



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

### Παραδοτέο Π1.9.1: Ενημερωμένη διαδικτυακή πλατφόρμα καταγραφής των ιών

#### Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π1.9.1**  
Ενότητα εργασίας: **ΕΕ1**  
Επικεφαλής δικαιούχος: **ΙΜΒΒ**  
Συγγραφείς: **Κρίτων Καλαντίδης**  
Έκδοση: **1.0**  
Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**  
Ημερομηνία παράδοσης: **12 Δεκεμβρίου 2025**

#### Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος  
Τίτλος (ΕΝ): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control  
Κωδικός πράξης: ΤΑΕΔΡ-0535675  
Ακρωνύμιο έργου: InnoPP  
Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023  
Διάρκεια: 28 Μήνες  
Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ</b> .....	<b>5</b>
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	5
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	7
<b>3</b>	<b>ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι-</b> Βιβλιογραφικές Αναφορές .....	<b>13</b>

## 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

Η ΕΕ1 επικεντρώνεται στην ανάπτυξη προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων και μεθόδων για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και παρακολούθηση εντομολογικών εχθρών, παθογόνων και των χαρακτηριστικών τους. Αποτελείται από 9 υποενότητες κάθε μία από τις οποίες εξειδικεύεται στην ανάπτυξη συγκεκριμένων καινοτόμων διαγνωστικών εργαλείων. Περιλαμβάνει την αξιολόγηση καινοτόμων ηλεκτρονικών παγίδων, την ανάπτυξη σύγχρονων μοριακών διαγνωστικών τεχνικών (LAMP, λυοφιλοποιημένα κιτ qPCR, ddPCR, τεχνολογίες αλληλούχισης), τη δημιουργία συστημάτων πρόβλεψης ιολογικών επιδημιών με δορυφορική χαρτογράφηση, καθώς και την αξιοποίηση τεχνητής νοημοσύνης για την αναγνώριση ζιζανίων και ασθενειών μέσω φασματικών τεχνολογιών και drone. Επιπλέον, περιλαμβάνει την ανάπτυξη βιοαισθητήρων για ωχρατοξίνες και υπολείμματα φυτοφαρμάκων, τη διερεύνηση μοριακών δεικτών ανθεκτικότητας, τη δημιουργία διαγνωστικών για την αξιολόγηση της δράσης βιοδιεγερτών και την εκτίμηση της διαγνωστικής αξίας συνυπάρχοντων ιών και ιοειδών, με στοχευμένη διάχυση των παραγόμενων αποτελεσμάτων.

### Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π1.9.1

Το Π1.9.1 αποσκοπεί στην βαθύτερη κατανόηση, μελέτη και τελικά την καταγραφή των φαινοτύπων που παρατηρούνται σε περιπτώσεις ταυτόχρονης παρουσίας ιών και ιοειδών με τη χρήση της τεχνικής northern blot. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν ο Ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (*Cucumber mosaic virus*, CMV, οικ. *Bromoviridae*), ο Ιός του θαμνώδους νανισμού της ντομάτας *Tomato bushy stunt virus* (TBSV, οικ. *Tombusviridae*) με το δορυφορικό του RNA, SatL, σε συνδυασμό με τρία ιοειδή της οικογένειας *Pospiviroidae*, το Ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων

της πατάτας (Potato spindle tuber viroid, PSTVd), το Ιοειδές του νανισμού του λυκίσκου (Hop stunt viroid, HSVd) και το ιοειδές της εξωκόρτιδας των ιοειδών (Citrus exocortis viroid, CEVd).

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Οι μολύνσεις από πολλαπλά παθογόνα αποτελούν συχνό φαινόμενο στη φύση και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους — ανταγωνιστικές, ουδέτερες ή συνεργατικές — μπορούν να επηρεάσουν καθοριστικά την επιδημιολογία, τη δυναμική της νόσου και την εξελικτική πορεία των παθογόνων (Karvonen, A., et al., 2019). Στο φυσικό περιβάλλον οι διαδοχικές μολύνσεις είναι συχνότερες από τις ταυτόχρονες, καθώς οι ξενιστές εκτίθενται επανειλημμένα σε διαφορετικούς παράγοντες. Οι φυτικοί ιοί αποτελούν κρίσιμο παράγοντα απωλειών στη γεωργία, ενώ οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών, όπως η RNA σίγηση, επηρεάζουν σημαντικά την έκβαση μολύνσεων αλλά και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιών (Baulcombe, 2004, Tollenaere, et al 2016. Παράλληλα, ο κάθε ιός παράγει συγκεκριμένους καταστολείς της σίγησης (VSRs) μπορούν να τροποποιήσουν την επιτυχία μολύνσεων σε μεικτά συστήματα (Burgyn and Havelda, 2011).

Πέραν των ιών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ιοειδή — οι μικρότερες γνωστές παθογόνες οντότητες φυτών και μη — τα οποία, παρά το γεγονός ότι δεν κωδικοποιούν καμία πρωτεΐνη, διαθέτουν συμπαγείς δευτεροταγείς δομές και αναπαράγονται μέσω μηχανισμού κυλιόμενου κύκλου (Diener, 1971; Tabler & Tsagris, 2004). Η ανακάλυψή τους από τον Diener (1969, 1971) αποκάλυψε μια νέα κατηγορία υπο-ϊικών παθογόνων με σημαντικό αντίκτυπο στη γεωργία, προκαλώντας οικονομικά σημαντικές ασθένειες σε πολλές καλλιέργειες (Owens, 2009). Παρότι τα ιοειδή δεν απαιτούν ιούς-βοηθούς για τον πολλαπλασιασμό τους, στις φυσικές συνθήκες συχνά εντοπίζονται μαζί με ιούς, δημιουργώντας μεικτές μολύνσεις που έχουν μελετηθεί ελάχιστα (Naidu et al., 2015, Valkonen et al.).

**Ο σκοπός του παρόντος εγγράφου αφορά** την καταγραφή των αποτελεσμάτων που προέκυψαν κατά τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων δύο RNA ιών, του CMV και του TBSV με δύο ιοειδή PSTVd και HSVd), σε φυτά *Nicotiana benthamiana*. Η μελέτη επεκτάθηκε και σε φυτά αγρονομικού ενδιαφέροντος όπως η τομάτα (*Solanum lycopersicum*) για το συνδυασμό του CMV με το PSTVd. Δεδομένου ότι στη φύση οι διαδοχικές μολύνσεις είναι συνηθέστερες, εξετάστηκαν δύο σενάρια: (α) μόλυνση πρώτα με ιό και μετά με ιοειδές και (β) το αντίστροφο. Στόχος ήταν η ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης κάθε παθογόνου υπό διαφορετική σειρά μόλυνσης και η κατανόηση του πώς οι αλληλεπιδράσεις εντός του ξενιστή επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό τους.

**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.

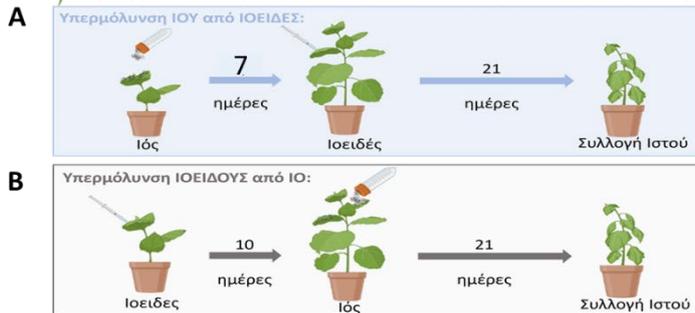
## 2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

### 2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Για την υλοποίηση του παραδοτέου Π1.9.1 χρησιμοποιήθηκαν αγρίου τύπου φυτά *Nicotiana benthamiana* καθώς και φυτά τομάτας, *Solanum lycopersicum* (Τομάτα Ace 55 VF). Αρχικά, έγινε σπορά σε φυτοδοχείο με το κατάλληλο χώμα και διατηρήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών (Aralab) στις βέλτιστες συνθήκες (θερμοκρασία 22°C, υγρασία 40% και φωτοπερίοδος 8hrs φως/ 16 ώρες σκοτάδι, 100μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Μετά από διάστημα 2 περίπου εβδομάδων πραγματοποιήθηκε μεταφύτευση σε ατομικά φυτοδοχεία, που περιέχουν μίγμα χώματος με αναλογία (2 μέρη humo: 1 μέρος τύρφη: 0,5 περλίτη σύσταση) και το πλήρες λίπασμα (12-12-7) και διατηρούνται σε θερμοκηπιακό θάλαμο, σταθερής θερμοκρασίας και φυσιολογικού φωτός.

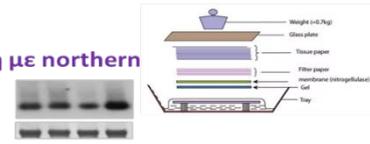
Με σκοπό τη μελέτη των υπερμολύνσεων ιών και ιοειδών, υλοποιήθηκαν δύο ειδών μελέτες. Όλες οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκήπιο και ακολουθείται, επιγραμματικά, η διαδικασία όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 1.9.1-1. Για κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν υγιή φυτάρια, ίδιας ηλικίας, τα οποία βρίσκονται σε στάδιο 4-5 πραγματικών φύλλων. Για τη μελέτη της υπερμόλυνσης ιών από ιοειδή (Εικόνα 1.9.1-1A), αρχικά πραγματοποιήθηκε μηχανική μόλυνση, με τον εκάστοτε ιό και έπειτα από 7 ημέρες πραγματοποιήθηκε αγροεμποτισμός σε υγιή και μολυσμένα με τον ιό φυτάρια, για κάθε ένα από τα ιοειδή. Σε όλα τα πειράματα έγινε καταγραφή συμπτωμάτων και συλλογή ιστού τρεις εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση (3 weeks post infection, 3wpi). Για τη μελέτη της υπερμόλυνσης ιοειδών από ιό (Εικόνα 1.9.1-1B), αρχικά πραγματοποιήθηκε αγροεμποτισμός σε φυτάρια *N.benthamiana* για κάθε ένα από τα ιοειδή που χρησιμοποιήθηκαν και έπειτα από 10 ημέρες μηχανική μόλυνση με ιό σε υγιή και μολυσμένα για το κάθε ιοειδές φυτά.

1. Πραγματοποίηση μικτών μολύνσεων με ιούς και ιοειδή



2. Εξαγωγή RNA

3. Ανάλυση με northern



**Εικόνα 1.9.1-1.** Απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε από το στάδιο 1. των υπερμολύνσεων με ιούς και ιοειδή, 2. της εκχύλισης RNA και 3. της ανάλυσης με τη μέθοδο northern.

Για τον αγροεμποτισμό χρησιμοποιήθηκε το *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 που έφερε το μολυσματικό στέλεχος του (PSTVdNB – AJ634596) από (Qi et al., 2004) από τους Dr. De Alba and Dr. Flores (Institute for Cellular and Molecular Plant Biology—IBMCP) από τους M. De Alba and P. Flores (Institute for Cellular and Molecular Plant Biology—IBMCP) είτε το στέλεχος *A. tumefaciens* C58C1 που έφερε τα μολυσματικά πλασμίδια pCdHSVd (HSVdY09352) και pCdCEVd (Daros and Flores, 2004) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως περιγράφεται σε (Katsarou et al, 2021).

Για τις μηχανικές μολύνσεις χρησιμοποιήθηκε φυτικό μόλυσμα από μολυσμένα φυτά *N.benthamiana*. Περιληπτικά, μέρος μολύσματος ομογενοποιείται παρουσία διαλύματος 50mM NaPO<sub>4</sub>, pH 6,8 (1: 4, μόλυσμα: διάλυμα) και διατηρείται σε πάγο έως ότου εφαρμοστεί στα φυτά. Πριν από την μόλυνση, προστίθεται στην επιφάνεια των φύλλων σκόνη πυριτιούχου καρβιδίου (carborundum, silicium carbide(SiC)carborundum) και στη συνέχεια γίνεται επάλειψη (με το χέρι) μικρής ποσότητας μολύσματος (~50μl για κάθε φύλλο). Αφήνεται το μόλυσμα να δράσει για λίγα λεπτά στην επιφάνεια του φύλλου και ακολούθως ξεπλένεται με νερό προς αποφυγή κατάρρευσης του ιστού. Για την περίπτωση του TBSV χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος TBSV-Sta (από Luisa Rubino)(Galetzka et al, 2000) ενώ για την περίπτωση του CMV το (CMV, I17F).

