the use of resistant varieties. Nevertheless, the lack of natural genetic sources of resistance to most severe diseases, along with the lack of basic knowledge on the inheritance pattern of main agronomic traits, render necessary the use of genetic engineering in citrus breeding. To this direction, the exploitation of genetic engineering requires the existence of an efficient tissue culture protocol for each citrus species, to ensure regeneration of sufficient number of transformed plants. In this framework, the present study initially focused on the determination of the most suitable genetic transformation protocol for each citrus species: *P. trifoliata*, Carrizo citrange (*C. sinensis* × *P. trifoliata*), Citrumelo 1452 (*P. trifoliata* × *C. paradisi*), sour orange and “Maglini” lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) (Chapter 1).

In recent years, one of the most efficient methods for the generation of resistance against viruses and viroids refers to the exploitation of RNA silencing (RNAi). Towards this direction, and in view of the recalcitrant nature of citrus species which renders transformation and regeneration particularly difficult, aim of this study was the development of transgenic CEVd resistance in the model plant *Nicotiana benthamiana* which is a non-host of CEVd. In this line, the CEVd-inoculation of *N. benthamiana* plants was pursued by two different approaches: a) agroinfiltration and b) stable genetic transformation, using a plasmid harboring the dimeric CEVd molecule (Chapter 2). The results indicate a low rate of CEVd replication in the agro-infiltrated plants, in contrast to transgenic plants which were capable of CEVd replication. The latter though, were characterized by reduced growth and seed production compared to wild-type plants.

Towards investigating the capability of various segments of the CEVd genome in inducing silencing of its genome and subsequent suppression of its replication, transgenic plants replicating the viroid were inoculated with two different self-complementary hairpin RNA fragments from the CEVd genome (Chapter 3). The results provided strong evidence that both CEVd regions are capable of triggering RNA silencing, thus causing a reduction to the viroid replication rate. These results were also confirmed by transient expression experiments in wild-type *N. benthamiana* plants, where viroid presence caused reduced accumulation of the selected CEVd fragments.

As a means to investigate whether the observed resistant phenotype of the model plant *N. benthamiana* can be achieved in citrus species, which consist the natural viroid hosts, the introgression of two selected segments of the CEVd genome was pursued, by genetic transformation, in various citrus genotypes (Chapter 4). To this purpose, genetic transformation was performed in plants of *P. trifoliata*, Carrizo citrange and Citrumelo 1452. Parallel aim was the generation of transgenic resistance against citrus psorosis disease, through the introgression of the viral coat protein of *Citrus psorosis virus* (CPsV) in sour orange and “Maglini” lemon (Chapter 4).

The most important method to control citrus diseases is the use of healthy certified propagation material. An effective method for plant sanitation is *in vitro* micrografting of apical meristems. The study of *in vitro* micrografted lemon, orange and mandarin plants verified the absence of the most important viruses and viroids for Greek citriculture, indicating that the necessary expertise for sanitation of the precious citrus propagation material exists in our country (Chapter 5).

Finally, this dissertation included the study of certain sequences which are overexpressed in the Greek lemon “Adamopoulou” compared to the Portuguese “Lisbon” (Chapter 6). The difference between the two varieties is that “Adamopoulou” is tolerant to mal secco and cold compared to “Lisbon”. Several of the sequences under study presented homology with proteins directly or indirectly involved in the defense mechanisms of plants against biotic and abiotic stresses, with the difference between the two varieties in expression of seven genes being at varying levels.

## **Keywords**

Citrus; *citrus exocortis viroid*; genetic engineering; RNA silencing; transgenic resistance; *N. benthamiana*; *in vitro* micrografting; suppression subtractive hybridization



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Ανδρέα Ε. Βολουδάκη, ουσιαστικό Επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας εργασίας, διότι εκείνος με ενέπνευσε για την επιλογή του συγκεκριμένου θέματος, με καθοδηγούσε και μου έδινε πολύτιμες συμβουλές στα πέντε χρόνια που διήρκησε η εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης. Η συνεργασία μας ήταν άριστη και το ενδιαφέρον του συνεχές σε όλα τα στάδια, αλλά ατυχείς συγκυρίες δεν επέτρεψαν να ολοκληρώσουμε μαζί αυτή την πορεία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή Γεώργιο Σκαράκη, μέλος εξ αρχής της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής και τελικά Επιβλέπων καθηγητή, για τη συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης και ιδιαίτερα τους τελευταίους μήνες της συγγραφής και της υποστήριξης της διδακτορικής μου διατριβής. Η συμβολή του ήταν καθοριστική για την επιτυχή έκβαση αυτής της πολυετούς προσπάθειας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή Πέτρο Ρούσσο, για την άριστη συνεργασία και τις χρήσιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Λέκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ουρανία Παυλή, για την πολύτιμη συμβολή της στην τελική μορφή του παρόντος κειμένου. Οι εύστοχες διορθώσεις και παρατηρήσεις της συνέβαλλαν στη δημιουργία του άρτιου τελικού αποτελέσματος.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια Πηνελόπη Μπεμπέλη, την Επίκουρη καθηγήτρια Ελισσάβετ Χατζηβασιλείου, τον Επίκουρο καθηγητή Εμμανουήλ Φλεμετάκη και τη Λέκτορα Ελένη Τάνη για τις εύστοχες επισημάνσεις και διορθώσεις τους στο κείμενο και την παρουσίαση της παρούσας εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ το προσωπικό του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού του Γ.Π.Α. για την άριστη συνεργασία και υποστήριξη που μου προσέφεραν στη διάρκεια της εκπόνησης της ερευνητικής αυτής προσπάθειας καθώς και τα μέλη των Εργαστηρίων Κηπευτικών Καλλιεργειών και Δενδροκομίας του Γ.Π.Α για τη φιλοξενία στους χώρους τους και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν για τη χρήση του εργαστηριακού τους εξοπλισμού.

Επίσης, ευχαριστώ το κληροδότημα Παν. Τριανταφυλλίδη για τη χορήγηση υποτροφίας κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ετών εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Και επειδή σε ένα μεγάλο κείμενο κοιτάμε πάντα την αρχή και το τέλος, θα ήθελα να κλείσω την ενότητα των ευχαριστιών με τα άτομα που έπαιξαν τον καθοριστικότερο ρόλο για την επίτευξη του μεγάλου στόχου της εκπόνησης της παρούσας διατριβής: τους αγαπημένους μου γονείς, που με στήριξαν ηθικά, ψυχολογικά και οικονομικά (για να έχω την πολυτέλεια να αφοσιωθώ αποκλειστικά στο στόχο μου), τους φίλους μου εντός και εκτός Πανεπιστημίου για την ψυχολογική υποστήριξη και κατανόηση και φυσικά τον άνθρωπο που γνώρισα στη μέση της μεγάλης «διαδρομής», το σύζυγό μου Δημήτρη, του οποίου η συνδρομή ήταν καταλυτική και ουσιαστική για να αντιληφθώ ότι πρέπει να υπάρχει ισορροπία στη ζωή μας για να είμαστε ευτυχισμένοι και ταυτόχρονα αποδοτικοί σε ό,τι κάνουμε.

Σας ευχαριστώ όλους από καρδιάς.

Ευαγγελία Μαρίνου Κουτσιουμάρη

**Αφιερωμένο  
στη μνήμη του πατέρα μου**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>Περίληψη</i> .....	4
<i>Abstract</i> .....	7
<i>Ευχαριστίες</i> .....	9
<i>Γενική εισαγωγή</i> .....	15
<i>Στόχοι της διδακτορικής διατριβής</i> .....	24
<i>Κεφάλαιο 1. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών</i> .....	25
<b>1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>25</b>
1.1.1. Ανάγκες βελτίωσης των εσπεριδοειδών.....	25
1.1.2. Παραδοσιακή βελτίωση των εσπεριδοειδών .....	26
1.1.3. Μοριακή βελτίωση εσπεριδοειδών – Γενετική Μηχανική .....	27
1.1.4. Ιστοκαλλιέργεια των εσπεριδοειδών .....	30
1.1.5. Σκοπός .....	32
<b>1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>33</b>
1.2.1. Φυτικό υλικό και προετοιμασία του.....	33
1.2.2. Προετοιμασία βακτηρίου .....	33
1.2.3. Γενετικός μετασχηματισμός εσπεριδοειδών.....	34
1.2.4. Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου στα αναγεννημένα φυτά.....	39
<b>1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>41</b>
<b>1.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>48</b>
<b>1.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>51</b>
<i>Κεφάλαιο 2. Δημιουργία φυτών <i>N. benthamiana</i> που πολλαπλασιάζουν το ιοειδές CEVd</i> .....	55
<b>2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>55</b>
2.1.1. Ιδιότητες των ιοειδών .....	55
2.1.2 Το ιοειδές CEVd .....	57
2.1.3. Το φυτό-μοντέλο <i>N. benthamiana</i> .....	59
2.1.4. Σκοπός.....	60
<b>2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>61</b>
2.2.1. Μόλυνση φυτών <i>N. benthamiana</i> αγρίου τύπου με το CEVd .....	61
2.2.1.1. Προετοιμασία πλασμίδιου .....	61
2.2.1.2. Αγρο-εμποτισμός (Agro-infiltration) φυτών <i>N. benthamiana</i> αγρίου τύπου.....	61
2.2.1.3. Απομόνωση RNA και έλεγχος του πολλαπλασιασμού του CEVd στα αγρο-εμποτισμένα φυτά <i>N. benthamiana</i> .....	62
2.2.2. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών <i>N. benthamiana</i> που πολλαπλασιάζουν το CEVd .....	64
2.2.2.1. Προετοιμασία βακτηρίου .....	64
2.2.2.2. Γενετικός μετασχηματισμός φυτών <i>N. benthamiana</i> .....	64
2.2.2.3. Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου στα αναγεννημένα φυτά .....	66
2.2.2.4. Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του CEVd στα μετασχηματισμένα φυτά .....	67
2.2.3. Μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών διαγονιδιακών φυτών <i>N. benthamiana</i> που πολλαπλασιάζουν το CEVd .....	68
2.2.3.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης.....	68
2.2.3.2. Επιβεβαίωση του πολλαπλασιασμού του CEVd στα διαγονιδιακά φυτά T <sub>1</sub> γενιάς.....	69
2.2.3.3. Μετρήσεις και στατιστική ανάλυση .....	69
<b>2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>71</b>
2.3.1. Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του CEVd σε φυτά αγρο-εμποτισμένα με το πλασμίδιο pCdCEVd .....	71
2.3.2. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών <i>N. benthamiana</i> που πολλαπλασιάζουν το CEVd .....	73

2.3.3. Μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών διαγονιδιακών φυτών <i>N. benthamiana</i> που πολλαπλασιάζουν το CEVd .....	79
<b>2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>87</b>
<b>2.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>91</b>
<b>Κεφάλαιο 3. Αξιολόγηση τμημάτων του CEVd ως προς την ικανότητα επαγωγής της RNA σιώπησης σε φυτά <i>N. benthamiana</i> .....</b>	<b>94</b>
<b>3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>94</b>
3.1.1. RNA σιώπηση και αντιμετώπιση των ιοειδών .....	94
3.1.2. Σκοπός.....	97
<b>3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>99</b>
3.2.1. Αλληλούχηση ελληνικών απομονώσεων του CEVd .....	99
3.2.2. Έλεγχος τμημάτων του CEVd ως προς την ικανότητα επαγωγής RNA σιώπησης σε διαγονιδιακά φυτά <i>N. benthamiana</i> που πολλαπλασιάζουν το ιοειδές.....	101
3.2.2.1. Προετοιμασία πλασμιδίων .....	101
3.2.2.2. Αγρο-εμποτισμός διαγονιδιακών φυτών <i>N. benthamiana</i> που πολλαπλασιάζουν το CEVd .....	107
3.2.2.3. Έλεγχος της σιώπησης με Real-time PCR .....	108
3.2.3. Έλεγχος της ικανότητας επαγωγής RNA σιώπησης μέσω παροδικής έκφρασης τμημάτων του CEVd .....	110
3.2.3.1. Προετοιμασία πλασμιδίων .....	110
3.2.3.2. Αγρο-εμποτισμός (agro-infiltration) φυτών <i>N. benthamiana</i> αγρίου τύπου.....	114
3.2.3.3. Απομόνωση RNA από τα αγρο-εμποτισμένα φύλλα <i>N. benthamiana</i> .....	114
3.2.3.4. Έλεγχος σιώπησης με ημι-ποσοτική και Real-time PCR.....	115
<b>3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>119</b>
3.3.1. Απομόνωση του CEVd από μολυσμένα εσπεριδοειδή και αλληλούχηση του .....	119
3.3.2. Έλεγχος τμημάτων του CEVd ως προς την ικανότητα επαγωγής RNA σιώπησης σε διαγονιδιακά φυτά <i>N. benthamiana</i> που πολλαπλασιάζουν το ιοειδές.....	122
3.3.3. Έλεγχος της ικανότητας επαγωγής RNA σιώπησης μέσω παροδικής έκφρασης τμημάτων του CEVd .....	128
<b>3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>133</b>
<b>3.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>138</b>
<b>Κεφάλαιο 4. Παραγωγή διαγονιδιακών εσπεριδοειδών που εκφράζουν τμήματα του ιοειδούς CEVd ή τμήμα της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού CPsV .....</b>	<b>142</b>
<b>4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>142</b>
4.1.1. Η εφαρμογή της RNA σιώπησης στις δενδρώδεις καλλιέργειες.....	142
4.1.2. Η ασθένεια της ψώρωσης των εσπεριδοειδών .....	143
4.1.3. Σκοπός.....	145
<b>4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>147</b>
4.2.1. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν τμήματα του CEVd.....	147
4.2.1.1. Φυτικό υλικό.....	147
4.2.1.2. Προετοιμασία βακτηρίου.....	147
4.2.1.3. Γενετικός μετασχηματισμός εσπεριδοειδών .....	147
4.2.1.4. <i>In vitro</i> εμβολιασμός .....	148
4.2.1.5. Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου στα αναγεννημένα φυτά .....	149
4.2.2. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού CPsV .....	150
4.2.2.1. Φυτικό υλικό.....	150
4.2.2.2. Προετοιμασία βακτηρίου.....	151
4.2.2.3. Γενετικός μετασχηματισμός εσπεριδοειδών .....	151
4.2.2.4. Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου στα αναγεννημένα φυτά .....	152
<b>4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>154</b>
4.3.1. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν τμήματα του CEVd.....	154

4.3.2. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν την καρδιακή πρωτεΐνη του ιού CPsV .....	159
<b>4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>162</b>
<b>4.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>166</b>
<b><i>Κεφάλαιο 5. Έλεγχος για την παρουσία ιών και ιοειδών σε μικροεμβολιασμένα εσπεριδοειδή υπό εξυγίανση.....</i></b>	<b><i>170</i></b>
<b>5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>170</b>
5.1.1. Ασθένειες των εσπεριδοειδών που προκαλούνται από ιούς και ιοειδή.....	170
5.1.2. Διάγνωση των ιών και ιοειδών .....	173
5.1.3. Μέθοδοι εξυγίανσης του πολλαπλασιαστικού υλικού .....	175
5.1.4. Ανίχνευση των ιών και ιοειδών στην Ελλάδα και παραγωγή άνοσου πολλαπλασιαστικού υλικού .....	178
5.1.5. Σκοπός.....	180
<b>5.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>181</b>
5.2.1. Φυτικό υλικό .....	181
5.2.2. Διάγνωση ιών και ιοειδών .....	181
<b>5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>184</b>
<b>5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>188</b>
<b>5.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>190</b>
<b><i>Κεφάλαιο 6. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων διαφορεικά εκφραζομένων σε βλαστούς δύο ποικιλιών λεμονιάς.....</i></b>	<b><i>195</i></b>
<b>6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>195</b>
6.1.1. Παράγοντες καταπόνησης στη λεμονιά .....	195
6.1.2. Βελτίωση της λεμονιάς για ανθεκτικότητα σε παράγοντες καταπόνησης .....	196
6.1.3. Ανίχνευση διαφορετικά εκφραζομένων γονιδίων στις ποικιλίες λεμονιάς Αδαμοπούλου και Lisbon .....	199
6.1.4. Σκοπός.....	200
<b>6.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>201</b>
6.2.1. Κατηγοριοποίηση των αλληλουχιών.....	201
6.2.2. Ανάλυση των αλληλουχιών με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) .....	201
<b>6.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>203</b>
6.3.1. Κατηγοριοποίηση των αλληλουχιών .....	203
6.3.2. Ανάλυση των αλληλουχιών με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) .....	205
<b>6.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>207</b>
<b>6.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>213</b>
<b><i>Γενική συζήτηση.....</i></b>	<b><i>218</i></b>
<b><i>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</i></b>	<b><i>228</i></b>
<b>I. Αλληλουχίες CEVd.....</b>	<b>228</b>
<b>II. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών του CEVd.....</b>	<b>229</b>
<b>III. Περιλήψεις εργασιών που παρουσιάστηκαν σε συνέδρια.....</b>	<b>231</b>

## Γενική εισαγωγή

Τα εσπεριδοειδή ανήκουν στην οικογένεια Rutaceae, στην υποοικογένεια Aurantioideae, στη φυλή Citrae και στην υποφυλή Citrinae. Είναι ιθαγενή των υποτροπικών και τροπικών περιοχών της νοτιο-ανατολικής Ασίας (βορειο-ανατολική Ινδία, νότια Κίνα) (Nicolosi, 2007). Η διάδοσή τους στη Μεσόγειο πιθανόν άρχισε προς το τέλος του 4<sup>ου</sup> αιώνα π.Χ. κατά την εκστρατεία του Μεγάλου Αλεξάνδρου προς τις χώρες της Ασίας, με την κίτριά (*Citrus medica* L.) να αποτελεί το πρώτο είδος που εισήχθη στην Ευρώπη (Nicolosi, 2007). Η καλλιέργειά της στην Περσία περιγράφεται από το Θεόφραστο το 313 π.Χ. ενώ στις ανατολικές μεσογειακές χώρες διαδόθηκε από τους Εβραίους. Η νεραντζιά (*Citrus aurantium* L.) και η λεμονιά (*Citrus limon* Burm.) διαδόθηκαν από τους Άραβες στην Ανατολική Μεσόγειο κατά το δέκατο αιώνα και αργότερα έφτασαν στη βόρεια Αφρική και τη Νότια Ευρώπη (Nicolosi, 2007). Η φράππα (*Citrus grandis* Osb.) κατάγεται από τις τροπικές περιοχές του Μαλαϊκού Αρχιπελάγους από όπου εξαπλώθηκε στην Κίνα και στη συνέχεια, στην ανατολική Μεσόγειο κατά το δέκατο αιώνα (Spiegel -Roy and Goldschmidt, 1996). Η πορτοκαλιά (*Citrus sinensis* L.) εισήχθη από την Κίνα στην Ευρώπη από τους Γενουάτες και διαδόθηκε από τους Πορτογάλους κατά το δωδέκατο αιώνα (Calabrese, 2002). Η λιμεττία (*Citrus aurantifolia* Swing.) κατάγεται από την ανατολική Ινδία και αναφέρεται για πρώτη φορά στην Ευρώπη κατά τον δέκατο τρίτο αιώνα και διαδόθηκε κατά τον ίδιο τρόπο, κατά το πρώτο ήμισυ του δωδέκατου αιώνα (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996). Τέλος, η μανταρινιά (*Citrus reticulata* Blanco) καλλιεργείται στην Κίνα εδώ και 4000 περίπου χρόνια, όμως το πρώτο δένδρο έφτασε στην Ευρώπη στις αρχές του δέκατου ένατου αιώνα (Nicolosi, 2007).

Σήμερα, τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται σε πολλές χώρες του κόσμου (Πίνακας 1) αλλά η παραγωγή είναι συγκεντρωμένη σε συγκεκριμένες περιοχές (Εικ. 1). Κατάλληλες περιοχές για την καλλιέργεια των εσπεριδοειδών θεωρούνται οι υποτροπικές περιοχές που βρίσκονται στη ζώνη μεταξύ 15° και 35° βόρειο και νότιο γεωγραφικό πλάτος (Jackson, 1999).

Η μεγαλύτερη ποσότητα πορτοκαλιών παράγεται στη Βραζιλία ενώ η Κίνα κατατάσσεται πρώτη στην παραγωγή μανταρινιών. Η Ελλάδα καταλαμβάνει την έκτη θέση μεταξύ των χωρών της λεκάνης της Μεσογείου στη συνολική παραγωγή εσπεριδοειδών (Πίνακας 1).



**Εικόνα 1.** Οι σημαντικότερες περιοχές καλλιέργειας των εσπεριδοειδών (Πηγή: Wikipedia).

**Πίνακας 1.** Οι εκτάσεις που καταλαμβάνουν τα εσπεριδοειδή στις κύριες χώρες καλλιέργειάς τους.

<b>Καλλιεργούμενη έκταση σε χιλιάδες εκτάρια</b>	
<b>Μεσογειακές χώρες</b>	
Ισπανία	295
Ιταλία	173
Αίγυπτος	157
Τουρκία	101
Μαρόκο	75
Αλγερία	54
<b>Ελλάδα</b>	<b>52</b>
Τυνησία	32
Ισραήλ	17
Κύπρος	5
<b>Βόρειο Ημισφαίριο</b>	
Κίνα	2.118
Ινδία	1.001
Μεξικό	552
Η.Π.Α.	334
Ιαπωνία	56
<b>Νότιο Ημισφαίριο</b>	
Βραζιλία	897
Αργεντινή	134
Νότιος Αφρική	70

(Στοιχεία: FAO, 2013)



**Πίνακας 2.** Κύριες χώρες παραγωγής εσπεριδοειδών και η παραγωγή τους τη χρονιά 2010-2011.

	Παραγωγή σε χιλιάδες τόνους				
	Σύνολο	Πορτοκάλια	Μανταρίνια	Λεμόνια	Γκρέιπφρουτ
<b>Μεσογειακές χώρες</b>					
Ισπανία	6.627	3.345	2.290	927	65
Αίγυπτος	3.610	2.430	787	333	60
Ιταλία	3.203	1.950	758	488	7
Τουρκία	3.077	1.260	687	860	270
Μαρόκο	1.701	904	716	80	1
<b>Ελλάδα</b>	<b>1.094</b>	<b>922</b>	<b>120</b>	<b>46</b>	<b>6</b>
Αλγερία	571	415	111	44	-
Ισραήλ	466	93	132	56	186
Τυνησία	352	202	52	47	50
Κύπρος	253	98	85	19	52
<b>Βόρειο Ημισφαίριο</b>					
Κίνα	22.940	5.900	14.000	-	2.800
Η.Π.Α.	10.445	7.937	594	793	1.121
Ινδία	8.267	5.319	-	2.749	198
Μεξικό	6.744	4.100	450	1.800	394
Ιαπωνία	1.038	62	968	-	-
<b>Νότιο Ημισφαίριο</b>					
Βραζιλία	22.704	20.645	1.103	898	58
Αργεντινή	2.490	580	280	1.490	140
Νότιος Αφρική	1.906	1.309	-	220	377

(Στοιχεία: FAO, 2012)

Πολλοί διαφορετικοί γονότυποι των εσπεριδοειδών καλλιεργούνται για εμπορική χρήση σε μια μεγάλη ποικιλία εδαφικών και κλιματικών συνθηκών. Για το λόγο αυτό, τα φυτά υποβάλλονται σε σημαντικές καταπονήσεις από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες οι οποίοι περιορίζουν την παραγωγή και σε ορισμένες περιπτώσεις δημιουργούν περιορισμούς στη χρήση συγκεκριμένων υποκειμένων και ποικιλιών. Οι κυριότεροι αβιοτικοί παράγοντες που δημιουργούν προβλήματα στην καλλιέργεια των εσπεριδοειδών είναι τα όξινα, αλκαλικά και αλατούχα εδάφη, οι πλημμύρες και η ξηρασία, ο παγετός και οι υψηλές θερμοκρασίες. Επίσης, τα εσπεριδοειδή προσβάλλονται από πολλούς εχθρούς και ασθένειες που προκαλούνται από νηματώδεις, μύκητες, βακτήρια, φυτοπλάσματα, ιούς και ιοειδή. Κάποιες από τις πλέον σοβαρές ασθένειες είναι αυτές που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Phytophthora* sp. και τον ιό της τριστέτσας των εσπεριδοειδών (*Citrus tristeza virus*, CTV). Σε

προσβεβλημένες περιοχές, οι ανωτέρω ασθένειες προκαλούν σημαντικές απώλειες στην παραγωγή και υποβάθμιση της ποιότητας των καρπών ορισμένων σημαντικών ποικιλιών ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις αποκλείουν τη χρήση ορισμένων εξαιρετικών υποκειμένων. Επίσης, τα βακτήρια *Xylella fastidiosa* (προκαλεί την ασθένεια της ποικιλοχλωρωτικής χλώρωσης) και *Liberobacter asiaticum* (προκαλεί την ασθένεια του πρασινίσματος των εσπεριδοειδών [citrus greening]) καταστρέφουν εκατομμύρια δένδρα και δεν υπάρχουν μέχρι τώρα αποτελεσματικοί τρόποι ελέγχου αυτών (Peña et al., 2007).

Τα εσπεριδοειδή αποτελούν τους φυσικούς ξενιστές αρκετών ιοειδών, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια *Pospiviroidae*. Το ιοειδές της εξωκορτίδας των εσπεριδοειδών (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) και το ιοειδές του νανισμού του λυκίσκου (*Hop stunt viroid*, HSVd, συν. CVd-II) προκαλούν τις σοβαρές ασθένειες της εξωκορτίδας και της καχεξίας, αντίστοιχα. Άλλα ιοειδή που προσβάλλουν τα εσπεριδοειδή είναι το ιοειδές της κάμψης του φύλλου των εσπεριδοειδών (*Citrus bent leaf viroid*, CBLVd, συν. CVd-I), το ιοειδές του νανισμού των εσπεριδοειδών (*Citrus dwarfing viroid*, CDVd, συν. CVd-III) και το ιοειδές του ραγίσματος του φλοιού των εσπεριδοειδών (*Citrus bark cracking viroid*, CBCVd, συν. CVd-IV). Τα δύο πρώτα (CBLVd και CDVd) δεν προκαλούν συγκεκριμένα συμπτώματα, αλλά το CDVd μπορεί να προκαλέσει μείωση του μεγέθους του δένδρου και της παραγωγής, ενώ το CBCVd, αν και λιγότερο διαδεδομένο σε σχέση με τα υπόλοιπα ιοειδή, προκαλεί σοβαρό σχίσμο του φλοιού των ευαίσθητων ειδών (Vernière et al., 2004). Το CVd-V (*Citrus viroid V*) συνήθως ανιχνεύεται σε μικτές μολύνσεις όπου έχει συνεργιστική δράση με άλλα ιοειδή (Serra et al., 2008). Τέλος, το ιοειδές CVd-OS (*Citrus viroid original sample*) έχει ανιχνευτεί κυρίως στην Ιαπωνία σε μικτές μολύνσεις με το CVd-II και το CVd-III (Ito et al., 2002).

Η ιδιότητα των ιοειδών να προκαλούν νανισμό στα δένδρα προκάλεσε το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητών τα τελευταία 60 χρόνια οι οποίοι τα χρησιμοποίησαν ως παράγοντες ελέγχου του ύψους των εσπεριδοειδών. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι δένδρα εμβολιασμένα σε ευαίσθητο υποκείμενο και μολυσμένα με το CDVd (συν. CVd-III) έχουν μικρότερο μέγεθος από το κανονικό, χωρίς να επηρεάζεται η ποσότητα και η ποιότητα της παραγωγής (Hardy et al., 2007). Πρόσφατα, έχουν δοκιμαστεί τα μικρά μεταδιδόμενα πυρηνικά ριβονουκλεοτίδια (transmissible small nuclear ribonucleic acids, TsnRNAs). Πρόκειται για πολύ καλά χαρακτηρισμένα RNA ιοειδών τα οποία δεν επάγουν συμπτώματα στα περισσότερα εσπεριδοειδή αλλά ενεργούν ως

ρυθμιστικά γενετικά στοιχεία που μπορούν να μεταβάλλουν κάποια χαρακτηριστικά του δένδρου, όπως είναι το ύψος (Vidalakis et al., 2007). Πρόκειται για μια μέθοδο ελέγχου της ανάπτυξης των δένδρων που έχει χαμηλό κόστος δημιουργίας και εφαρμογής σε σχέση με άλλες μεθόδους (πχ. χρήση ενδιάμεσου εμβολίου, χρήση χημικών ουσιών, έλεγχος του ποτίσματος), χωρίς βιολογικό κίνδυνο καθώς δεν χρησιμοποιούνται φυσικοί φορείς μετάδοσης και δεν περιλαμβάνει υλικά προερχόμενα από γενετικό μετασχηματισμό (Vidalakis et al., 2010). Στην Αμερική, έχει ήδη επιτραπεί η χρήση των TsnRNA-IIa και TsnRNA-IIIb για εμπορική χρήση.

Ιδιαίτερα ευαίσθητα στα ιοειδή είναι το τρίπτερο (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) και τα υβρίδιά του Carrizo citrange και Troyer citrange (*P. trifoliata* × *C. sinensis*) καθώς και το Rangpur lime (*Citrus limonia* Osb.), τα οποία προωθούνται ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια προς αντικατάσταση του πολύ καλού και ανθεκτικού στα ιοειδή υποκειμένου, της νεραντζιάς. Τα υπόλοιπα εσπεριδοειδή μολύνονται χωρίς να εκδηλώνονται συμπτώματα (Duran-Vila et al., 2000).

Τα ιοειδή των εσπεριδοειδών μεταδίδονται με τον εμβολιασμό, όταν χρησιμοποιούνται ως εμβόλια βλαστοί από μολυσμένα φυτά που δεν εκδηλώνουν συμπτώματα. Επιπλέον, η μετάδοση μπορεί να γίνει και μηχανικά, μέσω των εργαλείων κλαδέματος και εμβολιασμού. Τα ιοειδή των εσπεριδοειδών δεν μεταδίδονται με το σπόρο ή μέσω εντόμων φορέων (Duran-Vila and Semancik, 2003).

Οι παραπάνω λόγοι καθιστούν σημαντική την αντιμετώπιση των ιοειδών προκειμένου να διατηρηθούν υγιείς οπωρώνες. Γενικά, τα ιοειδή των εσπεριδοειδών είναι πολύ ανθεκτικά στην απενεργοποίηση με θέρμανση καθώς και σε πολλά χημικά που χρησιμοποιούνται για την απενεργοποίηση των ιών. Μπορεί να παραμείνουν μολυσματικά για μεγάλες περιόδους σε ξηρό ιστό ή σε ξηρές επιφάνειες. Τα μόνα αποτελεσματικά μέσα αδρανοποίησής τους είναι με υδρόλυση, με την εφαρμογή ριβονουκλεασών αλλά και με οικιακή χλωρίνη (Roistacher et al., 1969).

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος ελέγχου των ιοειδών είναι η αποφυγή εισόδου μολυσμένου φυτικού υλικού στον οπωρώνα ή στο θερμοκήπιο, τα αυστηρά μέτρα υγιεινής και η παρατήρηση της καλλιέργειας για συμπτώματα προσβολής. Για το λόγο αυτό είναι πολύ σημαντική η χρήση πιστοποιημένου σπόρου και πολλαπλασιαστικού υλικού. Για να αποφευχθεί η διασπορά των ιοειδών στους οπωρώνες, θα πρέπει να γίνεται απολύμανση των εργαλείων κλαδέματος και εμβολιασμού με διάφορα χημικά, όπως διαλύματα 1-5% υποχλωριώδους νατρίου, 6% υπεροξειδίου του υδρογόνου ή 2% υδροξειδίου του νατρίου με 2% φορμαλδεΰδη (Kovalskaya and Hammond, 2014).

Όταν τα παραπάνω μέτρα δεν είναι αποτελεσματικά στην αποφυγή εξάπλωσης των ιοειδών ή όταν πρόκειται για ήδη μολυσμένο γενετικό υλικό μεγάλης σημασίας, τότε εφαρμόζονται άλλες μέθοδοι, όπως η κρυοθεραπεία σε συνδυασμό με καλλιέργεια μεριστωμάτων *in vitro*. Σε αυτή την περίπτωση, τα μολυσμένα φυτά τοποθετούνται για κάποιους μήνες σε χαμηλές θερμοκρασίες και ακολουθεί *in vitro* καλλιέργεια των μεριστωμάτων της νέας βλάστησης (Lizirraga et al., 1980).

Μια εξέλιξη της παραπάνω μεθόδου είναι ο *in vitro* μικροεμβολιασμός, ο οποίος εφαρμόστηκε με μεγάλη επιτυχία τα τελευταία χρόνια στην Ισπανία (Navarro, 1993) αλλά και την Κύπρο (Καπαρή-Ησαΐα, 2006) στα πλαίσια προγραμμάτων εξυγίανσης με στόχο την δημιουργία υγιών μητρικών φυτειών εσπεριδοειδών από όπου παράγεται υγιές πολλαπλασιαστικό υλικό. Συνίσταται στον εμβολιασμό κορυφαίων μεριστωμάτων (μικρότερου μεγέθους σε σύγκριση με την προηγούμενη μέθοδο) από μολυσμένα φυτά σε υποκείμενα σπορόφυτα, υπό ασηπτικές συνθήκες. Η μέθοδος απαιτεί μεγαλύτερη δεξιοτεχνία στην εφαρμογή αλλά δίνει μεγαλύτερα ποσοστά εξυγιασμένων φυτών.

Μια άλλη μέθοδος αντιμετώπισης των ιοειδών είναι μέσω της διασταυρωτής προστασίας. Στηρίζεται στην παρατήρηση ότι η μόλυνση των φυτών με ήπιες απομονώσεις ενός ιού ή ιοειδούς μπορεί να τα προστατέψει από σοβαρές απομονώσεις του ίδιου ή συγγενούς ιού/ιοειδούς. Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για τον έλεγχο του ιού της τριστέτσας (Lee and Keremane, 2013). Επιπλέον, έχει δοκιμαστεί και για τον έλεγχο του CEVd σε φυτά χρυσάνθεμου αλλά δεν εφαρμόζεται στην πράξη (Niblett et al., 1978).

Τα τελευταία χρόνια, έχουν δοκιμαστεί διάφορες στρατηγικές με στόχο να περιοριστεί ή να αποφευχθεί η μόλυνση από τα ιοειδή εφαρμόζοντας γενετικό μετασχηματισμό στα φυτά-ξενιστές. Προς αυτή την κατεύθυνση, γίνονται προσπάθειες ένθεσης στο γονιδίωμα του φυτού τμημάτων του παθογόνου προκειμένου να επιτύχουν προστασία του φυτού-ξενιστή.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχουν πολλές βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις που πλήττουν το σύνολο των εσπεριδοειδών. Μέρος αυτών είναι περισσότερο σημαντικές για κάποια είδη λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας που παρουσιάζουν. Αξιοσημείωτη είναι η περίπτωση της λεμονιάς η οποία είναι αρκετά ευαίσθητη στις χαμηλές θερμοκρασίες σε σχέση με άλλα είδη εσπεριδοειδών. Οι λεμονιές, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα εσπεριδοειδή, δεν εισέρχονται σε λήθαργο κατά τη διάρκεια του χειμώνα αλλά χαρακτηρίζονται από μια τάση συνεχούς βλάστησης και καρποφορίας (Parker, 1948). Το γεγονός αυτό τις καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητες στο

ψύχος. Οι χαμηλές θερμοκρασίες και οι παγετοί είναι οι αιτίες σημαντικών απωλειών στην παραγωγή και οικονομικών ζημιών στους παραγωγούς. Επιπλέον, μια από τις πιο καταστρεπτικές μυκητολογικές ασθένειες των εσπεριδοειδών, που δημιουργεί σοβαρότατα προβλήματα στην καλλιέργεια της λεμονιάς, είναι η κορυφοξήρα που προκαλείται από το μύκητα *Phoma tracheiphila* (Petri) Kant.&Gik. Η προσβολή ξεκινάει είτε από τους βλαστούς (mal secco) είτε από τις ρίζες (mal nerro) και το δένδρο αποξηραίνεται μέσα σε 1-2 χρόνια από την εμφάνιση της ασθένειας (Solel and Salerno, 2000).

Οι τεχνικές της μοριακής βελτίωσης μπορούν να συμβάλλουν στη βελτίωση της λεμονιάς έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Το πρώτο βήμα προς αυτή την κατεύθυνση είναι ο εντοπισμός γονιδίων που πιθανόν εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς της λεμονιάς έναντι των χαμηλών θερμοκρασιών και της κορυφοξήρας. Στη συνέχεια, αυτές οι γενετικές πληροφορίες θα μπορούν να αξιοποιηθούν στα πλαίσια της μοριακής βελτίωσης για τη δημιουργία βελτιωμένων ποικιλιών λεμονιάς με ανθεκτικότητα στην κορυφοξήρα ή το ψύχος.

## **Βιβλιογραφία**

- Καπαρή-Ησαΐα Θ (2006) Εξυγίανση ποικιλιών και κλώνων εσπεριδοειδών στην Κύπρο. Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών. Κύπρος. ISBN: 9963-1-6005-0.
- Calabrese F (2002) Origin and history. In: Dugo G, Di Giacomo A (ed) The genus *Citrus*, Taylor & Francis, London, pp 1-15.
- Duran-Vila N, Semancik JS (2003) Citrus viroids. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS (ed) Viroids. CSIRO Publishing, Australia, pp 178-194.
- Duran-Vila N, Semancik JS, Broadbent P (2000) Exocortis. In: Timmer L, Garnsey S, Graham J (ed) Compendium of Citrus diseases, 2nd edn, APS Press, Minnesota, pp 53-54.
- FAO (2012) Citrus fruit. Fresh and processed. Annual statistics. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS\\_BULLETIN\\_2012.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf)
- FAO (2013) Statistical yearbook. World food and agriculture. <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>
- Hardy S, Donovan N, Barkley P (2007) Dwarfing citrus trees using viroids. In: Primefact 704, New South Wales department of primary industries, Australia.

- Ito T, Ieki H, Ozaki K, et al (2002) Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92:542–547.
- Jackson LK (1999) Citrus cultivation. In: Timmer LW, Duncan LW (ed) *Citrus health management*, APS Press, Minnesota, pp 17-20.
- Kovalskaya N, Hammond RW (2014) Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Sci* 228:48–60.
- Lee RF, Keremane ML (2013) Mild strain cross protection of tristeza: a review of research to protect against decline on sour orange in Florida. *Front Microbiol* 4:1–11.
- Lizirraga RE, Salazar LF, Roca WM (1980) Elimination of *Potato spindle tuber viroid* by low temperature and meristem culture. *Phytopathology* 70:754–755.
- Navarro L (1993) Citrus sanitation, quarantine and certification programs. In: Moreno P, da Graça J, Timmer L (eds) *Proc. 12th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOC*: Riverside, pp 383–391.
- Niblett CL, Dickson E, Fernow KH, Horst RK, Zaitlin M (1978) Cross protection among four viroids. *Virology* 91: 198-203.
- Nicolosi E (2007) Origin and taxonomy. In: Khan IA (ed) *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International. pp 19-43.
- Parker E (1948) Selection of orchard site. In: Batchelor LD, Webber HJ (ed) *The citrus industry*. University of California Press. pp 223-258.
- Peña L, Cervera M, Ghorbel R, et al (2007) Genetic transformation. In: Khan IA (ed) *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International. pp 329-344.
- Roistacher CN, Calavan EC, Blue RL (1969) Citrus exocortis virus – chemical inactivation on tools, tolerance to heat and separation of isolates. *Plant Dis Rep* 53:333-336.
- Serra P, Eiras M, Bani-Hashemian SM, et al (2008) Citrus viroid V: occurrence, host range, diagnosis, and identification of new variants. *Phytopathology* 98:1199–1204.
- Spiegel-Roy P, Goldschmidt EE (1996) *Biology of Citrus*. Cambridge University Press. Pp 4-18.
- Solel Z, Salerno M (2000) Mal secco. In: Timmer L, Garnsey S, Graham J (ed) *Compendium of Citrus diseases*, 2nd edn, APS Press, Minnesota, pp 33-35.
- Vernière C, Perrier X, Dubois C, et al (2004) Citrus Viroids: Symptom expression and effect on vegetative growth and yield of clementine trees grafted on trifoliate orange. *Plant Dis* 88:1189–1197.

Vidalakis G, Bash JA, Semancik JS (2007) Dwarfing of clementine mandarin on Carrizo citrange rootstock associated with mixtures of citrus viroids performing as transmissible small nuclear RNAs (TsnRNAs). In: Proceedings of the 17<sup>th</sup> Conference of the International Organisation of Citrus Virologists.

Vidalakis G, Pagliaccia D, Bash JA, Semancik JS (2010) Effects of mixtures of citrus viroids as transmissible small nuclear RNA on tree dwarfing and commercial scion performance on Carrizo citrange rootstock. *Ann Appl Biol* 157:415–423.

Wikipedia [https://en.wikipedia.org/wiki/Citrus\\_production](https://en.wikipedia.org/wiki/Citrus_production)

## Στόχοι της διδακτορικής διατριβής

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης έγινε προσπάθεια να επιτευχθούν οι παρακάτω στόχοι:

- 1) Να προσδιοριστεί η καταλληλότερη μέθοδος γενετικού μετασχηματισμού σημαντικών υποκειμένων και ποικιλιών εσπεριδοειδών.
- 2) Να παραχθούν φυτά *N. benthamiana* (μη ξενιστής του CEVd) που πολλαπλασιάζουν το ιοειδές και να μελετηθεί η επίδρασή του στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μολυσμένων φυτών.
- 3) Να μελετηθούν διάφορα τμήματα του γονιδιώματος του CEVd ως προς την ικανότητα επαγωγής RNA σιώπησης στο ιοειδές.
- 4) Να παραχθούν διαγονιδιακά φυτά υποκειμένων εσπεριδοειδών με ενσωμάτωση στο γονιδίωμά τους τμημάτων του γονιδιώματος του CEVd.
- 5) Να παραχθούν διαγονιδιακά φυτά εσπεριδοειδών με ενσωμάτωση στο γονιδίωμά τους τμήματος της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού CPsV.
- 6) Να ελεγχθούν τα μικροεμβολιασμένα φυτά εσπεριδοειδών που παράχθηκαν μέσω της τεχνικής του *in vitro* μικροεμβολιασμού στα πλαίσια ενός προγράμματος εξυγίανσης των ποικιλιών εσπεριδοειδών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα.
- 7) Να μελετηθεί η έκφραση γονιδίων διαφορεικά εκφραζομένων σε βλαστούς λεμονιάς που πιθανόν εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς έναντι της κορυφοξήρας ή του ψύχους.



## Κεφάλαιο 1. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών

### 1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1.1. Ανάγκες βελτίωσης των εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται σε μια μεγάλη ποικιλία εδαφικών και κλιματικών συνθηκών, με αποτέλεσμα να υπόκεινται σε καταπονήσεις από πολλούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Άμεσο αποτέλεσμα αποτελεί η αναγκαιότητα επιλογής κατάλληλου γενετικού υλικού, με βάση την περιοχή καλλιέργειας. Επιπρόσθετα, οι συνεχείς αλλαγές στην επιδημιολογία αγρού και στη μοριακή επιδημιολογία των παθογόνων μικροοργανισμών, που συχνά έχουν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση παθογόνων στελεχών που χαρακτηρίζονται από υψηλή μολυσματικότητα, καθιστούν αναγκαία τη δημιουργία γενετικά βελτιωμένων ποικιλιών.

Η εμφάνιση του καταστρεπτικότητας ιού της τριστέσσας των εσπεριδοειδών (CTV) στις αρχές του 20ού αιώνα οδήγησε στην ανάγκη αντικατάστασης της, πολύ καλής και ευρέως χρησιμοποιούμενης ως υποκείμενο, νεραντζιάς με τα υβρίδια της τρίφυλλης πορτοκαλιάς (*Poncirus trifoliata*). Τα συγκεκριμένα υβρίδια (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) είχαν προκύψει από μια αποτυχημένη προσπάθεια εισαγωγής στην πορτοκαλιά της ανθεκτικότητας του τρίπτερου στο ψύχος (Peña et al., 2008).

Οι βελτιωτικές προσπάθειες των υποκειμένων των εσπεριδοειδών έχουν ως στόχους: τη βελτίωση της ποσότητας και της ποιότητας της παραγωγής, τη μείωση του μεγέθους των δένδρων, την προσαρμογή στις διάφορες εδαφικές συνθήκες, την ανθεκτικότητα σε ασθένειες και την ανθεκτικότητα σε μικροοργανισμούς του εδάφους (Khan and Kender, 2007).

Όσον αφορά τις καλλιεργούμενες ποικιλίες, οι στόχοι των βελτιωτικών προγραμμάτων αφορούν: την ανθεκτικότητα στο ψύχος, σε εχθρούς και ασθένειες, τη δυνατότητα εφαρμογής μηχανικής συγκομιδής, την εμφάνιση και την ποιότητα των παραγόμενων καρπών, την πρωίμηση ή οψίμηση της παραγωγής, την απουσία σπερμάτων από τους καρπούς, τη διάρκεια αποθήκευσης, την ποιότητα των παραγόμενων χυμών κ.ά. (Khan and Kender, 2007). Τυπικά παραδείγματα ποικιλιών που προέκυψαν από προγράμματα υβριδισμού είναι οι μανταρινιές «Nova», «Kinnow» και «Fortune», ενώ από βελτιωτικές προσπάθειες με τη χρήση ακτίνων X προέκυψαν οι ποικιλίες γκρέιπ-φρουτ «Star Ruby» και «Rio Red» καθώς και διάφορες ποικιλίες άσπερμων μανταρινιών (Peña et al., 2008).

Παρόλα αυτά, η πλειοψηφία των καλλιεργούμενων ποικιλιών και υποκειμένων προέκυψε από τυχαίες μεταλλάξεις, φυσικά υβρίδια ή τυχαία σπορόφυτα που επιλέχθηκαν στη φύση ή σε οπωρώνες.

### 1.1.2. Παραδοσιακή βελτίωση των εσπεριδοειδών

Η δημιουργία νέων βελτιωμένων ποικιλιών εσπεριδοειδών με τις συμβατικές μεθόδους είναι εξαιρετικά αργή και υψηλού κόστους διαδικασία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, απαιτούνται 20-35 χρόνια από τη στιγμή που γίνεται η διασταύρωση των επιλεγμένων γονέων μέχρι τη διάθεση της βελτιωμένης ποικιλίας για εμπορική καλλιέργεια. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στα πλαίσια ανάπτυξης της βελτιωμένης ποικιλίας μανταρινιάς Kinnow, η πρώτη διασταύρωση χρονολογείται το 1915, η εμπορική της καλλιέργεια έλαβε χώρα μετά από 20 χρόνια και χρειάστηκαν επιπλέον 30 χρόνια προκειμένου να εδραιωθεί ως επιτυχημένη καλλιεργούμενη ποικιλία στις περιοχές του Πακιστάν και της Ινδίας (Khan και Kender, 2007).

Κατά τον υβριδισμό των εσπεριδοειδών, στα πλαίσια των παραδοσιακών μεθόδων βελτίωσης, ανακύπτουν πολλά προβλήματα τα οποία οφείλονται κυρίως σε (Peña et al., 2007):

- i) υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας,
- ii) φυσιολογικά φαινόμενα κατά την αναπαραγωγή, όπως η απόμειξη και η πολυεμβρυονία, που περιορίζουν την ανάπτυξη των ζυγωτικών εμβρύων,
- iii) ασυμβατότητα, λόγω στειρότητας της γύρης ή της ωοθήκης, γεγονός που περιορίζει τα φυτά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γονείς,
- iv) μεγάλη περίοδο νεανικότητας, που σε πολλές περιπτώσεις φτάνει τα 5-10 χρόνια μέχρι την πρώτη άνθηση,
- v) περιορισμένη παραγωγή υβριδίων, λόγω ανταγωνισμού των ζυγωτικών εμβρύων με τα τυχαία έμβρυα του νουκέλλου των αναπτυσσόμενων ωοθηκών.

Επιπλέον, η βελτίωση των ειδών αυτών απαιτεί την αξιοποίηση μεγάλου αριθμού φυταρίων, για τα οποία η διατήρηση της καλλιέργειάς τους συνεπάγεται μεγάλες εκτάσεις και ώρες εργασίας. Σημαντικό πρόσθετο εμπόδιο αποτελεί η έλλειψη γονοτύπων που να αποτελούν φυσικές πηγές ανθεκτικότητας σε ασθένειες που προκαλούνται από σημαντικά παθογόνα, όπως τα *Candidatus asiaticum* και *Xylella fastidiosa* (Peña et al., 2008). Τα ανωτέρω, σε συνδυασμό με την έλλειψη βασικής γνώσης σχετικά με τον τρόπο που κληρονομούνται τα κυριότερα αγρονομικά

χαρακτηριστικά, αποτελούν σημαντικούς περιοριστικούς παράγοντες για την αναβάθμιση του υπάρχοντος γενετικού υλικού εσπεριδοειδών, μέσω κλασικών διαδικασιών βελτίωσης.

Τα τελευταία χρόνια, σημαντικά εργαλεία της βιοτεχνολογίας συνεισφέρουν στην παραδοσιακή βελτίωση των εσπεριδοειδών. Πιο συγκεκριμένα, η αξιοποίηση των μοριακών δεικτών μπορεί να συμβάλει καθοριστικά στην απόκτηση γνώσης σχετικά με τον τρόπο κληρονομής σημαντικών χαρακτηριστικών καθώς και στην επιτάχυνση και αναβάθμιση των διαδικασιών επιλογής επιθυμητών γονοτύπων. Επιπλέον, ο σωματικός υβριδισμός, μέσω της σύντηξης πρωτοπλαστών, παρέχει τη δυνατότητα άρσης των εμποδίων που σχετίζονται με φαινόμενα όπως η γενετική ασυμβατότητα, η πολυεμβρυονία και η στειρότητα της γύρης ή της ωοθήκης τους άνθους (Grosser et al., 2000). Ακόμα, η εμβρυοδιάσωση είναι πολύ σημαντική για την απόκτηση τριπλοειδών ποικιλιών στην προσπάθεια παραγωγής άσπερμων καρπών (Navarro et al., 2003).

### **1.1.3. Μοριακή βελτίωση εσπεριδοειδών – Γενετική Μηχανική**

Εξαιτίας των παραπάνω προβλημάτων που προκύπτουν κατά την εφαρμογή των κλασικών μεθόδων βελτίωσης των εσπεριδοειδών, η γενετική μηχανική προσφέρει μια εναλλακτική λύση καθώς παρέχει τη δυνατότητα ενσωμάτωσης επιθυμητών γνωρισμάτων σε ήδη βελτιωμένους γονοτύπους, χωρίς να επηρεάζεται το *elite* γενετικό υπόβαθρό τους. Το διαγονίδιο μπορεί να προέρχεται από άλλο εσπεριδοειδές, άλλο φυτικό είδος ή ακόμα και από άλλο οργανισμό, όπως από κάποιο βακτήριο, έντομο ή ιό.

Η πρώτη προσπάθεια δημιουργίας διαγονιδιακού εσπεριδοειδούς έγινε το 1989 σε πρωτοπλάστες πορτοκαλιάς και είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κάλλου που περιείχε το γονίδιο φωσφοτρανσφεράση II της νεομυκίνης *nptII* (ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη) αλλά δεν μπόρεσαν να αναγεννηθούν διαγονιδιακά φυτά (Kobayashi and Uchimiya, 1989). Ακολούθησαν αρκετές προσπάθειες επιτυχούς μετασχηματισμού πρωτοπλαστών και κυτταρικών αιωρημάτων τα οποία έδωσαν πολύ λίγα ή καθόλου αναγεννημένα διαγονιδιακά φυτά (Hidaka et al., 1990; Fleming et al., 2000; Olivares-Fuster et al., 2003). Το 1992, οι Moore et al. πέτυχαν την παραγωγή δύο διαγονιδιακών φυτών Carrizo που εξέφραζαν γονίδια-μάρτυρες. Η διαφορά σε σχέση με τις προηγούμενες προσπάθειες ήταν ότι χρησιμοποίησαν μεσογονάτια διαστήματα βλαστού από φυτά που αναπτύσσονταν *in vitro*. Τα επόμενα χρόνια, διαδόθηκε η χρήση

επικοτυλίων και μεσογονατίων διαστημάτων φυταρίων που αναπτύσσονταν *in vitro* ή στο θερμοκήπιο ως έκφυτα στις προσπάθειες παραγωγής διαγονιδιακών εσπεριδοειδών. Η μελέτη των συνθηκών που επηρεάζουν την ικανότητα των εσπεριδοειδών να μετασχηματιστούν και να αναγεννηθούν διαγονιδιακά φυτά αύξησε σημαντικά τα ποσοστά επιτυχίας των σχετικών προσπαθειών (Gutiérrez et al., 1997; Cervera et al., 1998c; Dutt and Grosser, 2009).

Έτσι, ενώ οι πρώτες προσπάθειες δημιουργίας διαγονιδιακών εσπεριδοειδών στόχευαν στην ενσωμάτωση γονιδίων-μαρτύρων, οι έρευνες πλέον έχουν στραφεί στην προσπάθεια εισαγωγής γονιδίων που να προσδίδουν αγρονομικού ενδιαφέροντος χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, έχουν γίνει προσπάθειες εισαγωγής στα εσπεριδοειδή γονιδίων που προκαλούν νανισμό των δένδρων (Kaneyoshi and Kobayashi, 1999; Fagoaga et al., 2007), αύξηση της αντοχής στην αλατότητα και την ξηρασία (Cervera et al., 2000; Molinari et al., 2004), μείωση της περιόδου νεανικότητας (Peña et al., 2001; Endo et al., 2005) ή βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων καρπών (Wong et al., 2001; Guo et al., 2005).

Τα τελευταία χρόνια, οι έρευνες έχουν στραφεί στη δημιουργία διαγονιδιακών εσπεριδοειδών ανθεκτικών σε σημαντικές ασθένειες που οφείλονται κυρίως σε ιούς και βακτήρια. Οι περισσότερες προσεγγίσεις χρησιμοποιούν αλληλουχίες που προέρχονται από το ίδιο το παθογόνο (pathogen-derived resistance, PDR) ενώ πρόσφατα, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην επίτευξη ανθεκτικότητας μέσω του μηχανισμού της RNA σιώπησης.

Ο μετασχηματισμός των εσπεριδοειδών έχει επιτευχθεί σε πρωτοπλάστες με τη χρήση της πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) ή με ηλεκτροπόρωση. Παρόλα αυτά, η κύρια χρησιμοποιούμενη μέθοδος μετασχηματισμού είναι μέσω της χρήσης του *Agrobacterium tumefaciens*. Για το σκοπό αυτό, στα βακτηριακά κύτταρα ενσωματώνεται ένα πλασμίδιο που φέρει το επιθυμητό γονίδιο καθώς και γονίδια που επιτρέπουν την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων. Η επιτυχία του μετασχηματισμού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το έκφυτο, το βακτηριακό στέλεχος, το θρεπτικό υπόστρωμα, το φυτικό υλικό, οι συνθήκες συγκαλλιέργειας και επιλογής κλπ. Ωστόσο, η κατάσταση των καμβιακών κυττάρων στην επιφάνεια των εκφύτων αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα για την επιτυχή ενσωμάτωση του «ξένου» DNA και τη μετέπειτα αναγέννηση μετασχηματισμένων φυτών. Για το λόγο αυτό, έχουν δοκιμαστεί διάφορα είδη εκφύτων, όπως τμήματα φύλλων, τμήματα επικοτυλίου, μεσογονάτια διαστήματα, τμήματα της ρίζας κ.ά. (Peña et al., 2008).

Παρά τις εντατικές ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων που να επιτρέπουν τον αποτελεσματικό και με ικανοποιητική συχνότητα μετασχηματισμό, η γενετική τροποποίηση των εσπεριδοειδών παρουσιάζει δυσκολίες που έγκειται σε ποικίλους παράγοντες (Peña et al., 2007) που σχετίζονται με:

- i) την αναποτελεσματικότητα των βακτηριακών φορέων να μετασχηματίσουν τα κύτταρα των εσπεριδοειδών, διότι τα εσπεριδοειδή δε συνιστούν ξενιστές του *A. tumefaciens*,
- ii) την αδυναμία αποτελεσματικής επιλογής και αναγέννησης βλαστών που προέρχονται μόνο από μετασχηματισμένα κύτταρα,
- iii) δυσκολίες στη ριζοβολία των διαγονιδιακών βλαστών.

Σε όλες τις προσπάθειες δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών χρησιμοποιείται κάποιο γονίδιο-μάρτυρας προκειμένου είτε να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου μετασχηματισμού ή να διευκολυνθεί η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών. Το πλέον διαδεδομένο γονίδιο-μάρτυρας είναι αυτό της φωσφοτρανσφεράσης II της νεομυκίνης (neomycin phosphotransferase II, *nptII*). Το γονίδιο *nptII* προέρχεται από το βακτήριο *E. coli* K12 και έχει την ιδιότητα να απενεργοποιεί τα αντιβιοτικά της ομάδας των αμινογλυκοσιδών (καναμυκίνη, νεομυκίνη, G418 και παρομομυκίνη) (Miki and McHugh, 2004). Η επιτυχής έκφραση του *nptII* επιτρέπει την ανάπτυξη αποκλειστικά μετασχηματισμένων κυττάρων, παρουσία των αναφερόμενων αντιβιοτικών, και με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η επιλογή τους. Αντίστοιχα λειτουργούν και άλλα γονίδια μάρτυρες που παρέχουν προστασία σε άλλα αντιβιοτικά (*hpt*, *cat*) ή ζιζανιοκτόνα (*pat*, *bar*). Ένα ακόμα γονίδιο-μάρτυρας είναι αυτό της β-γλουκουρονιδάσης (β- glucuronidase, *uidA*), το οποίο προέρχεται από το βακτήριο *E. coli* και κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη που έχει την ιδιότητα να διασπά τα κατάλληλα υποστρώματα, προκαλώντας τελικά το χρωματισμό ή το φθορισμό τους (Jefferson et al., 1986). Τα τελευταία χρόνια, έχει διαδοθεί πολύ η χρήση του γονιδίου-μάρτυρα της πράσινης φθορίζουσας χρωστικής (green fluorescent protein, GFP) καθώς εξασφαλίζει γρήγορη και αξιόπιστη επιλογή των διαγονιδιακών φυτών, χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού (*nptII*) και χωρίς να καταστρέφεται ο υπό εξέταση ιστός (*uidA*). Πρόκειται για ένα γονίδιο που προέρχεται από το είδος μέδουσας *Aequorea victoria* και, υπό υπεριώδη ακτινοβολία, προκαλεί το φθορισμό των κυττάρων που το εκφράζουν (Chalfie et al., 1994). Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες δημιουργίας νέων συστημάτων επιλογής των μετασχηματισμένων φυτών, λόγω των προβληματισμών που προκύπτουν για την πιθανή παρουσία, αυτών των γονιδίων ή των

πρωτεϊνών που κωδικοποιούν, στα τρόφιμα καθώς και τους πιθανούς περιβαλλοντικούς κινδύνους που ανακύπτουν από τη μεταφορά της γύρης των διαγονιδιακών φυτών.

#### **1.1.4. Ιστοκαλλιέργεια των εσπεριδοειδών**

Η ευχερής αξιοποίηση της γενετικής μηχανικής προϋποθέτει την ύπαρξη ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου ιστοκαλλιέργειας για κάθε είδος και ποικιλία εσπεριδοειδούς, προκειμένου να εξασφαλιστεί η αναγέννηση ικανοποιητικού αριθμού μετασηματισμένων φυτών. Ως έκφυτα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τμήματα βλαστού, φύλλων, ρίζας ή επικοτυλίου φυτών που αναπτύσσονται στο θερμοκήπιο ή υπό ασηπτικές συνθήκες. Αυτά τα έκφυτα προέρχονται από απομεικτικά έμβρυα τα οποία διατηρούν το γενετικό υπόβραθρο των μητρικών φυτών και αναπτύσσονται εύκολα, αλλά τα διαγονιδιακά φυτά που παράγονται από αυτά διατηρούν τα νεανικά χαρακτηριστικά τους (Peña et al., 2008). Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες αναγέννησης φυτών από ώριμους ιστούς, προκειμένου να παρακαμφτεί η φάση νεανικότητας των αναγεννημένων φυτών ώστε αυτά να ανθίσουν και να παράγουν καρπούς σε λιγότερο από 14 μήνες (Cervera et al., 1998a). Κατά συνέπεια, τα φυτά αυτά μπορούν να περάσουν πιο γρήγορα στη φάση της αξιολόγησης των χαρακτηριστικών τους ως παραγωγικά φυτά. Παρόλα αυτά, οι ώριμοι ιστοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη δυσκολία στις μεταχειρίσεις κατά το μετασηματισμό αλλά και στην αναγεννητική τους ικανότητα, ενώ είναι δύσκολη η απολύμανσή τους για χρήση υπό ασηπτικές συνθήκες (Orbovic and Grosser, 2006).

Για την επιτυχή αναγέννηση των φυτών σημαντικό ρόλο παίζουν τα χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υποστρώματα καθώς και ο τύπος και οι συνδυασμοί των ορμονών. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υπόστρωμα είναι το MS (Murashige and Skoog, 1962) που περιλαμβάνει συγκεκριμένες ποσότητες των πιο σημαντικών μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων που είναι απαραίτητα για την απρόσκοπτη ανάπτυξη των φυτών. Το βασικό υπόστρωμα εμπλουτίζεται με βιταμίνες (θειαμίνη, πυριδοξίνη, νικοτινικό οξύ) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τόσο ο τύπος όσο και οι συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων ορμονών συνιστούν καθοριστικούς παράγοντες για την επιτυχή έκβαση όλων των σταδίων ιστοκαλλιέργειας. Ειδικότερα, για τη δημιουργία τυχαίων οφθαλμών στα έκφυτα αλλά και για τη ριζοβολία απαιτείται η σωστή αναλογία κυτοκινίνης και αυξίνης, η οποία εξαρτάται από το φυτικό είδος, το γονότυπο και τον τύπο του εκφύτου (Gaspar et al., 1996). Οι πιο ευρέως

χρησιμοποιούμενες κυτοκινίνες είναι οι 6-benzylaminopurine (BAP), N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (4-CPPU), 6-(gamma, gamma-dimethylallylamino) purine (2iP) και η κινετίνη, ενώ από τις αυξίνες είναι οι 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA) και alpha-naphthaleneacetic acid (NAA). Τέλος, για την επιμήκυνση των νεαρών βλαστών χρησιμοποιούνται οι γιββερελλίνες (GA<sub>3</sub>).

Άλλες ουσίες που προστίθενται στα υποστρώματα της ιστοκαλλιέργειας είναι ο ενεργός άνθρακας, ο οποίος δίνοντας μαύρο χρώμα στο υπόστρωμα προωθεί τη ριζοβολία. Επιπλέον, το MES [2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid] χρησιμοποιείται για τη διατήρηση του pH σε επιθυμητά επίπεδα (pH 5,8 - 6), καθώς το pH έχει την τάση να μειώνεται κατά τη διάρκεια της διατήρησης των εκφύτων στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Επιπλέον των παραπάνω συστατικών, τα υποστρώματα της ιστοκαλλιέργειας που χρησιμοποιούνται στα πλαίσια του γενετικού μετασχηματισμού περιλαμβάνουν και άλλα συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά, όπως η καναμυκίνη και η υγρομυκίνη. Για τον περιορισμό της ανάπτυξης του αγροβακτηρίου χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά, όπως η κεφοταξίμη, η βανκομυκίνη και το τιμεντίν (τικαρκιλλίνη και κλαβουλανικό οξύ). Τέλος, είναι πολύ διαδεδομένη η χρήση της ακετοσυριγκόνης (3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone). Πρόκειται για ένα φαινολικό συστατικό που εκκρίνουν οι τραυματισμένοι φυτικοί ιστοί και επάγει τα γονίδια της περιοχής *vir* του αγροβακτηρίου, τα οποία συντονίζουν τη διαδικασία της μόλυνσης, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην αύξηση της μολυσματικότητάς του και κατ' επέκταση στη μεταφορά του DNA από το πλασμίδιο στο φυτικό κύτταρο (Sheikholeslam and Weeks, 1987).

### 1.1.5. Σκοπός

Ερευνητικό στόχο του παρόντος τμήματος της διατριβής αποτέλεσε η εξεύρεση ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού, βλαστογένεσης και ριζοβολίας κατάλληλου για διαφορετικούς γονότυπους εσπεριδοειδών: Carrizo, Citrumelo 1452, *P. trifoliata*, Νεραντζιά και Μαγληνή λεμονιά. Προς την κατεύθυνση αυτή, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα πέντε διαφορετικών πρωτοκόλλων ως προς τη συχνότητα μετασχηματισμού και παραγωγής αναγεννημένων φυτών. Η αποτελεσματικότητα των υπό μελέτη μεθόδων μετασχηματισμού αξιολογήθηκε με τη χρήση του *GFP*, το οποίο αξιοποιήθηκε ως γονίδιο-μάρτυρας.



## 1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την επιλογή του καταλληλότερου πρωτοκόλλου μετασχηματισμού για κάθε είδος εσπεριδοειδούς δοκιμάστηκαν πέντε διαφορετικά πρωτόκολλα σε πέντε διαφορετικούς γονοτύπους.

### 1.2.1. Φυτικό υλικό και προετοιμασία του

Στα πειράματα αυτής της ενότητας χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα του τριπτέρου (*P. trifoliata*) και των υβριδίων του Carrizo citrange (*C. sinensis* × *P. trifoliata*) και Citrumelo 1452 (*P. trifoliata* × *C. paradisi*). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα λεμονιάς ποικιλίας «Μαγληνή» (*C. limon*) και νεραντζιάς (*C. aurantium*).

Η συλλογή των καρπών γινόταν κάθε χρόνο από το Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου. Στη συνέχεια οι καρποί απολυμαίνονταν με εμβάπτιση για 15 λεπτά σε διάλυμα χλωρίνης 30% και αφού στέγνωσαν καλά διατηρούνταν στο ψυγείο μέχρι τη χρήση τους.

Κατά την προετοιμασία των πειραμάτων, γινόταν εξαγωγή των σπερμάτων από τους καρπούς και ακολουθούσε απομάκρυνση του εξωτερικού περιβλήματος. Στη συνέχεια οι σπόροι εμβαπτιζόνταν για 15 λεπτά σε διάλυμα 30% χλωρίνης με 0,1% Tween-20 και ακολουθούσε ξέπλυμα των σπερμάτων τρεις φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό υπό ασηπτικές συνθήκες.

Η σπορά των σπερμάτων γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 25 ml υποστρώματος βλάστησης (4,4 g/l άλατα MS, 30 g/l σακχαρόζη, 0,7 g/l άγαρ, pH 5,7). Στη συνέχεια, οι σωλήνες τοποθετούνταν στο σκοτάδι και θερμοκρασία 25 °C για 3-6 εβδομάδες, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο, και στη συνέχεια στο θάλαμο σταθερών συνθηκών, με 16 ώρες φως και θερμοκρασία 25 °C, για 1-2 εβδομάδες.

### 1.2.2. Προετοιμασία βακτηρίου

Σε όλα τα πρωτόκολλα μετασχηματισμού των εσπεριδοειδών χρησιμοποιήθηκε το *A. tumefaciens* EHA105, που φέρει το πλασμίδιο pBin19-*sgfp* (Ghorbel et al., 1999) και ήταν ευγενική χορηγία του Leandro Peña (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, IVIA, Valencia, Spain). Το συγκεκριμένο πλασμίδιο περιλαμβάνει το γονίδιο *nr1II* που εξασφαλίζει την ανθεκτικότητα των διαγονιδιακών κυττάρων στο αντιβιοτικό канаμυκίνη καθώς και το γονίδιο *sgfp* (Chiu et al., 1996) που βοηθά στον εντοπισμό

των διαγονιδιακών ιστών. Το στέλεχος αγροβακτηρίου EHA105 θεωρείται πολύ μολυσματικό για τα εσπεριδοειδή (Cervera et al., 1998b).

Τα στάδια προετοιμασίας των μετασχηματισμένων κυττάρων του *A. tumefaciens*, πριν το γενετικό μετασχηματισμό των εσπεριδοειδών, είναι τα εξής:

- 1) Λήψη μίας αποικίας από το *A. tumefaciens* EHA105 pBin19-*sgfp*. Τα βακτήρια επωάστηκαν στους 28 °C με περιστροφή για περίπου 18 ώρες σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB που περιείχε τα αντιβιοτικά καναμυκίνη (25 mg/l) και ναλιδιξικό οξύ (25 mg/l).
- 2) Την επόμενη ημέρα, έγινε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 3.500 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά και επαναδιάλυση σε διάλυμα Μόλυνσης (Πίνακας 1.2). Η τελική οπτική πυκνότητα του διαλύματος ήταν περίπου  $OD_{600}=0,3-0,5$ , ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο.

### 1.2.3. Γενετικός μετασχηματισμός εσπεριδοειδών

Ο γενετικός μετασχηματισμός των εσπεριδοειδών έγινε χρησιμοποιώντας πέντε διαφορετικά πρωτόκολλα: Peña et al. (2007), Orbovic and Grosser (2006), Orbovic and Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011), Dutt and Grosser (2009), και Tan et al. (2009). Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα πρωτόκολλα που δοκιμάστηκαν ανά φυτικό είδος.

**Πίνακας 1.1.** Οι μέθοδοι μετασχηματισμού που δοκιμάστηκαν στους διαφορετικούς γονότυπους εσπεριδοειδών (*P. trifoliata*, Carrizo, Citrumelo 1452, Μαγληνή λεμονιά και Νεραντζιά).

	Peña et al. (2007)	Orbovic & Grosser (2006)	Orbovic & Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011)	Dutt & Grosser (2009)	Tan et al. (2009)
<i>P. trifoliata</i>	+	+	+		+
Carrizo	+	+	+	+	
Citrumelo 1452	+	+	+	+	
Μαγληνή λεμονιά	+	+	+	+	
Νεραντζιά	+	+	+	+	

Σε όλα τα πρωτόκολλα γενετικού μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα τμήματα του επικοτυλίου σποροφύτων που αναπτύσσονταν υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έκφυτα ελήφθησαν τέσσερεις έως επτά εβδομάδες μετά τη σπορά.

Η προετοιμασία των εκφύτων γινόταν ως εξής:

- 1) Απομάκρυνση της ρίζας, των κοτυληδόνων και της κορυφής των σποροφύτων υπό ασηπτικές συνθήκες.
- 2) Κοπή του επικοτυλίου σε τμήματα μήκους 1-1,5 εκατοστά με διαγώνιες τομές.
- 3) Εμβάπτιση των εκφύτων σε διάλυμα Συγκαλλιέργειας (Πίνακας 1.2), μέχρι τη μόλυνση με το αγροβακτήριο.

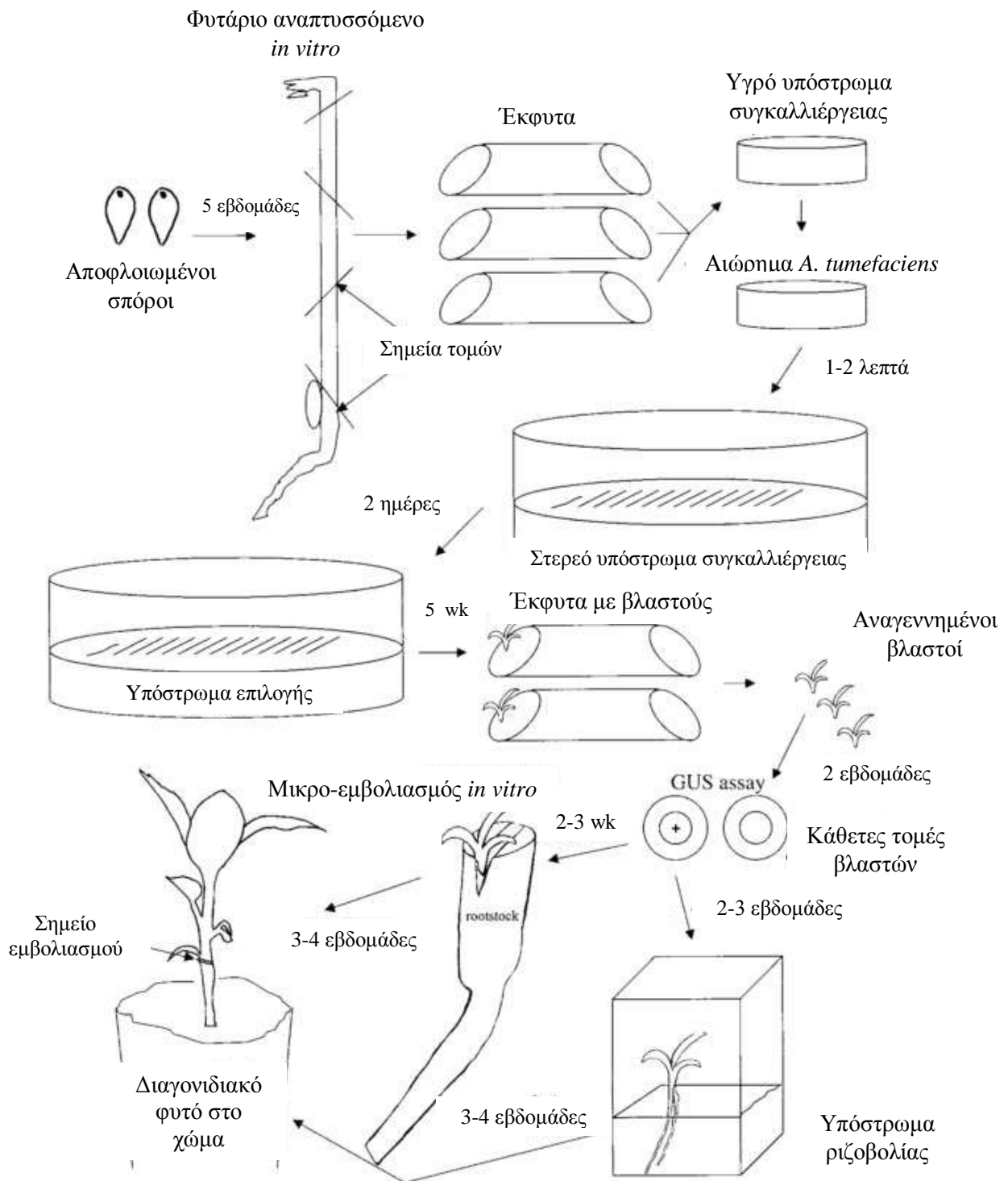
Στη συνέχεια, τα έκφυτα εμβαπτιζόνταν στο διάλυμα Μόλυνσης (Πίνακας 1.2) για 5-20 λεπτά. Η περίσσεια του αγροβακτηρίου απομακρυνόταν μετά από ελαφρύ στέγνωμα σε αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί και τα έκφυτα τοποθετούνταν οριζόντια σε στερεό υπόστρωμα Συγκαλλιέργειας (Πίνακας 1.2). Τα τρυβλία με τα έκφυτα τοποθετούνταν για 2-3 ημέρες σε θάλαμο σταθερών συνθηκών, με θερμοκρασία 25 °C, στο σκοτάδι ή σε 16 ώρες φως.

