

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Αριθμ. Πρωτοκ. 507
Ημερομηνία 9-10-2015

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Διερεύνηση του αιτίου που προκαλεί την
ασθένεια 'Μωσαϊκό της Συκιάς' στη Θεσσαλία
και την Εύβοια - Ελλάδα**



ΦΙΛΙΠΠΟΥ ΚΙΚΗ

Επιβλέπων: Ευάγγελος Βέλλιος

ΒΟΛΟΣ 2015

14710
15/3

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Ε. Βέλλιος** Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας – Εισηγητής
- 2. Ι. Γούναρης** Καθηγητής – Μέλος
- 3. Γ. Νάνος** Καθηγητής - Μέλος



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 14710/1
Ημερ. Εισ.: 15/03/2016
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός
Κωδικός: ΠΤ-ΦΠΑΠ
2015
ΦΙΛ

Δημοσιεύσεις από τη διατριβή

Συμμετοχές σε συνέδρια

Filippou, K. S., Karoni M. S., Vellios E. K., 2014. Detection of sequences of Badnavirus-1 (FBV-1) and Fig Mosaic Virus (FMV) in figs in Greece. (Poster). *Πρακτικά 17^{ου} Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου*, Βόλος, Ελλάδα, 13-17 Οκτωβρίου 2014, σ. 125

Karoni, M. S., Vellios, E. K., Filippou, K. S., Sano, T., 2015. Viral pathogens occurring in fig-mosaic diseased trees in Greece. (Oral Presentation). *Πρακτικά στο 23rd International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops (ICVF)*, Morioka, Iwate, Japan, 8-12 Ιουνίου 2015, p. 74

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή, κ. Βέλλιου Ευάγγελου.

Με την ολοκλήρωσή της θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τον κ. Βέλλιο ο οποίος μου ανέθεσε να ερευνήσω ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα και με φιλοξένησε στο εργαστήριό του όλο αυτό το διάστημα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της εργασίας, καθώς και για την αστείρευτη υπομονή και επιμονή που έδειξε μέχρις ότου ολοκληρωθεί η διατριβή μου. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις σημαντικές υποδείξεις και την καθοδήγησή του στο εργαστήριο καθώς και τις χρήσιμες παρεμβάσεις του στη διόρθωση της πτυχιακής μου διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στην Μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Λιάνα Παναγιωτάκη η οποία με βοήθουσε καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου μελέτης και έλυνε ακούραστα κάθε απορία μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Δενδροκομίας κ. Νάνο Γεώργιο για το χρόνο που διέθεσε για την ανάγνωση και διόρθωση της πτυχιακής μου μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Γούναρη Ιωάννη οι επισημάνσεις του οποίου βελτίωσαν τη μελέτη μου.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου επίσης θα ήθελα να εκφράσω στη μεταδιδάκτορα Καπώνη Μαρία η οποία με βοήθουσε καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου με πολύ υπομονή και μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου του Χιροσάκι (Hirosaki University) στην Ιαπωνία.

Ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή ιολογίας κ. Sano Teruo που με δέχτηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου του Χιροσάκι (Hirosaki University) στην Ιαπωνία για μία εβδομάδα και μου έδωσε την ευκαιρία να διευρύνω τις γνώσεις μου στην Ιολογία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω:

Στο προσωπικό του Εργαστηρίου Γενετικής και κυρίως στον Καθηγητή κ. Ιμπραήμ Αβραάμ Χα και την κα. Πανάγου Ασήμω για την παραχώρηση του καταψύκτη του εργαστηρίου Γενετικής για τουλάχιστον τρία χρόνια.

Στο προσωπικό του Εργαστηρίου Ιχθυολογίας και κυρίως στον Καθηγητή Γενετικής κ. Εξαδάκτυλο Αθανάσιο για την παροχή πάγου και τη δυνατότητα που μου έδωσε να χρησιμοποιήσω τον καταψύκτη τους για όσο καιρό αυτό χρειάστηκε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους παραγωγούς σύκων κα. Ουρανία και κ. Ιωάννη Μουσέτη που με φιλοξένησαν και με βοήθησαν κατά τη συλλογή δειγμάτων ασθενών φυτών στον Ταξιάρχη Εύβοιας.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω την κ. Κυριακοπούλου που έκανε ό,τι ήταν δυνατό για να βοηθήσει σ' αυτό το πείραμα και που μου έδωσε χρήσιμες συμβουλές και ιδέες, ακόμη και αν αυτό ήταν δύσκολο λόγω απόστασης.

Σημαντική βοήθεια για μένα πρόσφεραν ο φίλος μου Μάριος και η φίλη μου Ρεβέκκα οι οποίοι με υποστήριζαν ψυχολογικά όλον αυτό τον καιρό και μου έδιναν απλόχερα την ενέργειά τους όταν την είχα ανάγκη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου, Λία και Στέλιο, οι οποίοι στήριζαν τις σπουδές μου αλλά και εμένα την ίδια με διάφορους τρόπους φροντίζοντας καθημερινά για την καλύτερη δυνατή παιδεία και μόρφωσή μου.

Περιεχόμενα

Σελίδα

Περίληψη.....	7
Κεφάλαιο I. Εισαγωγή & Βιβλιογραφική Ανασκόπηση.....	8
1.1 Η καλλιέργεια της συκιάς.....	8
1.2 Ασθένεια του Μωσαϊκού της Συκιάς (Fig Mosaic Disease, FMD).....	11
1.3 Αιτιολογία της Ασθένειας του Μωσαϊκού της Συκιάς.....	12
1.3.1 Ιός του μωσαϊκού της συκιάς (<i>Fig Mosaic Virus</i> -FMV).....	12
1.3.2 Badna- ιός της Συκιάς 1 (<i>Fig Badnavirus</i> -1, FBV-1).....	13
1.3.3 Ιός που σχετίζεται με την ποικιλόχρωση στα φύλλα Συκιάς 1 & 2 (<i>Fig Leaf Mottle- associated Virus</i> 1 & 2, FLMaV-1 & 2).....	14
1.3.4 Ιός που σχετίζεται με το ήπιο Μωσαϊκό της Συκιάς (<i>Fig Mild Mottle-associated Virus</i> , FMMAV).....	14
1.3.5 Κρυπτο-ιός της Συκιάς (<i>Fig Cryptic Virus</i> , FCV).....	15
1.3.6 Άρκανσας Clostero-ιός της Συκιάς 1 & 2 (<i>Arkansas Fig Closterovirus</i> 1 & 2, AFCV 1 & 2).....	16
1.3.7 Λανθάνων ιός της Συκιάς (<i>Fig Latent Virus</i> -1, FLV-1).....	16
Κεφάλαιο II. Υλικά & Μέθοδοι.....	18
2.1 Φυτικό Υλικό.....	18
2.2 Εξαγωγή ολικού RNA.....	21
2.3 Εξαγωγή ολικού DNA.....	23
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR).....	24
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	27
2.6 Οριζόντια Ηλεκτροφόρηση.....	32
Κεφάλαιο III. Αποτελέσματα.....	34
Κεφάλαιο IV. Συζήτηση.....	38
Κεφάλαιο V. Συμπεράσματα.....	53
Κεφάλαιο VI. Βιβλιογραφία.....	54
6.1 Διεθνής Βιβλιογραφία.....	54
6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία.....	56
6.3 Ηλεκτρονικές πηγές.....	56

Περίληψη

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η διερεύνηση του αιτίου που προκαλεί την ‘Ασθένεια του Μωσαϊκού της Συκιάς’ (Fig Mosaic Disease, FMD) στην Ελλάδα και πιο συγκεκριμένα στους Νομούς Μαγνησίας και Εύβοιας. Η συγκεκριμένη ασθένεια είναι από τις πλέον διαδεδομένες ασθένειες της συκιάς παγκοσμίως αφού έχει παρατηρηθεί σε κάθε χώρα που καλλιεργείται η συκιά όπως η Αίγυπτος, η Τουρκία, το Ιράν, η Αραβία, η Ισπανία, η Αμερική και πολλές άλλες (Çağlayan *et al.* 2010, Hafez *et al.* 2011, Gattoni *et al.* 2010, Tzanetakis *et al.* 2010, Fernandez *et al.* 2013). Τα προσβεβλημένα δέντρα εμφανίζουν στα φύλλα και τους καρπούς τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της Ασθένειας του Μωσαϊκού όπως μωσαϊκό, χλωρώσεις, χλωρωτικοί δακτύλιοι, παραμορφώσεις και ξηράνσεις (Condit, Horne, 1933, Martelli *et al.* 1993). Αποτέλεσμα είναι η μείωση της εμπορικής αξίας του παραγόμενου προϊόντος και η εξασθένηση των δέντρων αφού καταστρέφεται τμήμα της φυλλικής επιφάνειας (Çağlayan *et al.* 2010, Hafez *et al.* 2011, Gattoni *et al.* 2010, Tzanetakis, *et al.* 2010, Fernandez *et al.* 2013). Για την ανίχνευση του αιτίου επιλέχθηκαν οι μοριακές μέθοδοι της αλυσιδωτής αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) αλλά και της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με γενικευμένους και εξειδικευμένους εκκινητές για τους ήδη γνωστούς ιούς που έχουν βρεθεί και θεωρούνται υπεύθυνοι για την ασθένεια ανά τον κόσμο.

Κεφάλαιο I. Εισαγωγή & Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

1.1 Η καλλιέργεια της συκιάς

Η συκιά (*Ficus carica* L.) ανήκει στην Οικογένεια *Moraceae* και καλλιεργείται κυρίως σε παραμεσόγειες χώρες και σε πεδινές ημιορεινές και ορεινές περιοχές. Αξιοποιώντας στο μέγιστο τις ξηροθερμικές συνθήκες αλλά και τα φτωχά και ασβεστούχα εδάφη αποτελεί ένα από τα πιο κοινά δέντρα της Ασίας, της Μέσης Ανατολής αλλά και των Μεσογειακών χωρών. Κατά τους Ομηρικούς χρόνους τα σύκα ήταν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής των αρχαίων Ελλήνων και θεωρούνταν όχι μόνο πολύτιμο για την υγεία αλλά και ιερό φρούτο. Στην αρχαία Ελλάδα, τα αττικά σύκα θεωρούνταν τα πιο εκλεκτά και η εξαγωγή τους απαγορευόταν με ειδικό νόμο λόγω περιορισμένης παραγωγής τους (Οδύσσεια Η.116, Λ.590, Ω.340). Στη νεότερη Ελλάδα, η καλλιέργεια της συκιάς ήταν πολύ σημαντική καθώς αποτελούσε βασικό διατροφικό στοιχείο ενώ ταυτόχρονα ήταν και ένα από τα κύρια εξαγωγίμα προϊόντα. Πιο συγκεκριμένα, κατά την περίοδο πριν το Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, τα σύκα αντιπροσώπευαν το 20% της αξίας των εξαγωγίμων προϊόντων (F.A.O.). Το 1908, σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων (F.A.O.), ο συνολικός αριθμός των δέντρων στην Ελλάδα αριθμούσε 5.000.000 και η εγχώρια παραγωγή σύκων έφτανε τους 87.000 τόνους. Κάτι που αξίζει να αναφερθεί είναι ότι την περίοδο εκείνη, σε σχέση με την παγκόσμια παραγωγή (1 εκατομμύριο τόνοι), η Ελλάδα ήταν δεύτερη στην κατάταξη μετά την Τουρκία (314.000 τόνοι) και ακολουθούσαν το Ιράν, η Αίγυπτος, το Μαρόκο και η Ισπανία. Το 1996 η παραγωγή σύκων στην Ελλάδα έφτασε τους 90.000 τόνους ενώ το έτος 2003 παρατηρήθηκε μία απότομη πτώση της Ελληνικής παραγωγής σύκων (25.000 τόνοι) με τις καλλιεργούμενες εκτάσεις να φτάνουν τα 65.000 στρέμματα (περίπου 2 εκατομμύρια δέντρα). Το 2007 η παραγωγή σύκων

συνέχισε να είναι πρωτική (20.413 τόνοι), ενώ πρώτη στην παγκόσμια παραγωγή ερχόταν η Αίγυπτος, δεύτερη η Τουρκία και ακολουθούσαν άλλες χώρες της Μεσογείου. Η Ελλάδα εκείνη τη χρονιά έπεσε στην δέκατη θέση. Οι πρώτες πέντε χώρες σε παραγωγή σύκων είναι η Τουρκία (257.394 τόνοι), η Αίγυπτος (203.139 τόνοι), το Μαρόκο (85.558 τόνοι), η Αλγερία (81.667 τόνοι) και το Ιράν (77.482 τόνοι) (μέσος όρος παραγωγής τα έτη 2000-2013, FAOSTAT)

Πλέον, η συκιά στη χώρα μας καλλιεργείται κυρίως στην Πελοπόννησο (Μεσσηνία, Λακωνία), στην Εύβοια (Ταξιάρχης, Κύμη) και σε ορισμένα νησιά του Αιγαίου (Λέσβο, Σάμο, Άνδρο, Νάξο). Οι σπουδαιότερες καλλιεργούμενες ποικιλίες στην Ελλάδα, ποικίλουν από τόπο σε τόπο και είναι η ‘Καλαμών’, η ‘Σμυρναϊκή’, η ‘Κύμης’, τα ‘βασιλικά’ (μαύρα), τα ‘Αργαλαστής’, τα ‘Αϊδωνίου’, τα ‘Πολίτικα’ και άλλες. Λόγω της ικανότητάς της να προσαρμόζεται σε μεγάλο εύρος εδαφών, η συκιά δεν θεωρείται απαιτητική καλλιέργεια, παρόλα αυτά, προσβάλλεται από ορισμένους εχθρούς και ασθένειες που είναι ικανοί να μειώσουν την παραγωγή και να υποβαθμίσουν ποιοτικά το παραγόμενο προϊόν (Ferguson et al., 1990).

Κυριότεροι εχθροί της καλλιέργειας είναι ο κηροπλάστης της συκιάς (*Ceroplastes rusci* L., Homoptera) ή αλλιώς ψώρα της συκιάς, που εμφανίζεται στα φύλλα και στα νεαρά κλαδιά και βλαστούς προκαλώντας καχεξία, κιτρίνισμα και μείωση ζωηρότητας, η μαύρη μύγα των σύκων ή Λογχαία (*Silba adipata* ή *Carpolonchaea aristella*, Diptera), η οποία προσβάλλει τους οφθαλμούς και τα σύκα κάνοντας στοές με αποτέλεσμα πρόωρη πτώση του καρπού. Επίσης σημαντικός εχθρός αποτελεί και η μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*, Diptera) και το άκαρι (*Aceria ficus*, Eriophyidae) το οποίο έχει αποδειχτεί ότι είναι φορέας του ιού του Μωσαϊκού της Συκιάς Fig Mosaic Virus, FMV (Elbeaino et al. 2009). Τέλος,

σοβαρός εχθρός της συκιάς είναι και οι νηματώδεις του Γένους *Meloidogyne* οι οποίοι προκαλούν μειωμένη ανάπτυξη και παραγωγή των δέντρων.

