



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ  
& ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Χαρακτηρισμός ιών της ελιάς

**Ευανθία Χ. Ξυλογιάννη**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Ελισάβετ Κ. Χατζηβασιλείου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ**  
**2021**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

**Χαρακτηρισμός Ιών της Ελιάς**

**“Characterisation of Viruses Infecting Olive Trees”**

**Ευανθία Χ. Ξυλογιάννη**

**Εξεταστική Επιτροπή:**

Ελισάβετ Κ. Χατζηβασιλείου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Πέτρος Α. Ρούσσος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

## **Χαρακτηρισμός ιών της ελιάς**

*ΠΜΣ Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης του Περιβάλλοντος  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας*

### **Περίληψη**

Η ελιά (*Olea spp*, *Oleaceae*) αποτελεί τον έκτο ελαιοπαραγωγικό καρπό, παγκοσμίως και η καλλιέργειά της έχει ιδιαίτερη σημασία για την Ελλάδα, αλλά και άλλες χώρες της Μεσογείου. Η χώρα μας κατέχει την τρίτη μεγαλύτερη σε έκταση ελαιοκαλλιέργειας στην Ευρωπαϊκή Ένωση, με κυριότερη ποικιλία την Κορωνέικη. Η ελιά προσβάλλεται από 15 ιούς, οι οποίοι συνήθως προκαλούν λανθάνουσες μολύνσεις, αλλά και ορισμένες σοβαρές ασθένειες. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της φυτοϋγείας των ελληνικών ελαιώνων και ο χαρακτηρισμός των ιών που απαντώνται σε αυτούς. Ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε σε μελέτες ενός νέου ιού του γένους *Terovirus* (*Betaflexiviridae*), που ταυτοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλληλούχισης υψηλής απόδοσης (HTS) και για τον οποίο προτάθηκε το όνομα *olive virus T* (ΟΙVΤ). Σε μελέτες βιολογικού χαρακτηρισμού του ΟΙVΤ, αυτός μεταδόθηκε επιτυχώς με εμβολιασμό σε φυτά των ποικιλιών Κορωνέικη, *Argemina* και *Frantoio*, αλλά παρέμεινε λανθάνων. Για τον έλεγχο της παρουσίας ιών της ελιάς, συμπεριλαμβανομένου και του ΟΙVΤ, πραγματοποιήθηκαν επισκοπήσεις αγρών, από το 2017 έως το 2020 και εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα RT-PCR, τα οποία αναπτύχθηκαν ή βελτιστοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Συνολικά ελέγχθηκαν 158 δείγματα ελιάς από 22 περιοχές της χώρας και ο νέος ιός (ΟΙVΤ) ανιχνεύθηκε στην Φθιώτιδα, την Αττική την Κόρινθο και την Αρκαδία (ποσοστό παρουσίας 4,4% επί του συνόλου των δειγμάτων). Φυλογενετική ανάλυση τμήματος των γονιδίων της πρωτεΐνης μετακίνησης και καψιδιακής πρωτεΐνης (MP-CP) των επτά απομονώσεων του ΟΙVΤ που αποκτήθηκαν έδειξε μεταξύ τους 75,6-99,3% ομοιότητα. Όταν συγκρίθηκαν με άλλους ιούς του γένους *Terovirus* τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 45,25-75,64%, με τη μεγαλύτερη ομοιότητα να καταγράφεται με τον *Prunus virus T*. Από τους γνωστούς ιούς της ελιάς ανιχνεύθηκαν οι *cucumber mosaic virus* (CMV), *cherry leafroll virus* (CLRV) και *olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV), με συχνότητα εμφάνισης 3,2%, 1,3% και 1,3%, αντίστοιχα. Οι απομονώσεις του CMV, με 91,55-100% ομοιότητα μεταξύ τους όσον αφορά την αλληλουχία του γονιδίου της πολυμεράσης του ιού, ομαδοποιήθηκαν η μία στο subI A και οι τέσσερις στο subI B του CMV και εμφάνισαν ομοιότητα από 85,55-89,1% με απομονώσεις ελιάς από την Αλβανία. Επιπλέον αποκτήθηκαν δύο όμοιες αλληλουχίες της περιοχής 3'UTR του CLRV με 91,9% ομοιότητα με τις ήδη γνωστές ελληνικές απομονώσεις από ελιά, ενώ η αλληλουχία του γονιδίου HSP70 του OLYaV της απομόνωσης της μελέτης αυτής διαφοροποιήθηκε (75,89% ομοιότητα) από την γνωστή ελληνική απομόνωση του ιού. Κανένας από τους ιούς που ανιχνεύθηκαν στους ελληνικούς ελαιώνες σε αυτή τη μελέτη, δεν συσχετίστηκε με συγκεκριμένα συμπτώματα στα μολυσμένα δένδρα ελιάς.

**Επιστημονική περιοχή:** Ιοί ελιάς

**Λέξεις κλειδιά:** HTS, ArMV, CLRV, CMV, OLYaV, OIVT, SLRSV, TMV, TNV, ελιά, ιοί

## **Characterisation of viruses infecting olive trees**

*MSc Plant Protection and Environment*

*Department of Crop Science*

*Laboratory of Phytopathology*

### **Abstract**

Olive (*Olea* spp, Oleaceae) is the sixth most important oil-producing fruit in the world and its cultivation is of essential importance for Greece and other Mediterranean countries. Greek olive cultivation ranks third in the European Union, and the main cultivated variety is Koroneiki. Fifteen viruses have been reported to naturally infect olive trees, usually in latent infections however, some may cause serious diseases. The aim of this study was to evaluate the phytosanitary status of Greek olives, by recording virus incidence and to further characterise any virus present. Particular emphasis was placed on studies of a novel virus of the genus *Tepovirus* (family *Betaflexiviridae*), that was identified in Greek olives using a high throughput sequencing approach and for which the name olive virus T (OIVT) was proposed. In the studies performed for the biological characterization of OIVT, the virus was successfully transmitted via grafting to olive plants of Koroneiki, Arbequina and Frantoio varieties, but without causing obvious symptoms. To record the presence of viruses in Greek olive orchards, including OIVT, field surveys were conducted from 2017 to 2020 using RT-PCR protocols developed or optimized in this study. A total of 158 olive samples were tested originating from 22 regions of the country. The new virus (OIVT) was detected in Fthiotida, Attica, Corinth and Arcadia (incidence 4.4% of the total samples). Phylogenetic analysis of the partial sequence of the movement protein-capsid protein (MP-CP) genes of the seven obtained OIVT isolates showed that they share 75.6-99.3% similarity. When compared to other viruses of the genus *Tepovirus* the corresponding percentages were 45.25-75.64%, with the greatest similarity observed with *Prunus virus T*. Cucumber mosaic virus (CMV), cherry leafroll virus (CLRV) and olive leaf yellowing associated virus (OLYaV), were also detected with an incidence of 3.2%, 1.3% and 1.3%, respectively. Our olive CMV isolates, showed 91.55-100% similarity in the viral polymerase gene sequence, and they were grouped in subIA (one isolate) and subIB (four isolates) of CMV. These isolates showed 85.55-89.1% similarity with the only available olive isolates from Albania. In addition, two identical sequences of the 3'UTR region of CLRV were obtained that showed 91.9% similarity to the already known Greek olive isolates. Finally, sequence of the HSP70 gene of OLYaV isolate we collected was differentiated (only 75.89% similarity) from the already known Greek isolate. In this study none of the viruses detected in Greek olive groves was associated with specific symptoms in the infected olive trees.

**Scientific area:** olive viruses

**Keywords:** HTS, ArMV, CLRV, CMV, OLYaV, OIVT, SLRSV, TMV, TNV, olive, viruses

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής του ΓΠΑ στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του τομέα Φυτοπροστασίας, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ελισάβετ Κ. Χατζηβασιλείου.

Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Ε.Κ. Χατζηβασιλείου για την ανάθεση του παρόντος θέματος αλλά και για το συνεχές ενδιαφέρον και τις συμβουλές της, τόσο επιστημονικές όσο και προσωπικές, καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Ιδιαίτερα, οφείλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κυριακή Σαρέλη, για το προσωπικό ενδιαφέρον και τις συμβουλές της, τόσο εντός όσο και εκτός εργαστηρίου, αλλά και τους προπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσαν με την παρουσία τους μέσα στο εργαστήριο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Επαμεινώνδα Παπλωματά και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Πέτρο Α. Ρούσσο, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της διατριβής μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Stephan Winter και Δρ. Paolo Margaria από το Ινστιτούτο Leibniz (DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, 38124 Braunschweig, Γερμανία) για τη συνεργασία τους στην ανάλυση των δεδομένων για τον νέο τερο ιό, όπως επίσης και την Δρ. Maria Saponari (Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Ιταλία) για την παροχή θετικών RNA για τους OLYaV και CLRV, και τον καθηγητή Νικόλαο Ι. Κατή από το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, της Γεωπονικής Σχολής, του ΑΠΘ για τους ArMV και CLRV, RNA, τον κ. Γιώργο Κωστελένο για την παροχή των δέντρων ελιάς, καθώς και τους Τρύφωνα Ζιάτα και Παναγιώτη Μπεναρδή για τα δείγματα ελιάς που μου παρείχαν.

Η παρούσα μελέτη έχει δημοσιευτεί

Xylogianni E, Margaria P, Knierim D, Sareli K, Winter S, Chatzivassiliou EK. Virus Surveys in Olive Orchards in Greece Identify Olive Virus T, a Novel Member of the Genus Tepovirus. Pathogens. 2021; 10(5):574. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050574>



## Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	1
Συνομογραφίες.....	4
Ευρετήριο Εικόνων.....	7
Ευρετήριο Πινάκων.....	11
Κεφάλαιο 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1 Η Ελιά.....	14
1.1.1 Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	16
1.1.2 Το Ελαιόλαδο.....	17
1.1.3 Η ελιά στην Ελλάδα.....	17
1.2 Οι ιοί της ελιάς.....	20
1.2.1 <i>Arabis Mosaic Virus</i> (ArMV).....	27
1.2.2 <i>Cherry leafroll virus</i> (CLRV).....	29
1.2.3 <i>Olive latent ringspot virus</i> (OLRSV).....	31
1.2.4 <i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV).....	33
1.2.5 <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV).....	35
1.2.6 <i>Olive latent virus 1</i> (OLV-1).....	37
1.2.7 <i>Olive mild mosaic virus</i> (OMMV).....	39
1.2.8 <i>Tobacco necrosis virus D</i> (TNV-D).....	41
1.2.9 <i>Olive latent virus 2</i> (OLV-2).....	43
1.2.10 <i>Olive latent virus-3</i> (OLV-3).....	45
1.2.11 <i>Olive leaf yellowing-associated virus</i> (OLYaV).....	46
1.2.12 <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV).....	48
1.2.15 <i>Olive semilatifolius virus</i> (OSLV).....	52
1.3 Συμπτωματολογία και ασθένειες ή σύνδρομα ιολογικών προσβολών στην ελιά - Οικονομική σημασία.....	53
1.3.1 Κιτρίνισμα φύλλων της ελιάς ( <i>olive leaf yellowing complex</i> ).....	54
1.3.2 Οίδημα καρπών ( <i>bumpy fruits</i> ).....	55
1.3.3 Δεσμίωση και διαφάνεια των νευρώσεων της ελιάς ( <i>vein banding and vein clearing</i> ).....	55
1.4 Ιοειδή και άλλα εμβολιο-μεταδιδόμενα παθογόνα.....	56
1.4.1 Δρεπανοειδές φύλλο ( <i>sickle leaf</i> ).....	56
1.4.2 Μερική παράλυση ( <i>partial paralysis</i> ).....	56

1.4.3 Παραμορφώσεις φύλλων (leaf malformation) .....	57
1.4.4 Μολυσματικός ίκτερος (infective yellowing) .....	57
1.4.5 Σφαίρωση (sphaeriosis).....	57
1.4.6 Ρωγμώδης φλοιός της ελιάς (bark cracking).....	57
1.4.7 Ύβοι καρπών και ευλογιά καρπών (fruit hump and fruit pox).....	57
1.5 Φυτοπλάσματα .....	58
1.6 Επιδημιολογία ιών της ελιάς.....	59
1.7 Αντιμετώπιση ιών της ελιάς - Παραγωγή Πιστοποιημένου Πολλαπλασιαστικού Υλικού (ΠΠΥ).....	62
1.8 Μέθοδοι ανίχνευσης ιών της ελιάς και διάγνωση ιολογικών ασθενειών.....	67
1.8.1 Βιοδοκιμές.....	67
1.8.2 Ορολογικές δοκιμές - ELISA.....	70
1.8.3 Μοριακές δοκιμές .....	70
1.8.4 Αλληλούχιση υψηλής απόδοσης (High-Throughput Sequencing Technologies–HTS) ή αλληλούχιση νέας γενιάς (next-generation sequencing - NGS) .....	73
1.9 Το γένος <i>Terovirus</i> .....	73
1.9.1 Potato virus T (PVT) .....	74
1.9.2 Prunus virus T (PrVT) .....	76
1.9.3 Cherry virus T (ChVT).....	76
1.9.4 Zostera virus T (ZoVT).....	76
Σκοπός της μελέτης .....	78
Κεφάλαιο 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	79
2.1 Επισκοπήσεις - Δειγματοληψίες .....	80
2.2 Ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών της ελιάς .....	84
2.2.1 Ανίχνευση ενός νέου ιού του γένους <i>Terovirus</i> .....	84
2.3 Μοριακή ανίχνευση ιών.....	84
2.3.1 Εξαγωγή ολικού RNA.....	85
2.3.2 Έλεγχος της ποιότητας και προσδιορισμός της ποσότητας του RNA .....	89
2.3.3 Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription, RT) - Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA Synthesis) .....	90
2.3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	91
2.5 Αλληλούχιση και φυλογενετική ανάλυση.....	100
2.6 Δοκιμές μετάδοσης του ΟΙVΤ .....	101
Κεφάλαιο 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	105



3.1 Έλεγχος της ποιότητας και προσδιορισμός της ποσότητας του ολικά εξαγόμενου RNA – Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης .....	106
3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) .....	112
3.2.1 Βελτιστοποίηση συνθηκών δοκιμής (Optimization) .....	112
3.2.2 Μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση των ιών .....	120
3.3 Φυλογενετική ανάλυση.....	123
3.4 Εμβολιασμοί δέντρων ελιάς.....	133
3.5 Μηχανικές μεταδόσεις σε φυτοδείκτες και σε δέντρα ελιάς.....	136
Κεφάλαιο 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	137
Συζήτηση .....	138
Βιβλιογραφία .....	147
Παράρτημα.....	163

## Συντομογραφίες

### Συντομογραφίες ιών

<b>ArMV</b>	<i>Arabidopsis</i> mosaic virus
<b>ChVT</b>	cherry virus T
<b>CLRV</b>	cherry leafroll virus
<b>CMV</b>	cucumber mosaic virus
<b>OLRSV</b>	olive latent ringspot virus
<b>OLV-1</b>	olive latent virus 1
<b>OLV-2</b>	olive latent virus 2
<b>OLV-3</b>	olive latent virus-3
<b>OLYaV</b>	olive leaf yellowing associated virus
<b>OMMV</b>	olive mild mosaic virus
<b>OSLV</b>	olive semilatifolius virus
<b>OYVaV</b>	olive vein yellowing associated virus
<b>OYMDaV</b>	olive yellow mottling and decline associated virus
<b>PVT</b>	potato virus T
<b>PrVT</b>	<i>Prunus</i> virus T
<b>SLRSV</b>	strawberry latent ringspot virus
<b>TMV</b>	tobacco mosaic virus
<b>TNV-D</b>	tobacco necrosis virus D
<b>ZoVT</b>	<i>Zostera</i> virus T

### Άλλες συντομογραφίες

<b>Aa</b>	Αμινοξέα (amino acids)
<b>bp</b>	Ζεύγη βάσεων (base pair)
<b>cDNA</b>	Συμπληρωματικό DNA (complementary DNA)
<b>CP</b>	Καψιδιακή πρωτεΐνη (Coat Protein)
<b>CP<sub>L</sub></b>	Μεγάλη καψιδιακή πρωτεΐνη (large coat protein)

<b>CP<sub>s</sub></b>	Μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη (small coat protein)
<b>DNA dNTPs</b>	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (Deoxyribonucleic acid) 5΄τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotides triphosphate)
<b>ELISA</b>	Ανοσοενζυμική δοκιμή (Enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>Hel</b>	Ελικάση (Helicase)
<b>HSP70h</b>	Ομόλογο της πρωτεΐνης θερμικής καταπόνησης 70 (Heat Shock Protein 70 homolog)
<b>HTS</b>	Αλληλούχιση υψηλής απόδοσης (High-Throughput Sequencing Technologies)
<b>ICTV</b>	Διεθνής Επιτροπή της Συστηματικής Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses)
<b>kb</b>	Χιλιάδες βάσεων
<b>kDa</b>	Χιλιάδες Dalton
<b>MB</b>	Μοριακό βάρος
<b>ML</b>	Maximum Likelihood (Μέγιστη πιθανοφάνεια)
<b>mM</b>	Χιλιοστομοριακότητα (Millimolar)
<b>MP</b>	Πρωτεΐνη μετακίνησης (Movement protein)
<b>NGS</b>	Αλληλούχιση νέας γενιάς (Next generation sequencing)
<b>Nm</b>	Νανόμετρα (nanometer)
<b>nt</b>	Νουκλεοτίδια (nucleotide)
<b>ORF</b>	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, ΑΠΑ (Open Reading Frame)
<b>P-Pro</b>	Τύπου παπαΐνης πρωτεάση (Papain-like protease)
<b>PCR</b>	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
<b>RdRp</b>	RNA-dependent-RNA-polymerase RNA-

	εξαρτώμενη RNA πολυμεράση
<b>RNA</b>	Ριβονουκλεϊκό οξύ (Ribonucleic acid)
<b>Rpm</b>	Στροφές ανά λεπτό (Revolutions per minute)
<b>RT-PCR</b>	Αντίστροφη μεταγραφή-PCR (Reverse Transcription-PCR)
<b>sgRNA</b>	Υπογενωμικό RNA (subgenomic RNA)
<b>siRNA</b>	Μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (small interfering RNA)
<b>ssRNA</b>	Μονόκλωνο RNA (single stranded RNA)
<b>TNA</b>	Συνολικά εξαγόμενα νουκλεϊκά οξέα (total nucleic acids)
<b>tRNA</b>	Συνολικά εξαγόμενο RNA (total RNA)
<b>U</b>	Ενεργότητα ενζύμου (Enzyme unit)
<b>UTR</b>	Μη μεταφραζόμενη περιοχή (Untranslated region)
<b>VPg</b>	ική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το γονιδίωμα (viral protein genome)
<b>μM</b>	Μικρομοριακότητα (Micromolar)
<b>ΠΠΥ</b>	Πιστοποιημένο πολλαπλασιαστικό υλικό

## Ευρετήριο Εικόνων

<b>Εικόνα 1.1:</b> Κατανομή, μεταξύ χωρών, των 46 εκατομμυρίων στρεμμάτων ελιάς που καλλιεγούνται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Άλλα: Γαλλία, Κροατία, Κύπρος, Σλοβενία (τροποποιημένη από Eurostat, 2017 <a href="https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20190301-1">https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20190301-1</a> )).0.....	15
<b>Εικόνα 1.2:</b> Γονιδιακή οργάνωση ιών του γένους <i>Nepovirus</i> . Το γενωμικό RNA εγκαψιδιώνεται σε δύο σωματίδια, το Β και το Μ. Κάθε RNA είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3 και στο 5' άκρο, ομοιοπολικά συνδεδεμένο με μία πρωτεΐνη VPg (CP: καψιδιακή πρωτεΐνη, P1A: P1A- πρωτεΐνη, Hel: ελικάση, VPg: Ιική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το γονιδίωμα, Pro: πρωτεάση, POL: πολυμεράση, P2A: P2A- πρωτεΐνη, MP: πρωτεΐνη μετακίνησης) (Τροποποιημένη από <a href="https://viralzone.expasy.org/300">https://viralzone.expasy.org/300</a> ).	29
<b>Εικόνα 1.3:</b> Συμπτώματα που προκαλεί ο cherry leafroll virus (CLRV) σε φύλλα και καρπούς ελιάς της ποικιλίας Rosinjola. Τα φύλλα εμφανίζουν παραμόρφωση και χλώρωση και οι καρποί καθυστερημένη ωρίμανση (Godena et al., 2016).	31
<b>Εικόνα 1.4:</b> Τοπικές νεκρωτικές κηλίδες σε <i>C. quinoa</i> (αριστερά) και τοπικές ερυθρές νεκρωτικές κηλίδες σε <i>G. globosa</i> (δεξιά) που εμφανίστηκαν έξι ημέρες μετά την μηχανική μετάδοση με τον olive latent ringspot virus (OLRV) (Savino et al., 1983).	32
<b>Εικόνα 1.5:</b> Γονιδιακή οργάνωση του Strawberry latent ringspot virus (SLRSV). Τα RNA 1 και RNA 2 είναι πολυαδενυλιωμένα στο 3' άκρο (Pro-C: συμπαράγοντας της πρωτεάσης, Hel: ελικάση, Vrg: Ιική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το γονιδίωμα, Pro: πρωτεάση, RdRp: RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση MP: πρωτεΐνη μετακίνησης, CPL: μεγάλη καψιδιακή πρωτεΐνη, CPS: μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη) (Tzanetakis et al., 2006).	34
<b>Εικόνα 1.6:</b> Κλαδιά, φύλλα, άνθη και καρποί της ποικιλίας Frantoio που παρουσιάζουν συμπτωματολογία του strawberry latent ringspot virus (SLRSV) (δεξιά), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα υγιή (αριστερά) (Caglayan et al., 2011).	35
<b>Εικόνα 1.7:</b> <b>A.</b> Ισσωμάτια του cucumber mosaic virus (CMV), <b>B.</b> Γονιδιακή οργάνωση του CMV όπου παρουσιάζονται τα RNA 1, RNA 2, RNA 3 μεγέθους 3.3 kb, 3kb και 2.2kb αντίστοιχα και τα δύο υπογενωμικά (sg) RNAs (RNA 4A και RNA 4) (1a και 2a: πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή, 2b: καταστολέας της σίγησης, 3a: πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη διακυτταρική μετακίνηση, CP: καψιδιακή πρωτεΐνη) (Scholthof et al., 2011).	37
<b>Εικόνα 1.8:</b> Γονιδιακή οργάνωση του olive latent virus-1 (p23 και p82 (RdRp): πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή του ιού, p8 και p6: πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη διακυτταρική μετακίνηση, p30 (CP): καψιδιακή πρωτεΐνη (Félix et al., 2007)	39
<b>Εικόνα 1.9:</b> Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής των ισωματίων του olive mild mosaic virus (OMMV) (αριστερά) και του Tobacco necrosis virus D (TNV-D) (δεξιά) όπου φαίνονται οι μεταλλάξεις μεταξύ των δύο ισωματίων, οι οποίες και παρουσιάζονται με σφαιρίδια. (Varanda et al., 2014).	41
<b>Εικόνα 1.10:</b> Γονιδιακή οργάνωση του tobacco necrosis virus D (TNV-D) (p22: πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αναπαραγωγή, p82–RdRp: πολυμεράση του ιού, p71, p7a και p7b: πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος στη διακυτταρική μετακίνηση του ιού, p29 – CP: καψιδιακή πρωτεΐνη) (Félix et al., 2012).	43
<b>Εικόνα 1.11:</b> Ισσωμάτια του olive latent virus 2 (OLV-2) σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η μπάρα αντιστοιχεί σε 100nm (Crisostomo Vovlas et al., 2003).	44

<b>Εικόνα 1.12:</b> Γονιδιακή οργάνωση του olive latent virus-3 (OLV-3) (MTR: μεθυλοτρανσφεράση, PRO: πρωτεάση, HEL: ελικάση, RdRp: πολυμεράση, MP: πρωτεΐνη μετακίνησης, CP: καψιδιακή πρωτεΐνη, p16: πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας) (Alabdullah et al., 2010).....	46
<b>Εικόνα 1.13:</b> Συμπτώματα χλώρωσης και χρωματική αλλοίωση που εκτείνεται κατά μήκος των φύλλων, σε δέντρο της ποικιλίας Carolea, στο οποίο ανιχνεύτηκε ο olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV) (Albanese et al., 2012). .....	48
<b>Εικόνα 1.14:</b> Το δέντρο ποικιλίας Leccino στο οποίο έγινε η πρώτη αναφορά στον tobacco mosaic virus (TMV) (A) και συμπτώματα περινεύριας χρώσης των νεύρων των φύλλων (B) (Triolo et al., 1996). .....	50
<b>Εικόνα 1.15:</b> Συμπτώματα χλώρωσης, σε φύλλα του δέντρου ελιάς, στο οποίο έγινε η πρώτη αναφορά του olive vein yellowing associated virus (OVYaV) (Caglayan et al., 2011).....	51
<b>Εικόνα 1.16:</b> Α. Οίδημα καρπών (Bumpy fruits). Παραμορφωμένοι καρποί (κάτω σειρές) σε σχέση με τον φυσιολογικό καρπό στην κορυφή, Β. Εξογκώματα στο ενδοκάρπιο (κάτω) σε σχέση με το φυσιολογικό στην κορυφή (Henriques et al., 1992).....	55
<b>Εικόνα 1.17:</b> Συμπτώματα σε δέντρα ελιάς που προκαλούνται από προσβολή από φυτοπλάσματα. Κοντά μεσογονάτια διαστήματα, σκούπα της μάγισσας και μικροφυλλία (αριστερά), υπερτροφικές ταξιανθίες (δεξιά) (Albanese et al., 2012). .....	59
<b>Εικόνα 1.18:</b> Στάδια παραγωγής πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φυτοπροστασίας Προσαρμογή από OEPP, 2009. ....	66
<b>Εικόνα 1.19:</b> Γονιδιακή οργάνωση του γένους Terovirus. Αποτελείται από τρία ORF. MT: methyltransferase- μεθυλοτρανσφεράση, Pro: πρωτεάση, HEL: ελικάση, RdRp: πολυμεράση, MP: πρωτεΐνη μετακίνησης, CP: καψιδιακή πρωτεΐνη. Προσαρμογή από <a href="https://viralzone.expasy.org/">https://viralzone.expasy.org/</a> .....	74
<b>Εικόνα 1.20:</b> Γονιδιακή οργάνωση του Prunus virus T. Αποτελείται από τρία ORFs που κωδικοποιούν την ρεπλικάση, την πρωτεΐνη μετακίνησης και την καψιδιακή πρωτεΐνη (Marais et al., 2015). .....	76
<b>Εικόνα 1.21:</b> Γονιδιακή οργάνωση του Zostera virus T, όπου MT: methyltransferase- μεθυλοτρανσφεράση, HEL: ελικάση, RdRp: πολυμεράση, MP: πρωτεΐνη μετακίνησης, CP: καψιδιακή πρωτεΐνη (Goh et al., 2019). .....	77
<b>Εικόνα 2.1:</b> Νομοί της χώρας όπου πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες σε ελαιώνες για τη διερεύνηση της παρουσίας ιών ελιάς και ο αριθμός δειγμάτων που συλλέχθηκε από κάθε νομό (βλέπε υπόμνημα).....	81
<b>Εικόνα 2. 2:</b> Διαδικασία εκχύλισης ολικού RNA με τη χρήση του RNeasy Plant Mini kit (προσαρμογή από Qiagen <a href="https://www.qiagen.com/">https://www.qiagen.com/</a> ) .....	88
<b>Εικόνα 2.3:</b> Οι τρεις ριβοσωμικές μονάδες (28 S, 18 S και 5,8 S) του RNA (Wang et al., 2012) .....	90
<b>Εικόνα 2.4:</b> Η μέθοδος του σχιστού εγκεντρισμού («εμβολιασμός με καλέμι») που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές μετάδοσης με εμβολιασμό του νέου Τερο-ιού της ελιάς. Α) Καρατόμηση του υποκειμένου, Β) Προετοιμασία του εμβολίου σε σχήμα σφήνας, Γ) Ένωση του υποκειμένου με το εμβόλιο, Δ) Δέσιμο του σημείου ένωσης λάστιχο και μεμβράνη τύπου parafilm. ....	103

<b>Εικόνα 3.1:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του ολικού εξαγόμενου RNA με χρήση του αντιδραστηρίου TRI - REAGENT (Sigma – Aldrich), αντιπροσωπευτικών δειγμάτων και τύπων ιστών (α: φύλλο, γ: φλοιός). .....	107
<b>Εικόνα 3.2:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του ολικού εξαγόμενου RNA με χρήση του πρωτόκολλου CTAB (αριστερά) και με το RNeasy Plant Mini kit (δεξιά) από διάφορα δείγματα και ιστούς (α: φύλλο, β: καρπός, γ: φλοιός, ζ: καρπίδιο) .....	109
<b>Εικόνα 3.3:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του ολικού εξαγόμενου RNA με χρήση του RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). Είναι εμφανείς οι κύριες ριβοσωμικές ζώνες 28S και 18S. Οι αριθμοί είναι οι κωδικοί κάθε δείγματος και τα γράμματα αναφέρονται στον τύπο του ιστού που έχει χρησιμοποιηθεί όπου α: φύλλο, β: καρπός, γ: φλοιός .....	110
<b>Εικόνα 3.4:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του ολικού εξαγόμενου RNA. Στα δείγματα 126α1, 125α1, 124α1, 5α1, 122α1, 123α1 η εκχύλιση του ολικού RNA έχει γίνει με το RNeasy PowerPlant Kit και στα δείγματα 123α4, 126α2, 124α4, 125α2, 5α2, 122α2 με το RNeasy Plant Mini kit. Οι αριθμοί αναφέρονται στους κωδικούς των δειγμάτων και ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του RNA ήταν φύλλο.....	111
<b>Εικόνα 3.5:</b> Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [MgCl <sub>2</sub> (mM) και Tm (°C)] για την ανίχνευση του OLYaV. Η ο υγιής δείκτης, P1 και P2 τα θετικά δείγματα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH <sub>2</sub> O. ....	113
<b>Εικόνα 3.6:</b> Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [MgCl <sub>2</sub> (mM) και Tm (°C)] για την ανίχνευση του CMV. Όπου Η ο υγιής δείκτης P το θετικό δείγμα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH <sub>2</sub> O .....	114
<b>Εικόνα 3.7:</b> Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [MgCl <sub>2</sub> (mM) και Tm (°C)] για την ανίχνευση του SLRSV. Όπου Η ο υγιής δείκτης P1 και P2 τα θετικά δείγματα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH <sub>2</sub> O .....	115
<b>Εικόνα 3.8:</b> Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [MgCl <sub>2</sub> (mM) και Tm (°C)] για την ανίχνευση του TMV. Όπου Η ο υγιείς δείκτης P1 και P2 τα θετικά δείγματα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH <sub>2</sub> O. ....	116
<b>Εικόνα 3.9:</b> Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [MgCl <sub>2</sub> (mM) και Tm (°C)] για την ανίχνευση του CLRV. Όπου Η ο υγιής δείκτης P1 και P2 τα θετικά δείγματα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH <sub>2</sub> O. ....	117
<b>Εικόνα 3.10:</b> Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [MgCl <sub>2</sub> (mM) και Tm (°C)] για την ανίχνευση του νέου Τερο-ιού. Όπου Η ο υγιείς δείκτης, P1 και P2 τα θετικά δείγματα, noRT, noRT1, noRT2 δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH <sub>2</sub> O. Αναφέρεται η θερμοκρασία υβριδοποίησης (°C) και η συγκέντρωση του MgCl <sub>2</sub> που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε ομάδα δειγμάτων .....	118
<b>Εικόνα 3. 11:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του OLYaV αντιπροσωπευτικών δειγμάτων ελιάς (1383,1384:δείγματα, P: θετικός μάρτυρας, noRT: δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της	

αντίστροφης μεταγραφής, noDNA: δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O). Το παραγόμενο προϊόν φαίνεται στα 383bp. .... 121

**Εικόνα 3.12:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του CMV αντιπροσωπευτικών δειγμάτων ελιάς (P: θετικός μάρτυρας, H: υγιής μάρτυρας, 231-236:δείγματα, noRT: δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, noDNA: δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O). Το παραγόμενο προϊόν φαίνεται στα 513bp. .... 121

**Εικόνα 3.13:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του CLRV αντιπροσωπευτικών δειγμάτων ελιάς (P: θετικός μάρτυρας, 1276-1281: δείγματα). Το παραγόμενο προϊόν φαίνεται στα 416bp. .... 122

**Εικόνα 3.14:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης προϊόντων PCR για την ανίχνευση του νέου Τερο-ιού αντιπροσωπευτικών δειγμάτων ελιάς (P: θετικός μάρτυρας, H: υγιής, 730-745 τα δείγματα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O). Το παραγόμενο προϊόν φαίνεται στα 400bp. .... 122

**Εικόνα 3.15:** Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ολόκληρη την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου HSP70 απομονώσεων του OLYaV που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (Genebank). Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 1000. Η μπάρα κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνει αντικαταστάσεις/θέση. .... 125

**Εικόνα 3.16:** Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ολόκληρη την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου RdRp απομονώσεων του CMV που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (Genebank). Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 1000. Η μπάρα κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνει αντικαταστάσεις/θέση. Στο δένδρο επισημαίνονται οι κύριες ομάδες (subgroups IA, IB, II) του CMV, καθώς και απομονώσεις που αποκλίνουν από αυτές (outgroups)..... 127

**Εικόνα 3.17:** Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας την νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής 3'UTR απομονώσεων που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (Genebank) για τον CLRV. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 1000. Η μπάρα κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνει αντικαταστάσεις/θέση. Επισημαίνονται οι φυλογενετικές ομάδες κατά τους Rebenstorf et al., 2016. .... 129

**Εικόνα 3.18:** Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας MP\_CP απομονώσεων Τερονίρις που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (Genebank) καθώς και των ελληνικών του ΟΙVΤ που αποκτήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 1000. Η μπάρα κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνει αντικαταστάσεις/θέση. .... 131

**Εικόνα 3.19:** Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες των απομονώσεων του ΟΙVΤ που



αποκτήθηκαν. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 1000. Η μπάρα κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνει αντικαταστάσεις/θέση.....	132
<b>Εικόνα 3. 20:</b> Επιτυχημένοι εμβολιασμοί εμβολίων μολυσμένων με τον ΟΙΝΤ σε δέντρο ποικιλίας Arbequina. Δεξιά φαίνεται καθαρά το σημείο ένωσης του εμβολίου με το υποκείμενο.....	134
<b>Εικόνα 3.21:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης προϊόντων PCR για την ανίχνευση του ΟΙΝΤ σε εμβολιασμένα δέντρα ελιάς (H: υγιής μάρτυρας, +: θετικός μάρτυρας, 677-683: δείγματα).....	134

## Ευρετήριο Πινάκων

<b>Πίνακας 1.1:</b> Παραγωγή ελαιολάδου στην Ευρώπη και στις μεγαλύτερες ελαιοπαραγωγικές χώρες. Παρουσιάζεται η ετήσια παραγωγή σε χιλιάδες τόνους από το 2014 έως το 2019, ο μέσος όρος αυτών των ετών, καθώς και ο εκτιμώμενος μέσος όρος παραγωγής για τη χρονιά 2019/2020 (Προσαρμογή από IOC 2019: <a href="https://www.internationaloliveoil.org/">https://www.internationaloliveoil.org/</a> )... 18	18
<b>Πίνακας 1.2:</b> Παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς στην Ευρώπη και στις μεγαλύτερες ελαιοπαραγωγικές χώρες. Παρουσιάζεται η ετήσια παραγωγή σε χιλιάδες τόνους από το 2014 έως το 2019, ο μέσος όρος αυτών των ετών, καθώς και ο εκτιμώμενος μέσος όρος παραγωγής για τη χρονιά 2019/2020 (Προσαρμογή από IOC 2019: <a href="https://www.internationaloliveoil.org/">https://www.internationaloliveoil.org/</a> )..... 19	19
<b>Πίνακας 1.3:</b> Κατάταξη ιών της ελιάς σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV))..... 21	21
<b>Πίνακας 1.4:</b> Συχνότητα εμφάνισης ιών στην ελιά, στις διάφορες χώρες που έχει αναφερθεί η παρουσία τους έως σήμερα..... 23	23
<b>Πίνακας 1.5:</b> Τρόποι μετάδοσης των ιών της ελιάς (Martelli, 2013)..... 60	60
<b>Πίνακας 1.6:</b> Υγειονομικές απαιτήσεις όπως ορίζονται από το εθελοντικό πρόγραμμα πιστοποίησης της Ιταλίας (DM 20/11/2006) (Zellama et al., 2019) ..... 65	65
<b>Πίνακας 1.7:</b> Πειραματικοί ξενιστές, τοπικά και διασυστηματικά συμπτώματα που εμφανίζονται με τη μόλυνση με κάθε ιό μετά από μηχανική μετάδοση στο εργαστήριο .... 68	68
<b>Πίνακας 1.8:</b> Τα σημαντικότερα είδη για διατήρηση και διάγνωση του Potato virus T και τα συμπτώματα που εμφανίζονται. Προσαρμοσμένος από (Harrison, 1977). ..... 75	75
<b>Πίνακας 2.1:</b> Αναλυτικά στοιχεία δειγματοληψιών (νομοί, αριθμός αγρών και δειγμάτων ανά νομό) που πραγματοποιήθηκαν την περίοδο 2017-2020, για τη διερεύνηση της παρουσίας ιών της ελιάς στην παρούσα μελέτη. .... 82	82
<b>Πίνακας 2.2:</b> Ελιές μεγάλης ηλικίας («αρχαίες ελιές» ή συμβολικής αξίας) που συλλέχθηκαν εκτός συστηματικών ελαιώνων, το 2017. .... 83	83
<b>Πίνακας 2.3:</b> Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μοριακή ανίχνευση ιών της ελιάς. Δίνεται η αλληλουχία των εκκινητών, η περιοχή ενίσχυσης, το μέγεθος του	

αναμενόμενου προϊόντος, η θερμοκρασία υβριδοποίησης ( $T_a$ ) και η σχετική βιβλιογραφική πηγή κάθε ζεύγους εκκινητών. ....	92
<b>Πίνακας 2.4:</b> Τελικές συγκεντρώσεις $MgCl_2$ (mM) που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές PCR για την ανίχνευση ιών της ελιάς και για τους OLYaV, CMV, SLRSV, TMV, CLRV και OIVT όπως προέκυψαν ύστερα από δοκιμές βελτιστοποίησης .....	95
<b>Πίνακας 2.5:</b> Θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_m$ ) για κάθε ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές PCR για την ανίχνευση ιών της ελιάς και για τους OLYaV, CMV, SLRSV, TMV, CLRV και OIVT όπως προέκυψαν από δοκιμές βελτιστοποίησης.....	96
<b>Πίνακας 2.6:</b> Ποικιλίες και αριθμός δέντρων κάθε ποικιλίας που εμβολιάστηκαν με μολυσμένο με τον OIVT υλικό.....	102
<b>Πίνακας 3.1:</b> Συγκέντρωση (ng/μl), λόγος A260/280 και λόγος A260/230 ολικού RNA, έπειτα από εξαγωγή με χρήση του αντιδραστηρίου TRI – REAGENT (Sigma – Aldrich), από διαφορετικά δείγματα και ιστούς (α: φύλλο, γ:φλοιός). ....	106
<b>Πίνακας 3.2:</b> Συγκέντρωση (ng/μl), λόγος A260/280 και λόγος A260/230 ολικού RNA, έπειτα από εξαγωγή ολικού RNA, με το πρωτόκολλο CTAB (A) και RNeasy Plant Mini kit (B), από διαφορετικά δείγματα και ιστούς (α: φύλλο, γ:φλοιός, ζ: καρπίδιο). ....	108
<b>Πίνακας 3.3:</b> Συγκέντρωση (ng/μl), λόγος A260/280 και λόγος A260/230 ολικού RNA, έπειτα από εξαγωγή ολικού RNA, με το πρωτόκολλο RNeasy Plant Mini kit της Qiagen (α: φύλλο, β: καρπός).....	109
<b>Πίνακας 3.4:</b> Συγκέντρωση (ng/μl), λόγος A260/280 και λόγος A260/230 ολικού RNA, έπειτα από εξαγωγή ολικού RNA, με το πρωτόκολλο RNeasy Plant Mini kit (A) της Qiagen και RNeasy PowerPlant Kit (B) από διαφορετικά δείγματα (α: φύλλο).....	111
<b>Πίνακας 3.5:</b> Τελική συγκέντρωση $MgCl_2$ (mM) και θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_m$ °C) που επιλέχθηκαν από τις δοκιμές βελτιστοποίησης, για την καλύτερη ενίσχυση του στόχου για κάθε ιό και ζεύγος εκκινητών. ....	119
<b>Πίνακας 3.6:</b> Συγκέντρωση $MgCl_2$ (mM) και θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_m$ °C) που χρησιμοποιήθηκαν για τα ζεύγη εκκινητών για τα οποία δεν έγιναν δοκιμές βελτιστοποίησης. ....	120
<b>Πίνακας 3.7:</b> Αλληλουχίες και αριθμοί καταχώρησης στη GenBank των απομονώσεων των ιών της ελιάς που αποκτήθηκαν από την παρούσα μελέτη.....	123
<b>Πίνακας 3.8:</b> Επιτυχία εμβολιασμών του OIVT ανά ποικιλία ελιάς.....	133
<b>Πίνακας 3.9:</b> Έλεγχος ορισμένων επιτυχημένων εμβολιασμών σε φυτά διαφόρων ποικιλιών, για την παρουσία του OIVT. Οι αριθμοί αφορούν στην κωδικοποίηση των εμβολιασμένων δέντρων. ....	135

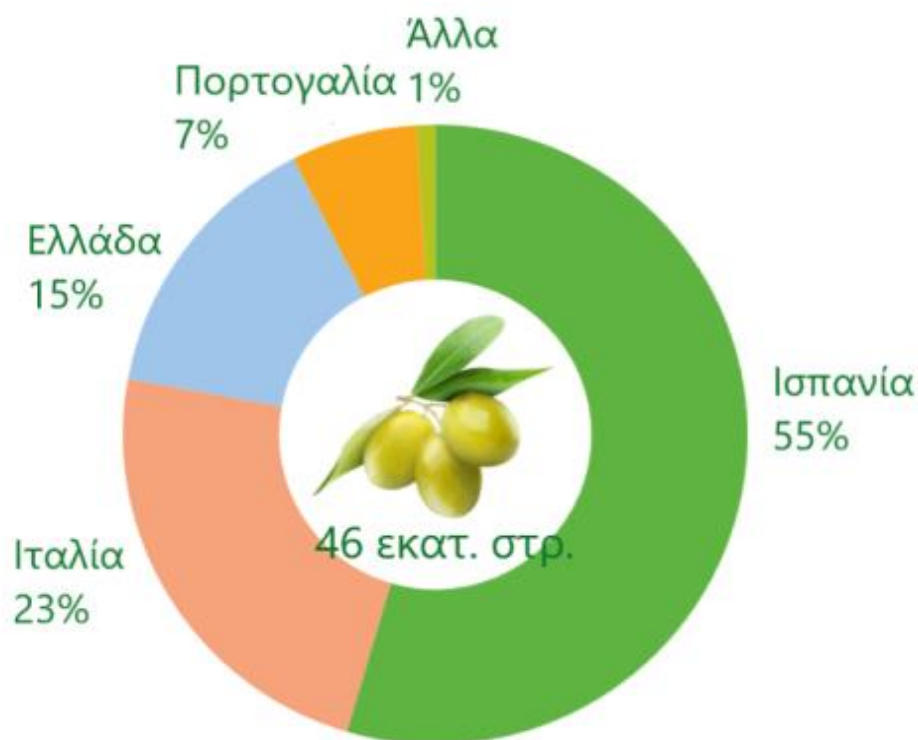
# Κεφάλαιο 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Η Ελιά

Η ελιά (*Olea* spp, Οικογένεια Oleaceae) είναι ένα από τα αρχαιότερα καλλιεργούμενα είδη στη μεσογειακή λεκάνη και το οποίο πλέον χαρακτηρίζει τη τοπική χλωρίδα. Υπάρχουν διάφορες θεωρίες για την έναρξη της καλλιέργειάς της. Με βάση την επικρατούσα, αυτή ξεκίνησε από τη Μέση Ανατολή, από περιοχές όπως η Συρία, η κεντρική Μεσοποταμία και το Ιράκ και συνεχίστηκε προς τη Δύση, όπου στη συνέχεια επεκτάθηκε γύρω από τη μεσογειακή λεκάνη (Breton et al., 2012; Κωστελένος, 2015), κυρίως κατά μήκος των αφρικάνικων και ευρωπαϊκών ακτών, αλλά και κοντά στις μεγάλες αλπικές λίμνες (Cirigliani et al., 2002). Στην Ελλάδα πρώτα καλλιεργήθηκε στα νησιά του Αιγαίου και την Κρήτη (Κωστελένος, 2015). Τα τελευταία 500 χρόνια η καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) εγκαταστάθηκε στον υπόλοιπο κόσμο, σχεδόν σε κάθε περιοχή με κατάλληλο κλίμα για την καλλιέργεια και την επιβίωσή της (Breton et al., 2012).

Σήμερα η ελιά είναι μια καλλιέργεια ιδιαίτερης σημασίας για την Ελλάδα, χάρη στο ρόλο που παίζει στην ελληνική/μεσογειακή διατροφή, αλλά και γιατί το ίδιο το δέντρο της έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ιστορία, τη μυθολογία, τον πολιτισμό και γενικότερα την κουλτούρα της. Η καλλιέργεια της ελιάς είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη χώρα μας από την αρχαιότητα και είναι σύμβολο της σοφίας, της ειρήνης, του πολιτισμού, της νίκης και της γονιμότητας. Όσον αφορά στη διατροφή, η ιδιαίτερη σημασία της έγκειται στις ευεργετικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στην κατανάλωση του ελαιόλαδου και στη μεγάλη οικονομική του αξία. Η ελιά, είναι ο έκτος σημαντικότερος ελαιοπαραγωγικός καρπός που καλλιεργείται παγκοσμίως (Breton et al., 2012). Περισσότερα από 750 εκ. δένδρα ελιάς καλλιεργούνται παγκοσμίως, με το μεγαλύτερο ποσοστό (>95 %) να βρίσκεται στην περιοχή της Μεσογείου (Breton et al., 2012). Οι κύριες ελαιοπαραγωγικές χώρες στον κόσμο είναι η Ισπανία, η Ελλάδα, η Ιταλία, η Τυνησία, η Τουρκία και το Μαρόκο (Κωστελένος, 2015). Σύμφωνα με τα στοιχεία της Eurostat το 2017, στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η καλλιέργεια της ελιάς καλύπτει συνολικά 46 εκατομμύρια στρέμματα, με το μεγαλύτερο ποσοστό να ανήκει στην Ισπανία (55%), την Ιταλία

(23%) και μετά ακολουθεί η Ελλάδα (15%) και η Πορτογαλία (7%), ενώ μικρότερες εκτάσεις κατέχουν η Γαλλία, η Κροατία, η Κύπρος και η Σλοβενία (Εικ 1). Οι κυριότερες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται στα εντατικά συστήματα καλλιέργειας είναι η Arbequina και η Arbosana στην Ισπανία, η Picholine στη Γαλλία και η Κορωνέικη στην Ελλάδα (Zellama et al., 2019).



**Εικόνα 1.1:** Κατανομή, μεταξύ χωρών, των 46 εκατομμυρίων στρεμμάτων ελιάς που καλλιεγούνται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Άλλα: Γαλλία, Κροατία, Κύπρος, Σλοβενία (τροποποιημένη από Eurostat, 2017 <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20190301-1>).0

### 1.1.1 Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Η ελιά (*Olea europaea* L.) είναι διπλοειδές είδος ( $2n = 2x = 46$ ) (Chiappetta et al., 2014) και ανήκει στην οικογένεια Oleaceae, η οποία αποτελείται από 25 γένη και 600 είδη (Rugini & Fedeli, 1990). Σε αυτή την οικογένεια ανήκουν και άλλα σημαντικά γένη όπως τα: *Fraxinus* (ash- Φράξινος), *Jasminum* (jasmine - Γιασεμί), *Ligustrum* (privet - Λιγούστρο), *Phillyrea* (Φιλυρέα) και *Syringa* (lilac-Πασχαλιά). Ωστόσο, από αυτά μόνο η ελιά παράγει βρώσιμο καρπό και καλλιεργείται για αυτόν (Rapoport et al., 2016), ενώ τα υπόλοιπα είδη καλλιεργούνται κυρίως ως καλλωπιστικά. Υπάρχουν πάνω από 2000 ποικιλίες ελιάς, από τις οποίες κάποιες δεν έχουν ακόμα ταξινομηθεί (Ilarioni & Proietti, 2014).

Οι βλαστοί αντιπροσωπεύουν την φυτική παραγωγή της ελιάς, οι οποίοι δεν είναι πλήρως ξυλοποιημένοι και χωρίζονται σε λαίμαργους, ξυλοφόρους, βλαστοφόρους και μικτούς (Toscano et al., 2014). Τα φύλλα της έχουν μικρό μίσχο, είναι απλά, αντίθετα με σχήμα μακρόστενο ή λογχοειδές και δερματώδη και το χρώμα μπορεί να ποικίλει από ανοιχτό ως σκούρο πράσινο (Κωστελένος, 2011). Τα άνθη σχηματίζονται σε ταξιανθία βότρυ και είναι χρώματος λευκού έως κίτρινου. Αποτελούνται από συμπέταλη στεφάνη με τέσσερα πέταλα και κυποελλοειδή κάλυκα με τέσσερα πέταλα. Έχουν δύο στήμονες και επιφυή ωοθήκη που αποτελείται από δύο καρπόφυλλα με βραχύστηλο ύπερο και δίλοβο στίγμα (Κωστελένος, 2011). Τα άνθη διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα κανονικά ή τέλεια που έχουν δύο στήμονες και κανονικό ύπερο, και τα αρσενικά ή ατελή που έχουν δύο στήμονες, αλλά υποπλαστικό ύπερο. Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη και το σχήμα του, ανάλογα με την ποικιλία, μπορεί να είναι πιο σφαιρικό ή οβάλ και επίμηκες (Κωστελένος, 2011). Αποτελείται από τρία τμήματα, το ενδοκάρπιο, το μεσοκάρπιο και το εξωκάρπιο. Το ενδοκάρπιο είναι ξυλώδες και αποτελεί το 13-24% του συνολικού καρπού και εσωκλείει τον σπόρο, ο οποίος καταλαμβάνει το 2-4% του καρπού. Το εδώδιμο μέρος του καρπού είναι το μεσοκάρπιο, το οποίο αποτελεί το 70-80% του καρπού και το εξωκάρπιο το 1,5-3,5%. Στο εξωκάρπιο βρίσκονται στόματα (Chiappetta et al., 2014). Το χρώμα του καρπού είναι αρχικά πράσινο και κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης διαμορφώνεται από ιώδες ως μαύρο, ανάλογα με

την ποικιλία (Κωστελένος, 2011). Σε γενικές γραμμές, ο καρπός αποτελείται από νερό (40-70%) και λάδι (6-25%) (Chiappetta et al., 2014).