Ακολουθούσε μεταφορά των εκφύτων σε υπόστρωμα Επιλογής (Πίνακας 1.2) που περιελάμβανε αντιβιοτικά για την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών και για τον περιορισμό της ανάπτυξης του αγροβακτηρίου. Τα έκφυτα παρέμεναν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 25 °C και 16 ώρες φως ή στο σκοτάδι τις πρώτες 2-4 εβδομάδες και στη συνέχεια, μεταφέρονταν σε θάλαμο με 16 ώρες φως. Κάθε τρεις εβδομάδες γινόταν μεταφορά των εκφύτων σε φρέσκο υπόστρωμα Επιλογής.

Παράλληλα, κάποια έκφυτα δε δέχονταν μεταχείριση με το αγροβακτήριο. Από αυτά, τα μισά τοποθετούνταν σε υπόστρωμα Επιλογής χωρίς αντιβιοτικά και χρησίμευαν ως μάρτυρες της δυναμικής των εκφύτων να παράγουν αναγεννημένους βλαστούς, ενώ τα άλλα μισά έκφυτα τοποθετούνταν σε υπόστρωμα Επιλογής με αντιβιοτικά ως μάρτυρες της αποτελεσματικότητας της καναμυκίνης να μην επιτρέπει την ανάπτυξη των μη-μετασχηματισμένων κυττάρων.

Στη συνέχεια, οι ανεπτυγμένοι βλαστοί απομακρύνονταν από τα έκφυτα και μεταφέρονταν σε υπόστρωμα Ανάπτυξης (Πίνακας 1.2) προκειμένου να επαχθεί η βλαστική τους ανάπτυξη. Ακολούθως, οι ανεπτυγμένοι βλαστοί μεταφέρονταν σε υπόστρωμα Ριζοβολίας (Πίνακας 1.3). Τέλος, τα ριζοβολημένα φυτάρια μεταφυτεύονταν στο χώμα.

Στην Εικόνα 1.1 παρουσιάζεται μια σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του γενετικού μετασχηματισμού των εσπεριδοειδών.



**Εικόνα 1.1.** Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του γενετικού μετασχηματισμού των εσπεριδοειδών (Orbovic and Grosser, 2006).

Η σύσταση των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πρωτόκολλο παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 1.2.

**Πίνακας 1.2.** Η σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων στα χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα γενετικού μετασχηματισμού εσπεριδοειδών.

	Peña et al. (2007)	Orbovic & Grosser (2006)	Orbovic & Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011)	Dutt & Grosser (2009)	Tan et al. (2009)
<b>Διάλυμα Μόλυνσης</b>					
Άλατα MS	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l
Θειαμίνη	0,2 mg/l	0,1 mg/l	0,1 mg/l	0,1 mg/l	10 mg/l
Πυριδοξίνη	1 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	10 mg/l
Νικοτινικό οξύ	1 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	5 mg/l
Μυο-ινοσιτόλη	-	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l	-
Γλυκίνη	-	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l
Σακχαρόζη	3% w/v	3% w/v	3% w/v	3% w/v	-
BAP	-	3 mg/l	-	3 mg/l	-
NAA	-	0,1 mg/l	-	0,1 mg/l	-
2,4-D	-	0,5 mg/l	-	1 mg/l	-
MES	-	-	-	500 mg/l	-
Ακετοσυριγκόνη	-	19,6 mg/l	19,6 mg/l	-	2 mg/l
pH	5,7	6	6	5,8	5,7
<b>Υπόστρωμα Συγκαλλιέργειας</b>					
Άλατα MS	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l
Θειαμίνη	1 mg/l	0,1 mg/l	0,1 mg/l	0,1 mg/l	10 mg/l
Πυριδοξίνη	1 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	10 mg/l
Νικοτινικό οξύ	1 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	5 mg/l
Μυο-ινοσιτόλη	-	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l	-
Γλυκίνη	-	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l
Σακχαρόζη	3% w/v	3% w/v	3% w/v	3% w/v	3% w/v
Άγαρ	0,8% w/v	0,8% w/v	0,8% w/v	0,8% w/v	0,75% w/v
BAP	-	3 mg/l	3 mg/l	3 mg/l	1 mg/l
2-iP	1 mg/l	-	-	-	-
Κινετίνη	-	-	-	-	0,5 mg/l
NAA	-	0,1 mg/l	0,1 mg/l	0,1 mg/l	0,1 mg/l
2,4-D	2 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	-
IAA	2 mg/l	-	-	-	-
MES	-	-	-	500 mg/l	-
Ακετοσυριγκόνη	-	19,6 mg/l	19,6 mg/l	19,6 mg/l	20 mg/l
pH	5,7	6	6	5,8	5,7

**Πίνακας 1.2.** (συνέχεια)

	Peña et al. (2007)	Orbovic & Grosser (2006)	Orbovic & Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011)	Dutt & Grosser (2009)	Tan et al. (2009)
<b>Υπόστρωμα Επιλογής</b>					<b>Υ.Ε. #1 / Υ.Ε. #2 *</b>
Άλατα MS	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l
Θειαμίνη	0,2 mg/l	0,1 mg/l	10 mg/l	0,1 mg/l	10 mg/l
Πυριδοξίνη	1 mg/l	0,5 mg/l	10 mg/l	0,5 mg/l	10 mg/l
Νικοτινικό οξύ	1 mg/l	0,5 mg/l	5 mg/l	0,5 mg/l	5 mg/l
Μυο-ινοσιτόλη	-	100 mg/l	-	100 mg/l	-
Γλυκίνη	-	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l
Σακχαρόζη	3% w/v	3% w/v	3% w/v	3% w/v	3% w/v
Άγαρ	0,8% w/v	0,8% w/v	0,8% w/v	0,8% w/v	0,75% w/v
BAP	1-3 mg/l	3 mg/l	-	3 mg/l	1 / 0,5 mg/l
4-CPPU	-	-	0,05 mg/l	-	-
Κινετίνη	-	-	-	-	0,5 mg/l
NAA	0-0,3 mg/l	0,5 mg/l	-	0,5 mg/l	0,1 mg/l
IAA	-	-	0,2 mg/l	-	-
MES	-	-	-	500 mg/l	-
Καναμυκίνη	100 mg/l	70 mg/l	70 mg/l	70 mg/l	50 mg/l
Βανκομυκίνη	250 mg/l	-	-	-	-
Κεφοταξίμη	500 mg/l	333 mg/l	333 mg/l	-	400 mg/l
Τιμεντίν	-	-	-	400 mg/l	-
pH	5,7	6	5,7	5,8	5,7
<b>Υπόστρωμα Ανάπτυξης</b>					
Άλατα MS	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l
Θειαμίνη	0,2 mg/l	0,1 mg/l	0,1 mg/l	0,1 mg/l	10 mg/l
Πυριδοξίνη	1 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	10 mg/l
Νικοτινικό οξύ	1 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	5 mg/l
Μυο-ινοσιτόλη	-	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l	-
Γλυκίνη	-	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l
Σακχαρόζη	3% w/v	2,5% w/v	2,5% w/v	2,5% w/v	3% w/v
Άγαρ	0,8% w/v	0,8% w/v	0,8% w/v	0,8% w/v	0,75% w/v
BAP	1-3 mg/l	-	-	0,2 mg/l	0,1 mg/l
NAA	0-0,3 mg/l	-	-	-	-
IBA	-	-	-	-	0,1 mg/l
GA <sub>3</sub>	-	-	-	1 mg/l	0,25 mg/l
MES	-	-	-	500 mg/l	-
Ενεργός άνθρακας	-	-	-	-	0,2 mg/l
Καναμυκίνη	100 mg/l	20 mg/l	20 mg/l	70 mg/l	-
Κεφοταξίμη	500 mg/l	50 mg/l	50 mg/l	-	200 mg/l
Βανκομυκίνη	250 mg/l	-	-	-	-
Τιμεντίν	-	-	-	200 mg/l	-
pH	5,7	5,8	5,8	5,8	5,7
* Μετά τη συγκαλλιέργεια με το αγροβακτήριο τα έκφυτα μεταφέρονται στο Υπόστρωμα Επιλογής #1 και παραμένουν στο σκοτάδι για 2 εβδομάδες και στο φως για 3 εβδομάδες. Στη συνέχεια, μεταφέρονται στο Υπόστρωμα Επιλογής #2.					

Για τη ριζοβολία των αναγεννημένων βλαστών δοκιμάστηκαν τρία υποστρώματα που διέφεραν ως προς την περιεκτικότητα στις ορμόνες NAA και IBA (Πίνακας 1.3). Για τους βλαστούς που σχημάτισαν ρίζα αλλά δεν αναπτυσσόταν περισσότερο ο βλαστός, δοκιμάστηκε μεταφορά σε υπόστρωμα ριζοβολίας χωρίς ορμόνες ένα μήνα μετά την τοποθέτηση στο πρώτο υπόστρωμα ή προσθήκη 2-3 σταγόνων GA3 (1 ppm) πάνω από κάθε βλαστό.

**Πίνακας 1.3.** Η σύσταση των υπό μελέτη υποστρωμάτων ριζοβολίας.

<b>Υποστρώματα Ριζοβολίας</b>			
<b>Συστατικά</b>	<b>Υ.Ρ. 1</b>	<b>Υ.Ρ. 2</b>	<b>Υ.Ρ. 3</b>
Άλατα MS	2,2 g/l	2,2 g/l	2,2 g/l
Θειαμίνη	0,05 mg/l	0,05 mg/l	0,05 mg/l
Πυριδοξίνη	0,25 mg/l	0,25 mg/l	0,25 mg/l
Νικοτινικό οξύ	0,25 mg/l	0,25 mg/l	0,25 mg/l
Μυο-ινοσιτόλη	50 mg/l	50 mg/l	50 mg/l
Γλυκίνη	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
Σακχαρόζη	2% w/v	2% w/v	2% w/v
Άγαρ	0,8% w/v	0,8% w/v	0,8% w/v
NAA	-	<b>1 mg/l</b>	<b>1 mg/l</b>
IBA	<b>1 mg/l</b>	-	<b>3 mg/l</b>
Καναμυκίνη	20 mg/l	20 mg/l	20 mg/l
Κεφοταξίμη	50 mg/l	50 mg/l	50 mg/l
pH	5,8	5,8	5,8

#### 1.2.4. Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου στα αναγεννημένα φυτά

Για τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου στα αναγεννημένα φυτά έγινε απομόνωση DNA με τη μέθοδο CTAB των Stewart και Via (1993). Για την απομόνωση, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 30 mg ιστού. Η επαναδιάλυση του ιζήματος έγινε σε 400 µl διαλύματος TNE (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). Ακολούθησε καθαρισμός του DNA από το RNA με την προσθήκη 5 µl RNάσης (συγκέντρωσης 4 mg/ml). Η RNάση απομακρύνθηκε από τα δείγματα με φαινόλη και καθίζηση με αιθανόλη. Η τελική επαναδιάλυση του καθαρισμένου DNA έγινε σε 50 µl νερό υψηλής καθαρότητας. Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωθέντος DNA με φωτομέτρηση.

Για τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου (*sgfp*) πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με το ζεύγος εκκινητών sGFP-F/sGFP-R (Πίνακας 1.4). Το αναμενόμενο προϊόν ήταν 661 ζεύγη βάσεων.

Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	19,25	
ThermoPol Buffer (10x)	2,5	1x
dNTPs (10mM)	0,5	200μM/dNTP
sGFP-F (10μM)	1	0,5 μM
sGFP-R (10μM)	1	0,5 μM
KAPA Taq polymerase (KAPA)	0,25	1,25 U
Δείγμα DNA	0,5	
Σύνολο	25	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

94 °C - 3 λεπτά	} 35 κύκλοι
94 °C - 30 δευτ.	
60 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 1 λεπτό	
72 °C - 10 λεπτά	

**Πίνακας 1.4.** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου (*sgfp*).

Ονόματα εκκινητών	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος (bp)
sGFP-F (Ghorbel et al., 1999)	ATGGTGAGCCAAGGGCGAGGA	661
sGFP-R (Ghorbel et al., 1999)	GGACCATGTGATCGCGCTTC	

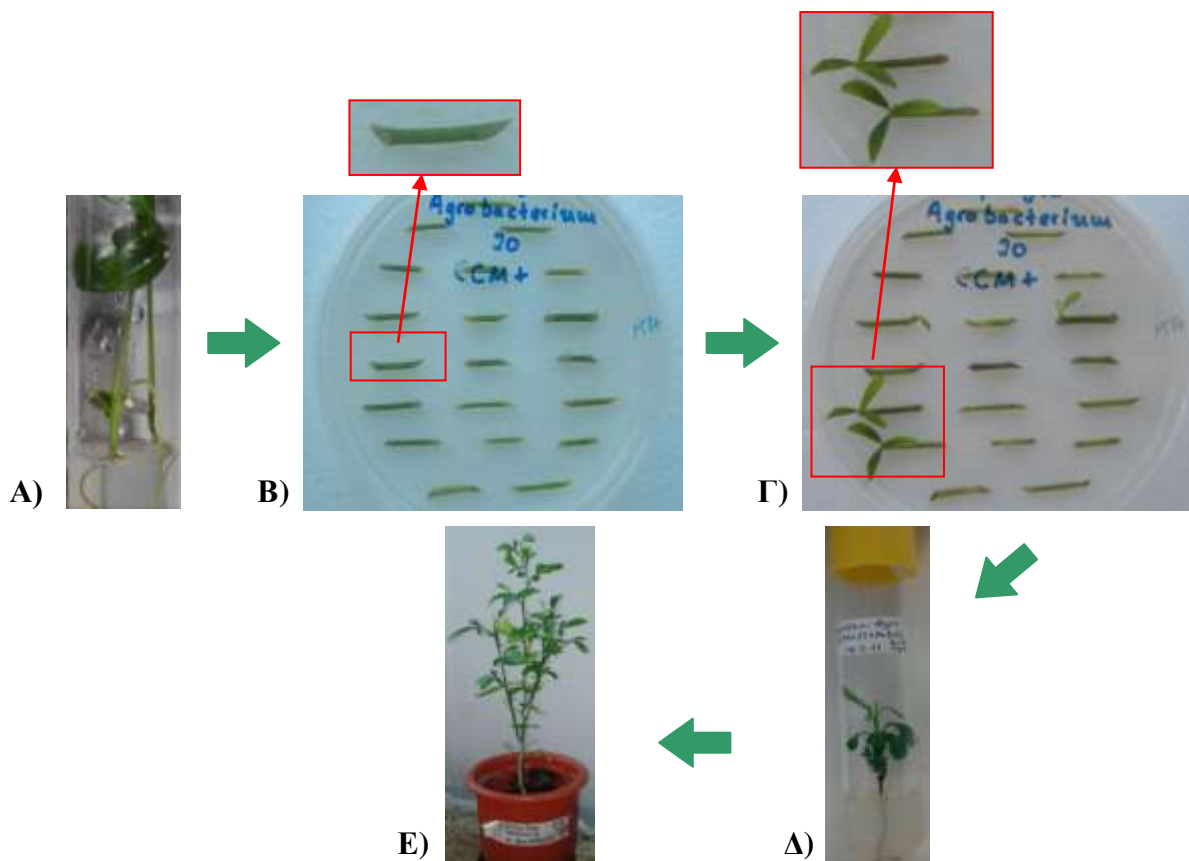


### 1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα πέντε διαφορετικών μεθόδων γενετικού μετασχηματισμού προκειμένου να προσδιοριστεί το καταλληλότερο πρωτόκολλο μετασχηματισμού για τους πέντε υπό μελέτη γονότυπους εσπεριδοειδών. Η επιλογή των συγκεκριμένων ειδών έγινε με γνώμονα τη χρήση τους για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε επιζήμιες ασθένειες, μέσω γενετικής μηχανικής (Κεφάλαιο 4 της παρούσας εργασίας: μετασχηματισμό του *P. trifoliata* και των υβριδίων του Carrizo και Citrumelo 1452 με τμήματα του CEVd και μετασχηματισμό της Μαγληνής λεμονιάς και της Νεραντζιάς με την καψιδιακή πρωτεΐνη του CPsV).

Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *A. tumefaciens* EHA105 που έφερε το πλασμίδιο pBin19-*sgfp*, με το γονίδιο *sgfp* να αποτελεί μάρτυρα της επιτυχούς ένθεσης της T-περιοχής του πλασμιδίου στο γονιδίωμα του φυτού. Στην Εικόνα 1.2 παρουσιάζονται τα στάδια της διαδικασίας μετασχηματισμού των εσπεριδοειδών. Ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν τμήματα επικοτυλίου που αναπτύσσονταν *in vitro*, τα οποία ανταποκρίνονται καλύτερα στους χειρισμούς της ιστοκαλλιέργειας και του γενετικού μετασχηματισμού (Moore et al., 1992). Στις τομές των εκφύτων αναπτύχθηκαν πιθανά μετασχηματισμένοι βλαστοί που προέρχονταν είτε από μικρούς κάλλους είτε απευθείας από την περιοχή του καμβίου. Στη συνέχεια, οι αναγεννημένοι βλαστοί τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο υπόστρωμα που προάγει τη βλαστική τους ανάπτυξη ή απευθείας σε υπόστρωμα ριζοβολίας. Τα καλά ανεπτυγμένα ριζοβολημένα φυτά μεταφέρθηκαν στο χώμα. Η διαδικασία του μετασχηματισμού διήρκησε επτά έως δώδεκα μήνες από την ημέρα της μόλυνσης των εκφύτων μέχρι τη μεταφύτευση στο χώμα.

Οι διαφορές μεταξύ των πρωτοκόλλων εντοπίζονται κυρίως στη σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων και ειδικότερα στη συγκέντρωση των διαφόρων ορμονών που χρησιμοποιούνται. Άλλες διαφορές αφορούν την ηλικία των χρησιμοποιούμενων εκφύτων (3-7 εβδομάδων) καθώς και τις συνθήκες διατήρησης των εκφύτων σε συγκεκριμένα στάδια της διαδικασίας (σκοτάδι ή φωτοπερίοδος 16-8).



**Εικόνα 1.2.** Τα στάδια της διαδικασίας μετασηματισμού επικοτυλίων εσπεριδοειδών: Α) σπορόφυτο αναπτυσσόμενο *in vitro*, Β) έκφυτα με λοξές τομές τοποθετημένα σε υπόστρωμα Επιλογής, Γ) αναγεννημένοι βλαστοί στις τομές των εκφύτων, Δ) ριζοβολημένος αναγεννημένος βλαστός, Ε) μετασηματισμένο φυτό σε γλάστρα.

**Πίνακας 1.5.** Ποσοστά των εκφύτων που ανέπτυξαν βλαστό από την εφαρμογή των πέντε μεθόδων μετασηματισμού εσπεριδοειδών.

Είδος	Μέθοδος μετασηματισμού				
	Peña et al. (2007)	Orbovic & Grosser (2006)	Dutt & Grosser (2009)	Orbovic & Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011)	Tan et al. (2009)
<b>Carrizo citrange</b>	7% (2/29)*	20% (18/89)	<b>46%</b> (17/37)	6% (6/90)	-
<b>Citrumelo 1452</b>	3% (2/60)	<b>11%</b> (9/80)	4% (2/45)	0% (0/42)	-
<b><i>P. trifoliata</i></b>	3% (1/35)	<b>73%</b> (52/71)	-	22% (20/89)	25% (9/36)
<b>Λεμονιά Μαγληνή</b>	0% (0/29)	0% (0/54)	0% (0/38)	<b>10%</b> (29/299)	-
<b>Νεραντζιά</b>	0% (0/111)	0% (0/61)	0% (0/28)	<b>11%</b> (34/309)	-

\* Στις παρενθέσεις φαίνεται ο αριθμός των εκφύτων που ανέπτυξαν βλαστό στο σύνολο των μολυνθέντων εκφύτων.

Στον Πίνακα 1.5 παρουσιάζεται ο αριθμός των εκφύτων που μολύνθηκαν με το αγροβακτήριο και ανέπτυξαν πιθανά μετασχηματισμένους βλαστούς. Η καλύτερη μέθοδος μετασχηματισμού για το Carrizo φαίνεται να είναι αυτή των Dutt and Grosser (2009), για το Citrumelo 1452 και το *P. trifoliata* αυτή των Orbovic and Grosser (2006), ενώ για τη Μαγληνή λεμονιά και τη Νεραντζιά η καλύτερη μέθοδος ήταν αυτή των Orbovic and Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η Μαγληνή λεμονιά και η Νεραντζιά δεν ανέπτυξαν πιθανά μετασχηματισμένους βλαστούς σε κανένα άλλο υπόστρωμα.

Όσον αφορά τους μάρτυρες, σχεδόν το σύνολο των εκφύτων Carrizo, Citrumelo 1452 και *P. trifoliata* που δεν είχαν μολυνθεί από το αγροβακτήριο και τοποθετήθηκαν σε υποστρώματα κατά Orbovic and Grosser (2006) και Dutt and Grosser (2009) χωρίς αντιβιοτικά σχημάτισαν αναγεννημένους βλαστούς (Πίνακας 1.6). Αντίστοιχα υψηλά ήταν τα ποσοστά και για τα έκφυτα Μαγληνής λεμονιάς και Νεραντζιάς που τοποθετήθηκαν σε υποστρώματα κατά Orbovic and Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011), γεγονός που υποδεικνύει ότι οι ορμόνες 4-CPPU και IAA είναι κατάλληλες για την προώθηση της αναγέννησης αυτών των δύο ειδών που παρουσιάζουν ιδιαίτερη δυσκολία στην αναγέννηση μετά το μετασχηματισμό (Gutiérrez et al., 1997; Dutt et al., 2009). Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν σαφώς τη γονοτυπική εξάρτηση των εσπεριδοειδών ως προς την καταλληλότητα του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος και ταυτόχρονα υπογραμμίζουν τη σημαντικότητα της επιλογής κατάλληλου πρωτοκόλλου μετασχηματισμού, με βάση τις εξειδικευμένες ανάγκες του κάθε είδους εσπεριδοειδούς.

**Πίνακας 1.6.** Η αναγεννητική ικανότητα των εκφύτων που δεν μολύνθηκαν με το αγροβακτήριο.

Είδος	Μέθοδος μετασχηματισμού				
	Peña et al. (2007)	Orbovic & Grosser (2006)	Dutt & Grosser (2009)	Orbovic & Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011)	Tan et al. (2009)
<b>Carrizo citrange</b>	7% (5/7)*	<b>100%</b> (27/27)	<b>100%</b> (12/12)	73% (19/26)	-
<b>Citrumelo 1452</b>	66% (8/12)	<b>100%</b> (27/27)	64% (9/14)	66% (4/6)	-
<b><i>P. trifoliata</i></b>	0% (0/8)	<b>100%</b> (23/23)	-	50% (14/28)	0% (0/10)
<b>Λεμονιά Μαγληνή</b>	0% (0/6)	0% (0/20)	0% (0/15)	<b>96%</b> (29/130)	-
<b>Νεραντζιά</b>	0% (0/21)	0% (0/19)	25% (2/8)	<b>92%</b> (34/120)	-

\* Στις παρενθέσεις φαίνεται ο αριθμός των εκφύτων που ανέπτυξαν βλαστό στο σύνολο των εκφύτων.

Οι αναγεννημένοι βλαστοί μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα Ανάπτυξης με στόχο την αύξηση του μήκους των μεσογονατίων διαστημάτων τους, καθώς όταν κόβονταν από τα έκφυτα ήταν αρκετά συμπαγή. Παρόλα αυτά, δεν επιτεύχθηκε μεγάλη ανάπτυξη των βλαστών.

Για το στάδιο της ριζοβολίας, αρχικά έγινε δοκιμή των υποστρωμάτων Υ.Ρ. 1 και Υ.Ρ. 2 χρησιμοποιώντας τους βλαστούς που προέκυψαν από τα έκφυτα που δεν μολύνθηκαν με το αγροβακτήριο. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.7, τα ποσοστά ριζοβολίας ήταν αρκετά ικανοποιητικά για τα τέσσερα είδη και στα δύο υποστρώματα (οι βλαστοί του *P. trifoliata* δεν ήταν αρκετά ανεπτυγμένοι και συνεπώς, δεν κατέστη δυνατή η δοκιμή των υποστρωμάτων ριζοβολίας). Οι βλαστοί που τοποθετήθηκαν στο υπόστρωμα Υ.Ρ. 1 (1 mg/l IBA) σχημάτισαν μία μακριά ρίζα (Εικ. 1.3, Α) ενώ αντίθετα, οι βλαστοί που τοποθετήθηκαν στο υπόστρωμα Υ.Ρ. 2 (1 mg/l NAA) σχημάτισαν πολλές, κοντές και αρκετά διογκωμένες ρίζες (Εικ. 1.3, Β). Η τελευταία μορφή ριζών δεν είναι επιθυμητή διότι δυσχεραίνει τη μεταφύτευση των φυτών στο χώμα.

**Πίνακας 1.7.** Ποσοστά επιτυχίας της ριζοβολίας των αναγεννημένων βλαστών που δεν μολύνθηκαν με το αγροβακτήριο.

Είδος	Υπόστρωμα Ριζοβολίας	
	Υ.Ρ. 1	Υ.Ρ. 2
Carrizo citrange	62% (13/21)*	95% (19/20)
Citrumelo 1452	90% (9/10)	100% (9/9)
Λεμονιά Μαγληνή	88% (7/8)	88% (7/8)
Νεραντζιά	100% (4/4)	100% (4/4)

\* Στις παρενθέσεις φαίνεται ο αριθμός των ριζοβολημένων βλαστών στο σύνολο των βλαστών που τοποθετήθηκαν για ριζοβολία.



**Εικόνα 1.3.** Οι μορφές των σχηματιζόμενων ριζών στα υποστρώματα με:

A) 1 mg/l IBA και B) 1 mg/l NAA.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια υποστρώματα καθώς και ένα τρίτο που περιείχε 3mg/l IBA και 1 mg/l NAA για τη ριζοβολία των πιθανά μετασχηματισμένων φυτών. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.8, τα ποσοστά ριζοβολίας ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην παρουσία των δύο αντιβιοτικών, και κυρίως της καναμυκίνης, στο υπόστρωμα (Vijaya Chitra et al., 2014). Τα χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας αποτελούν σημαντικό περιοριστικό παράγοντα κατά τη διαδικασία του γενετικού μετασχηματισμού, καθώς μειώνουν δραστικά το ποσοστό των φυτών που επιβιώνουν και μπορούν τελικά να μεταφυτευτούν στο χώμα. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο να συνεχιστούν οι προσπάθειες εξεύρεσης ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου ριζοβολίας των μετασχηματισμένων φυτών ή εναλλακτικά να εφαρμοστεί ο *in vitro* εμβολιασμός σε υποκείμενα σπορόφυτα.

**Πίνακας 1.8.** Ποσοστά επιτυχίας της ριζοβολίας των πιθανά μετασχηματισμένων βλαστών.

Είδος	Υπόστρωμα Ριζοβολίας		
	Υ.Ρ. 1	Υ.Ρ. 2	Υ.Ρ. 3
Carrizo citrange	50% (2/4)*	77% (10/13)	0% (0/3)
Citrumelo 1452	14% (1/7)	0% (0/6)	0% (0/7)
<i>P. trifoliata</i>	45% (5/11)	50% (5/10)	0% (0/3)
Λεμονιά Μαγληνή	0% (0/6)	-	0% (0/7)
Νεραντζιά	0% (0/7)	-	0% (0/3)

\* Στις παρενθέσεις φαίνεται ο αριθμός των ριζοβολημένων βλαστών στο σύνολο των βλαστών που τοποθετήθηκαν για ριζοβολία

Είναι αξιοσημείωτο ότι στα περισσότερα από τα φυτά που ριζοβόλησαν σταμάτησε να αναπτύσσεται ο βλαστός. Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκε μεταφορά των βλαστών σε υπόστρωμα χωρίς ορμόνες αλλά και η προσθήκη μερικών σταγόνων της ορμόνης GA<sub>3</sub> (1mg/l) απευθείας πάνω στο βλαστό, όμως χωρίς αποτέλεσμα. Το γεγονός αυτό είχε σαν συνέπεια τα φυτά να μην είναι αρκετά ανεπτυγμένα για να μεταφυτευτούν στο χώμα.

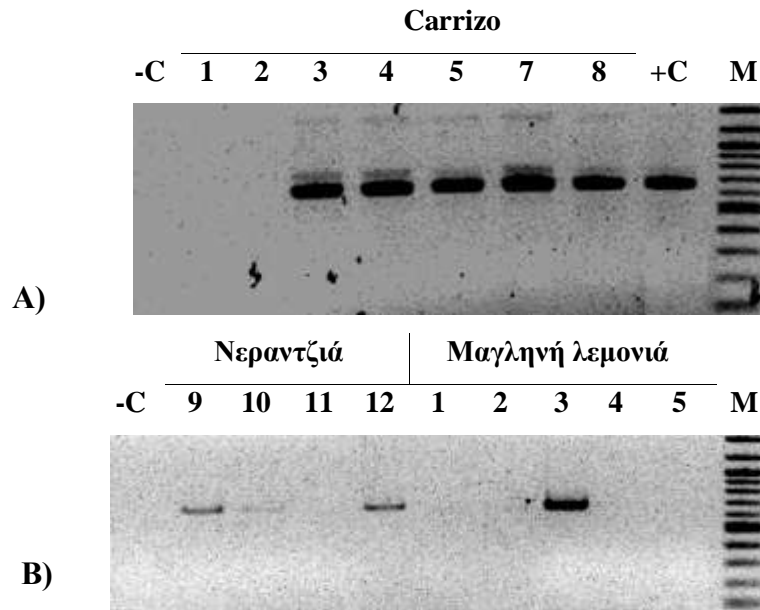
Επιπρόσθετα, το μικρό μέγεθος το βλαστών έκανε αδύνατη τη λήψη δειγμάτων για απομόνωση DNA για την ανίχνευση της παρουσίας του διαγονιδίου, καθώς η μέθοδος CTAB απαιτεί φυτικό ιστό βάρους τουλάχιστον 30 mg. Εναλλακτική προσέγγιση για τον έλεγχο της διαγονιδιακής φύσης των αναγεννημένων φυτών αποτέλεσε η οπτική παρατήρηση της έκφρασης του γονιδίου του *sgfp* κάτω από

υπεριώδη ακτινοβολία (λάμπα χειρός). Μέσω της προσέγγισης αυτής ωστόσο δεν κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός των μετασχηματισμένων φυτών.

Εξαιτίας των παραπάνω προβλημάτων, ελέγχθηκαν λίγα φυτά από κάθε είδος. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν, μέσω αντιδράσεων PCR, πέντε φυτά Carrizo, ένα Citrumelo 1452, τρία *P. trifoliata*, πέντε Μαγληνές λεμονιές και έξι Νεραντζιές (Πίνακας 1.9). Τα προϊόντα ενίσχυσης αναμενόμενου μεγέθους για το διαγονίδιο *sgfp* επιβεβαίωσαν την επιτυχία του μετασχηματισμού σε πέντε διαγονιδιακά φυτά Carrizo (μέθοδος κατά Orbonic & Grosser, 2006), μία διαγονιδιακή Μαγληνή λεμονιά και τρεις διαγονιδιακές Νεραντζιές [μέθοδος κατά Orbonic and Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011)] (Εικ. 1.4). Για τα Citrumelo 1452 και *P. trifoliata*, κανένα από τα συνολικά τέσσερα φυτά που ελέγχθηκαν δεν είχε ενσωματώσει το διαγονίδιο *sgfp*.

**Πίνακας 1.9.** Σύνοψη των αποτελεσμάτων ελέγχου των αναγεννημένων βλαστών για την παρουσία του διαγονιδίου *sgfp*.

Είδος	Αριθμός φυτών που ελέγχθηκαν	Αριθμός φυτών που ήταν θετικά
Carrizo citrange	5	5
Citrumelo 1452	1	0
<i>P. trifoliata</i>	3	0
Λεμονιά Μαγληνή	5	1
Νεραντζιά	6	3



**Εικόνα 1.4.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του διαγονιδίου *sgfp* στα αναγεννημένα φυτά: **A)** Carrizo, **B)** Νεραντζιά και Μαγληνή λεμονιά. **-C:** Αρνητικός μάρτυρας (H<sub>2</sub>O), **+C:** θετικός μάρτυρας (πλασμιδίο pBin-*sgfp*), **M:** 100bp DNA ladder (NEB).

#### 1.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα εσπεριδοειδή προσβάλλονται από διάφορα είδη εντόμων, μυκήτων, βακτηρίων και ιών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αντιμετώπιση των εχθρών και ασθενειών στηρίζεται στη χρήση ανθεκτικών υποκειμένων και ποικιλιών. Αυτό όμως δεν είναι πάντοτε εφικτό λόγω της δυσκολίας προσαρμογής ορισμένων γονοτύπων στις εκάστοτε εδαφικές και κλιματικές συνθήκες. Η πλειοψηφία των καλλιεργούμενων ποικιλιών και υποκειμένων προέκυψε από επιλογή τυχαίων μεταλλάξεων ενώ η εφαρμογή της κλασικής βελτίωσης στα εσπεριδοειδή είναι πολύ χρονοβόρα και παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η άντληση ανθεκτικότητας από το γονιδιακό απόθεμα των εσπεριδοειδών περιορίζεται σημαντικά από τη σπανιότητα των φυσικών πηγών ανθεκτικότητας, καθιστούν το γενετικό μετασχηματισμό μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση καθώς εξασφαλίζει την εισαγωγή των επιθυμητών χαρακτηριστικών στους καλλιεργούμενους γονοτύπους χωρίς να αλλάζει το *elite* γενετικό τους υπόβαθρο.

Απαραίτητη ωστόσο προϋπόθεση για την επιτυχία του γενετικού μετασχηματισμού αποτελεί η εφαρμογή του κατάλληλου πρωτοκόλλου καθώς τα εσπεριδοειδή συγκαταλέγονται στα δύστροπα στο μετασχηματισμό και αναγέννηση είδη και συνεπώς, δεν ανταποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο στα διάφορα πρωτόκολλα μετασχηματισμού (Gutiérrez et al., 1997). Για το λόγο, αυτό πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα μετασχηματισμού πέντε ειδών εσπεριδοειδών με τη χρήση του γονιδίου-μάρτυρα *sgfp* (Ghorbel et al., 1999).

Από τη σύγκριση των πέντε πρωτοκόλλων που δοκιμάστηκαν βρέθηκε ότι αυτό των Orbovic and Grosser (2006) ήταν αρκετά αποτελεσματικό για το *P.trifoliata* και τα υβρίδιά του Carrizo και Citrumelo 1452. Τα μεγαλύτερα προβλήματα που ανέκυψαν κατά τη διαδικασία του μετασχηματισμού αφορούν την ανάπτυξη των αναγεννημένων βλαστών καθώς και τη ριζοβολία τους, γεγονός που αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (Peña et al., 2008). Για το λόγο αυτό, ο έλεγχος για την παρουσία του διαγονιδίου κατέστη εφικτός σε μικρό αριθμό αναγεννημένων βλαστών, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να εκτιμηθεί αξιόπιστα η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού με το γονίδιο-μάρτυρα *sgfp*.

Όσον αφορά τη λεμονιά και τη νεραντζιά, πρόκειται για δύο είδη που ανταποκρίνονται δύσκολα στο γενετικό μετασχηματισμό σε σύγκριση με άλλα είδη εσπεριδοειδών (Ghorbel et al., 2001). Το γεγονός αυτό υπήρξε έναυσμα πληθώρας



ερευνητικών μελετών για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού (Gutiérrez et al., 1997; Ghorbel et al., 1999; Ghorbel et al., 2001; Dutt et al., 2009; Sohani et al., 2015; Hu et al., 2016). Στην παρούσα εργασία, για το μετασχηματισμό της Μαγληνής λεμονιάς και της Νεραντζιάς δοκιμάστηκαν τέσσερα διαφορετικά πρωτόκολλα που έχουν εφαρμοστεί σε άλλα εσπεριδοειδή. Από αυτά, το πλέον αποτελεσματικό ήταν αυτό που ακολουθούσε τη διαδικασία των Orbovic and Grosser (2006) με τροποποιήσεις, που αφορούσαν κυρίως τη σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων, των Roussos et al. (2011). Οι τελευταίοι ερευνητές, χρησιμοποίησαν τα συγκεκριμένα υποστρώματα για την αναγέννηση βλαστών από επικοτύλια Νεραντζιάς. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι τα υποστρώματα αυτά είναι κατάλληλα για το γενετικό μετασχηματισμό της Νεραντζιάς και της Μαγληνής λεμονιάς, δίνοντας ικανοποιητικά ποσοστά παραγωγής αναγεννημένων και μετασχηματισμένων βλαστών. Παρά το γεγονός ότι ο προτεινόμενος συνδυασμός πρωτοκόλλων είναι αρκετά αποτελεσματικός για τα προαναφερθέντα είδη, είναι σημαντικό να συνεχιστούν οι προσπάθειες βελτιστοποίησής τους προκειμένου να αυξηθούν περαιτέρω οι συχνότητες μετασχηματισμού και αναγέννησης ολόκληρων φυτών. Η αύξηση του ποσοστού επιτυχίας του μετασχηματισμού της λεμονιάς και της νεραντζιάς θα αναβαθμίσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα των βελτιωτικών διαδικασιών, μέσω της ενσωμάτωσης γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε σοβαρές ασθένειες, όπως η κορυφοξήρα και η τριστέσα, αντίστοιχα.

Στην παρούσα εργασία, δόθηκε έμφαση στην παραγωγή διαγονιδιακών εσπεριδοειδών που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα, με εξαίρεση τη Μαγληνή λεμονιά. Η αρνητική στάση του καταναλωτικού κοινού απέναντι στα προϊόντα που παράγονται από γενετικά τροποποιημένα φυτά οδηγεί την έρευνα προς την κατεύθυνση της γενετικής βελτίωσης των υποκειμένων και λιγότερο των καλλιεργούμενων ποικιλιών. Η παρουσία του διαγονιδίου σε φυτά που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση των χαρακτηριστικών του ίδιου του υποκειμένου (εδαφικές συνθήκες, βιοτικές καταπονήσεις) αλλά και στη βελτίωση των χαρακτηριστικών του εμβολιαζόμενου επί αυτού φυτού. Μελέτες που έχουν γίνει τόσο σε λαχανικά όσο και σε δένδρα έχουν δείξει ότι τα σήματα της RNA σιώπησης, όπως τα siRNAs, μπορούν να μεταφερθούν από το διαγονιδιακό υποκείμενο στο μη-διαγονιδιακό εμβόλιο και αντίστροφα, αυξάνοντας την ανθεκτικότητα του μη-μετασχηματισμένου τμήματος σε ιούς και ιοειδή (Kasai et al., 2013; Zhao and Song, 2014; Song et al., 2015). Σε αυτή την περίπτωση, το εμβόλιο και οι παραγόμενοι καρποί

δεν περιέχουν το διαγονίδιο και κατ' επέκταση δεν υπάρχει κίνδυνος από την πιθανή εξάπλωση της γύρης στις γειτονικές καλλιέργειες (Lusser et al., 2012). Μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στη βελτίωση των εσπεριδοειδών καθώς τα παραγόμενα προϊόντα προέρχονται από το μη-διαγονιδιακό τμήμα του φυτού. Παρόλα αυτά, δεν έχει αποσαφηνισθεί εάν τα διαγονιδιακά υποκείμενα θα πρέπει να υπόκεινται στη νομοθεσία που διέπει τις διαγονιδιακές καλλιέργειες φυτών (Song et al., 2015).

Μέρος των αποτελεσμάτων του παρόντος κεφαλαίου παρουσιάστηκαν στο 25<sup>ο</sup> Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, Λεμεσός 1-4 Νοεμβρίου, 2011. Η περίληψη παρατίθεται στο Παράρτημα III.

## 1.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Cervera M, Juárez J, Navarro A, et al (1998a) Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res* 7:51–59.
- Cervera M, López MM, Navarro L, Peña L (1998b) Virulence and supervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruits plants. *Physiol Mol Plant Pathol* 52:67-78.
- Cervera M, Pina JA, Juárez J, et al (1998c) *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep* 18:271–278.
- Cervera M, Ortega C, Navarro A, et al (2000) Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. *J Hortic Sci Biotechnol* 75:26–30.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802–805.
- Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 6:325-330.
- Dutt M, Grosser JW (2009) Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 98:331–340.
- Dutt M, Orbović V, Grosser JW (2009) Cultivar-dependent gene transfer into citrus using *Agrobacterium*. *Proc Fla State Hort Soc* 122:85–89.
- Endo T, Shimada T, Fujii H, et al (2005) Ectopic expression of an *FT* homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Res* 14:703–712.
- Fagoaga C, Tadeo FR, Iglesias DJ, et al (2007) Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a *GA 20-oxidase* gene modifies plant architecture. *J Exp Bot* 58:1407–1420.
- Fleming GH, Olivares-Fuster O, Fata Del-Bosco S, Grosser JW (2000) An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 36:450–455.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, et al (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 32:272–289.
- Ghorbel RR, Juárez J, Navarro L, Peña L (1999) Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. *Theor Appl Genet* 99:350–358.

- Ghorbel R, La-Malfa S, Lopez MM, et al (2001) Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a super-transformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in Citrus. *Physiol Mol Plant Pathol* 58:103–110.
- Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster O (2000) Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 36:434–449.
- Guo W, Duan Y, Olivares-Fuster O, et al (2005) Protoplast transformation and regeneration of transgenic Valencia sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase gene. *Plant Cell Rep* 24:482–486.
- Gutiérrez MA., Luth D, Moore GA (1997) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of *citrus tristeza virus*. *Plant Cell Rep* 16:745–753.
- Hidaka T, Omura M, Ugaki M, et al (1990) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. *Japanese J Breed* 40:199-207.
- Hu W, Li W, Xie S, et al (2016) *Kn1* gene overexpression drastically improves genetic transformation efficiencies of citrus cultivars. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 1–11.
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986)  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8447–8451.
- Kaneyoshi J, Kobayashi S (1999) Characteristics of transgenic trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid. *J Japan Soc Hortic Sci* 68:734–738.
- Kasai A, Sano T, Harada T (2013) Scion on a stock producing siRNAs of *potato spindle tuber viroid* (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. *PLoS One* 8:e57736.
- Khan IA, Kender WJ (2007) Citrus breeding: introduction and objectives. In: Khan IA (ed) *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International. pp 1-8.
- Kobayashi S, Uchimiya H (1989) Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. *Japanese J Genet* 64:91–97.
- Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerezo E (2012) Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat Biotech* 30:231–239.
- Miki B, McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: Applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* 107:193–232.
- Molinari HBC, Besspalhok JC, Kobayashi AK, et al (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf.  $\times$  *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. *Sci Hortic* 99:379–385.

- Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, et al (1992) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 11:238–242.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-479.
- Navarro L, Juárez J, Aleza P, Pina JA (2003) *Plant Biotechnology 2002 and Beyond: Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress June 23--28, 2002 Orlando, Florida, U.S.A.* In: Vasil IK (ed) Springer Netherlands, Dordrecht, pp 541–544.
- Olivares-Fuster O, Fleming GH, Albiach-Marti MR, et al (2003) *Citrus tristeza virus* (CTV) resistance in transgenic citrus based on virus challenge of protoplasts. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 39:567–572.
- Orbovic V and Grosser JW (2006) Citrus. In: K. Wang (ed.), *Methods in molecular biology*, Vol. 344, *Agrobacterium protocols*, 2nd ed, Vol. 2. Humana Press. pp177-189.
- Peña L, Martin-Trillo M, Juarez J, et al (2001) Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nat Biotech* 19:263–267.
- Peña L, Cervera M, Ghorbel R, et al (2007) Genetic transformation. In: Khan IA (ed) *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International. pp 329-344.
- Peña L, Cervera M, Fagoaga C, et al. (2008) Citrus. In: Kole C and Hall TC (ed) *Compendium of transgenic crop plants: transgenic tropical and subtropical fruits and nuts*. Blackwell publishing. pp 1-61.
- Roussos PA, Dimitriou G, Voloudakis AE (2011) N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (4-CPPU) enhances *in vitro* direct shoot organogenesis of *Citrus aurantium* L. epicotyl segments compared to other commonly used cytokinins. *Span. J. Agric. Res.* 9:504-509.
- Sheikholeslam SN, Weeks DP (1987) Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 8:291–298.
- Sohani MM, Rezadoost MH, Zamani AH, et al (2015) High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) using gene encoding *Citrus tristeza virus* coat protein. *J Appl Hortic* 17:109-114.
- Song G, Walworth A, Loescher W (2015) Grafting of genetically engineered plants. *J Am Soc Hortic Sci* 140:203–213.
- Stewart CN Jr, Via LE (1993) A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14:748-750.

- Tan B, Li DL, Xu SX, et al. (2009) Highly efficient transformation of the *GFP* and *MAC12.2* genes into precocious trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf), a potential model genotype for functional genomics studies in *Citrus*. *Tree Genet Genomes* 5:529-537.
- Vijaya Chitra DS, Chinthapalli B, Padmaja G (2014) Efficient regeneration system for genetic transformation of mulberry (*Morus indica* L. Cultivar S-36) using *in vitro* derived shoot meristems. *Am J Plant Sci* 5:1–6.
- Wong WS, Li GG, Ning W, et al (2001) Repression of chilling-induced ACC accumulation in transgenic citrus by over-production of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase RNA. *Plant Sci* 161:969–977.
- Zhao D, Song G (2014) Rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNAs and their effect on virus resistance in nontransgenic sweet cherry. *Plant Biotechnol J* 12:1319–1328.

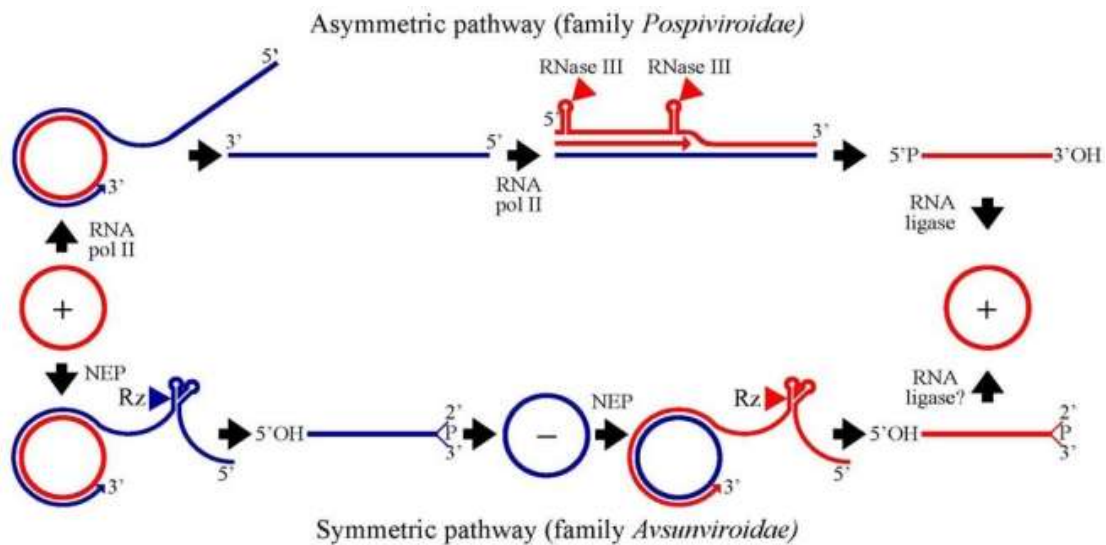
## **Κεφάλαιο 2. Δημιουργία φυτών *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το ιοειδές CEVd**

### **2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

#### **2.1.1. Ιδιότητες των ιοειδών**

Τα ιοειδή συνιστούν τα μικρότερα παθογόνα που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες σε φυτά. Πρόκειται για μικρά (239-401 νουκλεοτίδια), γυμνά, μονόκλιωνα, κυκλικά μόρια RNA, με υψηλό βαθμό δευτεροταγούς δομής, που δεν κωδικοποιούν καμία πρωτεΐνη ή πεπτίδιο. Η αλληλουχία τους και η δομή τους περιέχει όλες τις πληροφορίες που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό, τη μετακίνησή τους (μέσα στο κύτταρο, μεταξύ των κυττάρων και μέσα σε ολόκληρο το φυτό), καθώς και την ικανότητά τους να αντιστέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών και να προκαλούν συμπτώματα στα προσβεβλημένα φυτά (Palukaitis, 2014).

Τα ιοειδή κατατάσσονται σε δύο οικογένειες, με βάση τρία κριτήρια: α) τον τρόπο και την τοποθεσία του πολλαπλασιασμού τους, β) την παρουσία ή απουσία σφυροκέφαλου ριβοενζύμου (hammerhead ribozyme) και γ) τη δομή τους. Τα μέλη της οικογένειας *Pospiviroidae* πολλαπλασιάζονται και συσσωρεύονται στον πυρήνα του κυττάρου χρησιμοποιώντας την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II (DNA-dependent RNA polymerase II) του ξενιστή μέσω του μηχανισμού του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου (Εικ. 2.1). Πιο συγκεκριμένα, το μονομερές κυκλικό RNA του ιοειδούς (+) μεταγράφεται σε γραμμικά ολιγομερή RNAs αρνητικής αλληλουχίας (περιέχουν μερικές επαναλήψεις της αρνητικής αλυσίδας του ιοειδούς στη σειρά), τα οποία χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τη σύνθεση των θετικών αλυσίδων ολιγομερών του ιοειδούς. Στη συνέχεια, οι θετικές αλυσίδες ολιγομερών κόβονται από τις RNάσες του ξενιστή (RNase III) και σχηματίζονται γραμμικές αλυσίδες μονομερών, οι οποίες μετά τη δράση της RNA λιγάσης σχηματίζουν τα κυκλικά ώριμα ιοειδή (Branch et al., 1988; Ding and Itaya, 2007; Flores et al., 2009). Αντίθετα, τα μέλη της οικογένειας *Avsunviroidae* πολλαπλασιάζονται και συσσωρεύονται στο χλωροπλάστη του κυττάρου μέσω του μηχανισμού του συμμετρικού κυλιόμενου κύκλου (Εικ. 2.1), χρησιμοποιώντας τα ένζυμα του ξενιστή αλλά και τα δικά τους σφυροκέφαλα ριβοένζυμα (Branch et al., 1988; Hernandez and Flores, 1992).



**Εικόνα 2.1.** Ο μηχανισμός του κυλιόμενου κύκλου πολλαπλασιασμού των ιοειδών. Οι κόκκινες και μπλε γραμμές αναφέρονται στις θετικές (+) και αρνητικές (-) αλυσίδες, αντίστοιχα. Τα τρίγωνα επισημαίνουν τις θέσεις περιορισμού της RNase III ή των ριβοενζύμων (Rz). Η αρχική μεταγραφή γίνεται από την RNA πολυμεράση II (RNA pol II) ή τη χλωροπλαστική RNA πολυμεράση που κωδικοποιείται στον πυρήνα (nuclear-encoded chloroplastic RNA polymerase, NEP) (Flores et al., 2009).

Η προσβολή των φυτών από τα ιοειδή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ήπιων έως σοβαρών συμπτωμάτων αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις όπου δεν εμφανίζονται συμπτώματα στα φυτά. Συνήθως, τα συμπτώματα των προσβεβλημένων από ιοειδή φυτών μοιάζουν με αυτά των ιολογικών προσβολών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται νανισμός, επιναστία, αποχρωματισμός των αγγείων, παραμόρφωση και κηλίδωση των φύλλων, χλωρωτικές ή νεκρωτικές κηλίδες, έλκη, απολέπιση του φλοιού, παραμορφωμένες ρίζες-άνθη-φρούτα και σπάνια θάνατος των φυτών (Kovalskaya and Hammond, 2014).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα ιοειδή προκαλούν ασθένεια στα φυτά δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο χρησιμοποιούν τις RNA πολυμεράσες του ξενιστή για τον πολλαπλασιασμό τους ενισχύει την υπόθεση ότι η παθογένεια είναι απόρροια του αναπαραγωγικού τους κύκλου (Navarro et al., 2012). Το γονιδιωματικό RNA των ιοειδών ή/και τα ενδιάμεσα προϊόντα του αναπαραγωγικού τους κύκλου θα μπορούσαν να αποτελούν επαγωγείς αλλά και στόχους του μηχανισμού της RNA-σιώπησης των φυτών (Gómez et al., 2009). Πιο συγκεκριμένα, κάποια RNAs που παράγονται κατά τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού των ιοειδών, εξάγονται στο κυτταρόπλασμα και πιθανόν ελέγχουν την αποδόμηση μορίων mRNA του ξενιστή,



συγκεκριμένης αλληλουχίας, που είναι σημαντικά για τη φυσιολογία του και επομένως επάγουν έμμεσα την έκφραση συμπτωμάτων (Wang et al., 2004). Σε πειράματα που έχουν γίνει με τα ιοειδή των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) και της εξωκορτίδας των εσπεριδοειδών (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) παρατηρήθηκαν αλλαγές σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες και στα επίπεδα των διαφόρων πρωτεϊνών των ξενιστών τους (Kovalskaya and Hammond, 2014). Πιο συγκεκριμένα, σε φυτά τομάτας μολυσμένα με το PSTVd παρατηρήθηκαν αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση σε καταπονήσεις και σε ασθένειες, στη δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων, στη λειτουργία των χλωροπλαστών, στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών και σε διάφορες άλλες λειτουργίες (Itaya et al., 2002). Επιπλέον, σε φυτά τομάτας μολυσμένα με το CEVd βρέθηκε ότι επηρεάζεται η έκφραση 45 πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων μια ενδοχιτινάση (endochitinase), μια β-γλυκανάση καθώς και πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση (pathogenesis-related proteins) (Lisón et al., 2013).

### **2.1.2 Το ιοειδές CEVd**

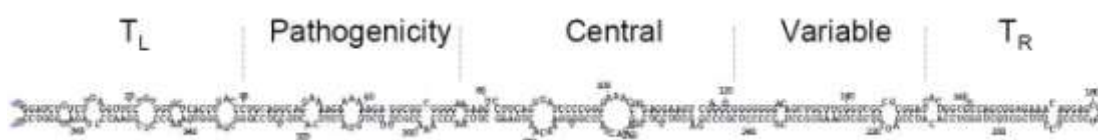
Το ιοειδές της εξωκορτίδας των εσπεριδοειδών (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) ανήκει στην οικογένεια Pospiriviridae και προκαλεί την ομόνυμη ασθένεια της εξωκορτίδας, η οποία εκδηλώνεται με απολέπιση του φλοιού (Εικ. 2.2. A) και νανισμό των προσβεβλημένων δένδρων (Εικ. 2.2. B). Ιδιαίτερα ευαίσθητα στην ασθένεια είναι το τρίπτερο (*Poncirus trifoliata*) και τα υβρίδιά του, όπως τα Carrizo citrange και Troyer citrange, τα οποία προωθούνται ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια προς αντικατάσταση της νεραντζιάς, ενός πολύ καλού και ανθεκτικού στα ιοειδή υποκειμένου. Οι πορτοκαλιές, οι μανταρινιές και τα γκρέιπφρουτ θεωρούνται ανεκτικά στο CEVd, διότι μολύνονται αλλά δεν εκδηλώνουν συμπτώματα παρά μόνο εάν εμβολιαστούν σε ευαίσθητα υποκείμενα. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου όταν ανθεκτικές ποικιλίες εμβολιάζονται σε ευαίσθητα υποκείμενα παρουσιάζουν κιτρίνισμα της κόμης και γενική εξασθένηση των δένδρων, χωρίς εμφανή συμπτώματα απολέπισης του φλοιού (Duran-Vila et al., 2000). Αρχικά, στο φλοιό εμφανίζονται κατακόρυφες σχισμές και στη συνέχεια λέπια από νεκρά τμήματα του φλοιού. Το εσωτερικό του φλοιού παραμένει ζωντανό και συνεχίζει να παράγει φλοιό, ο οποίος στη συνέχεια νεκρώνεται. Τα συμπτώματα συνήθως εμφανίζονται σε φυτά ηλικίας άνω των

4-8 ετών. Το CEVd μεταδίδεται με τη χρήση μολυσμένων εμβολίων αλλά και με τα εργαλεία κλαδέματος.



**Εικόνα 2.2.** A) Απολέπιση του φλοιού υποκειμένου Troyer μολυσμένου με CEVd (Πηγή: Boné, 1995), B) Έντονος νανισμός σε δένδρο πορτοκαλιάς ηλικίας 4 ετών εμβολιασμένο σε τρίπτερο μολυσμένο με CEVd (Πηγή: Hardy et al., 2008).

Το CEVd αποτελείται από μια μονόκλωνη αλυσίδα RNA μήκους 370-375 νουκλεοτιδίων. Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας *Pospiviroidae*, έχει ραβδοειδή δευτεροταγή δομή που χωρίζεται σε πέντε δομικούς και λειτουργικούς τομείς (Εικ. 2.3): τομέας του αριστερού άκρου (left-terminal domain,  $T_L$ ), τομέας παθογένειας (pathogenicity domain), κεντρική συντηρημένη περιοχή (central conserved region), μεταβλητός τομέας (variable domain) και τομέας του δεξιού άκρου (right terminal domain,  $T_R$ ) (Keese and Symons, 1985). Αυτοί οι τομείς παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των ιοειδών. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες αλληλουχίες σε έναν ή περισσότερους τομείς είναι πολύ σημαντικές για τον πολλαπλασιασμό, την κίνηση του ιοειδούς μέσα στο κύτταρο και από κύτταρο σε κύτταρο, την επαγωγή των συμπτωμάτων της ασθένειας, καθώς και την είσοδο και έξοδο του ιοειδούς στο αγγειακό σύστημα του φυτού (Flores et al, 2012).



**Εικόνα 2.3.** Σχηματική αναπαράσταση των πέντε τομέων του *Citrus exocortis viroid*, απομόνωση M34917 (GΔ<sub>74</sub>) υπολογισμένο με το λογισμικό Mfold (Martín et al., 2007).

Ως μέλος της οικογένειας Pospiriviridae πολλαπλασιάζεται με το μηχανισμό του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου (Εικ. 2.1). Τα ώριμα ιοειδή μετακινούνται στα γειτονικά κύτταρα μέσω των πλασμοδεσμάτων ενώ μεταφέρονται σε απομακρυσμένα μέρη του φυτού μέσω του αγγειακού συστήματος (Ding et al., 2005).

### 2.1.3. Το φυτό-μοντέλο *N. benthamiana*

Το *Nicotiana benthamiana* Domin αποτελεί ένα από τα πλέον διαδομένα φυτά-μοντέλα. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε τέσσερεις κυρίως λόγους (Goodin et al., 2008):

- i. προσβάλλεται από έναν πολύ μεγάλο αριθμό φυτοπαθογόνων ιών,
- ii. είναι ευαίσθητο σε μια ευρεία γκάμα φυτοπαθογόνων παραγόντων (βακτήρια, μύκητες, κ.ά.),
- iii. υπάρχουν διαθέσιμα πρωτόκολλα που παρέχουν υψηλά ποσοστά επιτυχίας στο γενετικό μετασχηματισμό και την αναγέννηση ολόκληρων φυτών,
- iv. παρουσιάζει ευκολία στον αγρο-εμποτισμό, καθιστώντας εφικτή τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων/πρωτεϊνών μέσω παροδικής έκφρασης.

Το γεγονός που το κατέστησε περισσότερο διαδεδομένο στις ιολογικές μελέτες σε σχέση με το *Arabidopsis thaliana* είναι η μεγάλη ευαισθησία του σε πολλούς ιούς (Quacquarelli and Avgelis, 1975). Αυτή η ευαισθησία αποδίδεται σε μια φυσική μετάλλαξη του γονιδίου της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (*NbRdRPI1m*) που παρουσιάζει το γονιδίωμα του *N. benthamiana* (Yang et al., 2004). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή της πρωτεΐνης RDR1, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών έναντι των ιολογικών προσβολών.

Οι παραπάνω ιδιότητες καθιστούν το *N. benthamiana* ένα ελκυστικό φυτό-μοντέλο για τη μελέτη της δυνατότητας επαγωγής ανθεκτικότητας έναντι των ιοειδών. Πιο συγκεκριμένα, έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα μελέτης της επαγωγής RNA σιώπησης για το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) (Itaya et al., 2007; Carbonell et al., 2008; Kasai et al., 2013; Adkar-Purushothama et al., 2015). Επιπλέον, οι Gómez and Pallás (2007) πραγματοποίησαν πειράματα με το ιοειδές του νανισμού του λυκίσκου (*Hop stunt viroid*, HSVd) στο *N. benthamiana*, το οποίο ωστόσο δεν αποτελεί ξενιστή του συγκεκριμένου ιοειδούς. Για να ξεπεράσουν αυτό το εμπόδιο, δημιούργησαν διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που εκφράζουν το διμερές μόριο του HSVd με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζουν το ιοειδές (Gómez and Pallás, 2006).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το *N. benthamiana* για την μελέτη της δυνατότητας επαγωγής ανθεκτικότητας έναντι του ιοειδούς CEVd. Η επιλογή του συγκεκριμένου είδους ως φυτό-μοντέλο βασίστηκε στο γεγονός ότι παρέχει τη δυνατότητα ευχερούς ανάπτυξης διαγονιδιακών φυτών, σε αντίθεση με τα εσπεριδοειδή τα οποία, όπως αποδείχθηκε και από τα ευρήματα του Κεφαλαίου 1, συνιστούν δύστροπα είδη ως προς το γενετικό μετασχηματισμό και την αναγέννηση ολόκληρων φυτών. Δεδομένου ότι το *N. benthamiana* δεν είναι ξενιστής του CEVd, αρχικά ελέγχθηκε η δυνατότητα πολλαπλασιασμού του ιοειδούς στο είδος αυτό και στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών που πολλαπλασιάζουν ενδογενώς το CEVd. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα πλασμίδιο που φέρει το διμερές μόριο του ιοειδούς και έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο γενετικό μετασχηματισμό του *A. thaliana*, το οποίο αποτελεί επίσης μη-ξενιστή του συγκεκριμένου ιοειδούς (Daròs and Flores, 2004).

#### **2.1.4. Σκοπός**

Στόχο των πειραμάτων του παρόντος τμήματος της διατριβής αποτέλεσε η δημιουργία φυτών *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν επιτυχώς το ιοειδές CEVd. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens* που έφερε το διμερές μόριο του CEVd. Η μετατροπή του είδους *N. benthamiana* σε ξενιστή του ιοειδούς CEVd επιχειρήθηκε σε φυτά αγρίου τύπου μέσω δύο διαφορετικών προσεγγίσεων: α) απευθείας μόλυνση των φυτών με αγροεμποτισμό και β) με σταθερό γενετικό μετασχηματισμό. Ακολούθησε αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών που προέκυψαν από το γενετικό μετασχηματισμό προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η παρουσία του πολλαπλασιαζόμενου ιοειδούς προκαλεί τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας στα μετασχηματισμένα φυτά του είδους *N. benthamiana*.

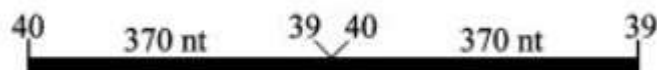
## 2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1. Μόλυνση φυτών *N. benthamiana* αγρίου τύπου με το CEVd

Στα πλαίσια μόλυνσης, μέσω αγρο-εμποτισμού, φυτών του είδους *N. benthamiana* με το ιοειδές CEVd, χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο που έφερε το διμερές μόριο του CEVd.

#### 2.2.1.1. Προετοιμασία πλασμιδίου

Χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCdCEVd που περιέχει το διμερές μόριο του CEVd και ήταν ευγενική χορηγία του Dr. J.A. Daròs (Εικ. 2.4) (Daròs and Flores, 2004). Το pCdCEVd εισήχθη σε επιδεκτικά κύτταρα *A. tumefaciens* EHA105 (Hood et al., 1993) με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης (Nagel et al., 1990). Για τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Micropulser της Biorad με τις κυβέττες με κενό 0,1 cm της ίδιας εταιρείας. Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν 40 μl βακτηριακού αιωρήματος και 2 μl από το πλασμίδιο. Η προετοιμασία των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *A. tumefaciens* EHA105 έγινε ακολουθώντας ένα τυπικό πρωτόκολλο ([www.bioguided.com](http://www.bioguided.com)).



**Εικόνα 2.4.** Διαγραμματική αναπαράσταση του διμερούς μορίου του CEVd όπως έχει ενσωματωθεί στον πλασμδιακό φορέα. Προέρχεται από την αλληλουχία M34917 στην οποία λείπει ένα G μεταξύ των νουκλεοτιδίων 70 και 74 (Daròs and Flores, 2004).

#### 2.2.1.2. Αγρο-εμποτισμός (Agro-infiltration) φυτών *N. benthamiana* αγρίου τύπου

Τα στάδια προετοιμασίας των μετασχηματισμένων *A. tumefaciens* πριν τον αγρο-εμποτισμό είναι τα εξής:

- 1) Λήψη μίας αποικίας από τα μετασχηματισμένα *A. tumefaciens* EHA105-pCdCEVd. Τα βακτήρια επώαστηκαν στους 28 °C με περιστροφή για περίπου 18 ώρες σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB που περιείχε τα αντιβιοτικά καναμυκίνη (50 mg/l) και ριφαμπικίνη (100 mg/l).
- 2) Την επόμενη ημέρα, έγινε υποκαλλιέργεια σε φρέσκο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά που περιείχε επιπλέον 10 mM MES (pH 5.7) και 20 μM acetosyringone. Τα βακτήρια επώαστηκαν στους 28 °C με περιστροφή για περίπου 18 ώρες.

- 3) Την ημέρα του αγρο-εμποτισμού έγινε φυγοκέντρωση της καλλιέργειας στις 3.500 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά και επαναδιάλυση σε διάλυμα MMA (10 mM MES pH 5.7, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM asetosyringone).
- 4) Το στάδιο 3 επαναλήφθηκε μία ακόμα φορά και πραγματοποιήθηκε η τελική επαναδιάλυση σε διάλυμα MMA, ώστε το βακτηριακό αιώρημα να έχει απορρόφηση OD<sub>600</sub>: 0,5-0,6. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε στο σκοτάδι για δύο ώρες.

Η μόλυνση με το αγροβακτήριο έγινε σε φυτά *N. benthamiana* ηλικίας πέντε εβδομάδων. Χρησιμοποιήθηκαν έξι φυτά για τη μόλυνση, η οποία έγινε με τρεις διαφορετικούς τρόπους (μολύνθηκαν δύο φυτά με κάθε τρόπο):

- 1) Εμποτισμός στο έλασμα του φύλλου με τη χρήση σύριγγας χωρίς βελόνα. Ο εμποτισμός έγινε σε πολλά σημεία του ελάσματος προκειμένου να εξαπλωθεί το βακτηριακό αιώρημα σε ολόκληρη την επιφάνεια.
- 2) Έγχυση σε σχισμή στη βάση του βλαστού. Έγινε διαγώνια σχισμή στη βάση του βλαστού με τη βελόνα της σύριγγας και έγχυση του αιωρήματος με τη χρήση της σύριγγας χωρίς βελόνα.
- 3) Ένεση στη βάση του βλαστού. Έγχυση του αιωρήματος στη βάση του βλαστού με τη χρήση σύριγγας με βελόνα.

Τα μολυσμένα φυτά διατηρήθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 24 °C και 18 ώρες φως. Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε μία, τρεις, πέντε και επτά εβδομάδες μετά τον εμποτισμό με λήψη νεαρών φύλλων που δεν είχαν εμποτιστεί. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την επεξεργασία τους.

#### 2.2.1.3. Απομόνωση RNA και έλεγχος του πολλαπλασιασμού του CEVd στα αγρο-εμποτισμένα φυτά *N. benthamiana*

Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRIzol Reagent (Ambion), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 70 mg ιστού. Η τελική επαναδιάλυση του ιζήματος του RNA έγινε σε 50 μl νερό υψηλής καθαρότητας. Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωθέντος RNA με φωτομέτρηση.

Στη συνέχεια, έγινε απομάκρυνση του DNA που πιθανόν να περιείχαν τα δείγματα RNA χρησιμοποιώντας μια ανασυνδυασμένη DNase I (Takara). Το μίγμα ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)
Buffer (10x)	5
DNase I	2
RNA	43
Σύνολο	50

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 30 λεπτά. Ακολούθησε καθαρισμός του RNA με όξινη φαινόλη, καθίζηση με αιθανόλη και προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης του καθαρισμένου RNA με φωτομέτρηση.

Ακολούθησε αντίδραση RT με τη χρήση της Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αντίδραση αναμείχθηκαν 300 ng ολικού RNA με τον εκκινητή CEVd-Pst-F (Πίνακας 2.1). Με το συγκεκριμένο εκκινητή εξασφαλίζεται η αντίστροφη μεταγραφή των πολλαπλασιαζόμενων ιοειδών (υβριδίζει στην αρνητική αλληλουχία (-) που παράγεται κατά τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού του CEVd, Εικ. 2.1) και όχι των μεταγραφημάτων του διαγονιδίου. Το μίγμα τοποθετήθηκε στους 95 °C για 5 λεπτά, στη συνέχεια στον πάγο για 2 λεπτά και ακολούθησε η προσθήκη των υπόλοιπων συστατικών της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (Ito et al., 2000).

Τα προϊόντα της RT χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για την PCR. Η αντίδραση έγινε με το ζεύγος εκκινητών LIC1\_298-70-F/LIC2\_298-70-R (Πίνακας 2.1). Το αναμενόμενο προϊόν ήταν 174 ζεύγη βάσεων. Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	13,52	
Buffer B (10x)	2	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
LIC1_298-70-F (10μM)	0,8	0,5 μM
LIC2_298-70-R (10μM)	0,8	0,5 μM
KAPA Taq polymerase (KAPA)	0,08	0,4 U
Δείγμα RNA	2,4	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C	-	2 λεπτά	} 33 κύκλοι
95 °C	-	30 δευτ.	
60 °C	-	30 δευτ.	
72 °C	-	1 λεπτό	
72 °C	-	5 λεπτά	

### 2.2.2. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το CEVd

Για την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών που πολλαπλασιάζουν ενδογενώς το CEVd πραγματοποιήθηκε σταθερός γενετικός μετασχηματισμός χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pCdCEVd, που φέρει το διμερές μόριο του CEVd. Για το μετασχηματισμό, εφαρμόστηκε η μέθοδος γενετικού μετασχηματισμού φυλλικών δίσκων (Horsch et al., 1985).

#### 2.2.2.1. Προετοιμασία βακτηρίου

Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCdCEVd, το οποίο εισήχθη σε επιδεκτικά κύτταρα *A. tumefaciens* EHA105 και C58C1 με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης, όπως περιγράφηκε στην υποενότητα 2.2.1.1.

Τα στάδια προετοιμασίας των μετασχηματισμένων *A. tumefaciens* πριν το γενετικό μετασχηματισμό φυτών του είδους *N. benthamiana* είναι τα εξής:

- 1) Λήψη μίας αποικίας από τα μετασχηματισμένα *A. tumefaciens* EHA105-pCdCEVd και C58C1-pCdCEVd. Τα βακτήρια επώστηκαν στους 28 °C με περιστροφή για περίπου 18 ώρες σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB που περιείχε τα αντιβιοτικά καναμυκίνη (50 mg/l) και ριφαμπικίνη (15 mg/l).
- 2) Την επόμενη ημέρα έγινε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 3.500 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά και επαναδιάλυση σε διάλυμα που περιείχε 4,4 g/l άλατα MS με βιταμίνες, 30 g/l σακχαρόζη και 19,6 mg/l ακετοσυριγκόνη (pH 5.8). Η τελική οπτική πυκνότητα του διαλύματος ήταν περίπου  $OD_{600}=1$ .

#### 2.2.2.2. Γενετικός μετασχηματισμός φυτών *N. benthamiana*

Ο γενετικός μετασχηματισμός έγινε με τη μέθοδο των φυλλικών δίσκων (Horsch et al., 1985). Η μέθοδος περιγράφεται συνοπτικά παρακάτω.



Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν φυτά *N. benthamiana* αγρίου τύπου ηλικίας 4-6 εβδομάδων.

Η προετοιμασία των φυλλικών δίσκων έχει ως εξής:

- 1) Τα φύλλα πλένονται με νερό βρύσης και στη συνέχεια απολυμαίνονται με εμβάπτιση για πέντε λεπτά σε διάλυμα χλωρίνης 20% και 0,1% Tween-20.
- 2) Τα φύλλα ξεπλένονται τέσσερις φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό.
- 3) Κόβονται φυλλικοί δίσκοι διαμέτρου περίπου 0,5 cm, με τη βοήθεια αποστειρωμένου φελλοτρυπητήρα.

Τα στάδια του γενετικού μετασχηματισμού έχουν ως εξής:

- 1) Οι φυλλικοί δίσκοι εμβαπτίζονται στο βακτηριακό αιώρημα για περίπου 30 λεπτά.
- 2) Μετά τη μόλυνση, οι φυλλικοί δίσκοι τοποθετούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς αντιβιοτικά επιλογής, με την κάτω επιφάνειά τους προς τα κάτω. Το υπόστρωμα συγκαλλιέργειας αποτελείται από 4,4 g/l άλατα MS με βιταμίνες, 30 g/l σακχαρόζη, 8 g/l άγαρ, 1 mg/l βανζυλαμινοπουρίνη (BAP) και 0,1 mg/l ναφθαλινοξικό οξύ (NAA). Το pH του υποστρώματος ρυθμίζεται στο 5.8.
- 3) Τα τρυβλία με τους φυλλικούς δίσκους τοποθετούνται σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 25 °C και 18 ώρες φως.
- 4) Μετά από τρεις ημέρες συγκαλλιέργειας των φυλλικών δίσκων με το αγροβακτήριο, γίνεται μεταφορά σε θρεπτικό υπόστρωμα με αντιβιοτικά επιλογής για τα μετασχηματισμένα κύτταρα και για το αγροβακτήριο. Το υπόστρωμα επιλογής αποτελείται από 4,4 g/l άλατα MS με βιταμίνες, 30 g/l σακχαρόζη, 8 g/l άγαρ, 1 mg/l βανζυλαμινοπουρίνη (BAP), 0,1 mg/l ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), 250 mg/l καρμπενικιλίνη και 10 mg/l υγρομυκίνη. Το pH του υποστρώματος ρυθμίζεται στο 5.8.
- 5) Οι φυλλικοί δίσκοι μεταφέρονται σε φρέσκο υπόστρωμα επιλογής κάθε τρεις εβδομάδες.
- 6) Στις άκρες των φυλλικών δίσκων σχηματίζονται μικροί κάλλοι. Όταν αναπτυχθούν βλαστοί από τους κάλλους, οι βλαστοί κόβονται και τοποθετούνται σε μεγαλύτερα δοχεία με υπόστρωμα επιλογής που επιτρέπουν την απρόσκοπτη ανάπτυξή τους.
- 7) Όταν οι βλαστοί αποκτήσουν μήκος 2-3 cm, μεταφέρονται σε δοχεία με υπόστρωμα ριζοβολίας, το οποίο αποτελείται από 4,4 g/l άλατα MS με βιταμίνες, 30 g/l σακχαρόζη, 5 g/l άγαρ, 250 mg/l κεφοταξίμη και 10 mg/l υγρομυκίνη. Το pH του υποστρώματος ρυθμίζεται στο 5.8.