Και στις δύο περιπτώσεις των υπερμολύνσεων ο ιστός συλλέχθηκε 3 εβδομάδες μετά τη δεύτερη μόλυνση (weeks post infection, wpi).

Ακολούθησε φαινοτυπική παρατήρηση των φυτών, λήψη φωτογραφιών και συλλογή μείγματος από τα 3 ανώτερα διασυστηματικών φύλλα των φυτών. Σε κάποιες περιπτώσεις ωστόσο αυτό δεν ήταν δυνατό καθώς λόγω των έντονων χαρακτηριστικών της μόλυνσης δεν υπήρχαν διαθέσιμα προς συλλογή φύλλα. Μετά τη συλλογή τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε βαθειά κατάψυξη, -80o C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε λειοτρίβιση του ιστού παρουσία υγρού αζώτου και εκχύλιση RNA από 100mg ιστού με Trizol σύμφωνα με (Katsarou et al, 2021). Το ολικό RNA αξιολογήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (nanodrop) ως προς τη συγκέντρωση και τους δείκτες καθαρότητας (λόγοι A260/280,

A260/230) και ακολούθως τα δείγματα αναλύθηκαν με την μέθοδο northern blot (Katsarou et al 2021).

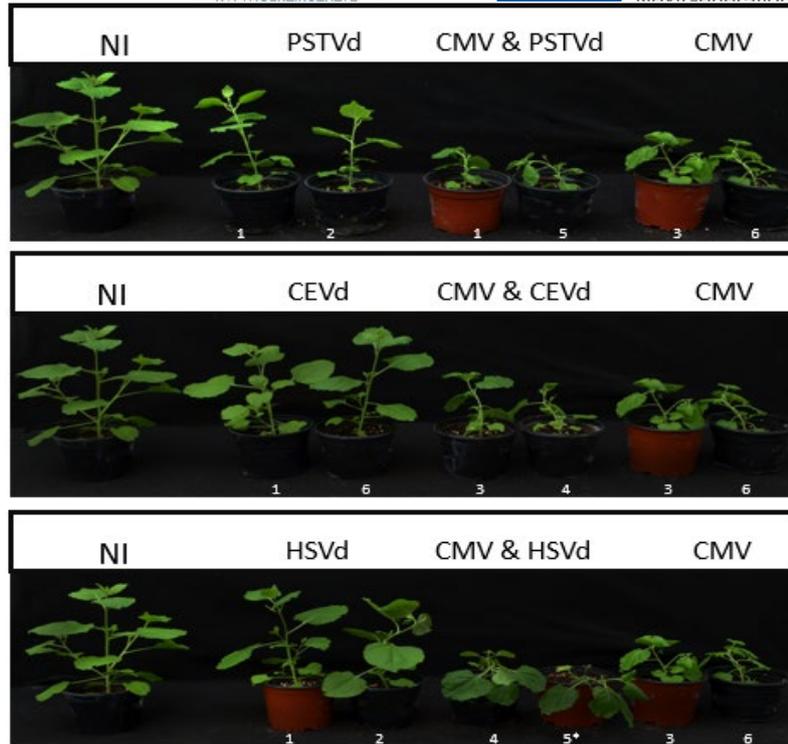
Σε κάθε τζελ αγαρόζης φορτώθηκε ίση ποσότητα (5ug RNA) από τα δείγματα προς αξιολόγηση και σύγκριση και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το σύστημα Azure sapphire.

Να σημειωθεί ότι τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια προέκυψαν μετά από συστηματική βελτιστοποίηση και προσαρμογή της μεθόδου σε κάθε περίπτωση. Οι προσαρμογές αυτές περιλάμβαναν τον καθορισμό των καταλληλότερων συνθηκών μόλυνσης για κάθε ιό/ιοειδές, του κατάλληλου ιικού/ιοειδικού φορτίου για τη μόλυνση, καθώς και του βέλτιστου σταδίου δειγματοληψίας, προκειμένου να είναι δυνατή η αξιόπιστη σύγκριση των επιπέδων μόλυνσης ανάλογα με τον συνδυασμό των παθογόνων και να εξαχθούν τα πιο ασφαλή συμπεράσματα.

## **2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση**

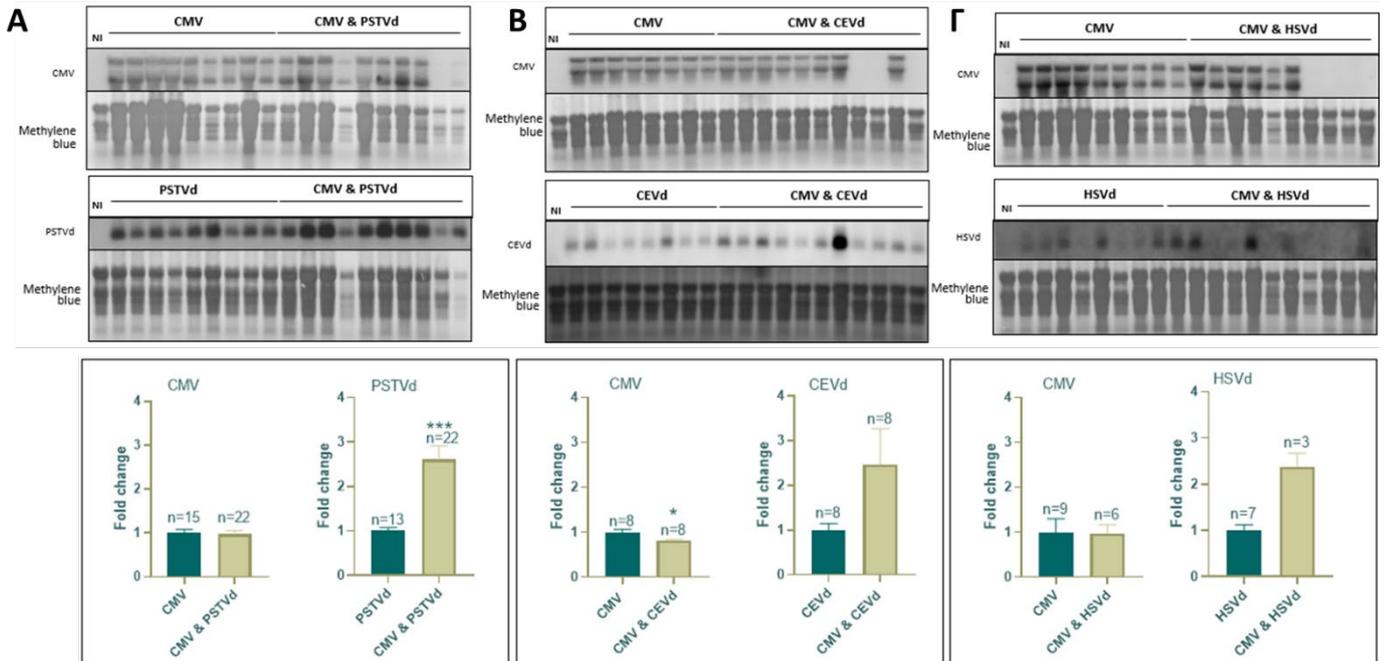
### **2.2.1 Αποτελέσματα υπερμόλυνσης ιοειδών από τον CMV σε φυτά *N.benthamiana***

Για τη μελέτη της υπερμόλυνσης των ιοειδών από τον CMV πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα όπως περιγράφεται παραπάνω. Έγινε καταγραφή συμπτωμάτων και συλλογή ιστού για περαιτέρω μοριακές αναλύσεις, τρεις εβδομάδες μετά από την αρχική μόλυνση. Ο φαινότυπος των μεικτών μολύνσεων ήταν πιο έντονος από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα των παθογόνων στις μεμονωμένες με τον ιό ή το αντίστοιχο ιοειδές, προκαλώντας σημαντική μείωση στην ανάπτυξη (νανισμό), κατάρωμα και μείωση της φυλλικής επιφάνειας γύρω από το βλαστό (Εικόνα. 1.9.1.-2). Στις εικόνες που παρουσιάζονται για όλα τα πειράματα, τα φυτάρια που δεν βρέθηκαν μολυσμένα με κάποιο από τα δύο παθογόνα, έχουν σημειωθεί με αστερίσκο (\*) και δε λήφθηκαν υπόψιν στην φαινοτυπική και τη μοριακή ανάλυση των πειραμάτων. Επίσης στις φωτογραφίες σημαίνονται οι αριθμοί των δειγμάτων.



**Εικόνα 1.9.1.-2.** Απεικόνιση χαρακτηριστικών φαινοτύπων υγιούς και μολυσμένων φυτών σε περιβάματα υπερμολύνσεως των ιοειδών PSTVd, CEVd και HSVd με τον ιό CMV, σε φυτά *N.benthamiana*. \*μη μολυσμένο με παθογόνο φυτό.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε εξαγωγή ολικού RNA και ανάλυση κατά northern blot. Από την ανάλυση του συνόλου των αποτελεσμάτων για την μελέτη των υπερμολύνσεων των ιοειδών με τον CMV, δεν προκύπτει ποσοτική διαφοροποίηση του ιού στις μεικτές μολύνσεις ενώ, αντίθετα για το PSTVd σημειώθηκε 160% αύξηση του PSTVd στις μεικτές μολύνσεις από ότι στις μονές με τιμή σημαντικότητας 0,0003 και  $+2,609 \pm 0,3987$  fold change. Παρατηρήθηκε επίσης μείωση του CMV στη μεικτή μόλυνση με CEVd με P-value ίση με 0,0166 και  $-0,8122 \pm 0,06905$  fold change. Στατιστική ανάλυση δεν δύναται για το HSVd λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων. Στην εικόνα 1.9.1-3 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες από τα πειράματα northern, καθώς και το σύνολο των αποτελεσμάτων με τη μορφή διαγράμματος, για κάθε ένα από τα ιοειδή PSTVd, CEVd και HSVd, 1.9.1-3.A-Γ, αντίστοιχα.

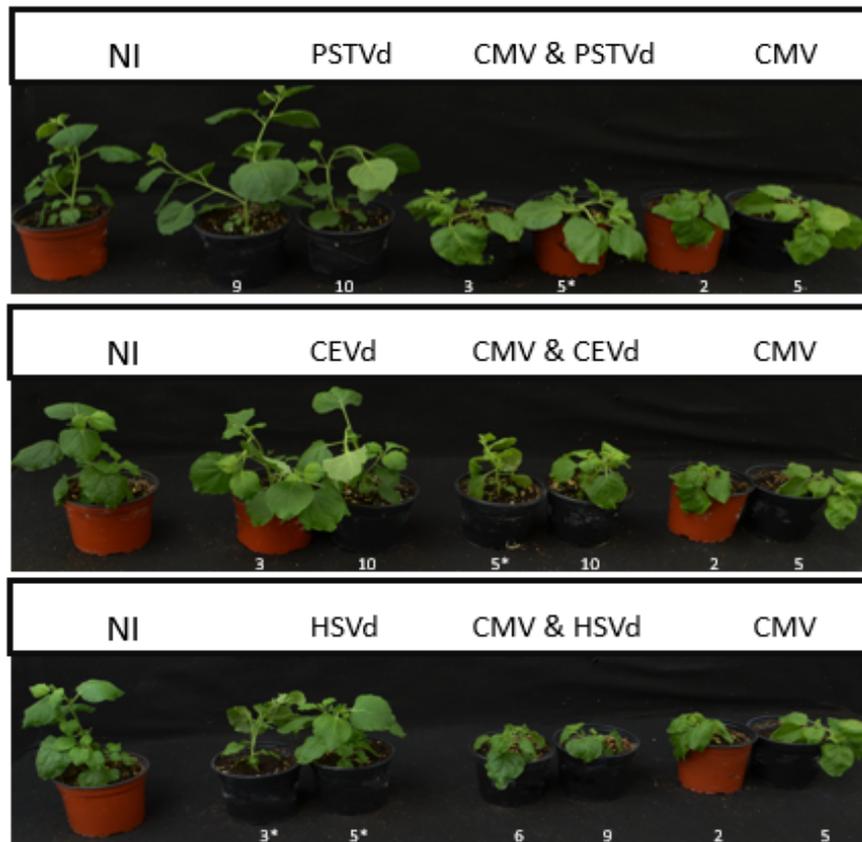


**Εικόνα 1.9.1-3.** Απεικόνιση των northern blot και των αντίστοιχων γραφικών παραστάσεων για τα πειράματα υπερμόλυνσης των ιοειδών **A.** PSTVd, **B.** CEVd, και **Γ.** HSVd από τον CMV. Η χρώση του ολικού RNA (methylene blue) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός έλεγχος. Το "NI" υποδηλώνει τα μη μολυσμένα φυτά. Η απόκλιση αντιπροσωπεύει το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Το "n" υποδηλώνει τον αριθμό των δειγμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με την ανάλυση Student's t-test. Η τιμή σημαντικότητας (P-value) ορίστηκε ως \* $P < 0.05$  και \*\*\* $P < 0.001$ .

