ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ»

Διερεύνηση του ρόλου RNase III ενδονουκλεασών στο φυτό *N. benthamiana*, παρουσία ιοειδούς

Παρασκευή Καλλέμη

Επιβλέπων Καθηγητής : Κρίτων Καλαντίδης

Ηράκλειο 2019

Ευχαριστίες

Η διεξαγωγή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής θα ήταν αδύνατη χωρίς την καθοριστική συμβολή ορισμένων ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή Κ. Καλαντίδη για την καθοδήγησή του και τις πολύτιμες γνώσεις που μου έχει προσφέρει καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Ειδικότερα, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, τον ευχαριστώ πολύ για τη βοήθεια και την εμπιστοσύνη του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον πιο υπομονετικό άνθρωπο του κόσμου, τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Κ. Κατσαρού. Την ευχαριστώ για την αμέριστη στήριξη και καθοδήγηση που μου παρείχε, την προθυμία να βοηθήσει σε κάθε δυσκολία που προέκυπτε, καθώς και για το όμορφο κλίμα του εργαστηρίου στο οποίο συνέβαλε σημαντικά η παρουσία της.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Φυτών, με τα οποία συναναστρεφόμουν καθημερινά και εκτιμώ ειλικρινά την άριστη συνεργασία μας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια και τους φίλους μου, καθώς είναι οι άνθρωποι χωρίς τους οποίους δε θα μπορούσα να βρίσκομαι σήμερα στην ευχάριστη θέση της ολοκλήρωσης των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη 5

Abstract 6

1. **Εισαγωγή** 7

1.1 RNA σίγηση: μια ιστορική αναδρομή 7

1.2 Ο μηχανισμός της RNA σίγησης στα φυτά 8

1.3 Τα μονοπάτια της RNA σίγησης 11

1.4 Ο ρόλος των φυτικών RNase III πρωτεϊνών 15

1.4.1 Οι DCL πρωτεΐνες 17

1.4.2 Οι RTL πρωτεΐνες 19

1.5 Ιοειδή : οι λιλιπούτειοι εχθροί των φυτών 21

1.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά 21

1.5.2 Ταξινόμηση – Ονοματολογία 22

1.5.3 Τρόποι μετάδοσης των ιοειδών 25

1.5.4 Η αναπαραγωγή των ιοειδών 25

1.6 Το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) 27

1.7 Σκοπός παρούσας εργασίας 29

2. Υλικά και μέθοδοι 30

2.1 Υλικά 30

2.1.1 Διαλύματα 30

2.1.2 Φυτικό και μολυσματικό υλικό.....32

2.1.3 Εκκινητές και πλασμίδια.....32

2.2 Μέθοδοι.....34

2.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση.....34

2.2.2 Φυλογενετική ανάλυση.....34

2.2.3 Απομόνωση RNA από φυτικό ιστό.....35

2.2.4 Αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση cDNA.....36

2.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....36

2.2.6 Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς με την αντίδραση λιγάσης.....37

2.2.7 Μετασχηματισμός βακτηρίων *Escherichia coli*.....37

2.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια *Escherichia coli*.....37

2.2.9 Έλεγχος με περιοριστικά ένζυμα και αλληλούχηση.....38

2.2.10 Καθαρισμός DNA με φαινόλη - χλωροφόρμιο.....38

2.2.11 Μετασχηματισμός βακτηρίων *Agrobacterium tumefaciens*....39

2.2.12 Γονιδιακή σίγηση επαγόμενη από ιό (Virus Induced Gene Silencing-VIGS).....39

2.2.13 Αγροεμποτισμός (Schöb et al. 1997).....40

2.2.14 Στύπωμα κατά Northern.....41

2.2.15 Καθαρισμός RNA δειγμάτων με δεοξυριβονουκλεάση (DNase I).....42

2.2.16 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) 42

3. Αποτελέσματα.....44

3.1 Ανίχνευση των RTL στο μεταγράφωμα της N. benthamiana 44

3.2 Φυλογενετική ανάλυση σε επίπεδο πρωτεϊνών 46

3.3 Ενίσχυση των RTL με PCR και κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς 49

3.3.1 RTLA.....49

3.3.2 RTLB.....55

3.3.4 RTLD.....62

3.3.5 RTLE.....64

3.4 Προετοιμασία πλασμιδιακών κατασκευών για τα πειράματα VIGS ..66

3.5 Πειραματικός σχεδιασμός 73

3.5.1 Έλεγχος έκφρασης των RTL στα διάφορα μέρη του φυτού.....73

3.5.2 Μελέτη των RTL κατά τη διάρκεια μολύνσεων με το ιοειδές PSTVd 75

3.6 Συζήτηση - Συμπεράσματα 100

Περίληψη

Οι RNAse III ενδονουκλεάσες αποτελούν μια υπερ – οικογένεια ριβονουκλεασών που οργανώνονται σε τέσσερις διακριτές τάξεις. Κοινό τους χαρακτηριστικό είναι μια συντηρημένη περιοχή 9 αμινοξέων στο καταλυτικό τους κέντρο, το RNase III – μοτίβο (RNase III signature motif) και ο ρόλος τους αφορά την πέψη δίκλωνων μορίων RNA. Τα ιοειδή της οικογένειας Pospiviroidae, που πολλαπλασιάζονται με το μηχανισμό του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου, απαιτούν τη δράση μιας άγνωστης ως τώρα RNAse III ενδονουκλεάσης για την πέψη ενδιάμεσων αλυσσιδομερών κατά τον αναδιπλασιασμό τους. Στην παρούσα μελέτη, διερευνάται ο ρόλος μιας ιδιαίτερης οικογένειας φυτικών RNAse III ενδονουκλεασών, τις RNAse Three – Like (RTL) πρωτεΐνες, στο βιολογικό κύκλο του ιοειδούς *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd, Pospiviroidae). Ειδικότερα, γίνεται προσέγγιση του λειτουργικού χαρακτηρισμού δύο RTL (RTLA και RTLB) πρωτεϊνών του οργανισμού *Nicotiana benthamiana,* παρουσία PSTVd, με τη μέθοδο της επαγόμενης από ιό γονιδιακής σίγησης (Virus Induced Gene Silencing-VIGS). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν τον πιθανό αμυντικό ρόλο της RTLA και την πιθανότητα συμμετοχής της RTLB στον αναδιπλασιασμό ή τη διασυστηματική μετακίνηση του ιοειδούς στο φυτό.

Abstract

The super – family of RNAse III endonucleases consists of four distinct classes. They are all characterized by the presence of a highly conserved 9 – amino acid stretch in their catalytic centre, namely RNase III signature motif, and their role is the cleavage of double stranded RNA molecules. Viroids of Pospiviroidae family replicate in the nucleus following an asymmetric rolling circle mechanism. During their replication, there is the need of an RNAse III endonuclease action, that would cleave the double stranded RNA concatemer intermediates. In this research, we focus on studying the putative impact of RNAse Three – Like (RTL) proteins on the life cycle of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd, Pospiviroidae). Specifically, we are trying to functionally characterize two RTL proteins (RTLA and RTLB) of *Nicotiana benthamiana* plants, upon PSTVd infection, based on the Virus Induced Gene Silencing (VIGS) assay. Our findings indicate the defensive role of RTLA and the possible implication of RTLB in viroid' s replication or movement in plants.

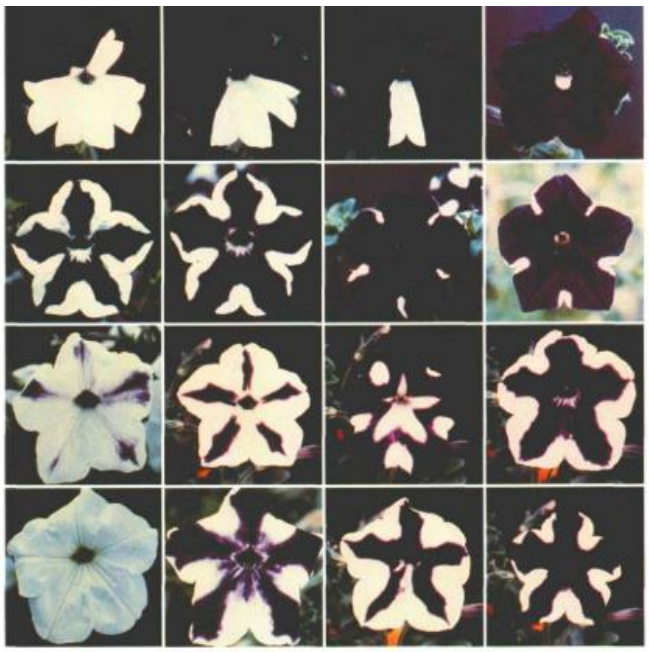
1. **Εισαγωγή**

1.1 RNA σίγηση: μια ιστορική αναδρομή

Ως RNA σίγηση ή RNA παρεμβολή (RNA interference, RNAi) ορίζεται το σύνολο των RNA-εξαρτώμενων διαδικασιών που οδηγούν σε ειδική προς την αλληλουχία αρνητική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Brodersen & Voinnet, 2006).

Το φαινόμενο παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1928 από τον Wingard, κατά τη διάρκεια μελέτης σε φυτά καπνού μολυσμένα από τον ιό της δακτυλιωτής κηλίδωσης του καπνού (Tobacco Ringspot Virus, TRV). Ο Wingard ανέφερε πως μόνο τα αρχικώς μολυσμένα φύλλα παρουσίασαν τα συμπτώματα του ιού, ενώ τα ανώτερα φύλλα έδειχναν να έχουν κάποιου τύπου ανοσία, την οποία δεν ήταν σε θέση να εξηγήσει τη δεδομένη χρονική περίοδο. Η περαιτέρω διερεύνηση της RNA παρεμβολής έγινε χρόνια αργότερα, όταν η ομάδα Ecker και συνεργατών παρατήρησαν μεταγραφική αναστολή σε διαγονιδιακά φυτά έπειτα από έκφραση αντισημαίνοντος RNA (Ecker & Davis, 1986). Το 1989, ο Matzke και οι συνεργάτες του, μελετώντας διπλά μεταλλάγματα φυτών καπνού, αναφέρθηκαν σε επιστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο περιοχών T-DNA εκκινητών που είχαν ως αποτέλεσμα τη μεθυλίωση του DNA και, συνεπώς, την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης των εκατέρωθεν αλληλουχιών (M. A. Matzke, Primig, Trnovsky, & Matzke, 1989). Ορόσημο αποτελούν τα πειράματα που έγιναν το 1990, όταν ερευνητές προσπάθησαν να ενισχύσουν το χρώμα των ανθέων της πετούνιας με υπερέκφραση του γονιδίου συνθετάση της χαλκόνης (CHS) που ευθύνεται για την εμφάνιση του μωβ χρώματος . Προς έκπληξή τους όμως η αυξημένη παραγωγή του γονιδίου είχε τελικά ως αποτέλεσμα την παραγωγή ποικίλων χρωματικών φαινοτύπων με πλήρως ή μερικώς λευκά άνθη, υποδηλώνοντας μειωμένη δραστηριότητα της συνθετάσης της χαλκόνης

(Εικόνα 1) (Napoli, Lemieux, & Jorgensen, 1990; Van Der Krol, Mur, Beld, Mol, & Stuitje, 1990). Αργότερα, με τη μελέτη της επίδρασης εισαγωγής δίκλωνων μορίων RNA (double stranded RNA , dsRNA) στο νηματώδη Caenorhabditis elegans, οι Fire και Mello πρότειναν για πρώτη φορά ότι για την αποσιώπηση ευθύνεται το dsRNA (Fire et al., 1998). Έκτοτε, το φαινόμενο RNAi δεν άργησε να εντοπισθεί σε ποικίλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Elbashir et al., 2001; Misquitta & Paterson, 1999; Peter M. Waterhouse, Michael W. Graham, 1998; Wargelius, Ellingsen, & Fjose, 1999). Για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού της RNA σίγησης, οι Fire και Mello τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel Φυσιολογίας ή Ιατρικής το 2006 (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/summary/>).



Εικόνα 1. Φαινότυποι υπερέκφρασης του γονιδίου CHS (Van Der Krol, Mur, Beld, Mol, & Stuitje, 1990)

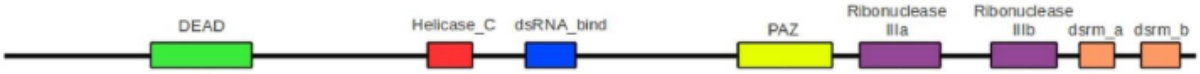
Είναι πλέον γνωστό ότι ο RNAi μηχανισμός στα φυτά δύναται να ενεργοποιηθεί κατά την έκφραση διαγονιδίων ή υπερέκφραση ενδογονιδίων, παρουσία παθογόνων, κατά τη ρύθμιση γονιδίων σχετιζόμενων με την ανάπτυξη αλλά και με τη δραστηριότητα μεταθετών στοιχείων (J. S. Parent, de Alba, & Vaucheret, 2012).

1.2 Ο μηχανισμός της RNA σίγησης στα φυτά

Η RNA σίγηση ενεργοποιείται από διάφορους τύπους ενδογενών ή εξωγενών μικρών RNAs. Αυτά αποτελούν πρόδρομα μόρια dsRNA, τα οποία πέπτονται ταχύτατα σε μικρά dsRNAs μήκους 21-24 νουκλεοτιδίων και αποτελούν τα μόρια -

οδηγούς για αναγνώριση και καταστροφή ή καταστολή της μετάφρασης συμπληρωματικών μονόκλωνων RNAs (single stranded RNAs, ssRNAs).

Η ωρίμανση των μικρών RNAs στους φυτικούς οργανισμούς καταλύεται στο κυτταρόπλασμα από νουκλεάσες με ενεργότητα ριβονουκλεάσης III (RNAse III). Αυτές συνιστούν μια μικρή οικογένεια πρωτεϊνών, τις dsRNA-εξειδικευμένες RNAse III ενδονουκλεάσες Dicer- Like (DCL). (Baulcombe, 2004; Meister & Tuschi, 2004). Οι DCL των φυτών έχουν μελετηθεί εκτενώς στο φυτό – μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, που διαθέτει τέσσερα ορθόλογα γονίδια DCL. Έχουν χαρακτηριστεί έξι επικράτειες: DEAD – μοτίβο, ελικάση-C, PAZ (Piwi Argonaute and Zwille), RNAseIII και DRB (double stranded RNA Binding Domain). Ίδια δομή παρουσιάζουν και τα DCL γονίδια άλλων φυτικών οργανισμών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2 (Nakasugi et al., 2013). Το DEAD - μοτίβο δρα ως ATPάση με τη διέγερση της από μόρια RNA (Tanner, Cordin, Banroques, Doère, & Linder, 2003). Η PAZ και η DRB επικράτεια εμπλέκονται στη δέσμευση του dsRNA μορίου, ενώ η RNAseIII ευθύνεται για την πέψη τους σε μικρότερα μόρια μήκους 21-24 νουκλεοτιδίων με μικρές μονόκλωνες περιοχές στα προεξέχοντα άκρα, σηματοδοτώντας την έναρξη του φαινομένου RNAi (Baulcombe, 2004). Μεταξύ της PAZ και της RNAseIII περιοχής μεσολαβεί μια απόσταση 65 Å, η οποία αντιστοιχεί στο μήκος ενός μορίου RNA 25 ζευγών βάσεων. Το αποδίδει στις DCL το χαρακτηρισμό «μοριακοί χάρακες», που αναγνωρίζουν και κόβουν τα dsRNAs με καθορισμένο τρόπο, παράγοντας μικρά RNAs συγκεκριμένου μήκους έκαστη (MacRae et al., 2006).



	Accession	DEAD	Helicase_C	dsRNA_bind	PAZ	RibonucleaseIIIa	RibonucleaseIIIb	dsrm_a	dsrm_b
At_DCL1	AT1G01040	245 – 448*	694 – 764	840 – 930	1181 – 1340	1375 – 1518	1594 – 1707	1734 – 1794	1832 – 1904
At_DCL2	AT3G03300	26 – 160	431 – 489	559 – 638	808 – 934	995 – 1113	1185 – 1296	1323 – 1383 *	not detected
At_DCL3	AT3G43920	54 – 175	407 – 457	not detected	789 – 930	973 – 1108	1182 – 1290	1272 – 1381 **	1411 – 1470 **
At_DCL4	AT5G20320	127 – 288	531 – 589	656 – 747	954 – 1076	1119 – 1251	1327 – 1436	1417 – 1526 **	1614 – 1697 **
Nb_DCL1	this study	256 – 419	712 – 770	846 – 945	1215 – 1380	1415 – 1563	1639 – 1752	1779 – 1836	1865 – 1935
Nb_DCL2	this study	24 – 158	430 – 488	559 – 641	832 – 939	1003 – 1121	1193 – 1304	1285 – 1395 **	not detected
Nb_DCL3	this study	not detected	238 – 310	381 – 468	687 – 828	873 – 1007	1085 – 1189	1171 – 1280 **	not detected
Nb_DCL4a	this study	53 – 216	438 – 506	573 – 658	844 – 985	1024 – 1154	1230 – 1339	1366 – 1430 *	1541 – 1614 *
Sl_DCL1	Solyc10g005130	257 – 420	714 – 772	848 – 940	1214 – 1351	1386 – 1489	1586 – 1699	1726 – 1783	1813 – 1883
Sl_DCL2a	Solyc11g008520	26 – 192	433 – 491	588 – 671	865 – 969	1031 – 1149	1221 – 1330	1311 – 1421 **	not detected
Sl_DCL2b	Solyc11g008530	18 – 138	346 – 419	489 – 571	765 – 853	918 – 1036	1109 – 1219	1200 – 1310 **	not detected
Sl_DCL2c	Solyc11g008540	18 – 137	378 – 436	507 – 590	777 – 908	950 – 1068	1140 – 1251	1232 – 1342 **	not detected
Sl_DCL2d	Solyc06g048960	22 – 187	428 – 486	557 – 640	821 – 957	1000 – 1118	1190 – 1301	1282 – 1392 **	not detected
Sl_DCL3	Solyc08g067210	not detected	205 – 277	348 – 434	660 – 794	840 – 974	1052 – 1156	1178 – 1265 **	not detected
Sl_DCL4	Solyc07g005030	9 – 129	350 – 418	485 – 571	773 – 895	937 – 1067	1143 – 1252	1279 -1343 *	1455 – 1528 *

Εικόνα 2.Οι λειτουργικές δομές των DCL στα είδη Arabidopsis thaliana (At), Nicotiana benthamiana (Nb) και Solanum lycopersicum (Sl) (προσαρμοσμένη από Nakasugi et al., 2013)

Μετά την πέψη τους, οι αλυσίδες των μικρών dsRNAs ανοίγουν και μόνο η μία από τις δύο έλικες ενσωματώνεται στο RNA-σύμπλοκο επαγωγής της σίγησης, ένα σύμπλεγμα μορίων που συνιστούν τη νουκλεάση RISC (RNA-induced silencing complex). Εκεί ενεργοποιείται μία άλλη ομάδα πρωτεϊνών, οι Αργοναύτες (AGO), που αποτελούν τους κύριους τελεστές της σίγησης. Είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση των μικρών RNAs, τα οποία χρησιμοποιούν ως οδηγούς για την εύρεση των αλληλουχιών στόχων, με σκοπό την καταστολή της έκφρασης είτε κατακερματίζοντας το στόχο ή παρεμποδίζοντας τη μεταγραφή ή τη μετάφρασή του (Bologna & Voinnet, 2014). Οι AGO πρωτεΐνες διαθέτουν τέσσερις επικράτειες: μία μεταβλητή N-τελική επικράτεια και τις συντηρημένες PAZ (Piwi Argonaute and Zwille), MID (middle) και PIWI περιοχές (Tolia & Joshua-Tor, 2007). Το φυτό *Arabidopsis thaliana* κωδικοποιεί δέκα AGO πρωτεΐνες, που διακρίνονται σε τρεις ομάδες με βάση τις φυλογενετικές σχέσεις τους και την ικανότητα πρόσδεσης μικρών RNAs (Vaucheret, 2008) .

