



Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Παραδοτέο 1.2.5: Πρωτόκολλα ανάλυσης ιολογικών ασθενειών με τεχνολογία αλληλούχησης υψηλής απόδοσης HTS

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π1.2.5**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ1**

Επικεφαλής δικαιούχος: **ΑΠΘ (συνεργαζόμενοι φορείς ΙΤΕ, ΜΦΙ)**

Συγγραφείς: **Βαρβάρα Μαλιόγκα, Χρυσούλα Ορφανίδου, Δέσποινα Μπερή, Κρίτων Καλαντίδης, Νικολέττα Κρυσοβρυσανάκη**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**

Ημερομηνία παράδοσης: **[15-06-2025]**

Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (EN): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: TAEDR-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας



Ελλάδα 2.0 ΕΘΝΙΚΟ ΣΧΕΔΙΟ ΑΝΑΚΑΜΨΗΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με
τον παραγωγικό ιστό, ID 16618
Κωδικός πράξης: ΤΑΕΔΡ-0535675

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	4
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	6
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	6
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	9
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	29
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	30

Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Σύνοψη της ΕΕ1

Στην ΕΕ1 θα αναπτυχθούν διαγνωστικά εργαλεία και μέθοδοι για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και παρακολούθηση των εχθρών και παθογόνων και των χαρακτηριστικών τους (έντομα, ακάρεα, νηματώδεις, φυτοπαθογόνοι οργανισμοί και ζιζάνια), με βάση σύγχρονες ηλεκτρονικές παγίδες, συστήματα επεξεργασίας εικόνων (δορυφορικών και drones) και μοριακές τεχνικές συνδυασμένες με φορητά συστήματα ανίχνευσης. Τα διαγνωστικά θα αφορούν υφιστάμενους και νέους μοριακούς δείκτες που θα προκύψουν από τις δραστηριότητες της ΕΕ1, ενώ θα συμπεριληφθούν και βιοαισθητήρες για ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και μυκοτοξινών. Οι μοριακές διαγνωστικές πλατφόρμες που θα χρησιμοποιηθούν θα επιλεγούν από αυτές που έχουν ήδη αναπτυχθεί διεθνώς, οι οποίες έχουν δυναμικό για πρακτικές εφαρμογές. Για τον προσδιορισμό των εχθρών και των φυτοπαθογόνων θα χρησιμοποιηθεί η ισοθερμική τεχνολογία LAMP, με διάφορες εναλλακτικές πλατφόρμες ανίχνευσης: "eye detection" – ποιοτική ανίχνευση, ή μέσω φορητών και εύχρηστων μικροσυσκευών για ημιποσοτικό προσδιορισμό στο πεδίο. Για ποσοτικούς και υπερευαίσθητους προσδιορισμούς (για παράδειγμα παρουσία μεταλλαγής ανθεκτικότητας σε πολύ μικρό ποσοστό) θα χρησιμοποιηθούν πρωτότυπα προϊόντα όπως τα "Ready to Go Lyophilised pellets", με ενσωματωμένα όλα τα "probes" και τα ένζυμα που απαιτούνται για την ανάλυση των βιοδεικτών σε "ετοιμόχρηστο" pellet, στο οποίο προστίθεται το βιολογικό υλικό (πχ crude insect homogenate). Για τις ιολογικές – φυτοπαθολογικές, επιδημιολογικές αναλύσεις θα χρησιμοποιηθούν πλατφόρμες Minion - HTD αλληλούχισης νέας γενιάς, για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων.

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π1.2.5

Το παραδοτέο 1.2.5 επικεντρώνεται στην ανάπτυξη, αξιολόγηση και βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων ανίχνευσης ιικών παθογόνων σε φυτά ξενιστές και έντομα-φορείς μέσω της τεχνολογίας HTS. Οι διαδικασίες περιλαμβάνουν όλα τα στάδια, από την εκχύλιση RNA έως τη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης, με στόχο τη δημιουργία πρωτοκόλλων υψηλής αξιοπιστίας για την ανίχνευση των ιικών παθογόνων. Επίσης, το παραδοτέο περιλαμβάνει την αξιολόγηση διαφορετικών πρωτοκόλλων εκχύλισης RNA, την εφαρμογή της HTS σε διαφορετικά βάθη αλληλούχησης (sequencing depth) και τη σύγκριση pipelines βιοπληροφορικής ανάλυσης, με στόχο τη βελτιστοποίηση των διαδικασιών.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Το παρόν παραδοτέο αφορά την ανάπτυξη, εφαρμογή και αξιολόγηση πρωτοκόλλων ανίχνευσης ιικών παθογόνων σε φυτικούς ξενιστές και έντομα-φορείς, με τη χρήση της τεχνολογίας αλληλούχησης υψηλής απόδοσης (High-Throughput Sequencing, HTS). Οι διαδικασίες που περιγράφονται καλύπτουν το σύνολο της πειραματικής και αναλυτικής ροής, από την εξαγωγή RNA έως τη βιοπληροφορική επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης. Στο πλαίσιο του παραδοτέου παρουσιάζονται αποτελέσματα από την αξιολόγηση διαφορετικών βαθών αλληλούχησης (sequencing depth), καθώς και συγκριτική ανάλυση εναλλακτικών πρωτοκόλλων βιοπληροφορικής επεξεργασίας, με στόχο τη βελτιστοποίηση της ευαισθησίας, της ακρίβειας και της αξιοπιστίας της ανίχνευσης ιικών παθογόνων. Τα ευρήματα συμβάλλουν στη διαμόρφωση πρότυπων και επαναλήψιμων πρωτοκόλλων, κατάλληλων για εφαρμογές παρακολούθησης και έγκαιρης διάγνωσης.

Ο σκοπός του παρόντος εγγράφου είναι η παρουσίαση των αποτελεσμάτων καινοτόμου έρευνας στα πλαίσια του παραδοτέου Π1.2.5. Το παραδοτέο επικεντρώνεται στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση αξιόπιστων πρωτοκόλλων ανίχνευσης ιικών παθογόνων σε φυτικούς ξενιστές και έντομα-φορείς, αξιοποιώντας την τεχνολογία υψηλής απόδοσης αλληλούχησης (HTS). Καλύπτονται όλα τα βασικά στάδια της διαδικασίας, από την εκχύλιση RNA έως τη βιοπληροφορική ανάλυση, ενώ αξιολογούνται διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης, βάθη αλληλούχησης και αναλυτικά pipelines, με στόχο τη βέλτιστη και αξιόπιστη ανίχνευση των ιών.

Το παρόν έγγραφο **ακολουθεί την παρακάτω δομή:**

1. Εισαγωγή και Στόχοι: Παρουσιάζεται το πλαίσιο της έρευνας και οι στόχοι του εγγράφου.



2. Περιγραφή των Εργασιών: 2.1. Υλικά και Μέθοδοι, 2.2. Αποτελέσματα και Συζήτηση.

3. Σύνοψη και Συμπεράσματα: Βασικά ευρήματα της έρευνας και σχετικά συμπεράσματα.

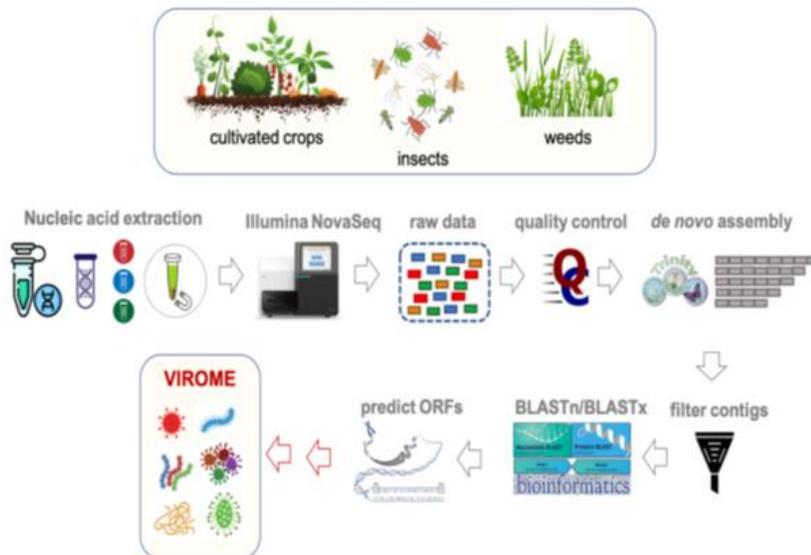
4. Παράρτημα: Βιβλιογραφικές αναφορές.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Η Εικόνα 1.2.5-1 παρουσιάζει τη μεταγονιδιωματική προσέγγιση που εφαρμόζεται για τον ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό του ιολογικού φορτίου (virome) σε καλλιέργειες, έντομα-φορείς και ζιζάνια. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη συστηματική εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων από τα βιολογικά δείγματα, ακολουθούμενη από αλληλούχηση υψηλής απόδοσης με την πλατφόρμα Illumina. Τα παραγόμενα δεδομένα υποβάλλονται σε ποιοτικό έλεγχο και φιλτράρισμα, προκειμένου να διασφαλιστεί η αξιοπιστία των αλληλουχιών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται *de novo* συναρμολόγηση των αναγνωσμάτων για την παραγωγή contigs, τα οποία φιλτράρονται βάσει μήκους και ποιότητας.