### 2.2.2 Αποτελέσματα υπερμόλυνσης CMV από ιοειδή σε φυτά *N.benthamiana*

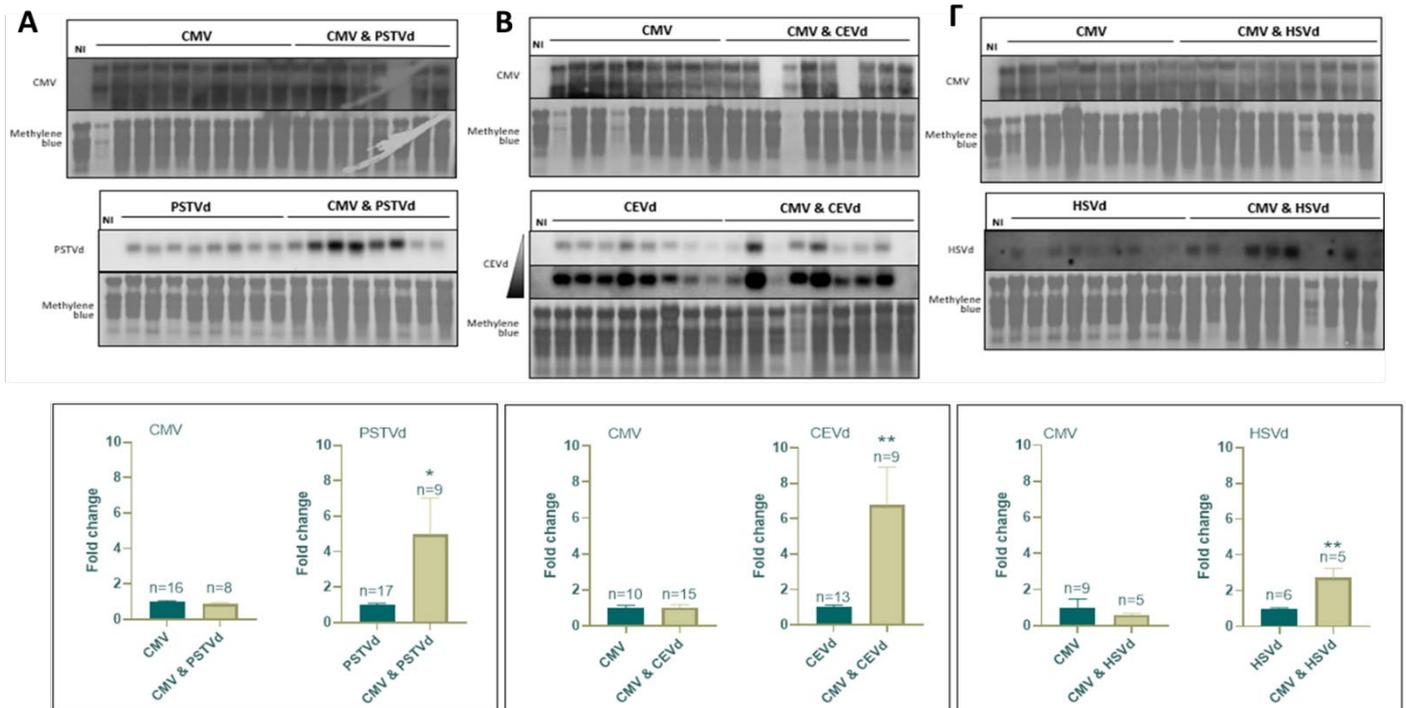
Για τη μελέτη της υπερμόλυνσης του CMV από τα τρία ιοειδή, πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα όπως περιγράφεται παραπάνω. Έγινε καταγραφή συμπτωμάτων και συλλογή ιστού 3 εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση.

Ο φαινότυπος των φυταρίων για τα ιοειδή, ήταν η ανώμαλη ανάπτυξη και το κατσάρωμα των φύλλων γύρω από το βλαστό. Για τον ιό καταγράφηκαν έντονο μωσαϊκό, παρεμπόδιση της ομαλής ανάπτυξης και μαρασμός. Για τις μεικτές μολύνσεις ο φαινότυπος ήταν πιο δυνατός από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα των μεμονωμένων παθογόνων, προκαλώντας νανισμό, κατσάρωμα και μείωση της φυλλικής επιφάνειας γύρω από το βλαστό, δηλαδή αντίστοιχος με του παραπάνω πειράματος και ας ήταν οι μολύνσεις χρονικά αντίθετες (Εικόνα. 1.9.1-4).



**Εικόνα 1.9.1-4.** Απεικόνιση χαρακτηριστικών φαινοτύπων υγιούς και μολυσμένων φυτών σε περιάματα υπερμολύνσης του CMV με τα ιοειδή PSTVd, CEVd και HSVd, σε φυτά *N.benthamiana*. \*μη μολυσμένο με παθογόνο φυτό.

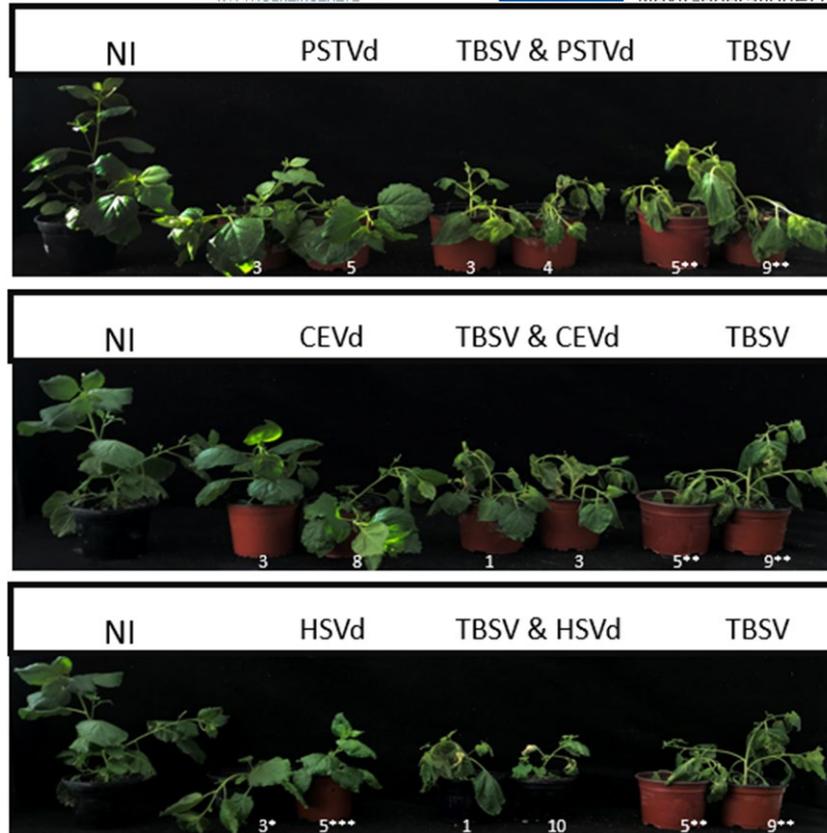
Από τη συνολική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την μελέτη των υπερμολύνσεων του CMV με τα ιοειδή παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση στις μεικτές μολύνσεις για τα ιοειδή σε σχέση με τις μεμονωμένες μολύνσεις αυτών. Συγκεκριμένα το PSTVd στην υπερμολύνση του CMV εμφανίζει τιμή σημαντικότητας ίση με 0,0136 και  $+4,961 \pm 1,487$  fold change, το CEVd στην αντίστοιχη περίπτωση που υπερμολύνει τον CMV, ίση με 0,0039 και  $+6,770 \pm 1,766$  fold change και το HSVd ίση με 0,0056 και  $+2,720 \pm 0,4758$  fold change. Τα αποτελέσματα χαρακτηρίζονται με επιφύλαξη λόγω της ύπαρξης μικρού αριθμού δειγμάτων. Στην εικόνα 1.9.1-5 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες από τα πειράματα northern, καθώς και το σύνολο των αποτελεσμάτων με τη μορφή διαγράμματος, για κάθε ένα από τα ιοειδή PSTVd, CEVd και HSVd, εικόνα 1.9.1-5Α-Γ, αντίστοιχα.



**Εικόνα 1.9.1-5.** Απεικόνιση των northern blot και των αντίστοιχων γραφικών παραστάσεων για τα πειράματα υπερμόλυνσης υπερμολύνσεως του CMV με τα ιοειδή, **A.** PSTVd, **B.** CEVd, και **Γ.** HSVd σε φυτά *N.benthamiana* των ιοειδών. Η χρώση του ολικού RNA (methylene blue) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός έλεγχος. Το "NI" υποδηλώνει τα μη μολυσμένα φυτά. Η απόκλιση αντιπροσωπεύει το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Το "n" υποδηλώνει τον αριθμό των δειγμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με την ανάλυση Student's t-test. Η τιμή σημαντικότητας (P-value) ορίστηκε ως \* $P < 0.05$  και \*\*\* $P < 0.001$ .

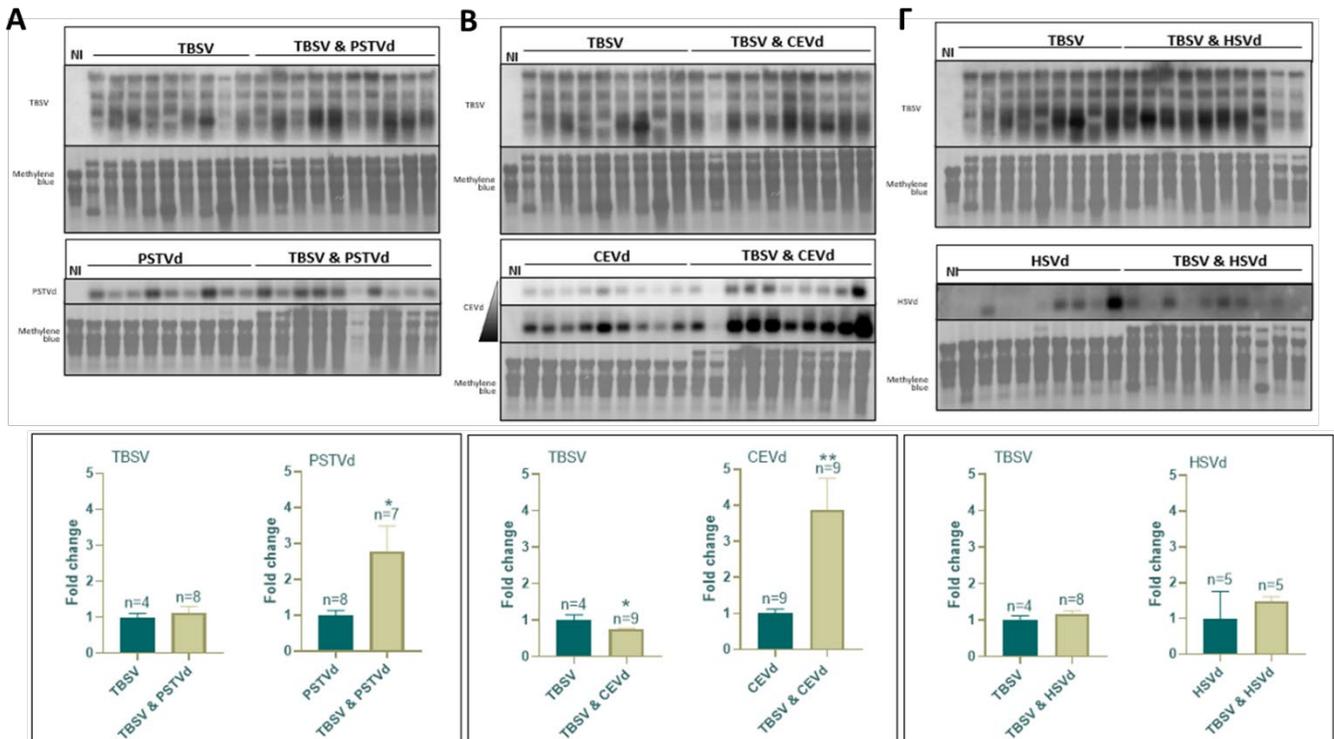
### 2.2.3 Αποτελέσματα υπερμόλυνσης ιοειδών από τον TBSV σε φυτά *N.benthamiana*

