



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) και των δορυφορικών του RNAs (satRNAs) από κολοκυνθοειδή



Χρήστος Α. Βαλαχάς
Τεχνολόγος Γεωπόνος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Χατζηβασιλείου Ελισάβετ, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2018**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) και των δορυφορικών του RNAs (satRNAs) από κολοκυνθοειδή

“Molecular analysis of Greek isolates of cucumber mosaic virus (CMV) and its satellite RNAs (satRNAs) from cucurbit crops”

Χρήστος Α. Βαλαχάς
Τεχνολόγος Γεωπόνος

Εξεταστική Επιτροπή:

Χατζηβασιλείου Ελισάβετ, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)

Παπλωματάς Επαμεινώνδας, Καθηγητής ΓΠΑ

Κατής Νικόλαος, Καθηγητής ΑΠΘ

Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (*cucumber mosaic virus*, CMV) και των δορυφορικών του RNAs (*satRNAs*) από κολοκυνθοειδή

ΠΜΣ Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Περίληψη

Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (*cucumber mosaic virus*, CMV, γένος *Cucumovirus*, οικογένεια *Bromoviridae*), είναι ένας οικονομικά σημαντικός ιός με ιδιαίτερα ευρύ κύκλο ξενιστών, που περιλαμβάνει καλλιεργούμενα και αυτοφυή φυτά. Η παρουσία του στις καλλιέργειες έχει ως συνέπεια την ποιοτική και ποσοτική υποβάθμιση της παραγωγής. Ο ιός χαρακτηρίζεται από σημαντική ποικιλομορφία με τις απομονώσεις του να ομαδοποιούνται σε διάφορες ομάδες (subs IA, IB, II). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ιού είναι ότι μερικές φορές συνοδεύεται από δορυφορικά RNA (*satellite*, *satRNAs*), που μπορεί, ανάλογα με το στέλεχός τους, να προκαλέσουν νεκρώσεις σε φυτά τομάτας. Το νεκρωτικό αυτό σύνδρομο προκαλεί κατά καιρούς σημαντικά προβλήματα σε καλλιέργειες τομάτας σε Ισπανία και Ιταλία, αλλά και στην χώρα μας, οδηγώντας σε πλήρη καταστροφή τους. Η παρούσα μελέτη είχε στόχο την μελέτη απομονώσεων του ιού κυρίως από κολοκυνθοειδή, όσον αφορά την παραλλακτικότητα του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης, καθώς και την παρουσία και παραλλακτικότητα των *satRNAs*. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν 29 επιλεγμένες απομονώσεις που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές του ιού από 19 νομούς της χώρας: 5 από κολοκύθι, 9 από πεπόνι, 3 από αγγούρι, 6 από πιπεριά, 2 τομάτα, 3 καπνός και 1 ανεμώνη. Τόσο οι δοκιμές PCR με εξειδικευμένους εκκινητές, όσο και η φυλογενετική ανάλυση, έδειξε ότι από το σύνολο των απομονώσεων μόνο μία, που προέρχεται από πιπεριά, ανήκει στην υποομάδα IB, ενώ οι υπόλοιπες ομαδοποιούνται στην υποομάδα IA. Οι απομονώσεις της υποομάδας IA παρουσίασαν μικρή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ τους (ποσοστά ομοιότητας να κυμαίνονται από 98,11% έως 99,74%), ενώ η απομόνωση που ομαδοποιήθηκε στην IB διαφοροποιήθηκε από τις υπόλοιπες σε ποσοστό 94,37%. Δεν ανιχνεύθηκε καμία απομόνωση της ομάδας II. Όσον αφορά την παρουσία *satRNAs*, αυτά ανιχνεύθηκαν μόνο σε δύο απομονώσεις από πεπόνι και παρουσίαζαν ποσοστό ομοιότητας 96,07% μεταξύ τους. Όταν αυτά αναλύθηκαν

φυλογενετικά, ομαδοποιήθηκαν το ένα με τα νεκρογενή (necrogenic) και το άλλο με τα ήπια (benign) satRNAs του CMV. Για τον βιολογικό χαρακτηρισμό αντιπροσωπευτικών απομονώσεων του CMV συγκρίθηκε η αντίδραση συγκεκριμένων φυτοδεικτών (τομάτα, πεπόνι, καπνός, κολοκύθι και πιπεριά). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι απομονώσεις της υποομάδας IA προκαλούν εντονότερα συμπτώματα σε τομάτα, πιπεριά και κολοκύθι, αλλά ηπιότερα σε πεπόνι, σε αντίθεση με την απομόνωση της IB που προκάλεσε έντονο μωσαϊκό σε κολοκύθι και ηπιότερα συμπτώματα στους άλλους ξενιστές. Μελέτες σπορομετάδοσης των απομονώσεων αυτών έδειξαν ότι ο ιός σπορομεταδίδεται σε τομάτα και καπνό, ενώ δεν επετεύχθη σπορομετάδοση σε πιπεριά. Προκαταρκτικές δοκιμές για την εμφάνιση των satRNAs στις υπό μελέτη απομονώσεις, με διαδοχικές μολύνσεις συγκεκριμένων ξενιστών, έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα.

Επιστημονική περιοχή: Φυτοπαθολογία-Ιολογία

Λέξεις κλειδιά: εύρος ξενιστών, καπνός, νεκρωτικό σύνδρομο, πιπεριά, σπορομετάδοση, συμπτώματα, φυλογενετική ανάλυση

Molecular analysis of Greek isolates of cucumber mosaic virus (CMV) and its satellite RNAs (satRNAs) from cucurbit crops

MSc Sciences and Plant Production Systems

Department of Crop Science

Laboratory of Phytopathology

Abstract

Cucumber mosaic virus (CMV, genus *Cucumovirus*, family *Bromoviridae*), is one of the most important plant viruses, with the broadest known host-range that includes many cultivated and wild species. Its epidemic spread in many crops may result in qualitative and quantitative losses of the fruits. The virus is characterized by a considerable molecular diversity with its isolates being grouped into several subgroups (subs IA, IB, II). One particular feature of the virus is that it is sometimes accompanied by satellite RNAs (satRNAs), which may, depending on their strain, cause necrosis in tomato crops. This necrotic syndrome occasionally causes major problems in tomato crops in Spain and Italy, but also in Greece, leading to crop failure. The aim of the present study was to analyze the molecular variability of the capsid protein (CP) gene of Greek CMV isolates mainly from cucurbits, and the presence and variability of their satRNAs. In total, 29 isolates from 19 prefectures of the country were collected and analyzed: 5 from zucchini, 9 from melon, 3 from cucumber, 6 from pepper, 2 from tomato, 3 from tobacco and 1 from anemone. Both PCR tests with specific primers and the phylogenetic analysis showed that only one isolate from pepper belongs to sub IB, while the majority is grouped in sub IA. Sub IA isolates showed a low genetic diversity (sequence identity ranging from 98.11% to 99.74%), while isolates grouped in sub IB shared a sequence identity of 94.37% with those of sub IA. None of the analysed isolates was grouped in sub II. Regarding the presence of satRNA, they were detected in only two isolates, both from melon that shared 96.07% of nucleotide identity, but clustered the one within the necrogenic group and the other within the benign group of the satRNAs of CMV. For the biological characterization of representative CMV isolates, the symptoms they produce after mechanical inoculation of specific plant species (tomato, melon, tobacco, zucchini and pepper) were compared. The isolates of sub IA induced more severe symptoms in tomato, pepper and zucchini, but milder in melon, unlike isolates of IB

that caused severe mosaic in zucchini and milder symptoms in the other hosts. Seed transmission studies of these isolates showed that the virus is seed-transmitted in tomato and tobacco, but no such transmission was recorded in pepper. Preliminary tests for the possible emergence of satRNAs by sequential mechanical inoculations of specific host plant species with some of the isolates under study gave negative results.

Scientific area: Phytopathology-Virology

Keywords: host range, necrogenic, pepper, phylogenetics, seed transmission, symptoms, tobacco

Περιεχόμενα	Σελ
Περίληψη.....	1
Abstract.....	3
Περιεχόμενα.....	5
Ευχαριστίες.....	8
Συντομογραφίες.....	9
Ευρετήριο	
Εικόνες	11
Πίνακες	15
Κεφάλαιο 1^ο	16
1. Εισαγωγή.....	17
1.1 Οι ιοί ως μολυσματικοί παράγοντες.....	17
1.2 Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV).....	19
1.2.1 Γενικά.....	19
1.2.2 Η παρουσία του CMV στην Ελλάδα.....	20
1.2.3 Δομή ισωματίου και οργάνωση γονιδιώματος.....	21
1.2.3.1 Δομή ισωματίου.....	21
1.2.3.2 Οργάνωση γονιδιώματος.....	22
1.2.4 Μικρού μεγέθους ενκαψιδιωμένα (small encapsidated RNAs) και ελαττωματικά (defective) μόρια RNA.....	24
1.2.5 Λειτουργίες πρωτεϊνών.....	25
1.3 Πολλαπλασιασμός (Αντιγραφή) του ιού.....	27
1.4 Μετακίνηση του ιού.....	28
1.5 Μοριακή παραλλακτικότητα και εξέλιξη.....	29
1.6 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του CMV με το φυτό ξενιστή.....	32
1.6.1 Απομονώσεις του ιού και συμπτωματολογία.....	32
1.6.2 Μικτές μολύνσεις και ανάπτυξη συμπτωμάτων.....	34
1.6.3 Η 2b πρωτεΐνη ως παράγοντας μόλυνσης.....	38
2. Τα δορυφορικά (satellite) RNAs (satRNAs) του CMV.....	40
2.1 Γενικά για τα satRNAs.....	40
2.2 Τα satRNAs του CMV.....	41
2.3 Σχέση μεταξύ αλληλουχίας και δομής με την παθογένεια των satRNAs του CMV.....	42
2.4 Σχέση μεταξύ του κύριου ιού και των satRNAs στην εκδήλωση των συμπτωμάτων.....	44
2.5 Μηχανισμοί παθογένειας.....	47

2.6 Επιδημιολογία του ιού CMV.....	48
2.6.1 Μετάδοση με αφίδες.....	48
2.6.2 Σπορομετάδοση.....	49
2.6.2.1 Σημασία σπορομετάδοσης φυτικών ιών.....	50
2.6.2.2 Μηχανισμοί μόλυνσης του εμβρύου.....	51
2.6.2.3 Οργανισμοί και πρωτόκολλα ελέγχου σπόρων.....	52
Σκοπός μελέτης.....	53
Κεφάλαιο 2^ο	54
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	55
2.1 Δειγματοληψίες- Συλλογή απομονώσεων.....	55
2.2 Ορολογική ανίχνευση του ιού.....	57
2.3 Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων.....	58
2.3.1 Εκχύλιση ολικού RNA.....	59
2.3.2 Μέτρηση συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού εξαγόμενου RNA.....	60
2.3.3 Έλεγχος της ποιότητας του RNA.....	61
2.3.4 Καθαρισμός δειγμάτων και μεταχείριση με το ένζυμο DNase.....	62
2.3.5 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT).....	64
2.3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	66
2.3.6.1 Εκκινητές για την μοριακή ανίχνευση χαρακτηρισμό του CMV.....	66
2.3.6.2. Συνθήκες δοκιμής PCR-Βελτιστοποίηση.....	67
2.4. Καθαρισμός προϊόντος της PCR.....	69
2.5. Αλληλούχιση και φυλλογενετική ανάλυση.....	70
2.6 Βιολογικός χαρακτηρισμός απομονώσεων CMV.....	74
2.6.1 Παθογένεια απομονώσεων CMV που ανήκουν σε διαφορετικές υποομάδες.....	74
3. Μελέτες σπορομετάδοσης.....	75
4. Διερεύνηση εμφάνισης satRNAs μέσω διαδοχικών μηχανικών μολύνσεων.....	76
Κεφάλαιο 3^ο	78
3. Αποτελέσματα.....	79
3.1 Προετοιμασία υλικού και βελτιστοποίηση μεθόδων.....	79
3.1.1 Καθαρότητα εξαγόμενου ολικού RNA.....	79
3.1.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών PCR.....	81
3.2 Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων του CMV.....	85
3.2.1 Ταυτοποίηση της παρουσίας του CMV και διαχωρισμός των απομονώσεων του σε υποομάδες με δοκιμές RT-PCR.....	85

3.2.2 Φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της ΚΠ απομονώσεων του CMV.....	87
3.2.3 Μοριακή ανίχνευση των δορυφορικών (satRNAs) του CMV.....	93
3.2.4 Φυλογενετική ανάλυση των satRNAs του CMV.....	93
3.3. Βιολογικός χαρακτηρισμός των απομονώσεων του CMV.....	95
3.3.1 Παθογένεια απομονώσεων CMV που ανήκουν σε διαφορετικές υποομάδες.....	95
3.3.2 Παθογένεια απομονώσεων κολοκυνθοειδών του CMV που περιέχουν satRNAs.....	99
3.4 Σπορομετάδοση απομονώσεων του CMV από κολοκυνθοειδή.....	100
3.5 Διαδοχικές μηχανικές μολύνσεις και εμφάνιση satRNA.....	104
Κεφάλαιο 4^ο	108
4. Συζήτηση.....	109
Βιβλιογραφία	118
Παράρτημα	145

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, χωρίς όμως την βοήθεια, την συμπαράσταση και την υποστήριξη κάποιων ανθρώπων αυτό δεν θα ήταν δυνατό.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου κ. Ελισάβετ Χατζηβασιλείου, Επίκουρη Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για την καθοδήγηση, την υπομονή της όλο αυτό το διάστημα καθώς και την εμπιστοσύνη της προς το πρόσωπό μου αναθέτοντας μου την μεταπτυχιακή αυτή εργασία.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Επαμεινώνδα Παπλωματά, Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του ΓΠΑ και τον Καθηγητή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης Νικόλαο Κατή για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και την πολύτιμη συμβολή τους κατά την συγγραφή της Διατριβής.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Ιωάννη Γιάντση, μεταδιδακτορικό ερευνητή του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Βιολογικού Ελέγχου (European Biological Control Laboratory, EBCL) στη Θεσσαλονίκη για τις πολύτιμες συμβουλές του και την καθοδήγηση στις φυλογενετικές αναλύσεις. Επίσης τον Δρ. Αντώνη Γιακουνή μεταδιδακτορικό ερευνητή του κέντρου βιοϊατρικών επιστημών 'Αλέξανδρος Φλέμινγκ' για την εκμάθηση των μοριακών τεχνικών που εφαρμόστηκαν στη μελέτη.

Θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κ. Κυριακή Σαρέλη, καθώς και όλους φοιτητές της ομάδας ιολογίας του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για τις ατελείωτες συζητήσεις και τις στιγμές που περάσαμε όλο αυτό το διάστημα.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω την γεωπόνο Msc Δανάη Δημοπούλου για την υπομονή της και την πολύτιμη βοήθειά της καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με στήριξε όλο αυτό το διάστημα και πίστεψε σε εμένα.

Συνομογραφίες

CP	Καψιδιακή Πρωτεΐνη, ΚΠ (Capsid Protein)
MP	Πρωτεΐνη μετακίνησης, ΠΜ (Movement Protein)
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
sub	Υποομάδα (subgroup)
nm	Νανόμετρα (nanometer)
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ (Ribonucleic acid)
satRNAs	Δορυφορικά RNAs (satellite RNAs)
ORF	Ανοιχτά Πλαίσια Ανάγνωσης, ΑΠΑ (Open Reading Frame)
Å	Άνγκστρομ (Angstrom)
m ⁷ G	Μεθυλιωμένη γουανίνη τύπου m ⁷ G
nt	Νουκλεοτίδια (Nucleotide)
RdRp	RNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση (RNA-dependent-RNA polymerase)
tRNA	Μεταφορικό RNA (transferRNA)
mRNA	Αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA)
dsRNA	Δίκλωνο RNA (double stranded RNA)
PTGS	Μετά-μεταγραφικό στάδιο (Post-transcriptional gene silencing)
siRNA	Μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (small interfering RNA)
miRNAs	Μικρού μεγέθους RNA (microRNAs)
RISC	Σύμπλεγμα σίγησης (RNA Induced Silencing Complex)
SDS	Διάλυμα θειικού δωδεκυλίου του νατρίου (Sodium dodecyl sulfate)
DNA	Δέοξυριβονουκλεϊκό οξύ (Deoxyribonucleic acid)
ssDNA	Μονόκλωνο δέοξυριβονουκλεϊκό οξύ (single strand DNA)
wt	Αγρίου τύπου (wild type)
bp	Ζεύγη βάσεων (base pair)
Kb	Χίλια ζεύγη βάσεων (kilobase)
NCBI	Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (National Center for Biotechnology Information)
Multiplex PCR	Πολυπλεκτική μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης
Real time PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο
ELISA	Ανοσοσενζυμική μέθοδος διάγνωσης φυτικών ιών (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
DAS-ELISA	Άμεση ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
IgG	γ-ανοσοσφαιρίνη (Immunoglobulin G)
PNPP	Φωσφορική παρανιτροφαινόλη (Para-Nitrophenyl-Phosphate)
RT	Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcription)
EDTA	Αιθυλένο διάμινο τετραοξικό οξύ (Ethylene diamine tetraacetic acid)
S	Συντελεστής καθίζησης σωματιδίου (Svedbergs)
rpm	Περιστροφές ανά λεπτό (Revolutions per minute)

Ιών

CMV	Ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς, (cucumber mosaic virus)
ZYMV	Ιός του κίτρινου μωσαϊκού της κοινής κολοκυθιάς (zucchini yellow mosaic virus)
PVY	Ιός Y της πατάτας (potato virus Y)
LMV	Ιός του μωσαϊκού του μαρουλιού (lettuce mosaic virus)
PSbMV	Σπορομεταδιδόμενος ιός του μωσαϊκού του πίσσου (pea seed-borne mosaic virus)
SMV	Ιός του μωσαϊκού της σόγιας (soybean mosaic virus)
PStV	Ιός της ράβδωσης της αραχίδας (peanut stripe virus)

Ευρετήριο

Εικόνες

- Εικόνα 1.1:** Συμπτώματα του CMV σε κολοκυνθοειδή και σολανώδη: Α) μωσαϊκό σε κολοκυθιά (πηγή: <http://www.flickr.com>), Β) μωσαϊκό σε πιπεριά (πηγή: <http://www.agric.wa.gov.au>), Γ) νημάτωση σε φύλλα τομάτας (πηγή: <http://www.avrdc.org>), Δ) μωσαϊκό σε αγγουριά (πηγή: <http://www.omafra.gov.on.ca>).....20
- Εικόνα 1.2** Δομή του ισωματίου του CMV, με τις πράσινες πλάκες, να απεικονίζουν τα καψομερή, που είναι σύμπλοκο αποτελούμενο από 3 μόρια καψιδιακής πρωτεΐνης που το καθένα περιέχει 180 πρωτεϊνικές υπομονάδες. Τα καψομερή συγκλίνουν στο κέντρο, που απεικονίζεται με μπλε χρώμα από όπου περνά και ο άξονας συμμετρίας. (πηγή: http://www.virology.wisc.edu/virusworld/jysart/cucumber_mosaic_asv2001.jpg).....22
- Εικόνα 1.3** Δομή του γονιδιώματος του ιού CMV, όπου απεικονίζονται τα τρία γενωμικά και τα δύο υπογενωμικά RNAs του ιού. (πηγή: <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=400&figno=12>).....23
- Εικόνα 1.4:** Αναπαράσταση του μηχανισμού σίγησης, όπου διακρίνεται ο τεμαχισμός του dsRNA από την ενδοριβονουκλεάση DCL σε siRNAs και την ενσωμάτωση των τελευταίων στο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα RISC με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του κικού mRNA (πηγή: <https://www.britannica.com/science/RNA-interference>).....36
- Εικόνα 1.5:** Απεικόνιση μοντέλων satRNAs, όπου αριστερά φαίνεται η δομή ενός μη νεκρωτικού και δεξιά ενός νεκρωτικού satRNA (Alvarez et al., 2003).....43
- Εικόνα 2.1:** Χάρτης της Ελλάδος, όπου φαίνονται οι περιοχές δειγματοληψίας, καθώς και το είδος των φυτών που συλλέχθηκαν, για την συλλογή απομονώσεων του ιού CMV. Με τα διάφορα χρώματα σημειώνονται οι διάφοροι ξενιστές.....55
- Εικόνα 2.2:** Απεικόνιση των τριών ριβοσωμικών υπομονάδων του ριβοσωμικού RNA (ribosomal RNA, rRNA) σε πηκτή αγαρόζης, η οποία δείχνει την υψηλή ποιότητα του ολικού RNA (Πηγή: <https://openi.nlm.nih.gov/index.php>)......62
- Εικόνα 2.3:** Τρεις κατηγορίες εκκινητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT). (Πηγή: Παπανικολάου, κ.α, 2015).....65
- Εικόνα 2.4:** Σχηματική αναπαράσταση της PCR, όπου αναπαριστάται το αρχικό DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα, η πρόσδεση των εκκινητών, ο σχηματισμός των νέων αλυσίδων DNA, καθώς και η εκθετική αύξηση των αντιγράφων με την πάροδο των κύκλων. (Πηγή: <http://www.sinauer.com>).....66
- Εικόνα 2.5:** Το γονιδίωμα του CMV, όπου διακρίνονται τα τρία γενωμικά και τα δύο υπογενωμικά RNAs. Στο RNA 3 διακρίνεται το γονίδιο της ΚΡ του ιού CMV που μελετήθηκε. (Πηγή: <http://www.apsnet.org>).....67
- Εικόνα 3.1:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του ολικά εξαγόμενου RNA από τα υπό εξέταση δείγματα για τον έλεγχο της ποιότητάς του. Διακρίνονται οι τρεις ριβοσωμικές υπομονάδες 28S, 18S, 5S.....79
- Εικόνα 3.2:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και των διαφορετικών συγκεντρώσεων MgCl₂ στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των απομονώσεων του CMV,

χρησιμοποιώντας τους εκκινητές έναντι του γονιδίου της ΚΠ των Giakountis et al., 2018. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα **GR034Cpe**, το προϊόν είχε αναμενόμενο μέγεθος τα 472 bp και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.....81

Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και των διαφορετικών συγκεντρώσεων $MgCl_2$ στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των απομονώσεων του CMV, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές έναντι της ΚΠ της υποομάδας I των Chen et al., 2018. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα **GR003Can**, το προϊόν είχε αναμενόμενο μέγεθος τα 593 bp και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.....82

Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και των διαφορετικών συγκεντρώσεων $MgCl_2$ στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των απομονώσεων του CMV, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές έναντι της ομάδας II των Chen et al., 2011. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα **Ane 1**, το προϊόν είχε αναμενόμενο μέγεθος τα 704 bp και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.....82

Εικόνα 3.5: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη σε συγκέντρωση $MgCl_2$ 1,5 mM στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των απομονώσεων του CMV, με τους εκκινητές F1/R1 & F2/R2 (Giakountis et al., 2018). Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα **Ane 1** με αναμενόμενο μέγεθος τα 375 bp για το ζεύγος F1/R1 και 325 bp για το ζεύγος F2/R2, ενώ ο δείκτης του μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA.....83

Εικόνα 3.6: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και των διαφορετικών συγκεντρώσεων $MgCl_2$ στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των απομονώσεων του CMV, που ανήκουν στην ομάδα II. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F1/R1 (α) και F2/R2 (β) (Giakountis et al., 2018). Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα **Ane 1** με αναμενόμενο μέγεθος τα 704 bp, ενώ ο δείκτης του μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA.....84

Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR για την επιβεβαίωση της παρουσία του CMV στα υπό μελέτη δείγματα, με δοκιμές PCR για το γονίδιο της ΚΠ με τη χρήση των εκκινητών Giakountis et al., 2018. Το παραγόμενο προϊόν έχει μέγεθος 472 bp και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.....85

Εικόνα 3.8: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της PCR με τη χρήση εκκινητών (Giakountis et al., 2018) για την ανίχνευση της ομάδα I του CMV. Ως θετικό χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση **GR003Can**. Το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος είναι 593 bp, και ο δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 bp DNA.....86

Εικόνα 3.9: Ηλεκτροφόρηση πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR με τη χρήση εκκινητών F2/R2 (Giakountis et al., 2018) για την ανίχνευση της ομάδας II του CMV. Ως θετικό χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση **Ane 1**. Το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος είναι 325 bp, ενώ ο δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 bp DNA.....86

Εικόνα 3.10: Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ολόκληρη την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης απομονώσεων που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (Genebank) για τον CMV. Οι ελληνικές απομονώσεις της μελέτης αυτής

επισημαίνονται εντός πλαισίου. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 100. Οι μπάρες κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνουν αντικαταστάσεις/θέση, ενώ παραπλεύρως (δεξιά) του δένδρου βρίσκονται οι αναγνωρισμένες ομάδες και υποομάδες του CMV.....89

Εικόνα 3.11: Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης των απομονώσεων των κολοκυνθοειδών για τον CMV. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 100. Οι μπάρες κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνουν αντικαταστάσεις/θέση.....91

Εικόνα: 3.12: Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης των απομονώσεων των κολοκυνθοειδών καθώς και των ελληνικών απομονώσεων από διάφορους ξενιστές που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (Genebank) για τον CMV. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 100. Οι μπάρες κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνουν αντικαταστάσεις/θέση.....92

Εικόνα 3.13: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του satRNA στις υπό μελέτη απομονώσεις του CMV. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Chen et al., 2011, το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος είναι 385 bp και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.....93

Εικόνα 3.14: Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ολόκληρη την νουκλεοτιδική αλληλουχία απομονώσεων των satRNAs του ιού CMV που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (Genebank) σε σύγκριση με τις ελληνικές των κολοκυνθοειδών (σε κύκλο). Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 100. Οι μπάρες κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνουν αντικαταστάσεις/θέση, ενώ παραπλεύρως (δεξιά) του δένδρου αναφέρονται τα χαρακτηριστικά των συμπτωμάτων που προκαλούν τα satRNAs όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Necrogenic: νεκρωτικό σύνδρομο, Benign: ηπιότερη συμπτωματολογία.).....94

Εικόνα 3.15: Συμπτώματα που προκαλεί η απομόνωση **Ane 1 (ομάδα II)** σε διάφορους ξενιστές έπειτα από μηχανική μόλυνση. **A & B** μωσαϊκό σε φύλλα και καρπό πεπονιού, **Γ** μωσαϊκό και νημάτωση σε φύλλα τομάτας, **Δ** χλώρωση στις νευρώσεις φύλλων καπνού (*N. tabacum* ποικ. Μπασμάς).....96

Εικόνα 3.16: Συμπτώματα που προκαλεί η απομόνωση **GR053Slv (υποομάδα IA)** σε διάφορους ξενιστές έπειτα από μηχανική μόλυνση. **A** μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιού **B** μωσαϊκό μαζί με νημάτωση του ελάσματος σε τομάτα και **Γ** μωσαϊκό σε φύλλα πιπεριάς.....97

Εικόνα 3.17: Συμπτώματα που προκαλεί η απομόνωση **GR013Cme (υποομάδα IA)** σε διάφορους ξενιστές έπειτα από μηχανική μόλυνση, **A** έντονο μωσαϊκό και φλύκταινες σε πιπεριά, **B** διάχυτο μωσαϊκό σε καπνό (*N. Sylvestris*) **Γ** έντονο μωσαϊκό σε κολοκύθι.....97

Εικόνα 3.18: Συμπτώματα που προκαλεί η απομόνωση **GR003Can (υποομάδα IB)** σε διάφορους ξενιστές έπειτα από μηχανική μόλυνση, **A** μωσαϊκό σε πιπεριά, **B** έντονο μωσαϊκό μαζί με κάμψη του ελάσματος σε φύλλα κολοκυθιού.....98

Εικόνα 3.19: Σύγκριση συμπτωμάτων που προκαλούν οι απομονώσεις GR003Can (υποομάδα IB, εικόνες A & Γ) και GR053Sly (υποομάδα IA εικόνες B & Δ) που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες σε κολοκύθι (A & B) συμπτώματα έντονου μωσαϊκού σε κολοκύθι και πιπεριά (Γ & Δ).....	98
Εικόνα 3.20: Συμπτώματα που προκάλεσε η απομόνωση GR018Cme που αρχικά περιείχε δορυφορικό RNA σε φυτοδείκτες, A) πολύ ήπιο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιάς, B) έντονο μωσαϊκό σε φύλλα πεπονιού και Γ) νημάτωση των φύλλων σε τομάτα.....	99
Εικόνα 3.21: Συμπτώματα που προκάλεσε η απομόνωση GR010Cme που αρχικά περιείχε δορυφορικό RNA σε φυτοδείκτες A) κίτρινο μωσαϊκό σε φύλλα πεπονιού, B) έντονο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιάς και Γ) μωσαϊκό στα νεαρά φύλλα της κορυφής σε φυτά τομάτας.....	99
Εικόνα 3.22: Συμπτώματα σποροφύτων τομάτας που προήλθαν από μητρικά φυτά μολυσμένα με τις απομονώσεις GR053Sly (A,νημάτωση, ήπιο μωσαϊκό) και GR011Cme (B,νημάτωση, ήπιο μωσαϊκό).....	101
Εικόνα 3.23: Σπορόφυτα πιπεριάς με συμπτώματα ήπιου μωσαϊκού που προήλθαν από μητρικά φυτά μολυσμένα με τις απομονώσεις), GR011Cme (A) GR025Csa (B)	102
Εικόνα 3.24: Συμπτώματα έντονου κίτρινου μωσαϊκού σε σπορόφυτο καπνού ποικιλίας Μπασμά που προήλθε από μητρικό φυτό μολυσμένο με την απομόνωση ChV 57	103
Εικόνα 3.25: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 1 ^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση GR010Cme . Ήπιο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιού, πεπονιού και τομάτας (Εικ. A, B & Γ) και έντονο μωσαϊκό σε καπνό (Εικ. Δ).....	104
Εικόνα 3.26: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 1 ^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση GR006Can . Διάστικτο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιάς, στα αρχικά φύλλα μόλυνσης (Εικ A), και στα πρώτα φύλλα λόγω της διασυστηματικής κίνησης του ιού (Εικ. B), β) πράσινο μωσαϊκό σε φύλλα πεπονιού (Εικ. Γ), γ) ήπιο μωσαϊκό σε φύλλα τομάτας (Εικ. Δ) και δ) , και σε καπνό (Εικ. E).....	105
Εικόνα 3.27: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 2 ^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση GR010Cme . Ήπιο μωσαϊκό σε κολοκύθι (Εικ. A), τομάτα (Εικ. Γ), και καπνό (Εικ. Δ), χλώρωση στις νευρώσεις των φύλλων στο πεπόνι (Εικ. B).....	105
Εικόνα 3.28: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 2 ^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση GR006Can . Διάστικτο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιάς, στα αρχικά φύλλα μόλυνσης (Εικ A) και στα πρώτα φύλλα λόγω της διασυστηματικής κίνησης του ιού (Εικ. B), πράσινο μωσαϊκό σε φύλλα πεπονιού (Εικ. Γ), ήπιο μωσαϊκό σε φύλλα τομάτας (Εικ. Δ) και καπνού (Εικ. E).....	106
Εικόνα 3.29: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 4 ^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση GR010Cme . Ήπιο μωσαϊκό σε κολοκύθι (Εικ. A), έντονο μωσαϊκό σε πεπόνι (Εικ B) και καπνό (Εικ. Δ). Τέλος απουσία ευδιάκριτων συμπτωμάτων σε τομάτα (Εικ. Γ).....	107
Εικόνα 3.30: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 4 ^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση GR006Can . Διάστικτο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιάς, στα αρχικά φύλλα μόλυνσης (Εικ A), και στα πρώτα φύλλα λόγω της διασυστηματικής κίνησης του ιού (Εικ. B) έντονο πράσινο μωσαϊκό σε φύλλα πεπονιού (Εικ. Γ), ήπιο μωσαϊκό σε φύλλα τομάτας (Εικ Δ) και έντονο κίτρινο μωσαϊκό σε φύλλα καπνού (Εικ. E).....	107

Πίνακες

Πίνακας 2.1: Ξενιστές και περιοχές δειγματοληψίας για τη συλλογή απομονώσεων του ιού CMV.....	56
Πίνακας 2.2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταχείριση με το ένζυμο DNase για την απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA από τα δείγματα RNA.....	63
Πίνακας 2.3: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των ελληνικών απομονώσεων του CMV από κολοκυνθοειδή για τον ιό CMV, καθώς και των δορυφορικών τους. Όπου, 1: Giakountis et al., 2018 και 2: Chen et al., 2011.....	67
Πίνακας 2.4: Αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, που χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία της PCR για τον πολλαπλασιασμό τμήματος της ΚΠ και του satRNAs.....	68
Πίνακας 2.5: Συνθήκες της PCR για τον πολλαπλασιασμό τμήματος της ΚΠ και του satRNAs.....	68
Πίνακας 2.6: Απομονώσεις του ιού CMV (αριθμός καταχώρησης στη Genebank, ξενιστής, ομαδοποίηση, χώρα προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης των ελληνικών απομονώσεων κολοκυνθοειδών.....	71
Πίνακας 2.7: Απομονώσεις των δορυφορικών RNAs (αριθμός καταχώρησης στη Genebank, ξενιστής, φαινότυπος στην τομάτα, ομαδοποίηση και χώρα προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις των ελληνικών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή.....	73
Πίνακας 2.8: Φυτικά είδη και ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της παθογένειας αντιπροσωπευτικών απομονώσεων του CMV.....	74
Πίνακας 2.9: Φυτά ξενιστές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της εμφάνισης satRNAs του CMV έπειτα από διαδοχικές μολύνσεις.....	77
Πίνακας 3.1: Συγκεντρώσεις και δείκτες καθαρότητας (ng/ μl) του ολικά εξαγόμενου RNA, των υπό μελέτη δειγμάτων. Με έντονη γραφή σημαίνονται τα δείγματα, που παρουσίαζαν χαμηλές τιμές στις συγκεντρώσεις και στους λόγους καθαρότητας 260/280 και 260/230 μετά τον αρχικό καθαρισμό (αριστερή στήλη), τον επιπλέον καθαρισμό (μεσαία στήλη) και τη μεταχείριση με το ένζυμο DNase (δεξιά στήλη).....	80
Πίνακας 3.2: Συμπτώματα των φυτών-ξενιστών μετά από τις μηχανικές μολύνσεις για την μελέτη της βιολογικής παραλλακτικότητας απομονώσεων του ιού CMV που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες. Όπου Ns: φυτό χωρίς συμπτώματα, Mo: Μωσαϊκό, Cl: Χλώρωση, DW: νανισμός, LD: Παραμόρφωση ελάσματος, LT: Συστροφή ελάσματος, PU: Φλύκταινες.....	95

Πίνακας 3.3: Έλεγχος σπόρων που προέκυψαν από μολυσμένα, με απομονώσεις του CMV, φυτά τομάτας (φυτρωτικότητα και συμπτώματα).....	100
Πίνακας 3.4: Έλεγχος σπόρων που προέκυψαν από μολυσμένα, με απομονώσεις του CMV, φυτά πιπεριάς (φυτρωτικότητα και συμπτώματα).....	102
Πίνακας 3.5: Έλεγχος σπόρων που προέκυψαν από μολυσμένα, με απομονώσεις του CMV, φυτά καπνού (φυτρωτικότητα και συμπτώματα).....	103

Κεφάλαιο 1^ο

Εισαγωγή

1.Εισαγωγή

1.1 Οι ιοί ως μολυσματικοί παράγοντες

Ως ιός, ορίζεται ως ένα ή περισσότερα μόρια νουκλεϊκού οξέος που περιβάλλονται από μεμβράνη πρωτεϊνικής ή λιποπρωτεϊνικής φύσεως, στερούμενων οποιονδήποτε μηχανισμών παραγωγής ενέργειας και η αναπαραγωγή των οποίων οργανώνεται μόνο σε ζωντανά κύτταρα του φυτού-ξενιστή (Matthews, 1991). Οι ιοί για να πραγματοποιήσουν όλες τις απαιτούμενες ενέργειες εκμεταλλεύονται πλήρως τους μηχανισμούς του ξενιστή τους, για δικό τους όφελος, όπως για την παραγωγή των ενζύμων που θα χρειαστούν για την αντιγραφή, την καψιδίωση και τη μετακίνησή τους στο εσωτερικό των φυτών. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των ιών είναι ότι στερούνται μηχανισμών διάτρησης της επιδερμίδας του ξενιστή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούν φορείς όπως έντομα, νηματώδεις, ακάρεα ή πρωτόζωα για να εισέλθουν στο εσωτερικό του ξενιστή (Madigan et al., 2005).

Ένας ιός απαντάται σε διάφορες φάσεις του “βιολογικού του κύκλου” με δύο μορφές την εξωκυτταρική και την ενδοκυτταρική. Η εξωκυτταρική χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός περιβλήματος πρωτεϊνικής ή λιποπρωτεϊνικής φύσεως που περιβάλλει το νουκλεϊκό οξύ. Η μορφή αυτή καλείται ιοσωμάτιο (virion), το οποίο δεν παρουσιάζει καμία αναπνευστική ή βιοσυνθετική λειτουργία, επιτρέπει δε την μεταφορά του ιικού γονιδιώματος από κύτταρο σε κύτταρο και από ξενιστή σε ξενιστή και προστατεύει το ιικό γονιδίωμα από την αποδόμηση. Η ενδοκυτταρική φάση του ιού εμφανίζεται μετά την είσοδό του στα κύτταρα του ξενιστή. Η φάση αυτή αφορά τη μόλυνση του φυτικού κυττάρου και περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό του ιού, δηλαδή τη δημιουργία νέων αντιγράφων, καθώς και τον σχηματισμό των νέων περιβλημάτων, τα οποία θα περιβάλλουν τα νεοπαραχθέντα νουκλεϊκά οξέα (Madigan et al., 2005).

Στους φυτικούς ιούς το ιικό γονιδίωμα μπορεί να είναι **RNA** ή **DNA** και επιμέρους διακρίνεται σε μονόκλωνο (single stranded, **ssRNA** ή **ssDNA**) ή δίκλωνο (double stranded, **dsRNA** ή **dsDNA**). Τα ιικά γονιδιώματα διακρίνονται σε θετικής και αρνητικής πολικότητας (+ ή -). Ως θετικής πολικότητας γονιδιώματος καλούνται εκείνα που αποτελούνται από μολυσματικά μόρια, τα οποία είναι σε θέση να αλληλοεπιδράσουν άμεσα με τα συστήματα πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου και να αναπαραχθούν. Αντίθετα, αρνητικής πολικότητας

γονιδιώματος είναι αυτά που αποτελούνται από συμπληρωματικά μόρια που δε μολύνουν άμεσα, αλλά για να μπορέσουν να εκφραστούν μέσα στο κύτταρο θα πρέπει πρώτα να μεταγραφούν σε θετικής πολικότητας μόρια (Hull et al., 2002).

Σε κάθε περίπτωση τα νουκλεϊκά οξέα των φυτικών ιών φέρουν στο 5' άκρο τους ένα μόριο σακχάρου (ριβόζη ή δεοξυριβόζη ανάλογα με το είδος του νουκλεϊκού οξέος) και στο 3' μια ελεύθερη υδροξυλομάδα (-OH). Ανάλογα με το γένος του ιού, πάνω σε αυτά τα άκρα υπάρχουν κάποιες ειδικές δομές όπως η ιική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το ιικό γονιδίωμα (**Viral Protein genome-linked, VPg**), ή η καλύπτρα (**CAP**) στο 5' άκρο και η πολυαδενυλική ακολουθία ή ουρά (**polyA**) ή μια δομή παρόμοια με το μεταφορικό RNA (transferRNA, **tRNA**) στο 3' άκρο, που συμπληρώνουν και επιπλέον σταθεροποιούν τη δομή του ιικού γονιδιώματος. Συγκεκριμένα, η καλύπτρα (CAP) προστατεύει το RNA από την αποδόμηση και αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης για ορισμένα γένη όπως τα *Tobamovirus*, *Cucumovirus*, *Bromovirus*, κ.ά. Η VPg απαντάται στο 5' άκρο και εμπλέκεται στην αναπαραγωγή του ιών που ανήκουν στα γένη *Comovirus*, *Luteovirus*, *Potyvirus*, κ.ά. Η πολυαδενυλική ακολουθία (polyA) εμπλέκεται στην αναπαραγωγή και τη μετάφραση του ιικού RNA, ενώ αυξάνει την σταθερότητα των ευκαριωτικών mRNA αλλά και των ιικών RNA στα γένη *Bromovirus*, *Hordeivirus*. Τέλος, οι tRNA δομές διευκολύνουν τη μετάφραση, ενώ αποτελούν και θέση αναγνώρισης για τη ρεπλικάση στα γένη *Tobamovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, κ.ά. (Hull et al., 2002).

Ανάμεσα στο 5' και στο 3' άκρο βρίσκονται τα **Ανοιχτά Πλαίσια Ανάγνωσης, (Open Reading Frames, ORF)**. Όταν όλα τα ΑΠΑ βρίσκονται στο ίδιο μόριο νουκλεϊκού οξέος το γονιδίωμα καλείται μονομερές, ενώ όταν απαντώνται σε δύο ή τρία διαφορετικά μόρια καλείται δι- ή τριμερές, αντίστοιχα. Σε ιούς που έχουν τεμαχισμένο (διηρημένο) γονιδίωμα (πολυσυστατικοί ιοί), είναι απαραίτητη η παρουσία όλων των τμημάτων του γονιδιώματος για να καταστεί μολυσματικός ο ιός. Η διαίρεση του γονιδιώματος σε δύο ή περισσότερα τμήματα είναι χαρακτηριστικό ορισμένων οικογενειών ή γενών RNA ιών και παρέχει το πλεονέκτημα του μικρότερου ισωματίου και της καλύτερης προστασίας του νουκλεϊκού οξέος από την καψιδιακή πρωτεΐνη (Fulton, 1980), ενώ τα λάθη που μπορεί να συμβούν κατά την αναπαραγωγή του ιού είναι λιγότερο θανατηφόρα (Reaney, 1982).

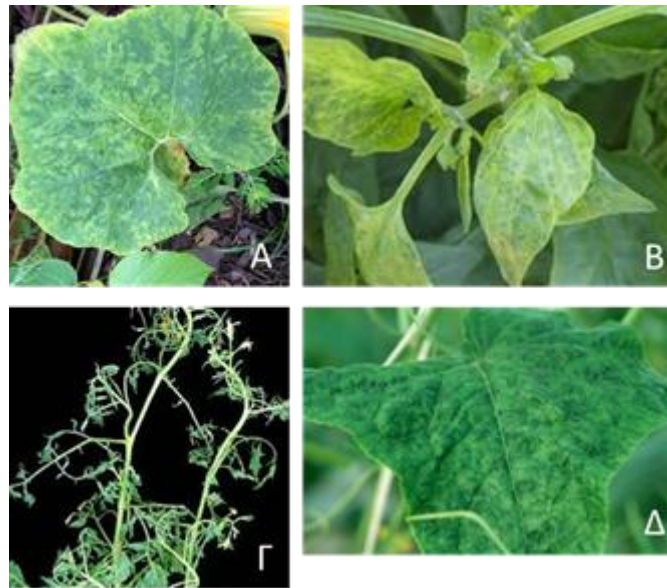
1.2 Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV)

1.2.1 Γενικά

Ο CMV ανήκει στην οικογένεια *Bromoviridae* και στο γένος *Cucumovirus* (<https://talk.ictvonline.org/>) είναι ένας ευρύτατα διαδομένος ιός που προσβάλλει μεγάλο αριθμό πολυετών και μονοετών φυτών, δικότυλων και μονοκότυλων. Το εύρος ξενιστών περιλαμβάνει περισσότερα από 1800 είδη που ανήκουν σε 100 διαφορετικές οικογένειες. Εκτός όμως από τα καλλιεργούμενα φυτά, στα οποία καταγράφεται πληθώρα συμπτωμάτων και ασθενειών, προσβάλλει και πολλά αυτοφυή συχνά χωρίς την παρουσία συμπτωμάτων (Jacquemond, 2012).

Τα συμπτώματα που προκαλεί ο CMV εξαρτώνται από το στέλεχος του ιού, την παρουσία ή μη δορυφορικού RNA (satellite RNAs, satRNAs) και το είδος και την ποικιλία του φυτού-ξενιστή και περιλαμβάνουν μωσαϊκά, νημάτωση φύλλων, ανθόρροια, νανισμό, φλύκταινες, καρπόπτωση, παραμόρφωση ελάσματος, παρουσία χλωρώσεων σε φύλλα και καρπούς, ενώ ιδιαίτερα στην τομάτα μπορεί να προκαλεί νέκρωση των φυτών, μείωση του μεγέθους και εσωτερική κασάνωση των καρπών (Palukaitis and García-Arenal, 2003; Jacquemond, 2012) (Εικ. 1.1).

Ως satRNAs χαρακτηρίζονται μονόκλινα μόρια RNA, που δεν παρουσιάζουν κανένα ΑΠΑ και χρειάζονται τον κύριο ιό για την καψιδίωση και την αντιγραφή τους, ενώ δεν παρουσιάζουν καμία ομολογιακή ακολουθία με τον κύριο ιό (Roossinck et al., 1992). Λόγω της ικανότητάς τους να χρησιμοποιούν την πολυμεράση του κύριου ιού για την αντιγραφή τους χαρακτηρίζονται ως «μοριακά παράσιτα» του κύριου ιού (Murant and Mayo, 1982). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των satRNAs είναι ότι επηρεάζουν την έκφραση των συμπτωμάτων (Roossinck et al., 1992). Εκτός από την παρουσία ή μη satRNAs, ένα άλλο στοιχείο που επηρεάζει την παρουσία και την ένταση των συμπτωμάτων του CMV είναι και η συγκέντρωσή του στα μολυσμένα φυτά (Kaper et al., 1995; Roossinck et al., 1992).



Εικόνα 1.1: Συμπτώματα του CMV σε κολοκυνθοειδή και σολανώδη: Α) μωσαϊκό σε κολοκυθιά (πηγή: <http://www.flickr.com>), Β) μωσαϊκό σε πιπεριά (πηγή: <http://www.agric.wa.gov.au>), Γ) νημάτωση σε φύλλα τομάτας (πηγή: <http://www.avrdc.org>), Δ) μωσαϊκό σε αγγουριά (πηγή: <http://www.omafra.gov.on.ca>).