### **1.1.2 Το Ελαιόλαδο**

Το ελαιόλαδο αποτελείται κατά κύριο λόγο από τριγλυκερόλες (triacylglycerols) σε ποσοστό περίπου 99%. Τα υπόλοιπα στοιχεία που το απαρτίζουν είναι ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονογλυκερόλες και διγλυκερόλες (mono- and diacylglycerols) και άλλα λιπίδια, όπως υδατάνθρακες, στερόλες, αλιφατικές αλκοόλες και τοκοφερόλες. Επίσης, υπάρχουν χρωστικές που δίνουν το χαρακτηριστικό χρώμα του παρθένου ελαιολάδου, με κυριότερες τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Επιπλέον, υπάρχουν φαινολικές και πτητικές ενώσεις, οι οποίες, παρόλο που βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό, επηρεάζουν την ποιότητα του ελαιολάδου και συνεισφέρουν στον ιδιαίτερο χαρακτήρα κάθε τύπου ελαιολάδου (Boskou et al., 2006). Το σύνολο των φαινολικών ενώσεων είναι αυτό που προσδίδει στο ελαιόλαδο τις αντικαρκινικές, αντι-αθηρογόνες και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Chiappetta et al., 2014).

### **1.1.3 Η ελιά στην Ελλάδα**

Η καλλιέργεια της ελιάς σήμερα εκτείνεται σε ολόκληρη τη χώρα, ακόμα και σε περιοχές που δεν θεωρούνται παραδοσιακά ελαιοπαραγωγικές. Στην Ελλάδα υπάρχουν πάνω από 100 ποικιλίες ελιάς, εκ των οποίων όμως είναι 52 οι καλλιεργήσιμες (Κωστελένος, 2011). Οι σημαντικότερες ποικιλίες που καλλιεργούνται είναι η Κορωνείκη, η Καλαμάτας και η Μαστοειδής. Στο σύνολό τους αυτές οι τρεις ποικιλίες αποτελούν το 90% της καλλιέργειας στην χώρα (Ilarioni & Proietti, 2014) (Πίν. 1.1, 1.2).

**Πίνακας 1.1:** Παραγωγή ελαιολάδου στην Ευρώπη και στις μεγαλύτερες ελαιοπαραγωγικές χώρες. Παρουσιάζεται η ετήσια παραγωγή σε χιλιάδες τόνους από το 2014 έως το 2019, ο μέσος όρος αυτών των ετών, καθώς και ο εκτιμώμενος μέσος όρος παραγωγής για τη χρονιά 2019/2020 (Προσαρμογή από IOC 2019: <https://www.internationaloliveoil.org/>).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ (Χ1000tn)	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019	ΜΟ	ΜΟ 2019/2020
<b>ΙΣΠΑΝΙΑ</b>	842,2	1.403,3	1.209,6	1.262,2	1.789,9	1.317,6	1.230,0
<b>ΙΤΑΛΙΑ</b>	222,0	474,6	182,3	428,9	173,6	296,3	340,0
<b>ΕΛΛΑΔΑ</b>	300,0	320,0	195,0	346,0	185,0	269,2	300,0
<b>ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ</b>	61,0	109,1	69,4	134,8	100,3	94,9	125,4
<b>ΤΥΝΗΣΙΑ</b>	340,0	140,0	100,0	325,0	140,0	209,0	300,0
<b>ΤΟΥΡΚΙΑ</b>	160,0	150,0	178,0	263,0	193,5	188,9	225,0
<b>ΜΑΡΟΚΟ</b>	120,0	130,0	110,0	140,0	200,0	140,0	145,0
<b>ΑΛΓΕΡΙΑ</b>	69,5	82,0	63,0	82,5	97,0	78,8	82,5
<b>ΑΙΓΥΠΤΟΣ</b>	17,0	16,5	30,0	39,5	7,0	22,0	27,5
<b>ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ</b>	30,0	24,0	24,0	45,0	27,5	30,1	26,0
<b>ΙΟΥΡΔΑΝΙΑ</b>	23,0	29,5	20,0	21,0	21,0	22,9	25,5
<b>ΠΑΛΑΙΣΤΙΝΗ</b>	24,5	21,0	20,0	19,5	15,0	20,0	23,0



**Πίνακας 1.2:** Παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς στην Ευρώπη και στις μεγαλύτερες ελαιοπαραγωγικές χώρες. Παρουσιάζεται η ετήσια παραγωγή σε χιλιάδες τόνους από το 2014 έως το 2019, ο μέσος όρος αυτών των ετών, καθώς και ο εκτιμώμενος μέσος όρος παραγωγής για τη χρονιά 2019/2020 (Προσαρμογή από IOC 2019: <https://www.internationaloliveoil.org/>).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ (Χ1000tn)	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019	ΜΟ	ΜΟ 2019/2020
<b>ΙΣΠΑΝΙΑ</b>	555,6	601,0	596,1	561,7	587,8	580,4	500,0
<b>ΕΛΛΑΔΑ</b>	249,0	194,0	180,0	261,0	167,0	210,2	207,0
<b>ΙΤΑΛΙΑ</b>	42,0	66,0	39,9	60,0	40,0	49,6	74,1
<b>ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ</b>	17,4	20,8	21,7	25,2	22,5	21,5	22,5
<b>ΑΙΓΥΠΤΟΣ</b>	450,5	335,5	550,0	750,0	400,0	497,2	690,0
<b>ΤΟΥΡΚΙΑ</b>	390,0	397,0	400,5	450,0	423,5	412,2	414,0
<b>ΑΛΓΕΡΙΑ</b>	233,5	221,0	293,0	303,5	299,5	270,1	300,0
<b>ΜΑΡΟΚΟ</b>	100,0	120,0	120,0	130,0	130,0	120,0	130,0
<b>ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ</b>	120,0	73,0	96,0	106,0	80,0	95,0	100,0
<b>ΙΡΑΝ</b>	68,0	60,5	75,5	60,0	60,0	64,8	57,0
<b>ΑΛΒΑΝΙΑ</b>	30,0	30,0	38,0	30,0	30,0	31,6	30,0
<b>ΙΟΥΔΑΝΙΑ</b>	34,5	35,5	19,0	29,0	25,0	28,6	30,0
<b>ΤΥΝΗΣΙΑ</b>	26,0	26,0	22,0	28,0	20,0	24,4	28,0
<b>ΛΙΒΑΝΟ</b>	17,0	19,0	22,0	20,5	20,0	19,7	20,0

## 1.2 Οι ιοί της ελιάς

Έως σήμερα, 15 ιοί έχουν βρεθεί να προσβάλλουν την ελιά, παγκοσμίως. Τρεις που ανήκουν στο γένος *Nepovirus*, οι *Arabis* mosaic Virus- Ιός του μωσαϊκού της αραβίδας (ArMV), cherry leafroll virus – Ιός του καρουλιάσματος των φύλλων της κερασιάς (CLRV) και olive latent ringspot virus – Ιός της λανθάνουσας δακτυλιωτής κηλίδωσης της ελιάς (OLRSV), ένας στο γένος *Cucumovirus*, ο cucumber mosaic virus- Ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), ένας στο *Tobamovirus*, ο tobacco mosaic virus – Ιός του μωσαϊκού του καπνού (TMV), δύο στο *Alphanecrovirus*, οι olive latent virus 1 – Λανθάνων ιός 1 της ελιάς (OLV-1), olive mild mosaic virus – Ιός του ήπιου μωσαϊκού της ελιάς (OMMV), ένας στο *Betanecrovirus*, ο tobacco necrosis virus D - Ιός της νεκρώσεως του καπνού-D (TNV-D), ένας στο *Oleavirus*, ο olive latent virus 2 - Λανθάνων ιός 2 της ελιάς (OLV-2), ένας στο *Marafivirus*, ο olive latent virus-3- Λανθάνων ιός 3 της ελιάς (OLV-3), ένας ως αταξινόμητο είδος στην οικογένεια *Seqoviridae*, ο strawberry latent ringspot virus – Ιός της λανθάνουσας δακτυλιωτής κηλίδωσης της φράουλας (SLRSV), και ένας ως αταξινόμητο είδος στην *Closteroviridae*, ο olive vein yellowing associated virus – Ιός συνδεόμενος με το κιτρίνισμα των νεύρων της ελιάς (OVYaV) (Martelli, 2013) . Επιπλέον τρεις ιοί, οι olive yellow mottling and decline associated virus – Ιός συνδεόμενος με την κίτρινη ποικιλοχλώρωση και κατάπτωση της ελαιάς (OYMDaV), olive semilatifolius virus – Ημιλανθάνων ιός της ελιάς (OSLV), και olive leaf yellowing associated virus –Ιός συνδεόμενος με το κιτρίνισμα των φύλλων της ελιάς (OLYaV), δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί και ταξινομηθεί επίσημα (ICTV Master Species List 2018b) (Πίνακας 1.3, 1.4). Επιπλέον, πρόσφατα στην Ιταλία ανιχνεύθηκε ένας ιός, με το προτεινόμενο όνομα olive-associated gemycircularvirus 1 (OaGV1), που ανήκει στο γένος *Gemycircularvirus*, που περιλαμβάνει συνήθως ιούς μυκήτων, και για τον οποίο όμως δεν έχει επιβεβαιωθεί αν αποτελεί ιό της ελιάς ή κάποιου παθογόνου της (Chiumenti et al., 2019).

Όσον αφορά στην παρουσία ιών της ελιάς στην Ελλάδα, δεν έχουν πραγματοποιηθεί ευρείες μελέτες, παρά μόνο υπάρχουν κάποιες αναφορές. Έτσι,

σε έλεγχο που έγινε στην Ιταλία, για τη διασπορά του OLV-3 στη Μεσόγειο, με τις μεθόδους RT-PCR και ανοσοαποτύπωσης σε μεμβράνη (dot blot), ο ιός ανιχνεύθηκε σε ελιές που είχαν συλλεχθεί στην Ελλάδα, το 2006 (Alabdullah et al., 2009). Αντίστοιχα, σε ελέγχους στην Καλιφόρνια, ανιχνεύθηκε ο OLYaV, με δοκιμές RT-PCR με τη χρήση dsRNA, σε ελληνικό φυτικό υλικό ελιάς που διατηρείται εκεί (Al-Rwahhieh et al., 2011). Μια πρώτη επισκόπηση της παρουσίας ιών της ελιάς στην Ελλάδα, παρότι ανίχνευσε κάποιους ιούς ορολογικά, απέτυχε να τους ταυτοποιήσει περαιτέρω (Καπώνη et al., 2006). Πρόσφατα, οι SLRSV, CLRV, OLYaV και ArMV ανιχνεύθηκαν με RT-PCR, σε συλλογή γενετικού υλικού στο Ινστιτούτο Υποτροπικών και Ελαίας στα Χανιά (Mathioudakis et al., 2020). Παρά το γεγονός ότι οι ιοί της ελιάς αρχικά θεωρήθηκαν ότι έχουν μοναδικό ξενιστή την ελιά, στη χώρα μας ο OLV-2 βρέθηκε να μολύνει φυτό ρικίνου (*Ricinus communis L.*) στα Δωδεκάνησα (Grieco & Parrella et al., 2002), ενώ ο OMMV βρεθηκε να προσβάλλει σπανάκι, στην περιοχή του Μαραθώνα σε φυτά που παρουσίαζαν νεκρωτικές κηλίδες (Gratsia et al., 2011). Ο OMMV έχει αναφερθεί και σε φυτά τουλίπας στην Ολλανδία (Varanda et al., 2011).

**Πίνακας 1.3:** Κατάταξη ιών της ελιάς σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών (*International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*)

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΓΕΝΟΣ	ΙΟΣ
<b><i>Bromoviridae</i></b>		<i>Cucumovirus</i>	Cucumber mosaic virus (CMV)
<b><i>Bromoviridae</i></b>		<i>Oleavirus</i>	Olive latent virus 2 (OLV-2)
<b><i>Closteroviridae</i></b>		Αταξινόμητο	Olive leaf yellowing associated virus (OLYaV)
<b><i>Secoviridae</i></b>		Αταξινόμητο	Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)
<b><i>Secoviridae</i></b>	<i>Comovirinae</i>	<i>Nepovirus</i>	<i>Arabis</i> mosaic virus (ArMV)

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΓΕΝΟΣ	ΙΟΣ
<b><i>Secoviridae</i></b>	<i>Comovirinae</i>	<i>Nepovirus</i>	Cherry leafroll virus (CLRV)
<b><i>Secoviridae</i></b>	<i>Comovirinae</i>	<i>Nepovirus</i>	Olive latent ringspot virus (OLRSV)
<b><i>Tombusviridae</i></b>	<i>Procedovirinae</i>	<i>Alphanecrovirus</i>	Olive latent virus 1 (OLV-1)
<b><i>Tombusviridae</i></b>	<i>Procedovirinae</i>	<i>Alphanecrovirus</i>	Olive mild mosaic virus (OMMV)
<b><i>Tombusviridae</i></b>	<i>Procedovirinae</i>	<i>Betanecrovirus</i>	Tobacco necrosis virus D (TNV-D)
<b><i>Tymovirales</i></b>	<i>Tymoviridae</i>	<i>Marafivirus</i>	Olive latent virus-3 (OLV-3)
<b><i>Virgaviridae</i></b>		<i>Tobamovirus</i>	Tobacco mosaic virus (TMV)
<b>Αταξιλόγητο</b>		Αταξιλόγητο	Olive vein yellowing associated virus (OVYaV)
<b>Αταξιλόγητο</b>		Αταξιλόγητο	Olive yellow mottling and decline associated virus (OYMDaV)
<b>Αταξιλόγητο</b>		Αταξιλόγητο	Olive semilatifolius virus (OSLV)

**Πίνακας 1.4:** Συχνότητα εμφάνισης ιών στην ελιά, στις διάφορες χώρες που έχει αναφερθεί η παρουσία τους έως σήμερα

ΙΟΣ	ΧΩΡΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
<b>Arabis mosaic virus (ArMV)</b>	Ιταλία	*	(Savino et al., 1979)
	Τουρκία	32,2%	(Caglayan et al., 2004)
	Συρία	0,7%	(Al Abdullah et al., 2005)
	Λίβανο	0,3%	(Fadel et al., 2005)
	Αίγυπτος	0,7%	(Youssef et al., 2010)
	Ιταλία	1,1%	(Al-Abdallah et al., 2012)
	Ιταλία	1%	(Faggioli et al., 2016)
	Αίγυπτος	0,3%	(EL-Banna et al., 2017)
	Ελλάδα	2,5%	(Mathioudakis et al., 2020)
	Μαρόκο	0,9%	(Afechtal & Mounir, 2020)
	<b>Cherry leafroll virus (CLRV)</b>	Ιταλία	*
Πορτογαλία		5%	(Henriques, 1994)
Τουρκία		46,1%	(Caglayan et al., 2004)
Συρία		15%	(Al Abdullah et al., 2005)
Λίβανο		2%	(Fadel et al., 2005)
Ιταλία		4,9%	(Faggioli et al., 2005)
Αίγυπτος		4,7%	(Youssef et al., 2010)
Τυνησία		13,1%	(El Air et al., 2011)
Κροατία		24%	(Luigi et al., 2011)
Ιταλία		4,2%	(Al-Abdallah et al., 2012)
Ιταλία		3%	(Faggioli et al., 2016)
Κροατία		11,3%	(Godena et al., 2016)

ΙΟΣ	ΧΩΡΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
	Ελλάδα	5%	(Mathioudakis et al., 2020)
<b>Cucumber mosaic virus (CMV)</b>	Ιταλία	*	(Savino & Gallitelli, 1983)
	Πορτογαλία	10%	(Henriques, 1994)
	Τουρκία	24%	(Caglayan et al., 2004)
	Συρία	23%	(Al Abdullah et al., 2005)
	Αίγυπτος	25%	(Youssef et al., 2010)
	Τυνησία	26%	(El Air et al., 2011)
	Ιταλία	33%	(Al-Abdallah et al., 2012)
	Μαρόκο	2,8%	(Afechtal & Mounir, 2020)
<b>Olive latent ringspot virus (OLRSV)</b>	Ιταλία	*	(Savino et al., 1983)
	Συρία	11,5%	(Al Abdullah et al., 2005)
	Αίγυπτος	6,7%	(Youssef et al., 2010)
	Τυνησία	16,6%	(El Air et al., 2011)
	Ιταλία	31,6%	(Al-Abdallah et al., 2012)
	Αίγυπτος	7,7%	(EL-Banna et al., 2017)
<b>Olive latent virus 1 (OLV-1)</b>	Ιταλία	*	(Gallitelli & Savino, 1985)
	Συρία	6%	(Al Abdullah et al., 2005)
	Λίβανο	8%	(Fadel et al., 2005)
	Τουρκία	5%	(SerçeÇ et al., 2007)
	Πορτογαλία	22%	(Varanda et al., 2010)
	Αίγυπτος	6%	(Youssef et al., 2010)
	Τυνησία	34%	(El Air et al., 2011)
	Ιταλία	7%	(Al-Abdallah et al., 2012)
	Κροατία	5%	(Godena et al., 2016)

ΙΟΣ	ΧΩΡΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
	Αίγυπτος	14%	(EL-Banna et al., 2017)
	Τυνησία	43%	(Zellama et al., 2019)
	Πορτογαλία	83%	(Campos et al., 2019)
	Τυνησία	94%	(Campos et al., 2019)
	Μαρόκο	8,6%	(Afechtal & Mounir, 2020)
<b>Olive latent virus 2 (OLV-2)</b>	Ιταλία	*	(Grieco et al., 1992)
	Συρία	2%	(Al Abdullah et al., 2005)
	Αίγυπτος	3%	(Youssef et al., 2010)
	Τυνησία	7%	(El Air et al., 2011)
	Ιταλία	5%	(Al-Abdallah et al., 2012)
	Αίγυπτος	15%	(EL-Banna et al., 2017)
	Μαρόκο	3,8%	(Afechtal & Mounir, 2020)
<b>Olive latent virus-3 (OLV-3)</b>	Ιταλία	*	(Sabanadzovic et al., 1999)
	Ιταλία	30%	(Alabdullah et al., 2009)
	Συρία	23%	(Alabdullah et al., 2009)
	Μάλτα	29%	(Alabdullah et al., 2009)
	Τυνησία	40%	(Alabdullah et al., 2009)
	Πορτογαλλία	17%	(Alabdullah et al., 2009)
	Τουρκία	56%	(Alabdullah et al., 2009)
	Λίβανο	20%	(Alabdullah et al., 2009)
	Ελλάδα	40%	(Alabdullah et al., 2009)
<b>Olive leaf yellowing associated virus (OLYav)</b>		*	(Sabanadzovic et al., 1999)
	Συρία	14,30%	(Al Abdullah et al., 2005)
	Λίβανο	23,70%	(Fadel et al., 2005)

ΙΟΣ	ΧΩΡΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
	Ιταλία	20,90%	(Faggioli et al., 2005)
	Αίγυπτος	1,30%	(Youssef et al., 2010)
	Τυνησία	49,10%	(El Air et al., 2011)
	Ιταλία	21,10%	(Al-Abdallah et al., 2012)
	Ιταλία	88,7%	(Faggioli et al., 2016)
	Αίγυπτος	0,70%	(EL-Banna et al., 2017)
	Τυνησία	63,00%	(Zellama et al., 2019)
	Τυνησία	60,60%	(Campos et al., 2019)
	Ελλάδα	5,00%	(Mathioudakis et al., 2020)
	Μαρόκο	16,2%	(Afechtal & Mounir, 2020)
<b>Olive mild mosaic virus (OMMV)</b>	Πορτογαλία	*	(Cardoso et al., 2005)
	Πορτογαλία	27,7%	(Varanda et al., 2010)
	Τυνησία	9,5%	(Zellama et al., 2019)
	Τυνησία	40%	(Campos et al., 2019)
<b>Olive semilatif virus (OSLV)</b>		*	(Martelli et al., 2002)
<b>Olive vein yellowing associated virus (OVYav)</b>	Ιταλία	*	(Grieco et al., 1995)
<b>Olive yellow mottling and decline associated virus (OYMDaV)</b>		*	(Martelli et al., 2002)
<b>Tobacco mosaic virus (TMV)</b>	Ιταλία	*	(Triolo et al., 1996)
<b>Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)</b>	Ιταλία	*	(Savino et al., 1979)
	Πορτογαλία	19%	(Henriques et al., 1992)
	Ιταλία	15%	(Faggioli et al., 2002)
	Τουρκία	48%	(Caglayan et al., 2004)
	Συρία	6%	(Al Abdullah et al., 2005)



ΙΟΣ	ΧΩΡΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
	Λίβανο	0,3%	(Fadel et al., 2005)
	Ιταλία	7,8%	(Faggioli et al., 2005)
	Αίγυπτος	2,3%	(Youssef et al., 2010)
	Τυνησία	7,4%	(El Air et al., 2011)
	Ιταλία	19%	(Al-Abdallah et al., 2012)
	Κροατία	3,2%	(S. Godena et al., 2016)
	Αίγυπτος	0,7%	(EL-Banna et al., 2017)
	Ελλάδα	55%	(Mathioudakis et al., 2020)
	Μαρόκο	1,9%	(Afechtal & Mounir, 2020)
<b>Tobacco necrosis virus D (TNV-D)</b>	Πορτογαλία	7,4%,*	(Félix & Clara, 2002; C. Varanda et al., 2010)
	Τυνησία	21,8%	(Zellama et al., 2019)

\*Πρώτη αναφορά στην ελιά

### 1.2.1 *Arabidopsis Mosaic Virus (ArMV)*

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην οικογένεια *Secoviridae* και στο γένος *Nepovirus*. Έχει διμερές γραμμικό ssRNA(+) γονιδίωμα, με δύο μόρια RNA, μοριακού βάρους  $2.4 \times 10^6$  και  $1.4 \times 10^6$ , αντίστοιχα. Τα ισωμάτια είναι ισοδιαμετρικά, με διάμετρο 30nm και η καψιδιακή πρωτεΐνη του (capsid protein, CP) έχει μοριακό βάρος  $54 \times 10^3$  (Εικ. 1.2) (Murant, 1981; Wetzel et al., 2001). Κάθε RNA είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3' και στο 5' άκρο, ομοιοπολικά συνδεδεμένο με μία ιική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το γονιδίωμα (viral protein genome linked) - VPg. Το RNA1 εκφράζει τον συμπαράγοντα της πρωτεάσης, την VPg, την πρωτεϊνάση και την πολυμεράση (RNA dependent- RNA polymerase, RdRp) του ιού (Wetzel et al., 2008). Το RNA 2 εκφράζει την πρωτεΐνη 2A, που σχετίζεται με την αντιγραφή, την πρωτεΐνη μετακίνησης (movement protein)- MP και την CP (Wetzel et al., 2001) (Εικ. 1). Έχουν

εντοπιστεί απομονώσεις του ιού, που φέρουν και δορυφορικό RNA (satellite RNA, satRNA) σε φυτό πασχαλιάς (*Syringa vulgaris*) (Liu et al., 1990).

### **Μετάδοση**

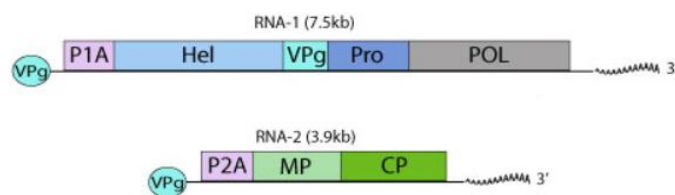
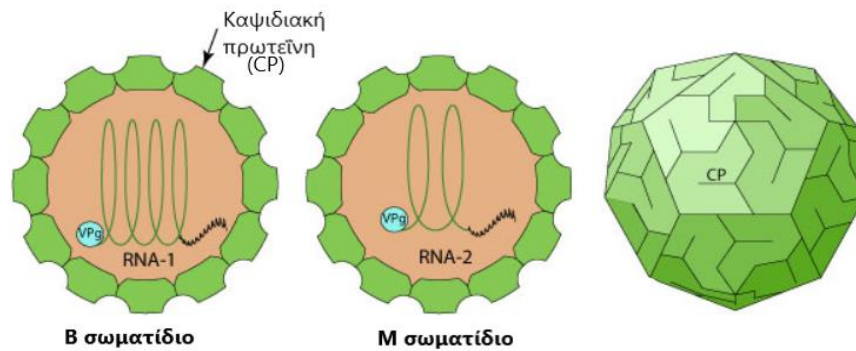
Ο ArMV είναι μηχανικά μεταδιδόμενος στο εργαστήριο (Martelli et al., 1995). Επιπλέον, μεταδίδεται με νηματώδεις και συγκεκριμένα με το είδος *Xiphinema diversicaudatum*, ωστόσο η μετάδοση αυτή έχει σημασία μόνο σε μικρές αποστάσεις, ενώ η μετάδοση σε μεγάλες αποστάσεις γίνεται μόνο με το πολλαπλασιαστικό υλικό (Wetzel et al., 2004). Μεταδίδεται επίσης και με τον σπόρο (Valdez et al., 1974).

### **Συχνότητα εμφάνισης**

Η πρώτη αναφορά του ArMV σε ελαιόδεντρα έγινε στην κεντρική Ιταλία, σε δέντρα χωρίς συμπτώματα (Savino et al., 1979). Ο ιός έχει εντοπιστεί επίσης στην Τουρκία (ποσοστό προσβολής 32%) (Caglayan et al., 2004), τη Συρία (0,7%) (Al Abdullah et al., 2005), το Λίβανο (0,3%) (Fadel et al., 2005), την Αίγυπτο (0,3% και 0,7%) (Youssef et al., 2010; EL-Banna et al., 2017), την Ιταλία (1,1%) (Al-Abdallah et al., 2012), το Μαρόκο (0,9%) (Afechtal & Mounir, 2020) και πρόσφατα σε συλλογή γενετικού υλικού την Ελλάδα (2,5%) (Mathioudakis et al., 2020). Επίσης ο ιός έχει αναφερθεί στην Πορτογαλία (Martelli, 2011) στην Αίγυπτο και στις ΗΠΑ (Saponari & Savino, 2003).

### **Συμπτωματολογία**

Στην ελιά, η μόλυνση από τον ArMV δεν προκαλεί συμπτώματα, ωστόσο σε άλλους ξενιστές η προσβολή από τον ιό συνοδεύεται από έντονη συμπτωματολογία, προκαλώντας σοβαρά προβλήματα, ειδικά σε φυτά των οικογενειών *Fragraria* και *Rubus*. Πιο συγκεκριμένα, τα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι διάστικτο μωσαϊκό, νανισμός και διάφορες μορφές παραμορφώσεων, αλλά και γλωσσίδια (Albanese et al., 2012). Για αυτό το λόγο ο ιός ανήκε, μέχρι πρόσφατα, στους ιούς καραντίνας (οδηγία 2000/29/EC) (Albanese et al., 2012), ενώ πλέον είναι ένας ιός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στα συστήματα πιστοποίησης του πολλαπλασιαστικού υλικού της ελιάς (Εκτελεστικός κανονισμός ΕΕ 2019/2072).



**Εικόνα 1.2:** Γονιδιακή οργάνωση ιών του γένους *Nepovirus*. Το γενωμικό RNA ενκαψιδιώνεται σε δύο σωματίδια, το B και το M. Κάθε RNA είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3 και στο 5' άκρο, ομοιοπολικά συνδεδεμένο με μία πρωτεΐνη VPg (CP: καψιδιακή πρωτεΐνη, P1A: P1A- πρωτεΐνη, Hel: ελικάση, VPg: Ιική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το γονιδίωμα, Pro: πρωτεάση, POL: πολυμεράση, P2A: P2A- πρωτεΐνη, MP: πρωτεΐνη μετακίνησης) (Τροποποιημένη από <https://viralzone.expasy.org/300>).

## 1.2.2 Cherry leafroll virus (CLRV)

### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην οικογένεια *Secoviridae* και στο γένος *Nepovirus*. Αποτελείται από δύο ssRNA(+) μήκους 15 kb. Τα RNA 1 και RNA 2 είναι 8.2 και 6.8 kb αντίστοιχα και είναι ξεχωριστά ενκαψιδιωμένα σε ισοδιαμετρικά σωματίδια, διαμέτρου 28 nm (Godena et al., 2012; von Bargen et al., 2012). Σε κάθε γενωμικό RNA υπάρχει ενκαψιδιωμένη μια VPg πρωτεΐνη που είναι ομοιοπολικά προσδεμένη στο 5' άκρο και έχουν μια 3' μη κωδική περιοχή που είναι σχεδόν ίδια στο RNA 1 και στο RNA 2 (Rebenstorf et al., 2006). Το RNA 1 κωδικοποιεί τον συμπαράγοντα της πρωτεάσης, την ελικάση, την VPg, την πρωτεάση και την RdRp. Το RNA 2 κωδικοποιεί την MP και την CP,

καθώς και μια πρωτεΐνη που ο ρόλος της δεν είναι ακόμη γνωστός (von Bargen et al., 2012).

### **Μετάδοση**

Ο CLRV, μεταδίδεται μηχανικά και με εμβολιασμό στο εργαστήριο (Martelli et al., 1995; von Bargen et al., 2009) και μεταδίδεται επίσης με γύρη και σπόρο (Godena et al., 2012). Μελέτες έδειξαν επίσης ότι έγινε μετάδοση μέσω μολυσμένων ριζών του φυτού *Chenopodium quinoa* σε υγιή φυτά (Rumbou et al., 2009). Επιπλέον, μπορεί να γίνεται μετάδοση και μέσω μολυσμένου νερού ή εδάφους αν έρθουν σε επαφή με τον ξενιστή στον οποίο ταυτόχρονα υπάρχουν πληγές (von Bargen et al., 2009).

### **Συχνότητα εμφάνισης**

Η πρώτη αναφορά του CLRV στην ελιά έγινε το 1981 από τους Savino και Gallitelli. Έχει εντοπιστεί στην Πορτογαλία (5%) (Henriques, 1994), την Τουρκία (46,7%) (Caglayan et al., 2004), (23%) (Caglayan et al., 2011), την Ιταλία (4,9% και 4,2%) (Al-Abdallah et al., 2012; Faggioli et al., 2005) την Αίγυπτο (4,7%) (Youssef et al., 2010), στο Λίβανο (2%) (Fadel et al., 2005), την Τυνησία (13,1%) (El Air et al., 2011), τη Συρία (15%) (Al Abdullah et al., 2005), την Κροατία (24%) (Luigi et al., 2011), (11,3%) (Godena et al., 2012) και πρόσφατα σε συλλογή γενετικού υλικού στην Ελλάδα (5%) (Mathioudakis et al., 2020).

### **Συμπτωματολογία**

Ο CLRV στην ελιά προκαλεί κυρίως λανθάνουσες μολύνσεις, ωστόσο στην Κροατία έχει αναφερθεί ότι προκαλεί συμπτώματα στις ποικιλίες Rosinjola, Buža runtoža, Frantoio και Ascolana τα οποία περιλαμβάνουν παραμόρφωση και χλώρωση φύλλων, καθυστέρηση ωρίμανσης των καρπών και ανώμαλη έκπτυξη των βλαστών (Εικ. 1.3) (Godena et al., 2016). Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές ότι συμμετέχει στο σύνδρομο του ικτέρου των φύλλων (leaf-yellowing complex disease), το οποίο μπορεί να προκαλεί στα ελαιόδεντρα χλώρωση και παραμόρφωση σε φύλλα και καρπούς (Godena et al., 2012; Luigi et al., 2011). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ποσότητα και την ποιότητα του ελαιολάδου, καθώς μειώνει την απόδοση του καρπού σε λάδι. Στην ποιότητα επιδρά αρνητικά με

μείωση της ο-διφαινόλης (o-diphenol) (Fontana et al., 2019). Σε άλλους ξενιστές, όπως είναι η φλαμουριά (*Tilia* sp), η σημύδα (*Betula* spp) (Werner et al., 1997), η κερασιά (*Prunus avium*) και η καρυδιά (*Juglans regia*) μπορεί να προκαλέσει πιο σοβαρά συμπτώματα, όπως χλωρωτικές κηλίδες και καθυστερημένη ανάπτυξη φύλλων, αλλά και νέκρωση κλάδων και ολόκληρων δέντρων. Για αυτό το λόγο ανήκε μέχρι πρόσφατα στα παθογόνα καραντίνας (οδηγία 2000/29/EC), ενώ πλέον είναι ένας ιός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν στα συστήματα πιστοποίησης του πολλαπλασιαστικού υλικού της ελιάς (Εκτελεστικός κανονισμός ΕΕ 2019/2072).



**Εικόνα 1.3:** Συμπτώματα που προκαλεί ο cherry leafroll virus (CLRV) σε φύλλα και καρπούς ελιάς της ποικιλίας *Rosinjola*. Τα φύλλα εμφανίζουν παραμόρφωση και χλώρωση και οι καρποί καθυστερημένη ωρίμανση (Godena et al., 2016).

### 1.2.3 Olive latent ringspot virus (OLRSV)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην οικογένεια *Secoviridae* και στο γένος *Nepovirus*. Το γονιδίωμά του είναι διμερές, ssRNA(+), με μοριακό βάρος  $2.65 \times 10^6$  (RNA-1) και  $1.4 \times 10^6$  (RNA-2). Έχει ισοδιαμετρικά ισοσώματα διαμέτρου 28 nm και καψιδιακή πρωτεΐνη με μοριακή μάζα 57,600 (Alkowni et al., 2001).

## Μετάδοση

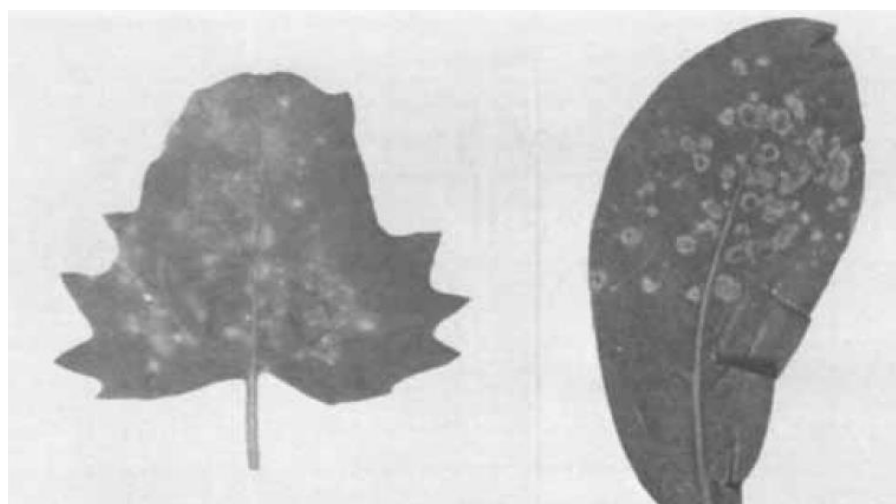
Είναι μηχανικά μεταδιδόμενος (Martelli et al., 1995). Δεν είναι γνωστά αλλά στοιχεία της επιδημιολογίας του.

## Συχνότητα εμφάνισης

Η πρώτη αναφορά του OLRV έγινε στην Ιταλία, σε ένα δέντρο κοντά στην περιοχή της Ρώμης, το οποίο δεν παρουσίαζε συμπτώματα πέρα από μερική αποφύλλωση (Savino et al., 1983). Έχουν γίνει αναφορές στην Πορτογαλία το 1990 (Albanese et al., 2012), στη Συρία (ποσοστό εμφάνισης 11,5%) (Al Abdullah et al., 2005), την Τυνησία (16,6%) (El Air et al., 2011), την Αίγυπτο (6,7%, 7,7%) (EL-Banna et al., 2017; Youssef et al., 2010) και την Ιταλία (31,6%) (Al-Abdallah et al., 2012).

## Συμπτωματολογία

Στην ελιά δε παρουσιάζει συμπτώματα, αλλά στους πειραματικούς ξενιστές *Chenopodium quinoa* και *Ch. amaranticolor*, παρουσιάζονται μικρές χλωρωτικές ή νεκρωτικές τοπικές κηλίδες στα φύλλα, διασυστηματικό μωσαϊκό και κάποιες φορές νέκρωση κορυφής και στην *Gomphrena globosa* τοπικές ερυθρές νεκρωτικές κηλίδες και διασυστηματική παραμόρφωση και στίγματα στα ανώτερα διασυστηματικά μολυσμένα φύλλα (Εικ. 1.4) (Savino et al., 1983).



**Εικόνα 1.4:** Τοπικές νεκρωτικές κηλίδες σε *C. quinoa* (αριστερά) και τοπικές ερυθρές νεκρωτικές κηλίδες σε *G. globosa* (δεξιά) που εμφανίστηκαν έξι ημέρες μετά την μηχανική μετάδοση με τον olive latent ringspot virus (OLRV) (Savino et al., 1983).

## 1.2.4 Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)

### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην Τάξη *Picornavirales* και στην οικογένεια *Secoviridae*, αλλά το γένος παραμένει προς το παρόν ακαθόριστο (ICTV). Αποτελείται από ισοδιαμετρικά σωματίδια, διαμέτρου 30 nm και το γονιδίωμα του περιλαμβάνει δύο ssRNA(+) (Faggioli et al., 2002). Το RNA1 κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη η οποία, κωδικοποιεί τον συμπαράγοντα της πρωτεάσης, την ελικάση, την Nrg, την πρωτεάση και την RdRp και είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3' άκρο. Το RNA 2 κωδικοποιεί την MP, την μεγάλη καψιδιακή πρωτεΐνη (large coat protein, CP<sub>L</sub>) και την μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη (small coat protein, CP<sub>S</sub>) (Εικ. 1.5). Έχει αναφερθεί και η παρουσία satRNA, σε κάποιες απομονώσεις του ιού (Tzanetakis et al., 2006). Μέχρι πρόσφατα ανήκε στα παθογόνα καραντίνας (οδηγία 2000/29/EC), ενώ πλέον είναι ένας ιός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν στα συστήματα πιστοποίησης του πολλαπλασιαστικού υλικού της ελιάς (Εκτελεστικός κανονισμός ΕΕ 2019/2072).

### Μετάδοση

Μεταδίδεται με εμβολιασμό, με νηματώδεις (*Xiphinema diversicaudatum*) και με σπόρο (Faggioli et al., 2005).

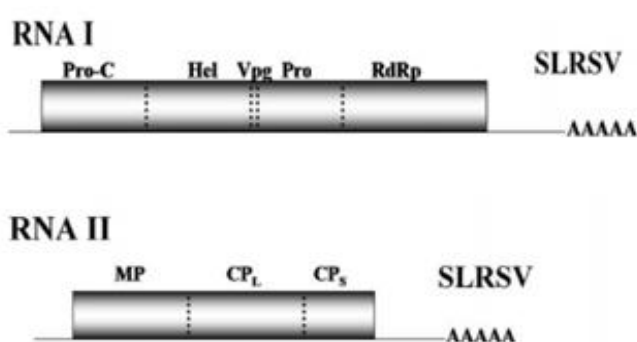
### Συχνότητα εμφάνισης

Η πρώτη απομόνωση του SLRSV έγινε στην κεντρική Ιταλία από ελαιόδεντρα ποικιλίας Corregiolo (Savino et al., 1979) και μεταγενέστερα συνδέθηκε με τα συμπτώματα που προκαλεί στα φύλλα στην ποικιλία Ascolana tenera, τα οποία είναι στένωση και συστροφή των φύλλων, θαμνώδη βλάστηση και παραμορφωμένοι καρποί (Faggioli et al., 2002; Marte, 1986). Έχει εντοπιστεί στην Ιταλία σε διάφορα ποσοστά (15%) (Faggioli et al., 2002), (19%) (Al-Abdallah et al., 2012), (7,8%) (Faggioli et al., 2005), την Πορτογαλία (19%) (Henriques et al., 1992), την Αλβανία σε δέντρο της τοπικής ποικιλίας 'K. M. Berat' μαζί με τον OLYaV (Luigi et al., 2009), την Τουρκία (48%) (Caglayan et al., 2004), την Αίγυπτο (2,3%) (Youssef et al., 2010) και (0,7%) (El-Banna et al., 2017), το Λίβανο (0,3%) (Fadel et al., 2005), την Τυνησία (7,4%) (El Air et al., 2011), τη Συρία (5,7%) (Al Abdullah et al., 2005), την Κροατία (3,2%) (Godena

et al., 2016), στο Μαρόκο (1,9%) (Afechtal & Mounir, 2020) και πρόσφατα σε συλλογή γενετικού υλικού στην Ελλάδα (55%) (Mathioudakis et al., 2020).

### Συμπτωματολογία

Είναι υπεύθυνος για την ασθένεια των ανώμαλων καρπών (bumpy fruit) και σε αντίθεση με την πλειονότητα των ιών που προσβάλλουν την ελιά, προκαλεί αρκετά συμπτώματα. Τα προσβεβλημένα ελαιόδεντρα εμφανίζουν σοβαρή στένωση και συστροφή των φύλλων, θαμνώδη βλάστηση, παραμορφωμένους καρπούς με μειωμένο βάρος και όγκο και μειωμένη απόδοση παραγωγής (Faggioli et al., 2002; Fontana et al., 2019). Ωστόσο, ο ιός έχει εντοπισθεί και σε δέντρα που δεν παρουσιάζουν αυτά τα χαρακτηριστικά συμπτώματα (Faggioli et al., 2002). Φαίνεται επιπλέον, ότι η ένταση και η έκταση των συμπτωμάτων εξαρτάται και από την ποικιλία του δέντρου. Για παράδειγμα, στην ποικιλία Negrinha η παραμόρφωση καρπών και φύλλων είναι ιδιαίτερα έντονη, στην οποία επίσης παρουσιάζεται και μειωμένη ικανότητα ριζοβολίας (Henriques et al., 1992). Ιδιαίτερα έντονα είναι τα συμπτώματα και στη ποικιλία Raggiola (Faggioli et al., 2002) (Εικ 1.6). Ο ιός λαμβάνεται υπόψιν στα συστήματα πιστοποίησης του πολλαπλασιαστικού υλικού της ελιάς (Εκτελεστικός κανονισμός ΕΕ 2019/2072).



**Εικόνα 1 5:** Γονιδιακή οργάνωση του Strawberry latent ringspot virus (SLRSV). Τα RNA 1 και RNA 2 είναι πολυαδενυλιωμένα στο 3' άκρο (Pro-C: συμπαράγοντας της πρωτεάσης, Hel: ελικάση, Vrg: Ιική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το γονιδίωμα, Pro: πρωτεάση, RdRp: RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση MP: πρωτεΐνη μετακίνησης, CPL: μεγάλη καψιδιακή πρωτεΐνη, CPS: μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη) (Tzanetakakis et al., 2006).





**Εικόνα 1. 6:** Κλαδιά, φύλλα, άνθη και καρποί της ποικιλίας *Frantoio* που παρουσιάζουν συμπτωματολογία του *strawberry latent ringspot virus (SLRSV)* (δεξιά), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα υγιή (αριστερά) (Caglayan et al., 2011).

### 1.2.5 Cucumber mosaic virus (CMV)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην οικογένεια *Bromoviridae* και στο γένος *Cucumovirus*. Ο CMV είναι από τους πιο σημαντικούς ιούς, τόσο από επιστημονική, όσο και από οικονομική σκοπιά. Έχει πάνω από 1000 ξενιστές και θεωρείται ο πιο ευρέως διαδεδομένος ιός (Roossinck, 2001; Scholthof et al., 2011). Τα ισωμάτια του είναι εικοσαεδρικά με διάμετρο 29 nm (Εικ. 1.7 Α). Το γονιδίωμα του είναι τριμερές, +ssRNA, που

ενκαψιδιώνεται σε διαφορετικά ισωμάτια. Τα RNA 1 (3.3kb) και RNA 2 (3.0kb) κωδικοποιούν τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORF) 1a και 2a αντίστοιχα. Το ORF 1a εκφράζει μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αναπαραγωγή και το ORF 2a εκφράζει την πολυμεράση του ιού. Το υπογενωμικό (subgenomic, sg) RNA 4A κωδικοποιεί το ORF 2b, που με τη σειρά του κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη-καταστολέα της RNA σίγησης (RNA silencing suppressor). Το RNA 3 (2.2kb) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 3a, που είναι η MP, ενώ η CP εκφράζεται από το υπογενωμικό RNA 4 και αυτές οι δύο πρωτεΐνες μαζί είναι απαραίτητες για τη μετακίνηση του ιού (Εικ. 1.7 Β) (Roossinck, 2001, 2002; Scholthof et al., 2011). Ο CMV συχνά συνοδεύεται από δορυφορικά RNAs (satRNAs), παρουσία των οποίων τα συμπτώματα του ιού μπορεί να είναι διαφορετικά, πιο ήπια ή πιο έντονα (Roossinck, 2001).

### **Μετάδοση**

Ο CMV μεταδίδεται με αφίδες με μη-έμμονο τρόπο, αλλά και με την κουσκούτα και με το σπόρο. Μεταδίδεται επίσης και μηχανικά στο εργαστήριο (Roossinck, 2001). Στην ελιά ωστόσο δεν έχει επιβεβαιωθεί η μετάδοση του με αφίδες (Albanese et al., 2012).

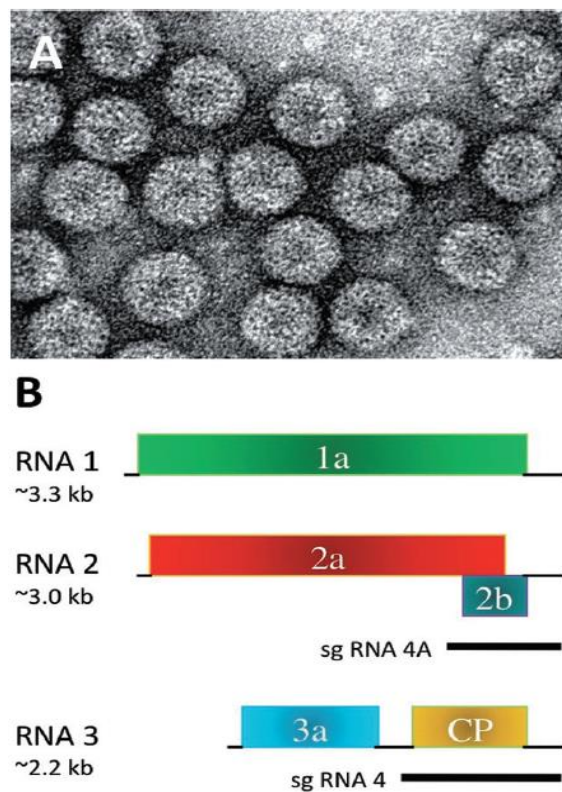
### **Συχνότητα εμφάνισης**

Η πρώτη αναφορά του CMV σε δέντρο ελιάς έγινε το 1983 από τους Savino και Gallitelli στην Ιταλία, όπου απαντάται σε ποσοστό 33% (Al-Abdallah et al., 2012). Ο ιός έχει αναφερθεί και στην Πορτογαλία (10%) (Henriques, 1994), όπου ανιχνεύθηκε μόνος του αλλά και σε μεικτή μόλυνση με τον SLRSV (Rei et al., 1993), στην Τουρκία (24%) (Caglayan et al., 2004), την Συρία (22,7%) (Al Abdullah et al., 2005), την Τυνησία (25,7%) (El Air et al., 2011), την Αίγυπτο (25%) (Youssef et al., 2010) και στο Μαρόκο (2,8%) (Afechtal & Mounir, 2020).

### **Συμπτωματολογία**

Ο CMV δεν προκαλεί συμπτώματα στην ελιά (Albanese et al., 2012). Ωστόσο, εξαιτίας της συχνότητας εμφάνισής του και των δυνητικών του επιπτώσεων σε άλλα

είδη, ανήκει στους ιούς για τους οποίους πρέπει να γίνεται έλεγχος στο πολλαπλασιαστικό υλικό και απαλλαγή (Εκτελεστικός κανονισμός 2014/98/ΕΕ).



**Εικόνα 1.7:** **A.** Ισωμάτια του *cucumber mosaic virus* (CMV), **B.** Γονιδιακή οργάνωση του CMV όπου παρουσιάζονται τα RNA 1, RNA 2, RNA 3 μεγέθους 3.3 kb, 3kb και 2.2kb αντίστοιχα και τα δύο υπογενωμικά (sg) RNAs (RNA 4A και RNA 4) (1a και 2a: πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή, 2b: καταστολέας της σίγησης, 3a: πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη διακυτταρική μετακίνηση, CP: καψιδιακή πρωτεΐνη) (Scholthof et al., 2011).

### 1.2.6 Olive latent virus 1 (OLV-1)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην οικογένεια *Tombusviridae* και στο γένος *Alphanecrovirus*. Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από ένα (+)ssRNA, μεγέθους 3700 nt και τα ισωμάτια είναι ισοδιαμετρικά με διάμετρο 30nm (Castellano et al., 2005). Αποτελείται από πέντε ORFs τα οποία κωδικοποιούν πέντε πρωτεΐνες μεγέθους 23, 82, 8, 6 και 30kDa (Félix et al., 2012). Οι πρωτεΐνες που εκφράζονται από τα ORF 1 και ORF 2 είναι

υπεύθυνες για την αναπαραγωγή του ιού, οι πρωτεΐνες που εκφράζονται από τα ORF 3 και ORF 4 είναι υπεύθυνες για τη διακυτταρική μετακίνηση, ενώ το ORF 5 εκφράζει την CP του ιού (Castellano et al., 2005) (Εικ. 1.8). Πέρα από την ελιά, ο ιός έχει βρεθεί να προσβάλλει εσπεριδοειδή στην Τουρκία, τουλίπες στην Ιαπωνία και ντομάτες σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια στην Πολωνία (Félix et al., 2012).