Οι κυριότερες μυκητολογικές ασθένειες που προσβάλλουν τη συκιά οφείλονται σε μύκητες των ειδών *Phytophthora* sp., και *Fusarium* sp.. Επίσης οι καρποί προσβάλλονται από μύκητες τόσο προσυλλεκτικά (*Botrytis cinerea*) όσο και μετασυλλεκτικά (*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp.) (Tous et al. 1996).

Τέλος, αρκετά συχνά εμφανίζεται και η Ασθένεια του Μωσαϊκού της Συκιάς Fig Mosaic Disease (FMD) για την οποία γίνεται αναφορά στην επόμενη παράγραφο.

1.2 Ασθένεια του Μωσαϊκού της Συκιάς (Fig Mosaic Disease, FMD)

Η ασθένεια του μωσαϊκού της συκιάς (FMD) είναι μία παγκοσμίως εξαπλωμένη ασθένεια της συκιάς (*Ficus carica*), η οποία έχει παρατηρηθεί εδώ και χρόνια όχι μόνο σε καλλιεργούμενες συκιές, αλλά και σε μεμονωμένες συκιές σε ιδιόκτητους κήπους ή ακόμα και άγριες. Η πρώτη αναφορά της ασθένειας στην Ελλάδα έγινε το 1953 (Sarejanni et al. 1953). Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα αυτής της ασθένειας ποικίλουν κατά πολύ, ανάλογα με το βαθμό της προσβολής, τη γεωγραφική περιοχή, την ποικιλία του δέντρου αλλά και το αίτιο ή το συνδυασμό των παθογόνων αιτιών που προκαλούν αυτή τη διαταραχή. Τα συμπτώματα εμφανίζονται κυρίως στα φύλλα και μπορεί να είναι μωσαϊκό (ήπιο, έντονο ή φλυκταινώδες), χλωρωτικές κηλίδες, περινεύριες χλωρώσεις, χλωρωτικοί δακτύλιοι, παραμορφώσεις περιφερειακές ξηράνσεις και διάφοροι συνδυασμοί όλων των παραπάνω (Condit, Horne, 1933, Martelli *et al.* 1993). Το παθογόνο αίτιο της ασθένειας δεν ήταν γνωστό και μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι οφείλονταν σε κάποιο ιό με διπλής μεμβράνης ημισφαιρικά σώματα (Double Membrane Bodies, DMBs), ο οποίος μεταδίδονταν με το άκαρι *Aceria ficus* (Elbeaino *et al.* 2009). Αργότερα, έγινε η αλληλούχηση και των τεσσάρων τμημάτων RNA του Ιού του Μωσαϊκού της Συκιάς (Elbeaino *et al.* 2009) που όπως είχε αποδειχτεί ήταν το κύριο παθογόνο αίτιο και ακολούθησαν μελέτες για την παγκόσμια διασπορά του ιού καθώς επίσης και την μολυσματικότητά του. Κατά τις έρευνες σχετικά με τον Ιό του Μωσαϊκού της Συκιάς, παρατηρήθηκαν και άλλα ιικά σωματίδια στους ιστούς φύλλων που έφεραν ή δεν έφεραν συμπτώματα. Κάποιοι ιοί προκαλούσαν συμπτώματα σε δέντρα όπως ο ιός που σχετίζεται με το Ήπιο Μωσαϊκό της Συκιάς ή ακόμη και άλλοι που δεν προκαλούσαν συμπτώματα όπως ο Badna-ιός της Συκιάς (Fig Badnavirus-1) και ο Λανθάνων Ιός της Συκιάς (Fig Latent Virus-1). Στη συνέχεια βρέθηκαν και άλλοι ιοί όπως ο ιός που σχετίζεται με την

Ποικιλόχρωση στα φύλλα Συκιάς 1 & 2 (Fig Leaf Mottle-associated Virus 1 & 2), ο Κρυπτο-ιός της Συκιάς (Fig Cryptic Virus) και οι Άρκανσας Clostero-ιοί 1 & 2 (Arkansas Closterovirus 1 & 2) κάνοντας έτσι αδύνατο το χαρακτηρισμό των ιών από τα συμπτώματα, αφού στις περισσότερες περιπτώσεις στο ίδιο δέντρο συνυπήρχαν περισσότεροι από δύο ιούς.

Η ασθένεια μεταδίδεται με το άκαρι *Aceria ficus*, Eriophyidae (Elbeaino *et al.* 2009), με κοκκοειδή (mealybugs) (Tzanetakis *et al.* 2010), με μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό (Elbeaino *et al.* 2009), με το σπόρο ή τη γύρη (Elbeaino *et al.* 2010) και πιο σπάνια με αφίδες (Tzanetakis *et al.* 2010), ανάλογα βέβαια το παθογόνο αίτιο. Σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις η ‘Ασθένεια του Μωσαϊκού της Συκιάς’ μεταδίδεται πολύ εύκολα, ενώ το ποσοστό προσβεβλημένων δέντρων μέσα στον συκεώνα αυξάνεται εκθετικά. Πλέον, σε κάθε χώρα όπου καλλιεργούνται συκιές, η ασθένεια έχει παρατηρηθεί τονίζοντας έτσι τη σημασία της πρόληψης της ασθένειας σε νέους συκεώνες για την αποφυγή της περαιτέρω εξάπλωσής της. Θα πρέπει κατά τη φύτευση ενός νέου συκεώνα να επιλέγονται υγιή πιστοποιημένα δέντρα, απαλλαγμένα από ιώσεις, ενώ η έγκαιρη καταπολέμηση των εντόμων φορέων είναι πλέον απαραίτητη.

1.3 Αιτιολογία της Ασθένειας του Μωσαϊκού της Συκιάς

1.3.1 Ιός του μωσαϊκού της συκιάς (*Fig Mosaic Virus-FMV*)

Ο ιός χαρακτηρίστηκε ως το κύριο παθογόνο αίτιο της ασθένειας του μωσαϊκού της συκιάς (Fig Mosaic Disease, FMD) (Elbeaino *et al.*, 2009). Ανήκει στην Οικογένεια Bunyaviridae και στο Γένος *Emaravirus* και πρόκειται για ένα τμηματοποιημένο ιό, ο οποίος αποτελείται από τέσσερα μόρια RNA αρνητικής φοράς. Κάθε ένα από αυτά τα μόρια περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open

Reading Frame, ORF) το οποίο κωδικοποιεί και διαφορετική πρωτεΐνη. Τα τμήματα αυτά έχουν μέγεθος 7.093, 2.252, 1.490 και 1.472 νουκλεοτίδια και κωδικοποιούν την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase-RdRp) (1^η πρωτεΐνη 264 kDa), μία γλυκοπρωτεΐνη (2^η πρωτεΐνη 73 kDa), μία νουκλεοκαψιδιακή πρωτεΐνη (3^η πρωτεΐνη 35 kDa) και μία πρωτεΐνη απροσδιόριστης λειτουργίας (4^η πρωτεΐνη 40,5 kDa) αντίστοιχα (Elbeaino *et al.* 2009). Τα σωματίδια του ιού είναι πιθανότατα οι ενδοκυτταρικές κατασκευές οι οποίες περιβάλλονται από φάκελο που περιγράφηκαν ως Double Membrane Bodies- DMBs και απαντώνται συχνά στα κύτταρα του μεσόφυλλου των φύλλων συκιάς που φέρουν συμπτώματα (Bradfute *et al.* 1970, Castellano *et al.* 2007, Elbeaino *et al.* 2007). Ο ιός βρέθηκε ότι μεταδίδεται κυρίως με τον εμβολιασμό, δηλαδή με προσβεβλημένο πολλαπλασιαστικό υλικό, αλλά και με το άκαρι *Aceria ficus* του οποίου βασικός ξενιστής είναι η συκιά (Condit and Horne, 1933, Flock and Wallace, 1955).

1.3.2 Badna- ιός της Συκιάς 1 (Fig Badnavirus-1, FBV-1)

Ανήκει στην Οικογένεια Caulimoviridae, στο Γένος *Badnavirus* και είναι ιός DNA διπλής έλικας (double stranded DNA, dsDNA). Ιοί που ανήκουν στο Γένος *Badnavirus* (όπως ο FBV-1) έχουν γένωμα που αποτελείται από κυκλικό μόριο DNA 7-8 kb (7.140 nts στην περίπτωση του FBV-1) και το ισωμάτιο είναι βακιλόμορφο χωρίς εξωτερικό φάκελο. Το DNA του ισωματίου μπορεί να ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή ή να αντιγράφεται αυτόνομα. Το γένωμα του ιού περιέχει τέσσερα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs) και το κάθε ένα κωδικοποιεί και μία πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από 143, 135, 1837 και 142 αμινοξέα με μοριακές μάζες 15,3, 16,5, 212,3 και 17 kDa αντίστοιχα. Φυτά που δεν έφεραν συμπτώματα συλλέχθηκαν, εξετάστηκαν και βρέθηκαν θετικά για την

παρουσία του ιού εντός των κυττάρων. Επομένως ο ιός δεν προκαλεί συμπτώματα στα δέντρα συκιάς που προσβάλλει (Tzanetakis *et al.* 2010). Φορείς του ιού φαίνεται να είναι κυρίως τα κοκκοειδή (mealybugs) και πιο σπάνια οι αφίδες (Laney *et al.* 2012).

1.3.3 Ιός που σχετίζεται με την ποικιλόχρωση στα φύλλα Συκιάς 1 & 2 (*Fig Leaf Mottle-associated Virus 1 & 2, FLMaV-1 & 2*)

Τα δύο αυτά μέλη της οικογένειας *Closteroviridae* βρέθηκαν σχετικά πρόσφατα (Elbeaino *et al.* 2006, 2007) σε δέντρα συκιάς Ιταλίας και Αλγερίας που έφεραν συμπτώματα, προερχόμενα από το Λίβανο. Στη συνέχεια οι δύο αυτοί ιοί βρέθηκαν στη Νότια Αίγυπτο (Elbeshehy *et al.* 2011), στην Τουρκία (Elci *et al.* 2012), στη Συρία (Elbeaino *et al.* 2012), στην Σαουδική Αραβία (Alhudaib 2012) και στην Ισπανία (Fernandez *et al.* 2013). Ανήκουν στην Οικογένεια *Closteroviridae* και στο Γένος *Closterovirus* και αποτελούνται από νηματοειδή σωματίδια. Πιο συγκεκριμένα, οι FLMaV 1 & 2 είναι ιοί RNA διπλής έλικας μεγέθους 19 Kbp.

1.3.4 Ιός που σχετίζεται με το ήπιο Μωσαϊκό της Συκιάς (*Fig Mild Mottle-associated Virus, FMMaV*)

Βρέθηκε για πρώτη φορά στη Νότια Ιταλία (Elbeaino *et al.* 2010) όταν εξετάστηκαν δέντρα με ελαφρύ μωσαϊκό και μικρή ή καθόλου παραμόρφωση, δηλαδή δέντρα με ηπιότερα συμπτώματα από ότι εμφανίζουν συνήθως δέντρα προσβεβλημένα από την Ασθένεια του Μωσαϊκού της Συκιάς στην Νότια Ιταλία. Ύστερα από εξέταση ιστών φύλλων από τα δέντρα αυτά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο βρέθηκαν νηματοειδή ιοσωμάτια μήκους 2.000 nm. Το RNA εντός αυτών των σωματιδίων ήταν μεγέθους 6.290 νουκλεοτιδίων και έφερε επτά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs) τα οποία κωδικοποιούν μία RNA

εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase-RdRp), μία πρωτεΐνη (6 kDa) που δίνει την ικανότητα στον ιό να προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα (nucleotide-binding properties), μία ομόλογη heat-shock πρωτεΐνη (63 kDa), μία πρωτεΐνη (64 kDa), μία δευτερεύουσα καψιδιακή πρωτεΐνη (Coat Protein minor, CPM) μεγέθους 26 kDa και την κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη (Coat Protein, CP). Αναλύοντας το γένωμα του ιού, παρατηρήθηκε ότι ομοιάζει με αυτό των ιών που ανήκουν στο Γένος *Closterovirus* γι' αυτό και ταξινομήθηκε σ' αυτό το γένος καθώς και στην οικογένεια *Closteroviridae* (Elbeaino *et al.* 2010).

1.3.5 Κρυπτο-ιός της Συκιάς (Fig Cryptic Virus, FCV)

Ανήκει στην Οικογένεια *Partitiviridae* στο Γένος *Alphacryptovirus*. Κατά την εξέταση δέντρων συκιάς χωρίς συμπτώματα στη Νότια Ιταλία, βρέθηκαν σωμάτια που έφεραν δύο μόρια RNA διπλής έλικας 1696 bp (RNA-1) και 1415 bp (RNA-2). Το RNA-1 περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF, 1419 nt) το οποίο κωδικοποιεί μία RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase-RdRp). Το RNA-2 εμπεριέχει επίσης ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF, 1014 nt) το οποίο κωδικοποιεί ένα πολυπεπίδιο (38 kDa), την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού καθώς επίσης και άλλες άγνωστες πρωτεΐνες. Εκτός από την Ιταλία ο ιός έχει ανιχνευτεί σε άλλες πέντε Μεσογειακές χώρες (Αλβανία, Αλγερία, Λίβανο, Συρία και Τυνησία) χωρίς όμως να προκαλεί εμφανή συμπτώματα. Είναι γνωστό ότι φυτικοί ιοί που είναι μέλη της Οικογένειας *Partitiviridae* μεταδίδονται μέσω του σπόρου και της γύρης και όχι μηχανικά ή μέσω εμβολιασμού. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η συγκέντρωση του ιού στα προσβεβλημένα δέντρα είναι πολύ χαμηλή ενώ αμφισβητείται κατά πόσο έχει οικονομική επίπτωση στις καλλιέργειες (Elbeaino *et al.* 2011).

1.3.6 Αρκάνσας Clostero-ϊός της Συκιάς 1 & 2 (Arkansas Fig Closterovirus 1 & 2, AFCV 1 & 2)

Ανήκουν στην Οικογένεια Closteroviridae στο Γένος *Closterovirus*. Αρχικά βρέθηκαν στο Αρκάνσας των Ηνωμένων Πολιτειών (Tzanetakis *et al.* 2010) σε συμπτωματικά δέντρα, ενώ παρατηρήθηκε ότι ο AFCV-2 ήταν ευρύτατα διαδεδομένος, καθότι βρέθηκε στα περισσότερα συμπτωματικά δέντρα σε αντίθεση με τον AFCV-1 ο οποίος δεν είναι τόσο διαδεδομένος. Αργότερα, ο AFCV-1 βρέθηκε στην Τουρκία (Elci *et al.* 2012), ενώ σε κανένα από τα δείγματα με συμπτώματα που εξετάστηκαν δεν βρέθηκε ο AFCV-2 κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τη διασπορά των ιών στο Αρκάνσας. Οι φορείς των συγκεκριμένων ιών δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστοί, αλλά αρκετοί Clostero-ιοί του Γένους *Closterovirus* μεταδίδονται με αφίδες (Tzanetakis *et al.* 2010). Συνεπώς είναι πολύ πιθανό, η διασπορά του ιού να γίνεται μέσω αυτών των εντόμων (Tzanetakis *et al.* 2010).