1.2.2 Η παρουσία του CMV στην Ελλάδα

Η παρουσία του CMV στον ελλαδικό χώρο είναι γνωστή από τη δεκαετία του 1980. Ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά το 1982, σε καλλιέργειες κολοκυθιάς με συμπτώματα μωσαϊκού (Kyriakopoulou and Bem, 1982) και αργότερα σε νεαρά φυτά μπανάνας, στην Κρήτη, που εμφάνιζαν χλωρωτικές κηλίδες στα νεαρά φύλλα και νανισμό (Avgelis, 1987). Εκτενείς μελέτες από το 1990 έχουν αναφέρει τον ιό σε πολλές καλλιέργειες λαχανικών και ιδιαίτερα σε αυτές της τομάτας πολλές φορές με επιδημική μορφή (Katis and Avgelis, 1991; Kyriakopoulou and Bem, 1991; Varveri et al., 1997). Η συμπτωματολογία των προσβεβλημένων φυτών που αναφέρεται αφορά κυρίως νημάτωση του ελάσματος των φύλλων, όπως έχουν περιγραφεί διεθνώς (Kaper and Waterworth, 1981), καθώς και την παρουσία τριών ομάδων συμπτωμάτων ή συνδρόμων στην τομάτα όπως το νεκρωτικό σύνδρομο σε φυτά τομάτας (Bem, 1989), η νέκρωση των καρπών (Katis and Avgelis, 1991) και η παρουσία εσωτερικού καφετιάσματος επίσης σε καρπούς (Kyriakopoulou et al., 1991).

Αργότερα, καταγράφηκε για πρώτη φορά η παρουσία του ιού στο φυτό *Nicotiana glauca* στην Ήπειρο, όπου τα συμπτώματα ήταν μωσαϊκό και δυσπλασία των φύλλων (Vonlas and Di Franco, 2004). Πρόσφατα καταγράφηκε η παρουσία του ιού σε φυτά στέβιας με συμπτώματα ήπιου μωσαϊκού στα φύλλα (Chatzivassiliou et al., 2016). Από την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ελληνικών απομονώσεων που συλλέχθηκαν τα έτη 1995-1996, διαπιστώθηκε, η παρουσία μόνο απομονώσεων της ομάδας I σε υπαίθριες και θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας (Varveri and Boutsika, 1999), ενώ κατά την επιδημία του ιού το 1998 διαπιστώθηκε η παρουσία και απομονώσεων της υποομάδας IB (Sclavounos et al., 2006). Επιπλέον, σχετικά πρόσφατα καταγράφηκε η παρουσία των υποομάδων IA & IB σε καλλιέργειες καρπουζιάς (Xanthis et al., 2015b), καθώς και η καταγραφή για πρώτη φορά στην Ελλάδα, της ομάδας II του ιού, σε φυτά ανεμώνης στην περιοχή των Γιαννιτσών (Xanthis et al., 2015a). Πρόσφατα σε επισκοπήσεις σε καλλιέργειες ψυχανθών καταγράφηκε η παρουσία απομονώσεων των υποομάδων IA & IB, ενώ δεν παρατηρήθηκε η παρουσία απομονώσεων της ομάδας II (Giakountis et al., 2018).

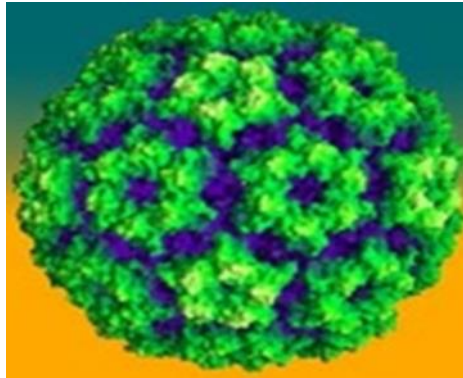
1.2.3 Δομή ιοσωματίου και οργάνωση γονιδιώματος

1.2.3.1 Δομή ιοσωματίου

Τα ιοσωμάτια του CMV παρουσιάζουν εικοσαεδρική συμμετρία (T=3) (Finch et al., 1967; Francki et al., 1966). Έχουν διάμετρο 29 nm, αποτελούνται από 180 υπομονάδες καψιδιακής πρωτεΐνης και περιέχει 18% RNA (Finch et al., 1967; Francki and Hatta, 1980; Habili and Francki, 1974a; Kaper and Re, 1974). Παρουσιάζει αξιοσημείωτη σταθερότητα που οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του RNA και των υπομονάδων της καψιδιακής πρωτεΐνης, πλην όμως η σταθερότητα αυτή μπορεί να επηρεαστεί από την υψηλή συγκέντρωση ουδέτερων αλάτων χλωρίου ή τη παρουσία θειικού δωδεκύλιου του νατρίου (C₁₂H₂₅SO₄Na) (Kaper, 1969; 1975).

Η δομή του CMV (Εικ. 1.2) μελετήθηκε με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ σε κλίμακα 3,2 Å (Smith et al., 2000). Η γεωμετρική διάταξη των διαφόρων δομών που σχηματίζουν οι πρωτεϊνικές υπομονάδες με τους άξονες τους δείχνει δίπτυχη, πεντάπτυχη, και σχεδόν εξάπτυχη συμμετρία. Η εξωτερική ακτίνα της σχεδόν εξάπτυχης

συμμετρίας είναι 144 Å, ενώ ο άξονας της πεντάπτυχης συμμετρίας επεκτείνεται για επιπλέον 3 Å. Σε όλη αυτή τη δομή το RNA είναι στενά πακεταρισμένο στη καψιδιακή πρωτεΐνη, αφήνοντας στον τρίπτυχο άξονα ένα κενό μεγέθους περίπου 110 Å (Palukaitis and García-Arenal, 2003).



Εικόνα 1.2 Δομή του ιοσωματίου του CMV, με τις πράσινες πλάκες, να απεικονίζουν τα καψομερή, που είναι σύμπλοκο αποτελούμενο από 3 μόρια καψιδιακής πρωτεΐνης που το καθένα περιέχει 180 πρωτεϊνικές υπομονάδες. Τα καψομερή συγκλίνουν στο κέντρο, που απεικονίζεται με μπλε χρώμα από όπου περνά και ο άξονας συμμετρίας. (πηγή: http://www.virology.wisc.edu/virusworld/jysart/cucumber_mosaic_asv2001.jpg).

1.2.3.2 Οργάνωση γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του CMV αποτελείται από τρία μονόκλιωνα θετικής πολικότητας RNA (RNA 1, RNA 2, RNA 3) (Palukaitis and García-Arenal, 2003) (Εικ. 1.3).

Το **RNA 1** (3357 nt) είναι μονοσιστρωνικό και κωδικοποιεί μόνο την πρωτεΐνη 1a. Η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει στο άμινο-τελικό της άκρο μια δραστηριότητα μέθυλοτρανσφεράσης που της επιτρέπει την πρόσδεση στο πέμπτο άκρο του γονιδιώματος μιας μεθυλιωμένης γουανίνης τύπου m⁷G cap που αποτελεί **CAP** κατασκευή (Gorbalenya et al., 1989; Habili and Symons, 1989; Hodgam, 1988; Rozanov et al., 1992; Watters et al., 2018), ενώ το κάρβοξυ-τελικό άκρο παρουσιάζει ένα μοτίβο ελικάσης που της δίνει την ιδιότητα του διαχωρισμού της διπλής έλικας του RNA κατά την ιική αντιγραφή (Palukaitis and García-Arenal, 2003).

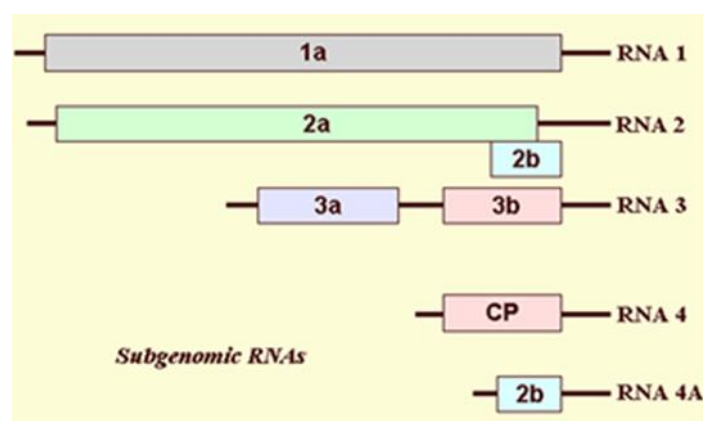
Το **RNA 2** (3050 nt) περιέχει δύο ΑΠΑ, κωδικοποιώντας μια μεγάλου μεγέθους πρωτεΐνη, τη 2a και μια μικρότερου μεγέθους, τη 2b. Η πρωτεΐνη 2a εκφράζεται από το γενωμικό RNA και παρουσιάζει ένα μοτίβο **GDD** (Gly-Asp-Asp) το οποίο είναι ιδιαίτερα συντηρημένο στις RNA εξαρτώμενες-RNA πολυμεράσες (**RNA dependent-RNA polymerase**,

RdRp). Η πρωτεΐνη 2b εκφράζεται από το υπογενωμικό RNA 4a, το οποίο προέρχεται από τη μετατόπιση του τρίτου τελικού άκρου του ΑΠΑ της 2a, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής της, κατά μία θέση μπροστά. Ο ρόλος της 2b είναι να καταστέλλει τον μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης του ξενιστή σε μέτα-μεταγραφικό στάδιο, ενώ εμπλέκεται και στη μετακίνηση του ιού και την έκφραση των συμπτωμάτων (Kamer and Argos, 1984; Koonin, 1991; Bruenn, 1991; Habili and Simons, 1989; Poch et al., 1989; Palukaitis and García-Arenal, 2003).

Το **RNA 3** (2216 nt) περιέχει δύο ΑΠΑ. Το πρώτο βρίσκεται στο γενωμικό RNA και εκφράζει την πρωτεΐνη 3a που αποτελεί τη πρωτεΐνη διακυτταρικής και διασυστηματικής μετακίνησης του ιού (**Movement Protein, MP**). Το δεύτερο ΑΠΑ εκφράζεται από το υπογενωμικό **RNA 4** και εκφράζει την καψιδιακή πρωτεΐνη (**Capsid Protein, CP**) (Palukaitis and García-Arenal, 2003).

Τα ΑΠΑ για την έκφραση των πρωτεϊνών 1a, 2a, 3a καθώς και αυτό της καψιδιακής πρωτεΐνης, απαντώνται σε όλα τα γένη της οικογένειας *Bromoviridae*, ενώ αυτό της 2b πρωτεΐνης απαντάται μόνο στο γένος *Cucumovirus* και *Ilarvirus*. Στους Cucumo-ιούς το κωδικόνιο έναρξης για την 2b βρίσκεται σε διαφορετικές θέσεις σε κάθε στέλεχος του ιού, φαίνεται μάλιστα ότι το γονίδιο για την έκφραση της 2b αποτελεί επιμήκυνση του γονιδίου 2a (Roossinck, 2002).

Επιπλέον των προηγούμενων, ένα άλλο υπογενωμικό RNA, το **RNA 5** καψιδιώνεται στα στελέχη που ανήκουν στην ομάδα II, ενώ απουσιάζει από τα στελέχη που ανήκουν στην ομάδα I (Palukaitis et al., 1992; Shi et al., 1997) ή απαντάται στα τελευταία σε μικρές ποσότητες (Blanchard et al., 1997).



Εικόνα 1.3 Δομή του γονιδιώματος του ιού CMV, όπου απεικονίζονται τα τρία γενωμικά και τα δύο υπογενωμικά RNAs του ιού. (πηγή: <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=400&figno=12>)

1.2.4 Μικρού μεγέθους ενκαψιδιωμένα (small encapsidated) και ελαττωματικά (defective) μόρια RNA

Εκτός από τα γενωμικά και υπογενωμικά τμήματα RNAs, μέσα στα ιοσωμάτια του CMV απαντώνται και κάποια μικρότερα σε μέγεθος RNAs, που καλούνται καψιδιωμένα ή ελαττωματικά RNAs και είναι μείγματα είτε των γενωμικών RNAs του ιού, είτε συνδυασμός μεταξύ του γενώματος του ιού και εκείνου του φυτού.

Μικρού μεγέθους καψιδιωμένα RNAs (small encapsidated RNAs). Τα ενκαψιδιωμένα RNAs ή αλλιώς RNAs 5 απαντώνται στα στελέχη της ομάδας II και φαίνεται να έχουν σχηματιστεί από την ανταλλαγή της μη κωδικής περιοχής του 3' άκρου των RNA 2 και RNA 3 του ιού (Blanchard et al., 1996) και το μέγεθός τους εκτιμάται στα 300 nt. Σε αντίθεση με τα γενωμικά και υπογενωμικά RNAs, τα καψιδιωμένα δε φέρουν στο 5' άκρο τους την CAP κατασκευή, ενώ δεν παρουσιάζουν κάποιο ΑΠΑ, με αποτέλεσμα να μην κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Jacquemond, 2012). Ένα χαρακτηριστικό που παρουσιάζουν τα μόρια αυτά, είναι η παρουσία μιας συντηρημένης κατασκευής που καλείται Box 1 και αποτελείται από 20 ή περισσότερα nt στο 5' άκρο τους και φέρει περιφερειακά τέσσερις κατασκευές θηλιάς (Thompson et al., 2008). Η απάλειψη ή μετάλλαξη κάποιας από τις βάσεις των κατασκευών θηλιάς επηρεάζει τον σχηματισμό των καψιδιωμένων RNA, ενώ δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό ή την συμπτωματολογία του ιού (de Wispelaere and Raw, 2009). Όμοια ο σχηματισμός του RNA 5 ενός στελέχους του CMV, είναι ανεξάρτητος από τον πολλαπλασιασμό του ιού και πιθανώς προκύπτει από τον κατακερματισμό των RNA 2, RNA 3 και RNA 4, παρά από την μεταγραφή τους (Jacquemond, 2012).

Ελαττωματικά (defective) RNAs. Τα ελαττωματικά RNAs, με μέγεθος να κυμαίνεται στα 70-80 nt, αρχικά θεωρούνταν ότι είναι ένα μίγμα από το tRNA του φυτού και το RNA του CMV, με άγνωστο ρόλο (Palukaitis and García-Arenal, 2003). Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι προέρχονται από τα γονίδια της ΠΜ και της ΚΠ μέσω της διαγραφής μερικών εκατοντάδων νουκλεοτιδίων στο ένα ή και στα δύο γονίδια (Jacquemond, 2012). Τα ελαττωματικά RNAs εμφανίζονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα κατά τον πολλαπλασιασμό της απομόνωσης **Y-CMV** (Yellowing-CMV), σε καπνό, όπου μετά από την εξαγωγή της απομόνωσης από τα φυτά καπνού τα παραγόμενα ελαττωματικά RNAs

παρουσίαζαν απαλοιφή 10 νουκλεοτιδίων από το 5' άκρο της μη μεταφραζόμενης περιοχής και 162 νουκλεοτίδια μέσα στο ΑΠΑ της 3α στις θέσεις 328-489 (López et al., 2007; Takeshita et al., 2008).

1.2.5 Λειτουργίες πρωτεϊνών

Ο CMV μέσα από τα γενωμικά και τα υπογενωμικά RNAs, εκφράζει τις απαραίτητες πρωτεΐνες για την ολοκλήρωση του “βιολογικού” του κύκλου (ενότητα 1.2.1). Ακολουθεί η ανάλυση της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών.

Η πρωτεΐνη 1a κωδικοποιείται από το RNA 1 του ιού (Hayes and Buck, 1990) και η παρουσία της εντοπίζεται κυρίως στον τονοπλάστη (Cillo et al., 2002). Η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει ένα αμινο-τελικό άκρο με δραστηριότητα μέθυλο-τρανσφεράσης που εμπλέκεται στην πρόσδεση στο άκρο του γενωμικού και υπογενωμικού RNA μιας CAP κατασκευής, καθώς και ένα καρβοξυλικό άκρο που λειτουργεί σαν ελικάση (Gorbalenya et al., 1988; Habili and Symons, 1989; Hodgam, 1988; Rozanov et al., 1992; Watters et al., 2018). Τα άκρα της πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους (O'Reilly et al., 1998), όσο και με το αμινο-τελικό άκρο της 2a πρωτεΐνης (Kim et al., 2002). Επιπλέον αν τροποποιηθεί το κάρβοξυ-άκρο της πρωτεΐνης 1a, με την προσθήκη 6 ιστιδινών, τότε αυτομάτως το αμινο-τελικό άκρο της 1a χάνει την λειτουργικότητά του (Gal-On et al., 2000). Εκτός από τα προαναφερθέντα, η πρωτεΐνη 1a φαίνεται να συνδέεται με δύο σημαντικά χαρακτηριστικά του, το ένα είναι η αντίδραση υπεραισθησίας που παρατηρείται στον καπνό (Lakshman and Gonsalves, 1985) και το δεύτερο είναι η ικανότητα του ιού να μεταδίδεται με το σπόρο (Hampton and Francki, 1992).

Η πρωτεΐνη 2a εκφράζεται από το RNA 2 του ιού και η παρουσία της εντοπίζεται, όπως και η 1a, στον τονοπλάστη (Cillo et al., 2002). Μελετώντας εκτενέστερα την ακολουθία των αμινοξέων της πρωτεΐνης 2a, διαφόρων απομονώσεων του ιού, διαπιστώθηκε η παρουσία μιας ιδιαίτερα συντηρημένης περιοχής στο κέντρο της ακολουθίας που αποτελείται από τρία μοτίβα που παρουσιάζουν χαρακτηριστικά πολυμεράσης (Kamer and Argos, 1984; Koonin, 1991; Bruenn, 1991; Habili and Simons, 1989; Poch et al., 1989; Palukaitis and García-Arenal, 2003). Η σύνθεση των τριών προαναφερθέντων μοτίβων είναι η ακόλουθη: **μοτίβο I:** ⁵⁰¹LEIDLKFDKS⁵¹¹, **μοτίβο II:** ⁵⁵⁹FORRTGDALTYFGNTIV⁵⁶⁵, **μοτίβο III:** ⁵⁸¹RLLSSGDDSLAF⁵⁹², με το μοτίβο III να χαρακτηρίζει την ιδιότητα της πρωτεΐνης 2a ως

RdRp, με την ακολουθία των αμινοξέων GDD να αποτελεί την 'θέση της πολυμεράσης' (Habibi and Simons, 1989).

Η πρωτεΐνη 2b εκφράζεται από το υπογενωμικό RNA 4a (Ding et al., 1994). Ο ρόλος της κυρίως είναι να αναστέλλει τον μηχανισμό σίγησης στο μετα-μεταγραφικό στάδιο (Brigneti et al., 1998; Li et al., 1999). Αρχικά παρεμποδίζει το σήμα για την ενεργοποίηση του μηχανισμού σίγησης σε απομακρυσμένους ιστούς, ενώ εμπλέκεται και στον περιορισμό της μεθυλίωσης του DNA σε αυτούς (Brigneti et al., 1998; Guo and Ding, 2002). Η τελευταία ιδιότητά της φαίνεται να οφείλεται στη θέση που έχει στον πυρήνα, γιατί οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στην 2b, επηρεάζουν τόσο την θέση της στον πυρήνα, όσο και την σίγηση (Lucy et al., 2000; Mayers et al., 2000).

Επιπλέον, η 2b παρουσιάζει και την εξής ιδιότητα: διαγραφή 15-16 αμινοξέων από το κάρβοξυ-τελικό άκρο της αφενός απενεργοποιεί τον μηχανισμό της μεταγραφής (Ham et al., 1999) και αφετέρου επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό, τη διασυστηματική μετακίνηση, καθώς και την έκφραση της μολυσματική ικανότητας του ιού (Ding et al., 1995), ενώ δεν επηρεάζει την ικανότητα για την καταστολή του μηχανισμού σίγησης (Lucy et al., 2000).

Τέλος, η 2b πρωτεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο και στη διακυτταρική μετακίνηση του ιού. Σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξε ο Shi και οι συνεργάτες του το 2002, όταν αντικατέστησαν το γονίδιο της πρωτεΐνης 2b από το στέλεχος **Q-CMV**, που ανήκει στην **ομάδα II** και δεν παρουσιάζει έντονη μολυσματικότητα με εκείνο από το στέλεχος **WAI-CMV**, που ανήκει στη **υποομάδα IA** και παρουσιάζει έντονη μολυσματικότητα δημιουργώντας το υβριδικό στέλεχος **CMV-qw**. Το αποτέλεσμα ήταν το **CMV-qw** να παρουσιάζει ταχύτερη εμφάνιση των συμπτωμάτων και να είναι περισσότερο μολυσματικό σε σύγκριση με τα στελέχη από τα οποία προήλθε (Shi et al., 2002), ενώ απαλοιφή του 2b γονιδίου οδήγησε είτε σε μείωση της ικανότητας μετακίνησης του ιού, είτε σε παρεμπόδιση του μέσα στο φυτό, ανάλογα με τον ξενιστή (Ding et al., 1995; Soards et al., 2002) και την ηλικία του (Ji and Ding, 2001).

Η πρωτεΐνη 3a μεταφράζεται από το RNA 3 του ιού και αποτελεί την ΠΜ (Boccard and Baulcombe, 1993; Canto et al., 1997; Suzuki et al., 1991). Η πρωτεΐνη **3a** εμφανίζει όλα τα χαρακτηριστικά μιας πρωτεΐνης μετακίνησης όπως: **I**. Εντοπίζεται στα πλασμοδέσματα. **II**. Αυξάνει το όριο αποκλεισμού μεγέθους (**Size Exclusion Limit, SEL**) των πλασμοδεσμάτων. **III**. Προτρέπει την μετακίνηση όχι μόνο του RNA του ιού αλλά και της ίδιας. **IV**. Προσδέεται

στα ιικά RNA, είτε σε μια συγκεκριμένη θέση που εντοπίζεται στο κάρβοξυ-τελικό άκρο μεταξύ των θέσεων 174-233, είτε σε δύο αντίστοιχες μικρότερες περιοχές στο κέντρο του μορίου. **V.** Έχει την ικανότητα να συμπεριφέρεται *in trans*, οπότε και να εξασφαλίσει τη μετακίνηση σε μια απομόνωση CMV που στερείται την ικανότητα αυτή (Jacquemond, 2012).

H πρωτεΐνη 3b εκφράζεται από το υπογενωμικό RNA 4 και αποτελεί την **KΠ** (Schwinghamer and Symons, 1975). Ο ρόλος της είναι να περιβάλλει τα ιοσωμάτια, ενώ παίζει ρόλο και στην διακυτταρική και διασυστηματική μετακίνηση του ιού στο φυτό (Boccard and Baulcombe, 1993; Canto et al., 1997; Mossop and Francki, 1977; Suzuki et al., 1991). Για να γίνει αυτό φαίνεται να υπάρχει μια αλληλεπίδραση μεταξύ της ίδιας και του ξενιστή, όχι όμως με τα ιικά RNA (Karlan and Palukaitis, 1998; Ryu et al., 1998; Wong et al., 1999). Τέλος παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού μέσω των αφίδων-φορέων, καθώς και στην εμφάνιση των συμπτωμάτων (Shintaku and Palukaitis, 1990).

1.3 Πολλαπλασιασμός (Αντιγραφή) του ιού

Η αντιγραφή του ιού ξεκινά με την είσοδο των ιοσωματίων στο κύτταρο, την έκδυση του RNA και την μετάφρασή του στις απαραίτητες ιικές πρωτεΐνες. Αρχικά σχηματίζονται οι πρωτεΐνες 1a και 2a, που μαζί με αυτές του ξενιστή ξεκινούν την διαδικασία της αντιγραφής στους τονοπλάστες, όπου η 1a συνδέεται απευθείας με την μεμβράνη, ενώ η 2a εμφανίζεται με δύο μορφές. Μια διαλυτή και μια που προσδένεται επίσης με την μεμβράνη, μέσω της 1a, λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ του κάρβοξυ-τελικού άκρου της 1a και του άμινο-τελικού άκρου της 2a. Στην συνέχεια, η 2a φωσφορυλιώνεται, εμποδίζοντας την επιπλέον αλληλεπίδραση με την 1a, έχοντας σαν αποτέλεσμα την ταυτόχρονη παρουσία της 2a με τις δύο μορφές (φωσφορυλιωμένη και μη) διατηρώντας έτσι αποθέματα της 2a για μεταγενέστερη χρήση, όπως για τη μετακίνηση του ιού εντός του ξενιστή (Gal-On et al., 2000; Kim et al., 2002). Όσον αφορά την αλληλεπίδραση με φυτικές πρωτεΐνες, σε πειράματα που έγιναν στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, διαπιστώθηκε ότι δύο ενδογενείς πρωτεΐνες των τονοπλαστών **TIP 1** και **TIP 2** αλληλεπιδρούν *in vitro* με την 1a, όχι όμως και με την 2a, λειτουργώντας έτσι ως ένα σύστημα "πρόσδεσης" για την 1a συμμετέχοντας με αυτό τον τρόπο στην αντιγραφή (Kim et al., 2006). Αντίστοιχα στον καπνό διαπιστώθηκε ότι επιπλέον η πρωτεΐνη **Tsip 1** αλληλεπιδρά και με τις δύο πρωτεΐνες TIP 1 και TIP 2 στους τονοπλάστες, τόσο *in vitro*, όσο και *in planta* (Huh et al., 2011).

Μετά την έκφραση των πρωτεϊνών 1a και 2a, ακολουθεί η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου (αλυσίδα αρνητικής πολικότητας) του RNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα για τον πολλαπλασιασμό του RNA του ιού και την παραγωγή αλυσίδων θετικής πολικότητας. Στη συνέχεια οι θετικές αλυσίδες χρησιμοποιούνται ως:

- I. Αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA, **mRNA**) για τη μετάφραση σε πρωτεΐνες
- II. Μήτρα (template) για περαιτέρω μεταγραφή
- III. Για την συγκρότηση νέων ιοσωματίων

Στον CMV δεν παρατηρείται η εξ ολοκλήρου μετατροπή του αρνητικού μονόκλωνου στελέχους (-) RNA σε θετικό (+) RNA, ενώ παρατηρείται και το ενδιάμεσο στάδιο του dsRNA. Ο ρόλος του dsRNA δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, καθώς υπάρχει ένας πεπερασμένος αριθμός (-) RNA, μέσα σε κάθε κύτταρο, σε αντίθεση βέβαια με την παρουσία των (+) RNAs που μπορούν να φτάσουν σε 100πλάσια ποσότητα σε σύγκριση με εκείνη των (-) RNAs (Seo et al., 2009).

Παρόλο που απαιτούνται και οι δύο πρωτεΐνες 1a και 2a για τον σχηματισμό των (-) RNAs, μόνο η 2a είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό (+) RNAs από (-) RNAs, με αποτέλεσμα η παρουσία της στο κυτόπλασμα να είναι έντονη (Seo et al., 2009). Ίσως και αυτός είναι και ο λόγος που η φωσφορυλίωση της 2a και κατ' επέκταση η διακοπή της αλληλεπίδρασής της με την 1a να λειτουργεί τελικά ως διακόπτης για τη μετάφραση από την αντιγραφή των (+) RNAs (Jacquemond, 2012).

1.4 Μετακίνηση του ιού

Μόλις ολοκληρωθεί η αντιγραφή, ο ιός πραγματοποιεί δύο μετακινήσεις, την τοπική (διακυτταρική) και τη διασυστηματική (Lucas and Gilbertson, 1994; Carrington et al., 1996). Η τοπική περιλαμβάνει τη μετακίνηση από το σημείο εισόδου (επιδερμικά κύτταρα), μέσω των πλασμοδεσμάτων, προς τα κύτταρα του μεσόφυλλου μέχρι ο ιός να συναντήσει τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, από όπου θα περάσει στο δεσμικό κολεό, ακολούθως στα συνοδά κύτταρα και από εκεί στους ηθμοσωλήνες. Η διασυστηματική κίνηση περιλαμβάνει την μετακίνηση του ιού από τους ηθμοσωλήνες στις μεγαλύτερες δεσμίδες (Carrington et al., 1996; Hipper et al., 2013). Για την τοπική μετακίνηση χρησιμοποιεί την ΠΜ αφενός για να αυξήσει το SEL των πλασμοδεσμάτων (Ding et al., 1995) και αφετέρου για να προσδέσει τα ssRNAs του ιού (Li and Palukaitis, 1996), ενώ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η ΚΠ με την

οποία σχηματίζουν το σύμπλοκο ΠΜ-ΚΠ-RNA (Suzuki et al., 1991; Boccard and Baulcombe, 1993; Canto et al., 1997). Από τη στιγμή της εισόδου του ιού στα επιδερμικά κύτταρα αποδεσμεύονται τα ιικά μονόκλινα RNA από το καψίδιο και αφού ολοκληρώσουν την διαδικασία της αντιγραφής σχηματίζουν το σύμπλοκο ΠΜ-ΚΠ-RNA και μετακινούνται μεταξύ των κυττάρων. Μόλις φτάσει το σύμπλοκο στους ηθμοσωλήνες, η μια ποσότητα της ΠΜ αποδεσμεύεται και συσσωρεύεται στα κύτταρα του ηθμοσωλήνα, επιτρέποντας στο σύμπλοκο να σχηματίσει τα ισωμάτια με τα οποία θα συνεχίσει τη διασυστηματική μετακίνηση (Nagano et al., 1997; Requena et al., 2006).

Η ικανότητα της ΠΜ να αυξάνει το SEL των πλασμοδεσμάτων οφείλεται στην αλληλεπίδραση της με την F-ακτίνη (Su et al., 2010), ενώ η μετακίνησή της μέσα στα πλασμοδέσματα οφείλεται στο τμήμα της που εντοπίζεται στο κάρβοξυ-τελικό της άκρο και εκτείνεται μεταξύ των θέσεων 174-233, που είναι πλούσιο σε κυστεΐνη και ιστιδίνη (Vaquero et al., 1997) και αποτελεί το σημείο 'πρόσδεσης' των μορίων RNAs. Από την άλλη, η παρουσία ιόντων Zn^{+2} , ο ρόλος των οποίων είναι να σχηματίζουν τα προαναφερθέντα σύμπλοκα, εντοπίζεται στον πυρήνα των πρωτεϊνών και βρίσκεται σε διαφορετική θέση μέσα στην ΠΜ (Sasaki et al., 2006). Οποιαδήποτε αποτυχία στη σύνδεση μεταξύ των ισωματίων και των πρωτεϊνών του ξενιστή οδηγεί σε αποτυχία μετακίνησης του ιού στο φυτό. Επιπλέον τα ισωμάτια αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του ξενιστή που είναι παρούσες στο φλοίωμα, προστατεύοντας τα ιικά RNA από τις ριβινοκλεάσεις, ενώ ίσως η ΠΜ να διευκολύνει και τη μετακίνηση των ιικών συμπλόκων στους ηθμοσωλήνες (Requena et al., 2006).

1.5 Μοριακή παραλλακτικότητα και εξέλιξη

Ο CMV είναι ένας ιός με χαρακτηριστικά μεγάλη παραλλακτικότητα. Οι απομονώσεις του ιού, με βάση τις διαφορές που παρατηρούνται στην αλληλουχία, τις ορολογικές αντιδράσεις, καθώς και τον υβριδισμό των νουκλεϊκών οξέων διαχωρίστηκαν από νωρίς σε δύο ομάδες τις I και II. Μεταξύ 80 στελεχών του ιού, το ποσοστό νουκλεοτιδικής ομολογίας μεταξύ των στελεχών που ανήκουν στις ομάδες I και II κυμαίνεται από **69-77%**, μεταξύ εκείνων που ανήκουν στην ομάδα I είναι **88%** και το αντίστοιχο των στελεχών της ομάδας II είναι **96%** (García-Arenal et al., 2000). Τα στελέχη των δύο αυτών ομάδων παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους σε ορισμένα χαρακτηριστικά

όπως η ετερογένεια και η μολυσματικότητα, με τα στελέχη της ομάδας I να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ετερογένεια (Palukaitis et al., 1992; Roossinck et al., 2002; García-Arenal et al., 2000) και προκαλούν εντονότερα συμπτώματα, σε σχέση με αυτά της ομάδας II (Wahyuni et al., 1992; Zhang et al., 1994). Μια άλλη σημαντική διαφορά είναι και ικανότητα των στελεχών της ομάδας I να προσβάλλουν μεγαλύτερο αριθμό φυτικών ειδών, σε σχέση με τα στελέχη της ομάδας II (Daniels and Campbell, 1992; Wahyuni et al., 1992).

Αργότερα, αναλύοντας την ποικιλομορφία της μη μεταφραζόμενης περιοχής του 5' άκρου του RNA 3, διαπιστώθηκε ότι οι απομονώσεις που ανήκουν στην ομάδα I, διαχωρίζονται εκ νέου σε δύο υποομάδες (υποομάδα IA και IB). Τα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ της υποομάδας IA και τις υποομάδας IB είναι **92-94 %**, ενώ το ποσοστό μεταξύ των IA και IB και της ομάδας II είναι IA/ομάδα II **74-78 %** και IB/ομάδα II **73-78 %**, αντίστοιχα (Roossinck, 2002). Η ποικιλομορφία αυτή του ιού οφείλεται στη γενετική ανταλλαγή μικρών τμημάτων αποτελούμενα από ελάχιστες βάσεις μέσω ανασυνδυασμού ή αναδιάταξης στο RNA 3, δίνοντας διαφοροποιήσεις στα γονίδια ΚΠ ή ΠΜ, και κατά συνέπεια, στην ομαδοποίηση του στελέχους (Bonnet et al., 2005; Nouri et al., 2014).

Ο Liu και οι συνεργάτες του το 2009, αναλύοντας την παραλλακτικότητα απομονώσεων του CMV από την Κίνα, πρότειναν ότι με βάση τα γονίδια 1a, 2a, ΚΠ και ΠΜ οι απομονώσεις κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες (I, II, III), ενώ εάν συγκριθούν οι ίδιες απομονώσεις με βάση το γονίδιο 2b τότε ομαδοποιούνται μόνο σε δύο (I, II). Στην ίδια εργασία παρατηρήθηκε ότι η ομάδα I διαχωρίζεται σε δύο επιμέρους υποομάδες (IA, IB), όταν εξετάζονται τα γονίδια 2a, 2b, ΚΠ και ΠΜ, αλλά με βάση το γονίδιο 1a η ομάδα I διαχωρίζεται σε τρεις υποομάδες (IA, IB, IC) (Liu et al., 2009).

Πρόσφατα ο Hasiów-Jaroszewska και οι συνεργάτες του (2017), μελετώντας τη γενετική παραλλακτικότητα απομονώσεων του ιού από κολοκυθιά, έδειξαν ότι ανάλογα με το εξεταζόμενο γονίδιο, ΚΠ ή ΠΜ, οι απομονώσεις κατηγοριοποιούνταν σε διαφορετικές υποομάδες, ενώ η παρουσία ανασυνδυασμού ή αναδιατάξεων επηρεάζει και την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Έτσι εκτός από μωσαϊκό, παραμόρφωση φύλλων, χλώρωση, τα στίγματα, αποχρωματισμό των φύλλων και καρπών, ορισμένα φυτά είναι δυνατόν να παρουσιάζουν συνδυασμό των παραπάνω συμπτωμάτων. Επίσης μπορεί να προκληθούν συμπτώματα σε ξενιστές που μέχρι πρότινος δεν προκαλούσαν (Hasiów-Jaroszewska et al., 2017).

Ως αποτέλεσμα, παρουσία αρκετών φαινοτύπων του ιού δυσχεραίνει τον στρατηγικό σχεδιασμό για τον έλεγχο του (Rubio et al., 2013; Acosta-Leal et al., 2011). Τα τελευταία χρόνια αναφέρονται επιπλέον απομονώσεις που διαφοροποιούνται πλήρως από την παραπάνω ταξινόμηση (ομάδα I, II). Το στέλεχος **CMV-Rom**, απομονώθηκε από φυτά δενδρολίβανου (*Rosmarinus officinalis* cv SLT) στην περιοχή Avignon της Γαλλίας, με συμπτώματα ήπιου νανισμού και νέκρωσης στα φύλλα και παρουσιάζει ένα πολύ μικρό αριθμό φορέων, σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη του CMV, καθώς μπορεί να μεταδοθεί μόνο με τα είδη *Aphis gossypii* και *Myzus persicae* (Terfer et al., 2016). Τα στελέχη **BX-CMV** και **PHz-CMV** που έχουν απομονωθεί από το φυτό *Pinellia ternate* στην Κίνα, δεν ανήκουν σε καμία από τις γνωστές ομάδες, αλλά σε μια προτεινόμενη καινούργια την **υποομάδα IC** (Wang et al., 2010). Παρόμοια διαφοροποιείται και το στέλεχος **CMV-209**, που έχει απομονωθεί από σόγια (*Glycine soja*) στη Ν. Κορέα (Phan et al., 2014).

Αντίστοιχα, σε ένα μεγάλο αριθμό απομονώσεων που προέρχονταν από φυτά πιπεριάς στην Τυνησία παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός ανασυνδυασμών με κυρίαρχους τους IB-IA-IA και IB-IA-IB και σε μικρότερο βαθμό ανασυνδυασμοί του τύπου IB-IA-II, IB-II-IA, IB-II-II, II-IA-IB, II-II-IB (Ben Tamarzizt et al., 2013). Ο Nouri και οι συνεργάτες του (2014) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά ανασυνδυασμού εντοπίζονται μεταξύ απομονώσεων που ανήκουν στην υποομάδα IB και στο γονίδιο της ΠΜ (IB-ΠΜ), είτε μεταξύ των απομονώσεων που ανήκουν στην υποομάδα IA και το γονίδιο της ΚΠ (IA-ΚΠ), ενώ για πρώτη φορά καταγράφονται ανασυνδυασμοί μεταξύ των γονιδίων ΚΠ και της ΠΜ απομονώσεων που ανήκουν στην υποομάδα IA και απομονώσεων που ανήκουν στην ομάδα II (IA-ΠΜ/II-ΚΠ). Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι τα τρία RNAs του CMV ακολουθούν διαφορετική εξελικτική ικανότητα και πορεία (Nouri et al., 2014).

Η μεγάλη γενετική ποικιλομορφία που απαντάται στον CMV μειώνεται μέσω γενετικών στενωπών, δηλαδή εξελικτικών μηχανισμών που οδηγούν σε μείωση των υπεράριθμων στελεχών που μπορεί να έχει ο ιός λόγω **α)** υψηλού ρυθμού μετάλλαξης, **β)** ανασυνδυασμού και **γ)** αναδιάταξης. Η μείωση αυτή συμβαίνει με τρόπο τυχαίο που όμως μπορεί να αναλυθεί στατιστικά, αλλά δεν μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια, οδηγώντας τελικά στη παρουσία ενός μικρού πληθυσμού στελεχών του ιού από το πλήθος της ποικιλομορφίας που δημιουργείται (Ali et al., 2006). Γενετικοί στενωποί μπορεί να λάβουν χώρα: **α)** κατά την διακυτταρική μετακίνηση του ιού μέσω πλασμοδεσμάτων, **β)** μέσω της

μετάδοσης με τους φορείς, γ) λόγω κλιματολογικών συνθηκών (υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία, ξηρασία κτλ.), δ) λόγω της μείωσης του αριθμού των φυτών σε μια καλλιέργεια, και ε) μέσω της σπορομετάδοσης κατά την μεταφορά του ιού από φυτό σε φυτό (κάθετη μετάδοση) (Ali and Roossinck, 2008).

Όσον αφορά την εξέλιξη των απομονώσεων του CMV που ταξινομούνται στις κύριες ομάδες και υποομάδες του CMV, φαίνεται ότι αρχικά υπήρξαν οι απομονώσεις της ομάδας II από τις οποίες προήλθαν αυτές της υποομάδας IB και ακολούθως αυτές της υποομάδας IA. Όσον αφορά την παγκόσμια παρουσία τους, οι απομονώσεις των ομάδων II και IA απαντώνται παντού, με την πρώτη να χαρακτηρίζεται ως θερμοευαίσθητη και η υποομάδα IA ως θερμοανθεκτική, ενώ εκείνες της υποομάδας IB απαντώνται κυρίως στην ανατολική Ασία (Roossinck, 2002; Bashir et al., 2006; Koundal et al., 2011).

1.6 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του CMV με το φυτό ξενιστή

1.6.1 Απομονώσεις του ιού και συμπτωματολογία

Ο μηχανισμός εμφάνισης των συμπτωμάτων στις προσβολές φυτών από τον CMV δεν είναι πλήρως γνωστός. Εκτός από το τυπικό μωσαϊκό που αποτελεί χαρακτηριστικό σύμπτωμα του ιού, όπως δηλώνει και το όνομά του, η παρουσία του συνδέεται επίσης με ποικίλα συμπτώματα, όπως χλώρωση, φλύκταινες, μείωση της επιφάνειας του ελάσματος του φύλλου, νανισμό, νημάτωση των φύλλων, εμφάνιση τοπικών χλωρωτικών και νεκρωτικών κηλίδων στα φύλλα, νέκρωση ολόκληρου του φυτού, αλλά και παρουσία καφέ ζώνης στο εσωτερικό των καρπών της τομάτας (Jacquemonod, 2012).

Η εμφάνιση των συμπτωμάτων εξαρτάται από το στέλεχος του ιού, τον ξενιστή και το περιβάλλον. Όσον αφορά το στέλεχος του ιού υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων I και II. Έτσι σε προσβολή τομάτας από στελέχη της ομάδας I, το φυτό παρουσιάζει, νημάτωση ελάσματος, νανισμό και ήπιο έως έντονο μωσαϊκό, ενώ σε μόλυνση από στελέχη του ομάδας II παρατηρείται, έντονο μωσαϊκό, νανισμός και κάμψη του ελάσματος προς τα κάτω σχηματίζοντας μια κατασκευή που θυμίζει 'πακέτο' (Francki et al., 1979; Gallitelli et al., 1988).

Διαφορές στα συμπτώματα όμως παρουσιάζονται και μεταξύ απομονώσεων που ανήκουν στην ίδια ομάδα (I, II) ανάλογα με τον ξενιστή οι Farzadfar και οι συνεργάτες του (2013), έδειξαν ότι αν και στελέχη που ανήκουν στις υποομάδες IA και IB προκαλούν παρόμοια συμπτώματα σε πεπόνι, αγγούρι, φασόλι, πιπεριά, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, διαφοροποιούνται σημαντικά σε τομάτα, όπου τα φυτά εμφάνισαν για τη υποομάδα IA, παραμόρφωση ελάσματος, σχηματισμό 'φύλλου φτέρης' και μωσαϊκό, ενώ για την υποομάδα IB, διάστικτο μωσαϊκό, καθώς και σε καπνό *N. glutinosa* όπου τα στελέχη της IA προκάλεσαν χλωρωτικές κηλίδες, παραμόρφωση φύλλων και έντονο μωσαϊκό, ενώ αυτό της υποομάδας IB προκάλεσε δακτυλιοειδής κηλίδες και διάστικτο μωσαϊκό. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όσον αφορά την συμπτωματολογία, παρουσιάζουν απομονώσεις που προκαλούν νεκρωτική συμπτωματολογία στον ξενιστή τους (Farzadfar et al., 2013). Για πρώτη φορά το 1953 αναφέρθηκε ένα στέλεχος, το **N-CMV**, που πρόσβαλε αρκετά είδη καπνού στις ΗΠΑ προκαλώντας διασυστηματικές νεκρωτικές κηλίδες και τελικά νέκρωση των φυτών (Fulton et al., 1953). Όταν αναλύθηκε το γονιδίωμα του στελέχους **Ns-CMV**, παράγωγο του **N-CMV** και συγκρίθηκε με εκείνο του στελέχους **Rs-CMV**, που προκαλεί μόνο μωσαϊκό, διαπιστώθηκε ότι η νέκρωση οφείλεται σε αλλαγή της εκφραζόμενης αργινίνης σε κυστεΐνη στην θέση R461C του RNA 1. Η αντικατάσταση της αργινίνης καθιστούσε το μη νεκρωτικό στέλεχος **Rs-CMV** νεκρωτικό. Ανάλογα πειράματα έγιναν και με το στέλεχος **TrK7-CMV** που ανήκει στην ομάδα II (Divéki et al., 2004).

Εκτός από το νεκρωτικό στέλεχος **Ns-CMV**, το 2007 απομονώθηκε από τομάτα και το στέλεχος **Cb7-CMV** που ανήκει στην ομάδα II και προκαλεί συστηματική νέκρωση στο φυτό *N. glutinosa*. Ανάλυση του γονιδιώματος του έδειξε ότι η νεκρωτική ικανότητά του οφείλεται στην παρουσία του αμινοξέος Leu⁵⁵ στην θέση 55 της 2b πρωτεΐνης, ενώ αντικατάστασή της σε μεταλλαγμένα στελέχη με την Pro⁵⁵, οδήγησε στην εμφάνιση ήπιου μωσαϊκού (Du et al., 2008). Η παρουσία νεκρωτικών κηλίδων αποτελεί αντίδρασης υπερευαισθησίας (**Hypersensitive Reaction, HR**), έχει ως αποτέλεσμα να περιορίζεται η μετακίνηση του ιού στα γειτονικά κύτταρα και φαίνεται να σχετίζεται με τις πρωτεΐνες 1a, 2a ή ΚΠ σε συνδυασμό με το στέλεχος και τον ξενιστή (Palukaitis and García-Arenal, 2003).

Μελέτες με το στέλεχος **HL-CMV** από κρίνο που προκαλεί νεκρωτικές κηλίδες στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Masuta et al., 2012), έδειξαν ότι η εμφάνιση των κηλίδων οφείλεται στην αλληλεπίδραση του RNA 2 και των επιπέδων του υπεροξειδίου του

υδρογόνου κατά το στάδιο της καταλάσης (**CAT**), που είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση του οξυγόνου στα κύτταρα. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2), σύμφωνα με την αντίδραση ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + 2O_2$) και απαντάται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς (Zámocký and Koller, 1999). Διαπιστώθηκε η αλληλεπίδραση της **CAT3** και του RNA 2 και η οποία συνδέεται με την παρουσία των αμινοξέων που βρίσκονται στο κάρβοξυ-τελικό άκρο στη θέση 40. Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ του ξενιστή και της 2b του ιού, έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου και κατ'επέκταση επηρεάζει την δράση της καταλάσης στα κύτταρα οδηγώντας τα σε νέκρωση (Masuta et al., 2012). Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ένταση των συμπτωμάτων είναι η παρουσία satRNAs και ιδιαίτερα σε φυτά τομάτας όπου μπορεί να αναπτυχθεί το νεκρωτικό σύνδρομο, είτε να ελαττώσει τα εκφραζόμενα συμπτώματα (βλέπε παράγραφο 2.1).

