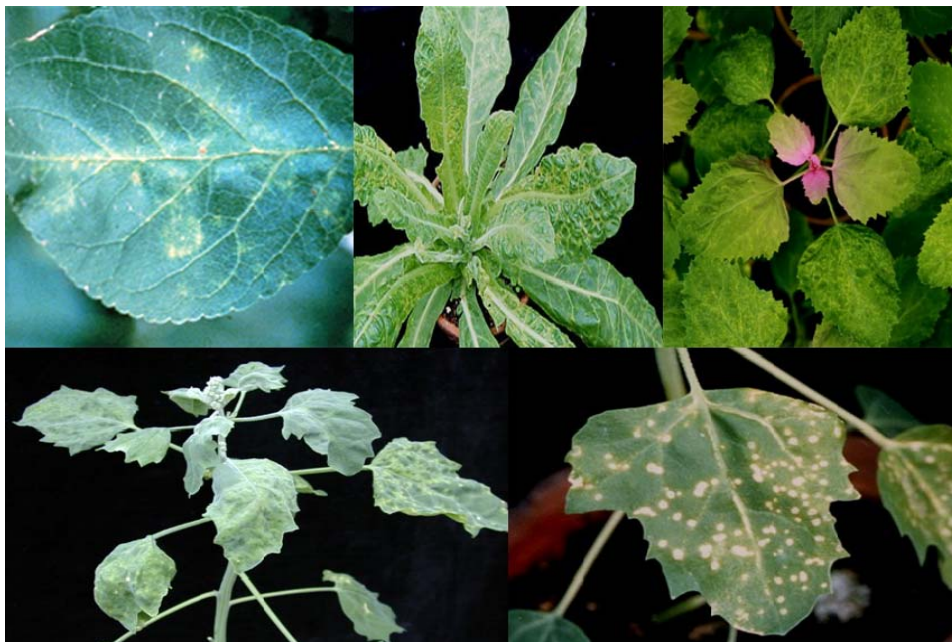


ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

**Ανίχνευση ιών της Οικογένειας *Flexiviridae* και μελέτη της
γενετικής παραλλακτικότητας του ιού της χλωρωτικής
κηλίδωσης των φύλλων της μηλιάς (ACLSV) σε διάφορα
είδη της οικογένειας *Rosaceae***



ΚΑΤΣΙΑΝΗ ΑΣΗΜΙΝΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2009

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

**Ανίχνευση ιών της Οικογένειας *Flexiviridae* και
μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας του ιού της
χλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων της μηλιάς
(ACLSV) σε διάφορα είδη της οικογένειας *Rosaceae***

ΚΑΤΣΙΑΝΗ ΑΣΗΜΙΝΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας της Γεωπονικής Σχολής
του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

N.I. Κατής

Καθηγητής

Εισηγητής

E. Χατζηβασιλείου

Λέκτορας

Μέλος

Γ. Καραογλανίδης

Λέκτορας

Μέλος

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2009

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2006-2009 στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τομέα Φυτοπροστασίας της Γεωπονικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Ολοκληρώνοντας την προσπάθεια αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Νικόλαο Ι. Κατή για την ανάθεση του θέματος, την αμέριστη συμπαράσταση, τη συνεχή καθοδήγηση και άριστη συνεργασία του καθ' όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στους λέκτορες κ. Ελισάβετ Χατζηβασιλείου και Γεώργιο Καραογλανίδη, μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, για την πολύτιμη συμβολή και βοήθειά τους στη μελέτη αυτή καθώς και για την κριτική ανάγνωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Μιλτιάδη Βασιλακάκη για την πολύτιμη βοήθειά του στην ταυτοποίηση των δειγμάτων που ελέγχθηκαν. Τη γεωπόνο κ. Δέσποινα Ρουκά και τον γεωπόνο κ. Παύλο Παυλίδη για τη συλλογή δειγμάτων από την περιοχή Βελβεντού Κοζάνης και τον Βαλκανικό Βοτανικό Κήπο Κρουσσιών Κιλκίς αντίστοιχα, καθώς και τον Dr Thierry Candresse (Station de Pathologie Vegetale, INRA, France) για την παροχή αντιορών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αρμόζουν στην Δρ. Βαρβάρα Μαλιόγκα για τη μύησή μου στις μοριακές τεχνικές, καθώς και τη συνεχή βοήθεια και συμπαράστασή της. Τον τεχνικό του εργαστηρίου κ. Κωνσταντίνο Ευθυμίου για τη διαρκή και ουσιαστική βοήθειά του σε διάφορες δυσκολίες της μελέτης αυτής, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Παππή Πολυξένη και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Λεωνίδα Λώτο, Καλογήρου Χριστίνα, Χαρίλαο Μπαχάρη, Απόστολο Γκουζιώτη και Γεώργιο Τζελέπη, για τη συνεχή υποστήριξη και αγάπη τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Δημήτριο Ραφαηλίδη για την υπομονή και την αμέριστη συμπαράστασή του στις δύσκολες στιγμές κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ως ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης για τους ανθρώπους που με μεγάλωσαν και για αυτά που μου έχουν προσφέρει, το παρόν πόνημα αφιερώνεται στους γονείς μου Θωμά και Σοφία και στην αδερφή μου Έλλη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
ABSTRACT	vi
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΙΩΝ	vii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	viii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή	
1.1.Οικογένεια <i>Flexiviridae</i>	1
1.1.1. Γενικά	1
1.1.2. Δομή των ιοσωματίων	1
1.1.3. Βιολογικές ιδιότητες	3
1.1.3.1. Εύρος ξενιστών	3
1.1.3.2. Επιδημιολογία	4
1.2. Γένος <i>Trichovirus</i>	4
1.2.1. Γενικά	4
1.2.2. Δομή του ιοσωματίου	5
1.2.3. Διαδικασία αντιγραφής	5
1.2.4. Βιολογικές ιδιότητες	6
1.2.4.1. Εύρος ξενιστών	6
1.2.4.2. Επιδημιολογία	6
1.3. Ιός της χλωρωτικής κηλίδωσης της μηλιάς (ACLSV)	7
1.3.1. Γενικά	7
1.3.1.1. Δομή του γονιδιώματος	7
1.3.1.2. Μοριακές ιδιότητες	8
1.3.1.3. Βιοποικιλότητα του ACLSV	9
1.3.1.3.1. Γενετική παραλλακτικότητα	9
1.3.1.3.2. Φυλογενετικές αναλύσεις	10
1.3.1.3.3. Παραλλακτικότητα ως προς τη συμπτωματολογία	11
1.3.1.3.4. Παραλλακτικότητα με βάση το Mr (Migration rate)	11
1.3.1.4. Ιδιότητες <i>in vitro</i>	12
1.3.1.5. Διακυτταρική μετακίνηση	12
1.3.1.6. Μετάδοση	13
1.3.2. Ξενιστές	13
1.3.2.1. Καλλιεργούμενοι ξενιστές	13
1.3.2.1.1. Γιγαρτόκαρπα	13
1.3.2.1.2. Πυρηνόκαρπα	15
1.3.2.2. Αυτοφυείς ξενιστές	18
1.3.2.3. Καλλωπιστικά	19
1.3.3. Διάγνωση	19
1.3.4. Εξυγίανση πολλαπλασιαστικού υλικού	24
1.3.5. Παρουσία του ACLSV στην Ελλάδα	24
1.4. Σκοπός της εργασίας	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Συχνότητα εμφάνισης του ACLSV σε καλλιεργούμενα, άγρια και αυτοφυή φυτά της οικογένειας *Rosaceae*

2.1. Εισαγωγή	26
2.2. Υλικά και μέθοδοι	27
2.2.1. Δειγματοληψία	27
2.2.2. Φυτικό υλικό	27
2.2.3. Προετοιμασία φυτικού υλικού	27
2.2.4. Ορολογική δοκιμή ELISA	27
2.2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	30
2.2.5.1. Διαδικασία RT-PCR σε έναν μικροσωλήνα	31
2.2.5.2. Εστιασμένη PCR	32
2.2.5.3. Ανίχνευση προϊόντων της RT-PCR και εστιασμένης PCR	32
2.3. Αποτελέσματα	32
2.3.1. Ορολογική ανίχνευση (δοκιμή ELISA)	32
2.3.2. Μοριακή ανίχνευση του ACLSV	32
2.3.2.1. Αξιολόγηση των μεθόδων ανίχνευσης	32
2.3.2.2. Μοριακή ανίχνευση του ιού	33
2.4. Συζήτηση	37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μοριακή ανίχνευση ιών των γενών *Tricho-*, *Capillo-* και *Foveavirus* με την PDO RT-PCR σε αυτοφυή, καλλωπιστικά και καλλιεργούμενα φυτά της οικογένειας *Rosaceae*

3.1. Εισαγωγή	40
3.2. Υλικά και μέθοδοι	41
3.2.1. Δείγματα που ελέγχθηκαν	41
3.2.2. Μοριακή ανίχνευση με την PDO RT-PCR	42
3.2.3. Προσδιορισμός τμήματος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ιών της οικογένειας <i>Flexiviridae</i> που ανιχνεύθηκαν με την PDO RT-PCR	44
3.3. Αποτελέσματα	44
3.3.1. Μοριακή ανίχνευση ιών της οικογένειας <i>Flexiviridae</i> με την PDO RT-PCR	44
3.3.2. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ιών που ανιχνεύθηκαν με την PDO RT-PCR	46
3.4. Συζήτηση	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης και της 3΄ Αμετάφραστης περιοχής του γονιδιώματος του ACLSV

4.1. Εισαγωγή	50
----------------------	----

4.2. Υλικά και μέθοδοι	51
4.2.1. Μοριακή ανίχνευση απομονώσεων του ACLSV	51
4.2.1.1. Ανάπτυξη εξειδικευμένης RT-PCR σε δύο μικροσωλήνες για την ανίχνευση απομονώσεων του ACLSV	51
4.2.1.1.1. Σχεδιασμός του εκκινητή	51
4.2.1.1.2. Ανάπτυξη RT-PCR σε δύο μικροσωλήνες	52
4.2.1.1.3. Εστιασμένη PCR	53
4.2.2. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ΚΠ	53
4.2.3. Φυλογενετική ανάλυση	54
4.3. Αποτελέσματα	54
4.3.1. Μοριακή ανίχνευση απομονώσεων του ACLSV	54
4.3.2. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της ΚΠ και της 3΄αμετάφραστης περιοχής	55
4.4. Συζήτηση	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Γενική συζήτηση και συμπεράσματα	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	76
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	93

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης καθώς και η γενετική παραλλακτικότητα του ιού της χλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων της μηλιάς (ACLSV) σε καλλιεργούμενα, καλλωπιστικά και αυτοφυή είδη της οικογένειας Rosaceae. Εξ' αιτίας του χαμηλού τίτλου του ιού η ορολογική δοκιμή ELISA δεν ήταν αξιόπιστη, ενώ συνδυάστηκαν δυο δημοσιευμένες μέθοδοι RT-PCR ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία ανίχνευσης της μεθόδου. Με την εστιασμένη PCR που αναπτύχθηκε, ο ιός ανιχνεύθηκε στα είδη μηλιά, αχλαδιά, κυδωνιά, ροδακινιά, κερασιά, αμυγδαλιά, γκορτσιά και καλλωπιστική κυδωνιά. Ο ιός ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα στη δαμασκηλιά, αγριοκερασιά, τριανταφυλλιά, κορομηλιά, *Crataegus monogyna*, τσαπουρνιά, καλλωπιστική δαμασκηλιά και *Rubus* sp., καθώς και στο αυτοφύες *Potentilla pindicola* που αναφέρεται για πρώτη φορά ως ξενιστής του ιού παγκοσμίως.

Η εφαρμογή της (PDO) RT-PCR για την ανίχνευση ιών που ανήκουν στα γένη *Trichovirus*, *Capillovirus* και *Foveavirus* ανέδειξε την παρουσία των ACLSV, ASPV και CGRMV σε μηλιά και κερασιά, και αποτελεί την πρώτη αναφορά του CGRMV στην Ελλάδα. Επίσης, αναπτύχθηκε μια αξιόπιστη και εξειδικευμένη εστιασμένη PCR για τη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας τμήματος του γονιδίου της ΚΠ και της 3' αμετάφραστης περιοχής του ACLSV. Η σύγκριση αλληλουχιών μεταξύ 14 Ελληνικών και άλλων απομονώσεων έδειξε ποσοστά ότι η παραλλακτικότητα του ιού στις απομονώσεις που μελετήθηκαν κυμαίνονταν από 3-14% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, η φυλογενετική ανάλυση κατέταξε τις περισσότερες απομονώσεις από καλλιεργούμενα πυρηνόκαρπα και γιγαρτόκαρπα σε διαφορετικές ομάδες, ενώ ομαδοποίηση μεταξύ απομονώσεων από καλλιεργούμενα, καλλωπιστικά και αυτοφυή είδη δεν ήταν εφικτή.

ABSTRACT

In this study the molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) in cultivated, ornamental and wild species of the Rosaceae family, was investigated. The serological method ELISA was unreliable and two RT-PCR methods were combined in order to increase its sensitivity. Also, a survey was carried out for ACLSV incidence in apple, pear, quince, peach, cherry, almond, *Pyrus amygdaliformis* and *Cydonia japonica* by using the nested PCR developed in this study. The virus was detected for the first time in Greece in plum, wild cherry, *Rosa canina*, *Prunus maliformis*, *Crataegus monogyna*, *Prunus spinosa*, *Prunus carassifera* and *Rubus* sp., as well as in *Potentilla pindicola* which is reported for the first time as a natural host of ACLSV.

The application of (PDO) RT-PCR for the detection of virus belonging to genera *Trichovirus*, *Capillovirus* and *Foveavirus*, arose the presence of ACLSV and CGRMV in cherry, and ASPV in apple. This is the first report of CGRMV in cherry trees in Greece. A reliable and virus specific PCR was developed for the study of ACLSV variability amplifying part of the CP encoding gene and the 3' untranslated area. Sequence comparison among 14 Greek isolates and isolates available in the database, ACLSV showed amino acid variability ranging between 3-14%. Moreover, the phylogenetic analysis revealed the clustering of most of the cultivated pome and stone fruits ACLSV isolates in different groups, though a clustering pattern able to separate isolates in cultivated, ornamental and wild species was not feasible.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΙΩΝ

ACLSV	Ιός της χλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων της μηλιάς (<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>)
APCLSV	Ιός της ψευδοχλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων της μηλιάς (<i>Apple pseudochlorotic leaf spot virus</i>)
ApMV	Ιός του μωσαϊκού της μηλιάς (<i>Apple mosaic virus</i>)
ASGV	Ιός του αυλακωτού ξύλου της μηλιάς (<i>Apple stem grooving virus</i>)
ASPV	Ιός της βοθρίωσης του κορμού της μηλιάς (<i>Apple stem pitting virus</i>)
BanMMV	Ιός του ήπιου μωσαϊκού της μπανάνας (<i>Banana mild mosaic virus</i>)
CGRMV	Ιός της πράσινης δακτυλιοειδούς ποικιλοχλώρωσης της κερασιάς (<i>Cherry green ring mottle virus</i>)
CLBV	Ιός της παραμόρφωσης των φύλλων των εσπεριδοειδών (<i>Citrus leaf blotch virus</i>)
CLV	Λανθάνων ιός της γαρυφαλιάς (<i>Carnation latent virus</i>)
CMLV	Ιός της ποικιλοχλώρωσης των φύλλων της κερασιάς (<i>Cherry mottle leaf virus</i>)
GINV	Ιός της εσωτερικής νέκρωσης της αμπέλου (<i>Grapevine inner necrosis virus</i>)
CNRMV	Ιός της καστανής νεκρωτικής κηλίδωσης της κερασιάς (<i>Cherry necrotic ring mottle virus</i>)
GVA	Ιός της αμπέλου Α (<i>Grape vine virus A</i>)
GVB	Ιός της αμπέλου Β (<i>Grapevine virus B</i>)
HLV	Λανθάνων ιός του <i>Heracleum</i> (<i>Heracleum latent virus</i>)
ICRSV	Ιός της δακτυλιοειδούς κηλίδωσης της κιτριάς (<i>Indian citrus ringspot virus</i>)
LChV-1	Ιός της μικροκαρπίας της κερασιάς-1 (<i>Little cherry virus-1</i>)
PcMV	Ιός του μωσαϊκού της ροδακινιάς (<i>Peach mosaic virus</i>)
PDV	Ιός του νανισμού των πυρηνοκάρπων (<i>Prune dwarf virus</i>)
PNRSV	Ιός της νεκρωτικής δακτυλιοειδούς κηλίδωσης των πυρηνοκάρπων (<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>)
PPV	Ιός της ευλογιάς των πυρηνοκάρπων (<i>Plum pox virus</i>)
PVT	Ιός T της πατάτας (<i>Potato virus T</i>)
PVX	Ιός X της πατάτας (<i>Potato virus X</i>)
SCSMaV	Ιός που σχετίζεται με το ραβδωτό μωσαϊκό του ζαχαροκάλαμου (<i>Sugarcane striate mosaic associated virus</i>)
ShVX	Ιός X του νωπού κρεμμυδιού (<i>Shallot virus X</i>)

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

+ss RNA	Θετικής πολικότητας μονής αλυσίδας RNA (+ single strand RNA)
aa	αμινοξέα (aminoacids)
AUG	Κωδικόνιο έναρξης
bps	Ζεύγη βάσεων (base pairs)
Cap	Μεθυλιωμένη νουκλεοτιδιακή καλύπτρα
c-DNA	Συμπληρωματικό DNA (complementary DNA)
CP	Καψιδιακή πρωτεΐνη, ΚΠ (Coat protein)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
ds RNA	Δίκλωνο RNA (Double strand RNA)
DTT	Διθειοθιτόλη
Hel	Ελικάση (Helicase)
IC-RT-PCR	RT-PCR με ανοσοσύλληψη (Immunocapture RT-PCR)
IgG	Ανοσοσφαιρίνη γ (Immunoglobulin G)
ISEM	Ανοσοπροσροφητική ηλεκτρονική μικροσκοπία (Immunosorbent Electron Microscopy)
kbp	Ζεύγη κιλοβάσεων (kilobase pairs)
kDa	Kilodaltons
MET	Μεθυλοτρανσφεράση (Methyltransferase)
MP	Πρωτεΐνη διακυτταρικής μετακίνησης, ΠΔΜ (Movement protein)
Mr	Ηλεκτροφορητική κινητικότητα (Migration Rate)
OD	Οπτική πυκνότητα (Optical Density)
oligo d(T)	Ολιγοθυμίνη (oligomeric deoxythymidine)
ORF	Ανοιχτό Πλαίσιο Ανάγνωσης, ΑΠΑ (Open reading frames)
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction)
PDO RT-PCR	Πολυδύναμη RT-PCR με χρήση εκφυλισμένων εκκινητών (Polyvalent degenerate oligonucleotide RT-PCR)
POL	Πολυμεράση (polymerase)
Poly-A tail	Πολυαδενιλική ουρά
P-PRO	Παπαΐνη με δομές σαν πρωτεάση (Papain-like protease)
RdRp	RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase)
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ (Ribonucleic acid)
RT-PCR	Αντίστροφη μεταγραφή Αλυσιδωτή Αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription PCR)
sg RNA	Υπογενωμικό RNA (subgenomic RNA)
ss RNA	Μονής αλυσίδας μόριο RNA (single strand RNA)
TGB	Triple Gene Block
UGA	Κωδικόνιο λήξης

UTR	Αμετάφραστη περιοχή (Untranslated region)
ΟΑ	Σημείο οριακής αραίωσης (Dilution end point)
ΣΘΑ	Σημείο θερμικής αδρανοποίησης (Thermal inactivation point)

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1. Οικογένεια *Flexiviridae*

1.1.1. Γενικά

Είναι μια μεγάλη οικογένεια που περιλαμβάνει πολλά και σημαντικά γένη φυτικών ιών. Πιο συγκεκριμένα, στην οικογένεια ανήκουν τα γένη *Allexivirus*, *Carlavirus*, *Capillovirus*, *Foveavirus*, *Mandarivirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* και *Citrivirus*, καθώς και ορισμένοι ιοί που δεν ομαδοποιούνται σε κανένα από αυτά (Πίνακας 1.1.A, 1.1.B) (Adams κ.ά., 2004; Martelli κ.ά., 2007). Η κατάταξη των ιών στην οικογένεια *Flexiviridae* βασίστηκε στη φυλογενετική ανάλυση των πρωτεϊνών της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RdRp) και της καψιδιακής πρωτεΐνης (ΚΠ) (Adams κ.ά., 2004). Παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά με αυτά των ιών-μελών της οικογένειας *Flexiviridae* παρατηρούνται επίσης σε ιούς-μέλη των οικογενειών *Closteroviridae* και *Potyviridae*. Αρχικά θεωρήθηκε ότι οι ΚΠ των νηματοειδών ιών σχετίζονται μεταξύ τους, και πιθανώς προέρχονται από μία κοινή πρωτεΐνη πρόγονο. Συγκρίσεις όμως του συνολικού γονιδιώματος έδειξαν ότι υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση ως προς την ΚΠ με αποτέλεσμα οι οικογένειες *Flexiviridae*, *Closteroviridae* να κατατάσσονται στην υπεριοικογένεια των *Alpha-like* ιών και η οικογένεια *Potyviridae* στην υπεριοικογένεια των *Picornalike* ιών (Martelli κ.ά., 2007).

1.1.2. Δομή των ιοσωματίων

Τα μέλη της οικογένειας έχουν μονομερές γονιδίωμα και φέρουν στο 3' άκρο μία πολύ-A ουρά (Martelli κ.ά., 2007). Τα ιοσωμάτια τους είναι ιδιαίτερα εύκαμπτα, νηματοειδή και ελικοειδή, ιδιότητα από την οποία προέρχεται και η ονομασία της οικογένειας. Το γονιδίωμα των ιών που ανήκουν στην οικογένεια είναι θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA (+ss RNA) και συχνά εντοπίζονται σε συσσωματώματα στο κυτόπλασμα των προσβεβλημένων φυτικών κυττάρων (Adams

κ.ά., 2004). Παρουσιάζουν αρκετές διαφορές ως προς τον αριθμό και τη φύση των γονιδίων που κωδικοποιούν (Πίνακας 1.2). Οι ιοί που ανήκουν στα γένη *Allexivirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Mandarivirus* και *Potexvirus*, καθώς και οι ελεύθεροι ιοί του ήπιου μωσαϊκού της μπανάνας (BanMMV), της πράσινης δακτυλιοειδούς ποικιλοχλώρωσης της κερασιάς (CGRMV), της καστανής νεκρωτικής κηλίδωσης της κερασιάς CNRMV και του ιού που σχετίζεται με το ραβδωτό μωσαϊκό του ζαχαροκάλαμου (SCSMaV), φέρουν στο γονιδιώμα τους μια ομάδα τριών αλληλεπικαλυπτόμενων Ανοιχτών Πλαισίων Ανάγνωσης (ΑΠΑ) που ονομάζεται Triple Gene Block (TGB) και είναι υπεύθυνα για την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη διακυτταρική μετακίνηση (ΠΔΜ) των ιών. Στα άλλα γένη και ελεύθερους ιούς, υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της ΠΔΜ είναι ένα μόνο ΑΠΑ (single protein SP) που ανήκει στην υπεροικογένεια των 30K πρωτεϊνών (Πίνακας 1.2). Επίσης, ορισμένοι ιοί-μέλη της οικογένειας εκφράζουν δύο πρωτεάσες, ενώ άλλοι μόνο μία (Martelli κ.ά., 2007).

Πίνακας 1.1. Γένη (A) και ελεύθεροι ιοί (B) που περιλαμβάνονται στην οικογένεια *Flexiviridae* (Adams κ.ά., 2004; Martelli κ.ά., 2007).

(A)		(B)
Γένος	Τυπικό μέλος	Ελεύθεροι ιοί της οικογένειας <i>Flexiviridae</i>
<i>Allexivirus</i>	Ιός X του νωπού κρεμμυδιού (ShVX)	Ιός του ήπιου μωσαϊκού της μπανάνας (BanMMV) Ιός της πράσινης δακτυλιοειδούς ποικιλοχλώρωσης της κερασιάς (CGRMV) Ιός της καστανής νεκρωτικής κηλίδωσης της κερασιάς (CNRMV) Ιός που σχετίζεται με το ραβδωτό μωσαϊκό του ζαχαροκάλαμου (SCSMaV) Ιός T της πατάτας (PVT)
<i>Carlavirus</i>	Λανθάνων ιός της γαρυφαλλιάς (CLV)	
<i>Capillovirus</i>	Ιός του αυλακατού ξύλου της μηλιάς (ASGV)	
<i>Foveavirus</i>	Ιός της βοθρίωσης του κορμού της μηλιάς (ASPV)	
<i>Mandarivirus</i>	Ιός της δακτυλιοειδούς κηλίδωσης της κίτριας (ICRSV)	
<i>Potexvirus</i>	Ιός X της πατάτας (PVX)	
<i>Trichovirus</i>	Ιός της χλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων της μηλιάς (ACLSV)	
<i>Vitivirus</i>	Ιός A της αμπέλου (GVA)	
<i>Citriovirus</i>	Ιός της παραμόρφωσης των φύλλων των εσπεριδοειδών (CLBV)	

Πίνακας 1.2. Οργάνωση και δομή του γονιδιώματος των γενών και των ανεξάρτητων ιών που ανήκουν στην οικογένεια *Flexiviridae* (Adams κ.ά., 2004). Όπου ΑΠΑ: Ανοιχτό Πλαίσιο Ανάγνωσης, ΠΔΜ: Πρωτεΐνη διακυτταρικής μετατόπισης και ΚΠ: Καψιδιακή πρωτεΐνη.

Γένος	Μέγεθος ισοματίων (nm)	Συνολικός αριθμός ΑΠΑ του γονιδιώματος	Είδος ΠΔΜ	Μέγεθος ΚΠ (kDa)
<i>Allexivirus</i>	800	6	TGB	26-29
<i>Carlavirus</i>	610-700	6	TGB	32-36
<i>Capillovirus</i>	640-700	2 ή 3	30K	25-27
<i>Foveavirus</i>	800	5	TGB	28-44
<i>Mandarivirus</i>	650	6	TGB	34
<i>Potexvirus</i>	470-580	5	TGB	22-27
<i>Trichovirus</i>	640-760	3 ή 4	30K	20-22, 28
<i>Vitivirus</i>	725-785	5	30K	18-22
<i>Citriovirus</i>	960	3	30K	41
BanMMV	580	5	TGB	27
CGRMV	1000+	5	TGB	30
CNRMV	1000+	5	TGB	30
SCSMaV	640	3	30K	24
PVT	950	5	TGB	23

1.1.3. Βιολογικές ιδιότητες

1.1.3.1. Εύρος ξενιστών

Προσβάλλουν έναν ευρύ κύκλο αυτοφυών, καλλωπιστικών και καλλιεργούμενων φυτών που περιλαμβάνει κυρίως ποώδη και ξυλώδη δικοτυλήδονα φυτά, ενώ σπανιότερα εντοπίζονται σε μονοκοτυλήδονα. Οι ιοί που ανήκουν στα γένη *Capillovirus*, *Foveavirus*, *Mandarivirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus*, *Citriovirus*, καθώς και τα ελεύθερα μέλη CGRMV και CNRMV είναι παθογόνα των ξυλωδών φυτών, ενώ τα μέλη των γενών *Allexivirus*, *Carlavirus*, *Potexvirus* και οι υπόλοιποι ελεύθεροι ιοί-μέλη της οικογένειας προσβάλλουν ποώδεις ξενιστές (Martelli κ.ά., 2007).

1.1.3.2. Επιδημιολογία

Οι ιοί της οικογένειας έχουν ευρεία γεωγραφική εξάπλωση που οφείλεται κυρίως στην διακίνηση προσβεβλημένου πολλαπλασιαστικού υλικού και απαντώνται σε όλες τις περιοχές του κόσμου που καλλιεργούνται ή ευδοκιμούν οι ξενιστές τους. Στα φυτά που πολλαπλασιάζονται αγενώς, καθώς και στα μέλη που δεν έχουν φορέα, η μετάδοσή τους βασίζεται αποκλειστικά στον εμβολιασμό. Οι ιοί που πολλαπλασιάζονται στα παρεγχυματικά κύτταρα, όπως αυτοί που ανήκουν στα γένη *Potexvirus*, *Carlavirus* και *Allexivirus*, έχει βρεθεί ότι μεταδίδονται μηχανικά στον αγρό ή στο εργαστήριο (Martelli κ.ά., 2007).

1.2. Γένος *Trichovirus*

1.2.1. Γενικά

Αρχικά στο γένος *Trichovirus* είχαν ταξινομηθεί πέντε ιοί, ο ACLSV που είναι και το τυπικό μέλος και οι ιός T της πατάτας (PVT), λανθάνων ιός του *Heracleum* (HLV), ιός της αμπέλου A (GVA) και ιός της αμπέλου B (GVB) (Martelli κ.ά., 1994). Από αυτούς, οι ACLSV και PTV μεταδίδονται σχετικά εύκολα με φυτικό εκχύλισμα, εισβάλλουν στους παρεγχυματικούς ιστούς όπου και πραγματοποιούν την αντιγραφή τους, και δεν έχουν γνωστούς φορείς (Lister, 1970α; Salazar κ.ά., 1978). Σε αντιδιαστολή, οι GVA και GVB μεταδίδονται μηχανικά με δυσκολία, περιορίζονται στο φλοιώμα των ξενιστών τους, μεταδίδονται με ψευδόκοκκους, και περιέχουν στο γονιδίωμα τους δυο περισσότερα ΑΠΑ (Boscia κ.ά., 1997; Minafra κ.ά., 1997). Ο HLV μεταδίδεται με αφίδες με ημι-έμμονο τρόπο με τη συμβολή του βοηθητικού ιού *Heracleum Closterovirus 6* (Bem και Murant, 1980) φέρει στο γονιδίωμα του δύο περισσότερα ΑΠΑ, και προσβάλλει μόνον έναν ξενιστή (Adams κ.ά., 2004). Οι διαφορές αυτές οδήγησαν στον επαναπροσδιορισμό των μελών του γένους με αποτέλεσμα οι HLV, GVA και GVB να ενταχθούν στο καινούριο γένος *Vitivirus* (James κ.ά., 2000). Επίσης ο PVT, ο οποίος φέρει στο γονιδίωμα του το TGB, δεν εντάσσεται πια στο γένος, αλλά αποτελεί ανεξάρτητο μέλος της

οικογένειας *Flexiviridae*, ενώ οι ιοί του *Trichovirus* φέρουν την 30K πρωτεΐνη (Adams κ.ά., 2004). Σύμφωνα με τις νεότερες συστηματικές κατατάξεις μέλη του γένους αποτελούν οι ACLSV, ιός της ποικιλοχλώρωσης των φύλλων της κερασιάς (CMLV) (James κ.ά., 1993), ιός της εσωτερικής νέκρωσης της αμπέλου (GINV) (Yoshikawa κ.ά., 1997), ιός του μωσαϊκού της ροδακινιάς (PcMV) (James και Howell, 1998) και ιός της ψευδοχλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων της μηλιάς (APCLSV) (Liberti κ.ά., 2004; Liberti κ.ά., 2005).

1.2.2. Δομή του ιοσωματίου

Τα ιοσωμάτια των μελών του γένους είναι ελικοειδή εύκαμπτα νηματοειδή μεγέθους 640-760 nm και πλάτους 12 nm και δεν περιέχουν λιπίδια και υδατάνθρακες. Τα νουκλεϊκά οξέα αποτελούν περίπου το 5% του συνολικού βάρους των ιοσωματίων, φέρουν μια πολύ-Α ουρά στο 3' άκρο και το μέγεθός τους ανέρχεται στα $2.2-2.5 \times 10^6$ daltons (7.5-8.7kb). Η κλίση της έλικας του νουκλεϊκού οξέως είναι 3.3-3.5 nm και σε κάθε στροφή της έλικας περιέχονται 10 υπομονάδες της ΚΠ (Martelli κ.ά., 1994). Τα μέλη του γένους με εξαίρεση τους PcMV και CMLV (James και Howell, 1998), και APCLSV και ACLSV (Liberti κ.ά., 2005) δεν παρουσιάζουν ορολογική συγγένεια (Martelli κ.ά., 1994).

1.2.3. Διαδικασία αντιγραφής

Η διαδικασία αντιγραφής των ιών του γένους πραγματοποιείται στο κυτόπλασμα των φυτικών κυττάρων, όπου συγκεντρώνονται και σχηματίζουν παρακρυσταλλικά συσσωματώματα. Στους ACLSV, APCLSV και GINV το γονιδίωμα αποτελείται από τρία αλληλοεπικαλυπτόμενα ΑΠΑ, τα οποία κωδικοποιούν την RdRp, την ΠΔΜ και την ΚΠ, ενώ στους CMLV και PcMV εντοπίζεται ένα επιπλέον ΑΠΑ με άγνωστη λειτουργία (James κ.ά., 2000; James και Howell, 1998). Τα ΑΠΑ της ΠΔΜ και ΚΠ εκφράζονται από υπογενωμικό RNA (sg RNA) (Martelli κ.ά., 1994).

1.2.4. Βιολογικές ιδιότητες

1.2.4.1. Εύρος ξενιστών

Οι ιοί του γένους εντοπίζονται κυρίως σε πυρηνοκάρπα (βερικοκιά, κερασιά, αμυγδαλιά, ροδακινιά και δαμασκηνιά), ενώ τα γιγαρτόκαρπα προσβάλλει μόνον ο ACLSV. Ο GINV είναι ο μοναδικός ιός του γένους που προσβάλλει την άμπελο. Στους ξενιστές παρατηρείται ποικιλομορφία συμπτωμάτων, όπως καθυστερημένη έκπτυξη οφθαλμών, νανισμός, κηλιδώσεις και παραμορφώσεις των φύλλων από τους PcMV, APCLSV και CMLV, ενώ ο ACLSV, συνήθως λανθάνων στην μηλιά, προκαλεί έντονα συμπτώματα στους καρπούς της κερασιάς. Ο GINV προκαλεί νεκρώσεις στις ράγες των προσβεβλημένων πρέμων.

1.2.4.2. Επιδημιολογία

Οι GINV, PcMV και CMLV μεταδίδονται με ακάρεα (Martelli κ.ά., 2007), ενώ δεν έχει βρεθεί φορέας για τους APCLSV και ACLSV (Πίνακας 1.3) (Martelli κ.ά., 1994; Liberti κ.ά., 2005). Ο APCLSV που αποτελεί και το νεότερο μέλος του γένους, έχει εντοπιστεί μόνο σε μικτές προσβολές με τον ACLSV. Όλοι οι ιοί που ανήκουν στο γένος μεταδίδονται με εμβολιασμό, αλλά και μηχανικά με φυτικό εκχύλισμα στο εργαστήριο.

Πίνακας 1.3. Φορείς των ιών-μελών του γένους *Trichovirus*

Ιός	Φορέας
ACLSV	Άγνωστος (Martelli κ.ά., 1994)
PcMV	<i>Eriophyes insidiosus</i> (Keifer κ.ά., 1955)
GINV	<i>Colomerus vitis</i> (Kunugi κ.ά., 2000)
CMLV	<i>Eriophyes inequalis</i> (Oldfield κ.ά., 1996)
APCLSV	Άγνωστος (Liberti κ.ά., 2005)

1.3. Ιός της χλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων της μηλιάς (ACLSV)

1.3.1. Γενικά

Συνώνυμα: *Apple chlorotic leaf spot virus*, plum bark split strain, *Apple latent virus 1*, *Bark split virus*, *Pear ring mosaic virus*, *Pear ring pattern mosaic virus* (Cropley, 1969α), *Plum bark split virus*, *Plum bark spot virus*, *Plum pseudopox virus*, *Quince stunt virus*.

Προσβολές από τον ιό έχουν αναφερθεί σε πολλές χώρες του κόσμου με μοναδική ίσως εξαίρεση την περιοχή της Ανατολικής Ασίας όπου δεν έχει ανιχνευθεί καθόλου σε καλλιέργειες βερικοκιάς (Sato κ.ά., 1993; Sipahioğlu και Baloglu, 2006). Αρχικά εντάχθηκε στην οικογένεια *Closteroviridae* (Martelli κ.ά., 1994) εξ' αιτίας των ομοιοτήτων των ισοωματίων του με αυτά των ιών του γένους *Closterovirus* (Lister, 1970α; Yoshikawa κ.ά., 1989). Αργότερα, εντοπίστηκαν διαφορές στη δομή και άλλες ιδιότητες με τα άλλα μέλη του γένους *Closterovirus* και προτάθηκε η δημιουργία ενός νέου γένους του *Trichovirus*, με τυπικό μέλος τον ACLSV (Martelli κ.ά., 1994).

1.3.1.1. Δομή του γονιδιώματος

Το μήκος των ισοωματίων είναι 600nm και το πλάτος του 12nm (Lister, 1965; Lister, 1970α), ενώ το RNA του αποτελείται από 7.555 νουκλεοτίδια χωρίς την πολύ Α-ουρά (Sato κ.ά., 1999). Το καψίδιο του ιού δεν περιβάλλεται από φάκελο λιποπρωτεΐνης, είναι νηματοειδές με ελικοειδή συμμετρία και κλίση της έλικας 3.8-3.9 nm (Martelli κ.ά., 1994). Στο 5' άκρο του γονιδιώματος πιθανώς διαθέτει μια μεθυλιωμένη νουκλεοτιδιακή καλύπτρα (cap) (Lister και Bar-Joseph, 1981). Η αναλογία των νουκλεοτιδικών βάσεων είναι περίπου: G 23.8%, A 31.5%, C 17.7%, U 27.0% (German κ.ά., 1990).

