



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

**Σάρωση τοπικών απομονώσεων παθογόνων μυκήτων
καλλιεργούμενων φυτών για τον εντοπισμό στελεχών-
φορέων δίκλωνου RNA**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΔΡΕΑΣ Κ. ΠΑΠΑΒΛΑΣΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΓΕΩΠΟΝΟΣ

MSc ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

**Σάρωση τοπικών απομονώσεων παθογόνων μυκήτων
καλλιεργούμενων φυτών για τον εντοπισμό στελεχών-
φορέων δίκλωνου RNA**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΔΡΕΑΣ Κ. ΠΑΠΑΒΛΑΣΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΓΕΩΠΟΝΟΣ

MSc ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ ΧΑΤΖΗΛΟΥΚΑΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΑΜΑΛΙΑ ΑΦΕΝΔΡΑ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΤΑΚΙΟΥΤΑΣ

ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ ΧΑΤΖΗΛΟΥΚΑΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010



ΤΡΑΠΕΖΑ ΜΕΣΙΑ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑΛΟΓΟΙ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ Π.Α.

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ

1. ΔΙΑΡΥΣΗ

1.1 Εξοπλισμός παραγωγής

1.2 Μηχανές

1.3 Εξοπλισμός μεταφορών

1.4 Γραφεία

1.5 Εξοπλισμός πληροφορικής

2. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ Π.Α.

2.1 Εξοπλισμός

2.1.1 Εξοπλισμός παραγωγής και διανομής

2.1.2 Εξοπλισμός γραφείων

2.1.3 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.4 Εξοπλισμός πληροφορικής

2.1.5 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.6 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.7 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.8 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.9 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.10 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.11 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.12 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.13 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.14 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.15 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.16 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.17 Εξοπλισμός μεταφορών

2.1.18 Εξοπλισμός μεταφορών

3. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ Π.Α.

3.1 Εξοπλισμός

3.2 Εξοπλισμός

3.2.1 Εξοπλισμός παραγωγής

3.2.2 Εξοπλισμός γραφείων

3.2.3 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.4 Εξοπλισμός πληροφορικής

3.2.5 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.6 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.7 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.8 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.9 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.10 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.11 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.12 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.13 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.14 Εξοπλισμός μεταφορών

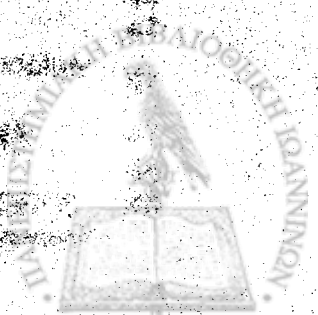
3.2.15 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.16 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.17 Εξοπλισμός μεταφορών

3.2.18 Εξοπλισμός μεταφορών

Στην οικογένειά μου



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΙΩΝ	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Σύγχρονη φυτοπροστασία	11
1.2 Μύκητες	12
1.2.1 Φυτοπαθογόνοι μύκητες	12
1.3 Ιοί	13
1.3.1 Γενικά περί μυκοϊών	14
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
2.1 Μυκοϊοί	16
2.1.1 Εύρος ξενιστών και συχνότητα εμφάνισης	17
2.1.2 Κατάταξη μυκοϊών	18
2.1.2.1 Χαρακτηριστικά μυκοϊών dsRNA	19
2.1.3 Καταγωγή και εξελικτική πορεία των μυκοϊών	22
2.1.3.1 Η θεωρία της αρχαίας συνεξέλιξης	22
2.1.3.2 Η θεωρία της προέλευσης από φυτικούς ιούς	24
2.1.3.3 Εξελικτική πορεία των μυκοϊών dsRNA	26
2.1.4 Διασπορά μυκοϊών	27
2.1.4.1 Βλαστική ασυμβατότητα μυκήτων	29
2.1.5 Επίδραση μυκοϊών στο φαινότυπο του ξενιστή	31
2.1.5.1 Ασυμπτωματικές ή λανθάνουσες μολύνσεις	31
2.1.5.2 Εξασθένηση του μύκητα-ξενιστή, υπομολυσματικότητα	32
2.1.5.2.1 Η περίπτωση του <i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	32
2.1.5.2.2 Η περίπτωση της <i>Cryphonectria parasitica</i>	33
2.1.5.3 Ωφέλιμες αλληλεπιδράσεις	36
2.1.6 Οι μυκοϊοί ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης	36
2.2 Ταυτοποίηση μυκήτων	38
2.2.1 Περιοχές ITS	38
2.3 Μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα	40
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
3.1 Σκοπός πειράματος	42
3.2 Υλικά και μέθοδοι	42
3.2.1 Δειγματοληψία φυτικού υλικού	42
3.2.2 Μικροβιολογικές τεχνικές	42
3.2.2.1 Απομόνωση παθογόνων	42
3.2.2.1.1 Αποθήκευση σπορίων μυκήτων στους -80°C	43
3.2.2.1.2 Ανάπτυξη μυκηλίου σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα	44
3.2.2.1.3 Αποθήκευση μυκηλίου στους -80°C	44
3.2.2.2 Πρωτόκολλο παρασκευής θρεπτικού μέσου	45
3.2.2.2.1 Στερεό θρεπτικό υλικό (1lt)	45
3.2.2.2.2 Υγρό θρεπτικό υλικό (1lt)	45
3.2.2.3 Παρασκευή μόνιμων μικροσκοπικών παρασκευασμάτων	46
3.2.2.3.1 Διαλύματα μικροσκοπίας	46
3.2.3 Βιοχημικές - μοριακές τεχνικές	47
3.2.3.1 Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων και επιβεβαίωση της ύπαρξης μορίων dsRNA	47
3.2.3.1.1 Προετοιμασία στήλης εκλεκτικού εμπλουτισμού του dsRNA	47
3.2.3.1.2 Πρωτόκολλο εκχύλισης dsRNA	48
3.2.3.1.3 Διαλύματα εκχύλισης dsRNA, μεταχείριση νερού με DEPC,	49

διάλυμα φαινόλης	
3.2.3.1.4 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων	50
3.2.3.1.5 Ενζυμικές δοκιμές διαπίστωσης της φύσης των απομονωθέντων νουκλεϊκών οξέων	51
3.3 Αποτελέσματα και Σχολιασμός	55
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	79



ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

• bp	base pairs	ζεύγη βάσεων
• CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide	βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο
• Da	Dalton	μονάδα μάζας πολύ κοντά σε αυτή του ατόμου του υδρογόνου
• DEPC	diethylpyrocarbonate	διαιθυλοπυροανθρακικό οξύ
• ddH ₂ O	double distilled water	δισ απεσταγμένο νερό
• dH ₂ O	distilled water	απεσταγμένο νερό
• DNA	deoxyribonucleic acid	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
• DNaseI	deoxyribonuclease I	δεοξυριβονουκλεάση I
• dsRNA	double-stranded RNA	δίκλωνο RNA
• EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	αιθυλενοδιαμινοτετροοξικό οξύ
• ETOH	ethanol	αιθανόλη
• FB	Formate Buffer	ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος
• ITS	Internal Transcribed Spacer	εσωτερικός μεταγραφόμενος διαχωριστής
• LSU	Large SubUnit-coding sequence	κωδικοποιούσα αλληλουχία του ριβωσομικού RNA της μεγάλης υπομονάδας
• ORFs	Open Reading Frames	ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης
• PBS	phosphate buffered saline	ρυθμιστικό φυσιολογικού ορού - φωσφορικών
• PCR	Polymerase Chain Reaction	αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
• PDA	Potato Dextrose Agar	στερεό θρεπτικό υπόστρωμα
• PDB	Potato Dextrose Broth	υγρό θρεπτικό υπόστρωμα
• rDNA	ribosomal DNA	ριβωσωμικό DNA
• RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση
• RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών τεμαχίων DNA
• RNA	ribonucleic acid	ριβονουκλεϊκό οξύ
• RNaseA	ribonuclease A	ριβονουκλεάση A
• RT	Reverse Transcription	αντίστροφη μεταγραφή
• SAS	Saturated Ammonium Sulfate	κορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου
• SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	δωδέκυλο θειικό νάτριο
• ssRNA	single stranded RNA	μονόκλωνο RNA
• SSU	Small SubUnit-coding sequence	κωδικοποιούσα αλληλουχία του ριβωσομικού RNA της μικρής υπομονάδας
• Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethane	τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθανικό
• VCG	Vegetative Compatibility Groups	ομάδες βλαστικής συμβατότητας
• VIC	Vegetative Incompatibility	βλαστική ασυμβατότητα
• VLPs	virus like particles	μόρια που μοιάζουν με ιούς



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΙΩΝ

AbV1	<i>Agaricus bisporus</i> virus 1
BCVF	<i>Botrytis cinerea</i> virus F
BVX	<i>Botrytis</i> virus X
CHV	<i>Cryphonectria hypovirus</i>
CThTV	<i>Curvularia thermal tolerance</i> virus
d-factor	debilitation factor of Dutch Elm Disease
GVA	<i>Garlic</i> virus A
GVE	<i>Garlic</i> virus E
GVX	<i>Garlic</i> virus X
Hv190SV	<i>Helminthosporium victoriae</i> 190S virus
LIV	La France isometric virus
LRV1	<i>Leishmania</i> RNA virus 1
LRV2	<i>Leishmania</i> RNA virus 2
PVX	<i>Potato</i> virus X
SCVL1 or ScVL-A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> virus L1 (or L-A)
ShVX	Shallot virus X
SsDRV	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> debilitation-associated RNA virus
Umv-H1	<i>Ustilago maydis</i> virus-H1



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών στην ειδίκευση των Βιολογικών Καλλιεργειών στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Με την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ειλικρινά ορισμένους ανθρώπους, δίχως την πολύτιμη προσπάθεια των οποίων η εργασία αυτή δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί.

Οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κο Ευστάθιο Χατζηλουκά, Αναπληρωτή Καθηγητή στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη μακρόχρονη συμπαράσταση από το προπτυχιακό επίπεδο μέχρι σήμερα καθώς επίσης για την υπόδειξη του θέματος και την αμέριστη, επιστημονική και ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους. Τον ευχαριστώ επίσης για την κριτική ανάγνωση του κειμένου, τις συμβουλές και υποδείξεις με σκοπό τη βελτίωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κα Αμαλία Αφένδρα Λέκτορα του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και κο Γεώργιο Πατακιούτα Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Ανθοκομίας - Αρχιτεκτονικής Τοπίου του ΤΕΙ Ηπείρου για τις ουσιαστικές υποδείξεις και διορθώσεις που έκαναν στη διατριβή μου.

Σημαντική ήταν η βοήθεια που μου παρείχε ο Δρ. Ιωάννης Σαΐνης κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κωνσταντίνα Κόλλα, το γεωπόνο MSc Παναγιώτη Μαγκλάρα και το μεταπτυχιακό φοιτητή Χαράλαμπο Παπαχρήστο για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν, τη γεωπόνο MSc Ιωάννα Κατσαρού και τον κτηνίατρο Ιωσήφ Τσίκα για τον ορθογραφικό και συντακτικό έλεγχο της μελέτης καθώς και τις συνοδοιπόρους μου σε αυτό το μεταπτυχιακό πρόγραμμα Παρασκευή Υφαντή και Κλεονίκη Πήλιου.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου, στην οποία αφιερώνω την παρούσα εργασία, για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη στην εκπλήρωση των στόχων μου.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιοί των μυκήτων ή μυκοϊοί είναι αρκετά διαδεδομένοι στη φύση και συχνά σχετίζονται με προσβολές οι οποίες δεν εμφανίζουν συμπτώματα στους ξενιστές τους. Σε άλλες περιπτώσεις η προσβολή από ένα μυκοϊό μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή του μύκητα, να προκαλέσει υπομολυσματικότητα ή να εντείνει τη μολυσματικότητα του μύκητα. Σήμερα γίνεται προσπάθεια εφαρμογής ορισμένων μυκοϊών ως παραγόντων βιολογικής καταπολέμησης.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η διερεύνηση ύπαρξης μυκοϊών με γονιδίωμα από δίκλωνο RNA (dsRNA) σε φυτοπαθογόνους μύκητες. Πραγματοποιήθηκε συλλογή φυτικών μερών με εμφανή σημάδια μυκητολογικής προσβολής από υπαίθριες αλλά και θερμοκηπιακές καλλιέργειες στους νομούς Άρτας, Ιωαννίνων και Πρέβεζας. Από τα δείγματα απομονώθηκαν σε καθαρές καλλιέργειες 48 μύκητες, οι οποίοι στη συνέχεια ελέχθησαν για την παρουσία dsRNA. Τέσσερις απομονώσεις αποδείχτηκαν θετικές στην παρουσία dsRNA (ποσοστό 8,33%) βάσει του ηλεκτροφορητικού τρόπου ζώνωσης των εμπριεχομένων μορίων dsRNA και κατόπιν δοκιμών ανθεκτικότητας στα ένζυμα RNaseA και DNaseI.

Τα απομονωθέντα μόρια dsRNA φαίνεται να ανήκουν στις οικογένειες Chrysoviridae, Partitiviridae ή Totiviridae βάσει του ηλεκτροφορητικού τους προτύπου ζώνωσης.



ABSTRACT

Fungal viruses or mycoviruses are believed to be widespread in nature and often are associated with latent infections of their hosts. In some cases, infection of a phytopathogenic fungus by a mycovirus can result in destruction of the fungus, cause the reduction or complete alleviation of the fungus' ability to infect its plant host (hypovirulence) or enhance the infectivity of the fungus. More recently, some mycoviruses have been used as biological control agents against phytopathogenic fungi.

The aim of the study was the screening of plant pathogenic fungi for the presence of mycoviruses containing double-stranded RNA (dsRNA). Samples of fungus-infected plant material were collected from field cultivations or greenhouses based in the regions of Arta, Ioannina and Preveza. Fungal isolates were purified and forty-eight were screened for the presence of dsRNA. Four different fungal isolates were identified as dsRNA hosts (8.33% of the examined samples), based on their gel electrophoretic banding pattern and their resistance to standard RNaseA and DNaseI assays.

Due to their banding pattern, the isolated dsRNA molecules seem to belong to the mycoviral families Chrysoviridae, Partitiviridae and Totiviridae.



... την πύξιν της ...

... Η ...

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

... (Υπουργείο Παιδείας 2006)

... (Αρ. 2007/2007)

... (Επιτομική έκδοση ...)

... (Επιτομική έκδοση ...)



1.1 Σύγχρονη φυτοπροστασία

Παρά την πρόοδο στην επιστήμη της φυτοπροστασίας, ακόμη και σήμερα παρατηρούνται σημαντικές απώλειες παραγωγής λόγω της δραστηριότητας διαφόρων παθογόνων των καλλιεργούμενων φυτών, όπως οι μύκητες.

Η ολοκληρωμένη διαχείριση των πληθυσμών/μολυσμάτων αποτελεί τη σύγχρονη αντίληψη για την αντιμετώπιση των εχθρών/παθογόνων των καλλιεργουμένων φυτών. Σύμφωνα με την Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, ολοκληρωμένη καταπολέμηση ονομάζεται η συνδυασμένη χρησιμοποίηση βιολογικών, καλλιεργητικών και χημικών μεθόδων για την καταπολέμηση των παθογόνων των φυτών. Σύμφωνα με την Εντομολογική Εταιρεία Ελλάδος, ολοκληρωμένη καταπολέμηση ονομάζεται η χρησιμοποίηση πολλαπλών μεθόδων (βιολογικών, βιοτεχνολογικών, καλλιεργητικών, χημικών κ.λπ.) συμβατών μεταξύ τους, για τη διατήρηση των πληθυσμών των εχθρών σε επίπεδο κάτω από αυτό που προκαλεί οικονομική ζημιά στην παραγωγή, ενώ εξασφαλίζεται προστασία στον άνθρωπο, στα οικιακά ζώα, στα φυτά και στο περιβάλλον (Υπουργείο Γεωργίας 1996).

Με τον όρο βιολογική καταπολέμηση πολλές φορές ορίζεται η καταπολέμηση των εχθρών/παθογόνων που συμβαίνει χωρίς την παρέμβαση του ανθρώπου (φυσική βιολογική καταπολέμηση), αλλά και η εισαγωγή και ο χειρισμός των βιολογικών παραγόντων από τον άνθρωπο για το σκοπό αυτό (εφαρμοσμένη βιολογική καταπολέμηση) (Τσιτσιπής 2000, Agrios 2005).

Η χημική μέθοδος καταπολέμησης τόσο των εχθρών των καλλιεργούμενων φυτών όσο και των φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι ευρύτατα διαδεδομένη. Όμως, παρότι σε πολλές περιπτώσεις έχει βοηθήσει σε μεγάλο βαθμό στον περιορισμό των ζημιών, δεν θεωρείται κατάλληλη για την αντιμετώπιση όλων των εχθρών/παθογόνων, καθώς η εκτεταμένη χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών στις καλλιέργειες μπορεί να οδηγήσει σε επανεμφάνιση των πρωτευόντων εχθρών, αντικατάστασή τους από πληθυσμούς δευτερευόντων εχθρών (Eizen 2001), μόλυνση του περιβάλλοντος (Frank *et al.* 1990), επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους (Croft 1990, Theiling & Croft 1988), ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών (Τζάμος 2004), τοξικότητα σε ανθρώπους - ζώα, αλλά και εμφάνιση προβλημάτων στους παραγωγούς λόγω αύξησης του κόστους παραγωγής (Τσιτσιπής 2000).

Το αυξανόμενο κοινωνικό ενδιαφέρον για την υπερβολική χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων και τις επιπτώσεις τους στη δημόσια υγεία, το



περιβάλλον και την ποιότητα των τροφίμων υποδεικνύει την ανάγκη για ανάπτυξη και εφαρμογή προγραμμάτων ολοκληρωμένης καταπολέμησης. Οι μέθοδοι βιολογικής καταπολέμησης ενός τέτοιου προγράμματος, πρέπει να συμπληρώνονται με τεχνικές βασιζόμενες στα αποτελέσματα ερευνών σχετικών με την εκλεκτικότητα των μυκητοκτόνων, με γενετικές παραμέτρους, με την αντίσταση των φυτών κ.α.

1.2 Μύκητες

Οι μύκητες ανήκουν στο βασίλειο Fungi και είναι κατώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί στερούμενοι χλωροφύλλης, ετερότροφοι. Είναι οργανισμοί ευρύτατα διαδεδομένοι στη φύση (Agrios 2005).

Η ανακάλυψη του μικροσκοπίου από τον Hooke στα μέσα του 17^{ου} αιώνα έδωσε μεγάλη ώθηση στη μελέτη της μορφολογίας και ανατομίας των μυκήτων.

Το σώμα των μυκήτων, το οποίο ονομάζεται θαλλός, δεν έχει βλαστό, φύλλα, ρίζες, ούτε διαφοροποιημένους ιστούς. Διαφοροποίηση παρατηρείται μόνο στα αναπαραγωγικά όργανα. Ο θαλλός στους περισσότερους μύκητες αποτελείται από λεπτές ίνες που ονομάζονται υφές, ενώ το σύνολο των υφών ονομάζεται μυκήλιο. Πολλές φορές οι υφές εμπλέκονται μεταξύ τους κατά τέτοιο τρόπο, ώστε κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση δίνουν την εικόνα ιστού ή ψευδοϊστού (στρώμα, σκληρώτια, ριζόμορφα, ριζοειδή) (Τζαβέλλα-Κλωνάρη 1996).

Οι μύκητες αναπτύσσονται στη φύση συμβιωτικά, παρασιτικά ή σαπροφυτικά, τρεφόμενοι από ζωντανή ή νεκρή οργανική ύλη.

1.2.1 Φυτοπαθογόνοι μύκητες

Η εμφάνιση μυκητολογικών προβλημάτων στα φυτά απασχόλησε τον άνθρωπο από την εποχή που ξεκίνησε να τα χρησιμοποιεί για τη διατροφή του, και κυρίως όταν άρχισε να τα καλλιεργεί.

Η εμφάνιση όμως καταστροφικών για την παραγωγή μυκητολογικών ασθενειών ερμηνευόταν ανάλογα με το πνεύμα της εποχής. Έτσι, ήδη από την εποχή των Φαραώ, μυκητολογικές ασθένειες που οδηγούσαν σε λιμούς αποδίδονταν στην οργή του Θεού (επτά πληγές του Φαραώ).

Οι οικονομικές επιπτώσεις διαφέρουν ανάλογα με το φυτοπαθογόνο μύκητα. Υπάρχουν ασθένειες που θίγουν ολόκληρο το φυτικό κεφάλαιο, π.χ. ξηράνσεις δέντρων, ενώ άλλες επηρεάζουν μόνο το παραγόμενο προϊόν, π.χ. κηλιδώσεις καρπών. Άλλες ασθένειες επηρεάζουν την ποσότητα του παραγόμενου



προϊόντος ή τη μετασυλλεκτική του διατήρηση, ενώ άλλες υποβαθμίζουν μόνο την ποιότητα.

Στη συνέχεια γίνεται αναφορά σε χαρακτηριστικές εργασίες που αποτελούν σταθμούς στην ιστορία της Φυτοπαθολογίας - Μυκητολογίας (Τζαβέλλα-Κλωνάρη 1996).

1755: Ο Tillet αποδεικνύει τη μετάδοση του μύκητα *Tilletia tritici* (δαυλίτης του σίτου) με το σπόρο. Με την εργασία αυτή αρχίζει να κλονίζεται η θεωρία της «αυτομάτου γενέσεως».

1807: Ο Prevost αποδεικνύει ότι η «σκόνη» του Tillet είναι σπόρια ενός μύκητα και ότι η ασθένεια του δαυλίτη αντιμετωπίζεται με εμβάπτιση των σπόρων του σίτου σε διάλυμα θειικού χαλκού.

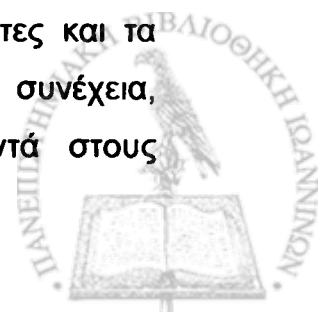
1845-1846: Ξεσπά στην Ευρώπη η μεγάλη πανδημία του περονοσπόρου του φυτού της πατάτας που είχε τραγικές συνέπειες, ιδιαίτερα για την Ιρλανδία, όπου η πατάτα αποτελούσε τη βάση της διατροφής. Η πρόκληση για τους επιστήμονες ήταν μεγάλη και το 1861 ο De Bary αποδεικνύει πειραματικά ότι η ασθένεια οφείλεται στο μύκητα *Phytophthora infestans*.

1860-1865: Καταρρίπτεται επίσημα από τον Pasteur η θεωρία της «αυτομάτου γενέσεως» και η Μικροβιολογία θεμελιώνεται ως επιστήμη.

1885: Ο Millardet ανακαλύπτει τη δράση του βορδιγάλειου πολτού εναντίον του μύκητα *Plasmopara viticola* (περονόσπορος της αμπέλου).

1.3 Ιοί

Η φύση των ιών αποτελεί ένα από τα πιο πολυσυζητημένα θέματα στην επιστήμη της ιολογίας. Το ερώτημα που απασχολεί ανέκαθεν τους επιστημονικούς κύκλους είναι, εάν και κατά πόσον οι ιοί θεωρούνται οργανισμοί. Η απάντηση εξαρτάται άμεσα από τον ορισμό που δεχόμαστε για το τι είναι οργανισμός. Σύμφωνα με τον Lwoff (1957), οργανισμός είναι μία μονάδα ανεξάρτητης δομής πλήρους και ανεξάρτητης λειτουργικότητας. Με βάση αυτόν τον ορισμό, ο ιός δεν μπορεί να θεωρηθεί οργανισμός επειδή δεν είναι ανεξάρτητος (ο ιός εξαρτάται ουσιαστικά από το ζωντανό κύτταρο - ξενιστή, μέσα στο οποίο - και μόνο - είναι σε θέση να οργανώσει την αναπαραγωγή του). Σε σύγκριση με οργανίδια του φυτικού κυττάρου, όπως οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια τα οποία χαρακτηρίζονται από ατομικότητα και ιστορική συνέχεια, στερούνται όμως εξελικτικής ανεξαρτησίας, οι ιοί είναι πιο κοντά στους μονοκύτταρους οργανισμούς, δεν έχουν όμως κυτταρική δομή.



Οι ιοί αποτελούν τα απλούστερα επίπεδα οργάνωσης της ζωντανής ύλης, οργανωμένα σε υπερμοριακά σύμπλοκα πρωτεϊνών και νουκλεϊκού οξέος (θεωρούνται χαρακτηριστική περίπτωση αβιοφάνειας).

Τρία είναι τα κυριότερα χαρακτηριστικά των ιών:

- η παρουσία ενός ή περισσότερων μορίων ενός τύπου νουκλεϊκού οξέος,
- η κάλυψη του νουκλεϊκού οξέος με ένα ή περισσότερα στρώματα μορίων πρωτεΐνης,
- η χρήση του βιοσυνθετικού μηχανισμού του κυττάρου - ξενιστή για την αναπαραγωγή τους.

Το πρώτο και το δεύτερο χαρακτηριστικό διαφοροποιούν τους ιούς από τα ενδοκυτταρικά παράσιτα, ενώ το τρίτο χαρακτηριστικό τους διακρίνει από τα εξωκυτταρικά παράσιτα, των οποίων ο υποχρεωτικός παρασιτισμός είναι αποτέλεσμα μόνο της ανάγκης για ορισμένα συστατικά ή ενδιάμεσες ουσίες του μεταβολισμού του κυττάρου - ξενιστή. Τέλος, το τελευταίο χαρακτηριστικό των ιών σκιαγραφεί τη φύση του παρασιτισμού τους, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί ως παρασιτισμός σε γενετικό επίπεδο (παράσιτα του κυτταρικού μεταφραστικού μηχανισμού).