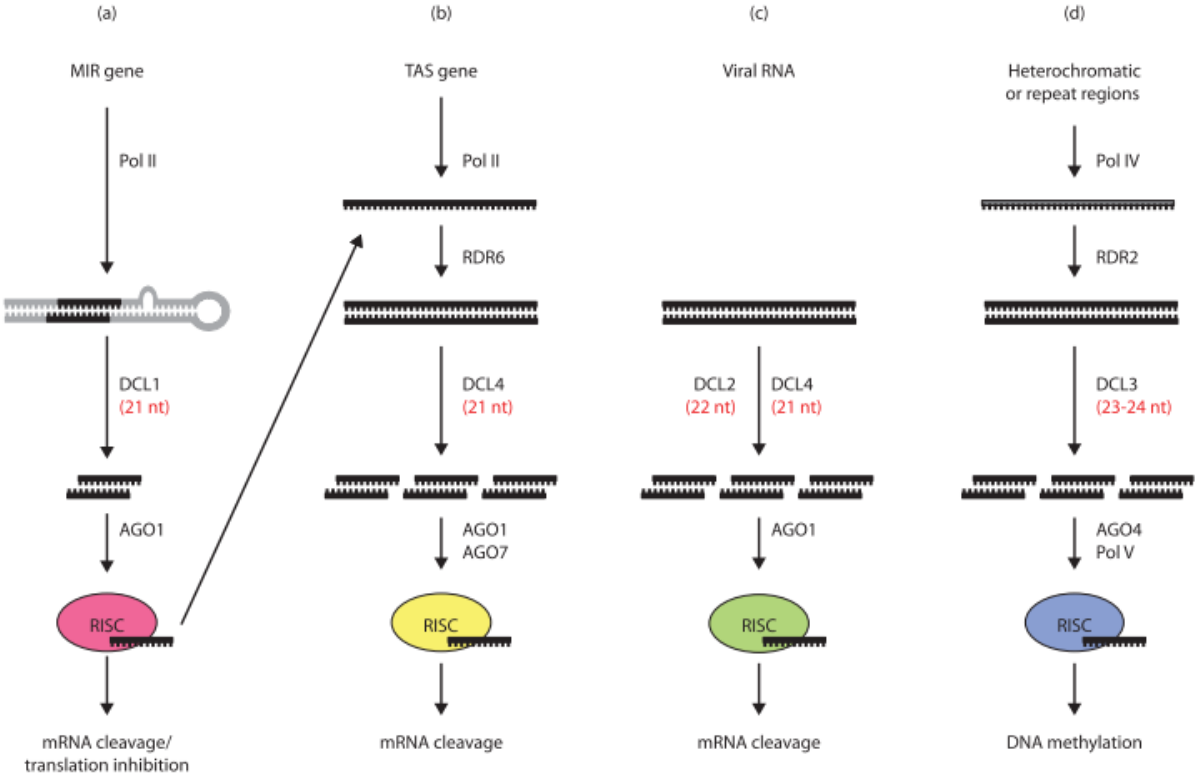
Στα περισσότερα μονοπάτια της RNA σίγησης μετέχει μία ακόμη σημαντική ομάδα πρωτεϊνών, οι RNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (RNA - directed RNA polymerases, RDR). Οι RDR είναι οι πρωτεΐνες που μετατρέπουν μονόκλωνα μόρια

RNA σε dsRNA, που αποτελούν ακολούθως υπόστρωμα για τις DCLs (Vaucheret, 2006). Αρχικά οι RDRs συγχέονταν με τις ιικής προέλευσης RNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (RNA-dependent RNA polymerases, RdRps), καθώς παρατηρήθηκε ότι η δράση τους αυξανόταν κατά τη διάρκεια μόλυνσης με ιό. Ωστόσο, είναι πλέον γνωστό ότι ο ρόλος τους είναι σημαντικός για την εγκαθίδρυση της άμυνας έναντι των ιών (Baulcombe, 2004). Στα φυτά έχουν ανιχνευθεί έξι RDRs, αλλά μόνο οι RDR1, RDR2 και RDR6 είναι καλά χαρακτηρισμένες. Συγκεκριμένα, οι RDR1 και RDR6 στο φυτό *Arabidopsis thaliana* είναι οι πολυμεράσες που ενεργοποιούνται κατά την ιική μόλυνση και παρουσία σαλικυλικού οξέως. Η RDR2 εντοπίζεται στον πυρήνα και συμμετέχει στη μεθυλίωση του DNA (Michael Wassenegger & Krczal, 2006).

Τέλος, σημαντικό ρόλο κατέχουν οι πρωτεΐνες HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) και SERRATE (SE) που προσδένουν dsRNA μόρια, συμβάλλοντας στην πέψη τους από την DCL1. Επιπλέον, τα ώριμα miRNA σταθεροποιούνται μέσω της δράσης της μεθυλτρανσφεράσης HUA ENHANCER 1 (HEN1), που μεθυλιώνει τα RNAs στο 3’ άκρο της κάθε αλυσίδας, αποτρέποντας την αποικοδόμησή τους (Voinnet, 2009)

1.3 Τα μονοπάτια της RNA σίγησης

Ανάλογα με την φύση των μικρών RNA που στοχεύονται, ενεργοποιούνται διαφορετικά μονοπάτια σίγησης, των οποίων οι τελεστές παρουσιάζουν εξελικτική συντήρηση στους ευκαρυώτες (Meister & Tuschi, 2004). Παρά τις διαφορές τους, όλα τα μονοπάτια συνίστανται σε τρία βασικά βήματα: την εκ των προτέρων ύπαρξη ή δημιουργία δίκλωνου RNA (dsRNA), την κοπή του σε μικρά RNAs και την κατασταλτική δράση των μικρών RNAs, με τη βοήθεια των κατάλληλων



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών μονοπατιών RNA σίγησης: (a) microRNA, (b) trans-acting siRNA, (c) ιικό siRNA, (d) μονοπάτι ετεροχρωματικών siRNAs. Τα μικρά RNAs υποβάλλονται σε επεξεργασία από τις Dicer-like (DCL) πρωτεΐνες. Ενσωματώνονται σε σύμπλοκα AGO με σκοπό την αναγνώριση και καταστροφή της αλληλουχίας - στόχου. Οι RDRs μετατρέπουν τα μετάγραφα που παράγονται από την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II (POL II) και IV (POL IV) σε dsRNA. Οι σχετικές πρωτεΐνες RDR, DCL και AGO που λειτουργούν σε κάθε οδό και τα μεγέθη και οι λειτουργίες των παραγόμενων sRNAs φαίνονται στην εικόνα. Το RISC αναφέρεται στο σύμπλοκο σίγησης που αποτελείται από μια πρωτεΐνη AGO, ένα sRNA και άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες. Οι διαφορετικές συνθέσεις των συμπλεγμάτων RISC υποδεικνύονται με διαφορετικά χρώματα. (Εικόνα προσαρμοσμένη από Molnar et al. 2011).

συμπλόκων, σε μερικώς ή πλήρως συμπληρωματικό RNA ή DNA (Εικόνα 3) (Molnar, Melnyk, & Baulcombe, 2011).

Συγκεκριμένα, διακρίνονται τέσσερα μονοπάτια. Αρχικά, διακρίνεται το ενδογενές μονοπάτι των μικρών RNAs (microRNA, miRNA). Τα ενδογενή μετάγραφα με συμπληρωματικές επαναλήψεις ζευγών βάσεων σχηματίζουν φουρκέτες dsRNA. Το ενδογενές γονίδιο MIR μεταγράφεται από την πολυμεράση II (Pol II). Το πρωτογενές μετάγραφο που προκύπτει (primary miRNA, pri-miRNA) κόβεται από την DCL1 στον πυρήνα και δημιουργείται το δευτερογενές μετάγραφο,

το πρόδρομο miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA). Αυτό, εν συνεχεία, επεξεργάζεται προς ώριμο miRNA από την DCL1. Τα ώριμα miRNA μόρια μεσολαβούν έπειτα στην καταστολή της μετάφρασης γονιδίων, ενώ μπορεί να οδηγήσουν και σε αποικοδόμηση του mRNA (Meister & Tuschi, 2004).

Επιπλέον, το εξωγενές μονοπάτι των μικρών παρεμβαλλόμενων RNAs (short interfering RNA, siRNA) είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση μολυσμένων από ιό φυτικών κυττάρων (Hamilton & Baulcombe, 1999). Στην περίπτωση αυτή, τα υπεύθυνα dsRNA μόρια είναι ενδιάμεσα αναδιπλασιασμού ή δευτερογενείς δομές του μονόκλωνου ιικού RNA. Ως αποτέλεσμα, στα νεοσχηματιζόμενα φύλλα ενός μολυσμένου φυτού παρατηρείται ανοσία, παρότι η ύπαρξη της μόλυνσης έχει εντοπιστεί ήδη σε γηραιότερα φύλλα. Σε αντιστοιχία με την είσοδο ιικών siRNAs δρουν και τα διαγονίδια. Η έκφρασή τους δεν είναι σταθερή, αλλά αποσιωπάται, ενώ ένα διασυστηματικό σήμα παράγεται και μεταφέρεται μέσω του φλοιώματος στα νεοσχηματιζόμενα φύλλα, επάγοντας τη σίγηση του διαγονιδίου (Kalantidis, Schumacher, Alexiadis, & Helm, 2008; Tournier, Tabler, & Kalantidis, 2006)

Επιπροσθέτως, υπάρχει το μονοπάτι της RNA σίγησης που οφείλεται σε μικρά μη κωδικά RNA μόρια πέραν των siRNAs και miRNAs, όπως είναι τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs με trans δράση (trans-acting siRNAs, tasiRNAs) και τα φυσικά αντικωδικά μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (natural antisense RNAs, natsiRNAs) (Borsani, Zhu, Verslues, Sunkar, & Zhu, 2005; Chapman & Carrington, 2007). Τα tasiRNAs προκύπτουν όταν τα TAS μετάγραφα στοχεύονται από miRNAs. Συγκεκριμένα, τα miR173 και miR390 στοχεύουν και κόβουν TAS μετάγραφα, με το προϊόν κοπής να αποτελεί το υπόστρωμα της RDR6. Κατά συνέπεια, προκύπτει ένα dsRNA το οποίο πέπτεται από την DCL4 και τα παραγόμενα siRNAs αναγνωρίζουν στόχους διαφορετικούς από τα TAS μετάγραφα, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η

ονομασία trans-acting siRNAs (Allen, Xie, Gustafson, & Carrington, 2005). Στην περίπτωση των natsiRNAs η παραγωγή dsRNA μορίων προκύπτει από το ζευγάρωμα σημαίνοντων και αντισημαίνοντων μεταγράφων κάποιου γονιδίου. Τα dsRNAs επεξεργάζονται περαιτέρω από την DCL2 και τα παραγόμενα natsiRNAs στοχεύουν ένα από τα μετάγραφα του αρχικού σημαίνοντος – αντισημαίνοντος ζευγαριού. Το μόριο που προκύπτει αποτελεί ύστερα υπόστρωμα για την RDR6 και το νέο dsRNA που δημιουργείται μετά τη δράση της DCL1 οδηγεί σε αποικοδόμηση των ομόλογων μεταγράφων (Bologna & Voinnet, 2014; Borsani et al., 2005).

Τέλος, ένα τέταρτο μονοπάτι σίγησης είναι αυτό της RNA-εξαρτώμενης DNA μεθυλίωσης (RNA-directed DNA Methylation, RdDM). Άρχισε να ερευνάται έπειτα από παρατήρηση RNA-κατευθυνόμενης μεθυλίωσης του DNA σε φυτά μολυσμένα από ιό και κατά την έκφραση διαγονιδίων (Mette, Aufsatz, Van der Winden, Matzke, & Matzke, 2000; M Wassenegger, Heimes, Riedel, & Sanger, 1994), ενώ δεν άργησε να διαπιστωθεί η κληρονομησιμότητα των επιγενετικών αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση (Jones, Ratcliff, & Baulcombe, 2001). Στα φυτά, παρουσία μορίων RNA που καθοδηγούν το μηχανισμό της RdDM, το πρότυπο μεθυλίωσης διαφοροποιείται από το σύνηθες. Συγκεκριμένα, παρατηρείται *denovo* μεθυλίωση σε CG περιοχές (συμμετρική), αλλά και σε CHG (σχεδόν συμμετρική) και CHH (μη συμμετρική), όπου το H συμβολίζει κάποια από τις αζωτούχες βάσεις A, C ή T (Dalakouras & Wassenegger, 2013; Pélissier et al., 1999). Παρά το γεγονός ότι δεν είναι ξεκάθαρο εάν απαιτείται πλήρης συμπληρωματικότητα του οδηγού RNA με την αλληλουχία-στόχο, έχει βρεθεί ότι η αποτελεσματικότητα για την πρόκληση μεθυλίωσης επηρεάζεται σημαντικά από την ομοιότητα στην αλληλουχία επαγωγέα-στόχου (Dalakouras, Dadami, Wassenegger, Krczal, & Wassenegger, 2016). Με βάση τα σύγχρονα δεδομένα, η επαγωγή της *de novo* μεθυλίωσης φαίνεται να συσχετίζεται με

την παρουσία 24-nt siRNAs, η παραγωγή των οποίων γίνεται από την DCL3 και εξαρτάται από την POLIV η οποία αποτελεί και τον βασικό παράγοντα έναρξης του μονοπατιού της RdDM (Bond & Baulcombe, 2015; Dalakouras, Dadami, & Wassenegger, 2013; Marjori A. Matzke & Mosher, 2014).

1.4 Ο ρόλος των φυτικών RNase III πρωτεϊνών

Η οικογένεια των RNase III ενδονουκλεασών συνίσταται από dsRNA εξειδικευμένες ενδονουκλεάσες, χαρακτηριστικό των οποίων είναι μια συντηρημένη περιοχή 9 αμινοξέων στο καταλυτικό τους κέντρο, το RNase III – μοτίβο (RNase III signature motif) (Blaszczyk et al., 2001; Filippov, Solovyev, Filippova, & Gill, 1999).

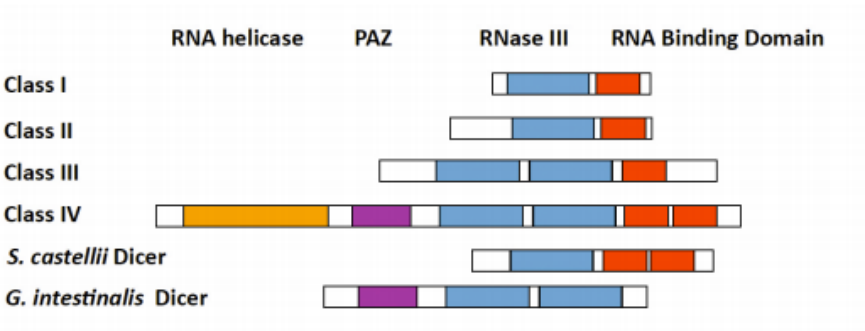
```
                                  αααα1αααα      αααααααα2ααααα                αααααααααααααααα3αααααααααααααααα
Aa-RNase III:   1   --MKMLEQLEKKLGYTFKDKSLLEKALTHVSYSKKEHYETLEFLGDALVNFFIVDLLVQYSPNK 62
                              |  ||||||    ||  |||| | | | | | ||||||      |   |    |
Ec-RNase III:   1   MNPIVINRLQRKLGYTFNHQELLQQALTHRSASSK-HNERLEFLGDSILSYVIANALYHRFPRV 63
                                                          1  2
                                                   "Signature" Motif

                    αααααααα4αααααααα   αααααααα5αααααααα  3¹⁰                αααααααααααααα6αααααααααααααα
Aa-RNase III:   63  REGFLSPLKAYLISEEFFNLLAQKLELHKFIRIKRGKI------NETIIGDVFEALWAAVYIDS 120
                     ||  |   | |        ||   ||    |   |         | |  |  |||   |  ||
Ec-RNase III:   64  DEGDMSRMRATLVRGNTLAELAREFELGECLRLGPGELKSGGFRRESILADTVEALIGGVFLDS 127
                                                     3                   4
```

Εικόνα 4. Προσαρμοσμένη εικόνα των Blaszczyk et al., 2001. Στο κουτί φαίνεται το συντηρημένο RNaseIII - μοτίβο στις στοιχισμένες ριβονουκλεάσες των οργανισμών Aquifex aeolicus (Aa- RNase III) και Escherichia coli (Ec-RNase III).

Το μήκος των RNase III πρωτεϊνών κυμαίνεται μεταξύ 200 έως 2000 αμινοξέων, ανάλογα με τον αριθμό των επιπρόσθετων επικρατειών που φέρουν. Κατανέμονται σε τέσσερις κατηγορίες με βάση το μοριακό βάρος τους και τη δομική πολυπλοκότητα (Εικόνα 5) (Filippov et al., 1999). Πιο αναλυτικά, στην κατηγορία I (Class I) εντάσσονται οι ριβονουκλεάσες που φέρουν μόνο μία RNaseIII και μία DRB επικράτεια, οι οποίες έχουν βρεθεί σε βακτήρια και ιούς, με αυτές των Aquifex

aeolicus (Aa- RNase III) και Escherichia coli (Ec-RNase III) να αποτελούν αντιπροσωπευτικό παράδειγμα. Η κατηγορία II (Class II) διαφέρει από την κατηγορία I στην ύπαρξη ενός τμήματος περίπου 200 αμινοξέων επιπλέον στο N-τελικό άκρο, ενώ φέρει τον ίδιο αριθμό επικρατειών. Στην κατηγορία II υπάγεται η ριβονουκλεάσ η Rnt1 του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και η Pac1 του *S. Pombe*. Οι ριβονουκλεάσες της κατηγορίας III (Class III) φέρουν επίσης ένα πρόσθετο τμήμα στο N-τελικό άκρο με μία DRB επικράτεια και δύο περιοχές RNaseIII. Σε αυτή περιλαμβάνεται η πρωτεΐνη Drosha, η οποία στο ζωικό βασίλειο αναλαμβάνει την πέψη των πρόδρομων miRNAs, χωρίς να έχει όμως την ικανότητα να παράγει από μόνη της μικρά RNAs. Την πολυπλοκότερη δομή έχουν οι πρωτεΐνες της κατηγορίας IV (Class IV), καθώς διαθέτουν μια περιοχή RNA ελικάσης, μία επικράτεια PAZ, μία ή δύο περιοχές RNase III και μία ή δύο περιοχές DRB. Οι πρωτεΐνες Dicer ή DCL, ζωικές ή φυτικές, είναι οι μόνες RNase III πρωτεΐνες που έχει δειχθεί ότι παράγουν μικρά RNAs 18-24 nt (Filippov et al., 1999; Shamandi et al., 2015).



Εικόνα 5. Οι κατηγορίες των RNase III πρωτεϊνών. Τα χρώματα αντιστοιχούν στις διαφορετικές επικράτειες που αναγράφονται (προσαρμοσένη εικόνα από Nahid Shamandi. Functional analysis of plant RNaseIII enzymes. Agricultural sciences. Université Paris Sud - Paris XI, 2013).

Οι φυτικές RNase III διακρίνονται σε δύο ξεχωριστές ομάδες: Dicer – Like (DCL) και RNase Three – Like (RTL) πρωτεΐνες (Πίνακας 1) (Olmedo & Guzmán, 2008).

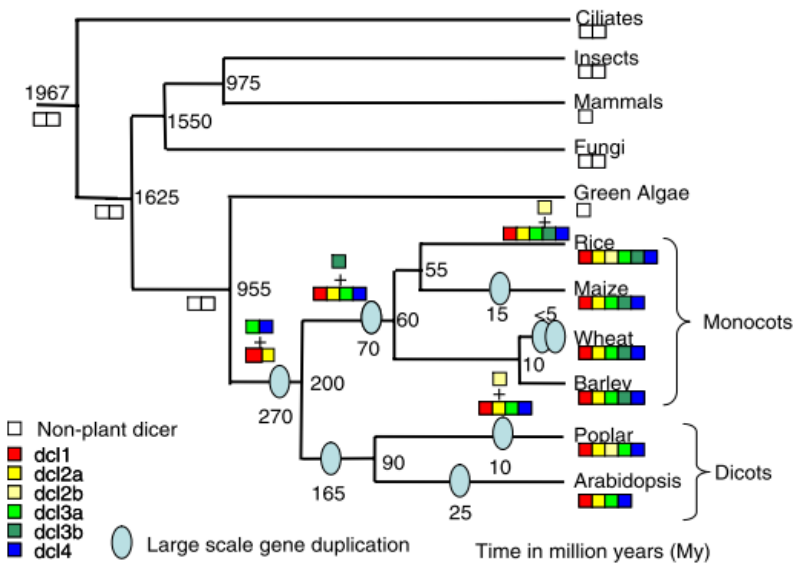
Πίνακας 1. Οι δύο ομάδες των φυτικών RNase III, DCL και RTL. (Προσαρμοσμένο από Olmedo et al. 2008)

Dicer-like enzymes	Number of genes			Processed products (predominant small RNA size)
	At	Os	Pt	
DCL1	1	1	1	miRNA (21 nt)
DCL2	1	2	2	Viral siRNAs (22–24 nt)
DCL3	1	2	1	Heterochromatin siRNAs (24 nt)
DCL4	1	1	1	Transactivating ta-siRNA (21 nt)
Non-Dicer-like enzymes				
RTL1	1	1	nd	nd
RTL2	1	1	nd	3′ETS from pre-rRNA
RTL3	1	1	nd	nd
RNC1	1	1	nd	Chloroplasts Group II Intron
Mini III	2	2	1	nd (Chloroplasts rRNA?)