Για την ταυτοποίηση ιικών αλληλουχιών εφαρμόζονται αναζητήσεις ομολογίας έναντι διαθέσιμων βάσεων δεδομένων, χρησιμοποιώντας τα εργαλεία BLASTn και BLASTx. Τέλος, πραγματοποιείται πρόβλεψη ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs), επιτρέποντας τον λειτουργικό χαρακτηρισμό και τη μοριακή ανάλυση των ανιχνευθέντων ιών. Η συγκεκριμένη ροή εργασίας παρέχει μια ολοκληρωμένη και αξιόπιστη μεθοδολογία για τη διερεύνηση της ποικιλότητας και της σύνθεσης του virome σε διαφορετικά αγροοικοσυστήματα.



Εικόνα 1.2.5-1: Σχηματική αναπαράσταση της μεταγονιδιωματικής προσέγγισης για τον χαρακτηρισμό του virome σε καλλιέργειες, έντομα και ζιζάνια. Περιλαμβάνει εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων, αλληλούχηση Illumina, ποιοτικό έλεγχο, *de novo* συναρμολόγηση, φιλτράρισμα contigs, αναζήτηση ομολογιών (BLASTn/BLASTx) και πρόβλεψη ORFs.

Κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους του έργου, πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες δειγματοληψίες από καλλιέργεια κολοκυθιάς στην περιοχή των Βασιλικών Θεσσαλονίκης. Παράλληλα, από την ίδια περιοχή συλλέχθηκαν

αυτοφυή ζιζάνια καθώς και έντομα (κυρίως αφίδες και αλευρώδεις), τα οποία αποτελούν σημαντικούς φορείς των φυτικών ιών.

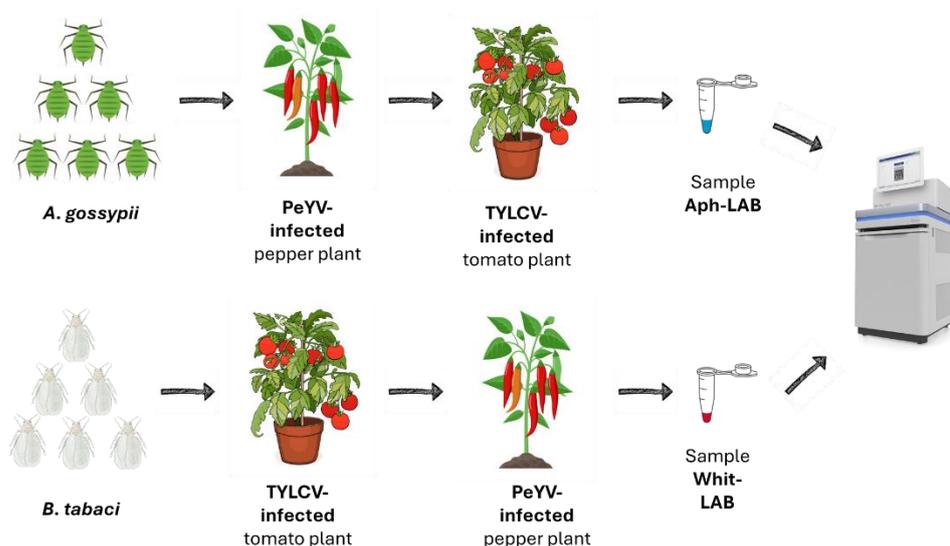
Για την **απομόνωση RNA** από **φυτικά δείγματα** (φυτά κολοκυθιάς και ζιζάνια), αξιολογήθηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα: (α) πρωτόκολλο CTAB με κατακρήμνιση RNA μέσω ισοπροπανόλης (Ruiz-Garcia et al., 2019 με τις τροποποιήσεις των Panailidou et al., 2023), (β) μέθοδος Trizol, και (γ) εμπορικό κιτ απομόνωσης RNA της εταιρείας Norgen Biotech. Η αξιολόγηση κάθε πρωτοκόλλου βασίστηκε σε ποσοτικούς και ποιοτικούς δείκτες: συγκέντρωση RNA (μέσω φασματοφωτομετρίας Nanodrop), καθαρότητα RNA (αναλογίες απορρόφησης A260/280 και A260/230), και ακεραιότητα RNA (μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης). Η ακεραιότητα του RNA βαθμολογήθηκε σε κλίμακα 1–5, με βάση τη σαφήνεια και ένταση των ριβοσωμικών υπομονάδων (rRNA bands), όπου 1 αντιστοιχεί σε έντονα κατακερματισμένο RNA και 5 σε υψηλής ακεραιότητας RNA. Επιπλέον, καταγράφηκαν δείκτες ευκολίας εφαρμογής και σχετικού κόστους για κάθε πρωτόκολλο. Η ευκολία αξιολογήθηκε εμπειρικά βάσει της πολυπλοκότητας των βημάτων, του απαιτούμενου εξοπλισμού και της δυνατότητας εφαρμογής από μη εξειδικευμένο προσωπικό (κλίμακα 1–5, όπου 1 = πολύ δύσκολο και 5 = πολύ εύκολο). Αντίστοιχα, το σχετικό κόστος βαθμολογήθηκε σε κλίμακα 1–5, με 1 να αντιστοιχεί σε πολύ οικονομικά πρωτόκολλα και 5 σε υψηλού κόστους διαδικασίες, χωρίς αναφορά σε απόλυτες τιμές.

Αντίστοιχη αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε και για το RNA που προήλθε από έξι κοινώς απαντώμενα **ζιζάνια** (γλυστρίδα, αγριοτοματιά, λουβουδιά, περιπλοκάδα, στελλάρια, τραχύ βλήτο), τα οποία συλλέχθηκαν από το ίδιο αγροτεμάχιο. Για κάθε είδος εφαρμόστηκαν τα ίδια τρία πρωτόκολλα απομόνωσης RNA και πραγματοποιήθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις ανά πρωτόκολλο.

Στο πλαίσιο της ίδιας αξιολόγησης, εξετάστηκε η απόδοση των πρωτοκόλλων απομόνωσης RNA και σε **έντομα**, συγκεκριμένα σε αφίδες (*Aphis gossypii*) και αλευρώδεις (*Bemisia tabaci*). Χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα CTAB-based και Trizol, καθώς και ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο βασισμένο στο εμπορικό κιτ της Norgen.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση pipeline σε διαφορετικά βάθη αλληλούχησης ολικού RNA από δείγματα ζιζανίων και κολοκυθιάς. Στόχος της παρούσας ανάλυσης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του βάθους αλληλούχησης στην ευαισθησία και την πληρότητα της ανίχνευσης ιικών παθογόνων. Για τον σκοπό αυτό, τα raw δεδομένα (~100M paired-end reads ανά δείγμα) υποβλήθηκαν σε στοχαστική υποδειγματοληψία (subsampling) με χρήση του εργαλείου seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>), ώστε να παραχθούν υποσύνολα 40M αναγνώσεων (reads). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με σταθερό seed για διασφάλιση της αναπαραγωγιμότητας.

Επιπροσθέτως, αξιολογήθηκε η απόδοση του in-house pipeline στην ανίχνευση ιών σε δείγματα εντόμων, σχεδιάστηκε εργαστηριακό πείραμα (Εικόνα 1.2.5-2), στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν αποικίες των ειδών *Aphis gossypii* (αφίδες) και *Bemisia tabaci* (αλευρώδεις). Τα έντομα τοποθετήθηκαν σε φυτά μολυσμένα α) με τον ιό 6 του ίκτερου των νεύρων της πιπεριάς PeYV-6 (πρώην PeYV, RNA ιός) και β) με τον ιό του κίτρινου καρουιάσματος των φύλλων της τομάτας TYLCV (DNA ιός) για 48 ώρες (24 ώρες σε κάθε φυτό) και ακολούθως συλλέχθηκαν, υποβλήθηκαν σε εξαγωγή ολικού RNA και έγινε αλληλούχηση HTS σε πλατφόρμα Illumina NovaSeq. Επιπλέον συλλέχθηκαν 3 δείγματα ομάδων εντόμων από την περιοχή των Βασιλικών Θεσσαλονίκης, των οποίων οι πληροφορίες αποτυπώνονται συνολικά στον Πίνακα 1.2.5-1.



Εικόνα 1.2.5-2: Πειραματικός σχεδιασμός για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας ανίχνευσης φυτικών ιών σε αφίδες και αλευρώδεις (*Aphis gossypii* και *Bemisia tabaci*) με HTS. Μετά την περίοδο πρόσληψης (AAP) των ιών, τα έντομα συλλέχθηκαν, ακολούθησε εκχύλιση ολικού RNA και HTS για την ανίχνευση ιικών γονιδιωμάτων.