1.3.1 Γενικά περί μυκοϊών

Οι ιοί των μυκήτων ή μυκοϊοί, παρότι ανακαλύφθηκαν πρόσφατα, φαίνεται πως έχουν διαδοθεί σε μεγάλο βαθμό στους μύκητες - ξενιστές τους και έχουν εξελιχθεί μαζί με αυτούς σε πρώιμο στάδιο κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους (Ghabrial 1998).

Υπάρχουν δύο ακραίες στρατηγικές επιβίωσης από τα παθογόνα, τα οποία είτε σκοτώνουν τον ξενιστή και διαδίδονται γρήγορα είτε συνυπάρχουν με αυτόν. Οι dsRNA ιοί των μυκήτων και των πρωτοζώων αντιπροσωπεύουν αυτή τη συνύπαρξη. Δεν έχουν καμία μολυσματική φάση (με λίγες εξαιρέσεις) και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχουν επιβλαβές αποτέλεσμα στους ξενιστές τους, ενώ υφίστανται ως μόνιμες επίμονες μολύνσεις και μεταβιβάζονται από κύτταρο σε κύτταρο μόνο μέσω της αναπαραγωγής και της κυτταροδιαίρεσης.

Αυτός θεωρείται και ο λόγος για τον οποίο η ανακάλυψή τους καθυστέρησε σε σύγκριση με τους ιούς των ζώων, των φυτών και των βακτηρίων, καθώς η πλειοψηφία των μυκοϊών δεν προκαλεί εμφανείς φαινοτυπικές αλλαγές στους ξενιστές τους.



Οι διαφορές στην ερμηνεία των άρθρων της Συνταξίας οφείλονται στην διαφορετική αντίληψη των μελών της Συνταξίας για το σκοπό της Συνταξίας και στην διαφορετική αντίληψη των μελών της Συνταξίας για το σκοπό της Συνταξίας...

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η Συνταξία είναι η βάση της πολιτικής ζωής του κράτους. Η Συνταξία είναι η βάση της πολιτικής ζωής του κράτους. Η Συνταξία είναι η βάση της πολιτικής ζωής του κράτους...

Από το 1975 και μετά, η Συνταξία είναι η βάση της πολιτικής ζωής του κράτους. Η Συνταξία είναι η βάση της πολιτικής ζωής του κράτους. Η Συνταξία είναι η βάση της πολιτικής ζωής του κράτους...

Ο Σύνταγμα είναι η βάση της πολιτικής ζωής του κράτους. Ο Σύνταγμα είναι η βάση της πολιτικής ζωής του κράτους. Ο Σύνταγμα είναι η βάση της πολιτικής ζωής του κράτους...



2.1 Μυκοϊοί

Οι μυκοϊοί, όπως προαναφέρθηκε, είναι ιοί που προσβάλλουν μύκητες. Οι περισσότεροι από αυτούς που έχουν αναγνωρισθεί και ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα διαθέτουν γονιδίωμα αποτελούμενο από dsRNA, συχνά με περισσότερα του ενός μορίων dsRNA παρόντα σε κάθε ιοσωμάτιο. Τα μόρια dsRNA, για να χαρακτηριστούν ως μυκοϊοί πρέπει να έχουν την ικανότητα να μεταδοθούν και να προσβάλλουν άλλα υγιή στελέχη μυκήτων. Πολλά μόρια dsRNA που έχουν βρεθεί στους μύκητες δεν παρουσιάζουν την παραπάνω ιδιότητα. Αυτά τα μόρια ονομάζονται VLPs (virus like particles) (Bozarth 1972).

Ο πρώτος μυκοϊός βρέθηκε στο βρώσιμο μανιτάρι *Agaricus bisporus*. Το 1950 οι Sinden και Hauser περιέγραψαν μία σοβαρή ασθένεια στη μονάδα παραγωγής μανιταριών των αδελφών La France στις ΗΠΑ. Σύντομα διαπιστώθηκε ότι η ασθένεια αυτή ήταν μεταδοτική. Τα προσβεβλημένα μανιτάρια εμφάνιζαν κολλώδη και ημίρρευση υφή και οι συνέπειες στην παραγωγή ήταν καταστροφικές. Μετά από περίπου δέκα χρόνια ο Hollings (1962), ένας μελετητής των ιών στα φυτά, απέδειξε ότι ιικά σωμάτια ήταν παρόντα σε μολυσμένα στελέχη των εν λόγω μανιταριών. Το γεγονός αυτό αντιπροσωπεύει την ανακάλυψη του πρώτου μυκοϊού που αργότερα ονομάστηκε LIV ή AbV1 (La France isometric virus ή *Agaricus bisporus* virus 1).

Από το 1960 και μετά αναπτύχθηκε μεγάλο ενδιαφέρον για τις ουσίες που προάγουν την παραγωγή ιντερφερονών. Οι τελευταίες είναι πρωτεΐνες που παράγονται από τα προσβεβλημένα κύτταρα και ενεργοποιούν τα γειτονικά ώστε να παράγουν ένζυμα που εμποδίζουν τους ιούς να αντιγράψουν τον εαυτό τους (Διαδικτυακή Πηγή 2, Δ2). Ερευνητικές εργασίες έδειξαν ότι οι ουσίες αυτές περιέχονται και σε ορισμένους μύκητες όπως σε αυτούς που ανήκουν στα γένη *Penicillium* spp. και *Aspergillus* spp. (Bozarth 1972). Η μελέτη αυτών των ουσιών κατέδειξε ότι αποτελούνται από δίκλωνο RNA και επίσης ότι έχουν ιική προέλευση (Bozarth 1972). Η ανακάλυψη αυτή απέδειξε την ύπαρξη ιών και στους μύκητες.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* virus L1 (ή L-A), εν συντομία SCVL1 (ή ScVL-A), είναι ο πιο εκτενώς μελετημένος μυκοϊός. Ο γονιδιωματικός του κύκλος είναι χαρακτηριστικός των dsRNA μυκοϊών και τα dsRNA του ScV αντιγράφονται ημισυντηρητικά. Η αντιγραφή του ScV διέπεται από τον άμεσο ή έμμεσο έλεγχο του ξενιστή, αφού ο ιός ούτε σκοτώνει το κύτταρο, ούτε επιτυγχάνει να μολύνει όλους τους απογόνους των μολυσμένων κυττάρων (δεν υπάρχουν DNA



αντίγραφα του dsRNA γονιδιώματος που να παρουσιάζονται σε στελέχη ξενιστών). Σύμφωνα με τους Sclafani & Fangman (1984) και Zakian *et al.* (1981) η αντιγραφή του ScV μπορεί να περιοριστεί στη φάση G1 του κύκλου του κυττάρου, ενώ σύμφωνα με τους Newman *et al.* (1981) δεν μπορεί. Έως τώρα τίποτε δεν είναι γνωστό για το μηχανισμό της ρύθμισης από την πλευρά του ξενιστή για τον αναδιπλασιασμό ScV.

2.1.1 Εύρος ξενιστών και συχνότητα εμφάνισης

Η συχνότητα εμφάνισης και η ποικιλότητα των μυκοΐων καθορίζεται βάσει του εντοπισμού δίκλωνων μορίων RNA, τα οποία έχουν αναγνωριστεί σε πολλούς φυτοπαθογόνους μύκητες με ποσοστά εμφάνισης που κυμαίνονται από μικρά έως 100% (Πίνακας 1). Μύκητες ξενιστές των μυκοΐων ανήκουν και στα τέσσερα φύλα των μυκήτων (Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota). Επίσης, φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο φύλο Oomycota (βασιλείο Chromista) όπως τα γένη *Phytophthora* και *Pythium* βρέθηκε να περιέχουν μόρια dsRNA. Οι μυκοΐοι διαφέρουν από τους ιούς που χρησιμοποιούν τους μύκητες ως φορείς, επειδή οι πρώτοι είναι ικανοί να αντιγράφονται μέσα στο μύκητα ξενιστή (Pearson *et al.* 2009).

Πίνακας 1: Παραδείγματα εμφάνισης dsRNA.

Είδος	Στελέχη με dsRNA (%)	Προσδιορισθείς αριθμός dsRNA
<i>Aspergillus flavi</i>	13	≤ 9
<i>Aspergillus spp.</i>	10	≤ 8
<i>Botrytis cinereae</i>	72	≤ 8
<i>Chalara elegans</i>	84	≤ 6
<i>Monilinia fruticola</i>	74	≤ 7
<i>Pyricularia oryzae</i>	70	≤ 12
<i>Phytophthora infestans</i>	36	≤ 4
<i>Pythium irregulare</i>	85	≤ 6
<i>Ustilago maydis</i> (ΗΠΑ)	34	1
<i>Ustilago maydis</i> (Μεξικό)	100	1

Πηγή: Pearson *et al.* 2009.

Μικτές μολύνσεις με δύο ή περισσότερους μυκοΐους είναι συχνό φαινόμενο, που πιθανώς να οφείλεται στον τρόπο μετάδοσης των ιών αυτών. Προφανώς δεν



υφίστανται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ισοωματίων, καθώς δεν παρατηρείται ετερόλογη καψιδίωση στις μικτές μολύνσεις (Ghabrial 1998).

2.1.2 Κατάταξη μυκοϊών

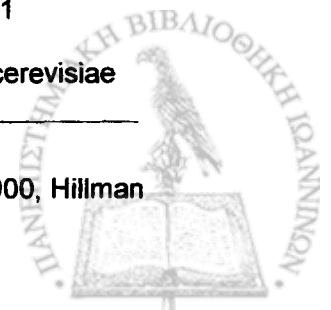
Η ταξινόμηση των μυκοϊών επικυρώθηκε από την 8η συνέλευση της Διεθνούς Επιτροπής για την Ταξινόμηση των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) το 2005 (Fauquet *et al.* 2005, Δ5). Με το σύστημα αυτό οι μυκοϊοί έχουν οργανωθεί σε οικογένειες, γένη και είδη σύμφωνα με την εθιμοτυπική ιεραρχία του Λινναίου και τη φυλογενετική συσχέτιση. Οι μυκοϊοί που έχουν αναγνωριστεί ξεπερνούν τα ενενήντα είδη και οι περισσότεροι από αυτούς κατατάχθηκαν σε εννέα οικογένειες, με ένα ποσοστό της τάξης του 20% να μην έχουν ενταχθεί (unassigned) ακόμη σε κάποιο γένος ή σε ορισμένες περιπτώσεις ούτε σε κάποια οικογένεια (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Οι επίσημα αναγνωρισμένες οικογένειες μυκοϊών και οι μη ενταγμένοι σε οικογένεια/γένος μυκοϊοί (τα επιβεβαιωμένα γένη/είδη αναγράφονται με πλάγια γραφή).

Γονιδίωμα	Οικογένεια	Γένος	Τυπικό μέλος
dsDNA		<i>Rhizidiovirus</i>	<i>Rhizidiomyces virus</i>
ss(+)RNA	Bamaviridae	<i>Bamavirus</i>	<i>Mushroom bacilliform virus</i>
	Namaviridae	<i>Namavirus</i> <i>Mitovirus</i>	<i>Saccharomyces 20S RNA namavirus</i> <i>Cryphonectria mitovirus 1</i>
	Unassigned	Unassigned	<i>Botrytis cinerea virus F</i>
	Unassigned	Unassigned	<i>Botrytis cinerea virus X</i>
	Unassigned	Unassigned	<i>Sclerotinia sclerotiorum debilitation - associated RNA virus</i>
ss(+)RNA-RT	Pseudoviridae	<i>Pseudovirus</i> <i>Hemivirus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae Ty1 virus</i> <i>Drosophila melanogaster copia virus</i>
	Metaviridae	<i>Metavirus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae Ty3 virus</i>
dsRNA	Chrysoviridae	<i>Chrysovirus</i>	<i>Penicillium chrysogenum virus</i>
	Hypoviridae*	<i>Hypovirus</i>	<i>Cryphonectria hypovirus 1</i>
	Partitiviridae	<i>Partivirus</i>	<i>Atkinsonella hypoxylon virus</i>
	Reoviridae	<i>Mycoreovirus</i>	<i>Mycoreovirus 1</i>
	Totiviridae	<i>Totivirus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae virus L-A</i>
	Unassigned	Unassigned	<i>Agaricus bisporus virus 1</i>
	Unassigned	δορυφορικά dsRNA	M satellites of <i>Saccharomyces cerevisiae virus L-A</i>

* Υπάρχουν ενδείξεις πως οι υποϊοί έχουν γονιδίωμα ss(+)RNA (Nuss 2005).

Πηγή: Pearson *et al.* 2009, Fauquet *et al.* 2005, Ghabrial *et al.* 2003, Ghabrial *et al.* 2000, Hillman *et al.* 2000, Mertens *et al.* 2000, Wickner *et al.* 2000.



Οι ιοί των οικογενειών *Barnaviridae* και *Narnaviridae* προσβάλλουν αποκλειστικά μύκητες. Οι ιοί των οικογενειών *Metaviridae* και *Pseudoviridae* εκτός από μύκητες έχουν βρεθεί και σε έντομα (Δ4).

Το γένος *Rhizidiovirus* έχει βρεθεί μόνο στο γένος *Rhizidiomyces* που φυλογενετικά πλέον δεν ανήκει στο βασίλειο των Μυκήτων αλλά στα Chromista (Pearson *et al.* 2009).

Οι ιοί *Botrytis cinerea virus X* (BVX) και *Sclerotinia sclerotiorum debilitation - associated RNA virus* (SsDRV) παρουσιάζουν ομολογία στην αλληλουχία με μέλη της οικογένειας *Flexiviridae* (φυτικοί ιοί) και συγκεκριμένα με τα γένη *Potexvirus* και *Allexivirus* αντίστοιχα (Pearson *et al.* 2009).

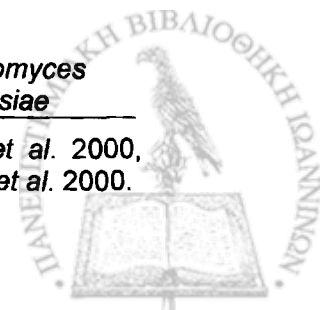
2.1.2.1 Χαρακτηριστικά μυκοϊών dsRNA

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και οι ξενιστές των μυκοϊών με γενετικό υλικό dsRNA φαίνονται στον Πίνακα 3 και στις Εικόνες 1 και 2.

Πίνακας 3: Μορφολογία και ξενιστές των μυκοϊών με dsRNA.

Οικογένεια / Είδος	Αριθμός μορίων dsRNA	Μορφολογία	Ξενιστής
<i>Chrysoviridae</i>	4 (χωριστά καψιδιωμένα)	μήκος 2,8 - 3,6 kbp το καθένα, περικλείονται από εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο μεγέθους 30 - 40 nm	μύκητες
<i>Partitiviridae</i>	2 (χωριστά καψιδιωμένα)	συμμετρικά ισωμάτια με διάμετρο 30 - 40 nm, το γονιδίωμα έχει συνολικό μεγέθους 4 - 6 kbp, εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο	μύκητες, φυτά
<i>Reoviridae</i>	10, 11 ή 12 (καψιδιωμένα όλα μαζί)	εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο (μία, δύο ή τρεις στρώσεις) διαμέτρου 70 - 90 nm	μύκητες, φυτά, ψάρια, ερπετά, πουλιά, θηλαστικά, αρθρόποδα
<i>Totiviridae</i>	1	τα ισωμάτια είναι συμμετρικά, εικοσαεδρικά, έχουν διάμετρο 30 - 40 nm και περιέχουν ένα μόριο dsRNA μεγέθους 4 - 7 kbp	μύκητες, πρωτόζωα
AbV1	9 (τρία μόρια ίσως ανήκουν σε δορυφορικούς ιούς)	ισομετρικά ισωμάτια με διάμετρο 34 - 36 nm	<i>Agaricus bisporus</i>
M satellites of ScVL-A	1	απαιτούν βοηθητικό ιό για την καψιδίωση	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Πηγή: Pearson *et al.* 2009, Fauquet *et al.* 2005, Ghabrial *et al.* 2003, Ghabrial *et al.* 2000, Ghabrial 1998, Hillman *et al.* 2000, Mertens 2004, Mertens *et al.* 2000, Wickner *et al.* 2000.



Υποσημείωση Πίνακα 3: Οι υποϊοί κατατάσσονται πλέον σε ιούς με μονόκλωνο (+)RNA.

Οικογένεια	Αριθμός μορίων ss(+)RNA	Μορφολογία	Ξενιστής
Hypoviridae	1	δεν έχουν πραγματικό ισωμάτιο (δεν διαθέτει καψίδιο) και το γονιδίωμά τους μεγέθους 9 - 13 kbp εσωκλείεται σε ένα πλειομορφικό κυστίδιο από λιπίδια του ξενιστή μεγέθους 50 - 80 nm	μύκητες

Πηγή: Ghabrial & Suzuki 2009, Pearson *et al.* 2009.

Η οικογένεια Chrysoviridae αποτελείται από μέλη που μέχρι πρότινος ανήκαν στην οικογένεια Partitiviridae. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν τα είδη *Helminthosporium victoriae virus* και *Penicillium chrysogenum virus* (Δ4, Ghabrial *et al.* 2003).

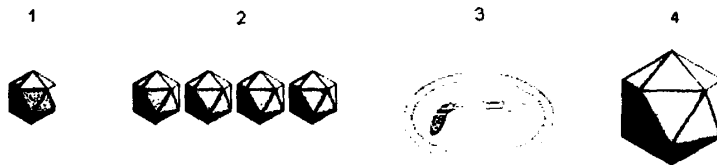
Η οικογένεια Hypoviridae εξετάζεται στην παράγραφο αυτή, καθώς μέχρι πρότινος θεωρούταν πως έχει γονιδίωμα dsRNA (Pearson *et al.* 2009). Οι υποϊοί απαντώνται συχνότερα με την αντιγραφική μορφή dsRNA στους ξενιστές τους. Εντούτοις, οι υφιστάμενες επί του παρόντος ενδείξεις υποδεικνύουν ότι οι ιοί αυτοί αντιγράφουν και εκφράζουν το γονιδίωμά τους με τρόπους όμοιους με τους ss(+)RNA ιούς και η καταγωγή των γονιδίων των RdRp (RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση) και των ελικασών είναι κοινή με αυτή των ss(+)RNA ιών (Ghabrial & Suzuki 2009). Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται οι ιοί *Cryphonectria hypovirus 1-EP713*, *Cryphonectria hypovirus 1-Euro7*, *Cryphonectria hypovirus 2-NB58*, *Cryphonectria hypovirus 3-GH2* και *Cryphonectria hypovirus 4-SR2* που προσβάλλουν το μύκητα *Cryphonectria parasitica* (Δ4, Ghabrial & Suzuki 2009, Hillman *et al.* 2000).

Τα μέλη της οικογένειας Partitiviridae συνήθως προκαλούν κρυπτικές μολύνσεις. Μέχρι σήμερα η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τρία γένη. Στο γένος *Partitivirus* περιλαμβάνονται ιοί που μολύνουν μύκητες όπως οι: *Agaricus bisporus virus 4*, *Aspergillus ochraceous virus*, *Atkinsonella hypoxylon virus*, *Fusarium poae virus*, *Fusarium solani virus 1*, *Fusarium solani virus 2*, *Gaeumannomyces graminis virus 019/6-A*, *Gaeumannomyces graminis virus T1-A*, *Penicillium stoloniferum virus S*, *Rhizoctonia solani virus 717*. Τα γένη *Alphacryptovirus* και *Betacryptovirus* προσβάλλουν φυτά (Δ4, Ghabrial *et al.* 2000).

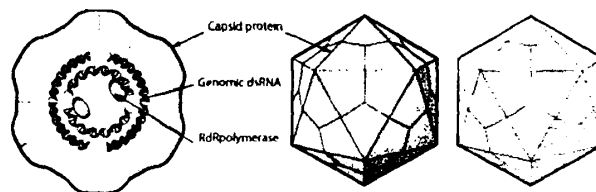
Ο μεγαλύτερος αριθμός dsRNA ιών που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα ανήκει στην οικογένεια Reoviridae. Το γένος *Mycoreovirus* προσβάλλει μύκητες (Δ4, Mertens *et al.* 2000).



Τα μέλη της οικογένειας Totiviridae προκαλούν συνήθως κρυπτικές μολύνσεις. Οι μυκοΐοί της οικογένειας αυτής ανήκουν στο γένος *Totivirus* (*Helminthosporium victoriae* virus 190S, *Saccharomyces cerevisiae* virus L-A (L1), *Saccharomyces cerevisiae* virus L-BC (La), *Ustilago maydis* virus H1). Οι ιοί των πρωτοζώων ανήκουν στα γένη *Giardiavirus* και *Leishmaniavirus* (Δ4, Wickner *et al.* 2000).



Εικόνα 1: Δομή dsRNA μυκοΐών: 1) Totiviridae, ένα μόριο dsRNA, 2) Chrysoviridae, τέσσερα μόρια dsRNA, 3) Hyponiridae, ένα γραμμικό μόριο μη καψιδιωμένου RNA, 4) Reoviridae, πακεταρισμένα 10-12 μόρια dsRNA (Προσαρμογή από Nuss 2005).



Εικόνα 2: Δομή ισοωματίου οικογένειας Partitiviridae, δύο μόρια dsRNA (Δ1).

Το ερώτημα που τίθεται από πολλούς επιστήμονες είναι για ποιο λόγο η πλειοψηφία των μυκοΐών εμφανίζουν γονιδίωμα dsRNA. Ο Buck (1986) πρότεινε πως το dsRNA ίσως είναι η «καλύτερη λύση» για τους ιούς που αναπτύσσονται αποκλειστικά μέσα στα κύτταρα του ξενιστή. Το dsRNA θα μπορούσε να προσαρμοστεί καλύτερα στο μηχανισμό αντιγραφής του dsDNA του ξενιστή και να το χρησιμοποιήσει για δικό του όφελος (η DNA τοποϊσομεράση I είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του M dsRNA, ενός δορυφορικού dsRNA που εξαρτάται από τον ScVL-A για την αντιγραφή και την καψιδίωσή του).

Είναι επίσης γνωστό πως η παρουσία ιικού dsRNA ενεργοποιεί κυτταρικούς μηχανισμούς του μύκητα ενάντια στην προσβολή (ενεργοποιούνται ένζυμα που εξαρτώνται από την παρουσία dsRNA). Πολλοί όμως μυκοΐοί dsRNA έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να «αποσιωπήσουν» την προσβολή των κυττάρων του ξενιστή. Μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπισθεί dsRNA τελείως γυμνό (χωρίς καψιδιακή πρωτεΐνη) σε μύκητες προσβεβλημένους από ιούς (οι υποϊοί, όπως αναφέρθηκε στον Πίνακα 3, μπορεί να μην διαθέτουν καψίδιο, αλλά το γονιδίωμά τους περικλείεται σε ένα κυστίδιο από λιπίδια), γεγονός που είναι άμεσα συνδεδεμένο με τις επιπτώσεις που έχουν οι μυκοΐοί στη βιολογία του κυττάρου του ξενιστή (Ghabrial 1998).

Η διαίρεση του γονιδιώματος σε δύο ή περισσότερα τμήματα είναι ένα χαρακτηριστικό που απαντάται αποκλειστικά σε ορισμένες οικογένειες ή γένη ιών



RNA. Ένα πλεονέκτημα του διαιρεμένου (μη ενιαίου) γονιδιώματος είναι ότι επιτρέπει στο ισωμάτιο να είναι μικρό και να προστατεύεται εύκολα από το πρωτεϊνικό καψίδιο. Επίσης, εάν το γονιδίωμα του ιού είναι διαιρεμένο σε δύο ή περισσότερες αλυσίδες RNA παρά ενωμένο σε μία μεγάλη αλυσίδα, τα «θανατηφόρα» λάθη που μπορεί να συμβούν κατά την αναπαραγωγή του ιού θα είναι λιγότερο σημαντικά. Ένα απλό λάθος στην αναπαραγωγή ενός ιού με γονιδίωμα ένα μεγάλο μόριο RNA μπορεί να είναι θανατηφόρο, αλλά εάν το ίδιο γονιδίωμα είναι διηρημένο σε δύο ή περισσότερα τμήματα, το ίδιο λάθος θα αφορά ένα μόνο τμήμα του γονιδιώματος, ενώ τα υπόλοιπα θα παραμείνουν άθικτα συμβάλλοντας στη διαδικασία αναπαραγωγής του ιού (Κατής 2000).

2.1.3 Καταγωγή και εξελικτική πορεία των μυκοϊών

Όπως προαναφέρθηκε, η πλειοψηφία των μέχρι τώρα ανακαλυφθέντων μυκοϊών έχουν γονιδίωμα αποτελούμενο από RNA. Οι RNA ιοί γενικότερα είναι πιο επιδεκτικοί σε λάθη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Σε κάθε βιολογικό κύκλο είναι δυνατό να υφίστανται πλήθος μεταλλάξεων, λόγω της χαμηλής πιστότητας αντιγραφής του γενετικού τους υλικού από την αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία στερείται ικανότητας επιδιόρθωσης των λαθών αντιγραφής. Συνεπώς, οι πληθυσμοί των RNA ιών αποτελούνται από πολύπλοκες και δυναμικές ομάδες αλληλουχιών, οι οποίες αναφέρονται και ως οιονεί είδη (*quasi species*). Το γεγονός αυτό αποτελεί πλεονέκτημα όσον αφορά στην εξέλιξη, καθώς μέσα σε ένα πληθυσμό μπορούν να δημιουργηθούν στελέχη καλύτερα προσαρμοσμένα στο νέο περιβάλλον (Pearson *et al.* 2009).

