

ΑΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΘΕΡΜΟΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

Νουκλεοτιδική αλληλούχηση και γενετική ανάλυση των απομονώσεων του ιού της τριστέτσας των εσπεριδοειδών (citrus tristeza virus, ctv) στη Δυτική Κρήτη .



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΤΣΟΧΕΙΡΑΚΗ ΣΟΦΙΑ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ.ΓΚΟΥΜΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος

Κεφάλαιο 1.....	5
1.1 Ιστορική ανασκόπηση της ασθένειας τριστέτσα.....	5
1.2 Ταξινόμηση.....	6
1.3 Βιολογικές ιδιότητες.....	6
1.3.1 Εύρος ξενιστών.....	6
1.3.2 Συμπτωματολογία.....	6
1.3.2.1 Η ασθένεια τριστέτσα (<i>Citrus tristeza virus</i> , CTV).....	7
1.3.2.2 Διάβρωση των μίσχων (SP).....	8
1.3.2.3 Βοθρίωση του ξύλου (SY).....	8
1.3.3 Μετάδοση και επιδημιολογία του ctv	10
<u>1.4 Μορφολογία και βιολογία ιών.....</u>	<u>11</u>
<u>1.4.1 Μορφολογία.....</u>	<u>11</u>
1.4.2 Κυττοπαθολογία.....	11
1.4.3 Οργάνωση γονιδιώματος.....	12
1.4.4 Στρατηγική έκφραση γονιδιώματος.....	12
1.5 CTV Διάγνωση και μέθοδοι ανίχνευσης του	14
1.5.1 Ανίχνευση βάσει τη βιολογίας του ιού.....	14
1.5.2 Ανίχνευση βασισμένη στις ιδιότητες των πρωτεϊνών του ιού.....	14
1.5.3 Ανίχνευση του ιού βασισμένο στις ιδιότητες του νουκλεϊκών οξέων	14
1.6 Χαρακτηρισμός στελεχούς.....	15
1.7 Γενετική παραλλακτικότητα.....	15
1.8 Σκοπός της έρευνας.....	16
Κεφάλαιο 2 Υλικά & μέθοδοι.....	17
2.1 Αποστείρωση και μέτρα προφύλαξης	17
2.2 Φυτικός ιστός.....	17
2.3 Ταυτοποίηση ιών.....	17
2.3.1 Ορολογικές μέθοδοι.....	17
2.3.2 Μοριακές Μέθοδοι.....	21
2.3.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction).....	21
2.4 Προετοιμασία φυτικού υλικού.....	24
2.4.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA	24

2.5 Εφαρμογή μοριακών μεθόδων ανίχνευσης του CTV.....	25
2.5.1 Ολιγονουκλεοτίδια.....	25
2.5.2 RT-PCR για την ανίχνευση των πρωτεϊνών του CTV.....	26
2.6 Ανίχνευση προϊόντων της RT-PCR (Διαδικασία ηλεκτροφόρησης αγαρόζης) ...	26
2.7 Εξαγωγή προϊόντος PCR από την πηκτική αγαρόζη	27
2.8 Φυλογενετική ανάλυση.....	28
Κεφάλαιο 3	29
Αποτελέσματα	29
3.1 Οροθετική ανίχνευση του CTV στους φυτικούς ιστούς.....	29
3.2 Διάγνωση του CTV χρησιμοποιώντας τη μέθοδο RT-PCR.....	32
3.3 Απομόνωση γονιδίων του CTV.....	33
3.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης	35
3.5 Δημιουργία φυλογενετικού δέντρου.....	38
Κεφάλαιο 4.....	39
Συζήτηση	39
Κεφάλαιο 5.....	41
Βιβλιογραφία.....	41

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πτυχιακή αυτή όπως και η πρακτική μου άσκηση πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων(Μ.Α.Ι.Χ), και ειδικότερα στο εργαστήριο Ιολογίας.

Σημαντική ήταν η βοήθεια του επιβλέποντα μου, Δρ.Λιβιεράτου Γιάννη ο οποίος με βοήθησε σημαντικά στη διεξαγωγή των απαραίτητων πειραμάτων για τη πτυχιακή μου εργασία και με προμήθευσε με τα απαραίτητα σκευάσματα για τη διεξαγωγή των πειραμάτων μου.

Για τη καθοδήγηση στην συγγραφή αυτής της διατριβής και τη βοήθεια του στην διεξαγωγή των πειραμάτων θα ήθελα να ευχαριστήσω το διδακτορικό φοιτητή τον Μαθιούδακη Μάνθο για την κατανόηση και την βοήθεια του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

Βιβλιογραφική επισκόπηση

1.1 Ιστορική ανασκόπηση της ασθένειας τριστέτσα

Ο ιός της τριστέτσας των εσπεριδοειδών (*Citrus tristeza virus*, CTV) ανήκει στο γένος *Closterovirus* και προκαλεί τη μεγαλύτερη οικονομικής σημασίας ασθένεια στα εσπεριδοειδή. Ο CTV έχει οδηγήσει στην αποπληξία εκατομμυρίων δέντρων σε ολόκληρο τον κόσμο, καθώς επίσης έχει καταστήσει ακατάλληλο ένα μεγάλο αριθμό εσπεριδοειδών για την παραγωγή. Ο CTV πιθανότατα εμφανίστηκε από τις χώρες προέλευσης των εσπεριδοειδών όπως Νοτιοανατολική Ασία και αρχιπέλαγος Malayan. Οι μετακινήσεις των εσπεριδοειδών από τις χώρες προέλευσης τους προς άλλες χώρες ήταν ως φρούτα ή σπόρος καθιστώντας αδύνατη την εξάπλωση του ιού. Αργότερα, χιλιάδες φυτά και εξωτικά είδη εισήχθησαν από την Ασία σε άλλες περιοχές με αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση του ιού με τις νέες ποικιλίες και την εξέλιξή του λόγω των διαφορετικών κλιματολογικών και περιβαλλοντικών συνθηκών (Roistacher 1981).

Οι πιο καταστροφικές επιδημίες της τριστέτσας παρουσιάστηκαν στην Αργεντινή (1930), τη Βραζιλία (1937), την Καλιφόρνια (1939), τη Φλόριντα (1951), την Ισπανία (1957) και τη Βενεζουέλα (1980), αλλά σημαντικές εστίες έχουν επίσης αναφερθεί από την Κύπρο (1989), την Κούβα (1992), το Μεξικό (1995), τη Δομινικανή Δημοκρατία (1996) και την Ιταλία (2002).

Οι αγρότες στη Βραζιλία και την Αργεντινή έδωσαν το όνομα «τριστέτσα», που σημαίνει θλίψη στα πορτογαλικά και τα ισπανικά, αναφερόμενοι στην καταστροφή που προήλθε από την ασθένεια το 1930.

1.2 Ταξινόμηση

Ο CTV είναι μέλος του γένους *Closterovirus* της οικογένειας *Closteroviridae*. Η οικογένεια περιλαμβάνει περισσότερους από τριάντα πέντε φυτικούς ιούς και περιέχει το μεγαλύτερο και πιο σύνθετο RNA γονιδίωμα με μέγεθος μέχρι και 20kb. Ο ιός έχει χαρακτηριστικά νηματοειδή μακριά ιικά σωματίδια και προκαλεί το σχηματισμό έγκλειστων σωματιδίων στο φλοιό των μολυσμένων φυτών τα οποία αποτελούν παθογνωμονικό σύμπτωμα (Koonin & Dolja, 1993; Karasev, 2000). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 20 ετών, η ταξινόμηση μέσα στην οικογένεια *Closteroviridae* έχει αλλάξει με αποτέλεσμα να περιλαμβάνει τρία γένη: α) το γένος *Closterovirus* όπου τα μέλη του μεταφέρονται με την αφίδα (*Aphis monoptartidae*), β) το γένος *Crinivirus* που μεταδίδονται με τη λευκή μύγα και γ) το γένος *Ampelovirus* (Karasev, 2000).

1.3 Βιολογικές ιδιότητες

1.3.1 Εύρος ξενιστών

Βασικοί ξενιστές του CTV είναι τα είδη των γενών *Citrus* και *Fortunella*, αλλά πειραματικά έχει επιτευχθεί η μόλυνση του ιού με τη τεχνική του εμβολιασμού στα συγγενικά γένη *Aegle*, *Aeglopsis*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Eremositrus*, *Merillia*, *Micrositrus*. Μόλυνση σε εργαστήριο έχει επιδεχθεί και σε μη εσπεριδοειδή είδη όπως το *Pasiflora gracilis* και το *Passiflora coerulea* με τη χρήση αφίδων (Price, 1966; Roistacher, 1988) αλλά και στη *Nicotiana belthamiana* με τη μέθοδο μόλυνσης των πρωτοπλαστών (Gowda 2005; Navas-Castillo 1997)

1.3.2 Συμπτωματολογία

Ανάλογα με το στέλεχος του ιού και των συνδυασμών στα εμβολιασμένα ριζώματα ο CTV μπορεί να προκαλέσει τρία ευδιάκριτα σύνδρομα που ονομάζονται α) τριστέτσα β) βοθρίωση του ξύλου (SP) γ) τα κίτρινα σπορόφυτα (SY).

Αυτά τα συμπτώματα μπορούν να περιγραφούν ως εξής :

1.3.2.1. Η ασθένεια τριστέτσα (*Citrus tristeza virus*, CTV)

Η τριστέτσα είναι η πιο επιθετική ασθένεια που επιφέρει γρήγορη νέκρωση σε διάφορα είδη εσπεριδοειδών όπως τα πορτοκάλια, τα γρεϊπφρουτ, τα μανταρίνια, το κουμκουάτ και τα πρασινολέμονα. Το δέντρο από τη κανονική του εμφάνιση ξεκινάει με συμπτώματα μαλασμού και καταρρέει τελείως σε μερικές εβδομάδες. Όταν η ασθένεια μεταφέρεται στο υποκείμενο εμβολιασμένων ειδών και τα δέντρα που επηρεάζονται παρουσιάζουν συνήθως το θαμπό πράσινο ή κίτρινο λεπτό φύλλωμα με αποτέλεσμα το φύλλο να αποκολλάται από τον κλαδίσκο, όπως επίσης και μικρά χλωρωτικά φύλλα που μοιάζουν με συμπτώματα τροφοπενίας αζώτου (Εικ.1). Ο CTV προκαλεί την κατάρρευση και νέκρωση των αγγείων του ξύλου, τη μείωση του ριζικού συστήματος το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα τον ανεπαρκή εφοδιασμό του φυτού με νερό και μεταλλικών στοιχείων οδηγώντας στη χλόρωση και τελικά στο μαλασμό.



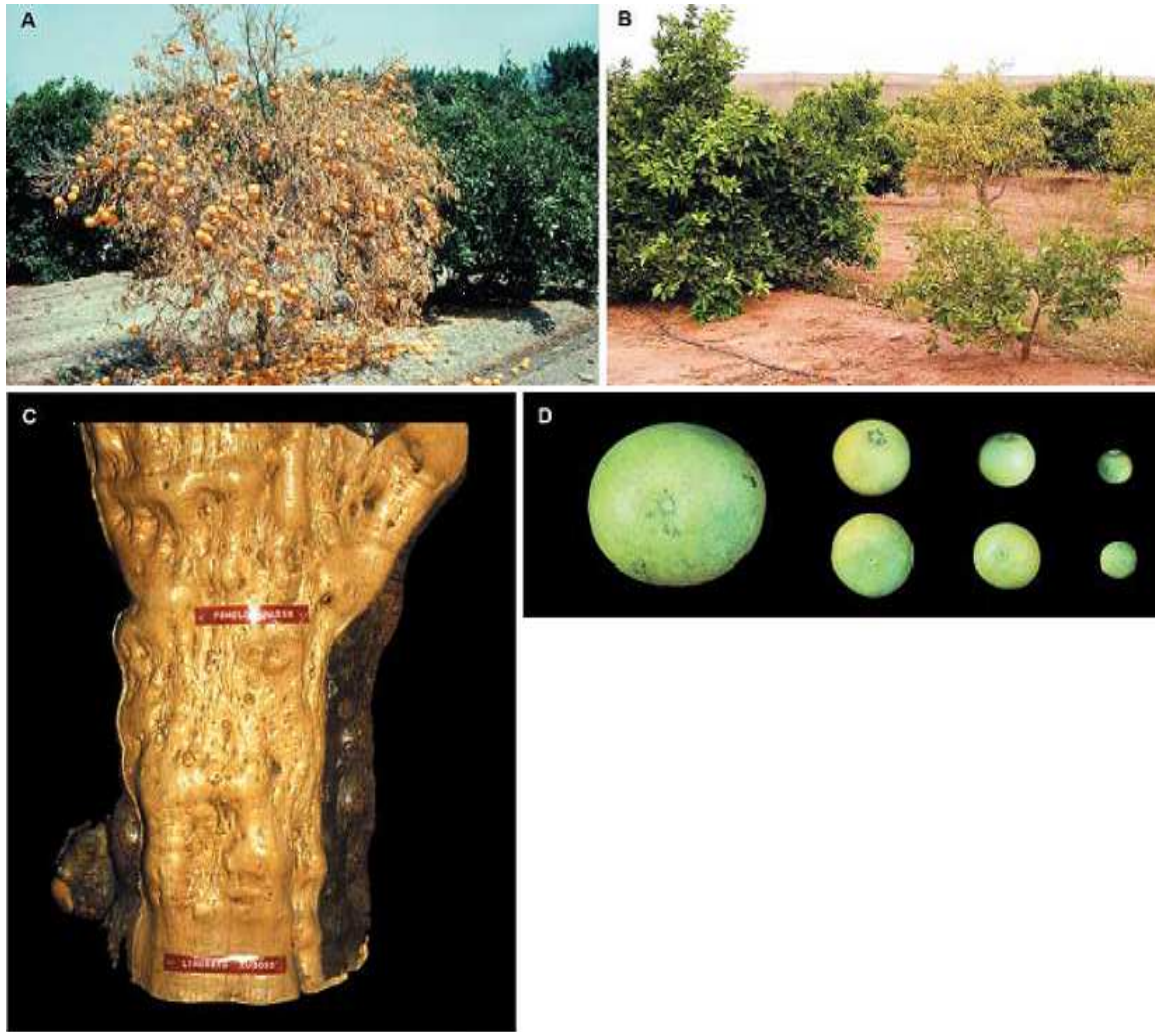
Εικόνα 1. Δέντρο πορτοκαλιάς προσβεβλημένο με CTV στην περιοχή της Αγίας Χανίων