1.6.2 Μικτές μολύνσεις και ανάπτυξη συμπτωμάτων

Στη φύση, εκτός από την παρουσία ενός μόνο ιού σε ένα φυτό, παρατηρείται και η ταυτόχρονη μόλυνση με περισσότερους ιούς, που επηρεάζει την εμφάνιση και την ένταση των συμπτωμάτων. Έχει παρατηρηθεί ότι η ταυτόχρονη παρουσία του CMV με κάποιο από τα μέλη των γενών *Tobamo-*, *Potex-*, *Crini-*, *Poty-*, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης των συμπτωμάτων, κυρίως στα κολοκυνθοειδή και την τομάτα, αυξάνοντας ταυτόχρονα και τη συγκέντρωση του CMV (φαινόμενο συνεργισμού) (Palukaitis and García-Arenal, 2003). Σε κολοκυνθοειδή που παρουσιάζουν ανεκτικότητα στον CMV, ταυτόχρονη μόλυνση του CMV με τον *zucchini yellow mosaic virus*, (*ZYMV*, *Potyvirus*), έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του CMV, χωρίς όμως να επηρεάζεται η ένταση των συμπτωμάτων (Wang et al., 2004). Από την άλλη η ταυτόχρονη παρουσία του CMV με έναν άλλον *Poty-*ιό, τον *potato virus Y* (*PVY*), σε φυτά τομάτας αυξάνει την συγκέντρωση του CMV, με ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης του *PVY*, ενώ παράλληλα αυξάνεται και η ένταση των συμπτωμάτων (Mascia et al., 2010). Υπεύθυνη για τα παραπάνω φαίνεται να είναι η πρωτεΐνη 2b, μέσω της ικανότητας της να εμπλέκεται στον μηχανισμό σίγησης (Siddiqui et al., 2011).

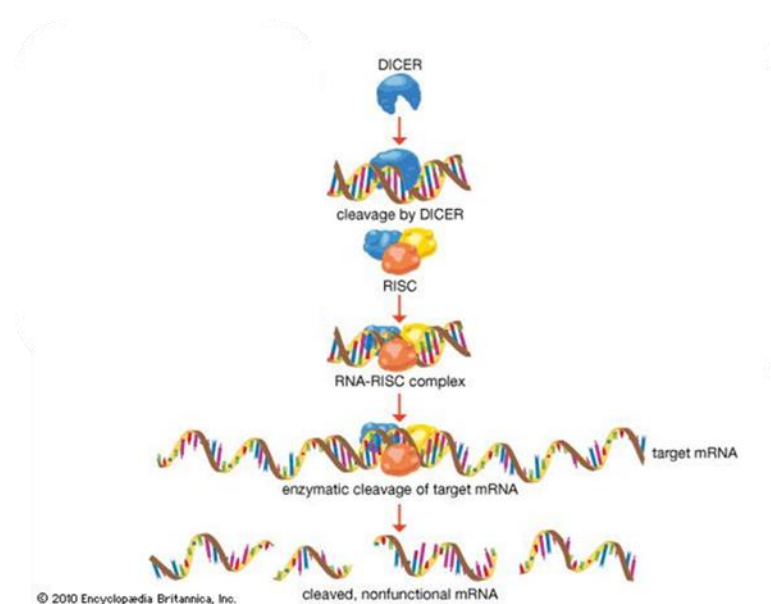
Εκτός από τις μικτές μολύνσεις ενός φυτού-ξενιστή από δύο διαφορετικούς ιούς, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η αλληλεπίδραση δύο διαφορετικών στελεχών του CMV σε ένα φυτό (συνεργισμός), με αποτέλεσμα είτε την αύξηση της έντασης των συμπτωμάτων, είτε την προστασία του φυτού που μολύνεται από ένα στέλεχος από μελλοντική προσβολή από άλλο στέλεχος του ιού (διασταυρωτή προστασία). Για την ερμηνεία του φαινομένου της διασταυρωτής προστασίας έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί: **α)** η σίγηση γονιδίων και **β)** ο ανταγωνισμός μεταξύ των στελεχών.

Μηχανισμός σίγησης γονιδίων στον CMV (ή σίγηση RNA, RNA silencing). Είναι ένας συντηρημένος μηχανισμός άμυνας που απαντάται σε φυτά, μύκητες και ζώα και εμπλέκεται στην αποδόμηση του RNA, αφορά την αποδιοργάνωση ξένων γονιδιακών τμημάτων που εισέρχονται στον οργανισμό ή την καταστολή της πρωτεϊνικής τους μετάφρασης. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα κατά το μετα-μεταγραφικό στάδιο (Post-transcriptional gene silencing, **PTGS**), όπου μετά την διαδικασία της μεταγραφής ακολουθεί η αποδόμηση του mRNA (Bartel, 2009; Brodersen and Voinnet, 2009). Ο μηχανισμός ενεργοποιείται από την παρουσία **dsRNA** στο εσωτερικό του κυττάρου, το οποίο κατακερματίζεται από μια εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (DICER Like, DCL) σε μικρού μεγέθους, 20-25 nt, δίκλιωνα siRNA (small interfering, **siRNA**), τα οποία φέρουν συνήθως δύο προεξοχές μήκους 2 βάσεων στο άκρο 3' των αλυσίδων τους και χρησιμοποιούνται ως οδηγοί από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο νουκλεάσης (RISC), για την αποδόμηση των ομόλογων RNAs (Ding et al., 2004; Qi et al., 2005).

Οι DICER Like είναι ριβινοκλεάσες που καλούνται από τα γονίδια DICER της *Drosophilla melanogaster* και αποτελούν μια κατηγορία ενδοριβονουκλεασών (DCL 1, DCL 2, DCL 3, DCL 4), μεγέθους 200 kDa, που ανήκουν στην οικογένεια των RNase III, όπου η καθεμία από αυτές επιτελεί ένα διαφορετικό έργο. Έτσι η DCL 1 εμπλέκεται στον σχηματισμό των microRNAs (miRNAs), ενώ οι υπόλοιπες στον σχηματισμό των small interfering RNAs (siRNAs). Εκφράζονται διαφορετικά ανάλογα με τον ιστό (αναπαραγωγικά όργανα, σπόροι), το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, αλλά και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως ξηρασία, κρύο και αλατότητα (Liu et al., 2009). Αποτελούνται από τα εξής τμήματα: **α)** ένα τμήμα **PAZ** (από τα αρχικά των πρωτεϊνών **PIWI**, **AGO**, **ZWILLE**), **β)** δύο τμήματα RNase III, η απόσταση μεταξύ των οποίων καθορίζει το μέγεθος των παραγόμενων dsRNA, **γ)** ένα τμήμα ATPase/RNA ελικάσης και **δ)** ένα κάρβοξυ-τελικό άκρο για να γίνει η πρόσδεση των

dsRNA που είναι για κατακερματισμό (Matsuda et al., 2000). Το σύμπλοκο DICER εμπλέκεται και στον σχηματισμό του συμπλέγματος σίγησης **RISC** (**RNA Induced Silencing Complex**), όπου η κύρια πρωτεΐνη είναι μια ενδονουκλεάση που καλείται Αργοναύτης (AGO) και διασπά το mRNA (Liu et al., 2009; MacRae et al., 2006; Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009). Το RISC είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών με κυρίαρχη την πρωτεΐνη AGO. Η AGO πρωτεΐνη έχει μέγεθος που κυμαίνεται στα 100 kDa και αποτελείται από μία περιοχή **PAZ** και από μια **PIWI** και παρουσιάζουν μια δράση νουκλεάσης που κατακερματίζει τα μόρια του RNA. Ο ρόλος της είναι να δεσμεύσει την κωδική αλυσίδα των siRNAs, που σχηματίζεται από την λειτουργία του συμπλόκου DICER και είναι συμπληρωματική ως προς το αρχικό mRNA. Μόλις γίνει αυτό, το RISC μαζί με το συμπληρωματικό RNA, αναζητά το αρχικό mRNA, σχηματίζει δίκλωνη αλυσίδα και ακολούθως κατακερματίζεται από την AGO σε μικρότερα τμήματα (Gregory et al., 2005).

Ο μηχανισμός της σίγησης περιλαμβάνει δύο στάδια (Εικ. 1.4), την έναρξη και την εφαρμογή. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τον κατακερματισμό του dsRNA σε siRNAs μήκους 20-25 νουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στην κωδική και αντικωδική αλυσίδα του γονιδίου στόχου. Για να σχηματιστούν τα siRNAs, τα dsRNA πέπτονται μέσω του συμπλόκου Dicer (Tang et al., 2005; Hamilton et al., 2002). Στο επόμενο στάδιο η δίκλωνη αλυσίδα των dsRNA, αποδιατάσσεται σε δύο αλυσίδες, την κωδική και την αντικωδική. Η κωδική αλυσίδα αποδιοργανώνεται πλήρως, ενώ η άλλη είναι συμπληρωματική με το mRNA στόχο και ενσωματώνεται στο RISC που επάγεται από το RNA και το καθοδηγεί στο συμπληρωματικό mRNA (Hull, 2002).



Εικόνα 1.4: Αναπαράσταση του μηχανισμού σίγησης, όπου διακρίνεται ο τεμαχισμός του dsRNA από την ενδοριβονουκλεάση DCL σε siRNAs και την ενσωμάτωση των τελευταίων στο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα RISC με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του ιικού mRNA (πηγή: <https://www.britannica.com/science/RNA-interference>).

Εκτός όμως από την παρουσία των siRNAs, στο κύτταρο απαντώνται και τα micro RNAs (**miRNAs**), τα οποία αποτελούνται από μικρού μήκους, 21-25 νουκλεοτιδίων, μονόκλωνη αλυσίδα RNA, που σχηματίζεται από την DCL 1 στον πυρήνα του κυττάρου και ο ρόλος τους είναι η παρακώλυση της μετάφρασης και όχι τόσο η αποδόμηση του RNA (Reinhart et al., 2002; Papp et al., 2003). Ο μηχανισμός της σίγησης δεν περιορίζεται αποκλειστικά στα κύτταρα του φυτού στα οποία και ενεργοποιείται, αλλά τα siRNAs μετακινούνται μέσω των πλασμοδεσμάτων σε γειτονικά κύτταρα, όπου με την βοήθεια της RdRp του ξενιστή δίνουν νέα dsRNA, που πέπτονται παράγοντας νέα siRNA, τα οποία μετακινούνται όπως και προηγουμένως. Με τη διαδικασία αυτή τα siRNAs φτάνουν μέχρι και το φλοιώμα, όπου πιθανόν συνδέονται με τις πρωτεΐνες του φυτού και από εκεί μετακινούνται σε ολόκληρο το φυτό.

Ο Ziebell και οι συνεργάτες (2007), απέδειξαν ότι με την απενεργοποίηση του γονιδίου 2b στο στέλεχος **Fny-CMV** (υποομάδα IA) και μόλυνση φυτών *N. benthamiana* και *N. tabacum*, τα φυτά εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην προσβολή από το στέλεχος **Fny-CMV** αγρίου τύπου (wild-type, **wt**), ενώ επιπλέον δεν μπορούσαν να προσβληθούν από άλλο στέλεχος που ανήκει στην ομάδα I (φαινόμενο διασταυρωτής προστασίας, cross protection) (Ziebell et al., 2007). Για την ερμηνεία του φαινομένου διατυπώθηκε η θεωρία ότι το στέλεχος παρεμπόδισης, ενεργοποιεί τον μηχανισμό σίγησης ενάντια σε στελέχη που παρουσιάζουν νουκλεοτιδική ακολουθία όμοια με αυτό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα στέλεχος που στερείται του γονιδίου απενεργοποίησης του μηχανισμού σίγησης να αποτελεί έναν πολύ καλό παράγοντα διασταυρωτής ανθεκτικότητας, ενεργοποιώντας τον μηχανισμό σίγησης του ξενιστή (Kurihara and Watanabe, 2003; Ratcliff et al., 1999; Valkonen et al., 2002).

Εκτός όμως από την ικανότητα προστασίας από στελέχη της ίδιας ομάδας, στα παραπάνω φυτά παρατηρήθηκε και η προστασία ακόμα από στελέχη που ανήκουν σε διαφορετική ομάδα, όπως παρατηρήθηκε και κατά την μόλυνση με το άγριου τύπου

στέλεχος **TC-CMV** (ομάδα II), όπου τα δυο στελέχη **Fny-CMV (wt)** και το **TC-CMV (wt)**, παρουσιάζουν 70% όμοια νουκλεοτιδική ακολουθία. Για την ερμηνεία του φαινομένου προτάθηκε ότι για την ενεργοποίηση της ικανότητας προστασίας θα πρέπει να υπάρχει μεταξύ των στελεχών ομοιότητα σε τουλάχιστον 23 νουκλεοτίδια (Thomas et al., 2001).

Ανταγωνισμός μεταξύ των στελεχών: Για τον δεύτερο μηχανισμό ο Rodríguez-Alvarado και συνεργάτες του, (2001), πραγματοποίησαν πειράματα σε φυτά πιπεριάς (*Capsicum annuum* L. type Anaheim), χρησιμοποιώντας τα στελέχη **I) CMV-S** που ανήκει στην ομάδα II και προκαλεί μια ήπια συμπτωματολογία μωσαϊκού, **II) CMV-SD2** που ανήκει στην ομάδα I και **III) CMV-35** που ανήκει στην ομάδα II που προκαλεί μια αρκετά έντονη συμπτωματολογία που περιλαμβάνει νανισμό, έντονο μωσαϊκό συνοδευόμενο από μια γενική χλώρωση, παραμόρφωση του ελάσματος και νημάτωση των φύλλων της κορυφής (Rodríguez-Alvarado et al., 2001). Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι έπειτα από προ-εμβολιασμό των φυτών με το ήπιο στέλεχος δεν παρατηρούνταν πολλαπλασιασμός του ισχυρού στελέχους, είτε τα στελέχη ανήκουν στην ίδια (ομόλογα) είτε σε διαφορετικές ομάδες (ετερόλογα). Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας τόσο μεταξύ ομόλογων, όσο και μεταξύ ετερόλογων στελεχών, παίζει η προέλευση των στελεχών που θα χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες παρεμπόδισης πολλαπλασιασμού των ισχυρών στελεχών και ειδικότερα η συγκέντρωση του γονιδίου της ΚΠ (Namba et al., 1991; Quemada et al., 1991). Αντίστοιχα η εφαρμογή του στέλεχος **CMV-WL** (ομάδα II), σε φυτά τομάτας και καπνού, οδήγησε σε αύξηση της διασταυρωτής ανθεκτικότητας σε προσβολή από στελέχη που ανήκουν είτε στην ομάδα I είτε στην ομάδα II (Namba et al., 1991; Xue et al., 1994). Το αντίθετο συμβαίνει όταν χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος **CMV-C** που ανήκει στην ομάδα I σε προσβολή από οποιοδήποτε στέλεχος που ανήκει σε οποιαδήποτε ομάδα (Quemada et al., 1991). Γενικότερα, ο μηχανισμός διασταυρωτής ανθεκτικότητας παρουσιάζει άριστα αποτελέσματα όταν τα στελέχη που συμμετέχουν παρουσιάζουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ομολογιακή ακολουθία (Hull, 2002). Συνεπώς και η επιτυχία σε πειράματα ανθεκτικότητας αυξάνεται όταν τα στελέχη που χρησιμοποιούνται ανήκουν στην ίδια ομάδα (Carr et al., 1994; Hellwald and Palukaitis, 1995; Wintermantel and Zaitlin, 2000; Zaitlin et al., 1994).

1.6.3 Η 2b πρωτεΐνη ως παράγοντας μόλυνσης

Η 2b πρωτεΐνη είναι η πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη σίγηση γονιδίων, εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων, όπου αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες που βρίσκονται στην θέση αυτή, όπως την AtKAPA του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Εκτός από την αλληλεπίδρασή της με τον ξενιστή, η 2b παρουσιάζει δύο θέσεις στη δομή της (22-27 και 33-36), πλούσιες σε αργινίνη, ενώ επιπλέον στις θέσεις 39-43 παρουσιάζει μια φωσφορυλιωμένη δράση που σχετίζονται με την παρουσία της στον πυρήνα των κυττάρων (Wang et al., 2004). Ένα χαρακτηριστικό της δομής της, είναι το γεγονός ότι ενώ παρουσιάζει μια συντηρητική περιοχή στο κάρβοξυ-τελικό της άκρο μεγέθους 17 αμινοξέων, εντούτοις είναι η πλέον ευμετάβλητη πρωτεΐνη στο γονιδίωμα του ιού (Lewsey et al., 2009). Εκτός από τη συμμετοχή της στο μηχανισμό σίγησης των γονιδίων, παίζει σημαντικό ρόλο και στη συμπτωματολογία του ιού. Απουσία του γονιδίου 2b συνδέεται με τη λανθάνουσα μόλυνση σε φυτά *N. glutinosa* και την απώλεια της διασυστηματικής μετακίνησης στα κολοκυνθοειδή (Ding et al., 1995).

Το 2009, ο Cillo και οι συνεργάτες του απέδειξαν τον ρόλο της 2b πρωτεΐνης στην εμφάνιση και ένταση των συμπτωμάτων χρησιμοποιώντας στελέχη του CMV από διαφορετικές ομάδες. Σχημάτισαν μεταλλαγμένα στελέχη ανταλλάσσοντας το γονίδιο 2b και παρατήρησαν ότι μεταφέροντας το γονίδιο 2b από το στέλεχος **LS-CMV** που ανήκει στην ομάδα II, στο στέλεχος **Fny-CMV** που ανήκει στην υποομάδα IA, η ένταση των συμπτωμάτων μειώνονταν (Cillo et al., 2009). Μετά την μεταφορά του γονιδίου 2b από το στέλεχος **Fny-CMV** (υποομάδα IA) σε στελέχη (**Cb7-CMV**, **PGs-CMV** κ.α.) που ανήκουν στην υποομάδα IB, τα συμπτώματα που καταγράφηκαν ήταν τα αναμενόμενα για το κάθε στέλεχος (Du et al., 2007), ενώ όταν μεταφέρθηκε από το στέλεχος **WAI1-CMV**, που ανήκει στην υποομάδα IA, στο στέλεχος Q-CMV, που ανήκει στην ομάδα II, παρατηρήθηκε αύξηση της μολυσματικότητας (Shi et al., 2002). Για την εκδήλωση των συμπτωμάτων σημαντικό ρόλο παίζει το άμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, ενώ για την ένταση των συμπτωμάτων υπεύθυνο είναι το κάρβοξυ-τελικό της άκρο και ειδικότερα το αμινοξύ της σερίνης που εδράζεται εκεί (Lewsey et al., 2009).

2. Τα δορυφορικά (satellite) RNAs (satRNAs) του CMV

2.1 Γενικά για τα satRNAs

Εκτός από τις ιδιότητες του γονιδιώματος ορισμένων ιών ενδιαφέρον παρουσιάζει και η παρουσία ενός μικρού μεγέθους RNA που είναι παρόν σε ορισμένα στελέχη τους και δεν ανήκει στο γονιδίωμα τους. Το γενετικό αυτό υλικό καλείται “δορυφορικό” (satellite RNAs, **satRNAs**) και χρειάζεται πάντα την παρουσία του κύριου ιού για τη μετακίνηση, αντιγραφή, καψιδίωση και τη μετάδοσή του. Η παρουσία των satRNAs παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί μπορούν να επηρεάσουν δραματικά τα συμπτώματα του κύριου ιού, όπως στην περίπτωση του CMV και την εμφάνιση του νεκρωτικού συνδρόμου στην τομάτα (Collmer and Howell, 1992; García-Arenal et al., 1987; Sleat and Palukaitis, 1990; Sleat et al., 1994; Zhang et al., 1994). Με βάση το μέγεθός τους υπάρχουν τρεις τύποι satRNAs:

- **Τύπος B:** είναι ευθύγραμμα RNAs, μεγάλου μεγέθους 0,7-1,5 kb, που περιέχουν ένα ΑΠΑ (Roossinck et al., 1992).
- **Τύπος C:** είναι ευθύγραμμα, μικρού μεγέθους RNAs, κάτω από 700 bp, που δεν περιέχουν κανένα ΑΠΑ (Mayo et al., 1995).
- **Τύπος D:** είναι κυκλικά τμήματα μικρού μεγέθους RNAs, κάτω από 350 bp, που δεν φέρουν κανένα ΑΠΑ (Bruening, 2000; Mayo et al., 1995).

Τα κύρια χαρακτηριστικά των satRNAs και οι επιδράσεις τους στον κύριο ιό έχουν ως εξής: **α)** Μπορούν να επηρεάσουν την συμπτωματολογία του κύριου ιού, αυξάνοντας ή μειώνοντας την ένταση των συμπτωμάτων του, **β)** Δεν εκφράζουν δική τους RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) για την αντιγραφή τους, οπότε και χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς του κύριου ιού και **γ)** Μπορεί να μειώσουν την συγκέντρωση των ιοσωματίων του κύριου ιού και για τον λόγο αυτό αποκαλούνται και ‘μοριακά παράσιτα’ των κύριων ιών (Hu et al., 2009).

2.2 Τα satRNAs του CMV

Τα satRNAs του CMV ανήκουν στον τύπο C, πρόκειται δηλαδή για μικρού μεγέθους ευθύγραμμα τμήματα, θετικής πολικότητας, όπως και ο κύριος ιός, με μέγεθος που κυμαίνεται από 330 με 405 nt. Δεν παρουσιάζουν κάποιο ΑΠΑ και ως εκ τούτου δεν εκφράζουν κάποια πρωτεΐνη (Collmer and Kaper, 1988; Devic et al., 1990; Jaegle et al., 1990; Masuta and Takanami, 1989). Έτσι τα satRNAs αλληλεπιδρούν με τον κύριο ιό και τον ξενιστή για να μπορέσουν να ολοκληρώσουν τον "βιολογικό" τους κύκλο (García-Arenal et al., 1987). Μέχρι στιγμής υπάρχουν καταγεγραμμένες στην παγκόσμια γονιδιωματική τράπεζα (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 188 αλληλουχίες satRNA (www.ncbi.nlm.nih.gov).

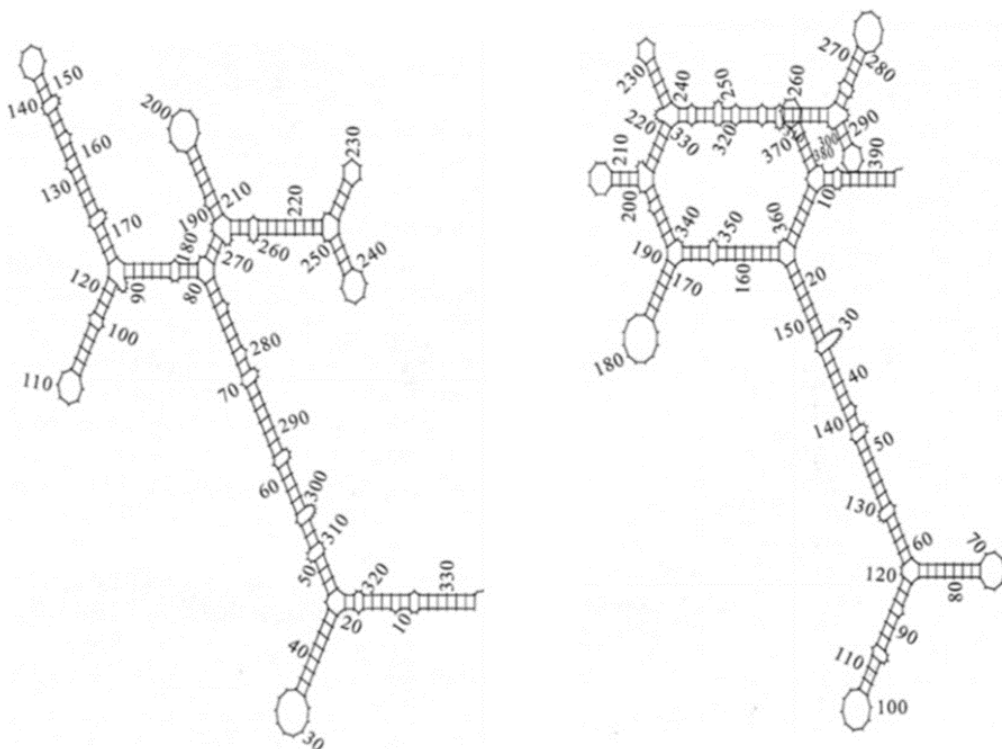
Η παρουσία των satRNAs, καθώς και ο μηχανισμός προσβολής και εμφάνισης των συμπτωμάτων που σχετίζονται με αυτά δεν είναι πλήρως κατανοητός. Δύο είναι οι κυριότερες θεωρίες όσον αφορά την καταγωγή και την εξέλιξή τους. Η μία υπόθεση θεωρεί ότι τα satRNAs υπάρχουν ως τμήματα στα γονιδιώματα των κύριων ιών, όπου κατά την διαδικασία της αντιγραφής αναγνωρίζονται από τον μηχανισμό της ρεπλικάσης και μετατρέπονται σε λειτουργικά μόρια, τα οποία στη συνέχεια επιλέγονται κάτω από τις συνθήκες του ξενιστή και του περιβάλλοντος και εκφράζονται ως satRNAs (Simon et al., 2004). Η δεύτερη υπόθεση αναφέρει ότι κάποια στελέχη του ιού περιέχουν σε πολύ μικρές ποσότητες satRNAs, τα οποία ξεκινούν την αντιγραφή και γίνονται εμφανή σε συνθήκες του εργαστηρίου (Palukaitis et al., 1992). Για την ανάλυση της τελευταίας θεωρίας χρησιμοποιήθηκαν κλώνοι του στελέχους **CMV-Fny** και **CMV-Ls**, τα οποία δεν φέρουν το satRNA, σε φυτά *Nicotiana tabacum* cv.Ky14. Η παρουσία του satRNA εντοπίστηκε μετά από οκτώ διαδοχικές μολύνσεις για το στέλεχος **CMV-Fny**, αλλά δεν εμφανίστηκε καθόλου ακόμα και μετά από 11 διαδοχικές μολύνσεις στην περίπτωση του στελέχους **CMV-Ls**. Ακολούθησε ανάλυση της ακολουθίας του satRNA του στελέχους CMV-Fny και συγκρίνοντας το με τις αντίστοιχες γνωστές αλληλουχίες των υπολοίπων satRNA φαίνεται να είναι μοναδική (Hajimorad et al., 2009; García-Luque et al., 1984; Gould et al., 1978; Kaper et al., 1976; Palukaitis et al., 1992).

2.3 Σχέση μεταξύ αλληλουχίας και δομής με την παθογένεια των satRNAs του CMV

Μια από τις ιδιότητες που παρουσιάζουν τα satRNAs είναι και η επίδραση (ενίσχυση ή μείωση) της έντασης των συμπτωμάτων που προκαλούνται από τον κύριο ιό. Έτσι σε ορισμένες περιπτώσεις έχει καταγραφεί ότι μπορούν να προκαλέσουν νέκρωση (Grieco et al., 1997; Jordá et al., 1992; Kaper and Waterworth, 1977; Kosaka et al., 1989; Raj et al., 2000), είτε χλώρωση (Gonsalves et al., 1982; Palukaitis, 1988; Takanami, 1981) σε φυτά τομάτας και καπνού.

Η συμπτωματολογία των satRNAs του CMV, εξαρτάται από την απομόνωση του satRNA, αλλά και από το φυτό-ξενιστή. Για παράδειγμα η απομόνωση **D-satRNA** προκαλεί νέκρωση στην τομάτα, πλην όμως τα συμπτώματα δεν είναι τόσο έντονα στον καπνό (García-Arenal and Palukaitis, 1999). Παρόμοια, η απομόνωση **PepY-satRNA**, προκαλεί χλώρωση στην κόκκινη πιπεριά, αλλά όχι σε τομάτα και σε καπνό (Choi et al., 2011), ενώ η απομόνωση **K8-satRNA**, μειώνει την ένταση των συμπτωμάτων στον καπνό και την τομάτα, ενώ δεν έχει καμία επίδραση στην συμπτωματολογία της κολοκύθας (Jacquemond, 2012). Έτσι ο φαινότυπος της απομόνωσης **WL2-satRNA** είναι λευκή χλώρωση (Gonsalves et al., 1982), υποδεικνύοντας την ταυτόχρονη απώλεια σε χλωροφύλλη και καροτενοειδή όπως η ξανθοφύλλη και ταυτόχρονα το μέγεθος των προσβεβλημένων κυττάρων μειώνεται, ενώ ο αριθμός τους παραμένει αναλλοίωτος (Simon et al., 2004), όμοια με το στέλεχος **B5-satRNA**, που προκαλεί μια κίτρινη χλώρωση στην τομάτα (García-Arenal et al., 1987). Ιδιαίτερα για τη διερεύνηση της παθογένειας των satRNAs του CMV έγιναν εκτεταμένες μελέτες της αλληλουχίας τους που σχετίζονται με την εμφάνιση νεκρωτικών συμπτωμάτων στην τομάτα και διαπιστώθηκε ότι η παθογένεια τους εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, αποτελούμενες από ένα μέχρι μερικά νουκλεοτίδια (Jaegle et al., 1990; Sleat and Palukaitis, 1990, 1992; Sleat et al., 1994; Zhang et al., 1994). Πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας ως φορέα τον *potato virus X*, για να εκφράσουν το νεκρωτικό στέλεχος **D4-satRNA** του CMV, απέδειξαν ότι η (-) αλυσίδα είναι υπεύθυνη για τη νέκρωση και όχι η (+) (Taliany et al., 1998) και επιπλέον διαπίστωσαν ότι κατά την έναρξη της νέκρωσης παρατηρείται αύξηση του αριθμού των αλυσίδων αρνητικής πολικότητας σε σύγκριση με

αυτό των θετικών (Xu and Roossinck, 2000). Η ανάλυση της δομής της (+) αλυσίδας του στελέχους **D4-satRNA**, έδειξε την παρουσία στο 3' άκρο μιας κατασκευής αποτελούμενη από 4 δομές θηλιάς οι οποίες είναι παρούσες σε κάθε νεκρωτικό στέλεχος (Alvarez et al., 2003) (Εικ. 1.5). Αξιοσημείωτη είναι επίσης η παρουσία δευτεροταγούς δομής στο γονιδίωμα, όπου το **50%** παρουσιάζει δεσμούς μεταξύ των βάσεων του (Rodríguez-Alvarado and Roossinck, 1997), αν και σε ορισμένες περιπτώσεις αλλαγές τόσο στην πρωτοταγή, όσο και στη δευτεροταγή δομή δε φαίνεται να επηρεάζουν την παθογένεια (García-Arenal and Palukaitis, 1999).



Εικόνα 1.5: Απεικόνιση μοντέλων satRNAs, όπου αριστερά φαίνεται η δομή ενός μη νεκρωτικού και δεξιά ενός νεκρωτικού satRNA (Alvarez et al., 2003).

Η μελέτη του γονιδιώματος των satRNAs έδειξε ότι η εμφάνιση της νέκρωσης στην τομάτα σχετίζεται με μια περιοχή που εδράζεται στο μέσο του 3' άκρου του δορυφορικού, ενώ η εμφάνιση της χλώρωσης στον καπνό και τη τομάτα οφείλεται στην περιοχή που εδράζεται στο 5' άκρο (Devic et al., 1990). Τα δε τμήματα που βρίσκονται έξω από την περιοχή επηρεάζουν την επέκταση της νέκρωσης (Palukaitis and García-Arenal, 2003). Κατά τη σύγκριση της αλληλουχίας πολλών νεκρωτικών και μη-satRNAs διαπιστώθηκε, ότι η ακολουθία του νεκρωτικού τμήματος είναι η ακόλουθη GA-GCUAAGGCUUA---UGCUAUGCUGAU και τα νεκρωτικά satRNAs έφεραν στις θέσεις **318**, **323** και **325** τις βάσεις

G,U,C, οι οποίες απουσίαζαν από τα μη νεκρωτικά satRNA (Devic et al., 1990). Επιπλέον φάνηκε ότι, εάν στο στέλεχος **Y-satRNA**, που προκαλεί το νεκρωτικό σύνδρομο, αντικατασταθεί η βάση της κυτοσίνης στην θέση 325 με εκείνη της ουρακίλης, τότε ο φαινότυπος αλλάζει από νεκρωτικός σε μη νεκρωτικός (Masuta and Takanami, 1989), το ίδιο συμβαίνει και όταν αντικατασταθούν οι βάσεις της γουανίνης με αδερίνη στη θέση 318, της ουρακίλης με κυτοσίνη στη θέση 323 και της κυτοσίνης με ουρακίλη στη θέση 325 (Devic et al., 1990). Αντίστοιχα σε στελέχη που δεν παρουσιάζουν νεκρωτικό φαινότυπο, όπως το **WL1-satRNA**, αντικατάσταση των βάσεων αδερίνης με γουανίνη, γουανίνης με ουρακίλη και ουρακίλης με κυτοσίνη στις θέσεις 318, 323 και 325, αντίστοιχα οδηγεί σε εμφάνιση νεκρωτικού φαινότυπου, ενώ εάν αντικατασταθούν ξανά με τα αρχικά τους νουκλεοτίδια επανέρχεται η μη νεκρωτική συμπτωματολογία (Sleat and Palukaitis, 1990). Το ενδιαφέρον με τη συγκεκριμένη αλληλουχία είναι ότι προκαλεί διασυστηματική νέκρωση στην τομάτα, αλλά όχι σε άλλα φυτικά είδη (García-Arenal and Palukaitis, 1999; Betancourt et al., 2011). Η περαιτέρω μελέτη της αλληλουχίας των νεκρωτικών δορυφορικών RNA δεν κατέστησε δυνατή την πλήρη ερμηνεία του μηχανισμού παθογένειας. Η παρουσία χλωρωτικού συμπτώματος σε διάφορους ξενιστές καθορίζεται κατά τρόπο ανάλογο με το νεκρωτικό σύνδρομο. Έτσι η παρουσία ουρακίλης στην θέση 149 οδηγεί στην εμφάνιση χλώρωσης στην τομάτα αλλά όχι στον καπνό, ενώ εάν στην ίδια θέση υπάρχει η κυτοσίνη εμφανίζεται χλώρωση και στον καπνό. Επίσης η διαγραφή νουκλεοτιδίου στην θέση 153 έχει σαν αποτέλεσμα την απουσία χλώρωσης είτε στην τομάτα είτε στον καπνό, χωρίς όμως να επηρεάζεται η αντιγραφή του satRNA (Sleat and Palukaitis, 1992).

2.4 Σχέση μεταξύ του κύριου ιού και των satRNAs στην εκδήλωση των συμπτωμάτων

Επιπλέον του ίδιου του satRNA, η εμφάνιση των συμπτωμάτων επηρεάζεται και από τον συνδυασμό του στελέχους του κύριου ιού και του satRNA. Για παράδειγμα, το στέλεχος του δορυφορικού **Y-satRNA**, όταν συνδυάζεται με το στέλεχος **Y-CMV** (Yellowing, **Y-satRNA**) δίνει νεκρωτικά συμπτώματα στην τομάτα, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο όταν συνδυαστεί με το στέλεχος **O-CMV** (Masuta and Takanami, 1989). Τέλος, σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του νεκρωτικού συνδρόμου παίζει η ευαισθησία του ξενιστή (Karper, 1992), καθώς και η θερμοκρασία, με την ιδανική θερμοκρασία για την εμφάνιση του νεκρωτικού συνδρόμου τους 24° C (White et al., 1995), ενώ διαφορά ακόμα και 2,5° C μπορεί να καθορίσει εάν το

παραπάνω στέλεχος **Y-CMV** μαζί με το **Y-satRNA**, μπορεί να προκαλέσει ή όχι νέκρωση (Collmer and Howell, 1992).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η αλληλεπίδραση μεταξύ των satRNAs και των ομάδων που ανήκουν οι κύριοι ιοί. Η απομόνωση **B5-satRNA**, σε συνδυασμό με απομονώσεις που ανήκουν στην ομάδα II εκδηλώνει έντονα συμπτώματα χλώρωσης στον καπνό, ενώ όταν ο κύριος ιός ανήκει στην ομάδα I παρατηρείται εξασθένηση των συμπτωμάτων (Sleat and Palukaitis, 1990). Στις περιπτώσεις επιδημικής εμφάνισης νεκρωτικών satRNAs σε Ιταλία και Ισπανία, τα στελέχη του κύριου ιού ανήκαν στην Ιταλία στην ομάδα II, στην Ισπανία στην υποομάδα IB (Bonnet et al., 2005), ενώ αντίστοιχα στην Ελλάδα η εμφάνιση νεκρωτικών satRNAs τόσο σε παλιότερες (Varveri and Boutsika, 1999), όσο και σε πρόσφατες, τα νεκρωτικά satRNAs σχετιζόνταν με απομονώσεις της ομάδας I (Giakountis et al., 2018).

Τα έτη 1986 και 1988, παράλληλα με την παρουσία νεκρωτικών στελεχών satRNAs σε Ισπανία και Ιταλία, καταγράφηκαν δύο νέα συμπτώματα κυρίως σε φυτά τομάτας, το καρούλιασμα και ο νανισμός (Grieco et al., 1992; Jordá et al., 1992), αλλά και η νέκρωση του καρπού ή αλλιώς η "εσωτερική κασάνωση", που πιθανά οφείλεται στον ίδιο τον ιό ή σε συνδυασμό του με το νεκρωτικό ή μη στέλεχος του satRNA (Crescenzi et al., 1993). Τελικά, ο Escriu και οι συνεργάτες του το 2003, κατά την μελέτη της επιδημιολογίας των satRNAs σε φυτά τομάτας διέκριναν τελικά τέσσερις ομάδες: α) τα νεκρωτικά, β) εκείνα που προκαλούν καρούλιασμα και νανισμό, γ) αυτά που δεν προκαλούν εμφανή συμπτώματα, και δ) εκείνα που αυξάνουν την ένταση των συμπτωμάτων του βοηθού ιού (Escriu et al., 2003).

Αν και δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός πρόκλησης των συμπτωμάτων, εντούτοις έχουν γίνει αρκετές υποθέσεις. Σε μια προσπάθεια ερμηνείας των συμπτωμάτων και της έντασης ανάλογα με τον ξενιστή και το στέλεχος, μελετήθηκαν οι αλληλουχίες ορισμένων στελεχών satRNAs, όπως οι απομονώσεις PepY-satRNA και Paf-satRNA, όπου διαπιστώθηκε η παρουσία μιας επιπλέον ακολουθίας νουκλεοτιδίων μεταξύ των θέσεων 86-96, που δεν ήταν παρούσα στην απομόνωση Paf-satRNA και προκαλεί την χλώρωση στην πιπεριά (Choi et al., 2011). Εκτός από την αλληλεπίδραση ξενιστή και στελέχους στην εμφάνιση των συμπτωμάτων, παρατηρείται και το φαινόμενο της αλλαγής (αύξηση της έντασης) των

συμπτωμάτων στον ίδιο ξενιστή όταν στα ίδια φυτά καπνού έγιναν επαναλήψεις μολύνσεων με τα ίδια στελέχη (Alvarez et al., 2003).

Εκτός όμως από την τομάτα τα νεκρωτικά satRNAs εντοπίζονται και σε άλλα καλλιεργούμενα φυτικά είδη , καθώς και σε ζιζάνια σε μικρότερη βέβαια συχνότητα χωρίς να συνδέονται με νεκρωτικά συμπτώματα (Sacristán et al., 2004; Cooper, 1995; McClement and Richards, 1956). Τα satRNA εμφανίζουν μια ιδιαίτερα υψηλή ποικιλομορφία λόγω μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών (Alonso-Prados et al., 1998; Aranda et al., 1993, 1997; Grieco et al., 1997), οδηγώντας στην εμφάνιση ενός πληθυσμού με μεγάλη ετερογένεια, ακόμα και με τον ίδιο κύριο ιό.

Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία του satRNA μειώνει την παθογένεια του CMV (Escriu et al., 2000; Palukaitis and García-Arenal, 2003; Liao et al., 2007). Η μείωση της παθογένειας εξαρτάται τόσο από το στέλεχος του CMV, όσο και από τον ξενιστή (Jacquemonod and Leroux, 1982; Cillo et al., 2007). Προτάθηκε ότι η μείωση της παθογένειας μπορεί να οφείλεται στον ανταγωνισμό κατά την αντιγραφή μεταξύ του κύριου ιού και του satRNA (Wu and Kaper, 1995). Εκτός όμως από τα δύο γενωμικά RNA, φαίνεται να επηρεάζεται και το υπογενωμικό RNA της καψιδιακής πρωτεΐνης (Shang et al., 2009). Η μείωση της συμπτωματολογίας σε μολυσμένα φυτά με satRNA οφείλεται στη μειωμένη συσσώρευση του γενωμικού RNA του CMV (Liao et al., 2007), όμως η μείωση της παθογένειας του CMV δεν επηρεάζει την συμπτωματολογία των satRNAs, όπως είναι το νεκρωτικό σύνδρομο στην τομάτα (Escriu et al., 2000).

Μελέτες που έγιναν σε καπνό και κολοκύθι, έδειξαν ότι η παρουσία των satRNAs επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης 1a του RNA 1, ενώ σε μικρότερο βαθμό φαίνεται να επηρεάζεται η αντίστοιχη πρωτεΐνη 2a του RNA 2 (Gal-On et al., 1995). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του satRNA, οδηγούσε σε μείωση της πρωτεΐνης που εκφράζεται από το γονίδιο 2b (Chen et al., 2010). Σε παρόμοια αποτελέσματα είχαν καταλήξει και ο Wang και οι συνεργάτες του το 2004, όταν κατάφεραν να μειώσουν την έκταση και την ένταση των συμπτωμάτων που προκαλούνται από το στέλεχος **Y-satRNA CMV**, χρησιμοποιώντας ένα καταστολέα σίγησης για τον καπνό (Wang et al., 2004). Έχοντας υπόψιν αυτά προκύπτει ότι το φαινόμενο της σίγησης πιθανόν να εμπλέκεται στην παθογένεια των satRNAs, οπότε και αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες προστασίας του βοηθού ιού από τον μηχανισμό σίγησης (Hou et al., 2011).

2.5 Μηχανισμοί παθογένειας

Στην τομάτα παρατηρείται το ακραίο φαινόμενο της νέκρωσης, όταν το στέλεχος του CMV περιέχει το νεκρωτικό satRNA. Ο μηχανισμός της παθογένειας σχετίζεται κυρίως με το μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου, όπως δείχνει η παρουσία χρωματίνης, μικρών τμημάτων DNA, καθώς και μικρών αποδομημένων τμημάτων DNA στα νεκρά κύτταρα. Ο κυτταρικός θάνατος λαμβάνει χώρα κατά τον σχηματισμό των κυττάρων του φλοιώματος στον βλαστό κάτω από το κορυφαίο μερίστωμα, εν συνεχεία μέσω των αγγείων του ξύλου και συνεχίζει σε ολόκληρο το φυτό. Τα φυτά νεκρώνονται 24-48 ώρες με την μόλυνση. Τα (+) και τα (-) στελέχη του satRNA βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα, ακόμη και σε εκείνα που έχουν νεκρωθεί, όμως παρατηρείται αυξημένο ποσοστό των (-) στελεχών του satRNA έναντι των (+) (Xu and Roossinck, 2000). Το φαινόμενο της νέκρωσης των κυττάρων του ξενιστή συνδέεται με αρκετούς μηχανισμούς όπως **α)** ο μηχανισμός παραγωγής συγκεκριμένων πρωτεϊνών παθογένειας, **β)** η αύξηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου και **γ)** η αύξηση των επιπέδων της καταλάσης 2 (**CAT 2**) (Xu et al., 2003). Επιπλέον ορισμένα γονίδια κατά την προσβολή με το νεκρωτικό satRNA παράγουν μεγάλες ποσότητες αιθυλενίου παίζοντας σημαντικό ρόλο στη νέκρωση των κυττάρων (Irian et al., 2007). Η παρουσία του CMV σε φυτά τομάτας δεν ενεργοποιεί από μόνη της κάποια ανιχνεύσιμη απόκριση των γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα του φυτού, πλην όμως κατά την ταυτόχρονη μόλυνση με το στέλεχος **D4-satRNA** και τον κύριο ιό παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων **PR1**, **PR5**, και **PR10** που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού (Xu et al., 2003).

Όσον αφορά την εμφάνιση της χλώρωσης σε καπνό όταν μολύνεται από το στέλεχος **Y-satRNA**, παρατηρήθηκε η παρουσία στο γονιδίωμα του satRNA μιας αλληλουχίας μεγέθους 22 nt, που είναι συμπληρωματική με την ακολουθία του mRNA του γονιδίου **Chl1**, που είναι υπεύθυνο για την σύνθεση της χλωροφύλλης (Shimura et al., 2011). Η συμπληρωματική αλυσίδα του satRNA προσδένεται με την αντίστοιχη του γονιδίου αυτού,

ενεργοποιώντας ταυτόχρονα τον μηχανισμό σίγησης των γονιδίων, με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό της δίκλωνης αλυσίδας σε μικρότερα RNA και κατ' επέκταση την μείωση της παραγόμενης ποσότητας χλωροφύλλης. Η παρουσία του **Y-satRNA** δε προκαλεί χλώρωση στην τομάτα και στο είδος *A. thaliana*, πλην όμως τροποποιώντας την αλληλουχία του **Y-satRNA** ως προς το γονίδιο **Chl1**, παρατηρήθηκε ότι τα φυτά εμφάνισαν χλώρωση (Shimura et al., 2011). Από την άλλη, στην πιπεριά ανακαλύφθηκε ένα νέο satRNA που προκαλεί χλώρωση, με μηχανισμό ανάλογο του **Y-satRNA**, πλην όμως δεν αφορά την ίδια περιοχή του satRNA καταδεικνύοντας την δυσκολία ανακάλυψης του μηχανισμού εμφάνισης των συμπτωμάτων μετά από την προσβολή από τα satRNA, καθώς και η σχέση μεταξύ ξενιστή και στελέχους του satRNA (Choi et al., 2011).

2.6 Επιδημιολογία του ιού CMV

Ο CMV εξαπλώνεται στη φύση με αφίδες, τον σπόρο ορισμένων από τους ξενιστές του, αλλά και με το αγενές πολλαπλασιαστικό υλικό, όπου αυτό χρησιμοποιείται.