1.3.7 Λανθάνων ιός της Συκιάς (Fig Latent Virus -1, FLV-1)

Πρόκειται για ένα ιό με νηματοειδή σωματίδια μήκους περίπου 700 nm, ο οποίος είναι πολύ διαδεδομένος σε συκεώνες της Νότιας Ιταλίας (Απούλια). Αναλύοντας το γένωμα του ιού, παρατηρήθηκε ότι ομοιάζει πολύ με διάφορα μέλη που ανήκουν στην Οικογένεια *Flexiviridae* στο Γένος *Trichovirus*, συνεπώς ταξινομήθηκε σε αυτό το Γένος (Gattoni *et al.* 2010). Για τη μελέτη της εξάπλωσης του ιού εξετάστηκαν δέντρα συκιάς που έφεραν ή δεν έφεραν συμπτώματα από διαφορετικές χώρες (Ελλάδα, Βοσνία- Ερζεγοβίνη, Μαυροβούνιο, Ουγγαρία, Πορτογαλία, Γαλλία, Αγγλία, Καλιφόρνια, Μεξικό και Νότια Αφρική), καθώς επίσης και σπορόφυτα χωρίς συμπτώματα για τη διερεύνηση της μετάδοσης του ιού μέσω του

σπόρου. Όσον αφορά τα δένδρα (με ή χωρίς συμπτώματα), ο ιός βρέθηκε σε σχετικά μεγάλο ποσοστό δειγμάτων (68 %) και σε μεγάλη συγκέντρωση. Επίσης αναφέρεται ότι ο ιός βρέθηκε σε μεγάλο ποσοστό σε δέντρα χωρίς συμπτώματα (40%) κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο FLV-1 δεν σχετίζεται άμεσα με τα συμπτώματα της Ασθένειας του Μωσαϊκού της Συκιάς (Gattoni *et al.* 2010). Αναφορικά με τα σπορόφυτα από προσβεβλημένα δέντρα, ο ιός βρέθηκε σε μεγάλο ποσοστό (80-100%) γεγονός που αποδεικνύει την ικανότητα του ιού να μεταδίδεται εύκολα μέσω του σπόρου (Castellano *et al.* 2009). Έρευνες για την ανίχνευση του ιού σε δέντρα συκιάς έγιναν σε Συρία, Ισπανία και Τουρκία και ο ιός βρέθηκε στη Συρία (Elbeaino *et al.* 2012) και την Τουρκία (Elci *et al.* 2012).

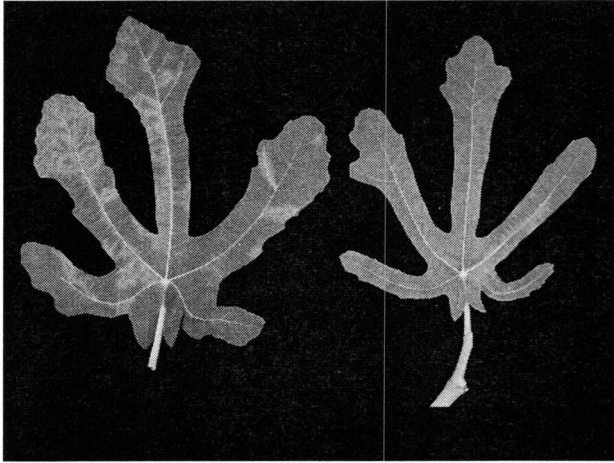
Κεφάλαιο II. Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Φυτικό Υλικό

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με κριτήριο την ύπαρξη συμπτωμάτων στα φύλλα συκιάς (*Ficus carica*), όπως μωσαϊκό, φλυκταινώδες μωσαϊκό, περινεύριες χλωρώσεις, χλωρωτικοί δακτύλιοι, παραμορφώσεις και ξηράνσεις (Εικόνες 2.1.1- 2.1.6). Συνολικά συλλέχθηκαν 58 δείγματα εκ των οποίων 29 από το Νομό Μαγνησίας (Ν. Δημητριάδα, Ν. Ιωνία, Καλά Νερά, Παλαιά Βόλου και Μπούφα) και τα οποία προέρχονταν από άγριες συκίες (*Ficus carica caprificus*) ή μεμονωμένα δέντρα σε ιδιόκτητους κήπους. Τα 28 από τα 29 δείγματα έφεραν συμπτώματα, ενώ ένα δείγμα δεν εμφάνιζε συμπτώματα και συλλέχτηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Τα υπόλοιπα 29 προέρχονταν από καλλιεργούμενες συκίες του Νομού Εύβοιας (περιοχή Ταξιάρχης) ποικιλίας ‘Σμυρναϊκή’ και έφεραν συμπτώματα (Πίνακας 2.1.1). Η συλλογή έγινε το Φθινόπωρο του 2013, το Φθινόπωρο του 2014 και την Άνοιξη του 2015. Αναφέρεται ότι το κάθε δείγμα αποτελούνταν από πέντε έως δέκα φύλλα. Η μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο γινόταν με προσθήκη πάγου, ενώ αμέσως μετά τη δειγματοληψία, τα φύλλα αποθηκεύονταν στους -80°C έως ότου γίνει η επεξεργασία τους.

Πίνακας 2.1.1 Αριθμός και είδος δειγμάτων που συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

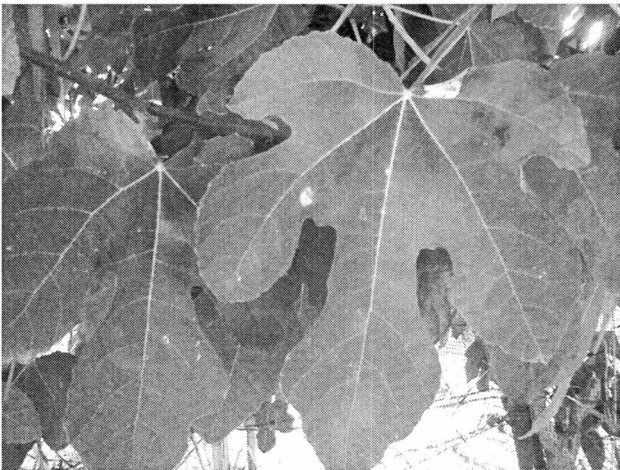
Είδος φυτού	Αριθμός δειγμάτων			Νομός
	Σύνολο	Με συμπτώματα	Χωρίς συμπτώματα	
Συκιά (<i>Ficus carica</i>)	58			
Αυτοφυής		28	1	Μαγνησίας
Ατομικές				
Καλλιεργούμενες		29	0	Εύβοιας



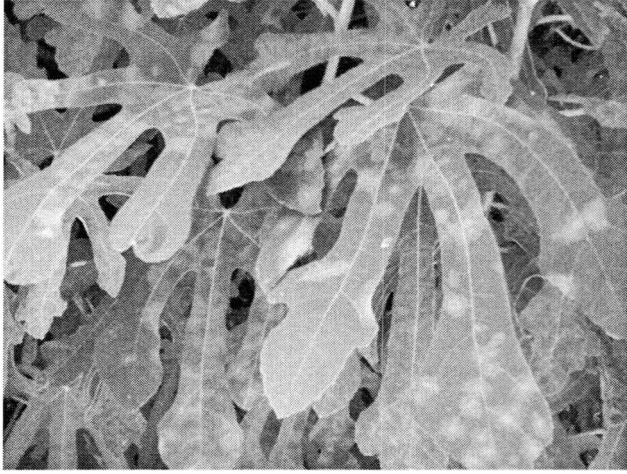
Εικόνα 2.1.1 Φύλλα με συμπτώματα παραμόρφωσης και χλωρωτικών κηλίδων.



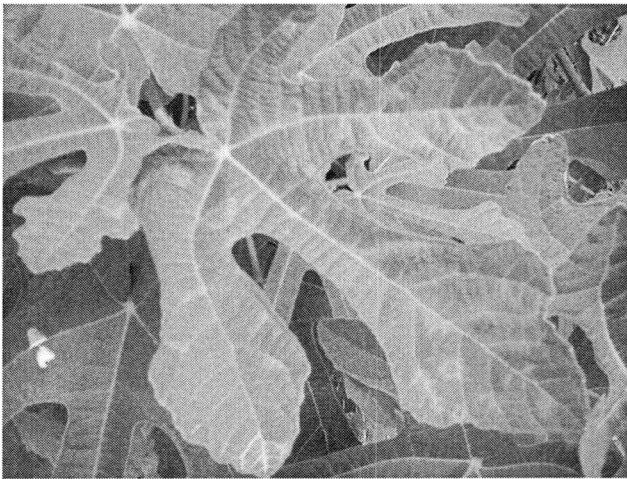
Εικόνα 2.1.2 Φύλλα με συμπτώματα μωσαϊκού και περιφερειακής νέκρωσης.



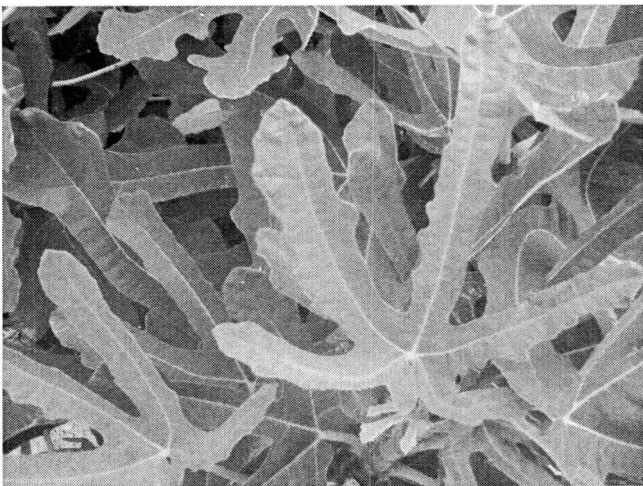
Εικόνα 2.1.3 Φύλλα με σύμπτωμα περινεύριας χλώρωσης.



Εικόνα 2.1.4 Φύλλα με συμπτώματα χλωρωτικών κηλίδων και παραμορφώσεων.



Εικόνα 2.1.5 Φύλλα με εμφανή συμπτώματα περινεύριας χλώρωσης και δακτυλιωτών κηλίδων.



Εικόνα 2.1.6. Φύλλα με συμπτώματα φλυκταινώδους μοσαϊκού και παραμόρφωσης.

2.2 Εξαγωγή ολικού RNA

Για την ανίχνευση των RNA ιών έγινε εξαγωγή ολικού RNA από 29 δείγματα φυτών συκιάς με ή χωρίς συμπτώματα από το Νομό Μαγνησίας και από 16 δείγματα από το Νομό Εύβοιας, με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τον S. A. MacFarlane (2001).

Αρχικά έγινε λειοτριβήση των δειγμάτων με υγρό άζωτο σε γουδιά και στη συνέχεια 100 mg λειοτριβημένου ιστού μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο μικροσωληνίσκο τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml. Επιλέχθηκαν τμήματα των φύλλων που έφεραν συμπτώματα χωρίς όμως παρουσία νεκρού ιστού. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος TLES (0,1 M LiCl, 100 mM tris-HCl pH: 8,0, 10 mM EDTA, 1% SDS) και αρχικά έγινε ένας καθαρισμός με φαινόλη (προσθήκη 400 μl φαινόλης, pH: 5,0). Ακολούθησε ανάδευση (σε αναδευτήρα τύπου Vortex) για 1 λεπτό και κατόπιν έγινε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά (20.800 g). Στη συνέχεια, συλλέχθηκε όλο το υπερκείμενο (400 μl) σε νέο μικροσωληνίσκο τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml και έγινε δεύτερος καθαρισμός του δείγματος προσθέτοντας 200 μl χλωροφορμίου και 200 μl φαινόλης. Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος (σε αναδευτήρα τύπου Vortex) για 1 λεπτό και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά (20.800 g). Το ίζημα απορρίφθηκε, ενώ το υπερκείμενο συλλέχθηκε και έγινε και δεύτερος καθαρισμός με 200 μl χλωροφορμίου και 200 μl φαινόλης. Μετά τη φυγοκέντρωση για 5 λεπτά (20.800 g), το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο σωληνίσκο και ελέγχθηκε η διαύγειά του. Εάν κρινόταν απαραίτητο, ακολουθούσε και τρίτος καθαρισμός του δείγματος με φαινόλη και χλωροφόρμιο. Στο τελικό υπερκείμενο (400 μl) ακολούθησε προσθήκη ίσου όγκου χλωριούχου λιθίου -LiCl 4M (400 μl). Έγινε γρήγορη ανάδευση (με αναδευτήρα τύπου Vortex) για λίγα δευτερόλεπτα και ακολούθησε παραμονή στους -20° C για 2

έως 12 ώρες. Κατόπιν ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά (20.800 g) και απορρίφθηκε το υπερκείμενο (υδατική φάση). Το ίζημα πλύθηκε με 70% αιθανόλη (EtOH) (προσθήκη 170 μl EtOH 70%, φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 20.800 g και απομάκρυνση της αιθανόλης). Κατόπιν σύντομης παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 20μl νερό DEPC και αποθηκεύτηκε στους -80°C .

2.3 Εξαγωγή ολικού DNA

Για την ανίχνευση του Badna-ιού της Συκιάς (FBV) έγινε εξαγωγή του DNA 21 φύλλων που έφεραν συμπτώματα από το Νομό Μαγνησίας και 29 φύλλων που έφεραν συμπτώματα από το Νομό Εύβοιας, βάση του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους W. Jarausch, ALPlanta-IPR, Neustadt, Germany (2010).

Σε κάθε δείγμα βάρους 1g ιστού προστέθηκαν 6 ml ρυθμιστικού διαλύματος TEXDir (CTAB 2%, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% PVP 25) μέσα σε θήκες εξαγωγής χυμού τύπου ELISA (BIOREBA Extraction Bags) και ακολούθησε ομογενοποίησή τους με τη βοήθεια ομογενοποιητή χειρός (BIOREBA). Από το χυμό που προέκυψε, μεταφέρθηκαν 2ml σε ένα αποστειρωμένο σωλήνα τύπου erpendorf χωρητικότητας 2 ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 4 λεπτά (2200 g). Μεταφέρθηκε 1 ml από το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf χωρητικότητας 2 ml και επώαστηκε στο υδατόλουτρο στους 65° C για 30-60 λεπτά. Ακολούθησε καθαρισμός του δείγματος με τη χρήση μίγματος φαινόλης: χλωροφορμίου (1: 1) ίσου όγκου με το υπερκείμενο, δηλαδή προστέθηκαν σε 1 ml δείγματος 500 μl φαινόλη και 500 μl χλωροφόρμιο. Έγινε καλή ανάδευση μέχρις ότου το μίγμα να πάρει μορφή γαλακτώματος. Αμέσως μετά, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά (19000 g). Ακολούθησε μεταφορά 800 μl από το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml και προστέθηκαν 640 μl ισοπροπανόλης. Το μίγμα ανακινήθηκε έντονα και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά να επωαστεί (ώστε να πραγματοποιηθεί η συμπύκνωση του DNA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά (19000 g) στους 4° C και στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα πλύθηκε με 500 μl αιθανόλης (EtOH). Έγινε γρήγορη ανάδευση (Vortex) μέχρι να επιπλεύσει το ίζημα και αμέσως μετά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά (19000 g) στους 4° C. Το υπερκείμενο

απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl νερό DEPC και αποθήκευσή του στους -20° C έως να χρησιμοποιηθεί για PCR.