At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa*; Pt, *Populus trichocarpa*; nd, not determined

1.4.1 Οι DCL πρωτεΐνες

Οι φυτικές DCL αποτελούν μία μονοφυλετική ομάδα πρωτεϊνών που εμφανίστηκε εξελικτικά πριν το διαχωρισμό μονοκοτυλήδονων – δικοτυλήδονων αλλά μετά το διαχωρισμό φυτών – άλγεων (Εικόνα 6) (Margis et al., 2006). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι DCL πρωτεΐνες είναι αυτές που πυροδοτούν την έναρξη του μηχανισμού της RNA σίγησης, μέσω της παραγωγής μικρών δίκλωνων RNA μορίων. Η έκφρασή τους είναι συστατική αλλά όχι ομοιόμορφα κατανεμημένη στους ιστούς, ενώ διαφέρει επίσης στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και κατά την απόκριση σε καταπονήσεις (Q. Liu, Feng, & Zhu, 2009). Η μελέτη των τεσσάρων ορθολόγων DCL του φυτού *Arabidopsis thaliana* έχει δείξει ότι οι DCL1, DCL2 και DCL4 έχουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στο στάδιο



Εικόνα 6. Προτεινόμενο φυλογενετικό δέντρο των Dicer γονιδίων, (προσαρμοσμένο από Margi et al., 2006).

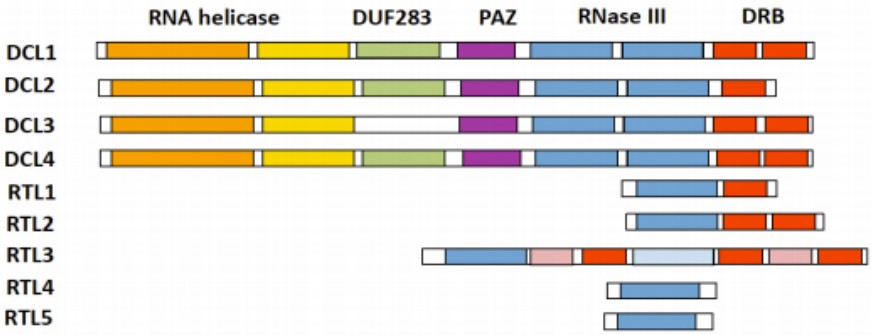
φυλλικής ή βλαστικής ανάπτυξης σε αντίθεση με την DCL3. Όσον αφορά, όμως, τα άνθη και τα σπέρματα, τα πρότυπα έκφρασης διαφέρουν σε κάθε DCL (Q. Liu et al., 2009). Υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, έχει βρεθεί ότι η DCL1 μειώνεται, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες DCL των οποίων τα επίπεδα διατηρούνται σταθερά. Επιπλέον, μελέτες επίδρασης του υψηλής έντασης φωτισμού στη σίγηση στο φυτό *Nicotiana benthamiana* έδειξαν αύξηση των επιπέδων της DCL3 (Kotakis et al., 2010).

Αναφορικά με τη λειτουργία τους, οι ρόλοι τους είναι επίσης διακριτοί, παρά τις βασικές ομοιότητες που παρουσιάζουν. Η DCL1 πέπτει dsRNA μόρια, με αποτέλεσμα την παραγωγή μικρών RNAs μήκους 21 νουκλεοτιδίων. Ο βασικός της ρόλος εντοπίζεται στην παραγωγή των ώριμων miRNAs και των ενδογενών siRNAs (Voinnet, 2009). Η DCL2 έχει αντι-ιικό ρόλο και φαίνεται να δρα συνεργατικά και ιεραρχικά με την DCL4. Παρουσία ιικού RNA τα δευτερογενή dsRNA του ιού που παράγονται από την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση αναγνωρίζονται από τις DCL2 και DCL4 και κόβονται σε μικρά dsRNA μήκους 22 και 21 ζευγών βάσεων, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την επαγωγή και εξάπλωση της σίγησης των ιικών γονιδίων (J.-S. Parent, Bouteiller, Elmayan, & Vaucheret, 2015). Ωστόσο, από μόνη της η DCL4 είναι υπεύθυνη για την παραγωγή 21 nt ta-siRNAs, μετά από miRNA – επαγόμενη πέψη TAS μεταγράφων και δημιουργία δίκλωνων μορίων από την RDR6 (Nakazawa, Hiraguri, Moriyama, & Fukuhara, 2007). Τέλος, η DCL3 δημιουργεί 24 nt siRNAs που προέρχονται από τρανσποζόνια και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA και είναι η κατεξοχήν DCL πρωτεΐνη που επάγει τη μεταγραφική γονιδιακή σίγηση μέσω της RNA - εξαρτώμενης μεθυλίωσης του DNA (RdDM) (Henderson et al., 2006; Marjori A. Matzke & Mosher, 2014).

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των DCL1, DCL2 και DCL3 είναι αποκλειστικά στον πυρήνα, κάτι που δε συμβαίνει στην περίπτωση της DCL4. Η DCL4 έχει βρεθεί στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, ανάλογα με το αν ο υποκινητής του DCL4 γονιδίου έχει υποστεί μεθυλίωση. Αν υπάρχει μεθυλίωση, η πρωτεΐνη που μεταγράφεται περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS) και έτσι δρα στον πυρήνα, ενώ στη μη μεθυλιωμένη μορφή του γονιδίου η NLS περιοχή λείπει και έτσι η πρωτεΐνη DCL4 λειτουργεί στο κυτταρόπλασμα, όπου μπορεί να ασκήσει την αντι-ιική της δράση (Pumplin et al., 2016).

1.4.2 Οι RTL πρωτεΐνες

Μια διακριτή ομάδα RNase III πρωτεϊνών συνιστούν οι RNase Three – Like πρωτεΐνες (RTL). Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει ενδονουκλεάσες με δομή απλούστερη των DCL (Εικόνα 7), που παραπέμπει σε αυτή των RNase III ενζύμων ορισμένων βακτηρίων και μυκήτων. (Comella et al., 2008; Olmedo & Guzmán, 2008). Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί στο φυτό – μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, όπου έχουν εντοπιστεί πέντε γονίδια RTL (RTL1 – RTL5). Η δομική διαφορά RTL και DCL έγκειται στο ότι οι πρώτες φέρουν μόνο μία ή δύο RNase III επικράτειες και, στην περίπτωση των RTL1, RTL2 και RTL3 του *Arabidopsis thaliana*, μία ή περισσότερες DRB περιοχές



Εικόνα 7. Φυτικές RNase III ενδονυκλεάσες - δομικές διαφορές των DCL και RTL του Arabidopsis thaliana. (προσαρμοσένη εικόνα από Nahid Shamandi. Functional analysis of plant RNaseIII enzymes. Agricultural sciences. Université Paris Sud - Paris XI, 2013).

(Shamandi et al., 2015). Πρόσφατα έχει διερευνηθεί η εμπλοκή των RTL1 και RTL2 στο φαινόμενο της RNA σίγησης.

Η RTL1 εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των κυττάρων και εκφράζεται ασθενώς μόνο στις ρίζες στο είδος *Arabidopsis* (Comella et al., 2008; Shamandi et al., 2015). Κόβει μεγάλου μήκους τέλεια ή σχεδόν τέλεια δίκλωνα μόρια RNA πριν την επεξεργασία τους από τις DCL2, DCL3 και DCL4 (Shamandi et al., 2015). Ως εκ τούτου, υπερέκφραση της RTL1 οδηγεί σε παρεμπόδιση της συσσώρευσης όλων των μεγεθών siRNA μορίων, χωρίς όμως να επηρεάζεται η συγκέντρωση των miRNA που παράγονται από τη δράση της DCL1. Επιπλέον, ο αντι – ιικός ρόλος της RTL1 προκύπτει από το γεγονός ότι ιική μόλυνση επάγει την έκφρασή της, ενώ στοχεύεται και από ιικούς καταστολείς της σίγησης (Shamandi et al., 2015). Επιπλέον, η προσθήκη γλουταθειόνης σε μια συντηρημένη κυστεΐνη της DRB περιοχής της RTL1 είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της RNase III δράσης της (Charbonnel et al., 2017). Η RTL2 φαίνεται να συμμετέχει στην ωρίμανση των ριβοσωμικών RNAs (ribosomal RNAs, rRNAs), κόβοντας στην 3’ εξωτερική μεταγραφόμενη περιοχή (External Transcribed Spacer, ETS) του 45S pre-rRNA (Comella et al., 2008). Έχει βρεθεί ακόμη ότι η πέψη dsRNA μορίων από την RTL2 οδηγεί σε παραγωγή μικρών RNA μήκους 21-25 νουκλεοτιδίων (Kiyota et al., 2011) και διαμερισματοποιείται στον κυτταρικό πυρήνα και το κυτταρόλασμα (Comella et al., 2008; Shamandi et al., 2015). Επιπλέον, ρυθμίζει τη συγκέντρωση των siRNA που παράγονται από την DCL3, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η μεθυλίωση του DNA (Elvira-Matelot et al., 2016). Η RTL3 είναι η μεγαλύτερη σε μήκος πρωτεΐνη της οικογένειας των RTL και φέρει δύο RNase III και τρεις DRB επικράτειες. Ωστόσο, δεν έχει ανιχνευθεί ποτέ σε κανέναν ιστό, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι δεν είναι λειτουργικό γονίδιο αλλά, πιθανώς, αποτελεί ψευδογονίδιο (Comella et al.,

2008). Αντίθετα, η RTL4 (ή Nuclear Defective Protein, NFD) βρέθηκε να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Δομικά, φέρει μόνο μία RNase III επικράτεια, που παραπέμπει στη δομή της Mini-III ενδονουκλεάσης του *Bacillus subtilis* (Redko, Bechhofer, & Condon, 2008). Σε μεταλλάγματα *rtl4* καταστρέφεται η ικανότητα δημιουργίας αρσενικών και θηλυκών γαμετοφύτων, εντούτοις η λειτουργία του γονιδίου σε μοριακό επίπεδο δεν έχει διαλευκανθεί (Portereiko et al., 2006). Η RTL5 περιλαμβάνει επίσης μία RNase III επικράτεια και όχι DRB. Η έκφρασή της εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς. Μέχρι στιγμής δεν έχει μελετηθεί στο είδος *Arabidopsis*, αλλά παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την ενδονουκλεάση RNC1 του φυτού *Zea mays*, η οποία εμπλέκεται στη διαδικασία ματίσματος εσωνίων στους χλωροπλάστες (Watkins et al., 2007).

1.5 Ιοειδή : οι λιλιπούτειοι εχθροί των φυτών

1.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Ο όρος ιοειδή (viroids) προτάθηκε το 1971 ως νέα κατηγορία φυτοπαθογόνων αφενός για να διαχωριστεί από την κατηγορία των φυτικών ιών και αφετέρου για να τονιστεί και η ομοιότητα που φαινόταν να έχουν με τους ιούς, οι οποίοι ήταν γνωστοί από τις αρχές του 19ου αιώνα (Diener, 1971). Τα ιοειδή είναι τα μικρότερα και δομικά απλούστερα παθογόνα των φυτών. Αποτελούνται από ομοιοπολικά κλειστά κυκλικά μόρια RNA απλής αλυσίδας (single stranded RNA, ssRNA), των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 246 - 401 νουκλεοτίδια και δεν περιβάλλονται από πρωτεϊνικό καψίδιο. Λόγω υψηλής συμπληρωματικότητας των βάσεων στα μόρια RNA των ιοειδών, σε πολλές περιπτώσεις παρατηρούνται δευτερογενείς δομές, ραβδόμορφες ή σχεδόν ραβδόμορφες, που δημιουργούνται με τη χρήση ελάχιστης

ελεύθερης ενέργειας (Giguere, Adkar-Purushothama, & Perreault, 2014). Για τον πολλαπλασιασμό τους στηρίζονται σχεδόν αποκλειστικά στον ξενιστή, καθότι δεν κωδικοποιούν καμία πρωτεΐνη (Daros, 2016). Το γεγονός αυτό ενισχύει τη σημασία της δομής του μορίου, εφόσον στηρίζονται μόνο σε αυτή για τον αυτόνομο αναδιπλασιασμό, τη μετακίνηση και τη μολυσματική τους ικανότητα, καθώς και για να καταφέρουν να υπερνικούν το μηχανισμό της RNA σίγησης του ξενιστή (Ding, 2010). Κατά τον αναδιπλασιασμό των ιοειδών προκύπτουν ενδιάμεσα μόρια dsRNA, ικανά να πυροδοτήσουν την ενεργοποίηση του μηχανισμού της RNA σίγησης στο προσβεβλημένο φυτό (Wang et al., 2004). Έρευνες έχουν δείξει ότι μολυσμένα με ιοειδή φυτά επιστρατεύουν όλες τις DCL έναντι των ώριμων μορίων RNA των ιοειδών. Ως αποτέλεσμα της δράσης των DCL παράγονται λειτουργικά μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA ιοειδούς (viroid small interfering RNAs, vd-siRNAS), τα οποία μάλιστα δεν υφίστανται κατακερματισμό από τη δράση της νουκλεάσης RISC (Dadami et al., 2013; Itaya et al., 2007; Navarro et al., 2009).

1.5.2 Ταξινόμηση – Ονοματολογία

Η ονοματολογία των ιοειδών παρουσιάζει ομοιότητες με αυτή των φυτικών ιών. Στηρίζεται στο αγγλικό τριώνυμο του οποίου η πρώτη λέξη αφορά τον ξενιστή στον οποίο βρέθηκε για πρώτη φορά το παθογόνο, η δεύτερη σχετίζεται με τα συμπτώματα που προκαλεί στον ξενιστή και η τρίτη περιγράφει το παθογόνο (viroid), όλα αποτυπωμένα με πλάγιους χαρακτήρες (italics) . Η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) έχει ταξινομήσει τα ιοειδή σε δύο οικογένειες (Di Serio et al., 2014):

Οικογένεια Avsunviroidae: Η οικογένεια απαρτίζεται από 3 γένη (Avsunviroid, Pelamoviroid και Elaviroid) στα οποία κατατάσσονται 4 ιοειδή (Πίνακας 2). Χαρακτηριστικό των ιοειδών είναι απουσία της κεντρικής συντηρημένης περιοχής, ενώ ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται στους χλωροπλάστες των κυττάρων.

Πίνακας 2. Μέλη της οικογένειας Avsunviroidae (από DiSerio et al., 2014).

Family *Avsunviroidae*	
Genus *Avsunviroid*	1 species - *Avocado sunblotch viroid*
Genus *Pelamoviroid*	2 species - *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, *Peach latent mosaic viroid*
Genus *Elaviroid*	1 species - *Eggplant latent viroid* [a]

Οικογένεια Pospiviroidae: Συνίσταται από 5 γένη (Pospiviroid, Hostuviroid, Cocadviroid, Apscaviroid και Coleviroid) στα οποία εντάσσονται 28 είδη ιοειδών (Πίνακας 3). Τα μέλη της οικογένειας χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας κεντρικής συντηρημένης περιοχής και τον πολλαπλασιασμό στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων.

Πίνακας 3. Μέλη της οικογένειας Pospiviroidae *(από* DiSerio et al., 2014*).*

Family Pospiviroidae	
Genus Pospiviroid	10 species - *Chrysanthemum stunt viroid, Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Iresine viroid 1, Mexican papita viroid, Pepper chat fruit viroid, Potato spindle tuber viroid, Tomato apical stunt viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Tomato planta macho viroid*
Genus Hostuviroid	1 species - *Hop stunt viroid*
Genus Cocadviroid	4 species - *Citrus bark cracking viroid, Coconut cadang- cadang viroid, Coconut tinangaja viroid, Hop latent viroid*
Genus Apscaviroid	10 species - *Apple dimple fruit viroid, Apple scar skin viroid, Australian grapevine viroid, Citrus bent leaf viroid, Citrus dwarfing viroid, Citrus viroid V, Citrus viroid VI, Grapevine yellow speckle viroid 1, Grapevine yellow speckle viroid 2, Pear blister canker viroid*
Genus Coleviroid	3 species - *Coleus blumei viroid* 1, 2, 3

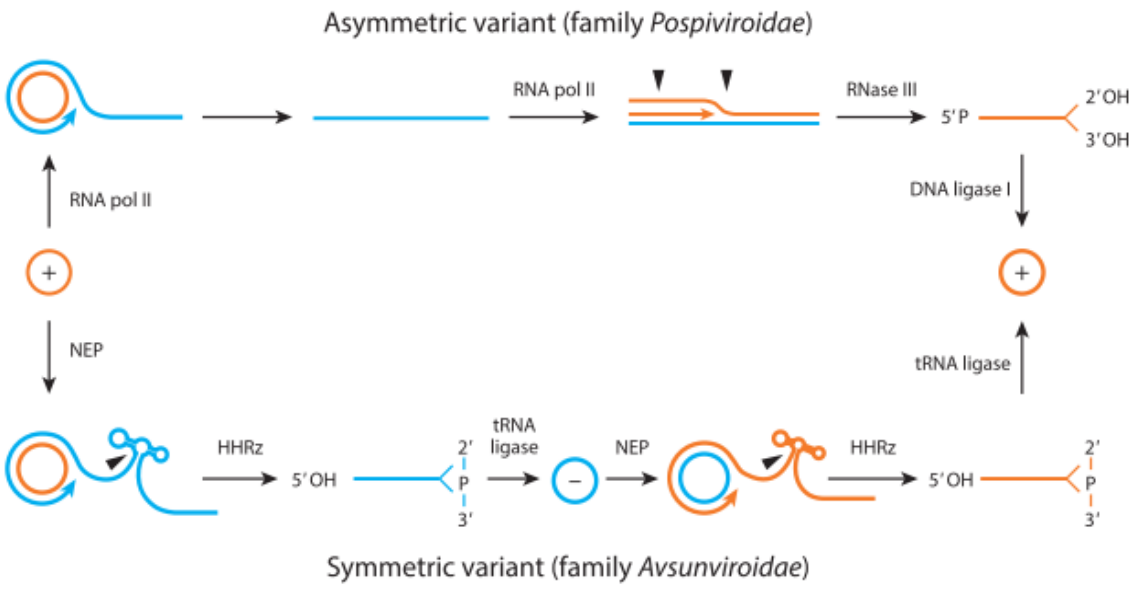
1.5.3 Τρόποι μετάδοσης των ιοειδών

Όπως όλοι οι φυτοπαθογόνοι παράγοντες, έτσι και τα ιοειδή μεταδίδονται με τη χρήση μολυσμένου αγενούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Επιπλέον, αποτελεσματική μετάδοση επιτυγχάνεται και με μηχανικό τρόπο μέσω οπών των κυτταρικών μεμβρανών (Flores, Hernandez, Alba, Daros, & Serio, 2005). Αξίζει να αναφερθεί πως η αναδιπλωμένη μορφή του μορίου των ιοειδών τους προσδίδει μεγάλη ανθεκτικότητα με αποτέλεσμα να παραμένουν μολυσματικά για μεγάλο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) μπορεί να μεταδοθεί με τον σπόρο καθώς και τη γύρη, επιβιώνοντας στην επιφάνειά τους για εκτεταμένο χρονικό διάστημα Τέλος, για πολλά χρόνια δεν είχε αναφερθεί μετάδοση μέσω φορέων, πέρα από τον άνθρωπο που συμβάλλει στη μετάδοση κυρίως με τις καλλιεργητικές πρακτικές. Παρόλα αυτά, πλέον γνωρίζουμε ότι υπάρχει περίπτωση μετάδοσης μέσω αφίδων (*Myzus persicae*) και βομβίνων (*Bombus ignitus*), που έχει διερευνηθεί για τα ιοειδή PSTVd και TASVd (*Tomato apical stunt* viroid) (Antignus, Lachman, & Pearlsman, 2007; Bogaert, Jonghe, Damme, Maes, & Smagghe, 2015; Matsuura & Matsushita, 2010).

1.5.4 Η αναπαραγωγή των ιοειδών

Τα μέλη της οικογένειας Avsunviroidae αναπαράγονται στους χλωροπλάστες σύμφωνα με το μηχανισμό του συμμετρικού κυλιόμενου κύκλου (symmetric rolling-circle mechanism) (Εικόνα 8), που μελετήθηκε κυρίως στο σύστημα ASBVd-avocado (Ιοειδές ηλιοκηλίδων του αβοκάντο, *Avocado Sunblotch Viroid*, ASBVd) (Daròs, Marcos, Hernández, & Flores, 1994). Το κυκλικό (+) RNA μεταγράφεται αρχικά προς ένα γραμμικό αλυσσιδομερές (-) RNA. Έπειτα, αυτό κόβεται σε τμήματα από

συγκεκριμένα «σφυροκέφαλα» ριβοένζυμα (De la Peña, Gago, & Flores, 2003) και επανακυκλοποείται ώστε να αποτελέσει μήτρα για την δημιουργία ενός γραμμικού αλυσσιδομερούς (+) RNA, το οποίο επίσης κόβεται και κυκλοποιείται (Flores, Gago-Zachert, Serra, Sanjuán, & Elena, 2014). Η συμμετρία που παρατηρείται μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου μισού του κύκλου είναι ο λόγος που ο μηχανισμός καλείται συμμετρικός κυλιόμενος κύκλος.