8) Όταν οι αναγεννημένοι βλαστοί αποκτήσουν ικανοποιητικό ριζικό σύστημα μεταφυτεύονται στο χώμα. Τα φυτά διατηρούνται σε θάλαμο με 18 ώρες φως και θερμοκρασία περίπου 22-26 °C.

9) Στο στάδιο της άνθησης, τα φυτά καλύπτονται με χάρτινα σακουλάκια προκειμένου να εξασφαλιστεί η αυτογονιμοποίηση και ακολουθεί η συλλογή του σπόρου από κάθε φυτό ξεχωριστά.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία ενός έως δύο φύλλων από κάθε αναγεννημένο φυτό για την απομόνωση DNA και RNA. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

### 2.2.2.3. Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου στα αναγεννημένα φυτά

Για τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου στα αναγεννημένα φυτά, έγινε απομόνωση DNA με τη μέθοδο CTAB των Stewart and Via (1993). Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν περίπου 50 mg ιστού. Η επαναδιάλυση του ιζήματος έγινε σε 400 μl διαλύματος TNE (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). Ακολούθησε καθαρισμός του DNA από το RNA με την προσθήκη 5 μl RNάσης (συγκέντρωσης 4 mg/ml). Η RNάση απομακρύνθηκε από τα δείγματα με φαινόλη και καθίζηση με αιθανόλη. Η τελική επαναδιάλυση του καθαρισμένου DNA έγινε σε 50 μl νερό υψηλής καθαρότητας. Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωθέντος DNA με φωτομέτρηση.

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας DNA στα δείγματα πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με τη χρήση των εκκινητών NADH-F/R (Πίνακας 2.1). Το αναμενόμενο προϊόν ήταν 1.453 ζεύγη βάσεων. Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	15,12	
Buffer B (10x)	2	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
NADH-F (10μM)	0,8	0,5 μM
NADH-R (10μM)	0,8	0,5 μM
KAPA Taq polymerase (KAPA)	0,08	0,4 U
Δείγμα DNA	0,8	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C	- 2 λεπτά	} 35 κύκλοι
95 °C	- 30 δευτ.	
60 °C	- 30 δευτ.	
72 °C	- 1 λεπτό	
72 °C	- 5 λεπτά	

Για τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με το ζεύγος εκκινητών 35S-F/nosT-R (Πίνακας 2.1). Το αναμενόμενο προϊόν ήταν 1.249 ζεύγη βάσεων. Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	15,12	
Buffer B (10x)	2	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
35S-F (10μM)	0,8	0,5 μM
nosT-R (10μM)	0,8	0,5 μM
KAPA Taq polymerase (KAPA)	0,08	0,4 U
Δείγμα DNA	0,8	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C	- 2 λεπτά	} 35 κύκλοι
95 °C	- 30 δευτ.	
55 °C	- 30 δευτ.	
72 °C	- 45 δευτ.	
72 °C	- 5 λεπτά	

#### 2.2.2.4. Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του CEVd στα μετασχηματισμένα φυτά

Στα αναγεννημένα φυτά *N. benthamiana* που ήταν θετικά στην παρουσία του διαγονιδίου έγινε απομόνωση RNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol Reagent (Ambion), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για κάθε δείγμα, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 60 mg ιστού. Η τελική επαναδιάλυση του ιζήματος του RNA έγινε σε 50 μl νερό υψηλής καθαρότητας. Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωθέντος RNA με φωτομέτρηση.

Στη συνέχεια, έγινε απομάκρυνση του DNA που πιθανόν να περιείχαν τα δείγματα RNA χρησιμοποιώντας μια ανασυνδυασμένη DNase I (Takara). Ακολούθησε η διαδικασία που περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.1.3.

Για την επιβεβαίωση της απουσίας DNA από τα δείγματα RNA πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR στο RNA με τη χρήση των εκκινητών NADH-F/R

(Πίνακας 2.1). Για την αντίδραση ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.2.3.

Ακολούθησε αντίδραση RT με τη χρήση της Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 300 ng ολικού RNA και ο εκκινητής CEVd-Pst-F (Πίνακας 2.1), όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.1.3.

Τα προϊόντα της RT χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για την PCR. Η αντίδραση έγινε με το ζεύγος εκκινητών LIC1\_298-70-F/LIC2\_298-70-R (Πίνακας 2.1), όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.1.3. Το αναμενόμενο προϊόν ήταν 174 ζεύγη βάσεων.

### **2.2.3. Μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το CEVd**

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η συσσώρευση των πολλαπλασιαζόμενων μορίων RNA του ιοειδούς προκαλεί συμπτώματα στα διαγονιδιακά φυτά, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ορισμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών σε φυτά της T<sub>1</sub> γενεάς. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν πέντε ανεξάρτητες σειρές που ήταν απόγονοι των φυτών που παράχθηκαν από το γενετικό μετασχηματισμό με το διμερές μόριο του CEVd και είχε επιβεβαιωθεί ότι πολλαπλασιάζουν το ιοειδές. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν ήταν το ύψος, ο χρόνος άνθησης, ο αριθμός των ανθέων και το βάρος του παραγόμενου σπόρου ανά φυτό.

#### **2.2.3.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης**

Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα. Στο πρώτο, χρησιμοποιήθηκε σπόρος από τις διαγονιδιακές σειρές N.b. 34-1, 36 και 39, ενώ στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκε σπόρος από τις διαγονιδιακές σειρές N.b. 32 και 38-2. Και στα δύο πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα ως μάρτυρες σπόροι από φυτά *N. benthamiana* αγρίου τύπου (wt). Οι σπόροι των διαγονιδιακών φυτών ήταν απόγονοι αυτογονιμοποίησης (T<sub>1</sub> γενιά) των φυτών που προέκυψαν από το γενετικό μετασχηματισμό που περιγράφηκε στην υποενότητα 2.2.2.

Η σπορά έγινε σε σπορείο σε θάλαμο ανάπτυξης με θερμοκρασία 25-30 °C. Ακολούθησε μεταφύτευση σε ατομικά γλαστράκια, τρεις εβδομάδες μετά τη σπορά, και τοποθέτηση στην ίδια θερμοκρασία με φωτοπερίοδο 18 ώρες φως και 6 ώρες σκοτάδι.

Αυτές οι συνθήκες διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων. Οι μετρήσεις έγιναν σε δέκα φυτά από κάθε διαγονιδιακή σειρά και σε δέκα φυτά αγρίου τύπου.

#### 2.2.3.2. Επιβεβαίωση του πολλαπλασιασμού του CEVd στα διαγονιδιακά φυτά T<sub>1</sub> γενιάς

Για την επιβεβαίωση του πολλαπλασιασμού του CEVd στα διαγονιδιακά φυτά, έγινε δειγματοληψία ενός φύλλου από κάθε φυτό, οκτώ εβδομάδες μετά τη σπορά. Ακολούθησε απομόνωση RNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol Reagent (Ambion), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για κάθε δείγμα, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 70 mg ιστού. Η τελική επαναδιάλυση του ιζήματος του RNA έγινε σε 50 μl νερό υψηλής καθαρότητας. Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωθέντος RNA με φωτομέτρηση.

Στη συνέχεια, έγινε απομάκρυνση του DNA που πιθανόν να περιείχαν τα δείγματα RNA χρησιμοποιώντας μια ανασυνδυασμένη DNase I (Takara). Ακολούθησε η διαδικασία που περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.1.3.

Ακολούθησε αντίδραση RT με τη χρήση της Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 300 ng ολικού RNA και ο εκκινητής CEVd-Pst-F (Πίνακας 2.1), όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.1.3.

Τα προϊόντα της RT χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για την PCR. Η αντίδραση έγινε με το ζεύγος εκκινητών LIC1\_298-70-F/LIC2\_298-70-R (Πίνακας 2.1), όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.1.3. Το αναμενόμενο προϊόν ήταν 174 ζεύγη βάσεων.

#### 2.2.3.3. Μετρήσεις και στατιστική ανάλυση

Η μέτρηση του ύψους ξεκίνησε τέσσερις εβδομάδες μετά τη σπορά και επαναλαμβανόταν κάθε τρεις με τέσσερις ημέρες.

Σχετικά με την άνθηση, καταγράφηκε η ημερομηνία εμφάνισης του πρώτου άνθους σε κάθε φυτό και ακολούθησε μέτρηση του αριθμού των ανθέων 12 ημέρες μετά. Η μέτρηση των ανθέων επαναλαμβανόταν κάθε επτά ημέρες.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε συλλογή και ζύγισμα του σπόρου από κάθε φυτό ξεχωριστά.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου JMP (έκδοση 8). Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test) για επίπεδο σημαντικότητας 5% ( $p \leq 0.05$ ).

**Πίνακας 2.1.** Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο της μελέτης.

Ονόματα εκκινητών	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος (bp)
35S-F (Oraby, 2005)	GCTCCTACAAATGCCATCA	1249
nosT-R (Oraby, 2005)	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	
CEVd-Pst-F	ACCCTGCAGGCAGGAAAAGAA	174
LIC1_298-70-F	cgacgacaagaccctCAAACCGCTTTTCTT*	
LIC2_298-70-R	gaggagaagagccctCGCCGCCTCTT*	1453
NADH-F (Martin et al., 2013)	GGACTCCTGACGTATACGAAGGATC	
NADH-R (Martin et al., 2013)	AGTAGATGCTATCACACATACAAT	

\* Τα μικρά γράμματα υποδεικνύουν τα νουκλεοτίδια που είναι ομόλογα με τη αλληλουχία του χρησιμοποιούμενου πλασμιδίου.

## 2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.3.1. Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του CEVd σε φυτά αγρο-εμποτισμένα με το πλασμίδιο pCdCEVd

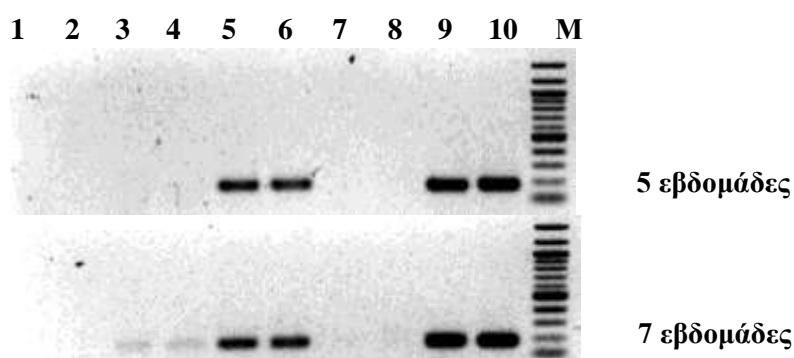
Το φυτό *N. benthamiana* χρησιμοποιείται ευρέως σε πειράματα που αφορούν τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ ιών και φυτών. Δεδομένου ότι δεν είναι ξενιστής του CEVd, προϋπόθεση αξιοποίησης του στα πειράματα αυτής της μελέτης αποτέλεσε η προηγούμενη μόλυνσή του με το ιοειδές.

Στα πλαίσια αυτά, επιχειρήθηκε η μόλυνση φυτών αγρίου τύπου, μέσω αγρο-εμποτισμού, με τη χρήση ενός πλασμιδίου που περιέχει το διμερές μόριο του CEVd. Αρχικά έγινε προσπάθεια να κατασκευαστεί το διμερές μόριο του CEVd από μια ελληνική απομόνωση του ιοειδούς, χωρίς επιτυχία. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCdCEVd, το οποίο αφορά μια κατασκευή που περιλαμβάνει δύο διαδοχικές αλληλουχίες του CEVd τοποθετημένες με την ίδια κατεύθυνση. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία από τους Daròs και Flores (2004) για το μετασχηματισμό φυτών *A. thaliana*, το οποίο συνιστά επίσης μη-ξενιστή του CEVd. Τα φυτά που παράχθηκαν από το μετασχηματισμό είχαν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζουν ενδογενώς το CEVd.

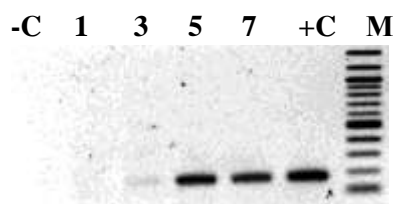
Για την ανίχνευση των πολλαπλασιαζόμενων ιοειδών, χρησιμοποιήθηκε στην αντίστροφη μεταγραφή ένας πρόσθιος εκκινητής σε αντίθεση με τις τυπικές αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής στις οποίες χρησιμοποιείται ο αντίστροφος εκκινητής. Ο πρόσθιος εκκινητής προσδένεται στην αρνητική (-) αλληλουχία του ιοειδούς, η οποία παράγεται μόνο όταν αυτό πολλαπλασιάζεται. Αντίθετα, ο αντίστροφος εκκινητής προσδένεται, εκτός από τη θετική (+) αλυσίδα του ιοειδούς, και στο mRNA που παράγεται από τη μεταγραφή του ενθέματος του πλασμιδίου. Ταυτόχρονα, ο καθαρισμός του RNA από πιθανές επιμολύνσεις με DNA απέκλεισε το ενδεχόμενο πολλαπλασιασμού, μέσω PCR, μορίων DNA προερχόμενων από το πλασμίδιο.

Ο αγρο-εμποτισμός έγινε με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στα φυτά που μολύνθηκαν με έγχυση στο έλασμα, το ιοειδές εντοπίστηκε επτά εβδομάδες μετά τη μόλυνση (Εικ. 2.5). Στα φυτά που μολύνθηκαν με έγχυση σε σχίσμο που δημιουργήθηκε στο βλαστό, το ιοειδές εντοπίστηκε τρεις εβδομάδες μετά τη μόλυνση (Εικ. 2.6). Αντίθετα, στα φυτά που μολύνθηκαν με ένεση

στο βλαστό, δεν κατέστη δυνατός ο εντοπισμός του ιοειδούς, ακόμη και επτά εβδομάδες μετά τη μόλυνση (Εικ. 2.5).



**Εικόνα 2.5.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση πολλαπλασιαζόμενου CEVd σε αγρο-εμποτισμένα φυτά *N. benthamiana*, στις πέντε (**πάνω**) και τις επτά (**κάτω**) εβδομάδες μετά τον εμποτισμό: **1:** αρνητικός μάρτυρας (H<sub>2</sub>O), **2:** *N. benthamiana* μη εμποτισμένο, **3-4:** φυτά εμποτισμένα στο έλασμα, **5-6:** φυτά εμποτισμένα σε σχισμή στο βλαστό, **7-8:** φυτά εμποτισμένα με ένεση στο βλαστό, **9-10:** Agro EHA105 pCdCEVd, **M:** 100 bp DNA ladder (NEB).



**Εικόνα 2.6.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση πολλαπλασιαζόμενου CEVd σε φυτό *N. benthamiana* αγρο-εμποτισμένο σε σχισμή στο βλαστό: **-C:** αρνητικός μάρτυρας (H<sub>2</sub>O), **1:** μία εβδομάδα μετά τη μόλυνση, **3:** τρεις εβδομάδες μετά τη μόλυνση, **5:** πέντε εβδομάδες μετά τη μόλυνση, **7:** επτά εβδομάδες μετά τη μόλυνση, **+C:** Agro EHA105 pCdCEVd, **M:** 100 bp DNA ladder (NEB).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι όταν ο εμποτισμός γίνεται στο έλασμα του φύλλου υπάρχει μεγάλη καθυστέρηση στη διασυστηματική μεταφορά του ιοειδούς μέσα στο φυτό. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει μια δυσκολία στη μετακίνηση του ιοειδούς στο φυτό ή ακόμα και ανεπαρκή ρυθμό πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, όταν η έγχυση γίνεται σε σχισμή στο βλαστό, πιθανόν το αγροβακτήριο περνάει κατευθείαν στο αγγειακό σύστημα μέσω του οποίου διασπείρεται σε ολόκληρο το φυτό και πολλαπλασιάζεται το ιοειδές. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών (Cress et al., 1983; Tabler and Sanger, 1984), όπου αναφέρεται ότι τα διμερή μόρια αρκετών ιοειδών που κατασκευάζονται *in vitro* είναι μολυσματικά για τους ξενιστές τους μετά



από μηχανική μόλυνση. Τα ευρήματα αυτά συνιστούν την πρώτη αναφορά πολλαπλασιασμού του CEVd σε φυτά του είδους *N. benthamiana* και επιπλέον παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι το είδος αυτό διαθέτει τους ενζυμικούς μηχανισμούς που απαιτούνται για τον *in vivo* πολλαπλασιασμό του CEVd.

### **2.3.2. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το CEVd**

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της προηγούμενης πειραματικής ενότητας υπογραμμίζουν τη δυσκολία μόλυνσης του *N. benthamiana* με το CEVd, μέσω μεθόδων αγρο-εμποτισμού. Τα φυτά είναι αρκετά γηρασμένα όταν αρχίζουν να πολλαπλασιάζουν το ιοειδές σε ποσότητες που να μπορούν να ανιχνευτούν με PCR (τρεις έως επτά εβδομάδες μετά τη μόλυνση) και επομένως, τα φυτά αυτού του σταδίου δεν είναι κατάλληλα για χρήση σε σχετικές μελέτες. Επιπλέον, πιθανολογείται ότι η εφαρμογή του αγρο-εμποτισμού δεν οδηγεί σε διασυστηματική μόλυνση, με αποτέλεσμα η διασπορά του ιοειδούς να μην είναι ομοιόμορφη σε ολόκληρο το φυτό (Zhu et al., 2001).

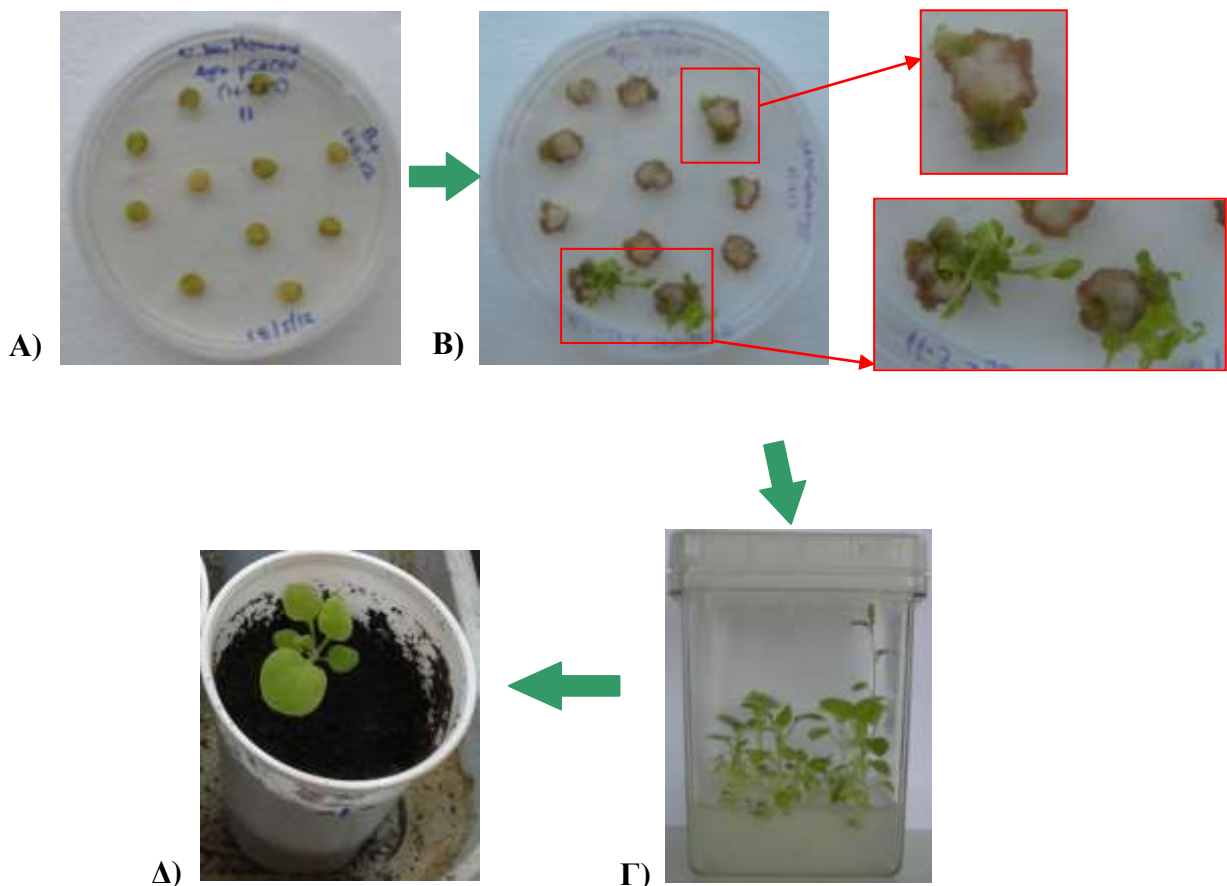
Για τους παραπάνω λόγους, κρίθηκε απαραίτητη η μετατροπή του *N. benthamiana* σε ξενιστή του ιοειδούς, μέσω σταθερού γενετικού μετασχηματισμού. Στα πλαίσια αυτά, ερευνητικό στόχο της παρούσας ενότητας αποτέλεσε η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών που πολλαπλασιάζουν ενδογενώς το ιοειδές και η μετέπειτα αξιοποίησή τους σε πειράματα ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι του CEVd, μέσω της εφαρμογής της RNA σιώπησης (Κεφάλαιο 3 της παρούσας διατριβής).

Για το γενετικό μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου του είδους *N. benthamiana* και εφαρμόστηκε η μέθοδος των φυλλικών δίσκων (Horsch et al., 1985). Κατά τη διαδικασία αυτή, διερευνήθηκε η δυνατότητα δύο διαφορετικών στελεχών του αγροβακτηρίου -EHA105-pCdCEVd και C58C1-pCdCEVd- ως προς τη δυνατότητά τους να μετασχηματίσουν γενετικά φυτά *N. benthamiana*. Συνολικά, μολύνθηκαν 240 έκφυτα. Παράλληλα, ελέγχθηκε η αναγεννητική ικανότητα των εκφύτων χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες φυλλικούς δίσκους από τα ίδια φύλλα, οι οποίοι δεν μολύνθηκαν με κανένα βακτήριο και τοποθετήθηκαν στα αντίστοιχα υποστρώματα χωρίς αντιβιοτικά. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.2, τα δύο βακτηριακά στελέχη έχουν μικρή διαφορά ως προς το ποσοστό των φυλλικών δίσκων που ανέπτυξαν βλαστούς.

**Πίνακας 2.2.** Τα ποσοστά των φυλλικών δίσκων που ανέπτυξαν βλαστούς, κατά τη διαδικασία μετασηματισμού, με τη χρήση δύο διαφορετικών στελεχών του αγροβακτηρίου που έφεραν το ίδιο πλασμίδιο.

Στέλεχος αγροβακτηρίου	Έκφυτα με βλαστούς	Ποσοστό
Μάρτυρας	36/50	72%
EHA105 pCdCEVd	32/145	22%
C58C1 pCdCEVd	27/95	28%

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.7, σε κάθε έκφυτο σχηματίστηκαν περισσότεροι του ενός κάλλοι και κάθε κάλλος παρήγαγε αρκετούς βλαστούς, οι οποίοι θεωρούνται μεταξύ τους κλώνοι καθώς προέκυψαν από το μετασηματισμό του ίδιου φυτικού κυττάρου.

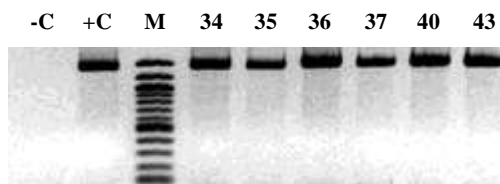


**Εικόνα 2.7.** Τα στάδια της διαδικασίας μετασηματισμού φυλλικών δίσκων *N. benthamiana*: Α) οι φυλλικοί δίσκοι, 1 εβδομάδα μετά τη μόλυνση, Β) κάλλοι και μικροί βλαστοί επί των εκφύτων, 3 μήνες μετά το μετασηματισμό, Γ) βλαστοί σε υπόστρωμα ριζοβολίας, 4 μήνες μετά το μετασηματισμό, Δ) μεταφύτευση αναγεννημένου βλαστού σε χώμα.

Η διαδικασία του μετασχηματισμού διήρκησε συνολικά περίπου έξι μήνες, από την ημέρα της μόλυνσης των εκφύτων μέχρι τη μεταφύτευση στο χώμα. Οι αναγεννημένοι βλαστοί τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας περίπου 3 μήνες μετά το μετασχηματισμό και μεταφυτεύτηκαν στο χώμα περίπου 3 μήνες αργότερα.

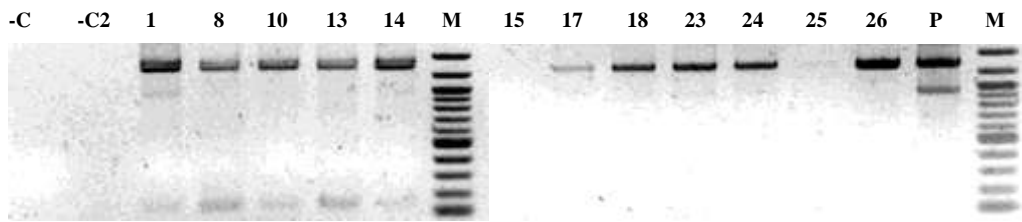
Στο χώμα μεταφυτεύτηκαν συνολικά 45 φυτά εκ των οποίων επιβίωσαν τα 35. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συλλογή σπόρου αυτογονιμοποίησης καθώς και δειγματοληψία φύλλων από όλα τα φυτά που επιβίωσαν. Ακολούθησε απομόνωση DNA, για τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου (pCdCEVd) και απομόνωση RNA για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του CEVd.

Για τον έλεγχο της καταλληλότητας της μεθόδου των Stewart και Via (1993) για την απομόνωση DNA από δείγματα φύλλων *N. benthamiana* και την επιβεβαίωση της παρουσίας DNA στα δείγματα έγινε αντίδραση PCR με τους εκκινητές NADH-F/R (Εικ. 2.8) που πολλαπλασιάζουν ένα τμήμα του γονιδίου της δεύτερης υπομονάδας της αφυδρογονάσης του NADH (*ndhB* gene). Το γονίδιο αυτό χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας (housekeeping gene) καθώς παρουσιάζει σταθερή έκφραση τόσο στα διαφορετικά κύτταρα και ιστούς όσο και στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης.



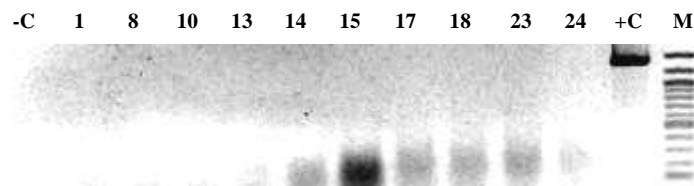
**Εικόνα 2.8.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τους εκκινητές NADH-F/R για την επιβεβαίωση της παρουσίας DNA στα δείγματα. **-C:** Αρνητικός μάρτυρας (H<sub>2</sub>O), **+C:** θετικός μάρτυρας (DNA από *N. benthamiana*). Οι αριθμοί συμβολίζουν τον αριθμό της διαγονιδιακής σειράς. **M:** 100bp DNA ladder (NEB).

Για τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου, στα αναγεννημένα φυτά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με το ζεύγος εκκινητών 35S-F/nosT-R (Εικ. 2.9). Οι εκκινητές αυτοί υβριδίζουν στον υποκινητή (promoter) 35S του ιού του μωσαϊκού του κουνουπιδιού (CaMV) και στον τερματιστή (terminator) NOS 3' από το γονίδιο της συνθάσης της νοπαλίνης, αντίστοιχα, οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν του διαγονιδίου και ελέγχουν την έκφρασή του στο φυτό.



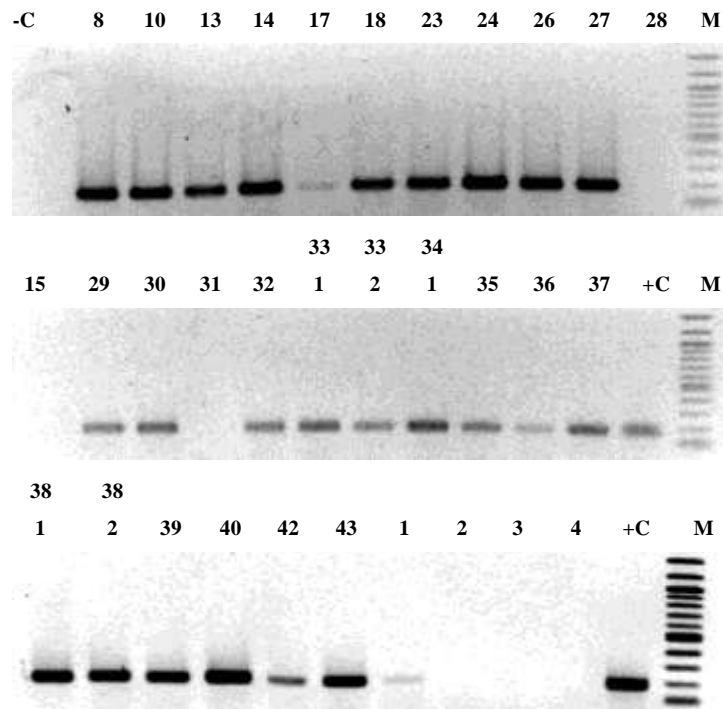
**Εικόνα 2.9.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τους εκκινητές 35S-F/nosT-R για την επιβεβαίωση της παρουσίας του διαγονιδίου pCdCEVd στα δείγματα. **-C:** Αρνητικός μάρτυρας (H<sub>2</sub>O), **-C2:** αρνητικός μάρτυρας (αγρίου τύπου *N. benthamiana*), **1-26:** οι αριθμοί συμβολίζουν τον αριθμό της διαγονιδιακής σειράς. **P:** πλασμίδιο pCdCEVd, **M:** 100bp DNA ladder (NEB).

Ακολούθησε απομόνωση RNA από τα δείγματα στα οποία ανιχνεύτηκε η παρουσία του διαγονιδίου. Στα δείγματα RNA, έγινε μεταχείριση με DNase προκειμένου να αποκλειστεί η παρουσία επιμολύνσεων DNA (Εικ. 2.10). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό για τη μετέπειτα ανίχνευση των πολλαπλασιαζόμενων ιοειδών καθώς εξασφαλίζει ότι η PCR δεν πολλαπλασιάζει DNA προερχόμενο από το πλασμίδιο.



**Εικόνα 2.10.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τους εκκινητές NADH-F/R για την επιβεβαίωση της απουσίας επιμολύνσεων DNA στα δείγματα. **-C:** Αρνητικός μάρτυρας (H<sub>2</sub>O), **+C:** αρνητικός μάρτυρας (αγρίου τύπου *N. benthamiana*), **1-24:** οι αριθμοί συμβολίζουν τον αριθμό της διαγονιδιακής σειράς. **M:** 100bp DNA ladder (NEB).

Για την ανίχνευση των πολλαπλασιαζόμενων ιοειδών στα μετασχηματισμένα *N. benthamiana*, πραγματοποιήθηκε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με τον πρόσθιο εκκινητή CEV-Pst-F. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η αντίστροφη μεταγραφή μόνο των αρνητικών αλυσίδων (-) του CEVd που παράγονται κατά τον πολλαπλασιασμό του ιοειδούς. Στη συνέχεια, οι αντιδράσεις PCR έγιναν με ζεύγος εκκινητών που υβριδίζει σε τμήμα του ιοειδούς (Εικ. 2.11).



**Εικόνα 2.11.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με τους LIC1\_298-70-F/LIC2\_298-70-R για την ανίχνευση των πολλαπλασιαζόμενων ιοειδών. Οι αριθμοί συμβολίζουν τον αριθμό της διαγονιδιακής σειράς. **-C:** Αρνητικός μάρτυρας (H<sub>2</sub>O), **+C:** θετικός μάρτυρας (πλασμίδιο pCdCEVd), **M:** 100bp DNA ladder (NEB).

Στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζεται μια σύνοψη των αποτελεσμάτων που αφορούν το μετασχηματισμό φυτών *N. benthamiana* με το διμερές μόριο του CEVd. Όπως φαίνεται, η πλειοψηφία των διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* πολλαπλασιάζουν το CEVd. Το γεγονός αυτό ενισχύει την παρατήρηση που έγινε στην ενότητα 2.3.1, ότι το *N. benthamiana* διαθέτει τα απαραίτητα ένζυμα RNase και RNA λυγάση τα οποία καταλύουν την αντίδραση κοπής των διμερών μορίων RNA σε μονομερή RNA πλήρους αλληλουχίας και το σχηματισμό του κυκλικού μορίου του ιοειδούς, αντίστοιχα.

Από τη σύνοψη των αποτελεσμάτων, προκύπτει σαφώς ότι το διμερές μόριο του CEVd έχει την ικανότητα μόλυνσης κατά την ενσωμάτωσή του σε φυτά *N. benthamiana*, μέσω σταθερού γενετικού μετασχηματισμού. Τα ευρήματα αυτά, είναι σύμφωνα με αποτελέσματα αντίστοιχων ερευνών στο είδος *A. thaliana* (Daròs and Flores, 2004). Με αυτό τον τρόπο, το ιοειδές πολλαπλασιάζεται και εξαπλώνεται σε ολόκληρο το φυτό, ξεπερνώντας το εμπόδιο της μη διασυστηματικής μετακίνησης που παρατηρείται στην περίπτωση της μόλυνσης φυτών που δεν είναι ξενιστές του CEVd. Οι απόγονοι των φυτών που προέκυψαν από το γενετικό μετασχηματισμό θα

χρησιμοποιηθούν σε πειράματα σιώπησης του CEVd (Κεφάλαιο 3), αφού επιβεβαιωθεί ότι το ιοειδές πολλαπλασιάζεται και στις επόμενες γενεές.

**Πίνακας 2.3.** Αποτελέσματα προσπάθειας μετασχηματισμού φυτών *N. benthamiana* με το διμερές μόριο του CEVd (pCdCEVd).

Διαγονιδιακή σειρά	Στέλεχος <i>Agrobacterium</i>	Απομόνωση DNA από μετασχηματισμένα φυτά	Ένθεση διαγονιδίου	Παρουσία DNA στο RNA	Παρουσία πολ/ζόμενου CEVd (RNA)
<i>N. benthamiana</i> - wt	-	+	-	-	-
N.b. 1	EHA105	+	+	-	+
N.b. 2	EHA105	+	-	-	-
N.b. 3	EHA105	+	-	-	-
N.b. 4	EHA105	+	-	-	-
N.b. 6	EHA105	+	-	-	-
N.b. 8	EHA105	+	+	-	+
N.b. 10	EHA105	+	+	-	+
N.b. 13	EHA105	+	+	-	+
N.b. 14	EHA105	+	+	-	+
N.b. 15	EHA105	+	-	-	-
N.b. 17	EHA105	+	+	-	+
N.b. 18	EHA105	+	+	-	+
N.b. 19	EHA105	+	-	-	-
N.b. 23	C58C1	+	+	-	+
N.b. 24	C58C1	+	+	-	+
N.b. 25	C58C1	+	-	-	-
N.b. 26	EHA105	+	+	-	+
N.b. 27	EHA105	+	+	-	+
N.b. 28	C58C1	+	-	-	-
N.b. 29	C58C1	+	+	-	+
N.b. 30	C58C1	+	+	-	+
N.b. 31	C58C1	+	-	-	-
N.b. 32	EHA105	+	+	-	+
N.b. 33.1*	EHA105	+	+	-	+
N.b. 33.2*	EHA105	+	+	-	+
N.b. 34.1	C58C1	+	+	-	+
N.b. 35	C58C1	+	+	-	+
N.b. 36	C58C1	+	+	-	+
N.b. 37	C58C1	+	+	-	+
N.b. 38.1*	C58C1	+	+	-	+
N.b. 38.2*	C58C1	+	+	-	+
N.b. 39	C58C1	+	+	-	+
N.b. 40	C58C1	+	+	-	+
N.b. 42	C58C1	+	+	-	+
N.b. 43	EHA105	+	+	-	+

\* Τα φυτά 33.1 και 33.2 προέρχονταν από τον ίδιο κάλλο. Το ίδιο συμβαίνει και με τα φυτά 38.1 και 38.2.

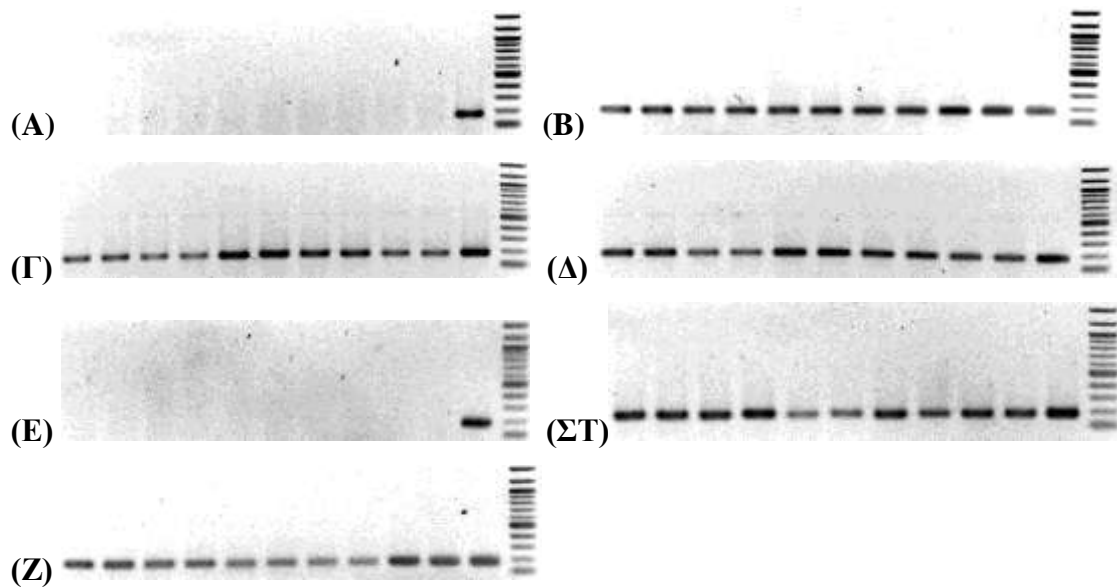
### 2.3.3. Μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το CEVd

Παρά το γεγονός ότι το *N. benthamiana* διαθέτει τα απαραίτητα ένζυμα για τον πολλαπλασιασμό του CEVd, το είδος αυτό δεν αποτελεί φυσικό ξενιστή του ιοειδούς και χαρακτηρίζεται από δυσκολία κατά τη μετακίνηση του τελευταίου στο φυτό, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα πειράματα μόλυνσης μέσω του αγροεμποτισμού. Συνεπώς, ο πιο αποτελεσματικός τρόπος μόλυνσης ενός μη-ξενιστή είναι μέσω του γενετικού μετασχηματισμού. Δεδομένου ότι η παρουσία του ιοειδούς επηρεάζει τις μεταβολικές διεργασίες του φυτού, αντικείμενο της παρούσας ενότητας αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του πολλαπλασιαζόμενου ιοειδούς στην ανάπτυξη των διαγονιδιακών φυτών. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν τρία μορφολογικά χαρακτηριστικά (ύψος, άνθηση, παραγωγή σπόρου) σε πέντε διαγονιδιακές σειρές, σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου (Εικ. 2.12).



**Εικόνα 2.12.** Τα αγρίου τύπου και διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μελέτης των μορφολογικών χαρακτηριστικών.

Για την επιβεβαίωση του πολλαπλασιασμού του ιοειδούς σε όλα τα διαγονιδιακά φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής και PCR. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.13, όλα τα διαγονιδιακά φυτά πολλαπλασίαζαν το CEVd, ενώ στα αγρίου τύπου φυτά δεν ανιχνεύτηκε το ιοειδές.



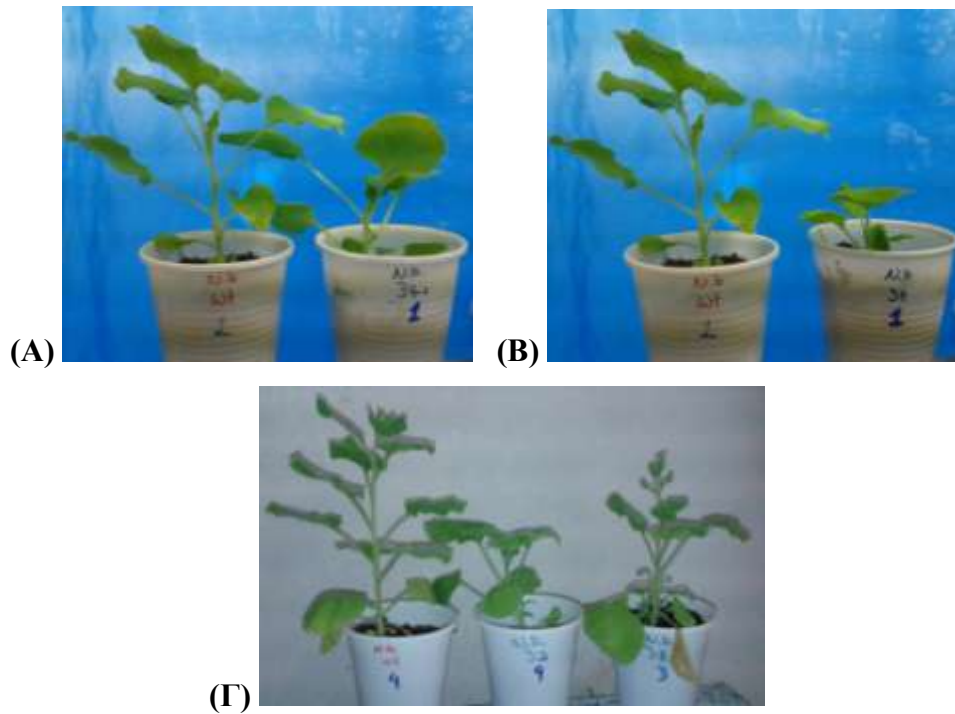
**Εικόνα 2.13.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με τους LIC1\_298-70-F/LIC2\_298-70-R για την επιβεβαίωση του πολλαπλασιασμού του CEVd σε δέκα φυτά των διαγονιδιακών σειρών που μελετήθηκαν ως προς τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. **(Α)** και **(Ε)** φυτά αγρίου τύπου. Διαγονιδιακά φυτά των σειρών **(Β)** N.b. 34-1, **(Γ)** N.b. 36, **(Δ)** N.b. 39, **(ΣΤ)** N.b. 32, **(Ζ)** N.b. 38-2, **+C**: θετικός μάρτυρας (DNA διαγονιδιακού φυτού N.b. 40), **M**: 100bp DNA ladder (NEB).

Η θερμοκρασία του θαλάμου κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν στους 25-30 °C, ώστε να ευνοείται η ανάπτυξη συμπτωμάτων (Gómez et al., 2008).

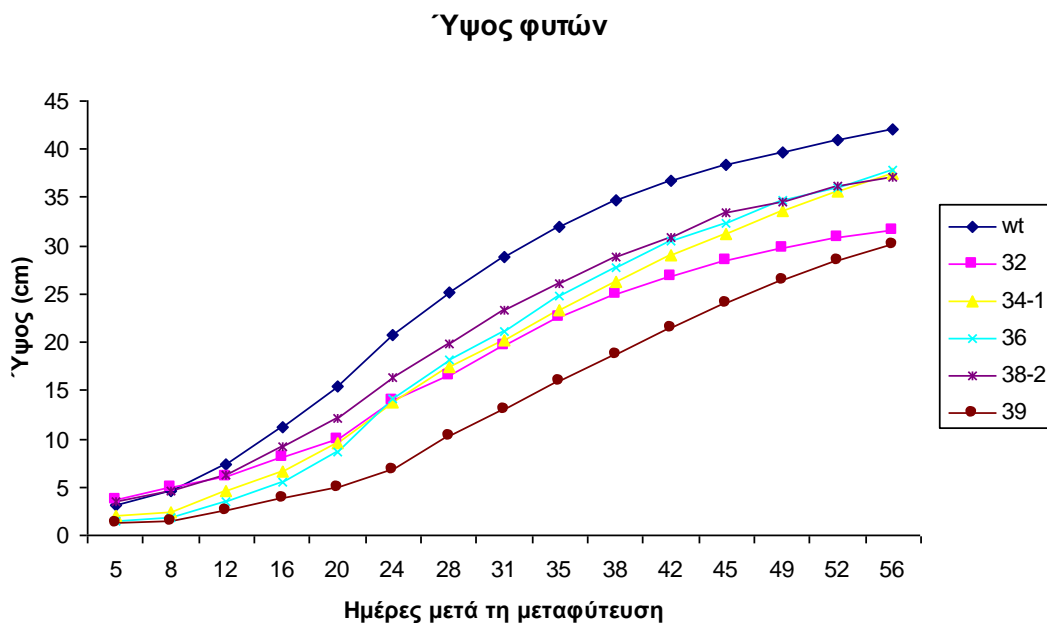
Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των πέντε διαγονιδιακών σειρών μελετήθηκαν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Στο πρώτο πείραμα μελετήθηκε η επίδραση του πολλαπλασιαζόμενου ιοειδούς στις σειρές N.b. 34-1, 36 και 39 σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου (wt), ενώ στο δεύτερο πείραμα μελετήθηκαν οι σειρές 32 και 38-2 σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου. Στην Εικόνα 2.14, φαίνεται η επίδραση του πολλαπλασιαζόμενου CEVd στο ύψος των διαγονιδιακών φυτών.

Η μέτρηση του ύψους των φυτών ξεκίνησε πέντε ημέρες μετά τη μεταφύτευση σε ατομικά ποτηράκια και επαναλαμβανόταν κάθε τρεις με τέσσερις ημέρες. Από τους μέσους όρους των μετρήσεων των δέκα φυτών κάθε σειράς προέκυψε το Διάγραμμα 2.1, στο οποίο φαίνεται ότι τα διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* έχουν σταθερά μικρότερο ύψος σε σχέση με τα αγρίου τύπου.





**Εικόνα 2.14.** Σύγκριση του ύψους των διαγονιδιακών φυτών με τα φυτά αγρίου τύπου στις: **A, B:** 12 ημέρες μετά τη μεταφύτευση (wt – N.b. 34-1, wt – N.b. 39) και **Γ:** στις 26 μέρες μετά τη μεταφύτευση (wt – N.b. 32 – N.b. 38-2).



**Διάγραμμα 2.1.** Επίδραση του πολλαπλασιαζόμενου CEVd στο ύψος διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου (wt).

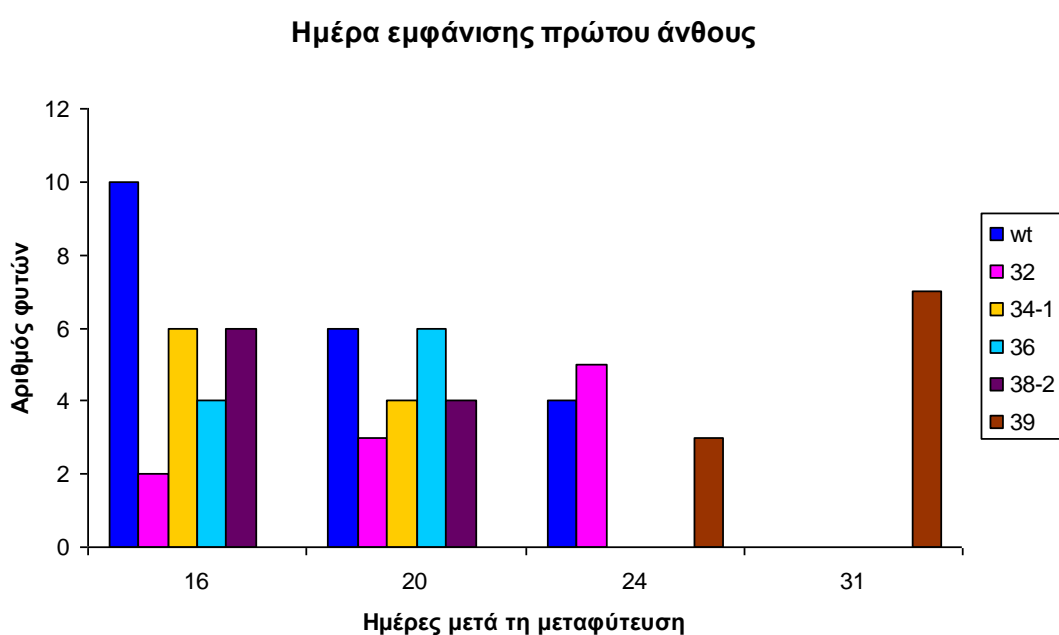
Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων του ύψους πραγματοποιήθηκε στις 28 ημέρες μετά τη μεταφύτευση, οπότε παρατηρείται εκθετική αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των φυτών και στις 56 ημέρες μετά τη μεταφύτευση, οπότε τα φυτά έχουν σχεδόν αποκτήσει το τελικό τους ύψος (Πίνακας 2.4). Οι μετρήσεις από τα δύο πειράματα αναλύθηκαν μαζί. Για το λόγο αυτό, για τα αγρίου τύπου φυτά υπήρχαν 20 επαναλήψεις. Η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με τη δοκιμασία t του Student (Student's t-test) για επίπεδο σημαντικότητας 5% ( $p \leq 0.05$ ).

**Πίνακας 2.4.** Στατιστική ανάλυση των μετρήσεων του ύψους στις 28 και 56 ημέρες μετά τη μεταφύτευση.

Σειρά	Επαναλήψεις	28 ημέρες			56 ημέρες		
		Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	t-test	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	t-test
wt	20	25,18	3,86	a	42,15	2,61	a
N.b. 38-2	10	19,85	4,76	b	37,10	7,41	b
N.b. 36	10	18,25	2,32	b	37,85	3,75	b
N.b. 34-1	10	17,40	4,36	b	37,40	3,73	b
N.b. 32	10	16,50	4,53	b	31,55	5,75	c
N.b. 39	10	10,20	3,01	c	30,20	5,19	c
		Συντελεστής παραλλακτικότητας: 21% Ελάχιστη σημαντική διαφορά ( $\alpha=0,05$ ): 1,99			Συντελεστής παραλλακτικότητας: 13% Ελάχιστη σημαντική διαφορά ( $\alpha=0,05$ ): 1,99		

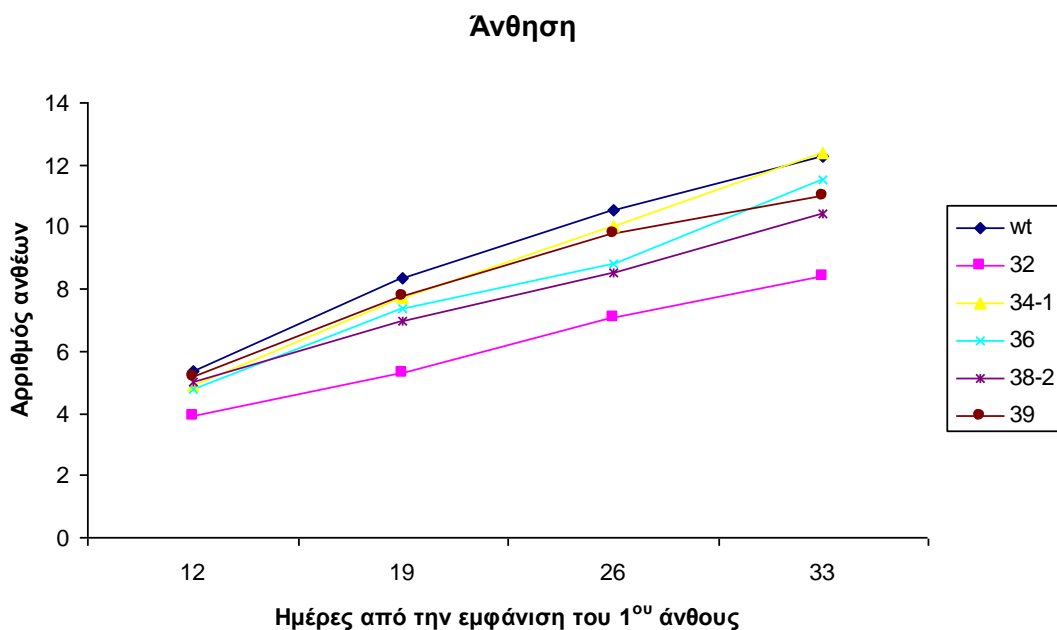
Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι το πολλαπλασιαζόμενο CEVd επηρεάζει το ύψος των διαγονιδιακών φυτών. Πιο συγκεκριμένα, σε όλες τις διαγονιδιακές σειρές ο μέσος όρος του ύψους των δέκα φυτών ήταν χαμηλότερος σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου σε όλες τις ημερομηνίες των μετρήσεων (Διάγραμμα 2.1). Επιπλέον, από τη στατιστική ανάλυση φαίνεται ότι τόσο στις 28 ημέρες όσο και στις 56 ημέρες μετά τη μεταφύτευση, όλα τα διαγονιδιακά φυτά είχαν στατιστικά σημαντικό μικρότερο ύψος σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου, ενώ υπάρχουν σημαντικές διαφορές και μεταξύ των υπό μελέτη διαγονιδιακών σειρών. Αυτές οι διαφορές, κατατάσσουν τις σειρές σε δύο ομάδες: στη μία περιλαμβάνονται οι σειρές N.b. 34-1, 36 και 38-2, ενώ στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι σειρές N.b. 32 και 39 που έχουν χαμηλότερους μέσους όρους ύψους σε σχέση με την προηγούμενη ομάδα. Το γεγονός αυτό, πιθανόν να οφείλεται στο ρυθμό πολλαπλασιασμού του ιοειδούς σε κάθε σειρά ή ακόμα και σε διαφορά στον αριθμό των αντιγράφων του διαγονιδίου που έχουν ενσωματωθεί σε κάθε μία από αυτές.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση του πολλαπλασιαζόμενου CEVd στην άνθηση. Πιο συγκεκριμένα, καταγράφηκε η ημερομηνία εμφάνισης του πρώτου άνθους σε κάθε φυτό και ακολούθησε μέτρηση του αριθμού των ανθέων στις 12, 19, 26 και 33 ημέρες μετά την εμφάνιση του πρώτου άνθους σε κάθε φυτό. Από το Διάγραμμα 2.2, φαίνεται ότι υπάρχουν μικρές διαφορές στην ημέρα εμφάνισης του πρώτου άνθους. Στην πλειοψηφία των μελετούμενων σειρών, τα πρώτα άνθη εμφανίζονται στις 16 ημέρες ενώ η διαγονιδιακή σειρά N.b. 39 φαίνεται ότι παρουσιάζει τη μεγαλύτερη καθυστέρηση στην έναρξη της άνθησης.



**Διάγραμμα 2.2.** Επίδραση του πολλαπλασιαζόμενου CEVd στην ημέρα εμφάνισης του πρώτου άνθους στα διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου (wt). Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των φυτών που εμφάνισαν το πρώτο άνθος σε 16, 20, 24 και 31 ημέρες μετά τη μεταφύτευση.

Στο Διάγραμμα 2.3 παρουσιάζεται ο ρυθμός σχηματισμού ανθέων. Και σε αυτή τη μέτρηση, οι διαφορές μεταξύ των διαγονιδιακών σειρών είναι μικρές και δεν φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά από τα φυτά αγρίου τύπου, με εξαίρεση τη σειρά N.b.32. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται και από τη στατιστική ανάλυση του αριθμού των ανθέων που καταγράφονται για κάθε φυτό στις 33 ημέρες μετά την εμφάνιση του πρώτου άνθους (Πίνακας 2.5).



**Διάγραμμα 2.3.** Επίδραση του πολλαπλασιαζόμενου CEVd στον αριθμό των ανθέων διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (wt).

**Πίνακας 2.5.** Στατιστική ανάλυση των μετρήσεων του αριθμού των ανθέων/φυτό στις 33 ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου άνθους σε κάθε φυτό.

Σειρά	Επαναλήψεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	t-test
N.b. 34-1	10	12,40	1,96	a
wt	20	12,25	1,89	a
N.b. 36	10	11,50	2,46	ab
N.b. 39	10	11,00	1,70	ab
N.b. 38-2	10	10,40	2,01	b
N.b. 32	10	8,40	2,27	c

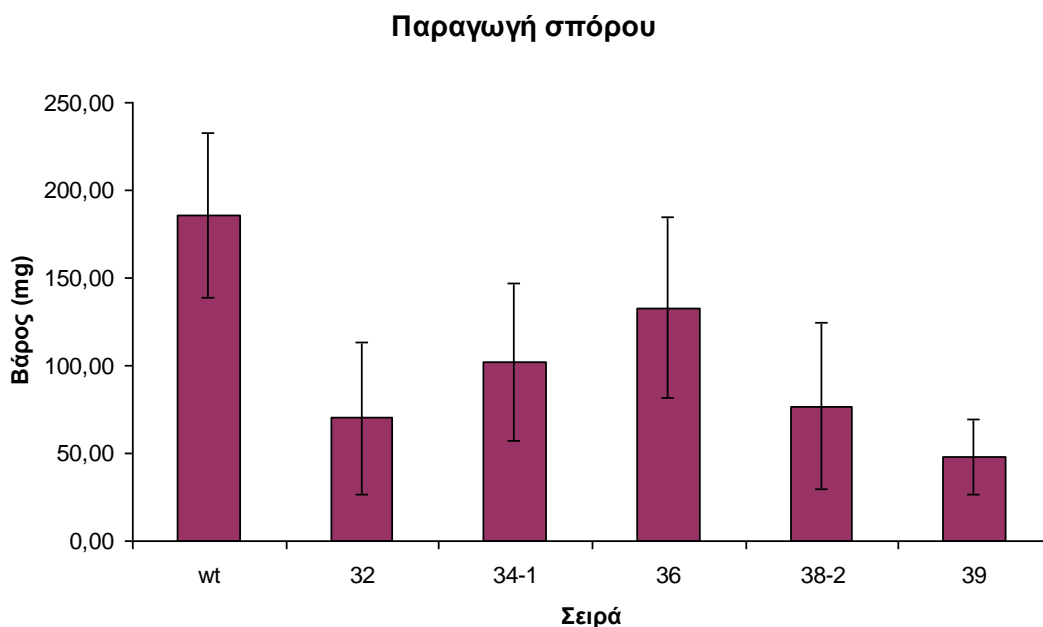
Συντελεστής παραλλακτικότητας: 18%

Ελάχιστη σημαντική διαφορά ( $\alpha=0,05$ ): 1,99

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.5, τα διαγονιδιακά φυτά δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς το συνολικό αριθμό των ανθέων σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει ότι το πολλαπλασιαζόμενο CEVd δεν επηρεάζει σημαντικά την ημερομηνία εμφάνισης του πρώτου άνθους αλλά ούτε και το συνολικό αριθμό των ανθέων ανά διαγονιδιακό φυτό.

Μετά την άνθηση, τα φυτά καλύφθηκαν με χάρτινα σακουλάκια προκειμένου να εξασφαλιστεί η αυτογονιμοποίηση των ανθέων. Ακολούθησε συλλογή του σπόρου από κάθε φυτό ξεχωριστά και ζύγιση του συνολικού σπόρου από κάθε φυτό. Στο Διάγραμμα

2.4 παρουσιάζεται η μέση παραγωγή σπόρου ανά φυτό ενώ στον Πίνακα 2.6 παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση του μέσου βάρους των σπόρων της κάθε σειράς.



**Διάγραμμα 2.4.** Επίδραση του πολλαπλασιαζόμενου CEVd στην παραγωγή σπόρου από τα διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου (wt). Οι τιμές αφορούν τη μέση παραγωγή σπόρου ανά σειρά.

**Πίνακας 2.6.** Στατιστική ανάλυση των μετρήσεων του βάρους των σπόρων ανά φυτό.

Σειρά	Επαναλήψεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	t-test
wt	20	185,25	46,97	a
N.b. 36	10	133,10	51,24	b
N.b. 34-1	10	102,00	45,05	bc
N.b. 38-2	10	76,70	47,49	cd
N.b. 32	10	70,10	43,16	cd
N.b. 39	10	47,80	21,65	d

Συντελεστής παραλλακτικότητας: 38%

Ελάχιστη σημαντική διαφορά ( $\alpha=0,05$ ): 1,99

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα αλλά και στη στατιστική ανάλυση, τα διαγονιδιακά φυτά έχουν σημαντικά μικρότερη παραγωγή σπόρου σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι στις διαγονιδιακές σειρές πολλά άνθη ήταν άγονα και δεν παρήγαγαν καθόλου σπόρο. Από τη σύνοψη των αποτελεσμάτων που αφορούν την άνθηση προκύπτει ότι όλες οι σειρές παράγουν

περίπου τον ίδιο αριθμό ανθέων, αλλά η παραγωγή σπόρου είναι σημαντικά μικρότερη στα διαγονιδιακά σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου φυτά. Επιπλέον, παρατηρούνται και σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαγονιδιακών σειρών ως προς την παραγωγή του σπόρου. Η παρουσία άγονων ανθέων στις διαγονιδιακές σειρές πιθανόν οφείλεται στην παρουσία των πολλαπλασιαζόμενων ιοειδών.

Είναι αξιοσημείωτο ότι ο πολλαπλασιασμός του ιοειδούς στα διαγονιδιακά φυτά δεν οδήγησε στην ανάπτυξη των τυπικών συμπτωμάτων που προκαλεί το ιοειδές στα εσπεριδοειδή, όπως απολέπιση του φλοιού ή επιναστία των φύλλων.

Συνοψίζοντας, από την ανάλυση των μετρήσεων των μορφολογικών χαρακτηριστικών των διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που φέρουν του διμερές μόριο του CEVd προκύπτει το συμπέρασμα ότι η παρουσία του πολλαπλασιαζόμενου CEVd στα διαγονιδιακά φυτά προκαλεί σημαντική μείωση του ύψους των φυτών. Ταυτόχρονα, παρατηρείται μείωση της γονιμότητας των ανθέων με επακόλουθο τη μειωμένη παραγωγή σπόρου, παρά το γεγονός ότι τα διαγονιδιακά φυτά παράγουν περίπου τον ίδιο αριθμό ανθέων με τα αγρίου τύπου φυτά.

## 2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ιοειδή αποτελούν σημαντικούς εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών και η εξάπλωσή τους μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη μείωση της παραγωγής σημαντικών καλλιεργούμενων φυτών, όπως η πατάτα και η τομάτα. Στα εσπεριδοειδή, προκαλούν μια ευρεία γκάμα συμπτωμάτων που περιλαμβάνει μείωση του μεγέθους των δένδρων, παραμορφώσεις στο φλοιό, μείωση της παραγωγής έως και γενική εξασθένηση του δένδρου. Η απειλή των εσπεριδοειδών από τα ιοειδή λαμβάνει μεγαλύτερες διαστάσεις λόγω της τάσης αντικατάστασης του υποκειμένου της νεραντζιάς από το ανθεκτικό στην τριστέσα τρίπτερο και τα υβρίδιά του, τα οποία είναι πολύ ευαίσθητα στα ιοειδή. Για τη χώρα μας, τα ιοειδή μπορούν να αποτελέσουν σημαντικό εχθρό για τα εσπεριδοειδή καθώς έχει ανιχνευθεί η παρουσία τους στα δένδρα της συλλογής του Δενδροκομικού Σταθμού του Πόρου (Wang et al., 2013), από όπου γίνεται η προμήθεια εμβολίων από φυτωριούχους και παραγωγούς.

Στην πλειοψηφία των πειραμάτων που πραγματοποιούνται για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ ιών και φυτών χρησιμοποιείται το φυτό-μοντέλο *N. benthamiana*, λόγω της ευκολίας που παρουσιάζει σε πολλούς πειραματικούς χειρισμούς, όπως στο γενετικό μετασχηματισμό και την αναγέννηση ολόκληρων φυτών, στην παροδική έκφραση γονιδίων και σε εφαρμογές γονιδιακής σιόπησης (Goodin et al., 2008). Για αυτούς τους λόγους, επιλέχθηκε η αξιοποίησή του στην παρούσα μελέτη, παρά το γεγονός ότι δεν είναι φυσικός ξενιστής του CEVd. Προκειμένου να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των φυτών *N. benthamiana* με το CEVd, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η δυνατότητα του *in vivo* πολλαπλασιασμού του ιοειδούς εντός των φυτών. Στα πλαίσια αυτά, αρχικά επιχειρήθηκε ο παροδικός πολλαπλασιασμός του ιοειδούς, μέσω αγρο-εμποτισμού με ένα πλασμίδιο που περιέχει το διμερές μόριο του ιοειδούς. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία από τους Daròs and Flores (2004) για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών *A. thaliana*, ένα φυτό μη-ξενιστή του CEVd και τα φυτά που παράχθηκαν είχαν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζουν το CEVd. Στην παρούσα μελέτη, ο αγρο-εμποτισμός φυτών *N. benthamiana* αγρίου τύπου με το πλασμίδιο pCdCEVd είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση μορίων του ιοειδούς σε διασυστηματικά φύλλα μετά από τρεις έως επτά εβδομάδες, ανάλογα με τον τρόπο μόλυνσης. Τα ευρήματα αυτά παρείχαν ισχυρές ενδείξεις ότι το *N. benthamiana* διαθέτει τα ενζυμικά συστήματα που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό του CEVd καθώς και τους απαραίτητους κυτταρικούς

παράγοντες που διευκολύνουν τη διασυστηματική κίνηση του ιοειδούς στο φυτό. Μάλιστα, παρατηρήθηκε ταχύτερη ανίχνευση των πολλαπλασιαζόμενων ιοειδών στα φυτά που μολύνθηκαν με έγχυση στο βλαστό σε σχέση με την έγχυση στα φύλλα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η διασυστηματική μετακίνηση τους ιοειδούς μέσω του αγγειακού συστήματος είναι πολύ πιο γρήγορη σε σχέση με τη μετακίνηση από κύτταρο σε κύτταρο. Αυτός είναι ίσως και ένας σημαντικός λόγος που το συγκεκριμένο φυτό είναι μη-ξενιστής του CEVd, αφού πιθανόν η δυσκολία στη μετακίνηση των ιοειδών μεταξύ γειτονικών κυττάρων, η μη σταθερότητα του RNA του ιοειδούς και ο χαμηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού ή συσσώρευσης των ιοειδών μπορούν να περιορίσουν και τελικά να εμποδίσουν τη διασυστηματική μόλυνση (Daròs and Flores, 2004; Gómez and Pallás, 2006). Αντίθετα, σε μελέτες που έχουν γίνει με αγρο-εμποτισμό διμερών μορίων των ιοειδών CEVd και HSVd στο έλασμα φύλλων *A. thaliana* και *N. benthamiana*, αντίστοιχα, δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία τους διασυστηματικά στις τέσσερις εβδομάδες μετά τη μόλυνση (Daròs and Flores, 2004; Gómez and Pallás, 2006), γεγονός που πιθανολογείται ότι οφείλεται στους προαναφερθέντες λόγους. Διασυστηματική κίνηση του HSVd έχει παρατηρηθεί μόνο μετά από εμβολιασμό επί διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που εξέφραζαν το διμερές μόριο του HSVd (Gómez and Pallás, 2006).

Σε πειράματα που έχουν γίνει με αγρο-εμποτισμό φυτών τομάτας με το ιοειδές PSTVd, έχει παρατηρηθεί ανομοιόμορφη κατανομή των πολλαπλασιαζόμενων ιοειδών στα διάφορα φυτικά μέρη (Zhu et al., 2001). Η πιθανή ανομοιόμορφη κατανομή καθώς και ο αργός ρυθμός πολλαπλασιασμού του CEVd στα αγρο-εμποτισμένα *N. benthamiana* τα καθιστούν μη αξιόπιστο υλικό για πειράματα εκτίμησης της επαγωγής ανθεκτικότητας με διάφορες μεθόδους.

Για τους παραπάνω λόγους, κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana*, μέσω σταθερού γενετικού μετασχηματισμού, που πολλαπλασιάζουν ενδογενώς το ιοειδές CEVd. Ο μετασχηματισμός των φυτών έγινε με τη χρήση του διμερούς μορίου του CEVd και οδήγησε στη δημιουργία 35 αναγεννημένων φυτών, εκ των οποίων τα 26 πολλαπλασίαζαν το CEVd. Το γεγονός αυτό, ενισχύει την προηγούμενη διαπίστωση ότι το *N. benthamiana* έχει τα απαραίτητα ενζυμικά συστήματα για τον πολλαπλασιασμό του ιοειδούς. Σε παρόμοια πειράματα, οι Daròs and Flores (2004) αναφέρουν τον επιτυχή πολλαπλασιασμό των ιοειδών CEVd, HSVd, CCCVd (*Coconut cadang-cadang viroid*), ASSVd (*Apple scar skin viroid*), CbVd-1 (*Coleus blumei viroid 1*) και ASBVd (*Avocado sunblotch viroid*) σε



διαγονιδιακά φυτά *A. thaliana* (μη-ξενιστής των παραπάνω ιοειδών). Αντίστοιχα, οι Gómez and Pallás (2006) αναφέρουν την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που πολλαπλασίαζαν το ιοειδές HSVd, μετά από μετασχηματισμό με το διμερές μόριο του ιοειδούς. Η παρούσα αποτελεί την πρώτη αναφορά επιτυχούς πολλαπλασιασμού του CEVd σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana*. Η προσέγγιση μετατροπής του *N. benthamiana* σε ξενιστή του CEVd παρέχει τη δυνατότητα αξιοποίησής του ως μοντέλο για τη μελέτη διαγονιδίων ως προς την ικανότητά τους να επάγουν ανθεκτικότητα έναντι του ιοειδούς.

Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η παρουσία του πολλαπλασιαζόμενου CEVd στα διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* έχει επιπτώσεις σε ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται σημαντική μείωση του ύψους των φυτών, που αποτελεί ένα από τα συμπτώματα που εμφανίζουν τα προσβεβλημένα από το ιοειδές τρίπτερα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση της γονιμότητας των ανθέων με επακόλουθο τη μειωμένη παραγωγή σπόρου, παρά το γεγονός ότι τα διαγονιδιακά φυτά παράγουν περίπου τον ίδιο αριθμό ανθέων με τα αγρίου τύπου φυτά. Είναι αξιοσημείωτο βέβαια το γεγονός ότι τα διαγονιδιακά φυτά δεν παρουσιάζουν τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας που εμφανίζουν τα εσπεριδοειδή, όπως είναι η απολέπιση του φλοιού και η επιναστία των φύλλων. Αντίστοιχα συμπτώματα έχουν παρατηρηθεί και σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που εξέφραζαν το διμερές μόριο του ιοειδούς HSVd (Martinez et al., 2008). Επίσης, έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση του ύψους φυτών *N. benthamiana* μετά από μόλυνση με το ιοειδές PSTVd (δεν προκαλεί συμπτώματα στο *N. benthamiana* μετά από φυσική μόλυνση) (Matoušek et al., 2007). Η εμφάνιση συμπτωμάτων στα διαγονιδιακά φυτά προσομοιάζει τις ανωμαλίες σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια που προκαλεί στα φυτά-ξενιστές η μόλυνση από τα ιοειδή, ως επακόλουθο της ενεργοποίησης του μηχανισμού της RNA-σιώπησης του φυτού (Wang et al., 2004). Αντίθετα με τα παραπάνω, οι Daròs και Flores (2004) παρατήρησαν μικρή μείωση του ύψους σε μία μόνο διαγονιδιακή σειρά φυτών *A. thaliana* που πολλαπλασίαζαν το HSVd.

Τα παραπάνω ενισχύουν την άποψη ότι το *N. benthamiana* αποτελεί πολύτιμο φυτό-μοντέλο σε πειράματα αλληλεπίδρασης με ιούς και ιοειδή, ακόμα και στις περιπτώσεις που δεν αποτελεί φυσικό ξενιστή τους. Αυτή η παρατήρηση ανοίγει το δρόμο για την αξιοποίησή του σε έρευνες ανθεκτικότητας έναντι μιας μεγάλης γκάμας ιών και ιοειδών με τη χρήση διαφόρων διαγονιδίων και μεθόδων. Επιπλέον, τα φυτά

αυτά αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό των παραγόντων των ξενιστών που εμπλέκονται στο βιολογικό κύκλο των ιοειδών.

Μέρος των αποτελεσμάτων του παρόντος κεφαλαίου παρουσιάστηκαν στο 10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, Αθήνα 27-28 Φεβρουαρίου 2015. Η περίληψη παρατίθεται στο Παράρτημα III.

## 2.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adkar-Purushothama CR, Kasai A, Sugawara K, et al (2015) RNAi mediated inhibition of viroid infection in transgenic plants expressing viroid-specific small RNAs derived from various functional domains. *Sci Rep.* 5:17949.
- Bové JM (1995) Viroid and viroid-like diseases. In: *Virus and virus - like diseases of citrus in the Near East region*. FAO, Rome.
- Branch AD, Benefeld BJ, Robertson HD (1988) Evidence for a single rolling circle in the replication of *potato spindle tuber viroid*. *Proc. Natl. Acad. Sci* 85:9128–9132.
- Carbonell A, Martínez de Alba A-E, Flores R, Gago S (2008) Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* 371:44–53.
- Cress DE, Kiefer MC, Owens RA (1983) Construction of infectious *potato spindle tuber viroid* cDNA clones. *Nucleic Acids Res* 11:6821–6835.
- Daròs J-A, Flores R (2004) *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6792–7.
- Ding B, Itaya A (2007) Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol Plant Microbe Interact* 20:7–20.
- Ding B, Itaya A, Zhong X (2005) Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. *Curr Opin Plant Biol* 8:606–612.
- Duran-Vila N, Semancik JS, Broadbent P (2000) Exocortis. In: Timmer L, Garnsey S, Graham J (ed) *Compendium of Citrus diseases*, 2nd edn, APS Press, Minnesota, pp 53-54.
- Flores R, Gas M-E, Molina-Serrano D, et al (2009) Viroid replication: rolling-circles, enzymes and ribozymes. *Viruses* 1:317–34.
- Flores R, Serra P, Minoia S, et al (2012) Viroids: from genotype to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. 3:1–13.
- Gómez G, Martínez G, Pallás V (2008) Viroid-induced symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent on RDR6 activity. *Plant Physiol* 148:414–423.
- Gómez G, Martinez G, Pallás V (2009) Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends Plant Sci.* 14:264-269.
- Gómez G, Pallás V (2006) Hop stunt viroid is processed and translocated in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants. *Mol Plant Pathol* 7:511–517.
- Gómez G, Pallás V (2007) Mature monomeric forms of *Hop stunt viroid* resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J* 51:1041–9.

- Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA (2008) *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant – pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1015–1026.
- Hardy S, Donovan N, Barkley P (2008) *Citrus exocortis*. In: Primefact 722, New South Wales department of primary industries, Australia.
- Hood E, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* 2:208–218.
- Hernandez C, Flores R (1992) Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc Natl Acad Sci* 89:3711–3715.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, et al (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
- Itaya A, Matsuda Y, Gonzales RA, et al (2002) *Potato spindle tuber viroid* strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 15:990–999.
- Itaya A, Zhong X, Bundschuh R, et al (2007) A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J Virol* 81:2980–2994.
- Ito T, Ieki H, Ozaki K, Ito T (2000) A population of variants of a viroid closely related to *citrus viroid-I* in citrus plants. *Arch Virol* 145:2105-2114.
- Kasai A, Sano T, Harada T (2013) Scion on a stock producing siRNAs of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. *PLoS One* 8:e57736.
- Keese P, Symons RH (1985) Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. 82:4582–4586.
- Kovalskaya N, Hammond RW (2014) Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Sci* 228:48–60.
- Lisón P, Tárraga S, López-Gresa P, et al. (2013) A noncoding plant pathogen provokes both transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato. *Proteomics* 13: 833–844.
- Martín R, Arenas C, Daròs J-A, et al (2007) Characterization of small RNAs derived from *Citrus exocortis viroid* (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* 367:135–46.
- Martin RR, Tzanetakis IE (2013) High risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: implications for certification, nurseries, and fruit production. *Plant Dis* 97:1358–1362.

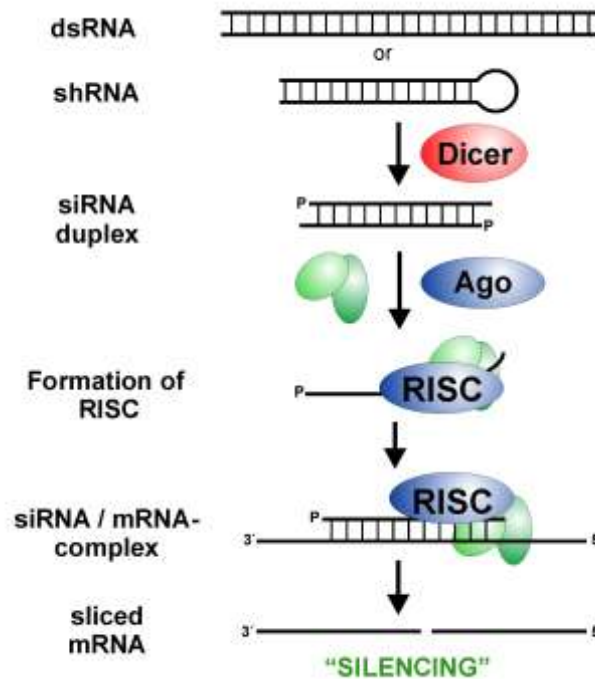
- Martínez G, Pallás V, Gómez G (2008) Analysis of symptoms developed in *Nicotiana benthamiana* plants expressing dimeric forms of *Hop stunt viroid*. *J Plant Pathol* 90:121–124.
- Matoušek J, Kozlová P, Orctová L et al. (2007) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol Chem* 388:1-13.
- Nagel R, Elliott a., Masel a., et al (1990) Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiol Lett* 67:325–328.
- Navarro B, Gisel A, Rodio M-E, et al (2012) Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie* 94:1474–80.
- Oraby HA, Hassan AA, Abou Mossallam AA (2005) Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3' terminator. *J Sci Food Agric* 85:1974–1980.
- Palukaitis P (2014) What has been happening with viroids? *Virus Genes* 49:175-184.
- Quacquarelli A, Avgelis A (1975) *Nicotiana benthamiana* Domin, as host for plant viruses. *Phytopathol Mediterr* 14:36-39.
- Stewart CN Jr, Via LE (1993) A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14:748-750.
- Tabler M, Sängler HL (1984) Cloned single- and double-stranded DNA copies of *potato spindle tuber viroid* (PSTV) RNA and co-inoculated subgenomic DNA fragments are infectious. *EMBO J* 3:3055–3062.
- Wang M-B, Bian X-Y, Wu L-M, et al (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3275–80.
- Wang J, Boubourakas IN, Voloudakis AE, et al (2013) Identification and characterization of known and novel viroid variants in the Greek national citrus germplasm collection: threats to the industry. *Eur J plant Pathol J plant Pathol* 137:17–27.
- Yang S, Carter SA, Cole AB et al (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6297-6302.
- Zhu Y, Green L, Woo Y, et al (2001) Cellular basis of *Potato spindle tuber viroid* systemic movement. *Virology* 279:69–77.
- <http://www.bioguider.com/m/view.php?aid=20428>. Making electrocompetent *Agrobacterium*.

## **Κεφάλαιο 3. Αξιολόγηση τμημάτων του CEVd ως προς την ικανότητα επαγωγής της RNA σιώπησης σε φυτά *N. benthamiana***

### **3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

#### **3.1.1. RNA σιώπηση και αντιμετώπιση των ιοειδών**

Η RNA σιώπηση (RNA silencing) είναι μια ρυθμιστική λειτουργία που ελέγχει την έκφραση των γονιδίων και προστατεύει τους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των φυτών, από εξωγενή (ιοί και διαγονίδια) και ενδογενή (μεταθετά στοιχεία) νουκλεϊκά οξέα. Η RNA σιώπηση λειτουργεί σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση στις αλληλουχίες και επάγεται από δίκλιωνα μόρια RNA (dsRNAs), μόρια RNA με τη μορφή φουρκέτας (hairpin RNA, hpRNA) και περίπλοκης δομής μονόκλιωνα RNAs (ssRNAs) από τα οποία παράγονται μικρά RNAs (sRNAs) με τη δράση εξειδικευμένων ισοενζύμων της ενζυμικής οικογένειας RNase III (dicer, dicer-like, DCL) (Navarro et al., 2012). Οι δύο κυριότερες κατηγορίες μικρών RNAs είναι τα microRNAs (miRNAs, μήκους 21 και 22 νουκλεοτιδίων) και τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (small interfering RNAs, siRNAs, μήκους 21, 22 και 24 νουκλεοτιδίων). Στη συνέχεια, τα sRNAs προσδένονται στις πρωτεΐνες Αργοναύτες (Argonaute, AGO) και τις οδηγούν στο στόχο όπου απενεργοποιούν τα ομόλογα μόρια RNA ή DNA (Mallory and Vaucheret, 2010). Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες αποτελούν τον πυρήνα του «συμπλέγματος της RNA-επαγόμενης σιώπησης» (RNA inducing silencing complex, RISC) (Εικ. 3.1). Η μετα-μεταγραφική γονιδιακή σιώπηση (post-transcriptional gene silencing, PTGS) θεωρείται ως ένας αμυντικός μηχανισμός των φυτών, καθώς συμβάλει στην άμυνα έναντι των ιών και άλλων εξωγενών RNAs, διασφαλίζει τη σταθερότητα του γονιδιώματος μέσω της καταστολής της δράσης των μεταθετών στοιχείων (transposon activity) και παρέχει έναν επιπλέον μηχανισμό για τη ρύθμιση των ενδογονιδίων (Baulcombe, 2004).



**Εικόνα 3.1.** Ο μηχανισμός της RNA σιώπησης. Επάγεται από δίκλιωνα μόρια RNA (dsRNA) ή μικρά μόρια RNA υπό μορφή φουρκέτας (shRNA), από τα οποία παράγονται μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs) με τη δράση του ενζύμου Dicer. Τα siRNAs προσδένονται στις πρωτεΐνες Αργοναύτες (Ago) του συμπλέγματος της RNA-επαγόμενης σιώπησης (RISC) και μέσω αυτού οδηγούνται στις ομόλογες αλληλουχίες mRNA. Το σύμπλεγμα RISC κόβει το mRNA με αποτέλεσμα τη σιώπηση της έκφρασής του. (πηγή: <http://www.uni-konstanz.de/FuF/chemie/jhartig/>)

Σε αντίθεση με τους ιούς, που ξεπερνούν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών μέσω της παραγωγής πρωτεϊνών που καταστέλλουν την RNA σιώπηση (RNA silencing suppression proteins), τα ιοειδή δεν κωδικοποιούν καμία πρωτεΐνη και επομένως το RNA τους δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καταστολέας της RNA σιώπησης (Itaya et al., 2007). Αντίθετα, το RNA των ιοειδών μπορεί να ενεργοποιήσει το μηχανισμό της RNA σιώπησης στα φυτά (Itaya et al., 2001). Μέσω αυτού του μηχανισμού, εικάζεται ότι τα ιοειδή προκαλούν τις ασθένειες στα φυτά (Conejero, 2003).

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τα ιοειδή της οικογένειας *Pospiviroidae* έχουν γίνει στο ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (PSTVd), αλλά οι παρατηρήσεις τους πιθανόν να ισχύουν και για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας. Σε φυτά μολυσμένα με το PSTVd, τα siRNAs που παράγονται εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και όχι στον πυρήνα του κυττάρου (Denti et al., 2004). Επίσης, το

σύμπλεγμα RISC φαίνεται ότι είναι ενεργό κυρίως στο κυτταρόπλασμα και όχι στον πυρήνα όπου πολλαπλασιάζεται και συσσωρεύεται το ιοειδές (Itaya et al., 2007). Όμως, τα ιοειδή είναι εκτεθειμένα στο μηχανισμό της RNA σιώπησης καθώς διασχίζουν το κυτταρόπλασμα προκειμένου να μετακινηθούν σε γειτονικά κύτταρα αλλά και μέσω του αγγειακού συστήματος σε ολόκληρο το φυτό. Παρόλα αυτά, το σύστημα RISC δεν είναι αποτελεσματικό στα ώριμα RNAs του PSTVd και του HSVd (Gómez and Pallás, 2007; Itaya et al., 2007). Οι πιθανοί λόγοι που το σύμπλεγμα RISC αποτυγχάνει να προκαλέσει σιώπηση στο RNA των ιοειδών είναι: α) η περίπλοκη δευτεροταγής δομή τους, β) η πιθανή σύνδεσή τους με παράγοντες του ξενιστή που προστατεύουν από τη σιώπηση, γ) η διαφορετική θέση πολλαπλασιασμού και συσσώρευσής τους (πυρήνας ή χλωροπλάστης) σε σχέση με τη θέση δράσης του συμπλέγματος RISC (κυτταρόπλασμα) και δ) η πιθανή ενεργοποίηση ενός νέου αναστολέα της σιώπησης (silencing suppressor) (Kovalskaya and Hammond, 2014).

Στη σύγχρονη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορες στρατηγικές που είχαν ως στόχο να περιοριστεί ή να αποφευχθεί η μόλυνση από τα ιοειδή εφαρμόζοντας γενετικό μετασχηματισμό στα φυτά-ξενιστές. Τη δεκαετία του 1990, πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες μελέτες που αξιοποίησαν μεθόδους βασισμένες στο RNA για την απόκτηση διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών στα ιοειδή. Η πρώτη μελέτη έγινε από τους Matoušek et al. (1994), στην οποία διαγονιδιακά φυτά πατάτας εξέφραζαν τμήματα της συμπληρωματικής (antisense) αλληλουχίας του PSTVd σχεδιασμένα ώστε να υβριδίζουν είτε στη θετική (+) είτε στην αρνητική (-) αλυσίδα του ιοειδούς. Σε αυτά τα φυτά, παρατηρήθηκε σημαντική καθυστέρηση στον πολλαπλασιασμό του ιοειδούς αλλά τελικά αρκετά φυτά παρουσίασαν πολύ έντονη προσβολή έξι έως οκτώ εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Οι Atkins et al. (1995) παρατήρησαν μερική μείωση της συγκέντρωσης του RNA του CEVd σε διαγονιδιακά φυτά τομάτας που εξέφραζαν συμπληρωματικές αλληλουχίες (antisense constructs) του ιοειδούς και στόχευαν στην αρνητική αλυσίδα του, μετά από μόλυνση με το ιοειδές. Αντίθετα, σε διαγονιδιακά φυτά τομάτας που εξέφραζαν αλληλουχίες του ιοειδούς και στόχευαν στη θετική αλυσίδα του CEVd παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού συγκέντρωσης του ιοειδούς. Αργότερα, οι Yang et al. (1997) παρατήρησαν ότι διαγονιδιακά φυτά πατάτας που εξέφραζαν ένα σφυροκέφαλο ριβοένζυμο που στόχευε την αρνητική (-) αλυσίδα του PSTVd εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα αντοχής στη μόλυνση από το ιοειδές.

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν αρκετά παραδείγματα επιτυχούς εφαρμογής της RNA σιώπησης στην ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών έναντι των ιοειδών. Οι



Carbonell et al. (2008) πραγματοποίησαν πειράματα σε φυτά γυνούρας (*Gynura aurantiaca*) και τομάτας στα οποία έγινε ταυτόχρονη μόλυνση με τα ιοειδή CEVd ή PSTVd και αντίστοιχα μόρια dsRNA για κάθε ιοειδές. Τόσο στο σύστημα CEVd-γυνούρα όσο και στο σύστημα CEVd-τομάτα παρατηρήθηκε εμφανής μείωση της προσβολής παρουσία του CEVd-dsRNA.

Μια αρκετά διαδεδομένη μέθοδος επαγωγής της RNA σιώπησης είναι με τη χρήση πλασμιδιακών φορέων που δημιουργούν κατασκευές φουρκέτας με εσώνιο (intron-containing hairpin RNA, ihrRNA). Η φουρκέτα σχηματίζεται από την ένθεση στο πλασμίδιο δύο επαναλήψεων μιας αλληλουχίας με αντίθετο προσανατολισμό μεταξύ τους, έτσι ώστε μετά τη μεταγραφή τους σε mRNA να υβριδίσουν τα δύο αντίγραφα και το μόριο να αποκτήσει τη δομή φουρκέτας. Η αλληλουχία που εισάγεται στο πλασμίδιο είναι όμοια με κάποιο τμήμα του mRNA του προς σιώπηση γονιδίου-στόχου. Η παρουσία του εσωνίου ανάμεσα στα δύο αντίγραφα της αλληλουχίας αυξάνει την αποτελεσματικότητα της σιώπησης, καθώς έχει βρεθεί ότι το ποσοστό των σιωπημένων διαγονιδιακών φυτών μπορεί να φτάσει το 90-100% (Wesley et al., 2001). Οι Schwind et al. (2009) έδειξαν ότι διαγονιδιακά φυτά τομάτας που εξέφραζαν αλληλουχίες του PSTVd υπό μορφή φουρκέτας ήταν ανθεκτικά στη μόλυνση από το ιοειδές. Η ανθεκτικότητα συσχετίστηκε με την ανίχνευση υψηλών επιπέδων siRNAs που προέρχονταν από το ιοειδές. Σε μια άλλη προσέγγιση, οι Kasai et al. (2013) παρατήρησαν μειωμένη συσσώρευση του PSTVd στα πρώτα στάδια της μόλυνσης σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που εξέφραζαν μια σχεδόν πλήρη αλληλουχία του PSTVd, υπό μορφή φουρκέτας, εξειδικευμένης στα συνοδά κύτταρα (companion cells). Αυτή η προσέγγιση αποσκοπούσε στην αύξηση της παραγωγής των siRNAs στα κύτταρα του ηθμού, μέσω του οποίου μετακινείται το ιοειδές από το υποκείμενο στο εμβόλιο.

### 3.1.2. Σκοπός

Στόχο των πειραμάτων του παρόντος τμήματος της διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της ικανότητας διαφόρων τμημάτων του CEVd να επάγουν σιώπηση της έκφρασης του ιοειδούς και κατ' επέκταση, τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού του. Για το σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση δύο ελληνικών απομονώσεων του CEVd και σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών τους με άλλες δημοσιευμένες απομονώσεις του CEVd. Ακολούθησε επιλογή δύο τμημάτων του

γονιδιώματος του CEVd και κατασκευή γονιδιακών κατασκευών, υπό μορφή φουρκέτας, ικανών να επάγουν το μηχανισμό της RNA σιώπησης κατά την έκφρασή τους σε φυτά. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των δύο επιλεγμένων τμημάτων του ιοειδούς να επάγουν ανθεκτικότητα πραγματοποιήθηκε αξιοποιώντας το μηχανισμό της RNA σιώπησης: α) σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το ιοειδές με αγροεμποτισμό των υπό μελέτη τμημάτων του ιοειδούς με τη μορφή φουρκέτας και β) σε αγρίου τύπου φυτά *N. benthamiana* με ταυτόχρονη έγχυση του ιοειδούς και ενός μορίου ανιχνευτή συνδεδεμένου με τα υπό μελέτη τμήματα του ιοειδούς.

## 3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1. Αλληλούχηση ελληνικών απομονώσεων του CEVd

Για την απομόνωση του CEVd χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φύλλων από ένα δένδρο λεμονιάς ποικιλίας «Αδαμοπούλου» και ένα δένδρο πορτοκαλιάς ποικιλίας «ΡΟ25» που προέρχονταν από το Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου και είχαν εγκατασταθεί στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τα δένδρα είχαν ελεγχθεί με RT-PCR και ήταν θετικά για το CEVd.

Ακολούθησε απομόνωση RNA με τη μέθοδο της silica (Rott and Jelkmann, 2001).

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) έγινε με τη χρήση της Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή με μια μικρή τροποποίηση. Για την αντίδραση αναμίχθηκε 1 μg ολικού RNA με τον εκκινητή CEV-AM3 (Πίνακας 3.1). Το μίγμα τοποθετήθηκε στους 95 °C για 5 λεπτά, στη συνέχεια στον πάγο για 2 λεπτά και ακολούθησε η προσθήκη των υπόλοιπων συστατικών της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (Ito et al., 2000).

Το προϊόν της RT χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η αντίδραση έγινε με τη χρήση των εκκινητών CEV-AP3/CEV-AM3 (Πίνακας 3.1) και την πολυμεράση υψηλής πιστότητας Phusion high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Finland). Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	10,3	
HF buffer (5x)	4	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
DMSO	0,6	3%
CEV-AP3 (10μM)	1	0,5 μM
CEV-AM3 (10μM)	1	0,5 μM
Phusion pol.	0,2	0,4 U
Προϊόν RT	2,5	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

98 °C - 30 δευτ.	} 36 κύκλοι
98 °C - 10 δευτ.	
55 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 10 λεπτά	

Ακολούθησε προσθήκη νουκλεοτιδίων αδενίνης (A) στα 3' - άκρα των προϊόντων της PCR. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 72 °C για 30 λεπτά. Με αυτόν τον τρόπο, διευκολύνεται η ένθεση των προϊόντων στον πλασμιδιακό φορέα που φέρει ουρές από θυμίνες (T).

Συστατικά	Ποσότητες (μl)
H <sub>2</sub> O	14,7
10x buffer	4
dATP (10mM)	0,8
Taq polymerase (NEB)	0,5
Προϊόν PCR	20
Σύνολο	40

Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αгарόζης, κοπή της επιθυμητής ζώνης και καθαρισμός του DNA με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, UK).

Τα προϊόντα της PCR εισήχθησαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy Vector (Promega, U.S.A), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5α με τη μέθοδο του θερμικού shock (heat shock). Για το μετασχηματισμό, χρησιμοποιήθηκαν 50 μl βακτηριακού αιωρήματος και 5 μl διαλύματος πλασμιδίου. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων έγινε με τη βοήθεια της αντίδρασης στη β-γαλακτοσιδάση (επιλογή μπλε-άσπρο).

Ακολούθησε απευθείας αντίδραση PCR από την αποικία (colony PCR) και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης για την επιβεβαίωση της παρουσίας του γονιδιώματος του CEVd στα επιλεγμένα βακτήρια.

Στη συνέχεια, έγινε απομόνωση των πλασμιδίων από τις βακτηριακές καλλιέργειες με αλκαλική λύση με τη χρήση SDS (Sambrook and Russell, 2006).

Για αλληλούχηση, στάλθηκαν συνολικά τέσσερα πλασμίδια: δύο που περιείχαν την αλληλουχία του CEVd από τη λεμονιά «Αδαμοπούλου» και δύο από την πορτοκαλιά «PO25». Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία VBC (Αυστρία) με τη χρήση των εκκινητών M13F και M13R, οι οποίοι εξασφαλίζουν την αλληλούχηση των δύο νουκλεοτιδικών αλυσίδων ολόκληρου του ενθέματος.

Οι αποκτηθείσες αλληλουχίες συγκρίθηκαν μεταξύ τους αλλά και με την αλληλουχία αναφοράς για το CEVd (GenBank: NC001464). Η ευθυγράμμιση (alignment) των αλληλουχιών έγινε με το λογισμικό Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Παράλληλα, έγινε και σύγκριση με άλλες ελληνικές απομονώσεις του CEVd

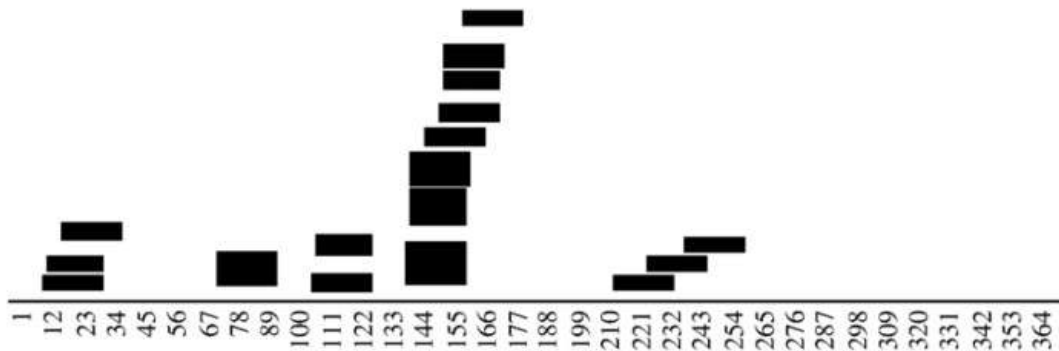
(Wang et al., 2013) καθώς και με την επιθετική απομόνωση CEVd-A (Genbank: M30868, Visvader and Symons, 1985) και την ήπια απομόνωση CEVd-B (GenBank: K00965, Visvader and Symons, 1983). Από τις προαναφερθείσες συγκρίσεις, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο, με τη χρήση του λογισμικού MEGA 6 (Tamura et al., 2013) και τη μέθοδο Neighbor-joining. Ο έλεγχος της στατιστικής εγκυρότητας της τοπολογίας του δένδρου έγινε με 10.000 bootstrap επαναλήψεις.

### **3.2.2. Έλεγχος τμημάτων του CEVd ως προς την ικανότητα επαγωγής RNA σιώπησης σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το ιοειδές**

Για τον έλεγχο της ικανότητας δύο τμημάτων της αλληλουχίας του CEVd να επάγουν το μηχανισμό της RNA σιώπησης, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίησή τους σε ειδικό πλασμιδιακό φορέα προκειμένου να αποκτήσουν δομή δίκλωνου μορίου (φουρκέτα). Στη συνέχεια, τα πλασμίδια εισήχθησαν με αγρο-εμποτισμό σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το CEVd (Κεφάλαιο 2 της παρούσας διατριβής) και αξιολογήθηκε η ικανότητά τους να επάγουν RNA σιώπηση, μέσω ποσοτικοποίησης του RNA του ιοειδούς στο μολυσμένο ιστό.

#### **3.2.2.1. Προετοιμασία πλασμιδίων**

Τα τμήματα της αλληλουχίας του CEVd που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αντιστοιχούν στις περιοχές από το νουκλεοτίδιο 70 έως το 180 και από το νουκλεοτίδιο 298 έως το 70. Η επιλογή των συγκεκριμένων τμημάτων έγινε με βάση τα ευρήματα των Martín et al. (2007), οι οποίοι αναφέρουν ότι σε φυτά τομάτας μολυσμένα με CEVd, τα περισσότερα CEVd sRNAs που παράγονται είναι θετικής πολικότητας και παράγονται από το δεξί ήμισυ της RNA αλληλουχίας του CEVd (Εικ. 3.2). Σύμφωνα με τα ευρήματα των ερευνητών αυτών, η περιοχή CEV70-180 φαίνεται ότι παράγει πολλά sRNAs, ενώ η περιοχή CEV298-70 παράγει πολύ λιγότερα.



**Εικόνα 3.2.** Οι θέσεις των CEVd sRNAs που ανιχνεύτηκαν σε φυτά τομάτας μολυσμένα με το CEVd σε αντιστοιχία με το γονιδίωμα του ιοειδούς. Το πάχος των γραμμών συμβολίζει την ποσότητα των απομονωθέντων sRNAs (Martín et al., 2007).

Για την απομόνωση των τμημάτων του ιοειδούς χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το RNA από φύλλα μολυσμένης με CEVd λεμονιάς της ποικιλίας «Αδαμοπούλου», που απομονώθηκε όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 3.2.1.

Η αντίδραση RT έγινε με τη χρήση της Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αντίδραση αναμίχθηκε 1 μg ολικού RNA με τον εκκινητή CEVd-Pst-R για το τμήμα CEV70-180 ή τον εκκινητή CEVd-Bam-R για το τμήμα CEV298-70 (Πίνακας 3.1). Ο πρώτος εκκινητής προσδένεται στη θέση CEV45-30 και ο δεύτερος στη θέση CEV93-73. Η αντίδραση RT πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.1.

Τα προϊόντα της RT χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για την PCR. Για το τμήμα CEV70-180 χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών LIC1\_70-180-F/ LIC2\_70-180-R και LIC4\_70-180-F/ LIC3\_70-180-R ενώ για το τμήμα CEV298-70 χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών LIC1\_298-70-F/ LIC2\_298-70-R και LIC4\_298-70-F/ LIC3\_298-70-R (Πίνακας 3.1). Οι συγκεκριμένοι εκκινητές προσθέτουν στα άκρα του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος αλληλουχίες ομόλογες με τον πλασμιδιακό φορέα pRNAi-LIC (Xu et al., 2010) στον οποίο γίνεται η ένθεση.

Το μίγμα των αντιδράσεων PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	13	
KAPA Hifi buffer (5x)	5	1x
dNTPs (10mM)	0,75	300μM/dNTP
DMSO	1,25	5%
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,75	0,3 μM
Αντίστροφος εκκινητής (10μM)	0,75	0,3 μM
KAPA Hifi polymerase	0,5	0,5 U
Προϊόν RT	3	
Σύνολο	25	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C - 3 λεπτά	} 36 κύκλοι
98 °C - 20 δευτ.	
70 °C - 15 δευτ.	
72 °C - 40 δευτ.	
72 °C - 5 λεπτά	

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης, κοπή των επιθυμητών ζωνών και καθαρισμός του DNA με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, UK).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR για την ενίσχυση του τμήματος PDK του πλασμιδίου pRNAi-LIC. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο πλασμίδιο ως εκμαγείο και το ζεύγος εκκινητών PDK-LIC-F/R (Πίνακας 3.1). Το μίγμα της αντίδρασης PCR ήταν όπως παραπάνω.

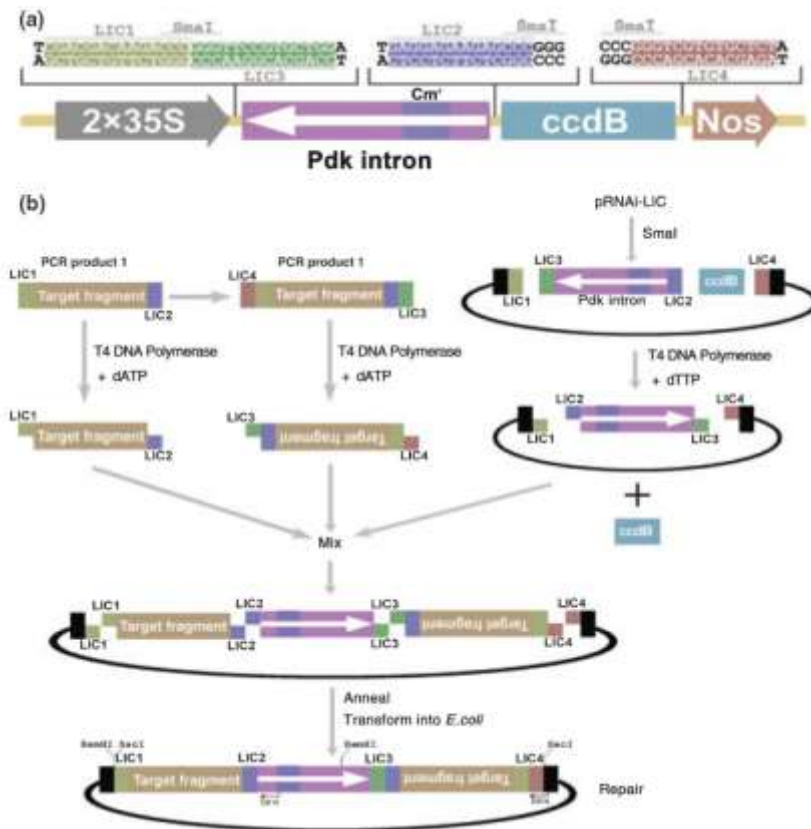
Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C - 3 λεπτά	} 36 κύκλοι
98 °C - 20 δευτ.	
65 °C - 15 δευτ.	
72 °C - 40 δευτ.	
72 °C - 5 λεπτά	

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης, κοπή της επιθυμητής ζώνης και καθαρισμός του DNA με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, UK).

Για διαμόρφωση των επιλεγμένων τμημάτων του CEVd σε μορφή φουρκέτας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pRNAi-LIC (Εικ. 3.3, Xu et al., 2010), που παρέχει τη

δυνατότητα κατασκευής φουρκέτας μέσω της ένθεσης δύο ανεστραμμένων επαναλήψεων της επιθυμητής αλληλουχίας εκατέρωθεν του εσωνίου PDK.



**Εικόνα 3.3.** (α) Σχηματική αναπαράσταση του τμήματος του πλασμιδίου pRNAi-LIC όπου σχηματίζεται η φουρκέτα. (β) Σχηματική περιγραφή του τρόπου ένθεσης των επιθυμητών αλληλουχιών στο πλασμίδιο. Αρχικά, η επιθυμητή αλληλουχία πολλαπλασιάζεται με εξειδικευμένους εκκινητές που φέρουν στα άκρα τους προσαρμοστές LIC1/LIC2 (PCR προϊόν 1) και LIC3/LIC4 (PCR προϊόν 2 - ανεστραμμένη αλληλουχία). Ακολουθεί μεταχείριση των προϊόντων με την T4 DNA πολυμεράση, υπό την παρουσία αδεΐνης (dATP). Μετά την πέψη του πλασμιδίου με το περιοριστικό ένζυμο *SmaI*, γίνεται μεταχείριση με T4 DNA πολυμεράση υπό την παρουσία θυμίνης (dTTP). Στη συνέχεια, όλα τα προϊόντα αναμιγνύονται και το μίγμα χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων *E.coli*. Στις θέσεις OX13 και OX14 προσδένονται οι αντίστοιχοι εκκινητές για την αλληλούχηση του πλασμιδίου που φέρει τα ενθέματα (Xu et al., 2010).



Το κόλλημα του πλασμιδίου έγινε με το περιοριστικό ένζυμο *SmaI*. Ακολούθησε καθαρισμός με φαινόλη και καθίζηση με αιθανόλη. Το μίγμα της πέψης είχε ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)
H <sub>2</sub> O	82,5
10x buffer N	10
<i>SmaI</i> (NEB)	2,5
Πλασμίδιο pRNAi-LIC	5
Σύνολο	100

Για την ένθεση των τμημάτων του CEVd στο κομμένο pRNAi-LIC δεν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους Xu et al. (2010) αλλά έγινε με τη χρήση του In-Fusion HF Cloning Kit (Clontech), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, το μίγμα της αντίδρασης είχε ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)
H <sub>2</sub> O	0,8
Μίγμα ενζύμου In-Fusion	2
Κομμένο πλασμίδιο (111 ng)	3
Τμήμα CEVd με άκρα LIC1/2 (37 ng)	1
Τμήμα CEVd με άκρα LIC3/4 (39 ng)	0,7
Εσώνιο PDK (71 ng)	2,5
Σύνολο	10

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 50 °C για 15 λεπτά. Από την αντίδραση προέκυψαν τα πλασμίδια pRNA-LIC:CEV70-180 και pRNAi-LIC:CEV298-70.

Ακολούθησε μετασχηματισμός επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* DH5α με τη μέθοδο του θερμικού shock (heat shock). Για το μετασχηματισμό, χρησιμοποιήθηκαν 50 μl βακτηριακού αιωρήματος και 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης.

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης των τμημάτων στο πλασμίδιο και το μετασχηματισμό των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε απευθείας αντίδραση PCR από την αποικία (colony PCR) με τη χρήση των ζευγών εκκινητών LIC1\_70-180-F/LIC2\_70-180-R και LIC1\_298-70-F/LIC2\_298-70-R (Πίνακας 3.1).

Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	12,1	
Buffer (5x)	4	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
MgCl <sub>2</sub>	0,8	3%
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,8	0,5 μM
Αντίστροφος εκκινητής (10μM)	0,8	0,5 μM
GoTaq polymerase (Promega)	0,1	0,5 U
Αποικία αραιωμένη σε 100 μl H <sub>2</sub> O	1	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C - 2 λεπτά	} 35 κύκλοι
95 °C - 30 δευτ.	
60 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 1 λεπτό	
72 °C - 5 λεπτά	

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης και του σωστού προσανατολισμού των επιλεγμένων τμημάτων του CEVd στα πλασμίδια pRNAi-LIC:CEV70-180 και pRNAi-LIC:CEV298-70, έγινε αλληλούχηση των πλασμιδίων από την εταιρεία Beckman Coulter Genomics (UK). Η απομόνωση των πλασμιδίων από τις βακτηριακές καλλιέργειες έγινε με αλκαλική λύση με τη χρήση SDS (Sambrook and Russell, 2006). Η αλληλούχηση έγινε με τη χρήση των εκκινητών OX13 και OX14 (Πίνακας 3.1).

Τα απομονωθέντα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *A. tumefaciens* EHA105 με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης, όπως περιγράφηκε στην υποενότητα 2.2.1.1. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ένα άδειο πλασμίδιο pRNAi-LIC (pRNAi-LIC:empty), ως αρνητικός μάρτυρας στα πειράματα ελέγχου της RNA σιώπησης, το οποίο εισήχθη στο ίδιο στέλεχος του *A. tumefaciens*.

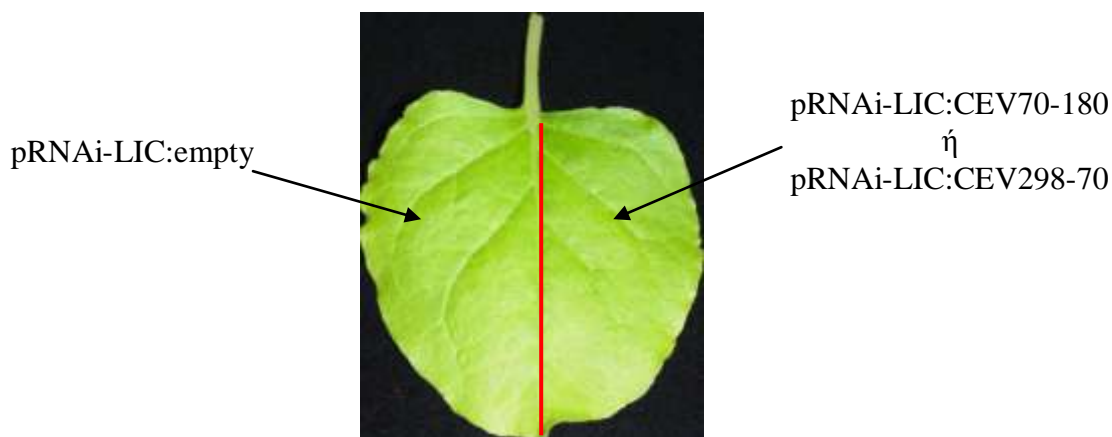
Για την επιβεβαίωση του μετασχηματισμού των κυττάρων *A. tumefaciens*, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR απευθείας από επιλεγμένες βακτηριακές αποικίες, όπως περιγράφεται παραπάνω.

### 3.2.2.2. Αγρο-εμποτισμός διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το CEVd

Για τα πειράματα αυτής της ενότητας χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά των σειρών N.b. 32 και N.b. 38-2, απόγονοι αυτογονιμοποίησης (T<sub>1</sub> γενιά) των φυτών που προέκυψαν από το γενετικό μετασχηματισμό (Κεφάλαιο 2). Για την επιβεβαίωση του πολλαπλασιασμού του ιοειδούς σε αυτά τα φυτά έγινε απομόνωση RNA και αντίδραση PCR, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.1.3.

Η προετοιμασία των μετασχηματισμένων κυττάρων *A. tumefaciens* πριν τον αγρο-εμποτισμό έγινε όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.1.2. Η καλλιέργεια των αγροβακτηρίων έγινε σε υγρό θρεπτικό υλικό LB που περιείχε τα αντιβιοτικά канаμυκίνη (25 mg/l), ριφαμικίνη (100 mg/l) και χλωραμφενικόλη (5 mg/l).

Η μόλυνση έγινε σε φυτά ηλικίας έξι εβδομάδων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο φυτά για τον εμποτισμό με καθένα από τα πλασμίδια pRNAi-LIC:CEV70-180 και pRNAi-LIC:CEV298-70. Σε κάθε φυτό μολύνθηκαν δύο φύλλα: στην αριστερή πλευρά του ελάσματος έγινε εμποτισμός με το άδειο pRNAi-LIC:empty ενώ στη δεξιά πλευρά του ελάσματος έγινε εμποτισμός με το pRNAi-LIC:CEV70-180 ή το pRNAi-LIC:CEV298-70 (Εικ. 3.4). Ο αγρο-εμποτισμός έγινε με τη χρήση σύριγγας χωρίς βελόνα, σύμφωνα με τη μέθοδο των Schöb et al. (1997). Ο εμποτισμός έγινε σε πολλά σημεία του ελάσματος προκειμένου να εξασφαλιστεί η εξάπλωση του βακτηριακού αιωρήματος σε ολόκληρη την επιφάνεια του φύλλου. Τα μολυσμένα φυτά διατηρήθηκαν στους 20 °C με 16 ώρες φως και έγινε δειγματοληψία των μολυσμένων φύλλων στις 4 και στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση (σε κάθε δειγματοληψία λήφθηκε ένα μολυσμένο φύλλο). Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την επεξεργασία τους.



**Εικόνα 3.4.** Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών μόλυνσης του ελάσματος φύλλου διαγονιδιακού φυτού *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζει το CEVd.

### 3.2.2.3. Έλεγχος της σιώπησης με Real-time PCR

Η απομόνωση του RNA από τα δείγματα και η μεταχείρισή του με DNase έγινε όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.2.1.3. Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την έλεγχο της σιώπησης του πολλαπλασιαζόμενου CEVd με Real-time PCR.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RT με το ένζυμο SuperScript II (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 500 ng ολικού RNA και οι εκκινητές CEVd-Bam-F καθώς και ο EF-1 $\alpha$ -R, ως εσωτερικός μάρτυρας (Πίνακας 3.1).

Τα προϊόντα των αντιδράσεων RT χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για τις αντιδράσεις Real-time PCR. Οι αντιδράσεις έγιναν σε τρεις επαναλήψεις με τα ζεύγη εκκινητών EF-1 $\alpha$ -F/R και IF70-180-F/R (Πίνακας 3.1) και το ένζυμο KAPA SYBR FAST qPCR Kit της KapaBiosystems, χρησιμοποιώντας το παρακάτω μίγμα:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	2	
SuperMix (2x)	5	1x
Πρόσθιος εκκινητής (2μM)	1	0,2 μM
Αντίστροφος εκκινητής (2μM)	1	0,2 μM
Προϊόν RT	1	
Σύνολο	10	

Το πρόγραμμα της Real-time PCR που χρησιμοποιήθηκε στο θερμοκυκλικό μηχάνημα PikoReal της Thermo ήταν:

95 °C - 3 λεπτά	} 35 κύκλοι
95 °C - 3 δευτ.	
60 °C - 20 δευτ.	
72 °C - 20 δευτ.	

διάβασμα των δειγμάτων

Στο τέλος του προγράμματος υπήρξε ένα στάδιο για τη δημιουργία της καμπύλης αποδιάταξης (melt curve):

95 °C για 10 δευτερόλεπτα,

melt curve 65 °C to 95 °C, με αύξηση κατά 0,5 °C για 5 δευτερόλεπτα και διάβασμα των δειγμάτων.

Μετά τις αντιδράσεις της Real-time PCR, έγινε δειγματοληπτικά ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ορισμένων προϊόντων από κάθε αντίδραση προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων και η απουσία μη εξειδικευμένων ζωνών.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση των λογισμικών PikoReal Software 2.2 και Microsoft Excel. Για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων, εφαρμόστηκε η εξίσωση  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Η μέθοδος έχει ως εξής:

1. Το λογισμικό του μηχανήματος δίνει τον αριθμό του κύκλου της αντίδρασης κατά τη διάρκεια του οποίου η καμπύλη του φθορισμού τέμνει τον άξονα του ορίου (threshold). Ο αριθμός αυτός συμβολίζεται ως Ct ή Cq.

2. Υπολογίζεται η διαφορά των τιμών Ct στα δείγματα cDNA των δύο επεμβάσεων:

$$\Delta Ct_{\text{επέμβαση 1}} = Ct_{\text{(υπό μελέτη γονίδιο)}} - Ct_{\text{(γονίδιο αναφοράς)}}$$

$$\Delta Ct_{\text{επέμβαση 2}} = Ct_{\text{(υπό μελέτη γονίδιο)}} - Ct_{\text{(γονίδιο αναφοράς)}}$$

3. Αφαιρούνται οι παραπάνω διαφορές και υπολογίζεται κατά πόσες φορές είναι διαφορετική η έκφραση ενός γονιδίου στη μία επέμβαση σε σχέση με την άλλη:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{επέμβαση 1}} - \Delta Ct_{\text{επέμβαση 2}}$$

4. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης στις δύο επεμβάσεις υπολογίζονται από:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Με αυτό τον τρόπο, η έκφραση του υπό μελέτη RNA (αρνητική αλυσίδα του RNA του ιοειδούς στο παρόν πείραμα) κανονικοποιείται πρώτα με τα επίπεδα έκφρασης του *EF-1α* (γονίδιο αναφοράς) και στη συνέχεια, υπολογίζεται η έκφραση του RNA της επέμβασης 2 (pRNAi-LIC:CEV70-180 ή pRNAi-LIC:CEV298-70) σε σχέση με την έκφραση του RNA της επέμβασης 1 (pRNAi-LIC:empty).

Η τυπική απόκλιση (standard deviation, S.D.) του μέσου όρου των τριών τιμών Ct που προέκυψαν από τις τρεις επαναλήψεις του κάθε δείγματος υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Τέλος, υπολογίστηκε ο συντελεστής παραλλακτικότητας από τον τύπο:

$$C.V. = (S.D./\text{μέση τιμή Ct}) \times 100$$

### 3.2.3. Έλεγχος της ικανότητας επαγωγής RNA σιώπησης μέσω παροδικής έκφρασης τμημάτων του CEVd

Για τον έλεγχο της δυνατότητας επαγωγής RNA σιώπησης μέσω παροδικής έκφρασης, δοκιμάστηκαν τα δύο τμήματα της αλληλουχίας του CEVd: CEV70-180 και CEV298-70. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν φυτά *N. benthamiana* αγρίου τύπου (wt) στα οποία έγινε ταυτόχρονη έγχυση του κάθε τμήματος του ιοειδούς και του διμερούς μορίου του CEVd.

#### 3.2.3.1. Προετοιμασία πλασμιδίων

Για την απομόνωση των τμημάτων του ιοειδούς, χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το RNA από φύλλα μολυσμένης λεμονιάς της ποικιλίας «Αδαμοπούλου», που απομονώθηκε όπως περιγράφηκε στην υποενότητα 3.2.1.

Η αντίδραση RT έγινε με τη χρήση της Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αντίδραση, αναμίχθηκε 1 μg ολικού RNA με τον εκκινητή CEVd-Pst-R για το τμήμα CEV70-180 ή τον εκκινητή CEVd-Bam-R για το τμήμα CEV298-70 (Πίνακας 3.1). Ο πρώτος εκκινητής προσδένεται στη θέση CEV45-30 και ο δεύτερος στη θέση CEV93-73. Το μίγμα τοποθετήθηκε στους 95 °C για 5 λεπτά, στη συνέχεια στον πάγο για 2 λεπτά και ακολούθησε η προσθήκη των υπόλοιπων συστατικών της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (Ito et al., 2000).

Τα προϊόντα της RT χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για την PCR. Η αντίδραση έγινε με τα ζεύγη εκκινητών CEVd-Pst-F/R και CEVd-Bam-F/R (Πίνακας 3.1). Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	10,3	
HF buffer (5x)	4	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
DMSO	0,6	3%
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	1	0,5 μM
Αντίστροφος εκκινητής (10μM)	1	0,5 μM
Phusion πολυμεράση	0,2	0,4 U
Προϊόν RT	2,5	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

98 °C - 30 δευτ.	} 36 κύκλοι
98 °C - 10 δευτ.	
55 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 10 λεπτά	

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης, κοπή της επιθυμητής ζώνης και καθαρισμός του DNA με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, UK).

Τα προϊόντα της παραπάνω PCR αραιώθηκαν 100 φορές και χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για την επόμενη αντίδραση PCR που έγινε με τα ζεύγη εκκινητών IF 70-180-F/R και IF 298-70-F/R (Πίνακας 3.1). Οι συγκεκριμένοι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία JX885864 και προσθέτουν στο 5'-άκρο του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος αλληλουχίες ομόλογες με τον πλασμιδιακό φορέα pGDG (Goodin et al., 2002) στον οποίο γίνεται η ένθεση καθώς και δύο θέσεις περιορισμού για τα ένζυμα *BglIII* και *SallI*. Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	11,3	
HF buffer (5x)	4	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
DMSO	0,6	3%
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	1	0,5 μM
Αντίστροφος εκκινητής (10μM)	1	0,5 μM
Phusion polymerase	0,2	0,4 U
Προϊόν RT	1,5	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

98 °C - 30 δευτ.	} 36 κύκλοι
98 °C - 10 δευτ.	
70 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 10 λεπτά	

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης, κοπή της επιθυμητής ζώνης και καθαρισμός του DNA με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, UK).





Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 50 °C για 15 λεπτά. Από την αντίδραση προέκυψαν τα πλασμίδια pGDG:CEV70-180 και pGDG:CEV298-70.

Ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηρίων *E.coli* DH5α με τη μέθοδο του θερμικού shock (heat shock). Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν 50 μl βακτηριακού αιωρήματος και 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης.

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης των τμημάτων στο πλασμίδιο και το μετασχηματισμό των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε απευθείας αντίδραση PCR από την αποικία (colony PCR) με τη χρήση των pGD-mcs-F/R εκκινητών (Πίνακας 3.1). Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	13,1	
Buffer (5x)	4	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
MgCl <sub>2</sub>	0,8	3%
pGD-mcs-F (10μM)	0,8	0,5 μM
pGD-mcs-R (10μM)	0,8	0,5 μM
GoTaq polymerase (Promega)	0,1	0,5 U
Μικρή ποσότητα αποικίας	-	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C - 2 λεπτά	} 35 κύκλοι
95 °C - 30 δευτ.	
55 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 45 δευτ.	
72 °C - 5 λεπτά	

Τα αναμενόμενα προϊόντα για τα πλασμίδια pGDG:CEV70-180 και pGDG:CEV298-70 ήταν 225 και 258 ζεύγη βάσεων, αντίστοιχα.

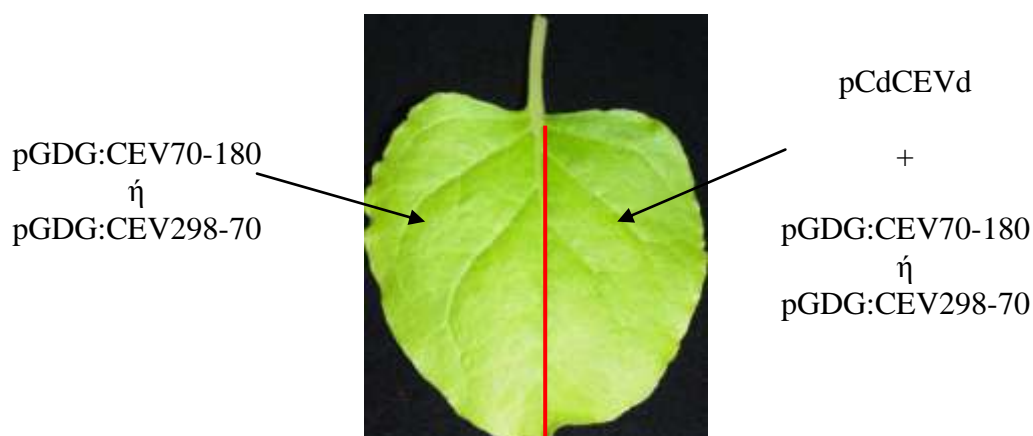
Ακολούθησε απομόνωση των πλασμιδίων από τις βακτηριακές καλλιέργειες με αλκαλική λύση με τη χρήση SDS (Sambrook and Russell, 2006). Τα απομονωθέντα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης, όπως περιγράφηκε στην υποενότητα 2.2.1.1.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCdCEVd (Daròs and Flores, 2004) που περιέχει το διμερές μόριο του CEVd. Το pCdCEVd εισήχθη στο *A. tumefaciens* C58C1 με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

### 3.2.3.2. Αγρο-εμποτισμός (agro-infiltration) φυτών *N. benthamiana* αγρίου τύπου

Η προετοιμασία των μετασχηματισμένων *A. tumefaciens* πριν τον αγρο-εμποτισμό έγινε όπως περιγράφηκε στην υποενότητα 2.2.1.2.

Η μόλυνση έγινε σε φυτά *N. benthamiana* ηλικίας πέντε εβδομάδων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο φυτά για τη μόλυνση με κάθε τμήμα του CEVd. Σε κάθε φυτό μολύνθηκε ένα φύλλο: στην αριστερή πλευρά του ελάσματος έγινε εμποτισμός με το pGDG:CEV70-180 ή το pGDG:CEV298-70 ενώ στη δεξιά πλευρά του ελάσματος έγινε εμποτισμός με μίγμα βακτηρίων που περιείχαν το pCdCEVd μαζί με το pGDG:CEV70-180 ή το pGDG:CEV298-70 (Εικ. 3.6). Ο αγρο-εμποτισμός έγινε με τη χρήση σύριγγας χωρίς βελόνα σύμφωνα με τη μέθοδο των Schöb et al. (1997). Ο εμποτισμός έγινε σε πολλά σημεία του ελάσματος προκειμένου να εξαπλωθεί το βακτηριακό αιώρημα σε ολόκληρη την επιφάνεια του φύλλου. Τα μολυσμένα φυτά διατηρήθηκαν στους 20 °C και έγινε δειγματοληψία των μολυσμένων φύλλων 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την επεξεργασία τους.



**Εικόνα 3.6.** Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών μόλυνσης του ελάσματος φύλλου φυτού *N. benthamiana* αγρίου τύπου.

### 3.2.3.3. Απομόνωση RNA από τα αγρο-εμποτισμένα φύλλα *N. benthamiana*

Η απομόνωση του RNA από τα δείγματα και η μεταχείρισή του με DNase έγινε όπως περιγράφηκε στην υποενότητα 2.2.1.3.

Για την επιβεβαίωση της απουσίας DNA από τα δείγματα RNA πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR στο RNA με τη χρήση των εκκινητών NADH-F/R (Πίνακας 3.1). Το αναμενόμενο προϊόν για το DNA είναι 1.453 ζεύγη βάσεων.

Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	15,12	
Buffer B (10x)	2	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
NADH-F (10μM)	0,8	0,5 μM
NADH-R (10μM)	0,8	0,5 μM
KAPA Taq polymerase (KAPA)	0,08	0,4 U
Δείγμα RNA	0,8	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C	-	2 λεπτά	} 35 κύκλοι
95 °C	-	30 δευτ.	
60 °C	-	30 δευτ.	
72 °C	-	1 λεπτό	
72 °C	-	5 λεπτά	

#### 3.2.3.4. Έλεγχος σιώπησης με ημι-ποσοτική και Real-time PCR

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της σιώπησης με ημι-ποσοτική και Real-time PCR.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής με το ένζυμο SuperScript II Reverse transcriptase (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 500 ng ολικού RNA και οι εκκινητές pGD-mcs-R καθώς και ο EF-1α-R, ως εσωτερικός μάρτυρας (Πίνακας 3.1).

##### A. Αντιδράσεις ημι-ποσοτικής PCR

Τα προϊόντα των αντιδράσεων RT χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για τις ημι-ποσοτικές PCR. Οι αντιδράσεις έγιναν με τα ζεύγη εκκινητών EF-1α-F/R και pGD-mcs-F/R (Πίνακας 3.1). Μετά τον 18ο κύκλο της αντίδρασης, έγινε παύση του προγράμματος και λήψη δείγματος 5 μl. Ακολούθησαν άλλες τρεις παύσεις κάθε 5 κύκλους και λήψη δείγματος. Το πρόγραμμα ολοκληρώθηκε στους 38 κύκλους.

Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	22,68	
Buffer B (10x)	3	1x
dNTPs (10mM)	0,6	200μM/dNTP
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	1,2	0,5 μM
Αντίστροφος εκκινητής (10μM)	1,2	0,5 μM
KAPA Taq polymerase (KAPA)	0,12	0,4 U
Προϊόν RT	1,2	
Σύνολο	30	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C - 2 λεπτά	} 38 κύκλοι
95 °C - 30 δευτ.	
60 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 1 λεπτό	
72 °C - 5 λεπτά	

Τα δείγματα που ελήφθησαν κάθε πέντε κύκλους της αντίδρασης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% σε 0,5x TAE buffer. Για την εμφάνιση των ζωνών στην πηκτή, έγινε χρώση της με βρωμιούχο αιθίδιο για 20 λεπτά στο σκοτάδι και φωτογραφήθηκε κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

#### B. Αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Εκτός από τις ημι-ποσοτικές PCR, στα ίδια δείγματα πραγματοποιήθηκαν και αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Ως εκμαγεία, χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα της αντίδρασης RT. Οι αντιδράσεις έγιναν σε τρεις επαναλήψεις με τα ζεύγη εκκινητών EF-1α-F/R και pGD-mcs-F/R και το ένζυμο KAPA SYBR FAST qPCR Kit της KaraBiosystems, χρησιμοποιώντας το παρακάτω μίγμα:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	2	
SuperMix (2x)	5	1x
Πρόσθιος εκκινητής (2μM)	1	0,2 μM
Αντίστροφος εκκινητής (2μM)	1	0,2 μM
Προϊόν RT	1	
Σύνολο	10	

Το πρόγραμμα της Real-time PCR που χρησιμοποιήθηκε στο θερμοκυκλικό μηχάνημα PikoReal της Thermo ήταν:

95 °C - 3 λεπτά	} 35 κύκλοι
95 °C - 3 δευτ.	
55 °C - 20 δευτ.	
72 °C - 20 δευτ.	
διάβασμα των δειγμάτων	

Στο τέλος του προγράμματος, υπήρξε ένα στάδιο για τη δημιουργία της καμπύλης αποδιάταξης (melt curve):

95 °C για 10 δευτερόλεπτα,

melt curve 65 °C to 95 °C, με αύξηση κατά 0,5 °C για 5 δευτερόλεπτα και διάβασμα των δειγμάτων.

Μετά τις αντιδράσεις της Real-time PCR, έγινε δειγματοληπτικά ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όλων των προϊόντων της κάθε επανάληψης προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων και η απουσία μη εξειδικευμένων ζωνών.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση των λογισμικών PikoReal Software 2.2 και Microsoft Excel, όπως περιγράφηκε στην υποενότητα 3.2.2.3.

**Πίνακας 3.1.** Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο της μελέτης.

Ονόματα εκκινητών	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος (bp)
CEV-AP3 (Ito et al., 2002)	GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG	371
CEV-AM3 (Ito et al., 2002)	CCGGGGATCCCTGAAGGACTT	
CEVd-Bam-F (Hajeri et al., 2011)	CTCGGATCCCCGGGGAAACCT	
CEVd-Bam-R (Hajeri et al., 2011)	CAAGGATCCCTGAAGGACTTCTTC	
CEVd-Pst-F	ACCCTGCAGGCAGGAAAAGAA	
CEVd-Pst-R	TGCCTGCAGGGTCAGGTGA	
EF-1 $\alpha$ -F (Asai et al., 2008)	CCTCAAGAAGGTTGGATACAAC	152
EF-1 $\alpha$ -R (Asai et al., 2008)	TCTTGGGCTCATTAAATCTGGTC	
IF70-180-F	cgcgggcccgggatccAGATCTGGGGAAGAAGTCCTTCAG*	155
IF70-180-R	tagatccggtggatccGTCGACCTCCTGTTTCTCCGCTGGA*	
IF298-70-F	cgcgggcccgggatccAGATCTCAAACCGCTTTTCTTATATCTTC*	188
IF298-70-R	tagatccggtggatccGTCGACCGCCGCTCTTTTTCTTTT*	
LIC1_70-180-F	cgacgacaagaccctGGGGAAGAAGTCCTTC*	141
LIC2_70-180-R	gaggagaagagccctCTCCTGTTTCTCCGC*	
LIC4_70-180-F	agagcacacgaccctGGGGAAGAAGTCCTTAG*	141
LIC3_70-180-R	ccagcacggaaccctCTCCTGTTTCTCCGCT*	
LIC1_298-70-F	cgacgacaagaccctCAAACCGCTTTTCTT*	174
LIC2_298-70-R	gaggagaagagccctCGCCGCTCTT*	
LIC4_298-70-F	agagcacacgaccctCAAACCGCTTTTCTT*	174
LIC3_298-70-R	ccagcacggaaccctCGCCGCTCTTTTTCTTTT*	
NADH-F (Martin et al., 2013)	GGACTCCTGACGTATACGAAGGATC	1453
NADH-R (Martin et al., 2013)	AGTAGATGCTATCACACATACAAT	
OX13 (Xu et al., 2010)	TCTTCTCGTCTTACACATC	
OX14 (Xu et al., 2010)	AAGACCGGCAACAGGATTC	
PDK-LIC-F	GGGCTCTTCTCCTCAGGG	1641
PDK-LIC-R	GGGTCCGTGCTGGAACC	
pGD-mcs-F	AGCTCAAGCTTCGAATTCTGC	78 in empty vector
pGD-mcs-R	GATCAGTTATCTAGATCCGGTGGA	

\* Τα μικρά γράμματα υποδεικνύουν τα νουκλεοτίδια που είναι ομόλογα με τη αλληλουχία του χρησιμοποιούμενου πλασμιδίου.

### 3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.3.1. Απομόνωση του CEVd από μολυσμένα εσπεριδοειδή και αλληλούχηση του

Η απομόνωση της πλήρους αλληλουχίας του CEVd, μήκους περίπου 371 ζευγών βάσεων, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών CEV-AP3/CEV-AM3 (Εικ. 3.7).



**Εικόνα 3.7.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την απομόνωση του CEVd από μολυσμένα δένδρα των ποικιλιών: **1:** «Αδαμοπούλου», **2:** «PO25». **M:** 100 bp ladder (NEB).

Για την αλληλούχηση, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές M13F και M13R οι οποίοι υβριδίζουν εξωτερικά της περιοχής του ενθέματος στο πλασμίδιο pGEM-T Easy. Με αυτό το ζεύγος, επιτυγχάνεται η αλληλούχηση και των δύο αλυσίδων του DNA. Οι αλληλουχίες κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων του NCBI με τους κωδικούς:

«Αδαμοπούλου»	JX885864 και JX885865
«PO25»	JX885866 και JX885867

Οι πλήρεις αλληλουχίες παρουσιάζονται στο Παράρτημα I.

Στην Εικόνα 3.8, παρουσιάζεται η ευθυγράμμιση των τεσσάρων αλληλουχιών μαζί με την αλληλουχία αναφοράς για το CEVd (GenBank: NC001464) από την Καλιφόρνια (Gross et al., 1982). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι ληφθείσες απομονώσεις παρουσιάζουν διαφορές σε ορισμένα νουκλεοτίδια τόσο μεταξύ τους όσο και με την αλληλουχία αναφοράς.

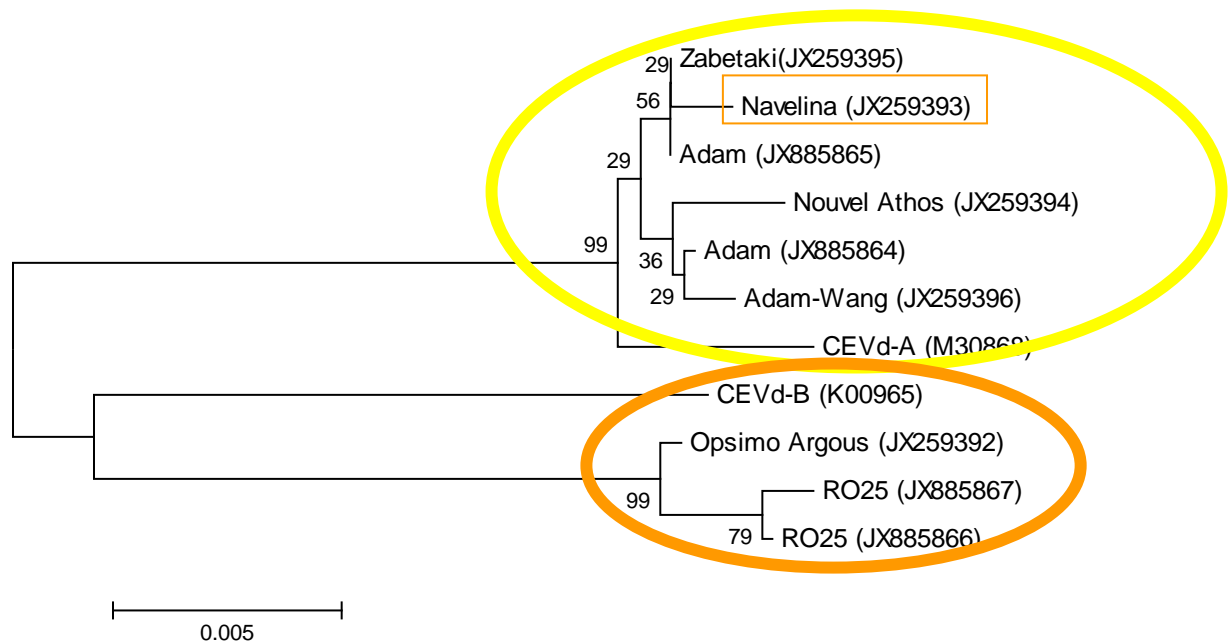
NC001464	CGGGATCTTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAAGAAAA	60
JX885864	CGGGATCTTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAAGAA-AA	59
JX885865	CGGGATCTTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAAGAAAA	60
JX885866	CGGGATCTTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGTAAAAAGAAAA	60
JX885867	CGGGATCTTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGTAAAAAGAAAA	60
	***** **	
NC001464	AGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGAGGAAGTCGAGG	120
JX885864	AAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGAGGAAGTCGAGG	119
JX885865	AAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGAGGAAGTCGAGG	120
JX885866	AGAGGCGGCGGGG-AAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGAGGAAGTCGAGG	119
JX885867	AGAGGCGGCGGGGAAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGAGGAAGTCGAGG	119
	* * * ** *****	
NC001464	TCCGG-GGGGACACTGCTTCGGTCCGCGGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA	179
JX885864	TCCGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCCGCGGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA	179
JX885865	TCCGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCCGCGGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA	180
JX885866	TCCGG-GGGGACACTGCTTCGGTCCGCGGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA	178
JX885867	TCCGG-GGGGACACTGCTTCGGTCCGCGGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA	178
	***** ** *****	
NC001464	GCTCGTCTCCTTCCTTTTCGCTGCTGGTCCACATCCGATCGTTCGTAAGCGCCTCGCC	239
JX885864	GCTCGTCTCCTTCCTTTTCGCTGCTGGTCCACATCCGATCGTTCGTAAGCGCCTCGCC	239
JX885865	GCTCGTCTCCTTCCTTTTCGCTGCTGGTCCACATCCGATCGTTCGTAAGCGCCTCGCC	240
JX885866	GCTCGACTCCTTCCTTTTCGCTGCTGGTCCACATCCGATCGTTCGTAAGCGCTGCGCGCC	238
JX885867	GCTCGACTCCTTCCTTTTCGCTGCTGGTCCACATCCGATCGTTCGTAAGCGCTGCGCGCC	238
	***** ***** ** **	
NC001464	CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAACCCCA	299
JX885864	CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAACCCCA	299
JX885865	CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAACCCCA	300
JX885866	CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAACCCCG	298
JX885867	CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAACCCCG	298
	***** *****	
NC001464	AACCGCTTTTCTTATATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAGCCCTCGGAAC CCTA	359
JX885864	AACCGCTTTTCTTATATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAGCCCTCGGAAC CCTA	359
JX885865	AACCGCTTTTCTTGTATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAGCCCTCGGAAC CCTA	360
JX885866	TACCGCTTTTCTTG-ATCTTAGCTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAGCCCTCGGAAC CCTA	357
JX885867	TACCGCTTTTCTTGATTCTTAGCTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAGCCCTCGGAAC CCTA	358
	***** ** *****	
NC001464	GATTGGGTCCCT 371	
JX885864	GATTGGGTCCCT 371	
JX885865	GATTGGGTCCCT 372	
JX885866	GAGTGGGTCCCT 369	
JX885867	GAGTGGGTCCCT 370	
	** *****	

**Εικόνα 3.8.** Ευθυγράμμιση των απομονώσεων του CEVd από τη λεμονιά «Αδαμοπούλου» (JX885864 και JX885865) και την πορτοκαλιά «PO25» (JX885866 και JX885867), σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς NC001464.

Ακολούθησε σύγκριση των αποκτηθεισών αλληλουχιών με πέντε ελληνικές απομονώσεις του CEVd προερχόμενες από διαφορετικές ποικιλίες λεμονιάς και πορτοκαλιάς (Παράρτημα II). Τα αποτελέσματα των ανωτέρω συγκρίσεων υποδεικνύουν ότι η πλειοψηφία των διαφορών εντοπίζεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 60-100 καθώς και μεταξύ των νουκλεοτιδίων 300-330, δηλαδή κυρίως εντός των ορίων της περιοχής παθογένειας και της κεντρικής περιοχής (Εικόνα 2.3) του γονιδιώματος του CEVd. Τέλος, οι ληφθείσες αλληλουχίες καθώς και οι προερχόμενες από τις



διαθέσιμες ελληνικές απομονώσεις του ιοειδούς αξιοποιήθηκαν για την κατασκευή φυλογενετικού δένδρου (Εικόνα 3.9). Χαρακτηριστική είναι η ομαδοποίηση των αλληλουχιών ως προς το είδος του δένδρου από το οποίο απομονώθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, στο φυλογενετικό δένδρο παρατηρούμε δύο ομάδες: τις αλληλουχίες που προέρχονται από τις πορτοκαλιές (PO25, Όψιμο Ομφαλοφόρο Άργους) και τις αλληλουχίες που προέρχονται από τις λεμονιές (Αδαμοπούλου, Ζαμπετάκη, Nouvel Athos). Εξάιρεση αποτελεί η απομόνωση από την πορτοκαλιά «Navelina» η οποία ομαδοποιείται με τις λεμονιές. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι οι αλληλουχίες της ομάδας των λεμονιών έχουν ομοιότητα με την επιθετική απομόνωση του CEVd (CEVd-A), ενώ στην ομάδα των πορτοκαλιών τοποθετείται η ήπια απομόνωση του CEVd (CEVd-B). Αυτή η ομαδοποίηση επιβεβαιώνει την παρατήρηση των Bernad et al. (2009) ότι ο κάθε ξενιστής επιδρά διαφορετικά στην εξέλιξη του παθογόνου. Η εικόνα από την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών βρίσκεται στο Παράρτημα II.



**Εικόνα 3.9.** Φυλογενετικό δένδρο από τη σύγκριση των τεσσάρων αλληλουχιών της παρούσας μελέτης με πέντε ελληνικές, μια επιθετική (CEVd-A) και μια ήπια (CEVd-B) απομόνωση του CEVd. Για την κατασκευή χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MEGA6 και η μεθοδολογία Neighbor-joining. Ο έλεγχος της στατιστικής εγκυρότητας της τοπολογίας του δένδρου έγινε με 10.000 bootstrap επαναλήψεις. Με κίτρινο κύκλο πλαισιώνεται η ομάδα των λεμονιών και με πορτοκαλί κύκλο η ομάδα των πορτοκαλιών.

### 3.3.2. Έλεγχος τμημάτων του CEVd ως προς την ικανότητα επαγωγής RNA σιώπησης σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το ιοειδές

Σύμφωνα με αναφορές στη βιβλιογραφία, το γονιδιωματικό RNA των ιοειδών ή/και τα ενδιάμεσα προϊόντα του αναπαραγωγικού τους κύκλου μπορεί να αποτελούν ταυτόχρονα επαγωγείς αλλά και στόχους του μηχανισμού της RNA-σιώπησης των φυτών (Gómez et al., 2009). Με βάση αυτή τη θεωρία, είναι πιθανό οι διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος του CEVd να χαρακτηρίζονται από διαφορετική ικανότητα επαγωγής του μηχανισμού RNA σιώπησης. Για να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση, επιλέχθηκαν δύο τμήματα της αλληλουχίας του CEVd, το CEV70-180 και το CEV298-70, προκειμένου να διαπιστωθεί η ικανότητά τους να αποτελούν πηγή ή/και στόχο της RNA-σιώπησης.

Για την δημιουργία των γονιδιακών κατασκευών, υπό μορφή φουρκέτας, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pRNAi-LIC (Xu et al., 2010). Για την προετοιμασία των ενθεμάτων/διαγονιδίων, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, όπου το κάθε ζεύγος προσθέτει, στα άκρα των PCR προϊόντων, αλληλουχίες ομόλογες με αυτές του πλασμιδίου στις θέσεις ένθεσης. Κατ' αυτόν τον τρόπο, παράγονται δύο προϊόντα PCR με διαφορετικά άκρα, γεγονός που εξασφαλίζει την ένθεσή τους στη σωστή θέση και με το σωστό προσανατολισμό. Η κλωνοποίηση με τη χρήση του πλασμιδίου pRNAi-LIC χαρακτηρίζεται ως μέθοδος κλωνοποίησης απαλλαγμένης από το ένζυμο λιγάση (ligation-independent cloning) και υπερτερεί σημαντικά έναντι άλλων χρησιμοποιούμενων μεθόδων. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή είναι πιο αποτελεσματική και γρήγορη σε σχέση με τα συστήματα που χρησιμοποιούν λιγάση, αλλά και χαμηλού κόστους σε σχέση με την πολύ διαδεδομένη μέθοδο GATEWAY (Wesley et al., 2001).

Αρχικά, για την ένθεση των επιλεγμένων τμημάτων του CEVd στο pRNA-LIC, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο των Xu et al. (2010), που βασίζεται στη χρήση της T4 DNA πολυμεράσης για τη δημιουργία μονόκλωνων άκρων στα PCR προϊόντα και στο κομμένο πλασμίδιο (βλέπε λεζάντα Εικ. 3.3). Ωστόσο, δεν κατέστη εφικτή η ένθεση με την τεχνική αυτή, για αδιευκρίνιστους λόγους.

Τελικά, η ένθεση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του In-Fusion HF Cloning Kit (Clontech), χρησιμοποιώντας τα PCR προϊόντα που παράχθηκαν με τους εκκινητές που περιγράφονται από τους Xu et al. (2010), με το χρησιμοποιούμενο ένζυμο να παρουσιάζει δράση ανάλογη με την T4 DNA πολυμεράση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η

κλωνοποίηση με τη μεθοδολογία αυτή απαιτεί τη μεσολάβηση λιγότερων σταδίων και ταυτόχρονα, εξασφαλίζει υψηλή αποτελεσματικότητα. Από το μετασχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων DH5α αποκτήθηκε μικρός αριθμός αποικιών, για τις οποίες επιβεβαιώθηκε η παρουσία των επιθυμητών τμημάτων του CEVd στο πλασμίδιο με την εφαρμογή της άμεσης PCR από την αποικία.

Ακολούθησε αλληλούχηση των πλασμιδίων pRNAi-LIC:CEV70-180 και pRNAi-LIC:CEV298-70 και επιβεβαιώθηκε η παρουσία του σωστού τμήματος του CEVd σε κάθε πλασμίδιο και με το σωστό προσανατολισμό. Επιπλέον, διαπιστώθηκε η σχεδόν πλήρης ομολογία των δύο επαναλήψεων της αλληλουχίας του CEVd στο κάθε πλασμίδιο, γεγονός που εξασφαλίζει τον πλήρη υβριδισμό μεταξύ τους για τη δημιουργία του κορμού (stem) της φουρκέτας (Εικ. 3.10). Η διαφορά που υπάρχει σε ένα νουκλεοτίδιο στο pRNAi-LIC:CEV70-180, πιθανόν οφείλεται σε λάθος της πολυμεράσης κατά την αντιγραφή του DNA ή σε λάθος κατά την αλληλούχηση.

