



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
& ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**Βελτιστοποίηση μοριακών μεθόδων ανίχνευσης ιών των ψυχανθών
που ανήκουν στα γένη *Potyvirus* και *Polemonivirus***

Παρασκευή Κ. Σιταρένιου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Ελισάβετ Κ. Χατζηβασιλείου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2024**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βελτιστοποίηση μοριακών μεθόδων ανίχνευσης ιών των ψυχανθών
που ανήκουν στα γένη *Potyvirus* και *Polerovirus*

Optimization of molecular methods for the detection of legume viruses
belonging to the genera *Potyvirus* and *Polerovirus*

Παρασκευή Κ. Σιταρένιου

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ελισάβετ Κ. Χατζηβασιλείου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)

Γαρυφαλιά Οικονόμου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αλίκη Τζίμα, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Βελτιστοποίηση μοριακών μεθόδων ανίχνευσης ιών των ψυχανθών που ανήκουν στα γένη *Potyvirus* και *Polerovirus*

ΠΜΣ Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας & Διαχείρισης του Περιβάλλοντος

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ψυχανθή αποτελούν μία από τις πιο οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες παγκοσμίως καθώς χαρακτηρίζονται από υψηλή διατροφική αξία. Επίσης καλλιεργούνται για την παραγωγή ζωοτροφών, ως φυτά χλωρής λίπανσης και ως καλλιέργειες αμειψισποράς. Προσβάλλονται από περισσότερους από 168 ιούς, οι οποίοι ευθύνονται για μεγάλες οικονομικές ζημιές και απώλειες της παραγωγής. Οι ιοί των γενών *Potyvirus* και *Polerovirus* αποτελούν διαδεδομένα παθογόνα παγκοσμίως, που προκαλούν συμπτώματα όπως ίκτερος, μωσαϊκά, νανισμός και μείωση της παραγωγής. Αυτό καθιστά σημαντική την έγκαιρη ανίχνευσή τους. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η βελτιστοποίηση των μεθόδων μοριακής ανίχνευσης ιών των γενών *Potyvirus* και *Polerovirus* σε επίπεδο γένους καθώς και της εξειδικευμένης ανίχνευσης ορισμένων από αυτούς σε επίπεδο είδους, με τη χρήση της δοκιμής PCR, τα προϊόντα της οποίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για διαγνωστικούς σκοπούς όσο και για φυλογενετικές αναλύσεις. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ελληνικές απομονώσεις για το εκάστοτε γένος εκάστοτε ή ιό, οι οποίες αποκτήθηκαν με επισκοπήσεις και έλεγχο των δειγμάτων με δοκιμές ELISA είτε στη διάρκεια της παρούσας διατριβής, είτε στο παρελθόν και η ταυτότητα ορισμένων είχε ήδη επιβεβαιωθεί μέσω της αλληλούχισης υψηλής απόδοσης (HTS). Αρχικά ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα δύο διαφορετικών μεθόδων εξαγωγής ολικού RNA όπου τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρήση του αντιδραστηρίου TRI Reagent® ήταν εξίσου επιτυχής με τη χρήση του RNeasy Plant Mini Kit (της εταιρείας Qiagen) όμως παρείχε υψηλότερη συγκέντρωση ολικού RNA. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες PCR (θερμοκρασία υβριδισμού και συγκέντρωση MgCl₂) για τρία διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για τους ιούς του γένους *Potyvirus*, εκ των οποίων ένα εξειδικευμένο για τον ιό του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς (bean common mosaic virus, BCMV) και ένα εξειδικευμένο για τον ιό του κίτρινου μωσαϊκού της φασολιάς (bean yellow mosaic virus, BYMV), και πέντε διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για τους ιούς του γένους *Polerovirus* εκ των οποίων, το ένα εξειδικευμένο για τον ιό του δυτικού ίκτερου των τεύτλων (beet western yellows virus, BWYV). Στη συνέχεια, τα βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα εφαρμόστηκαν σε έναν αριθμό δειγμάτων φυτών μηδικής (*Medicago sativa*) και αραχίδα (*Arachis hypogaea*) που συλλέχθηκαν τις χρονιές 2021 - 2022 από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, τα οποία είχαν προηγουμένως ελεγχθεί για την παρουσία των σχετικών ιών με δοκιμές ELISA. Σε 47 δείγματα αραχίδων που συλλέχθηκαν, το 12,8% ελέγχθηκε θετικό για την παρουσία των Poty-ιών, αλλά κανένα από αυτά δε βρέθηκε θετικό για την παρουσία του BCMV στις δοκιμές PCR. Ένα δείγμα μηδικής ελέγχθηκε θετικό στην παρουσία του BWYV και η ταυτότητα του ιού επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση του προϊόντος της PCR. Δεν κατέστη δυνατή η επιβεβαίωση της παρουσίας των ιών *Polerovirus* σε άλλα θετικά στην ELISA δείγματα.

Επιστημονική περιοχή: Φυτοπαθολογία

Λέξεις κλειδιά: Μηδική, αραχίδα, BCMV, BWYV, ELISA, εκκινητές, PCR, ηλεκτροφόρηση

Optimization of molecular methods for the detection of legume viruses belonging to the genera *Potyvirus* and *Polerovirus*

MSc Plant protection & Environment

Department of Crop Science

Laboratory of Phytopathology

ABSTRACT

Legumes are one of the most economically important crops worldwide as they are characterized by high nutritional value. Furthermore, they are cultivated to produce animal feed, as green manure plants and as rotational crops. It is reported that legumes are infected by at least 168 viruses, which are responsible for large economic damages and production losses. The genera *Potyvirus* and *Polerovirus* consist of viruses which occur worldwide and cause diseases associated with various symptoms such as mosaic, yellows, stunting and reduced production. Due to the high impact of these viruses to legumes, their early detection is very crucial. The aim of the present thesis was to optimize the generic detection of the viruses belonging to the genera *Potyvirus* and *Polerovirus* using PCR at genus level or their specific detection at species level. For this purpose, Greek isolates of each virus genus or specific species were obtained by surveys and further testing by ELISA, during the present and past studies. The identity of some of these isolates has been also confirmed through high throughput sequencing (HTS). Firstly, the efficiency of two different total RNA extraction methods was tested and the results suggested that TRI Reagent® was equally successful as the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) but resulted in higher RNA concentration. Different PCR conditions were tested (such as annealing temperature and MgCl₂ concentration) for three different primer pairs for the *Potyvirus* genus, which included one specific primer pair for the detection of each of bean common mosaic virus (BCMV) and bean yellow mosaic virus (BYMV) and five different primer pairs for the *Polerovirus* genus, one of which is specific for the detection of beet western yellows virus (BWYV). The optimized protocols were then applied to several alfalfa (*Medicago sativa*) and groundnut (*Arachis hypogaea*) samples that were collected in 2021-2022 from different regions of Greece and were tested for the presence of the relevant viruses by ELISA. In 47 groundnut samples collected, 12,8% tested positive for the presence of *Potyvirus* genus, but none of them tested positive for BCMV in PCR tests. An alfalfa sample tested positive for the presence of BWYV and the identity of the virus was confirmed by sequencing the PCR product. It was not possible to confirm the presence of poleroviruses in other ELISA-positive samples.

Scientific area: Phytopathology

Keywords: Alfalfa, groundnut, BCMV, BWYV, ELISA, primers, PCR, electrophoresis

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διεξήχθη στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας. Με την ολοκλήρωση της θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια την επιβλέπουσα της διατριβής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ελισάβετ Κ. Χατζηβασιλείου για την ευκαιρία που μου έδωσε να εμβαθύνω τις γνώσεις μου στον τομέα των φυτικών ιών, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Καθηγήτρια Γαρυφαλιά Οικονόμου και την Επίκουρη Καθηγήτρια Αλίκη Τζίμα για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική Επιτροπή της διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ θερμά την Δρ Χ. Βαρβέρη καθώς και όλους τους συναδέλφους στο Εργαστήριο Ιολογίας της Επιστημονικής Διεύθυνσης Φυτοπαθολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου που μου προσέφεραν το χώρο του εργαστηρίου τους για την διεξαγωγή μέρος του πειραματισμού καθώς και τον Dr. Stephan Winter (Ινστιτούτο DSMZ) για τα αντισώματα και για τους θετικούς μάρτυρες που μας παραχώρησαν.

Κατά την εκπόνηση της διατριβής μου σημαντικό ρόλο, συμβουλές και στήριξη μου προσέφερε η υποψήφια διδάκτορας Ευανθία Ξυλογιάννη στην οποία θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, καθώς και στην κ. Κυριακή Σαρέλη για τη συμβολή της στη διεξαγωγή του πειράματός μου καθώς και όλους τους συμφοιτητές μου με τους οποίους εξελιχθήκαμε, συνεργαστήκαμε και μοιραστήκαμε σκέψεις και προβληματισμούς. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου για την υπομονή και την υποστήριξη που μου παρείχε.

Παρασκευή Σιταρένιου

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ii
ABSTRACT	iii
Ευχαριστίες.....	iv
Πίνακας περιεχομένων	v
Συντομογραφίες	vii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Ψυχανθή	2
1.1. Κατάταξη ψυχανθών	2
1.2. Καλλιέργεια ψυχανθών παγκοσμίως	4
1.3. Καλλιέργεια των ψυχανθών στην Ελλάδα	5
2. Ιοί ψυχανθών	7
2.1. Ιοί των ψυχανθών παγκοσμίως.....	8
2.2. Ιοί των ψυχανθών στην Ελλάδα	12
3. Αντιμετώπιση ιολογικών προσβολών	13
4. Οικογένεια <i>Potyviridae</i>	14
5. Γένος <i>Potyvirus</i>	16
5.1. Ταξινόμηση	19
5.2. Μετάδοση.....	20
5.3. Ξενιστές και συμπτώματα των ιών του γένους <i>Potyvirus</i>	20
5.4. Γονιδίωμα των ιών του γένους <i>Potyvirus</i>	21
5.5. Κύκλος ζωής των ιών του γένους <i>Potyvirus</i>	26
5.6. Μέθοδοι ανίχνευσης των ιών του γένους <i>Potyvirus</i>	30
5.7. Αντιμετώπιση.....	31
6. Ιοί των ψυχανθών του γένους <i>Potyvirus</i>	32
6.1. Ιός του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς (<i>Bean common mosaic virus, BCMV</i>) και Ιός του κοινού μωσαϊκού με νεκρώσεις της φασολιάς (<i>Bean common mosaic necrosis virus, BCMNV</i>)	33
6.2. Ιός του κίτρινου μωσαϊκού του φασολιού (<i>Bean yellow mosaic virus, BYMV</i>)	40
6.3. Λοιποί ιοί του γένους <i>Potyvirus</i> που μολύνουν ψυχανθή	43
7. Οικογένεια <i>Solemoviridae</i>	43
8. Γένος <i>Polerovirus</i>	45
8.1. Μετάδοση.....	46
8.2. Ξενιστές & συμπτώματα.....	46
8.3. Γονιδίωμα των ιών του γένους <i>Polerovirus</i>	46
8.4. Κύκλος ζωής των ιών του γένους <i>Polerovirus</i>	47
8.5. Εξέλιξη	52
8.6. Μέθοδοι ανίχνευσης των ιών του γένους <i>Polerovirus</i>	53
8.7. Αντιμετώπιση των ιών του γένους <i>Polerovirus</i>	54
9. Ιοί των ψυχανθών του γένους <i>Polerovirus</i>	54
9.1. <i>Beet western yellows virus, BWYV</i> (Ιός του δυτικού ίκτερου των τεύτλων)	56
9.2. <i>Turnip yellows virus (TuYV)</i> - Ιός του ίκτερου του γογγυλιού	61
9.3. Λοιποί ιοί του γένους <i>Polerovirus</i> που μολύνουν ψυχανθή	63
Σκοπός της μελέτης	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	67
1. Επιλογή απομονώσεων.....	68
1.1. Συλλογή δειγμάτων	68
1.2. Μεταχείριση δειγμάτων	68
1.3. Ορολογικές δοκιμές.....	69
1.3.1. Triple Antibody Sandwich (TAS) ELISA.....	69

1.3.2. ACP (Antigen Coated Plate) ELISA	72
2. Μοριακή Ανίχνευση Ιών	74
2.1. Εξαγωγή ολικού RNA από φυτικό ιστό	75
2.1.1. Αντιδραστήριο TRI Reagent®	75
2.1.2. RNeasy Plant Mini kit (στήλες)	76
2.2. Μέτρηση συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού εξαγόμενου RNA.....	77
2.3. Καθαρισμός του ολικού εξαγόμενου RNA	77
2.4. Έλεγχος της ποιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	78
2.5. Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription, RT) – Σύνθεση συμπληρωματικού κλώνου DNA (cDNA synthesis)	79
2.6. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	80
2.6.1. Εκκινητές για τη μοριακή ανίχνευση των ιών του γένους <i>Potyvirus</i>	81
2.6.2. Εκκινητές για τη μοριακή ανίχνευση των ιών του γένους <i>Polerovirus</i>	82
2.6.3. Έλεγχος ποιότητας RNA με ενίσχυση του γονιδίου 18S	83
2.7. Ανίχνευση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	83
3. Βελτιστοποίηση συνθηκών δοκιμών PCR	85
Για την ανίχνευση των ιών σε φυτικά δείγματα, είναι απαραίτητη η δοκιμή διαφορετικών συνθηκών PCR, με σκοπό την επιλογή αυτών που θα παρέχουν την υψηλότερη εξειδίκευση (specificity) και απόδοση (efficiency) της δοκιμής. 85	
3.1. Επιλογή ενζύμων.....	85
3.2. Επιλογή θερμοκρασιών υβριδισμού εκκινητών και συγκεντρώσεων $MgCl_2$	85
3.3. Επίλυση Προβλημάτων (Troubleshooting).....	87
4. Εφαρμογή επιλεγμένων πρωτοκόλλων στην ανίχνευση ελληνικών απομονώσεων των ψυχανθών	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	92
1. Επιλογή απομονώσεων (ορολογικές δοκιμές).....	93
2. Μοριακή ανίχνευση ιών	94
2.1. Συγκέντρωση και καθαρότητα ολικού εξαγόμενου RNA.....	94
2.2. Καθαρισμός του ολικού εξαγόμενου RNA.....	97
2.3. Ποιότητα ολικού εξαγόμενου RNA	97
2.4. Έλεγχος ποιότητας δειγμάτων με ενίσχυση του γονιδίου 18S.....	98
3. Βελτιστοποίηση συνθηκών PCR.....	99
3.1. Επιλογή ενζύμων	99
3.2. Βελτιστοποίηση συνθηκών PCR για την ανίχνευση ιών του γένους <i>Potyvirus</i>	100
3.3. Βελτιστοποίηση συνθηκών PCR για την ανίχνευση ιών του γένους <i>Polerovirus</i>	102
3.4. Επίλυση Προβλημάτων (Troubleshooting)	107
4. Εφαρμογή βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων για την ανίχνευση ιών των γενών <i>Polerovirus</i> & <i>Potyvirus</i>	108
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	112
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	118

Συντομογραφίες

AAP	Χρόνος διατροφής του φορέα για την απόκτηση του ιού (acquisition access period)
bp	Ζεύγη βάσεων (Base pair)
CABI	Centre for Agriculture and Biosciences International
cDNA	Συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA)
CP	Καψιδιακή πρωτεΐνη (Coat Protein)
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (Deoxyribonucleic acid)
dNTPs	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοσίδια (Deoxynucleosides triphosphate)
dsRNA	Δίκλωνο RNA (Double stranded RNA)
ELISA	Ανοσοενζυμική δοκιμή (Enzyme-linked immunosorbent assay)
HC-Pro	Helper component proteinase
ICTV	Διεθνή Επιτροπή της Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IRES	Εσωτερική θέση εισόδου ριβοσωμάτων (Internal Ribosome Entry Site)
kb	Χιλιάδες βάσεις Ζεύγη βάσεων (kilobase)
kDa	Χιλιάδες Dalton (kilodalton)
MAb	Μονοκλωνικό αντίσωμα (Monoclonal antibody)
MP	Πρωτεΐνη μετακίνησης (Movement protein)
mRNA	Αγγελιοφόρο RNA (Messenger RNA)
NGS	Αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing)
nm	Νανόμετρα (nanometer)
ORF	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open reading frame)
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction)
PG	Παθότυπος (Pathogroup)
RdRp	RNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση (RNA-dependent RNA-polymerase)
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ (Ribonucleic acid)
rpm	Στροφές ανά λεπτό (rounds per minute)
RT	Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription) (Πρωτεΐνη) υπερανάγνωσης (Readthrough protein)
RTD	Μοτίβο Υπερανάγνωσης (Readthrough Domain)
RT-PCR	Αντίστροφη μεταγραφή PCR (Reverse Transcription PCR)
sgRNA	υπογενωμικό RNA (subgenomic RNA)
siRNA	μικρά παρεμβαλλόμενα RNA
ssRNA	Μονόκλωνο RNA (Single stranded RNA)
UTR	Αμετάφραστη περιοχή (Untranslated Region)
VPg	Ιική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το γονιδίωμα (Viral Protein genome-linked)
VRC	Σύμπλοκο ιικής αναπαραγωγής (Viral Replication Complex)

Συντομογραφίες των σημαντικότερων για την εργασία ιών

AMV	Alfalfa mosaic virus	Ιός του μωσαϊκού της μηδικής
BBSV	Broad bean stain virus	Ιός της κηλίδωσης των κουκιών
BBWV	Broad bean wilt virus	Ιός του μαρασμού των κουκιών
BChV	Beet chlorosis virus	Ιός της χλώρωσης των τεύτλων
BCMNV	Bean common mosaic necrosis virus	Ιός του κοινού μωσαϊκού με νέκρωση της φασολιάς
BCMV	Bean common mosaic virus	Ιός του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς
BLRV	Bean leafroll virus	Ιός του καρουλιάσματος των φύλλων της φασολιάς
BMVY	Beet mild yellowing virus	Ιός του ήπιου ίκτερου των τεύτλων
BWYV	Beet western yellows virus	Ιός του δυτικού ίκτερου των τεύτλων
BYMV	Bean yellow mosaic virus	Ιός του κίτρινου μωσαϊκού της φασολιάς
CABYV	Cucurbit aphid borne yellows virus	Ιός του αφιδομεταδιδόμενου ίκτερου των κολοκυνθοειδών
CLRDV	Cotton leaf roll dwarf virus	Ιός του καρουλιάσματος των φύλλων με νανισμό του βαμβακιού
CIYV	Clover yellow vein virus	Ιός των κίτρινων νεύρων του τριφυλλιού
CMV	Cucumber mosaic virus	Ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς
CpCSV	Chickpea chlorotic stunt virus	Ιός του χλωρωτικού νανισμού της ρεβιθιάς
FBNYV	Faba bean necrotic yellows virus	Ιός του νεκρωτικού ίκτερου του κουκιού
PEMV	Pea enation mosaic virus	Ιός του μωσαϊκού με γλωσσίδα του αρακά
PLRV	Potato leafroll virus	Ιός του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας
PSbMV	Pea seed-borne mosaic virus	Ιός του μωσαϊκού του μπιζελιού
PStV	Peanut stripe virus	Ιός της ράβδωσης της αραχίδας
PVY	Potato virus Y	Ιός της πατάτας Y
SbDV	Soybean dwarf virus	Ιός του νανισμού της σόγιας
SbMV	Soybean mosaic virus	Ιός του μωσαϊκού της σόγιας
TSWV	Tomato spotted wilt virus	Ιός του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας
TuMV	Turnip mosaic virus	Ιός του μωσαϊκού το γογγυλιού
TuYV	Turnip yellows virus	Ιός του ίκτερου του γογγυλιού
ZYMV	Zucchini yellow mosaic virus	Ιός του κίτρινου μωσαϊκού της κολοκυθιάς

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ψυχανθή

Τα ψυχανθή είναι δικοτυλήδωνα φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Fabaceae (συν. Leguminosae ή Papilionaceae) στην οποία κατατάσσονται περισσότερα από 18.000 είδη και καλλιεργούνται από την αρχαιότητα σε χώρες της τροπικής και υποτροπικής ζώνης για την παραγωγή σπόρων τόσο προς ανθρώπινη κατανάλωση (πχ. φασόλια, κουκί, ρεβίθι, φακή, αρακάς, αραχίδα, κ.ά.), όσο και προς διατροφή των ζώων (μηδική, βίκος, τριφύλλι, λούπινο, κτηνοτροφικά κουκιά, κτηνοτροφικό μπιζέλι, ρόβι, σόγια κ.ά.). 1. Η μηδική καλλιεργείται αποκλειστικά για κτηνοτροφική χρήση και οι ποικιλίες της ως επί το πλείστον είναι πολυετείς αλλά υπάρχουν και άλλες που είναι μονοετείς. Σε μερικές περιπτώσεις (μπιζέλια, φασόλια, κουκιά) εκτός από το σπόρο χρησιμοποιούνται και οι νωποί λωβοί. Επίσης, καλλιεργούνται για την παραγωγή ζωοτροφών (υπό μορφή σπόρων, χλωρού χόρτου, σανού και ενσιρώματος) αλλά και ως φυτά χλωρής λίπανσης (Voisin et al., 2013). Τα ψυχανθή καλλιεργούνται παγκοσμίως λόγω της υψηλής διατροφικής αξίας τους, καθώς είναι πλούσια σε πρωτεΐνες (20-45%), αμινοξέα, βιταμίνες και φυτικές ίνες (Marhosa & Jideani, 2017) και γι' αυτό το λόγο αποτελούν από τις πιο σημαντικές πηγές τροφής και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα του κρέατος. Σε μεγαλύτερη έκταση καλλιεργούνται τα φυτά που προορίζονται για την παραγωγή ελαίων, δηλαδή η σόγια και η αραχίδα που είναι πλούσια σε λίπη (Hema et al., 2014) και που μεταξύ άλλων χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χορτοφαγικών προϊόντων.

1.1. Κατάταξη ψυχανθών

Τα ψυχανθή, βάσει της ανθεκτικότητάς τους στις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν σε μια περιοχή και την εποχή σποράς τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες (Stoddard, 2017): τα χειμερινά και τα εαρινά. Τα χειμερινά καλλιεργούνται κατά τις ψυχρές περιόδους και είναι τα γένη *Lathyrus* (λαθούρι), *Lens* (φακές), *Pisum* (μπιζέλι), *Vavilovia*, *Vicia* (βίκος, κουκιά, ρόβι), *Cicer* (ρεβίθια), *Medicago* (μηδική), *Trigonella*, *Ononis*, *Parochetus*, *Trifolium* και *Melilotus*. Αντιθέτως, τα εαρινά καλλιεργούνται κατά τις θερμές περιόδους και αποτελούν την πλειοψηφία των ψυχανθών όπως τα γένη *Vigna*, *Phaseolus*, *Cajanus* και *Glycine* (σόγια). Η καλλιέργεια των χειμερινών ψυχανθών φαίνεται να είναι λιγότερο αποδοτική σε σχέση με την καλλιέργεια των εαρινών, η οποία είναι ευρέως διαδεδομένη με την σόγια να αποτελεί την πιο σημαντική παγκοσμίως, αλλά για την Ελλάδα μεγάλη αξία έχουν η φασολιά και η αραχίδα.

Προς ανθρώπινη κατανάλωση χρησιμοποιούνται οι σπόροι που παράγονται εντός των λοβών του φυτού και είναι τα όσπρια, η αραχίδα, το λούπινο και η σόγια. Σύμφωνα με τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) τα όσπρια ταξινομούνται σε 11 κατηγορίες:

1. Αποξηραμένα φασόλια: είδη του γένους *Phaseolus* και μερικά του γένους *Vigna* όπως

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

Κοινό φασόλι (*P. vulgaris*), φασόλι γίγαντας (*P. coccineus*), lima/butter bean (*P. lunatus*), adzuki bean (*V. angularis*), ροβίτσα (*V. radiata*), κ.ά.

2. Αποξηραμένα κουκιά (υποείδη του *Vicia faba*)
3. Αποξηραμένα μπιζέλια (είδη του γένους *Pisum*)
4. Ρεβίθια (*Cicer arietinum*)
5. Αμπελοφάσουλα (*Vigna unguiculata*) με 4 υποείδη όπως είναι τα μαυρομάτικα φασόλια (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*)
6. Pigeon pea (*Cajanus cajan*)
7. Φακές (*Lens culinaris*)
8. Bambara beans ή Bambara groundnut (*Vigna subterranean*)
9. Βίκος (*Vicia sativa*)
10. Λούπινα (είδη του γένους *Lupinus*)
11. Λουπά: lablab/hyacinth bean (*Dolichos* spp.), winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*), yam bean (*Pachyrrhizus erosus*), κ.ά.

Τα ψυχανθή αποτελούν μικρού κόστους καλλιέργειες καθώς δεν απαιτούνται ακριβά συστήματα άρδευσης και λίπανσης, είναι ανθεκτικά σε ασθένειες, εχθρούς και δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ ευδοκιμούν σε φτωχά εδάφη (Maphosa & Jideani, 2017), αποτελώντας έτσι οικονομική λύση στα προβλήματα υποσιτισμού που πλήττουν μεγάλο μέρος του ανθρώπινου πληθυσμού. Επίσης, οι ρίζες των ψυχανθών αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Rhizopus*, μετατρέποντας το άζωτο που είναι σε αέρια μορφή και δεν αξιοποιείται σε αμμώνιο. Αυτό μπορούν να το εκμεταλλευτούν τα φυτά για την πρωτεϊνοσύνθεση και ταυτόχρονα να εμπλουτίσουν το έδαφος με θρεπτικά συστατικά καθιστώντας τες έτσι εξαιρετικές καλλιέργειες αμειψισποράς (Voisin et al., 2013, Maphosa & Jideani, 2017).

Ένας ακόμα λόγος που επιλέγονται τα όσπρια ως βασικό μέρος της διατροφής είναι το γεγονός ότι πρόκειται για υψηλής ποιότητας τρόφιμα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία αντιοξειδωτικών, φυτικών ινών, την απουσία κορεσμένων λιπαρών καθώς και τη μεγάλη περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες-διπλάσια από εκείνη των σιτηρών- με τα υψηλότερα ποσοστά πρωτεϊνών να περιέχονται στα λούπινα και στη σόγια (38-45%) (Iqbal et al., 2006, Maphosa & Jideani, 2017). Οι πρωτεΐνες των οσπρίων είναι πλούσιες στο ένα από τα εννέα απαραίτητα αμινοξέα, τη λυσίνη αλλά με εξαίρεση τη σόγια φτωχές σε θειούχα αμινοξέα (sulphur-containing amino acids SCAA) όπως η μεθειονίνη, κυστεΐνη και τρυπτοφάνη, χωρίς αυτό να είναι αρνητικό: τα χαμηλά επίπεδα των SCAA οδηγούν σε αυξημένη κατακράτηση ιόντων ασβεστίου (Iqbal et al., 2006, Maphosa & Jideani, 2017). Το ακριβώς αντίστροφο ισχύει στα σιτηρά, δηλαδή είναι φτωχά σε λυσίνη και πλούσια σε SCAA και επομένως αυτά τα τρόφιμα μπορούν να καταναλωθούν συνδυαστικά. Τέλος, τα ψυχανθή είναι φτωχά σε νάτριο και ταυτόχρονα περιέχουν μέταλλα και

ιχνοστοιχεία όπως είναι κάλιο, μαγνήσιο, φώσφορος, ασβέστιο ψευδάργυρος, σίδηρος, χαλκός, σελήνιο και χρώμιο που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ποικίλες διαδικασίες του οργανισμού (Worrall et al., 2015).

Εκτός από την υψηλή διατροφική αξία τους, τα ψυχανθή είναι ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία και συμβάλλουν στην πρόληψη πληθώρας ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, ο διαβήτης και η παχυσαρκία (Stoddard, 2017). Η κατανάλωσή τους ενδείκνυται για διαβητικούς και για άτομα με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη, καθώς αποτελούν τρόφιμα χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη (glycemic index). Αυτό συμβαίνει διότι το άμυλο τους πέπτεται πιο αργά συγκριτικά με εκείνο των σιτηρών και της πατάτας, απελευθερώνοντας έτσι σταδιακά τη γλυκόζη στο αίμα με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται καλύτερος γλυκαιμικός έλεγχος. Επίσης, οι πρωτεΐνες των ψυχανθών συμβάλλουν στη μείωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (low density lipoproteins), οι οποίες συνδέονται με καρδιακές παθήσεις (Zhang et al., 2010). Τέλος, πρόκειται για τρόφιμα χωρίς γλουτένη επομένως είναι κατάλληλα για τη διατροφή ανθρώπων που πάσχουν από τη νόσο Κουλιοκάκη (Coeliac ή Celiac Disease) καθώς και από άτομα που παρουσιάζουν δυσανεξία στις πρωτεΐνες γλιαδίνη και γλουτενίνη (Marhosa & Jideani, 2017).

Για τους παραπάνω λόγους τα ψυχανθή και τα παράγωγα προϊόντα τους (πχ τόφου) έχουν ενταχθεί στη διατροφή των ανθρώπων παγκοσμίως, με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο να κατέχουν σε αναπτυσσόμενες χώρες της Αφρικής, Ασίας και Νότιας Αμερικής (Marhosa & Jideani, 2017).

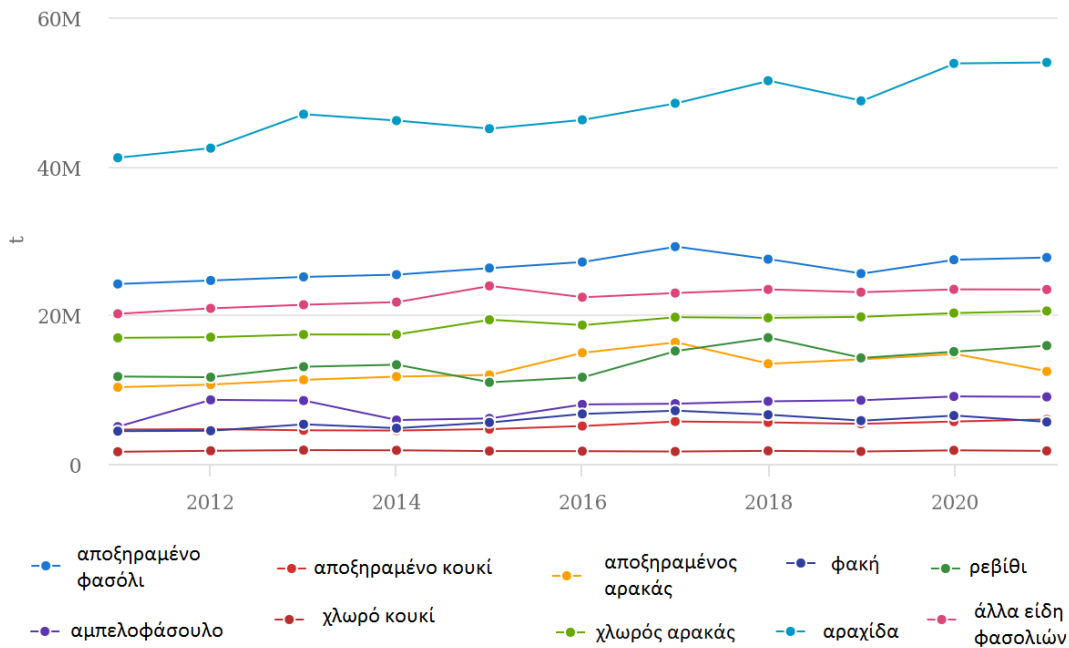
1.2. Καλλιέργεια ψυχανθών παγκοσμίως

Η **σόγια** (*Glycine max*) αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή πρωτογενή τρόφιμα που παράγονται παγκοσμίως, στην οποία σημειώνεται ραγδαία αύξηση την τελευταία δεκαετία, ξεπερνώντας τους 370 εκατομμύρια τόνους το 2021 (FAO/2021), με κύριες χώρες παραγωγής να αποτελούν οι ΗΠΑ, η Βραζιλία και η Αργεντινή. Η **αραχίδα** ακολουθεί επίσης συνεχή ανοδική πορεία τα τελευταία 50 χρόνια και πλέον παράγονται περίπου 54 εκατομμύρια τόνοι από την Κίνα, Ινδία, Νιγηρία, Σουδάν, ΗΠΑ κ.ά., καταλαμβάνοντας έκταση 33 εκατομμυρίων εκταρίων (ha). Όσον αφορά την καλλιέργεια **φασολιών**, σύμφωνα με τα τρέχοντα δεδομένα, αυτή καταλαμβάνει περίπου 36 εκατομμύρια εκτάρια, παράγοντας περισσότερα από 37 εκ. τόνους, εκ των οποίων το μεγαλύτερο μερίδιο της κατέχει η Ινδία και η Βραζιλία παράγοντας 6 και 3 εκατομμύρια τόνους, αντίστοιχα. Το **μπιζέλι** κατάγεται από το Αφγανιστάν και την Αιθιοπία και σύμφωνα με τον FAO ο αποξηραμένος σπόρος αρακά παράγεται κατά κύριο λόγο στον Καναδά και τη Ρωσία, ενώ ο χλωρός στην Κίνα και στην Ινδία σε ποσότητα 12 και 20 εκ. τόνων, αντίστοιχα.

Το **ρεβίθι** αποτελεί το 3^ο σημαντικότερο όσπριο, του οποίου η καλλιέργεια καταλαμβάνει έκταση περίπου 15 εκ. εκτάρια, παράγοντας 16 εκ. τόνους παγκοσμίως έχοντας ανοδική πορεία, με το 56% να αφορά την Ινδία μόνο και δευτερευόντως την Αυστραλία, την Τουρκία, το Πακιστάν, το Μιανμάρ, την Αιθιοπία, το Ιράν, τον Καναδά, τις ΗΠΑ, κ.ά. Αντίστοιχη είναι η έκταση που καταλαμβάνουν τα **αμπελοφάσουλα** αλλά η παραγωγή τους είναι συγκριτικά μικρότερη (περισσότερα από 8 εκ. τόνους

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

ετησίως κατά την τελευταία δεκαετία), το 95% των οποίων λαμβάνει χώρα στην Αφρική. Τα **κουκιά** παράγονται σε μικρότερο βαθμό (περίπου 5 εκ. τόνοι) με κύριες παραγωγούς χώρες την Κίνα, την Αυστραλία, την Αιθιοπία και την Αίγυπτο και τέλος, η καλλιέργεια **λούπινου** είναι εμφανώς μικρότερη (1,5 εκ. τόνοι για το 2021) (FAOSTAT, 2022) . Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται τα δεδομένα που αφορούν την παγκόσμια παραγωγή των ψυχανθών (εκτός της σόγιας) που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση κατά την τελευταία δεκαετία

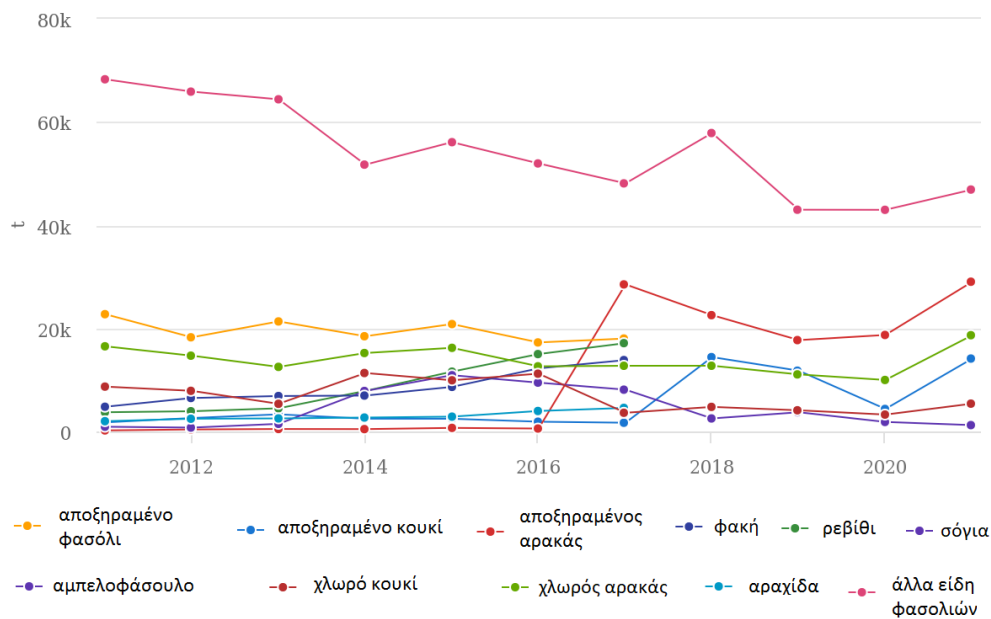


Εικόνα 1 Παγκόσμια παραγωγή των ψυχανθών εξαιρούμενης της σόγιας από το 2011 σε τόνους (Πηγή: FAOSTAT).

1.3. Καλλιέργεια των ψυχανθών στην Ελλάδα

Όσον αφορά την παραγωγή των ψυχανθών στην Ελλάδα (Εικ. 2), αυτή είναι περιορισμένη και η πλειοψηφία αυτών εισάγονται από άλλες χώρες. Σύμφωνα με τα δεδομένα του FAO για το 2021, η παραγωγή αρακά (χλωρού και αποξηραμένου) ανέρχεται συνολικά στους περίπου 47.600 τόνους και σε μικρότερο βαθμό ακολουθούν η καλλιέργεια κουκιών και σόγιας (19.500 και 5.390 τόνοι, αντίστοιχα) (FAO, 2021).

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή



Εικόνα 2 Παραγωγή των ψυχανθών στην Ελλάδα την τελευταία δεκαετία (Πηγή: FAOSTAT).

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η παραγωγή αλλά και έκταση των ψυχανθών στη χώρα μας για τα έτη 2019-2021, σύμφωνα με τον Οργανισμό Πληρωμών και Ελέγχου Κοινοτικών Ενισχύσεων Προσανατολισμού και Εγγυήσεων (ΟΠΕΚΕΠΕ). Η καλλιέργεια τριφυλλιών και μηδικής καταλαμβάνει την πρώτη θέση στην ετήσια παραγωγή και την έκταση και φαίνεται να ξεπερνάει τα όσπρια. Οι βασικές Περιφερειακές Ενότητες (Π.Ε.) που καλλιεργούν μηδική και είδη τριφυλλιού είναι αυτές των Σερρών, Αιτωλοακαρνανίας, Τρικάλων, Κιλκίς και Κοζάνης, ενώ για τα υπόλοιπα σανοδοτικά και χορτοδοτικά ψυχανθή οι Π.Ε. Σερρών, Κιλκίς, Γρεβενών, Πέλλας, Καβάλας, Ηρακλείου και Έβρου. Όσον αφορά τα όσπρια, τη μεγαλύτερη έκταση καταλαμβάνει η καλλιέργεια βίκου και ακολουθούν τα λούπινα και οι φακές, στις οποίες παρατηρείται μια μικρή αλλά σταθερή αύξηση και παράγονται κυρίως στις εξής Π.Ε.: Θεσσαλονίκης, Λάρισας, Χαλκιδικής, Κιλκίς, Γρεβενών, Φθιώτιδας, Κοζάνης και Σερρών.

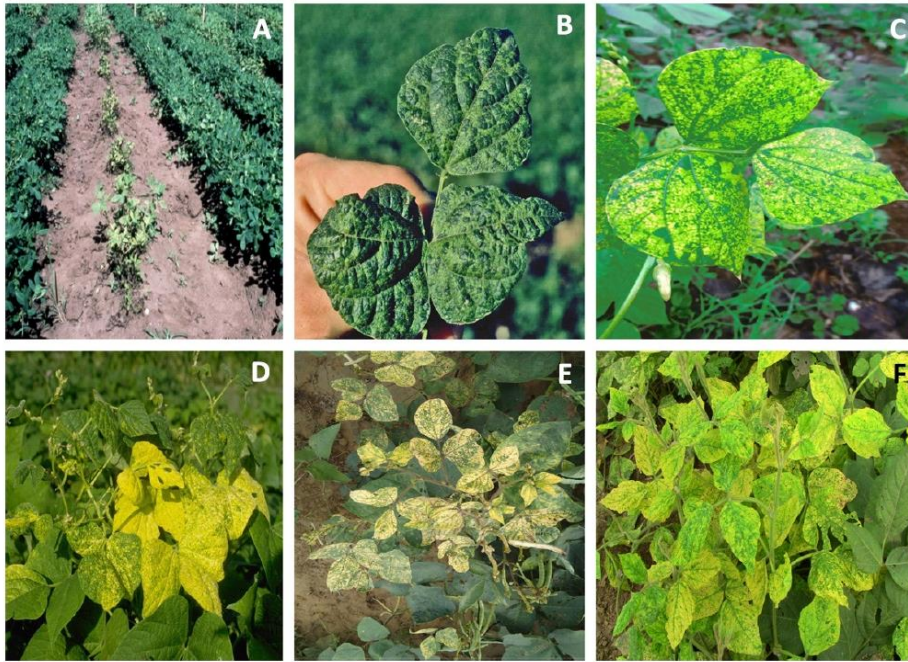
Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

Πίνακας 1 Ετήσια έκταση (εκτάρια, ha) και παραγωγή ψυχανθών (τόνοι, tn) στην Ελλάδα, για τα έτη 2019, 2020, 2021 (ΟΠΕΚΕΠΕ).

	Έκταση (ha)			Παραγωγή (tn)		
	2021	2020	2019	2021	2020	2019
Σύνολο Οσπρίων για καρπό	132.664	133.309	128.878	19.934	18.887	17.279
Μπιζέλια κτηνοτροφικά	18.370	14.955	12.855	2.847	2.485	1.737
Κουκιά, Λαθούρια	4.044	2.554	3.667	1.386	450	1.155
Λούπινα	11.611	13.417	15.278	1.553	2.137	2.246
Βίκος	65.702	67.119	62.728	8.481	8.651	7.650
Ρόβη	56	82	74	5	10	8
Μπιζέλια, Αρακάς	1.675	1.746	1.521	304	301	220
Φακές	11.594	11.375	11.193	1.180	1.035	1.035
Ρεβίθια	9.947	12.089	12.657	2.291	1.468	1.398
Αραχίδα	1.163	1.726	1.549	446	659	586
Φασόλια ξηρά	7.041	6.844	6.284	1.215	1.464	1.070
Φασόλια μαυρομάτικα	223	305	238	43	63	46
Φάβα Θήρας	567	534	388	82	77	56
Φάβα	669	562	446	101	88	71
Σόγια για καρπό	696	826	799	92	144	335
Σόγια (Ενεργειακές Καλλιέργειες)	1.586	2.725	2.876	730	1.252	1.409
Σανοδοτικά, Χορτοδοτικά ετήσια						
Ψυχανθή	10.138	26.004	44.525	2.806	13.494	13.431
Τριφύλλια, Μηδική	137.966	168.820	189.276	105.683	148.000	139.253

2. Ιοί ψυχανθών

Οι ιολογικές ασθένειες αποτελούν την βασική αιτία οικονομικής ζημιάς και απώλειας της παραγωγής από βιοτικό παράγοντα στις καλλιέργειες ψυχανθών. Αναλυτικότερα, τα ψυχανθή επηρεάζονται από περισσότερους από 168 ιούς που ανήκουν σε 39 γένη και 16 διαφορετικές οικογένειες (Chatzivassiliou, 2021), αποτέλεσμα των οποίων είναι σημαντικές οικονομικές απώλειες καθώς μειώνεται η απόδοση της καλλιέργειας και συχνά οι παραγόμενοι σπόροι είναι υποβαθμισμένης ποιότητας (Hema et al., 2014). Όμως, τα συμπτώματα (Εικ. 3) και το μέγεθος της ζημιάς που αυτοί προκαλούν ποικίλει ανάλογα την περιοχή, την εποχή της μόλυνσης το στέλεχος/παθότυπο του ιού, το φορτίο του, αλλά και από το γενότυπο του φυτού και τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη μόλυνση (περιβαλλοντικές και θρέψης) (Makkouk et al., 2012, Hema et al., 2014). Επίσης, οι ιοί που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες παρουσιάζουν διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά όπως είναι το εύρος ξενιστών και ο τρόπος μετάδοσης τους, πληροφορίες πολύ σημαντικές για την πρόληψη και την αντιμετώπισή τους.



Εικόνα 3 Χαρακτηριστικά συμπτώματα ιολογικών ασθενειών στα ψυχανθή: Α) Νανισμός που προκαλείται από την Ασθένεια της ροζέτας της αραχίδας, (GRD) σε σύγκριση με τα υγιή (εκατέρωθεν), Β) παραμορφώσεις φύλλων φασολιού λόγω του bean common mosaic virus (BCMV), C) μωσαϊκά που προκαλούνται στα φύλλα φασολιού από το bean yellow mosaic virus (BYMV), D) Συμπτώματα ίκτερου σε φύλλα φασολιού λόγω του bean golden mosaic virus (BGMV), E) μωσαϊκά σε φύλλα ροβίτσας λόγω του mungbean yellow mosaic disease (MYMD) και F) μωσαϊκά σε φύλλα σόγιας που προκαλούνται από τον soybean mosaic virus (SbMV) (Patil, 2021).

2.1. Ιοί των ψυχανθών παγκοσμίως

Γενικότερα, ως οι πιο διαδεδομένοι και επιζήμιοι ιοί των ψυχανθών παγκοσμίως έχουν αναφερθεί οι εξής: ο ιός του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς (bean common mosaic virus, BCMV), ο ιός του μωσαϊκού της σόγιας (soybean mosaic virus, SbMV), ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) και ο ιός του μωσαϊκού της μηδικής (alfalfa mosaic virus, AMV). Σημαντικές απώλειες προκαλούν επίσης ο ιός της ποικιλοχλώρωσης της αραχίδας (peanut mottle virus, PeMoV), ο ιός της ράβδωσης της αραχίδας (peanut stripe virus, PStV), ο ιός του μωσαϊκού του μπιζελιού (pea seed-borne mosaic virus, PSbMV) και ο ιός του κίτρινου μωσαϊκού της φασολιάς (bean yellow mosaic virus, BYMV).

Αναλυτικότερα, την **αραχίδα** έχει βρεθεί ότι μολύνουν περισσότεροι από 32 ιοί (Patil, 2021), εκ των οποίων υπεύθυνοι για τις πιο σημαντικές οικονομικές ζημιές φαίνεται να είναι: ο CMV και ο BCMV που προκαλούν κίτρινα μωσαϊκά, ο ιός του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας (Tomato spotted wilt orthotospovirus, TSWV) που είναι εξαπλωμένος παγκοσμίως και μπορεί να μειώσει την απόδοση της καλλιέργειας έως και κατά 100%, ο ιός του νανισμού της αραχίδας (peanut stunt virus, PSV) που αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1966 και είναι υπεύθυνος για τη μείωση της παραγωγής της καλλιέργειας και ο οποίος έχει βρεθεί πρόσφατα και στην Ελλάδα (Τσαπικούνη, 2022) και ο ιός της νέκρωσης των οφθαλμών της αραχίδας (peanut bud necrosis virus, PBNV) που περιορίζεται σε χώρες της Ασίας. Επίσης ο

ιός της ράβδωσης του καπνού (tobacco streak virus, TSV), ο οποίος δεν έχει καταγραφεί στην Ελλάδα αλλά είναι διαδεδομένος στην Ινδία, Πακιστάν, Νότια Αφρική και Βραζιλία και προκαλεί την ασθένεια «stem necrosis disease» με συμπτώματα που περιλαμβάνουν νέκρωση του στελέχους και των μίσχων (Patil, 2021), ενώ οι peanut clump virus (PCV) και Indian peanut clump virus (IPCV) πλήττουν καλλιέργειες σε χώρες της Ασίας και Αφρικής προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες. Τις αραχίδες μολύνουν ακόμα ο PeMoV, που δεν έχει καταγραφεί στην Ευρώπη και ο PStV, οι οποίοι προκαλούν συμπτώματα που προσομοιάζουν μεταξύ τους και περιλαμβάνουν την εμφάνιση λωρίδων και κηλίδων και μολύνουν επίσης το κοινό φασόλι, τη σόγια, τα αμπελοφάσουλα, το μπιζέλι και το λευκό λούπινο και τέλος, η Ασθένεια της ροζέτας της αραχίδας (groundnut rosette disease, GRD) που αποτελείται από ένα σύμπλεγμα 3 ιών (Hema et al., 2014).

Όσον αφορά συνολικά τους ιούς που προσβάλλουν τη **μηδική**, έχουν αναφερθεί περισσότεροι από 36 ιοί, που ανήκουν σε 24 γένη, με τον πιο διαδεδομένο να είναι ο AMV. Η παρουσία του αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1931, στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ και ευθύνεται για κίτρινες ποικιλοχλωρώσεις-παραμόρφωση φύλλων και νανισμό του φυτού, συμπτώματα τα οποία εντείνονται κάτω από συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών. Ο ιός του καρουλιάσματος των φύλλων της μηδικής (alfalfa leaf curl virus, ALCV), ο οποίος έχει αναφερθεί σε μηδική και στην Ελλάδα (Davoodi et al., 2018) προκαλεί επίσης νανισμό των φυτών αλλά και καρούλιασμα/παραμόρφωση και συρρίκνωση φύλλων (Chatzivassiliou, 2021). Σημαντικές επιπτώσεις στην καλλιέργεια έχουν επίσης οι εξής ιοί: CMV, ιός της παροδικής ράβδωσης της μηδικής (lucerne transient streak virus, LTSV), lucerne Australian latent virus (LALV), ο ιός του καρουλιάσματος των φύλλων της φασολιάς (bean leafroll virus, BLRV), ο ιός του δυτικού ίκτερου των τεύτλων (beet western yellows virus, BWYV), ο ιός του νανισμού της σόγιας (soybean dwarf virus, SbDV) και ο ιός του ίκτερου του γογγυλιού (turnip yellows virus, TuYV).

Τα φυτά **μπιζελιού** μολύνονται από περισσότερους από 42 ιούς παγκοσμίως, με τους πιο σημαντικούς να αποτελούν οι BLRV, AMV, BWYV, καθώς και οι BYMV και PSbMV του γένους *Potyvirus* οι οποίοι προκαλούν κυρίως καρούλιασμα, μωσαϊκά και χλώρωση των νεύρων των φύλλων και νανισμό, καθώς και ο ιός του μωσαϊκού με γλωσσίδα του αρακά (PEMV) που αποτελείται από σύμπλεγμα δύο ιών: pea enation mosaic virus PEMV-1 και PEMV-2 του γένους *Enamovirus* και *Umbravirus*, αντίστοιχα (Makkouk et al., 2012, Hema et al., 2014). Ως διαδεδομένοι αναφέρονται επίσης ο ιός της πρώιμης καστάνωσης του αρακά (pea early browning virus, PEBV), ο ιός του νεκρωτικού νανισμού με ίκτερο του αρακά (pea necrotic yellow dwarf virus, PNYDV), ο ιός της ράβδωσης του αρακά (pea streak virus), ο TuYV και ο ιός του μωσαϊκού των νεύρων του κόκκινου τριφυλλιού (red clover vein mosaic virus, RCMV) (Chatzivassiliou, 2021).

Τα **φασόλια** αποτελούν ξενιστές περισσότερων από 83 ιών παγκοσμίως, αλλά οικονομικής σημασίας είναι πρωτίστως ο BCMV και ο συγγενής του, ο ιός του κοινού μωσαϊκού με νέκρωση της φασολιάς (bean

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

common mosaic necrosis virus, BCMNV), ο οποίος αρχικά είχε θεωρηθεί φυλή του BCMV, του γένους *Potyvirus*. Θεωρούνται οι πιο καταστρεπτικοί για το κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), μπορούν να προκαλέσουν ζημιά που αγγίζει το 80% (Tang & Feng, 2022) και παρουσιάζουν δύο βασικούς τύπους συμπτωμάτων: μωσαϊκά και συστροφές στα φύλλα (Εικ. 4β) και νέκρωση στελέχους, γνωστή ως “black root”. Ο ιός αυτός είναι διαδεδομένος παγκοσμίως, αλλά και στην Ελλάδα. Επίσης έχουν αναφερθεί αρκετοί αναδυόμενοι ιοί του γένους *Begomovirus* (οικογένεια *Geminiviridae*) όπως είναι ο ιός του χρυσού μωσαϊκού της φασολιάς (bean golden mosaic virus, BGMV), ο ιός του χρυσού κίτρινου μωσαϊκού της φασολιάς (bean golden yellow mosaic virus, BGYMV), ο ιός του μωσαϊκού με νανισμό της φασολιάς (bean dwarf mosaic virus, BDMV), ο ιός της θερινής νέκρωσης της φασολιάς (bean summer death virus), ο ιός του κίτρινου νανισμού της φασολιάς (bean yellow dwarf virus) και ιός του μωσαϊκού *calico* της φασολιάς (bean calico mosaic virus, BCaMV) (Chatzivassiliou, 2021), που μεταδίδονται με τον αλευρώδη *Bemisia tabaci*. Τα φυτά φασολιού μολυσμένα με τους Begomo-ιούς εμφανίζουν συμπτώματα ίκτερου και κίτρινων μωσαϊκών και πλήττουν κυρίως χώρες της Καραϊβικής (πχ Δομινικανή Δημοκρατία), της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (πχ Βραζιλία, Μεξικό), όμως το μέγεθος της οικονομικής ζημιάς τους δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα (Hema et al., 2014). Τέλος, ως σημαντικοί ιοί για το φασόλι επίσης αναφέρονται και ο BYMV, που είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση καρουλιάσματος και κίτρινης κηλίδωσης των φύλλων, ο AMV που προκαλεί μωσαϊκά και ποικιλοχλωρώσεις (Εικ. 4α), ο ιός των κίτρινων νεύρων του τριφυλλιού (clover yellow vein virus, CIYVV) (Jha et al., 2023) και ο CMV που προκαλούν παραμορφώσεις και μεταχρωματισμούς (Εικ. 4γ).



Εικόνα 4 Συμπτώματα ιολογικών προσβολών σε φύλλα φυτών φασολιού. (α) κίτρινο μωσαϊκό λόγω προσβολής από τον alfalfa mosaic virus (AMV), (β) καρούλιασμα λόγω προσβολής από τον bean common mosaic virus (BCMNV) και (γ) σκούρος πράσινος περινεύριος μεταχρωματισμός λόγω προσβολής από τον cucumber mosaic virus (CMV) (Παπακώστα-Τασσοπούλου, 2012).

Στα φυτά **κουκιού**, από τους 50 ιούς που έχουν βρεθεί παγκοσμίως, στη Μεσόγειο έχουν καταγραφεί 20, εκ των οποίων σημαντική απειλή αποτελούν οι εξής: ο ιός του νεκρωτικού ίκτερου του κουκιού (faba bean necrotic yellows virus, FBNYV), BLRV, BYMV και ο ιός της ποικιλοχλώρωσης του κουκιού (broad bean mottle virus, BBMV) και δευτερευόντως ο ιός του νεκρωτικού νανισμού των κουκιών (faba bean necrotic stunt virus, FBNSV) ο ιός της κηλίδωσης των κουκιών (broad bean stain virus, BBSV), ο ιός του μαρασμού των κουκιών (broad bean wilt virus, BBWV) και ο AMV. Τα **αμπελοφάσουλα** έχει αναφερθεί ότι μολύνουν περισσότεροι από 33 ιοί, εκ των οποίων ευρεία εξάπλωση στις παραγόμενες χώρες έχουν οι σπορομεταδιδόμενοι BCMV- η φυλή του μωσαϊκού του αμπελοφάσουλου (BCMV- blackeye cowpea

mosaic strain, BCMV-BICM), ιός του αφιδομεταδιδόμενου μωσαϊκού του αμπελοφάσουλου (cowpea arhoid-borne mosaic virus, CABMV), οι οποίοι προκαλούν μεσονεύριες ή χλωρώσεις των νεύρων και ο CMV. Ως σημαντικοί αναφέρονται επίσης ο ιός της ποικιλοχλώρωσης του αμπελοφάσουλου (cowpea mottle virus, CPMoV), ο ιός του μωσαϊκού του αμπελοφάσουλου (cowpea mosaic virus, CPMV), ο ιός του σοβαρού μωσαϊκού του αμπελοφάσουλου (cowpea severe mosaic virus, CPSMV) και ο ιός του μωσαϊκού του μαυροφάσουλου (southern bean mosaic virus) (Patil, 2021, Hema et al., 2014) καθώς και οι αφιδομεταδιδόμενοι ιός της χλωρωτικής ποικιλοχλώρωσης των κουκιών (cowpea chlorotic mottle virus, CCMV) και ο ιός του χρυσού μωσαϊκού των κουκιών (cowpea golden mosaic virus, CGMV).

Οι ιοί μεγάλης οικονομικής αξίας που προσβάλλουν τα **ρεβίθια** προκαλούν την ασθένεια γνωστή ως “stunt disease” με συμπτώματα κυρίως νανισμού, μικροφυλλίας, καρουλιάσματος και κιτρινίσματος φύλλων (Hema et al., 2014, Jha et al., 2023). Πρόκειται για μια αναδυόμενη απειλή για την καλλιέργεια αυτή, με απώλειες της παραγωγής που αγγίζουν μέχρι και το 95%. Υπεύθυνοι για την ασθένεια αυτή είναι ο ιός του χλωρωτικού νανισμού του ρεβιθίου (chickpea chlorotic stunt virus, CrCSV) και ο ιός του χλωρωτικού νανισμού του ρεβιθίου (chickpea chlorotic dwarf virus, CrCDV) (Jha et al., 2023). Επίσης ως σημαντικές απειλές της καλλιέργειας των ρεβιθιών αναφέρονται και οι εξής ιοί (Chatzivassiliou, 2021):

- α) οι αφιδομεταδιδόμενοι BWYV, ιός του αφιδομεταδιδόμενου ίκτερου των κολοκυνθοειδών (cucurbit arhoid borne yellows virus, CABYV), και ιός του καρουλιάσματος των φύλλων με νανισμό του βαμβακιού (cotton leaf roll dwarf virus, CLRDV) του γένους *Polerovirus*, οι ιός του νανισμού του ρεβιθίου (chickpea stunt luteovirus, CrLV) και BLRV του γένους *Luteovirus*, (Chatzivassiliou, 2021, Hema et al., 2014) καθώς και πληθώρα ιών του γένους *Nanovirus* όπως είναι οι FBNYV, ιός των κίτρινων φύλλων των κουκιών (faba bean yellow leaf virus, FBYL) και FBNSV που προκαλούν κυρίως μωσαϊκά και ποικιλοχλωρώσεις (Chatzivassiliou, 2021).
- β) οι αλευρομεταδιδόμενοι ιοί του γένους *Mastrevirus* (οικογένεια *Geminiviridae*): ο ιός της χλώρωσης του ρεβιθίου (chickpea chlorosis virus, CrCV), ο ιός των κόκκινων φύλλων του ρεβιθίου (chickpea redleaf virus, CrRLV) και ο ιός του ίκτερου του ρεβιθίου (chickpea yellows virus, CrYV).