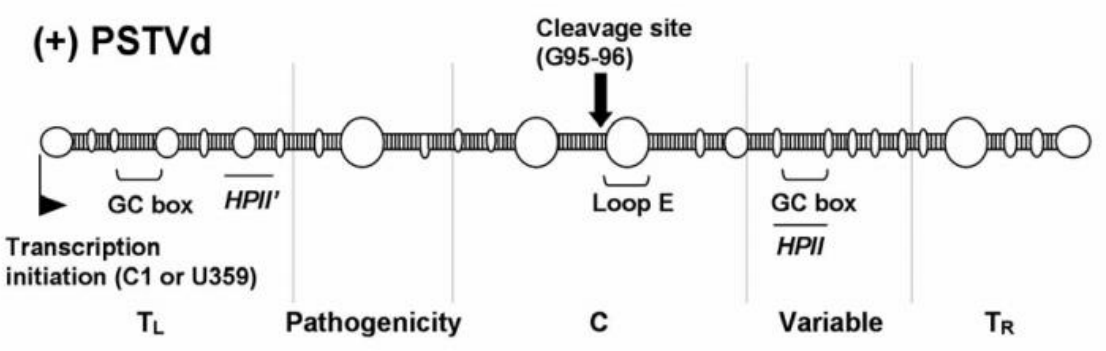
Εικόνα 8. Ασύμμετρες και συμμετρικές παραλλαγές του μηχανισμού κυλιόμενου κύκλου που προτείνεται για την αντιγραφή των μελών των οικογενειών Pospiviroidae και Avsunviroidae, αντίστοιχα. Τα πορτοκαλί και μπλε χρώματα αναφέρονται σε θετικής και αρνητικής πολικότητας αλυσίδες RNA, αντίστοιχα, με τις θέσεις κοπής να σημειώνονται με βέλη. Αναφέρονται τα ένζυμα και τα ριβοένζυμα τα οποία πιθανότατα καταλύουν τα βήματα αναδιπλασιασμού. Σημειώνεται ότι η RNA πολυμεράση II (και η NEP) ανακατευθύνεται για να μεταγράψει τα RNA - καλούπια και λιγάση DNA 1 για την κυκλοποίηση RNA υποστρωμάτων. Συντομογραφίες: HHRz: «σφυροκέφαλα» ριβοένζυμα (hammerhead ribozymes), NEP: πυρηνική κωδικοποιημένη πολυμεράση.(Εικόνα προσαρμοσμένη από Flores et al., 2014).

Όσον αφορά τα μέλη της οικογένειας Pospivioridae, πολλαπλασιάζονται στον πυρήνα του κυττάρου με το μηχανισμό του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου (Εικόνα 8) (Branch & Robertson, 1984). Το κυκλικό (+)RNA του ιοειδούς μεταγράφεται αρχικά σε γραμμικό αλυσσιδομερές (-)RNA στο πυρηνόπλασμα. Αυτό, εν συνεχεία,

χρησιμεύει ως ενδιάμεσο αναπαραγωγής για τη δημιουργία γραμμικών αλυσσιδομερών (+)RNA. Έπειτα, αυτά είτε μεταφέρονται πρώτα στον πυρηνίσκο, όπου κόβονται από κάποια RNase III ενδονουκλεάση και κυκλοποιούνται με τη δράση λιγάσης, ή κόβονται και κυκλοποιούνται στο πυρηνόπλασμα ώστε να μεταφερθεί στον πυρηνίσκο το ώριμο RNA του ιοειδούς (Qi & Ding, 2003).

1.6 Το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid,* PSTVd)

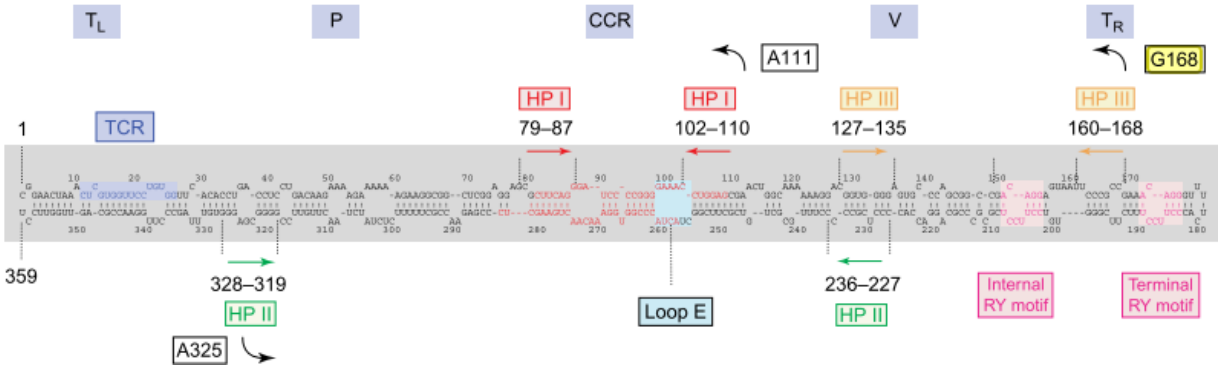
Το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας (*Potato spindle tuber viroid,* PSTVd) είναι το πρώτο παθογόνο της κατηγορίας των ιοειδών που μελετήθηκε το 1967 και βρέθηκε να σχετίζεται με σημαντική υποβάθμιση της παραγωγής πατάτας (Diener & Raymer, 1967). Ωστόσο, η πρώτη αναφορά της ασθένειας των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας εντοπίζεται το 1922 στη Βόρεια Αμερική, ενώ το χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η ανάπτυξη επιμηκών κονδύλων. Η έκφραση των συμπτωμάτων εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το στέλεχος PSTVd (ήπιο, ενδιάμεσο ή σοβαρό) και από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η υψηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος ευνοεί τη μόλυνση με το ιοειδές και αυξάνει την ένταση των συμπτωμάτων (Schmitz & Steger, 2007).



Εικόνα 9. Δευτερογενής δομή του PSTVd. (Εικόνα προσαρμοσμένη από Ding & Itaya, 2007).

Το PSTVd, της οικογένειας *Pospiviroidae*, διαθέτει ένα κυκλικό γονιδίωμα ssRNA μήκους μόλις 359 νουκλεοτιδίων και ραβδόμορφη δευτερογενή δομή (Εικόνα 9) (Ding & Itaya, 2007; Tabler & Tsagris, 2004).

Όπως αναφέρθηκε για την οικογένεια Pospivioroidae, το PSTVd πολλαπλασιάζεται στον πυρήνα του κυττάρου. Η μεταγραφή του γίνεται πιθανώς από την DNA- εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II (Pol II) με το μηχανισμό του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου (Branch & Robertson, 1984), ώστε από το θετικής πολικότητας γραμμικό PSTVd (+) προκύπτει το πολυμερές γραμμικό PSTVd (-). Η διαδικασία ξεκινά πιθανότατα από τη θέση G168 (Εικόνα 10) (Tabler & Tsagris, 2004). Έπειτα, το PSTVd (-) χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση γραμμικού PSTVd (+), που κόβεται στη συνέχεια στις θέσεις G95 – G96 από RNase III ενδονουκλεάσες. Τα μονομερή γραμμικά PSTVd (+) που προκύπτουν συνδέονται με τη δράση λιγάσης για τη δημιουργία του ώριμου κυκλικού PSTVd (+) (Flores et al., 2014; Tabler & Tsagris, 2004).



Εικόνα 10. Συντηρημένες λειτουργικές επικράτειες στο RNA του PSTVd. (Εικόνα προσαρμοσμένη από Tabler & Tsagris, 2004).

Το ίδιο το ιοειδές, καθώς και dsRNA μόρια που μπορεί να παραχθούν ως ενδιάμεσα κατά την αντιγραφή του, πέπτονται από τις DCL4, DCL2 και DCL3 σε 21-

, 22- και 24-nt μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA ιοειδούς (viroid small interfering RNAs, vd-siRNAS), αντίστοιχα με συγκεκριμένη ιεραρχία (Dadami et al., 2013; Di Serio, Martinez de Alba, Navarro, Gisel, & Flores, 2010; Katsarou, Mavrothalassiti, Dermauw, Van, & Kalantidis, 2016). Τα vd-siRNAs είναι λειτουργικά μόρια και προκαλούν γονιδιακή σίγηση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (PTGS). Ωστόσο, τα μόρια αυτά φαίνεται να συμβάλλουν και στην επαγωγή της RdDM, χωρίς όμως να είναι ακόμη απόλυτα ξεκάθαρο το αν υπάρχει κάποια βιολογική σημασία του φαινομένου κατά τη μόλυνση φυτών με PSTVd (Dalakouras, Dadami, Bassler, et al., 2015; Dalakouras et al., 2013).

1.7 Σκοπός παρούσας εργασίας

Η παρούσα εργασία αφορά της διερεύνηση του ρόλου των RTL πρωτεϊνών στο βιολογικό κύκλο του PSTVd. Ειδικότερα, όπως προαναφέρθηκε, οι RNAse III ενδονουκλεάσες που συμμετέχουν στον αναδιπλασιασμό του ιοειδούς κόβοντας τα ενδιάμεσα αλυσσιδομερή δεν έχουν χαρακτηριστεί. Δεδομένου ότι καμία από τις DCL πρωτεΐνες δεν εμπλέκεται στον αναδιπλασιασμό του PSTVd, εξετάζεται η υπόθεση συμμετοχής των RTL στη διαδικασία αυτή. Πέραν τούτου, παρουσιάζεται μια γενικότερη μελέτη για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των RTL στο φυτό *Nicotiana benthamiana*.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Διαλύματα

1. Murashige Skoog (MS) θρεπτικό μέσο

Το θρεπτικό μέσο MS αποτελείται από μακροστοιχεία, μικροστοιχεία και βιταμίνες που προμηθεύονται ως έτοιμα μίγματα (PhytoTechnology Laboratories) και χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται μεταξύ 5,7 και 5,8 με προσθήκη υδροξειδίου του καλίου (KOH) 1M. Για την παραγωγή στερεού θρεπτικού μέσου MS προστίθενται 8gr/L άγαρ.

2. Luria-Bertani (LB) θρεπτικό μέσο

- 1% Τρυπτόνη
- 0,5% Εκχύλισμα ζύμης
- 1% Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)

Ρύθμιση του pH στο 7,0 με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 1M

3. Αντιβιοτικά

- Αμπικιλίνη Applichem GmbH
- Καναμυκίνη Duchefa Biochemie
- Ριφαμπυκίνη Phytotechnology Laboratories

4. 5x loading dye (10ml) (Μακρομοριακά RNA)

- 720μl φορμαλδεΰδη
- 3084μl φορμαμίδιο
- 80μl 500mM EDTA pH 8,0
- 16μl διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης

- 2ml γλυκερόλη
- 4ml 10x MOPS ρυθμιστικό διάλυμα

5. **2x loading dye (Μικρομοριακά RNA)**

- 80% φορμαμίδιο
- 10mM EDTA
- 1mg/ml μπλε της βρωμοφαινόλης
- 1mg/ml ξυλόλιο

6. **10x MOPS ρυθμιστικό διάλυμα**

- 200mM MOPS pH 7,0
- 50mM Οξικό νάτριο
- 10mM EDTA pH 8,0

7. **SSC 20x**

- 3M Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- 0,3M Κιτρικό νάτριο (C6H5Na3O7·2H2O)
- Ρύθμιση του pH στο 7,0 με υδροχλώριο (HCl) 1M

8. **TBE 1x**

- 89mM Tris βάση
- 89mM Βορικό οξύ (H3BO3)
- 2mM Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) pH 8

9. TAE 1x

- 40 mM Tris (pH 7.6)
- 20mM οξικό οξύ
- 1mM Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)

2.1.2 Φυτικό και μολυσματικό υλικό

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φυτά *N. benthamiana* αγρίου τύπου. Οι μολύνσεις έγιναν με το ιοειδές $PSTVd^{KF\ 440-2}$ (GenBank : X58388.1), καθώς και με και με τον ιό TRV.

2.1.3 Εκκινητές και πλασμίδια

Στους πίνακες 4 και 5 παρουσιάζονται οι εκκινητές και τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων:

Πίνακας 4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.

ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'-3')	ΣΤΟΧΟΣ
RTLA-F	ATGCAGTCGCCGGAATCT	Ενίσχυση RTLA N. benthamiana
RTLA-R	TTAACTGAGGTTAGAATCTTGCAG	Ενίσχυση RTLA N. benthamiana
RTLB-F	ATGATGACGGAAGCAAATGGGC	Ενίσχυση RTLB N. benthamiana
RTLB-R	TTAACTGACCTTGGATTCTTGCAAAC	Ενίσχυση RTLB N. benthamiana
RTLC-F	ATGGAAAATCCAAAACAAGAGG	Ενίσχυση RTLC N. benthamiana
RTLC-R	TCAACTTTGTATTTCATCACAAGG	Ενίσχυση RTLC N. benthamiana
iFWrtlA	5’ CGTCACAGTGAGTTGCCCTAT -3’	Ενίσχυση RTL A-ενδιάμεσοι εκκινητές
iREVrtlA	5’CCACTGACTTAACAGAAGACTCCA 3’	Ενίσχυση RTL A- ενδιάμεσοι εκκινητές
iFWrtlB	5’ AA**GGATCC**AAGAACAACCACAACCTGTAACT 3’	Ενίσχυση RTL B- ενδιάμεσοι εκκινητές
iREVrtlB-X 3’	5’AACCCGGGTCAACATCCATCTCATCATAACAGT	Ενίσχυση RTL B- ενδιάμεσοι εκκινητές
iFWrtlC	5’ AA**GGATCC**CAAATTTGTTGGAAAGGGAGAGT 3’	Ενίσχυση RTL C- ενδιάμεσοι εκκινητές
iREVrtlC	5’AA**AAGCTT**GTTCCTCCACTGACCTCTCTG 3’	Ενίσχυση RTL C- ενδιάμεσοι εκκινητές
iFW2-rtlA	5’ AA**GGATCC** AACAGTGCAACAGGAGGAGC 3’	Ενίσχυση RTL A-ενδιάμεσοι εκκινητές
iRev2-rtlA	5’ AA**AAGCTT** TACAGGCTGCGGTTGTTCTT 3’	Ενίσχυση RTL A-ενδιάμεσοι εκκινητές
AR-X	CTCGAGGAGGCCCCTAAATATC	Ενίσχυση RTL A-ενδιάμεσοι εκκινητές
AF-X	CTCGAGCCTATTATCACATTAGAC	Ενίσχυση RTL A-ενδιάμεσοι εκκινητές
CR-N	TGACTGCAATTCCTCCATGG	Ενίσχυση RTLC-1° τμήμα
CF-N	TGACTGCAATTCCTCCATGG	Ενίσχυση RTLC 1° τμήμα
CR-E	CTCTGAATTCTTCCACTTGTCCT	Ενίσχυση RTLC 2° τμήμα
CF-E	AGAAACTTGCTAGAGTTTCCACT	Ενίσχυση RTLC 2° τμήμα
RTLD-F	ATGGGATCTTGGTTACGTTCCT	Ενίσχυση RTLD N. benthamiana
iREV-RTLD	AGAGTACCACTTTAATGATCAGGAT	Ενίσχυση RTLD-ενδιάμεσοι εκκινητές
RTLD-R	GCTATTAGCTATCTTCATATTGCCAAC	Ενίσχυση RTLD N. benthamiana
RTLE-F	ATGGCCATGGAGTTGTGTTCA	Ενίσχυση RTLE N. benthamiana
RTLE-R	TACCACCTTGGGTTGGATCTG	Ενίσχυση RTLE N. benthamiana
iFW-RTLE	CAGCTGTCTTTCTTGCACCC	Ενίσχυση RTLE-ενδιάμεσοι εκκινητές
RTLE-1R	CCACACACTTCAAATAGGACACG	Ενίσχυση RTLE-ενδιάμεσοι εκκινητές
qRTLB-R	ACAGGAAGTGTGAGTTAGAGCTT	RTLB-εκκινητές qPCR

Πίνακας 5. Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν.

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ/ ΕΤΑΙΡΙΑ
pBlueScript SK (-)	pBSSKm	Πρωτόκολλο: Universal TA Cloning (Zhou, 2000)
TRV RNA2- pTV00	pTV00	-
pENTR3C DUAL	-	Invitrogen

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Για την ανίχνευση των RTL χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Sol Genomics (https://solgenomics.net/tools/blast/?db_id=266) και Waterhouse(http://benthgenome.qut.edu.au/), που διαθέτουν το πλήρες μεταγράφωμα του φυτού *Nicotiana benthamiana* έπειτα από στοίχιση των μεταγράφων. Η διασταύρωση των δεδομένων από τις δύο βάσεις παρείχε τη δυνατότητα ελέγχου της ορθότητας των αποτελεσμάτων. Η μετάφραση των αλληλουχιών που ξεχώρισαν έγινε με τη χρήση του ExPASy (https://web.expasy.org/translate/), ενώ στο ScanProsite (https://prosite.expasy.org/scanprosite/) προσδιορίστηκαν οι περιοχές RNase III και double stranded RNA – binding (dsRBD). Η πολλαπλή στοίχιση των πιθανών RTL αλλά και DCL αλληλουχιών έγινε με το CLUSTALW (Larkin et al., 2007) (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Τέλος, τα εργαλεία Primer3 και BLAST (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)(Ye et al., 2012) χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών.

2.2.2 Φυλογενετική ανάλυση

Η φυλογενετική ανάλυση έγινε σε επίπεδο πρωτεϊνών, καθότι όταν τα δεδομένα συνιστούν ένα σύνολο κωδικών αλληλουχιών, οι αμινοξικές αλληλουχίες προτιμούνται για την κατασκευή ενός αξιόπιστου φυλογενετικού δέντρου. Μετά τη συλλογή των πρωτογενών δεδομένων πραγματοποιήθηκε στοίχιση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα MEGAX – Muscle alignment. Η κατασκευή του δέντρου έγινε με το πακέτο BEAUTi and the BEAST (Drummond et al. 2012). Οι στοιχισμένες αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα BEAUTi (Bayesian Evolutionary Analysis Utility) v1.10.4, όπου ορίστηκε το BLOSUM62 ως μοντέλο υποκατάστασης

για πρωτεϊνικές αλληλουχίες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν περαιτέρω στο BEAST (Bayesian evolutionary analysis sampling tree), το πρόγραμμα Μπεϋζιανής ανάλυσης με χρήση του Markov Chain Monte Carlo (MCMC), για την αναζήτηση του πιο αντιπροσωπευτικού δέντρου μεταξύ όλων των πιθανών δέντρων. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν ως προς την εγκυρότητά τους στο πρόγραμμα Tracer και, τέλος, η απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου έγινε με το TreeAnnotator.

2.2.3 Απομόνωση RNA από φυτικό ιστό

Για την απομόνωση RNA χρησιμοποιήθηκαν 500mg φυτικού ιστού ανά δείγμα φύλλων *Nicotiana benthamiana* αγρίου τύπου. Όλη η διαδικασία εκτελέστηκε σε απαγωγό, λόγω χρήσης πτητικών τοξικών αντιδραστηρίων. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει λειοτρίβηση του ιστού παρουσία υγρού αζώτου και προσθήκη 900μl διαλύματος Trizol . Ακολουθεί ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα (Vortex). Έπειτα από επώαση δέκα λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για δέκα λεπτά σε 13000 rpm στους 4° C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και προστίθενται σε αυτό 200μl χλωροφόρμιο. Επαναλαμβάνεται ανάδευση, δεκάλεπτη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση σε 13000 rpm για 10 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο συλλέγεται ξανά και προκαλείται κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη 250 μl ισοπροπανόλης και 250 μl διαλύματος υψηλής αλατότητας (1.2 M χλωριούχο νάτριο και 0,8 M κιτρικό νάτριο) . Αφού γίνει μία ακόμη φυγοκέντρηση, ακολουθεί πλύση με 70% αιθανόλη για απομάκρυνση αλάτων και επαναδιαλυτοποίηση του στεγνού ιζήματος με νερό.