Για την εξέταση των υπερμολύνσεων των ιοειδών με τον TBSV, υγιή φυτά *N.benthamiana* μολύνθηκαν με μολυσματικούς κλώνους για το TBSV και 10dpr συλλέχθηκε ιστός, λειοτριβήθηκε και αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Η φαινοτυπική εικόνα των μολυσμένων με TBSV φυταρίων εμφάνισε έντονα συμπτώματα. Αρχικά τα φύλλα παρουσίασαν έντονο μωσαϊκό και τα φυτάρια καχεξία, ακολούθησε η νέκρωση του κορυφαίου μεριστώματος έως και ξήρανση ολόκληρου του στελέχους. Για τα ιοειδή παρατηρήθηκαν τυπικά συμπτώματα ανώμαλης ανάπτυξης και καχεξία των φυταρίων. Τα μεικτά μολυσμένα φυτά παρουσίασαν κοινή με τον ιό συμπτωματολογία (Εικόνα 1.9.1-6).



**Εικόνα 1.9.1.-6.** Απεικόνιση χαρακτηριστικών φαινοτύπων υγιούς και μολυσμένων φυτών σε περιάματα υπερμόλυνσης των ιοειδών PSTVd, CEVd και HSVd με τον ιό TBSV, σε φυτά *N.benthamiana*. \*μη μολυσμένο με παθογόνο φυτό.

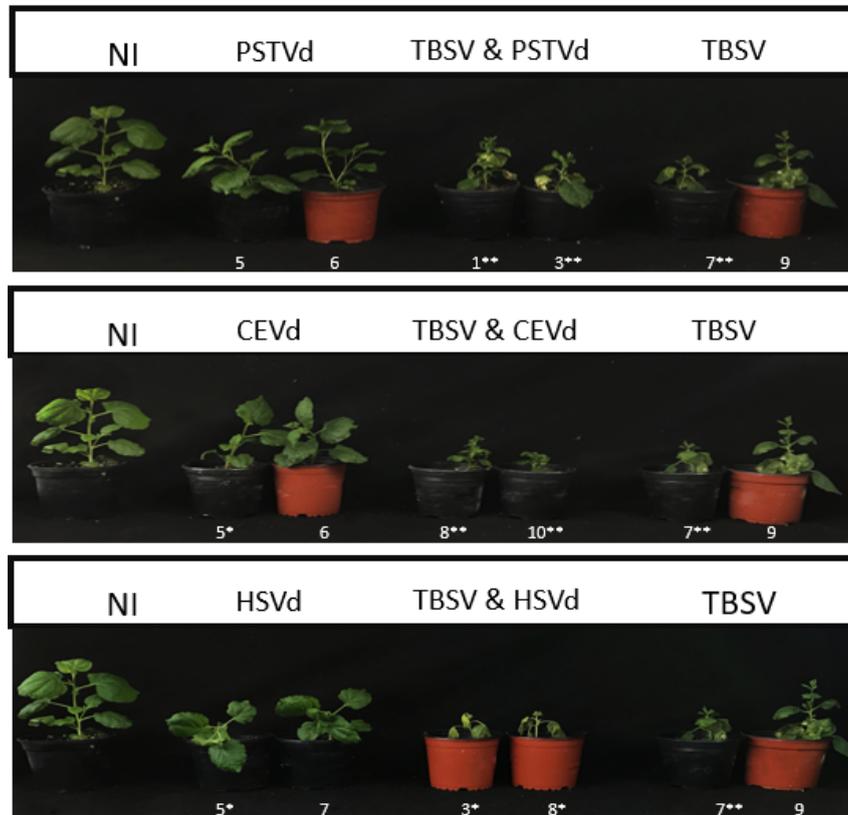
Από τη στατιστική ανάλυση ενός πειράματος υπερμόλυνσης των ιοειδών από τον TBSV, φαίνεται να υπάρχει αύξηση κατά 177% ( $+1,774 \pm 0,6843$  fold change) του PSTVd στη μεικτή μόλυνση από ότι στη μονή, με τιμή σημαντικότητας 0,0224. Στην υπερμόλυνση του CEVd από τον TBSV, παρατηρείτε μείωση του ιού κατά 25% ( $-0,2477 \pm 0,1010$  fold change) με P-value ίση με 0,0322 ενώ για το ιοειδές παρατηρείτε αύξηση κατά 280% ( $+2,881 \pm 0,8806$  fold change) και τιμή σημαντικότητας 0,0048. Στην εικόνα 1.9.1-7 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες από τα πειράματα northern, καθώς και το σύνολο των αποτελεσμάτων με τη μορφή διαγράμματος, για κάθε ένα από τα ιοειδή PSTVd, CEVd και HSVd, 1.9.1-7A-Γ, αντίστοιχα.



**Εικόνα 1.9.1-7.** Απεικόνιση των northern blot και των αντίστοιχων γραφικών παραστάσεων για τα πειράματα υπερμόλυνσης των ιοειδών **A.** PSTVd, **B.** CEVd, και **Γ.** HSVd από τον CMV. Η χρώση του ολικού RNA (methylene blue) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός έλεγχος. Το "NI" υποδηλώνει τα μη μολυσμένα φυτά. Η απόκλιση αντιπροσωπεύει το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Το "n" υποδηλώνει τον αριθμό των δειγμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με την ανάλυση Student's t-test. Η τιμή σημαντικότητας (P-value) ορίστηκε ως \* $P < 0.05$  και \*\*\* $P < 0.001$ .

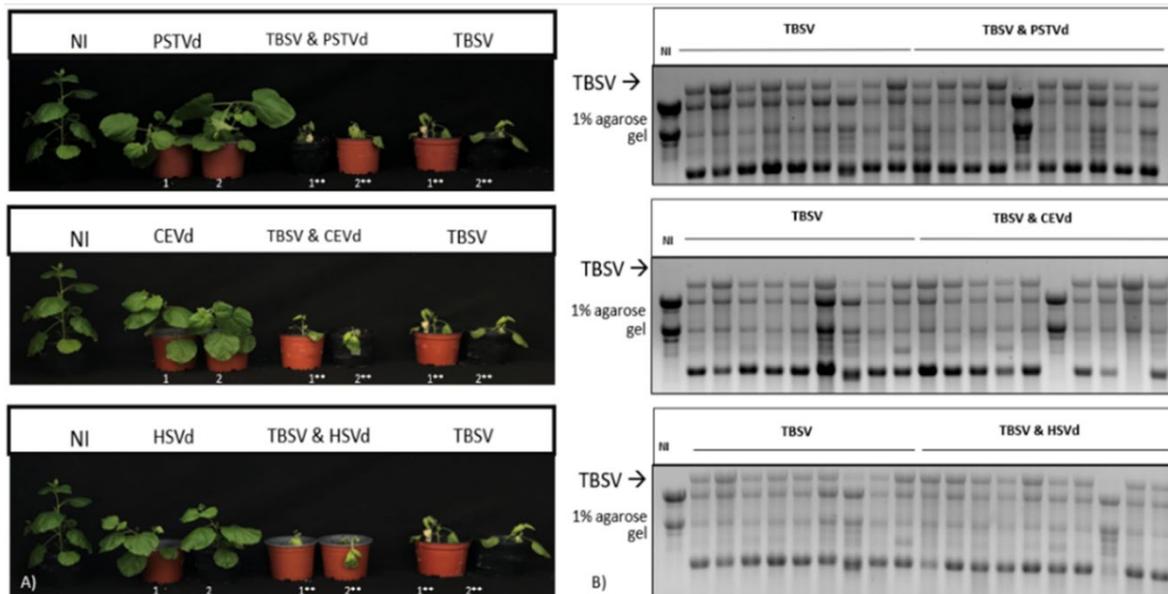
## 2.2.4 Αποτελέσματα υπερμόλυνσης TBSV από ιοειδή σε φυτά *N.benthamiana*

Για τη μελέτη της υπερμόλυνσης του TBSV από τα τρία ιοειδή, PSTVd, CEVd και HSVd, πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα όπως περιγράφεται παραπάνω και ο ιστός συλλέχθηκε 18dpi. Τη δεδομένη χρονική στιγμή, η φαινοτυπική εικόνα των φυτών ήταν το έντονο μωσαϊκό, η καχεξία, η ανωμαλία στην ανάπτυξη και η νέκρωση του κορυφαίου μεριστώματος. Για τα ιοειδή παρατηρήθηκαν τυπικά συμπτώματα ανώμαλης ανάπτυξης και καχεξία των φυταρίων. Τα μεικτά μολυσμένα φυτά παρουσίασαν κοινή με τον ιό συμπτωματολογία αλλά ακόμα περισσότερο νανισμό. Ο φαινότυπος αντιστοιχούσε σε αυτόν των πειραμάτων με την αρχική μόλυνση με τα ιοειδή και την υπερμόλυνση με τον ιό, καθώς πάντα τον πιο έντονο φαινότυπο τον έδινε ο ιός και όχι τα ιοειδή (εικόνα 1.9.1-10).



**Εικόνα 1.9.1.-10.** Απεικόνιση χαρακτηριστικών φαινοτύπων υγιούς και μολυσμένων φυτών σε περιπάματα υπερμολύνσης του TBSV με τα ιοειδή PSTVd, CEVd και HSVd, σε φυτά *N.benthamiana*. \*μη μολυσμένο με παθογόνο φυτό.

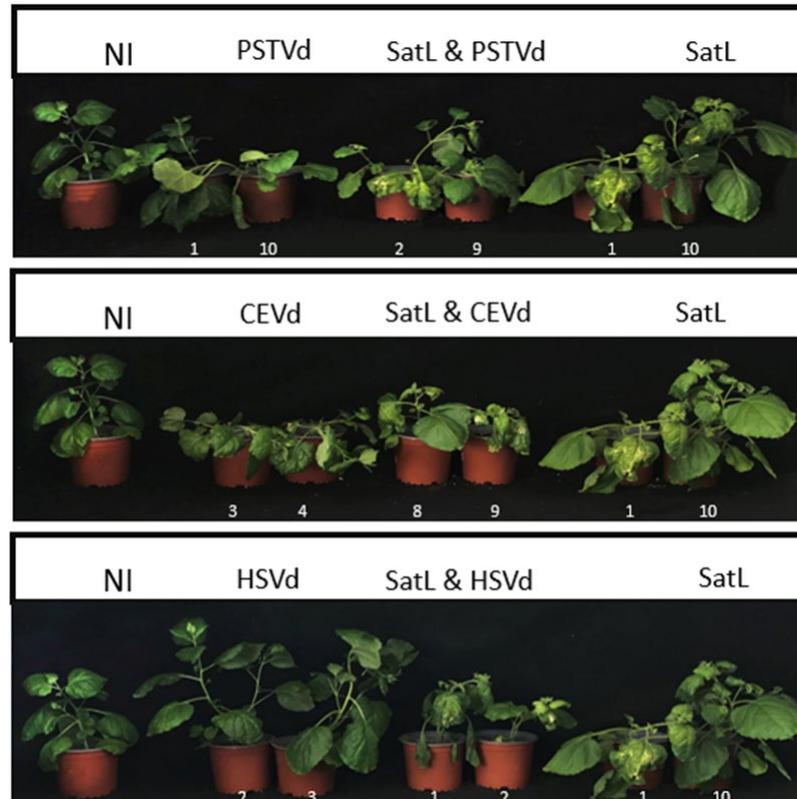
Ακολούθησε εκχύλιση RNA και ανάλυση με northern για τη σύγκριση των επιπέδων του τόσο του ιού όσο και των ιοειδών σε μεικτές μολύνσεις. Καθώς λόγω τεχνικών θεμάτων και ιδιαιτερότητας του μολύσματος, ο αριθμός των επιτυχώς μολυσμένων φυτών είναι περιορισμένος ( $n < 5$  και για το HSVd=1), γεγονός που δεν επιτρέπει την ακριβή στατιστική ανάλυση αλλά προκύπτουν ενδείξεις για την μολυσματικότητα των υπό ανάλυση παθογόνων στις δεδομένες συνθήκες. Στην εικόνα 1.9.1-11 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες από τα πειράματα northern.