Τέλος, οι κυριότεροι ιοί που μολύνουν τα φυτά **φακής** μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες βάσει των συμπτωμάτων που προκαλούν (Hema et al., 2014):

- α) Ιοί που προκαλούν ίκτερο, νανισμό, νεκρώσεις καθώς και καρούλιασμα φύλλων. Οι πιο επιζήμιοι είναι οι BLRV, BWYV, FBNYV, CrCSV, και SbDV.
- β) Ιοί που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση μωσαϊκών και ποικιλοχλωρώσεων, που προσομοιάζουν εκείνων που προκαλούνται από θρεπτικές διαταραχές και τοξικότητες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι CrCDV, PSbMV, CMV, PEMV-1, BYMV, AMV και BBSV.

Τα ζιζάνια, τα αυτοφυή καθώς και οι πολυετείς καλλιέργειες ψυχανθών όπως η μηδική, το τριφύλλι και ο βίκος αποτελούν εστίες μόλυνσης πολλών ιών, οι οποίοι μπορούν στη συνέχεια να μεταδοθούν στη

βασική καλλιέργεια, ειδικά στις περιπτώσεις εκείνων που μεταδίδονται με τη βοήθεια φορέων (Chatzivassiliou, 2021).

2.2. Ιοί των ψυχανθών στην Ελλάδα

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στα ψυχανθή που καλλιεργούνται ως επί το πλείστον στη χώρα μας έχουν δείξει την παρουσία πληθώρας ιών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη. Ωστόσο, τα διαθέσιμα δεδομένα που αφορούν την παρουσία των ιών σε καλλιέργειες ψυχανθών στην Ελλάδα είναι περιορισμένα και αποσπασματικά, λόγω της έλλειψης εκτεταμένων μελετών και αποτελεί σημαντικό αντικείμενο έρευνας στο μέλλον λόγω και της σημασίας της καλλιέργειας των ψυχανθών για την Ελλάδα.

Στη χώρα μας σε φυτά **κουκιών** έχει βρεθεί σε μεγάλο ποσοστό η παρουσία των εξής ιών: BLRV (Σαρέλη, 2015), ο BYMV (Χατζηβασιλείου κ.ά., 2012, Κοκκίνης, 2002), ο AMV, οι CMV, ο PEMV, και ο PSbMV (Σαρέλη, 2015), ενώ κατά τη δεκαετία του '90 βρέθηκε ότι ο ιός της κίτρινης δακτυλοειδούς κηλίδωσης της αγκινάρας (artichoke yellow ringspot virus, AYRSV) ο οποίος εκτός από φυτά φασολιάς μολύνει επίσης και τα κουκιά (Κοκκίνης, 2002). Έχει αναφερθεί ακόμα η παρουσία του BBWV, του BBSV και του BWYV (Τερζάκης, 2002).

Όσον αφορά τις καλλιέργειες **μηδικής**, σύμφωνα με τους Angelis and Katis (1989), ο πιο διαδεδομένος ιός της Ελλάδας αποτελεί ο AMV πιθανόν λόγω της διακίνησης μολυσμένων και μη πιστοποιημένων σπόρων, ευρήματα τα οποία συμφωνούν και με εκείνα του Οικονόμου (2018). Επίσης, μετά την εξέταση φυτών μηδικής από καλλιέργειες από όλη τη χώρα, η Τσαπικούνη (2022) ανέφερε ότι στο υψηλότερο ποσοστό βρέθηκε ο AMV ,με εντονότερη παρουσία στις Σέρρες και στην Ξάνθη, ακολουθούμενος από τον CMV και Poty-ιούς. Στη μηδική έχει αναφερθεί επίσης ο BLRV σε σημαντικό βαθμό (Οικονόμου, 2018, Χατζηβασιλείου κ.ά., 2012, Καστόρα, 2022), καθώς και οι PEMV (Οικονόμου, 2018, Σαρέλη κ.ά., 2016), ο BYMV (Οικονόμου, 2018, Καστόρα, 2022), ο BGMV (Καστόρα, 2022), CMV (Οικονόμου, 2018) και FBNYV (Καστόρα, 2022). Στα φυτά **αραχίδας** στην Ελλάδα φαίνεται ότι ο πιο συνηθισμένος ιός είναι επίσης ο AMV (Τσαπικούνη, 2022) και ο FBNYV (Καστόρα, 2022) αλλά έχουν βρεθεί και ο TSWV (Chatzivassiliou et al., 1996), ο CMV (Τσαπικούνη, 2022) ο BLRV, ο BWYV, και ο BGMV (Καστόρα, 2022).

Σε δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν το 1994-1997 από τον Κοκκίνη (2002) και το 2011-2012 από τους Χατζηβασιλείου κ.ά. (2012), σε φυτά κοινού **φασολιού** (*P.vulgaris*) και φασολιού γίγαντας (*P.coccineus*) προέκυψε ότι ο πιο συχνά απαντώμενος ιός στην Ελλάδα είναι ο CMV και ακολουθεί ο BCMV. Η πιο έντονη παρουσία του BCMV, σε ποσοστό 19,8%, παρατηρήθηκε στα κοινά φασόλια και επικρατεί στις Π.Ε. Πέλλας και Θεσσαλονίκης, ενώ στα φασόλια γίγαντες στο Κιλκίς. Επίσης έχουν ανιχνευτεί και ο BYMV σε κοινά φασόλια και ο AMV σε κοινά φασόλια και σε γίγαντες (Χατζηβασιλείου κ.ά., 2012, Κοκκίνης, 2002). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται από τον Σταυριανό (2013), έπειτα από εξέταση διάφορων ειδών φασολιάς στα οποία ανιχνεύτηκε ο CMV σε ποσοστό 23,1%, ο BCMV (15,8%) και οι δύο κυρίως στη

Π.Ε. Αργολίδας και Πιερίας ενώ ο πρώτος και στην Πρέβεζα. Δευτερευόντως ανιχνεύτηκαν και οι AMV (6,9%), BLRV (4%), BYMV (2,4%). Η παρουσία του BCMNV στην Ελλάδα καταγράφηκε για πρώτη φορά από τον Σταυριανό (2013) σε μικρό ποσοστό (0,8%) σε δείγματα που προέρχονταν από τις Π.Ε. Αργολίδος και Πιερίας.

Φυτά κοινού **βίκου** με συμπτώματα ίκτερου και μειωμένου αριθμού λοβών και φυτά **ρόβης** με κοκκίνισμα φύλλων παρατηρήθηκαν στη Θεσσαλονίκη και η μοριακή ανάλυση αυτών υπέδειξε την παρουσία του BLRV (γένος *Luteovirus*). Επίσης ο BLRV φάνηκε να είναι υπεύθυνος για τη μεσονεύρια χλώρωση φύλλων που στη συνέχεια εξελίχθηκε σε ολική χλώρωση που παρατηρήθηκε σε φυτά μηδικής στα Γρεβενά (Lotos et al., 2021), ενώ ο ιός ήταν παρόν στο 37% των συμπτωματικών κουκιών που ελέγχθηκαν στο ΓΠΑ στα πλαίσια πτυχιακής διατριβής (Σαρέλη, 2015).

Σε επισκοπήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας από τους Chatzivassiliou et al. (2016) για τα έτη 2007-2009 και 2010-2012 σε αγρούς με συμπτωματικά φυτά **φακής**, φάνηκε ότι οι πιο συχνά απαντώμενοι ιοί είναι οι PEMV-1 και BLRV. Αναλυτικότερα, τα έτη 2007-2009 συλλέχθηκαν 1216 δείγματα στα οποία εντοπίστηκαν ο PSbMV (σε ποσοστό 4,9%), ο AMV (2,4%) και ο BYMV (1%). Σε 274 δείγματα από αυτά όμως, ο BLRV ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 38,8%. Στη συνέχεια κατά τις χρονιές 2010-2012, υψηλότερη παρουσία είχε πάλι ο BLRV (στο 36,1%) στις Π.Ε. Έβρου, Κοζάνης και Λάρισας και στη συνέχεια ο PEMV-1 (35%) στην περιοχή της Κορίνθου και στην Αττική (στο χώρο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών). Σε μικρότερο ποσοστό ανιχνεύτηκαν επίσης οι BYMV (3,9%) με εντονότερη παρουσία στην Κοζάνη και οι CMV, PSbMV και AMV, με ποσοστά εμφάνισης 2,8%, 2,2% και 2,2% αντίστοιχα.

Τέλος, σε φυτά **ρεβιθιού** στη χώρα μας έχει βρεθεί ο BYMV (Χατζηβασιλείου κ.ά., 2012), ο BWYV και ο ιός του μωσαϊκού του μαρουλιού (Lettuce mosaic rotynivirus, LMV) (Τερζάκης, 2002), ενώ στα φυτά **αρακά** έχουν καταγραφεί μολύνσεις σε μεγάλο ποσοστό από τους PEMV και BLRV (Σίσκος, 2015, Γαϊτάνης, 2020, Χατζηβασιλείου κ.ά., 2012), ενώ έχουν αναφερθεί επίσης οι PSbMV (Chatzivassiliou et al., 2002), CMV και BYMV (Σίσκος, 2015).

3. Αντιμετώπιση ιολογικών προσβολών

Η γνώση και κατανόηση της επιδημιολογίας και της μοριακής βιολογίας ενός ιού είναι το πρωταρχικό βήμα για την εύρεση μια στρατηγικής περιορισμού στα πλαίσια μιας ολοκληρωμένης διαχείρισης του παθογόνου, με συνδυασμό μεθόδων που περιλαμβάνουν καλλιεργητικά μέσα, γενετική βελτίωση των φυτών αλλά και χημικά μέσα. Ως βασικά μέσα περιορισμού των ιών αναφέρονται τα εξής (Astier, 2007):

- Εξασφάλιση σπόρων και πολλαπλασιαστικού υλικού απαλλαγμένων από ιούς.
- Χρήση ανθεκτικών ή βελτιωμένων ποικιλιών που παρέχουν ανθεκτικότητα έναντι ενός ιού ή εύρους ιών.

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

- Αποφυγή εγκατάστασης καλλιεργειών σε μολυσμένες περιοχές.
- Απομάκρυνση ζιζανίων και αυτοφυών φυτών εντός και περιφερειακά της καλλιέργειας που είτε εμφανίζουν συμπτώματα είτε όχι, καθώς αποτελούν εστίες μόλυνσης του ιού και διαχείμανσης του φορέων.
- Περιορισμός ή/και αντιμετώπιση φορέων, με συνδυασμό μεθόδων. Για τους μη έμμονους η αντιμετώπιση βασίζεται σε καλλιεργητικά μέτρα: φυτά φράχτες (φυτά όχι ξενιστές του ιού που προσελκύουν πιθανούς φορείς και να διατρέφονται μέχρι να χάσουν την ιοφόρο ικανότητα τους), εδαφοκάλυψη με πλαστικό στα νεαρά στάδια της καλλιέργειας και τη χρήση αρπακτικών και παρασιτοειδών. Στην περίπτωση των έμμονων ιών η χρήση χημικών σκευασμάτων είναι αποτελεσματική μέθοδος πρόληψης και αντιμετώπισης.

4. Οικογένεια *Potyviridae*

Η οικογένεια *Potyviridae* αποτελεί μια από τις πολυπληθέστερες οικογένειες RNA ιών, περιλαμβάνοντας σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή της Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), περισσότερα από 230 είδη (Inoue-Nagata et al., 2022) ταξινομημένα σε 12 γένη (Πιν. 2), τα οποία παρουσιάζουν κάποιες διαφορές μεταξύ τους ως προς τον τρόπο μετάδοσης, το εύρος ξενιστών και την οργάνωση του γονιδιώματος. Η ταξινόμηση των ειδών στην οικογένεια αυτή έχει πραγματοποιηθεί βάσει των κοινών χαρακτηριστικών τους, τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2 Χαρακτηριστικά της οικογένειας Potyviridae (Inoue-Nagata et al., 2022, Wylie et al., 2017, López-Moya & García, 1999).

Ισοσμάτια	Ραβδόμορφα χωρίς φάκελο, μήκους 650-950 nm & διαμέτρου 11-20nm Ελικοειδής συμμετρία, 2000 μόρια καψιδιακής πρωτεΐνης
Γονιδίωμα	+ssRNA, μέγεθος 8.2-11.5 kb Μονομερές (εξαιρέση το γένος <i>Bymovirus</i> με διμερές)
Πολλαπλασιασμός	Στο κυτταρόπλασμα
Μετάφραση	Από γενωμικά RNA μέσω μιας πολυπρωτεΐνης
Εύρος ξενιστών	Φυτά
5' άκρο	VPG
3' άκρο	Παρουσία πολύ-Α ουράς

Σχετικά με τον τρόπο μετάδοσής τους, αυτός διαφέρει μεταξύ των γενών ωστόσο οι ιοί της οικογένειας αυτής στη φύση μεταδίδονται κυρίως μέσω των αρthropόδων φορέων τους, (Wylie et al., 2017), αλλά έχει καταγραφεί και σπορομετάδοση σε ορισμένους από αυτούς (Πιν. 3).

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

Πίνακας 3 Τα γένη της οικογένειας *Potyviridae*, καθώς και το αντιπροσωπευτικό είδος-μέλος, ο αριθμός των ειδών, τις διαστάσεις των ισωματίων, το μέγεθος του γονιδιώματος και ο τρόπος μετάδοσης του καθενός, σύμφωνα με την αναφορά του 2022 (MSL38) της ICTV. (ME): Μη-έμμοнос τρόπος μετάδοσης, (HE) Ημι-έμμοнос τρόπος μετάδοσης

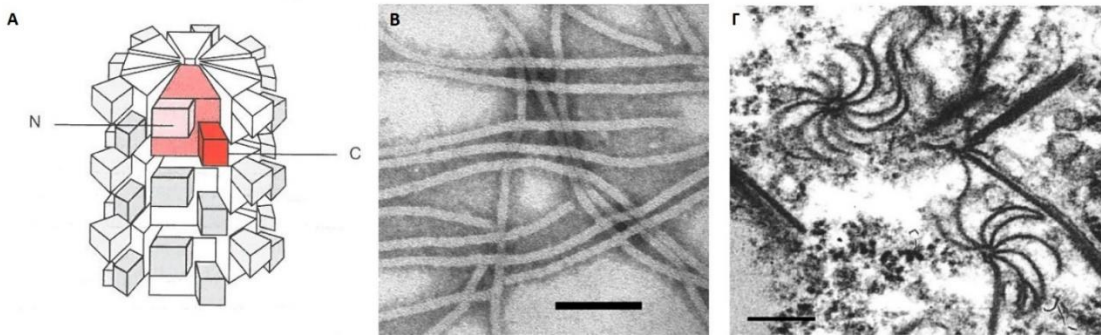
Γένος	Αντιπροσωπευτικό μέλος	Αριθμός ειδών	Διαστάσεις ισωματίου/ων	Μέγεθος γονιδιώματος	Τρόπος μετάδοσης
<i>Areparavirus</i>	Areca palm necrotic ringspot virus, ANRSV	2	780×15nm.	9.4 kb	Άγνωστος- Πιθανώς έντομα
<i>Bevemovirus</i>	Bellflower veinal mottle virus, BVMoV	1	Μήκος 760 nm	8,259 nt	Άγνωστος-Πιθανώς αφίδες
<i>Brambyvirus</i>	Blackberry virus Y, BIVY	1	800×11-15nm	11 kb	Άγνωστος
<i>Bymovirus</i>	Barley yellow mosaic virus, BaYMV	6	250-300×13 nm & 500-600×13 nm	7.2–7.6 kb & 2.3–3.7 kb	<i>Polymyxa graminis</i>
<i>Celavirus</i>	Celery latent virus, CelV	1	Μήκος 885–900 nm	11.5 kb	Σπόροι
<i>Ipomovirus</i>	Sweet potato mild mottle virus, SPMMV	7	Μήκος 800–950 nm	9.7 kb	<i>Bemisia tabaci</i> (ME)
<i>Macluravirus</i>	Maclura mosaic virus, MacMV	11	650-675×13-16nm	8.0 kb	Αφίδες (ME)
<i>Poacevirus</i>	Triticum mosaic virus, TriMV	3	890×15 nm	9.7–10.2 kb	Ακάρεα (HE)
<i>Potyvirus</i>	Potato virus Y, PVY	201	680-900×11-13 nm	9.7–11 kb	Αφίδες (ME)
<i>Roymovirus</i>	Rose yellow mosaic virus, RYMV	2	Μήκος 720–750 nm	9,508 nt.	Πιθανώς Ακάρεα (HE)
<i>Rymovirus</i>	Ryegrass mosaic virus, RGMV	3	690-720×11-15 nm	9.5 kb	Ακάρεα (HE)
<i>Tritimovirus</i>	Brome streak virus, BrSMV	6	Μήκος 690-700 nm	9.4–9.6 kb	Ακάρεα (HE)

Όσον αφορά τα γένη *Macluravirus* και *Potyvirus*, υπεύθυνα για τη μετάδοση από τις αφίδες φορείς τους φαίνεται να είναι τρία διαφορετικά συντηρημένα μοτίβα, που εδράζονται σε διαφορετικές περιοχές δύο πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονιδιώμα τους. Σε άλλα γένη όπως είναι τα *Rymovirus*, *Poacevirus* και *Tritimovirus* απουσιάζουν αυτά τα μοτίβα και έχουν άλλα αντίστοιχα που συνδέονται με τα ακάρεα και γι' αυτό το λόγο φαίνεται ότι μεταδίδονται από ακάρεα της οικογένειας Eriophyidae με ημι-έμμοнос τρόπο (Wylie et al., 2017). Αντίστοιχα, για το γένος *Roymovirus* έχει καταγραφεί η παρουσία των μοτίβων που σχετίζονται με τα ακάρεα και η απουσία αυτών που σχετίζεται με τις αφίδες και γι' αυτό θεωρείται ότι φορείς τους είναι τα ακάρεα της οικογένειας Eriophyidae. Τέλος, ο BVMoV που αποτελεί το μοναδικό είδος του γένους *Bevemovirus*, περιέχει κάποια μοτίβα που είναι ανάλογα με αυτά που εμπλέκονται στη μετάδοση με τις αφίδες στην καψιδιακή πρωτεΐνη (Capsid protein, CP) του.

Η οικογένεια *Potyviridae* αποτελείται από ραβδόμορφους/νηματοειδείς ιούς διαμέτρου 11-13nm με εύκαμπτα ισωμάτια χωρίς φάκελο (Εικ. 5B) και μήκος το οποίο διαφέρει μεταξύ των γενών, όμως κυμαίνεται από 650 μέχρι 950 nm, με εξαίρεση το γένος *Bymovirus* που αποτελείται από διμερές γονιδίωμα με μήκη ισωματίων 250-300nm & 500-600nm (Wylie et al., 2017 & Inoue-Nagata et al., 2022). Τα ισωμάτια αποτελούνται κατά 95% από πρωτεΐνη και 5% από RNA, έχουν ελικοειδή συμμετρία με την παρουσία περίπου 2000 πανομοιότυπων μονάδων της CP, τα αμινο-τελικά άκρα (N-τελικά άκρα) της οποίας βρίσκονται εκτεθειμένα στην επιφάνεια του ισωματίου (Εικ. 5A) (Revers & García, 2015) και σε

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

μερικούς ιούς το ίδιο ισχύει και για τα καρβοξυ-τελικά άκρα (C-τελικά άκρα) της (Valli et al., 2021, Inoue-Nagata et al., 2022). Χαρακτηριστικό της οικογένειας αποτελεί ο σχηματισμός ειδικών εγκλείστων στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων, σχήματος ανεμόμυλου ή τροχού (pinwheel/ scroll shaped cytoplasmic inclusions) (Εικ. 5Γ).



Εικόνα 5 Α) Τρισδιάστατη απεικόνιση της ελικοειδούς συμμετρίας του ισωματίου του γένους *Potyvirus*. Το N-τελικό άκρο και το C-τελικό άκρο των υπομονάδων της καψιδιακής πρωτεΐνης βρίσκονται εκτεθειμένα στην επιφάνεια του ισωματίου (Astier, 2007), Β) Φωτογραφία ισωματίων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η γραμμή αντιστοιχεί σε μήκος 100nm (Berger & Parrish, 2011) και Γ) Τα χαρακτηριστικά έγκλειστα σχήματος ανεμόμυλου στο κυτταρόπλασμα φυτού *Nicotiana benthamiana* μολυσμένα με τον ιό *plum pox virus*. Η γραμμή αντιστοιχεί σε μήκος 200nm (Valli et al., 2021).

Τα μέλη της οικογένειας αυτής έχουν ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA (+ssRNA) γονιδίωμα που λειτουργεί και ως αγγελιαφόρο RNA, μεγέθους που κυμαίνεται μεταξύ 8.2-11.5 kb, με εξαίρεση το γένος *Bymovirus* το οποίο έχει δύο μονόκλινα μόρια RNA (RNA1 και RNA2) που ενκαψιδιώνονται σε διαφορετικά ισωμάτια (López-Moya & García, 1999). Στο 5' άκρο του γονιδιώματος είναι συνδεδεμένη μια ική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το γονιδίωμα (Viral Protein genome-linked, VPg), ενώ στο 3' άκρο βρίσκεται μια πολυαδενυλιωμένη (πολύ-A) ουρά. Από το γονιδίωμα κωδικοποιείται μια μη λειτουργική πολυπρωτεΐνη (340-370 kDa) που αποτελείται από- κατά κανόνα- 11 επιμέρους πρωτεΐνες εκ των οποίων οι 2 ή 3- αναλόγως το γένος- είναι πρωτεάσες που στη συνέχεια βοηθούν στην κατάλυση της ίδιας της πολυπρωτεΐνης (Valli et al., 2021). Χαρακτηριστικό της προσβολής των φυτών από τους ιούς της οικογένειας αποτελεί η αλλαγή στη διαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης τους: ο πολλαπλασιασμός λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, σε θέσεις κοντά σε κυτταρικές μεμβράνες που ονομάζονται τα μεμβρανικά κυστίδια- (vesicles), τα οποία τροποποιούνται από πρωτεΐνες του ιού προκειμένου να δημιουργήσουν τα ικά σύμπλοκα αναπαραγωγής (virus replicase complex, VRC) (Worrall et al., 2015).

5. Γένος *Potyvirus*

Το γένος αυτό αποτελεί το πιο πολυπληθές της οικογένειας καθώς σε αυτό περιλαμβάνεται το 30% των φυτοπαθογόνων ιών που έχουν καταγραφεί (López-Moya & García, 1999) και αναφέρεται ότι τα μέλη του είναι υπεύθυνα για τις περισσότερες απώλειες παραγωγής που σχετίζονται με ιολογικές μολύνσεις

(Astier, 2007). Οι περισσότεροι ιοί του γένους *Potyvirus* έχουν στενό εύρος ξενιστών, ενώ κάποιοι μεγαλύτερο, προσβάλλοντας ακόμα και 30 οικογένειες φυτών (Wylie et al., 2017), όπως είναι το τυπικό μέλος του γένους, ο ιός της πατάτας Υ (potato virus Υ, PVY) του οποίου οι ξενιστές ανήκουν σε 31 οικογένειες και προκαλούν σοβαρές ζημιές σε καλλιέργειες μεγάλης οικονομικής σημασίας. Οι ιοί του εν λόγω γένους μεταδίδονται με μη έμμονο (non-persistent, stylet-borne) τρόπο από τις αφίδες φορείς τους κατά τη διάρκεια του οποίου, εισάγουν το στίλετο τους στα επιδερμικά κύτταρα και ο χρόνος διατροφής που απαιτείται για την απόκτηση του ιού (acquisition access period, AAP) και τη μετάδοση του (inoculation access period, IAP) κυμαίνεται από δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά, ενώ δεν απαιτείται λανθάνουσα περίοδος (latent period). Κάποιοι ιοί του γένους όπως οι BCMV και BCMNV μεταδίδονται και με το σπόρο (Jordan & Hammond, 2008).

Ο πρώτος ιός του γένους αλλά και της οικογένειας *Potyviridae* που αναφέρθηκε ήταν ο rokeweed mosaic virus (PkMV) το 1902, ο οποίος περιγράφηκε αργότερα, το 1969 (Berger & Parrish, 2011). Το 1924 αναφέρθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο προβλήματα στην καλλιέργεια της πατάτας, που έχουν καταγραφεί από το 1778 και σχετίζονται με παθογόνο που μεταδίδεται από έντομα, το οποίο χαρακτηρίστηκε κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1930 ως ο PVY (Gibbs et al., 2020). Εν τω μεταξύ, η εμφάνιση των ιών του γένους αυτού με τις αφίδες συσχετίστηκε για πρώτη φορά το 1919 ενώ, το 1974 βρέθηκε ότι απαραίτητο για τη μετάδοση από αυτές ήταν μια πρωτεΐνη του ιού που ονομάστηκε Helper component proteinase (γνωστή πλέον ως HC-Pro) ακριβώς λόγω του ρόλου του στην αφιδομετάδοση. Ωστόσο η πρώτη πλήρης αλληλουχία Poty-ιών πραγματοποιήθηκε το 1986 με δύο ιούς που προσβάλλουν τον καπνό και το 1988-1989 έγινε η περιγραφή των πρωτεασών που κωδικοποιούνται από τους ιούς (Berger & Parrish, 2011).

Λόγω της ανακάλυψης μεθόδων που επέτρεπαν την αλληλούχιση γονιδίων κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970, έγινε εφαρμογή τους στο χαρακτηρισμό και την ταξινόμηση των φυτοπαθογόνων ιών. Έτσι, μέχρι το 1991 είχαν ταυτοποιηθεί 57 είδη, που ανήκουν στο γένος *Potyvirus*, ενώ μέχρι το 2000 πάνω από 1.000 αλληλουχίες των Poty-ιών είχαν καταγραφεί στη διαδικτυακή βάση δεδομένων GenBank, αριθμός που σήμερα ξεπερνάει τις 26.000 αλληλουχίες (Gibbs et al., 2020) και ειδικά για τον BCMV έχουν γίνει 86 καταχωρήσεις πλήρους αλληλουχίας του από διαφορετικές απομονώσεις που προέρχονται από διάφορα ψυχανθή.

Το γένος περιλαμβάνει ιδιαίτερα επιβλαβείς ιούς για πλήθος οικονομικά σημαντικών καλλιεργειών. Ένας από τους πιο σημαντικούς ιούς του γένους *Potyvirus* ο PVY, από τον οποίο και πήρε το όνομα του το γένος και αποτελεί το αντιπροσωπευτικό μέλος, θεωρείται ο πέμπτος πιο σημαντικός ανάμεσα σε όλους τους φυτοπαθογόνους ιούς (Bhoi et al., 2022). Μολύνει συνολικά 495 διαφορετικά φυτικά είδη που ανήκουν σε 72 γένη, συμπεριλαμβανόμενων της πατάτας, τομάτας, πιπεριάς και μελιτζάνας που ανήκουν στην οικογένεια Solanaceae, αλλά και φυτά που ανήκουν στις οικογένειες Amaranthaceae, Fabaceae, Chenopodiaceae, Compositae και Brassicaceae.

Μια από τις πιο καταστρεπτικές ασθένειες των πυρηνόκαρπων με σημαντικές οικονομικές απώλειες είναι γνωστή ως «σάρκα» και «ευλογία των πυρηνόκαρπων» και υπεύθυνος για αυτήν είναι ο ιός της ευλογιάς της δαμασκηνιάς (plum rix virus, PPV). Στο διάστημα των τελευταίων 3 δεκαετιών το κόστος για τον έλεγχο της ασθένειας σε παγκόσμιο επίπεδο, υπολογίζεται ότι φτάνει τα \$10 δισεκατομμύρια. Ξενιστές του αποτελούν τα καλλιεργούμενα είδη πυρηνόκαρπων (δαμασκηνιά, ροδακινιά, αμυγδαλιά, βερικοκιά, κερασιά, βυσσινιά), άγρια και καλλωπιστικά είδη του γένους *Prunus* (Patil, 2021), καθώς και είδη που ανήκουν στις οικογένειες Solanaceae, Fabaceae, Asteraceae, κ.ά. Αρχικά, το μεγαλύτερο πρόβλημα εντοπιζόταν στις δαμασκηνιές και βερικοκιές, στη συνέχεια επεκτάθηκε και στα άλλα είδη. Ως βασικό σύμπτωμα της σάρκας αναφέρεται η πρόωρη καρπόπτωση που μπορεί να φτάσει ακόμα και το 80% και υποβάθμιση της ποιότητας των καρπών (μαλάκωμα και ελαφρώς πικρή γεύση), ενώ στις ευπαθείς ποικιλίες υπολογίζεται ότι η απώλεια της παραγωγής μπορεί να ανέλθει στο 80-100% (Varveri, 2006, Patil, 2021). Παθογνωμικό σύμπτωμα της ασθένειας όμως αποτελούν οι χαρακτηριστικοί δακτύλιοι που εμφανίζονται στην επιφάνεια του πυρήνα. Πρόκειται για έναν από τους πιο διαδεδομένους ιούς παγκοσμίως και στην Ελλάδα καταγράφηκε για πρώτη φορά το 1967 στη Π.Ε. Αργολίδας (Demetriades & Catsimbas, 1968) και στη συνέχεια εξαπλώθηκε, με τις καλλιέργειες βερικοκιάς να έχουν υποστεί τις σημαντικότερες ζημιές αφού αναφέρεται ότι η Ελλάδα από το 35% των βερικόκων της παγκόσμιας παραγωγής έφτασε στο 13%. Σήμερα, σύμφωνα με το ΦΕΚ 1952/2008, ο ιός συμπεριλαμβάνεται στα παθογόνα από τα οποία οφείλει να είναι απαλλαγμένο το πολλαπλασιαστικό υλικών των ειδών του γένους *Prunus*.

Ο PSbMV ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ευρώπη το 1966 και μέσα στα επόμενα χρόνια εντοπίστηκε επίσης στην Ιαπωνία, στις ΗΠΑ και στη Νέα Ζηλανδία και πλέον έχει παγκόσμια εξάπλωση. Αν και προσβάλει φυτά που ανήκουν σε διάφορες οικογένειες, κυριότεροι ξενιστές του αποτελούν ψυχανθή όπως είναι το μπιζέλι, η φακή, το κουκί και το ρεβίθι. Τα συμπτώματα που προκαλεί ομοιάζουν με εκείνα άλλων ιών του γένους *Potyvirus* (καρούλιασμα φύλλων, μωσαϊκά, μείωση μεγέθους του σπόρου, κ.ά.) και μεταδίδεται μέσω μολυσμένου σπόρου και δευτερογενώς με τις αφίδες (Beck-Okins et al., 2022).

Η καλλιέργεια παπάγιας (*Carica papaya*) λαμβάνει χώρα κυρίως στην Ινδία η οποία είναι υπεύθυνο για το 45% της παγκόσμιας παραγωγής και δευτερευόντως στη Βραζιλία, στο Μεξικό, κ.ά. Η σημαντικότερη ασθένεια της παπάγιας θεωρείται πως είναι ιολογικής φύσεως και οφείλεται στον ιό της δακτυλοειδούς κηλίδωσης της παπάγιας (papaya ringspot virus, PRSV) ο οποίος έχει παγκόσμια διασπορά (Patil, 2021) και μολύνει κι άλλες καλλιέργειες όπως είναι τα κολοκυνθοειδή. Βασικές συνέπειες της προσβολής από τον ιό αυτό είναι οι σημαντικές απώλειες στην παραγωγή που προκαλεί καθώς και η υποβάθμιση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων.

Ένας απ' τους πιο σημαντικούς αναδυόμενους ιούς των κολοκυνθοειδών αποτελεί ο ιός του κίτρινου μωσαϊκού της κολοκυθιάς (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) ενώ σημαντικές ζημιές σε φυτά της οικογένειας Brassicaceae προκαλεί ο ιός του μωσαϊκού το γογγυλιού (turnip mosaic virus, TuMV). Τέλος,

ως ιοί μεγάλης αξίας για πολλές καλλιέργειες αναφέρονται και οι: ο ιός της ποικιλοχλώρωσης της πιπεριάς (pepper mottle virus, PepMoV), ο SbMV, ο PStV, ιός της πατάτας Α (potato virus A, PVA), tobacco etch virus (TEV), κ.ά. (Patil, 2021, Bhoi et al., 2022).

5.1. Ταξινόμηση

Οι ιοί του γένους *Potyvirus* φαίνεται ότι προέρχονται από κοινό πρόγονο που χρονολογείται πριν 6770 χρόνια και υποβλήθηκαν σε διαφορετικές εξελικτικές διαδικασίες (Gibbs & Ohshima, 2010), στις οποίες σημαντικό ρόλο διαδραμάτισαν οι ανθρώπινες δραστηριότητες. Οι προσπάθειες αποσαφήνισης της σχέσης μεταξύ των ιών του γένους ξεκίνησαν από τη δεκαετία του 1960, όταν με τη χρήση ορολογικών μεθόδων αναφέρθηκαν 4 διακριτές υποομάδες, ομαδοποίηση η οποία παρόλο που δεν έχει ταξινομική σημασία αποτελεί εργαλείο που χρησιμεύει στην περιγραφή ενός υποσυνόλου ειδών με κοινές ορολογικές ιδιότητες, που σχετίζονται με την CP, που βρίσκονται κοντά σε ένα φυλογενετικό δέντρο (Gibbs & Ohshima, 2010, Jordan & Hammond, 2008). Ωστόσο η ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων και βάσει των πλήρων αλληλουχιών των ιών που αποκτήθηκαν, διεύρυναν τα δεδομένα κι έτσι δόθηκε η δυνατότητα πιο λεπτομερούς κατηγοριοποίησης, σε αντίθεση με την ομαδοποίηση βάσει της CP μόνο. Οι Gibbs και Ohshima (2010) με τα δεδομένα που ήταν διαθέσιμα στη βάση Genbank μέχρι το 2009, διαίρεσαν τους Poty-ιούς σε πέντε υπερομάδες και 11 υποομάδες, η ονομασία των οποίων πήρε την ονομασία της από το πρώτο είδος που χαρακτηρίστηκε για την καθεμία: ομάδα του BCMV, ομάδα του BYMV, ομάδα του ιού του μωσαϊκού των τεύτλων (beet mosaic virus, BtMV), ομάδα του ιού της ποικιλοχλώρωσης των νεύρων του τσίλι (chilli vein mottle virus, ChVMV), ομάδα του ιού του μωσαϊκού της δάφνης (daphne mosaic virus, DaMV), ομάδα του ιού του κίτρινου νανισμού του κρεμμυδιού (onion yellow dwarf virus, OYDV), ομάδα του PRSV, ομάδα του PVY, ομάδα του ιού του μωσαϊκού του ζαχαροκάλαμου (sugarcane mosaic virus, SCMV), ομάδα του TEV και ομάδα του TuMV. Η ομάδα του BCMV περιέχει τουλάχιστον 37 είδη, εκ των οποίων τα έξι προκαλούν σημαντικές ασθένειες σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες όπως είναι τα ψυχανθή και τα κολοκυνθοειδή (Gibbs & Ohshima, 2010), ενώ τα υπόλοιπα μέλη εντοπίζονται σε ιθαγενή αυτοφυή φυτά και καλλιέργειες της Νοτιοανατολικής ή Ανατολικής Ασίας και Ωκεανίας. Πολλοί ιοί όπως για παράδειγμα ο azuki bean mosaic virus, ο blackeye cowpea mosaic virus, ο peanut chlorotic ring mottle virus και ο peanut mild mottle virus θεωρούνταν ξεχωριστά είδη, όμως πλέον κατατάσσονται ως στελέχη του BCMV.

Τα κριτήρια για τον διαχωρισμό των ειδών του γένους *Potyvirus* αποτελούν (Hull, 2013):

- i. Η ομοιότητα των αμινοξέων της CP να είναι μικρότερη από 80% και η ομοιότητα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της CP ή/και ολόκληρου του γονιδιώματος να είναι μικρότερη από 76%
- ii. Διαφορετικές θέσεις πέψης της πολυπρωτεΐνης
- iii. Διαφορετικοί ξενιστές και συμπτωματολογία

- iv. Διαφορετική μορφολογία των εγκλειστών σωματίων (inclusion body)
- v. Ορολογική συγγένεια

5.2. Μετάδοση

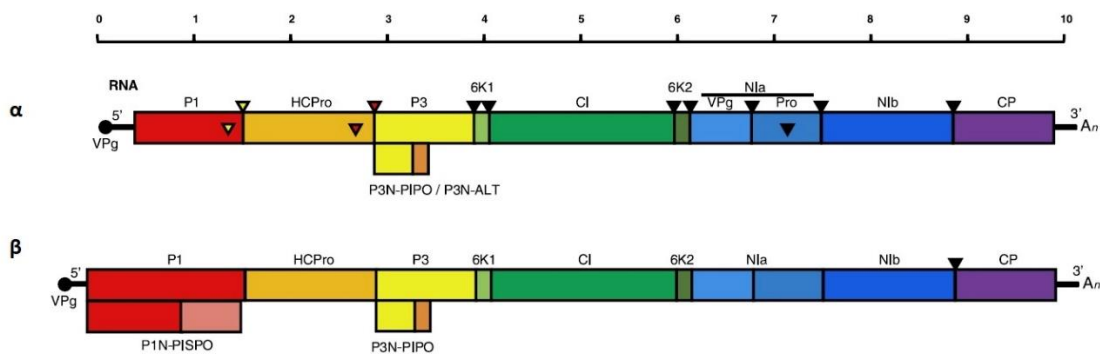
Οι ιοί του γένους *Potyvirus* μεταδίδονται κατά κύριο λόγο από αφίδες με μη έμμονο τρόπο κατά τη διατροφή τους από τα επιδερμικά κύτταρα του φυτού, ενώ, μερικά είδη όπως οι PSbMV, PVY, SbMV, ιός του μωσαϊκού του μαρουλιού (lettuce mosaic virus, LMV), ιός του μωσαϊκού της καρπουζιάς (watermelon mosaic virus, WMV) και ο ZYMV μεταδίδονται επίσης μέσω του σπόρου (Revers & García, 2015), ενώ στο εργαστήριο είναι εφικτή η μετάδοση τους και μηχανικά ή με εμβολιασμό (Wylie et al., 2017). Μικρό ποσοστό των φυτικών ιών μπορούν να μεταδίδονται μέσω του σπόρου (περίπου το 10%), η πλειοψηφία των οποίων φαίνεται να ανήκει στο γένος *Potyvirus* (Astier, 2007). Οι ιοί που σπορομεταδίδονται φαίνεται ότι εισάγονται σε νέες περιοχές μέσω των μολυσμένων σπόρων και εγκαθίστανται σε αυτές με τη δραστηριότητα των αφίδων-φορέων τους. Ο τρόπος μετάδοσης των Poty-ιών μέσω φορέων έχει μελετηθεί σε βάθος στο αντιπροσωπευτικό μέλος του γένους, τον PVY, του οποίου φορείς αποτελούν περισσότερα από 20 είδη αφίδων, συμπεριλαμβανομένων μερικών που δεν δημιουργούν αποικίες στα φυτά πατάτας (Gadhav et al., 2020). Γενικότερα, οι αφίδες φορείς των ιών του γένους αυτού πρόκειται για ως επί το πλείστον πολυφάγα ή ολιγοφάγα είδη με κυριότερα το είδος *Myzus persicae*, ένα πολυφάγο και κοσμοπολίτικο είδος που μπορεί και μεταδίδει το 53,4% των Poty-ιών που έχουν μελετηθεί (Gadhav et al., 2020) και ακολουθούν τα επίσης πολυφάγα είδη *Aphis gossypii* (μεταδίδει το 25.6% των Poty-ιών), *Aphis craccivora* (15.9%), *Macrosiphum euphorbiae* (14.2%), *Aphis fabae* (10.8%) και *Aphis spiraeicola* (8.5%). Οστόσο σε ορισμένα στελέχη η μετάδοση με τις αφίδες είτε είναι αναποτελεσματική, είτε δεν είναι καθόλου εφικτή, πιθανόν λόγω μεταλλάξεων στις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή (HC-Pro και CP) (Revers & García, 2015).

5.3. Ξενιστές και συμπτώματα των ιών του γένους *Potyvirus*

Η φύση και η ένταση των συμπτωμάτων των ιών του γένους *Potyvirus*, αν και επηρεάζεται σημαντικά από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, θεωρείται ότι προκαλούν σοβαρές ζημιές σε καλλιέργειες οικονομικής αξίας (Revers et al., 1999). Ως πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα αναφέρεται η χλώρωση των νεύρων των φύλλων, η εμφάνιση κηλίδων και μωσαϊκών σε αυτά που προσομοιάζουν με φυσιολογικές διαταραχές (πχ τροφопενία μαγνησίου ή σιδήρου), καθώς και αλλοιώσεις στα άνθη, τους καρπούς και τους σπόρους των μολυσμένων φυτών. Το σημαντικότερο ρόλο στην εκδήλωση των συμπτωμάτων διαδραματίζει η πρωτεΐνη HC-Pro, που κωδικοποιείται από τους Poty-ιούς, η οποία καταστέλλει την άμυνα του ξενιστή, την RNA σίγηση ωστόσο συμμετέχουν κι άλλες περιοχές του γονιδιώματος (Revers & García, 2015).

5.4. Γονιδίωμα των ιών του γένους *Potyvirus*

Οι Poty-ιοί αποτελούνται από +ssRNA γονιδίωμα, μεγέθους 9.7–11 kb που μεταφράζεται σε ένα μεγάλο μόριο πολυπρωτεΐνης, από το οποίο διασπώνται πρωτεολυτικά οι ώριμες λειτουργικές πρωτεΐνες από τρεις πρωτεάσες που κωδικοποιεί ο ίδιος ο ιός (P1, HC-Pro και NIa-pro). Η P1 και η HC-Pro είναι πρωτεάση σερίνης και κυστεΐνης αντίστοιχα, οι οποίες έχουν *cis* δράση, δηλαδή έχουν την ικανότητα να αποκόπτονται μόνες τους στο C-τελικό τους άκρο από το μόριο της πολυπρωτεΐνης (Valli et al., 2021). Η NIa-pro όμως, που είναι επίσης πρωτεάση σερίνης, εκτός από την αυτοκαταλυτική δράση (*cis*) μπορεί να διασπάσει και τις υπόλοιπες πρωτεΐνες (*trans*), όπως φαίνεται στην Εικόνα 6. Μέχρι πρόσφατα ήταν αποδεκτό ότι το γονιδίωμα των ιών του γένους αυτού αποτελούταν μόνο από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη, ωστόσο το 2008 διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός ακόμα ORF ενσωματωμένου εντός της κωδικής περιοχής της πρωτεΐνης P3, το PIPO (Pretty Interesting Potyviral ORF), το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οποίας το C-τελικό άκρο της, συνδέεται με το N-τελικό άκρο της P3 κι έτσι προκύπτει η πρωτεΐνη P3N-PIPO (Chung et al., 2008).



Εικόνα 6 Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος αντιπροσωπευτικών ειδών του γένους *Potyvirus*. Τα παραλληλόγραμμα με διαφορετικά χρώματα συμβολίζουν τα διαφορετικά ORFs. Στο 5' άκρο φαίνεται συνδεδεμένη η VPg, ενώ στο 3' άκρο η πολύ-Α ουρά, ενώ με βελάκι συμβολίζονται οι θέσεις πέψης από τις πρωτεάσες του ιού καθώς και ποια πρωτεάση είναι υπεύθυνη α) Ο *rotato virus Y* (PVY) που αποτελεί το τυπικό μέλος του γένους και β) Ο *sweet potato feathery mottle virus* αντιπροσωπεύει μια υποομάδα του γένους *Potyvirus*, η οποία μολύνει γλυκοπατάτες (Valli et al., 2021).

Το γονιδίωμα των ιών του γένους *Potyvirus* ξεκινάει από την 5' αμετάφραστη περιοχή (Untranslated Region, UTR), μεγέθους μέχρι 300 bp που βρίσκεται καθοδικά της VPg, της οποίας ο ρόλος δεν είναι απολύτως κατανοητός, αλλά φαίνεται να είναι η ενίσχυση της μετάφρασης (Valli et al., 2021) και η εκδήλωση των συμπτωμάτων (Revers & García, 2015). Ακόμα μια UTR, μεγέθους μέχρι 200bp εδράζεται στο 3' άκρο του γονιδιώματος ανοδικά της πολύ-Α ουράς και εμπλέκεται στη μολυσματικότητα του ιού, επάγοντας συμπτώματα στους ξενιστές (Valli et al., 2021). Η ακολουθία των επιμέρους πολυπεπτιδίων στις οποίες διασπάται το μόριο της πολυπρωτεΐνης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6, είναι η εξής (με κατεύθυνση

από το 5' άκρο προς το 3' άκρο): P1, HC-Pro, P3N-PIPO, 6K1, CI, 6K2 Niarpro, Nib και CP. Επισημαίνεται ότι οι πρωτεΐνες του εν λόγω γένους αλληλεπιδρούν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ τους, αλλά και με φυτικές πρωτεΐνες, γεγονός που τις καθιστά πολυλειτουργικές (Revers & García, 2015) και οι παράγοντες αυτοί μαζί χτίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο.

Πρωτεΐνη P1 (Protein 1)

Πρόκειται για μία από τις τρεις πρωτεάσες του γονιδιώματος, η οποία είναι πρωτεάση σερίνης, που αποκόπτει τον εαυτό της από την πολυπρωτεΐνη, αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες που βρίσκονται στο C-τελικό άκρο της και είναι μια αλκαλική και εξαιρετικά ετερογενής πρωτεΐνη, τόσο σε μέγεθος (από 26 μέχρι 60kDa) όσο και σε νουκλεοτιδική αλληλουχία (Valli et al, 2021, López-Moya & García, 1999). Η ετερογένεια αυτή φαίνεται να οφείλεται στο N- τμήμα της πρωτεΐνης, καθώς το μοτίβο της πρωτεάσης που εδράζεται στο C-τελικό άκρο είναι συντηρημένο. Δεν είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του ιού. Ωστόσο φαίνεται να διαδραματίζει πολλαπλούς ρόλους, όπως είναι η συμμετοχή της: α) στη γονιδιακή RNA σίγηση, είτε μέσω ενίσχυσης της δράσης της HC-Pro, η οποία είναι καταστολέας της διαδικασίας αυτής (RNA silencing suppression, RSS), είτε μέσω διέγερσης της μετάφρασης της HC-Pro (Revers & García, 2015), β) στη διαμόρφωση του εύρους των ξενιστών (Untiveros et al., 2016), καθώς και γ) στην ενίσχυση της μολυσματικότητας του ιού (Revers & García, 2015).

Στην περίπτωση της υποομάδας του γένους που αποτελείται από τέσσερα συγγενικά είδη που προσβάλλουν γλυκοπατάτες (*Ipomoea batatas*), η P1 είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των υπόλοιπων μελών του γένους (Εικ. 6) και περιέχει δύο διακριτές περιοχές: την P1-pro στο C-τελικό άκρο, η οποία δρα όπως αναφέρθηκε παραπάνω και μια επέκταση προς το N-τελικό άκρο, η οποία απουσιάζει από τους υπόλοιπους rotγ-ιούς, την P1-N, η οποία πιθανώς δρα ως καταστολέας της γονιδιακής σίγησης (Untiveros et al., 2016).

Πρωτεΐνη HC-Pro (Helper Component Protease)

Η πρωτεΐνη αυτή, μεγέθους 50 kDa, πήρε την ονομασία της λόγω του βοηθητικού ρόλου που έχει κατά την αφιδομετάδοση, διαθέτει πολλαπλές λειτουργίες και πρόκειται για την πιο μελετημένη πρωτεΐνη του γένους. Αναλυτικότερα, η πρωτεΐνη αυτή χωρίζεται σε τρία νοητά τμήματα: α) το N-τελικό μέρος της (100 αμινοξέα), που είναι απαραίτητο για την μετάδοση του ιού με τις αφίδες φορείς καθώς περιέχει το μοτίβο K1TC που αλληλεπιδρά με την CP (Valli et al, 2018), β) το κεντρικό τμήμα της (250 αμινοξέα), που είναι υπεύθυνο για την πλειοψηφία των λειτουργιών της, συμπεριλαμβανόμενης της συμμετοχής της στη διασυστηματική μετακίνηση και της δράσης της ως καταστολέα της μετα-μεταγραφικής γονιδιακής RNA σίγησης (Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS), καθώς αλληλεπιδρά με τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (small interfering RNAs, siRNAs) και με την πρωτεΐνη αργοναύτη (AGO3) (Hull, 2013) ενώ, γ) το C-τελικό μέρος της (100 αμινοξέα) έχει δραστηριότητα πρωτεάσης κυστεΐνης, διασπώντας τον εαυτό της από

την πολυπρωτεΐνη στο C-άκρο της (Valli et al., 2018) και συγκεκριμένα διασπά το διπεπτίδιο Gly–Gly που ενώνει τις HC-Pro και P3 (Hull, 2013).

Έχουν προταθεί όμως και επιπλέον πιθανές λειτουργίες ή χαρακτηριστικά της HC-Pro όπως είναι η επαγωγή των συμπτωμάτων στα μολυσμένα φυτά, ο σχηματισμός άμορφων εγκλείστων σε ορισμένες περιπτώσεις, η συμμετοχή της στη σταθεροποίηση της CP, η συμμετοχή στη συγκρότηση και μολυσματικότητα των αντιγράφων του ιού και τη συμμετοχή της στο σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης (Revers & García, 2015). Τέλος, η HC-Pro αλληλεπιδρά με πληθώρα πρωτεϊνών τόσο ιικές (CP, CI, P1, VPg, NIa), όσο και φυτικές [τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF4) και την ισομορφή του (eIFiso4), το μεταγραφικό παράγοντα που επάγεται από το αιθυλένιο (RAV2), την RNA μεθυλοτρανσφεράση (HEN1), πολλαπλούς παράγοντες του πρωτεασώματος (PAE1, PAA, PBB και PBE), κ.ά.], ο ρόλος όμως των περισσότερων αλληλεπιδράσεων δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως (Revers & García, 2015).

Πρωτεΐνη P3 (Protein 3)

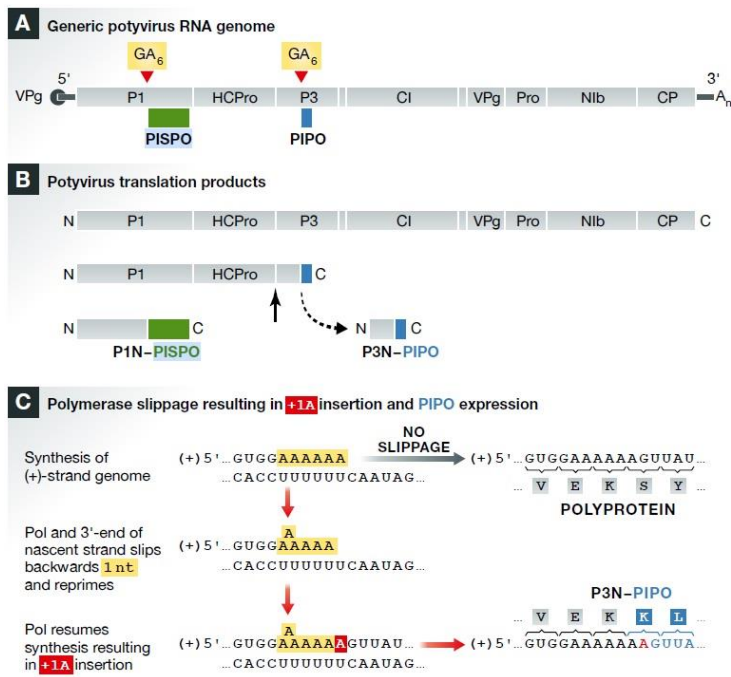
Με εξαίρεση τις πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν, οι υπόλοιπες αποκóπτονται από την πολυπρωτεΐνη με τη δράση της τρίτης πρωτεάσης, της NIpro καθιστώντας τις λειτουργικές. Η P3 (μεγέθους 40kDa) είναι η λιγότερο χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη και η ακριβής λειτουργία της είναι ασαφής. Φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, μέσω της αλληλεπίδρασης της με την CI (Valli et al., 2021, Revers & García, 2015) και σχετίζεται με την κυλινδρική δομή που σχηματίζεται από την CI στο κυτταρόπλασμα, όπως αναλύεται παρακάτω, καθώς και με τα κρυσταλλικά έγκλειστα που σχηματίζονται από τις NIa και NIb στον πυρήνα. Επίσης, η P3 έχει δύο υδροφοβικές περιοχές στο C-τελικό άκρο της, οι οποίες στοχεύουν το ενδοπλασματικό δίκτυο και έτσι σχηματίζονται έγκλειστα συνδεδεμένα με το σύμπλεγμα Golgi, τα οποία εντοπίζονται στη συνέχεια στα κυστίδια αναπαραγωγής. Τέλος, η εν λόγω πρωτεΐνη πιθανώς να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη μολυσματικότητα του ιού και την εκδήλωση συμπτωμάτων με τρόπο που δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα (Revers & García, 2015).

Πρωτεΐνες P3N-PIPO & P1N-PISPO

Εντός της κωδικής περιοχής του P3, εντοπίζεται ένα ORF που κωδικοποιεί την transframe fusion πρωτεΐνη P3N-PIPO, η οποία είναι συνδεδεμένη με το N- άκρο της P3 και πρόκειται για πρωτεΐνη μετακίνησης, ο ρόλος της οποίας είναι η αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες του ξενιστή, έτσι ώστε να τροποποιείται η πλασμοδέσμη και να είναι δυνατή η διέλευση του ιού σε γειτονικό κύτταρο μέσω αυτής. Συγκεκριμένα, η P3N-PIPO οδηγεί το σύμπλοκο μετακίνησης (είτε ριβονουκλιοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, είτε ολόκληρο ισοσμάτιο) προς τις πλασμοδέσμες και αλληλεπιδρά με μια φυτική πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης, την PCaP1 (Vijayarajani et al., 2012) ούτως ώστε να διαπερνάει τις κωνικές δομές που σχηματίζονται από την CI και να επιτρέπεται η διέλευση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των πλασμοδεσμών. Στο 5' άκρο κωδικής περιοχής του PIPO εντοπίζεται μια συντηρημένη αλληλουχία GAAAAA (GA₆), μοτίβο που παρατηρείται μόνο στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος, στην οποία

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

λαμβάνει χώρα ολίσθηση της RdRp (polymerase slippage) (Εικ. 7), κατά τη διάρκεια της οποίας προστίθεται ένα μόριο αδενίνης και αλλάζει το αναγνωστικό πλαίσιο, επιτρέποντας την έκφραση της P3N-PIPO.



Εικόνα 7 Έκφραση των PISPO και PIPO μέσω ολίσθησης της RdRp (White, 2015). Α) Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος ενός Potyv-ιού, στην οποία φαίνονται οι θέσεις που εδράζονται τα ORF των PISPO (με πράσινο χρώμα) και PIPO (με μπλε χρώμα) καθώς και η τοποθεσία των GA₆ μοτίβων. Τονίζεται ότι η PISPO είναι παρούσα μόνο στην υποομάδα του γένους Potyvirus που προσβάλλει γλυκοπατάτες. Β) Τα προϊόντα που παράγονται μετά τη μετάφραση: η πολυπρωτεΐνη (πάνω), το P3N-PIPO μετά την ολίσθηση της RdRp και αποκόπτεται από την πρωτεΐνη (κέντρο) και Γ) Αλληλουχία γεγονότων κατά την ολίσθηση της RdRp. Κατά την αντιγραφή, στη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας, λαμβάνει χώρα η ολίσθηση της πολυμεράσης προσθέτοντας μια αδενίνη, αλλάζοντας έτσι το αναγνωστικό πλαίσιο και την αλληλουχία των αμινοξέων κι έτσι παράγεται η P3N-PIPO (κάτω) αντί για την πολυπρωτεΐνη (πάνω).

Σε μια υποομάδα του γένους που προσβάλλει γλυκοπατάτες η συγκεκριμένη αλληλουχία (GA₆) εμφανίζεται και σε ένα ακόμα σημείο του γονιδιώματος, στο C-τελικό άκρο ενός επικαλυπτόμενου ORF, του PISPO (Pretty Interesting Sweet Potato Potyvirus ORF) που είναι συνδεδεμένο με το N-τελικό άκρο της P1 (Untiveros et al., 2016, Valli et al., 2021, White, 2015) (Εικ. 6), κι έτσι εκφράζονται οι PIPO και PISPO με την προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου αδενίνης. Στην περίπτωση του φυτού *Nicotiana benthamiana* η P1 και η P1N-PISPO αποτελούν πρωτεΐνες καταστολείς της γονιδιακής RNA σίγησης (Untiveros et al., 2016). Αυτή η ολίσθηση της πολυμεράσης στην περίπτωση του CIYVV έχει ως αποτέλεσμα την διαγραφή ενός νουκλεοτιδίου από το μοτίβο GA₆, αλλάζοντας το πλαίσιο ανάγνωσης και δημιουργώντας ένα κωδικόνιο τερματισμού κι έτσι προκύπτει η P3N-ALT η οποία συμμετέχει στην διακυτταρική μετακίνηση του CIYVV (Εικ. 6α).