2.2.4 Αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA έγινε με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (MINOTECH RT). Η διαδικασία ξεκινά με προσθήκη RNA (3-5μg), Random Primers (50–250 ng), dNTP Mix (10 mM) και αποστειρωμένου νερού σε μικροσωλήνα, σε τελικό όγκο 13μl. Το μείγμα αυτό επωάζεται για πέντε λεπτά στους 65°C και τουλάχιστον ένα λεπτό στον πάγο. Στη συνέχεια προστίθενται στο μικροσωλήνα 4μl ρυθμιστικού διαλύματος (5X MINOTECH RT assay buffer), 1μl DTT 0.1 M, 1μl αναστολέα ριβονουκλεασών (Recombinant RNase Inhibitor 40 U/ μl) και 1 μl από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (MINOTECH RT 200 units/μl). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ρυθμίζεται στα 20μL. Ακολουθεί επώαση στους 25°C για δέκα λεπτά, 50 ^{o}C για μία ώρα και το στάδιο απενεργοποίησης της αντίδρασης στους 70 ^{o}C για δεκαπέντε λεπτά.

2.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) για την ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων – στόχων χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Taq DNA Polymerase (5U/μl, MINOTECH). Πέραν του ενζύμου, τα συστατικά της αντίδρασης περιλαμβάνουν τη μήτρα DNA, ρυθμιστικό διάλυμα με ιόντα Mg^{2+}, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), ειδικό ζεύγος εκκινητών και αποστειρωμένο νερό. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται όλα τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Η ανάλυση των προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης και χρήση βρωμιούχου αιθιδίου ως χρωστική πρόσδεσης στο DNA.

2.2.6 Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς με την αντίδραση λιγάσης

Η αντίδραση της λιγάσης (T4 DNA Ligase- NEB) έγινε σε τελικό όγκο 20 μl με τελική συγκέντρωση ενζύμου 2 U/μl και προσθήκη του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος με ATP (T4 DNA Ligase Buffer 10X) . Η ποσότητα του φορέα που προστέθηκε ήταν 50 – 100 ng και η αναλογία φορέα: ενθέματος μεταξύ 3: 1 – 5: 1, ανά περίπτωση. Η αντίδραση επωάστηκε για 3-5 ώρες σε θερμοκρασία 25°C και η απενεργοποιήθηκε στους 65°C για δέκα λεπτά.

2.2.7 Μετασχηματισμός βακτηρίων *Escherichia coli*

Από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης χρησιμοποιήθηκαν 10 μl για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων Escherichia coli DH10b με τη μέθοδο θερμικού σοκ. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει επώαση του μείγματος κυττάρων και προϊόντος αντίδρασης λιγάσης για μισή ώρα στον πάγο, 40 δευτερόλεπτα θερμικού σοκ στους 42°C και προσθήκη περίπου 800μl θρεπτικού μέσου LB για περαιτέρω επώαση στους 37°C για μία ώρα. Έπειτα τα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλίο petri με LB θρεπτικό μέσο και το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων και επωάζονται για 16- 18 ώρες στους 37 ^{o} C.

2.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια *Escherichia coli*

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε έπειτα από συλλογή των αποικιών από τα τρυβλία και ανάπτυξή τους σε καλλιέργειες 3ml υγρού θρεπτικού μέσου LB, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ξεκινά με φυγοκέντρηση των καλλιεργειών για συλλογή του ιζήματος. Σε αυτό προστίθενται 100μl Διαλύματος I (50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCL pH 8, 10mM EDTA pH 8) για επαναδιάλυση του ιζήματος με μηχανική ανάδευση. Τα δείγματα

επωάζονται για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί προσθήκη 200μl Διαλύματος ΙΙ (0,2N NaOH, 1% SDS, πάντα παρασκευάζεται φρέσκο επί τόπου), και 150μl Διαλύματος ΙΙΙ (3M Οξικό κάλιο και ρύθμιση pH στο 5,5 με οξικό οξύ), με μηχανική ανάδευση και επώαση σε πάγο για πέντε λεπτά μετά από κάθε βήμα. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται και συλλέγεται το υπερκείμενο, στο οποίο γίνεται κατακρήμνιση του DNA με διπλάσιο όγκο 100% αιθανόλης και 1/10 του όγκου οξικό νάτριο. Μετά από 20 λεπτά στους -20°C, γίνεται φυγοκέντρηση για μισή ώρα σε 13000 rpm στους 4 ^{o}C. Τέλος, το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 50μl αποστειρωμένου νερού και 0.2μl ριβονουκλεάσης ανά δείγμα.

2.2.9 Έλεγχος με περιοριστικά ένζυμα και αλληλούχηση

Η πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του φυλλαδίου του εκάστοτε ενζύμου. Στις αντιδράσεις προστέθηκε 1 unit ενζύμου/ 1μg DNA . Η ανάλυση των προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης. Στις περιπτώσεις που το προϊόν χρειάστηκε να απομονωθεί για άλλη χρήση, η επιθυμητή ζώνη αφαιρέθηκε προσεκτικά και καθαρίστηκε με το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG).

Επιπλέον, έγινε αλληλούχηση μέσω της εταιρίας Macrogen (https://dna.macrogen-europe.com/eng/) για τον έλεγχο της ορθότητας του ενθέματος.

2.2.10 Καθαρισμός DNA με φαινόλη - χλωροφόρμιο

Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από τα δείγματα DNA με μία ή περισσότερες εκχυλίσεις με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο. Η

διαδικασία είναι η εξής: Στα δείγματα προστίθεται νερό σε τελικό 300μl και ίσος όγκος φαινόλης. Μετά από μηχανική ανάδευση και δεκάλεπτη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, γίνεται φυγοκέντρηση με αποτέλεσμα τη δημιουργία τριών φάσεων. Πραγματοποιείται συλλογή της υδάτινης φάσης που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με 200μl χλωροφόρμιο, που απομακρύνει τα λιπίδια και τη φαινόλη από την υδάτινη φάση και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες. Μετά από εκ νέου συλλογή της υδάτινης φάσης, προστίθεται διπλάσιος όγκος 100% αιθανόλης και 1/10 του όγκου οξικό νάτριο για κατακρήμνιση του DNA. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο νερού.

2.2.11 Μετασχηματισμός βακτηρίων *Agrobacterium tumefaciens*

Από το καθαρισμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκαν 5μg σε 100μl δεκτικών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens*. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο μετασχηματισμού με θερμικό σοκ, το μείγμα βυθίζεται απευθείας σε υγρό άζωτο για 1 λεπτό και επωάζεται για 20- 30 λεπτά στους 37° C. Ύστερα προστίθενται 800μl υγρού θρεπτικού μέσου LB και τα κύτταρα επωάζονται για2-4h στους 28° C. Τα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλίο petri με LB θρεπτικό μέσο και τα κατάλληλα αντιβιοτικά (ριφαμπυκίνη 100μg/ml για τα αγροβακτήρια και το αντιβιοτικό επιλογής για το πλασμίδιο) και επωάζονται 2- 3 μέρες στους 28° C.

2.2.12 Γονιδιακή σίγηση επαγόμενη από ιό (Virus Induced Gene Silencing-VIGS)

Η γονιδιακή σίγηση επαγόμενη από ιό (VIGS) είναι μια χρήσιμη μέθοδος για τη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας σε φυτά, που αναπτύχθηκε αρχικά από την ομάδα του Dinesh- Kumar (Liu et al., 2002). Ο πιο αποδοτικός φορέας VIGS μέχρι

στιγμής είναι ο Tobacco rattle virus (TRV) φορέας. Τα γονίδια – στόχοι και το τμήμα του ιοειδούς PSTVd που φέρονταν στο πλασμίδιο pTV00 (TRV- RNA1), το πλασμίδιο pTRV2, καθώς και το γονίδιο του ενζύμου αποκορεσμού του φυτοενίου (PDS) στον φορέα pTV00 (TRV- RNA1), χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό αγροβακτηρίων. Οι αποικίες των μετασχηματισμένων αγροβακτηρίων, αφού ελέγχθηκαν επανειλημμένα, αναπτύχθηκαν εκ νέου σε υγρό θρεπτικό μέσο για 16- 18 ώρες στους 28° C και ακολούθησε αγροεμποτισμός σε φυτά *N. benthamiana* αγρίου τύπου.

Η σίγηση του PDS αποτέλεσε τον μάρτυρα για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας της μεθόδου VIGS. Το PDS αποτελεί το ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεση των καροτενοειδών (α- και β- καροτενίου), με αποτέλεσμα η σίγησή του να προκαλεί στα φυτά την εμφάνιση λευκού χρώματος. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο εμφάνισης του φαινοτύπου PDS καταστολής και το χρόνο που απαιτείται για πλήρη μόλυνση του φυτού από το PSTVd, πραγματοποιήθηκε συλλογή 5- 6 φύλλων από την κορυφή των φυτών στις 3 η 4 εβδομάδες μετά τον αγροεμποτισμό με το ιοειδές.

2.2.13 Αγροεμποτισμός (Schöb et al. 1997)

Τα κατάλληλα αγροβακτήρια επωάστηκαν για 16- 18 ώρες σε υγρό θρεπτικό μέσο LB με αντιβιοτικά. Την επόμενη μέρα, φυγοκεντρήθηκαν στις 2700rpm για 10 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε αντίστοιχη ποσότητα MMA (1x MS υγρό θρεπτικό μέσο, 10mM 2-μορφολινο-αιθανικό σουλφονικό οξύ, 200μM ακετοσυριγκόνη). Ακολούθησε επώαση για 1- 3 ώρες στους 28° C και ξανά φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Τα αγροβακτήρια πλύθηκαν 3 φορές με 10mM χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) ίσης ποσότητας με

ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις και τελικά επαναδιαλύθηκαν στο ίδιο διάλυμα και αραιώθηκαν έως ότου η οπτική απορρόφηση (OD_{600}) ήταν 0,2. Στη συνέχεια έγινε ο εμποτισμός σε φυτά με σύριγγα ινσουλίνης (1ml). Αγροεμποτίστηκαν φυτά *N. benthamiana* αγρίου τύπου, που βρίσκονταν στο στάδιο των 6- 8 φύλλων και ο αγροεμποτισμός έγινε στα φύλλα 3- 4 ανάλογα με την κατάστασή τους.

2.2.14 Στύπωμα κατά Northern

Το στύπωμα κατά Northern χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του PSTVd στα φυτά που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων με τη μέθοδο VIGS. Τα δείγματα φύλλων που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση του ολικού RNA. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η συγκέντρωσή τους σε σπεκτροφωτόμετρο. Για κάθε δείγμα προετοιμάστηκαν 5μg RNA με 10μl χρωστικής σε τελικό όγκο 20μl. Ακολούθησε βρασμός των δειγμάτων για πέντε λεπτά και τοποθέτηση σε πάγο.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (1.4% αγαρόζη, 1X MOPS, φορμαλδεΰδη, βρωμιούχο αιθίδιο και νερό) στα 100V σε διάλυμα 1X MOPS και φορμαλδεΰδης. Ακολούθησε οπτικοποίηση του πηκτώματος με υπεριώδη ακτινοβολία και έπειτα επώαση σε 10X SSC για 15 λεπτά.

Η μεταφορά σε νάιλον μεμβράνη αποτύπωσης (Whatman® Nytran blotting membrane) έγινε χρησιμοποιώντας την κλασική μέθοδο μεταφοράς μέσω ανοδικών τριχοειδών φαινομένων. Έτσι, η μεταφορά των RNAs έγινε ταυτόχρονα με την κίνηση του διαλύματος 10X SSC μέσα από το πήκτωμα προς προσροφητικό χαρτί. Παρότι στην περίπτωση αυτή το διάλυμα συνέχισε να κινείται, τα νουκλεΐκά οξέα παρέμειναν προσκολλημένα στη μεμβράνη.

Με το πέρας της μεταφοράς έγινε μονιμοποίηση των RNAs στη μεμβράνη με υπεριώδη ακτινοβολία (1200μJ/cm^2) και τοποθέτηση σε διάλυμα μπλε μεθυλενίου (0.3M οξικό νάτριο, 0.03% σκόνη μπλε μεθυλενίου), μέχρι να γίνουν ορατά τα RNAs. Η υβριδοποίηση έγινε με DIG- σεσημασμένο ανιχνευτή για 16- 18 ώρες. Η εμφάνιση του συμπλόκου ανιχνευτή με RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χημειοφωταύγειας . Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το χημικό αντιδραστήριο CDP-Star (Roche). Η ουσία αυτή ανήκει στις διοξετάνες και μετά από αφαίρεση της φωσφορικής ομάδας μετατρέπεται σε μια ασταθή ένωση, η διάσπαση της οποίας οδηγεί σε εκπομπή φωτονίων στο σημείο όπου έχει υβριδιστεί ο ανιχνευτής, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ζωνών.

2.2.15 Καθαρισμός RNA δειγμάτων με δεοξυριβονουκλεάση (DNase I)

Επιλεγμένα από τα RNA δείγματα που απομονώθηκαν επεξεργάστηκαν περαιτέρω για να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία σύνθεσης cDNA για την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Για το λόγο αυτό μεταχειρίστηκαν με το ένζυμο DNase I, προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα DNA. Αρχικά, 10 ng RNA μεταφέρθηκαν σε μείγμα που περιείχε 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10X, 2,5U DNase I και νερό σε τελικό όγκο 50μl. Μετα από επώαση στους 37°C για μία ώρα ακολούθησε καθαρισμός με τη μέθοδο φαινόλης – χλωροφορμίου.

2.2.16 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR)

Με τη μέθοδο της qPCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) έγινε η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων – στόχων των VIGS πειραμάτων. Τα επιλεχθέντα RNA χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία σύνθεσης cDNA, σύμφωνα με το

πρωτόκολλο της αντίστροφης μεταγραφής. Το cDNA προϊόν αραιώθηκε έπειτα κατά 10 φορές.

Για την qPCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Bio-Rad CFX και η χρωστική SYBR green. Η ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR green στο DNA κατά τη σύνθεσή του έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Σε όλες τις περιπτώσεις ορίστηκαν 35 κύκλοι ενίσχυσης, ενώ σε κάθε κύκλο πρόεκυπτε μία καμπύλη ενίσχυσης. Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων αφορά την εκθετική φάση της αντίδρασης με σημαντικότερη παράμετρο την τιμή Ct (threshold cycle). Η τιμή Ct αναφέρεται στον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε ο φθορισμός που παρατηρείται να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold) και είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος.

Όσον αφορά τις αναλογίες των συστατικών της αντίδρασης, σε αποστειρωμένους ειδικούς PCR μικροσωλήνες προστέθηκαν κάθε φορά 3μl cDNA, 0,4μl από κάθε εκκινητή, 5μl KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) και 1.2μl αποστειρωμένο νερό.

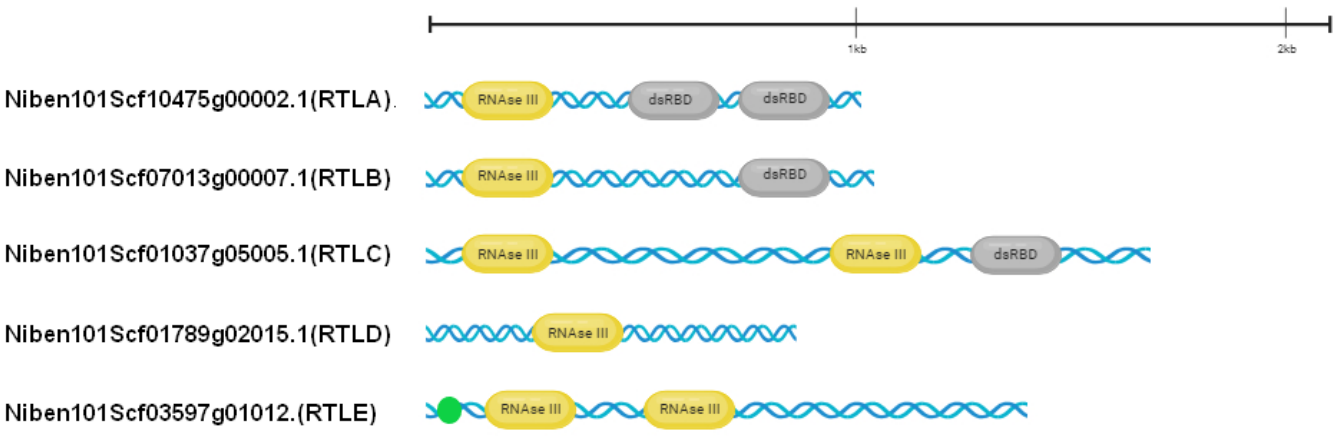
3. Αποτελέσματα

3.1 Ανίχνευση των RTL στο μεταγράφωμα του *N. benthamiana*

Για την ανίχνευση των RTL χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων "Sol Genomics" (https://solgenomics.net/tools/blast/?db_id=266) και "Waterhouse" (http://benthgenome.qut.edu.au/), που διαθέτουν το πλήρες μεταγράφωμα του φυτού Nicotiana benthamiana έπειτα από στοίχιση των μεταγράφων. Η διασταύρωση των δεδομένων από τις δύο βάσεις παρείχε τη δυνατότητα ελέγχου της ορθότητας των αποτελεσμάτων.

Αρχικά έγινε εξαγωγή των αλληλουχιών όλων των RNAse III πρωτεϊνών της *N. benthamiana*. Έπειτα, από το σύνολο εξήχθησαν οι DCL πρωτεΐνες. Αφού εντοπίστηκαν όλες οι περιοχές RNase III των DCL, πραγματοποιήθηκε στοίχισή τους σε γνωστά μετάγραφα ή πρωτεΐνες με το εργαλείο tblastx του NCBI, που στηρίζεται στο δυναμικό κωδικοποίησης των αλληλουχιών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν περαιτέρω στη βάση δεδομένων Sol Genomics (https://solgenomics.net/tools/blast/?db_id=266), όπου με tblastx διατηρήθηκαν μόνο οι RNAse III πρωτεΐνες που δεν ανήκουν στην οικογένεια των DCL Αυτές ελέγχθηκαν έπειτα και στη βάση δεδομένων "Waterhouse" (http://benthgenome.qut.edu.au/). Έτσι, εντοπίστηκαν τελικά πέντε πιθανές RTL πρωτεΐνες στο μεταγράφωμα της *N. benthamiana*. Σύμφωνα με την ονομασία τους στη βάση δεδομένων "Sol Genomics", τα μετάγραφα που επιλέχθηκαν είναι τα εξής: Niben101Scf01037g05005.1, Niben101Scf01789g02015.1, Niben101Scf03597g01012.1, Niben101Scf07013g00007.1, Niben101Scf10475g00002.1. Οι αλληλουχίες των μεταγράφων, όπως δίνονται στη βάση δεδομένων "Sol Genomics", παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι.

Η μετάφραση των αλληλουχιών που ξεχώρισαν έγινε με τη χρήση του προγράμματος “ExPASy” (https://web.expasy.org/translate/) κι έπειτα επιβεβαιώθηκε η ακριβής θέση των περιοχών RNase III και double stranded RNA – binding (dsRBD) με τη χρήση του προγράμματος ‘ScanProsite” (https://prosite.expasy.org/scanprosite/). Στη συνέχεια, η πολλαπλή στοίχιση των πιθανών RTL αλλά και DCL αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος “CLUSTALW” (Larkin et al., 2007) (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) η οποία επιβεβαίωσε ότι τα αποτελέσματα περιελάμβαναν RNAse III πρωτεΐνες που δεν ανήκουν στην οικογένεια των DCL και ξεχωρίζουν μεταξύ τους. Μετά την ανάλυση για τον χαρακτηρισμό των επικρατειών τους στο πρόγραμμα “ScanProsite”, προσδιορίστηκε η δομή τους και ονομάστηκαν ως Nb RTLA – E (εν συντομία RTLA – E πρωτεΐνες) (Εικόνα 11), κατά αντιστοιχία με τις At RTL1 – 5 του *A. thaliana* (εν συντομία RTL1 – 5 πρωτεΐνες).