Δύο είναι οι θεωρίες που αφορούν την καταγωγή και την εξελικτική πορεία των μυκοϊών, η θεωρία της αρχαίας συνεξέλιξης και η θεωρία της προέλευσης από φυτικούς ιούς (Pearson *et al.* 2009).

2.1.3.1 Η θεωρία της αρχαίας συνεξέλιξης

Εφόσον οι μυκοϊοί πρόσβαλαν τους προγόνους των σημερινών μυκήτων και συνεξελίχθηκαν με αυτούς, είναι λογικό να συμπεράνει κανείς πως σε αυτή την εξελικτική πορεία υπήρχαν αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μύκητα - ξενιστή και του ιού. Η θεωρία αυτή βασίζεται στο ότι ο τρόπος μετάδοσης των μυκοϊών περιορίζεται μέσω ενδοκυττάρικων μηχανισμών, γεγονός που υποδεικνύει ότι η συσχέτιση μεταξύ του ξενιστή και του ιού προέρχεται από πολύ παλιά (Pearson *et al.* 2009). Οι μολύνσεις από τους μυκοϊούς είναι λανθάνουσες



και έμμονες. Η λανθάνουσα μόλυνση ευνοεί την επιβίωση του ξενιστή, ενώ ο έμμονος τρόπος δράσης ευνοεί τον ιό, εφόσον δεν μπορεί να επιβιώσει εκτός του κυττάρου.

Πολλοί μυκοϊοί διατήρησαν μόνο τα γονίδια που τους είναι απαραίτητα για την επιβίωσή τους (*RDRP* και *CP*, π.χ. *totiviruses* και *partitiviruses*) εκμεταλλευόμενοι όμως αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες του ξενιστή τους. Τα κύτταρα του μύκητα - ξενιστή έχουν εξελιχθεί έτσι, ώστε να μπορούν να «ανέχονται» συγκεκριμένο επίπεδο ιικού φορτίου πέρα από το οποίο η συμβίωση μύκητα ιού «διαταράσσεται» και μετατρέπεται σε παθογένεια, με αποτέλεσμα το θάνατο των κυττάρων και συνεπώς και του ιού (Ghabrial 1998).

Κάτω από το πρίσμα της θεωρίας αυτής θα ανέμενε κανείς πως η εξέλιξη στη δομή των μυκοϊών ακολουθεί τα εξελικτικά μονοπάτια των ξενιστών τους. Η οικογένεια *Reoviridae*, για παράδειγμα, είναι μία μεγάλη και βιολογικά ποικιλόμορφη οικογένεια, η οποία αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από ζωικούς ιούς και περιλαμβάνει τρία φυτοπαθογόνα γένη και ένα μοναδικό γένος που προσβάλλει μύκητες (*Mycoreovirus*). Ωστόσο, οι ιοί του γένους *Mycoreovirus* δείχνουν χαμηλό έως μέτριο βαθμό ομοιότητας με ομόλογα τμήματα ζωικών ιών του πολύ συγγενικού γένους *Coltivirus* (Pearson *et al.* 2009).

Θα ανέμενε κανείς πως το εύρος ξενιστών κάθε μυκοϊού είναι περιορισμένο σε ένα είδος ή σε στενά συγγενικά είδη και ότι η προσβολή από το μυκοϊό οδήγησε στην εξειδίκευση αυτή. Οι Koornin *et al.* (1991) μελέτησαν αυτή την πιθανότητα λαμβάνοντας υπόψη την ομοιότητα στο γονιδίωμα (και στα έξι βασίλεια) και πρότειναν πως τα μόρια dsRNA που σχετίζονται με την υπολυσματικότητα στη *Cryphonectria parasitica* και το γένος *Potyvirus* (φυτικοί ιοί) έχουν κοινή καταγωγή. Ίσως ένας σαπροφυτικός ή παθογόνος μύκητας προσέλαβε ένα ιό ssRNA από το φυτό - ξενιστή, στη συνέχεια έχασε το γονίδιο που κωδικοποιεί το πρωτεϊνικό καψίδιο και μετεξελίχθηκε έτσι ώστε να κυριαρχήσει η dsRNA αντιγραφόμενη μορφή του ιού κάτω από την εξελικτική πίεση στο νέο περιβάλλον του ξενιστή (μετάδοση μέσω των αναστομώσεων των υφών). Ωστόσο, μπορεί να έχει συμβεί και το αντίστροφο, δηλαδή οι φυτικοί ssRNA ιοί να προέρχονται από τους dsRNA μυκοϊούς (Pearson *et al.* 2009).

Ενδείξεις που ενισχύουν τη θεωρία της αρχαίας συνεξέλιξης είναι ο μεγάλος αριθμός χρωμοσωμικών γονιδίων που απαιτούνται για την αντιγραφή των φονικών ιών (killer viruses) στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, η χρήση μιτοχονδριακού γενετικού κώδικα για τη μετάφραση στους μυκοϊούς των



μιτοχονδρίων και η χρήση ενζύμων που κωδικοποιούνται από τον ξενιστή για τη δημιουργία της καψιδιακής πρωτεΐνης όπως συμβαίνει στον ιό *Helminthosporium victoriae virus* 190S. Τα αποτελέσματα από μία έρευνα που έγινε στον ιό *Ustilago maydis virus-H1* (Umv-H1) ενισχύουν τη θεωρία της συνεξέλιξης. Ο ιός αυτός προσβάλλει το μύκητα *Ustilago maydis* που προκαλεί την ασθένεια άνθρακας του αραβοσίτου. Στην έρευνα αυτή εξετάστηκε η φυλογενετική κατανομή σε σχέση με τη γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών Umv-H1 στις ΗΠΑ και στο Μεξικό με στόχο να διευκρινιστεί κατά πόσο η δυναμική των πληθυσμών του φυτού και του μύκητα επηρέασαν τη δομή του πληθυσμού του ιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η «προγονική» μορφή του ιού Umv-H1 ξεκίνησε από το Μεξικό και ότι η εξάπλωσή του στις ΗΠΑ σήμερα είναι αποτέλεσμα γεγονότων που συνέβησαν σε πολύ παλαιότερες χρονικές περιόδους και δεν οφείλεται στη μετακίνηση του σπόρου αραβοσίτου μέσω του εμπορίου (Pearson *et al.* 2009). Σε μία άλλη έρευνα σχετικά με τον ιό *Botrytis cinerea virus F* (BCVF) που προσβάλλει το μύκητα *Botrytis cinerea*, αναγνωρίστηκαν τρεις ομάδες ιού με υψηλό βαθμό συγγένειας σε απομονώσεις του μύκητα που προέρχονταν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Δύο από τις ομάδες περιλάμβαναν στελέχη από τη Νέα Ζηλανδία και την Ευρώπη, γεγονός που υποδηλώνει τη συμβολή του ανθρώπου στη μεταφορά του ιού και του μύκητα από την περιοχή καταγωγής (βόρειο ημισφαίριο) στο νότιο ημισφαίριο (Pearson *et al.* 2009).

Η θεωρία αυτή ενισχύεται επίσης και από το γεγονός ότι πολλές προσβολές από μυκοϊούς οδηγούν σε μολύνσεις χωρίς φαινοτυπικά συμπτώματα στον ξενιστή. Ωστόσο, δεν σχετίζονται όλοι οι μυκοϊοί με ασυμπτωτικές προσβολές (Pearson *et al.* 2009).

2.1.3.2 Η θεωρία της προέλευσης από φυτικούς ιούς

Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η εξέλιξη των μυκοϊών και των μυκήτων - ξενιστών τους δεν έγινε παράλληλα. Ενδείξεις που ενισχύουν την υπόθεση αυτή είναι η ομοιότητα που παρουσιάζεται μεταξύ των μυκοϊών και των φυτικών ιών. Για παράδειγμα, οι υποϊοί CHV1, CHV2, CHV3 και CHV4, οι οποίοι σχετίζονται με το φαινόμενο της υπομολυσματικότητας, δείχνουν κοινή φυλογενετική καταγωγή με διάφορα είδη του γένους *Potyvirus* (ssRNA). Επίσης, η αλληλουχία μίας RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης από ένα dsRNA ιό του μύκητα *Fusarium graminearum* βρέθηκε να συσχετίζεται στενά με τις αλληλουχίες των CHV1, CHV2 και CHV3 και με το φυτικό ιό *Barley yellow mosaic virus* (*Potyvirus*). Οι Xie *et al.*



(2006) υποστηρίζουν ότι πολλοί μυκοϊοί ssRNA, που σχετίζονται με την εξασθένηση/υπομολυσματικότητα (SsDRV) είναι φυλογενετικά πολύ πιο κοντά στους ss(+)RNA φυτικούς ιούς από ότι σε άλλους μη μολυσματικούς μυκοϊούς (Pearson *et al.* 2009).

Τουλάχιστον είκοσι φυτικοί ιοί ή ασθένειες που αποδίδονται σε ιούς, χωρίς όμως να έχει απομονωθεί το παθογόνο αίτιο, έχουν περιγραφεί ότι έχουν ως φορέα μύκητες (Κατής 2000). Πιστεύεται πως ένα σπάνιο γεγονός πιθανώς οδήγησε τον ιό από την εξωτερική επιφάνεια των ζωοσπορίων στο εσωτερικό αυτών. Ωστόσο, αυτός ο τρόπος μετάδοσης δεν είναι πολύ συνηθισμένος, ενώ σε ό,τι αφορά τους φυτικούς ιούς είναι πιθανό ο μύκητας να μολύνεται απευθείας μέσω της προσβολής του φυτού - ξενιστή (Pearson *et al.* 2009).

Τρεις πρόσφατα περιγραφόμενοι πολυεδρικοί μυκοϊοί ssRNA παρουσιάζουν ομολογία στην αλληλουχία τους με φυτικούς ιούς. Όσον αφορά στον ιό BCVF, η RdRp παρουσιάζει υψηλή ομολογία με αυτή των tymoviruses και rotyniruses (φυτικοί ιοί), ενώ από το γονιδιωματικό χαρακτηρισμό του μυκοϊού BVX προέκυψε σε επίπεδο αμινοξέων υψηλή ταύτιση με γονίδια των «rotex-like» ssRNA φυτικών ιών. Ο BVX σχετίζεται στενά με μέλη του γένους *Allexivirus* (φυτικοί ιοί) σύμφωνα με μελέτη της αλληλουχίας της RdRp και της καψιδιακής πρωτεΐνης. Υπάρχει και η άποψη πως ο BVX πιθανό να είναι μέλος ενός καινούργιου γένους της οικογένειας Flexiviridae. Ο SsDRV είναι ένας ss(+)RNA ιός που περιέχει συντηρημένη μεθυλοτρανσφεράση. Η ιική RNA ελικάση και η RdRp παρουσιάζουν χαρακτηριστικά των γονιδίων αντιγραφής της υπερομάδας «alphavirus-like» (+ssRNA φυτικών ιών) και μεγάλη ομοιότητα με τους «rotex-like» φυτικούς ιούς. Οι *Sclerotinia* και *Botrytis* είναι συγγενικά γένη και η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι ο SsDRV είναι συγγενικό είδος του BCVF. Οι δύο αυτοί μυκοϊοί μπορούν να ομαδοποιηθούν με ορισμένους allexviruses όπως είναι οι Garlic virus E (GVE), Garlic virus A (GVA), Garlic virus X (GVX) και Shallot virus X (ShVX) στην οικογένεια Flexiviridae. Ωστόσο, ενώ στους περισσότερους flexiviruses το γονιδίωμα περιέχει τρία έως έξι ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), το γονιδίωμα του SsDRV περιέχει μόνο ένα ORF (193 kDa) το οποίο είναι παρόμοιο σε μέγεθος με το ORF1 του BCVF και ορισμένων flexiviruses (150-250 kDa). Οι SsDRV και BCVF (και ο BVX) δεν παρουσιάζουν καμία αλληλουχία που να κωδικεύει κινητήρια πρωτεΐνη, ενώ δεν υπάρχει γονίδιο καψιδιακής πρωτεΐνης (Pearson *et al.* 2009).



Ορισμένοι ερευνητές πιστεύουν πως υπήρχε από πολύ παλιά εξελικτική σχέση μεταξύ του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis* και του φυτικού γένους *Allium*. Είδη που ανήκουν στο γένος *Allium* είναι ευπαθή σε πολλούς *allexiniviruses* (GVE, GVA, GVX και ShVX), ενώ ο *B. cinerae* μπορεί τυχαία να προσέλαβε τους φυτικούς ιούς κατά τη διαδικασία της προσβολής. Συγκεκριμένα, ο BVX δείχνει 73% ομολογία σε επίπεδο αμινοξέων σε σχέση με την RdRp του GVA, η οποία είναι η υψηλότερη που έχει βρεθεί μεταξύ μυκοϊών και ssRNA φυτικών ιών. Αυτό υποδεικνύει είτε ένα πρόσφατο ανασυνδυασμό μεταξύ των δύο ιών, είτε μία σχετικά πρόσφατη γενετική «παρέκκλιση» από ένα κοινό πρόγονο (Pearson *et al.* 2009).

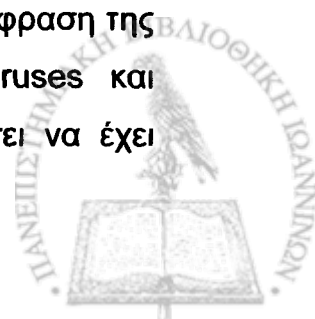
Συμπερασματικά, και οι δύο θεωρίες για την καταγωγή των μυκοϊών θεωρούνται βάσιμες και δίνουν ικανοποιητική εξήγηση στην ποικιλότητα των μυκοϊών που έχει βρεθεί στη φύση. Επιπλέον είναι πιθανό, στην περίπτωση των μυκήτων που προσβάλλουν φυτά, οι ιοί να μεταπήδησαν από το μύκητα - ξενιστή στο φυτό και να δημιουργήσαν τους φυτικούς ιούς (Pearson *et al.* 2009).

2.1.3.3 Εξελικτική πορεία των μυκοϊών dsRNA

Οι *totiviruses* προσβάλλουν μύκητες και παρασιτικά πρωτόζωα και πιστεύεται ότι έχουν αρχαία προέλευση καθώς τα πρωτόζωα και οι μύκητες διαχωρίστηκαν πολύ νωρίς κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Το γεγονός πως ο ιός Hn190SV που προσβάλλει μύκητες σχετίζεται στενότερα με τους ιούς LRV1 και LRV2 (*Leishmania* RNA virus, ιοί πρωτοζώων) παρά με τους ιούς των ζυμών υποδηλώνει πως οι Hn190SV και LRVs προϋπήρχαν σε ένα κοινό πρόγονο των μυκήτων και των πρωτοζώων (Ghabrial 1998).

Οι *partitiviruses* θεωρείται ότι έχουν εξελιχθεί από τους *totiviruses* με διαίρεση του γονιδιώματός τους σε δύο μόρια dsRNA. Όπως και οι *totiviruses*, οι *partitiviruses* διαθέτουν απλά γονιδιώματα που αποτελούνται από δύο γονίδια (*CP* και *RDRP*) αλλά, σε αντίθεση με τους *totiviruses*, το κάθε γονίδιο εδράζεται σε ξεχωριστό μόριο dsRNA (Ghabrial 1998).

Ο LIV ή AbV1 πιθανό να έχει προκύψει από έναν *partitivirus* μέσω ανασυνδυασμού και απόκτησης επιπλέον γονιδίων τα οποία τον βοήθησαν στην εξάπλωσή του μέσα στους μαλακούς ιστούς του μανιταριού και στην έκφραση της παθογένειας. Η LIV RdRp σχετίζεται στενά με αυτές των *totiviruses* και *partitiviruses*, όμως, σε αντίθεση με τους ιούς αυτούς, ο LIV πρέπει να έχει



εμφανιστεί πρόσφατα στην εξελικτική διαδικασία, καθώς η χρήση κωδικονίων του διαφέρει από αυτή του ξενιστή του, *A. bisporus* (Ghabrial 1998).

2.1.4 Διασπορά μυκοΐων

Οι μυκοΐοι δεν μπορούν να επιβιώσουν εκτός του μύκητα ξενιστή τους (ο βιολογικός τους κύκλος περιορίζεται μέσα στον ξενιστή), ενώ δεν έχουν βρεθεί φυσικοί φορείς τους. Παρόλα αυτά όμως είναι πολύ διαδεδομένοι σε όλα τα φύλα των μυκήτων. Εξαιτίας της μη μετάδοσής τους ως ελεύθερα ισωμάτια, έχουν περιγραφεί ως μη μολυσματικοί, ενδογενείς ή κληρονομήσιμοι ιοί. Ο χαρακτηρισμός «μη μολυσματικοί ιοί» τους διαχωρίζει από αυτούς που περνούν μέρος του βιολογικού τους κύκλου εκτός του ξενιστή και μεταδίδονται με ελεύθερα ισωμάτια, γεγονός που υποδεικνύει κάποιες μορφολογικές ιδιαιτερότητες. Οι όροι «ενδογενείς ιοί» και «κληρονομήσιμοι ιοί» δείχνουν πως οι μυκοΐοι έχουν τη δυνατότητα να ενσωματώνουν αντίγραφο του DNA ή RNA τους στο DNA του ξενιστή τους. Αν η θεωρία αυτή αποδειχθεί σωστή, αυτό σημαίνει ότι οι μυκοΐοι λειτουργούν αποκλειστικά μέσα στα κύτταρα του ξενιστή τους (Ghabrial 1998).

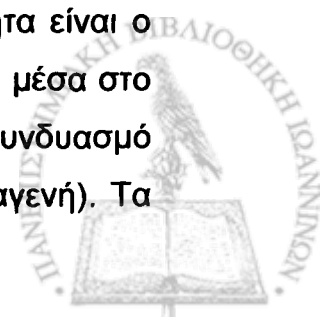
Σε εργαστηριακές συνθήκες, πρωτοπλάστες διαφόρων μυκήτων έχουν μολυνθεί με «καθαρούς» ιούς και επίσης ιοί έχουν μεταδοθεί μέσω σύντηξης των πρωτοπλαστών. Στο μύκητα *S. cerevisiae* παρατηρήθηκε πετυχημένη μεταφορά VLPs μορίων που υποδηλώνει ότι τουλάχιστο για τις ζύμες, η μεταφορά αυτή πιθανώς αποτελεί ένα φυσικό τρόπο μόλυνσης (Pearson *et al.* 2009).

Στη φύση, οι μυκοΐοι μεταδίδονται με δύο τρόπους: είτε μέσω των σπορίων (serial or vertical transmission, κάθετη μετάδοση) είτε μέσω της αναστόμωσης των υφών (lateral transmission, οριζόντια μετάδοση) (Ghabrial 1998) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Κάθετη και οριζόντια μετάδοση μυκοΐων (Nuss 2005).

Η κάθετη μετάδοση των ιών από το μυκήλιο στα σπόρια του μύκητα είναι ο βασικός τρόπος διασποράς των μυκοΐων. Ο ρυθμός μετάδοσης του ιού μέσα στο ίδιο είδος μύκητα μπορεί να διαφέρει και εξαρτάται τόσο από το συνδυασμό στέλεχος-μύκητα / ιού όσο και από το είδος των σπορίων (εγγενή ή αγενή). Τα

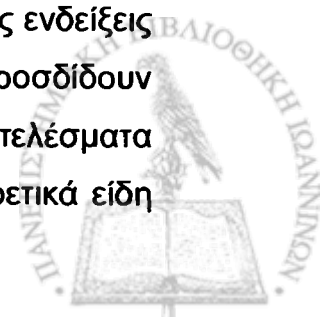


αγενή σπόρια παράγονται από διαφοροποιημένες υφές και οι μυκοΐοι μεταφέρονται σε αυτά μέσω του κυτταροπλάσματος καθώς τα σπόρια αναπτύσσονται. Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η μετάδοση των μυκοΐων με εγγενή σπόρια δεν είναι τόσο κοινή και ότι το ποσοστό μόλυνσης είναι χαμηλό για τους μύκητες που εμφανίζουν συχνά τέλεια μορφή στο βιολογικό τους κύκλο (10% εμφάνιση dsRNA σε 668 απομονώσεις *Aspergillus*). Άλλες έρευνες όμως έδειξαν ότι παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά μετάδοσης μέσω εγγενών σπορίων και συγκεκριμένα στους μύκητες *Fusarium graminearum* (με συχνότητα μετάδοσης των dsRNA 100% τόσο μέσω των κονιδίων όσο και μέσω των ασκοσπορίων), *Heterobasidion annosum* (με το 10-84% των βλαστανόντων βασιδιοσπορίων να περιέχουν dsRNA) και *Monilinia fruticola* (dsRNA βρέθηκαν στο 74% των απομονώσεων, ενώ επισημαίνεται ότι η τέλεια μορφή του μύκητα απαντάται πολύ συχνά). Επίσης στο μύκητα *B. cinerea* ο ιός BVX βρέθηκε στο 35% (όταν συμμετείχε ως δέκτης το αρνητικού φύλου πατρικό μυκήλιο) και 53% (όταν συμμετείχε ως δότης το αρνητικού φύλου πατρικό μυκήλιο) των απογόνων που προέκυψαν από τη βλάστηση των ασκοσπορίων (Pearson *et al.* 2009).

Κατά συνέπεια, δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές στο ρυθμό μετάδοσης των μυκοΐων τόσο μέσω των αγενών όσο και μέσω των εγγενών τους σπορίων, ενώ η μετάδοση μέσω των εγγενών σπορίων δεν πρέπει να θεωρείται σπάνιο φαινόμενο.

Η οριζόντια μετάδοση μεταξύ διαφορετικών στελεχών μυκήτων μέσω των αναστομώσεων των υφών τους είναι ένα συχνό φαινόμενο και έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά ώστε να επιτευχθεί μετάδοση μυκοΐων σε εργαστηριακές συνθήκες. Σε πολλούς μύκητες παρατηρείται κατά τη διάρκεια της αύξησής τους συνένωση μεταξύ των βλαστικών υφών, φαινόμενο γνωστό ως αναστόμωση υφών (hyphal anastomosis). Μέσω της διαδικασίας αυτής λαμβάνει χώρα ανταλλαγή κυτταροπλάσματος και γενετικού υλικού. Δεδομένου ότι οι μυκοΐοι απαντώνται στο κυτταρόπλασμα, μεταφέρονται εύκολα με τον τρόπο αυτό.

Είναι γνωστό πως πολλοί φυτικοί ιοί προσβάλλουν ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, οι οποίοι συχνά ανήκουν σε διαφορετικά γένη ή και οικογένειες. Κάτι τέτοιο θα ήταν πολύ δύσκολο να συμβεί με τους μυκοΐους λόγω της μη ύπαρξης φορέων και της μη μετάδοσής τους με μηχανικό τρόπο. Υπάρχουν όμως ενδείξεις οριζόντιας μεταφοράς μυκοΐων μεταξύ διαφορετικών ειδών, οι οποίες προσδίδουν νέες διαστάσεις στο θέμα της καταγωγής μερικών μυκοΐων. Αποτελέσματα ερευνών έδειξαν πως ίδια στελέχη του ιού CHV1 βρέθηκαν σε διαφορετικά είδη



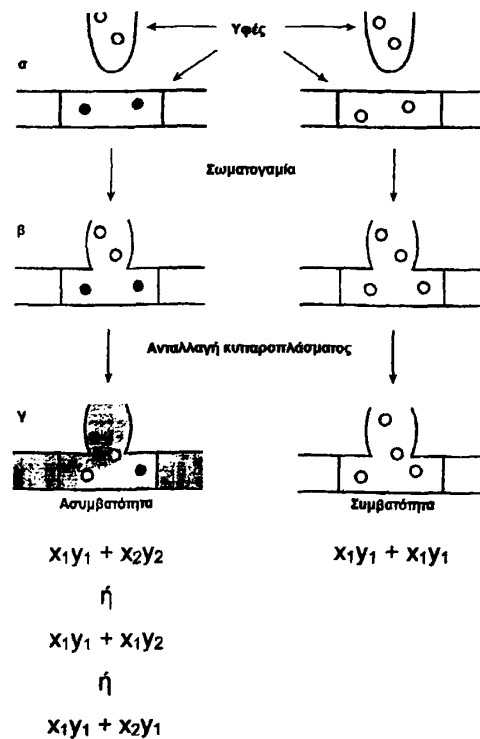
Cryphonectria, γεγονός που υποδηλώνει οριζόντια μεταφορά που συνέβη πρόσφατα στην εξελικτική διαδικασία. Επίσης οι ίδιοι μεταξύ τους έχουν εντοπιστεί σε διαφορετικές τάξεις τόσο των Ασκομυκήτων όσο και των Βασιδιομυκήτων (Pearson *et al.* 2009). Οι van Diepeningen *et al.* (2000) απέδειξαν τη μεταφορά μυκοίων μεταξύ του είδους *Fusarium roae* και στελεχών του μαύρου *Aspergillus* μέσω της σύμπτυξης των πρωτοπλαστών, με το ποσοστό μόλυνσης να παραμένει σε σταθερό επίπεδο ακόμη και μετά από αρκετές ανακαλλιέργειες. Ωστόσο, δεν έχει παρατηρηθεί κάτι τέτοιο στη φύση.

Επειδή η πλασμογαμία επαναλαμβάνεται αρκετά συχνά στη διάρκεια του βιολογικού κύκλου των μυκήτων, καθώς και επειδή παράγονται μεγάλες ποσότητες αγενών και εγγενών σπορίων, τα οποία μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις, οι μυκοΐοι έχουν τη δυνατότητα να μεταδοθούν και με τους δύο τρόπους και έτσι η διασπορά τους γίνεται εύκολα.

