

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



TECHNOLOGICAL
EDUCATIONAL
INSTITUTE *of* CRETE

DEPARTMENT *of* plant
production

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΙΩΝ ΣΕ
ΦΥΤΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ
ΑΜΥΝΑΣ»

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ 2013

Τ.Ε.Ι ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΙΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΜΥΝΑΣ»

ΜΑΡΙΑ ΠΕΠΟΝΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΝΙΚΩΝΑΣ ΒΑΣΙΛΑΚΟΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Β΄

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ 2013

ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΚΑΘ.

ΚΑΘ.

ΚΑΘ.

***ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΥ ΜΠΕΝΑΚΕΙΟΥ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ***

Αφιερωμένο στους γονείς μου...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας του τμήματος Φυτοπαθολογίας, στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Ερευνητή Β' Νίκωνα Βασιλάκο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό Ιολογίας και να προσπαθήσω να φέρω σε πέρας, όπως αποδείχθηκε, ένα πολύ δύσκολο έργο. Ευχαριστώ από καρδιάς την εξαδέλφη μου Μαρία για τις χρήσιμες πληροφορίες που μου έδωσε καθώς και για την αμέριστη συμπαράσταση της και στήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Χαρίδημο και Ειρήνη και στους δυο αδερφούς μου Στέλιο και Κώστα για την στήριξη, την κατανόηση και την αγάπη τους, την συμπαράστασή τους και την ηθική και οικονομική τους βοήθεια όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Ευχαριστώ θερμά από τα βάθη της καρδιάς μου.

*Με εκτίμηση,
Μαρία Πεπονάκη*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήσαμε την επίδραση της καταστολής διαφόρων πρωτεϊνών Dicer σε φυτά καπνού *Nicotiana benthamiana*, προσβεβλημένα από τρεις ιούς, τον ιό του πράσινου ποικολοχλωρωτικού μωσαϊκού της αγγουριάς (CGMMV), τον ιό του κροταλίσματος του καπνού, τροποποιημένο ώστε να εκφράζει τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (TRV-GFP) και τον ιό της ευλογίας της δαμασκηλιάς (PPV). Επιλέξαμε φυτά *N. benthamiana* για την ευκολία της παρακολούθησης των συμπτωμάτων και για το μικρό βιολογικό κύκλο τους. Από τους τρεις ιούς, οι δυο πρώτοι (CGMMV και TRV-GFP) κανονικά δεν προκαλούν συμπτώματα στο *N. benthamiana*, σε αντίθεση με τον PPV ο οποίος προκαλεί συμπτώματα, επειδή το είδος αυτό ανήκει στους πειραματικούς του ξενιστές.

Σκοπός της εργασίας ήταν η αξιολόγηση διαφόρων διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* με καταστολή των πρωτεϊνών DICER στην αντίδρασή τους στη μόλυνση με διάφορους ιούς (TRV-GFP, CGMMV, PPV) για να διαπιστωθεί ποιες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι σημαντικές για την άμυνα έναντι των παραπάνω ιών.

Χρησιμοποιήσαμε τη σίγηση RNA (RNA silencing), ένα μηχανισμό άμυνας των φυτών που περιλαμβάνει την καταστολή της έκφρασης ξένου προς τον οργανισμό γονιδιακού υλικού όπως το προερχόμενο από ιούς, καθώς και μεταθετά στοιχεία, μέσω ενός συγκεκριμένου μηχανισμού αποδόμησης του RNA. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε φυτά *N. benthamiana* με κατεσταλμένες τις πρωτεΐνες D1, D2, D3, D4, και το συνδυασμό των D2 και D4 (D2/4) για να παρατηρήσουμε πόσο σημαντικές είναι αυτές οι πρωτεΐνες για τη σίγηση του ιικού RNA στα φυτά αυτά. Εξετάσαμε 3 παράγοντες: α) τα συμπτώματα που εμφανίστηκαν σε φυτά με κατεσταλμένη μια ή δυο διαφορετικές πρωτεΐνες Dicer β) τον φθορισμό στην υπεριώδη ακτινοβολία των παραπάνω φυτών όταν μολύνονται με τον ιό TRV-GFP και γ) την εκτίμηση του τίτλου (συγκέντρωσης) των διαφόρων ιών με ημιποσοτική ELISA.

Από τα αποτελέσματα που πήραμε, είδαμε ότι η έλλειψη των πρωτεϊνών Dicer 2 και 4 είτε μόνων τους, είτε και των δυο ταυτόχρονα, επηρεάζει σημαντικά την σίγηση του

ικού RNA στα φυτά. Τα φυτά στα οποία έλειπαν οι πρωτεΐνες αυτές και είχαν μολυνθεί με τον TRV-GFP είχαν πολύ έντονο φθορισμό και συμπτώματα μωσαϊκού και παραμόρφωσης. Εκείνα που είχαν μολυνθεί με τον CGMMV παρουσίασαν ήπια συμπτώματα παραμόρφωσης, όταν τα αντίστοιχα φυτά αγρίου τύπου δεν παρουσίασαν κανένα σύμπτωμα. Αντίθετα, η μόλυνση με τον PPV δεν φάνηκε να επηρεάζεται σε ότι αφορά τη συμπτωματολογία και τη συγκέντρωση του ιού από την έλλειψη των Dicers.

Άρα τα συμπτώματα που εμφανίζονται στο *N. benthamiana* δεν εξαρτώνται μόνο από το είδος των Dicer που καταστέλλονται ή λειτουργούν, αλλά και από το είδος του ιού.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΙΟΥΣ	1
1.2	Ο ΙΟΥΣ ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΠΟΙΚΙΛΟΧΛΩΡΩΤΙΚΟΥ ΜΩΣΑΪΚΟΥ ΤΗΣ ΑΓΓΟΥΡΙΑΣ	2
1.2.1	Γενικά.....	2
1.2.2	Συμπτωματολογία	2
1.2.3	Το σωματίδιο του ιού	4
1.2.4	Μετάδοση.....	4
1.2.5	Αντιμετώπιση	5
1.3	Ο ΙΟΥΣ ΤΟΥ ΚΡΟΤΑΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ	5
1.3.1	Γενικά.....	5
1.3.2	Συμπτωματολογία	6
1.3.3	Οργάνωση γονιδιώματος	6
1.3.4	Αντιμετώπιση	7
1.4	Ο ΙΟΥΣ ΤΗΣ ΕΥΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΔΑΜΑΣΚΗΝΙΑΣ	7
1.4.1	Γενικά.....	7
1.4.2	Συμπτωματολογία	8
1.4.3	Οργάνωση γονιδιώματος	9
1.4.4	Μετάδοση.....	9
1.4.5	Αντιμετώπιση	10
1.5	ΣΙΓΗΣΗ RNA.....	10
1.6	Dicers.....	12
2	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	14
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15
3.1	Φυτά που χρησιμοποιήθηκαν και υϊκές απομονώσεις	15
3.2	Μηχανικές μολύνσεις.....	15
3.2.1	Μέθοδος ELISA.....	16
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	17
4.1	Αντίδραση των φυτών στον TRV-GFP	17
4.1.1	Διαφοροποίηση συμπτωμάτων	17
4.1.2	Διαφοροποίηση στον φθορισμό	18
4.1.3	Επίδραση στην συγκέντρωση του ιού.....	19

4.2	Αντίδραση των φυτών στον CGMMV.....	20
4.2.1	Διαφοροποίηση συμπτωμάτων	20
4.2.2	Επίδραση στην συγκέντρωση του ιού.....	20
4.3	Αντίδραση των φυτών στον PPV	21
4.3.1	Διαφοροποίηση συμπτωμάτων	21
4.3.2	Επίδραση στην συγκέντρωση του ιού.....	21
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	22
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	24

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΙΟΥΣ

Οι ιοί είναι σοβαρά παθογόνα των φυτών, επιβλαβή στη γεωργική παραγωγή. Έρχονται δεύτεροι αμέσως μετά τους μύκητες όσον αφορά στον αριθμό και στην οικονομική σημασία των προκαλούμενων ασθενειών. Φυτά τα οποία προσβάλλονται από ιούς παρουσιάζουν τόσο ποσοτική όσο και ποιοτική υποβάθμιση της παραγωγής, που κάποιες φορές οδηγεί σε ολοσχερή καταστροφή του φυτικού κεφαλαίου (Agris, 2005).

Οι ιοί είναι άθροισμα ενός ή περισσότερων πρότυπων γονιδιωματικών μορίων νουκλεϊνικών οξέων, που περιβάλλονται από ένα προστατευτικό κάλυμμα πρωτεΐνης ή λιποπρωτεΐνης και είναι ικανά να οργανώσουν και να ολοκληρώσουν την αναπαραγωγή τους μέσα στα κύτταρα του καταλλήλου ξενιστή (Agris, 2005; Τζάμος, 2004).

Η αναπαραγωγή των ιών:

- Είναι εξαρτημένη από τον κυτταρικό μηχανισμό συνθέσεως πρωτεϊνών.
- Οι ιοί προέρχονται από δεξαμενές απαραίτητων δομικών υλικών και όχι από δυαδική διαίρεση.
- Πραγματοποιείται σε διάφορες θέσεις όπως στο πρωτόπλασμα ή στον πυρήνα των κυττάρων.

Γενικά χαρακτηριστικά των ιών είναι το μέγεθος, η μορφολογία και η σύσταση του ιοσωματίου, η δομή του γονιδιώματος και το είδος του γενετικού υλικού (RNA, DNA), ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η σταθερότητα στο φυτικό χυμό, το σημείο θερμικής αδρανοποίησης και η τελική αραίωση, η κυτταροπαθολογία και ο τρόπος μετάδοσης καθώς και οι ορρολογικές σχέσεις με άλλους ιούς (Agris, 2005; Τζάμος, 2004).