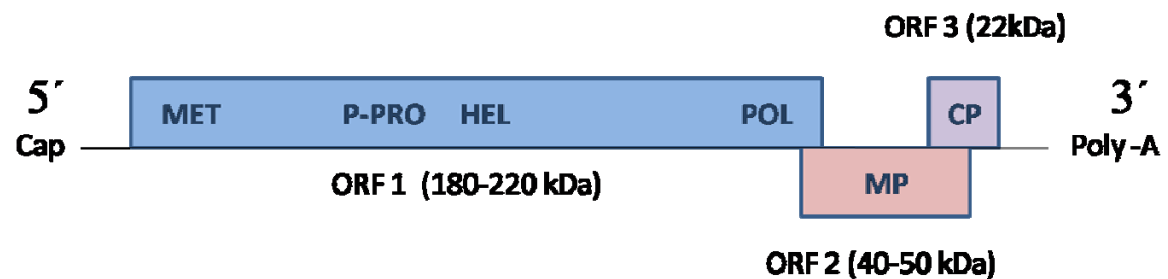
1.3.1.2. Μοριακές ιδιότητες

Στο 5' άκρο του γονιδιώματος του ACLSV εντοπίζεται μια αμετάφραστη περιοχή μήκους 151 νουκλεοτιδίων (German κ.ά., 1990; Marini κ.ά., 2008). Ακολουθεί το κωδικόνιο έναρξης (AUG) του ΑΠΑ 1 που εκτείνεται έως το κωδικόνιο λήξης (UGA) στη θέση 5.804 και κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη μεγέθους 180-220 kDa που περιέχει μία μεθυλοτρανσφεράση (MET), μία πρωτεάση με δομή παρόμοια της παπαΐνης (P-PRO), μία ελικάση (HEL) και μία πολυμεράση (POL) (Εικόνα 1.1). Το ΑΠΑ 2 που αλληλεπικαλύπτεται ελαφρώς με το ΑΠΑ 1, εκτείνεται από τη θέση 5.718 έως τη θέση 7.098 και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 40-50 kDa που αποτελεί την ΠΔΜ (MP) (Εικόνα 1.1) (German κ.ά., 1990). Το ΑΠΑ 3 επικαλύπτεται σε μεγάλο βαθμό με το ΑΠΑ 2 καθώς ξεκινά από τη θέση 6.613 και τερματίζει στη θέση 7.366 και κωδικοποιεί την 22 kDa ΚΠ (CP) (Εικόνα 1.1) (Martelli κ.ά., 1994). Μετά το ΑΠΑ 3, ακολουθεί η 3' αμετάφραστη περιοχή μήκους 189 νουκλεοτιδίων. Παρόλο που σε κάποιες απομονώσεις του ιού το μέγεθος του ΑΠΑ της ΚΠ είναι 28kDa, το σύννηθες μέγεθος της πρωτεΐνης είναι 22 kDa καθώς η μετάφραση του γονιδίου ξεκινά από το δεύτερο σε σειρά κωδικόνιο έναρξης (Candresse κ.ά., 1996; German- Renata κ.ά., 1997). Φυλογενετικές αναλύσεις που βασίζονται στην αλληλουχία των αμινοξέων της ΚΠ έδειξαν ότι ο συνδυασμός των πέντε αμινοξέων στις θέσεις 40, 59, 75, 130 και 184 (Ala⁴⁰-Val⁵⁹-Phe⁷⁵-Ser¹³⁰-Met¹⁸⁴ ή Ser⁴⁰-Leu⁵⁹-Tyr⁷⁵-Thr¹³⁰-Leu¹⁸⁴) είναι πολύ συντηρημένος. Περαιτέρω αναλύσεις κάθε ομάδας έδειξαν ότι ο συνδυασμός των δύο αμινοξέων (Ala⁴⁰-Phe⁷⁵ ή Ser⁴⁰-Tyr⁷⁵) είναι σημαντικός για την μολυσματικότητα του ιού. Μεταλλαγμένα στελέχη του ιού, στις συγκεκριμένες θέσεις, διαθέτουν περιορισμένη μολυσματικότητα (Yaegashi κ.ά., 2007).

Αρχικά από προσβεβλημένα φυτά είχαν απομονωθεί 5 μόρια ιικού dsRNA (Yoshikawa κ.ά., 1988), ενώ αργότερα διαπιστώθηκε η παρουσία ενός ακόμη μορίου. Τα μεγέθη των 6 μοτίβων dsRNA εκτιμήθηκαν στα 7.5, 6.4, 5.4, 2.2, 1.1 και 1.0 kbps (German κ.ά., 1992). Εκτός από το dsRNA μεγέθους 7.5 kbps που αντιστοιχεί σε ολόκληρο το ιικό γονιδίωμα, το μέγεθος και η θέση των 2.2 kbps, και 1.1 kbps δείχνουν ότι είναι μορφές υπογενωμικού RNA το οποίο επιτρέπει την έκφραση των

εσωτερικών Α.Π.Α που κωδικοποιούν την ΠΔΜ και την ΚΠ, αντίστοιχα. Τα dsRNA 6.4 kbps, και 5.4 kbps απαντώνται συχνότερα και περιέχουν το 5' άκρο του γενωμικού RNA, ενώ το dsRNA μεγέθους 1.0 kbps είναι ένα εσωτερικό τμήμα του γονιδιώματος.

ACLSV (7.555 νουκλεοτίδια)



Εικόνα 1.1. Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της χλωρωτικής κηλίδωσης της μηλιάς (ACLSV). MET: μεθυλοτρανσφεράση, P-PRO: πρωτεάση με δομή παρόμοια της παπαΐνης, HEL: ελικάση, POL: πολυμεράση (RdRp), MP: πρωτεΐνη διακυτταρικής μετακίνησης, CP: Καψιδιακή πρωτεΐνη

1.3.1.3. Βιοποικιλότητα του ACLSV

1.3.1.3.1. Γενετική Παραλλακτικότητα

Τα γονίδια που κωδικοποιούν την ελικάση (HEL) και την πολυμεράση (POL), καθώς και οι αμετάφραστες περιοχές που τα περικλείουν, είναι αρκετά συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος και εμφανίζουν πάνω από 90% ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξέων μεταξύ διαφόρων απομονώσεων του ιού. Φαίνεται όμως ότι υπάρχει μια μικρή περιοχή καθοδικά της μεθυλοτρανσφεράσης (MET) και πριν την πρωτεάση (P-PRO) στην οποία παρατηρείται υψηλή παραλλακτικότητα (έως 80% σε αμινοξέα) μεταξύ όλων των απομονώσεων του ιού (German-Retana κ.ά., 1997). Τα μεγαλύτερα ποσοστά παραλλακτικότητας που κυμαίνονται από 15 έως 23% σε επίπεδο αμινοξέων

παρατηρούνται στο ΑΠΑ που κωδικοποιεί την ΠΔΜ και η μέγιστη στο C-ήμισυ της πρωτεΐνης (German-Retana κ.ά., 1997). Η πιο συντηρημένη πρωτεΐνη του ιού είναι η ΚΠ (7-13% παραλλακτικότητα σε αμινοξέα), γεγονός που ερμηνεύει και την ανίχνευση της πλειονότητας των απομονώσεων του ιού με τα ίδια αντισώματα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σε ορισμένες απομονώσεις του ιού το μέγεθος της ΚΠ είναι 28 kDa. Στις απομονώσεις αυτές, στην αμετάφραστη περιοχή που μεσολαβεί ανάμεσα στο πρώτο και στο δεύτερο κωδικόνιο AUG, παρατηρείται σημαντική γενετική παραλλακτικότητα που κυμαίνεται από 14 έως 17% σε αμινοξέα (German-Retana κ.ά., 1997). Η ομοιότητα του γονιδίου της ΚΠ μιας απομόνωσης (SX/2) από την Πολωνία ήταν πολύ μικρότερη (84%) με την ομόλογη περιοχή των υπολοίπων απομονώσεων γεγονός που εξηγεί και την αδυναμία ανίχνευσης της με την ELISA (Malinowski κ.ά., 1998; Rwahnih κ.ά., 2004). Η μεγαλύτερη παραλλακτικότητα της ΚΠ εντοπίζεται στο 5' άκρο της, όπου και αλληλεπικαλύπτεται με την ΠΔΜ (Candresse κ.ά., 1995). Εξαίρεση αποτελούν τέσσερις απομονώσεις του ιού από την Ιταλία, την Ουγγαρία, την Ιορδανία και την Τουρκία οι οποίες εμφανίζουν υψηλή παραλλακτικότητα σε ολόκληρο το γονίδιο της ΚΠ (Rwahnih κ.ά., 2004).

Συνοψίζοντας θα μπορούσαμε να πούμε ότι στο γονιδίωμα του ACLSV οι μεγαλύτερες γενετικές διαφοροποιήσεις εντοπίζονται στην περιοχή που βρίσκεται ανάμεσα στην μεθυλοτρανσφεράση και την πρωτεάση, καθώς και στην περιοχή της ΠΔΜ που αλληλεπικαλύπτεται με την ΚΠ.

1.3.1.3.2. Φυλογενετικές αναλύσεις

Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες ώστε να διερευνηθεί αν οι απομονώσεις του ACLSV ομαδοποιούνται μεταξύ τους με βάση τον ξενιστή που απομονώθηκαν ή την γεωγραφική τους προέλευση. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν φυλογενετικές αναλύσεις με εκκινητές που εδράζουν στο γονίδιο της ΚΠ (Candresse κ.ά., 1995; Menzel κ.ά., 2002). Η πρώτη φυλογενετική ανάλυση στηρίχτηκε σε ένα τμήμα 358bps του γονιδίου της ΚΠ 16 απομονώσεων και διακρίθηκαν τρεις ομάδες (Candresse κ.ά., 1995). Στην πρώτη ομαδοποιήθηκαν απομονώσεις του ιού από πυρηνόκαρπα και γιγαρτόκαρπα, στη δεύτερη απομονώσεις από πυρηνόκαρπα και στην τρίτη απομονώσεις από γιγαρτόκαρπα, καθώς και μία απομόνωση από

ροδακινιά. Μια ακόμα φυλογενετική ανάλυση που αφορούσε την ίδια περιοχή της ΚΠ, πραγματοποιήθηκε σε 14 απομονώσεις του ιού (Ulubas Serce και Rosner, 2006). Και εδώ δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες όπου, η πρώτη περιλάμβανε απομονώσεις από πυρηνόκαρπα και γιγαρτόκαρπα, η δεύτερη απομονώσεις από πυρηνόκαρπα και η τρίτη χωρίστηκε σε δύο υποομάδες, μία που περιλάμβανε απομονώσεις από πυρηνόκαρπα και η άλλη με απομονώσεις πυρηνοκάρπων και γιγαρτοκάρπων. Νεότερες μελέτες που βασίστηκαν σε μεγαλύτερο τμήμα της ΚΠ (677 bps) έδειξαν ότι οι απομονώσεις του ιού από τα πυρηνόκαρπα και τα γιγαρτόκαρπα ανήκαν φυλογενετικά σε ξεχωριστές ομάδες με εξαίρεση κάποιες απομακρυσμένες απομονώσεις πυρηνοκάρπων που εντάχθηκαν σε ομάδες γιγαρτοκάρπων και αντίστροφα (Rwahnih κ.ά., 2003; Rwahnih κ.ά., 2004; Candresse κ.ά., 2006; Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β). Σαφή συμπεράσματα ως προς τη γεωγραφική προέλευση των απομονώσεων δεν υπήρξαν εξαιτίας της ευρύτατης διακίνησης πολλαπλασιαστικού υλικού μεταξύ των χωρών (Candresse κ.ά., 1995; Rwahnih κ.ά., 2003; Rwahnih κ.ά., 2004; Candresse κ.ά., 2006; Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β).

1.3.1.3.3. Παραλλακτικότητα ως προς τη συμπτωματολογία

Οι απομονώσεις του ιού διαφοροποιούνται μεταξύ τους και ως προς τη συμπτωματολογία που προκαλούν στους διάφορους ξενιστές. Για παράδειγμα, η απομόνωση Balaton 1 του ιού προκαλεί παραμορφώσεις και αποχρωματισμό των φύλλων σε σπορόφυτα ροδακινιάς GF 305, συμπτωματολογία αρκετά διαφορετική από αυτή των άλλων απομονώσεων του ιού (German-Retana κ.ά., 1997).

1.3.1.3.4. Παραλλακτικότητα με βάση το Mr (Migration rate)

Με βάση την ηλεκτροφορητική κινητικότητα (Mr) της ΚΠ, απομονώσεις του ACLSV από την Ιταλία και την Ουγγαρία κατατάχθηκαν σε τρεις κύριες ομάδες με Mr 22.7 kDa, 21.5 kDa, και 19.7 kDa (Pasquini κ.ά., 1998; Krizbai κ.ά., 2001). Μια απομόνωση (SX/2) από την Πολωνία βρέθηκε να παρουσιάζει ταχύτερη Mr από όλες τις υπόλοιπες απομονώσεις του ACLSV (Rwahnih κ.ά., 2004). Είναι πιθανό η διαφοροποίηση αυτή να οφείλεται περισσότερο σε διαφορές στην σύνθεση των

αμινοξέων της SX/2 παρά στο μέγεθος της ΚΠ (Cieslinska κ.ά., 1994; Malinowski κ.ά., 1998; Rwahnih κ.ά., 2004).

1.3.1.4. Ιδιότητες *in vitro*

Η πυκνότητα των ιοσωματιών σε Cs_2So_4 είναι $1,27\text{gcm}^{-3}$, ο συντελεστής καθίζησης είναι $96 S_{20w}$ και το σημείο θερμικής αδρανοποίησης (ΣΘΑ) ανέρχεται στους $52-55^\circ\text{C}$ (Lister κ.ά., 1965). Η διάρκεια ζωής *in vitro* είναι 1 ημέρα στους 20°C και 10 ημέρες στους 4°C . Αν και η συγκέντρωση του ιού εξαρτάται από τον ξενιστή, το σημείο οριακής αραίωσης (OA) συνήθως είναι 10^{-4} (Ραυονιό, 1988). Το RNA του ιού φαίνεται να είναι ευαίσθητο στη δράση ριβονουκλεασών, ενώ απουσία βασικών δισθενών κατιόντων (Mg^{2+} , Ca^{2+}) ή πολυαμινών, που θεωρούνται απαραίτητα για τη σταθερότητα της τεταρτοταγούς δομής των ιοσωματιών, έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμησή τους και τον σχηματισμό συσσωματωμάτων (Lister και Hadidi, 1971). Ο ιός χάνει τη μολυσματικότητά του σε τιμές pH κάτω από 5.5 και πάνω από 9.5 (Saksena και Mink, 1969).

1.3.1.5. Διακυτταρική μετακίνηση

Η μετακίνηση από κύτταρο σε κύτταρο γίνεται μέσω των πλασμοδεσμάτων που αποτελούν το κανάλι επικοινωνίας του κυτοπλάσματος των γειτονικών κυττάρων (Yoshikawa κ.ά., 1999; Satoh κ.ά., 2000). Οι ΠΔΜ που εκφράζουν οι ιοί, δεσμεύουν τα μονής αλυσίδας μόρια RNA (ssRNA) και τα μεταφέρουν σε γειτονικά υγιή κύτταρα (Fujiwara κ.ά., 1993). Προς το παρόν, αυτό πραγματοποιείται με δύο τρόπους. Στην πρώτη περίπτωση η ΠΔΜ αλληλεπιδρά με τα πλασμοδέσματα στο σημείο της μόλυνσης και επάγει μια αξιοσημείωτη αύξηση της διαμέτρου τους, επιτρέποντας έτσι τη μετακίνηση του συμπλόκου ΠΔΜ-ssRNA στα γειτονικά κύτταρα (Atkins κ.ά., 1991; Reichel κ.ά., 1999). Στην κατηγορία των ιών που μετακινούνται με τον τρόπο αυτό ανήκει και ο ACLSV (Yoshikawa κ.ά., 1999). Μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε η ΠΔΜ του ACLSV συζευγμένη με την GFP-πρωτεΐνη έδειξαν ότι η ενδοκυτταρική της μετακίνηση από το σημείο σύνθεσης της στο κυτόπλασμα έως τα πλασμοδέσματα, γίνεται μέσω του κυτοσκελετού και του ενδοπλασματικού δικτυωτού (ΕΔ) (Huang και Zhang, 1999). Τέλος, θα πρέπει να

αναφερθεί ότι η ΠΔΜ του ιού δεν παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς τη θέση δέσμευσης της στο ssRNA (Isogai και Yoshikawa, 2005).

1.3.1.6. Μετάδοση

Ο ACLSV έχει ευρύτατη γεωγραφική εξάπλωση και απαντάται σε καλλιέργειες γιγαρτοκάρπων και πυρηνοκάρπων στις αρκετές περιοχές του κόσμου (Lister, 1970α; Rwahnih κ.ά., 2004). Μεταδίδεται με εμβολιασμό, πιθανώς με εμβολιασμό ριζών (Gilmer κ.ά., 1971), ενώ είχε αναφερθεί μετάδοσή του με νηματώδεις χωρίς ωστόσο να επιβεβαιωθεί (Fritzsche και Kegler, 1968). Σε πειράματα που έγιναν στο παρελθόν δεν παρατηρήθηκε μετάδοση του ιού με το σπόρο μηλιάς ή με την αφίδα *Myzus persicae* (Sweet κ.ά., 1980α).

1.3.2. Ξενιστές

Ο ACLSV προσβάλλει μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών (καλλιεργούμενων, αυτοφυών και καλλωπιστικών) που ανήκουν στην οικογένεια *Rosaceae*. Από τα γιγαρτόκαρπα προσβάλλει τη μηλιά, την αχλαδιά και την κυδωνιά, ενώ από τα πυρηνόκαρπα την αμυγδαλιά, τη βερικοκιά, την κερασιά, τη ροδακινιά και τη δαμασκηλιά.

1.3.2.1. Καλλιεργούμενοι ξενιστές

1.3.2.1.1. Γιγαρτόκαρπα

Μηλιά

Αποτελεί τον ξενιστή στον οποίο εντοπίστηκε ο ιός για πρώτη φορά (Mink και Shay, 1959; Mink και Shay, 1962; Lister κ.ά., 1965). Στη μηλιά, είναι συνήθως λανθάνων καθώς στις περισσότερες ποικιλίες δεν προκαλεί συμπτώματα ενώ όταν παρατηρούνται συμπτώματα, αυτά διαφοροποιούνται ανάλογα με την ποικιλία (Luckwill και Campbell, 1959; Verma και Sharma, 1999; Rwahnih κ.ά., 2004). Για παράδειγμα, στην ποικιλία Northern Spy (καλλιεργείται στις ΗΠΑ) παρατηρείται συστροφή και χλωρωτικές κηλίδες στα φύλλα, νανισμός καθώς και βοθρίωση του

κορμού, ενώ στην ποικιλία Virginia βοθρίωση του κορμού (Mink και Shay, 1959). Συχνά παρατηρούνται στους καρπούς δακτύλιοι ως αποτέλεσμα προσβολής από ορισμένες απομονώσεις, ενώ σε κάποιες ποικιλίες όπως η Granny Smith στους καρπούς εμφανίζονται κυρίως γραμμώσεις και χλωρωτικοί δακτύλιοι (Εικόνα 1.2.) (Desvignes και Boyé, 1988). Ορισμένα στελέχη του ιού που εντοπίστηκαν στην Ολλανδία (Van der Meer, 1986) και τη Νέα Ζηλανδία (Wood, 2001) προκαλούν κηλίδες με μορφή «νιφάδας» στα φύλλα των ποικιλιών ‘Golden Delicious’ και ‘Lord Lambourne’.



Εικόνα 1.2. Χλωρωτικά και κοκκινωπά δακτυλιοειδή σχέδια σε καρπούς μηλιάς από τον ACLSV

Κυδωνιά

Στην κυδωνιά ο ιός είναι συνήθως λανθάνων (Mathioudakis κ.ά., 2007). Παρόλα αυτά, όταν υπάρχουν συμπτώματα, συνήθως αφορούν χλωρωτικούς δακτυλίους και κηλιδώσεις στα φύλλα ενώ οι καρποί μπορεί να φέρουν παραμορφώσεις (Cromptley κ.ά., 1963; Cromptley κ.ά., 1969α; Fridlund, 1986). Στην Ελλάδα, η κυδωνιά καλλιεργείται κυρίως ως υποκείμενο της αχλαδιάς και όχι τόσο για τους καρπούς της (Βασιλακάκης και Θεριός, 2001) με αποτέλεσμα, όταν τα φυτά δεν εμφανίζουν συμπτώματα, ο ιός να μεταδίδεται μέσω του εμβολιασμού στο εμβόλιο της αχλαδιάς. Συχνά παρατηρείται και ασυμφωνία εμβολίου-υποκειμένου (Rana κ.ά., 2008β).

Αχλαδιά

Τα κυριότερα συμπτώματα είναι δακτυλιοειδή σχέδια στα φύλλα και μωσαϊκό (Posnette κ.ά., 1957; Cromptley κ.ά., 1969α; Salem κ.ά., 2005). Αρχικά ονομάστηκε ως

ιός του δακτυλιοειδούς μωσαϊκού της αχλαδιάς (*Pear ring line pattern mosaic virus*) που αποτελεί πλέον συνώνυμη ονομασία (Zahi κ.ά., 2000).

1.3.2.1.2. Πυρηγόκαρπα

Αμυγδαλιά

Τα συμπτώματα είναι μωσαϊκό, ανοιχτοί κίτρινοι έως και χλωρωτικοί αποχρωματισμοί, τοπικές νεκρώσεις και συστροφή των φύλλων, αποτυχία έκπτυξης των οφθαλμών, δεσμιώσεις και σχηματισμός ροζέτας στους βλαστούς, νανισμός και θαμνώδης ανάπτυξη (Zahi κ.ά., 2000). Με τη συμπτωματολογία αυτή σχετίζονται οι ArMV, PDV, και PNRSV που ανήκουν στο γένος *Illarivirus* καθώς και ο ACLSV, που συνήθως συναντάται σε μικρότερη συχνότητα και σπανίως προκαλεί προβλήματα στην καλλιέργεια (Martelli και Savino, 1997).

Βερικοκιά

Αν και ο PPV (ιός της ευλογιάς των πυρηνοκάρπων) προκαλεί την πιο σημαντική ασθένεια της βερικοκιάς, αρκετά συχνά συναντάται και ο ACLSV όπως και οι PDV και PNRSV, τόσο σε συμπτωματικά όσο και σε φαινομενικά υγιή φυτά. Συχνά ο ιός δεν προκαλεί συμπτώματα, ενώ ορισμένες απομονώσεις του ACLSV προκαλούν σοβαρές ασθένειες όπως είναι η ασθένεια 'butteratura' (Ragozzino και Pugliano, 1974) στην Ιταλία και η 'viruela' στην Ισπανία (Peña- Iglesias και Ayuso, 1975; Cañizares κ.ά., 2001α). Η συμπτωματολογία του ιού ποικίλει ανάλογα με το γενότυπο και με βάση αυτή, ο τύπος αντίδρασης των προσβεβλημένων φυτών διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες (Πίνακας 1.4.).

Πίνακας 1.4. Τύποι αντίδρασης ποικιλιών βερικοκιάς σε προσβολές από ACLSV (Desvignes και Boyé 1988).

Τύπος αντίδρασης	Ορολογική Δοκιμή ELISA	Ποικιλία
Τα ασθενή δέντρα εμφανίζουν ροζέτα. Ήπιες βοθριάσεις στον κορμό.	Αρνητική	Luizet Bergeron Hatif Colomer Priana
Προσβάλλονται από τον ιό αλλά είναι ανεκτικές (Λανθάνουσα μόλυνση: δεν παρατηρούνται συμπτώματα).	Θετική	Canino Rouge de Roussillon Tardif de Bordaneil
Κάποια φυτά σχηματίζουν ροζέτα, ενώ άλλα αναπτύσσονται κανονικά. Ακανόνιστη συγκέντρωση και κατανομή του ιού στο ασθενές δέντρο.	Άλλοτε θετική και άλλοτε αρνητική	Polonais Houcall

Κερασιά

Οι περισσότερες ποικιλίες συνήθως δεν παρουσιάζουν συμπτώματα του ACLSV (Desvignes και Boyé, 1988). Στις ευπαθείς ποικιλίες τα συμπτώματα που συνήθως παρατηρούνται είναι χλωρωτικοί δακτύλιοι, χλωρωτικές και νεκρωτικές κηλίδες και κίτρινο μωσαϊκό στα φύλλα, ενώ στους καρπούς παρατηρούνται αποχρωματισμοί, σκοτεινές κηλίδες, βαθουλώματα, νεκρώσεις και παραμορφώσεις (Εικόνα 1.4.) (Savino, 1997; Desvignes κ.ά., 1999). Ορισμένες απομονώσεις του ιού προκαλούν ρωγμές στον φλοιό (Εικόνα 1.3.) και σταδιακή κατάπτωση των δέντρων (Desvignes και Boyé, 1988).



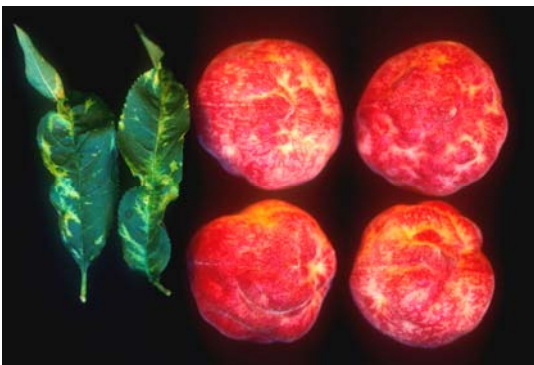
Εικόνα 1.4. Αποχρωματισμοί και παραμορφώσεις καρπών κερασιάς που οφείλονται σε προσβολή των δέντρων από στελέχη του ACLSV.



Εικόνα 1.3. Ρωγμές στο φλοιό κερασιάς προσβεβλημένης από τον ACLSV.

Ροδακινιά

Η ροδακινιά θεωρείται γενικώς ανθεκτική στον ACLSV, ωστόσο έχουν εντοπιστεί ορισμένα στελέχη του ιού που προκαλούν το σχηματισμό δακτυλιδίων (παρόμοια με αυτά που προκαλεί ο PPV) και κηλίδων στους καρπούς, ενώ άλλα προκαλούν χλωρωτικά γραμμικά σχέδια στα φύλλα (Εικόνα 1.5.) (Desvignes και Boyé, 1988).



Εικόνα 1.5. Συμπτώματα προσβολής από τον ACLSV σε φύλλα και καρπούς ροδακινιάς. Στους καρπούς διακρίνονται τα δακτυλιοειδή σχέδια και στα φύλλα οι χλωρωτικοί μεταχρωματισμοί.

Δαμασκηλιά

Στην δαμασκηλιά προκαλεί την ασθένεια ψευδοευλογιά (Németh, 1986) που προκαλεί συμπτώματα παρόμοια με τον PPV.

Άλλα είδη του γένους *Prunus*

Ο ACLSV έχει επίσης ανιχνευθεί και σε καλλωπιστικά φυτά του γένους *Prunus* (Gilmer, 1967; Cropsey, 1968β; Cropsey, 1969β; Cropsey, 1974; Colin και Verhoyen, 1975). Η συμπεριφορά των διαφόρων ειδών στην προσβολή από τον ιό μοιάζει με αυτή της βερικοκιάς (Πίνακας 1.5.).

Πίνακας 1.5. Αντίδραση ειδών του γένους *Prunus* σε προσβολές του ACLSV (Desvignes και Boyé, 1988).

Τύπος αντίδρασης		Είδος του γένους <i>Prunus</i>
Παρουσία συμπτωμάτων	Η καλλιέργεια παρουσιάζει συμπτώματα ιολογικής προσβολής.	<i>P. maliformis</i> (κορομηλιά)
Απουσία συμπτωμάτων, παρουσία του ιού	Αφορά κυρίως καλλωπιστικά φυτά στα οποία είναι λανθάνων (Colin και Verhoyen, 1975).	<i>P. cerasifera</i> , <i>P. insititia</i> , <i>P. salicina</i> , <i>P. blireana</i>
Διαφορετικές αντιδράσεις	Ορισμένα είδη αντιδρούν στον ιό με τοπικές νεκρώσεις, ψευδοευλογιά στους καρπούς, ρωγμές και βοθρίωση του κορμού.	Υποκείμενο GF 677

1.3.2.2. Αυτοφυείς ξενιστές

Οι πληροφορίες σχετικά με την παρουσία του ιού σε αυτοφυή φυτά είναι σχετικά περιορισμένες. Ευπαθή στον ιό είναι η αγριοκερασιά (German-Retana κ.ά., 1997; Rana κ.ά., 2008γ), η αγριαχλαδιά, η γκορτσιά, η αγριομηλιά, η αγριοβερικοκιά (Rana κ.ά., 2007), η τσαπουρνιά (Sweet, 1980α), η αγριοαμυγδαλιά (Zahi κ.ά., 2000)

και τα είδη που ανήκουν στο γένος *Sorbus* sp (*Sorbus hybrid*, *Sorbus aucuparia*) (Ramsfjell, 1957; Kengler, 1960; Kralikova, 1961; Sweet και Campbell, 1976) καθώς και *Rubus* sp (Citir και Ibagi, 2008).

1.3.2.3. Καλλωπιστικά

Ο ACLSV εντοπίστηκε επίσης και σε πολλά καλλωπιστικά είδη με ποικίλη συμπτωματολογία. Ανιχνεύθηκε σε είδη του γένους *Crataegus* που εμφάνιζαν χλωρωτικά δακτυλοειδή σχέδια στα φύλλα (Posnette κ.ά., 1957), σε είδη του γένους *Amelanchier* που εκδηλώνουν δακτυλοειδή σχέδια και μωσαϊκό στα φύλλα (Van Katwijk, 1957) και στο είδος *Pyronia veitchii* με συμπτώματα χλώρωσης και νανισμού (Sweet, 1980β). Επίσης εντοπίστηκε και σε είδη τροπικής προέλευσης που ανήκουν στα γένη *Chaenomeles*, *Cydonia* και *Mespilus* (Schimanski και Schmelzer, 1974; Sweet, 1976; Sweet και Campbell, 1976; Sweet, 1980β), καθώς και στο *Amelanchier canadensis* (Ramsfjell, 1957). Ο ACLSV ανιχνεύθηκε και σε καλλωπιστικά είδη των γενών *Malus* και *Pyrus* sp (Campbell, 1971; Sweet και Campbell, 1973). Τέλος, ο ιός ανιχνεύθηκε και σε τριανταφυλλιά (*Rosa canina*) καθώς και στην καλλωπιστική αμυγδαλιά *Prunus glandulosa* (Sweet, 1980β; Spiegel κ.ά., 2005).

1.3.3. Διάγνωση

Για τη διάγνωση του ιού χρησιμοποιούνται οι παρακάτω μέθοδοι:

A. Χρήση κατάλληλων φυτοδεικτών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο ACLSV μεταδίδεται μηχανικά με φυτικό εκχύλισμα στο εργαστήριο. Οι πλέον κατάλληλοι φυτοδείκτες ανήκουν στις οικογένειες *Chenopodiaceae*, *Leguminosae-Papilionoideae*, *Rosaceae*. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι: *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Crataegus* sp, *Cydonia oblonga* (C7/1), *Malus platycarpa* (Εικόνα 1.6.), *Malus sylvestris* (Εικόνα 1.7.), *Prunus armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica*, *Phaseolus vulgaris*, *Pyronia veitchii*, *Pyrus communis*. Η συμπτωματολογία του ιού ποικίλει ανάλογα με το είδος του

φυτοδείκτη (Πίνακας 1.6.) (Lister, 1970α). Για τη διατήρηση και αναπαραγωγή του ιού χρησιμοποιείται το *C. quinoa* στο οποίο προκαλεί διασυστηματική μόλυνση. Αρχικά παρατηρούνται τοπικές κηλίδες που σταδιακά γίνονται νεκρωτικές και χλωρωτικές, 5-7 ημέρες μετά τη μόλυνση και ακολουθούν τα συμπτώματα μωσαϊκού στα ανώτερα φύλλα, σε 10-13 μέρες (Sato κ.ά., 1999).

Η μηχανική μετάδοση του ιού σε ξυλώδεις φυτοδείκτες πραγματοποιείται με τον εμβολιασμό ή τον ενοφθαλμισμό του υπό μελέτη δείγματος, ενώ οι ποώδεις φυτοδείκτες μολύνονται μηχανικά με πρόκληση πληγών. Ο ιστός από προσβεβλημένα φυτά ομογενοποιείται με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος (φωσφορικό διάλυμα που περιέχει: KH_2PO_4 και Na_2HPO_4 σε αναλογία 2:3 και τελική συγκέντρωση 0,1M με pH 7,0 και 0,01M Na_2SO_3) με ιγδίο και ύπερο (Dijkstra και De Jager, 1998) ή με 2% polyvinyl pyrrolidone (PVP) (Rana κ.ά., 2008α) ή με νικοτίνη 2,5% (Terlizzi, 1998), ώστε να αποφεύγεται η αδρανοποίηση του ιού κατά την εκχύλιση. Ακολουθεί ομοιόμορφη επίταση των φύλλων των φυτοδεικτών με ανθρακοπυρίτιο για τη δημιουργία πληγών και τέλος, γίνεται επάλειψη του εκχυλίσματος στα φύλλα με τη βοήθεια βαμβακοφόρου. Καταλληλότερο, για τη μηχανική μόλυνση, τμήμα του φυτού θεωρούνται τα άνθη (Lister κ.ά., 1965) και οι καρποί (Croyley, 1968α) εξαιτίας της μικρότερης περιεκτικότητας σε φαινολικές ουσίες σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς.

Παρόλο που ο εμβολιασμός σε φυτοδείκτες αποτελεί την τεχνική ανίχνευσης που χρησιμοποιείται ευρύτερα σε προγράμματα πιστοποίησης, παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα. Απαιτεί θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις και μεγάλο αριθμό φυτοδεικτών την κατάλληλη χρονική στιγμή, είναι ακριβή, χρονοβόρα, και συχνά απαιτείται επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με άλλη διαγνωστική τεχνική (Mink κ.ά., 1971; Yanase, 1974; Spiegel κ.ά., 2006).



Εικόνα 1.6. Χλωρωτικοί δακτύλιοι σε φύλλα του είδους *M. platycarpa*

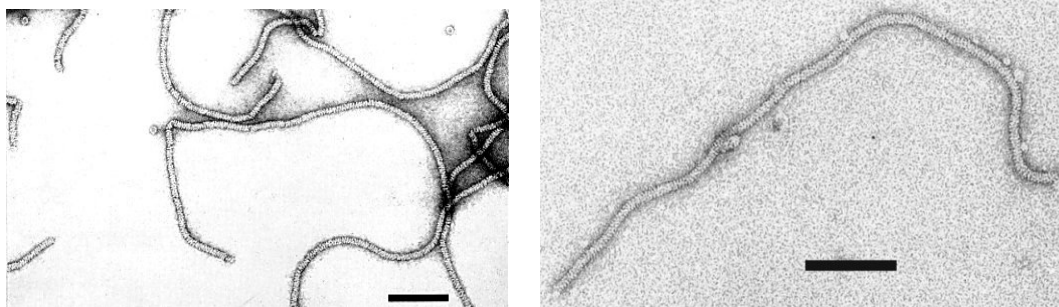
Εικόνα 1.7. Χλωρωτικές κηλίδες σε φύλλα του είδους *M. sylvestris* cv. R12740-7A

Πίνακας 1.6. Οι κυριότεροι φυτοδείκτες που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση του ACLSV και συμπτώματα που εκδηλώνονται σε αυτούς (Lister, 1970α).

Είδος Φυτοδείκτη	Συμπτώματα
<i>Malus sylvestris</i> cv. R12740-7A	Ασύμμετρες κηλίδες Δυσμορφία των νεαρών φύλλων
<i>Malus platycarpa</i> (κλώνος Long Aston)	Ακανόνιστοι χλωρωτικοί δακτύλιοι Γραμμικά σχέδια Μικρά φύλλα που αποβάλλονται πρόωρα Δυσμορφία φύλλων
<i>Chenopodium quinoa</i>	Τοπικές κηλίδες που σταδιακά γίνονται νεκρωτικές ή χλωρωτικές Μωσαϊκό Δακτυλιοειδή και γραμμικά σχέδια
<i>C. amaranticolor</i>	Χλωρωτικές τοπικές κηλίδες που περιβάλλονται από νεκρωτική ζώνη
<i>Prunus</i> sp.	Πράσινες μικρές κηλίδες Ήπιες παραμορφώσεις της φυλλικής επιφάνειας Σοβαρές κηλιδώσεις και παραμορφώσεις (ορισμένες απομονώσεις)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Καστανές ή πορφυρές νεκρωτικές κηλίδες Δακτύλιοι μεγέθους 1-3 mm

Β. Ηλεκτρονική μικροσκοπία (ΗΜ)

Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο περιορισμένου αριθμού δειγμάτων. Βασίζεται στην παρατήρηση των νηματοειδών ισοωματίων με ‘αρνητική χρώση’ στο μικροσκόπιο (Yoshikawa και Takahashi, 1988). Οι πιο αποτελεσματικές χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτρονική μικροσκοπία για τη μελέτη του ιού είναι το οξικό ουρανύλιο και το μυρμηγκικό ουρανύλιο (Εικόνα 1.8. α, β), ενώ η χρήση φωσφορικών αλάτων του βολφραμικού οξέος προκαλεί θραύση των ισοωματίων (Lister, 1970α). Ο τίτλος του ιού στους ιστούς ξυλωδών ξενιστών του είναι γενικώς χαμηλός (Candresse κ.ά., 1995; Kinarad κ.ά., 1996) γεγονός που καθιστά τη χρήση της Η.Μ. ως διαγνωστικό εργαλείο αρκετά επισφαλή.



α.

β.

Εικόνα 1.8. Ηλεκτρονιομικροφωτογραφίες ισοωματίων του ACLSV μετά από ‘αρνητική χρώση’ με οξικό ουρανύλιο. Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τα 100nm.

Γ. Ορολογικές μέθοδοι

Αρχικά, η ανίχνευση του ιού βασίστηκε στον εμβολιασμό ξυλωδών φυτοδεικτών ενώ αργότερα, παρασκευάστηκαν μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα και αναπτύχθηκαν ορολογικές δοκιμές όπως η Ανοσοπροσοφική ηλεκτρονική μικροσκοπία (ISEM) (Kerlan κ.ά., 1981; Kalashjan και Lipartia, 1986) και η ELISA (Pena-Iglesias και Ayuso, 1973; Flegg και Clark, 1979; Detienne κ.ά., 1980; Pracros κ.ά., 1981; Acer κ.ά., 1985; Lemmety, 1988; Poul κ.ά., 1990; Wu κ.ά., 1998; Caglayan κ.ά., 2006). Διαφορετικές μελέτες έδειξαν ανόμοια κατανομή του ιού στην κόμη των ασθενών δέντρων, ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωσή του εντοπίστηκε

στα άνθη και κυρίως στα πέταλα (Karešoná και Paprštein, 1997; Karešoná και Paprštein, 2001; Borisova, 2005). Η συγκέντρωση του ιού στα φυτά επηρεάζεται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος και κυρίως τη θερμοκρασία γεγονός που καθιστά μη αξιόπιστη την ανίχνευσή του με τις ορολογικές μεθόδους κατά τη διάρκεια του θέρους, λόγω του μειωμένου τίτλου του (Candresse κ.ά., 1995; Kinard κ.ά., 1996; Kummert κ.ά., 1998; Menzel κ.ά., 2002; Salmon κ.ά., 2002; Borisova, 2005). Για τους λόγους αυτούς συνιστάται η δειγματοληψία να γίνεται την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο, και να χρησιμοποιούνται κυρίως τα άνθη των φυτών (Varveri κ.ά., 1997; Borisova, 2005). Κατά τους χειμερινούς μήνες αξιόπιστη ορολογική ανίχνευση του ιού επιτυγχάνεται με χρήση ιστού από μονοετείς ή διετείς βλαστούς (Topchiiska, 1995).