2.1.4.1 Βλαστική ασυμβατότητα μυκήτων

Το φαινόμενο της αναστόμωσης των υφών έχει παρατηρηθεί σε πολλά μέλη των Ασκομυκήτων, Βασιδιομυκήτων και Αδηλομυκήτων. Η επαφή μεταξύ υφών του ίδιου είδους μπορεί να καταλήξει σε βλαστική ασυμβατότητα (vegetative incompatibility, vic), γνωστή και ως σωματική ασυμβατότητα (somatic incompatibility) ή ετεροκάρυος ασυμβατότητα (heterokaryon incompatibility) (Εικόνα 4). Αυτή μπορεί να παρατηρηθεί κατά τη διαδικασία της εγγενούς αναπαραγωγής (φυλετική αναπαραγωγή), αν και η «φυλετική» ετερογονιδιακή ασυμβατότητα έχει μελετηθεί σε περιορισμένο βαθμό σε σύγκριση με τη βλαστική ετερογονιδιακή ασυμβατότητα (Τζάμος 2004).



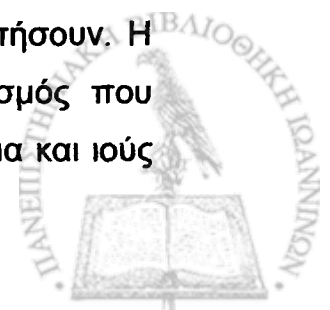


Εικόνα 4: Αναστόμωση και βλαστική ασυμβατότητα στους μυκηλιακούς μύκητες. α) Οι υφές συμβατών και ασύμβατων στελεχών συναντιούνται. β) Η επαφή των υφών οδηγεί σε τοπική διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος και στη συνέχεια σε νέα σύνθεσή του, η ένωση αυτή δημιουργεί ένα κύτταρο επιτρέποντας την ελεύθερη ανταλλαγή οργανιδίων και κυτταροπλάσματος. γ) Τα συμβατά στελέχη έχουν ίδια αλληλόμορφα βλαστικής ασυμβατότητας (*vic*) σε όλους τους τόπους (*loci*), με αποτέλεσμα την επιτυχημένη ανταλλαγή κυτταροπλάσματος και τη μεταφορά των μορίων dsRNA. Τα στελέχη όμως που διαφέρουν στα αλληλόμορφα σε έναν ή περισσότερους τόπους αντιδρούν αποπτωτικά. Καθώς ο θάνατος του κυτταροπλάσματος μπορεί να καθυστερήσει, συγκεκριμένοι συνδυασμοί αλληλομόρφων *vic* μπορούν να επιτρέψουν τη μετάδοση ιών σε μικρό βαθμό παρά την αντίδραση ασυμβατότητας. Τα γράμματα x και y συμβολίζουν δύο τόπους βλαστικής ασυμβατότητας (*vic loci*), με τους δείκτες να συμβολίζουν τα αλληλόμορφα (Προσαρμογή από McCabe *et al.* 1999).

Υπάρχουν παραδείγματα ασυμβατότητας όπου παρεμποδίζεται τόσο η «φυλετική» όσο και η βλαστική συνένωση και κατά συνέπεια κάθε ανταλλαγή γενετικού υλικού (Agris 2005).

Επισημαίνεται πως ασυμβατότητα μπορεί να συμβεί και μετά τη συνένωση των υφών. Στην περίπτωση συναντήσεως δύο αποικιών που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες συμβατότητας οι υφές μπορεί να συνενωθούν, αλλά τελικά παρατηρείται καταστροφή του πρωτοπλάσματος στις συνενώσεις και στις γειτονικές θέσεις (Agris 2005).

Η φυσική επιλογή επιδρά κυρίως σε ατομικό επίπεδο. Οι χαρακτήρες των ατόμων που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν και να αφήνουν περισσότερους απογόνους σε σύγκριση με άλλα άτομα θα ευνοηθούν και θα επικρατήσουν. Η βλαστική ασυμβατότητα μπορεί να είναι ένας διαφορετικός μηχανισμός που προστατεύει τα άτομα από επιζήμιους πυρήνες, μιτοχόνδρια, πλασμίδια και ιούς (Τζάμος 2004).



Η κίνηση του dsRNA μέσω των αναστομών των υφών ευνοείται όταν τα στελέχη ανήκουν στην ίδια ομάδα συμβατότητας.

2.1.5 Επίδραση μυκοΐων στο φαινότυπο του ξενιστή

Παρότι έχει αναφερθεί μεγάλος αριθμός μυκοΐων που δεν έχουν καμία δράση στον ξενιστή τους, είναι φανερό πως σε ορισμένες περιπτώσεις ορισμένοι dsRNA ιοί μπορούν να οδηγήσουν σε καταστροφή του ξενιστή τους ή ακόμη να προκαλέσουν υπομολυσματικότητα ή και να εντείνουν την παθογόνο ικανότητα του μύκητα. Επίσης, έχουν παρατηρηθεί αλλοιώσεις στη μορφολογία των σπορίων, μειωμένη παραγωγή χρωστικών, μειωμένη παραγωγή σπορίων και μειωμένη παραγωγή λακκάσης (Ghabrial 1998).

2.1.5.1 Ασυμπτωματικές ή λανθάνουσες μολύνσεις

Οι περισσότερες μολύνσεις από μυκοΐους οδηγούν σε ασυμπτωματικές προσβολές στους ξενιστές τους. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την ευρεία διάδοση των ιών αυτών στη φύση, έχει οδηγήσει πολλούς επιστήμονες στο συμπέρασμα πως οι μυκοΐοί δεν έχουν καμία επίδραση στη βιολογία του μύκητα - ξενιστή. Η απουσία συμπτωμάτων κάτω από τις υπάρχουσες περιβαλλοντικές συνθήκες δεν αποκλείει ότι το γεγονός αυτό μπορεί να αλλάξει, αν μεταβληθούν οι συνθήκες αυτές. Είναι λογικό να υποθέτει κανείς πως μολύνσεις με μυκοΐους μπορούν να επιφέρουν - αν και σε μικρό βαθμό - επίδραση στην ανάπτυξη του μύκητα. Σχετικά πειράματα έγιναν σε ισογονιδιακές μολυσμένες και μη μολυσμένες σειρές μυκήτων του γένους *Aspergillus* spp., όπου μελετήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του μυκηλίου, η παραγωγή σπορίων και η ικανότητα ανταγωνισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν μικρές αλλά στατιστικώς σημαντικές διαφορές για όλα τα στελέχη. Συνεπώς, ο όρος λανθάνουσα μόλυνση θεωρείται προτιμότερος και υποδηλώνει πως κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να εκδηλωθεί συμπτωματολογία. Είναι εκ πρώτης όψεως περίεργο το γεγονός ότι τόσοι πολλοί μυκοΐοί εξελικτικά έχουν οδηγηθεί σε αυτή την «ουδέτερη κατάσταση». Η μολυσματικότητα του ιού έχει προφανώς περιοριστεί λόγω της ανάγκης να επιβιώσει ο ξενιστής και να αναπαράγει τον ιό. Το γεγονός αυτό δημιουργεί επιλεκτική πίεση στους μυκοΐους που είτε δημιουργούν ασυμπτωματικές μολύνσεις είτε δρουν ωφέλιμα για τον ξενιστή τους (Pearson *et al.* 2009).



2.1.5.2 Εξασθένηση του μύκητα-ξενιστή, υπομολυσματικότητα

Ενώ οι περισσότεροι μυκοϊοί σχετίζονται με λανθάνουσες μολύνσεις, μερικοί μειώνουν την ικανότητα των μυκήτων ξενιστών τους να προκαλέσουν ασθένεια στα φυτά. Αυτή η ικανότητα, γνωστή και ως υπομολυσματικότητα, έχει προκαλέσει το ερευνητικό ενδιαφέρον, δεδομένου των οικονομικών επιπτώσεων των μυκητολογικών ασθενειών στην παραγωγή και των περιορισμένων στρατηγικών για την αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες (Πίνακας 4). Η χρήση ενός παθογόνου εναντίον ενός άλλου θεωρείται μία οικολογικά αποδεκτή λύση. Οι μοριακές τεχνικές που πλέον χρησιμοποιούνται ευρέως έχουν δώσει πολλές απαντήσεις σε αυτή την ιδιαίτερη αλληλεπίδραση μεταξύ του ιού του μύκητα και του φυτού. Το φυτό εξακολουθεί να είναι προσβεβλημένο από το παθογόνο, αλλά ανακάμπτει και επιβιώνει (Nuss 2005).

Πίνακας 4: Αναφορές ιών που προσδίδουν υπομολυσματικότητα σε φυτοπαθογόνους μύκητες.

Ασθένεια	Μύκητας	Οικογένεια μυκοϊού
Έλκος της καστανιάς	<i>Cryphonectria parasitica</i>	Reoviridae, Narnaviridae (Mitovirus), Hypoviridae
Έλκος των πυρηνοκάρπων	<i>Diaporthe perijuncta</i>	Μη ταξινομημένος ssRNA ιός, ομοιότητα με tombusviruses
Σκληρωτινίαση του χλοοτάπητα	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	Narnaviridae (Mitovirus)
Ολλανδική ασθένεια της φτελιάς	<i>Ophiostoma ulmi</i> , <i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	Narnaviridae (Mitovirus)
Ριζοκτονίαση της πατάτας	<i>Rhizoctonia solani</i>	Δεν έχει ταξινομηθεί
Ξερή σηψιρριζία	<i>Fusarium graminearum</i>	Δεν έχει ταξινομηθεί
Ελμινθοσπορίαση της βρώμης	<i>Helminthosporium victoriae</i>	Totiviridae, Chrysoviridae
Λευκή σηψιρριζία	<i>Rosellinia necatrix</i>	Reoviridae

Πηγή: Nuss 2005.

Η υπομολυσματικότητα στους μύκητες μπορεί να προκληθεί με πολλούς τρόπους. Αυτοί περιλαμβάνουν μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA, μεταλλάξεις του γονιδιώματος ή την παρουσία μυκοϊών όπως προαναφέρθηκε.

2.1.5.2.1 Η περίπτωση του *Ophiostoma novo-ulmi*

Το καλύτερα μελετημένο παράδειγμα μυκοϊού που εξασθενεί τον ξενιστή του είναι ο παράγοντας d του *Ophiostoma novo-ulmi*, ενός μύκητα που προκαλεί την ολλανδική ασθένεια της φτελιάς. Στο μύκητα έχουν βρεθεί πολλά διαφορετικού μεγέθους μόρια dsRNA, ενώ μελέτες έχουν δείξει πως τρία συγκεκριμένα μόρια σχετίζονται με το φαινόμενο της εξασθένησης. Το dsRNA που προκαλεί πρόβλημα στον *O. novo-ulmi* βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και μειώνει το επίπεδο

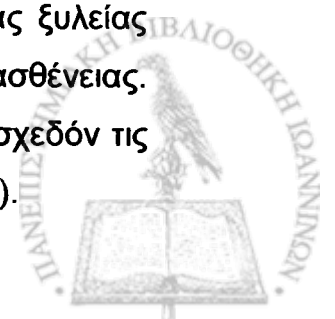


της κυτοχρωμικής οξειδάσης, με αποτέλεσμα τη μείωση της κυτταρικής αναπνοής. Τα συγκεκριμένα μόρια dsRNA μπορούν να δράσουν ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης, καθώς ο εξασθενημένος μύκητας δεν μπορεί να προκαλέσει ασθένεια στον ξενιστή του. Η διασπορά του dsRNA εξαρτάται από την εμφάνιση βλαστικής ασυμβατότητας στους πληθυσμούς του μύκητα (McCabe *et al.* 1999). Επίσης, η μετατροπή του μύκητα σε μορφή ζύμης, μία από τις κύριες φάσεις διασποράς του στο εσωτερικού του δέντρου (Pomerleau & Mehran 1966), του επιτρέπει να χάσει τους καταστρεπτικούς για αυτόν παράγοντες d (Webber 1993).

2.1.5.2.2 Η περίπτωση της *Cryphonectria parasitica*

Η υπομολυσματικότητα στους μύκητες έγινε ευρέως γνωστή μετά από μία καταστροφική επιδημία που έπληξε τα δάση καστανιάς της βορειοανατολικής Αμερικής. Το 1904 ο Herman Merkel, υπεύθυνος δασολόγος του ζωολογικού πάρκου της Νέας Υόρκης, παρατήρησε έλκη στις καστανιές του πάρκου. Τα δέντρα αυτά πολύ σύντομα εμφάνισαν νεκρώσεις σε φύλλα και αργότερα σε ολόκληρα κλαδιά, μέχρις ότου ολόκληρα δέντρα κατέρρευσαν. Η ασθένεια αυτή ονομάστηκε έλκος της καστανιάς και την προκαλεί ο ασκομύκητας *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. Ο μύκητας εισήλθε στη Β. Αμερική από την Ασία στις αρχές του 20ου αιώνα και κατά το διάστημα 1904-1950 νέκρωσε περισσότερα από 30 εκατομμύρια στρέμματα αμερικανικής καστανιάς *Castanea dentata*. Στην Ευρώπη η ασθένεια αναφέρθηκε το 1938 στην Ιταλία και από εκεί μεταδόθηκε σταδιακά σε όλη την περιοχή εξάπλωσης της καστανιάς. Στην Ευρώπη όμως η εξέλιξη της ασθένειας παρουσιάζεται με μικρότερη ένταση από ότι στις ΗΠΑ, αφενός διότι η ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa*) αποδείχθηκε λιγότερο ευαίσθητη από την αμερικανική και αφετέρου διότι εδώ εμφανίσθηκαν στελέχη του μύκητα με μειωμένη παθογόνο ικανότητα (υπομολυσματικά). Στα στελέχη αυτά που είναι προσβεβλημένα με τον ιό *Cryphonectria hyronivus* βασίζεται η βιολογική καταπολέμηση της ασθένειας (Anagnostakis 1982).

Το έλκος της καστανιάς διαγνώσθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα στο Πήλιο από τον Δ. Μπίρη το 1963. Αμέσως μετά ίσχυσε απαγορευτική διάταξη του Υπουργείου Γεωργίας με την οποία ρυθμίστηκε η μετακίνηση έμφλοιας ξυλείας καστανιάς εκτός Ν. Μαγνησίας, για τον περιορισμό της επέκτασης της ασθένειας. Παρόλα τα μέτρα, η ασθένεια εντοπίσθηκε τα επόμενα χρόνια σε όλες σχεδόν τις περιοχές όπου αναπτύσσεται η καστανιά, σε δάση και καστανεώνες (Δ3).



Συμπτώματα

Ο μύκητας προσβάλλει το φλοιό. Η προσβολή συνήθως εκδηλώνεται σε σημεία όπου υπάρχει διάρρηξη του φλοιού όπως τομές κλάδευσης, σημεία εμβολιασμού (Εικόνα 5), φαγώματα εντόμων κ.λπ. Στο σημείο προσβολής ο φλοιός νεκρώνεται και σε νεαρά δέντρα ή κλαδιά γίνεται πορτοκαλέρυθρος έως καστανός. Μέσα και κάτω από το φλοιό δημιουργούνται λευκοκίτρινες μυκηλιακές πλάκες με μορφή βεντάλιας. Στο κάτω μέρος του έλκους εκπτύσσονται ταχυφυείς βλαστοί (Εικόνα 6). Όταν η νέκρωση του φλοιού και στη συνέχεια του καμβίου επέρχεται με βραδύ ρυθμό, το δέντρο σχηματίζει νέα κύτταρα φλοιού (επουλωτικό ιστό), με αποτέλεσμα τη διόγκωση του κορμού στο σημείο του έλκους και την κατά μήκος ραγάδωσή του (Εικόνα 6). Όταν το έλκος περιβάλλει τον κορμό, τότε το τμήμα του δέντρου που βρίσκεται πάνω από αυτό νεκρώνεται. Οι ρίζες δεν προσβάλλονται από το μύκητα. Στην επιφάνεια του φλοιού εμφανίζονται κιτρινοπορτοκαλόχρωμες διογκώσεις, όχι μεγαλύτερες από 2mm, τα πυκνίδια, μέσα στα οποία παράγονται τα αγενή πυκνιδιοσπόρια, ενώ κάτω από το φλοιό σχηματίζονται τα περιθήκια, μέσα στα οποία παράγονται τα εγγενή σπόρια, τα ασκοσπόρια (Δ3).



Εικόνα 5: Νεαρό δενδρύλλιο καστανιάς με έλκος στην περιοχή εμβολιασμού (Δ3).



Εικόνα 6: Ενεργό έλκος σε κορμό νεαρής καστανιάς (Δ3).

Εξάπλωση

Στην Ελλάδα η εξάπλωση της ασθένειας γίνεται με τα πυκνιδιοσπόρια, τα οποία μεταφέρονται κυρίως με τη βροχή και το υδρονέφος που δημιουργείται μέσα στο δάσος. Πυκνιδιοσπόρια είναι δυνατό να μεταφερθούν σε μεγάλες αποστάσεις από τα πτηνά, τα έντομα και βέβαια τον άνθρωπο. Ιδιαίτερα η



μεταφορά έμφλοιας ξυλείας, φυτευτικού υλικού και εμβολίων φαίνεται ότι αποτελούν τους κύριους τρόπους διάδοσης της ασθένειας (Δ3).

Αντιμετώπιση

Η χημική καταπολέμηση δεν είναι εφικτή. Βιολογική καταπολέμηση πραγματοποιείται με τοποθέτηση μολύσματος που αποτελείται από φυσικά υπομολυσματικά στελέχη του μύκητα *C. parasitica*, περιμετρικά των ελκών. Στη συνέχεια ο ιός μεταφέρεται από το υπομολυσματικό στο μολυσματικό στέλεχος του μύκητα και σταματά την αύξησή του. Το δέντρο παράγει τραυματικό ιστό και επουλώνει το έλκος (Εικόνα 7). Η επέμβαση γίνεται σε τουλάχιστο δύο δέντρα ανά στρέμμα, η δε μέθοδος καταπολέμησης βασίζεται στη φυσική μετάδοση των υπομολυσματικών στελεχών στο καστανοδάσος. Παράλληλα συνιστώνται δενδροκομικές επεμβάσεις, όπως η κλάδευση των προσβεβλημένων κλάδων και επάλειψη των τομών με προστατευτική ουσία, η υλοτομία και απομάκρυνση των έντονα ασθενών δέντρων, η απολύμανση των εργαλείων κλάδευσης κ.λπ. Η Γενική Γραμματεία Δασών και Φυσικού Περιβάλλοντος χρηματοδοτεί από το 1998 την υλοποίηση προγραμμάτων βιολογικής καταπολέμησης της ασθένειας στο Άγιον Όρος και στους καστανεώνες του όρους Πάρνωνα στην Πελοπόννησο σε συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας - Ινστιτούτο Δασικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, όπου παρασκευάζεται το μόλυσμα (Δ3).



Εικόνα 7: Επουλωμένο έλκος μετά από περιμετρικό εμβολιασμό με υπομολυσματικό στέλεχος του μύκητα *C. parasitica* (Δ3).

2.1.5.3 Ωφέλιμες αλληλεπιδράσεις

Μερικοί μυκοϊοί επιβιώνουν προσδίδοντας ωφέλιμες ιδιότητες στους ξενιστές τους, π.χ. φονικοί φαινότυποι (killer phenotypes) σε ζύμες και μύκητες. Η ανακάλυψη αυτής της ιδιότητας τη δεκαετία του 1960 στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και στο μύκητα *Ustilago maydis* που προκαλεί την ασθένεια άνθρακας του αραβοσίτου, οδήγησαν στην εύρεση των ισομετρικών μυκοϊών dsRNA με μη «τεμαχισμένα» γονιδιώματα, που σήμερα κατατάσσονται στο γένος *Totivirus* της οικογένειας Totiviridae. Τα στελέχη της ζύμης και του άνθρακα που φέρουν το συγκεκριμένο φαινότυπο παράγουν μία τοξίνη η οποία, ενώ δεν προσβάλλει τα ίδια, είναι φονική για άλλους μύκητες (Ghabrial 1998). Το γεγονός αυτό ίσως εξηγεί το ότι οι ζύμες έχουν επικρατήσει σε υγρά περιβάλλοντα σε αντίθεση με τους μυκηλιακούς μύκητες (Pearson *et al.* 2009).

Έρευνες έχουν δείξει πως ένας μυκοϊός dsRNA μήκους 6,0kbp που προσβάλλει το μύκητα *Nectria radicicola* αυξάνει τη μολυσματική ικανότητα του μύκητα μέσω της διαταραχής των οδών μεταφοράς του μηνύματος της προσβολής (Pearson *et al.* 2009).

Ένα πολύ ενδιαφέρον παράδειγμα συμβίωσης μεταξύ ενός μυκοϊού, του ενδοφυτικού μύκητα *Curvularia protuberata* και της πόας *Dichanthelium lanuginosum* έχει προσφάτως αναγνωριστεί. Πριν την ανακάλυψη αυτή πιστευόταν πως η ενδοφυτική προσβολή προσέδιδε στο φυτό και στο μύκητα θερμική αντοχή και τους επέτρεπε να επιβιώνουν σε υψηλές θερμοκρασίες. Σήμερα όμως είναι γνωστό πως η αντοχή αυτή είναι εξαρτώμενη από το αν ο μύκητας έχει μολυνθεί από το μυκοϊό dsRNA *Curvularia thermal tolerance virus* (CThTV) (Pearson *et al.* 2009).

2.1.6 Οι μυκοϊοί ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης

Η προστασία του περιβάλλοντος και η ανάγκη παραγωγής και κατανάλωσης προϊόντων με λιγότερα χημικά υπολείμματα και λιγότερες τοξίνες επιβάλλει την εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης των ασθενειών, μεταξύ των οποίων και τη βιολογική καταπολέμηση. Η βιολογική καταπολέμηση των παθογόνων των φυτών έχει χαρακτηριστεί ως ένας πιθανός και πολλά υποσχόμενος τρόπος αντιμετώπισης των ασθενειών. Δυστυχώς όμως οι προσπάθειες εφαρμογής των εργαστηριακών αποτελεσμάτων στον αγρό δεν ήταν πάντοτε επιτυχείς.



Στη φύση απαντώνται υπομολυσματικά στελέχη μυκήτων εξαιτίας της προσβολής τους από ιούς, τα οποία εάν σχηματίσουν μικτές μολύνσεις με μολυσματικά στελέχη, είναι ικανά μέσω οριζόντιας και κάθετης μεταφοράς αυτής της ιδιότητάς τους να μεταδώσουν την υπομολυσματικότητα και να περιορίσουν σε πρακτικά ανεκτό επίπεδο την εξάπλωση μίας ασθένειας και κατά συνέπεια την οικονομική ζημιά. Παρόλο που η βλαστική ασυμβατότητα είναι ένα σοβαρό εμπόδιο στην εξάπλωση των μυκοΐων, θα μπορούσαν οι ιοί αυτοί να τροποποιηθούν με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής με σκοπό να εξαλείψουν αυτή την αντίδραση ασυμβατότητας (Pearson *et al.* 2009).

Επίσης ο φονικός φαινότυπος είναι μία επιθυμητή ιδιότητα διότι περιορίζει την ανάπτυξη ανταγωνιστών. Για να χρησιμοποιηθεί όμως στη βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων, θα πρέπει να προσδιοριστούν και άλλες παράμετροι που έχουν να κάνουν με την «επιθετικότητα» του προς χρήση στελέχους και τις επιπτώσεις στην οικολογική ισορροπία.

Καθώς οι περισσότεροι μυκοΐοι φαίνεται να έχουν πολύ μικρή επίδραση στους ξενιστές τους, θα μπορούσαν αυτοί κάτω από διαφορετικό πρίσμα να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης λειτουργώντας ως φορείς γονιδίων. Η προσέγγιση αυτή δεν απαιτεί από τον ίδιο το μυκοΐο να καταπολεμήσει τον ξενιστή του, αλλά απαιτεί μία γονιδιακή δομή που θα είναι συμβατή με την ενσωμάτωση μη ιικών γονιδίων με καταστρεπτικές ιδιότητες για τους μύκητες (non-viral antifungal genes). Οι ssRNA μυκοΐοι BVX, BCVF και SsDRV που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με ιούς της οικογένειας Flexiviridae θα μπορούσαν να μελετηθούν ως προς την κατεύθυνση αυτή, καθώς ο flexivirus Potato virus X (PVX, φυτικός ιός) έχει επιτυχώς χρησιμοποιηθεί ως φορέας γονιδιακής έκφρασης από διαφορετικές πηγές σε φυτά.

Τέλος, για να εφαρμοστεί ένα πρόγραμμα καταπολέμησης με επιτυχία, κρίνονται απαραίτητα: α) η χαρτογράφηση επακριβώς της έκτασης προσβολής από την ασθένεια και οι οικονομικές επιπτώσεις του παθογόνου στην παραγωγή, β) η ύπαρξη ωφέλιμων στελεχών (στελέχη με υπομολυσματικότητα ή φονικό φαινότυπο), γ) η βλαστική συμβατότητα των ωφέλιμων στελεχών με τα φυτοπαθογόνα στελέχη, δ) η δυνατότητα παραγωγής των ωφέλιμων στελεχών σε εμπορική κλίμακα και ε) η ενημέρωση όλων των εμπλεκόμενων για τη σωστή εφαρμογή ενός τέτοιου προγράμματος.



2.2 Ταυτοποίηση μυκήτων

Η ταυτοποίηση των μυκήτων είναι μία διαδικασία που μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους.

Η διάγνωση μίας μυκητολογικής ασθένειας εξαρτάται από την ευχέρεια αναγνώρισεως ενός παθογνωμονικού συμπτώματος ή συνδρόμου μίας ασθένειας.