1.2 Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΠΟΙΚΙΛΟΧΛΩΡΩΤΙΚΟΥ ΜΩΣΑΪΚΟΥ ΤΗΣ ΑΓΓΟΥΡΙΑΣ

1.2.1 Γενικά

Ο ιός του πράσινου ποικιλοχλωρωτικού μωσαϊκού της αγγουριάς (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) ανήκει στο γένος Tobamovirus που αποτελεί μία μεγάλη ομάδα ιών με μεγάλο εύρος ξενιστών. Γενικά, οι Tobamo-ιοί αποτελούνται από επιμήκη κυλινδρικά σωματίδια μήκους 300-310 nm και διαμέτρου 18 nm. Οι Tobamo-ιοί είναι πολύ σταθεροί ιοί. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το τυπικό είδος του γένους, ο ιός του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV), ο οποίος σε φυτικό υλικό μπορεί να διατηρήσει τη μολυσματικότητά του έως και 50 χρόνια (Silber and Burk, 1965). Οι ιοί του γένους αποτελούν απειλή για πολλά φυτά των οικογενειών Solanaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae και Malvaceae. Μεταδίδονται μηχανικά και με τον σπόρο (Gibbs, 1977).

Ο CGMMV αναφέρθηκε πρώτη φορά στην αγγουριά (*Cucumis sativus*) στη Μ. Βρετανία (Ainsworth, 1935). Ο CGMMV έχει εντοπιστεί στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα (Varveri *et al.*, 2002), όπως και στην Ινδία, Ιαπωνία, Πακιστάν, Ισραήλ, Κορέα και Σαουδική Αραβία.

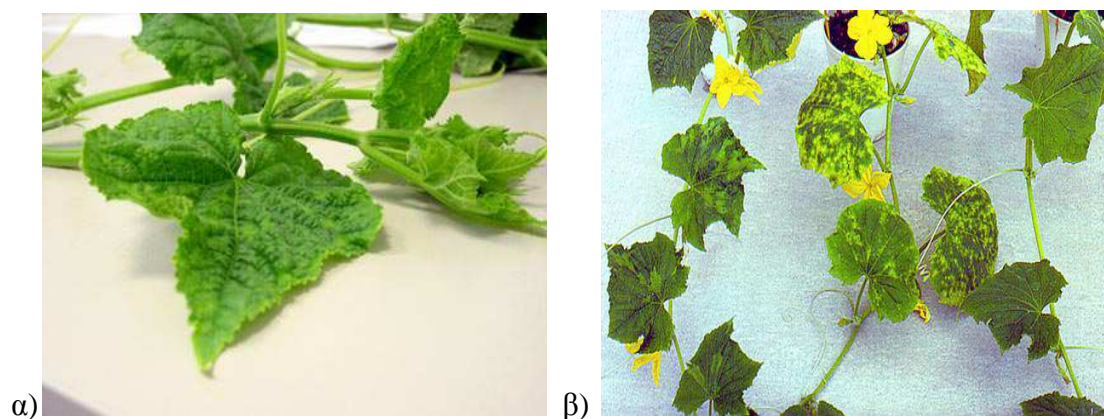
Ο ιός έχει κύκλο ξενιστών αποκλειστικά σχεδόν στην οικογένεια των κολοκυνθοειδών. Έτσι, μολύνει φυσικά την αγγουριά (*Cucumis sativus*), την καρπουζιά (*Citrullus vulgaris*), την πεπονιά (*Cucumis melo*) και την νεροκολοκυθιά (*Lagenaria siceraria*) η οποία χρησιμοποιείται σαν υποκείμενο της καρπουζιάς. Επίσης, στη φύση ο ιός έχει ανιχνευθεί και στην πικραγγουριά (*Ecballium elaterium*) (Antignus *et al.*, 2001).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο CGMMV διατηρεί τη μολυσματικότητά του στο έδαφος το λιγότερο για 10 μήνες, και επειδή συχνά χρησιμοποιείται η μέθοδος του εμβολιασμού στους καλλιεργούμενους ξενιστές του ιού, ο μολυσμένος σπόρος υποκειμένου αποτελεί σημαντικό παράγοντα διάδοσης της ασθένειας (Hollings *et al.*, 1975).

1.2.2 Συμπτωματολογία

Οι φυλές της αγγουριάς προκαλούν σοβαρά προβλήματα κυρίως στις αγγουριές θερμοκηπίου. Τα αρχικά συμπτώματα περιλαμβάνουν ελαφρύ

αποχρωματισμό και ζάρωμα των φύλλων, τα οποία καταλήγουν σε σκουροπράσινες ποικιλοχλώρωσεις και ελαφρές παραμορφώσεις. Ενίοτε, έχουμε ποικιλοχλώρωση και παραμόρφωση των προσβεβλημένων καρπών. Υπάρχουν και φυλές που προκαλούν στα φύλλα ανοιχτοκίτρινες κηλίδες με άσπρες γραμμές, δακτυλίους ή αστεροειδείς κηλίδες. Τα φυτά εμφανίζονται με καχεκτική ανάπτυξη. Συχνά εμφανίζεται πτώση καρπών, ενώ οι υπόλοιποι παραμένουν μικροί. Η μείωση της απόδοσης πολλές φορές φτάνει το 15%, ενώ το χειμώνα μπορεί να αγγίξει και το 30% (Hollings *et al.*,1975).



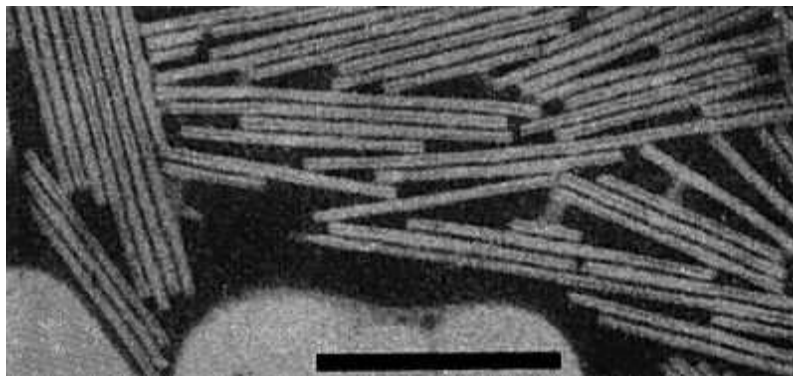
Εικόνα 1: Φυτά αγγουριάς μολυσμένα με τον ιό CGMMV με α) πράσινη ποικιλοχλώρωση και β) κίτρινο μωσαϊκό (aucuba)



Εικόνα 2: Συμπτώματα CGMMV σε φύλλα αγγουριάς

1.2.3 Το σωματίδιο του ιού

Το σωματίδιο του CGMMV αποτελείται από την καψιδιακή πρωτεΐνη και ένα μόριο RNA μονής θετικής αλυσίδας. Το 1991 δημοσιεύθηκε η πλήρης ανάλυση του γονιδιωματικού RNA του CGMMV και συγκεκριμένα της φυλής SH (Ugaki *et al.*, 1991). Το RNA διατάσσεται ελικοειδώς σε ακτίνα 40Å από τον κεντρικό άξονα με 49 υπομονάδες πρωτεΐνης ανά τρεις περιελίξεις της έλικας. Η καψιδιακή πρωτεΐνη αποτελείται από 160 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 17.261. Θεωρείται όξινη πρωτεΐνη και δεν περιέχει ιστιδίνη και τα αμινοξέα που περιέχουν θείο (μεθειονίνη και κυστεΐνη). Το γονιδιωματικό RNA του CGMMV περιέχει 6421 νουκλεοτίδια.



Εικόνα 3 : Ιοσωμάτια του CGMMV στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Hollings *et al.*, 1975)

1.2.4 Μετάδοση

Ο ιός μεταδίδεται μηχανικά και με τον σπόρο. Στη μετάδοση με τον σπόρο ο ιός εντοπίζεται στο εξωτερικό περίβλημα του σπόρου και πολύ σπάνια στο ενδοσπέρμιο. Η μετάδοση αυτή γίνεται σε ποσοστό 5-8%. Στην αγγουριά η μετάδοση του ιού με τον σπόρο ξεπερνά το 8% όταν η σπορά του γίνεται ένα μήνα μετά τη συγκομιδή του, ενώ μειώνεται στο 1% όταν ο σπόρος αποθηκεύεται για μήνες πριν από την σπορά. Ωστόσο, η διάδοσή του στην καλλιέργεια στηρίζεται κυρίως στη μετάδοση με την επαφή των μολυσμένων φύλλων με υγιή, με τις καλλιεργητικές φροντίδες (π.χ. μολυσμένα γεωργικά εργαλεία) και υπογείως με τις ρίζες, όταν τα φυτά φυτευτούν σε χώμα όπου δεν έχουν απομακρυνθεί μολυσμένα φυτικά υπολείμματα (Hollings *et al.*, 1975).

1.2.5 Αντιμετώπιση

Η καταπολέμηση του ιού, όπως και όλων των ιώσεων, βασίζεται σε προληπτικά μέτρα. Η πρόληψη ξεκινά από τη χρήση πιστοποιημένου, υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Εξάλλου, ενδείκνυται η χρήση πιστοποιημένων υποκειμένων καρπουζιάς, *L. siceraria* και *C. pepo* (Schmelzer & Wolf., 1975; Boubourakas *et al.*, 2004). Για σπόρους αγνώστου προελεύσεως πρέπει να ακολουθείται έκθεσή τους σε θερμοκρασίες 70°C για 3 ημέρες (Fletcher *et al.*, 1969) ή εμβάπτισή τους σε διάλυμα Na₃PO₄ για 3 ημέρες. Η χρήση της τελευταίας μεθόδου στην Πελοπόννησο είχε ως αποτέλεσμα τη μη επανεμφάνιση της ιώσεως αλλά πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή καθώς μπορεί να παρουσιαστούν προβλήματα στο φύτρωμα των σπόρων. Στον αγρό πρέπει να γίνεται απολύμανση του σκελετού του θερμοκηπίου, των εργαλείων, υλικών και χεριών με ψεκασμό ή εμβάπτιση σε Teepol ή διαλύματα Na₃PO₄. Καλό είναι επίσης, όσο είναι δυνατό, να αποφεύγονται οι χειρισμοί που προκαλούν τραυματισμούς στα φυτά.