(A)

Range 1: 1 to 111		Graphics		Next Match		Previous M.	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
196 bits(216)	1e-55	110/111(99%)	0/111(0%)	Plus/Minus			
Query	1	CTCCTGTTTCTCCGCTGGACGCCAGTGATCCGCGGGCAGCCGAAGCAGCTGTA	60	ccccccccG			
Sbjct	111	CTCCTGTTTCTCCCTCTGGACGCCAGTGATCCGCGGGCAGCCGAAGCAGCTGTAC	52	ccccccccG			
Query	61	ACCTCGACTTCCTCCAGGTTTCCCGGGGATCCCTGAAGGACTTCTTCCCC	111				
Sbjct	51	ACCTCGACTTCCTCCAGGTTTCCCGGGGATCCCTGAAGGACTTCTTCCCC	1				

(B)

Range 1: 1 to 144		Graphics		Next Match		Previous	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
260 bits(288)	5e-75	144/144(100%)	0/144(0%)	Plus/Minus			
Query	1	CGCCGCCTCTTTTCTTTTCTTTCTGCCTGCAGGGTCAGGTGAGCACCACAGGAACCTCAAG	60				
Sbjct	144	CGCCGCCTCTTTTCTTTTCTTTCTGCCTGCAGGGTCAGGTGAGCACCACAGGAACCTCAAG	85				
Query	61	AAAGATCCCAGGGACCCAAATCTAGGGTTCCGAGGGCTTTCACCCCTCGCCCGGAGAGCAG	120				
Sbjct	84	AAAGATCCCAGGGACCCAAATCTAGGGTTCCGAGGGCTTTCACCCCTCGCCCGGAGAGCAG	25				
Query	121	TGAAGATATAAGAAAAGCGGTTTG	144				
Sbjct	24	TGAAGATATAAGAAAAGCGGTTTG	1				

**Εικόνα 3.10.** Ευθυγράμμιση των δύο επαναλήψεων των τμημάτων του CEVd που εισήχθησαν στο (A) pRNAi-LIC:CEV70-180 και (B) pRNAi-LIC:CEV298-70. Η ευθυγράμμιση έγινε με το λογισμικό Pair-Blast μετά την αλληλούχηση με τους εκκινητές OX13 (query) και OX14 (sbjct).

Στη συνέχεια, τα ελεγμένα πλασμίδια εισήχθησαν σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *A. tumefaciens* EHA105 και τα μετασχηματισμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν

για τον εμποτισμό διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* των σειρών N.b. 32 και N.b. 38-2. Τα φυτά ήταν απόγονοι αυτογονιμοποίησης (T<sub>1</sub> γενιά) των φυτών που αναγεννήθηκαν μετά το μετασχηματισμό με το πλασμίδιο pCdCEVd, που φέρει το διμερές μόριο του CEVd. Στα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας επιβεβαιώθηκε ο επιτυχής πολλαπλασιασμός του ιοειδούς CEVd, μέσω αντιδράσεων RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα RNA με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.

Ο αγρο-εμποτισμός (agroinfiltration) αποτελεί μια γρήγορη και ευέλικτη μέθοδο παροδικής έκφρασης διαγονιδίων, η οποία καθιστά εφικτή τη μελέτη της επίδρασης της έκφρασής τους *in planta*. Τα τελευταία χρόνια, η προσέγγιση αυτή αξιοποιείται συστηματικά για τον έλεγχο της ικανότητας ποικίλων διαγονιδίων να προκαλέσουν ανθεκτικότητα, μέσω της RNA σιώπησης, έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Η μέθοδος περιλαμβάνει την αξιοποίηση αφοπλισμένων πλασμιδίων, που φέρουν τα υπό μελέτη διαγονίδια, και τη μετέπειτα ενσωμάτωσή τους σε κύτταρα του αγροβακτηρίου που δύνανται να μεταφέρουν την T-DNA περιοχή στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου. Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνονται πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης των διαγονιδίων στην αγρο-εμποτισμένη επιφάνεια των φύλλων (Helm et al., 2011).

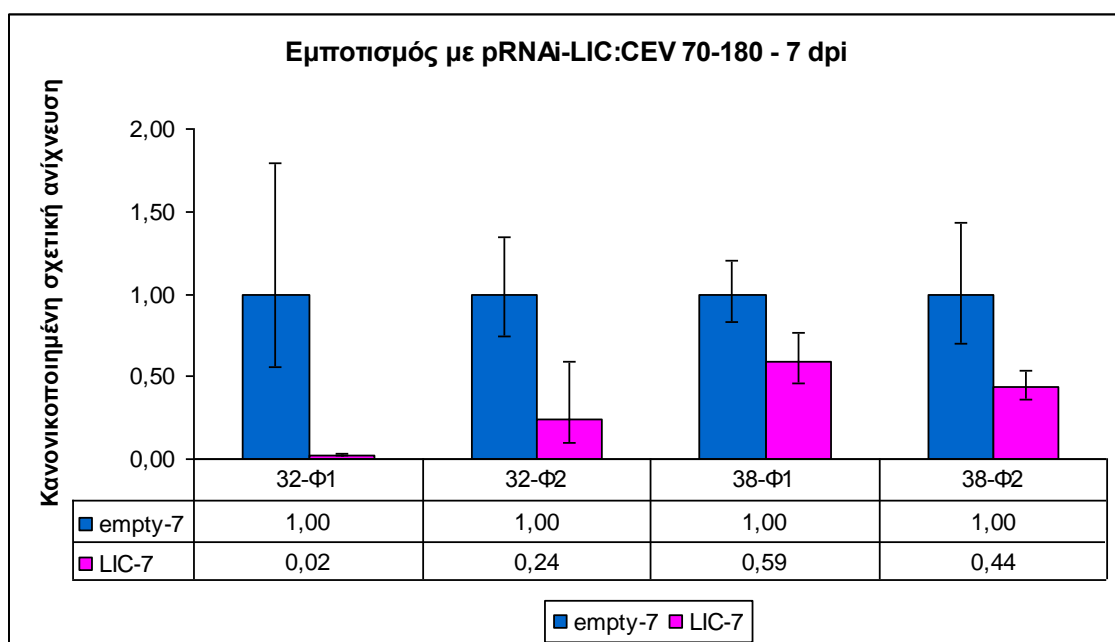
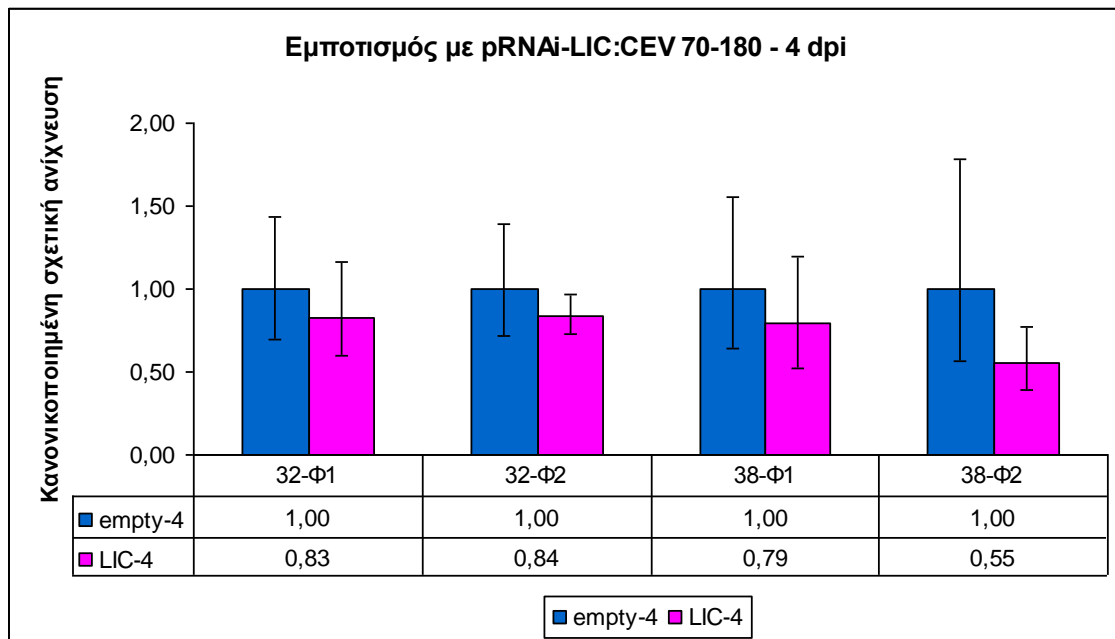
Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε αγρο-εμποτισμός σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το ιοειδές CEVd με τα πλασμίδια pRNAi-LIC:CEV70-180 ή pRNAi-LIC:CEV298-70. Στο ίδιο φύλλο, εμποτίστηκε, ως μάρτυρας, το άδειο πλασμίδιο pRNAi-LIC:empty. Ακολούθησε δειγματοληψία ενός φύλλου, στις 4 και στις 7 ημέρες μετά τον εμποτισμό.

Για τον έλεγχο ενδεχόμενης RNA σιώπησης του ιοειδούς -λόγω της έκφρασης επιλεγμένων αλληλουχιών του- σε φυτά που πολλαπλασιάζουν ενδογενώς το CEVd, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του πολλαπλασιαζόμενου ιοειδούς, μέσω αντιδράσεων Real-time PCR. Οι αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής έγιναν με τον εκκινητή CEVd-Bam-F, προκειμένου να εξασφαλιστεί η αντίστροφη μεταγραφή μόνο του πολλαπλασιαζόμενου ιοειδούς (αρνητική αλυσίδα RNA του ιοειδούς) και όχι το μεταγράφημα του διαγονιδίου του πλασμιδίου ή του διαγονιδιακού φυτού. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης έγινε βάσει της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου *EF-1a*, για το οποίο έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζεται η έκφρασή του από την παρουσία του CEVd (Lisón et al., 2013).

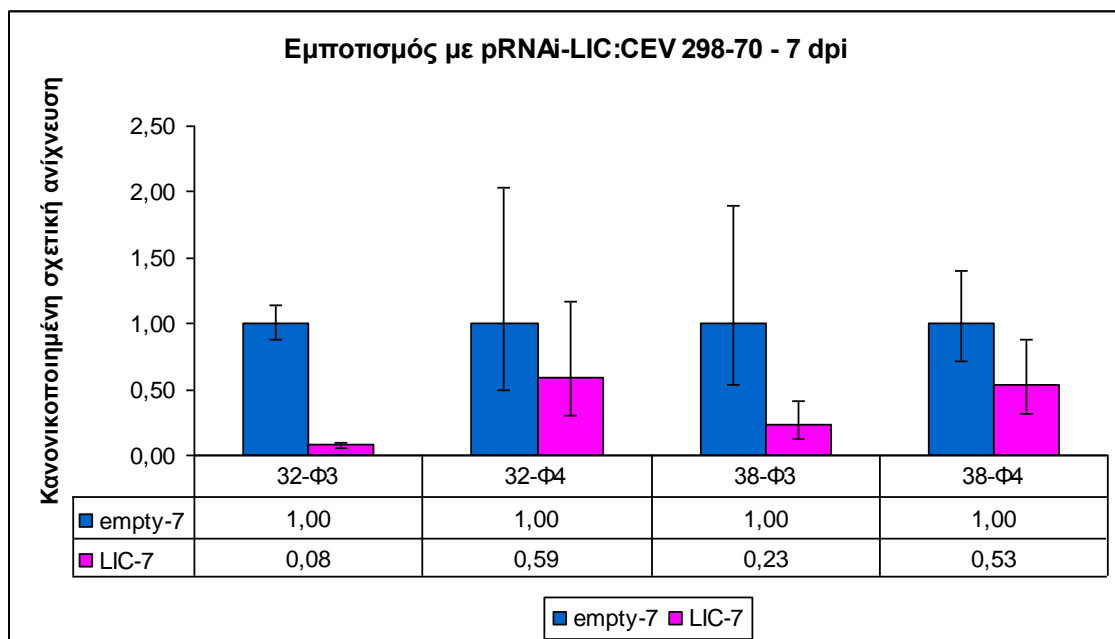
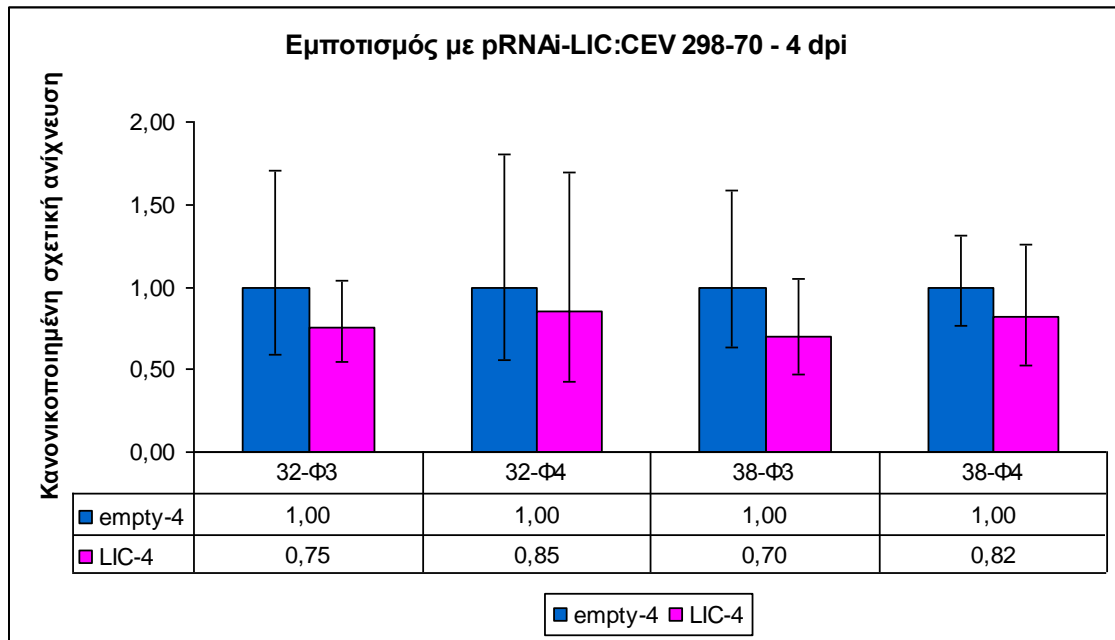
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων της Real-time PCR έγινε για κάθε φυτό και κάθε διαγονιδιακή σειρά ξεχωριστά διότι ο περιορισμένος αριθμός

δειγμάτων (δύο φυτά ανά διαγονιδιακή σειρά) δεν επέτρεπε την εφαρμογή στατιστικής ανάλυσης και την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων της Real-time PCR υποδεικνύουν μειωμένη συσσώρευση του πολλαπλασιαζόμενου ιοειδούς στα φύλλα που εκφράζουν τα προερχόμενα από το CEVd διαγονίδια. Πιο συγκεκριμένα, ο εμποτισμός των διαγονιδιακών φυτών με το τμήμα CEV70-180 προκάλεσε μειωμένα επίπεδα συσσώρευσης του ιοειδούς κατά 16% έως 45% στις τέσσερις ημέρες και κατά 41% έως 98% στις επτά ημέρες μετά τον εμποτισμό (Διάγραμμα 3.1). Αντίστοιχα είναι τα αποτελέσματα και από τον εμποτισμό με το τμήμα CEV298-70, το οποίο προκάλεσε μείωση της συσσώρευσης του ιοειδούς κατά 15% έως 30% στις τέσσερις ημέρες και κατά 41% έως 92% στις επτά ημέρες μετά τον εμποτισμό (Διάγραμμα 3.2).

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα επιλεγμένα τμήματα του CEVd (70-180 και 298-70) έχουν τη δυνατότητα να διεγείρουν το μηχανισμό της RNA σιώπησης εναντίον του ίδιου ιοειδούς, όταν αυτά εκφράζονται *in planta* υπό δομή φουρκέτας. Η διαπίστωση ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού του ιοειδούς κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα για τα δυο τμήματα, υποδεικνύει ότι η θέση τους στο γονιδίωμα του ιοειδούς δεν επηρεάζει σημαντικά την ικανότητά τους να προκαλέσουν σιώπηση του CEVd. Είναι αξιοσημείωτο ότι στις επτά ημέρες μετά τον εμποτισμό, παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση του πολλαπλασιαζόμενου ιοειδούς, γεγονός που υποδηλώνει αύξηση της δράσης σιώπησης με την πάροδο των ημερών μετά τον εμποτισμό.



**Διάγραμμα 3.1.** Σχετικά επίπεδα ανίχνευσης του πολλαπλασιαζόμενου ιοειδούς σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* εμποτισμένα με τα πλασμίδια pRNAi-LIC:empty και pRNAi-LIC:CEV70-180, στις τέσσερις (επάνω) και στις επτά (κάτω) ημέρες μετά τον εμποτισμό. Η ποσότητα του ιοειδούς στα δείγματα που εμποτίστηκαν με το pRNAi-LIC:empty ορίζεται ως 1. Στα γραφήματα παρουσιάζονται οι μέσοι των τριών τεχνικών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις.



**Διάγραμμα 3.2.** Σχετικά επίπεδα αντίχνευσης του πολλαπλασιαζόμενου ιοειδούς σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* εμποτισμένα με τα πλασμίδια pRNAi-LIC:empty και pRNAi-LIC:CEV298-70, στις τέσσερις (επάνω) και στις επτά (κάτω) ημέρες μετά τον εμποτισμό. Η ποσότητα του ιοειδούς στα δείγματα που εμποτίστηκαν με το pRNAi-LIC:empty ορίζεται ως 1. Στα γραφήματα παρουσιάζονται οι μέσοι των τριών τεχνικών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις.

### 3.3.3. Έλεγχος της ικανότητας επαγωγής RNA σιώπησης μέσω παροδικής έκφρασης τμημάτων του CEVd

Η μέθοδος ελέγχου της δυνατότητας των επιλεγμένων τμημάτων του CEVd να επάγουν ανθεκτικότητα, μέσω RNA σιώπησης, στο είδος *N. benthamiana* προϋποθέτει τον προηγούμενο γενετικό μετασχηματισμό των φυτών, ώστε να καταστούν ικανά να πολλαπλασιάζουν το ιοειδές. Δεδομένου του χρόνου που απαιτεί η δημιουργία των διαγονιδιακών φυτών, είναι σαφώς επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης μιας μεθοδολογίας-πρωτοκόλλου για τον αποτελεσματικό έλεγχο μεγαλύτερου αριθμού αλληλουχιών ως υποψήφιων επαγωγέων της RNA σιώπησης. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε ο ταυτόχρονος εμποτισμός (co-infiltration), μέσω του οποίου δίνεται η δυνατότητα να μελετηθεί η αλληλεπίδραση διαφορετικών διαγονιδίων σε ένα φυτικό κύτταρο. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα της προσέγγισης αυτής ως εναλλακτικό εργαλείο ελέγχου της ικανότητας επιλεγμένων τμημάτων του CEVd να επάγουν RNA σιώπηση σε μη διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana*.

Στα πλαίσια αυτά, οι επιλεγμένες αλληλουχίες του CEVd εισήχθησαν σε ειδικό πλασμιδιακό φορέα και συνδέθηκαν με ένα γονίδιο-δείκτη (sensor). Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGDG (Goodin et al., 2002) που φέρει το γονίδιο *rsGFP*. Η επιλογή του συγκεκριμένου πλασμιδίου έγκειται στο γεγονός ότι η θέση του γονιδίου-δείκτη είναι στο 5'- άκρο της θέσης ένθεσης της υπό μελέτη αλληλουχίας, διάταξη που είναι σημαντική σε πειράματα με ιοειδή καθώς δεν διαθέτουν κωδικόνιο έναρξης στην αλληλουχία τους.

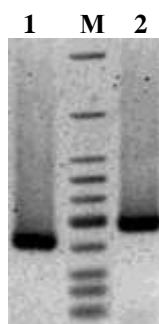
Από τη χρήση των ζευγών εκκινητών IF 70-180-F/R και IF 298-70-F/R προέκυψαν τμήματα του CEVd (Εικ. 3.11, 3.12) εμπλουτισμένα στο 5'- άκρο με νουκλεοτίδια συμπληρωματικά με τα άκρα του κομμένου με το *BamHI* πλασμιδίου pGDG (υπογραμμισμένες αλληλουχίες). Επιπλέον, στα άκρα των τμημάτων του ιοειδούς προστέθηκαν και δύο θέσεις για τα ένζυμα περιορισμού *BglIII* (νουκλεοτίδια με μπλε χρώμα) και *Sall* (νουκλεοτίδια με κόκκινο χρώμα), για πιθανή μελλοντική χρήση.



```
CEV 70-180
cgcgggccccgggatccAGATCTGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTG
GAGGAAGTCGAGGTTCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTTCGCCGCGGATCACTGGCGTCCA
GCGGAGAAACAGGAGGTCGACgggatccaccggatcta
```

```
CEV 298-70
cgcgggccccgggatccAGATCTCAAACCGCTTTTCTTATATCTTCACTGCTCTCCGGGC
GAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTAGATTGGGTCCCTCGGGATCTTTCTTGAGGTTCCT
GTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAAAGAGGCGGCGGTCGACgggatc
caccggatcta
```

**Εικόνα 3.11.** Οι αλληλουχίες των τμημάτων CEV70-180 και CEV298-70, όπως προετοιμάστηκαν για την ένθεση στο πλασμίδιο pGDG. Οι υπογραμμισμένες αλληλουχίες αντιστοιχούν στα ομόλογα άκρα του κομμένου με *Bam*HI πλασμιδίου. Τα νουκλεοτίδια με μπλε χρώμα αντιστοιχούν στις θέσεις περιορισμού με το ένζυμο *Bgl*II ενώ τα νουκλεοτίδια με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στις θέσεις περιορισμού με το ένζυμο *Sal*I.



**Εικόνα 3.12.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με τους εκκινητές IF 70-180-F/R και IF 298-70-F/R για την απομόνωση των αντίστοιχων τμημάτων του CEVd. **1:** CEV70-180, **2:** CEV298-70, **M:** Low MW ladder (NEB).

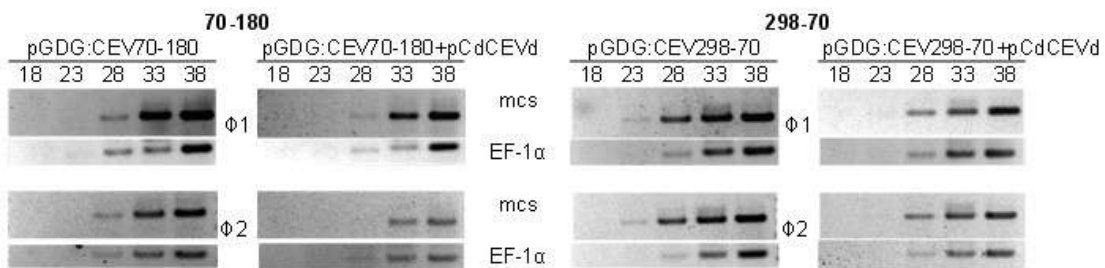
Από τη διαδικασία της κλωνοποίησης των τμημάτων του CEVd σε επιδεικτικά βακτηριακά κύτταρα DH5α προέκυψαν πολλές αποικίες στις οποίες έγινε δειγματοληπτικός έλεγχος, αντίδραση PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων όπου επιβεβαιώθηκε η παρουσία του ενθέματος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμαστικές προσπάθειες αγροεμποτισμού με τα πλασμίδια pGDG:CEV70-180 και με μη μετασχηματισμένα στελέχη αγροβακτηρίου C58C1, EHA105 και GV3101. Σε αυτά τα φυτά, έγινε έλεγχος στις 3 και 7 ημέρες μετά τη μόλυνση με τη χρήση λάμπας UV χειρός αλλά δεν υπήρχε οπτική διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων. Δεδομένου ότι δεν κατέστη εφικτή η οπτική παρατήρηση της έκφρασης του GFP, η ανίχνευση της έκφρασης των τμημάτων του CEVd έγινε με την εφαρμογή αντιδράσεων PCR. Πιθανόν, η συγκεκριμένη αλληλουχία του GFP (*rsGFP*) να μην έχει αρκετά ισχυρή έκφραση για παρατήρηση με γυμνό

οφθαλμό σε αντίθεση με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με ακτίνες laser (laser-scanning confocal microscope), όπως προτείνεται από τους Goodin et al (2002) που κατασκεύασαν το πλασμίδιο pGDG.

Ακολούθησε ταυτόχρονος αγρο-εμποτισμός φυτών *N. benthamiana* αγρίου τύπου με βακτηριακά κύτταρα *A. tumefaciens* C58C1 που φέρουν το πλασμίδιο pGDG:CEV70-180 ή pGDG:CEV298-70 και το πλασμίδιο pCdCEVd, στο οποίο είναι ενσωματωμένο το διμερές μόριο του CEVd. Το πλασμίδιο pCdCEVd χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα. Ακολούθησε δειγματοληψία, 4 ημέρες μετά τον εμποτισμό, απομόνωση RNA και καθαρισμός με DNase. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με τους NADH εκκινητές με τις οποίες επιβεβαιώθηκε η απουσία DNA από τις RNA απομονώσεις. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από φυτό *N. benthamiana*.

Τα απομονωθέντα δείγματα RNA χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία σε αντιδράσεις ημι-ποσοτικής PCR. Για όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε ίση αρχική ποσότητα RNA. Οι αντιδράσεις PCR έγιναν με τη χρήση των mcs-F/R εκκινητών που πολλαπλασιάζουν την περιοχή του ενθέματος του πλασμιδίου pGDG, στην προκειμένη περίπτωση τις αλληλουχίες CEV70-180 και CEV298-70. Με τους συγκεκριμένους εκκινητές επιβεβαιώνεται ότι η μειωμένη ανίχνευση οφείλεται σε εξειδικευμένο κόψιμο του mRNA του ενθέματος και όχι σε αναστολή της μετάφρασής του. Ως μάρτυρας για τη χρήση ίσης ποσότητας RNA χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *EF-1α*.

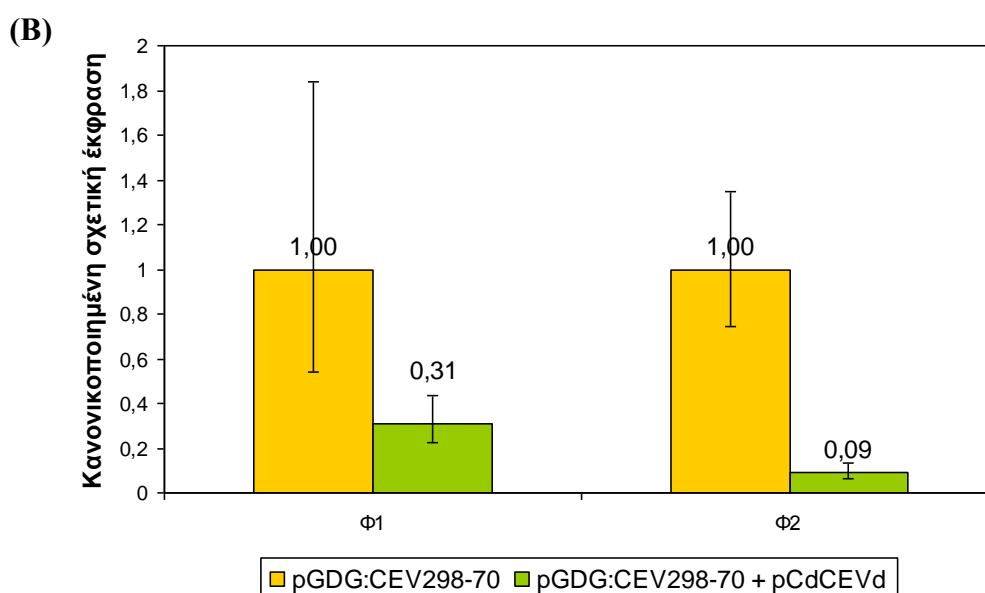
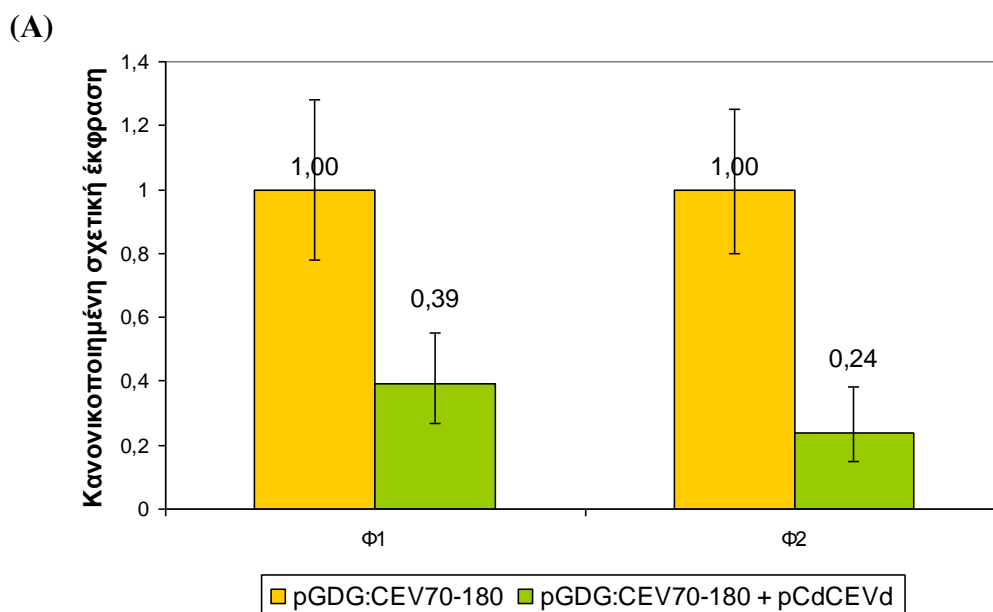


**Εικόνα 3.13.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της ημι-ποσοτικής PCR. Στην πηκτή αγαρόζης φορτώθηκαν 5  $\mu$ l δείγματος που λήφθηκε στους 18, 23, 28, 33 και 38 κύκλους ενίσχυσης. Ως μάρτυρας για τη χρήση ίσης ποσότητας RNA χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *EF-1α*.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.13, ο ταυτόχρονος εμποτισμός των δύο πλασμιδίων (pGDG:CEVxx + pCdCEVd) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση στην ανίχνευση του ενθέματος (CEVxx). Το ίδιο προφίλ συσσώρευσης των ενθεμάτων σημειώθηκε και στα δύο φυτά κάθε πειράματος, καθώς και στους δύο διαφορετικούς συνδυασμούς πλασμιδίων.

Ακολούθησε μια πιο λεπτομερής ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων με την εφαρμογή αντιδράσεων Real-time PCR, οι οποίες παρέχουν τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης της σχετικής έκφρασης των ενθεμάτων. Οι αντιδράσεις Real-time PCR επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της ημι-ποσοτικής PCR. Πιο συγκεκριμένα, η ταυτόχρονη έγχυση του διμερούς μορίου του CEVd (pCdCEVd) με το πλασμίδιο pGDG:CEV70-180 οδήγησε σε μειωμένη έκφραση του διαγονιδίου CEV 70-180 κατά 61% και 76% σε σχέση με το μάρτυρα στα φυτά 1 και 2, αντίστοιχα (Διάγραμμα 3.3 A). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και από την ταυτόχρονη έγχυση του pCdCEVd με το πλασμίδιο pGDG:CEV298-70, οπότε παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του διαγονιδίου CEV298-70 κατά 69% έως και 91% σε σχέση με το μάρτυρα (Διάγραμμα 3.3 B).

Τα ευρήματα από την προσέγγιση αυτή συμπίπτουν πλήρως με αυτά που προέκυψαν από τον εμποτισμό διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που πολλαπλασίαζαν το CEVd με τα επιλεγμένα τμήματα του ιοειδούς υπό μορφή φουρκέτας. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ο ταυτόχρονος εμποτισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προκαταρκτικά πειράματα για τον γρήγορο έλεγχο της δυνατότητας επαγωγής σιώπησης από επιλεγμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου θα ήταν ακόμα λιγότερο χρονοβόρα εάν είχε επιτευχθεί η οπτική παρατήρηση της σιώπησης του GFP.



**Διάγραμμα 3.3.** Ποσοτική σύγκριση της έκφρασης των τμημάτων (A) CEV70-180 και (B) CEV298-70, τέσσερις ημέρες μετά τον αγρο-εμποτισμό. Η έκφραση στους μάρτυρες (pGDG:CEV70-180 και pGDG:CEV298-70) ορίζεται ως 1. Τα επίπεδα έκφρασης των εμποτισμένων και με το pCdECVd φυτών εκφράζονται σε σχέση με την τιμή του μάρτυρα. Στα γραφήματα παρουσιάζονται οι μέσοι των τριών τεχνικών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις.

### 3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ιοειδή αποτελούν ισχυρούς επαγωγείς του μηχανισμού της RNA σιώπησης εξαιτίας του υψηλού βαθμού συμπληρωματικότητας των νουκλεοτιδίων τους και του τρόπου πολλαπλασιασμού τους. Ως αποτέλεσμα, σε πολλά μολυσμένα φυτά αναφέρεται η ύπαρξη μικρών RNAs, μεγέθους 21-24 νουκλεοτίδια, που προέρχονται από τα ιοειδή (viroid-derived sRNAs) (Itaya et al., 2001; Gómez and Pallas, 2007). Τα εν λόγω RNAs είναι πιθανόν υπεύθυνα για την εκδήλωση συμπτωμάτων σε φυτά-ξενιστές, εξαιτίας της σιώπησης που προκαλούν στα ομόλογα mRNAs τους (Papaefthimiou et al., 2001). Παρόλα αυτά, έχει διαπιστωθεί ότι τα μικρά RNAs δεν είναι ικανά να αναστείλουν πλήρως τον *in planta* πολλαπλασιασμό των ιοειδών, εξαιτίας μηχανισμών άμυνας που διαθέτουν τα τελευταία, οι οποίοι ωστόσο παραμένουν αδιευκρίνιστοι (Itaya et al., 2007). Αντίθετα, έχει βρεθεί ότι όταν τα μικρά RNAs παράγονται μετά από ένθεση στο φυτό αλληλουχιών του ιοειδούς υπό μορφή φουρκέτας (hp-siRNAs) προκαλούν σιώπηση του RNA γονιδιώματος του ιοειδούς (Schwind et al., 2009). Συνεπώς, η αξιοποίηση του μηχανισμού της RNA σιώπησης αποτελεί ίσως έναν αποτελεσματικό τρόπο ανάπτυξης διαγονιδιακών φυτών που παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα έναντι των ιοειδών.

Η αξιόπιστη επιλογή τμημάτων του CEVd που δύνανται να προκαλέσουν RNA σιώπηση του ιοειδούς απαιτεί αρχικά την απομόνωση και αλληλούχηση στελεχών του CEVd που έχουν ανιχνευτεί σε διαθέσιμα δενδρύλλια. Προς αυτή την κατεύθυνση, αλληλουχήθηκαν οι απομονώσεις του CEVd από δύο διαφορετικά είδη εσπεριδοειδών, μια λεμονιά και μια πορτοκαλιά. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την ύπαρξη διαφορών, τόσο μεταξύ των απομονώσεων που προέρχονταν από το ίδιο είδος όσο και από τα δύο διαφορετικά είδη, γεγονός που είναι ενδεικτικό των μεταλλάξεων που υφίστανται τα ιοειδή κατά την πορεία συνεξέλιξής τους με τα φυτά-ξενιστές (Bernad et al., 2009). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα συγκρίσεων με άλλες ελληνικές απομονώσεις του CEVd που προέρχονταν από διαφορετικές ποικιλίες λεμονιάς και πορτοκαλιάς. Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες όπου αναφέρεται ότι η πλειοψηφία των διαφορών εντοπίζεται στην περιοχή παθογένειας (Owens et al., 2003; Bernad et al., 2009). Η περιοχή αυτή θεωρείται ότι εμπλέκεται στην έκφραση των συμπτωμάτων αλλά και στην άμυνα των ιοειδών έναντι της RNA σιώπησης. Επιπλέον, ορισμένες μεταλλάξεις, όπως η παρουσία μίας επιπλέον

αδενίνης στη θέση 62 (στις αλληλουχίες JX885864 και JX885865), φαίνεται ότι σχετίζονται με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού του CEVd (Hajeri et al., 2011).

Επιπρόσθετα, στο φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάστηκε διαπιστώνεται ομαδοποίηση των απομονώσεων με βάση το φυτικό είδος. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη ότι η εξέλιξη των ιοειδών επηρεάζεται σημαντικά από τον ξενιστή στον οποίο λαμβάνει χώρα ο πολλαπλασιασμός τους, γεγονός που πιθανότατα αποδίδεται στην ασκούμενη πίεση επιλογής από μέρους του ξενιστή. Η τελευταία, δρα συνήθως υπέρ της αύξησης του ρυθμού μεταλλάξεων στο RNA του ιοειδούς και την εδραίωση των παθογόνων τύπων που εμφανίζουν σημαντικό πλεονέκτημα προσαρμογής (Bernad et al., 2009). Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι οι ελληνικές απομονώσεις του CEVd που έχουν απομονωθεί από τις λεμονιές ομαδοποιούνται με μια επιθετική φυλή του CEVd, ενώ η ομάδα των πορτοκαλιών, με εξαίρεση τη Navelina, ομαδοποιείται με μια ήπια φυλή του ιοειδούς. Στο σύνολό τους, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικής γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των ελληνικών απομονώσεων του CEVd, η οποία μάλιστα αντανακλάται και στο διαφορετικό βαθμό μολυσματικότητας. Τα ανωτέρω, σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη τάση αντικατάστασης της ανθεκτικής νεραντζιάς από τα ευαίσθητα στα ιοειδή υβρίδια της τρίπτερης πορτοκαλιάς, καθιστούν επιτακτική την ανάγκη εξεύρεσης αποτελεσματικών λύσεων για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που ανακύπτουν από ασθένειες που οφείλονται στα ιοειδή.

Τα τελευταία χρόνια, είναι σαφώς έκδηλη μία συνεχώς αυξανόμενη τάση αξιοποίησης του μηχανισμού της RNA σιώπησης για την ανάπτυξη διαγονιδιακής ανθεκτικότητας έναντι πληθώρας ασθενειών. Προς την κατεύθυνση αυτή, έχει αποδειχθεί ότι η αποτελεσματική επαγωγή της RNA σιώπησης απαιτεί την παρουσία δίκλωνων μορίων RNA, τα οποία θεωρείται ότι επάγουν την ενεργοποίηση του μηχανισμού. Τα τελευταία, μπορεί να έχουν διάφορες μορφές, ωστόσο η δομή φουρκέτας θεωρείται ως η πιο αποτελεσματική (Helliwell and Waterhouse, 2005). Στην παρούσα εργασία, για την κατασκευή των φουρκετών χρησιμοποιήθηκαν τμήματα της αλληλουχίας του CEVd και όχι ολόκληρο το γονιδίωμα του καθώς έχει αποδειχθεί ότι διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν την πλήρη ή σχεδόν πλήρη αλληλουχία του PSTVd, υπό τη μορφή φουρκέτας, παρουσίαζαν συμπτωματολογία ανάλογη με αυτή των μολυσμένων με το ιοειδές φυτών αγρίου τύπου (Wang et al., 2004).

Τα τμήματα που επιλέχθηκαν για τη μελέτη της πιθανής επαγωγής RNA σιώπησης προέρχονταν από δύο διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος του CEVd. Το

τμήμα CEV 70-180 περιέχει την κεντρική συντηρημένη περιοχή (central), το μεταβλητό τομέα (variable) και τον τομέα του δεξιού άκρου (right terminal) και έχει βρεθεί ότι παράγει μεγάλο αριθμό sRNAs (Martín et al., 2007). Αντίθετα, το τμήμα CEV 298-70, το οποίο περιλαμβάνει την περιοχή παθογένειας (pathogenicity) και το αριστερό άκρο (left terminal), παράγει πολύ λιγότερα sRNAs, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτή η περιοχή είναι περισσότερο ανθεκτική στη δράση των ενζύμων DICER (Martín et al., 2007; Bernad et al., 2009). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη εξειδίκευσης των διαφορετικών τύπων πρωτεϊνών Αργοναυτών ως προς την ικανότητα πρόσδεσής τους με συγκεκριμένα sRNAs (διαφορετικό νουκλεοτίδιο στο 5'- άκρο) (Mi et al., 2008). Είναι συνεπώς αναμενόμενο, η συσσώρευση sRNAs από διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος του CEVd να σχετίζεται με την *in planta* διαθεσιμότητα των διαφόρων τύπων των πρωτεϊνών Αργοναυτών (Schwind et al., 2009).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σε πολλές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η παρουσία ενός ιοειδούς προκαλεί τη συσσώρευση μικρών RNAs, προερχόμενων από το ιοειδές (viroid-derived siRNAs), τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σιώπηση σε αλληλουχίες του ιοειδούς αλλά όχι στις βιολογικές μορφές αυτού, πιθανόν λόγω της δευτεροταγούς δομής του (Itaya et al., 2007; Gómez and Pallás, 2007). Ανάλογα ευρήματα επιτυχούς σιώπησης σημειώθηκαν και στα πειράματα παροδικής έκφρασης της παρούσας μελέτης, όπου έγινε ταυτόχρονος εμποτισμός του διμερούς μορίου του CEVd και των επιλεγμένων τμημάτων του ιοειδούς συζευγμένα με ένα γονίδιο-δείκτη. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το ιοειδές αποτελεί υπόστρωμα για την παραγωγή siRNAs, τα οποία προέρχονται από διαφορετικά τμήματα του ιοειδούς, συμπεριλαμβανομένων των επιλεγμένων περιοχών. Αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι η επαγωγή σιώπησης των αντίστοιχων τμημάτων. Επιπλέον, τα ευρήματα αυτά παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ο ταυτόχρονος εμποτισμός μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστη μέθοδο για τον προκαταρκτικό έλεγχο της ικανότητας επιλεγμένων αλληλουχιών των ιοειδών να επάγουν τα βιοχημικά μονοπάτια της RNA σιώπησης.

Σε νεότερες μελέτες, διαπιστώθηκε ότι και τα ώριμα RNAs των ιοειδών (βιολογικές μορφές) μπορούν να αποτελούν στόχους του μηχανισμού της RNA σιώπησης. Στο πλαίσιο αυτό, οι Carbonell et al. (2008) παρατήρησαν σημαντική μείωση της μολυσματικότητας των ιοειδών, έπειτα από εμποτισμό του ιοειδούς ταυτόχρονα με α) μεγάλη ποσότητα ομόλογου δίκλωνου RNA ή β) siRNAs που προέρχονταν από τα ιοειδή και είχαν παραχθεί *in vitro*. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν στην υπόθεση ότι τα siRNAs (που παρέχονται άμεσα στο φυτό ή παράγονται από την

επεξεργασία του δίκλωνου RNA) προσδένονται στο σύμπλεγμα RISC και αποδομούν το ομόλογο RNA του ιοειδούς εντός του κυτταροπλάσματος κατά τη φάση της διακυτταρικής κίνησής του και όχι στον πυρήνα, όπου λαμβάνει χώρα η αναπαραγωγή και συσσώρευσή του (Carbonell et al., 2008). Ως εναλλακτική προσέγγιση, οι Schwind et al. (2009) πέτυχαν αποτελεσματική σιώπηση μέσω της έκφρασης της αλληλουχίας του ιοειδούς, υπό μορφή φουρκέτας (hpRNA), στο φυτό. Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι η αποτελεσματική σιώπηση προϋποθέτει τη διαθεσιμότητα επαρκούς ποσότητας siRNAs στο κατάλληλο στάδιο της μόλυνσης και στο σωστό υποκυτταρικό διαμέρισμα (Schwind et al., 2009).

Αντίστοιχα ευρήματα αποτελεσματικής σιώπησης σημειώθηκαν στα πειράματα της παρούσας μελέτης, όπου ο εμποτισμός διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το ιοιδές με δίκλιωνα μόρια του CEVd (hpRNA) οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιαζόμενου ιοειδούς. Η μείωση αυτή είναι ενδεικτική της παραγωγής εξειδικευμένων siRNAs τα οποία είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του μηχανισμού σιώπησης που τελικά οδηγεί στην εκδήλωση ανθεκτικότητας έναντι του ιοειδούς. Το ποσοστό αναστολής του πολλαπλασιασμού κυμάνθηκε σε παρόμοιο επίπεδο για τα δύο επιλεγμένα τμήματα του CEVd. Αντίστοιχα πειράματα με φυτά *N. benthamiana* που εξέφραζαν τμήματα του PSTVd υπό μορφή φουρκέτας, κατέδειξαν την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι του ιοειδούς σε όλες τις διαγονιδιακές σειρές, με μικρές διαφορές μεταξύ των τμημάτων του ιοειδούς ως προς την ικανότητα επαγωγής της RNA σιώπησης (Adkar-Purushothama et al., 2015). Ωστόσο, είναι πιθανό σε μεταγενέστερα στάδια να μειώνεται η επίδραση της σιώπησης, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις, αλλά παραμένει ανεξήγητο (Carbonell et al., 2008; Kasai et al., 2013; Adkar-Purushothama et al., 2015).

Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής ενότητας ενισχύουν την υπόθεση ότι ο μηχανισμός της RNA σιώπησης μπορεί να αξιοποιηθεί ως μία αποτελεσματική στρατηγική για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι των ιοειδών. Επιπρόσθετα, παρέχονται ισχυρές ενδείξεις ως προς την ικανότητα των δύο επιλεγμένων τμημάτων του CEVd να επάγουν σιώπηση στο πολλαπλασιαζόμενο ιοιδές. Δεδομένου ότι οι σχετικές αναφορές στη βιβλιογραφία αφορούν σε μόνο δύο εργασίες, οι οποίες ωστόσο χρησιμοποιούν παλαιότερες μεθοδολογίες (Atkins et al., 1995; Carbonell et al., 2008), η παρούσα μελέτη συμβάλει καθοριστικά στην απόκτηση βασικής γνώσης σχετικά με τη δυνατότητα εφαρμογής της RNA σιώπησης εναντίον του CEVd. Αν και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υπογραμμίζουν την



αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιούμενης προσέγγισης για την αντιμετώπιση του ιοειδούς CEVd, η εξασφάλιση της αξιοπιστίας της μεθόδου απαιτεί σαφώς την αξιολόγηση μεγαλύτερου αριθμού φυτών ή/και γονιδιωματικών τμημάτων του ιοειδούς. Επίσης, κρίνεται σκόπιμη η ανίχνευση των παραγόμενων siRNAs στα ανθεκτικά στο ιοειδές φυτά, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η ανθεκτικότητα έγκειται στην ενεργοποίηση του μηχανισμού RNA σιώπησης.

Τέλος, η παραγωγή φυτών στα οποία είναι *a priori* ενεργοποιημένος ο μηχανισμός της RNA σιώπησης παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης εξειδικευμένων siRNAs πριν από τη μόλυνση και μελέτης της εξέλιξης της ασθένειας. Δεδομένου βέβαια ότι το είδος *N. benthamiana* δεν μολύνεται μηχανικά με το ιοειδές, η προσέγγιση αυτή μπορεί να λάβει χώρα στα εσπεριδοειδή που συνιστούν φυσικούς ξενιστές του ιοειδούς CEVd.

### 3.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adkar-Purushothama CR, Kasai A, Sugawara K, et al (2015) RNAi mediated inhibition of viroid infection in transgenic plants expressing viroid-specific small RNAs derived from various functional domains. *Sci Rep.* 5:17949.
- Asai S, Ohta K, Yoshioka H (2008) MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 20:1390–1406.
- Atkins D, Young M, Uzzell S, et al (1995) The expression of antisense and ribozyme genes targeting *citrus exocortis viroid* in transgenic plants. *J Gen Virol* 76:1781–1790.
- Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431:356–363.
- Bernad L, Duran-Vila N, Elena SF (2009) Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of citrus *exocortis viroid*. *J Gen Virol* 90:2040–2049.
- Carbonell A, Martínez de Alba A-E, Flores R, Gago S (2008) Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* 371:44–53.
- Conejero V (2003) Viroids and gene silencing. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semencik JS (ed) *Viroids*. CSIRO Publishing, Australia, pp 67-70.
- Daròs J-A, Flores R (2004) *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6792–7.
- Denti MA, Boutla A, Tsagris M, Tabler M (2004) Short interfering RNAs specific for *potato spindle tuber viroid* are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *Plant J* 37:762–769.
- Gómez G, Martínez G, Pallas V (2009) Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends Plant Sci.* 14:264-269.
- Gómez G, Pallás V (2007) Mature monomeric forms of *Hop stunt viroid* resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J* 51:1041–9.
- Goodin MM, Dietzgen RG, Schichnes D, et al (2002) pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *Plant J* 31:375–83.
- Gross HJ, Krupp G, Domdey H, et al (1982) Nucleotide sequence and secondary structure of *citrus exocortis* and *chrysanthemum stunt viroid*. *Eur J Biochem* 121:249–57.

- Hajeri S, Ramadugu C, Manjunath K, et al (2011) *In vivo* generated *Citrus exocortis viroid* progeny variants display a range of phenotypes with altered levels of replication, systemic accumulation and pathogenicity. *Virology* 417:400–409.
- Helliwell CA, Waterhouse PM (2005) Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods Enzymol.* pp 24–35.
- Helm JM, Dadami E, Kalantidis K (2011) Local RNA silencing mediated by agroinfiltration. In: Kodama H, Komamine A (eds) *RNAi plant gene function and analysis*. Springer Science, pp 97–108.
- Itaya A, Folimonov A, Matsuda Y, et al (2001) *Potato spindle tuber viroid* as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 14:1332–1334.
- Itaya A, Zhong X, Bundschuh R, et al (2007) A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J Virol* 81:2980–2994.
- Ito T, Ieki H, Ozaki K, Ito T (2000) A population of variants of a viroid closely related to *citrus viroid-I* in citrus plants. *Arch Virol* 145:2105–2114.
- Ito T, Ieki H, Ozaki K (2002) Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 106:235–239.
- Kasai A, Sano T, Harada T (2013) Scion on a stock producing siRNAs of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. *PLoS One* 8:e57736.
- Kovalskaya N, Hammond RW (2014) Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Sci* 228:48–60.
- Lisón P, Tárraga S, López-Gresa P, et al. (2013) A noncoding plant pathogen provokes both transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato. *Proteomics* 13: 833–844.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25:402–408.
- Mallory A, Vaucheret H (2010) Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22:3879–3889.
- Martín R, Arenas C, Daròs J-A, et al (2007) Characterization of small RNAs derived from *Citrus exocortis viroid* (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* 367:135–46.
- Martin RR, Tzanetakis IE (2013) High risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: implications for certification, nurseries, and fruit production. *Plant Dis* 97:1358–1362.

- Matoušek J, Schroder AR, Trnena L et al. (1994) Inhibition of viroid infection by antisense RNA expression in transgenic plants. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 375:765–777.
- Mi S, Cai T, Hu Y, et al (2008) Sorting of small RNAs into Arabidopsis Argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133:116–127.
- Navarro B, Gisel A, Rodio M-E, et al (2012) Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie* 94:1474–80.
- Owens RA, Thompson SM, Kramer M (2003) Identification of neutral mutants surrounding two naturally occurring variants of *Potato spindle tuber viroid*. *J Gen Virol* 84:751–756.
- Papaefthimiou I, Hamilton AJ, Denti MA, et al (2001) Replicating *Potato spindle tuber viroid* RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res* 29:2395–2400.
- Rott ME, 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. *Eur J Plant Pathol* 107:411–420.
- Sambrook J, Russell DW (2006) Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: miniprep. *CSH Protoc.* 1.
- Schöb H, Kunz C, Meins F (1997) Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Mol Gen Genet* 581–585.
- Schwind N, Zwiebel M, Itaya A, et al (2009) RNAi-mediated resistance to *Potato spindle tuber viroid* in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. *Mol Plant Pathol* 10:459–469.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, et al (2011) Fast, scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:1-6.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729.
- Visvader JE, Symons RH (1983) Comparative sequence and structure of different isolates of *citrus exocortis viroid*. *Virology* 130:232-237.
- Visvader JE, Symons RH (1985) Eleven new sequence variants of *citrus exocortis viroid* and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Res* 13:2907–2920.
- Wang M-B, Bian X-Y, Wu L-M, et al (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3275–80.

- Wang J, Boubourakas IN, Voloudakis AE, et al (2013) Identification and characterization of known and novel viroid variants in the Greek national citrus germplasm collection: threats to the industry. *Eur J plant Pathol J plant Pathol* 137:17–27.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, et al (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27:581–90.
- Xu G, Sui N, Tang Y, et al (2010) One-step, zero-background ligation-independent cloning intron-containing hairpin RNA constructs for RNAi in plants. *New Phytol* 187:240–50.
- Yang X, Yie Y, Zhu F, et al (1997) Ribozyme-mediated high resistance against *potato spindle tuber viroid* in transgenic potatoes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4861–4865.

<http://www.uni-konstanz.de/FuF/chemie/jhartig/>

## **Κεφάλαιο 4. Παραγωγή διαγονιδιακών εσπεριδοειδών που εκφράζουν τμήματα του ιοειδούς CEVd ή τμήμα της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού CPsV**

### **4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

#### **4.1.1. Η εφαρμογή της RNA σιώπησης στις δενδρώδεις καλλιέργειες**

Εξαιτίας της μεγάλης διάρκειας ζωής τους, οι δενδρώδεις καλλιέργειες παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στις ιολογικές ασθένειες. Οι Scorza et al. (2001) ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν ότι ο μηχανισμός της μετα-μεταγραφικής σιώπησης (PTGS) μπορεί να λειτουργήσει αποτελεσματικά στη βελτίωση της ανθεκτικότητας των δενδρωδών καλλιεργειών έναντι των ιών. Πιο συγκεκριμένα, διαγονιδιακά φυτά δαμασκηνιάς που εξέφραζαν το γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού της Ευλογιάς των πυρηνοκάρπων (*plum pox virus*, PPV) παρουσίαζαν υψηλή ανθεκτικότητα στον ιό (Scorza et al., 2001). Σε φυτά καρυδιάς, η RNA σιώπηση δύο συντηρημένων γονιδίων του ογκογόνου βακτηρίου *A. tumefaciens*, συνέβαλλε στην αύξηση της ανθεκτικότητά τους στην ασθένεια του όγκου του λαιμού (crown gall) (Escobar et al., 2002). Επιπλέον, η σιώπηση των ίδιων γονιδίων σε διαγονιδιακά φυτά μηλιάς είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη ανθεκτικότητα στην ασθένεια (Viss et al., 2003).

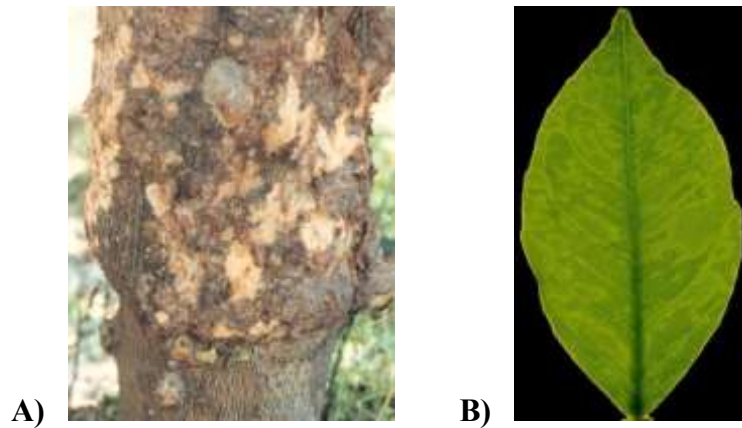
Στην ιστορία των διαγονιδιακών εσπεριδοειδών, οι περισσότερες μελέτες αφορούν τη δημιουργία φυτών ανθεκτικών στην πολύ καταστρεπτική ασθένεια της τριστέτσας (CTV). Η πρώτη προσπάθεια έγινε το 2000 από τους Domínguez et al., αλλά οι μελέτες συνεχίζονται μέχρι σήμερα από διάφορες ερευνητικές ομάδες καθώς δεν έχει βρεθεί ακόμα μια μέθοδος που να εξασφαλίζει πλήρη και σταθερή ανθεκτικότητα στον ιό. Επιπλέον, η αξιολόγηση των παραγόμενων διαγονιδιακών φυτών καθυστερεί πολύ εξαιτίας της αργής ανάπτυξης και της μακράς περιόδου νεανικότητας που χαρακτηρίζει τα εσπεριδοειδή. Εναντίον της τριστέτσας έχουν δοκιμαστεί διάφορα διαγονίδια, όπως η καψιδιακή πρωτεΐνη, μια μη-μεταφραζόμενη εκδοχή της καψιδιακής πρωτεΐνης, η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του ιού, τα γονίδια του ιού *p20*, *p23* και *p27*, το 3' άκρο του γονιδιωματικού RNA του ιού καθώς και συνδυασμοί των παραπάνω (Domínguez et al., 2002; Febres et al., 2003; López et al., 2010). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι διαγονιδιακά φυτά πορτοκαλιάς που φέρουν, σε μορφή φουρκέτας, την αλληλουχία που κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη (CP) του

ιού της ψώρωσης των εσπεριδοειδών (*Citrus psorosis virus*, CPsV) παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στον ιό (Reyes et al., 2011a). Τα τελευταία χρόνια, οι έρευνες έχουν στραφεί και σε άλλα παθογόνα, όπως το φυτόπλασμα *Candidatus Liberibacter asiaticus* και το βακτήριο *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, έναντι των οποίων έχει δοκιμαστεί πληθώρα γονιδίων προερχόμενων από έντομα, βακτήρια αλλά και από φυτά του είδους *A. thaliana* και *N. benthamiana* (Boscariol et al., 2006; Barbosa-Mendes et al., 2009; Dutt et al., 2015; Hao et al., 2015).

Παρά την αποτελεσματικότητα της RNA σιώπησης στην αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι ιολογικών ασθενειών, η φύση των πολυετών φυτών δυσχεραίνει τα σχετικά πειράματα με αποτέλεσμα την αξιοποίηση φυτών-μοντέλων. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των ιοειδών, όπου όλες οι δημοσιευμένες εργασίες αφορούν πειράματα σε ποώδη μονοετή φυτά, όπως τα *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *A. thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Gynura aurantiaca* και *Dendranthema grandiflora*.

#### **4.1.2. Η ασθένεια της ψώρωσης των εσπεριδοειδών**

Η ψώρωση των εσπεριδοειδών προκαλείται από τον ομώνυμο ιό *Citrus psorosis virus* (CPsV). Πρόκειται για την πρώτη ίωση των εσπεριδοειδών που μελετήθηκε και περιγράφηκε στην Καλιφόρνια τη δεκαετία του 1930. Το τυπικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι η απολέπιση του φλοιού του κορμού και των κλάδων που συχνά συνοδεύεται από έκκριση κόμμεως από το ξύλο (Roistacher, 1993). Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν την εμφάνιση χλωρωτικών κηλίδων και δακτυλίων στα νεαρά φύλλα και τους καρπούς (Martín et al., 2004). Έχουν περιγραφεί δύο είδη ψώρωσης: η Α και η Β. Η ψώρωση Α είναι η πιο διαδεδομένη μεταξύ των δύο και χαρακτηρίζεται κυρίως από τα συμπτώματα στο φλοιό, ενώ η ψώρωση Β είναι πιο επιθετική και προκαλεί έντονα συμπτώματα στο φλοιό, στα ώριμα φύλλα και τους καρπούς. Η επιδημιολογική εξέλιξη της ασθένειας υπό συνθήκες αγρού, είναι ιδιαίτερος αργή, με αποτέλεσμα συχνά τα συμπτώματα να εμφανίζονται 10-15 χρόνια μετά τη μόλυνση. Τα είδη που προσβάλλονται περισσότερο είναι η πορτοκαλιά, η μανταρινιά και το γκρέιπ-φρουτ, αλλά πολλά ακόμα είδη, συμπεριλαμβανομένων της λεμονιάς και της νεραντζιάς, παρουσιάζουν τα τυπικά συμπτώματα στα φύλλα χωρίς αλλοιώσεις στο φλοιό (Milne et al., 2003). Συνήθως, τα δένδρα δεν νεκρώνονται από την ασθένεια αλλά παρουσιάζουν σταδιακά εντονότερα συμπτώματα μαρασμού και τελικά καθίστανται μη παραγωγικά (Achachi et al., 2014).



**Εικόνα 4.1.** Τυπικά συμπτώματα της ψώρωσης των εσπεριδοειδών: Α) απολέπιση φλοιού σε κορμό πορτοκαλιάς, Β) χλωρωτικές κηλίδες σε νεαρό φύλλο. (Πηγή: Milne et al., 2003)

Ο ιός της ψώρωσης μεταδίδεται μέσω μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού που προέρχεται από ασυμπτωματικά δένδρα. Μηχανική μετάδοση έχει αναφερθεί κυρίως σε ποώδη φυτά (*Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa*), ενώ δεν υπάρχουν αποδείξεις για μετάδοση μέσω του σπόρου (Roistacher, 1993; Milne et al., 2003). Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές αναφορές για φυσική μετάδοση του ιού στον αγρό. Στον παρελθόν, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι οι αφίδες είναι πιθανοί φορείς του ιού στην Αργεντινή (Derrick and Barthe, 2000). Σε πιο πρόσφατη έρευνα αναφέρεται ότι ο ιός της ψώρωσης μεταδίδεται φυσικά μέσω ενός ωομύκητα του γένους *Olpidium* που προσβάλλει τις ρίζες των δένδρων (Palle et al., 2005).

Στην Ελλάδα, η εν λόγω ιολογική ασθένεια είναι γνωστή ήδη από τη δεκαετία του 1950 και είναι αρκετά διαδεδομένη σε παλαιούς οπωρώνες πορτοκαλιάς και μανταρινιάς, σε όλες σχεδόν τις περιοχές καλλιέργειας των εσπεριδοειδών (Αργολίδα, Κορινθία, κ.α.) (Κυριακοπούλου και Δήμου, 2008). Τα τελευταία χρόνια, η ανανέωση των φυτειών με εμβόλια προερχόμενα από προγράμματα εξυγίανσης της Κορσικής και της Καλιφόρνιας συνέβαλλε ουσιαστικά στον περιορισμό της ασθένειας στους ελληνικούς οπωρώνες (Kyriakopoulou, 2002).

Η αποτελεσματική αντιμετώπιση της ψώρωσης παραδοσιακά βασίζεται κυρίως στη χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Η απόκτηση τέτοιου υλικού εξασφαλίζεται με την εφαρμογή θερμοθεραπείας σε μοσχεύματα σε συνδυασμό με τον *in vitro* εμβολιασμό μεριστωμάτων (Carvalho et al., 2002). Επιπλέον, η σωματική εμβρυογένεση μπορεί να εξασφαλίσει την παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από το CPsV (D'Onghia et al., 2001).



Η διασταυρωτή προστασία είναι μια ακόμα πρακτική που έχει δοκιμαστεί με επιτυχία στην αντιμετώπιση του CPsV. Η μόλυνση των φυτών με ένα λιγότερο μολυσματικό στέλεχος, που συνεπάγεται εμφάνιση πιο ήπιων συμπτωμάτων και βραδεία εξέλιξη της ασθένειας, συχνά παρέχει αποτελεσματική προστασία έναντι περισσότερο μολυσματικών στελεχών του ίδιου ή/και συγγενών ιών (Roistacher, 1993).

Οι σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις που προκαλεί η ψώρωση, σε συνδυασμό με την έλλειψη φυσικών πηγών ανθεκτικότητας, έχουν οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην εντατική αξιοποίηση της γενετικής μηχανικής για την παραγωγή φυτών ανθεκτικών στην ασθένεια. Στο πλαίσιο αυτό, κύρια προσέγγιση αποτελεί η επαγωγή ανθεκτικότητας που προέρχεται από το ίδιο το παθογόνο (pathogen-derived resistance, PDR). Η πρώτη αναφορά αξιοποίησης της PDR για τη δημιουργία ανθεκτικών στην ψώρωση εσπεριδοειδών αφορά την ενσωμάτωση της καψιδιακής πρωτεΐνης του CPsV σε διαγονιδιακά φυτά πορτοκαλιάς (Zanek et al., 2008). Παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε αύξηση της ανθεκτικότητάς τους στον ιό, τα ευρήματα της μελέτης παρείχαν την πρώτη ένδειξη ότι η καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού μπορεί να διεγείρει το μηχανισμό της μετα-μεταγραφικής σιώπησης (PTGS). Η διαπίστωση αυτή αξιοποιήθηκε από τους Reyes et al. (2011b) στη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών πορτοκαλιάς που εξέφραζαν τρία διαφορετικά τμήματα του γονιδιώματος του CPsV υπό μορφή φουρκέτας (ihpRNA): τα γονίδια *cp*, *54K* και *24K*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενσωμάτωση του ihpCP σε διαγονιδιακά φυτά πορτοκαλιάς αύξησε σημαντικά την ανθεκτικότητά τους στον ιό, σε αντίθεση με τα ihp54K και ihp24K που προσέδωσαν μερική ή καθόλου ανθεκτικότητα στο CPsV (Reyes et al., 2011a). Αξιοσημείωτο ήταν το εύρημα ότι η *a priori* παρουσία μικρών παρεμβαλλόμενων RNAs (siRNAs) στα διαγονιδιακά φυτά που είχαν ενσωματώσει το ihpCP συνέβαλλε στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της RNA σιώπησης, χωρίς ωστόσο η ποσότητα των συσσωρευμένων siRNAs να σχετίζεται άμεσα με το επίπεδο ανθεκτικότητας των διαγονιδιακών σειρών (Reyes et al., 2011a).

#### 4.1.3. Σκοπός

Ερευνητικό στόχο του παρόντος κεφαλαίου αποτέλεσε η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών υποκειμένων εσπεριδοειδών που εκφράζουν τμήματα του CEVd υπό μορφή φουρκέτας. Παράλληλα, επιχειρήθηκε η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών λεμονιάς και νεραντζιάς που εκφράζουν τμήμα της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού

CPsV υπό μορφή φουρκέτας. Η παρουσία αυτών των μορίων στα διαγονιδιακά φυτά πιθανόν να οδηγεί στην αναβάθμιση της ανθεκτικότητάς τους στο ιοειδές CEVd και στον ιό της ψώρωσης.

## 4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.2.1. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν τμήματα του CEVd

Στα πλαίσια της προσπάθειας δημιουργίας φυτών εσπεριδοειδών ανθεκτικών στο ιοειδές CEVd, έγινε ένθεση των τμημάτων CEV70-180 και CEV298-70 (Κεφάλαιο 3) υπό μορφή φουρκέτας στα υποκείμενα *P. trifoliata*, Carrizo citrange και Citrumelo 1452.

#### 4.2.1.1. Φυτικό υλικό

Για την εφαρμογή του γενετικού μετασχηματισμού με τμήματα του CEVd χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα του *P. trifoliata* και των υβριδίων του Carrizo citrange και Citrumelo 1452. Οι καρποί προέρχονταν από το Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου. Η προετοιμασία για τη σπορά υπό ασηπτικές συνθήκες καθώς και το υπόστρωμα βλάστησης των σπερμάτων έγινε όπως περιγράφεται στην υποενότητα 1.2.1. Οι σωλήνες με τα σπέρματα τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι και θερμοκρασία 25 °C για 5 εβδομάδες.

#### 4.2.1.2. Προετοιμασία βακτηρίου

Για την παραγωγή φυτών που να εκφράζουν τμήματα του CEVd χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *A. tumefaciens* EHA105 (Hood et al., 1993) που έφερε το πλασμίδιο pRNA-LIC:CEV70-180 ή pRNAi-LIC:CEV298-70. Η προετοιμασία αυτών των πλασμιδίων περιγράφεται αναλυτικά στην υποενότητα 3.2.2.1.

Τα στάδια προετοιμασίας του αγροβακτηρίου για το γενετικό μετασχηματισμό περιγράφονται στην υποενότητα 1.2.2. Η καλλιέργεια των αγροβακτηρίων έγινε σε υγρό θρεπτικό υλικό LB που περιείχε τα αντιβιοτικά καναμυκίνη (25 mg/l), ριφαμπικίνη (100 mg/l) και χλωραμφενικόλη (5 mg/l). Η τελική οπτική πυκνότητα του Διαλύματος Μόλυνσης ήταν περίπου  $OD_{600}=0,5$ .

#### 4.2.1.3. Γενετικός μετασχηματισμός εσπεριδοειδών

Για το γενετικό μετασχηματισμό των επιλεγμένων ειδών εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο κατά Orbovic and Grosser (2006). Πιο αναλυτικά, για την προετοιμασία των εκφύτων απομακρύνθηκαν η ρίζα, οι κοτυληδόνες και η κορυφή των σποροφύτων.

Το επικοτύλιο κόπηκε σε τμήματα μήκους 1-1,5 εκατοστά με διαγώνιες τομές τα οποία εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα Συγκαλλιέργειας (Πίνακας 1.2, Κεφάλαιο 1), μέχρι την ώρα της μόλυνσης με το αγροβακτήριο. Ακολούθησε εμβάπτιση στο διάλυμα Μόλυνσης (Πίνακας 1.2) με το αγροβακτήριο για 5 λεπτά και μεταφορά σε τρυβλία με υπόστρωμα Συγκαλλιέργειας, όπου παρέμειναν για δύο ημέρες σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 25 °C και 16 ώρες φως. Στη συνέχεια, τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα Επιλογής (Πίνακας 1.2) και παρέμειναν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 25 °C και 16 ώρες φως. Κάθε τρεις εβδομάδες γινόταν ανανέωση των υποστρωμάτων Επιλογής.

Οι αναγεννημένοι βλαστοί παρέμειναν επί των εκφύτων μέχρι να αναπτυχθούν αρκετά και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας που ήταν παραλλαγή του Υ.Ρ.2 (Πίνακας 1.3, Κεφάλαιο 1), καθώς περιείχε τη μισή ποσότητα της ορμόνης NAA (0,5 mg/l). Οι βλαστοί παρέμειναν σε αυτό το υπόστρωμα για μία έως δύο εβδομάδες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα που δεν περιείχε καθόλου ορμόνες, το οποίο ανανεωνόταν κάθε τρεις εβδομάδες. Η ριζοβολία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 25 °C και 16 ώρες φως.

#### 4.2.1.4. *In vitro* εμβολιασμός

Στους βλαστούς που τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας και απέτυχαν να ριζοβολήσουν εφαρμόστηκε μικρο-εμβολιασμός ακολουθώντας τη μέθοδο των Peña et al. (1995). Πιο συγκεκριμένα, ως υποκείμενα χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα Νεραντζιάς που αναπτύσσονταν *in vitro*. Η προετοιμασία για τη σπορά υπό ασηπτικές συνθήκες καθώς και το υπόστρωμα βλάστησης των σπερμάτων έγινε όπως περιγράφεται στην υποενότητα 1.2.1. Τα σπορόφυτα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό ήταν ηλικίας περίπου τεσσάρων έως έξι εβδομάδων.

Κατά την προετοιμασία των υποκειμένων, απομακρύνθηκαν οι κοτυληδόνες και οι πλάγιες ρίζες ενώ η κεντρική ρίζα περιορίστηκε στα 4-5 εκατοστά. Το επικοτύλιο καρατομήθηκε σε ύψος 2-3 εκατοστών πάνω από τις κοτυληδόνες. Στην κορυφή έγινε κατακόρυφη τομή, περίπου στη μέση της διαμέτρου, βάθους 2-3 χιλιοστών.

Σε κάθε αναγεννημένο βλαστό που απέτυχε να ριζοβολήσει έγινε ανανέωση της τομής της βάσης του για να πάρει τη μορφή σφήνας και τοποθετήθηκε στην κατακόρυφη τομή του υποκειμένου. Όλοι οι χειρισμοί γίνονταν υπό ασηπτικές

συνθήκες. Τα εμβολιασμένα φυτά τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και στηρίχτηκαν στην επιφάνεια με τη βοήθεια χάρτινης «γέφυρας». Το υπόστρωμα ανάπτυξης των μικρο-εμβολιασμένων φυτών αποτελείται από 4,4 g/l άλατα MS, 75 g/l σακχαρόζη, 0,2 mg/l θυαμίνη, 1 mg/l πυριδοξίνη, 1 mg/l νικοτινικό οξύ και 100 mg/l μυο-ινοσιτόλη (pH 5,7). Τα φυτά ελέγχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα και απομακρύνονταν οι βλαστοί που αναπτύσσονταν από το υποκείμενο.

#### 4.2.1.5. Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου στα αναγεννημένα φυτά

Στα αναγεννημένα φυτά εφαρμόστηκε η μέθοδος της άμεσης PCR (direct PCR) για την ανίχνευση του διαγονιδίου μετά από μια σύντομη επεξεργασία. Η δειματοληψία έγινε κατά την τοποθέτηση των βλαστών στο υπόστρωμα ριζοβολίας ή κατά τον εμβολιασμό.

Το κάθε δείγμα αποτελείται από ένα μικρό φυλλάριο μήκος μέχρι 0,5 εκατοστά. Η επεξεργασία των δειγμάτων πριν από την PCR αποτελεί μια παραλλαγή της μεθόδου των Wang et al. (1993). Πιο συγκεκριμένα, ο ιστός τοποθετείται σε μικροσωληνίσκο και λειοτριβείται παρουσία 20 μl NaOH (1M). Ακολουθεί προσθήκη 20 μl Tris.HCl (100mM, pH 8) και ανάδευση. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 10.000 στροφές/λεπτό και 5 μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε μικροσωληνίσκο που περιέχει 200 μl Tris.HCl (100mM, pH 8).

Για την ανίχνευση του διαγονιδίου CEV70-180 στα αναγεννημένα φυτά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με τα ζεύγη εκκινητών LIC1\_70-180-F/LIC2\_70-180-R (Πίνακας 4.1), με αναμενόμενο προϊόν 141 ζεύγη βάσεων, ενώ για το διαγονίδιο CEV298-70 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών LIC1\_298-70-F/LIC2\_298-70-R (Πίνακας 4.1), με αναμενόμενο προϊόν 174 ζεύγη βάσεων. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκε και το ζεύγος εκκινητών NADH-F/R ως εσωτερικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση, με αναμενόμενο προϊόν 1453 ζεύγη βάσεων.

Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	13,52	
Buffer B (10x)	2	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
LIC1_xx-xx-F (10μM)	0,8	0,5 μM
LIC1_xx-xx-R (10μM)	0,8	0,5 μM
NADH-F (10μM)	0,8	0,5 μM
NADH-R (10μM)	0,8	0,5 μM
KAPA Taq polymerase (KAPA)	0,08	0,4 U
Δείγμα DNA	0,8	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C	-	2 λεπτά	} 35 κύκλοι
95 °C	-	30 δευτ.	
62 °C	-	30 δευτ.	
72 °C	-	30 δευτ.	
72 °C	-	5 λεπτά	

#### 4.2.2. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού CPsV

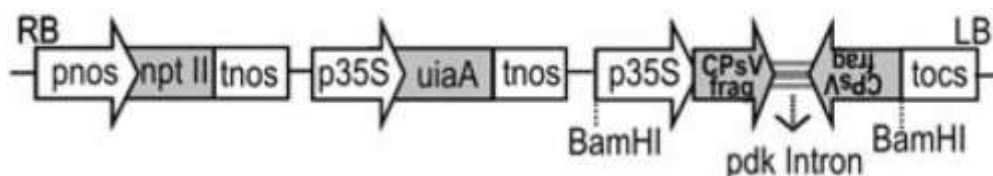
Στα πλαίσια της προσπάθειας δημιουργίας φυτών εσπεριδοειδών ανθεκτικών στον ιό της ψώρωσης των εσπεριδοειδών, έγινε ένθεση τμήματος της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού CPsV υπό μορφή φουρκέτας σε σπορόφυτα Νεραντζιάς και Μαγληνής λεμονιάς.