Μία άλλη λύση είναι η εργαστηριακή εξέταση δειγμάτων ασθενών φυτών, η οποία στηρίζεται στη χρησιμοποίηση διαφόρων μέσων και μεθόδων. Τα μέσα που συνήθως χρησιμοποιούνται σε ένα εργαστήριο είναι το στερεοσκόπιο (μέσω του οποίου αναζητούνται σημεία μυκήτων μετά από μεγέθυνση της εικόνας τους κατά 10-40 φορές), το μικροσκόπιο (η μικροσκοπική εικόνα μεγεθύνει το αντικείμενο που παρατηρείται κατά 100-1000 φορές) και η βιβλιοθήκη (πηγή πληροφόρησης στη διαγνωστική φυτοπαθολογία). Οι μέθοδοι εστιάζονται στην απομόνωση του παθογόνου σε θρεπτικά υποστρώματα.

Με την πρόοδο όμως που παρατηρήθηκε στον κλάδο της μοριακής βιολογίας τα τελευταία χρόνια και τη δυνατότητα σύγκρισης συντηρημένων τμημάτων αλληλουχιών γονιδιακού DNA, η ανάπτυξη εργαστηριακών τεχνικών για διαγνωστικούς σκοπούς αυξήθηκε με εξαιρετικά ταχείς ρυθμούς για όλες τις κατηγορίες μικροοργανισμών. Η χρήση αυτών των σύγχρονων τεχνικών στη φυτοπαθολογία έχει αυξήσει κατά πολύ την ικανότητα για ταυτοποίηση των μυκήτων προσφέροντας ταχύτητα, μεγαλύτερη ευαισθησία αλλά και ακρίβεια στη διάγνωση.

Οι αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν ριβοσωμικά RNA (rRNA) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη των ταξινομικών σχέσεων και της γενετικής ποικιλότητας στους μύκητες.

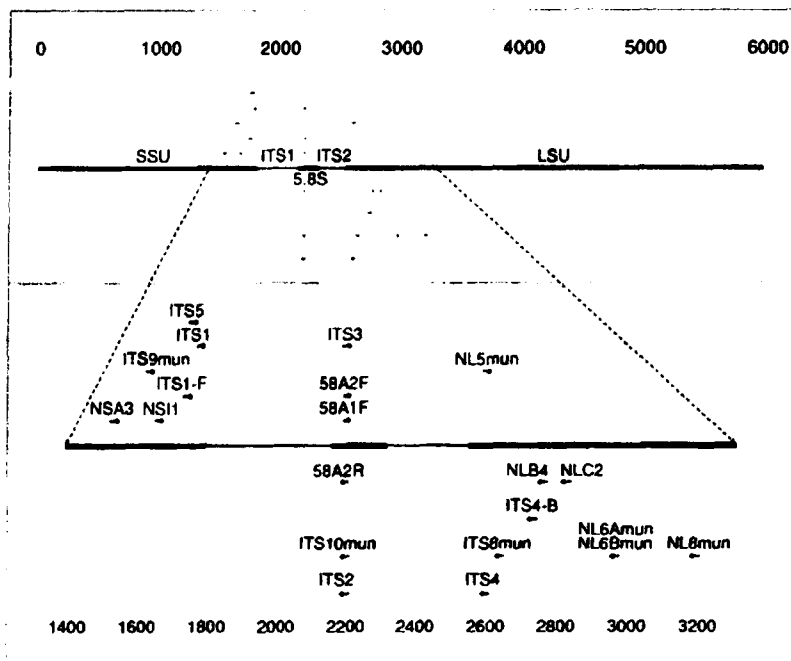
2.2.1 Περιοχές ITS

Η ομάδα των γονιδίων του rRNA συναντάται στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια και αποτελείται από πολύ συντηρημένες (Small SubUnit-coding sequence, 17-18S, 5.8S, Large SubUnit-coding sequence, 25-28S) και από εύκολα μεταβλητές περιοχές (Internal Transcribed Spacer 1 and 2). Τα γονίδια rRNA του πυρήνα των μυκήτων διευθετούνται ως δίδυμες επαναλήψεις με αρκετές εκατοντάδες αντίγραφα ανά γονιδίωμα. Οι περιοχές μεταξύ των υπομονάδων, που ονομάζονται Internal Transcribed Spacer (περιοχές ITS), έχουν χρησιμοποιηθεί



ευρέως σε έρευνες για τις σχέσεις μεταξύ των ειδών ενός γένους καθώς και στελεχών του ίδιου είδους λόγω της έντονης μεταβλητότητάς τους.

Οι πρώτοι εκκινητές PCR που έτυχαν ευρείας αποδοχής για τη μελέτη των περιοχών ITS των μυκήτων ήταν οι ITS1 και ITS4, οι οποίοι ενισχύουν τις με μεγάλη παραλλακτικότητα περιοχές ITS1 και ITS2 που βρίσκονται πριν και μετά την 5.8S-αλληλουχία και μεταξύ της μικρής SSU (Small SubUnit-coding sequence, 17-18S) και της μεγάλης LSU (Large SubUnit-coding sequence, 25-28S) υπομονάδας της ομάδας γονιδίων του rRNA (Εικόνα 8) (Kendall & Rygielwicz 2005).



Εικόνα 8: Σχηματική παράσταση των περιοχών που στοχεύουν οι εκκινητές στο rDNA (SSU, ITS1, 5.8S, ITS2 και LSU rDNA). Οι εκκινητές δεσμεύονται αριστερά (forward primers) ή δεξιά (reverse primers) των συμπληρωματικών περιοχών αλληλουχίας. Η κλίμακα είναι σε ζεύγη βάσεων (Kendall & Rygielwicz 2005).

Η περιοχή ITS αποτελεί ένα χρήσιμο πεδίο για μελέτες μοριακού χαρακτηρισμού μυκήτων για τέσσερις κύριους λόγους (Innis *et al.* 1990):

- η περιοχή ITS είναι σχετικά μικρή σε μέγεθος (500 - 800 bp) και μπορεί εύκολα να ενισχυθεί μέσω PCR με τη χρησιμοποίηση εξειδικευμένων για αυτήν εκκινητών,
- η επαναλαμβανόμενη φύση του rDNA καθιστά εύκολη την ενίσχυση της περιοχής ITS από μικρά, διαλυμένα ή αποδομημένα δείγματα DNA,
- η περιοχή ITS μπορεί να ποικίλει αρκετά μεταξύ μορφολογικά διαφορετικών ειδών, κατά συνέπεια δεδομένα από RFLP ανάλυση



μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση γενετικών αποστάσεων μεταξύ ειδών,

- είναι εφικτή και ιδιαίτερα ταχεία η κατασκευή εξειδικευμένων για την περιοχή ITS ιχνηλατών χωρίς την απαίτηση κατασκευής χρωμοσωμικής βιβλιοθήκης.

Η χρήση της περιοχής ITS στην ταυτοποίηση μυκήτων έχει αναφερθεί σε πολλά φυτοπαθογόνα γένη όπως *Fusarium*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Verticillium* (Kendall & Rygielwicz 2005, Innis *et al.* 1990).

2.3 Μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα

Μικροβιολογικό θρεπτικό υπόστρωμα είναι κάθε υγρό ή στερεό μέσο το οποίο μπορεί να καλύψει τις θρεπτικές ανάγκες ενός μικροβιακού κυττάρου. Ένα θρεπτικό υπόστρωμα πρέπει να περιέχει απαραίτητα: νερό, πηγή άνθρακα, πηγή ενέργειας, πηγή αζώτου και πηγή αλάτων (Καραγκούνη-Κύρτσου 1999).

Οι μύκητες απορροφούν τα θρεπτικά συστατικά με τη βοήθεια ενζύμων που εκκρίνουν στο περιβάλλον και διασπούν μεγάλα οργανικά μόρια σε μικρότερα, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρά τους.

Οι μύκητες συνήθως αυξάνονται σε απλά θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν σάκχαρα, ανόργανη ή οργανική πηγή αζώτου και ελάχιστα ιχνοστοιχεία. Τα μυκητολογικά θρεπτικά υποστρώματα συνήθως περιέχουν υψηλό ποσοστό σακχάρων 4% και χαμηλό εύρος pH (3,8 - 5,6). Αυτές οι συνθήκες περιορίζουν την αύξηση των περισσότερων βακτηρίων (εύρος pH 6,5 - 7,5) (Καραγκούνη-Κύρτσου 1999).

Τα θρεπτικά υποστρώματα λόγω της χημικής τους σύστασης είναι συνήθως υγρά διαλύματα. Για τη στερεοποίηση των υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων, με σκοπό την επιφανειακή καλλιέργεια μικροοργανισμών, γίνεται προσθήκη 1 έως 2% (συνηθέστερη συγκέντρωση 1,5%) άγαρ (Καραγκούνη-Κύρτσου 1999).



3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



3.1 Σκοπός Πειράματος

Τα πειράματα διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το αντικείμενο της έρευνας αφορά τη διερεύνηση για την ύπαρξη μορίων dsRNA που πιθανώς να σχετίζονται με μυκοϊούς σε φυτοπαθογόνους μύκητες. Σε πρώτη προσέγγιση απαιτήθηκε η ταυτοποίηση απομονώσεων των φορέων των μυκοϊών.

Η σημασία του να απομονωθούν και να χαρακτηριστούν όσο το δυνατόν περισσότεροι μυκοϊοί είναι μεγάλη καθώς έχουν βρεθεί ιοί που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης, λόγω της ιδιότητάς τους να προκαλούν υπομολυσματικότητα στο μύκητα - ξενιστή (Nuss 2005).

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Δειγματοληψία φυτικού υλικού

Κατά τους μήνες Σεπτέμβριο και Οκτώβριο του 2004 πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες κηπευτικών (τομάτα, αγγουριά, φασολάκι) καθώς και σε καλλιέργεια πατάτας στην περιοχή της Πρέβεζας και σε δενδρώδεις καλλιέργειες στην περιοχή της Άρτας. Επίσης μελετήθηκε μία απομόνωση μύκητα από την περιοχή Ιωαννίνων.

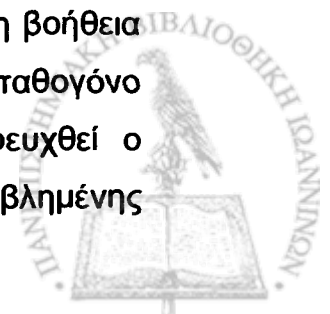
Συλλέχθηκαν κυρίως φύλλα αλλά και βλαστοί, τα οποία εμφάνιζαν συμπτώματα προσβολής από μύκητα όπως μεταχρωματισμούς, μαλακές σήψεις, τοπικές νεκρωτικές κηλίδες καθώς και εμφανείς μυκηλιακές δομές. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε όλες τις περιπτώσεις σε ώριμα φυτά, κατά μήκος των γραμμών φύτευσης και με συλλογή τόσο νεοτέρων όσο και παλαιότερων ηλικιακά τμημάτων των φυτών.

Κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε πλαστικό περιέκτη και ταξινομήθηκε με κωδικό. Μετά την επιστροφή στο εργαστήριο τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4°C.

3.2.2 Μικροβιολογικές τεχνικές

3.2.2.1 Απομόνωση παθογόνων

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση των μυκήτων που υπήρχαν στα δείγματα. Η επιφάνεια του θαλάμου νηματικής ροής ψεκάστηκε και καθαρίστηκε με αιθανόλη. Η όλη διαδικασία της απομόνωσης έγινε κοντά σε φλόγα bunsen, με τη βοήθεια βελόνας μόλυνσης, η οποία πριν από κάθε επαφή της με το παθογόνο εμβάπτιστηκε σε αιθανόλη 70% και πυρακτώθηκε, ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος επιμολύνσεων. Στη συνέχεια έγινε απόξεση της προσβεβλημένης



περιοχής του φυτού και πραγματοποιήθηκε μόλυνση στο κέντρο τρυβλίου που περιείχε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar). Ακολούθησε σήμανση με κωδικούς και ημερομηνία εμβολιασμού σε κάθε τρυβλίο και επώαση σε επωαστικό κλίβανο στους 22°C για όσο χρονικό διάστημα απαιτούνταν, ώστε να σποριοποιήσει ο μύκητας και το μυκήλιό του να καλύψει περίπου το 80% του θρεπτικού υποστρώματος.

Τα τρυβλία στα οποία είχαν αναπτυχθεί οι μύκητες φωτογραφήθηκαν και δημιουργήθηκαν μικροσκοπικά παρασκευάσματα, τα οποία με τη σειρά τους φωτογραφήθηκαν μέσω του προγράμματος Cam2Com Olympus (Εργαστήριο Βοτανικής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών) (βλέπε παράγραφο 3.2.2.3).

Μετά την έλευση μερικών ημερών στους 22°C, σε ορισμένα τρυβλία παρατηρήθηκαν μικτές καλλιέργειες μυκήτων. Στις περιπτώσεις αυτές έγινε διαχωρισμός των αποικιών ώστε να δημιουργηθούν καθαρές αποικίες. Το μόλυσμα για την ανακαλλιέργεια παραλήφθηκε μετά από αναστροφή του τρυβλίου με τις μικτές καλλιέργειες και απόξεση της επιφάνειας στο σημείο ανάπτυξης του κάθε μύκητα. Τα νέα τρυβλία που δημιουργήθηκαν μετά τους εμβολιασμούς τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 22°C και ελέγχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για την καθαρότητα των καλλιεργειών.

3.2.2.1.1 Αποθήκευση σπορίων μυκήτων στους -80°C

Από τις στερεές καλλιέργειες μυκήτων που είχαν επικαλύψει το 80% τουλάχιστον της επιφάνειας του τρυβλίου, στο οποίο καλλιεργούταν έκαστος, παραλήφθηκε ποσότητα σπορίων και μυκηλίου με σπάτουλα που είχε προηγουμένως αποστειρωθεί σε αιθανόλη 70% και πυρακτωθεί για την αποφυγή μολύνσεων. Τα σπόρια και το μυκήλιο τοποθετήθηκαν σε μικροσωλήνα τύπου errendorf που περιείχε 1ml αποστειρωμένου διαλύματος PBS [1x] με τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 30% (v/v) και ακολούθησε ήπια ανάδευση, σήμανση με κωδικούς και αποθήκευση στους -80°C. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής, υπό την παρουσία φλόγας και όσο το δυνατόν καλύτερων ασηπτικών συνθηκών.



3.2.2.1.2 Ανάπτυξη μυκηλίου σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Η επιφάνεια του θαλάμου νηματικής ροής ψεκάστηκε και καθαρίστηκε με αιθανόλη. Η όλη διαδικασία του εμβολιασμού έγινε κοντά σε φλόγα Bunsen. Τα σωληνάρια errendorf με τα αποθηκευμένα σπόρια μυκήτων απομακρύνθηκαν από τους -80°C και αφέθηκαν να αποψυχθούν. Από κάθε σωληνάριο errendorf ελήφθησαν με πιπέτα περίπου 20ml και τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστή κωνική φιάλη που περιείχε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (PDB). Η κάθε κωνική φιάλη στη συνέχεια σφραγιζόταν με ειδικά αποστειρωμένα πώματα, σημειωνόταν ο κωδικός του δείγματος και η ημερομηνία εμβολιασμού και τοποθετούταν στον επωαστικό κλίβανο στους 22°C . Η ανάπτυξη της υγρής καλλιέργειας ελεγχόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για την παρατήρηση της καθαρότητάς της. Σε περίπτωση ύπαρξης επιμόλυνσης στην κωνική φιάλη αυτή αποσυρόταν και καταστρεφόταν. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό την παρουσία όσο το δυνατόν καλύτερων ασηπτικών συνθηκών.

3.2.2.1.3 Αποθήκευση μυκηλίου στους -80°C

Μετά την πάροδο περίπου δύο εβδομάδων από τον εμβολιασμό του υγρού θρεπτικού υποστρώματος με τα σπόρια του μύκητα και λαμβανόμενου υπόψη του ρυθμού αύξησης του μύκητα, το ανεπτυγμένο μυκήλιο συλλέχθηκε από τις κωνικές φιάλες ως εξής:

- η κατακράτηση του μυκηλίου επιτεύχθηκε με τη βοήθεια ηθμού και έκπλυση με απιονισμένο νερό,
- το στέγνωμα του μυκηλίου πραγματοποιήθηκε με διαδοχικά περάσματα από απορροφητικό χαρτί και στη συνέχεια ζύγισμα (ικανοποιητικό βάρος 6-10g, μέτρηση υγρού βάρους),
- τοποθέτηση του μυκηλίου σε τεμάχιο διηθητικού χαρτιού (3MM Whatman), σφράγισμα, αναγραφή σε αυτό του κωδικού του και της ημερομηνίας συλλογής και αποθήκευση στους -80°C .

Σε περίπτωση που έπρεπε να συλλεχθούν αρκετοί μύκητες, μετά το πέρας της συλλογής καθενός, αυτός τοποθετούταν αμέσως στους -20°C , και αφού είχαν συλλεχθεί όλοι, στη συνέχεια τοποθετούνταν στους -80°C . Επίσης ο ηθμός μετά από τη συλλογή κάθε μύκητα και πριν τη συλλογή του επόμενου ξεπλενόταν σχολαστικά με απιονισμένο νερό.



3.2.2.2 Πρωτόκολλο παρασκευής θρεπτικού μέσου (Sambrook & Russel 2001)

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου κρίθηκε αναγκαία η χρήση αντιβιοτικών ουσιών, ώστε να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη αποικιών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα αντιβιοτικών ουσιών στις παρακάτω ποσότητες ανά λίτρο θρεπτικού μέσου:

Αντιβιοτικό	Διάλυμα αποθήκευσης	Διάλυμα εργασίας	Ποσότητα ανά 1 lt θρεπτικού υλικού
Τετρακυκλίνη	[10 mg/ml]	[12-15 mg/ml]	1,5 ml
Αμπικιλίνη	[25 mg/ml]	[35-50 mg/ml]	2,0 ml
Καναμυκίνη	[25 mg/ml]	[50 mg/ml]	2,0 ml

Η αμπικιλίνη είναι κλασικό ευρέος φάσματος πενικιλλινούχο αντιβιοτικό με βακτηριοκτόνο δράση εναντίον ευαίσθητων Gram (+) και πολλών συνήθων Gram (-) βακτηρίων. Η καναμυκίνη αναστέλλει Gram (-) προαιρετικά αναερόβια ραβδία και διάφορα άλλα προαιρετικά βακτήρια. Η τετρακυκλίνη είναι αντιμικροβιακό ευρέος φάσματος εναντίον Gram (+) και Gram (-) μικροοργανισμών.

3.2.2.2.1 Στερεό θρεπτικό υλικό (1lt)

1. 200g πατάτας σε 500ml ddH₂O, αποστείρωση στο αυτόκαυστο.
2. 20g δεξτρόζης σε 200ml ddH₂O, ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.
3. Προσθήκη του διαλύματος δεξτρόζης στο ζυμό πατάτας, συμπλήρωση του όγκου στο 1lt με ddH₂O.
4. Καλή ανάδευση.
5. Προσθήκη σε κωνική φιάλη του διαλύματος καθώς και 17g άγαρ.
6. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο.
7. Το θρεπτικό διάλυμα αφήνεται να κρυώσει αρκετά (περίπου 55°C) και στη συνέχεια προστίθενται τα αντιβιοτικά.

3.2.2.2.2 Υγρό θρεπτικό υλικό (1lt)

1. Βήματα 1 - 4 της παραγράφου 3.2.2.2.1.
2. Ισομερισμός σε κωνικές φιάλες του διαλύματος με τη βοήθεια ογκομετρικού σωλήνα (100ml ανά φιάλη, σύνολο 10 φιάλες).
3. Βήματα 6 - 7 της παραγράφου 3.2.2.2.1.



3.2.2.3 Παρασκευή μόνιμων μικροσκοπικών παρασκευασμάτων

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα σημειώνεται ο κωδικός του μύκητα και η ημερομηνία επεξεργασίας του πλακιδίου. Με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας τοποθετούνται 1-2 σταγόνες διαλύματος [1x] PBS σε τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 30% (v/v) στην αντικειμενοφόρο. Με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας λαμβάνεται μικρή ποσότητα δείγματος από περιοχή που ο μύκητας έχει σποριοποιήσει και τοποθετείται στη σταγόνα. Το δείγμα απλώνεται λίγο, για καλύτερη παρατήρηση στο μικροσκόπιο και καλύπτεται προσεκτικά με καλυπτρίδα ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρος. Το παρασκεύασμα μονιμοποιείται με κόλλα γύρω από την καλυπτρίδα και αποθηκεύεται στους 4°C.

3.2.2.3.1 Διαλύματα μικροσκοπίας (Sambrook & Russel 2001)

Διάλυμα [1x] PBS σε τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 30% (v/v)

Σε αποστειρωμένη φιάλη των 100ml προστίθενται με τη βοήθεια αποστειρωμένου ογκομετρικού σωλήνα 70ml [1x] PBS (αποστειρωμένου) και 30ml γλυκερόλης. Το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά.

Ρυθμιστικό διάλυμα [10x] PBS (1L)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.



3.2.3 Βιοχημικές - μοριακές τεχνικές

3.2.3.1 Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων και επιβεβαίωση της ύπαρξης μορίων dsRNA

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων έγινε σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης, με τη χρήση υγρού αζώτου και σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Morris και Dodds (1979). Η κυτταρίνη Whatman CF-11 που χρησιμοποιήθηκε ως υλικό πλήρωσης της στήλης χρωματογραφίας επιλέχθηκε λόγω της εκλεκτικής ικανότητας που εμφανίζει για δίκλινα μόρια τα οποία και συγκρατεί. Επίσης κατά την εκχύλιση, το ποσοστό της αιθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης της στήλης είναι εκείνο που επιτρέπει την εκλεκτική απομάκρυνση του DNA και τον εμπλουτισμό της στήλης σε dsRNA. Η παρουσία των μορίων dsRNA επιβεβαιώνεται με τις δοκιμές DNaseI και RNaseA. Με τη δοκιμή DNaseI διαπιστώνεται, εάν το εκχυλισμένο νουκλεϊκό οξύ είναι DNA ή RNA, καθώς η DNaseI υδρολύει το DNA, ενώ με τη δοκιμή RNaseA συμπεραίνεται, εάν το RNA είναι μονόκλινο ή δίκλινο. Το δίκλινο RNA σε συνθήκες υψηλής αλατότητας προστατεύεται από τη δράση του ενζύμου RNaseA, το οποίο στις ίδιες συνθήκες αλατότητας υδρολύει το μονόκλινο RNA. Σε συνθήκες χαμηλής ή απουσίας αλατότητας η RNaseA αποδομεί το δίκλινο RNA, όπως και το μονόκλινο.

3.2.3.1.1 Προετοιμασία στήλης εκλεκτικού εμπλουτισμού του dsRNA

1. Σε σωλήνα των 15ml προστίθενται 0,5g κυτταρίνης CF-11 (Whatman), 12ml FB και 2 ml SAS και αναδεύονται ήπια.
 2. Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο 100°C για 30min.
 3. Κατά τη διάρκεια της επώασης ο σωλήνας αναδεύεται ήπια.
 4. Ο σωλήνας απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και φυγοκεντρείται για 5min στις 3500 rpm (θερμοκρασία δωματίου).
 5. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
 6. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη δύο φορές. Τη δεύτερη φορά προστίθενται στο σωλήνα 11,5ml FB και 1,5ml SAS και την τρίτη 11ml FB και 1ml SAS.
 7. Την τελευταία φορά δεν απομακρύνεται το υπερκείμενο και ο σωλήνας αποθηκεύεται στους 4°C (μέγιστος χρόνος αποθήκευσης: 2 μήνες).
- Πριν από κάθε χρήση της στήλης απορρίπτεται το υπερκείμενο.



3.2.3.1.2 Πρωτόκολλο εκχύλισης dsRNA

A. Εκχύλιση

1. Σε γουδί λειοτριβείται 1-1,5g (βάρος μετά από ψύξη στους -80°C) μυκηλίου σε υγρό άζωτο και αφού κονιορτοποιηθεί πλήρως, η σκόνη τοποθετείται σε σωλήνα των 15ml. Ακολούθως προστίθενται 1ml κορεσμένου διαλύματος θειικού αμμωνίου (Saturated Ammonium Sulfate, SAS) και 6ml ρυθμιστικού διαλύματος μυρμηκικού (Formate buffer, FB). Το δείγμα αναδεύεται καλά σε ανακινητή «vortex». Στη συνέχεια προστίθενται 3,4ml φαινόλη και 0,6ml χλωροφόρμιο και το δείγμα αναδεύεται έντονα σε ανακινητή «vortex» (επεξεργασία όλων των δειγμάτων στον πάγο).

2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5min στις 7000 rpm και στους 4°C .

3. Λαμβάνονται 8ml υπερκείμενου, με προσοχή ώστε να μην απορροφηθεί η κάτω φάση της φαινόλης, σε νέο σωλήνα των 15ml. Προστίθενται 1,46ml απόλυτης αιθανόλης θερμοκρασίας -20°C και αναδεύονται ήπια (15,43% αιθανόλη). Το δείγμα είναι έτοιμο να τοποθετηθεί στη στήλη.

B. Κατασκευή της χρωματογραφικής στήλης

1. Αποχύνεται το υπερκείμενο του υλικού της στήλης. Προστίθεται το δείγμα και αναδεύεται ήπια. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται για 30min στον πάγο με τοποθέτηση των σωληναρίων σε πλάγια θέση. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα σωληνάρια περιοδικά αναδεύονται ήπια.

2. Το περιεχόμενο μεταφέρεται σε σιφώνιο των 10ml του οποίου το στόμιο έχει φραγεί με υαλοβάμβακα για τη συγκράτηση της κυτταρίνης. Η στήλη αφήνεται να τρέξει μέχρι να σταματήσει να στάζει.

3. Η στήλη εκπλένεται 3 φορές με 8ml διαλύματος αιθανόλης-οξικού αμμωνίου (Ethanol NH_4Ac), με προσοχή ώστε να μην αναταράσσεται η κυτταρίνη.