1.3 Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΚΡΟΤΑΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ

1.3.1 Γενικά

Ο ιός του κροταλίσματος του καπνού (*Tobacco rattle virus*, TRV) είναι το τυπικό μέλος του γένους *Tobravirus*. Οι ιοί του γένους *Tobravirus* εκτός του TRV είναι ο *Pea early browning virus* (PEBV) και ο *Pepper ring-spot virus* (PeprRSV) και μεταδίδονται στα φυτά με νηματώδεις των γενών *Trichodorus* και *Paratrichodorus* (Robinson, 2003).

Περισσότερα από 400 είδη φυτών είναι γνωστά πως είναι ευπαθή σε προσβολή από τον TRV, που έχει έναν από τους πιο ευρείς κύκλους ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων αρκετών σημαντικών εμπορικών καλλιεργειών όπως πατάτας, λαχανικών, καπνού και καλλωπιστικών. Στην Ελλάδα παρουσιάστηκε ζημιά από τον TRV σε καπνά στο νομό Πιερίας το 1987 σε ποσοστό 50-80% (Μπεμ, 1987). Ο ιός είναι ευρέως διαδεδομένος στην Ανατολική και Δυτική Ευρώπη, στη Ρωσία και στη Βόρεια Αμερική και έχει επίσης αναφερθεί από την Κίνα, την Βραζιλία, την Ιαπωνία και τη Νέα Ζηλανδία (Κατής και Αυγελής, 1997; Zheng *et al.*, 1990).



Εικόνα 4 : Συμπτώματα TRV σε καπνό (*N. tabacum*)

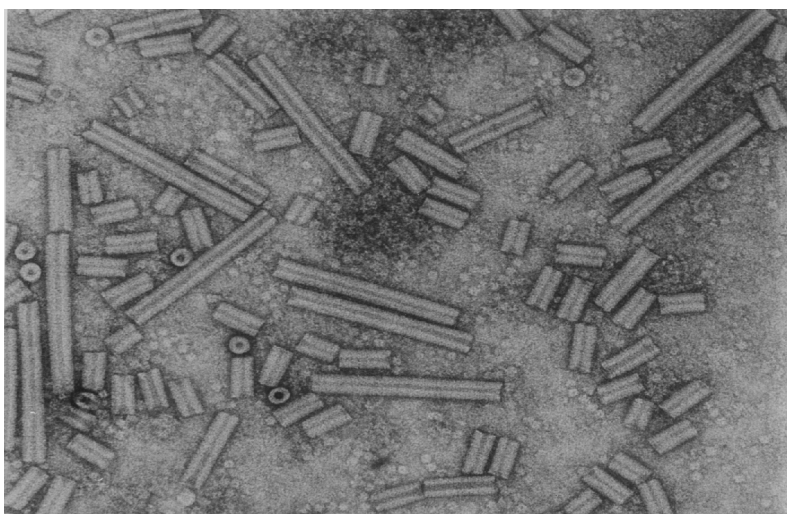
1.3.2 Συμπτωματολογία

Ο TRV προκαλεί μικρές, 1-20 χιλ., σκούρες καφέ κηλίδες στη σάρκα των κονδύλων της πατάτας και γρήγορη ξήρανση των φύλλων. Η νέκρωση των φύλλων είναι τοπική και όχι τόσο ευρεία όσο η ζημιά που προκαλείται από τον ιό Y της πατάτας (*Potato virus Y, PVY*). Τα συμπτώματα στα φύλλα εύκολα συγχέονται με τα συμπτώματα του PVY, αλλά δεν υπάρχουν μαυρισμένα νεύρα στα γειτονικά φύλλα. Τα συμπτώματα στον κόνδυλο είναι παρόμοια με τις φυσιολογικές κηλίδες σκουριάς, αλλά οι κηλίδες που προκαλούνται από τον ιό TRV είναι πολύ πιο σκούρες (Robinson, 2003).

1.3.3 Οργάνωση γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του TRV αποτελείται από δύο τμήματα RNA μονής αλυσίδας και θετικής πολικότητας, τα RNA1 και RNA2. Τα RNA1 και RNA2 περιέχονται σε ραβδόμορφα ιικά σωματίδια, με διάμετρο περίπου 23nm και δύο επικρατέστερα μήκη, μακριά (L – particles, 180 – 210 nm) που περιέχουν το RNA1 και κοντά (S – particles, 45 – 115 nm) που περιέχουν το RNA2. Οι υπομονάδες της καψιδιακής πρωτεΐνης του TRV αναπτύσσουν μια σταθερή ελικοειδή διάταξη παρόμοια με αυτή

του TMV με το αμινικό και το καρβοξυλικό άκρο τους τοποθετημένο στην εξωτερική πλευρά του ιοσωματίου (Goulden *et al.*, 1992).



Εικόνα 5: Ραβδόμορφα ιϊκά σωματίδια του TRV τα οποία διακρίνονται σε κοντά και μακριά (Robinson, 2003).

1.3.4 Αντιμετώπιση

Στα καπνά πρέπει να γίνεται η εγκατάσταση της φυτείας αποφεύγοντας μολυσμένα αγροτεμάχια, να γίνεται σωστός καθαρισμός των καλλιεργητικών εργαλείων από χώματα, καθώς και να αποφεύγεται η μεταφορά χωμάτος από αγρούς με νηματώδεις-φορείς. Η σωστή καταπολέμηση νηματωδών φορέων είναι απαραίτητη, όπως και η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών. Στην πατάτα συνιστάται η επιμελής ζιζανιοκτονία και η καλλιέργεια ειδών που δεν ευνοούν τους νηματώδεις (Κατής και Αυγελής 1997)

1.4 Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΕΥΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΔΑΜΑΣΚΗΝΙΑΣ

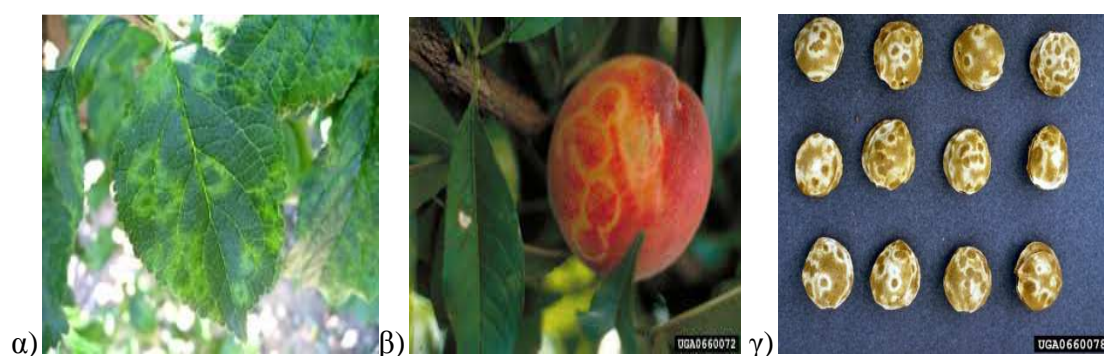
1.4.1 Γενικά

Ο ιός της ευλογιάς της δαμασκηνιάς (*Plum pox virus*, PPV), γένος *Potyvirus*, αποτελεί τον καταστροφικότερο ιό των πυρηνοκάρπων (βερικοκιάς, ροδακινιάς, δαμασκηνιάς, νεκταρινιάς, κερασιάς, βυσσινιάς). Ως παθογόνο αίτιο της ίωσης

σάρκας των πυρηνοκάρπων, προκαλεί σημαντική μείωση της παραγωγής και καθιστά τους καρπούς μη εμπορεύσιμους με αλλοιώσεις της εξωτερικής εμφάνισης και της εσωτερικής φυσικής και χημικής σύστασής τους. Το 2005 ο αριθμός των μολυσμένων δένδρων στην Ευρώπη υπολογίζονταν στα 100 εκ (Glasa & Candresse, 2005).

1.4.2 Συμπτωματολογία

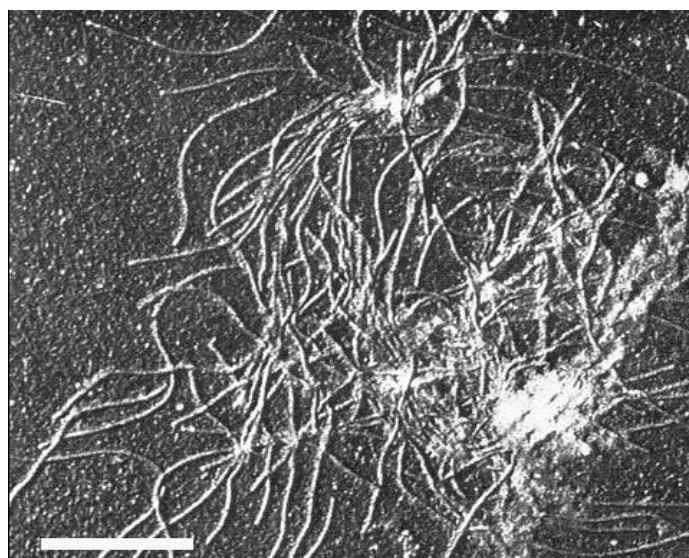
Τα συμπτώματα του ιού εξαρτώνται από το είδος του ξενιστή και την ποικιλία, από το στέλεχος του ιού, και από την εποχή και τοποθεσία της καλλιέργειας. Τα συμπτώματα του ιού στα φύλλα είναι τυπικές χλωρωτικές κηλίδες, κηλίδες σαν λαδιές, χλωρωτικά σχέδια όπως δακτύλιοι και ζώνες. Τα συμπτώματα εμφανίζονται στα νεαρά φύλλα και είναι ευδιάκριτα στο διάχυτο φως. Ανάλογα με το γένος του ξενιστή, οι κηλίδες στον καρπό έχουν διαφορετική υφή και μέγεθος. Συχνά εκρέει ρητίνη. Οι προσβεβλημένοι ιστοί βαθουλώνουν. Σχέδια εμφανίζονται στο μέρος της σάρκας που έρχεται σε επαφή με το κουκούτσι, και κυρίως κόκκινοι κόμποι σαν σκουριά. Στους περισσότερους καρπούς τα επιφανειακά συμπτώματα είναι χαρακτηριστικά. Τα φύλλα και οι καρποί παραμορφώνονται. Το κουκούτσι αποκτά σχέδια σε σχήμα δέρματος λεοπάρδαλης, ή καφέ δικτυωτό. Στα υπερευαίσθητα είδη επηρεάζεται και ο φλοιός, που σπάζει (Glasa & Candresse, 2005).