1.3.2.2 Διάβρωση των μίσχων (SP)

Το δεύτερο σύνδρομο αρχίζει πιθανότατα κατά τον περιορισμό και τη μερική διακοπή της μεριστοματικής δραστηριότητας στις περιοχές του καμβίου το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων όπως λεπτό φύλλωμα, μικρά κίτρινα φύλλα και μικρά φρούτα χαμηλής περιεκτικότητας σε χυμό που τα καθιστά μη εμπορεύσιμα (Εικ.2.1). Οι ευαίσθητες ποικιλίες εσπεριδοειδών στη διάβρωση των μίσχων επηρεάζονται ανεξάρτητα από το αν είναι σπορόφυτο ή αν είναι εμβολιασμένο το δέντρο και έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζωμα. Τα γκρέιπφρουτ και μερικές ποικιλίες γλυκών πορτοκαλιών παρουσιάζουν ενδιάμεση ευαισθησία ενώ τα μανταρίνια παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανοχή (Duran-Vila and Moreno, 2000, Timmer *et al.*, 2000). Σε αντίθεση με την τριστέσα η διάβρωση των μίσχων δεν προκαλεί τη νέκρωση του δέντρου αλλά επί σειρά ετών μειωμένη παραγωγή προκαλεί τις ίδιες οικονομικές απώλειες

1.3.2.3 Βοθρύωση του ξύλου (SY)

Το τρίτο σύνδρομο που προκαλείται από το CTV χαρακτηρίζεται από τη μείωση ή τη πλήρη απώλεια της παραγωγής, από μικρά χλωρωτικά κίτρινα φύλλα και ένα μειωμένο ριζικό σύστημα. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου φυτά μολυσμένα με SY δείχνουν σημάδια ανάκαμψης εκπύσσοντας νέα φυτά. Αυτές και άλλες παρατηρήσεις οδήγησαν στην ερμηνεία ότι ο SY συνδέθηκε με το CTV με ένα συστατικό το οποίο θα μπορούσε να φιλτραριστεί από τα ξινά πορτοκάλια, γκρέιπφρουτ και λεμόνια τα οποία προσβάλλει πολύ σπάνια (McClellan, 1963; Wallace και Drake, 1972).



Εικόνα 2. Α) δέντρο προσβεβλημένο με CTV με γρήγορο σύνδρομο πτώσης Β) διαφορετικά στάδια από τρία προσβεβλημένα δέντρα της ίδιας οικογένειας με διαφορές στο μέγεθος και το χρωματισμό των φύλλων C) διάβρωση των μίσχων του κορμού σε δέντρο ενός γκρέιπφρουτ (αυτό το γκρέιπφρουτ ήταν μια από τις πρώτες εισαγωγές από τη Νότια Αφρική στην Αργεντινή).D) μικρά φρούτα από ένα δέντρο γκρέιπφρουτ στο υποκείμενο trifoliata Poncirus που επηρεάζεται σοβαρά με τη διάβρωση μίσχων, σε σύγκριση με ένα κανονικό γκρέιπφρουτ (AI Moreno *et al.*, 2008)

1.3.3. Μετάδοση και επιδημιολογία του CTV

Ο CTV έχει μεταφερθεί στις περισσότερες περιοχές εσπεριδοειδών από την διάδοση των μολυσμένων οφθαλμών από διάφορα είδη αφίδων, κυρίως το *Toxoptera citricida* (kirkaldy) και το *Aphis gossypii* (glover) (εικ. 3).

Το *Toxoptera citricida* είναι καθιερωμένο στην Ασία, την Αυστραλία, τη Σαχάρα, την κεντρική και νότια Αμερική και διάφορες περιοχές της Καραϊβικής. Το *Aphis gossypii* είναι το κύριο έντομο στη μετάδοση του CTV στη λεκάνη της Μεσογείου, τις περιοχές της Β. Αμερικής και έχει ανιχνευτεί πρόσφατα και στα απομονωμένα δέντρα εσπεριδοειδών στη βόρεια Ισπανία και την Πορτογαλία.

Τέλος, έχουν αναφερθεί και μερικά άλλα είδη αφίδων τα οποία σε πειραματισμούς μόλυνσης ήταν λιγότερο αποδοτικά στην εξάπλωση του CTV όπως το *Aphis citricola* και το *Toxoptera aurantii*.



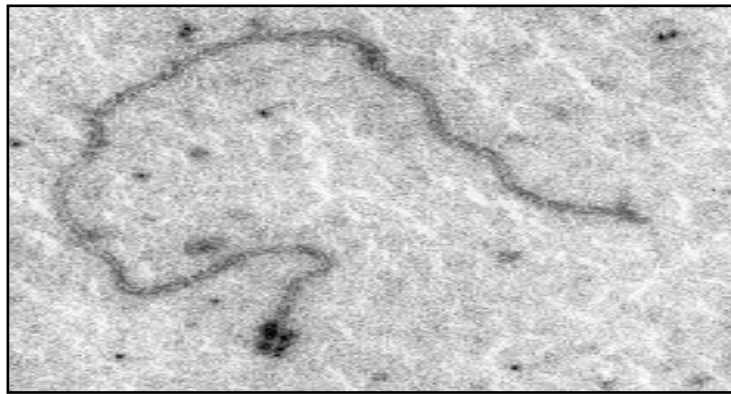
Εικόνα 3. Τα πιο επίσημα έντομα μεταδοσης του CTV οι αφίδες (A) *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). (B) *Aphis gossypii* (Glover).

Adapted from (www.agnet.org/library/ac/1998c/) and (www.koppertonline.ca/pestroster.asp)

1.4 Μορφολογία και βιολογία ιών

1.4.1 Μορφολογία

Ως μέλος των *Closteroviruses* ο CTV έχει μακριά εύκαμπτα ιικά σωματίδια μεγέθους περίπου 2000×11 nm (Εικ. 4) Τα ιικά σωματίδια του CTV είναι διπολικά και περιέχουν δυο καψιδιακές πρωτεΐνες, μια μεγέθους 25 kDa (CP) και μια 27 kDa (CPm) οι οποίες αποτελούν το 3% του συνολικού μεγέθους του ιού.



Εικόνα 4. Ηλεκτρονική μικρογραφία ιικών σωματιδίων του *Citrus tristeza virus*

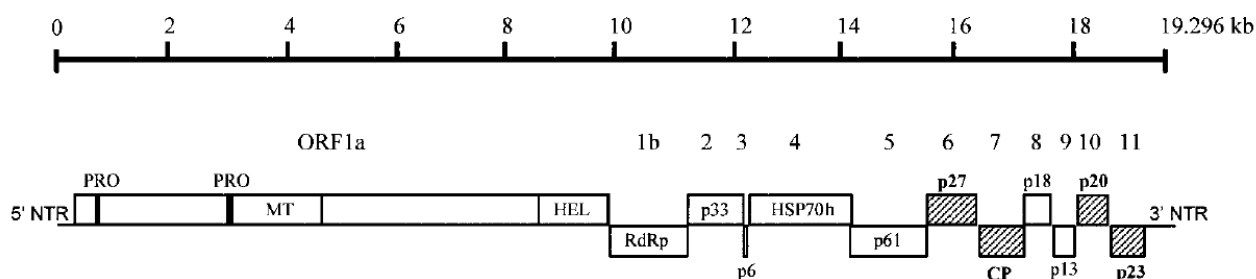
1.4.2 Κυτοπαθολογία

Ο CTV δημιουργεί έγκλειστα σωματίδια στα μολυσμένα φυτά τα οποία απατώνται κυρίως στα κύτταρα του φλοιώματος και εμφανίζονται ως μεγάλα συσσωματώματα. Αυτά τα έγκλειστα σωματίδια μπορούν να βρεθούν περιστασιακά και στο κάμβιο του νεοσχηματιζόμενου ξύλου. Όταν προσβληθεί το κάμβιο, τα μητρικά κύτταρα από το ξύλωμα και το φλοιώμα δεν ενεργοποιούνται και ο παρεγχυματικός ιστός παραμένει στο φλοιό με αποτέλεσμα τα βοθρία να σχηματίζονται στο ξύλο όταν ο φλοιός απομακρύνεται.

Η ανίχνευση των έγκλειστων σωματιδίων είναι σημαντική για τη διάκριση ήπιων στελεγχών του CTV. Η απαρίθμηση των έγκλειστων σωματιδίων σε μολυσμένο ιστό μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο δείκτη για την αυστηρότητα του στελέχους του CTV.

1.4.3 Οργάνωση γονιδιώματος

Ο CTV ήταν ο πρώτος που χαρακτηρίστηκε ως μέλος του γένους των *Closterovirus*. Έχει ένα γονιδίωμα μεγέθους 19296 νουκλεοτιδίων (Εικ 5), το οποίο είναι το μεγαλύτερο σε σχέση με τους υπόλοιπους φυτικούς ιούς. Το γονιδίωμα περιέχει δώδεκα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Μπορεί να κωδικοποιήσει 17 πρωτεϊνικά προϊόντα και δυο στις αμετάφραστες περιοχές (UTRs) μεγέθους 107 και 273 nt του 5' και 3' άκρο αντίστοιχα.



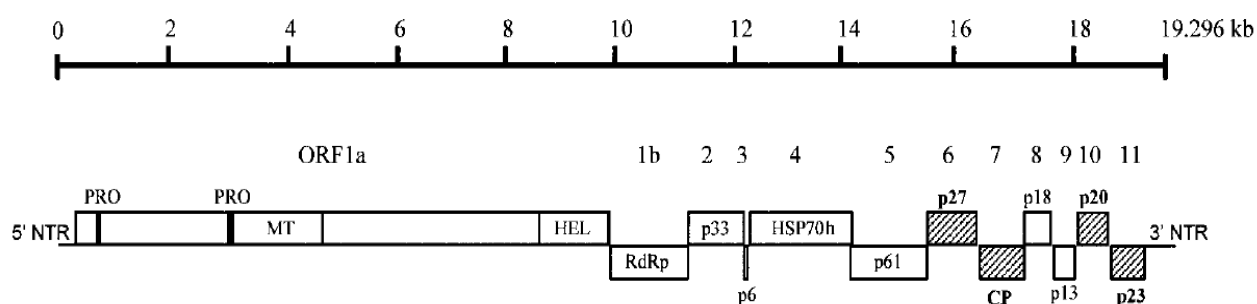
Εικόνα 5 Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του γονιδιώματος CTV. Τα ORFs αντιπροσωπεύονται από τα κουτιά που είναι αριθμημένα από το 1 μέχρι το 11. Το μέγεθος του γονιδιώματος σε νουκλεοτίδια παρουσιάζεται από μια στερεά γραμμή στην κορυφή. Οι θέσεις του CP, και p23 στο γονιδίωμα υποδεικνύονται από τα σκιασμένα κουτιά (Karasev *et al.*, 1995).