4. Τα δείγματα εκλούονται με 5ml [0,2M] οξικού αμμωνίου και συλλέγονται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50ml τύπου Corning. Ακολουθεί η καταβύθιση των μορίων dsRNA.

Γ. Καταβύθιση dsRNA

1. Στα 5ml διαλύματος dsRNA προστίθενται 10ml [10%] διαλύματος φικόλλης (Ficoll[®] PM 400, Sigma) και 13,5ml παγωμένης απόλυτης αιθανόλης, αναδεύονται σε vortex και αποθηκεύονται στους -80°C για 15 έως 20 ώρες (overnight).

2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 min στις 8500 rpm και στους 4°C .

3. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.



4. Το ίζημα εκπλένεται με 5ml [70%] αιθανόλης (-20°C).
5. Στη συνέχεια το ίζημα ξηραίνεται σε κενό (speed vac).
6. Ακολούθως το ίζημα διαλυτοποιείται με 50ml αποστειρωμένο dH₂O μεταχειρισμένο με διαιθυλοπυροανθρακικό οξύ (diethylpyrocarbonate, DEPC).
7. Μετά τη διαλυτοποίηση των δειγμάτων ακολουθεί διαγνωστική ηλεκτροφόρηση, με 10ml από κάθε δείγμα.

3.2.3.1.3 Διαλύματα εκχύλισης dsRNA, μεταχείριση νερού με DEPC, διάλυμα φαινόλης

A. Ρυθμιστικό διάλυμα κορεσμένου θειικού αμμωνίου (Saturated Ammonium Sulfate, SAS)

Παρασκευάζεται διάλυμα τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθανικό (Tris-hydroxymethyl-aminomethane, Tris) [0,01M]. Σε 90ml ρυθμίζεται το pH στο 7 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 100ml. Στο διάλυμα προστίθενται 76,68g (NH₄)₂SO₄ και διαλύονται με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.

Μετά την αποστείρωση σχηματίζονται κρύσταλλοι στον πυθμένα της φιάλης, οι οποίοι δεν επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του διαλύματος.

B. Ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος (Formate Buffer, FB) (500 ml)

Με τη βοήθεια αποστειρωμένων σκευών, διαλύονται 5,15g μυρμηκικού νατρίου σε 500ml αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό και προστίθενται 3ml μυρμηκικού οξέος. Το διάλυμα δεν χρειάζεται αποστείρωση.

Γ. 0,2M οξικό αμμώνιο [CH₃COONH₄, (NH₄Ac)] (250 ml)

Σε 250 ml αποστειρωμένο απιονισμένο νερό διαλύονται με αποστειρωμένο μαγνήτη 4,0gr NH₄Ac. Το διάλυμα αποστειρώνεται με διήθηση μέσω ηθμού (διάμετρος πόρων 0,45μm) και εισάγεται σε αποστειρωμένη φιάλη.

Δ. Διάλυμα πλύσης της στήλης (18,66% αιθανόλης-οξικού αμμωνίου, Ethanolic NH₄Ac)

Σε αποστειρωμένη φιάλη εισάγεται 150ml [0,2M] NH₄Ac και 28ml απόλυτης αναλυτικής αιθανόλης. Το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά.



Ε. Μεταχείριση νερού με DEPC

Για τη μη αντιστρεπτή αδρανοποίηση των ριβονουκλεασών (RNases), οι οποίες μέσα σε λίγα λεπτά μπορούν να υδρολύσουν το RNA, χρησιμοποιήθηκε νερό μεταχειρισμένο με DEPC.

Η κατεργασία με DEPC γίνεται ως εξής: υδατικό διάλυμα DEPC 0,1% (v/v) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 18h και κατόπιν αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο για την απομάκρυνση τυχόν εναπομείναντος ίχνους DEPC (Fedorcsak & Ehrenberg 1966).

ΣΤ. Παρασκευή διαλύματος φαινόλης

1. Η φαινόλη αφήνεται να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια λιώνεται στους 68°C (η διαδικασία λαμβάνει χώρα στην απαγωγό). Προστίθεται 1g 8-Hydroxyquinoline (η κίτρινη αυτή ουσία είναι αντιοξειδωτική, μερικώς αναστολέας RNase και επίσης το κίτρινο χρώμα βοηθά στο να αναγνωριστεί η οργανική φάση).

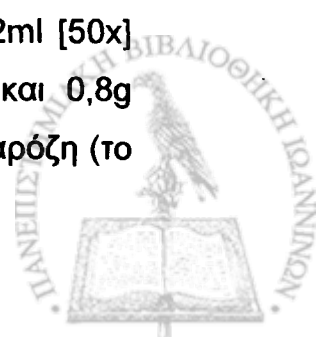
2. Στη λιωμένη φαινόλη προστίθεται ίσος όγκος ρυθμιστικού (1lt [1M] Tris-Cl pH 8,0, θερμοκρασία δωματίου). Το μείγμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα για 15min. Μετά το πέρας της ανάδευσης και μόλις οι δύο φάσεις διαχωριστούν απομακρύνεται, με αντλία κενού και πιπέτα Pasteur, όσο το δυνατόν περισσότερη από την υπερκείμενη (υδατική) φάση.

3. Προστίθεται ίσος όγκος 0,1M Tris-Cl (pH: 8,0) στη φαινόλη και το μίγμα αναδεύεται στο μαγνητικό αναδευτήρα για 15min. Μετά το πέρας της ανάδευσης απομακρύνεται η υπερκείμενη υδατική φάση όπως προηγουμένως. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία συνεχώς μέχρι να επιτευχθεί pH>7,8 στην υπερκείμενη φάση (μέτρηση με πεχάμετρο).

4. Αφού εξισορροπηθεί η φαινόλη και έχει απομακρυνθεί η υπερκείμενη υδατική φάση, προστίθεται 0,1 όγκος 0,1M Tris-Cl (pH: 8,0) [για 100ml: 10ml Tris-Cl [1M] (pH: 8,0) + 90ml ddH₂O]. Η φαινόλη αποθηκεύεται σε αυτή τη μορφή σε φιάλες (όχι διαπερατές στο φως) στους 4°C για περίοδο έως και ένα μήνα.

3.2.3.1.4 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (Sambrook & Russel 2001)

Σε κωνική φιάλη των 250ml προστίθενται 98ml απιονισμένο νερό, 2ml [50x] ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Tris-acetate-EDTA, TAE) και 0,8g αγαρόζη [1,2% (w/v)]. Το διάλυμα βράζει μέχρι να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη (το διάλυμα γίνεται διαυγές).



Το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί στους 60°C περίπου και στη συνέχεια προστίθενται 10μl [10mg/ml] βρωμιούχο αιθίδιο. Το παραπάνω μίγμα αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει. Όταν το διάλυμα πήξει, αφαιρείται το χτένι που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία φρεατίων, καθώς και τα πλάγια τμήματα του πλαισίου και προστίθεται [1x] ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (980ml dH₂O και 20ml [50x] TAE).

Προετοιμάζονται τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα ως εξής: Σε ένα μικροσωληνάκι προστίθενται 20μl δείγματος και 4μl διάλυμα φόρτωσης.

Για το μάρτυρα μοριακών μαζών, σε ένα μικροσωληνάκι προστίθενται:

-0.5μl [0,2μg/μl] 1kb ladder

-1.0μl [10x] ρυθμιστικό φόρτωσης και

-4.5μl απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό

Τελικός όγκος 6.0μl

Τέλος, προστίθενται το διάλυμα φόρτωσης (έτοιμο loading buffer, Takara) στη συσκευή και τα δείγματα στα αντίστοιχα πηγαδάκια.

Η παρασκευή [50x] ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1L γίνεται με προσθήκη 242g Tris, 57,1ml C₂H₆O (glacial acetic acid), 100ml [0,5M] EDTA(Ethylenediaminetetraacetic Na₂) pH: 8, ογκομέτρηση και συμπλήρωση με dH₂O μέχρις όγκου 1L.

3.2.3.1.5 Ενζυμικές δοκιμές διαπίστωσης της φύσης των απομονωθέντων νουκλεϊκών οξέων

Τα δείγματα που χαρακτηρίζονταν ως ύποπτα για την παρουσία dsRNA, υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες RNaseA και DNaseI, ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο οι ζώνες που εμφανίζονται μετά την ηλεκτροφόρηση να αντιστοιχούν σε μονόκλωνο RNA ή DNA αντίστοιχα.

A. Δοκιμή DNaseI

Για τη δοκιμή DNaseI χρησιμοποιούνται:

α) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα χωρίς DNaseI

β) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα με DNaseI

γ) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα και 1kb ladder

δ) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα με DNaseI και 1kb ladder

Ο 1kb DNA ladder προστίθεται ως αποδεικτικό της ύπαρξης νουκλεολυτικής ενεργότητας στα δείγματα, ότι δηλαδή δεν υφίστανται στα δείγματα αναστολείς της ενεργότητας του ενζύμου ή ότι το ένζυμο δεν είναι (ενδεχομένως) ανενεργό.



α) dsRNA

5,0μl dsRNA

0,8μl [10x] ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI

2,2μl dH₂O/DEPC

8,0μl

β) dsRNA + DNaseI

5,0μl dsRNA

0,8μl [10x] ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI

0,5μl [5 units/μl] DNaseI

1,7μl dH₂O/DEPC

8,0μl

γ) dsRNA + 1kb ladder

5,0μl dsRNA

0,8μl [10x] ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI

1,0μl [0,2μg/μl] 1kb ladder

1,2μl dH₂O/DEPC

8,0μl

δ) dsRNA + DNaseI + 1kb ladder

5,0μl dsRNA

0,8μl [10x] ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI

1,0μl [0,2μg/μl] 1kb ladder

0,5μl [5 units/μl] DNaseI

0,7μl dH₂O/DEPC

8,0μl

Όλα τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 30min και στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πήγμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,2% (w/v).

B. Δοκιμή RNaseA

Για τη δοκιμή RNaseA χρησιμοποιούνται:

α) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα χωρίς προσθήκη RNaseA σε υψηλή συγκέντρωση NaCl



β) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα με προσθήκη RNaseA σε υψηλή συγκέντρωση NaCl

γ) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα σε χαμηλή συγκέντρωση NaCl

δ) δείγμα από το προς εξέταση μύκητα με προσθήκη RNaseA σε χαμηλή συγκέντρωση NaCl

Για να παρασκευαστεί RNaseA συγκέντρωσης 40μg/ml αρχικά προστίθενται 2μl [10mg/ml] RNaseA σε 198μl dH₂O, οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 100μg/ml. Στη συνέχεια προστίθενται 40μl [100 μg/ml] RNaseA σε 60μl dH₂O οπότε προκύπτει το διάλυμα της RNaseA με συγκέντρωση [40μg/ml].

Η αρχική συγκέντρωση του NaCl είναι [5M] και η τελική στην αντίδραση [0,5M].

α) dsRNA + [0,5M] NaCl

5,0μl dsRNA

0,8μl [5,0 M] NaCl

2,2μl dH₂O/DEPC

8,0μl

β) dsRNA + [0,5M] NaCl + RNaseA

5,0μl dsRNA

0,8μl [5,0 M] NaCl

1,0μl [40 μg/ml] RNaseA

1,2μl dH₂O/DEPC

8,0μl

γ) dsRNA

5,0μl dsRNA

3,0μl dH₂O/DEPC

8,0μl

δ) dsRNA + RNaseA

5,0μl dsRNA

1,0μl [40 μg/ml] RNaseA

2,0μl dH₂O/DEPC

8,0μl



Όλα τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 30min, στη συνέχεια στις αντιδράσεις (γ) και (δ) προστίθεται 0,8ml [5 M] NaCl, ώστε όλα τα δείγματα κατά την ηλεκτροφόρηση να κινούνται με την ίδια ταχύτητα και κατόπιν ηλεκτροφορούνται σε πήγμα αгарόζης συγκέντρωσης 1,2% (w/v).



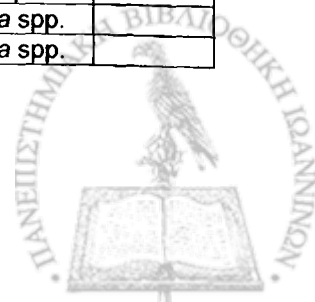
3.3 Αποτελέσματα και Σχολιασμός

Από τις πραγματοποιηθείσες δειγματοληψίες απομονώθηκαν συνολικά 100 στελέχη μυκήτων, από τα οποία μελετήθηκαν 48, τα πιθανά γένη των οποίων φαίνονται στον Πίνακα 5. Η ταξινόμηση σε γένος για όσους μύκητες ήταν εφικτό, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με μικροσκοπική παρατήρηση, ενώ χρησιμοποιήθηκε επίσης η μορφή των σπορίων και η ανάπτυξη και η μορφή των κονιδιοφόρων. Επίσης, έγινε συσχετισμός των συμπτωμάτων που παρατηρήθηκαν στα προσβεβλημένα φυτικά μέρη. Στις Εικόνες 9-16 παρουσιάζονται οι μύκητες στους οποίους ανιχνεύθηκε τελικά dsRNA, καθώς και πρότυποι μύκητες.



Πίνακας 5: Δείγματα που ελέχθησαν για παρουσία dsRNA.

α/α	Φυτό	Τμήμα φυτού	Εποχή δειγματολ.	Περιοχή συλλογής	Κωδικός μύκητα	Πιθανό γένος μύκητα	dsRNA
1	Αγγουριά	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΑΓΓ1	<i>Alternaria</i> spp.	
2	Αγγουριά	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΑΓΓ2	<i>Alternaria</i> spp.	
3	Αγγουριά	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΑΓΓ4/1	<i>Fusarium</i> spp.	ΝΑΙ
4	Αγγουριά	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΑΓΓ4/3	<i>Fusarium</i> spp.	
5	Αγγουριά	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΑΓΓ5	<i>Alternaria</i> spp.	
6	Αγγουριά	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΑΓΓ6	<i>Alternaria</i> spp.	
7	Αμυγδαλιά	Καρπός	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΑΛΜ1/1	<i>Alternaria</i> spp.	
8	Αμυγδαλιά	Φύλλο	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΑΛΜ2	<i>Alternaria</i> spp.	
9	Ελιά	Φύλλο	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΕΛ1/3	<i>Alternaria</i> spp.	
10	Ελιά	Φύλλο	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΕΛ2/1	Ταυτοποίηση μη εφικτή	
11	Ελιά	Καρπός	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΕΛ3	<i>Alternaria</i> spp.	
12	Καρυδιά	Φύλλο	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΚΑΡ1	<i>Alternaria</i> spp.	
13	Κουτσουπιά	Φύλλο	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΚΟΥ1/2	<i>Alternaria</i> spp.	
14	Κυδωνιά	Φύλλο	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΚΥΔ1	<i>Alternaria</i> spp.	
15	Πιπεριά	Καρπός	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΠΙΠ1	Ταυτοποίηση μη εφικτή	
16	Πιπεριά	Καρπός	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΠΙΠ2	<i>Penicillium</i> spp.	ΝΑΙ
17	Πιπεριά	Καρπός	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΠΙΠ3/1	Ταυτοποίηση μη εφικτή	
18	Πιπεριά	Καρπός	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΠΙΠ4	<i>Fusarium</i> spp.	
19	Ροδακινιά	Φύλλο	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΡΟΔ1/3	<i>Alternaria</i> spp.	
20	Τομάτα	Καρπός	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ1/1	<i>Fusarium</i> spp.	
21	Τομάτα	Καρπός	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ1/2	<i>Alternaria</i> spp.	
22	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ2/2	<i>Aspergillus</i> spp.	ΝΑΙ
23	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ2/1''	Ταυτοποίηση μη εφικτή	
24	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ2''/1	<i>Fusarium</i> spp.	
25	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ4	<i>Alternaria</i> spp.	
26	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ5'	<i>Alternaria</i> spp.	
27	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ7	<i>Alternaria</i> spp.	
28	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ8	<i>Fusarium</i> spp.	
29	Τομάτα	Καρπός	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ9''	<i>Fusarium</i> spp.	
30	Τομάτα	Καρπός	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ11	<i>Alternaria</i> spp.	
31	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ12	<i>Alternaria</i> spp.	
32	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ13	Ταυτοποίηση μη εφικτή	
33	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ14/1	Ταυτοποίηση μη εφικτή	
34	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ14/3	<i>Aspergillus</i> spp.	ΝΑΙ
35	Τομάτα	Καρπός	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ15/1	Ταυτοποίηση μη εφικτή	
36	Τομάτα	Καρπός	03/10/04	Πρέβεζα	ΤΟΜ15/2	Ταυτοποίηση μη εφικτή	
37	Τομάτα	Φύλλο	03/10/04	Ιωάννινα	ΤΟΜΠΑΠ	<i>Alternaria</i> spp.	
38	Τριανταφυλλιά	Φύλλο	05/10/04	Κωστακιοί Άρτας	ΤΡ1/1	Ταυτοποίηση μη εφικτή	
39	Φασολιά	Φύλλο	25/09/04	Πρέβεζα	ΦΑΣ1/1	<i>Fusarium</i> spp.	
40	Φασολιά	Φύλλο	25/09/04	Πρέβεζα	ΦΑΣ1/2	<i>Fusarium</i> spp.	
41	Φασολιά	Στέλεχος	25/09/04	Πρέβεζα	ΦΑΣ2	<i>Alternaria</i> spp.	
42	Φασολιά	Φύλλο	25/09/04	Πρέβεζα	ΦΑΣ3/1	<i>Alternaria</i> spp.	
43	Φασολιά	Φύλλο	25/09/04	Πρέβεζα	ΦΑΣ4	<i>Alternaria</i> spp.	
44	Φασολιά	Φύλλο	25/09/04	Πρέβεζα	ΦΑΣ5	<i>Alternaria</i> spp.	
45	Φασολιά	Φύλλο	25/09/04	Πρέβεζα	ΦΑΣ6	<i>Alternaria</i> spp.	
46	Φασολιά	Φύλλο	25/09/04	Πρέβεζα	ΦΑΣ7	Ταυτοποίηση μη εφικτή	
47	Φασολιά	Φύλλο	25/09/04	Πρέβεζα	ΦΑΣ8/1	<i>Alternaria</i> spp.	
48	Φασολιά	Φύλλο	25/09/04	Πρέβεζα	ΦΑΣ8/2	<i>Alternaria</i> spp.	





(α)



(β)



(γ)

Εικόνα 9: (α) Μικροσκοπική φωτογραφία σπορίων, (β) μακροσκοπική φωτογραφία ανάπτυξης του μύκητα με κωδική ονομασία ΑΓΓ4/1 σε στερεό και (γ) υγρό θρεπτικό μέσο.



(α)



(β)



(γ)

Εικόνα 10: (α) Μικροσκοπική φωτογραφία σπορίων, (β) μακροσκοπική φωτογραφία ανάπτυξης του μύκητα με κωδική ονομασία TOM14/3 σε στερεό και (γ) υγρό θρεπτικό μέσο.



(α)

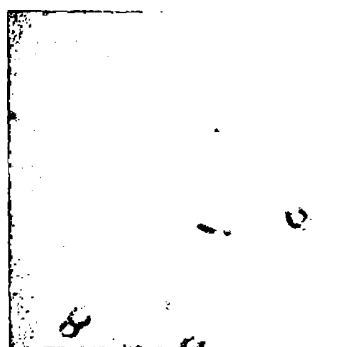


(β)



(γ)

Εικόνα 11: (α) Μικροσκοπική φωτογραφία σπορίων, (β) μακροσκοπική φωτογραφία ανάπτυξης του μύκητα με κωδική ονομασία TOM2/2 σε στερεό και (γ) υγρό θρεπτικό μέσο.



(α)



(β)



(γ)

Εικόνα 12: (α) Μικροσκοπική φωτογραφία σπορίων, (β) μακροσκοπική φωτογραφία ανάπτυξης του μύκητα με κωδική ονομασία ΠΠ2 σε στερεό και (γ) υγρό θρεπτικό μέσο.



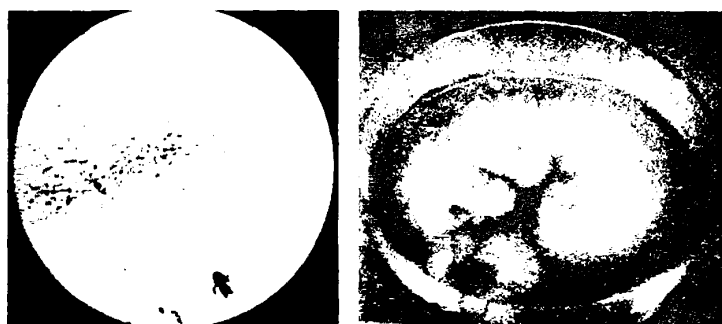
(α) (β) (γ)

Εικόνα 13: (α) Μικροσκοπική φωτογραφία σπορίων, (β) μακροσκοπική φωτογραφία ανάπτυξης μύκητα του γένους *Alternaria* σε στερεό και (γ) υγρό θρεπτικό μέσο.



(α) (β)

Εικόνα 14: (α) Μικροσκοπική φωτογραφία σπορίων και (β) μακροσκοπική φωτογραφία ανάπτυξης του μύκητα *C. parasitica* P46 (πρότυπο) σε στερεό θρεπτικό μέσο.



(α) (β)

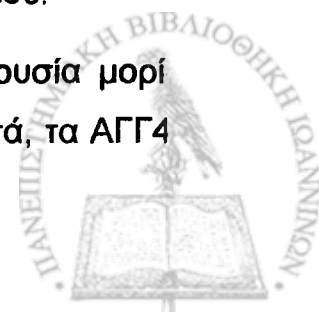
Εικόνα 15: (α) Μικροσκοπική φωτογραφία σπορίων και (β) μακροσκοπική φωτογραφία ανάπτυξης του μύκητα *C. parasitica* P5 σε στερεό θρεπτικό μέσο.



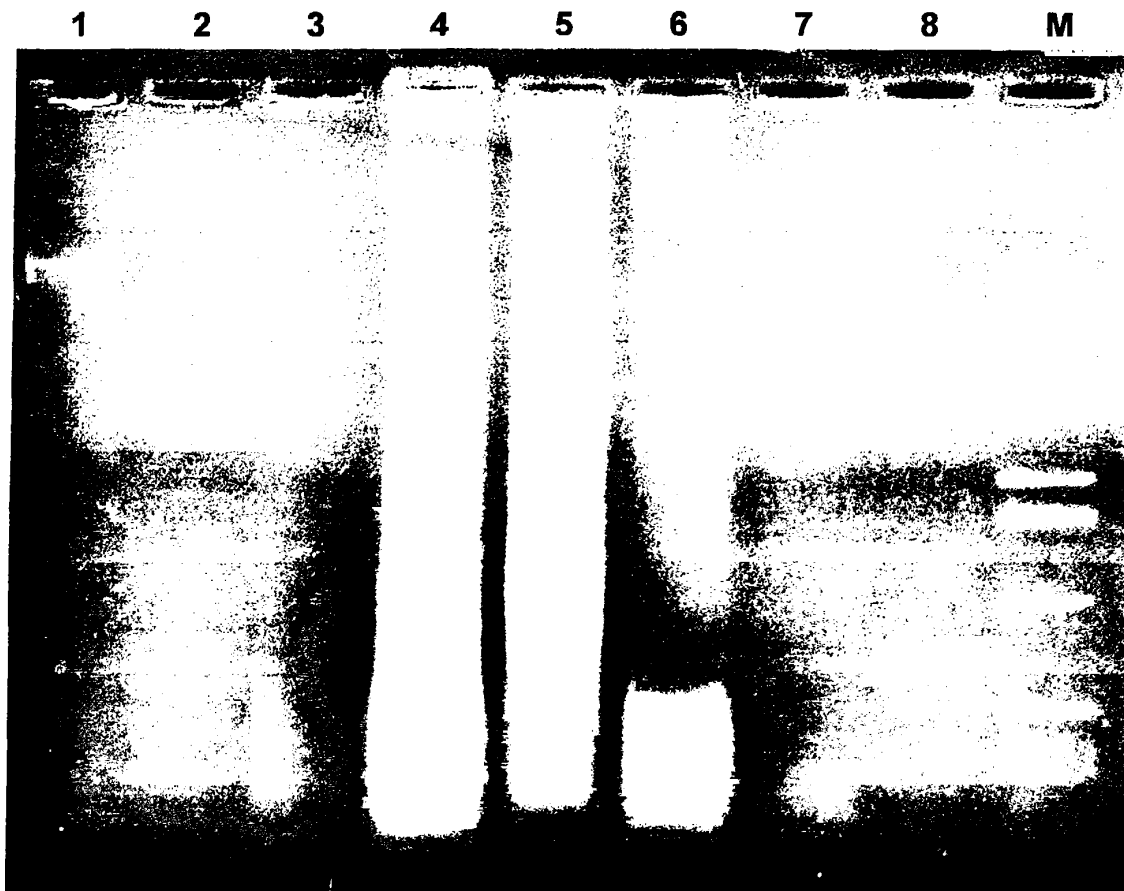
(α) (β)

Εικόνα 16: (α) Μικροσκοπική φωτογραφία σπορίων και (β) μακροσκοπική φωτογραφία ανάπτυξης του μύκητα *C. parasitica* P47 σε στερεό θρεπτικό μέσο.

Στη συνέχεια ελέγχθηκαν τα 48 στελέχη μυκήτων για την παρουσία μορί *dsRNA*. Τα αποτελέσματα του ελέγχου έδειξαν ότι τέσσερα από αυτά, τα ΑΓΓ4 ΠΙΠ2, ΤΟΜ2/2 και ΤΟΜ14/3 ήταν θετικά στην παρουσία *dsRNA*.