2.6.1 Μετάδοση με αφίδες

Ο ιός μεταδίδεται στη φύση με 80 διαφορετικά είδη αφίδων, με μη έμμονο τρόπο. Από αυτά τα είδη *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* είναι τα πλέον σημαντικά, λόγω των υψηλών πληθυσμών που αναπτύσσουν στα φυτά και της υψηλής αποτελεσματικότητας μετάδοσης του ιού. Σημαντικοί φορείς είναι επίσης και τα είδη *Aphis glycines*, *Acyrtosiphon pisum* και *Therioaphis trifolii* (Gildow et al., 2008).

Από τα τρία γενωμικά και τα δύο υπογενωμικά RNA αυτό που παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του CMV μέσω των αφίδων είναι το υπογενωμικό RNA 4, που εκφράζει την ΚΠ. Ειδικότερα σημαντικό ρόλο παίζουν τα αμινοξέα που βρίσκονται στις θέσεις 129, 162, 25, 168, 214 και βρίσκονται είτε στην εξωτερική (όπως η θέση 129), είτε στην εσωτερική πλευρά της πρωτεΐνης (όπως η θέση 162) (Smith et al., 2000). Για τη μετάδοση από το είδος *A. gossypii*, σημαντικά είναι τα αμινοξέα στις θέσεις 129 και 162, ενώ για τη μετάδοση από το είδος *M. persicae* απαραίτητα είναι τα αμινοξέα στις θέσεις 25, 168 και 214 (Perry et al., 1998). Οι παραπάνω θέσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση από τις αφίδες-φορείς, κυρίως λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ των στοιχείων στο στιλέτο της αφίδας, όσο και της επίδρασής τους (αρνητική ή θετική) στη σταθερότητα των ισωματίων, όπως παρατηρείται για τη θέση 162 και τη 161, αλλά όχι για τη θέση 129 (Ng et al., 2005).

Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα της αφιδομετάδοσης επηρεάζεται και από την ακολουθία των αμινοξέων που βρίσκονται στις θέσεις 191 μέχρι 197 και εντοπίζονται στην β-πτυχή της επιφάνειας της ΚΠ, χωρίς οι θέσεις αυτές να επηρεάζουν τη μολυσματικότητα ή τη συγκέντρωση του ιού (Liu et al., 2002). Αλλαγές στην ακολουθία των αμινοξέων των παραπάνω θέσεων επηρεάζει την αφιδομετάδοση, με το είδος *M. persicae* να επηρεάζεται περισσότερο σε σχέση με το *A. gossypii* (Perry et al., 1998).

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αφιδομετάδοση του CMV είναι το στέλεχος του και η παρουσία ή μη satRNA. Έτσι η παρουσία του satRNA του στελέχους N-satRNA, μειώνει δραματικά τη συγκέντρωση του στελέχους Fny-CMV στην τομάτα (Escriu et al., 2000, 2003). Έτσι για τη μετάδοση απαιτείται διπλάσιος χρόνος για να τραφεί η αφίδα από φυτό που είναι μολυσμένο με στέλεχος που φέρει το νεκρωτικό satRNA, σε σχέση με το χρόνο σε φυτό μολυσμένο με οποιαδήποτε άλλο στέλεχος που είτε περιέχει μη νεκρωτικό satRNA, είτε δεν φέρει καθόλου satRNA (Escriu et al., 2000, 2003; Betancourt et al., 2008).

2.6.2 Σπορομετάδοση

Ο CMV μεταδίδεται με το σπόρο ορισμένων καλλιεργούμενων ξενιστών του σε ποσοστά έως και 100%, ενώ σημαντική είναι και η σπορομετάδοση του και σε ζιζάνια (Neegaard, 1977; Douine et al., 1979; Brunt et al., 1990; Palukaitis et al., 1992; Yang et al., 1997; O'Keefe et al., 2007). Ο ιός μετακινείται μέσω του φυτού στο έμβρυο, όπου δυνητικά μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό νέων ωμών φυτών (Palukaitis et al., 1992). Τα φυτικά είδη στα οποία έχει καταγραφεί σπορομετάδοση του CMV είναι: φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) και σπανάκι (*Spinacia oleracea*) (Yang et al., 1997), φακή (*Lens culinaris*) (Makkouk and Attar, 2003), λούπινο (*Lupinus mutabilis*) (O'Keefe et al., 2007), πιπεριά (*Capsicum annum*) (Ali and Kobayashi, 2010), μαυρομάτικο φασόλι (*Vigna unguiculata, V. radiata*) (Abdullahi et al., 2001; Babovic et al., 1997; Bashir and Hampton, 1996; Bhattiprolu, 1991; Chalam et al., 2008; Lahoz et al., 1994), μπιζέλι (*Pisum sativum*) (Latham and Jones, 2001), ρεβίθια (*Cicer arietinum*), βίκος (*Vicia sp*) και αρκετά είδη τριφυλλιού (*Trifolium sp.*) (Latham et al., 2001), τομάτα (*Lycopersicon esculentum*) (Park and Cha, 2002) και κολοκύθα (*Cucurbita pepo*) (Τόβιás et al., 2008). Το ποσοστό μολυσμένων φυτών που προέρχονται από μολυσμένο σπόρο κυμαίνεται συνήθως κάτω του 2,5%, με εξαίρεση τη φακή (9,5%), την τομάτα (8%), το σπανάκι (15%) και τα μαυρομάτικα φασόλια (21%) (Jacquemond, 2012;

Maule and Wang, 1996). Παρόλα αυτά ακόμη και ένα τόσο μικρό ποσοστό σπορομετάδοσης είναι ικανό να οδηγήσει σε επιδημική εμφάνιση του ιού στον αγρό (Palukaitis et al., 1992).

2.6.2.1 Σημασία σπορομετάδοσης φυτικών ιών

Περίπου το 20% των φυτικών ιών μπορούν να μεταδοθούν με το σπόρο κάποιου από τους ξενιστές του, ενώ υπολογίζεται ότι το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει και το 1/3 του παγκόσμιου "πληθυσμού" των ιών (Stacie-Smith and Hamilton, 1988). Η ικανότητα αυτή έχει ως αποτέλεσμα: **α)** τη μετάδοση των ιών σε μεγάλες αποστάσεις, σε σχέση με τις περιοχές που ενδημούν, **β)** την εισβολή των ιών σε νέα οικοσυστήματα, **γ)** τη διατήρηση των ιών μεταξύ των καλλιεργητικών περιόδων, **δ)** την εξειδίκευση στον εκάστοτε ξενιστή λόγω της μόλυνσης του εμβρύου και **ε)** τη δημιουργία εστιών μόλυνσης για τα υπόλοιπα φυτά σε έναν αγρό (Baker, 1972). Ένα σημαντικό στοιχείο της «βιολογίας» των ιών είναι η αδυναμία διατήρησής τους εκτός των φυτικών ιστών. Το πρόβλημα αυτό είναι εντονότερο για τους ιούς που προσβάλλουν ετήσια φυτά και μπορεί να ξεπεραστεί με τη σπορομετάδοση (Stacie-Smith and Hamilton, 1988). Η μετάδοση με το σπόρο αποτελεί μέρος ενός ιδιαίτερα πολύπλοκου και αλληλεξαρτώμενου συστήματος που αποτελείται από τον ξενιστή, τον ιό και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σημαντικό επίσης στοιχείο είναι και η απουσία συχνά συμπτωμάτων στα μολυσμένα σπορόφυτα, δημιουργώντας ακόμη μεγαλύτερη δυναμική στην επιδημιολογία του ιού (Gallitelli, 2000).

Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η παρουσία του ιού στο έμβρυο του σπόρου δεν εξασφαλίζει πάντοτε την μετάδοσή του στο παραγόμενο σπορόφυτο (Mink, 1993; de Assis Filho and Sherwood, 2000). Σε πειράματα που έγιναν με τον ιό ZYMV, σε ποσοστό προσβολής των σπόρων 21,9%, η μετάδοση του ιού στα σπορόφυτα ήταν μόνο 1,8% (Simmons and Munkvold, 2014). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τον ιό LMV (lettuce mosaic virus) (Hunter and Bowyer, 1993). Αυτό πιθανά οφείλεται στην παρουσία του ιού σε ιστούς του σπόρου, όπως στο κάλυμμά του στα οποία μπορούν να ανιχνευτεί με τις διαγνωστικές μεθόδους, αλλά όχι στο έμβρυο οδηγώντας σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Σε άλλες περιπτώσεις το ποσοστό μόλυνσης των σπόρων είναι το ίδιο με εκείνο των παραγόμενων σποροφύτων, όπως για τον ιό του μωσαϊκού της σόγιας (soybean mosaic virus, SMV) (Bowers and Goodman, 1979) και τον ιό της ράβδωσης της αραχίδας (peanut stripe virus, PStV) (Xu et al., 1991). Για να θεωρηθεί ότι ένας ιός μεταδίδεται με το

σπόρο θα πρέπει να ισχύουν δύο κριτήρια: **α)** να μπορεί να επιβιώσει στο εσωτερικό του εμβρύου και **β)** να μπορεί να επαναδραστηριοποιηθεί (Albrechtsen, 2006).

2.6.2.2 Μηχανισμοί μόλυνσης του εμβρύου

Οι μηχανισμοί μεταφοράς του ιού στο εσωτερικό του σπόρου (μόλυνση εμβρύου) δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί, ενώ έχουν προταθεί τρία σενάρια. Το πρώτο (άμεση μεταφορά), αφορά την απευθείας είσοδο του ιού στους ιστούς του εμβρύου κατά την γονιμοποίηση, το δεύτερο (έμμεση μεταφορά), αφορά την μόλυνση των γαμετών πριν την γονιμοποίηση μέσω της γύρης ή των ωοθηκών και το τρίτο αφορά τον συνδυασμό των δύο ανωτέρω (Wang and Maule, 1997). Σε μελέτες που έγιναν στον σπορομεταδιδόμενο ιό του αρακά (pea-seed borne mosaic virus, PSbMV) παρατηρήθηκε ότι η άμεση εισβολή του ιού στους ιστούς του εμβρύου γίνεται ως εξής: Αρχικά κατά την γονιμοποίηση ο ζυγώτης αρχίζει και διαιρείται ασυμμετρικά μέσα στον εμβρυόσακκο της σπερματικής βλάστης, σχηματίζοντας μια μικρή μάζα από όπου θα προκύψει το έμβρυο. Μέσα στην σπερματική βλάστη υπάρχει και το ενδοσπέρμιο που αποτελεί την πηγή τροφής του εμβρύου. Το ενδοσπέρμιο συνδέεται με την ωοθήκη μέσω της μικροπύλης απ' όπου εισέρχεται η γύρη (Wang and Maule, 1997), έτσι μεταφέρεται ο ιός από τα μητρικά κύτταρα μέσω της μικροπύλης στο ενδοσπέρμιο και από εκεί στο έμβρυο (Roberts and Orparka, 2003). Η ικανότητα της έμμεσης μετάδοσης του ιού στο έμβρυο μέσω της μόλυνσης των γαμετών παρουσιάζει μικρότερη δυναμική σε σύγκριση με εκείνη της άμεσης, εντούτοις έχει αποδειχτεί η ικανότητα σε αρκετούς ιούς να εισβάλλουν στο έμβρυο μέσω της γύρης (Mink, 1993). Αντίστοιχος μηχανισμός για την είσοδο του ιού στο εσωτερικό του σπόρου έχει παρατηρηθεί και στον CMV, όπου διαπιστώθηκε η παρουσία του στο κυτταρόπλασμα του παρεγχυματικού τοιχώματος, των επιδερμικών κυττάρων του περιβλήματος των ωοθηκών (Yang et al., 1997).

2.6.2.3 Οργανισμοί και πρωτόκολλα ελέγχου σπόρων

Η δυνατότητα μετάδοσης μέσω σπόρου αφορά όλα τα παθογόνα και για το λόγο αυτό ανάπτυξη κατάλληλων πρωτοκόλλων για τον έλεγχο των σπόρων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον περιορισμό της μετακίνησής τους και ιδιαίτερα των παθογόνων καραντίνας. Τρεις οργανισμοί παγκοσμίως ασχολούνται με την ανάπτυξη τέτοιων πρωτοκόλλων: **α)** Η διεθνής ένωση για τον έλεγχο των σπόρων (**International Seed Testing Association, ISTA**), **β)** Η Παγκόσμια πρωτοβουλία για την υγεία των σπόρων (**International Seed Health Initiative, ISHI**) και **γ)** ο Εθνικός Οργανισμός ελέγχου της υγείας των σπόρων των ΗΠΑ (**U.S National Seed Health System, NSHS**) σε συνεργασία με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φυτοπροστασίας (**European Plant Protection Organization, EPPO**) (Aveling, 2014). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για όλα τα παθογόνα περιλαμβάνουν ανοσολογικά, μοριακά πρωτόκολλα καθώς και μεθόδους καλλιέργειας σε τεχνητά υποστρώματα, όπου αυτές είναι εφαρμόσιμες. Σε κάθε μια κατηγορία παθογόνων μπορούν να προστεθούν και κάποια επιπλέον ή να διαφοροποιηθούν τα ήδη υπάρχοντα πρωτόκολλα. Έτσι για ιούς χρησιμοποιούνται ορολογικές (Hill et al., 2002) και μοριακές μέθοδοι όπως: αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR), η σύνθετη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (multiplex PCR) καθώς και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR) (Adams et al., 2009). Για τα βακτήρια και τους μύκητες χρησιμοποιούνται αντίστοιχα πρωτόκολλα καθώς και η ανάπτυξη σε θρεπτικά υποστρώματα (Schaad et al., 2014).

Σκοπός μελέτης

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά της επιδημιολογίας του CMV είναι η παρουσία satRNAs στο μόριό του, που συνδέεται με την επιδημιολογία του νεκρωτικού συνδρόμου στην τομάτα. Για το σύνδρομο αυτό οι γνώσεις μας είναι ιδιαίτερα περιορισμένες. Στη χώρα μας είναι γνωστό ότι νεκρογενή satRNAs προκαλούν προβλήματα σε καλλιέργειες τομάτας (Varveri and Boutsika, 1999; Kyriakopoulou et al., 2000) και για τα οποία πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι απαντώνται και σε καλλιέργειες ψυχανθών, χωρίς όμως η παρουσία τους να σχετίζεται με νεκρωτικά συμπτώματα (Giakountis et al., 2018). Οι καλλιέργειες κολοκυνθοειδών φαίνεται να ευνοούν την παρουσία satRNAs (Betancourt et al., 2011) και καθώς είναι ευρέως διαδομένες στη χώρα μας, θα μπορούσαν σε συνδυασμό με τα ψυχανθή, να εξασφαλίσουν την συνεχή παρουσία πηγών των satRNAs για τη διατήρησή τους στην φύση. Έτσι για την κατανόηση της επιδημιολογίας του CMV και ιδιαίτερα σε αναζήτηση άλλων εναλλακτικών πηγών των satRNAs του, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η καταγραφή της μοριακής παραλλακτικότητας των απομονώσεων του CMV που απαντώνται στις καλλιέργειες κολοκυνθοειδών στη χώρα μας, καθώς και της παρουσίας και της παραλλακτικότητας των satRNAs τους. Παράλληλα μελετήθηκαν σημαντικά βιολογικά χαρακτηριστικά αντιπροσωπευτικών απομονώσεων του ιού (παθογένεια, σπορομετάδοση), και διερευνήθηκε και η θεωρία της δημιουργίας των satRNAs ως αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενων μηχανικών μολύνσεων συγκεκριμένων φυτικών ειδών (Hajimorad et al., 2009).

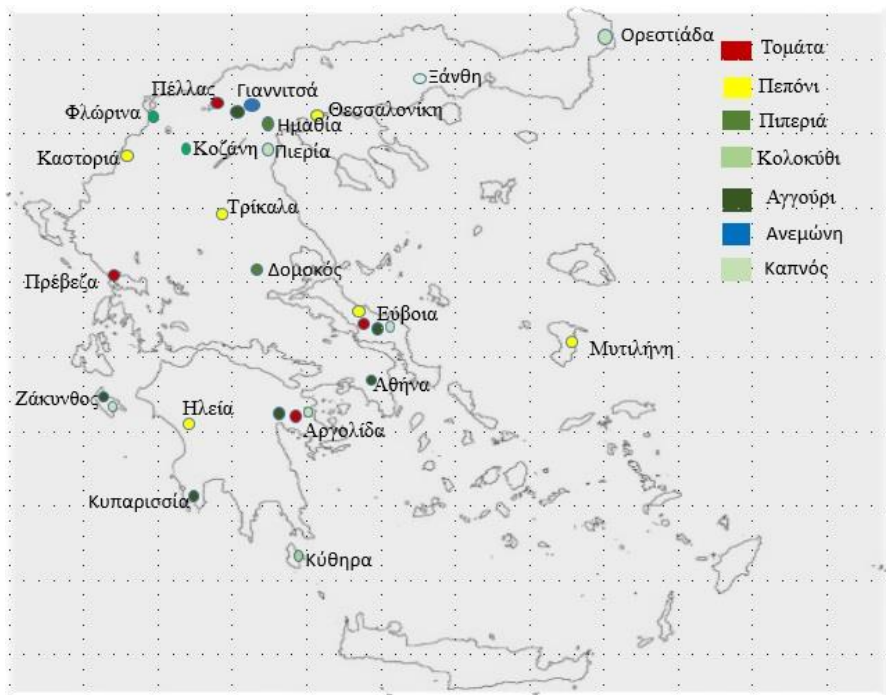
Κεφάλαιο 2^ο

Υλικά και Μέθοδοι

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δειγματοληψίες- Συλλογή απομονώσεων

Για την συλλογή απομονώσεων του CMV πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από το 2015 έως το 2017, σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Εικ. 2.1), κυρίως σε καλλιέργειες κολοκυνθοειδών (*Cucurbitaceae*) (Πίν. 2.1) και αφορούσαν φυτά τα οποία έφεραν συμπτώματα χαρακτηριστικά της προσβολής από τον CMV. Παράλληλα συλλέχθηκαν και φυτά άλλων οικογενειών (*Solanaceae* και *Ranunculaceae*), όταν αυτά βρισκόταν σε συγκαλλιέργεια ή σε γειτνίαση με τις καλλιέργειες στόχο (*Cucurbitaceae*) (Πίν. 2.1). Από τα φυτά αυτά συλλέχθηκαν κορυφές και φύλλα με την χαρακτηριστική συμπτωματολογία του CMV, καθώς και καρποί. Τα δείγματα ταξινομήθηκαν και διαχωρίστηκαν σε τρία υποδείγματα το καθένα για: **α)** τον έλεγχό τους, με την μέθοδο της άμεσης ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay, DAS-ELISA), **β)** μηχανικές μολύνσεις σε φυτά-δείκτες και **γ)** τον μοριακό χαρακτηρισμό και αποθηκεύτηκαν στους -20°C ή -80°C έως την ανάλυσή τους.



Εικόνα 2.1: Χάρτης της Ελλάδος, όπου φαίνονται οι περιοχές δειγματοληψίας, καθώς και το είδος των φυτών που συλλέχθηκαν, για την συλλογή απομονώσεων του ιού CMV. Με τα διάφορα χρώματα σημειώνονται οι διάφοροι ξενιστές (βλέπε υπόμνημα).

Τα δείγματα ελέγχθηκαν αρχικά για την παρουσία του CMV με τη μέθοδο ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) και αφού ταυτοποιήθηκε η παρουσία του ιού, αντιπροσωπευτικά δείγματα, όσον αφορά τις περιοχές προέλευσης και τους ξενιστές, χρησιμοποιήθηκαν για την μοριακή ανάλυση και μελέτη του ιού.

Πίνακας 2.1: Ξενιστές και περιοχές δειγματοληψίας για τη συλλογή απομονώσεων του ιού CMV.

Οικογένεια	Ξενιστής	Νομός	ΠΕΡΙΟΧΗ
<i>Cucurbitaceae</i>	Κολοκύθι (<i>Cucurbita pepo</i>)	Αργολίδας	Αργολίδα
		Αρκαδίας	Λεωνίδιο
		Ζακύνθου	Ζάκυνθος
		Έβρου	Ορεσιτιάδα
		Πιερίας	Πιερία
		Κυθήρων	Κυθήρα
		Τρικάλων	Τρίκαλα
		Πέλλας	Δυτικό Πέλλας
	Πεπόνι (<i>Cucumis melo</i>)	Τρικάλων	Τρίκαλα
		Θεσσαλονίκης	Θεσ/κη (ΑΠΘ)
		Λέσβου	Μυτιλήνη
		Πρεβέζης	Πρέβεζα
		Λευκάδας	Λευκάδα
	Αγγούρι (<i>Cucumis sativus</i>)	Μεσσηνίας	Κυπαρισσία
		Αττικής	Αθήνα (Λαχανόκηπος,ΓΠΑ)
Πέλλας		Γιαννιτσά	
Ζακύνθου		Ζάκυνθος	
Πρεβέζης		Πρέβεζα	
<i>Solanaceae</i>	Τομάτα (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Εύβοιας	Ιστιαία
			Στρόπωνες
	Πιπεριά (<i>Capsicum annuum</i>)	Ημαθίας	Πλατύ Ημαθίας
		Κοζάνης	Κοζάνη
		Φλώρινας	Φλώρινα
		Τρικάλων	Τρίκαλα
		Φθιώτιδας	Δομοκός
	Καπνός Virginia (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Ξάνθης	Ξάνθη
	<i>Ranunculaceae</i>	Ανεμώνη (<i>Anemone sp</i>)	Πέλλας

2.2 Ορολογική ανίχνευση του ιού

Για την ορολογική ανίχνευση του ιού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της άμεσης ανοσοενζυμικής δοκιμής ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα του Ινστιτούτου DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο, σε πλάκες πολυστυρενίου της εταιρείας Nunc™. Όλοι οι όγκοι των διαλυμάτων ήταν 200 μl. Η διαδικασία είχε ως εξής:

Double Antibody Sandwich ELISA (DAS- ELISA)

1^ο στάδιο: Περιλαμβάνει την επίστρωση της διαλυμένης γ-ανοσοσφαιρίνης (IgG) στην πλάκα (τα εξωτερικά βοθρία εξαιρούνται). Η αναλογία της γ-ανοσοσφαιρίνης είναι 1:1000 σε διάλυμα επίστρωσης της πλάκας (coating buffer).

Coating buffer (pH= 9,6 1 lt): 1000 ml απιονισμένο νερό, 1,59 gr Na_2CO_3 και 2,93 gr NaHCO_3

Καλύπτεται η πλάκα με μεμβράνη και τοποθετείται σε θάλαμο επώασης στους 37°C, για 2 h. Στη συνέχεια οι πλάκες πλένονται με το διάλυμα πλύσης (PBS-Tween) τρεις φορές, ενώ μεταξύ των πλύσεων μεσολαβεί χρόνος 5 min.

PBS-Tween (Για 1 lt): 100 ml PBS 10X, 5 ml Tween 20, 900 ml απεσταγμένο νερό

Phosphate buffer saline (PBS) 10X (pH=7,4, Για 1 lt): 81,1 gr NaCl, 2,72 gr KH_2PO_4 14,2 gr Na_2HPO_4 1,49 gr KCl και 1000 ml απιονισμένο νερό.

2^ο στάδιο: Περιλαμβάνει την εκχύλιση του φυτικού ιστού με το διάλυμα εκχύλισης (extraction buffer) σε αναλογία 1:20 (w/v) και προσθήκη στην πλάκα του χυμού του κάθε φυτικού δείγματος. Στην κάθε πλάκα συμπεριλαμβάνεται ένας θετικός μάρτυρας, ένας αρνητικός μάρτυρας (υγιές) και σε ένα βοθρίο τοποθετείται διάλυμα εκχύλισης.

Extraction buffer (Για 100 ml): 100 ml PBS-Tween, 2 gr PVP (Polyvinylpyrrolidone) και 0,2 gr BSA (Bovine serum albumin).

Καλύπτεται η πλάκα με μεμβράνη και τοποθετείται στους 4°C στο ψυγείο για 12-18 h. Ακολουθεί πλύσιμο με το διάλυμα πλύσης (PBS-Tween), τρεις φορές, ενώ μεταξύ των πλύσεων μεσολαβεί χρόνος 5 min.

3^ο στάδιο: Περιλαμβάνει την τοποθέτηση του συζευγμένου με το ειδικό ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης αντισώματος (IgG conjugate, IgGc) στα βοθρία, σε διάλυμα συζεύγματος (conjugate buffer) σε αναλογία 1:1000.

Conjugate buffer (Για 100 ml): 100 ml PBS- Tween και 0,2 gr BSA.

Στη συνέχεια τοποθετείται η πλάκα σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 2 h, ενώ ακολουθεί πλύσιμο με το διάλυμα πλύσης (PBS-Tween) τρεις φορές, ενώ μεταξύ των πλύσεων μεσολαβεί χρόνος 5 min.

4^ο στάδιο: Στο τελικό στάδιο τοποθετείται το υπόστρωμα φωσφορική παρανιτροφαινόλη (Para-Nitrophenyl-Phosphate, PNPP), σε ποσότητα 1 mg/ml, σε διάλυμα υποστρώματος (substrate buffer).

Substrate buffer (pH= 9,8 Για 1 lt): 97 ml Διαιθανολαμίνη και 800 ml απεσταγμένο νερό. Τέλος ρύθμιση του pH και προσθήκη νερού μέχρι τον τελικό όγκο.

Στη συνέχεια οι πλάκες τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο, στους 37°C για 60 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 405 nm στο φωτόμετρο.

2.3 Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων

Η διαδικασία των μοριακών αναλύσεων, τόσο των φυτών για την ταυτοποίηση της παρουσίας του CMV, όσο και για τον μοριακό χαρακτηρισμό των απομονώσεων, περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια. Όπου δεν αναφέρονται συγκεκριμένα πρωτόκολλα ή τροποποιήσεις τους, ακολουθούνται τα τυπικά πρωτόκολλα των Maniatis et al., 1982.

- Εκχύλιση ολικού RNA.
- Μέτρηση της συγκέντρωσης και καθαρότητας του ολικού εξαγόμενου RNA.
- Έλεγχος ποιότητας του ολικού εξαγόμενου RNA.
- Επιπλέον καθαρισμός RNA και μεταχείριση με το ένζυμο της DNase
- Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT).
- Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).
- Καθαρισμός των προϊόντων της PCR και μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA.

Αλληλούχιση (Sequencing) και φυλογενετική ανάλυση.

2.3.1 Εκχύλιση ολικού RNA

Για την εξαγωγή του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRI από την εταιρεία MRC (Molecular Research Center, Inc.), σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο, ως εξής.

- Λειοτρίβηση των δειγμάτων (0,1 gr) με υγρό άζωτο, μέχρι την δημιουργία πούδρας και μεταφορά της σε σωλήνα τύπου erpedorf 1,5 ml.
- Προσθήκη 1000 μl διάλυμα TRI και παραμονή στο πάγο, για 5 min.
- Προσθήκη 200 μl χλωροφόρμιο, ανάδευση και παραμονή στον πάγο, για 5 min.
- Φυγοκέντριση στις 13000 rpm, για 5 min, στους 4°C.
- Λήψη με προσοχή (χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα), όγκου ίσου με 450 μl από το υπερκείμενο, τοποθέτηση σε καθαρό σωλήνα τύπου erpedorf και προσθήκη 500 μl ισοπροπανόλης.
- Ελαφρά ανακίνηση, τοποθέτηση στον πάγο για 15 min και στη συνέχεια φυγοκέντριση στις 13000 rpm, για 15 min, στους 4°C, για την καταβύθιση του RNA.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 500 μl αιθανόλη (70%) για το 'πλύσιμο' του RNA.
- Ανάδευση μέχρις ότου να αποκολληθεί πλήρως το ίζημα του RNA και απομάκρυνση της αιθανόλης, με προσοχή να μην απορριφθεί το ίζημα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται δύο φορές.
- Έπειτα από την απομάκρυνση της αιθανόλης, παραμονή των σωλήνων τύπου erpedorf σε προστατευμένο από επιμολύνσεις χώρο έως ότου στεγνώσουν.
- Επαναδιάλυση RNA σε 50 μl σε αποστειρωμένο δις απεσταγμένο, με θέρμανση στους 65°C, για 5 min και ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση του ιζήματος.

2.3.2 Μέτρηση συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού εξαγόμενου RNA

Η μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA έγινε με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop1000 της εταιρείας ThermoFisher Scientific. Η αρχή λειτουργίας του στηρίζεται στην ιδιότητα των μορίων να απορροφούν μέρος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας του φάσματος, με αποτέλεσμα τη διέγερση των ηλεκτρονίων των εξωτερικών στοιβάδων και τη μετάπτωσή τους σε τροχιά υψηλότερων ενεργειών. Κάθε χημική ένωση παρουσιάζει ένα ξεχωριστό μήκος κύματος χαρακτηριστικό για την ίδια, έτσι τα νουκλεϊικά οξέα παρουσιάζουν την μέγιστη της απορρόφησης τους στα 260 nm, με τις πουρίνες να είναι λίγο χαμηλότερα και τις πυριμιδίνες υψηλότερα. Από την άλλη, υπεριώδη ακτινοβολία δεν απορροφούν μόνο τα νουκλεϊκά οξέα, αλλά και οι πρωτεΐνες, καθώς και οι πεπτιδικοί δεσμοί. Έτσι οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν τη μέγιστη απορρόφηση για τα αρωματικά αμινοξέα (όπως η τυροσίνη, τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη) στα 280 nm και τα 260 nm με τα κατάλοιπα της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης να απορροφούν στα 280nm, ενώ η φαινυλαλανίνη στα 260 nm. Από την άλλη οι πεπτιδικοί δεσμοί απορροφούν μεταξύ 215-230 nm.

Κατά την διάρκεια της μέτρησης στην οθόνη του οργάνου εμφανίζονται η συγκέντρωση του ολικού RNA και οι λόγοι 260/280 και 260/230. Στην περίπτωση του πρώτου λόγου αναφέρεται στην καθαρότητα του ολικού RNA, οπότε και η τιμή του θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 2.0, ενώ είναι κάτω από 1.7 όταν το δείγμα παρουσιάζει προσμίξεις είτε πρωτεϊνών, είτε φαινολών. Από την άλλη, ο λόγος 260/230 αναφέρεται στην παρουσία διάφορων ξένων παραγόντων όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα άλατα, η ουρία οι φαινόλες και οι υδατάνθρακες που απορροφούν σε μήκος κύματος 230 nm και για να χαρακτηριστεί ένα δείγμα ως απαλλαγμένο από τις ουσίες αυτές θα πρέπει ο λόγος να είναι μεγαλύτερος από 2.0.

2.3.3 Έλεγχος της ποιότητας του RNA

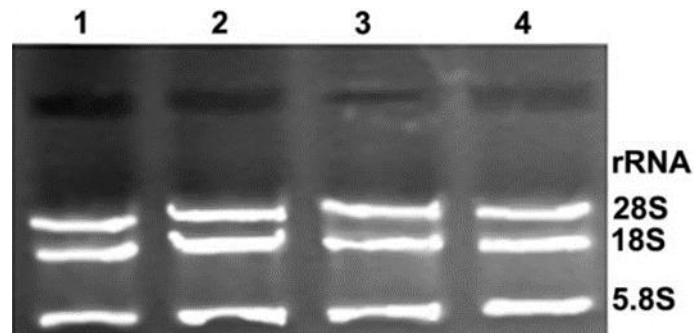
Ο έλεγχος της ποιότητας του ολικού RNA έγινε σε πηκτή αγαρόζης 1% σε διάλυμα TAE 1X.

TAE 1X (Για 1 lt): 20 ml TAE 50X και 980 ml H₂O)

TAE 50X (Για 1 lt): 242 gr Tris base, 57,1 ml glacial acetic acid και 100 ml EDTA 0,5 M, pH=8

Πριν την προετοιμασία της πηκτής η δεξαμενή της ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκε σε διάλυμα θειικού δωδεκυλίου του νατρίου (Sodium dodecyl sulfate, SDS) για την καταστροφή υπολειμμάτων πρωτεϊνών και ενζύμων (RNases) που καταστρέφουν την δομή του RNA. Στην δεξαμενή προστέθηκαν 10 ml από το SDS (10%) και συμπληρώθηκε με διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O) έως τον όγκο των 200 ml και έγινε επώαση για 20 min.

Λαμβάνεται ποσότητα RNA που αντιστοιχεί σε 1500 ng μαζί με 4 μl χρωστικής (Gel Loading Dye, Purple 6X, NEB) και συμπληρώνεται με αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό (Heat treated ddH₂O) μέχρις τελικού όγκου 20 μl. Εκμεταλλευόμενοι την αρνητική πολικότητα των μορίων του RNA εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο τάσης 100 volt, με αποτέλεσμα τα μόρια να μετακινούνται προς τον θετικό πόλο. Η πηκτή αγαρόζης, λόγω της ιδιότητας που παρουσιάζει να σχηματίζει μικρούς πόρους, επιτρέπει τη διέλευση συγκεκριμένου μεγέθους μορίων, με τα μεγαλύτερα να μένουν στην αρχή της πηκτής και τα μικρότερα να μετακινούνται προς τα κάτω. Ο έλεγχος της ποιότητας του RNA στηρίζεται στην εμφάνιση τριών ζωνών στην πηκτή, που αντιπροσωπεύουν τις τρεις ριβοσωμικές υπομονάδες του ριβοσωμικού RNA (ribosomal RNA, rRNA) 28S, 18S και 5,8S (Εικ. 2.2). Στα υψηλής ποιότητας δείγματα RNA αναμένεται η ζώνη που αντιπροσωπεύει την ριβοσωμική μονάδα 28S να είναι δύο φορές πιο έντονη από ότι αυτή της 18S.



Εικόνα 2.2: Απεικόνιση των τριών ριβοσωμικών υπομονάδων του ριβοσωμικού RNA (ribosomal RNA, rRNA) σε πηκτική αгарόζης, η οποία δείχνει την υψηλή ποιότητα του ολικού RNA (Πηγή: <https://openi.nlm.nih.gov/index.php>).

2.3.4 Καθαρισμός δειγμάτων και μεταχείριση με το ένζυμο DNase

Σε δείγματα των οποίων το RNA παρουσίαζε χαμηλές τιμές στους λόγους 260/280 και 260/230, έγινε επιπλέον καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο και ακολούθησε μεταχείριση με το ένζυμο DNase (δεσοξυριβονουκλεάση), το οποίο υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στα εναπομείναντα μόρια DNA.

Η διαδικασία είχε ως εξής:

- Επαναδιάλυση του RNA σε 500 μl αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό.
- Προσθήκη 500 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) και έντονη ανάδευση για 2 min.
- Φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 5 min στους 4°C.
- Μεταφορά 450 μl του υπερκειμένου υγρού σε σωλήνα τύπου eppendorf 1,5 ml.
- Προσθήκη 500 μl χλωροφόρμιο και έντονη ανάδευση για 1 min.
- Φυγοκέντριση στις 13000 rpm, για 5 min, στους 4°C.
- Μεταφορά 450 μl του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf 1,5 ml.
- Προσθήκη 500 μl ισοπροπανόλης και παραμονή στον πάγο για 15 min.
- Φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 15 min στους 4°C.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 500 μl 70% αιθανόλης και έντονη ανάδευση για 2 min.
- Φυγοκέντριση στις 13000 rpm, για 5 min, στους 4°C.
- Επανάληψη των δύο τελευταίων σταδίων.

- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και τοποθέτηση των σωλήνων σε προστατευμένο από επιμολύνσεις χώρο, ώστε να στεγνώσει το RNA.
- Επαναδιάλυση του RNA σε 30 μl αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό, με θέρμανση, για 5 min, στους 65°C και ανάδευση.

Για τη μεταχείριση με DNase χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της εταιρείας Invitrogen, σύμφωνα με πρωτόκολλο της εταιρείας με μικρές τροποποιήσεις ως εξής:

- Λήψη ποσότητας του κάθε δείγματος που περιέχει 10 μg RNA.
- Προσθήκη 10 μl από το master mix (Πίν. 2.2) και συμπλήρωση του όγκου μέχρι τα 50 μl με αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό.

Πίνακας 2.2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταχείριση με το ένζυμο DNase για την απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA από τα δείγματα RNA.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα	
10X buffer DNase I (100 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C), 25 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂)	5 μl	10 μl/ δείγμα
DNase I (50u/μl)	1 μl	
αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό	4 μl	

- Γρήγορη ανάδευση για 3 sec και γρήγορη καταβύθιση για 5 sec.
- Τοποθέτηση σε υδατόλουτρο, στους 37°C, για 1 h.
- Προσθήκη σε κάθε δείγμα 40 μl οξικού νατρίου (sodium Acetate grade) 3M, (pH=5.6), 310 μl αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό και 400 μl φαινόλη/ χλωροφόρμιο και γρήγορη ανάδευση για 30-60 sec.
- Φυγοκέντριση στις 13000 rpm, για 5 min, στους 4°C.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούργιο σωλήνα τύπου erpedorf και προσθήκη 1000 μl αιθανόλη (100 %).
- Ανακίνηση και παραμονή στους -80°C για 24 h.
- Φυγοκέντριση στις 13000 rpm, για 30 min, στους 4°C.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου, χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.
- Προσθήκη 500 μl 70% αιθανόλη.

- Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm, για 5 min, στους 4°C.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και παραμονή στον πάγο μέχρι να 'στεγνώσει' το RNA.
- Επαναδιάλυση στα 20 μl με την προσθήκη αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό.
- Τοποθέτηση στους 65°C, για 5 min.
- Έντονη ανάδευση και μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο.

2.3.5 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT)

Αντίστροφη μεταγραφή, καλείται η σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (complementary, cDNA), έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, το οποίο στη φύση απαντάται σε RNA-Ρετροϊούς.

Για την αντίδραση της RT μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρεις κατηγορίες εκκινητών (Εικ. 2.3).

1. Oligo-dT (ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης): η κατηγορία αυτή των εκκινητών υβριδίζουν κυρίως την πολυ-αδενυλιωμένη ουρά των mRNAs. Με τους oligo-dT εκκινητές μπορούν να συντεθούν ολόκληρα τα μόρια mRNA, η χρήση τους όμως δεν συνιστάται σε περιπτώσεις μεγάλων μορίων mRNA >4 Kb, γιατί το 5' άκρο τους δεν θα αντιπροσωπεύεται επαρκώς και όταν τα μόρια του RNA στόχου δεν έχουν πολυ-αδενυλιωμένη ουρά, όπως είναι το RNA των προκαρυωτικών οργανισμών (Παπανικολάου, κ.α., 2015).

2. Μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών (random primers): Οι εκκινητές αυτοί αποτελούνται από ένα μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους συνήθως 6 βάσεων, που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση. Με την χρήση των τυχαίων εκκινητών επιτυγχάνεται καλύτερη κάλυψη όλων των μορίων RNA σε όλο το μήκος τους, ανεξαρτήτως της παρουσίας πολυ-αδενυλιωμένης ουράς (Παπανικολάου, κ.α., 2015).

3. Ειδικοί εκκινητές για το γονίδιο στόχο (gene specific primers): η κατηγορία αυτή των εκκινητών χρησιμοποιείται, όταν είναι απαραίτητη η αυξημένη ευαισθησία, καθώς και ο έλεγχος ενός μικρού αριθμού γονιδίων, πλην όμως η μέθοδος απαιτεί την προσαρμογή

των συνθηκών της αντίδρασης για το κάθε ζεύγος εκκινητών ξεχωριστά (Παπανικολάου, κ.α., 2015).



Εικόνα 2.3: Τρεις κατηγορίες εκκινητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (RT). (Πηγή: Παπανικολάου, κ.α., 2015).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Moloney Murine Leukemia Virus transcriptase (M-MuLV) της εταιρείας TAKARA-BIO, ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο, με τη χρήση είτε τυχαίων εκκινητών της εταιρείας New England Biolabs (NEB), είτε εξειδικευμένους καθοδικούς εκκινητές (βλέπε Πίν. 2.3 § 2.3.6.1).

Το πρωτόκολλο της RT είχε ως εξής:

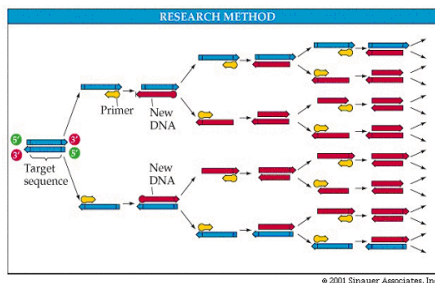
1. Για κάθε δείγμα λαμβάνεται ποσότητα διαλύματος RNA που περιέχει 5000 ng
2. Προστίθενται 1,5 μl από το master mix 1 (dNTPS 10 mM=1 μl και Random primers 10 mM=0,5 μl).
3. Τα δείγματα τοποθετούνται στους 65°C, για 5 min.
4. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 10 μl από το master mix 2 [4 μl 5X buffer TAKARA (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 μl RNase Inhibitor, 0,5 μl M-MuLV 200 u/μl, 4,5 μl ddH₂O)].
5. Τοποθέτηση σε θερμοκυκλοποιητή όπου τα δείγματα θερμαίνονται αρχικά στους 30°C για 10 min, στη συνέχεια στους 42°C για 60 min και τέλος στους 70°C για 15 min, για την αδρανοποίηση του ενζύμου.
6. Προσθήκη 180 μl ddH₂O.

Ο μάρτυρας στη δοκιμή χρησιμοποιείται και ένα δείγμα, στο οποίο δεν έχει προστεθεί το ένζυμο M-MuLV κατά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (noRT) και θα χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων. Η ποσότητα RNA που

χρησιμοποιείται είναι ίση με 1000 ng, το οποίο λαμβάνεται ισόποσα από όλα τα δείγματα της αντίδρασης.

2.3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων του υπό μελέτη γενετικού υλικού. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ταχύτητα, ειδικότητα και μεγάλη ευαισθησία με σχετικά χαμηλό κόστος. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τρία επαναλαμβανόμενα στάδια (Εικ. 2.4)



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση της PCR, όπου αναπαριστάται το αρχικό DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα, η πρόσδεση των εκκινητών, ο σχηματισμός των νέων αλυσίδων DNA, καθώς και η εκθετική αύξηση των αντιγράφων με την πάροδο των κύκλων. (Πηγή: <http://www.sinauer.com>).

2.3.6.1 Εκκινητές για την μοριακή ανίχνευση και χαρακτηρισμό του CMV

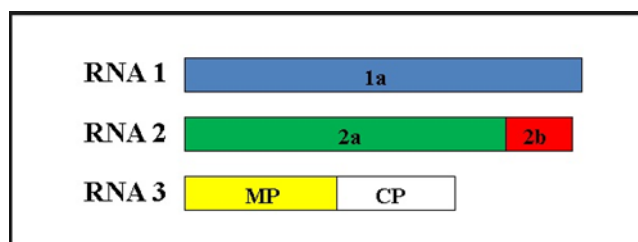
Για την ανίχνευση του CMV και τον έλεγχο της παραλλακτικότητας της καψιδιακής του πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που αναφέρονται στον πίνακα 2.3. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές α) που στοχεύουν ένα τμήμα στο 3' άκρο της ΚΠ (Εικ. 2.5) με μέγεθος 472 bp, β) για την ομάδα I 593 bp, ενώ για την ομάδα II στα 704 bp με το ζεύγος εκκινητών του Chen et al., 2011 και αντίστοιχα 375 και 325 bp για τα ζεύγη F1/R1 και F2/R2 του Giakountis et al., 2018. Εκτός από την παρουσία του ιού και τον διαχωρισμό της ΚΠ έγινε και έλεγχος για την παρουσία του satRNA με προϊόν στα 385 bp (Chen et al., 2011).

Πίνακας 2.3: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των ελληνικών απομονώσεων του CMV από κολοκυνθοειδή για τον ιό CMV, καθώς και των δορυφορικών τους. Όπου, **1:** Giakountis et al., 2018 και **2:** Chen et al., 2011.

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	Γονίδιο στόχος	Προϊόν	Βιβλιογραφική αναφορά
CMV3 F ΚΠ ¹	AACCAGTGCTGGTCGTAACC	ΚΠ	472 bp	Giakountis et al., 2018
CMV3 R ΚΠ ¹	GTTGGCTTGGACTCCAGATG	ΚΠ	472 bp	Giakountis et al., 2018
CMV ΟΜΑΔΑ I F ²	GCCACCAAAAATAGACCG	ΚΠ	593 bp	Chen et al., 2011
CMV ΟΜΑΔΑ I R ²	ATCTGCTGGCGTGGATTTCT	ΚΠ	593 bp	Chen et al., 2011
CMV ΟΜΑΔΑ II F ²	CTACGTTTATCTTCC	ΚΠ	704 bp	Chen et al., 2011
CMV ΟΜΑΔΑ II R ²	AACCGGTGATTTACCATCGC	ΚΠ	704 bp	Chen et al., 2011
CMV SAT F ²	GTTTTGTTTGTGGAGAGTTGCG	SAT	385 bp	Chen et al., 2011
CMV SAT R ²	GGGTCCTGTAGAGGAATGTGACATT	SAT	385 bp	Chen et al., 2011
ΟΜΑΔΑ II / F1 ¹	CAATAAAACCCTCGCCATTG	ΚΠ	375 bp	Giakountis et al., 2018
ΟΜΑΔΑ II / R1 ¹	CCGGTGAATTACCATCGCC	ΚΠ	375 bp	Giakountis et al., 2018
ΟΜΑΔΑ II / F2 ¹	GGTGCGGATGCAGGGTTGCG	ΚΠ	325 bp	Giakountis et al., 2018
ΟΜΑΔΑ II / R2 ¹	AAACCGGTGAATTACCATCG	ΚΠ	325 bp	Giakountis et al., 2018

2.3.6.2 Συνθήκες Δοκιμής PCR-Βελτιστοποίηση

Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της δοκιμής PCR, όσον αφορά την θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών και την συγκέντρωση του MgCl₂.



Εικόνα 2.5: Το γονιδίωμα του CMV, όπου διακρίνονται τα τρία γενωμικά και τα δύο υπογενωμικά RNAs. Στο RNA 3 διακρίνεται το γονίδιο της ΚΠ του ιού CMV που μελετήθηκε. (Πηγή: <http://www.apsnet.org>).