Πίνακας 1.2.5-1: Στοιχεία δειγμάτων αφίδων και αλευρωδών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Κωδικός δειγμάτων	Είδος εντόμου	Περίοδος-Τόπος συλλογής	Φυτά-«Ξενιστές»
Aph-LAB	<i>Aphis gossypii</i>	Εργαστηριακό πείραμα	τομάτα
Whi-LAB	<i>Bemisia tabaci</i>	Εργαστηριακό πείραμα	πιπεριά

BOX1	<i>Aphis gossypii</i>	Μάρτιος 2024	ζωχός
BOX4	<i>Aphis gossypii</i>	Ιούλιος 2024	γερμανός
Whit-Vas	<i>Bemisia tabaci</i>	Ιούλιος 2024	Φυτό κολοκυθιάς

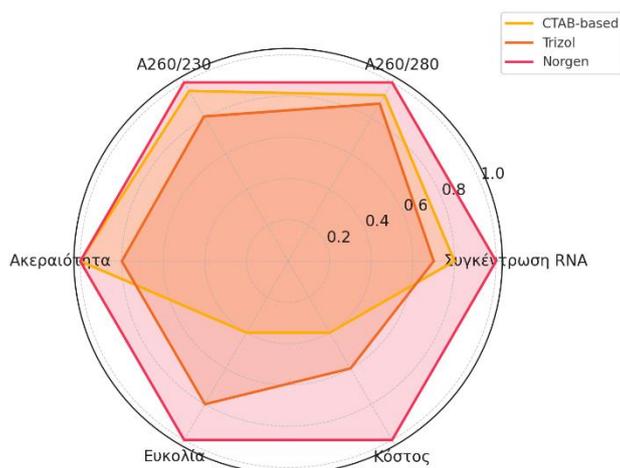
Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και σύγκριση pipelines HTS μεταξύ εργαστηρίων.

2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Τα αποτελέσματα εξαγωγής ολικού RNA από φύλλα κολοκυθιάς έδειξαν ότι όλα τα πρωτόκολλα απέδωσαν RNA αποδεκτής ποιότητας, ωστόσο το εμπορικό κιτ και το CTAB-based πρωτόκολλο οδήγησαν σε υψηλότερα επίπεδα καθαρότητας και ακεραιότητας RNA. Συνεπώς θεωρήθηκαν πιο κατάλληλα για την εκχύλιση υψηλής ποιότητας RNA για τις μεταγενέστερες εφαρμογές HTS (high-throughput sequencing).

Πίνακας 1.2.5-2: Ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά εκχυλισματος ολικού RNA, το οποίο απομονώθηκε από φύλλα κολοκυθιάς, με τη χρήση διαφορετικών πρωτοκόλλων απομόνωσης. Αξιολογήθηκαν η συγκέντρωση RNA (ng/μL), οι λόγοι καθαρότητας A260/280 και A260/230, η ακεραιότητα RNA (κλίμακα 1–5), η ευκολία εφαρμογής (1–5) και το σχετικό κόστος του πρωτοκόλλου (1–5). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (SD) από τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.

Πρωτόκολλο	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)	A260/280	A260/230	Ακεραιότητα RNA	Ευκολία	Κόστος
CTAB-based	950 ± 15	1.95 ± 0.03	2.0 ± 0.1	5	2	2
Trizol	890 ± 20	1.85 ± 0.05	1.7 ± 0.1	4	4	3
Norgen	1120 ± 10	2.1 ± 0.02	2.1 ± 0.1	5	5	5

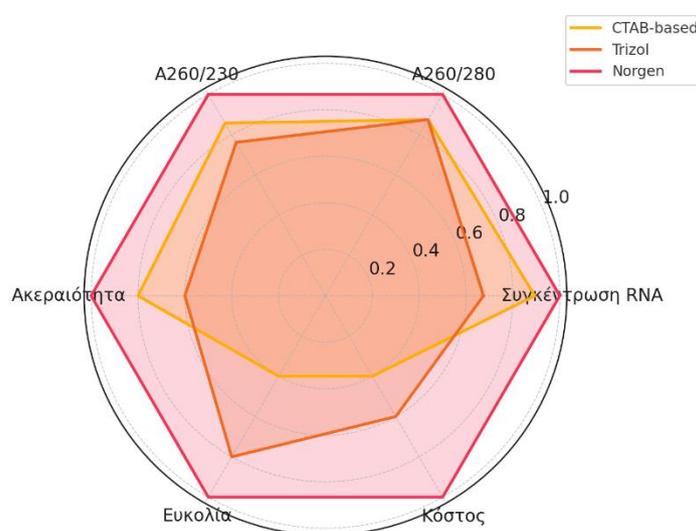


Εικόνα 1.2.5-3: Radar chart σύγκρισης των τριών πρωτοκόλλων απομόνωσης RNA από φυτά κολοκυθιάς, βάσει έξι ποιοτικών και ποσοτικών δεικτών: συγκέντρωση RNA, λόγοι A260/280 και A260/230, ακεραιότητα RNA, ευκολία εφαρμογής και σχετικό κόστος. Οι τιμές έχουν κανονικοποιηθεί στην κλίμακα 0–1 ώστε να επιτρέπεται η οπτική σύγκριση μεταξύ διαφορετικών μεταβλητών.

Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης RNA από έξι κοινώς απαντώμενα ζιζάνια (γλυστρίδα, αγριοτοματιά, λουβουδιά, περιπλοκάδα, στελλάρια, τραχύ βλήτο) συνοψίζονται στον Πίνακα 1.2.5-3 και απεικονίζονται συγκριτικά στο Εικόνα 1.2.5-4. Το εμπορικό κιτ της Norgen Biotech οδήγησε σε σταθερά υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης και καθαρότητας RNA, καθώς και στην υψηλότερη ακεραιότητα. Το CTAB-based πρωτόκολλο παρείχε επίσης ικανοποιητικά αποτελέσματα, ενώ η μέθοδος Trizol εμφάνισε μειωμένη καθαρότητα και μεγαλύτερη διακύμανση στις μετρήσεις. Συνολικά, παρατηρήθηκε ελαφρώς χαμηλότερη απόδοση των πρωτοκόλλων στα ζιζάνια συγκριτικά με τα καλλιεργούμενα φυτά, γεγονός που ενδέχεται να οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των ιστών ή στην παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών. Παρόλα αυτά, τα πρωτόκολλα Norgen και CTAB-based αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αξιόπιστα και στα ζιζάνια, επιβεβαιώνοντας τη χρησιμότητά τους ως αξιόπιστες μέθοδοι εξαγωγής ολικού RNA.

Πίνακας 1.2.5-3. Μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση (SD) ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών RNA που απομονώθηκε από φύλλα 6 κοινών ειδών ζιζανίων (γλυστρίδα, αγριοτοματιά, λουβουδιά, περιπλοκάδα, στελλάρια, τραχύ βλήτο) με τη χρήση τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων. Για κάθε είδος πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις ($n = 12$ ανά πρωτόκολλο). Αξιολογήθηκαν συγκέντρωση RNA (ng/ μ L), λόγοι καθαρότητας A260/280 και A260/230, ακεραιότητα RNA (1–5), ευκολία εφαρμογής (1–5) και σχετικό κόστος (1–5). Οι τιμές προκύπτουν από 2 βιολογικές επαναλήψεις ανά είδος ζιζανίου.

Πρωτόκολλο	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)	A260/280	A260/230	Ακεραιότητα RNA	Ευκολία	Κόστος
CTAB-based	947 ± 12	1.75 ± 0.03	1.8 ± 0.2	4	2	2
Trizol	880 ± 18	1.75 ± 0.08	1.6 ± 0.2	3	4	3
Norgen	1165 ± 5	2.0 ± 0.04	2.1 ± 0.1	5	5	5



Εικόνα 1.2.5-4: Radar chart σύγκρισης τριών πρωτοκόλλων απομόνωσης RNA από ιστούς έξι κοινών ειδών ζιζανίων (γλυστρίδα, αγριοτοματιά, λουβουδιά, περιπλοκάδα, στελλάρια, τραχύ βλήτο). Τα πρωτόκολλα αξιολογήθηκαν βάσει έξι δεικτών: συγκέντρωση RNA, λόγοι καθαρότητας A260/280 και A260/230, ακεραιότητα RNA, ευκολία εφαρμογής και σχετικό κόστος. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι κανονικοποιημένοι στην κλίμακα 0–1, για διευκόλυνση της οπτικής σύγκρισης.