Ενδεικτικά, ακολουθούν Εικόνες (17-20) ηλεκτροφορήσεων σε πι
αγαρόζης 1,2% (w/v) από απομονώσεις μυκήτων ορισμένες από τις οτ
κρίθηκαν ύποπτες στην παρουσία dsRNA. Σε όλες τις εκχυλίσεις dsRNA
πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιούταν το στέλεχος P46 του μύκητα *C. paras*
(δεν περιέχει dsRNA) ως αρνητικός μάρτυρας ενώ τα στελέχη P47 και
περιέχουν dsRNA και λειτουργούσαν ως θετικοί μάρτυρες.

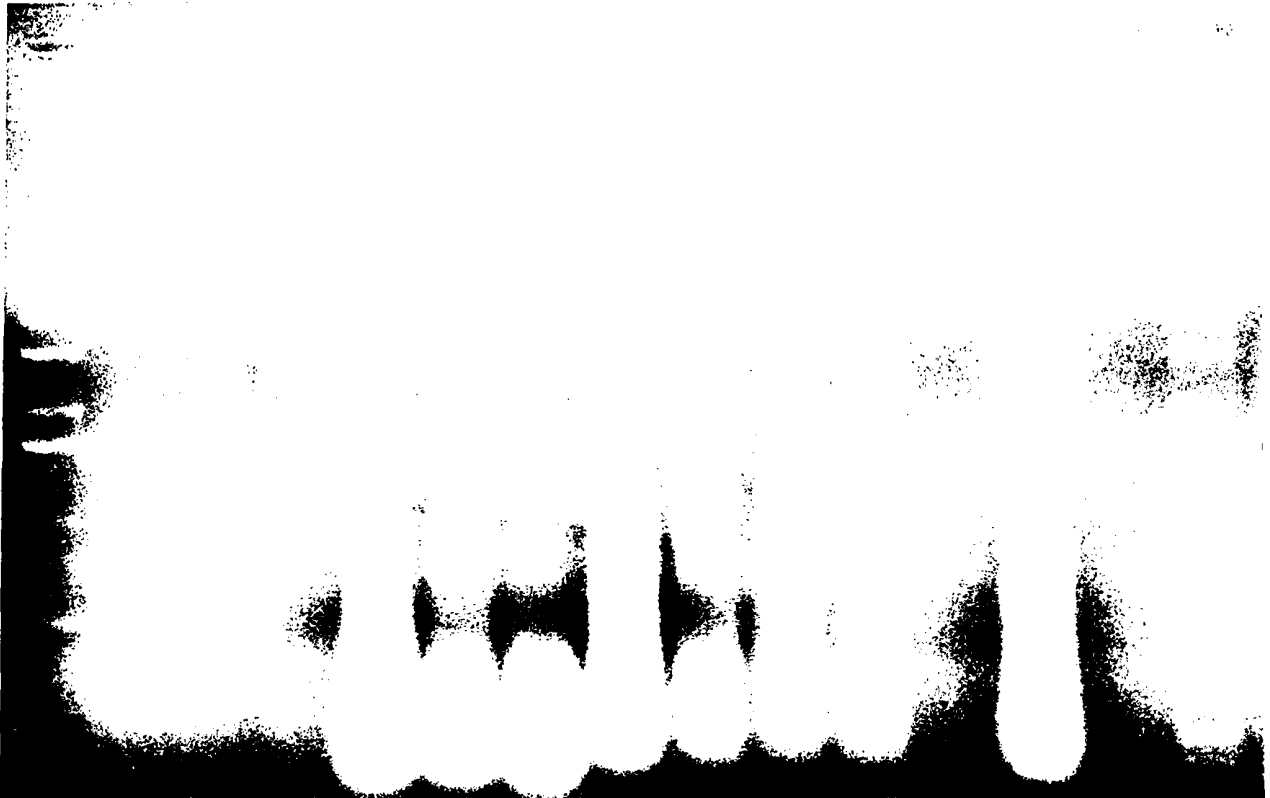


Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της εκχύλισης για την ανίχνευση παρους
dsRNA.

Διαδρομές: 1: P47, 3: P46, 4: ΠΙΠ2, 5: ΑΓΓ2, 6: ΦΑΣ8/1, 7: TOM2/1
M: 1kb ladder (βλέπε Παράρτημα)

Στην Εικόνα 17 παρατηρείται ότι στις διαδρομές 1 και 3 οι μάρτυρες έδειξαν
αναμενόμενα αποτελέσματα, ενώ στη διαδρομή 4 το δείγμα από το ΠΙΠ2 κρίθ
ύποπτο για την παρουσία μορίων dsRNA.

M1 1 M2 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M1



Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της εκχύλισης για την ανίχνευση παρουσίας dsRNA.

Διαδρομές: M1: 1kb ladder, M2: λDNA/*Hind*III (βλέπε Παράρτημα), 1: P5, 2: P46, 3: ΡΟΔ1/3, 4: TOM2/2, 5: ΕΛ1/3, 6: TOM14/1, 7: ΦΑΣ1/2, 8: ALM2, 9: TOM7, 11: ΦΑΣ3/1

Στην Εικόνα 18 παρατηρείται ότι στις διαδρομές 1 και 2 οι μάρτυρες έδειξαν αναμενόμενα αποτελέσματα, ενώ στη διαδρομή 4 το δείγμα από το TOM2 κρίθηκε ύποπτο για την παρουσία μορίων dsRNA.

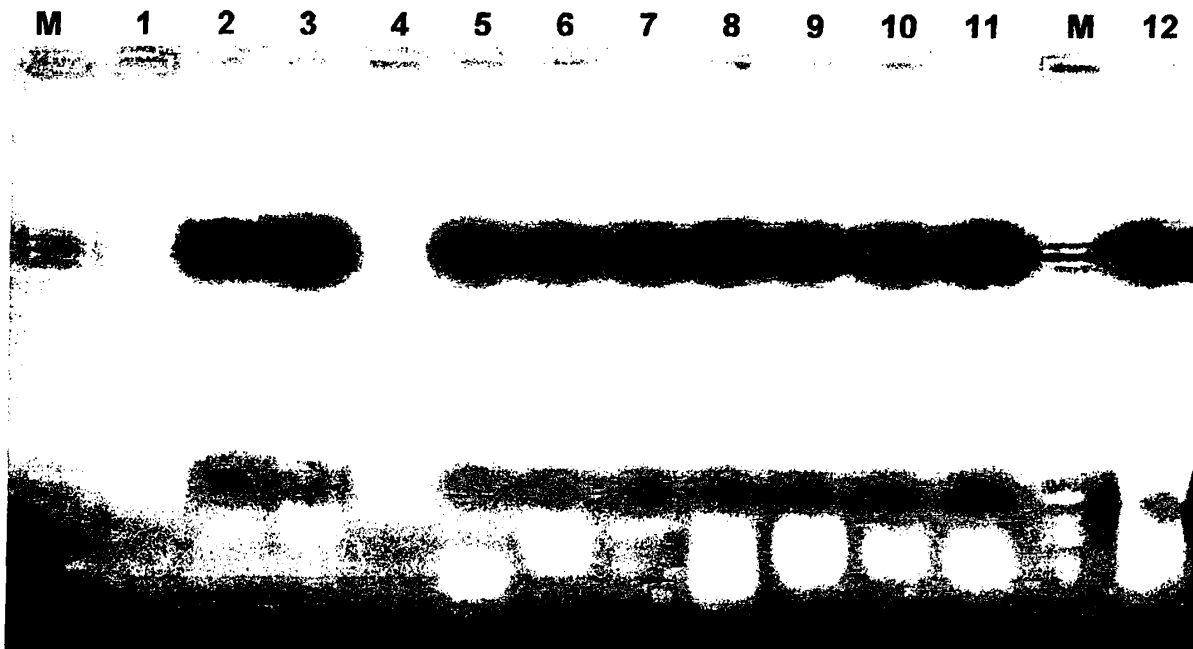
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 M



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της εκχύλισης για την ανίχνευση παρουσίας dsRNA.

Διαδρομές: M: 1kb ladder, 1: P47, 2: P46, 3: TOM15/2, 4: TOM11, 5: ΦΑΣ8/2, 6: ΦΑΣ6, 7: ΑΓΓ4/1, 8: ΑΓΓ5, 9: TOM12, 10: ΦΑΣ4, 11: TOM8, 12: ΕΛ2, 13: ΚΑΡ4, 14: ΦΑΣ5

Στην Εικόνα 19 παρατηρείται ότι στις διαδρομές 1 και 2 οι μάρτυρες έδειξαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα, ενώ στις διαδρομές 7, 10, 13 και 14 τα δείγματα από τα ΑΓΓ4/1, ΦΑΣ4, ΚΑΡ1 και ΦΑΣ5 αντίστοιχα, κρίθηκαν ύποπτα για την παρουσία μορίων dsRNA.



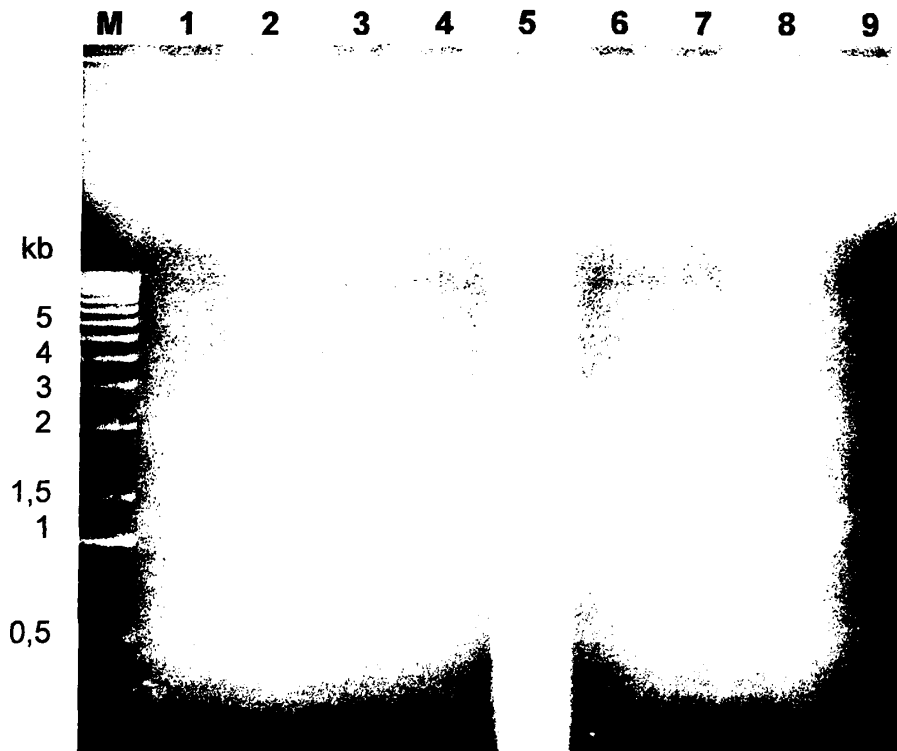
Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της εκχύλισης για την ανίχνευση παρουσίας dsRNA.

Διαδρομές: M: 1kb ladder, 2: P47, 3: P46, 5: TOM2/1'', 6: TOM1/1, 7: ΠΙΠ3/1, 8: TOM14/3, 9: ΑΓΓ4/3, 10: TOM9', 11: ΦΑΣ1/1, 12: ΕΛ2/1

Στην Εικόνα 20 παρατηρείται ότι στις διαδρομές 2 και 3 οι μάρτυρες έδειξαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα, ενώ στη διαδρομή 8 το δείγμα από το TOM14/3 κρίθηκε ύποπτο για την παρουσία μορίων dsRNA.

Κατόπιν, τα επτά δείγματα ΑΓΓ4/1, ΚΑΡ1, ΠΙΠ2, ΤΟΜ2/2, ΤΟΜ14/3, ΦΑΣ4 ΦΑΣ5 ελέγχθηκαν περαιτέρω με δοκιμές RNaseA και DNaseI, ώστε επιβεβαιωθεί η παρουσία dsRNA.

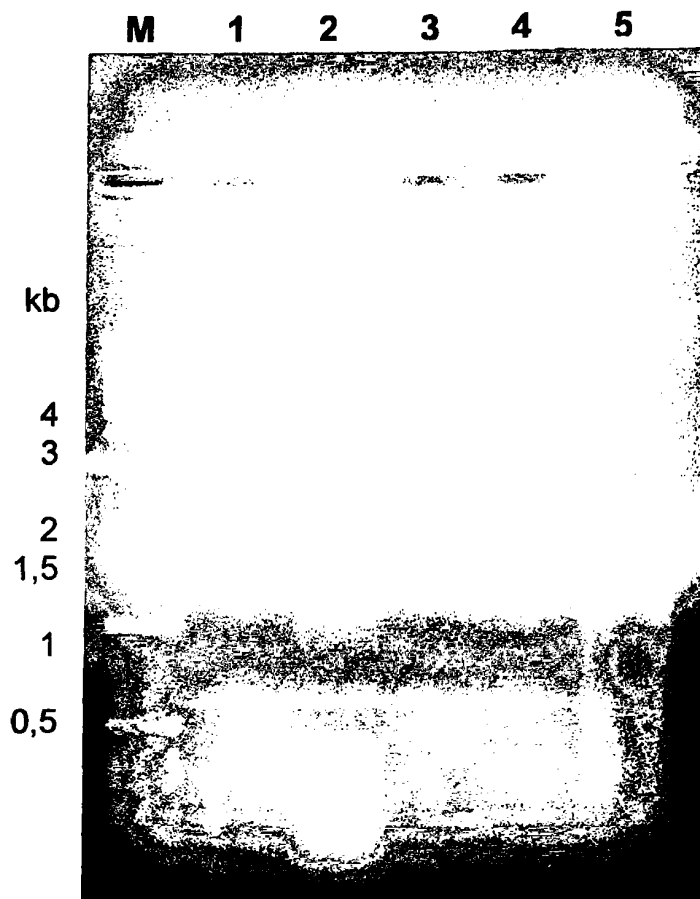
Οι Εικόνες 21-24 αφορούν ηλεκτροφορήσεις με τα αποτελέσματα των δοκιμής RNaseA.



Εικόνα 21: Δοκιμή RNaseA στην απομόνωση RNA του μύκητα ΠΙΠ2.

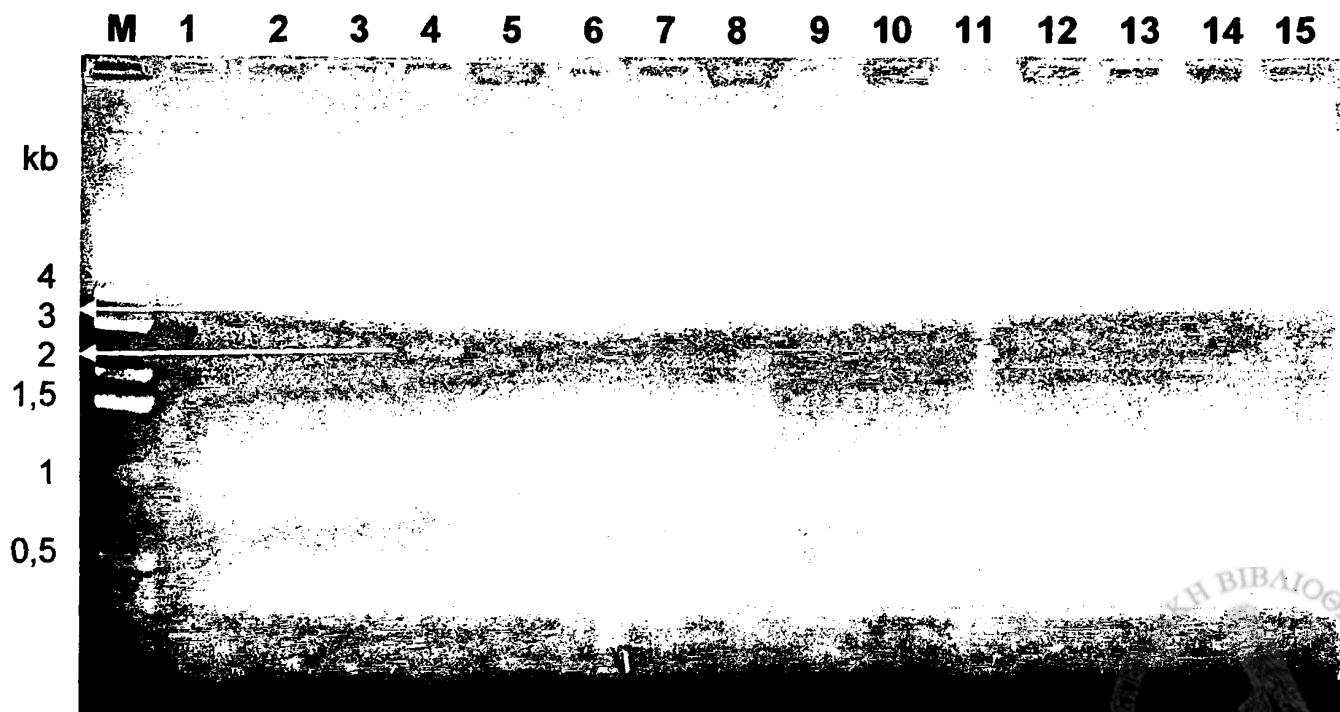
Διαδρομές: M: 1kb ladder, 2: ΠΙΠ2, 5: ΠΙΠ2 + HS (High Salt) + RNaseA, 8: ΠΙΠ2 + RNaseA

Στην Εικόνα 21 παρατηρείται ότι στη διαδρομή 5 το δείγμα δεν υδρολύεται με τη RNaseA παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, ενώ υδρολύεται όταν απουσιάζουν (διαδρομή 8), γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για dsRNA ή DNA. Βάσει του ηλεκτροφορητικού προτύπου ζώνωσης του μορίου dsRNA (ζώνη μεταξύ 4 - 5 kb) ο μυκοϊός πιθανά να ανήκει στην οικογένεια Totiviric (Πίνακας 3).



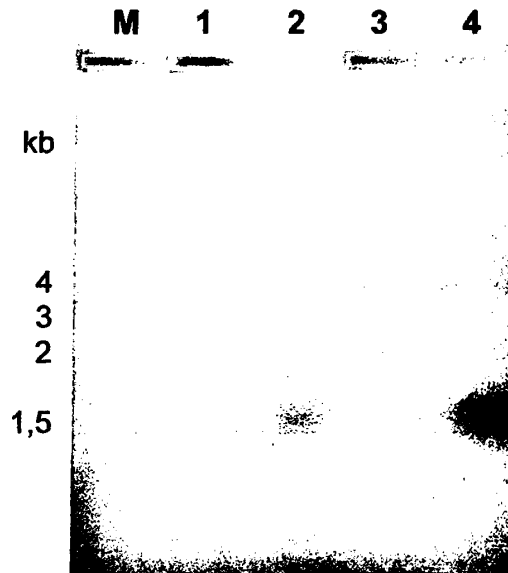
Εικόνα 22: Δοκιμή RNaseA στην απομόνωση RNA του μύκητα TOM2/2.
 Διαδρομές: M: 1kb ladder, 2: TOM2/2 + HS + RNaseA, 5: TOM2/2 + RNaseA

Το ίδιο με την Εικόνα 21 παρατηρείται για τις διαδρομές 2 και 5 αντίστοιχα της Εικόνας 22. Βάσει του ηλεκτροφορητικού προτύπου ζώνωσης των μορίων dsRNA (4 ζώνες μεταξύ 1 - 4 kb) ο μυκοϊός πιθανά να ανήκει στην οικογένεια Chrysoviridae (Πίνακας 3).



Εικόνα 23: Δοκιμή RNaseA στην απομόνωση RNA του μύκητα ΑΓΓ4/1.
 Διαδρομές: M: 1kb ladder
 1: ΦΑΣ5 + HS + RNaseA
 2: ΚΑΡ1 + HS + RNaseA
 3: ΦΑΣ4 + HS + RNaseA
 4: ΑΓΓ4/1 + HS + RNaseA
 5: ΦΑΣ5 + RNaseA
 6: ΚΑΡ1 + RNaseA
 7: ΦΑΣ4 + RNaseA
 8: ΑΓΓ4/1 + RNaseA
 9: ΦΑΣ4 + RNaseA
 10: ΑΓΓ4/1 + RNaseA
 11: ΑΓΓ4/1 + RNaseA
 12: ΦΑΣ5 + RNaseA
 13: ΚΑΡ1 + RNaseA
 14: ΦΑΣ4 + RNaseA
 15: ΑΓΓ4/1 + RNaseA

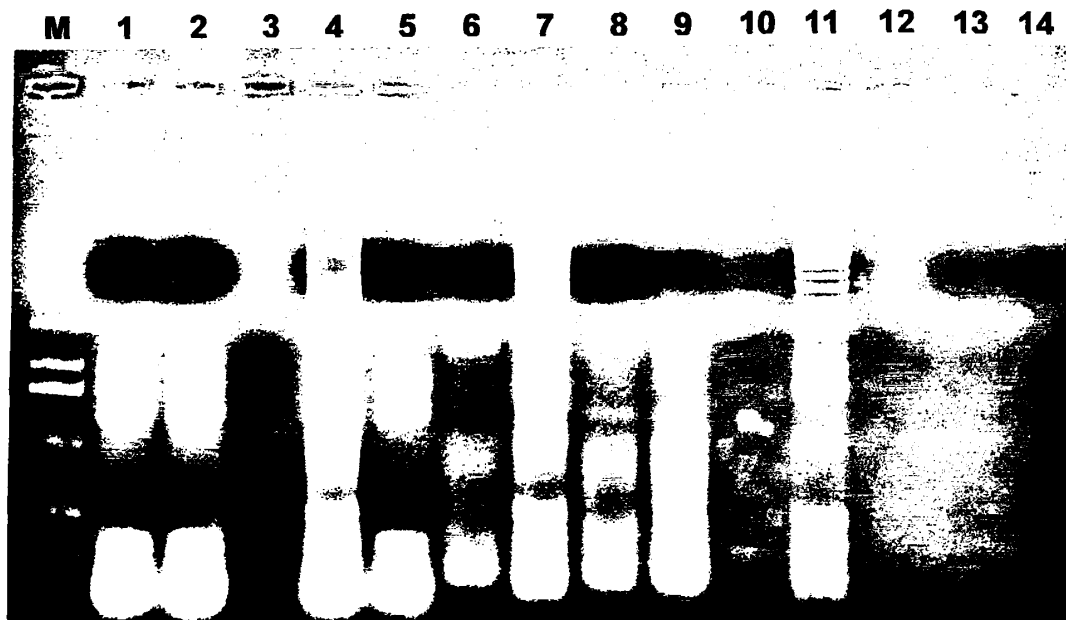
Το ίδιο με την Εικόνα 21 παρατηρείται για τις διαδρομές 4 και 11 αντίστοιχα της Εικόνας 23. Βάσει του ηλεκτροφορητικού προτύπου ζώνωσης των μορίων dsRNA (2 ζώνες μεταξύ 3 - 4 kb) ο μυκοΐδς πιθανά να ανήκει στην οικογένεια Partitiviridae (Πίνακας 3). Τα δείγματα ΦΑΣ5, ΚΑΡ1 και ΦΑΣ4 ελέγχθηκαν και δεν βρέθηκαν θετικά στην παρουσία μορίων dsRNA.



Εικόνα 24: Δοκιμή RNaseA στην απομόνωση RNA του μήκητ TOM14/3. Διαδρομές: M: 1kb ladder, 2: TOM14/3 + HS + RNaseA, 4: TOM14/3 + RNaseA

Το ίδιο με την Εικόνα 21 παρατηρείται για τις διαδρομές 2 και 4 αντίστοιχα της Εικόνας 24. Βάσει του ηλεκτροφορητικού προτύπου ζώνωσης των μορίων dsRNA (2 ζώνες μεταξύ 3 - 4 kb) ο μυκοΐδς πιθανά να ανήκει στην οικογένεια Partitiviridae (Πίνακας 3).

Τα τέσσερα πιθανά δείγματα dsRNA μαζί με κατάλληλους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες υπέστησαν δοκιμή με DNaseI, ώστε να αποκλεισθεί η περίπτωση να αποτελούν μόρια DNA. Τα αποτελέσματα των δοκιμών DNaseI παρουσιάζονται στις Εικόνες 25-27.



Εικόνα 25: Δοκιμή DNaseI απομονώσεων TOM2/2, ΑΓΓ4/1 και P47.

M: 1kb ladder

1: TOM2/2 + DnaseI

2: TOM2/2 + DNaseI + M

4: TOM2/2 + M

5: TOM2/2

6: ΑΓΓ4/1 + DNaseI

7: ΑΓΓ4/1 + M

8: ΑΓΓ4/1 + DNaseI + M

9: ΑΓΓ4/1

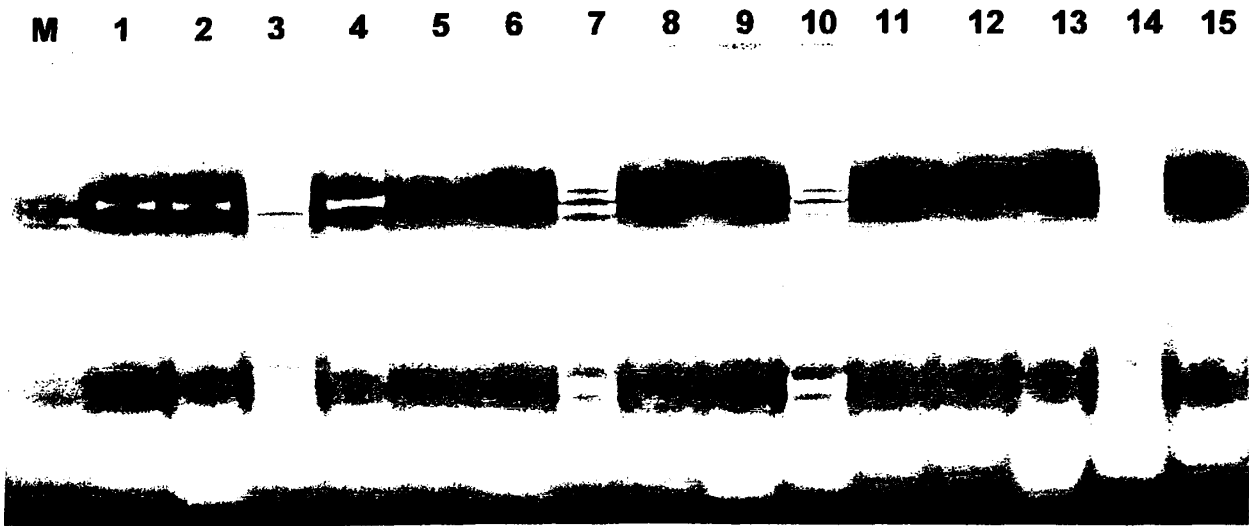
10: P47

11: P47 + M

13: P47 + M + DNaseI

14: P47 + DNaseI

Στην Εικόνα 25 παρατηρείται ότι στη διαδρομή 1 το δείγμα δεν υδρολύεται από τη DNaseI, ενώ παρουσία του δείγματος υδρολύεται ο 1kb ladder στη διαδρομή 2, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν πρόκειται για DNA. Το ίδιο παρατηρείται με τις διαδρομές 6 και 8 αντίστοιχα όπως και 14 και 13 αντίστοιχα.