##### 4.2.2.1. Φυτικό υλικό

Για την εφαρμογή του γενετικού μετασχηματισμού με την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού της ψώρωσης χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα Νεραντζιάς και Μαγληνής λεμονιάς. Οι καρποί προέρχονταν από το Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου. Η προετοιμασία για τη σπορά υπό ασηπτικές συνθήκες καθώς και το υπόστρωμα βλάστησης των σπερμάτων έγινε όπως περιγράφεται στην υποενότητα 1.2.1. Οι σωλήνες με τα σπέρματα τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι και θερμοκρασία 25 °C για έξι εβδομάδες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 25 °C και 16 ώρες φως, για μία εβδομάδα.

#### 4.2.2.2. Προετοιμασία βακτηρίου

Για την παραγωγή φυτών που να εκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού της ψώρωσης των εσπεριδοειδών χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *A. tumefaciens* EHA105 που έφερε το πλασμίδιο p35S-ihpCP (Reyes et al., 2011a). Το πλασμίδιο ήταν μια ευγενική χορηγία της Dr. Maria-Laura Garcia (Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, La Plata, Argentina). Το πλασμίδιο p35S-ihpCP περιλαμβάνει ένα τμήμα μήκους 372 ζευγών βάσεων του γονιδίου που κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη του CPsV σε δύο αντίγραφα αντίθετου προσανατολισμού, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται ένα εσώνιο (Εικ. 4.2).



**Εικόνα 4.2.** Διαγραμματική αναπαράσταση του τμήματος του πλασμιδίου p35S-ihpCP που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη του CPsV υπό μορφή φουρκέτας (Reyes et al., 2009).

Τα στάδια προετοιμασίας του αγροβακτηρίου για το γενετικό μετασχηματισμό περιγράφονται στην υποενότητα 1.2.2. Η καλλιέργεια των αγροβακτηρίων έγινε σε υγρό θρεπτικό υλικό LB που περιείχε τα αντιβιοτικά καναμυκίνη (100 mg/l) και ναλιδιξικό οξύ (25 mg/l). Η τελική οπτική πυκνότητα του Διαλύματος Μόλυνσης ήταν περίπου  $OD_{600}=0,5$ .

#### 4.2.2.3. Γενετικός μετασχηματισμός εσπεριδοειδών

Για το γενετικό μετασχηματισμό των επιλεγμένων ειδών εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο κατά Orbovic and Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην υποενότητα 4.2.1.3.

Οι αναγεννημένοι βλαστοί δεν τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας αλλά μικρο-εμβολιάστηκαν σε υποκείμενα σπορόφυτα Troyer citrange (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), όπως περιγράφεται στην υποενότητα 4.2.1.4.

#### 4.2.2.4. Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου στα αναγεννημένα φυτά

Στα αναγεννημένα φυτά εφαρμόστηκε η μέθοδος της άμεσης PCR (direct PCR) για την ανίχνευση του διαγονιδίου μετά από μια σύντομη επεξεργασία, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 4.2.1.5. Η δειγματοληψία έγινε κατά τον μικρο-εμβολιασμό.

Για την ανίχνευση του διαγονιδίου *ihpCP* στα αναγεννημένα φυτά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με τα ζεύγη εκκινητών *hpCP1a/pdk2* (Πίνακας 4.1) με αναμενόμενο προϊόν 600 ζεύγη βάσεων. Ταυτόχρονα χρησιμοποιήθηκε και το ζεύγος εκκινητών *NADH-F/R* ως εσωτερικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση με αναμενόμενο προϊόν 1453 ζεύγη βάσεων.

Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	13,52	
Buffer B (10x)	2	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
<i>hpCP1a</i> (10μM)	0,8	0,5 μM
<i>pdk2</i> (10μM)	0,8	0,5 μM
<i>NADH-F</i> (10μM)	0,8	0,5 μM
<i>NADH-R</i> (10μM)	0,8	0,5 μM
KAPA Taq polymerase (KAPA)	0,08	0,4 U
Δείγμα DNA	0,8	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C - 2 λεπτά	} 35 κύκλοι
95 °C - 30 δευτ.	
55 °C - 30 δευτ.	
72 °C - 1 λεπτό	
72 °C - 5 λεπτά	



**Πίνακας 4.1.** Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο της μελέτης.

Ονόματα εκκινητών	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος (bp)
hpCP1a (Reyes et al., 2011a)	AAGGATCCGAATTCGTTCAAGATGGAGCAAGT	600
pdk2 (Reyes et al., 2011a)	AATATACAAAGCGCAAGATC	
LIC1_70-180-F	cgacgacaagaccctGGGGAAGAAGTCCTTC*	141
LIC2_70-180-R	gaggagaagagccctCTCCTGTTTCTCCGC*	
LIC1_298-70-F	cgacgacaagaccctCAAACCGCTTTTCTT*	174
LIC2_298-70-R	gaggagaagagccctCGCCGCCTCTT*	
NADH-F (Martin et al., 2013)	GGACTCCTGACGTATACGAAGGATC	1453
NADH-R (Martin et al., 2013)	AGTAGATGCTATCACACATACAAT	

\* Τα μικρά γράμματα υποδεικνύουν τα νουκλεοτίδια που είναι ομόλογα με τη αλληλουχία του χρησιμοποιούμενου πλασμιδίου.

### 4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 4.3.1. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν τμήματα του CEVd

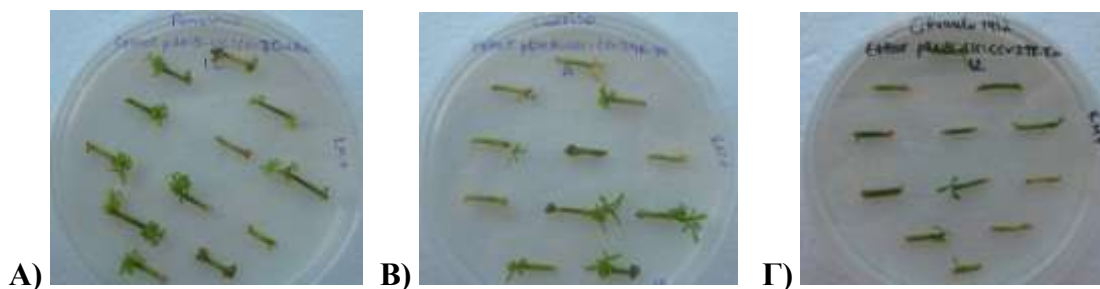
Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου 3 παρέχουν ενδείξεις ότι τα τμήματα CEV70-180 και CEV298-70 μπορούν να προκαλέσουν σιώπηση στο CEVd, μειώνοντας σημαντικά τον πολλαπλασιασμό του σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana*. Η διαπίστωση αυτή αποτέλεσε το έναυσμα για την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν αυτά τα δύο τμήματα υπό μορφή φουρκέτας. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pRNA-LIC:CEV70-180 και pRNAi-LIC:CEV298-70 που το καθένα περιλαμβάνει δύο αντίγραφα του επιλεγμένου τμήματος του CEVd με αντίθετο προσανατολισμό, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται ένα εσώνιο.

Τα έκφυτα προέρχονταν από σπορόφυτα του *P. trifoliata* και των υβριδίων του Carrizo citrange και Citrumelo 1452. Τα είδη αυτά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στα ιοειδή και αξιοποιούνται τα τελευταία χρόνια στη χώρα μας ως υποκείμενα για την αντικατάσταση της Νεραντζιάς. Για το γενετικό μετασχηματισμό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Orbovic and Grosser (2006) καθώς διαπιστώθηκε η αποτελεσματικότητά της (Κεφάλαιο 1), με βάση τον αριθμό των εκφύτων που παρήγαγαν αναγεννημένους βλαστούς μετά από τη μόλυνση με το αγροβακτήριο, και για τα τρία υπό μελέτη είδη. Το ποσοστό των εκφύτων που ανέπτυξαν πιθανά μετασχηματισμένους βλαστούς ήταν αρκετά υψηλό (Πίνακας 4.2). Στην Εικόνα 4.3, φαίνονται οι αναγεννημένοι βλαστοί που αναπτύσσονται στα έκφυτα των τριών ειδών σε υπόστρωμα Επιλογής.

**Πίνακας 4.2.** Ποσοστά των εκφύτων που ανέπτυξαν βλαστό μετά το μετασχηματισμό με τα pRNA-LIC:CEV70-180 και pRNAi-LIC:CEV298-70.

	CEV70-180	CEV298-70
<i>P. trifoliata</i>	55% (24/44)*	57% (25/44)
Carrizo	60% (56/94)	65% (65/100)
Citrumelo 1452	24% (14/57)	35% (18/52)

\* Στις παρενθέσεις φαίνεται ο αριθμός των εκφύτων που ανέπτυξαν βλαστό στο σύνολο των μολυνθέντων εκφύτων.



**Εικόνα 4.3.** Οι αναγεννημένοι βλαστοί στις τομές των εκφύτων Α) *P. trifoliata*, Β) Carrizo και Γ) Citrumelo 1452.

Όταν οι αναγεννημένοι βλαστοί έφτασαν σε ύψος περίπου 1 εκατοστού μεταφέρθηκαν σε ειδικά δοχεία με υπόστρωμα ριζοβολίας. Βάσει των αποτελεσμάτων του Κεφαλαίου 1, οι αναγεννημένοι βλαστοί ανταποκρίνονται καλύτερα παρουσία του NAA, αλλά οι αναπτυσσόμενες ρίζες είναι πολλές, κοντές και αρκετά διογκωμένες. Για να περιοριστεί η ανάπτυξη των ριζών με μη φυσιολογικό φαινότυπο, οι βλαστοί τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας Υ.Ρ. 2 με τη μισή ποσότητα NAA (0,5 mg/l) και παρέμειναν εκεί για μία έως δύο εβδομάδες. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα ριζοβολίας χωρίς ορμόνες (Yu et al., 2002).

Οι χειρισμοί αυτοί οδήγησαν σε σημαντική αύξηση του ποσοστού βλαστών που ριζοβόλησαν, σχηματίζοντας μία ή δύο μακριές ρίζες φυσιολογικού πάχους (Πίνακας 4.3, Εικ. 4.4). Ταυτόχρονα, η ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος ήταν ικανοποιητική σχεδόν στο σύνολο των ριζοβολημένων φυτών. Παρά το γεγονός ότι τα μισά περίπου έκφυτα έδωσαν αναγεννημένους βλαστούς, οι περισσότεροι από αυτούς δεν αναπτύχθηκαν αρκετά ώστε να μεταφερθούν σε υπόστρωμα ριζοβολίας (Πίνακες 4.2 και 4.3).

**Πίνακας 4.3.** Ποσοστά επιτυχίας της ριζοβολίας των πιθανά μετασχηματισμένων βλαστών.

	<b>CEV70-180</b>	<b>CEV298-70</b>
<b><i>P. trifoliata</i></b>	8% (1/12)*	**
<b>Carrizo</b>	68% (23/34)	53% (8/15)
<b>Citrumelo 1452</b>	0% (0/4)	50% (7/14)

\* Στις παρενθέσεις φαίνεται ο αριθμός των ριζοβολημένων βλαστών στο σύνολο των βλαστών που τοποθετήθηκαν για ριζοβολία

\*\* Δεν αναπτύχθηκαν αρκετά οι βλαστοί για να τοποθετηθούν για ριζοβολία



**Εικόνα 4.4.** Αναγεννημένοι βλαστοί Carrizo σε υπόστρωμα ριζοβολίας χωρίς ορμόνες.

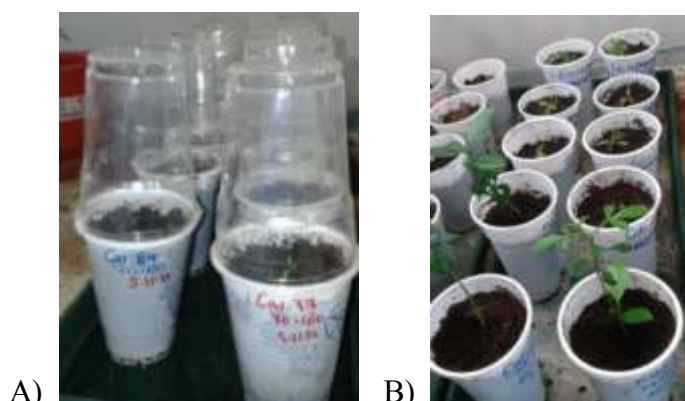
Τα φυτά που δεν ριζοβόλησαν στο παραπάνω υπόστρωμα εμβολιάστηκαν σε σπορόφυτα Νεραντζιάς (Εικ. 4.5). Η χρήση του συγκεκριμένου υποκειμένου διευκολύνει την αναγνώριση του εμβολίου καθώς πολλές φορές από την τομή εμβολιασμού αναπτύσσονται βλαστοί του υποκειμένου. Έτσι, το εμβόλιο ξεχωρίζει από το υποκείμενο καθώς και τα τρία είδη έχουν σύνθετα φύλλα αποτελούμενα από τρία φυλλάρια, σε αντίθεση με τη Νεραντζιά που έχει απλά φύλλα.



**Εικόνα 4.5.** Βλαστός Carrizo μικρο-εμβολιασμένος επί σποροφύτου Νεραντζιάς. Το εμβόλιο στηρίζεται στην επιφάνεια του υγρού θρεπτικού υλικού με χάρτινη γέφυρα.

Τα αναγεννημένα ριζοβολημένα φυτάρια παρέμειναν σε δοχεία με υπόστρωμα ριζοβολίας χωρίς ορμόνες μέχρι να φτάσουν σε ύψος περίπου 2 εκατοστών, οπότε μεταφέρθηκαν στο χώμα (Εικ. 4.6). Αντίστοιχα, τα μικρο-εμβολιασμένα φυτά παρέμειναν στους σωλήνες μέχρι να γίνει καλή συγκόλληση εμβολίου-υποκειμένου και αρχίσει η ανάπτυξη του εμβολίου. Συνολικά, μεταφυτεύτηκαν στο χώμα 2 φυτά *P. trifoliata*, 29 φυτά Carrizo και 8 φυτά Citrumelo 1452 (Πίνακας 4.4). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο μικροεμβολιασμός δε συνέβαλε σημαντικά στην αύξηση του αριθμού των φυτών προς μεταφύτευση πιθανώς λόγω της καταπόνησης που υπέστησαν οι άρριζοι βλαστοί κατά τη διαδικασία της ριζοβολίας. Η διαδικασία του μετασηματισμού διήρκησε συνολικά περίπου έντεκα μήνες από την ημέρα της μόλυνσης των εκφύτων μέχρι τη μεταφύτευση στο χώμα. Ειδικότερα, οι βλαστοί

τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας περίπου επτά μήνες μετά το μετασχηματισμό και μεταφυτεύτηκαν στο χώμα περίπου τέσσερις μήνες αργότερα.



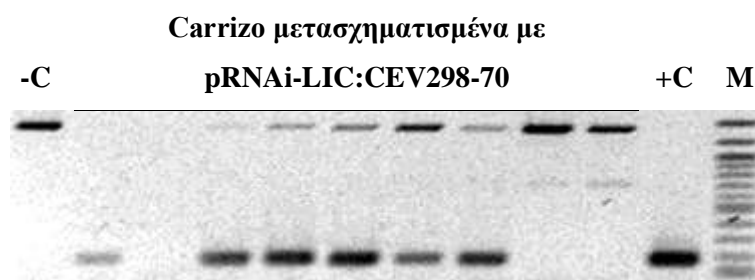
**Εικόνα 4.6.** Μεταφορά αυτόρριζων ή μικροεμβολιασμένων φυτών στο χώμα: A) καλυμμένα με πλαστικά ποτήρια αμέσως μετά τη μεταφύτευση, B) έξι μήνες μετά τη μεταφύτευση.

**Πίνακας 4.4.** Αριθμός αναγεννημένων φυτών που μεταφυτεύτηκαν στο χώμα.

	Αυτόρριζα	Μικρο-εμβολιασμένα
<i>P. trifoliata</i>	1	1
Carrizo	25	4
Citrumelo 1452	7	1

Στο στάδιο της τοποθέτησης των αναγεννημένων βλαστών στο υπόστρωμα ριζοβολίας ή κατά τον εμβολιασμό, γινόταν δειγματοληψία ενός μικρού φύλλου. Τα δείγματα μετά από σύντομη προετοιμασία χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση άμεσης PCR (direct PCR), χωρίς να απαιτείται η χρονοβόρα διαδικασία της απομόνωσης του DNA. Επιπλέον, σε αντίθεση με τη μέθοδο CTAB, απαιτείται μια πολύ μικρή ποσότητα φυτικού ιστού. Με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου δίνεται η δυνατότητα να εξεταστεί πολύ γρήγορα ένας πολύ μεγάλος αριθμός φυτών ακόμα και στην περίπτωση που το δείγμα του φυτικού ιστού είναι πολύ περιορισμένο. Στην παρούσα εργασία, η αξιοπιστία της μεθόδου ενισχύεται και από την παράλληλη αντίδραση που πραγματοποιείται στον ίδιο μικροσωληνίσκο με εκκινητές για έναν εσωτερικό μάρτυρα (NADH-F/R) (Εικ. 4.7). Με τον τρόπο αυτό, επιβεβαιώνεται η παρουσία DNA στο δείγμα καθώς και η απουσία από το έξαγμα παραγόντων που καταστέλλουν τη δράση της πολυμεράσης. Έτσι, με την εφαρμογή της άμεσης PCR δόθηκε η δυνατότητα να εξεταστεί ένας μεγάλος αριθμός αναγεννημένων βλαστών ώστε να εκτιμηθεί η

αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού, παρόλο που πολλά από αυτά τα φυτά δεν κατάφεραν να ριζοβολήσουν ώστε να μεταφυτευτούν στο χώμα.



**Εικόνα 4.7.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της άμεσης PCR με τα ζεύγη εκκινητών NADH-F/R (ανώτερη ζώνη) και LIC1\_CEV298-70-F/LIC2\_CEV298-70-R (κατώτερη ζώνη). -C: Carrizo-wt, +C: πλασμίδιο pRNAi-LIC:CEV298-70, M: 100bp DNA ladder (NEB).

Όλα τα αναγεννημένα φυτά *P. trifoliata* που εξετάστηκαν είχαν ενσωματώσει το τμήμα CEV70-180 (Πίνακα 4.5). Αντίθετα, οι αναγεννημένοι βλαστοί του ίδιου είδους που μετασχηματίστηκαν με το τμήμα CEV298-70 δεν αναπτύχθηκαν αρκετά ώστε να τοποθετηθούν για ριζοβολία ή να μικροεμβολιαστούν, με αποτέλεσμα να μην γίνει δειγματοληψία. Για το λόγο αυτό δεν υπάρχουν στοιχεία για την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού σε αυτό το συνδυασμό. Για το Carrizo, τα ποσοστά ήταν αρκετά υψηλά και για τα δύο τμήματα του CEVd. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι αναγεννημένοι βλαστοί του Carrizo αναπτύχθηκαν αρκετά με αποτέλεσμα να ελεγχθούν συνολικά 102 βλαστοί, εκ των οποίων οι 67 ήταν θετικοί. Τέλος, για το Citrumelo 1452, τα ποσοστά επιτυχίας του μετασχηματισμού ήταν ικανοποιητικά καθώς αποκτήθηκαν συνολικά πέντε μετασχηματισμένα φυτά.

**Πίνακας 4.5.** Ποσοστά επιτυχίας μετασχηματισμού τριών υποκειμένων εσπεριδοειδών με δύο τμήματα του CEVd υπό μορφή φουρκέτας.

	CEV70-180	CEV298-70
<i>P. trifoliata</i>	100% (12/12)	*
Carrizo	74% (42/57)	55% (25/45)
Citrumelo 1452	25% (1/4)	25% (4/16)

\* Δεν έγινε δειγματοληψία.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, φαίνεται ότι η μέθοδος μετασχηματισμού κατά Orbovic and Grosser (2006), σε συνδυασμό με το μολυσματικό για τα εσπεριδοειδή

στέλεχος του *A. tumefaciens* EHA105, μπορούν να εφαρμοστούν επιτυχώς για το μετασχηματισμό των γονοτύπων *P. trifoliata* και των υβριδίων του, Carrizo και Citrumelo 1452. Επιπρόσθετα, η κατασκευή των φουρκετών κατέστη δυνατή με τη χρήση του πλασμιδίου pRNAi-LIC. Η πειραματική αυτή προσέγγιση οδήγησε στην επιτυχή ένθεση των επιλεγμένων τμημάτων της αλληλουχίας του CEVd στο γονιδίωμα του *P. trifoliata* και των υβριδίων του, Carrizo και Citrumelo 1452, και την απόκτηση μετασχηματισμένων φυτών.

#### 4.3.2. Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού CPsV

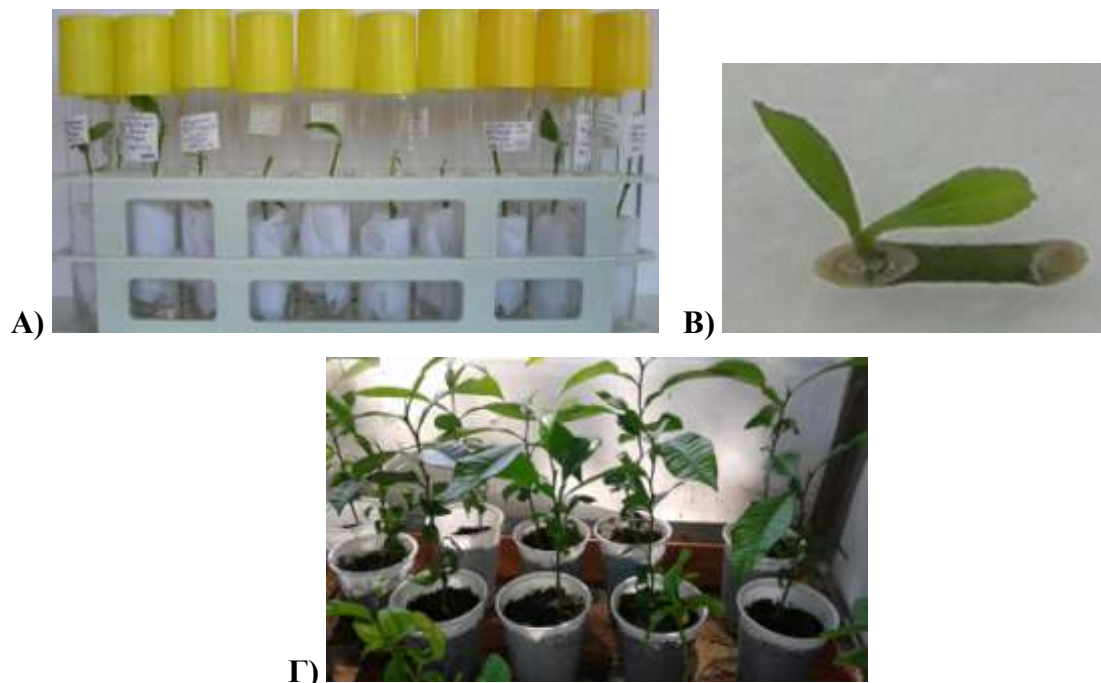
Σε παλαιότερες μελέτες έχει βρεθεί ότι τα διαγονιδιακά φυτά πορτοκαλιάς που εκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού της ψώρωσης των εσπεριδοειδών υπό μορφή φουρκέτας παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ανθεκτικότητας στον ιό (Reyes et al., 2011a). Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, δοκιμάστηκε η εισαγωγή του πλασμιδίου p35S-ihpCP, το οποίο φέρει τμήμα του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού υπό μορφή φουρκέτας, σε σπορόφυτα Νεραντζιάς και Μαγληνής λεμονιάς. Τα συγκεκριμένα είδη προσβάλλονται από τον ιό της ψώρωσης και εμφανίζουν συμπτώματα στα νεαρά φύλλα, ενώ δεν παρατηρείται απολέπιση του φλοιού, όπως συμβαίνει στις πορτοκαλιές και τα γκρέιπ-φρουτ (Boné, 1995). Για το μετασχηματισμό εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο των Orbovic and Grosser (2006) με τροποποιήσεις κατά Roussos et al. (2011), το οποίο ήταν το μόνο αποτελεσματικό για την παραγωγή αναγεννημένων βλαστών Νεραντζιάς και Μαγληνής λεμονιάς, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου 1. Τα ποσοστά παραγωγής αναγεννημένων βλαστών ήταν αρκετά ικανοποιητικά, καθώς περίπου το 30% των εκφύτων που μολύνθηκαν με το αγροβακτήριο ανέπτυξαν βλαστούς (Πίνακας 4.6).

**Πίνακας 4.6.** Σύνοψη των αποτελεσμάτων από το μετασχηματισμό της Νεραντζιάς και της Μαγληνής λεμονιάς με το p35S-ihpCP.

	Έκφυτα με βλαστό	Επιτυχείς μικρο-εμβολιασμοί	Μετασχηματισμένοι βλαστοί
<b>Νεραντζιά</b>	19% (29/153)*	74% (14/19)	0/19
<b>Μαγληνή λεμονιά</b>	17% (28/166)	65% (13/20)	2/20

\* Στις παρενθέσεις φαίνεται ο αριθμός των εκφύτων που ανέπτυξαν βλαστό στο σύνολο των μολυνθέντων εκφύτων.

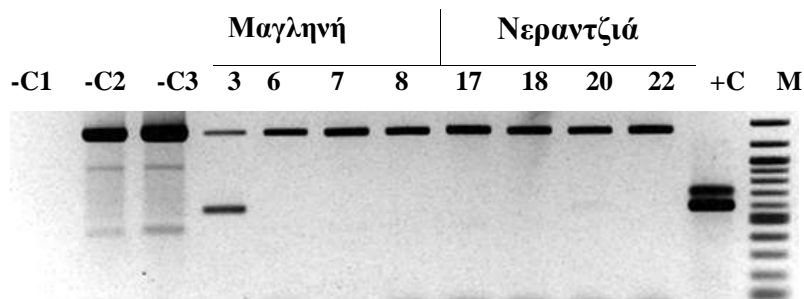
Τα ευρήματα του Κεφαλαίου 1, που αφορά την ανάπτυξη ενός βέλτιστου πρωτοκόλλου για την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών, υποδεικνύουν σαφώς την αδυναμία των μετασχηματισμένων βλαστών της Νεραντζιάς και της Μαγληνής λεμονιάς να ριζοβολήσουν στα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Προς αποφυγή παρόμοιων φαινομένων, οι αναγεννημένοι βλαστοί που προέκυψαν από το μετασχηματισμό με το p35S-ihpCP και είχαν ικανοποιητικό μήκος μικρο-εμβολιάστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε σπορόφυτα Troyer (Εικ. 4.8 Α). Το Troyer είναι ένα υβρίδιο του *P. trifoliata*, το οποίο έχει σύνθετα φύλλα με τρία φυλλάρια. Η χρήση του συγκεκριμένου υποκειμένου διευκολύνει την αναγνώριση του βλαστού του εμβολίου το οποίο έχει απλά φύλλα. Παρόλα αυτά, αρκετοί αναγεννημένοι βλαστοί δεν μικρο-εμβολιάστηκαν διότι ήταν αρκετά συμπαγείς με κοντά μεσογονάτια διαστήματα (Εικ. 4.8 Β), γεγονός που δυσχέραινε τη δημιουργία της απαιτούμενης σφήνας στη βάση του εμβολίου. Η διαδικασία του μετασχηματισμού διήρκησε περίπου δέκα μήνες από την ημέρα της μόλυνσης των εκφύτων μέχρι τη μεταφύτευση στο χώμα. Ειδικότερα, οι βλαστοί εμβολιάστηκαν σε υποκείμενα σπορόφυτα περίπου τέσσερις μήνες μετά το μετασχηματισμό και μεταφυτεύτηκαν στο χώμα περίπου έξι μήνες αργότερα.



**Εικόνα 4.8.** Α) Σωλήνες με μικρο-εμβολιασμένους βλαστούς Νεραντζιάς και Μαγληνής λεμονιάς, Β) συμπαγής αναγεννημένος βλαστός από έκφυτο Νεραντζιάς, Γ) μικροεμβολιασμένα φυτά Νεραντζιάς και Μαγληνής λεμονιάς που μεταφυτεύτηκαν και εγκαταστάθηκαν σε επιτυχία στο χώμα.



Τα ποσοστά επιτυχίας του μικρο-εμβολιασμού ήταν αρκετά υψηλά (Πίνακας 4.6, Εικ. 4.8 Γ). Παρόλα αυτά, οι αντιδράσεις PCR αποκάλυψαν ότι μόνο δύο βλαστοί της Μαγληνής λεμονιάς είχαν ενσωματώσει το διαγονίδιο, ενώ από τις Νεραντζιές δεν αποκτήθηκε κανένα μετασχηματισμένο φυτό (Εικ. 4.9). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα καθώς είναι γνωστό ότι τόσο οι νεραντζιές όσο και οι λεμονιές θεωρούνται είδη που μετασχηματίζονται δύσκολα και τα ποσοστά επιτυχίας του μετασχηματισμού τους δεν ξεπερνούν το 4% και 3%, αντίστοιχα (Ghorbel et al., 2001). Έτσι, παρά το γεγονός ότι η εφαρμογή του μικρο-εμβολιασμού αύξησε τα ποσοστά επιβίωσης των αναγεννημένων βλαστών τελικά η πλειοψηφία αυτών δεν ήταν μετασχηματισμένοι.



**Εικόνα 4.9.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της άμεσης PCR με τα ζεύγη εκκινητών NADH-F/R (ανώτερη ζώνη) και hpCP1a/pdk2 (κατώτερη ζώνη). **-C1:** H<sub>2</sub>O, **-C2:** Νεραντζιά-wt, **-C3:** Μαγληνή-wt, **+C:** πλασμίδιο p35S-ihpCP, **M:** 100bp DNA ladder (NEB).

Παρά το γεγονός ότι το ποσοστό των βλαστών που επιβίωσαν στο υπόστρωμα επιλογής και στη συνέχεια μικρο-εμβολιάστηκαν με επιτυχία ήταν ικανοποιητικό, σχεδόν στο σύνολο αυτών δεν κατέστη δυνατή η επιβεβαίωση επιτυχούς μετασχηματισμού. Παράλληλα, το γεγονός ότι σε κανένα από τα μη-μολυσμένα έκφυτα που τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα με αντιβιοτικά δεν αναγεννήθηκαν βλαστοί, υποδεικνύει την αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής. Παρόμοια φαινόμενα ψευδώς θετικών (false positives) αναγεννημένων φυτών έχουν αναφερθεί και σε παλαιότερες μελέτες (Peña et al., 1995; Gutiérrez et al., 1997; Yu et al., 2002).

#### 4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ευρήματα από τη δοκιμή εμποτισμού των τμημάτων της αλληλουχίας του CEVd 70-180 και 298-70 σε φυτά *N. benthamiana* (Κεφάλαιο 3) κατέδειξε ότι οι επιλεγμένες αλληλουχίες του CEVd μπορούν να προκαλέσουν σιώπηση του ιοειδούς και μείωση του πολλαπλασιασμού του. Η διαπίστωση αυτή αποτέλεσε το έναυσμα για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών με ενσωμάτωση στο γονιδίωμα τους των επιλεγμένων τμημάτων του CEVd. Απώτερο σκοπό αποτελεί η μελέτη της δυνατότητας των συγκεκριμένων τμημάτων να επάγουν το μηχανισμό της RNA σιώπησης, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της ανθεκτικότητας των εσπεριδοειδών στο ιοειδές. Όπως είναι γνωστό, το *P.trifoliata* και τα υβρίδιά του Carrizo και Citrumelo 1452 είναι ευαίσθητα στα ιοειδή των εσπεριδοειδών και ειδικότερα στο CEVd (Boné, 1995).

Για την παραγωγή διαγονιδιακών εσπεριδοειδών (*P.trifoliata*, Carrizo και Citrumelo 1452) που να εκφράζουν τα τμήματα CEV70-180 και CEV298-70 χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Orbovic and Grosser (2006), το οποίο σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου 1, παρέχει τα υψηλότερα ποσοστά μετασηματισμού και αναγέννησης στα συγκεκριμένα είδη. Η εφαρμογή του μικρο-εμβολιασμού (Peña et al., 1995) οδήγησε σε αυξημένο ποσοστό επιβίωσης των αναγεννημένων βλαστών, ενώ η αξιοποίηση της αντίδρασης άμεσης PCR (Wang et al., 1993) παρείχε τη δυνατότητα αξιόπιστης εκτίμησης των αποτελεσμάτων του μετασηματισμού με τα τμήματα του CEVd. Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη αναφορά σε διαγονιδιακά φυτά εσπεριδοειδών που εκφράζουν τμήματα της αλληλουχίας του CEVd με σκοπό την αύξηση της ανθεκτικότητά τους στο ιοειδές.

Σε συνέχεια αυτών των πειραμάτων, τα φυτά που αποκτήθηκαν από τον μετασηματισμό θα πρέπει να πολλαπλασιαστούν αγενώς έτσι ώστε να αποκτηθεί ένας ικανοποιητικός αριθμός για τη διεξαγωγή πειραμάτων αξιολόγησης της ανθεκτικότητας στο ιοειδές, μετά από τεχνητές μολύνσεις. Στο στάδιο αυτό θα πρέπει να μελετηθεί και η επίδραση της παρουσίας των τμημάτων CEV70-180 και CEV298-70 στη μορφολογία και φυσιολογία των διαγονιδιακών φυτών. Επιπλέον, είναι σημαντικό να μετρηθεί η συγκέντρωση των siRNAs που παράγονται εξαιτίας της έκφρασης δίκλωνων μορίων του CEVd στο φυτικό γονιδίωμα, καθώς η παρουσία τους είναι ενδεικτική της επαγόμενης ανθεκτικότητας στο ιοειδές. Σε αντίστοιχα πειράματα των Schwind et al. (2009) με διαγονιδιακά φυτά τομάτας που εξέφραζαν το διαγονίδιο PSTVd-hpRNA

διαπιστώθηκε ότι τα φυτά που είχαν υψηλή συγκέντρωση hp-siRNAs ήταν ανθεκτικά στο PSTVd, ενώ αυτά που είχαν χαμηλά επίπεδα hp-siRNAs ήταν ευαίσθητα στη μόλυνση με το PSTVd.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, προτείνεται ένα ολοκληρωμένο πρωτόκολλο για το γενετικό μετασχηματισμό των *P.trifoliata*, Carrizo και Citrumelo 1452 που περιλαμβάνει τη μέθοδο μετασχηματισμού κατά Orbovic and Grosser (2006), το μολυσματικό στα εσπεριδοειδή *A. tumefaciens* EHA105 (Ghorbel et al., 2001), το πλασμίδιο pRNAi-LIC για την κατασκευή φουρκετών (Xu et al., 2010), τη μεταφορά των βλαστών από το υπόστρωμα ριζοβολίας με ορμόνη σε αντίστοιχο υπόστρωμα χωρίς ορμόνη σε σύντομο χρονικό διάστημα (Yu et al., 2002), το μικρο-εμβολιασμό *in vitro* (Peña et al., 1995) και την εφαρμογή άμεσης αντίδρασης PCR (Wang et al., 1993). Αυτό το πρωτόκολλο μπορεί να εφαρμοστεί για την ενσωμάτωση άλλων τμημάτων του CEVd καθώς και αλληλουχιών από άλλα ιοειδή στο γονιδίωμα των συγκεκριμένων ειδών ή/και άλλων εσπεριδοειδών, προκειμένου να εξεταστεί η δυνατότητά τους να βελτιώσουν την ανθεκτικότητα στα παθογόνα αυτά. Τέτοιες μελέτες θα ήταν πολύ σημαντικές στα πλαίσια της βελτίωσης των εσπεριδοειδών καθώς μέχρι αυτή τη στιγμή στην παγκόσμια επιστημονική βιβλιογραφία δεν υπάρχει καμία αναφορά σε διαγονιδιακά φυτά εσπεριδοειδών που εκφράζουν αλληλουχία προερχόμενη από ιοειδή.

Στη συνέχεια, αξιοποιήθηκε η μέθοδος των Orbovic and Grosser (2006), με τα υποστρώματα των Roussos et al. (2011), για την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα της Νεραντζιάς και της Μαγληνής λεμονιάς ενός τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί την καμψιδιακή πρωτεΐνη του ιού της ψύρωσης των εσπεριδοειδών, υπό μορφή φουρκέτας. Το συγκεκριμένο διαγονίδιο συμβάλλει στην αύξηση της ανθεκτικότητας στον ιό όταν εκφράζεται σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* και πορτοκαλιάς (Reyes et al., 2009; Reyes et al., 2011b). Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αποκτήθηκε μεγάλος αριθμός αναγεννημένων βλαστών αρκετοί από τους οποίους εμβολιάστηκαν επιτυχώς σε υποκείμενα σπορόφυτα. Παρόλα αυτά, τα ποσοστά επιτυχίας του μετασχηματισμού ήταν πολύ χαμηλά, καθώς σε πολλά από τα αναγεννημένα φυτά δεν ενσωματώθηκε επιτυχώς το προς μεταφορά γονίδιο. Η ύπαρξη ψευδώς θετικών αναγεννημένων φυτών εικάζεται ότι οφείλεται στην ικανότητα των μετασχηματισμένων κυττάρων να παρέχουν προστασία έναντι της καναμυκίνης στα μη-μετασχηματισμένα κύτταρα που περιβάλλουν. Εναλλακτικά, η πιθανή παρουσία ανθεκτικών βακτηριακών αποικιών στα άκρα των εκφύτων μπορεί να έχει προστατευτική επίδραση στα μη-

μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα, ευνοώντας έτσι την παραγωγή μη-μετασχηματισμένων βλαστών (Domínguez et al., 2004).

Για την αποφυγή ανάπτυξης ψευδώς θετικών φυτών από τη διαδικασία του μετασχηματισμού έχει προταθεί η ανάπτυξη στρατηγικών που αποσκοπούν στον περιορισμό της παραμονής του αγραβακτηρίου στα έκφυτα αλλά και η αντικατάσταση των αντιβιοτικών με γονίδια-μάρτυρες που είτε δεν εκφράζονται στα βακτήρια είτε κωδικοποιούν παράγοντες επιλογής που δεν επιτρέπουν την απόδραση στα γειτονικά μη-μετασχηματισμένα κύτταρα (Domínguez et al., 2004). Τα συστήματα που έχουν δοκιμαστεί με επιτυχία στα εσπεριδοειδή περιλαμβάνουν το γονίδιο *manA*, που κωδικοποιεί την ισομεράση της φωσφομαννόζης (phosphomannose isomerase, PMI), και την επιλογή μέσω του γονιδίου της τρανσφεράσης του ισοπεντενυλίου (isopentenyl transferase, *ipt*) (Boscariol et al., 2003; Ballester et al., 2007). Η χρήση συστημάτων επιλογής απαλλαγμένων από αντιβιοτικά υπερέχουν καθώς δεν εγείρουν προβληματισμούς που σχετίζονται με την πρόκληση πιθανών αλλεργιών και πιθανής οριζόντιας μεταφοράς των γονιδίων σε βακτήρια του γαστρεντερικού συστήματος (Peña et al., 2008). Τέλος, υπάρχει και η δυνατότητα παραγωγής διαγονιδιακών φυτών χωρίς τη χρήση κανενός συστήματος επιλογής. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται ο έλεγχος με PCR όλων των αναγεννημένων βλαστών. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί ότι απουσία επιλογής ο αριθμός των διαγονιδιακών φυτών λάιμ στα οποία παρατηρείται σιώπηση του διαγονιδίου μπορεί να αυξηθεί μέχρι και κατά 30%, με αποτέλεσμα να μην εκφράζεται τελικά το επιθυμητό χαρακτηριστικό (Domínguez et al., 2002).

Σε συνέχεια αυτών των πειραμάτων, θα πρέπει να εντατικοποιηθούν οι προσπάθειες για την παραγωγή μεγαλύτερου αριθμού φυτών Νεραντζιάς και Μαγληνής λεμονιάς που να εκφράζουν το διαγονίδιο *ihpCP*, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στον ιό, μετά από τεχνητές μολύνσεις. Η εφαρμογή των πρακτικών που προαναφέρθηκαν πιθανόν να αυξήσει τα ποσοστά επιτυχίας του μετασχηματισμού και της αναγέννησης διαγονιδιακών φυτών. Τέλος, κρίνεται σκόπιμος ο μετασχηματισμός ώριμων ιστών καθώς για τα συγκεκριμένα είδη, σε αντίθεση με τα υποκείμενα, είναι πολύ σημαντικό να ξεπεραστεί γρήγορα το πολυετές στάδιο της νεανικότητας. Η πρακτική αυτή θα επιτρέψει την πρόωμη αξιολόγηση και κατ' επέκταση την εμπορική διάθεση των αναγεννημένων διαγονιδιακών φυτών.

Παρά το γεγονός ότι η γενετική μηχανική είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία παραγωγής ανθεκτικών φυτών, είναι αρκετά χρονοβόρα, ιδιαίτερα στις πολυετείς καλλιέργειες, και παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες. Επιπλέον, η αρνητική στάση του

καταναλωτικού κοινού, ιδιαίτερα εντός της ΕΕ, απέναντι σε ό,τι προέρχεται από διαγονιδιακά φυτά καθιλώνει τις έρευνες σε εργαστηριακό επίπεδο. Έτσι, η χρήση υγιούς και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού, σε συνδυασμό με την εφαρμογή της καραντίνας, αποτελεί προς το παρόν μονόδρομο για την αποφυγή της εξάπλωσης της καταστρεπτικής ίωσης της τριστέτσας καθώς και άλλων ιών, ιοειδών και βακτηρίων που απειλούν την εσπεριδοκαλλιέργεια.

#### 4.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Κυριακοπούλου ΠΗ, Δήμου Δ (2008) Ιολογικές και παρόμοιες ασθένειες των εσπεριδοειδών. Γεωργία-Κτηνοτροφία 10:104-121.
- Achachi A, Barka EA, Ibriz M (2014) Recent advances in *Citrus psorosis virus*. *VirusDisease* 25:261–276.
- Ballester A, Cervera M, Penã L (2007) Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination. *Plant Cell Rep* 26:39–45.
- Barbosa-Mendes JM, Filho FDAAM, Filho AB, et al (2009) Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. *Sci Hortic* 122:109–115.
- Boscariol RL, Almeida WAB, Derbyshire MTVC, et al (2003) The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell Rep* 22:122–128.
- Boscariol RL, Monteiro M, Takahashi EK, et al (2006) *Attacin A* gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* ‘Hamlin’. *J Am Soc Hortic Sci* 131:530–536.
- Bové JM (1995) Virus and virus-like diseases of citrus in the Near East region. Food and Agric. Org. of the United Nations, Rome.
- Carvalho SA, Santos FA, Machado MA (2002) Psorosis virus complex elimination from citrus by shoot-tip grafting associated to thermotherapy. *Fitopatol Bras* 27:306–308.
- D’Onghia A, Carimi F, Pasquale F De, et al (2001) Elimination of *Citrus psorosis virus* by somatic embryogenesis from stigma and style cultures. *Plant Pathol* 50:266–269.
- Derrick KS, Barthe GA (2000) Psorosis. In: Timmer L, Garnsey S, Graham J (ed) *Compendium of Citrus diseases*, 2nd edn, APS Press, Minnesota, pp 58-59.
- Domínguez A, Guerri J, Cambra M, et al (2000) Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of *citrus tristeza virus*. *Plant Cell Rep* 19:427–433.
- Domínguez A, Fagoaga C, Navarro L, et al (2002) Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Mol Genet Genomics* 267:544–556.
- Domínguez A, Cervera M, Pérez RM, et al (2004) Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation

- of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Mol Breed* 14:171–183.
- Dutt M, Barthe G, Irely M, Grosser J (2015) Transgenic citrus expressing an arabidopsis *NPR1* gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus greening). *PLoS One* 10:1–17.
- Escobar MA, Leslie CA, Mcgranahan GH, Dandekar AM (2002) Silencing crown gall disease in walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Sci* 163:591–597.
- Febres VJ, Niblett CL, Lee RF, Moore GA (2003) Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with *citrus tristeza closterovirus* genes. *Plant Cell Rep* 21:421–428.
- Ghorbel R, La-Malfa S, Lopez MM, et al (2001) Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a super-transformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in citrus. *Physiol Mol Plant Pathol* 58:103–110.
- Gutiérrez MA., Luth D, Moore GA (1997) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Rep* 16:745–753.
- Hao G, Pitino M, Duan Y, Stover E (2015) Reduced susceptibility to *Xanthomonas citri* in transgenic citrus expressing the FLS2 receptor from *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 29:132-142.
- Hood E, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* 2:208–218.
- Kyriakopoulou PE (2002) Virus and virus-like diseases of citrus in Greece and the greek certification program. In: Durán-Vila N, Milne R, da Graça J (eds) *Proc. 15th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside*, pp 408–412.
- López C, Cervera M, Fagoaga C, et al (2010) Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. *Mol Plant Pathol* 11:33–41.
- Martín S, Alioto D, Milne RG, et al (2004) Detection of *Citrus psorosis virus* by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. *Eur J Plant Pathol* 110:747–757.
- Martin RR, Tzanetakis IE (2013) High risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: implications for certification, nurseries, and fruit production. *Plant Dis* 97:1358–1362.
- Milne RG, García ML, Moreno P (2003) Citrus psorosis virus. In: AAB descriptions of plant viruses. No 401. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=401>

- Orbovic V, Grosser JW (2006) Citrus. In: K. Wang (ed.), Methods in molecular biology, Vol. 344, Agrobacterium protocols, 2nd ed, Vol. 2. Humana Press. pp177-189.
- Palle SR, Miao H, Seyran M, et al (2005) Evidence for association of *Citrus psorosis virus* with symptomatic trees and an *Olpidium*-like fungus. In: Hilf ME, Duran-Vila N, Rocha-Peña MA (eds) Proc. 16th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside, pp 423-426.
- Peña L, Cervera M, Juárez J, et al (1995) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. Plant Sci 104:183–191.
- Peña L, Cervera M, Fagoaga C, et al. (2008) Citrus. In: Kole C and Hall TC (ed) Compendium of transgenic crop plants: transgenic tropical and subtropical fruits and nuts. Blackwell publishing. pp 1-61.
- Reyes CA, Peña EJ, Zaneck MC, et al (2009) Differential resistance to *Citrus psorosis virus* in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing hairpin RNA derived from the coat protein and 54K protein genes. Plant Cell Rep 28:1817–1825.
- Reyes CA, De Francesco A, Peña EJ, et al (2011a) Resistance to *Citrus psorosis virus* in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein-RNA silencing. J Biotechnol 151:151–158.
- Reyes CA, Zaneck MC, Velázquez K, et al (2011b) Generation of sweet orange transgenic lines and evaluation of *Citrus psorosis virus*-derived resistance against psorosis A and psorosis B. J Phytopathol 159:531–537.
- Roistacher CN (1993) Psorosis - A review. In: Moreno P, da Graça J, Timmer L (eds) Proc. 12th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside, pp 139-154.
- Roussos PA, Dimitriou G, Voloudakis AE (2011) N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (4-CPPU) enhances *in vitro* direct shoot organogenesis of *Citrus aurantium* L. epicotyl segments compared to other commonly used cytokinins. Span. J. Agric. Res. 9:504-509.
- Schwind N, Zwiebel M, Itaya A, et al (2009) RNAi-mediated resistance to *Potato spindle tuber viroid* in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. Mol Plant Pathol 10:459–469.
- Scorza R, Callahan A, Levy L, et al (2001) Post-transcriptional gene silencing in *plum pox virus* resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. Transgenic Res 10:201–209.
- Viss W, Pitrak J, Humann J, et al (2003) Crown-gall-resistant transgenic apple trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes. Mol Breed 12:283–295.
- Wang H, Qi M, Cutler AJ (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res 21:4153–4154.



- Xu G, Sui N, Tang Y, et al (2010) One-step, zero-background ligation-independent cloning intron-containing hairpin RNA constructs for RNAi in plants. *New Phytol* 187:240–50.
- Yu C, Huang S, Chen C, et al (2002) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 71:147–155.
- Zanek MC, Reyes CA, Cervera M, et al (2008) Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of *Citrus psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus. *Plant Cell Rep* 27:57–66.

## Κεφάλαιο 5. Έλεγχος για την παρουσία ιών και ιοειδών σε μικροεμβολιασμένα εσπεριδοειδή υπό εξυγίανση

### 5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 5.1.1. Ασθένειες των εσπεριδοειδών που προκαλούνται από ιούς και ιοειδή

Τα εσπεριδοειδή δέχονται σημαντικές καταπονήσεις από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες οι οποίοι περιορίζουν την παραγωγή και σε ορισμένες περιπτώσεις, καθιστούν απαγορευτική τη χρήση συγκεκριμένων υποκειμένων και ποικιλιών. Λόγω της έλλειψης αποτελεσματικών μέτρων για την καταπολέμηση των ασθενειών που προκαλούνται από ιούς και ιοειδή, τα παθογόνα αυτά θεωρούνται εξαιρετικά επιζήμια για την καλλιέργεια των εσπεριδοειδών.

Η ασθένεια τριστέτσα των εσπεριδοειδών προκαλείται από τον ιό *Citrus tristeza virus* (CTV). Αποτελεί ένα από τα πλέον καταστροφικά παθογόνα των εσπεριδοειδών καθώς έχει προκαλέσει την απώλεια εκατομμυρίων δένδρων σε Αργεντινή, Βραζιλία, Η.Π.Α., Ισπανία κ.α. (Bar-Joseph et al., 1989; Cambra et al., 2000a). Η έκφραση των συμπτωμάτων της ασθένειας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η επιθετικότητα του στελέχους του ιού, οι επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες, το είδος του εσπεριδοειδούς και ο συνδυασμός υποκειμένου-εμβολίου. Χαρακτηριστικά συμπτώματα της τριστέτσας είναι ο νανισμός, η αναστροφή των φύλλων προς τα άνω, η διαφάνεια και χλώρωση των νευρώσεων, η βοθρίωση των βλαστών και η μικροκαρπία. Ωστόσο, το πλέον σοβαρό σύμπτωμα της ασθένειας είναι η κατάπτωση των δένδρων που είναι εμβολιασμένα σε νεραντζιά (EPPO). Πιο συγκεκριμένα, οι πορτοκαλιές, οι μανταρινιές και τα γκρέιπ-φρουτ που είναι εμβολιασμένα σε νεραντζιά παραμένουν νάνα, χλωρωτικά και συχνά ξηραίνονται μετά από λίγους μήνες ή χρόνια, ενώ στην περίπτωση της αποπληξίας, τα δένδρα πεθαίνουν μερικές ημέρες μετά την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων (Lee and Bar-Joseph, 2000). Η ξήρανση των δένδρων οφείλεται στη νέκρωση του ηθμού, στο σημείο ακριβώς κάτω από την τομή εμβολιασμού (EPPO). Κάποια στελέχη του CTV είναι ήπιας μολυσματικότητας και δεν προκαλούν εμφανή συμπτώματα στα δένδρα. Ανεκτικά στην τριστέτσα υποκείμενα είναι τα υβρίδια του τριπτέρου (*P. trifoliata*) αλλά σε περίπτωση ισχυρά μολυσματικών στελεχών μπορεί να εκδηλωθούν συμπτώματα ακόμα και σε δένδρα εμβολιασμένα σε ανεκτικά υποκείμενα (EPPO). Ο CTV μεταδίδεται με τον εμβολιασμό (μολυσμένο

αγενές πολλαπλασιαστικό υλικό) αλλά και διάφορα είδη αφίδας, ενώ η εξάπλωσή του σε μεγάλες αποστάσεις οφείλεται στη διακίνηση μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Ο αποτελεσματικότερος φορέας μετάδοσης είναι το είδος *Toxoptera citricida* το οποίο δεν έχει αναφερθεί ακόμα στην Ελλάδα, παρόλο που πρόσφατα εντοπίστηκε στην Πορταγαλία και την Ισπανία (Hermoso de Mendoza et al., 2008). Η αφίδα *Aphis gossypii* μπορεί επίσης να μεταδώσει τον CTV, αλλά με μικρότερη αποτελεσματικότητα (EPPO).

Η ψώρωση των εσπεριδοειδών είναι μια ασθένεια που οφείλεται στον ιό *Citrus psorosis virus* (CPsV) και εντοπίζεται κυρίως σε οπωρώνες μεγάλης ηλικίας. Στα προσβεβλημένα δένδρα, κυρίως πορτοκαλιάς, γκρέιπ-φρουτ και μανταρινιάς, παρατηρείται απολέπιση του φλοιού του κορμού, των βραχιόνων και των κλάδων, που συχνά συνοδεύεται και από έκκριση κόμμεως (Derrick and Barthe, 2000). Τα προσβεβλημένα δένδρα παρουσιάζουν συμπτώματα εξασθένησης και ξήρανση της κόμης, η οποία συνοδεύεται από σημαντική μείωση της παραγωγής και τελικά την ξήρανση ολόκληρου του δένδρου (Achachi et al., 2014). Επιπλέον, συχνά εμφανίζονται συμπτώματα στα νεαρά φύλλα του δένδρου την άνοιξη, όπου παρατηρείται στικτή χλώρωση των νεύρων ή ακανόνιστες χλωρωτικές περιοχές στο έλασμα (Derrick and Barthe, 2000). Δεδομένου ότι ο ιός μεταδίδεται μέσω μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού, η ύπαρξη ασυμπτωματικού υλικού συχνά ευθύνεται για την εξάπλωση της ασθένειας. Στο πλαίσιο αυτό, το προσβεβλημένο πολλαπλασιαστικό υλικό νεραντζιάς και λεμονιάς που, αν και εμφανίζει συμπτώματα στα νεαρά φύλλα, δεν παρουσιάζει απολέπιση του κορμού ή των κλάδων, συνιστά σημαντική εστία μετάδοσης του ιού.

Άλλες ασθένειες των εσπεριδοειδών που εμφανίζονται σποραδικά στους ελληνικούς οπωρώνες και οφείλονται σε ιούς είναι η κοίλη και η θυλακοειδής ψώρωση, η λιθίαση ή πέτρωμα των καρπών, η κριστακορτίδα, οι ξυλώδεις όγκοι της νεραντζιάς, το ζαρωμένο φύλλο και η μολυσματική ποικιλοχλώρωση (Κυριακοπούλου και Δήμου, 2008). Ο ιός *Citrus tatter leaf virus* (CTLV), παρόλο που δεν έχει αναφερθεί στην Ελλάδα και στην Ευρώπη γενικότερα, προκαλεί σοβαρά συμπτώματα στα δένδρα που είναι εμβολιασμένα στο *P. trifoliata* και τα υβρίδιά του. Η συμπτωματολογία περιλαμβάνει ανωμαλίες στο σημείο εμβολιασμού, με αποτέλεσμα τα δένδρα να γίνονται χλωρωτικά και να παραμένουν νάνα (Miyakawa and Ito, 2000).

Όπως αναφέρθηκε και στη γενική εισαγωγή, τα εσπεριδοειδή αποτελούν τους φυσικούς ξενιστές πέντε ιοειδών, με την εξωκορτίδα και την καχεξία-ξυλοπόρωση να προκαλούν τις πιο σοβαρές ασθένειες. Στη φύση ωστόσο, οι περισσότεροι συνδυασμοί

ιοειδούς-ξενιστή είναι ασυμπτωματικοί και η αλληλεπίδρασή τους οδηγεί σε εκδήλωση ασθένειας μόνο όταν ένας ευαίσθητος ξενιστής μολυνθεί με ένα ιοειδές. Συνεπώς, η αξιοποίηση της νεραντζιάς ως υποκείμενο εξασφαλίζει την απουσία συμπτωμάτων, σε αντίθεση με άλλα ευαίσθητα σε ιοειδή υποκείμενα, όπως το *P. trifoliata* και τα υβρίδιά του, όπου εκδηλώνονται συμπτώματα της ασθένειας στις εμβολιαζόμενες επί αυτών ποικιλίες (Duran-Vila and Semancik, 2003; Vernière et al., 2004). Δεδομένου ότι υπό συνθήκες αγρού τα ιοειδή συνήθως εντοπίζονται ως μικτές μολύνσεις, αποτελούμενες από δύο ή περισσότερα ιοειδή, στο παρελθόν η πλειοψηφία των συμπτωμάτων αποδιδόταν στο ιοειδές της εξωκορτίδας (Vernière et al., 2002). Η μετάδοση των ιοειδών γίνεται μέσω του πολλαπλασιαστικού υλικού (μολυσμένα εμβόλια χωρίς συμπτώματα) και των εργαλείων κλαδέματος και εμβολιασμού (Duran-Vila et al., 2000).

Η ασθένεια της εξωκορτίδας οφείλεται στο ιοειδές της εξωκορτίδας των εσπεριδοειδών (*Citrus exocortis viroid*, CEVd). Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι η απολέπιση του φλοιού κάτω από την εμβολιαστική τομή, που έχει ως αποτέλεσμα το νανισμό των δένδρων. Παράλληλα, παρατηρείται επιναστία και παραμόρφωση των φύλλων (Duran-Vila and Semancik, 2003). Σε ανθεκτικές ποικιλίες εμβολιασμένες σε ευαίσθητα υποκείμενα, παρατηρείται κιτρίνισμα της κόμης και γενική εξασθένηση των δένδρων, χωρίς εμφανή συμπτώματα απολέπισης του φλοιού (Duran-Vila et al., 2000). Η παρουσία του ιού της εξωκορτίδας μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση της παραγωγής όταν μια μολυσμένη ποικιλία εμβολιάζεται σε ευαίσθητο υποκείμενο (Vernière et al., 2004).

Η ασθένεια της καχεξίας προκαλείται από το ιοειδές II των εσπεριδοειδών (*Citrus viroid II*, CVd-II), που αποτελεί ειδικό στέλεχος του ιοειδούς του νανισμού του λυκίσκου (*Hop stunt viroid*, HSVd). Έχουν βρεθεί τρεις απομονώσεις του CVd-II, οι IIa, IIb και IIc, εκ των οποίων οι δύο τελευταίες είναι αυτές που θεωρούνται μολυσματικές και προκαλούν τα συμπτώματα της καχεξίας (Duran-Vila et al., 2000). Τα πιο ευαίσθητα είδη είναι η μανταρινιά και τα υβρίδιά της (tangors και tangelos), το *Citrus macrophylla* (alemow), το λάιμ και το κουμ-κουάτ (Duran-Vila et al., 2000). Χαρακτηριστικά συμπτώματα της καχεξίας είναι η βοθρίωση του ξύλου και ο εμποτισμός του φλοιού με κόμμι πάνω από την εμβολιαστική τομή, ενώ έχουν παρατηρηθεί και ραγίσματα στο φλοιό του υποκειμένου *P. trifoliata* (Vernière et al., 2004). Τα μολυσμένα φυτά παρουσιάζουν διάφορου βαθμού νανισμό, χλώρωση των φύλλων, κατάπτωση του δένδρου και θάνατο (Duran-Vila et al., 2000).

Το ιοειδές της κάμψης του φύλλου των εσπεριδοειδών (*Citrus bent leaf viroid*, CBLVd, συν. CVd-I) προκαλεί χαρακτηριστική κάμψη του ελάσματος του φύλλου της κιτριάς Etrog ενώ στο υποκείμενο *P. trifoliata* παρατηρείται έντονη βοθρίωση του ξύλου και σημαντική μείωση της βλάστησης (Roistacher et al., 1993). Το ιοειδές του νανισμού των εσπεριδοειδών (*Citrus dwarfing viroid*, CDVd, συν. CVd-III) προκαλεί σημαντική μείωση στο μέγεθος του δένδρου και της παραγωγής. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί ότι σε μολυσμένα με το CDVd φυτά πορτοκαλιάς «Valencia» εμβολιασμένα σε *P. trifoliata*, η παραγωγή ανά όγκο βλάστησης είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τα υγιή φυτά (Semancik et al., 1997). Για το λόγο αυτό, το ιοειδές CDVd χρησιμοποιείται και ως παράγοντας νανισμού των δένδρων στα συστήματα πυκνής φύτευσης (Hutton et al., 2000). Όσον αφορά το ιοειδές του ραγίσματος του φλοιού των εσπεριδοειδών (*Citrus bark cracking viroid*, CBCVd, συν. CVd-IV), θεωρείται λιγότερο διαδεδομένο σε σχέση με τα υπόλοιπα ιοειδή των εσπεριδοειδών και προκαλεί έντονο ράγισμα στο φλοιό του *P. trifoliata* (Bernad and Duran-Vila, 2006; Vernière et al., 2004).

Τέλος, έχουν αναφερθεί και δύο ακόμα ιοειδή που βρίσκονται υπό χαρακτηρισμό. Πρόκειται για τα *Citrus viroid V* (CVd-V) και *Citrus viroid VI* (παλαιότερη ονομασία *Citrus viroid original source*, CVd-OS). Το CVd-V προκαλεί μικρές νεκρωτικές κηλίδες και σχισίματα στο βλαστό του φυτού-δείκτη (κιτριά Etrog), που ορισμένες φορές περιέχουν κόμμι (Serra et al., 2008b). Τα συμπτώματα που προκαλεί το συγκεκριμένο ιοειδές στα εμπορικά είδη και ποικιλίες δεν είναι γνωστά, αλλά έχει βρεθεί να έχει συνεργιστική δράση σε μικτές μολύνσεις με τα ιοειδή CBLVd και CDVd στις κιτριές Etrog (Serra et al., 2008a). Το CVd-VI προκαλεί μόνο ήπια κάμψη των φύλλων και νέκρωση του μίσχου σε φυτά κιτριάς Etrog (Ito et al., 2001).

### **5.1.2. Διάγνωση των ιών και ιοειδών**

Η παραδοσιακή μέθοδος ανίχνευσης ιών και ιοειδών είναι η βιοδοκιμή με τη χρήση φυτών-δεικτών. Για την ανίχνευση της τριστέτσας των εσπεριδοειδών χρησιμοποιείται το Mexican lime, για τον ιό της ψώρωσης η πορτοκαλιά και η μανταρινιά, για τα περισσότερα ιοειδή των εσπεριδοειδών χρησιμοποιείται η επιλογή Arizona 861-S1 της κιτριάς Etrog, ενώ για το CVd-II χρησιμοποιείται η μανταρινιά Parson's special εμβολιασμένη σε κάποιο ζωνρό υποκείμενο (IOCV, 1968; Duran-Vila et al., 2000). Τα φυτά-δείκτες μολύνονται μέσω εμβολιασμού ενός τμήματος από το

φλοιού, από ένα φύλλο ή από έναν οφθαλμό του υπό εξέταση φυτού και κάθε ιός ή ιοειδές δίνει διαφορετικό συνδυασμό συμπτωμάτων μετά την παρέλευση αρκετά μεγάλου χρονικού διαστήματος.

Τα τελευταία χρόνια, η βιοδοκιμή συνδυάζεται με τις ορολογικές ή τις μοριακές μεθόδους με σκοπό τη μείωση του χρόνου που απαιτείται για τη διάγνωση, τη δυνατότητα ελέγχου περισσότερων δειγμάτων και την αύξηση της ακρίβειας της διάγνωσης. Από τις ορολογικές μεθόδους, η πλέον διαδεδομένη για την ανίχνευση των ιών των εσπεριδοειδών είναι η ανοσολογική δοκιμή ELISA (enzyme linked immunosorbent assay, ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος προσδιορισμού). Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση εξειδικευμένων αντισωμάτων που αναγνωρίζουν και προσδένονται σε συγκεκριμένο αντιγόνο-στόχο (ιό). Τα αντισώματα είναι συζευγμένα με ένα ένζυμο το οποίο αντιδρά με κατάλληλο υπόστρωμα και έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κίτρινου χρώματος στα θετικά δείγματα (Clark and Adams, 1977). Μια εξέλιξη αυτής της μεθόδου είναι η εφαρμογή της ELISA σε στυπώματα ιστών (tissue print-ELISA) κατά την οποία η βάση από δείγματα φύλλων ή βλαστών αποτυπώνεται απευθείας σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, χωρίς να απαιτείται προετοιμασία φυτικού εξάγματος (Lin et al., 1990). Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία για τη διάγνωση του ιού της τριστέτσας, καθώς δίνει τη δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και χωρίς να απαιτεί εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό (Cambra et al., 2000b).

Οι ορολογικές μέθοδοι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση των ιοειδών λόγω της απουσίας καψιδιακής πρωτεΐνης. Έτσι για τα ιοειδή, εκτός από τη βιολογική μέθοδο, εφαρμόζονται μοριακές τεχνικές ανίχνευσης της παρουσίας του RNA τους. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία ιοειδών σε ένα δείγμα μπορεί να εντοπιστεί με ηλεκτροφόρηση εξάγματος RNA σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) και με μοριακό υβριδισμό. Για τα ιοειδή των εσπεριδοειδών, έχει αναπτυχθεί η διαδοχική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (sequential PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, sPAGE) κατά την οποία, μετά την αρχική ηλεκτροφόρηση του RNA του φυτικού δείγματος, η περιοχή που περιέχει το RNA στο μέγεθος του ιοειδούς απομονώνεται και χρησιμοποιείται ως δείγμα σε δεύτερη ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιείται υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Rivera-Bustamante et al., 1986; Duran-Vila et al., 1993). Το πλεονέκτημα της μεθόδου sPAGE έναντι των υπολοίπων μοριακών μεθόδων ανίχνευσης των ιοειδών είναι ότι δεν προϋποθέτει τη γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ιοειδούς. Όσον αφορά το

μοριακό υβριδισμό, τα υπό εξέταση δείγματα σταθεροποιούνται σε κατάλληλες μεμβράνες και η ανίχνευση επιτυγχάνεται με τη χρήση μορίων ανιχνευτών (probes) που υβριδίζουν εξειδικευμένα με τις αλληλουχίες των ιοειδών. Ταυτόχρονα, τα μόρια ανιχνευτές είναι σημασμένα και αντιδρώντας με συγκεκριμένα υποστρώματα εκπέμπουν κάποιο σήμα στα θετικά δείγματα (Meinkoth and Wahl, 1984). Συνήθως, ως δείγμα για τον υβριδισμό χρησιμοποιείται χυμός από τον ιστό (dot blot), καθαρό RNA (Northern blot) ή γίνεται απευθείας αποτύπωση στη μεμβράνη μιας φρεσκοκομμένης επιφάνειας βλαστού, φύλλου ή φρούτου (tissue print) (Mühlbach et al., 2003).

Στο πλαίσιο διάγνωσης ιών και ιοειδών τα τελευταία χρόνια έχει διαδοθεί ευρέως η αξιοποίηση της PCR καθώς εξασφαλίζει υψηλή ευαισθησία και ευκολία στην εφαρμογή της σε σχέση με τις προηγούμενες μεθόδους. Στην περίπτωση των ιοειδών, δεν απαιτείται η μόλυνση φυτών-δεικτών που αυξάνουν τη συγκέντρωση του ιοειδούς, αλλά λόγω της υψηλής ευαισθησίας μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε RNA από δείγματα αγρού. Το πρώτο στάδιο της ανίχνευσης απαιτεί την απομόνωση του RNA του υπό εξέταση φυτικού ιστού και την εφαρμογή αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής για την παραγωγή cDNA, καθώς οι ιοί και τα ιοειδή που προσβάλλουν τα εσπεριδοειδή έχουν RNA γονιδίωμα. Στη συνέχεια το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο σε αντίδραση απλής PCR ή PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) για την ενίσχυση της αλληλουχίας του παθογόνου με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών. Η ανίχνευση των ιοειδών με τη χρήση της RT-PCR απαιτεί ελάχιστη ποσότητα RNA και θεωρείται 10-100 φορές πιο ευαίσθητη από το μοριακό υβριδισμό και 2500 φορές πιο ευαίσθητη από την ηλεκτροφόρηση (Hadidi and Yang, 1990).

### **5.1.3. Μέθοδοι εξυγίανσης του πολλαπλασιαστικού υλικού**

Δεδομένου ότι τα εσπεριδοειδή προσβάλλονται από σημαντικό αριθμό ιών και ιοειδών, σημαντικό ρόλο για τη δημιουργία μιας οικονομικά και βιολογικά βιώσιμης καλλιέργειας είναι η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού σε συνδυασμό με πρακτικές αποφυγής εξάπλωσης των ιολογικών και συναφών ασθενειών. Τα μέτρα που λαμβάνονται αφορούν: α) τη χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, β) τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, γ) την εκρίζωση και καταστροφή των προσβεβλημένων δένδρων, δ) την απαγόρευση εισαγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού από χώρες όπου υπάρχει η ασθένεια, ε) την αποτροπή εισόδου ή καταπολέμηση των εντόμων-φορέων των ασθενειών (Garnsey, 1999).

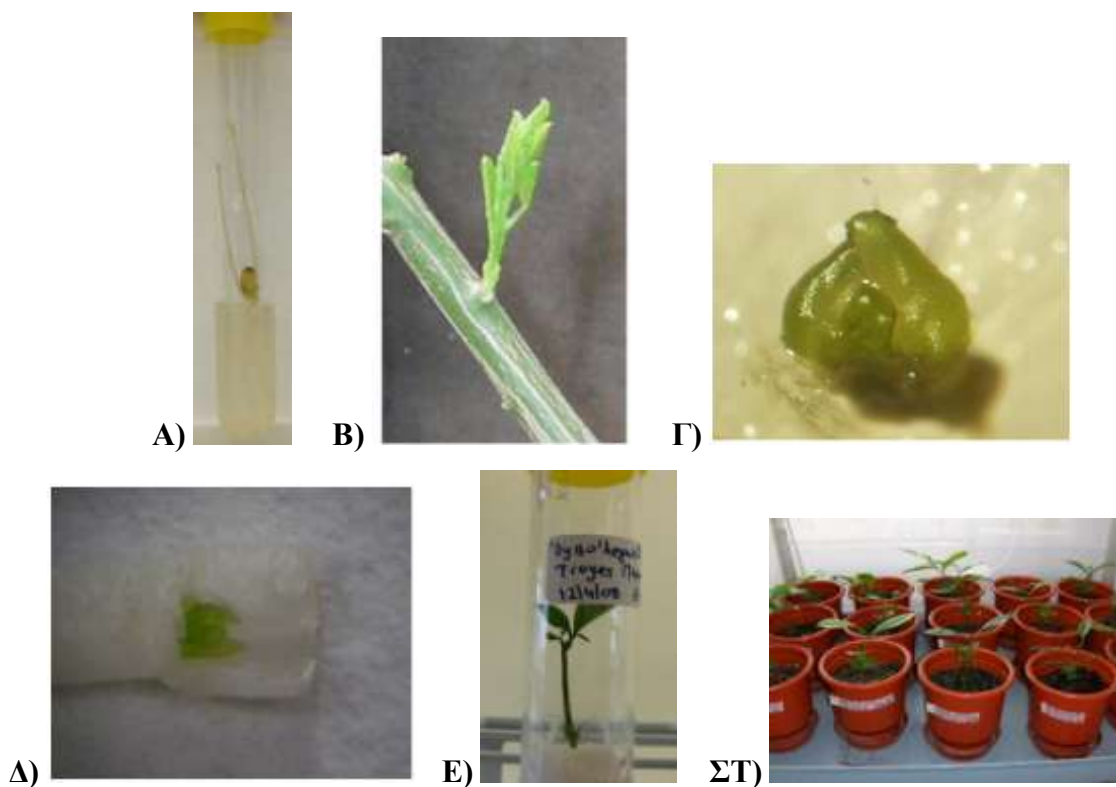
Για τις δενδρώδεις καλλιέργειες, όπως τα εσπεριδοειδή, που πολλαπλασιάζονται αγενώς οι μόνες μέθοδοι εξυγίανσης που μπορούν να εφαρμοστούν είναι αυτές που αφορούν τον «καθαρισμό» των ήδη προσβεβλημένων καλλιεργούμενων ποικιλιών από τα παθογόνα και τη διατήρηση των υγιών φυτών. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η θερμοθεραπεία, η ιστοκαλλιέργεια μεριστωμάτων, ο *in vitro* μικροεμβολιασμός, η *in vitro* χημειοθεραπεία, η κρυοθεραπεία αλλά και ο συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων (Varveri et al., 2015).

Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος για την εξυγίανση των εσπεριδοειδών είναι ο *in vitro* μικροεμβολιασμός κορυφαίων μεριστωμάτων (shoot-tip grafting *in vitro*), ο οποίος εξασφαλίζει την παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από ιούς και ιοειδή και τα νέα φυτά δεν επανέρχονται σε φάση νεανικότητας όπως συμβαίνει με άλλες μεθόδους ιστοκαλλιέργειας (Navarro et al., 1975). Η τεχνική αναπτύχθηκε από τους Murashige et al. (1972) και βελτιώθηκε από τους Navarro et al. (1975) και βασίζεται στη γνώση ότι το κορυφαίο μερίστωμα δεν έχει αγγειακή σύνδεση με το υπόλοιπο φυτό (Roistacher et al., 1976). Επιπλέον, τα σπορόφυτα που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα είναι υγιή καθώς οι ιοί και τα ιοειδή των εσπεριδοειδών δεν μεταδίδονται με το σπόρο (Murashige et al., 1972; Timmer et al., 2000). Η τεχνική έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία σε προγράμματα δημιουργίας υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών στην Αμερική, την Ισπανία, την Κύπρο, κ.α. (Roistacher et al., 1976; Navarro, 1993; Καπαρή-Ησαΐα, 2006).

Συνοπτικά, τα στάδια της διαδικασίας του *in vitro* μικροεμβολιασμού κορυφαίων μεριστωμάτων συνίστανται στα εξής:

1. Ανάπτυξη σποροφύτων τρίτερων υποκειμένων (Carrizo, Citrumelo, Troyer) υπό ασηπτικές συνθήκες σε δοκιμαστικό σωλήνα (Εικ. 5.1, Α).
2. Λήψη νεαρών βλαστών από ασθενή δένδρα αγρού ή θερμοκηπίου (Εικ. 5.1, Β).
3. Απομόνωση του κορυφαίου μεριστώματος της νεαρής βλάστησης και τοποθέτηση, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε τομή ανεστραμμένου T στην κορυφή του υποκειμένου κάτω από το στερεοσκόπιο (Εικ. 5.1, Γ, Δ).
4. Τοποθέτηση του μικροεμβολιασμένου φυτού σε σωλήνα με θρεπτικό υπόστρωμα, εκβλάστηση του μεριστώματος και ανάπτυξη νεαρού βλαστού (Εικ. 5.1, Ε).
5. Μεταφύτευση στο χώμα των επιτυχημένων μικροεμβολιασθέντων φυτών σε εντομοστεγή κλωβό στο θερμοκήπιο (Εικ. 5.1, ΣΤ).
6. Έλεγχος των νεαρών φυτών για την παρουσία παθογόνων.