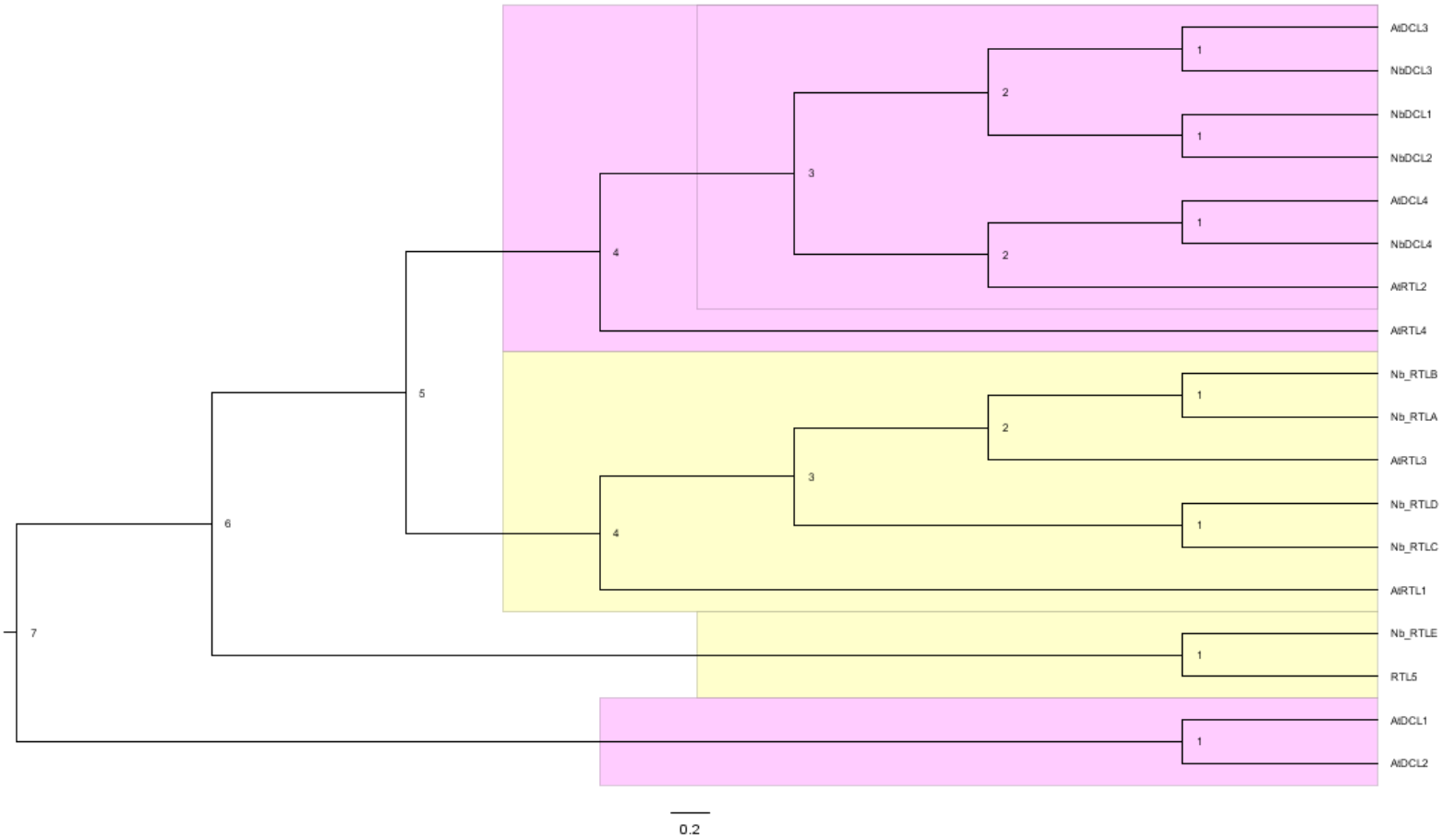


Εικόνα 11. Απεικόνιση δομής των πέντε RTL πρωτεϊνών του οργανισμού N.benthamiana.

3.2 Φυλογενετική ανάλυση σε επίπεδο πρωτεϊνών

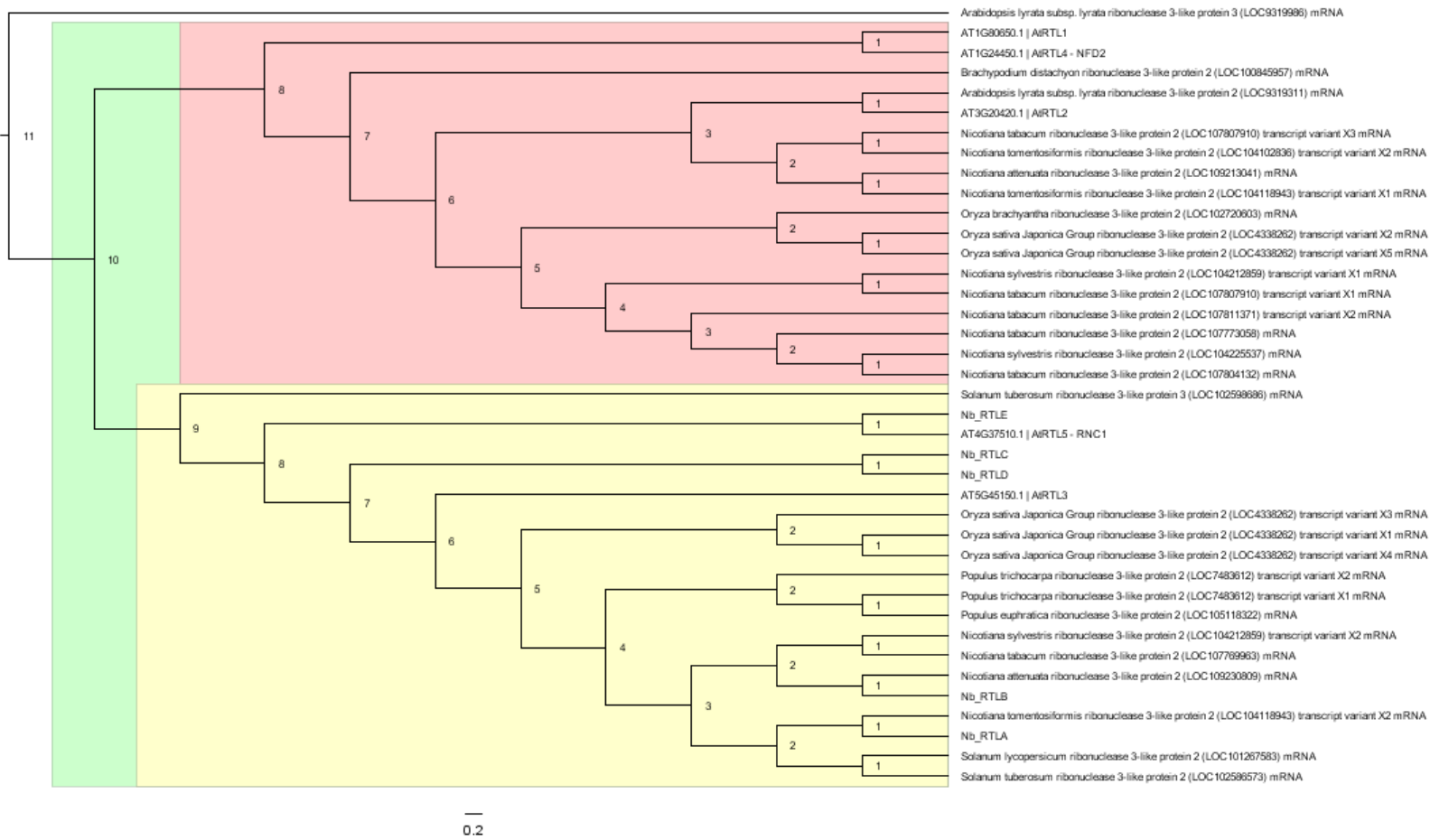
Η κατασκευή των δέντρων έγινε με το λογισμικό “BEAUTi and the BEAST” (Bouckaert & Drummond, 2017). Οι αλληλουχίες των DCL και RTL πρωτεϊνών των οργανισμών *N.benthamiana* και *A.thaliana,* που χρησιμοποιήθηκαν για πολλαπλή στοίχιση με το πρόγραμμα “CLUSTALW”, επεξεργάστηκαν με το λογισμικό BEAUTi (Bayesian Evolutionary Analysis Utility) v1.10.4. Το BLOSUM62 χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο υποκατάστασης για πρωτεϊνικές αλληλουχίες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν περαιτέρω στο BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Tree), για την αναζήτηση του πιο αντιπροσωπευτικού δέντρου μεταξύ όλων των πιθανών δέντρων. Η απεικόνιση των δέντρων έγινε με τη χρήση του λογισμικού “FigTree”.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο φυλογενετικό δέντρο της εικόνας 12. Στο δέντρο αυτό απεικονίζονται οι σχέσεις των DCL και RTL πρωτεϊνών στους οργανισμούς *A.thaliana* και *N.benthamiana*. Στα πλαίσια ροζ χρώματος εμπερικλείονται οι πρωτεΐνες DCL και των δύο οργανισμών, ενώ, αντίστοιχα, στο πλαίσιο κίτρινου χρώματος εμπερικλείονται οι RTL πρωτεΐνες. Ειδικότερα, φαίνεται ότι οι RTL πρωτεΐνες και των δύο οργανισμών αποτελούν μια μονοφυλετική οικογένεια πρωτεϊνών, διακριτή της οικογένειας των DCL. Ωστόσο, παρατηρείται ότι οι AtRTL2 και AtRTL4 εμφανίζονται στον ίδιο κλάδο με κάποιες από τις DCL. Παρόλα αυτά, η θέση τους δείχνει ότι δεν αποτελούν ορθόλογα γονίδια των DCL, απλώς σχετίζονται περισσότερο εξελικτικά με τις DCL σε σύγκριση με τις υπόλοιπες RTL. Από την άλλη, οι RTL του φυτού *N.benthamiana* ομαδοποιούνται όλες μαζί μεταξύ τους αλλά και με τις υπόλοιπες RTL του φυτού *A.thaliana* στον ίδιο κλάδο του φυλογενετικού δέντρου, ξεχωρίζοντας εμφανώς από τις DCL.



Εικόνα 12. Σχέσεις μεταξύ των DCL και RTL πρωτεϊνών στους οργανισμούς A.thaliana και N.benthamiana.

Με τον ίδιο τρόπο κατασκευάστηκε ένα δεύτερο φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τις σχέσεις μεταξύ των RTL πρωτεϊνών του οργανισμού *N.benthamiana* με τις RTL άλλων φυτικών οργανισμών (Εικόνα 13). Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν φυτικοί οργανισμοί που έχουν μελετηθεί σε επίπεδο γονιδιώματος, όπως : *A.thaliana* (Brassicaceae), *Arabidopsis lyrata* (Brassicaceae), *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), *Nicotiana sylvestris* (Solanaceae), *Solanum tuberosum* (Solanaceae), *Solanum lycopersicum* (Solanaceae), *Oryza brachyantha* (Poaceae), *Oryza sativa* (Poaceae), *Populus trichocarpa* (Salicaceae). Οι αλληλουχίες βρέθηκαν έπειτα από αναζήτηση στη βάση δεδομένων NCBI. Στο Παράρτημα Ι παρατίθενται οι κωδικοί των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν όπως εμφανίζονται στο NCBI. Σε αυτό το



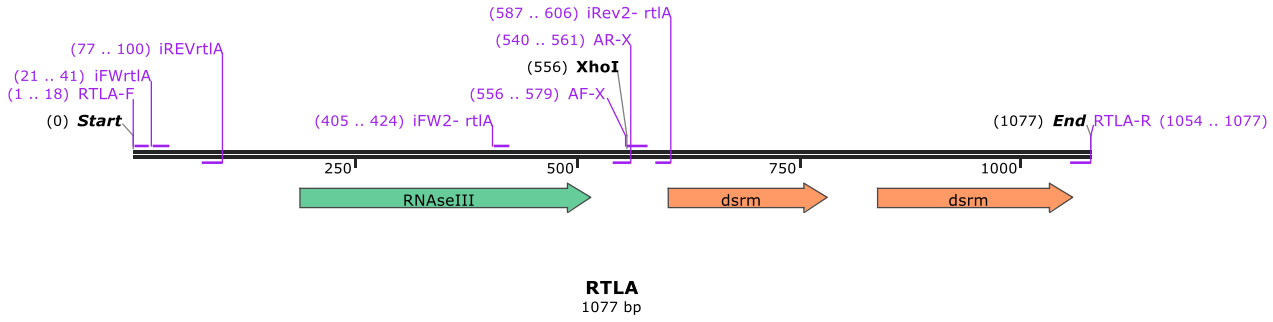
Εικόνα 13. Απεικόνιση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των NbRTL πρωτεϊνών και των RTL άλλων φυτικών οργανισμών.

φυλογενετικό δέντρο παρατηρείται η ομαδοποίηση των RTL πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως σε δύο ομάδες, οι οποίες απεικονίζονται με ροζ και κίτρινο χρώμα στην εικόνα 13. Ειδικότερα, οι NbRTL ομαδοποιούνται με αυτές των άλλων ειδών του γένους *Nicotiana* και φυτών της οικογένειας Solanaceae (*Solanum tuberosum* και *Solanum lycopersicum*), αλλά και των οργανισμών *Oryza sativa* (Poaceae) και *Populus trichocarpa* (Salicaceae). Αναφορικά με τη σχέση τους με τις AtRTL, η μεγαλύτερη ομολογία εμφανίζεται μεταξύ των RTL5 και RTLE. Επιπλέον, η RTL3 βρίσκεται εξελικτικά πιο κοντά στις RTLC και D, ενώ οι RTL1 και 2 εμφανίζονται σε διαφορετικό κλάδο από τις RTLA και B.

3.3 Ενίσχυση των RTL με PCR και κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς

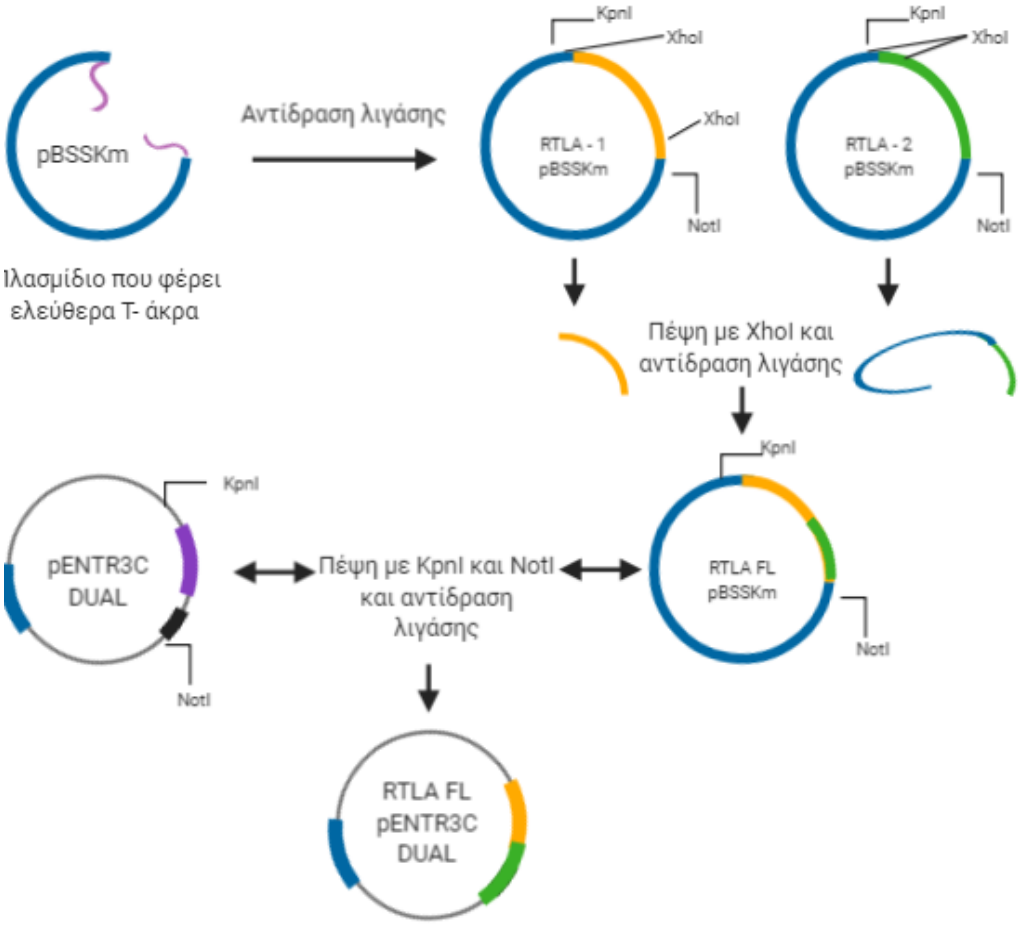
3.3.1 RTLA

Στην εικόνα 14 παρουσιάζεται η δομή της πρωτεΐνης RTLA με τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυσή της με PCR.



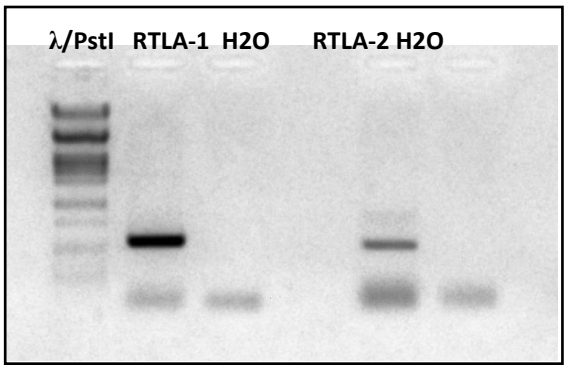
Εικόνα 14. Δομή της πρωτεΐνης RTLA με τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών.

Το σχέδιο κλωνοποίησης της πλήρους *RTLA* αλληλουχίας φαίνεται στην εικόνα 15. Η ενίσχυση της RTLA έγινε σε δύο βήματα. Με PCR ενισχύθηκε το τμήμα *RTLA-1* που ορίζεται από τους εκκινητές RTLA-F – AF-X και το τμήμα *RTLA-2* που ορίζεται από τους εκκινητές AR-X – RTLA-R. Καθένα από τα δύο τμήματα κλωνοποιήθηκε ξεχωριστά στον πλασμιδιακό φορέα pBSSKm. Έπειτα, έγινε πέψη των δύο πλασμιδιακών κατασκευών με το περιοριστικό ένζυμο *Xho*I, ώστε στην πλασμιδιακή κατασκευή RTLA-2 (pBSSKm) να εντεθεί με αντίδραση λιγάσης το τμήμα *RTLA-1*. Ακολούθησε πέψη με τα ένζυμα *Kpn*I και *Not*I προκειμένου να γίνει η κλωνοποίηση της πλήρους αλληλουχίας στο φορέα pENTR3C DUAL. Το γεγονός ότι



Εικόνα 15. Σχέδιο κλωνοποίησης των δύο τμημάτων της RTLA. Η πλήρης αλληλουχία κλωνοποιήθηκε τελικά στον πλασμιδιακό φορέα pENTR3C DUAL.

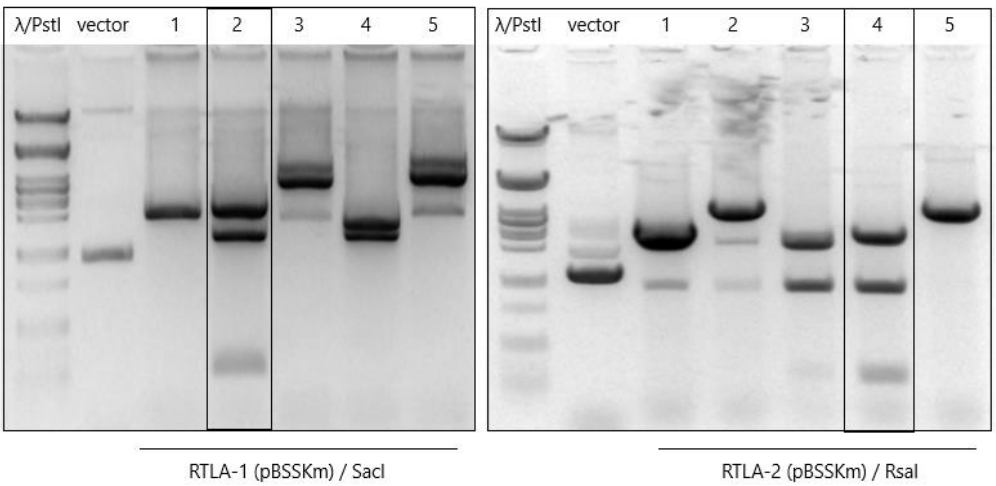
υπάρχει αλληλεπικάλυψη των τμημάτων *RTLA-1* και *RTLA-2* στο σημείο μεταξύ των εκκινητών AF-X και AR-X εξασφάλισε το ότι το ένα κομμάτι ακολουθεί το άλλο και δε λείπει κάποιο τμήμα ενδιάμεσα.



Εικόνα 16. PCR: RTLA, πρώτο (A1) και δεύτερο μισό(A2).