### **Μετάδοση**

Μεταδίδεται με εμβολιασμό, αλλά και με το σπόρο της ελιάς, όπου εντοπίστηκε σε ποσοστό 82% σε ελέγχους στην Ιταλία (Saronari et al., 2002). Επιπλέον, σε πειράματα που έγιναν με *N. benthamiana*, ο ιός μεταδόθηκε σε υγιές φυτό διαμέσω των ριζών, το οποίο μεγάλωσε σε έδαφος στο οποίο είχαν μεγαλώσει μολυσμένα φυτά, είτε σε υγρό υπόστρωμα στο οποίο υπήρχε ο ιός (Félix et al., 2007, 2012; Félix & Clara, 2002). Μεταδίδεται και μηχανικά στο εργαστήριο (Félix et al., 2007).

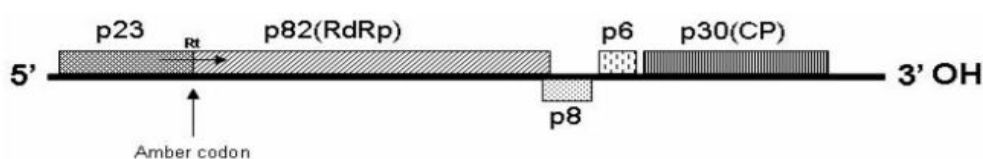
### **Συχνότητα εμφάνισης**

Η πρώτη αναφορά του OLV-1 έγινε το 1985, όταν ο ιός απομονώθηκε από ελαιόδεντρα στην περιοχή της Απούλια, στην νότια Ιταλία. Τα δέντρα αυτά παρουσίαζαν περιστασιακά διχαλώσεις φύλλων και δεσμίωση βλαστών (Gallitelli & Savino, 1985). Έκτοτε έχει εντοπιστεί στην Ιταλία (7%) (Al-Abdallah et al., 2012), την Πορτογαλία (22,2%) (Varanda et al., 2010) και (83%) (Campos et al., 2019) μόνος του, αλλά και σε μικτές μολύνσεις με τους TNV-D και OMMV, την Αίγυπτο (5,7%) (Youssef et al., 2010) και (14%) (El-Banna et al., 2017), το Λίβανο (8,3%) (Fadel et al., 2005), την Τυνησία (34,3%) (El Air et al., 2011), (43%) (Zellama et al., 2019), (93%) (Campos et al., 2019), τη Συρία (6%) (Al Abdullah et al., 2005), την Τουρκία (4,6%) (Çifçi & Serçe, 2014), την Κροατία (5%) (Godena et al., 2016) και το Μαρόκο (8,6%) (Afechtal & Mounir, 2020).

### **Συμπτωματολογία**

Ο OLV-1 συχνά προκαλεί συμπτώματα, αλλά έχει ανιχνευθεί και σε ασυμπτωματικά δέντρα. Τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα που έχουν αναφερθεί είναι η μειωμένη ζωηρότητα, αποφύλλωση, διχαλώσεις και δεσμώσεις βλαστών (Félix et al., 2012).

Στις ποικιλίες *Galega vulgar*, *Cordovil de Serpa* και *Verdeal Alentejana* στην Πορτογαλία αναφέρθηκε μειωμένη ζωηρότητα και χλώρωση, καθώς επίσης και παραμόρφωση και διακλάδωση των στελεχών (Félix et al., 2007). Στο φυτοδείκτη *Nicotiana benthamiana* προκαλεί τοπικές νεκρωτικές κηλίδες και διασυστηματικό μωσαϊκό, ενώ σε άλλους ξενιστές τοπικές νεκρωτικές κηλίδες (Félix et al., 2012).



**Εικόνα 1.8:** Γονιδιακή οργάνωση του *olive latent virus-1* (p23 και p82 (RdRp): πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή του ιού, p8 και p6: πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη διακυτταρική μετακίνηση, p30 (CP): καψιδιακή πρωτεΐνη (Félix et al., 2007)

### 1.2.7 Olive mild mosaic virus (OMMV)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην οικογένεια Tombusviridae και στο γένος *Alphanecrovirus*. Το γονιδίωμα του είναι ssRNA(+) μήκους 3.7 kb και περιλαμβάνει 5 ORFs που κωδικοποιούν πέντε πρωτεΐνες. Το ORF 1 εκφράζει την p23, το ORF 2 την p82, που είναι η RdRp του ιού, τα ORF 3 και ORF 4 εκφράζουν τις p8 και p6 που πιθανών εμπλέκονται στη μετακίνηση του ιού και το ORF 5 κωδικοποιεί τη CP (Félix et al., 2012). Τα ισομάτιά του είναι ισοδιαμετρικά, διαμέτρου 28 nm (Varanda et al., 2014). Αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως μία απομόνωση (GP) του TNV-D (Cardoso et al., 2004; Cardoso et al., 2009). Στη συνέχεια όμως, περαιτέρω αλληλουχίσεις έδειξαν ότι ο OMMV προέκυψε από ανασυνδυασμό των OLV-1 και TNV-D (Cheng & Nagy, 2003; Félix et al., 2007), καθώς η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) του OLV-1 έχει μεγάλη ομοιότητα με του OMMV, ενώ η αλληλουχία της CP παρουσιάζει

μεγάλη ομοιότητα με τη CP του TNV-D (Cardoso et al., 2009; Félix et al., 2012; Varanda et al., 2018). Τέτοιου είδους ανασυνδυασμοί είναι κοινοί στην οικογένεια *Tombusviridae* (Cheng & Nagy, 2003). Στην περίπτωση του OMMV το γονιδίωμα του TNV-D λειτούργησε ως δότης και το γονιδίωμα του OLV-1 ως δέκτης ('acceptor' template) (Félix et al., 2007) (Εικ. 1.9).

### **Μετάδοση**

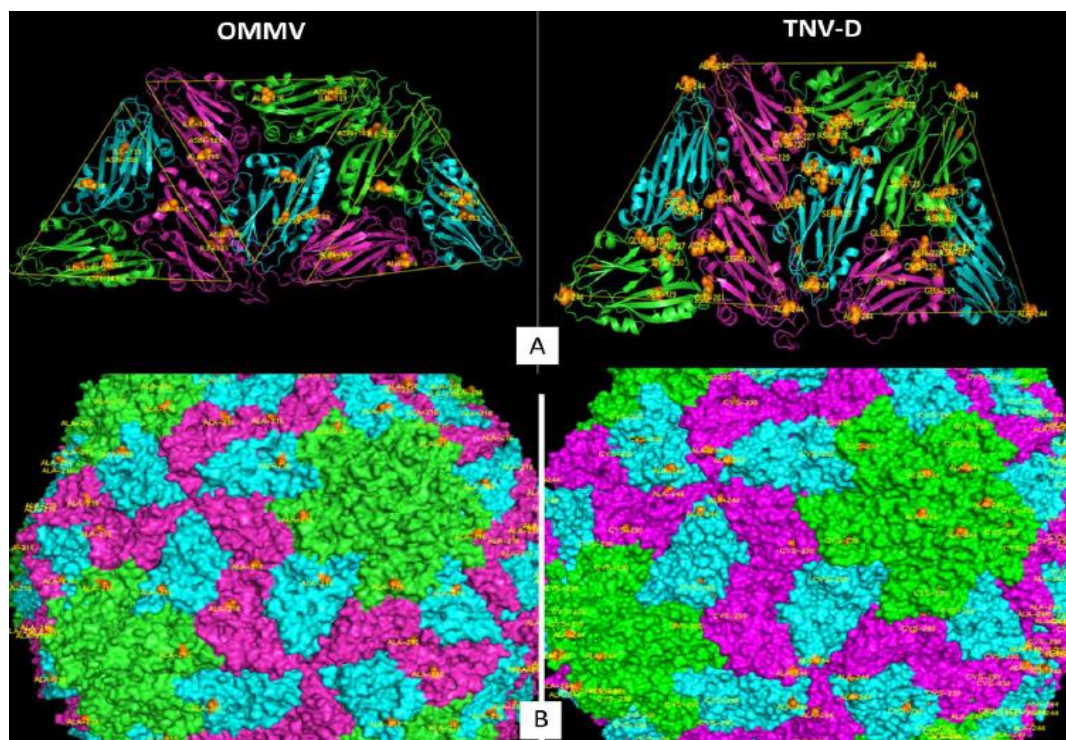
Πειράματα σε *N. benthamiana* έδειξαν ότι ο OMMV μεταδίδεται μέσω των ριζών όταν στο έδαφος υπάρχει ο ιός. Ωστόσο, αν ο OMMV υπάρχει σε χαμηλή συγκέντρωση στο έδαφος δεν μπορεί να προσβάλλει εύκολα το υγιές φυτό, στην περίπτωση όμως που ταυτόχρονα υπάρχει και ο OLV-1, οι δύο ιοί δρουν συνεργιστικά και προσβάλλουν εύκολα τις ρίζες του υγιούς φυτού προκαλώντας διασυστηματικά συμπτώματα (Félix et al., 2007, 2012; Varanda et al., 2018). Μεταδίδεται και με τα πρωτόζωα *Olipidium virulentus* και *O. brassicae* μέσω των ζωοσπορίων (Varanda et al., 2011, 2015). Φαίνεται μάλιστα ότι ο *O. virulentus* είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός φορέας, λόγω μετάλλαξης της CP που διευκολύνει την πρόσδεση των ισωματίων στα ζωοσπόρια του μύκητα και αναλόγως αυξάνονται τα ποσοστά μετάδοσης (Félix et al., 2012; Varanda et al., 2015). Στο εργαστήριο έγινε μηχανική μετάδοση από μολυσμένο σπανάκι σε *Chenopodium quinoa* και μετάδοση με σπόρο (Gratsia et al., 2011).

### **Συχνότητα εμφάνισης**

Η πρώτη αναφορά του OMMV στην ελιά έγινε το 2004, στην Πορτογαλία, όπου ανιχνεύθηκε σε δέντρο της ποικιλίας 'Galega vulgar' που παρουσίαζε ελαφρύ μωσαϊκό (Cardoso et al., 2004; Félix et al., 2012). Εμφανίζεται συχνά και σε μικτές μολύνσεις με τον TNV-D και τον OLV-1 στην Πορτογαλία, όπου συνολικά καταγράφηκε σε ποσοστό 27,7% (Varanda et al., 2010). Έχει ανιχνευθεί στην Τυνησία σε ποσοστό 9,5% (Zellama et al., 2019). Επιπλέον, έλεγχος με κοινούς εκκινητές με τον TNV-D έδειξε υψηλά ποσοστά εμφάνισης σε ελαιώνες στη Πορτογαλία (86%) και στην Τυνησία (40%) (Campos et al., 2019).

## Συμπτωματολογία

Εκτός από την ελιά ο OMMV προσβάλλει την τουλίπα και το σπανάκι στο οποίο προκαλεί τοπικές νεκρωτικές κηλίδες όπως και σε διάφορους φυτοδείκτες. Στην *N. Benthamiana*, αν η μόλυνση γίνει σε νεαρό στάδιο, μπορεί να μολύνει διασυστηματικά και να προκαλέσει νεκρώσεις αλλά και το θάνατο του φυτού (Félix et al., 2012; Gratsia et al., 2011).



**Εικόνα 1.9:** Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής των ισωματίων του olive mild mosaic virus (OMMV) (αριστερά) και του Tobacco necrosis virus D (TNV-D) (δεξιά) όπου φαίνονται οι μεταλλάξεις μεταξύ των δύο ισωματίων, οι οποίες και παρουσιάζονται με σφαιρίδια. (Varanda et al., 2014).

### 1.2.8 Tobacco necrosis virus D (TNV-D)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην οικογένεια *Tombusviridae* και στο γένος *Betanecrovirus*. Το ισωμάτιο έχει εικοσαεδρική δομή, διαμέτρου 28 nm. Το γονιδίωμα είναι (+)ssRNA μήκους



περίπου 3.8 kb και αποτελείται από έξι ORFs (Cardoso et al., 2009). Το ORF 1 εκφράζει την πρωτεΐνη p22 που μαζί με την p82 συμμετέχει στην αναπαραγωγή (Díaz-cruz et al., 2017), το ORF 2 εκφράζει την p82 που είναι η RdRp του ιού, τα ORF 2, 3 και 4 εκφράζουν αντίστοιχα τις p71, p7a και p7b που παίρνουν μέρος στη διακυτταρική μετακίνηση του ιού και το ORF 5 κωδικοποιεί τη CP (Εικ 1.9) (Félix et al., 2012). Υπάρχουν τρεις απομονώσεις του TNV-D, που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και ξενιστές, η Αγγλική (TNV-D), η Ουγγρική (TNV-D<sup>H</sup>) και η Πορτογαλική (TNV-D<sup>P</sup>) και οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερα συντηρημένα γονιδιώματα (Félix et al., 2011). Η αλληλουχία της CP του TNV-D<sup>P</sup> παρουσιάζει ομοιότητα 97,0% και 95,5% με αυτές του TNV-D and TNV-D<sup>H</sup>, αντίστοιχα. Οι κυριότερες διαφορές στην αλληλουχία του γονιδιώματος μεταξύ των τριών απομονώσεων εντοπίζονται στην p71, η οποία εμπλέκεται στην διακυτταρική μετακίνηση του ιού και φαίνεται να είναι αποτέλεσμα προσαρμογής σε διαφορετικά φυτά ξενιστές (Cardoso et al., 2009).

### **Μετάδοση**

Μεταδίδεται μηχανικά στο εργαστήριο (Félix & Clara, 2002). Επιπλέον, μεταδίδεται φυσικά από το πρωτόζωο *Ospidium brassicae* που διαβιεί στο έδαφος (Cardoso et al., 2004).

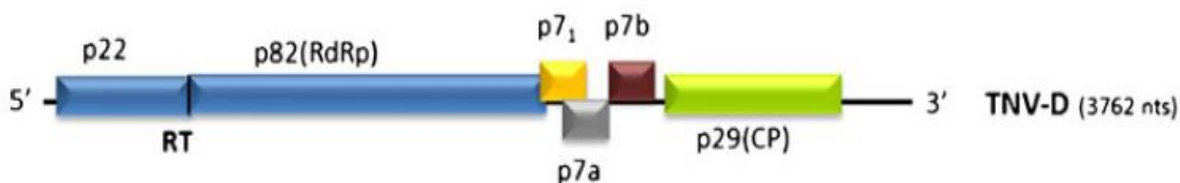
### **Συχνότητα εμφάνισης**

Η πρώτη αναφορά στην ελιά ήταν το 2000 στην Πορτογαλία, όπου απομονώθηκε από ελιά της ποικιλίας Verdeal Alentejana (Félix & Clara, 2002), όπου καταγράφεται σε ποσοστό 7,4% σε μικτές μολύνσεις με τον OMMV και τον OLV-1 (Varanda et al., 2010). Έχει αναφερθεί στην Τυνησία με ποσοστό 21,8% (Zellama et al., 2019). Επιπλέον, έλεγχος με εκκινητές κοινούς και για τον OMMV έδειξε υψηλά ποσοστά εμφάνισης σε ελαιώνες στη Πορτογαλία (86%) και την Τυνησία (40%) (Campos et al., 2019).

### **Συμπτωματολογία**

Στην ελιά ο TNV-D δεν παρουσιάζει συμπτώματα. Προκαλεί τοπικές νεκρωτικές κηλίδες στον φυτοδείκτη *N. benthamiana* (Félix & Clara, 2002).





**Εικόνα 1.10:** Γονιδιακή οργάνωση του tobacco necrosis virus D (TNV-D) (p22: πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αναπαραγωγή, p82–RdRp: πολυμεράση του ιού, p71, p7a και p7b: πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος στη διακυτταρική μετακίνηση του ιού, p29 – CP: καψιδιακή πρωτεΐνη) (Félix et al., 2012).

### 1.2.9 Olive latent virus 2 (OLV-2)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην οικογένεια *Bromoviridae* και στο γένος *Oleavirus*. Το γονιδίωμά του είναι τριμερές (+)ssRNA. Τα ισωμάτια είναι βακιλλόμορφα που ποικίλουν σε μέγεθος, καθώς κυμαίνονται από 37, 43, 48 και 55 nm σε μήκος με 18 nm πλάτος (Εικ 1.11) (Grieco et al., 1992). Ο ιός αποτελείται από τέσσερα RNAs. Τα RNA1 (3126 nt) και RNA2 (2734 nt) κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αντιγραφή, το RNA3 (2438 nt) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μετακίνησης (MP) και την καψιδιακή πρωτεΐνη (CP) και το RNA4 (2078 nt) που η λειτουργία του δεν έχει καθοριστεί ακόμα. Στα μολυσμένα φυτά έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός ενός υπογενωμικού RNA (ca 1042 nt), το οποίο κωδικοποιεί τη CP (Grieco et al., 1996).

#### Μετάδοση

Μεταδίδεται μηχανικά στο εργαστήριο σε φυτοδείκτες οι οποίοι παρουσιάζουν συμπτώματα (Grieco et al., 2002; Parrella et al., 2008), ωστόσο το εύρος των πειραματικών ξενιστών του είναι μικρό (Grieco et al., 1992). Δεν υπάρχουν επιπλέον στοιχεία όσον αφορά τρόπους μετάδοσης και άλλους φυσικούς ξενιστές του ιού.

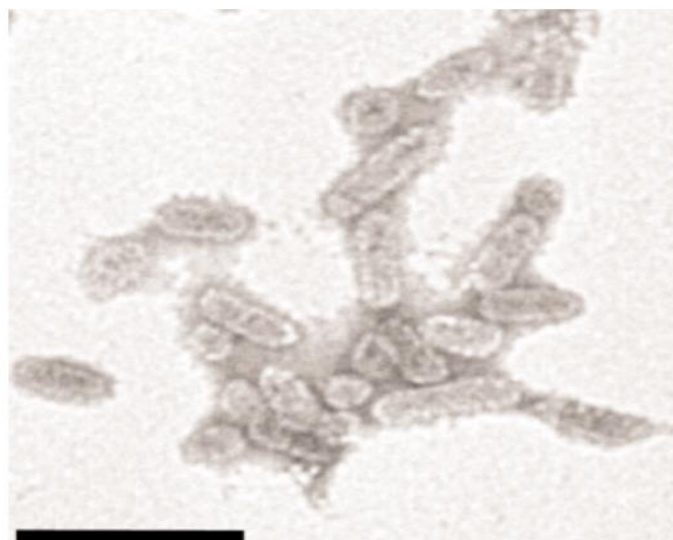
#### Συχνότητα εμφάνισης

Η πρώτη αναφορά του OLV-2 έγινε το 1984 στην Ιταλία, σε δείγμα που συλλέχθηκε από ασυμπτωματικά δέντρα στην περιοχή της Puglia (Grieco et al., 1992). Στη χώρα

μας έχει εντοπιστεί το 2002, στη Ρόδο και το Καστελόριζο, σε φυτά ρετινολαδιάς (*Ricinus communis* L.), τα οποία παρουσίαζαν μεσονεύριες χλωρώσεις και στίγματα στο φύλλωμα. Ήταν η πρώτη φορά που ο ιός εντοπίστηκε εκτός Ιταλίας και σε ξενιστή διαφορετικό από την ελιά (Crisostomo Vovlas et al., 2003). Το 2005-2006 εντοπίστηκε και σε φυτά ρετινολαδιάς και στην Ιταλία, κάτι που δείχνει ότι το φυτό μπορεί να έχει ιδιαίτερο ρόλο στην επιδημιολογία του ιού, λειτουργώντας ως φυσικό ρεζερβουάρ (Parrella et al., 2008). Στην ελιά έχει εντοπιστεί και στην Αίγυπτο σε ποσοστά 2,7% (Youssef et al., 2010) και 15% (EL-Banna et al., 2017), στην Τυνησία (6,9%) (El Air et al., 2011), τη Συρία (2%) (Al Abdullah et al., 2005), την Ιταλία (5%) (Al-Abdallah et al., 2012) και το Μαρόκο (3,8%) (Afechtal & Mounir, 2020).

### **Συμπτωματολογία**

Δε φαίνεται να προκαλεί συγκεκριμένα συμπτώματα στην ελιά. Στην ρετινολαδιά (*R. communis*) ανιχνεύθηκε σε δέντρο που παρουσίαζε έντονο μωσαϊκό, ποικιλοχλώρωση και δικτύωση των νεύρων στα φύλλα (Parrella et al., 2008).



**Εικόνα 1.11:** Ισσωμάτια του olive latent virus 2 (OLV-2) σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η μπάρα αντιστοιχεί σε 100nm (Crisostomo Vovlas et al., 2003).

### 1.2.10 Olive latent virus-3 (OLV-3)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην τάξη *Tymovirales* και στο γένος *Marafivirus*. Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από ένα ssRNA(+), μεγέθους 7148 nt, χωρίς την poly(A) ουρά και κωδικοποιεί τέσσερα ORFs (Alabdullah et al., 2009). Το ORF1 κωδικοποιεί μία πολυπρωτεΐνη μεγέθους 221.6 kDa, η οποία πιθανόν εκφράζει τη μεθυλοτρανσφεράση, την τύπου παπαΐνης πρωτεάση, την ελικάση και την RdRp και σχετίζεται με την αντιγραφή. Το ORF2 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 43.33 kDa που πιθανών αποτελεί την πρωτεΐνη μετακίνησης του ιού. Το ORF3 κωδικοποιεί την CP του ιού (28.46 kDa) και το ORF4 κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο (p16) με μέγεθος 16 kDa, που η λειτουργία του δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα (Εικ 1.11) (Alabdullah et al., 2010).

#### Μετάδοση

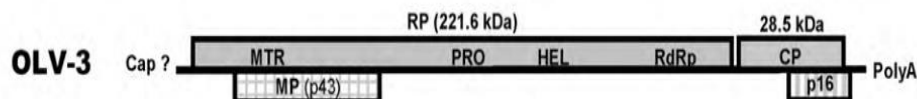
Αν και ο ιός φαίνεται να είναι αρκετά διαδεδομένος στις χώρες της Μεσογείου (Alabdullah et al., 2009b), δεν υπάρχουν αναφορές για φορείς του ιού (Raporort et al., 2016) ενώ προσπάθειες για μηχανική μετάδοσή του στο εργαστήριο ήταν ανεπιτυχείς (Varanda et al., 2010). Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί σε άλλον ξενιστή εκτός από την ελιά (Martelli, 2013).

#### Συχνότητα εμφάνισης

Η πρώτη απομόνωση προέρχεται από την περιοχή της Απούλιας στη νότια Ιταλία, από ελιά της ποικιλίας Cellina di Nardò, που δεν παρουσίαζε συμπτώματα. Η δειγματοληψία έγινε για τον έλεγχο ιών (Sabanadzovic et al., 1999) και αργότερα ταυτοποιήθηκε ως OLV-3 (Alabdullah et al., 2010). Σε ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν στην Ιταλία, σε δείγματα από διάφορες μεσογειακές χώρες ανιχνεύθηκε σε ελιές που είχαν συλλεχθεί στην Πορτογαλία (17%), την Τουρκία (56%), την Ιταλία (30%), τη Συρία (23%), τη Μάλτα (29%), την Τυνησία (40%), το Λίβανο (20%), και την Ελλάδα (42%) (Alabdullah et al., 2009).

## Συμπτωματολογία

Δεν προκαλεί εμφανή συμπτώματα στην ελιά (Alabdullah et al., 2010).



**Εικόνα 1.12:** Γονιδιακή οργάνωση του olive latent virus-3 (OLV-3) (MTR: μεθυλοτρανσφεράση, PRO: πρωτεάση, HEL: ελικάση, RdRp: πολυμεράση, MP: πρωτεΐνη μετακίνησης, CP: καψιδιακή πρωτεΐνη, p16: πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας) (Alabdullah et al., 2010).

### 1.2.11 Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ανήκει στην οικογένεια *Closteroviridae*, αλλά δεν έχει γίνει ταξινόμηση σε κάποιο γένος, καθώς απουσιάζουν τα αναγκαία βιολογικά και μοριακά δεδομένα. Ο ιός αποτελείται από ένα ssRNA(+). Έχει αλληλουχηθεί το πλήρες γονιδίωμα μια απομόνωσης του ιού. Το RNA αποτελείται από 11 ORFs. Το ORF 1α κωδικοποιεί την τύπου παπαΐνης πρωτεάση (L-Pro), την μεθυλοτρανσφεράση (Met-T) και την ελικάση (Hel). Το ORF 1b (58kDa) κωδικοποιεί την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp), το ORF 2 (21 kDa) κωδικοποιεί την τύπου θαυματίνης πρωτεΐνη, το ORF 3 (7kDa) πιθανών κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, το ORF 4 (66 kDa) κωδικοποιεί το ομόλογο της πρωτεΐνης θερμικής καταπόνησης 70 (HSP70h) και το ORF 5 (60 kDa) το ομόλογο της πρωτεΐνης θερμικής καταπόνησης 90 και το ORF 6 (26 kDa) κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη (CP). Τα ORF 7 (18 kDa), ORF8 (10kDa), ORF9 (7kDa), ORF10 (26kDa) και ORF 11 (10kDa) κωδικοποιούν πρωτεΐνες που η λειτουργία τους δεν είναι ακόμα γνωστή (Ruiz-García et al., 2020). Ο ιός δείχνει να έχει πολύ μεγάλη παραλλακτικότητα και θεωρείται πιθανό να ανήκει σε ένα σύμπλεγμα ιών (Al-Rwahnih et al., 2011). Ανήκει στους ιούς που εντάσσονται

στα σχήματα πιστοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού της ελιάς (2014/96/EU, 2014/97/EU, 2014/98/EU).

### **Μετάδοση**

Μεταδίδεται με ψευδόκοκκους (Οικογένεια *Pseudococcidae*) (Ruiz-García et al., 2020) και με την ψύλλα της ελιάς *Eurhyllura olivina* (Al-Rwahneh et al., 2011). Οι προσπάθειες μηχανικής μετάδοσης στο εργαστήριο απέτυχαν ενώ ο εμβολιασμός σε υγιή δέντρα της ποικιλίας Biancolilla έδειξαν συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων (Sabanadzovic et al., 1999).

### **Συχνότητα εμφάνισης**

Η πρώτη αναφορά έγινε στην Σικελία σε δέντρο της ποικιλίας Biancolilla που παρουσίαζε έντονο κίτρινο αποχρωματισμό στα φύλλα (Sabanadzovic et al., 1999). Έχει υψηλά ποσοστά εμφάνισης (93,8%) στην Καλιφόρνια, στην 20,9% (Faggioli et al., 2005) ή 21,% (Al-Abdallah et al., 2012) στην Ιταλία, 60% στη Σικελία, 86% στη Καλάμπρια (Fontana et al., 2019) και 63.0% στην Τυνησία (Zellama et al., 2019). Έχει εντοπιστεί στην Αλβανία σε δέντρο της τοπικής ποικιλίας 'K. M. Berat' μαζί με τον SLRSV (Luigi et al., 2011), στην Αίγυπτο (1,3%) (Youssef et al., 2010), (0,7%) (El-Banna et al., 2017), την Τυνησία (49,1) (El Air et al., 2011), (63%) (Zellama et al., 2019), (60,6%) (Campos et al., 2019), τη Συρία (14,3%) (Al Abdullah et al., 2005), την Κροατία (Luigi et al., 2011), το Λίβανο (23,7%) (Fadel et al., 2005), το Μαρόκο (16,2%) (Afechtal & Mounir, 2020) και πρόσφατα σε συλλογή γενετικού υλικού στην Ελλάδα (5%) (Mathioudakis et al., 2020).

### **Συμπτωματολογία**

Σύγκριση μεταξύ υγιών και μολυσμένων δέντρων έδειξε ότι η παρουσία του OLYaV μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της διαμέτρου του κορμού, μείωση του μεγέθους των φύλλων και μείωση του μήκους και του αριθμού των κλαδιών. Επίσης διαφορές παρατηρήθηκαν και στο υδατικό δυναμικό, όπου στα μολυσμένα δέντρα φαίνεται να είναι υψηλότερο από τα υγιή. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στο τελικό ύψος των δέντρων. Μπορεί να παραμένει ασυμπτωματικός, αλλά κάποια δέντρα εμφανίζουν συμπτώματα, όπως χλώρωση και χρωματική αλλοίωση που

εκτείνεται κατά μήκος του φύλλου (Εικ. 1.13) (Cutuli et al., 2017). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία του ιού μπορεί να αυξήσει την ποιότητα του ελαιολάδου, καθώς τα προσβεβλημένα νεαρά δέντρα δίνουν ελαιόλαδο με ελεύθερη οξύτητα αισθητά χαμηλότερη από το ελαιόλαδο που παράγεται από υγιή δέντρα (Fontana et al., 2019).



**Εικόνα 1.13:** Συμπτώματα χλώρωσης και χρωματική αλλοίωση που εκτείνεται κατά μήκος των φύλλων, σε δέντρο της ποικιλίας *Carolea*, στο οποίο ανιχνεύτηκε ο *olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV)* (Albanese et al., 2012).

### 1.2.12 Tobacco mosaic virus (TMV)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ο TMV θεωρείται από τους σημαντικότερους, αν όχι ο πιο σημαντικός ιός, τόσο λόγω της οικονομικής του σημασίας, αλλά και επειδή αποτελεί ένα ιό-μοντέλο (Scholthof et al., 2011). Ανήκει στην οικογένεια *Virgaviridae* και στο γένος *Tobamovirus*. Τα ισωμάτια του είναι ραβδόμορφα, μεγέθους 300 nm x 15 nm. Κάθε ισωμάτιο αποτελείται από 2130 αντίγραφα της CP που περιβάλλουν το γονιδίωμα. Το RNA του ιού έχει μέγεθος 6400 nt και αποτελείται από ένα γραμμικό ssRNA(+), με τέσσερα ORFs, που το κάθε ένα κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη (Scholthof, 2004). Τα ORF 1 και ORF 2 κωδικοποιούν δύο πρωτεΐνες, 130 kDa και 180 kDa

αντίστοιχα, οι οποίες σχετίζονται με τη αναπαραγωγή του ιού. Το ORF 3 κωδικοποιεί την MP, μεγέθους 30kDa και το ORF 4 κωδικοποιεί τη CP μεγέθους 17,5kDa. Το 3' άκρο αποτελείται από μία μη φωσφορυλιωμένη αδενοσίνη και το 5' άκρο αποτελείται από δομή καλύπτρας (cap) (Okada, 1999).

### **Μετάδοση**

Στον αγρό ο TMV μεταδίδεται μηχανικά και πολύ εύκολα μέσω των καλλιεργητικών εργασιών, καθώς βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στα κύτταρα του φυτού. Επίσης, μπορεί να βρίσκεται στο περίβλημα των σπόρων και από εκεί να προσβάλλει το φυτό (Mphuthi & Africa, 2017).

### **Συχνότητα εμφάνισης**

Η πρώτη αναφορά του TMV στην ελιά έγινε στην Ιταλία. Έγινε απομόνωση του ιού από δέντρο της ποικιλίας Leccino στην περιοχή της Τοσκάνης, που παρουσίαζε παρακμή και κάποια συμπτώματα περινεύριου μεταχρωματισμού στα φύλλα (Εικ. 1.13) (Martelli et al., 2002; Triolo et al., 1996).

### **Συμπτωματολογία**

Τα ελαιόδεντρα, στα οποία εντοπίστηκε ο TMV, παρουσίαζαν συμπτώματα περινεύριου μεταχρωματισμού στα φύλλα, με αποχρωματισμό των κύριων νεύρων, αποφύλλωση και παρακμή. Επιπλέον, παρουσίαζαν μειωμένη παραγωγή. Επίσης, σε φυσικά μολυσμένα δέντρα, σε συνθήκες θερμοκηπίου, παρατηρήθηκαν παραμόρφωση φύλλων, κοντά μεσογονάτια διαστήματα και περινεύριο μεταχρωματισμό στα φύλλα (Εικ. 1.14) (Triolo et al., 1996). Ωστόσο, ακόμα δεν υπάρχει ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του ιού και των συγκεκριμένων συμπτωμάτων (Martelli et al., 2002; Triolo et al., 1996). Επιπλέον, ο ιός φαίνεται να συμμετέχει μαζί με τον OSLV, στο σύμπλοκο του περινεύριου μεταχρωματισμού και της χλώρωσης των νεύρων της ελιάς (Caglayan et al., 2011).



**Εικόνα 1.14:** Το δέντρο ποικιλίας *Leccino* στο οποίο έγινε η πρώτη αναφορά στον *tobacco mosaic virus (TMV)* (A) και συμπτώματα περινεύριας χρώσης των νεύρων των φύλλων (B) (Triolo et al., 1996).

### 1.2.13 Olive vein yellowing associated virus (OVYAV)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Ο ιός προτάθηκε ως μέλος του γένους *Potexvirus* ωστόσο, σύμφωνα με την επίσημη κατάταξη του ICTV, δεν έχει γίνει ακόμη αποδεκτή η ταυτότητα και ταξινόμησή του. Έχει επιμήκη και εύκαμπτα σωματίδια μήκους 520 nm και πλάτους 12 nm, με βάρος 29kDa (Faggioli & Barba, 1995) .



## Μετάδοση

Ο ιός ανιχνεύεται μετά από μηχανικές μεταδόσεις στους φυτοδείκτες *Chenopodium quinoa* όπου παρατηρούνται διασυστηματικά συμπτώματα και *Nicotiana clevelandii* που η μόλυνση είναι λανθάνουσα (Faggioli & Barba, 1995).

## Συχνότητα εμφάνισης

Η πρώτη αναφορά του ΟVYaV έγινε το 1995, στην Ιταλία. Η απομόνωση του ιού έγινε από δέντρο σε περιοχή κοντά στη Ρώμη, χωρίς καρπούς, που παρουσίαζε χλώρωση στα φύλλα (Faggioli & Barba, 1995).

## Συμπτωματολογία

Ο ιός απομονώθηκε από δέντρο χωρίς καρπούς, δηλαδή με μειωμένη παραγωγή, που παρουσίαζε συμπτώματα χλώρωσης (Εικ. 1.15). Εργαστηριακά, σε μηχανικές μεταδόσεις φυτών *Ch. quinoa* καταγράφηκαν διασυστηματικά συμπτώματα μεσονεύριας χλώρωσης (Faggioli & Barba, 1995).



**Εικόνα 1.15:** Συμπτώματα χλώρωσης, σε φύλλα του δέντρου ελιάς, στο οποίο έγινε η πρώτη αναφορά του olive vein yellowing associated virus (OVYaV) (Caglayan et al., 2011).

### **1.2.14 Olive yellow mottling and decline associated virus (OYMDaV)**

#### **Γονιδιακή οργάνωση**

Ο ιός δεν έχει ταξινομηθεί ακόμα. Έχει εύκαμπτα επιμήκη σωματίδια μήκους 800 nm (Albanese et al., 2012).

#### **Μετάδοση**

Ο ιός μεταδόθηκε μηχανικά στο εργαστήριο σε κάποιους φυτοδείκτες από συμπτωματικά δένδρα ελιάς. Σε όλα τα φυτά (ελιάς και φυτοδείκτες) ανιχνεύτηκε η παρουσία dsRNA, ως ένδειξη παρουσίας του ιού (Caglayan et al., 2011).

#### **Συχνότητα εμφάνισης**

Η πρώτη αναφορά του ιού έγινε το 1996, στην Σικελία, σε δέντρο της ποικιλίας 'Nostrana' (Albanese et al., 2012).

#### **Συμπτωματολογία**

Τα συμπτώματα των δέντρων από τα οποία έγινε η απομόνωση του OYMDaV συμπεριλάμβαναν κίτρινο αποχρωματισμό και νεκρώσεις φύλλων, αποφύλλωση και γενικότερη παρακμή (Sabanadzovic et al., 1999). Συμμετέχει στο σύνδρομο του ικτέρου των φύλλων της ελιάς (olive leaf yellowing, OLY) (Albanese et al., 2012).

### **1.2.15 Olive semilatent virus (OSLV)**

#### **Γονιδιακή οργάνωση**

Δεν έχει ταξινομηθεί ακόμα. Στους προσβεβλημένους ιστούς παρατηρήθηκαν ισοδιαμετρικά σωματίδια διαμέτρου 28 nm (Caglayan et al., 2011; Martelli, 1999; Materazzi et al., 1996).

## **Μετάδοση**

Βιοδοκιμές που έγιναν σε φυτά καπνού έδειξαν ότι υπάρχει η δυνατότητα μηχανικής μετάδοσης του OSLV στο εργαστήριο (Martelli, 1999; Materazzi et al., 1996).

## **Συχνότητα εμφάνισης**

Η πρώτη αναφορά του ιού έγινε στην περιοχή της Τοσκάνης στην Ιταλία. Τα δέντρα παρουσίαζαν συμπτώματα διαφάνειας νεύρων και ελαφρά συμπτώματα χλωρωτικού αποχρωματισμού των νεύρων (Martelli, 1999).

## **Συμπτωματολογία**

Ο OSLV, μαζί με τον TMV, έχει συνδεθεί με το σύμπλοκο του περινεύριου μεταχρωματισμού (vein banding) (Caglayan et al., 2011). Το κύριο σύμπτωμα που παρατηρήθηκε στα δέντρα στα οποία ανιχνεύθηκε ο ιός ήταν ελαφριά μεσονεύρια χλώρωση στα φύλλα, ωστόσο ακόμα δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση μεταξύ αυτών των συμπτωμάτων και της παρουσίας του ιού (Albanese et al., 2012; Martelli, 1999).

## **1.3 Συμπτωματολογία και ασθένειες ή σύνδρομα ιολογικών προσβολών στην ελιά - Οικονομική σημασία**

Οι περισσότεροι ιοί της ελιάς προκαλούν λανθάνουσες μολύνσεις. Ορισμένοι όμως από αυτούς όπως οι ArMV (Savino et al., 1979), CLRV (Rugini & Fedeli, 1990), CMV (Savino & Gallitelli, 1983) και TMV (Triolo et al., 1996) προκαλούν σοβαρά προβλήματα σε άλλες καλλιέργειες και η ελιά μπορεί να αποτελέσει πηγή τους. Υπάρχουν ωστόσο και ιοί που προκαλούν σοβαρά συμπτώματα και ασθένειες στην ελιά όπως ο SLRSV, ο οποίος ανάλογα με την ποικιλία προκαλεί παραμορφωμένους καρπούς με μειωμένο βάρος και όγκο και μείωση της παραγωγής (Faggioli et al., 2002; Fontana et al., 2019) αλλά και της εμπορικής αξίας του προϊόντος (Henriques, 1994). Σε γενικές γραμμές οι ιολογικές προσβολές στην ελιά, ακόμη και απουσία τυπικής συμπτωματολογίας, μπορεί να επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής, την ευρωστία, καθώς συχνά παρατηρείται αδυναμία, και αποφύλλωση αλλά και την

ικανότητα της ελιάς να ανταπεξέλθει σε διάφορες καταπονήσεις (Henriques, 1994) ενώ μπορεί να επηρεάσουν και την ποιότητα του ελαιολάδου (Zellama et al., 2019). Δέντρα προσβεβλημένα από τον CLRV είχαν μειωμένη παραγωγή ιδιαίτερα αυτά της ποικιλίας Frantoio, στην οποία υπήρχε χαμηλά απόδοση ελαιόλαδου και με μειωμένη περιεκτικότητα ο-διφαινόλες και μειωμένη αναλογία ολεϊκού/λινολεϊκού οξέος που μπορεί να επηρεάσει τη συντηρησιμότητα του (Godena et al., 2012). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι οι επιπτώσεις στο ελαιόλαδο δεν είναι απαραίτητα αρνητικές, καθώς ελαιόδεντρα μολυσμένα με OLYaV παράγουν ελαιόλαδο χαμηλότερης οξύτητας, άρα και καλύτερης ποιότητας, σε σχέση με τα υγιή, αυξάνοντας την ποιότητα χωρίς κάποια άλλη εμφανή αρνητική συνέπεια της μόλυνσης (Fontana et al., 2019).

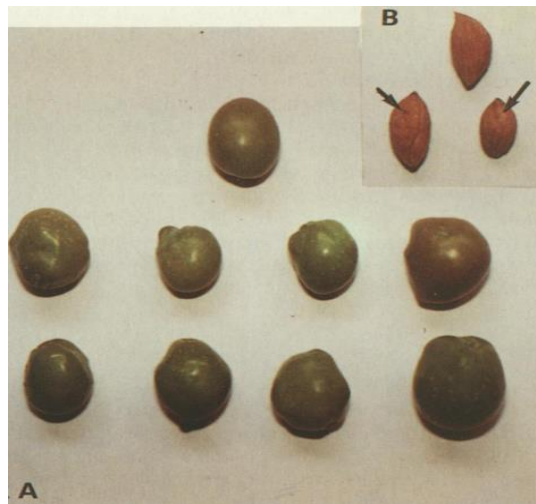
Παράλληλα στην ελιά έχουν περιγραφεί συγκεκριμένα σύνδρομα, τα οποία έχουν συσχετιστεί ή όχι με την παρουσία συγκεκριμένων ιών. Τέτοια σύνδρομα είναι: (i) το κιτρίνισμα των φύλλων της ελιάς (olive leaf yellowing complex), (ii) το οίδημα καρπών (bumpy fruits) και (iii) η δεσμίωση και διαφάνεια νευρώσεων της ελιάς (vein banding and vein clearing).

### **1.3.1 Κιτρίνισμα φύλλων της ελιάς (olive leaf yellowing complex)**

Το σύμπλοκο αποτελείται από τρεις διαφορετικές ασθένειες/ιούς, οι οποίοι είναι (i) το κιτρίνισμα των νεύρων που αποδίδεται στον OLYaV, (ii) η χλώρωση των φύλλων που αποδίδεται στον OLYaV, και (iii) ο αποχρωματισμός των φύλλων και η κατάπτωση του δέντρου που αποδίδονται στον OYMDaV (Martelli, 1999). Χαρακτηριστικά συμπτώματα του συμπλόκου είναι η μειωμένη παραγωγή, η κίτρινη ποικιλοχλώρωση των φύλλων και η έντονη αποφύλλωση. Επιπλέον, εμφανίζονται δέντρα με νεκρώσεις των φύλλων και παρακμή (Martelli et al, 1999, 2002). Η συσχέτιση όμως των συμπτωμάτων του συνδρόμου με τους συγκεκριμένους ιούς δεν έχει αποδειχθεί και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη.

### 1.3.2 Οίδημα καρπών (bumpy fruits)

Το σύμπτωμα αφορά σε καρπούς που παρουσιάζουν εξογκώματα τα οποία παρατηρούνται και στο ενδοκάρπιο (Εικ. 1.16) και έχει καταγραφεί ιδιαίτερα συχνά στην ποικιλία Negrinha στην Πορτογαλία (Henriques et al., 1992). Συχνά παρατηρείται μαζί με συμπτώματα στένωσης και παραμόρφωσης φύλλων και μειωμένη παραγωγή (Caglayan et al., 2004; Faggioli et al., 2002). Αν και τα συμπτώματα αυτά εμφανίζονται σε δέντρα μολυσμένα από SLRSV, ωστόσο ακόμα έχει αποδειχθεί ότι ο ιός αυτός αποτελεί το αίτιο της συγκεκριμένης συμπτωματολογίας.



**Εικόνα 1.16:** A. Οίδημα καρπών (Bumpy fruits). Παραμορφωμένοι καρποί (κάτω σειρές) σε σχέση με τον φυσιολογικό καρπό στην κορυφή, B. Εξογκώματα στο ενδοκάρπιο (κάτω) σε σχέση με το φυσιολογικό στην κορυφή (Henriques et al., 1992).

### 1.3.3 Δεσμίωση και διαφάνεια των νευρώσεων της ελιάς (vein banding and vein clearing)

Στα φύλλα παρατηρείται χλωρωτικός έως κίτρινος αποχρωματισμός κατά μήκος των κεντρικών νεύρων και αποφύλλωση, καθώς και μειωμένη απόδοση και κατάπτωση του δέντρου. Από δέντρα στην περιοχή της Τοσκάνης που παρουσίαζαν αυτά τα συμπτώματα ταυτοποιήθηκε στέλεχος του TMV (Martelli et al., 2002; Triolo et al.,

1996), ενώ από άλλα με διαφάνεια των νεύρων των φύλλων απομονώθηκε ο OSLV (Martelli, 1999; Materazzi et al., 1996) χωρίς να αποδειχθεί η συσχέτιση των ιών αυτών με την παρουσία αυτών των συμπτωμάτων.

#### **1.4 Ιοειδή και άλλα εμβολιο-μεταδιδόμενα παθογόνα**

Δεν υπάρχουν πολλές αναφορές σε ιοειδή στην ελιά αλλά υπάρχουν αναφορές σε ασθένειες άγνωστης αιτιολογίας που προκαλούνται από παθογόνα που μοιάζουν με αυτές που προκαλούν ιοί.

##### **1.4.1 Δρεπανοειδές φύλλο (sickle leaf)**

Σε έλεγχο που έγινε στη Χιλή το 1999 εντοπίστηκε RNA που έμοιαζε με ιοειδούς (viroid-like RNA) σε δέντρα τα οποία εμφάνιζαν δρεπανοειδές φύλλο, συχνά με χλώρωση στην εσωτερική πλευρά της καμπύλης, και στα οποία δεν εντοπίστηκε dsRNA που να υποδεικνύει παρουσία ιών (Herrera & Madariaga, 1999). Συμπτώματα δρεπανοειδούς φύλλου έχουν αναφερθεί στην Καλιφόρνια (1958), την Ιταλία (1953), τη Χιλή, την Πορτογαλία, το Ισραήλ, αλλά και στην Ελλάδα (Barba, 1993; Caglayan et al., 2011; P. E. Kyriakopoulou, 1993, 1996). Στην Ελλάδα παρατηρήθηκαν ευρέως στις ποικιλίες Καλαμών, Κορωνέικη, Μανάκι και Μεγαρίτικη και μαζί με την παραμόρφωση των φύλλων παρατηρήθηκε και χλώρωση και κυρίως οι βλαστοί που είχαν δρεπανοειδή φύλλα παρουσίαζαν μειωμένη ανάπτυξη και ξήρανση κορυφής. Δοκιμές εμβολιασμών σε ελιές είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των συμπτωμάτων σε κάποια δέντρα (Barba, 1993; Kyriakopoulou, 1993; Martelli, 1999).

##### **1.4.2 Μερική παράλυση (partial paralysis)**

Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις που τα δέντρα εμφανίζουν συμπτώματα παρακμής. Αρχικά παρατηρήθηκε σε ελαιώνα στην Αργεντινή (Martelli, 1999). Η μερική παράλυση εμφανίζεται ταυτόχρονα με μωσαϊκό, χλωρωτικούς δακτύλιους, γραμμωτά σχέδια στα φύλλα και σχηματισμό ροζέτας στο φύλλωμα. Στο εργαστήριο τα συμπτώματα αναπαρήχθησαν έπειτα από μηχανική μόλυνση σε φυτά *Ligustrum sinensis* που εμφάνισε χλωρωτικούς δακτύλιους και ροζέτες αλλά όχι σε ελιά (Barba, 1993).

#### **1.4.3 Παραμορφώσεις φύλλων (leaf malformation)**

Δέντρα που εμφανίζουν φύλλα με ανωμαλίες στο σχήμα και στο μέγεθος έχουν παρατηρηθεί στην Ιταλία και στην Ελλάδα (Κυριακοπούλου, 1994) και το πιθανό αίτιο δε μεταδόθηκε μηχανικά σε δέντρα ελιάς (Caglayan et al., 2011; Martelli et al., 2002), ωστόσο, έγινε αναπαραγωγή συμπτωμάτων, έπειτα από εμβολιασμό μολυσμένων οφθαλμών ελιάς σε *Ligustrum lucidum* (Caglayan et al., 2011).

#### **1.4.4 Μολυσματικός ίκτερος (infective yellowing)**

Συμπτώματα έντονης χλώρωσης μαζί με μείωση της παραγωγής έχουν καταγραφεί στην Ιταλία σε δέντρα της ποικιλίας Dolce Agogia από τον Ribaldi το 1959 (Martelli, 1999). Η χλώρωση αυτή μεταδόθηκε με εμβολιασμό σε δέντρα άγριας ελιάς (*O. europaea var. oleaster*) (Barba, 1993; Martelli, 1999).

#### **1.4.5 Σφαίρωση (spherosis)**

Η ασθένεια αφορά την ανάπτυξη σφαιροβλαστών (σφαιρικές υπερπλασίες) στον κορμό και τους βραχίονες, κυρίως σε δέντρα της ποικιλίας Manzanillo στο Ισραήλ (Caglayan et al., 2011) που συνοδεύεται νανισμό, μειωμένο σθένος και παραγωγικότητα ενώ στην ποικιλία Nabali ορισμένες φορές καταγράφεται και παρακμή (Caglayan et al., 2011; Martelli, 1999) Τα συμπτώματα μεταδίδονται με εμβολιασμό από ελιά σε ελιά (Martelli et al., 2002).

#### **1.4.6 Ρωγμώδης φλοιός της ελιάς (bark cracking)**

Έχει αναφερθεί στην Ιορδανία, στην τοπική ποικιλία Nabali B (Caglayan et al., 2011). Τα δέντρα εμφανίζουν νανισμό, μειωμένη παραγωγή και πάχυνση στον φλοιό με ρωγμές σε όλο το μήκος του (Martelli, 1999) και γενικευμένη χλώρωση στα φύλλα (Caglayan et al., 2011). Τα συμπτώματα δεν όμως δεν κατέστη δυνατό να μεταδοθούν με εμβολιασμό (Martelli et al., 2002).