Πρωτεΐνη 6K1 (6-kDa peptide 1)

Το σύμπλοκο P3+6K1 εντοπίζεται στα μολυσμένα κύτταρα και φαίνεται να είναι το βασικό λειτουργικό προϊόν και όχι το καθένα ξεχωριστά και δεν είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός τους για τη βιωσιμότητα του ιού. Το προϊόν P3+6K1 έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στο σύμπλοκο αναπαραγωγής, ευθύνεται για τη μολυσματικότητα του ιού, την εκδήλωση συμπτωμάτων, καθώς και για το εύρος ξενιστών (Valli et al., 2021). Η πρωτεολυτική διάσπαση των προϊόντων αυτών όμως έχει προταθεί ότι έχει ρυθμιστικό ρόλο (Revers & García, 2015), ενώ παρουσία της 6K1 ως μεμονωμένο προϊόν έχει και άλλες

λειτουργίες που παραμένουν ακόμα ασαφείς, αλλά φαίνεται να εμπλέκεται στη μολυσματικότητα (Revers & García, 2015).

Πρωτεΐνη CI (Cylindrical Inclusion)

Η CI αποτελεί το μεγαλύτερο προϊόν της πολυπρωτεΐνης (70 kDa), αποτελεί μείζουσα σημασία στην ταξινόμηση, καθώς η αλληλουχία της είναι ξεχωριστή για τους ιούς της οικογένειας *Potyviridae* (Valli et al., 2021) και έχει δράση ΑΤΡάσης και RNA ελικάσης, συμμετέχοντας έτσι στη διαδικασία του πολλαπλασιασμού του ιικού γονιδιώματος (Revers & García, 2015). Χαρακτηριστικός είναι ο σχηματισμός ειδικών κυλινδρικών εγκλείστων σχήματος ανεμόμυλου στο κυτταρόπλασμα (cytoplasmic pinwheel cylindrical inclusions) των μολυσμένων κυττάρων (Εικ. 5Γ), καθώς και τις κωνικές δομές στις πλασμοδέσμες. Αναλυτικότερα, η CI αλληλεπιδρά με την P3N-PIPO κατά τη διάρκεια της διακυτταρικής μετακίνησης και συμμετέχει σε αυτή μέσω των κωνικών δομών που σχηματίζονται στις πλασμοδέσμες και επιτρέπουν τη διέλευση του ιού μέσω αυτών (Revers & García, 2015, López-Moya & García, 1999).

Πρωτεΐνη 6K2 (6-kDa peptide 2)

Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, της οποίας ο βασικός ρόλος φαίνεται να αφορά τον πολλαπλασιασμό του ιού, καθώς προσδένει το σύμπλοκο ιικής αντιγραφής (VRC) στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου και συμμετέχει στη διαμόρφωση των μεμβρανικών δομών στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντιγραφή (Valli et al., 2021). Στον ιό της πατάτας Α (potato virus A ,PVA) έχει αναφερθεί πιθανή εμπλοκή της 6K2 στη διασυστηματική μετακίνηση του ιού και την εκδήλωση συμπτωμάτων με τρόπους ανεξάρτητους μεταξύ τους.

Πρωτεΐνη NIa (Nuclear Inclusion a)

Το προϊόν αυτό είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό κρυστάλλινων εγκλείστων (inclusion bodies) που εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου, αλλά έχουν επίσης βρεθεί και στο κυτταρόπλασμα (Revers & García, 2015). Η πρωτεΐνη έχει μέγεθος 49kDa συνολικά και φέρει δύο διακριτές περιοχές, που έπειτα από εσωτερική διάσπαση προκύπτουν δύο διαφορετικές πρωτεΐνες: η VPg (21 kDa) που είναι συνδεδεμένη ομοιοπολικά στο 5' άκρο και την NIa-pro (28 kDa), που αποτελεί την πρωτεάση σερίνης (López-Moya & García, 1999, Valli et al., 2021). Διαθέσιμα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η **VPg** δρα ως εκκινήτης κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, καθώς κατευθύνεται προς τις μεμβρανώδεις δομές που έχει διαμορφώσει ο ιός (Revers & García, 2015) και αλληλεπιδρά/υποβαθμίζει συστατικά της RNA σίγησης καταστέλλοντας έτσι την άμυνα του ξενιστή (Valli et al., 2021). Η φωσφορυλίωση και η μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση των λειτουργιών της VPg. Επίσης, η αλληλεπίδραση της VPg με φυτικούς παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (όπως είναι ο eIF4E και τα ισόμορφά του) φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάφραση, στην αντιγραφή και στη μολυσματικότητα των Poty-ιών (Revers & García, 2015) και τέλος, φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με άλλες φυτικές πρωτεΐνες που αναφέρονται ως VPg-interacting proteins (PVIP)

υποβοηθώντας τη μετακίνηση (Astier, 2007, Hull, 2013). Όταν η VPg έχει αποσπαστεί από τη NIa συνδέεται ομοιοπολικά με το 5' άκρο του γονιδιώματος, ενώ όταν είναι ακόμα συνδεδεμένη στη NIa εντοπίζεται στον πυρήνα του ξενιστή και τέλος με τη μορφή συμπλόκου 6K2–VPg–NIaPro εντοπίζεται σε μεμβρανώδεις δομές που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η **NIa-pro** καταλύει την πέψη των περισσότερων πρωτεϊνών της πολυπρωτεΐνης, εκτός των P1 και HC-Pro που αποκόπτονται μόνες τους, δρα τόσο *cis* όσο και *trans* και έχει μοτίβα πρωτεάσης σερίνης αλλά το καταλυτικό κέντρο της έχει ένα κατάλοιπο κυστεΐνης (López-Moya & García, 1999).

Πρωτεΐνη NIb (Nucleon Inclusion B)

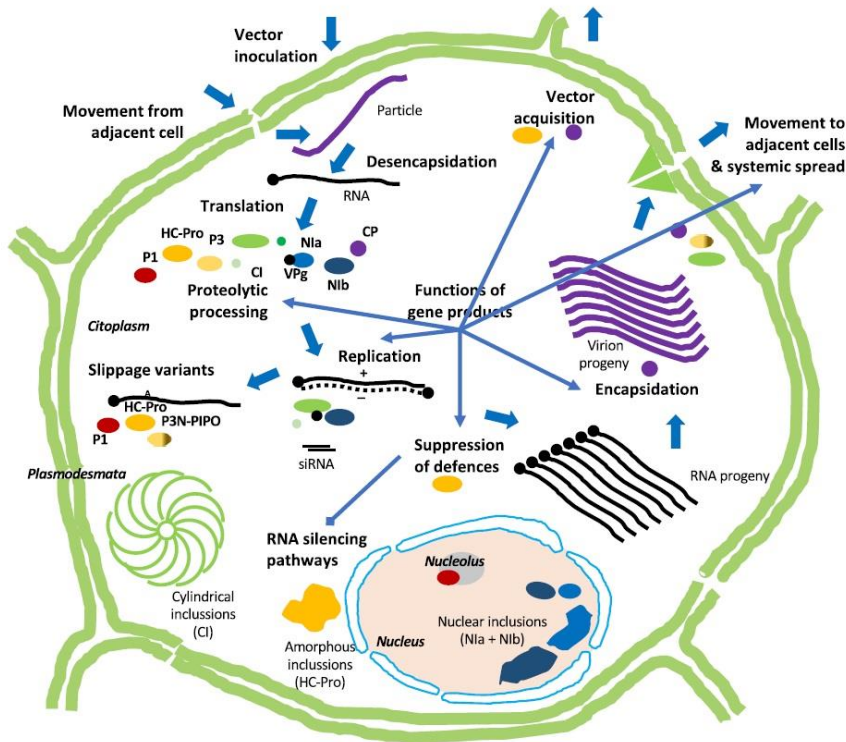
Υπεύθυνη για τον πολλαπλασιασμό του ιικού γονιδιώματος είναι η NIb που πρόκειται για RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA Polymerase, RdRp), μεγέθους 56kDa. Σχηματίζει πυρηνικά έγκλειστα (nuclear inclusions) στα μολυσμένα κύτταρα και κατευθύνεται προς τις μεμβρανώδεις δομές του πυρήνα μέσω κάποιων σημάτων στην αλληλουχία της (Valli et al., 2021), στις οποίες πραγματοποιείται η αντιγραφή έπειτα από αλληλεπίδραση με τη NIa. Τέλος, η NIb αλληλεπιδρά με φυτικούς παράγοντες (eEF1A, PABP και Hsc70-3) προκειμένου να σχηματίσει το VRC (Revers & García, 2015).

Καψιδιακή πρωτεΐνη CP

Η τελευταία πρωτεΐνη στο 3' άκρο του ιικού γονιδιώματος είναι μια CP (30–47 kDa), η κεντρική περιοχή της οποίας είναι υψηλά συντηρημένη στο γένος, ενώ η N-περιοχή που βρίσκεται εκτεθειμένη στην επιφάνεια του ιοσωματίου (Εικ. 5Α) είναι εξαιρετικά μεταβλητή (Revers & García, 2015). Η πρωτεΐνη αυτή, πέρα από την καψιδίωση και την προστασία του ιικού γονιδιώματος, φαίνεται να συμμετέχει σε πολλαπλές λειτουργίες κατά τη διάρκεια του κύκλου μόλυνσης του ιού, στη διακυτταρική μετακίνηση μέσω αύξησης του SEL (Size Exclusion Limit) των πλασμοδεσμών και στη διασυστηματική μετακίνηση. Όμως βασικότερη λειτουργία της αποτελεί η εμπλοκή της στην αφιδομετάδοση μέσω του συντηρημένου μοτίβου DAG, που βρίσκεται στο N-τελικό άκρο το οποίο συνδέεται με την HC-Pro και εκείνη με τη σειρά της με το στίλετο της αφίδας, επιτρέποντας έτσι τη μετάδοση του ιού σε νέα φυτά (Valli et al., 2021).

5.5. Κύκλος ζωής των ιών του γένους *Potyvirus*

Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών των Potyv-ιών είναι πολυλειτουργικές και συμμετέχουν σε πολλαπλές λειτουργίες. Η μόλυνση από τους ιούς αυτούς είναι ένα ρυθμισμένο δίκτυο εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων καθώς έχουν καταγραφεί 33 αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών των ιών του γένους αυτού (Revers & García, 2015), οι οποίες δεν έχουν καθοριστεί ολοκληρωτικά ακόμα.



Εικόνα 8 Σχηματική απεικόνιση του κύκλου μόλυνσης ενός φυτικού κυττάρου από τους Ρογ-ιούς. Ο κύκλος ξεκινάει με είσοδο του ιού στο κύτταρο, ακολουθεί απόδοση του ισωματίου και μετάφραση του RNA. Το σύμπλοκο αναπαραγωγής στο οποίο εμπλέκονται πρωτεΐνες του ιού και ο eIF4E παράγοντας του ξενιστή, παράγει την (-) πολικότητα αλυσίδα RNA από το γονιδιωματικό, η οποία χρησιμεύει ως εκμαγείο για την παραγωγή πολλών αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος. Κατά την αντιγραφή παράγεται ένα προσωρινά δίκλωνο μόριο RNA που πυροδοτεί την άμυνα του ξενιστή, η οποία όμως καταστέλλεται από ικές πρωτεΐνες (πχ HC-Pro). Στο μοτίβο GA₆ πραγματοποιείται ολίσηση της RdRp κι έτσι παράγονται διαπλασιασικά προϊόντα. Τα προϊόντα της αντιγραφής μετά μπορούν είτε να μετακινηθούν στα γειτονικά κύτταρα μέσω των πλασμοδεσμών με την εμπλοκή των P3N-PIPO, CI, VPg και CP, είτε να ενκαψιδιωθούν προκειμένου να αποκτηθεί το ισωμάτιο από το φορέα και να μεταδοθεί σε νέους ξενιστές (Valli et al, 2021).

Μετά την είσοδο του ιού στον ξενιστή ακολουθεί η έκδυση του ισωματίου στο κυτταρόπλασμα με μηχανισμό που δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά φαίνεται ότι εμπλέκεται η HC-Pro, καθώς αυτή αλληλεπιδρά με τις άκρες του ισωματίου (Revers & García, 2015). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μετάφραση του γονιδιώματος για να κωδικοποιηθούν οι απαραίτητες ικές πρωτεΐνες για την αντιγραφή του. Η πρωτεΐνη VPg που βρίσκεται συνδεδεμένη στο 5' άκρο του γονιδιώματος μιμείται τη δομή καλύπτρας που βρίσκεται στο 5' άκρο του κυτταρικού mRNA και αλληλεπιδρά με πολλούς φυτικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη μετάφραση.

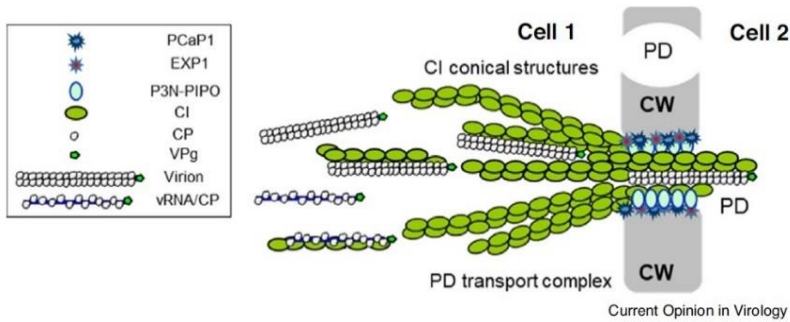
Η αντιγραφή λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου σε μεμβρανικά κυστίδια (membranous vesicles) που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και τροποποιούνται με τη βοήθεια πρωτεϊνών τόσο του ιού, όσο και του ξενιστή (Valli et al., 2021). Έχει βρεθεί ότι η ική πρωτεΐνη 6K2 περιέχει μια υδροφοβική περιοχή, η οποία αλληλεπιδρά με την VPg-NlaPro, αλληλεπίδραση που αποτελεί το πρώτο βήμα στη συγκρότηση του VRC. Το σύμπλοκο 6K2-VPg-NlaPro σχηματίζει τα κυτταροπλασματικά κυστίδια που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi και στα οποία πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός του ιού. Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής εμπλέκονται σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες του γονιδιώματος (εκτός από τις CP P3N-PIPO) είτε ανεξάρτητα, είτε ως

σύμπλοκα και η διαδικασία βασίζεται στο VRC, που εντοπίζεται στα μεμβρανικά κυστίδια. Αυτό αποτελείται από τις ιικές πρωτεΐνες N1b, N1a-pro, 6K2-N1a, CI-6K2, HC-Pro, CI, P3, και πιθανόν τις P3+6K1, καθώς και από παράγοντες του κυττάρου, όπως είναι ο ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF4 που αλληλεπιδρά με την VPg (Inoue-Nagata et al., 2022). Η N1b είναι η πολυμεράση που πραγματοποιεί την αντιγραφή του γονιδιώματος, η CI είναι η RNA ελικάση, η 6K2 οδηγεί το σύμπλοκο αναπαραγωγής στις μεμβρανικές δομές (κυστίδια) και το αγκιστρώνει σε αυτές, και η N1a έπειτα από πέψη απελευθερώνει την VPg η οποία αλληλεπιδρά με τη N1b και έτσι λειτουργεί ως εκκινήτης της διαδικασίας (López-Moya & García, 1999, Astier, 2007, Revers & García, 2015). Ο ρόλος της HC-Pro στον πολλαπλασιασμό έγκειται στη δράση της ως καταστολέας της γονιδιακής σίγησης, η οποία ενεργοποιείται ως απόκριση στην παρουσία δίκλωνου μορίου RNA, όπως είναι η αναπαραγωγική μορφή (replicative form), που συντίθεται κατά την αντιγραφή και την προστατεύει από την άμυνα του ξενιστή (Valli et al., 2021). Επίσης, η αλληλεπίδραση της HC-Pro με άλλες δύο βασικές στον πολλαπλασιασμό ιικές πρωτεΐνες (CI, VPg), καθώς και δύο παράγοντες του φυτού [eIF4E και eIF(iso)4E], ενισχύει τον ρόλο της στη διαδικασία αυτή (Revers & García, 2015).

Προκειμένου να είναι επιτυχής η μόλυνση από έναν ιό είναι απαραίτητο να μπορεί να μετακινηθεί εντός του φυτού, ωστόσο φαίνεται ότι η διαδικασία αυτή είναι στενά συνδεδεμένη με τον πολλαπλασιασμό τους, καθώς πρώτον η ολίσθηση της RdRp έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση της P3N-PIPO, πρωτεΐνη που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη διακυτταρική μετακίνηση και δεύτερον τα κυστίδια στα οποία πραγματοποιείται η αντιγραφή μετακινούνται μέσα στο κυτταρόπλασμα, φτάνοντας στα πλασμοδέσμες προκειμένου να μεταφερθούν στα υγιή γειτονικά κύτταρα και να συνεχίσει η μόλυνση (Wang, 2021, Inoue-Nagata et al., 2022 και Valli et al., 2021). Στη διακυτταρική μετακίνηση των Ρογ-ιών δεν υπάρχει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη μεταφοράς, αλλά οι κύριες πρωτεΐνες που εμπλέκονται είναι οι CP, CI, και P3N-PIPO: το σύμπλοκο μετακίνησης, το οποίο πιθανολογείται ότι πρόκειται για ολόκληρο ιοσωμάτιο (Wang, 2021), διαπερνάει τις πλασμοδέσμες μέσω των κυτταροπλασματικών εγκλείστων κωνικού σχήματος που σχηματίζονται από την CI με τη βοήθεια της P3N-PIPO (Εικ. 5 και 8). Αναλυτικότερα, η P3N-PIPO δεσμεύει την CI και το σύμπλοκο CI/P3N-PIPO οδηγείται και αγκιστρώνεται στις πλασμοδέσμες όπου αλληλεπιδρά με την φυτική PCaP1, μια πρωτεΐνη δέσμευσης του ασβεστίου που είναι αγκιστρωμένη στη κυτταρική μεμβράνη (Εικ. 9) και στη συνέχεια περισσότερα μόρια CI δεσμεύονται στο σύμπλοκο CI/P3N-PIPO/PCaP1, έως ότου σχηματιστούν οι κωνικές δομές. Η αλληλεπίδραση της P3N-PIPO με την PCaP1 φαίνεται να υποβοηθά το σύμπλοκο μετακίνησης να προχωρήσει μέσω των κωνικών σχηματισμών στις πλασμοδέσμες προς τα γειτονικά κύτταρα (Wang, 2021, Vijayarajani et al., 2012, Revers & García, 2015) και πιθανολογείται ότι η αλληλεπίδραση αυτή επηρεάζει άμεσα τις συγκεντρώσεις ασβεστίου στις πλασμοδέσμες, το οποίο με τη σειρά του μειώνει τα επίπεδα καλλόζης σε αυτά, με αποτέλεσμα την αύξηση του SEL επιτρέποντας τη διακυτταρική μετακίνηση. Παράλληλα η CP και νεοσυντιθέμενα μόρια ιικού RNA απελευθερώνονται από τα κυστίδια αναπαραγωγής, οδηγούνται προς τις πλασμοδέσμες,

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

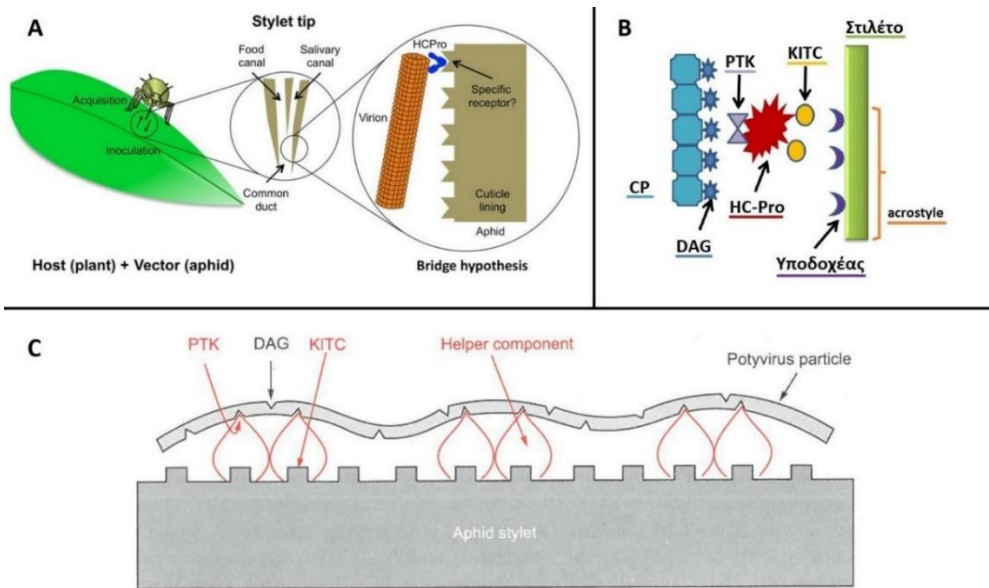
σχηματίζουν τα σύμπλοκα μετακίνησης (είτε ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα, είτε με ισωμάτια), τα οποία δεσμεύονται στις κωνικές δομές, που σχηματίζονται από τη CI και ταξιδεύουν μέσω των πλασμοδεσμών στα γειτονικά κύτταρα. Τέλος, σύμφωνα με το μοντέλο που προτείνεται από τον Wang (2021), στη διαδικασία της διακυτταρικής μετακίνησης εμπλέκεται ακόμα μια πρωτεΐνη α-εξπανσίνη (*α-expansin*) της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία εδράζεται επίσης στις πλασμοδέσμες (Εικ. 9) και επιστρατεύεται από τους Ρογυ-ιούς για να χαλαρώσει το κυτταρικό τοίχωμα, προκειμένου να υποβοηθηθεί η διακυτταρική μετακίνηση και η αντιγραφή.



Εικόνα 9 Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου διακυτταρικής μετακίνησης των ιών του γένους *Potyvirus* Η P3N – PIPO που βρίσκεται στις πλασμοδέσμες οδηγεί την CI προς τα εκεί απ’ όπου περνάει το ισωμάτιο μέσω της κωνικής δομής που σχηματίζει η CI. Στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται επίσης φυτικές πρωτεΐνες (PCaP1 και η α-εξπανσίνη EXPA1) που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και ανοίγουν τις πλασμοδέσμες ώστε να είναι δυνατή η διέλευση του ισωματίου ή του συμπλόκου αναπαραγωγής είτε μαζί με την CI είτε χωρίς (CW= Κυτταρικό τοίχωμα) (Wang, 2021).

Ακολουθεί η διασυστηματική μετακίνηση του ιού εντός του φλοιώματος του μολυσμένου φυτού στην οποία συμμετέχουν οι CP, VPg και πιθανώς οι 6K2 και HC-Pro (Revers & García, 2015, Bhoi et al., 2022) και το τελευταίο βήμα στον κύκλο μόλυνσης των ιών του γένους *Potyvirus* είναι η μετάδοση του ιού σε νέα υγιή φυτά, διαδικασία που εξαρτάται από το φορέα τους, τις αφίδες. Συγκεκριμένα η επιτυχία της μετάδοσης βασίζεται στην ικανότητα των φορέων να αποκτήσουν τον ιό και την ύπαρξη τριών συντηρημένων μοτίβων που βρίσκονται στις ιικές πρωτεΐνες HC-Pro και CP, σύμφωνα με τη θεωρία της “γέφυρας” (Εικ. 10). Η θεωρία αυτή προτείνει ότι η HC-Pro συνδέει τα ισωμάτια με τα στοματικά μόρια της αφίδας (Valli et al., 2018) μέσω δύο ανεξάρτητων περιοχών της αλληλουχίας της: από τη μία, το συντηρημένο μοτίβο PTK (αλληλουχία Pro-Thr-Lys) στο C- τμήμα της HC-Pro φαίνεται να συνδέεται με το συντηρημένο μοτίβο DAG (αμινοξική αλληλουχία Asp-Ala-Gly) στο N-τελικό άκρο της CP και από την άλλη, το μοτίβο KITC (αλληλουχία Lys-Ile-Thr-Cys) στο N-τελικό άκρο της HC-Pro συνδέεται με υποδοχείς που εδράζονται στο στυλέτο της αφίδας, με τρόπο που δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ακόμα. Θεωρείται όμως ότι οι υποδοχείς βρίσκονται στην άκρη του στυλέτου (stylet tip/ acrostyle), όπου συγχωνεύονται ο αγωγός διατροφής με τον αγωγό σιέλου και σχηματίζουν έναν κοινό αγωγό (common duct), όπως φαίνεται στην Εικόνα 10A (Gadhavre et al., 2020, Bhoi et al., 2022).

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή



Εικόνα 10 Σχηματική αναπαράσταση της μετάδοσης των Potyv-ιών από τις αφίδες σύμφωνα με τη θεωρία της γέφυρας. Α. Αριστερά: διατροφή αφίδας από μολυσμένο φυτό. Κέντρο: η άκρη του στυλέτου της αφίδας στην οποία το κανάλι διατροφής που συνδέεται με το σιελογόνο κανάλι. Δεξιά: η HC-Pro είναι συνδεδεμένη με μόρια CP και αλληλεπιδρά με υποδοχείς που βρίσκονται στο στυλέτο του εντόμου (Valli et al, 2018), Β) Η HC-Pro λειτουργεί ως γέφυρα συνδέοντας την CP του ιού με το στυλέτο της αφίδας. Το μοτίβο KITC στο N-τελικό άκρο της συνδέεται με υποδοχείς στην άκρη του στυλέτου (acrostyle), ενώ το PTK μοτίβο που βρίσκεται προς το C-τελικό άκρο της HC-Pro συνδέεται με το μοτίβο DAG (N-τελικό άκρο) της CP (Bhoi et al., 2022), Γ) Ο ρόλος της HC-Pro στη σύνδεση του ιοσωματίου με το στυλέτο του φορέα (Astier, 2007).

5.6. Μέθοδοι ανίχνευσης των ιών του γένους *Potyvirus*

Η ανίχνευση των Potyv-ιών γίνεται εφικτή επιτυχώς με τη χρήση ορολογικών δοκιμών όπως είναι η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) και οι παραλλαγές της για τις οποίες υπάρχουν διαθέσιμα πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα. Οι δοκιμές αυτές πραγματοποιούνται ως επί το πλείστον σε επίπεδο γένους και αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ως αντιγόνο έναν επίτοπο που βρίσκεται στο συντηρημένο τμήμα της CP, δηλαδή στον πυρήνα της (Valli et al., 2021).

Η ανίχνευση των Potyv-ιών μπορεί να επιτευχθεί επίσης με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), χρησιμοποιώντας εκκινητές με τους οποίους ο ερευνητής μπορεί να ελέγξει πόσο εξειδικευμένη θα είναι η αντίδραση, δηλαδή με γενικευμένους (general ή universal) εκκινητές που στοχεύουν συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος μπορεί να γίνει ανίχνευση ιών του γένους, ενώ με εκκινητές που στοχεύουν σε ετερογενείς περιοχές του γονιδιώματος μπορεί να γίνει ανίχνευση συγκεκριμένου στελέχους ιού (Hull, 2013). Οι Zheng et al. (2008) ανέλυσαν τις πλήρεις αλληλουχίες που ήταν διαθέσιμες στη βάση GenBank και ανέφεραν 17 συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος εντός των γονιδίων CI, CP και NIb. Το τελευταίο φαίνεται να είναι το πιο συντηρημένο και συγκεκριμένα το μοτίβο GNNSGQ στο κέντρο του γονιδίου (Zheng et al., 2010) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ταξινόμησή τους (Ha et al., 2008).

Ο συνδυασμός ορολογικών μεθόδων, ακολουθούμενες από μοριακές έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικός στην ανίχνευση ιών, με εξαιρετική ευαισθησία (Valli et al., 2021). Η εφαρμογή νέων τεχνολογιών και περαιτέρω ανάπτυξη των ήδη υπαρχόντων προσφέρουν πιο ευαίσθητες και αποτελεσματικές μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί εξαιρετικά ευαίσθητες, ακριβείς και αξιόπιστες μέθοδοι ανίχνευσης των ιών όπως είναι η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR, qRT-PCR), η οποία βασίζεται στον υπολογισμό και την εμφάνιση, σε πραγματικό χρόνο, αυξανόμενης φθορίζουσας ακτινοβολίας ως αποτέλεσμα της ενίσχυσης του στόχου της αντίδρασης (Boonham et al., 2014) και με τον τρόπο αυτό, εκτός από την ανίχνευση ή όχι ενός ιού, είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου. Έως το 2005 ήταν διαθέσιμες περίπου 45 αλληλουχίες πλήρους γονιδιώματος ιών του γένους, αριθμός πολύ μικρός συγκριτικά με τα διαφορετικά είδη που έχουν βρεθεί, λόγω του μεγάλου μεγέθους του γονιδιώματος τους, καθώς και της έλλειψης συντηρημένων περιοχών σε αρκετές κωδικές περιοχές (Ha et al., 2008). Βάσει αυτών είναι διαθέσιμα ζεύγη εκκινητών που στοχεύουν στα γονίδια HC-Pro και CI για την ανίχνευση των Poty-ιών, η χρήση των οποίων, σε συνδυασμό με ζεύγη εκκινητών που είναι εξειδικευμένα σε επίπεδο είδους, παρέχει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού ολόκληρου του γονιδιώματος μιας απομόνωσης (Ha et al., 2008).

Ακόμα μια μέθοδος που έχει ξεκινήσει να χρησιμοποιείται για τη μοριακή ανίχνευση παθογόνων (μύκητες, βακτήρια, ιοί) ονομάζεται Recombinase Polymerase Amplification (RPA) και πρόκειται για μία καινοτόμο τεχνολογία ισοθερμικής ενίσχυσης, η οποία επιτρέπει σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (από 5 μέχρι 20 λεπτά), τον πολλαπλασιασμό τμημάτων του γονιδιώματος, χρησιμοποιώντας εκκινητές, με διαδικασία παρόμοια με εκείνη της PCR. Συλλέγεται ο φυτικός ιστός και στη συνέχεια στο φυτικό εκχύλισμα από φύλλα, άνθη, βλαστοί, ρίζες, κλπ., εκτελείται η αντίδραση με τη βοήθεια 3 ενζύμων σε θερμοκρασία 37°C. Επομένως η μέθοδος αυτή παρέχει ευαισθησία και είναι ταχύτερη αφού δεν απαιτείται επεξεργασία του δείγματος και μπορεί να εκτελεστεί εκτός του χώρου του εργαστηρίου (Qin et al., 2021).

5.7. Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση της εξάπλωσης των Poty-ιών με τη χρήση εντομοκτόνων είναι αναποτελεσματική λόγω του μη έμμουνου τρόπου μετάδοσης τους (Makkouk et al., 2012), καθώς ο χρόνος που απαιτείται για να δράσει το σκεύασμα στο έντομο είναι μεγαλύτερος από τη διάρκεια διατροφής του που απαιτείται για τη μετάδοση. Συχνά οι αφίδες προσλαμβάνουν τους Poty-ιούς των ψυχανθών από τη μηδική ή αυτοφυή και ζιζάνια της οικογένειας Fabaceae που φύονται στον ίδιο αγρό με την καλλιέργεια ή σε γειτονικό, γι' αυτό συνίσταται η απομάκρυνση και καταστροφή των φυτών αυτών (Makkouk et al., 2012) ή η αποφυγή φύτευσης ψυχανθών κοντά σε αυτά. Επίσης, η σπορά φυτών φρακτών που δεν αποτελούν ξενιστές των μη έμμουνων ιών όπως για παράδειγμα ο αραβόσιτος, περιφερειακά της καλλιέργειας, δρα

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

αποτελεσματικά στην πρόληψη εισόδου στην καλλιέργεια ιών όπως οι PVY, BCMV, BYMV και SbMV (Gadhane et al., 2020). Με τον τρόπο αυτό ο φορέας διατρέφεται από τα φυτά φράχτες χρονικό διάστημα αρκετό για να χάσει την ιοφόρο ικανότητά του. Πρόκειται για είδη που δεν αποτελούν ξενιστές των μη έμμονων ιών που απειλούν την καλλιέργεια, κι επομένως περιορίζεται στην πρόληψη με εφαρμογή καλλιεργητικών τεχνικών και χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. Ωστόσο, στην περίπτωση των BCMV και BYMV η πρωτογενής μόλυνση ενός αγρού με ψυχανθή επιτυγχάνεται και μέσω μολυσμένου σπόρου, επομένως η χρήση πιστοποιημένων σπόρων αποτελεί σημαντικό μέτρο πρόληψης και διαχείρισης.

6. Ιοί των ψυχανθών του γένους *Potyvirus*

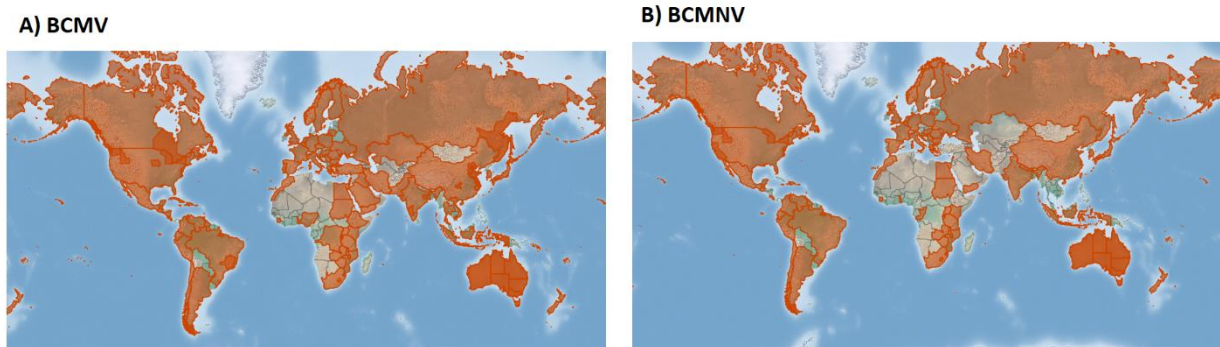
Όσον αφορά τα ψυχανθή (καλλιεργούμενα και μη), οι βασικότεροι ιοί που ανήκουν στο γένος *Potyvirus* και τα προσβάλλον καταγράφονται στον Πίνακα 4, όμως ως πιο καταστρεπτικά είδη αναφέρονται ο BCMV, ο οποίος προκαλεί σοβαρές ζημιές στο κοινό φασόλι που μπορεί να ανέρχονται ακόμα και στο 100% (Worrall et al., 2015) και ο συγγενής του, BCMNV. Οι ιοί αυτοί είναι πολύ κοινοί και έχουν εξαπλωθεί παγκοσμίως σε περισσότερες από 57 χώρες που καλλιεργούνται είδη φασολιών (Εικ. 11) (Tang & Feng, 2022), εν μέρει λόγω της εξαγωγής μολυσμένου σπόρου και γενετικού υλικού. Σε κάποιες από αυτές τις χώρες φαίνεται ο BCMV να αποτελεί τον πιο διαδεδομένο, ενώ σε άλλες μπορεί όπως να κυριαρχεί είτε ο BCMNV είτε ο BYMV (Jordan & Hammond, 2008).

Πίνακας 4 Ιοί του γένους *Potyvirus* που προσβάλλουν τα ψυχανθή καθώς και οι ξενιστές τους (Jordan & Hammond, 2008, Chatzivassiliou, E. K., 2021, CABI, 2022).

Ιός	Ακρωνύμιο	Ξενιστές – Ψυχανθή
Bean yellow mosaic virus	BYMV	Μηδική, φασολιά, αμπελοφάσουλα, ρεβιθιά, κουκιά, φακή, <i>Medicago</i> spp., μπιζέλι, αραχίδα, <i>Trifolium</i> spp.
Bean common mosaic necrosis virus	BCMNV	Φασολιά, αμπελοφάσουλα, αραχίδα
Bean common mosaic virus	BCMV	<i>Medicago</i> spp (Μηδική), φασολιά, αμπελοφάσουλα, κουκιά, αραχίδα, σόγια, λούπινο
Beet mosaic virus	BtMV	Ρεβιθιά
Bidens mosaic virus	BiMV	Κουκιά, μπιζέλι
Bidens mottle virus	BiMoV	Κουκιά
Clover yellow vein virus	CIYVV	Μηδική, φασολιά, κουκιά, μπιζέλι, <i>Trifolium</i> spp.
Cowpea aphid-borne mosaic virus	CABMV	Φασολιά, αμπελοφάσουλα, αραχίδα
Lettuce mosaic virus	LMV	Ρεβιθιά, μπιζέλι
Papaya ringspot virus	PRSV	Μπιζέλι
Passion fruit woodiness virus	PWV	Μπιζέλι, αραχίδα
Pea seed-borne mosaic virus	PSbMV	Μηδική, φασολιά, ρεβιθιά, κουκιά, φακή, μπιζέλι
Peanut mottle virus	PeMoV	Φασολιά, αμπελοφάσουλα, <i>Medicago</i> spp., μπιζέλι, αραχίδα, <i>Trifolium</i> spp.
Plum pox virus	PPV	<i>Trifolium</i> spp.
Soybean mosaic virus	SMV	Μηδική, φασολιά, αμπελοφάσουλα
Turnip mosaic virus	TuMV	Ρεβιθιά, κουκιά, μπιζέλι, φακή
Watermelon mosaic virus	WMV	<i>Medicago</i> spp., μπιζέλι
Wisteria vein mosaic virus	WVMV	Φασολιά
Zucchini yellow mosaic virus	ZYMV	<i>Trifolium</i> spp.

6.1. Ιός του κοινού μωσαϊκού της φασολιάς (Bean common mosaic virus, BCMV) και Ιός του κοινού μωσαϊκού με νεκρώσεις της φασολιάς (Bean common mosaic necrosis virus, BCMNV)

Οι πιο συνηθισμένοι και καταστρεπτικοί ιοί του γένους *Potyvirus* που προσβάλλουν ψυχανθή είναι οι BCMV και BCMNV, που προκαλούν την ασθένεια γνωστή ως «Κοινό μωσαϊκό της φασολιάς». Οι ιοί αυτοί στο παρελθόν θεωρούνταν ως ένα είδος, αλλά στη συνέχεια ταξινομήθηκαν σε δύο οροτύπους (serotypes) βάσει των ορολογικών αντιδράσεων τους, την αλληλουχία του πολυπεπτιδίου της CP, καθώς και την ομοιότητα της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους: στους οροτύπους Α και Β που αντιπροσωπεύουν τον BCMNV και BCMV, αντίστοιχα. Τα δύο αυτά είδη διαφέρουν επίσης μεταξύ τους στο μήκος των ισοσωματίων, στο μέγεθος της CP και στις βιολογικές ιδιότητες (Jordan & Hammond, 2008). Και τα δύο αυτά είδη μπορούν να μεταδοθούν μέσω αφίδων με μη έμμονο τρόπο, με σπόρο, με γύρη και μηχανικά στο εργαστήριο, η αποτελεσματικότητα των οποίων όμως εξαρτάται τόσο από την ποικιλία του φυτού, όσο και από το στέλεχος του ιού (Tang & Feng, 2022). Η γεωγραφική κατανομή και των δύο αυτών είναι παγκόσμια (Εικ. 11), ωστόσο ο BCMV φαίνεται να είναι πιο διαδεδομένος στις περιοχές όπου καλλιεργούνται φυτά κοινού φασολιού, αμπελοφάσουλων, σόγιας και μπιζελιού και ως περιοχή προέλευσής του αναφέρεται η Νότια Αμερική, η οποία έχει τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία στις καλλιέργειες αυτές (Jordan & Hammond, 2008). Ο BCMNV θεωρείται ότι προέρχεται από την Αφρική, στην οποία επικρατεί και προκαλεί μεγαλύτερες ζημιές συγκριτικά με τον BCMV.



Εικόνα 11 Η παγκόσμια γεωγραφική κατανομή του Α) *Bean common mosaic virus* (BCMV) και Β) *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) για το έτος 2023 (Centre for Agriculture and Biosciences International, CABI).

Ιστορία & ταξινόμηση

Η πρώτη αναφορά του BCMV συνέβη στις ΗΠΑ το 1917 έπειτα από την παρατήρηση μιας ασθένειας που προκαλούσε μωσαϊκά στα φυτά φασολιού που ονομάστηκε «μωσαϊκό της φασολιάς» (bean mosaic disease) και ο ιός υπεύθυνος για την ασθένεια αυτή είχε ονομασίες όπως bean virus 1, bean mosaic virus και *rhaseolus virus* 1. η ονομασία BCMV, που χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα δόθηκε το 1934. Λίγα χρόνια αργότερα, το 1943, βάσει των διαφορετικών συμπτωμάτων που προκαλούν στις ποικιλίες

φασολιού, τα στελέχη του BCMV κατηγοριοποιήθηκαν σε 7 παθότυπους (PG I–VII) (pathogroups, PGs), οι οποίοι επίσης διαφέρουν στις βιολογικές τους ιδιότητες, όπως είναι το εύρος των ξενιστών και η παθογένειά τους (Worrall et al., 2015), ενώ το 2015 αναφέρθηκε 8^{ος} παθότυπος (PG VIII) (Tang & Feng, 2022). Τη δεκαετία του 1980 πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διαχωρισμός τους ορολογικά σε οροτύπους (serotypes) Α και Β: Ο ορότυπος Α αποτελείται από στελέχη που προκαλούν συμπτώματα αγγειακής νέκρωσης σε φυτά που κατέχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας “I”, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία, ενώ τα στελέχη του οροτύπου Β προκαλούν κυρίως μωσαϊκά, ενώ μερικά στελέχη μπορούν επίσης να προκαλέσουν νεκρώσεις, αλλά μόνο όταν η θερμοκρασία υπερβεί τους 30°C. Στη συνέχεια, η ανάλυση της αλληλουχίας της CP καθώς και της 3’-UTR υπέδειξε ότι οι ορότυποι αυτοί αντιπροσωπεύουν στην πραγματικότητα διαφορετικά είδη (Jordan & Hammond, 2008) με τον ορότυπο Α να αποτελεί πλέον τον BCMNV, ενώ ο ορότυπος Β τον BCMV, του οποίου δύο στελέχη είναι ικανά να προκαλέσουν νεκρώσεις. Η πρώτη καταχώρηση αλληλουχίας του BCMV στη βάση GenBank, πραγματοποιήθηκε το 1992 από την Ισπανία, ενώ του BCMNV το 1995, από τις ΗΠΑ (Tang & Feng, 2022).

Βάσει των παραπάνω καθώς και των κριτηρίων που αναφέρθηκαν στην ενότητα 5.1, δηλαδή ότι δύο είδη του γένους *Potyvirus* θεωρούνται ξεχωριστά εφόσον η ομοιότητα της αλληλουχίας της CP, καθώς και η πλήρης νουκλεοτιδική αλληλουχία τους, είναι μικρότερη από 80% και 85%, αντίστοιχα, προκύπτει ότι τα BCMV και BCMNV είναι ξεχωριστά είδη. Όσον αφορά τα στελέχη του κάθε είδους, 19 στελέχη έχουν καταχωρηθεί για τον BCMV που στο παρελθόν θεωρούνταν ξεχωριστά είδη (όπως είναι ο peanut stripe virus, azuki mosaic virus, blackeye cowpea mosaic virus, κ.ά.) λόγω του διαφορετικού εύρους ξενιστών, ενώ 5 για τον BCMNV (Jordan & Hammond, 2008, Worrall et al., 2015). Διαφορετικά στελέχη μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικά συμπτώματα στον ίδιο ξενιστή. Η υψηλή αυτή παραλλακτικότητα εντός του είδους παρατηρείται στο γένος *Potyvirus* λόγω των μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών που λαμβάνουν χώρα. Οι πιο συνηθισμένες περιοχές του γονιδιώματος του BCMV που συμβαίνουν ανασυνδυασμοί εντοπίζονται στο 5’ τμήμα του, συμπεριλαμβανόμενης της 5’-UTR, της P1 και της HC-Pro (Tang & Feng, 2022)

Έχει παρατηρηθεί ακόμα το φαινόμενο δημιουργίας νέων στελεχών κατά τη μικτή μόλυνση ενός ξενιστή με διαφορετικά στελέχη ή διαφορετικά είδη, όπως είναι για παράδειγμα το στέλεχος NL-3 K του BCMNV το οποίο είναι αποτέλεσμα ανασυνδυασμού μεταξύ στελεχών των BCMV και BCMNV (Arli-Sokmen et al., 2016). Για την ταξινόμηση των απομονώσεων του BCMV χρησιμοποιείται η 3’-UTR (Worrall et al., 2015) και το γονίδιο της CP, καθώς παρατηρείται ετερογένεια και οι διαφοροποιήσεις σε αυτά οδηγούν στην ομαδοποίηση των απομονώσεων του BCMV βάσει των ξενιστών του ή της γεωγραφικής προέλευσής τους (Jordan & Hammond, 2008).

Οι BCMV και BCMNV παρουσιάζουν την τυπική γονιδιακή οργάνωση και μορφολογία ισωματίων του γένους *Potyvirus*, αλλά παρουσιάζουν μεταξύ τους κάποιες διαφορές: τα ισωμάτια του BCMV έχουν μήκος που φτάνει τα 847-886nm, ενώ του BCMNV 810-818 nm, αποτελούμενα από 10000bp και 9600bp

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

γονιδίωμα αντίστοιχα, που ενκαψιδιώνεται από 1700-2000 μόρια CP μεγέθους 33kDa για τον BCMV και 30 kDa για τον BCMNV (Jordan & Hammond, 2008). Επίσης, και τα δύο αυτά είδη κωδικοποιούν τρεις πρωτεάσες, όμως διαφέρουν στις θέσεις που πραγματοποιείται η ενζυμική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης, με εξαίρεση την θέση HC-Pro/P3 (Jordan & Hammond, 2008). Τέλος, διαφοροποιήσεις μεταξύ των απομονώσεων και των δύο ιών στην 5'-UTR και N- άκρο της P1 είναι ικανές να προκαλέσουν διαφορετικά συμπτώματα στα φυτά φασολιού (Jordan & Hammond, 2008).

Ξενιστές

Ο BCMV έχει ευρύ φάσμα ξενιστών, μολύνοντας περισσότερα από 100 είδη και όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα και καταστρεπτικά παθογόνα ιολογικής προέλευσης των ψυχανθών (Πιν. 5) με βασικό ξενιστή το κοινό φασόλι αλλά και αραχίδα, ρεβιθιά, σόγια, φακή, κουκιά, κλπ. Εκτός αυτών έχει βρεθεί ότι προσβάλλει και τα είδη *Cudrania tricuspidata*, *Passiflora foetida*, *Sesamum indicum* και *Alpinia purpurata* (CABI, 2022). Κύριες εστίες μόλυνσης του BCMV αποτελούν αυτοφυή φυτά και μολυσμένα σπορόφυτα, ενώ σε δεύτερο βαθμό μολυσμένες καλλιέργειες μηδικής και τριφυλλιού (Κοκκίνη, 2002).

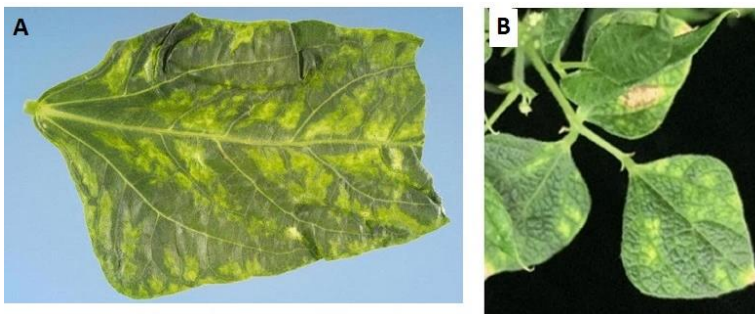
Πίνακας 5 Φυτά της οικογένειας Fabaceae που αποτελούν ξενιστές του bean common mosaic virus (BCMV) (Jordan & Hammond, 2008, CABI, 2022, Tang & Feng, 2022).

Είδος	Κοινή Ονομασία
<i>Arachis hypogaea</i>	Αραχίδα
<i>Cajanus cajan</i>	Pigeon pea
<i>Cassia tora</i>	Sickle senna
<i>Cicer arietinum</i>	Ρεβιθιά
<i>Crotalaria incana</i>	Woolly Rattlepod
<i>Crotalaria juncea</i>	Sunn hemp
<i>Crotalaria micans</i>	Shining Rattlepod
<i>Crotalaria pallida</i>	Smooth crotalaria
<i>Crotalaria spectabilis</i>	Showy crotalaria
<i>Glycine max</i>	Σόγια
<i>Lablab purpureus</i>	Φασόλι υάκινθου
<i>Lens culinaris</i>	Φακή
<i>Lupinus albus</i>	Λευκό λούπινο
<i>Lupinus luteus</i>	Κίτρινο λούπινο
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Siratro
<i>Macrotyloma axillare</i>	Perennial horse gram
<i>Medicago sativa</i>	Μηδική
<i>Melilotus albus</i>	White sweet clover
<i>Pachyrhizus erosus</i>	Yam bean
<i>Phaseolus coccineus</i>	Φασόλια γίγαντες
<i>Phaseolus lunatus</i>	lima bean ή butter bean
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Φασολιά
<i>Pueraria phaseoloides</i>	Tropical kudzu
<i>Rhynchosia minima</i>	
<i>Vicia faba</i>	Κουκιά
<i>Vigna angularis</i>	Adzuki bean
<i>Vigna radiata</i>	Ροβίτσα ή mung bean

<i>Vigna unguiculata</i>	Αμπελοφάσουλα
<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>unguiculata</i>	Μαυρομάτικο φασόλι
<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i>	Asparagus bean
<i>Vigna vexillata</i>	Wild sweetpea ή Red noodle bean

Συμπτώματα

Τα συμπτώματα που παρουσιάζονται σε φυτά προσβεβλημένα με τους BCMV ή BCMNV μοιάζουν μεταξύ τους, αλλά εξαρτώνται από το στέλεχος του ιού, την ποικιλία του ξενιστή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) κοινό μωσαϊκό και παραμόρφωση των φύλλων και β) νέκρωση του στελέχους και του φυτού, γνωστή ως “black root”. Αναλυτικότερα, στελέχη του BCMV και BCMNV προκαλούν μωσαϊκά, χλωρώσεις (Εικ. 12), καρούλιασμα, παραμορφώσεις, ζάρωμα και συστροφές στα φύλλα (Εικ. 13), καθώς και αναστολή της ανάπτυξης του φυτού ή νανισμό (Εικ. 14). Έχει αναφερθεί επίσης μείωση της απόδοσης της καλλιέργειας έως και 80%, ακόμα και όταν η μόλυνση είναι λανθάνουσα, αλλά και υποβάθμιση της ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος (Hall, 2005, Tang & Feng, 2022). Όταν η μόλυνση των φυτών με τον BCMV πραγματοποιηθεί κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυτών φασολιού, εκτός από καχεκτική ανάπτυξη, παρατηρείται παραγωγή λιγότερων αλλά και μικρότερων λοβών (Hall, 2005), ενώ αν πραγματοποιηθεί κατά τα μεγαλύτερα στάδια ανάπτυξης, οι λοβοί εμφανίζουν μαύρο μεταχρωματισμό.

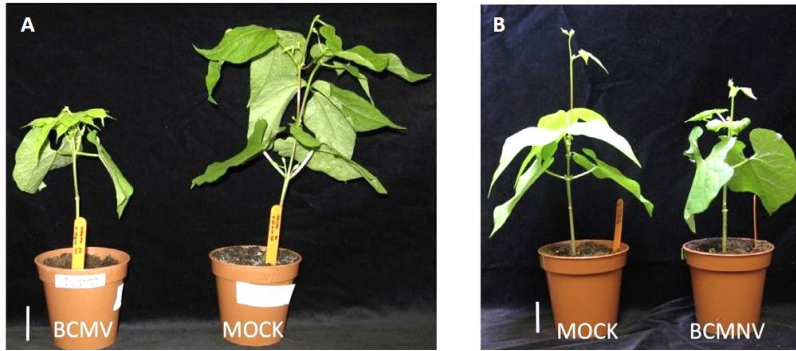


Εικόνα 12 Συμπτώματα χλωρωτικών κηλίδων και μωσαϊκών σε φύλλα φασολιού που προκαλούνται από τον bean common mosaic virus (BCMV) Α) Jeffrey W. Lotz, Β) Tang & Feng, 2022



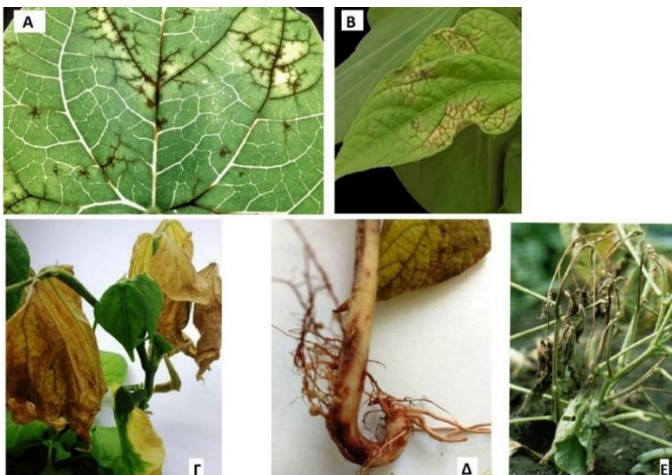
Εικόνα 13 Συστροφή, πάχυνση και παραμόρφωση φύλλων Α) Tang & Feng, 2022, Β) Howard F. Schwartz, Γ) Worrall et al. 2015.

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

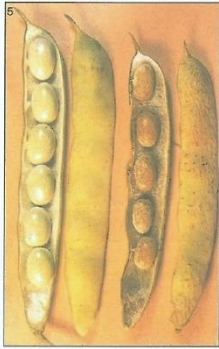


Εικόνα 14 Συμπτώματα νανισμού σε φυτά φασολιάς που προκαλούνται από τον Α) *bean common mosaic virus* (BCMV) και Β) *bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) σε σύγκριση με υγιές φυτό (Worrall et al., 2015). Η γραμμή αντιστοιχεί σε μήκος 4cm.

Αν και ο BCMV τυπικά δε συνδέεται με νεκρώσεις του φυτού, τέσσερα στελέχη του, τα NL-2, NL-6, US3 και US4 (Hall, 2005) με αύξηση της θερμοκρασίας άνω των 30°C και παρουσία του κυρίαρχου γονιδίου ανθεκτικότητας “I”, μπορεί να προκαλέσει τοπική ή διασυστηματική νέκρωση των αγγείων (Εικ. 15) και ερυθροκάστανες κηλίδες που στη συνέχεια εξελίσσονται σε νεκρωτικές (Chatzivassiliou, 2021), σύνδρομο γνωστό ως “μαύρες ρίζες” (black root) που μπορεί να οδηγήσει στη θανάτωση του φυτού. Όμως, όλα τα στελέχη του BCMNV είναι ικανά να προκαλέσουν τα συμπτώματα νέκρωσης στα φυτά φασολιού ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας (Tang & Feng, 2023). Η νέκρωση αυτή συμβαίνει παρουσία του κυρίαρχου γονιδίου ανθεκτικότητας “I” και πρόκειται για αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitivity reaction, HR), κατά τη διάρκεια της οποίας αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός του ιού στους συγκεκριμένους ιστούς του φυτού που συμβαίνει η νέκρωση (Feng et al., 2014). Η διαφοροποίηση αυτή των συμπτωμάτων βάσει της θερμοκρασίας που επικρατεί μπορεί να προσφέρει ένδειξη για τον διαχωρισμό των δύο αυτών ιών.



Εικόνα 15 Συμπτώματα που προκαλούνται από τον *bean common mosaic virus* (BCMV) σε φυτά φασολιού, σύνδρομο γνωστό ως “black root” Α,Β) Τοπική νέκρωση των νεύρων των φύλλων (CABI και Tang & Feng, 2022), και Γ, Δ) νέκρωση του στελέχους (Kyrychenko et al., 2019), Ε) Νέκρωση βλαστών (Hall, 2005).



Τέλος, η παρουσία του BCMNV σε φυτά κοινού φασολιού μπορεί να προκαλέσει νέκρωση στο λοβό και στους σπόρους (Εικ. 16) καθώς και ακανόνιστη κατανομή αυτών.

Εικόνα 16 Συμπτώματα νεκρώσεων στο λοβό και στους σπόρους φυτού φασολιού που προκαλούνται από τον *bean common mosaic virus* (BCMV) (δεξιά) σε σύγκριση με φυτό απαλλαγμένο από αυτόν (Astier, 2007).

Μετάδοση

Όλα τα γνωστά στελέχη και των δύο ιών μπορούν να μεταδοθούν μηχανικά, μέσω των φορέων τους, μέσω μολυσμένης γύρης και σπόρου, σε ποσοστό περίπου 35% (Hall, 2005, Makkouk et al., 2012) ενώ το ποσοστό σπορομετάδοσης του BCMV κυμαίνεται από 3% μέχρι 95%, αναλόγως με το στέλεχος του ιού και την ποικιλία του ξενιστή (Tang & Feng, 2022). Αναλυτικότερα, εντός της καλλιέργειας ο ιός εξαπλώνεται με τη βοήθεια των αφίδων φορέων τους με μη έμμοιο τρόπο και ο χρόνος διατροφής για την απόκτηση καθώς και τη μετάδοση του ιού είναι λιγότερο από 1 λεπτό. Όμως η πρωτογενής εισαγωγή των ιών αυτών στην καλλιέργεια πραγματοποιείται μέσω μολυσμένου σπόρου (Jordan & Hammond, 2008) και αυτός φαίνεται να είναι και ο κύριος λόγος της παγκόσμιας εξάπλωσης του BCMV.