**Εικόνα 1.9.1.-11.** Απεικόνιση των northern blot και των αντίστοιχων γραφικών παραστάσεων για τα πειράματα υπερμόλυνσης του TBSV με τα ιοειδή **A.** PSTVd, **B.** CEVd, και **Γ.** HSVd. Η χρώση του ολικού RNA (methylene blue) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός έλεγχος. Το "NI" υποδηλώνει τα μη μολυσμένα φυτά. Η απόκλιση αντιπροσωπεύει το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Το "n" υποδηλώνει τον αριθμό των δειγμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με την ανάλυση Student's t-test. Η τιμή σημαντικότητας (P-value) ορίστηκε ως \*P < 0.05 και \*\*\*P < 0.001.

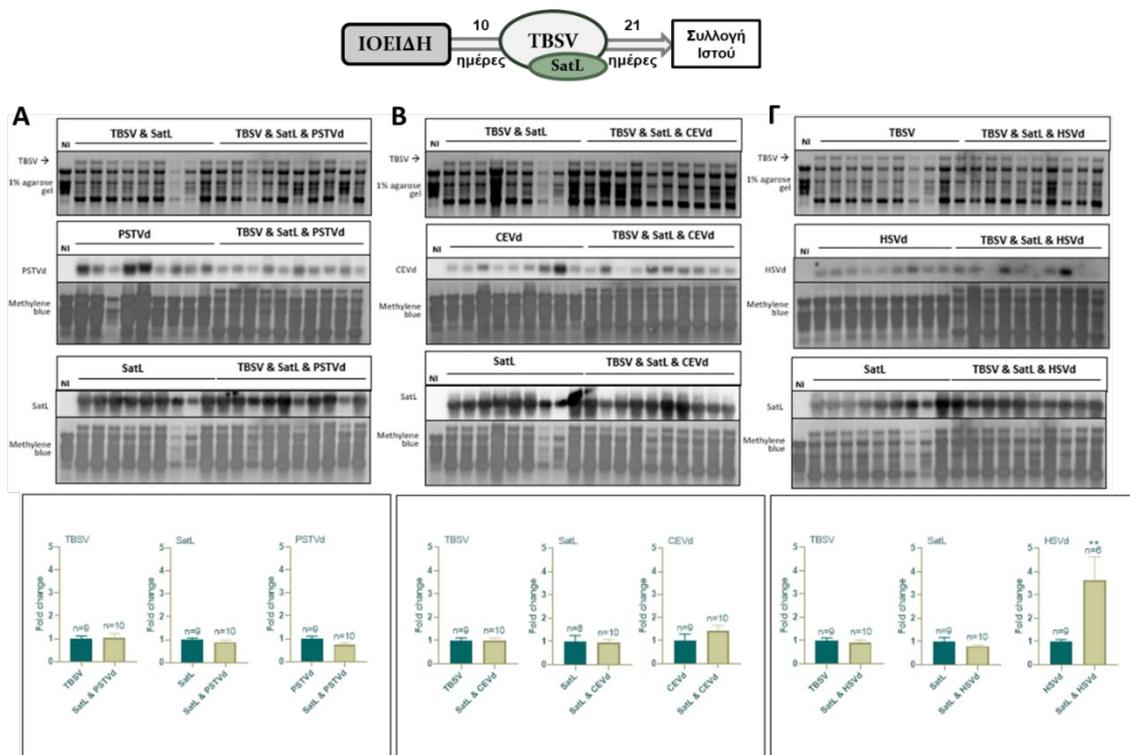
## 2.2.5 Αποτελέσματα υπερμόλυνσης ιοειδών από τον TBSV & SatL σε φυτά *N.benthamiana*

Για την εξέταση των υπερμολύνσεων των ιοειδών με τον TBSV και το SatL μαζί, υγιή φυτά *N.benthamiana* συνεπιμολύνθηκαν με μολυσματικούς κλώνους για το TBSV και το SatL και 21dpi συλλέχθηκε ιστός, λειοτριβήθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C. Από αυτό το συγκεντρωτικό δείγμα πραγματοποιήθηκαν όλες οι μολύνσεις που αφορούσαν τον TBSV και το SatL. Από τη φαινοτυπική παρατήρηση προκύπτει ότι, σε αντίθεση με τα φυτά που μολύνθηκαν με TBSV ή με TBSV και SatL σε μικρή συγκέντρωση, τα φυτά που μολύνθηκαν με TBSV και SatL από την αρχή της μόλυνσης δεν παρουσίασαν έντονη ξήρανση. Η συμπτωματολογία που καταγράφηκε ήταν το έντονο διάσπικτο μωσαϊκό, παραμόρφωση του ελάσματος των φύλλων, καχεξία στην ανάπτυξη έως και εσχάρωση του ελάσματος του φύλλου (Εικόνα 1.9.1-12).



**Εικόνα 1.9.1.-13.** Απεικόνιση χαρακτηριστικών φαινοτύπων υγιούς και μολυσμένων φυτών σε πειράματα υπερμολύνσης των ιοειδών *PSTVd*, *CEVd* και *HSVd* με τον ιό *TBSV* & *SatL*, σε φυτά *N.benthamiana*. \*μη μολυσμένο με παθογόνο φυτό.

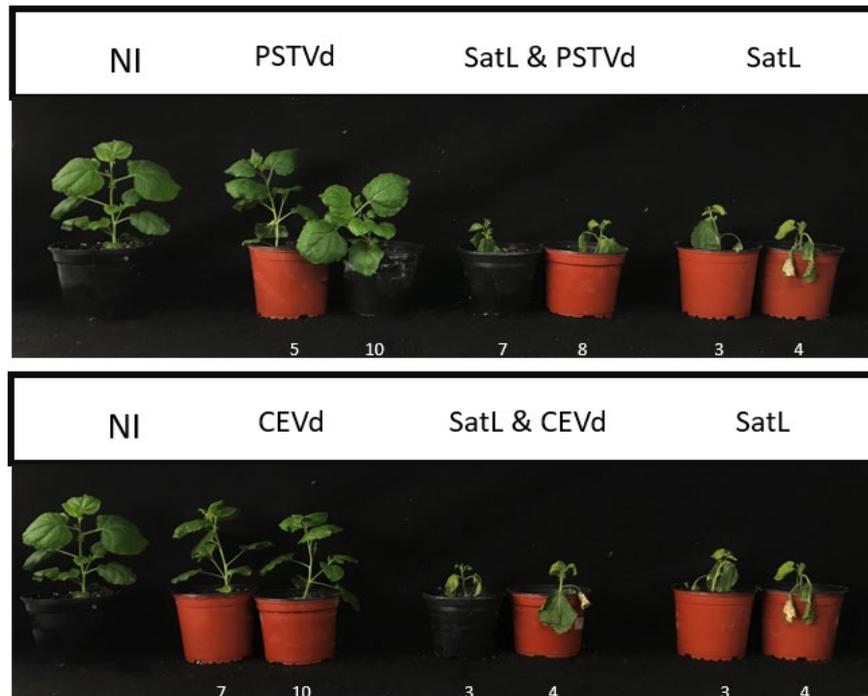
Ακολούθησε εκχύλιση RNA και ανάλυση τύπου northern για την σύγκριση των επιπέδων τόσο του ιού και του *SatL* όσο και των ιοειδών. Έτσι κατά την υπερμολύνση με τα ιοειδή, στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση εμφανίστηκε μόνο για το *HSVd*, με τάση αύξησης και τιμή σημαντικότητας ίση με 0,0069. Στην εικόνα 1.9.1.-14 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες από τα πειράματα northern, καθώς και το σύνολο των αποτελεσμάτων με τη μορφή διαγράμματος, για κάθε μία από τις υπερμολύνσεις των ιοειδών *PSTVd*, *CEVd* και *HSVd*, από *TBSV* & *SatL*, αντίστοιχα.



**Εικόνα 1.9.1-14.** Απεικόνιση των northern blot και των αντίστοιχων γραφικών παραστάσεων για τα πειράματα υπερμόλυνσης των ιοειδών **A.** PSTVd, **B.** CEVd, και **Γ.** HSVd από τον ιό TBSV & SatL. Η χρώση του ολικού RNA (methylene blue) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός έλεγχος. Το "NI" υποδηλώνει τα μη μολυσμένα φυτά. Η απόκλιση αντιπροσωπεύει το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Το "n" υποδηλώνει τον αριθμό των δειγμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με την ανάλυση Student's t-test. Η τιμή σημαντικότητας (P-value) ορίστηκε ως \*P < 0.05 και \*\*\*P < 0.001.

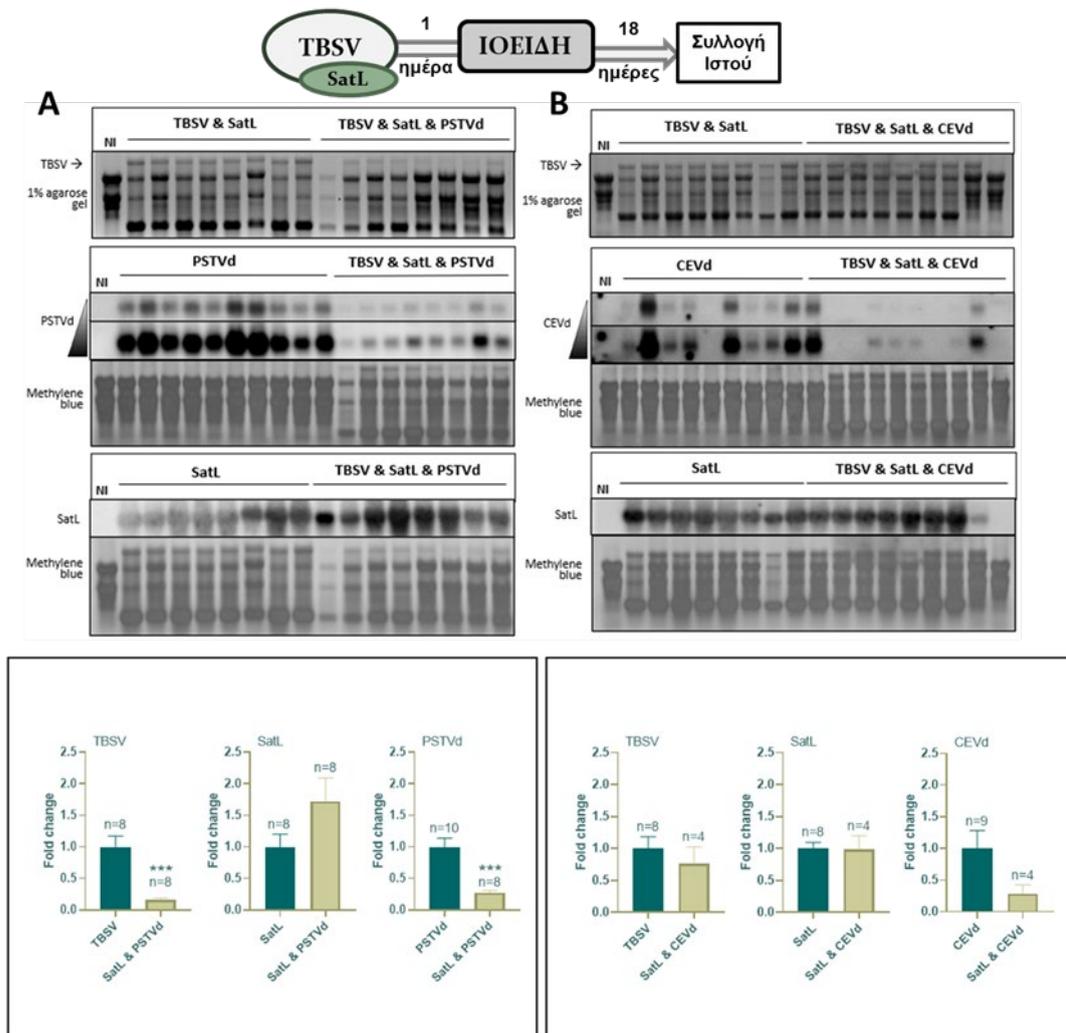
## 2.2.6 Αποτελέσματα υπερμόλυνσης του TBSV & SatL με τα ιοειδή σε φυτά *N.benthamiana*