Δ. Μοριακές Μέθοδοι

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ACLSV από τους German κ.ά. (1990), επέτρεψε την ανάπτυξη διάφορων μοριακών δοκιμών όπως είναι η RT-PCR, IC-RT-PCR και Real time RT-PCR που παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση και επιτρέπουν την αξιόπιστη ανίχνευση του ιού καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Candresse κ.ά., 1995; Kinard κ.ά., 1996; Menzel κ.ά., 2003; Myrta κ.ά., 2003; Ulubas και Ertunc, 2005; Sanchez Navarro κ.ά., 2005; Mohamed κ.ά., 2006). Έκτοτε έχουν σχεδιαστεί αρκετά ζεύγη εκκινητών που εδράζουν στις συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος, με μικρά ποσοστά διαφοροποίησης μεταξύ των απομονώσεων του ιού, όπως αυτή της RdRp (Kummert κ.ά., 2000; Jan κ.ά., 2003) και της ΚΠ (Dunez κ.ά., 1994; Candresse, 1995; Menzel κ.ά., 2002; Μαθιουδάκης κ.ά. 2006γ,δ). Για την ανίχνευση του ACLSV προτιμήθηκαν οι εκκινητές που εδράζουν στην ΚΠ, καθώς η περιοχή της RdRp είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των ιών της οικογένειας *Flexiviridae* καθιστώντας αδύνατη την εξειδικευμένη ανίχνευση του ιού (Foissac κ.ά., 2005; Spiegel κ.ά., 2006). Παρόλα αυτά, προβλήματα αξιοπιστίας στην ανίχνευση του ιού παρατηρούνται συχνά και με τις μοριακές μεθόδους εξ' αιτίας της μεγάλης παραλλακτικότητας του ιού που καθιστά αδύνατη την ανίχνευση ορισμένων απομονώσεων (Candresse κ.ά., 1995; Malinowski κ.ά., 1998).

1.3.4 Εξυγίανση πολλαπλασιαστικού υλικού

Για την εξυγίανση προσβεβλημένων φυτών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι όπως η καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων, η χημειοθεραπεία και η θερμοθεραπεία μόνες τους ή σε συνδυασμό (Wood, 1973; Juárez κ.ά., 1988; Wood, 2001; Cieslinska, 2002; Paunovic κ.ά., 2007). Η θερμοθεραπεία από μόνη της δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα καθώς μόνο το 20% των εκφύτων ήταν απαλλαγμένα από τον ιό. Η εξυγίανση σε γενοτύπους μηλιάς και ειδών του γένους *Prunus* επιτυγχάνεται σχετικά εύκολα με συνδυασμό θερμοθεραπείας και καλλιέργειας ακραίων μεριστωμάτων. Ανάλογα με τη διάρκεια της θερμοθεραπείας, στους 37° C τα ποσοστά επιτυχίας κυμαίνονταν από 60-100%. Σε *in vitro* καλλιέργεια ακραίου μεριστώματος το ποσοστό επιτυχίας άγγιζε το 100%, ενώ κυττάρων μασχαλαίων οφθαλμών ήταν πολύ μικρότερο (Monette, 1983; Knapp κ.ά., 1995; Gella και Ertea, 1998; Liping κ.ά., 2006). Η χημειοθεραπεία (εφαρμογή αντικών ουσιών) μπορεί επίσης να συμβάλλει στην εξυγίανση πολλαπλασιαστικών υλικών (Paunovic κ.ά., 2007). Κυρίως χρησιμοποιείται η ριμπαβιρίνη (ribavirin), που είναι ένα συνθετικό ανάλογο της γουανοσίνης και έχει αντιϊκή δράση (Hansen, 1988). Με την εφαρμογή ριμπαβιρίνης σε προσβεβλημένα με τον ACLSV φυτά αχλαδιάς σε δόσεις 25 και 50 mg/L επιτεύχθηκε εξυγίανση από τον ιό 78% και 88%, αντίστοιχα (Cieslinska, 2002). Συνδυασμός της μεθόδου με τη θερμοθεραπεία δεν έδωσε καλύτερα αποτελέσματα (Cieslinska, 2002).

1.3.5. Παρουσία του ACLSV στην Ελλάδα

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες για την εκτίμηση της συχνότητας της εμφάνισης του ιού. Ο ιός εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε φυτείες μηλιάς στην Πιάνα Αρκαδίας (Ανώνυμος, 1971) και αργότερα στη Νάουσα, τη Βέροια και τη Σκύδρα (Συργιαννίδης, 1977). Ακολούθησε ορολογικός έλεγχος φυτειών πυρηνοκάρπων και γιγαρτοκάρπων, όπου διαπιστώθηκε υψηλή συχνότητα εμφάνισης του ιού σε φυτείες μηλιάς (29,4-100%), ροδακινιάς (25,9%) και αχλαδιάς (20,4-27,7%), ενώ μικρότερη σε φυτείες βερικοκιάς (11,5%) και κερασιάς (12,5%)

(Βαρβέρη και Μπέμ, 1994; Varveri και Bem, 1995; Varveri, 1998). Πρόσφατα μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης του ιού με τη χρήση μοριακών μεθόδων ανίχνευσης σε φυτείες αχλαδιάς (16,0%), μηλιάς (74,0%), καλλωπιστικής κυδωνιάς (50%) (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006α), κυδωνιάς (11,5%) (Mathioudakis κ.ά., 2007) και αμυγδαλιάς (21,5%) (Χαρού κ.ά., 2006; Χαρού, 2008). Τέλος, πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος σε περιορισμένο αριθμό αυτοφυών και καλλωπιστικών φυτών όπου και διαπιστώθηκε η παρουσία του ιού σε γκορτσιές (*Pyrus amygdaliformis*) και στο είδος *Pyrus calleryana* (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006α).

1.4. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της συχνότητας εμφάνισης και του εύρους ξενιστών του ιού της χλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων της μηλιάς (ACLSV). Αξιολογήθηκαν διαθέσιμες ορολογικές (ELISA) και μοριακές (PDO RT-PCR, PCR) μέθοδοι ώστε να διαπιστωθεί η ευαισθησία τους, και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του ACLSV καθώς και άλλων ιών της οικογένειας *Flexiviridae*.

Στα πλαίσια της μελέτης συλλέχθηκαν στελέχη του ACLSV από καλλιεργούμενα (οπωροφόρα και καλλωπιστικά) και άγρια είδη της οικογένειας *Rosaceae*, με στόχο την ανάλυση της γενετικής τους παραλλακτικότητας. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκε η αλληλουχία τμήματος του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης και της 3'αμετάφραστης περιοχής διαφόρων στελεχών και ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση προκειμένου να διαπιστωθεί τυχόν ομαδοποίηση είτε ως προς τον ξενιστή από τον οποίο απομονώθηκαν, είτε ως προς τη γεωγραφική τους προέλευση.

Κεφάλαιο 2

Συχνότητα εμφάνισης του ACLSV σε καλλιεργούμενα, καλλωπιστικά και αυτοφυή φυτά της οικογένειας *Rosaceae*

2.1. Εισαγωγή

Ο ACLSV είναι ένας από τους διαδεδομένους ιούς των καρποφόρων δέντρων καθώς ο ευρύς κύκλος ξενιστών που προσβάλλει, η ιδιότητα του να παραμένει λανθάνων σε ορισμένα είδη, καθώς και η ανεξέλεγκτη διακίνηση προσβεβλημένου πολλαπλασιαστικού υλικού, ευνοούν την παγκόσμια διασπορά του.

Στην Ελλάδα μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες που βασίστηκαν κυρίως σε ορολογικές μεθόδους ανίχνευσης προκειμένου να εκτιμηθεί η συχνότητα του ιού σε φυτείες πυρηνοκάρπων και γιγαρτοκάρπων (Βαρβέρη και Μπέμ, 1994; Varveri και Bem, 1995; Varveri, 1998). Πρόσφατα μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης του ιού με τη χρήση μοριακών μεθόδων ανίχνευσης σε φυτείες αχλαδιάς, μηλιάς, καλλωπιστικής κυδωνιάς (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006α), κυδωνιάς (Mathioudakis κ.ά., 2007) και αμυγδαλιάς (Χαρού κ.ά., 2006; Χαρού, 2008). Μοριακός έλεγχος έχει πραγματοποιηθεί επίσης και σε περιορισμένο αριθμό αυτοφυών όπου διαπιστώθηκε η παρουσία του ιού σε γκορτσιές (*Pyrus amygdaliformis*) και στο είδος *Pyrus calleryana* (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006α).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης του ACLSV σε διάφορα καλλιεργούμενα, αυτοφυή και καλλωπιστικά είδη των οικογενειών *Rosaceae*, *Moraceae*, *Ulmaceae*, *Asteraceae*, *Fagaceae*, *Simmondsiaceae*, *Betulacea*, *Punicaceae* και *Lauraceae* με την ορολογική δοκιμή ELISA αλλά και την μοριακή μέθοδο RT-PCR.

2.2. Υλικά και μέθοδοι

2.2.1. Δειγματοληψία

Οι δειγματοληψίες ήταν τυχαίες και πραγματοποιήθηκαν τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο του 2007 και Απρίλιο, Μάιο και Ιούνιο του 2008. Η πλειονότητα των φυτών από τα οποία λήφθηκαν δείγματα δεν εκδήλωναν συμπτώματα ιολογικών προσβολών στα φύλλα και στους καρπούς. Συνολικά συλλέχθηκαν 743 δείγματα καλλιεργούμενων, καλλωπιστικών και αυτοφυών φυτών που ανήκουν στις οικογένειες *Rosaceae*, *Moraceae*, *Ulmaceae*, *Asteraceae*, *Fagaceae*, *Simmondsiaceae*, *Betulaceae*, *Punicaceae* και *Lauraceae* (Πίνακας 2.1) από διάφορους νομούς της Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας (Πίνακας 2.2, Πίνακας 2.3).

2.2.2. Φυτικό υλικό

Για την ορολογική ανίχνευση του ιού χρησιμοποιήθηκε ιστός καρπών, ανθέων, και φύλλων, ενώ για την μοριακή ανίχνευση του χρησιμοποιήθηκε επιπλέον και φλοιός ετήσιων βλαστών.

2.2.3. Προετοιμασία φυτικού υλικού

Για την ορολογική ανίχνευση του ιού η εκχύλιση του φυτικών ιστών έγινε σε PBS- Tween με 2% PVP (Polyvinylpyrrolidone, Acros organics) (Βλέπε Παράρτημα 1).

Για τη μοριακή ανίχνευση η εκχύλιση του ολικού RNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Rott και Jelkmann (2001α) (Βλέπε Παράρτημα 2).

2.2.4. Ορολογική δοκιμή ELISA

Για την ορολογική ανίχνευση του ACLSV εφαρμόστηκε η δοκιμή DAS-ELISA. Χρησιμοποιήθηκαν δύο πολυκλωνικά αντισώματα, ένα από το Ινστιτούτο INRA (Bordeaux) της Γαλλίας (ευγενική προσφορά του Dr.Thierry Candresse) και ο δεύτερος από τη συλλογή του ινστιτούτου BIOREBA (Bioreba AG, Reinach, Switzerland) (Βλέπε Παράρτημα 1).

Πίνακας 2.1. Είδη και αριθμός φυτών που συλλέχθηκαν και ελέγχθηκαν για την παρουσία του ACLSV

Οικογένεια	Γένος	Είδος	Κοινή ονομασία	Αριθμός φυτών
Rosaceae	Prunus	<i>amygdalus</i>	Αμυγδαλιά	17
		<i>webbii</i>	Αγριοαμυγδαλιά	8
		<i>myrobalana</i>	Αγριοκορομηλιά	5
		<i>avium L.</i>	Αγριοκερασιά	36
		<i>maliformis</i>	Κορομηλιά	50
		<i>persica</i>	Ροδακινιά	21
		<i>spinosa</i>	Τσαπουρνιά	14
		<i>cerassifera</i>	Καλλωπιστική δαμασκηλιά	38
		<i>armeniaca</i>	Βερικοκιά	16
		<i>mahaleb</i>	Μαχλέπι	5
		<i>domestica</i>	Δαμασκηλιά	29
		<i>avium</i>	Κερασιά	100
		<i>cerasus</i>	Βυσσινιά	1
	Cydonia	<i>obloga</i>	Κυδωνιά	7
		<i>japonica</i>	Καλλωπιστική κυδωνιά	62
	Rosa	<i>canina</i>	Τριανταφυλλιά	26
		<i>acicularis</i>	Αγριοτριανταφυλλιά	9
	Malus	<i>domestica</i>	Μηλιά	22
		<i>communis</i>	Αγριομηλιά	12
		<i>sp.</i>	Καλλωπιστική μηλιά	1
	Pyrus	<i>amygdaliformis</i>	Γκορτσιά	81
		<i>communis</i>	Αχλαδιά	16
		<i>pyraster</i>	Αγριαχλαδιά	43
	Potentilla	<i>pindicola</i>	-	7
		<i>reptans</i>	-	2
	Crataegus	<i>monogyna</i>	Κράταιγος	40
Pyracantha	<i>coccinea</i>	Πυράκανθος	29	
Spiraea	<i>chamaedryfolia</i>	-	1	
Rubus	<i>sp.</i>	-	2	
Sorbus	<i>sp.</i>	Σορβιά	23	
Moraceae	Morus	<i>sp.</i>	Μουριά	1
Lauraceae	Laurus	<i>sp.</i>	Καλλωπιστική δάφνη	1
Asteraceae	Centaurea	<i>huljakii</i>	-	2
Fagaceae	Castanea	<i>sativa</i>	Καστανιά	1
Betulaceae	Corylus	<i>avellana</i>	Φουντουκιά	1
Simmondsiaceae	Simmondsia	<i>chinensis</i>	Τζιτζιφιά	1
Punicaceae	Punica	<i>granatum</i>	Ροδιά	2
Ulmaceae	Celtis	<i>australis</i>	Κέλτις	11

Πίνακας 2.2. Νομοί που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες και είδη που συλλέχθηκαν

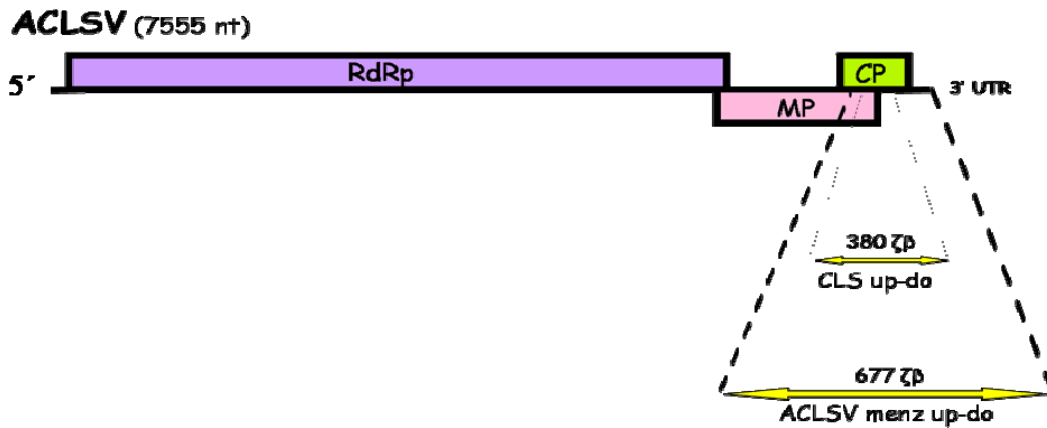
Είδη	Νομοί δειγματοληψίας
Δαμασκηλιά	Κοζάνη, Κομοτηνή, Ιωάννινα, Θεσπρωτία
Αμυγδαλιά	Κοζάνη, Φθιώτιδα, Ιωάννινα
Κερασιά	Κοζάνη, Γρεβενά, Πέλλα, Κομοτηνή, Κιλκίς, Πιερία, Ιωάννινα
Βυssινιά	Κοζάνη, Γρεβενά, Ιωάννινα
Ροδακινιά	Κοζάνη, Πέλλα
Βερικοκιά	Ιωάννινα , Χαλκιδική
Κορομηλιά	Γρεβενά, Θεσσαλονίκη, Θεσπρωτία, Άρτα, Πρέβεζα, Ιωάννινα
Μαχλέπι	Ιωάννινα
Καλλωπιστική δαμασκηλιά	Ιωάννινα, Θεσσαλονίκη, Γρεβενά, Χαλκιδική
Τσαπουρνιά	Κοζάνη, Κιλκίς, Ιωάννινα
Αγριοαμυγδαλιά	Χαλκιδική
Αγριοκορομηλιά	Γρεβενά, Κιλκίς
Αγριοκερασιά	Γρεβενά, Ιωάννινα, Κιλκίς, Κομοτηνή
Τριανταφυλλιά	Κιλκίς, Χαλκιδική, Θεσσαλονίκη
Αγριοτριανταφυλλιά	Γρεβενά
Μηλιά	Κομοτηνή, Κοζάνη, Γρεβενά, Ιωάννινα, Θεσσαλονίκη
Αγριομηλιά	Γρεβενά, Ιωάννινα
Καλλωπιστική μηλιά	Ιωάννινα
Καλλωπιστική κυδωνιά	Ιωάννινα, Κομοτηνή, Θεσσαλονίκη, Φθιώτιδα, Λάρισα
Κυδωνιά	Κομοτηνή, Ιωάννινα
Αγριαχλαδιά	Άρτα, Ιωάννινα, Γρεβενά
Αχλαδιά	Κοζάνη, Γρεβενά, Κομοτηνή, Χαλκιδική, Ιωάννινα
Γκορτσιά	Κοζάνη, Γρεβενά, Κιλκίς, Χαλκιδική, Φθιώτιδα, Θεσπρωτία, Πρέβεζα
Σορβιά	Χαλκιδική, Ιωάννινα
Πυράκανθος	Λάρισα
Κράταιγος	Κιλκίς, Ιωάννινα, Πρέβεζα
<i>Potentilla pindicola</i>	Κιλκίς
<i>Potentilla reptans</i>	Κιλκίς
<i>Rubus sp.</i>	Κιλκίς
<i>Spiraea chamaedryfolia</i>	Κιλκίς
Μουριά	Κομοτηνή
Καλλωπιστική δάφνη	Θεσσαλονίκη
<i>Centaurea huljakii</i>	Κιλκίς
Καστανιά	Κοζάνη
Φουντουκιά	Κοζάνη
Τζιτζιφιά	Κοζάνη
Ροδιά	Κοζάνη, Χαλκιδική
Κέλτις	Θεσσαλονίκη

Πίνακας 2.3. Συνολικός αριθμός δειγμάτων που συλλέχθηκαν από διάφορους νομούς της Ελλάδος

Νομοί δειγματοληψίας	Σύνολο δειγμάτων
Αρτας	7
Γρεβενών	99
Θεσπρωτίας	6
Θεσσαλονίκης	39
Ιωαννίνων	187
Κιλκίς	60
Κοζάνης	88
Κομοτηνής	42
Λάρισας	60
Πέλλας	45
Περίας	5
Πρέβεζας	9
Φθιώτιδας	14
Χαλκιδικής	82
Σύνολο	743

2.2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει σχεδιαστεί μεγάλος αριθμός εκκινητών για την εξειδικευμένη ανίχνευση του ACLSV (Dunez κ.ά., 1994; Candresse, 1995; Kummert κ.ά., 2000; Menzel κ.ά., 2002; Jan κ.ά., 2003; Μαθιουδάκης κ.ά. 2006γ,δ). Η RT-PCR που προτείνουν οι Menzel κ.ά. (2002) βασίζεται στη χρήση εκκινητών που εδράζουν στην ΚΠ και 3' αμετάφραστη περιοχή, και πολλαπλασιάζουν τμήμα μήκους 677ζβ (ACLSV Menz up και ACLSV Menz Do) (Εικόνα 2.1). Μία ακόμη μέθοδος RT-PCR αναπτύχθηκε από τους Μαθιουδάκης κ.ά.(2006γ,δ) με εκκινητές που εδράζουν στην ΚΠ του ιού και πιο συγκεκριμένα εσωτερικά αυτών που προτείνουν οι Menzel κ.ά. (2002), ενισχύοντας προϊόν μεγέθους 380ζβ (CLSup και CLSdo) (Εικόνα 2.1). Αρχικά αξιολογήθηκε η ευαισθησία των δύο αυτών μεθόδων, ενώ έγινε μια προσπάθεια συνδυασμού τους πραγματοποιώντας μια εστιασμένη PCR, με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας της ανίχνευσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δέκα δείγματα, ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 2.1. Το γονιδίωμα του ACLSV και η περιοχή του γονιδιώματος στην οποία εδράζονται καθώς και το μέγεθος του ληφθέντος προϊόντος.

2.2.5.1. Διαδικασία RT-PCR σε έναν μικροσωλήνα

Δύο μl εκχυλίσματος ολικού RNA που παραλήφθηκε από τον φυτικό ιστό χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για τη σύνθεση του c-DNA κλώνου και ακολούθως πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της PCR στον ίδιο μικροσωλήνα των 0,2ml σε ένα τελικό όγκο διαλύματος 25μl.

Στη μία RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ACLSV Menz up και ACLSV Menz Do που πολλαπλασιάζουν τμήμα του γονιδιώματος του ιού μήκους 677ζβ. Η συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση είναι 0,2μM και η θερμοκρασία υβριδοποίησής τους ανέρχεται στους 62 °C (Πίνακας 2.4) (Βλέπε Παράρτημα 3.A).

Στη δεύτερη RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές CLSup και CLSdo που πολλαπλασιάζουν τμήμα μήκους 380ζβ. Η συγκέντρωσή τους στην αντίδραση είναι 0,2μM και 0,4μM αντίστοιχα και η θερμοκρασία υβριδοποίησής τους ανέρχεται στους 51°C (Πίνακας 2.4) (Βλέπε Παράρτημα 3.B).

Πίνακας 2.4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την μοριακή ανίχνευση του ACLSV

Εκκινητής	Αλληλουχία	Συγκέντρωση στην αντίδραση (μM)	Μήκος Προϊόντος (ζβ)
ACLSV Menz up	5'-TTCATGAAAGACAGGGGCAA-3'	0,2	677
ACLSV Menz Do	5'-AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA-3'	0,2	
CLS up	5'-CTGGAACAGATACTGGAGTC-3'	0,2	380
CLS do	5'-GCCTTGTTTCATGATRAACAT-3'	0,4	

R= A ή G

2.2.5.2. Εστιασμένη PCR

Στην εστιασμένη PCR ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε 1μl του προϊόντος της RT-PCR που ανέπτυξαν οι Menzel κ.ά., (2002), ενώ χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές CLSup και CLSdo. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20μl σε μικροσωλήνα των 0,2 ml (Βλέπε Παράρτημα 4).

2.2.5.3. Ανίχνευση προϊόντων της RT-PCR και εστιασμένης PCR

Η ανίχνευση των τελικών προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη. Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκε 1,5% αγαρόζη σε διάλυμα της ηλεκτροφόρησης TAE 1X (Βλέπε Παράρτημα 5).

2.3 Αποτελέσματα

2.3.1. Ορολογική ανίχνευση (δοκιμή ELISA)

Ο ACLSV ανιχνεύθηκε συνολικά σε 85 (από τα 743) δείγματα όταν χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα της BIOREBA, και σε 121 δείγματα όταν χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα προερχόμενα από το INRA (Πίνακας 2.5).

2.3.2. Μοριακή ανίχνευση του ACLSV

2.3.2.1. Αξιολόγηση των μεθόδων ανίχνευσης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη των προϊόντων των δυο RT-PCR δοκιμών (Menzel κ.ά., 2002; Μαθιουδάκης κ.ά., 2006 γ,δ) ανέδειξε την παρουσία του ιού μόνο στον θετικό μάρτυρα (Εικόνα 2.2, Εικόνα 2.3), ενώ στα προϊόντα της εστιασμένης PCR που αναπτύχθηκε, ο ιός ανιχνεύθηκε, εκτός από τον θετικό μάρτυρα, σε 4 από τα υπό εξέταση δείγματα (Εικόνα 2.4).

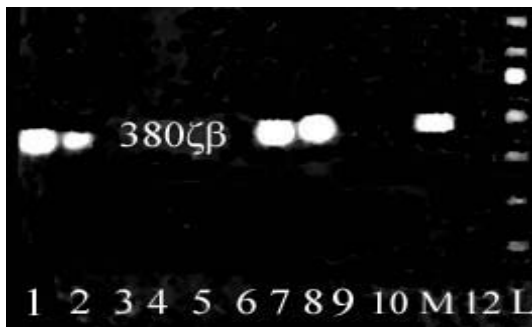
Στη συνέχεια, για την ανίχνευση του ιού επιλέχθηκε ο συνδυασμός των δύο μεθόδων με την ανάπτυξη αρχικά μιας RT-PCR όπως προτείνεται από τους Menzel κ.ά., (2002) ακολουθούμενη από μια εστιασμένη με τους εκκινητές CLSup και CLSdo (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006 γ,δ) καθώς, όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία.



Εικόνα 2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης προϊόντων RT-PCR με τη μέθοδο που προτείνουν οι Menzel κ.ά. (2002). Διαδρομή 1-10 δείγματα, M:θετικός μάρτυρας, 12:αρνητικός μάρτυρας, L:δείκτης μοριακού βάρους/100ζβ.



Εικόνα 2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης προϊόντων RT-PCR με τη μέθοδο που προτείνουν οι Μαθιουδάκης κ.ά. (2006 γ,δ). Διαδρομή 1-10 δείγματα, M:θετικός μάρτυρας, 12:αρνητικός μάρτυρας, L:δείκτης μοριακού βάρους/100ζβ.



Εικόνα 2.4. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της εστιασμένης PCR που προέκυψε από το συνδυασμό των δύο μεθόδων. Διαδρομή 1-10 δείγματα, M: θετικός μάρτυρας, 12:αρνητικός μάρτυρας, L:δείκτης μοριακού βάρους/100ζβ.

2.3.2.2. Μοριακή ανίχνευση του ιού

Από τα 743 δείγματα που ελέγχθηκαν συνολικά ο ιός ανιχνεύθηκε σε 154 φυτά-μέλη της οικογένειας *Rosaceae*, ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε είδη άλλων οικογενειών (Πίνακας 2.5).

Τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν στους νομούς Θεσσαλονίκης (53,8%), Κοζάνης (43,1%) και Κομοτηνής (38%), ενώ δεν ανιχνεύτηκε στους Νομούς Θεσπρωτίας, Άρτας, Πιερίας και Φθιώτιδας (Πίνακας 2.6).

Από τα καλλιεργούμενα είδη που ελέγχθηκαν, τα υψηλότερα ποσοστά προσβολής διαπιστώθηκαν στις μηλιές (72,7%), αμυγδαλιές (52,9%), αχλαδιές (50%), ροδακινιές (33,3%), δαμασκηνιές (31%), κυδωνιές (28,5%) και στις κερασιές (21%), ενώ δεν ανιχνεύθηκε στη βερικοκιά και τη βυσσινιά (Πίνακας 2.5).

Σε ορισμένα καλλωπιστικά διαπιστώθηκε υψηλή συχνότητα προσβολής (καλ. δαμασκηνιά 73,3% και καλ. κυδωνιά 38,7%), σε κάποια άλλα η συχνότητα ήταν μικρότερη (τριανταφυλλιά 7,7%, *Crataegus monogyna* 2,5%), ενώ δεν ανιχνεύθηκε στον πυράκανθο και στη δάφνη (Πίνακας 2.5) .

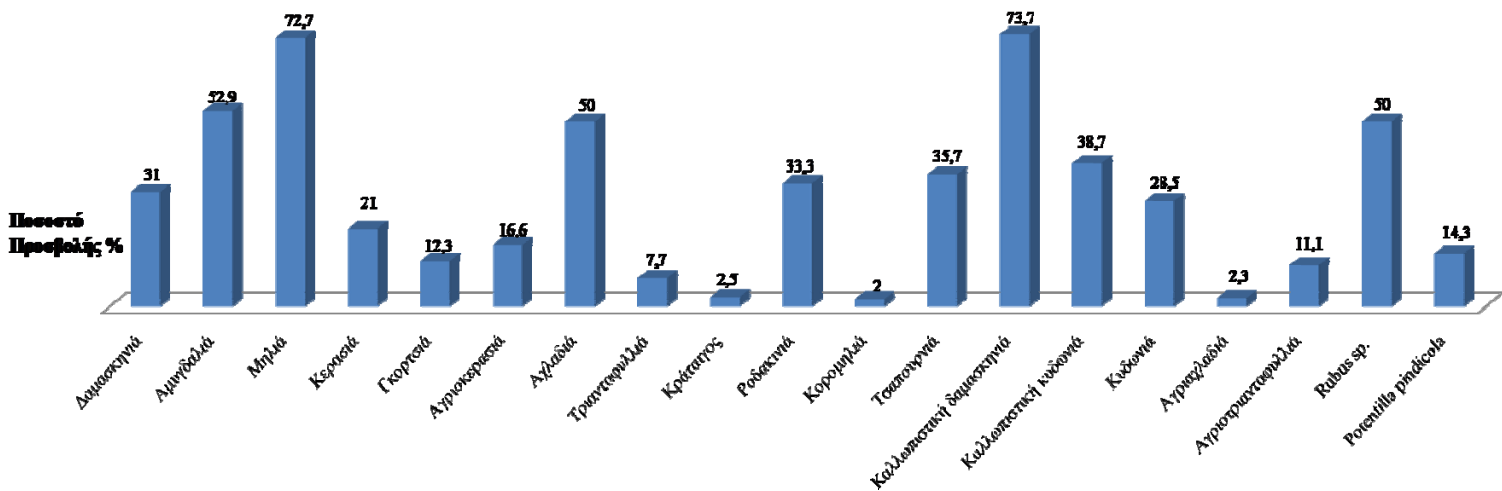
Και τα άγρια είδη εμφάνισαν ποικίλλουσα συχνότητα εμφάνισης του ιού καθώς ανιχνεύτηκε σε σημαντικό ποσοστό στα είδη *Rubus* sp. (50%), αγριοκερασιά (16,6%), τσαπουρνιά (35,7%), *Potentilla pindicola* (14,3%), γκορτσιά (12,3%) και αγριοτριανταφυλλιά (11,1%) ενώ ήταν πολύ χαμηλότερο στις αγριαχλαδιές (2,3%) και στις κορομηλιές (2%). Τέλος, ο ιός δεν ανιχνεύθηκε σε αγριομηλιές, αγριοκορομηλιές, σορβιές, αγριοαμυγδαλιές, στο μαχλέπι, καθώς και στα είδη *Celtis australis*, *Potentilla reptans*, *Spiraea chamaedryfolia*, *Centaurea huljakii*, μουριά, καστανιά, φουντουκιά, τζιτζιφιά και ροδιά (Πίνακας 2.5).

Πίνακας 2.5. Αριθμητής: Αριθμός δειγμάτων που ανιχνεύθηκε ο ACLSV με ορολογικές και μοριακές μεθόδους, Παρανομαστής: Συνολικός αριθμός δειγμάτων που ελέγχθηκαν, και ποσοστό προσβολής % που υπολογίστηκε από τα αποτελέσματα της μοριακής ανίχνευσης.

Είδος	Μέθοδος Ανίχνευσης			Ποσοστό προσβολής%
	ELISA		RT-PCR	
	Αντίσωμα BIOREBA	Αντίσωμα INRA		
<i>Prunus domestica</i>	1/29	1/29	9/29	31
<i>Prunus amygdalus</i>	0/17	0/17	9/17	52.9
<i>Prunus avium</i>	15/100	11/100	21/100	21
<i>Prunus avium L.</i>	13/36	3/36	6/36	16.6
<i>Prunus persica</i>	0/21	2/21	7/21	33.3
<i>Prunus maliformis</i>	0/50	1/50	1/50	2
<i>Prunus myrobalana</i>	0/5	0/5	0/5	0
<i>Prunus spinosa</i>	0/14	0/14	5/14	35.7
<i>Prunus carassifera</i>	5/38	15/38	28/38	73.7
<i>Prunus armeniaca</i>	0/16	0/16	0/16	0
<i>Prunus mahaleb</i>	0/5	0/5	0/5	0
<i>Prunus webbii</i>	0/8	0/8	0/8	0
<i>Prunus cerasus</i>	0/1	0/1	0/1	0
<i>Malus domestica</i>	5/22	8/22	16/22	72.7
<i>Malus communis</i>	0/12	3/12	0/12	0
<i>Malus sp.</i>	0/1	0/1	1/1	100
<i>Pyrus communis</i>	6/16	5/16	8/16	50.0
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	27/81	13/81	10/81	12.3
<i>Pyrus pyraster</i>	4/43	4/43	1/43	2.3
<i>Cydonia japonica</i>	0/62	20/62	24/62	38.7
<i>Cydonia obloga</i>	0/7	0/7	2/7	28.5
<i>Rosa canina</i>	4/26	0/26	2/26	7.7
<i>Rosa acicularis</i>	0/9	9/9	1/9	11.1
<i>Crataegus monogyna</i>	0/40	4/40	1/40	2.5
<i>Sorbus sp.</i>	0/23	1/23	0/23	0
<i>Pyracantha coccinea</i>	0/29	18/29	0/29	0
<i>Rubus sp.</i>	2/2	1/2	1/2	50
<i>Potentilla pindicola</i>	1/7	0/7	1/7	14.3
<i>Potentilla reptans</i>	1/2	1/2	0/2	0
<i>Spiraea chamaedryfolia</i>	0/1	0/1	0/1	0
<i>Morus sp.</i>	0/1	0/1	0/1	0
<i>Laurus sp.</i>	0/1	0/1	0/1	0
<i>Centaurea huljakii</i>	0/2	0/2	0/2	0
<i>Castanea sativa</i>	1/1	0/1	0/1	0
<i>Corylus avellana</i>	0/1	0/1	0/1	0
<i>Simmondsia chinensis</i>	0/1	0/1	0/1	0
<i>Punica granatum</i>	0/2	0/2	0/2	0
<i>Celtis australis</i>	0/11	1/11	0/11	0
Σύνολο	85/743	121/743	154/743	

Πίνακας 2.6. Ποσοστό προσβολής με τον ACLSV σε διάφορους νομούς της χώρας (στο σύνολο των δειγμάτων των διαφόρων ξενιστών που συλλέχθηκαν από κάθε νομό) .

Νομοί δειγματοληψίας	Ποσοστό προσβολής %
Κοζάνης	43,1
Κιλκίς	15
Γρεβενών	10,1
Πέλλας	21,9
Ιωαννίνων	18,7
Χαλκιδικής	4,9
Κομοτηνής	38
Θεσσαλονίκης	53,8
Θεσπρωτίας	0
Άρτας	0
Πρέβεζας	11,1
Περίας	0
Φθιώτιδας	0
Λάρισας	18,3



Εικόνα 2.5. Ποσοστά προσβολής από τον ACLSV των διαφόρων φυτικών ειδών

2.4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μια επισκόπηση προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία του ACLSV σε καλλιεργούμενα, καλλωπιστικά και αυτοφυή είδη της οικογένειας *Rosaceae*, καθώς και άλλων οικογενειών, με μοριακές (RT-PCR) και ορολογικές (ELISA) μεθόδους ανίχνευσης.

Για την μοριακή ανίχνευση του ιού αξιολογήθηκαν δύο μέθοδοι RT-PCR όπου, στην πρώτη χρησιμοποιούνται εκκινητές που ενισχύουν τμήμα της ΚΠ και 3'αμετάφραστης περιοχής του ιού και δίνουν προϊόν μήκους 677ζβ (Menzel κ.ά., 2002), ενώ στη δεύτερη χρησιμοποιούνται εκκινητές που ενισχύουν τμήμα της ΚΠ και δίνουν προϊόν μήκους 380ζβ (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006 γ,δ). Επίσης αξιολογήθηκε και ο μεταξύ τους συνδυασμός σε μια προσπάθεια αύξησης της ευαισθησίας της μεθόδου.

Τελικά, για την ανίχνευση του ιού επιλέχθηκε ο συνδυασμός και των δύο μεθόδων με την ανάπτυξη μιας RT-PCR όπως προτείνεται από τους Menzel κ.ά., (2002) ακολουθούμενη από μια εστιασμένη PCR χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών που ενισχύει προϊόν μήκους 380ζβ (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006 γ,δ). Η εστιασμένη PCR έχει ιδιαίτερη σημασία διότι αυξάνει την εξειδίκευση και την ευαισθησία ανίχνευσης ιών καθώς παρακάμπτει αναστολές της PCR (Rowhani κ.ά., 1995) με την εξειδικευμένη ενίσχυση ενός εσωτερικού τμήματος του προϊόντος της πρώτης γενικής RT-PCR επιβεβαιώνοντας και ενισχύοντας τα αποτελέσματά της, όπως διαπιστώθηκε και στην παρούσα μελέτη (Εικόνα 2.4).

Η μοριακή μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του ACLSV κρίθηκε ιδιαίτερα αξιόπιστη καθώς ο ιός ανιχνεύθηκε σε 154 δείγματα από καλλιεργούμενα, καλλωπιστικά και αυτοφυή είδη της οικογένειας *Rosaceae* (Πίνακας 2.5). Δεδομένου ότι οι περισσότερες μοριακές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα παρουσιάζουν μικρό εύρος ανίχνευσης διαφοροποιημένων απομονώσεων του ιού (Candresse κ.ά., 1995; Malinowski κ.ά., 1998), η μοριακή μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε προγράμματα ελέγχου μητρικών φυτειών για την παραγωγή πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού.

Η ορολογική δοκιμή ELISA που εφαρμόστηκε, κρίθηκε αναξιόπιστη και με τα δύο αντισώματα καθώς παρουσίασε μικρό εύρος ανίχνευσης. Πιθανόν, αυτό συνέβη εξ αιτίας του χαμηλού τίτλου του ιού στους ιστούς των φυτών-ξενιστών του ή και της

μεγάλης παραλλακτικότητας μεταξύ των απομονώσεων του (Candresse κ.ά., 1995; Kinard κ.ά., 1996; Kummert κ.ά., 1998; Malinowski κ.ά., 1998; Menzel κ.ά., 2002; Salmon κ.ά., 2002; Rwahnih κ.ά., 2004; Borisova, 2005). Επίσης η ELISA έδωσε σε αρκετές περιπτώσεις ψευδή θετικά αποτελέσματα καθώς ο ιός δεν ανιχνεύθηκε με την RT-PCR στα δείγματα αυτά (Πίνακας 2.5). Αυτό μπορεί να οφείλεται, είτε στην παρουσία άλλου ιού μέλους του ίδιου γένους όπως ο APCLSV που παρουσιάζει σταυροειδή αντίδραση με τον ACLSV (Liberti κ.ά., 2005), είτε στις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο φυτικό εκχύλισμα ορισμένων φυτικών ειδών και οι οποίες δεσμεύονται μη ειδικά στην πλάκα πολυστυρενίου δίδοντας θετική ορολογική αντίδραση.