Ο BCMV εισάγεται στο σπόρο κυρίως μέσω του ενδοσπερμίου, των κοτυληδόνων (Worrall et al. 2015), αλλά μπορεί να συμβεί και μέσω μολυσμένης γύρης (Tang & Feng, 2022, Jordan & Hammond, 2008). Ο ιός μπορεί να επιβιώσει σε αυτόν για μεγάλο χρονικό διάστημα (έως και 30 χρόνια) όμως, το ποσοστό μόλυνσης των σπόρων από τον BCMV και BCMNV εξαρτάται από παράγοντες όπως η ποικιλία του φυτού, το αναπτυξιακό του στάδιο κατά τη μόλυνση, το στέλεχος του ιού, αλλά και από εξωτερικούς παράγοντες (Worrall et al. 2015, Makkouk et al., 2012). Για παράδειγμα, στα φυτά που μολύνονται από τους BCMV και BCMNV μετά την ανθοφορία δεν καταγράφεται μόλυνση του σπόρου, καθώς δεν εντοπίζονται ούτε στο έμβρυο ούτε στις κοτυληδόνες, ενώ αντίθετα μεγάλο ποσοστό μόλυνσης παρατηρείται όταν η προσβολή πραγματοποιηθεί κατά το στάδιο των πρώτων φύλλων.

Όσον αφορά τις αφίδες που είναι ικανές να μεταδώσουν τον BCMV, έχουν αναφερθεί 36 είδη που ανήκουν σε 21 διαφορετικά γένη, συμπεριλαμβανόμενων των *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae*, *Myzus persica* και *Aphis craccivora* (Tang & Feng, 2022). Παρόλο που είναι υπεύθυνες για τη δευτερογενή μετάδοση των ιών αυτών, ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός, καθώς μια εισβολή του BCMV σε μικρό ποσοστό μέσω των σπόρων μπορεί να εξελιχθεί σε επιδημία λόγω της διατροφής των αφίδων Αυτό συνέβη το 1996 στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ, όπου η μόλυνση με BCMNV κατά τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας από 5–10% έφτασε σε 70–90% σε μετέπειτα στάδια ανάπτυξης των φυτών (Worrall et al. 2015). Πολλοί ιοί, συμπεριλαμβανόμενου του BCMV μπορούν να προκαλέσουν μορφολογικές και φυσιολογικές αλλαγές

στα φυτά οι οποίες αλλάζουν τη συμπεριφορά των φορέων τους. Έτσι φυτά που είναι μολυσμένα με ιούς που προκαλούν ίκτερους και αποχρωματισμό στα φύλλα φαίνεται να είναι πιο ελκυστικά για τις αφίδες, καθώς εκείνες “προτιμούν” αυτές τις αποχρώσεις (Tang & Feng, 2022). Επίσης θεωρείται ότι ο BCMV μπορεί να επηρεάσει το μονοπάτι παραγωγής του ιασημονικού οξέος ούτως ώστε να μειωθούν οι άμυνες του ξενιστή κατά των εντόμων (Tang & Feng, 2022).

Εργαστηριακές μέθοδοι ανίχνευσης των BCMV & BCMNV

Τα συμπτώματα που προκαλούνται από τους δύο αυτούς ιούς είναι πανομοιότυπα και η διάκριση τους απαιτεί εργαστηριακή εξέταση. Τα ισωμάτια των BCMV και BCMNV μπορούν να διακριθούν ορολογικά μέσω της μεθόδου ELISA, με τη χρήση εξειδικευμένων πολυκλωνικών αλλά και μονοκλωνικών αντισωμάτων (Monoclonal antibodies, MAbs), που είναι γνωστό πως παρέχουν αυξημένη ευαισθησία (Boonham et al., 2014). Έχουν ανακαλυφθεί ορισμένα MAbs ευρέως φάσματος, τα οποία είναι ικανά να ανιχνεύουν όλα τα επιμέρους στελέχη του BCMV και να μην παρουσιάζουν διασταυρωτή αντίδραση (cross-reaction) με τον BCMNV, ενώ άλλα MAbs είναι αρκετά εξειδικευμένα ώστε να ανιχνεύουν ορισμένα μόνο στελέχη μέσω της αντίδρασής τους με το εκτεθειμένο στην επιφάνεια του ισωματίου N-άκρο της CP, που έχει ποικίλους επιτόπους εξειδικευμένους για το κάθε είδος. Αντίστοιχα, τα MAbs που είναι εξειδικευμένα στην ανίχνευση των στελεχών του BCMNV δεν αντιδρούν με τα στελέχη του BCMV, ούτε με άλλον ιό του γένους (Jordan & Hammond, 2008).

Για την ανίχνευση των ιών αυτών χρησιμοποιείται ακόμα η μοριακή μέθοδος PCR, η οποία μπορεί επίσης να τους διαχωρίσει μεταξύ τους όταν ως εκκινητές χρησιμοποιούνται αλληλουχίες που στοχεύουν στα γονίδια των CP ή CI ή P3. Ακόμα, οι Qin et al. (2021) ανέπτυξαν τη μέθοδο RPA για την ανίχνευση του BCMV σε φύλλα σόγιας και σε σπόρους και φύλλα του φασολιού adzuki, χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν την CP και στη συνέχεια έκαναν δοκιμές με άλλους 3 Roty-ιούς προκειμένου να διαπιστώσουν τυχόν διασταυρωτές αντιδράσεις. Συμπέραναν ότι η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και εξειδικευμένη αφού οι εκκινητές δεν αντέδρασαν με άλλους ιούς, απλή εφόσον η επεξεργασία του φυτικού ιστού ήταν ελάχιστη και τέλος ταχύτατη καθώς η διάρκεια της ήταν 20 λεπτά, ωστόσο βασικό μειονέκτημα της είναι το μεγάλο κόστος των αντιδραστηρίων.

Αντιμετώπιση

Για την αντιμετώπιση του BCMV τα μέτρα επικεντρώνονται στην πρόσληψη με τρεις βασικές στρατηγικές: με τον έλεγχο των αφίδων-φορέων, μέθοδος που, όπως αναφέρθηκε ήδη, δεν είναι πολύ αποτελεσματική λόγω του μη έμμονου τρόπου μετάδοσης, με τη χρήση πιστοποιημένου υγιούς σπόρου και τέλος η πιο αποτελεσματική φαίνεται να είναι η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. Αναλυτικότερα, στο κοινό φασόλι έχουν ταυτοποιηθεί διάφορα γονίδια ανθεκτικότητας στο BCMV, κυρίως και υπολειπόμενα, που χρησιμοποιούνται στη γενετική βελτίωση των φυτών (Tang & Feng, 2022). Κυρίαρχο

γονίδιο ανθεκτικότητας έχει καταγραφεί μόνο ένα, το “I”, το οποίο προσφέρει υψηλή ανθεκτικότητα, ακόμα και ανοσία στο BCMV στα φυτά φασολιού σε θερμοκρασία κάτω των 30°C. Στα φυτά αυτά, σε θερμοκρασία άνω των 30°C εμφανίζονται τα συμπτώματα νέκρωσης που αναφέρθηκαν παραπάνω, ως αντίδραση υπερευαισθησίας και προκειμένου να περιορίσει την εξάπλωση του ιού (Feng et al., 2014). Έτσι, καθώς στις περισσότερες εμπορικές ποικιλίες φασολιού είναι παρόν το γονίδιο ανθεκτικότητας “I”, παρέχεται προστασία έναντι των στελεχών που προκαλούν συμπτώματα μωσαϊκών και παραμορφώσεων και περιορίζεται η σπορομετάδοση, ωστόσο είναι πιθανό να νεκρωθεί τμήμα ή ολόκληρο το φυτό εξαιτίας του BCMV (Hema et al., 2014, Tang & Feng, 2022). Παρόλα αυτά, η νέκρωση που προκαλείται μπορεί να περιοριστεί ή ακόμα και να αποφευχθεί με την παρουσία των υπολειπόμενων γονιδίων bc-1, bc-1², bc-2 bc-2² bc-3 και bc-u, τα οποία είναι εξειδικευμένα σε επίπεδο στελέχους ιού (Feng et al., 2014), οπότε σε συνδυασμό με το κυρίαρχο “I” παρέχουν υπολειπόμενη ανθεκτικότητα (recessive resistance) έναντι όλων των στελεχών του BCMV (Hema et al., 2014). Στην περίπτωση του BCMNV, η ύπαρξη του κυρίαρχου “I” δεν είναι αρκετή για την προστασία του φυτού, καθώς είναι απαραίτητη και η παρουσία και υπολειπόμενων γονιδίων σε διαφορετικούς συνδυασμούς (Jordan & Hammond, 2008).

6.2. Ιός του κίτρινου μωσαϊκού του φασολιού (Bean yellow mosaic virus, BYMV)

Η παρουσία του BYMV αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε φυτά φασολιού το 1925 στις ΗΠΑ και στην Ολλανδία (Baradar et al., 2021) και έκτοτε ο ιός έχει παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση. Τα ισωμάτια είναι ραβδόμορφα και έυκαμπτα μήκους 750 nm, δηλαδή λίγο μικρότερα από τα αντίστοιχα του BCMV, ελικοειδούς συμμετρίας (Makkouk et al., 2012) και το γονιδίωμα του παρουσιάζει την τυπική οργάνωση του γένους *Potyvirus*.

Τα στελέχη του ιού αυτού που έχουν αναγνωριστεί έχουν ταξινομηθεί στην ομάδα του BYMV, η οποία περιλαμβάνει στενά συγγενείς ιούς, που έχουν παρόμοιες ορολογικές και βιολογικές ιδιότητες, όπως πχ το εύρος των ξενιστών. Για τις φυλογενετικές αναλύσεις χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο το γονίδιο που κωδικοποιεί την CP και δευτερευόντως τις NIb και VPg, παρόλα αυτά για την ορθότερη ταξινόμηση και διαχωρισμό των απομονώσεων συνιστάται η χρήση του πλήρους γονιδιώματος (Baradar et al., 2021).

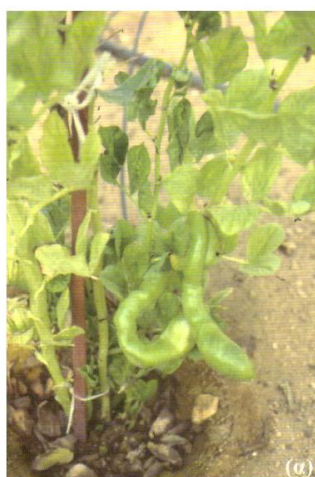
Προκαλεί σημαντικές απώλειες στην παραγωγή των ψυχανθών (Hall, 2005) και εν αντιθέσει με την πλειοψηφία των ιών του γένους *Potyvirus*, έχει μεγάλο εύρος ξενιστών (Πιν. 6) προσβάλλοντας μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά που ανήκουν σε οικογένειες εκτός της Fabaceae (Baradar et al., 2021). Αναφέρονται περίπου 200 είδη (μερικά από τα οποία φαίνονται στον Πιν. 6) που ανήκουν σε 16 διαφορετικές οικογένειες. Η μηδική και το τριφύλλι το έρπον (*Trifolium repens*) αποτελούν εστίες μόλυνσης του ιού.

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

Πίνακας 6 Το εύρος ξενιστών του ιού bean yellow mosaic virus (BYMV) (CABI, 2022).

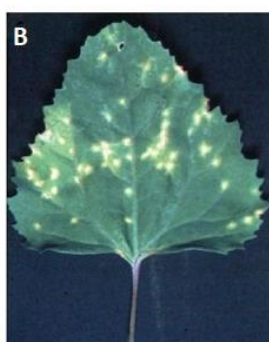
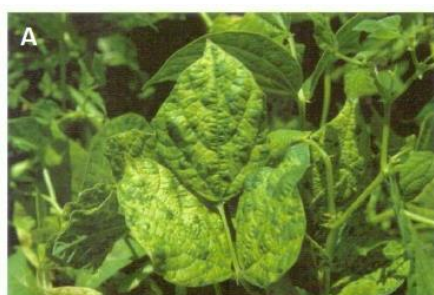
Οικογένεια	Είδος	Κοινή Ονομασία
Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	Κινόα
	<i>Spinacia oleracea</i>	Σπανάκι
Apiaceae	<i>Aegoropodium podagraria</i>	Ground elder
Asteraceae	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>	Αγκινάρα
Cannaceae	<i>Canna</i>	
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i>	Κολοκυθιά
Fabaceae	<i>Arachis hypogaea</i>	Αραχίδα
	<i>Cicer arietinum</i>	Ρεβιθιά
	<i>Cladrastis kentukea</i>	American yellowwood
	<i>Crotalaria micans</i>	
	<i>Glycine max</i>	Σόγια
	<i>Lathyrus odoratus</i>	Μοσχομπίζελο
	<i>Lathyrus sativus</i>	Λαθούρι βρώσιμο
	<i>Lens culinaris</i>	
	<i>Lens culinaris</i> subsp. <i>culinaris</i>	Φακή
	<i>Lupinus</i>	Λούπινο
	<i>Lupinus albus</i>	Λευκό λούπινο
	<i>Lupinus angustifolius</i>	Μπλε λούπινο
	<i>Lupinus luteus</i>	Κίτρινο λούπινο
	<i>Medicago</i> spp.	Μηδική
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Φασολιά
	<i>Pisum sativum</i>	Μπιζέλι
	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	Winged bean
	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Ψευδοακακία
	<i>Trifolium</i>	Αγριοτριφύλλο
	<i>Trifolium hybridum</i>	Alsike clover
	<i>Trifolium incarnatum</i>	Crimson clover
	<i>Trifolium pratense</i>	Κόκκινο τριφύλλι
	<i>Trifolium subterraneum</i>	Υπόγειο τριφύλλι
	<i>Trifolium vesiculosum</i>	Arrowleaf clover
	<i>Vicia faba</i>	Κουκιά
	<i>Vicia sativa</i>	Βίκος
<i>Vigna radiata</i>	Ροβίτσα	
<i>Vigna unguiculata</i>	Αμπελοφάσουλα	
Fagaceae	<i>Fagus sylvatica</i>	Δασική οξιδιά
Iridaceae	<i>Crocsmia</i>	
	<i>Crocus</i>	
	<i>Crocus sativus</i>	Σαφράν
	<i>Freesia</i>	Φρέζια
	<i>Gladiolus hybrids</i>	Sword lily
	<i>Iris</i> sp.	Ίριδα
	<i>Ixia</i>	Corn lilies
	<i>Sparaxis</i>	
Orchidaceae	<i>Vanilla planifolia</i>	Βανίλια
Papaveraceae	<i>Papaver somniferum</i>	Οριυμ poppy
Passifloraceae	<i>Passiflora coerulea</i>	Πασιφλόρα
Poaceae	<i>Setaria parviflora</i>	Knotroot foxtail
Solanaceae	<i>Physalis peruviana</i>	Φυσαλίδα
Tropaeolaceae	<i>Tropaeolum majus</i>	Ινδοκάρδαμο/ καπουτσίνος
Violaceae	<i>Viola odorata</i>	English violet
Zingiberaceae	<i>Alpinia galanga</i>	Galangal

Τα συμπτώματα που προκαλεί ο BYMV ποικίλουν ανάμεσα στα διάφορα φυτικά είδη που προσβάλλουν και εξαρτώνται από παράγοντες όπως είναι η ηλικία και η ποικιλία του ξενιστή, η εποχή που θα γίνει η μόλυνση, ο γενότυπος του ιού, οι περιβαλλοντικές συνθήκες κ.ά. (Hall, 2005). Τα βασικά συμπτώματα που παρατηρούνται στις καλλιέργειες των ψυχανθών λόγω της μόλυνσης με BYMV περιλαμβάνουν μείωση της απόδοσης της καλλιέργειας, παραμορφώσεις, μωσαϊκό, ποικιλοχρωώσεις, συστροφή, κατσάρωμα των φύλλων και συχνά νανισμό. Το μωσαϊκό στα φύλλα με ανοιχτό κίτρινο χρώμα που κάνει έντονη αντίθεση με το πράσινο χρώμα του ελάσματος (Εικ. 18) γίνεται πιο έντονο καθώς το φυτό μεγαλώνει. Ταυτόχρονα σε πολλές περιπτώσεις (π.χ. στη φακή) μειώνεται η ανθοφορία και η παραγωγή λοβών, οπότε κατά συνέπεια και η παραγωγή σπόρων. Αναλυτικότερα, στα φυτά μπιζελιού παρατηρούνται ανοιχτόχρωμα κίτρινα μωσαϊκά στα φύλλα, στίγματα και χλώρωση των νεύρων (Makkouk et al., 2012), ενώ στα φασόλια ζάρωμα των φύλλων συνοδευόμενο από κηλίδες στο έλασμα και νέκρωση των νεύρων. Ορισμένα στελέχη μπορούν να προκαλέσουν νέκρωση της ρίζας και του στελέχους, η οποία



συχνά συγχέεται με τοξικότητα μαγγανίου ή με προσβολή από βακτήριο (Makkouk et al., 2012). Έχει διαπιστωθεί επίσης ότι η μόλυνση φυτών κουκιού με BYMV (Εικ. 17), στον οποίο και είναι ευαίσθητα, προκαλεί νεκρωτικές δακτυλιωτές κηλίδες στους λοβούς, παραμόρφωσή τους και αποχρωματισμό στο περίβλημα των σπόρων, όπως επίσης και μείωση της απόδοσης παραγωγής σπόρων κατά 42-44% (Kaiser, 1973).

Εικόνα 17 Συμπτώματα του *bean yellow mosaic virus* (BYMV) σε φυτά κουκιού (α) παραμόρφωση λοβών και (β) μωσαϊκό στα φύλλα (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2012)



Εικόνα 18 Συμπτώματα που προκαλεί ο *bean yellow mosaic virus* (BYMV). Α) Κίτρινο μωσαϊκό στα φύλλα φασολιάς (Hall, 2005), Β) Χλωρωτικές κηλίδες σε φυτά *Chenopodium quinoa* (Hull, 2013).

Ο τρόπος μετάδοσης του BYMV είναι ο χαρακτηριστικός του γένους *Potyvirus*, δηλαδή με μη έμμονο τρόπο από τις αφίδες φορείς του, οι οποίες έχει αναφερθεί ότι ξεπερνούν τα 20 είδη συμπεριλαμβανόμενων των *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae*, *Acyrtosiphon sesbaniae*, *Aphis gossypii*, *Aulacorthum solani*, *Brevicoryne brassicae*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum maidis* (Makkouk et al., 2012) καθώς και *Aphis craccivora*. Επίσης είναι δυνατή και η σπορομετάδοση σε φυτά κουκιών, αρακά, φακής λούπινου, τριφυλλίου, κ.ά. (Makkouk et al., 2012) αλλά όχι σε φυτά του γένους *Phaseolus* (Hall, 2005).

Ως μέτρα πρόληψης της προσβολής από τον BYMV προτείνονται αυτά που αναφέρονται στο κεφάλαιο 3. Επισημαίνεται ότι ο πιο σημαντικός τρόπος πρόληψης είναι η χρήση και η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών μέσω της αξιοποίησης γονιδίων ανθεκτικότητας όπως είναι το κυρίαρχο *By-2* και το υπολειπόμενο *mo* (Hall, 2005). Επίσης έχει αναφερθεί σημαντική μείωση των συμπτωμάτων που προκαλούνται από τον BYMV σε φυτά κουκιού όταν πραγματοποιηθεί εφαρμογή σαλικυλικού οξέος πριν τη μόλυνση, καθώς αυτό ενισχύει το σύστημα της φωτοσύνθεσης και προστατεύει τα μόρια χλωροφύλλης (Radwan et al., 2008).

6.3. Λοιποί ιοί του γένους *Potyvirus* που μολύνουν ψυχανθή

Ο ιός του σπορομεταδιδόμενου μωσαϊκού του αρακά (**pea seed-borne mosaic virus, PSbMV**) έχει ιοσωμάτια μήκους 770nm που περιέχουν το γονιδίωμά του μεγέθους 9.900 βάσεων (Makkouk et al., 2012) και μεταδίδεται μέσω σπόρων και μέσω των αφίδων φορέων του όπως είναι τα είδη *Aphis pisum*, *M. persicae* και *A. gossypii*. Η σπορομετάδοση του όμως φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την ευρύτερη εξάπλωση του ιού και την είσοδο του σε νέες περιοχές (Hema et al., 2014). Τα συμπτώματα που προκαλεί ποικίλουν: στο μπιζέλι παρατηρούνται μωσαϊκά, καρούλιασμα και χλώρωση των φύλλων, παραμόρφωση των λοβών και μερικές φορές ανωμαλία και μικρό μέγεθος στους σπόρους, καθώς και νανισμός του φυτού. Τα συμπτώματα αυτά είναι πιο έντονα σε περίπτωση μικτής μόλυνσης με τον PEMV και όταν ο ιός μεταδίδεται μέσω του σπόρου (Makkouk et al., 2012).

7. Οικογένεια *Solemoviridae*

Η οικογένεια *Solemoviridae* αποτελείται από 4 γένη ιών: *Sobemovirus*, *Polemovirus*, *Enamovirus* και *Polerovirus* τα οποία σύμφωνα με την ICTV περιλαμβάνουν 21, 1, 5 και 26 είδη αντίστοιχα. Τα μέλη της οικογένειας αυτής έχουν μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA γονιδίωμα (+ssRNA), μεγέθους 5.6-6.2kb (LaTourrette et al., 2021) το οποίο αποτελείται από 5-6 ORFs. Οι ιοί του γενών *Sobemovirus* και *Polemovirus* μεταδίδονται μηχανικά μέσω πληγών (Sömera et al., 2021), φορέων αλλά και μέσω του εδάφους, ενώ τα οι ιοί των γενών *Polerovirus* και *Enamovirus* αποκλειστικά από τους φορείς τους, τις αφίδες (Homoptera):

Aphididae) με έμμονο (κυκλοφορών), μη πολλαπλασιαζόμενο τρόπο (LaTourrette et al., 2021 & Sömera et al., 2021).

Μέχρι πρόσφατα τα γένη *Luteovirus*, *Polerovirus* και *Enamovirus* ανήκαν στην οικογένεια *Luteoviridae*, όμως το 2021, σύμφωνα με την ICTV, η οικογένεια αυτή καταργήθηκε λόγω της διαφοράς που παρατηρείται μεταξύ των γενών στις δομικές πρωτεΐνες, στις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και γενικότερα στην οργάνωση του γονιδιώματος. Πλέον τα γένη της πρώην οικογένειας *Luteoviridae* κατατάσσονται ως εξής: τα γένη *Enamovirus* και *Polerovirus* ανήκουν στην οικογένεια *Solemoviridae*, ενώ το γένος *Luteovirus* στην *Tombusviridae*. Οι ιοί των γενών *Polerovirus* και *Enamovirus* διαφέρουν στην οργάνωση του γονιδιώματος: με τους πρώτους να κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες P3a και P4 που είναι υπεύθυνες για τη μετακίνηση του ιού (LaTourrette et al., 2021) και οι οποίες απουσιάζουν από τους Enamo-ιούς.

Πράγματι, τα γένη της οικογένειας *Luteoviridae* κατέχουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες οι οποίες αποδίδονται στο 5' μισό του γονιδιώματος των μελών (Miller, 1999). Τα γονίδια της RdRp των Polero-ιών παρουσιάζουν στενή ομοιότητα με εκείνα των ιών του γένους *Sobemovirus*, ενώ των Luteo-ιών με εκείνα των γενών *Umbravirus*, *Carmovirus*, *Tombusvirus* και *Dianthovirus*. Αντιθέτως το 3' μισό του γονιδιώματος είναι παρόμοιο μεταξύ των ιών των γενών *Polerovirus* και *Luteovirus*. Ως συμπέρασμα από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αλληλουχία της RdRp μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαχωριστικός παράγοντας τόσο μεταξύ των γενών *Polerovirus* και *Luteovirus*, όσο και των ειδών του κάθε γένους, ενώ η αλληλουχία της CP δεν επαρκεί για το σκοπό αυτό (Miller, 1999, Domier et al., 2002). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η CP του Luteo-ιού BLRV, η οποία προσομοιάζει με εκείνη των Polero-ιών (Domier et al., 2002). Επίσης δύο μέλη του γένους *Polerovirus*, ο BWYV και ο ιός του ήπιου ίκτερου των τεύτλων (beet mild yellowing virus, BMYV) έχουν 90% ομοιότητα στα γονίδια των δομικών πρωτεϊνών, αλλά πολύ μικρότερη σε αυτά της Ρ0 (περίπου 30%) και της RdRp.

Τα γεγονότα ανασυνδυασμών που λαμβάνουν χώρα στο γονιδίωμα των RNA ιών είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην προσαρμοστικότητα, στην εξέλιξη και στην επιδημιολογία τους και φαίνεται ότι είναι πολύ συχνά στα γένη *Polerovirus*, *Luteovirus* και *Enamovirus*. Συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν στην αμινοξική αλληλουχία των ιών των γενών αυτών αποκαλύπτουν ότι ο RNA ανασυνδυασμός μεταξύ των μελών ευθύνεται για τη δημιουργία νέων ειδών και αναφέρονται τρεις τύποι ανασυνδυασμού (Hull, 2013). Πρώτον είναι αυτοί που συμβαίνουν εντός του γονιδίου, δεύτερον ανασυνδυασμοί μεγάλων τμημάτων του γονιδιώματος διαφορετικών ειδών, αλλά εντός του ίδιου γένους όπως είναι για παράδειγμα ο BMYV του οποίου το 5' τμήμα του γονιδιώματος θεωρείται ότι προέρχεται από τον CABYV ενώ το 3' τμήμα προσομοιάζει με τον BWYV και τέλος, ανασυνδυασμοί μεγάλων τμημάτων μεταξύ διαφορετικών γενών (Hull, 2013). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν ο CABYV που πιθανολογείται ότι είναι αποτέλεσμα ανασυνδυασμού Polero-ιού και του PEMV (*Enamovirus*) και ο BLRV

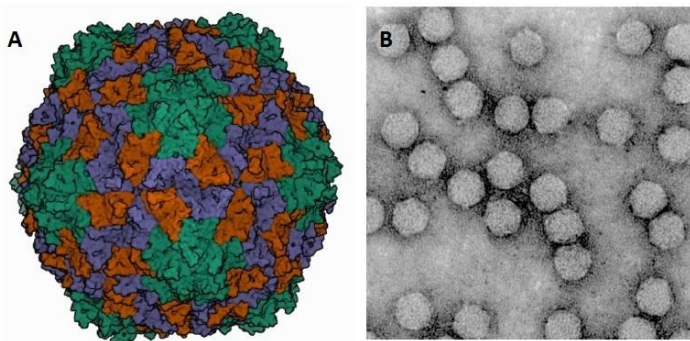
Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

που έχει προταθεί ότι προέκυψε από ανασυνδυασμό κάποιων προγόνων Polerovirus-like και Luteovirus-like ιών (Hull, 2013, Domier et al., 2002).

Πίνακας 7 Βασικά χαρακτηριστικά της οικογένειας *Solemoviridae* (LaTourrette et al., 2021 & Sömera et al., 2021).

Ιοσωμάτια	Σφαιρικά χωρίς φάκελο, διαμέτρου 20-34 nm Εικοσαεδρικά με συμμετρία T=3, αποτελούνται από 180 μόρια καψιδιακής πρωτεΐνης
Γονιδίωμα	+ssRNA, μέγεθος 4-6.2 kb Μονομερές
Πολλαπλασιασμός	Στο κυτταρόπλασμα
Μετάφραση	Από γενωμικά και υπογενωμικά RNA μέσω διαρρέουσας σάρωσης, πρωτεΐνη υπερανάγνωσης, -1 αλλαγή πλαισίου, IRES,
Εύρος ξενιστών	Φυτά (μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα)
5' άκρο	VPG
3' άκρο	Απουσία πολύ-A ουράς, παρουσία σταθερής δομής

Τα ιοσωμάτια της οικογένειας *Solemoviridae* είναι σφαιρικά διαμέτρου 20-34 nm με εικοσαεδρική συμμετρία (Εικ. 19Α), χωρίς φάκελο (Εικ. 19Β). Η καψιδιακή πρωτεΐνη αποτελείται από 60 ασύμμετρες μονάδες που η καθεμία περιλαμβάνει 3 μόρια πρωτεΐνης.



Εικόνα 19 Α) Τρισδιάστατη απεικόνιση του ιοσωματίου του rice yellow mottle virus (Sömera et al., 2021) και Β) Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Van Den Heuvel et al., 2011).

8. Γένος *Polerovirus*

Το γένος *Polerovirus* αποτελεί από τα πιο σημαντικά γένη φυτικών ιών καθώς προκαλεί σοβαρές ζημιές σε οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες όπως για παράδειγμα η πατάτα. Για πρώτη φορά έγινε περιγραφή συμπτωμάτων καρουλιάσματος σε φύλλα πατάτας το 1913 και μετά από μερικά χρόνια η ασθένεια φάνηκε ότι μεταδίδεται με αφίδες. Το 1967 απομονώθηκε ο ιός του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας (potato leafroll virus, PLRV), το αντιπροσωπευτικό μέλος του γένους, από τις αφίδες φορείς του. Ύστερα από λίγα χρόνια, το 1976 αναγνωρίστηκαν οι ιοί της οικογένειας *Luteoviridae*, ως

ξεχωριστή ομάδα ιών, ενώ το γένος *Polerovirus* καθιερώθηκε το 1999 (Van Den Heuvel et al., 2011) και τέλος, αυτό κατατάχθηκε από την ICTV στην οικογένεια *Solemoviridae* το 2021. Πλέον, επίσημα καταγεγραμμένα είναι 26 είδη, ενώ υπάρχουν κι άλλα 37 των οποίων έχει προταθεί η ένταξή τους στο γένος και η αλληλουχία τους είναι διαθέσιμη στη βάση δεδομένων GenBank (Sömera et al., 2021, LaTourrette et al., 2021).

8.1. Μετάδοση

Οι ιοί του γένους *Polerovirus* απαντώνται παγκοσμίως και μεταδίδονται με έμμονο τρόπο (κυκλοφορών, μη πολλαπλασιαζόμενο εντός του φορέα) με τη βοήθεια των φορέων τους, τις αφίδες που ανήκουν κυρίως στα γένη *Myzus* (*M. persicae*), *Rhopalosiphum* (*R. maidis* και *R. padi*), *Stiobion* (*S. avenae*), και *Aphis* (*A. gossypii*) (Garcia-Ruiz et al., 2021). Προκειμένου να είναι εφικτή η μετάδοση ενός Polero-ιού το έντομο πρέπει να διατρέφεται ώρες έως και μέρες από ένα μολυσμένο φυτό και στη συνέχεια από ένα υγιές για να τον αποκτήσει και μεταδώσει αντίστοιχα, επομένως ο έμμονος τρόπος μετάδοσης σε αντίθεση με τον μη-έμμονο απαιτεί εξειδικευμένη σχέση μεταξύ αφίδας και φυτού, δηλαδή το έντομο να αποικίζει το φυτό.

8.2. Ξενιστές & συμπτώματα

Τα μέλη του εν λόγω γένους, έχουν ένα ευρύ φάσμα ξενιστών και μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές οικονομικές ζημιές σε καλλιέργειες όπως είναι οι πατάτες, το καλαμπόκι και τα παντζάρια. Οι



Εικόνα 20 Χαρακτηριστικό σύμπτωμα μεσονευρικής χλώρωσης σε φύλλο μαρουλιού που προκαλείται από τον turnip yellows virus (TuYV) (Moreno & Fereres, 2012).

Polero-ιοί εντοπίζονται στα κύτταρα του φλοιώματος και ως εκ τούτου προκαλούν συμπτώματα που συνδέονται με τη διαταραχή του φλοιώματος όπως είναι η καχεξία και ο νανισμός του φυτού, αλλά και μεσονεύριο ίκτερο (Εικ. 20) και συστροφή των φύλλων (Sömera et al., 2021), λόγω της διακοπής της θρέψης του φυτού (Astier, 2007). Συχνά όμως οι μολύνσεις μπορεί είναι ασυμπτωματικές ή τα συμπτώματα μπορεί να παραπέμπουν σε ζημιές από μη παρασιτικά αίτια.

Τέλος, διαθέσιμα δεδομένα υποστηρίζουν ότι μικτές μολύνσεις με ιούς άλλων γένων, (π.χ. PLRV και PVY) μπορούν να εντείνουν τα συμπτώματα (Garcia-Ruiz et al., 2021).

8.3. Γονιδίωμα των ιών του γένους *Polerovirus*

Το τυπικό γονιδίωμα των ιών του γένους *Polerovirus* (Εικ. 21) αποτελείται από 8 ORFs, τα ORF0-ORF7, τα οποία εκφράζουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες P0-P7, οργανωμένα σε ένα γραμμικό μόριο ssRNA μεγέθους 5.6-6 kb. Το γονιδίωμα φέρει τρεις αμετάφραστες περιοχές, οι δύο εντοπίζονται στα άκρα του

γονιδιώματος, ενώ η τρίτη βρίσκεται εσωτερικά (intergenic untranslated region, iUTR) μεταξύ των ORF2 και ORF3a και είναι μικρού μεγέθους (Εικ. 21). Στην 5' UTR βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη μια VPg, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και μετάφραση του ιικού γονιδιώματος (Sömera et al., 2021), ενώ στην 3' UTR δεν εντοπίζεται πολύ-Α ουρά, ούτε tRNA-like δομή. Τα ORFs που βρίσκονται πλησιέστερα στο 5' άκρο, δηλαδή τα ORF0-2 εκφράζονται απευθείας από το ριβόσωμα μέσω του γενωμικού RNA (genomic RNA, gRNA), ενώ τα ORF3a και ORF3-7 που εντοπίζονται πλησιέστερα στο 3' άκρο, δηλαδή μετά την iUTR, μεταφράζονται μέσω δύο υπογενωμικών RNA (subgenomic RNAs, sgRNAs), τα sgRNA1 και sgRNA2 (Farooq et al., 2022, Moreno & Fereres, 2012, Abraham et al., 2006, Hull, 2013, Stevens et al., 2005).

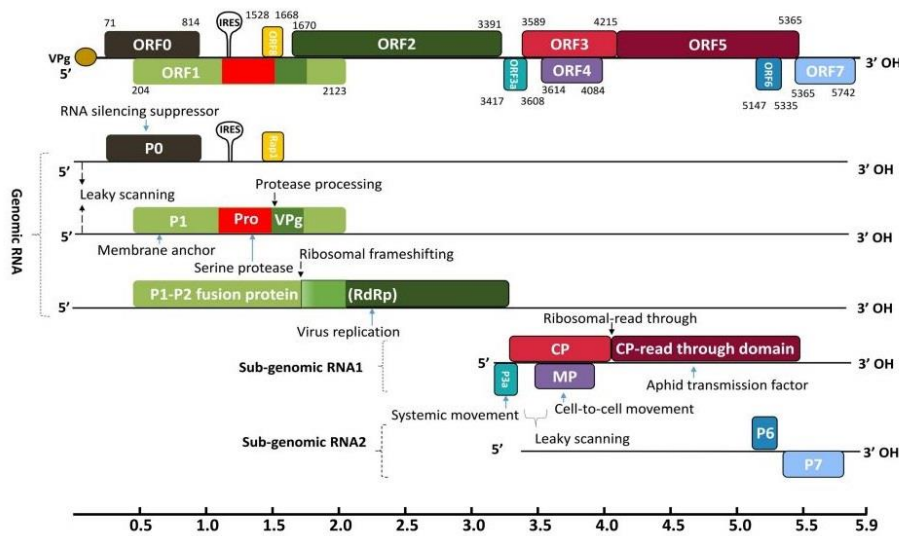
Οι ιοί του γένους *Poleovirus* χρησιμοποιούν πολλές από τις στρατηγικές έκφρασης που είναι γνωστές για τους φυτικούς ιούς προκειμένου να κωδικοποιήσουν τις απαραίτητες για τη μόλυνση πρωτεΐνες, οι βασικές λειτουργίες των οποίων είναι οι εξής (LaTourrette et al., 2021, Farooq et al., 2022):

- Η VPg εμπλέκεται στη μετάφραση και τον πολλαπλασιασμό
- Η P0 είναι καταστολέας της γονιδιακής σίγησης
- Η Rap1 (Replication associated protein 1) εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό του ιού
- Η P1 περιέχει αλληλουχίες της VPg που εμπλέκεται στην αναπαραγωγή των ιών
- Η διαπλασιασική P1:P2 είναι μια RNA-εξαρτώμενη-RNAπολυμεράση (RNA dependent RNA Polymerase, RdRp), βασική για τον πολλαπλασιασμό του ιού
- Η P3 αποτελεί την κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη (major capsid protein, CP_{major}) που εμπλέκεται στη συγκρότηση των ιοσωματίων και τη συμπτωματολογία
- Η πρωτεΐνη υπερανάγνωσης P3:P5, η CP-RTD (CP- Readthrough Domain) αποτελεί τη δευτερεύουσα CP (CP_{minor}), που εμπλέκεται στη συγκρότηση των ιοσωματίων, την αφιδομετάδοση, τη διακυτταρική μετακίνηση του ιού και τη συμπτωματολογία.
- Η P3a αποτελεί την πρωτεΐνη μετακίνησης (movement protein, MP) που είναι υπεύθυνη για τη διασυστηματική μετακίνηση του ιού
- Η P4 είναι MP που εμπλέκεται στη διακυτταρική μετακίνηση των ιών
- Η P6 είναι ρυθμιστής της μεταγραφής του ιού
- Η P7 εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής του ιού και πιθανώς στην αύξηση της γονιμότητας του φορέα

8.4. Κύκλος ζωής των ιών του γένους *Poleovirus*

Οι Poleo-ιοί χρησιμοποιούν πληθώρα στρατηγικών προκειμένου να μπορέσει να μεταφραστεί το γονιδίωμά τους σε λειτουργικές πρωτεΐνες και στη συνέχεια να πολλαπλασιαστούν εντός των μολυσμένων φυτικών κυττάρων (Εικ. 21).

Polerovirus (PLRV, 5,883 nt)



Εικόνα 21 Σχηματική απεικόνιση της γονιδιακής οργάνωσης των ιών του γένους *Polerovirus* και οι στρατηγικές έκφρασης των γονιδίων (Farooq et al., 2022). VPg: viral genome-linked protein; IRES: internal ribosomal entry site, Rap1: replication-associated protein 1, CP: coat protein, MP: movement protein, RdRp: RNA-dependent RNA polymerase.

Αναλυτικότερα, στο 5' άκρο του γενωμικού RNA εδράζεται το ORF0, το οποίο εκφράζει την P0 (μεγέθους περίπου 29kDa), μια πρωτεΐνη καταστολέα της μετα-μεταγραφικής σίγησης (suppressor of post-transcriptional gene silencing, PTGS), που στοχεύει και αποδομεί την πρωτεΐνη αργοναύτη1 (argonaute 1, AGO1) του συμπλόκου RISC (RNA-induced silencing complex). Έχει αναφερθεί επίσης ότι εμπλέκεται στην παθογένεια του ιού (Delfosse et al., 2021).

Η μετάφραση του ORF1 είναι εφικτή λόγω της **διαρρέουσας σάρωσης (leaky scanning)**, όπου το ριβόσωμα παρακάμπει το κωδικόνιο έναρξης του ORF0 και συνεχίζει τη σάρωση του γονιδιώματος έως ότου εντοπίσει το κωδικόνιο έναρξης του ORF1. Στη συνέχεια το ριβόσωμα ξεκινάει τη μετάφραση και κωδικοποιεί την P1, μία πολυπρωτεΐνη μεγέθους περίπου 70kDa, η οποία περιέχει μοτίβα της VPg, καθώς και μιας πρωτεάσης σερίνης, η οποία έπειτα από πέψη ελευθερώνει την VPg που συνδέεται ομοιοπολικά με το 5' άκρο του γονιδιώματος (Sömera et al., 2021, Garcia-Ruiz et al., 2021, LaTourrette et al., 2021). Όπως αναφέρθηκε, η VPg συμμετέχει στη διαδικασία της μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA, καθώς αλληλεπιδρά με τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4 ή το ισόμορφό του eIF(iso)4G1 (Sömera et al., 2021).

Το ORF2 περιέχει τα μοτίβα ελικάσης, πρωτεάσης (Hull, 2013) και RdRp, αλλά εκφράζεται ως διαπλαισιακή πρωτεΐνη P1:P2, μεγέθους περίπου 119kDa. Αναλυτικότερα, κατά την έκφραση του ORF1 συμβαίνει **-1 ριβοσωμική αλλαγή πλαισίου (-1 ribosomal frameshift)**, λόγω της ύπαρξης μιας ολισθηρής αλληλουχίας 7 νουκλεοτιδίων και μιας δευτεροταγούς δομής μορφής ψευδοκόμπου, επιτρέποντας έτσι τη μετάφραση της RdRp ως διαπλαισιακή πρωτεΐνη (Delfosse et al., 2021). Η αλλαγή πλαισίου όμως δεν είναι συχνό φαινόμενο και η παρουσία του έχει ρυθμιστικό ρόλο επιτρέποντας την P1 να εκφράζεται σε

μεγαλύτερη ποσότητα απ' ό,τι η διαπλαισιακή πρωτεΐνη. Επίσης, στον PLRV έχει αναφερθεί ένα ακόμα ORF, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεγέθους 5-kDa, που εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιού και ονομάζεται replication associated protein 1 (Rap1). Η μετάφρασή του είναι εφικτή μέσω μιας **εσωτερικής θέσης εισόδου ριβοσωμάτων (Internal, ribosomal entry site, IRES)** που βρίσκεται στο ORF1 του γενωμικού RNA, η οποία επιτρέπει σε κάποια ριβοσώματα ξεκινάνε την κωδικοποίηση της Rap1, (Jaag et al., 2003, Delfosse et al., 2021).

Οι πρωτεΐνες που εδράζονται στο 3' άκρο του γονιδιώματος εκφράζονται από δύο **sgRNAs** τα οποία πιθανολογείται ότι δημιουργούνται λόγω της IRES, με τη βοήθεια της RdRp. Τα ORF3 και ORF5 μέσω του **sgRNA1** κωδικοποιούν την πρωτεΐνη P3, που είναι η CPmajor μεγέθους 22kDa και την πρωτεΐνη υπερανάγνωσης P3+P5, που είναι η CPminor, μεγέθους 22kDa και οι οποίες είναι δομικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αφιδομετάδοση, τη συγκρότηση των ισοσωματίων και τη συμπτωματολογία (LaTourrette et al., 2021).

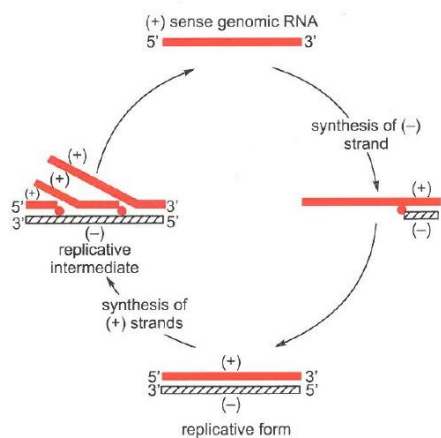
Το ORF5 βρίσκεται καθοδικά του ORF3 και το **κωδικόνιο λήξης του ORF3 είναι διαρρέον**, επομένως το ριβόσωμα δεν τερματίζει τη μετάφραση κι έτσι προκύπτει η **πρωτεΐνη υπερανάγνωσης P3+P5** ή Readthrough (RT) ή CPminor, που είναι υβριδική πρωτεΐνη της CP και της P5, η οποία είναι απαραίτητη για τη μετάδοση του ιού από τις αφίδες φορείς και τη συσσώρευση του ιού στα μολυσμένα κύτταρα (Fereses & Raccah, 2015, Farooq et al., 2022, LaTourrette et al., 2021). Το μοτίβο της RT (RTD) περιέχει μια συντηρημένη περιοχή που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση του ιού με τους φορείς και επομένως στην αφιδομετάδοση (Delfosse et al., 2021).

Το sgRNA1 επίσης, εκφράζει δύο διαφορετικές πρωτεΐνες μετακίνησης (MP): μέσω του ORF3a που εδράζεται κοντά στο 5' άκρο του, κωδικοποιείται η MP που εμπλέκεται στη διασυστηματική μετακίνηση του ιού εντός του μολυσμένου φυτού (Sömera et al., 2021), ενώ το ORF4 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη διακυτταρικής μετακίνησης P4 (μεγέθους περίπου 17kDa). Το ORF4 επικαλύπτεται εντελώς από το ORF3, όμως έχει διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης και το κωδικόνιο έναρξης του ORF4 είναι πιο ευνοϊκό από αυτό του ORF3, επομένως μέσω του μηχανισμού της **διαρρέουσας σάρωσης** το ριβόσωμα ξεκινάει τη μετάφραση από το ORF4 (LaTourrette et al., 2021).

Στο sgRNA2 που έχει βρεθεί στο γονιδίωμα των PLRV και CABYV βρίσκονται τα ORF6 και ORF7 από τα οποία μεταφράζονται οι αντίστοιχες πρωτεΐνες P6 και P7, με την P6 να εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντιγραφής του ιού. Η P7 διαδραματίζει ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής του ιού (Sömera et al., 2021), καθώς και στην ενίσχυση της γονιμότητας των αφίδων-φορέων και στην αναστολή επαγωγής αιθυλενίου από αυτές (LaTourrette et al., 2021). Παρόλα αυτά, ο ρόλος των P6 και P7 χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

Ύστερα από την έκδυση του ισωματίου και την απελευθέρωση του RNA στο κυτταρόπλασμα, ακολουθεί η μετάφραση του γενωμικού RNA, όπως αναλύθηκε παραπάνω, ξεκινώντας από τα ORF1 και ORF2 τα οποία κωδικοποιούν την διαπλασιασική πρωτεΐνη RdRp. Έτσι είναι δυνατή η αντιγραφή του ιικού

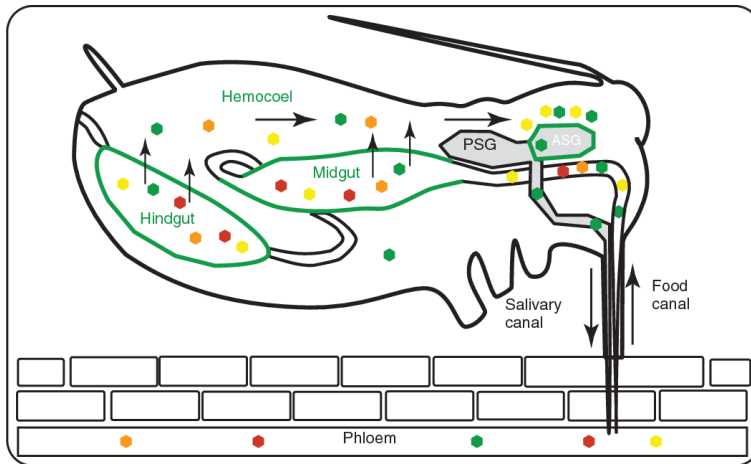


Εικόνα 22 Πολλαπλασιασμός των +ssRNA, συμπεριλαμβανομένων εκείνων του γένους *Polyovirus* και *Potyvirus* (Astier, 2007).

γονιδιώματος των μελών του γένους *Polyovirus* που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου. Όπως συμβαίνει με τους +ssRNA ιούς (Εικ. 22), μετά την παραγωγή της πολυμεράσης συντίθεται το συμπληρωματικό μόριο αρνητικής πολικότητας, το οποίο συνδέεται με το μόριο θετικής πολικότητας με δεσμούς υδρογόνου, κι έτσι προκύπτει προσωρινά ένα δίκλωνο μόριο RNA, που ονομάζεται αναπαραγωγική μορφή (replicative form) (Astier, 2007, Valli et al., 2021). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο ιικής αναπαραγωγής, χρησιμοποιώντας το συμπληρωματικό (-) RNA ως εκμαγείο, παράγει πολλαπλά αντίγραφα θετικής πολικότητας, δηλαδή του γονιδιώματος του ιού (López-Moya & García, 1999, Revers & García, 2015).

Πρώτο βήμα για τη μετακίνηση του ιού αποτελεί η διέλευση του στα γειτονικά κύτταρα μέσω των πλασμοδεσμών. Στη διαδικασία αυτή κυρίαρχο ρόλο παίζει η P4 η οποία σε κυτταρικό επίπεδο εντοπίζεται στις πλασμοδέσμες, σε μεμβρανικά κυστίδια, μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες (Delfosse et al., 2021) και έχει τη δυνατότητα να αυξάνει το SEL των πλασμοδεμών και μέσω αυτών να φτάσει στο φλοιώμα για να μετακινηθεί διασυστηματικά. Από εκεί στη συνέχεια, οι αφίδες μπορούν με το στίλετό τους, κατά τη διατροφή τους, να τον αποκτήσουν και να τον μεταφέρουν σε υγιείς ξενιστές.

Αναλυτικότερα, η μετάδοση του ιού σε νέα φυτά είναι μια διαδικασία που εξαρτάται στενά από τους φορείς του γένους, τις αφίδες, οι οποίες τον μεταδίδουν με έμμονο τρόπο, αλληλεπιδρώντας με εξειδικευμένους μηχανισμούς, καθώς αυτός πρέπει να ξεπεράσει δύο ιστολογικά φράγματα εντός του εντόμου (Hull, 2013): α) μεταφορά των ισωματίων μέσω μηχανισμών τρανσκύτωσης (transcytosis) δηλαδή ενδοκύτωσης και εξωκύτωσης (endocytosis και exocytosis), έξοδο από το έντερο στο αιμόκοιλο και β) είσοδο στους σιελογόνους αδένες (Εικ. 23). Η λανθάνουσα περίοδος, δηλαδή το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την απόκτηση του ιού μέχρι την στιγμή που αυτός είναι ικανός να μεταδοθεί, διαρκεί περισσότερες από 24 ώρες. Ως βασικός φορέας των ιών που σχετίζονται με τον ίκτερο των τεύτλων έχει αναφερθεί το πολυφάγο είδος *Myzus persicae* (Stevens et al., 2005), το *Macrosiphum euphorbiae* είναι λιγότερο αποτελεσματικός στη μετάδοση των BWYV και TuYV, αλλά δε μεταδίδει τον BChV και τέλος, ως λιγότερο αποτελεσματικά έχουν αναφερθεί τα είδη *Myzus ascalonicus*, *Aphis fabae* και *A. gossypii*. Οι μηχανισμοί με τους οποίους αλληλεπιδρούν ιός - φορέας είναι εξειδικευμένοι και βασίζονται σε μοτίβα του ιού που εδράζονται στις CP και RTD, καθώς και σε υποδοχείς στο σώμα της αφίδας (Stevens et al., 2005).



Εικόνα 23 Σχηματική αναπαράσταση του έμμονου τρόπου μετάδοσης. Τα βέλη συμβολίζουν την πορεία που διασχίζει ο ιός: από το φλοιώμα εισέρχεται στο σώμα του εντόμου μέσω του τροφικού καναλιού και εξέρχονται από το μέσο ή οπίσθιο έντερο (ανάλογα το είδος του ιού) στο αιμόκοιλο. Τέλος, τα ιοσωμάτια εισέρχονται στους βοηθητικούς σιελογόνους αδένες (ASG), μέσω των οποίων προσπερνούν τους πρωτεύοντες σιελογόνους αδένες (PSG) και μπορούν μέσω της διατροφής του εντόμου να μεταφερθούν σε νέα υγιή φυτά (Fereres & Raccah, 2015).

Ο κύκλος της μετάδοσης ξεκινάει όταν η αφίδα φορέας με τα νύσσοντος τύπου στοματικά μόρια της πραγματοποιήσει δοκιμαστικό νύγμα ούτως ώστε να ελέγξει αν το φυτό αποτελεί κατάλληλο ξενιστή και στη συνέχεια με το σιλέτο του διαπερνά τα επιδερμικά κύτταρα και φτάνει στο φλοιώμα του φυτού απ' όπου και τρέφεται. Έτσι, εάν το φυτό είναι μολυσμένο, κατά τη διάρκεια της διατροφής της η αφίδα αποκτά τον ιό από τα κύτταρα του φλοιώματος, μέσω του τροφικού καναλιού όπου εισέρχεται στο έντερο του εντόμου και το οποίο διαπερνάει μέσω μηχανισμού ενδοκύττωσης. Στην περίπτωση των BWYV και PLRV, αυτοί εισέρχονται στο έντομο μέσω των επιθηλιακών κυττάρων του μέσου εντέρου (midgut), ενώ ο CABYV εισέρχεται μέσω των επιθηλιακών κυττάρων τόσο του μέσου, όσο και του οπίσθιου εντέρου (hindgut) (Hull, 2013). Έτσι, κατά τη διάρκεια των 12-16 ωρών από την είσοδο του ιού, ο ιός διασχίζει τον πεπτικό σωλήνα του εντόμου μέσω των επιθηλιακών κυττάρων του οπίσθιου ή του μέσου εντέρου ανάλογα το είδος του ιού και στη συνέχεια με μηχανισμό εξωκύττωσης εξέρχεται στο αιμόκοιλο του εντόμου. Εκεί οι ιοί του γένους *Poleovirus* προστατεύονται από το μη ευνοϊκό περιβάλλον του αιμόκοιλου με τη βοήθεια της πρωτεΐνης συμβιονίνη (ομόλογη της GroEL του *Escherichia coli*), που παράγουν τα συμβιωτικά βακτήρια του γένους *Buchnera* (είδος *Buchnera aphidicola*), που βρίσκονται στην αιμόλεμφο του εντόμου. Μόρια συμβιονίνης προσδένονται στις δομικές πρωτεΐνες των ιών και οδηγούν τα ιοσωμάτια στο σιελογόνο αδένα, στον οποίο και εισέρχονται (Bouvaire et al., 2011).

Ο σιελογόνος αγωγός αποτελείται από δύο ζεύγη αδένων (Εικ. 23), ένα ζεύγος πρωτευόντων σιελογόνων αδένων (primary salivary glands - PSG) κι ένα ζεύγος βοηθητικών σιελογόνων αδένων (accessory glands, ASGs). Οι Poleo-ιοί χρησιμοποιούν αποκλειστικά τους ASG προκειμένου να προσπεράσουν πρώτα την εξωκυτταρική μεμβράνη βάσης (basal lamina) που περιβάλλει τους αδένες, στη συνέχεια τη κυτταρική μεμβράνη (plasmalemma) και στο τέλος να εισέλθουν στους σιελογόνους αγωγούς (Hull, 2013). Τέλος, οι αφίδες εκκρίνουν σιέλο μέσω του σιλέτου κατά τη διατροφή τους κι έτσι μπορούν

να απελευθερώσουν τα ισωμάτια από τους βοηθητικούς σιελογόνους αδένες τους στο φλοίωμα ενός νέου φυτού ξενιστή, προκειμένου να ξεκινήσει νέος κύκλος μόλυνσης (Garcia-Ruiz et al., 2021).

Υπεύθυνες για την αφιδομετάδοση φαίνεται ότι είναι και οι δύο CP πρωτεΐνες (CPmajor και CPminor), καθώς η CPmajor εμπλέκεται στην εξαγωγή από το οπίσθιο έντερο. Σε πειράματα στα οποία πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του RTD από την P3:P5 πρωτεΐνη υπερανάγνωσης του BWYV και PLRV, αυτή είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία πρόσδεσης του ιού στην GroEL και επομένως την αδυναμία του να εισέλθει στους ASG και να μεταδοθεί από τον φορέα (Feres & Raccah, 2015, Delfosse et al., 2021).

8.5. Εξέλιξη

Τα γεγονότα ανασυνδυασμού του RNA που παρατηρούνται συχνά στο γονιδίωμα των ιών του γένους *Poleovirus* είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία νέων ειδών και στελεχών, μέσω των μεταλλάξεων που συσσωρεύονται και οι οποίες πρόκειται κυρίως για μονονουκλεοτιδικούς ανασυνδυασμούς (Single-nucleotide polymorphisms, SNPs) (Stevens et al., 2005, LaTourrette et al., 2021). Το ίδιο το γένος *Poleovirus* θεωρείται ότι προέκυψε από ανασυνδυασμό μεταξύ ενός ιού του γένους *Sobemovirus* και ενός προγόνου, ο οποίος παρείχε το 3' τμήμα του γονιδιώματος. Καθώς το γονιδίωμα του γένους αποτελείται από επικαλυπτόμενα ORFs (Εικ. 21), οι μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν τη λειτουργία πολλών πρωτεϊνών.

Οι πιο συνηθισμένες θέσεις ανασυνδυασμού στο γονιδίωμα είναι οι περιοχές που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες: α) Η P0, β) η RdRp (υβριδική πρωτεΐνη P1:P2) και πιο συγκεκριμένα το τμήμα της P1, καθώς το τμήμα της P2 είναι συντηρημένο, γ) η VPg, δ) το RTD της CP-RT, καθώς και ε) η UTR μεταξύ των ORF2 και ORF3, δηλαδή το 5' άκρο του υπογενωμικού RNA1 (sgRNA1). Η CP διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού από τις αφίδες, επομένως μεταλλάξεις που συμβαίνουν σ' αυτήν την περιοχή μπορούν να επηρεάσουν τόσο το εύρος των φορέων των ιών όσο και το εύρος των ξενιστών (LaTourrette et al., 2021). Οι μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες P0, P1 και CP-RT στο 5' άκρο και στο 3' άκρο αντίστοιχα, είναι οι πιο συνηθισμένες, γεγονός που εξηγεί τη μεγάλη ετερογένεια που παρατηρείται ανάμεσα στα είδη και κατά συνέπεια τη δημιουργία νέων στελεχών, βιώσιμων με προσαρμοστικότητα (fitness).