Για την εξέταση των υπερμολύνσεων του TBSV & SatL μαζί, με τα ιοειδή, υγιή φυτά *N.benthamiana* συνεπιμολύνθηκαν με μολυσματικούς κλώνους για το TBSV και το SatL και 18dpi συλλέχθηκε ιστός, λειοτριβήθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80οC. Επιλέχθηκε αυτό το χρονικό περιθώριο συλλογής του ιστού καθώς έπειτα από δειγματοληψία στις 21 dpi ο ιστός είχε καταρρεύσει λόγω των υψηλών επιπέδων της μόλυνσης. Από τη φαινοτυπική παρατήρηση προκύπτει ότι, σε αντίθεση με τα φυτά που μολύνθηκαν με TBSV ή με TBSV και SatL σε μικρή συγκέντρωση, τα φυτά που μολύνθηκαν με TBSV και SatL από την αρχή της μόλυνσης δεν παρουσίασαν έντονη ξήρανση. Η συμπτωματολογία που καταγράφηκε ήταν το έντονο διάσπικτο μωσαϊκό, παραμόρφωση του ελάσματος των φύλλων, καχεξία στην ανάπτυξη έως και εσχάρωση του ελάσματος του φύλλου (Εικόνα 1.9.1-15).



**Εικόνα 1.9.1.-15.** Απεικόνιση χαρακτηριστικών φαινοτύπων υγιούς και μολυσμένων φυτών σε περιάματα υπερμόλυνσης του TBSV & SatL με τα ιοειδή PSTVd και CEVd, σε φυτά *N.benthamiana*. \*μη μολυσμένο μη παθογόνα φυτά.

Ομοίως με τις παραπάνω περιπτώσεις, ακολούθησε ανάλυση τύπου northern για την αξιολόγηση των επιπέδων του κάθε παθογόνου στη μεικτή μόλυνση. Έτσι, στην περίπτωση όπου ο ιός και SatL συνεπιμολύνουν πρώτα το φυτό και το PSTVd τα υπερμολύνει, παρατηρείται ένα πολύ ξεκάθαρο αποτέλεσμα με έντονη διαβλαθμισή στην ποσότητα του ιού και του ιοειδούς. Συγκεκριμένα ο TBSV παρουσίασε μείωση  $-0,8402 \pm 0,1757$  fold change όταν υπερμολύνθηκε από το PSTVd ενώ το PSTVd παρουσίασε  $-0,7269 \pm 0,1593$  fold change στις μεικτές μολύνσεις. Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας βρέθηκε ίση με 0,0003 και στις δύο περιπτώσεις. Για το CEVd δεν εξήχθησαν αποτελέσματα λόγω μικρού αριθμού διπλά μολυσμένων δειγμάτων και αντίστοιχα για το HSVd κανένα συμπέρασμα, αφού δεν βρέθηκαν πετυχημένες για το ιοειδές μολύνσεις. Στην Εικόνα Π1.9.1.-16 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες από τα πειράματα northern, καθώς και το σύνολο των αποτελεσμάτων με τη μορφή διαγράμματος, για κάθε μία από τις υπερμολύνσεις του ιού TBSV & SatL με τα ιοειδή PSTVd και CEVd, αντίστοιχα.

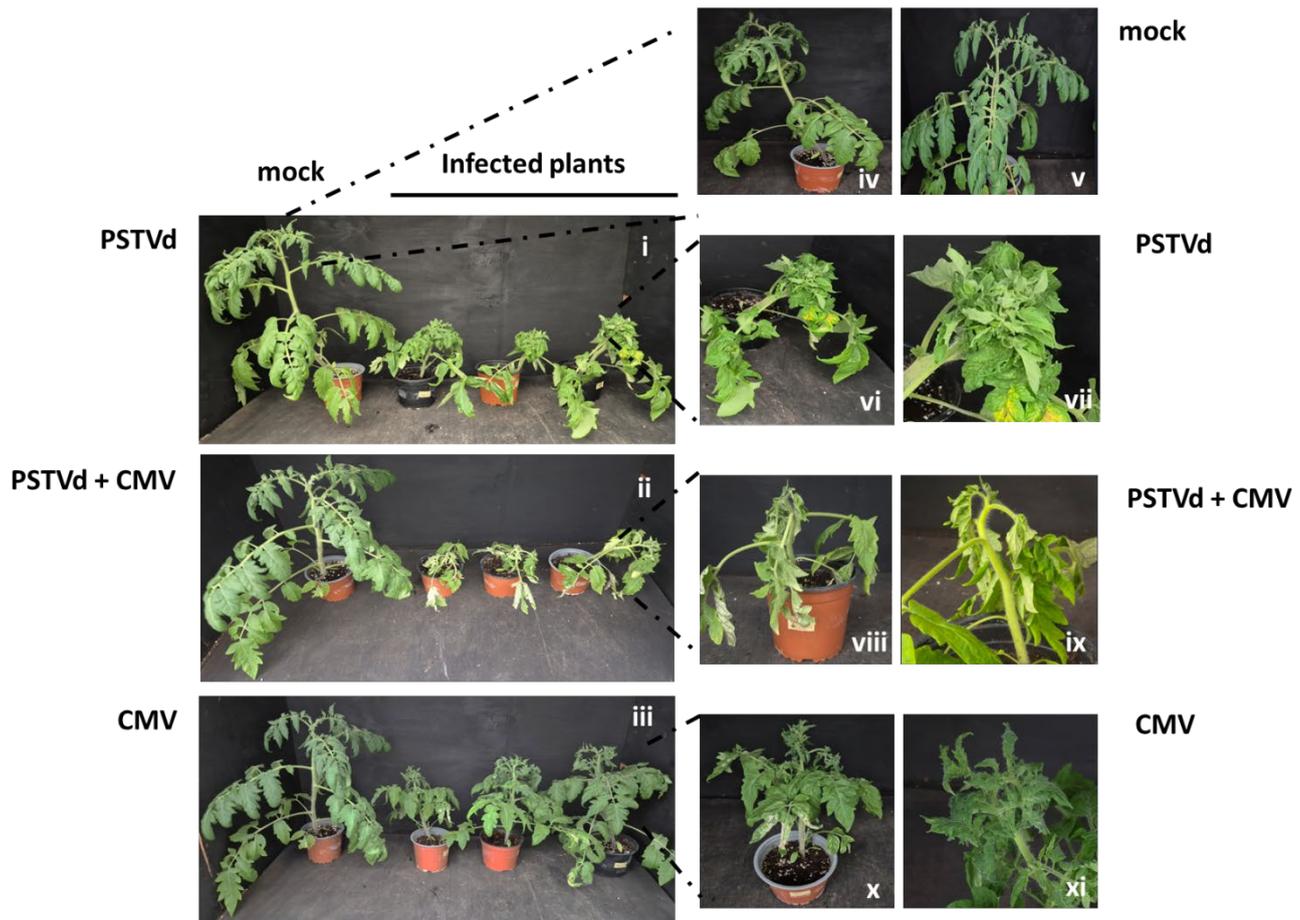


**Εικόνα 1.9.1-16.** Απεικόνιση των northern blot και των αντίστοιχων γραφικών παραστάσεων για τα πειράματα υπερμόλυνσης υπερμολύνσης του TBSV & SatL με τα ιοειδή A. PSTVd και B. CEVd, σε φυτά *N.benthamiana*. Η χρώση του ολικού RNA (methylene blue) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός έλεγχος. Το "NI" υποδηλώνει τα μη μολυσμένα φυτά. Η απόκλιση αντιπροσωπεύει το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Το "n" υποδηλώνει τον αριθμό των δειγμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με την ανάλυση Student's t-test. Η τιμή σημαντικότητας (P-value) ορίστηκε ως \*P < 0.05 και \*\*\*P < 0.001.

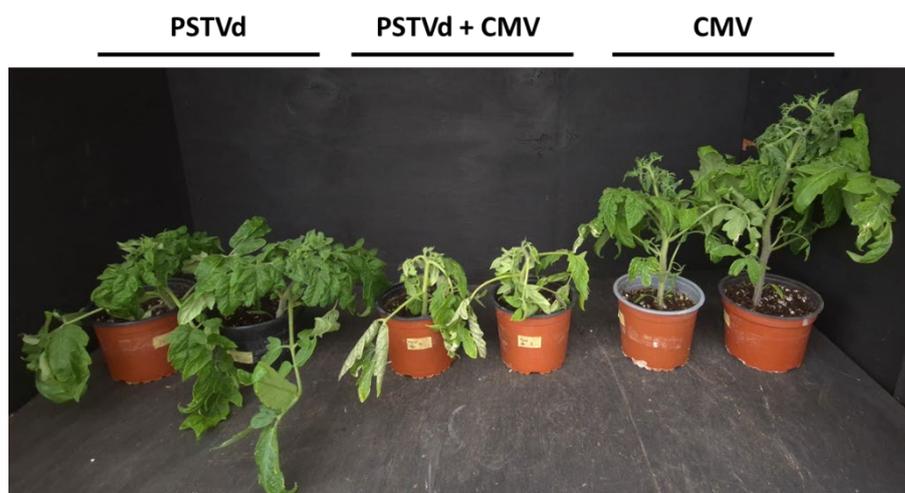
## **2.2.7 Αποτελέσματα υπερμόλυνσης του CMV από το PSTVd σε φυτά *S. lycopersicum***

Αφού ολοκληρώθηκαν τα παραπάνω πειράματα, επόμενος στόχος ήταν η επέκταση και η επιβεβαίωση σχέσεων αλληλεπίδρασης μεταξύ των παθογόνων και σε άλλο φυτό όπως είναι η αγρονομικού ενδιαφέροντος τομάτα. Επιλέχθηκε να γίνει ανάλυση για την σχέση συνεργασίας που βρέθηκε μεταξύ του ιού CMV και του ιοειδούς PSTVd, είτε με την παρουσία του ιού να προηγείται της παρουσίας του ιοειδούς είτε αντίστροφα. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκε αντίστοιχη διαδικασία με αυτήν που περιγράφεται για τα φυτά *N.benthamiana*. Νεαρά φυτά τομάτας ίδιας ηλικίας, στο στάδιο των 4-5 φύλλων μολύνθηκαν με τα παθογόνα και πραγματοποιήθηκε συγκριτική αξιολόγηση των επιπέδων των παθογόνων σε κάθε περίπτωση, 3 εβδομάδες μετά και τη δεύτερη μόλυνση.