1.4.4 Στρατηγική έκφρασης του γονιδιώματος

Η έκφραση του γονιδιώματος του CTV περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται ευρέως από RNA ιούς θετικής πολικότητας : α) την πρωτεολυτική διαδικασία β) τη ριβοσωματική μετακίνηση του πλαισίου γ) το σχηματισμό ενός εστιασμένου 3'- άκρο υπογενωμικού RNA. Η αναπαραγωγή του γενομικού RNA περιλαμβάνει τη σύνθεση των κλώνων θετικής πολικότητας που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη δημιουργία νέων θετικών κλώνων θετικής

πολικότητας αν και τα τελευταία συσσωρεύονται δέκα με είκοσι φορές περισσότερο από τον αρνητικό κλώνο.

Τα πλαίσια ανοικτής ανάγνωσης 1a και 1b μεταφράζονται απευθείας από γενωμικό RNA,. Από το πρώτο παράγεται μια πολυπρωτεΐνη ~349-kDa ενώ από τη μετάφραση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης 1b που εμφανίζεται περιστασιακά προκύπτει μια πολυπρωτεΐνη ~400-kDa η οποία στη συνέχεια υπόκειται σε πρωτεολυτική διαδικασία. Τα δέκα γονίδια στο 3' άκρο του γενωμικού RNA του CTV εκφράζονται από τη σύνθεση υπογενωμικών RNAs στο 3' άκρο όπου δρουν ως αγγελιοφόρα του mRNA από τα οποία και μεταφράζεται το 5' άκρο του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (Εικ. 6). Ένας παρόμοιος συνδυασμός αρνητικής πολικότητας υπογενωμικών RNAs παράγεται στα μολυσμένα κύτταρα αλλά αυτά συσσωρεύονται 40-50 φορές λιγότερο από τα υπογενωμικά RNAs θετικής πολικότητας.



Εικόνα 6 Σχηματική αντιπροσώπευση της οργάνωσης του γονιδιώματος του ctv. Οι περιοχές των πρωτεϊνών αντιπροσωπεύονται από τα κιβώτια και είναι αριθμημένα 1 μέχρι 11. Το μέγεθος του γονιδιώματος στις βάσεις κιλού παρουσιάζεται από μια στερεά γραμμή στην κορυφή. Οι θέσεις του CP, και p23 στο γονιδίωμα υποδεικνύονται από τα σκιασμένα κιβώτια (Karasev *et al.*, 1995).

1.5 CTV διάγνωση και μέθοδοι ανίχνευσης

1.5.1 Ανίχνευση βάση της βιολογίας του ιού

Η διάγνωση της μόλυνσης του CTV έχει εφαρμοστεί για πολύ καιρό με βιολογικές μεθόδους πρόληψης και τη μελέτη των συμπτωμάτων στους ευαίσθητους φυτοδείκτες όπως τα Μεξικάνικα lime και τα *Citrus macrophylla*, τα οποία κατά τη μόλυνση με CTV παρουσιάζουν συστροφή των φύλλων, διάβρωση των μίσχων, λεύκανση των νεύρων στα νεαρά φύλλα (Roistacher, 1991).

1.5.2 Ανίχνευση βασισμένη στις ιδιότητες των πρωτεϊνών του ιού.

Μετά τον καθαρισμό του CTV είναι δυνατή η παραγωγή μονοκλωνικών αντισώματων ενάντια στη καψιδιακή πρωτεΐνη που επιτρέπουν τη διάγνωση του CTV σε δοκιμές ρουτίνας με ανοσοενζυμικές διαδικασίες. Η ELISA ήταν ένα κρίσιμο εργαλείο για να επεκτείνει την έρευνα στα πεδία όπου είχαμε μετακίνηση του ιού, χαρακτηρισμό απομόνωσης, βελτίωση προγράμματος εκρίζωσης. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για το CTV πιθανότατα περισσότερο από κάθε άλλο φυτικό ιό.

1.5.3 Ανίχνευση του ιού βασισμένο στις ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων

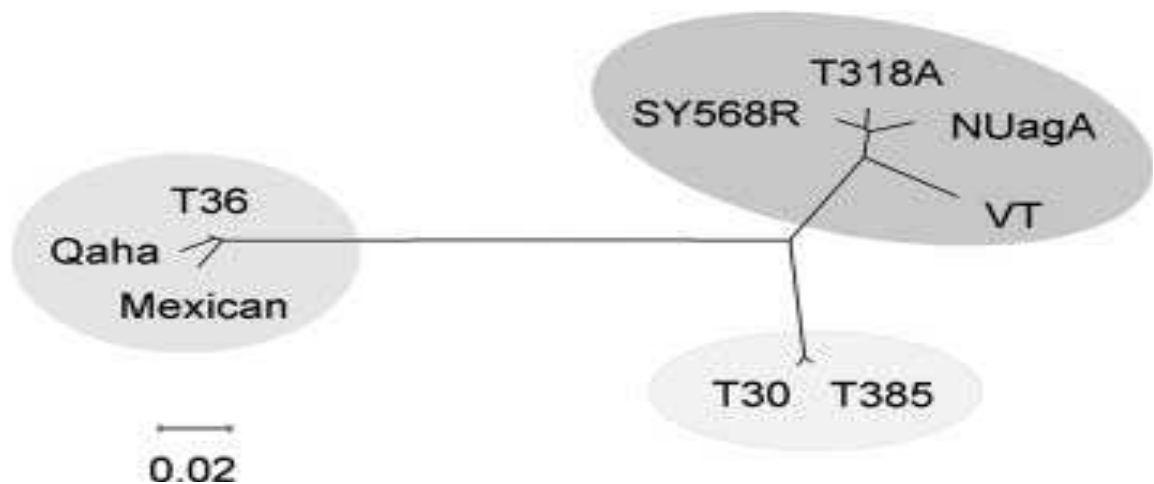
Μετά την πλήρη αλληλούχιση του ctn, το γενομικό RNA είναι διαθέσιμο για διάφορες διαγνωστικές διαδικασίες που είναι βασισμένες στην εξειδικευμένη ανίχνευση του ιικού RNA. Οι πιο κοινές χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι ο υβριδισμός του νουκλεϊκού οξέος με έλεγχο του cDNA ή cRNA ιχνηλάτες με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (reverse transcriptase-polymerase, RT-PCR) και πρωτόκολλα τα οποία έχουν μεγάλη ευαισθησία στην ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο. Επίπροσθέτως επιτρέπουν τον προσδιορισμό της ποσότητας των γενομικών αντιγράφων στους προσβεβλημένους ιστούς των εσπεριδοειδών ή ιωμένες αφίδες (Barbarossa και Savino, 2006).

1.6 Χαρακτηρισμός στελέχους

Ποικιλότητα σε βιολογικά χαρακτηριστικά των απομονώσεων του CTV, συμπεριλαμβανομένων του τύπου και της έντασης των συμπτωμάτων ή της μετάδοσης μέσω αφίδων, έχουν παρατηρηθεί από τις πρώτες επιδημίες. Επίπροσθέτως απόδειξη για την παρουσία διαφορετικών φυλών του CTV τα οποία μπορούν να διαχωριστούν μετά την μετάδοση μέσω αφίδας ή το ξενιστή, αποκτήθηκε επίσης πριν την ταυτοποίηση των RNA ιών ως πληθυσμός γενετικών φύλλων. Παρόλα αυτά η γενετική βάση για αυτή τη γενετική παραλλακτικότητα είναι ακόμα άγνωστη. Η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών απομονώσεων του CTV για την παροχή ενός παθογνωμονικού προφίλ ήταν και συνεχίζει να είναι με εμβολιασμό σε διαφορετικούς φυτοδείκτες .

1.7 Γενετική παραλλακτικότητα

Η γενετική παραλλακτικότητα στο γονιδίωμα του CTV είναι ανομοιόμορφα κατανομημένη, η πιο συντηρημένη περιοχή βρίσκεται στο 3' άκρο με ποσοστά ομολογίας 95% μεταξύ των απομονώσεων, ενώ η περιοχή στο 5' άκρο εμφανίζει τη μεγαλύτερη παραλλακτικότητα με τιμές ομολογίας 44-45%. Οι φυλογενετικές αναλύσεις των εννέα πλήρως αλληλουχημένων απομονώσεων του CTV έδειξαν την κατανομή σε τρεις ομάδες που περιλαμβάνουν 1) απομονώσεις με αυστηρή συμπτωματολογία π.χ T318A από Ισπανία (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006), SY568R από Καλιφόρνια (Vives *et al.*, 2005; Z.-N. Yang *et al.*, 1999), NuagA από Ιαπωνία (Suastika *et al.*, 2001) και VT από Ισραήλ (Mawassi *et al.*, 1996); 2) απομονώσεις με ήπια συμπτωματολογία π.χ T30 από Φλόριντα T385 από Ισπανία (Vives *et al.*, 1999); και 3) οι υπόλοιπες απομονώσεις π.χ T36 από Φλόριντα, Γκάχα από Αίγυπτο (AY340974) και Μεξικό (DQ272579) (Εικ. 7)



Εικόνα 7 Με τη μέθοδο Neighbor-joining δημιουργήθηκε το παραπάνω δέντρο με της πλήρης νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εννέα πλήρως αλληλουχημένων απομονώσεων. οι αλληλουχίες είναι χωρισμένες βάση της ομάδας στην οποία συμπεριλαμβάνονται.

1.8 Σκοπός της έρευνας

Ο CTV είναι ο σημαντικότερος φυτικός ιός των εσπεριδοειδών και προκαλεί τα σοβαρότερα οικονομικά προβλήματα στη βιομηχανία των εσπεριδοειδών στις Μεσογειακές χώρες. Η Ελλάδα θεωρείται σημαντική πηγή για την καλλιέργεια των εσπεριδοειδών στη Μεσόγειο.

Έχοντας κατά νου ότι οι ασθένειες αυτές δεν είναι ενδημικές και μόλις εντοπιστεί ένα δέντρο θετικό αμέσως μπαίνουν σε διαδικασία καραντίνας, σκοπός της πτυχιακής αυτής είναι η έρευνα και η διάγνωση των μολυσμένων δέντρων στην περιοχή της Αγίας Χανίων με τη μέθοδο της ELISA και στη συνέχεια με μοριακές τεχνικές RT-PCR. Τέλος, με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία διάφορων απομονώσεων του ιού που επιλέχθηκαν ήταν δυνατή μια φυλογενετική ανάλυση.

Κεφάλαιο 2.

Υλικά & μέθοδοι

2.1. Αποστείρωση και μέτρα προφύλαξης

Όλα τα πλαστικά, τα γυαλικά και τα γάντια που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε 121°C για 20 min, 15lb/sq.in σε ειδικό κλίβανο. Τα αντιβιοτικά αποστειρώθηκαν με φιλτράρισμα και αποθηκεύτηκαν στους -20°C όπως και όλα τα ενζυμα βρίσκονταν στην ίδια θερμοκρασία τους -20°C

2.2 Φυτικός ιστός

Οι φρέσκοι μίσχοι και τα φύλλα από 200 δείγματα εσπεριδοειδών από την Κρήτη, την περιοχή Κουφός-Αγιάς στο νομό Χανίων πάρθηκαν σε δυο περιόδους (Οκτώβριος-Νοέμβριος και Μάρτιος-Απρίλιος). Οι φρέσκοι ιστοί χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για να γίνει η διάγνωση τους για CTV με τη μέθοδο της ELISA ενώ οι υπόλοιποι κρατήθηκαν στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση (εξαγωγή RNA, RT-PCR)

2.3 Ταυτοποίηση ιών

2.3.1 Ορολογικές μέθοδοι

Κύριος σκοπός χρησιμοποίησης των ορολογικών μεθόδων είναι ο έλεγχος φυτών προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία διαφόρων ιών.

Η διαγνωστική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των μολυσμένων δειγμάτων ήταν η Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) όπου η χρησιμοποίηση ενζύμου για την σήμανση αντισωμάτων αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1966 και αναπτύχθηκε για τον εντοπισμό αντιγόνων. Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκε ο τύπος της Άμεσης-DAS ELISA

(Άμεση Double Antibody Sandwich method ELISA) που περιγράφηκε από τους Clark και Adams το 1977 αποτελούμενος από μια αλληλουχία τεσσάρων σταδίων και σήμερα είναι ο πιο διαδεδομένος.

Στην ELISA χρησιμοποιείται αντιορός με αντισώματα που αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο ιό (αντιγόνο). Ανιχνεύοντας την σύνδεση του αντισώματος και του ομόλογου αντιγόνου συμπεραίνουμε την ύπαρξη του ιού στο δείγμα μας.