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)

Στα δείγματα που συλλέχθηκαν έγινε αντίστροφη μεταγραφή (δημιουργία συμπληρωματικής αλυσίδας DNA- cDNA από μητρική αλυσίδα RNA) με εκκινητές που φαίνονται στον Πίνακα 2.4.1. Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, σε μικροσωληνίσκο τύπου Eppendorf προστέθηκαν (για κάθε δείγμα) 1 μl εκκινητής, διάλυμα ολικού RNA (ποσότητα που κυμαίνεται από 340-1540 ng) και υπερκάθαρο νερό (μετά από επεξεργασία με DEPC για καταστροφή της ριβονουκλεάσης), ώστε ο τελικός όγκος να είναι 11,5 μl. Το μίγμα θερμάνθηκε στους 70° C για 10 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετήθηκε στον πάγο για 2-5 λεπτά.

Ακολούθησε το δεύτερο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης κατά το οποίο στο μίγμα προστέθηκαν 4 μl 5x ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (Invitrogen, 250 mM Tris-HCl, pH 8.3 σε θερμοκρασία δωματίου, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 μl DTT (0,1 M), 1 μl μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων (10 mM dNTPs), 1 μl αντίστροφη μεταγραφάση του ιού Moloney Murine Leukemia- MMLV (Invitrogen, 200 U/μl) και 0,5 μl παρεμποδιστή ριβονουκλεάσης RNase OUTTM (40 U/μl) έτσι ώστε ο συνολικός όγκος των αντιδρώντων να είναι 20 μl. Το μίγμα των αντιδρώντων θερμάνθηκε στους 37° C για 60 λεπτά. Στο τέλος της αντίδρασης προστέθηκαν 80 μl (DEPC) με τελικό όγκο 100 μl. Ως αρνητικός μάρτυρας θεωρήθηκε μία αντίδραση που αντί για προσθήκη RNA έγινε προσθήκη υπερκάθαρου (MilliQ) νερού. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-PCR φαίνονται στον Πίνακα 2.4.2.

Πίνακας 2.4.1 Δείγματα και εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-PCR.

Δείγματα (Κωδικός αριθμός δείγματος)	Εκκινητής	Βιβλιογραφία
4, 6, 8, 9, 13, 18, 20, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 (Ν. Μαγνησίας)	FMV R (RdRp)	Elbeaino <i>et al.</i> 2009
	FMV R (NC)	Elci <i>et al.</i> 2013
	FMMaV R	Elbeaino <i>et al.</i> 2010
	FCV R	Elbeaino <i>et al.</i> 2011
	FLV-1 R	Gattoni <i>et al.</i> 2009
	FLMaV-1 R	Elbeaino <i>et al.</i> 2006
	FLMaV-2 R	Elbeaino <i>et al.</i> 2006
	FLMaV-1 R	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010
	FLMaV-2 R	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010
	AFCV-1 R	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010
	AFCV-2 R	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010
1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 23, 24 (Ν. Εύβοιας)	FMV R (RdRp)	Elbeaino <i>et al.</i> 2009

Πίνακας 2.4.2 Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-PCR.

FMV RdRp	5'-AACACTGTTTTTGCGATTGG	Elbeaino <i>et al.</i> 2009
FMV R Nucleocapsid	5'-TCTACTACATTCTACACATTCACAC	Elci <i>et al.</i> 2013
FMMaV R	5'-TATTACGCGCTTGAGGATTGC	Elbeaino <i>et al.</i> 2010
FCV R	5'-CGCATCCACAGTATCCCATT	Elbeaino <i>et al.</i> 2011
FLV-1 R	5'-TCGAAGGCCAGAGTTGATGCA	Gattoni <i>et al.</i> 2009
FLMaV-1 R	5'-TATCAAGTCGCAATAGGGGGAA	Elbeaino <i>et al.</i> 2006
FLMaV-2 R	5'-GAACAGTGCCTATCAGTTTGATTTG	Elbeaino <i>et al.</i> 2006
FLMaV-1 R	5'-ACGTGTCTGATGGGGA	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010
FLMaV-2 R	5'-CCTAGTCGGAGTGGATT	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010
AFCV-1 R	5'-ATGCTTCCTCGGCTGC	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010
AFCV-2 R	5'-ACCCGCTAGAGTAATCAGTCAGTCAAGTT	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα καθώς και η αλληλουχία τους δίνονται στον Πίνακα 2.5.1.

Η κάθε αντίδραση περιείχε 2,5 μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα Taq Buffer NEB (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, pH 8.3), 1,5 μl επιπλέον MgCl₂ 25 mM, 0,5 μl από κάθε εκκινητή 10 mM, 2,5 μl μείγμα νουκλεοτιδίων 2 mM (dNTPs), 0,5 μl πολυμεράσης Taq (LA HS Taqara) 5 U/μl και 18 μl υπερκάθαρο (MilliQ) νερό.

Για όλα τα ζεύγη εκκινητών έγιναν επιπλέον αντιδράσεις όταν αντί για προσθήκη DNA έγινε προσθήκη νερού. Αυτές οι αντιδράσεις θεωρήθηκαν αρνητικοί μάρτυρες.

Πίνακας 2.5.1 Εκκινητές, οι αλληλουχίες τους και τα δείγματα για τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις PCR.

Ζεύγος Εκκινητών	Αλληλουχία	Βιβλιογραφία	Κωδικός αριθμός δειγμάτων	
FMV RdRp	F 5'-CGGTAGCAAATGGAATGAAA R 5'-AACACTGTTTTTGCATTGG	Elbeaino <i>et al.</i> 2009	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 20, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 (N. Μαγνησίας)	
FMV-Nucleocapsid (Random)	F 5'-AAGAGAAACAGAACGAGCAC R 5'-TCTACTACATTCTACACATTACACAC	Elci <i>et al.</i> 2013		
FBV	F 5'-ACCAGACGGAGGGAAGAAAT R 5'-TCCTTGCCATCGGTTATCTC	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010		
FMMaV	F 5'-AAGGGGAATCTACAAGGGTCG R 5'-TATTACGCGCTTGAGGATTGC	Elbeaino <i>et al.</i> 2010		
FCV	F 5'-TCGGATTGTCTTTGGAGAGG R 5'-CGCATCCACAGTATCCCATT	Elbeaino <i>et al.</i> 2011		
FLV-1	F 5'-CTGTATCTGTCATTACCTCTTCGGG R 5'-TCGAAGGCCAGAGTTGATGCA	Gattoni <i>et al.</i> 2009		
FLMaV-1 (N17)	F 5'-CGTGGCTGATGCAAAGTTTA R 5'-TATCAAGTCGCAATAGGGGGAA	Elbeaino <i>et al.</i> 2006		
FLMaV-2 (F3)	F 5'-GAACAGTGCCTATCAGTTTGATTTG R 5'-TCCCACCTCCTGCGAAGCTAGAGAA	Elbeaino <i>et al.</i> 2006		
FLMaV-1	F 5'-GGGTTGGAGTTCGGG R 5'-ACGTGTCTGATGGGGA	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010		
FLMaV-2	F 5'-ACTTGCACCCGATAA R 5'-CCTAGTCGGAGTGGATT	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010		
AFCV-1	F 5'-CTGTATCTGTCATTACCTCTTCGGG R 5'-ATGCTTCCTCGGCTGC	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010		
AFCV-2	F 5'-GTTCGGAATTAGTTAATAGATACGGT C R 5'-ACCCGCTAGAGTAATCAGTCAGTCAA GTT	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010		
FMV RdRp	F 5'-CGGTAGCAAATGGAATGAAA R 5'-AACACTGTTTTTGCATTGG	Elbeaino <i>et al.</i> 2009		1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 (N. Εύβοιας)
FBV	F 5'-ACCAGACGGAGGGAAGAAAT R 5'-TCCTTGCCATCGGTTATCTC	Tzanetakis <i>et al.</i> , 2010		

Τα θερμοκρασιακά προφίλ της κάθε αντίδρασης δίνονται στους Πίνακες 2.5.2., 2.5.3., 2.5.4., 3.5.5.

Πίνακας 2.5.2 Θερμοκρασιακό προφίλ της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με το ζεύγος εκκινητών FBV-1 F, FBV-1 R, FMV-NC F, FMV-NC R, FLV-1 F, FLV-1 R, FLMaV-1(N17) F, FLMaV-1(N17) R, FLMaV-2 (F3) F, FLMaV-2 (F3) R για τους ιούς FBV-1, FMV-NC, FLV-1 και FLMaV-1, FLMaV-2 (Elbeaino *et al.* 2006) αντίστοιχα.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρονικό διάστημα	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	10 λεπτά	1
Αποδιάταξη	94	30 δευτερόλεπτα	35
Υβριδισμός των εκκινητών	55	30 ή (45 FMV) δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση των εκκινητών	72	45 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση	72	10 λεπτά	1
Θερμικό Σοκ	4	1 ώρα	1

Πίνακας 2.5.3 Θερμοκρασιακό προφίλ της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με το ζεύγος εκκινητών FMV F, FMV R, FCV F και FCV R για τους ιούς FMV RdRp και FCV αντίστοιχα.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρονικό διάστημα	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	10 λεπτά	1
Αποδιάταξη	94	30 δευτερόλεπτα	35
Υβριδισμός των εκκινητών	50	30 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση των εκκινητών	72	45 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση	72	10 λεπτά	1
Θερμικό Σοκ	4	1 ώρα	1

Πίνακας 2.5.4 Θερμοκρασιακό προφίλ της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με το ζεύγος εκκινητών FMMAV F και FMMAV R για τον ιό FMMAV.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρονικό διάστημα	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	10 λεπτά	1
Αποδιάταξη	94	30 δευτερόλεπτα	35
Υβριδισμός των εκκινητών	58	30 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση των εκκινητών	72	45 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση	72	10 λεπτά	1
Θερμικό Σοκ	4	1 ώρα	1

Πίνακας 2.5.5 Θερμοκρασιακό προφίλ της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με το ζεύγος εκκινητών AFCV-1 F, AFCV-1 R, AFCV-2 F, AFCV-2 R για τους ιούς AFCV-1 και AFCV-2 αντίστοιχα.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρονικό διάστημα	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	10 λεπτά	1
Αποδιάταξη	94	30 δευτερόλεπτα	35
Υβριδισμός των εκκινητών	60	30 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση των εκκινητών	72	45 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση	72	10 λεπτά	1
Θερμικό Σοκ	4	1 ώρα	1

Πίνακας 2.5.6 Θερμοκρασιακό προφίλ της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με το ζεύγος εκκινητών FLMAV-1 F, FLMAV-1 R, FLMAV-2 F, FLMAV-2 R για τους ιούς FLMAV-1 και FLMAV-2 με εκκινητές των Tzanetakis *et al.* 2010.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρονικό διάστημα	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	10 λεπτά	1
Αποδιάταξη	94	30 δευτερόλεπτα	35
Υβριδισμός των εκκινητών	55	10 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση των εκκινητών	72	90 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση	72	10 λεπτά	1
Θερμικό Σοκ	4	1 ώρα	1

2.6. Οριζόντια Ηλεκτροφόρηση

Για την ανάλυση των προϊόντων της PCR έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1,5 % σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE (8,9 mM Tris-HCl, 8,9 mM βορικού οξέος, 0,1 mM EDTA pH 8.0) με τη χρήση συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (mini electrophoresis unit, Sigma-Aldrich). Αναμείχθηκαν 10 μl DNA από κάθε προϊόν της PCR με 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης πήγματος (2,5 % Ficoll Type 400, 11 mM EDTA, 3,3 mM Tris-HCl, 0,017 % SDS, 0,015 % bromophenol blue, pH 8.0) και τοποθετήθηκαν στα βοθρία της πηκτής. Ως δείκτης μοριακού βάρους τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε Marker 100 bps (New England Biolabs, NEB). Η ηλεκτοφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 100 V και 65 mA και διήρκησε 45 λεπτά. Αφού τελείωσε η ηλεκτροφόρηση, έγινε χρώση της πηκτής με εμβάπτιση σε διάλυμα βρωμιούχου αιθυδίου (Sigma 1,6 μl/ml) (200 ml TBE, 4 μl βρωμιούχο αιθύδιο) για 45 λεπτά και ακολούθησε έκπλυση σε αποσταγμένο νερό για 2 λεπτά. Τέλος για να γίνουν ορατές οι ζώνες των προϊόντων (DNA), ακολούθησε απεικόνιση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (360 nm) και φωτογράφιση της πηκτής. Το μέγεθος των τμημάτων του DNA καθοριζόταν με βάση τον δείκτη μοριακού βάρους.

Κεφάλαιο III. Αποτελέσματα

Στα δείγματα συκιάς που εξετάστηκαν με τις μεθόδους RT-PCR και PCR ανιχνεύτηκαν ο Ιός του Μωσαϊκού της Συκιάς (το γονίδιο της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης του FMV και το γονίδιο της νουκλεοκαψιδιακής πρωτεΐνης του FMV), ο Badna- ιός της Συκιάς-1 (FBV-1), ο Ιός που σχετίζεται με την ποικιλόχρωση στα φύλλα Συκιάς-1 (FLMaV-1), ο Κρυπτο-ιός της Συκιάς (FCV) και ο Λανθάνων Ιός της Συκιάς 1 (FLV-1).

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1 εξετάστηκαν 36 δείγματα για μόλυνση από τον ιό FMV (20 δείγματα από Μαγνησία και 16 από Εύβοια). Από αυτά, 7 βρέθηκαν με μόλυνση από τον ιό, ενώ όλα προέρχονταν από το Ν. Μαγνησίας. Τα προϊόντα είχαν το αναμενόμενο μέγεθος των 302 bp, όπως φαίνεται στο πήγμα αγαρόζης μετά από οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 3.1, 3.3 και 3.8). Από τα 16 δείγματα του Νομού Εύβοιας, δεν βρέθηκε κανένα θετικό, όπως φαίνεται και στην οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 3.9).

Εξετάστηκαν επίσης 58 δείγματα για μόλυνση από τον ιό FBV-1 (29 δείγματα από Μαγνησία και 29 από Εύβοια). Από αυτά βρέθηκαν 10 με μόλυνση από τον ιό, ενώ και τα δέκα προέρχονταν από τη Μαγνησία. Τα προϊόντα της PCR έδωσαν το αναμενόμενο μέγεθος των 474 bp όπως φαίνεται και στις οριζόντιες ηλεκτοφορήσεις (Εικόνα 3.1 και 3.6). Από τα 29 δείγματα του Νομού Εύβοιας, δεν βρέθηκε κανένα θετικό (Εικόνα 3.10).

Εξετάστηκαν 12 δείγματα από τη Μαγνησία για μόλυνση από τον ιό FLMaV-1. Από αυτά, 9 δείγματα βρέθηκαν με μόλυνση. Πιο συγκεκριμένα, 8 από τα 12 προϊόντα της PCR έδωσαν το αναμενόμενο μέγεθος των 580 bp χρησιμοποιώντας εξειδικευμένο εκκινητή για τον FLMaV-1 (Tzanetakis *et al.* 2010) όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4, ενώ 5 από τα 12 προϊόντα της PCR έδωσαν το αναμενόμενο μέγεθος

των 350 bp χρησιμοποιώντας διαφορετικό εκκινητή για τον FLMaV-1 (N17) (Elbeaino *et al.* 2006) όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.7.