Τελικά, οι δοκιμές PCR για τον πολλαπλασιασμό της ΚΠ και των satRNAs, πραγματοποιήθηκε με τα αντιδραστήρια και τις ποσότητες που αναγράφονται στον πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4: Αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, που χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία της PCR για τον πολλαπλασιασμό τμήματος της ΚΠ και του satRNA.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
10X PCR buffer Invitrogen (200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl)	2 μl
MgCl ₂ 25 mM New England BioLabs	1,2 μl
dNTPS 10 mM	0,5 μl
Ανοδικός εκκινητής 10 μM	1 μl
Καθοδικός εκκινητής 10 μM	1 μl
Betaine 5 M	4 μl
Taq DNA polymerase 5 u/μl	0,5 μl
ddH ₂ O	5,8 μl
Εκμαγείο cDNA	4 μl
Τελικός όγκος	20 μl

Στις δοκιμές συμπεριλήφθηκαν οι εξής μάρτυρες:

- noRT: αφορά δείγμα στο οποίο δεν είχε προστεθεί το ένζυμο της M-MuLV κατά την διαδικασία της αντιστροφής μεταγραφής.
- noDNA: αφορά δείγμα όπου σαν εκμαγείο αντί για cDNA έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O.
- θετικός μάρτυρας: αφορά δείγμα γνωστής αλληλουχίας και θετικής αντίδρασης.

Στη συνέχεια, οι σωλήνες τύπου erpedorf μεταφέρονται σε θερμοκυκλοποιητή της εταιρείας ThermoFisher SCIENTIFIC Applied Biosystems με τις ακόλουθες συνθήκες της αντίδρασης (Πίν. 2.5):

Πίνακας 2.5: Συνθήκες της PCR για τον πολλαπλασιασμό τμήματος της ΚΠ και του satRNA .

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αρ.κύκλων
Προ αποδιάταξη	95° C	5 min	1
Αποδιάταξη	95° C	20 sec	40
Υβριδισμός	60° C	20 sec	
Επιμήκυνση	72° C	30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72° C	5 min	1
Αποθήκευση	5° C		

Για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 1%, σε διάλυμα TAE 1X και σε τάση 100 volt, για 20 min.

TAE 1X: 20 ml TAE 50X σε 980 ml H₂O

Το μέγεθος των παραγόμενων ζωνών, συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες ζώνες του δείκτη μεγέθους μοριακού βάρους (Ladder), εύρους ζευγών βάσεων 100 (base pair, bp) της εταιρείας (New England Biolabs, NEB).

2.4 Καθαρισμός προϊόντος της PCR

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης τα τμήματα της πηκτής αγαρόζης που έχουν την ζώνη με το αναμενόμενο μέγεθος κόπηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι, τοποθετήθηκαν σε καθαρούς σωλήνες τύπου erpedorf και ακολούθησε ο καθαρισμός τους με το kit της εταιρείας MACHEREY-NAGEL, σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο:

- Ζυγίζονται τα δείγματα με ακρίβεια 0,001 gr.
- Προσθήκη 200 μl buffer NT1 για κάθε 100 ng της πηκτής
- Επώαση στους 50°C, για 10 min.
- 700 μl από το δείγμα μεταφέρεται στην στήλη του kit.
- Φυγοκέντριση για 30 sec στις 11000 rpm-Απόρριψη του διαλύματος.
- Προσθήκη 700 μl από το buffer NT3 στη στήλη.
- Φυγοκέντριση για 30 sec στις 11000 rpm - Απόρριψη του διαλύματος.
- Επανάληψη του προηγούμενου σταδίου.

- Φυγοκέντρωση στις 11000 rpm, για 1 min.
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα, όπου αναγράφονται τα πλήρη στοιχεία της απομόνωσης.
- Προσθήκη 20 μl από το διάλυμα έκλουσης, NE.
- Παραμονή για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρωση στις 11000 rpm, για 1 min.
- Επανατοποθέτηση του διαλύματος έκλουσης στην στήλη.
- Παραμονή στους 70°C, για 5 min.
- Φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 min.
- Μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA σε φασματοφωτόμετρο.

2.5 Αλληλούχιση και φυλλογενετική ανάλυση

Για την αλληλούχισή τους, τα προϊόντα της PCR στάλθηκαν στην εταιρεία BIOLINE (<http://www.bioline.gr>) και χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής με στοιχεία ABI3500 GENETIC ANALYZER (Applied Biosystems). Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες των ελληνικών απομονώσεων για το γονίδιο της ΚΠ διορθώθηκαν με βάση τα χρωματογραφήματα με το πρόγραμμα **MEGA 7** (**M**olecular **E**volutionary **G**enetics **A**nalysis, version 7.0.26) (Kumar et al., 2016) και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες, που έχουν χαρακτηριστεί πλήρως, ελληνικές και ξένες και υπάρχουν καταχωρημένες στην βάση δεδομένων NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Οι κωδικοί κατάθεσης των ελληνικών απομονώσεων της μελέτης αυτής στην ίδια βάση δεδομένων αναφέρεται στον Πίνακα 1(Παράρτημα). Η παραλλακτικότητα των ζευγών των αλληλουχιών υπολογίστηκε με το μοντέλο Tamura-Nei, του λογισμικού **MEGA 7**, ενώ για την στοίχιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος ClustalW, του ίδιου προγράμματος. Η ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ελληνικών απομονώσεων και των διεθνών, για το γονίδιο της ΚΠ, έγινε με την μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (**M**aximum **L**ikelihood, **ML**) (Tamura et al., 2013), ενώ για την αξιοπιστία της φυλογενετικής υπόθεσης χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση bootstrap (100 επαναλήψεις). Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, ο ξενιστής και η χώρα προέλευσης (Πίν. 2.6).

Πίνακας 2.6: Απομονώσεις του ιού CMV (αριθμός καταχώρησης στη Genebank, ξενιστής, ομαδοποίηση, χώρα προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης των ελληνικών απομονώσεων κολοκυνθοειδών.

Απομόνωση	Αριθμός καταχώρησης στην GenBank	Ομαδοποίηση	Ξενιστής	Χώρα	Απομόνωση	Αριθμός καταχώρησης στην GenBank	Ομαδοποίηση	Ξενιστής	Χώρα
Ane 1	LN810056	ΟΜΑΔΑ II	Ανεμώνη	Ελλάδα	FT	D28487	IA	Τομάτα	Ιαπωνία
CMV-GRcl1	LN810059		Καρπούζι	Ελλάδα	Ix	U20219		Τομάτα	
CP43	KT734836		Φασόλι-καπνός	Ελλάδα	KP	KM272276		Πιπεριά	
CP44	KT734850		Τομάτα – καπνός	Ελλάδα	L1	AJ831578	IA	Κρίνος	Ινδία
CP47	KT734852		Φασόλι-καπνός	Ελλάδα	Lucknow	EF153734	IB	Τομάτα	Ινδία
CP48	KT734842		Φασόλι	Ελλάδα	Mgh91	JX025997		Πεπόνι	
CP48	KT734848		Φασόλι-καπνός	Ελλάδα	Nb-Ca	AY429432		Καπνός	
CP52	KT734838		Φασόλι	Ελλάδα	New Delhi	GU111229		Τομάτα	
CP55	KT734843		Φασόλι	Ελλάδα	O	D00385	IA		Ιαπωνία
CPA12	KT734847		Τομάτα	Ελλάδα	Oahu	U31220	IB		Αμερική
CPA12A	KT734845		Τομάτα-καπνός	Ελλάδα	PSV G	JN135292			
CPA15	KT734846		Τομάτα	Ελλάδα	Run-In	JF279608.1			Ινδία
CPA46	KT734844		Φασόλι	Ελλάδα	Ri-8	AM183119		Τομάτα	Ισπανία
CPPsi220	KT734831	IA	Φακή	Ελλάδα	Tfn	Y16926	IB	Τομάτα	Ιταλία
Bal-In	JF279609		Πεπόνι		TN	AB176847		Τομάτα	
Ban	U43888	IA			Vir	HE962480		Πιπεριά	
Ban-In	JF279607	IB	Καπνός	Ινδία	Wem	L40953	ΟΜΑΔΑ II		
C	D00462.1	IA	Καπνός	Αμερική	WL	D00463.1			Ινδία
Fny	D10538	IA		Αμερική	Z1	GU327368		Αγγούρι	Κορέα
2A1-A	AJ271416				S	AF063610	ΟΜΑΔΑ II		Αμερική
FT	KU255786	IA	Πιπεριά						

Με τον ίδιο τρόπο έγινε και η φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων για τα satRNAs, χρησιμοποιώντας απομονώσεις, ελληνικές και ξένες που έχουν χαρακτηρισθεί πλήρως και υπάρχουν καταχωρημένες στην βάση δεδομένων NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Πίν. 2.7) Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA (Kumar et al., 2016), ενώ για την στοίχιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος ClustalW, του MEGA 7. Η ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ελληνικών απομονώσεων και των διεθνών, έγινε με την μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (**Maximum Likelihood, ML**) (Tamura et al., 2013), ενώ για την αξιοπιστία της φυλογενετικής υπόθεσης χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση bootstrap (100 επαναλήψεις).

Πίνακας 2.7: Απομονώσεις των δορυφορικών RNAs (αριθμός καταχώρησης στη Genebank, ξενιστής, φαινότυπος στην τομάτα, ομαδοποίηση και χώρα προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις των ελληνικών απομονώσεων από κολοκυνθοειδή.

Απομόνωση	Αριθμός καταχώρησης	Φαινότυπος στην τομάτα	Ομαδοποίηση	Ξενιστής	Χώρα
CE-satRNA	X86425	Νεκρωτικό	I	Σέλινο	Ιταλία
D27-satRNA	U31661	Μη-νεκρωτικό		Τομάτα	Αμερική
G-satRNA	M16585	Μη-νεκρωτικό	Ήπιο (benign) B	Κολοκύθι	Αμερική
PG-satRNA	X86426	Νεκρωτικό	II	Τομάτα	Ιταλία
T12-satRNA	X86416	Νεκρωτικό	I	Τομάτα	Ιταλία
T16-satRNA	X86413	Νεκρωτικό	II	Τομάτα	Ιταλία
T18-satRNA	X86708	Νεκρωτικό	II	Τομάτα	Ιταλία
T27-satRNA	X86419	Νεκρωτικό	I	Τομάτα	Ιταλία
T2-satRNA	X86410	Νεκρωτικό	II	Τομάτα	Ιταλία
T57-satRNA	X86418	Νεκρωτικό	II	Τομάτα	Ιταλία
T59-satRNA	X86423	Νεκρωτικό	I	Πιπεριά	Ιταλία
T6-satRNA	X86414	Νεκρωτικό	II	Τομάτα	Ιταλία
T7-satRNA	X86411	Νεκρωτικό	II	Τομάτα	Ιταλία
T8A-satRNA	X86408	Μη-νεκρωτικό	Ήπιο (Benign B) II	Τομάτα	Ιταλία
T8-satRNA	X86420	Νεκρωτικό	I+II	Τομάτα	Ιταλία
TTS-satRNA	X69136	Μη-νεκρωτικό	Ήπιο (Benign B)I	Τομάτα	Ιταλία
WL2-satRNA	M16590	Μη-νεκρωτικό	Ήπιο (Benign B)	Τομάτα	Αμερική
Sat43	KT382261	Νεκρωτικό		Φασόλι	Ελλάδα
A15	KT382259	Νεκρωτικό		Τομάτα	Ελλάδα
Sat43	KT382258	Νεκρωτικό		Φασόλι –καπνός	Ελλάδα
Sat21	KT382264	Νεκρωτικό		Φακή	Ελλάδα
Sat24	KT382268	Νεκρωτικό		Φακή	Ελλάδα
Sat25	KT382259	Νεκρωτικό		Φακή	Ελλάδα

2.6 Βιολογικός χαρακτηρισμός απομονώσεων CMV

2.6.1 Παθογένεια απομονώσεων CMV που ανήκουν σε διαφορετικές υποομάδες

Μελετήθηκε συγκριτικά η αντίδραση συγκεκριμένων φυτοδεικτών (Πίν. 2.8) απομονώσεων που ανήκουν στις αντιπροσωπευτικές ομάδες του CMV έπειτα από τον μοριακό χαρακτηρισμό τους (ενότητα 2.3).

Πίνακας 2.8: Φυτικά είδη και ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της παθογένειας αντιπροσωπευτικών απομονώσεων του CMV.

Οικογένεια	Είδος	Ποικιλία / υβρίδιο
<i>Cucurbitaceae</i>	Κολοκύθι (<i>Cucurbita pepo</i>)	Miranda
	Πεπόνι (<i>Cucumis melo</i>)	Cantalupo di charentais
<i>Solanaceae</i>	Τομάτα (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Ace 55F
	Πιπεριά (<i>Capsicum annuum</i>)	California wonder
	<i>N. glutinosa</i>	
	<i>N. rusticae</i>	
	<i>N. tabaccum</i>	
	<i>N. sylvestris</i>	
	Καπνός (<i>Nicotiana sp</i>)	

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για την ομάδα II η ελληνική απομόνωση Ane 1 (LN810056) από τα Γιαννιτσά.

Οι μηχανικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

- Επιλέγονται τα φύλλα των φυτών που θα μολυνθούν και σημειώνονται. Στα κολοκυνθοειδή αυτά αφορούν τις κοτυληδόνες, ενώ στα σολανώδη τα πρώτα πραγματικά φύλλα.
- Ακολουθεί “σκοπισμός” των επιλεγμένων φύλλων με ανθρακοπυρίτιο (carbogundum με διάμετρο 600 mesh).

- Ζυγίζεται η απαιτούμενη ποσότητα του μολύσματος (0,5-1 gr φυτικού ιστού) και λειοτριβείται σε γουδί πορσελάνης με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (0,1M, pH=7.0) μηχανικών μολύνσεων (KH_2PO_4 : Na_2HPO_4 σε αναλογία 2:3 και 0,01M Na_2SO_3) σε αναλογία 1/10 ή 1/100.
- Γίνεται επάλειψη της άνω επιφάνειας του φύλλου με τον φυτικό χυμό.
- Μετά από μερικά λεπτά ξεπλένονται τα φύλλα στα οποία έγινε η μόλυνση με νερό και τα φυτά μεταφέρονται στο θερμοκήπιο σε συνθήκες ημέρας/νύκτας 16/8h και θερμοκρασία $25 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Ακολουθεί καθημερινή καταγραφή των συμπτωμάτων και έλεγχος των φυτών με Elisa, ένα μήνα, μετά για τη διερεύνηση τη παρουσία/απουσίας του ιού.

3. Μελέτες σπορομετάδοσης

Μελετήθηκε η ικανότητα μετάδοσης αντιπροσωπευτικών απομονώσεων των κολοκυνθοειδών (Πίν. 2.1) του ιού με το σπόρο συγκεκριμένων φυτικών ειδών που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες παθογένειας (βλέπε § 2.8).

Χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας, πιπεριάς και καπνού (Πίν. 2.8). Από την εκδήλωση των συμπτωμάτων και την ταυτοποίηση της παρουσίας του ιού με ELISA (βλέπε § 2.2) τα φυτά παρέμειναν στο θερμοκήπιο μέχρι την δημιουργία και ωρίμανση των καρπών και τη συλλογή των σπόρων. Οι σπόροι συλλέχθηκαν, πλύθηκαν, στέγνωσαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και διατηρήθηκαν στο ψυγείο μέχρι τον έλεγχό τους.

Ο έλεγχος της σπορομετάδοσης έγινε με εκτίμηση του ποσοστού μολυσμένων φυτών που προέκυψαν από τους υπό μελέτη σπόρους. Αρχικά οι σπόροι μεταχειρίστηκαν με διάλυμα εμπορικής χλωρίνης 2,5%, ώστε να απολυμανθεί εξωτερικά ο σπόρος από τυχόν υπολείμματα του πλακούντα που μπορεί να μεταφέρουν τον ιό, καθώς και για να βελτιωθεί η βλαστική ικανότητα των σπόρων (Stamova and Chetelat, 2000). Ακολούθως οι σπόροι παρέμειναν στον επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 40°C για 48 h, ώστε να εξατμιστεί το μεγαλύτερο ποσοστό υγρασίας τους και ακολούθησε η σπορά τους σε γλαστράκια. Για την τομάτα και την πιπεριά σπάρθηκαν οκτώ σπόροι ανά φυτό και απομόνωση. Για τον καπνό

χρησιμοποιήθηκε μαζικό σπορείο, από όπου μεταφυτεύτηκαν και ελέγχθηκαν τέσσερα φυτά ανά απομόνωση. Μετά την σπορά έγινε ριζοπότισμα με μυκητοκτόνο propanoicarb (Previcur, Bayer) για την αποφυγή ανάπτυξης μυκήτων. Σε κάθε απομόνωση μετρήθηκε ο αριθμός των φυτών που προέκυψαν (φυτρωτική ικανότητα), καθώς και η παρουσία ή μη συμπτωμάτων και υπολογίστηκε η αποτυχία φυτρώματος (%) και το ποσοστό (%) συμπτωματικών σποροφύτων. Ακολούθησε έλεγχος για την παρουσία του ιού με δοκιμές DAS-ELISA.

4. Διερεύνηση εμφάνισης satRNAs μέσω διαδοχικών μηχανικών μολύνσεων

Μια από τις θεωρίες για την παρουσία των satRNA του CMV αναφέρει τη εμφάνισή τους μετά από διαδοχικές μολύνσεις σε φυτά καπνού (*N. tabacum*), απομονώσεων που δεν έφεραν το satRNA στο μόριο τους (Hajimorad et al., 2009).

Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε η επίδραση της διαδοχικής μόλυνσης στην εμφάνιση του satRNA των ελληνικών απομονώσεων του CMV σε διάφορους ξενιστές. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις απομονώσεις του ιού, στις οποίες δεν ανιχνεύθηκε satRNA (GR053Slg, GR013Cme, GR006Can) και ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δύο απομονώσεις στις οποίες ανιχνεύθηκε satRNA (GR010Cme, GR018Cme) (Πίν. 2.1).

Τα φυτά-ξενιστές (Πίν. 2.9) μολύνθηκαν με μηχανικές μολύνσεις (βλέπε § 2.8.1) και παρέμειναν στο θερμοκήπιο με συνθήκες θερμοκρασίας $25 \pm 2^\circ\text{C}$ και φωτοπερίοδο μέρας/νύκτας 16/8h για 15 ημέρες, όπου καταγράφονταν καθημερινά τα συμπτώματα. Με την πάροδο των 15 ημερών από την επιτυχή μόλυνσή τους, πραγματοποιούνταν η επόμενη μηχανική μόλυνση σε νέα φυτά-ξενιστές, χρησιμοποιώντας ως αρχικό μόλυσμα το φυτικό υλικό από τα αντίστοιχα φυτά της προηγούμενης μόλυνσης.

Πίνακας 2.9: Φυτά ξενιστές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της εμφάνισης satRNAs του CMV έπειτα από διαδοχικές μολύνσεις.

Είδος	Ποικιλία / υβρίδιο
Τομάτα (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Ace 55F
Καπνός (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Μπασμάς
Κολοκύθι (<i>Cucurbita pepo</i>)	Miranda
Πεπόνι (<i>Cucumis melo</i>)	Cantalupo di charentais

Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις ανα απομόνωση και σε κάθε επανάληψη μολύνθηκαν δυο φυτά κολοκυθιού, τέσσερα φυτά τομάτας, δυο φυτά πεπονιού και δυο φυτά μπασμά). Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν έξι ημέρες μετά τη μόλυνση, ενώ 15 μέρες μετά τη μόλυνση κορυφαία (με έντονα συμπτώματα) φύλλα χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικό μόλυσμα για την επόμενη διαδοχική μόλυνση και αποθηκεύτηκαν στους -20° C για τον έλεγχο με PCR για την παρουσία satRNA.

Κεφάλαιο 3^ο

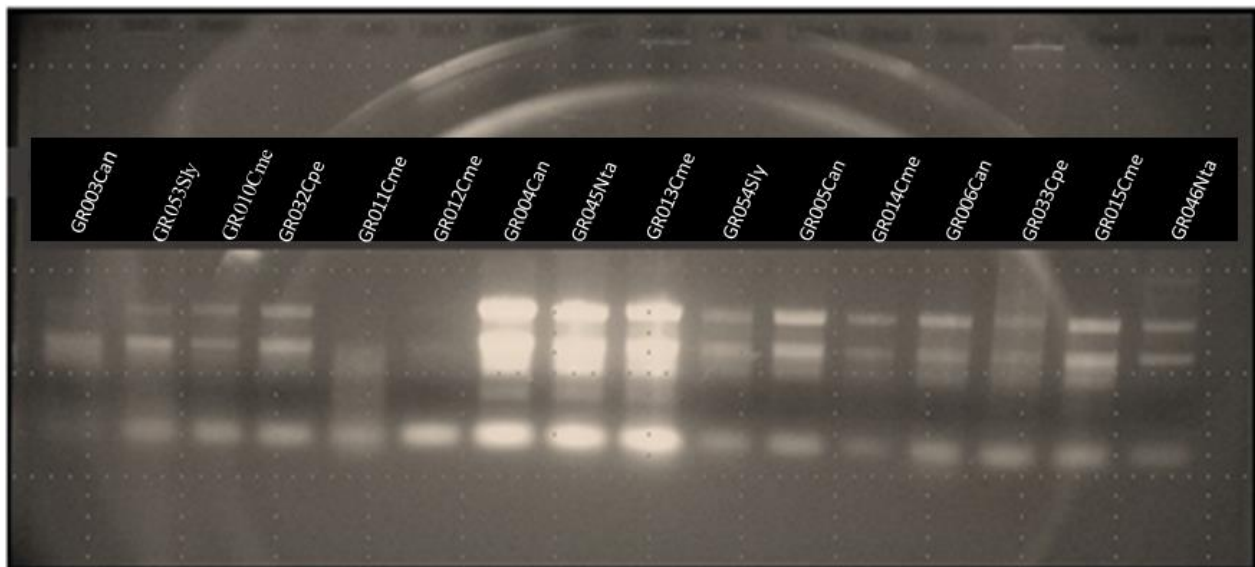
Αποτελέσματα

3. Αποτελέσματα

3.1 Προετοιμασία υλικού και βελτιστοποίηση μεθόδων

3.1.1 Καθαρότητα εξαγόμενου ολικού RNA

Με την ολοκλήρωση της εξαγωγής του ολικού RNA, ακολούθησε έλεγχος της ποιότητάς του σε πηκτή αгарόζης, όπου διακρίνεται ο διαχωρισμός των τριών ριβοσωμικών υπομονάδων με μεγέθη 28S, 18S και 5S (Εικ. 3.1).



Εικόνα 3.1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης του ολικά εξαγόμενου RNA από τα υπό εξέταση δείγματα για τον έλεγχο της ποιότητάς του. Διακρίνονται οι τρεις ριβοσωμικές υπομονάδες 28S, 18S, 5S.

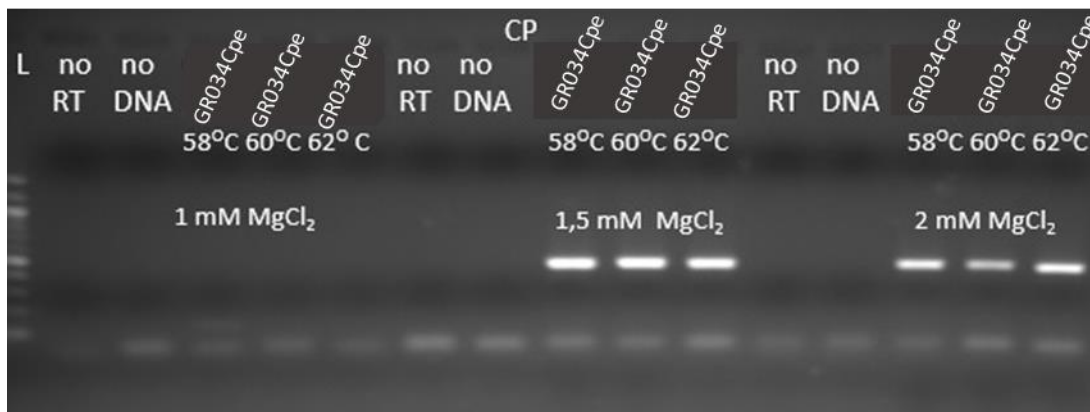
Ακολούθησε μέτρηση της καθαρότητας του RNA σε φασματοφωτόμετρο (Πίν. 3.1). Στα δείγματα GR012Cme, GR045Nta, GR054Sly, GR014Cme, GR006Can, GR033Cpe, GR024Csa, GR034Cpe, GR047Nta, GR025Csa, GR017Cme, που παρουσίασαν, κατά την φωτομέτρηση χαμηλές τιμές στους λόγους καθαρότητας ($260/280 \leq 1.8$ και $260/230 \leq 2.0$), έγινε επιπλέον καθαρισμός για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων πρωτεΐνης, φαινολικών και άλλων καταλοίπων και καθώς εξακολουθούσαν να εμφανίζουν χαμηλή τιμή στους αντίστοιχους λόγους, ακολούθησε και μεταχείριση με το ένζυμο DNase, για την αποδιάταξη των υπολειμμάτων γενωμικού DNA (Πίν. 3.1). Οι παραπάνω μεταχειρίσεις είχαν ως αποτέλεσμα την απόκτηση RNA υψηλής ποιότητας για τις μοριακές δοκιμές (Πίν. 3.1).

Πίνακας 3.1: Συγκεντρώσεις και δείκτες καθαρότητας (ng/μl) του ολικά εξαγόμενου RNA, των υπό μελέτη δειγμάτων. Με έντονη γραφή σημαίνονται τα δείγματα, που παρουσίαζαν χαμηλές τιμές στις συγκεντρώσεις και στους λόγους καθαρότητας 260/280 και 260/230 μετά τον αρχικό καθαρισμό (αριστερή στήλη), τον επιπλέον καθαρισμό (μεσαία στήλη) και τη μεταχείριση με το ένζυμο DNase (δεξιά στήλη).

Τιμές μετά την εξαγωγή του ολικού RNA				Τιμές μετά τον επιπλέον καθαρισμό			Τιμές μετά την μεταχείριση με το ένζυμο DNase		
ΚΩΔΙΚΟΣ	Συγκέντρωση ng/μl	260/280	260/230	Συγκέντρωση ng/μl	260/280	260/230	Συγκέντρωση ng/μl	260/280	260/230
GR003Can	2468,6	1,94	1,71						
GR053Sly	2454,8	1,87	1,77						
GR010Cme	2587,5	1,98	1,94						
GR032Cpe	3626,8	1,72	1,88						
GR011Cme	3070,8	1,87	1,87						
GR012Cme	349,5	1,98	1,33	301,5	2,02	1,56	245,7	2,00	1,88
GR004Can	625,1	2,01	1,67						
GR045Nta	363,5	1,99	1,04	327,8	1,95	1,48	268,5	2,02	1,90
GR013Cme	1909,9	1,96	1,90						
GR054Sly	989,4	1,98	1,32	945,8	1,94	1,62	823,2	1,98	1,85
GR005Can	313,8	1,95	2,25						
GR014Cme	869,3	2,00	1,43	836,2	1,92	1,75	752,3	1,98	1,92
GR006Can	415,3	1,94	0,63	392,5	1,92	1,35	312,2	1,96	1,78
GR033Cpe	507,1	1,90	0,65	475,6	1,92	1,42	369,8	2,00	1,90
GR015Cme	458,2	1,92	1,85						
GR046Nta	1235,3	1,88	1,91						
GR023Csa	1752,4	1,92	1,98						
GR024Csa	630,4	1,91	0,98	584,3	1,95	1,46	462,3	1,92	1,83
GR034Cpe	412,2	1,92	1,05	375	1,95	1,50	245,3	1,90	1,93
GR047Nta	612,7	1,54	0,87	587,9	1,81	1,56	438,2	1,93	1,85
GR002Asp	1894,5	1,92	2,01						
GR025Csa	693,8	1,54	0,89	623,4	1,82	1,48	543,2	1,93	1,82
GR016Cme	769,1	1,80	1,85						
GR017Cme	498,9	1,68	1,30	458,2	1,83	1,60	315,2	1,98	1,89
GR018Cme	693,5	1,78	1,86						
GR035Cpe	1368,2	1,89	1,93						
GR007Can	863,4	1,80	1,92						
GR036Cpe	2096,6	1,78	1,91						
GR008Can	1943,2	1,85	1,97						

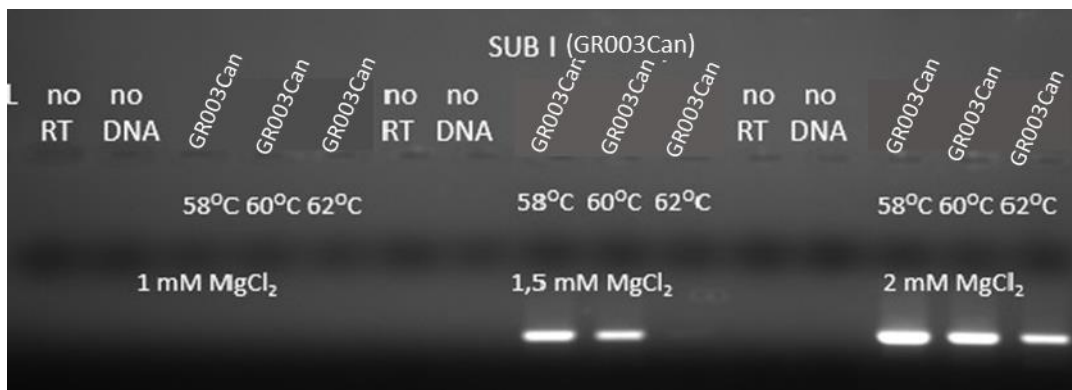
3.1.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών PCR

Για τον έλεγχο της παρουσίας και τον χαρακτηρισμό του ιού κρίθηκε αναγκαία η βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR. Ελέγχθηκαν τρεις θερμοκρασίες υβριδισμού (58°C, 60°C, 62°C) και τρεις τελικές συγκεντρώσεις MgCl₂ (1-1,5-2 mM) για το κάθε ζεύγος εκκινητών. Η βελτιστοποίηση που πραγματοποιήθηκε για τους εκκινητές που ανιχνεύουν το γονίδιο της ΚΠ των Giakountis et al., 2018 (Πίν. 2.3, § 2.3.6.1) έδειξε ότι οι ιδανικότερες συνθήκες είναι συγκέντρωση 1,5 mM MgCl₂ και θερμοκρασία υβριδισμού στους 58°C. Δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος όταν η συγκέντρωση του MgCl₂ είναι κάτω από 1,5 mM, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία υβριδισμού (Εικ. 3.2).



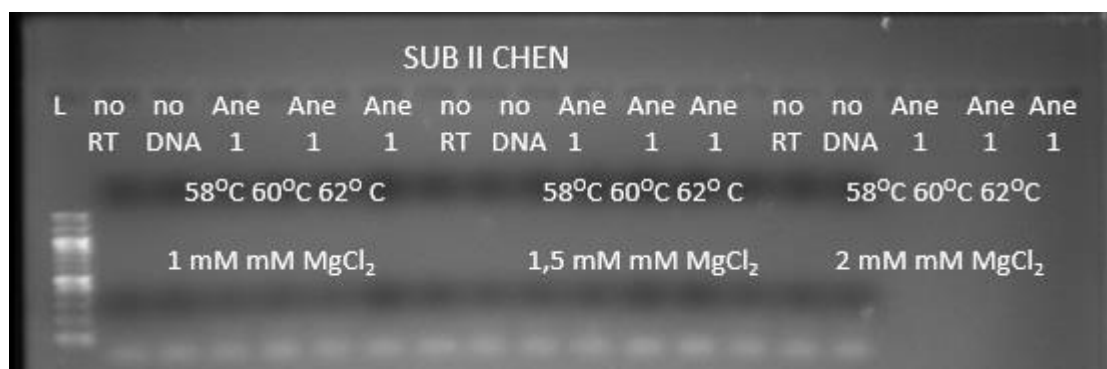
Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και των διαφορετικών συγκεντρώσεων MgCl₂ στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των απομονώσεων του CMV, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές έναντι του γονιδίου της ΚΠ των Giakountis et al., 2018. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα **GR034Cpe**, το προϊόν είχε αναμενόμενο μέγεθος τα 472 bp και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.

Για τους εκκινητές που ανιχνεύουν απομονώσεις της ομάδας I, στοχεύοντας το γονίδιο της ΚΠ με τους εκκινητές των Chen et al., 2011, αποδείχτηκε ότι οι ιδανικότερες συνθήκες είναι για την μεν συγκέντρωση του MgCl₂ τα 2 mM και για τη θερμοκρασία υβριδισμού οι 62°C. Όταν η συγκέντρωση του MgCl₂ είναι 1,5 mM, οι εκκινητές υβριδοποιούν μόνο σε θερμοκρασίες 58°C και 60°C, ενώ με χαμηλότερη συγκέντρωση δεν παρατηρείται ο υβριδισμός τους (Εικ. 3.3).



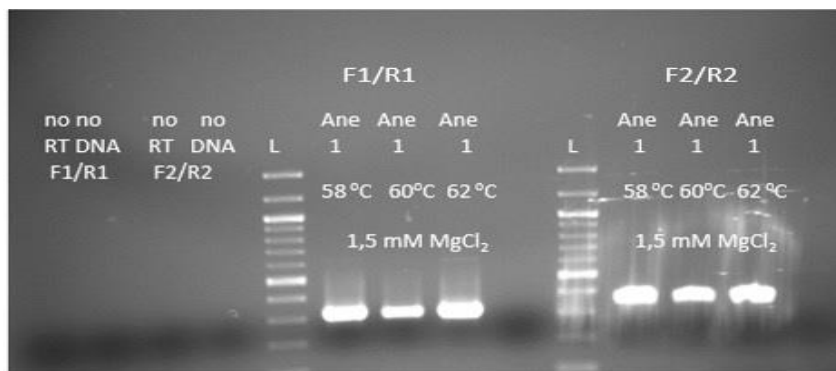
Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και των διαφορετικών συγκεντρώσεων $MgCl_2$ στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των απομονώσεων του CMV, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές έναντι της ΚΠ της ομάδας I των Chen et al., 2018. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα **GR003Can**, το προϊόν είχε αναμενόμενο μέγεθος τα 593 bp και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.

Όταν επιχειρήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR για τους εκκινητές του Chen et al., 2011 (βλέπε Πίν. 2.3, § 2.3.6.1), που ανιχνεύουν απομονώσεις της ομάδας II στοχεύοντας επίσης το γονίδιο της ΚΠ, δε διαπιστώθηκε ο σχηματισμός προϊόντος σε καμία από τις θερμοκρασίες υβριδισμού και συγκεντρώσεις $MgCl_2$ που ελέγχθηκαν (Εικ. 3.4).



Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και των διαφορετικών συγκεντρώσεων $MgCl_2$ στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των απομονώσεων του CMV, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές έναντι της ομάδας II των Chen et al., 2011. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα **Ane 1**, το προϊόν είχε αναμενόμενο μέγεθος τα 704 bp και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.

Για το λόγο αυτό ελέγχθηκαν τα ζεύγη εκκινητών F1-R1 και F2-R2 των Giakountis et al., 2018 (Πίν. 2.3, § 2.3.6.1), πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχες δοκιμές βελτιστοποίησης και ως ιδανική για το σχηματισμό προϊόντος αποδείχθηκε η συγκέντρωση 1,5 mM MgCl₂, ενώ επιτυχής ήταν η αντίδραση σε όλες τις θερμοκρασίες υβριδισμού 58°C, 60°C και 62°C (Εικ. 3.5).



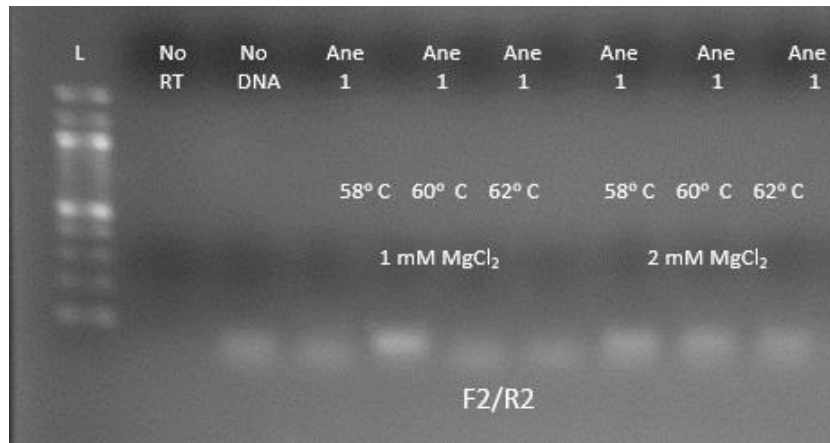
Εικόνα 3.5: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη σε συγκέντρωση MgCl₂ 1,5 mM στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των απομονώσεων του CMV, με τους εκκινητές F1/R1 & F2/R2 (Giakountis et al., 2018). Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα **Ane 1** με αναμενόμενο μέγεθος τα 375 bp για το ζεύγος F1/R1 και 325 bp για το ζεύγος F2/R2, ενώ ο δείκτης του μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA.

Κατά τη μεταβολή της συγκέντρωσης του MgCl₂ σε καμία από τις προαναφερόμενες θερμοκρασίες υβριδισμού δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος για τα ζευγάρια των εκκινητών F1/R1 και F2/R2 σε συγκεντρώσεις MgCl₂ 1 mM και 2 mM αντίστοιχα (Εικ. 3.6).

α



β

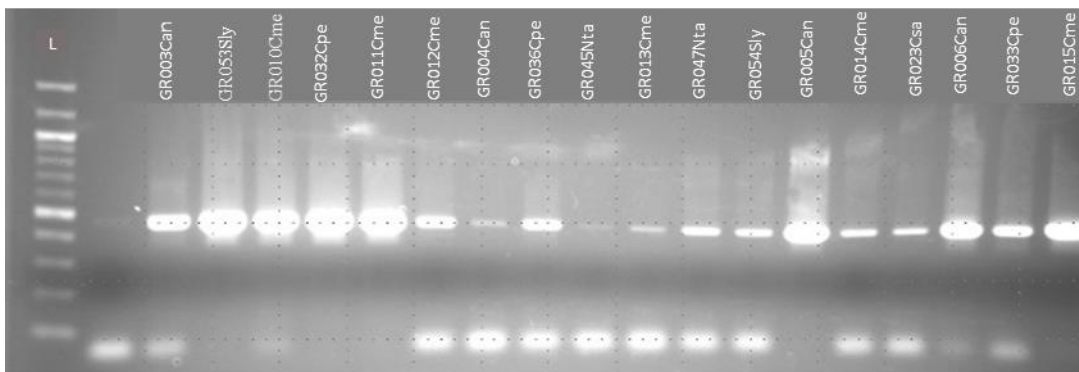


Εικόνα 3.6: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και των διαφορετικών συγκεντρώσεων MgCl₂ στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των απομονώσεων του CMV, που ανήκουν στην ομάδα II. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F1/R1 (α) και F2/R2 (β) (Giakountis et al., 2018). Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα **Ane 1** με αναμενόμενο μέγεθος τα 704 bp, ενώ ο δείκτης του μοριακού βάρους είναι 100 bp DNA.

3.2 Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων του CMV

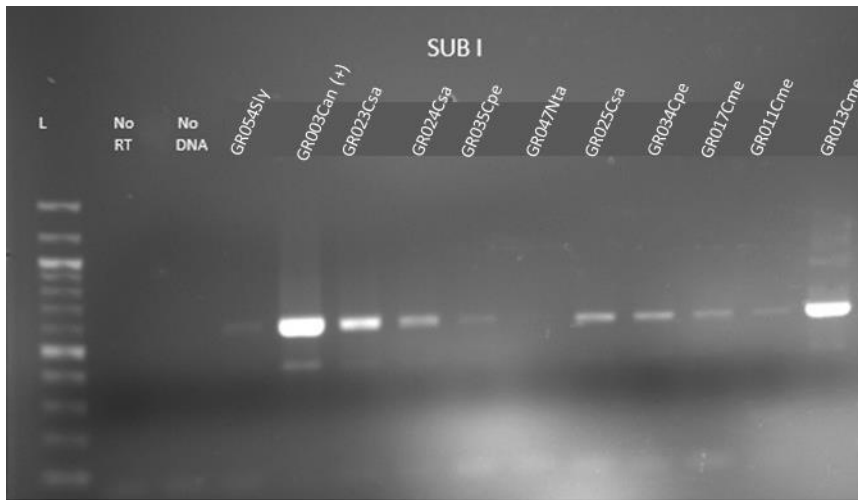
3.2.1 Ταυτοποίηση της παρουσίας του CMV και διαχωρισμός των απομονώσεων του σε υποομάδες με δοκιμές RT-PCR

Ο ιός ταυτοποιήθηκε με δοκιμές RT-PCR και χρήση των εκκινητών τόσο του Chen et al., 2011 (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται), όσο και των Giakountis et al., 2018 (Εικ. 3.7) στο σύνολο των φυτών που ανιχνεύθηκε με δοκιμές ELISA, τόσο σε εκείνα με τα χαρακτηριστικά συμπτώματα, όσο και σε ορισμένα που δεν έφεραν συμπτώματα.

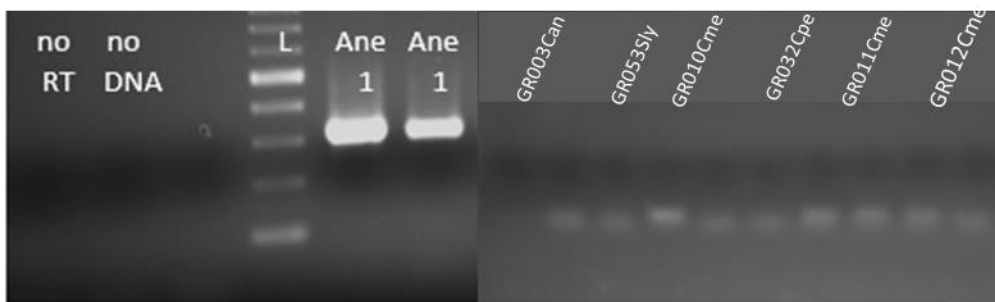


Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR για την επιβεβαίωση της παρουσίας του CMV στα υπό μελέτη δείγματα, με δοκιμές PCR για το γονίδιο της ΚΠ με τη χρήση των εκκινητών Giakountis et al., 2018. Το παραγόμενο προϊόν έχει μέγεθος 472 bp και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.

Οι δοκιμές RT-PCR χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές για τις ομάδες I και II των Giakountis et al., 2018, έδειξαν ότι το σύνολο των απομονώσεων ανήκουν στην ομάδα I (Εικ.3.8), ενώ καμία απομόνωση δεν ανήκει στην ομάδα II (Εικ. 3.9).



Εικόνα 3.8: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της PCR με τη χρήση εκκινητών (Giakountis et al., 2018) για την ανίχνευση της ομάδας I του CMV. Ως θετικό χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση **GR003Can**. Το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος είναι 593 bp, και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.



Εικόνα 3.9: Ηλεκτροφόρηση πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR με τη χρήση εκκινητών F2/R2 (Giakountis et al., 2018) για την ανίχνευση της ομάδας II του CMV. Ως θετικό χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση **Ane 1**. Το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος είναι 325 bp, ενώ ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.

3.2.2 Φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της ΚΠ απομονώσεων του CMV

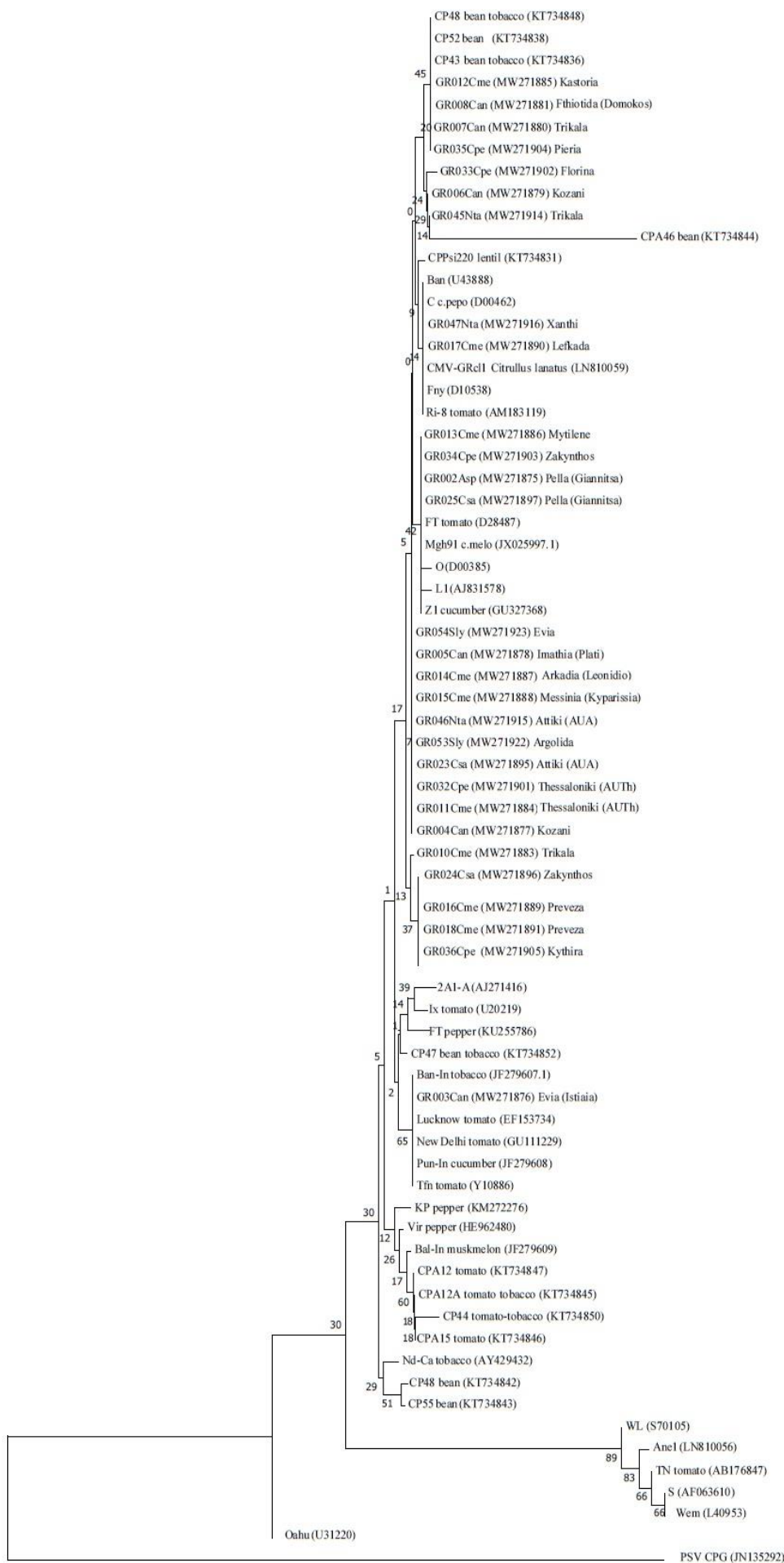
Μετά την αλληλούχιση ακολούθησε η φυλογενετική ανάλυση και η κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων για τον έλεγχο της ταξινόμησης των απομονώσεων της μελέτης αυτής σε υποομάδα IA και υποομάδα IB, καθώς και τη μελέτη της παραλλακτικότητας του γονιδίου της ΚΠ όπως πολλαπλασιάστηκε με τους εκκινήτες των Giakountis et al., 2018. Οι ελληνικές απομονώσεις των κολοκυνθοειδών καθώς και των άλλων ξενιστών αυτής της μελέτης, συγκρίθηκαν με άλλες ελληνικές απομονώσεις από διάφορους ξενιστές (Εικ 3.12) καθώς και με αντιπροσωπευτικές απομονώσεις από άλλες χώρες (Εικ. 3.10), πιο αναλυτικά μεταξύ τους (Εικ 3.11).