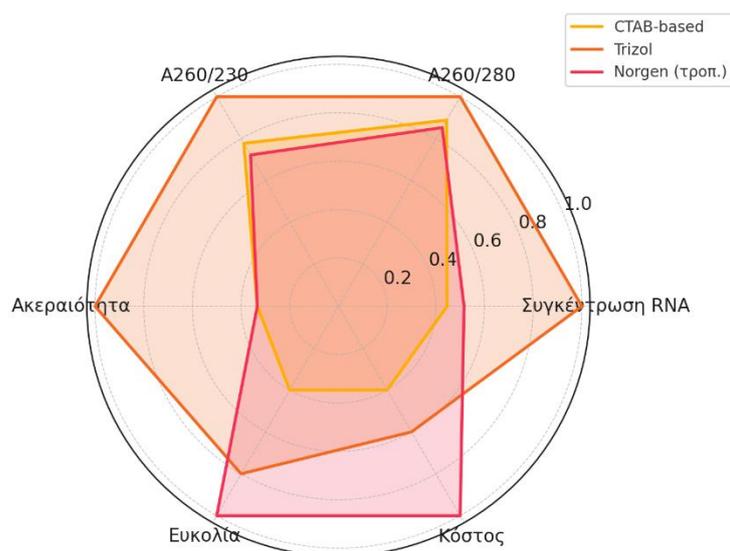
Στο πλαίσιο της ίδιας αξιολόγησης, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα των πρωτοκόλλων απομόνωσης RNA και σε εντομολογικά δείγματα, συγκεκριμένα σε αφίδες (*Aphis gossypii*) και αλευρώδεις (*Bemisia tabaci*). Για τον σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα τύπου CTAB, η μέθοδος Trizol, καθώς και ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο που βασίζεται σε εμπορικό kit της εταιρείας Norgen.

Παρότι και τα τρία πρωτόκολλα απέδωσαν ικανοποιητικές συγκεντρώσεις RNA (Πίνακας 1.2.5-4), μόνο το Trizol παρείχε RNA υψηλής ακεραιότητας, με χαρακτηριστικές ριβοσωμικές κορυφές (18S και 28S) και RIN ≥ 8.7, όπως

επιβεβαιώθηκε από ανάλυση με TapeStation (Agilent). Αντιθέτως, τα άλλα δύο πρωτόκολλα παρουσίασαν σημαντική κατακερμάτιση του RNA, το οποίο πιθανώς θα επηρεάσει την επιτυχή κατασκευή cDNA βιβλιοθηκών (Εικόνα 1.2.5-5). Συνεπώς, το πρωτόκολλο Trizol προτείνεται ως η πλέον αξιόπιστη μέθοδος απομόνωσης RNA από έντομα-φορείς ιών.

Πίνακας 1.2.5-4: Ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά RNA που απομονώθηκε από έντομα (*Aphis gossypii* και *Bemisia tabaci*) με τη χρήση τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων: CTAB-based, Trizol και τροποποιημένο εμπορικό κιτ της Norgen. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD) από δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Αξιολογήθηκαν συγκέντρωση RNA (ng/μL), καθαρότητα (A260/280 και A260/230), ακεραιότητα RNA (1–5), ευκολία εφαρμογής (1–5) και σχετικό κόστος (1–5).

Πρωτόκολλο	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)	A260/280	A260/230	Ακεραιότητα RNA	Ευκολία	Κόστος
CTAB-based	450 \pm 120	1.75 \pm 0.07	1.4 \pm 0.3	1	2	2
Trizol	1008 \pm 50	1.97 \pm 0.02	1.8 \pm 0.2	3	4	3
Norgen (τροπ.)	520 \pm 68	1.68 \pm 0.06	1.3 \pm 0.2	1	5	5



Εικόνα 1.2.5-5: Radar chart σύγκρισης τριών πρωτοκόλλων απομόνωσης RNA από έντομα-φορείς ιών (*Aphis gossypii*, *Bemisia tabaci*). Οι δείκτες αξιολόγησης περιλαμβάνουν συγκέντρωση RNA, λόγους καθαρότητας

A260/280 και A260/230, ακεραιότητα RNA, ευκολία εφαρμογής και σχετικό κόστος. Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν στην κλίμακα 0–1 ώστε να επιτρέπεται η οπτική σύγκριση μεταξύ διαφορετικών μεταβλητών. Το πρωτόκολλο Trizol κατέγραψε συνολικά την καλύτερη απόδοση όσον αφορά την ακεραιότητα του RNA, κρίσιμο παράγοντα για την επιτυχή κατασκευή cDNA βιβλιοθηκών.

Αφού αξιολογήθηκαν και επιλέχθηκαν τα καταλληλότερα πρωτόκολλα απομόνωσης RNA για φυτικά δείγματα (φυτά κολοκυθιάς και ζιζάνια), επιλέχθηκαν συνολικά τέσσερις ομάδες δειγμάτων (pool) κολοκυθιάς και τέσσερις δειγμάτων ζιζανίων (βλ. Πίνακας 1.2.5-5), τα οποία υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση υψηλής απόδοσης (HTS) με την πλατφόρμα Illumina NovaSeq. Τα εν λόγω δείγματα συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο του 2023 από υπαίθρια καλλιέργεια κολοκυνθοειδών στα Βασιλικά Θεσσαλονίκης, όπου παρατηρήθηκαν τυπικά συμπτώματα ιολογικών ασθενειών, όπως μωσαϊκό, νημάτωση φύλλων και ποικιλοχλωρώσεις. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε σε βάθος 100 εκατομμυρίων reads ανά δείγμα (paired-end, 101 bp).

Παράλληλα, αναπτύχθηκε ένα νέο pipeline για την ανάλυση δεδομένων HTS από έντομα και αυτοφυή φυτά, με σκοπό τη διερεύνηση της δυνατότητας ανίχνευσης φυτικών ιών σε δεδομένα HTS από έντομα-φορείς και αυτοφυή φυτά. Το pipeline βασίστηκε σε υφιστάμενη μεθοδολογία ανάλυσης φυτικών δειγμάτων HTS, αξιοποιώντας την αλληλουχία του ξενιστή ως αναφορά για το φιλτράρισμα των *deduplicated, trimmed* reads κάθε dataset. Ο σχεδιασμός του επιτρέπει την εφαρμογή του χωρίς περαιτέρω προσαρμογές, ανεξαρτήτως του είδους του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται το δείγμα (αλευρώδης, αφίδα ή αυτοφυές φυτό).

Για την αρχική αξιολόγηση του pipeline, πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση δεδομένων RNAseq από τη βάση δεδομένων SRA, τα οποία αφορούσαν έντομα που είχαν τραφεί σε φυτά προσβεβλημένα με RNA και/ή DNA ιούς. Εφαρμόστηκε πρωτογενής ανάλυση με *de novo* συναρμολόγηση και BLAST, προκειμένου να διαπιστωθεί ποιες αλληλουχίες (γονιδιωματικές, πλαστικών ή συμβιωτικών οργανισμών) είναι απαραίτητο να συμπεριληφθούν για τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι το pipeline είναι ικανό να διαχειριστεί δείγματα εντόμων και αυτοφυών φυτών, ανιχνεύοντας RNA ιούς, αλλά όχι DNA ιούς, όπως ήταν αναμενόμενο.

Η HTS ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε φυτά κολοκυθιάς και ζιζάνια που προήλθαν από την περιοχή των Βασιλικών αποκάλυψε την παρουσία τόσο γνωστών όσο και νέων ιών (Πίνακας 1.2.5-5). Συγκεκριμένα, στα φυτά κολοκυθιάς ανιχνεύθηκαν οι ιοί cucumber mosaic virus (CMV), cucurbit

yellow stunting disorder virus (CYSDV), cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV), watermelon mosaic virus (WMV) και zucchini yellow mosaic virus (ZYMV). Παράλληλα, εντοπίστηκαν νέοι ιοί που ανήκουν στα γένη carmovirus, totivirus και rolerovirus. Η ανάλυση των δεδομένων από τα ζιζάνια ανέδειξε την παρουσία γνωστών ιών των κολοκυνθοειδών, όπως WMV, CABYV και CMV, καθώς και νέων ιών, μεταξύ των οποίων ένας κρυπτοϊός και δύο νέοι ιοί που ανήκουν στα γένη crinivirus και trirhavirus. Η παρουσία των παραπάνω ιών επιβεβαιώθηκε σε όλα τα μεμονωμένα δείγματα που συνέθεσαν τα pool μέσω συμβατικών μοριακών μεθόδων.