ΑΜΕΣΗ-DAS ELISA

<u>ΥΛΙΚΑ :</u>	
1)	Μικροπλάκα ELISA 96 φρεατίων από πολυστηρένιο
2)	Διάλυμα επίστρωσης της πλάκας (Coating Buffer)
3)	γ-ανοσοσφαιρίνη (IgG)
4)	Διάλυμα πλύσης της πλάκας (PBS-Tween)
5)	Φυτό-δότης (δείγμα)
6)	Diaca 0,45%
7)	Συζευγμένη γ-ανοσοσφαιρίνη (IgG-conjugate)
8)	Διάλυμα υποστρώματος (Substrate Buffer)
9)	Ένζυμο (φωσφορική παρα-νιτροφαινόλη, PNPP)
10)	Πιπέτα και πολυπιπέτα
11)	Φωτόμετρο για μέτρηση της οπτικής πυκνότητας

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ :

ΣΤΑΔΙΟ 1^ο

Προσθήκη αντισώματος (IgG) στα φρεάτια της πλάκας το οποίο αραιώθηκε πριν την εφαρμογή σε Coating Buffer. Τα αντισώματα παράγονται με έγχυση του ιού (αντιγόνου) σε κάποιο ζώο (κουνέλι, κατσίκια) το οποίο στην συνέχεια ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό του σύστημα. Βέβαια προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα αντισώματα του ζώου υφίστανται μια διαδικασία καθαρισμού. Ανάλογα με το αντίσωμα που χρησιμοποιούμε υπάρχουν και διαφορετικές αραιώσεις. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αραιώση που αναγράφεται στον Πίνακα 1.

Αφού προσδιοριστεί ο συνολικός όγκος του Coating Buffer που θα χρειαστεί, με βάση τον αριθμό των δειγμάτων γίνεται ο υπολογισμός του όγκου IgG με την βοήθεια της εξίσωσης από τον νόμο της αραιώσης ($C_{IgG} * V_{IgG} = C_{coating\ buffer} * V_{coating\ buffer}$). Συνήθως καλύπτουμε τα 60 κεντρικά φρεάτια της πλάκας και όχι τα περιφερειακά. Σε κάθε φρεάτιο χρησιμοποιήθηκαν 100μl και η εφαρμογή τους γίνεται με ειδική πολυπιπέτα («στρώσιμο της πλάκας»). Οι πλάκες καλύπτονται με ζελατίνα και τοποθετούνται για επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 3 ώρες. Κατόπιν ακολουθεί πλύσιμο των πλακών με PBS-Tween τουλάχιστον τρεις φορές απομακρύνοντας οτιδήποτε δεν είχε προσκολληθεί στα τοιχώματα των φρεατίων κατά τη διάρκεια της επώασης. Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή για να μην υπάρξει επιστροφή των σταγονιδίων στην πλάκα. Το PBS-Tween παραμένει στις πλάκες για 2-3min.

Παρασκευή PBS-Tween : για 10lt χρειάστηκαν 1lt PBS 10x, 10lt απεσταγμένο νερό και 5ml απορρυπαντικό Tween.

Παρασκευή PBS : για 4lt θα χρειάστηκαν 8gr NaCl, 8gr KH₂PO₄, 56gr Na₂HPO₄, 320gr KCl και 4lt απεσταγμένο νερό.

ΙΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΗ ANTIΟΡΟΥ IgG ΣΕ Coating Buffer
CTV	1:1000

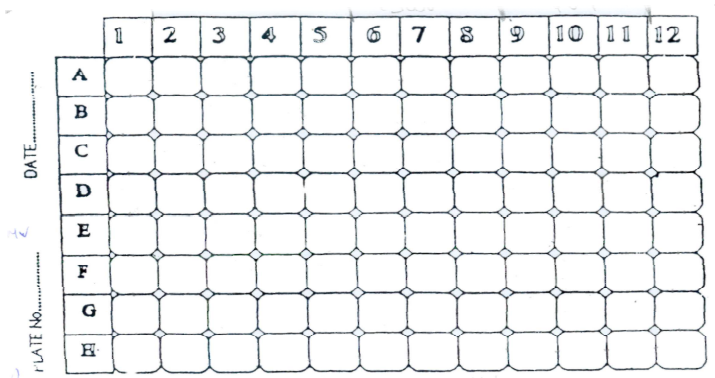
Πίνακας 1: Αραιώσεις της IgG που χρησιμοποιήθηκε

ΣΤΑΔΙΟ 2^ο

Προετοιμασία και τοποθέτηση αντιγόνων (για τον κάθε ιό) στην πλάκα. Λειοτρίβηση 1-1.5gr φυτικού ιστού από το κάθε δείγμα με 2,5ml PBS-Tween και Dieca 45% και τοποθέτηση του φυτικού χυμού σε eppendorf και φυγοκέντρηση τους 1min στις 14.000 rpm. Στη συνέχεια, 100μl από υπερκείμενο του φυτικού χυμού τοποθετούνται στην πλάκα (σε κάθε φρεάτιο υπάρχει και διαφορετικό

δείγμα.). Στην τελευταία στήλη κάθε πλάκας προσθέτουμε τους μάρτυρες (θετικά-μολυσμένα δείγματα από τον συγκεκριμένο ιό που μελετάμε κάθε φορά και χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες), τα αρνητικά (που είναι δηλαδή υγιή) και το διάλυμα εξαγωγής. Στην συνέχεια, οι πλάκες καλύπτονται με ζελατίνα και τοποθετούνται στο ψυγείο στους 4°C για 16-18 ώρες (όλη τη νύχτα). Σε αυτή τη φάση το αντιγόνο προσκολλάται στο αντισώμα που βρίσκεται ήδη προσκολλημένο στα φρεάτια.

Στο στάδιο αυτό κρατάμε πάντα ένα σχέδιο κάτοψης της πλάκας (Εικ. 1) για να μπορούμε να ξέρουμε τον αριθμό του δείγματος που υπάρχει σε κάθε πηγάδι, για την αποφυγή τυχόν λαθών.



Εικ. 1 Σχέδιο κάτοψης πλάκας ELISA.

ΣΤΑΔΙΟ 3^ο

Η μικροπλάκα ξεπλένεται με PBS-Tween ώστε να απομακρυνθούν οι ποσότητες του αντιγόνου που παραμένουν αδέσμευτες και ο φυτικός χυμός. Στη συνέχεια, προστίθεται το συζευγμένο IgG με ειδικό ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση) αραιωμένο σε PBS-Tween. Κατόπιν γίνεται τοποθέτηση 100μl σε κάθε φρεάτιο και επώαση για 3 ώρες στους 37°C, αφού πρώτα η πλάκα καλυφθεί με ζελατίνη. Σε αυτή την επώαση γίνεται πρόσδεση του συζεύγματος στο αντιγόνο.

ΣΤΑΔΙΟ 4^ο

Στη συνέχεια η πλάκα ξεπλένεται με PBS-Tween, όπως στο 1^ο στάδιο. Στο τελευταίο αυτό στάδιο γίνεται η προσθήκη 100μl υποστρώματος. Η παρασκευή του

γίνεται λίγο πριν το τέλος του 3^{ου} σταδίου. Το υπόστρωμα περιλαμβάνει την p-nitrophenyl-phosphate (PNPP) σε αναλογία 1mg για κάθε ml του Substrate Buffer (του οποίου ο συνολικός όγκος έχει υπολογιστεί με βάση τον αριθμό των δειγμάτων). Κατά την επώαση των πλακών σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες, υδρολύονται οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί του υποστρώματος από την αλκαλική φωσφατάση και εμφανίζεται το κίτρινο χρώμα που δηλώνει την σύνδεση αντιγόνου με το ομόλογο αντίσωμα. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γίνεται με ειδικό φωτόμετρο στα 405nm. Το πείραμα θεωρείται επιτυχές όταν ο θετικός μάρτυρας αντιδρά (εμφανίζεται δηλαδή κίτρινο χρώμα) και ο αρνητικός μάρτυρας δεν αντιδρά. Αν τα δείγματα που εξετάζουμε αντιδράσουν όπως και ο θετικός μάρτυρας συμπεραίνουμε ότι ταυτίζονται ορολογικά με αυτόν. Θα πρέπει λοιπόν να ισχύει :

$X > 2y$ ή $3y$ για το μολυσμένο δείγμα και

$X < 2y$ ή $3y$ για το υγιές δείγμα

Όπου X = οπτική πυκνότητα αγνώστου δείγματος και

y = οπτική πυκνότητα υγιούς δείγματος

2.3.2 Μοριακές Μέθοδοι

2.3.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (*Polymerase chain reaction, PCR*).

Η PCR είναι μια εξειδικευμένη μέθοδος η οποία βασίζεται στην ικανότητα μορίων DNA να αναδιπλασιάζονται. Ο αναδιπλασιασμός αυτός στηρίζεται στην ιδιότητα της συμπληρωματικότητας των οργανικών βάσεων του DNA, δηλαδή στην ικανότητα των αδενινών μιας αλυσίδας του DNA να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις θυμίνες της άλλης αλυσίδας και οι κυττοσίνες ομοίως να ενώνονται με τις γουανίνες, επιτρέποντας έτσι τον σχηματισμό ενός δίκλωνου μορίου.

Η διαδικασία αναδιπλασιασμού ξεκινά με μία αποελίκωση του δίκλωνου DNA για τον σχηματισμό μονόκλωνων περιοχών (τοπική αποδιάταξη). Οι μονόκλωνες αυτές περιοχές λειτουργούν ως εκμαγεία σε προκαθορισμένες θέσεις για την βιοσύνθεση συμπληρωματικών μορίων μονόκλωνου RNA. Τα μόρια αυτά λειτουργούν δηλαδή ως εκκινητές (primers) για την βιοσύνθεση του DNA, δηλαδή

τον πολυμερισμό τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων (dNTPs) σε νέες αλυσίδες DNA συμπληρωματικές ως προς την αρχική πατρική. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από ένα ολοένζυμο την DNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση.

Η PCR λοιπόν μιμείται αυτή την φυσική διαδικασία αναδιπλασιασμού του DNA. Αποδιατάσσοντας την διπλή αλυσίδα DNA ενός μορίου (στην προκειμένη περίπτωση των ιών) και προσθέτοντας κατάλληλους εκκινητές κ.α, μπορεί να ανιχνεύει και να πολλαπλασιάζει τμήματα του DNA ή RNA γονιδιώματος στόχου και την ταυτοποίηση του εν' λόγω ιού εφόσον το τμήμα του γονιδιώματος που έχει επιλεγεί σαν στόχος υπάρχει στον οργανισμό (ιό) και μόνο και σε κανέναν άλλο.

ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ PCR

α) Αποδιάταξη του DNA

Στο στάδιο αυτό γίνεται η ολική, θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες που πραγματοποιείται συνήθως με μία επώαση του μίγματος στους 90-95°C για 30-60 δευτερόλεπτα.

β) Επανασύνδεση του εκμαγείου με τους εκκινητές

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η υβριδοποίηση των εκκινητών με το εκμαγείο. Γίνεται η δέσμευση των εκκινητών σε κάποια περιοχή (αλληλουχία στόχο που έχουμε προκαθορίσει ως μοναδική για τον κάθε ιό. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η γνώση της αλληλουχίας του DNA ή RNA στόχου) της μιας από τις δύο αλυσίδες η οποία είναι συμπληρωματική στην ακολουθία βάσεων των εκκινητών. Ο κάθε εκκινητής δεσμεύεται σε διαφορετική αλυσίδα και σε αντιπαράλληλη κατεύθυνση (από το 5' προς το 3' άκρο της αλυσίδας) σχηματίζοντας έτσι ένα μικρό δίκλωνο τμήμα. Η επανασύνδεση γίνεται στους 40-70°C για 60 δευτερόλεπτα (ανάλογα με το μήκος εκκινητών και την αλατότητα του διαλύματος).

γ) Επιμήκυνση των δεσμευμένων εκκινητών

Η επιμήκυνση των εκκινητών αρχίζει από το 3'-OH άκρο τους και καταλύεται από το ένζυμο Taq-πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό πολυμερίζει τα μονομερή dNTPs μέσω επώασης στους 72°C για 30-60s καταλήγοντας έτσι στην

σύνθεση νέων τμημάτων DNA, όπου το ένα άκρο (το 5') συνιστά πάντοτε ο εκκινητής που έχει νουκλεοτιδική αλληλουχία συμπληρωματική ως προς αυτή της μιας αλυσίδας του εκμαγείου.

Ο κύκλος των παραπάνω σταδίων επαναλαμβάνεται 25 έως 35 φορές και ολοκληρώνεται με μια επώαση στους 72°C για 10min.

Η PCR πραγματοποιείται σε ειδικές συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές που προγραμματίζονται κατάλληλα ώστε η θερμοκρασία να μεταβάλλεται ταχύτατα και με μεγάλη ακρίβεια.