Γενικά κατά τον έλεγχο της παραλλακτικότητας των ελληνικών απομονώσεων, διαπιστώθηκε πολύ μικρό ποσοστό μοριακής διαφοροποίησης μεταξύ των ελληνικών και των υπολοίπων απομονώσεων του εξωτερικού. Μόνο μία από τις απομονώσεις της μελέτης αυτής ομαδοποιήθηκε με απομονώσεις της **υποομάδας IB** (GR003Can), ενώ όλες οι άλλες ομαδοποιήθηκαν με αυτές της **υποομάδας IA**. Καμία απομόνωση δεν ομαδοποιήθηκε με απομονώσεις της **ομάδας II** (Εικ. 3.10). Οι ελληνικές απομονώσεις της μελέτης αυτής, με την πλειονότητα να αποτελούν απομονώσεις κολοκυνθοειδών, εντοπίζονται στην υποομάδα IA σε 6 ομάδες με τα ποσοστά διαφοροποίησης μεταξύ των ομάδων να κυμαίνονται μεταξύ 96,85- 98,74%. Δεν παρατηρείται στενή ομαδοποίηση ανά ξενιστή, καθώς στο φυλογενετικό δένδρο η κάθε μια ομάδα περιέχει απομονώσεις από διαφορετικούς ξενιστές και χώρες (Εικ 3.10). Αναλυτικότερα η **1^η ομάδα** αποτελείται από τις απομονώσεις: GR035Cpe (κολοκύθι), GR007Can (πιπεριά), GR008Can (πιπεριά) και GR012Cme (πεπόνι), η **2^η ομάδα** αποτελείται από τις: GR017Cme (πεπόνι) και GR047Nta (καπνός), η **3^η ομάδα** από τις: GR013Cme (πεπόνι), GR034Cpe (κολοκύθι), GR025Csa (αγγούρι) και GR002Asp (ανεμώνη), η **4^η ομάδα** περιλαμβάνει τις: GR054Sly (τομάτα), GR005Can (πιπεριά), GR014Cme (πεπόνι), GR015Cme (πεπόνι), GR046Nta (καπνός), GR053Sly (τομάτα), GR023Csa (αγγούρι), GR032Cpe (κολοκύθι), GR011Cme (πεπόνι) και GR004Can (πιπεριά), η **5^η ομάδα** τις: GR024Csa (αγγούρι), GR016Cme (πεπόνι), GR018Cme (πεπόνι), GR036Cpe (κολοκύθι) και τέλος η **6^η ομάδα** περιλαμβάνει την GR003Can (πιπεριά).

Συγκρίνοντας τις ελληνικές απομονώσεις που μελετήθηκαν με αυτές από άλλες χώρες (Εικ. 3.10), διαπιστώνεται, σε ορισμένες περιπτώσεις, η απουσία παραλλακτικότητας και γενικότερα η μικρή παραλλακτικότητα στο γονίδιο της ΚΠ μεταξύ απομονώσεων

απομακρυσμένων γεωγραφικά χωρών, αλλά και αυτών που προέρχονται από διαφορετικούς ξενιστές. Έτσι στην 1^η ομάδα ομαδοποιούνται μαζί και οι ελληνικές **CP43 bean** και **CP52 bean** με ξενιστή το φασόλι και προέρχονται από Θήβα και Πρέβεζα αντιστοίχα. Η 2^η ομάδα περιέχει επίσης την απομόνωση **C** με καταγωγή από την Αμερική και ξενιστή καπνό, αλλά και την ελληνική **CMV-GRcl1** από καρπούζι από τη Λέσβο. Η 3^η ομάδα περιλαμβάνει την **Mgh91** από το Ιράν και την **FT** από την Ιαπωνία με ξενιστές το πεπόνι και την τομάτα αντίστοιχα. Στην 4^η και 5^η ομάδα βρίσκονται οι υπό διερεύνηση ελληνικές απομονώσεις από διάφορους ξενιστές, ενώ η 6^η που περιλαμβάνει την μοναδική απομόνωση που ανήκει στην IB μαζί με τις **Ban-In** και **Lucknow** και οι δύο από την Ινδία με ξενιστές τον καπνό και την τομάτα αντίστοιχα.

Εικόνα 3.10 (επόμενη σελίδα): Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ολόκληρη την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης απομονώσεων που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (Genbank) για τον CMV. Στην παρένθεση αναφέρονται οι κωδικοί κατάθεσης στην Genbank των υπο μελέτη ελληνικών απομονώσεων. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 100. Οι μπάρες κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνουν αντικαταστάσεις/θέση, ενώ παραπλεύρως (δεξιά) του δένδρου βρίσκονται οι αναγνωρισμένες υποομάδες του CMV.



sub IA

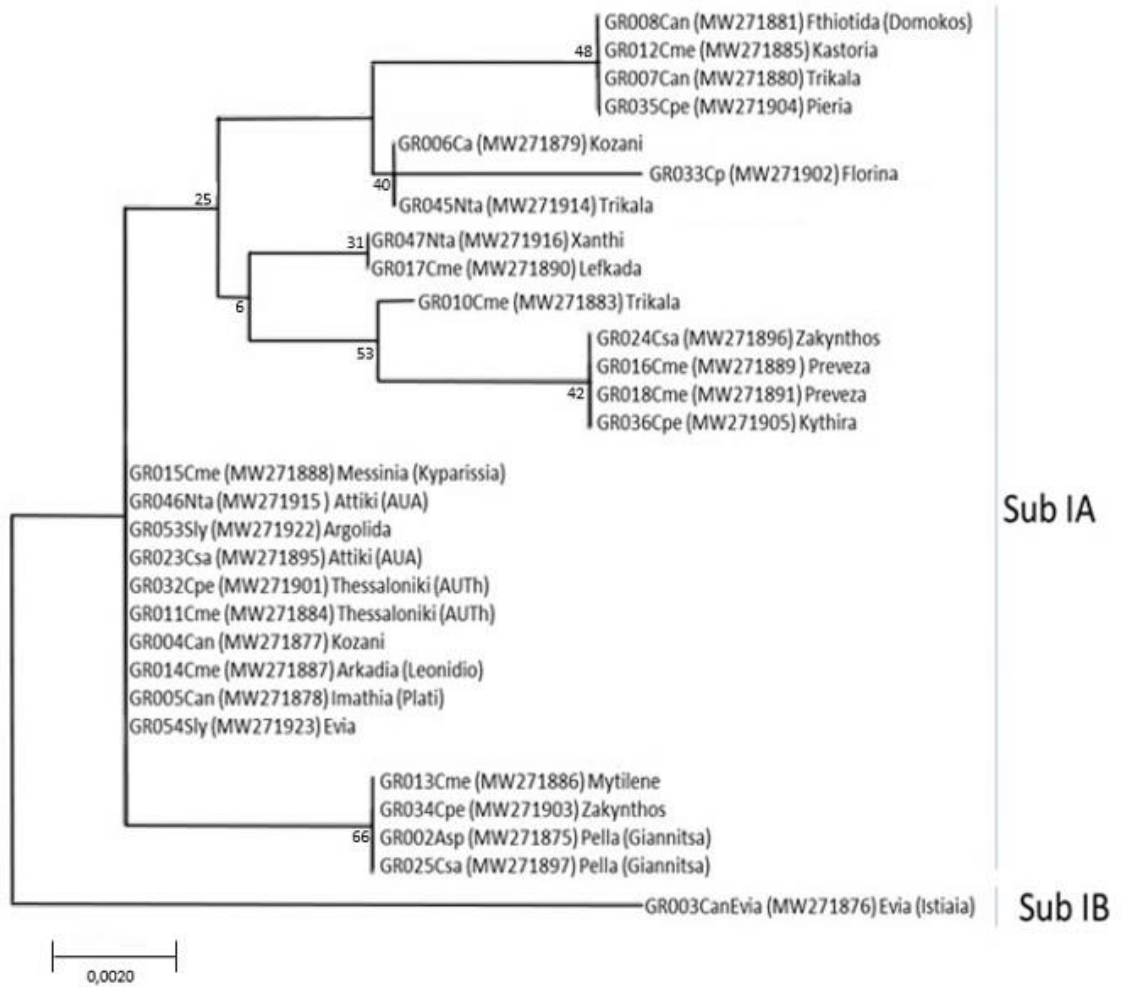
sub IB

sub II

0.10

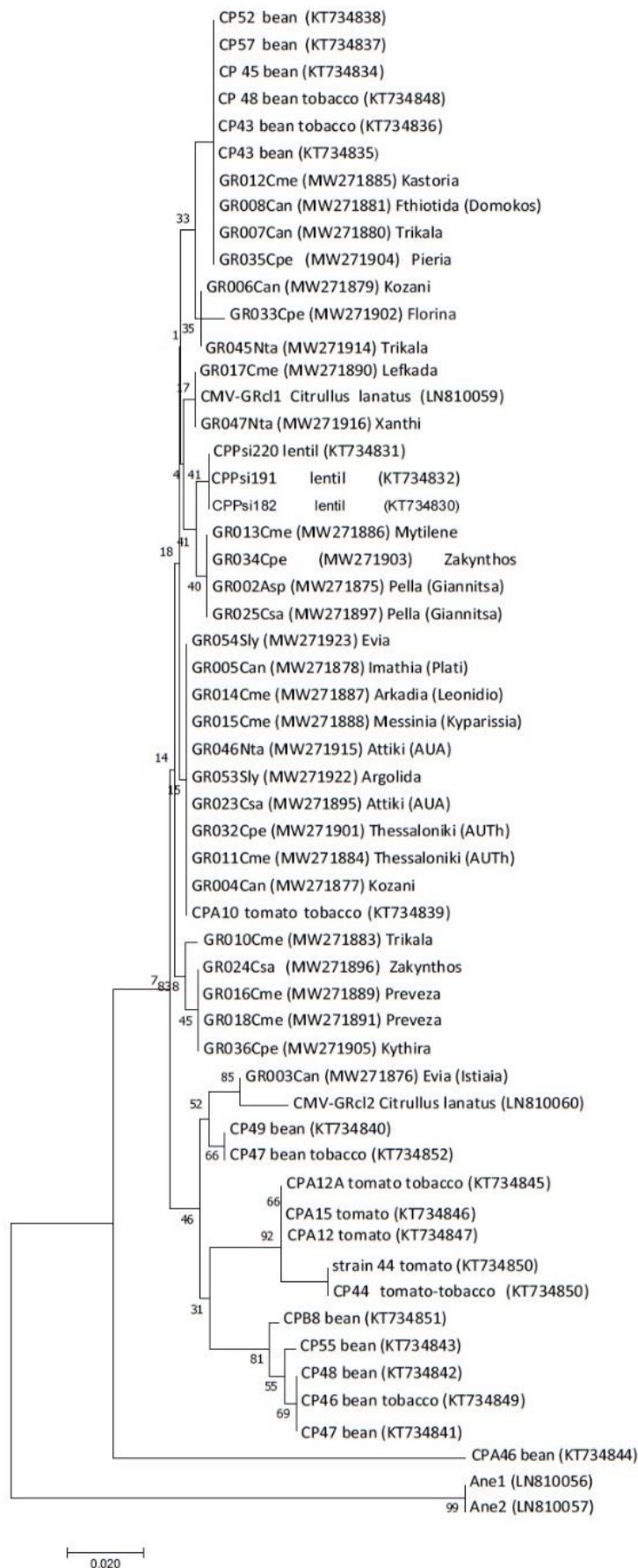
Εικόνα 3.10

Εξετάζοντας την φυλογενετική διασύνδεση των ελληνικών απομονώσεων των κολοκυνθοειδών μεταξύ τους όσον αφορά το γονίδιο της ΚΠ (Εικ. 3.11) παρατηρείται ότι το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των εξεταζόμενων απομονώσεων κυμαίνεται μεταξύ **94,37%** - **99,74%**, με το μικρότερο ποσοστό ομοιότητας με τις υπόλοιπες να αφορά την απομόνωση **GR003Can** που ανήκει στην **υποομάδα IB**, σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες που ανήκουν στην **IA**. Οι απομονώσεις αυτές κατηγοριοποιούνται σε πέντε κύριες διακριτές ομάδες με ταυτόσημες μεταξύ τους αλληλουχίες, παρά το γεγονός ότι μπορεί να προέρχονται από διαφορετικούς ξενιστές (όπως οι απομονώσεις GR008Can από πιπεριά και GR012Cme από πεπόνι), είτε έχουν προέλθει από απομακρυσμένες περιοχές της χώρας, όπως οι GR047Nta από την Ξάνθη και η GR017Cme από την Λευκάδα. Εκτός των προαναφερόμενων ομάδων διακρίνονται και τέσσερις απομονώσεις που κατηγοριοποιούνται ανά ζεύγη μεταξύ τους, η GR006Can με την GR045Nta και η GR047Nta με την GR017Cme, καθώς και μία GR033Cpe, που βρίσκεται μεταξύ των παραπάνω ομάδων. Τέλος, όπως είναι αναμενόμενο, η μοναδική απομόνωση που ανήκει στην υποομάδα IB (GR003Can) παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση (94,37% ομοιότητα με τις υπόλοιπες) (Εικ. 3.11).



Εικόνα 3.11: Φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης των απομονώσεων των κολοκυνθοειδών για τον CMV. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 100. Οι μπάρες κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνουν αντικαταστάσεις/θέση. Στην παρένθεση αναφέρονται οι κωδικοί κατάθεσης στην Genbank.

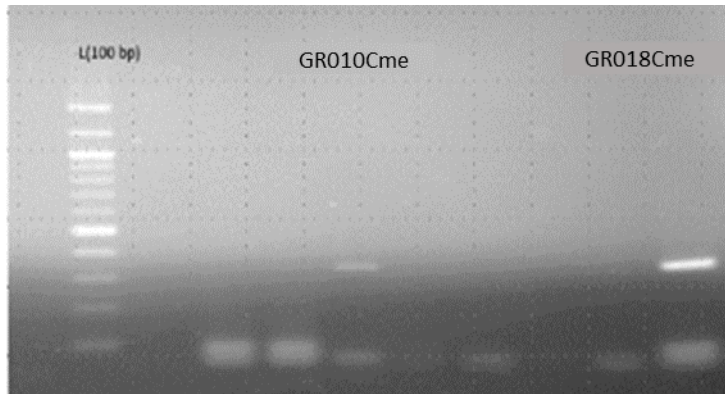
Συνολικά συγκρίνοντας τις ελληνικές απομονώσεις των κολοκυνθοειδών με άλλες ελληνικές απομονώσεις από άλλους ξενιστές, διαπιστώνεται ότι δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση όσον αφορά την παραλλακτικότητα του γονιδίου της ΚΠ, ανεξαρτήτως του ξενιστή ή της γεωγραφικής προέλευσής τους (Εικ. 3.12).



Εικόνα 3.12: Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης των απομονώσεων των κολοκυνθοειδών καθώς και των ελληνικών απομονώσεων από διάφορους ξενιστές που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (Genebank) για τον CMV. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 100. Οι μπάρες κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνουν αντικαταστάσεις/θέση. Στην παρένθεση αναφέρονται οι κωδικοί κατάθεσης στην Genbank.

3.2.3 Μοριακή ανίχνευση των satRNAs του CMV

Εκτός από τη μελέτη της μοριακής παραλλακτικότητας των απομονώσεων του CMV που μελετήθηκαν, έγινε και έλεγχος της παρουσίας του satRNA με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών (Πίν. 2.3, § 2.3.6.1). Από το σύνολο των απομονώσεων μόνο σε δύο που προήλθαν από πεπόνι ανιχνεύθηκε η παρουσία satRNA, μία από την περιοχή της Πρέβεζας (**GR018Cme**) και η άλλη από τα Τρίκαλα (**GR010Cme**) (Εικ. 3.13).



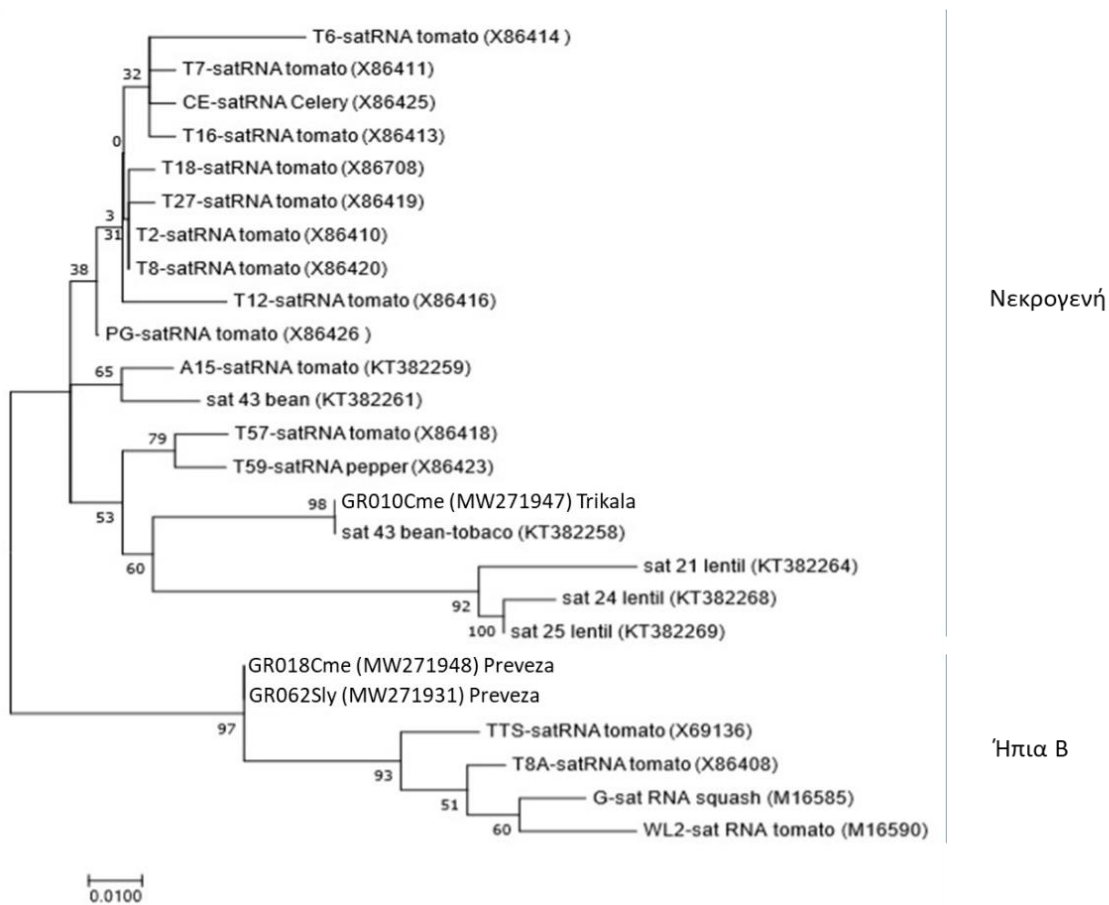
Εικόνα 3.13: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του satRNA στις υπό μελέτη απομονώσεις του CMV. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Chen et al., 2011, το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος είναι 385 bp και ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ανά 100 bp DNA.

3.2.4 Φυλογενετική ανάλυση των satRNAs του CMV

Οι δύο απομονώσεις των satRNAs της παρούσας μελέτης συγκρίθηκαν φυλογενετικά με αντίστοιχες απομονώσεις (ελληνικές και μη) από την παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Πίν. 2.7 § 2.7) και κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα φυλογενετικά δένδρα. Στο φυλογενετικό δένδρο διακρίνονται δύο υποομάδες satRNAs, εκείνα που προκαλούν το νεκρωτικό σύνδρομο στη τομάτα (νεκρογενή, necrogenic) και εκείνα που δεν το προκαλούν (ήπια, benign).

Όταν οι απομονώσεις satRNAs αυτής της μελέτης συγκρίθηκαν φυλογενετικά βρέθηκε να παρουσιάζουν **96,07%** νουκλεοτιδική ομοιότητα, αλλά ομαδοποιούνται διαφορετικά στο φυλογενετικό δένδρο (Εικ. 3.14). Η απομόνωση **GR010Cme** που προέρχεται από τα Τρίκαλα παρουσιάζει 100% ομοιότητα με την ελληνική απομόνωση **sat 43 bean-tobacco** από την Βοιωτία (KT382258) που προέρχεται από φασόλι και ομαδοποιούνται με τα νεκρογενή satRNAs. Η απομόνωση του πεπονιού **GR018Cme**

παρουσιάζει 100% ομοιότητα με την απομόνωση τομάτας **GR062Sly**, με την οποία προήλθε από τον ίδιο αγρό (συγκαλλιέργεια) και ομαδοποιούνται με τα ήπια satRNAs. Ακολούθησε η κατάθεση των αλληλουχιών των satRNA στην Genebank (δες παράρτημα).



Εικόνα 3.14: Φυλογενετικό δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ολόκληρη την νουκλεοτιδική αλληλουχία απομονώσεων των satRNAs του ιού CMV που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (Genebank) σε σύγκριση με τις ελληνικές των κολοκυνθοειδών. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων σε κόμβο πραγματοποιήθηκε με ποσοστό επαναλήψεων (bootstrap) ίσο με 100. Οι μπάρες κάτω αριστερά από το δέντρο δείχνουν αντικαταστάσεις/θέση, ενώ παραπλευρώς (δεξιά) του δένδρου αναφέρονται τα χαρακτηριστικά των συμπτωμάτων που προκαλούν τα satRNAs όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Necrogenic: νεκρωτικό σύνδρομο, Benign: ηπιότερη συμπτωματολογία). Στην παρένθεση αναφέρονται οι κωδικοί κατάθεσης στην Genbank.

3.3. Βιολογικός χαρακτηρισμός των απομονώσεων του CMV

3.3.1 Παθογένεια απομονώσεων CMV που ανήκουν σε διαφορετικές υποομάδες

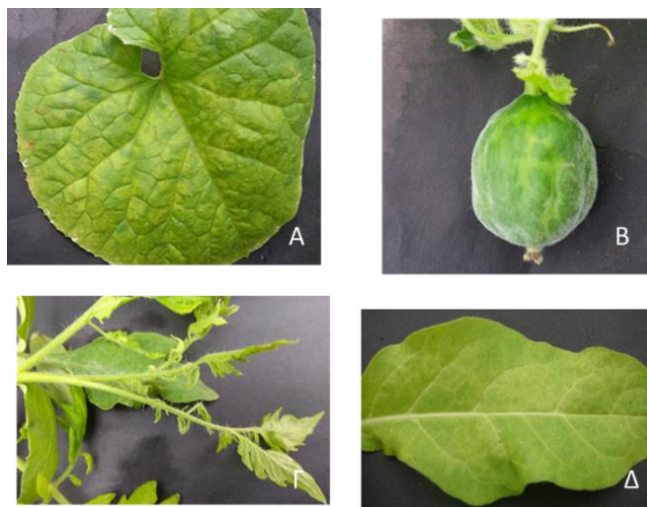
Μελετήθηκε η αντίδραση συγκεκριμένων φυτικών ειδών στη μόλυνση από επιλεγμένες απομονώσεις αντιπροσωπευτικές των υποομάδων του CMV, έπειτα από μηχανική μόλυνση, χρησιμοποιήθηκαν είδη που ανήκουν στις οικογένειες *Solanaceae* (καπνός, τομάτα, πιπεριά) και *Cucurbitaceae* (πεπόνι, κολοκύθι) (Πίν. 3.2).

Πίνακας 3.2: Συμπτώματα των φυτών-ξενιστών μετά από τις μηχανικές μολύνσεις για την μελέτη της βιολογικής παραλλακτικότητας απομονώσεων του ιού CMV που ανήκουν σε διαφορετικές υποομάδες. Όπου **Ns:** φυτό χωρίς συμπτώματα, **Mo:** Μωσαϊκό, **Cl:** Χλώρωση, **DW:** νανισμός, **LD:** Παραμόρφωση ελάσματος, **LT:** Συστροφή ελάσματος, **PU:** Φλύκταινες.

Ξενιστής	Ομαδοποίηση (sub)	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Cucurbita melo</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Capsicum annum</i>	<i>Nicotiana rustica</i>	<i>Nicotiana sylvestris</i>	<i>Nicotiana tabacum cv basmas</i>
Απομόνωση								
GR003Can	IB	Mo, Cl	Mo	Mo, LT, DW	Mo, LT	Mo	Mo, LD	Mo
GR053Sly	IA	Mo, Cl	Mo	Mo, DW	Mo, LT, DW	Mo, LD	Mo	Mo
GR010Cme	IA	Mo	Mo	M	Mo	Ns	Mo	Mo
GR011Cme	IA	Mo	Mo	DW, LD	Mo	Mo	Ns	Mo
GR013Cme	IA	Mo	Mo	Mo	Mo, LT, DW, PU	Ns	CL	CL
GR054Sly	IA	Mo	Mo	Mo, DW	Mo	Ns	CL	Mo
GR006Can	IA	Mo	CR, DW	CL	Ns	Ns	CL	Mo
GR033Cpe	IA	Mo	Mo	Mo	Ns	Ns	Ns	Mo
GR015Cme	IA	Mo	CL	Mo	Mo, DW	Mo	Ns	CL
GR002Asp	IA	Mo	Mo	Mo, LD	Ns	CL	Ns	Mo
GR025Csa	IA	Mo	Mo	CL	Mo	Ns	Ns	Mo

Η συμπτωματολογία που παρατηρήθηκε για το σύνολο των εξεταζόμενων απομονώσεων ήταν τυπική της προσβολής από τον ιό CMV και περιελάμβανε παρουσία μωσαϊκού, χλώρωση και συστροφή του ελάσματος στους διάφορους ξενιστές, καθώς και νημάτωση φύλλων στην τομάτα. Εκτός όμως από την παρουσία συμπτωμάτων, υπήρχαν και απομονώσεις που δεν προκάλεσαν συμπτώματα σε κάποιον από τους εξεταζόμενους ξενιστές, στους οποίους η παρουσία του ιού επιβεβαιώθηκε είτε με ELISA, είτε με μοριακές δοκιμές (Πιν. 3.2).

Για τη διάκριση των συμπτωμάτων που σχετίζονται με τις διαφορετικές υποομάδες του CMV και ειδικότερα για την **ομάδα II** χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (εφόσον δεν βρέθηκαν απομονώσεις στην παρούσα μελέτη) η απομόνωση **Ane 1 (LN 810056)**. Μόλυνση με την απομόνωση αυτή προκάλεσε την ανάπτυξη έντονου μωσαϊκού, ιδιαίτερα σε πεπόνι όπου εκτός από τα φύλλα, μωσαϊκό και φλύκταινες παρατηρήθηκαν και στον καρπό, επιπλέον νημάτωση στα φύλλα της τομάτας, ενώ στον καπνό ποικιλίας μπασμά, παρατηρήθηκε μόνο έντονη χλώρωση των νεύρων των φύλλων (Εικ. 3.15).



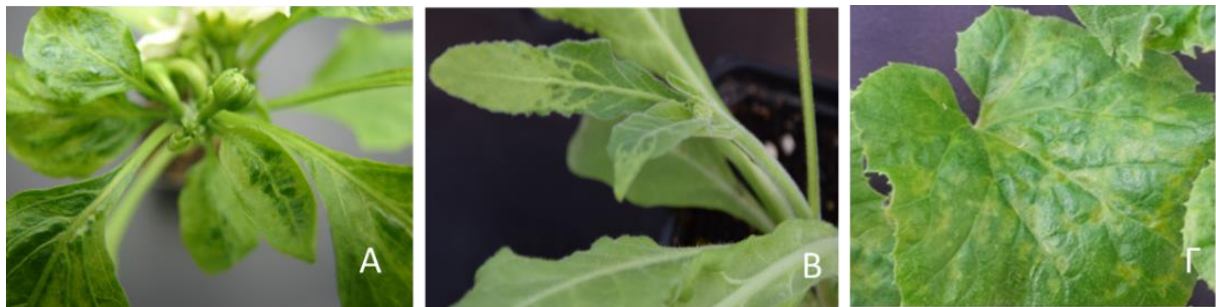
Εικόνα 3.15: Συμπτώματα που προκαλεί η απομόνωση **Ane 1 (ομάδα II)** σε διάφορους ξενιστές έπειτα από μηχανική μόλυνση. **A & B)** μωσαϊκό σε φύλλα και καρπό πεπονιού, **Γ)** μωσαϊκό και νημάτωση σε φύλλα τομάτας, **Δ)** χλώρωση στις νευρώσεις φύλλων καπνού (*N. tabacum* ποικ. Μπασμάς) (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Οι απομονώσεις που ομαδοποιήθηκαν στην υποομάδα IA (**GR053Sly & GR013Cme**), προκάλεσαν την ανάπτυξη μωσαϊκού και σε ορισμένες περιπτώσεις έντονου, καθώς και νημάτωσης στα φύλλα της τομάτας. Αναλυτικότερα, έπειτα από μόλυνση με την **GR053Sly** (Εικ. 3.16), τα φύλλα του κολοκυθιού και της πιπεριάς παρουσίαζαν μωσαϊκό, ενώ στην τομάτα εκτός από το μωσαϊκό παρατηρείται και νημάτωση στο έλασμα των φύλλων.



Εικόνα 3.16: Συμπτώματα που προκαλεί η απομόνωση **GR053Slg** (υποομάδα **IA**) σε διάφορους ξενιστές έπειτα από μηχανική μόλυνση. **A)** μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιού **B)** μωσαϊκό μαζί με νημάτωση του ελάσματος σε τομάτα και **Γ)** μωσαϊκό σε φύλλα πιπεριάς (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Έπειτα από μόλυνση με την **GR013Cme** (Εικ. 3.17), παρατηρήθηκε ιδιαίτερα έντονο μωσαϊκό στην πιπεριά και στο κολοκύθι, καθώς και φλύκταινες στα νεαρά φύλλα. Έντονο μωσαϊκό παρατηρήθηκε σε φύλλα *N. sylvestris*.



Εικόνα 3.17: Συμπτώματα που προκαλεί η απομόνωση **GR013Cme** (υποομάδα **IA**) σε διάφορους ξενιστές έπειτα από μηχανική μόλυνση, **A)** έντονο μωσαϊκό και φλύκταινες σε πιπεριά, **B)** διάχυτο μωσαϊκό σε καπνό (*N. Sylvestris*) **Γ)** έντονο μωσαϊκό σε κολοκύθι (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Η απομόνωση **GR003Can** (Εικ. 3.18) που ανήκει στην **υποομάδα IB**, προκάλεσε έντονο μωσαϊκό σε κολοκύθι με καρούλιασμα του ελάσματος προς τα επάνω, ενώ η πιπεριά αντέδρασε με ηπιότερο μωσαϊκό σε σχέση με τις απομονώσεις της **IA**.



Εικόνα 3.18: Συμπτώματα που προκαλεί η απομόνωση **GR003Can (υποομάδα IB)** σε διάφορους ξενιστές έπειτα από μηχανική μόλυνση, **A)** μωσαϊκό σε πιπεριά, **B)** έντονο μωσαϊκό μαζί με κάμψη του ελάσματος σε φύλλα κολοκυθίου (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Όταν συγκρίθηκαν τα συμπτώματα που προκαλούν στον ίδιο ξενιστή απομονώσεις που ανήκαν σε διαφορετικές υποομάδες (απομόνωση GR003Can, που ανήκει στην υποομάδα IB και απομόνωση GR053Sly, που ανήκει στην υποομάδα IA), παρατηρήθηκε ότι η απομόνωση της υποομάδας IB χαρακτηρίζεται από πιο έντονη συμπτωματολογία στο κολοκύθι, ενώ οι απομονώσεις και των δύο υποομάδων δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά στα συμπτώματα που προκαλούν στην πιπεριά (Εικ. 3.19).



Εικόνα 3.19: Σύγκριση συμπτωμάτων που προκαλούν οι απομονώσεις **GR003Can (υποομάδα IB, εικόνες A & Γ)** και **GR053Sly (υποομάδα IA εικόνες B & Δ)** που ανήκουν σε διαφορετικές υποομάδες σε κολοκύθι (**A & B**) συμπτώματα έντονου μωσαϊκού σε κολοκύθι και πιπεριά (**Γ & Δ**) (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

3.3.2 Παθογένεια απομονώσεων κολοκυνθοειδών του CMV που περιέχουν satRNAs

Κατά την μελέτη των συμπτωμάτων των δύο απομονώσεων (**GR010Cme** και **GR018Cme**) που περιείχαν satRNAs και προήλθαν από πεπόνι, η μοριακή ανάλυση των φυτοδεικτών έδειξε ότι δεν κατέστη δυνατή η μετάδοση σε αυτούς του δορυφορικού RNA. Απουσία του δορυφορικού, η απομόνωση GR018Cme προκάλεσε την παρουσία ήπιου μωσαϊκού σε κολοκύθι, αλλά έντονου στο πεπόνι. Στην τομάτα καταγράφηκε νημάτωση φύλλων (Εικ. 3.20).



Εικόνα 3.20: Συμπτώματα που προκάλεσε η απομόνωση GR018Cme που αρχικά περιείχε δορυφορικό RNA σε φυτοδείκτες, **A)** πολύ ήπιο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιάς, **B)** έντονο μωσαϊκό σε φύλλα πεπονιού και **Γ)** νημάτωση των φύλλων σε τομάτα (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Απουσία δορυφορικού, η απομόνωση GR010Cme στο κολοκύθι προκάλεσε πιο έντονο μωσαϊκό, στο πεπόνι ήταν έντονο κίτρινο μωσαϊκό, ενώ η τομάτα ανέπτυξε νημάτωση του ελάσματος και μωσαϊκό (Εικ. 3.21).



Εικόνα 3.21: Συμπτώματα που προκάλεσε η απομόνωση **GR010Cme** που αρχικά περιείχε δορυφορικό RNA σε φυτοδείκτες **A)** κίτρινο μωσαϊκό σε φύλλα πεπονιού, **B)** έντονο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιάς και **Γ)** μωσαϊκό στα νεαρά φύλλα της κορυφής σε φυτά τομάτας (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά)

3.4 Σπορομετάδοση απομονώσεων του CMV από κολοκυνθοειδή

Κατά τις μελέτες σπορομετάδοσης του ιού, σπόροι από μηχανικά μολυσμένα φυτά τομάτας, πιπεριάς και καπνού σπάρθηκαν και έγινε καταγραφή της φυτρωτικής ικανότητας και της παρουσίας συμπτωμάτων (Πίν. 3.3, 3.4, 3.5).

Στους σπόρους που προέκυψαν από τις μολυσμένες με CMV τομάτες καταγράφηκε αποτυχία φύτευσης που κυμάνθηκε από 0-100%, ανάλογα με την απομόνωση με την οποία ήταν μολυσμένα τα μητρικά φυτά (Πίν. 3.3). Στα σπορόφυτα της τομάτας που αναπτύχθηκαν γενικά παρατηρήθηκαν πολύ ήπια συμπτώματα, εκτός από τις απομονώσεις GR053Sly και GR011Cme που συνδυάστηκαν με νημάτωση και ήπιο μωσαϊκό (Εικ. 3.22). Το ποσοστό των συμπτωματικών σποροφύτων κυμάνθηκε από 12,5% έως 87,5% (επί του συνόλου των σπόρων) ανάλογα με την απομόνωση (Πίν. 3.3).

Πίνακας 3.3: Έλεγχος σπόρων που προέκυψαν από μολυσμένα, με απομονώσεις του CMV, φυτά τομάτας

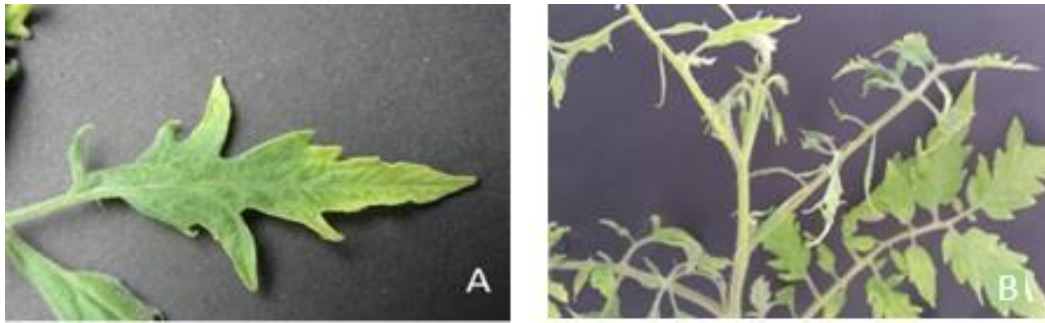
Απομόνωση	Αριθμός σπόρων		Φύτευση		Φυτά με Συμπτώματα			
	Σπάρθηκαν	Φύτευσαν	Επιτυχία (%)	Αποτυχία (%)	Αριθμός	Συμπτώματα ¹	% επί των φυτρωμένων	% επί του συνόλου
GR053Sly	8	6	75,0	25,0	3	mMo	50,0	37,5
GR010Cme	8	7	87,5	12,5	6	CL, mMO	85,7	75,0
GR011Cme	8	3	37,5	62,5	2	mMo, LD	66,6	25,0
GR013Cme	8	0	0	100,0	-	-	-	-
GR006Can	8	1	12,5	87,5	1	Stun	100,0	12,5
GR015Cme	8	7	87,5	12,5	5	mMo, CL	71,4	62,5
GR025Csa	8	0	0	100,0	-	-	-	-
ChV 52 ³	8	7	87,5	12,5	6	mMo	85,7	75,0
ChV 53 ³	8	8	100,0	0	7	mMo	87,5	87,5
ChV 55 ³	8	7	87,5	12,5	7	mMo	100,0	87,5
ChV 56 ³	8	7	87,5	12,5	4	mMo	57,1	25,0
ChV 57 ³	8	0	0	100,0	-	-	-	-

(φυτρωτικότητα και συμπτώματα).

¹ Έγινε έλεγχος ορισμένων δειγμάτων με ELISA (βλέπε κείμενο)

² Συμπτώματα: mMo (mild Mosaic): Ήπιο μωσαϊκό, CI (Clorosis): χλωρώση, Stun (Stunding): νανισμός, LD (Leaf deformation): παραμόρφωση φύλλου

³ Απομονώσεις, επιπλέον αυτών που συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση της μοριακής παραλλακτικότητας



Εικόνα 3.22: Συμπτώματα σποροφύτων τομάτας που προήλθαν από μητρικά φυτά μολυσμένα με τις απομονώσεις **GR053Sly** (A, νημάτωση, ήπιο μωσαϊκό) και **GR011Cme** (B, νημάτωση, ήπιο μωσαϊκό) (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Στους σπόρους που προέκυψαν από τις μολυσμένες με CMV πιπεριές καταγράφηκε αποτυχία φύτευσης που κυμάνθηκε από 37,5-100%, ανάλογα με την απομόνωση με την οποία ήταν μολυσμένα τα μητρικά φυτά (Πιν. 3.4). Τα σπορόφυτα πιπεριάς δεν εμφάνισαν συμπτώματα για την απομόνωση GR013Cme, ενώ καταγράφηκε ήπιο μωσαϊκό στις απομονώσεις GR011Cme και GR025Csa (Εικ. 3.23). Το ποσοστό των συμπτωματικών σποροφύτων κυμάνθηκε από 0% έως 50% (επί του συνόλου των σπόρων) ανάλογα με την απομόνωση (Πιν. 3.4).

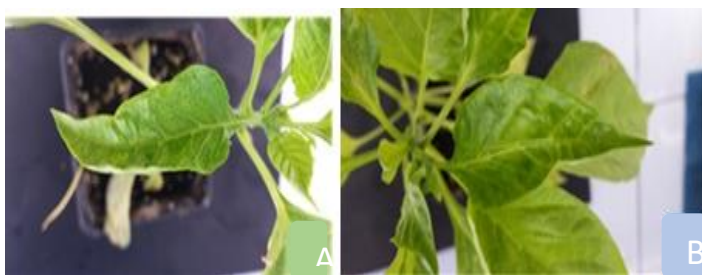
Πίνακας 3.4: Έλεγχος σπόρων που προέκυψαν από μολυσμένα, με απομονώσεις του CMV, φυτά πιπεριάς (φυτρωτικότητα και συμπτώματα).

Απομόνωση	Αριθμός σπόρων		Φύτρωση		Φυτά με Συμπτώματα ¹			
	Σπάρθηκα ν	Φύτρωσαν	Επιτυχία (%)	Αποτυχία (%)	Αριθμός	Συμπτώματα	% επί των φυτρωμένων	% επί του συνόλου
GR053Sly	8	2	25,0	75,0	2	mMo	100,0	25,0
GR010Cme	8	1	12,5	87,5	1	mMo	100,0	12,5
GR011Cme	8	1	12,5	87,5	1	mMo	100,0	12,5
GR013Cme	8	0	0,0	100,0	-	-	-	-
GR054Sly	8	4	50,0	50,0	2	mMo	50,0	25,0
GR006Can	8	4	50,0	50,0	0	NS	0	0
GR015Cme	8	5	62,5	37,5	4	mMo, CL	80,0	50,0
GR025Csa	8	3	37,5	62,5	1	mMo	33,3	12,5
ChV 54 ³	8	2	25,0	75,0	1	mMo	50,0	12,5
ChV 55 ³	8	1	12,5	87,5	1	mMo, Stu	100,0	12,5
ChV 56 ³	8	4	50,0	50,0	3	mMo,CL	75,0	37,5

¹ Έγινε έλεγχος ορισμένων δειγμάτων με ELISA (βλέπε κείμενο)

² Συμπτώματα: mMo (mild Mosaic): Ήπιο μωσαϊκό, CI (Clorosis): χλώρωση, Stun (Stunding): νανισμός, NS (no Symptoms): χωρίς συμπτώματα

³ Απομονώσεις, επιτέλεσαν αυτών που συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση της μοριακής παραλλακτικότητας



Εικόνα 3.23: Σπορόφυτα πιπεριάς με συμπτώματα ήπιου μωσαϊκού που προήλθαν από μητρικά φυτά μολυσμένα με τις απομονώσεις, **GR011Cme (A)** **GR025Csa (B)** (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Στους σπόρους που προέκυψαν από τα μολυσμένα με CMV καπνά δεν ήταν δυνατή η καταγραφή της φύτρωσης, λόγω του ότι τα φυτά σπάρθηκαν σε σπορείο (Πίν. 3.5). Τα σπορόφυτα *N. rustica* δεν εμφάνισαν συμπτώματα για τις απομονώσεις GR011Cme και GR046Nta, ενώ τα συμπτώματα ήταν πολύ ήπια στις άλλες απομονώσεις. Για την

απομόνωση ChV 57 καταγράφηκε έντονο κίτρινο μωσαϊκό σε σπορόφυτα καπνού ποικιλίας Μπασμά (Εικ. 3.24). Γενικά το ποσοστό των σποροφύτων καπνού των διαφόρων ποικιλιών που εκδήλωσαν συμπτώματα κυμάνθηκε από 0% έως 100% (Πίν. 3.5).

Πίνακας 3.5: Έλεγχος σπόρων που προέκυψαν από μολυσμένα, με απομονώσεις του CMV, φυτά καπνού (φυτρωτικότητα και συμπτώματα).

Φυτικό είδος	Απομόνωση	Σπορόφυτα που μεταφυτεύτηκαν	Φυτά με Συμπτώματα ²			
			Αριθμός	Συμπτώματα ¹	% επί των φυτρωμένων	% επί του συνόλου
<i>N. rusticae</i>	GR053Sly	4	3	mMo	75,0	75,0
	GR011Cme	4	2	Ns	50,0	50,0
	GR013Cme	4	3	mMo	75,0	75,0
	GR006Can	4	3	mMo	75,0	75,0
	GR033Cpe	4	3	CL	75,0	75,0
	GR046Nta	4	0	NS	0	0
<i>N. tobaccum cv basmas</i>	ChV 57 ³	4	4	Mo, CL	100,0	100,0
<i>N. sylvestris</i>	GR054Sly	4	1	CL	25,0	25,0
	ChV 57 ³	4	3	mMo	75,0	75,0

¹ Εγινε έλεγχος ορισμένων δειγμάτων με ELISA (βλέπε κείμενο)

² Συμπτώματα: mMo (mild Mosaic): Ήπιο μωσαϊκό, CL (Chlorosis): χλώρωση, NS (no Symptoms): χωρίς συμπτώματα

³ Απομονώσεις, επιπλέον αυτών που συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση της μοριακής παραλλακτικότητας



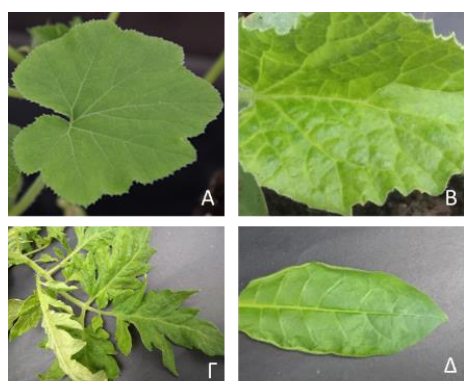
Εικόνα 3.24: Συμπτώματα έντονου κίτρινου μωσαϊκού σε σπορόφυτο καπνού ποικιλίας Μπασμά που προήλθε από μητρικό φυτό μολυσμένο με την απομόνωση **ChV 57** (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Σε αντιπροσωπευτικά σπορόφυτα με συμπτώματα που ελέγχθηκαν με δοκιμές ELISA, η παρουσία του ιού επιβεβαιώθηκε σε συμπτωματικά σπορόφυτα τομάτας (πέντε θετικά από τα εννέα που ελέγχθηκαν) (Πίν. 3.3) και καπνού (δύο θετικά από τα εννέα που ελέγχθηκαν) (Πίν. 3.5). Δεν επιβεβαιώθηκε η παρουσία του ιού σε μικρό αριθμό (5) σποροφύτων πιπεριάς από αυτά που παρουσίαζαν ύποπτα συμπτώματα (Πίν. 3.4) και ελέγχθηκαν για την παρουσία του ιού.