Πίνακας 1.2.5-5. Στοιχεία δειγμάτων που αναλύθηκαν με HTS και ανιχνευθέντες ιοί. CMV: cucumber mosaic virus, CABYV: cucurbit aphid-borne yellows virus, WMV: watermelon mosaic virus, CYSDV: cucurbit yellow stunting disorder virus, ZYMV: zucchini yellow mosaic virus, CpCSV: chickpea chlorotic stunt virus, CuCV: cucurbit carmovirus, RCMV: rubus chlorotic mottle virus

Κωδικός δειγματος	Φυτικά είδη (αριθμός από το κάθε είδος)	Ιοί που ανιχνεύτηκαν στα pool δειγμάτων
Pool1	Ζωχός (2), λουβουδιά (2), βλήτο (2), τάτουλας (3), στελλάρια (3), περιπλοκάδα (2), τσουκνίδα (1)	CABYV, WMV
Pool2	Περιπλοκάδα (2), αγριοτοματιά (3), τάτουλας (1), λουβουδιά (2), βλήτο (4), γλυστρίδα (3)	CMV, crinivirus, RCMV, CpCSV-like
Pool3	βλήτο (3), ζωχός (3), περιπλοκάδα (4), αγριοτοματιά (3), τσουκνίδα (2)	CMV, WMV, crinivirus
Pool4	Στελλάρια (2), λουβουδιά (4), ζωχός (4), αγριοσινάπι (3)	CMV, trirhavirus, RCMV
Pool5	Κολοκύθι (15)	CMV, WMV, ZYMV, CABYV, CuCV, CYSDV
Pool6	Κολοκύθι (15)	CMV, WMV, CpCSV-like, CABYV
Pool7	Κολοκύθι (15)	CMV, WMV, CpCSV-like, CABYV
Pool8	Κολοκύθι (15)	CMV, WMV, CpCSV-like, CABYV, CYSDV

Παράλληλα, αξιολογήθηκε η απόδοση των pipelines ανάλυσης σε διαφορετικά βάθη αλληλούχησης ολικού RNA από δείγματα ζιζανίων και κολοκυθιάς. Σκοπός της ανάλυσης ήταν να εξεταστεί η επίδραση του βάθους

αλληλούχησης στην ευαισθησία και την πληρότητα της ανίχνευσης ιικών παθογόνων.

Τα υποσύνολα υποβλήθηκαν στην ίδια ροή HTS ανάλυσης με το αρχικό dataset, ώστε να συγκριθεί η ακρίβεια και η ευαισθησία ανίχνευσης μεταξύ των δύο επιπέδων βάθους (Πίνακας 1.2.5-6).

Η ανίχνευση και αξιολόγηση των ιικών γονιδιωμάτων πραγματοποιήθηκε με ευθυγράμμιση των unmapped reads στη βάση αναφοράς ιικών αλληλουχιών, χρησιμοποιώντας το εργαλείο Bowtie2. Τα αποτελέσματα μετατράπηκαν σε ταξινομημένα αρχεία BAM και αναλύθηκαν με το Samtools, εξάγοντας per-base κάλυψη για κάθε ιικό γονιδίωμα. Από την κάλυψη υπολογίστηκαν δείκτες όπως το breadth of coverage (ποσοστό κάλυψης αλληλουχίας) και το average depth (μέσο βάθος κάλυψης) με χρήση awk.

Η ποιότητα της συναρμολόγησης αξιολογήθηκε μέσω στατιστικών δεικτών, όπως N50, μέγιστο και μέσο μήκος contig, υπολογισμένων με τη βιβλιοθήκη Biopython (Πίνακας 1.2.5-7). Επιπλέον, για την εκτίμηση της πληρότητας των συναρμολογημένων ιικών γονιδιωμάτων, πραγματοποιήθηκε BLASTn των contigs έναντι της βάσης δεδομένων ιικών αναφορών. Τα αποτελέσματα φιλτραρίστηκαν με awk, διατηρώντας μόνο εκείνα με >97% query coverage, ως ένδειξη σχεδόν πλήρους ταυτοποίησης.

Η συγκριτική αξιολόγηση των διαφορετικών επιπέδων βάθους αλληλούχησης (40M έναντι 100M) ανέδειξε ότι μεγαλύτερα βάθη συνήθως οδηγούν σε ανίχνευση περισσότερων ιικών contigs και αυξημένη πληρότητα συναρμολόγησης. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις δειγμάτων ζιζανίων (π.χ. δείγματα Pool1 και Pool3), το υποδειγματοληπτικό βάθος (40M) κατέγραψε υψηλότερο αριθμό contigs ή εντοπισμό συγκεκριμένων ιών που δεν ανιχνεύθηκαν στο πλήρες dataset. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς οφείλεται σε στοχαστικές διαφορές κατά την υποδειγματοληψία και στην αυξημένη πολυπλοκότητα του πλήρους dataset (100M reads), όπου ο υψηλός όγκος δεδομένων μπορεί να ενισχύσει τον τεχνικό θόρυβο και να δυσχεράνει την καθαρή συναρμολόγηση ορισμένων ιικών αλληλουχιών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι σε ορισμένα δείγματα (π.χ. Pool6–Pool8), η κάλυψη ήταν επαρκής ακόμα και στα 40M, γεγονός που υποδεικνύει ότι το κατάλληλο βάθος εξαρτάται και από τη συγκέντρωση του ιικού φορτίου και το προφίλ κάθε δείγματος (Πίνακας 1.2.5-6 και Πίνακας 1.2.5-7)

Πίνακας 1.2.5-6: Ανίχνευση ιικών παθογόνων σε δείγματα ζιζανίων και κολοκυθιάς με διαφορετικό βάθος αλληλούχησης (40M και 100M). Ο αριθμός των ανιχνευμένων contigs ανά ιό παρουσιάζεται εντός παρενθέσεων. nd= not detected

Sample ID	Sample type	Depth	# Viral Hits (contigs)	# Viruses	CABYV	CMV	WMV	ZYMV	CYSDV	CuCV	CpCSV-like	RCMV	Crinivirus
Pool1	ζιζάνια	40M	14	2	+ (1)	nd	+	nd	Nd	nd	nd	nd	Nd
		100M	9	2	+ (6)	nd	+	nd	Nd	nd	nd	nd	Nd
Pool2	ζιζάνια	40M	17	3	Nd	+	Nd	nd	Nd	nd	+ (4)	nd	+ (7)
		100M	23	4	Nd	+	Nd	nd	Nd	nd	+ (4)	+ (5)	+ (8)
Pool3	ζιζάνια	40M	36	3	Nd	+	+	nd	Nd	nd	nd	nd	+ (16)
		100M	38	4	Nd	+	+	nd	Nd	nd	nd	+ (2)	+ (20)
Pool4	ζιζάνια	40M	0	0	Nd	nd	Nd	nd	Nd	nd	nd	nd	Nd
		100M	10	2	Nd	+	Nd	nd	Nd	nd	nd	+ (1)	Nd
Pool5	κολοκυθιά	40M	57	6	+ (12)	+	+	+ (1)	+ (21)	+ (3)	nd	nd	Nd
		100M	79	6	+ (16)	+	+	+ (1)	+ (2)	+ (1)	nd	nd	Nd
Pool6	κολοκυθιά	40M	27	4	+ (5)	+	+	nd	Nd	nd	+ (1)	nd	Nd
		100M	44	4	+ (8)	+	+	nd	Nd	nd	+ (2)	nd	Nd
Pool7	κολοκυθιά	40M	20	3	+ (7)	+	+	nd	Nd	nd	nd	nd	Nd
		100M	101	4	+ (6)	+	+	nd	Nd	nd	+ (3)	nd	Nd
Pool8	κολοκυθιά	40M	20	4	+ (6)	+	+	nd	Nd	nd	nd	nd	Nd
		100M	43	5	+ (6)	+	+	nd	Nd	nd	nd	nd	Nd

Πίνακας 1.2.5-7. Στατιστικά συναρμολόγησης ιικών contigs για δείγματα ζιζανίων και κολοκυθιών, σε βάθη αλληλούχησης 40M και 100M. Παρουσιάζονται ο συνολικός αριθμός ιικών contigs, η μέση κάλυψη σε εύρος (breadth) και βάθος (depth), καθώς και δείκτες ποιότητας συναρμολόγησης (N50, μήκος μεγαλύτερου contig, μέσο μήκος). Επίσης αναφέρεται ο αριθμός σχεδόν πλήρους μήκους γονιδιωμάτων που ταυτοποιήθηκαν (>97% ομοιότητα σε κάλυψη query) και σχετικές παρατηρήσεις ανά δείγμα.

Sample ID	Sample type	Depth	Number of viral contigs	Breadth of coverage (%)	Average depth of coverage (x)	N50 (nt)	Length of longest contig (nt)	Average contig length (nt)	Near-complete genomes (>97% query coverage)	Comments
Pool1	ζιζάνια	40M	14	44.66	0.7	197	349	212	0	Χαμηλή συνολική κάλυψη (breadth 44.66%, depth 0.7x),