#### **1.4.7 Ύβροι καρπών και ευλογιά καρπών (fruit hump and fruit pox)**

Στην Ελλάδα έχουν παρατηρηθεί παραμορφώσεις, ανυψωμένες λευκές κηλίδες σε ανώριμους καρπούς οι οποίοι στη συνέχεια δεν ωριμάζουν και παραμένουν πράσινοι. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί καρποί με βυθισμένες σκούρες κηλίδες με ανώμαλη επιφάνεια. Δεν έχουν γίνει προσπάθειες μετάδοσης για αυτά τα συμπτώματα, ωστόσο, πιθανολογείται ότι μπορεί να σχετίζονται με τον SLRSV και

τα συμπτώματα οιδημάτων στους καρπούς που έχουν παρατηρηθεί σε άλλες χώρες (Caglayan et al., 2011; Marte, 1986; Κυριακοπούλου, 1994).

## 1.5 Φυτοπλάσματα

Οι πρώτες αναφορές για φυτοπλάσματα στην ελιά έγιναν το 1995 (Faggioli et al., 2016). Έκτοτε, έχουν ανιχνευθεί διαφορετικές ομάδες φυτοπλασμάτων σε ασθενή δέντρα ελιάς, αν και δεν είναι ξεκάθαρη η παρουσία τους στους ελαιώνες και οι επιπτώσεις που προκαλούν. Υπάρχουν αναφορές για μετάδοση με έντομα της οικογένειας Cicadellidae και έντομα του είδους *Hyalestes* spp, που βρέθηκαν σε εντομοπαγίδες οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε δέντρα που εμφάνιζαν συμπτώματα (Sprooner-hart et al., 2007). Η συχνότητα εμφάνισης φαίνεται να μην ξεπερνά το 10% (Martelli, 2013). Στην κεντρική και νότια Ιταλία έχουν εντοπισθεί ασθένειες που αποδίδονται σε φυτοπλάσματα με χαρακτηριστικό σύμπτωμα τη σκούπα της μάγισσας. Τα δέντρα εμφανίζουν επίσης κακή ανάπτυξη με κοντά μεσογονάτια διαστήματα, χλώρωση, φυλλωδία, παραμόρφωση και συστροφή των φύλλων, μικροφυλλία, υπερτροφικές ταξιανθίες, αποβολή λουλουδιών, αποτυχία σχηματισμού οφθαλμών και ροζέτες (Εικ. 1.17) (Martelli et al., 2002; Pasquini et al., 2000). Φυτοπλάσματα με αντίστοιχα συμπτώματα έχουν εντοπιστεί στην Ισπανία και στο Ιράν (Caglayan et al., 2011). Τα φυτοπλάσματα που εντοπίστηκαν σε αυτά τα δέντρα ανήκουν στις εξής οικογένειες και υποοικογένειες 16S-IB (Aster yellow), 16S-IC (Clover phyllody), 16Sr-III (Peach X disease), 16S-VA (Elm yellow) και 16S-XIIA (Stolbur) (Albanese et al., 2012; Faggioli et al., 2016). Μπορεί να εντοπίζονται και σε μικτές μολύνσεις, με δύο ή και περισσότερα φυτοπλάσματα να συνυπάρχουν. Δεν υπάρχει ακόμα ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ των συμπτωμάτων και την παρουσία φυτοπλασμάτων καθώς εντοπίζονται μόνο στο 53,0% των συμπτωματικών δέντρων όπου απαντώνται είτε σε μονές είτε σε μικτές μολύνσεις, ενώ μπορεί να ανιχνεύονται και σε δένδρα χωρίς συμπτώματα (Martelli, 2013; Pasquini et al., 2000).





**Εικόνα 1.17:** Συμπτώματα σε δέντρα ελιάς που προκαλούνται από προσβολή από φυτοπλάσματα. Κοντά μεσογονάτια διαστήματα, σκούπα της μάγισσας και μικροφυλλία (αριστερά), υπερτροφικές ταξιανθίες (δεξιά) (Albanese et al., 2012).

## 1.6 Επιδημιολογία ιών της ελιάς

Η επιδημιολογία των ιών της ελιάς είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστη και μόνο λίγα στοιχεία είναι γνωστά για τους μηχανισμούς μετάδοσής τους στον αγρό (Πιν. 1.5). Υπάρχουν ιοί που μεταδίδονται μηχανικά στο εργαστήριο όπως ο OLV-2, OLRSV, με νηματώδεις π.χ. ArMV, SLRSV, με τον σπόρο π.χ. CLRV, με αφίδες π.χ. CMV ή και διαμέσω του εδάφους π.χ. OLV-1, OMMV. Παρόλα αυτά όλοι οι ιοί μεταδίδονται με το αγενές πολλαπλασιαστικό υλικό, το οποίο φαίνεται να αποτελείσε και το πιο αποτελεσματικό μέσο ευρείας διασποράς τους.

**Πίνακας 1.5:** Τρόποι μετάδοσης των ιών της ελιάς (Martelli, 2013)

	Σπόρος	Γύρη	Μηχανικά*	Εμβολιασμός	Έντομα φορείς	Φανερόγαμα Παράσιτα	Μύκητες	Νηματώδεις	Μέσω εδάφους
ArMV	+	-	+	-	-	-	-	<i>Xiphinema diversicaudatum</i>	-
CLRV	+	+	+	+	-	-	-	-	Μέσω ριζών, μέσα νερού
OLRSV	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SRSV	+	-	+	+	-	-	-	<i>Xiphinema diversicaudatum</i>	-
CMV	+	-	+	-	αφίδες	κουσκούτα	-	-	-
TMV	+ περιβλημα	-	+	-	-	-	-	-	-
OLV-1	+	-	+	-	-	-	-	-	μέσω του εδάφους απευθείας στις ρίζες
OMMV	-	-	+	-	-	-	<i>Olpidium virulentus</i> , <i>Olpidium brassicae</i>	-	μέσω του εδάφους στις ρίζες του
TNV-D	-	-	+	-	-	-	<i>Olpidium brassicae</i>	-	-

	Σπόρος	Γύρη	Μηχανικά*	Εμβολιασμός	Έντομα φορείς	Φανερόγαμα Παράσιτα	Μύκητες	Νηματώδεις	Μέσω εδάφους
<b>OLV-2</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>OLYaV</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>OYMDaV</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>OSLV</b>	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>OLYaV</b>	-	-	-	+	ψευδόκοκκος (Οικ.Pseudococcidae), Euphyllura olivina	-	-	-	-
<b>OLV-3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*μηχανικά στο εργαστήριο

## **1.7 Αντιμετώπιση ιών της ελιάς - Παραγωγή Πιστοποιημένου Πολλαπλασιαστικού Υλικού (ΠΠΥ)**

Στην ελιά, η επιλογή των δέντρων για πολλαπλασιασμό γινόταν για αιώνες με οπτική παρατήρηση, λόγω της απουσίας διαγνωστικών μεθόδων για την ανίχνευση ιών και άλλων διασυστηματικών παθογόνων. Παράλληλα, στην πλειονότητά τους οι ιοί της ελιάς δεν παρουσιάζουν συμπτώματα ή, όπως στην περίπτωση της ποικιλίας 'Raggiola' υπήρχε η πεποίθηση ότι τα συμπτώματα της προσβολής του SLRSV ήταν φαινοτυπικό χαρακτηριστικό της ίδιας της ποικιλίας (Albanese et al., 2012). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό μολυσμένων δένδρων και την ευρεία διάδοση των ιών της ελιάς, τόσο σε καλλιέργειες όσο και σε συλλογές γενετικού υλικού ελιάς σε όλο τον κόσμο (Martelli, 2013).

Σήμερα γίνεται προσπάθεια για την επιλογή των μητρικών φυτών μέσω υγειονομικής (sanitary) και κλωνικής επιλογής. Όμως, τα προγράμματα εξυγίανσης και πιστοποίησης προϋποθέτουν ευαίσθητες διαγνωστικές μεθόδους και αποτελεσματικά πρωτόκολλα εξυγίανσης (Loconsole et al., 2010).

Η εξυγίανση και η χρήση πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού είναι η μόνη μέθοδος για να αποτραπεί η μετάδοση των ιών. Είναι ξεκάθαρη η σημασία της ελιάς και των παράγωγων της στην Ελλάδα επομένως πρέπει να γίνει κατανοητή και η σημασία της εγχώριας παραγωγής πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού δεδομένου ότι είναι η μόνη λύση για την παραγωγή καθαρών δέντρων. Θα πρέπει να δοθεί βάρος στην παραγωγή ΠΠΥ, καθώς η χρήση πιστοποιημένων δέντρων μπορεί να συμβάλει στην αύξηση της ποιότητας των προϊόντων δηλαδή της ελιάς και του ελαιολάδου όπως επίσης και στην εμπορική αναβάθμιση τους. Στην χώρα ξεκίνησε το καλοκαίρι του 2020 η παραγωγή πιστοποιημένου βασικού πολλαπλασιαστικού υλικού ελιάς. Στην Ελλάδα οι ιοί για τους οποίους πρέπει να γίνεται έλεγχος και απαλλαγή ορίζονται από την οδηγία 2014/98/ΕΕ, απόφαση αριθμ. 218/8241. Συγκεκριμένα, οι ιοί αυτοί είναι ο Arabis mosaic nepovirus (ArMV), ο Cherry leaf roll nepovirus (CLRV) και ο Strawberry latent ringspot virus (SLRV), και αναφέρεται και το σύνδρομο Leaf yellowing complex disease 3. Από την Ευρωπαϊκή Ένωση η παραγωγή πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού ορίζεται από τις οδηγίες 92/34 και 93/48, από την οποία προβλέπεται εμπορία

υλικού ακόμα και ποιότητας CAC (CONFORMITAS AGRARIA COMMUNITATIS – Ελάχιστων Κοινοτικών Προδιαγραφών) και ο έλεγχος για την απουσία όλων των γνωστών ιών.

Η Ιταλία έχει αναπτύξει ένα πιο αυστηρό εθελοντικό πρόγραμμα ελέγχου για την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού απαλλαγμένο ιών (VF) και υλικού ελεγμένο ως προς την παρουσία ιών (VT) (Πιν. 1.6) (DM 20/11/2006) (Zellama et al., 2019), το οποίο χρησιμοποιείται και ως βάση για τα προγράμματα πιστοποίησης άλλων χωρών, όπως η Τυνησία.

**Παραγωγή πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού:** Για την παραγωγή πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού αρχικά γίνεται επιλογή του υλικού με οπτική αξιολόγηση για διάστημα περίπου δύο χρόνων και με βάση τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Από τα δένδρα αυτά, στη συνέχεια γίνεται συλλογή φυτικού υλικού (βλαστών) ηλικίας 1-2 ετών, που ελέγχονται για την παρουσία dsRNA. Φυτά στα οποία δεν έχει ανιχνευθεί dsRNA χαρακτηρίζονται ως «υλικό απαλλαγμένο ιών (virus free, VF)». Επιπλέον, γίνεται μοριακός έλεγχος για την απουσία των γνωστών ιών που αναφέρονται στο εκάστοτε σχήμα πιστοποίησης. Το υλικό που πιστοποιείται ως virus free χρησιμοποιείται ως βασικό υλικό και διατηρείται σε συνθήκες καραντίνας, όπως ορίζονται από τα επίσημα πρωτόκολλα. Από τον πολλαπλασιασμό αυτού του αρχικού υλικού προέρχεται το πολλαπλασιαστικό υλικό από το οποίο αργότερα θα παραχθούν τα πιστοποιημένα φυτά, δενδρύλλια προς φύτευση, υποκείμενα ή δέντρα εμβολιοληψίας (Εικ.1.18) (Abdine et al., 2007; OEPP, 2009). Στα συστήματα πιστοποίησης το φυτικό υλικό, και στην προκειμένη περίπτωση αυτό της ελιάς, φέρει τρεις τεχνικούς χαρακτηρισμούς, όσον αφορά την παρουσία ιών (Υ.Α.289718/2008 - ΦΕΚ 1952/Β/23-9-2008):

**Υλικό CAC - Ελάχιστων Κοινοτικών Προδιαγραφών (CONFORMITAS AGRARIA COMMUNITATIS):** το πολλαπλασιαστικό υλικό και τα οπωροφόρα δένδρα που πληρούν τις ελάχιστες προϋποθέσεις που ορίζονται για την κατηγορία αυτή στο δελτίο το οποίο καταρτίζεται, όσον αφορά το συγκεκριμένο είδος, κατά εφαρμογή του άρθρου 4 της Κ.Υ.Α. αριθ. 436690/27.12.1994 Κοινή Υπουργική Απόφαση (Κ.Υ.Α.) «Τεχνικός κανονισμός για την εμπορία του πολλαπλασιαστικού υλικού οπωροφόρων δένδρων και των οπωροφόρων δένδρων που προορίζονται για την

παραγωγή φρούτων, σε συμμόρφωση προς τις οδηγίες 92/34/ΕΟΚ του Συμβουλίου και 93/48/ΕΟΚ, 93/64/ΕΟΚ και 93/79 της Επιτροπής» (ΦΕΚ Β/21) όπως αυτή τροποποιήθηκε με την Κ.Υ.Α. 321216/31.01.2005 (ΦΕΚ 173/ΤΒ/2005).

**Υλικό απαλλαγμένο ιών (*virus free VF*):** το υλικό που έχει υποβληθεί σε εργαστηριακές δοκιμασίες και για το οποίο έχει διαπιστωθεί ότι είναι απαλλαγμένο από μολύνσεις σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένες επιστημονικές μεθόδους και, το οποίο, κατά τον έλεγχο που διενεργήθηκε στο στάδιο της ανάπτυξής του, διαπιστώθηκε ότι είναι απαλλαγμένο από τα συμπτώματα οποιουδήποτε ιού ή ιοειδούς παθογόνου, έχει διατηρηθεί υπό συνθήκες που εξασφαλίζουν την προστασία του από μολύνσεις και θεωρείται ως απαλλαγμένο από όλους τους ιούς ή τα ιοειδή παθογόνα του οικείου είδους που είναι γνωστό ότι υπάρχουν στην Κοινότητα.

**Υλικό ελεγμένο ως προς την παρουσία ιών (*virus tested VT*):** το υλικό που έχει υποβληθεί σε εργαστηριακές δοκιμασίες και για το οποίο έχει διαπιστωθεί ότι είναι απαλλαγμένο από μολύνσεις σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένες επιστημονικές μεθόδους και, το οποίο κατά τον έλεγχο που διενεργήθηκε στα στάδια της ανάπτυξής του, διαπιστώθηκε ότι είναι απαλλαγμένο από τα συμπτώματα οποιουδήποτε ιού ή ιοειδούς παθογόνου, έχει διατηρηθεί υπό συνθήκες που εξασφαλίζουν την προστασία του από μολύνσεις και θεωρείται ως απαλλαγμένο από ορισμένους σοβαρούς ιούς ή ιοειδή παθογόνα του οικείου είδους που είναι γνωστό ότι υπάρχουν στην Κοινότητα και μπορούν να μειώσουν τη χρησιμότητα του υλικού.

Αντίστοιχο με τις παραπάνω κατηγορίες υλικό (VF ή VT) θεωρείται επίσης το υλικό που προέρχεται απευθείας, με αγενή πολλαπλασιασμό και με συγκεκριμένο αριθμό σταδίων ανάπτυξης, από το παραπάνω υλικό και το οποίο, κατά τον έλεγχο που διενεργήθηκε στα στάδια της ανάπτυξής του, διαπιστώθηκε ότι ήταν απαλλαγμένο από συμπτώματα οποιουδήποτε ιού ή ιοειδούς παθογόνου και το οποίο έχει παραχθεί και διατηρηθεί υπό συνθήκες που εξασφαλίζουν την προστασία του από μολύνσεις. Ο συγκεκριμένος αριθμός σταδίων ανάπτυξης και για τις δυο παραπάνω κατηγορίες καθορίζεται για το οικείο είδος, κατ' εφαρμογή του άρθρου 4 της Κ.Υ.Α. αριθ. 436690/27.12.1994 Κοινή Υπουργική Απόφαση (Κ.Υ.Α.) «Τεχνικός κανονισμός

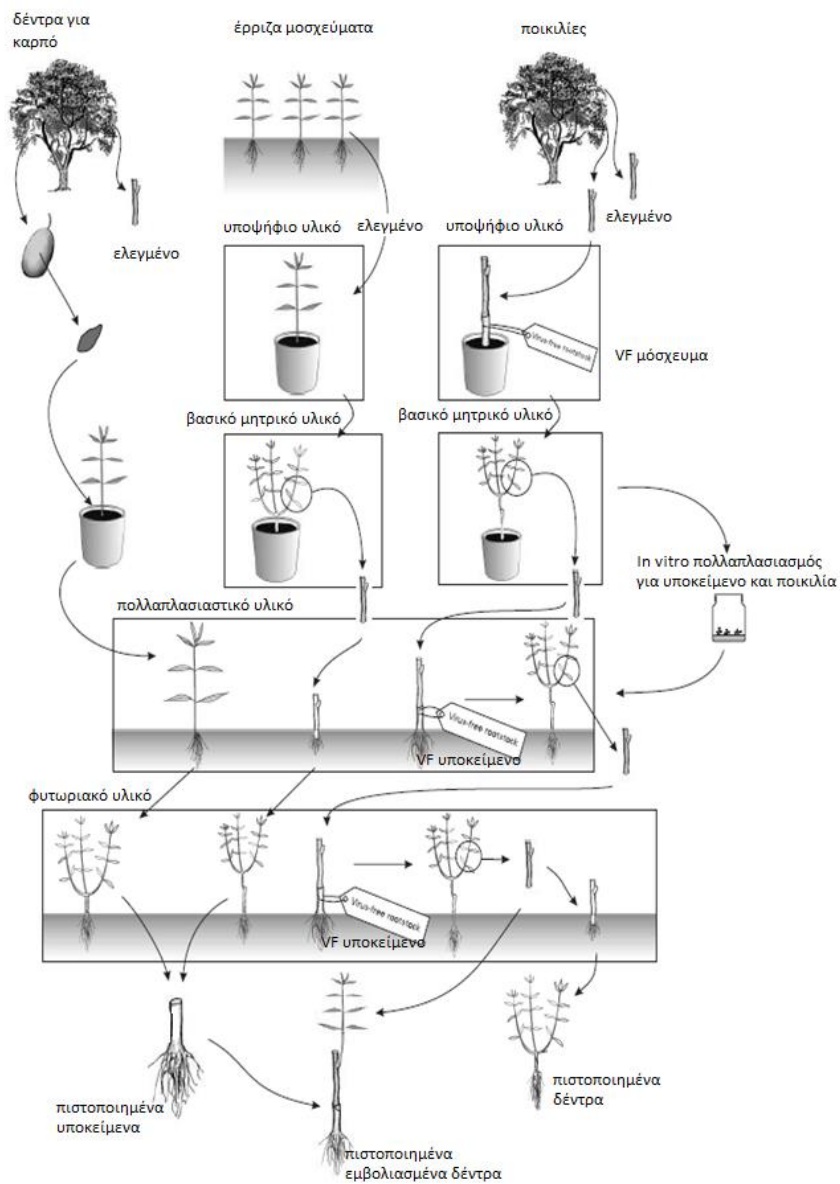
για την εμπορία του πολλαπλασιαστικού υλικού οπωροφόρων δένδρων και των οπωροφόρων δένδρων που προορίζονται για την 28212 ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ (ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ) παραγωγή φρούτων, σε συμμόρφωση προς τις οδηγίες 92/34/ΕΟΚ του Συμβουλίου και 93/48/ΕΟΚ, 93/64/ΕΟΚ και 93/79 της Επιτροπής» (ΦΕΚ Β/21) όπως αυτή τροποποιήθηκε με την Κ.Υ.Α. 321216/31.01.2005 (ΦΕΚ 173/ΤΒ/2005).

Ο παραπάνω κανονισμός δεν αναφέρει συγκεκριμένους ιούς οπότε η κάθε χώρα καθορίζει τους ιούς που εντάσει. Για την Ελλάδα σύμφωνα με την Κ.Υ.Α. 289718/2008 (ΦΕΚ 1952/Β/23-9-2008) που είναι σε ισχύ, το πολλαπλασιαστικό υλικό της ελιάς θα πρέπει να ελέγχεται και να λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα έτσι ώστε να αποκλείονται από τα μητρικά δένδρα όλων των κατηγοριών πιστοποίησης οι ιοί ArMV, CMV και SLRSV. Σύμφωνα με τον νέο εκτελεστικό κανονισμό (ΕΕ) 2019/2072, ο οποίος δεν έχει ενσωματωθεί ακόμα στην εθνικά νομοθεσία, το πολλαπλασιαστικό υλικό των δένδρων ελιάς πρέπει να είναι απαλλαγμένο από τους ιούς ArMV, CLRV, OLYaV, OLYaV και OYMDaV.

Σε διάφορες όμως χώρες π.χ. Ιταλία (Πιν. 1.6) έχουν αναπτυχθεί εθελοντικά προγράμματα πιστοποίησης, πέρα από τις οδηγίες της Ε.Ε. που περιλαμβάνουν έλεγχο για μεγαλύτερο αριθμό ιών.

**Πίνακας 1.6:** Υγειονομικές απαιτήσεις όπως ορίζονται από το εθελοντικό πρόγραμμα πιστοποίησης της Ιταλίας (DM 20/11/2006) (Zellama et al., 2019)

Ιοί		Virus-free (VF)	Virus-tested (VT)
<b>Arabis mosaic virus</b>	ArMV	X	X
<b>Cherry leafroll virus</b>	CLRV	X	X
<b>Strawberry latent ringspot virus</b>	SLRSV	X	X
<b>Cucumber mosaic virus</b>	CMV	X	-
<b>Olive latent 1 virus</b>	OLV-1	X	X
<b>Olive latent 2 virus</b>	OLV-2	X	X
<b>Olive leaf yellowing associated</b>	OLYaV	X	X
<b>Tobacco necrosis virus virus</b>	TNV	X	-



**Εικόνα 1.18:** Στάδια παραγωγής πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φυτοπροστασίας Προσαρμογή από ΟΕΡΡ, 2009.



## **1.8 Μέθοδοι ανίχνευσης ιών της ελιάς και διάγνωση ιολογικών ασθενειών**

Η ανίχνευση των ιών της ελιάς και η διάγνωση των σχετικών με αυτούς ασθενειών, παρουσιάζει δυσκολίες εξαιτίας της λανθάνουσας μορφής των μολύνσεων ή της άτυπης συμπτωματολογίας που συχνά συγχέεται με προσβολές από άλλα βιοτικά και αβιοτικά αίτια. Στην πλειονότητά τους οι ιοί δεν παρουσιάζουν χαρακτηριστικά συμπτώματα επομένως η παρατήρηση στον αγρό δεν μπορεί να δώσει σημαντικά στοιχεία για την κατάσταση του δέντρου. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις (τίτλος) των ιών είναι σχετικά χαμηλοί στους ιστούς της ελιάς γεγονός που καθιστά ακόμα πιο δύσκολη και αναξιόπιστη από πλευράς αποτελεσματικότητας, την ανίχνευσή τους κυρίως λόγω ανισοκατανομής αλλά και διαφοροποίησης ανάλογα με την εποχή δειγματοληψίας (Campos et al., 2019). Ως καλύτερη εποχή για την ανίχνευση ιών θεωρείται η άνοιξη, ενώ σε δέντρα θετικά σε ιούς δεν μπόρεσαν αυτοί να ανιχνευθούν κατά τη διάρκεια του χειμώνα εξαιτίας χαμηλού τίτλου (Bertolini et al., 2003).

### **1.8.1 Βιοδοκιμές**

Οι πρώτες διαγνώσεις ιικών μολύνσεων στην ελιά έγιναν με μηχανική μετάδοσης σε πλώδεις φυτοδείκτες και αξιολόγηση των συμπτωμάτων (Πιν. 1.7) και λίγο αργότερα με τη χρήση, ορολογικών μεθόδων, ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι δεν χαρακτηρίζονται από επαρκή ευαισθησία ώστε να θεωρούνται αξιόπιστες για την ανίχνευση ιών σε ελαιόδεντρα (Caglayan et al., 2011).

**Πίνακας 1.7:** Πειραματικοί ξενιστές, τοπικά και διασυστηματικά συμπτώματα που εμφανίζονται με τη μόλυνση με κάθε ιό μετά από μηχανική μετάδοση στο εργαστήριο

Ιός	Πειραματικός ξενιστής	Τοπικά συμπτώματα	Διασυστηματικά συμπτώματα	Ξενιστής πολλαπλασιασμού
<b>ArMV</b>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	ΧΚ	Ποι	
	<i>Ch. quinoa</i>	ΧΚ	Ποι	
	<i>Cucumis sativus</i>	ΧΚ	ΧΝ	
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>White</i>	ΧΚ/ΝΚ	ΧΚ	
	<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. <i>The</i>	ΧΚ	ν, Πα	
	<i>Petunia hybrida</i>	ΧΚ/ΝΔ	ΧΔ	*
	<i>Nicotiana clevelandii</i>			*
<b>OLRSV</b>	<i>Ch. quinoa</i>	ΧΚ/ΝΔ	Μ, νκ	*
	<i>Ch. amaranticolor</i>	ΧΚ/ΝΚ	Μ, νκ	
	<i>Gomphrena globosa</i>	ΝΚ	Πα	
<b>OLV-2</b>	<i>N. benthamiana</i>		Ποι	
	<i>N. clevelandii</i>		ΧΚ/ΝΚ	
	<i>N. occidentalis</i>		ΧΚ/ΝΚ	*
	<i>N. benthamiana</i>			*
	<i>Gomphrena globosa</i>	ΧΚ		
<b>CMV</b>	<i>Beta vulgaris</i>	ΧΚ		
	<i>Ch. amaranticolor</i>	ΧΚ/ΝΚ	Σπ	
	<i>Ch. quinoa</i>	ΧΚ/ΝΚ	Σπ	
	<i>Cucurbita spp</i>		Μ	
	<i>N. clevelandii</i>			*
<b>SLRSV</b>	<i>Ch. amaranticolor</i>	ΧΚ/ΝΚ		
	<i>Ch. murale</i>	ΧΚ/ΝΚ		
	<i>Ch. quinoa</i>	ΧΚ/ΝΚ		
	<i>Cucumis sativus</i>	ΧΚ	ΜΧ	*

Ιός	Πειραματικός ξενιστής	Τοπικά συμπτώματα	Διασυστηματικά συμπτώματα	Ξενιστής πολλαπλασιασμού
	<i>N. rustica</i>		λ	
	<i>N. tabacum</i>		λ	
	<i>N. hybrida</i>		λ	
<b>TMV</b>	<i>N. tabacum</i> cvs. <i>Turkish</i>	XK	ΜΧ,Μ,Πα	*
	<i>N. tabacum</i> cv <i>White Burley</i>	XK	ΜΧ,Μ,Πα	*
	<i>N. tabacum</i> cv <i>Xanthi</i>	XK	ΜΧ,Μ,Πα	*
	<i>N. glutinosa</i>	NK	χ	
	<i>N. tabacum</i> cvs. <i>Samsun NN</i>	NK		
	<i>N. tabacum</i> cv <i>Xanthi-nc</i>	NK		
	<i>Ch. amaranticolor</i>	NK		
	<i>Ch. quinoa</i>	NK		
	<i>Ph. vulgaris</i> cv. <i>Pinto</i>	NK		
	<i>N. benthamiana</i>	v	v	
<b>TNV-D</b>	<i>Ph. vulgaris</i> cv. <i>The Prince</i>	XK		
	<i>Ph. vulgaris</i>	XK		
	<i>Ph. aureus</i>	KP		
	<i>Ch. murale</i>			
<b>OLV--1</b>	<i>N. benthamiana</i>		M	*
	<i>Ch. amaranticolor</i>	NK		
	<i>Ch. quinoa</i>	NK		
	<i>Cucumis sativus</i>	NK		
<b>OYVaV</b>	<i>Ch. quinoa</i>		XN	*
<b>OMMV</b>	<i>N. benthamiana</i>	XK	v	
<b>CLRV</b>	<i>Ch. amaranticolor</i>	XK/NK	χ,v	
	<i>C. quinoa</i>	XK/NK	χ,v	*
	<i>Cucumis sativus</i>	XK	M	

Ιός	Πειραματικός Ξενιστής	Τοπικά συμπτώματα	Διασυστηματικά συμπτώματα	Ξενιστής πολλαπλασιασμού
	<i>N. rustica</i>	NK	NΔ/ΧΔ	*
	<i>N. tabacum cvs White Burley</i>	NK	NΔ/ΧΔ	*
	<i>N. tabacum cv Xanthi-nc</i>	NK	NΔ/ΧΔ	*

κ: κηλίδες, λ: λανθάνουσα μόλυνση, ν: νέκρωση, νκ: νέκρωση κορυφής, χ: χλώρωση, ΚΡ: κηλίδες στο ριζικό σύστημα, Μ: μωσαϊκό, ΜΧ: μεσονεύρια χλώρωση, Πα: παραμόρφωση, Ποι: ποικιλοχλώρωση, Σπ: σπανίως διασυστηματικά, ΧΔ: χλωρωτικοί δακτύλιοι, ΧΚ: χλωρωτικές κηλίδες, ΝΚ: νεκρωτικές κηλίδες, ΝΔ: νεκρωτικοί δακτύλιοι, ΧΝ: χλώρωση νεύρων

### 1.8.2 Ορολογικές δοκιμές - ELISA

Διάφοροι τύποι ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ανίχνευση ιών στην ελιά, ωστόσο, η ευαισθησία της μεθόδου είναι χαμηλή. Η χαμηλή αποτελεσματικότητα και αξιοπιστία της οφείλεται στον χαμηλό τίτλο των ιών στους ιστούς της ελιάς (Grieco et al., 2000) στη σύσταση των ιστών, καθώς τα έλαια της μπορεί να δρουν ανασταλτικά στην αντίδραση, ενώ συχνά έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ψευδών θετικών αποτελεσμάτων με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων (Bertolini et al., 2001). Στην ελιά, με τη χρήση DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich – ELISA) έχει γίνει επιτυχής ανίχνευση του SLRSV, του CMV και του CLRV στην Πορτογαλία και στην Ισπανία (Bertolini et al., 2001; Henriques et al., 1992; 1994), του TMV στην Ιταλία (Triolo et al., 1996), των SLRSV, CLRV, CMV και ArMV στην Τουρκία (Caglayan et al., 2004), του TNV στην Πορτογαλία (Cardoso et al., 2004).

### 1.8.3 Μοριακές δοκιμές

Σήμερα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ιών της ελιάς χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο μοριακές τεχνικές οι οποίες προσφέρουν μεγάλη ευαισθησία και αξιοπιστία. Οι διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

**Ανάλυση δίκλωνου RNA (dsRNA).** Η ανάλυση dsRNA είναι έχει διπλή χρήση. Αποτελεί δείκτη μόλυνσης υποδεικνύοντας την παρουσία ιών καθώς το dsRNA είναι

αποκλειστικά ιικής προέλευσης (Grieco et al., 2000). Η ευρεία παρουσία του δείχνει ότι η παρουσία ιών στην ελιά είναι πιο διαδεδομένη και μάλιστα σε λανθάνουσες μολύνσεις από ότι αναμενόταν (Grieco et al., 2000; Martelli et al., 1995). Στο 97,9% των δένδρων (49 δέντρα, 36 ποικιλιών) στην τράπεζα γενετικού υλικού του USDA (University of California, Davis) τα οποία δεν εμφάνιζαν καθόλου συμπτώματα, ανιχνεύθηκε dsRNA (Al-Rwahhieh et al., 2011). Παρόμοια στην Ιταλία το αντίστοιχο ποσοστό εμφάνισης dsRNA ήταν 73.4% (Grieco et al., 2000).

Αν και το dsRNA είναι δείκτης παρουσίας ιών, ωστόσο δεν υποδεικνύει το είδος του ιού. Όμως το dsRNA χρησιμοποιείται και ως template στην RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) δίνοντας καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το ολικό RNA (tRNA), καθώς το τελευταίο είναι συχνά μειωμένης καθαρότητας, εξαιτίας της σύστασης της ελιάς (Zellama et al., 2019). Το dsRNA δίνει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα και ως template στον dot-blot υβριδισμό για ανίχνευση ιών με τη χρήση εξειδικευμένων ανιχνευτών (Grieco et al., 2000). Η εξαγωγή του δίκλωνου RNA γίνεται ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Morris and Dodds (1979) (Grieco et al., 2000).

**Μοριακός υβριδισμός.** Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί, ιδιαίτερα στο παρελθόν για την ανίχνευση των ιών της ελιάς, είτε για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR με τη μέθοδο της χρωματομετρίας (colourimetric detection) για τους CMV, OLV-1, ArMV, CLRV, OLV-2 και SLRSV στην Ισπανία (Bertolini et al., 2001), είτε για την ταυτόχρονη ανίχνευση των ArMV, CLRV και SLRSV στην Ιταλία (Saponari et al., 2001). Με τη μέθοδο της αποτύπωσης κατά Southern για την ανίχνευση των OLRV, OLV-2, OLV-1, SLRV, CLRV και ArMV (Pantaleo et al., 2001). Για την ανίχνευση των OLV-2, OLV-1, OLYaV, OLRV CMV, SLRSV, ArMV και CLRV με τη χρήση dsRNAs ως template (Grieco et al., 2002). Η μέθοδος αποτυπώματος κηλίδας (dot blot) έχει χρησιμοποιηθεί για την πιστοποίηση πολλαπλασιαστικού υλικού ελιάς στην Ιταλία χάρη στην ευκολία που προσφέρει και στον μεγάλο αριθμό δειγμάτων που μπορούν να ελεγχθούν, σε συνδυασμό με την χρήση PCR για τον έλεγχο των αρνητικών αποτελεσμάτων (Alabdullah et al., 2009; Montemurro et al., 2008; Albanese et al., 2012).

**Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse transcription-polymerase chain reaction - RT-PCR).** Χάρη στην υψηλή ευαισθησία η RT-PCR είναι η πιο αξιόπιστη διαγνωστική μέθοδος και εφαρμόζεται ευρέως (Grieco et al., 2000). Είναι η καταλληλότερη μέθοδος για τον εντοπισμό ιών στην ελιά, όπου χάρη στην υψηλή ευαισθησία μπορούν να ξεπεραστούν τα προβλήματα της άνισης κατανομής και συγκέντρωσης των ιών (Pantaleo et al., 2001; Youssef et al., 2010). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι στόχοι ως εκμαγεία για την PCR όπως συνολικά εξαγόμενα νουκλεϊκά οξέα (total nucleic acids, TNA), συνολικά εξαγόμενο RNA (total, tRNA), dsRNA και φυτικό εκχύλισμα (Campos et al., 2019; Grieco et al., 2000). Φαίνεται ωστόσο, ότι η χρήση TNA ως εκμαγείο για την ανίχνευση των ιών της ελιάς έχει κάποια προβλήματα εξαιτίας της σύστασης της ελιάς, δηλαδή μεγάλη περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες, φαινολικές ενώσεις και αναστολείς PCR με αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση RNA να είναι χαμηλή (Bertolini et al., 2001). Αντίθετα, η χρήση dsRNA ως εκμαγείο δίνει πολύ καλύτερα αποτελέσματα καθώς με τη διαδικασία που ακολουθείται το δείγμα καθαρίζει από αναστολείς του φυτού και περιορίζεται η ποσότητα του μη ιικού νουκλεϊκού οξέος (Zellama et al., 2019). Παρ' όλα αυτά, απαιτείται αρκετή ποσότητα ιστού και η διαδικασία για την εξαγωγή dsRNA είναι χρονοβόρα, επομένως για μαζικούς ελέγχους ρουτίνας χρησιμοποιείται tRNA (Alabdullah et al., 2009). Ο πιο διαδεδομένος τύπος PCR για την ανίχνευση των ιών της ελιάς είναι η RT-PCR ενός σταδίου (one-step RT-PCR) (Luigi et al., 2009). Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί διάφορα πρωτόκολλα πολλαπλής RT-PCR (multiplex) RT-PCR, με ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών στόχων (Bertolini et al., 2001) ή πολλαπλής εστιασμένης (multiplex nested) RT-PCR και για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών ιών σε ελέγχους για ιούς καραντίνας και για παραγωγή πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού (Bertolini et al., 2003). Επιπλέον, έχει δοκιμαστεί και μία εστιασμένη (nested) PCR για ελέγχους ρουτίνας για τους ιούς ArMV, CLRV, OLV-1, OLV-2, OLRSV και SLRV με αποτελέσματα με μεγαλύτερη ευαισθησία από την RT-PCR, αν και λόγω μεγάλης ευαισθησίας μπορεί να δώσει ψευδή αποτελέσματα (Pantaleo et al., 2001). Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ποσοτικής (quantitative) q PCR για την ανίχνευση ιών οι οποίες δίνουν πολύ καλά

αποτελέσματα ακόμα με τη χρήση ολικού RNA ως template. Με τις συγκεκριμένες δοκιμές γίνεται γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση αλλά και ποσοτικοποίηση του ιού (Campos et al., 2019).

#### **1.8.4 Αλληλούχιση υψηλής απόδοσης (High-Throughput Sequencing Technologies-HTS) ή αλληλούχιση νέας γενιάς (next-generation sequencing - NGS)**

Η αλληλούχιση νέας γενιάς (next-generation sequencing - NGS) χρησιμοποιεί διάφορες πλατφόρμες και διαφορετικά είδη εκμαγείων όπως RNAs, DNA, μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια (short interfering RNAs, siRNA) και dsRNAs (Marais et al., 2015). Τα τελευταία χρόνια έχουν ανιχνευθεί πολλοί νέοι ιοί, καθώς με τις συγκεκριμένες πλατφόρμες γίνεται αλληλούχιση του γονιδιώματος χωρίς να είναι απαραίτητη η γνώση των αλληλουχιών των ιών προς ανίχνευση. Με την αλληλούχιση δημιουργούνται σύνολα αλληλεπικαλυπτόμενων DNA. Στη συνέχεια, με τη διαδικασία της εκ νέου συναρμολόγησης (*de novo assembly*) προκύπτουν σύνολα αλληλουχιών (*contigs* - αναφέρεται στα τμήματα αλληλουχίας που προέρχονται ύστερα από την αλληλοεπικάλυψη μικρότερων τμημάτων) τα οποία σε αντιπαραβολή με τις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων (BLAST-based methodologies) ταξινομούνται σε οικογένειες, γένη, είδη. Στην ελιά μέσω NGS έχει πρόσφατα αποκτηθεί ολόκληρη η αλληλουχία του OLYaV (Ruiz-García et al., 2020).

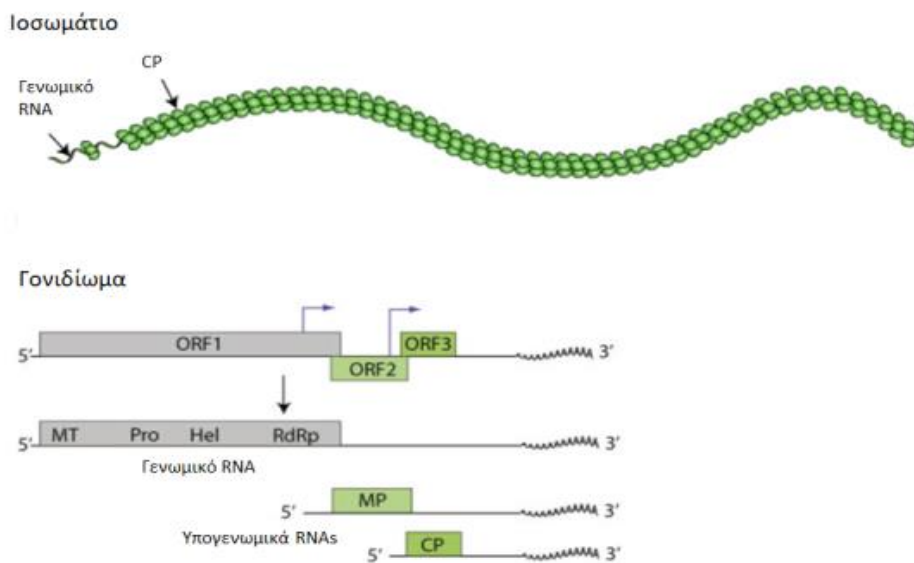
### **1.9 Το γένος *Tepovirus***

Σήμερα στο γένος *Tepovirus* της οικογένειας *Betaflexiviridae* ανήκουν ο Potato virus T (PVT) (Rubino et al., 2012) που είναι και το τυπικό μέλος του γένους και ο Prunus virus T (PrVT) (Marais et al., 2015). Συνεχώς όμως εντοπίζονται καινούριοι ιοί που έχουν προταθεί να ενταχθούν στο γένος όπως είναι ο cherry virus T (ChVT) που απομονώθηκε από βύσσινο (*Prunus cerasus*, cv. Amarelka Chvalkovicka) (Marais et al., 2020) και ο Zostera virus T (ZoVT) που απομονώθηκε από φύκη *Zostera muelleri* (Goh et al., 2019).

### 1.9.1 Potato virus T (PVT)

#### Γονιδιακή οργάνωση

Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA με ραβδόμορφα σωματίδια μήκους 64 X 12 nm. Αποτελείται από 6539 nt χωρίς την poly(A) ουρά και από τρία ORFs. Το ORF 1 έχει μέγεθος 185 kDa και κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την αναπαραγωγή, δηλαδή τη μεθυλοτρανσφεράση, την τύπου παπαΐνης πρωτεάση, την ελικάση και την RdRp, το ORF 2 έχει μέγεθος 40 kDa και κωδικοποιεί την MP και το ORF 3 έχει μέγεθος 24 kDa και κωδικοποιεί την CP του ιού. Το 5' άκρο και το 3' άκρο αποτελούνται από μία αμετάφραστη περιοχή (UTR) με μέγεθος 74 και 184 nt (Russo et al., 2009). Η πρώτη αναφορά έγινε το 1977 όπου απομονώθηκε από δείγματα πατάτας της ποικιλίας Antargui που συλλέχθηκαν στο Περού (Harrison, 1977).



**Εικόνα 1.19:** Γονιδιακή οργάνωση του γένους *Terovirus*. Αποτελείται από τρία ORF. MT: methyltransferase- μεθυλοτρανσφεράση, Pro: πρωτεάση, HEL: ελικάση, RdRp: πολυμεράση, MP: πρωτεΐνη μετακίνησης, CP: καψιδιακή πρωτεΐνη. Προσαρμογή από <https://viralzone.expasy.org/>



## Μετάδοση

Μεταδίδεται με τη γύρη, τον σπόρο (*D. Stramonium*) και μηχανικά στο εργαστήριο (Martelli, 2009; Harrison, 1977), ενώ οι προσπάθειες για αφιδομετάδοση δεν είχαν επιτυχία (Harrison, 1977).

## Συμπτώματα

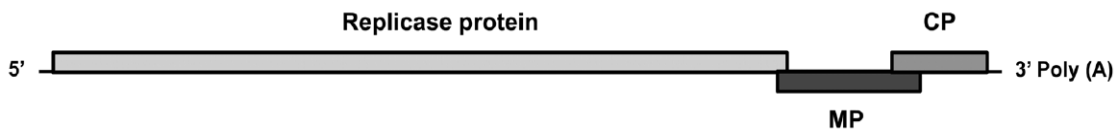
Ο ιός φαίνεται πως προκαλεί διασυστηματική νέκρωση στην ποικιλία *P. vulgaris* cv. Pinto με συχνότητα εμφάνισης 14%. Επίσης προκαλεί συμπτώματα σε φυτοδείκτες (Πιν. 1.8) (Harrison, 1977).

**Πίνακας 1.8:** Τα σημαντικότερα είδη για διατήρηση και διάγνωση του Potato virus T και τα συμπτώματα που εμφανίζονται. Προσαρμοσμένος από (Harrison, 1977).

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΕΙΔΟΣ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	
		ΤΟΠΙΚΑ	ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΑ
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	χλωρωτικές κηλίδες	παραμορφώσεις, νεκρώσεις
	<i>Chenopodium quinoa</i>	χλωρωτικές κηλίδες το χειμώνα	το μωσαϊκό το καλοκαίρι, νέκρωση το χειμώνα
	<i>Datura stramonium</i>	ασυμπτωματική μόλυνση	μωσαϊκό
	<i>Nicotiana debneyi</i>	ασυμπτωματική μόλυνση	μωσαϊκό, νεκρωτικές κηλίδες
	<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. The Prince	νεκρωτικές κηλίδες	παραμορφώσεις, νεκρώσεις, μωσαϊκό
	<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto	νεκρωτικές κηλίδες	νεκρώσεις κορυφής

### 1.9.2 Prunus virus T (PrVT)

Η πρώτη αναφορά του ιού έγινε το 2015. Δείγματα κερασιάς που συλλέχθηκαν στην Ιταλία και δαμασκηνιάς που συλλέχθηκαν στο Αζερμπαϊτζάν, εξετάστηκαν με NGS. Η οργάνωση του γονιδιώματος παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με την οικογένεια Betaflexiviridae. Αποτελείται από τρία ORF μεγέθους 1,779aa, 384aa, 222aa και κωδικοποιούν την ρεπλικάση, την MP και την CP αντίστοιχα (Εικ. 1.20). Απαιτείται ακόμα περαιτέρω έρευνα για τον χαρακτηρισμό του ιού (Marais et al., 2015).



**Εικόνα 1.20:** Γονιδιακή οργάνωση του *Prunus virus T*. Αποτελείται από τρία ORFs που κωδικοποιούν την ρεπλικάση, την πρωτεΐνη μετακίνησης και την καψιδιακή πρωτεΐνη (Marais et al., 2015).

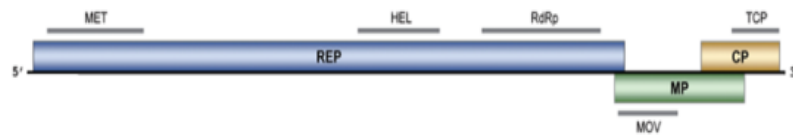
### 1.9.3 Cherry virus T (ChVT)

Ο ιός απομονώθηκε από δέντρο βυσσινιάς (*Prunus cerasus*, cv. Amarelka Chvalkovicka) το οποίο δεν παρουσίαζε συμπτώματα. Το γονιδίωμα έχει μήκος 6.847nt και αποτελείται από τρία ORFs, τα οποία κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αναπαραγωγή του ιού (Marais et al., 2020). Οι προσπάθειες για μηχανική μετάδοση σε φυτοδείκτες δεν ήταν επιτυχείς και οι δοκιμές εμβολιασμού απέτυχαν. Χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για συμπεράσματα πάνω στην παθογένεια του ιού (Marais et al., 2020).

### 1.9.4 Zostera virus T (ZoVT)

Ο ιός απομονώθηκε από φύκος του είδους *Zostera muelleri*. Το γονιδίωμά του, όπως και στους υπόλοιπους ιούς του γένους Terovirus αποτελείται από τρία ORFs. Το ORF1 μεγέθους 1826 aa κωδικοποιεί τη μεθυλοτρανσφεράση, την ελικάση και την RdRp που σχετίζονται με την αναπαραγωγή του ιού, το ORF2 μεγέθους 398aa

κωδικοποιεί την MP και το ORF3 μεγέθους 240αα κωδικοποιεί την CP (Εικ. 1.21) (Goh et al., 2019).



**Εικόνα 1.21:** Γονιδιακή οργάνωση του *Zostera virus T*, όπου *MT*: methyltransferase-μεθυλοτρανσφεράση, *HEL*: ελικάση, *RdRp*: πολυμεράση, *MP*: πρωτεΐνη μετακίνησης, *CP*: καψιδιακή πρωτεΐνη (Goh et al., 2019).