Η Taq-πολυμεράση προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και έχει ως βέλτιστη θερμοκρασία τους 72°C και ο χρόνος ημιζώης ανέρχεται στα 11 min στους 97.5°C, 40min στους 95°C και πάνω από 2 ώρες στους 92.5°C. Η βέλτιστη τιμή pH κυμαίνεται μεταξύ 8.2 και 9.0 στους 25°C. Ως εκμαγείο χρησιμοποιείται το εκχύλισμα ασθενών φυτών. Οι εκκινητές είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει την εξειδίκευση του προϊόντος της αντίδρασης. Η επιλογή τους λοιπόν είναι καθοριστική για την ακρίβεια και την απόδοση της PCR. Για να εξασφαλιστεί η εξειδίκευση της αντίδρασης προσπαθούμε να επιλέξουμε ως θέσεις δέσμευσης εκείνα τα σημεία ενός εκμαγείου τα οποία εμφανίζουν την μεγαλύτερη μοναδικότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων τους. Η συγκέντρωση ιόντων Mg^{++} στο διάλυμα αντίδρασης είναι εξαιρετικά σημαντική τόσο για την πιστότητα όσο και για την απόδοση της PCR. Επηρεάζει α) την ορθή αλληλουχιακά επανασύνδεση εκκινητών στο εκμαγείο β) την θερμοκρασία διάστασης των δίκλωνων μορίων DNA και γ) την αναγνώριση νουκλεοτιδίων από την πολυμεράση κ.α.

Για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR απαιτείται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήγμα αγαρόζης. Το πήγμα εμβαπτίζεται στη συνέχεια σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Κατά την διάρκεια επώασης το βρωμιούχο αιθίδιο εισχωρεί στο πήγμα, δεσμεύεται εκλεκτικά μεταξύ κατάλληλων βάσεων DNA και όταν ακτινοβοληθεί σε υπεριώδεις ακτίνες φθορίζει έντονα κάνοντας έτσι ορατό το DNA.

Εκτός από την απλή PCR η οποία περιγράφηκε παραπάνω υπάρχουν και άλλα είδη PCR, όπως :

- 1) Εστιασμένη PCR (Nested PCR)
- 2) Ημιεστιασμένη PCR (Semi Nested PCR)
- 3) Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR)

- 4) RT-PCR (PCR μετά ανάστροφη μεταγραφή)
- 5) BIO-PCR
- 6) Ανοσοδέσμευση PCR (IC PCR)
- 7) Δέσμευση αποτυπώματος PCR (PC PCR)

2.4 Προετοιμασία φυτικού υλικού

2.4.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA

1. Εκχύλιση του δείγματος (300mg) σε 3ml διαλύματος ομογενοποίησης (grinding buffer: 4M Θειοκυανιούχος γουανιδίνη, 0,2M NaOAc pH 5.2, 25mM EDTA, 5M KOAc, 6% PVP-30, Applichem) και φυγοκέντρωση του εκχυλίσματος στις 13.000rpm για 1 λεπτό.
2. Μεταφορά 500μl από την υδατινή φάση (υπερκείμενο) σε νέο μικροσωλήνα και προσθήκη 100μl 10% *N*-lauryl sarkosyl (40ml απιονισμένο ύδωρ, 4 gr *N*-lauryl sarkosyl). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους 70°C για 10 λεπτά (ενδιάμεση ανάδευση ανά 2 λεπτά) και εν συνεχεία παραμονή του μικροσωλήνα στον πάγο τουλάχιστον για 5 λεπτά.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 10 λεπτά και μεταφορά 300μl από το υπερκείμενο σε νέο μικροσωλήνα. Μετά την προσθήκη 150μl αιθανόλης (100%), 300μl NaI 6M και 25μl υδατικού αιωρήματος SiO₂ (silica, Sigma S-5631), για τη δέσμευση του RNA, ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, με ενδιάμεση ανάδευση ανά 2-3 λεπτά.
4. Φυγοκέντρωση στις 6.000rpm για 1 λεπτό και απόχυση του υπερκειμένου. Το ιζήμα επαναδιαλυτοποιείται σε 500μl διαλύματος έκπλυσης (wash buffer: 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,5mM EDTA, 50mM NaCl, 50% αιθανόλη) και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 6.000rpm για 1 λεπτό.
5. Το στάδιο έκπλυσης του ιζήματος επαναλήφθηκε δυο φορές. Τοποθέτηση του μικροσωλήνα σε θάλαμο νηματικής ροής και επαναδιάλυση του ιζήματος, αφότου στεγνώσει, σε 150μl ύδατος που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC.
6. Επώαση του διαλύματος στους 70°C για 4 λεπτά (ενδιάμεση ανάδευση ανά 2 λεπτά) και φυγοκέντρωση στις 14.000rpm για 3 λεπτά. Μεταφορά του

υπερκείμενου σε νέο μικροσωλήνα και προσθήκη 1ml αιθανόλης 100% και 10ml οξικό νάτριο.

7. Παραμονή του διαλύματος στους -80°C όλη τη νύχτα για την κατακρήμνιση του RNA. Την επομένη φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 10 λεπτά, απομακρύνθηκε η υδάτινη φάση και το ίζημα παρέμεινε για στέγνωμα σε θάλαμο νηματικής ροής. Η τελική παραλαβή του ολικού RNA έγινε μετά από επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50μl ύδατος που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC. Το rna αποθηκεύεται στους -80°C

2.5 Εφαρμογή μοριακών μεθόδων ανίχνευσης του *ctv*

2.5.1 Ολιγονουκλεοτίδια

Οι συγκεκριμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές του CTV (Πίν. 2) δημιουργήθηκαν βασιζόμενοι στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της απομόνωσης T385 (Y18420) (Al Viveset, 1999) και σχεδιάστηκαν για να ενισχύσουν δυο γονίδια του CTV, την p23 και την CP.

Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')
CTV-T385-P23-F	ATGGATGATACTAGCGGACAA
CTV-T385-P23-R	TCAGATGAAGTGGTGTTCACG
CTV-T385-CP-F	ATGGACGACGAAACAAAGAAAT
CTV-T385-CP-R	TCAACGTGTGTAAATTTCCCA

Πίνακας 2. Συγκεκριμένοι ανοδικοί (F) and καθοδικοί (R) ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές

2.5.2 RT-PCR για την ανίχνευση των πρωτεϊνών του CTV

Για την εφαρμογή της RT-PCR ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ολικού RNA. Και οι δυο αντιδράσεις έγιναν στον ίδιο μικροσωλήνα των 0,2ml σε ένα τελικό όγκο διαλύματος 25μl. Το διάλυμα της αντίδρασης περιείχε: 10mM Tris-HCl (pH 8.8), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 5% DMSO, 0,5mM DDT, 0,25mM από κάθε

dNTP, 0,2μM εκκινητή CLSup και 0,4μM CLSdo, 12 μονάδες αναστολέα ριβονουκλεασών Ribonuclease inhibitor (HT Biotechnology, England), 0,7 μονάδες AMV αντίστροφη μεταγραφάση (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase, Finnzymes, Finland), 0,7 μονάδες Superscript™ II Rnase H αντίστροφη μεταγραφάση (Invitrogen, The Netherlands) και μία μονάδα Dynazyme™ II DNA πολυμεράση (Finnzymes, Finland). Τέλος, αφού το διάλυμα φτάσει στα 23μl με την προσθήκη ύδατος που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC, προστίθενται 2μl εκχυλίσματος ολικού RNA (εκμαγείο).

Η αντίδραση της RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Mastercycler gradient, Eppendorf) σύμφωνα με το ακόλουθο προφίλ:

1. 47°C για 50' και 50°C για 7', για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε DNA
2. 94°C για 4', για την μετουσίωση της αντίστροφης μεταγραφάσης
3. 32 κύκλοι που περιλαμβάνουν τα εξής στάδια:
 - i. 96°C για 40''. Αποδιάταξη του δίκλωνου εκμαγείου DNA
 - ii. 52°C για 40''. Υβριδοποίηση των εκκινητών με το εκμαγείο
 - iii. 72°C για 1:30''. Επέκταση των εκκινητών
 - iv. Ένα τελικό στάδιο επέκτασης στους 72°C για 2', για συμπλήρωση των ημιτελών αλυσίδων.

2.6 Ανίχνευση προϊόντων της RT-PCR (Διαδικασία ηλεκτροφόρησης αγαρόζης)

Η ανίχνευση των τελικών προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκε 1,5% αγαρόζη σε διάλυμα της ηλεκτροφόρησης TAE 1X (TAE 50X για 1lt: 242 gr Tris-base, 57,1ml οξικό οξύ, 100ml EDTA pH 8.0). Μετά τη θέρμανση του διαλύματος (άγαρ/TAE 1X) για 2-3 λεπτά η πηκτή τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Μετά την πήξη της πηκτής η συσκευή πληρώθηκε με TAE 1X και ακολούθησε η φόρτωση των προϊόντων της RT-PCR. Δέκα μl από το προϊόν της RT-PCR αναμείχθηκαν με 1μl χρωστικής ουσίας (50% γλυκερόλη, 0,01M NaH₂PO₄ pH 7.0, 0,4% κυανού της βρωμοφαινόλης), ενώ για τη σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένας δείκτης

μοριακού βάρους ανά 100ζβ [Ladder 100 bases pair, (bp), BioLabs^{Inc}, New England, ΗΠΑ].

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 110V για 1 ώρα και 45 λεπτά και εν συνεχεία η πηκτή τοποθετήθηκε σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5mg/ml), για 30 λεπτά. Η θέση των προϊόντων γίνεται ορατή κατά την τοποθέτηση της πηκτής σε τράπεζα φθορισμού (UV transilluminator).

2.7 Εξαγωγή προϊόντος PCR από την πηκτή αγαρόζη

Αρχικά έγινε μια εστιασμένη PCR για κάθε ένα από τα δείγματα τελικού όγκου 80μl. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης (συγκέντρωση 1,5%) και η επιθυμητή ζώνη στα 312ζβ απομακρύνθηκε με αποστειρώμενη λεπίδα και τοποθετήθηκε σε μικροσωλήνα των 2ml.

Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα "matrix gel extraction system" (Marligen Bioscience, USA) σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο.

Ομογενοποίηση της πηκτής σε 30μl διαλύματος διαλυτοποίησης (Gel Solubilization, L1) ανά 10mg πηκτής και προσθήκη 1/10 όγκου διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂, Silica Resin) για την δέσμευση του DNA. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση του μικροσωλήνα σε υδατόλουτρο στους 50°C για 15 λεπτά, με ενδιάμεση ανάδευση ανά 3 λεπτά. Αφού το διάλυμα της πηκτής διαλυτοποιηθεί πλήρως ακολουθεί μια ακόμη ανάδευση και επανατοποθέτηση του μικροσωλήνα στο υδατόλουτρο (50°C) για 5 λεπτά.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση του εναιωρήματος για 30 δευτερόλεπτα στα 12.000 g (rcf) και απόχυση του υπερκείμενου. Το ίζημα επαναδιαλύεται στο διάλυμα L1 και φυγοκεντρήθηκε για 30 δευτερόλεπτα στα 12.000 g. Ακολούθησαν δυο πλυσίματα με το διάλυμα L2 (Washing buffer, 30μl/10mg πηκτής και φυγκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα 12.000 g), το οποίο περιέχει αιθανόλη, και στέγνωμα του ιζήματος SiO₂ με το δεσμευμένο DNA σε θάλαμο νηματικής ροής για 5-10 λεπτά.

Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ύδωρ που έχει υποστεί μεταχείριση με DEPC και τοποθετείται για επώαση σε υδατόλουτρο στους 50°C για 5 λεπτά (με μια ενδιάμεση ανάδευση) για την απελευθέρωση του DNA στο υδατικό διάλυμα. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 12.000 g για 30 δευτερόλεπτα και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε

σε νέο μικροσωλήνα 1,5ml. Το καθαρό αυτό προϊόν της εστιασμένης PCR χρησιμοποιήθηκε για απευθείας αλληλούχιση (direct sequencing).

2.8 Φυλογενετική ανάλυση

Για τη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν απομονώσεις του *ctv* για της πρωτεΐνη *cp* σε σύγκριση με τις ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες του γονιδίου από άλλα στελέχη. Για τη στοίχιση των αλληλουχιών αμινοξέων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CLUSTAL-X (Thompson et al., 1997), ενώ η απεικόνιση του δένδρου έγινε με το πρόγραμμα TreeView (Page, 1996) με τη μέθοδο της ένωσης γειτόνων (Neighbor-joining analysis).