										υποδεικνύοντας πολύ περιορισμένη παρουσία των ιών στο δείγμα.
		100M	9	97.48	5.45	3609	5614	1850	0	Πολύ καλή συνολική κάλυψη (breadth 97.48%, depth 5.5x), αν και με σχετικά χαμηλό βάθος.
Pool2	ζιζάνια	40M	14	79.65	159.43	5055	8529	3278	2	Μέση κάλυψη breadth 79.65% και βάθος 159.4x, με χαμηλή κάλυψη για PlaCV-RNA2 (48.03%) και CpCSV (41.75%).
		100M	9	78.27	439.04	8590	13859	4313	2	Μέση κάλυψη breadth 78.27% και βάθος 439.0x, με χαμηλές τιμές για RCMV (breadth 57.34%, depth 1.0x) και CpCSV (breadth 42.42%, depth 80.4x).
Pool3	ζιζάνια	40M	36	71.66	30.63	2335	5739	1242	2	Παρά την υψηλή κάλυψη για τους ιούς CMV και WMV, το δείγμα παρουσιάζει σημαντικά μειωμένο breadth και βάθος για τον RCMV (2.31%, 0x) και το PlaCV_RNA2 (29.63%, 1.2x), υποδεικνύοντας ανομοιόμορφη ιική αντιπροσώπευση.
		100M	38	82.30	93.81	3386	6166	2573	2	Πολύ καλή κάλυψη για CMV και WMV. Χαμηλότερη παρουσία ή μερική κάλυψη για RCMV και PlaCV_RNA2.
Pool4	ζιζάνια	40M	0	0	0	0	0	0	0	-
		100M	2	80.20	2.23	466	547	387	0	Το δείγμα εμφανίζει μέτρια συνολική κάλυψη των CMV γονιδιωμάτων, με σχετικά χαμηλό βάθος, ακόμη χαμηλότερη κάλυψη για RCMV
Pool5	Φυτά κολοκυθιάς	40M	57	92.89	63.57	3650	9554	1526	1	Καλή συνολική κάλυψη, με μικρές εξαιρέσεις όπως το CuCV (breadth 58.28%, depth 1.4%) ή CMV-RNA1 (4.3x depth)
		100M	79	96.95	227.14	2554	9563	2026	6	Πολύ καλή συνολική κάλυψη (breadth 96.95%, depth 227.1x), με μόνη εξαίρεση το CuCV (breadth 75.83%, depth 9.9x)
Pool6	Φυτά κολοκυθιάς	40M	27	84.76	756.2	2358	5171	1616	1	Μέση κάλυψη breadth 84.76% και βάθος 756.2x, με σαφή επίδραση από το χαμηλό CpCSV (breadth 10.73%, depth 0.2x).

		100M	44	89.62	5547.97	2725	9998	2117	1	Πολύ υψηλή συνολική κάλυψη (breadth 89.62%, depth 5547.97x), με σαφή εξαίρεση το CpCSV (breadth 36.66%, depth 3.0x).
Pool7	Φυτά κολοκυθιάς	40M	20	83.64	1007.23	3844	5585	2526	3	Μέση κάλυψη breadth 83.64% και βάθος 1007.2x, με έντονη επίδραση από το CpCSV (breadth 10.07%, depth 0.1x).
		100M	101	87.75	7788.0	2176	5602	1535	3	Καλή συνολική κάλυψη (breadth 87.75%, depth 7788.0x), με χαμηλή ανίχνευση για CpCSV (breadth 35.36%, depth 1.8x).
Pool8	Φυτά Κολοκυθιάς	40M	20	95.5	368.13	7430	8775	2332	3	Καλή συνολική κάλυψη (breadth 95.15%, depth 368.1x), με μόνη εξαίρεση το CYSVD-RNA2 (breadth 75.19%, depth 1.8x).
		100M	43	82.84	1489.6	2955	9834	2078	3	Μέση κάλυψη breadth 82.84% και βάθος 1489.6x, με σαφείς αποκλίσεις λόγω των χαμηλών CYSVD-RNA1 (59.24%, 1.8x) και CpCSV (5.73%, 0.1x)

Όσον αφορά την αξιολόγηση του pipeline ανίχνευσης ιών σε έντομα φορείς, τα raw data από τα δείγματα εντόμων υποβλήθηκαν σε έλεγχο ποιότητας με το εργαλείο FastQC, ενώ η προεπεξεργασία (trimming, φιλτράρισμα βάσει ποιότητας, απομάκρυνση duplicates) πραγματοποιήθηκε με χρήση του Prinseq++. Για την απομάκρυνση των reads που προέρχονται από το γονιδίωμα ξενιστή (έντομο), έγινε ευθυγράμμιση με το Bowtie2 και διατήρηση μόνο των unmapped reads για την ιολογική ανάλυση. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε *de novo* συναρμολόγηση με χρήση του assembler rnaSPAdes, και τα παραγόμενα contigs ευθυγραμμίστηκαν έναντι βάσης δεδομένων ιικών γονιδιωμάτων μέσω BLASTn.

Σε πρώτο στάδιο αξιολογήθηκε η εφαρμογή του pipeline στα εργαστηριακά δείγματα εντόμων (Whit-LAB, Aph-LAB, βλ. Πίνακας 1.2.5-1). Και στις 2 περιπτώσεις, ανιχνεύτηκε επιτυχώς ο PeVYV-6 (πρωην PeYV), ενώ δεν εντοπίστηκαν contigs/reads του TYLCV. Αξίζει να σημειωθεί ότι πριν το RNAseq είχε προηγηθεί ποσοτική ανάλυση με RT-qPCR για τον PeVYV-6 και qPCR για τον TYLCV, η οποία επιβεβαίωσε ότι τα έντομα είχαν προσλάβει και τους δύο ιούς. Το γεγονός ότι ο TYLCV δεν ανιχνεύτηκε με RNAseq στον αλευρώδη αποτελεί μια ένδειξη ότι ο ιός δεν πολλαπλασιάζεται στον φορέα και δείχνει ότι δεν μπορεί να γίνει ταυτοποίηση φυτικών DNA ιών εντός του εντόμου με αυτή την τεχνολογία.

Επιπλέον, στο δείγμα Aph-LAB ανιχνεύθηκαν δύο contigs (μήκους 5.126 και 4.696 nt

αντίστοιχα), τα οποία παρουσίασαν υψηλό ποσοστό ταυτότητας (>98% σε επίπεδο nt) με τον ssDNA εντομο-ιό *Myzus persicae densovirus 1* (γένος *Hemiambidensovirus*, οικογένεια *Parvoviridae*, accession number NC_005040). Στο δείγμα Whit-LAB, ανιχνεύθηκαν οκτώ contigs που πιθανόν ανήκουν σε νέο ιό του γένους *Aleyavirus* (οικογένεια *Lisproviridae*, negative ssRNA γονιδίωμα), καθώς και πέντε επιπλέον contigs που συσχετίζονται με πιθανό νέο ιό του γένους *Perorovirus* (οικογένεια *Artoviridae*, negative ssRNA γονιδίωμα). **Αξίζει να σημειωθεί ότι το παρόν pipeline επικεντρώνεται στην ανίχνευση RNA ιών**, καθώς στηρίζεται σε δεδομένα RNAseq και πρωτόκολλα εκχύλισης ολικού RNA. Συνεπώς, όπως προαναφέρθηκε DNA ιοί φυτικής προέλευσης όπως ο TYLCV ενδέχεται να μην ανιχνεύονται, εφόσον δεν υφίσταται ενεργή μεταγραφή τους στο έντομο. Αντιθέτως, DNA ιοί των εντόμων όπως ο *Myzus persicae densovirus 1*, είναι δυνατό να ανιχνευθούν μέσω RNAseq, λόγω της παραγωγής μεταγράφων τους στον ξενιστή.

Συλλέχθηκαν επίσης 3 ομάδες εντόμων από την περιοχή των Βασιλικών, άπτερες αφίδες από τα ζιζάνια ζωχό (κωδικός BOX1) και γερμανό (κωδικός BOX4) και αλευρώδεις (κωδικός Whit-Vas) από διάφορα κορυφαία φύλλα κολοκυθιάς (Πίνακας 1.2.5-1). Ακολούθησε εκχύλιση ολικού RNA και ανάλυση με τις προαναφερθείσες μεθόδους. Η ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων ανέδειξε επίσης σημαντικά ευρήματα. Στις άπτερες αφίδες που συλλέχθηκαν από ζιζάνια δεν ανιχνεύτηκαν φυτικοί ιοί, αλλά επιβεβαιώθηκε η παρουσία του *M. persicae densovirus 1*. Στο δείγμα αλευρωδών, εντοπίστηκαν φυτικοί ιοί που είναι γνωστό ότι ενδημούν σε φυτά κολοκυθιάς και ζιζάνια, όπως οι CYSDV, CABYV και WMV, καθώς και ο *Cucurbit cytorhabdovirus 1* (CuCV1), του οποίου η παρουσία είχε επιβεβαιωθεί παλαιότερα στην περιοχή αλλά δεν είχε ανιχνευθεί στην παρούσα μελέτη στα φυτικά δείγματα. Εντοπίστηκε επίσης ο crinivός που είχε προηγουμένως καταγραφεί σε δείγματα ζιζανίων (pool2, pool3), γεγονός που δημιουργεί υπόθεση μετάδοσης του ιού προς την καλλιέργεια κολοκυθιάς, πιθανώς μέσω των αλευρωδών. Συνεπώς, τα δείγματα κολοκυθιάς είναι υπό έλεγχο με τη χρήση RT-PCR για την παρουσία του συγκεκριμένου ιού.

Συνολικά, η ανάλυση των εντόμων συνέβαλε ουσιαστικά στη σκιαγράφηση του ιολογικού φορτίου στην καλλιέργεια και τα ζιζάνια, προσφέροντας επιπλέον πληροφορίες για ιούς που είτε δεν ανιχνεύθηκαν στα φυτικά δείγματα (CuCV1) είτε δεν είχαν προηγουμένως καταγραφεί (ιοί των εντόμων). Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν την αξία της ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων εντόμων ως συμπληρωματικό εργαλείο στις στρατηγικές επισκόπησης μέσω HTS.