Στην Ελλάδα, μέχρι σήμερα, ο ιός είχε ανιχνευθεί σε μηλιά, αχλαδιά, κυδωνιά, ροδακινιά, βερικοκιά, κερασιά και αμυγδαλιά από τα καλλιεργούμενα είδη, στο *Pyrus amygdaliformis* από τα αυτοφυή, και στα καλλωπιστικά *Cydonia japonica* και *Pyrus calleryana* (Βαρβέρη και Μπέμ, 1994; Varveri και Bem, 1995; Varveri, 1998; Mathioudakis κ.ά., 2007; Χαρού κ.ά., 2006; Χαρού, 2008; Μαθιουδάκης κ.ά., 2006α). Στην παρούσα μελέτη ο ιός ανιχνεύθηκε σε όλα τα προαναφερθέντα είδη με εξαίρεση την βερικοκιά, τη βυσσινιά και το είδος *Pyrus calleryana*.

Εκτός από τα παραπάνω, ο ιός ανιχνεύθηκε σε δαμασκηλιά καθώς και σε αγριοκερασιά, τριανταφυλλιά, κορομηλιά, *Crataegus monogyna*, τσαπουρνιά, καλλωπιστική δαμασκηλιά και *Rubus* sp. που αποτελούν είδη στα οποία η παρουσία του διαπιστώνεται για πρώτη φορά στη Ελλάδα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ανίχνευση του ACLSV στο αυτοφυές είδος *Potentilla pindicola*. Το εύρημα αυτό αποτελεί πρώτη αναφορά παγκοσμίως, ενώ θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των ξενιστών αυτών (άγρια είδη) στη διατήρηση του ιού στη φύση, στην εξάπλωση και την επιδημιολογία του, καθώς ο μοναδικός γνωστός τρόπος μετάδοσης του ιού είναι ο εμβολιασμός (Gilmer κ.ά., 1971).

Η συχνότητα εμφάνισης του ιού στα καλλιεργούμενα είδη που προέκυψε από την παρούσα μελέτη βρέθηκε υψηλή σε μηλιά (72,7%), αχλαδιά (50%), ροδακινιά (33,3%) και στην κερασιά (21%), ενώ σε παλαιότερες μελέτες ήταν πολύ χαμηλότερη [μηλιά (29,4-100%) , αχλαδιά (20,4-27,7%), ροδακινιά (25,9%), κερασιά (12,5%)] (Βαρβέρη και Μπέμ, 1994; Varveri και Bem, 1995; Varveri, 1998). Το ίδιο παρατηρήθηκε όταν συγκρίθηκε με την συχνότητα εμφάνισης του ιού από άλλες χώρες της Μεσογείου (Topchiiska, 1995; Myrta κ.ά., 2003; Borisova, 2005; Matić κ.ά., 2008). Οι διαφορές αυτές πιθανώς οφείλονται στο ότι οι παλαιότερες μελέτες πραγματοποιήθηκαν με ορολογικές δοκιμές που δεν διαθέτουν την αξιοπιστία των

μοριακών εξ αιτίας του χαμηλού τίτλου και της υψηλής παραλλακτικότητας του ιού (Candresse κ.ά., 1995; Kinard κ.ά., 1996; Kummert κ.ά., 1998; Malinowski κ.ά., 1998; Menzel κ.ά., 2002; Salmon κ.ά., 2002; Rwahnih κ.ά., 2004; Borisova, 2005).

Τέλος, εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι παρόλο που ελέγχθηκε μικρός αριθμός αυτοφυών ειδών, ο ιός παρουσίασε σημαντική συχνότητα εμφάνισης στα *Rubus* sp. (50%), αγριοκερασιά (16,6%), τσαπουρνιά (35,7%), *Potentilla pindicola* (14,3%), γκορτσιά (12,3%) και αγριοτριανταφυλλιά (11,1%) κάνοντας επιτακτική την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης ύπαρξης φορέα.

Κεφάλαιο 3**Μοριακή ανίχνευση ιών των γενών *Tricho-*, *Capillo-* και *Foveavirus* με την PDO RT-PCR σε αυτοφυή, καλλωπιστικά και καλλιεργούμενα φυτά της οικογένειας *Rosaceae*****3.1. Εισαγωγή**

Η οικογένεια *Flexiviridae* περιλαμβάνει τα γένη *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Allexivirus*, *Capillovirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus*, *Mandarivirus* και τους ελεύθερους ιούς BanMMV, CGRMV, CNRMV, CLBv, SCSMaV (Zhang κ.ά., 1998; Gambley και Thomas, 2001; Rott και Jelkmann, 2001β; Gallipienso κ.ά., 2001, Thompson και Randles, 2001; Adams κ.ά., 2004).

Η διαθεσιμότητα αρκετών αλληλουχιών συνέβαλε στην ανάπτυξη τεχνικών ανίχνευσης που βασίζονται στην RT-PCR και στοχεύουν σε συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος των ιών αυτών επιτρέποντας σε μία μόνο PCR την ταυτόχρονη ανίχνευση ιών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη. (Tian κ.ά., 1996; Routh κ.ά., 1998; Sabanadzovic κ.ά., 2000; Maliogka κ.ά., 2004). Αρχικά ταυτοποιήθηκαν πέντε περιοχές με συντηρημένες αλληλουχίες (μοτίβα I, II, V, VI, και VII) στο γονίδιο της RdRp των θετικής πολικότητας RNA ιών (Koonin, 1991) και αργότερα πραγματοποιήθηκαν ευθυγραμμίσεις των διαθέσιμων αλληλουχιών με στόχο τον εντοπισμό των ομόλογων αλληλουχιών της RdRp των αντιπροσωπευτικών ιών των γενών *Trichovirus*, *Capillovirus*, και *Foveavirus* (ACLSV, ASPV, ASGV, και CVA) καθώς και των ελεύθερων ιών CGRMV και CNRMV (Foissac κ.ά., 2005). Με βάση τις αλληλουχίες αυτές αναπτύχθηκε μια πολυδύναμη εστιασμένη (PDO) RT-PCR για την ανίχνευση των ιών που ανήκουν στα γένη *Trichovirus*, *Capillovirus* και *Foveavirus* και διαφόρων ελεύθερων ιών της οικογένειας με τη χρήση εκφυλισμένων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που περιέχουν ινোসίνη (Foissac κ.ά., 2005).

Στην παρούσα ενότητα της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή PDO RT-PCR για την ανίχνευση ιών που ανήκουν στα γένη *Trichovirus*, *Capillovirus* και *Foveavirus* καθώς και ελεύθερων ιών της οικογένειας *Flexiviridae* σε αυτοφυή, καλλωπιστικά και καλλιεργούμενα φυτά της οικογένειας *Rosaceae*.

3.2. Υλικά και μέθοδοι

3.2.1. Δείγματα που ελέγχθηκαν

Από το σύνολο των φυτικών ειδών που ελέγχθηκαν στην προηγούμενη ενότητα (Κεφάλαιο 2) επιλέχθηκαν 137 δείγματα, εκ των οποίων 34 εκδήλωναν συμπτώματα που δεν σχετίζονταν με προσβολή από τον ACLSV (παράγραφος 2.2.1, Πίνακας 3.1, Πίνακας 3.2). Στα δείγματα αυτά συμπεριλαμβάνονταν και 36 δείγματα θετικά στον ACLSV που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για την αξιολόγηση του εύρους ανίχνευσης της μεθόδου.

Για τη ανίχνευση των ιών που ανήκουν στα γένη *Fovea*-, *Tricho*- και *Capillo*- καθώς και των ελεύθερων μελών της οικογένειας χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ολικού RNA (ενότητα 2.2.3).

Πίνακας 3.1. Είδη φυτών που επιλέχθηκαν για την παρουσία ιών της οικογένειας *Flexiviridae*.

Είδος	Αριθμός φυτών που επιλέχθηκαν	Είδος	Αριθμός φυτών που επιλέχθηκαν
<i>Prunus amygdalus</i>	3	<i>Pyrus pyraister</i>	6
<i>Prunus cerasus</i>	1	<i>Prunus maliformis</i>	3
<i>Malus communis</i>	2	<i>Prunus cerassifera</i>	4
<i>Prunus webbii</i>	1	<i>Crataegus monogyna</i>	3
<i>Laurus sp.</i>	1	<i>Prunus avium L.</i>	8
<i>Punica granatum</i>	1	<i>Prunus domestica</i>	3
<i>Malus sp.</i>	1	<i>Cydonia japonica</i>	6
<i>Potentilla reptans</i>	1	<i>Celtis australis</i>	7
<i>Potentilla pindicola</i>	1	<i>Pyraccantha coccinea</i>	5
<i>Centaurea huljakii</i>	1	<i>Prunus armeniaca</i>	9
<i>Morus sp.</i>	1	<i>Sorbus sp.</i>	8
<i>Rubus sp</i>	2	<i>Malus domestica</i>	5
<i>Spiraea chamaedryfolia</i>	1	<i>Prunus spinisa</i>	3
<i>Castanea sativa</i>	1	<i>Pyrus communis</i>	7
<i>Cydonia obloga</i>	3	<i>Pyrus amygdaliformis</i>	11
<i>Prunus mahaleb</i>	2	<i>Prunus avium</i>	17
<i>Prunus maliformis</i>	3	<i>Rosa acicularis</i>	3
<i>Rosa canina</i>	3		

Πίνακας 3.2. Είδη φυτών που έφεραν συμπτώματα παρόμοια με αυτά που προκαλούν οι ιοί.

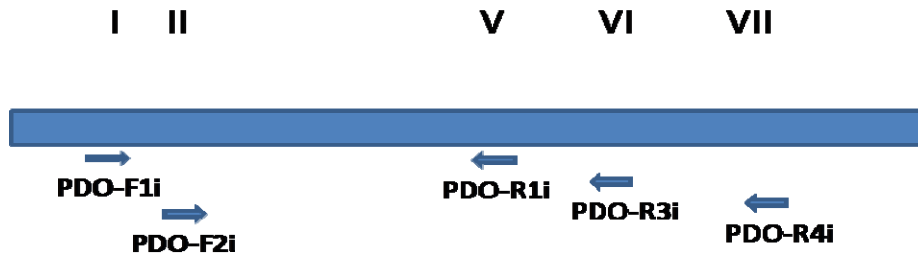
Είδος	Αριθμός φυτών που έφεραν συμπτώματα	Συμπτώματα					
		Συστροφή των φύλλων	Στένωση φύλλων	Μωσαϊκό στα φύλλα	Δεσμίωση βλαστού	Παραμόρφωση καρπών	Δακτυλιοειδή σχέδια στα φύλλα
<i>Morus sp.</i>	1	-	-	1/1	-	-	-
<i>Cydonia obloga</i>	2	-	-	2/2	-	-	-
<i>Rosa canina</i>	1	-	-	1/1	-	-	-
<i>Pyrus pyraster</i>	3	-	-	3/3	-	-	-
<i>Celtis australis</i>	7	-	-	7/7	-	-	-
<i>Prunus armeniaca</i>	7	4/7	-	7/7	-	-	1/7
<i>Pyrus communis</i>	2	-	-	1/2	1/2	-	-
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	1	-	-	1/1	-	-	-
<i>Prunus avium</i>	10	1/10	1/10	7/10	-	1/10	-

3.2.2. Μοριακή ανίχνευση με την PDO RT-PCR

Ως εκμαγείο (2μl) για τη σύνθεση του c-DNA χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα του ολικού RNA που παραλήφθηκε από τον φυτικό ιστό κατά την προετοιμασία του δείγματος και ακολούθησε PCR στον ίδιο μικροσωλήνα των 0,2 ml σε τελικό όγκο διαλύματος 25μl (βλέπε Παράρτημα 6). Για την RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PDO-F1i, PDO-R3i, και PDO-R4i (Foissac κ.ά., 2005), των οποίων η συγκέντρωση στην αντίδραση είναι 1μM και η θερμοκρασία υβριδοποίησης 42°C (Πίνακας 3.3, Εικόνα 3.1).

Για την εστιασμένη PCR χρησιμοποιήθηκε 1 μl από το προϊόν της RT-PCR σε τελικό όγκο διαλύματος 20 μl και οι εκκινητές PDO-F2i και PDO-R1i (Foissac κ.ά., 2005) σε συγκέντρωση 1 μM και θερμοκρασία υβριδοποίησης 42°C (Πίνακας 3.3, Εικόνα 3.1) (βλέπε Παράρτημα 6). Η ανίχνευση του τελικού προϊόντος της εστιασμένης PCR (362ζβ) έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Συντηρημένες περιοχές στην πολυμεράση



Εικόνα 3.1. Συντηρημένες περιοχές (motifs) του γονιδίου της πολυμεράσης που εδράζουν οι εκφυλισμένοι εκκινητές της PDO RT-PCR.

Πίνακας 3.3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PDO RT-PCR και μέγεθος παραγόμενου προϊόντος.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Προϊόν	
PDO-R3i	5' GCRCACATRTCRTCiCCiGCRAAiiA 3' (motif VI)	446ζβ	
PDO-F1i	5' TiTTYATKAARWSiCARYWiTGiAC 3' (motif I)		631ζβ
PDO- R4i	5' ARiYiCCATCCRCARAAMiTiGG 3' (motif VII)		
PDO-F2i	5' GCYAARGCiGGiCARACiYTKGCiTG 3' (motif II)	362ζβ	
PDO-R1i	5' TCHCCWGTRAAiCKSATiAiiGC 3' (motif V)		

R= A ή G, i= G, Y= C ή T, K= G ή T, W= A ή T, S= C ή G, M= A ή C, H= A ή C ή T

3.2.3. Προσδιορισμός τμήματος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ιών της οικογένειας *Flexiviridae* που ανιχνεύθηκαν με την PDO RT-PCR

Αλληλουχήθηκε τμήμα της RdRp τεσσάρων ιών μελών της *Flexiviridae* που ενισχύθηκαν κατά την εστιασμένη PDO RT-PCR τα οποία δεν έδωσαν προϊόν κατά τον εξειδικευμένο έλεγχο για τον ACLSV.

Μετά την εξαγωγή του προϊόντος της εστιασμένης PCR από την πηκτή αγαρόζης (Βλέπε Παράρτημα 7) το καθαρό προϊόν χρησιμοποιήθηκε για απευθείας αλληλούχηση. Για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Βλέπε παράρτημα 8.A) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PDO-F2i και PDO-R1i. Τέλος, οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων του NCBI (National Centre for Biotechnology Information Bethesda USA) με εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST.

3.3. Αποτελέσματα

3.3.1. Μοριακή ανίχνευση ιών της οικογένειας *Flexiviridae* με την PDO RT-PCR

Από τα 137 δείγματα που ελέγχθηκαν με την PDO RT-PCR, η παρουσία ιών μελών της οικογένειας *Flexiviridae* ανιχνεύθηκε στα 22 (Πίνακας 3.4). Από τα 22 δείγματα που ενισχύθηκαν κατά την εστιασμένη PDO RT-PCR ο ACLSV δεν είχε ανιχνευθεί σε 7 κατά τον εξειδικευμένο έλεγχο.

Τέλος, ο συσχετισμός των συμπτωμάτων που παρουσίαζαν 34 φυτά από τα οποία έγινε η δειγματοληψία με τα αποτελέσματα της PDO RT-PCR, φαίνεται να είναι εφικτός στην περίπτωση της κερασιάς, καθώς σε 7 από τις 10 που παρουσίασαν συμπτώματα ανιχνεύθηκαν ιοί-μέλη της *Flexiviridae* (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.4. Συνολικός αριθμός δειγμάτων που ελέγχθηκαν και αριθμός δειγμάτων στα οποία διαπιστώθηκε η παρουσία ιών της οικογένειας *Flexiviridae* με την PDO RT-PCR

Είδος	Αριθμός δειγμάτων που ελέγχθηκαν	Αριθμός δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν ιοί-μέλη της <i>Flexiviridae</i>
<i>Morus</i> sp.	1	0
<i>Cydonia obloga</i>	3	0
<i>Rosa canina</i>	3	0
<i>Pyrus pyraister</i>	6	0
<i>Celtis australis</i>	7	0
<i>Prunus armeniaca</i>	9	0
<i>Pyrus communis</i>	7	2
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	11	1
<i>Prunus avium</i>	17	10
<i>Prunus amygdalus</i>	3	0
<i>Prunus cerasus</i>	1	1
<i>Malus communis</i>	2	0
<i>Prunus webbii</i>	1	0
<i>Laurus</i> sp.	1	0
<i>Punica granatum</i>	1	0
<i>Malus</i> sp.	1	0
<i>Potentilla reptans</i>	1	0
<i>Potentilla pindicola</i>	1	0
<i>Centaurea huljakii</i>	1	0
<i>Rubus</i> sp.	2	0
<i>Spiraea chamaedryfolia</i>	1	0
<i>Castanea sativa</i>	1	0
<i>Prunus mahaleb</i>	2	0
<i>Prunus maliformis</i>	3	0
<i>Prunus myrobalana</i>	3	0
<i>Prunus cerassifera</i>	4	3
<i>Crataegus monogyna</i>	3	0
<i>Prunus avium</i> L.	8	0
<i>Prunus domestica</i>	3	0
<i>Cydonia japonica</i>	6	0
<i>Pyracantha coccinea</i>	5	0
<i>Sorbus</i> sp.	8	0
<i>Malus domestica</i>	5	5
<i>Prunus spinosa</i>	3	0
<i>Rosa acicularis</i>	3	0
Σύνολο	137	22

Πίνακας 3.5. Είδη φυτών που έφεραν συμπτώματα ιολογικών προσβολών καθώς και αριθμός φυτών στα οποία ανιχνεύθηκε ο ACLSV και ιοί της οικ. *Flexiviridae* με την PDO RT-PCR.

Είδος	Αριθμός φυτών με συμπτώματα ιολογικών προσβολών	Αριθμός φυτών προσβεβλημένων με τον ACLSV	Αριθμός φυτών προσβεβλημένων από ιούς της οικογένειας <i>Flexiviridae</i>
<i>Morus</i> sp.	1	0	0
<i>Cydonia obloga</i>	2	2	0
<i>Rosa canina</i>	1	0	0
<i>Pyrus pyraister</i>	3	0	0
<i>Celtis australis</i>	7	0	0
<i>Prunus armeniaca</i>	7	0	0
<i>Pyrus communis</i>	2	1	1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	1	1	1
<i>Prunus avium</i>	10	2	7
Σύνολο	34	6	9

3.3.2. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ιών που ανιχνεύθηκαν με την PDO RT-PCR.

Επιλέχθηκαν 4 από τα 7 δείγματα που ενισχύθηκαν κατά την εστιασμένη PDO RT-PCR (3 κερασιές και 1 μηλιά), στα οποία ο ACLSV δεν είχε ανιχνευθεί κατά τον εξειδικευμένο έλεγχο (Πίνακας 3.4). Μετά από απευθείας αλληλούχηση του προϊόντος, προσδιορίστηκε τμήμα της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας και επιβεβαιώθηκε η ιική τους προέλευση. Η μετάφραση των νουκλεοτιδίων σε αμινοξέα έδειξε υψηλή ομολογία με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες του γονιδίου της RdRp των ACLSV και CGRMV στα 3 δείγματα κερασιάς και του ASPV στην μηλιά. [Η μετάφραση σε αμινοξέα έγινε με το πρόγραμμα [EMBOSSTranseq](http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/) (www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/) της EMBL-EBI].

Πιο συγκεκριμένα η απομόνωση μηλιάς του ASPV εμφανίζει 92,9% ομολογία σε αμινοξέα με την απομόνωση D21829 από αγλαδιά (Jelkman κ.ά., 1994), ενώ σε επίπεδο νουκλεοτιδίων η ομολογία είναι πιο χαμηλή (83,0%). Η απομόνωση του ACLSV εμφανίζει 95,0% ομολογία σε αμινοξέα με την απομόνωση AF413955 από κερασιά (Foissac κ.ά., 2005), ενώ σε επίπεδο νουκλεοτιδίων η ομολογία είναι πιο χαμηλή 92,0%. Η απομόνωση CGRMV 1 παρουσιάζει μεγαλύτερη ομολογία σε

επίπεδο αμινοξέων και νουκλεοτιδίων (82,5% και 75% αντίστοιχα) με την απομόνωση AJ291761 (άγνωστος ξενιστής) (Gentit κ.ά., 2001), ενώ η απομόνωση CGRMV 2 παρουσιάζει μεγαλύτερη ομολογία σε επίπεδο αμινοξέων και νουκλεοτιδίων (95,1% και 89% αντίστοιχα) με την απομόνωση AF017780 (άγνωστος ξενιστής) (Zhang κ.ά., 1998). Η σύγκριση των δύο απομονώσεων του CGRMV μεταξύ τους έδειξε μια ομολογία 82,5% σε επίπεδο αμινοξέων.

Οι αλληλουχίες των ASPV, ACLSV, CGRMV 1 και CGRMV 2 αναφέρονται στο Παράρτημα 9.

3.4. Συζήτηση

Πρόσφατα αναπτύχθηκε μια μοριακή μέθοδος ταυτόχρονης ανίχνευσης ιών-μελών των γενών *Trichovirus*, *Capillovirus*, και *Foveavirus* που στηρίζεται στη χρήση εκφυλισμένων εκκινητών που περιέχουν ινοσίνη και ενισχύουν τμήμα συντηρημένων γενωμικών περιοχών του γονιδίου της RdRp (Foissac κ.ά., 2005). Παρόλο που από το επίπεδο του γένους και πάνω από αυτό υπάρχουν λίγες τέτοιες περιοχές, τα συντηρημένα μοτίβα που εντοπίζονται στην περιοχή της RdRp των ιών-μελών της *Flexiviridae* καθιστούν δυνατή την ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης (Koonin, 1991). Σχεδιασμός εκκινητών, που στοχεύουν σε τέτοια συντηρημένα μοτίβα, για την ανάπτυξη εξειδικευμένων μεθόδων ανίχνευσης σε επίπεδο γένους, έχει αναφερθεί για ιούς των γενών *Viti-* (Saldarelli κ.α, 1998), *Carmo-* (Morozov κ.α, 1995), *Tymo-* (Sabanadzovic κ.ά., 2000), *Marafi-* (Sabanadzovic κ.ά., 2000) και *Ilarviruses* (Maliogka κ.ά., 2007).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η PDO RT-PCR για τον έλεγχο 137 δειγμάτων που είχαν αξιολογηθεί και στην προηγούμενη ενότητα εργασίας (Κεφάλαιο 2), για να διερευνηθεί η παρουσία προσβολών με άλλους ιούς-μέλη της οικογένειας *Flexiviridae*. Επιλέχθηκαν δείγματα από το σύνολο των φυτικών ειδών που μελετήθηκαν για την παρουσία του ACLSV, με έμφαση σε φυτά που έφεραν συμπτώματα ιολογικών προσβολών τα οποία δεν σχετίστηκαν με τον ACLSV. Επίσης, για την αξιολόγηση του εύρους ανίχνευσης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν 36 δείγματα ως θετικοί μάρτυρες στα οποία ανιχνεύτηκε ο ACLSV κατά τον εξειδικευμένο έλεγχο.

Από το σύνολο των 137 δειγμάτων που αξιολογήθηκαν με την PDO RT-PCR στην παρούσα μελέτη, η παρουσία ιών μελών της οικογένειας *Flexiviridae* διαπιστώθηκε στα 22 (Πίνακας 3.4).

Επιλέχθηκαν 4 (3 κερασιές και 1 μηλιά) από τα 7 δείγματα στα οποία δεν ανιχνεύθηκε ο ACLSV κατά τον εξειδικευμένο έλεγχο, ενώ η PDO RT-PCR ανέδειξε την παρουσία ιών της *Flexiviridae* σε αυτά, και αλληλουχήθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ιού που ενισχύθηκε. Η μετάφραση των νουκλεοτιδίων σε αμινοξέα έδειξε υψηλή ομολογία με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες του γονιδίου της RdRp πολυμεράσης των ACLSV και CGRMV σε ένα και δύο δείγματα κερασιάς αντίστοιχα, καθώς και του ASPV στην μηλιά. Πρόσφατα σε επισκοπίσεις οπωρώνων κερασιάς για προσβολή από ιούς με γενικές μεθόδους RT-PCR ανιχνεύθηκαν οι ιοί PDV, LChV-1, CNRMV και PNRSV, ενώ δεν είχε ανιχνευθεί ο CGRMV (Μαλιόγκα κ.ά., 2006). Στην παρούσα εργασία ο CGRMV ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε κερασιά στην Ελλάδα.

Παρά το γεγονός ότι με την PDO RT-PCR κατέστη δυνατή η ανίχνευση των ACLSV, CGRMV και ASPV, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι δεν μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο εργαλείο σε προγράμματα ελέγχου για την εξειδικευμένη ανίχνευση του ACLSV καθώς η ευαισθησία της, συγκρινόμενη με την ευαισθησία της εξειδικευμένης μεθόδου που αναπτύχθηκε στην προηγούμενη ενότητα εργασίας, κρίθηκε περιορισμένη (η PDO RT-PCR ανίχνευσε τον ιό σε 15 από τα 36 δείγματα) (Πίνακας 3.4). Δεδομένου ότι ο ιός δεν ανιχνεύθηκε κυρίως σε άγρια και καλλωπιστικά είδη (καλλωπιστική κυδωνιά, τσαπουρνιά, τριανταφυλλιά, αγριαχλαδιά, *Potentilla pindicola*, *Rubus* sp.), η υψηλή παραλλακτικότητα του ιού φαίνεται να αποτελεί μια πιθανή εξήγηση.

Συσχετισμός μεταξύ της παρουσίας συμπτωμάτων και προσβολής από ιούς-μέλη της *Flexiviridae* φαίνεται να είναι εφικτός στην κερασιά, καθώς σε 7 από τα 10 δείγματα που έφεραν συμπτώματα ανιχνεύθηκαν ιοί-μέλη της *Flexiviridae*. Παρά το γεγονός ότι από δύο συμπτωματικά φυτά κερασιάς απομονώθηκε ο CGRMV, θα ήταν λανθασμένη η συσχέτιση του συγκεκριμένου ιού με τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν καθώς τα δέντρα μπορεί να φέρουν μικτές προσβολές από διαφορετικούς ιούς με αποτέλεσμα η οποιαδήποτε σύνδεση συγκεκριμένης συμπτωματολογίας με έναν συγκεκριμένο ιό ή απομόνωση να είναι τις περισσότερες φορές αδύνατη (Nemeth, 1986).

Στην παρούσα εργασία δεν διαπιστώθηκαν μικτές προσβολές. Φαίνεται πως υπάρχει ένας περιορισμός στην ευαισθησία ταυτόχρονης ανίχνευσης διαφορετικών ιών δεδομένου ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η PDO μπορεί να ενισχύσει και τους δύο

παράγοντες, ενώ σε άλλες μόνο τον έναν. Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε ανταγωνισμό μεταξύ διαφορετικών cDNAs μορίων κατά την διαδικασία της ενίσχυσης (Foissac κ.ά., 2005). Επομένως, θα έπρεπε να δίνεται μεγάλη προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της PDO RT-PCR γιατί η ανίχνευση ενός ιού δεν μπορεί να αποκλείσει την παρουσία άλλου(ων) (Foissac κ.ά., 2005).

Παρά τους περιορισμούς που προέκυψαν στην παρούσα εργασία, η PDO RT-PCR κρίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο καθώς δύναται να ανιχνεύει και αγνώστους ιούς-μέλη της οικογένειας *Flexiviridae* όπως συνέβη στην περίπτωση του APCLSV (Liberti κ.ά., 2004) δίνοντας τη δυνατότητα, μέσω αλληλούχησης των προϊόντων της, να αναπτυχθούν εξειδικευμένες, για τους παράγοντες αυτούς, μέθοδοι ανίχνευσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης και της 3΄Αμετάφραστης περιοχής του ACLSV

4.1. Εισαγωγή

Οι γενετικές μεταβολές των θετικής πολικότητας RNA ιών αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς εξέλιξης τους, και οφείλονται σε μεταλλάξεις και σε ανασυνδυασμό του γονιδιώματος (Dolja και Carrington, 1992; Drake, 1993; Domingo και Holland, 1997). Οι μεταβολές αυτές στη δομή του RNA μπορεί να επηρεάσουν την αναπαραγωγή των ιών καθώς και την ένταση των συμπτωμάτων (Graves κ.ά., 1996; Hernandez κ.ά., 1996; Cheng κ.ά., 2002). Η παραλλακτικότητα των RNA ιών εντοπίζεται κατά μήκος του συνόλου του γονιδιώματος με συνηθέστερα πιο συντηρημένη εξελικτικά περιοχή αυτή του γονιδιώματος της RdRp (Dolja και Carrington, 1992; Zaccomer κ.ά., 1995) ενώ το γονίδιο της ΚΠ συνήθως εμφανίζει παραλλακτικότητα, και εξαιτίας του ρόλου της στην εξειδίκευση των ικών οροτύπων, χρησιμοποιείται συχνά σε φυλογενετικές αναλύσεις (Dolja και Carrington, 1992; Zaccomer κ.ά., 1995; Canizares κ.ά., 2001β).

Μελέτες της γενετικής παραλλακτικότητας του ACLSV περιλαμβάνουν αλληλουχίες απομονώσεων καλλιεργούμενων ειδών (πυρηνόκαρπα, γιγαρτόκαρπα) (Candresse κ.ά., 1995; Rwahnih κ.ά., 2004; Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β; Ulubas Serce και Rosner, 2006), ενώ μέχρι σήμερα η παραλλακτικότητα απομονώσεων από καλλωπιστικά και αυτοφυή είδη δεν έχει μελετηθεί. Φυλογενετικές αναλύσεις που βασίστηκαν σε αλληλουχίες μήκους 677ζβ της ΚΠ και της 3΄αμετάφραστης περιοχής διαφόρων απομονώσεων του ιού (Rwahnih κ.ά., 2004; Candresse κ.ά., 2006; Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β) έδειξαν καλύτερη ομαδοποίηση ως προς τον ξενιστή σε σχέση με άλλες που βασίστηκαν σε μικρότερου μήκους αλληλουχίες της ΚΠ (Candresse κ.ά., 1995; Ulubas Serce και Rosner, 2006), ενώ δεν ήταν δυνατή η διαφοροποίηση των απομονώσεων του ιού με βάση την γεωγραφική τους προέλευση (Candresse κ.ά., 1995; Rwahnih κ.ά., 2004; Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β; Candresse κ.ά., 2006).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι εξελικτικές σχέσεις απομονώσεων του ACLSV από διάφορους ξενιστές και περιοχές της χώρας. Στις φυλογενετικές αναλύσεις συμπεριλήφθησαν αλληλουχίες τμήματος του γονιδίου της ΚΠ και της 3' αμετάφραστης περιοχής μήκους 677ζβ 14 ελληνικών καθώς και δημοσιευμένων απομονώσεων του ιού.

4.2. Υλικά και μέθοδοι

4.2.1. Μοριακή ανίχνευση απομονώσεων του ACLSV

Από κάθε φυτικό είδος στο οποίο διαπιστώθηκε η παρουσία του ACLSV (παράγραφος 2.3.2.2, Πίνακας 2.5) επιλέχθηκαν τουλάχιστον δύο δείγματα με στόχο τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.

Η RT-PCR που ανέπτυξαν οι Menzel κ.ά. (2002) αδυνατούσε να ανιχνεύσει την πλειονότητα των απομονώσεων του ιού (παράγραφος 2.3.2.1). Επομένως, κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη μιας RT-PCR που θα χρησιμοποιεί τον καθοδικό εκκινητή ACLSV Menz do και έναν νέο ανοδικό εκκινητή, και η οποία θα ακολουθείται από μία εστιασμένη PCR με τους εκκινητές ACLSV Menz up και ACLSV Menz do που δίνουν προϊόν μήκους 677ζβ.

4.2.1.1. Ανάπτυξη εξειδικευμένης RT-PCR σε δύο μικροσωλήνες για την ανίχνευση απομονώσεων του ACLSV

4.2.1.1.1. Σχεδιασμός του εκκινητή

Για τον σχεδιασμό εξειδικευμένου ανοδικού εκκινητή, με όσο το δυνατόν μεγαλύτερο εύρος ανίχνευσης απομονώσεων του ιού, επιλέχθηκε μια συντηρημένη περιοχή μετά από στοίχιση ομόλογων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της ΚΠ ορισμένων κατατεθειμένων στην τράπεζα γενετικών πληροφοριών EMBL-EBI απομονώσεων του ACLSV, με το πρόγραμμα CLUSTAL-X (Εικόνα 4.1). Η αλληλουχία του εκκινητή που σχεδιάστηκε (ACLSV CP UP1) ήταν 5'-CRGAARRCAGACCYCTTCATG-3' (Tm=47-59°C και όπου R=A/G και Y=C/T).



Εικόνα 4.1. Στοίχιση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων τμήματος της ΚΠ 13 απομονώσεων του ACLSV από διάφορους ξενιστές. Η στοίχιση έγινε με το πρόγραμμα CLUSTAL-X. Με το πράσινο πλαίσιο σημειώνεται η συντηρημένη περιοχή που επιλέχθηκε για τον σχεδιασμό του ανοδικού εκκινητή, ενώ ο τελικός εκκινητής που επιλέχθηκε (ACLSV CP UP 1) αναφέρεται κάτω από τις ευθυγραμμίσεις.

4.2.1.1.2. Ανάπτυξη RT-PCR σε δύο μικροσωλήνες

Για τη σύνθεση του cDNA εφαρμόστηκε η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Trascription, RT) σε έναν μικροσωλήνα των 0,2ml με εκμαγείο 2 μl εκχυλίσματος ολικού RNA και τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Το διάλυμα της αντίδρασης περιείχε: 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 0,5mM από κάθε dNTP, 1μM εκκινητή ολιγοθυμίνης [oligo d(T) 18-mere], 15 μονάδες αναστολέα ριβονουκλεασών Ribonouclease inhibitor (HT Biotechnology, England), 60 μονάδες αντίστροφη μεταγραφάση (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, MMLV, Invitrogen, The Netherlands) και νερό που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20 μl. Η αντίδραση της RT πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Mastercyclegradient, Eppendorf) σύμφωνα με το ακόλουθο προφίλ: 42⁰C για 60' και 75⁰C για 15'.

Ακολούθως, 1 μl cDNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την εκτέλεση της PCR, σε μικροσωλήνα των 0,2ml. Το διάλυμα της αντίδρασης περιείχε: 10mM Tris-HCl (pH 8.8), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 5%DMSO, 0,2mM από κάθε dNTP, 0,4μM από τον εκκινητή ACLSV Menz do και 0,5μM από τον εκκινητή ACLSV CP UP 1, 1 μονάδα DynazymeTM II DNA πολυμεράση (Finnzymes, Finland) και συμπληρώθηκε μέχρι τα 20μl με απεσταγμένο νερό που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC.

Το θερμικό προφίλ που επιλέχθηκε ήταν το ακόλουθο: 95⁰C για 5' και 40 κύκλοι στους 95⁰C για 30'', 57⁰C για 30'' και 72⁰C για 30''. Τέλος, η αντίδραση ολοκληρώνεται με επώαση στους 72⁰C για 2', για συμπλήρωση των ημιτελών αλυσίδων.

4.2.1.1.3. Εστιασμένη PCR

Για την εφαρμογή της εστιασμένης PCR, ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε 1μl από το προϊόν της PCR (παράγραφος 4.2.1.1.2). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωλήνα των 0,2 ml σε τελικό όγκο 20μl. Το διάλυμα της αντίδρασης περιείχε: 10mM Tris-HCl (pH 8.8), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 3% DMSO, 0,2mM από κάθε dNTP, 0,4μM από τον εκκινητή ACLSV Menz up και 0,4μM από τον εκκινητή ACLSV Menz do, μια μονάδα DynazymeTM II DNA πολυμεράση (Finnzymes, Finland) και νερό που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC μέχρι να φτάσει το διάλυμα τα 20μl. Η αντίδραση της εστιασμένης PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Mastercyclegradient, Eppendorf) και το τελικό προφίλ με τις βελτιστοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν το ακόλουθο: 95⁰C για 5' και ακολούθησαν 40 κύκλοι στους 95⁰C για 30'', 56⁰C για 30'' και 72⁰C για 30''. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ένα τελευταίο στάδιο επέκτασης στους 72⁰C για 2'. Η ανίχνευση των τελικών προϊόντων της PCR μήκους 677ζβ έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (βλέπε παράρτημα 5).

4.2.2. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ΚΠ

Για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (βλέπε παράρτημα 8.B) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ACLSV Menz up- ACLSV Menz do (Πίνακας 2.4).

Οι αλληλουχίες των ελληνικών απομονώσεων συγκρίθηκαν με αλληλουχίες καταχωρημένες στη βάση δεδομένων του NCBI με εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST. Τα ποσοστά ομοιότητας σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, μεταξύ των ελληνικών απομονώσεων προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>).

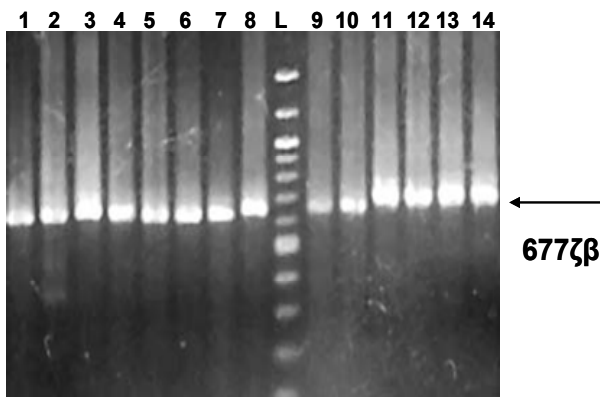
4.2.3. Φυλογενετική ανάλυση

Για τη μελέτη της φυλογενετικής συγγένειας πραγματοποιήθηκε στοίχιση των αλληλουχιών νουκλεοτιδίων του γονιδίου της ΚΠ και της 3΄αμετάφραστης περιοχής απομονώσεων του ACLSV που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία με τις ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες. Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την εντολή ‘Alignment Explorer’ του προγράμματος MEGA έκδοση 4 (Tamura κ.ά., 2007). Τα κατάλληλα μοντέλα αντικατάστασης νουκλεοτιδίων βρέθηκαν με το FINDMODEL (<http://hcv.lanl.gov/content/hcvdb/findmodel/findmodel.html>). Για τις φυλογενετικές αναλύσεις επιλέχθηκε το μοντέλο εξέλιξης GTR+G. Ο υπολογισμός των φυλογενετικών δέντρων έγινε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood, ML) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο PHYML (Guindon και Gascuel, 2003). Η αξιοπιστία της φυλογενετικής υπόθεσης αξιολογήθηκε με τη χρησιμοποίηση της μη παραμετρικής ανάλυσης bootstrap (NPB).