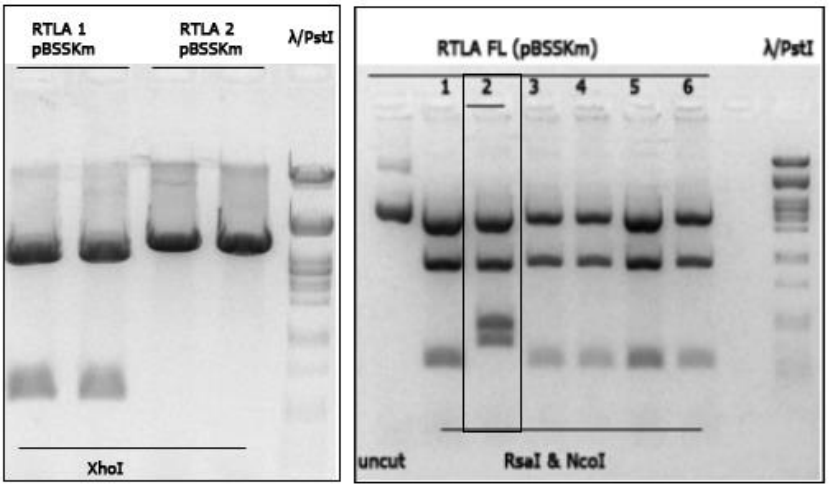
Κατά την ενίσχυση της RTLA σε δύο με βήματα, με PCR παραλήφθηκε το πρώτο τμήμα από την αρχή του μεταγράφου έως τη θέση 561bp (*RTLA-1*) και το δεύτερο τμήμα μήκους 522bp (*RTLA-2*) από τη θέση 556bp έως το τέλος του μεταγράφου, όπως φαίνεται στην εικόνα 16.

Αρχικά έγινε η εισαγωγή των δύο τμημάτων στον πλασμιδιακό φορέα pBSSKm με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση και μετασχηματισμό βακτηρίων E.coli. Η ταυτοποίηση των θετικών κλώνων έγινε με διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *Sac*I και *Rsa*I για τα τμήματα *RTLA-1* και *RTLA-2* (Εικόνα 17). Το μέγεθος των αναμενόμενων ζωνών για το RTLA-1 ήταν 1767bp, 1087bp και 600bp και για το RTLA-2 ήταν 2093bp, 1087bp και 316bp. Οι θετικοί κλώνοι



Εικόνα 17.Διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα SacI και RsaI για τα τμήματα RTLA-1 και RTLA-2.

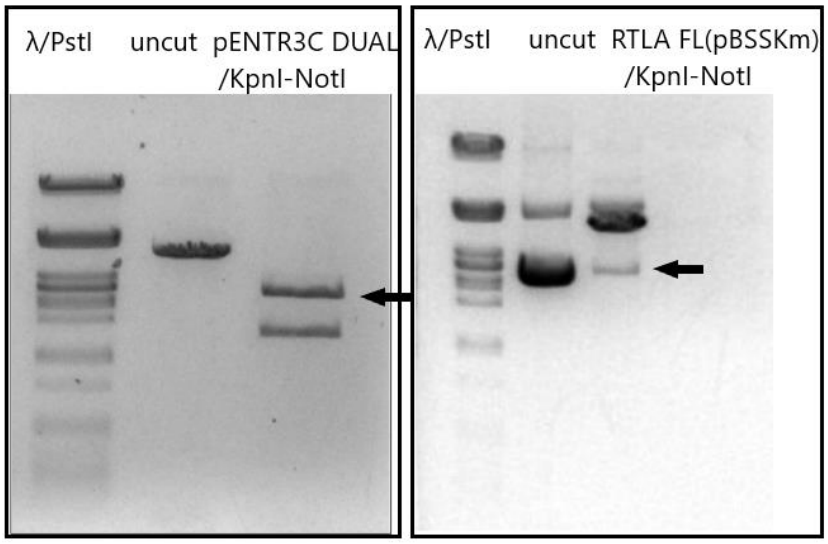
ελέγχθηκαν επιπλέον με αλληλούχηση, όπου διαπιστώθηκε 98% ομοιότητα του τμήματος *RTLA-1* με την προβλεπόμενη αλληλουχία και 96% ομοιότητα με την προβλεπόμενη αλληλουχία για το τμήμα *RTLA-2* (Παράρτημα ΙΙ). Εν συνεχεία, έγινε πέψη των δύο πλασμιδιακών κατασκευών με το περιοριστικό ένζυμο *Xho*I (Εικόνα 18, αριστερά). Το προϊόν μήκους 561bp από την πέψη του *RTLA-1* και το προϊόν από τον κομμένο γραμμικό πλασμιδιακό φορέα της κατασκευής RTLA-2 εξήχθησαν από το πήκτωμα αγαρόζης, καθαρίστηκαν με τη χρήση κολόνας και χρησιμοποιήθηκαν για μία αντίδραση λιγάσης που αποσκοπούσε στην απόκτηση της πλήρους αλληλουχίας (*RTLA Full Length, RTLA FL*) στο φορέα pBSSKm. Έπειτα, έγιναν



Εικόνα 18. Πέψη των δύο πλασμιδιακών κατασκευών RTLA με το περιοριστικό ένζυμο XhoI (αριστερά) και της πλήρους αλληλουχίας (δεξιά) με τα ένζυμα RsaI και NcoI.

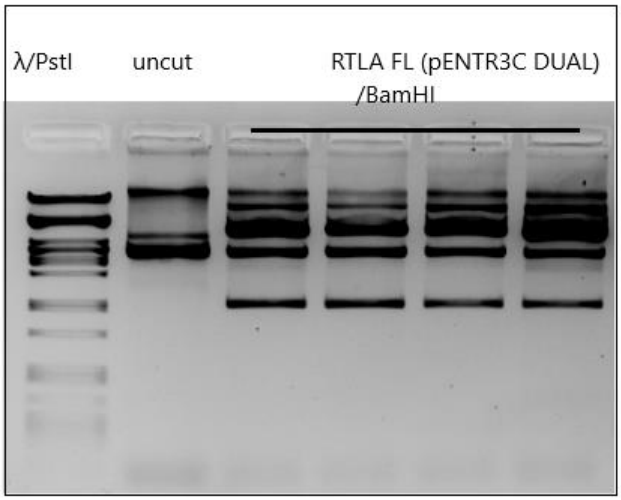
διαγνωστικές πέψεις για την εύρεση του επιθυμητού κλώνου με τα ένζυμα *Rsa*I και *Nco*I (Εικόνα 18, δεξιά). Το αναμενόμενο μέγεθος των ζωνών ήταν 2093bp, 1087bp, 1135bp και 375bp.

Ο πιθανά ορθός κλώνος που αναμενόταν να περιέχει την πλήρη αλληλουχία *RTLA FL* χρησιμοποιήθηκε για κλωνοποίηση πλασμιδιακό φορέα pENTR3CDUAL, με σκοπό να αλληλουχηθεί αφού γίνει και αυτή η κλωνοποίηση. Η διαδικασία ξεκίνησε με πέψη του RTLA FL (pBSSKm) και του πλασμιδιακού φορέα pENTR3CDUAL με τα ένζυμα *Kpn*I και *Not*I. Στην εικόνα 19 φαίνονται τα αποτελέσματα της πέψης. Οι ζώνες που συμβολίζονται με βέλη είναι αυτές που εξήχθησαν από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρίστηκαν με τη χρήση κολόνας.



Εικόνα 19. Πέψη του RTLA FL (pBSSKm) και του πλασμιδιακού φορέα pENTR3CDUAL με τα ένζυμα KpnI και NotI..

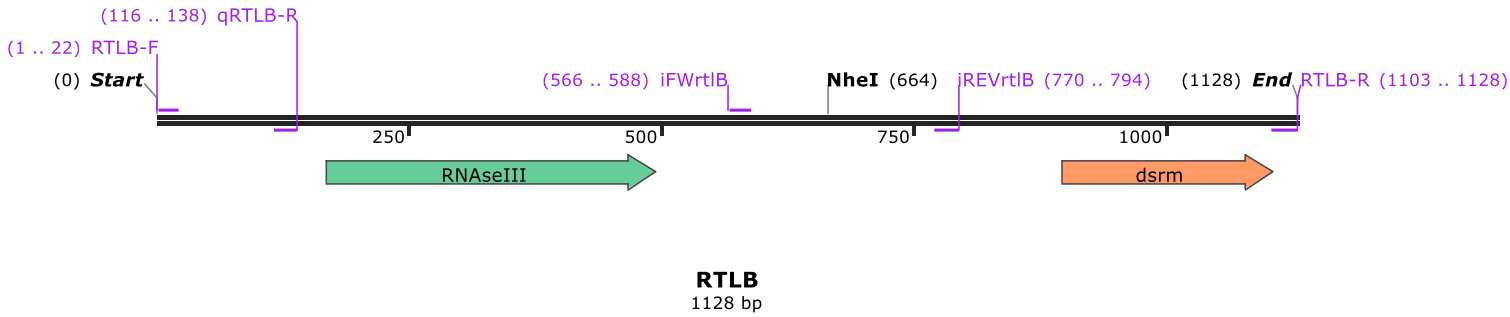
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης και μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli*. Οι αποικίες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για πλασμιδιακή απομόνωση. Έπειτα, ελέγχθηκε η ορθότητα των πλασμιδιακών κατασκευών με πέψη με τα περιοριστικό ένζυμο *Bam*HI. Το μήκος των αναμενόμενων ζωνών ήταν 2296bp και 1144bp. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 20. Μία από τις τέσσερις πλασμιδιακές κατασκευές που ελέγχθηκαν στάλθηκε για αλληλούχηση, όπου επιβεβαιώθηκε ότι φέρει την προβλεπόμενη πλήρη αλληλουχία *RTLA* (Παράρτημα ΙΙ).



Εικόνα 20. Πέψη των RTLA FL (pENTR3C DUAL) πλασμιδιακών κατασκευών με το ένζυμο BamHI.

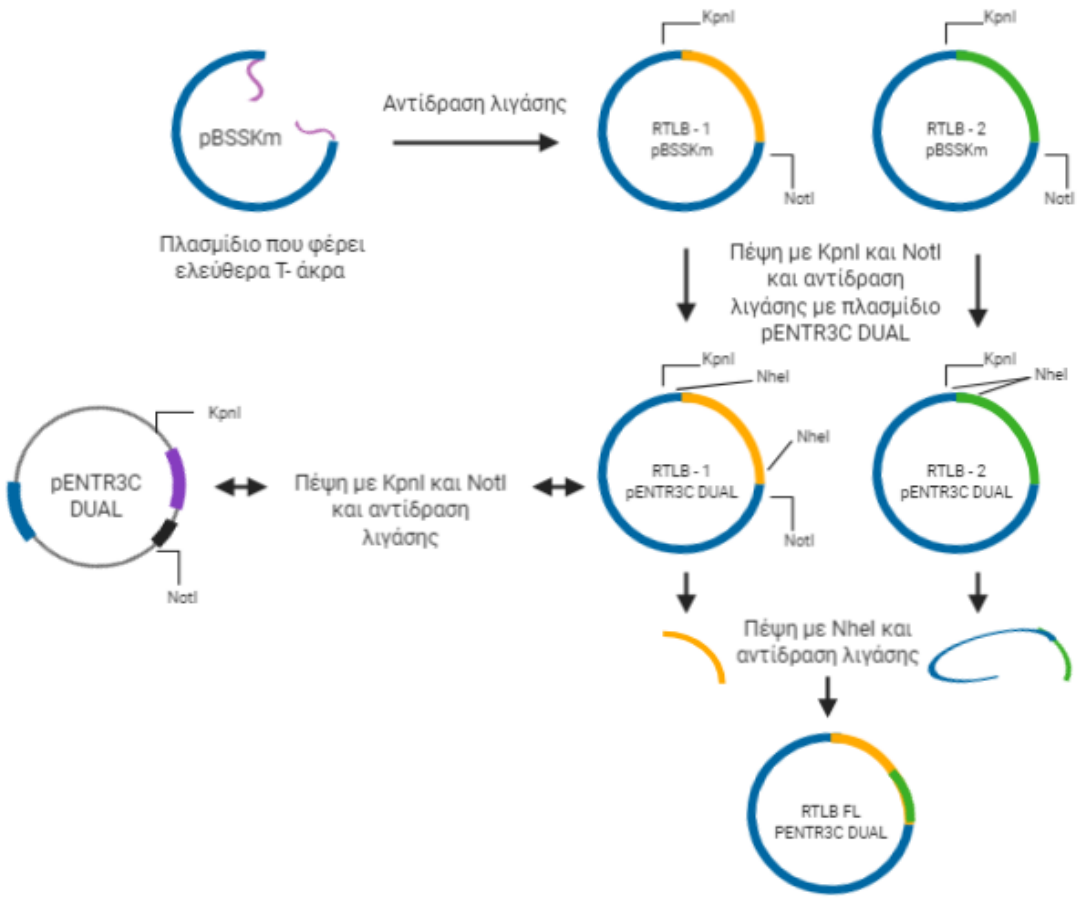
3.3.2 RTLB

Στην εικόνα 21 παρουσιάζεται η δομή της πρωτεΐνης RTLB με τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυσή της με PCR.



Εικόνα 21. Δομή της πρωτεΐνης RTLB με τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών.

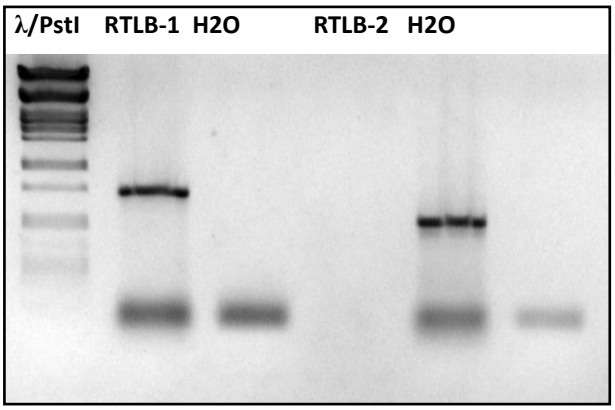
Στην εικόνα 22 φαίνεται το σχέδιο κλωνοποίησης της πλήρους *RTLB* αλληλουχίας. Η ενίσχυση της RTLB με PCR έγινε σε δύο βήματα. Αρχικά, έγινε ενίσχυση ενός τμήματος που ορίζεται από τους εκκινητές RTLB-F – iREV-RTLB και ενός τμήματος που ορίζεται από τους εκκινητές εκκινητών iFW-RTLB – RTLB-R. Και τα δύο τμήματα κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά σε πλασμιδιακό φορέα pBSSKm. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη και των δύο πλασμιδιακών κατασκευών με το ένζυμα *Kpn*I και *Not*I, ώστε καθένα από αυτά να κλωνοποιηθεί στο φορέα pENTR3C DUAL. Ακολούθησε πέψη με το ένζυμο *Nhe*I, με σκοπό την ένθεση της περιοχής *RTLB-1* στην πλασμιδιακή κατασκευή που φέρει την περιοχή *RTLB-2*. Έτσι, αποκτήθηκε τελικά η πλήρης *RTLB* αλληλουχία (*RTLB Full Length, RTLB FL*) στο φορέα pENTR3C DUAL. Το γεγονός ότι υπάρχει αλληλεπικάλυψη των τμημάτων *RTLB-1* και *RTLB-2* στο σημείο μεταξύ των εκκινητών iFW-RTLB



Εικόνα 22. Σχέδιο κλωνοποίησης των δύο τμημάτων της RTLB. Η πλήρης αλληλουχία κλωνοποιήθηκε τελικά στον πλασμιδιακό φορέα pENTR3C DUAL.

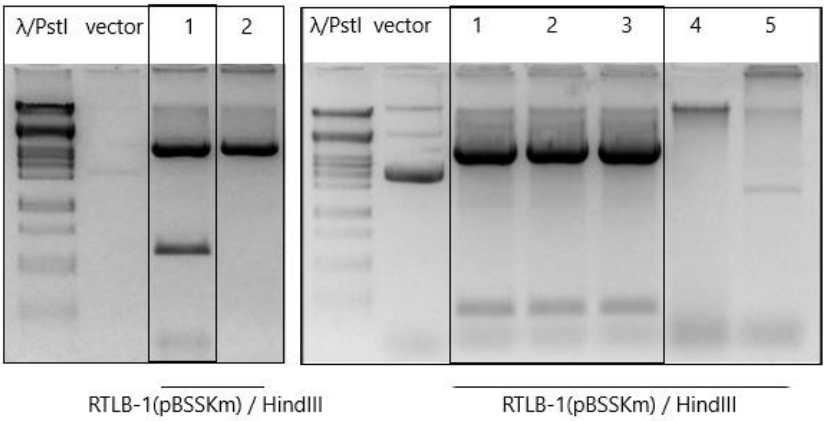
και iREV-RTLB εξασφάλισε το ότι το ένα κομμάτι ακολουθεί το άλλο και δε λείπει κάποιο τμήμα ενδιάμεσα.

Στην εικόνα 23 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR για τα δύο τμήματα της RTLB. Η ενίσχυση με PCR για το πρώτο τμήμα (*RTLB-1*) έγινε με το ζεύγος εκκινητών RTLB-F – iREV-RTLB και περιλαμβάνει τα πρώτα 795bp του μεταγράφου, ενώ για το δεύτερο τμήμα (*RTLB-2*) έγινε με το ζεύγος εκκινητών iFW-RTLB – RTLB-R κι έχει μήκος 563bp.



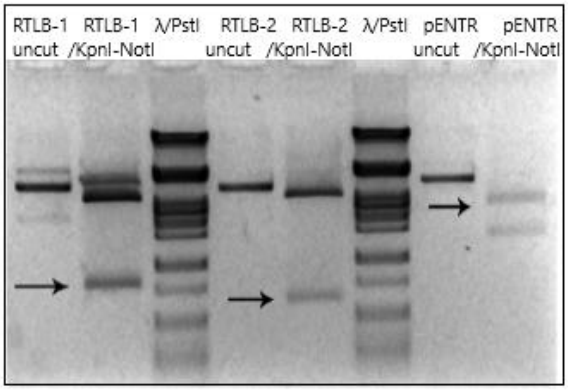
Εικόνα 23. PCR: RTLB, πρώτο (B1) και δεύτερο μισό(B2).

Τα δύο τμήματα που ενισχύθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για κλωνοποίηση με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης στον πλασμιδιακό φορέα pBSSKm και για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli*. Η ορθότητα των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης που κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pBSSKm ελέγχθηκε αρχικά με διαγνωστικές πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο *Hind*III (Εικόνα 24), όπου τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών για το *RTLB-1* ήταν 3014bp, 624bp και 114bp και για το *RTLB-2* ήταν 3348bp και 173bp. Επιπλέον, οι θετικοί κλώνοι ελέγχθηκαν και με αλληλούχηση των προϊόντων, που έδειξε ομοιότητα με την προβλεπόμενη αλληλουχία 99% για το *RTLB-1* και 98% για το *RTLB-2* (Παράρτημα II).

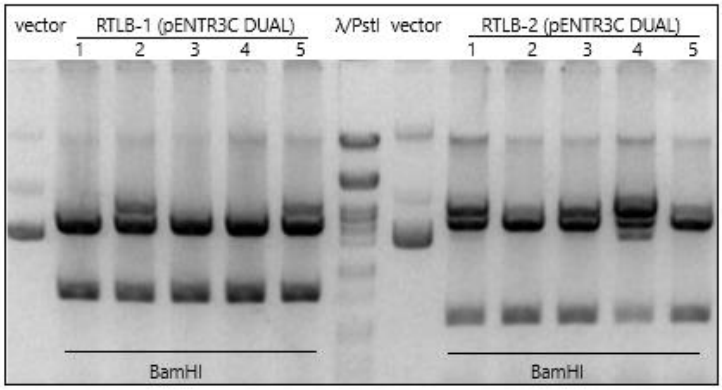


Εικόνα 24. Διαγνωστικές πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο HindIII των δύο πλασμιδιακών κατασκευών RTLB.

Ακολούθως, τα δύο τμήματα *RTLB-1* και *RTLB-2* κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά στον πλασμιδιακό φορέα pENTR3CDUAL με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *Kpn*Iκαι *Not*I. Στην εικόνα 25 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πέψεων στα οποία επισημαίνονται με βέλη οι ζώνες οι οποίες εξήχθησαν από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρίστηκαν με κολόνα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση λιγάσης. Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* και οι θετικοί κλώνοι επιλέχθηκαν μετά από πέψη των πλασμιδιακών κατασκευών με το ένζυμο *BamH*I (Εικόνα 26). Το μήκος των αναμενόμενων ζωνών για το *RTLB-1* ήταν 2296bp και 866bp και για το *RTLB-2* ήταν ήταν 2296bp και 635bp.