Η σύγκριση των pipelines μεταξύ των εμπλεκόμενων εργαστηρίων ολοκληρώθηκε μέσω της ανάλυσης κοινών RNAseq datasets που περιλάμβαναν δείγματα από 4 φυτικά είδη (αμπέλι, ροδακινιά, κολοκυθιά, τομάτα). Κάθε εργαστήριο ανέλυσε τα ίδια δεδομένα με τη δική του προσέγγιση, και τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε ενιαίο πρότυπο αναφοράς, ώστε να είναι συγκρίσιμα ως προς ορισμένες παραμέτρους.

Βάσει της συγκριτικής ανάλυσης τεσσάρων φυτικών δειγμάτων (τομάτας, κολοκυθιάς, ροδακινιάς και αμπελιού) με τη χρήση τριών HTS pipelines από διαφορετικά εργαστήρια, παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στην ικανότητα ανίχνευσης και συναρμολόγησης των γονιδιωμάτων των ιών. Ενδεικτικά, μόνο στο δείγμα της

κολοκυθιάς (Πίνακας 1.2.5-9) επιτεύχθηκε πλήρης ανίχνευση όλων των καταγεγραμμένων ιών και από τα τρία εργαστήρια, με υψηλά ποσοστά κάλυψης και παρόμοια consensus lengths: όλοι οι γνωστοί ιοί, όπως ο Cucurbit cytorhabdovirus 1, ανιχνεύθηκαν με σχεδόν 100% κάλυψη. Αντίθετα, στα υπόλοιπα δείγματα (τομάτας, ροδακινιάς και αμπελιού) καταγράφηκαν αποκλίσεις τόσο ως προς την πληρότητα όσο και ως προς την ευαισθησία των pipelines. Συγκεκριμένα, στο δείγμα ροδακινιάς (Πίνακας 1.2.5-10) παρατηρήθηκαν διαφορές στην πληρότητα ανίχνευσης του Nectarine stem pitting-associated virus και του Alfalfa mosaic virus, με το LAB-A να παρουσιάζει σημαντικά πληρέστερη συναρμολόγηση σε σύγκριση με τα άλλα δύο εργαστήρια. Το ίδιο μοτίβο καταγράφηκε και στο δείγμα αμπελιού (Πίνακας 1.2.5-11), όπου το LAB-A εμφάνισε την υψηλότερη αποτελεσματικότητα ανίχνευσης για ιούς, όπως ο Grapevine-associated jinvivirus 1. Επιπλέον, στο δείγμα τομάτας (Πίνακας 1.2.5-8), ορισμένοι ιοί ή ιοειδή, όπως το Potato spindle tuber viroid και το Lycopersicon esculentum endogenous virus, ανιχνεύθηκαν μόνο από συγκεκριμένα εργαστήρια, ενώ ο Mercurialis latent virus ανιχνεύθηκε αποκλειστικά από το LAB-A. Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν ότι η επιλογή pipeline μπορεί να επηρεάσει καθοριστικά την ερμηνεία των HTS δεδομένων και την ιολογική διάγνωση, ενισχύοντας τη σημασία της πολυπαραμετρικής και συνδυαστικής προσέγγισης, καθώς και της διασταύρωσης αποτελεσμάτων όταν είναι εφικτό με άλλες μεθόδους, ώστε να διασφαλίζεται η μέγιστη αξιοπιστία στην ανίχνευση φυτικών ιών μέσω HTS τεχνολογιών.

Πίνακας 1.2.5-8. Αποτελέσματα σύγκρισης τριών HTS pipelines σε δεδομένα RNAseq τομάτας

Ιοί	Μετρικές Ανίχνευσης / Συναρμολόγησης	LAB-A	LAB-B	LAB-C
Southern tomato virus (STV)	Number of contigs	8	3	4
	consensus length	2,238	873	1,035
	Coverage	65.7	25.0	30.1
Potato virus Y (PVY)	Number of contigs	16	2	6
	consensus length	4,422	547	826
	Coverage	45.6	6.0	8.53
Tomato bushy stunt virus (TBSV)	Number of contigs	4	1	1
	consensus length	1,420	257	163
	Coverage	29.8	6.0	3.42
Potato spindle tuber viroid (PSTVd)	Number of contigs	1	1	1
	consensus length	409	414	358
	Coverage	100	100	99.72

		Number of contigs	1	nd	Nd
Mercurialis latent virus (MeLV)		consensus length	153	nd	Nd
		Coverage	6.7	nd	Nd
		Number of contigs	Nd	nd	1
Lycopersicon endogenous virus	esculentum	consensus length	Nd	nd	162
		Coverage	Nd	nd	3.19

Nd: not detected

Πίνακας 1.2.5-9. Αποτελέσματα σύγκρισης τριών HTS pipelines σε δεδομένα RNAseq κολοκυθιάς

Ioi			Μετρικές Ανίχνευσης / Συναρμολόγησης	LAB-A	LAB-B	LAB-C
Cucurbit (CuCV1)	cytorhabdovirus	1	Number of contigs	253	1	1
			consensus length	13,065	13,069	13,063
			Coverage	100	100	99.95
Moroccan watermelon mosaic virus (MWMV)			Number of contigs	97	1	1
			consensus length	9,721	9,717	9,716
			Coverage	99.9	100	99.89
Watermelon mosaic virus (WMV)			Number of contigs	36	2	3
			consensus length	10,023	10,018	10,023
			Coverage	100	100	99.83
Papaya ringspot virus (PRSV)			Number of contigs	152	1	1
			consensus length	10,319	10,318	10,383
			Coverage	99.9	100	99.91
Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV)			Number of contigs	767	3	5
			consensus length	5,640	5,521	5,652
			Coverage	99.4	99.0	99.29
Tomato leaf curl New Delhi virus			Number of contigs	26	1	1

(ToLCNDV) -DNA-A

	consensus length	2,740	2,738	2,738
	Coverage	100	100	100
	Number of contigs	31	1	1
Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) -DNA-B	consensus length	2,684	2,739	2,682
	Coverage	99.6	100	100

Πίνακας 1.2.5-10. Αποτελέσματα σύγκρισης τριών HTS pipelines σε δεδομένα RNAseq ροδακινιάς

Ιοί	Μετρικές Ανίχνευσης / Συναρμολόγησης	LAB-A	LAB-B	LAB-C
	Number of contigs	2	4	18
Plum pox virus (PPV)	consensus length	9,347	8,935	7,734
	Coverage	100	91.0	79.03
	Number of contigs	9	4	9
Nectarine stem pitting-associated virus (NSPaV)	consensus length	4,993 with gaps	2,708	2,073
	Coverage	93.0	55.0	41.53
	Number of contigs	1	nd	3
Peach latent mosaic viroid (PLMVd)	consensus length	337	nd	315
	Coverage	99.0	nd	92.92
	Number of contigs	1	1	1
Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) – RNA1	consensus length	3,203	3,200	3,165
	Coverage	96.1	99.28	95.59
	Number of contigs	1	1	1
Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) – RNA2	consensus length	2,576	2,576	2,571
	Coverage	99.0	99.0	97.9
Prunus necrotic ringspot virus	Number of contigs	1	1	1

(PNRSV) – RNA3

	consensus length	1,941	1,941	1,914
	Coverage	99.0	99.0	98.51
	Number of contigs	1	1	7
Ti ringspot associated virus (TiRSV) – RNA1	consensus length	7,137	7,136	6,353
	Coverage	98.9	100	89.01
	Number of contigs	1	1	2
Ti ringspot associated virus (TiRSV) – RNA2	consensus length	2,310	2,310	1,778
	Coverage	96.0	100	76.97
	Number of contigs	1	1	1
Ti ringspot associated virus (TiRSV) – RNA3	consensus length	1,107	1,068	1,004
	Coverage	100	100	90.7
	Number of contigs	1	1	1
Ti ringspot associated virus (TiRSV) – RNA4	consensus length	1,306	1,306	1,306
	Coverage	97.0	100	100
	Number of contigs	1	1	1
Ti ringspot associated virus (TiRSV) – RNA5	consensus length	574	436	574
	Coverage	43.0	76.0	86.06
	Number of contigs	5	5	d/na
Alfalfa mosaic virus (AMV)* - RNA1	consensus length	3,630 with gaps	4,614	d/na
	Coverage	96.9	74.0	d/na
	Number of contigs	9	nd	d/na
Alfalfa mosaic virus (AMV)* - RNA2	consensus length	2,562 with gaps	nd	d/na
	Coverage	91.0	nd	d/na
	Number of contigs	4	2	d/na
Alfalfa mosaic virus (AMV)* - RNA3	consensus length	2,013 with	2,398	d/na

		gaps		
	Coverage	94.0	65.0	d/na
	Number of contigs	9	12	d/na
Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)*	consensus length	6,356 with gaps	4,614	d/na
	Coverage	97.0	74.0	d/na
	Number of contigs	2	nd	nd
Potato virus Y (PVY)*	consensus length	2,093	nd	nd
	Coverage	22.0	nd	nd

* επιμόλυνση στο δείγμα

d/na: detected/not analyzed

Πίνακας 1.2.5-11. Αποτελέσματα σύγκρισης τριών HTS pipelines σε δεδομένα RNAseq αμπελιού.