Τέλος, η εξειδικευμένη αλληλεπίδραση που συμβαίνει μεταξύ των ιών με τους φορείς τους έχουν οδηγήσει την υπόθεση ότι τα μέλη της πρώην οικογένειας *Luteoviridae* προέρχονται από έναν εντομοπαθογόνο πρόγονο και στην συνέχεια συν-εξελιχθηκαν ώστε να είναι ανθεκτικά στην άμυνα του εντόμου, να μην είναι βλαβερά απέναντι του, αλλά και να μπορούν να πολλαπλασιάζονται εντός του φυτού (Stevens et al., 2005).

8.6. Μέθοδοι ανίχνευσης των ιών του γένους *Polerovirus*

Η ανίχνευση των ιών του γένους *Polerovirus* αποτελεί πρόκληση από τη συμπτωματολογία τους μέχρι την εργαστηριακή εξέταση και την αλληλούχισή τους. Πολλοί ιοί μπορούν να προκαλούν παρόμοια συμπτώματα τα οποία προσομοιάζουν με ζημιές από αβιοτικούς παράγοντες και το γεγονός ότι οι ιοί περιορίζονται στο φλοιώμα του φυτού καθιστά αδύνατη τη μηχανική μετάδοσή τους σε φυτοδείκτες (Lotos et al., 2014). Επίσης, η μεγάλη ομοιότητα των αλληλουχιών του γονιδίου της CP μεταξύ των μελών της οικογένειας *Solemoviridae*, αλλά και με μέλη και του γένους *Luteovirus* (Chomič et al., 2010) έχει ως συνέπεια τα αποτελέσματα πολλών δοκιμών να είναι αναξιόπιστα.

Αναλυτικότερα, η ανίχνευση των ιών του εν λόγω γένους βασίζεται σε ορολογικές και μοριακές μεθόδους. Από τη δεκαετία του 1970 έχουν κατασκευαστεί πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα για τη χρήση τους στην ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, όμως αυτή παρουσιάζει κάποια προβλήματα. Επίσης, η παρουσία των ιών αυτών είναι σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με φυτοπαθογόνους ιούς άλλων γενών και ο περιορισμός των ισοματιών στο φλοιώμα του φυτού μπορούν να κάνουν δύσκολη την επιτυχή προετοιμασία του δείγματος για τη διεξαγωγή της ELISA.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αυτά σχετίζονται με την εξειδίκευση της αντίδρασης, καθώς η CP των μελών της πρώην οικογένειας *Luteoviridae* είναι υψηλά συντηρημένη ανάμεσα στους ιούς και επομένως με άλλους ιούς, ακόμα και διαφορετικού γένους ή οικογένειας (Chomič et al., 2010, D'Arcy et al., 1989) δίνοντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, πολυκλωνικά αντισώματα που κατασκευάστηκαν έναντι των BWYV ή BMYV, δε μπορούν να τα διαχωρίσουν σε επίπεδο είδους λόγω της υψηλής ομοιότητας τους στις δομικές πρωτεΐνες (Stevens et al., 2005, Miller, 1999). Όμως, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι στου αντιπροσωπευτικού είδους του γένους *Luteovirus*, του BYDV (barley yellow dwarf virus-PAV, ιός του κίτρινου νανισμού του κριθαριού) αντέδρασε με τον BMYV αλλά όχι με τον BWYV και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό αυτών των δύο ιών (D'Arcy et al., 1989). Επίσης κατά την εξέταση χλωρωτικών φυτών ο αντιορός για τον CrCSV αντέδρασε με την ομάδα των BWYV-like ιών (Abraham et al., 2006).

Για τους λόγους αυτούς προτιμάται η μοριακή μέθοδος RT-PCR, σε συνδυασμό με αλληλούχιση κατά Sanger, καθώς αποτελεί πιο ευαίσθητη μέθοδο και αποφεύγονται τα παραπάνω προβλήματα. Η περιοχή του γονιδιώματος που ενισχύεται μπορεί να οριστεί από τον χειριστή καθώς και η εξειδίκευση της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας εκκινητές είτε εξειδικευμένους σε επίπεδο είδους (Stevens et al., 2005), είτε γενικευμένους για την ενίσχυση του γονιδιώματος σε επίπεδο γένους. Κατά την κατασκευή γενικευμένων εκκινητών που ανιχνεύουν τους Polero-ιούς επιλέγονται περιοχές του γονιδιώματος που είναι συντηρημένες στο γένος, όπως είναι η CP και η RdRp, και στη συνέχεια πραγματοποιείται αλληλούχιση για την απόκτηση της πλήρους αλληλουχίας που ενισχύθηκε. Όμως, η πλέον σύγχρονη μοριακή μέθοδος ανίχνευσης παθογόνων είναι η αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) ή αλληλούχιση υψηλής απόδοσης (High-Throughput Sequencing Technology, HTS), η οποία επιτρέπει

την απόκτηση του πλήρους γονιδιώματος του ιού, χωρίς να είναι αναγκαία η εκ των προτέρων γνώση των αλληλουχιών των ιών που βρίσκονται εντός του φυτικού δείγματος (Boonham et al., 2014).

Επιπλέον, η αποτύπωση κατά Northern (Northern blot) και η χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας είναι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ταυτοποίησης των Polero-ιών (Garcia-Ruiz et al., 2021). Με τη βοήθεια Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης (Transmission Electron Microscope, TEM) έχουν εντοπιστεί οι BWYV, PLRV CABYV και cereal yellow dwarf virus (CYDV) να μετακινούνται από το έντερο στα επιθηλιακά κυττάρου εντός της αφίδας.

8.7. Αντιμετώπιση των ιών του γένους *Polerovirus*

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας της μόλυνσης των φυτών από τους Polero-ιούς αποτελούν οι φορείς τους και καθώς πρόκειται για έμμοτους ιούς αναμένεται οι αφίδες να αποικίζουν τους ξενιστές. Η καταπολέμησή τους με τη χρήση χημικών σκευασμάτων φαίνεται να είναι αποτελεσματική, καθώς και ο έλεγχος των πληθυσμών των αφίδων με καλλιεργητικά μέτρα (Miller, 1999). Η χημική αντιμετώπισή τους όμως συνεπάγεται διάφορα μειονεκτήματα όπως είναι η ανάγκη για επαναλαμβανόμενη εφαρμογή τους, κάτι το οποίο βλάπτει την υγεία των παραγωγών, είναι οικονομικά ασύμφορο και επιβαρύνει επίσης περιβάλλον. Στο μέλλον είναι πιθανό να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σπόροι επικαλυμμένοι με εντομοκτόνο προς αποφυγή των πρώιμων μολύνσεων. Ο ασφαλέστερος τρόπος όμως αποφυγής των μολύνσεων αποτελεί η χρήση ανθεκτικών, στον εκάστοτε ιό, ποικιλιών (Knierim et al., 2010).

9. Ιοί των ψυχανθών του γένους *Polerovirus*

Ο διαχωρισμός και η ταξινόμηση των ιών του γένους *Polerovirus* και πιο συγκεκριμένα της ομάδας των ιών που σχετίζεται με τον ίκτερο των τεύτλων, έχει υπάρξει πρόκληση από τη δεκαετία του 1950 (Beuve et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, το 1958 στο Ηνωμένο Βασίλειο απομονώθηκε ο BMVYV και σχεδόν ταυτόχρονα στην Βόρεια Αμερική βρέθηκαν πανομοιότυπα στελέχη που προσβάλλουν τα τεύτλα τα οποία ονομάστηκαν BWYV (Stevens et al., 2005, Stevens et al., 2008). Ενώ και οι δύο ιοί μολύνουν ζιζάνια όπως τα καψέλα (*Capsella bursa-pastoris*), *Montia perfoliate* και μαρτιάκος (*Senecio vulgaris*), καθώς και καλλιέργειες όπως τα ζαχαρότευτλα και το σπανάκι, αυτά τα αμερικάνικα στελέχη (BWYV-USA) αποδείχτηκε πως έχουν μεγαλύτερο εύρος ξενιστών. Αυτοί προσβάλλουν περισσότερα από 150 φυτικά είδη (Beuve et al., 2008), που ανήκουν σε περισσότερες από 23 οικογένειες, μερικά από τα οποία είναι οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες, όπως το μαρούλι και το μπρόκολο. Αντιθέτως οι ξενιστές των ευρωπαϊκών στελεχών του BMVYV περιορίζονταν στην οικογένεια Chenopodiaceae (Stevens et al., 2005).

Η εύρεση των ιών αυτών οδήγησε στην αναζήτηση του BWYV στην Ευρώπη και όντως, το 1975 οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο έδειξαν την παρουσία ιού παρόμοιου με τον BWYV (BWYV-like), ορολογικώς συγγενή, σε ξενιστές που είχε αναφερθεί πως έχουν ανοσία στον BMVYV

(π.χ. μαρούλι), υποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη ευρωπαϊκών στελεχών του BWYV, συγγενικά με τα αμερικάνικα (Stevens et al., 2005). Αυτά τα ευρωπαϊκά στελέχη του BWYV φαινόταν πως είχαν ομοίως ευρύ φάσμα ξενιστών (Stevens et al., 2005).

Οι αναλύσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των απομονώσεων αυτών στο 5' άκρο του γονιδιώματος τους καθώς και των βιολογικών ιδιοτήτων, απέδειξαν ότι πρόκειται για διαφορετικό είδος. Έτσι σύμφωνα με την ICTV, οι ευρωπαϊκές απομονώσεις που μολύνουν τα τεύτλα ονομάζονται BMYV, ως BWYV χαρακτηρίζονται οι απομονώσεις που προσβάλλουν εμπορικές και οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες, ενώ τα στελέχη του BWYV που δε μολύνουν τα τεύτλα έχουν ταξινομηθεί ως ξεχωριστός ιός, τον TuYV (Stevens et al., 2005, Beuve et al., 2008).

Ο διαχωρισμός των ειδών έγινε πιο περίπλοκος κατά τη δεκαετία του 1990, όταν βρέθηκε ένας ακόμα ιός που μολύνει τα τεύτλα τόσο στο Ηνωμένο Βασίλειο όσο και στις ΗΠΑ (Stevens et al., 2005) ο οποίος ονομάστηκε ιός της χλώρωσης των τεύτλων (beet chlorosis virus, BChV). Στο Ηνωμένο Βασίλειο, ενώ αυτός αρχικά θεωρήθηκε στέλεχος του BMYV λόγω της συμπτωματολογίας του, δεν αντέδρασε με το μονοκλωνικό αντίσωμα που αποτελούσε κλειδί στην ταυτοποίησή του. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την αδυναμία μόλυνσης χαρακτηριστικών για τους BWYV-like ιούς ξενιστών, όπως είναι οι *Montia perfoliata* και *Capsella bursa-pastoris*, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για διαφορετικό είδος ιού. Αντίστοιχα, η απομόνωση του ιού αυτού στις ΗΠΑ ήταν ορολογικά συγγενής με τον BWYV, αλλά είχε μικρότερο εύρος ξενιστών και ομοίως, δεν μόλυνε την καψέλα (Stevens et al., 2005).

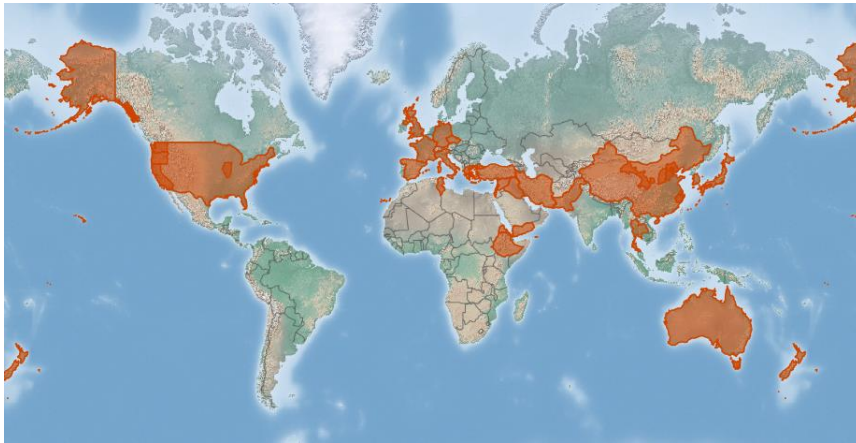
Οι προσπάθειες διαχωρισμού των παραπάνω ειδών αποτύγχαναν στο παρελθόν καθώς η αμινοξική αλληλουχία της CP αυτών παρουσιάζει μεγαλύτερη από 90% ομοιότητα (Beuve et al., 2008). Ωστόσο, ο σαφής διαχωρισμός τους έγινε εφικτός λόγω της υψηλής ποικιλομορφίας που παρουσιάζεται στο 5' άκρο του γονιδιώματος των Polerovirίων και πιο συγκεκριμένα των αλληλουχιών της P0 (μικρότερη από 30% ομολογία) (Stevens et al., 2005). Έτσι, σήμερα η ομάδα των Polerovirίων γνωστή ως "BWYV-like group" συνιστάται από τα τέσσερα διαφορετικά είδη, εκ των οποίων τα τρία πρώτα συνιστούν την ομάδα που είναι γνωστή ως το σύμπλοκο των ιών του ίκτερου των τεύτλων (beet infecting viruses):

- α. Ιός του δυτικού ίκτερου των τεύτλων – beet western yellows virus, BWYV
- β. Ιός της χλώρωσης των τεύτλων - beet chlorosis virus, BChV
- γ. Ιός του ήπιου ίκτερου των τεύτλων - beet mild yellowing virus, BMYV και
- δ. Ιός του ίκτερου το γογγυλιού - turnip yellows virus, TuYV.

Τέλος, ο faba bean Polerovirus 1 (FBPV-1) αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Filardo et al. (2019), οι οποίοι προτείνουν ότι πρόκειται για έναν ιό μεγέθους 5,631 νουκλεοτιδίων που είναι αποτέλεσμα ανασυνδυασμού των ιών CrCSV και TuYV.

9.1. Beet western yellows virus, BWYV (Ιός του δυτικού ίκτερου των τεύτλων)

Ο BWYV έχει καταγραφεί σε πολλές χώρες παγκοσμίως (Εικ. 24), συμπεριλαμβανόμενης και της Ελλάδας στην οποία, σύμφωνα με επισκοπήσεις που πραγματοποιήθηκαν από τους Fotopoulos, Donas & Katis (2011), εντοπίστηκε σε φυτά σπανακιού στις Π.Ε. Θεσσαλονίκης, Χαλκιδικής και Ευβοίας, ενώ η παρουσία του έχει καταγραφεί επίσης σε καλλιέργειες ψυχανθών της χώρας μας, όπως είναι κουκιά στην Αττική, ρεβίθια στη Φθιώτιδα (Τερζάκης, 2002) και αραχίδα στις Σέρρες (Καστόρα, 2022).

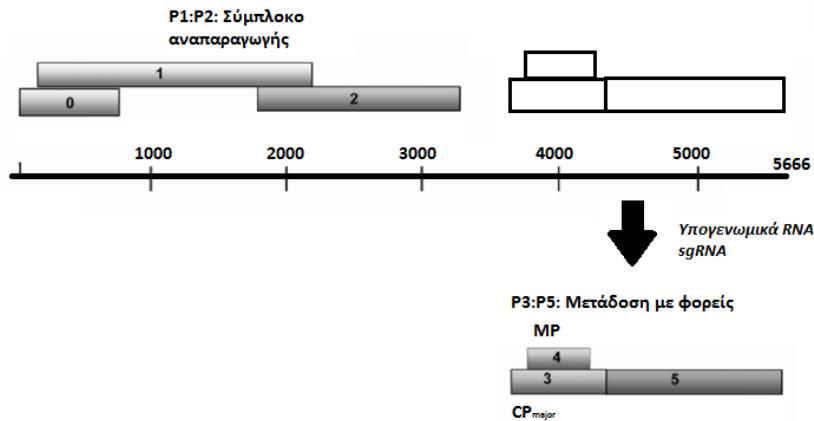


Εικόνα 24 Η παγκόσμια γεωγραφική κατανομή του beet western yellows virus (BWYV) για το έτος 2023 σύμφωνα με το CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International).

Τα ισωμάτια του BWYV έχουν διάμετρο 25-30nm με εικοσαεδρική συμμετρία και αποτελούνται από δύο είδη υπομονάδων της καψιδιακής πρωτεΐνης, την CPmajor μεγέθους 24kDa και την CPminor, μεγέθους 75kDa, η οποία είναι προϊόν υπερανάγνωσης.

Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από 5666 νουκλεοτίδια με την τυπική οργάνωση του γένους *Polemovirus*, όπως αυτή αναλύθηκε στο υποκεφάλαιο 8.3. (Εικ. 25). Συνοπτικά, παράγονται 7 πρωτεΐνες: η P0 είναι καταστολέας της γονιδιακής σίγησης του φυτού, οι P1, P2 καθώς και η διαπλαισιακή P1:P2 είναι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό του ιού. Η P3 είναι η καψιδιακή πρωτεΐνη CPmajor, η πρωτεΐνη υπερανάγνωσης (readthrough protein, RT) P3:P5 εμπλέκεται στη μετάδοση του ιού μέσω των φορέων του, ενώ η P4 (δεν απεικονίζεται) σχετίζεται με την μετακίνηση του ιού εντός του φυτού και τέλος, στο 5' άκρο του γονιδιώματος βρίσκεται η VPg.

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή



Εικόνα 25 Οργάνωση του γονιδιώματος του beet western yellows virus (BWYV) (τροποποιημένη από Beuve et al., 2008)

Ενώ γενικότερα φαίνεται ότι οι Ρολερο-ιοί έχουν περιορισμένο εύρος ξενιστών, ο BWYV έχει διευρυμένο, μολύνοντας καλλιεργούμενα, αυτοφυή φυτά και ζιζάνια, που ανήκουν σε 23 διαφορετικές οικογένειες. Έχουν αναφερθεί πάνω από 150 φυτικά είδη, που είναι ευπαθή σε διαφορετικά στελέχη του ιού, τόσο καλλιεργούμενα όσο και ζιζάνια όπως η ραπανίδα (*Raphanus raphanistrum*), η κόνουζα (*Conyza spp.*), το *Solanum nigrum* και το ετήσιο τριφύλλι (οικ. Fabaceae), μερικά από τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 8. Εκτός από ψυχανθή όπως είναι το μπιζέλι, το κουκί, το ρεβίθι, οι φακές, τα φασόλια και η σόγια, ο ιός μολύνει και άλλες καλλιέργειες μεγάλης οικονομικής αξίας όπως είναι τα σπανάκι, μαρούλι, κουνουπίδι, μπρόκολο, ζαχαρότευτλο, παντζάρι, ελαιοκράμβη, αγγούρια, κολοκυθιά, πιπεριά, τομάτα, κ.ά. (Coutts et al., 2006, Hema et al., 2014). Ωστόσο τονίζεται ότι διαφορετικά στελέχη του ιού έχουν την ικανότητα να προσβάλουν διαφορετικούς ξενιστές.

Πίνακας 8 Το εύρος ξενιστών του beet western yellows virus (BWYV) (Beuve et al, 2008 και CABI, 2022).

Οικογένεια	Είδος	Κοινή ονομασία
Aizoaceae	<i>Tetragonia expansa</i>	New Zealand spinach
Amaranthaceae	<i>Amaranthus retroflexus</i>	Τραχύ βλήτο
	<i>Beta vulgaris</i>	Παντζάρι
	<i>Gomphrena globosa</i>	Γόμφρενα
	<i>Spinacia oleracea</i>	Σπανάκι
Asteraceae	<i>Chrysanthemum koreanum</i>	Hardy Chrysanthemum
	<i>Cirsium arvense</i>	Κίρσιο, λιγκαβέτσι
	<i>Conyza canadensis</i>	Κόνουζα
	<i>Lactuca sativa</i>	Μαρούλι
	<i>Senecio vulgaris</i>	Μαρτιάκος
	<i>Sonchus oleraceus</i>	Ζωχός
	<i>Taraxacum officinale complex</i>	Αγριοράδικο/ Πικραλίδα
Boraginaceae	<i>Amsinckia douglasiana</i>	Douglas' fiddleneck
	<i>Phacelia tanacetifolia</i>	Φακελωτή
Brassicaceae	<i>Alyssum</i>	Άλυσσο

	<i>Arabis caucasica</i>	Κάρδαμο
	<i>Brassica carinata</i>	Ethiopian rape
	<i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i>	Rutabaga/ Swedish turnip
	<i>Brassica napus</i> var. <i>napus</i>	Ελαιοκράμβη
	<i>Brassica nigra</i>	Black mustard
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	Κινέζικη λαχανίδα
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Κουνουπίδι
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Λάχανο
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	Λαχανάκι Βρυξελλών
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>	Γογγυλοκράμβη/ Kohlrabi
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	Μπρόκολο
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabauda</i>	Λάχανο σαβόι
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>viridis</i>	Λαχανίδα
	<i>Brassica perviridis</i>	Mustard Spinach
	<i>Brassica rapa</i> cultivar group Taatsai	Chinese flat cabbage
	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>	Bok choy
	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>oleifera</i>	Field mustard
	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	Κινέζικο λάχανο
	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>rapa</i>	Γογγύλι
	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>trilocularis</i>	Yellow sarson
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Καψέλα
	<i>Crambe abyssinica</i>	Abyssinian Kale, Crambe
	<i>Erysimum cheiri</i>	Κίτρινη βιολέτα
	<i>Iberis</i>	Ίβερις
	<i>Iberis sempervirens</i>	Evergreen candytuft
	<i>Lepidium campestre</i>	Field pepperweed
	<i>Lepidium nitidum</i>	Shining pepperweed
	<i>Lepidium sativum</i>	Κάρδαμο
	<i>Matthiola incana</i>	Βιολέτα
	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Ραπανίδα
	<i>Raphanus sativus</i>	Ρεπάνι
	<i>Sinapis alba</i>	Σινάπι το λευκόν
	<i>Sinapis arvensis</i>	Άγριο σινάπι
	<i>Thlaspi arvense</i>	Θλάσπι
Cactaceae	<i>Epiphyllum</i> spp.	Επίφυλλο
Cannabaceae	<i>Humulus scandens</i>	Ιαπωνικός λυκίσκος
Caprifoliaceae	<i>Valerianella locusta</i>	Common cornsalad
Caryophyllaceae	<i>Spergula arvensis</i>	Σπέργουλα
	<i>Stellaria media</i>	Στελλάρια
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Παντζάρι
	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>saccharifera</i>	Ζαχαρότευτλο
	<i>Spinacia oleracea</i>	Σπανάκι
Convolvulaceae	<i>Convolvulus arvensis</i>	Περικοκλάδα
Cyperaceae	<i>Cyperus rotundus</i>	Πορφυρή κύπερη
Fabaceae	<i>Cicer arietinum</i>	Ρεβιθιά
	<i>Glycine max</i>	Σόγια
	<i>Lathyrus sativus</i>	Λαθούρι (φάβα)
	<i>Lens culinaris</i> subsp. <i>culinaris</i>	Φακή
	<i>Lupinus albus</i>	Λευκό λούπινο
	<i>Lupinus luteus</i>	Κίτρινο λούπινο
	<i>Medicago hispida</i>	Bur clover
	<i>Medicago sativa</i>	Μηδική
	<i>Ornithopus sativus</i>	Bird's foot
	<i>Pisum sativum</i>	Αρακάς

	<i>Trifolium incarnatum</i>	Crimson clover
	<i>Trifolium resupinatum</i>	Τριφύλλι το περσικό
	<i>Trifolium subterraneum</i>	Υπόγειο τριφύλλι
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Τριγωνέλλα
	<i>Vicia spp</i>	Αγριόβικος
	<i>Vicia faba</i>	Κουκιά
	<i>Vicia sativa</i>	Βίκος
Iridaceae	<i>Crocus sativus</i>	Σαφράν
Lamiaceae	<i>Lamium amplexicaule</i>	Δωδεκάνθι
	<i>Lamium purpureum</i>	Πορφυρό λάμιο
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Flax
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i>	Bourbon cotton
Montiaceae	<i>Claytonia</i>	Κλειτόνια
	<i>Montia perfoliate</i>	Miner's lettuce
Papaveraceae	<i>Fumaria officinalis</i>	Καπνόχορτο
Plantaginaceae	<i>Veronica arvensis</i>	Wall speedwell
	<i>Veronica persica</i>	Βερονίκη η περσική
Polygonaceae	<i>Rumex japonicus</i>	Λάπαθο
Portulacaceae	<i>Montia perfoliata</i>	Winter Purslane
Primulaceae	<i>Anagallis arvensis</i>	Αναγαλλίδα
Solanaceae	<i>Capsicum anuum</i>	Πιπεριά
	<i>Capsicum frutescens</i>	Πιπεριά τσίλι
	<i>Datura stramonium</i>	Τάτουλας
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Τομάτα
	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Cleveland's tobacco
	<i>Nierembergia frulea</i>	
	<i>Physalis floridana</i>	Husk tomato
	<i>Physalis wrightii</i>	Sharpleaf groundcherry
	<i>Schizanthus pinnatus</i>	Σχίζανθος
	<i>Schizanthus wisefonensis</i>	Butterfly Flower
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Τομάτα
	<i>Solanum nigrum</i>	Αγριοτομάτα
	<i>Solanum polytrichon</i>	Haircap moss
Urticaceae	<i>Urtica urens</i>	Μικρή τσουκνίδα
Violaceae	<i>Viola arvensis</i>	Αγριοπανσές κοινός

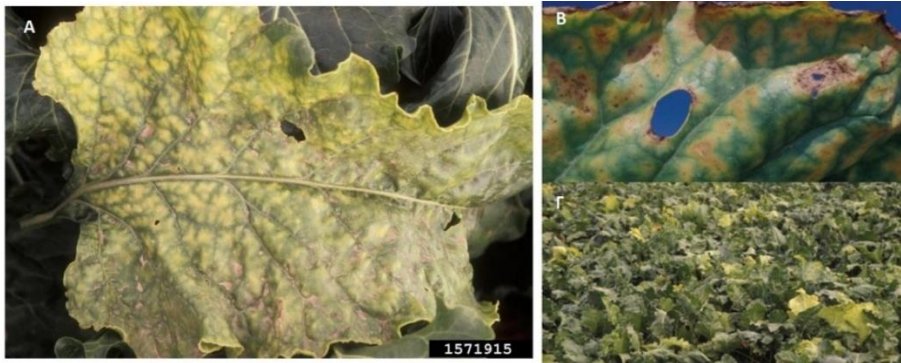
Συμπτώματα

Τα συμπτώματα που προκαλούνται από τον BWYV διαφέρουν από οικογένεια σε οικογένεια ξενιστών, γενικότερα όμως περιλαμβάνουν τη συστροφή, πάχυνση και χλώρωση των φύλλων (Εικ. 26Α), ενώ μερικές φορές παρατηρείται κόκκινος αποχρωματισμός περιθωριακά των φύλλων (Εικ. 26Β). Τα ασθενή φυτά παρουσιάζουν καχεξία, νανισμό και χλώρωση (Εικ. 26Γ). Αναλυτικότερα, σε φυτά μαρουλιού χαρακτηριστικά συμπτώματα προσβολής αποτελούν το κιτρίνισμα των μεσονεύριων διαστημάτων, ενώ τα παλαιότερα φύλλα μπορούν να αποχρωματιστούν και να γίνουν λευκά και η απόδοση της καλλιέργειας μπορεί να μειωθεί έως 30% (Moreno & Fereres, 2012).

Επίσης, μικτές μολύνσεις του BWYV με άλλους ιούς μπορεί να κάνει τα συμπτώματα πιο έντονα, αλλά και να προκαλέσει νέα, όπως είναι νέκρωση φύλλων. Για παράδειγμα, η μικτή μόλυνση με BWYV και BtMV του γένους *Potyvirus*, εκτός από επιδείνωση των συμπτωμάτων, επιταχύνει τη διασυστηματική

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

μετακίνηση των ιών (García-Ruiz et al., 2021). Επίσης, όταν συνυπάρχουν ιοί του γένους *Polerovirus* με αυτούς του *Potyvirus* διαταράσσεται η φωτοσύνθεση και οι δύο ιοί συσσωρεύονται σε μεγαλύτερα επίπεδα συγκριτικά με τις μεμονωμένες μολύνσεις.



Εικόνα 26 (Α). Συμπτώματα χλώρωσης του φύλλου ζαχαρότευτλου που οφείλεται σε μόλυνση από τον *beet western yellows virus* (BWYV), (Β) χλωρωτικές κηλίδες και πορτοκαλί όρια σε φύλλο (Γ) Χλώρωση ολόκληρων φυτών (Πηγές: (Α) Holmes, G. (n.d.). *Beet Western Yellows Virus [Polerovirus BWYV]*, <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1571915#> (Β) García-Ruiz et al., 2021).

Μετάδοση

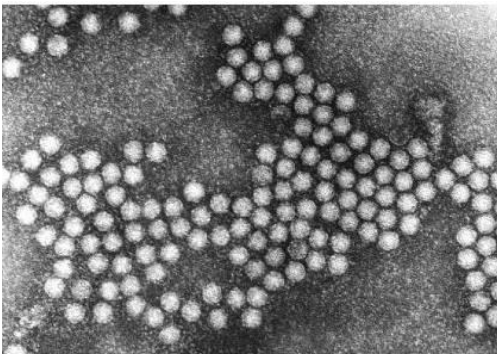
Ο BWYV ως μέλος του γένους *Polerovirus* μεταδίδονται μέσω των φορέων του, τις αφίδες με έμμονο τρόπο, όπως αναλύθηκε στο υποκεφάλαιο 8.1. Ως σημαντικότερα είδη φορέων του ιού έχουν αναφερθεί οι αφίδες *Myzus persicae* (Εικ. 27), *Macrosiphum euphorbiae* (Stevens et al., 2005) και *Acyrtosiphon pisum*, αλλά επίσης έχουν καταγραφεί και οι *Aphis craccivora*, *Aulacorthum solani*, *Brevicoryne brassicae*, *Brachycaudus helichrysi*, *Hyperomyzus lactucae* και *Lipaphis erysimi* (Makkouk & Kumari, 2009, Coutts et al., 2006). Ο ελάχιστος χρόνος διατροφής του φορέα για την πρόσληψη του ιού (AAP) είναι 5 λεπτά, ο οποίος στη συνέχεια πρέπει να ξεπεράσει δύο ιστολογικά φράγματα εντός του εντόμου: κατά την έξοδο από το έντερο και την είσοδο στους σιελογόνους αδένες. Με τη διατροφή, τα ισωμάτια μεταφέρονται μέσω του τροφικού καναλιού στο μέσο έντερο της αφίδας, απ' όπου εξέρχονται στο αιμόκοιλο και οδηγούνται στους σιελογόνους αδένες απ' όπου και μεταδίδονται στα υγιή φυτά απ' τα οποία τρέφεται. Ο χρόνος για τη μετάδοση του ιού στο φυτό (IAP) είναι 10 λεπτά και στη συνέχεια μεσολαβεί η λανθάνουσα περίοδος που μπορεί να διαρκέσει περισσότερες από 24 ώρες κατά τη διάρκεια της οποίας τα ισωμάτια κυκλοφορούν εντός του εντόμου. Οι φορείς μπορεί να διατηρήσουν την ιοφόρο ικανότητα τους για αρκετές μέρες μέχρι και για εφ' όρου ζωής, ακόμα και μετά την έκδυσή τους, χωρίς όμως μεταδίδεται στους απογόνους τους. Δεν έχει αναφερθεί σπορομετάδοση (Moreno & Fereres, 2012).



Εικόνα 27 Ο πιο σημαντικός φορέας του beet western yellows virus (BWYV) αλλά και πολλών ειδών του γένους *Polemonivirus*, *Myzus persicae* (Stevens et al., 2008).

9.2. Turnip yellows virus (TuYV) - Ιός του ίκτερου του γογγυλιού

Ο TuYV ανιχνεύτηκε αρχικά στο Ηνωμένο Βασίλειο και θεωρήθηκε ότι πρόκειται για στέλεχος του BWYV, αλλά η ICTV κατέταξε τα ευρωπαϊκά στελέχη του BWYV που δε μολύνουν τα τεύτλα ως ξεχωριστό είδος ιών εντός του γένους *Polemonivirus*. Το είδος αυτό έχει επίσης παγκόσμια διασπορά, καθώς έχει ανιχνευτεί σε χώρες της Ευρώπης (Ηνωμένο Βασίλειο, Γερμανία, Τσεχία, Γαλλία, Σερβία), της Αφρικής (Αίγυπτος, Μαρόκο, Νότια Αφρική), της Ασίας (Ιράν, Κίνα, Σαουδική Αραβία), στην Αυστραλία, στην Κολομβία και στις ΗΠΑ (Stevens et al., 2005). Επισημαίνεται ότι προτού πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των ειδών, ιοί που είχαν βρεθεί σε περιοχές της Αυστραλίας είχαν καταχωρηθεί ως BWYV, ενώ μοριακές αναλύσεις των απομονώσεων αυτών που ακολούθησαν, έδειξαν μεγαλύτερη συγγένεια με τον TuYV.



Εικόνα 28 Τα ισωμάτια του turnip yellows virus (TuYV) από φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Stevens et al., 2008).

Κύριοι ξενιστές του TuYV είναι τα φυτά μαρουλιού, στα οποία προκαλεί κυρίως συμπτώματα μεσονεύριας χλάρωσης των φύλλων, ενώ αποτελεί από τις πιο σημαντικές απειλές από ιολογικής άποψης των φυτών ρεβιθιού (Filardo et al., 2021b) και ελαιοκράμβης (*Brassica napus*) (Εικ. 29), στην περίπτωση των οποίων η μόλυνσή τους έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση παραγωγής σπόρου, αλλά και ελαίου η οποία έχει αναφερθεί να φτάνει το 26% στο Ηνωμένο Βασίλειο και το 46% στην Αυστραλία (Stevens et al., 2008).



Εικόνα 29 Φυτά ελαιοκράμβης μολυσμένα με τον turnip yellows virus (TuYV) παρουσιάζουν περιθωριακό κοκκίνισμα των φύλλων καθώς και κιτρίνισμα του ελάσματος (Stevens et al., 2008).

Παρόλα αυτά το είδος αυτό φαίνεται να έχει ευρύ φάσμα ξενιστών, που ανήκουν σε τουλάχιστον 21 διαφορετικές οικογένειες φυτών, όπως:

- Οικ. Brassicaceae: κουνουπίδι (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), λάχανο (*Brassica oleracea* var. *Capitata*), λαχανάκια Βρυξελλών (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), γογγύλι (*Brassica rapa* ssp. *rapifera*), ελαιοκράμβη (*Brassica napus*), σινάπι (*Sinapis alba*), κ.ά.
- Οικ. Chenopodiaceae: σπανάκι (*Spinacea oleracea*),
- Οικ. Compositae: μαρούλι (*Lactuca sativa*)
- Οικ. Fabaceae: ρεβίθι (*Cicer arietinum*), λούπινο (*Lupinus albus*), μπιζέλι (*Pisum sativum*), κουκί (*Vicia faba*), κίτρινο λούπινο (*Lupinus luteus*), *Ornithopus sativus* και τριφύλλι το περσικό (*Trifolium resupinatum*).

Επισημαίνεται ότι ζιζάνια (π.χ. κόνυζα), που αποτελούν επίσης ξενιστές του ιού αλλά και πολυετείς καλλιέργειες διαδραματίζουν σημαντικό επιδημιολογικό ρόλο, καθώς αποτελούν εστία μόλυσματος, στην οποία ο ιός μπορεί να επιβιώσει κατά τη διάρκεια όλου του έτους.

Τα συμπτώματα που προκαλεί ο TuYV ποικίλουν και, όπως συμβαίνει με πολλές ιολογικές ασθένειες, συγχέονται με τροφοπενίες και περιβαλλοντικό στρες. Επίσης, σε πολλές περιπτώσεις η ασθένεια είναι λανθάνουσα και τα μολυσμένα φυτά είναι ασυμπτωματικά. Τα συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν νανισμό των φυτών, κοκκίνισμα και κιτρίνισμα των μεσονεύριων διαστημάτων των φύλλων (ίκτερος), καθώς και κοκκίνισμα των περιθωρίων (Εικ. 29 και 30). Σε μερικά είδη ζιζανίων όπως το

Capsella bursa-pastoris (καψέλα), τα παλαιότερα φύλλα κιτρινίζουν, συστρέφονται και γίνονται εύθραυστα, ενώ σε άλλα, όπως το *Montia perfoliata*, γίνονται κόκκινα (Εικ. 30).



Εικόνα 30 Χαρακτηριστικά συμπτώματα του turnip yellows virus (TuYV) στα ζιζάνια: Στην καψέλα παρατηρείται κιτρίνισμα και στο *Montia perfoliata* κοκκίνισμα των φύλλων (τροποποιημένη από Stevens et al., 2008).

Ο TuYV μεταδίδεται από τα έντομα φορείς του με έμμονο τρόπο (κυκλοφορών, μη πολλαπλασιαζόμενο), ενώ δεν έχει αναφερθεί δυνατότητα μηχανικής μετάδοσης ή σπορομετάδοσης (Moreno & Fereres, 2012). Ως κύριος φορέας του ιού αναφέρεται η πράσινη αφίδα της ροδακινιάς, *Myzus persicae*, δευτερευόντως τα είδη *Brevicoryne brassicae* και *Macrosiphum euphorbiae*, ενώ έχουν αναφερθεί κι άλλα 14 είδη αφίδων φορέων του (Stevens et al., 2005, Schliephake et al., 2000). Η ανάπτυξη της *M. persicae* ευνοείται από ήπιους χειμώνες και υψηλότερες θερμοκρασίες. Με την άνοδο της θερμοκρασίας παγκοσμίως, λόγω της κλιματικής αλλαγής, αναμένεται αύξηση των πληθυσμών των αφίδωνμ επιδείνωση της κατάστασης και διασπορά ιολογικών ασθενειών σε νέες περιοχές.

Μόλις οι αφίδες αποκτήσουν τον TuYV, παραμένουν ιοφόρες στα διάφορα αναπτυξιακά τους στάδια, αλλά δεν έχουν την ικανότητα να τον μεταφέρουν στους απογόνους τους. Ως έμμοнос ιός, ο TuYV εντοπίζεται και προσλαμβάνεται από το φλοιώμα του μολυσμένου φυτού, όπου η αφίδα πρέπει να τραφεί έως 15 λεπτά προκειμένου να αποκτήσει τον ιό (AAP). Ακολουθεί η λανθάνουσα περίοδος που διαρκεί τουλάχιστον 24 ώρες και μπορεί να φτάσει έως και 4 ημέρες και στη συνέχεια, ο χρόνος διατροφής για τη μετάδοση του TuYV (inoculation access period) στο υγιές φυτό είναι από 10 έως 30 λεπτά.

9.3. Λοιποί ιοί του γένους *Polemovirus* που μολύνουν ψυχανθή

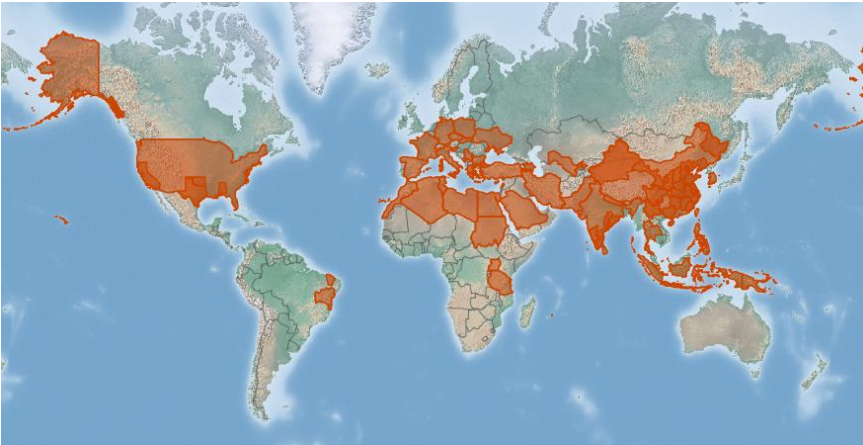
- Chickpea chlorotic stunt virus (CrCSV), Ιος του χλωρωτικού νανισμού του ρεβιθιού

Ο ιός αυτός βρέθηκε ταυτοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε από τους Abraham et al. (2006) και σύμφωνα με το CABI έχει καταγραφεί σε ορισμένες χώρες της Αφρικής (Μαρόκο, Τυνησία, Αιθιοπία, Ερυθραία) και

της Ασίας (Συρία, Αζερμπαϊτζάν και Ιράν). Ως ξενιστές του ιού αναφέρονται τα ρεβίθια, τα κουκιά, η φακή και ο αρακάς (Abraham et al., 2006) και τα συμπτώματα που παρατηρούνται στα μολυσμένα φυτά ποικίλουν ανάλογα τον ξενιστή. Στα φυτά ρεβιθιάς και κουκιού αυτά περιλαμβάνουν νανισμό του φυτού, κιτρίνισμα, χλώρωση των φύλλων και σε μερικές περιπτώσεις δερμάτωση των φύλλων, ακόμα και θανάτωση του φυτού (Abraham et al., 2009), ενώ στα φυτά φακής παρατηρείται επίσης ραβδωτός ίκτερος, κοκκίνισμα, μικροφυλλία και παραμορφώσεις, ενώ στα φυτά μπιζελιού οι μολύνσεις είναι λανθάνουσες και δεν εκδηλώνονται συμπτώματα.

- Cotton leafroll dwarf virus (CLRDV), Ιός του καρουλιάσματος των φύλλων με νανισμό του βαμβακιού
Η ασθένεια του βαμβακιού γνωστή ως «κυάνωση του βαμβακιού» αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Κεντροαφρικανική Δημοκρατία το 1949, ωστόσο αυτή συσχετίστηκε με την παρουσία ιού μόλις το 1971 και πλέον έχει καταγραφεί και σε άλλες χώρες της Αφρικής και στη Βραζιλία. Ο ιός που είναι υπεύθυνος για την ασθένεια αυτή ονομάστηκε cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) από τους Corrêa et al. (2005), ενώ το 2010 πραγματοποιήθηκε η αλληλούχιση και ο χαρακτηρισμός του πλήρους γονιδιώματός του, από τους Distéfano et al. (2010). Βασικός φορέας αποτελεί η αφίδα *Aphis gossypii* και εκτός από το βαμβάκι ως ξενιστές έχουν αναφερθεί ένας μεγάλος αριθμός ζιζανίων, που ανήκουν σε περισσότερες από 16 οικογένειες (όπως είναι τα *Amaranthus palmeri*, *Mollugo verticillata*, *Oenothera biennis*, *Lamium amplexicaule*). Στην οικογένεια Fabaceae, ο ιός μολύνει το ρεβίθι καθώς και 3 είδη ζιζανίων (Sedhain et al., 2021).
- Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV), Ιός του αφιδομεταδιδόμενου ίκτερου των κολοκυνθοειδών
Ο CABYV καταγράφηκε πρώτη φορά το 1992 στην Γαλλία σε κολοκυνθοειδή (Lecoq et al., 1992), όπου τα προηγούμενα χρόνια είχαν παρατηρηθεί συμπτώματα ίκτερου και τα οποία είχαν αποδοθεί σε τροφопενία. Από τότε έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως (Εικ. 31), με έντονη παρουσία στις μεσογειακές χώρες, συμπεριλαμβανόμενης και της Ελλάδας, στην οποία αναφέρεται ως ένας από τους πιο συνήθεις Poleroviruses στις καλλιέργειες αγγουριών (Orfanidou et al., 2019).

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή



Εικόνα 31 Χάρτης με απεικόνιση της παγκόσμιας γεωγραφικής κατανομής του *cucurbit arhoid borne yellows virus* (CABYV), σύμφωνα με το CABl για το έτος 2021.

Προκαλεί ίκτερο στα φύλλα των φυτών που μολύνει (Εικ. 32) καθώς και πάχυνσή τους και όταν η μόλυνση γίνει στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυτού οι απώλειες μπορεί να φτάσουν στο 40-50% μειώνοντας την παραγωγή καρπών, χωρίς όμως να τους παραμορφώνει (Lecoq et al., 1992). Ως βασικοί ξενιστές του CABYV αναφέρονται μέλη της οικογένειας Cucurbitaceae, ενώ ως κυριότεροι φορείς οι αφίδες *M. persicae* και *A. gossypii*. Σε επισκοπήσεις θερμοκηπιακών καλλιεργειών αγγουριάς και πεπονιας της χώρας μας από τους Boubourakas et al. (2006), ο ιός αυτός εντοπίστηκε σε τρία θερμοκήπια, στην περιφερειακή ενότητα Πέλλας. Ο CABYV εκτός από τα κολοκυνθοειδή μολύνει φυτά μαρουλιού, κουκιού, φακής, αραχίδας και ρεβιθιού, στα οποία προκαλεί καχεξία και κιτρίνισμα των φύλλων (Kumari et al., 2018, Mabele et al., 2022).



Εικόνα 32 α) Συμπτώματα ίκτερου που προκαλούνται από τον *cucurbit arhoid borne yellows virus* (CABYV) στα φύλλα φυτού κολοκυθιάς (Radeva-Ivanova et al., 2022) και β) φύλλο από φυτό καρπουζιάς με χαρακτηριστικό κιτρίνισμα (Lecoq et al., 2022).

- Potato leafroll virus (PLRV), Ιός του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας

Ο PLRV έχει ευρύ φάσμα ξενιστών με τους κυριότερους να ανήκουν στην οικογένεια Solanaceae (πατάτες, *Solanum villosum*, κα), αλλά και σε είδη που ανήκουν σε άλλες οικογένειες όπως κολοκυθιά, μαρούλι, κ.ά. Ο ιός αυτός αποτελεί έναν από τους πιο καταστρεπτικούς ιούς του γένους *Polevirus* καθώς και τον πιο επιζήμιο στις πατάτες προκαλώντας ποσοτικές απώλειες παραγωγής της τάξης του 50-60% και

υποβιβάζοντας την ποιότητα των κονδύλων (Garcia-Ruiz et al., 2021, Mayo & Barker, 2003). Εκτός από την ανάσχεση την ανάπτυξης, άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν το χαρακτηριστικό καρούλιασμα των φύλλων προς τα πάνω, αλλά και τον αποχρωματισμό τους. Σύμφωνα με το CABI, πρόκειται για ένα από τα πιο διαδεδομένα παθογόνα σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανόμενης και της Ελλάδας (CABI online).

Σε επισκοπήσεις που πραγματοποιήθηκαν στη χώρα μας τα έτη 2005 και 2006 από τους Chatzivassiliou et al., 2008, ο PLRV εντοπίστηκε σε συμπτωματικά φυτά πατάτας σε καλλιέργειες σε ποσοστό 2% επί του συνόλου των δειγμάτων, αλλά σε υψηλότερα ποσοστά στην περιφέρεια Ξάνθης (37,8%) και Κιλκίς (20%). Επιπλέον από τα 180 δείγματα εισαγόμενου πατατόσπορου που ελέγχθηκαν, ο PLRV εντοπίστηκε στα 15, ενώ από τα 638 δείγματα μη πιστοποιημένου πατατόσπορου στα 86, με το μεγαλύτερο ποσοστό να εμφανίζεται στην περιφέρεια Πέλλας. Όσον αφορά τα ψυχανθή, έχει καταγραφεί μόλυνση φυτών ρεβιθιούκαι φακής σε χώρες της Ασίας όπως η Συρία και το Ιράκ (Makkouk et al., 1992, El-Muadhidi et al., 2001,)

Σκοπός της μελέτης

Οι ιοί αποτελούν τη σημαντικότερη βιοτική απειλή για τα ψυχανθή, η οποία ολοένα και μεγαλώνει λόγω της δημιουργίας νέων ειδών και νέων φυλών ήδη χαρακτηρισμένων ειδών, καθένα από τα οποία παρουσιάζει διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά. Οι ιοί του γένους *Potyvirus* είναι γνωστά παθογόνα των ψυχανθών, αφού ο BCMV αναφέρθηκε για πρώτη φορά περισσότερο από έναν αιώνα πριν και έκτοτε έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως. Αντιθέτως, το γένος *Polerovirus* αποτελεί αναδυόμενη απειλή για την καλλιέργεια των ψυχανθών, καθώς τα είδη του χαρακτηρίζονται από υψηλή μοριακή παραλλακτικότητα και κάποια από αυτά, όπως ο BWYV έχουν ευρύ φάσμα ξενιστών. Το ενδιαφέρον της παρούσας διατριβής στράφηκε στη βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων της διαδικασίας της PCR που αφορούν την ανίχνευση ελληνικών απομονώσεων ιών του γένους *Potyvirus* και *Polerovirus* που μολύνουν τα ψυχανθή, όμως επικεντρώθηκε στους δεύτερους καθώς η χρήση της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA έχει κριθεί αναξιόπιστη. Τα πρωτόκολλα που βελτιστοποιήθηκαν αφορούν τις ελληνικές απομονώσεις ιών των ψυχανθών, ώστε τα προϊόντα της PCR να μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για τη διάγνωση των σχετικών ασθενειών, όσο και για φυλογενετικές αναλύσεις των ιών που εμπλέκονται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Επιλογή απομονώσεων

1.1. Συλλογή δειγμάτων

Για την απόκτηση ελληνικών απομονώσεων για τις μελέτες της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από αγρούς με ψυχανθή, σε διάφορες Περιφερειακές Ενότητες της χώρας, τα έτη 2021 και 2022. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε με κριτήριο τη μακροσκοπική τους εικόνα, δηλαδή από φυτά ύποπτα για ιολογική προσβολή, τα οποία εμφάνιζαν συμπτώματα ίκτερου, μωσαϊκών, χλωρώσεων και νανισμού. Η πλειοψηφία των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ήταν φυτά μηδικής (*Medicago sativa*) και αραχίδας (*Arachis hypogaea*), ενώ σε μικρότερο αριθμό συλλέχθηκαν δείγματα από δένδρα ακακίας (*Robinia pseudoacacia*) και χαρουπιάς (*Ceratonia siliqua*), από τις εξής Περιφερειακές Ενότητες: Αιτωλοακαρνανίας, Αργολίδας, Έβρου, Καβάλας, Μεσσηνίας, Ξάνθης, Ρεθύμνου, Ροδόπης και Σερρών (Πιν. 9).

Πίνακας 9 Προέλευση, φυτικά είδη και αριθμός δειγμάτων που ελέγχθηκαν.

Περιφερειακή ενότητα	Φυτικά δείγματα
Αιτωλοακαρνανίας	Μηδική (60)
Αργολίδας	Χαρουπιά (4)
Έβρου	Μηδική (50)
Καβάλας	Μηδική (20) και ακακία (18)
Μεσσηνίας	Μηδική (26)
Ξάνθης	Μηδική (66) και ακακία (16)
Ρεθύμνου	Μηδική (20)
Ροδόπης	Μηδική (30)
Σερρών	Μηδική (44) και αραχίδα (137)

1.2. Μεταχείριση δειγμάτων

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου ταξινομήθηκαν και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτες στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί ο έλεγχός τους. Τα δείγματα αυτά ελέγχθηκαν αρχικά στα πλαίσια πτυχιικών διατριβών που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του ΓΠΑ (Καστόρα, 2022 & Τσαπικούνη, 2022) με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), για την παρουσία των ιών PSV και CMV (*Cucumovirus*), AMV (*Alfamonivirus*), BLRV (*Luteovirus*), BYMV (*Potyvirus*), BGMV (*Begomovirus*), FBNYV (*Nanovirus*) και BWYV (*Polerovirus*).

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής τα δείγματα ελέγχθηκαν ορολογικά με δοκιμές ELISA, επιπλέον και (α) για την παρουσία των Poty-ιών, είτε με γενικά αντισώματα για την ανίχνευση του γένους (Poty-generic), είτε συγκεκριμένα για την παρουσία του BCMV και (β) για την παρουσία των Polero-ιών, BWYV και CABYV.

Ακολούθησαν μοριακές δοκιμές στις οποίες συμπεριλήφθησαν δείγματα τα οποία στις παραπάνω ορολογικές δοκιμές είτε:

- Βρέθηκαν θετικά σε ιούς των γενών *Polerovirus* και *Potyvirus*
- Βρέθηκαν αρνητικά στους παραπάνω ιούς του γένους *Luteovirus*, *Nanovirus*, *Begomovirus*, *Alfamovirus* και *Cucumovirus* αλλά η συμπτωματολογία του φυτού παρέπεμπε σε προσβολή από ιούς του γένους *Polerovirus* και *Potyvirus*.
- Βρέθηκαν θετικά στον BLRV, λόγω της διασταυρωτής αντίδρασης των αντισωμάτων του ιού αυτού με τον BWYV, η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι έχουν 90% ομοιότητα στην αλληλουχία των δομικών πρωτεϊνών τους (Miller, 1999).

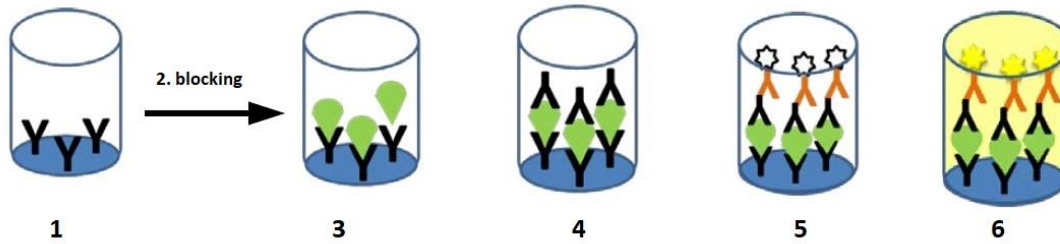
1.3. Ορολογικές δοκιμές

Ο ορολογικός έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) για την ανίχνευση των ιών BWYV, CABYV, BCMV καθώς και για το γένος *Potyvirus* με τη χρήση αντισωμάτων εξειδικευμένων αντισωμάτων, τα οποία προέρχονται από το Ινστιτούτο DSMZ και πλακών πολυστυρενίου της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Αναλυτικότερα, για την ανίχνευση των BWYV, CABYV και BCMV χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Triple Antibody Sandwich (TAS) ELISA, ενώ για το γένος *Potyvirus* το πρωτόκολλο της Antigen Coated Plate (ACP) ELISA, σύμφωνα με τις συστάσεις της εταιρείας. Σε κάθε πλάκα προστίθενται τα δείγματα και περιλαμβάνονται επίσης ένας θετικός μάρτυρας, ένα δείγμα αρνητικό στον εκάστοτε ιό και τέλος μια ποσότητα από το διάλυμα εξαγωγής (extraction buffer). Για την κάθε δοκιμή σχεδιάζεται μια κάτοψη της πλάκας στην οποία απεικονίζεται η θέση του κάθε δείγματος και μάρτυρα για να είναι δυνατή η ανάλυση των αποτελεσμάτων και τέλος, τονίζεται ότι οι εξωτερικές σειρές με βοθρία της πλάκας εξαιρούνται από τις δοκιμές, καθώς σε αυτές καταγράφεται μη σταθερή μεταβολή των θερμοκρασιών που επηρεάζει τα αποτελέσματα.

1.3.1. Triple Antibody Sandwich (TAS) ELISA

Για τον έλεγχο των δειγμάτων ως προς την παρουσία των ιών BWYV, CABYV και BCMV χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Triple Antibody Sandwich (TAS) ELISA (Εικ. 33) και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων ήταν οι εξής:

BCMV:	IgG- 1:1000	BWYV:	IgG- 1:1000	CABYV:	IgG- 1:1000
	MAb-1:100		MAb-1:500		MAb-1:1000
	Conjugate- 1:1000		Conjugate- 1:1000		Conjugate- 1:1000



Εικόνα 33 Τα βήματα κατά την εκτέλεση της TAS-ELISA. Αρχικά πραγματοποιείται επώαση της πλάκας με το IgG και έπειτα από την παρεμπόδιση μη ειδικών αντιδράσεων ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων και στη συνέχεια η προσθήκη MAb αντισώματος. Στη συνέχεια, προστίθεται το αντίσωμα έναντι του Mab που είναι συζευγμένο με το ένζυμο, το οποίο μετά την προσθήκη του υποστρώματος είναι ικανό να αντιδράσει με αυτό και να δώσει το χαρακτηριστικό για το υπόστρωμα χρώμα (στη συγκεκριμένη περίπτωση κίτρινο). Με πράσινο συμβολίζεται το δείγμα, με μαύρο «Y» το αντίσωμα ειδικό για τον ιό, ενώ με πορτοκαλί «Y» το αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο (τροποποιημένη από το πρωτόκολλο του ινστιτούτου DSMZ).