Εικόνα 6: α) Δακτυλιοειδείς χλωρωτικές κηλίδες σε φύλλο δαμασκηιάς προσβεβλημένο με τον PPV, β) καρπός ροδακινιάς με κίτρινα δαχτυλίδια (ποικιλόχρωση), γ) κηλίδωση σε πυρήνες βερικοκιάς.

1.4.3 Οργάνωση γονιδιώματος

Οι ιοί του γένους *Potyvirus*, διαθέτουν μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA το οποίο συνδέεται στο 5' άκρο του με την ιϊκή πρωτεΐνη διακυτταρικής μετακίνησης (VPg). Το ισωμάτιο είναι μονό, νηματόμορφο, ελαφρώς εύκαμπτο, μεγέθους 15x750 nm. Η μετάδοση με αφίδες με μη έμμονο τρόπο γίνεται μόνο παρουσία μιας βοηθητικής πρωτεΐνης η οποία κωδικοποιείται από τον ιό (Stam *et al.*, 1993). Για επιτυχημένη μεταφορά του ιού οι αφίδες πρέπει να έχουν πρόσβαση στην βοηθητική πρωτεΐνη πριν ή ταυτόχρονα με τα ισωμάτια, γεγονός που σημαίνει ότι η βοηθητική πρωτεΐνη έχει το ρόλο συνδέσμου ή γέφυρας μεταξύ των ισωματίων και των στίλετων της άνω γνάθου των εντόμων (Sasaya *et al.*, 2000).



Εικόνα 7: Ισωμάτια του PPV στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (H. B.Schmidt: Kegler and Schade, 1971)

1.4.4 Μετάδοση

Ο ιός μεταδίδεται με τουλάχιστον 20 είδη αφίδων-φορέων κυρίως την άνοιξη και το φθινόπωρο με μη έμμονο τρόπο. Η μετάδοση γίνεται συνήθως όχι στα διπλανά δένδρα αλλά σε αυτά που είναι λίγο απομακρυσμένα (Βαρβέρη, 2003). Η εξάπλωση της ασθένειας σε μεγάλες αποστάσεις γίνεται με τη διακίνηση μολυσμένου αγενούς πολλαπλασιαστικού υλικού (εμβόλια, εμβολιασμένα ή αυτόρριζα δενδρύλλια) (Kegler and Schade, 1971; Glasa and Candresse, 2005).

1.4.5 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση της ασθένειας στη χώρα μας, όπου αυτή έχει έντονα επιδημικό χαρακτήρα, είναι πολύ δύσκολη. Συνιστάται η χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (πιστοποιημένου) ακόμη και σε μολυσμένες περιοχές μετά την εγκατάσταση, η εκρίζωση των νεοεμφανισθέντων μολυσμένων δένδρων όταν η μόλυνση δεν ξεπερνά το 30%, η καταπολέμηση των αφίδων χωρίς ωστόσο να αναστέλλεται η εξάπλωση του ιού, και η χρησιμοποίηση ανεκτικών ποικιλιών. Στον τελευταίο αυτόν τομέα της γενετικής βελτίωσης με κλασικές και σύγχρονες μεθόδους γίνεται έντονη έρευνα στην Ελλάδα και διεθνώς (Karayiannis, 2006; Manganaris *et al.*, 2003; Varveri, 2004;)

1.5 ΣΙΓΗΣΗ RNA

Η σίγηση RNA (RNA silencing) είναι ένας συντηρημένος μηχανισμός αποδόμησης του RNA εξειδικευμένος ως προς την ακολουθία νουκλεοτιδίων. Αναφέρεται γενικά στο μετα-μεταγραφικό έλεγχο της έκφρασης γονιδίων που έχει παρατηρηθεί σε φυτά, μύκητες αλλά και στα ζώα, και περιλαμβάνει την καταστολή ξένου προς τον οργανισμό γονιδιακού υλικού όπως ιοί και μεταθετά στοιχεία, μέσω ενός συγκεκριμένου μηχανισμού αποδόμησης RNA. Επειδή ο μηχανισμός αυτός γίνεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, δηλαδή έχουμε μεταγραφή και στη συνέχεια αυξημένη αποδόμηση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) λέγεται και μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση ή σίγηση (Post-transcriptional gene silencing, PTGS). Ειδικότερα στα φυτά η σίγηση RNA αποτελεί τον βασικό μηχανισμό άμυνας ενάντια στους ιούς ενώ τελευταία πειραματικά δεδομένα δείχνουν την εμπλοκή της RNAi και στην αλληλεπίδραση των φυτών με φυτοπαθογόνα βακτήρια και μύκητες.

Η σίγηση RNA ενεργοποιείται ως αντίδραση στην ύπαρξη διπλής αλυσίδας RNA (dsRNA). Οι ιοί, καθώς και διαγονίδια που έχουν εισαχθεί ως αντίστροφες επαναλήψεις μπορούν απευθείας να παράγουν dsRNA, ενώ υψηλά μεταγραφόμενα διαγονίδια μονής εισδοχής παράγουν μη φυσιολογικά μεταγραφήματα που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την παραγωγή dsRNA. Στη συνέχεια, το dsRNA γίνεται στόχος για μια εξειδικευμένη dsRNA ριβονουκλεάση η οποία παράγει μικρά εμπλεκόμενα RNAs (small interfering, siRNAs) τα οποία λειτουργούν ως οδηγοί για την εξειδικευμένη αποδόμηση ομόλογων RNAs από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο νουκλεάσης (Ding *et al.*, 2004).

Χαρακτηριστικό της RNA σίγησης είναι η δημιουργία διασυστηματικού σήματος και η ενεργοποίηση του μηχανισμού και σε ιστούς απομακρυσμένους από αυτούς που πρώτο-ενεργοποιήθηκε ο μηχανισμός.

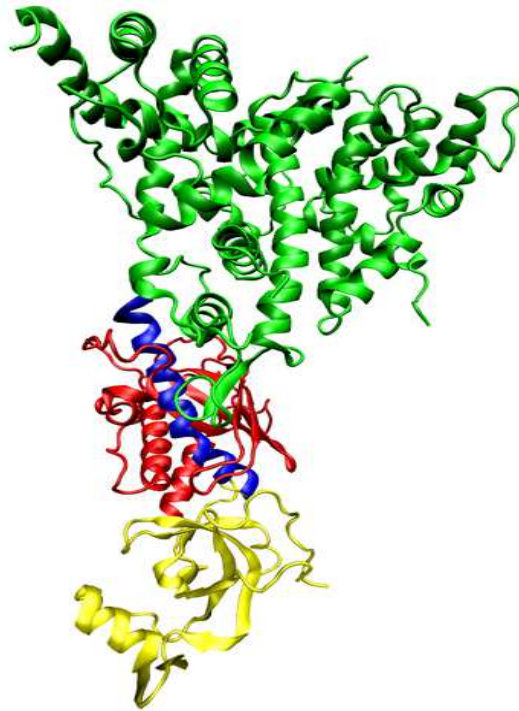
Ο μηχανισμός της σίγησης RNA που επάγεται από dsRNA περιλαμβάνει δυο βήματα: το εναρκτήριο βήμα και το βήμα υλοποίησης. Το εναρκτήριο βήμα περιλαμβάνει τον τεμαχισμό του dsRNA σε siRNAs μήκους 21-26 νουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στην κωδική και αντικωδική αλυσίδα του γονιδίου στόχου. Τα dsRNAs πέπτονται μέσω εξειδικευμένων dsRNA ριβονουκλεασών, που ονομάζονται Dicer Like από τα γονίδια Dicer της *Drosophilla melanogaster* (Tang *et al.*, 2003, Hamilton *et al.*, 2002). Στο βήμα υλοποίησης, τα siRNAs αποδιατάσσονται και ενσωματώνονται σε ένα σύμπλοκο σίγησης που επάγεται από το RNA (RNA-induced silencing complex, RISC), το οποίο περιέχει τουλάχιστον ένα μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Αργοναύτες. Η μονή αλυσίδα κλώνος siRNA που μένει είναι ένα αντινοσηματικό/μη κωδικευόμενο RNA συμπληρωματικό με το mRNA στόχο. Το siRNA καθοδηγεί το σύμπλοκο RISC στο συμπληρωματικό mRNA στόχο, το οποίο κόβεται στη περιοχή που έχει υβριδιστεί με το siRNA και αποδομείται. Οι πιο σύγχρονες μελέτες αναφέρονται στο βιοχημικό μονοπάτι των microRNAs (miRNAs) τα οποία είναι μικρά μονόκλιωνα μόρια RNA μήκους 21 νουκλεοτιδίων, και των οποίων ο ρόλος φαίνεται να είναι όχι η αποδόμηση του mRNA, αλλά η παρακώλυση της διαδικασίας μετάφρασης. Η σίγηση RNA δε δρα μόνο στους ιστούς του φυτού όπου ενεργοποιείται αρχικά. Η αρχή, βέβαια, γίνεται με τη αποδόμηση του dsRNA των ιών αλλά και συγγενικών mRNAs, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλου αριθμού siRNAs. Στη συνέχεια, ενεργοποιείται ένα διασυστηματικό σήμα αποδόμησης ομόλογων mRNAs και στα απομακρυσμένα κύτταρα, το οποίο οφείλεται στα siRNAs ή τα dsRNAs που κινούνται μέσω των πλασμοδεσμάτων μεταξύ των γειτονικών κυττάρων και μέσω του φλοιώματος στα πιο απομακρυσμένα.