3.5 Διαδοχικές μηχανικές μολύνσεις και εμφάνιση satRNA

Κατά τις διαδοχικές μηχανικές μολύνσεις τομάτας, κολοκυθίου, πεπονιού και καπνού των απομονώσεων που δεν έφεραν satRNA στο μόριο τους (GR053Sl_y, GR013Cm_e, GR006Can), είτε έφεραν ως απομονώσεις αγρού, αλλά το έχασαν στις αρχικές μηχανικές μολύνσεις (GR010Cm_e, GR018Cm_e), δεν καταγράφηκε η παρουσία νεκρωτικού συνδρόμου στην τομάτα (ένδειξη παρουσίας νεκρογενούς satRNA) σε καμία από τις εξεταζόμενες απομονώσεις και σε καμία από τις μολύνσεις. Τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν ήταν μωσαϊκό, σε ορισμένες περιπτώσεις αρκετά έντονο, νημάτωση στο έλασμα της τομάτας, καθώς και χλώρωση στις νευρώσεις. Αναλυτικότερα:

1^η επανάληψη: Η απομόνωση **GR053Sl_y** προκάλεσε ήπιο μωσαϊκό στον καπνό, η τομάτα έντονη νημάτωση που αργότερα έγινε πιο ήπια, ενώ οι υπόλοιποι ξενιστές δεν ανέπτυξαν ευδιάκριτα συμπτώματα. Η απομόνωση **GR010Cm_e** (Εικ 3.25) προκάλεσε ήπιο μωσαϊκό σε κολοκύθι, πεπόνι και τομάτα, αλλά εντονότερο μωσαϊκό στον καπνό.

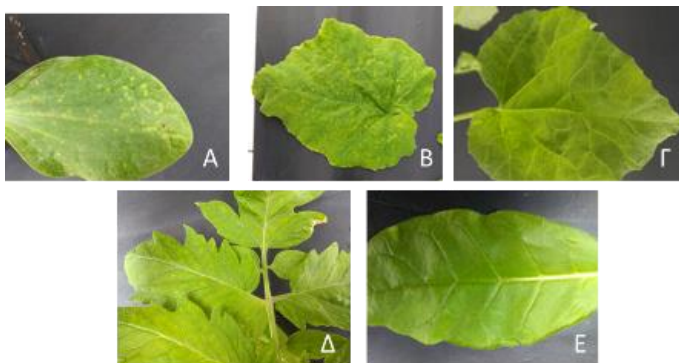


Εικόνα 3.25: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 1^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση **GR010Cm_e**. Ήπιο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθίου, πεπονιού και τομάτας (**Εικ. Α, Β & Γ**) και έντονο μωσαϊκό σε καπνό (**Εικ. Δ**) (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Η απομόνωση **GR013Cm_e**, προκάλεσε ήπιο μωσαϊκό στο κολοκύθι, αλλά απουσία συμπτωμάτων στους υπόλοιπους ξενιστές. Η απομόνωση **GR006Can** (Εικ. 3.26), προκάλεσε διάστικτο μωσαϊκό, τόσο στα φύλλα μόλυνσης του κολοκυθίου (τοπική μόλυνση), όσο και

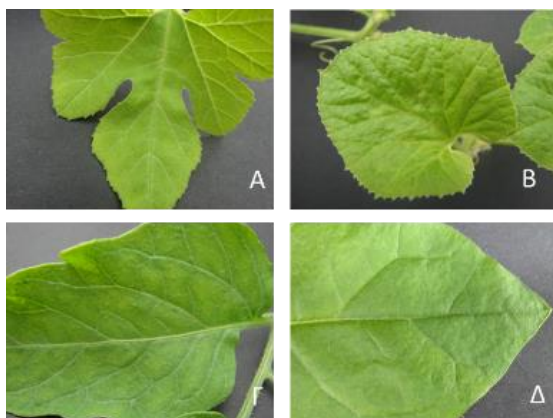
στα διασυστηματικά μολυσμένα φύλλα. Τέλος, η απομόνωση **GR018Cme** προκάλεσε διαφάνεια στα νεύρα των φύλλων του κολοκυθιού και ήπιο μωσαϊκό στους άλλους ξενιστές.

Εικόνα 3.26: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 1^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση **GR006Can**. Διάστικτο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιάς, στα αρχικά φύλλα μόλυνσης (**Εικ. Α**), και στα πρώτα φύλλα λόγω της διασυστηματικής κίνησης του ιού (**Εικ. Β**), **β**) πράσινο μωσαϊκό σε φύλλα πεπονιού (**Εικ. Γ**), **γ**) ήπιο μωσαϊκό σε φύλλα τομάτας (**Εικ. Δ**) και **δ**), και σε καπνό (**Εικ. Ε**) (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).



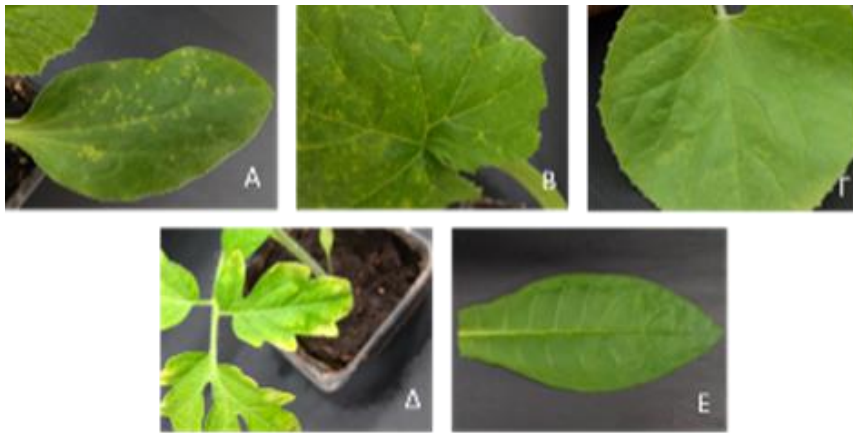
Η 2^η επανάληψη χαρακτηρίζεται από την παρουσία ήπιου μωσαϊκού σε όλους σχεδόν τους ξενιστές. Μόνο για την απομόνωση **GR006Can** (**Εικ. 3.28**), τα συμπτώματα ήταν τα ίδια με την 1^η επανάληψη. Αναλυτικότερα:

Στην απομόνωση **GR053Sl_y** τα συμπτώματα αφορούσαν την παρουσία ήπιου μωσαϊκού σε κολοκύθι και καπνό, ενώ δεν εμφάνισαν συμπτώματα το πεπόνι και η τομάτα. Στα φυτά που μολύνθηκαν με την απομόνωση **GR010Cme**, αναπτύχθηκε ήπιο μωσαϊκό σε κολοκύθι, τομάτα και καπνό, ενώ το πεπόνι εμφάνισε χλώρωση νεύρων στα φύλλα (**Εικ. 3.27**).



Εικόνα 3.27: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 2^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση **GR010Cme**. Ήπιο μωσαϊκό σε κολοκύθι (**Εικ. Α**), τομάτα (**Εικ. Γ**), και καπνό (**Εικ. Δ**), χλώρωση στις νευρώσεις των φύλλων στο πεπόνι (**Εικ. Β**) (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Στις μολύνσεις με την απομόνωση **GR013Cme**, καταγράφηκε έντονο διάστικτο μωσαϊκό στο κολοκύθι με κάμψη του ελάσματος, έντονο μωσαϊκό στο πεπόνι και τον καπνό, ενώ η τομάτα εμφάνισε ήπιο μωσαϊκό. Στις μολύνσεις με την απομόνωση **GR006Can**, καταγράφηκε έντονο διάστικτο μωσαϊκό στα φύλλα μόλυνσης του κολοκυθιού (τοπικά συμπτώματα) και διάστικτο μωσαϊκό στα πραγματικά φύλλα (διασυστηματικά συμπτώματα). Το πεπόνι εμφάνισε πράσινο μωσαϊκό, ενώ η τομάτα και ο καπνός ήπιο μωσαϊκό (Εικ. 3.28).

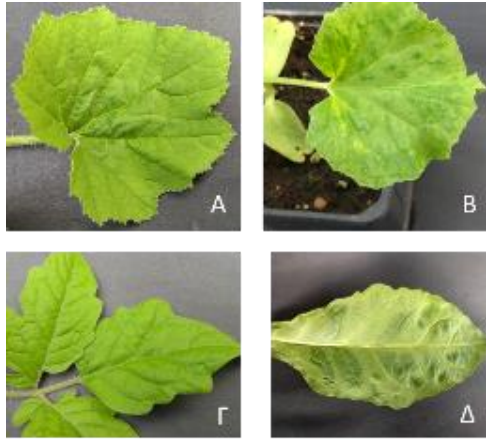


Εικόνα 3.28: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 2^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση **GR006Can**. Διάστικτο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιάς, στα αρχικά φύλλα μόλυνσης (**Εικ. Α**), και στα πρώτα φύλλα λόγω της διασυστηματικής κίνησης του ιού (**Εικ. Β**) πράσινο μωσαϊκό σε φύλλα πεπονιού (**Εικ. Γ**), ήπιο μωσαϊκό σε φύλλα τομάτας (**Εικ. Δ**), και καπνού (**Εικ. Ε**) (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Στις μολύνσεις με την απομόνωση **GR018Cme**, παρατηρήθηκε ήπιο μωσαϊκό σε κολοκύθι, τομάτα και καπνό, ενώ το πεπόνι δεν εμφάνισε συμπτώματα.

Κατά την 3^η επανάληψη δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση όσον αφορά το είδος και την ένταση των συμπτωμάτων σε σχέση με την προηγούμενη (2^η) επανάληψη.

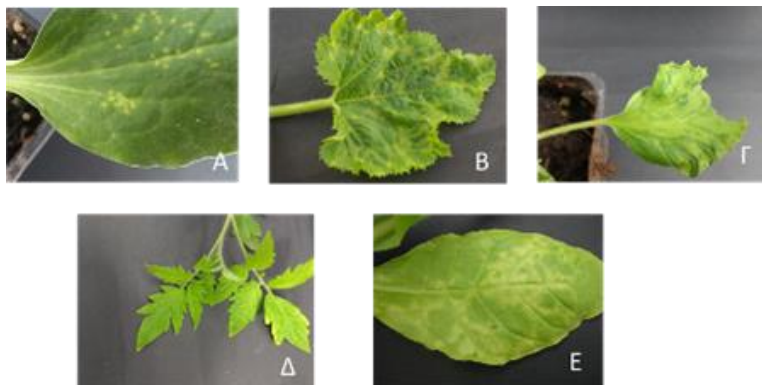
Στην 4^η, επαναλαμβανόμενη μόλυνση το σύνολο των ξενιστών εμφάνισαν συμπτώματα μωσαϊκού κυμαινόμενο σε ένταση από ήπιο μέχρι έντονο. Οι απομονώσεις **GR053Sly** και **GR010Cme** (Εικ. 3.29), στην 4^η διαδοχική μόλυνση προκάλεσαν ήπιο μωσαϊκό σε κολοκύθι, έντονο μωσαϊκό σε πεπόνι και καπνό και απουσία έντονων συμπτωμάτων στην τομάτα.



Εικόνα 3.29: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 4^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση **GR010Cme**. Ήπιο μωσαϊκό σε κολοκύθι (**Εικ. Α**), έντονο μωσαϊκό σε πεπόνι (**Εικ Β**) και καπνό (**Εικ. Δ**). Τέλος απουσία ευδιάκριτων συμπτωμάτων σε τομάτα (**Εικ. Γ**) (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).

Οι απομονώσεις **GR013Cme** και **GR006Can** (Εικ. 3.30), προκάλεσαν έντονο διάστικτο μωσαϊκό, τόσο στα τοπικά, όσο και στα διασυστηματικά μολυσμένα φύλλα του κολοκυθιού. Το πεπόνι εμφάνιζε πράσινο μωσαϊκό, η τομάτα ήπιο μωσαϊκό και ο καπνός έντονο μωσαϊκό.

Εικόνα 3.30: Συμπτώματα που καταγράφηκαν έπειτα από την 4^η μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών με την απομόνωση **GR006Can**. Διάστικτο μωσαϊκό σε φύλλα κολοκυθιάς, στα αρχικά φύλλα μόλυνσης (**Εικ Α**), και στα πρώτα φύλλα λόγω της διασυστηματικής κίνησης του ιού (**Εικ. Β**) έντονο πράσινο μωσαϊκό σε φύλλα πεπονιού (**Εικ. Γ**), ήπιο μωσαϊκό σε φύλλα τομάτας (**Εικ Δ**) και έντονο κίτρινο μωσαϊκό σε φύλλα καπνού (**Εικ. Ε**) (από προσωπικό αρχείο Χ.Α. Βαλαχά).



Η απομόνωση **GR018Cme** στην 4^η επαναλαμβανόμενη μόλυνση, προκάλεσε ήπιο μωσαϊκό στο κολοκύθι και τον καπνό. Το πεπόνι εμφάνισε έντονο μωσαϊκό και η τομάτα στένωση του ελάσματος του φύλλου.

Όταν τα φυτά της 4^{ης} επαναλαμβανόμενης μόλυνσης ελέγχθηκαν με δοκιμές PCR, δεν ανιχνεύθηκε σε κανέναν φυτοδείκτη και σε καμία απομόνωση η παρουσία satRNA, παρά μόνο αυτή του CMV (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Κεφάλαιο 4^ο

Συζήτηση

4. Συζήτηση

Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV) παρουσιάζει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών που περιλαμβάνει καλλιεργούμενα και αυτοφυή φυτά, σε αρκετές οικογένειες (Palukaitis et al., 1992; Palukaitis and García-Arenal, 2003; Jacquemond, 2012; Berniak et al., 2010). Οι απομονώσεις του χαρακτηρίζονται από σημαντική γενετική ποικιλομορφία που συχνά επηρεάζει και την ένταση των συμπτωμάτων που προκαλεί. Θεωρείται ως ο ιός με το μεγαλύτερο οικονομικό αντίκτυπο σε καλλιέργειες τομάτας, πιπεριάς, βίνιας, μαρουλιού και κολοκυθίου (Tomlinson, 1987). Μεταξύ των ξενιστών του, οι καλλιέργειες των κολοκυνθοειδών προσβάλλονται εκτενώς και με σημαντικές απώλειες, αλλά ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι τα κολοκυνθοειδή μπορεί να αποτελέσουν, χωρίς διακριτά συμπτώματα, πηγές των satRNA του ιού (Betancourt et al., 2011; García-Arenal and Palukaitis, 1999; Moriones et al., 1991) παίζοντας επιπλέον σημαντικό ρόλο στην επιδημιολογία ιδιαίτερα καταστρεπτικών ασθενειών, όπως το νεκρωτικό σύνδρομο στην τομάτα. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η καταγραφή της μοριακής παραλλακτικότητας των απομονώσεων του CMV που απαντώνται στις καλλιέργειες κολοκυνθοειδών στη χώρα μας, καθώς και η παρουσία και παραλλακτικότητα των satRNAs τους.

Για τη συλλογή απομονώσεων πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες (2013-2016) σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας κατά κύριο λόγο σε φυτά της οικογένειας *Cucurbitaceae*, αλλά και άλλων οικογενειών όπως *Solanaceae* και *Ranunculaceae*, όταν αυτά βρίσκονταν σε συγκαλλιέργεια ή γειτνίαση με τα πρώτα. Η παρουσία του ιού ταυτοποιήθηκε σε φυτά με χαρακτηριστικά συμπτώματα της προσβολής από τον CMV, όπως μωσαϊκό, νημάτωση του ελάσματος, κάμψη του ελάσματος, νανισμός και χλώρωση (Palukaitis et al., 1992; Palukaitis and García-Arenal, 2003; Jacquemond, 2012). Ανάλυση των απομονώσεων αυτών, τόσο με δοκιμές PCR με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών για την διαφοροποίηση των υποομάδων του ιού, όσο και η φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της ΚΠ που ενισχύθηκε με εκκινητές για όλες τις απομονώσεις, έδειξε ότι το σύνολο τους ανήκει στην ομάδα I, και ειδικότερα στην IA, και μόνο μία απομόνωση, από πιπεριά, ανήκει στην IB. Παρόμοιες επισκοπήσεις σε άλλες χώρες έχουν δείξει ότι η υποομάδα IA απαντάται συχνότερα από την ομάδα II (Crescenzi et al., 1993; Fraile et al., 1997). Επιπλέον, η IA εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό παγκοσμίως σε σύγκριση με την IB, η οποία IB εντοπίζεται κυρίως στην Ασία, από την οποία φαίνεται να έχει προέλθει (Jacquemond, 2012; Palukaitis and

García-Arenal, 2003; Roossinck, 2002). Μελέτες έχουν εντοπίσει απομονώσεις της IB και σε περιοχές εκτός Ασίας, όπως η Ιταλία (Gallitelli, 2000), η Ισπανία (Aramburu et al., 2007), η Αμερική (Roossinck et al., 1999), η Βραζιλία (Eiras et al., 2004), η Χαβάη (Lin et al., 2004) αλλά και η Ελλάδα (Sclavounos et al., 2006).

Στη μελέτη αυτή δεν βρέθηκε καμία απομόνωση που να ανήκει στην ομάδα II. Μια ερμηνεία για την απουσία της ομάδας II είναι αφενός το χαμηλό ποσοστό που παρουσιάζει παγκοσμίως, μόλις 20% (Hsu et al., 2000) και αφετέρου το ότι φαίνεται να ενδημεί στα ψυχρότερα κλίματα (Jacquemonod, 2012; Haase et al., 1989). Παρόλα αυτά όμως έχουν καταγραφεί απομονώσεις της ομάδας II, σε θερμές χώρες της λεκάνης της Μεσογείου όπως η βόρεια Τυνησία, η Ιταλία και η Ισπανία (Ben Tamarzizt et al., 2013; Bonnet et al., 2005; Davino et al., 2012; Fraile et al., 1997; Hsu et al., 2000). Στη χώρα μας απομονώσεις της ομάδας II έχουν καταγραφεί μόνο δύο φορές, σε ανεμώνη στην περιοχή των Γιαννιτσών (Xanthis et al., 2015a) και στο φυτό *N. glauca* στην Ήπειρο (Vovlas and Di Franco, 2004).

Η ανάλυση του γονιδίου της ΚΠ έδειξε επιπλέον ότι οι ελληνικές απομονώσεις παρουσίαζαν μικρή γενετική διαφοροποίηση με το ποσοστό ομοιότητάς τους να κυμαίνεται μεταξύ 96,85-98,74%, γεγονός που παρατηρείται στον CMV. Για τον CMV η ομοιότητα μεταξύ των στελεχών της κάθε ομάδας (I και II), είναι σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% (Palukaitis et al., 1992; Palukaitis and Zaitlin 1997; Roossinck et al., 1999). Γενικά η ποικιλομορφία του CMV που απαντάται στη φύση οφείλεται σε ανταλλαγή ή σε αναδιάταξη σε συγκεκριμένα γονίδια του ιού, μεταξύ διαφορετικών στελεχών που απαντώνται στην ίδια περιοχή (Ben Tamarzizt et al., 2013; Bonnet et al., 2005; Eiras et al., 2004; García-Arenal et al., 2000, 2001; Masuta, 2014; Nouri et al., 2014). Το φαινόμενο της δημιουργίας νέων στελεχών λόγω τυχαίας αναδιάταξης ακέραιων γονιδιακών τμημάτων του ιού είναι συχνό σε πολυσυστατικούς ιούς, όπως ο CMV και αντισταθμίζει τις απώλειες που μπορεί να συμβούν στο γονιδίωμα λόγω των διαδοχικών περασμάτων στα φυτά ξενιστές και μπορούν να βοηθήσουν στην αύξηση της «βιωσιμότητας» ενός ιού σε ένα πληθυσμό που έχει μειωθεί (Roossinck et al., 1997). Από την άλλη όμως η συχνότητα των παραλλαγών αυτών μειώνεται μέσω των γενετικών στενωπών που αντιπροσωπεύουν ο ξενιστής και οι αφίδες-φορείς (Ali et al., 2006; Li and Roossinck, 2004), είτε από το φαινόμενο του ιδρυτή (Founder effect), κατά το οποίο ένας πληθυσμός έχει αποσπαστεί από ένα αρχικό, χωρίς όμως να αποτελείται από τα αντιπροσωπευτικά άτομα (Lin et al., 2004; Fraile et al., 1997).

Γενικότερα θεωρείται ότι περιοριστικοί παράγοντες στην ποικιλομορφία λόγω ανασυνδιασμών είναι η απουσία μικτών μολύνσεων στη φύση από στελέχη που θα μπορούσαν να ανταλλάξουν γονιδιώματα (Gallitelli et al., 1997) και το γεγονός ότι τα ανασυνδιασμένα γονίδια δεν προτιμώνται από τις αφίδες-φορείς κατά την εκτέλεση των δοκιμαστικών νυγμάτων στα ασθενή φυτά (Fraile et al., 1997; Gallitelli et al., 1997), άρα υστερούν στην μετάδοση. Καθώς η ΚΠ σχετίζεται στενά με την μετάδοση του ιού (Shintaku et al., 1990; Perry et al., 1998; Smith et al., 2000; Ng et al., 2005) είναι αναμενόμενο ότι οι απομονώσεις του ιού στη φύση υφίστανται περιορισμό στην ποικιλομορφία του γονιδίου αυτού. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ απομονώσεων που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές ακόμη και χώρες, επιβεβαιώνοντας ότι η γεωγραφική προέλευση δεν επηρεάζει την ποικιλομορφία του CMV (Davino et al., 2012; Lin et al., 2003, 2004; Thompson et al., 2015).

Ο CMV εκτός από την ικανότητα να προσβάλλει μεγάλο αριθμό φυτών παρουσιάζει διαφορετική συμπτωματολογική εικόνα στα διάφορα φυτά που προσβάλλει (Douine et al., 1979; Francki et al., 1979; Horvath et al., 1980; Kaper and Waterworth, 1981). Τα συμπτώματα που παρουσιάζουν τα μολυσμένα φυτά είναι μωσαϊκό, παραμόρφωση του ελάσματος και νημάτωση των φύλλων (Palukaitis et al., 1992; Palukaitis and García-Arenal, 2003; Jacquemond, 2012). Η εμφάνιση των συμπτωμάτων αποτελεί αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ της ομάδας, στην οποία ανήκουν οι απομονώσεις και του ξενιστή. Κατά την μελέτη του βιολογικού χαρακτήρα απομονώσεων που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες (I, II), διαπιστώθηκε διαφορά στη συμπτωματολογική εικόνα (Marrou et al., 1975; Wahyuni et al., 1992), σε πέντε από το σύνολο των 12 απομονώσεων με τα στελέχη που ανήκουν στην ομάδα I να προκαλούν εντονότερη συμπτωματολογία σε όλους τους ξενιστές σε σχέση με την II (Mochizuki and Ohki, 2012; Roossinck, 2002), εκτός από το πεπόνι όπου η ομάδα II εμφάνιζε εντονότερα συμπτώματα.

Στην παρούσα μελέτη, εκτός από την παραλλακτικότητα των απομονώσεων διερευνήθηκε και η παρουσία satRNAs. Τα satRNAs επηρεάζουν τη συμπτωματολογία κατά την προσβολή σε ένα ξενιστή (Waterworth et al., 1979; Mossop and Francki, 1979; Jacquemond and Leroux, 1982; Kaper et al., 1986), ενώ η μορφή των συμπτωμάτων είναι συνισταμένη τριών παραγόντων, του ξενιστή, του στελέχους του κύριου ιού και του στελέχους του satRNA (Collmer and Howell, 1992; García-Arenal et al., 1987; Sleat and

Palukaitis, 1990; Sleat et al., 1994; Zhang et al., 1994). Η σημασία των satRNAs έγκειται στο γεγονός ότι υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στα συμπτώματα που προκαλούν στην τομάτα, όπου είτε προκαλείται το νεκρωτικό σύνδρομο, είτε τα φυτά εμφανίζουν ηπιότερη συμπτωματολογική εικόνα (Devic et al., 1990; Betancourt et al., 2011). Τα κολοκυνθοειδή δεν ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των satRNAs, σε σύγκριση με την τομάτα και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των σολανωδών (García-Arenal and Palukaitis 1999; Betancourt et al. 2011). Παρόλα αυτά, καθώς δεν παρουσιάζουν νεκρωτικά συμπτώματα κατά την προσβολή τους από ένα νεκρωτικό στέλεχος των satRNAs (Betancourt et al., 2011; García-Arenal and Palukaitis, 1999; Moriones et al., 1991), θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως «ασυμπτωματικές» δεξαμενές της ασθένειας για τις καλλιέργειες της τομάτας. Αυτό το ρόλο στη χώρα μας φαίνεται ότι μπορεί να παίξουν τα ψυχανθή, όπου επίσης τα νεκρωτικά satRNAs δεν προκαλούν έντονη συμπτωματολογία (Giakountis et al., 2018).

Στην παρούσα εργασία και οι δύο απομονώσεις που περιείχαν satRNAs, ένα νεκρογενές και ένα ήπιο, είχαν ως αρχικό ξενιστή πεπόνι, επιβεβαιώνοντας ότι στα κολοκυνθοειδή μπορεί να απαντώνται και οι δυο τύποι satRNAs (Betancourt et al., 2011). Το νεκρωτικό satRNA (**GR010Cme**, Τρίκαλα) δεν παρουσιάζει καμία διαφοροποίηση με τις ελληνικές απομονώσεις satRNAs που προέρχονται από φακή (Giakountis et al., 2018), ενώ για πρώτη φορά αποκτάται αλληλουχία από μη νεκρωτικό ελληνικό στέλεχος (**GR018Cme**, Πρέβεζα) το οποίο δεν εμφανίζει μεγάλη διαφοροποίηση από τις αντίστοιχες απομονώσεις από άλλες χώρες. Καθώς τα satRNAs, ενκαψιδιώνονται μέσα στο μόριο του CMV είναι πιθανό να μεταφέρονται μέσω του σπόρου σε μεγάλες αποστάσεις (Alonso-Prados et al., 1998; Aranda et al., 1997; Grieco et al., 1997) κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη παραλλακτικότητά τους. Μελέτη της πρωτοταγής δομής των νεκρογενών στελεχών, έδειξε την παρουσία στις θέσεις 318, 323, 325 των βάσεων G, U, C (Devic et al., 1990), ενώ άλλες έδειξαν επίσης αλληλεπίδραση της δευτεροταγούς δομής των satRNAs με τις πρωτεΐνες του ξενιστή (García-Arenal et al., 1987; Gordon and Symons, 1983; Rodriguez-Alvarado and Roossinck, 1997). Ο μικρός αριθμός satRNAs σε σύγκριση με τον αριθμό των απομονώσεων που αναλύθηκαν μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν υπήρχε έξαρση του νεκρωτικού συνδρόμου κατά τα έτη δειγματοληψίας. Επιπλέον είναι γνωστό ότι δεν υποστηρίζουν όλα τα στελέχη του ιού την παρουσία των satRNAs στο μόριο τους (García-Arenal and Palukaitis, 1999), οπότε παραμένει ανοιχτό το ερώτημα αν οι συγκεκριμένες απομονώσεις μπορεί να

υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό satRNAs. Τέλος, σημαντικό ρόλο στην παρουσία των satRNAs διαδραματίζουν και οι θερμοκρασίες κατά την διάρκεια της άνοιξης, με τις χαμηλές να ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των νεκρωτικών satRNAs (White et al., 1995). Η παρουσία των satRNAs στη φύση παραμένει ένα μυστήριο. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε η θεωρία που αναφέρει την παρουσία μικρών συγκεντρώσεων satRNAs σε διάφορα στελέχη του CMV και τα οποία εμφανίζονται έπειτα από αναπαραγωγή με επαναλαμβανόμενες μολύνσεις σε συγκεκριμένους ξενιστές (García-Luque et al., 1984; Gould et al., 1978; Kaper et al., 1988; Palukaitis et al., 1992). Στον περιορισμένο αριθμό δοκιμών αυτής της μελέτης, αν και καταγράφηκε αύξηση της έντασης των συμπτωμάτων, δεν καταγράφηκε νεκρωτικό σύνδρομο, ούτε και κατέστη δυνατή η ανίχνευση satRNAs σε κανένα από τα φυτά και σε καμία από τις απομονώσεις (που είχαν ή όχι, ως απομονώσεις αγρού, satRNAs). Σίγουρα η θεωρία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, καθώς επίσης και η ικανότητα εμφάνισης του satRNA μέσω διαδοχικών μεταδόσεων με τις αφίδες-φορείς.

Παράλληλα με τον μοριακό χαρακτηρισμό των απομονώσεων του CMV και των satRNAs του, έγινε μια πρώτη προσπάθεια και της ικανότητάς τους να μεταδίδονται με το σπόρο. Ο CMV μεταδίδεται είτε με το πολλαπλασιαστικό υλικό (σπόροι, μολυσμένα φυτά), είτε με πάνω από 80 είδη αφίδων με μη έμμοιο τρόπο, με σπουδαιότερα τα είδη *Aphis gossypii* και *Myzus persicae* (Palukaitis et al., 1992). Ιδιαίτερα η μετάδοση με τον σπόρο μπορεί να του εξασφαλίσει την διατήρησή του μέχρι την επόμενη καλλιεργητική περίοδο καθώς και την μετακίνησή του σε μεγάλες αποστάσεις (Escρίου et al., 2003). Τα ποσοστά μετάδοσης του CMV, εξαρτώνται από τον ξενιστή και μπορεί να είναι είτε χαμηλά για ορισμένα είδη φυτών, όπως στο κολοκύθι (0,7%) (Sharma and Chohan, 1974) ή αρκετά υψηλά όπως για ορισμένα ζιζάνια όπως το *Echinocystis lobata* (55%) (Neegaard, 1977; Douine et al., 1979; Brunt et al., 1990; Palukaitis et al., 1992; Yang et al., 1997; O'Keefe et al., 2007; Doolittle and Walker, 1925). Στην παρούσα μελέτη, φαίνεται ότι φυτά τομάτας, πιπεριάς και καπνού, που παρήχθησαν από σπόρο μολυσμένων μητρικών φυτών, παρουσίαζαν στο σύνολό τους μια πολύ ήπια συμπτωματολογική εικόνα που αφορούσε κυρίως την παρουσία μωσαϊκού και χλώρωσης. Είναι συχνό, άλλωστε τα μολυσμένα σπορόφυτα να μην εμφανίζουν διακριτά συμπτώματα (Ali and Kobayashi, 2010) στα εξεταζόμενα σπορόφυτα. Παράλληλα καταγράφηκε και σημαντική μείωση της φυτρωτικής ικανότητας η οποία μπορεί επίσης να σχετίζεται με την παρουσία του ιού. Όσον αφορά την

μετάδοση του CMV με το σπόρο, μελέτες στο σπανάκι έδειξαν την παρουσία ισωματίων στο κυτόπλασμα, στα κυστίδια και στα ινίδια κατά μήκος των τονοπλαστών στα τοιχώματά της ωοθήκης, καθώς και στα κύτταρα του παρεγχύματος του ανθήρα όπως και στα επιδερμικά κύτταρα, όπου ο ιός μπορεί να αναπαραχθεί και να εισέλθει στο έμβρυο (Hatta and Francki, 1981; Johansen et al., 1994).

Επιπλέον ο ιός αναφέρεται ότι εντοπίζεται και στο περίβλημα του σπόρου, πλην όμως η ικανότητα μετάδοσής του στο έμβρυο από τα καλύμματα είναι μικρή, καθώς αυτός δεν είναι αρκετά σταθερός, οπότε η παρουσία του εκτός του σπόρου έχει σαν αποτέλεσμα την αποδόμησή του και την ανενεργή του κατάσταση (Ali and Kobayashi, 2010). Τελικά η παρουσία του ιού ανιχνεύθηκε μόνο σε ορισμένα σπορόφυτα τομάτας και καπνού, αλλά όχι πιπεριάς, αλλά ο αριθμός που ελέγχθηκε ήταν μικρός (λόγω μη διαθεσιμότητας αντισωμάτων) για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Η επιδημιολογία του CMV και των satRNAs του είναι πολυσύνθετη, με απομονώσεις οι οποίες χωρίς σημαντική μοριακή διαφοροποίηση είναι ικανές να μολύνουν διάφορους ξενιστές, να σπορομεταδίδονται ή όχι σε κάποιους από αυτούς και ίσως να υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό satRNAs. Τα κολοκυνθοειδή, ως ξενιστές απομονώσεων που μπορεί να φέρουν τόσο νεκρωτικά, όσο και ήπια satRNAs, φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο σε αυτό το σύστημα, ο οποίος όμως απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Βιβλιογραφία

- Abdullahi, I., Ikotun, T., Winter, S., Thottappilly, G. and Atiri, G.I. (2001).** Investigation on seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in cowpea. *African Crop Science Journal*, 9:677-684.
- Acosta-Leal, R., Duffy, S., Xiong, Z., Hammond, R.W. and Elena, S.F. (2011).** Advances in plant virus evolution: translating evolutionary insights into better disease management. *American Phytopathology Society*, 101:1136–1148.
- Adams, I. P., Glover R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M. and Boonham, N. (2009).** Next-generation sequencing and metagenomics analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10:537-545.
- Albrechtsen, S.E. (2006).** Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. CABI Publishing, Wallingford.
- Ali, A. and Kobayashi, M. (2010).** Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in pepper. *Journal of Virological Methods*, 163:234–237.
- Ali, A. and Roossinck, M.J. (2008).** Genetic Bottlenecks. *Plant Virus Evolution*. Springer, pp: 123-131.
- Ali, A., Li, H., Schneider, W.L., Sherman, D.J., Gray, S., Smith, D. and Roossinck, M.J., (2006).** Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of Virology*, 80:8345–8350.
- Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Malpica, J.M., García-Arenal, F. and Fraile, A. (1998).** Satellite RNA of *Cucumber mosaic cucumovirus* spreads epidemically in natural populations of its helper virus. *American Phytopathology Society*, 88:520–524.
- Alvarez, S.P, Xue, C.Y. and Zhou, X.P. (2003).** Emergence of a new satellite RNA from *Cucumber mosaic virus* isolate P1. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 4:336-339.
- Aramburu, J., Galipienso, L. and López, C. (2007).** Reappearance of *Cucumber mosaic virus* isolates belonging to subgroup IB in tomato plants in North-eastern Spain. *Journal of Phytopathology*, 155:513–518.
- Aranda, M.A., Fraile, A. and García-Arenal, F. (1993).** Genetic variability and evolution of the satellite RNA of *Cucumber mosaic virus* during natural epidemics. *Journal of Virology*, 67:5896–5901.

- Aranda, M.A., Fraile, A., Dopazo, J., Malpica, J.M. and García-Arenal, F. (1997).** Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. *Journal of Molecular Evolution*, 44:81–88.
- Aveling, T.A.S. (2014).** Global Standards in Seed Health Testing. *Global Perspectives on the Health of seeds and Plant Propagation Material, Plant Pathology in the 21 st Century* 6. Springer. Part 1, chapter 2 p:17-28.
- Avgelis, A. (1987).** Cucumber Mosaic Virus on Banana in Crete. *Journal of Phytopathology* 120:20–24.
- Babovic, M., Bulajic, A., Delibasic, G., Milijic, S. and Todorovic, D. (1997).** Role of bean seed in transmitting *Bean common mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. *Acta Horticulturae*, 462:253–258.
- Baker, K.F (1972).** Seed pathology. In: Kozlowski TT (ed) *Germination control. Metabolism and pathology*. Academic, New York, pp: 317-416
- Bartel, D.P. (2009).** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136:215-233.
- Bashir, M. and Hampton, R.O. (1996).** Detection and identification of seed-borne viruses from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) germplasm. *Plant Pathology*, 45:54–58.
- Bashir, N.S., Kalhor, M.R. and Zarghani, S.N. (2006).** Detection, differentiation and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes*, 32:277–288.
- Bem F. (1989).** Tomato necrosis: a serious lethal necrotic disease of field tomato crop in Argolida country. In: *Summaries of Invited and Research Papers of the 5th National Phytopathological Congress, 1989. Thessaloniki, Greece: HPS*, 29.
- Ben Tamarzizt, H., Montarry J., Girardot G., Fakhfakh H., Tepfer M. and Jacquemond, M. (2013).** *Cucumber mosaic virus* populations in Tunisian pepper crops are mainly composed of virus reassortants with resistance-breaking properties. *British Society for Plant pathology*, 62:1415-1428.
- Berniak, H., Kamińska, M. and Malinowski, T. (2010).** *Cucumber mosaic virus* groups IA and II are represented among isolates from naturally infected lilies. *European Journal of Plant Pathology*, 127:305–309.

- Betancourt, M., Fraile A. and García-Arenal, F. (2011).** *Cucumber mosaic virus* satellite RNAs that induce similar symptoms in melon plants show large differences in fitness. *Journal of General Virology*, 92:1930–1938.
- Betancourt, M., Fereres, A., Fraile, A. and García-Arenal, F. (2008).** Estimation of the effective number of founders that initiate an infection after aphid transmission of a multipartite plant virus. *Journal of Virology*, 82:12416–12421.
- Bhattiprolu, S.L. (1991).** Seed-borne *Cucumber mosaic virus* infecting French bean (*Phaseolus vulgaris*) in India. *Indian Journal of Virology*, 7:67–76.
- Blanchard, C. L., Boyce, P.M. and Anderson, B.J. (1996).** *Cucumber mosaic virus* RNA 5 is a mixed population derived from the conserved 3'-terminal regions of genomic RNAs 2 and 3. *Virology*, 217:598–601.
- Blanchard, C.L., Higgins, T.J.V. and Anderson, B.J. (1997).** RNAs 4A and 5 are present in tomato aspermy virus and both subgroups of cucumber mosaic virus. *Archives of Virology*, 142:1273–1283.
- Boccard, F. and Baulcombe, D. (1993).** Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of *Cucumber mosaic virus*. *Virology*, 193:563-578
- Bonnet, J., Fraile, A., Sacristán, N.S., Malpica, J.M. and García-Arenal, F. (2005).** Role of recombination in the evolution of natural populations of cucumber mosaic virus, a tripartite RNA plant virus. *Virology*, 332:359–368.
- Bowers, G.R.Jr. and Goodman, R.M. (1979).** Soybean mosaic virus: infection of soybean seed parts and seed transmission. *American Phytopathology Society*, 69: 569-572.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W-X., Ji, L-H., Ding, S-W. and Baulcombe, D.C. (1998).** Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal*, 17:6739–6746.
- Brodersen, P. and Voinnet, O. (2009).** Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10:141-148.
- Bruening, G., Buzayan, J. M., Ferreiro, C. and Lim, W. (2000).** Evidence for participation of RNA 1-encoded elicitor in *Cowpea mosaic virus*-mediated concurrent protection. *Virology*, 266: 299-309.

- Bruenn, J.A. (1991).** Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 19:217–226.
- Brunt, A., Crabtree, K. and Gibbs, A. (1990).** Viruses of Tropical Plants: Description and Lists from the VIDE Database. CAB International, Wallingford, UK.
- Canto, T., Prior, D.A. M., Hellwald, K-H., Oparka, K.J. and Palukaitis, P. (1997).** Characterization of *Cucumber mosaic virus*. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of CMV. *Virology*, 237:237–248.
- Carr, J. P., Gal-On, A., Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1994).** Replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus* in transgenic plants involves suppression of both virus replication in the inoculated leaves and long- distance movement. *Virology*, 199:439–447.
- Carrington, J. C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. and Schaad, M.C., (1996).** Cell-to-cell long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell*, 8:1669–1681.
- Chalam, V.C., Parakh, D.B., Khetarpal, R.K., Maurya, A.K., Anju, J. and Singh, S. (2008).** Interception of seed-transmitted viruses in cowpea and mungbean germplasm imported during 2003. *Indian Journal of Virology*, 19:12–16.
- Chatzivassiliou, E.K., Giakountis, A., Kumari, S.G. and Makkouk, K.M. (2016).** Viruses affecting lentil (*Lens culinaris* Medik.) in Greece; incidence and genetic variability of Bean leafroll virus and Pea enation mosaic virus. *Phytopathologia Mediterranea*, 55:239-252.
- Chatzivassiliou, E. K., Giakountis, A., Testa, A., Kienle, U. and Jungbluth, T. (2016).** Natural infection of *Stevia rebaudiana* by *Cucumber mosaic virus* in Spain and by *Sclerotium rolfsii* in Greece. *Plant disease* 100, pp:1029.
- Chen, J. (2010).** Gene function of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA regarding viral-host Interactions. *Experimental Plant Virology*, pp:125–162.
- Chen, S., Gu, H., Wang, X., Chen, J. and Zhu, W. (2011).** Multiplex RT-PCR detection of *Cucumber mosaic virus* subgroups and Tobamoviruses infecting tomato using 18S rRNA as an internal control. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43:465-471.

- Choi, S-K., Jeon, Y-W., Yoon, J-Y. and Choi, J-K. (2011).** Characterisation of a satellite RNA of *Cucumber mosaic virus* that induces chlorosis in *Capsicum annuum*. *Virus Genes*, 43:111–119.
- Cillo, F., Mascia, T., Pasciuto, M.M. and Gallitelli, D. (2009).** Differential effects of mild and severe *Cucumber mosaic virus* strains in the perturbation of microRNA-regulated gene expression in tomato map to the 3' sequence of RNA2. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22:1239–1249.
- Cillo, F., Pasciuto, M.M., De Giovanni, C., Finetti-Sialer, M.M., Ricciardi, L. and Gallitelli, D. (2007).** Response of tomato and its wild relatives in the genus *Solanum* to *Cucumber mosaic virus* and satellite combinations. *Journal of General Virology*, 88:3166–3176.
- Cillo, F., Roberts, I.M. and Palukaitis, P. (2002).** In situ localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of *Cucumber mosaic virus* in tobacco and cucumber. *Journal of Virology*, 76:19654–19664.
- Collmer, C.W. and Kaper, J.M. (1988).** Site-directed mutagenesis of potential protein-coding regions in expressible cloned cDNAs of *Cucumber mosaic viral* satellites. *Virology*, 163:293-298.
- Collmer, C.W. and Howell, S.H. (1992).** Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. *Annual Revision of Phytopathology*, 30:419–442.
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J.A., Dodds, J.A. and Beachy, R.N. (1995).** A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology*, 206:307–313.
- Cooper, J. I. 1995.** *Viruses and the Environment*. 2 ed. Chapman and Hall, London
- Crescenzi, A., Barbarossa, L., Cillo, F., Di Franco, A., Vovlas, N. and Gallitelli, D., (1993).** Role of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA in the etiology of tomato fruit necrosis in Italy. *Archives of Virology*, 131:321–33.
- Crescenzi, A., Barbarossa, L., Gallitelli, D. and Martelli, G.P. (1993).** *Cucumber mosaic* cucumovirus populations in Italy under natural epidemic conditions and after a satellite-mediated protection test. *Plant Disease*, 77:28–33.
- Daniels, J. and Campbell, R.N. (1992).** Characterization of *Cucumber mosaic virus* isolates from California. *Plant Disease*, 76:1245-1250.

- Davino, S., Panno, S., Rangel, E.A., Davino, M., Bellardi, M.G. and Rubio, L. (2012).** Population genetics of *Cucumber mosaic virus* infecting medicinal, aromatic and ornamental plants from northern Italy. *Archives of Virology*, 157:739-745.
- de Assis Filho, F.M. and Sherwood, J.L. (2000).** Evaluation of seed transmission of *Turnip yellow mosaic virus* and *Tobacco mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, 90:1233–1238.
- de Wispelaere, M. and Rao, A.L.N. (2009).** Production of *Cucumber mosaic virus* RNA5 and its role in RNA recombination. *Virology*, 384:179–191.
- Devic, M., Jaegle, M. and Baulcombe, D. (1990).** *Cucumber mosaic virus* satellite RNA (strain Y): analysis of sequences which affect systemic necrosis on tomato. *Journal of General Virology*, 71:1443-1449.
- Ding, B., Li, Q., Nguyen, L., Palukaitis, P. and Lucas, W.J. (1995).** *Cucumber mosaic virus* 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology*, 207:345–353.
- Ding, S-W., Anderson, B.J., Haase, H.R. and Symons, R.H. (1994).** New overlapping gene encoded by the *Cucumber mosaic virus* genome. *Virology*, 198:593–601.
- Ding, S-W., Li, W-X. and Symons, R.H. (1995).** A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO Journal*, 14:5762–5772.
- Ding, X. S., Liu, J., Cheng, N-H., Folimonov, A., Hou, Y-M., Bao, Y., Katagi, C., Carter, S.A. and Nelson, R.S. (2004).** The *Tobacco mosaic virus* 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17:583-592.
- Divéki, Z., Salánki, K. and Balázs, E. (2004).** The necrotic pathotype of the *Cucumber mosaic virus* (CMV) Ns strain is solely determined by amino acid 461 of the 1a protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17:837-845
- Doolittle, S.P. and Walker, M.N. (1925).** Further studies on the overwintering and dissemination of cucurbit mosaic. *Journal of Agricultural Research*, 31:1-58.
- Douine, L., Quite, J.B., Marchoux, G. and Archange, P. (1979).** Index of plants susceptible to *Cucumber mosaic virus* bibliographical study. *Annales de Phytopathologie*, 11:439–475.