Αναλυτικότερα, τα βήματα που ακολουθούνται, σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο του Ινστιτούτου DSMZ είναι τα εξής:

1. Προσρόφηση του ειδικού αντισώματος (IgG) στην πλάκα

- Διάλυση του IgG αντισώματος (γ-ανοσοσφαιρίνη) σε ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης (coating buffer), σύμφωνα με το πρωτόκολλο
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο της πλάκας
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση για 2-4 ώρες, σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C ή εναλλακτικά overnight (για 16-18 ώρες) στους 4°C
- Πλύση της πλάκας με το διάλυμα PBS-Tween με τη χρήση υδροβολέα και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Επανάληψη του πλυσίματος ακόμα 4 φορές
- Στέγνωμα της πλάκας

2. Παρεμπόδιση μη ειδικών αντιδράσεων

- Δημιουργία διαλύματος 2% σκόνη γάλακτος με PBS-Tween
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 30 min
- Απομάκρυνση του διαλύματος και στέγνωμα της πλάκας

3. Προσθήκη φυτικών δειγμάτων

- Λειοτριβήση των δειγμάτων σε φρέσκο διάλυμα εκχύλισης (extraction buffer) αραιωμένο 1:20 w/v
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο της πλάκας
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση overnight (για 16-18 ώρες) στους 4°C
- Πλύση της πλάκας με το διάλυμα PBS-Tween με τη χρήση υδροβολέα και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Επανάληψη του πλυσίματος ακόμα 4 φορές

- Στέγνωμα της πλάκας

4. Προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος (MAb IgG)

- Αραίωση του μονοκλωνικού αντισώματος MAb σε διάλυμα σύζευξης (conjugate buffer), σύμφωνα με το πρωτόκολλο
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο της πλάκας
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση για 2-4 ώρες σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C ή εναλλακτικά overnight (για 16-18 ώρες) στους 4°C
- Πλύση της πλάκας με το διάλυμα PBS-Tween με τη χρήση υδροβολέα και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Επανάληψη του πλυσίματος ακόμα 4 φορές
- Στέγνωμα της πλάκας

5. Προσθήκη του συζευγμένου με ειδικό ένζυμο αντισώματος έναντι του μονοκλωνικού αντισώματος (Goat anti-mouse conjugated IgG)

- Αραίωση του συζευγμένου αντισώματος (goat anti-mouse conjugated IgG) σε διάλυμα σύζευξης (conjugate buffer), σύμφωνα με το πρωτόκολλο
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο της πλάκας
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση για 1 ώρα σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C
- Πλύση της πλάκας με το διάλυμα PBS-Tween με τη χρήση υδροβολέα και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Επανάληψη του πλυσίματος ακόμα 4 φορές
- Στέγνωμα της πλάκας

6. Προσθήκη του υποστρώματος

- Διάλυση 1μg/ml φωσφορικής παρανιτροφαινόλης (para-nitrophenyl phosphate, PNPP) σε διάλυμα υποστρώματος (substrate buffer)
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο της πλάκας
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση για 30-60 λεπτά σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C
- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (optical density, OD) με τη χρήση φωτόμετρου στα 405nm, όταν η διάσπαση του υποστρώματος δίνει κίτρινο χρώμα

7. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

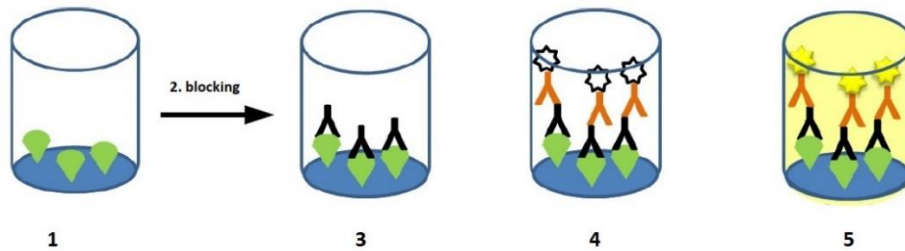
Συγκρίνεται η OD των δειγμάτων με αυτήν του αρνητικού μάρτυρα. Ο γενικός κανόνας ορίζει ως θετικά τα δείγματα των οποίων η OD είναι τριπλάσια από την αντίστοιχη του αρνητικού μάρτυρα.

1.3.2. ACP (Antigen Coated Plate) ELISA

Με τη διαδικασία της ACP (Antigen Coated Plate) ELISA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του DSMZ (Εικ. 34) πραγματοποιήθηκε έλεγχος των δειγμάτων για ιούς του γένους *Potyvirus*, με το αντίστοιχο γενικό αντίσωμα. Οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων ήταν οι εξής:

Mab- 1:1100

Conjugate- 1:1000



Εικόνα 34 Η εκτέλεση της ACP-ELISA ξεκινάει με την προσθήκη των δειγμάτων και στη συνέχεια η προστίθεται το MAb αντίσωμα και στη συνέχεια αντίσωμα έναντι του Mab, που είναι συζευγμένο με το ένζυμο. Μετά την προσθήκη του υποστρώματος το ένζυμο το διασπά και παράγει το χαρακτηριστικό για το υπόστρωμα χρώμα (στη συγκεκριμένη περίπτωση κίτρινο). Με πράσινο συμβολίζεται το δείγμα, με μαύρο «Υ» το αντίσωμα ειδικό για τον ιό, ενώ με πορτοκαλί «Υ» το αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο (τροποποιημένη από το πρωτόκολλο του Ινστιτούτου DSMZ).

Αναλυτικότερα, τα βήματα που ακολουθούνται, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Ινστιτούτου DSMZ έχουν ως εξής:

1. Προσρόφηση των δειγμάτων στις πλάκες

- Λειοτρίβηση των δειγμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης (coating buffer) στο οποίο έχει προστεθεί 0,05M DIECA
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο της πλάκας
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση overnight (για 16-18 ώρες) στους 4°C
- Πλύση της πλάκας με το διάλυμα PBS-Tween με τη χρήση υδροβολέα και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Επανάληψη του πλυσίματος ακόμα 4 φορές
- Στέγνωμα της πλάκας

2. Παρεμπόδιση μη ειδικών αντιδράσεων

- Δημιουργία διαλύματος 2% σκόνη γάλακτος με PBS-Tween
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 30 min
- Απομάκρυνση του διαλύματος και στέγνωμα της πλάκας

3. Προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος (MAb IgG)

- Αραίωση του μονοκλωνικού αντισώματος MAb σε διάλυμα σύζευξης (conjugate buffer), σύμφωνα με το πρωτόκολλο
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο της πλάκας
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση για 2-4 ώρες σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C ή εναλλακτικά overnight (για 16-18 ώρες) στους 4°C
- Πλύση της πλάκας με το διάλυμα PBS-Tween με τη χρήση υδροβολέα και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Επανάληψη του πλυσίματος ακόμα 4 φορές
- Στέγνωμα της πλάκας

4. Προσθήκη του συζευγμένου με ειδικό ένζυμο αντισώματος έναντι του μονοκλωνικού αντισώματος (IgG conjugate, IgGc)

- Αραίωση του συζευγμένου αντισώματος (goat anti-mouse conjugated, IgGc) σε διάλυμα σύζευξης (conjugate buffer), σύμφωνα με το πρωτόκολλο
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο της πλάκας
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση για 1 ώρα σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C
- Πλύση της πλάκας με το διάλυμα PBS-Tween με τη χρήση υδροβολέα και στη συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Επανάληψη του πλυσίματος ακόμα 4 φορές
- Στέγνωμα της πλάκας

5. Προσθήκη του υποστρώματος

- Διάλυση 1μg/ml φωσφορικής παρανιτροφαινόλης (para-nitrophenyl phosphate, PNPP) σε διάλυμα υποστρώματος (substrate buffer)
- Προσθήκη 200μl του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο της πλάκας
- Κάλυψη της πλάκας με πλαστική μεμβράνη και επώαση για 30-60 λεπτά σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C
- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (optical density, OD) με τη χρήση φωτόμετρου στα 405nm όταν η διάσπαση του υποστρώματος δίνει κίτρινο χρώμα

6. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Συγκρίνεται η OD των δειγμάτων με αυτήν του αρνητικού μάρτυρα. Ο γενικός κανόνας ορίζει ως θετικά τα δείγματα των οποίων η OD είναι τριπλάσια από την αντίστοιχη του αρνητικού μάρτυρα

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές ELISA.

Πίνακας 10 Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις ανοσοενζυμικές δοκιμές ELISA

Διάλυμα	Σύσταση
Ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης (Coating buffer)	1.59 g sodium carbonate (Na ₂ CO ₃) + 2.93 g sodium bicarbonate (NaHCO ₃) Αραίωση με H ₂ O έως τα 900 ml, ρύθμιση του pH στο 9.6 με τη χρήση HCl και τέλος, συμπλήρωση νερού έως το 1l.
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 10x (Phosphate Buffer Saline, PBS)	8.0 g sodium chloride (NaCl) 0.2 g monobasic potassium phosphate (KH ₂ PO ₄) 1.15 g dibasic sodium phosphate (Na ₂ HPO ₄) 0.2 g potassium chloride (KCl) 0.2 g sodium azide (NaN ₃) Αραίωση με H ₂ O έως τα 900 ml, ρύθμιση του pH στο 7.4 με τη χρήση NaOH ή HCl και τέλος, συμπλήρωση νερού έως το 1l.
Διάλυμα πλύσης (PBS-Tween, PBST)	PBS + 0.5 ml Tween20 ανά λίτρο
Διάλυμα εκχύλισης (Extraction Buffer)	PBST + 2% PVP
Διάλυμα σύζευξης (Conjugate buffer)	PBST + 2% PVP + 0.2% αλβουμίνη βοδιού (BSA)
Διάλυμα υποστρώματος (Substrate buffer)	97 ml διαιθυνολαμίνη + 600 ml H ₂ O +0.2 g sodium azide (NaN ₃) Ρύθμιση του pH στο 9.8 με τη χρήση HCl και συμπλήρωση νερού έως το 1l.

2. Μοριακή Ανίχνευση Ιών

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1, για τις μοριακές δοκιμές επιλέχθηκαν τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά στους Ρογ-ιούς και BWYV (γένος *Poleovirus*), καθώς και αυτά που αντέδρασαν με τα αντισώματα του BLRV, λόγω της διασταυρωτής αντίδρασης τους με τον BWYV. Επιπλέον συμπεριλήφθησαν και αυτά που ελέγχθηκαν ως αρνητικά στα υπόλοιπα γένη ιών (*Luteovirus*, *Nanovirus*, *Begomovirus*, *Alfavirus*, *Cucumovirus*) για τη διερεύνηση της παρουσίας των υπό μελέτη ιών σε δείγματα σε δείγματα με ικό τίτλο που πιθανά δεν ανιχνεύτηκε με τις ορολογικές δοκιμές.

Η διαδικασία της μοριακής ανίχνευσης των ιών των γενών *Poleovirus* και *Potyvirus* στα δείγματα ψυχανθών περιλαμβάνουν τα εξής στάδια:

- Εξαγωγή ολικού RNA.
- Μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του ολικού εξαγόμενου RNA, με τη χρήση φασματοφωτομέτρου μικρού όγκου (Nanodrop).
- Καθαρισμός του ολικού εξαγόμενου RNA (εφόσον χρειάζεται)

- Έλεγχος της ποιότητας του ολικού εξαγόμενου RNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.
- Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT) για τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA (complementary DNA synthesis, cDNA synthesis).
- Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).
- Οπτικοποίηση του προϊόντος της PCR μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.
- Καθαρισμός των προϊόντων της PCR και μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA.
- Αλληλούχιση (Sequencing).

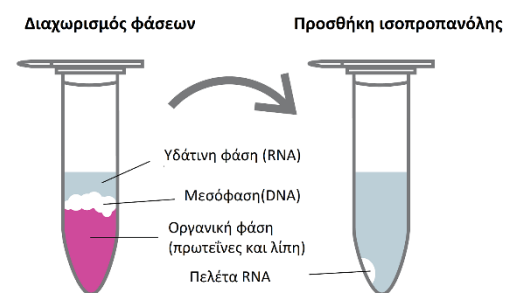
2.1. Εξαγωγή ολικού RNA από φυτικό ιστό

Για την εξαγωγή του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητά τους: α) με το αντιδραστήριο TRI Reagent® από την εταιρεία Sigma – Aldrich και β) με στήλες με τη χρήση του RNeasy Plant Mini Kit της εταιρείας Qiagen.

2.1.1. Αντιδραστήριο TRI Reagent®

Σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο του αντιδραστηρίου TRI – REAGENT® της εταιρείας Sigma – Aldrich, η διαδικασία εκχύλισης του ολικού RNA έχει ως εξής:

- Λειοτρίβηση 50 - 100 mg φυτικού ιστού σε υγρό άζωτο μέχρι τη δημιουργία πούδρας και μεταφορά σε σωληνάριο τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml
- Προσθήκη 800 - 1.000 μl του αντιδραστηρίου TRI και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
- Προσθήκη 200 μl χλωροφόρμιο, έντονη ανάδευση και επώαση στον πάγο για 5 min
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές ανά λεπτό (rounds per minute, rpm) σε θερμοκρασία 4°C min για 15 min
- Μεταφορά της υδατινής φάσης (Εικ. 35) όγκου περίπου 450μl σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf των 1,5 ml με προσοχή να μη διαταραχθεί το ίζημα
- Προσθήκη 500 μl παγωμένης ισοπροπανόλης, ελαφρά ανακίνηση και επώαση στον πάγο για 10 min (σχηματισμός πελέτας)
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C για 10 min
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 1000 μl παγωμένης αιθανόλης 75% και έντονη ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 8.200 rpm σε θερμοκρασία 4°C για 5 min



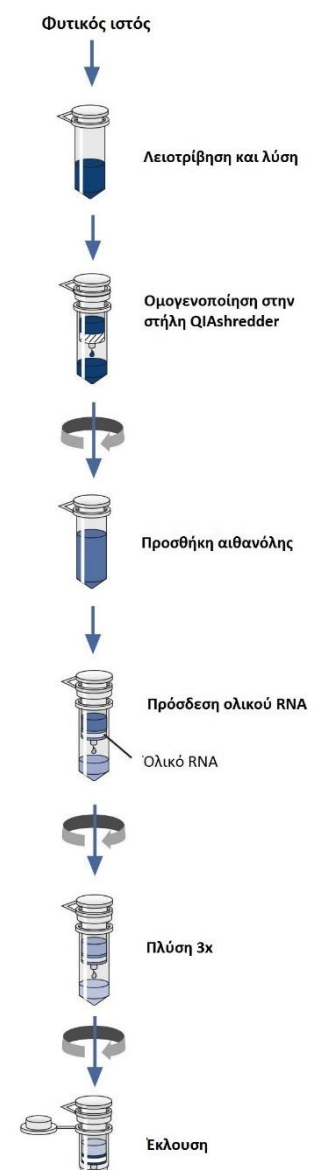
Εικόνα 35 Διαχωρισμός φάσεων και σχηματισμός πελέτας με το αντιδραστήριο TRI Reagent® (<https://zymoresearch.eu/pages/what-is-trizol>).

- Επανάληψη βημάτων 8 και 9
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επώαση των σωληνάρων σε θερμοκρασία δωματίου σε προστατευμένο από επιμολύνσεις χώρο μέχρις ότου στεγνώσουν
- Επαναδιάλυση του ιζήματος (RNA) σε 30 μl αποστειρωμένου δις-απεσταγμένου νερού (ddH₂O) με θέρμανση στους 60°C για 10 - 15 min
- Μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου (nanodrop)
- Αποθήκευση του RNA σε καταψύκτη -80°C

2.1.2. RNeasy Plant Mini kit (στήλες)

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Qiagen για τη χρήση του RNeasy Plant Mini Kit, η εξαγωγή του ολικού RNA έχει ως εξής (Εικ. 36):

- Ζύγιση 100mg φυτικού ιστού
- Λειοτριβήση με υγρό άζωτο σε γουδί έως ότου ο ιστός μετατραπεί σε πούδρα. Μεταφορά σε σωληνάριο τύπου erpendorf των 2ml
- Προσθήκη 450 μl του ειδικού διαλύματος λύσης RLT και έντονη ανάδευση στο vortex
- Επώαση για 1-3 min στους 56°C
- Μεταφορά του διαλύματος στην ειδική στήλη QIA shredder και φυγοκέντρωση της στις 14.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C για 2 min
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf των 2ml αφήνοντας ανέπαφη την πελέτα
- Προσθήκη 0,5 όγκου αιθανόλης 100% (200 μl) και ανάμιξη με πιπέτα
- Μεταφορά του δείγματος (650 μl) στην ειδική στήλη RNeasy Mini spin και φυγοκέντρωση της στις 10.000 rpm για 15 s. Απόρριψη του διηθήματος και τοποθέτηση του υπερκείμενου πάλι στην στήλη
- Προσθήκη 700 μl του διαλύματος RW1 στην στήλη RNeasy spin και φυγοκέντρωση της στις 10.000 rpm για 15 s. Απόρριψη του διηθήματος και τοποθέτηση του υπερκείμενου πάλι στην στήλη
- Προσθήκη 500 μl του διαλύματος RPE στη στήλη RNeasy spin και φυγοκέντρωση της στις 10.000 rpm για 15 s. Απόρριψη του διηθήματος και τοποθέτηση του υπερκείμενου πάλι στην στήλη
- Προσθήκη 500 μl του διαλύματος RPE στη στήλη RNeasy spin και φυγοκέντρωση της στις 10.000 rpm για 2 min



Εικόνα 36 Εξαγωγή ολικού RNA RNeasy Plant Mini Kit (τροποποιημένη από την εταιρεία Qiagen).

- Τοποθέτηση της RNeasy spin στήλης σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf των 2ml και προσθήκη 50 μl ddH₂O
- Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 1 min για έκλουση του RNA
- Μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου (nanodrop)
- Αποθήκευση του RNA στους -80°C.

2.2. Μέτρηση συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού εξαγόμενου RNA

Ο έλεγχος της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του ολικού εξαγόμενου RNA πραγματοποιήθηκε με το φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου Nanodrop1000 της εταιρείας ThermoFischer, που δίνει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης της συγκέντρωσης του ολικού RNA και η οποία είναι εκφρασμένη σε ng/μl, ενώ καταγράφονται επίσης οι λόγοι απορρόφησης 260/280 και 260/230. Η λειτουργία του Nanodrop βασίζεται στην ικανότητα των μορίων να απορροφούν μέρος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 260 nm, οι πρωτεΐνες σε μήκος κύματος 280 nm, οι πεπτιδικοί δεσμοί μεταξύ 215-230 nm, ενώ άλλες ουσίες όπως φαινόλες, άλατα και οι υδατάνθρακες σε μήκος κύματος 230nm. Έτσι λόγος 260/280, με τιμή 2,0 υποδηλώνει διάλυμα καθαρού RNA, ενώ λόγος 260/230 με τιμή πάνω 1,8-2,2 σημαίνει ότι το δείγμα είναι απαλλαγμένο από την παρουσία άλλων ξένων παραγόντων όπως άλατα, φαινόλες και υδατάνθρακες (Desjardins & Conklin, 2010).

2.3. Καθαρισμός του ολικού εξαγόμενου RNA

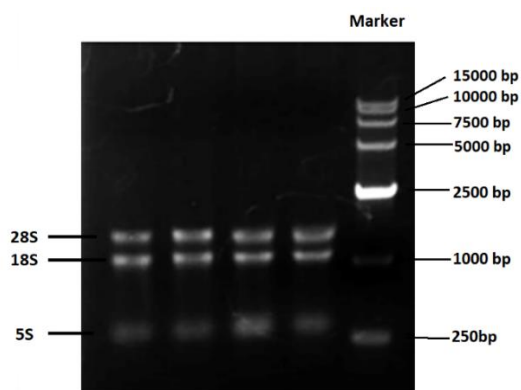
Μετά την εξαγωγή του ολικού RNA και αξιολόγηση της καθαρότητάς του, σε κάποια δείγματα παρατηρήθηκε ότι οι τιμές των λόγων 260/280 και 260/230 παρέκκλιναν σημαντικά από το 2.0 που θεωρείται ιδανικό. Στα δείγματα αυτά ακολούθησε επιπλέον καθαρισμός του ολικού εξαγόμενου RNA με τη χρήση φαινόλης/χλωροφόρμιου. Αναλυτικότερα, η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Επαναδιάλυση του RNA δείγματος σε 500 μl ddH₂O
2. Προσθήκη 500 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκόολη (25:24:1)
3. Πολύ καλή ανάδευση για 2 min (vortex)
4. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (13.000 rpm) στους 4°C για 5 min
5. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf
6. Προσθήκη 500 μl χλωροφόρμιο και έντονη ανάδευση
7. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm στους 4°C για 5 min
8. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf
9. Προσθήκη 500 μl ισοπροπανόλη και επώαση στον πάγο για 15 min
10. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C για 15 min

11. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 1000 μl παγωμένης αιθανόλης 75% και έντονη ανάδευση
12. Φυγοκέντρηση στις 13.00 rpm σε θερμοκρασία 4°C για 5 min
13. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επώαση των σωληνάρων σε θερμοκρασία δωματίου σε προστατευμένο από επιμολύνσεις χώρο μέχρις ότου στεγνώσουν
14. Επαναδιάλυση του ιζήματος (RNA) σε 30 μl ddH₂O με επώαση στους 65°C για 10 - 15 min
15. Μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου (nanodrop)
16. Αποθήκευση του RNA σε καταψύκτη -80°C

2.4. Έλεγχος της ποιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Ο προσδιορισμός της ποιότητας του ολικού εξαγόμενου RNA πραγματοποιήθηκε επιπλέον σε πηκτή αγαρόζης 1%, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris base 2M, acetic acid 1M, EDTA 50 Mm). Η οπτικοποίηση του RNA έγινε με τη βοήθεια της φθορίζουσας χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium Bromide, EtBr), η οποία προσδένεται στο γενετικό υλικό και με την εφαρμογή υπεριώδους (ultraviolet, UV) ακτινοβολίας. Αναλυτικότερα, η διαδικασία ξεκινάει με τον καθαρισμό της συσκευής ηλεκτροφόρησης με τη χρήση διαλύματος 10% SDS (sodium dodecyl sulfate), προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα πρωτεϊνών και ενζύμων όπως RNases, τα οποία αποδομούν το RNA και στη συνέχεια παρασκευάζεται 1% πηκτή αγαρόζης με μικρή ποσότητα EtBr. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής, λαμβάνεται από κάθε δείγμα και με βάση τις τιμές του nanodrop, ποσότητα τόση ώστε η τελική συγκέντρωση του RNA να φτάνει 1500 ng, προστίθενται 3 μl χρωστικής με γλυκερόλη (Gel Loading Dye, Purple 6x, NEB) και συμπληρώνονται με αποστειρωμένο ddH₂O μέχρις ότου ο τελικός όγκος να φτάσει στα 20 μl. Εφόσον έχει πήξει η πηκτή, τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις που έχουν δημιουργηθεί σε αυτήν τα δείγματα, στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και η τάση της ρυθμίζεται στα 90-100 Volt και ο χρόνος που χρειάζεται συνήθως κυμαίνεται στα 30–40 min. Ο έλεγχος του RNA στηρίζεται στην παρουσία και ένταση τριών ζωνών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις τρεις ριβοσωμικές υπομονάδες 28S, 18S και 5S (Εικ. 37) υπό την επίδραση της UV ακτινοβολίας. Έτσι, όταν τα δείγματα έχουν διασχίσει περίπου το μισό της πηκτής, αυτή τοποθετείται σε συσκευή με λαμπτήρα UV και ακολουθεί παρατήρηση των ριβοσωμικών υπομονάδων και αξιολόγηση της ποιότητας του RNA.



Εικόνα 37 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης για τον έλεγχο της ποιότητας του εξαγόμενου RNA. Είναι διακριτές οι τρεις ριβοσωμικές υπομονάδες 28S, 18S και 5S (τροποποιημένη από Ma et al., 2015).

2.5. Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription, RT) – Σύνθεση συμπληρωματικού κλώνου DNA (cDNA synthesis)

Για την ενίσχυση γενετικού υλικού των επιλεγμένων απομονώσεων μέσω της PCR, είναι αναγκαίο αυτό να είναι σε μορφή DNA. Καθώς οι Ροτγ-ιοί και Ρολερο-ιοί έχουν ως γενετικό υλικό μονόκλιωνα μόρια RNA, είναι απαραίτητη η σύνθεση συμπληρωματικού κλώνου DNA (complementary DNA, cDNA) από το RNA που εξήχθη. Αυτό πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase, RT) καθώς και ενός καθοδικού εκκινητή.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν αντιστροφes μεταγραφάσες των εταιρειών New England Biolabs (NEB) και Takara Biosystems, οι οποίες είναι ανασυνδυασμένα ένζυμα που προέρχονται από τον ρετροϊό moloney murine leukemia virus (MMLV). Ως εκκινητής χρησιμοποιήθηκε μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών (random primers) της εταιρείας Takara Bio, όπου πρόκειται για μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων με τυχαία σύσταση, οι οποίοι προσδένονται σε ολόκληρο το μήκος της αλυσίδας του RNA προσφέροντας κάλυψη όλων των μορίων. Σε κάποια δείγματα χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι για το γονίδιο RdRp των Ρολερο-ιών εκκινητές (specific primers), οι οποίοι αυξάνουν την εξειδίκευση της αντίδρασης PCR καθώς συνθέτουν το cDNA της επιθυμητής αλληλουχίας του γονιδιώματος. Σε κάθε περίπτωση εκτός των υπό εξέταση δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε και ένα δείγμα μάρτυρας, το noRT, στο οποίο προστίθεται RNA από τα δείγματα αλλά όχι αντίστροφη μεταγραφάση.

Το πρωτόκολλο της αντίστροφης μεταγραφής που χρησιμοποιήθηκε για κάθε δείγμα, έχει ως εξής:

- Σε κάθε αντίδραση απαιτείται εύρος από 0,1ng μέχρι 1.000ng ολικά εξαγόμενου RNA. Η αντίστοιχη ποσότητα δείγματος υπολογίζεται βάσει της συγκέντρωσης (ng/μl) και προστίθεται σε σωληνάριο τύπου erpendorf (1,5mL). Παράλληλα συμπεριλαμβάνεται και ο μάρτυρας της δοκιμής (noRT) στον οποίο προστίθενται συνολικό μίγμα 1000 ng RNA από όλα τα υπό εξέταση δείγματα.
- Προσθήκη 2 μl εκκινητών (random ή specific), καθώς και 1 μl dNTPs συγκέντρωσης 10 mM.
- Προσθήκη αντίστοιχης ποσότητας ddH₂O μέχρις ότου ο τελικός όγκος να φτάσει στα 10 μl.

- Τα δείγματα επωάζονται για 5 min στους 65°C και στη συνέχεια τοποθετούνται για μικρό χρονικό διάστημα στον πάγο.
- Προσθήκη 10 μl του Master mix (Πιν. 11 & 12, αντίστοιχα για κάθε ένζυμο) σε κάθε σωληνάριο

Πίνακας 11 Master mix που παρασκευάστηκε για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση του ενζύμου M-MuLV της εταιρείας NEB.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
MMLV buffer (10x)	2,0
RNase inhibitor	0,2
M-MuLV NEB	1,0
ddH ₂ O	6,8

Πίνακας 12 Master mix που παρασκευάστηκε για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση του ενζύμου MMLV PrimeScript™ της εταιρείας Takara Bio.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
MMLV buffer (5x)	4,0
RNase inhibitor	0,5 (20 units)
MMLV PrimeScript	0,5 (100-200 units)
ddH ₂ O	5,0

Στο μάρτυρα της δοκιμής (noRT) δεν προστίθεται το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, αλλά ddH₂O, προκειμένου να ελεγχθούν τυχόν επιμολύνσεις.

- Θέρμανση στους για 42 °C για 60 min
- Για τη M-MuLV της εταιρείας NEB ακολουθεί θέρμανση στους 65°C για 20 min προκειμένου να αδρανοποιηθεί το ένζυμο, ενώ για την MMLV PrimeScript™ (Takara Bio) στους 70°C για 15 min
- Αποθήκευση του cDNA σε καταψύκτη στους -20°C

2.6. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο της μοριακής βιολογίας που έχει βρει εφαρμογή σε πληθώρα πεδίων (ιατρική, εγκληματολογία, κ.ά.) καθώς παρέχει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού γενετικού υλικού και δημιουργία πολυάριθμων αντιγράφων του (από χιλιάδες μέχρι δισεκατομμύρια αντίγραφα), με εξαιρετική ευαισθησία καθώς και μεγάλη εξειδίκευση και ακρίβεια.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές PCR ήταν τα εξής:

- Ένζυμο Taq πολυμεράση της εταιρείας Kara Biosystems, το οποίο χρησιμοποιεί μονόκλωνη αλυσίδα DNA ως εκμάρτυρο για την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων

- Πέντε ζεύγη εκκινητών για την ανίχνευση των ιών του γένους *Polerovirus* και 2 ζεύγη εκκινητών για την ανίχνευση των ιών του γένους *Potyvirus*, τα οποία ορίζουν το εύρος και την περιοχή που θα ενισχυθεί
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) το οποίο προσφέρει σταθερότητα στο ιονικό περιβάλλον που θα λάβει χώρα η αντίδραση
- Χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) που ρυθμίζει την εξειδίκευση του υβριδισμού των εκκινητών
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) που αποτελούν βασικό συστατικό της αλυσίδας DNA που θα συντεθεί

2.6.1. Εκκινητές για τη μοριακή ανίχνευση των ιών του γένους *Potyvirus*

Για την ανίχνευση των Poty-ιών πραγματοποιήθηκε έλεγχος ενός γενικευμένου ζεύγους εκκινητών που ανιχνεύει όλους τους ιούς του γένους (Ha et al., 2008), στοχεύοντας στη CI περιοχή. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και δύο ζεύγη εκκινητών εξειδικευμένα σε επίπεδο είδους: ένα ζεύγος εξειδικευμένο για τον BCMV, το οποίο σχεδιάστηκε από την ομάδα Ιολογίας στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του ΓΠΑ (Σταυριανός, 2013) προκειμένου να ανιχνεύει το γονίδιο CI και ένα ζεύγος εξειδικευμένο για τον BYMV, το οποίο ενισχύει το γονίδιο της P1, μια περιοχή εξαιρετικά ετερογενής στους ιούς του γένους *Potyvirus* (Χατζηβασιλείου, αδημοσίευτα δεδομένα). Οι αλληλουχίες των εκκινητών και το αναμενόμενο προϊόν φαίνονται στον Πίνακα 13, ενώ οι περιοχές στις οποίες υβριδίζονται στο γονιδίωμα των Poty- ιών στην Εικόνα 38.

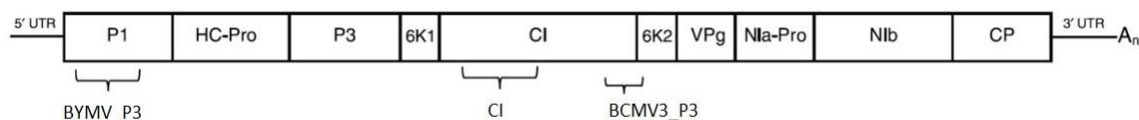
Πίνακας 13 Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές για την ανίχνευση των ιών του γένους *Potyvirus*, το αναμενόμενο προϊόν της PCR και η περιοχή στόχος του γονιδιώματος του ιού.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Αναμενόμενο μέγεθος (bp)	Γονίδιο-στόχος	Αναφορά
CIFor	GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC	683	5' μέρος της CI	Ha et al., 2008
CIRev	ACICCRTTYTCDATDATRRTTIGTIGC			
BYMV_P3 for	TAAACAACCTTTGTGTGAATTCGAG	594	P1	Χατζηβασιλείου, αδημοσίευτα δεδομένα
BYMV_P3 rev	CTTCTTTACAATGCTGAGAAGTTCC			
BCMV3_P3-F	AATCGGAAATGGTGCTGAAC	227	3' μέρος της CI	Σταυριανός, 2013
BCMV3_P3-R	TGCGTTTACGCTTGTGAGTC			

Όπου I=inosine, Y=C/T, R=G/A, W=A/T, V=A/C/G, S=C/G και D=A/G/T

Αναλυτικότερα, οι γενικευμένοι εκκινητές CIFor και CIRev (Ha et al., 2008) στοχεύουν στα μοτίβα I και V αντίστοιχα του γονιδίου CI, ενισχύοντας έτσι μια περιοχή υψηλά συντηρημένη ανάμεσα στα είδη-μέλη του γένους *Potyvirus* και λιγότερο στα γένη *Rymovirus*, *Ipotomovirus* και *Tritimovirus* της οικογένειας *Potyviridae*. Έτσι είναι πολύ πιθανό οι εκκινητές αυτοί να μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης για την

ανίχνευση και των γενών αυτών και στη συνέχεια η περιοχή που πολλαπλασιάζεται από τους εκκινητές αυτούς μπορεί με τη βοήθεια της αλληλούχισης να διαφοροποιήσει τους ιούς σε επίπεδο είδους. Οι πιο μεταβλητές περιοχές του γονιδιώματος των ιών του γένους *Potyvirus* εντοπίζονται στο 5' τμήμα του και ειδικότερα στις πρωτεΐνες P1, P3 καθώς και το N-τμήμα της CP και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό εξειδικευμένων εκκινητών. Το γονίδιο της P1 είναι εξαιρετικά ετερογενές γι' αυτό επιλέχθηκε για την ανίχνευση του BYMV (BYMV_P3).



Εικόνα 38 Περιοχές υβριδισμού των εκκινητών στο γονιδίωμα του γένους *Potyvirus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

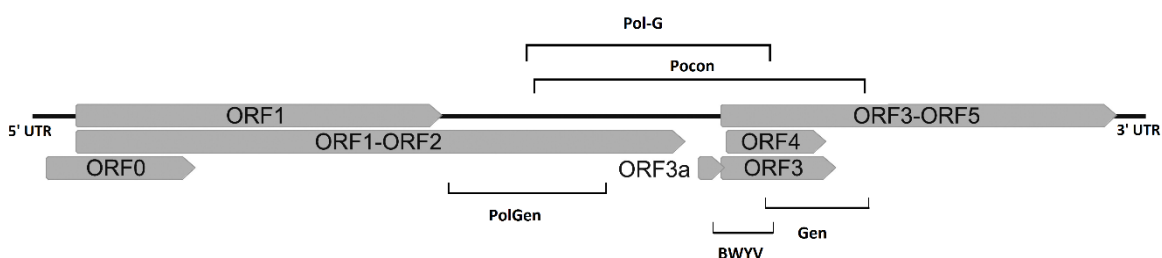
2.6.2. Εκκινητές για τη μοριακή ανίχνευση των ιών του γένους *Polerovirus*

Για την ανίχνευση ιών του γένους *Polerovirus* ελέγχθηκαν τέσσερα διαφορετικά ζεύγη γενικευμένων εκκινητών που ανιχνεύουν ιούς του γένους, καθώς και ένας εξειδικευμένος για την ανίχνευση του BWYV, οι αλληλουχίες και οι περιοχές ενίσχυσης των οποίων φαίνονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14 Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των ιών του γένους *Polerovirus*, το αναμενόμενο προϊόν της PCR και η περιοχή του γονιδιώματος του ιού.

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία	Αναμενόμενο μέγεθος (bp)	Γονίδιο στόχος	Αναφορά
BWYV-F	GTGGGTAGAAGAACAATCAATG	290	5' της CP	Χατζηβασιλείου, δημοσίευτα δεδομένα
BWYV-R	GTAGGCCTTGAGTATTCCATTA			
Pol-G-F	GAYTGCTCYGGYTTYGACTGGAG	1.121	3' μέρος της RdRp- UTR- 5' μέρος της CP	Knierim et al., 2010
Pol-G-R	GATYTTATAYTCATGGTAGGCCTTGAG			
Pocon F	TGYTCYGGTTTTGACTGG	1.400	3' μέρος της RdRp – UTR- 5' μέρος της CP	Xiang et al., 2008
Pocon R	CGTCTACCTATTTSGGRTTNT			
PolGenUp2	GATGARGGTCGYTACCG	593	3' της RdRp	Lotos et al., 2014
PolGenDown2	ACCTCGACTTTRAARC			
Gen-1	CTCAARGCCTACCATGARTATAARATC	325	3' μέρος της CP	Knierim et al., 2013
Gen-2	CGTCTACCTATTTNGGRTTNTG			

Στόχος των γενικευμένων εκκινητών είναι η ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων απομονώσεων των ιών του γένους, γι' αυτό το λόγο κατά το σχεδιασμό των εκκινητών επιλέγονται περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες είναι υψηλά συντηρημένες στα μέλη του γένους. Στην περίπτωση των Polero-ιών οι περιοχές αυτές είναι τα ORF 2 (RdRp) και ORF 3 (CP), (Filardo et al., 2021) όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 39, επομένως επιλέγονται οι εκκινητές που υβριδοποιούν στα γονίδια αυτά. Το ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε από τους Knierim et al. (2010), το «Pol-G», βελτιστοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και επιλέχθηκε για την ανίχνευση των Polero-ιών, καθώς ενισχύει τις συντηρημένες αυτές περιοχές του γένους, δηλαδή τμήμα της RdRp και της CP. Οι εξειδικευμένοι εκκινητές BWYV σχεδιάστηκαν από το Ινστιτούτο DSMZ βασισμένοι σε μια ελληνική απομόνωση του ιού.



Εικόνα 39 Περιοχές- στόχοι στο γονιδίωμα του γένους Polerovirus των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

2.6.3. Έλεγχος ποιότητας RNA με ενίσχυση του γονιδίου 18S

Ένας τρόπος για τον έλεγχο της ακεραιότητας του εξαγόμενου RNA, αλλά και για την επιτυχία της σύνθεσης cDNA είναι ενισχύοντας με PCR το 18S ριβοσωμικό RNA, το οποίο είναι ένα απ' τα βασικά συστατικά των ευκαρυωτικών οργανισμών. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στα προς εξέταση δείγματα στα οποία η σύνθεση cDNA έγινε με τυχαιοποιημένους εκκινητές. Η θερμοκρασία υβριδισμού των 18S εκκινητών ήταν 60°C, το προϊόν που παράγεται είναι μήκους 255bp και η αλληλουχία τους έχει ως εξής (Du et al., 2006):

18S Forward: 5'- GAGAAACGGCTACCATCCA -3'

18S Reverse: 5'- CGTGCCATCCCAAAGTCCAAC -3'

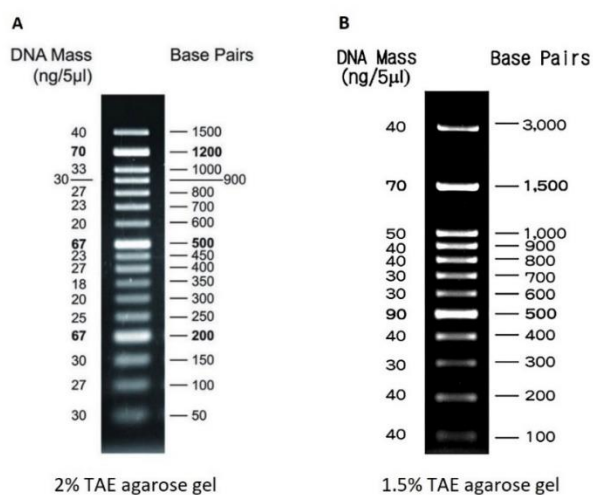
2.7. Ανίχνευση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 1% σε διάλυμα TAE (1x). Η παρασκευή ενός λίτρου TAE (50x) γίνεται με τα υλικά που φαίνονται στον Πίνακα 15 και ακολουθεί αραιώση του ώστε να προκύψει TAE (1x).

Πίνακας 15 Υλικά που χρησιμοποιούνται για την Παρασκευή διαλύματος TAE για την ηλεκτροφόρηση του RNA.

Υλικά Παρασκευής	Όγκος/Βάρος
Tris Base	242 gr
Άνυδρο οξικό οξύ	57,1 mL
EDTA (0.5M)	100 MI
ddH ₂ O	Έως 1L

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 110 volt για περίπου 20-30 λεπτά (εξαρτάται από το αναμενόμενο προϊόν) και με την προσθήκη δείκτη μοριακών μεγεθών (ladder) είναι εφικτή η εκτίμηση του μέγεθος των παραγόμενων ζωνών. Στην παρούσα διατριβή, αναλόγως των αναμενόμενων προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί δείκτες: της εταιρείας Nippon Genetics 50 bp και 100 bp (Εικ. 40) καθώς και της εταιρείας NEB 1000 bp.



Εικόνα 40 Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή (A) 50bp (B) 100bp (Nippon Genetics).

3. Βελτιστοποίηση συνθηκών δοκιμών PCR

Για την ανίχνευση των ιών σε φυτικά δείγματα, είναι απαραίτητη η δοκιμή διαφορετικών συνθηκών PCR, με σκοπό την επιλογή αυτών που θα παρέχουν την υψηλότερη εξειδίκευση (specificity) και απόδοση (efficiency) της δοκιμής.

3.1. Επιλογή ενζύμων

Για την εκτέλεση της δοκιμής PCR, πρώτο βήμα αποτελεί η εξαγωγή του ολικού RNA από το φυτικό ιστό το οποίο χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την παραγωγή cDNA, με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Απαραίτητα συστατικά για την διαδικασία αυτή αποτελούν πρώτον, το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση που επιτελεί το έργο της μετατροπής του γενετικού υλικού από RNA σε DNA και δεύτερον, οι εκκινητές της αντίδρασης. Κατά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά ένζυμα αντίστροφης μεταγραφής: η M-MuLV της εταιρείας New England Biolabs (NEB) καθώς και η M-MLV PrimeScript™ της εταιρείας Takara Bio. Επίσης, δοκιμάστηκαν τυχαιοποιημένοι εκκινητές (random primers), οι οποίοι προσφέρουν την δυνατότητα της χρήση του ίδιου cDNA σε μετέπειτα δοκιμές PCR για διαφορετικά γονίδια στόχους, καθώς και εκκινητές ειδικοί για το εκάστοτε γονίδιο στόχο (gene specific primers), οι οποίοι προσφέρουν αυξημένη ευαισθησία στην ανίχνευση συγκεκριμένου γονιδίου/ιού.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμές χρησιμοποιώντας Taq πολυμεράσες από δύο διαφορετικές εταιρείες: της Kara Biosystems και της New England Biolabs (NEB), προκειμένου να επιλεγεί εκείνη που θα ενισχύει επιτυχώς τους θετικούς μάρτυρες και θα δίνει πιο έντονο σήμα κατά την ηλεκτροφόρηση.

3.2. Επιλογή θερμοκρασιών υβριδισμού εκκινητών και συγκεντρώσεων MgCl₂

Για την ανίχνευση των Polero-ιών και Poty-ιών, ελέγχθηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού των ζευγών εκκινητών, καθώς και συγκεντρώσεις του χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της PCR επηρεάζοντας τον υβριδισμό των εκκινητών (Πιν. 14).

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR χρησιμοποιήθηκαν θετικά στον εκάστοτε ιό δείγματα του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του ΓΠΑ, η παρουσία των οποίων επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση από το Ινστιτούτο DSMZ και από στην εταιρεία VBC-BIOTECH Service GmbH. Εξαιρεση αποτελεί το ζεύγος εκκινητών που ανιχνεύει τον BYMV για τον οποίο χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φασολιού που είχαν βρεθεί θετικά στον ιό αυτό με τη μέθοδο της ELISA στα πλαίσια της διατριβής του Σταυριανού Σ. (2015).

Για κάθε ζεύγος εκκινητών επιλέχθηκαν και δοκιμάστηκαν τρεις θερμοκρασίες υβριδισμού βάσει των θερμοκρασιών τήξεως τους (melting temperature T_m) (±5°C) (Asif et al., 2021), ενώ οι συγκεντρώσεις του MgCl₂ που δοκιμάστηκαν ήταν 1,5mM και 2 mM για τους όλους τους εκκινητές του γένους *Polerovirus* εκτός των PolGen στους οποίους δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 1,2 και 2 mM MgCl₂ (Πιν. 16). Ομοίως, για τους

εκκινητές BYMV_P3 ελέγχθηκαν οι συγκεντρώσεις 1.5 & 2 mM, ενώ για τους υπόλοιπους εκκινητές του γένους *Potyvirus* εκλέχθηκαν τρεις συγκεντρώσεις (1.5 mM, 2 mM και 2.5 mM MgCl₂).

Πίνακας 16 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης των εκκινητών

Ζεύγος εκκινητών	Εκκινητές	cDNA primers	T annealing (°C)	MgCl ₂ (mM)
<i>Potyvirus</i>	BCMV	random	58-60-62	1.5, 2 & 2.5
	CI	-	50-52-54	1.5, 2 & 2.5
	BYMV	random	60-62	1.5 & 2
<i>Polerovirus</i>	Pol-G	random	58-60-62	1.5 & 2
	Pocon	random	50-52-54	1.5 & 2
	PolGen	random & specific		1.2 & 2
	Gen	random	52-54-56	1.5 & 2
	BWYV	random	56-58-60	1.5 & 2

Για τη βελτιστοποίηση των εκκινητών PolGen δοκιμάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί ενζύμων και εκκινητών τόσο κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, όσο για της PCR ενώ οι θερμοκρασίες υβριδισμού που χρησιμοποιήθηκαν είναι εκείνες που προτείνει το πρωτόκολλο των Lotos et al. (2014), δηλαδή 58 °C, 54 °C και 52°C. Αναλυτικότερα, δοκιμάστηκε η παρασκευή cDNA με τη βοήθεια ενζύμων αντίστροφης μεταγραφής από 3 διαφορετικές εταιρείες: α) M-MuLV Reverse Transcriptase της NEB, β) M-MLV Reverse Transcriptase της Invitrogen και γ) SuperScript™ III της Invitrogen με τη χρήση τόσο τυχαιοποιημένων εκκινητών όσο και εξειδικευμένων (ονομασία PolGen RT3). Στη συνέχεια, για καθέναν από τους παραπάνω συνδυασμούς πραγματοποιήθηκαν PCR με δύο διαφορετικές DNA πολυμεράσες: την Q5® High-Fidelity DNA Polymerase της NEB και την Taq DNA Polymerase της NEB. Κατά την βελτιστοποίηση των εκκινητών Gen, στην αντίδραση PCR συμπεριλήφθηκαν και εκκινητές μάρτυρες όπως προτείνεται από τους Knierim et al; (2013) οποίοι στοχεύουν την υπομονάδα 5 του γονιδίου της NADH αφυδρογονάσης (NADH dehydrogenase subunit 5, nad5).

Τέλος, για τους εκκινητές CI δοκιμάστηκε τόσο PCR δύο βημάτων (two-steps PCR) όσο και PCR ενός βήματος (one-step PCR) στην οποία ως γενετικό υλικό χρησιμοποιείται απευθείας RNA το οποίο προστίθεται στο PCR master mix που περιέχει τόσο το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή όσο και την DNA πολυμεράση. Έτσι, πραγματοποιείται RT ταυτόχρονα με PCR. Τα βασικά πλεονεκτήματα της PCR ενός βήματος σε σύγκριση με την PCR δύο βημάτων είναι η ταχύτητα εκτέλεσης, αποτελεί πιο οικονομική μέθοδο καθώς γίνεται λιγότερη χρήση αντιδραστηρίων και τέλος, μειώνεται η πιθανότητα επιμολύνσεων και σφαλμάτων κατά το χειρισμό των δειγμάτων. Όμως ένα μειονέκτημα σε σχέση με την PCR δύο βημάτων είναι ότι στην

περίπτωση της δεύτερης μπορεί να κατασκευαστεί cDNA με τυχαιοποιημένους εκκινητές, το οποίο στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί πολλές φορές για την ανίχνευση διαφορετικών γονιδίων ή ακόμα και διαφορετικών ιών (Nakaune & Nakano, 2006).

3.3. Επίλυση Προβλημάτων (Troubleshooting)

Έπειτα από τη βελτιστοποίηση των εκκινητών του γένους *Polerovirus* ακολούθησε ο έλεγχος δειγμάτων είτε θετικών από τις δοκιμές ELISA, είτε συμπτωματικών φυτών στα οποία δε βρέθηκαν άλλοι ιοί. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, υπήρξαν περιπτώσεις στις οποίες οι θετικοί μάρτυρες αδυνατούσαν να δώσουν σήμα στο gel ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR με ταυτόχρονη παρουσία διμερών εκκινητών, δηλαδή μη ειδικός πολλαπλασιασμός μικρών προϊόντων PCR, τα οποία ανταγωνίζονται το DNA-στόχο. Για την επίλυση των προβλημάτων αυτών εφαρμόστηκε πληθώρα στρατηγικών.

Αρχικά δημιουργήθηκαν νέα aliquots των επιμέρους αντιδραστηρίων της PCR (dNTPs, ζεύγος εκκινητών, buffer) προς αποφυγή επιμολύνσεων (Asif et al., 2021) και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές PCR με τις συνθήκες του βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου, αλλάζοντας έναν παράγοντα κάθε φορά. Ακολούθησε η χρήση καινούργιου ενζύμου Taq για να αυξηθεί η δραστικότητα του και η εκ νέου δημιουργία εκκινητών. Στη συνέχεια δοκιμάστηκε αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών για την ενίσχυση του DNA του θετικού μάρτυρα (Asif et al., 2021) Έπειτα αυξήθηκε η ποσότητα της Taq πολυμεράσης καθώς και ο χρόνος επιμήκυνσης ούτως ώστε οι εκκινητές να μπορούν να υβριδιστούν στο DNA στόχο και το ένζυμο να ενισχύσει το πλήρες μήκος του επιθυμητού προϊόντος του θετικού μάρτυρα. Παράλληλα δοκιμάστηκαν δύο συγκεντρώσεις $MgCl_2$ (1.5mM και 2 mM).

Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας της αντίδρασης της PCR αποτελεί το εκμαγείο DNA. Γι' αυτό το λόγο ελέγχθηκαν διαφορετικές ποσότητες του στο master mix της PCR. Η μείωση της ποσότητας του DNA αποσκοπούσε στην αποφυγή δημιουργίας μη ειδικών προϊόντων και στην αύξηση της εξειδίκευσης της αντίδρασης, ενώ η αύξηση της ποσότητας του DNA στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της (Asif et al., 2021). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εκ νέου σύνθεση cDNA από το RNA των θετικών δειγμάτων και έγινε επανάληψη της PCR με τους εκκινητές 18S.

Οι παραπάνω παράγοντες ελέγχθηκαν με 35 και με 40 κύκλος επαναλήψεων, ούτως ώστε να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός του θετικού μάρτυρα και επισημαίνεται ότι ο κάθε παράγοντας ελέγχθηκε ξεχωριστά σε διαφορετικές αντιδράσεις.

4. Εφαρμογή επιλεγμένων πρωτοκόλλων στην ανίχνευση ελληνικών απομονώσεων των ψυχανθών

Για την εφαρμογή των βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων πραγματοποιήθηκαν PCR για την ανίχνευση των ιών του γένους *Polerovirus* και *Potyvirus* στα δείγματα ψυχανθών που συλλέχθηκαν από διαφορετικές Π.Ε.

της χώρας. Τα δείγματα που τελικά συμπεριλήφθηκαν στη διαδικασία βελτιστοποίησης των πρωτοκόλλων και στην εφαρμογή αυτών ως δείγματα αγρού ήταν 32 και τα στοιχεία τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17 Τα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στην εφαρμογή των πρωτοκόλλων PCR έπειτα από τη βελτιστοποίησή τους. Το cDNA τους παρασκευάστηκε με τη χρήση τυχαιοποιημένων εκκινητών

Κωδικός Δείγματος	Κωδικός cDNA	Φυτικό Είδος	Προέλευση	Μεθοδος Εξαγωγής RNA
17.22N	VS2	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit
17.22K	VS4	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit
A46	VS13	Αρακάς	Βοιωτία	TRI
Δ578	VS16	Μηδική	Σέρρες	TRI
Δ579	VS14	Μηδική	Σέρρες	TRI
Δ619	Δ619	Μηδική	Έβρος	TRI
Δ695	Δ695	Ακακία	Καβάλα	TRI
Δ698	Δ698	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ699	Δ699	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ701	Δ701	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ702	Δ702	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ715	Δ715	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ716	Δ716	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ717	Δ717	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ721	Δ721	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ723	Δ723	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ724	Δ724	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ725	Δ725	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ729	Δ729	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ732	Δ732	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit
Δ735	Δ735	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit
Δ737	Δ737	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit
Δ811	Δ811	Μηδική	Πέλλα	TRI
Δ823	Δ823	Χαρουπιά	Αργολίδα	TRI
Δ824	Δ824	Χαρουπιά	Αργολίδα	TRI
Δ827	Δ827	Αραχίδα	Μεσσηνία	TRI
Δ852	Δ852	Αραχίδα	Σέρρες	TRI
Δ959	VS7	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit
Δ963	VS8	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit
Δ977	VS9	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit
Δ981	VS10	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit
Δ991	VS11	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit
Δ995	VS12	Αραχίδα	Σέρρες	RNeay Plant Mini Kit

Τα αντιδραστήρια και οι τελικές συνθήκες των αντιδράσεων καταγράφονται στους Πίνακες 18, 19 και 20. Για την ανίχνευση των Ρολερο-ιών στα δείγματα αυτά επιλέχθηκαν οι εκκινητές ΡοΙ-G. Επισημαίνεται ότι το 10x buffer που χρησιμοποιήθηκε στις PCR δύο βημάτων, περιέχει MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 1.5 mM. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αντίστροφη μεταγραφάση PrimeScript™ της εταιρείας Takara Bio και η Ταq DNA πολυμεράση της εταιρείας Kapa Biosystems.

Πίνακας 18 Συνθήκες εκτέλεσης πρωτοκόλλου PCR που επιλέχθηκε για την αποτελεσματική ανίχνευση των ιών του γένους Ρολερονίγους χρησιμοποιώντας τους γενικευμένους εκκινητές ΡοΙ-G.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl) ανά δείγμα
ddH ₂ O	18,8
Taq PCR buffer (10x)	2,5
dNTPs (10mM)	0,5
ΡοΙ-G Forward (10mM)	1
ΡοΙ-G Reverse (10mM)	1
Taq DNA Polymerase (kapa)	0,2
Εκμαγείο cDNA	1
Τελικός Όγκος	25

Πίνακας 19 Συνθήκες εκτέλεσης πρωτοκόλλου PCR που επιλέχθηκε για την ανίχνευση του bean common mosaic virus (BCMV) χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές BCMV3_P3.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl) ανά δείγμα
ddH ₂ O	18,9
Taq PCR buffer (10x)	2,5
MgCl ₂	0
dNTPs (10mM)	0,5
BCMV3_P3 Forward (10mM)	1
BCMV3_P3 Reverse (10mM)	1
Taq DNA Polymerase	0,1
Εκμαγείο cDNA	1
Τελικός Όγκος	25

Μετά την παρασκευή του master mix ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή της εταιρείας Thermo Fisher Scientific - Applied Biosystems (MiniAmp™ plus) για την εκτέλεση της PCR. Οι παράμετροι εκτέλεσης της αντίδρασης προτείνονται από το πρωτόκολλο του ενζύμου Taq που χρησιμοποιείται, ενώ η θερμοκρασία υβριδισμού και τη διάρκεια επιμήκυνσης των εκκινητών εξαρτάται από τη σύσταση αυτών. Ο χρόνος που απαιτείται για την επιμήκυνση των εκκινητών, κατά κανόνα, αναφέρεται 1 min ανά 1.000 bp. Έτσι, οι συνθήκες εκτέλεσης της PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20 Θερμοκρασιακό προφίλ των πρωτοκόλλων PCR που εφαρμόστηκαν σε δείγματα αγρού.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Αρ. Κύκλων	Διάρκεια
Προ- αποδιάταξη	95	1	3 min
Αποδιάταξη	95	35	30 sec
Υβριδισμός εκκινητών	Pol-G: 60		30 sec
	BCMV3_P3: 62		
Επιμήκυνση	72		Pol-G: 1,5 min
		BCMV3_P3: 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72	1	7 min
Αποθήκευση	4	-	-

Στην περίπτωση του ζεύγους εκκινητών CI για την ανίχνευση ιών του γένους *Potyvirus*, πραγματοποιήθηκε PCR ενός βήματος (Πιν. 21). Κατά τη διαδικασία αυτή, αντί για DNA χρησιμοποιείται RNA ως εκμαγείο, το οποίο προστίθεται σε master mix που περιέχει και τα δύο ένζυμα που απαιτούνται για την εκτέλεση της δοκιμής. Με τον τρόπο αυτό η σύνθεση του cDNA κλώνου με τους εκκινητές της PCR ακολουθείται από τον πολλαπλασιασμό του τμήματος αυτού. Κατά την εκτέλεση της PCR, πρώτα πραγματοποιείται θέρμανση του μίγματος της PCR στους 42°C για μία ώρα και έπειτα ακολουθεί το πρόγραμμα θερμοκρασιών που παρουσιάζεται στον Πίνακα 22.

Πίνακας 21 Συνθήκες εκτέλεσης της PCR ενός βήματος για την ανίχνευση των ιών του γένους *Potyvirus* χρησιμοποιώντας τους γενικευμένους εκκινητές CI (Ha et al 2007).

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl) ανά δείγμα
RNA template	1
RNase inhibitor	0,1
MMLV αντίστροφη μεταγραφάση	0,2
ddH ₂ O	15,85
Taq PCR buffer (5x)	5
MgCl ₂ (τελική συγκέντρωση 2mM)	1
dNTPs (25mM)	0,25
CI Ανοδικός εκκινητής (25mM)	0,75
CI Καθοδικός εκκινητής (25mM)	0,75
Taq DNA Polymerase	0,1
Τελικός Όγκος	25

Πίνακας 22 Θερμοκρασιακό προφίλ της PCR ενός βήματος για την ανίχνευση των ιών του γένους Rotavirus χρησιμοποιώντας τους γενικευμένους εκκινητές CI (Ha et al 2007).

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Αρ. Κύκλων	Διάρκεια
Σύνθεση cDNA	42	1	1 hr
Προ- αποδιάταξη	95	1	3 min
Αποδιάταξη	95	35	30 sec
Υβριδισμός εκκινητών	50		30 sec
Επιμήκυνση	72		1 min
Τελική επιμήκυνση	72	1	7 min
Αποθήκευση	4	-	-

Στις δοκιμές συμπεριλήφθηκαν επίσης οι εξής τέσσερις μάρτυρες:

- **noRT:** Περιέχει RNA δείγματος αλλά δεν έχει προστεθεί το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται η ύπαρξη τυχόν επιμολύνσεων με εξωτερικό DNA.
- **noDNA:** Δείγμα απαλλαγμένο από γενετικό υλικό και στο οποίο ως εκμαγείο χρησιμοποιείται ddH₂O, προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των υλικών της PCR.
- **Θετικός μάρτυρας:** Περιέχει επιβεβαιωμένα τον επιθυμητό ιό, ούτως ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της δοκιμής καθώς και για να υποδείξει το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος.
- **Αρνητικός μάρτυρας:** Προέρχεται από δείγμα απαλλαγμένο από τον ιό προς ανίχνευση, προκειμένου να πιστοποιηθεί η εξειδίκευση της αντίδρασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Επιλογή απομονώσεων (ορολογικές δοκιμές)

Από τις δειγματοληψίες φυτών αραχίδας που πραγματοποιήθηκαν το 2022 από την περιοχή των Σερρών, συλλέχθηκαν 47 δείγματα αραχίδων τα οποία ελέγχθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA με τη χρήση αντισωμάτων που ανιχνεύουν ιούς του γένους *Potyvirus*. Θετικό βρέθηκε το 12,8% και τα δείγματα αυτά επιλέχθηκαν για να χρησιμοποιηθούν στις μελέτες της παρούσας διατριβής (Πιν. 23).