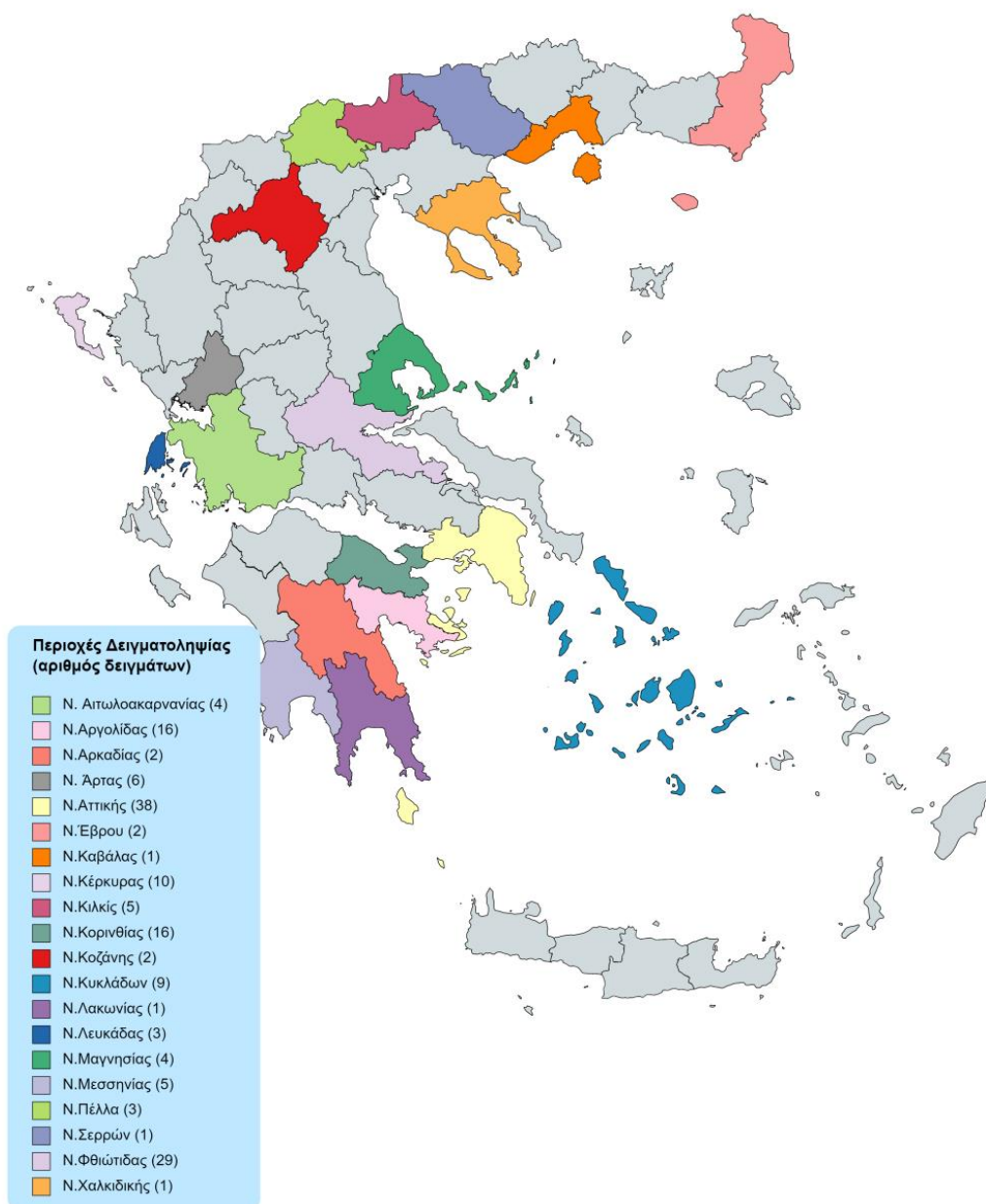
## Σκοπός της μελέτης

Η ελιά έχει βρεθεί να προσβάλλεται από τουλάχιστον 15 ιούς παγκοσμίως οι οποίοι, αν και συχνά απαντώνται σε λανθάνουσες μολύνσεις, μπορεί να προκαλούν και σημαντικές ασθένειες και να επηρεάζουν αρνητικά την καλλιέργεια. Για το σκοπό αυτό σε όλες τις ελαιοπαραγωγικές χώρες πραγματοποιούνται, εδώ και χρόνια, μελέτες για την καταγραφή και χαρακτηρισμό των ιών της ελιάς. Σε αντίθεση, ελάχιστα στοιχεία είναι γνωστά για την παρουσία ιών στις καλλιέργειες ελιάς στη χώρα μας, παρά το γεγονός ότι αυτή αποτελεί για την τρίτη μεγαλύτερη ελαιοπαραγωγική χώρα στην Ευρωπαϊκή Ένωση και η ελαιοκαλλιέργεια έχει μεγάλη οικονομική σημασία. Για αυτό στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η διερεύνηση της φυτοϋγείας, από άποψη παρουσίας ιών, των ελληνικών ελαιοκαλλιεργειών, καθώς και η μελέτη της μοριακής παραλλακτικότητας των ιών που απαντώνται. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες μολυσματικότητας και βιολογικού χαρακτηρισμού ενός νέου ιικού είδους, που ανιχνεύθηκε σε ελληνικά ελαιόδεντρα στα πλαίσια μιας ευρύτερης μελέτης ανάλυσης του ιώματος (virome) της ελιάς, με τη χρήση αλληλούχισης υψηλής απόδοσης (HTS).

## Κεφάλαιο 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 Επισκοπήσεις - Δειγματοληψίες

Για την διερεύνηση της παρουσίας γνωστών, αλλά και νέων ιών της ελιάς και τη συλλογή απομονώσεων για περαιτέρω μελέτη, έγιναν επισκοπήσεις σε ελαιώνες, αλλά και σε μεμονωμένα, μεγάλης ηλικίας, δένδρα, σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας από το 2017 έως το 2020. Καθώς στην πλειονότητά τους, τα προσβεβλημένα από ιούς ελαιόδεντρα είναι ασυμπτωματικά, η δειγματοληψία αφορούσε τυχαία επιλεγμένα δένδρα, ανεξάρτητα από την ύπαρξη συμπτωμάτων, αν και γινόταν καταγραφή της ύπαρξης πιθανών αποκλίσεων. Από κάθε δένδρο έγινε συλλογή διάφορων τμημάτων του, καθώς η συγκέντρωση των ιών δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένη (Loconsole et al., 2010; Bertolini et al., 2003). Συλλέχθηκαν μονοετείς και διετείς βλαστοί, μήκους 30-40 cm, από τέσσερα έως έξι σημεία της περιμέτρου της κόμης, ώστε το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό της ανισοκατανομής των ιών (Al Rwahnih et al., 2011). Οι δειγματοληψίες έγιναν κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου και της άνοιξης, εποχές που οι ιοί έχουν υψηλότερο τίτλο στην ελιά και θεωρείται πιο αξιόπιστη η ανίχνευσή τους (Bertolini et al., 2003). Συλλέχθηκαν από 5 έως 10 δείγματα ανά ελαιώνα, ενώ έγινε δειγματοληψία και από μεμονωμένα δένδρα στην περίπτωση δένδρων μεγάλης ηλικίας και συμβολικής σημασίας. Τα δείγματα μετά τη συλλογή τοποθετήθηκαν άμεσα στους 4°C (Zellama et al., 2018). Συνολικά συλλέχθηκαν 139 δείγματα από ελαιώνες που βρίσκονται σε 19 νομούς της χώρας τα έτη 2018-2020 (Εικ. 2.1, Πίν. 2.1). Επιπλέον, έγινε έλεγχος 19 δέντρων μεγάλης ηλικίας («αρχαίες ελιές») από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, που συλλέχθηκαν το 2017 (Πίν. 2.2).



**Εικόνα 2.1:** Νομοί της χώρας όπου πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες σε ελαιώνες για τη διερεύνηση της παρουσίας ιών ελιάς και ο αριθμός δειγμάτων που συλλέχθηκε από κάθε νομό (βλέπε υπόμνημα).

**Πίνακας 2.1:** Αναλυτικά στοιχεία δειγματοληψιών (νομοί, αριθμός αγρών και δειγμάτων ανά νομό) που πραγματοποιήθηκαν την περίοδο 2017-2020, για τη διερεύνηση της παρουσίας ιών της ελιάς στην παρούσα μελέτη.

Νομός	Περιοχή	Αριθμός αγρών	Συνολικός αριθμός δειγμάτων
<b>Αιτωλοακαρνανίας</b>	Μενίδι	1	2
	Βόνιτσα	1	1
<b>Αργολίδας</b>	Αρχαίο Ηραίο	1	5
	Μυκήνες	1	5
	Νεμέα	1	5
<b>Αρκαδίας</b>	Κούτρουφα	1	2
<b>Άρτας</b>	Άρτα	1	2
	Κόπρανα	1	4
<b>Αττικής</b>	Παιανία	6	31
	Μέγαρα	1	5
<b>Κέρκυρας</b>	Κέρκυρα	2	10
<b>Κιλκίς</b>	Εύρωπος	1	5
<b>Κορινθίας</b>	Αρχαίες Κλεωνές	1	5
	Σπαθοβούνι	1	5
	Νεμέα	1	5
<b>Κυκλάδων</b>	Μύκονος	1	6
	Κίμωλος	1	2
<b>Λευκάδας</b>	Λευκάδα	1	3
<b>Μαγνησίας</b>	Νέος Πλάτανος	1	3
<b>Μεσσηνίας</b>	Μεσσηνία	1	5
<b>Πέλλας</b>	Μεγαπλάτανος	1	1



Νομός	Περιοχή	Αριθμός αγρών	Συνολικός αριθμός δειγμάτων
	Αριδαίας		
Φθιώτιδας	Λαμία	1	17
	Ράχες	1	5
	Αχινός	1	5
<b>Σύνολο</b>			<b>139</b>

*Πίνακας 2.2: Ελιές μεγάλης ηλικίας («αρχαίες ελιές» ή συμβολικής αξίας) που συλλέχθηκαν εκτός συστηματικών ελαιώνων, το 2017.*

Νομός	Περιοχή	Αριθμός δειγμάτων
Αιτωλοακαρνανίας	Αγρίνιο	1
Αργολίδας	Μυκήνες	1
Αττικής	Πόρος	1
Αττικής	Τροιζηνία	1
Έβρος	Νέα Μάκρη	2
Καβάλας	Οφρύνιο	1
Κοζάνης	Κοιλάδα Αλιάκμονα	2
Κορινθίας	Κιάτο	1
Κυκλάδων	Νάξος	1
Λακωνίας	Γύθειο	1
Μαγνησίας	Βόλος	1
Πέλλας	Μεγαπλάτανος	2
Σερρών	Σέρρες	1
Φθιώτιδας	Στυλίδα	1
	Ράχες	1
Χαλκιδικής	Ιερισσός	1
<b>Σύνολο</b>		<b>19</b>

**Διαχείριση δειγμάτων:** Τα δείγματα που συλλέχθηκαν χωρίστηκαν σε τρία, προς ανάλυση, υποδείγματα: α) δείγματα φύλλων που περιλάμβαναν μέρος του φύλλου και του κεντρικού νεύρου, β) δείγματα καρπού και ανθέων (όπου αυτά υπήρχαν) και γ) δείγματα φλοιού (cortical scrapings) (Πίν. 2.3, 2.4). Τα υποδείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C, ως φρέσκος, αλλά και ως λυοφιλιωμένος ιστός.

## **2.2 Ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών της ελιάς**

### **2.2.1 Ανίχνευση ενός νέου ιού του γένους *Terovirus***

Για τη διερεύνηση του ιικού προφίλ (virome) της ελιάς χρησιμοποιήθηκε η αλληλούχιση υψηλής απόδοσης (HTS) και αναλύθηκαν ορισμένα δείγματα ελιάς, που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της χώρας. Η ανάλυση έγινε από τους Δρς Stephan Winter και Paolo Margaria, στο Εργαστήριο Ιολογίας, του Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)), στη Γερμανία. Σε δένδρο ποικιλίας Αμφίσσης που συλλέχθηκε από ελαιώνα στην περιοχή της Λαμίας, το 2017, ανιχνεύθηκε ένας νέος ιός που παρουσιάζει ομοιότητες με ιούς του γένους *Terovirus*, αλλά διαφοροποιείται από τους ήδη γνωστούς ιούς του γένους. Για τον ιό αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητές και στην παρούσα διατριβή, αναπτύχθηκε πρωτόκολλο για την μοριακή του ανίχνευση το οποίο και εφαρμόστηκε στις επισκοπήσεις, όπως περιγράφεται παρακάτω. Το όνομα που προτείνεται για τον ιό είναι είναι olive virus T (OIVT).

## **2.3 Μοριακή ανίχνευση ιών**

Για την ανίχνευση των ιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription) - αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction) (RT-PCR). Τα δείγματα ελέγχθηκαν για τους ιούς ArMV, CLRV, OLRV, CMV, TMV, OLV-1, OMMV, TNV-D, OLV-2, OLV-3, OLYaV, SLRSV που προσβάλλουν την ελιά, καθώς και για τον νέο Τερο-ιό που ανιχνεύθηκε σε ελληνικές ελιές. Στις δοκιμές δεν συμπεριλήφθηκαν οι OLYaV, OLYMDaV, OSLV,

καθώς δεν υπάρχουν δημοσιευμένοι εκκινητές και πρωτόκολλα για την ανίχνευσή τους.

Συνολικά, η διαδικασία της ανίχνευσης περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- Εξαγωγή ολικού RNA
- Μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA, με φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου (Nanodrop)
- Έλεγχος της ποιότητας του RNA, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT) ή σύνθεση συμπληρωματικού κλώνου DNA (cDNA synthesis)
- Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)
- Οπτικοποίηση του προϊόντος της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.
- Καθαρισμός των προϊόντων της PCR και μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA
- Αλληλούχιση (Sequencing) και φυλογενετική ανάλυση

### 2.3.1 Εξαγωγή ολικού RNA

Η εξαγωγή καλής ποιότητας και υψηλής καθαρότητας RNA από φυτικό υλικό ελιάς παρουσιάζει δυσκολία εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητάς της σε έλαια, πολυσακχαρίτες, φαινολικές ενώσεις και αναστολείς της PCR (Bertolini et al., 2001). Στη μελέτη αυτή δοκιμάστηκαν τέσσερις διαφορετικοί τρόποι και πρωτόκολλα εκχύλισης ολικού RNA: α) με χρήση του αντιδραστηρίου TRI - REAGENT® (Sigma – Aldrich), β) με τη χρήση του πρωτοκόλλου CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) με τροποποιήσεις του εργαστηρίου DSMZ (Sambrook, 2001), γ) με το kit RNeasy PowerPlant Kit (Qiagen), και δ) με το kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen)(εικ). Έγινε εκχύλιση ολικού RNA ίδιων δειγμάτων με τα διαφορετικά kit της Qiagen.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε σε κάθε περίπτωση είχε ως εξής:

#### ***Εξαγωγή ολικού RNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI - REAGENT® (Sigma – Aldrich)***

Σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο.

1. Λειοτριβήση 50 - 100 mg ιστού με υγρό άζωτο έως τη δημιουργία πούδρας και τοποθέτηση σε σωληνάριο τύπου erpendorf 1,5 ml
2. Προσθήκη 800 - 1000 μl Trizol και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
3. Προσθήκη 200 μl χλωροφόρμιο, έντονη ανάδευση και επώαση σε πάγο για 5 min
4. Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4°C, για 15 min
5. Μεταφορά της υδατινής φάσης σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf 1,5 ml
6. Προσθήκη 500 μl παγωμένης ισοπροπανόλης, ελαφρά ανακίνηση και επώαση στον πάγο για 10 min (σχηματισμός πελέτας)
7. Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm, στους 4°C για 10 min
8. Απόρριψη του υπερκείμενου, προσθήκη 1000 μl παγωμένης αιθανόλης 75% και έντονη ανάδευση
9. Φυγοκέντρηση στις 8.200 στροφές ανά λεπτό, στους 4°C για 5 min.
10. Απόρριψη του υπερκείμενου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 - 10 min για το στέγνωμα της πελέτας
11. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 30 μl αποστειρωμένου διπλά απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O) με επώαση στους 60°C για 10 - 15 min
12. Μέτρηση της ποσότητας και καθαρότητας του RNA στο nanodrop.
13. Αποθήκευση του RNA στους - 80°C

### ***Εξαγωγή ολικού RNA με τη χρήση CTAB***

1. Λειοτριβήση 0,3 gr ιστού με υγρό άζωτο έως τη δημιουργία πούδρας
2. Προσθήκη 1ml από το buffer CTAB  
*[2g cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 8,18g Sodium chloride (NaCl), 200μl β-mercaptoethanol (β-ME), 0,744g Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10ml Tris hydrochloride (Tris-HCl), pH 8, συμπλήρωση με αποστειρωμένο διπλά απεσταγμένο νερό μέχρι τα 100ml]*
3. Μεταφορά 0,7 ml εκχυλίσματος σε σωληνάριο τύπου erpendorf
4. Προσθήκη 50 μl Sodium dodecyl sulfate (SDS) 20%
5. Έντονη ανάδευση (vortex)
6. Επώαση στους 65°C, για 15 min
7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, για 2 min

8. Προσθήκη 250 μl 5M παγωμένου Potassium Acetate και έντονη ανάδευση
9. Επώαση σε πάγο, για 20 min
10. Φυγοκέντρηση στις 13300 στροφές ανά λεπτό, για 10 min
11. Μεταφορά 600 μl του υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf
12. Προσθήκη 600 μl παγωμένης ισοπροπανόλης και ανάμιξη με ελαφριά ανάδευση
13. Επώαση στους -20°C, για 30 min
14. Φυγοκέντρηση στις 13300 στροφές ανά λεπτό, για 5 min
15. Απόρριψη του υπερκειμένου και στέγνωμα της πελέτας
16. Διάλυση της πελέτας με 50μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O)
17. Μέτρηση της ποσότητας και καθαρότητας του RNA στο nanodrop.
18. Αποθήκευση του RNA στους - 80°C

#### ***Εξαγωγή ολικού RNA με τη χρήση του RNeasy Power Plant kit (Qiagen)***

1. Ζύγιση ποσότητας ιστού περίπου 0,1 gr και λειοτριβήση με υγρό N έως τη δημιουργία πούδρας
2. Μεταφορά πούδρας σε ειδικό σωληνάριο (Power Bead tube)
3. Προσθήκη 550 μl διαλύματος MBL/β-ME και 50 μl διαλύματος PSS και έντονη ανάδευση (vortex) για 2 min
4. Φυγοκέντρηση σε 11.000 στροφές ανά λεπτό, για 2 min, σε θερμοκρασία δωματίου
5. Μεταφορά υπερκειμένου (≈ 500-600 μl) σε σωλήνα τύπου erpedorf των 2 ml
6. Προσθήκη 200 μl διαλύματος IRS και έντονη ανάδευση (vortex) στους 2-8°C, για 5 min
7. Φυγοκέντρηση σε 11.000 στροφές ανά λεπτό για 2 min
8. Μεταφορά του υπερκειμένου (όχι περισσότερο από 650 μl) σε σωλήνα τύπου erpedorf των 2 ml
9. Προσθήκη 650 μl διαλύματος PM3 και 650 μl διαλύματος PM4 και έντονη ανάδευση (vortex)
10. Μεταφορά 650 μl από το υπερκείμενο υγρό στην ειδική στήλη (MB RNA spin column)
11. Φυγοκέντρηση σε 11.000 στροφές ανά λεπτό για 1 min, απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση του σωλήνα. Επανάληψη της διαδικασίας μέχρι να περάσει όλη η ποσότητα του διαλύματος από τη στήλη

12. Προσθήκη 600 μl διαλύματος PM5 στη στήλη (MB RNA spin column) που φέρει σωλήνα συλλογής διηθήματος, φυγοκέντρηση σε 11.000 στροφές ανά λεπτό για 1 min και απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση του σωλήνα
13. Προσθήκη 650 μl διαλύματος PM4, φυγοκέντρηση σε 13.000 στροφές ανά λεπτό για 1min, απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση του σωλήνα
14. Φυγοκέντρηση σε 13.000 στροφές ανά λεπτό για 2 min
15. Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωλήνα των 2 ml, προσθήκη 100 μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O) για έκλυση του RNA και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου
16. Φυγοκέντρηση σε 11.000 στροφές ανά λεπτό για 1 min
17. Μέτρηση της ποσότητας και καθαρότητας του RNA στο nanodrop
18. Αποθήκευση RNA στους - 80°C

### **Εξαγωγή ολικού RNA με τη χρήση του RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) (εικ)**

1. Ζύγιση 0,1 gr φυτικού ιστού
2. Λειοτριβήση του ιστού με υγρό άζωτο σε γουδί έως της δημιουργία πούδρας και μεταφορά της σε σωλήνα τύπου erpedorf των 2 ml
3. Προσθήκη 450 μl διαλύματος λύσης (RLT) και έντονη ανάδευση (vortex)
4. Παραμονή για 1-3 min, σε θερμοκρασία 56°C
5. Μεταφορά του διαλύματος στη ειδική στήλη (QIA shredder) που φέρει σωλήνα συλλογής διηθήματος
6. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 14.000 στροφές ανά λεπτό, για 2 min, στους 4°C
7. Μεταφορά του υπερκείμενου που έχει συλλεχθεί στον σωλήνα διηθήματος του QIA shredder (400 μl), χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα, σε νέο σωλήνα τύπου erpedorf των 2 ml
8. Προσθήκη 0,5 vol (200 μl) αιθανόλης 100% και διάλυση της πελέτας με ανάμιξη με πιπέτα
9. Μεταφορά του διαλύματος (≈650μl) στην ειδική



**Εικόνα 2. 2:** Διαδικασία εκχύλισης ολικού RNA με τη χρήση του RNeasy Plant Mini kit (προσαρμογή από Qiagen <https://www.qiagen.com/>)

στήλη (RNeasy spin) με σωλήνα συλλογής διηθήματος και φυγοκέντρηση σε 10.000 στροφές ανά λεπτό, για 15sec

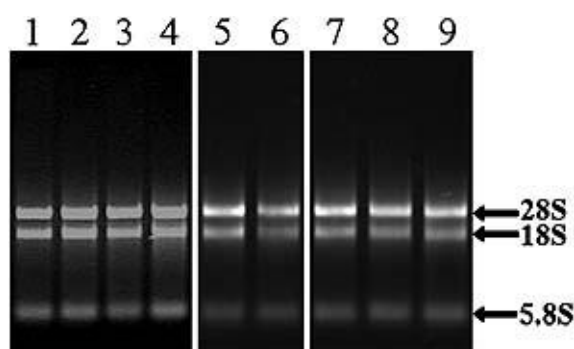
10. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση του σωλήνα
11. Προσθήκη 700 μl διαλύματος RW1 και φυγοκέντρηση σε 10.000 στροφές ανά λεπτό για 15sec, απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση του σωλήνα
12. Προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE στη στήλη και Φυγοκέντρηση σε 10.000 rpm για 15 sec, απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση του σωλήνα
13. Προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE στη στήλη και φυγοκέντρηση σε 10.000 στροφές ανά λεπτό για 2 min
14. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf των 1,5 ml και προσθήκη 50 μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O) στη στήλη
15. Φυγοκέντρηση σε 10.000 στροφές ανά λεπτό για 1 min για έκλυση του RNA και λήψη του διηθήματος
16. Μέτρηση της ποσότητας και καθαρότητας του RNA στο nanodrop
17. Αποθήκευση του RNA στους – 80°C

### **2.3.2 Έλεγχος της ποιότητας και προσδιορισμός της ποσότητας του RNA**

**Μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου (Nanodrop).** Ύστερα από την εξαγωγή του ολικού RNA έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητάς του σε φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου (Nanodrop 1000) της εταιρείας ThermoFischer. Τα αποτελέσματα από τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Nanodrop, είναι η συγκέντρωση του ολικού RNA σε ng/μL και οι λόγοι 260/280 και 260/230. Ο λόγος 260/280 με την τιμή 2,00 υποδηλώνει διάλυμα καθαρού RNA και ο λόγος 260/230 με τιμή >2,00 υποδηλώνει την καθαρότητα του ολικού RNA από πρωτεΐνες, άλατα, φαινόλες και υδατάνθρακες (Warburg & Christian, 1942).

**Ηλεκτροφόρηση του RNA σε πηκτή αγαρόζης.** Για την αξιολόγηση της ποιότητας του εξαγόμενου RNA έγινε προσδιορισμός της ποιότητας του με μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop1000 της εταιρείας ThermoFischer. Ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο έλεγχος έγινε σε πηκτή αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris base 2M,

acetic acid 1M, EDTA 50 mM). Στην πηκτή αγαρόζης προστέθηκε επιπλέον 1% φθορίζουσας χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium Bromide, EtBr). Για κάθε δείγμα σε ποσότητα περίπου 1500 ng RNA, προστέθηκαν 4 μl χρωστικής (Gel Loading Dye, Purple 6X, NEB) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 20 μl. Η τάση της ηλεκτροφόρησης ήταν στα 90-100 volt και ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης ήταν 30-40 min. Ο έλεγχος της ποιότητας του ολικού RNA στηρίζεται στην εμφάνιση τριών ζωνών οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις τρεις ριβοσωμικές του μονάδες 28 S, 18 S και 5,8 S με την εφαρμογή UV ακτινοβολίας στην πηκτή αγαρόζης (Εικ. 2.3).



**Εικόνα 2.3:** Οι τρεις ριβοσωμικές μονάδες (28 S, 18 S και 5,8 S) του RNA (Wang et al., 2012)

### 2.3.3 Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription, RT) - Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA Synthesis)

Για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (complementary DNA - cDNA) χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο RevertAid H Minus Reverse Transcriptase της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, που είναι μια ανασυνδυασμένη Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) ανάστροφη τρανσκριπτάση .

Το πρωτόκολλο της αντίστροφης μεταγραφής είχε ως εξής, για κάθε δείγμα:

- Σε σωληνάριο τύπου erpendorf (1,5 mL) προστίθεται 0,1-500 ng ολικά εξαγόμενου RNA
- Στο ίδιο σωληνάριο προστίθενται τυχαίοι εκκινητές (random primers, Promega) 0,4 μl (100 pmol)
- Προστίθεται ddH<sub>2</sub>O με τελικό όγκο τα 12,5 μl – γίνεται ανάδευση και φυγοκέντρηση του σωληναρίου



- Επώαση στους 65°C, για 5 min
- Στο σωληνάριο προστίθενται 4μl 5x Buffer, 0,5 μl RNase inhibitor (20U), 2 μl dNTPs και 1μl Revert Aid – γίνεται ανάδευση και γρήγορη φυγοκέντρηση (spin down)
- Επώαση του σωληναρίου στους 25° C για 10 min, στη συνέχεια στους 42° C για 60 min και τέλος στους 70° C για 10 min για αδρανοποίηση του ενζύμου
- Αποθήκευση του cDNA στους – 20°C

#### **2.3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Εκκινητές για την ανίχνευση γνωστών ιών της ελιάς. Για την ανίχνευση των ιών της ελιάς επιλέχθηκαν οι δημοσιευμένοι εκκινητές και οι περιοχές στόχοι που αναφέρονται στον Πίνακα 2.3. Για την γενική ανίχνευση των ιών OMMV και TNV-D που ανήκουν στο γένος Necrovirus, χρησιμοποιήθηκε επιπλέον το ζεύγος γενικών εκκινητών TNVcons (Verdin et al. 2018).

**Εκκινητές για την ανίχνευση του OIVT.** Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν από τους ερευνητές του DSMZ στοχεύουν τμήμα των γονιδίων της πρωτεΐνης μετακίνησης (MP) και της καψιδιακής πρωτεΐνης (CP) του νέου *Tero*-ιού, με αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 380 ζεύγη βάσεων (base pairs, bp).

OIVT\_For                                5'-GGAGTTTCCTTCGGTCCCAT-3'

OIVT\_Rev                                5'-TGAGCAGCGTCTGAGAACTG-3'

**Πίνακας 2.3:** Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μοριακή ανίχνευση ιών της ελιάς. Δίνεται η αλληλουχία των εκκινητών, η περιοχή ενίσχυσης, το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος, η θερμοκρασία υβριδοποίησης (Ta) και η σχετική βιβλιογραφική πηγή κάθε ζεύγους εκκινητών.

Ιός	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' - 3')	Περιοχή ενίσχυσης	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Θερμοκρασία υβριδοποίησης (Ta)	Πηγή
<b>OMMV</b>	OMMVd5'	CCGTGCCAAA CACAATCTC	RdRp και CP	934	54°C	Zellama et al. 2018 Varanda et al. 2010 <sup>1</sup>
	OMMVd3'	GCTTAGCCCA GAAGATCTAG G				
<b>TNV-D</b>	TNVD-polF	CGGCGGGGAC TAGTGAACG	RdRp	703	52°C	Verdin et al. 2018
	TNVD-polR	CACCAGACAT CCTGCATCCC				
	TNVcons-f	GGGGMYTRRT GGAAMGAKT AT	RdRp	698	57°C	
	TNVcons-r	CATGTCHCCRS WCATYCTRCA WCCC				
<b>TNV-A</b>	TNV-A5'	CCAGTGGATC AATTGCCATG	CP	552	54°C	Zellama et al. 2018
	TNV-A3'	CAGGGTCTGC CAAGGTCTTG TG				
<b>OLV1</b>	PB	TTTCACCCAC CAAATGGC	3'terminal	747	54°C	Grieco et al. 1996, 2002 <sup>1</sup> ,Zellama et al. 2018
	PA	CTCACCCATCG TTGTGTGG				
<b>ARMV</b>	ARMV-5	TTGGTTAGTG AATGGAACGG	CP	504	50°C	Grieco et al. 2002, 1995 <sup>1</sup>
	ARMV-3	TCAACTCACCC TCCAAATCCC				

Ιός	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' - 3')	Περιοχή ενίσχυσης	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Θερμοκρασία υβριδοποίησης (Ta)	Πηγή
<b>SLRSV</b>	SLRSV-5	TCAAGGAGAA TATCCCTGGCC C	CP	525	50°C	Grieco et al. 2002
	SLRSV-3	CTAAGTGCCA GAACTAAACC				
<b>CMV</b>	CMV-5	TAACCTCCCA GTTCTCACCGT	RdRp	513	50°C	Grieco et al. 2002
	CMV-3	CCATCACCTTA GCTTCCATGT				
<b>CLRV</b>	CLRV-5	TTGGCGACCG TGTAACGGCA	CP	416	50°C	Faggioli et al., 2005, Werner et al., 1997, Loconsole 2010
	CLRV-3	GTCGGAAAGA TTACGTAAAA GG				
<b>OLRSV</b>	OLRSV5'	CTGCAAACT AGTGCCAGAG G	3'- terminal	492	50°C	Alkowni et al. 2000, Grieco et al. 2002
	OLRSV3'	TGCATAAGGC TCACAGGAG				
<b>OLYaV</b>	OLYaV-1	GGGACGGTTA CGGTCGAGAG	HSP70h	383	55°C	Sabanadzovic et al., 1999, Loconsole 2010
	OLYaV-2	CGAAGAGAGC GGCTGAAGGC TC				
<b>OLV-2</b>	OLV2-H	GAAGGTGGCT CGCCTAGAG	RdRp	206	50°C	Bertolini et al. 2001, Zellama et al. 2018
	OLV2-C	GCGAGGAGTT TGAGCTTTG				
<b>OLV-3</b>	OLV-3f	CCCGTTGAGC AAGTTGTCTTC C	RdRp	176	58°C	Alabdullah et al. 2009, Zellama et al. 2018
	OLV-3r	ACCGAACGCA ATTCAGCGTG CCG				

Ιός	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' - 3')	Περιοχή ενίσχυσης	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Θερμοκρασία υβριδοποίησης (Ta)	Πηγή
TMV	TMV5'	CGACATCAGC CGATGCAGC	replicase	880	60 °C	Kumar et al. 2011, Zellama et al. 2018
	TMV3'	ACCGTTTTCGA ACCGAGACT				

**Βελτιστοποίηση συνθηκών δοκιμών PCR.** Για τα ζεύγη εκκινητών των ιών OLYaV, CMV, SLRSV, TMV, CLRV και για τον OIVT και τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν για αυτήν την μελέτη, δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού και διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου μαγνησίου ( $MgCl_2$ ), ώστε να επιλεγούν οι καλύτερες συνθήκες με τα χρησιμοποιούμενα, στις παρούσες δοκιμές, ένζυμα. Σε κάθε περίπτωση οι θερμοκρασίες υβριδισμού που ελέγχθηκαν κατά τις δοκιμές βελτιστοποίησης επιλέχθηκαν και με βάση τις θερμοκρασίες τήξεως (melting temperature,  $T_m$ ) του κάθε ζεύγους εκκινητών, ενώ η συγκέντρωση του  $MgCl_2$  με βάση την αρχική του συγκέντρωση στο buffer της εταιρείας που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν 2mM. Για κάθε ζεύγος εκκινητών έγιναν δοκιμές με συγκέντρωση  $MgCl_2$  2- 2,5- 3 mM και θερμοκρασίες τήξεως 55-59-62°C για τον OLYaV, 50-55-59°C για τον CMV, 50-53-56°C για τον SLRSV, 58-60-62°C για τον TMV, 50-53-57 °C για τον CLRV και 52-55-58-60°C για τον OIVT για κάθε μία συγκέντρωση  $MgCl_2$ .

Για τα υπόλοιπα ζεύγη εκκινητών για τους ιούς ArMV, TNV-D/OMMV, OMMV, OLV-1, OLV-2, OLV-3 και OLRV οι θερμοκρασίες υβριδισμού υπολογίστηκαν με τον υπολογιστή της εταιρείας Thermo Fisher Scientific που τους κατασκεύασε και η συγκέντρωση χλωριούχου μαγνησίου ( $MgCl_2$ ) που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2 mM που είναι η προκαθορισμένη από το πρωτόκολλο του ενζύμου.

**Συνθήκες δοκιμής PCR.** Για την αντίδραση της PCR, σε μικροσωλήνα των 0,2ml χρησιμοποιήθηκε 1μl cDNA σε τελικό όγκο 50μl. Προστέθηκαν 5 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα, 1.25 U Dream Taq Hot Start DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 0.2 mM από κάθε dNTP, 0,2 μM από κάθε εκκινητή (Πιν. 2.3), 2- 3mM  $MgCl_2$  ανάλογα

με τις συνθήκες που απαιτεί κάθε ζεύγος εκκινητών (Πίν 2.4) και ddH<sub>2</sub>O έως τελικού όγκου 50 μl.

**Πίνακας 2.4:** Τελικές συγκεντρώσεις MgCl<sub>2</sub> (mM) που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές PCR για την ανίχνευση ιών της ελιάς και για τους OLYaV, CMV, SLRSV, TMV, CLRV και OIVT όπως προέκυψαν ύστερα από δοκιμές βελτιστοποίησης

Ιός	Εκκινητές	Συγκέντρωση (mM)	MgCl <sub>2</sub>
<b>OIVT</b>	OVTFor/ OVTRev	3	
<b>OLYaV</b>	OLYaV-1/ OLYaV-2	3	
<b>CMV</b>	CMV-5/CMV-3	3	
<b>SLRSV</b>	SLRSV-5/SLRSV-3	2,5	
<b>CLRV</b>	CLRV-5/CLRV-3	3	
<b>TNV-D/OMMV</b>	TNVcons-f/ TNVcons-r	2	
<b>TMV</b>	TMV5'/ TMV3'	3	
<b>ArMV</b>	ArMV-5/ArMV-3	2	
<b>OMMV</b>	OMMVd5'/ OMMVd3'	2	
<b>OLV-1</b>	PV/PA	2	
<b>OLV-2</b>	OLV2-H/ OLV2-C	2	
<b>OLV-3</b>	OLV-3f/ OLV-3r	2	
<b>OLRSV</b>	OLRSV5'/ OLRV3'	2	

Το θερμικό προφίλ της PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν: αρχική αποδιάταξη του εκμαγείου για 3 min στους 95°C, στη συνέχεια 35 κύκλοι αποτελούμενοι από τρία στάδια:

- i) αποδιάταξη του εκμαγείου στους 95°C για 30 sec,
- ii) υβριδοποίηση των εκκινητών με το εκμαγείο σε διαφορετική θερμοκρασία, ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών (Πίν 2.5) για 30 sec,
- iii) επέκταση των αλυσίδων στους 72°C για 1min,

και η αντίδραση ολοκληρώθηκε με επώαση για 5min στους 72°C. Χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής MiniAmp™ Plus Thermal Cycler, της εταιρείας ThermoFischer Scientific.

**Πίνακας 2.5:** Θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_m$ ) για κάθε ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές PCR για την ανίχνευση ιών της ελιάς και για τους OLYaV, CMV, SLRSV, TMV, CLRV και OIVT όπως προέκυψαν από δοκιμές βελτιστοποίησης

Ιός	Εκκινητές	$T_m$ (°C)
<b>OIVT</b>	OVTFor/ OVTRev	58
<b>OLYaV</b>	OLYaV-1/ OLYaV-2	59
<b>CMV</b>	CMV-5/CMV-3	55
<b>SLRSV</b>	SLRSV-5/SLRSV-3	56
<b>CLRV</b>	CLRV-5/CLRV-3	50
<b>consNecro</b>	TNVcons-f/ TNVcons-r	58
<b>TMV</b>	TMV5'/ TMV3'	58
<b>ArMV</b>	ArMV-5/ArMV-3	55
<b>OMMV</b>	OMMVd5'/ OMMVd3'	56
<b>OLV-1</b>	PV/PA	57
<b>OLV-2</b>	OLV2-H/ OLV2-C	56
<b>OLV-3</b>	OLV-3f/ OLV-3r	63
<b>OLRSV</b>	OLRSV5'/ OLRV3'	56

Στις δοκιμές PCR συμπεριλήφθηκαν και οι εξής μάρτυρες:

**noRT:** δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, για τον έλεγχο πιθανών επιμολύνσεις με εξωτερικό DNA

**noDNA:** δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O, και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο πιθανών επιμολύνσεων στα υλικά της δοκιμής

**Θετικός μάρτυρας:** από δείγμα μολυσμένο για τον εκάστοτε ιό που πιστοποιεί ότι η δοκιμή είναι επιτυχής και υποδεικνύει το μήκος του αναμενόμενου προϊόντος

**Αρνητικός μάρτυρας:** από δείγμα απαλλαγμένο τουλάχιστον από τον ιό που μελετήθηκε.

Ως υγιείς/αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε υλικό από δέντρα ελιάς των ποικιλιών arbequina και coratina τα οποία προήλθαν από εργαστήριο ιστοκαλλιέργειας από την Ιταλία (Vitroplant Italia Srl Società Agricola, [www.vitroplant.it](http://www.vitroplant.it)). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε α) για τους OLYaV και CLRV, RNA από το Εργαστήριο Ιολογίας του Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche ([www.ipsp.cnr.it](http://www.ipsp.cnr.it)) από την Ιταλία (ευγενική χορηγία της Dr M. Saponari), β) για τους TMV, ArMV, TNV-D και SLRSV λυοφιλομένος ιστός από το Εργαστήριο Ιολογίας του Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) από τη Γερμανία (ευγενική χορηγία του Dr S. Winter) και γ) για τους ArMV και CLRV, RNA από το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, της Γεωπονικής Σχολής, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (<http://lab.web.auth.gr/auth-labs>) (ευγενική χορηγία του Καθηγητή Ν.Ι. Κατή). Για τον νέο Τερο-ιό ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που κατασκευάστηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του DSMZ (Dr S. Winter), με κλωνοποίηση ενός τμήματος του γονιδιώματος (349bp, με τους εκκινητές που αναφέρθηκαν) με το pDrive Cloning Vector (Qiagen), από την πρώτη απομόνωσή του ιού από την περιοχή της Λαμίας. Για τους υπόλοιπους ιούς της ελιάς OMMV, OLV-1, OLV-2, OLV-3 και OLSRV δεν ήταν δυνατό να βρεθούν θετικά δείγματα.

**Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης.** Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική

αγαρόζης συγκέντρωσης 1,5% σε διάλυμα TAE (Tris base 2M, acetic acid 1M, EDTA 50 mM). Η τάση της ηλεκτροφόρησης ήταν 120 volt και ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης 20 min. Για τη σύγκριση των παραγόμενων ζωνών έγινε με προσθήκη ενός μοριακού δείκτη (ladder) 100bp της εταιρείας Takara.

**Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.** Για τον καθαρισμό των προϊόντων προς αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε το Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit της εταιρείας Macherey&Nagel. Ο καθαρισμός έγινε είτε απευθείας από το προϊόν της PCR, είτε με εξαγωγή από την πηκτή αγαρόζης στην περίπτωση που υπήρχαν παραπροϊόντα.

#### **Άμεσος καθαρισμός προϊόντων PCR**

- Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O στο σωληνάριο που βρίσκεται το προϊόν της PCR μέχρι τα 50 μl
- Ανάμιξη 100 μl διαλύματος NT1 με τα 50 μl του δείγματος (αναλογία 1:2) και μεταφορά στην ειδική στήλη που παρέχεται πάνω από σωληνάριο τύπου erpendorf (2 ml)
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 30 sec
- Απόρριψη του υποκείμενου υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης
- Προσθήκη 700 μl διαλύματος NT3
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 30 sec
- Απόρριψη του υποκειμένου υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης
- Προσθήκη 700 μl διαλύματος NT3
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 30 sec
- Απόρριψη του υποκειμένου υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 1 min
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf (2 ml)



- Επώαση στους 70°C για 2-5 min με ανοιχτό το καπάκι του σωληνάριου για απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf (1,5 ml)
- Προσθήκη 15-30 μl του διαλύματος NE
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 1 min
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 1 min
- Το καθαρό DNA εκλύεται στο σωληνάριο
- Αποθήκευση του καθαρού DNA στους -20°C

#### ***Εξαγωγή προϊόντων από την πηκτή αγαρόζης***

- Αποκοπή της ζώνης του προϊόντος από την πηκτή αγαρόζης, ζύγιση 0,001g και μεταφορά σε αποστειρωμένο σωληνάριο (1,5 ml)
- Προσθήκη διαλύματος NTI σε αναλογία 1:2 (100mg προϊόντος/200ml NTI)
- Επώαση στους 50°C για 5-10 min και έντονη ανάδευση ανά 2 min μέχρι να διαλυθεί τελείως το κομμάτι της πηκτής
- Μεταφορά του μίγματος στην ειδική στήλη που παρέχεται, πάνω από αποστειρωμένο σωληνάριο (2 ml)
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 30 sec
- Απόρριψη του υποκείμενου υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης
- Προσθήκη 700 μl διαλύματος NT3
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 30 sec
- Απόρριψη του υποκείμενου υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης
- Προσθήκη 700 μl διαλύματος NT3
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 30 sec
- Απόρριψη του υποκείμενου υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 1 min
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf (2 ml)
- Επώαση στους 70°C για 2-5 min με ανοιχτό το καπάκι του σωληνάριου για απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης

- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf (1,5 ml)
- Προσθήκη 15-30 μl του διαλύματος NE
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 1 min
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 1 min
- Το καθαρό DNA εκλύεται στο σωληνάριο
- Αποθήκευση του καθαρού DNA στους -20°C

Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων έγινε μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο για τον προσδιορισμό της ποιότητας του DNA όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.3.2.

## 2.5 Αλληλούχιση και φυλογενετική ανάλυση

Τα προϊόντα της PCR, έπειτα από καθαρισμό, αλληλουχήθηκαν στο Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, χρησιμοποιώντας τον αναλυτή 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Η διόρθωση των χρωματογραφημάτων των αλληλουχιών που αποκτήθηκαν στην παρούσα μελέτη έγινε με το Chromas (<https://technelysium.com.au>), όπου και αποκόπηκαν τα τμήματα των υβριδοποιημένων εκκινήτων. Η κοινή αλληλουχία (consensus) για κάθε απομόνωση αποκτήθηκε μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας benchling (<https://benchling.com/>). Για τον κάθε ιό η στοίχιση των αλληλουχιών μεταξύ τους, αλλά και με τις αντίστοιχες ελληνικές και ξένες αλληλουχίες, που επιλέχθηκαν από τη βάση δεδομένων NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), έγινε με το πρόγραμμα MEGA\_X\_10.0.5 (<https://www.megasoftware.net>) (Kumar et al., 2018). Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με βάση τον αλγόριθμο ClustalW, του ίδιου προγράμματος. Η ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των απομονώσεων και η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έγινε με τη μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood, ML) και η αξιοπιστία κάθε κλάδου αξιολογήθηκε με τη χρησιμοποίηση της μη παραμετρικής ανάλυσης bootstrap (NPB) ρυθμισμένη στις 1000 επαναλήψεις.

Για τη φυλογενετική ανάλυση του κάθε ιού χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες κατατεθειμένες στην βάση δεδομένων NCBI ως εξής: 84 του γονιδίου HSP70 του

OLYaV (Παράρτημα, Πιν. 1), 28 αλληλουχίες του γονιδίου RdRp του CMV (Παράρτημα, Πιν. 2), και 85 αλληλουχίες της περιοχής 3'UTR του CLRV (Παράρτημα, Πιν. 3) και 12 αλληλουχίες μέρους της περιοχής MP\_CP για τον ΟΙVΤ (Παράρτημα, Πιν. 4).

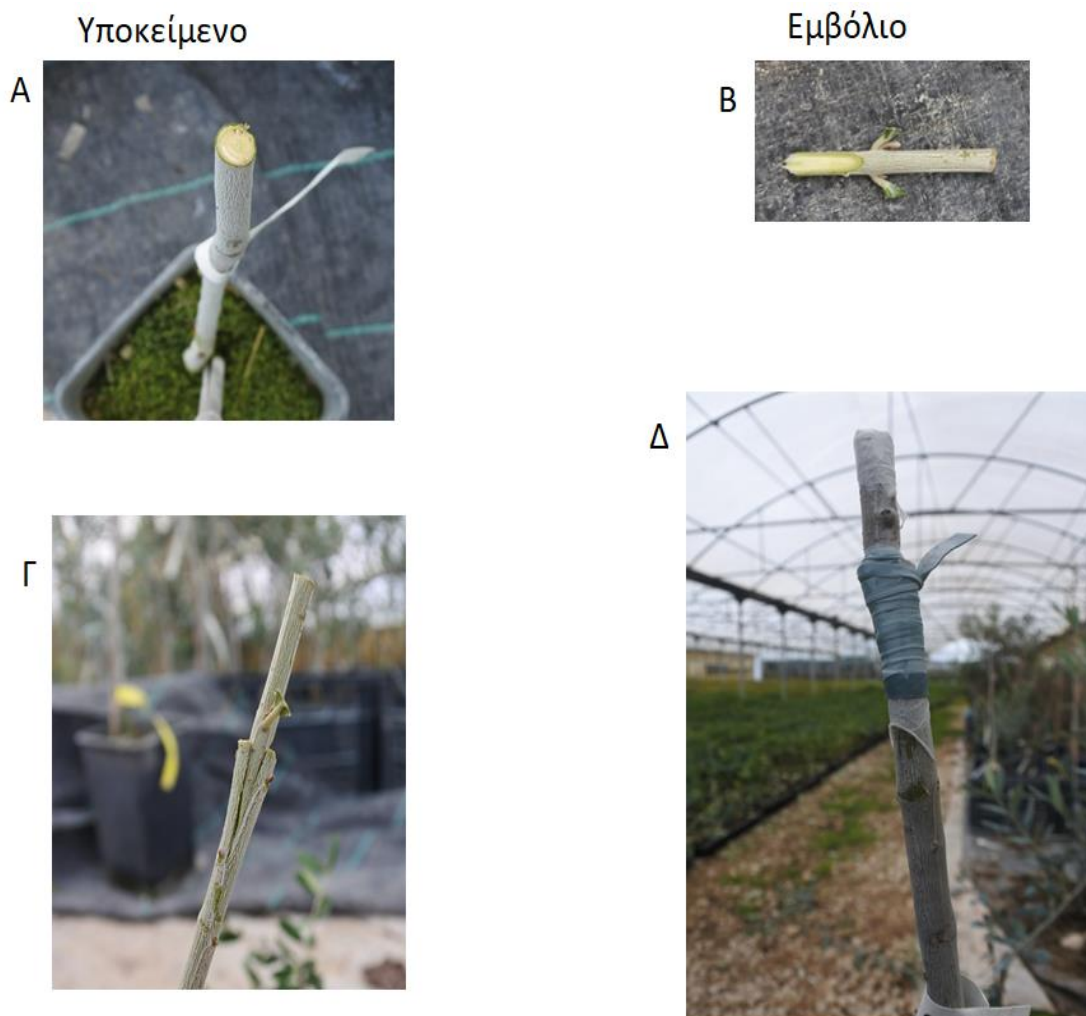
## 2.6 Δοκιμές μετάδοσης του ΟΙVΤ

**Δοκιμές μετάδοσης με εμβολιασμό.** Για τις δοκιμές εμβολιασμού του ΟΙVΤ, εμβόλια ελήφθησαν τέλη Φεβρουαρίου του 2020, από το αρχικά μολυσμένο δένδρο αγρού, όπου και ανιχνεύθηκε ο ιός. Τα δέντρα ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν ως υποκείμενα για τον εμβολιασμό προήλθαν από εργαστήριο παραγωγής πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού της Ιταλίας (Vitroplant Italia srl Soc. [www.vitroplant.it](http://www.vitroplant.it)) και από τα φυτώρια Κωστελαίνος ([www.kostelenosfytoria.gr](http://www.kostelenosfytoria.gr)). Για τους εμβολιασμούς χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποικιλίες: Τραγολιά, Μαυρολιά Μεσσηνίας, Κορωνέικη, Μαστοειδής, Arbequina, Arbosana, Ascolana, Frantoio, Seroka, Coratina. Οι εμβολιασμοί έγιναν με τη μέθοδο του σχιστού εγκεντρισμού («εμβολιασμός με καλέμι») (Εικ. 2.4). Οι βλαστοί/ εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκεντρισμό ήταν διαμέτρου 0,4 - 1 cm και τα υποκείμενα κατατομήθηκαν σε ύψος 20-30cm (Εικ. 2.4Α). Η προετοιμασία των εμβολίων έγινε με δύο αντιδιαμετρικές τομές, με κλίση προς το κέντρο της διατομής του βλαστού ώστε να δημιουργηθεί μια αμφίπλευρη σφήνα (Εικ. 2.4Β). Στα υποκείμενα έγινε τομή κάθετα στον άξονα του κορμού και τοποθετήθηκε το εμβόλιο εντός της τομής, με τρόπο που οι περιοχές του καμβίου του υποκειμένου να συμπιπτουν (Εικ. 2.4Γ). Το σημείο της ένωσης δέθηκε σφιχτά με λάστιχο και καλύφθηκε με μεμβράνη τύπου parafilm, η οποία τοποθετήθηκε και στην κορυφή του εμβολίου για προστασία (Εικ. 2.4Δ). Συνολικά εμβολιάστηκαν 45 δέντρα από τις διάφορες ποικιλίες (Πιν 2.6).

**Πίνακας 2.6:** Ποικιλίες και αριθμός δέντρων κάθε ποικιλίας που εμβολιάστηκαν με μολυσμένο με τον ΟΙΝΤ υλικό.

Ποικιλία	Αριθμός δέντρων
Κορωνέικη	3
Μαστοειδής	2
Μαυρολιά μεσσηνίας	3
Τραγολιά	2
Arbequina	17
Arbosana	4
Ascolana	3
Coratina	4
Frantoio	4
Sepoka	3
<b>Σύνολο</b>	<b>45</b>

Ο έλεγχος της παρουσίας του ιού στα εμβολιασμένα φυτά έγινε δύο φορές, έπειτα από διάστημα τριών μηνών και οχτώ μηνών. Από τους επιτυχημένους εμβολιασμούς συλλέχθηκαν δείγματα τόσο από το υποκείμενο, όσο και από τον βλαστό που μεγάλωνε από το εμβόλιο. Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν με RT-PCR όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.3.4.



**Εικόνα 2.4:** Η μέθοδος του σχιστού εγκεντρισμού («εμβολιασμός με καλέμι») που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές μετάδοσης με εμβολιασμό του νέου Τερο-ιού της ελιάς. Α) Καρατόμηση του υποκειμένου, Β) Προετοιμασία του εμβολίου σε σχήμα σφήνας, Γ) Ένωση του υποκειμένου με το εμβόλιο, Δ) Δέσιμο του σημείου ένωσης λάστιχο και μεμβράνη τύπου parafilm.