1.6 Dicers

Οι Dicers (DCLs) αποτελούν μια μικρή οικογένεια πρωτεϊνών στα φυτά των οποίων ο χρόνος διαφοροποίησης ανάγεται στην εμφάνιση των βρύων (*Physcomitrella patens*). Οι DCLs είναι πανταχού παρούσες, αλλά όχι ομοιόμορφα εκφραζόμενες στους διάφορους ιστούς, στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, αλλά και κατά την αντιμετώπιση περιβαλλοντικών καταπονήσεων. Ωστόσο, διακριτά προφίλ έκφρασης για όλες τις DCL διαπιστώθηκαν κατά την ανάπτυξη των αναπαραγωγικών οργάνων, λουλουδιών και σπόρων. Οι αποκρίσεις των DCL στην ξηρασία, το κρύο, και το αλάτι είναι αρκετά διαφορετικές, ένδειξη ότι τα φυτά μπορεί να έχουν εξειδικευμένο ρυθμιστικό μηχανισμό για την αντιμετώπιση διαφορετικών αβιοτικών πιέσεων (Liu *et al.*, 2009).

Η Dicer είναι μια ενδοριβονουκλεάση (ένζυμο που κόβει νουκλεοξέα εσωτερικά) της οικογένειας των RNασών III (ένζυμα που κόβουν RNA) η οποία κόβει τα dsRNA και πρόδρομα μόρια των microRNA (miRNA) σε siRNAs, μήκους περίπου 20-25 νουκλεοτιδίων, συνήθως με δυο προεξοχές μήκους 2 βάσεων στο άκρο 3' των αλυσίδων τους. Η Dicer περιέχει δυο τόπους όπου εστιάζεται η λειτουργία της ως RNase III (πράσινες περιοχές, Εικόνα 9), την "πλατφόρμα" πρόσδεσης του dsRNA (dsRBD, κόκκινη περιοχή) και μια περιοχή που λέγεται PAZ, σημαντική για την πρόσδεση μονόκλωνων RNA (Εικόνα 9). Αυτές οι περιοχές θεωρείται ότι λειτουργούν στη δέσμευση και διάσπαση του dsRNA. Η απόσταση μεταξύ της RNase III και της PAZ ορίζεται από το μήκος και τη γωνία της έλικας που τα συνδέει (μπλε) και μπορεί να επηρεάσει το μήκος των παραγόμενων siRNAs (Macrae *et al.*, 2006)

Η Dicer διευκολύνει το σχηματισμό του συμπλέγματος της σίγησης που επάγεται από RNA (RNA-induced silencing complex, RISC), του οποίου το καταλυτικό συστατικό, η πρωτεΐνη Αργοναύτης, είναι μια ενδοριβονουκλεάση ικανή να διασπά αγγελιοφόρο RNA (mRNA) (Liu *et al.*, 2009; Macrae *et al.*, 2006; Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009).



Εικόνα 8: Η Dicer του σκόληκα *Giardia intestinalis* (Από Macrae *et al.*, 2006)

Κάθε Dicer επεξεργάζεται το dsRNA σε διάφορα κλάσματα και μεγέθη: η DCL-2 παράγει siRNAs 22nt, η DCL-3 siRNAs 24nt και η DCL-4 siRNAs 21nt (Donoyer *et al.*, 2005; Donaire *et al.*, 2008). Κάθε Dicer είναι γνωστό ότι έχει έναν ιδιαίτερο ρόλο στο μηχανισμό του RNAi. Το dsRNA κόβεται από τη DCL4 σε μια σταδιακή αντίδραση που μπορεί να γίνει από τη DCL2 όταν η DCL4 είναι απενεργοποιημένη. Οι DCL2 και DCL4 επίσης εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό στην προκαλούμενη από RNA και μεσολαβούμενη από dsRNA γενετική παρεμπόδιση που χρησιμοποιείται και για πειραματική καταστολή γονιδίων στα φυτά (Liu *et al.*, 2009; Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009).

Πιο αναλυτικά, οι DCLs στην αραβίδοψη επεξεργάζονται διαφορετικά το dsRNA διαφόρων ιών. Η DCL4 προγραμματίζει ένα σύμπλοκο παραγόντων αντιϊκής ανοσίας και παρεμποδίζει την μεταφορά των ιών από τον ηθμό, ενώ η απενεργοποίηση τόσο της DCL4, όσο και της DCL2 ήταν ικανή να αποκαταστήσει τη διασυστηματική μόλυνση ιών στερούμενων καταστολέων της σίγησης (Deleris *et al.*, 2006). Η DCL3 εμποδίζει τη συσσώρευση ιϊκού RNA, αλλά η DCL4 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή siRNAs 21 και 22 νουκλεοτιδίων σε Tobamovούς, όπως ο *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV), ενώ η DCL2 την υποκαθιστά όταν παρεμποδίζεται ή μεταλλάσσεται (Blevins *et al.*, 2006; Bouche *et al.*, 2006; Deleris *et*

al., 2006). Επίσης, η ανοσία της αραβίδωσης σε ιούς του γένους *Potyvirus* με έλλειψη του καταστολέα της σίγησης HC-Pro όπως ο *Turnip mosaic potyvirus* σχετίζεται άμεσα με τη δράση των DCL2 και DCL4 σε συνδυασμό με τις πολυμεράσες RDR1 RDR6, αντιστοίχως (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). Τα siRNA του TRV παράγονται κυρίως από τη DCL4 σε συνδυασμό και με τις πρωτεΐνες DCL2, DCL3, RDR1, RDR2, και RDR6, με τη DCL2 να είναι υπεύθυνη για την παραγωγή μιας μικρής ομάδας siRNA από το άκρο 3' του RNA του TRV (Donaire *et al.*, 2008). Συμπερασματικά, κυρίως η πρωτεΐνη DCL4 και δευτερευόντως η DCL2 αποδομούν τα RNA των παραπάνω ιών σε siRNA (Donoyer *et al.*, 2005; Donaire *et al.*, 2008).

2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια αξιολόγησης διαφόρων διαγονιδιακών φυτών *Nicotiana benthamiana* με καταστολή των πρωτεϊνών DICER στην αντίδρασή τους στη μόλυνση με διάφορους ιούς (TRV-GFP, CGMMV, PPV) για να διαπιστωθεί ποιες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι σημαντικές για την άμυνα έναντι των παραπάνω ιών. Επιλέχθηκαν δύο ιοί, οι TRV και CGMMV οι οποίοι δεν προκαλούν συμπτώματα και ένας ιός, ο PPV, ο οποίος προκαλεί συμπτώματα στη *N. benthamiana*. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι από τις τέσσερις πρωτεΐνες τύπου Dicer, η DCL4 και δευτερευόντως η DCL2 είναι οι πιο σημαντικές. Η παρούσα μελέτη υποστηρίζει τα έως τώρα δεδομένα.

Πιο αναλυτικά, αξιολογήθηκαν φυτά καπνού *N. benthamiana*, ως προς την επίδραση της καταστολής των πρωτεϊνών Dicer στη μόλυνση με τους ιούς TRV, CGMMV και PPV. Η μελέτη εστιάστηκε στα εξής: α) την παρακολούθηση των συμπτωμάτων που εμφανίστηκαν σε φυτά με κατεσταλμένη μια ή δυο διαφορετικές πρωτεΐνες Dicer, όπως και σε φυτά αγρίου τύπου μετά τη μόλυνσή τους με τους ιούς αυτούς, β) στη παρατήρηση του φθορισμού στην υπεριώδη ακτινοβολία, των παραπάνω φυτών όταν μολύνονται με τον ιό TRV-GFP ώστε να εκτιμηθεί μέσω του φθορισμού η επίδραση της έλλειψης των διαφόρων Dicers στον πολλαπλασιασμό και τη μετακίνηση του ιού και γ) στην εκτίμηση του τίτλου των διαφόρων ιών με ημιποσοτική ELISA, η οποία γινόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα για τον προσδιορισμό της αραίωσης μέχρι την οποία επιτυγχάνονταν η ανίχνευση.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Φυτά που χρησιμοποιήθηκαν και ιϊκές απομονώσεις

Χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* με καταστολή έκφρασης των Dicer 1, 2, 3, 4, και των 2 και 4 ταυτόχρονα (ομάδες D1, D2, D3, D4 και D2/4), καθώς και φυτά αγρίου τύπου (WT). Τα φυτά με καταστολή των dicers παραχωρήθηκαν από τον Επίκουρο καθηγητή Κ. Καλαντίδη (Πανεπιστήμιο Κρήτης, ΙΤΕ). Τα αγρίου τύπου φυτά αναπαράγονταν στο Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ).

Τα φυτά σε όλα τα πειράματα αναπτύχθηκαν στους 25°C/18°C ημέρα/νύχτα, σε εντομοστεγές θερμοκήπιο, με φωτοπερίοδο 16 ωρών, εκτός αν ορίζεται διαφορετικά.

Ο CGMMV και ο PPV προέρχονταν από την εσωτερική συλλογή του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ) και διατηρούνταν σε φυτά καπνού (TRV, PPV) και αγγουριάς (CGMMV). Ο TRV έφερε το γονίδιο σήμανσης της πράσινης φθορίζουσας χρωστικής (Green Fluorescent Protein, GFP) αναφέρεται ως TRV-GFP και επιτρέπει την παρατήρηση της παρουσίας του ιού σε φυτικούς ιστούς κάτω από έκθεση σε λυχνία που εκπέμπει στο υπεριώδες (UV) (MacFarlane and Poronich, 2000). Συγκεκριμένα, κάτω από UV ακτινοβολία η GFP φθορίζει πράσινη ενώ οι υγιείς φυτικοί ιστοί αυτοφθορίζουν κόκκινοι.