Επιπλέον στις μελέτες συμπεριελήφθησαν από προηγούμενους ορολογικούς ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν το 2021 στα πλαίσια πτυχιακής διατριβής (Καστόρα, 2022, Τσαπικούνη, 2022) επιπλέον 43 δείγματα τα οποία είτε (α) βρέθηκαν θετικά στο γένους *Potyvirus*, (β) βρέθηκαν θετικά στον BWYV ή (γ) βρέθηκαν αρνητικά για την παρουσία ιών που ανήκουν στα γένη *Luteovirus*, *Nanovirus*, *Begomovirus*, *Alfamonivirus* και *Cucumovirus*. Έτσι, από τα δείγματα που ελέγχθηκαν τα έτη 2021 και 2022, επιλέχθηκαν συνολικά 48 δείγματα για την περαιτέρω μελέτη τους με τη μοριακή μέθοδο PCR (Πίν. 23).

Πίνακας 23 Τα δείγματα που έπειτα από τον έλεγχο με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA επιλέχθηκαν για την εξαγωγή ολικού RNA και τις περαιτέρω μοριακές δοκιμές.

Κωδικός RNA Εργαστηρίου	Φυτικό Είδος	Προέλευση	Αποτελέσματα ELISA	Αναφορά
16.13	Αραχίδα	Σέρρες	Potyv	Παρούσα διατριβή
17.22K	Αραχίδα	Σέρρες	Potyv	Παρούσα διατριβή
17.22N	Αραχίδα	Σέρρες	Potyv	Παρούσα διατριβή
Δ576	Μηδική	Σέρρες	(-), CMV	Καστόρα, 2022, Τσαπικούνη, 2022
Δ577	Μηδική	Σέρρες	(-), CMV	Καστόρα, 2022, Τσαπικούνη, 2022
Δ578	Μηδική	Σέρρες	(-), CMV	Καστόρα, 2022, Τσαπικούνη, 2022
Δ579	Μηδική	Σέρρες	(-), CMV	Καστόρα, 2022, Τσαπικούνη, 2022
Δ580	Μηδική	Σέρρες	(-), CMV	Καστόρα, 2022, Τσαπικούνη, 2022
Δ581	Μηδική	Σέρρες	(-), CMV	Καστόρα, 2022, Τσαπικούνη, 2022
Δ582	Μηδική	Σέρρες	(-)	Καστόρα, 2022
Δ583	Μηδική	Σέρρες	(-), CMV	Καστόρα, 2022, Τσαπικούνη, 2022
Δ598	Μηδική	Έβρος	(-), CMV	Καστόρα, 2022, Τσαπικούνη, 2022
Δ605	Μηδική	Έβρος	(-)	Καστόρα, 2022
Δ619	Μηδική	Έβρος	BLRV	Καστόρα, 2022
Δ647	Μηδική	Ξάνθη	(-)	Καστόρα, 2022

Δ660	Μηδική	Ξάνθη	(-)	Καστόρα, 2022
Δ661	Μηδική	Ξάνθη	BLRV	Καστόρα, 2022
Δ673	Μηδική	Ξάνθη	(-)	Καστόρα, 2022
Δ680	Μηδική	Ξάνθη	(-)	Καστόρα, 2022
Δ695	Ακακία	Καβάλα	(-)	Καστόρα, 2022
Δ698	Αραχίδα	Σέρρες	BLRV, BWYV	Καστόρα, 2022
Δ699	Αραχίδα	Σέρρες	BLRV, BWYV	Καστόρα, 2022
Δ700	Αραχίδα	Σέρρες	BLRV, BWYV	Καστόρα, 2022
Δ701	Αραχίδα	Σέρρες	(-)	Καστόρα, 2022
Δ715	Αραχίδα	Σέρρες	(-)	Καστόρα, 2022
Δ716	Αραχίδα	Σέρρες	(-)	Καστόρα, 2022
Δ717	Αραχίδα	Σέρρες	BLRV, BWYV	Καστόρα, 2022
Δ721	Αραχίδα	Σέρρες	(-)	Καστόρα, 2022
Δ723	Αραχίδα	Σέρρες	BLRV, BWYV	Καστόρα, 2022
Δ724	Αραχίδα	Σέρρες	(-)	Καστόρα, 2022
Δ725	Αραχίδα	Σέρρες	(-)	Καστόρα, 2022
Δ729	Αραχίδα	Σέρρες	BWYV	Καστόρα, 2022
Δ732	Αραχίδα	Σέρρες	(-)	Καστόρα, 2022
Δ735	Αραχίδα	Σέρρες	Poty	Τσαλικούνη, 2022
Δ801	Μηδική	Αιτωλοακαρνανία	BLRV	Καστόρα, 2022
Δ811	Μηδική	Πέλλα	(-)	Καστόρα, 2022
Δ814	Μηδική	Πέλλα	(-)	Καστόρα, 2022
Δ823	Χαρουπιά	Αργολίδα	(-)	Καστόρα, 2022
Δ824	Χαρουπιά	Αργολίδα	(-)	Καστόρα, 2022
Δ827	Αραχίδα	Μεσσηνία	(-)	Καστόρα, 2022
Δ852	Αραχίδα	Σέρρες	(-)	Καστόρα, 2022
Δ957	Αραχίδα	Σέρρες	Poty	Παρούσα διατριβή
Δ959	Αραχίδα	Σέρρες	Poty	Παρούσα διατριβή
Δ963	Αραχίδα	Σέρρες	Poty	Παρούσα διατριβή
Δ977	Αραχίδα	Σέρρες	Poty	Παρούσα διατριβή
Δ981	Αραχίδα	Σέρρες	Poty	Παρούσα διατριβή
Δ991	Αραχίδα	Σέρρες	Poty	Παρούσα διατριβή
Δ995	Αραχίδα	Σέρρες	Poty	Παρούσα διατριβή

Όπου (-) αρνητικά αποτελέσματα για τους BLRV, γένος Potyvirus, BGMV, FBNYV και BWYV.

2. Μοριακή ανίχνευση ιών

2.1. Συγκέντρωση και καθαρότητα ολικού εξαγόμενου RNA

Κατά τη μέθοδο εξαγωγής του ολικού RNA δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης και στη συνέχεια στα δείγματα αυτά μετρήθηκε η συγκέντρωση και η καθαρότητα του ολικού εξαγόμενου RNA με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου Nanodrop1000 (Πίν. 24).

Το αντιδραστήριο TRI Reagent® της εταιρείας Sigma – Aldrich έδωσε κατά κανόνα δείγματα με υψηλή συγκέντρωση RNA με τιμές που κυμαίνονται από 42,2 ng/μl (δείγμα Δ852) έως 4485,7 ng/μl (δείγμα Δ576) και έναν μέσο όρο 873,62 ng/μl. Ο λόγος καθαρότητας 260/280 είχε μέσο όρο 1,71 και οι τιμές κυμαίνονταν από 1,08 (δείγμα Δ723) έως 2,55 (δείγμα Δ661), ενώ του λόγου καθαρότητας 260/230 κυμαίνονταν από 0,21 (δείγμα Δ724) -πιθανόν λόγω της παρουσίας υπολειμμάτων του αντιδραστηρίου TRI- έως 3,62 (δείγμα Δ578) (Πιν. 24).

Όταν χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Plant Mini Kit της εταιρείας Qiagen, οι συγκεντρώσεις του RNA ήταν χαμηλές στα περισσότερα δείγματα (8,9 στο δείγμα Δ732 και 121,8 στο δείγμα 17.22N). Οι λόγοι καθαρότητας 260/280 ήταν κοντά στη βέλτιστη τιμή (μέσος όρος: 2,05) με τιμές κυμαίνονταν από 1,87 (δείγμα Δ735) έως 2,16 (δείγμα 17.22K), ενώ οι λόγοι 260/230 από 0,07 (δείγμα 17.22K) έως 1,24 (δείγμα 16.13A). Παρατηρείται ότι στα δείγματα αραχίδας οι λόγοι καθαρότητας είναι χαμηλότεροι συγκριτικά με τα άλλα ψυχανθή (αρακάς, μηδική, φασόλια) πιθανόν διότι αυτά είναι πλούσια σε λιπίδια, τανίνες, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και φαινολικές ουσίες, οι οποίες προσδένονται στα νουκλεϊκά οξέα, καθιστώντας την εξαγωγή υψηλής ποιότητας και καθαρότητας RNA δύσκολη διαδικασία (Mainkar et al., 2023). Ο λόγος καθαρότητας 260/280 ήταν ικανοποιητικός (από 1,87 στο δείγμα Δ735 μέχρι 2,11 στο δείγμα 16.13A), όμως οι λόγοι 260/230 ήταν επίσης χαμηλοί, πιθανόν λόγω των υπολειμμάτων των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της εξαγωγής του ολικού RNA (Πιν. 24).

Πίνακας 24 Συγκέντρωση RNA (ng/μl) και οι λόγοι καθαρότητας στα υπό εξέταση δείγματα μετά την εξαγωγή του ολικού RNA.

Κωδικός RNA Εργαστηρίου	Φυτικό Είδος	Extraction method	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)	260/280	260/230
Δ576	Μηδική	TRI	4485,7	2,12	2,11
Δ577	Μηδική	TRI	141	1,96	0,65
Δ578	Μηδική	TRI	264,9	2,11	3,62
Δ579	Μηδική	TRI	702,8	2,04	1,57
Δ580	Μηδική	TRI	81,4	1,6	0,44
Δ581	Μηδική	TRI	1940,2	2,06	2,05
Δ582	Μηδική	TRI	687,8	1,76	0,89
Δ583	Μηδική	TRI	1421,9	1,98	2,3
Δ598	Μηδική	TRI	157,1	2,09	1,5
Δ605	Μηδική	TRI	443,4	2,04	1,72
Δ619	Μηδική	TRI	761,4	1,93	1,1
Δ647	Μηδική	TRI	924,1	1,99	2,14
Δ660	Μηδική	TRI	1351,2	1,99	1,76
Δ661	Μηδική	TRI	912,3	2,55	1,01
Δ680	Μηδική	TRI	1551,5	2,05	2,17
Δ695	Ακακία	TRI	252,4	1,29	0,35
Δ698	Αραχίδα	TRI	388	1,58	0,68
Δ699	Αραχίδα	TRI	1346,1	1,32	0,46

Κεφάλαιο Γ. Αποτελέσματα

Δ700	Αραχίδα	TRI	778,7	1,28	0,36
Δ701	Αραχίδα	TRI	408,6	1,91	1,45
Δ715	Αραχίδα	TRI	111,9	1,44	0,5
Δ716	Αραχίδα	TRI	565,7	1,73	0,86
Δ717	Αραχίδα	TRI	704,6	1,62	0,72
Δ721	Αραχίδα	TRI	719,7	1,21	0,42
Δ723	Αραχίδα	TRI	2033,2	1,08	0,3
Δ724	Αραχίδα	TRI	46,7	1,56	0,21
Δ725	Αραχίδα	TRI	119	1,57	0,7
Δ729	Αραχίδα	TRI	552,7	1,2	0,36
Δ801	Μηδική	TRI	711	1,64	0,67
Δ811	Μηδική	TRI	2999,9	1,96	2,12
Δ814	Μηδική	TRI	391,6	1,94	1,32
Δ823	Χαρουπιά	TRI	1283,2	1,35	0,45
Δ824	Χαρουπιά	TRI	46,4	1,63	0,22
Δ827	Αραχίδα	TRI	1248,5	1,1	0,32
Δ852	Αραχίδα	TRI	42,2	1,32	0,47
Δ673	Μηδική	RNeasy Plant Mini kit	18,7	2	1,04
Δ732	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	8,9	2	0,89
Δ735	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	20,7	1,87	0,99
16.13	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	108,9	2,11	1,24
17.22K	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	30	2,16	0,07
17.22N	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	121,8	2,09	1,17
Δ957	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	68	2,09	0,12
Δ959	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	-	-	-
Δ963	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	-	-	-
Δ977	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	-	-	-
Δ981	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	-	-	-
Δ991	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	-	-	-
Δ995	Αραχίδα	RNeasy Plant Mini kit	-	-	-

Όπου (-), αρνητική τιμή κατά τη μέτρηση.

Τα δείγματα που παρουσίασαν χαμηλές τιμές συγκέντρωσης RNA κατά την εξαγωγή του με το αντιδραστήριο TRI Reagent®, δε συμπεριλήφθηκαν στις περαιτέρω δοκιμές. Αναλυτικότερα, ως ακατάλληλα κρίθηκαν 15 δείγματα, όπως π.χ. το Δ580 του οποίου η συγκέντρωση RNA ήταν 81,4 ng/μl. Στις δοκιμές τελικά συμπεριλήφθηκαν όλα τα δείγματα των οποίων το RNA εξήχθη με το RNeasy Plant Mini Kit παρά τις χαμηλές συγκεντρώσεις του RNA, όπως και τα δείγματα Δ959, Δ963, Δ968, Δ977, Δ981, Δ991 και Δ995.

2.2. Καθαρισμός του ολικού εξαγόμενου RNA

Από τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του ολικού RNA, μερικά εμφάνισαν χαμηλή τιμή στους λόγους καθαρότητας 260/280 και 260/230 και κάποια από αυτά επιλέχθηκαν για να πραγματοποιηθεί ένα βήμα καθαρισμού με φαινόλη και χλωροφόρμιο έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα πρωτεϊνών και φαινολικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 25.

Πίνακας 25 Συγκέντρωση RNA (ng/μl) και οι λόγοι καθαρότητας στα υπό εξέταση δείγματα μετά την εξαγωγή του ολικού RNA καθώς και οι αντίστοιχες τιμές μετά το επιπλέον βήμα καθαρισμού με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

Κωδικός Δείγματος Εργαστηρίου	Φυτικό είδος	Τιμές μετά την εξαγωγή ολικού RNA			Τιμές μετά τον καθαρισμό		
		ng/μl	260/280	260/230	ng/μl	260/280	260/230
Δ723	Αραχίδα	2033,2	1,08	0,3	336	1,03	0,34
Δ698	Αραχίδα	388	1,58	0,68	176,1	1,41	0,77
Δ680	Μηδική	1551,5	2,05	0,7	68,1	1,78	-2,88
Ξ86	Κουκιά	631,1	1,43	0,59	93,1	1,52	1,17
Δ577	Μηδική	141	1,96	0,65	78,7	1,72	-2,09

Μετά το πέρας του καθαρισμού φάνηκε να μειώνεται σημαντικά η συγκέντρωση του RNA στα περισσότερα δείγματα με μικρές αλλαγές στους λόγους καθαρότητας. Λόγω της χαμηλής ποιότητας του ολικού εξαγόμενου RNA, ακόμα και μετά την περαιτέρω επεξεργασία τους, τα δείγματα αυτά δε χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω στην παρούσα μελέτη.

2.3. Ποιότητα ολικού εξαγόμενου RNA

Μετά την εξαγωγή του ολικού RNA ακολουθεί έλεγχος της ποιότητας του σε πηκτή αγαρόζης, όπου αναμένεται να είναι διακριτές οι τρεις ριβοσωμικές υπομονάδες 28S, 18S και 5S. Στην Εικόνα 41 παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια RNA δειγμάτων στα οποία η εξαγωγή έγινε με το αντιδραστήριο TRI Reagent® (Εικ. 41). Στα δείγματα με κωδική ονομασία Δ698 και Δ699 οι τρεις ριβοσωμικές υπομονάδες είναι ευδιάκριτες και λιγότερο στα Δ721 και Δ717 ενώ, στα δείγματα Δ582, Δ581 και Δ583 διακριτές είναι οι δύο υπομονάδες. Αντιθέτως, στα δείγματα Ξ90 και Δ647 παρατηρείται κατακερματισμός του RNA ενώ τέλος, στο δείγμα Δ724 δε διακρίνεται κάποια ζώνη, γεγονός που εξηγείται και από τη χαμηλή τιμή συγκέντρωσης RNA (46,7) που παρουσίασε κατά τη μέτρηση του στο φασματοφωτόμετρο. Όσον αφορά τα δείγματα των οποίων η εκχύλιση του RNA πραγματοποιήθηκε με το RNeasy Plant Mini Kit, οι ριβοσωμικές μονάδες δεν ήταν εμφανείς, παρόλα αυτά οι PCR που πραγματοποιήθηκαν με τα cDNA των δειγμάτων αυτών είχαν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση προϊόντων στο gel ηλεκτροφόρησης.

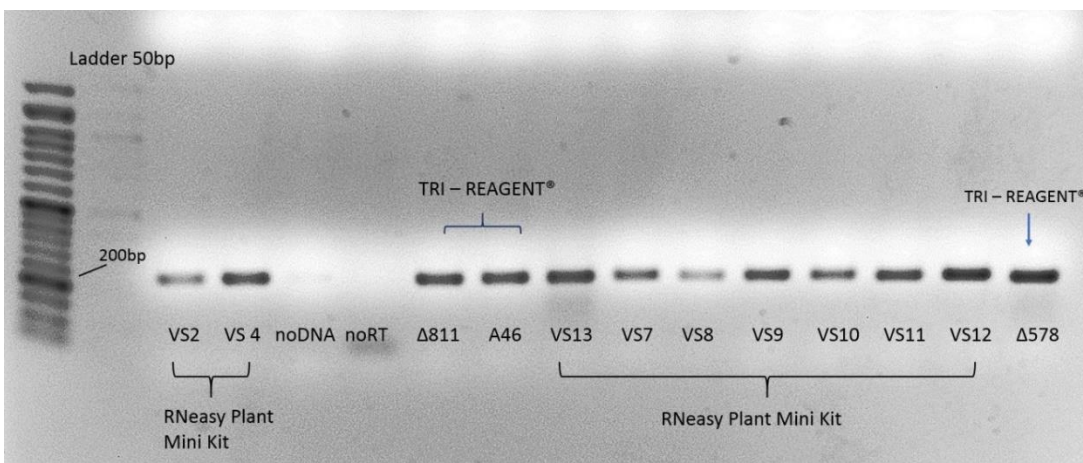
Δ721 Δ582 Ξ90 Δ581 Δ583 Δ647 Δ724 Δ699 Δ717 Δ698



Εικόνα 41 Οπτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης ολικού RNA από τα υπό εξέταση δείγματα, μετά την εξαγωγή με τη χρήση του TRI Reagent®.

2.4. Έλεγχος ποιότητας δειγμάτων με ενίσχυση του γονιδίου 18S

Με σκοπό τον έλεγχο της ποιότητας του ολικού εξαγόμενου RNA, αλλά και της επιτυχίας της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής, πραγματοποιήθηκε PCR στα υπο εξέταση δείγματα με τη χρήση των εκκινητών 18S. Στα δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία το γονίδιο 18S του φυτού ενισχύθηκε επιτυχώς δίνοντας προϊόντα του αναμενόμενου μεγέθους των 250 bp (Εικ. 42).



Εικόνα 42 Έλεγχος ποιότητας και ακεραιότητας του υπό εξέταση γενετικού υλικού αντιπροσωπευτικών δειγμάτων με την ενίσχυση του φυτικού γονιδίου 18S.

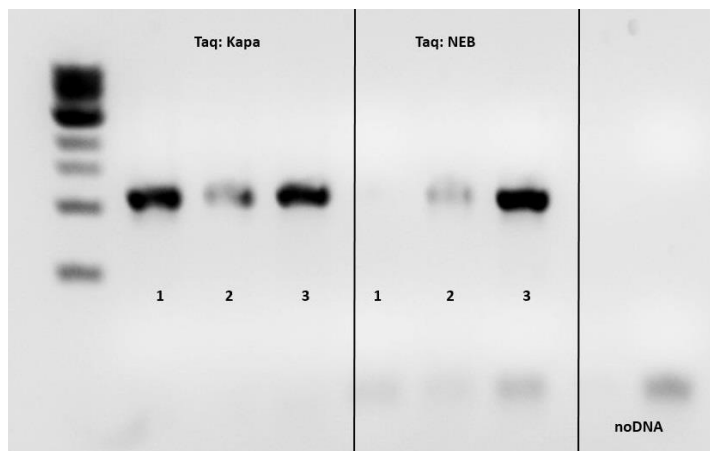
Αξίζει να σημειωθεί ότι στα δείγματα (17.22N) VS2, (17.22K) VS4 και VS7-VS12 (Δ959, Δ963, Δ977, Δ981, Δ991 και Δ995) για την εξαγωγή του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Plant Mini Kit της εταιρείας Qiagen το οποίο, εμφάνισαν χαμηλές συγκεντρώσεις RNA καθώς και χαμηλό λόγο καθαρότητας 260/230, όπως επίσης στην ηλεκτροφόρηση τους δεν ήταν εμφανείς οι ριβοσωμικές ζώνες. Παρόλα αυτά η παρασκευή cDNA από τα δείγματα αυτά φαίνεται να ήταν καλής ποιότητας κι επομένως η αντίδραση PCR με την χρήση των εκκινητών 18S έδωσε καθαρές ζώνες για καθένα από αυτά τα δείγματα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το πρωτόκολλο του RNeasy Plant Mini Kit δίνει RNA καλής ποιότητας για τον πολλαπλασιασμό του σε μοριακές δοκιμές.

3. Βελτιστοποίηση συνθηκών PCR

Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR με σκοπό την αύξηση της εξειδίκευσης και απόδοσης της δοκιμής για την ανίχνευση ελληνικών απομονώσεων του γένους *Potyvirus* και *Polerovirus* από ψυχανθή. Όπως αναλύθηκε, για κάθε ζεύγος εκκινητών δοκιμάστηκαν συγκριτικά διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού, οι οποίες υπολογίστηκαν βάσει της θερμοκρασίας αποδιάταξης (T_m), καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις $MgCl_2$. Στη διαδικασία αυτή ως θετικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν φυτά τα οποία προηγουμένως είχαν αλληλουχηθεί με NGS κι έτσι έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία του εκάστοτε ιού.

3.1. Επιλογή ενζύμων

Για τη βελτιστοποίηση των αντιδράσεων της PCR, αρχικά ελέγχθηκαν δύο διαφορετικές Taq DNA πολυμεράσες προκειμένου να επιλεγθεί η πιο αποτελεσματική, δηλαδή εκείνη που ταυτόχρονα δίνει καλής ποιότητας προϊόν και διακριτό στην ηλεκτροφόρηση χωρίς την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων, καθώς και για τους περισσότερους ή ακόμα και όλους τους θετικούς μάρτυρες. Τα ένζυμα Taq που δοκιμάστηκαν προέρχονταν από την εταιρεία Kara Biosystems και από τη New England Biolabs (NEB) (Εικ. 43).



Εικόνα 31 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR κατά τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των ενζύμων Taq DNA polymerase. Χρησιμοποιήθηκαν τους γενικευμένους εκκινητές Pol-G των Knierim et al., 2010. Όπου: “1” δείγμα θετικό στον *beet western yellow virus* (BWYV), “2” και “3” δείγματα θετικά στον *cucurbit aphid borne yellow virus* (CABYV) και ως “noDNA” χαρακτηρίζονται δείγματα στα οποία ως εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH_2O .

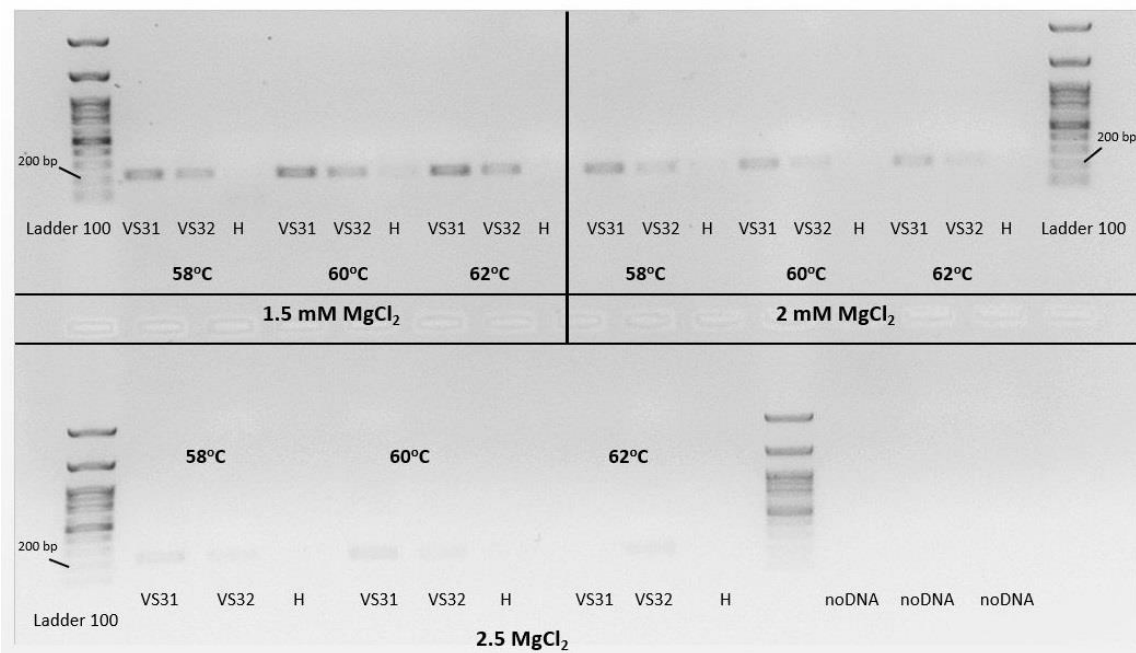
Όταν χρησιμοποιήθηκε η Taq της εταιρείας Kara Biosystems, η αντίδραση είχε καλή απόδοση ενισχύοντας και τα τρία προϊόντα, εν αντιθέσει με αυτή της εταιρείας NEB, η οποία δεν ενίσχυε αποτελεσματικά το προϊόν για τον BWYV, ιός ο οποίος είναι βασικό αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την απουσία σχηματισμού διμερών των εκκινητών (primer dimers) στην περίπτωση του ενζύμου της εταιρείας Kara Biosystems, την έκανε ιδανική για την εκτέλεση των πειραμάτων της διατριβής.

3.2. Βελτιστοποίηση συνθηκών PCR για την ανίχνευση ιών του γένους *Potyvirus*

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών των εκκινητών εξειδικευμένων στην ανίχνευση των Poty-ιών και την ανάπτυξη πρωτοκόλλων μοριακής ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκαν απομονώσεις δειγμάτων φασολιών που είχαν βρεθεί θετικά στους BCMV και BCMNV, σε προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας (Σταυριανός, 2013).

Ζεύγος εκκινητών BCMV

Για τους εκκινητές που ανιχνεύουν τμήμα της πρωτεΐνης CI του BCMV (Σταυριανός, 2013), αφότου δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας υβριδισμού και συγκεντρώσεων $MgCl_2$ (Εικ. 44) ως ιδανικός επιλέχθηκε ο συνδυασμός $62^\circ C$ και $1.5mM MgCl_2$, καθώς ενισχύονται αποτελεσματικά τα αναμενόμενα προϊόντα των θετικών δειγμάτων, μεγέθους 227bp και επίσης δε φαίνεται να παράγονται μη ειδικά προϊόντα. Επίσης, σε αντίθεση με την αντίδραση στους $60^\circ C$ δεν έχει σχηματιστεί προϊόν στον υγιή μάρτυρα, επομένως η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας δίνει τόσο την εξειδίκευση όσο και την απόδοση που είναι επιθυμητή σε μια αντίδραση PCR (Εικ. 44).



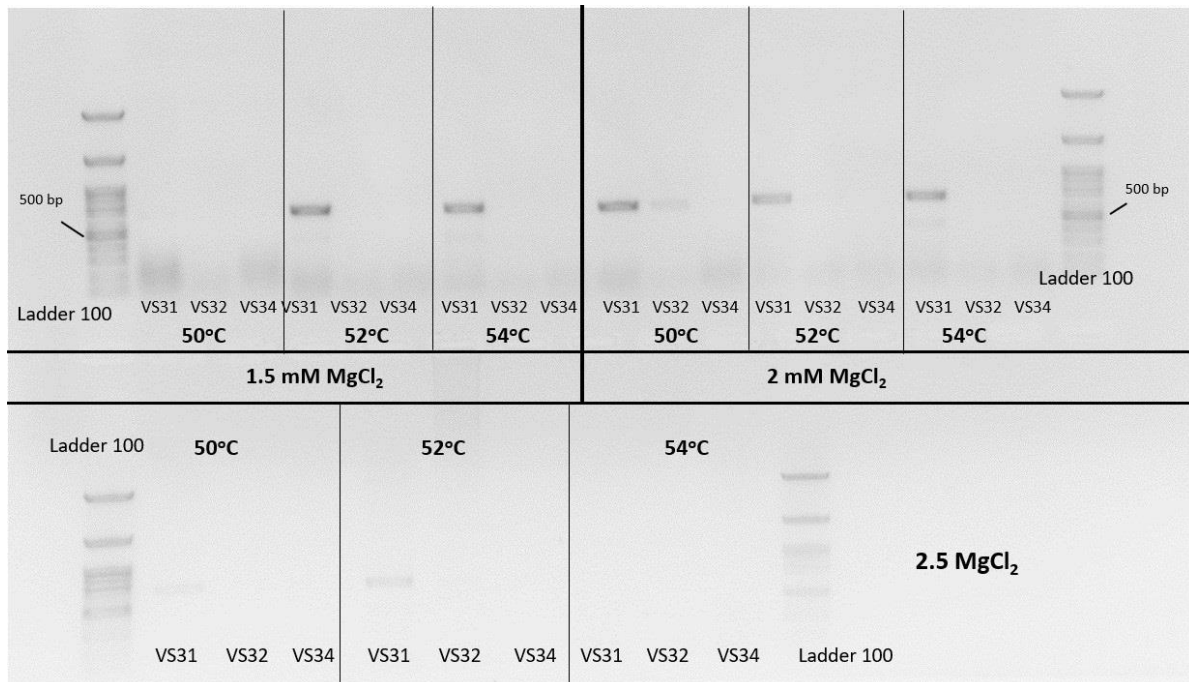
Εικόνα 44 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR για τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών $MgCl_2$ και $T^\circ C$ υβριδισμού στην αποτελεσματικότητα ανίχνευσης του *bean common mosaic virus* (BCMV), χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών BCMV3_P3 (Χατζηβασιλείου, αδημοσίευτα). Ως "VS31" "VS32" συμβολίζονται το cDNA από τα δείγματα φασολιών θετικά στον BCMV, ενώ ως "H" τα δείγματα αρνητικά στον BCMV και ως "noDNA" τα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ddH_2O ως εκμαγείο για κάθε μια από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα θετικά δείγματα έδωσαν προϊόν του αναμενόμενου μεγέθους (227 bp) ενώ ο δείκτης μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε είναι ανά 50 bp.

Ζεύγος εκκινητών CI

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών του γενικευμένου ζεύγους εκκινητών CI ελέγχθηκαν συνδυασμοί τριών διαφορετικών θερμοκρασιών υβριδισμού (50°C, 52°C και 54°C) και τριών συγκεντρώσεων MgCl₂ (1.5mM, 2mM και 2.5mM) τόσο με PCR δύο βημάτων όσο και με PCR ενός βήματος (Εικ. 45).

Στην περίπτωση της PCR δύο βημάτων όπου ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε cDNA θετικών στον BCMV δειγμάτων, δεν παρατηρείται υβριδισμός των εκκινητών σε κανέναν από τους συνδυασμούς θερμοκρασίας και MgCl₂ που ελέγχθηκαν. Αντίθετα, όταν ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε RNA των ίδιων δειγμάτων, στην ηλεκτροφόρηση φάνηκαν προϊόντα του αναμενόμενου μεγέθους (683 bp) (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται).

Όταν η συγκέντρωση MgCl₂ είναι 2 mM, προϊόντα λαμβάνονται για το ένα θετικό δείγμα σε όλες τις θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν, ενώ οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας είναι στους 50°C καθώς λαμβάνονται προϊόντα και για δύο διαφορετικά θετικά δείγματα. Προϊόντα από τα θετικά δείγματα δε λαμβάνονται όταν επικρατούν οι συνθήκες χαμηλότερης συγκέντρωσης MgCl₂ και θερμοκρασίας (1.5mM & 50°C), καθώς επίσης και συνθήκες υψηλότερης συγκέντρωσης MgCl₂ και θερμοκρασίας (2.5mM & 54°C) μεταξύ αυτών που δοκιμάστηκαν (Εικ. 45).



Εικόνα 45 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της PCR ενός βήματος για τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών MgCl₂ και T°C υβριδισμού των εκκινητών CI στην αποτελεσματικότητα ανίχνευσης Roty-ιών. Ως "VS31" "VS32" και "VS34" συμβολίζεται το RNA που προέρχεται από δείγματα φασολιών θετικά στον BCMV. Τα θετικά δείγματα έδωσαν προϊόν του αναμενόμενου μεγέθους (683 bp), ενώ ο δείκτης μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε είναι ανά 100 bp.

Ζεύγος εκκινητών BYMV

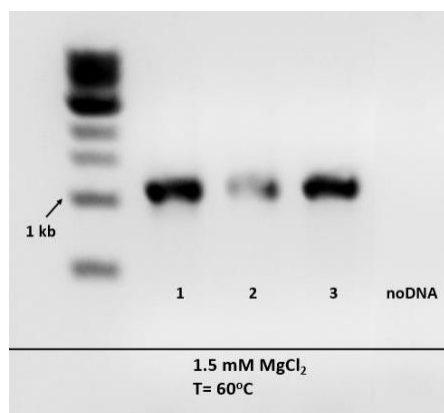
Για τη βελτιστοποίηση των BYMV εκκινητών ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φασολιάς, τα οποία ήταν θετικά στον εν λόγω ιό από προηγούμενες μελέτες και δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού καθώς και δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις $MgCl_2$. Όμως κανένας συνδυασμός συνθηκών δεν έδωσε προϊόν στην PCR, πιθανώς λόγω αποδόμησης του RNA των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Για το λόγο αυτό δε χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω αυτοί οι εκκινήτες.

3.3. Βελτιστοποίηση συνθηκών PCR για την ανίχνευση ιών του γένους *Polevirus*

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών των εκκινητών του γένους *Polevirus* χρησιμοποιήθηκαν τρία θετικά δείγματα κολοκυθίου θετικά στον BWYV και CABYV, τα οποία έχουν αλληλουχηθεί από το Εργαστήριο Ιολογίας του DSMZ και πιο συγκεκριμένα 3 δείγματα φυτών (Σαρέλη, αδημοσίευτα). Για τους συγκεκριμένους ιούς ως εκκινητές προτιμώνται εκείνοι που ενισχύουν ένα μεγάλο τμήμα του γονιδιώματος, καθώς παρατηρείται υψηλή ομοιότητα στην αλληλουχία των Pole- ιών και άλλων γενών και επομένως απαιτείται περισσότερη γενετική πληροφορία για τον διαχωρισμό τους.

Ζεύγος εκκινητών Pol-G

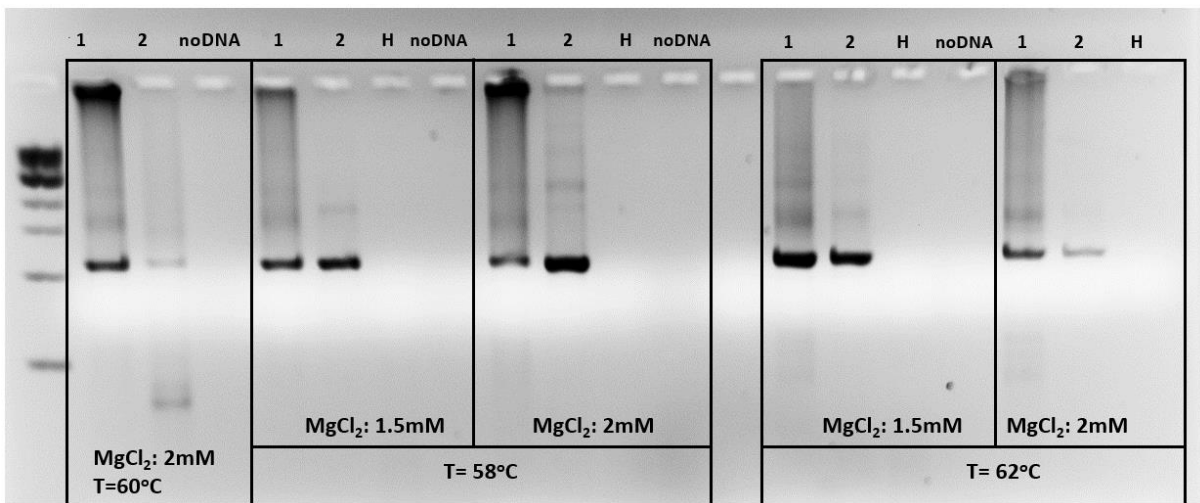
Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών για το ζεύγος εκκινητών Pol-G ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού (58°C, 60°C και 62°C), καθώς και δύο διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις $MgCl_2$ (1,5 mM και 2 mM). Η δοκιμή ήταν επιτυχής σε κάθε συνδυασμό συνθηκών, δίνοντας προϊόντα του αναμενόμενου μεγέθους (1.100bp), όμως τα βέλτιστα αποτελέσματα λήφθηκαν στη δοκιμή όπου χρησιμοποιήθηκαν 1,5 mM $MgCl_2$ και πιο συγκεκριμένα, στους 60°C (Εικ. 46 και 47) αφού δεν παρατηρείται ο σχηματισμός μη ειδικών προϊόντων. Σε κάθε περίπτωση, η παραγωγή του cDNA από το αρχικό RNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών (random primers).



Εικόνα 46 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR κατά τη δοκιμή βελτιστοποίησης του ζεύγους εκκινητών Pol-G. Ως "1" συμβολίζεται το δείγμα θετικό στον beet western yellow virus (BWYV), "2" και "3" δείγματα θετικά στον cucurbit aphid borne yellow virus (CABYV) και ως "noDNA" χαρακτηρίζονται δείγματα στα οποία ως εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH_2O . Τα

Κεφάλαιο Γ. Αποτελέσματα

Θετικά δείγματα έδωσαν το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντων μεγέθους 1.100 bp, ενώ ο δείκτης μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε είναι ανά 500 bp.

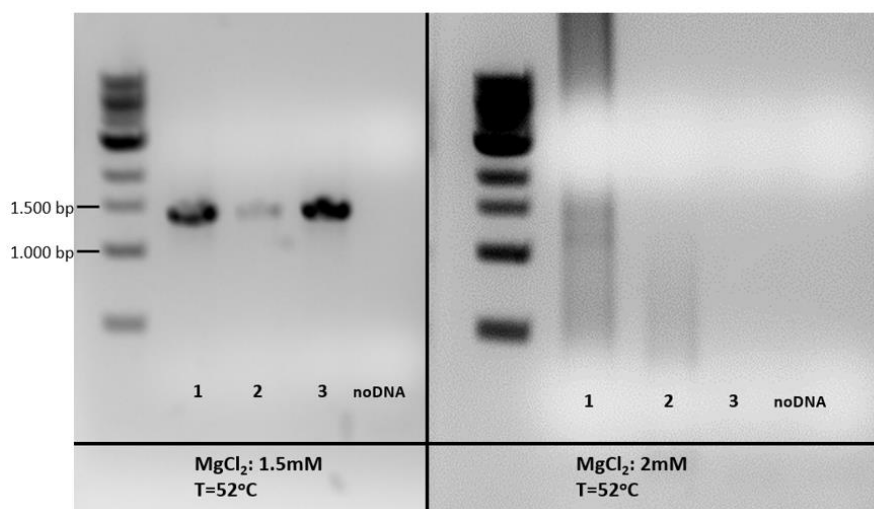


Εικόνα 47 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ($MgCl_2$ και $T^\circ C$ υβριδισμού) για την ανίχνευση των ιών του γένους *Polerovirus* με τη βοήθεια του ζεύγους εκκινητών *Pol-G*. Ως "1" συμβολίζονται τα δείγματα θετικά στον *beet western yellow virus (BWYV)*, ως "2" αυτά θετικά στον *cucurbit aphid borne yellow virus (CABYV)*, ως "H" τα δείγματα αρνητικά στους *Polerovirus* και ως "noDNA" τα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ddH_2O ως εκμαγείο. Τα προϊόντα των θετικών δειγμάτων ήταν του αναμενόμενου μεγέθους των 1100 bp, ενώ ο δείκτης μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε είναι ανά 500 bp.

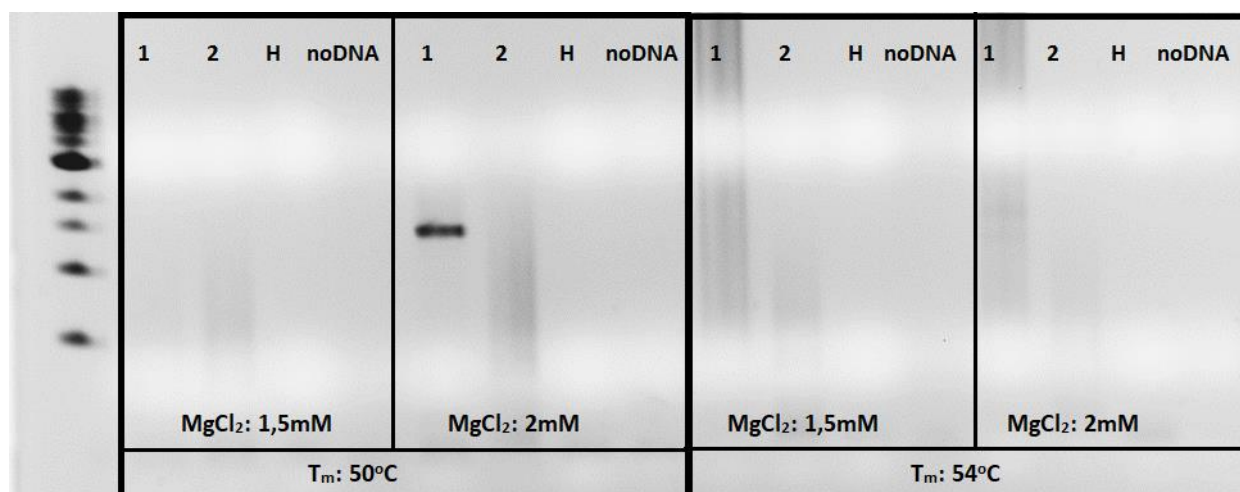
Ζεύγος εκκινητών *Polcon*

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών για το ζεύγος εκκινητών *Polcon* (Εικόνες 48 & 49) αρχικά δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού ($50^\circ C$, $52^\circ C$ και $54^\circ C$), καθώς και δύο διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις $MgCl_2$ (1,5 mM και 2 mM). Όταν η συγκέντρωση του $MgCl_2$ είναι 1.5 mM, το αναμενόμενο προϊόν παρήχθη μόνο στη θερμοκρασία $52^\circ C$ τόσο για τον *BWYV* όσο και για τον *CABYV*, ενώ όταν η συγκέντρωση του $MgCl_2$ είναι 2 mM, η αντίδραση είναι επιτυχής μόνο στη θερμοκρασία $50^\circ C$, αλλά δίνοντας το αναμενόμενο προϊόν μόνο για τον *BWYV* (Εικ. 48 & 49). Όταν η θερμοκρασία υβριδισμού ήταν $54^\circ C$, δεν παρατηρείται προϊόν για κανέναν ιό (Εικ. 49). Επομένως οι βέλτιστες συνθήκες για την ανίχνευση των *Polero*-ιών κρίνεται ότι είναι ο συνδυασμός 1.5 mM $MgCl_2$ σε θερμοκρασία υβριδισμού $52^\circ C$ (Εικ. 49). Σε κάθε περίπτωση, η παραγωγή του cDNA από το αρχικό RNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών (random primers).

Κεφάλαιο Γ. Αποτελέσματα



Εικόνα 48 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης για τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων $MgCl_2$ στην αποτελεσματικότητα ανίχνευσης των *Polerovirus* χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών *Pocop* και ως θερμοκρασία υβριδισμού τους $52^\circ C$ όπως προτείνεται από τους Xiang et al., 2008. Όπου: “1” δείγμα θετικό στον *beet western yellows virus (BWYV)*, “2” και “3” δείγματα θετικά στον *cucurbit arhid borne yellow virus (CABYV)*, “H” δείγμα αρνητικό στους *Polerovirus* και ως “noDNA” χαρακτηρίζονται δείγματα στα οποία ως εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH_2O . Τα προϊόντα είχαν το αναμενόμενο μέγεθος 1400 ζευγών βάσεων, ενώ ο δείκτης μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε είναι ανά 500 bp.

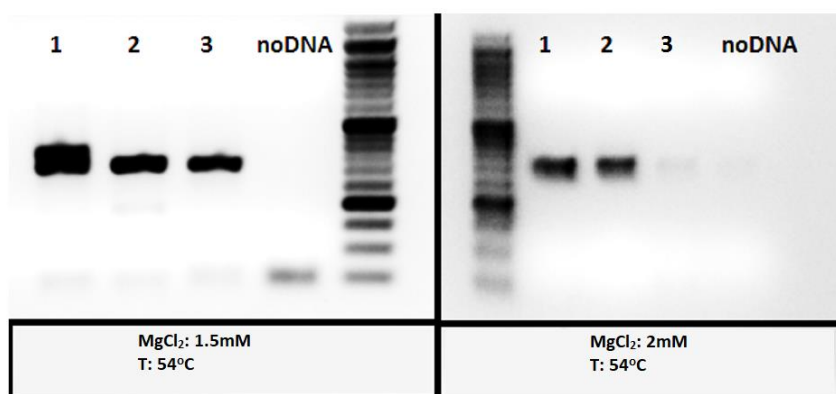


Εικόνα 49 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της PCR κατά τη δοκιμή βελτιστοποίησης συνθηκών ($MgCl_2$ και $T^\circ C$ υβριδισμού) για την ανίχνευση των ιών του γένους *Polerovirus* με τη βοήθεια του ζεύγους εκκινητών *Pocop*. Ως “1” συμβολίζονται τα δείγματα θετικά στον *beet western yellows virus (BWYV)*, ως “2” αυτά θετικά στον *cucurbit arhid borne yellow virus (CABYV)*, ως “H” τα δείγματα αρνητικά στους *Polerovirus* και ως “noDNA” τα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ddH_2O ως εκμαγείο. Το μέγεθος του θετικού δείγματος είναι 1400 bp, ενώ ο δείκτης μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε είναι ανά 500 bp.

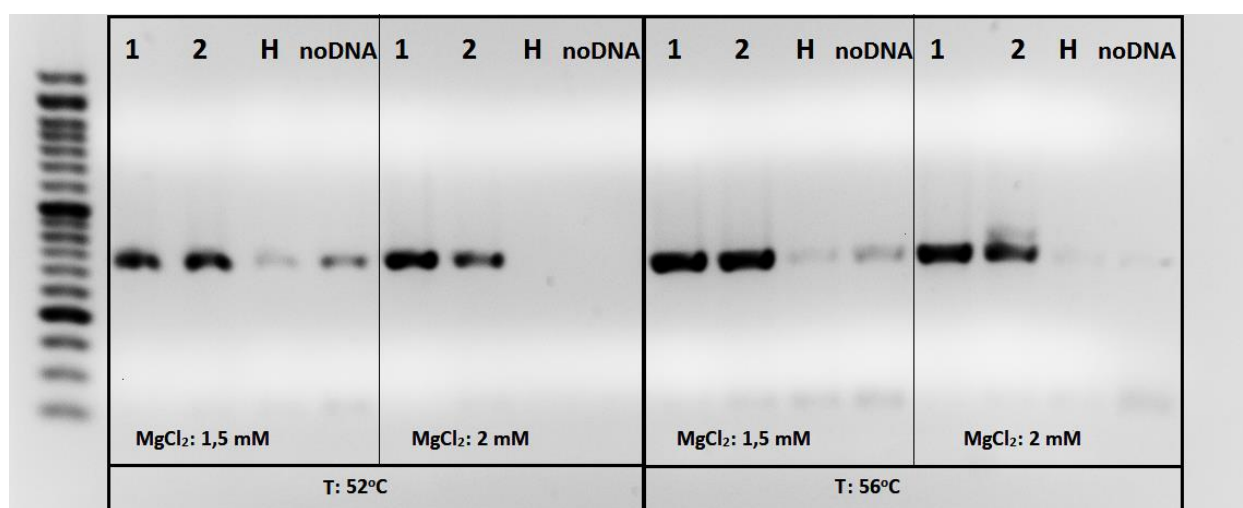
Ζεύγος εκκινητών PolGen

Για τη βελτιστοποίηση του ζεύγους εκκινητών PolGen, οι οποίοι σχεδιάστηκαν από τους Lotos et al., 2014 βάσει ελληνικών απομονώσεων διαφορετικών Polero-ίων, μελετήθηκαν οι επιδράσεις που είχαν στις αντιδράσεις τέσσερις διαφορετικοί παράγοντες: Ταq DNA πολυμεράση, συγκέντρωση $MgCl_2$, αντίστροφη μεταγραφάση και εκκινητές κατά την RT. Αναλυτικότερα, δοκιμάστηκαν Ταq DNA πολυμεράσες από τρεις

Κεφάλαιο Γ. Αποτελέσματα



Εικόνα 51 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR κατά τη δοκιμή βελτιστοποίησης του ζεύγους εκκινητών *Gen* ως προς τη συγκέντρωση του $MgCl_2$ (1,5 mM και 2 mM) χρησιμοποιώντας ως θερμοκρασία υβριδισμού τους 54°C, όπως προτείνεται από τους Knierim et al., 2008. Όπου: “1” δείγμα θετικό στον *beet western yellows virus* (BWYV), “2” και “3” δείγματα θετικά στον *cucurbit arphid borne yellow virus* (CABYV) και ως “noDNA” χαρακτηρίζονται δείγματα στα οποία ως εκμαγείο έχει χρησιμοποιηθεί ddH₂O. Τα θετικά δείγματα έδωσαν προϊόν του αναμενόμενου μεγέθους (325 bp), ενώ ο δείκτης μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε είναι ανά 50 bp.



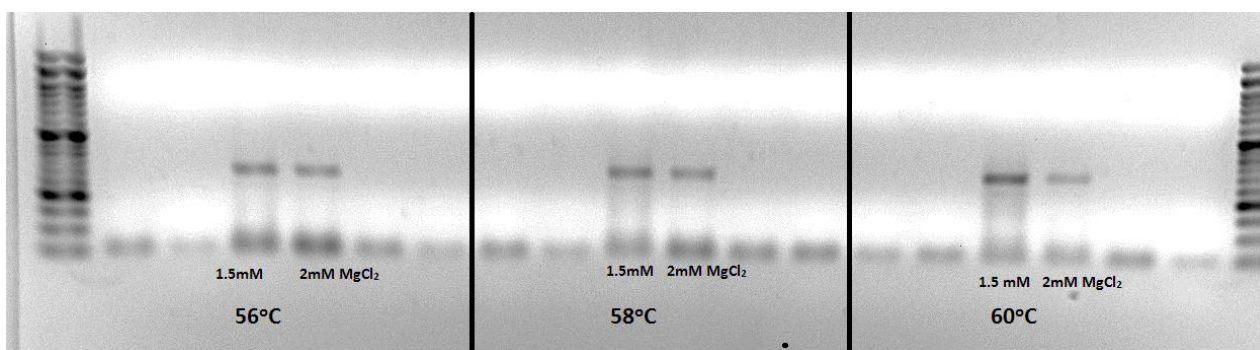
Εικόνα 52 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR για τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών $MgCl_2$ και $T^{\circ}C$ υβριδισμού στην αποτελεσματικότητα ανίχνευσης των *Poleo*-ιών χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών *Gen*. Ως “1” συμβολίζονται τα δείγματα θετικά στον *beet western yellows virus* (BWYV), ως “2” αυτά θετικά στον *cucurbit arphid borne yellow virus* (CABYV), ως “H” τα δείγματα αρνητικά στους *Poleovirus* και ως “noDNA” τα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ως εκμαγείο. Τα θετικά δείγματα έδωσαν προϊόν του αναμενόμενου μεγέθους (325 bp), ενώ ο δείκτης μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε είναι ανά 50 bp.

Μετά το πέρας της βελτιστοποίησης των γενικευμένων εκκινητών για την ανίχνευση ιών που ανήκουν στο γένος *Poleovirus* ως πιο ιδανικοί κρίνονται τα ζεύγη εκκινητών Pol-G και Pocon. Σημαντικό πλεονέκτημά τους αποτελεί το γεγονός ότι ενισχύουν και τα δύο τμήματα του γονιδιώματος που είναι γνωστό πως είναι συντηρημένα εντός του γένους, δηλαδή το 3' τμήμα της RdRp και το 5' τμήμα της CP. Με αυτό τον τρόπο, όπως αποδείχτηκε παραπάνω είναι δυνατή η ανίχνευση διαφορετικών μελών του γένους *Poleovirus*, το ζεύγος εκκινητών Pol-G με λίγο μεγαλύτερη επιτυχία, γι' αυτό και επιλέχθηκε για την εφαρμογή των

βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων στα δείγματα που συλλέχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Η δυνατότητα ανίχνευσης τόσο του BWYV όσο και του CABYV παρατηρήθηκε για το ζεύγος εκκινητών Gen, όμως βασικό μειονέκτημά τους αποτελεί το μικρό μέγεθος του παραγόμενου προϊόντος (325bp), σε αντίθεση με τους εκκινητές PοΙ-G και PοCOη, των οποίων το παραγόμενο προϊόν (1,1kb και 1,4kb, αντίστοιχα) επιτρέπει τις περαιτέρω φυλογενετικές αναλύσεις.

Ζεύγος εκκινητών BWYV

Όσον αφορά το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών BWYV ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού (56°C, 58°C και 60°C) σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις MgCl₂ (1.5mM και 2mM). Οι βέλτιστες συνθήκες φαίνεται να είναι σε συγκέντρωση 1.5mM MgCl₂ στη θερμοκρασία 60°C καθώς παρήχθη περισσότερο προϊόν (πιο έντονη ζώνη) (Εικ. 53, δεξιά).



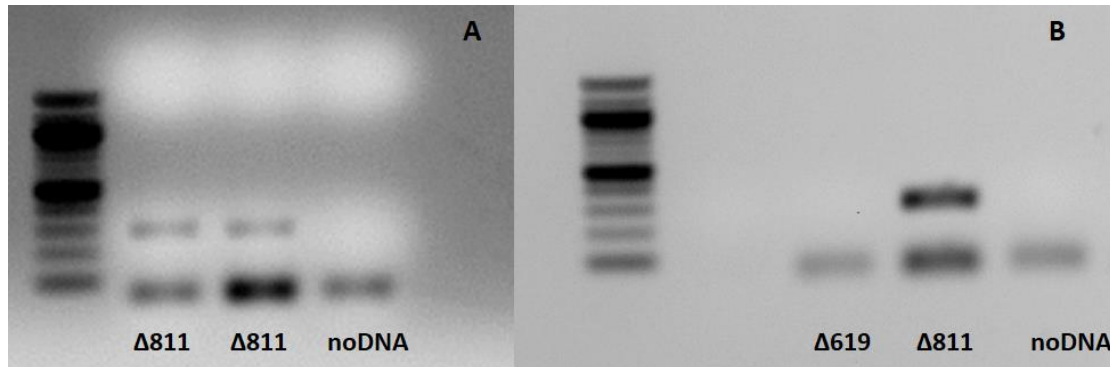
Εικόνα 53 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR για τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών MgCl₂ και T°C υβριδισμού στην αποτελεσματικότητα ανίχνευσης του beet western yellows virus (BWYV) με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών BWYV (Χατζηθασιλείου, αδημοσίευτα). Τα θετικά δείγματα έδωσαν προϊόν του αναμενόμενου μεγέθους (290 bp), ενώ ο δείκτης μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε είναι ανά 50 bp.

3.4. Επίλυση Προβλημάτων (Troubleshooting)

Μετά τη βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων της αντίδρασης της PCR που αφορούν τους εκκινητές για την εύρεση των PοIηρο-ιών πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε έναν αριθμό δειγμάτων, όμως παρατηρήθηκε η παρουσία διμερών των εκκινητών (primer dimers) σε αυτά καθώς και εξασθένιση του σήματος των θετικών δειγμάτων. Η πρώτη στρατηγική επίλυσης των προβλημάτων της PCR αφορά τα βασικά αντιδραστήρια της δοκιμής. Για τον έλεγχο των παραγόντων αυτών πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε καθεμία από τις οποίες άλλαζε μόνο ένας παράγοντας κάθε φορά (dNTPs, ζεύγος εκκινητών, buffer και Taq). Ωστόσο δε παρατηρήθηκε επίλυση του προβλήματος, δείχνοντας ότι η αιτία των προβλημάτων δεν ήταν η επιμόλυνση ή η ποιότητα των υλικών.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι που αφορούσαν τις συγκεντρώσεις των συστατικών της PCR. Η συγκέντρωση του MgCl₂ είχε ήδη βελτιστοποιηθεί σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία υβριδισμού των

εκκινητών, επομένως δοκιμάστηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις του ζεύγους εκκινητών, καθώς και της Taq πολυμεράσης. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της ποσότητας της Taq πολυμεράσης στην αντίδραση είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πιο ευδιάκριτων ζωνών στο gel ηλεκτροφόρησης. Επίσης, η ίδια ενίσχυση του σήματος των θετικών δειγμάτων παρατηρήθηκε και με την αύξηση της συγκέντρωσης του εκμαγείου cDNA όμως ταυτόχρονα η παρουσία των διμερών των εκκινητών έγινε εντονότερη (Εικ. 54).