**Μηχανική μετάδοση σε φυτοδείκτες (Βιοδοκιμές).** Για τη μερική διερεύνηση του εργαστηριακού εύρους του νέου Τερο-ιού της ελιάς, έγιναν μηχανικές μολύνσεις σε διάφορα είδη και ποικιλίες φασολιού (*Dolichos* spp.- Μαυρομάτικο Τήνου, *Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*- πήχεως, *Phaseolus vulgaris* cv *magirus*, *Phaseolus vulgaris* 'Etna'), ξενιστή ο οποίος φαίνεται να προσβάλλεται από άλλους ιούς του γένους *Tenovirus*, σε φυτά *Nicotiana benthamiana* και *Chenopodium quinoa* και ελιές ποικιλίας Αμφίσσης και Αρβεquina.

Οι φυτοδείκτες αναπτύχθηκαν σε μείγμα τύρφης:περλίτη (3:1) και οι μολύνσεις έγιναν στο στάδιο των κοτυληδόνων για τα φασόλια και του 2<sup>ου</sup>-4<sup>ου</sup> πραγματικού φύλλου για τα είδη *Nicotiana*. Οι ελιές ήταν έρριζα μοσχεύματα μεγέθους περίπου 10 cm, που προήλθαν από τα φυτώρια Κωστελαίνος ([www.kostelenosfytoria.gr](http://www.kostelenosfytoria.gr)). Μολύνθηκαν συνολικά οχτώ φυτά κάθε ποικιλίας. Ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκε ιστός από τα αρχικά μολυσμένο δένδρο αγρού, όπου και ανιχνεύθηκε ο ιός έπειτα από αποθήκευση στους -20°C, είτε από ιστό από εμβολιασμένα δέντρα ελιάς, στα οποία ανιχνεύθηκε επιτυχώς ο ιός με PCR. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε με 0,1 M φωσφορικό διάλυμα (pH 7,5) (600ml - 35,89 γρ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ·12H<sub>2</sub>O/ L απεσταγμένου νερού + 400ml – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ L απεσταγμένου νερού) σε αραιώση 1/10 και ακολούθησε επάλειψη του χυμού σε σημαδεμένα φύλλα των φυτοδεικτών, στα οποία είχε τοποθετηθεί carborundum (silicon carbide, 600 mesh), ως πληγωτική ουσία. Ακολούθησε πλύσιμο των φύλλων μετά από μερικά λεπτά με νερό βρύσης και τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θερμοκήπιο (22-25°C) όπου και ελέγχονταν κάθε μέρα και για διάστημα ενός μήνα, για ανάπτυξη πιθανών συμπτωμάτων. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος με RT-PCR για την παρουσία του ιού, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.3.4.

## Κεφάλαιο 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Έλεγχος της ποιότητας και προσδιορισμός της ποσότητας του ολικά εξαγόμενου RNA – Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης

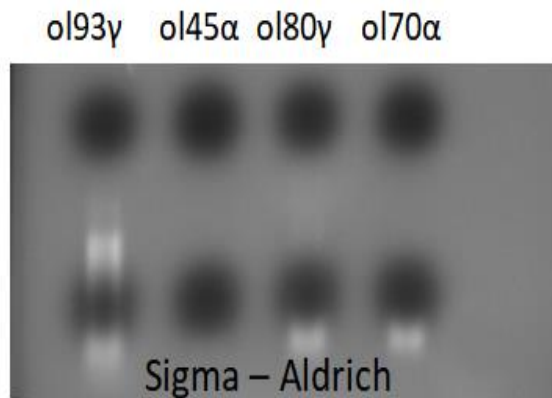
Δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι εκχύλισης ολικού RNA σε έναν αριθμό δειγμάτων και ιστών. Ο έλεγχος της ποιότητας του ολικού RNA, έγινε με την παρατήρηση των τριών ριβοσωμικών υπομονάδων (28S, 18S, 5,8S) έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, καθώς και με μετρήσεις της ποσότητας και καθαρότητας του ολικού εξαγόμενου RNA σε nanodrop.

Όταν χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRI - REAGENT® (Sigma – Aldrich), οι συγκεντρώσεις του ολικού RNA ήταν χαμηλές, όπως χαμηλοί ήταν και οι λόγοι 260/280 και 260/230, ενώ στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης το RNA ήταν κατακερματισμένο (Πιν. 3.1, Εικ 3.1). Ακόμα και στις περιπτώσεις που η συγκέντρωση του RNA ήταν ικανοποιητική, όπως στο δείγμα ol80γ, οι λόγοι καθαρότητας ήταν χαμηλοί (Πιν. 3.1) και οι ριβοσωμικές ζώνες δεν ήταν εμφανείς (Εικ 3.1).

**Πίνακας 3.1:** Συγκέντρωση (ng/μl), λόγος A260/280 και λόγος A260/230 ολικού RNA, έπειτα από εξαγωγή με χρήση του αντιδραστηρίου TRI – REAGENT (Sigma – Aldrich), από διαφορετικά δείγματα και ιστούς (α: φύλλο, γ:φλοιός).

	ng/μl	260/280	260/230
ol 45α	24,3	1,60	1,12
ol 80γ	804,2	1,13	0,42
ol 70α	70	1,46	0,57
ol 93γ	82,7	1,58	1,26





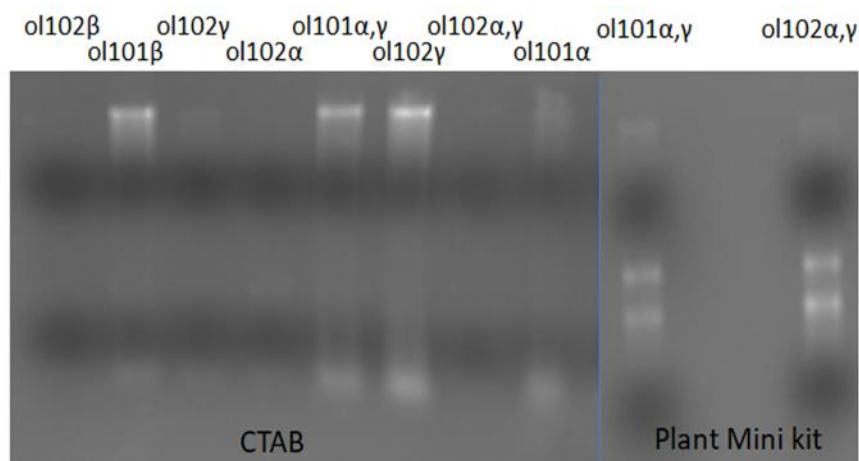
**Εικόνα 3.1:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του ολικού εξαγόμενου RNA με χρήση του αντιδραστηρίου TRI - REAGENT (Sigma – Aldrich), αντιπροσωπευτικών δειγμάτων και τύπων ιστών (α: φύλλο, γ: φλοιός).

Όταν χρησιμοποιήθηκε το CTAB, οι συγκεντρώσεις του ολικού RNA ήταν χαμηλές, όπως χαμηλοί ήταν και οι λόγοι 260/280 και 260/230, ενώ στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης το RNA ήταν κατακερματισμένο, ακόμα και σε περιπτώσεις που η συγκέντρωση του RNA ήταν ικανοποιητική, όπως στα δείγματα ol101α και ol102β. Επιπλέον, σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίστηκαν αρνητικοί ή πολύ υψηλοί λόγοι 260/230, όπως στο δείγμα ol101ζ, που ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε ήταν καρπίδιο (Πιν. 3.2, Εικ. 3.2). Στα δείγματα ol101α,γ και ol102α,γ, που έγινε εξαγωγή ολικού RNA συγκριτικά με το πρωτόκολλο με τη χρήση CTAB και με το RNeasy Plant Mini kit (Qiagen), είναι εμφανής η καλύτερη ποιότητα RNA, που εξήχθη με το RNeasy Plant Mini kit στο οποίο, στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, είναι ευδιάκριτες οι ζώνες 28S και 18S του ριβοσωμικού RNA (Πιν. 3.2, Εικ. 3.2).

**Πίνακας 3.2:** Συγκέντρωση (ng/μl), λόγος A260/280 και λόγος A260/230 ολικού RNA, έπειτα από εξαγωγή ολικού RNA, με το πρωτόκολλο CTAB (A) και RNeasy Plant Mini kit (B), από διαφορετικά δείγματα και ιστούς (α: φύλλο, γ:φλοιός, ζ: καρπίδιο).

A	ng/μl	260/280	260/230
ol102β	62,5	1,61	1,14
ol101β	22,1	1,61	1,69
ol102γ	26	1,38	-1,74
ol102α	95,7	1,57	-13,46
ol101α,γ	58,5	1,56	1,26
ol102γ	102	1,66	1,78
ol102α,γ	52,6	1,54	1,59
ol101α	124,3	1,74	1,87
ol102α,γ	9,8	1,20	-0,16
ol101ζ	47,9	1,25	27,62

B	ng/μl	260/280	260/230
101α,γ	50	2,02	0,84
102α,γ	47,1	2,05	0,38



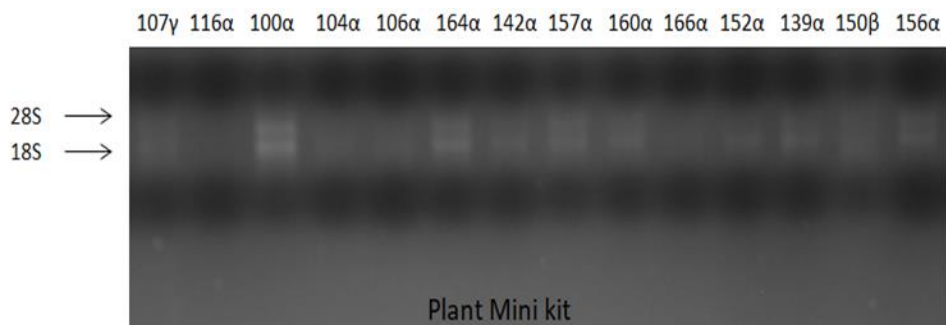
**Εικόνα 3.2:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του ολικού εξαγόμενου RNA με χρήση του πρωτόκολλου CTAB (αριστερά) και με το RNeasy Plant Mini kit (δεξιά) από διάφορα δείγματα και ιστούς (α: φύλλο, β: καρπός, γ: φλοιός, ζ: καρπίδιο)

Στα δείγματα που δοκιμάστηκε το RNeasy Plant Mini kit (Qiagen), ήταν εμφανής η καλή ποιότητα του ολικού RNA, τόσο στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, με ευδιάκριτες τις ζώνες 28S και 18S του ριβοσωμικού RNA, καθώς και με τις υψηλότερες τιμές στις μετρήσεις του nanodrop (Πιν. 3.3, Εικ. 3.3).

**Πίνακας 3.3:** Συγκέντρωση (ng/μl), λόγος A260/280 και λόγος A260/230 ολικού RNA, έπειτα από εξαγωγή ολικού RNA, με το πρωτόκολλο RNeasy Plant Mini kit της Qiagen (α: φύλλο, β: καρπός).

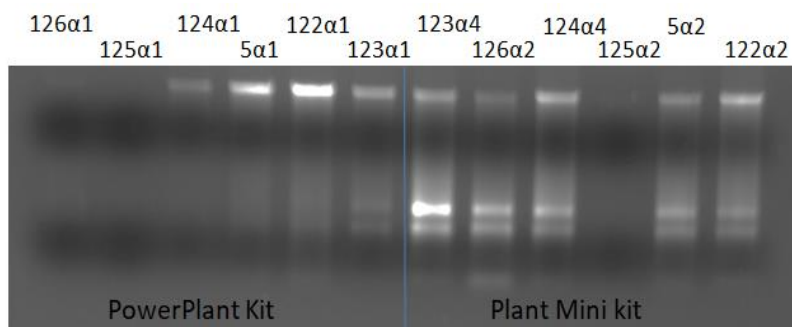
	ng/μl	260/280	260/230
ol107γ	5,6	1,90	0,43
ol116α	14,3	2,09	0,70
ol100α	41,4	2,08	1,51
ol104α	12	2,03	0,71
ol106α	10,8	1,98	0,35
ol164	17,2	2,03	1,37
ol142α	10,7	1,96	0,75
ol157α	14,6	2,02	0,06

	ng/μl	260/280	260/230
ol160α	12,5	2,10	0,43
ol166α	7,3	2,19	0,16
ol152α	11,4	1,99	0,48
ol139α	15,7	2,02	0,16
ol150β	7,9	1,99	0,68
ol156α	15	2,04	1,04



**Εικόνα 3.3:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του ολικού εξαγόμενου RNA με χρήση του RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). Είναι εμφανείς οι κύριες ριβοσωμικές ζώνες 28S και 18S. Οι αριθμοί είναι οι κωδικοί κάθε δείγματος και τα γράμματα αναφέρονται στον τύπο του ιστού που έχει χρησιμοποιηθεί όπου α: φύλλο, β: καρπός, γ: φλοιός

Όταν χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Power Plant kit (Qiagen), οι συγκεντρώσεις του ολικού RNA ήταν χαμηλές, όπως ήταν και οι λόγοι 260/280 και 260/230, ενώ στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης το RNA εμφανίστηκε κατακερματισμένο. Οπότε, για την τελική επιλογή και μεταξύ των δύο kit της Qiagen έγινε σύγκριση μεταξύ των δύο kit με την μεταχείριση ίδιων δειγμάτων (Εικ. 3.4, Πίν 3.4).



**Εικόνα 3.4:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του ολικού εξαγόμενου RNA. Στα δείγματα 126α1, 125α1, 124α1, 5α1, 122α1, 123α1 η εκχύλιση του ολικού RNA έχει γίνει με το RNeasy PowerPlant Kit και στα δείγματα 123α4, 126α2, 124α4, 125α2, 5α2, 122α2 με το RNeasy Plant Mini kit. Οι αριθμοί αναφέρονται στους κωδικούς των δειγμάτων και ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του RNA ήταν φύλλο.

**Πίνακας 3.4:** Συγκέντρωση (ng/μl), λόγος A260/280 και λόγος A260/230 ολικού RNA, έπειτα από εξαγωγή ολικού RNA, με το πρωτόκολλο RNeasy Plant Mini kit (A) της Qiagen και RNeasy PowerPlant Kit (B) από διαφορετικά δείγματα (α: φύλλο).

A	ng/μl	260/280	260/230
οl123α4	174,8	2,09	2,10
οl126α2	134,8	2,05	1,34
οl124α4	141,4	2,05	0,99
οl125α2	10	1,92	0,05
οl5α2	135,1	2,06	1,74
οl122α2	137,1	2,01	1,39

B	ng/μl	260/280	260/230
ol123α1	44,6	2,04	1,97
ol126α1	11	1,71	0,59
ol124α1	17,3	1,76	0,85
ol125α1	2,9	1,61	0,32
ol5α1	53,4	1,92	1,63
ol122α1	87,2	1,93	1,89

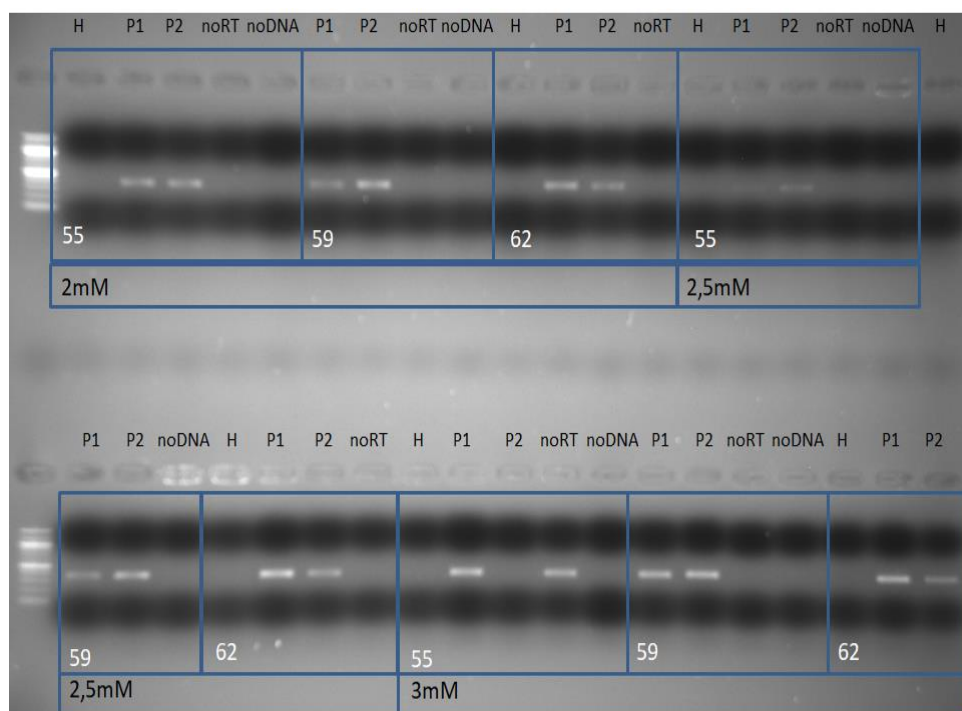
Συνολικά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μεταξύ των πρωτοκόλλων εξαγωγής, το Rneasy Plant Mini kit της Qiagen έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τα πρωτόκολλα της Sigma – Aldrich (Εικ.3.1), του CTAB και του RNeasy PowerPlant Kit που δοκιμάστηκαν. Για αυτό το λόγο για την εξαγωγή του RNA όλων των δειγμάτων που ελέγχθηκαν στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε το Rneasy Plant Mini kit της Qiagen.

## 3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

### 3.2.1 Βελτιστοποίηση συνθηκών δοκιμής (Optimization)

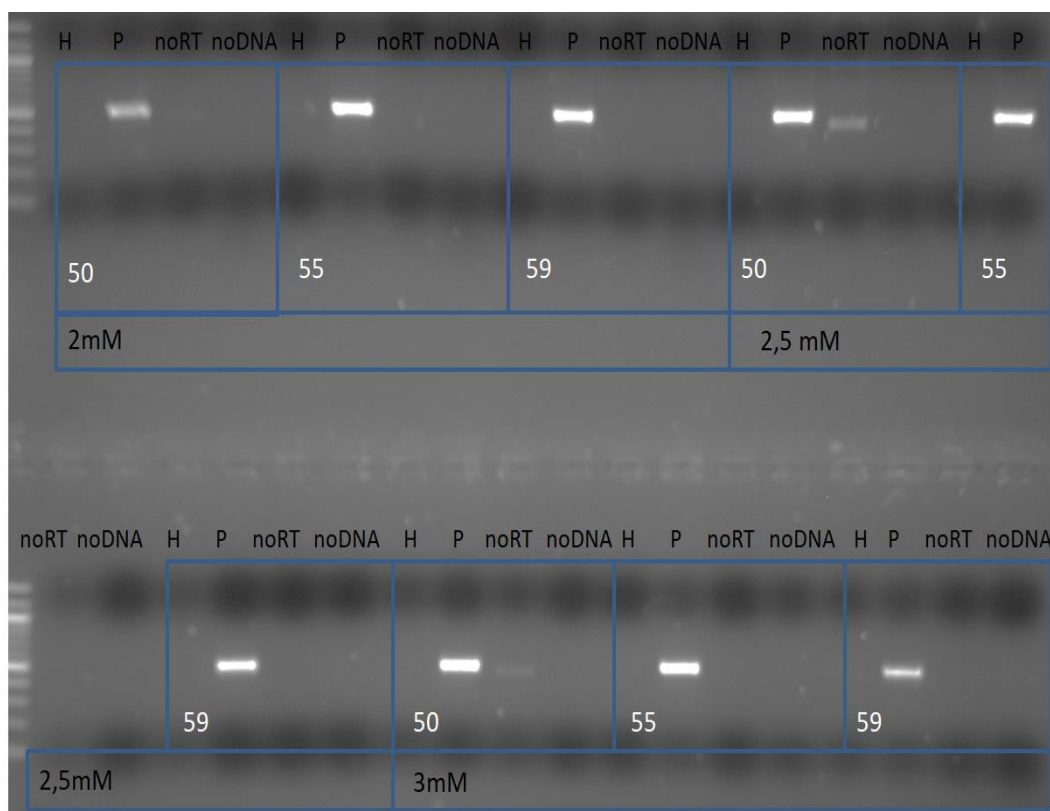
Για τους ιούς που υπήρχαν θετικοί μάρτυρες πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών, ενώ για τους υπόλοιπους οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν σύμφωνες με το πρωτόκολλο της πολυμεράσης - Dream Taq Hot Start DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού και συγκεντρώσεις  $MgCl_2$  και επιλέχθηκε ο συνδυασμός που έδινε την καλύτερη ενίσχυση για κάθε ζεύγος εκκινητών (Πιν.3.5).

**OLYαV:** Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών για το ζεύγος εκκινητών του OLYαV ελέγχθηκαν τρεις θερμοκρασίες υβριδισμού (55°, 59°, 62°C) και τρεις τελικές συγκεντρώσεις MgCl<sup>2</sup> (2-2,5-3 mM). Η βελτιστοποίηση έδειξε ότι οι καλύτερες συνθήκες είναι συγκέντρωση 3mM MgCl<sup>2</sup> και θερμοκρασία υβριδισμού στους 59°C (Εικ.3.5).



**Εικόνα 3.5:** Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [ $MgCl_2$  (mM) και  $T_m$  (°C)] για την ανίχνευση του OLYαV. Η ο υγιής δείκτης, P1 και P2 τα θετικά δείγματα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O.

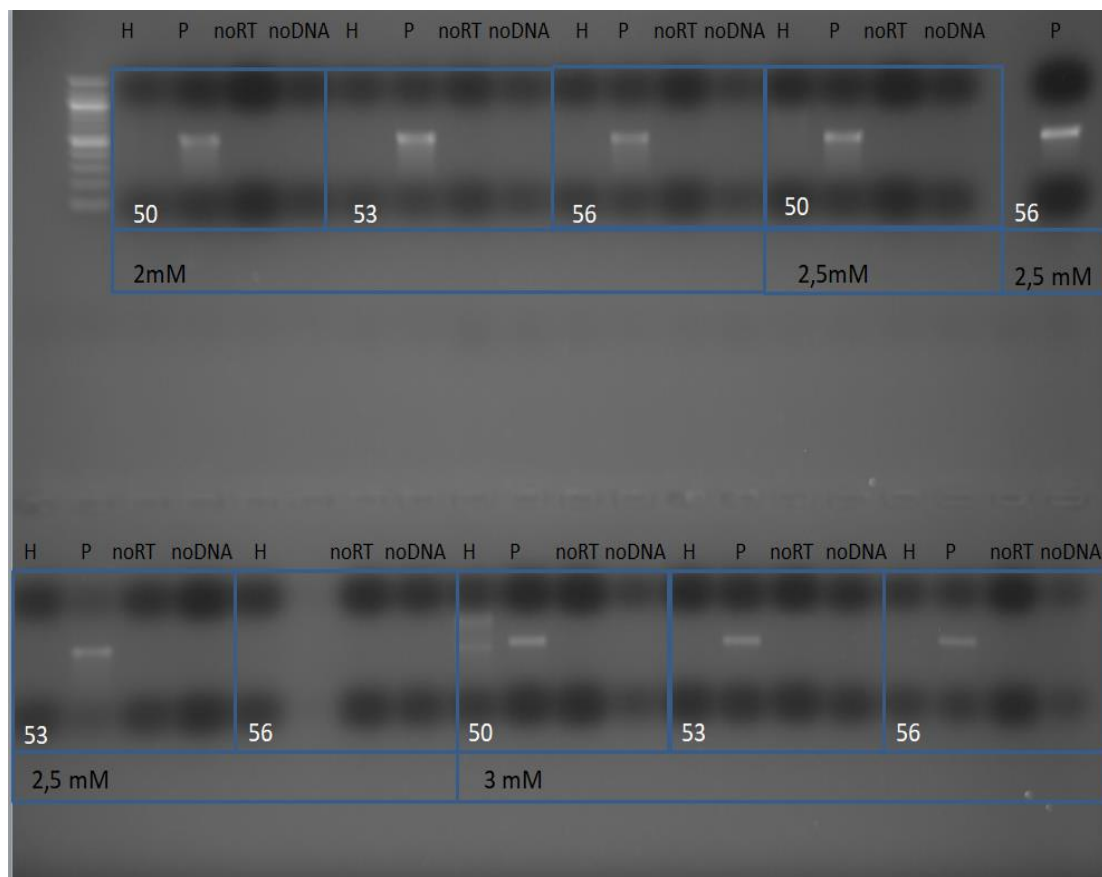
**CMV:** Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών για το ζεύγος εκκινήτων του CMV ελέγχθηκαν τρεις θερμοκρασίες υβριδισμού (50°, 55°, 59°C) και τρεις συγκεντρώσεις MgCl<sup>2</sup> (2-2,5-3 mM). Η βελτιστοποίηση έδειξε ότι οι καλύτερες συνθήκες είναι συγκέντρωση 3mM MgCl<sub>2</sub> και θερμοκρασία υβριδισμού στους 55°C (Εικ.3.6).



**Εικόνα 3.6:** Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [MgCl<sub>2</sub> (mM) και T<sub>m</sub> (°C)] για την ανίχνευση του CMV. Όπου H ο υγιής δείκτης P το θετικό δείγμα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O

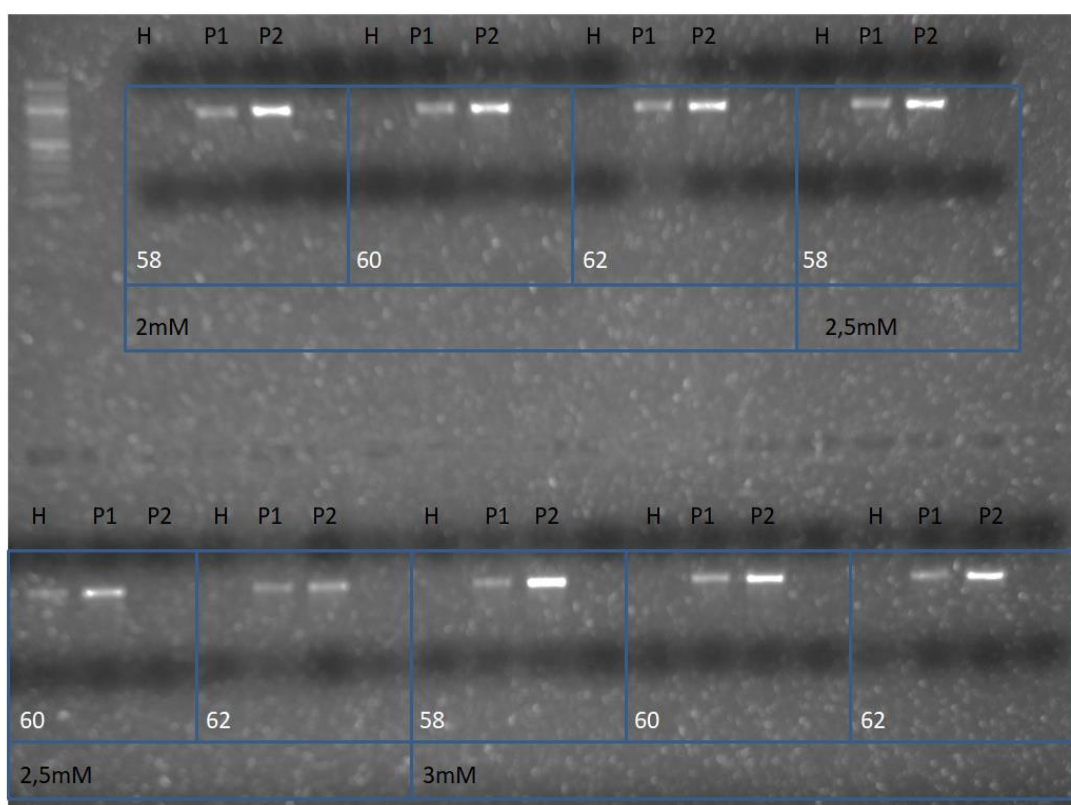


**SLRSV:** Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών για το ζεύγος εκκινητών του SLRSV ελέγχθηκαν τρεις θερμοκρασίες υβριδισμού (50°, 53°, 56°C) και τρεις συγκεντρώσεις  $MgCl_2$  (2-2,5-3 mM). Η βελτιστοποίηση έδειξε ότι οι καλύτερες συνθήκες είναι συγκέντρωση 2,5mM  $MgCl_2$  και θερμοκρασία υβριδισμού στους 56°C (Εικ.3.7).



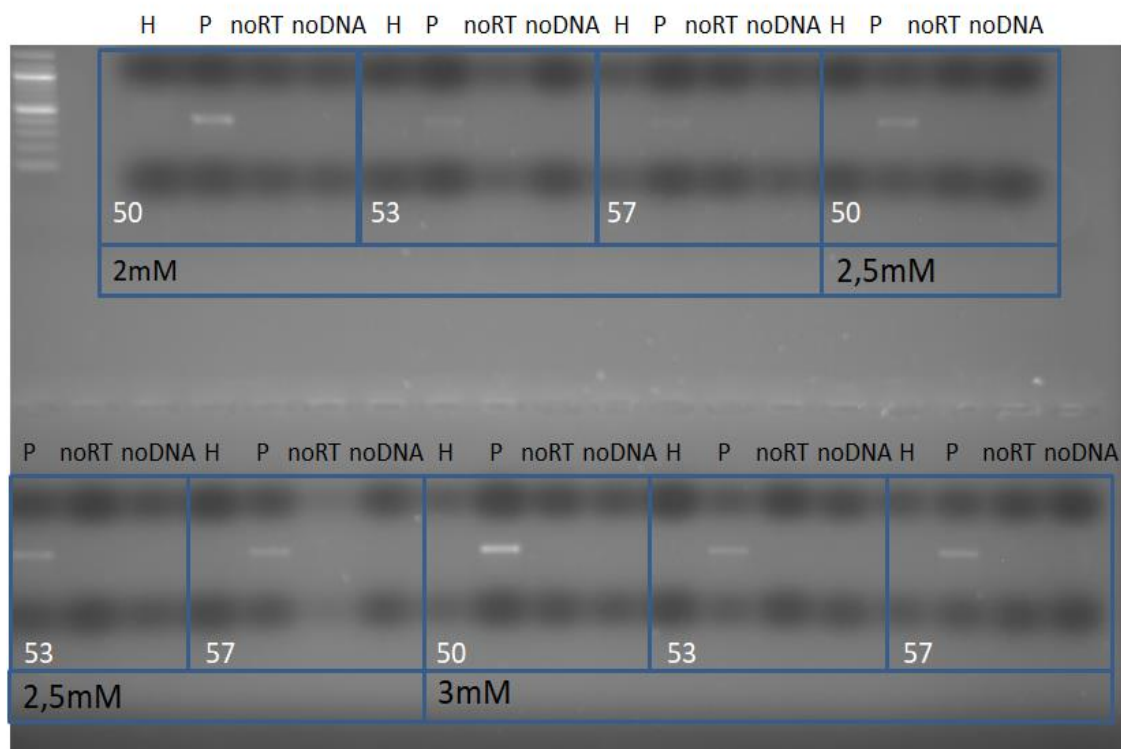
**Εικόνα 3.7:** Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [ $MgCl_2$  (mM) και  $T_m$  (°C)] για την ανίχνευση του SLRSV. Όπου H ο υγιής δείκτης P1 και P2 τα θετικά δείγματα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O

**TMV:** Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών για το ζεύγος εκκινήτων του TMV ελέγχθηκαν τρεις θερμοκρασίες υβριδισμού (58°, 60°, 62°C) και τρεις συγκεντρώσεις  $MgCl_2$  (2-2,5-3 mM). Η βελτιστοποίηση έδειξε ότι οι καλύτερες συνθήκες είναι συγκέντρωση 3mM  $MgCl_2$  και θερμοκρασία υβριδισμού στους 58°C (Εικ.3.8).



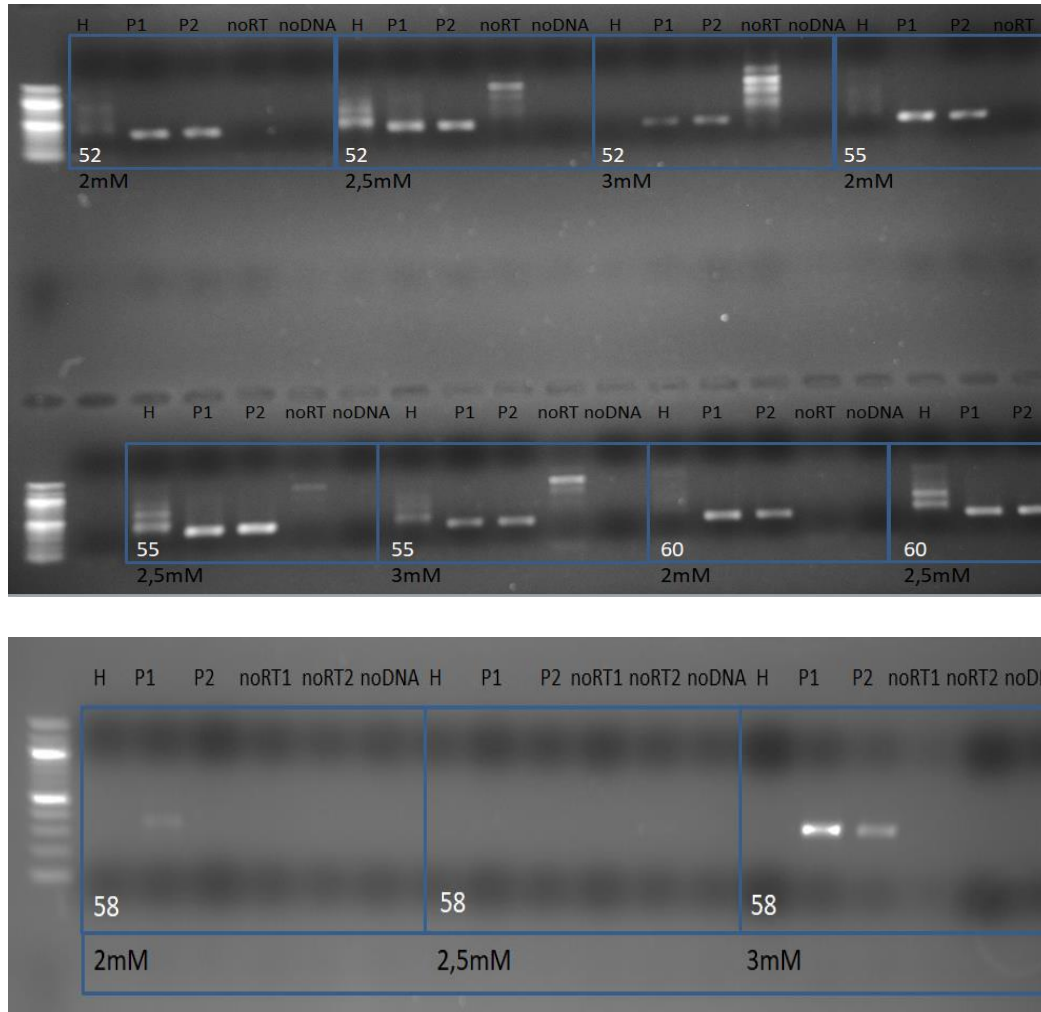
**Εικόνα 3.8:** Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [ $MgCl_2$  (mM) και  $T_m$  (°C)] για την ανίχνευση του TMV. Όπου H ο υγείας δείκτης P1 και P2 τα θετικά δείγματα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί  $ddH_2O$ .

**CLR<sub>V</sub>:** Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών για το ζεύγος εκκινητών του CLR<sub>V</sub> ελέγχθηκαν τρεις θερμοκρασίες υβριδισμού (50°, 53°, 57°C) και τρεις συγκεντρώσεις MgCl<sub>2</sub> (2-2,5-3 mM). Η βελτιστοποίηση έδειξε ότι οι καλύτερες συνθήκες είναι συγκέντρωση 3mM MgCl<sub>2</sub> και θερμοκρασία υβριδισμού στους 50°C (Εικ. 3.9).



**Εικόνα 3.9:** Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [MgCl<sub>2</sub> (mM) και T<sub>m</sub> (°C)] για την ανίχνευση του CLR<sub>V</sub>. Όπου H ο υγιής δείκτης P1 και P2 τα θετικά δείγματα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O.

**OIVT:** Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών για το ζεύγος εκκινητών του Τερο-ιού ελέγχθηκαν τέσσερις θερμοκρασίες υβριδισμού (52°, 55°, 58°C, 60°C) και τρεις συγκεντρώσεις  $MgCl_2$  (2-2,5-3 mM). Η βελτιστοποίηση έδειξε ότι οι καλύτερες συνθήκες είναι συγκέντρωση 3mM  $MgCl_2$  και θερμοκρασία υβριδισμού στους 58°C (Εικ. 3.10).



**Εικόνα 3.10:** Δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών [ $MgCl_2$  (mM) και  $T_m$  (°C)] για την ανίχνευση του νέου Τερο-ιού. Όπου H ο υγιείς δείκτης, P1 και P2 τα θετικά δείγματα, noRT, noRT1, noRT2 δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O. Αναφέρεται η θερμοκρασία υβριδοποίησης (°C) και η συγκέντρωση του  $MgCl_2$  που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε ομάδα δειγμάτων

**Πίνακας 3.5:** Τελική συγκέντρωση  $MgCl_2$  (mM) και θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_m$  °C) που επιλέχθηκαν από τις δοκιμές βελτιστοποίησης, για την καλύτερη ενίσχυση του στόχου για κάθε ιό και ζεύγος εκκινητών.

Ιός	Εκκινητές	$MgCl_2$	$T_m$
<b>OIVT (Εικ. 3.10)</b>	OVT1	3 mM	58°C
<b>OLYaV (Εικ. 3.5)</b>	OLYaV-1 OLYaV-2	3 mM	59°C
<b>CMV (Εικ. 3.6)</b>	CMV-5 CMV-3	3 mM	55°C
<b>SLRSV (Εικ. 3.7)</b>	SLRSV-5 SLRSV-3	2,5 mM	56°C
<b>CLRV (Εικ. 3.9)</b>	CLRV-5 CLRV-3	3 mM	50°C
<b>TMV (Εικ. 3.8)</b>	TMV5' TMV3'	3 mM	58°C

Για τα ζεύγη εκκινητών που δεν έγινε βελτιστοποίηση ο συνδυασμός συγκέντρωσης  $MgCl_2$  και  $T_m$  που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο προκαθορισμένος από το πρωτόκολλο του ενζύμου και σύμφωνα με τον υπολογιστή της εταιρείας <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>

**Πίνακας 3.6:** Συγκέντρωση  $MgCl_2$  (mM) και θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_m$  °C) που χρησιμοποιήθηκαν για τα ζεύγη εκκινητών για τα οποία δεν έγιναν δοκιμές βελτιστοποίησης.

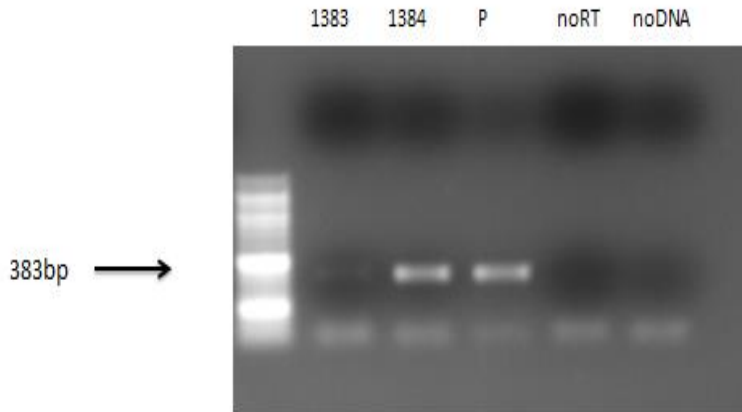
Ιός	Εκκινητές	$MgCl_2$	$T_m$
<b>ArMV</b>	ARMV-5	2 mM	55°C
	ARMV-3		
<b>TNV-D, OMMV</b>	TNV cons-f	3 mM	58°C
	TNV cons-r		
<b>OMMV</b>	OMMVd5	2 mM	56°C
	OMMVd3		
<b>OLV-1</b>	OLV1_PB	2 mM	57°C
	OLV1_PA		
<b>OLV-2</b>	OLV2-H	2 mM	56°C
	OLV2-C		
<b>OLV-3</b>	OLV-3f	2 mM	63°C
	OLV-3r		
<b>OLRSV</b>	OLRSV5'	2 mM	56°C
	OLRSV3'		

### 3.2.2 Μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση των ιών

Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR έγινε ανίχνευση για την παρουσία των ιών.

Για τους γνωστούς ιούς της ελιάς από τα 158 δείγματα που ελέγχθηκαν για τους ArMV, SLRSV, TMV, OMMV, ArMV, OLV-1, OLV-2, OLV-3 και OLRSV δεν ανιχνεύτηκε κανένα ως θετικό. Στους ελέγχους για τον CMV ανιχνεύτηκαν πέντε θετικά, για τον OLYaV δύο και για τον CLRV δύο.

**OLYaV.** Στις δοκιμές για τον OLYaV ενισχύθηκε το αναμενόμενο κομμάτι στα 383 bp, σε δύο δείγματα (1,3% επί του συνόλου των δειγμάτων). Τα θετικά δείγματα ήταν τα OL80 (κωδικός δείγματος στην PCR 1384 ) (Εικ. 3.11) από την Αρκαδία και το OL184 από τον Εύρωπο στο Κιλκίς.



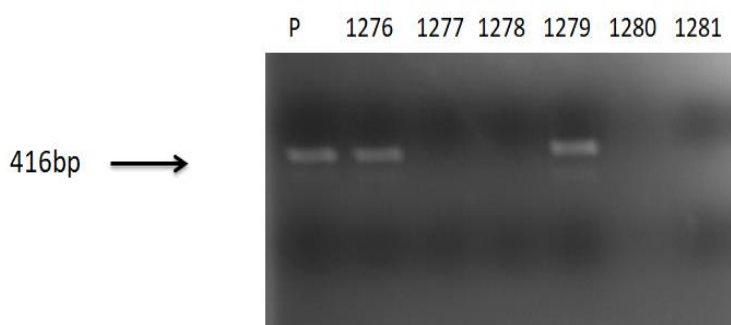
**Εικόνα 3. 11:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του OLYaV αντιπροσωπευτικών δειγμάτων ελιάς (1383,1384:δείγματα, P: θετικός μάρτυρας, noRT: δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, noDNA: δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O). Το παραγόμενο προϊόν φαίνεται στα 383bp.

**CMV.** Για τον CMV βρέθηκαν θετικά πέντε δείγματα, όπου ενισχύθηκε το αναμενόμενο κομμάτι στα 513bp (3,2% επί του συνόλου των δειγμάτων). Τα θετικά δείγματα είναι το OL45 (κωδικός PCR 235) (Εικ. 3.12) από το Αργίλιο, το OL195 από την Αττική, το OL367 από τις Μυκήνες στην Πελοπόννησο, το OL374 και το OL375 από τις αρχαίες Κλεωνές στην Κορινθία.



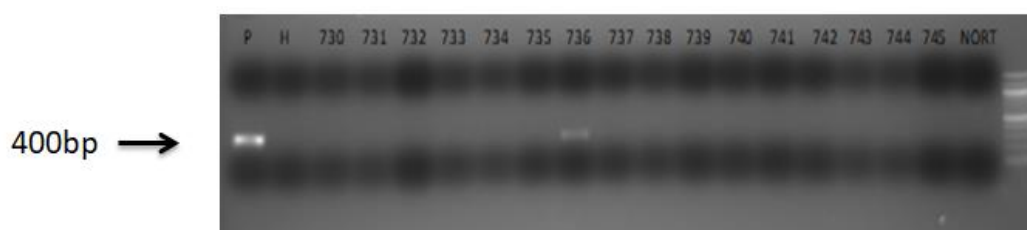
**Εικόνα 3.12:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του CMV αντιπροσωπευτικών δειγμάτων ελιάς (P: θετικός μάρτυρας, H: υγιής μάρτυρας, 231-236:δείγματα, noRT: δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, noDNA: δείγμα όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O). Το παραγόμενο προϊόν φαίνεται στα 513bp.

**CLRV.** Ο CLRV ανιχνεύθηκε σε δύο δείγματα, όπου ενισχύθηκε το αναμενόμενο κομμάτι στα 416bp (1,3% επί του συνόλου των δειγμάτων). Τα θετικά είναι το OL252 (κωδικός PCR 1276) από τα Μέγαρα και το OL186 (κωδικός PCR 1279) από την Παιανία (Εικ. 3.13).



**Εικόνα 3.13:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του CLRV αντιπροσωπευτικών δειγμάτων ελιάς (P: θετικός μάρτυρας, 1276-1281: δείγματα). Το παραγόμενο προϊόν φαίνεται στα 416bp.

**OIVT.** Για τον OIVT, από τα 158 δείγματα που ελέγχθηκαν, σε επτά ενισχύθηκε το αναμενόμενο κομμάτι στα 400bp (4,4% επί του συνόλου των δειγμάτων). Τα δύο ήταν από δένδρα στον ελαιώνα του Ν. Φθιώτιδας όπου αρχικά εντοπίστηκε ο ιός (δείγματα OL168 και OL170), το δείγμα OL214 στο νομό Αττικής, και τα υπόλοιπα στην Πελοπόννησο και συγκεκριμένα στην Αρκαδία (OL220), το Σπαθοβούνι Κορινθίας (OL258), τη Νεμέα Αργολίδας (OL263) και στο Αρχαίο Ηραίο Άργους (OL379).



**Εικόνα 3.14:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης προϊόντων PCR για την ανίχνευση του νέου Τερο-ιού αντιπροσωπευτικών δειγμάτων ελιάς (P: θετικός μάρτυρας, H: υγιής, 730-745 τα δείγματα, noRT δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και noDNA δείγμα



όπου σαν εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH<sub>2</sub>O). Το παραγόμενο προϊόν φαίνεται στα 400bp.

### 3.3 Φυλογενετική ανάλυση

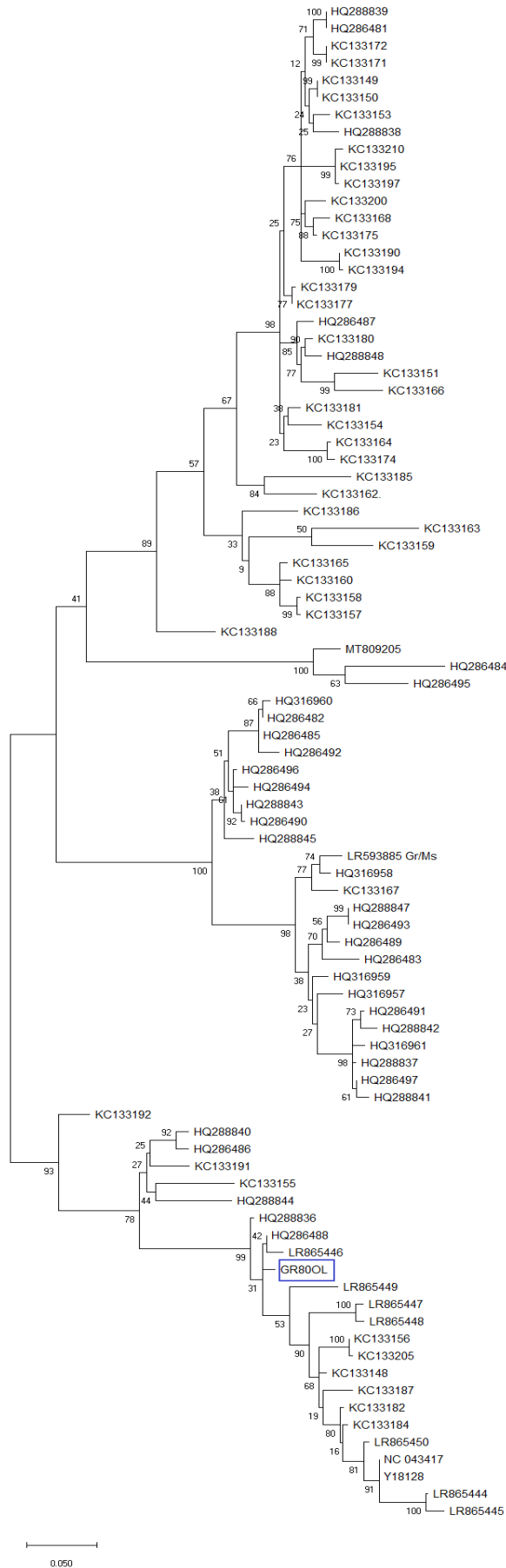
#### Μοριακή παραλλακτικότητα

Συνολικά στη μελέτη αυτή αποκτήθηκαν και κατατέθηκαν στη GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) οχτώ απομονώσεις τριών γνωστών ιών (OLYaV, CLRV, CMV) και επτά αλληλουχίες για τον ΟΙVΤ (Πιν. 3.7).