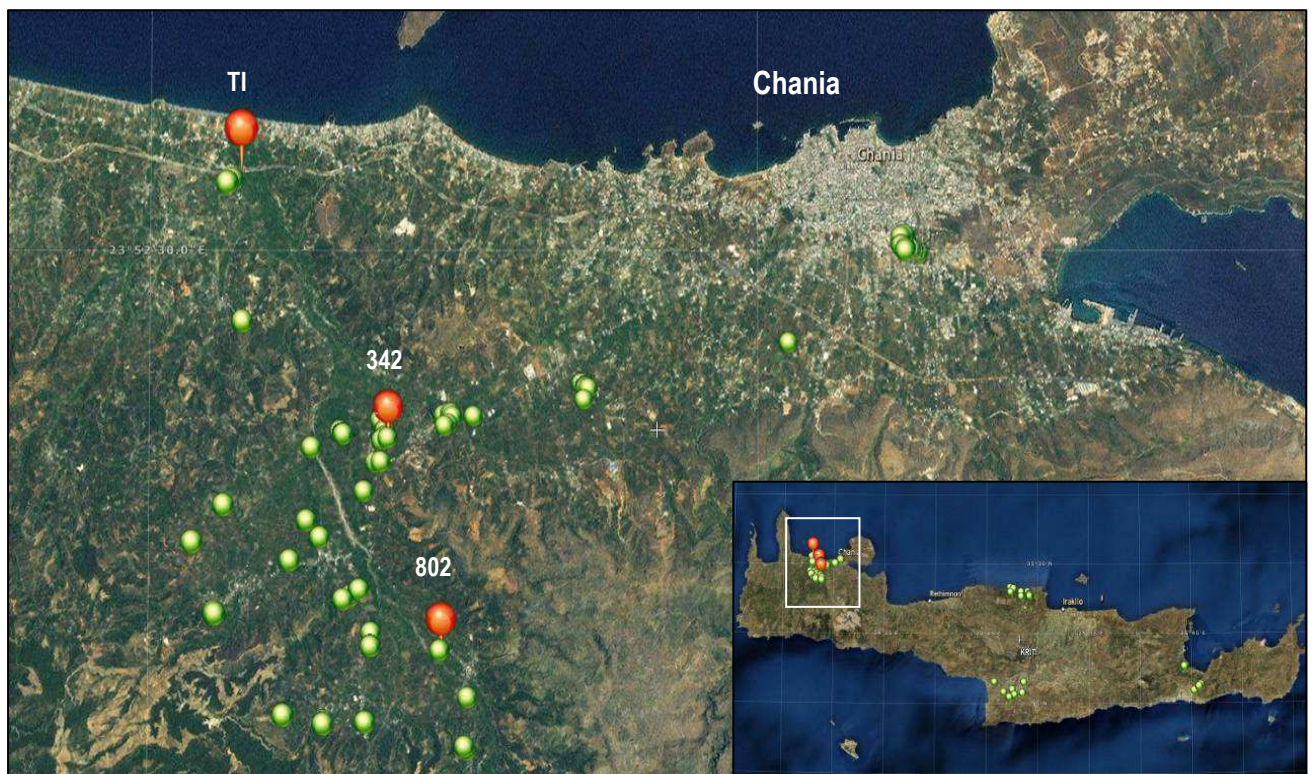
Κεφάλαιο 3.

Αποτελέσματα

3.1 Οροθετική ανίχνευση του CTV στους φυτικούς ιστούς

Κύριος στόχος αυτής της πτυχιακής ήταν η ανίχνευση του ιού της τριστέτσας καθώς και ο προσδιορισμός των στελεχών που μπορεί να βρίσκονται σε μια περιοχή. Διακόσια δείγματα εσπεριδοειδών συλλέχθηκαν με τη βοήθεια της γεωργικής υπηρεσίας του νομού Χανίων της περιόδου (Οκτώβριος-Νοέμβριος) και (Μάρτιος-Απρίλιος) σε τρεις διαφορετικές περιοχές α) Αγία Χανίων (π.χ δείγμα 342) β) Μόδι Χανίων (π.χ δείγμα Ti) γ) Φουρνές Χανίων (π.χ δείγμα 802) (Εικ.3.1 και 3.3).

Ο φρέσκος ιστός ελέγχθηκε αρχικά με τη μέθοδο της ELISA, χρησιμοποιώντας ένα διαθέσιμο στο εμπόριο kit (PlantPrint, Valencia-Spain) με τη χρήση της μεθόδου όπως περιγράφεται στα υλικά και μεθόδους. Οι τρυφεροί νέοι βλαστοί και κλάδοι με τα ανεπτυγμένα φύλλα ελέγχθηκαν από τέσσερις διαφορετικές πλευρές του δέντρου. Από τα διακόσια δείγματα που συλλέγησαν συνολικά τα 146 βρέθηκαν θετικά στον ιό, και για ακόμη 4 τα αποτελέσματα δεν ήταν σίγουρα (γραφ 1).

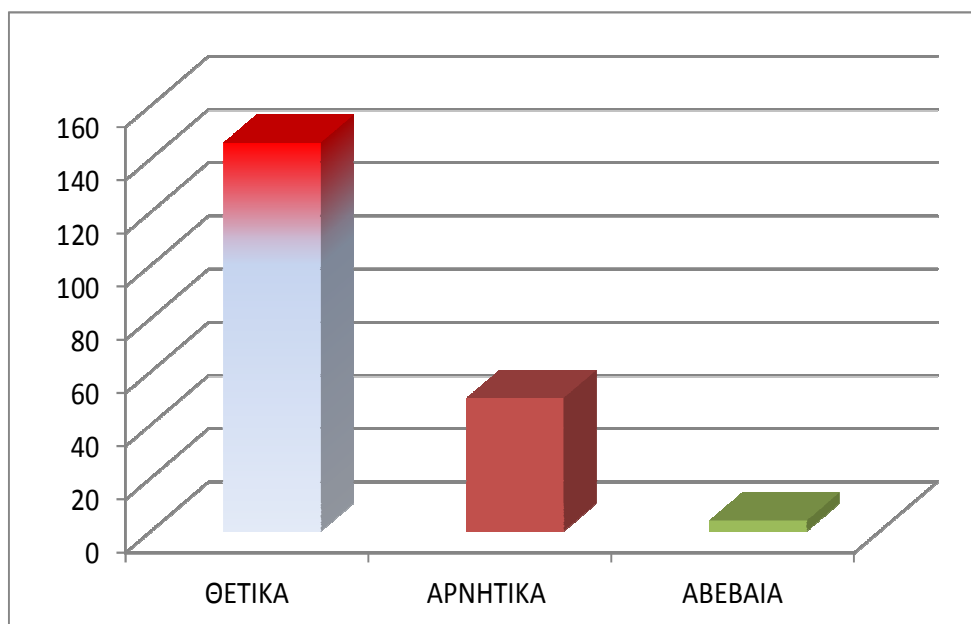


Εικόνα 3.1 Η δορυφορική εικόνα για το νησί της Κρήτης παρουσιάζει τις θέσεις των μολυσμένων δέντρων (Tj, 342 και 802) ως κόκκινα σημεία, ενώ τα πράσινα σημεία είναι οι τομείς μη μολυσμένοι που εξετάστηκαν επίσης από την ELISA.





Εικόνα 3.3 Τα μολυσμένα δέντρα με ctv κατά τη διάρκεια των περιόδων φθινόπωρο και άνοιξη από της περιοχές Αγιά, Μόδι, Φουρνές Χανίων

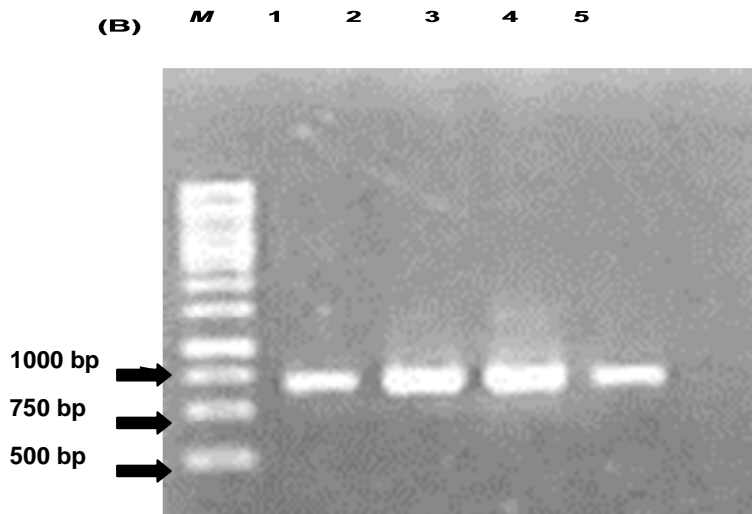


Γράφημα 1 :Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ELISA

3.2. Διάγνωση του CTV χρησιμοποιώντας τη μέθοδο RT-PCR

Τα αβέβαια δείγματα της ELISA ελέγχθησαν με τη μέθοδο της RT-PCR για να επιβεβαιωθεί η προσβολή του ιού χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα για το CTV ένα μολυσμένο δείγμα προερχόμενο από την Αθήνα (Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο) στοχεύοντας σε συγκεκριμένα πλήρη γονίδια την CP.Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 (2.5.2) χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτίδια (κεφάλαιο 2.5.1) με την χρήση του ενζύμου primescript Takara

Μετά την RT-PCR, τα προϊόντα του DNA αναλύθηκαν σε ένα πήκτωμα αγαρόζης 1% το οποίο και έδωσε αποτελέσματα μεταξύ των 500-750bp όπου και ανήκει η καψιδιακή πρωτεΐνη (CP μεγέθους 780bp). Αποτέλεσμα το οποίο δείχνει ότι τα δείγματα είναι μολυσμένα με τον ιό του CTV (εικ 3.4)



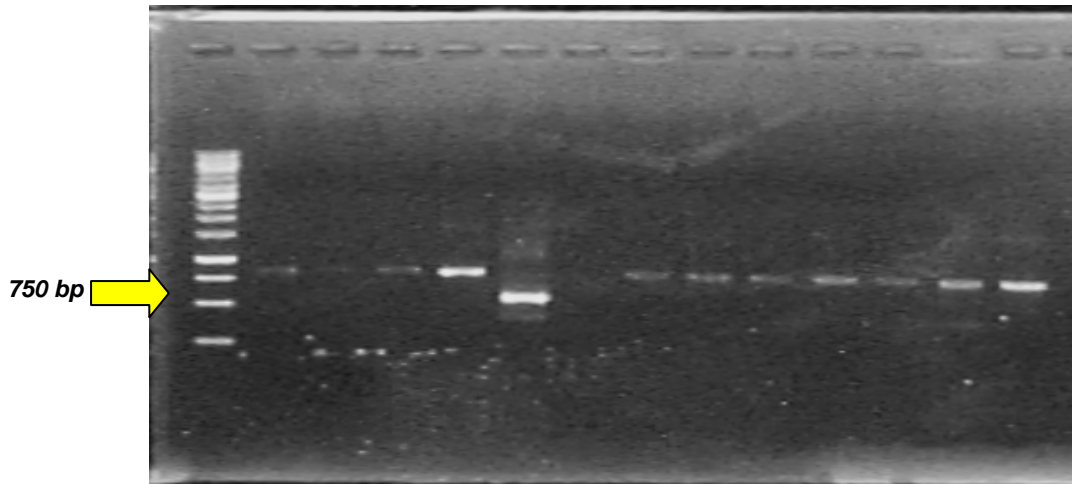
Εικόνα 3.4. Ανίχνευση του CTV με τη μέθοδο RT-PCR χρησιμοποιώντας μολυσμένα δείγματα για την CP πρωτεΐνη.