4.3. Αποτελέσματα

4.3.1. Μοριακή ανίχνευση απομονώσεων του ACLSV

Με την εστιασμένη PCR που αναπτύχθηκε στην παρούσα ενότητα προσδιορίστηκαν συνολικά οι αλληλουχίες 14 απομονώσεων του ιού που προήλθαν από 11 είδη (μηλιά, κερασιά, γκορτσιά, αχλαδιά, τσαπουρνιά, καλλωπιστική κυδωνιά, καλλωπιστική δαμασκηλιά, κυδωνιά, *Rubus* sp., *Potentilla pindicola* και καλλωπιστική μηλιά (Εικόνα 4.2, Πίνακας 4.1), ενώ δεν ήταν δυνατός ο πολλαπλασιασμός της ομόλογης περιοχής στα υπόλοιπα 9 είδη (δαμασκηλιά, αμυγδαλιά, ροδακινιά, κορομηλιά, αγριαχλαδιά, κράταιγο, αγριοκερασιά, αγριοτριανταφυλλιά και τριανταφυλλιά). Οι αλληλουχίες των 14 απομονώσεων που προσδιορίστηκαν αναφέρονται στο Παράρτημα 9.



Εικόνα 4.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της εστιασμένης PCR σε πηκτή αгарόζης. Διαδρομή L:δείκτης μοριακού βάρους / 100ζβ. Διαδρομές 1-8 και 9-14 οι απομονώσεις που πολλαπλασιάστηκαν.

Πίνακας 4.1. Γεωγραφική προέλευση, ξενιστής και κωδικός πρόσβασης στη βάση δεδομένων EMBL-EBI των απομονώσεων που αλληλουχήθηκαν.

Απομόνωση	Προέλευση	Ξενιστής	Κωδικός πρόσβασης
274-Chal	Χαλκιδική	<i>Pyrus amygdaliformis</i> (γκορτσιά)	FN391009
ACLSV-MET	Μέτσοβο	<i>Malus domestica</i> (μηλιά)	FN386786
347-Io	Ιωάννινα	<i>Malus</i> sp. (καλλωπιστική μηλιά)	FN391007
321-Io	Ιωάννινα	<i>Malus domestica</i> (μηλιά)	FN391011
156-Ki	Κιλκίς	<i>Prunus spinosa</i> (τσαπουρνιά)	FN391008
ACLSV-KOM	Κομοτηνή	<i>Pyrus communis</i> (αχλαδιά)	FN386788
571-Kom	Κομοτηνή	<i>Cydonia obloga</i> (κυδωνιά)	FN391013
534-Kom	Κομοτηνή	<i>Cydonia obloga</i> (κυδωνιά)	FN391012
236-Io	Ιωάννινα	<i>Prunus cerassifera</i> (καλ. δαμασκηλιά)	FN391014
239-Io	Ιωάννινα	<i>Prunus cerassifera</i> (καλ. δαμασκηλιά)	FN391015
ACLSV-POT	Κιλκίς	<i>Potentilla pindicola</i>	FM992664
260-Kom	Κομοτηνή	<i>Cydonia japonica</i> (καλ. κυδωνιά)	FN391010
155-Ki	Κιλκίς	<i>Rubus</i> sp.	FN391016
146-Pe	Πέλλα	<i>Prunus avium</i> (Κερασιά)	FN391006

4.3.2. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της ΚΠ και της 3' αμετάφραστης περιοχής

Τα αποτελέσματα της συγκριτικής ανάλυσης των αλληλουχιών των απομονώσεων αναδεικνύουν την ύπαρξη υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας στο γονίδιο της ΚΠ και της 3' αμετάφραστης περιοχής του ACLSV (Εικόνα 4.5). Τα ποσοστά παραλλακτικότητας μεταξύ των ελληνικών απομονώσεων ήταν 0-24% και 0-12% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, αντίστοιχα (Πίνακας 4.2). Η μικρότερη παραλλακτικότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων παρατηρήθηκε μεταξύ των απομονώσεων 236-Io και 239-Io (0%), και ACLSV-MET και 347-Io (1%), ενώ η μεγαλύτερη μεταξύ των απομονώσεων ACLSV-POT, 146-Pe, 156-Ki, 260-Kom και 155-Ki (21-24%). Σε επίπεδο αμινοξέων η μικρότερη παραλλακτικότητα (0%) παρατηρήθηκε μεταξύ των απομονώσεων 274-Chal και ACLSV-MET, 534-Kom και 571-Kom, 236-Io και 239-Io, ενώ η μεγαλύτερη παρατηρήθηκε μεταξύ των απομονώσεων 155-Ki και 236-Io, 239-Io (12%).

Το ποσοστό παραλλακτικότητας των ελληνικών απομονώσεων με άλλες ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες απομονώσεων του ACLSV κυμαίνονταν από 3-14% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (Πίνακας 4.3).

Οι απομονώσεις ACLSV-POT και 260-Kom εμφανίζουν το μεγαλύτερο μήκος στην αλληλουχία της ΚΠ και χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός μοναδικού, μεταξύ του συνόλου των απομονώσεων, τμήματος αλληλουχίας στην 3' αμετάφραστη περιοχή (Εικόνα 4.5) (θέση 540-555).

Για τον καθορισμό των σχέσεων μεταξύ των απομονώσεων δημιουργήθηκαν, μετά από ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, δύο διαφορετικά φυλογενετικά δέντρα. Η φυλογενετική ανάλυση με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του γονιδίου της ΚΠ και της 3' αμετάφραστης περιοχής έδειξε ότι οι ελληνικές απομονώσεις ομαδοποιούνται σε δύο ευδιάκριτους κλάδους, οι οποίοι υποστηρίζονται από υψηλές τιμές bootstrap (εικόνα 4.3). Στην πρώτη ομάδα περιλήφθησαν απομονώσεις καλλιεργούμενων (κυδωνιά, αχλαδιά, μηλιά), αυτοφυών (γκορτσιά) και καλλωπιστικών (καλλωπιστική μηλιά) γιγαρτοκάρπων καθώς και τρεις απομονώσεις από καλλωπιστικά (2 από καλλωπιστική δαμασκηνιά) και αυτοφυή (1 από τσαπουρνιά) πυρηνόκαρπα. Η δεύτερη ομάδα είναι μικτή καθώς περιέχει πυρηνόκαρπα (κερασιά), γιγαρτόκαρπα (καλλωπιστική κυδωνιά), και δύο απομονώσεις από άγρια είδη (*Potentilla pindicola* και *Rubus* sp.).

Στη φυλογενετική ανάλυση που συμπεριλήφθησαν και οι 9 διαθέσιμες αλληλουχίες απομονώσεων του ACLSV προέκυψε ο σχηματισμός τεσσάρων ομάδων που υποστηρίζονται από υψηλές τιμές bootstrap (Εικόνα 4.4). Όλες οι απομονώσεις από τα αυτοφυή (γκορτσιά), καλλιεργούμενα (μηλιά, αχλαδιά, κυδωνιά) και καλλωπιστικά (καλλωπιστική μηλιά) γιγαρτόκαρπα εντάχθηκαν μαζί στην πρώτη ομάδα, με εξαίρεση δύο απομονώσεις από κυδωνιά και καλλωπιστική κυδωνιά που εντάχθηκαν στην τέταρτη ομάδα. Επίσης, στην πρώτη ομάδα εντάχθηκαν μία απομόνωση από αμυγδαλιά καθώς και δύο απομονώσεις από αυτοφυή (αγριοβερικοκιά και τσαπουρνιά) πυρηνόκαρπα. Η δεύτερη και τρίτη ομάδα σχηματίστηκαν με απομονώσεις από καλλωπιστικά (καλλωπιστική δαμασκηνιά) και καλλιεργούμενα (δαμασκηνιά και ροδακινιά) πυρηνόκαρπα είδη αντίστοιχα. Τέλος, η τέταρτη ομάδα είναι μικτή καθώς περιλαμβάνει, εκτός από τις δύο διαφοροποιημένες απομονώσεις γιγαρτοκάρπων

Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας του ACLSV

(κυδωνιά και καλλωπιστική κυδωνιά), δύο απομονώσεις πυρηνοκάρπων (κερασιά) και τις απομονώσεις ACLSV-POT (*Potentilla pindicola*) και 155-Ki (*Rubus* sp.).

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.2. Ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (γονίδιο της ΚΠ και 3' Αμετάφραστη περιοχή) και αμινοξέων (γονίδιο της ΚΠ) των 14 Ελληνικών απομονώσεων του ACLSV

Nt aa	146-Pe	347-Io	ACLSV-KOM	ACLSV-POT	156-Ki	274-Chal	ACLSV-MET	260-Kom	321-Io	534-Kom	571-Kom	236-Io	239-Io	155-Ki
146-Pe	-	80%	79%	76%	78%	79%	80%	77%	81%	78%	78%	78%	78%	99%
347-Io	91%	-	90%	78%	89%	90%	99%	78%	90%	88%	87%	83%	83%	80%
ACLSV-KOM	91%	98%	-	78%	92%	90%	90%	78%	90%	88%	87%	84%	84%	79%
ACLSV-POT	91%	93%	95%	-	78%	77%	78%	98%	78%	77%	77%	78%	78%	76%
156-Ki	90%	97%	99%	94%	-	88%	90%	78%	88%	86%	86%	84%	84%	77%
274-Chal	91%	99%	98%	93%	98%	-	91%	78%	90%	89%	88%	86%	86%	78%
ACLSV-MET	91%	99%	98%	93%	98%	100%	-	79%	91%	88%	88%	84%	84%	80%
260-Kom	92%	93%	94%	98%	93%	93%	93%	-	78%	77%	77%	78%	78%	77%
321-Io	91%	98%	99%	94%	98%	98%	98%	93%	-	88%	88%	86%	86%	80%
534-Kom	90%	98%	97%	93%	96%	98%	98%	92%	97%	-	99%	85%	85%	78%
571-Kom	90%	98%	97%	93%	96%	98%	98%	92%	97%	100%	-	85%	85%	77%
236-Io	90%	95%	95%	90%	95%	95%	95%	89%	95%	94%	94%	-	100%	78%
239-Io	90%	95%	95%	90%	95%	95%	95%	89%	95%	94%	94%	100%	-	78%
155-Ki	98%	90%	90%	90%	89%	90%	90%	90%	90%	89%	89%	88%	88%	-

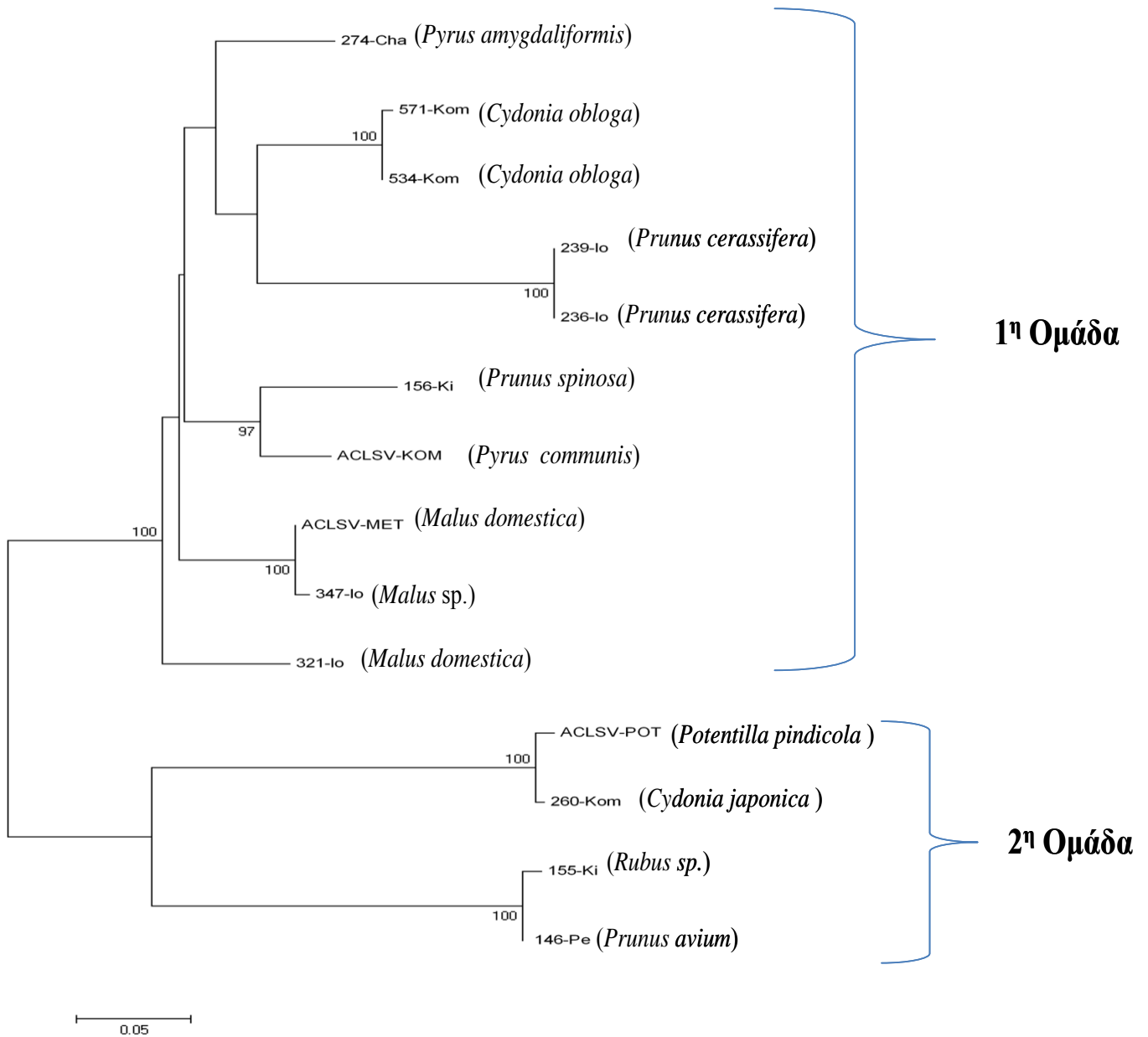
Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας του ACLSV

Πίνακας 4.3. Ποσοστά ομολογίας των ελληνικών απομονώσεων του ACLSV που μελετήθηκαν με ήδη καταχωρημένες απομονώσεις του ACLSV.

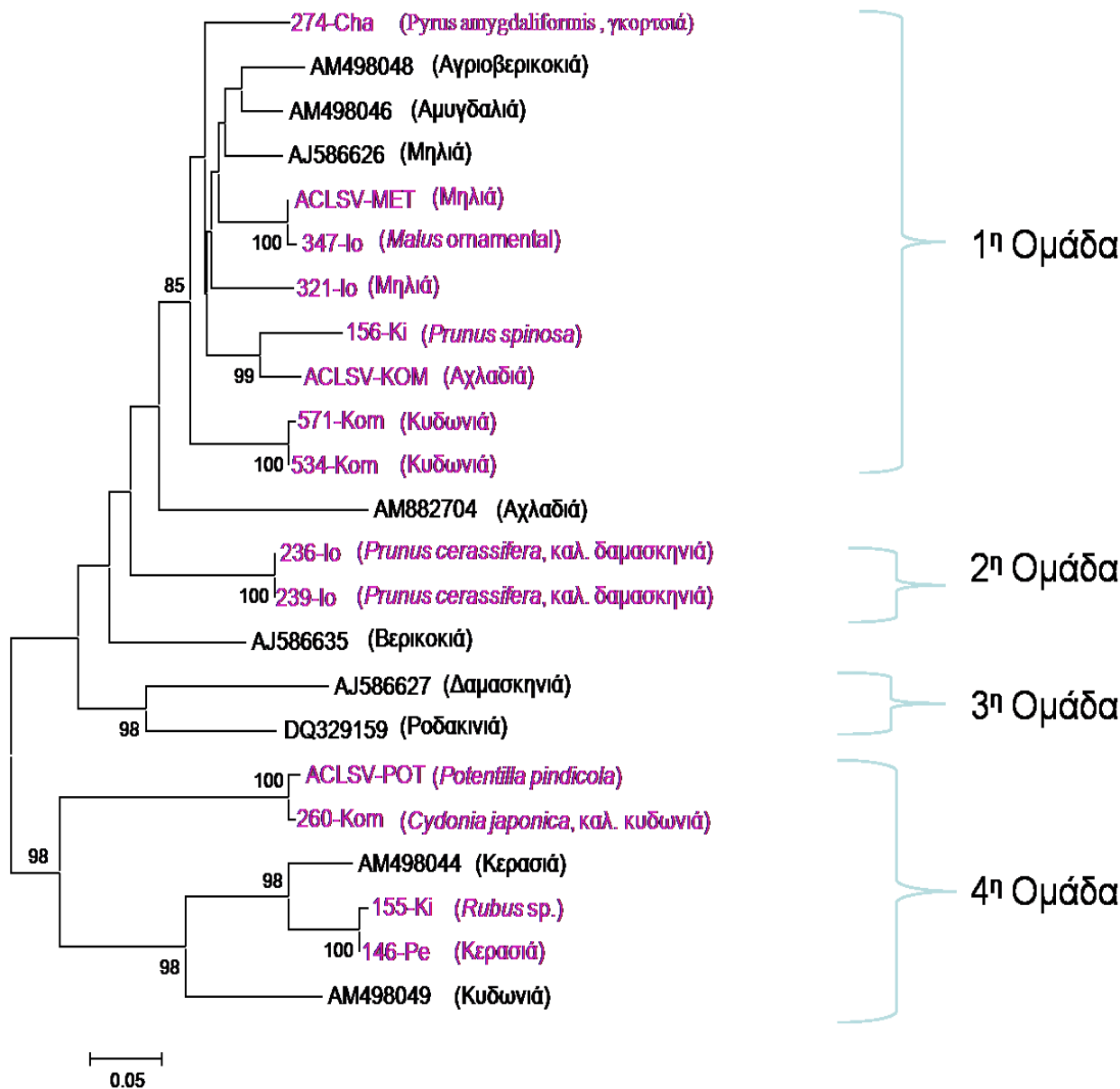
Ξενιστής	Κωδικός Απομόνωσης	Ομοιότητα σε		Κωδικός Πρόσβασης στην EMBL-EBI
		νουκλεοτίδια	αμινοξέα	
<i>Prunus avium</i> (Κερασιά)	146-Pe	97%	100%	DQ329160
<i>Malus</i> sp. (καλλωπιστική μηλιά)	347-Io	90%	99%	AM498048
<i>Pyrus communis</i> (Αχλαδιά)	ACLSV-KOM	92%	99%	DQ834688
<i>Potentilla pindicola</i>	ACLSV-POT	93%	96%	AB326225
<i>Prunus spinosa</i> (Τσαπουρνιά)	156-Ki	91%	98%	DQ834688
<i>Pyrus amygdaliformis</i> (Γκορτσιά)	274-Chal	89%	100%	AM498048
<i>Malus domestica</i> (Μηλιά)	ACLSV-MET	91%	99%	DQ834688
<i>Cydonia japonica</i> (καλ. Κυδωνιά)	260-KOM	94%	98%	AB326225
<i>Malus domestica</i> (Μηλιά)	321-Io	91%	99%	AM494510
<i>Cydonia obloga</i> (Κυδωνιά)	534-Kom	89%	98%	AM498048
<i>Cydonia obloga</i> (Κυδωνιά)	571-Kom	89%	98%	AM498048
<i>Prunus cerassifera</i> (καλ. Δαμασκηλιά)	236-Io	86%	96%	AM494510
<i>Prunus cerassifera</i> (καλ. Δαμασκηλιά)	239-Io	86%	96%	AM494510
<i>Rubus</i> sp.	155-Ki	96%	98%	DQ329160

Πίνακας 4.4. Γεωγραφική προέλευση και ξενιστές των δημοσιευμένων στη βάση δεδομένων απομονώσεων του ACLSV που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογενετική ανάλυση.

Απομόνωση	Προέλευση	Ξενιστής	Κωδικός πρόσβασης
-	Ινδία	Αγριοβερικοκιά	AM498048
-	Ινδία	Αμυγδαλιά	AM498046
M93	Αλβανία	Μηλιά	AJ586626
-	Ινδία	Αχλαδιά	AM882704
Apr63	Ιταλία	Βερικοκιά	AJ586635
P145	Ιταλία	Δαμασκηλιά	AJ586627
R2D43	Βουλγαρία	Ροδακινιά	DQ329159
-	Ινδία	Κερασιά	AM498044
-	Ινδία	Κυδωνιά	AM498049



Εικόνα 4.3. Φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με ανάλυση μέγιστης πιθανοφάνειας χρησιμοποιώντας την ομάδα ομόλογων αλληλουχιών που αντιστοιχούν στην ΚΠ και την 3' Αμετάφραστη περιοχή. Η ρίζα του δέντρου τοποθετήθηκε στο ενδιάμεσο σημείο του μακρύτερου κλάδου (midpoint rooted). Οι τιμές αριστερά στον κάθε κλάδο υποδεικνύουν το ποσοστό 1000 επαναλήψεων της ανάλυσης bootstrap, η οποία υποστηρίζει την ομαδοποίηση σε κάθε κόμβο. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει τον αριθμό αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων ανά θέση. Το μήκος των βραχιόνων είναι ανάλογο με τις γενετικές αποστάσεις που υπολογίστηκαν.



Εικόνα 4.4. Φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας που προσδιορίστηκε με στοίχιση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων του γονιδίου της ΚΠ και της 3΄Αμετάφραστης περιοχής. Οι δημοσιευμένες απομονώσεις του ACLSV αναφέρονται με τον κωδικό πρόσβασης τους στην EMBL, ενώ οι Ελληνικές απομονώσεις αναγράφονται με μωβ χρώμα. Ο κωδικός πρόσβασης της κάθε απομόνωσης συνοδεύεται από τον ξενιστή που απομονώθηκε. Οι τιμές αριστερά στον κάθε κλάδο υποδεικνύουν το ποσοστό 1000 επαναλήψεων της ανάλυσης bootstrap, η οποία υποστηρίζει την ομαδοποίηση σε κάθε κόμβο. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει τον αριθμό αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων ανά θέση. Το μήκος των βραχιόνων είναι ανάλογο με τις γενετικές αποστάσεις που υπολογίστηκαν.

4.4. Συζήτηση

Ο ACLSV έχει ευρύ κύκλο ξενιστών που περιλαμβάνει καλλιεργούμενα, καλλωπιστικά και αυτοφυή είδη-μέλη της οικογένειας *Rosaceae* (Cropley, 1969a; Rwahnih κ.ά., 2004). Στα καλλιεργούμενα γιγαρτόκαρπα είναι συνήθως λανθάνων (Mink και Shay, 1971; Cropley κ.ά., 1969a), προκαλεί σοβαρές ασθένειες στα πυρηνόκαρπα και σε ορισμένα από τα καλλωπιστικά, ενώ η παρουσία του έχει διαπιστωθεί και σε αρκετά αυτοφυή είδη (Ramsfjell, 1957; Posnette κ.ά., 1957; Van Katwijk, 1957; Kralikova, 1961; Kengler, 1960; Schimanski και Schmelzer, 1974; Peña- Iglesias Ayuso, 1975; Sweet, 1976; Sweet και Campbell, 1976; Sweet, 1980β; Desvignes και Boyé, 1988; Zahi κ.ά., 2000; Saad κ.ά., 2000; Rana κ.ά., 2007).

Οι φυλογενετικές αναλύσεις του ACLSV που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα αφορούσαν κυρίως απομονώσεις από καλλιεργούμενα είδη και βασιζόνταν στην ΚΠ του ιού (Candresse κ.ά., 1995; Rwahnih κ.ά., 2003; Rwahnih κ.ά., 2004; Candresse κ.ά., 2006; Ulubas Serce και Rosner, 2006; Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β). Στις αναλύσεις αυτές, δεν ήταν εφικτή η ομαδοποίηση των απομονώσεων ως προς τον ξενιστή ή τη γεωγραφική τους προέλευση όταν χρησιμοποιήθηκαν μικρού μήκους αλληλουχίες (350-380ζβ) (Candresse κ.ά., 1995; Ulubas Serce και Rosner, 2006), ενώ υπήρξε καλύτερη ομαδοποίηση των ειδών που ανήκουν στα πυρηνόκαρπα και τα γιγαρτόκαρπα όταν χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερου μήκους αλληλουχίες (677ζβ) που περιελάμβαναν και τμήμα της 3' Αμετάφραστης περιοχής (Rwahnih κ.ά., 2003; Rwahnih κ.ά., 2004; Candresse κ.ά., 2006; Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β).

Στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκε ένας νέος ανοδικός εκκινητής για τη βελτίωση της RT-PCR που αναπτύχθηκε από τους Menzel κ.ά. (2002) ώστε να είναι εφικτή η ανάπτυξη εστιασμένης PCR με το ζεύγος των εκκινητών που πολλαπλασιάζει το επιθυμητού μήκους (677ζβ) προϊόν (Menzel κ.ά., 2002). Από τα 20 είδη στα οποία ανιχνεύθηκε ο ιός σε προηγούμενη ενότητα εργασίας επιλέχθηκαν δύο τουλάχιστον δείγματα, όπου αυτό ήταν εφικτό, από κάθε είδος προκειμένου να αξιολογηθεί η μέθοδος. Το αποτέλεσμα ήταν να πολλαπλασιαστούν 14 απομονώσεις του ιού από 11 διαφορετικά είδη (μηλιά, κερασιά, γκορτσιά, αχλαδιά, τσαπουρνιά, καλλωπιστική κυδωνιά, καλλωπιστική δαμασκηλιά, κυδωνιά, *Rubus* sp., *Potentilla pindicola* και

καλλωπιστική μηλιά) (Εικόνα 4.2, Πίνακας 4.1), ενώ δεν πολλαπλασιάστηκε η ομόλογη περιοχή απομονώσεων από άλλα 9 είδη.

Η ανάλυση των αλληλουχιών των απομονώσεων που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία αναδεικνύουν την ύπαρξη υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας στο γονίδιο της ΚΠ και της 3΄αμετάφραστης περιοχής του ACLSV (Εικόνα 4.5). Η μεγάλη παραλλακτικότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (21-24%) που παρατηρήθηκε μεταξύ των απομονώσεων από τα είδη *Potentilla pindicola*, *Rubus* sp., κερασιά και τσαπουρνιά ήταν αναμενόμενη καθώς προήλθαν από αυτοφυείς ξενιστές, απομακρυσμένους γενετικά μεταξύ τους, που εντάσσονται σε διαφορετικά γένη. Αντίθετα, μικρή παραλλακτικότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων παρατηρήθηκε μεταξύ απομονώσεων καλλωπιστικής δαμασκηνιάς (0%). Δεδομένου ότι προήλθαν από την ίδια περιοχή (Ιωάννινα) καθώς και ότι πολλαπλασιάζονται με αγενή τρόπο, η μικρή παραλλακτικότητα πιθανόν οφείλεται στον εμβολιασμό των φυτών αυτών στο ίδιο προσβεβλημένο υποκείμενο. Ομοίως εξηγείται και η μικρή παραλλακτικότητα μεταξύ μιας απομόνωσης μηλιάς με μια από καλλωπιστική μηλιά (1%).

Οι απομονώσεις ACLSV-POT και 260-Kom εμφανίζουν μεγαλύτερο μήκος στην αλληλουχία της ΚΠ και χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός μοναδικού, μεταξύ του συνόλου των απομονώσεων, τμήματος αλληλουχίας στην 3΄αμετάφραστη περιοχή (Εικόνα 4.5) (θέση 540-555) που πιθανώς είναι αποτέλεσμα ανασυνδυασμού (Bonnet κ.ά., 2005; Singh κ.ά., 2005; Tanne και Sela, 2005).

Για τον καθορισμό των σχέσεων μεταξύ των απομονώσεων δημιουργήθηκαν δύο διαφορετικά φυλογενετικά δέντρα. Στο φυλογενετικό δέντρο που υπολογίστηκε μόνον με τις Ελληνικές απομονώσεις σχηματίστηκαν δύο ομάδες, μία που περιέχει γιγαρτόκαρπα και τρεις απομονώσεις πυρηνοκάρπων, και μία μικτή στην οποία κατατάσσονται καλλωπιστικά, καλλιεργούμενα και αυτοφυή είδη πυρηνοκάρπων. Η κατάταξη σε ομάδες γιγαρτοκάρπων διαφοροποιημένων απομονώσεων από πυρηνόκαρπα είχε παρατηρηθεί και σε παλαιότερες φυλογενετικές μελέτες (Rwahnih κ.ά., 2003; Rwahnih κ.α, 2004; Candresse κ.ά., 2006; Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β). Στο φυλογενετικό δέντρο που σχηματίστηκε με τις ελληνικές και τις δημοσιευμένες απομονώσεις δημιουργήθηκαν 4 ομάδες. Μία μεγάλη ομάδα που περιέχει κυρίως απομονώσεις γιγαρτοκάρπων, δύο ομάδες πυρηνοκάρπων, και μία μικτή ομάδα. Και στα δύο φυλογενετικά δέντρα ομαδοποίηση μεταξύ των

απομονώσεων που προήλθαν από αυτοφυή, καλλιεργούμενα και καλλωπιστικά είδη δε φαίνεται να είναι εφικτή.

Μελέτες για τους ACLSV (Candresse κ.ά., 1995) και ASGV (Yoshikawa κ.ά., 1996) έχουν δείξει ότι μια απομόνωση ενός ιού από ένα φυτό-ξενιστή μπορεί να αποτελείται από έναν πληθυσμό διαφορετικών παραλλαγών του ιού. Οι παραλλαγές μιας απομόνωσης μπορεί να οφείλονται σε μεταλλάξεις (Drake, 1993) ή να προέρχονται από τα υποκείμενα ή τα εμβόλια τα οποία είχαν αρχικά μολυνθεί με τις παραλλαγές του ιού, καθώς οι ACLSV και ASGV δεν έχουν φορέα μετάδοσης (Lister, 1970 α,β). Η ευρεία εξάπλωση του ACLSV οφείλεται στη διακίνηση του προσβεβλημένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Στην περίπτωση των απομονώσεων της μηλιάς, η ευρεία χρήση υποκειμένων του γένους *Malus* πιθανώς εξηγεί τα υψηλά ποσοστά ομοιότητας σε νουκλεοτίδια που παρατηρήθηκαν μεταξύ της μηλιάς και της καλλωπιστικής μηλιάς και οι οποίες ομαδοποιήθηκαν μαζί και στα δύο φυλογενετικά δέντρα. (Candresse κ.ά., 1995). Παρόμοια εξήγηση μπορεί να δοθεί και στην περίπτωση των απομονώσεων αχλαδιάς, γκορτσιάς και κυδωνιάς δεδομένου ότι η κυδωνιά αποτελεί πλέον το βασικότερο υποκείμενο της αχλαδιάς (παλαιότερα χρησιμοποιούνταν και η γκορτσιά) (Βασιλακάκης, 1991; Βασιλακάκης, 2004) και ο εμβολιασμός αποτελεί τον κυριότερο τρόπο εξάπλωσης των ιών των καρποφόρων δέντρων. Από το φυλογενετικό δέντρο που περιλαμβάνει μόνο τις Ελληνικές απομονώσεις φαίνεται ότι οι απομονώσεις της αχλαδιάς, της γκορτσιάς και της κυδωνιάς προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο (απομόνωση) και για το λόγο αυτό εμφανίζουν στενή φυλογενετική σχέση. Ο πρόγονος αυτός μπορεί αρχικά να εμφάνιζε πολλές παραλλαγές όπως έχει ήδη αναφερθεί κατά το παρελθόν (Candresse κ.ά., 1995). Συνεπώς, είναι πιθανό οι απομονώσεις της κυδωνιάς να προήλθαν από την γκορτσιά ή και την αχλαδιά, και η παρατηρούμενη διαφοροποίηση να είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων (Dolja και Carrington, 1992; Drake, 1993; Domingo και Holland, 1997) ή ανασυνδυασμού του RNA (Bruyere κ.ά., 2000; Kim και Kao, 2001). Επίσης, η επικράτηση μιας παραλλαγής μπορεί να οφείλεται σε επιλεκτικό πολλαπλασιασμό (Aldaoud κ.ά., 1989) ή αλληλεπίδραση γενοτύπου ξενιστή παθογόνου σε μία προσπάθεια προσαρμογής και επιβίωσης του ιού και επίδρασης του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσεται ο ξενιστής (Hull, 2002; Singh κ.ά., 2005).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μικρή παραλλακτικότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων που παρατηρήθηκε μεταξύ των απομονώσεων αχλαδιάς και *Prunus spinosa* (8%), των απομονώσεων *Potentilla pindicola* και *Cydonia japonica* (2%) καθώς και των απομονώσεων κερασιάς και *Rubus* (1%), οι οποίες σχηματίζουν μεταξύ τους υποομάδες και στα δυο φυλογενετικά δέντρα. Επειδή είναι απίθανο να προέρχονται από κάποιο κοινό πρόγονο, θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω η πιθανότητα ύπαρξης φορέα.