3.2 Μηχανικές μολύνσεις

Μηχανικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά πλήρως αναπτυγμένα φύλλα με μόλυσμα που προερχόταν από φύλλα φυτών μολυσμένα με τους αντίστοιχους ιούς [1:3 w/v ομογενοποιημένου φυτικού ιστού σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (KPO₄ 0.03M, pH 7.4, K₂HPO₄ 1M, KH₂PO₄ 1M)]. Στα φύλλα προηγήθηκε επίπαση με σκόνη carborudum ώστε να δημιουργηθούν πληγές εισόδου στα επιδερμικά κύτταρα, ενώ γινόταν άμεση πλύση των φύλλων με νερό για αποφυγή νέκρωσής τους. Σε ένα γουδί τοποθετούνταν το μολυσμένο φύλλο μαζί με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα και γινόταν ομογενοποίηση του μίγματος. Στη συνέχεια μόλυσμα περάστηκε ελαφρά με γάντια στην επιφάνεια του φύλλου, το οποίο ακολούθως ξεπλύθηκε με νερό προσεκτικά. Τα φυτά τοποθετήθηκαν στο θερμοκήπιο για παρατήρηση εμφάνισης συμπτωμάτων και περαιτέρω ανάλυση.

3.2.1 Μέθοδος ELISA

Η μέθοδος ELISA χρησιμοποιείται τόσο για την ανίχνευση όσο και τη μελέτη των και άλλων φυτοπαθογόνων οργανισμών (Clark και Adams, 1977). Η ημιποσοτική ELISA χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αραιώσης πέρα από την οποία δε μπορούσαν να ανιχνευτούν οι ιοί ώστε να εκτιμηθεί η σχετική ποσότητα του εξεταζόμενου ιού μεταξύ των φυτών των διαφόρων ομάδων. Η μέθοδος ELISA περιελάμβανε τα εξής στάδια:

Τη πρώτη ημέρα, γινόταν κάλυψη της πλάκας με αντίσωμα έναντι της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού σε ρυθμιστικό διάλυμα (coating buffer, 1,59 gr Na_2CO_3 , 2,93gr NaHCO_3 , 0,2gr NaN_3 /lt, pH 9.6). Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται στον κλίβανο για 3 ώρες στους 37°C. Μετά την έξοδο της πλάκας από τον κλίβανο πραγματοποιούνταν τρία ξεπλύματα με PBST Tween X 5 λεπτά (PBS 10x, 0,05% - Tween 20 όπου PBS: phosphate buffered saline, 80gr NaCl , 2gr KCl , 14,24gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2gr KH_2PO_4 /lt, pH 7.4). Έπειτα γινόταν προετοιμασία των δειγμάτων [ομογενοποίηση 0,5 g ιστού με ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής (extraction buffer, 100ml PBS 10x, 0,5ml Tween, 20gr PVP/lt, pH 9.6) σε αναλογία 1:10 w/v, καθώς και στις προβλεπόμενες κατά περίπτωση αραιώσεις] και προσθήκη των δειγμάτων στην πλάκα. Η πλάκα τοποθετείται στους 4°C για όλη τη νύχτα.

Την επόμενη μέρα, επαναλαμβάνονταν τρία ξεπλύματα με PBS-Tween των 5 λεπτών. Στη συνέχεια προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι από 200μl σύζευγμα αντισώματος και αλκαλικής φωσφατάσης (IgG- alkaline phosphatase conjugate), το οποίο προσκολλάται μόνο σε πηγαδάκια όπου προϋπάρχει δεσμευμένη ιϊκή πρωτεΐνη, αραιωμένο στην κατάλληλη συγκέντρωση, σε ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής και η πλάκα τοποθετείται στους 37°C για 3 ώρες. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με PBS-Tween των 5 λεπτών. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη υποστρώματος p-Nitrophenyl Phosphate (PNPP) σε διάλυμα διαιθανολαμίνης (diethalonamine 10% v/v, pH 9.8) 1mg/ml και η πλάκα αφήνεται σε σκοτεινό σημείο σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση διαρκεί περίπου 1 ώρα. Η πλάκα τοποθετείται σε φωτόμετρο και μετράται η απορρόφηση στα 405nm ανά 30λεπτά. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης λαμβάνονται μετρώντας στο φωτόμετρο την ένταση του χρώματος σε κάθε πηγαδάκι η με απλή οπτική παρατήρηση. Η παρουσία χρώματος σε κάποιο πηγαδάκι καταδεικνύει ότι το συγκεκριμένο δείγμα περιέχει ιό.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αντίδραση των φυτών στον TRV-GFP

4.1.1 Διαφοροποίηση συμπτωμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν οι ομάδες D1, D2, D3, D4, D2/4 και WT. Γινόταν καθημερινή παρατήρηση για την εμφάνιση συμπτωμάτων και παρατήρηση για την ύπαρξη φθορισμού κάθε τρεις μέρες έως 20 μέρες μετά την μόλυνση. Πραγματοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πειράματα με 10 φυτά ανά ομάδα.

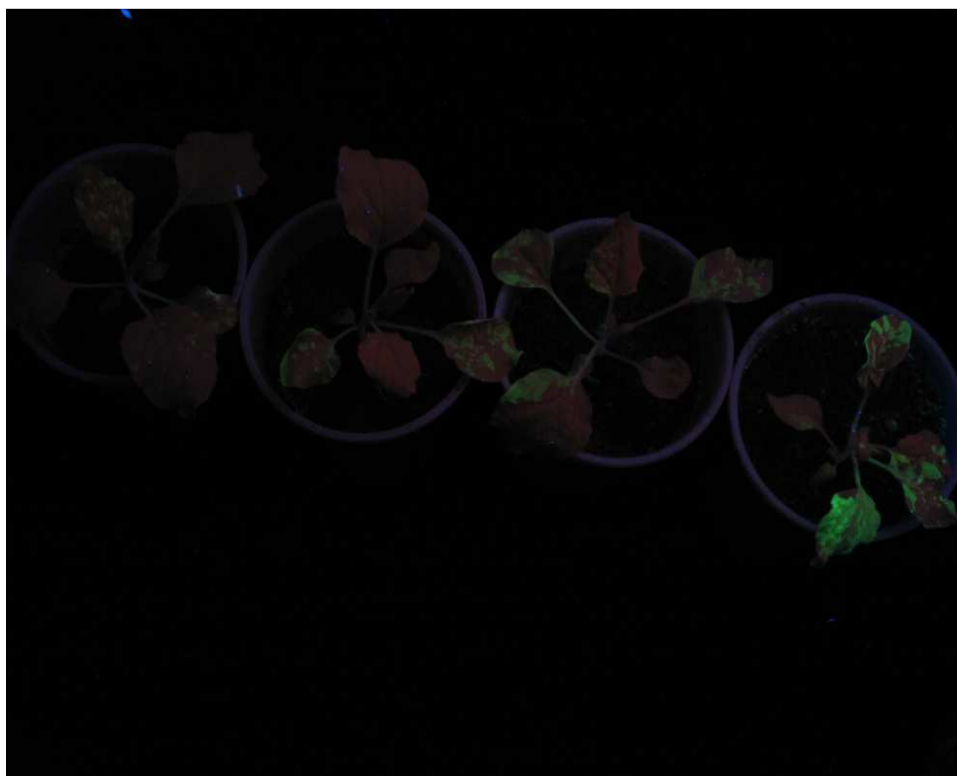
Σε ένα από τα τρία πειράματα εμφανίστηκαν ήπια συμπτώματα (ελαφρύ μωσαϊκό και παραμόρφωση) σε έξι από τα 10 φυτά της ομάδας D2/4 στις 14 μέρες μετά τη μόλυνση σε αντίθεση με τα φυτά του μάρτυρα και των υπολοίπων ομάδων στα οποία δε παρατηρήθηκαν συμπτώματα καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων (Εικόνα 9).



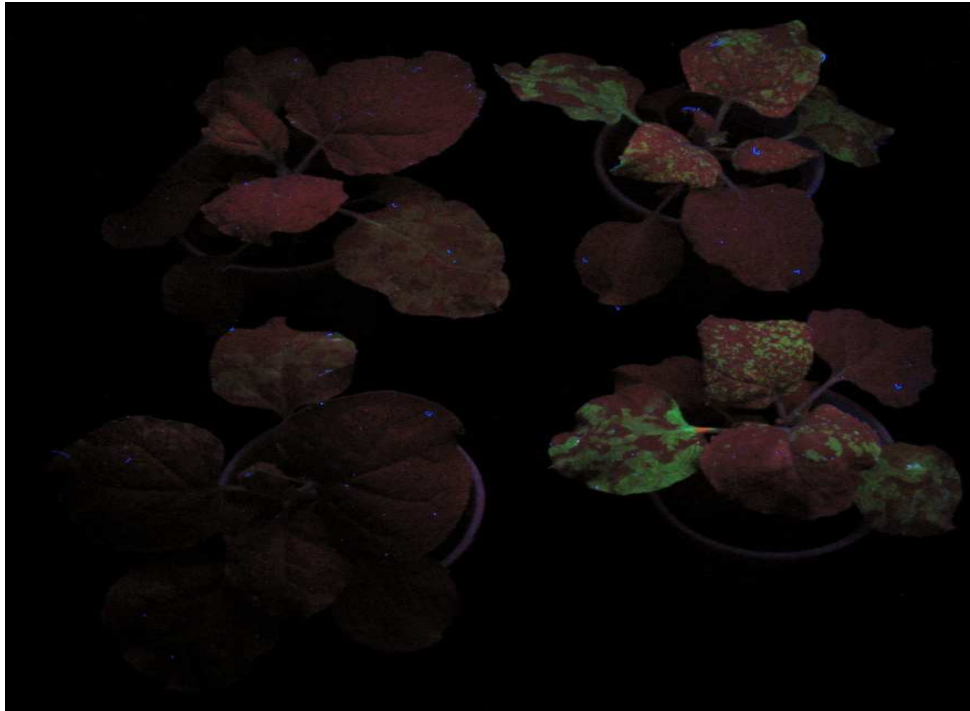
Εικόνα 9: Συμπτώματα σε *N. benthamiana* με κατεσταλμένη την έκφραση των πρωτεΐνων D2/4, μολυσμένα με τον ιό TRV-GFP

4.1.2 Διαφοροποίηση στον φθορισμό

Στις δύο με τρεις ημέρες μετά τη μόλυνση άρχισαν να γίνονται ευδιάκριτες μικρές φθορίζουσες κηλίδες στα φύλλα που έγινε η μόλυνση, που αντιστοιχούσαν σε περιοχές του φύλλου που πολλαπλασιαζόταν ο ιός. Δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στον αριθμό και την ένταση των κηλίδων στα φύλλα των φυτών των διαφορετικών ομάδων που εξετάστηκαν. Επίσης, φθορισμός παρατηρήθηκε σε όλα τα φυτά υποδεικνύοντας μόλυνση των φυτών όλων των ομάδων από τον TRV-GFP. Εντούτοις, στις έξι μέρες μετά τη μόλυνση στα φυτά της ομάδας D2/4 σε διασυστηματικό επίπεδο ο φθορισμός παρέμενε έντονος σε αντίθεση με το φθορισμό των φυτών των υπολοίπων ομάδων που ήταν μειωμένος σε ένταση και παρόμοιος με εκείνο των φυτών WT (Εικόνα 10). Αντίστοιχα ήταν τα δεδομένα και στις 13 ημέρες μετά τη μόλυνση (Εικόνα 11). Οι παραπάνω διαφορές μεταξύ της ομάδας D2/4 και των υπολοίπων ομάδων στην ένταση και τη διάρκεια του φθορισμού παρατηρήθηκαν και στα τρία πειράματα.