Εξετάστηκαν 12 δείγματα από τη Μαγνησία για μόλυνση από τον ιό FLMaV-2 όμως δεν βρέθηκε κανένα θετικό. Για τον συγκεκριμένο ιό έγινε PCR στα δείγματα με δύο ειδών εξειδικευμένους εκκινητές, τον FLMaV-2 (Tzanetakakis *et al.* 2010) όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4 και τον FLMaV-2 (F3) (Elbeaino *et al.* 2006) όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.7.

Όσον αφορά τον AFCV-1 και AFCV-2, από τα 12 δείγματα του Ν. Μαγνησίας που εξετάστηκαν δε βρέθηκε κανένα θετικό. Τα αποτελέσματα της PCR φαίνονται στην οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 3.2).

Τα 12 δείγματα του Ν. Μαγνησίας εξετάστηκαν επίσης για μόλυνση από τον ιό FMMaV και FCV όμως δεν βρέθηκε κανένα θετικό καθότι τα προϊόντα της PCR δεν είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα των 308-311 bp για τον FMMaV, όπως φαίνεται και στην οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 3.5). Επίσης δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα στον FCV (δεν βρέθηκαν προϊόντα μεγέθους 353 bp για τον FCV).

Τέλος, εξετάστηκαν τα 12 δείγματα του Ν. Μαγνησίας για μόλυνση από τον ιό FLV-1. Από αυτά 7 βρέθηκαν με μόλυνση από τον ιό όπως φαίνεται και στην οριζόντια ηλεκτροφόρηση της PCR (Εικόνα 3.5).

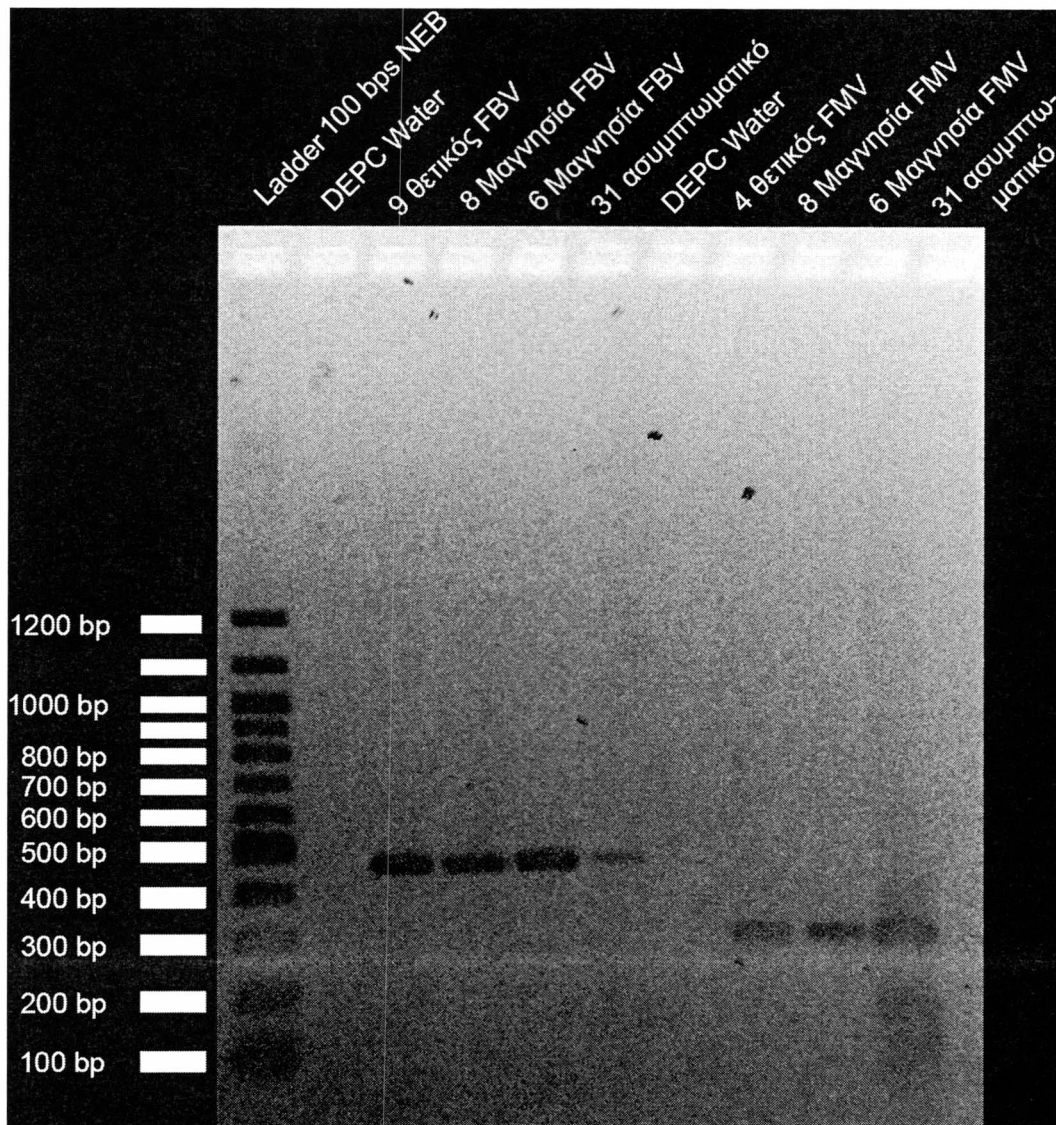
Πίνακας 3.1 Δείγματα του Ν. Μαγνησίας που εξετάστηκαν για τους ιούς FMV, FBV-1, FLMaV-1, FLMaV-2, FMMaV, FCV, AFCV-1, AFCV-2 και FLV-1.

Ιός	FMV	FBV	FLMaV	FLMaV	FMMa	FCV	AFCV	AFCV	FLV
Δείγμα		1	1	2	V		1	2	1
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

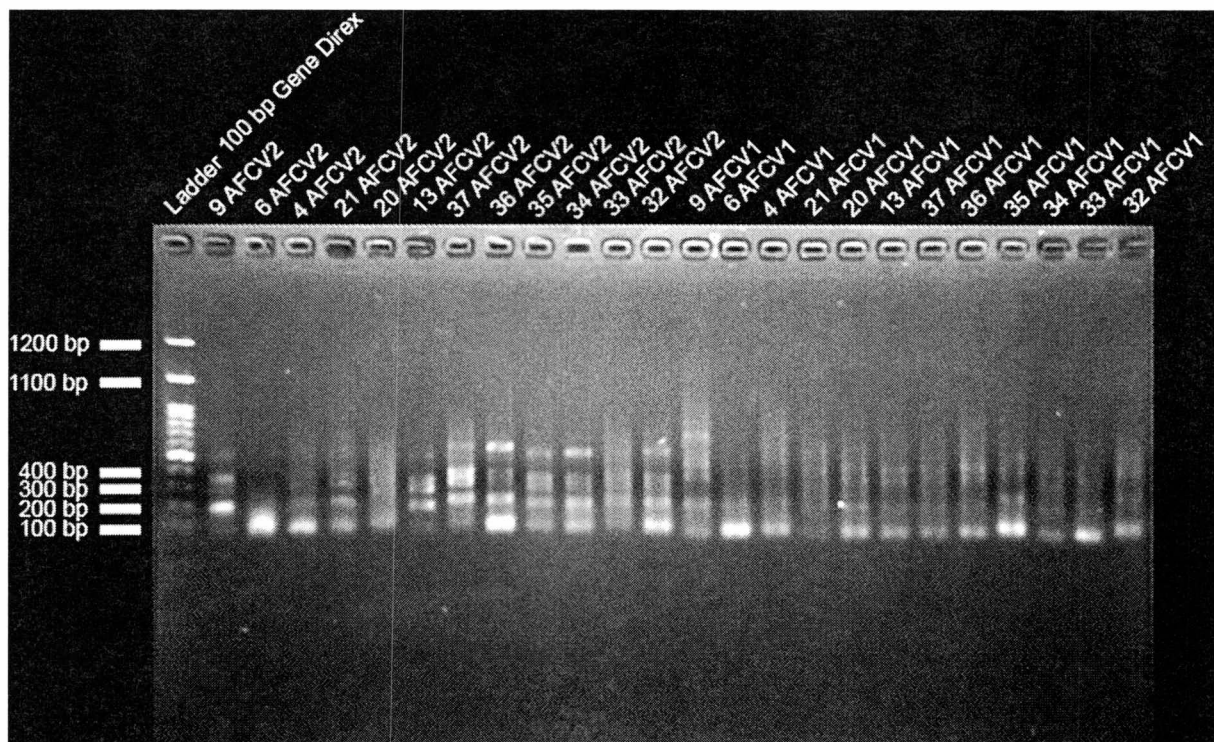
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	-	-	-	-	-	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	+	-	-	-	-	-	+
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	+	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	+	+	-	-	-	-	-	-
34	+	+	+	-	-	-	-	-	-
35	-	+	+	-	-	-	-	-	+
36	+	+	+	-	-	-	-	-	+
37	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Πίνακας 3.2 Δείγματα του Ν. Εύβοιας που εξετάστηκαν για τους ιούς FMV και FBV-1.

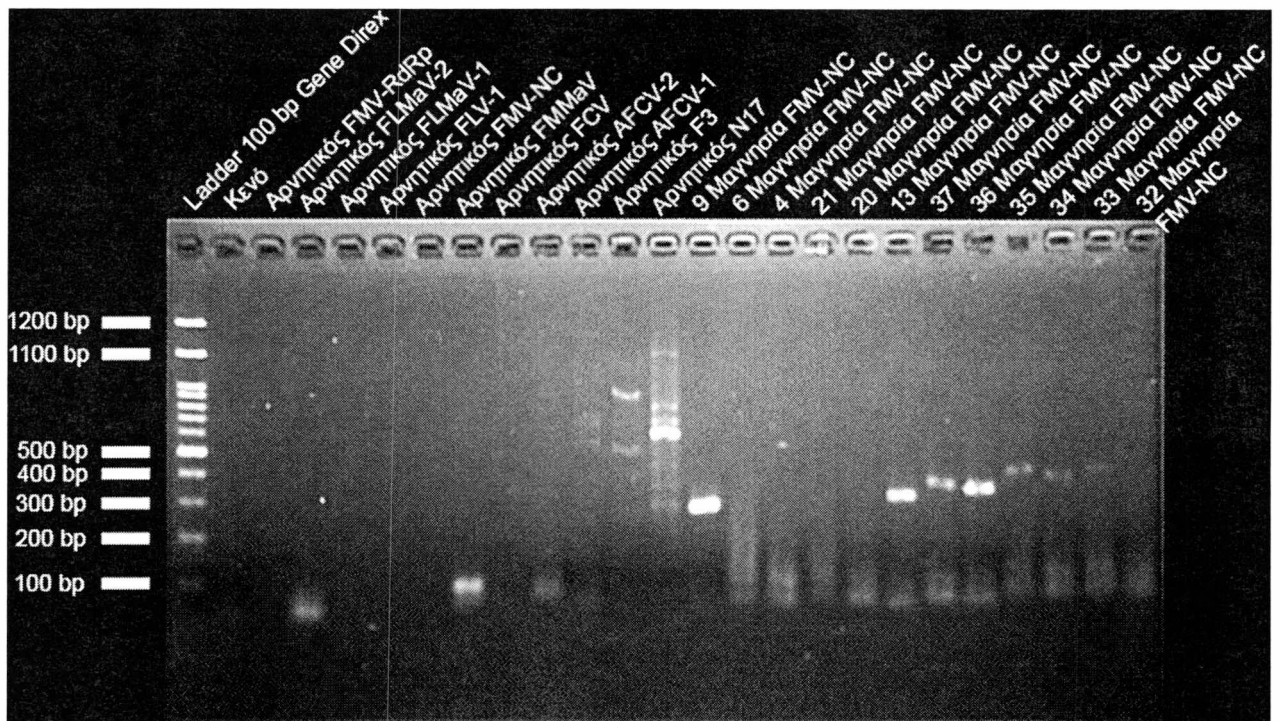
Δείγμα	Ιός	FMV	FBV-1
1		-	-
2		-	-
3		-	-
6		-	-
8		-	-
9		-	-
10		-	-
12		-	-
14		-	-
15		-	-
16		-	-
19		-	-
20		-	-
21		-	-
23		-	-
24		-	-



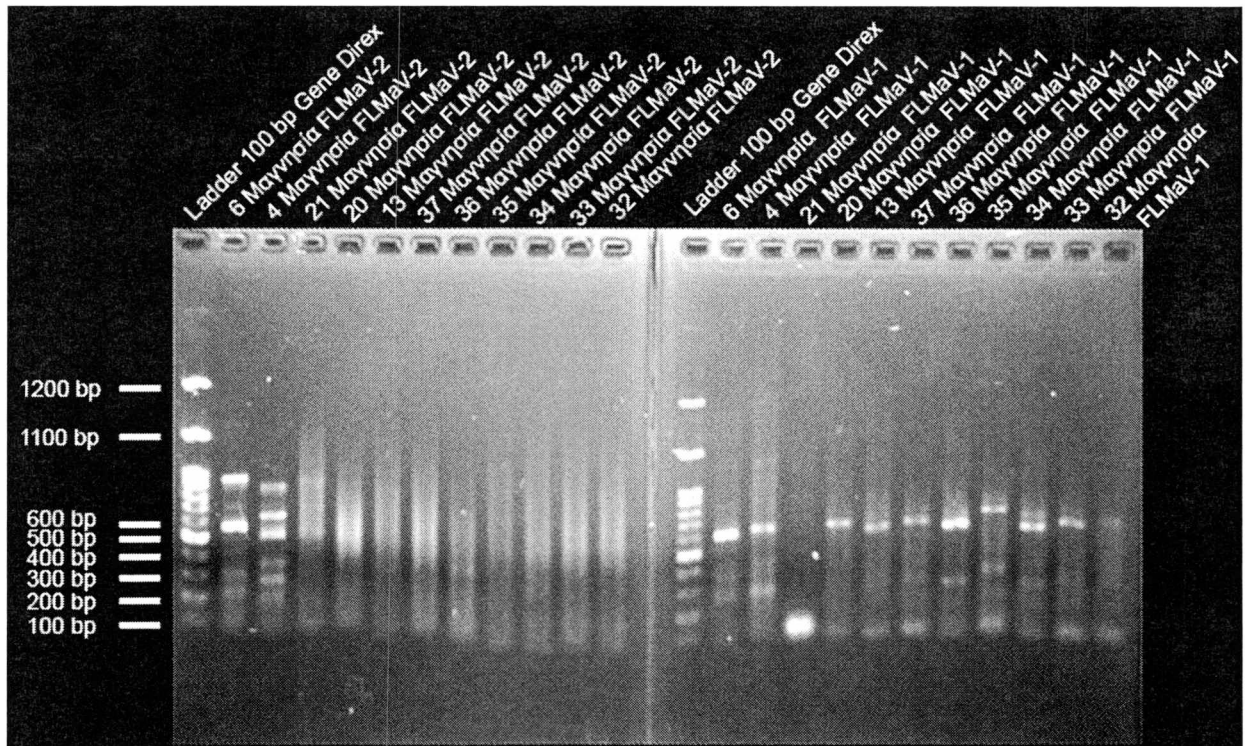
Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR FMV F/R των FMV F και FMV R για την ανίχνευση του Ιού του Μωσαϊκού της Συκιάς (FMV), καθώς επίσης και προϊόντων PCR με εκκινητές FBV-1 F και FBV-1 R εξειδικευμένους για την ανίχνευση του Badna-ιού της Συκιάς-1 (FBV-1) σε πηκτή αγαρόζης (1,5% σε TBE 1x). Στη θέση 1 είναι ο Ladder 100 bps της NEB (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp). Στις θέσεις 2 και 7 είναι οι αρνητικοί μάρτυρες (DEPC νερό). Στις θέσεις 6, 11 είναι το δείγμα 31 (δεν φέρει συμπτώματα) το οποίο ήταν ομοίως αρνητικός μάρτυρας. Τέλος, στις θέσεις 3 έως 5 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FBV F/R για την ανίχνευση του FBV-1, ενώ στις θέσεις 8-10 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FMV F/R για την ανίχνευση της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης του FMV. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι 302 nts για την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του FMV και 474 nts για τον FBV-1.