Πιο συγκεκριμένα, για τη μελέτη της υπερμόλυνσης του CMV από το PSTVd, τα φυτά μολύνθηκαν με τον ιό, 7 ημέρες αργότερα μολύνθηκαν με το ιοειδές και ο ιστός συλλέχθηκε 21dpi, από το ιοειδές. Ακολούθησε καταγραφή των φαινοτυπικών συμπτωμάτων και παρουσιάζονται χαρακτηριστικές φωτογραφίες από τη φαινοτυπική παρατήρηση στην εικόνα (Εικόνα 1.9.1-17). Φαίνεται ότι τα μολυσμένα με το ιοειδές εμφανίζουν έντονη ύφεση στην ανάπτυξή τους, μειωμένη έκπτυξη και καρούλιασμα των νεαρών φύλλων (εικόνα 1.9.1-17i, vi, vii). Τα μολυσμένα μόνο με CMV φυτά έχουν επίσης μειωμένη ανάπτυξη αλλά λιγότερο έντονη από αυτήν των μολυσμένων φυτών με το ιοειδές, θαμνώδη έκπτυξη και καρούλιασμα των ανώτερων φύλλων και ελαφρύ μωσαϊκό (εικόνα 1.9.1-17iii, x, xi). Τα φυτά που είναι μολυσμένα και με τα δύο παθογόνα εμφανίζουν όλα τα παραπάνω συμπτώματα σε μεγαλύτερη ένταση. Η έντονη καχεξία στην ανάπτυξή τους, και η δυσχέρειες στη διαμόρφωση και ανάπτυξη των φύλλων έχει οδηγήσει σε φυτά που μοιάζουν σχεδόν μαραμένα (εικόνα 1.9.1-17ii, viii, ix). Ενώ στην εικόνα 1.9.1-17 iv-v, απεικονίζεται ένα υγιές φυτό. Παράλληλα, στην εικόνα 1.9.1-18 φαίνεται η συγκριτική φαινοτυπική ανάλυση των ενδεικτικών φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία.

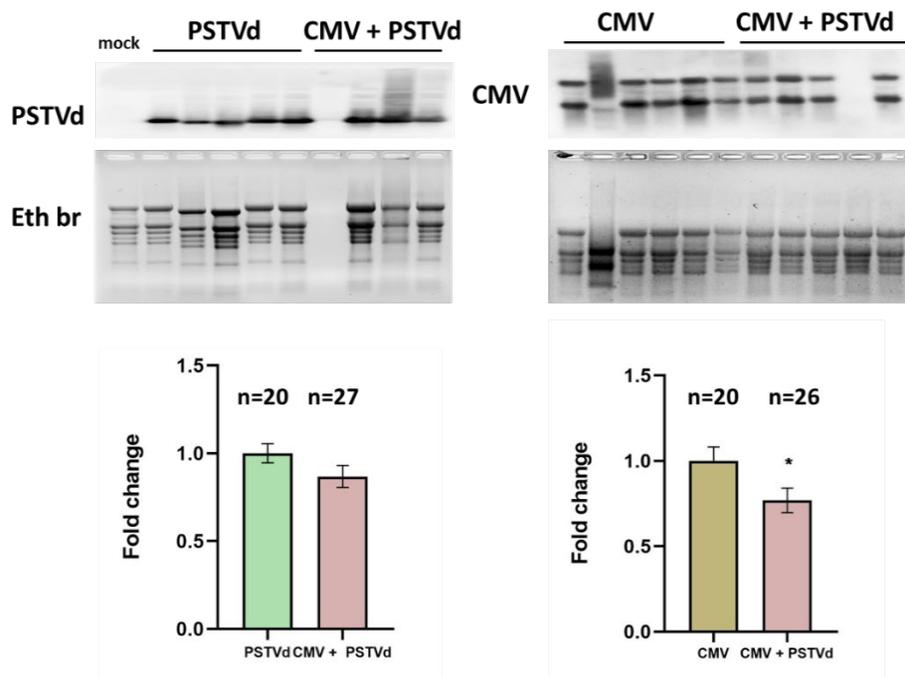


**Εικόνα 1.9.1-17.** Απεικόνιση χαρακτηριστικών φαινοτύπων υγιούς και μολυσμένων φυτών σε περιβάματα υπερμολύνσης του CMV από το PSTVd σε φυτά *S.lycopersicum*. Με mock αναφέρεται το υγιές φυτό.



**Εικόνα 1.9.1-18.** Συγκριτική απεικόνιση φαινοτύπων των μολυσμένων φυτών σε περιβάματα υπερμολύνσης του CMV από το PSTVd σε φυτά *S.lycopersicum*. Με mock αναφέρεται το υγιές φυτό.

Ακολούθησε συλλογή του ιστού και αποθήκευση στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση RNA με Trizol και ανάλυση των επιπέδων του κάθε παθογόνου με τη χρήση της μεθόδου northern blot. Η συνολική ποσοτικοποίηση των δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν έδειξε ότι κατά την υπερμόλυνσή του με τον PSTVd με τον CMV, δεν παρατηρείται καμία διαφοροποίηση στα επίπεδα του ιοειδούς ενώ ο CMV μειώνεται στις 0,76 φορές. Στην εικόνα 1.9.1-19 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες από τα πειράματα northern, καθώς και το

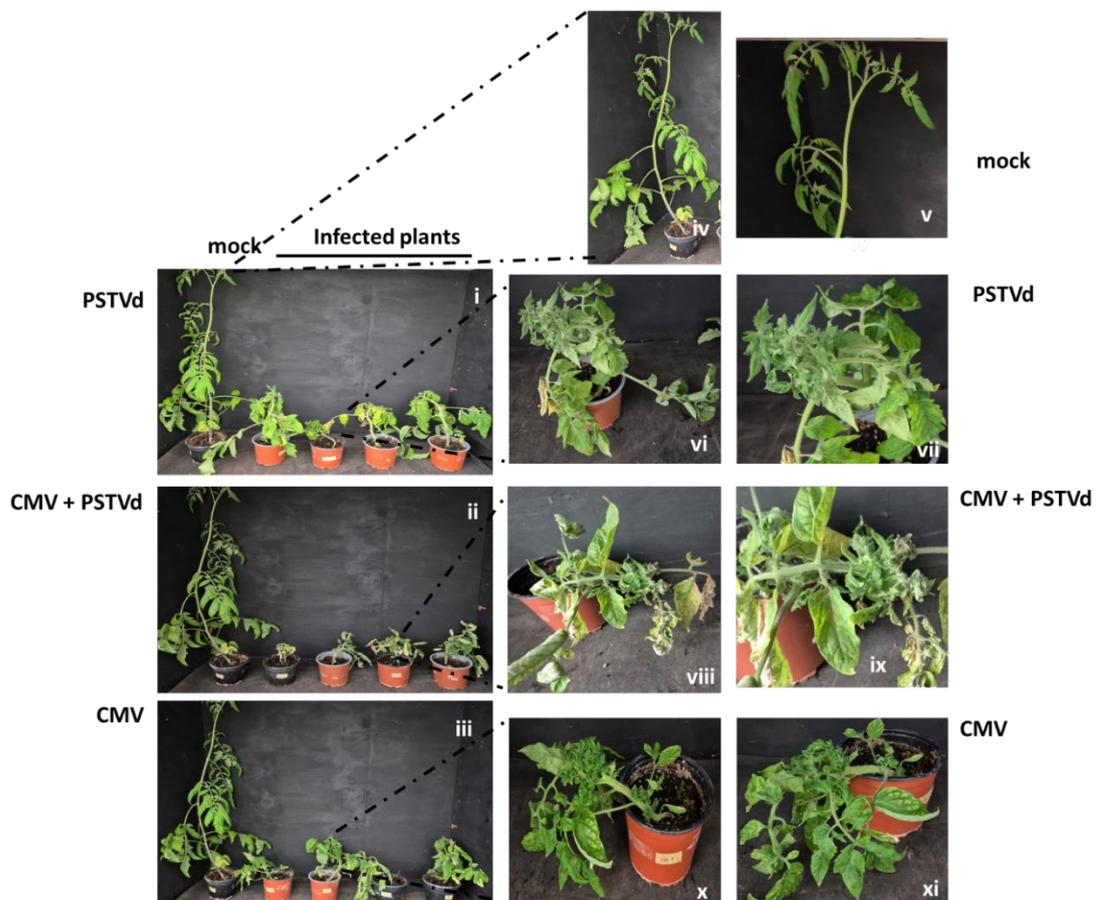


σύνολο των αποτελεσμάτων με τη μορφή διαγράμματος.

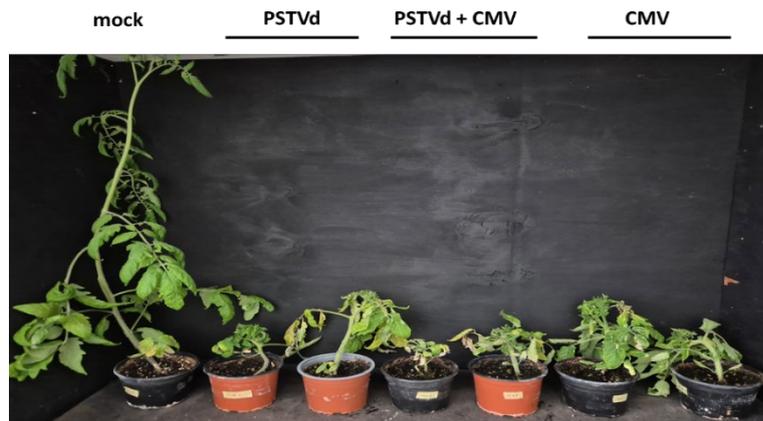
**Εικόνα 1.9.1-19.** Απεικόνιση ενδεικτικών northern blots και των αντίστοιχων γραφικών παραστάσεων για τα πειράματα υπερμόλυνσης υπερμολύνσης του PSTVd από τον CMV, σε φυτά *S.lycopersicum*. Η χρώση του ολικού RNA (ethidium bromide) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός έλεγχος. Το mock υποδηλώνει τα μη μολυσμένα φυτά. Η απόκλιση αντιπροσωπεύει το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Το "n" υποδηλώνει τον αριθμό των δειγμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με την ανάλυση Student's t-test. Η τιμή σημαντικότητας (P-value) ορίστηκε ως \* $P < 0.05$  και \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2.2.8 Αποτελέσματα υπερμόλυνσης του PSTVd από τον CMV σε φυτά *S. lycopersicum*

Με ανάλογο τρόπο πραγματοποιήθηκε και η μελέτη της υπερμόλυνσης του PSTVd από τον CMV. Τα φυτά μολύνθηκαν με τον ιοειδές και 10 ημέρες αργότερα μολύνθηκαν με τον ιό (καθώς το ιοειδές χρειάζεται λίγο παραπάνω χρόνο για να μολύνει) και ο ιστός συλλέχθηκε 21dpi, από το ιοειδές. Ακολούθησε καταγραφή των φαινοτυπικών συμπτωμάτων και παρουσιάζονται χαρακτηριστικές φωτογραφίες από τη φαινοτυπική παρατήρηση στην εικόνα (εικόνα 1.9.1-20). Φαίνεται ότι τα μολυσμένα με το ιοειδές εμφανίζουν έντονο νανισμό, μικρά νερά φύλλα με έντονο καρούλιασμα σε θαμνώδη διάταξη στην κορυφή του φυτού. (εικόνα 1.9.1-20 ,i, vi, vii). Τα μολυσμένα μόνο με CMV φυτά έχουν μειωμένη ανάπτυξη, θαμνώδη έκπτυξη και καρούλιασμα των ανώτερων φύλλων και ελαφρύ μωσαϊκό (εικόνα 1.9.1-20 iii, x, xi). Τα φυτά που είναι μολυσμένα και με τα δύο παθογόνα εμφανίζουν όλα τα παραπάνω συμπτώματα σε μεγαλύτερη ένταση. Η έντονη καχεξία στην ανάπτυξή τους, και η δυσχέρειες στη διαμόρφωση και ανάπτυξη των φύλλων έχει οδηγήσει σε φυτά που μοιάζουν σχεδόν μαραμένα (εικόνα 1.9.1-20 ii, viii, ix). Ενώ στην εικόνα 1.9.1-20 iv-v, απεικονίζεται ένα υγιές φυτό. Παράλληλα, στην εικόνα 1.9.1-21 φαίνεται η συγκριτική φαινοτυπική ανάλυση των ενδεικτικών φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία.