Εικόνα 10: Φυτά *N. benthamiana* μολυσμένα με τον ιό TRV-GFP και με κατεσταλμένη (από αριστερά προς τα δεξιά) την έκφραση της πρωτεΐνης D2, D3, D4 και D2/4 στις έξι μέρες μετά τη μόλυνση. Παρατηρείται πιο έντονος και διασυστηματικός πράσινος φθορισμός στην ομάδα D2/4, ενώ στις υπόλοιπες ομάδες η ένταση είναι μειωμένη και παρόμοια με το φθορισμό του WT.



Εικόνα 11 :Φυτά *N. benthamiana* μολυσμένα με τον ιό TRV-GFP WT (αριστερά), και με κατεσταλμένη την έκφραση των πρωτεϊνών D2/4 (δεξιά), στις 13 μέρες μετά την μόλυνση. Παρατηρείται μειωμένος σε ένταση φθορισμός στα φυτά WT σε σχέση με τον φθορισμό των φυτών D2/4. Οι φθορίζουσες περιοχές αντιστοιχούν στην παρουσία του ιού.

4.1.3 Επίδραση στην συγκέντρωση του ιού

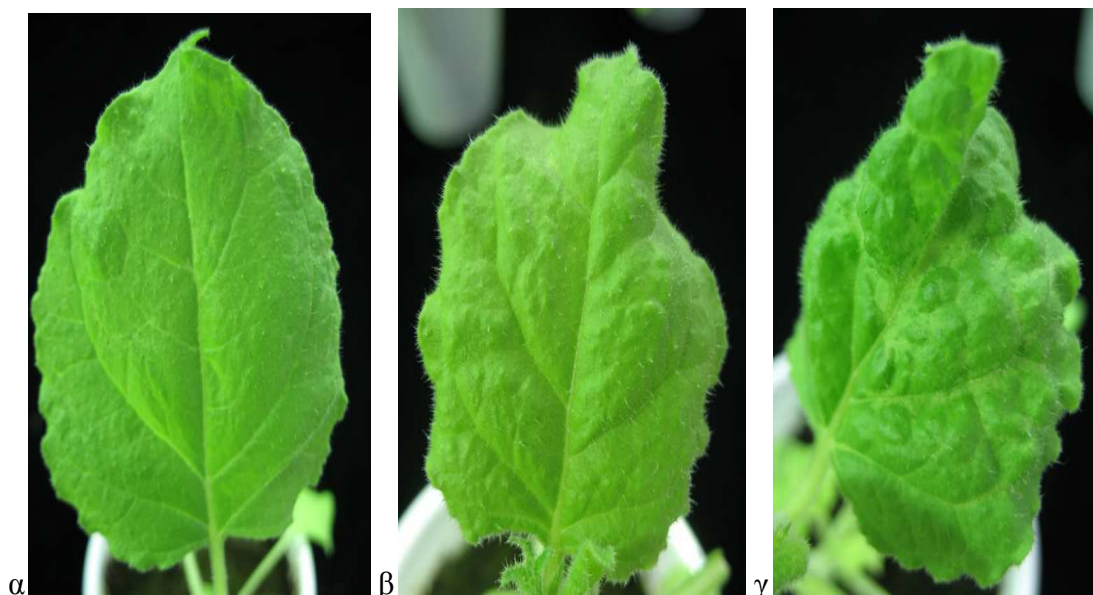
Με βάση τα δεδομένα από την παρατήρηση του ιού μέσω του GFP έγινε ημιποσοτική ELISA σε συνδυασμένα δείγματα που προέρχονταν από 2 φυτά μόνο των ομάδων D2/4 και WT. Τα δείγματα (κορυφαία φύλλα) συλλέχθηκαν 7 μέρες μετά τη μόλυνση και εξετάστηκαν οι αραιώσεις: 1:100, 1:1000, 1:10000. Σε αντίθεση με τη μακροσκοπική παρατήρηση του ιού μέσω της GFP και στις δύο ομάδες ανιχνεύτηκε ο ιός μέχρι την ίδια αραιώση 1: 10.000 υποδηλώνοντας ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωσή του μεταξύ των δύο ομάδων.

4.2 Αντίδραση των φυτών στον CGMMV

4.2.1 Διαφοροποίηση συμπτωμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν οι ομάδες D1, D2, D3, D4, D2/4 και WT. Σε καθημερινή βάση παρατηρήθηκαν τα φυτά στο θερμοκήπιο για την εμφάνιση συμπτωμάτων. Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πειράματα με 15 φυτά ανά ομάδα.

Στο πρώτο πείραμα δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση συμπτωμάτων στα φυτά καμίας ομάδας. Αντίθετα, στο δεύτερο πείραμα στις 20 μέρες μετά την μόλυνση παρατηρήθηκε μωσαϊκό και παραμόρφωση φύλλων, στα φυτά D2/4 και λιγότερο στα D1 ενώ τα φυτά WT, D2, D3, D4, δεν εμφάνισαν συμπτώματα (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Φύλλα φυτών *N. benthamiana* μολυσμένα με τον ιό CGMMV, WT (α), και με κατασταλμένη την έκφραση της πρωτεΐνης D1 (β) και D2/4 (γ) στις 20 ημέρες μετά την μόλυνση. Παρατηρήθηκε μωσαϊκό και παραμόρφωση φύλλων, στα φυτά D2/4 και λιγότερο στα D1 ενώ τα φυτά WT, δεν εμφάνισαν συμπτώματα.

4.2.2 Επίδραση στην συγκέντρωση του ιού

Πραγματοποιήθηκε ημιποσοτική ELISA στα φυτά των ομάδων D1, D2, D3, D4, D2/4 και WT. Εξετάστηκαν δείγματα από το 2^ο νεώτερο πλήρως εκπτυγμένο φύλλο στις 14 και 20 μέρες μετά την μόλυνση, στις αραιώσεις 1:100, 1:1000, 1:10000. Στο πρώτο πείραμα ο ιός ανιχνεύθηκε σε 10 φορές μεγαλύτερη

συγκέντρωση στα φυτά της ομάδας D2/4 (αραίωση 1:100) σε σχέση με τα φυτά των υπολοίπων ομάδων (αραίωση 1:10) ενώ στο δεύτερο πείραμα ανιχνεύθηκε σε 10 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση τόσο στην ομάδα D2/4 όσο και σε φυτά της ομάδας D2 (αραίωση 1:100) σε σχέση με τα φυτά των υπολοίπων ομάδων (αραίωση 1:10).

4.3 Αντίδραση των φυτών στον PPV

4.3.1 Διαφοροποίηση συμπτωμάτων

Όπως και προηγουμένως χρησιμοποιήθηκαν φυτά από τις ομάδες D1, D2, D3, D4, D2/4 και WT. Η παρακολούθηση των συμπτωμάτων ήταν καθημερινή. Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα με 10 φυτά ανά ομάδα.

Εμφανίστηκαν έντονα συμπτώματα (παραμόρφωση, μωσαϊκό) στα φυτά όλων των ομάδων από τις 7-10 ημέρες μετά τη μόλυνση (Εικόνα 13).

4.3.2 Επίδραση στην συγκέντρωση του ιού

Τα δείγματα (κορυφαία φύλλα) συλλέχθηκαν 33 μέρες μετά τη μόλυνση και εξετάστηκαν οι αραιώσεις: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. Και στα δύο πειράματα ο ιός ανιχνεύτηκε μόνο μέχρι την αραιώση 1:10 στα φυτά όλων των ομάδων.



Εικόνα 13: Φυτά *N. benthamiana* μολυσμένα με τον ιό PPV και με κατεσταλμένη την έκφραση πρωτεϊνών Dicer στις 33 ημέρες μετά τη μόλυνση (από αριστερά προς τα δεξιά: WT, D1, D2, D3, D4, D2/4).

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εργασία αυτή διερεύνησε το ερώτημα αν η έλλειψη μιας από τις Dicer 1, 2, 3, 4 ή ταυτόχρονα των Dicer 2 και 4 αυξάνει την ευπάθεια στους ιούς. Επιλέχθηκαν δύο ιοί, οι TRV και CGMMV οι οποίοι δεν προκαλούν συμπτώματα και ένας ιός, ο PPV, ο οποίος προκαλεί συμπτώματα στη *N. benthamiana*. Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν ότι η έλλειψη των Dicer 1 ή 3 δεν επηρεάζει την αντίδραση των φυτών στον TRV και CGMMV σε αντίθεση με την έλλειψη των Dicer 2, 4 ξεχωριστά ή σε συνδυασμό. Υπενθυμίζεται ότι οι πρωτεΐνες αυτές παράγουν siRNAs μεγέθους 21 ή 22 νουκλεοτιδίων και ότι το ιικό dsRNA κόβεται από τη DCL4 σε μια σταδιακή αντίδραση που μπορεί να γίνει από τη DCL2 όταν η DCL4 είναι απενεργοποιημένη (Blevins *et al.*, 2006; Bouche *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006). Εντούτοις, ενώ τα φυτά με κατασταλμένη την έκφραση των Dicer 2 και 4 που είχαν μολυνθεί με TRV-GFP εμφάνισαν μεγαλύτερη ένταση και διάρκεια φθορισμού σε σχέση με τα φυτά των υπόλοιπων ομάδων και τα φυτά αγρίου τύπου, στην ανάλυση με ημι-ποσοτική ELISA δεν παρουσίασαν μεγαλύτερο τίτλο ιού. Η παραπάνω αναντιστοιχία πιθανόν να οφείλεται στο ότι η διαφορά στη συγκέντρωση του ιού μεταξύ των φυτών των ομάδων D2, 4 και των υπολοίπων να ήταν μικρότερη από δέκα φορές και να μην έγινε ανιχνεύσιμη από την ημι-ποσοτική ELISA που ήταν σχεδιασμένη σε δεκαδικές αραιώσεις. Η ανάλυση με μία πιο λεπτομερή ημι-ποσοτική ELISA ή/και με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφής- ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-qPCR) πιθανόν να διαλευκάνει το θέμα αυτό.