Εικόνα 54 Gel ηλεκτροφόρησης διαφορετικών PCR με τη χρήση των εκκινητών εξειδικευμένων στην ανίχνευση του *beet western yellows virus* (BWYV). (A) Με την αρχική συγκέντρωση της Taq πολυμεράσης, (B) Ενίσχυση του σήματος του θετικού μάρτυρα μετά την αύξηση της συγκέντρωσης της Taq πολυμεράσης.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ποιότητα του γενετικού υλικού της PCR πραγματοποιώντας εκ νέου σύνθεση cDNA από το RNA των θετικών δειγμάτων καθώς και κάποιων υπό εξέταση δειγμάτων. Ο έλεγχος με τους εκκινητές 18S έδειξε ότι το RNA των θετικών δειγμάτων πιθανόν έχει μάλλον σε μεγάλο βαθμό αποδομηθεί. Σε μια τέτοια περίπτωση, για την ανίχνευση των ιών του γένους *Polerovirus* με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών Pol-G, προτείνεται η αύξηση της ποσότητας της Taq DNA πολυμεράσης.

4. Εφαρμογή βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων για την ανίχνευση ιών των γενών *Polerovirus* & *Potyvirus*

Βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της βελτιστοποίησης των συνθηκών για τη διεξαγωγή της PCR, η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση του MgCl₂ που προέκυψε παρουσιάζονται στον Πίνακα 26, ενώ τα τελικά πρωτόκολλα με τις συγκεντρώσεις των υλικών στους Πίνακες 27-29. Τα cDNA των δειγμάτων για τη βελτιστοποίηση κατασκευάστηκε με τη χρήση τυχαιοποιημένων εκκινητών, με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τους εκκινητές PolGen, οι οποίοι έδωσαν αποτελέσματα μόνο στην περίπτωση cDNAs από εξειδικευμένους εκκινητές. Η Taq DNA πολυμεράση που επιλέχθηκε προέρχεται από την εταιρεία Kapa Biosystems.

Κεφάλαιο Γ. Αποτελέσματα

Πίνακας 26 Οι τελικές θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών έπειτα από βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR.

Ιός	Εκκινητής	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)	Χρόνος επιμήκυνσης	MgCl ₂ (mM)
<i>Polerovirus</i> (general)	Pol-G	60	1,5 min	1,5
	Pocon	52	1,5 min	1.5
	PolGen			2
	Gen	54	40 sec	1.5
BWYV	BWYV	60	30 sec	1.5
<i>Potyvirus</i> (general)	Cl	50	1 min	2
BCMV	BCMV3_P3	62	30 sec	1.5

Πίνακας 27 Τελικό πρωτόκολλο PCR για την ανίχνευση των ιών του γένους *Polerovirus* χρησιμοποιώντας τους γενικευμένους εκκινητές Pol-G. Το διάλυμα Taq PCR buffer περιέχει MgCl₂ τελικής συγκέντρωσης 1,5 Mm, ενώ το cDNA των δειγμάτων παρήχθη με τη χρήση τυχαιοποιημένων εκκινητών.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl) ανά δείγμα
ddH ₂ O	18,8
Taq PCR buffer (10x)	2,5
dNTPs (10mM)	0,5
Pol-G ανοδικός εκκινητής (10mM)	1
Pol-G καθοδικός εκκινητής (10mM)	1
Taq DNA Polymerase (kapa)	0,2
Εκμαγείο cDNA	1
Τελικός Όγκος	25

Πίνακας 28 Τελικό πρωτόκολλο PCR για τους εκκινητές Pocon, Gen, BWYV & BCMV3_P3. Το διάλυμα Taq PCR buffer περιέχει MgCl₂ τελικής συγκέντρωσης 1,5mM, ενώ το cDNA των δειγμάτων παρήχθη με τη χρήση τυχαιοποιημένων εκκινητών.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl) ανά δείγμα
ddH ₂ O	18,9
Taq PCR buffer (10x)	2,5
MgCl ₂	0
dNTPs (10mM)	0,5
Ανοδικός εκκινητής (10mM)	1
Ανοδικός εκκινητής (10mM)	1
Taq DNA Polymerase	0,1
Εκμαγείο cDNA	1
Τελικός Όγκος	25

Κεφάλαιο Γ. Αποτελέσματα

Πίνακας 29 Συνθήκες εκτέλεσης της PCR ενός θήματος για την ανίχνευση των ιών του γένους *Rotavirus* χρησιμοποιώντας τους γενικευμένους εκκινητές *Cl* (Ha et al 2007). Το διάλυμα *Taq* PCR buffer που χρησιμοποιήθηκε δεν περιέχει $MgCl_2$.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl) ανά δείγμα
RNA template	1
RNase inhibitor	0,1
MMLV αντίστροφη μεταγραφάση	0,2
ddH ₂ O	15,85
Taq PCR buffer (5x)	5
MgCl ₂ (τελική συγκέντρωση 2mM)	1
dNTPs (25mM)	0,25
Cl Ανοδικός εκκινητής (25mM)	0,75
Cl Καθοδικός εκκινητής (25mM)	0,75
Taq DNA Polymerase	0,1
Τελικός Όγκος	25

Για τη βελτιστοποίηση των εκκινητών *PolGen* ελέγχθηκαν διαφορετικοί παράγοντες, τόσο κατά την παρασκευή του cDNA, όσο και κατά την εκτέλεση της PCR. Αναλυτικότερα, κατά την σύνθεση του cDNA, η χρήση τυχαιοποιημένων εκκινητών δεν κατάφερε να δώσει θετικά προϊόντα, όπως συνέβη και με τη χρήση της *M-MuLV* που προέρχεται από την εταιρεία *NEB* και της *M-MLV* από την *Invitrogen*. Αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών και με την αντίστροφη μεταγραφάση *SuperScript™ III* της *Invitrogen*.

Όσον αφορά τις συνθήκες εκτέλεσης της PCR δοκιμάστηκαν διαφορετικές *Taq* DNA πολυμεράσες και διαφορετικές συγκεντρώσεις $MgCl_2$. Τελικά ο συνδυασμός που το αναμενόμενο προϊόν ήταν το ένζυμο *Taq* από την εταιρεία *NEB* με τελική συγκέντρωση $MgCl_2$ 2mM. Έτσι το τελικό πρωτόκολλο που προτείνεται στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται στον Πίνακα 30 .

Πίνακας 30 Τελικό πρωτόκολλο της PCR για την ανίχνευση των ιών του γένους *Poliovirus*, χρησιμοποιώντας τους γενικευμένους εκκινητές *PolGen*. Το cDNA παρασκευάστηκε με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών, η *Taq* που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας *NEB* ενώ ο διάλυμα *Taq* PCR buffer δεν περιέχει $MgCl_2$.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl) ανά δείγμα
ddH ₂ O	11,7
Taq PCR buffer (10x)	2
MgCl ₂	0,8
dNTPs (25mM)	0,5
Ανοδικός εκκινητής (10mM)	1,25
Ανοδικός εκκινητής (10mM)	1,25
Taq DNA Polymerase	0,5
Εκμαγείο cDNA	2
Τελικός Όγκος	20

Τέλος, για την εκτέλεση της PCR με το ζεύγος εκκινητών PolGen με τις παραπάνω συνθήκες, χρησιμοποιήθηκε το θερμικό προφίλ που προτείνεται τους Lotos et al. (2014) (Πιν. 31).

Πίνακας 31 Πρόγραμμα συνθηκών PCR με τη χρήση των εκκινητών PolGen (Lotos et al., 2014)

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Αρ. Κύκλων	Διάρκεια
Προ- αποδιάταξη	95	1	30 sec
Αποδιάταξη	95	35	30 sec
Υβριδισμός εκκινητών	58		15 sec
	54		10 sec
	52		10 sec
Επιμήκυνση	68		30 sec
Τελική επιμήκυνση	68	1	5 min
Αποθήκευση	4	-	-

Έλεγχος δειγμάτων αγρού. Εφαρμόστηκαν δοκιμές PCR με τη χρήση των εκκινητών Pol-G και το παραπάνω πρωτόκολλο και ελέγχθηκαν συνολικά 14 δείγματα (εννέα αραχίδα, δύο μηδική και δύο χαρουπιά), εκ των οποίων ως θετικό επιβεβαιώθηκε ένα φυτό μηδικής από τον Αρχάγγελο του νομού Πέλλας. Το προϊόν της PCR του δείγματος αυτού στη συνέχεια καθαρίστηκε και αλληλουχίστηκε στο Ινστιτούτο DSMZ (Καστόρα, 2022).

Παράλληλα, ελέγχθηκαν τρία δείγματα αραχίδας και ένα μηδικής, τα οποία είχαν βρεθεί θετικά στον BLRV σε δοκιμές ELISA, για τον έλεγχο πιθανής διασταυρωτής αντίδρασης των αντισωμάτων αλλά τα αποτελέσματα δεν έδειξαν την παρουσία ιών του γένους *Polevirus*. Τα δείγματα αυτά ελέγχθηκαν και για την περίπτωση μικτής μόλυνσης με τον BCMV και βρέθηκαν αρνητικά.

Τέλος, ελέγχθηκαν μοριακά για την παρουσία BCMV 27 δείγματα από διάφορους ξενιστές (21 αραχίδα, 2 μηδική, 2 χαρουπιά, 1 ακακία και 1 αρακάς). Από τις αραχίδες, συνολικά τα οκτώ δείγματα επιβεβαιώθηκαν ως θετικά στην παρουσία ιών του γένους *Potyvirus* (από δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν τα έτη 2021 και 2022), αλλά ήταν αρνητικά στην παρουσία του BCMV.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οικογένεια των ψυχανθών (οικογένεια Fabaceae) καταλαμβάνει σημαντική θέση στη διατροφή του ανθρώπου και στην κτηνοτροφία, αφού αποτελούν τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας (Makkouk & Kumari, 2009, Marhosa & Jideani, 2017) και μερικά από αυτά, όπως η σόγια και η αραχίδα, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ελαίων και χορτοφαγικών προϊόντων. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυτά χλωρής λίπανσης και αποτελούν εξαιρετικές καλλιέργειες αμειψισποράς. Τα ψυχανθή όμως μολύνονται από 168 είδη ιών που ανήκουν σε 39 διαφορετικά γένη και 26 οικογένειες τα οποία μπορούν να προκαλέσουν μεγάλες απώλειες της παραγωγής (Chatzivassiliou, 2021). Μια από τις πιο επιζήμιες ασθένειες των ψυχανθών αποτελεί το «Κοινό μωσαϊκό της φασολιάς» που προκαλείται από τους BCMV και BCMNV (γένος *Potyvirus*), οι οποίοι εξαιρετικά επιζήμιοι στα είδη των γενών *Phaseolus* και *Vigna* και οι οποίοι απαντώνται παγκοσμίως (Worrall et al., 2015, Tang & Feng, 2022). Οι ιοί αυτοί μεταδίδονται με σπόρο και με τις αφίδες-φορείς τους, ωστόσο οι μολυσμένοι σπόροι αντιπροσωπεύουν μεγάλο ποσοστό των πρωτογενών μολύνσεων ενός αγρού με ψυχανθή (Jordan & Hammond, 2008) και στη συνέχεια, οι αφίδες εξαπλώνουν τους ιούς αυτούς εντός αγρού, αλλά και σε γειτονικούς. Από την άλλη και οι ιοί του γένους *Polerovirus* αποτελούν αναδυόμενη απειλή για καλλιέργειες όπως τα ψυχανθή με την ομάδα των ιών που σχετίζονται με τον ίκτερο των τεύτλων (beet infecting viruses) να προκαλεί σημαντικές ζημιές που περιλαμβάνουν ίκτερο, νανισμό και παραμορφώσεις (LaTourrette et al., 2021). Ο αριθμός των ειδών του γένους *Polerovirus* συνεχώς αυξάνεται (Makkouk & Kumari, 2009) και μεταδίδονται αποκλειστικά με τις αφίδες με έμμονο τρόπο (LaTourrette et al., 2021). Η αφιδομετάδοση επηρεάζει πολύ σημαντικά την επιδημιολογία των ιών, ειδικά για τα ψυχανθή, καθώς τα περισσότερα από αυτά αποτελούν μονοετείς καλλιέργειες κι έτσι η προσβολή των περιφερειακών αυτοφυών και ζιζανίων με τους ιούς αυτούς λειτουργεί ως εστία μόλυνσης για τη βασική καλλιέργεια (Hull, 2013, Al-Shahwan et al., 2017, Chatzivassiliou, 2021) αλλά και ως μέρος διαχείμανσης των φορέων τους (Hull, 2013). Το ίδιο ισχύει και για το ρόλο της μηδικής, αφού αποτελεί ένα από τα λίγα ψυχανθή που είναι πολυετή.

Για τους λόγους αυτούς είναι πολύ σημαντική η έγκαιρη διάγνωση των ασθενειών των ψυχανθών που σχετίζονται με τους ιούς αυτούς και ως εκ τούτου, η χρήση αποτελεσματικών μεθόδων ανίχνευσής τους. Έτσι στόχος της παρούσας διατριβής, ήταν η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων μοριακής ανίχνευσης των ιών του γένους *Potyvirus* και *Polerovirus* με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για τη γενικευμένη ή εξειδικευμένη ανίχνευση των του γένους.

Οι ορολογικές μέθοδοι, όπως είναι η ELISA, χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς αποτελούν εξαιρετικά ευαίσθητες και ακριβείς μεθόδους για την ανίχνευση των ιών του γένους *Potyvirus* σε επίπεδο γένους (Valli et al., 2021), όμως ο διαχωρισμός σε επίπεδο είδους είναι δύσκολος. Αυτό συμβαίνει διότι οι ιοί είναι ορολογικά συγγενείς με κοινούς επίτοπους στην CP, οι οποίοι δημιουργούν διασταυρωτές αντιδράσεις (cross reactions), ενώ οι επίτοποι που είναι εξειδικευμένοι σε επίπεδο είδους, εντοπίζονται στο N-άκρο της CP, το οποίο είναι εκτεθειμένο στην επιφάνειά της, καθιστώντας τους επιρρεπείς στην αποδόμηση. Έτσι,

στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το γενικευμένο αντίσωμα που αντιδρά με τους ιούς του γένους *Potyvirus* και στη συνέχεια, τα θετικά δείγματα ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους για τον BCMV εκκινητές, προς διαπίστωση της παρουσίας του σε φυτά μηδικής, αραχίδας, χαρουπιάς και ακακίας.

Εναλλακτικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί PCR χρησιμοποιώντας γενικευμένους εκκινητές που στοχεύουν τμήματα γονιδίων που είναι υψηλά συντηρημένα σε επίπεδο γένους με στόχο την ενίσχυση όσο το δυνατόν περισσότερων απομονώσεων των ιών του γένους και στη συνέχεια να προσδιοριστεί το είδος του ιού έπειτα από αλληλούχισή του. Στο γένος *Potyvirus*, οι συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος τους που χρησιμοποιούνται συνήθως κατά το σχεδιασμό των γενικευμένων εκκινητών είναι το γονίδιο CI, το NIb και το κεντρικό τμήμα του γονιδίου της CP (Zheng et al., 2008). Για το λόγο αυτό στα πλαίσια της παρούσας διατριβής βελτιστοποιήθηκε το πρωτόκολλο μοριακής ανίχνευσης χρησιμοποιώντας γενικευμένους εκκινητές που στοχεύουν στο γονίδιο CI και πιο συγκεκριμένα στα μοτίβα I και V, ενισχύοντας μια περιοχή του γονιδιώματος υψηλά συντηρημένη στο γένους *Potyvirus* (Ha et al., 2008).

Σε αντίθεση με τους ιούς του γένους *Potyvirus*, τα αποτελέσματα των ορολογικών δοκιμών ELISA για την ανίχνευση ιών που ανήκουν στο γένος *Polerovirus* είναι σε μεγάλο βαθμό αναξιόπιστα (Chomič et al., 2010). Συχνά, στα αντισώματα του γένους αυτού παρατηρούνται διασταυρωτές αντιδράσεις, είτε μεταξύ ειδών του ίδιου γένους, όπως συμβαίνει με τα αντισώματα του BWYV που αντιδρούν επίσης με τον BMYV, καθώς οι ιοί αυτοί έχουν 90% ομοιότητα στην αλληλουχία των δομικών πρωτεϊνών τους (Miller, 1999), είτε μεταξύ ειδών διαφορετικού γένους ή/και οικογένειας, όπως συμβαίνει με τα γένη *Polerovirus* και *Luteovirus* (Chomič et al., 2010, D'Arcy et al., 1989).

Ως συνέπεια των παραπάνω, η μέθοδος PCR κρίνεται πιο αξιόπιστη για την ανίχνευση των ιών του γένους *Polerovirus* χρησιμοποιώντας είτε γενικευμένους εκκινητές, είτε εξειδικευμένους σε επίπεδο είδους. Στην περίπτωση των ιών του γένους *Polerovirus*, αυτές οι συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος είναι οι CP και RdRp (Filardo et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα, το RTD της P3:P5 περιέχει μια υψηλά συντηρημένη στο γένος περιοχή η οποία εμπλέκεται στην αφιδομετάδοση, ενώ η RdRp αποτελεί διαπλαισιακή πρωτεΐνη, με τη συντηρημένη περιοχή να εντοπίζεται στο ORF2. Στην παρούσα διατριβή βελτιστοποιήθηκαν δοκιμές PCR για την ανίχνευση ιών του γένους *Polerovirus* με γενικευμένους εκκινητές που στοχεύουν τα γονίδια αυτά. Το ζεύγος εκκινητών Gen (Knierim et al., 2013) στοχεύει στο 3' τμήμα του γονιδίου της CP, ωστόσο, οι αλληλουχίες του γονιδίου αυτού παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των γενών *Polerovirus* και *Luteovirus*, επομένως ενίσχυση της περιοχής αυτής θα πιθανόν να οδηγούσε σε ανίχνευση ιών εκτός του γένους *Polerovirus* (Lotos et al., 2014) κι έτσι είναι προτιμότερη η επιλογή εκκινητών που ενισχύουν είτε την RdRp (PolGen) είτε και τις δύο (Pol-G και Pocon). Για το λόγο αυτό, προτιμούνται οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν από τους Lotos et al. (2014) (PolGen) με στόχο την ενίσχυση τμήματος της RdRp, το οποίο θα

παρέχει εξειδίκευση στους ιούς του γένους, αλλά και διαφοροποίηση με ιούς του γένους *Sobemovirus* και *Enamovirus*.

Τα ζεύγη εκκινητών Pol-G (Knierim et al., 2010) και Pocon (Xiang et al., 2008) έχουν το πλεονέκτημα ότι ενισχύουν τόσο το 3' τμήμα της RdRp όσο και το 5' τμήμα της CP. Επίσης, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους γενικευμένους εκκινητές που βελτιστοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, το παραγόμενο προϊόν είναι μεγάλου μεγέθους (1,1kb και 1,4kb, αντίστοιχα) κι έτσι είναι εφικτή η ανάλυση ενός μεγαλύτερου τμήματος της αλληλουχίας του γονιδιώματος των ιών και ως εκ τούτου παρέχουν περισσότερες πληροφορίες.

Κατά τη βελτιστοποίησή των γενικευμένων εκκινητών διαπιστώθηκε ότι το ζεύγος PolGen (Lotos et al., 2014), ενίσχυσε επιτυχώς το θετικό στον BWYV δείγμα αλλά όχι το θετικό στον CABYV, ενώ τα υπόλοιπα τρία ζεύγη ενίσχυσαν επιτυχώς και τους δύο θετικούς μάρτυρες. Όμως, το προϊόν που ενισχύεται από το ζεύγος εκκινητών Gen είναι μικρού μεγέθους (325bp) κι έτσι ενώ αποτελεί εξαιρετικό εργαλείο για διαγνωστικούς σκοπούς, υστερεί στον τομέα της ταξινόμησης και των φυλογενετικών αναλύσεων. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, ιδανικοί για την ανίχνευση ιών του γένους *Polerovirus* κρίθηκαν τα ζεύγη εκκινητών Pol-G και Pocon, με το πρώτο να έχει τη δυνατότητα να ενισχύει τα επιθυμητά προϊόντα σε κάθε συνδυασμό συνθηκών που δοκιμάστηκαν.

Η στρατηγική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή για την απόκτηση ελληνικών απομονώσεων των γενών *Potyvirus* και *Polerovirus* ήταν ο συνδυασμός των μεθόδων ELISA και PCR. Πρώτα πραγματοποιήθηκε έλεγχος ενός μεγάλου αριθμού συμπτωματικών ψυχανθών με τη μέθοδο ELISA, στα πλαίσια της παρούσας και προηγούμενων διατριβών και βάσει των αποτελεσμάτων της επιλέχθηκαν κάποια δείγματα τα οποία συμπεριλήφθηκαν στις μοριακές δοκιμές (εξαγωγή ολικού RNA, σύνθεση cDNA και PCR).

Στα δείγματα που επιλέχθηκαν για τις μοριακές δοκιμές πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του ολικού RNA με δύο διαφορετικές μεθόδους. Τα δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με το αντιδραστήριο TRI Reagent® (Sigma – Aldrich) είχαν υψηλή συγκέντρωση RNA (μέσος όρος 873,62 ng/μl) σε αντίθεση με εκείνα που προέκυψαν μετά τη χρήση του RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) των οποίων η συγκέντρωση ήταν χαμηλή (μέσος όρος 53,86 ng/μl). Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με εκείνα των Kanani et al. (2019) και των Arruabarrena et al. (2016), όπου κατά τη σύγκριση διαφορετικών μεθόδων εξαγωγής RNA από φυτικούς ιστούς παρατηρήθηκε και στις δύο περιπτώσεις ότι με το αντιδραστήριο TRI Reagent® προέκυψαν δείγματα σε υψηλότερη συγκέντρωση RNA σε σύγκριση με το rNeasy Plant Mini Kit. Οι Portillo et al. (2006) επίσης προτείνουν ότι η εξαγωγή ολικού RNA από φυτικούς ιστούς με χρήση του TRI Reagent®, εκτός από διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης RNA, επίσης προσφέρει διατήρηση της ακεραιότητας του RNA σε σύγκριση με άλλα αντιδραστήρια. Οι λόγοι απορρόφησης που παρατηρήθηκαν με το TRI Reagent® στην παρούσα εργασία κυμαίνονται σε παρόμοιες τιμές με εκείνες των Arruabarrena et al. (2016). Συγκεκριμένα

στα δείγματα ψυχανθών της παρούσας εργασίας οι λόγοι 260/280 και 260/230 είχαν μέσο όρο 1,71 και 1,08 αντίστοιχα, ενώ των Arruabarrena et al. (2016) οι αντίστοιχες τιμές σε φυτά τομάτας ήταν 2,00 και 1,25. Οι χαμηλές αυτές τιμές του λόγου 260/230 πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη υπολειμμάτων φαινολικών ενώσεων λόγω του αντιδραστηρίου TRI Reagent®. Παρόλα αυτά, η ποιότητα του ολικού εξαγόμενου RNA με τη χρήση του TRI Reagent® μπορεί να βελτιωθεί με τροποποιήσεις στο προτεινόμενο πρωτόκολλο, όπως είναι η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας του αντιδραστηρίου, ειδικά στην περίπτωση των ψυχανθών που χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα τους σε φαινολικές ουσίες, οι οποίες δυσχεραίνουν τη διαδικασία της εξαγωγής του RNA (Mainkar et al., 2023).

Για να είναι εφικτή η εκτέλεση της PCR είναι απαραίτητο το γενετικό υλικό να είναι σε μορφή DNA, κι έτσι για τον έλεγχο των RNA ιών, μεσολαβεί η σύνθεση του cDNA. Στην παρούσα μελέτη, κατά τη σύνθεση του cDNA των επιλεγμένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τυχαιοποιημένοι εκκινητές, καθώς αυτοί επιτρέπουν την παραγωγή ενός μεγάλου τμήματος DNA από το εκμαγείο και κατά συνέπεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για την ανίχνευση πολλών RNA ιών (Nakaune & Nakano, 2006). Ένα ακόμα πλεονέκτημα της χρήσης τυχαιοποιημένων εκκινητών είναι η δυνατότητα ελέγχου της ποιότητας του RNA και της επιτυχίας σύνθεσης του cDNA αλλά και των αντιδραστηρίων της PCR, εκτελώντας δοκιμές χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν σε περιοχές που αφθονούν στο γονιδίωμα των φυτών, όπως είναι το γονίδιο του 18S ριβοσωμικού RNA, συστατικό των ριβοσωμάτων και του γονιδίου της NADH αφυδρογονάσης που συμμετέχει στη μεταφορά ηλεκτρονίων στο κύτταρο (Du et al., 2006). Σύγκριση των δύο αυτών μαρτύρων στην PCR υποδεικνύει ότι αυτοί που στοχεύουν το 18S rRNA παρέχουν μεγαλύτερη ευαισθησία (Du et al., 2006). Έτσι στην παρούσα διατριβή, για τον έλεγχο της ποιότητας του γενετικού υλικού των δειγμάτων που υπέστησαν επεξεργασία με το αντιδραστήριο TRI Reagent® και με το RNeasy Plant Mini Kit, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές PCR με τη χρήση των εκκινητών 18S. Αξίζει να σημειωθεί ότι το προϊόν παρήχθη από RNA που εξήχθη και με τις δύο μεθόδους, ακόμα και στα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Plant Mini Kit και η συγκέντρωση του RNA τους ήταν χαμηλή.

Μετά τον έλεγχο της ποιότητας των δειγμάτων ακολούθησε η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων της PCR πραγματοποιώντας δοκιμές διαφορετικών συνδυασμών θερμοκρασίας υβριδισμού εκκινητών και συγκεντρώσεων $MgCl_2$, παράγοντες που αποτελούν τους πιο σημαντικούς για την ευαισθησία και την ποιότητα της αντίδρασης (Lorenz, 2012). Χαμηλή θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της εξειδίκευσης της αντίδρασης, καθώς μπορούν να προσδεθούν σε αλληλουχίες που δεν είναι απόλυτα συμπληρωματικές, δημιουργώντας έτσι μη ειδικά προϊόντα. Η υψηλή θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών όμως μειώνει την απόδοση της αντίδρασης, καθώς λιγότερα μόρια των εκκινητών προσδένονται στο DNA στόχο (Asif et al., 2021). Όσον αφορά το $MgCl_2$, που αποτελεί συν-παράγοντα της Taq DNA πολυμεράσης, συμβαίνει το αντίστροφο, δηλαδή, χαμηλή συγκέντρωση $MgCl_2$ μειώνει την απόδοση της PCR και την παραγωγή προϊόντος και υψηλή συγκέντρωση $MgCl_2$ μειώνει την

εξειδίκευση δημιουργώντας μη ειδικά προϊόντα (Asif et al., 2021). Έτσι, οι δύο αυτοί παράγοντες της αντίδρασης PCR λειτουργούν αντίστροφα, δηλαδή η αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών πρέπει να συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση της συγκέντρωσης του $MgCl_2$.

Στην παρούσα διατριβή, μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR ακουλούθησε η εφαρμογή των πρωτοκόλλων σε δείγματα αγρού. Κατά την εκτέλεση δοκιμών PCR για την ανίχνευση ιών του γένους *Polerovirus*, παρατηρήθηκε ασθενές σήμα στους θετικούς μάρτυρες και γι' αυτό δοκιμάστηκαν διαδοχικά διαφορετικές τρόποι επίλυσης του προβλήματος. Οι στρατηγικές που ακολουθούνται διαφέρουν αναλόγως το πρόβλημα. Για την ενίσχυση του σήματος των θετικών μαρτύρων της αντίδρασης συστήνεται η αύξηση της ποσότητας του εκμαγείου DNA και των εκκινητών, όμως για την εξάλειψη των διμερών των εκκινητών συστήνεται η μείωσή τους (Asif et al., 2021). Πρώτα ανανεώθηκαν τα επιμέρους υλικά της δοκιμής (ένα σε κάθε δοκιμή) προς αποφυγή επιμολύνσεων (Lorenz, 2012) και στη συνέχεια δοκιμάστηκαν οι στρατηγικές που προτείνονται από τους Asif et al. (2021), οι οποίες περιλαμβάνουν την αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών, την αύξηση της ποσότητας του εκμαγείου DNA και την αύξηση των κύκλων επαναλήψεων της αντίδρασης. Η αύξηση της ποσότητας του DNA βελτίωσε σημαντικά το σήμα των θετικών μαρτύρων όπως παρατηρήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση, αλλά ως συνέπεια είχε την παρουσία υψηλότερης συγκέντρωσης διμερών εκκινητών. Τελικά η αύξηση της ποσότητας της Taq πολυμεράσης, έλυσε το πρόβλημα. Δυστυχώς δεν κατέστη δυνατός ο έλεγχος επιπλέον δειγμάτων καθώς όπως φάνηκε το RNA τους είχε αποδομηθεί σε μεγάλο βαθμό κατά την αποθήκευσή του.

Γενικά η ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών αποτελεί ένα απαιτητικό πεδίο έρευνας, αλλά αυτές αποτελούν το πρώτο βήμα και καθοριστικό παράγοντα για τη διερεύνηση σημαντικών ιολογικών ασθενειών των καλλιεργειών και τη διαχείρισή τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διεθνής Βιβλιογραφία

- Abraham, A. D., Menzel, W., Lesemann, D. E., Varrelmann, M., & Vetten, H. J. (2006). Chickpea chlorotic stunt virus: A new polerovirus infecting cool-season food legumes in Ethiopia. *Phytopathology*[®], *96*(5), 437–446. <https://doi.org/10.1094/phyto-96-0437>
- Abraham, A. D., Menzel, W., Varrelmann, M., & Vetten, H. J. (2009). Molecular, serological and biological variation among chickpea chlorotic stunt virus isolates from five countries of North Africa and West Asia. *Archives of Virology*, *154*(5), 791–799. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0374-0>
- Al-Shahwan, I. M., Abdalla, O. A., Al-Saleh, M. A., & Amer, M. (2017). Detection of new viruses in alfalfa, weeds and cultivated plants growing adjacent to alfalfa fields in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *24*(6), 1336–1343. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.022>
- Arli-Sokmen, M., Deligöz, İ., & Kutluk-Yılmaz, N. D. (2016). Characterization of Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus isolates in common bean growing areas in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, *146*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0886-x>
- Arruabarrena, A., Benitez-Galeano, M. J., Giambiasi, M., Bertalmío, A., Colina, R., & Hernández-Rodríguez, L. (2016). Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. *Journal of Virological Methods*, *237*, 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.011>
- Asif, S., Author_Id, N., Khan, M., Arshad, M., Shabbir, M. I., Author_Id, N., Author_Id, N., & Author_Id, N. (2021). PCR optimization for beginners: A Step by step guide. *Research in Molecular Medicine*, *9*(2), 81–102. <https://doi.org/10.32598/rmm.9.2.1189.1>
- Astier, S. (2007). *Principles of plant virology: Genome, pathogenicity, virus ecology*. CRC Press. (pp 22, 55, 103, 187, 246, 376)
- Avgelis, A., & Katis, N. I. (1989). Identification of alfalfa mosaic virus in Greek alfalfa crops. *Journal of Phytopathology*, *125*(3), 231–237. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1989.tb01064.x>
- Baradar, A., Hosseini, A., Ratti, C., & Hosseini, S. M. (2021). Phylogenetic analysis of a Bean yellow mosaic virus isolate from Iran and selecting the phylogenetic marker by comparing the individual genes and complete genome trees of BYMV isolates. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *114*, 101632. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101632>
- Beck-Okins, A. L., Del Río Mendoza, L. E., Burrows, M., Simons, K., & Pasche, J. S. (2022). Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) Risk analysis of field pea based on susceptibility, yield loss, and seed transmission. *Plant Disease*, *106*(3), 938–946. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-21-1349-re>
- Berger, P. A., & Parrish, J. C. (2011). Potyvirus. *Springer EBooks*, 1425–1437. https://doi.org/10.1007/978-0-387-95919-1_235
- Beuve, M., Stevens, M., Liu, H. Y., Wintermantel, W. M., Hauser, S., & Lemaire, O. (2008). Biological and molecular characterization of an american sugar beet-infecting beet western yellows virus isolate. *Plant Disease*, *92*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-1-0051>
- Bhoi, T. K., Samal, I., Majhi, P. K., Komal, J., Mahanta, D. K., Pradhan, A. K., Saini, V., Raj, M. C., Ahmad, M. A., Behera, P. P., & Ashwini, M. (2022). Insight into aphid mediated Potato Virus Y transmission: A molecular to bioinformatics prospective. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1001454>

- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., Van Der Vlugt, R., Bergervoet, J. H. W., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>
- Boubourakas, I. N., Avgelis, A. D., Kyriakopoulou, P. E. & Katis N. I. (2006). Occurrence of yellowing viruses (Beet pseudo-yellowing virus, Cucurbit yellow stunting disorder virus and Cucurbit aphid-borne yellows virus) affecting cucurbits in Greece. *Plant Pathology* 55, 276–283.
- Bouvaine, S., Boonham, N., & Douglas, A. E. (2011). Interactions between a luteovirus and the GroEL chaperonin protein of the symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* of aphids. *Journal of General Virology*, 92(6), 1467–1474. <https://doi.org/10.1099/vir.0.029355-0>
- Buzkan, N., Arpacı, B. B., Simon, V., Fakhfakh, H., & Moury, B. (2012). High prevalence of poleroviruses in field-grown pepper in Turkey and Tunisia. *Archives of Virology*, 158(4), 881–885. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1553-y>
- Chatzivassiliou, E. K. (2021). An annotated list of legume-infecting viruses in the light of metagenomics. *Plants*, 10(7), 1413. <https://doi.org/10.3390/plants10071413>
- Chatzivassiliou, E. K., Boubourakas, H., Winter, S., Lesemann, D. E., Avgelis, A. D., & Katis, N. I. (2002). Viruses infecting pea (*Pisum sativum* L.) crops in Greece. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, 82.
- Chatzivassiliou, E., Giakountis, A., Kumari, S. G., & 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(2), 239–252. https://doi.org/10.14601/phytopathol_mediterr-17866
- Chatzivassiliou, E., Livieratos, I. C., Katis, N. I., Avgelis, A., & Lykouressis, D. P. (1996). Occurrence of tomato spotted wilt virus in vegetables and ornamentals in Greece. *Acta Horticulturae*, 431, 44–50. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1996.431.3>
- Chatzivassiliou, E., Moschos, E., Gazi, S., Koutretsis, P., & Tsoukaki, M. (2008). Infection of potato crops and seeds with potato virus Y and potato leafroll virus in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 90(2), 253–261. <https://doi.org/10.4454/jpp.v90i2.660>
- Chomič, A., Pearson, M. N., Clover, G., Farreyrol, K., Saul, D., Hampton, J. G., & Armstrong, K. (2010). A generic RT-PCR assay for the detection of Luteoviridae. *Plant Pathology*, 59(3), 429–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02282.x>
- Chung, B. Y., Miller, W. A., Atkins, J. F., & Firth, A. E. (2008). An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5897–5902. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800468105>
- Corrêa, R. L., Silva, T. F., Simões-Araújo, J. L., Barroso, P. A. V., Vidal, M. S., & Vaslin, M. F. S. (2005). Molecular characterization of a virus from the family Luteoviridae associated with cotton blue disease. *Archives of Virology*, 150(7), 1357–1367. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0475-8>
- Coutts, B. A., Hawkes, J. R., & Jones, R. A. C. (2006). Occurrence of Beet western yellows virus and its aphid vectors in over-summering broad-leaved weeds and volunteer crop plants in the grainbelt region of south-western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(9), 975. <https://doi.org/10.1071/ar05407>
- D’Arcy, C. J., Torrance, L., & Martín, R. R. (1989). Discrimination among luteoviruses and their strains by monoclonal antibodies and identification of common epitopes. *Phytopathology*, 79(8), 869. <https://doi.org/10.1094/phyto-79-869>
- Davoodi, Z., Bejerman, N., Richet, C., Filloux, D., Kumari, S. G., Chatzivassiliou, E., Galzi, S., Julian, C., Samarfard, S., Trucco, V. M., Giolitti, F., Fiallo-Olivé, E., Navas-Castillo, J., Asaad, N., Moukahel, A., Hijazi,

- J., Mghandef, S., Heydarnejad, J., Massumi, H., Filloux, D. (2018). The Westward journey of Alfalfa leaf curl virus. *Viruses*, 10(10), 542. <https://doi.org/10.3390/v10100542>
- Delfosse, V. C., Barón, M. V. V., & Distéfano, A. J. (2021). What we know about poleroviruses: Advances in understanding the functions of polerovirus proteins. *Plant Pathology*, 70(5), 1047–1061. <https://doi.org/10.1111/ppa.13368>
 - Demetriades, S.D. & Catsimbas, C. (1968). Attaques et nouveaux ennemis signalés. *FAO Plant Protection Bulletin* 16, 10–11.
 - Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 1. <https://doi.org/10.3791/2565>
 - Distéfano, A. J., Bonacic Kresic, I., & Hopp, H. E. (2010). The complete genome sequence of a virus associated with cotton blue disease, cotton leafroll dwarf virus, confirms that it is a new member of the genus Polerovirus. *Archives of Virology*, 155(11), 1849–1854. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0764-3>
 - Domier, L. L., McCoppin, N. K., Larsen, R., & D'Arcy, C. J. (2002). Nucleotide sequence shows that Bean leafroll virus has a Luteovirus-like genome organization. *Journal of General Virology*, 83(7), 1791–1798. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-7-1791>
 - Du, Z., Chen, J., & Hiruki, C. (2006). Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. *Plant Disease*, 90(2), 185–189. <https://doi.org/10.1094/pd-90-0185>
 - El-Muadhidi, M. A., Makkouk, K. M., Kumari, S. G., Jerjess, M., Murad, S. S., Mustafa, R. R., & Tarik, F. (2001). Survey for legume and cereal viruses in Iraq. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), 224–233. https://doi.org/10.14601/phytopathol_mediterr-1639
 - Farooq, T., Hussain, M. D., Shakeel, M. T., Riaz, H., Waheed, U., Siddique, M., Shahzadi, I., Aslam, M. N., Tang, Y., She, X., & He, Z. (2022). Global genetic diversity and evolutionary patterns among Potato leafroll virus populations. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1022016>
 - Feng, X., Poplawsky, A. R., Op, N., Myers, J. R., & Karasev, A. V. (2014). Recombinants of *Bean common mosaic virus* (BCMV) and genetic determinants of BCMV involved in overcoming resistance in common bean. *Phytopathology*, 104(7), 786–793. <https://doi.org/10.1094/phyto-08-13-0243-r>
 - Fereres, A., & Racciah, B. (2015). Plant virus transmission by Insects. *eLS*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000760.pub3>
 - Filardo, F., Nancarrow, N., Kehoe, M. A., McTaggart, A. R., Congdon, B., Kumari, S. G., Aftab, M., Trębicki, P., Rodoni, B., Thomas, J. M., & Sharman, M. (2021). Genetic diversity and recombination between turnip yellows virus strains in Australia. *Archives of Virology*, 166(3), 813–829. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04931-w>
 - Filardo, F., Thomas, J. M., Webb, M. L., & Sharman, M. (2019). Faba bean polerovirus 1 (FBPV-1); a new polerovirus infecting legume crops in Australia. *Archives of Virology*, 164(7), 1915–1921. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04233-w>
 - Fotopoulos V, Dovas C I, Katis N I, 2011. Incidence of viruses infecting spinach in Greece, highlighting the importance of weeds as reservoir hosts. *Journal of Plant Pathology*. 93 (2), 389-395. <http://sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/1194>
 - Gadhawe, K. R., Gautam, S., Rasmussen, D. A., & Srinivasan, R. (2020). Aphid transmission of potyvirus: the largest plant-infecting rna virus genus. *Viruses*, 12(7), 773. <https://doi.org/10.3390/v12070773>
 - Garcia-Ruiz, H., Holste, N. M., & LaTourrette, K. (2021). Poleroviruses (Luteoviridae). *Encyclopedia of Virology*, 594–602. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.21343-5>

- Gibbs, A. J., & Ohshima, K. (2010). Potyviruses and the digital revolution. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 205–223. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114404>
- Gibbs, A. J., Hajizadeh, M., Ohshima, K., & Jones, R. (2020). The Potyviruses: An evolutionary synthesis is emerging. *Viruses*, 12(2), 132. <https://doi.org/10.3390/v12020132>
- Ha, C., Coombs, S. J., Revill, P., Harding, R., Vu, M., & Dale, J. (2008). Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives of Virology*, 153(1), 25–36. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1053-7>
- Hall, R. (2005). *Compendium of bean diseases*. (Issue 1). <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BB01117558>
- Hema, M., Sreenivasulu, P., Patil, B. C., Kumar, P. S., & Reddy, D. N. (2014). Tropical food legumes. In *Advances in Virus Research* (pp. 431–505). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801246-8.00009-3>
- Hull, R. (2013). *Plant Virology*. Academic Press. (pp. 30, 148, 164 456, 688, 701, 793, 811, 931, 954, 1019).
- Inoue-Nagata, A. K., Jordan, R., Kreuze, J., Li, F., López-Moya, J. J., Mäkinen, K., Ohshima, K., & Wylie, S. J. (2022). ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae 2022. *Journal of General Virology*, 103(5). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001738>
- Iqbal, A., Khalil, I. H., Ateeq, N., & Khan, M. S. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.011>
- Jaag, H. M., Kawchuk, L., Rohde, W., Fischer, R., Emans, N., & Prüfer, D. (2003). An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), 8939–8944. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332697100>
- Jha, U. C., Nayyar, H., Chattopadhyay, A., Beena, R., Lone, A. A., Naik, Y. D., Thudi, M., Prasad, P. V. V., Gupta, S., Dixit, G. P., & Siddique, K. H. M. (2023). Major viral diseases in grain legumes: designing disease resistant legumes from plant breeding and OMICS integration. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1183505>
- Jordan, R. L., & Hammond, J. (2008). Bean common mosaic virus and bean common mosaic necrosis virus. In *Elsevier eBooks* (pp. 288–295). <https://doi.org/10.1016/b978-012374410-4.00559-8>
- Kaiser, W. C. (1973). Biology of Bean Yellow Mosaic and Pea Leaf Roll Viruses affecting *Vicia faba* in Iran. *Journal of Phytopathology*, 78(3), 253–263. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1973.tb04175.x>
- Kanani, P., Shukla, Y., Modi, A., Subhash, N., & Kumar, S. (2019). Standardization of an efficient protocol for isolation of RNA from *Cuminum cyminum*. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.12.008>
- Knierim, D., Deng, T. C., Tsai, W. S., Green, S. K., & Kenyon, L. (2010). Molecular identification of three distinct Polerovirus species and a recombinant Cucurbit aphid-borne yellows virus strain infecting cucurbit crops in Taiwan. *Plant Pathology*, 59(5), 991–1002.
- Knierim, D., Tsai, W. S., & Kenyon, L. (2013). Analysis of sequences from field samples reveals the presence of the recently described pepper vein yellows virus (genus Polerovirus) in six additional countries. *Archives of Virology*, 158(6), 1337–1341. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1598-y>
- Kumari, S. G., Moukahel, A. R., Hamed, A. A., & Sharman, M. (2018). First report of cucurbit aphid-borne yellows virus affecting chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Sudan. *Plant Disease*, 102(10), 2048–2048. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-18-0347-pdn>
- Kyrychenko, A., Is, S., & Mishchenko, L. (2019). BCMV-ukr: isolate of bean common mosaic virus revealed in Ukraine. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52(11–12), 1005–1017. <https://doi.org/10.1080/03235408.2019.1688448>

- LaTourrette, K., Holste, N. M., & Garcia-Ruiz, H. (2021). Polerovirus genomic variation. *Virus Evolution*, 7(2). <https://doi.org/10.1093/ve/veab102>
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O., & Herrbach, E. (1992). A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology*, 41(6), 749–761. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1992.tb02559.x>
- Lecoq, H., Desbiez, C., & Schoeny, A. (2022, January 7). Cucurbit aphid-borne yellows virus (Cucurbit aphid-borne yellows). CABI Compendium. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.110067>
- López-Moya, J. J., & García, J. A. (1999). Potyviruses (Potyviridae). *Elsevier eBooks*, 1369–1375. <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0229>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain Reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Lotos, L., Efthimiou, K., Maliogka, V. I., & Katis, N. I. (2014). Generic detection of poleroviruses using an RT-PCR assay targeting the RdRp coding sequence. *Journal of Virological Methods*, 198, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.12.007>
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19932330933>
- Lotos, L., Tsialtas, I. T., Katis, N. I., & Maliogka, V. I. (2021). First report of bean leafroll virus (BLRV) naturally infecting common and bitter vetch and alfalfa in Greece. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00801-9>
- Ma, Z., Huang, B., Xu, S., Chen, Y., Li, S., & Lin, S. (2015). Isolation of high-quality total RNA from Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook). *PLOS ONE*, 10(6), e0130234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130234>
- Mabele, A. S., Muyekho, F. N., & Were, H. K. (2022). First report of cucurbit aphid-borne yellows virus infecting groundnut in Kenya. *Plant Health Progress*. <https://doi.org/10.1094/php-08-22-0071-rs>
- Mainkar, P., Jayaswal, D., Kumar, D., Jayaswal, K., Jaiswal, S., Singh, A. K., Kumar, S., & Kansal, R. (2023). Development of modified CTAB and Trizol protocols to isolate high molecular weight (HMW) RNA from polyphenol and polysaccharides rich pigeonpea (*Cajanuscajan* (L.) Millsp. *PLOS ONE*, 18(12), e0291949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0291949>
- Makkouk, K. M., Kumari, S. G., & Aldaoud, R. (1992). Survey of viruses affecting lentil (*Lens culinaris* Med.) in Syria. *Phytopathologia Mediterranea*, 31(3), 188–190.
- Makkouk, K. M., & Kumari, S. G. (2009). Epidemiology and integrated management of persistently transmitted aphid-borne viruses of legume and cereal crops in West Asia and North Africa. *Virus Research*, 141(2), 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.12.007>
- Makkouk, K. M., Pappu, H. R., & Kumari, S. G. (2012). Virus diseases of peas, beans, and faba bean in the Mediterranean Region. *Elsevier eBooks*, 367–402. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394314-9.00011-7>
- Maphosa, Y., & Jideani, V. A. (2017). The Role of Legumes in Human Nutrition. In *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69127>
- Mayo, M. A., & Barker, H. (2003). Potato leafroll virus: a classic pathogen shows some new tricks. *Molecular Plant Pathology*, 4(2), 81–89. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00153.x>
- Miller, W. A. (1999). Luteovirus (Luteoviridae). In *Elsevier eBooks* (pp. 901–908). <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0170>
- Moreno, A., & Fereres, A. (2012). Virus diseases in lettuce in the Mediterranean basin. *Advances in Virus Research*, 247–288. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394314-9.00007-5>
- Mwaipopo, B., Nchimbi-Msolla, S., Njau, P. J. R., Mark, D., & Mbanzibwa, D. R. (2018). Comprehensive surveys of bean common mosaic virus and bean common mosaic necrosis virus and molecular evidence

for occurrence of other *Phaseolus vulgaris* viruses in Tanzania. *Plant Disease*, 102(11), 2361–2370. <https://doi.org/10.1094/pdis-01-18-0198-re>

- Nakaune, R., & Nakano, M. (2006). Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for the detection of grapevine viruses and viroids. *Journal of Virological Methods*, 134(1–2), 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.016>
- Orfanidou, C. G., Papayiannis, L. C., Pappi, P., Katis, N. I., & Maliogka, V. I. (2019). Criniviruses associated with cucurbit yellows disease in Greece and Cyprus: an ever-changing scene. *Plant Pathology*, 68(4), 764–774. <https://doi.org/10.1111/ppa.12986>
- Patil, B. L. (2021). Plant viral diseases: economic implications. In *Elsevier eBooks* (pp. 81–97). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.21307-1>
- Portillo, M., Fenoll, C., & Escobar, C. (2006). Evaluation of different RNA extraction methods for small quantities of plant tissue: Combined effects of reagent type and homogenization procedure on RNA quality-integrity and yield. *Physiologia Plantarum*, 128(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00716.x>
- Qin, J., Yin, Z., Shen, D., Chen, H., Chen, X., Cui, X., & Chen, X. (2021). Development of a recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick assay for rapid and sensitive detection of bean common mosaic virus. *Phytopathology Research*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s42483-021-00080-3>
- Radeva-Ivanova, V., Pasev, G., Lyall, R., Angelov, M., Nankar, A. N., & Kostova, D. (2022). First report of cucurbit aphid-borne yellows virus causing yellowing disease on pumpkin (*Cucurbita pepo*) and Cucumber (*Cucumis sativus*) in Bulgaria. *Plant Disease*, 106(9), 2538. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-21-2030-pdn>
- Radwan, D. E. M., Lu, G., Fayez, K. A., & Mahmoud, S. Y. (2008). Protective action of salicylic acid against bean yellow mosaic virus infection in *Vicia faba* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165(8), 845–857. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.07.012>
- Revers, F., Gall, O. L., Candresse, T., & Maule, A. J. (1999). New advances in understanding the molecular biology of Plant/Potyvirus interactions. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 12(5), 367–376. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1999.12.5.367>
- Revers, F., & García, J. A. (2015). Molecular Biology of Potyviruses. In *Advances in Virus Research* (pp. 101–199). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>
- Schliephake, E., Graichen, K., Rabenstein, F. (2000). Investigations on the vector transmission of the Beet mild yellowing virus (BMVYV) and the Turnip yellows virus (TuYV). *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*, 107(1):81-87. <https://www.jstor.org/stable/43215342>
- Sedhain, N. P., Bag, S., Morgan, K., Carter, R., Triana, P., Whitaker, J., Kemerait, R. C., & Roberts, P. M. (2021). Natural host range, incidence on overwintering cotton and diversity of cotton leafroll dwarf virus in Georgia USA. *Crop Protection*, 144, 105604. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105604>
- Sömera, M., Fargette, D., Hébrard, E., & Sarmiento, C. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Solemoviridae 2021. *Journal of General Virology*, 102(12). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001707>
- Stevens, M., Freeman, B., Liu, H. Y., Herrbach, E., & Lemaire, O. (2005). Beet poleroviruses: close friends or distant relatives? *Molecular Plant Pathology*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00258.x>
- Stevens, M., McGrann, G., Clark, B. (2008). Turnip yellows virus (syn Beet western yellows virus): an emerging threat to European oilseed rape production? <https://www.researchgate.net/publication/237460066>

- Stoddard, F. L. (2017). Grain legumes: an overview. In *CABI eBooks* (pp. 70–87). <https://doi.org/10.1079/9781780644981.0070>
- Tang, M., & Feng, X. (2022). Bean Common Mosaic Disease: Etiology, Resistance Resource, and Future Prospects. *Agronomy*, *13*(1), 58. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010058>
- Untiveros, M., Olsper, A., Artola, K., Firth, A. E., Kreuze, J., & Valkonen, J. P. T. (2016). A novel sweet potato potyvirus open reading frame (ORF) is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing. *Molecular Plant Pathology*, *17*(7), 1111–1123. <https://doi.org/10.1111/mpm.12366>
- Valli, A., Gallo, A., Rodamilans, B., López-Moya, J. J., & García, J. A. (2018). The HCPro from the *Potyviridae* family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. *Molecular Plant Pathology*, *19*(3), 744–763. <https://doi.org/10.1111/mpm.12553>
- Valli, A., García, J. A., & López-Moya, J. J. (2021). Potyviruses (Potyviridae). *Elsevier eBooks*, 631–641. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.21252-1>
- Van Den Heuvel, J. C., Hoffmann, K. a. M., & Van Der Wilk, F. (2011). Polerovirus‡. *Springer New York eBooks*, 827–831. https://doi.org/10.1007/978-0-387-95919-1_121
- Varveri, C. (2006). Epidemiology of Plum pox virus strain M in Greece. *EPPO Bulletin*, *36*(2), 276–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2006.00987.x>
- Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N., & Miller, W. A. (2012). Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLOS Pathogens*, *8*(4), e1002639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002639>
- Voisin, A., Guéguen, J., Huyghe, C., Jeuffroy, M., Magrini, M., Meynard, J. M., Mougél, C., Pellerin, S., & Pelzer, E. (2013). Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, *34*(2), 361–380. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0189-y>
- Wang, A. (2021). Cell-to-cell movement of plant viruses via plasmodesmata: a current perspective on potyviruses. *Current Opinion in Virology*, *48*, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.03.002>
- White, K. A. (2015). The polymerase slips and PIPO exists. *EMBO Reports*, *16*(8), 885–886. <https://doi.org/10.15252/embr.201540871>
- Worrall, E. A., Wamonje, F. O., Mukeshimana, G., Harvey, J., Carr, J. J., & Mitter, N. (2015). Bean common mosaic virus and bean common mosaic necrosis virus. In *Advances in Virus Research* (pp. 1–46). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.04.002>
- Wylie, S. J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., López-Moya, J. J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D. C., Wang, A., & Zerbin, F. M. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. *Journal of General Virology*, *98*(3), 352–354. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000740>
- Xiang, H. Y., Shang, Q. X., Han, C. G., Li, D. W., & Yu, J. L. (2008). Complete sequence analysis reveals two distinct poleroviruses infecting cucurbits in China. *Archives of Virology*, *153*(6), 1155–1160. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0083-0>
- Zhang, Z., Lanza, E., Kris-Etherton, P. M., Colburn, N. H., Bagshaw, D., Rovine, M. J., Ulbrecht, J. S., Bobe, G., Chapkin, R. S., & Hartman, T. J. (2010). A high legume low glycemic index diet improves serum lipid profiles in men. *Lipids*, *45*(9), 765–775. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3463-7>
- Zheng, L., Rodoni, B., Gibbs, M. T., & Gibbs, A. J. (2010). A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology*, *59*(2), 211–220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x>
- Zheng, L., Wayper, P. J., Gibbs, A. J., Fourment, M., Rodoni, B., & Gibbs, M. T. (2008). Accumulating Variation at Conserved Sites in Potyvirus Genomes Is Driven by Species Discovery and Affects Degenerate Primer Design. *PLOS ONE*, *3*(2), e1586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001586>

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Γαϊτάνης, Κ. (2020). Μοριακή παραλλακτικότητα ελληνικών απομονώσεων ιών του αρακά (*Pisum sativum*). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, σελ.: 53-55.
- Καστόρα, Δ. (2022). Παρουσία ιών που σχετίζονται με ικτέρους των ψυχανθών στην Ελλάδα και μοριακός χαρακτηρισμός του ιού του δυτικού ικτέρου των τεύτλων (beet western yellows virus, BWYV). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πτυχιακή Διατριβή, σελ.: 73-84.
- Κοκκίνης, Γ. (2002). Μελέτη των ιών που προσβάλουν είδη του γένους *Phaseolus*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Διδακτορική Διατριβή, σελ.: 24-30, 76, 84-85.
- Παπακώστα-Τασοπούλου, Δ. (2012). *Ειδική γεωργία: Σιτηρά και Ψυχανθή*. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, σελ.: 547, 615.
- Οικονόμου, Ν. (2018). Συχνότητα εμφάνισης κι επιδημιολογία ιών των ψυχανθών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πτυχιακή Διατριβή, σελ.: 41.
- Σαρέλη, Κ. (2015). Αφιδομεταδιδόμενοι ιοί των κουκιών στην Ελλάδα: Παρουσία και <https://doi.org/10.1094/rdis-06-21-1349-re>. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πτυχιακή Διατριβή, σελ.: 42-43.
- Σαρέλη, Κ., Γιακουντής, Α., Οικονόμου, Ν., Σίσκος, Λ., & Χατζηβασιλείου, Ε.Κ. (2016). Παρουσία και μοριακός χαρακτηρισμός των κυριότερων αφιδομεταδιδόμενων ιών των οσπρίων στην Ελλάδα. 18^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Πρόγραμμα και Περιλήψεις Εργασιών, Ηράκλειο, σελ.: 99.
- Σίσκος, Λ. (2015). Αφιδομεταδιδόμενοι ιοί του αρακά στην Ελλάδα: Παρουσία και μοριακή γενετική παραλλακτικότητα. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πτυχιακή Διατριβή, σελ.: 37-38.
- Σταυριανός, Σ (2013). Παρουσία σπορομεταδιδόμενων ιών σε καλλιέργειες φασολιάς στην Ελλάδα και μοριακός χαρακτηρισμός των ιών Bean common mosaic virus (BCMV) και Bean common mosaic necrosis virus (BCMNV). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πτυχιακή Διατριβή, σελ.: 35, 40,46.
- Τερζάκης, Μ. (2002). Μελέτη Σπορομεταδιδόμενων ιών των χορτοδοτικών ψυχανθών *Vicia sativa* και *Lathyrus cicera*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Διδακτορική Διατριβή σελ.: 24-28.
- Τσαπικούνη, Π. (2022). Παρουσία ιών που σχετίζονται με συμπτώματα μωσαϊκού σε ψυχανθή στην Ελλάδα και μοριακός χαρακτηρισμός του ιού του νανισμού της αραχίδας (peanut stunt virus, PSV). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πτυχιακή Διατριβή, σελ.: 54, 57.
- Χατζηβασιλείου, Ε.Κ., Γιακουντής, Α., & Σταυριανός, Σ. (2012). Ορολογική ανίχνευση και μοριακή ταυτοποίηση ιών των ψυχανθών. 16^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Πρόγραμμα και Περιλήψεις Εργασιών, Θεσσαλονίκη, σελ.: 89.

Εικόνες

- Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org, <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5365712>
- Jeffrey W. Lotz, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Bugwood.org, <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5384778>