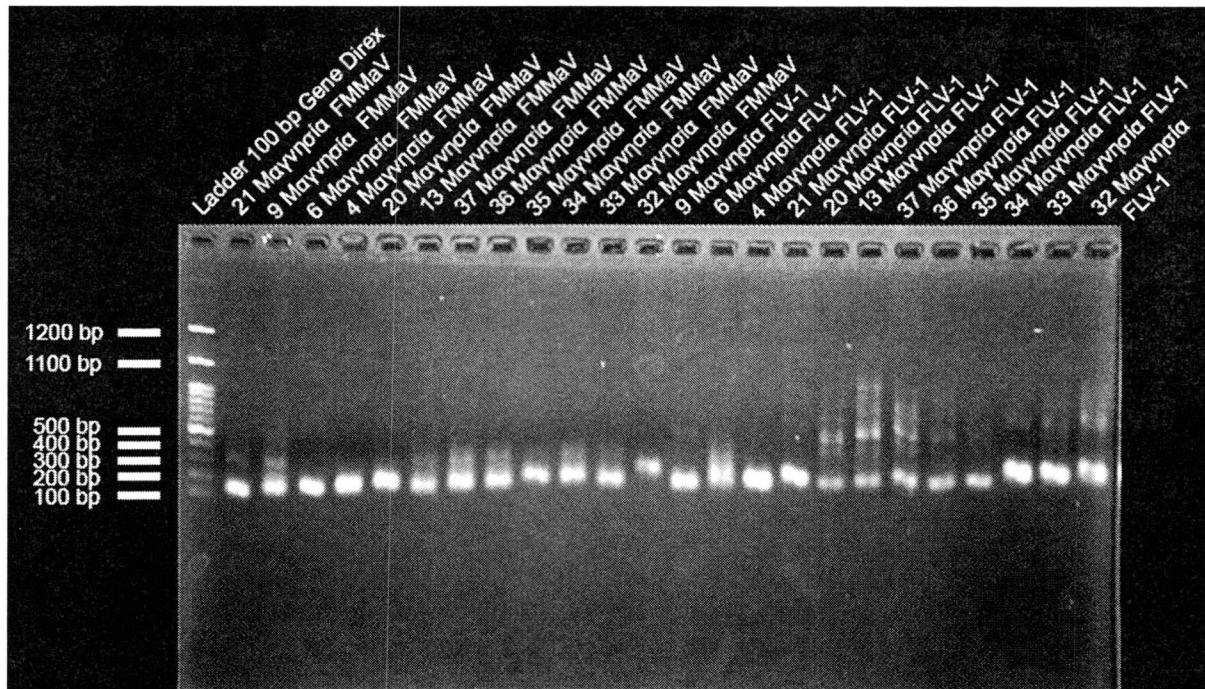
Εικόνα 3.2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR AFCV-1 F/R των AFCV-1 F και AFCV-1 R για την ανίχνευση του Αρκάνσας Clostero-ιού της Συκιάς 1 (AFCV-1) καθώς επίσης και προϊόντων PCR με εκκινητές AFCV-2 F και AFCV-2 R εξειδικευμένων για την ανίχνευση του Αρκάνσας Clostero-ιού της Συκιάς 2 (AFCV-2) σε πηκτή αγαρόζης (1,5% σε TBE 1x). Στη θέση 1 είναι ο Ladder 100 bps της Gene Direx (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp). Στις θέσεις 2 έως 13 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR AFCV-2 F/R για την ανίχνευση του AFCV-2 ενώ στις θέσεις 14 έως 25 βρίσκονται τα προϊόντα PCR AFCV-1 F/R για την ανίχνευση του AFCV-1. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι 375 nts για τον AFCV-1 και 1671 nts για τον AFCV-2.



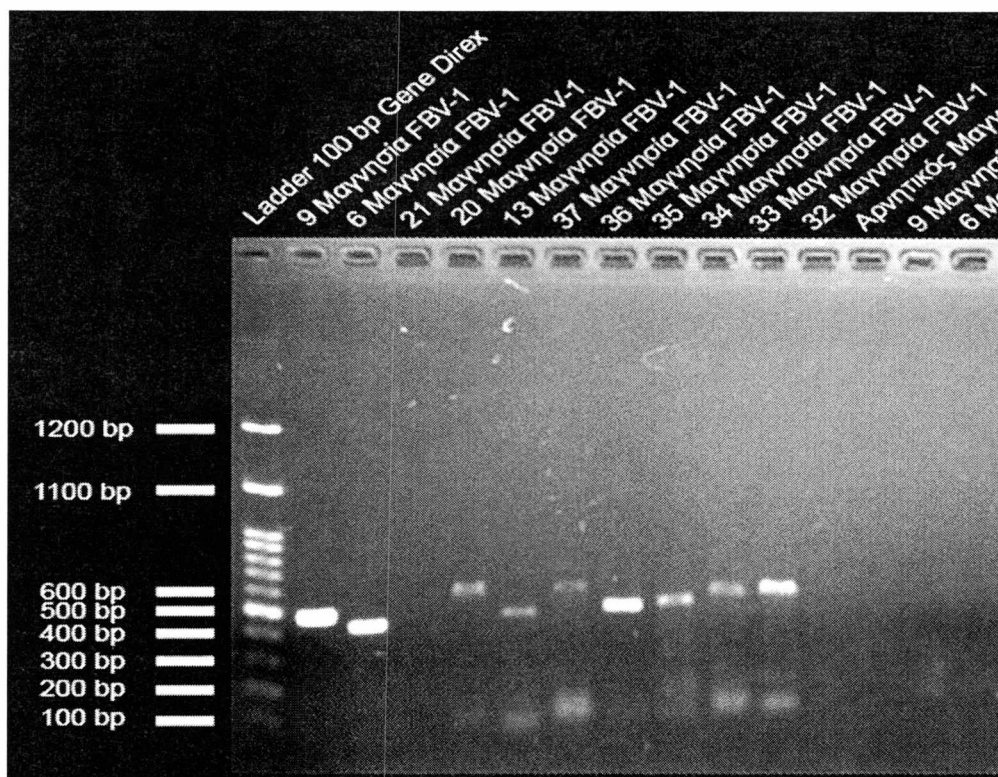
Εικόνα 3.3. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR FMV-NC F/R των FMV-NC F και FMV-NC R για την ανίχνευση της Νουκλεοκαψιδιακής πρωτεΐνης του Ιού του Μωσαϊκού της Συκιάς (FMV-NC) σε πηκτή αγαρόζης (1,5% σε TBE 1x). Στη θέση 1 είναι ο Ladder 100 bps της Gene Direx (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp). Στις θέσεις 3 έως 13 βρίσκονται οι αρνητικοί μάρτυρες (αντί για DNA έγινε προσθήκη νερού) των ιών FMV RdRp, FLMaV-2, FLMaV-1, FLV-1, FMV-NC, FMMAV, FCV, AFCV-2, AFCV-1, FLMaV-2 (F3), FLMaV-1 (N17). Στις θέσεις 14 έως 25 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FMV-NC F/R για την ανίχνευση του FMV-NC. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι 300 nts για τον FMV-NC.



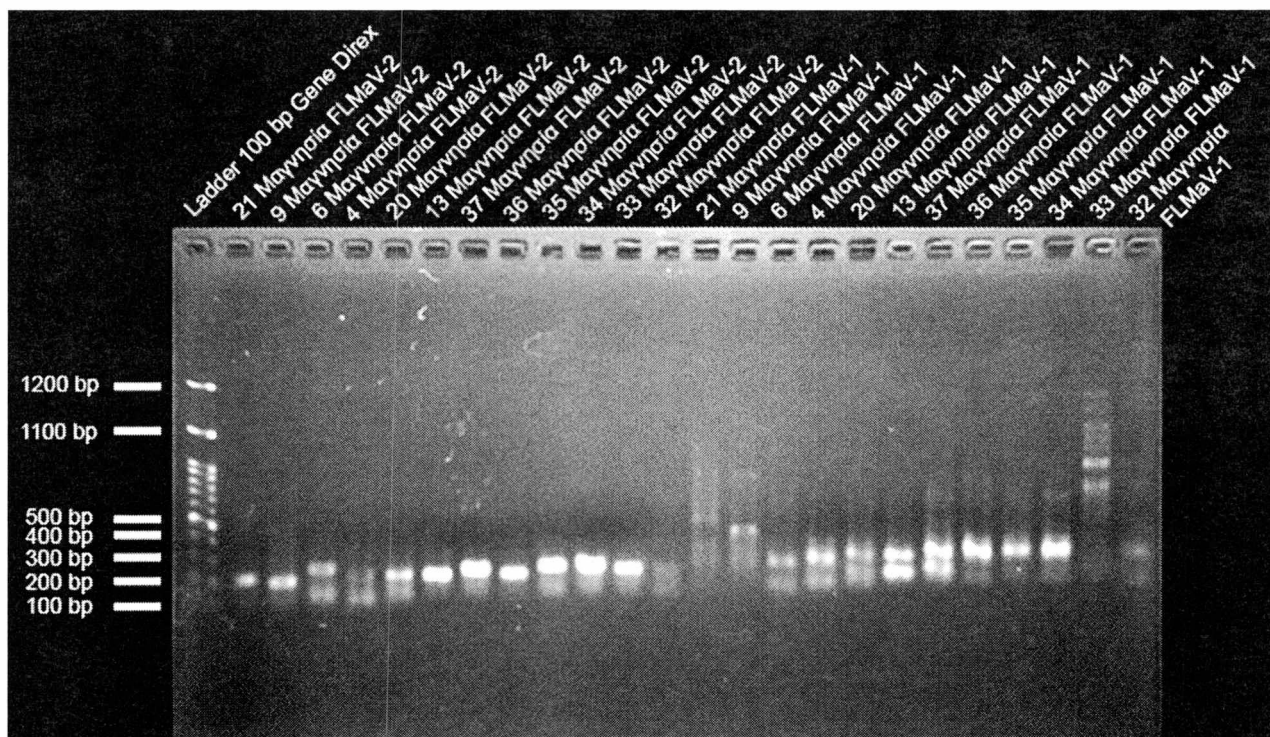
Εικόνα 3.4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR FLMaV-1 F/R των FLMaV-1 F και FLMaV-1 R (Tzanetakis *et al.* 2010) για την ανίχνευση του Ιού που σχετίζεται με την ποικιλόχρωση στα φύλλα Συκιάς-1 (FLMaV-1) καθώς επίσης και προϊόντων PCR με εκκινητές FLMaV-2 F και FLMaV-2 R (Tzanetakis *et al.* 2010) εξειδικευμένους για την ανίχνευση του Ιού που σχετίζεται με την ποικιλόχρωση στα φύλλα Συκιάς-2 (FLMaV-2) σε πηκτή αγαρόζης (1,5% σε TBE 1x). Στις θέσεις 1 και 13 είναι ο Ladder 100 bps της Gene Direx (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp). Στις θέσεις 2 έως 12 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FLMaV-2 F/R για την ανίχνευση του FLMaV-2. Στις θέσεις 14 έως 24 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FLMaV-1 F/R για την ανίχνευση του FLMaV-1. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι 479 nts για τον FLMaV-2 και 580 nts για τον FLMaV-1.



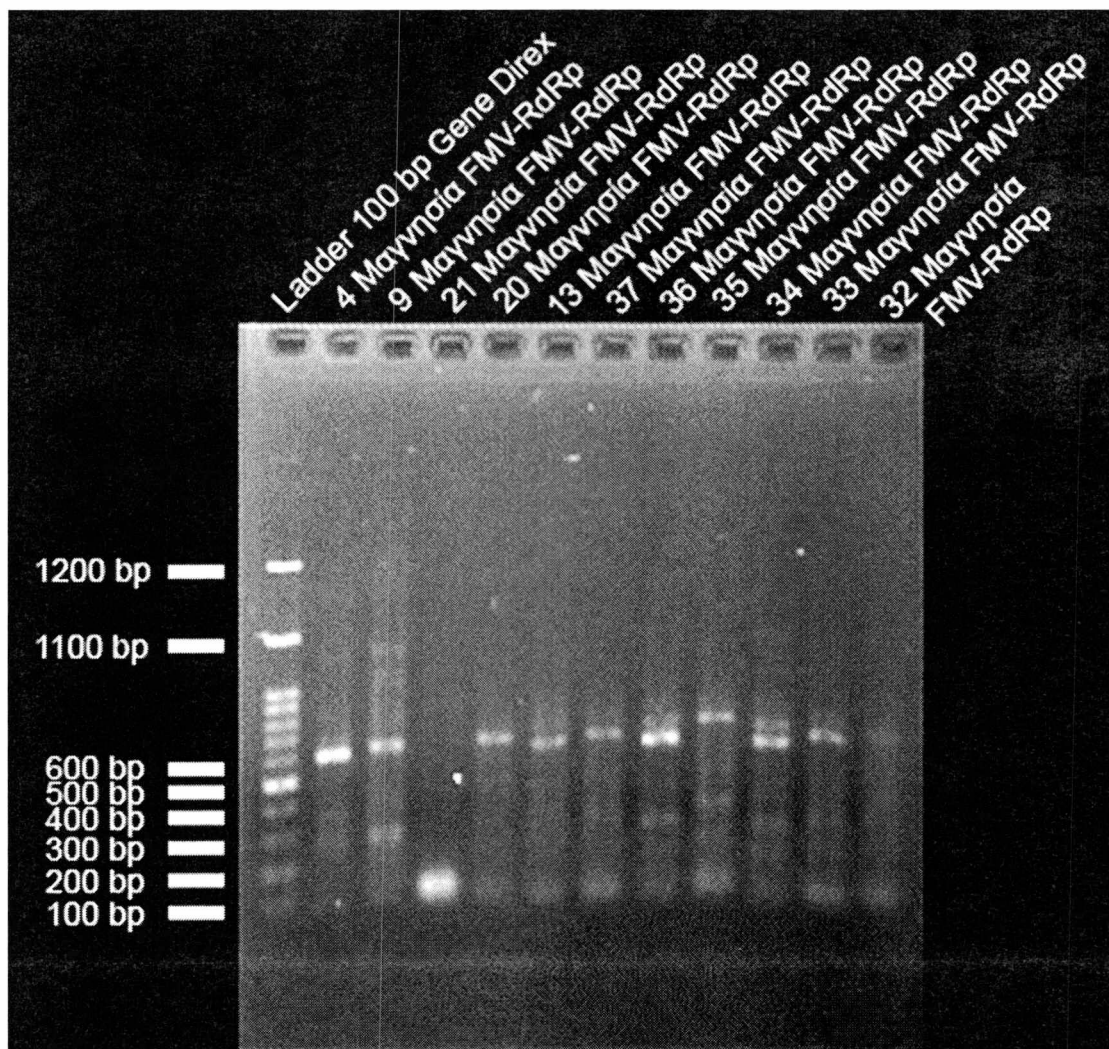
Εικόνα 3.5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR FMMaV F/R των FMMaV F και FMMaV R για την ανίχνευση του Ιού που σχετίζεται με το ήπιο μωσαϊκό της Συκιάς (FMMaV) καθώς επίσης και προϊόντων PCR με εκκινητές FLV-1 F και FLV-1 R εξειδικευμένους για την ανίχνευση του Λανθάνων Ιού της Συκιάς (FLV-1) σε πηκτή αραρόζης (1,5% σε TBE 1x). Στη θέση 1 είναι ο Ladder 100 bps της Gene Direx (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp). Στις θέσεις 2 έως 13 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FMMaV F/R για την ανίχνευση του FMMaV. Στις θέσεις 14 έως 25 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FLV-1 F/R για την ανίχνευση του FLV-1. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι 308-311 nts για τον FMMaV και 125 nts για τον FLV-1.