Η γεωγραφική προέλευση των απομονώσεων του ACLSV φαίνεται να μην επηρεάζει τη φυλογενετική τους συγγένεια όπως έχει αναφερθεί κατά το παρελθόν (Candresse κ.ά., 1995). Συνεπώς, η απόδοση της υψηλής παραλλακτικότητας των απομονώσεων του ιού στα καλλιεργητικά συστήματα και αγρονομικές πρακτικές που ακολουθούνται στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές της χώρας μας αλλά και μεταξύ άλλων χωρών φαίνεται να περιορίζεται με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Περαιτέρω έρευνα και ανάλυση ενός μεγαλύτερου αριθμού απομονώσεων του ACLSV θα μας επιτρέψει να αποκτήσουμε περισσότερες πληροφορίες και να κατανοήσουμε καλύτερα πως η παραλλακτικότητα του επιδρά στην γενετική δομή των πληθυσμών, στην επιδημιολογία και στην εξέλιξη των πληθυσμών του ιού.

```

146-Pe : CACTGGAA CAGACACTGGAGGCCATCTTCGCGAACATAGCGATCCAAAGGACGTCGGAGCAGACCGGAGTTCTGGATGTGAC : 82
347-Io : CACTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATACAGGGAACGTCAGAGCAAACCGGAGTTCTGGATCTAGT : 82
ACLSV-KOM : CACTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATA CAGGGGACATCAGAGCAGACAGAGTTCTGGATCTGGT : 82
ACLSV-POT : TTCTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATCCAGGGGACCTCGGAACAACCGGAGTTCTGGACTTGGT : 82
156-Ki : TTCTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATA CAGGGAACGTCGGAACAACAGAGTTCTGGACCTGGT : 82
274-Chal : TTCTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATA CAGGGAACGTCGGAACAACCGGAAATTCCTGGATCTGGT : 82
ACLSV-MET : TTCTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATA CAGGGAACGTCAGAGCAAACCGGAGTTCTGGATCTAGT : 82
260-Kom : TTCTGGAA CTGACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATCCAGGGGACCTCGGAACAACCGGAGTTCTGGACTTGGT : 82
321-Io : TTCTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATT CAAGGAACAATCAGAGCAGACCGGAAATTCCTGGATCTAGT : 82
534-Kom : TTCTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATA CAGGGAACGTCAGAGCAGACCGGAAATTCCTGGATCTGGT : 82
571-Kom : TTCTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATA CAGGGAACAATCAGAGCAAACCGGAAATTCCTGGATCTGGT : 82
236-Io : TTCTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATA CAGGGGACATCGGAGCAGACCGGAAATTCCTGGACCTGAC : 82
239-Io : TTCTGGAA CAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATA CAGGGGACATCGGAGCAGACCGGAAATTCCTGGACCTGAC : 82
155-Ki : CACTGGAA CAGCCACTGGAGGCCATCTTCGCGAACATAGCGATCCAAAGGACGTCGGAGCAGACCGGAGTTCTGGATGTGAC : 82
CTGGAA CaGatACTGGAGtCCATCTTCGCGAAcATAGC AT CA GG AC TC GAgCA ACgGA TT CTGGA Tg

```

```

146-Pe : AGTGGAGCTCAAGTCAATGGAGGATCAGAAAGTGATAGGATCCCTCAACCTGAAAGGAGGTGGTCAATTGATCAAGATCTTC : 164
347-Io : GGTGGAGCTCAAGTCAATGGAGGATCAGAAAGTGAATAGGTTCCCTACAATTTGAAAGGAGGTGGTCAACATGATCAAAGCTTTC : 164
ACLSV-KOM : GGTGGAGCTCAAAATCAATGGAGGATCAGAAAGTGAATAGGTTCCCTACAATCTGAGCAAGTGGTCAACATGATCAAAGCTTTC : 164
ACLSV-POT : GGTGGAGCTCAAAATCAATGGAGGATCAGAAAGTGGTGGTTCCTACAATCTGAGCAAGTGGTCAACATGATCAAAGATCTTC : 164
156-Ki : GGTGGAGCTCAAAATCAATGGAGGATCAGCAAGTGATAGGTTCTTACAATTTGAGCAAGTGGTCAACATGATCAAAGCTTTC : 164
274-Chal : TGTGGAGCTCAAAATCAATGGAGGATCAGAAAGTGAATAGGTTCTTACAATCTGAAAGCAAGTGGTCAACATGATCAAAGCTTTC : 164
ACLSV-MET : GGTGGAGCTCAAGTCAATGGAGGATCAGAAAGTGAATAGGTTCCCTACAATTTGAAAGGAGGTGGTCAACATGATCAAAGCTTTC : 164
260-Kom : GGTGGAGCTCAAAATCAATGGAGGATCAGAAAGTGGTGGTTCCTACAATCTGAGCAAGTGGTCAACATGATCAAAGCTTTC : 164
321-Io : GGTGGAGCTCAAAATCAATGGAGGATCAGAAAGTGGTGGTTCCTACAACCTGAGCAAGTGGTCAACATGATCAAAGCTTTC : 164
534-Kom : GGTGGAGCTCAAGTCAATGGAGGATCAGAAAGTGGTGGTTCCTACAATTTGAAAGGAGTGGTCAACATGATCAAAGCTTTC : 164
571-Kom : GGTGGAGCTCAAGTCAATGGAGGATCAGAAAGTGGTGGTTCCTACAATTTGAAAGGAGTGGTCAACATGATCAAAGCTTTC : 164
236-Io : GGTGGAGCTCAAGTCAATGGAGGATCAGAAATGTGATAGGTTCAATCAATCTAAAGGAGGTAGTCAACATGATCAAAGCAATTC : 164
239-Io : GGTGGAGCTCAAGTCAATGGAGGATCAGAAATGTGATAGGTTCAATCAATCTAAAGGAGGTAGTCAACATGATCAAAGCAATTC : 164
155-Ki : AGTGGAGCTCAAGTCAATGGAGGATCAGAAAGTGATAGGATCCCTCAACCTGAAAGGAGGTGGTCAATTGATCAAGATCTTC : 164
gGTGGA GT AA TCAatTGGAGGATcAGAA GT at GG TC TaCAat TgA gg GTgTcaa TgATCAA TTC

```

```

146-Pe : AAGACTACATCTTCCGATCCGAAACATAAAGCAACATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCAGAAAGCAAGAAATC : 246
347-Io : AAGACTACCTCTTCCGATCCGAAACATCAGCAGCATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCAGAGAGCCGAGAAACG : 246
ACLSV-KOM : AAGACTACCTCTTCCGATCCGAAACATCAGCGGAATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCCGGAGCCAGAAATC : 246
ACLSV-POT : AAAACTACATCTTCCGATCCGAAACATAAAGGGATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCGGAGCCAGAAACG : 246
156-Ki : AAGACTACCTCTTCCGATCCGAAACATCAGCGGAATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCAGCTGAAAGCCAGAAATC : 246
274-Chal : AAGACTACCTCTTCCGATCCGAAACATCAGCAGCATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCAGCCGAGCCAGAAACG : 246
ACLSV-MET : AAGACTACCTCTTCCGATCCGAAACATCAGCAGCATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCAGAGAGCCGAGAAACG : 246
260-Kom : AAAACTACATCTTCCGATCCGAAACATAAAGGGATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCCGGAGCCAGAAACG : 246
321-Io : AAGACTACCTCTTCCGATCCGAAACATCAGCAACATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCCGGAGCCAGAAACG : 246
534-Kom : AGGACTACCTCTTCCGATCCGAAACATCAGCAGCATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCCGCCGAGCCAGAAACG : 246
571-Kom : AGGACTACCTCTTCCGATCCGAAACATCAGCAGCATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCCGCCGAGCCAGAAACG : 246
236-Io : AAAACTACATCTTCCGATCCGAAACATAAAGGGATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCAGCTGAAAGCAAGAAACG : 246
239-Io : AAAACTACATCTTCCGATCCGAAACATAAAGGGATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCAGCTGAAAGCAAGAAACG : 246
155-Ki : AAGACTACATCTTCCGATCCGAAACATAAAGCAACATGACTTTCCGCCAGGTTCTGTGAGGCTTTTGGCTCCAGAAAGCAAGAAATC : 246
Aa ACTAC TCTTCCGA CCGAA AT A C ATGAC TTcCGcCaggT TgTgAGGc TT GC CC GA GC AG AA G

```

```

146-Pe : GGTTCGTAAAACTGAAGTAAAGGGGTTTTACCAACCTTTTCTACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGAAATACCCGGAACT : 328
347-Io : GGTTCGTCAAACCTGAATAAAGGGGTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGAAATACCCGGAGCT : 328
ACLSV-KOM : GGTTCGTCAAACCTGAATAAAGGGGTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGAAATACCCGGAACT : 328
ACLSV-POT : GGTTCGTCAAACCTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGTGGAAATACCCAGAGCT : 328
156-Ki : GGTTCGTCAAACCTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGTGGAAATACCCGGAACT : 328
274-Chal : GGTTCGTAAAACTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGTAAAGTATCCGGAGCT : 328
ACLSV-MET : GGTTCGTCAAACCTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGTAAAGTATCCGGAGCT : 328
260-Kom : GGTTCGTCAAACCTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGTAAAGTATCCGGAGCT : 328
321-Io : GGTTCGTAAAACTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGTAAAGTATCCGGAGCT : 328
534-Kom : GGTTCGTCAAACCTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGTAAAGTATCCGGAGCT : 328
571-Kom : GGTTCGTCAAACCTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGTAAAGTATCCGGAGCT : 328
236-Io : GGTTCGTCAAACCTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGTAAAGTATCCGGAGCT : 328
239-Io : GGTTCGTCAAACCTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCAACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGTAAAGTATCCGGAGCT : 328
155-Ki : GGTTCGTAAAACTGAAGTAAAGGGGTTTTTACCAACCTTTTCTACCATGCCAGAAAGTTGGAGGGAAATACCCGGAACT : 328
GG TgGT AAa TgAA TA AAAGGgGTTTTcAC AACCT TT aC ACcATGCC GA GtGG G AAaTAcCC GAgcT

```

Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας του ACLSV

```

*          340          *          360          *          380          *          400          *
146-Pe : CATGTTTGACTTGAATAAAGGGCTGAACATGTTTATAATGAACAAAGCTCAGCAAAAAGTGATAACAAATATGAATCGGCGT : 410
347-Io : GATGTTTGATTTAACAAGGGTCTTAACATGTTTATCATGAATAAGGCCAGCAAAAAGTCATAAATAACATGAACCGACGT : 410
ACLSV-KOM : GATGTTTGATTTCAATAAAGGGTCTTAACATGTTTATCATGAATAAAGGCCAGCAAAAAGTCATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
ACLSV-POT : CATGTTTGACTTTAACAAGGGTCTTAACATGTTTATAATGAACAAAGCTCAGCAAAAAGTGATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
156-Ki : AATGTTTGATTTCAATAAAGGGTCTTAACATGTTTATCATGAATAAAGGCCAGCAAAAAGTCATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
274-Chal : GATGTTTGACTTTCAATAAAGGGCTTAAACATGTTTATCATGAATAAAGGCCAGCAAAAAGTGATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
ACLSV-MET : GATGTTTGATTTAACAAGGGTCTTAACATGTTTATCATGAATAAAGGCCAGCAAAAAGTGATAAATAACATGAACCGACGT : 410
260-Kom : CATGTTTGACTTTAACAAGGGTCTTAACATGTTTATAATGAACAAAGCTCAGCAAAAAGTGATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
321-Io : GATGTTTGATTTCAACAAGGGCTTAAACATGTTTATCATGAATAAAGGCCAGCAAAAAGTCATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
534-Kom : GATGTTTGATTTCAATAAAGGGTCTTAACATGTTTATCATGAATAAAGGCCAGCAAAAAGTGATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
571-Kom : GATGTTTGATTTCAATAAAGGGTCTTAACATGTTTATCATGAACAAAGGCCAGCAAAAAGTCATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
236-Io : GATGTTTGATTTCAACAAGGGCTTAAATATGTTTATCATGAATAAAGGCCAGCAAAAAGTGATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
239-Io : GATGTTTGATTTCAACAAGGGCTTAAATATGTTTATCATGAATAAAGGCCAGCAAAAAGTGATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
155-Ki : CATGTTTGACTTTAATAAAGGGCTGAACATGTTTATAATGAACAAAGCTCAGCAAAAAGTGATAAATAACATGAACCGGCGT : 410
ATGTTtGA TT AA AA GG cT AA ATGTT AT ATGAA AA GC CAgCAaAA GT ATaAc AAAtATGAA CGgCGT
    
```

```

          420          *          440          *          460          *          480          *
146-Pe : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATGG : 492
347-Io : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
ACLSV-KOM : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
ACLSV-POT : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
156-Ki : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
274-Chal : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
ACLSV-MET : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
260-Kom : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
321-Io : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
534-Kom : CTTTTCACAGACTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
571-Kom : CTTTTCACAGACTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
236-Io : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
239-Io : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
155-Ki : CTTTTCAAAACCTGAATTTGCAAAAAGTGAAGAAATGAGGCCAAAATGTCATCTGTGTAACAATGATCTTTGCATTTAGTTTATTC : 492
CTTTtACaAaACTGAATTTGCaAAAAGTGA AATGAGGC AA cT TC TcTgTtAc aCTGATCTTTGcAtTtAgttt tt
    
```

```

          500          *          520          *          540          *          560          *
146-Pe : AGAAAGCTTTGGTTCAATAAATAAAATAAAACAATA--TAAATAAGC-----AAATTAATTAAGTTCTGT : 553
347-Io : AAGAAGCTTTGGTTTGATAAATAAAATAAAATAGATA---ATGTGTGT-----GTGTTAGATATATTTCCAT : 556
ACLSV-KOM : AAGAAGCTTTGGTTTGATCAATAGGATAAATAAATA---CTGTGTGT-----GTGTTAAATATGTTTCTAT : 556
ACLSV-POT : AAGAAGCTTTGGTTCAATAAACAAGATAAATAAACAATAACACTGTGTTTGTGATATATATAAATGTGTTCTCAGTTTCTCT : 574
156-Ki : AAGAAGCTTTGGTTTGATTAATAGGATAAATAAATA---ATTTGTGT-----GTGTTAAATATGTTTCTAT : 556
274-Chal : AGAAAGCTTTGGTTTGATAAATAAAATAAATAAATA---CTGTGTGT-----GTGTTAAGCATATTTCTCT : 556
ACLSV-MET : AAGAAGCTTTGGTTTGATAAATAAATAAATAAATA---ATGTGTGT-----GTGTTAGATATATTTCCAT : 556
260-Kom : AAGAAGCTTTGGTTCAATAAACAATAAATAAACAATAACACTGTGTTTGTGATATATATAAATGTGTTCTCAGTTTCTCT : 574
321-Io : AAGAAGCTTTGGTTTGATAAATAAATAAATAAATA---CTGTGTGT-----GTGTTAAATATATTTCCAT : 556
534-Kom : AAGAAGCTTCGGTCAATAAATAAATAAATAAATA---GTGTGTGT-----ATGTTT-AAATATGTTTCTGT : 555
571-Kom : AAGAAGCTTCGGTCAATAAATAAATAAATAAATA---CTGTGTGT-----ATGTTT-AAATATGTTTCTGT : 555
236-Io : AAGAAGCTTCGGTTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAGTTTCTCTA-----GTGTTCAAAATACATTTCTTT : 560
239-Io : AAGAAGCTTCGGTTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAGTTTCTCTA-----GTGTTCAAAATACATTTCTTT : 560
155-Ki : AGAAAGCTTTGGTTCAATAAATAAATAAACAATA--TAAATAAGC-----AAATTAATTAAGTTCTGT : 553
AagA GtT GGTt ATaAAtAaaaTaAAtAaATA T tG t tgtT at tTtG T
    
```

```

          580          *          600          *          620          *          640          *
146-Pe : GT-----TAAATTTCTGT-----CAAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---TAAATGGAG : 617
347-Io : TAA----ATAAGTTTTCATTAACCGAATAAACTCTCGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---CAATGGAG : 631
ACLSV-KOM : TAA----ATAAGTTTTCATCAAATAAAACAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---TAAATGGAG : 631
ACLSV-POT : AAATAACTTGTGATCTCGTTG-CATTCGAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---AATGGAG : 652
156-Ki : CAA----GTAAGTTTACAT--AAATGAATAAACTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---TAACTGGAG : 630
274-Chal : TAA----ATAAGTTTTCATTAACCGAATAAACTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---TAAATGGAG : 631
ACLSV-MET : TAA----ATAAGTTTTCATTAACCGAATAAACTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---CAATGGAG : 631
260-Kom : AAATAACTTGTGATCTCGTTG-CATTCGAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---AATGGAG : 652
321-Io : TAA----ATAAGTTTTCATTAACCGAATAAAACAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---TAAATGGAG : 631
534-Kom : TGAATATGTAAGTTTTCATCGAATAAAACAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---TAAATGGAG : 634
571-Kom : TGAATATGTAAGTTTTCATCGAATAAAACAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---TAAATGGAG : 634
236-Io : GAA----TGAATTTCTTTGAATAAAACAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---TAAATGGAG : 634
239-Io : GAA----TGAATTTCTTTGAATAAAACAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---TAAATGGAG : 634
155-Ki : GT-----TAAATTTCTGT-----CAAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT---AATGGAG : 616
a t t TtGg t c AACTCT GAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATT AAtTGGAG
    
```

146-Pe	:	TGI	:	620
347-Io	:	TGI	:	634
ACLSV-KOM	:	TGI	:	634
ACLSV-POT	:	TGI	:	655
156-Ki	:	TGI	:	633
274-Chal	:	TGI	:	634
ACLSV-MET	:	TGI	:	634
260-Kom	:	TGI	:	655
321-Io	:	TGI	:	634
534-Kom	:	TGI	:	637
571-Kom	:	TGI	:	637
236-Io	:	TGI	:	637
239-Io	:	TGI	:	637
155-Ki	:	TGI	:	619
		TGI		

Εικόνα 4.5. Στοιχίση του γονιδιώματος της καμινιακής πρωτεΐνης και της 3' Αμετάφραστης περιοχής του ACLSV. Περιλαμβάνονται μόνο οι ελληνικές απομονώσεις 146-Pe (Κερασιά), 347-Io (*Malus ornamental*), ACLSV-KOM (Αχλαδιά), ACLSV-POT (*Potentilla pindicola*), 156-Ki (*Prunus spinosa*, τσαπουρνιά), 274-Chal (*Pyrus amygdaliformis*, γκορτσιά), ACLSV-MET (Μηλιά), 260-Kom (*Cydonia japonica*, καλ. κυδωνιά), 321-Io (Μηλιά), 534-Kom (Κυδωνιά), 571-Kom (Κυδωνιά), 236-Io (*Prunus cerassifera*, καλ. δαμασκηλιά), 239-Io (*Prunus cerassifera*, καλ. δαμασκηλιά), 155-Ki (*Rubus* sp.). Η στοιχίση των νουκλεοτιδιακών αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα MEGA έκδοση 4.

Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας του ACLSV

		*	20	*	40	*	60	*	80																																															
146-Pe	:	LEQ	TL	EA	IFANIAIQGTSE	QTEFLDVT	VEVKSMEDQ	KVIGSFNLKE	VVSLIKI	FKTTSSDPNIN	NNMTFRQ	VCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
347-Io	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	QTEFLDLV	VEVKSMEDQ	KVIGSYNLKE	VVNMIKA	FKTTSSDPNIS	SSMTFRQ	VCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
ACLSV-KOM	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	QTEFLDLV	VEVKSMEDQ	KVIGSYNLRE	VVNMIKA	FKTTSSDPNIS	SGMTFRQ	VCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
ACLSV-POT	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	QTEFLDLV	VEVKSMEDQ	KVVGSYNLRS	VVDLIK	FKTTSSDPNIN	NGMTFR	RVCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
156-Ki	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	QTEFLDLV	VEVKSMEDQ	QVIGSYNLRE	VVNMIKA	FKTTSSDPNIS	SGMTFRQ	VCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
274-Chal	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	QTEFLDLV	VEVKSMEDQ	KVIGSYNLKE	VVNMIKA	FKTTSSDPNIS	SSMTFRQ	VCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
ACLSV-MET	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	QTEFLDLV	VEVKSMEDQ	KVIGSYNLKE	VVNMIKA	FKTTSSDPNIS	SSMTFRQ	VCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
260-Kom	:	LE	L	T	LES	IFANIAIQGTSE	QTEFLDLV	VEVKSMEDQ	KVVGSYNLRS	VVDLIK	FKTTSSDPNIN	NGMTFR	QVCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																							
321-Io	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	QTEFLDLV	VEVKSMEDQ	KVIGSYNLRE	VVNMIKA	FKTTSSDPNIS	SNMTFRQ	VCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
534-Kom	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	QTEFLDLV	VEVKSMEDQ	KVIGSYNLK	GVVNMIKA	FRTTSSDPNIS	SSMTFRQ	VCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
571-Kom	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	QTEFLDLV	VEVKSMEDQ	KVIGSYNLK	GVVNMIKA	FRTTSSDPNIS	SSMTFRQ	VCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
236-Io	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	HTEFLDLT	VEVKSMEDQ	NVIGSYNLKE	VVNMIKA	FKTTSSDPNIS	SNMTFR	QLCEV	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
239-Io	:	LEQ	IL	ES	IFANIAIQGTSE	HTEFLDLT	VEVKSMEDQ	NVIGSYNLKE	VVNMIKA	FKTTSSDPNIS	SNMTFR	QLCEV	FAPEAR	NGLV	:	84																																								
155-Ki	:	LD	Q	P	LE	EA	IFANIAIQGTSE	QTEFLDVT	VEVKSMEDQ	KVIGSFNLKE	VVSLIKI	FKTTSSDPNIN	NNMTFRQ	VCEAF	FAPEAR	NGLV	:	84																																						
		Leq	i	L	E	S	IFANIAIQGTSE	qTEFLD6	VEVKSMEDQ	kv6GS5NL4	VV	6IK	F4TTSSDPNI	MTFRq6	CeA	fAPEAR	NGLV																																							
				*	100	*	120	*	140	*	160																																													
146-Pe	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GGKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	M	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
347-Io	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GRKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
ACLSV-KOM	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
ACLSV-POT	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
156-Ki	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
274-Chal	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
ACLSV-MET	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
260-Kom	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
321-Io	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
534-Kom	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
571-Kom	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	T	T	D	L	C	I	:	160	
236-Io	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	S	T	D	L	C	I	:	160	
239-Io	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	L	S	S	V	S	T	D	L	C	I	:	160	
155-Ki	:	KLK	YK	GV	FTNLF	FTMPEV	GSKYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	M	S	S	V	T	P	D	L	C	I	:	160	
		KLK	YK	GV	FTNLF	3TMPEV	G	KYP	ELM	FD	FNK	G	LN	MF	I	M	N	K	A	Q	Q	K	V	I	T	N	M	N	R	R	L	L	Q	T	E	F	A	K	S	E	N	E	A	K	6	S	S	V	3	t	D	L	C	I		

Εικόνα 4.6. Στοίχιση του μεταφρασμένου σε αμινοξέα γονιδιώματος της καρδιακής πρωτεΐνης του ACLSV. Περιλαμβάνονται μόνο οι ελληνικές απομονώσεις 146-Pe (Κερασιά), 347-Io (*Malus ornamental*), ACLSV-KOM (Αχλαδιά), ACLSV-POT (*Potentilla pindicola*), 156-Ki (*Prunus spinosa*, τσαπουρνιά), 274-Chal (*Pyrus amygdaliformis*, γκορτσιά), ACLSV-MET (Μηλιά), 260-Kom (*Cydonia japonica*, καλ. κυδωνιά), 321-Io (Μηλιά), 534-Kom (Κυδωνιά), 571-Kom (Κυδωνιά), 236-Io (*Prunus cerassifera*, καλ. δαμασκηλιά), 239-Io (*Prunus cerassifera*, καλ. δαμασκηλιά), 155-Ki (*Rubus* sp.). Η στοίχιση της αλληλουχίας των αμινοξέων έγινε με το πρόγραμμα MEGA έκδοση 4.

Κεφάλαιο 5

Γενική συζήτηση και συμπεράσματα

Ο ACLSV αποτελεί το τυπικό μέλος του γένους *Trichovirus* (Martelli κ.ά., 1994) και προσβάλλει καλλιεργούμενα, αυτοφυή και καλλωπιστικά είδη της οικογένειας *Rosaceae*. Έχει ευρεία γεωγραφική εξάπλωση και απαντάται σε καλλιέργειες γιγαρτοκάρπων και πυρηνοκάρπων στις περισσότερες περιοχές του κόσμου (Cropley, 1969α; Rwahnih κ.ά., 2004). Στα γιγαρτόκαρπα είναι συνήθως λανθάνων (Verma και Sharma, 1999; Mathioudakis κ.ά., 2007), ενώ στα πυρηνόκαρπα προκαλεί σοβαρές ζημιές (Ragozzino και Pugliano, 1974; Németh, 1986). Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί φορέας, επομένως ο μοναδικός τρόπος διασποράς του είναι η διακίνηση του προσβεβλημένου πολλαπλασιαστικού υλικού γεγονός που κάνει επιτακτική την ανάγκη ύπαρξης αξιόπιστων και ευαίσθητων μεθόδων ανίχνευσης ικανών να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα πιστοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μια επισκόπηση για την παρουσία του ACLSV σε καλλιεργούμενα, καλλωπιστικά και αυτοφυή είδη των οικογενειών *Rosaceae*, *Moraceae*, *Ulmaceae*, *Asteraceae*, *Fagaceae*, *Simmondsiaceae*, *Betulacea*, *Punicaceae* και *Lauraceae* με τη χρήση μοριακών (RT-PCR) και ορολογικών (ELISA) μεθόδων ανίχνευσης.

Για την μοριακή ανίχνευση του ACLSV αξιολογήθηκαν δύο μέθοδοι RT-PCR με εκκινητές που ενισχύουν τμήμα του γονιδίου της ΚΠ μήκους 380ζβ (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006 γ,δ) και 677ζβ (Menzel κ.ά., 2002) αντίστοιχα. Επίσης, αναπτύχθηκε μία RT-PCR όπως προτείνεται από τους Menzel κ.ά., (2002) και μία εστιασμένη PCR με το ζεύγος εκκινητών που ενισχύει προϊόν μήκους 380ζβ (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006 γ,δ).

Ο συνδυασμός των δύο μεθόδων αποδείχθηκε ότι αποτελεί ένα πιο αξιόπιστο εργαλείο ανίχνευσης του ιού καθώς παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με την μεμονωμένη εφαρμογή τους, δεδομένου ότι οι μέθοδοι των Menzel κ.ά., (2002) και Μαθιουδάκης κ.ά., (2006 γ,δ) δεν ανίχνευσαν ορισμένες απομονώσεις του ιού. Επομένως, ο συνδυασμός αυτός θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε προγράμματα

παραγωγής πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού, καθώς οι βιοδοκιμές είναι αρκετά χρονοβόρες, επίπονες και υψηλού κόστους, με περιορισμένες δυνατότητας εφαρμογής σε μαζικούς ελέγχους (Mink κ.ά., 1971; Yanase, 1974; Spiegel κ.ά., 2006). Επίσης, η υψηλή ευαισθησία των μοριακών τεχνικών που μελετήθηκαν, επιτρέπει την ανίχνευση του ιού καθόλη τη διάρκεια του έτους σε αντίθεση με την ορολογική δοκιμή ELISA η οποία δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα μόνο κατά τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου λόγω του χαμηλού τίτλου του ιού, και ορισμένες φορές δίνει ψευδή θετικά αποτελέσματα (Candresse κ.ά., 1995; Kinard κ.ά., 1996; Kummert κ.ά., 1998; Menzel κ.ά., 2002; Salmon κ.ά., 2002; Borisova, 2005; Liberti κ.ά., 2005).

Στην Ελλάδα, ο ιός εντοπίστηκε σε καλλιεργούμενα είδη της οικογένειας *Rosaceae* όπως μηλιά, ροδακινιά, αχλαδιά, βερικοκιά, κερασιά, αμυγδαλιά και κυδωνιά, και στα είδη *Pyrus amygdaliformis*, *Cydonia japonica* και *Pyrus calleryana*) (Βαρβέρη και Μπέμ, 1994; Varveri και Bem, 1995; Varveri, 1998; Χαρού κ.ά., 2006; Μαθιουδάκης κ.ά., 2006α; Mathioudakis κ.ά., 2007; Χαρού, 2008). Στην παρούσα μελέτη ο ιός ανιχνεύθηκε σε όλα τα καλλιεργούμενα είδη που προαναφέρθηκαν (εκτός από τη βερικοκιά και τη βυσσινιά), καθώς και στο αυτοφυές είδος *Pyrus amygdaliformis* (γκορτσιά) και καλλωπιστικό είδος *Cydonia japonica* (καλλωπιστική κυδωνιά). Για πρώτη φορά διαπιστώθηκε στην Ελλάδα η παρουσία του στα είδη *Prunus domestica* (δαμασκηνιά), *Prunus avium* L. (αγριοκερασιά), *Rosa canina* (τριανταφυλλιά), *Prunus maliformis* (κορομηλιά), *Crataegus monogyna* (κράταιγος), *Prunus spinosa* (τσαπουρνιά), *Prunus cerassifera* (καλλωπιστική δαμασκηνιά) και *Rubus* sp. ενώ, ανιχνεύθηκε και στο είδος *Potentilla pindicola* που αποτελεί και την πρώτη αναφορά του είδους ως ξενιστή του ιού παγκοσμίως.

Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης του ACLSV που εντοπίστηκε σε φυτείες γιγαρτοκάρπων (72,7% στις μηλιές), πυρηνοκάρπων (33,3% στις ροδακινιές) άλλα και καλλωπιστικών (73,3% στις καλλωπιστικές δαμασκηνιές) κατά την διάρκεια της επισκόπησης αναδεικνύει την ανάγκη παραγωγής πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού, που αποτελεί και το μοναδικό τρόπο αντιμετώπισης των ιολογικών ασθενειών των καρποφόρων δέντρων (Πίνακας 2.6) (Rowhani κ.ά., 2005). Αν και ο ACLSV προσβάλει αρκετά φυτικά είδη της οικογένειας *Rosaceae* οι μελέτες που είχαν λάβει χώρα μέχρι σήμερα τόσο στην Ελλάδα όσο και στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου για τη συχνότητα εμφάνισης του ιού πραγματοποιήθηκαν με

ορολογικές μεθόδους ανίχνευσης, και αφορούσαν κυρίως καλλιεργούμενα είδη (Βαρβέρη και Μπεμ, 1994; Varveri και Bem, 1995; Myrta κ.ά., 2003; Borisova, 2005). Η συχνότητα εμφάνισης του ιού με τη χρήση μοριακών τεχνικών έχει μελετηθεί σε γιγαρτόκαρπα (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006α), ενώ η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη ουσιαστική μελέτη για τα αυτοφυή, καλλωπιστικά και τα πυρηνόκαρπα με εξαίρεση την αμυγδαλιά (Χαρού, 2008; Χαρού κ.ά., 2006) και την καλλωπιστική δαμασκηλιά (Μαθιουδάκης κ.ά., 2006α).

Σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με την PDO RT-PCR ενισχύθηκαν 7 απομονώσεις ιών της οικ. *Flexiviridae* που πιθανώς δεν ανήκουν στον ACLSV καθώς ο ιός δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα αυτά κατά τον εξειδικευμένο έλεγχο. Προκειμένου να ταυτοποιηθεί ο ιός που ενισχύθηκε με την PDO RT-PCR, επιλέχθηκαν 4 από τις 7 απομονώσεις (τρεις από κερασιά και μία από μηλιά) και εστάλησαν για αλληλούχηση προκειμένου να προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ιού. Η μετάφραση των νουκλεοτιδίων σε αμινοξέα έδειξε υψηλή ομολογία με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες του γονιδίου της RdRp των ACLSV και CGRMV σε ένα και δύο δείγματα κερασιάς αντίστοιχα, καθώς και του ASPV στην μηλιά. Ο ASPV αποτελεί το τυπικό μέλος του γένους *Foveavirus*, προσβάλλει μόνο τα γιγαρτόκαρπα και συχνά εντοπίζεται σε μικτές μολύνσεις με τον ACLSV (Leone κ.ά., 1998; Adams κ.ά., 2004). Ο ASPV αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα το 1988 (Syrgiannidis, 1988) όπου και εντοπίστηκε σε οπωρώνες μηλιάς, ενώ πρόσφατα η παρουσία του διαπιστώθηκε σε οπωρώνες αχλαδιάς και κυδωνιάς (Μαθιουδάκης, 2006γ). Ο CGRMV αποτελεί ελεύθερο μέλος της οικογένειας *Flexiviridae* και προσβάλλει μόνον την κερασιά (Adams κ.ά., 2004). Σε επισκοπίσεις οπωρώνων κερασιάς της χώρας μας ανιχνεύθηκαν οι ιοί PDV, LChV-1, CNRMV και PNRSV, ενώ δεν ανιχνεύθηκε ο CGRMV (Μαλιόγκα κ.ά., 2006). Οι απομονώσεις του CGRMV που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία, αποτελούν και την πρώτη αναφορά του ιού στην Ελλάδα.

Παρά το γεγονός ότι με την PDO RT-PCR κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση μίας απομόνωσης από ACLSV, δύο απομονώσεων CGRMV και μίας ASPV δεν θα πρέπει να συστήνεται η χρήση της σε προγράμματα ελέγχου για την εξειδικευμένη ανίχνευση του ACLSV καθώς η ευαισθησία της, συγκρινόμενη με την ευαισθησία της εξειδικευμένης μεθόδου που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, κρίθηκε περιορισμένη (η PDO RT-PCR ανίχνευσε τον ιό στα 15 από τα 36 θετικά δείγματα).

Για τη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας του γονιδίου της ΚΠ και της 3΄αμετάφραστης περιοχής του ACLSV αναπτύχθηκε ένα σύστημα εξειδικευμένης RT-PCR σε δύο μικροσωλήνες που ακολουθείται από μια εστιασμένη PCR. Για την RT χρησιμοποιήθηκε εκκινητής ολιγοθυμίνης [oligo d(T) 18-mer], ενώ στην PCR σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε ένας νέος ανοδικός εκκινητής (ACLSV CP UP1) και ο καθοδικός εκκινητής ACLSV Menz do. Τέλος ακολούθησε μία εστιασμένη PCR με τους εκκινητές ACLSV Menz up και ACLSV Menz do που δίνουν προϊόν μήκους 677ζβ (Menzel κ.ά., 2002).

Με την εστιασμένη PCR που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν συνολικά οι αλληλουχίες 14 απομονώσεων του ACLSV που προήλθαν από 11 είδη (μηλιά, κερασιά, γκορτσιά, αχλαδιά, τσαπουρνιά, καλλωπιστική κυδωνιά, καλλωπιστική μηλιά, καλλωπιστική δαμασκηλιά, κυδωνιά, *Rubus* sp. και *Potentilla pindicola*) και τα αποτελέσματα της συγκριτικής ανάλυσης των αλληλουχιών των απομονώσεων ανέδειξαν την ύπαρξη υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας στο γονίδιο της ΚΠ και ιδιαίτερα στην 3΄αμετάφραστη περιοχή. Η παραλλακτικότητα μεταξύ των ελληνικών απομονώσεων κυμαίνονταν μεταξύ 0 και 24% (σε επίπεδο νουκλεοτιδίων), ενώ σε μελέτες που είχαν λάβει χώρα κατά το παρελθόν και αφορούσαν ελληνικές απομονώσεις (μήκους 677ζβ) κυμαίνονταν μεταξύ 2% και 19% (Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β). Μεγάλα ποσοστά παραλλακτικότητας (έως 30%) παρατηρήθηκαν και σε μελέτες απομονώσεων (μήκους 677ζβ) από διάφορες χώρες της Μεσογείου, Μέσης Ανατολής και Κίνας (Rwahnih κ.ά., 2004), ενώ τα ποσοστά ήταν πολύ χαμηλότερα (έως 20%) σε απομονώσεις που συγκρίθηκε μικρότερο τμήμα αλληλουχίας (358ζβ) (Candresse κ.ά., 1995; Ulubas Serce και Rosner, 2006). Το μεγαλύτερο ποσοστό διαφοροποίησης που διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη, σε σχέση με την παλαιότερη που αφορούσε τις ελληνικές απομονώσεις, πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι συμπεριλήφθηκε μεγαλύτερος αριθμός απομονώσεων, ένας αριθμός των οποίων προέρχονταν από άγρια και καλλωπιστικά είδη.

Το ποσοστό παραλλακτικότητας των ελληνικών απομονώσεων με άλλες ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες του ACLSV κυμαίνονταν από 0 έως 14% (σε επίπεδο νουκλεοτιδίων), ενώ οι απομονώσεις που είχαν προσδιοριστεί κατά το παρελθόν (Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β) εμφάνιζαν παραλλακτικότητα με τις δημοσιευμένες αλληλουχίες από 2% έως 10%. Η εργασία αυτή, είναι και η πρώτη μελέτη γενετικής

παραλλακτικότητας ACLSV παγκοσμίως που περιλαμβάνει απομονώσεις από καλλωπιστικά και αυτοφυή είδη.

Για τον καθορισμό των σχέσεων μεταξύ των απομονώσεων δημιουργήθηκαν δύο φυλογενετικά δέντρα. Στο φυλογενετικό δέντρο που περιελάμβανε μόνον τις Ελληνικές απομονώσεις σχηματίστηκαν δύο ομάδες που υποστηρίζονται από υψηλές τιμές bootstrap, μία που περιέχει κυρίως γιγαρτόκαρπα και τρεις απομονώσεις πυρηνοκάρπων και μία μικτή στην οποία εντάχθηκαν δύο απομονώσεις πυρηνοκάρπων καθώς και οι απομονώσεις από τα *Rubus* sp. και *Potentilla pindicola*. Στο φυλογενετικό δέντρο που σχηματίστηκε με τις ελληνικές και τις δημοσιευμένες απομονώσεις του ιού δημιουργήθηκαν 4 ομάδες που υποστηρίζονται από υψηλές τιμές bootstrap. Εδώ σχηματίστηκε μία μεγάλη ομάδα που περιέχει κυρίως απομονώσεις γιγαρτοκάρπων, δύο ομάδες πυρηνοκάρπων και μία μικτή ομάδα. Η κατάταξη σε ομάδες γιγαρτοκάρπων διαφοροποιημένων απομονώσεων από πυρηνόκαρπα και αντίστροφα, είχε παρατηρηθεί και σε παλαιότερες φυλογενετικές μελέτες (Rwahnih κ.ά., 2003; Rwahnih κ.ά., 2004; Candresse κ.ά., 2006; Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μικρή παραλλακτικότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο μεταξύ απομονώσεων αχλαδιάς και *Prunus spinosa* (8%), των απομονώσεων *Potentilla pindicola* και *Cydonia japonica* (2%) καθώς και των απομονώσεων κερασιάς και *Rubus* (1%), οι οποίες σχηματίζουν μεταξύ τους υποομάδες και στα δυο φυλογενετικά δέντρα. Επειδή είναι απίθανο να προέρχονται από κάποιο κοινό πρόγονο, θα πρέπει να διερευνηθεί η πιθανότητα ύπαρξης φορέα.

Επίσης, η γεωγραφική προέλευση των απομονώσεων του ACLSV που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία δε φαίνεται να επηρεάζει τη φυλογενετική τους συγγένεια όπως άλλωστε έχει αναφερθεί και κατά το παρελθόν (Candresse κ.ά., 1995; Rwahnih κ.ά., 2003; Rwahnih κ.ά., 2004; Candresse κ.ά., 2006; Μαθιουδάκης και Κατής, 2006β). Αυτό πιθανώς οφείλεται στην ευρεία διακίνηση πολλαπλασιαστικού υλικού (Candresse κ.ά., 1995).

Τόσο σήμερα όσο και κατά το παρελθόν, άγρια είδη όπως η γκορτσιά και η αγριοαχλαδιά χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα της αχλαδιάς (Βασιλακάκης, 1991; Βασιλακάκης, 2004). Το ίδιο συμβαίνει και στις καλλιέργειες μηλιάς όπου η χρήση υποκειμένων διαφόρων ειδών του γένους *Malus* (άγρια και καλλωπιστικά) είναι

ευρεία. Επομένως, αυτοφυή φυτά (αγριοκερασιά, αγριομηλιά, γκορτσιά και αγριαχλαδιά) που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα σε καλλιεργούμενα μπορούν να συμβάλλουν στη διασπορά του ιού καθώς ο εμβολιασμός αποτελεί τον μοναδικό τρόπο εξάπλωσης του ACLSV στα καρποφόρα δέντρα (δεν έχει βρεθεί φορέας). Από το φυλογενετικό δέντρο που περιλαμβάνει μόνο τις Ελληνικές απομονώσεις του ιού φαίνεται ότι αυτές της αχλαδιάς, της γκορτσιάς και της κυδωνιάς προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο (απομόνωση) και γι αυτό το λόγο εμφανίζουν μεταξύ τους στενή φυλογενετική σχέση. Ανάλογες εξελικτικές σχέσεις παρατηρούνται μεταξύ απομονώσεων μηλιάς και καλλωπιστικής μηλιάς. Για τον λόγο αυτό, ομαδοποίηση απομονώσεων από καλλιεργούμενα, καλλωπιστικά και αυτοφυή είδη δεν ήταν εφικτή. Τα υπόλοιπα αυτοφυή στα οποία ανιχνεύθηκε ο ιός (τσαπουρνιά, *Rubus* sp. και *Potentilla pindicola*) δε φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην επιδημιολογία του ιού καθώς δεν έχει εντοπιστεί φορέας του ιού.

Περαιτέρω έρευνα και ανάλυση ενός μεγαλύτερου αριθμού απομονώσεων του ACLSV θα επιτρέψει την απόκτηση περισσότερων πληροφοριών για τη γενετική παραλλακτικότητά του καθώς και για την επίδραση του είδους του ξενιστή στην ομαδοποίηση των πληθυσμών του ιού. Επίσης, ο προσδιορισμός περισσότερων αλληλουχιών από αυτοφυή, καλλωπιστικά και καλλιεργούμενα είδη της οικογένειας *Rosaceae* κρίνεται απαραίτητος, προκειμένου να αναπτυχθούν πιο αποτελεσματικές μοριακές μέθοδοι διάγνωσης που θα ανιχνεύουν το σύνολο των απομονώσεων του ιού. Τέλος, ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στη διερεύνηση του τρόπου μετάδοσης του ιού καθώς ο εμβολιασμός σε προσβεβλημένο υποκείμενο ή η χρήση προσβεβλημένου πολλαπλασιαστικού υλικού, δε φαίνεται να ευσταθούν ως πιθανές απαντήσεις στο ερώτημα με πιο τρόπο ο ιός μεταδόθηκε στο είδος *Potentilla pindicola* καθώς και σε άλλα αυτοφυή είδη της οικογένειας *Rosaceae*.