**Πίνακας 3.7:** Αλληλουχίες και αριθμοί καταχώρησης στη GenBank των απομονώσεων των ιών της ελιάς που αποκτήθηκαν από την παρούσα μελέτη

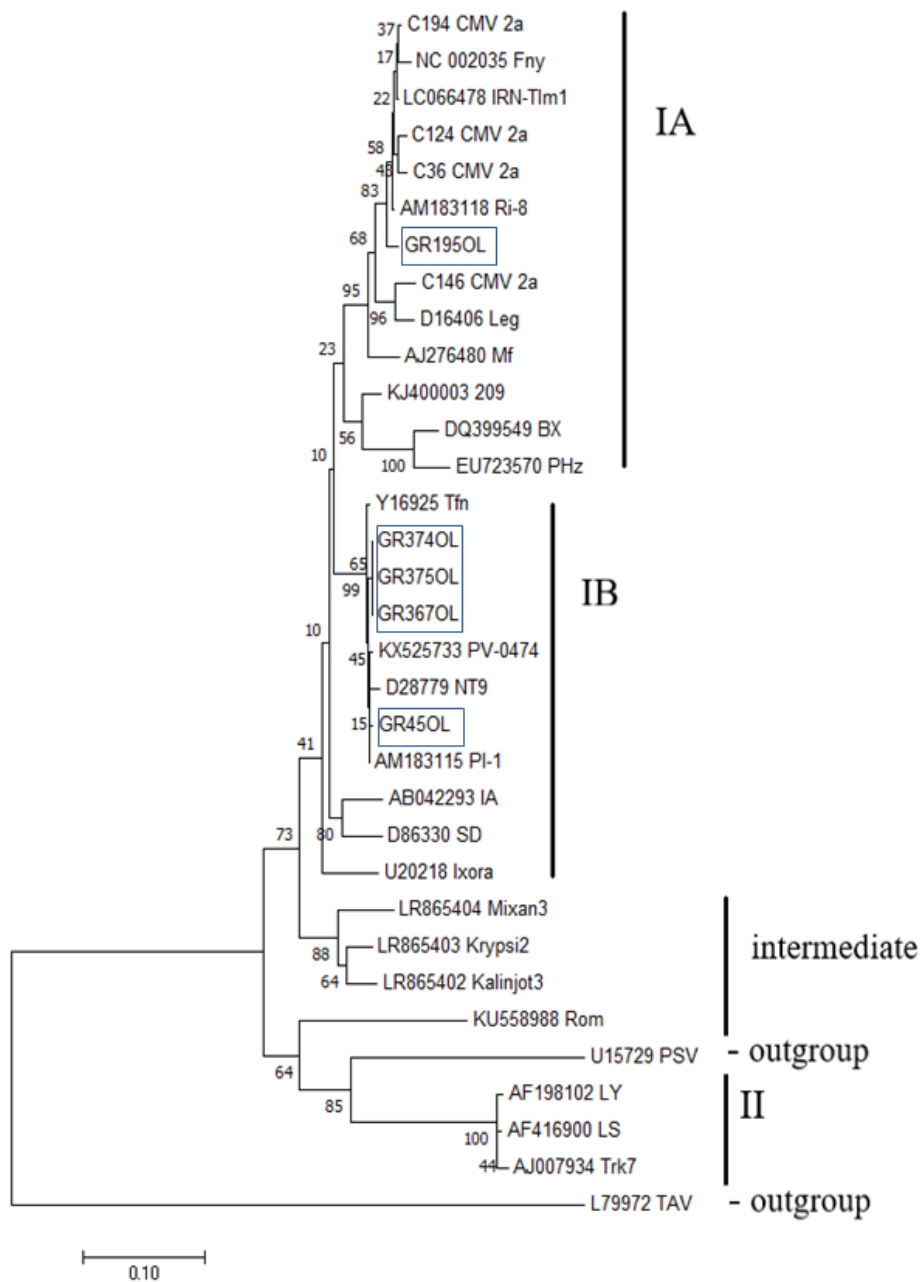
Κωδικός δείγματος	Αριθμός καταχώρησης	Ιός
GR80OL	MW805382	OLYaV
GR186OL	MW814913	CLRV
GR252OL	MW814914	CLRV
GR45OL	MW805377	CMV
GR195OL	MW805378	CMV
GR367OL	MW805379	CMV
GR374OL	MW805380	CMV
GR375OL	MW805381	CMV
GR135OL	MZ020973	ΟΙVΤ
GR127OL	MZ020974	ΟΙVΤ
GR170OL	KF700263	ΟΙVΤ
GR214OL	MZ020976	ΟΙVΤ
GR220OL	MZ020972	ΟΙVΤ
GR258OL	MZ020975	ΟΙVΤ
GR379OL	MZ020977	ΟΙVΤ

**OLYaV.** Από τα δύο δείγματα που βρέθηκαν θετικά στον OLYaV, μόνο από το ένα (GR800L) ήταν επιτυχής η απόκτηση της αλληλουχίας του γονιδίου HSP70 (Πιν. 3.7). Για τη φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου HSP70, έχει προταθεί ομαδοποίηση σε τρεις ομάδες όταν πρόκειται για τις ιταλικές απομονώσεις (Essakhi et al., 2006) και σε έξι όταν πρόκειται για τη συλλογή της Καλιφόρνια (Al Rwahhieh et al., 2011). Όταν η ελληνική απομόνωση συγκρίθηκε με αντίστοιχες αλληλουχίες, μία ελληνική και ξένες, συμπεριλαμβανομένων των απομονώσεων της Ιταλίας και της Καλιφόρνιας, κατατεθειμένες στην GenBank (Εικ. 3.15) τα ποσοστά ομοιότητας κυμάνθηκαν από 75,29% έως 98,8%. Η αλληλουχία της απομόνωσης GR800L βρέθηκε να ομαδοποιείται με άλλες απομονώσεις από την Καλιφόρνια και την Ιταλία, ενώ εμφάνισε μεγάλη διαφοροποίηση (75,89%) σε σχέση με την κατατεθειμένη ελληνική απομόνωση (LR593885), η οποία ομαδοποιείται μόνο με τις απομονώσεις που προέρχονται από την συλλογή της Καλιφόρνιας. Επιπλέον, η αλληλουχία που αποκτήσαμε παρουσίασε μεγαλύτερη ομοιότητα (98,8%) με την απομόνωση HQ286488 που προήλθε από ελιά ποικιλίας Ruget που προέρχεται από τη Γαλλία και διατηρείται στην τράπεζα υλικού του USDA, στην Καλιφόρνια.



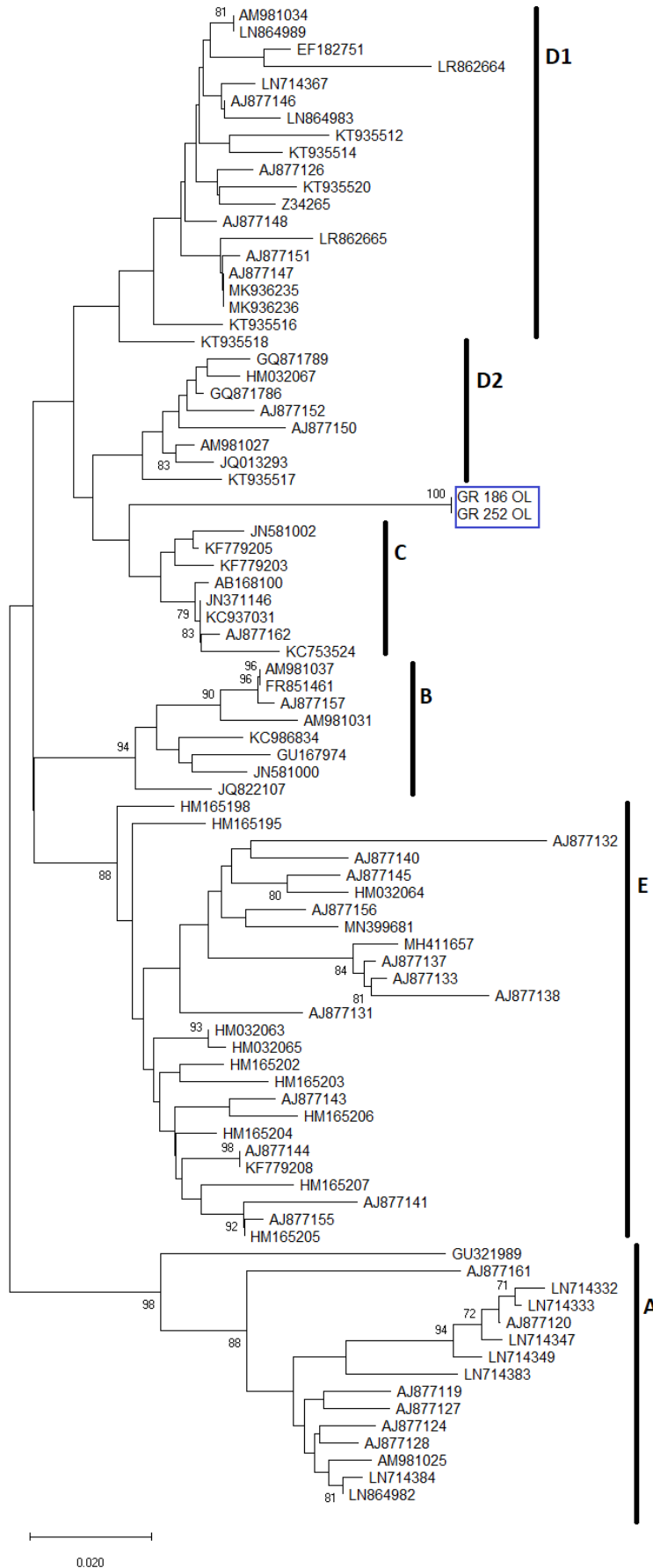
**Εικόνα 3.15:** Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (*maximum likelihood*) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ολόκληρη την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *HSP70* απομονώσεων του *OLγΑν* που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (*Genebank*). Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (*bootstrap*) ίσο με 1000. Η μπάρα κάτω αριστερά από το δένδρο δείχνει αντικαταστάσεις/θέση.

**CMV.** Συνολικά αποκτήθηκαν πέντε αλληλουχίες του γονιδίου της RdRp του CMV. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις μοναδικές διαθέσιμες ελληνικές αλληλουχίες GR45OL, GR195OL, GR374OL, GR375OL, GR367OL από κολοκυνθοειδή (Σαρέλη, αδημοσίευτα δεδομένα) και κατατεθειμένες στην GenBank αλληλουχίες του γονιδίου RdRp του CMV (Πιν. 3.7, Εικ. 3.16). Από τη φυλογενετική ανάλυση προέκυψε ότι οι ελληνικές απομονώσεις παρουσιάζουν μεταξύ τους ομοιότητα που κυμαίνεται από 91,55% έως 100%. Η απομόνωση GR195OL, η οποία προέρχεται από την Παιανία Αττικής, ομαδοποιείται στην υποομάδα IA (subIA) του CMV και παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιότητα (97,32%) με μία ιρανική απομόνωση από *Impatiens balsamina* (LC066478). Οι απομονώσεις GR374OL, GR375OL από την Κορινθία, η GR367OL από την Αργολίδα είναι όμοιες μεταξύ τους και παρουσιάζουν ομοιότητα 99,16% με την απομόνωση GR45OL από το Αγρίνιο. Ομαδοποιούνται στην υποομάδα IB (subIB) του CMV με μεγαλύτερη ομοιότητα (99,44%-99,72%) με μία ισπανική απομόνωση από ντομάτα (AM183115). Οι ελληνικές απομονώσεις παρουσιάζουν ομοιότητα από 85,55% έως 89,1% με τις υπάρχουσες στην GenBank απομονώσεις από ελιά, που προέρχονται από την Αλβανία (LR865402-LR865404).



**Εικόνα 3.16:** Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (*maximum likelihood*) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ολόκληρη την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *RdRp* απομονώσεων του *CMV* που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (*Genbank*). Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (*bootstrap*) ίσο με 1000. Η μπάρα κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνει αντικαταστάσεις/θέση. Στο δένδρο επισημαίνονται οι κύριες ομάδες (*subgroups IA, IB, II*) του *CMV*, καθώς και απομονώσεις που αποκλίνουν από αυτές (*outgroups*).

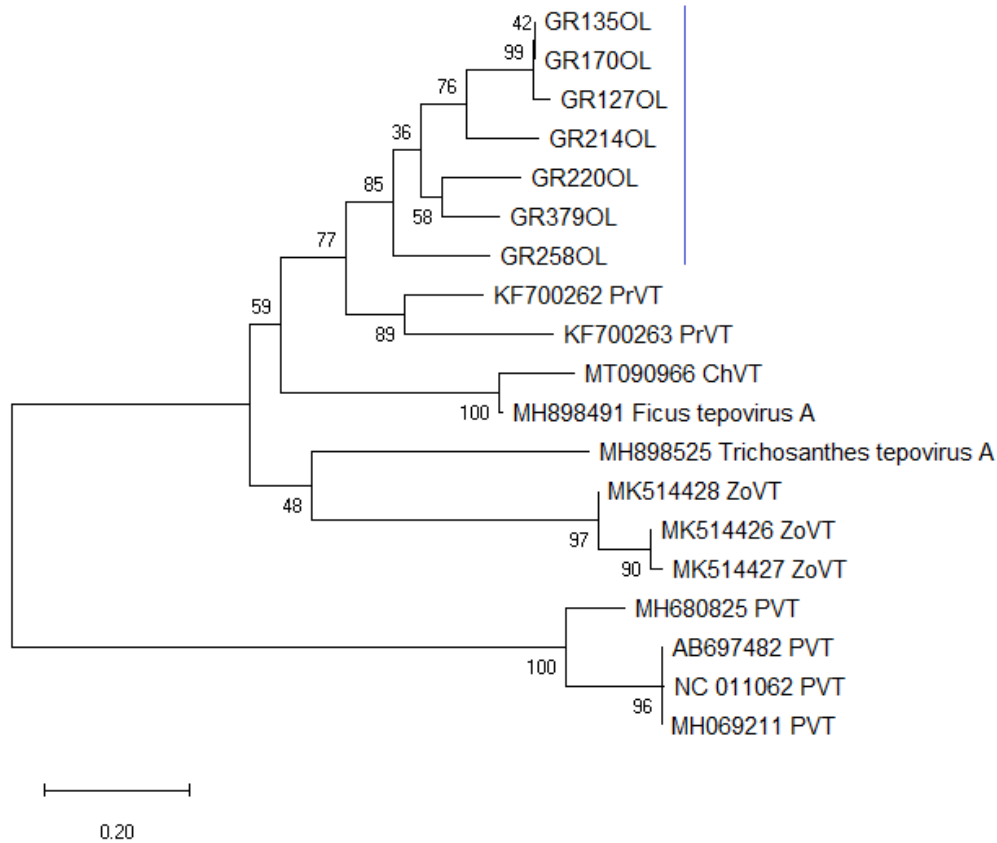
**CLRV.** Συνολικά αποκτήθηκαν δύο αλληλουχίες της περιοχής 3'UTR του CLRV από τις απομονώσεις GR186OL και GR252OL από την Αττική (Πιν.3.7). Η σύγκριση των αλληλουχιών αυτών με άλλες αντίστοιχες ελληνικές και ξένες αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στην GenBank (Εικ. 3.17) έδειξε ποσοστά παραλλακτικότητας που κυμαίνονται από 84,75% έως 93,84%. Η σύγκριση των απομονώσεων αυτών με τις άλλες δύο κατατεθειμένες ελληνικές απομονώσεις από ελιά (MK936235, MK936236) έδειξε μεταξύ τους ομοιότητα 91,9%, με τη διαφοροποίηση να εντοπίζεται κυρίως την απουσία 8 βάσεων που εμφανίζουν οι απομονώσεις MK936235 και MK936236 από την Κρήτη. Για τον CLRV έχει προταθεί μία ομαδοποίηση με βάση τον ξενιστή των απομονώσεων (Rebenstorf et al., 2016) και σύμφωνα με αυτή οι ελληνικές απομονώσεις αυτής της μελέτης ομαδοποιούνται ανάμεσα από τις υποομάδες D2 και C. Η υποομάδα D2 αποτελείται κυρίως από απομονώσεις *Juglans regia* και η υποομάδα C από απομονώσεις διάφορων ειδών κυρίως *Rubus* spp., *Vaccinium* sp. και *Ribes* sp. Όπως προέκυψε από τη φυλογενετική ανάλυση οι ελληνικές αλληλουχίες έχουν μεγαλύτερη ομοιότητα (93,84%) με δύο αλληλουχίες από τη Νέα Ζηλανδία, από *Plantago major* (KF779205) και *Actinidia chinensis* (KF779203) και παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση (84,75%) με μία απομόνωση από *Rubus idaeus* (AJ877167) επίσης από τη Νέα Ζηλανδία και με μία απομόνωση από *Betula pubescens* (LN714383) από τη Φινλανδία.



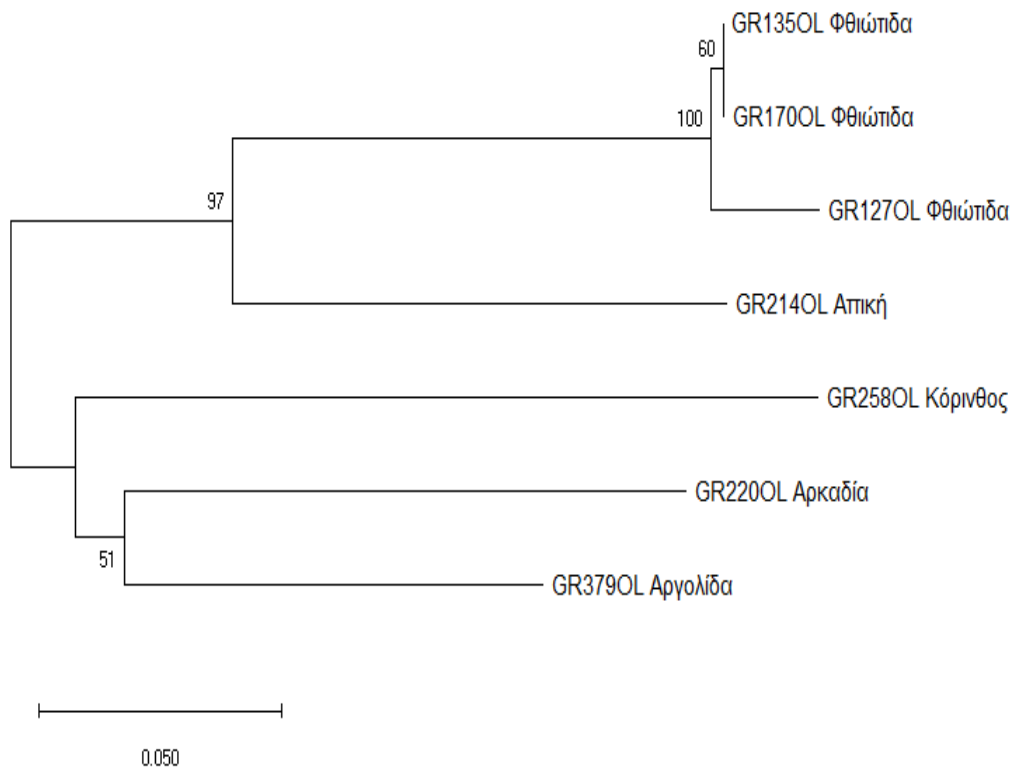
**Εικόνα 3.17:** Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (*maximum likelihood*) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας την νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής 3'UTR απομονώσεων που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (*Genbank*) για τον CLRV. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (*bootstrap*) ίσο με 1000. Η μπάρα κάτω αριστερά από το δένδρο δείχνει αντικαταστάσεις/θέση. Επισημαίνονται οι φυλογενετικές ομάδες κατά τους *Rebenstorf et al., 2016*.

**ΟΙVΤ.** Συνολικά αποκτήθηκαν επτά απομονώσεις του ΟΙVΤ (Πιν. 3.7). Για τη φυλογενετική ανάλυση του ΟΙVΤ χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες μέρους της περιοχής MP\_CP (partial MP\_CP region) που αποκτήθηκαν για τις απομονώσεις GR135OL, GR170OL, GR127OL, GR214OL, GR220OL, GR379OL και GR258OL. Οι απομονώσεις GR135OL και GR170OL προέρχονται από το ίδιο αρχικό υλικό, το δένδρο στο οποίο αρχικά ανιχνεύτηκε ο ιός, αλλά από δύο διαφορετικές συλλογές με διαφορά ενός έτους. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης αλληλουχίες κατατεθειμένες στην GenBank απομονώσεων άλλων ιών του γένους *Terovirus*. Οι απομονώσεις μελετήθηκαν ως προς τη μεταξύ τους διαφοροποίηση (Εικ. 3.19), αλλά και ως προς τη σχέση τους με τους άλλους ιούς του γένους *Terovirus* (Εικ. 3.18) Οι ελληνικές απομονώσεις παρουσίασαν μεταξύ τους ομοιότητα που κυμαίνεται από 75,6% έως 99,3%, με τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση να βρίσκεται μεταξύ των απομονώσεων της Φθιώτιδας (GR135OL, GR170OL) και της Κορίνθου (GR258OL). Σε σύγκριση με άλλους ιούς του γένους *Terovirus*, η μεγαλύτερη ομοιότητα (75,64%) εντοπίζεται μεταξύ της απομόνωσης της Κορίνθου (GR258OL) και της απομόνωσης KF700262 του PrVT, ενώ η μεγαλύτερη διαφοροποίηση (40,25%-41,23%) εντοπίζεται μεταξύ της απομόνωσης του Αγρινίου (GR220OL) και των απομονώσεων του PVT.





**Εικόνα 3.18:** Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (*maximum likelihood*) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας *MP\_CP* απομονώσεων *Tepovirus* που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (*Genebank*) καθώς και των ελληνικών του *OIVT* που αποκτήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (*bootstrap*) ίσο με 1000. Η μπάρα κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνει αντικαταστάσεις/θέση.



**Εικόνα 3.19:** Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (*maximum likelihood*) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες των απομονώσεων του ΟΙΥΤ που αποκτήθηκαν. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (*bootstrap*) ίσο με 1000. Η μπάρα κάτω αριστερά από το δένδρο δείχνει αντικαταστάσεις/θέση.

### 3.4 Εμβολιασμοί δέντρων ελιάς

Από τους εμβολιασμούς που πραγματοποιήθηκαν, οι 30 ήταν επιτυχημένοι, ενώ οι 17 ανεπιτυχείς (Πιν. 3.8, Εικ. 3.20).

**Πίνακας 3.8:** Επιτυχία εμβολιασμών του ΟΙΝΤ ανά ποικιλία ελιάς

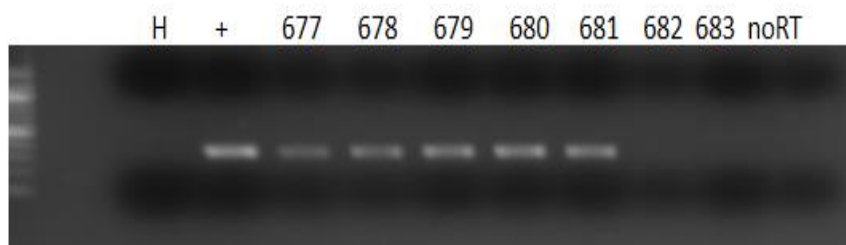
Ποικιλία	Αριθμός δέντρων	Επιτυχημένοι εμβολιασμοί	Αποτυχημένοι εμβολιασμοί
Κορωνέικη	3	2	1
Μαστοειδής	2	2	0
Μαυρολιά Μεσσηνίας	4	3	1
Τραγολιά	2	1	1
Arbequina	17	11	6
Arbosana	5	4	1
Ascolana	3	1	2
Coratina	4	3	1
Frantoio	4	2	2
Sepoka	3	1	2
<b>Σύνολο</b>	<b>47</b>	<b>30</b>	<b>17</b>



**Εικόνα 3. 20:** Επιτυχημένοι εμβολιασμοί εμβολίων μολυσμένων με τον ΟΙΝΤ σε δέντρο ποικιλίας *Arbequina*. Δεξιά φαίνεται καθαρά το σημείο ένωσης του εμβολίου με το υποκείμενο.

Στον έλεγχο με RT-PCR για την παρουσία του ιού τρεις μήνες από τους εμβολιασμούς, όλων των επιτυχώς εμβολιασμένων φυτών, ο νέος ΟΙΝΤ ανιχνεύτηκε με δοκιμές RT-PCR μόνο στη βλάστηση που προήλθε από το εμβόλιο (Εικ. 3.20), αλλά όχι στο υποκείμενο. Σε αντίστοιχη δειγματοληψία και έλεγχο επτά μήνες μετά από τους εμβολιασμούς ενός αριθμού επιτυχώς εμβολιασμένων δένδρων, τόσο στη βλάστηση που προήλθε από το μολυσμένο εμβόλιο, αλλά και στη βλάστηση του υποκειμένου, σε ορισμένα δέντρα ο ΟΙΝΤ ανιχνεύθηκε και στα δύο μέρη του δέντρου (Πιν. 3.9, Εικ. 3.21).

Στα δέντρα που βρέθηκαν θετικά για την παρουσία του ιού, δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα.



**Εικόνα 3.21:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης προϊόντων PCR για την ανίχνευση του ΟΙΝΤ σε εμβολιασμένα δέντρα ελιάς (H: υγιής μάρτυρας, +: θετικός μάρτυρας, 677-683: δείγματα)

**Πίνακας 3.9:** Έλεγχος ορισμένων επιτυχημένων εμβολιασμών σε φυτά διαφόρων ποικιλιών, για την παρουσία του ΟΙΝΤ. Οι αριθμοί αφορούν στην κωδικοποίηση των εμβολιασμένων δέντρων.

Κωδικός	Τμήμα Φυτού	Ποικιλία <sup>1</sup> (υποκείμενο)	Αποτελέσματα
<b>410</b>	Υποκείμενο	Arbosana	-
	Εμβόλιο	3	+
<b>411</b>	Υποκείμενο	Coratina	-
	Εμβόλιο	3	+
<b>412</b>	Υποκείμενο	Arbequina	-
	Εμβόλιο	3	+
<b>414</b>	Υποκείμενο	Arbequina	+
	Εμβόλιο	3	+
<b>415</b>	Υποκείμενο	Arbequina	-
	Εμβόλιο	3	+
<b>416</b>	Υποκείμενο	Arbequina	+
	Εμβόλιο	3	+
<b>420</b>	Υποκείμενο	Frantoio	+
	Εμβόλιο	3	+
<b>422</b>	Υποκείμενο	Μαυρολιά	-
	Εμβόλιο	3	+
<b>424</b>	Υποκείμενο	Τραγολιά	-
	Εμβόλιο	3	-
<b>427</b>	Υποκείμενο	Arbequina	-
	Εμβόλιο	1	-
<b>429</b>	Υποκείμενο	Arbequina	-
	Εμβόλιο	1	+
<b>430</b>	Υποκείμενο	Κορωνέικη	+
	Εμβόλιο	1	+
<b>432</b>	Υποκείμενο	Arbosana	-
	Εμβόλιο	1	+
<b>435</b>	Υποκείμενο	Ascolana	-
	Εμβόλιο	1	+

<sup>1</sup> Σε κάθε περίπτωση τα εμβόλια ήταν η ποικιλία αγρού, με το 1, 3 να αντιστοιχούν στα δύο θετικά δέντρα του Ν. Φθιώτιδας.

### **3.5 Μηχανικές μεταδόσεις σε φυτοδείκτες και σε δέντρα ελιάς**

Στα μηχανικά μολυσμένα φυτά γινόταν καθημερινά έλεγχος για διάστημα ενός μήνα, αλλά δεν παρατηρήθηκαν ύποπτα συμπτώματα στα φυτά. Έλεγχος των φυτών για την παρουσία του ΟΙΝΤ με RT-PCR δεν έδειξε θετικό αποτέλεσμα.

## Κεφάλαιο 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## Συζήτηση

Η ελιά είναι μια καλλιέργεια με ιδιαίτερη οικονομική και κοινωνική σημασία για την χώρα μας, η οποία κατατάσσεται ως η 3<sup>η</sup> ελαιοπαραγωγική χώρα στον κόσμο (Κωστελένος, 2015; Eurostat, 2017). Κατά τη διάρκεια της μακράιωνης παρουσίας της ελιάς στον ελλαδικό χώρο, έχουν αναπτυχθεί πάνω από 100 ελληνικές ποικιλίες, εκ των οποίων οι 52 είναι καλλιεργήσιμες και αποτελούν τη βάση της ελληνικής ελαιοκαλλιέργειας (Κωστελένος, 2011).

Στη φύση η ελιά προσβάλλεται από τουλάχιστον 15 ιούς, οι περισσότεροι εκ των οποίων, αν και σε λανθάνουσες μολύνσεις, μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην καλλιέργειά της (Martelli, 2013). Κύριο μέσο διασποράς των ιών της ελιάς είναι το αγενές πολλαπλασιαστικό υλικό και για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται παγκοσμίως υποχρεωτικά και εθελοντικά συστήματα πιστοποίησης (Loconsole et al., 2010). Η παραγωγή πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού θεωρείται μεγάλης σημασίας για μια χώρα, ιδιαίτερα για καλλιέργειες όπως της ελιάς που στηρίζονται στο εγχώριο γενετικό υλικό, αλλά προϋποθέτει την επαρκή γνώση των ενδημικών παθογόνων. Την τελευταία δεκαετία γίνεται προσπάθεια για την οργάνωσή της και στη χώρα μας. Παρόλα αυτά και όσον αφορά στην παρουσία ιών της ελιάς στην Ελλάδα, υπάρχουν μόνο περιορισμένα στοιχεία (Karoni & Kyriakopoulou, 2006; Kyriakopoulou, 1993) ενώ απουσιάζουν ευρείες επισκοπήσεις και καταγραφές, που έχουν γίνει σε όλες σχεδόν τις ελαιοπαραγωγικές χώρες. Για το λόγο αυτό στόχος της μελέτης αυτής ήταν η καταγραφή της παρουσίας και ο χαρακτηρισμός των ιών που απαντώνται στους ελληνικούς ελαιώνες. Για την πιο αποτελεσματική επίτευξη του στόχου αυτού και σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ιολογίας του DSMZ στη Γερμανία έγινε προσπάθεια διερεύνησης του ιικού προφίλ (virome) της ελιάς στη χώρα μας με τη χρήση αλληλούχιση υψηλής απόδοσης (HTS) και η οποία επέτρεψε τη ταυτοποίηση ενός νέου είδους του γένους *Terovirus*, για τον οποίο έχει προταθεί το όνομα "ο ιός T της ελιάς (olive virus T, OIVT)". Έτσι στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, επιπλέον των γνωστών ιών της ελιάς, βασικό στόχο αποτέλεσε και η ανάπτυξη και αξιολόγηση ενός διαγνωστικού πρωτοκόλλου RT-PCR για την ανίχνευση του OIVT, η διερεύνηση της παρουσίας τους στους ελληνικούς ελαιώνες, καθώς και μελέτες μολυσματικότητάς του.



Για τη διερεύνηση της παρουσίας των ιών της ελιάς και τη συλλογή απομονώσεων για περαιτέρω μελέτη, έγιναν επισκοπήσεις σε ελαιώνες, αλλά και σε μεμονωμένα, μεγάλης ηλικίας, δένδρα, σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας, από το 2017 έως το 2020. Βασικά προβλήματα για την ανίχνευση των ιών στην ελιά αποτελεί η ανισοκατανομή τους στο δένδρο και η χαμηλή τους συγκέντρωση (Loconsole et al., 2010; Bertolini et al., 2003) και για αυτόν τον λόγο και για την αξιόπιστη ανίχνευσή τους επιλέχθηκε η μέθοδος RT-PCR. Πρόκληση όμως για τις μοριακές δοκιμές αποτελεί η εξαγωγή RNA υψηλής ποιότητας και καθαρότητας από τους ιστούς της ελιάς που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε έλαια, πολυσακχαρίτες και φαινολικές ενώσεις (Bertolini et al., 2001). Για αυτό και στην παρούσα μελέτη έγινε αξιολόγηση διάφορων πρωτοκόλλων και επιβεβαιώθηκε ότι το RNeasy Plant Mini kit της Qiagen δίνει την καλύτερη ποιότητα εξαγόμενου RNA και παρουσιάζει μεγάλη αποτελεσματικότητα, ταχύτητα και ευαισθησία, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες αντίστοιχες μελέτες (Bertolini et al., 2001; Grieco et al., 2000). Παράλληλα αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο RT-PCR για την ανίχνευση του ΟΙΝΤ και το οποίο εφαρμόστηκε επιτυχώς στη μελέτη.

Συνολικά η ανάλυση των δειγμάτων ελιάς που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της χώρας έδειξε χαμηλή παρουσία ιών. Από σύνολο 158 δειγμάτων, μόνο το 10,1% βρέθηκε μολυσμένα με κάποιον ιό. Τόσο χαμηλά ποσοστά μόλυνσης έχουν αναφερθεί μόνο στην Αλβανία (2%) (Luigi et al., 2009) και διαφοροποιείται σημαντικά από άλλες χώρες (Fadel et al., 2005; Al Abdullah et al., 2005; Faggioli et al., 2005; Afechtall and Munir, 2020; Youssef et al., 2010; Bertolini et al., 2003; Zellama et al., 2018; Varanda et al., 2010) στις οποίες η εμφάνιση ιών στους ελαιώνες κυμαίνεται σε υψηλά ποσοστά έως και 86,3%, ποσοστό που αναφέρθηκε στην Τυνησία (El Air et al., 2010). Η μεθοδολογία που επιλέγεται στην κάθε επισκόπηση, δηλαδή ο αριθμός των εξεταζόμενων δειγμάτων, η μέθοδος (dot blot υβριδισμός, RT-PCR), οι εκκινητές στην RT (τυχαίοποιημένοι, ειδικοί) και το είδος του εκμαγείου που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση (tRNA, dsRNA) φαίνεται πως επηρεάζουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης. Επιπλέον, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την ύπαρξη άγνωστων ιών, οι οποίοι δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί, υπόθεση που στηρίζει και η μεγάλη συχνότητα ανίχνευσης dsRNA, το

οποίο αποτελεί ενδιάμεσο στάδιο και απόδειξη πολλαπλασιασμού ιών (Grieco et al., 2000; Martelli et al., 1995), σε διάφορες χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι πολλές εργασίες, που αναφέρουν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά μολύνσεων, αφορούν τράπεζες γενετικού υλικού ή αντίστοιχες συλλογές, όπως στην Καλιφόρνια (USDA National Clonal Germplasm Repository, Davis, California), όπου τα ποσοστά μόλυνσης φτάνουν το 93,8% (Al Rwahnih et al., 2011). Τέτοια ποσοστά μπορεί όμως να μην αντιστοιχούν πάντα στην πραγματική διασπορά των ιών στον αγρό. Τα ποσοστά μολύνσεων στην Ελλάδα σε μια συλλογή γενετικού υλικού του Ινστιτούτου Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου, στα Χανιά είναι 62,5% (Mathioudakis et al., 2020).

Στις επισκοπήσεις που πραγματοποιήσαμε ο νέος ΟΙVT αποδείχθηκε ως ο πιο συχνά απαντώμενος ιός, καθώς ανιχνεύθηκε στο 4,4% των δειγμάτων, με μολύνσεις να καταγράφονται στη Λαμία, την Αττική, την Κορινθία, την Αρκαδία και την Αργολίδα. Λαμβάνοντας υπ' όψιν το γεγονός ότι ο ιός ανιχνεύθηκε σε περιοχές που βρίσκονται σε απόσταση μεταξύ τους, μπορεί να υποτεθεί πως δεν πρόκειται για νέο ιό ή εισαγωγή του στην Ελλάδα. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν γνωστοί φορείς για κανέναν ιό που ανήκει στο γένος *Terovirus*, οπότε δεν μπορεί να προταθεί εξάπλωση μέσω κάποιου πιθανού φορέα.

Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός νέων ιών και κυρίως δένδρων ανιχνεύονται και ταυτοποιούνται με HTS, αλλά απουσιάζουν δοκιμές μολυσματικότητας. Στην παρούσα εργασία, με την πραγματοποίηση εμβολιασμών σε δέντρα ελιάς, διαπιστώθηκε ότι ο ΟΙVT μεταδίδεται και μάλιστα αποδείχθηκε η ευπάθεια των ποικιλιών Κορονέικη, Arbequina και Frantoio. Η Κορονέικη είναι η κύρια ποικιλία που καλλιεργείται στην Ελλάδα και μαζί με την ισπανική Arbequina είναι οι κύριες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται σε συστήματα πυκνής φύτευσης που εξαπλώνονται τα τελευταία χρόνια στην καλλιέργεια της ελιάς (Κωστελένος, 2011). Αν και οι εμβολιασμοί που πραγματοποιήθηκαν και σε άλλες ποικιλίες ελιάς δεν ήταν επιτυχείς, ωστόσο ο αριθμός των δέντρων που ελέγχθηκε ήταν μικρός ώστε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την ευαισθησία τους στον ΟΙVT. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν συγκεκριμένα συμπτώματα, ούτε στα δέντρα που βρέθηκαν μολυσμένα στον αγρό, ούτε και σε αυτά στα οποία ο ιός

μεταδόθηκε με εμβολιασμό. Γενικά, η απουσία ευδιάκριτων συμπτωμάτων είναι κοινό χαρακτηριστικό για τους ιούς του γένους *Terovirus*. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι ο ΟΙVΤ διακινείται με το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό, που παραμένει ασυμπτωματικό, όπως και οι περισσότεροι ιοί που προσβάλλουν την ελιά (Martelli, 2013). Ωστόσο, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για την καταγραφή της ευαισθησίας των διαφόρων ποικιλιών ελιάς, την παρουσία πιθανών συμπτωμάτων, αλλά κυρίως για τις επιπτώσεις που μπορεί να έχει η μόλυνση.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν μηχανικές μολύνσεις του ΟΙVΤ σε ορισμένους φυτοδείκτες, χωρίς επιτυχία. Και σε αυτήν την περίπτωση όμως, χρειάζεται να γίνουν δοκιμές σε μεγαλύτερο αριθμό φυτών και φυτικών ειδών για να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την ικανότητα μηχανικής μετάδοσης του ιού. Από τους υπόλοιπους ταξινομημένους ιούς στο γένος *Terovirus* μόνο ο ΡVΤ μεταδίδεται μηχανικά στο εργαστήριο (Martelli, 2009; Harrison, 1977), ενώ για τον ChVT οι προσπάθειες για μηχανική μετάδοση σε φυτοδείκτες δεν ήταν επιτυχείς (Marais et al., 2020).

Στην παρούσα μελέτη εκτός από τον ΟΙVΤ, από τους γνωστούς ιούς της ελιάς ανιχνεύθηκαν μόνο οι CMV, CLRV και OLYaV. Ο CMV ανιχνεύθηκε στην Κορινθία, το Αργίριο, την Αττική και την Αργολίδα (3,2%) ο OLYaV στην Αρκαδία και το Κιλκίς (1,3%) και ο CLRV στα Μέγαρα και την Παιανία Αττικής (1,3%).

Ο CMV είναι ένας ενδημικός ιός σε καλλιέργειες μεγάλης οικονομικής σημασίας στη χώρα μας (Chatzivassiliou et al., 2016; Giakountis et al., 2016; Giakountis et al., 2018; Kyriakopoulou et al., 2000; Valachas et al., 2021; Varveri & Boutsika, 1999; Vovlas & Di Franco, 2004; Xanthis et al., 2015a,b) και ήταν ο ιός που ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα μετά τον ΟΙVΤ. Ο ημι-έμμονος τρόπος μετάδοσής του με αφίδες (Gallitelli, 2000; Palukaitis & García-Arenal, 2003) διευκολύνει την εξάπλωση του CMV σε περισσότερα από 1.060 φυτικά είδη, που αποτελούν τους γνωστούς του ξενιστές, συμπεριλαμβανομένης και της ελιάς (Yoon et al., 2019). Μολύνσεις του CMV σε ελιά έχουν αναφερθεί σε λίγες χώρες και πάντα χωρίς παρουσία συμπτωμάτων. Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης αναφέρεται στην Ιταλία με ποσοστό 33,6% (Al Rwahnih et al., 2011; Çaglayan et al., 2011; El Air et al., 2011; Al-Abdallah et al., 2012; Afechtal and Mounir, 2020).

Παγκοσμίως, οι απομονώσεις του CMV παρουσιάζουν πολύ μεγάλη γενετική ποικιλομορφία και στην πλειοψηφία τους κατηγοριοποιούνται σε τρεις υποομάδες - subgroups IA, IB και II (Jacquemond, 2012). Οι απομονώσεις που αποκτήθηκαν από αυτή τη μελέτη κατηγοριοποιούνται στην υποομάδα I, στην οποία ανήκουν σχεδόν όλες οι ελληνικές απομονώσεις του ιού (Giakountis et al., 2018; Valachas et al., 2021). Ωστόσο, οι τέσσερις απομονώσεις της ελιάς ανήκουν στην υποομάδα IB, και η μία στην υποομάδα υποομάδα IA, όπως και οι υπόλοιπες κατατεθειμένες ελληνικές. Το subIB συμπεριλαμβάνει απομονώσεις που προέρχονται από την Ανατολική Ασία (Jacquemond, 2012) και επιπλέον κάποιες εξειδικευμένες προς τον ξενιστή ελληνικές απομονώσεις λαχανικών (Valachas et al., 2021). Στις απομονώσεις που αποκτήθηκαν δεν ανιχνεύθηκε δορυφορικό RNA του ιού (satRNA) - το μη κωδικοποιούμενο μοριακό παράσιτο του CMV (Mochizuki & Ohki, 2012). Από τη φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων της μελέτης επιβεβαιώνεται ότι δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ της φυλογένεσης και της γεωγραφικής προέλευσης των απομονώσεων, κάτι που γενικότερα παρατηρείται στον CMV (Jacquemond, 2012).

Ο OLYaV, είναι ιός που προσβάλλει μόνο την ελιά και πρόκειται για ένα μη ταξινομημένο είδος, που πιθανόν ανήκει σε ένα νέο γένος της οικογένειας *Closteroviridae* (Ruiz-García et al., 2020). Ο ιός έχει σχετιστεί με συμπτώματα όπως είναι ο έντονος αποχρωματισμός (Çağlayan et al., 2011; Martelli et al., 2013; Albanese et al., 2012), μεταβολές στη φυτική ανάπτυξη (Cutuli et al., 2017) ή ξυλώδη κυλινδρικά συμπτώματα (Ruiz-García et al., 2020). Επιπλέον, μπορεί να έχει θετική επίδραση στην ποιότητα του ελαιόλαδου, χάρη στη μείωση της ελεύθερης οξύτητάς του (Fontana et al., 2019). Είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους ιούς της ελιάς, με παγκόσμια εξάπλωση και συχνότητα εμφάνισης που στην Ιταλία και συγκεκριμένα στην περιοχή της Καλαβρίας, φτάνει το 86% (Al-Abdallah et al., 2012; Çağlayan, et al., 2011; El Air et al., 2011; Martelli et al., 2013; Godena et al., 2016; El-Banna et al., 2017; Zellama et al., 2018; Campos et al., 2019; Fontana et al., 2019). Υψηλά ποσοστά μόλυνσεων από τον OLYaV έχουν αναφερθεί και σε τράπεζες γενετικού υλικού όπως στην Καλιφόρνια (USDA National Clonal Germplasm Repository, Davis, California), όπου το ποσοστό των δέντρων που βρέθηκαν

μολυσμένα με τον OLYaV ήταν 93,8%, και ανάμεσα τους και τρεις ελληνικές ποικιλίες (Al Rwahnih et al., 2011). Σε συλλογή στο Ινστιτούτο Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου στα Χανιά, το 5% των δέντρων βρέθηκε μολυσμένο με τον OLYaV (Mathioudakis et al., 2020).

Οι απομονώσεις του OLYaV εμφανίζουν μεγάλη μοριακή ποικιλομορφία στο γονίδιο HSP70h, το οποίο κωδικοποιείται από το ORF4 και διακρίνεται από το προφίλ αναλύσεων SSCP (Fadel et al., 2005; Essakhi et al., 2006) και τη φυλογενετική ανάλυση (Essakhi et al., 2006; Al Rwahnih et al., 2011). Διαφοροποιημένες απομονώσεις ομαδοποιούνται σε ξεχωριστές φυλογενετικές ομάδες, οι οποίες μπορεί και να συνυπάρχουν σε μικτές μολύνσεις στο ίδιο δέντρο. Αυτή η γενετική ποικιλομορφία οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές αμινοξέων στην παραγόμενη πρωτεΐνη HSP70 (Essakhi et al., 2006; Al Rwahnih et al., 2011) και έχει προταθεί ότι σχετίζεται με τη γεωγραφική προέλευση του μολυσμένου υλικού (Essakhi et al., 2006), αν και άλλες μελέτες διαφωνούν (Al Rwahnih et al., 2011). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι το μεγάλο εύρος παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο γονίδιο HSP70 σχετίζεται με αντίστοιχη παραλλακτικότητα που εμφανίζει η RdRp (Essakhi et al., 2006), με τα δύο γονίδια να συμπεριλαμβάνονται στα κριτήρια ταξινόμησης για τα είδη της οικογένειας *Closteroviridae* (Fuchs et al., 2020). Η απομόνωση που χαρακτηρίσαμε σε αυτή τη μελέτη, εμφανίζεται ιδιαίτερα διαφοροποιημένη από τις υπόλοιπες ελληνικές απομονώσεις του ιού που υπάρχουν στην GenBank (Mathioudakis et al., 2020) και ομαδοποιείται σε μία ομάδα που περιλαμβάνει απομονώσεις από την Καλιφόρνια και την Ιταλία.

Τέλος, ανιχνεύθηκε και ο CLRV ο οποίος μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες σε μεγάλο αριθμό, κυρίως ξυλωδών, φυσικών ξενιστών (Büttner et al., 2011). Ο ιός έχει ανιχνευθεί και προηγουμένως σε δέντρα ελιάς και καρυδιάς στην Ελλάδα (Mathioudakis et al., 2020; Sclavounos et al., 2008; Karoni & Kyriakopoulou, 2006). Στην ελιά προκαλεί κυρίως λανθάνουσες μολύνσεις (Savino and Gallitelli, 1981), ωστόσο, μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στην απόδοση και την ποιότητα του ελαιόλαδου, ανάλογα με την ποικιλία (Godena et al., 2012). Ο ιός έχει ανιχνευθεί στην ελιά σε πολλές χώρες, με το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης να αναφέρεται στην Κροατία (24%) (Al-Abdallah et al., 2012; Çağlayan et al., 2011; El Air et al., 2011;

Luigi et al., 2011; Godena et al., 2016; Afechtal and Mounir, 2020). Μπορεί να μεταδοθεί με το σπόρο της ελιάς, σε ποσοστό 41% (Saronari et al., 2002), επομένως η χρήση σπορόφυτων ελιάς ως υποκείμενα μπορεί να συμβάλει περαιτέρω στην εξάπλωσή του.

Ο CLRV έχει ssRNA γονιδίωμα που αποτελείται από δύο RNAs που έχουν σχεδόν όμοιο 3'UTR (Borja et al., 1995) και είναι το μέρος του γονιδιώματος που χρησιμοποιείται συχνά για την φυλογενετική ανάλυση του ιού. Για τις απομονώσεις του CLRV έχει προταθεί μια «εξειδικευμένη προς τον ξενιστή» ομαδοποίηση των αλληλουχιών (Rebenstorf et al., 2006), η οποία υποστηρίζεται και από πιο πρόσφατες μελέτες (Cieślińska, 2020). Η αποτελεσματική μετάδοση του CLRV με τον σπόρο και τη γύρη με απουσία ξενιστή (Jones, 1985) έχει ως αποτέλεσμα την εξάπλωσή του κυρίως μέσα στο ίδιο είδος και αυτός ο τρόπος μετάδοσης είναι ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει τη βιολογική, ορολογική και μοριακή παραλλακτικότητα των απομονώσεων του (Rebenstorf et al., 2006), που ίσως και να σχετίζονται και με την γεωγραφική προέλευσή τους (Jones, 1985). Ωστόσο, υπάρχουν απομονώσεις που διαφοροποιούνται από αυτή την ομαδοποίηση (von Bargen et al., 2009; Woo et al., 2012; Woo & Pearson, 2014). Από την άλλη, απομονώσεις που έχουν την ίδια αλληλουχία στην περιοχή 3'UTR μπορεί να έχουν διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά (εύρος ξενιστών, συμπτώματα, σπορομετάδοση) (Woo and Pearson, 2013). Οι ελληνικές απομονώσεις αυτής της μελέτης ομαδοποιούνται ανάμεσα από τις υποομάδες D2 και C σύμφωνα με τους Rebenstorf και συνεργάτες (2006), με μεγαλύτερη ομοιότητα (93,84%) με μία αλληλουχία που απομονώθηκε από *Plantago major* και μία από *Actinidia chinensis*, από την Νέα Ζηλανδία. Η ομάδα D2 περιλαμβάνει κυρίως απομονώσεις που προέρχονται από καρυδιά (*Juglans regia*) χωρίς να υπάρχει ξεκάθαρη γεωγραφική προέλευση και η ομάδα C περιλαμβάνει απομονώσεις που δεν σχετίζονται μεταξύ τους. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι οι ελληνικές απομονώσεις διαφοροποιούνται αρκετά (97%), από τις κατατεθειμένες ελληνικές απομονώσεις ελιάς οι οποίες ομαδοποιούνται στην ομάδα D1 (Mathioudakis et al., 2020).

Στη μελέτη αυτή δεν ανιχνεύτηκαν οι ArMV και SLRSV, δύο ιοί που ανήκουν στο γένος *Nepovirus* και ανιχνεύτηκαν πρόσφατα σε συλλογή γενετικού υλικού του

Ινστιτούτου Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου, στα Χανιά (Mathioudakis et al., 2020). Οι ιοί αυτοί μεταδίδονται με νηματώδεις, που χαρακτηρίζονται από περιορισμένη κινητικότητα, οπότε και θεωρείται ότι εξαπλώνονται σε μεγάλες αποστάσεις κυρίως με το μολυσμένο φυτικό. Οι διαφορές αυτές λοιπόν στην παρουσία τους μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στην προέλευση του πολλαπλασιαστικού υλικού.

Η επιδημιολογία των ιών της ελιάς δεν είναι πλήρως κατανοητή. Ο CLRV δεν έχει ενεργούς φορείς, ενώ δεν υπάρχουν γνωστοί φορείς τόσο για τον OLYaV (Sabanazdovic et al., 1999) όσο και για τον νέο ιό που ανιχνεύσαμε, τον OIVT. Ακόμα και για τον CMV που είναι αφιδομεταδιδόμενος, οι φορείς που εμπλέκονται στη μετάδοσή του και η αποτελεσματικότητα της μετάδοσης στους ελαιώνες δεν είναι ακόμα γνωστή. Επομένως, το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό είναι το κύριο μέσο μετάδοσης των ιών στην ελιά, η διασπορά των οποίων διευκολύνεται από το γεγονός ότι οι μολύνσεις είναι κυρίως λανθάνουσες (Martelli et al., 2013). Στην Ελλάδα οι ελαιώνες κατά κύριο λόγο είναι μικρού μεγέθους και το πολλαπλασιαστικό υλικό που διακινείται δεν είναι πιστοποιημένο και προέρχεται από αυτόχθονες ποικιλίες ή γενότυπους που παράγονται σε τοπικά φυτώρια. Μόνο πρόσφατα, έχει ξεκινήσει εγκατάσταση ελαιώνων πυκνής φύτευσης με τις ποικιλίες Arbequina, Arbosana και Κορωνέικη (i-38), με τη χρήση πολλαπλασιαστικού υλικού που εισάγεται από την Ισπανία. Έτσι έως πρόσφατα στη χώρα μας, η παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού γινόταν με παραδοσιακές πρακτικές, χωρίς σημαντική εισαγωγή υλικού από άλλες χώρες, με αποτέλεσμα το εγχώριο υλικό να μην έχει υποστεί σημαντικές αλλαγές, εδώ και αιώνες. Πιθανόν, αυτός να είναι και ο λόγος που δεν καταγράψαμε εκτεταμένη παρουσία ιολογικών προσβολών.