3.3 Απομόνωση γονιδίων του CTV

Εφόσον έγινε η διαπίστωση του ιού, και τα δέντρα ήταν μολυσμένα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της RT-PCR με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν (κεφάλαιο 2.5.1) και σε άλλα εννέα τυχαία δείγματα με σκοπό την απομόνωση της καψιδιακής πρωτεΐνης και της ρ23 (εικ 3.5 και 3.6), για να βρεθεί η προέλευση των στελεχών της. Στη μέθοδο αυτή (περιγράφετε στο κεφάλαιο 2.5.2) χρησιμοποιήθηκε το ενζυμο LA Taq TaKaRa πολυμεράσης και τα προϊόντα αποτυπώθηκαν σε ένα πήκτωμα αγαρόζης (εικ 3.5)

CP

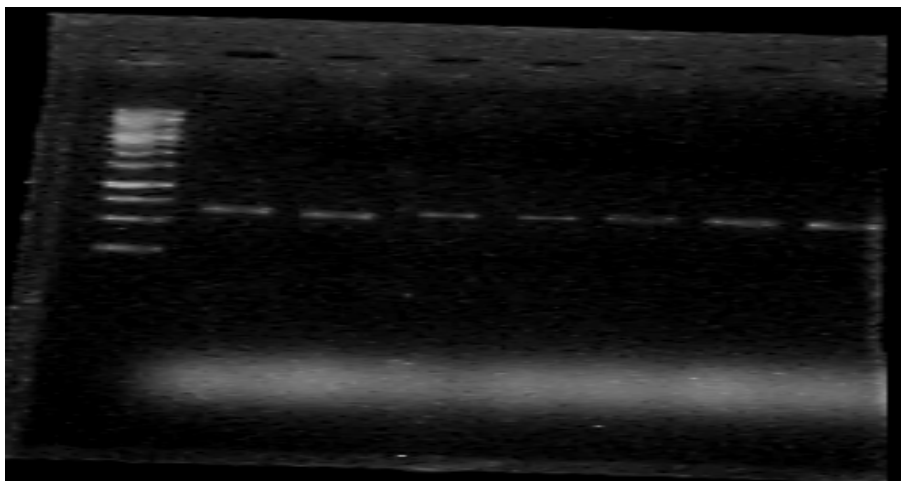
M	2	1	3	2	1	κ	3	1	1	T	3	8	3
	5	8	2	5	8	α	2	8	5	I	2	0	4
	8	4	8	6	2	l	5	2	6		6	2	2
	3	8	8	6	3	v	0	5	6		0		



Εικόνα 3.5 απεικόνιση της cp πρωτεΐνης διαφόρων δειγμάτων σε ένα πήκτωμα αγαρόζης

P23

M	2	3	2	3	8	T	1
	5	2	5	4	0	I	8
	8	8	6	2	2		8
	3	8	6				1



Εικόνα 3.6 απεικόνιση της p23 πρωτεΐνης διαφόρων δειγμάτων σε ένα πήκτωμα αγαρόζης

3.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης

Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτώματα αγαρόζης ακολουθήθηκε η διαδικασία εξαγωγή τους με τη διαδικασία όπως περιγράφεται (κεφάλαιο 2.6.1), στη συνέχεια τα καθαρισμένα δείγματα στάλθηκαν στο εργαστήριο της Λάρισας όπου και έγινε η ανάλυση του στα παρακάτω :

Για την cp πρωτεΐνη

Κωδικός δείγματος 1848

ATGAATCGAGAATCAGAACGCAATAAATCAACGTGTTAAATTTCCCAAGCTGCC
TGACATTAGTAACTACGACCTCATCAGCCCCTCGCTTCTTTAATAAATTGCTCTTTA
GCTTGTAAGTACACTGCACATTTCTAAATCAGTCAAGCCAGCTCCGGTCAAGAAAT
CTGCACACAGGTAGTGATACCCGGCTGGAATTCCTGCATCTAACGGACGTCCACC
ATAACTCAAGTTGCGGTTCTGTCTACAAAAAGCCAAATAAAGGGCATCGTTAGTT
CTACCCAGACTCGAAGGGCGTTAGTACGGTTACCAATACCCTTAGAGTTAAACA
CGACGTCTGTCCAAAGTTTGTTCAGACAACCTCCACTTCAACACCTTCCCGAGTGTA
CGTCACACCCGTTGGTATCATCGTCGCTTTGTAATGATGAACTCTTAACTGCTAAAC
GATATAACATCATAGCTATGTGAAAGTCTTTATCTTTGTCAGGTAAGTTAGGATA
CTTCCCTTTCAAGGTAAGAAACAAATCTCTATTCAAAGCAGCATTCTGTTGGGTA
CCCAACTGACGCACATCGTTCATCGCTATCAGAGTCGGATCGATGTGTAAGTTTA
ACGAACCGAAAGAAGACTCAGCTGCAACAACATCGTCGCCTTCTTTTCGTTTCCTT
GTTTTGTCTTCAATTTCTTTGTTTCGTCGTCATAATTCAAACCTAGTAAACA
AT

Κωδικός δείγματος 3288

ATGAATCGAGAATCAGAACGCAATAAATCAACGTGTTAAATTTCCAAGCTGCT
GACATTAGTAACTACAACCTCATCAGCCCCTCGCTTCTTTAATAAATTGCTCTTTAG
CTTGTAAGTACACTGCACATTTCTAAATCAGTCAAGCCAGCTCCGGTCAAGAAATC
TGCACACAGGTAGTGATACCCGGCTGGAATTCCTGCATCTAACGGACGTCCACCA
TAACTCAAGTTGCGGTTCTGTCTACAAAAAGCCAAATAAAGGGCATCGTTAGTTC
TACCCAGACTCGAAGGGCGTTAGTACGGTTACCAATACCCTTAGAGTTAAACAC
GACGTCTGTCCAAAGTTTGTTCAGACAACCTCCACTTCAACACCTTCCCGAGTGTA
GTCACACCCGTTGGTATCATCGTCGCTTTGTAATGATGAACTCTTAACTGCTAAAC
GATATAACATCATAGCTATGTGAAAGTCTTTATCTTTGTCAGGTAAGTTAGGATA
CTTCCCTTTCAAGGTAAGAAACAAATCTCTATTCAAAGCAGCATTCTGTTGGGTA
CCCAACTGACGCACATCGTTCATCGCTATCAGAGTCGGATCGATGTGTAAGTTTA

ACGAACCGAAAGAAGACTCAGCTGCAACAACATCGTCGCATTGGTTCGTTTCCTT
GTTTTGTTTTCAATTTCTTGTTCGTCTGGTCCCCATTAAC

Κωδικός δείγματος 1825

CGCTTTTTTAATAAATTGCTCTTTAGCTGAAAGTACACTGCACATTCTAATCAGTC
AAGCCAGCTCCGGTCAAGAAATCTGCACACAGGTAGTGATACCCGGCTGGAATT
CCTGCATCTAACGGACGTCCACCATAACTCAAGTTGCGGTTCTGTCTACAAAAG
CCAAATAAAGGGCATCGTTAGTTCTACCCCAGACTCGAAGGGCGTTAGTACGGT
ACCAATACCCTTAGAGTTAAACACGACGTCTGTCCAAAGTTTGTCTAGACAACCTC
ACTTCAACACCTTCCCGAGTGTACGTACACCCGTGGTATCATCGTCGCTTTGTAA
TGATGAACTCTTAACTGCTAAACGATATAACATCATAGCTATGTGAAAGTCTTTA
TCTTTGTCAGGTAAGTTAGGATACTTCCCTTTCAGGTAAGAAACAAATCTCTATT
CAAAGCAGCATTCTGTTGGGTACCCAACCTGACGCACATCGTTCATCGCTATCAGA
GTCGGATCGATGTGTAAGTTTAACGAACCGAAAGAAGACTCAGCTGCAACAACA
TCGTCTGCTTTTCGTTTCCTTGTTTTTGTTCTTCAATTTCTTGTTCGTCTCCAT

Κωδικός δείγματος T1

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAACAAAGGAAACGAAAGAAGG
CGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTCGGTTCGTAACCTTACACATCGATC
CGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGC
TTTGAACAGGGACTTATTTCTTGCTCTGAAAGGGGAAGTATCCTAACTTGCCTGAC
AAAGATAAGGACTTTCACATAGCTATGATGTTATACCGTTTAGCGGTTAAGAGTT
CATCATTGCAAAGTGATGATGACACCACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTG
TTGAAGTAGATTTGTCTGACAACTTTGGACCGACATCGTGTATAATTCTAAGGG
TATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCTCTT
TACTTAGCCTTTTGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCGCTAG
ATGCAGGGATTCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGC
TGGCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTGTTG
AAAAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAA
TTAACACACGTTGA

Κωδικός δείγματος 342

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAACAAAGGAAACGAAAGAAGG
CGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTCGGTTCGTAACCTTACACATCGATC
CGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGC
TTTGAACAGGGACTTATTTCTTGCTCTGAAAGGGGAAGTATCCTAACTTGCCCGAC
AAAGATAAGGACTTTCACATAGCTATGATGTTATACCGTTTAGCGGTTAAGAGTT
CATCATTGCAAAGTGATGATGACACCACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTG
TTGAAGTAGATTTGTCTGACAACTTTGGACCGACATCGTGTATAATTCTAAGGG
TATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCTCTT
TACTTAGCCTTTTGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCGCTAG
ATGCAGGGATTCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGC
TGGCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTGTTG
AAAAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAA
TTAACACACGTTGA

Κωδικός δείγματος 802

ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGG
CGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTCCGGTCCGTAAACTTACACATCGATC
CGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGC
TTTGAACAGGGACTTATTTCTTGCTCTGAAAGGGAAGTATCCTAACTTGCCTGAC
AAAGATAAGGACTTTCACATAGCTATGATGTTATACCGTTTACGCGTTAAGAGTT
CATCATTGCAAAGTGATGATGACACCACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTG
TTGAAGTAGATTTGTCTGACAAACTTTGGACCGACATCGTGTATAATTCTAAGGG
TATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCTCTT
TACTTGGCCTTTTGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAG
ATGCAGGGATTCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGC
TGGCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTGTTG
AAAAAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAA
TTTAAACACACGTTGA

Για την p23 πρωτεΐνη

Κωδικός δείγματος T1

ATGGATGATACTAGCGGACAAACTTTCGTTTCTGTGAACCTTCTGACGAAAGCA
ACACGGCAAGCACTAAAGTTGAAAACGTAAAATCGGAAGCGGATCGCTTGGAGT
TTTTACGTAAAATGAATCCCTTTATTGTTGACGCTCTGGTGCGGAAAACCAATTAT
CAGGGTGCTCGCTTTCGCGCAAGAATAATAGGAGTGTGCGTGGATTGTGGTAGAA
AACACGACAAGGCGCTCAAGACTGAACGTAAGTGTAAGGTCAACAATACGCAAT
CTCAGAACGAGGTGGCGCATATGTTGATGCACGATCCCGTTAAGTATTTGAACAA
AAGAAAGGCTAGAGCCTTTTCTAACGCAGAGATGTTTGCATTGAATTGGTTTTG
TACACCAAGGAAAGGCAATTGGCGGTTCGATTTAGCCGCTGAAAGGGAGAAGACG
AGACTGGCTCGTAGACACCCAATACGTTCTCCGGAAGAACTCCGGAACATTATA
AATTCGGTATGACTGCTAAGGCAATGTTACCGGACATCAACGCCGTAGACGTTGG
TGATAACGAGGAAACTTCGTCGGAGTACCCAGTGAGTCTGAGTGTCTGCGGGA
GTTCTCCGTGAACACCACTTCATCTGA

Κωδικός δείγματος 342

ATGGATGATACTAGCGGACAAACTTTCGTTTCTGTGAACCTTCTGACGAAAGCA
ACACGGCAAGCACTAAAGTTGAAAACGTAAAATCGGAAGCGGATCGCTTGGAGT
TTTTACGTAAAATGAATCCCTTTATTGTTGACGCTCTGGTGCGGAAAACCAATTAT
CAGGGTGCTCGCTTTCGCGCAAGAATAATAGGAGTGTGCGTGGATTGTGGTAGAA
AACACGACAAGGCGCTCAAGACTGAACGTAAGTGTAAGGTCAACAATACGCAAT
CTCAGAACGAGGTGGCGCATATGTTGATGCACGATCCCGTTAAGTATTTGAACAA
AAGAAAGGCTAGAGCCTTTTCTAACGCAGAGATGTTTGCATTGAATTGGTTTTG
TACACCAAGGAAAGGCAATTGGCGGTTCGATTTAGCCGCTGAAAGGGAGAAGACG
AGACTGGCTCGTAGACACCCAATACGTTCTCCGGAAGAACTCCGGAACATTATA
AATTCGGTATGACTGCTAAGGCAATGTTACCGGACATCAACGCCGTAGACGTTGG
TGATAACGAGGAAACTTCGTCGGAGTACCCAGTGAGTCTGAGTGTCTGCGGGA
GTTCTCCGTGAACACCACTTCATCTGA