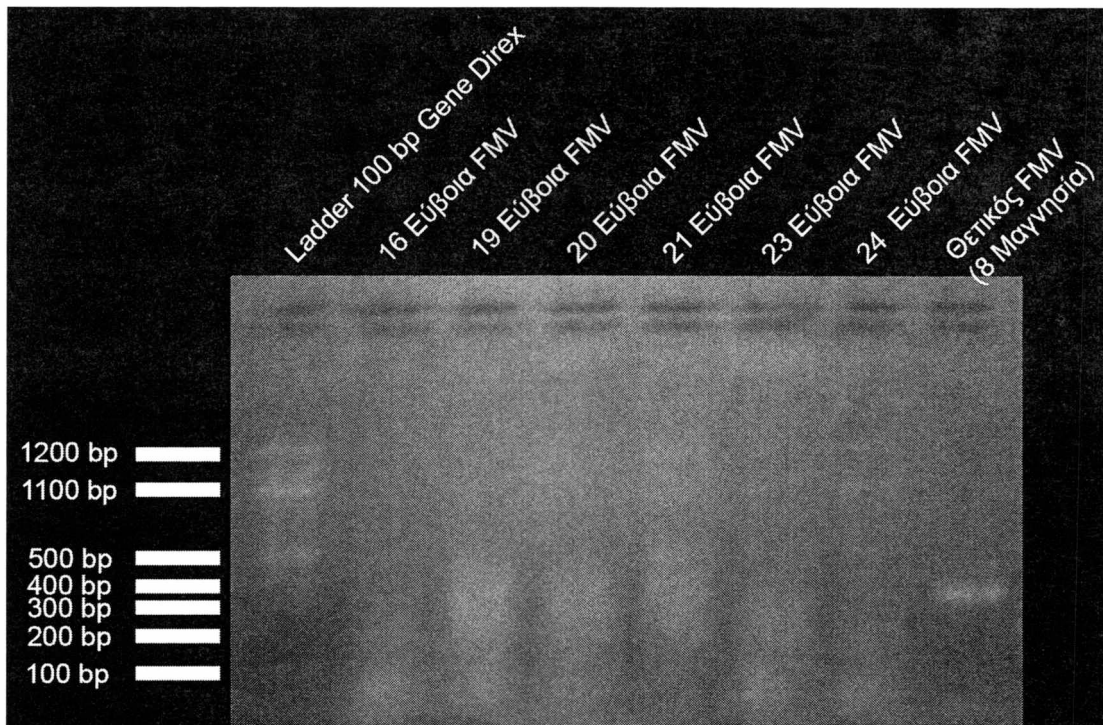
Εικόνα 3.6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR FBV-1 F/R των FBV-1 F και για την ανίχνευση του Badna-ιού της Συκιάς (FBV-1) σε πηκτή αγαρόζης (1,5% σε TBE 1x). Στη θέση 1 είναι ο Ladder 100 bps της Gene Direx (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp). Στις θέσεις 2 έως 12 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FBV-1 F/R για την ανίχνευση του FBV-1. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι 474 nts για τον FBV-1.



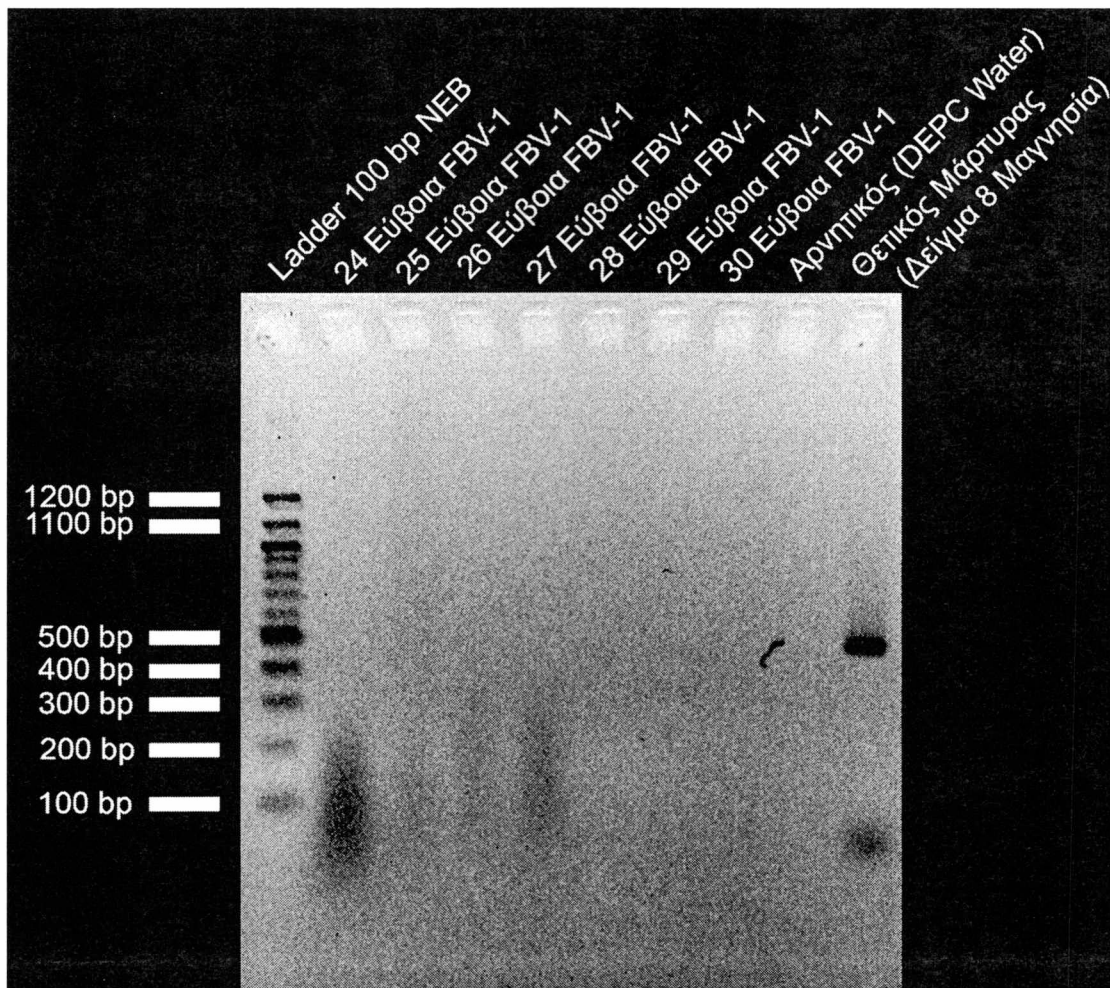
Εικόνα 3.7. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR FLMaV-1 F/R των FLMaV-1 F και FLMaV-1 R (N17) (Elbeaino *et al.* 2006) για την ανίχνευση των FLMaV-1 καθώς επίσης και προϊόντων PCR με εκκινητές FLMaV-2 F και FLMaV-2 R εξειδικευμένων για την ανίχνευση του FLMaV-1 σε πηκτή αραρόζης (1,5% σε TBE 1x). Στη θέση 1 είναι ο Ladder 100 bps της Gene Direx (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp). Στις θέσεις 2 έως 13 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FLMaV-2 F/R για την ανίχνευση του FLMaV-2. Στις θέσεις 14 έως 25 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FLMaV-1 F/R για την ανίχνευση του FLMaV-1. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι 350 nts για τον FLMaV-1 και 360 nts για τον FLMaV-2.



Εικόνα 3.8. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR FMV-RdRp F/R των FMV F και FMV R για την ανίχνευση του FMV-RdRp σε πηκτική αγαρόζη (1,5% σε TBE 1x). Στη θέση 1 είναι ο Ladder 100 bps της Gene Direx (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp). Στις θέσεις 2 έως 12 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FMV-RdRp F/R για την ανίχνευση του FMV-RdRp. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι 302 nts για την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του FMV.



Εικόνα 3.9. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR FMV F/R των FMV F και FMV R για την ανίχνευση του FMV σε πηκτική αγαρόζης (1,5% σε TBE 1x). Στη θέση 1 είναι ο Ladder 100 bps της Gene Direx (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp). Στις θέσεις 2 έως 7 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FMV F/R για την ανίχνευση του FMV-RdRp. Στη θέση 8 βρίσκεται ο θετικός μάρτυρας (δείγμα 8 Μαγνησία). Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι 302 nts για την RNA ανεξάρτητη RNA πολυμεράση του FMV.



Εικόνα 3.10. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR FBV-1 F/R των FBV-1 F και FBV-1 R για την ανίχνευση του FBV-1 σε πηκτική αγαρόζη (1,5% σε TBE 1x). Στη θέση 1 είναι ο Ladder 100 bps της NEB (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp). Στις θέσεις 2 έως 8 βρίσκονται τα προϊόντα της PCR FBV-1 F/R για την ανίχνευση του FBV-1. Στη θέση 9 βρίσκεται ο αρνητικός μάρτυρας (αντί για DNA έγινε προσθήκη νερού), ενώ στη θέση 10 βρίσκεται ο θετικός μάρτυρας (Δείγμα 8 Μαγνησία). Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι 474 nts για τον FBV-1.

Κεφάλαιο IV. Συζήτηση

Η Ασθένεια του Μωσαϊκού της Συκιάς (FMD) είναι η βασικότερη ιολογικής φύσης διαταραχή της συκιάς (Elbeaino *et al.* 2009), με παγκόσμια εξάπλωση (Çağlayan *et al.* 2010, Hafez *et al.* 2011, Gattoni *et al.* 2010, Tzanetakis *et al.* 2010, Fernandez *et al.* 2013) και μεγάλο εύρος συμπτωματολογίας (Condit & Horne, 1933, Martelli *et al.* 1993) που μπορεί να κυμαίνεται από απλό έως φλυκταινώδες μωσαϊκό, περινεύριες χλωρώσεις, δακτυλιωτές και χλωρωτικές κηλίδες, παραμορφώσεις των φύλλων και περιφερειακές ξηράνσεις (Elbeaino *et al.* 2007, Martelli 2011, Tzanetakis *et al.* 2010). Εκτός όμως από τις προσβολές στα φύλλα, έχουν παρατηρηθεί συμπτώματα και στους καρπούς, όπως μωσαϊκό, παραμορφώσεις ακόμα και πρόιμη καρπόπτωση, με αποτέλεσμα την εξασθένηση των δέντρων και την ποιοτική υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος (Ferguson *et al.* 1990). Υπεύθυνοι για την Ασθένεια του Μωσαϊκού της Συκιάς είναι ο Ιός του Μωσαϊκού της Συκιάς (FMV), ο οποίος θεωρούνταν ως το βασικό παθογόνο αίτιο αυτής της διαταραχής (Elbeaino *et al.* 2007), ο Badna-ιός της Συκιάς-1 (FBV-1) (Tzanetakis *et al.* 2010), οι Ιοί που σχετίζονται με την ποικιλόχρωση στα φύλλα Συκιάς 1 & 2 (FLMaV 1 & 2) (Elbeaino *et al.* 2007), ο Ιός που σχετίζεται με το ήπιο Μωσαϊκό της Συκιάς (FMMaV) (Elbeaino *et al.* 2010), οι Αρκάνσας Clostero-ιοί της Συκιάς 1 & 2 (AFCV 1 & 2) (Tzanetakis *et al.* 2010), ο Κρυπτο-ιός της Συκιάς (FCV) (Elbeaino *et al.* 2011) και ο Λανθάνων Ιός της Συκιάς-1 (FLV-1) (Gattoni *et al.* 2010). Η μετάδοση της ασθένειας ποικίλει ανάλογα με το παθογόνο και μπορεί να γίνει με τον εμβολιασμό και με το άκαρι *Aceria ficus* όπως στην περίπτωση του FMV (Elbeaino *et al.* 2009), με τα κοκκοειδή όπως συμβαίνει στον FBV-1 ή με τις αφίδες στην περίπτωση των Clostero-ιών (Tzanetakis *et al.* 2010). Επίσης, μετάδοση μπορεί να γίνει και μέσω του

σπόρου ή της γύρης όπως συμβαίνει με τους FCV (Elbeaino *et al.* 2011) και FLV-1 (Gattoni *et al.* 2010).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, συλλέχτηκαν 58 δείγματα το Φθινόπωρο του 2013, 2014 και την Άνοιξη του 2015 εκ των οποίων τα 29 ήταν από το Νομό Μαγνησίας και τα 29 από το Νομό Εύβοιας. Από τα 58 δείγματα, μόνο το ένα δεν είχε συμπτώματα, ενώ τα υπόλοιπα έφεραν τα συνήθη συμπτώματα της Ασθένειας του Μωσαϊκού της Συκιάς. Από τα δείγματα αυτά έγινε απομόνωση RNA και DNA, ενώ τα προϊόντα αποθηκεύτηκαν στους -80 μέχρι να γίνει η ανάλυσή τους.