Συνολικά η παρούσα μελέτη έδειξε χαμηλή παρουσία των γνωστών ιών της ελιάς στους ελληνικούς ελαιώνες, παρόλο που υψηλότερα ποσοστά σε άλλες περιοχές ή σε νεότερους ελαιώνες δεν μπορούν να αποκλειστούν. Ωστόσο, ανιχνεύτηκε αρκετά συχνά ένας καινούριος ιός, ο OIVT που μάλλον υπάρχει στη χώρα μας εδώ και χρόνια. Η μέθοδος RT-PCR που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη επιτρέπει την ανίχνευση σχετικά διαφοροποιημένων απομονώσεων του OIVT και θα ήταν χρήσιμο να μελετηθεί η παρουσία και εξάπλωση του ιού και σε άλλες χώρες. Περαιτέρω

μελέτες όσον αφορά στα βιολογικά χαρακτηριστικά του ιού θα καθορίσουν τις ακριβείς επιπτώσεις του στην καλλιέργεια της ελιάς.



## Βιβλιογραφία

- Abdine, M., Allak, H., Nus, B. E., Nigro, F., Catalano, L., & Digiario, M. (2007). *Phytosanitary Aspects and Nursery Production of Olive in Syria : pitfalls and perspectives*. 151, 143–151.
- Afechtal, M., & Mounir, M. (2020). Preliminary evaluation of the status of olive-infecting viruses in Morocco. *Moroccan Journal of Agricultural Sciences*, 1(1), 59–61.
- Al-Abdallah, O., Elbeaino, T., Valentini, F., Digiario, M., & Farinelli, D. (2012). Sanitary assessment of olive varieties in a collection plot in Perugia (Umbria, Italy). *Acta Horticulturae*, 940(April 2014), 673–680.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.940.93>
- Al-Rwahnih, M., Guo, Y., Daubert, S., Golino, D., & Rowhani, A. (2011). Characterization of latent viral infection of olive trees in the National Clonal germplasm repository in California. *Journal of Plant Pathology*, 93(1), 227–231.  
<https://doi.org/10.1400/169612>
- Al Abdullah, A., El Beaino, T., Saponari, M., Hallak, H., & Digiario, M. (2005). Preliminary evaluation of the status of olive-infecting viruses in Syria. *EPPO Bulletin*, 35(2), 249–252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2005.00818.x>
- Alabdullah, A., Elbeaino, T., Minafra, A., Digiario, M., & Martelli, G. P. (2009). Detection and variability of olive latent virus 3 in the mediterranean region. *Journal of Plant Pathology*, 91(3), 521–525.  
<https://doi.org/10.4454/jpp.v91i3.542>
- Alabdullah, A., Minafra, A., Elbeaino, T., Saponari, M., Savino, V., & Martelli, G. P. (2010). Complete nucleotide sequence and genome organization of Olive latent virus 3, a new putative member of the family Tymoviridae. *Virus Research*, 152(1–2), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.05.010>
- Albanese, G., Saponari, M., & Faggioli, F. (2012). Phytosanitary Certification. *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*,

November. <https://doi.org/10.5772/51722>

- Alkowni, R., Grieco, F., & Martelli, G. P. (2001). Complete nucleotide sequence of RNA-2 of Olive latent ringspot virus. *Archives of Virology*, *146*(1), 127–133. <https://doi.org/10.1007/s007050170196>
- Barba, M. (1993). Viruses and virus-like diseases of olive. *EPPO Bulletin*, *23*(3), 493–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1993.tb01358.x>
- Bertolini, E., Olmos, A., Martínez, M. C., Gorris, M. T., & Cambra, M. (2001). Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *Journal of Virological Methods*, *96*(1), 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00313-5)
- Bertolini, Edson, Olmos, A., López, M. M., & Cambra, M. (2003). Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology*, *93*(3), 286–292. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.286>
- Breton, C. M., Warnock, P., & Bervillé, A. J. (2012). Origin and History of the Olive. In *Olive Germplasm – The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy* (Vol. 32, pp. 137–144). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/51933>
- Büttner, C., von Barga, S., Bandte, M., & Myrta, A. (2011). Cherry leaf roll virus. In: Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. In *APS press*.
- Caglayan, K., Faggioli, F., & Barba, M. (2011). CHAPTER 53: Viruses, Phytoplasmas, and Diseases of Unknown Etiology of Olive Trees. *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits, December 2013*, 289–297. <https://doi.org/10.1094/9780890545010.053>
- Caglayan, K., Fidan, U., Tarla, G., & Gazel, M. (2004). First report of olive viruses in Turkey Drssesr Noru FIRST REPORT OF OLIVE VIRUSES IN Drsenss Nors FIRST REPORT OF PLUM BARK NECROSIS STEM PITTING . ASSOCIATED. *Journal of Plant Pathology*, *86*(April 2016), 91.

- Campos, M. D., Zellama, M. S., Varanda, C., Materatski, P., Peixe, A., Chaouachi, M., & Félix, M. do R. (2019). Establishment of a sensitive qPCR methodology for detection of the olive-infecting viruses in portuguese and tunisian orchards. *Frontiers in Plant Science*, *10*(May), 1–7.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00694>
- Cardoso, J. M.S., Félix, M. R., Clara, M. I. E., & Oliveira, S. (2005). The complete genome sequence of a new necrovirus isolated from *Olea europaea* L. *Archives of Virology*, *150*(4), 815–823. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0453-1>
- Cardoso, J. M.S., Félix, M. R., Oliveira, S., & Clara, M. I. E. (2004). A Tobacco necrosis virus D isolate from *Olea europaea* L.: Viral characterization and coat protein sequence analysis. *Archives of Virology*, *149*(6), 1129–1138.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-003-0258-7>
- Cardoso, Joana M.S., Félix, M. R., Clara, M. I. E., & Oliveira, S. (2009). Complete genome sequence of a Tobacco necrosis virus D isolate from olive trees. *Archives of Virology*, *154*(7), 1169–1172. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0414-9>
- Castellano, M. A., Loconsole, G., Grieco, F., Di Sansebastiano, G. P., & Martelli, G. P. (2005). Subcellular localization and immunodetection of movement proteins of olive latent virus 1. *Archives of Virology*, *150*(7), 1369–1381.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-004-0472-y>
- Chatzivassiliou, EK Giakountis, A., Kumari, S., & Makkouk, K. (2016). Viruses affecting lentil (*Lens culinaris* Medik.) in Greece; incidence and genetic variability of Bean leafroll virus and Pea enation mosaic virus. *Phytopathologia Mediterranea*, *55*(2), 239–252.
- Cheng, C.-P., & Nagy, P. D. (2003). Mechanism of RNA Recombination in Carmo- and Tombusviruses: Evidence for Template Switching by the RNA-Dependent RNA Polymerase In Vitro. *Journal of Virology*, *77*(22), 12033–12047.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.77.22.12033-12047.2003>
- Chiappetta, A., Bruno, L., & Muzzalupo, I. (2014). Omics Approaches for the

- Characterization and Valorisation of Olive Varieties. In *Agricultural and Food Biotechnologies of Olea europaea and Stone Fruit* (pp. 75–108). Bentham Science. <https://doi.org/10.2174/97816080599351150101>
- Çifçi, O., & Serçe, Ç. U. (2014). Research on the presence of some viruses in olive orchards using serological and molecular techniques in Mardin province of Turkey. *Bitki Koruma Bülteni*, *54*(3), 233–246.
- Cutuli, M., Lo Bianco, R., Marra, F. P., & Caruso, T. (2017). Growth and physiological responses of young olive trees affected by Olive leaf yellowing associated virus. *Acta Horticulturae*, *1177*, 165–168. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1177.22>
- Díaz-cruz, G. A., Smith, C. M., Wiebe, K. F., & Cassone, B. J. (2017). First Complete Genome Sequence of Tobacco necrosis virus D Isolated from Soybean and from North America. *American Society for Microbiology*, *5*(32), 32–33.
- EL-Banna, O.-H. M., Maher, E. M., Youssef, S. A., Agric, F., Pathol, P., Inst, P. R., & Centre, A. R. (2017). RESEARCH ARTICLE MOLECULAR CHARACTERIZATION AND CYTOPATHOLOGICAL STUDIES OF OLIVE LATENT VIRUS 1 ( OLV-1 ) AND OLIVE LATENT VIRUS 2 ( OLV-2 ) ISOLATED LATED FROM OLIVE TREES IN EGYPT 1 Om-Hashem. *International Journal of Current Research*, *9*(09), 57910–57916.
- El Air, M., Mahfoudi, N., Digiario, M., Najjar, A., & Elbeaino, T. (2011). Detection of Olive-infecting Viruses in Tunisia. *Journal of Phytopathology*, *159*(4), 283–286. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01771.x>
- Fadel, C., Digiario, M., Choueiri, E., El Beaino, T., Saponari, M., Savino, V., & Martelli, G. P. (2005). On the presence and distribution of olive viruses in Lebanon. *EPPO Bulletin*, *35*(1), 33–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2005.00776.x>
- Faggioli, F., & Barba, M. (1995). An elongated virus isolated from olive (*Olea Europea* L.). *Acta Horticulturae*, *386*, 593–600. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.386.87>
- Faggioli, F., Ferretti, L., Albanese, G., Sciarroni, R., Pasquini, G., Lumia, V., & Barba, M. (2005). Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-

- PCR. *Journal of Plant Pathology*, 87(1), 49–55.  
<https://doi.org/10.4454/jpp.v87i1.896>
- Faggioli, F., Ferretti, L., Pasquini, G., & Barba, M. (2002). Detection of Strawberry latent ring spot virus in leaves of olive trees in Italy using a one-step RT-PCR. *Journal of Phytopathology*, 150(11–12), 636–639.  
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00810.x>
- Faggioli, F., Roschetti, A., Luigi, M., Leo, G., & Albanese, G. (2016). Sanitary Selection of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars for Worldwide Distribution. *Asian Journal of Plant Pathology*, 11(1), 28–34. <https://doi.org/10.3923/ajppaj.2017.28.34>
- Félix, M. do R., Cardoso, J. M. S., Oliveira, S., & Clara, M. I. E. (2007). Biological and molecular characterization of olive latent virus 1. *Plant Viruses*, 1(2), 170–177.
- Félix, M. do R., Varanda, C. M. R., & Clara, M. I. E. (2012). Biology and molecular characterization of necroviruses affecting *Olea europaea* L.: A review. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 247–259. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9907-y>
- Félix, M. R. F., & Clara, M. I. E. (2002). Two necrovirus isolates with properties of olive latent virus 1 and of tobacco necrosis virus from Olive in Portugal. *Acta Horticulturae*, 586, 725–728.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.586.155>
- Fontana, A., Piscopo, A., De Bruno, A., Tiberini, A., Muzzalupo, I., & Albanese, G. (2019). Impact of Olive Leaf Yellowing Associated Virus on Olive (*Olea europaea* L.) Oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(4), 1–4.  
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201800472>
- Fuchs, M., Bar-Joseph, M., Candresse, T., Maree, H. J., Martelli, G. P., Melzer, M. J., Menzel, W., & Minafra, A. Sabanadzovic, S. (2020). ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Closteroviridae. *Journal of General Virology*, 101, 364–365.
- Gallitelli, D. (2000). The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research*, 71(1–2), 9–21.

- Gallitelli, D., & Savino, V. (1985). Olive latent virus-1, an isometric virus with a single RNA species isolated from olive in Apulia, Southern Italy. *Annals of Applied Biology*, *106*(2), 295–303. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1985.tb03119.x>
- Giakountis, A., Tsarmopoulos, I., & Chatzivassiliou, E. K. (2018). Cucumber mosaic virus isolates from Greek legumes are associated with satellite RNAs that are necrogenic for tomato. *Plant Disease*, *102*(11), 2268–2276. <https://doi.org/10.1094/pdis-08-17-1259-re>
- Godena, S., Faggioli, F., Luigi, M., Saponari, M., Loconsole, G., Vončina, D., & Đermić, E. (2016). Incidence of viruses on autochthonous and introduced olive varieties in Croatian Istria detected by three diagnostic techniques. *Journal of Plant Pathology*, *98*(3), 657–660. <https://doi.org/10.4454/JPP.V98I3.045>
- Godena, Sara, Bendini, A., Giambanelli, E., Cerretani, L., Ermić, D., & Ermić, E. (2012). Cherry leafroll virus: Impact on olive fruit and virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *114*(5), 535–541. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100277>
- Goh, C. J., Park, D., Lee, J. S., Davey, P. A., Pernice, M., Ralph, P. J., & Hahn, Y. (2019). *Zostera virus T – a novel virus of the genus Tepovirus identified in the eelgrass, Zostera muelleri*. 366–372. <https://doi.org/10.4149/av>
- Gratsia, M. E., Kyriakopoulou, P. E., Voloudakis, A. E., & Tzanetakis, I. E. (2011). *Two viruses associated with a new disease of spinach in Greece*.
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Pantaleo, V., Savino, V., & Martelli, G. P. (2002). Molecular Detection of Olive-Infecting Viruses. *Acta*, *586*, 737–740.
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V., & Martelli, G. P. (2000). Molecular detection of olive viruses. *EPPO Bulletin*, *30*(3–4), 469–473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2000.tb00931.x>
- Grieco, F., Dell’Orco, M., & Martelli, G. P. (1996). The nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 of olive latent virus 2 and its relationships in the family Bromoviridae. *Journal of General Virology*, *77*(10), 2637–2644. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-10-2637>

- Grieco, F., Martelli, G. P., & Savino, V. (1995). The nucleotide sequence of RNA3 and RNA4 of olive latent virus 2. *Journal of General Virology*, 76(4), 929–937.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-929>
- Grieco, F., Martelli, G. P., Savino, V., & Piazzolla, P. (1992). PROPERTIES OF OLIVE LATENT VIRUS 2 Author ( s ): F . GRIECO , G . P . MARTELLI , V . SAVINO and P . PIAZZOLLA Source : Rivista di Patologia Vegetale , Serie V , Vol . 2 , No . 3 ( 1992 ), pp . 125-136 Published by : Società Italiana di Patologia Vegetale. *Rivista Di Patologia Vegetale*, 2(3), 125–136.
- Grieco, F., Parrella, G., & Vovlas, C. (2002). An isolate of Olive latent virus 2 infecting castor bean in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 84(2), 129–131.  
<https://doi.org/10.4454/jpp.v84i2.1097>
- Harrison, B. D. (1977). *Host range , purification and properties of potato virus T*. 223–235.
- Henriques, M. I. da C., Rei, F. T., Leitão, F. A., Serrano, J. F., & Potes, M. . (1992). Virus diseases in *Olea europaea* L. cultivars. I. Immunodiagnosis of Strawberry latent ringspot nepovirus. *Phytopathologia Mediterranea*, 31(3), 127–132.  
<http://www.jstor.org/stable/42685831>
- Henriques, M. I. E. da C. (1994). virus diseases of olive: an overlook. *Acta*, 379–385.
- Herrera, G., & Madariaga, V. (1999). Detection of viroid-like organism on olive plants ( *Olea europaea* L .) with sickle leaf symptoms. *Agricultura Tecnica*, 59(3), 178–185.
- Ilarioni, L., & Proietti, P. (2014). The extra-virgin olive oil handbook. In *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook* (pp. 59–67). <https://doi.org/10.1002/9781118460412>
- Jacquemond, M. (2012). Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, 84, 439–504.
- Jones, A. (1985). *Cherry leaf roll virus*. *Association of Applied Biologists, Descriptions of Plant Viruses*, 306. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=306>
- Kaponi, M., & Kyriakopoulou, P. (2006). Olive viruses in Greece. *13th National*

*Phytopathological Congress, Athens, GR, 2006-10-16/19, 78.*

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kyriakopoulou, P. E. (1993). Olive sickle leaf symptoms widespread in Greece'. *EPPO Bulletin*, *23*, 499–500.
- Kyriakopoulou, P. E. (1996). Olive fruit hump and olive fruit pox: two new diseases of possible viral origin. *Phytopathologia Mediterranea*, *35*, 231–232.
- Kyriakopoulou, P., Perdakis, D., Sclavounos, A., Girgis, S., Lykouressis, D., Tsitsipis, J., & Christaki, P. (2000). Cucumber mosaic cucumovirus incidence in open-field tomato in the Olympia area and trap captures of alate aphids. *OEPP/EPPO Bulletin*, *30*(2), 305–315.
- Liu, Y. Y., Hellen, C. U. T., Cooper, J. I., Bertoli, D. J., Coates, D., & Bauer, G. (1990). The nucleotide sequence of a satellite RNA associated with arabis mosaic nepovirus. *Journal of General Virology*, *71*(6), 1259–1263. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-6-1259>
- Loconsole, G., Saponari, M., Faggioli, F., Albanese, G., Bouyahia, H., Elbeaino, T., Materazzi, A., Nuzzaci, M., Prota, V., Romanazzi, G., Trisciuzzi, N., & Savino, V. (2010). Inter-laboratory validation of PCR-based protocol for detection of olive viruses. *EPPO Bulletin*, *40*(3), 423–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2010.02416.x>
- Luigi, M., Godena, S., Dermić, E., Barba, M., & Faggioli, F. (2011). Detection of viruses in olive trees in Croatian Istria. *Phytopathologia Mediterranea*, *50*(1), 150–153. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-8398](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8398)
- Luigi, M., Manglli, A., Thomaj, F., Buonauro, R., Barba, M., & Faggioli, F. (2009). Phytosanitary evaluation of olive germplasm in Albania. *Phytopathologia Mediterranea*, *48*(2), 280–284. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-2785](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2785)



- Marais, A., Faure, C., Mustafayev, E., Barone, M., Alioto, D., & Candresse, T. (2015). Characterization by Deep Sequencing of Prunus virus T , a Novel Tepovirus Infecting Prunus Species. *Phytopathology*, *105*(1), 135–140.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-04-14-0125-R>
- Marais, A., Šafářová, D., Navrátil, M., Faure, C., Cornaggia, D., Brans, Y., Suchá, J., & Candresse, T. (2020). Complete genome sequence of cherry virus T, a novel cherry-infecting tepovirus. *Archives of Virology*, *165*(7), 1711–1714.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04656-w>
- Marte, M. (1986). Strawberry Latent Ringspot Virus Associated with a New Disease of Olive in Central Italy. *Plant Disease*, *70*(2), 171. <https://doi.org/10.1094/pd-70-171>
- Martelli, G. P. (1999). Infectious diseases and certification of olive : an overview. *EPPO Bulletin*, *29*, 127–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1999.tb00806.x>
- Martelli, G. P., Salerno, M., Savino, V., & Prota, U. (2002). An appraisal of diseases and pathogens of olive. *Acta Horticulturae*, *586*, 701–708.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.586.150>
- Martelli, G.P., Savino, V., Catalano, L., Di Terlizzi, B., Sabanadzovic, S., & Greco, N. (1995). VIRUSES AND CERTIFICATION OF OLIVE IN APULIA (SOUTHERN ITALY). *Acta Horticulturae*, *386*(386), 569–573.  
<https://doi.org/10.17660/actahortic.1995.386.83>
- Martelli, Giovanni P. (2013). A brief outline of infectious diseases of olive. *Palestine Technical University Research Journal*, *1*(1), 1–9.
- Materazzi, A., Toni, S., Panatroni, A., Osti, A., & Triolo, E. (1996). On the presence of a new isometric virus in *Olea Europaea* L. *Convegno Annuale Della Societa Italiana Di Patologia*, 57–59.
- Mathioudakis, M. M., Saponari, M., Hasiówjarszewska, B., Elbeaino, T., & Koubouris, G. (2020). Detection of viruses in olive cultivars in Greece, using a rapid and effective RNA extraction method, for certification of virus-tested

- propagation material. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(1), 203–211.  
<https://doi.org/10.14601/Phyto-11033>
- Mochizuki, T., & Ohki, S. (2012). Cucumber mosaic virus: Viral genes as virulence determinants. *Molecular Plant Pathology*, 13(3), 217–225.
- Montemurro, C., Simeone, R., Saponari, M., Bottalico, G., Savino, V., & Martelli, G. P. (2008). Sanitary Selection and Molecular Characterization of Olive Cultivars Grown in Apulia. *Acta Horticulturae*, 791, 603–610.
- Mphuthi, P., & Africa, S. (2017). *Particularly Those*. April.
- Murant, A. F. (1981). *Plant virus infections* (Elsevier/North Holland Biomedical Press (ed.)).
- OEPP. (2009). Pathogen-tested Olive Trees and Rootstocks. *OEPP/EPPO Bulletin*, 36(2), 77–83.
- Okada, Y. (1999). Historical overview of research on the tobacco mosaic virus genome: Genome organization, infectivity and gene manipulation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1383), 569–582.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0408>
- Palukaitis, P., & García-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62, 241–323.
- Pantaleo, V., Saponari, M., & Gallitelli, D. (2001). Development of a nested pcr protocol for detection of olive-infecting viruses in crude extracts. *Journal of Plant Pathology*, 83(2), 143–146. <https://doi.org/10.4454/jpp.v83i2.1123>
- Parrella, G., De Stradis, A., & Vovlas, C. (2008). First report of Olive latent virus 2 in wild castor bean (*Ricinus communis*) in Italy. *Plant Pathology*, 57(2), 392.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01722.x>
- Pasquini, G., Marzachì, C., Pollini, C. P., Faggioli, F., Ragozzino, A., Bissani, R., Vischi, A., Barba, M., Giunchedi, L., & Boccardo, G. (2000). Molecular identification of phytoplasmas from olive trees in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 82(3), 213–219. <https://doi.org/10.4454/jpp.v82i3.1172>

- Rapoport, H. F., Fabbri, A., & Sebastiani, L. (2016). Olive Biology. In *The Olive Tree Genome* (pp. 75–98). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48887-5>
- Rebenstorf, K., Candresse, T., Dulucq, M. J., Büttner, C., & Obermeier, C. (2006). Host Species-Dependent Population Structure of a Pollen-Borne Plant Virus, Cherry Leaf Roll Virus. *Journal of Virology*, *80*(5), 2453–2462. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.5.2453-2462.2006>
- Rei, F. T., Henriques, M.-I. E. C., Leitao, F. A., Serrano, J. F., & Potes, M. F. (1993). *Immunodiagnosis of cucumber mosaic cucumovirus in different olive cultivars*. *504*(23), 501–504.
- Roossinck, M. J. (2001). Pathogen profile Cucumber mosaic virus , a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology*, *2*(2), 59–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/10040001.htm>
- Roossinck, M. J. (2002). Evolutionary History of Cucumber Mosaic Virus Deduced by Phylogenetic Analyses. *Journal of Virology*, *76*(7), 3382–3387. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.7.3382-3387.2002>
- Rubino, L., Russo, M., de Stradis, A., & Martelli, G. P. (2012). Tepovirus, a novel genus in the family Betaflexiviridae. *Archives of Virology*, *157*(8), 1629–1633. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1342-7>
- Rugini, E., & Fedeli, E. (1990). *Olive (Olea europaea L.) as an Oilseed Crop*. *10*, 593–641. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74448-8\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74448-8_29)
- Ruiz-García, A. B., Candresse, T., Canales, C., Morán, F., Oliveira, C. M. de, Bertolini, E., & Olmos, A. (2020). Molecular Characterization of the Complete Coding Sequence of Olive Leaf Yellowing-Associated Virus. *Plants (Basel)*, *9*(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9101272>
- Rumbou, A., Von Bargen, S., & Büttner, C. (2009). A model system for plant-virus interaction-infectivity and seed transmission of Cherry leaf roll virus (CLRV) in *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Plant Pathology*, *124*(3), 527–532. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9425-8>

- Russo, M., Rubino, L., De Stradis, A., & Martelli, G. P. (2009). The complete nucleotide sequence of potato virus T. *Archives of Virology*, *154*(2), 321–325. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0300-x>
- Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem, N., La Notte, P., Savino, V., Scarito, G., & Martelli, G. P. (1999). Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. *Journal of Plant Pathology*, *81*(1), 37–45. <https://doi.org/10.4454/jpp.v81i1.1044>
- Sambrook, J. F., & D.W., R. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saponari, M., Nigro, F., Loconsole, G., Romanazzi, G., Vovlas, N., & Cariddi, C. (2001). *Distribuzione dei patogeni dell'olivo in Puglia 1*.
- Saponari, M., Savino, V., & Martelli, G. P. (2002). SEED TRANSMISSION IN OLIVE OF TWO OLIVE-INFECTING VIRUSES Author ( s ): M . Saponari , V . Savino and G . P . Martelli Published by : Società Italiana di Patologia Vegetale ( SIPaV ) Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/41998107> Accessed : 22-06-2016. *Journal of Plant Pathology*, *84*(3), 167–168.
- Savino, V., Barba, M., Galitelli, G., & Martelli, G. P. (1979). Two nepoviruses isolated from Olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, *18*, 135–142.
- Savino, V., & Gallitelli, D. (1981). Cherry leaf roll virus in olive. *Phytopathologia Mediterranea*, *20*, 202–203.
- Savino, V., & Gallitelli, D. (1983). Isolation of cucumber mosaic virus from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, *22*, 76–77.
- Savino, V., Gallitelli, D., & Barba, M. (1983). Olive latent ringspot virus, a newly recognised virus infecting olive in Italy. *Annals of Applied Biology*, *103*(2), 243–249. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1983.tb02761.x>
- Scholthof, K. B. G. (2004). Tobacco Mosaic Virus: A model system for plant biology. *Annual Review of Phytopathology*, *42*(6), 13–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140322>

- Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., & Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938–954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
- Sclavounos, AP, Kyriakopoulou, P., Holeva, M., Kostas, P., & Voloudakis, A. (2008). Detection of Cherry leaf roll (CLRV) from walnut (*Juglans regia* L.) in Greece. *13th National Phytopathological Congress, Athens, GR*, 155.
- Spooner-hart, R., Tesoriero, L., & Hall, B. (2007). *Field Guide to Olive Pests, Diseases and Disorders in Australia* (Vol. 07).
- Toscano, P., Iannotta, N., & Scalercio, S. (2014). Botanical and Agricultural Aspects: Agronomic Techniques and Orchard Management. In *Agricultural and Food Biotechnology of Olea europaea and Stone Fruit* (pp. 3–73). <https://doi.org/10.2174/97816080599351150101>
- Triolo, E., Materazzi, A., & Toni, S. (1996). An isolate of Tobacco Mosaic Tobamovirus from *Olea europaea* L. *Advances in Horticultural Science*, 10(1), 39–45. <https://doi.org/10.1400/75288>
- Tzanetakos, I. E., Postman, J. D., Gergerich, R. C., & Martin, R. R. (2006). A virus between families: nucleotide sequence and evolution of Strawberry latent ringspot virus. *Virus Research*, 121(2), 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.06.001>
- Valachas, C. A., Giantsis, I. A., Sareli, K., Winter, S., & Zelezniakof, E. Pentheroudaki, Z. Chatzivassiliou, E. K. (2021). *Molecular analysis of Greek isolates of cucumber mosaic virus from vegetables show a low prevalence of satellite RNAs and suggest the presence of host-associated virus strains*. Agricultural University of Athens.
- Valdez, R. B., McNamara, D. G., Ormerod, P. J., Pitcher, R. S., & Thresh, J. M. (1974). Transmission of the hop strain of arabis mosaic virus by *Xiphinema diversicaudatum*. *Annals of Applied Biology*, 76(1), 113–122. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1974.tb01361.x>

- Varanda, C., Cardoso, J. M. S., do Rosário Félix, M., Oliveira, S., & Clara, M. I. (2010). Multiplex RT-PCR for detection and identification of three necroviruses that infect olive trees. *European Journal of Plant Pathology*, *127*(2), 161–164. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9593-1>
- Varanda, C., Félix, M. do R., Soares, C. M., Oliveira, S., & Clara, M. I. (2011). Specific amino acids of Olive mild mosaic virus coat protein are involved in transmission by *Olpidium brassicae*. *Journal of General Virology*, *92*(9), 2209–2213. <https://doi.org/10.1099/vir.0.032284-0>
- Varanda, C. M., Machado, M., Martel, P., Nolasco, G., Clara, M. I. E., & Félix, M. R. (2014). Genetic diversity of the coat protein of olive mild mosaic virus (OMMV) and tobacco necrosis virus D (TNV-D) isolates and its structural implications. *PLoS ONE*, *9*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110941>
- Varanda, C. M. R., Materatski, P., Campos, M. D., Clara, M. I. E., Nolasco, G., & Félix, M. do R. (2018). Olive mild mosaic virus coat protein and P6 are suppressors of RNA silencing, and their silencing confers resistance against OMMV. *Viruses*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/v10080416>
- Varanda, C. M. R., Silva, M. S. M. R., Félix, M. D. R. F., & Clara, M. I. E. (2011). Evidence of olive mild mosaic virus transmission by *Olpidium brassicae*. *European Journal of Plant Pathology*, *130*(2), 165–172. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9742-1>
- Varanda, C., Santos, S., Clara, M. I. E., & Félix, M. do R. (2015). Olive mild mosaic virus transmission by *Olpidium virulentus*. *European Journal of Plant Pathology*, *142*(1), 197–201. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0593-z>
- Varveri, C., & Boutsika, K. (1999). Characterization of cucumber mosaic cucumovirus isolates in Greece. *Plant Pathology*, *48*(1), 95–100.
- von Barga, S., Grubits, E., Jalkanen, R., & Büttner, C. (2009). Cherry leaf roll virus - An emerging virus in Finland? *Silva Fennica*, *43*(5), 727–738. <https://doi.org/10.14214/sf.169>
- von Barga, S., Langer, J., Robel, J., Rumbou, A., & Büttner, C. (2012). Complete

- nucleotide sequence of Cherry leaf roll virus (CLRV), a subgroup C nepovirus. *Virus Research*, 163(2), 678–683.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.018>
- Vovlas, C, & Di Franco, A. (2004). Cucumber mosaic virus in *Nicotiana glauca* in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 86, 91–92.
- Vovlas, Crisostomo, Parrella, G., & Di Franco, A. (2003). Infezioni naturali del virus latente dell' olivo su piante di ricino in Grecia. *INFORMATORE FITOPATOLOGICO 7-8 / 2002, March 2003*, 66–68.
- Werner, R., Mühlbach, H. P., & Büttner, C. (1997). Detection of cherry leaf roll nepovirus (CLRV) in birch, beech and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. *European Journal of Forest Pathology*, 27(5), 309–318.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1997.tb01085.x>
- Wetzel, T., Beck, A., Wegener, U., & Krczal, G. (2004). Complete nucleotide sequence of the RNA 1 of a grapevine isolate of Arabis mosaic virus. *Archives of Virology*, 149(5), 989–995. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0277-4>
- Wetzel, T., Meunier, L., Jaeger, U., Reustle, G. M., & Krczal, G. (2001). Complete nucleotide sequences of the RNAs 2 of German isolates of Grapevine fanleaf and Arabis mosaic nepoviruses. *Virus Research*, 75(2), 139–145.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00235-0)
- Wetzel, Thierry, Chisholm, J., Bassler, A., & Sanfaçon, H. (2008). Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1-encoded polyprotein from Arabis mosaic virus (subgroup A nepovirus). *Virology*, 375(1), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.046>
- Woo, E., Clover, G., & Perason, M. (2012). First report of Cherry leafroll virus (CLRV) in *Malus domestica*. *Australasian Plant Disease Notes*, 7, 151–156.
- Woo, E., & Pearson, M. (2014). Biological and molecular variation of Cherry leaf roll virus isolates from *Malus domestica*, *Ribes rubrum*, *Rubus idaeus*, *Rumex obtusifolius* and *Vaccinium darrowii*. *Plant Pathology*, 63, 838–845.

- Xanthis, C., Maliogka, V., & Katis, N. (2015). First report of Cucumber mosaic virus in *Anemone* sp in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 97(3), 541.
- Xanthis, C., Maliogka, V., Lecoq, H., Dezbiez, C., Tsvetkov, I., & Katis, N. (2015). First report of Cucumber mosaic virus infecting watermelon in Greece and Bulgaria. *Journal of Plant Pathology*, 97(2), 399.
- Yoon, J.-H., Palukaitis, P., & Choi, S.-K. (2019). Host range:Cucumber mosaic virus. *APS Press*, 15–18.
- Youssef, S. A., Moawed, S. M., El-Sayed, M., & Shalaby, A. A. (2010). Detection of olive tree viruses in Egypt by one-step RT-PCR. *Julius-Kühn-Archiv*, 427, S. 51. <http://pub.jki.bund.de/index.php/JKA/article/view/405>
- Zellama, M. S., Varanda, C. M. R., Materatski, P., Nabi, N., Hafsa, A. Ben, Saamali, B. M., Chaouachi, M., & Félix, M. R. (2019). An integrated approach for understanding the high infection rates of olive viruses in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology*, 153(4), 1043–1054. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01620-y>
- Κυριακοπούλου, Π. Η. (1994). Ύβρι καρπών ελιάς και ευλογιά καρπών ελιάς-Δύο νέες ασθένειες πιθανής ιολογικής αιτιολογίας. *Περίληψεις Εργασιών 7 Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου*, 51–52.
- Κωστελένος, Γ. (2011). *Στοιχεία ελαιοκομίας ΙΣΤΟΡΙΑ, ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ*.
- Κωστελένος, Γ. (2015). *Η καταγωγή και η εξημέρωση της ελιάς*.



## Παράρτημα

### OLYaV

Για τη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες κατατεθειμένες στην βάση δεδομένων NCBI (Πιν. 1) του γονιδίου HSP70 του OLYaV.

**Πίνακας 1.** Αριθμοί καταχώρησης, χώρα προέλευσης και ποικιλία δέντρων των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για φυλογενετική ανάλυση των κατασκευών των φυλλογενετικών δέντρων του OLYaV. Για το υλικό που προέρχεται από Ιταλία διευκρινίζεται η περιοχή συλλογής, ενώ για το υλικό που προέρχεται από την τράπεζα συλλογής του USDA η αρχική περιοχή συλλογής δηλώνεται στην παρένθεση.

Αριθμός Καταχώρησης	Χώρα	Ποικιλία
LR865446	Αλβανία	Frangu
HQ288836	Καλιφόρνια (Τυνησία)	Bidh El Hammam
HQ286488	Καλιφόρνια (Γαλλία)	Rouget
LR865449	Αλβανία	Bardhi
LR865450	Αλβανία	Mixan
KC133148	Ιταλία: Σικελία	Nocellara Messinese
KC133184	Ιταλία: Σικελία	Abunara
Y18128	Ιταλία	Άγνωστη
LR865447	Αλβανία	Kushan
KC133182	Ιταλία: Σικελία	Minuta
KC133187	Ιταλία: Σικελία	Crasto
LR865448	Αλβανία	Kalinjot
KC133156	Ιταλία: Σικελία	Trabia
KC133205	Ιταλία: Σικελία	Trabia
LR865444	Αλβανία	Boc
HQ288840	Καλιφόρνια (Γαλλία)	Zitoum
LR865445	Αλβανία	Managiel
HQ286486	Καλιφόρνια (Πορτογαλλία)	Tragolea
HQ288844	Άγνωστο	Mostazal
KC133191	Ιταλία: Μολίζε	Gentile di Larino
KC133155	Ιταλία: Σικελία	Moresca
KC133192	Ιταλία: Μολίζε	Gentile di Larino
HQ288839	Καλιφόρνια (Αλγερία)	Mission
HQ286481	Καλιφόρνια (Αλγερία)	Mission
HQ288838	Καλιφόρνια (Ιταλία)	San Francesco
HQ288848	Καλιφόρνια (Κύπρος)	Ascolano Dura
KC133163	Ιταλία: Σικελία	Lumiaru
KC133172	Ιταλία: Απούλια	Coratina
KC133171	Ιταλία: Απούλια	Coratina

KC133180	Ιταλία: Απούλια	Termite di Bitetto
KC133168	Ιταλία: Βασιλικάτα	Cima di Melfi
KC133165	Ιταλία: Σικελία	Erbano
HQ286495	Καλιφόρνια(Γαλλία)	Oblonga
HQ286487	Καλιφόρνια (Ιταλία)	Frantojoi
KC133200	Ιταλία: Μολίζε	Rosciola di Rotello
KC133175	Ιταλία: Απούλια	Cazzinichhio
KC133160	Ιταλία: Σικελία	Giaraffa
KC133159	Ιταλία: Σικελία	Piricuddara
HQ286496	Καλιφόρνια (Γαλλία)	Oblonga
HQ316960	Καλιφόρνια (Ισπανία)	Sevillano
KC133195	Ιταλία: Μολίζε	Rosciola di Rotello
KC133185	Ιταλία: Σικελία	Abunara
KC133181	Ιταλία: Απούλια	Nolca
HQ288849	Καλιφόρνια (Γαλλία)	Grossane
KC133197	Ιταλία: Μολίζε	Rosciola di Rotello
KC133179	Ιταλία: Απούλια	Termite di Bitetto
KC133164	Ιταλία: Σικελία	Nerba
KC133158	Ιταλία: Σικελία	Cerasola
KC133157	Ιταλία: Σικελία	Cerasola
KC133149	Ιταλία: Απούλια	Ogliarola
KC133210	Ιταλία: Σικελία	Cassanese
KC133177	Ιταλία: Απούλια	Termite di Bitetto
KC133153	Ιταλία: Απούλια	Toscanina
KC133150	Ιταλία: Απούλια	Ogliarola
HQ288845	Καλιφόρνια (Ισπανία)	Sevillano
HQ288843	Καλιφόρνια	Mostazal
MT809205	Βραζιλία	Zarzalena
KC133174	Ιταλία: Απούλια	Picholine
KC133154	Ιταλία: Απούλια	Toscanina
HQ286484	Άγνωστο	Mission
KC133188	Ιταλία: Σικελία	Santagatese
KC133162	Ιταλία: Σικελία	Lumiaru
HQ316957	Καλιφόρνια (Ισπανία)	Manzanillo
KC133190	Ιταλία: Μολίζε	Gentile di Larino
HQ288847	Άγνωστο	Columello
KC133194	Ιταλία: Μολίζε	Gentile diLarino
HQ286497	Καλιφόρνια (Ιταλία)	Mission
HQ288837	Καλιφόρνια (Αυστραλία)	Lucca
HQ286485	Καλιφόρνια (Τυνησία)	Barouni
HQ288841	Καλιφόρνια (Ιταλία)	Lecci
HQ286482	Καλιφόρνια (Ισπανία)	Sevillano
HQ288842	Άγνωστο	Midxelbasa
HQ316961	Καλιφόρνια (Ιταλία)	GrossDiSpagna
HQ316958	Καλιφόρνια (Αυστραλία)	LateBlanquette
HQ316959	Καλιφόρνια (Ισπανία)	Arbequina
LR593885	Ελλάδα	Mastoidis
KC133151	Ιταλία: Απούλια	Ogliarola
HQ286483	Καλιφόρνια (Ισπανία)	Sevillano

HQ286492	Άγνωστο	Franklin
HQ286490	Καλιφόρνια (Χιλή)	Azapa
HQ286494	Καλιφόρνια (Ισραήλ)	Kadesh
HQ286491	Καλιφόρνια (Αυστραλία)	Bouquetier
HQ286489	West Bank	Souri
HQ286493	Ελλάδα	Gaidourelia

## CMV

Για τη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες κατατεθειμένες στην βάση δεδομένων NCBI (Πιν.2) του γονιδίου RdRp του CMV.

**Πίνακας 2.** Αριθμοί καταχώρησης, χώρα προέλευσης και ξενιστής των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για φυλογενετική ανάλυση την κατασκευή των φυλλογενετικών δέντρων του CMV.

Αριθμός καταχώρησης	Ξενιστής	Χώρα
C194 CMV 2a	<i>Cucurbita pepo</i>	Ελλάδα
NC_002035	NCBI Reference Sequence	
LC066478	<i>Impatiens balsamina</i>	Ιράν
C124 CMV 2a	<i>Capsicum anuum</i>	Ελλάδα
C36 CMV 2a	<i>Cucurbita pepo</i>	Ελλάδα
AM183118	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ισπανία
C146 CMV 2a	<i>Cucurbita pepo</i>	Ελλάδα
D16406	<i>Vigna unguiculata</i>	Άγνωστο
AJ276480	Άγνωστο	Νότια Κορέα
KJ400003	<i>Glycine soja</i>	Νότια Κορέα
DQ399549	<i>Pinellia ternata</i>	Κίνα
EU723570	<i>Pinellia ternata</i>	Κίνα
Y16925	<i>Solanum lycopersicum</i>	Άγνωστο
KX525733	<i>Cucumis melo</i>	Ισπανία
D28779	Άγνωστο	Άγνωστο
AM183115	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ισπανία
AB042293	Άγνωστο	Άγνωστο
D86330	Άγνωστο	Άγνωστο
U20218	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Άγνωστο
LR865404	<i>Olea europaea</i>	Αλβανία
LR865403	<i>Olea europaea</i>	Αλβανία
LR865402	<i>Olea europaea</i>	Αλβανία
KU558988	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Γαλλία
U15729 PSV	<i>Vigna unguiculata</i>	Άγνωστο
AF198102	<i>Lupinus angustifolius</i>	Άγνωστο
AF416900	<i>Lactuca saligna</i>	ΗΠΑ:Νέα Υόρκη
AJ007934	Άγνωστο	Άγνωστο
L79972 TAV	Άγνωστο	Άγνωστο

## CLRV

Για τη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες κατατεθειμένες στην βάση δεδομένων NCBI (Πιν. 3) της περιοχής 3' UTR του CLRV.

**Πίνακας 3.** Αριθμοί καταχώρησης, χώρα προέλευσης και ξενιστές των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για φυλογενετική ανάλυση την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων του CLRV.

Αριθμός Καταχώρησης	Ξενιστής	Χώρα
KF779205	<i>Plantago major</i>	Νέα Ζηλανδία
AB168100	<i>Rumex acetosella</i>	Ιαπωνία
KC937031	<i>Vaccinium darrowii</i>	Νέα Ζηλανδία
JN371146	<i>Ribes</i> sp.	Νέα Ζηλανδία
KF779203	<i>Actinidia chinensis</i>	Νέα Ζηλανδία
AJ877162	<i>Rubus idaeus</i>	Νέα Ζηλανδία
AM981027	<i>Juglans regia</i>	Γερμανία
HM032067	<i>Prunus avium</i>	Πολωνία
AJ877156	<i>Carpinus betulus</i>	Γερμανία
GQ871786	<i>Juglans regia</i>	Πολωνία
AJ877152	<i>Juglans regia</i>	Σλοβακία
HM032063	<i>Prunus armeniaca</i>	Πολωνία
HM165202	<i>Sambucus nigra</i>	Πολωνία
JQ013293	<i>Ptelea trifoliata</i>	Ουγγαρία
HM165205	<i>Sambucus racemosa</i> cv. <i>Sutherland Gold</i>	Πολωνία
MN399681	Άγνωστο ζιζάνιο	Γερμανία
AJ877155	<i>Sorbus aucuparia</i>	Γερμανία
GQ871789	<i>Juglans regia</i>	Πολωνία
AJ877143	<i>Sambucus nigra</i>	Ουγγαρία
MK936236	<i>Olea europaea</i> cv <i>Gaidourelia</i>	Ελλάδα
MK936235	<i>Olea europaea</i> cv <i>Throuboulia</i>	Ελλάδα
AM981034	<i>Betula pendula</i>	Φινλανδία
AJ877151	<i>Juglans regia</i>	Γαλλία
AJ877128	<i>Prunus avium</i>	Ηνωμένο Βασίλειο
AJ877124	<i>Betula pendula</i>	Ηνωμένο Βασίλειο
LN864983	<i>Betula</i> sp.	Γαλλία
GU321989	<i>Solanum acaule</i>	ΗΠΑ

Αριθμός Καταχώρησης	Ξενιστής	Χώρα
LN864989	<i>Betula</i> sp.	Γαλλία
EF182751	<i>Juglans regia</i>	Τουρκία
LR862664	Άγνωστο	Άγνωστο
LN714367	<i>Betula pubescens</i>	Φινλανδία
AJ877146	<i>Juglans regia</i>	Γερμανία
KT935512	<i>Juglans regia</i>	Ιταλία
KT935514	<i>Juglans regia</i>	Ιταλία
AJ877126	<i>Juglans regia</i>	Ηνωμένο Βασίλειο
KT935520	<i>Juglans regia</i>	Ιταλία
Z34265	<i>Juglans regia</i>	Άγνωστο
AJ877148	<i>Juglans regia</i>	Ηνωμένο Βασίλειο
LR862665	Άγνωστο	Άγνωστο
AJ877147	<i>Juglans regia</i>	Γαλλία
KT935516	<i>Juglans regia</i>	Ιταλία
KT935518	<i>Juglans regia</i>	Ιταλία
AJ877150	<i>Juglans regia</i>	Ουγγαρία
KT935517	<i>Juglans regia</i>	Ιταλία
JN581002	<i>Malus x domestica</i>	Νέα Ζηλανδία
KC753524	<i>Vaccinium darrowii</i>	Νέα Ζηλανδία
AM981037	<i>Betula pubescens</i>	Φινλανδία
FR851461	<i>Rheum</i> sp.	Γερμανία
AJ877157	<i>Aegopodium podagraria</i>	Γερμανία
AM981031	<i>Betula pubescens</i>	Φινλανδία
KC986834	<i>Rumex obtusifolius</i>	Νέα Ζηλανδία
GU167974	<i>Tropaeolum majus</i>	Άγνωστο
JN581000	<i>Malus x domestica</i> cv. <i>Royal Gala</i>	Νέα Ζηλανδία
JQ822107	<i>Malus x domestica</i> cv. <i>Royal Gala</i>	Νέα Ζηλανδία
HM165198	<i>Sambucus nigra</i>	Πολωνία
HM165195	<i>Sambucus nigra</i>	Πολωνία
AJ877132	<i>Sambucus nigra</i>	Γερμανία
AJ877140	<i>Sambucus nigra</i>	Γερμανία
AJ877145	<i>Sambucus canadensis</i>	ΗΠΑ
HM032064	<i>Prunus armeniaca</i>	Πολωνία
MH411657	<i>Sambucus nigra</i>	Ιράν
AJ877137	<i>Sambucus nigra</i>	Γερμανία
AJ877133	<i>Sambucus nigra</i>	Γερμανία
AJ877138	<i>Sambucus nigra</i>	Γερμανία
AJ877131	<i>Sambucus nigra</i>	Γερμανία

Αριθμός Καταχώρησης	Ξενιστής	Χώρα
HM032065	<i>Prunus avium</i>	Πολωνία
HM165203	<i>Sambucus kamtschatica</i>	Πολωνία
HM165206	<i>Sambucus racemosa</i> cv. <i>Sutherland Gold</i>	Πολωνία
HM165204	<i>Sambucus nigra</i> cv. <i>Aurea</i>	Πολωνία
AJ877144	<i>Sambucus nigra</i>	Γερμανία
KF779208	<i>Sambucus nigra</i>	Γερμανία
HM165207	<i>Sambucus nigra</i>	Πολωνία
AJ877141	<i>Sambucus nigra</i>	Γερμανία
AJ877161	<i>Cornus florida</i>	ΗΠΑ
LN714332	<i>Betula pubescens</i>	Φινλανδία
LN714333	<i>Betula pubescens</i>	Φινλανδία
AJ877120	<i>Betula pendula</i>	Γερμανία
LN714347	<i>Betula pubescens</i>	Φινλανδία
LN714349	<i>Betula pubescens</i>	Φινλανδία
LN714383	<i>Betula pubescens</i>	Φινλανδία
AJ877119	<i>Betula pendula</i>	Γερμανία
AJ877127	<i>Prunus avium</i>	Γερμανία
AM981025	<i>Betula</i> sp.	Γερμανία
LN714384	<i>Betula pubescens</i>	Φινλανδία
LN864982	<i>Betula</i> sp.	Γαλλία

## ΟΙVΤ

Για τη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες κατατεθειμένες στην βάση δεδομένων NCBI (Πιν. 4) απομονώσεων του γένους Τερονίρις.

**Πίνακας 4:** Απομονώσεις του γένους Τερονίρις που χρησιμοποιήθηκαν για τη φυλογενετική ανάλυση του ΟΙVΤ.

Αριθμός Καταχώρησης	Ιός	Ξενιστής	Χώρα
<b>KF700262</b>	Prunus virus T	<i>Prunus avium</i>	Ιταλία
<b>KF700263</b>	Prunus virus T	<i>Prunus domestica</i>	Αζερμπαϊτζάν
<b>MT090966</b>	Cherry virus T	<i>Prunus cerasus</i>	Τσεχία
<b>MH898491</b>	Ficus tepovirus A	<i>Ficus carica</i>	Ιαπωνία
<b>MH898525</b>	Trichosanthes tepovirus A	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Κίνα
<b>MK514428</b>	Zostera virus T	<i>Zostera muelleri</i>	Αυστραλία
<b>MK514426</b>	Zostera virus T	<i>Zostera muelleri</i>	Αυστραλία
<b>MK514427</b>	Zostera virus T	<i>Zostera muelleri</i>	Αυστραλία
<b>MH680825</b>	Potato virus T	<i>Zostera muelleri</i>	Αυστραλία
<b>AB697482</b>	Potato virus T	Άγνωστο	Περού
<b>NC 011062</b>	Potato virus T	NCBI Reference Sequence	Περού
<b>MH069211</b>	Potato virus T	<i>Solanum palustre</i>	Ηνωμένο Βασίλειο