Εικόνα 26: Δοκιμή DNaseI απομονώσεων ΠΙΠ2, Ρ47, ΦΑΣ5 και ΦΑΣ4.

M: 1kb ladder

- | | | | |
|----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| 1: ΠΙΠ2 + DNaseI | 5: Ρ47+ DNaseI | 8: ΦΑΣ5 + DNaseI | 12: ΦΑΣ4 + DNaseI |
| 2: ΠΙΠ2 + DNaseI + M | 6: Ρ47 + M + DNaseI | 9: ΦΑΣ5 + M + DNaseI | 13: ΦΑΣ4 + M + DNaseI |
| 3: ΠΙΠ2 + M | 7: Ρ47 + M | 10: ΦΑΣ5 + M | 14: ΦΑΣ4 + M |
| 4: ΠΙΠ2 | | 11: ΦΑΣ5 | 15: ΦΑΣ4 |

Στην Εικόνα 26 παρατηρείται στη διαδρομή 1 ότι το δείγμα δεν υδρολύεται από τη DNaseI, ενώ παρουσία του δείγματος υδρολύεται ο 1kb ladder στη διαδρομή 2, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν πρόκειται για DNA. Το ίδιο παρατηρείται με τις διαδρομές 5 και 6 αντίστοιχα. Τα δείγματα ΦΑΣ5 και ΦΑΣ4 δεν είναι θετικά στην παρουσία dsRNA και χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M 14



Εικόνα 27: Δοκιμή DNaseI απομονώσεων TOM14/3, P47 και KAP1.

M: 1kb ladder

1: TOM14/3 + DNaseI

2: TOM14/3 + DNaseI + M

3: TOM14/3 + M

4: TOM14/3

6: P47+ DNaseI

7: P47 + M + DNaseI

8: P47 + M

9: P47

10: KAP1 + DNaseI

11: KAP1+DNaseI+M

12: KAP1 + M

13: KAP1

14: ΑΓΓ4/1

Στην Εικόνα 27 παρατηρείται στη διαδρομή 1 ότι το δείγμα δεν υδρολύεται απ τη DNaseI, ενώ παρουσία του δείγματος υδρολύεται ο 1kb ladder στη διαδρομή 2, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν πρόκειται για DNA. Το ίδιο παρατηρείται μ τις διαδρομές 6 και 7 αντίστοιχα. Το δείγμα KAP1 δεν είναι θετικό στην παρουσία dsRNA και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Στη διαδρομή 1 φορτώθηκε διαγνωστικά δείγμα απομόνωσης ΑΓΓ4/1.

Επομένως οι τέσσερις απομονώσεις από τα δείγματα ΑΓΓ4/1, ΠΙΠ2, ΤΟΜ2/ και ΤΟΜ14/3 περιέχουν μόρια dsRNA (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Προβλεπόμενη φύση των δειγμάτων.

α/α	Κωδικός δείγματος	Πιθανό γένος μύκητα	Πιθανή οικογένεια μυκοϊού
1	ΑΓΓ4/1	<i>Fusarium</i> spp.	Partitiviridae*
2	ΠΙΠ2	<i>Penicillium</i> spp.	Totiviridae
3	ΤΟΜ2/2	<i>Aspergillus</i> spp.	Chrysoviridae*
4	ΤΟΜ14/3	<i>Aspergillus</i> spp.	Partitiviridae*

* Υπό την προϋπόθεση ότι δεν αποτελούν μικτές ιικές μολύνσεις.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

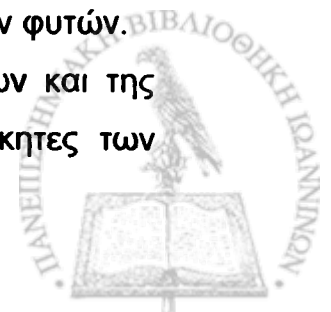
Η ασθένεια είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης παθογόνου, ξενιστή και περιβάλλοντος (Goidanich 1964). Έτσι κάθε μέσο περιορισμού της ασθένειας πρέπει να αποσκοπεί:

- Στη μείωση της παρουσίας του παθογόνου (όπως την καταστροφή των μολυσμάτων ή την παρεμπόδιση παραγωγής σπορίων κ.λπ.).
- Στην αλλαγή του περιβάλλοντος με τέτοιο τρόπο, ώστε να μην περιορίζεται η ανάπτυξη του φυτού-ξενιστή. Οι ενέργειες κατά βάση είναι καλλιεργητικές, όπως η αμειψισπορά, η μεταβολή της εποχής ή διάρκειας ή βάθους σποράς, η κατεργασία του εδάφους κ.λπ.
- Στο χειρισμό του φυτού - ξενιστή. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας ή η αλλαγή των φαινολογικών σταδίων της καλλιέργειας έτσι ώστε να μην προσελκύει ή να παρεμποδίζει το παθογόνο.

Είναι κατά τα ανωτέρω πολύ περίπλοκες οι σχέσεις μεταξύ παθογόνου, περιβάλλοντος και ξενιστή και απαιτείται λεπτομερής γνώση της βιολογίας του παθογόνου, της οικολογίας, καθώς και της σχέσης όλων των βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων στο αγροοικοσύστημα. Για την αντιμετώπιση επομένως των ασθενειών τα μέτρα πρέπει να λαμβάνονται ολοκληρωμένα σε ένα ευέλικτο σύστημα, το οποίο θα είναι συμβατό με την αντιμετώπιση και των άλλων φυτοπροστατευτικών προβλημάτων αλλά και παράλληλα να είναι οικονομικά αποδεκτά.

Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στην περίπτωση αντιμετώπισης των φυτοπαθογόνων με βιολογικό τρόπο, υπάρχει η ιδιαιτερότητα του χειρισμού ενός πλήθους άλλων παραγόντων (βιοτικών και αβιοτικών) που συνιστούν το οικολογικό περιβάλλον της φυτικής επιφάνειας και του επιφανειακού, καλλιεργούμενου εδάφους. Τα περιβάλλοντα αυτά και ειδικότερα το καλλιεργούμενο επιφανειακό έδαφος είναι πλούσια σε μικροβιακή δραστηριότητα. Το έδαφος μάλιστα αποτελεί την πλουσιότερη εστία αλληλοεπηρεαζόμενων μικροοργανισμών και από πλευράς αριθμού και από πλευράς ειδών, παρέχοντας πλείστες όσες ευκαιρίες έκφρασης χρήσιμου ανταγωνισμού μεταξύ τους (Cook & Baker 1983). Ίσως για το λόγο αυτό είναι δυσκολότερη η αντιμετώπιση των εδαφογενών ασθενειών από τις αντίστοιχες του υπέργειου τμήματος των φυτών.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, από περιοχές της Άρτας, των Ιωαννίνων και της Πρέβεζας απομονώθηκαν από προσβεβλημένα τμήματα φυτών μύκητες των γενών:



α) *Aspergillus*: παρατηρήθηκε σκουρόχρωμη επάνθιση τόσο στον προσβεβλημένο φυτικό ιστό όσο και στην ανάπτυξη του μύκητα σε υγρό και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Τα σπόρια και οι καρποφορίες είναι τα χαρακτηριστικά του γένους (Εικόνες 10 και 11).

β) *Fusarium*: στην προσβεβλημένη φυτική περιοχή αλλά και στην ανάπτυξη του μύκητα σε υγρό και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα παρατηρήθηκαν μυκηλιακές υφές λευκού χρώματος. Επιπλέον, τα κονίδια έχουν το χαρακτηριστικό σχήμα του παθογόνου μύκητα (Εικόνα 9).

γ) *Alternaria*: παρατηρήθηκαν μικροί κονιδιοφόροι μεμονωμένοι, ελεύθεροι με σκουρόχρωμα, ροπαλοειδή, πολυκύτταρα κονίδια (Εικόνα 13). Επιπλέον, στα προσβεβλημένα φύλλα παρατηρήθηκαν νεκρωτικές κυκλικές κηλίδες κατά ομόκεντρους κύκλους χαρακτηριστικές της ασθένειας.

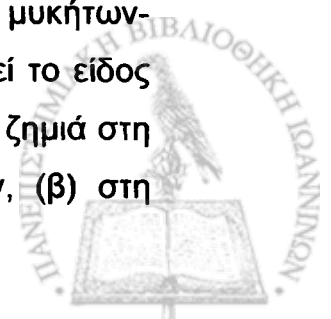
δ) *Penicillium*: παρατηρήθηκαν κονιδιοφόροι με σπόρια ωοειδή, μονοκύτταρα, υαλώδη ή ελαφρώς χρωματισμένα πράσινα. Η ανάπτυξη του μύκητα σε υγρό και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα έδωσε επάνθιση χρώματος πράσινου (Εικόνα 12).

Βάσει των δοκιμών RNaseA και DNaseI διαπιστώθηκε ότι τέσσερα δείγματα ήταν θετικά στην παρουσία μορίων dsRNA. Το ποσοστό αυτών στο σύνολο των ελεγχόμενων δειγμάτων (48) είναι της τάξης του 8,33%. Οι ξενιστές των μορίων αυτών ταυτοποιήθηκαν ταξινομικά μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης και των μακροσκοπικών συμπτωμάτων στους φυτικούς ιστούς. Έτσι, οι μύκητες με την κωδική ονομασία ΑΓΓ4/1, ΠΙΠ2, ΤΟΜ2/2 και ΤΟΜ14/3 ανήκουν στα γένη *Fusarium* ο πρώτος, *Penicillium* ο δεύτερος και *Aspergillus* οι δύο τελευταίοι.

Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο ζώνωσης των μορίων dsRNA που ανιχνεύτηκαν στις απομονώσεις δείχνουν πως οι μυκοϊοί πιθανώς να ανήκουν στις οικογένειες Totiviridae (ένα μόριο dsRNA, Εικόνες 1 και 21), Partitiviridae (δύο μόρια dsRNA, Εικόνες 2, 23 και 24) ή Chrysoviridae (τέσσερα μόρια dsRNA, Εικόνες 1 και 22). Επίσης είναι πιθανό τα μόρια dsRNA που απομονώθηκαν από τα δείγματα να προέρχονται από μικτές μολύνσεις μυκοϊών.

Επισημαίνεται πως καταγραφή μυκοϊών γίνεται ίσως για πρώτη φορά στην ελληνική επικράτεια (εκτός της περίπτωσης του *Cryphonectria hyrovirus*) και αποτελεί καταγραφή της ποικιλότητας των ελληνικών ιών.

Περαιτέρω έρευνα πρέπει να εστιάσει: (α) στην ταυτοποίηση των μυκήτων-φορέων μορίων dsRNA με μοριακές τεχνικές έτσι ώστε να διαπιστωθεί το είδος του μύκητα και κατά πόσο αυτός προξενεί ασθένειες που δημιουργούν ζημιά στη φυτική παραγωγή και στην ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων, (β) στη



διερεύνηση για το αν τα μόρια dsRNA είναι μυκοϊοί ή VLPs και (γ) στον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των ευρεθέντων μυκοϊών.

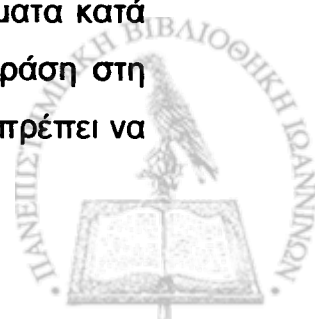
Επίσης, η εύρεση υγιών στελεχών μυκήτων (που δεν είναι φορείς μορίων dsRNA) και η σύγκριση καλλιεργειών μολυσμένων και υγιών στελεχών θα επιτρέψει την παρατήρηση των πιθανά φαινοτυπικών αλλαγών που προκαλούν τα μόρια dsRNA στο μύκητα-ξενιστή. Στη συνέχεια, ο εμβολιασμός φυτών-ξενιστών του μύκητα με υγιή και μολυσμένα στελέχη και η σύγκριση αυτών θα δώσει αποτελέσματα σχετικά με τη δυνατότητα του μυκοϊού να προκαλεί υπομολυσματικότητα και συνεπώς να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας βιολογικής καταπολέμησης.

Είναι γνωστό πως η βιολογική καταπολέμηση έγινε αντικείμενο ενδελεχούς διερεύνησης τις τελευταίες δεκαετίες μετά τη διαπίστωση ότι και είδη που δεν ήταν στόχοι βιολογικής καταπολέμησης, πολλά από τα οποία ήταν υπό ειδική μέριμνα για να μην εξαφανισθούν, είχαν προσβληθεί και είχαν ωθηθεί σε εξαφάνιση από εισαχθέντες ωφέλιμους οργανισμούς (Howarth 1991, Simperloff & Stilling 1996).

Έτσι οι μυκοϊοί, πριν εισαχθούν στο αγροοικοσύστημα για να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα βιολογικής καταπολέμησης, πρέπει να υφίστανται ενδελεχείς δοκιμές, οι οποίες αποβλέπουν στο να διαπιστωθεί η επίδρασή τους σε στελέχη μη παθογόνα του ίδιου είδους.

Οι συζητήσεις για το μέγεθος τέτοιων προβλημάτων επικεντρώνονται σε δύο θέματα: (α) εάν υπάρχει επαρκής παρακολούθηση για την πρόβλεψη τέτοιων επιπτώσεων σε είδη όχι στόχους και (β) για την πιθανότητα που υπάρχει για έναν ωφέλιμο οργανισμό να εξελιχθεί και να προσβάλλει και άλλους ξενιστές εκτός από το είδος για το οποίο εισήχθη. Το γεγονός ότι οι οργανισμοί, οι οποίοι προορίζονται να χρησιμοποιηθούν για τη βιολογική καταπολέμηση, έχουν τη δυνατότητα να εξαπλωθούν και να εξελιχθούν, όπως οποιοδήποτε ξενικό είδος, επιβάλλει να γίνονται οι απαιτούμενες δοκιμές πριν την ελευθέρωση των οργανισμών αυτών.

Επίσης, πρέπει να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της υπομολυσματικότητας που προκαλείται σε ένα φυτοπαθογόνο μύκητα από το μυκοϊό και της δυναμικής του βιολογικού ελέγχου. Ένας μυκοϊός μπορεί να δίνει αξιόλογα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια όλων των αρχικών δοκιμών, αλλά να μην δείχνει καμία δράση στη φύση, απλά και μόνο γιατί δεν εγκαθίσταται στον ξενιστή. Συνεπώς, θα πρέπει να



εξεταστεί η δυνατότητα μεταβίβασης των μορίων dsRNA από μολυσμένα στελέχη του μύκητα σε υγιή σε συνθήκες αγρού.

Ο καθορισμός των ομάδων βλαστικής συμβατότητας (Vegetative Compatibility Groups, VCG) στο είδος μπορεί να αποτελέσει ένα ακόμη πεδίο έρευνας. Η κλωνοποίηση και η ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων *vic* θα επιτρέψει τον καθορισμό της ποικιλομορφίας των VCG. Έτσι, θα γίνουν πιο κατανοητά τα προβλήματα που θέτει η βλαστική ασυμβατότητα στη διασπορά των μυκοϊών μεταξύ ίδιων ειδών (Kubisiak & Milgroom 2006).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



ΕΛΛΗΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Καραγκούνη-Κύρτσου Α.Δ. 1999.** Μικροβιολογία. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, σελ. 144-149.
2. **Κατής Ν.Ι. 2000.** Ιολογία φυτών. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Εκδόσεις Πήγασος, σελ. 21-22, 138-141.
3. **Τζαβέλλα-Κλωνάρη Κ. 1996.** Γενική Φυτοπαθολογία. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, σελ. 21-28.
4. **Τζάμος Ε.Κ. 2004.** Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., σελ. 182-185, 465-494.
5. **Τσιτσιπής. Ι. 2000.** Αρχές Φυτοπροστασίας. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Βόλος, σελ. 54-62, 110-123.
6. **Υπουργείο Γεωργίας - Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής. 1996.** Ολοκληρωμένη Καταπολέμηση στα Κηπευτικά υπό Κάλυψη. Εκδόσεις Καμπύλη, Αθήνα, σελ. 22.



ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Anagnostakis S.L. 1982.** Biological control of chestnut blight. *Science*, (215): 466-471.
2. **Agrios G.N. 2005.** Plant Pathology. Elsevier Academic Press (5th edition), pp. 132, 303-305, 390.
3. **Bozarth R.F. 1972.** Mycoviruses: A New Dimension in Microbiology. *Environmental Health Perspectives*, (2): 23-39.
4. **Buck K.W. 1986.** Fungal Virology. CRC Press (1st edition), Florida, pp. 1-84.
5. **Cook R.J. and Baker K.F. 1983.** The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
6. **Croft B.A. 1990.** Arthropod Biological Control Agents and Pesticides. Wiley, New York.
7. **Elzen G.W. 2001.** Lethal and sublethal effects of insecticide residues on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) and *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae). *Journal of Economic Entomology*, (94): 55-59.
8. **Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger, U. and Ball L.A. (Editors) 2005.** Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press.
9. **Fedorcsak I. and Ehrenberg L. 1966.** Effects of diethylpyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chemica Scandinavica*, (20): 107.
10. **Frank R., Braun H.E., Ripely B.D and Clegg B.S. 1990.** Contamination of rural ponds with pesticides, 1971-85, Ontario, Canada. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, (44): 401-409.
11. **Ghabrial S.A. and Suzuki N. 2009.** Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, (47): 353-384.
12. **Ghabrial S.A., Caston J., Jiang D. and Carracoa J. 2003.** Molecular characterization and particle structure of *Penicillium chrysogenum* virus: a dsRNA mycovirus with multiparticle genome. Final Programme and Abstracts, 8th International Symposium on Double Stranded RNA Viruses. Abstract W1.1, p. 1.



13. **Ghabrial S.A., Bozarth R.F., Buck K.W., Martelli G.P. and Milne R.G. 2000.** Family Partitiviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*, Academic Press, pp. 503-513.
14. **Ghabrial S.A. 1998.** Origin Adaptation and Evolutionary Pathways of Fungal Viruses. *Virus Genes*, 16 (1): 119-131.
15. **Goidanich G. 1964.** Manuale di patologia vegetale. Edizioni Agricole, BO.
16. **Hillman B.I., Fulbright D.W., Nuss D.L. and van Alfen N.K. 2000.** Family Hypoviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*, Academic Press, pp. 515-520.
17. **Hollings M. 1962.** Viruses Associated with A Die-Back Disease of Cultivated Mushroom. *Nature*, (196): 962-965.
18. **Howarth F.G. 1991.** Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review of Entomology*, (36): 485-509.
19. **Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. and White T.J. 1990.** PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Academic Press, pp. 307-324.
20. **Kendall J.M. and Rygiewicz P.T. 2005.** Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5(1): 28.
21. **Koonin E.V., Choi G.H., Nuss D.L., Shapira R. and Carrington J.C. 1991.** Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-stranded RNA and a group of positive-strand RNA plant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23): 10647-10651.
22. **Kubisiak T.L. and Milgroom M.G. 2006.** Markers linked to vegetative incompatibility (*vic*) genes and a region of high heterogeneity and reduced recombination near the mating type locus (*MAT*) in *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genetics and Biology*, 43 (6): 453-463.
23. **Lwoff A. 1957.** The Concept of Virus. *Journal of General Microbiology*, 17(2): 239-253.
24. **McCabe P.M., Pfeiffer P. and van Alfen N.K. 1999.** The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends in Microbiology*, 7 (9): 377-381.
25. **Mertens P. 2004.** The dsRNA viruses. *Virus Research*, (101): 3-13.
26. **Mertens P.P.C., Arella M., Attoui H., Belloncik S., Bergoin M., Boccardo G., Booth T.F., Chiu W., Diprose J.M., Duncan R., Estes M.K., Gorziglia**



- M., Gouet P., Gould A.R., Grimes J.M., Hewat E., Hill C., Holmes I.H., Hoshino Y., Joklik W.K., Knowles N., Lopez Ferber M.L., Malby R., Marzachi C., McCrae M.A., Milne R.G., Nibert M., Nunn M., Omura T., Prasad B.V.V., Pritchard I., Samal S.K., Schoehn G., Shikata E., Stoltz D.B., Stuart D.I., Suzuki N., Upadhyaya N., Uyeda I., Waterhouse P., Williams C.F., Winton J.R. and Zhou H.Z. 2000. Family Reoviridae. In *Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses, Academic Press, pp. 395-480.
27. **Morris T.J. and Dodds J.A. 1979.** Isolation and analyses of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, (69): 854-858.
28. **Newman A.M., Elliott S.G., McLaughlin C.S., Sutherland P.A. and Warner R.C. 1981.** Replication of double-stranded RNA of the virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Virology*, 38(1): 263-271.
29. **Nuss D.L. 2005.** Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, (3): 632-642.
30. **Pearson M.N., Beever R.E., Boine B. and Arthur K. 2009.** Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 10(1): 115-128.
31. **Pomerleau R. and Mehran. R. 1966.** Distribution of spores of *Ceratocystis ulmi* labelled with phosphorus-32 in green shoots and leaves of *Ulmus americana*. *Naturaliste Canadien*, (93): 577-582.
32. **Sambrook J. and Russel D.W. 2001.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
33. **Sclafani R.A. and Fangman W.L. 1984.** Conservative replication of double-stranded RNA in *Saccharomyces cerevisiae* by displacement of progeny single strands. *Molecular and Cellular Biology*, 4(8): 1618-1626.
34. **Simberloff D. and Stiling P. 1996.** How risky is biological control? *Ecology*, (77): 1965-1974.
35. **Sinden J.W. and Hauser E. 1950.** Report of two new mushroom diseases. *Mushroom Science*, (1): 96-100.
36. **Theiling K.M. and Croft B.A. 1988.** Pesticide side-effects on arthropod natural enemies: A database summary. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 21(3): 191-218.



37. **van Diepeningen A.D., Debets A.J.M., Slakhorst S.M., Fekete C., Hornok L. and Hoekstra R.F. 2000.** Interspecies virus transfer via protoplast fusions between *Fusarium poae* and black *Aspergillus* strains. *Fungal Genetics Newsletter*, (47): 99-100.
38. **Webber J.F. 1993.** D factors and their potential for the control of Dutch elm disease. In: Dutch elm disease research: Cellular and molecular approaches (Editors M.B. Sticklen and J.L. Sherald). Springer-Verlag New York Inc., pp. 322-332.
39. **Wickner R.B., Ghabrial S.A. Bruenm J.A., Buck K., Patterson J.L., Stuart K.D. and Wang C.C. 2000.** Family Totiviridae. In Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses, Academic Press, pp. 491-501.
40. **Xie J., Wei D., Jiang D., Fu Y., Li G., Ghabrial S. and Peng Y. 2006.** Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Journal of General Virology*, (87): 241-249.
41. **Zakian V.A., Wagner D.W. and Fangman W.L. 1981.** Yeast L double-stranded ribonucleic acid is synthesized during the G1 phase but not the S phase of the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 1(8): 673-679.



ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- Δ1. http://education.expasy.org/images/Partitiviridae_virion.jpg
- Δ2. <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%99%CE%BF%CE%AF#.CE.99.CE.BD.CF.84.CE.B5.CF.81.CF.86.CE.B5.CF.81.CF.8C.CE.BD.CE.B5.CF.82>
- Δ3. http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/dasika/kastania/Elkos_Kastanias.htm
- Δ4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/lctv/index.htm>
- Δ5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

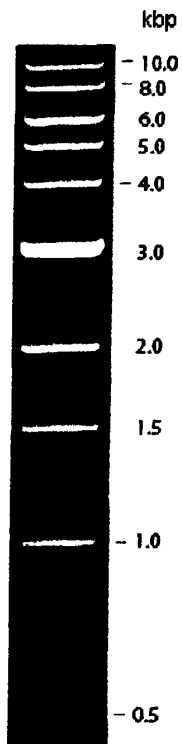
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Επιστημονική Επιτροπή

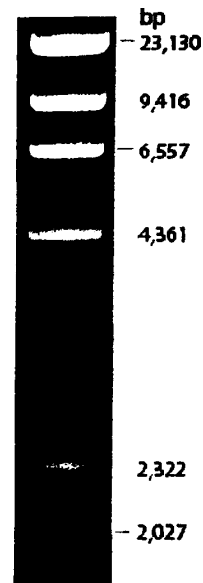
Επιστημονική Επιτροπή



ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΑΡΤΥΡΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΑΖΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ



Εικόνα 28: 1 kb DNA ladder σε πήγμα αγαρόζης 1% (w/v), [0,2 µg/µl] (Dialat Ltd.).



Εικόνα 29: λDNA/*Hind*III σε πήγμα αγαρόζης 1% (w/v), [500 µg/ml] (New England BioLabs Inc.).