Για τη διερεύνηση του παθογόνου αιτίου που είναι υπεύθυνο για την Ασθένεια του Μωσαϊκού της Συκιάς επιλέχτηκαν οι μοριακές μέθοδοι της αλυσιδωτής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) με τυχαίους και εξειδικευμένους εκκινητές και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η ανίχνευση του DNA ιού (FBV-1) πραγματοποιήθηκε με τρεις τρόπους. Αρχικά έγινε απομόνωση του DNA από 50 δείγματα του ιού (21 δείγματα του Ν. Μαγνησίας και 29 του Ν. Εύβοιας) και στη συνέχεια PCR FBV-1 F/R για την ανίχνευσή του. Έγινε επίσης απομόνωση RNA σε 8 δείγματα και στη συνέχεια απευθείας PCR με εξειδικευμένους εκκινητές για την ανίχνευσή του FBV-1. Τέλος για την ανίχνευση του FBV-1, έγινε εξαγωγή RNA σε 11 δείγματα, ακολούθησε RT-PCR και τελικά PCR με εξειδικευμένους εκκινητές για την ανίχνευσή του FBV-1. Από τα δείγματα αυτά, βρέθηκαν 10 με μόλυνση από τον FBV-1. Βρίσκοντας θετικά προς τον ιό δείγματα με την πρώτη μεταχείριση, αποδεικνύεται η ύπαρξη του DNA ιού στα φύλλα που συλλέχτηκαν. Βρίσκοντας δείγματα με μόλυνση από τον FBV-1 με τη δεύτερη μεταχείριση, σημαίνει πιθανώς ότι κατά την απομόνωση του RNA έγινε παράλληλα απομόνωση και του DNA, καθότι δεν προστέθηκε DNAάση στο τελικό προϊόν της απομόνωσης, άρα ο DNA ιός συνυπήρχε μαζί με το υπόλοιπο RNA

έξαγμα. Τέλος, το ότι βρέθηκαν δείγματα με μόλυνση από τον FBV-1 με την τρίτη μεταχείριση εξηγείται λόγω πιθανής ύπαρξης mRNA, απαραίτητα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών του ιού, άρα αποδεικνύεται και η ύπαρξη του ιού. Επίσης εξετάστηκαν 29 δείγματα του Νομού Εύβοιας αλλά κανένα δεν βγήκε θετικό στον FBV-1. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ορισμένους παράγοντες όπως στην κακή διατήρηση των δειγμάτων μέχρι την ανάλυσή τους (βλάβη στον καταψύκτη όπου ήταν αποθηκευμένα), στη χαμηλή συγκέντρωση του DNA ιού μετά την απομόνωσή του (ώστε η αποτύπωσή του στο πήγμα αγαρόζης να μην είναι ορατή), στην εποχιακή διακύμανση του ιού στον ξενιστή αλλά και στη διακύμανση του μολύσματος μέσα στο φυτό ή στην έλλειψη του συγκεκριμένου ιού από τα δέντρα.

Για την ανίχνευση των RNA ιών έγινε εξαγωγή RNA, ακολούθησε RT-PCR και στη συνέχεια PCR. Όσον αφορά τον FMV, από τα 36 δείγματα (20 δείγματα του Ν. Μαγνησίας και 16 του Ν. Εύβοιας), τα 7 βρέθηκαν με μόλυνση από τον FMV και προέρχονταν όλα από το Ν. Μαγνησίας. Το σχετικά χαμηλό ποσοστό των θετικών δειγμάτων έρχεται σε αντίθεση με άλλες έρευνες (Fernandez *et al.* 2013, Elci *et al.* 2012, Elbeshherhy και Elbeaino 2011) και μπορεί να οφείλεται στην κακή διατήρηση των δειγμάτων σε συνάρτηση με την ευαισθησία του συγκεκριμένου ιού. Επίσης, από τα 16 δείγματα του Νομού Εύβοιας που εξετάστηκαν δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα, παρόλο που τα δέντρα από τα οποία συλλέχτηκαν τα δείγματα έφεραν τα χαρακτηριστικά συμπτώματα του Ιού του Μωσαϊκού της Συκιάς. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην κακή συντήρηση των δειγμάτων, μέχρι να γίνει η ανάλυσή τους, στην εποχιακή διακύμανση του μολύσματος, στη διακύμανση του μολύσματος μέσα στο φυτό ή στην έλλειψη του συγκεκριμένου ιού από τα δέντρα.

Όσον αφορά τους ιούς FLMaV-1 και FLMaV-2, από τα 12 δείγματα 9 βρέθηκαν θετικά στον FLMaV-1. Για την ανίχνευση του ιού χρησιμοποιήθηκαν δύο

ειδών εξειδικευμένοι εκκινητές FLMaV-1 F και FLMaV-1 R (Tzanetakis *et al.* 2010) και FLMaV-1 F (N17) και FLMaV-1 R (N17) (Elbeaino *et al.* 2006). Στον FLMaV-2 δεν βρέθηκε θετικό δείγμα, με κανέναν από τους δύο εκκινητές. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα ομοιάζουν με έρευνες άλλων χωρών, καθώς στην Ισπανία ο FLMaV-2 δεν ανιχνεύτηκε, ενώ ο FLMaV-1 ήταν σε μικρό ποσοστό (Fernandez *et al.* 2013). Στην Τουρκία επίσης δεν ανιχνεύτηκε ο FLMaV-2, βρέθηκαν όμως θετικά αποτελέσματα για τον FLMaV-1 (Elci *et al.* 2012). Σε αντίθεση έρχονται τα αποτελέσματα από το Λίβανο, κατά τα οποία βρέθηκαν θετικά δείγματα και στους δύο ιούς, με διαφορά βέβαια στο ποσοστό των προσβεβλημένων φυτών (μεγαλύτερο ποσοστό προσβεβλημένων φυτών από τον FLMaV-1) (Elbeaino *et al.* 2007).

Όσον αφορά τους ιούς AFCV-1 και AFCV-2, από τα 12 δείγματα που εξετάστηκαν δεν βρέθηκε κανένα θετικό. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στη μεγάλη εξειδίκευση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, γι'αυτό και τα προϊόντα της PCR δεν έδειξαν το αναμενόμενο μέγεθος, είτε στο ότι τα δέντρα που εξετάστηκαν δεν ήταν προσβεβλημένα από τους συγκεκριμένους ιούς.

Όσον αφορά τον FMaV δεν βρέθηκε κανένα θετικό από τα 12 δείγματα που εξετάστηκαν, κάτι που μπορεί να οφείλεται είτε στην ανικανότητα των εκκινητών να υβριδίσουν την επιλεγμένη περιοχή είτε στην έλλειψη του ιού από τα συγκεκριμένα δέντρα που εξετάστηκαν. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα που πήραμε στην ηλεκτροφόρηση των συγκεκριμένων δειγμάτων ήταν μεγέθους 150-200 bp αντί για 308-3011 bp. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη κάποιου άλλου στελέχους του ιού γι'αυτό και ενισχύθηκε από τους συγκεκριμένους εκκινητές.

Από τα 12 δείγματα που εξετάστηκαν για την ανίχνευση του FCV δε βρέθηκε κανένα θετικό, κάτι που μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως η έλλειψη των ιών ως παθογόνα, η αδυναμία των εκκινητών να υβριδίσουν την

επιλεγμένη περιοχή του γονιδιώματος του ιού και η ανομοιόμορφη κατανομή του ιού στο φυτό αλλά και ανά εποχή.

Τέλος, από τα 12 δείγματα που εξετάστηκαν για την ανίχνευση του FLV-1, 7 θεωρείται ότι βρέθηκαν με μόλυνση στον ιό διότι όπως φαίνεται και στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 3.5) αρκετά προϊόντα της PCR FLV-1 F/R δεν είχαν ξεκάθαρο μέγεθος των αναμενόμενων ζευγών βάσεων. Αυτό οφείλεται σε λάθος κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης (ηλεκτροφόρηση μικρής διάρκειας) με αποτέλεσμα να μην είναι ευδιάκριτες οι ζώνες του Ladder και κατ'επέκταση των προϊόντων της PCR. Συνεπώς για τη διερεύνηση των προϊόντων της συγκεκριμένης PCR θα ήταν σκόπιμο να γίνει αλληλούχιση έτσι ώστε να αποδειχθεί η παρουσία του ιού.

Κεφάλαιο V. Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα από τις μεθόδους που επιλέχθηκαν αποδεικνύεται η ύπαρξη της Ασθένειας του Μωσαϊκού της Συκιάς στην Ελλάδα σε ποσοστό 34,4% για τον FBV (στο Νομό Μαγνησίας), ενώ για την Εύβοια φαίνεται ότι δεν υπάρχουν προσβεβλημένα από τον FBV δέντρα. Το ποσοστό των προσβεβλημένων δέντρων από τον FMV είναι 35% στο Νομό Μαγνησίας, ενώ στο Νομό Εύβοιας, σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν υπάρχουν προσβεβλημένα από τον FMV δέντρα, παρόλο που όλα εμφάνιζαν τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της Ασθένειας του Μωσαϊκού της Συκιάς. Όσον αφορά το ποσοστό των προσβεβλημένων δέντρων από τον FLMaV-1, το ποσοστό ανέρχεται σε 75% ενώ όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα δεν υπάρχουν προσβεβλημένα δέντρα από τον FLMaV-2. Επίσης δεν υπάρχουν θετικά αποτελέσματα για την ύπαρξη προσβεβλημένων δέντρων από τους FMMaV, AFCV-1, AFCV-2 και FCV. Τέλος το ποσοστό προσβεβλημένων δέντρων από τον FLV-1 είναι 58%.

Η έλλειψη θετικών αποτελεσμάτων στους ιούς FMV (του Νομού Εύβοιας), FBV-1 (του Νομού Εύβοιας), FMMaV, AFCV-1, AFCV-2 και FCV πιθανότατα να οφείλεται στην κακή συντήρηση των δειγμάτων. Γι'αυτό είναι πολύ σημαντικό, η ανάλυση των δειγμάτων να γίνεται άμεσα μετά τη συλλογή τους έτσι ώστε να μην καταστρέφονται οι RNA ιοί που θεωρούνται οι πλέον ευαίσθητοι.

Τέλος, κρίνεται απαραίτητο, να γίνουν δειγματοληψίες και από άλλες περιοχές της Ελλάδας, έτσι ώστε να έχουμε πλήρη εικόνα της κατανομής της Ασθένειας του Μωσαϊκού της Συκιάς στην Ελλάδα, καθώς επίσης και των φορέων που ευθύνονται για την εξάπλωση του κάθε ιού στις συκίες. Επίσης θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να γίνει μία σύγκριση των προϊόντων της PCR που διέφεραν κατά λίγες βάσεις από τα αναμενόμενα μεγέθη των ιών που εξετάζονταν.

Κεφάλαιο VI. Βιβλιογραφία

6.1 Διεθνής Βιβλιογραφία

- Alfaro-Fernandez A., Hernandez-Llopis D., Font M.I., 2013. Fig Viruses in Mainland Spain. *Journal of Phytopathology* **10**, 1-6
- Çağlayan K., Serçe Ç.U., Barutçu E., and Kaya K., Medina V., Gazel M., Soylu S., Çalışkan O., 2010. Comparison by Sequence-Based and Electron Microscopic Analyses of Fig mosaic virus Isolates Obtained from Field and Experimentally Inoculated Fig Plants. *Plant Disease* **94**, 1448-1452
- Condit I.J., Horne W.T., 1933. A mosaic of the fig in California. *Phytopathology* **23**, 887-896
- Elbeaino T., Digiario M., Alabdullah A., De Stradis A., Minafra A., Mielke N., Castellano M.A., Martelli G.P., 2009. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *Journal of General Virology* **90**, 1281-1288
- Elbeaino T., Digiario M., De Stradis A., Martelli G.P., 2006. Partial Characterization Of A Closterovirus Associated With A Chlorotic Mottling Of Fig. *Journal of Plant Pathology* **88**, 187-192
- Elbeaino T., Digiario M., Martelli G.P., 2009. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. *Archives of Virology* **154**, 1719–1727
- Elbeaino T., Choueiri E., Hobeika C., Digiario M., 2007. Presence Of Fig Leaf Mottle-Associated Virus 1 and 2 in Lebanese Fig Orchards. *Journal of Plant Pathology* **89**, 409-411

- Elbeaino T., Digiario M., Heinoun K., De Stradis A., Martelli G.P., 2010. Fig Mild Mottle-Associated Virus, A Novel Closterovirus Infecting Fig. *Journal of Plant Pathology* **92**, 165-172
- Elbeaino T., Abou Kubaa R., Ismaeil F., Mando J., Digiario M., 2012. Viruses And Hop Stunt Viroid Of Fig Trees In Syria. *Journal of Plant Pathology* **94**, 687-691
- Elbeaino T., Kubaa R.A., Digiario M., Minafra A., Martelli G.P., 2011. The complete nucleotide sequence and genome organization of Fig cryptic virus, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin. *Virus Genes* **42**, 415-421
- Elbeshehy E.K.F., Elbeaino T., 2011. Viruses infecting figs in Egypt. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, 327-332
- Elci E., Serce C.U., Gazel M., Caglayan K., 2012. Molecular Detection and Comparative Sequence Analysis of Viruses Infecting Fig Trees in Turkey. *Journal of Phytopathology* **160**, 418-423
- Ferguson L., Michailidies T.J., Shorey H.H., 1990. The California fig industry. *Horticultural Reviews* **12**, 409-490
- Gattoni G., Minafra A., Castellano M.A., De Stradis A., Boscia D., Elbeaino T., Digiario M., Martelli G.P., 2010. Worldwide diffusion of Fig latent virus 1 in fig accessions and its detection by serological and molecular tools. *Julius-Kühn-Archiv* **427**, 83-86
- Hafez E.E., El-Morsi A.A., Abdelkhalek A.A., 2011. Biological and Molecular Characterization of The Fig Mosaic Disease. *Molecular Pathogens* **2**, 10-17
- Khalid A., 2012. Incidence of Fig Leaf Mottle-associated Virus and Fig Mosaic Virus in Eastern Province of Saudi Arabia. *International Journal of Virology* **8**, 128-132

- Laney A.G., Hassan M., Tzanetakis I.E., 2012. An Integrated Badnavirus Is Prevalent in Fig Germplasm. *Phytopathology* **102**, 1182-1189
- Martelli G.P., Castellano M.A., Laforteza R., 1993. An ultrastructural study of fig mosaic. *Phytopathologia Mediterranea* **32**, 33-43
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6th Edition,
- Sarejanni J.A. *et al.*, 1953. *Annals Benaki Phytopathology Institute* **7**, 5-10
- Sarejanni J.A. *et al.*, 1954. *Annals Benaki Phytopathology Institute* **8**, 77-83
- Tzanetakis I.E., Laney A.G., Keller K.E., Martin R.R., 2010. New viruses found in fig exhibiting mosaic symptoms. *Julius-Kühn-Archiv* **427**, 79-82
- Walia J.J., Falk B.W., 2012. Fig mosaic virus mRNAs show generation by cap-snatching. *Virology* **426**, 162-166

6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

- Δημητριάδου Σ.Δ. *et al.*, 1959. *Χρονικά Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου* **2**, 3-12
- Δημητριάδου Σ.Δ. *et al.*, 1962. *Χρονικά Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου* **4**, 213-226
- Ανώνυμου, 1971. *Χρονικά Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου* **10**, 71-124

6.3 Ηλεκτρονικές πηγές

<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-12-11-0351>

<http://sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/973>

http://www.jstor.org/stable/41998310?seq=1#page_scan_tab_contents

<http://www.opengov.gr/ypaat/wp-content/uploads/downloads/2013/02/sykia.pdf>

<http://www.agrostrat.gr/sites/default/files/inventory/%CE%B5%CF%87%CE%B8%CF%81%CE%BF%CE%B9%20%CF%86%CF%85%CF%83%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%B9%CE%B1%CF%82.pdf>

<http://hortsci.ashspublications.org/content/42/5/1083.full#ref-35>



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000134259