**Εικόνα 5.1.** Τα στάδια του *in vitro* μικροεμβολιασμού κορυφαίων μεριστωμάτων: Α) υποκείμενο σπορόφυτο αναπτυσσόμενο *in vitro*, Β) νεαρή βλάστηση μολυσμένου δένδρου, Γ) κορυφαίο μερίστωμα βλαστού (εικόνα από στερεοσκόπιο), Δ) κορυφαίο μερίστωμα τοποθετημένο σε τομή ανεστραμμένου Τ του υποκειμένου (εικόνα από στερεοσκόπιο), Ε) εκβλάστηση του εμβολίου, ΣΤ) μεταφυτευμένα μικροεμβολιασμένα φυτάρια σε χώμα σε εντομοστεγή κλωβό (όλες οι φωτογραφίες είναι από προσωπικό αρχείο).

Τα δενδρύλλια που παράγονται από τη διαδικασία του *in vitro* μικροεμβολιασμού, και αφού επιβεβαιωθεί η απουσία επιβλαβών οργανισμών, φυλάσσονται σε εντομοστεγείς κλωβούς σε θερμοκήπιο και αποτελούν το προβασικό πολλαπλασιαστικό υλικό. Συνήθως, την ευθύνη διατήρησης της προβασικής φυτείας έχει κάποιος δημόσιος φορέας. Στη συνέχεια, το προβασικό υλικό χρησιμοποιείται για την εγκατάσταση της βασικής φυτείας από την οποία θα δημιουργηθεί η πιστοποιημένη φυτεία. Η τελευταία, αποτελεί την πηγή μοσχευμάτων για την παραγωγή των δενδρυλλίων που θα διοχετευτούν στην αγορά. Όλες οι φυτείες ελέγχονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα για την παρουσία επιβλαβών οργανισμών. Τα παραπάνω προβλέπονται στον «Τεχνικό Κανονισμό Ελέγχου και Πιστοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού οπωροφόρων φυτών και των οπωροφόρων δένδρων που προορίζονται για την παραγωγή φρούτων, κατηγοριών ανώτερων της κατηγορίας CAC (Conformitas Agraria Communitatis –

Ελαχίστων Κοινοτικών Προδιαγραφών) που παράγεται στη χώρα» (ΦΕΚ 1952/28-9-2008).

Η διαδικασία που περιγράφηκε αποτελεί ένα από τα τρία στάδια που εφαρμόζονται με επιτυχία στην Αμερική, την Ισπανία, την Κύπρο κ.α. και είναι απαραίτητα για τη διατήρηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού των εσπεριδοειδών και άλλων οπωροφόρων δένδρων. Ένα ολοκληρωμένο σύστημα προστασίας του πολλαπλασιαστικού υλικού περιλαμβάνει τα παρακάτω προγράμματα (Lee et al., 1999):

1. Πρόγραμμα καραντίνας, που αφορά την ασφαλή εισαγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού από άλλες χώρες. Τα εισαγόμενα φυτά διατηρούνται σε συνθήκες καραντίνας μέχρι να ολοκληρωθεί ο έλεγχός τους και εάν χρειαστεί, υπόκεινται στη διαδικασία της εξυγίανσης.
2. Πρόγραμμα παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, που αφορά τον έλεγχο του υπάρχοντος υλικού και την εξυγίανσή του. Αρχικά, γίνεται επιλογή του μητρικού υλικού, έλεγχος για την παρουσία επιβλαβών οργανισμών, ακολουθεί η εξυγίανσή του, ο έλεγχος των νέων φυτών και η διατήρησή τους υπό συνθήκες που εξασφαλίζουν τη φυτοϋγεία.
3. Πρόγραμμα πιστοποίησης, που αφορά την ανάπτυξη και διατήρηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού για εμπορική χρήση. Σκοπός αυτού του προγράμματος είναι η εξασφάλιση της υγείας και της ταυτότητας του πολλαπλασιαστικού υλικού που παράγεται στα ιδιωτικά φυτώρια και διοχετεύεται στην αγορά.

#### **5.1.4. Ανίχνευση των ιών και ιοειδών στην Ελλάδα και παραγωγή άνοσου πολλαπλασιαστικού υλικού**

Η χρήση μοσχευμάτων απαλλαγμένων από ιούς και ιοειδή ξεκίνησε στην Ελλάδα στις αρχές της δεκαετίας του 1970 με την εισαγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού από την Κορσική και την Καλιφόρνια για την εγκατάσταση μητρικών φυτειών στο Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου, Ξυλοκάστρου και Χανίων (Kyriakopoulou, 2002). Οι σταθμοί αυτοί προμήθευαν τους παραγωγούς και τους φυτωριούχους πολλαπλασιαστικό υλικό απαλλαγμένο ιώσεων. Έκτοτε, η έλλειψη ενός αυστηρού συστήματος πιστοποίησης και η ελεύθερη διακίνηση πολλαπλασιαστικού υλικού εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης οδήγησαν στη διάδοση ασθενειών που οφείλονται σε ιούς, όπως η τριστέσα και η ψώραση. Όσον αφορά τα ιοειδή, αυτά πιθανόν να προϋπήρχαν

στο υλικό που εισήχθη από την Κορσική και την Καλιφόρνια καθώς τότε δεν είχαν ακόμα ταυτοποιηθεί ως παθογόνοι οργανισμοί και δεν είχε αναπτυχθεί κάποια μέθοδος εξυγίανσης (Boubourakas et al., 2010).

Σε μια προσπάθεια εγκατάστασης ενός «προγράμματος παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού» για τα εσπεριδοειδή στην Ελλάδα, το πρώτο βήμα ήταν ο έλεγχος της παρουσίας ιών και ιοειδών στις μητρικές φυτείες. Έτσι, στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «Επισκόπηση, ανίχνευση και μελέτη ιών και ιοειδών στην Ελλάδα» - ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II (Επιστημονικός Υπεύθυνος τ. Καθ. Π. Κυριακοπούλου), που πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών σε συνεργασία με το πανεπιστήμιο της Καλιφόρνιας (Dr. Γ. Βιδαλάκης), ελέγχθηκαν τα μητρικά δένδρα του Δενδροκομικού Σταθμού Πόρου, ο οποίος αποτελεί τη βασικότερη υπηρεσία παραγωγής και διάθεσης εμβολιοφόρων βλαστών σε φυτωριούχους και παραγωγούς εσπεριδοειδών της χώρας. Αναφορικά με τον έλεγχο παρουσίας ιών, ανιχνεύτηκε μόνο ο ιός της ψώρωσης (CPsV) σε λίγα μόνο από τα υπό μελέτη δείγματα. Αντίθετα, ανιχνεύθηκαν όλα τα ιοειδή (CEVd, CVd-II, CBLVd, CDVd, CBCVd), μεμονωμένα ή σε μικτές μολύνσεις, σχεδόν στο σύνολο των εξεταζόμενων δένδρων (Boubourakas et al., 2010; Wang et al., 2013).

Παρά την επιβεβαιωμένη πλέον παρουσία ιοειδών στις μητρικές φυτείες εσπεριδοειδών, οι προκαλούμενες από ιοειδή ασθένειες δεν υπήρξαν επιζήμιες στο παρελθόν, λόγω της χρήσης της νεραντζιάς ως υποκείμενο, το οποίο εξασφαλίζει την απουσία συμπτωμάτων στις εμβολιαζόμενες επί αυτού ποικιλίες. Η πρόσφατη ωστόσο είσοδος της τριστέτσας στην Ελλάδα (Dimou et al., 2002) και η αναγκαστική στροφή προς την αξιοποίηση υποκειμένων ανθεκτικών στην τριστέτσα αλλά ευαίσθητων στα ιοειδή -όπως το *P. trifoliata* και τα υβρίδιά του καθώς και η μανταρινιά (Boné, 1995)- θέτουν σε κίνδυνο την ελληνική εσπεριδοειδοκαλλιέργεια, λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων των μητρικών δένδρων με ιοειδή. Από τα παραπάνω, είναι σαφές ότι η εξασφάλιση της οικονομικής βιωσιμότητας των καλλιεργειών αυτών απαιτεί την ύπαρξη στην Ελλάδα υγιούς και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού των εσπεριδοειδών, όπως προβλέπεται από τον «Τεχνικό Κανονισμό Ελέγχου και Πιστοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού οπωροφόρων φυτών και των οπωροφόρων δένδρων που προορίζονται για την παραγωγή φρούτων, κατηγοριών ανώτερων της κατηγορίας CAC (Conformitas Agraria Communitatis – Ελαχίστων Κοινοτικών Προδιαγραφών) που παράγεται στη χώρα» (ΦΕΚ 1952/28-9-2008).

Προς αυτήν την κατεύθυνση, υλοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών τη διετία 2007-2008 το ερευνητικό πρόγραμμα «Εξυγίανση ελληνικών ποικιλιών εσπεριδοειδών και διάγνωση ιοειδών σε *in vitro* καλλιέργεια» (Επιστημονικός Υπεύθυνος Επίκ. Καθ. Ανδρέας Βολουδάκης) σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών της Κύπρου (Θ. Καπαρή-Ησαΐα). Στόχος του προγράμματος ήταν η παραγωγή δενδρυλλίων εσπεριδοειδών, απαλλαγμένων από εμβολιομεταδιδόμενα παθογόνα, προκειμένου να εγκατασταθούν στην προβασική φυτεία λήψης εμβολιοφόρων βλαστών. Στα πλαίσια του προγράμματος, εφαρμόστηκε από τη γράφουσα η τεχνική του *in vitro* μικροεμβολιασμού μεριστωμάτων. Τα εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από το Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου και ένα ιδιωτικό φυτώριο στη Σκάλα Λακωνίας. Ειδικότερα, τα χρησιμοποιούμενα εμβόλια προέρχονταν από δένδρα λεμονιάς (Αδαμοπούλου, Βύζα, Ζαμπετάκη, Interdonato, Nouvel Athos), μανταρινιάς (Κλημεντίνη Πόρου, Χιώτικο, Nova) και πορτοκαλιάς (Oval Valencia Πόρου, Όψιμο ομφαλοφόρο Άργους, Newhall, PO25, Washington navel). Ως υποκείμενα στο μικροεμβολιασμό χρησιμοποιήθηκαν τα τρίπτερα Carrizo citrange, Troyer citrange και Citrumelo 1452. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 290 μικροεμβολιασμοί, από τους οποίους προέκυψαν 61 δένδρα που τελικά εγκαταστάθηκαν σε εντομοστεγή κλωβό. Το πρόγραμμα αυτό αποτελεί την πρώτη μεγάλη προσπάθεια εξυγίανσης του πολλαπλασιαστικού υλικού των εσπεριδοειδών στην Ελλάδα. Παλαιότερα, είχε εφαρμοστεί ο *in vitro* μικροεμβολιασμός μόνο για την εξυγίανση της μανταρινιάς Κλημεντίνη Πόρου (Πλαστήρα, 1987).

#### **5.1.5. Σκοπός**

Επιμέρους στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η προσπάθεια εξυγίανσης ελληνικών ποικιλιών εσπεριδοειδών από την παρουσία των περισσότερο διαδεδομένων και επιζήμιων για τη χώρα ιών και ιοειδών. Για το σκοπό αυτό, τα δενδρύλλια που προέκυψαν από την εφαρμογή του *in vitro* μικροεμβολιασμού μεριστωμάτων, ελέγχθηκαν, μέσω αντιδράσεων αντίστροφης μεταγραφής και PCR με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών, για την παρουσία των ιών CTV, CPsV και CTLV, και των ιοειδών CEVd, CBLVd, HSVd, CDVd και CBCVd.

## 5.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 5.2.1. Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό προερχόταν από μικροεμβολιασμένα φυτά που παράχθηκαν κατά τη διετία 2007-2008. Οι μικροεμβολιασμοί έγιναν από τη γράφουσα στα πλαίσια του προγράμματος «Εξυγίανση ελληνικών ποικιλιών εσπεριδοειδών και διάγνωση ιοειδών σε *in vitro* καλλιέργεια». Οι δειγματοληψίες διεξάγονταν μία φορά το χρόνο, στις αρχές καλοκαιριού. Τα δείγματα αποτελούνταν από πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα μαζί με το μίσχο τους και φυλάσσονταν στους -80 °C μέχρι τη χρήση τους.

Συνολικά, ελέγχθηκαν εννέα λεμονιές (τρεις Αδαμοπούλου, δύο Βύζα, μία Ζαμπετάκη, μία Interdonato, δύο Nouvel Athos), δέκα πορτοκαλιές (τρεις ΡΟ25, δύο Όψιμο ομφαλοφόρο Άργους, δύο Washington navel, τρεις Newhall) και δύο μανταρινιές της ποικιλίας Χιώτικο.

### 5.2.2. Διάγνωση ιών και ιοειδών

Για την απομόνωση του RNA από τα υπό εξέταση δείγματα χρησιμοποιήθηκε ο μίσχος και η βάση του φύλλου. Η απομόνωση του RNA έγινε με τη χρήση του RNeasy Plant Mini Kit της Qiagen, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή με μια μικρή τροποποίηση. Για την αντίδραση αναμιχθηκε 1 μg ολικού RNA με διάλυμα που περιείχε τυχαία εξαμερή (Random Hexamers, Invitrogen). Το μίγμα τοποθετήθηκε στους 95 °C για 5 λεπτά, στη συνέχεια στον πάγο για 2 λεπτά και ακολούθησε η προσθήκη των υπόλοιπων συστατικών της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (Ito et al., 2000).

Τα προϊόντα της RT χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για τις PCR. Οι αντιδράσεις έγιναν με τη χρήση ζευγών εκκινητών εξειδικευμένων για κάθε ιό ή ιοειδές (Πίνακας 5.1). Το μίγμα της PCR ήταν ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	13,52	
Buffer B (10x)	2	1x
dNTPs (10mM)	0,4	200μM/dNTP
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,8	0,5 μM
Αντίστροφος εκκινητής (10μM)	0,8	0,5 μM
KAPA Taq polymerase (KAPA)	0,08	0,4 U
Δείγμα RNA	2,4	
Σύνολο	20	

Το πρόγραμμα της PCR ήταν:

95 °C	-	2 λεπτά	} 33 κύκλοι
95 °C	-	30 δευτ.	
60 °C*	-	30 δευτ.	
72 °C	-	1 λεπτό	
72 °C	-	5 λεπτά	

\* Για την ανίχνευση των ιών η θερμοκρασία υβριδισμού ρυθμίστηκε στους 55 °C

Ως θετικοί μάρτυρες για τα ιοειδή, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φύλλων από φυτά αγρού που είχαν βρεθεί μολυσμένα κατά τον έλεγχο των μητρικών δένδρων (Wang et al., 2013). Ως θετικοί μάρτυρες για τους ιούς CPsV και CTLV, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φύλλων από μολυσμένα φυτά που διατηρούνταν σε συνθήκες καραντίνας σε θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του ΓΠΑ, ενώ για το τον CTV χρησιμοποιήθηκε RNA από μολυσμένο φυτό από την Ινδία (Munmi Borah).

**Πίνακας 5.1.** Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της παρουσίας ιών και ιοειδών στα υπό μελέτη δενδρύλλια.

Ονόματα εκκινητών	Ιός/ ιοειδές στόχος	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος (bp)
CEV-AP3 (+) (Ito et al., 2002)	CEVd	GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG	371
CEV-AM3 (-) (Ito et al., 2002)		CCGGGGATCCCTGAAGGACTT	
CVd-I-F	CBLVd	CTCAGCCCTACCTGCGAAAG	170
CVd-I-R		AAGGRGACCGGTCCGGTTAC	
CV2-AP (+) (Ito et al., 2002)	HSVd	GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC	302
CV2-AM (-) (Ito et al., 2002)		CCGGGGCTCCTTCTCAGGTAAGT	
CV3-AP (+) (Ito et al., 2002)	CDVd	CTCCGCTAGTCGGAAAGACTCCGC	271
CV3-AM (-) (Ito et al., 2002)		TCACCAACTTAGCTGCCTTCGTC	
CV4-AP4 (+) (Ito et al., 2002)	CBCVd	TCTGGGGAATTTCTCTGCGGGACC	209
CV4-AM3 (-) (Ito et al., 2002)		TCTATCTCAGGTCGCGAAGGAAGAAGC	
AR18-F (Roy et al., 2005)	CTV	ATGTCAGGCAGCTTGGGAAATT	511
AR18-R (Roy et al., 2005)		TTCGTGTCTAAGTCRCGCTAAACA	
CTLV-AP (+) (Ito et al., 2002)	CTLV	CCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTT	456
CTLV-AM (-) (Ito et al., 2002)		TAGAAAAACCACTAACCCTGGAAATGC	
CPV-F (Vidalakis et al., 2006)	CPsV	CAGTGA CTCTTGATGATGAATC	546
CPV-R (Vidalakis et al., 2006)		CAGGAGTTGCACCAACAG	

### 5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

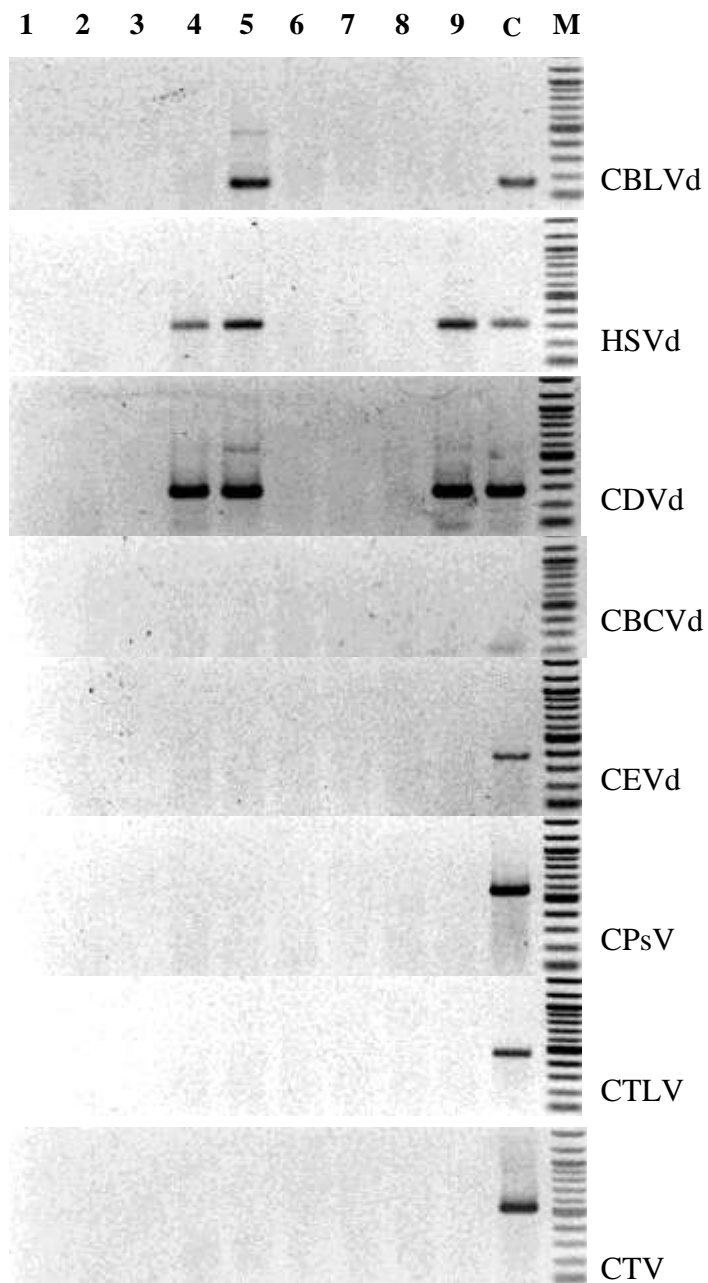
Στην παρούσα μελέτη, έγινε έλεγχος συνολικά 21 δενδρυλλίων εσπεριδοειδών που προέκυψαν από την προσπάθεια παραγωγής εξυγιασμένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Τα περισσότερα δεδομένα για την κατάσταση των μητρικών δένδρων προέρχονται από την εργασία των Wang et al. (2013), ενώ τα υπόλοιπα μητρικά δένδρα ελέγχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Τα μητρικά δένδρα που ελέγχθηκαν προέρχονταν από το Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου και είχαν εγκατασταθεί στο Γ.Π.Α. για τις ανάγκες του προγράμματος εξυγίανσης (Αδαμοπούλου, Βύζα, PO25) ή προέρχονταν από το ιδιωτικό φυτώριο στη Σκάλα Λακωνίας (Interdonato, Newhall, Χιώτικο).

Στις ηλεκτροφορήσεις της Εικόνας 5.2, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανίχνευσης ιών και ιοειδών σε ορισμένες ποικιλίες λεμονιάς και πορτοκαλιάς που προέκυψαν από το μικροεμβολιασμό *in vitro*. Για ορισμένες ποικιλίες επετεύχθη η παραγωγή εξυγιασμένων φυτών, ενώ σε κάποιες ποικιλίες τα νέα δενδρύλλια παρέμειναν μολυσμένα.

Η σύνοψη των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης ιών και ιοειδών στα μικροεμβολιασμένα δενδρύλλια παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.2. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η εφαρμογή του *in vitro* μικροεμβολιασμού μεριστωμάτων μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά στην παραγωγή εξυγιασμένου πολλαπλασιαστικού υλικού των ποικιλιών Βύζα, Ζαμπετάκη, Nouvel Athos, PO25, Όψιμο ομφαλοφόρο Άργους, Washington Navel και Newhall. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ποικιλίες λεμονιάς Βύζα και Ζαμπετάκη, και πορτοκαλιάς PO25 και Όψιμο ομφαλοφόρο Άργους είναι ελληνικές κλωνικές επιλογές για τις οποίες δεν υπάρχει άλλη πηγή λήψης υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού.





**Εικόνα 5.2.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την έλεγχο της παρουσίας πέντε ιοειδών (CBLVd, HSVd, CDVd, CBCVd, CEVd) και τριών ιών (CPsV, CTLV, CTV) σε μικροεμβολιασμένα δενδρύλια. **1:** H<sub>2</sub>O, **2:** Ζαμπετάκη (E63), **3:** Nouvel Athos (E69), **4:** Αδαμοπούλου (E31), **5:** Interdonato (E112), **6:** PO25 (E161), **7:** Όψιμο ομφαλοφόρο Άργους (E40), **8:** Βύζα (E216), **9:** Βύζα (E276), **C:** θετικός μάρτυρας, **M:** 100bp DNA ladder (NEB).

**Πίνακας 5.2.** Αποτελέσματα της ανίχνευσης ιών και ιοειδών σε δενδρύλλια που παράχθηκαν από την εφαρμογή του *in vitro* μικροεμβολιασμού μεριστωμάτων.

	Ιοειδή					Ιοί		
	CBLVd (CVd-Ib)	HSVd (CVd-II)	CDVd (CVd-III)	CBCVd (CVd-IV)	CEVd	CTV	CPsV	CTLV
<b>Λεμονιές</b>								
<i>Αδαμοπούλου (μητρικό δένδρο)</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
Αδαμοπούλου (E30)*	-	+	+	+	+	-	-	-
Αδαμοπούλου (E31)	-	+	+	-	-	-	-	-
Αδαμοπούλου (E295)	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Βύζα (μητρικό δένδρο)</i>	-	+	+	-	+	-	-	-
Βύζα (E216)	-	-	-	-	-	-	-	-
Βύζα (E276)	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Ζαμπετάκη (μητρικό δένδρο)**</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
Ζαμπετάκη (E63)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Interdonato (μητρικό δένδρο)</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
Interdonato (E112)	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Nouvel Athos (μητρικό δένδρο)**</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
Nouvel Athos (E69)	-	-	-	-	-	-	-	-
Nouvel Athos (E73)	-	+	+	+	+	-	-	-
<b>Πορτοκαλιές</b>								
<i>PO25 (μητρικό δένδρο)</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
PO25 (E161)	-	-	-	-	-	-	-	-
PO25 (E166)	-	-	-	-	-	-	-	-
PO25 (E167)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Όψιμο ομφαλ. Άργους (μητρικό δένδρο)**</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
Όψιμο ομφαλ. Άργους (E40)	-	-	-	-	-	-	-	-
Όψιμο ομφαλ. Άργους (E42)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Washington navel (μητρικό δένδρο)**</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
Washington navel (E127)	-	-	-	-	-	-	-	-
Washington navel (E129)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Newhall (μητρικό δένδρο)</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
Newhall (E136)	-	-	-	-	-	-	-	-
Newhall (E145)	-	-	-	-	-	-	-	-
Newhall (E148)	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Μανταρινιές</b>								
<i>Χιώτικο (μητρικό δένδρο)</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
Χιώτικο (E78)	-	+	+	+	-	-	-	-
Χιώτικο (E257)	-	+	+	+	-	-	-	-

\* Στην παρένθεση αναφέρεται ο αύξων αριθμός του μικροεμβολιασμένου φυτού.

\*\* Wang et al., 2013.

Όπως είναι γνωστό, το μέγεθος του μικροεμβολίου παίζει σημαντικό ρόλο στην επιτυχία του εμβολιασμού. Έτσι, το μεγάλο μέγεθος μικροεμβολίου αυξάνει τα ποσοστά επιτυχίας του μικροεμβολιασμού αλλά ταυτόχρονα, μειώνεται το ποσοστό των εξυγιασμένων φυτών (Navarro et al., 1976). Στην περίπτωση της Αδαμοπούλου – E31 και της Βύζα – E276, φαίνεται ότι κατά τη διαδικασία της εξυγίανσης τα νέα δενδρύλλια είναι απαλλαγμένα από ένα ή δύο μόνο από τα ιοειδή με τα οποία είναι μολυσμένα τα μητρικά φυτά. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ανομοιόμορφη κατανομή των διαφόρων ιοειδών στην περιοχή του κορυφαίου μεριστώματος κατά τη στιγμή της λήψης των μικροεμβολίων (Juárez et al., 1990; Flores, 2016).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η εφαρμογή του μικροεμβολιασμού κορυφαίων μεριστωμάτων *in vitro* είναι αποτελεσματική στην απαλλαγή των εσπεριδοειδών από τα ιοειδή, χωρίς να απαιτείται ο συνδυασμός με άλλες μεθόδους όπως η κρυοθεραπεία. Επιπλέον, τα ευρήματα της μελέτης αυτής παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής ακολουθούμενη από αντίδραση PCR μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για την ανίχνευση των ιοειδών των εσπεριδοειδών. Πέραν της αξιοπιστίας, της ταχύτητας καθώς και της ευκολίας εφαρμογής της, η μέθοδος αυτή υπερέχει καθώς δεν απαιτείται η χρήση φυτών-δεικτών για την αύξηση του τίτλου (titer) του ιοειδούς στο δείγμα (Garnsey et al., 2002; Guardo et al., 2005; Bernad and Duran-Vila, 2006).

#### 5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ιολογικές ασθένειες δημιουργούν σοβαρά προβλήματα στις καλλιέργειες τόσο λόγω των σοβαρών απωλειών που προκαλούν όσο και της δυσκολίας στην αντιμετώπισή τους. Στα εσπεριδοειδή, η πιο καταστρεπτική ιολογική ασθένεια προκαλείται από τον ιό της τριστέτσας. Η αντιμετώπισή της απαιτεί τη λήψη προληπτικών κυρίως μέτρων που περιλαμβάνουν τη χρήση ανθεκτικών εμβολίων και υποκειμένων, τον έλεγχο των εισαγομένων φυτών αλλά και την άμεση καταστροφή των μολυσμένων δένδρων. Παρόλα αυτά, το πιο σημαντικό μέτρο για την αποφυγή εξάπλωσης της τριστέτσας και των άλλων ασθενειών που οφείλονται σε ιούς και ιοειδή είναι η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού.

Η εφαρμογή του «Τεχνικού κανονισμού ελέγχου και πιστοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού οπωροφόρων φυτών και των οπωροφόρων δένδρων που προορίζονται για την παραγωγή φρούτων, κατηγοριών ανώτερων της κατηγορίας CAC (Conformitas Agraria Communitatis – Ελαχίστων Κοινοτικών Προδιαγραφών) που παράγεται στην Ελλάδα» (ΦΕΚ1952/23-9-2008) κάνει επιτακτική την ύπαρξη υγιούς προβασικού πολλαπλασιαστικού υλικού στη χώρα μας. Επιπλέον, σύμφωνα με το νέο νόμο (ΦΕΚ 889/13-5-2009) απαραίτητη προϋπόθεση για την εγγραφή των εσπεριδοειδών στον Εθνικό Κατάλογο Ποικιλιών είναι μεταξύ άλλων να είναι απαλλαγμένα από τους πιο σημαντικούς ιούς και ιοειδή, όπως προβλέπεται από το Πρωτόκολλο για τους ελέγχους διακριτότητας, ομοιομορφίας και σταθερότητας που εκδίδεται από το Κοινοτικό Γραφείο Φυτικών Ποικιλιών (CPVO, 2004).

Ενόψει όλων των παραπάνω, είναι προφανής η αναγκαιότητα δημιουργίας στη χώρα μας ενός «Προγράμματος παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού» για τα εσπεριδοειδή. Το πρώτο βήμα έγινε με την επισκόπηση και ανίχνευση ιών και ιοειδών στις μητρικές φυτείες εσπεριδοειδών του Δενδροκομικού Σταθμού Πόρου, ενώ το δεύτερο βήμα ήταν η εξυγίανση των πιο σημαντικών καλλιεργούμενων ποικιλιών εσπεριδοειδών στη χώρα μας (Βολουδάκης κ.ά., 2008, Boubourakas et al., 2010). Οι έλεγχοι των φυτών που προέκυψαν πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Αυτή ήταν η πρώτη μεγάλη προσπάθεια εξυγίανσης του πολλαπλασιαστικού υλικού ποικιλιών εσπεριδοειδών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα και όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας στέφθηκε από επιτυχία.

Από τις ποικιλίες για τις οποίες επετεύχθη η παραγωγή εξυγιασμένου πολλαπλασιαστικού υλικού οι λεμονιές Βύζα και Ζαμπετάκη, και οι πορτοκαλιές ΡΟ25

και Όψιμο ομφαλοφόρο Άργους είναι ελληνικές κλωνικές επιλογές για τις οποίες δεν έχει γίνει άλλη προσπάθεια εξυγίανσης στην Ελλάδα. Οι ποικιλίες αυτές έχουν πολύ καλά αγρονομικά χαρακτηριστικά (πρωιμότητα-οψιμότητα) και η ύπαρξη υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού μπορεί να συμβάλει στην εξάπλωση της καλλιέργειάς τους, ακόμα και σε συνδυασμό με ευαίσθητα στα ιοειδή υποκείμενα.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι πλέον υπάρχει και στη χώρα μας η τεχνογνωσία για όλα τα στάδια της εξυγίανσης των εσπεριδοειδών, από την εφαρμογή της «λεπτής» τεχνικής του *in vitro* μικροεμβολιασμού κορυφαίων μεριστωμάτων μέχρι τον έλεγχο για την παρουσία ιών και ιοειδών στα παραγόμενα από τη διαδικασία αυτή νεαρά δενδρύλλια. Επόμενο σημαντικό βήμα για τα φυτά αυτά είναι η διατήρησή τους υπό κατάλληλες συνθήκες και ο μετέπειτα πολλαπλασιασμός τους, καθώς αποτελούν το υλικό πυρήνα από το οποίο θα προκύψει το προβασικό και το βασικό υλικό για την παραγωγή στην Ελλάδα υγιούς και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών. Προς την κατεύθυνση αυτή, είναι σημαντικό να συνεχιστούν οι προσπάθειες για την εξυγίανση και των υπόλοιπων ποικιλιών εσπεριδοειδών που καλλιεργούνται στη χώρα μας. Τέλος, κρίνεται σκόπιμη η εφαρμογή της τεχνικής του *in vitro* μικροεμβολιασμού και ως μέρος ενός συστήματος εξυγίανσης νέων ποικιλιών που εισάγονται στη χώρα μας.

Μέρος των αποτελεσμάτων του παρόντος κεφαλαίου παρουσιάστηκαν στο 1<sup>st</sup> General Meeting του COST FA1306, Gatersleben 22-24 Ιουνίου, 2015. Η περίληψη παρατίθεται στο Παράρτημα III.



Δικτυοκήπιο του Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) όπου φυλάσσεται η τράπεζα γενετικού υλικού των εσπεριδοειδών της Ισπανίας. Η τελευταία, περιλαμβάνει 653 γονοτύπους που προέκυψαν από *in-vitro* μικροεμβολιασμό Ισπανικών και ξένων ποικιλιών (Moncada, Valencia) (προσωπικό αρχείο).

## 5.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βολουδάκης ΑΕ, Καπαρή-Ησαΐα Θ, Κουτσιουμάρη ΕΜ, κ.ά (2008) Εξυγίανση εκλεκτών ποικιλιών εσπεριδοειδών στην Ελλάδα – Πρώτα πειραματικά δεδομένα. Πρακτ. 14<sup>ου</sup> Πανελ. Φυτοπαθολ. Συνεδρ. σελ. 112.
- Καπαρή-Ησαΐα Θ (2006) Εξυγίανση ποικιλιών και κλώνων εσπεριδοειδών στην Κύπρο. Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών. Κύπρος. ISBN: 9963-1-6005-0.
- Κυριακοπούλου ΠΗ, Δήμου Δ (2008) Ιολογικές και παρόμοιες ασθένειες των εσπεριδοειδών. Γεωργία-Κτηνοτροφία 10:104-121.
- Πλαστήρα Β (1987) Εφαρμογή της μεθόδου του μικροεμβολιασμού για την απαλλαγή από τις ιώσεις της ποικιλίας μανταρινιάς «κλημεντίνη Πόρου». Χρον. Μπενακείου Φυτοπαθ. Ινστ. 15:99-113.
- ΦΕΚ 889/13-5-2009. Ειδικός Τεχνικός Κανονισμός Αποδοχής Ποικιλιών των καλλιεργουμένων φυτικών ειδών καρποφόρων δένδρων, θάμνων και λοιπών μικρών καρποφόρων.
- ΦΕΚ 1952/28-9-2008. Τεχνικός Κανονισμός Ελέγχου και Πιστοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού οπωροφόρων φυτών και των οπωροφόρων δένδρων που προορίζονται για την παραγωγή φρούτων, κατηγοριών ανώτερων της κατηγορίας CAC (Conformitas Agraria Communitatis – Ελαχίστων Κοινοτικών Προδιαγραφών) που παράγεται στη χώρα.
- Achachi A, Ait Barka E, Ibriz M (2014) Recent advances in *Citrus psorosis virus*. *VirusDisease* 25:261–276.
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF (1989) The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annu Rev Phytopathol* 27:291–316.
- Bernad L, Duran-Vila N (2006) A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Mol Cell Probes* 20:105–113.
- Boubourakas IN, Voloudakis AE, Agorastou T, et al (2010) Pilot survey of citrus mother trees in Greece for the presence of viruses and viroids. In: Hilf ME, Milne RG, Timmer LW, da Graça J V. (eds) Proc. 17h Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside, pp 229–232.
- Bové JM (1995) Virus and virus-like diseases of citrus in the Near East region. Food and Agric. Org. of the United Nations, Rome.
- Cambra M, Gorrís MT, Marroquín C, et al (2000a) Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Res* 71:85–95.
- Cambra M, Gorrís MT, Román MP, et al (2000b) Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and

- recombinant antibodies. In: da Graça JV, Lee RF, Yokomi RK (eds) Proc. 14th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside, pp 34–41.
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34:475–483.
- CPVO (2004) Protocol for distinctness, uniformity and stability tests. CPVO-TP202.
- Derrick KS, Barthe GA (2000) Psorosis. In: Timmer L, Garnsey S, Graham J (ed) *Compendium of Citrus diseases*, 2nd edn, APS Press, Minnesota, pp 58-59.
- Dimou D, Drossopoulou J, Moschos E, et al (2002) First report of *Citrus tristeza virus* in Greece. In: Durán-Vila N, Milne R, da Graça J (eds) Proc. 15th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside, pp 78–82.
- Duran-Vila N, Pina JA, Navarro L (1993) Improved indexing of citrus viroids. In: Moreno P, da Graça J, Timmer L (eds) Proc. 12th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside, pp 202–211.
- Duran-Vila N, Semancik JS, Broadbent P (2000) Viroid diseases. In: Timmer L, Garnsey S, Graham J (ed) *Compendium of Citrus diseases*, 2nd edn, APS Press, Minnesota, pp 51-54.
- Duran-Vila N, Semancik JS (2003) Citrus viroids. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS (ed) *Viroids*. CSIRO Publishing, Australia, pp 178-194.
- EPPO (2004) *Citrus tristeza closterovirus*. EPPO Bull 34:239–246.
- Flores R (2016) Callose deposition in plasmodesmata and viroid invasion of the shoot apical meristem. *Front Microbiol* 7:52.
- Garnsey SM (1999) Systemic diseases. In: Timmer LW, Duncan LW (ed) *Citrus health management*, APS Press, Minnesota, pp 95-106.
- Garnsey, S M, Zies, D L, Irely M, et al (2002) Practical field detection of citrus viroids in Florida by RT-PCR. In: Durán-Vila N, Milne R, da Graça J (eds) Proc. 15th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside, pp 219–229.
- Guardo M, Marletta T, Boninelli G, et al (2005) Detection of viroids in forced citrus cuttings. *J Plant Pathol* 87:141–144.
- Hadidi A, Yang X (1990) Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J Virol Methods* 30:261–269.
- Hermoso de Mendoza A, Alvarez A, Michelena JM, et al (2008) Spread, biology and natural enemies of *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Hemiptera, Aphididae) in Spain. *Boletín de Sanidad Vegetal – Plagas* 34:77-87.

- Hutton RJ, Broadbent P, Bevington KB (2000) Viroid dwarfing for high density citrus plantings. *Hortic Rev* 24: 277–317.
- IOCV Committee on Indexing Procedures, Diagnosis, and Nomenclature (1968) Indexing procedures for 15 virus diseases of citrus trees. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, Washington
- Ito T, Ieki H, Ozaki K, Ito T (2000) A population of variants of a viroid closely related to *citrus viroid I* in citrus plants. *Arch Virol* 145:2105-2114.
- Ito T, Ieki H, Ozaki K, Ito T (2001) Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed Citrus viroid OS. *Arch Virol* 146:975–982.
- Ito T, Ieki H, Ozaki K (2002) Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 106:235–239.
- Juárez J, Molins M, Navarro L, Duran-Vila N (1990) Separation of citrus viroids by shoot-tip grafting *in vitro*. *Plant Pathol* 39:472–476.
- Kyriakopoulou PE (2002) Virus and virus-like diseases of citrus in Greece and the greek certification program. In: Durán-Vila N, Milne R, da Graça J (eds) Proc. 15th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside, pp 408–412.
- Lee RF, Lehman PS, Navarro L (1999) Nursery practices and certification programs for budwood and rootstocks. In: Timmer LW, Duncan LW (ed) Citrus health management, APS Press, Minnesota, pp 35-46.
- Lee RF, Bar-Joseph M (2000) Tristeza. In: Timmer L, Garnsey S, Graham J (ed) Compendium of Citrus diseases, 2nd edn, APS Press, Minnesota, pp 61-63.
- Lin NS, Hsu YH, Hsu HT (1990) Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80:824–828.
- Meinkoth J, Wahl G (1984) Hybridisation of nucleic acids immobilised on solid supports. *Anal Biochem* 138:267–284.
- Miyakawa T, Ito T (2000) Tatter leaf – Citrange stunt. In: Timmer L, Garnsey S, Graham J (ed) Compendium of Citrus diseases, 2nd edn, APS Press, Minnesota, pp 60.
- Mühlbach H-P, Weber U, Gómez G, et al (2003) Molecular hybridization. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS (ed) Viroids. CSIRO Publishing, Australia, pp 103-114.
- Murashige T, Bitters WP, Rangan TS, et al (1972) A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. *HortScience* 7:118–119.



- Navarro L, Roistacher CN, Murashige T (1975) Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *J Am Soc Hortic Sci* 100:471–479.
- Navarro L, Roistacher CN, Murashige T (1976) Effect of size and source of shoot tips on psorosis-A and exocortis content of navel orange plants obtained by shoot tip grafting *in vitro*. In: Calavan E (ed) *Proc. 7th Conf. Int. Organ. Citrus Virol.* IOCV: Riverside, pp 194–197.
- Navarro L (1993) Citrus sanitation, quarantine and certification programs. In: Moreno P, da Graça J, Timmer L (eds) *Proc. 12th Conf. Int. Organ. Citrus Virol.* IOCV: Riverside, pp 383–391.
- Rivera-Bustamante RF, Gin R, Semancik JS (1986) Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Anal Biochem* 156:91–95.
- Roistacher CN, Navarro L, Murashige T (1976) Recovery of citrus selections free of several viruses, exocortis viroid, and *Spiroplasma citri* by shoot-tip grafting *in vitro*. In: Calavan E (ed) *Proc. 7th Conf. Int. Organ. Citrus Virol.* IOCV: Riverside, pp 186–193.
- Roistacher CN, Bash JA, Semancik JS (1993) Distinct disease symptoms in *Poncirus trifoliata* induced by three citrus viroids from three specific groups. In: Moreno P, da Graça JV, Timmer LW (eds) *Proc. 12th Conf. Int. Organ. Citrus Virol.* IOCV: Riverside, pp 173–179.
- Roy A, Fayad A, Barthe G, Brlansky RH (2005) A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. *J Virol Methods* 129:47–55.
- Semancik JS, Rakowski AG, Bash JA, Gumpf DJ (1997) Application of selected viroids for dwarfing and enhancement of production of “Valencia” orange. *J Hortic Sci* 72:563–570.
- Serra P, Barbosa CJ, Darós JA, et al (2008a) *Citrus viroid V*: Molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus *Apscaviroid*. *Virology* 370:102–112.
- Serra P, Eiras M, Bani-Hashemian SM, et al (2008b) *Citrus viroid V*: occurrence, host range, diagnosis, and identification of new variants. *Phytopathology* 98:1199–1204.
- Timmer L, Garnsey S, Graham J (2000) *Compendium of Citrus diseases*, 2nd edn, APS Press, Minnesota, pp 51–66.
- Varveri C, Maliogka V, Kapari-Isaia T (2015) Principles for supplying virus-tested material. In: Loebenstein G, Katis N (eds) *Advances in virus research*. Academic Press, pp 1–32.

- Vernière C, Botella L, Dubois A, et al (2002) Properties of citrus viroids: Symptom expression and dwarfing. In: Durán-Vila N, Milne R, da Graça J (eds) Proc. 15th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside, pp 240–248.
- Vernière C, Perrier X, Dubois C, et al (2004) Citrus Viroids: Symptom expression and effect on vegetative growth and yield of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Plant Dis* 88:1189–1197.
- Vidalakis GE, Boubourakas IN, Voloudakis AE et al (2006) Pilot survey of citrus mother trees in Greece for the presence of viruses and viroids. In: Paplomatas E (eds) Proc. 12th Int. Conf. Organ. Med. Phytopathol. pp 168–171.
- Wang J, Boubourakas IN, Voloudakis AE, et al (2013) Identification and characterization of known and novel viroid variants in the Greek national citrus germplasm collection: threats to the industry. *Eur J plant Pathol J plant Pathol* 137:17–27.

## **Κεφάλαιο 6. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων διαφορετικά εκφραζομένων σε βλαστούς δύο ποικιλιών λεμονιάς**

### **6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

#### **6.1.1. Παράγοντες καταπόνησης στη λεμονιά**

Η λεμονιά (*Citrus limon* Burm.) ήλθε στη Μεσόγειο με τους Άραβες αλλά η εξάπλωσή της γύρω από τη Μεσόγειο καθώς και η εμπορική της εξέλιξη έγινε από τους Γενουάτες και τους Βενετούς (Πρωτοπαπαδάκης, 1994). Στην Ελλάδα, οι πρώτες περιοχές στις οποίες καλλιεργήθηκε ήταν η Ρόδος και η Κως (Γεννάδιος, 1997). Σήμερα, η καλλιέργεια της λεμονιάς είναι η τρίτη σημαντικότερη καλλιέργεια εσπεριδοειδών στη χώρα μας, με την παραγωγή να ανέρχεται στους 46.000 τόνους (FAO, 2012). Οι μεγαλύτερες εκτάσεις καλλιέργειας της λεμονιάς βρίσκονται στο Νομό Κορινθίας, με τη Μαγληνή να αποτελεί τη σημαντικότερη καλλιεργούμενη ποικιλία (Γεωργία-Κτηνοτροφία, 2008).

Η λεμονιά υποφέρει από πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων που μειώνουν τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων, ενώ πολλές φορές οδηγούν και σε μείωση της διάρκειας ζωής του δένδρου. Στις βιοτικές καταπονήσεις συμπεριλαμβάνονται αρκετά έντομα, μύκητες και ιοί ενώ σε επίπεδο αβιοτικών καταπονήσεων, η λεμονιά πλήττεται περισσότερο από τις χαμηλές θερμοκρασίες και την έλλειψη σημαντικών ιχνοστοιχείων.

Μια από τις περισσότερο επιζήμιες μυκητολογικές ασθένειες της λεμονιάς είναι η κορυφοξήρα που προκαλείται από το μύκητα *Phoma tracheiphila* (Petri) Kant.&Gik. (EPPO). Η ασθένεια εκδηλώνεται με μαρασμό και ξήρανση των φύλλων σε μερικούς βλαστούς και εν συνεχεία, με την αποξήρανση από την κορυφή προς τη βάση των κλαδίσκων και βραχιόνων του δένδρου (Παναγόπουλος, 1997). Χαρακτηριστικό παθογνωμονικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι ο μεταχρωματισμός του ξύλου των προσβεβλημένων κλάδων. Στα αρχικά στάδια της προσβολής, όπου οι κλάδοι είναι ακόμα πράσινοι ή ημίξηροι, το ξύλο αποκτά χρώμα ρόδινο έως πορτοκαλί, ενώ σε προχωρημένο στάδιο μεταχρωματίζεται σε καστανό (Παναγόπουλος, 1997). Για την αντιμετώπιση της κορυφοξήρας συνίσταται η αφαίρεση και το κάψιμο των ξηρών κλάδων μαζί με τμήμα του υγιούς βλαστού, η εκρίζωση και το κάψιμο των δένδρων που ξηραίνονται από την ασθένεια, η αποφυγή τραυματισμού των ριζών, του κορμού

και των κλάδων των δένδρων κατά την εκτέλεση καλλιεργητικών εργασιών καθώς και ψεκασμοί με χαλκούχα σκευάσματα από το φθινόπωρο μέχρι τις αρχές τις άνοιξης (Solel and Salerno, 2000). Παρόλα αυτά, η αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας προϋποθέτει τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών λεμονιάς, όπως οι ελληνικές Αδαμοπούλου, Βακάλου και Καρυστινή και οι ξένες Ziacara Bianca, Interdonato, Λαπήθου Κύπρου, Monachello και Nouvel Athos (Πρωτοπαπαδάκης, 2004). Ωστόσο, η πρακτική αυτή περιορίζει σημαντικά τη δυνατότητα αξιοποίησης ορισμένων πολύ καλών ποικιλιών, όπως η Lisbon, η Eureka και η Μαγληνή, ιδιαίτερα σε περιοχές όπου το πρόβλημα της κορυφοξήρας είναι έντονο.

Δεύτερος σε σημαντικότητα παράγοντας καταπόνησης της λεμονιάς είναι το ψύχος. Η ευαισθησία στο ψύχος έγκειται στο γεγονός ότι οι λεμονιές, σε αντίθεση με τα άλλα εσπεριδοειδή, δεν εισέρχονται σε λήθαργο κατά τη διάρκεια του χειμώνα αλλά χαρακτηρίζονται από μια τάση συνεχούς βλάστησης και καρποφορίας (Ποντίκης, 2003). Συνεπώς, οι χαμηλές θερμοκρασίες και οι παγετοί συνιστούν αιτίες σοβαρών απωλειών στην παραγωγή και οικονομικών ζημιών στους παραγωγούς. Επιπρόσθετα, οι ζημιωμένοι από τον παγετό βραχίονες, κλάδοι και βλαστοί αποτελούν εστίες δευτερογενών μολύνσεων, με αποτέλεσμα να προσβάλλονται συχνά από μύκητες και βακτήρια που μπορούν να οδηγήσουν τελικά στη νέκρωσή τους (Timmer et al., 2000). Για παράδειγμα, οι σχισμές στο φλοιό των βλαστών αποτελούν πολύ σημαντικές πύλες εισόδου στο υπέργειο μέρος του φυτού του μύκητα *P. tracheiphila*. Από τις διάφορες ποικιλίες λεμονιάς, η πλέον ανθεκτική στις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα είναι η Nouvel Athos, ενώ σχετική ανθεκτικότητα στο ψύχος παρουσιάζουν: η Eureka SRA4, η Ziacara Bianca και από τις ελληνικές ποικιλίες η Αδαμοπούλου (Πρωτοπαπαδάκης, 1994).

### **6.1.2. Βελτίωση της λεμονιάς για ανθεκτικότητα σε παράγοντες καταπόνησης**

Η κλασική βελτίωση των εσπεριδοειδών είναι χρονοβόρα και υψηλού κόστους διαδικασία, διότι τα εσπεριδοειδή είναι πολυετή φυτά, χαρακτηρίζονται από μεγάλη περίοδο νεανικότητας, έχουν υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας και εμφανίζουν τα φαινόμενα της πολυεμβρυονίας και της απομιξίας (Khan και Kender, 2007). Για τους λόγους αυτούς, οι προσεγγίσεις μοριακής βελτίωσης αποτελούν μια αποτελεσματική εναλλακτική λύση, καθώς επιτρέπουν την ενσωμάτωση επιθυμητών γνωρισμάτων σε υπάρχοντες καλούς γονοτύπους χωρίς να επηρεάζονται τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά

τους (Peña et al. 2007). Προς την κατεύθυνση αυτή, είναι σημαντικός ο προσδιορισμός και η απομόνωση γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα των εσπεριδοειδών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Οι σχετικές μελέτες δύνανται να αξιοποιηθούν στα πλαίσια της μοριακής βελτίωσης των εσπεριδοειδών για τη δημιουργία βελτιωμένων ανθεκτικών ποικιλιών.

Είναι ευρέως γνωστό ότι η αλληλεπίδραση των ξενιστών με τους παθογόνους μικροοργανισμούς έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πλήθους μεταβολικών μονοπατιών άμυνας. Οι επικείμενες μεταβολές περιλαμβάνουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), την επαγωγή του μηχανισμού της επίκτητης διασυστηματικής ανθεκτικότητας (systemic acquired resistance, SAR) και σε ορισμένες περιπτώσεις, την πυροδότηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (hypersensitive response, HR). Η τελευταία, αφορά τη νέκρωση των κυττάρων του ξενιστή πλησίον του σημείου εισόδου του παθογόνου και έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εγκατάστασης και εξάπλωσης του παθογόνου (Hammond-Kosack and Jones, 1996). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών έναντι των παθογόνων παίζει η συσσώρευση ουσιών όπως οι φυτοαλεξίνες και οι πρωτεΐνες παθογένεσης (pathogenesis-related proteins, PR). Από τα ανωτέρω είναι φανερό ότι ο εντοπισμός των γονιδίων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών ή επάγουν την παραγωγή εξειδικευμένων ουσιών είναι θεμελιώδους σημασίας για τη βελτίωση της αντοχής των φυτών γενικότερα και των εσπεριδοειδών ειδικότερα στις βιοτικές καταπονήσεις.

Όσον αφορά τη μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στο μύκητα *P. tracheiphila*, οι Recupero et al. (1997) διατύπωσαν την υπόθεση της ύπαρξης τριών εναλλακτικών (alternative) γονιδίων (A, B και C) που εμφανίζουν κυριαρχική δράση. Η ύπαρξη έστω και ενός κυρίαρχου αλληλομόρφου οδηγεί στην εκδήλωση ανθεκτικότητας στην κορυφοξήρα. Ωστόσο, αναφέρεται η ύπαρξη ενός τέταρτου γονιδίου (I) το οποίο στην κυρίαρχη μορφή του λειτουργεί ως επιστατικό, με αποτέλεσμα να επάγει ευαισθησία αδρανοποιώντας την κυριαρχία του B αλληλομόρφου (Recupero et al., 1997). Όμως, είναι πολύ πιθανό στο γνώρισμα της ανθεκτικότητας στην κορυφοξήρα να εμπλέκεται μεγαλύτερος αριθμός γονιδίων.

Οι Gentile et al. (2007) δημιούργησαν διαγονιδιακά φυτά λεμονιάς που εξέφραζαν το γονίδιο *chit42* από το μύκητα *Trichoderma harzianum* και βρήκαν ότι αυξήθηκε η ανθεκτικότητά τους στους μύκητες *P. tracheiphila* and *Botrytis cinerea*. Η παρατηρηθείσα αύξηση στην έκφραση τριών γονιδίων (allene oxide synthase, fatty acid

hydroperoxide lyase και phenylalanine-ammonia lyase), που εμπλέκονται στο μηχανισμό της επαγόμενης διασυστηματικής ανθεκτικότητας (induced systemic resistance, ISR), πιθανολογείται ότι ευθύνεται για την αυξημένη ανθεκτικότητα των διαγονιδιακών φυτών στους δύο μύκητες (Distefano et al., 2008). Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει στραφεί περισσότερο προς την ανάπτυξη ανθεκτικότητας μέσω της χρήσης βιολογικών παραγόντων (βάκιλλοι, ενδόφυτα κλπ.). Για το λόγο αυτό, δεν υπάρχουν νεότερα δεδομένα σχετικά με τα γονίδια που πιθανόν εμπλέκονται στην άμυνα της λεμονιάς εναντίον της κορυφοξήρας.

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες, είναι μια ιδιότητα που μπορεί να αυξήσει τη ζώνη καλλιέργειας της λεμονιάς και να μειώσει τις οικονομικές ζημιές που προκύπτουν από την καταστροφή των δένδρων έπειτα από την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών. Η έκθεση των φυτών στις χαμηλές θερμοκρασίες επηρεάζει την έκφραση πλήθους γονιδίων που κωδικοποιούν ρυθμιστικές αλλά και λειτουργικές πρωτεΐνες. Τα φυτά προσαρμόζονται στις χαμηλές θερμοκρασίες ενεργοποιώντας μια σειρά από βιοχημικά γεγονότα που οδηγούν σε φυσιολογικές και βιοχημικές αλλαγές. Κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού παράγονται νέες πρωτεΐνες, αλλάζει η σύσταση των λιπιδίων και των υδατανθράκων, συσσωρεύονται ωσμωλύτες, όπως η προλίνη, η βεταΐνη και διαλυτά σάκχαρα, και ενεργοποιούνται τα κανάλια ιόντων (Zhang et al. 2005). Το *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. και το *Citrus unshiu* είναι από τα πλέον ανθεκτικά στις χαμηλές θερμοκρασίες εσπεριδοειδή. Για το λόγο αυτό, το πρώτο έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετά βελτιωτικά προγράμματα με στόχο την αύξηση της ανθεκτικότητας στο ψύχος, όμως χωρίς μεγάλη επιτυχία (Sahin-Cevik and Moore, 2006). Η μοριακή ανάλυση των δύο συγκεκριμένων ειδών έδειξε ότι υπό την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών επάγεται η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μεταγραφή των γονιδίων, ο μεταβολισμός, η άμυνα των κυττάρων, η μετάδοση σημάτων και ο μηχανισμός μεταφοράς πρωτεϊνών, γεγονός που υποδεικνύει ότι το γνώρισμα της αντοχής στις χαμηλές θερμοκρασίες παρουσιάζει σύνθετη γενετική βάση (Lang et al., 2005; Sahin-Cevin and Moore, 2006).

Αξιοσημείωτο είναι ότι πολλά γονίδια που εμπλέκονται στην ανταπόκριση των φυτών στο ψύχος ενεργοποιούνται και σε συνθήκες ξηρασίας, γεγονός που αποδίδεται στο ότι η καταπόνηση που προκαλείται από χαμηλές θερμοκρασίες είναι αντίστοιχη αυτής που οφείλεται στην ξηρασία και την αφυδάτωση. Μια ομάδα γονιδίων που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή των φυτών στις χαμηλές θερμοκρασίες αλλά και στην ξηρασία είναι οι αφυδρίνες. Πρόκειται για πρωτεΐνες που

προσδένονται στα κυτταρικά μακρομόρια, ειδικότερα στις μεμβράνες και τις πρωτεΐνες, εμποδίζοντας την πήξη τους και συμβάλλοντας στη διατήρηση της λειτουργικότητάς τους υπό συνθήκες περιβαλλοντικών καταπονήσεων (Close, 1997). Στα εσπεριδοειδή, έχει απομονωθεί η αφυδρίνη CuCOR19, η οποία φαίνεται ότι ενεργοποιείται από τις χαμηλές θερμοκρασίες και έχει κρυο-προστατευτική δράση (Hara et al., 2001).

Η κατασκευή και ανάλυση αφαιρετικών βιβλιοθηκών μεταξύ δύο πληθυσμών που διαφέρουν ως προς την ανθεκτικότητα σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις είναι μια αποτελεσματική μέθοδος εντοπισμού των γονιδίων που πιθανόν εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών. Η σύγκριση μεταξύ δύο πληθυσμών mRNA μπορεί να γίνει με πολλές μεθόδους, όπως η διαφορική έκφραση (differential display, DD), ο κατασταλτικός αφαιρετικός υβριδισμός (suppression subtractive hybridization, SSH), οι μικροσυτοιχίες (microarrays) και η αλληλούχηση του RNA (RNA-Seq) (Cassasola et al., 2013).

### **6.1.3. Ανίχνευση διαφορικά εκφραζομένων γονιδίων στις ποικιλίες λεμονιάς Αδαμοπούλου και Lisbon**

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η μελέτη της διαφορικής έκφρασης γονιδίων που ελέγχουν σημαντικά αγρονομικά γνωρίσματα διευκολύνεται σημαντικά από τη διαθεσιμότητα γενετικού υλικού που χαρακτηρίζεται από συγγενικό γενετικό υπόβαθρο και διαφορικό φαινότυπο ως προς τα υπό μελέτη γνωρίσματα. Στα πλαίσια αυτά, οι ποικιλίες λεμονιάς «Αδαμοπούλου» και «Lisbon», που παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συγγένειας (η «Αδαμοπούλου» θεωρείται κλώνος της «Lisbon») και επιπλέον θεωρούνται ανεκτική και ευαίσθητη αντίστοιχα στην κορυφοξήρα και στο ψύχος (Πρωτοπαπαδάκης, 1994), συνιστούν ιδανικό γενετικό υλικό για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης γονιδίων (Πασσίσης και Κεραμίδας, 1983). Για το σκοπό αυτό, προηγούμενες μελέτες επικεντρώθηκαν στη σύγκριση σε μεταγραφικό επίπεδο (mRNA) των γονιδίων που εκφράζονται στο βλαστό των ποικιλιών «Αδαμοπούλου» και «Lisbon», οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ανθεκτικότητα στην κορυφοξήρα και το ψύχος (Κουτσιουμάρη, 2007; Κουτσιουμάρη, 2009). Από τους βλαστούς των δύο ποικιλιών απομονώθηκε RNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή δύο αφαιρετικών (subtracted) cDNA βιβλιοθηκών με την εφαρμογή της τεχνικής του Κατασταλτικού Αφαιρετικού Υβριδισμού. Τα προϊόντα των «αφαίρέσεων» κλωνοποιήθηκαν, αλληλουχήθηκαν και οι αποκτηθείσες αλληλουχίες

κατατέθηκαν στη διεθνή βάση δεδομένων NCBI με αριθμούς πρόσβασης GO256630-GO256710. Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με αυτές που βρίσκονται κατατεθειμένες στις διεθνείς βάσεις δεδομένων. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι οι δύο ποικιλίες λεμονιάς εμφανίζουν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων τους με τις αλληλουχίες της «Αδαμοπούλου» να παρουσιάζουν ομολογία με πρωτεΐνες που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Κουτσιουμάρη, 2009).

#### **6.1.4. Σκοπός**

Στόχος των πειραμάτων του παρόντος τμήματος της διατριβής ήταν η περαιτέρω μελέτη των αλληλουχιών που εκφράζονται διαφορετικά στην ποικιλία «Αδαμοπούλου». Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των αλληλουχιών ως προς τη λειτουργικότητά τους στο φυτό και μετρήθηκε η σχετική έκφραση οκτώ επιλεγμένων cDNAs μεταξύ των δύο ποικιλιών με την εφαρμογή αντιδράσεων PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).



## 6.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 6.2.1. Κατηγοριοποίηση των αλληλουχιών

Οι αποκτηθείσες αλληλουχίες (Κουτσιουμάρη, 2009) επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού BLAST-X (NCBI, USA), προκειμένου να επικαιροποιηθεί ο πίνακας με τις πιο πρόσφατες ομοιότητες με πρωτεΐνες που είναι κατατεθειμένες στη διεθνή βάση δεδομένων του NCBI για το βασίλειο των Viridiplantae. Ως κατώτατο όριο ομοιότητας (e-value cutoff) ορίστηκε το  $10^{-3}$ . Τα αποτελέσματα εισήχθησαν στο λογισμικό Blast2Go (Conesa et al., 2005), με το οποίο έγινε κατηγοριοποίηση των αλληλουχιών με βάση τη λειτουργία τους στο φυτό.

### 6.2.2. Ανάλυση των αλληλουχιών με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Επιλέχθηκαν οκτώ αλληλουχίες της αφαιρετικής βιβλιοθήκης «Αδαμοπούλου-Lisbon» και σχεδιάστηκαν εκκινητές με τη χρήση του λογισμικού Beacon Designer 5 (Πίνακας 6.1). Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της δεύτερης υπομονάδας της αφυδρογονάσης του NADH (*ndhB* gene). Η καταλληλότητα του εν λόγω γονιδίου ως εσωτερικού μάρτυρα (housekeeping gene) έγκειται στο γεγονός ότι εκφράζεται σταθερά σε διαφορετικούς ιστούς και αναπτυξιακά στάδια του φυτού (Maloukh et al., 2009).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής με το ένζυμο SuperScript II (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε 1μg ολικού RNA από δείγματα βλαστού των ποικιλιών Αδαμοπούλου και Lisbon.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων RT αραιώθηκαν 1:10 και χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για τις αντιδράσεις Real-time PCR. Οι αντιδράσεις έγιναν σε δύο επαναλήψεις με το ένζυμο KAPA SYBR FAST qPCR Kit της KaraBiosystems στο παρακάτω μίγμα:

Συστατικά	Ποσότητες (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	2	
SuperMix (2x)	5	1x
Πρόσθιος εκκινητής (2μM)	1	0,2 μM
Αντίστροφος εκκινητής (2μM)	1	0,2 μM
Προϊόν RT	1	
Σύνολο	10	

Το πρόγραμμα της Real time PCR που χρησιμοποιήθηκε στο θερμοκυκλικό μηχάνημα MJ MiniOpticon της Biorad ήταν:

95 °C	-	3 λεπτά	}	40 κύκλοι
95 °C	-	3 δευτ.		
50 °C	-	20 δευτ.		
72 °C	-	20 δευτ.		

διάβασμα των δειγμάτων

Στο τέλος του προγράμματος υπήρξε ένα στάδιο για τη δημιουργία της καμπύλης αποδιάταξης (melt curve):

95 °C για 10 δευτερόλεπτα,

melt curve 65 °C to 95 °C, με αύξηση κατά 0,5 °C για 5 δευτερόλεπτα και διάβασμα των δειγμάτων.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση των λογισμικών Bio-Rad CFX Manager και του Microsoft Excel. Για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων εφαρμόστηκε η εξίσωση  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001), όπως περιγράφηκε στην υποενότητα 3.2.2.3. του Κεφαλαίου 3.

**Πίνακας 6.1.** Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των υπό μελέτη διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων.

Ονόματα εκκινητών	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος (bp)
CLAdsh-42-F	GATGCCGAAGGTGGAAAGG	129
CLAdsh-42-R	AAGGTGCTGTCGTGTATCTAC	
CLAdsh-115-F	GATGGTCACGCACTCACG	136
CLAdsh-115-R	GCCTGCCGCCATAATTTTC	
CLAdsh-160-F	ACGCTTAACAGGATCAAAGTTG	91
CLAdsh-160-R	CTTCTTGCTCTGTATAGTTGCTG	
CLAdsh-252R-F	AAGAAGACAACGAAGGCATC	120
CLAdsh-252R-R	GGAAGCAAACCTGAATACGC	
CLAdsh-254-F	TTCGTGGACACCATCAGC	138
CLAdsh-254-R	CAGGATCAGCAGGCGTTC	
CLAdsh-282R-F	ACATAAACCAAACACATT	77
CLAdsh-282R-R	TCTGTTACTGCTGCTTTTC	
CLAdsh-583-F	TGCCGCCGACATAGAAGG	110
CLAdsh-583-R	CGAAATGCCGAACACCAAC	
CLAdsh-591-F	CAGGGTGTATAGGCGTAG	101
CLAdsh-591-R	ACCAGACCTTCGTGTTCC	
qNADH-F	TCCCACTCCAGTCGTTGC	120
qNADH-R	TCCAGAAGAAGATGCCATTTCG	

## 6. 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 6.3.1. Κατηγοριοποίηση των αλληλουχιών

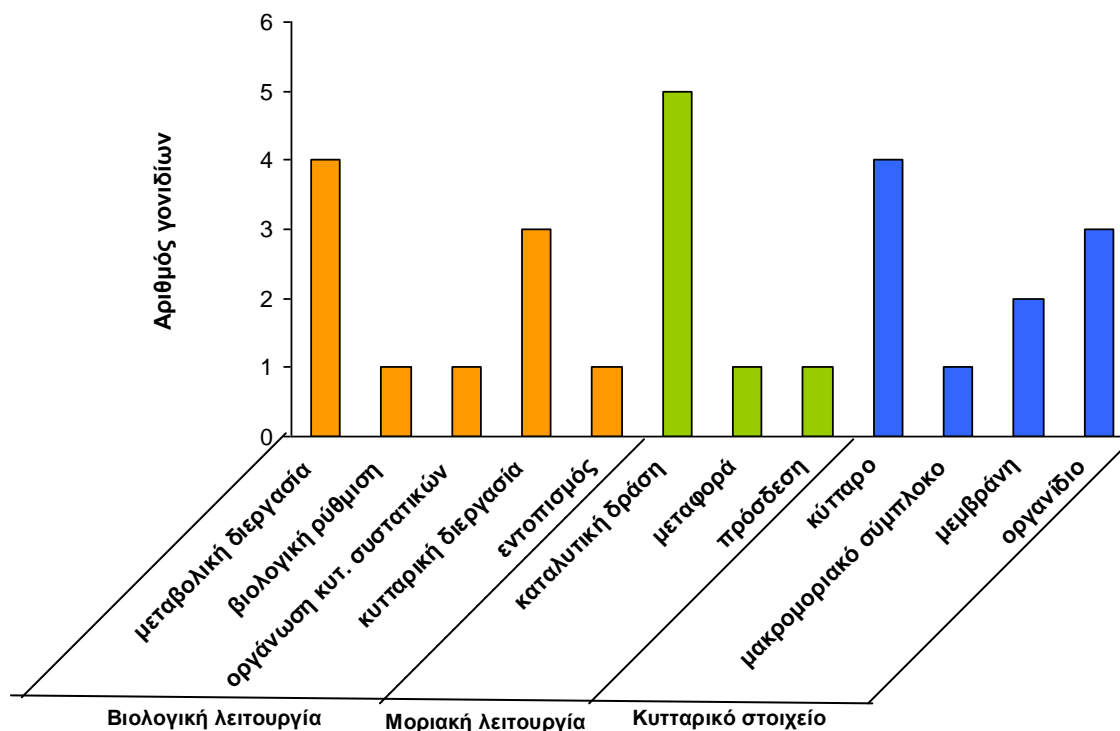
Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης έγινε εκ νέου διαλογή των αλληλουχιών της αφαιρετικής βιβλιοθήκης «Αδαμοπούλου-Lisbon» και προέκυψαν 56 μοναδικές αλληλουχίες, οι οποίες εισήχθησαν στο λογισμικό BLAST-X προκειμένου να εντοπιστεί πιθανή ομολογία με πρωτεΐνες που είναι κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων του NCBI. Ως κατώτατο όριο ομοιότητας (e-value cutoff) ορίστηκε το  $10^{-3}$ . Από αυτή την ανάλυση προέκυψε ότι μόνο οι 16 αλληλουχίες (28,6%) είχαν ομολογία με γνωστά γονίδια ενώ οι υπόλοιπες 40 αλληλουχίες (71,4%) δεν είχαν ομολογία με κανένα γονίδιο της βάσης δεδομένων.

Στη συνέχεια, οι 16 αλληλουχίες ταξινομήθηκαν σε επτά κατηγορίες με βάση τη λειτουργία της ομόλογης πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.2, οι αλληλουχίες πιθανόν κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μεταβολισμό, τη μεταφορά, τη μεταγραφή, την απόκριση σε καταπονήσεις, ενώ κάποιες έχουν άγνωστη ή υποθετική λειτουργία. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η πλειοψηφία των αλληλουχιών έχει ομολογία με πρωτεΐνες που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων.

Ακολούθησε ανάλυση των 16 αλληλουχιών με το λογισμικό Blast2Go, με το οποίο έγινε ταξινόμηση των αλληλουχιών με βάση τη μοριακή τους λειτουργία, την παρουσία τους στα υποκυτταρικά οργάνια και τη συμμετοχή τους σε βιολογικές διεργασίες του φυτού (Διάγρ. 6.1).

**Πίνακας 6.2.** Σύγκριση των αλληλουχιών που εκφράζονται στην «Αδαμοπούλου» με αλληλουχίες κατατεθειμένες στις διεθνείς βάσεις δεδομένων των φυτών για τις πρωτεΐνες (BLAST-X) και κατηγοριοποίηση με βάση το ρόλο τους στο φυτό.

Κλώνος	Αριθμός πρόσβασης στο NCBI	Αριθμός πρόσβασης ομόλογης πρωτεΐνης	Πλησιέστερη ομόλογη πρωτεΐνη	E-value	Μέγεθος DNA (bp)	Φυτικό είδος
<i>Μεταβολισμός</i>						
CLAdsh-32	GO256645	AGT17357	cytochrome P450 monooxygenase	1.12E-14	167	<i>Saccharum hybrid</i>
CLAdsh-115	GO256655	XP_008228875	Predicted: 4-coumarate--CoA ligase 1-like	3.00E-04	408	<i>Prunus mume</i>
CLAdsh-583	GO256689	AGZ15401	allantoinase	8.99E-09	356	<i>Phaseolus vulgaris</i>
CLAdsh-590	GO256693	XP_008239696	Predicted: acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha, chloroplastic	2.49E-05	245	<i>Prunus mume</i>
CLAdsh-591	GO256694	AEL95440	polyphenol oxidase	2.00E-03	203	<i>Populus euphratica</i>
<i>Μεταβολισμός νουκλεϊκών οξέων</i>						
CLLish-362	GO256703	XP_009355254	Tyrosine--tRNA ligase, mitochondrial isoform X1	7.80E-15	199	<i>Pyrus x bretschneideri</i>
CLLish-546	GO256705	XP_002538985	werner helicase interacting protein, putative	5,90E-04	97	<i>Ricinus communis</i>
<i>Μεταφορά</i>						
CLAdsh-133	GO256658	XP_003614380	Cytochrome P450 like TATA box binding protein	6.00E-04	112	<i>Medicago truncatula</i>
CLAdsh-159	GO256659	YP_004237259	cytochrome c biogenesis FN (mitochondrion)	1.60E-09	170	<i>Ricinus communis</i>
<i>Μεταγραφή</i>						
CLAdsh-254	GO256676	XP_004153449	Predicted: transcriptional regulatory protein TyrR-like	1.11E-15	309	<i>Cucumis sativus</i>
		XP_002948320	nitrogen assimilation regulatory protein	5.50E-03	309	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>
CLAdsh-c60	GO256698	XP_002539363	Transcription elongation protein nusA, putative	8.00E-03	99	<i>Ricinus communis</i>
<i>Απόκριση σε καταπονήσεις</i>						
CLAdsh-160	GO256660	NP_001148021	ultraviolet-B-repressible protein	4.00E-03	124	<i>Zea mays</i>
CLAdsh-248	GO256672	AEX55694	betaine aldehyde dehydrogenase	3.61E-21	356	<i>Brassica rapa subsp. oleifera</i>
<i>Άγνωστη λειτουργία</i>						
CLAdsh-45	GO256650	XP_003588355	Mitochondrial protein, putative	2.00E-03	82	<i>Medicago truncatula</i>
CLAdsh-230	GO256666	XP_003614391	Tar1p	5.87E-22	195	<i>Medicago truncatula</i>
<i>Υποθετικές πρωτεΐνες</i>						
CLAdsh-26	GO256641	XP_002534842	conserved hypothetical protein	2.00E-12	197	<i>Ricinus communis</i>
CLAdsh-42	GO256649	CBI15784	unnamed protein product	1,02E-08	360	<i>Vitis vinifera</i>
CLAdsh-585	GO256690	XP_002536774	conserved hypothetical protein	1.11E-06	274	<i>Ricinus communis</i>



**Διάγραμμα 6.1.** Κατηγοριοποίηση των αλληλουχιών που εκφράζονται διαφορεικά στην «Αδαμοπούλου» με βάση τη λειτουργία τους στο φυτό, σύμφωνα με το λογισμικό Blast2Go.