Βιβλιογραφία

1. Ξενόγλωσση

- Acer G., Cambra M., Lavina A. and Aramburu J. (1985). Suitable conditions for detecting *Apple chlorotic leaf spot virus* in apricot trees by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Agronomie* 5: 809-812
- Adams M.J., Antoniw J.F., Bar-Joseph M., Brunt A.A., Candresse T., Foster G.D., Martelli G.P., Milne R.G. and Fauquet C.M. (2004). "The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation". *Archives of Virology* 149: 1045-1060
- Aldaoud R., Dawson W.O. and Jones G.E. (1989). Rapid, random evolution of the genetic structure of replicating *Tobacco mosaic virus* populations. *Intervirology* 30: 227-233
- Atkins D., Hull R., Wells B., Roberts K., Moore P. and Beachy R.N. (1991). The *Tobacco mosaic virus* 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localised to plasmodesmata. *Journal of General Virology* 72: 209-211
- Bem F. and Murant A.F. (1980). Heracleum latent virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, no. 228
- Bonnet J., Fraile A., Sacristan S., Malpica J.M. and Garcia-Arenal F. (2005). Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA virus. *Virology* 332: 359-368
- Borisova A. (2005). Preliminary results of the study on the spread of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) in different fruit tree species in Kyustendil region of Bulgaria. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 33: 82-86
- Boscia D., Minafra A. and Martelli G.P. (1997). Filamentous viruses of the grapevine: putative *Trichoviruses* and *Capilloviruses*. In: Monette PL(ed) *Filamentous viruses of woody plants*. Research Singpost, Trivandrum, India. pp 19–28
- Bruyere A., Wantroba M., Flasiński S., Dzianott A. and Bujarski J.J. (2000). Frequent homologous recombination events between molecules of one RNA component in a multipartite RNA virus. *Journal of Virology* 74: 4214-4219
- Caglayan K., Ulubas Serce C., Gazel M. and Jelkmann W. (2006). Detection of four apple viruses by ELISA and RT-PCR assays in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 30: 241-246

- Campbell A.I. (1971). The distribution of viruses in ornamental *Malus* and their effects on growth. *Proceedings of the international Plant Propagators Society Annual Meeting*, 236-245
- Candresse T. (1995). Recent developments in plant viruses detection. *Acta Horticulturae* 386: 601-605
- Candresse T., Lanneau M., Revers F., Grasseau N., Macquaire G., German S., Malinowski T. and Dunez J. (1995). An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Acta Horticulturae* 386: 136-147
- Candresse T., German S., Lanneau M. and Dunez J. (1996). *In vitro* translation of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) RNA. *Archives of Virology* 141: 2031-2043
- Candresse T., Barone M., Svanella-Dumas L., Marais A., Ragozzino A., Mathioudakis M.M., Maliogka V.I. and Katis N.I. (2006). Analysis of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), genetic diversity and implications for its evolutionary history and for its epidemiology. *XIth International Symposium on small fruit virus diseases*, Antalya, Turkey (22-26 May), pp. 24
- Cañizares M.C., Aparicio F., Amari K and Pallás V. (2001α). Studies on the aetiology of apricot “viruela” disease. *Acta Horticulturae* 550: 249-256
- Canizares M.C., Marcos J.F. and Pallas V. (2001β). Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of *Carnation mottle virus* (CarMV) and phylogenetic relationships within the Tombusviridae family. *Archives of Virology* 146: 2039-2051
- Cheng C.P., Pogany J. and Nagy P.D. (2002). Mechanism of DI RNA formation in *Tombusviruses*: Dissecting the requirement for primer extension by the tombusvirus RNA-dependant RNA polymerase *In vitro*. *Virology* 304: 460-473
- Cieslinska M., Malinowski T. and Zawadzka B.J. (1994). Studies of several strains of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) isolated from different fruit tree species. *Acta Horticulturae* 386: 63-71
- Cieslinska M. (2002). Elimination of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. *Acta Horticulturae* 596: 481-484
- Citir A. and Ilbagi H. (2008). Serological identification of some important viruses on fruit trees and bushes in Tekirdag province of Turkey. *Acta Horticulturae* 781: 103-106
- Colin and Verhoyen (1975). Identification of the viruses in ornamental *Prunus* sp. in Belgium. *Landbouwtijdschrift. Revue de l'Agriculture* (Belgium) 28: 935-951

- Cropley R. and Posnette A.F. (1963). The identification of some viruses infecting apple, pear and quince. *Phytopathological Mediterraneana* 2: 132-136
- Cropley R. (1968α). Comparison of some apple latent viruses. *Annals of Applied Biology* 61: 361-372
- Cropley R. (1968β). The identification of plum pox (Sharka) virus in England. *Plant Pathology* 17: 66-70
- Cropley R. (1969α). *Apple chlorotic leafspot virus*. In: *Virus diseases of apples and pears*, Technical Communication 30, *Supplement Nos. 2/3/4*, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK, 10-13
- Cropley R. (1969β). Virus diseases in ornamental *Prunus* plants. *Nurseryman and Garden Centre* 149: 357-359
- Cropley R. (1974). Virus diseases of ornamental and other trees. *Report of East Malling Research Station for 1973* p.154
- Desvignes J.C. and Boyé R. (1988). Different diseases caused by the *Chlorotic leaf spot virus* on the fruit trees. *Acta Horticulturae* 235: 31-35
- Desvignes, J. C., Boyé, R., Cornaggia, D., and Grasseau, N. (1999). Virus Diseases of Fruit Trees. *Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes* Paris, France
- Detienne G., Delbos R. and Dunez J. (1980). Use and versatility of the immunoenzymatic ELISA procedure in the detection of different strains of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Acta Phytopathologica Academia Scientia Hungary* 15: 39-45
- Dijkstra J. and De Jager C.P. (1998). *Practical plant Virology. Protocols and Exercises*. Springer/Berlin, Heidelberg, New York
- Dolja V.V. and Carrington J.C. (1992). Evolution of positive-strand RNA viruses. *Seminars in Virology* 3: 315-326
- Domingo E. and Holland J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* 51: 151-178
- Drake J.W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 4171-4175
- Dunez J., Ravelonandro M. and Candresse T. (1994). Plum pox: advances in research on disease and its causal agent, and possible means of control. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24: 537-543
- Flegg C.L. and Clark M.F. (1979). The detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Annals of Applied Biology* 91: 61-65

- Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentit P., Dulucq M. J., Marais A. and Candresse T. (2005). Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-polymerase chain reaction: A polyvalent detection and characterization tool for *Trichoviruses*, *Capilloviruses*, and *Foveaviruses*. *Phytopathology* 95: 617-625
- Fritzsche R. and Kengler H. (1968). Nematoden als Vektoren von Viruskrankheiten der Obstgewachse. *TagBer. dt. Akad. Landw. Berlin* 97: 289-295
- Friedlund P.R. (1986). Symptoms intensities in pear and quince cultivars incited by the virus that causes *Pear ring pattern mosaic* and *Apple chlorotic leaf spot*. *Zastita Bilja* 37: 327-333
- Fujiwara T., Giesman- Cookmeyer D., Ding B., Lommel S.A. and Lucas W.J. (1993). Cell-to-cell trafficking of micromolecules through plasmodesmata potentiated by the *Red clover necrotic mosaic virus* movement protein. *Plant Cell* 5: 1783-1794
- Gallipienso L., Vives M.C., Moreno P., Milne R.G., Navarro L. and Guerri J. (2001). Partial characterization of *Citrus leaf blotch virus*, a new virus from Nagami kumquat. *Archives of Virology* 146: 357-368
- Gambley C.F. and Thomas J.E. (2001). Molecular characterization of *Banana mild mosaic virus*, a new filamentous virus in *Musa* spp. *Archives of Virology* 146: 1369-1379
- Gella R. and Errea P. (1998). Application of *In Vitro* Therapy for *Ilarvirus* Elimination in Tree *Prunus* Species. *Journal of Phytopathology* 146: 445-449
- Gentit P., Foissac X., Svanella-Dumas L., Peypelut M., Macquaire G. and Candresse T. (2001). Biological properties and partial molecular characterisation of two *Foveaviruses* associated with similar disorders of cherry trees. *Acta Horticulturae* 550: 161-168
- German S., Candresse T., Lanneau M., Pernollet J. C. and Dunez J. (1990): Nucleotide sequence and genomic organization of *Apple chlorotic leaf spot closterovirus*. *Virology* 179: 104-112
- German S., Candresse T., Le Gall O., Lanneau M. and Dunez J. (1992). Analysis of the dsRNAs of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of General Virology* 73: 767-773
- German-Retana S., Bergey B., Delbos R.P., Candresse T. and Dunez J. (1997). Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of *Apple chlorotic leaf spot trichovirus* (ACLSV). *Archives of Virology* 142: 833-841
- Gilmer R.M. (1967). *Apple chlorotic leafspot* and *Tobacco mosaic viruses* in cherry. *Plant disease Reporter* 51: 823-825

- Gilmer R.M., Mink G.I., Shay G.R., Stouffer R.F. and McCrum R.C. (1971). Latent viruses of apple: I. Detection with woody indicators. *NY States of Agricultural Experiment Station (Geneva)* 1: 1-9
- Graves M.V., Pogany J. and Romero J. (1996). Defective interfering RNAs and defective viruses associated with multipartite RNA viruses of plants. *Seminars in virology* 7: 6251-6256
- Guindon S. and Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704
- Hansen A.J. (1988). Chemotherapy of plant virus infections. In: E. Kurstak, R.G. Marusyk, F.A. Murphy and M.H.V. Van Regenmortel (Eds.), *Applied Virology Research, Vol. 1. Plenum Medical Book Company, New York.* pp. 285-299
- Hernandez C., Carette J.E., Brown D.J.F. and Bol J. (1996). Serial passage of *Tobacco rattle virus* under different selection conditions results in deletion of structural and non-structural genes I RNA 2. *Journal of Virology* 70: 4933-4940
- Huang M. and Zhang L. (1999). Association of the movement protein of *Alphavirus mosaic virus* with the endoplasmic reticulum and its trafficking in epidermal cells of onion bulb scales. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 680-690
- Hull R. (2002). In: *Matthew's Plant Virology*. Fourth edition, Academic Press
- Isogai M. and Yoshikawa N. (2005). Mapping the RNA-binding domain on the *Apple chlorotic leaf spot virus* movement protein. *Journal of General Virology* 86: 225-229
- James D. and Mukerji S. (1993). Mechanical Transmission, Identification, and Characterization of a virus associated with *Mottle Leaf in Cherry*. *Plant Disease* 77: 271-275
- James D. and Howell W.E. (1998). Isolation and partial characterization of a filamentous virus associated with *Peach mosaic virus* disease. *Plant Disease* 82: 903-913
- James D., Jelkmann W. and Upton C. (2000). Nucleotide sequence and genome organization of *Cherry mottle leaf virus* and its relationship to members of the *Trichovirus* genus. *Archives of Virology* 145: 995-1007
- Jan F.J., Wu Z.B., Kuo A.J., Zheng Y.X., Chang H.H., Su C.C. and Yang Y.S. (2003). Detection of *Apple chlorotic leaf spot* and *Apple stem grooving viruses* by the method of reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Pathology Bulletin* 12: 10-18
- Jelkmann W. (1994). Nucleotide sequences of *Apple stem pitting virus* and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their

- relationship with *Potex*- and *Carlaviruses*. *Journal of General Virology* 75: 1535-1542
- Juárez J., Arregui J.M., Camarasa E., Cambra M., Llácer G., Ortega C., Ortega V. and Navarro L. (1988). Recovery of virus-free peach trees from selected clones by shoot-tip grafting *in vitro*. *Acta Horticulturae* 235: 77-83
- Kalashjan J.A. and Lipartia Z.M. (1986). *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) in affected tissues and the possibility of its detection by immune electron microscopy (ISEM). *Acta Horticulturae* 193: 311-318
- Karešová R. and Paprštejn F. (1997). Occurrence of plum pseudopox (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) in plum germplasm. *Acta Horticulturae* 478: 283-286
- Karesova R. and Paprstein F. (2001). *Apple chlorotic leaf spot virus* in germplasm collection of fruit species. *Acta Horticulturae* 550: 259-264
- Keifer H. and Wilson N. (1955). A new species of eriophyd mite responsible for the vection of *Peach mosaic virus*. *The Bulletin (Department of Agriculture, State of California)* 44: 145-146
- Kengler H. (1960). Das ringfleckenmosaik der Eberesche (*Sorbus acuparia* L.) *Phytopathologische Zeitschrift* 37: 214-216
- Kerlan C., Mille B. and Dunez J. (1981). Immunosorbent electron microscopy for detecting *Apple chlorotic leaf spot* and *Plum pox viruses*. *Phytopathology* 71: 400-404
- Kim M.J. and Kao C. (2001). Factors regulating template switch *in vitro* by RNA-dependant RNA polymerases: implications for RNA-RNA recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 4972-4977
- Kinard G.R., Scott S.W. and Barnett O.W. (1996). Detection of *Apple chlorotic leaf spot* and *Apple Stem Grooving Viruses* using RT-PCR. *Plant Disease* 80: 616-621
- Knapp E., Hanzer V., Weiss H., Da Câmara Machado A., Weiss B., Wang Q., Katinger H. and Laimer da Câmara Machado M. (1995). New aspects of virus elimination in fruit trees. *Acta Horticulturae* 386: 409-418
- Koonin E. V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 72: 2197-2206
- Kralikova K. (1961). Kruzkov it ost jarabiny v CSSR. *Biologia Bratislava* 16: 835-838
- Krizbai L., Ember I., Nemeth M. and Kolber M. (2001). Characterization of Hungarian isolates of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Acta Horticulturae* 550: 291-295

- Kummert J., Marinho V.L.A., Rufflard G., Colinet D. and Lepoivre P. (1998). Sensitive detection of *Apple stem grooving* and *Apple stem pitting viruses* from infected apple trees by RT-PCR. *Acta Horticulture* 472: 97-104
- Kummert J, Vendrame M, Steyer S and Lepoivre P (2000) Development of routine RT-PCR tests for routine certification of fruit tree multiplication material. *OEPP/EPPO Bulletin* 30: 441–448
- Kunugi Y., Asari S., Terai Y. and Shinkai A. (2000). Studies on the *Grapevine berry inner necrosis virus* disease. 2. Transmission of *Berry inner necrosis virus* by the grape erineum mite *Colomerus vitis* in Yamanashi. *Bulletin of Yamanashi Fruit Tree Experiment Station* 10: 57-63
- Lemmety A. (1988). Isolation and purification of *Apple chlorotic leaf spot virus* and its occurrence in Finnish orchards. *Acta Horticulturae* 235: 177-180
- Leone G. Lindner J.L., Van der Meer F.A. and Schoen C.D. (1998). Symptoms on apple and pear indicators after back-transmission from *Nicotiana occidentalis* confirm the identity of *Apple stem pitting virus* with *Pear vein yellows virus*. *Acta Horticulturae* 472: 61-65
- Liberti D., Ragozzino A., Marais A., Svanella- Dumas L., Candresse T. and Gentit P. (2004) Identification of a New *Trichovirus* in Some Fruit Trees Infected by *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* (ACLSV). *Acta Horticulturae* 657: 81-85
- Liberti D., Marais A., Svanella-Dumas L., Dulucq M., Alioto D., Ragozzino A., Rodoni B. and Candresse T. (2005). Characterization of *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus*, A Novel *Trichovirus* Isolated from Stone Fruit Trees. *Phytopathology* 95: 420-426
- Liping W., Guoping W., Ni H., Rongrong T., Xiaoyun D. and Hong Z. (2006). Effect of thermotherapy on elimination of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* for in vitro-cultured pear shoot tips. *HortScience* 41: 729-732
- Lister R.M., Bancroft J.B. and Nadakavukaren M.J. (1965). Some sap-transmissible viruses from apple. *Phytopathology* 55: 859-870
- Lister R.M. (1970α). *Apple chlorotic leaf spot virus*. CMI/AAB Descriptions of plant Viruses, No 30
- Lister R.M. (1970β). *Apple Stem Grooving virus*. CMI/ABB Descriptions of Plant Viruses, No 31
- Lister R. and Hadidi A. (1971). Some properties of *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* and Their Relation to Purification Problems. *Virology* 45: 240-251

- Lister R.M. and Bar-Joseph M. (1981). *Closteroviruses*. In 'Hand-book of Plant virus Infections and Comparative Diagnosis' (E. Kurstak Ed.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 809-844
- Luckwill L.C and Campbell A.I. (1959). *Malus platycarpa* as an apple virus indicator. *Journal of Horticultural Science* 34: 248-252
- Malinowski T., Komorowska B., Cieslinska M., Zawadzka B. and Candresse T. (1998). Characterization of SX/2, an *Apple chlorotic leaf spot virus* isolate showing unusual coat protein properties. *Acta Horticulturae* 472: 43-50
- Maliogka V., Dovas C. I., Efthimiou K. and Katis N. I. (2004). Detection and differentiation of *Comoviridae* species using a semi-nested RTPCR and a phylogenetic analysis based on the polymerase protein. *Journal of Phytopathology* 152: 404-409
- Maliogka V. I., Dovas C. I. and Katis N. I. (2007). Demarcation of *Ilarviruses* based on the phylogeny of RNA2-encoded RdRp and a generic ramped annealing RT-PCR. *Archives of Virology* 152: 1687-1698
- Marini D., Gibson P. and Scott S. (2008). The complete nucleotide sequence of an isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus* from peach (*Prunus persica* (L.) Batch). *Archives of Virology* 153: 1003-1005
- Martelli G.P., Candresse T. and Namba S. (1994). *Trichovirus*, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology* 134: 451-455
- Martelli G.P. and Savino V. (1997). Infectious diseases of almond with special references to the Mediterranean area. *Eppo Bulletin* 27: 525-534
- Martelli G., Adams M., Kreuze J. and Dolja V. (2007). Family *Flexiviridae*: A case study in virion and genome Plasticity. *Annual Review of Phytopathology* 45: 73-100
- Mathioudakis M. M., Candresse T. and Katis N. I. (2007). First Report of *Apple chlorotic leaf spot virus* in Quince in Greece. *Plant Disease* 91: 462
- Matić, S., Al Rwahnih, M., Myrta, A. and Đurić, G. (2008). Viruses of stone fruits in Bosnia and Herzegovina. *Acta Horticulturae* 781: 71-74
- Menzel W., Jelkmann W. and Maiss E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99: 81-92
- Menzel W., Zahn V. and Maiss E. (2003). Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. *Journal of Virological Methods* 110: 153-157

- Minafra A., Saldarelli P. and Martelli G.P. (1997). *Grapevine virus A*: nucleotide sequence, genome organization, and relationship in the *Trichovirus* genus. *Archives of Virology* 142: 417-423
- Mink G.I. and Shay J.R. (1959). Preliminary evolution of some Russian apple varieties as indicators for apple viruses. *Supplement Plant Disease Reporter* 13:254
- Mink, G. I., and J. R. Shay. (1962). Latent viruses in apple. Purdue University Agricultural Experiment Station. *Research Bulletin* pp. 756
- Mink G.I, Shay G.R., Gilmer R.M. and Stouffer R.F. (1971). Latent viruses in apple II. Symptoms in woody indicators and strain variation. *New York State Agricultural Experiment Station Search Agriculture* 1: 9-15
- Mohamed H., Myrta A. and Polak J. (2006). Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 133: 124-129
- Monette P.L. (1983). Virus eradication through in vitro techniques. *Proceedings of the International Plant Propagation Society* 33: 90-100
- Morozov S.Y., Ryabov E.V., Leiser R.M. and Zavriev S. K. (1995). Use of highly conserved motifs in plant virus RNA polymerases as the tags for specific detection of *Carmovirus*-related RNA-dependent RNA polymerase genes. *Virology* 207: 312-315
- Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. and Martelli G.P. (2003). Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. *Options Méditerranéennes Série B* 45: 15-23
- Németh M. (1986). Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit trees. *Ed. Akademiai Kiado, Budapest and Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster* pp.840
- Oldfield G and Proeseler G. (1996). Eriophyoid mites as vectors of plant viruses. *In Eriophyoid Mites, Their biology, Natural enemies and control. EE Lindquist, MW Sabelis, J Bruin, Amsterdam: Elsevier* pp.259-275
- Pasquini G., Faggioli F, Pilotti M., Lumia V. Barba M. (1998). Characterization of *apple chlorotic leaf spot virus* isolates. *Acta Horticulturae* 472: 195-202
- Paunović S. (1988). Properties of two *Apple chlorotic leaf spot virus* isolates. *Acta Horticulturae* 235: 39-48
- Paunovic S., Ruzic D., Vujovic T., Milenkovic S. and Jevremonic D. (2007). In vitro production of plum pox- free plums by chemotherapy with Ribavirin. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 21: 417-421

- Pena-Iglesias A. and Ayuso Gonzalez P. (1973). Preliminary identification of the viruses producing Spanish apricot pseudopox (viruela) and Apricot mosaic diseases. *Acta Horticulturae* 44: 255-265
- Peña- Iglesias A. and Ayuso P. (1975). Preliminary identification of the viruses producing Spanish apricot pseudo pox “viruela” and apricot mosaic diseases. *Acta Horticulturae* 44: 255-265
- Posnette A.F. (1957). Virus diseases of pears in England. *Journal of Horticultural Science* 32: 53-61
- Poul F. and Dunez J. (1990). Use of monoclonal antibodies for the identification of different antigenic domains in *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Archives of Virology* 114: 191-202
- Pracros P., Dettienne G., Sarraquigne C. and Dunez J. (1981). Interets compares de l'indexage biologique sur semis de pecher GF-305 et du diagnostic immunoenzymatique ELISA pour la detection de virus des especes fruitieres. *Agronomie* 1: 535-540
- Ragozzino A. and Pugliano G. (1974). La butteratura delle albicocche. Indagini preliminary sulla eziologia. *Rivista dell'Ortoflorofrutticoltura Italiana* 58: 136-145
- Ramsfjell T. (1957). Virussjukdommer pa frukttraeer. *Frukt og Baer* 10: 64-76
- Rana T., Chandel V., Hallan V. and Zaidi A.A. (2007). Molecular evidence for *Apple chlorotic leaf spot virus* in wild and cultivated apricot in Himachal Pradesh, India. *Journal of Plant Pathology* 89 p.S72
- Rana T, Chandel V., Hallan V. and Zaidi A. A. (2008α). Characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* infecting almonds in India. *Australasian Plant Disease Notes* 3: 65-67
- Rana T., Chandel V., Hallan V. and Zaidi A. (2008β). *Cydonia oblonga* as reservoir of *Apple chlorotic leaf spot virus* in India. *Plant Pathology* 57: S393
- Rana T., Chandel V., Hallan V. and Zaidi A.A. (2008γ). Himalayan wild cherry (*Prunus cerasoides* D.Don): a new host of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *For. Path.* 38: 73-77
- Reichel C., Mas P. and Beachy R.N. (1999). The role of the ER and cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends in Plant Science* 4: 458-462
- Rott M.E. and Jelkmann W. (2001α). Characterization and Detection of Several Filamentous Viruses of Cherry: Adaptation of an Alternative Cloning Method (DOP-PCR), and Modification of an RNA Extraction Protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107: 411-420

- Rott M. E., and Jelkmann W. (2001β). Complete nucleotide sequence of *Cherry necrotic rusty mottle virus*. *Archives of Virology* 146: 395-401
- Routh G., Zhang Y.-P., Saldarelli P. and Rowhani A. (1998). Use of degenerate primers for partial sequencing and RT-PCR-based assays of grapevine leafroll-associated viruses 4 and 5. *Phytopathology* 88: 1238-1243
- Rowhani A., Maningas M.A., Lile L.S., Doubert S.D. and Galino D.A. (1995). Development of a detection system of viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology* 85: 347-352
- Rowhani A., Uyemoto J.K., Golino D.A. and Martelli G.P. (2005). Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. *Annual Review of Phytopathology* 43: 261-278
- Rwahnih A.M, Turturo C., Minafra A., Myrta A., Pallas V. Potere O., Boscia D. and Savino V. (2003). Studies on the variability of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of Plant Pathology* 85: S320
- Rwahnih Al M., Turturo C., Minafra A., Saldarelli P., Myrta A., Pallás V. and Savino V. (2004). Molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* in different hosts and geographical regions. *Journal of Plant Pathology* 86: 117-122
- Sabanadzovic S., Abou-Ghanem N., Castellano M.A., Digiario M. and Martelli G.P. (2000). *Grapevine fleck virus*-like viruses in *Vitis*. *Archives of Virology* 145: 553-565
- Saksena K.N. and Mink G.I. (1969). Purification and properties of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Phytopathology* 59: 84-88
- Salazar L.F. and Harrison B.D. (1978). Potato virus T. CMI/AAB Descriptions of plant Viruses, No.187
- Saldarelli P., Rowhani A., Routh G., Minafra A. and Digiario M. (1998). Use of degenerate primers in a RT-PCR assay for the identification and analysis of some filamentous viruses, with special reference to *Closteroviruses* and *Vitivirus* of the grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 104: 945-950
- Salem N., Mansour A. and Al-Musa A. (2005). Viruses of pome fruit trees in Jordan. *Journal of Plant Pathology* 87: 123-186
- Salmon M.A., Vendrame M., Kummert J. and Lepoivre P. (2002). Detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* using a 5' nuclease assay with a fluorescent 3' minor groove binder-DNA probe. *Journal of Virological Methods* 104: 99-106

- Sanchez Navarro J.A., Aparicio F., Herranz M.C., Minafra A., Myrta A. and Pallas V. (2005). Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 111: 77-84
- Sato K. Yoshikawa N. and Takahashi T. (1993). Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of General Virology* 74: 1927-1931
- Satoh H., Yoshikawa N. and Takahashi T. (1999). Construction and biolistic inoculation of an infectious cDNA clone of *Apple chlorotic leaf spot Trichovirus*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 65: 301-304
- Satoh H., Matsuda H., Kawamura T., Isogai M., Yoshikawa N. and Takahashi T. (2000). Intracellular distribution, cell-to-cell trafficking and tubule-inducing activity of the 50kDa movement protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* fused to green fluorescent protein. *Journal of General Virology* 81: 2085-2093
- Savino V. (1997). Virosi del ciliegio e certificazione. In *Atti del convegno Nazionale del Ciliegio (Godini A. ed) Società Orticola Italiana* pp.119-129
- Schimanski H.H. and Schmelzer K. (1974). Nachweis der chlorotischen blattfleckung des apfels und der verzweigung von *Malus platycarpa* in ringfleckiger *Chaenomeles*. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 10: 211-215
- Singh A.K., Hallan V., Ram R. and Zaidi A. (2005). Variability in the coat protein of Lily symptomless virus isolates infecting various lily species. *Plant Pathology* 54: 621-624
- Sipahioglu H.M. and Baloglu S. (2006). The incidence of *Prunus necrotic ringspot* (PNRSV) and *Apple chlorotic leaf spot* (ACLSV) viruses on stone fruits grown in East Anatolia region of Turkey. *Acta Horticulturae* 701: 469-472
- Spiegel S., Thompson D., Varga A. and James D. (2005). An *Apple chlorotic leaf spot virus* isolate from ornamental dwarf flowering almond (*Prunus glandulosa* 'sinensis'): Detection and characterization. *Journal of Horticultural Science* 40: 1401-1404
- Spiegel S., Thompson A., Varga A., Rosner A. and James D. (2006). Evaluation of reverse transcription-polymerase chain reaction assays for detecting *Apple chlorotic leaf spot virus* in certification and quarantine programs. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: 280-288
- Sweet J.B. and Campbell A.I. (1973). Improvement of woody ornamentals-*Malus* and *Pyrus* species. *Report of Lond Ashton Research Station for 1972* pp. 42-43
- Sweet J. B. (1976). Virus diseases of some ornamental and indigenous trees and shrubs in Britain. *Acta Horticulturae* 59: 83-92

- Sweet J.B. and Campbell A.I. (1976). Pome fruit virus infections of some woody ornamental and indigenous species of *Rosaceae*. *Journal of Horticultural Science* 5: 91-97
- Sweet J.B. (1980α). Hedgerow hawthorn (*Crataegus* spp.) and blackthorn (*Prunus spinosa*) as hosts of fruit tree viruses in Britain. *Annals of Applied Biology* 94: 83-90
- Sweet J.B. (1980β). Fruit tree virus infections of ornamental rosaceous trees and shrubs. *Journal of Horticultural Science* 55: 103-111
- Syrgiannidis G.D. (1988). Problems of virus diseases of delicious fruit trees in Greece. *Acta Horticulturae* 235: 21-25
- Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. (2007). *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599
- Tanne E. and Sela I. (2005). Occurrence of a DNA sequence of a non-retro RNA virus in a host plant genome and its expression: evidence for recombination between viral and hosts RNAs. *Virology* 332: 614-622
- Terlizzi di B. (1998). Biological diagnosis of virus and virus-like diseases: a special reference to stone fruit certification. *Option Méditerranéennes série B* 19: 1016-1228
- Thompson N. and Randles J.W. (2001). The genome organisation and taxonomy of *Sugarcane striate mosaic associated virus*. *Archives of Virology* 146: 1441-1451
- Tian T., Klaassen V.A., Soong J., Wisler G., Duffus J.E. and Falk B.W. (1996). Generation of cDNAs specific to *Lettuce infectious yellows closterovirus* and other whitefly-transmitted viruses by RT-PCR and degenerate oligonucleotide primers corresponding to the *Closterovirus* gene encoding the heat shock protein 70 homologue. *Phytopathology* 86: 1167-1173
- Topchiiska M. (1995). *Apple chlorotic leaf spot virus* in *Prunus* spp. in Bulgaria. *Plant Science* 32: 24-27
- Ulubas C. and Ertunc F. (2005). *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) status in Turkey and sensitive detection using advanced techniques. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29: 251-257
- Ulubas Serce C. and Rosner A. (2006). Molecular typing of Turkish *Apple chlorotic leaf spot virus* isolates based on partial coat protein gene. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: 117-125
- Van der Meer, F.A. (1986). Observations on the etiology of some virus diseases of apple and pear. *Acta Horticulture* 193: 73-74

- Van Katwijk W. (1957). Een lijnenmosiek van *Amelanchier*, veroorzaakt door het ringvlekken-mozaiekvirus van peer. *Plantenziektenkundigen te Wageningen* 130: 165-167
- Varveri C. and Bem F. (1995). Viruses of stone and pome-fruit mother-tree plantations in Greece. *Acta Horticulturae* 386: 431-438
- Varveri C., Holeva R. and Bem F. P. (1997). Effect of sampling time and plant part of the detection of two viruses in apricot and one in almond by ELISA. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki* 18: 25-33
- Varveri C. (1998). Sanitary status of stone fruit industry in the Mediterranean countries. *Options Mediterraneennes, serie B* 19: 51-52
- Verma L. and Sharma R. (1999). Apple Scab and its Management. In: “*Diseases of Horticultural Crops/Fruits*”. *Indus Publishing Co.*, NewDelhi, India. pp.724
- Wood G.A. (1973). Application of heat therapy for the elimination of viruses from pip and stone fruit trees in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 16: 255-262
- Wood G. A. (2001). Sensitivity of apple (*Malus domestica*) indicator cultivars to russet ring disease, and the results of graft- transmission trials of other fruit- affecting disorders of apple. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 29: 255-265
- Wu Y.Q., Zhang D.M., Chen S.Y., Wang X.F. and Wang W.H. (1998). Comparison of three ELISA methods for the detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* and *Apple stem grooving virus*. *Acta Horticulturae* 472: 55-59
- Yaegashi H., Isogai M., Tajima H., Sano T. and Yoshikawa N. (2007). Combinations of two amino acids (Ala⁴⁰ and Phe⁷⁵ or Ser⁴⁰ and Tyr⁷⁵) in the coat protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* are crucial for infectivity. *Journal of General Virology* 88: 2611-2618
- Yanase H. (1974). Studies on apple latent viruses in Japan: the association of apple topworking disease with apple latent viruses. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station, Japan, Series C* (Morioka) 1: 47-109.
- Yoshikawa N. and Takahashi T. (1988). Properties of RNAs and Proteins of *Apple Stem Grooving* and *Apple Chlorotic Leaf spot Viruses*. *Journal of General Virology*, 69: 241-245
- Yoshikawa N. and Takahashi T. (1989). *In vitro* translation of *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus RNA*. *Journal of General Virology* 70: 3051-3054

- Yoshikawa N., Sasamoto K., Sakurada M., Takahashi T. and Yanase H. (1996). *Apple stem grooving* and *Citrus tatter leaf Capilloviruses* obtained from a single shoot of Japanese pear (*Pyrus serotina*). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 62: 119-124
- Yoshikawa N., Iida H., Goto S., Magome H., Takahashi T. and Terai Y. (1997). Grapevine berry inner necrosis, a new *Trichovirus*: comparative studies with several known trichoviruses. *Archives of Virology* 142: 1351-1363
- Yoshikawa N., Oogake S., Terada M., Miyabayashi S., Ikeda Y., Takahashi T. and Ogawa K. (1999). *Apple chlorotic leaf spot virus* 50kDa protein is targeted to plasmodesmata and accumulates in sieve elements in transgenic plant leaves. *Archives of Virology* 144: 2475-2483
- Zaccomer B., Haenni A.L. and Macaya G. (1995). The remarkable variety of plant RNA virus genomes. *Journal of General Virology* 76: 231-247
- Zahi H., Atallah K., Jawdah Y. A. and Saad A. (2000). Virus diseases infecting almond germplasm in Lebanon. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 417-422
- Zhang, Y.P., Kirkpatrick, B.C., Smart, C.D. and Uyemoto, J.K. (1998). cDNA cloning and molecular characterization of *Cherry green ring mottle virus*. *Journal of General Virology* 79: 2275-2281

2. Ελληνική

- Ανώνυμος (1971). Παρατηρηθείσαι εν Ελλάδι ασθένειαι των καλλιεργούμενων φυτών κατά την περίοδο 1962-1969. Χρονικά Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου Ν.Σ., 10: 71-124
- Βαρβέρη Χ. και Μπεμ Φ. (1994). Μαζική διάγνωση ιώσεων σε κρατικά και ιδιωτικά φυτώρια γιγαρτοκάρπων στην Ελλάδα με την ανοσολογική μέθοδο ELISA. 7^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο. Πρακτικά Συνεδρίου σελ. 10-11
- Βασιλακάκης Μ. (1991). Στοιχεία γενικής και ειδικής δενδροκομίας. Πανεπιστημιακές εκδόσεις. σελ 267
- Βασιλακάκης, Μ. και Θερίος, Ι. (2001). Μαθήματα Ειδικής Δενδροκομίας. Πανεπιστημιακές εκδόσεις. σελ.93
- Βασιλακάκης Μ. (2004). Γενική και Ειδική δενδροκομία. Εκδόσεις Δεδούση, σελ. 721
- Μαθιουδάκης Μ. Μ., Μαλιόγκα Β. Ι., Δόβας Χ. Ι., Μπαρμπαγιάννης Ν. και Κατής Ν. Ι. (2006δ). Ανάπτυξη εστιασμένης RT-PCR για την ανίχνευση του ASPV και συσχέτισή του με την ασθένεια της παραμόρφωσης των καρπών της κυδωνιάς. 13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο. Πρακτικά Συνεδρίου σελ. 129
- Μαθιουδάκης Μ.Μ. (2006γ). Διερεύνηση της αιτιολογίας της ασθένειας ‘ Παραμόρφωση των καρπών της κυδωνιάς’ και μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας του ASPV στην Ελλάδα. Μεταπτυχιακή Διατριβή που υποβλήθηκε στο ΑΠΘ
- Μαθιουδάκης Μ.Μ. και Κατής Ν.Ι. (2006β). Φυλογενετική ανάλυση του ιού της χλωρωτικής κηλίδωσης των φύλλων της μηλιάς (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) και η επίδραση του ξενιστή στη δομή του πληθυσμού του. 13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο. Πρακτικά Συνεδρίου σελ. 128
- Μαθιουδάκης Μ.Μ., Μαλιόγκα Β.Ι. και Κατής Ν.Ι. (2006α). Παρουσία των ACLSV και ASPV σε καλλιεργούμενα, καλλωπιστικά και αυτοφυή είδη *Rosaceae* στην Ελλάδα. 13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο. Πρακτικά Συνεδρίου σελ. 130
- Μαλιόγκα Β.Ι. Δόβας Χ.Ι. Δρούγκας Ε.Β. Ευθυμίου Κ.Ε. και Κατής Ν.Ι. (2006). Ανίχνευση ιών των γενών *Closterovirus*, *Foveavirus* και *Ilarvirus* στην κερασιά. 13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο. Πρακτικά Συνεδρίου σελ. 131
- Συργιαννίδης Γ.Δ. (1977). Ιώσεις διαπιστωθείσαι επί οπωροφόρων δένδρων εν τη περιοχή κεντρικής Μακεδονίας. Πεπραγμένα Α’ Συμποσίου Γεωτεχνικών Ερευνών Β-Π: 357-364

- Χαρού Α. (2008). Συχνότητα εμφάνισης ιών σε καλλιέργειες αμυγδαλιάς σε Ελλάδα και Κύπρο και μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας των PDV και ACLSV. Μεταπτυχιακή διατριβή που υποβλήθηκε στο ΑΠΘ
- Χαρού Α. Θ., Μαλιόγκα Β. Ι., Μαθιουδάκης Μ. Μ., Ευθυμίου Κ. Ε., Παπαγιάννης Λ. Χ. και Κατής Ν. Ι. (2006). Συχνότητα εμφάνισης των ιών PNRSV, PDV και ACLSV σε καλλιέργειες αμυγδαλιάς σε Ελλάδα και Κύπρο. *13^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο*. Πρακτικά Συνεδρίου σελ. 163

1. Ορολογική δοκιμή ELISA

Αντιδραστήρια

Διάφορα χημικά: Applichem, J.T.Baker, Sigma

Αλκαλική φωσφατάση: Fluka

Αντισώματα: Χρησιμοποιήθηκαν δύο πολυκλωνικά αντισώματα από το INRA (Bordeaux, Γαλλία, ευγενική προσφορά του Dr. Thierry Candresse) και από τη συλλογή του ινστιτούτου BIOREBA (Bioreba AG, Reinach, Switzerland).

Αντί- αντισώματα: Συζευγμένη αντί- ποντίκι γ- σφαιρίνη- αλκαλική φωσφατάση, A-3562 (Sigma).

Η δοκιμή DAS -ELISA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτάθηκε από τους Clark& Adams (1977) και περιλαμβάνει τέσσερα στάδια.

Στο πρώτο στάδιο έχουμε προσρόφηση του πολυκλωνικού αντισώματος (100μl/φρεάτιο) στη μικροπλάκα πολυστερενίου, (96 φρεατίων, Costar immuno plates:EIA/RIA Costar corporation). Η IgG χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1/1000 σε διάλυμα επίστρωσης (coating buffer: 0,014M Na₂CO₃, 0,035M NaHCO₃, pH9.6). Ακολούθησε, επώαση στους 37°C για 4 ώρες και ξέπλυμα με PBS Tween (0,05% Tween, PBS: 1,4M NaCl, 0,01M KH₂PO₄, 0,08M Na₂HPO₄ × H₂O, 0,02M KCl) 2 φορές.

Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η προσθήκη του φυτικού εκχυλίσματος (100μl/φρεάτιο) σε PBS- Tween και 2% PVP (Polyvinylpyrrolidone, Acros organics) K29-32 και ακολουθεί επώαση στους 4°C για 16 ώρες και ξέπλυμα της μικροπλάκας με PBS- Tween (2 φορές).

Στο τρίτο στάδιο ακολουθεί η προσρόφηση της συζευγμένης με αλκαλική φωσφατάση IgG (100μl/ φρεάτιο). Στην περίπτωση αυτή η συζευγμένη IgG της BIOREBA ήταν 1/1000 ενώ του INRA ήταν 1/1500, σε διάλυμα που περιείχε PBS- Tween, 2% PVP K29-32 και 0,2% αλβουμίνη (BSA, Sigma). Ακολούθησε, επώαση στους 37°C για 4 ώρες και ξέπλυμα με PBS Tween 2 φορές.