Αντίθετα, η μόλυνση με τον PPV δεν φάνηκε να επηρεάζεται σε ότι αφορά τη συμπτωματολογία και την συγκέντρωση του ιού από την έλλειψη των Dicers. Η τελευταία διαπίστωση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με τη χρήση πιο αναλυτικών μεθόδων όπως η RT-qPCR και την εξέταση της πορείας της μόλυνσης σε αρχικό στάδιο. Είναι πιθανό η καταστολή των Dicers να επηρεάζει τον τίτλο του PPV στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, και οι όποιες διαφοροποιήσεις να εξισορροπούνται στη συνέχεια.

Συμπερασματικά, τα πειράματα που έγιναν στην εργασία αυτή έδειξαν ότι η αντίδραση των φυτών *N. benthamiana* στα οποία είχε κατασταλεί η έκφραση των πρωτεϊνών Dicer 1, 2, 3, και 4, και των Dicer 2 και 4 ταυτόχρονα, στη μόλυνση με

τρία διαφορετικά είδη ιών σχετίζεται όχι μόνο με το είδος της Dicer όπως αναμενόταν, αλλά και με το είδος του ιού.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agrios G. N., 2005. Plant Pathology. Κεφ.14, Plant diseases caused by viruses, σελ 724-825. Academic Press, CA, USA, σελ. 990.
2. Ainsworth G. C., 1935. Mosaic disease of cucumber. Annals of Applied. Biology 22: 55-67
3. Antignus Y., Wang Y., Pearlsman M., Lachman O., Lavi N., A. Gal-On. 2001. Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting Tobamovirus Phytopathology 91: 565-571
4. Barbara D. J., Clark M. F., 1982. A Simple indirect ELISA using F(ab')₂ fragments of immunoglobulin. Journal of General Virology 58: 315-322
5. Blevins T., Rajeswaran R., Shivaprasad P. V., Beknazariants D., Si- Ammour A., Park H. S., Vazquez F., Robertson D., Meins F. Jr., Hohn T., Pooggin, M. M., 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. Nucleic Acids Research 34: 6233-6246
6. Boubourakas I. N., Hatziloukas E., Antignus Y., Katis N. I., 2004. Etiology of leaf chlorosis and deterioration of fruit interior of watermelon plant. Journal of Phytopathology. 152: 580-588.
7. Bouche N., Lauressegues D., Gasciolli V., Vaucheret H., 2006. An antagonistic function for *Arabidopsis* DCL2 in development and new function for DCL4 in generating viral siRNAs. EMBO journal 25: 3347-3356.
8. Brigneti G., Voinnet O., Li W. X., Ji L. H., Ding S. W., 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. EMBO Journal 17 :6739-6746.
9. Clark M. F., Adams A. N., 1977. Characteristics of the microplate method of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology. 34: 475-483
10. Conti M., Gallitelli D., 2006. Οι κυριότεροι ιοί των κηπευτικών. Κεφ. 3. Διάγνωση των ιών των κηπευτικών, σελ. 74-78. Εκδόσεις Ζεύς, Αθήνα 2006, σελ.218.

11. Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., Baulcombe D., 2000. An RNA-dependent RNA polymerase is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-553
12. Deleris A., Gallego-Bartolome J., Bao J., Kasschau K. D., Carrington J. C., Voinnet O., 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313: 68-71
13. Ding S., Li H., Lu R., Li F., Li W. X., 2004. RNA silencing a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Research* 102(1) : 109-115
14. Donaire L., Barajas D., Martinez-Garcia B., Martinez-Priego L., Pagan I., Llave C., 2008. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *Journal of Virology* 82: 5167-5177.
15. Dunoyer P., Himber ., Voinnet O., 2005. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat. Genet.* 37: 1356-1360.
16. Fletcher J. T., George A.J., Green D. E., 1969. *Cucumber green mottle mosaic virus*, its effect on yield and its control in the Lea Valley, England. *Plant Pathology*, 18: 16-22 doi: 10.1111/j.1365-3059.1969.tb00457.x
17. Garcia-Ruiz H., Takeda A., Chapman E. J., Sullivan C.M., Fahlgen N., Brempelis K. J., Carrington J. C., 2010. *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and Dicer- Like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Cell* 22: 481-496
18. Gibbs A. J., 1977. Tobamovirus group. CMI/AAB, Descriptio of Plant Viruses No.184
19. Glasa M., Candresse T., 2005. *Plum pox virus*, CMI/AAB, Descriptios of Plant Viruses No. 410
20. Goulden M. G., Davies J. W., Wood K. R., Lomonosoff G. P., 1992. Structure of tobaviral particles: a model suggested from sequence conservation in tobaviral and tobamoviral coat proteins. *Journal of Molecular B;iology* 227:1-8
21. Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D., 2002. Two classes of shortinterfering RNA in silencing EMBO Journal 21: 4671-4679.
22. Hollings M., Komuro Y., Tochiyara H., 1975. *Cucumber green mottle mosaic virus*. CMI/AAB, Descriptions of Plant Viruses No. 154

23. Karayiannis I., 2006. Breeding for resistance: conventional breeding for *Plum pox virus* resistant apricots (*Prunus armeniaca L.*) in Greece. Bulletin OEPP/EPPO 36: 319-322.
24. Κατής Ν., Αυγελής Α., 1997. Ιολογικές ασθένειες φυτών μεγάλης καλλιέργειας. Εκδόσεις Αγρότυπος. Σελ.197.
25. Kegler H., Schade C., 1971. *Plum pox virus*. CMI/AAB, Descriptions of Plant viruses No.70
26. Lindbo J. A., Silva Rosales L., Proebsting W. M., Dougherty W. G., 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implication for the regulation of gene expression and virus resistance. Plant cell 5: 1749-1759.
27. Liu Q., Feng Y., Zhu Z., 2009. Dicer-like (DCL) proteins in plants. Functional Integr. Genomics 9:277–286 (doi:10.1007/s10142-009-0111-5)
28. MacFarlane S. A., Popovich A. H. 2000. Expression of foreign proteins in roots from tobavirus vectors. Virology 267: 29–35.
29. Macrae I. J., Zhou K., Li F., Repic A., Brooks A. N., Cande W. Z., Adams P. D., Doudna J. A., 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311: 195.
30. Mallory A. C., Reinhart B. J., Bartel D. P., Vance V. B., Bowman L. H. 2002. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99: 15228–15233.
31. Μπεμ Φ., 1987. Μια σοβαρή ασθένεια σε καλλιέργειες καπνού της Πιερίας, οφειλόμενη στον ιό *Tobacco rattle*. Περίληψεις 4ου Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, Αθήνα, σελ. 49.
32. Robinson D. J., 1989. *Tobacco rattle virus*. CMI/AAB, Descriptions of Plant Viruses No. 398.
33. Robinson D., Mumford R., Stevens M., Adams M., (Editors), 1970-2012. Descriptions of Plant Viruses. Association of Applied Biologists (www.dpvweb.net)
34. Ruiz-Ferrer V., Voinnet O., 2009. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. Annual Review of Plant Biology 60: 485–510.

35. Sasaya T., Torrance L., Cowan G., Ziegler A., 2000. Aphid transmission studies using helper component proteins of *Potato virus Y* expressed from a vector derived from *Potato virus X*. *Journal of General Virology* 81:1115-1119.
36. Schmelzer K., Wolf P., 1975. Possibilities of control of virus diseases on cucumber and tomato under glass and plastics. *Phytopathologische Zeitschrift* 28: 1-56.
37. Tang G., Reinhart B. J., Bartel D. P., Zamore P. D., 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Dev.* 17: 49–63.
38. Τζάμος Ε. Κ., 2004. Φυτοπαθολογία. Κεφ. 6, Ιοί των φυτών, σελ. 293-326. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα, σελ. 557.
39. Ugaki M., Tomiyama M., Kakutani T., Hidaka S., Kiguchi T., Nagata R., Sato T., Motoyoshi F., Nishiguchi M., 1991. The complete nucleotide sequence of *Cucumber green mottle mosaic virus* (SH strain) genomic RNA. *Journal of General Virology* 72: 1487-1495.
40. Varveri, C., Vassilakos, N., Bem, F., 2002. Characterization and detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Greece. *Phytoparasitica* 30(5): 493-501.
41. Varveri, C., 2004. Direct nested-RT-PCR for the detection of *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae* 657: 155-158.
42. Varveri C., Vassilakos N., 2008. Preliminary biological and molecular characterization of mild PPV isolates naturally induced in *N. benthamiana* plants. *Acta Horticulturae* 781: 249-253.
43. Vander Krol A .R., Mur L. A., Beld M., Mol J. N. M., and Stuitje A.R., 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-299.
44. Vaucheret H., Beclin C., Fagard M., 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* 114: 3083–3091.
45. Voinnet O., Lederer C., Baulcombe D.C., 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157-167.

46. Zheng X., Lin Q., Xie L., 1990. The identification of *Tobacco rattle virus* isolated from Narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) in Fujian [China]. Journal of Fujian Agricultural College: 19(1): 58-63 (abstract in English)