Κωδικός δείγματος 802

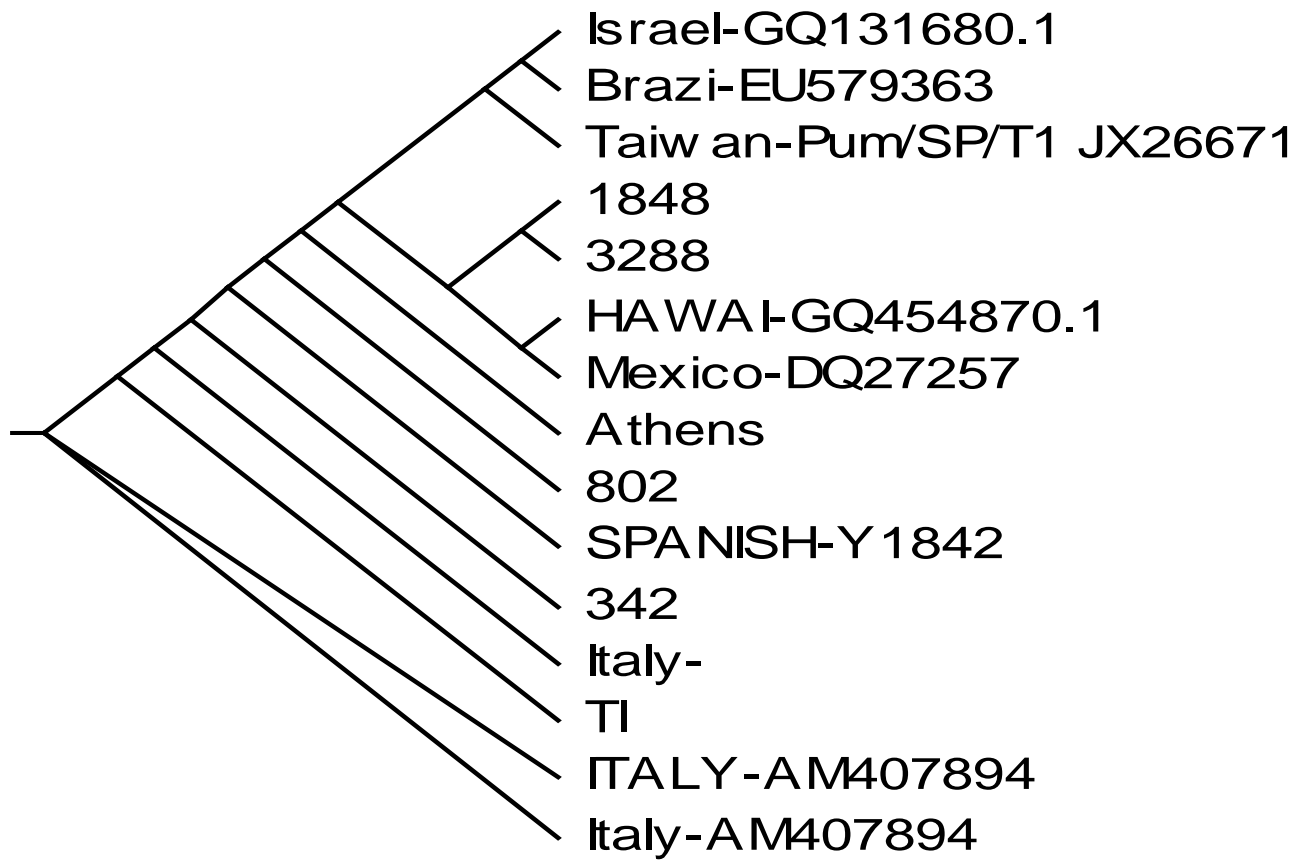
ATGGATGATACTAGCGGACAAACTTTTCGTTTCTGTGAACCTTTCTGACGAAAGCA
ACACGGCAAGCACTAAAGTTGAAAACGTAAAATCGGAAGCGGATCGCTTGGAGT
TTTTACGTAAAATGAATCCCTTTATTGTTGACGCTCTGGTGC GGAAAACCAATTAT
CAGGGTGCTCGCTTTCGCGCAAGAATAATAGGAGTGTGCGTGGATTGTGGTAGAA
AACACGACAAGGCGCTCAAGACTGAACGTAAGTGTAAGGTCAACAATACGCAAT
CTCAGAACGAGGTGGCGCATATGTTGATGCACGATCCCGTTAAGTATTTGAACAA
AAGAAAGGCTAGAGCCTTTTCTAACGCAGAGATGTTTGC GATTGAATTGGTTTTG
TACACCAAGGAAAGGCAATTGGCGGTTCGATTTAGCCGCTGAAAGGGAGAAGACG
AGACTGGCTCGTAGACACCCAATACGTTCTCCGGAAGAACTCCGGAACATTATA
AATTCGGTATGACTGCTAAGGCAATGTTACCGGACATCAACGCCGTAGACGTTGG
TGATAACGAGGAACTTCGTCGGAGTACCCAGTGAGTCTGAGTGTTCGCGGA
GTTCTCCGTGAACACCACTTCATCTGA

Κωδικός δείγματος 1881

TTTTTACGAAAAAAGACCCCTTTATRATCGYCGCTTTGGTACGGAAAACCAATT
ATCAGGGTGCTCGCTTTCGCGCAAAAATAATAGGAGTATGCGTAGATTGTGGTAG
AAAACACGATAAGGGGTTGAAGACCGAACGTAAATGTAAGGTCAATAATACACA
GTCTCAGAACGAGGTGGCGCATATGTTAATGCACGATCCCGTTAAGTATTTAAAT
AAAGGAAAGGCTAGAGCCTTTTCTAACGCAGAGATGTTTGCAATCGATTTGGTTA
TGTAACCAAGGAAAAGCAGTTGGCGGTTAATTTGGCCGCTGAAAGGGAGAAGA
CGAGACTGGCTRGTAGACACCCGATGCGTTCTCCGGAAGAACTCCGGAATTCTA
TAAATTCGGTATAACTGCTAAAGCAACGTTACCGAACATCAACGCTGTGGACGTT
GGTGATAACGAGGACACTTRGTTCGGAGTACCCAGTGAGTCTGAGT

3.5 Δημιουργία φυλογενετικού δέντρου.

Για τη δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιήθηκαν οι αναλύσεις των αλληλουχιών (κεφ 3.4) σε συνδυασμό με τη χρήση των προγραμμάτων Clustalx και Tree ViewX . Δημιουργήθηκε ένα δέντρο μόνο για την cp πρωτεΐνη εφόσον οι κωδικοί των δέντρων είναι οι ίδιοι(εικ 3.7).



Εικόνα 3.7 φυλογενετικό δέντρο που δημιουργήθηκε βάση των απομονώσεων της *cyp19a1* πρωτεΐνης. Οι αριθμοί είναι τα δέντρα που μελετήθηκαν και οι χώρες με τους κωδικούς είναι γνωστές αλληλουχίες από το ncbi

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση

Σκοπός αυτής της πτυχιακής ήταν η μελέτη, η διάγνωση και η φυλογενετική προέλευση του ιού *Citrus tristeza virus* (CTV) από δείγματα εσπεριδοειδών που συλλέχτηκαν στο νομό Χανίων.

Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο της ELISA έδειξαν ότι υπήρξε μόλυνση από τον ιό CTV σε ποσοστό εμφάνισης 80%.. Για επαλήθευση των αποτελεσμάτων αυτών εφαρμόστηκε η μέθοδος της PCR η οποία είναι κατά 1000 φορές μεγαλύτερης ευαισθησίας από τη μέθοδο της ELISA. Τα δεδομένα που προέκυψαν από την εφαρμογή της PCR ήταν θετικά στον ιό του CTV.

Μετά την επαλήθευση της ασθένειας, φυτικό υλικό από τυχαία μολυσμένα δέντρα χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την απομόνωση και την αλληλούχιση των γονιδίων CP και p23. Οι πρωτεΐνες αυτές προτιμήθηκαν σε σχέση με άλλα μέρη του γονιδιώματος διότι η καψιδιακή πρωτεΐνη (CP) α) αποτελεί την πρωτεΐνη παραγωγής των αντισωμάτων ενάντια στους ιούς β) είναι μοναδική για κάθε ιό και η πιο μελετημένη πρωτεΐνη καθώς αποτελεί το γονίδιο με το οποίο πραγματοποιούνται οι κατατάξεις ενός ιού σε κάποιο γένος με βάση τη φυλογενετική ανάλυση και γ) στη βάση δεδομένων υπάρχει μεγάλος αριθμός διαθέσιμων αλληλουχιών. Ομοίως και για την p23, επιλέχθηκε καθώς είναι μοναδική πρωτεΐνη του CTV σε σχέση με άλλους ιούς του γένους *Closterovirus* και εμφανίζει επίσης και ιδιότητες δέσμευση RNA.

Τέλος στην παρούσα πτυχιακή μετά τη αλληλουχία της CP από τα δείγματα κατέστη δυνατή η δημιουργία ενός φυλογενετικού δέντρου. Στο δέντρο αυτό προστέθηκαν οι αλληλουχίες από την περιοχή της Αγίας Χανίων (342,1848,3288), Μόδι Χανίων (Ti) Φουρνές Χανίων (802) και από τη βάση δεδομένων του NCBI διάφορες χώρες με προσβολές από ctn έτσι ώστε τα αποτελέσματα να μπορούν να είναι συγκρίσιμα.

Στο φυλογενετικό δέντρο φάνηκε ότι στην περιοχή της Αγιάς έχουμε τέσσερα διαφορετικά στελέχη βάσει τριών δειγμάτων. Το 342 δείγμα είναι ανάμεσα στα στελέχη του Ιταλικού και του Ισπανικού κάτι το οποίο και ήταν αναμενόμενο εφόσον γνωρίζουμε ότι η χώρα μας κάνει το μεγαλύτερο μέρος των εισαγωγών της σε σπόρους και μοσχεύματα από αυτές τις χώρες. Τα δείγματα όμως 1848 και 3288 δείχνουν να πλησιάζουν το Χαβανέζικο και το Μεξικάνικο στέλεχος κάτι που δεν έχει ξανά αναφερθεί στην Ελλάδα. Η ποικιλομορφία των στελεχών σε μια περιοχή δεν οφείλεται μόνο στα μοσχεύματα από της χώρες προέλευσης αλλά κυρίως στις αφίδες που μεταφέρουν το μόλυσμα.

Τα υπόλοιπα δείγματα από τις άλλες δυο περιοχές (802-Φουρνές,Τι-Μόδι) είναι ανάμεσα στα Ιταλικά και τα Ισπανικά στελέχη κάτι που όπως προαναφέρθηκε είναι αναμενόμενο και ίσως να μην έχουμε μεγάλη ποικιλομορφία λόγω της μικρότερης έκτασης που καλλιεργούνται τα εσπεριδοειδή στις περιοχές αυτές, αλλά και των καιρικών συνθηκών που δεν ευνοούν ιδιαίτερα την εξάπλωση των εντόμων μετάδοσης της ασθένειας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Barbarossa, L. and Savino, V. (2006). Sensitive and specific digoxigeninlabelled RNA probes for routine detection of *Citrus tristeza virus* by dot blot hybridization. *J. Phytopathol.* **154**, 329–335.

Duran-Vila, N. and Moreno, P. (2000). Enfermedades de los Cítricos. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Gowda, S., Satyanarayana, T., Robertson, C. J., Garnsey, S. M. and Dawson, W. O. (2005). Infection of citrus plants with virions generated in *Nicotiana benthamiana* plants agroinfiltrated with binary vector based *Citrus tristeza virus*. In: Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Hilf, M.E., Duran-Vila, N. and Rocha-Peña, M.A., eds), pp. 23–33. Riverside, CA: IOCV.

Karasev, A. V. (2000). Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Reviews* **38**: 293-324.

Koonin, E. V. and Dolja, V. V. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**: 375-430.

Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G. and Bar-Joseph, M. (1996). Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *J. Gen.Virol.* **77**, 2359–2364.

McClellan, A. P. D. (1963). The tristeza complex: Its variability in field-grown citrus in South Africa. *S. Afr. J. Agric. Sci.* **6**, 303–332.

Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M. R., Gowda, S., Hilf, M. E., Garnsey, S. M. and Dawson, W. O. (1997). Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. *Virology*, **228**, 92–97.

Price, W. C. (1966). Flexuous rods in phloem cells of lime plants infected with *Citrus tristeza virus*. *Virology*, **29**, 285–294.

Roistacher, C. N. (1981). A blueprint for disaster. I. The history of seedling yellows disease. *Citrograph*, **67**, 4–24.

Roistacher, C.N., Dodds, J. A. and Bash, J. A. (1988). Cross protection against citrus tristeza seedling yellows and stem pitting viruses by protective isolates developed in greenhouse plants. In: Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Timmer, L.W., Garnsey, S.M. and Navarro L., eds), pp. 91–100. Riverside, CA: IOCV.

Roistacher, C. N. and Moreno, P. (1991). The worldwide threat from destructive isolates of *citrus tristeza virus*. A review. In: Proceedings of the 11th Conference of

the International Organization of Citrus Virologists (Brlansky, R.H., Lee, R.F. and Timmer, L.W., eds), pp. 7–19. Riverside, CA: IOCV.

Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J. and Ambrós, S. (2006). The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. *Arch. Virol.* **151**, 387–398.

Timmer, L.W., Garnsey, S. M. and Graham, J. H. (2000). Compendium of Citrus Diseases. St Paul, MN: APS Press.

Wallace, J. M. and Drake, R. J. (1972). Studies on recovery of citrus plants from seedling yellows and the resulting protection against reinfection. In: Proceedings of the 5th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Price, W.C., ed.), pp. 127–136. Gainesville, FL: University of Florida Press.

Vives, M. C., Rubio, L., Sambade, A., Mirkov, Moreno, P. and Guerri, J. (2005). Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus tristeza virus* isolate. *Virology*, **331**, 232–237.