Τέλος, στο τέταρτο στάδιο γίνεται η προσθήκη του υποστρώματος φωσφορική παρανιτροφαινόλη (p-paranitrophenyl phosphate, PNPP) (100μl/ φρεάτιο, αραιώση 1mg/ml) που αραιώνεται σε διάλυμα υποστρώματος (για 1lt pH 9.8: 97ml διεθανολαμίδης, 800ml απιονισμένο ύδωρ και 0,2 gr NaN₃).

Ακολουθεί επώαση της μικροπλάκας σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) στα 405 nm σε φωτόμετρο (Labsystems multiskan RC), 1 και 2 ώρες μετά την προσθήκη του υποστρώματος.

2. Εκχύλιση ολικού RNA

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 φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος στις 13.000 rpm για 1 λεπτό. Μεταφορά 500μl από την υδάτινη φάση (υπερκεείμενο) σε νέο μικροσωλήνα και προσθήκη 100μl 10% N-lauryl sarkosyl. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους 70⁰C για 10 λεπτά (ενδιάμεση ανάδευση ανά 2 λεπτά) και παραμονή του μικροσωλήνα στον πάγο για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά και μεταφορά 300μl από το υπερκεείμενο 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. Φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 1 λεπτό και απόχυση του υπερκειμένου, ενώ το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 500μl διαλύματος έκπλυσης (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,5mM EDTA, 50mM NaCl, 50% αιθανόλη) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000rpm για 1 λεπτό. Η έκπλυση 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. Επώαση του διαλύματος στους 70⁰C για 4 λεπτά (ενδιάμεση ανάδευση ανά 2 λεπτά) και φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 3 λεπτά. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο μικροσωλήνα και προσθήκη 1ml αιθανόλης 100% και 10 ml οξικό νάτριο. Τοποθέτηση του διαλύματος στους -80⁰C όλη τη νύχτα για την κατακρήμιση του RNA. Την επομένη φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 10 λεπτά, απομακρύνθηκε η υδάτινη και το ίζημα υποβλήθηκε σε στέγνωμα σε θάλαμο νηματικής ροής. Η τελική παραλαβή του ολικού RNA έγινε μετά από επαδιάλυση του ιζήματος σε 50μl ύδατος που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC.

3. RT- PCR

A. Πρωτόκολλο των Menzel κ.α. (2002)

Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν 2μl εκχυλίσματος ολικού RNA και η διαδικασία της πραγματοποιήθηκε σε ένα μικροσωλήνα σε ένα διάλυμα αντίδρασης τελικού όγκου 25μl το οποίο περιείχε: 10mM Tris-HCl (pH 8.8), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 5%DMSO, 0,5mM DTT, 0,25mM από κάθε dNTP, 0,4 μM από κάθε εκκινητή (ACLSV Menz up ACLSV Menz do), 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 SuperscriptTM II Rnase H⁻ αντίστροφη μεταγραφάση (Invitrogen, The Netherlands), μια μονάδα DynazymeTM II DNA πολυμεράση (Finnzymes, Finland) και συμπληρώθηκε μέχρι τα 23μl με απεσταγμένο ύδωρ που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC.

Οι τελικές συνθήκες που επιλέχθηκαν μετά από βελτιστοποιήσεις είναι οι εξής: 46⁰C για 20', 48⁰C για 20', 50⁰C για 20', 52⁰C για 5', και 95⁰C για 5' (αντίδραση μεταγραφής RNA σε DNA και μετουσίωση της αντίστροφης μεταγραφάσης), 40 κύκλοι : 95⁰C για 30'' (αποδιάταξη δίκλωνου εκμαγείου DNA), 56⁰C για 30'' (υβριδοποίηση των εκκινητών με το εκμαγείο) και 72⁰C για 30'' (επέκταση των εκκινητών). Τέλος για τη συμπλήρωση των ημιτελών αλυσίδων η αντίδραση ολοκληρώνεται με επώαση στους 72⁰C για 2',.

B. Πρωτόκολλο των Μαθιουδάκης κ.α. (2006)

Για την εφαρμογή της RT- PCR ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ολικού RNA (2μl). Και οι δύο 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 DTT, 0,25mM από κάθε dNTP, 0,2μM από τον εκκινητή CLSup και 0,4μM από τον εκκινητή 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 SuperscriptTM II Rnase H⁻ αντίστροφη μεταγραφάση (Invitrogen, The Netherlands), μια μονάδα DynazymeTM II DNA πολυμεράση (Finnzymes, Finland). Τέλος προστίθεται ύδωρ που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC έως ότου ο όγκος του

διαλύματος γίνει 23μl. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Mastercycler gradient, Eppendorf) σύμφωνα με το ακόλουθο προφίλ: 47⁰C για 50' και 50⁰C για 7': για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε DNA και 94⁰C για 4': για την μετουσίωση της αντίστροφης μεταγραφάσης, 40 κύκλοι που περιλαμβάνουν τα εξής στάδια 94⁰C για 30'' όπου πραγματοποιείται αποδιάταξη του δίκλωνου εκμαγείου DNA, 51⁰C για 30'' όπου επιτυγχάνεται η υβριδοποίηση των εκκινητών με το εκμαγείο και 72⁰C για 30'' όπου πραγματοποιείται η επέκταση των εκκινητών, και τέλος ένα τελικό στάδιο επέκτασης στους 72⁰C για 2' για συμπλήρωση των ημιτελών αλυσίδων.

4. Διαδικασία εστιασμένης PCR

Για την εφαρμογή της εστιασμένης PCR, ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε 1μl από το προϊόν της γενικής RT-PCR (Βλέπε Παράρτημα 3.A). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωλήνα των 0,2 ml σε τελικό όγκο 20μl. Το διάλυμα της αντίδρασης περιείχε: 10mM Tris-HCl (pH 8.8), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 3% DMSO, 0,2mM από κάθε dNTP, 0,2μM από τον εκκινητή CLSup και 0,4μM από τον εκκινητή CLSdo, μια μονάδα DynazymeTM II DNA πολυμεράση (Finnzymes, Finland) και ύδωρ που είχε υποστεί μεταχείριση με DEPC μέχρι να φτάσει το διάλυμα τα 20μl. Η αντίδραση της εστιασμένης PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Mastercyclergradient, Eppendorf) και το τελικό προφίλ ήταν: 94⁰C για 4', ακολούθησαν 40 κύκλοι στους 94⁰C για 30'', 51⁰C για 30'', και 72⁰C για 20''. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ένα τελευταίο στάδιο επέκτασης στους 72⁰C για 2'.

5. Ανίχνευση προϊόντων της RT-PCR

Η ανίχνευση των τελικών προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκε 1,5% αгарόζη σε διάλυμα της ηλεκτροφόρησης TAE 1X (TAE 50X για 1lt: 242 gr Tris-base, 57,1 ml 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 PCR. Δέκα (10)μl από το προϊόν της 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 ανα 100 ζβ [Ladder 100bps, 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).

6. PDO RT-PCR

Κάθε δοκιμή περιλάμβανε μια συνδυασμένη RT-PCR με τους εκκινητές PDO-F1i, PDO-R3i, και PDO-R4i, και μία εστιασμένη PCR με τους εκκινητές PDO-F2i και PDO-R1i. Στην RT-PCR προστέθηκαν 2 μl ολικού εκχυλίσματος RNA σε τελικό όγκο 25 μl 10mM Tris-HCl (pH 8.8), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,25 % DMSO, 5mM DTT, 0,25 mM κάθε dNTP, και 1 μM από κάθε εκκινητή PDO-F1i, PDO-R3i, και PDO-R4i) με 0,4 μονάδες *Avian myeloblastosis virus* (AMV) (*Avian Myeloblastosis Virus Reverse transcriptase*, Finnzymes, Finland), 0,8 μονάδες MMLV, 12 μονάδες Rnase inhibitor και 1,5 μονάδα *Taq* DNA πολυμεράση (Finnzymes, Finland). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 42°C για 45 λεπτά και ακολούθησαν ένα στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 3 λεπτά, 40 κύκλοι (95°C για 30 s, 42°C για 30 s, και 72°C για 30 s) και ένα στάδιο επέκτασης της αλυσίδας στους 72°C για 2 λεπτά.

Η εστιασμένη PCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 1 μl από το προϊόν της RTPCR σε τελικό όγκο 20 μl (10 mM Tris-HCl [pH 8.8], 50 mM KCl, 0.19% Triton X-100, 4 mM MgCl₂, 0,2 μM από κάθε dNTP, 0,15% DMSO, 1 μM από τους εκκινητές PDO-F2i και PDO-R1i και 1 μονάδα *Taq* πολυμεράση. Μετά από 3 λεπτά στους 95°C, το θερμικό προφίλ που χρησιμοποιήθηκε (40 κύκλοι) ήταν 95°C για 30 s, 42°C για 30 s, και 72°C για 30 s. Τέλος, ακολούθησε το στάδιο της επέκτασης του προϊόντος στους 72°C για 2 λεπτά. Το τελικό προϊόν της PCR (362 ζβ) έγινε ορατό κάτω από υπεριώδη φωτισμό (UV) έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης που είχε εμβαπτιστεί σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 2%.

7. Εξαγωγή προϊόντος PCR από την πηκτή αγαρόζη

Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση του προϊόντος (80μl) σε πηκτή αγαρόζης (συγκέντρωση 1,5%) και τέλος το προϊόν αφαιρείται από την πηκτή με τη βοήθεια αποστειρωμένης λεπίδας και τοποθετείται σε μικροσωλήνα όγκου 2ml. Για την εκχύλιση του DNA χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα 'matrix gel extraction system' (Maligen Bioscience, USA), σύμφωνα με τα ακόλουθα στάδια:

1. Ομογενοποίηση της πηκτής (10 mg) σε 30 ml διάλυμα διαλυτοποίησης (Gel Solubilization, L1) και προσθήκη 1/10 όγκου διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂, Silica Resin) για τη δέσμευση του DNA. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση του μικροσωλήνα σε υδατόλουτρο στους 50°C για 15 λεπτά, με ενδιάμεση ανάδευση ανά 3 λεπτά. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση της πηκτής ακολουθεί ανάδευση και επανατοποθέτηση στο υδατόλουτρο (50°C) για 5 λεπτά.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του εναιωρήματος για 30 δευτερόλεπτα στις 12.000 στροφές (rcf) και απόχυση του υπερκείμενου. Το ίζημα επαναδιαλύεται στο διάλυμα L1 και φυγοκεντρείται ξανά για 30 δευτερόλεπτα στις 12.000 στροφές. Ακολουθούν δυο πλυσίματα με διάλυμα L2 (Washing buffer, 30 ml/10mg πηκτής και φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 12.000 στροφές), το οποίο περιέχει αιθανόλη, και το ίζημα SiO₂ αφήνεται να στεγνώσει σε θάλαμο νηματικής ροής για 5-10 λεπτά.
3. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε νερό έχει υποστεί μεταχείριση με DEPC, και επωάζεται σε υδατόλουτρο για 5 λεπτά στους 50°C με μία ενδιάμεση ανάδευση για την απελευθέρωση του DNA στο υδατικό διάλυμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος για 30 δευτερόλεπτα στις 12.000 στροφές και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο μικροσωλήνα 1,5ml. Το καθαρό αυτό προϊόν της εστιασμένης PCR χρησιμοποιήθηκε για την απευθείας αλληλούχισή του.

8. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

A. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγινε με τη μέθοδο των διεδόξυ-αναλόγων του Sanger (ρυθμιζόμενη διακοπή της αντιγραφής του DNA) σε αναλυτή ABI Prism 3700 DNA, με τη χρήση του πακέτου ‘ABI Prism Big Dye TM Terminators v3.0’ (Applied biosystems, Foster City,CA). Για την απευθείας αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

PDO-F2i: 5’ GCYAARGCiGGiCARACiYTKGCiTG 3’

PDO-R1i: 5’ TCHCCWGTRAAiCKSATiAiGC 3’

Τέλος, οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν για ομοιότητες με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων του NCBI (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda,USA) με εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST.

B. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγινε με τη μέθοδο των διεδόξυ-αναλόγων του Sanger (ρυθμιζόμενη διακοπή της αντιγραφής του DNA) σε αναλυτή ABI Prism 3700 DNA, με τη χρήση του πακέτου ‘ABI Prism Big Dye TM Terminators v3.0’ (Applied biosystems, Foster City,CA). Για την απευθείας αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

ACLSV Menz up: 5’-TTCATGAAAGACAGGGGCAA-3’

ACLSV Menz do: 5’-AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA-3’

Τέλος, οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν για ομοιότητες με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων του NCBI (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda,USA) με εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST.

9. Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν

Από το γονίδιο της RdRp

1. ACLSV

CTTTCCACACAAGGTTCTTGTGTTGAGTTCAGTCCATGGTGTAGGTACACTGA
AAAGGTGCTCACTTCGAATCTACCAGATAATTAATTAATTCACCAAAGGA
AGAATTTTCAGTGAACCTCGAAGATTTTGCAAAGAGGTTTTCAAATGGCTCA
GTCTGTGTGGAGTCAGATTACACAGCCTTCGACGTTTCACAAGATCACAC
CATATTGGCTTTTGAGGTAGAGTTACTCAAACATTTTGGGTGGGATGATAA
GGTGTTCGAAAGTTACATCAGAATGAAATGCACCTTGGGCTGCAGACTAG
GGGGTTTT

Μετάφραση σε αμινοξέα

FPHKVLVEFSPWCRYTEKVLTSNLPDNYIYIHQKKNFSELEDFAKRFSNGSVCVESDYTAF
DVSQDHTILAFEVELLKHFQWDDKVLQSYIRMKCTLGCRLLGGF

2. CGRMV 1

TTCCATCATAATGTTCTATGCAGACTTGCTCCCTACATAAGGTACATAGA
AAAGAAAGTTAATGCTGTGTTGCCAAGCAATATGTACATTCATTCTGGAA
AAAATTTTGATGAGTTAGAATCATGGGTAGTTCAGAATTTTCACGGAGGT
GTTTGCCTGAATCTGACTATGAAGCTTTTGATTTCATCACAGGACTGCAAT
ATATTGGCTTTTGAGGTGGCTCTCATGAATTATTTAAGACTCCCTAGGGAT
CTAATAGAAGACTACAAGTACCTCAAGTTCAACACTACCAGCAAATTGGG
GAACTTT

Μετάφραση σε αμινοξέα

FHHNVL CRLAPYIRYIEKKVNAVLP SNMYI HSGKNFDELESWV VQNFHGGVCTESDY EAF
DSSQDCN ILAFEVALMNYLRLPRDLIEDYKYLKFN TTSKLGNF

3. CGRMV 2

CTCCATCACAATGTACTTTGTCGTCTTGCTCCATACATTAGGTACATTGA
AAAAAAAAATTTTCAAACCTACCAGACA ACTATTACATTCATT CAGGCA
AGAATTTTGATGAGCTGAGGAGCTGGGTATTGAAAACTCTTTCGTTGGG
ATGTGCACTGAGTCTGATTATGAAGCCTTTGATTCTTCCAAGATGCCAAT
ATATTAGCATTTGAAGTTAGCCTAATGCGCTACTTGAGACTCCCAAGGGA
CTAATCGAGGATTACAAGTATCTGAAATTC AATACCAGGTCCAAACTTG
GGCAGTTC

Μετάφραση σε αμινοξέα

FHHNVL CRLAPYIRYIEKKIFQNL PDNYYI HSGKNFDELRSWV LKNSFVGMCTESDY EAF
DSSQDAN ILAFEVSLMRYLRLPRDLIEDYKYLKFN TRSKLGGF

4. ASPV

GCGTTTTGCACCCTACATGCGATATATTGAGTCCAAAGTTATGGAGGTTCT
CCCAAAGAATCTGTACATCCATTCTGGGAAAAATATTGATGATTTGGCAT
CTTGGGTGACAGCAAACAAATTCAATGGAGTCTGCACAGAGTCTGATTAT
GAAGCTTTTGATGCCTCGCAGGACCATTATATTCTTGCTTTTGAGCTTGAA
GTTATGAAATTTTGGGACTACCGTCTGATCTCATTGCTGATTATACTTTCA
TTAAGACCCATTTGGGATCTAAGCTTGGAAGTTTT

Μετάφραση σε αμινοξέα

LRFAPYMR YIESKVM EVLPKNLYI HSGKNIDDLASWVTANKFN GVCCTESDY EAFD
ASQDHYI LAFELEV MKFLGLPSDLIADYTFIKTHL GSKLGSF

Από το γονίδιο της ΚΠ και της 3' αμετάφραστης περιοχής

1. 146-Pe

CACTGGAACAGACACTGGAGGCCATCTTCGCGAACATAGCGATCCAAGGG
ACGTCGGAGCAGACGGAGTTTCTGGATGTGACAGTGGAGGTCAAGTCAAT
GGAGGATCAGAAGGTGATAGGATCCTTCAACCTGAAGGAGGTGGTCAGTT
TGATCAAGATCTTCAAGACTACATCTTCGGATCCGAACATAAACAACATG
ACTTCCGCCAGGTCTGTGAGGCATTTGCTCCAGAAGCAAGAAATGGGTT
GGTTAAATTGAAGTATAAAGGGGTTTTCACAAACCTGTTTTCTACCATGCC
AGAAGTTGGAGGGAAATACCCGGA ACTCATGTTTGACTTCAATAAAGGGC
TGAACATGTT CATAATGAACAAAGCTCAGCAAAAAGTGATAACAAATATG

AATCGGCGTCTTTTACAAACTGAATTTGCAAAGAGTGAAAATGAGGCAAA
AATGTCATCTGTTACAACCTGATCTTTGCATTTAGTTTATGGAGAAAGCTTG
GTTCAATAAATAAAAATAAACAAATATAATAAGCAATTTAATTAAGTTGTG
TGTTAATTTGTGTCAAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCAT
GGTATTTAAATGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΠ

LEQTLEAIFANIAIQGTSEQTEFLDVTVEVKSMEDQKVIKSGFNLKEVVSLLIKIFKTTSSD
PNINNMTRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLFSTMPPEVGGKYPELMFDFNKGLNMF
IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKMSSVTTDLCI

2. 347- Iο

CACTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATACAGGGA
ACGTCAGAGCAAACGGAGTTCCTGGATCTAGTGGTGGAGGTGAAGTCAAT
GGAGGATCAGAAGGTAATAGGGTCCTACAATTTGAAGGAGGTGGTCAAC
ATGATCAAAGCTTTCAAGACTACCTCTTCGGACCCGAACATCAGCAGCAT
GACTTTCCGCCAGGTGTGTGAGGCTTTCGCACCAGAGGCGAGAAACGGGT
TGGTCAAACCTGAAATATAAAGGGGTTTTACCAACCTTTTTACAACCATGC
CAGAAGTGGGAAGAAAATACCCGGAGCTGATGTTTGATTTAACAAGGGT
CTTAACATGTTTATCATGAATAAGGCCCAGCAAAAAGTCATAACTAACAT
GAACCGACGTCTTTTACAAACTGAATTTGCAAAAAGTGAGAATGAGGCGA
AACTCTCATCTGTTACAACCTGATCTTTGCATTTAGTTTATTCAAGAAGTTTG
GTTTGATAAATAAATAAATAGATAATGTGTTGTGTGTTTAGATATATTTG
CATTAATATGTTTGCATTAACCGAATAAACTCTCGAACCCATGAAAGAG
TATAAAGAGTCATGGTATTCAATTGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΠ

LEQILESIIFANIAIQGTSEQTEFLDLVVEVKSMEDQKVIKSYNLKEVVNMIKAFKTTSSD
PNISSMTRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLFSTMPPEVGRKYPELMFDFNKGLNMF
IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVTTDLCI

3. ACLSV-KOM

CACTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAATATAGCGATACAGGGG
ACATCAGAGCAGACAGAGTTCCTGGATCTGGTGGTGGAGGTGAAATCGAT
GGAGGATCAGAAGGTAATCGGGTCCTACAATCTGAGAGAAGTGGTCAAC
ATGATCAAAGCTTTCAAGACTACCTCTTCGGATCCGAACATCAGCGGAAT
GACCTTCCGCCAGGTATGTGAGGCTTTTGCGCCGGAAGCGAGAAATGGGC
TGGTCAAGCTGAAATACAAAGGGGTTTTCACTAACCTCTTCACGACCATG
CCAGAAGTGGGCAGTAAATACCCGGAACCTGATGTTTGATTTCAATAAGGG
TCTTAACATGTTTATCATGAATAAGGCCCAGCAGAAAGTCATAACTAATA
TGAACCGGCGTCTTTTACAAACTGAATTTGCAAAAAGTGAGAATGAGGCG
AAACTCTCGTCTGTTACAACCTGATCTTTGCATTTAGCTTGTTAAGAAGTTT
GGTTTGATGAATAGGATAAATAAATAGTGTGTTGTGTGTTAATATGTTT
GTATTAATATGTTTGCATCAAATAAACAAACTCTTGAACCCATGAAAGA
GTATAAAGAGTCATGGTATTTAATTGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΠ

LEQILESIIFANIAIQGTSEQTEFLDLVVEVKSMEDQKVIKSYNLREVVNMIKAFKTTSSD
PNISGMTFRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLFSTMPPEVGGKYPELMFDFNKGLNMF
IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVTTDLCI

4. ACLSV-POT

TTCTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATCCAGGGG
 ACCTCGGAACAAACGGAGTTCCTGGACTTGGTGGTGGAGGTCAAATCAAT
 GGAGGATCAGAAGGTGGTGGGTTCCCTACAATCTAAGGTCGGTGGTGGATC
 TCATCAAGATCTTCAAACACTACATCTTCGGACCCGAATATAAACGGGATG
 ACTTCCGCCGAGTCTGTGAGGCTTTTGCTCCGGAGGCAAGAAACGGGCT
 GGTCAAACTAAAGTACAAAGGGGTTTTTACAAACCTCTTTACAACCATGC
 CTGAAGTGGGTGGCAAATACCCAGAGCTCATGTTCGACTTTAACAAAGGT
 TTGAATATGTTTATAATGAACAAAGCTCAGCAAAGGTAATCACCAATAT
 GAACCGGCGTCTTTTACAAACTGAATTTGCAAAAAGTGAAAATGAGGCGA
 AACTTTCGTCTGTCACGACTGATCTTTGCATCTAATCTGCTGAAGAGGTTT
 GGTTCATAAACAGAATGAATAAATAACAGTGTGTTTTTGATATATATA
 ATTGTGTTCTCAGTTGTTTGCTTAAATAACTTGTGTATGTCGTTGCATTCGA
 ACTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGGGTCATGGTATTAAATTGGAGT
 GT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της KII

LEQILESIFANIAIQGTSEQTEFLDLVVEVKSMEDQKVVGSYNLRVVDLIKIFKTTSSD
 PNINGMTFRRVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLF'TTMPEVGGKYPELMFDFNKGLNMF
 IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVTTDLCI

5. 156-Ki

TTCTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATACAGGGA
 ACGTCCGAACAAACAGAGTTCCTGGACCTGGTGGTGGAGGTGAAATCAAT
 GGAGGATCAGCAGGTGATAGGGTCTTACAATTTGAGGGAAGTGGTCAACA
 TGATCAAAGCTTTCAAGACTACCTCTTCGGATCCGAACATCAGCGGAATG
 ACCTCCGCCAGGTGTGTGAGGCTTTTGCACCTGAAGCGAGAAATGGGCT
 GGTCAAACTAAAGTATAAAGGGGTTTTACTAACCTCTTTACGACCATGC
 CAGAAGTGGGCAGCAAATACCCGGAGTTAATGTTTGATTTCAATAAGGGT
 CTTAACATGTTCATCATGAATAAGGCCAGCAAAAAGTCATTACTAATAT
 GAACCGGCGTCTTTTGCAAACTGAATTTGCAAAAAGTGAGAACGAGGCGA
 AACTCTCGTCCGTCACGACTGATCTTTGCATTTAGTTTGTCTAAGAGGTTT
 GGTTTGATTAATAGGATAAATAAATAATTTGTTGTGTGTTTAAATATGTTT
 GTATCAAGTATGTTTACATAAATGAATAAACTCTTGAACCCATGAAAGAG
 TATAAAGAGTCATGGTATTTAACTGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της KII

LEQILESIFANIAIQGTSEQTEFLDLVVEVKSMEDQQVIGSYNLRVVDLIKIFKTTSSD
 PNISGMTFRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLF'TTMPEVGSKYPELMFDFNKGLNMF
 IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVTTDLCI

6. 274-Chal

TTCTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATACAAGGA
 ACATCCGAGCAGACGGAAATTCCTGGATCTGGTTGTGGAAGTGAATCAAT
 GGAGGACCAGAAGGTAATAGGGTCTTACAATCTGAAGGAAGTGGTCAAC
 ATGATCAAAGCTTTCAAGACTACCTCTTCGGACCCGAATATCAGCAGCAT
 GACCTTTCGTCAGGTGTGTGAGGCTTTCGCACCCGGAGGCGAGGAACGGGT

TGGTTAAACTGAAATACAAAGGAGTTTTTACCAACCTCTTCACTACCATGC
 CAGAAGTGGGAAGTAAGTATCCGGAGTTGATGTTTGACTTCAATAAAGGC
 CTTAACATGTTTATCATGAATAAGGCCAGCAGAAAGTAATAACCAATAT
 GAACCGGCGTCTTTTACAAACTGAATTTGCAAAAAGTGAGAATGAGGCGA
 AGCTCTCATCTGTTACGACTGATCTTTGCATTTAGTTTGTGTTAGAAAGTTT
 GTTTGATAAATAAAATAAATAAATAGTGTGTTGTGTGTTTAAGCATATTTG
 CTTTAAATATGTTTGCATTAATGAACAACTCTTGAACCCATGAAAGAGT
 ATAAAGAGTCATGGTATTTAATTGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΠ

LEQILESIFANIAIQGTSEQTEFLDLVVEVKSMEDQKVI GSYNLKEVVNMIKAFKTTSSD
 PNISSMTFRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLF'TTMPEVGSKYPELMFDFNKGLNMF
 IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVTTDLCI

7. ACLSV-MET

TTCTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATACAGGGA
 ACGTCAGAGCAAACGGAGTTCCTGGATCTAGTGGTGGAGGTGAAGTCAAT
 GGAGGATCAGAAGGTAATAGGGTCCTACAATTTGAAGGAGGTGGTCAAC
 ATGATCAAAGCTTTCAAGACTACCTCTTCGGACCCGAACATCAGCAGCAT
 GACTTTCCGCCAGGTGTGTGAGGCTTTCGCACCAGAGGCGAGAAACGGGT
 TGGTCAAACCTGAAATATAAAGGGGTTTTACCAACCTTTTTACAACCATGC
 CAGAAGTGGGAAGCAAATACCCGGAGCTGATGTTTGATTTAACAAGGGT
 CTTAACATGTTTATCATGAATAAGGCCAGCAAAAAGTCATAACTAACAT
 GAACCGACGTCTTTTACAAACTGAATTTGCAAAAAGTGAGAATGAGGCGA
 AGCTCTCATCTGTTACAACCTGATCTTTGCATTTAGTTTATTCAAGAAGTTT
 GTTTGATAAATAAAATAAATAGATAATGTGTTGTGTGTTTAGATATATTTG
 CATTAATATGTTTGCATTAACCGAATAAACTCTCGAACCCATGAAAGAG
 TATAAAGAGTCATGGTATTCAATTGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΠ

LEQILESIFANIAIQGTSEQTEFLDLVVEVKSMEDQKVI GSYNLKEVVNMIKAFKTTSSD
 PNISSMTFRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLF'TTMPEVGSKYPELMFDFNKGLNMF
 IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVTTDLCI

8. 260-Kom

TTCTGGAACACTGACACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATCCAGGGG
 ACCTCGGAACAAACGGAGTTCCTGGACTTGGTGGTGGAGGTCAAATCAAT
 GGAGGATCAGAAGGTGGTGGGTTCCCTACAATCTGAGGTCGGTGGTGGATC
 TCATCAAGATCTTCAAAACTACATCTTCGGACCCGAATATAAACGGGATG
 ACTTTCCGCCAGGTCTGTGAGGCTTTTGTCTCCGGAGGCAAGAAACGGGCT
 GGTCAAACCTAAAGTACAAAGGGGTTTTTACAAACCTCTTTACAACCATGC
 CTGAAGTGGGTGGCAAATACCCAGAGCTCATGTTGACTTTAACAAGGT
 TTGAATATGTTTATAATGAACAAAGCTCAGCAAAAGGTAATCACCAATAT
 GAACCGGCGTCTTTTACAAACTGAATTTGCAAAAAGTGAAAATGAGGCGA
 AACTTTTCGTCTGTCACGACTGATCTTTGCATCTAATCTGTTGAAGAGGTTT
 GGTTCATAAACAATAAATGAATAAATAAACAGTGTGTGTTTGATATATATA
 ATTGTGTTCTCAGTTGTTTGCTTAAATAACTTGTGTATGTCGTTGCATTCGA
 ACTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGGGTCATGGTATTAATTGGAGT
 GT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΠ

LELTTLESIFANIAIQGTSEQTEFLDLVVEVKSMEDQKVVGSYNLRSVVDLIKIFKTTSSD
 PNINGMTFRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLFTTMPEVGGKYPELMFDFNKGLNMF
 IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVTTDLCI

9. 321-Io

TTCTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCGATTCAAGGA
 ACATCAGAGCAGACGGAATTCCTGGATCTAGTGGTGGAGGTGAAATCAAT
 GGAGGACCAGAAAGTGATCGGATCCTACAACCTGAGGGGAGGTGGTCAAC
 ATGATCAAAGCTTTCAAGACTACCTCTTCGGATCCGAACATCAGCAACAT
 GACTTTCCGCCAGGTGTGTGAGGCTTTCGCACCGGAGGCGAGAAACGGGT
 TGGTAAAATTGAAGTATAAAGGGGTTTTCACTAACCTTTTTACGACCATGC
 CGGAAGTAGGAAGTAAGTACCCGGAGCTGATGTTTGATTTCACAAAGGC
 CTTAACATGTTTATTATGAATAAGGCTCAACAGAAAGTCATAACTAATAT
 GAACCGGCGTCTTTTACAAACTGAATTTGCAAAAAGTGAAAATGAGGCGA
 AGCTCTCGTCTGTTACAACCTGATCTTTGCATTTAGTTTGTTTAAGAGGTTTG
 GTTCTATAAATAAAGTAAACAAATAGTATGTTGTGTGTTTAAATATATTCG
 CATTAATATGTTTGCTTTAAATAAACAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGT
 AATAAGAGTCATGGTATTTAATTGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΠ

LEQILESIFANIAIQGTSEQTEFLDLVVEVKSMEDQKVIIGSYNLRVNVNMIKAFKTTSSD
 PNISNMTFRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLFTTMPEVGGKYPELMFDFNKGLNMF
 IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVTTDLCI

10. 534-Kom

TTCTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATACAAGGA
 ACATCAGAGCAGACGGAATTTCTGGATCTGGTGGTGGAAAGTGAAGTCAAT
 GGAGGATCAGAAAGTGATCGGGTCCTACAATTTGAAGGGAGTGGTCAAC
 ATGATCAAAGCTTTCAAGACTACCTCTTCGGACCCGAATATCAGCAGCAT
 GACATTCGCCAAGTGTGCGAGGCCTTCGCCCCGGAGGCGAGGAACGGGT
 TGGTCAAACCTGAAGTATAAAGGGGTTTTCACTAACCTCTTTACGACCATGC
 CAGAGGTGGGAAGTAAATATCCAGAGCTGATGTTTGATTTCATAAAGGGT
 CTTAACATGTTTATCATGAACAAGGCCAGCAAAAGGTCATAACTAATAT
 GAATCGGCGTCTTTTACAGACTGAATTTGCGAAAAGTGAAAATGAAGCAA
 AGCTCTCATCTGTTACGACTGATCTTTGTATTTAGTTTGTTTAAGAAGTTTCG
 GTCAAATAAATAAAATAAATAAATAGTGTGTTGCATGTTTAAATATGTTTGT
 GTTGAATATGTATGTTTGCATCGAATAAACAACCTCTTGAACCCATGAAA
 GAGTATAAAGAGTCATGGTATTTAATTGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΠ

LEQILESIFANIAIQGTSEQTEFLDLVVEVKSMEDQKVIIGSYNLKGVVNMKAFRTTSSD
 PNISNMTFRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLFTTMPEVGGKYPELMFDFNKGLNMF
 IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVTTDLCI

11. **571-Kom**

TTCTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATACAAGGA
 ACATCAGAGCAAACGGAATTTCTGGATCTGGTGGTGGAAAGTGAAGTCAAT
 GGAGGATCAGAAAGTGATCGGGTCCTACAATTTGAAGGGAGTGGTCAAC
 ATGATCAAAGCTTTCAGGACTACCTCTTCGGACCCGAATATCAGCAGCAT
 GACATTCCGCCAAGTGTGCGAGGCCTTCGCCCCGGAGGCGAGGAACGGGT
 TGGTCAAACCTGAAGTATAAAGGGGTTTTCACTAACCTCTTTACGACCATGC
 CAGAGGTGGGAAGTAAATATCCAGAGCTGATGTTTGATTTCATAAAGGGT
 CTTAACATGTTTCATCATGAACAAGGCCAGCAAAAGGTCATAACTAATAT
 GAATCGGCGTCTTTTACAGACTGAATTTGCGAAAAGTGAATAAAGCAA
 AGCTCTCATCTGTTACGACTGATCTTTGTATTTAGTCTGTTTAAGAAGTTCG
 GTCAAATAAATAAATAAATAAATAGTGTGTTGCATGTTTAATATGTTTGT
 GTTGAATATGTATGTTTGCATCGAATAAACAACCTCTTGAACCCATGAAA
 GAGTATAAAGAGTCATGGTATTTAATTGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΠ

LEQILESIFANIAIQGTSEQTEFLDLVVEVKSMEDQKVIKSYNLKGVVNMKAFRTTSSD
 PNISMTFRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLFTTMPEVGSKYPELMFDFNKGLNMF
 IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVTTDLCI

12. **236- Io**

TTCTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATTCAAGGG
 ACATCGGAGCACACGGAATTTCTGGACCTGACGGTGGAAAGTGAAGTCAAT
 GGAGGATCAGAATGTGATAGGGTCATACAATCTAAAGGAGGTAGTCAAC
 ATGATCAAAGCATTCAAACACTACATCTTCGGACCCGAATATCAGCAATAT
 GACCTTCCGTCAGCTTTGTGAGGTCTTCGCACCTGAAGCAAGGAACGGGC
 TTGTCAAATTGAAGTACAAAGGGGTTTTCACTAACCTCTTCACGACAATGC
 CGGAGGTGGGGAGCAAATACCCAGAGCTGATGTTTGATTTCACAAGGGC
 CTTAATATGTTTATCATGAATAAGGCTCAACAAAAGGTTATAACCAATAT
 GAATCGGCGTCTTCTACAAACTGAATTTGCAAAAAGTGAGAATGAGGCGA
 AGCTCTCGTCTGTTTCGACTGATCTTTGCATTTAGTTTGTTTAAGAAGTTCG
 GTTTAATAAATAAATAAATAAATAAATAGTTTGCTTAGTGTTCAAATAC
 ATTCTTTTGAATGTATTTGCTTTGAATAAACGAACTCTGGAACCCATGAAA
 GAGTATAAAGAGTCATGGTATTTAATTGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΠ

LEQILESIFANIAIQGTSEHTEFLDLTVEVKSMEDQNVIGSYNLKEVVNMKAFKTTSSD
 PNISNMTFRQLCEVFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLFTTMPEVGSKYPELMFDFNKGLNMF
 IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVSTDLCI

13. **239- Io**

TTCTGGAACAGATACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGCAATTCAAGGG
 ACATCGGAGCACACGGAATTTCTGGACCTGACGGTGGAAAGTGAAGTCAAT
 GGAGGATCAGAATGTGATAGGGTCATACAATCTAAAGGAGGTAGTCAAC
 ATGATCAAAGCATTCAAACACTACATCTTCGGACCCGAATATCAGCAATAT
 GACCTTCCGTCAGCTTTGTGAGGTCTTCGCACCTGAAGCAAGGAACGGGC
 TTGTCAAATTGAAGTACAAAGGGGTTTTCACTAACCTCTTCACGACAATGC
 CGGAGGTGGGGAGCAAATACCCAGAGCTGATGTTTGATTTCACAAGGGC

CTTAATATGTTTATCATGAATAAGGCTCAACAAAAGGTTATAACCAATAT
GAATCGGCGTCTTCTACAAACTGAATTTGCAAAAAGTGAGAATGAGGCGA
AGCTCTCGTCTGTTTCGACTGATCTTTGCATTTAGTTTGTTTAAGAAGTTCG
GTTTAATAAATAAAATAAATAAATAAATAGTTTGCTTAGTGTTCAAATAC
ATTCTTTTGAATGTATTTGCTTTGAATAAACGAACTCTGGAACCCATGAAA
GAGTATAAAGAGTCATGGTATTTAATTGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΙΙ

LEQILESIFANIAIQGTSEHTEFLDLTVEVKSMEDQNVI GSYNLKEVVNMIKAFKTTSSD
PNISNMTFRQLCEVFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLFSTMPEVGSKYPELMFDFNKGLNMF
IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKLSSVSTDLCI

14. 155-Ki

CACTGGACCAGCCACTGGAGGCCATCTTCGCGAACATAGCGATCCAAGGG
ACGTCGGAGCAGACGGAGTTTCTGGATGTGACAGTGGAGGTCAAGTCAAT
GGAGGATCAGAAGGTGATAGGATCCTTCAACCTGAAGGAGGTGGTCAGTT
TGATCAAGATCTTCAAGACTACATCTTCGGATCCGAACATAAAACAACATG
ACTTCCGCCAGGTCTGTGAGGCATTTGCTCCAGAAGCAAGAAATGGGTT
GGTAAATTGAAGTATAAAGGGGTTTTCACAAACCTGTTTTCTACCATGCC
AGAAGTTGGAGGGAAATACCCGGAACCTCATGTTTGACTTTAATAAAGGGC
TGAACATGTTCATAATGAACAAAGCTCAGCAAAAAGTGATAACAAATATG
AATCGGCGTCTTTTACAAACTGAATTTGCAAAGAGTGAAAATGAGGCAAA
AATGTCATCTGTTACACCTGATCTTTGCATTTAGTTTATGGAGAAAGCTTG
GTTCAATAAATAAAATAAACAATATAATAAGCAATTTAATTAAGTTGTG
TGTTAATTTGTGTCAAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCAT
GGTATTAATGGAGTGT

Μετάφραση σε αμινοξέα τμήματος του γονιδίου της ΚΙΙ

LDQPLEAIFANIAIQGTSEQTEFLDVTVEVKSMEDQKVI GSFNLKEVVSLIKIFKTTSSD
PNINNMTRQVCEAFAPPEARNGLVKLYKGVFTNLFSTMPEVGGKYPELMFDFNKGLNMF
IMNKAQQKVIITNMNRLLQTEFAKSENEAKMSSVTPDLCI