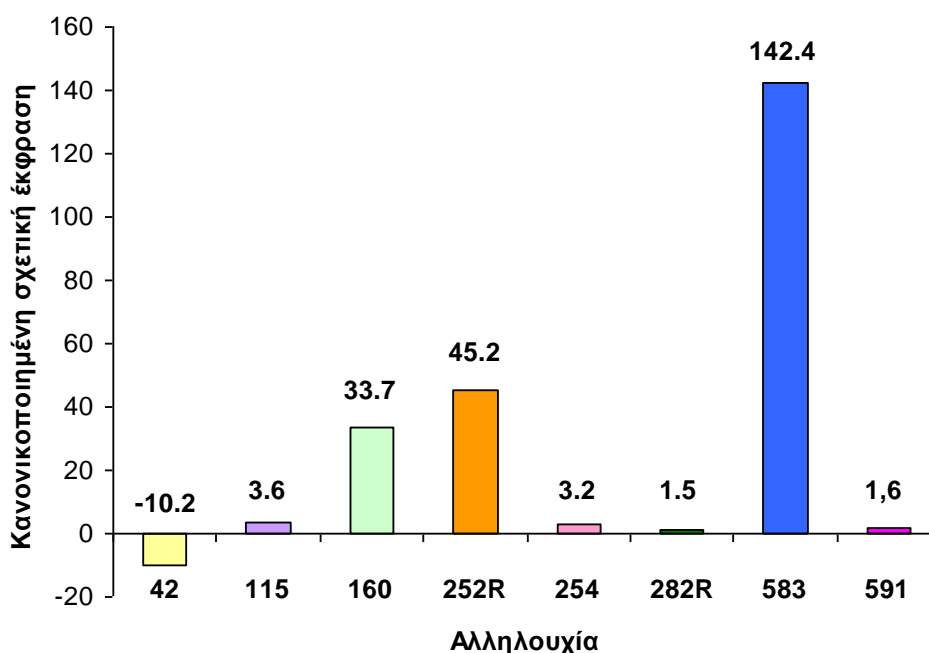
### 6.3.2. Ανάλυση των αλληλουχιών με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Οι αντιδράσεις Real-time PCR πραγματοποιήθηκαν με στόχο να επαληθευτεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων του Κατασταλτικού Αφαιρετικού Υβριδισμού αλλά και για να εκτιμηθεί η διαφορά της σχετικής έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων στις δύο ποικιλίες λεμονιάς.

Αρχικά, σχεδιάστηκαν εκκινητές για τις 16 αλληλουχίες που παρουσίασαν σημαντική ομολογία με πρωτεΐνες της βάσης δεδομένων του NCBI. Οι επιλεγμένοι εκκινητές αξιολογήθηκαν εφαρμόζοντας δοκιμαστικές αντιδράσεις απλής PCR και Real-time PCR υπό διάφορες συνθήκες και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Οι εκκινητές για δέκα αλληλουχίες δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα καθώς σχημάτιζαν διμερή εκκινητών (primer-dimer), απουσία της αναμενόμενης ζώνης ή παρουσία επιπλέον ζωνών, και για το λόγο απορρίφθηκαν. Οι εκκινητές για τις υπόλοιπες έξι αλληλουχίες έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και εκκινητές για δύο αλληλουχίες για τις οποίες δεν βρέθηκε σημαντική ομολογία (πάνω από  $10^{-3}$ ) στις βάσεις δεδομένων.

Οι αντιδράσεις Real-time PCR έγιναν σε δείγματα cDNA από βλαστούς «Αδαμοπούλου» και «Lisbon» και εκτιμήθηκε η διαφορά στη σχετική έκφραση μεταξύ των δύο ποικιλιών (Διάγρ. 6.2). Από το διάγραμμα φαίνεται ότι τα επτά από τα οκτώ γονίδια που μελετήθηκαν υπερεκφράζονται στην «Αδαμοπούλου». Τη μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση παρουσιάζουν οι αλληλουχίες CLAdsh-160, CLAdsh-252R και CLAdsh-583. Η αλληλουχία CLAdsh-583, που παρουσίασε και τη μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση, πιθανόν κωδικοποιεί το ένζυμο αλλαντοϊνάση. Η αλληλουχία CLAdsh-160 έχει υψηλή ομολογία με μια πρωτεΐνη που καταστέλλεται από την Β-υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ για την αλληλουχία CLAdsh-252R δεν βρέθηκε ομολογία με κάποια γνωστή πρωτεΐνη και επομένως χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Αντίθετα, για την αλληλουχία CLAdsh-42 βρέθηκε ότι εκφράζεται 10 φορές περισσότερο στη «Lisbon» σε σχέση με την «Αδαμοπούλου», γεγονός που υποδεικνύει ότι οι αφαιρετικές βιβλιοθήκες μπορεί να περιλαμβάνουν και ένα ποσοστό ψευδώς θετικών αλληλουχιών (false positives) και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να γίνεται επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του Κατασταλτικού Αφαιρετικού Υβριδισμού.



**Διάγραμμα 6.2.** Ανάλυση της έκφρασης οκτώ ESTs της αφαιρετικής βιβλιοθήκης «Αδαμοπούλου-Lisbon». Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως σχετική διαφορά στην έκφραση μεταξύ των δύο ποικιλιών. Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *ndhB*. Οι αριθμοί υποδεικνύουν τους κλώνους CLAdsh όπως αναφέρονται στον Πίνακα 6.2.

#### 6.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λεμονιά αποτελεί μια σημαντική καλλιέργεια για τη χώρα μας. Όμως τα τελευταία χρόνια οι καλλιεργούμενες εκτάσεις μειώθηκαν σημαντικά εξαιτίας της καταστροφής πολλών δένδρων από τις χαμηλές θερμοκρασίες και την κορυφοξήρα. Ιδιαίτερα στην περιοχή της Κορινθίας, που αποτελούσε παραδοσιακά το μεγαλύτερο κέντρο καλλιέργειας της λεμονιάς, οι ζημιές από τον παγετό του 2004 και την κορυφοξήρα ήταν πολύ μεγάλες, εξαιτίας της χρήσης της παραδοσιακής ποικιλίας Μαγληνής που είναι πολύ ευαίσθητη σε αμότερες τις καταπονήσεις. Από το 2004 και μετά, ένα μεγάλο μέρος των εκτάσεων εγκαταλείφθηκε και η παραγωγή μειώθηκε, με αποτέλεσμα να αυξηθούν πολύ οι εισαγωγές λεμονιών. Το γεγονός αυτό σηματοδότησε τη στροφή της λεμονοκαλλιέργειας προς τη χρήση νέων ποικιλιών περισσότερο ανθεκτικών στις χαμηλές θερμοκρασίες και στην κορυφοξήρα, με τις οποίες εξασφαλίζεται ταυτόχρονα και η κλιμάκωση της συγκομιδής.

Η βελτίωση της ανθεκτικότητας των εσπεριδοειδών στις χαμηλές θερμοκρασίες έχει απασχολήσει πολλούς επιστήμονες. Η διαπίστωση ότι το συγγενές είδος *Poncirus trifoliata* είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στις χαμηλές θερμοκρασίες, είχε ως αποτέλεσμα την αξιοποίησή του σε σχετικές βελτιωτικές διαδικασίες που απέφεραν την παραγωγή μερικών πολύ καλών υποκειμένων, χωρίς ωστόσο να επιτευχθεί η δημιουργία μιας καλής ποικιλίας (Sahin-Cevik and Moore, 2006). Με την πρόοδο της βιοτεχνολογίας, η έρευνα στράφηκε προς την κατεύθυνση της εύρεσης των γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα εσπεριδοειδή, τόσο σε αβιοτικές όσο και σε αβιοτικές καταπονήσεις. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα, δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως ο τρόπος κληρονομής για κανένα σχεδόν σημαντικό χαρακτηριστικό, ώστε να καταστεί δυνατή η ενσωμάτωση γονιδίων ανθεκτικότητας σε υπέρτερους γονότυπους εσπεριδοειδών (Pena et al., 2007). Ειδικότερα, για τη λεμονιά δεν υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που να σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ για την ανθεκτικότητα κορυφοξήρα αναφέρεται μία μόνο μελέτη, όπου η βελτίωση του γνωρίσματος προσεγγίζεται μέσω μεθόδων μοριακής βελτίωσης (Distefano et al., 2008). Ο εξαιρετικά περιορισμένος αριθμός σχετικών ερευνών πιθανώς αποδίδεται στην αρνητική στάση του καταναλωτικού κοινού στα προϊόντα που παράγονται από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς και το απαγορευτικό νομικό πλαίσιο που διέπει τις καλλιέργειες αυτές εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Σε συνέχεια προηγούμενων ερευνών (Κουτσιουμάρη, 2007; Κουτσιουμάρη, 2009), η παρούσα εργασία αφορά την εκτενή μελέτη των γονιδίων που εκφράζονται διαφορετικά σε βλαστούς λεμονιάς της, ανεκτικής στην κορυφοξήρα και το ψύχος, ποικιλίας «Αδαμοπούλου». Από την εκ νέου ανάλυση των 56 μοναδικών αλληλουχιών με το λογισμικό BLAST-X και κατώτατο όριο ομοιότητας (e-value cutoff) το  $10^{-3}$  προέκυψε ότι οι 40 από τις 56 αλληλουχίες (71,4%) δεν είχαν σημαντική ομολογία με αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στη διεθνή βάση δεδομένων του NCBI. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η τεχνική του K.A.Y. είναι κατάλληλη για την εύρεση «νέων» αλληλουχιών από οργανισμούς που δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς σε μοριακό επίπεδο.

Παρά το γεγονός ότι ο K.A.Y. αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την απομόνωση διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων, υπάρχουν αναφορές ότι τα προϊόντα της PCR συχνά περιλαμβάνουν και αλληλουχίες κοινές ή με παρόμοια επίπεδα έκφρασης στους δύο υπό εξέταση πληθυσμούς (Peng et al., 2012; Liu et al., 2012). Προκειμένου να διερευνηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μέσω της χρήσης του K.A.Y. (Κουτσιουμάρη, 2007; Κουτσιουμάρη, 2009), πραγματοποιήθηκε η μελέτη επιλεγμένων γονιδίων που πιθανόν εκφράζονται διαφορετικά στις δύο ποικιλίες.

Από τα αποτελέσματα των αντιδράσεων Real-time PCR φάνηκε ότι ο κλώνος CLAdsh-583 εκφράζεται 140 φορές περισσότερο στο βλαστό της «Αδαμοπούλου» σε σχέση με τη «Lisbon». Αυτή η αλληλουχία έχει υψηλή ομολογία με την αλλαντοϊνάση (allantoinase), ένα ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση της αλλαντοϊνης (allantoin) σε αλλαντοϊκό οξύ (allantoic acid). Οι Watanabe et al. (2014) απέδειξαν ότι σε φυτά *A. thaliana* μεταλλαγμένα για το γονίδιο της αλλαντοϊνάσης η συσσώρευση της αλλαντοϊνης προκάλεσε αύξηση των επιπέδων του αμπισσικού οξέος (ABA) μέσω της ενεργοποίησης του μεταβολισμού του. Διάφορες προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της επίδρασης του ABA στην αλληλεπίδραση φυτού-παθογόνου με τα αποτελέσματα να υποδεικνύουν την ύπαρξη ανταγωνιστικής σχέσης μεταξύ του ABA και του σαλικυλικού οξέος (SA) (Anderson et al., 2004; Yasuda et al., 2008; Jiang et al., 2010). Το SA αποτελεί ένα σημαντικό μόριο σηματοδότησης κατά τη διάρκεια των αμυντικών αποκρίσεων των φυτών σε βιοτροφικά και ημι-βιοτροφικά παθογόνα. Επιπλέον, το SA συμβάλλει στην επαγωγή της επίκτητης διασυστηματικής ανθεκτικότητας, η οποία παρέχει μακράς διάρκειας και μεγάλου εύρους ανθεκτικότητα έναντι των παθογόνων (Cao et al., 2011). Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της αλλαντοϊνάσης στην «Αδαμοπούλου» πιθανόν να σχετίζονται με την ανθεκτικότητά της



σε ασθένειες καθώς τα επίπεδα του ABA μπορεί να είναι χαμηλά περιορίζοντας έτσι την αρνητική επίδραση που έχει το ABA στην ανθεκτικότητα των φυτών στα παθογόνα.

Τα γονίδια του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450) έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορα είδη φυτών. Αυτά τα γονίδια εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των φαινυλπροπανοϊδών, μέσω του οποίου παράγεται πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση και την προστασία των φυτικών ιστών έναντι των περιβαλλοντικών καταπονήσεων (Yang et al., 2005). Τα ένζυμα cinnamate-4-hydroxylase (C4H), phenylalanine ammonia lyase (PAL) and 4-coumarate CoA ligase (4CL) έχουν σημαντικό ρόλο στο βασικό (core) μονοπάτι των φαινυλπροπανοϊδών. Η αλληλουχία CLAdsh-115 που εκφράζεται στην «Αδαμοπούλου» 3,6 φορές περισσότερο σε σχέση με τη «Lisbon» παρουσιάζει ομολογία με τη λιγάση του 4-κουμαρικού: συνένζυμο A (4-coumarate CoA ligase). Γονίδια που κωδικοποιούν το παραπάνω ένζυμο έχουν απομονωθεί από πολλά φυτά που βρίσκονται σε συνθήκες καταπόνησης. Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το 4CL παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της περιεκτικότητας και της σύστασης των μονομερών μορίων της λιγνίνης του κυτταρικού τοιχώματος (Kajita et al., 1996). Η λιγνίνη, ως σύμπλοκο φαινολικό πολυμερές, ενισχύει τα κυτταρικά τοιχώματα στα ανώτερα φυτά παρέχοντας αποτελεσματική άμυνα έναντι προσβολών από παθογόνα (Kawasaki et al., 2006). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι Cristofani-Yaly et al (2007) διαπίστωσαν υπερέκφραση του 4CL σε φυτά *P. trifoliata* που ήταν προσβεβλημένα από ένα επιθετικό στέλεχος του ιού της τριστέσσας των εσπεριδοειδών. Επιπλέον, η αλληλουχία CLAdsh-32 παρουσιάζει ομοιότητα με την μονο-οξυγενάση του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450 monooxygenase). Αυτή η πρωτεΐνη συμμετέχει σε ένα πολύ μεγάλο αριθμό βιοχημικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν τη βιοσύνθεση λιγνίνης, χρωστικών ουσιών (pigments), αμυντικών ουσιών, λιπαρών οξέων, ορμονών, μορίων σηματοδότησης, φαινυλπροπανοϊδών, αλκαλοειδών, τερπενοειδών, λιπιδίων και φυτορρυθμιστικών ουσιών, όπως οι γιββερελλίνες, το γιασμονικό οξύ και τα μπρασινοστεροειδή (Zhou et al., 1999; Pan et al., 2009). Η έκφραση του γονιδίου της μονο-οξυγενάσης του κυτοχρώματος P450 κατά τη διάρκεια μυκητολογικών προσβολών έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, οι Beyer et al. (2001) απομόνωσαν το γονίδιο της μονο-οξυγενάσης του κυτοχρώματος P450 σε αφαιρετική βιβλιοθήκη που προέκυψε από εφαρμογή του K.A.Y. σε φύλλα πατάτας μολυσμένα με το μύκητα *Phytophthora infestans*. Επιπλέον, γονίδια του

κυτοχρώματος P450 έχουν βρεθεί ότι υπερεκφράζονται κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της αντίδρασης υπερευαισθησίας φυτών *Coffea arabica* προσβεβλημένα από το μύκητα *Hemileia vastatrix* (Fernandez et al., 2004). Επίσης, η μονο-οξυγενάση του κυτοχρώματος P450 παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση της καμαλεξίνης, μιας φυτοαλεξίνης που έχει βρεθεί ότι παράγεται σε φυτά *A. thaliana* και θεωρείται σημαντική για την άμυνα των φυτών έναντι νεκροτροφικών παθογόνων μυκήτων, όπως οι *Alternaria brassicicola* και *Botrytis cinerea* (Nafisi et al., 2007). Η αλληλουχία CLAdsh-133 έχει ομολογία με ένα άλλο γονίδιο του κυτοχρώματος P450, την cytochrome P450-like TBP (TATA box binding protein), η οποία ανήκει στην ομάδα των οξειδοαναγωγικών πρωτεϊνών που καταλύουν διάφορες οξειδωτικές αντιδράσεις (Isin and Guengerich, 2007). Αυτό το ένζυμο θεωρείται ότι εμπλέκεται στις αποκρίσεις των φυτών στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, συμπεριλαμβανομένης της αντίδρασης υπερευαισθησίας εναντίων των προσβολών από παθογόνα, και έχει βρεθεί ότι επάγεται πρώιμα σε φυτά αβοκάντο προσβεβλημένα από το μύκητα *Phytophthora cinnamomi* (Cheng et al., 2010; Mohamed and van den Berg, 2011).

Οι πολυφαινολοξειδάσες (polyphenol oxidases, PPOs) είναι πολύ διαδεδομένες στα αγγειόσπερμα και πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών εναντίων εχθρών και ασθενειών (Li and Steffens, 2002). Οι πολυφαινολοξειδάσες καταλύουν των οξυγονο-εξαρτώμενη οξείδωση των φαινολών σε κινίνες. Στην παρούσα εργασία, η αλληλουχία CLAdsh-591 παρουσιάζει ομοιότητες με την PPO και βρέθηκε ότι εκφράζεται στην «Αδαμοπούλου» 1,5 φορές περισσότερο σε σύγκριση με τη «Lisbon». Σε διαγονιδιακά φυτά τομάτας που υπερεκφράζουν των PPO παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση της αντοχής στην προσβολή από το βακτήριο *Pseudomonas syringae*, συνοδευόμενη από μικρότερης έντασης συμπτώματα στα φύλλα ενώ η ανάπτυξη του βακτηρίου ήταν πολύ περιορισμένη (Li and Steffens, 2002). Πιστεύεται ότι η αυξημένη οξείδωση των ενδογενών φαινολικών ουσιών που οφείλεται στη δράση της PPO οδήγησε στον περιορισμό της εξάπλωσης της ασθένειας. Επιπλέον, στην ποικιλία μπανάνας «Calcutta-4», η οποία είναι ανθεκτική στο μύκητα *Fusarium oxysporum*, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της PPO στα προσβεβλημένα σε σχέση με τα υγιή φυτά (Swarupa et al., 2013).

Οι χαμηλές θερμοκρασίες προκαλούν αλλαγές στη διαθεσιμότητα νερού στα φυτά οδηγώντας σε ωσμωτική καταπόνηση η οποία διακόπτει τις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες και μπορεί να προκαλέσει μέχρι και θάνατο του φυτού (Xiong and Zhu, 2002). Για το λόγο αυτό, η ωσμωρύθμιση αποτελεί σημαντικό προσαρμοστικό

μηχανισμό διότι επιτρέπει στα φυτά να ανεχθούν παρατεταμένες περιόδους επικράτησης χαμηλών θερμοκρασιών. Η σύνθεση και η συσσώρευση ωσμωλυτών χαμηλού μοριακού βάρους, όπως είναι τα σάκχαρα, σακχαροαλκοόλες, οι πολυόλες και τα αμινοξέα, συμβάλουν σημαντικά στην ωσμωρύθμιση των φυτών (Peng et al., 2012). Η γλυκίνη-βεταΐνη αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς ωσμωλύτες που παράγεται σε πολλά φυτά ως αντίδραση σε αβιοτικές καταπονήσεις (ψύχος, ξηρασία, αλατότητα) και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας και στην προστασία των κυτταρικών μεμβρανών (Majahan and Tuteja, 2005). Η βεταΐνη συσσωρεύεται ως αντίδραση στις χαμηλές θερμοκρασίες και η συσσώρευσή της κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού σχετίζεται, ως ένα βαθμό, με την ανθεκτικότητα στο ψύχος (Kishitani et al., 1994). Η αλληλουχία CLAdsh-248 παρουσιάζει υψηλή ομολογία με το γονίδιο της αφυδρογονάσης της αλδεΐδης της βεταΐνης που είναι το τελευταίο ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της γλυκίνης-βεταΐνης. Αυξημένα επίπεδα μεταγραφημάτων του παραπάνω γονιδίου έχουν ανιχνευτεί ως αντίδραση στην υψηλή αλατότητα, την ξηρασία και κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού στο ψύχος (McCue and Hanson, 1992; Kishitani et al., 1994; Kumar et al., 2004), με αντίστοιχη αύξηση της ανθεκτικότητας των φυτών στις καταπονήσεις.

Μια ακόμα αλληλουχία που απομονώθηκε στην παρούσα μελέτη είναι η CLAdsh-160 που εκφράζεται 34 φορές περισσότερο στην «Αδαμοπούλου» σε σύγκριση με τη «Lisbon» και είναι παρόμοια με το γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που καταστέλλεται από την Β-υπεριώδη ακτινοβολία (ultraviolet-B repressible protein). Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει απομονωθεί μαζί με άλλα γονίδια ως αντίδραση σε αβιοτικές καταπονήσεις. Ειδικότερα, η αύξηση της έκφρασής του συνδέεται με συνθήκες αλατότητας και αφυδάτωσης αλλά επάγεται και ως αντίδραση σε χαμηλές θερμοκρασίες (Luo et al., 2005; Chung et al., 2009; Hernández-Lucero et al., 2014).

Οι αλληλουχίες CLAdsh-252R και CLAdsh-282R, που εκφράζονται 45 και 1,5 φορές περισσότερο στην «Αδαμοπούλου» σε σχέση με τη «Lisbon», δεν έχουν σημαντική ομολογία με γνωστά γονίδια στη βάση δεδομένων του NCBI και απαιτείται περαιτέρω μελέτη για τον προσδιορισμό αυτών των μεταγραφημάτων.

Σε αντίθεση με τις επτά αλληλουχίες για τις οποίες επιβεβαιώθηκε η υπερέκφρασή τους στην «Αδαμοπούλου», η αλληλουχία CLAdsh-42, που κωδικοποιεί μια άγνωστη πρωτεΐνη, εκφράζεται στη «Lisbon» 10 φορές περισσότερο σε σχέση με την «Αδαμοπούλου». Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη σημαντικότητα της επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων του K.A.Y.

Τα αποτελέσματα της παρούσας καθώς και προηγούμενων μελετών από τους ίδιους ερευνητές εμπλουτίζουν τη βιβλιογραφία και τις διεθνείς βάσεις δεδομένων με γονίδια της λεμονιάς που πιθανόν εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς έναντι της κορυφοξήρας και του ψύχους. Επιπλέον, μελετώνται για πρώτη φορά γονίδια της ελληνικής ποικιλίας Αδαμοπούλου και συγκρίνεται η έκφρασή τους σε σχέση με την πορτογαλική ποικιλία Lisbon.

Σε συνέχεια της παρούσας εργασίας θα ήταν σκόπιμο να μελετηθεί η έκφραση των γονιδίων που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία υπό συνθήκες καταπόνησης (έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες, μόλυνση με *P. tracheiphila*) προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συμβολή τους στην ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας της λεμονιάς στις χαμηλές θερμοκρασίες και την κορυφοξήρα. Η εύρεση γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με τα γνωρίσματα αυτά μπορεί να οδηγήσει στην πρακτική αξιοποίησή τους στο μέλλον ως λειτουργικούς μοριακούς δείκτες για τον ευχερή προσδιορισμό γενετικού υλικού λεμονιάς που παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην κορυφοξήρα ή/και το ψύχος. Επιπλέον, κρίνεται σκόπιμη η μελέτη για τον πλήρη χαρακτηρισμό των αλληλουχιών που φαίνεται ότι υπερεκφράζονται στην «Αδαμοπούλου» αλλά δεν έχουν ομολογία με κάποια γνωστή πρωτεΐνη.

Μέρος των αποτελεσμάτων του παρόντος κεφαλαίου παρουσιάστηκαν στο 12<sup>th</sup> International Citrus Congress, Valencia 18-23 Νοεμβρίου 2012. Η περίληψη παρατίθεται στο Παράρτημα III.

Τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου αποτελούν μέρος της δημοσίευσης στο Journal of Horticultural Science and Biotechnology:

Koutsioumari EM, Voloudakis AE (2016) Isolation and expression analysis of differentially expressed genes in stem tissue of the Greek lemon cv. Adamopoulou. J Hort Sci Biotech, DOI:10.1080/14620316.2016.1224131.

## 6.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γενάδιος ΠΓ (1997) Λεξικόν Φυτολογικόν. Εκδόσεις Τροχαλία (1<sup>η</sup> έκδοση 1914).
- Γεωργία-Κτηνοτροφία. (2008) Αφιέρωμα Εσπεριδοειδή. Τεύχος 10.
- Κουτσιουμάρη Ε (2007) Διαφορική έκφραση γονιδίων σε βλαστό λεμονιάς ποικιλιών Αδαμοπούλου και Lisbon. Πτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Κουτσιουμάρη Ε (2009) Απομόνωση και χαρακτηρισμός γονιδίων διαφορικά εκφραζομένων σε βλαστό λεμονιάς ποικιλιών Αδαμοπούλου και Lisbon. Μεταπτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Παναγόπουλος ΧΓ (1997) Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου. Τρίτη Έκδοση. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης. ISBN: 960-7306-18-X.
- Πασσίσης Μ, Κεραμίδας Κ (1983) Η λεμονιά Αδαμοπούλου. Διεύθυνση Γεωργίας Πειραιώς. Δενδροκομικός Σταθμός Πόρου.
- Ποντίκης ΚΑ (2003) Ειδική Δενδροκομία Εσπεριδοειδή. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης. ISBN: 960-7306-60-0.
- Πρωτοπαπαδάκης Ε (1994) Οι ποικιλίες λεμονιάς. Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους. Γεωργία-Κτηνοτροφία 8:18-20.
- Πρωτοπαπαδάκης Ε (2004) Τα εσπεριδοειδή. Εκδόσεις Ψύχαλου. ISBN: 960-8455-05-7.
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM et al (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:3460-3479.
- Beyer K, Binder A, Boller T, Collinge M (2001) Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Pathol* 2:125-134.
- Cao FY, Yoshioka K, Desveaux D (2011) The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *J Plant Res* 124:489-499.
- Casassola A, Brammer SP, Chaves MS, et al (2013) Gene expression: a review on methods for the study of defense-related gene differential expression in plants. *Am J Plant Sci* 4:64-73.
- Cheng DW, Lin H, Takahashi Y, et al (2010) Transcriptional regulation of the grape cytochrome P450 monooxygenase gene CYP736B expression in response to *Xylella fastidiosa* infection. *BMC Plant Biol* 10:135.

- Chung E, Kim KM, Heo JE, et al (2009) Molecular characterization of mungbean peroxisomal alanine glyoxylate aminotransferase gene induced by low temperature stress. *Genes Genom* 31:11–18.
- Close TJ (1997) Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 100:291-296.
- Conesa A, Götz S, Garcia-Gomez JM, et al (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-3676.
- Cristofani-Yaly M, Berger IJ, Targon MLPN., et al (2007) Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through EST analysis and *in silico* hybridization. *Genet Mol Biol* 30:972–979.
- Distefano G, La Malfa S, Vitale A, et al (2008) Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Res* 17:873-879.
- EPPO. Data sheets on quarantine pests.  
[http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Deuterophoma\\_tracheiphila/DEUTTR\\_ds.pdf](http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Deuterophoma_tracheiphila/DEUTTR_ds.pdf)
- FAO (2012) Citrus fruit. Fresh and processed. Annual statistics.  
[http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS\\_BULLETIN\\_2012.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf)
- Fernandez D, Santos P, Agostini C et al (2004) Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Mol Plant Pathol* 5:527–536.
- Gentile A, Deng Z, La Malfa S, et al (2007) Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene. *Plant Breed* 126:146-151.
- Hammond-Kosack KE, Jones JD (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.
- Hara M, Terashima S, Kuboi T (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J Plant Physiol* 158:1333-1339.
- Hernández-Lucero E, Rodríguez- Hernández AA, Ortega-Amaro MA, Jiménez-Bremont JF (2014) Differential expression of genes for tolerance to salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol Biol Rep* 32:318-327.
- Isin EM, Guengerich FP (2007) Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1770:314-329.

- Jiang C, Shimono M, Sugano S et al (2010) Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice – *Magnaporthe grisea* interaction. *Mol Plant Microbe In* 23:791–798.
- Kajita S, Katayama Y, Omori S (1996) Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate:coenzyme A ligase. *Plant Cell Physiol* 37:957–965.
- Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, et al (2006) Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci* 103:230-235.
- Khan IA, Kender WJ (2007) Citrus breeding: introduction and objectives. In: Khan IA (ed) *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International. pp 1-8.
- Kishitani S, Watanabe K, Yasuda S, et al (1994) Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant Cell Environ* 17:89–95.
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004) Plastid-expressed *betaine aldehyde dehydrogenase* gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol* 136:2843-2854.
- Lang P, Zhang C, Ebel RC, et al (2005) Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. *Gene* 359:111-118.
- Li L, Steffens JC (2002) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215:239-247.
- Liu Q, Zhu A, Chai L, et al (2009) Transcriptome analysis of a spontaneous mutant in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] during fruit development. *J Exp Bot* 60:801-813.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25:402-408.
- Luo M, Liang XQ, Dang P et al (2005) Microarray-based screening of differentially expressed genes in peanut in response to *Aspergillus parasiticus* infection and drought stress. *Plant Sci* 169:695–703.
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* 444:139-158.
- Mahomed W, van den Berg N (2011) EST sequencing and gene expression profiling of defence-related genes from *Persea americana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *BMC Plant Biol* 11:167.
- Maloukh L, De Keukeleire J, Van Bockstaele E, et al (2007) Optimisation of real time RT-PCR protocol for the analysis of gene expression in hop tissues. In: Seigner E (ed) *Proc. Scient. Com. Int. Hop Growers Convention: Wolnzach*, pp 88.

- McCue KF, Hanson AD (1992) Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol Biol* 18:1–11.
- Nafisi M, Goregaoker S, Botanga CJ et al (2007) *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell* 19:2039-2052.
- Pan Y, Michael TP, Hudson ME, et al (2009) Cytochrome P450 monooxygenases as reporters for circadian-regulated pathways. *Plant Physiol* 150:858-878.
- Peña L, Cervera M, Ghorbel R, et al (2007) Genetic transformation. In: Khan IA (ed) *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International, pp 329-344.
- Peng T, Zhu XF, Fan QJ, et al (2012) Identification and characterization of low temperature stress responsive genes in *Poncirus trifoliata* by suppression subtractive hybridization. *Gene* 492:220-228.
- Recupero GR, Gentile A, Russo MP, Domina F (1997) Genetic analysis of resistance to *Phoma tracheiphila* in three *Citrus* and *Poncirus* progenies. *Plant Breed* 116:198-200.
- Sahin-Cevik M, Moore GA (2006) Identification and expression analysis of cold-regulated genes from the cold-hardy *Citrus* relative *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Plant Mol Biol* 62:83-97.
- Solel Z, Salerno M (2000) Mal secco. In: Timmer L, Garnsey S, Graham J (ed) *Compendium of Citrus diseases*, 2nd edn, APS Press, Minnesota, pp 33-35.
- Swarupa V, Ravishankar KV, Rekha A (2013) Characterization of tolerance to *Fusarium oxysporum* f.sp., *cubense* infection in banana using suppression subtractive hybridization and gene expression analysis. *Physiol Mol Plant Pathol* 83:1–7.
- Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH (2000) *Compendium of Citrus diseases*. APS Press. ISBN: 0-89054-248-1.
- Watanabe S, Matsumoto M, Hakomori Y, et al (2014) The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant Cell Environ* 37:1022-1036.
- Xiong L, Zhu JK (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Physiol* 25:131-139.
- Yang DH, I BYC, Kim J, et al (2005) cDNA cloning and sequence analysis of the rice cinnamate-4-hydroxylase gene, a cytochrome P450-dependent monooxygenase involved in the general phenylpropanoid pathway. *J Plant Biol* 48:311–318.
- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y et al (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:1678-1692.



- Zhang C, Lang P, Dane F (2005) Cold acclimation induced genes of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). *Plant Cell Rep* 23:764-769.
- Zhou N, Tootle TL, Glazebrook J (1999) Arabidopsis *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* 11:2419–2428.

## Γενική συζήτηση

Τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται για περισσότερα από 4000 χρόνια στην Κίνα και στις υπόλοιπες τροπικές και υποτροπικές περιοχές της νοτιο-ανατολικής Ασίας (Nicolosi, 2007). Η εισαγωγή και εξάπλωσή τους σε περιοχές εκτός της ζώνης καταγωγής τους συνοδεύτηκε από την εμφάνιση νέων ασθενειών και καταπονήσεων που δεν ήταν γνωστές στις αρχικές περιοχές καλλιέργειάς τους, όπου η εξέλιξή τους υπό την δράση της φυσικής επιλογής οδήγησε στην προσαρμογή τους στις υπάρχουσες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις.

Αρχικά, η αντιμετώπιση των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων που σχετίζονταν με εδαφικούς παράγοντες βασίστηκε στη χρήση γονοτύπων με επιθυμητά χαρακτηριστικά ως υποκειμένων. Για τις υπόλοιπες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, κύριο ρόλο διαδραμάτισε η επιλογή από τον καλλιεργητή φυτών που προέρχονταν από τυχαίες μεταλλάξεις και παρουσίαζαν ανθεκτικότητα σε μια δεδομένη καταπόνηση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση ενός δένδρου λεμονιάς, το οποίο πιθανόν προήλθε από τυχαία μετάλλαξη, που επιβίωσε ανάμεσα σε δένδρα της ποικιλίας Lisbon που είχαν καταστραφεί από την κορυφοξήρα στον Δενδροκομικό Σταθμό του Πόρου (Πασσίσης και Κεραμίδας, 1983). Η επιλογή του συγκριμένου δένδρου και η συστηματική μελέτη του κατέληξαν στην καλλιέργεια μιας νέας εξαιρετικής ποικιλίας λεμονιάς, της «Αδαμοπούλου». Αντίστοιχες περιπτώσεις εμπειρικής επιλογής από καλλιεργητές υπάρχουν σε όλο τον κόσμο για μεγάλο αριθμό σημαντικών αλλά και λιγότερο διαδεδομένων ποικιλιών και υποκειμένων εσπεριδοειδών.

Οι δύο προαναφερθείσες ποικιλίες διαφέρουν σημαντικά ως προς την ανθεκτικότητά τους στην κορυφοξήρα και το ψύχος. Η «Αδαμοπούλου» θεωρείται ανεκτική στις συγκεκριμένες καταπονήσεις σε αντίθεση με τη «Lisbon», η οποία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη (Πρωτοπαπαδάκης, 1994). Αυτή η γνώση, σε συνάρτηση με το γεγονός ότι η «Αδαμοπούλου» είναι κλώνος της «Lisbon» (Πασσίσης και Κεραμίδας, 1983), τις καθιστούν ιδανικό συνδυασμό για τον εντοπισμό γονιδίων της λεμονιάς που πιθανόν εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού έναντι της κορυφοξήρας ή του ψύχους. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε μια μοριακή αφαίρεση σε επίπεδο cDNA μεταξύ των ποικιλιών «Αδαμοπούλου» και «Lisbon», οι οποίες διαφέρουν ως προς την ανθεκτικότητα στις συγκεκριμένες καταπονήσεις (Koutsoumari and Voloudakis, 2016). Αυτή η προσπάθεια είχε ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό

γονιδίων ομόλογων με γονίδια που υπερεκφράζονται υπό συνθήκες βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων σε διάφορους φυτικούς οργανισμούς. Η εκτίμηση της σχετικής έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων, που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, επιβεβαίωσε την αυξημένη έκφρασή τους στην ανθεκτική ποικιλία «Αδαμοπούλου».

Τα τελευταία χρόνια, η εντατική καλλιέργεια των εσπεριδοειδών σε συνδυασμό με την ευχερή διακίνηση πολλαπλασιαστικού υλικού και καρπών σε ολόκληρο τον κόσμο, έχει οδηγήσει στην εξάπλωση σοβαρών παθογόνων (*Citrus tristeza virus*, *Xylella fastidiosa*, *Liberobacter asiaticum*) για τα οποία δεν υπάρχει μέθοδος αποτελεσματικής αντιμετώπισης. Για το λόγο αυτό, ένα από τα σημαντικότερα μέτρα είναι η πρόληψη εισαγωγής και εξάπλωσης των ασθενειών μέσω της χρήσης υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού σε συνδυασμό με ένα ολοκληρωμένο σύστημα πιστοποίησης και συνεχών ελέγχων. Σε αυτά τα πλαίσια, πραγματοποιήθηκε στη χώρα μας μια μεγάλη προσπάθεια ανάπτυξης ενός προγράμματος παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού με σκοπό να λειτουργεί επικουρικά με το πρόγραμμα καραντίνας που ήδη εφαρμόζεται με μεγάλη επιτυχία έναντι σοβαρών παθογόνων των εσπεριδοειδών (τριστέτσα, *X. fastidiosa*). Η προσέγγιση αυτή, που αφορούσε τον έλεγχο των μητρικών δένδρων του Δενδροκομικού Σταθμού Πόρου, κατέδειξε την παρουσία ιών και ιοειδών στο σύνολο σχεδόν των εξεταζόμενων δειγμάτων (Boubourakas et al., 2010; Wang et al., 2013). Παράλληλα, επιχειρήθηκε η εξυγίανση των σημαντικότερων ποικιλιών εσπεριδοειδών που καλλιεργούνται στη χώρα μας με την εφαρμογή του *in vitro* μικροεμβολιασμού κορυφαίων μεριστωμάτων (Βολουδάκης et al., 2008). Η διαδικασία αυτή στέφτηκε από επιτυχία καθώς, όπως υποδεικνύουν τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, επιτεύχθηκε η παραγωγή εξυγιασμένων δενδρυλλίων λεμονιάς ποικιλιών: Βύζα, Ζαμπετάκη και Nouvel Athos, και πορτοκαλιάς ποικιλιών: PO25, Όψιμο ομφαλοφόρο Άργους, Washington Navel και Newhall. Η διατήρηση των εξυγιασμένων δενδρυλλίων υπό κατάλληλες συνθήκες, σε συνδυασμό με την υλοποίηση πρόσθετων δράσεων προς την κατεύθυνση αυτή, μπορεί να οδηγήσει στη χρήση του εξυγιασμένου υλικού ως πυρήνα για την ανάπτυξη προβασικού και βασικού υλικού που θα αποτελέσει τη βάση για την παραγωγή στην Ελλάδα υγιούς και πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού εσπεριδοειδών.

Δεδομένου ωστόσο της συχνά παρατηρούμενης ανεπάρκειας των προγραμμάτων παραγωγής και πιστοποίησης υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού να παρέχουν πλήρη κάλυψη έναντι εχθρών και ασθενειών, ειδικά εν όψει της διάδοσης σημαντικών

ασθενειών με έντομα-φορείς, η πλέον αποτελεσματική αντιμετώπισή τους προϋποθέτει την καλλιέργεια γενετικού υλικού ανθεκτικού σε εχθρούς και ασθένειες. Προς αυτή την κατεύθυνση, η διεξαγωγή σχετικών βελτιωτικών προγραμμάτων και η αξιοποίηση όλων των διαθέσιμων μεθόδων και εργαλείων μπορεί να αποτελέσει μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη δημιουργία βελτιωμένων ποικιλιών ανθεκτικών σε εχθρούς και ασθένειες. Στο παρελθόν, η παραγωγή βελτιωμένων ποικιλιών βασίστηκε εξ ολοκλήρου σε μεθόδους κλασικής βελτίωσης. Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί, η εφαρμογή των μεθόδων αυτών συνοδεύεται από σημαντικά μειονεκτήματα και δυσκολίες που έγκεινται κυρίως στο μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την επιτυχή ενσωμάτωση ενός χαρακτηριστικού σε μια ποικιλία. Για τους λόγους αυτούς είναι προφανές ότι η αξιοποίηση της γενετικής μηχανικής στη βελτίωση των εσπεριδοειδών αποτελεί σημαντική εναλλακτική λύση για την ταχύτερη παραγωγή ποικιλιών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και ανθεκτικότητα σε σημαντικές βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις.

Η βάση για την εφαρμογή της γενετικής μηχανικής είναι ο γενετικός μετασχηματισμός, ο οποίος περιλαμβάνει την ενσωμάτωση του επιθυμητού γονιδίου στο φυτικό γονιδίωμα και την αναγέννηση των μετασχηματισμένων κυττάρων για τη δημιουργία ολοκληρωμένων φυτών (Singh and Rajam, 2009). Τα εσπεριδοειδή εντάσσονται στην κατηγορία των δύστροπων ως προς το μετασχηματισμό και την αναγέννηση ολόκληρων φυτών, ενώ παράλληλα εμφανίζουν σημαντική γονοτυπική εξάρτηση ως προς την επιδεκτικότητά τους με αποτέλεσμα να υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ειδών και ποικιλιών (Bond and Roose, 1998; Ghorbel et al., 2001). Τα ανωτέρω συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι η εξεύρεση ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου μετασχηματισμού για κάθε είδος και ποικιλία ξεχωριστά αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση επιτυχίας του γενετικού μετασχηματισμού των εσπεριδοειδών.

Στην παρούσα εργασία, ο γενετικός μετασχηματισμός των εσπεριδοειδών έγινε με τη χρήση ειδικού στελέχους του Αγροβακτηρίου σε έκφυτα σποροφύτων αναπτυσσόμενων υπό ασηπτικές συνθήκες. Η δοκιμή πέντε διαφορετικών πρωτοκόλλων μετασχηματισμού επέτρεψε την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου για καθένα από τα πέντε είδη που δοκιμάστηκαν. Επιπλέον, ο προσδιορισμός του καταλληλότερου υποστρώματος ριζοβολίας, σε συνδυασμό με την εφαρμογή του *in vitro* εμβολιασμού, οδήγησε στην αύξηση των ποσοστών επιβίωσης των

αναγεννημένων βλαστών. Τέλος, η εφαρμογή μιας σύντομης διαδικασίας απομόνωσης DNA κατέστησε δυνατή την ταχύτερη αξιολόγηση των μετασχηματισμένων φυτών.

Η εφαρμογή της γενετικής μηχανικής στη βελτίωση των εσπεριδοειδών προϋποθέτει την ύπαρξη χαρακτηρισμένων γονιδίων προερχόμενων από γνωστές πηγές προκειμένου να καταστεί εφικτή η ενσωμάτωσή τους στο φυτικό γονιδίωμα και η δημιουργία γονοτύπων με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Η παραγωγή φυτών ανθεκτικών σε βιοτικές καταπονήσεις περιλαμβάνει την αξιοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας των οποίων η προέλευση συνηθέστερα αφορά κάποιο φυτικό είδος (natural resistance) ή το ίδιο το παθογόνο (pathogen-derived resistance). Στην πρώτη περίπτωση, ανήκει το γονίδιο *NPR1* (non-expressor of pathogenesis related 1) από το φυτό *A. thaliana*. Πρόκειται για ένα γονίδιο που παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μεταγραφής των γονιδίων άμυνας και στη μεταγωγή του σήματος οδηγώντας στην εκδήλωση του μηχανισμού της επίκτητης διασυστηματικής ανθεκτικότητας (SAR) (Despres et al., 2000; Zhang et al., 1999). Το γονίδιο *NPR1* έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο γενετικό μετασχηματισμό διαφόρων εσπεριδοειδών και η υπερέκφρασή του οδήγησε σε αυξημένη έκφραση γονιδίων παθογένεσης (pathogenesis-related genes) και βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι του citrus canker (Zhang et al., 2010; Febres, 2011).

Από το σύνολο των βιοτικών παραγόντων, αυτοί που καταπονούν περισσότερο τα εσπεριδοειδή είναι οι ιοί και τα ιοειδή. Οι μηχανισμοί άμυνας που έχουν αναπτύξει τα φυτά εναντίον τους (RNA σιώπηση) έχουν συμβάλει στη δημιουργία πλήθους μεταλλάξεων στα γονιδιώματα ιών και ιοειδών με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται ολοένα και μολυσματικότερες φυλές. Σε πολλές περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι το είδος του ξενιστή επηρεάζει την εξέλιξη των ιών και ιοειδών αυξάνοντας το ρυθμό μεταλλάξεων στο RNA του παθογόνου με αποτέλεσμα την εδραίωση των παθογόνων τύπων που εμφανίζουν σημαντικό πλεονέκτημα προσαρμογής (Bernad et al., 2009; Cheng et al., 2014). Η άποψη αυτή επιβεβαιώνεται και στην παρούσα εργασία όπου η κατασκευή φυλογενετικού δένδρου με ελληνικές απομονώσεις του CEVd από διάφορους ξενιστές οδήγησε σε ομαδοποίησή τους με βάση το φυτικό είδος. Επιπλέον, η μία ομάδα περιελάμβανε μια μολυσματική απομόνωση του ιοειδούς, ενώ η άλλη ομάδα περιελάμβανε μια λιγότερο μολυσματική απομόνωση.

Ο υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων που παρουσιάζουν οι ιοί και τα ιοειδή, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις δεν υπάρχουν φυσικές πηγές ανθεκτικότητας, κάνει επιτακτική την ανάγκη αξιοποίησης των μεθόδων της γενετικής μηχανικής στη βελτίωση των εσπεριδοειδών. Η πρώτη προσπάθεια εναντίον της

τριστεύσας των εσπεριδοειδών με την αξιοποίησης της γενετικής μηχανικής έγινε από τους Domínguez et al. (2000). Ωστόσο, οι μελέτες συνεχίζονται μέχρι σήμερα από διάφορες ερευνητικές ομάδες καθώς δεν έχει βρεθεί ακόμα μια μέθοδος που να εξασφαλίζει πλήρη και σταθερή ανθεκτικότητα στον ιό. Εναντίον της τριστεύσας έχουν δοκιμαστεί διάφορα διαγονίδια, όπως η καμνιδιακή πρωτεΐνη, μια μη-μεταφραζόμενη εκδοχή της καμνιδιακής πρωτεΐνης, η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του ιού, τα γονίδια του ιού *p20*, *p23* και *p27*, το 3' άκρο του γονιδιωματικού RNA του ιού καθώς και συνδυασμοί των παραπάνω (Domínguez et al., 2002; Febres et al., 2003; López et al., 2010). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι διαγονιδιακά φυτά πορτοκαλιάς που φέρουν, σε μορφή φουρκέτας, την αλληλουχία που κωδικοποιεί την καμνιδιακή πρωτεΐνη (CP) του ιού της ψώρασης των εσπεριδοειδών (*Citrus psorosis virus*, CPsV) παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στον ιό (Reyes et al., 2011). Τα τελευταία χρόνια, οι έρευνες έχουν στραφεί και σε άλλα παθογόνα, όπως το φυτόπλασμα *Candidatus Liberibacter asiaticus* και το βακτήριο *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, έναντι των οποίων έχει δοκιμαστεί πληθώρα γονιδίων προερχόμενων από έντομα, βακτήρια αλλά και από φυτά των ειδών *A. thaliana* και *N. benthamiana* (Boscariol et al., 2006; Barbosa-Mendes et al., 2009; Dutt et al., 2015; Hao et al., 2015).

Βασικό ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η βελτίωση της ανθεκτικότητας των εσπεριδοειδών έναντι του ιοειδούς της εξωκορτίδας. Ειδικότερα, η επίτευξη του στόχου αυτού προσεγγίστηκε μέσω της αξιοποίησης των πρόσφατα αποσαφηνισμένων μηχανισμών της RNA σιώπησης. Σημαντικός ανασταλτικός παράγοντας προς την κατεύθυνση αυτή υπήρξε η τεκμηριωμένη, βάσει βιβλιογραφίας, δυσκολία μετασχηματισμού και αναγέννησης διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών. Προκειμένου να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό, η προκαταρκτική αξιολόγηση της επιδιωκόμενης στρατηγικής ανθεκτικότητας βασίστηκε στην αξιοποίηση του φυτού-μοντέλου *N. benthamiana*. Το συγκεκριμένο είδος, αν και παρουσιάζει πλεονεκτήματα που αφορούν κυρίως στη διαθεσιμότητα αποτελεσματικών πρωτοκόλλων μετασχηματισμού και αναγέννησης, δε συνιστά φυσικό ξενιστή του CEVd. Στα πλαίσια αυτά, αρχικά επιχειρήθηκε ο *in planta* πολλαπλασιασμός του ιοειδούς, μέσω πειραμάτων αγροεμποτισμού με το διμερές μόριο του CEVd. Ωστόσο, τα ευρήματα της προσέγγισης αυτής κατέδειξαν τη δυσκολία που χαρακτηρίζει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την διασυστηματική μετακίνηση του ιοειδούς, η οποία εξελίσσονταν πολύ αργά. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε σταθερός μετασχηματισμός φυτών *N. benthamiana* με το διμερές μόριο του CEVd, με

αποτέλεσμα να παραχθεί ικανοποιητικός αριθμός φυτών που πολλαπλασιάζουν το ιοειδές. Η παρουσία του CEVd στα διαγονιδιακά φυτά φαίνεται ότι επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξής τους καθώς και τη συνολική παραγωγή σπόρου.

Στο πλαίσιο ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι του ιοειδούς, δύο επιλεγμένα τμήματα του γονιδιώματος του CEVd, υπό δομή φουρκέτας, αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να επάγουν το μηχανισμό RNA σιώπησης στα διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που πολλαπλασιάζουν το CEVd. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού του ιοειδούς από την παρουσία των δύο τμημάτων του γονιδιώματός του. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα επιλεγμένα τμήματα της αλληλουχίας του CEVd φαίνεται ότι αποτελούν ταυτόχρονα στόχους και επαγωγείς της RNA σιώπησης. Αυτή η γνώση μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την παραγωγή φυτών με *a priori* ενεργοποιημένο το μηχανισμό της RNA σιώπησης, τα οποία θα έχουν συσσωρευμένα siRNAs απαραίτητα για την εκδήλωση άμεσης απόκρισης του φυτού σε μόλυνση από το ιοειδές.

Δεδομένου ωστόσο ότι το *N. benthamiana* δεν μολύνεται μηχανικά με το ιοειδές, κρίνεται απαραίτητη η αξιολόγηση της παρατηρηθείσας ανθεκτικότητας στα εσπεριδοειδή που συνιστούν φυσικούς ξενιστές του ιοειδούς CEVd. Για το σκοπό αυτό, επιχειρήθηκε η παραγωγή διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν τα δύο επιλεγμένα τμήματα της αλληλουχίας του CEVd με τη μορφή φουρκέτας. Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη αναφορά δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών εσπεριδοειδών που εκφράζουν δίκλινα μόρια της αλληλουχίας του CEVd με σκοπό την αύξηση της ανθεκτικότητά τους στο ιοειδές. Μελλοντικά, θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω οι παραχθείσες διαγονιδιακές σειρές και, έπειτα από τεχνητές μολύνσεις με το ιοειδές, να αξιολογηθεί η ικανότητά τους να επάγουν ανθεκτικότητα στο CEVd, μέσω RNA σιώπησης.

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η αξιοποίηση των επιτευγμάτων της βιοτεχνολογίας και της γενετικής μηχανικής μπορεί να συμβάλει καθοριστικά στην αναβάθμιση των βελτιωτικών προγραμμάτων γενικότερα και στη δημιουργία ανθεκτικού γενετικού υλικού εσπεριδοειδών ειδικότερα. Δεδομένου ωστόσο ότι η Ευρωπαϊκή Ένωση απαγορεύει ρητά την καλλιέργεια φυτικών ειδών που είναι προϊόντα γενετικής μηχανικής, τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει στραφεί προς την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων για την αντιμετώπιση των πλέον επιζήμιων εχθρών και ασθενειών. Προς την κατεύθυνση αυτή, μία υποσχόμενη προσέγγιση αφορά τη χρήση

μορίων RNA (ssRNAs, dsRNAs, siRNAs, amiRNAs και πρόδρομες μορφές τους) που εφαρμόζονται εξωγενώς είτε με μηχανική μόλυνση είτε με ψεκάσμο και έχουν την ικανότητα να επάγουν το μηχανισμό της RNA σιώπησης έναντι ιών ή ιοειδών (Tenllado et al., 2004). Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια είναι εμφανώς διακριτή η τάση επιστροφής στη χρήση μεταλλάξεων για τη βελτίωση των φυτών. Στα πλαίσια αυτά, η τεχνολογία TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes), που συνιστά μια μαζική και χαμηλού κόστους μέθοδο που επιτρέπει την εύρεση ωφέλιμων μεταλλάξεων έπειτα από την εφαρμογή μεταλλαξιγόνου παράγοντα (Tadele et al., 2010), έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε μεγάλο αριθμό μονοετών ποωδών φυτών (Sikora et al., 2011). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι παρέχει τη δυνατότητα αξιόπιστου προσδιορισμού της λειτουργίας γονιδίων (gene-function) και αξιοποίησης των μεταλλάξεων σε βελτιωτικά προγράμματα. Στα εσπεριδοειδή, έχει αναφερθεί η χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας για τον προσδιορισμό γονιδίων που ευθύνονται για την αλλαγή του χρώματος των καρπών της μανταρινιάς Κλημεντίνη στο στάδιο της ωρίμανσης (Rios et al., 2009).



## Βιβλιογραφία

- Βολουδάκης ΑΕ, Καπαρή-Ησαΐα Θ, Κουτσιουμάρη ΕΜ, κ.ά (2008) Εξυγίανση εκλεκτών ποικιλιών εσπεριδοειδών στην Ελλάδα – Πρώτα πειραματικά δεδομένα. Πρακτ. 14<sup>ο</sup> Πανελ. Φυτοπαθολ. Συνεδρ. σελ. 112.
- Πασσίσης Μ, Κεραμίδας Κ (1983) Η λεμονιά Αδαμοπούλου. Διεύθυνση Γεωργίας Πειραιώς. Δενδροκομικός Σταθμός Πόρου.
- Πρωτοπαπαδάκης Ε (1994) Οι ποικιλίες λεμονιάς. Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους. Γεωργία-Κτηνοτροφία 8:18-20.
- Barbosa-Mendes JM, Filho FDAAM, Filho AB, et al (2009) Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. *Sci Hort* 122:109–115.
- Bernad L, Duran-Vila N, Elena SF (2009) Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of *citrus exocortis viroid*. *J Gen Virol* 90:2040–2049.
- Bond JE, Roose ML (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Rep* 18:229-234.
- Boscariol RL, Monteiro M, Takahashi EK, et al (2006) *Attacin A* gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* ‘Hamlin’. *J Am Soc Hort Sci* 131:530–536.
- Boubourakas IN, Voloudakis AE, Agorastou T, et al (2010) Pilot survey of citrus mother trees in Greece for the presence of viruses and viroids. In: Hilf ME, Milne RG, Timmer LW, da Graça J V. (eds) Proc. 17h Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV: Riverside, pp 229–232.
- Cheng X, Virk N, Wang H (2014) Impact of the host on plant virus evolution. In: Gaur RK, Hohn T, Sharma P (ed) Plant virus - host interaction. Molecular approaches and viral evolution. Academic Press. Pp 359-371.
- Despres C, DeLong C, Glaze S, Liu E, Fobert P R (2000) The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of Bzip transcription factors. *Plant Cell* 12:279-290.
- Domínguez A, Guerri J, Cambra M, et al (2000) Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of *citrus tristeza virus*. *Plant Cell Rep* 19:427–433.
- Domínguez A, Fagoaga C, Navarro L, et al (2002) Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Mol Genet Genomics* 267:544–556.

- Dutt M, Barthe G, Irely M, Grosser J (2015) Transgenic citrus expressing an arabidopsis *NPR1* gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus greening). *PLoS One* 10:1–17.
- Febres VJ, Niblett CL, Lee RF, Moore GA (2003) Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with *citrus tristeza closterovirus* genes. *Plant Cell Rep* 21:421–428.
- Febres V, Fisher L, Khalaf A, Moore GA (2011) Citrus transformation: challenges and prospects. In: Alvarez MA (ed) Genetic transformation. InTech. pp 101-122.
- Ghorbel R, La-Malfa S, Lopez MM, et al (2001) Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a super-transformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in citrus. *Physiol Mol Plant Pathol* 58:103–110.
- Hao G, Pitino M, Duan Y, Stover E (2015) Reduced susceptibility to *Xanthomonas citri* in transgenic citrus expressing the FLS2 receptor from *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 29:132-142.
- Koutsoumari EM, Voloudakis AE (2016) Isolation and expression analysis of differentially expressed genes in stem tissue of the Greek lemon cv. Adamopoulou. *J Hort Sci Biotech*, DOI:10.1080/14620316.2016.1224131.
- López C, Cervera M, Fagoaga C, et al (2010) Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. *Mol Plant Pathol* 11:33–41.
- Nicolosi E (2007) Origin and taxonomy. In: Khan IA (ed) Citrus genetics, breeding and biotechnology. CAB International. pp 19-43.
- Reyes CA, De Francesco A, Peña EJ, et al (2011) Resistance to *Citrus psorosis virus* in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein-RNA silencing. *J Biotechnol* 151:151–158.
- Rios G, Naranjo MA, Iglesias D, et al (2009) Genomics meets induced mutations in citrus: identification of deleted genes through comparative genomic hybridization. In: Shu QY (ed) Induced plant mutations in the genomics era, FAO/IAEA, Rome, pp 407-410.
- Sikora P, Chawade A, Larsson M, et al (2011) Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *Int J Plant Genomics* 2011: 314829.
- Singh S, Rajam M V (2009) Citrus biotechnology: achievements, limitations and future directions. *Physiol Mol Biol Plants* 15:3-22.
- Tadele Z, MBA C, Till BJ (2010) TILLING for mutations in model plants and crops. In: Mohar Jain S, Brar DS (ed) Molecular techniques in crop improvement, 2nd ed, Springer. pp 307-332.

- Tenllado F, Llave C, Diaz-Ruiz JR (2004) RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Res* 102:85–96.
- Wang J, Boubourakas IN, Voloudakis AE, et al (2013) Identification and characterization of known and novel viroid variants in the Greek national citrus germplasm collection: threats to the industry. *Eur J plant Pathol J plant Pathol* 137:17–27.
- Zhang YL, Fan WH, Kinkema M, Li X, Dong XN (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc Natl Acad Sci* 96:6523-6528.
- Zhang XD, Francis MI, Dawson WO, et al (2010) Over-expression of the Arabidopsis *NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker. *Eur J Plant Pathol* 128:91–100.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### I. Αλληλουχίες CEVd

#### > JX885864 (Αδαμοπούλου-1)

CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAA  
AAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAG  
GTCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAG  
GAGCTCGTCTCCTTCCTTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCACG  
CCCCCTCGCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAAC  
CCCAAACCGCTTTTCTTATATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAA  
CCCTAGATTGGGTCCCT

#### > JX885865 (Αδαμοπούλου-2)

CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAA  
AAAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAGTCGA  
GGTCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACA  
GGAGCTCGTCTCCTTCCTTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCAC  
GCCCCCTCGCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAA  
CCCCAAACCGCTTTTCTTGTATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGA  
ACCCTAGATTGGGTCCCT

#### > JX885866 (PO25-1)

CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGTAAAAGAAAA  
AAGAGGCGGGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAG  
GTCGGGGGGAGCAACTGCCTCGGTCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGG  
AGCTCGACTCCTTCCTTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGCCTGCGCG  
CCCCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAACC  
CCGTACCGCTTTTCTTGATCTTAGCTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACC  
CTAGAGTGGGTCCCT

#### > JX885867 (PO25-2)

CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGTAAAAGAAAA  
AAGAGGCGGGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGAGGAAGTCGAG  
GTCGGGGGGAGCAACTGCCTCGGTCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGG  
AGCTCGACTCCTTCCTTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGCCTGCGCG  
CCCCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTCAACC  
CCGTACCGCTTTTCTTGATCTCAGCTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAAC  
CCTAGAGTGGGTCCCT

## II. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών του CEVd.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
M30868      CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAA 60
JX885865   CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAA 60
JX259394   CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAA-AA 59
JX259393   CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAA-AA 59
JX259395   CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAA-AA 59
JX885864   CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAA-AA 59
JX259396   CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAA-AA 59
K00965     CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAA 60
JX885867   CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGTAAAAGAAAA 60
JX885866   CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGTAAAAGAAAA 60
JX259392   CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGTAAAAGAAAA 60
*****

M30868      AGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGG 120
JX885865   AAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGG 120
JX259394   AAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGG 119
JX259393   AAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGG 119
JX259395   AAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGG 119
JX885864   AAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGG 119
JX259396   AAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGG 119
K00965     GATGGCGGGTGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCGCCGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGG 120
JX885867   AGAGGCGGGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGAAAC-CTGAGGAAGTCGAGG 119
JX885866   AGAGGCGGGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGAAAC-TGGAGGAAGTCGAGG 119
JX259392   AGAGGCGGGGGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGAAAC-TGGAGGAAGTCGAGG 119
      * * * * *

M30868      TCGGG-GGGGACAGCTGCTTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 179
JX885865   TCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 180
JX259394   TCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 179
JX259393   TCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 179
JX259395   TCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 179
JX885864   TCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 179
JX259396   TCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 179
K00965     TCGGG-GGGAGCTTCGCCTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 179
JX885867   TCGGG-GGGAGCAACTGCCTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 178
JX885866   TCGGG-GGGAGCAACTGCCTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 178
JX259392   TCGGG-GGGAGCAACTGCCTCGGTCGCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGA 178
*****

M30868      GCTCGTCTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCTCGCC 239
JX885865   GCTCGTCTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCACGCC 240
JX259394   GCTCGTCTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCACGCC 239
JX259393   GCTCGTCTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCACGCC 239
JX259395   GCTCGTCTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCACGCC 239
JX885864   GCTCGTCTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCACGCC 239
JX259396   GCTCGTCTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCACGCC 239
K00965     GCTCGTCTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGCGTCGCCACC 239
JX885867   GCTCGACTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGCGTCGCCGCC 238
JX885866   GCTCGACTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGCGTCGCCGCC 238
JX259392   GCTCGACTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGCGTCGCCGCC 238
*****

M30868      CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGAGACTACCCGGTGGAAACAACCTGAAGCTTCAACCCCA 299
JX885865   CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGATACTACCCGGTGGATAACAACCTGAAGCTTCAACCCCA 300
JX259394   CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGATACTACCCGGTGGATAACAACCTGAAGCTTCAACCCCA 299
JX259393   CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGATACTACCCGGTGGATAACAACCTGAAGCTTCAACCCCA 299
JX259395   CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGATACTACCCGGTGGATAACAACCTGAAGCTTCAACCCCA 299
JX885864   CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGATACTACCCGGTGGATAACAACCTGAAGCTTCAACCCCA 299
JX259396   CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGATACTACCCGGTGGATAACAACCTGAAGCTTCAACCCCA 299
K00965     CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGATACTACCCGGTGGATAACAACCTGAAGCTTCAACCCCA 299
JX885867   CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGATACTACCCGGTGGATAACAACCTGAAGCTTCAACCCCG 298
JX885866   CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGATACTACCCGGTGGATAACAACCTGAAGCTTCAACCCCG 298
JX259392   CCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGATACTACCCGGTGGATAACAACCTGAAGCTTCAACCCCG 298
*****
```

M30868 AACCGCTTTTCTTGTATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 359  
**JX885865** AACCGCTTTTCTTGTATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 360  
JX259394 AACCACTTTTCTTATATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 359  
JX259393 AACCGCTTTTCTTGTATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 359  
JX259395 AACCGCTTTTCTTGTATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 359  
**JX885864** AACCGCTTTTCTTATATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 359  
JX259396 TACCGCTTTTCTTATATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 359  
K00965 GTACCGCTTTTCTTGTATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 359  
**JX885867** TACCGCTTTTCTTGTATCTCAGCTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 358  
**JX885866** TACCGCTTTTCTTGTATC-TTAGCTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 357  
JX259392 TACCGCTTTTCTTGTATCTCAACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTA 358  
\* \*\* \* \* \*\*\*\*\*

M30868 GATTGGGTCCCT 371  
**JX885865** GATTGGGTCCCT 372  
JX259394 GATTGGGTCCCT 371  
JX259393 GATTGGGTCCCT 371  
JX259395 GATTGGGTCCCT 371  
**JX885864** GATTGGGTCCCT 371  
JX259396 GATTGGGTCCCT 371  
K00965 GATTGGGTCCCT 371  
**JX885867** GAGTGGGTCCCT 370  
**JX885866** GAGTGGGTCCCT 369  
JX259392 GATTGGGTCCCT 370  
\*\* \*\*\*\*\*

### III. Περίληψεις εργασιών που παρουσιάστηκαν σε συνέδρια.

#### 25<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών

PP-22

#### ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΙΔΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ-ΠΡΩΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Ε.Μ. Κουτσιουμάρη<sup>1</sup>, Π.Α. Ρούσσος<sup>2</sup> & Α.Ε. Βολουδάκης<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών & Γεωργικού Πειραματισμού, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

<sup>2</sup>Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Δενδροκομίας, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

##### Περίληψη

Η καλλιέργεια των εσπεριδοειδών (*Citrus* spp.) είναι πολύ σημαντική για την Ελλάδα, αλλά απειλείται από σοβαρούς εχθρούς και ασθένειες, με πιο σημαντικές τις ιολογικές ασθένειες. Η πλέον αποτελεσματική μέθοδος αντιμετώπισης των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων στα φυτά θεωρείται η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και υποκειμένων. Οι σύγχρονες τεχνικές βελτίωσης των φυτών, μέσω της γενετικής τροποποίησης (μετασχηματισμός) οδηγούν στη δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών με την ενσωμάτωση συγκεκριμένων γενετικών πληροφοριών σε υπάρχοντες *elite* γονοτύπους. Ο μετασχηματισμός των εσπεριδοειδών παρουσιάζει δυσκολίες και έχει χαμηλά ποσοστά επιτυχίας με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η πλέον αποτελεσματική μέθοδος μετασχηματισμού για το κάθε είδος εσπεριδοειδούς ξεχωριστά. Στη συγκεκριμένη εργασία, δοκιμάστηκαν πέντε μέθοδοι μετασχηματισμού τμημάτων επικοτυλίου από σπορόφυτα πέντε ειδών και υβριδίων εσπεριδοειδών (Carrizo, Citrumelo 1452, νεραντζιά, λεμονιά 'Μαγληνή', *Poncirus trifoliata*) αναπτυσσόμενων *in vitro*, με τη χρήση του *Rhizobium radiobacter* (syn. *Agrobacterium tumefaciens*), οι οποίες διέφεραν κυρίως στη σύσταση των υποστρωμάτων αναγέννησης των εκφύτων. Οι αναγεννημένοι βλαστοί, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο, προέρχονταν από τυχαίους οφθαλμούς ή από κάλλο αναπτυσσόμενο στις τομές των εκφύτων. Ως προς την αποτελεσματικότητα αναγέννησης πιθανών μετασχηματισμένων φυτών, βρέθηκε ότι η καλύτερη μέθοδος για το *P. trifoliata* και το Citrumelo 1452 ήταν αυτή των Orbovic & Grosser, ενώ για το Carrizo η μέθοδος των Dutt & Grosser (υποστρώματα MS που εμπεριέχουν βενζυλαδεσίνη [BAP] και ναφθαλινοξικό οξύ [NAA]). Αντίθετα, η νεραντζιά και η λεμονιά έδωσαν ικανοποιητικά ποσοστά αναγέννησης μόνο στο υπόστρωμα MT (Murashige and Tucker) που εμπεριείχε τις ορμόνες 4-CPPU και ινδολυλοξικό οξύ (IAA). Από τους αναγεννημένους βλαστούς που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα MS ή MT, που εμπεριείχε καναμικίνη ως αντιβιοτικό επιλογής μετασχηματισμένων φυτικών ιστών, έγινε απομόνωση φυτικού DNA και εφαρμογή της PCR για την ανίχνευση της ενσωμάτωσης του γονιδίου της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) στο γονιδίωμα των εσπεριδοειδών. Από τα έως τώρα δεδομένα, το αναμενόμενο προϊόν της PCR βρέθηκε στο Carrizo, στη νεραντζιά και στη 'Μαγληνή' λεμονιά, υποδεικνύοντας ότι έχουν αποκτηθεί μετασχηματισμένοι βλαστοί από τα φυτά αυτά. Επιπρόσθετα, δοκιμάστηκε υπόστρωμα βλαστογένεσης με BAP αλλά μόνο για το Carrizo επιτεύχθηκε η παραγωγή πολλών βλαστών που έφεραν το επιθυμητό γονίδιο από έναν μόνο αρχικό μετασχηματισμένο βλαστό. Επίσης, μετασχηματισμένοι βλαστοί Carrizo τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας MS που εμπεριείχε αυξίνη (IBA ή NAA) και καναμικίνη και ριζοβόλησαν σε ποσοστό περίπου 70%. Αντίθετα, στο ίδιο χρονικό διάστημα και στο ίδιο υπόστρωμα, οι μετασχηματισμένοι βλαστοί των άλλων ειδών δεν ριζοβόλησαν.

**Λέξεις κλειδιά:** Γενετική τροποποίηση, βλαστογένεση, Carrizo, Citrumelo 1452, νεραντζιά, λεμονιά, *Poncirus trifoliata*



## ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΟΕΙΔΟΥΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΟΡΤΙΔΑΣ ΣΤΟ ΦΥΤΟ *NICOTIANA BENTHAMIANA*, ΕΝΑ ΜΗ ΞΕΝΙΣΤΗ.

Ε.Μ. Κουτσιουμάρη<sup>1</sup>, José-Antonio Daròs<sup>2</sup> και Α.Ε. Βολουδάκης<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

<sup>2</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia, Spain

Η εσπεριδοειδοκαλλιέργεια είναι πολύ σημαντική για τη χώρα μας αλλά απειλείται από σοβαρούς εχθρούς και ασθένειες, με πιο σημαντικές τις ιολογικές ασθένειες. Το ιοειδές της εξωκορτίδας (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) αποτελεί μια από τις σοβαρότερες ασθένειες του *Poncirus trifoliata* και των υβριδίων του, υποκειμένων των εσπεριδοειδών, τα οποία προωθούνται τα τελευταία χρόνια προς αντικατάσταση του πολύ καλού υποκειμένου στην ελληνική εσπεριδοειδοκαλλιέργεια -αλλά ευαίσθητου στην τριστέσα- νεραντζιάς. Η πλέον αποτελεσματική μέθοδος αντιμετώπισης των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων στα φυτά θεωρείται η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. Μία μέθοδος παραγωγής φυτών ανθεκτικών σε ιούς και ιοειδή είναι αυτή της εφαρμογής της RNA-σιώπησης (RNA silencing, RNAi), η οποία έχει δοκιμαστεί με επιτυχία για τα PSTVd και HSVd σε τομάτα και *Nicotiana benthamiana*, αντίστοιχα. Προκειμένου να βρεθεί το τμήμα του CEVd που μπορεί να επιφέρει σιώπηση στο ιοειδές, και επομένως ανθεκτικότητα, «μόρια ανιχνευτές» τα οποία εμπεριέχουν αλληλουχίες του CEVd συζευγμένες με γονίδιο μάρτυρα μπορούν να δοκιμαστούν στο φυτό-μοντέλο *N. benthamiana* όταν σε αυτό πολλαπλασιάζεται το CEVd. Δεδομένου ότι η *N. benthamiana* δεν είναι ξενιστής του συγκεκριμένου ιοειδούς, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός φυτών με τη χρήση του *Rhizobium radiobacter* (syn. *Agrobacterium tumefaciens*) που έφερε τον πλασμιδιακό φορέα στον οποίο έχει ενσωματωθεί το διμερές μόριο του ιοειδούς. Στα αναγεννημένα *N. benthamiana* φυτά εφαρμόστηκαν αντιδράσεις PCR και RT-PCR και επιβεβαιώθηκε η παρουσία του διαγονιδίου (γένωμα του CEVd) καθώς και του RNA του ιοειδούς, αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι η *N. benthamiana*, ένας μη ξενιστής του CEVd, έχει τα απαραίτητα ενζυμικά συστήματα για τον πολλαπλασιασμό του ιοειδούς στα διαγονιδιακά φυτά.



## POSTER 40

### Production of virus-free citrus germplasm in Greece

*E.M. Koutsoumani, T. Kapari-Isaia, A. Kyriakou, P.E. Kyriakopoulou,*

*T. Agorastou, G. Magripis, A.E. Voloudakis*

Agricultural University of Athens, Greece

Citriculture is very important for Greece, but unfortunately is threatened by serious pests and diseases, as well as frost damage. Citrus tristeza virus (CTV) is the most serious viral disease that could be transmitted by aphids, as well as through grafting and was detected for the first time in Greece in 2000. Sour orange is the most well-adopted rootstock in greek citriculture, due to its tolerance to calcified soils and *Phytophthora* spp, but it is very susceptible to CTV. *Poncirus trifoliata* and its hybrids, proposed to be used as alternative to sour orange rootstocks due to their tolerance to CTV, are, however, susceptible to citrus viroids. A recent survey revealed that citrus mother trees in Greece were found infected by several graft-transmissible viruses and viroids. Consequently, the use of virus-free propagation material is crucial to sustain greek citriculture. In Agricultural University of Athens the production of healthy citrus propagation material is achieved by employing the "in vitro micrografting" technique, in which the apical meristem of infected trees of elite citrus cultivars are grafted in vitro on healthy rootstock seedlings under aseptic conditions. The new plantlets arising from meristem grafting are subjected to RT-PCR in order to confirm the absence of viroids. This process resulted in obtaining several elite greek cultivars -free of viroids- that could be used as pathogen-free mother material for the establishment of the primary citrus foundation blocks.

#### Keywords

citriculture, citrus, Greece, Citrus tristeza virus

## XII INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS 2012

### S03P01

#### **Expression analysis of genes differentially expressed in stem tissue of two lemon cultivars.**

Koutsoumari E.M., and Voloudakis A.E.

Agricultural University of Athens (AUA), Laboratory of Plant Breeding and Biometry, Department of Crop Science, Greece.

[eva.kouts@yahoo.gr](mailto:eva.kouts@yahoo.gr)

Lemon (*Citrus limon*) cultivation in Greece and other Mediterranean countries suffers from two major problems: the destructive disease Mal Secco caused by the fungus *Phoma tracheiphila* and chilling injury caused by low temperatures. The knowledge of genes involved in resistance to the above mentioned stresses would be useful in breeding tolerant lemon cultivars. In order to determine the molecular basis of resistance to these stresses, suppression subtractive hybridization (SSH) was applied on two lemon cultivars exhibiting differences in resistance to Mal Secco and cold, namely 'Lisbon' (susceptible to both stresses) and 'Adamopoulou' (tolerant Greek cultivar), which is believed to have derived from 'Lisbon'. Two subtractions were performed resulting in two subtractive cDNA libraries: 'Adamopoulou-Lisbon' containing sequences expressed preferentially in 'Adamopoulou' and 'Lisbon-Adamopoulou' containing genes expressed in 'Lisbon'. A total of 587 clones were sequenced and the obtained sequences were edited resulting in 81 non-redundant ESTs that have been deposited in GenBank EST database. The analysis of these sequences using BLAST software (NCBI) revealed homology to previously identified genes involved in defense mechanisms against biotic and abiotic stresses. ESTs from each subtractive library were selected for further analysis of their expression in both cultivars by performing semi-quantitative RT-PCR reactions. The results of this experiment will be discussed.