- Du, Z., Chen, F., Zhao, Z., Liao, Q., Palukaitis, P. and Chen, J. (2008).** The 2b protein and the C-terminus of the 2a protein of *Cucumber mosaic virus* subgroup I strains both play a role in viral accumulation and induction of symptoms. *Virology*, 380:363–370.
- Du, Z-Y., Chen, F-F., Liao, Q-S., Zhang, H-R., Chen, Y-F. and Chen, J-S. (2007).** 2b ORFs encoded by subgroup IB strains of *Cucumber mosaic virus* induce differential virulence on *Nicotiana* species. *Journal of General Virology*, 88:2596–2604.
- Eiras, M., Boari, A.J., Colariccio, A., Chaves, A.L.R., Briones, M.R.S., Figueira, A.R. and Harakava, R., (2004).** Characterization of isolates of the cucumovirus *Cucumber mosaic virus* present in Brazil. *Journal Plant Pathology*, 86:61–69.
- Escriu, F., Fraile, A and García-Arenal, F. (2000).** Evolution of virulence in natural populations of the satellite RNA of *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology*, 90:480-485.
- Escriu, F., Fraile, A. and García-Arenal, F. (2003).** The evolution of virulence in a plant virus. *Evolution*, 57:755–765.
- Escriu, F., Perry, K.L. and García-Arenal, F. (2000).** Transmissibility of *Cucumber mosaic virus* by *Aphis gossypii* correlates with viral accumulation and is affected by the presence of its satellite RNA. *Phytopathology*, 90:1068–72.
- Farzadfar, S., Pourrahim, R. and Arafati, N. (2013).** Molecular identification of *Cucumber mosaic virus* subgroup IB isolates in south Iran. *Journal of Plant Pathology*, 95:423-428.
- Ferguson, T.S. (1982).** An Inconsistent Maximum Likelihood Estimate. *Journal of the American Statistical Association*, 77, pp: 831-834
- Finch, J.T., Klug, A. and Van Regenmortel, M.H.V. (1967).** The structure of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of Molecular Biology*, 24:269–273.
- Fraile, A., Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Bernal, J.J., Malpica, J.M. and García-Arenal, F. (1997).** Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. *Journal of Virology*, 71:934–940.
- Francki, R.I.B. and Hatta, T. (1980).** *Cucumber mosaic virus*-Variation and problems of identification. *Acta Horticulturae*, 110:167–174.

- Francki, R.I.B., Mossop, D.W. and Hatta, T. (1979).** *Cucumber mosaic virus*. In: Harrison BD, Mutant AF, editors. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 213, p:6
- Francki, R.I.B., Randles, J.W., Chambers, T.C. and Wilson, S.B. (1966).** Some properties of purified *Cucumber mosaic virus* (Q strain). *Virology*, 28:729–741.
- Fulton, R.W. (1953).** Resistance in tobacco to cucumber mosaic virus infection. *Phytopathology*, 43:472.
- Fulton, R.W. (1980).** Biological significance of multicomponent viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 18:131-46
- Gallitelli, D. (2000).** The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Research*, 71:9–21.
- Gallitelli, D., Di Franco, A., Vovlas, C. and Kaper, J.M. (1988).** Infezioni miste del virus del mosaico del cetriolo (CMV) e di potyvirus in colture ortive di Puglia e Basilicata. *Informatore Fitopatologico*, 12:57–64.
- Gallitelli, D., Grieco, F. and Cillo, F., (1997).** The potential of a beneficial satellite RNA of *Cucumber mosaic virus* to acquire deleterious functions: nature versus greenhouse. *Virus-Resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact*. Springer-Verlag, Berlin, pp:100–106
- Gal-On, A., Canto, T. and Palukaitis, P., (2000).** Characterisation of genetically modified *Cucumber mosaic virus* expressing histidine-tagged 1a and 2a proteins. *Archives of Virology*, 145:37-50.
- Gal-On, A., Kaplan, I. and Palukaitis, P. (1995).** Differential effects of satellite RNA on the accumulation of *Cucumber mosaic virus* RNAs and their encoded proteins in tobacco vs zucchini squash with two strains of CMV helper virus. *Virology*, 208:58–66.
- García-Arenal, F. and Palukaitis, P. (1999).** Structure and functional relationships of satellite RNAs of *Cucumber mosaic virus*. *Satellites and Defective Viral RNAs*. Springer, pp:37–63.
- García-Arenal, F., Escriu, F., Aranda, M.A., Alonso-Prados, J.L., Malpica, J.M. and Fraile, A. (2000).** Molecular epidemiology of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA. *Virus Research*, 71:1–8.
- García-Arenal, F., Fraile, A. and Malpica, J. M. (2001).** Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39:156–186.

- García-Arenal, F., Zaitlin, M. and Palukaitis, P. (1987).** Nucleotide sequence analysis of six satellite RNAs of *Cucumber mosaic virus*: primary sequence and secondary structure alterations do not correlate with differences in pathogenicity. *Virology*, 158:339–347.
- García-Luque, I., Kaper, J.M., Diaz-Ruiz, J.R. and Rubio-Huertos, M. (1984).** Emergence and characterization of satellite RNAs associated with Spanish *Cucumber mosaic virus* isolates. *Journal of General Virology*, 65:539–547
- Giakountis, A., Tsarmopoulos, I. and Chatzivassiliou, E.K. (2018).** *Cucumber mosaic virus* isolates from Greek legumes are associated with satellite RNA that are necrogenic for tomato. *Plant Disease*, 102:2268-2276.
- Gildow, F.E., Shah, D.A., Sackett, W.M., Butzler, T., Nault, B.A. and Fleischer, S.J. (2008).** Transmission efficiency of *Cucumber mosaic virus* by aphids associated with virus epidemics in snap bean. *Phytopathology* 98:1233–1241.
- Gonsalves, D., Provvidenti, R. and Edwards, M.C. (1982).** Tomato white leaf: the relation of an apparent satellite RNA and *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology*, 72:1533–1538.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1988).** A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *Federation of European Biochemical Societies*, 235:16–24.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1989).** Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research*, 17:4713-4730.
- Gordon, K.H.J. and Symons, R.H. (1983).** Satellite RNA of *Cucumber mosaic virus* forms a secondary structure with partial 3'-terminal homology to genomic RNA. *Nucleic Acids Research*, 11:947–960.
- Gould, A.R., Palukaitis, P., Symons, R.H. and Mossop, D.W. (1978).** Characterization of a satellite RNA associated with *Cucumber mosaic virus*. *Virology*, 84:443–455.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2005).** Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123:631–640.

- Grieco, F., Cillo, F., Barbarossa, L. and Gallitelli, D. (1992).** Nucleotide sequence of a *Cucumber mosaic virus* satellite RNA associated with a tomato top stunting. *Nucleic Acids Research*, 20: 6733.
- Grieco, F., Lanave, C. and Gallitelli, D. (1997).** Evolutionary dynamics of *Cucumber mosaic virus* satellite RNA during natural epidemics in Italy. *Virology*, 229:166–74.
- Gullino, M.L. and Munkvold, G. (2014).** Global perspectives on the health of seeds and plant propagation material, plant pathology in the 21 st century 6. Springer.
- Guo, H.S. and Ding, S.W. (2002).** A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *European Molecular Biology Organization Journal*, 21:398–407.
- Haase, A., Richter, J. and Rabenstein, F. (1989).** Monoclonal antibodies for detection and serotyping of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of Phytopathology*, 127:129-136.
- Habili, N. and Francki, R.I.B. (1974).** Comparative studies on *Tomato aspermy* and *Cucumber mosaic viruses*. I. Physical and chemical properties. *Virology*, 57:302–401.
- Habili, N. and Symons, R.H. (1989).** Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acids Research*, 17:9543–9555.
- Hajimorad, M.R., Ghabrial, S.A. and Roossinck, M.J. (2009).** De novo emergence of a novel satellite RNA of *Cucumber mosaic virus* following serial passages of the virus derived from RNA transcripts. *Archives of Virology*, 154:137–140.
- Ham, B-K., Lee, T-H., You, J-S., Nam, Y-W., Kim, J-K. and Paek, K-H. (1999).** Isolation of a putative tobacco host factor interacting with *Cucumber mosaic virus* encoded 2b protein by yeast two-hybrid screening. *Molecules and Cells*, 9:548–555.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. (2002).** Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *European Molecular Biology Organization Journal*, 21:4671–4679.
- Hampton, R.O. and Francki, R.I.B., (1992).** RNA-1 dependent seed transmissibility of *Cucumber mosaic virus* in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, 82:127-130.
- Hasiów-Jaroszewska, B., Budzyńska, D., Rymelska, N., Korpys, P. and Borodynko-Filas, N. (2018).** Phylogenetic evidence of natural reassortants in the *Cucumber mosaic virus* population in Poland. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40:587-593.

- Hasiów-Jaroszewska, B., Chrzanowski, M. Budzyńska, D., Rymelska, N. and Borodynko-Filas, N. (2017).** Genetic diversity, distant phylogenetic relationships and the occurrence of recombination events among *Cucumber mosaic virus* isolates from zucchini in Poland. *Archives of Virology*, 162:1751–1756
- Hatta, T. and Francki, R.I.B. (1981).** Cytopathic structures associated with tonoplasts of plant cells infected with *Cucumber mosaic* and *Tomato aspermy viruses*. *Journal of General Virology*, 53:343–346.
- Hayes, R.J. and Buck, K.W. (1990).** Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell*, 63:363–368.
- Hellwald, K-H. and Palukaitis, P. (1995).** Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against *Cucumber mosaic virus*. *Cell*, 83:937–946.
- Hill, N.S., Hiatt, E.E., Battista, J.P. de., Costa, M.C., Griffiths, C.H., Klap, J., Thorogood, D. and Reeves, J.H. (2002).** Seed testing for endophytes by microscopic and immunoblot procedures. *Seed Science and Technology*, 32:347-355.
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V. and Revers, F. (2013).** Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in Plant Science*, 4:1–18.
- Hodgman, T.C. (1988).** A new superfamily of replicative proteins. *Nature*, 333:22–23.
- Horvath, J. (1980).** Viruses of lettuce II. Host ranges of *Lettuce mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 29:333-352.
- Hou, W-N., Duan, C-G., Fang, R-X., Zhou, X-Y. and Guo, H-S. (2011).** Satellite RNA reduces expression of the 2b suppressor protein resulting in the attenuation of symptoms caused by *Cucumber mosaic virus* infection. *Molecular Plant Pathology*, 12:595–605.
- Hsu, H.T., Barzuna, L., Hsu, Y.H., Bliss, W. and Perry, K.L. (2000).** Identification and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* with mouse monoclonal antibodies. *Virology*, 90:615-620.
- Hu, C-C., Hsu, Y-H. and Lin, N-S. (2009).** Satellite RNAs and satellite viruses of plants. *Review Viruses*, 1:1325-1350.
- Huh, S.U., Kim, M.J., Ham, B-K. and Paek, K-E., (2011).** A zinc finger protein Tsip1 controls *Cucumber mosaic virus* infection by interacting with the replication complex on vacuolar membranes of the tobacco plant. *New phytologist*, 191:746–762.

- Hull, R. (2002).** Comparative Plant Virology. Second Edition. Elsevier Academic Press.
- Hunter, D.G. and Bowyer, J.W. (1993).** Cytopathology of lettuce mosaic-virus infected lettuce seeds and seedlings. *Journal of Phytopathology*, 137, pp: 61-72.
- Irian, S., Xu, P., Dai, X., Zhao, P.X. and Roossinck, M.J. (2007).** Regulation of a virus-induced lethal disease in tomato revealed by LongSAGE analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20:1477–1488.
- Jacquemond, M. (2012).** *Cucumber Mosaic Virus*, *Advances in Virus Research*, 84:443–455.
- Jacquemond, M. and Leroux, J.P. (1982).** L'ARN satellite du virus de la mosaïque du concombre. II. Etude de la relation virus-ARN satellite chez divers hôtes. *Agronomie*, 2:55-62.
- Jaegle, M., Devic, M., Longstaff, M. and Baulcombe, D. (1990).** *Cucumber mosaic virus* satellite RNA (Y strain): analysis of sequences which affect yellow mosaic symptoms on tobacco. *Journal of General Virology*, 71:1905–1912.
- Ji, L-H. and Ding, S-W. (2001).** The suppressor of transgene RNA silencing encoded by *Cucumber mosaic virus* interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14:715–724.
- Johansen, E., Edwards, M.C. and Hampton, R.O. (1994).** Seed transmission of viruses: Current perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, 32:363- 386.
- Jordá, C., Alfaro A., Aranda M.A., Moriones E. and García-Arenal, F. (1992).** Epidemic of *Cucumber mosaic virus* plus satellite RNA in tomatoes in eastern Spain. *Plant Disease*, 76: 363-366.
- Kamer, G. and Argos, P. (1984).** Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research*, 12:7269–7282.
- Kaper, J.M. (1992).** Satellite-induced viral symptom modulation in plants: a case of nested parasitic nucleic acids competing for genetic expression. *Research in Virology*, 143:5-10.
- Kaper, J.M. and Waterworth, H.E. (1981).** Cucumoviruses. In *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, Elsevier/North Holland, New York, pp:257–332.

- Kaper, J.M., Geletka, L.M., Wu, G.S. and Tousignant, M.E. (1995).** Effect of temperature on *Cucumber mosaic virus* satellite-induced lethal tomato necrosis is helper virus strain dependent. *Archives of Virology*, 140:65–74.
- Kaper, J.M. (1969).** Reversible dissociation of *Cucumber mosaic virus* (strain S). *Virology*, 37:134–139.
- Kaper, J.M. (1975).** The chemical basis of virus structure, dissociation and reassembly. *Frontiers of Biology*, 39:321–352.
- Kaper, J.M. and Re, G.G. (1974).** Redetermination of the RNA content and the limiting RNA size of three strains of *Cucumber mosaic virus*. *Virology*, 60:308–311.
- Kaper, J.M. and Waterworth, H.E. (1977).** *Cucumber mosaic virus* associated RNA 5: causal agent for tomato necrosis. *Science*, 196:429–431.
- Kaper, J.M., Duriat, A.S. and Tousignant, M.E. (1986).** The 368-nucleotide satellite of *Cucumber mosaic virus* strain Y from Japan does not cause lethal necrosis in tomato. *Journal of General Virology*, 7:2241-2246
- Kaper, J.M., Tousignant, M.E. and Lot, H. (1976).** A low molecular weight replicating RNA associated with a divided genome plant virus: defective or satellite RNA? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 72:1237–1243.
- Kaper, J.M., Tousignant, M.E. and Steen, M.T. (1988).** *Cucumber mosaic virus*-associated RNA5. XI. Comparison of 14 CARNA 5 variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence. *Virology*, 163:284–292.
- Kaplan, I.B. and Palukaitis, P. (1998).** Characterization of *Cucumber mosaic virus*. VI. Generation of deletions in defective RNA 3s during passage in transgenic tobacco expressing the 3a gene. *Virology*, 251:279–287.
- Katis, N.J. and Avgelis, A.D. (1991).** Tomato fruit necrosis caused by *Cucumber mosaic virus*. *Geotechnical Scientific Issues*, 4:17–22.
- Kim, M.J., Kim, H.R. and Paek, K-H. (2006).** Arabidopsis tonoplast proteins TIP1 and TIP2 interact with the *Cucumber mosaic virus* 1a replication protein. *Journal of General Virology*, 87:3425–3431.
- Kim, S.H., Palukaitis, P. and Park, Y.I. (2002).** Phosphorylation of *Cucumber mosaic virus* RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *European Molecular Biology Organization Journal*, 21:2292–2300.

- Koonin, E.V. (1991).** The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, 72:2197-2206.
- Kosaka, Y., Hanada, K., Fukunishi, T. and Tochihara, H. (1989).** *Cucumber mosaic virus* isolate causing tomato necrotic disease in Kyoto prefecture. *Annual Phytopathological Society of Japan*, 55:229–32.
- Koundal, V., Haq, Q.M.R. and Praveen, S. (2011).** Characterization, genetic diversity and evolutionary link of *Cucumber mosaic virus* strain New Delhi from India. *Biochemical Genetics*, 49:25–38.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016).** MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33:1870–1874
- Kurihara, Y. and Watanabe, Y. (2003).** Cross-protection in *Arabidopsis* against crucifer tobamovirus Cg by an attenuated strain of the virus. *Molecular Plant Pathology*, 4:259–269.
- Kyriakopoulou, P.E, Perdakis, D.Ch., Sclavounos, A.P., Girgis, S.M., Lykouressis, D.P., Tsitsipis, J.A. and Christakis, P.A. (2000).** *Cucumber mosaic cucumovirus* incidence in open-field tomato in the Olympia area and trap captures of alate aphids. *Bulletin OEPP/EPPO*, 30:305-315.
- Kyriakopoulou, P.E. and Bem, F. (1982).** *Cucumber mosaic virus* on cucurbitaceae and other crops in Greece. *Annual Institute Phytopathological Benaki*, 13:151-162
- Kyriakopoulou, P.E. and Bem, F. (1991).** *Cucumber mosaic virus* on Cucurbitaceae and other crops in Greece. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki (ns)*, 13:151-162.
- Kyriakopoulou, P.E., Bem, F. and Varveri, C. (1991).** Tomato shrinkage and tomato fruit toughness, two new diseases in Greece probably related to *Cucumber mosaic virus*. *Annales de l' Institut Phytopathologique Benaki*, 16:151–156.
- Lahoz, E., Piccirillo, P. and Ragozzino, A. (1994).** Studies on the seed transmissibility of three isolates of CMV (*Cucumber mosaic virus*) in different cultivars of common bean. *Petria*, 4:117–122.
- Lakshman, D.K. and Gonsalves, D. (1985).** Genetic analyses of two large-lesion isolates of *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology*, 75:758–762.

- Latham, L.J. and Jones, R.A.C. (2001).** Incidence of virus infection in experimental plots, commercial crops, and seed stocks of cool season crop legumes. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52:397–413.
- Latham, L.J., Jones, R.A.C. and McKirdy, S.J. (2001).** *Cucumber mosaic* cucumovirus infection of cool-season crop, annual pasture, and forage legumes: Susceptibility, sensitivity, and seed transmission. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52:683–697.
- Lewsey, M., Surette, M., Robertson, F.C., Ziebell, H., Choi, S.H., Ryu, K.H., Canto, T., Palukaitis, P., Payne, T., Walsh, J.A. and Carr, J.P. (2009).** The role of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein in viral movement and symptom induction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6:642–654.
- Li, H. and Roossinck, M.J. (2004).** Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *Journal of Virology*, 78:10852–10857.
- Li, H-W., Lucy, A.P., Guo, H-S., Li, W-X., Ji, L-H., Wong, S-M. and Ding, S-W. (1999).** Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *European Molecular Biology Organization Journal*, 18:2683–2691.
- Li, Q. and Palukaitis, P. (1996).** Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of *Cucumber mosaic* cucumovirus and *Tobacco mosaic* tobamovirus. *Virology*, 216:71–79.
- Liao, Q., Zhu, L., Du, Z., Zeng, R., Peng, J. and Chen, J. (2007).** Satellite RNA-mediated reduction of *Cucumber mosaic virus* genomic RNAs accumulation in *Nicotiana tabacum*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39:217-223.
- Lin, H-X., Rubio, L., Smythe, A.B. and Falk, B.W. (2004).** Molecular population genetics of *Cucumber mosaic virus* in California: Evidence for founder effects and reassortment. *Journal of Virology*, 78:6666–6675.
- Lin, H-X., Rubio, L., Smythe, A., Jiminez, M. and Falk, B.W. (2003).** Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 84:249–258.
- Liu, S., He, X., Park, G., Josefsson, C. and Perry, K.L. (2002).** A conserved capsid protein surface domain of *Cucumber mosaic virus* is essential for efficient aphid vector transmission. *Journal of Virology*, 76:9756–9762.

- Liu, Y.Y., Yu, S.L., Lan, Y.F., Zhang, C.L., Hou, S.S., Li, X.D., Chen, X.Z. and Zhu, X.P. (2009).** Molecular variability of five *Cucumber mosaic virus* isolates from China. *Acta Virologica*, 53:89–97.
- López, C., Aramburu, J., Galipienso, L. and Nuez, F. (2007).** Characterisation of several heterogeneous species of defective RNAs derived from RNA3 of *Cucumber mosaic virus*. *Archives of Virology*, 152:621–627.
- Lucas, W.J. and Gilbertson, R.L. (1994).** Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Annual Review of Phytopathology*, 32:387–411.
- Lucy, A.P., Guo, H-S., Li, W-X. and Ding, S-W. (2000).** Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *European Molecular Biology Organization Journal*, 19:1672–1680.
- MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D. and Doudna, J.A. (2006).** Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer, *Science*, 311: 195-198.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2005).** *Brock Biology of Microorganisms*. Tenth Edition. Pearson Education, pp: 270-304.
- Makkouk, K.M. and Attar, N. (2003).** Seed transmission of Cucumber mosaic virus and Alfalfa mosaic virus in lentil seeds. *Arab Journal of Plant Protection*, 21:49–52.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.K. (1982).** *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Marrou, J., Quiot, J.B., Marchoux, G. and Duteil, M. (1975).** Caractérisation par la symptomatologie de quatorze souches du virus de la mosaïque du concombre et de deux autres cucumovirus. Tentative de classification. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*, 40:107-117.
- Mascia, T., Cillo, F., Fanelli, V., Finetti-Sialer, M.M., De Stradis, A., Palukaitis, P. and Gallitelli, D. (2010).** Characterization of the Interactions between *Cucumber mosaic virus* and *Potato virus Y* in mixed Infections in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23:1514–1524.
- Masuta, C., Inaba, J-I. and Shimura, H. (2012).** The 2b proteins of *Cucumber mosaic virus* generally have the potential to differentially induce necrosis on Arabidopsis. *Plant Signaling and Behavior*, 7:43–45.

- Masuta, C. (2014).** Molecular biology of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA. *Journal of General Plant Pathology*, 80:514-518.
- Masuta, C. and Takanami, Y. (1989).** Determination of sequence and structural requirements for pathogenicity of a *Cucumber mosaic virus* satellite RNA (Y-satRNA). *Plant Cell*, 1:1165–1173
- Matsuda, S., Ichigotani, Y., Okuda, T., Irimura, T., Nakatsugawa, S. and Hamaguchi, M. (2000).** Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1490:163–169.
- Matthews, R.E.F. (1991).** *Plant virology*. Academic press, pp.1-897.
- Maule, A.J. and Wang, D. (1996).** Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. *Trends in Microbiology*, 4:153-158.
- Mayers, C.N., Palukaitis, P. and Carr, J.P. (2000).** Subcellular distribution analysis of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein. *Journal of General Virology*, 81:219–226.
- Mayo, M.A, Berns, K., Fritsch, C., Jackson, A.O, Kaper, J., Leibowitz, M. and Taylor, J.M. (1995)** Satellites. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (eds) *Virus taxonomy the classification and nomenclature of viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer, Vienna New York, pp:487–492.
- McClement, W.D. and Richards, M.G. (1956).** Virus in wild plants. *Canadian Journal of Botany*, 34:793-798.
- Mink, G.I. (1993).** Pollen and seed transmitted viruses and viroids. *Annual Review of Phytopathology*, 31:375–402.
- Mochizuki, T. and Ohki, S.T. (2012).** *Cucumber mosaic virus*: Viral genes as virulence determinants. *Molecular Plant Pathology*, 13:217-225.
- Moriones, E., Fraile, A. and García-Arenal, F. (1991).** Host-associated selection of sequence variants from a satellite RNA of *Cucumber mosaic virus*. *Virology*, 184:465-468.
- Mossop, D.W. and Francki, R.I.B. (1977).** Association of RNA 3 with aphid transmission of *Cucumber mosaic virus*. *Virology*, 81:177–181.
- Mossop, D.W. and Francki, R.I.B. (1979).** Comparative studies on two satellite RNAs of *Cucumber Mosaic Virus*. *Virology*, 95: 395-404.

- Murant, A.F. and Mayo, M.A. (1982).** Satellites of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 20:49-70.
- Nagano, H., Okuno, T., Mise, K. and Furusawa, I. (1997).** Deletion of the C-terminal 33 amino acids of *Cucumber mosaic virus* movement protein enables a chimeric *Brome mosaic virus* to move from cell to cell. *Journal of Virology*, 7:2270–2276.
- Namba, S., Ling, K., Gonsalves, C., Gonsalves, D. and Slightom, J.L. (1991).** Expression of the gene encoding the coat protein of *Cucumber mosaic virus* (CMV) strain WL appears to provide protection to tobacco plants against infection by several different CMV strains. *Gene*, 107:181-188.
- Neegaard, P. (1977).** Survey of seed-borne viruses. In *Seed Pathology*. John Wiley and Sons, New York, pp:80–116.
- Ng, J.C.K., Josefsson, C., Clark, A.J., Franz, A.W.E and Perry, K.L. (2005).** Virion stability and aphid vector transmissibility of *Cucumber mosaic virus* mutants. *Virology*, 332:397-405.
- Nouri, S., Arevalo, R., Falk, B.W. and Groves, R.L. (2014).** Genetic structure and molecular variability of *Cucumber mosaic virus* isolates in the United States. *PLoS One*, 9:1-12
- O’Keefe, D.C., Berryman, D.I., Coutts, B.A. and Jones, R.A.C. (2007).** Lack of seed coat contamination with *Cucumber mosaic virus* in lupin permits reliable, large-scale detection of seed transmission in seed samples. *Plant Disease*, 91:504–508.
- O’Reilly, E.K., Wang, Z., French, R. and Kao, C.C. (1998).** Interactions between the structural domains of the RNA replication proteins of plant-infecting RNA viruses. *Journal of Virology*, 72:7160–7169.
- Palukaitis, P. (1988).** Pathogenicity regulation by satellite RNAs of *Cucumber mosaic virus*: minor nucleotide sequence changes alter host responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1:175–81.
- Palukaitis, P. and García-Arenal, F. (2003).** Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62:242–323.
- Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1997).** Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Advances in Virus Research*, 48:349- 377.
- Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. and Francki, R.I. (1992).** *Cucumber mosaic virus*. *Advances in virus research*, 41:281–348.

- Papp, I., Mette, M.F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S.E., Ray, A., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A.J.M. (2003).** Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiology*, 132:1382–1390.
- Park, K-H. and Cha, B-J. (2002).** Detection of TMV, ToMV and CMV from tomato seeds and plants. *Research in Plant Disease*, 8:101-106.
- Perry, K.L., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1998).** Amino acid changes in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* differentially affect transmission by aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology*, 242:204-210.
- Phan, M.S.V., Seo, J-K., Choi, H-S., Lee, S-H. and Kim, K-H. (2014).** Molecular characterization of an isolate of *Cucumber mosaic virus* from *Glycine soja* by generating its infectious full-genome cDNA clones. *Plant Pathology Journal*, 30:159–167.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. and Tordo, N. (1989).** Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *European Molecular Biology Organization Journal*, 8:3867–3874.
- Qi, Y., Denli, A.M. and Hannon, G.J. (2005).** Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Molecular Cell*, 19:421–428.
- Quemada, H.D., Gonsalves, D. and Slightom, J.L. (1991).** Expression of coat protein gene from *Cucumber mosaic virus* strain C in tobacco protection against infections by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. *Molecular Plant Pathology*, 81:794-802.
- Raj, S.K., Srivastava, A., Chandra, G. and Singh, B.P. (2000).** Role of satellite RNA of an Indian isolate of *Cucumber mosaic virus* in inducing lethal necrosis of tobacco plants. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38:613–16.
- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A. and Baulcombe, D.C. (1999).** Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*, 11:1207–1216.
- Reaney, D.C. (1982).** The evolution of RNA viruses. *Annual Review of Microbiology*, 36:47-73.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002).** MicroRNAs in plants. *Genes and Development*, 16:1616– 1626.

- Requena, A., Simón-Buela, L., Salcedo, G. and García-Arenal, F. (2006).** Potential involvement of a Cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of *Cucumber mosaic virus* particles. *Molecular plant-Microbe Interactions*, 19:734–746.
- Roberts, A.G. and Oparka, K.J. (2003).** Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell and Environment*, 26:103-124.
- Rodríguez-Alvarado, G. and Roossinck, M.J. (1997).** Structural analysis of a necrogenic strain of *Cucumber mosaic* cucumovirus satellite RNA in planta. *Virology*, 236:155–166.
- Rodríguez-Alvarado, G., Kurath, G. and Dodds, J.A. (2001).** Cross protection between and within subgroup I and II of *Cucumber mosaic virus* isolates from pepper. *Agrosciencia*, 35:563-573.
- Roossinck, M.J. (2002).** Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology*, 76:3382–3387.
- Roossinck, M.J., Sleat, D. and Palukaitis, P. (1992).** Satellite RNAs of plant viruses: Structure and biological effects. *Microbiology Reviews*, 56:265–279.
- Roossinck, M.J., Zhang, L. and Hellwald, K-H. (1999).** Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology*, 73:6752–6758.
- Roossinck, M.J., Kaplan, I. and Palukaitis, P. (1997).** Support of a *Cucumber mosaic virus* satellite RNA maps to a single amino acid proximal to the helicase domain of the helper virus. *Journal of Virology*, 71:608–612.
- Rozanov, M.N., Koonin, E.V. and Gorbalenya, A.E. (1992).** Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, 73:2129–2134.
- Rubio, L., Guerri, J. and Moreno, P. (2013).** Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*. *Frontiers in Microbiology*, 4:1–15.
- Ruiz-Ferrer, V. and Voinnet, O. (2009).** Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology*, 60:485–510.
- Ryu, K.H., Kim, C-H. and Palukaitis, P. (1998).** The coat protein of *Cucumber mosaic virus* is a host range determinant for infection of maize. *Molecular plant-Microbe Interactions*, 11:351–357.

- Sacristán, S., Fraile, A. and García-Arenal, F. (2004).** Population dynamics of *Cucumber mosaic virus* in melon crops and in weeds in central Spain. *Ecology and Epidemiology*, 94:992-998.
- Sasaki, N., Park, J-W., Maule, A.J. and Nelson, R.S. (2006).** The cysteine-histidine-rich region of the movement protein of *Cucumber mosaic virus* contributes to plasmodesmata targeting, zinc binding and pathogenesis. *Virology*, 349:396–408.
- Schaad, N.W., Mortensen, C.N., Li, J.Q., Feng, J.J., Luo, L., Mazzaglia, A. and Balestra, G.M. (2014).** Technical challenges for specific, sensitive detection of seed-borne bacterial pathogens. *Global Perspectives on the Health of seeds and Plant Propagation Material, Plant Pathology in the 21 st Century 6*. Springer Part II. chapter 5. pp:59-66.
- Schwinghamer, M.W. and Symons, R.H. (1975).** Fractionation of *Cucumber mosaic virus* RNA and its translation in a wheat embryo cell-free system. *Virology*, 63:252–262.
- Sclavounos, A.P., Voloudakis, A.E., Arabatzis, Ch. and Kyriakopoulou, P.E. (2006).** A severe Hellenic CMV tomato isolate: symptom variability in tobacco, characterization and discrimination of variants. *European Journal of Plant Pathology*, 115:163–172.
- Seo, J-K., Kwon, S-J., Choi, H-S. and Kim, K-Y. (2009).** Evidence for alternate states of *Cucumber mosaic virus* replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis. *Virology*, 383:248–260.
- Shang, J., Xi, D-H., Huang, Q-R., Xu, M-Y., Yuan, S., Wang, S-D., Jia, S-D., Cao, S., Zhou, Z-L. and Lin, H-H. (2009).** Effect of two satellite RNAs on *Nicotiana glutinosa* infected with *Cucumber mosaic virus* (CMV). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74:184–190.
- Sharma, Y.R. and Chohan, J.S. (1974).** Transmission of cucumis viruses 1 and 3 through seed of cucurbits. *Indian Phytopathology*, 26:596-598.
- Shi, B-J., Ding, S-W. and Symons, R.H. (1997).** In vivo expression of an overlapping gene encoded by the cucumoviruses. *Journal of General Virology*, 78:237–241.
- Shi, B-J., Palukaitis, P. and Symons, R.H. (2002).** Differential virulence by strains of *Cucumber mosaic virus* is mediated by the 2b gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15:947-55.
- Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, T., Myojo, N. and Inaba, J-i. (2011).** A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in

chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathogens*, 7:1-12.

Shintaku, M. and Palukaitis, P. (1990). *Viral Genes of Plant Pathogenesis*, Springer-Verlag, New York, pp:156-164.

Siddiqui, S.A., Valkonen, J.P.T., Rajamäki, M-L. and Lehto, K. (2011). The 2b silencing suppressor of a mild strain of *Cucumber mosaic virus* alone is sufficient for synergistic interaction with *Tobacco mosaic virus* and induction of severe leaf malformation in 2b-transgenic tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24:685–693.

Simmons, H.E. and Munkvold, G.P. (2014). Seed transmission in the Potyviridae. *Global Perspectives on the Health of seeds and Plant Propagation Material, Plant Pathology in the 21 st Century* 6. Springer. Part 1. Chapter 1, pp:3-16.

Simon, A.E., Roossinck, M.J. and Havelda, Z. (2004). Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annual Review of Phytopathology*, 42:415–437.

Sleat, D.E. and Palukaitis, P. (1990). Induction of tobacco chlorosis by certain *Cucumber mosaic virus* satellite RNAs is specific to subgroup II helper strains. *Virology*, 176:292-95.

Sleat, D.E. and Palukaitis, P. (1990). Site-directed mutagenesis of a plant viral satellite RNA changes its phenotype from ameliorative to necrogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 87:2946–2950.

Sleat, D.E. and Palukaitis, P. (1992). A single nucleotide change within a plant virus satellite RNA alters the host specificity of disease induction. *Plant Journal for cell and molecular biology*, 2:43–49.

Sleat, D.E., Zhang L. and Palukaitis, P. (1994). Mapping determinants within *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA for the induction of necrosis in tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7:189–195.

Smith, T.J., Chase, E., Schmidt, T. and Perry, K.L. (2000). The structure of *Cucumber mosaic virus* and comparison to *Cowpea chlorotic mottle virus*. *Journal of Virology*, 74:7578–7586.

- Soards, A.J., Murphy, A.M., Palukaitis, P. and Carr, J.P. (2002).** Virulence and differential local and systemic spread of *Cucumber mosaic virus* in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15:647–653.
- Stacie-Smith, R. and Hamilton, R.I. (1988).** Inoculum thresholds of seedborne pathogens. *Phytopathology*, 78:875-880.
- Stamova, B.S. and Chetelat, R.T. (2000).** Inheritance and genetic mapping of cucumber mosaic virus resistance introgressed from *Lycopersicon chilense* into tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 101:527–537.
- Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., Miao, L., Wang, X-C. and Yuan, M. (2010).** *Cucumber mosaic virus* movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *Plant Cell*, 22:1373–1387.
- Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoka, J., Masuta, C., Nitta, N. and Takanami, Y. (1991).** Functional analysis of deletion mutants of *Cucumber mosaic virus* RNA3 using an *in vitro* transcription system. *Virology*, 183:106–113.
- Takanami, Y. (1981).** A striking change in symptoms on *Cucumber mosaic virus* infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology*, 109:120–126.
- Takeshita, M., Matsuo, Y., Yoshikawa, T., Suzuki, M., Furuya, N., Tsuchiya, K. and Takanami, Y. (2008).** Characterization of a defective RNA derived from RNA 3 of the Y strain of *Cucumber mosaic virus*. *Archives of virology*, 153: 579-583.
- Taliansky, M.E., Ryabov, E.V., Robinson, D.J., and Palukaitis, P. (1998).** Tomato cell death mediated by complementary plant viral satellite RNA sequences. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11:1214–22.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013).** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725–2729.
- Tang, G. (2005).** siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences*, 30:106–14.
- Tepfer M., Girardot G., Fénéant L., Ben Tamarzizt H., Verdin E., Moury B. and Jacquemond M. (2016).** A genetically novel, narrow-host-range isolate of *Cucumber mosaic virus* (CMV) from rosemary. *Archives of virology*, 161:2013-2017.

- Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C. and Maule, A.J. (2001).** Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant Journal for cell and molecular biology*, 25:417–425.
- Thompson, J.R., Buratti, E., de Wispelaere, M. and Tepfer, M. (2008).** Structural and functional characterization of the 5' region of subgenomic RNA5 of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 89:1729–1738.
- Thompson, J.R., Langenhan, J.L., Fuchs, M. and Perry, K.L. (2015).** Genotyping of *Cucumber mosaic virus* isolates in western New York state during epidemic years. *Virus Research*, 210:169-177.
- Tóbiás, I., Szabó, B., Salánki, K., Sári, L., Kuhlmann, H. and Palkovics, L. (2008).** Seedborne transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in Styrian Hulless group of *Cucurbita pepo*. *Cucurbitaceae 2008 Proceedings of the IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, pp:189–197.
- Tomlinson, J.A. (1987).** Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals of Applied Biology*, 110:661-681.
- Valkonen, J.P.T., Rajamäki, M-L. and Kekarainen, T. (2002).** Mapping of viral genomic regions important in cross-protection between strains of a potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15:683–692.
- Vaquero, C., Liao, Y-C., Nähring J. and Fischer, R. (1997).** Mapping of the RNA-binding domain of the *Cucumber mosaic virus* movement protein. *Journal of General Virology*, 78:2095–2099.
- Varveri, C., Avgelis, A.D. and Bem, F. (1997).** Spread of the most important aphid-borne viruses of tomato and potato in Greece. *Geotechnical Scientific Issues* 8:7–13.
- Varveri, C. and Boutsika, K. (1999).** Characterization of *Cucumber mosaic virus* cucumovirus isolates in Greece. *Plant Pathology*, 48:95–100.
- Vovlas, C. and Di Franco, A. (2004).** *Cucumber mosaic virus* in *Nicotiana glauca* in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 86:91-92.
- Wahyuni, W.S., Dietzgen, R.G., Hanada. K. and Francki, R.I.B (1992).** Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of *Cucumber mosaic virus*. *Plant Pathology*, 41:282-297.

- Wang, D. and Maule, A.J (1997).** Contrasting patterns in the spread of two seed-borne viruses in pea embryos. *Plant Journal*, 11:1333-1340.
- Wang, X.B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W-X., Chen, X., Yu, J-L. and Ding, S-W. (2010).** RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A*, 107:484–489.
- Wang, Y., Lee, K.C., Gaba, V., Wong, S.M., Palukaitis, P. and Gal-On, A. (2004).** Breakage of resistance to *Cucumber mosaic virus* by co-infection with *Zucchini yellow mosaic virus*: Enhancement of CMV accumulation independent of symptom expression. *Archives of Virology*, 149:379–396.
- Wang, Y., Tzfira, T., Gaba, V., Citovsky, V., Palukaitis, P. and Gal-On, A. (2004).** Functional analysis of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein: Pathogenicity and nuclear localization. *Journal of General Virology*, 85:3135–3147.
- Waterworth, H.E., Kaper, J.M. and Tousignant, M.E. (1979).** CARNA-5, the small *Cucumber mosaic virus* dependent replicating RNA, regulates disease expression. *Science*, 204:845-847.
- Watters, E.K., Choudhary, K., Aviran, S., Lucks, B.J., Perry, L.K. and Thompson, R.J. (2018).** Probing of RNA structures in a positive sense RNA virus reveals selection pressures for structural elements. *Nucleic Acids Research*, 46:2573–2584.
- White, J.L., Tousignant, M.E., Geletka, L.M. and Kaper, J.M. (1995).** The replication of a necrogenic *Cucumber mosaic virus* satellite is temperature-sensitive in tomato. *Archives of Virology*, 140:53-63.
- Wintermantel, W.M. and Zaitlin, M. (2000).** Transgene translatability increases effectiveness of replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 81:587–595.
- Wong, S-M, Thio, S.S-C., Shintaku, M.H. and Palukaitis, P. (1999).** The rate of cell-to-cell movement in squash of *Cucumber mosaic virus* is affected by sequences of the capsid protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12:628–632.
- Wu, G. and Kaper, J.M. (1995).** Competition of viral and satellite RNAs of *Cucumber mosaic virus* for replication *in vitro* by viral RNA-dependent RNA polymerase. *Research in Virology*, 146:61-67.

- Xanthis, C.K., Maliogka, V.I. and Katis, N.I. (2015a).** First report of *Cucumber mosaic virus* in *Anemone sp.* in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 97:541.
- Xanthis, C.K., Maliogka, V.I., Lecoq, H., Dezbiez, C., Tsvetkov, I. and Katis, N.I. (2015b).** First report of *Cucumber mosaic virus* infecting watermelon in Greece and Bulgaria. *Journal of Plant Pathology*, 97:399.
- Xu, Z., Chen, K., Zhang, Z. and Chen, J. (1991).** Seed transmission of *Peanut stripe virus* in peanut. *Plant Disease*, 75:723-726.
- Xu, P. and Roossinck, M.J. (2000).** *Cucumber mosaic virus* D satellite RNA-induced programmed cell death in tomato. *Plant Cell*, 12:1079–1092.
- Xu, P., Blancaflor, E.B. and Roossinck, M.J. (2003).** In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with *Cucumber mosaic virus* and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16:467-476.
- Xue, B., Gonsalves, C., Provvidenti, R., Slightom, J.L., Fuchs, M. and Gonsalves, D. (1994).** Development of transgenic tomato expressing a high level of resistance to *Cucumber mosaic virus* strains of subgroups I and II. *Plant Disease*, 78:1038-1041.
- Yang, Y., Kim, K.S. and Anderson, E.J. (1997).** Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in spinach. *Phytopathology*, 87:924-931.
- Zaitlin, M., Anderson, J.M., Perry, K.L., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1994).** Specificity of replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus*. *Virology*, 201:200–205.
- Zámocký, M. and Koller, F. (1999).** Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72:19-66.
- Zhang, L., Hanada, K. and Palukaitis, P. (1994).** Mapping local and systemic symptom determinants of *Cucumber mosaic cucumovirus* in tobacco. *Journal of General Virology*, 75:3185–3191.
- Zhang, L., Kim, C.H. and Palukaitis, P. (1994).** The chlorosis-induction domain of the satellite RNA of *Cucumber mosaic virus*: identifying sequences that affect accumulation and the degree of chlorosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7:208–13.
- Ziebell, H., Payne, T., Berry, J.O., Walsh, J.A. and Carr, J.P. (2007).** A *Cucumber mosaic virus* mutant lacking the 2b counter-defense protein gene provides protection against wildtype strains. *Journal of General Virology*, 88:2862–2871.

Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ. και Δούκισσας, Λ. (2015) Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου στον υπολογιστή και στον πάγκο. (Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας– Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών). Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, pp:136-137

Ιστότοποι:

- <https://talk.ictvonline.org>
- <https://openi.nlm.nih.gov/index.php>
(https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/36/3961114/PMC3961114_ETM-07-04-0901-g01.png)
- <http://www.flickr.com>
(<https://www.google.gr/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiHvfeH4LzdAhWRK1AKHY78DoMQjRx6BAgBEAU&url=https%3A%2F%2Fwww.flickr.com%2Fphotos%2Fscotnelson%2F14635556018&psig=AOvVaw0ESoAinLXsOCtLAr9bEmlu&ust=1537091980302325>)
- <http://www.agric.wa.gov.au>
(<https://www.google.gr/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj4s6m34LzdAhWEI1AKHfA3DsYQjRx6BAgBEAU&url=https%3A%2F%2Fwww.agric.wa.gov.au%2Fcapsicums-and-chillies%2Fcucumber-mosaic-virus-capsicum&psig=AOvVaw0ESoAinLXsOCtLAr9bEmlu&ust=1537091980302325>)
- <http://www.avrdc.org>
(https://www.google.gr/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwini5bw4LzdAhVFJIAKHbDFAtkQjRx6BAgBEAU&url=https%3A%2F%2Favrdc.org%2F%3Fwpfb_dl%3D171&psig=AOvVaw0ESoAinLXsOCtLAr9bEmlu&ust=1537091980302325)
- <http://www.omafra.gov.on.ca>
(<https://www.google.gr/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj77N3Y4bzdAhWILIAKHwYcCtoQjRx6BAgBEAU&url=http%3A%2F%2Fwww.omafra.gov.on.ca%2Fenglish%2Fcrops%2Fhort%2Fnews%2Fgrower%2F2009%2F09gn09a1.htm&psig=AOvVaw0ESoAinLXsOCtLAr9bEmlu&ust=1537091980302325>)

Παράρτημα

Πίνακας 1: Κωδικοί καταχώρισης στην GenBank και λοιπά στοιχεία (κωδικός απομόνωσης, ξενιστής και περιοχή προέλευσης, γονίδιο στόχος) των αλληλουχιών που αποκτήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Ξενιστής	Κωδικός εργαστηρίου	Κωδικός GenBank	Γεωγραφική περιοχή	Γονίδιο στόχος	Αριθμός καταχώρισης GenBank
<i>Anemone sp</i>	ChV 29	GR002Asp	Πέλλα (Γιαννιτσά)	CMV CP	MW271875
<i>Capsicum annuum</i> L.	ChV 1	GR003Can	Εύβοια (Ιστιαία)	CMV CP	MW271876
	ChV 7	GR004Can	Κοζάνη	CMV CP	MW271877
	ChV 13	GR005Can	Ημαθία (Πλατύ)	CMV CP	MW271878
	ChV 16	GR006Can	Κοζάνη	CMV CP	MW271879
	ChV 47	GR007Can	Τρίκαλα	CMV CP	MW271880
	ChV 49	GR008Can	Φθιώτιδα (Δομοκός)	CMV CP	MW271881
<i>Cucumis melo</i> L.	ChV 3	GR010Cme	Τρίκαλα	CMV CP	MW271883
	ChV 5	GR011Cme	Θεσσαλονίκη (ΑΠΘ)	CMV SAT	MW271947
	ChV 6	GR012Cme	Καστοριά	CMV CP	MW271884
	ChV 10	GR013Cme	Μυτιλήνη	CMV CP	MW271886
	ChV 14	GR014Cme	Αρκαδία (Λεωνίδιο)	CMV CP	MW271887
	ChV 18	GR015Cme	Μεσσηνία (Κυπαρισσία)	CMV CP	MW271888
	ChV 31	GR016Cme	Πρέβεζα	CMV CP	MW271889
	ChV 32	GR017Cme	Λευκάδα	CMV CP	MW271890
	ChV 33	GR018Cme	Πρέβεζα	CMV CP	MW271891
				CMV SAT	MW271948
<i>Cucumis sativus</i> L.	ChV 20	GR023Csa	Αττική (ΓΠΑ)	CMV CP	MW271895
	ChV 23	GR024Csa	Ζάκυνθος	CMV CP	MW271896
	ChV 30	GR025Csa	Πέλλα (Γιαννιτσά)	CMV CP	MW271897
<i>Cucurbita pepo</i> L.	ChV 4	GR032Cpe	Θεσσαλονίκη (ΑΠΘ)	CMV CP	MW271901
	ChV 17	GR033Cpe	Φλώρινα	CMV CP	MW271902
	ChV 25	GR034Cpe	Ζάκυνθος	CMV CP	MW271903
	ChV 46	GR035Cpe	Πιερία	CMV CP	MW271904
	ChV 48	GR036Cpe	Κύθουρα	CMV CP	MW271905
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	ChV 9	GR045Nta	Τρίκαλα	CMV CP	MW271914
	ChV 19	GR046Nta	Αττική (ΓΠΑ)	CMV CP	MW271915
	ChV 28	GR047Nta	Ξάνθη	CMV CP	MW271916
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	ChV 2	GR053Sly	Αργολίδα	CMV CP	MW271922
	ChV 12	GR054Sly	Εύβοια	CMV CP	MW271923