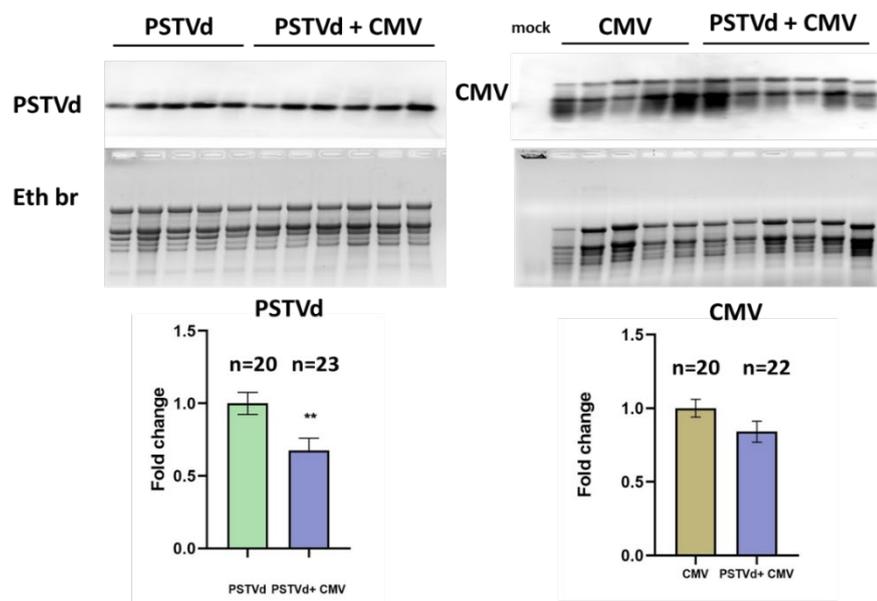


**Εικόνα 1.9.1-20.** Απεικόνιση χαρακτηριστικών φαινοτύπων υγιούς και μολυσμένων φυτών σε περιβάματα υπερμόλυνσης του PSTVd από τον CMV σε φυτά *S.lycopersicum*. Με mock αναφέρεται το υγιές φυτό



**Εικόνα 1.9.1-21.** Συγκριτική απεικόνιση φαινοτύπων των μολυσμένων φυτών σε περιβάματα υπερμόλυνσης του PSTVd από τον CMV σε φυτά *S. lycopersicum*. Με mock αναφέρεται το υγιές φυτό.

Ακολούθησε συλλογή του ιστού και αποθήκευση στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση RNA με Trizol και ανάλυση των επιπέδων του κάθε παθογόνου με τη χρήση της μεθόδου northern blot. Η συνολική ποσοτικοποίηση των δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν έδειξε ότι κατά την υπερμόλυνσή του με τον CMV, μειώνεται στις 0,67 φορές, ενώ στην περίπτωση αυτή ο CMV φαίνεται να μη διαφοροποιείται. Στην εικόνα Π1.91.1-22 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες από τα πειράματα northern, καθώς και το σύνολο των αποτελεσμάτων με τη μορφή διαγράμματος.



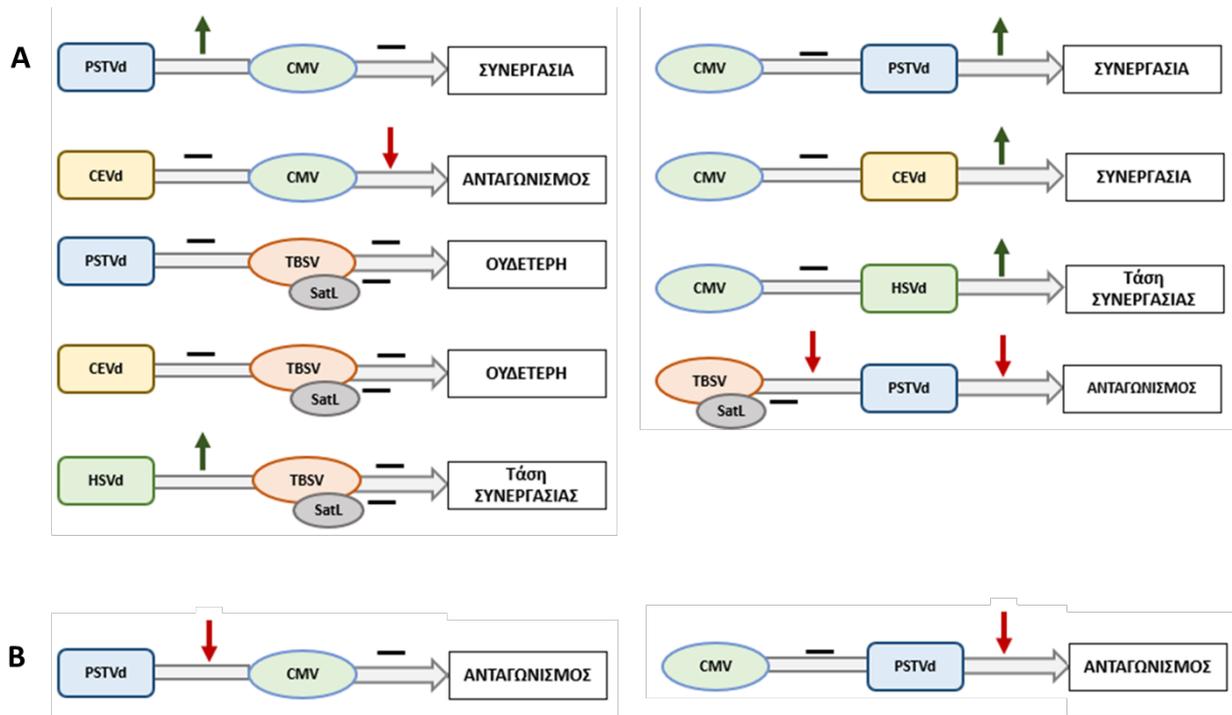
**Εικόνα 1.9.1-22.** Απεικόνιση ενδεικτικών northern blots και των αντίστοιχων γραφικών παραστάσεων για τα πειράματα υπερμόλυνσης υπερμόλυνσης του PSTVd από τον CMV, σε φυτά *S. lycopersicum*. Η χρώση του ολικού RNA (ethidium bromide) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός έλεγχος. Το mock υποδηλώνει τα μη μολυσμένα φυτά. Η απόκλιση αντιπροσωπεύει το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Το "n" υποδηλώνει τον αριθμό των δειγμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε με την ανάλυση Student's t-test. Η τιμή σημαντικότητας (P-value) ορίστηκε ως  $*P < 0.05$  και  $***P < 0.001$ .

### 3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την ολοκλήρωση του παραδοτέου Π1.9.1 φαίνεται ότι τα ιοειδή τείνουν να αυξάνουν τη συγκέντρωσή του σε συνθήκες μεικτής μόλυνσης με τον CMV ή τον TBSV. Η παρουσία SatRNAs καταγράφηκε να επιδρά αρνητικά για το ιοειδές, είτε με την σταθεροποίηση ή τη μείωση του σε μεικτή του μόλυνση, με εξαιρέσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στην εικόνα 1.9.1-23 όπου επιγραμματικά, συμπεραίνεται ότι:

- Όταν το PSTVd υπερμολύνεται από CMV ή TBSV παρουσιάζει αύξηση της συσσώρευσης του και συνεργασία με τον ιό. Στην περίπτωση όμως υπερμολύνσης από TBSV & SatL η συσσώρευση όλων των παθογόνων παραμένει σταθερή.
- Όταν το CEVd υπερμολύνεται από CMV παρουσιάζει σταθεροποίηση και από TBSV αύξηση, και στις δύο περιπτώσεις δρα ανταγωνιστικά με τον ιό καθώς προκαλεί μείωση στη συσσώρευση του ιού, εκτός όταν υπερμολύνεται από TBSV & SatL όπου η συσσώρευση όλων των παθογόνων παραμένει σταθερή.
- Για την υπερμολύνση του HSVd καταγράφηκαν αποτελέσματα μόνο όταν υπερμολύνεται από TBSV & SatL όπου η συσσώρευση του παρουσιάζει τάση αύξησης, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ιοειδή, ενώ των υπόλοιπων παθογόνων παραμένει σταθερή.
- Όταν ο CMV υπερμολύνεται από ιοειδή, η συσσώρευση του παραμένει σταθερή ενώ των ιοειδών αυξάνεται ή δείχνει αυξητική τάση.
- Στην περίπτωση υπερμολύνσης του TBSV με το SatL από το PSTVd, καταγράφεται ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ του ιού και του SatL και του PSTVd και του SatL.
- Στα φυτά *S.lycopersicum* παρατηρούνται διαφορετικά αποτελέσματα καθώς και στις δύο περιπτώσεις μεικτών μολύνσεων σημειώνεται μείωση του PSTVd υποδηλώνοντας τις ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ των παθογόνων.
- 

Η μελέτη των μεικτών μολύνσεων ιών και ιοειδών είναι κρίσιμη, καθώς αυτές οι αλληλεπιδράσεις αντικατοπτρίζουν τις πραγματικές συνθήκες των αγρών και ενδέχεται να επηρεάσουν σημαντικά τη γεωργική παραγωγή και την επισιτιστική ασφάλεια. Η κατανόηση των πολύπλοκων σχέσεων μεταξύ ιών, ιοειδών και ξενιστή αποτελεί αναγκαίο βήμα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης φυτικών ασθενειών.



**Εικόνα 1.9.1 – 23.** Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων μεικτών μολύνσεων με τους ιούς CMV, TBSV & SatL με τα ιοειδή PSTVd, CEVd, και HSVd A. σε φυτά *N.bentamiana* και B. σε φυτά *S.lycopersicum*.

## 4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Βιβλιογραφικές Αναφορές

**Karvonen, A., Jokela, J., & Laine, A.-L. 2019.** Importance of Sequence and Timing in Parasite Coinfections. *Trends in Parasitology*, 35(2), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.007>

**Katsarou K, Kryovrysanaki N, Kalantidis K. 2022.** Detection of Viroid RNA and vd-siRNA in *N. benthamiana* Plants: Northern Blot Analyses for Viroid and vd-siRNAs. *Methods Mol Biol.*; 2316:287-312. doi: 10.1007/978-1-0716-1464-8\_24

**Diener, T. O. 1971.** Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, 428, 411-428

**Daros, J.-A., Flores, R., 2004.** Arabidopsis thaliana has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc Natl Acad Sci* 101, 6792-6797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401090101>

**Baulcombe, D. RNA silencing in plants. Nature 431, 356-363. 2004.**  
<https://doi.org/10.1038/nature02874>

**Burguán, J., Havelda, Z., 2011.** Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.010>

**Tollenaere, C., Susi, H., & Laine, A. L. 2016.** Evolutionary and Epidemiological Implications of Multiple Infection in Plants. *Trends in Plant Science*, 21(1), 80-90.)

**Tabler, M., Tsagris, M., 2004.** Viroids: Petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.05.007>

**Flores, R., Di Serio, F., Navarro, B., Duran-Vila, N., Owens, R.A. 2011.** Viroids and Viroid Diseases of Plants. *Stud Viral Ecol Microb Bot Host Syst* 1, 307-342. <https://doi.org/10.1002/9781118025666.ch12>

**Owens, R.A., Hammond, R.W., 2009.** Viroid pathogenicity: One process, many faces. *Viruses* 1, 298-316. <https://doi.org/10.3390/v1020298>

**Valkonen, J.P.T. 1992.** Accumulation of potato virus Y is enhanced in *Solanum brevidens* also infected with tobacco mosaic virus or potato spindle tuber viroid. *Annals of Applied Biology*. 121, 321-327.

**Naidu, R. A., Maree, H. J., & Burger, J. T. 2015.** Grapevine Leafroll Disease and Associated Viruses: A Unique Pathosystem. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 613-634. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-102313-045946>

**Qi, W.Y., Pé, T., Itaya, A., Hunt, E., Wassenegger, M., Ding, B., 2004.** Direct Role of a Viroid RNA Motif in Mediating Directional RNA Trafficking across a Specific Cellular Boundary. *Plant Cell* 16, 1741-1752. <https://doi.org/10.1105/tpc.021980>

**Galetzka, D., Russo, M., Rubino, L. & Krczal, G. (2000).** *Molecular characterization of a tombusvirus associated with a disease of statice [Goniolimon tataricum (L.) Boiss.]* **Journal of Plant Pathology**, **82**(2), 151–155.