Ιοί	Μετρικές Ανίχνευσης / Συναρμολόγησης	LAB-A	LAB-B	LAB-C
Grapevine badnavirus 1	Number of contigs	154	7	3
	consensus length	7,669	7,604	7,097
	Coverage	100	100	99.93
Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	Number of contigs	51	7	10
	consensus length	7,196	6,656	5,619
	Coverage	100	100	79.25
Grapevine leafroll-associated virus 3	Number of contigs	85	2	3
	consensus length	18,165	18,605	18,360
	Coverage	97.8	100	98.61
Grapevine leafroll-associated virus 4	Number of contigs	97	70	48
	consensus length	13,786	12,560	12,366
	Coverage	99.9	100	89.58

	Number of contigs	68	36	42
Grapevine rupestris stem pitting-associated virus	consensus length	8,611	7,983	4,664
	Coverage	97.8	100	53.55
	Number of contigs	24	11	14
Grapevine virus A (GVA)	consensus length	7,325	6,027	4,013
	Coverage	99.5	90.0	54.66
	Number of contigs	7	nd	2
Grapevine virus B (GVB)	consensus length	2,092	nd	175
	Coverage	27.58	nd	2.31
	Number of contigs	39	13	14
Grapevine virus F (GVF)	consensus length	7,521 with gaps	6,812	2,546
	Coverage	99.3	98.0	33.94
	Number of contigs	17	1	1
Grapevine virus H (GVH)	consensus length	7,430	7,430	7,430
	Coverage	99.1	99.0	99.11
	Number of contigs	89	43	27
Grapevine virus L (GVL)	consensus length	7,777	7,437	6,689
	Coverage	100	100	97.15
	Number of contigs	20	5	8
Grapevine Pinot Gris virus (PGV)	consensus length	6,993 with gaps	1,369	393
	Coverage	60.6	20	5.54
	Number of contigs	10	nd	3
Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVFV)	consensus length	6,749 with gaps	nd	248
	Coverage	20.2	nd	3.68

		Number of contigs	13	nd	2
Grapevine-associated virus	tymo-like	consensus length	4,230 with gaps	nd	179
		Coverage	29.6	nd	3.01
		Number of contigs	2	2	nd
Grapevine-associated jivivirus 1 – RNA1		consensus length	4,028	4,016	nd
		Coverage	99.06	99.0	nd
		Number of contigs	3	3	nd
Grapevine-associated jivivirus 1 – RNA2		consensus length	3,199	3,185	nd
		Coverage	99.4	100	nd
		Number of contigs	7	7	nd
Grapevine-associated jivivirus 1 – RNA3		consensus length	2,125	1,982	nd
		Coverage	99,35	99.0	nd
		Number of contigs	12	2	nd
Grapevine-associated jivivirus 1 – RNA4		consensus length	1,985	1,880	nd
		Coverage	98.8	93.0	nd
		Number of contigs	6	2	nd
Grapevine-associated jivivirus 1 – RNA5		consensus length	1,397	389	nd
		Coverage	75.07	22.0	nd
		Number of contigs	8	7	nd
Grapevine-associated jivivirus 1 – RNA6		consensus length	1,466	1,245	nd
		Coverage	88.15	79.0	nd
		Number of contigs	10	4	nd
Grapevine-associated jivivirus 1 – RNA7		consensus length	1,697	983	nd
		Coverage	99.76	62.0	nd
		Number of contigs	11	4	nd
Grapevine-associated jivivirus 1 – RNA8		consensus length	1,695	1,408	nd

	Coverage	98.49	86.0	nd
Grapevine-associated jivivirus 1 – RNA9	Number of contigs	3	1	nd
	consensus length	1,620	1,620	nd
	Coverage	96.43	96.0	nd
Grapevine-associated jivivirus 1 – RNA10	Number of contigs	5	nd	nd
	consensus length	1,642	nd	nd
	Coverage	92.82	nd	nd
Cucumber mosaic virus (CMV) – RNA1	Number of contigs	6	nd	1
	consensus length	1,575	nd	201
	Coverage	46.9	nd	5.99
Cucumber mosaic virus (CMV) – RNA2	Number of contigs	8	5	5
	consensus length	2,706	2,499	1,493
	Coverage	88.95	83.0	49.08
Cucumber mosaic virus (CMV) – RNA3	Number of contigs	6	4	3
	consensus length	1,723	1,249	260
	Coverage	77.58	57.0	11.74
Tomato spotted wilt virus (TSWV) – RNA1	Number of contigs	10	2	2
	consensus length	3,045	522	211
	Coverage	35.06	98.71	2.38
Tomato spotted wilt virus (TSWV) – RNA2	Number of contigs	3	nd	1
	consensus length	655	nd	184
	Coverage	13.6	nd	3.83
Tomato spotted wilt virus (TSWV) – RNA3	Number of contigs	3	nd	1
	consensus length	982	nd	164
	Coverage	33.31	nd	5.51
Grapevine fleck virus (GFkV)	Number of contigs	14	2	4
	consensus length	2,660	1,369	225

	Coverage	35.17	6.0	3.01
Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1)	Number of contigs	3	nd	1
	consensus length	366	nd	366
	Coverage	100	nd	100
Hop stunt viroid (HSVd)	Number of contigs	1	nd	1
	consensus length	299	nd	296
	Coverage	100	nd	100
New satellite virus?	Number of contigs	2	1	1
	consensus length	1110	991	794
	Coverage	100	33.0	65.56
Grapevine toga-like virus	Number of contigs	3	nd	nd
	consensus length	3,594 with gaps	nd	nd
	Coverage	98.0	nd	nd
Tombus-like virus	Number of contigs	1	nd	nd
	consensus length	4,664	nd	nd
	Coverage	Unknown	nd	nd

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η HTS είναι αποτελεσματική και ευέλικτη μέθοδος, αλλά απαιτεί υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης και βελτιστοποίηση όλων των διαδικασιών συμπεριλαμβανομένης της εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων και συνολικά των pipeline που εφαρμόζονται ανά εργαστήριο. Παρότι τα δείγματα που αναλύθηκαν εδώ ήταν τα ίδια για όλους, η απόδοση μεταξύ των συμμετεχόντων ποίκιλε ανάλογα με τη βιοπληροφορική ανάλυση. Η διαφορά στην απόδοση οφείλεται κυρίως στη βιοπληροφορική προσέγγιση. Όλα τα εργαστήρια χρησιμοποίησαν δικά τους pipelines, με διαφορές στο είδος συναρμολόγησης (de novo vs reference-based), παρουσία ή όχι βήματος αφαίρεσης των host reads (και σε ποιο στάδιο), τύπο και μέγεθος βάσεων δεδομένων (viral refseq, NCBI nt/nr, custom κ.ά.). Καθοριστικό ρόλο, επίσης, έχει ο βαθμός αυστηρότητας των παραμέτρων που εφαρμόζονται σε κάθε ένα από τα στάδια της βιοπληροφορικής ανάλυσης.

Ο αριθμός των αλληλουχιών και η ποιότητα της συναρμολόγησης επηρεάζουν έντονα την ικανότητα ταυτοποίησης. Ειδικά όταν υπάρχουν διαφορετικοί γενότυποι του ίδιου ιού, απαιτούνται καλά ρυθμισμένα pipelines για την αποφυγή δημιουργίας χιμαιρικών ακολουθιών ή την αποτυχία αναγνώρισης όλων των γενότυπων.

Η ταυτοποίηση νέων ή μη καλά χαρακτηρισμένων ιών είναι πιο απαιτητική. Η χρήση blastx ή άλλων εργαλείων ανίχνευσης βάσει πρωτεϊνών ήταν κρίσιμη για την αναγνώριση νέων ιών (novel viruses). Η απουσία αυτής της προσέγγισης οδήγησε σε αποχίες αναγνώρισης σε ορισμένες περιπτώσεις.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Ruiz-García AB, Bester R, Olmos A, Maree HJ (2019) Bioinformatic tools and genome analysis of Citrus tristeza virus. *Citrus tristeza virus*. Humana, New York, pp 163–178. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5_12

Panailidou, P., Galeou, A., Beris, D., Pappi, P., Theologidis, I., Tzagaki, E., ... & Maliogka, V. I. (2023). Identification and genetic diversity of grapevine virus L in Greece. *Archives of Virology*, 168(4), 127. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05756-z>

James, A., Kryovrysanaki, N., Andronis, C. Pappi, P. G., Kalantidis, K., Katsarou K. Identification and characterisation of Zucchini yellow fleck virus and a novel Nepovirus from next-generation sequencing of mixed virus infections in cucumbers (*Cucumis sativus*) from Crete. *Annals of Applied Biology*, 2024;1–14, DOI: 10.1111/aab.12962