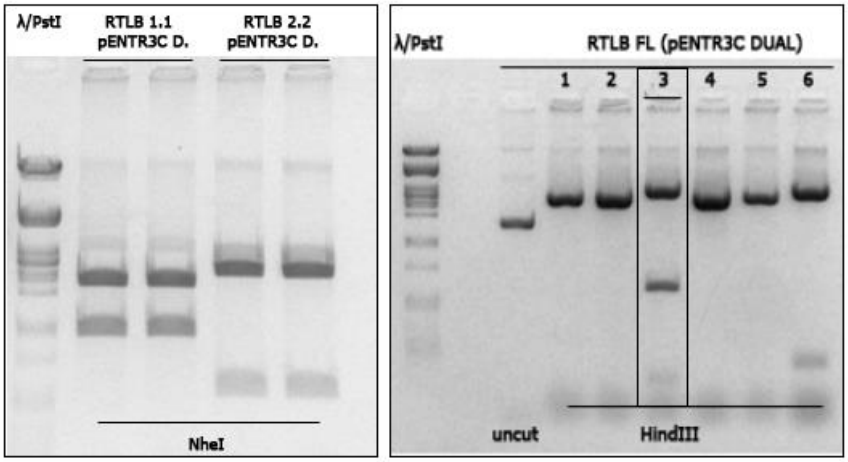
Εικόνα 25. *Πέψεις με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων KpnI και NotI. για την κλωνοποίηση των RTLB-1 και RTLB-2 στον πλασμιδιακό φορέα pENTR3C DUAL.*



Εικόνα 26. Πέψεις των RTLB-1 και RTLB-2 στον πλασμιδιακό φορέα pENTR3C DUAL με το ένζυμο BamHI.

Η απόκτηση της πλήρους αλληλουχίας *RTLB* (*RTLB Full Length, RTLB FL*) έγινε έπειτα από πέψη των δύο πλασμιδιακών κατασκευών με *Nhe*I. Συγκεκριμένα, από το πήκτωμα αγαρόζης, που παρουσιάζεται στην εικόνα 27 αριστερά, έγινε εξαγωγή και καθαρισμός με κολόνα της ζώνης μήκους 1157bp του *RTLB-1* και της ζώνης μήκους 2339bp του *RTLB-2* και ακολούθησε αντίδραση λιγάσης και μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli*. Ο έλεγχος για την ταυτοποίηση των ορθών

κλώνων πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο *Hind*III (Εικόνα 27, δεξιά). Το μήκος των αναμενόμενων ζωνών ήταν 2762bp, 626bp και 114bp.

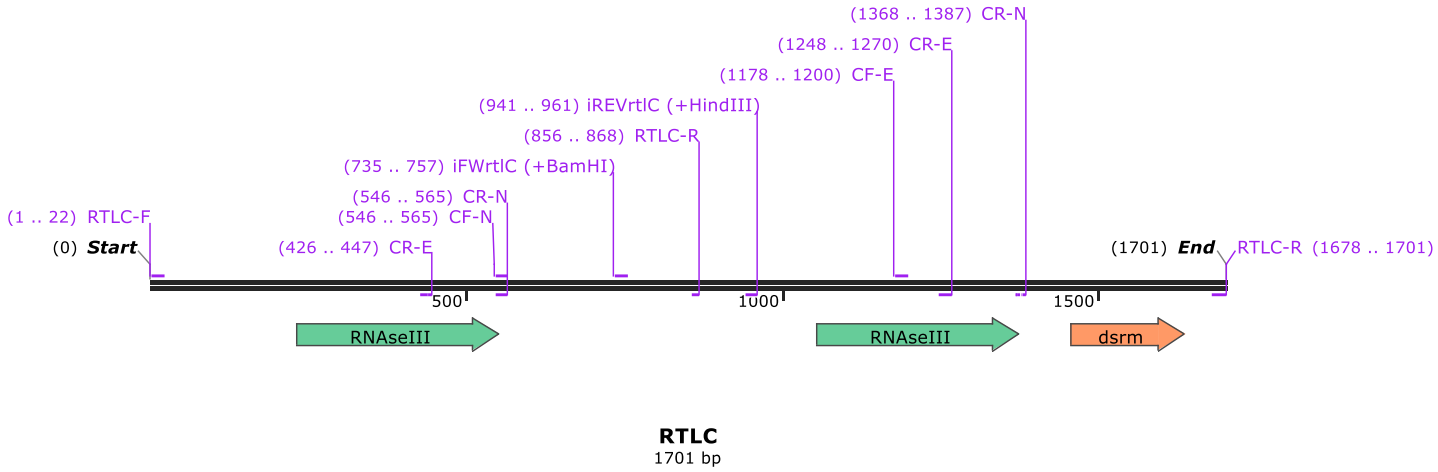


Εικόνα 27.Πέψη των δύο πλασμιδιακών κατασκευών με NheI (αριστερά) και ταυτοποίηση των ορθών κλώνων με HindIII (δεξιά).

Τέλος, ο θετικός κλώνος RTLB FL (pENTR3C DUAL) που αποκτήθηκε, αλληλουχήθηκε και τα αποτελέσματα έδειξαν 98% ομοιότητα με την προβλεπόμενη αλληλουχία (Παράρτημα ΙΙ). Επόμενος μελλοντικός στόχος είναι η κλωνοποίηση της πλήρους RTLB αλληλουχίας από τον φορέα pENTR σε φορέα pEARLY GATE, με σκοπό τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης.

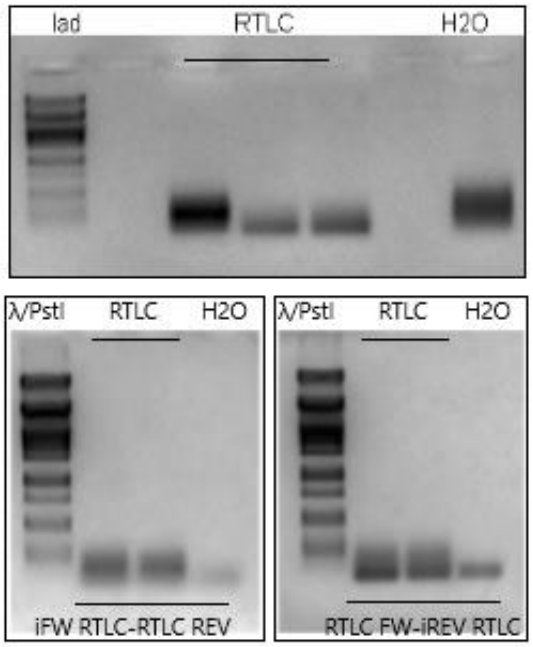
3.3.3 RTLC

Η δομή της πρωτεΐνης RTLC, καθώς και οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυσή της φαίνονται στην εικόνα 28.



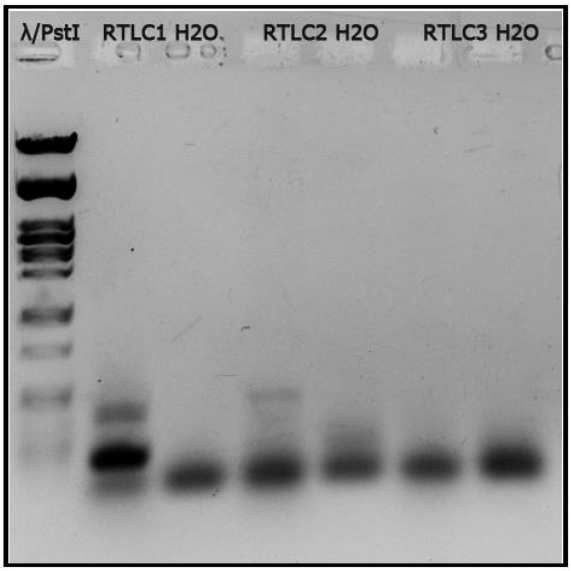
Εικόνα 28. Δομή της πρωτεΐνης RTLC με τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών.

Παρά τις επανειλημμένες δοκιμές, η PCR για την ενίσχυση της RTLC δεν έδωσε κάποιο προϊόν, παρότι χρησιμοποιήθηκε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Στην εικόνα 29 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα των προσπαθειών ενίσχυσης της RTLC. Πέρα από τη στόχευση της πλήρους αλληλουχίας της *RTLC*, έγινε προσπάθεια ενίσχυσης των τμημάτων που ορίζονται από τα ζεύγη εκκινητών iFW-RTLC – RTLC-R και RTLC-F – iREV-RTLC, χωρίς επιτυχία (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. *PCR - δοκιμές για την ενίσχυση της RTLC.*

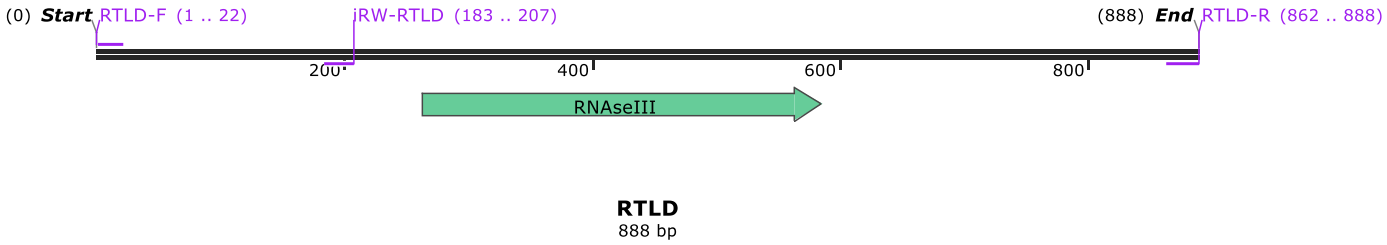
Ωστόσο, έγιναν δοκιμές για την ενίσχυση της RTLC χρησιμοποιώντας ως μήτρα γενωμικό DNA του φυτού *N. benthamiana*. Χρησιμοποιήθηκαν τρία ζεύγη εκκινητών: RTLC-F – CR-N, CF-N – CR-E, CF-E – RTLC-R. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30, τα δείγματα που περιέχουν το πρώτο και το δεύτερο τμήμα της RTLC και ορίζονται από τα ζεύγη εκκινητών RTLC-F – CR-N και CF-N – CR-E, αντίστοιχα, παρουσιάζουν κάποιες ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης. Οι ζώνες αυτές εξήχθησαν και καθαρίστηκαν με χρήση κολόνας. Ακολούθησε έπειτα αλληλούχηση, τα αποτελέσματα της οποίας τελικά δεν αντιστοιχούσαν με τα αναμενόμενα (Παράρτημα ΙΙ). Συνεπώς, η ανίχνευση της RTLC δεν κατέστη δυνατή στα πλαίσια της παρούσας μελέτης και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης μελλοντικά.



Εικόνα 30. PCR για την ενίσχυση της RTLC από γενωμικό DNA του φυτού N. benthamiana.

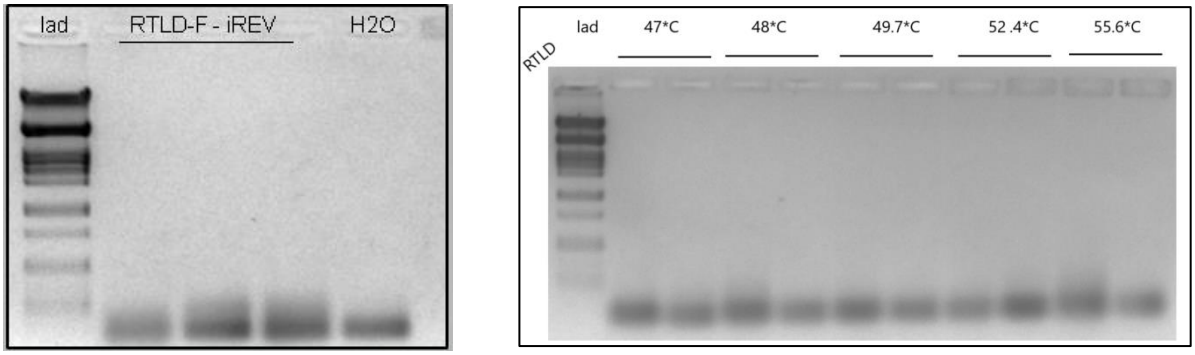
3.3.4 RTLD

Η δομή της πρωτεΐνης RTLD, καθώς και οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυσή της φαίνονται στην εικόνα 31.



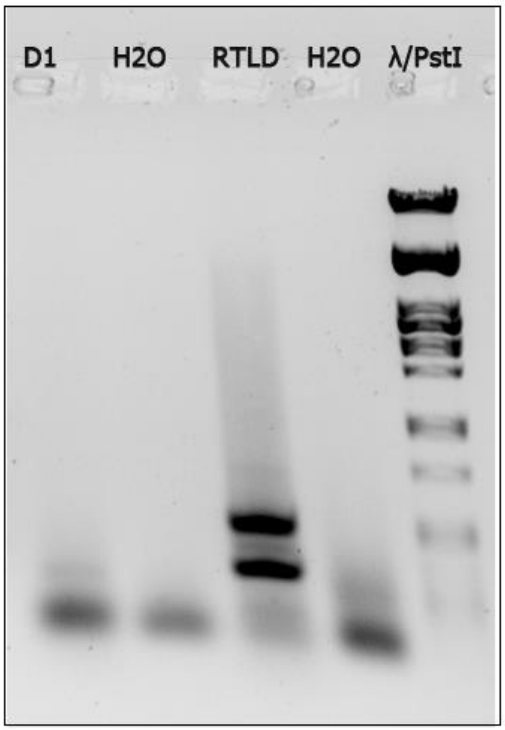
Εικόνα 31. Δομή της πρωτεΐνης RTLD με τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών.

Ομοίως με την RTLC, η RTLD δεν ήταν δυνατό να ενισχυθεί με PCR από cDNAτου *N.benthamiana*. Δοκιμάστηκαν τα ζεύγη εκκινητών RTLD-F – iREV-RTLD για το μικρότερο τμήμα, καθώς και RTLD-F - RTLD-R για την ενίσχυση της πλήρους αλληλουχίας. Ωστόσο, καμία δοκιμή δεν έδωσε προϊόν (Εικόνα 32).



Εικόνα 32. *PCR - δοκιμές για την ενίσχυση της RTLD.*

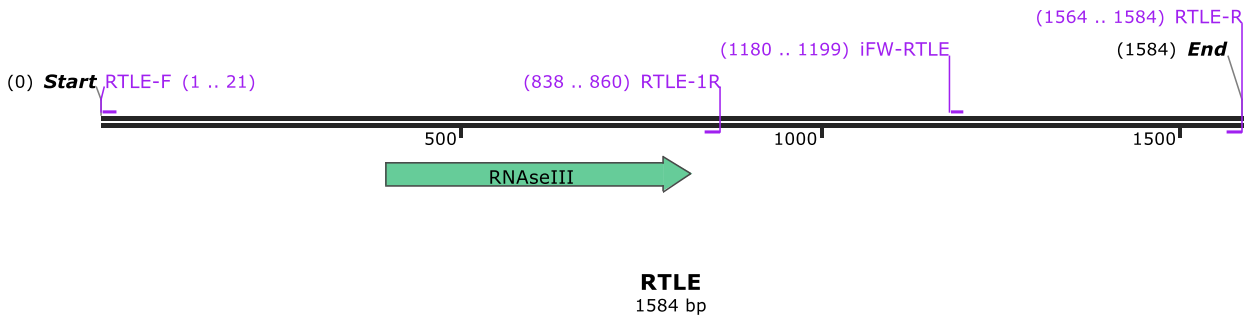
Επιπλέον, αφού οι PCR που έγιναν με τη χρήση του cDNA δεν έδωσαν κάποιο προϊόν, έγιναν δοκιμές για την ενίσχυση της RTLD χρησιμοποιώντας ως μήτρα γενωμικό DNA του φυτού *N.benthamiana* (Εικόνα 33). Χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών: RTLD-F - iREV-RTLD (το τμήμα συμβολίζεται στην εικόνα ως *D1*) και RTLD-F – RTLD-R (το τμήμα συμβολίζεται στην εικόνα ως *RTLD*). Στην εικόνα 33 παρατηρούνται δύο ζώνες στο δείγμα με όνομα *RTLD* που συμβολίζει την πλήρη αλληλουχία της πρωτεΐνης. Οι ζώνες αυτές όμως, δεν αναλύθηκαν περαιτέρω, καθώς κανενός το μέγεθος δεν αντιστοιχεί στο αναμενόμενο. Έτσι, η ανίχνευση της RTLD δεν κατέστη δυνατή στα πλαίσια της παρούσας μελέτης και θα διερευνηθεί περαιτέρω στο μέλλον.



Εικόνα 33. *PCR για την ενίσχυση της RTLD από γενωμικό DNA του φυτού N. benthamiana.*

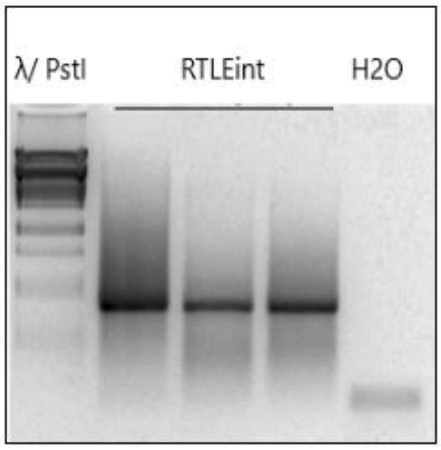
3.3.5 RTLE

Η δομή της πρωτεΐνης RTLE, καθώς και οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυσή της φαίνονται στην εικόνα 34.



Εικόνα 34. Δομή της πρωτεΐνης RTLE με τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών.

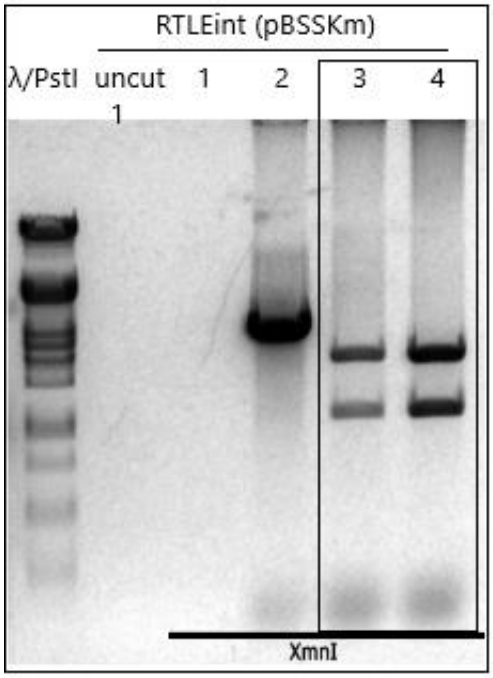
Αρχικά, ο στόχος που τέθηκε ήταν η ενίσχυση της πλήρους αλληλουχίας *RTLE* με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών RTLE-F – RTLE-R. Παρόλα αυτά, επειδή αυτό δεν ήταν δυνατό, έγινε προσπάθεια ενίσχυσης ενός μικρότερου τμήματος περίπου 400bp που ορίζεται από το ζεύγος εκκινητών iFW-RTLE – RTE-R, ώστε να επιβεβαιωθεί τουλάχιστον η ύπαρξη του μεταγράφου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 35, με PCR ενισχύθηκε τελικά το τμήμα αυτό, το οποίο ονομάστηκε ως *RTLE internal* (εν συντομία, *RTLE int.*).



Εικόνα 35.PCR για την κλωνοποίηση του τμήματος RTLE internal (RTLE int.).

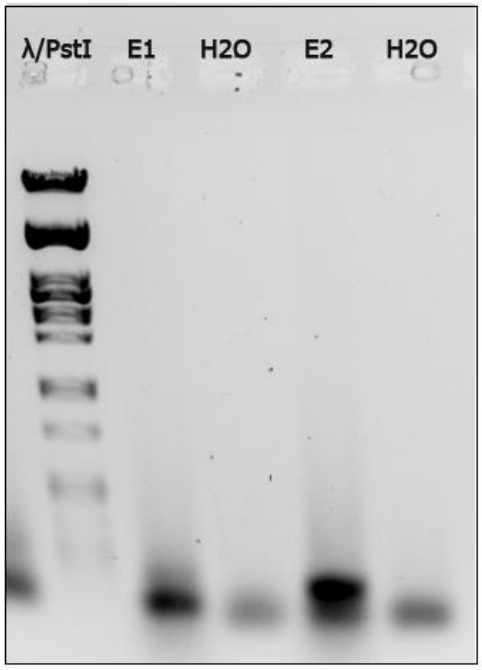
Οι ζώνες που προέκυψαν από την PCR για το τμήμα *RTLE int.* εξήχθησαν από το πήκτωμα αγαρόζης, καθαρίστηκαν με τη χρήση κολόνας και χρησιμοποιήθηκαν για κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα pBSSKm με αντίδραση λιγάσης.

Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli*. Οι θετικοί κλώνοι ταυτοποιήθηκαν μετά από διαγνωστική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Xmn*I, κατά την οποία οι αναμενόμενες ζώνες έπρεπε να αντιστοιχούν στα μεγέθη 3050bp και 1194bp (Εικόνα 36). Έπειτα έγινε αλληλούχηση των ορθών πλασμιδιακών κατασκευών. Η αλληλούχηση έδειξε ομοιότητα σε ποσοστό 98% με την προβλεπόμενη αλληλουχία (Παράρτημα ΙΙ). Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του μεταγράφου.



Εικόνα 36. Διαγνωστική πέψη των RTLE int. κλώνων με XmnI.

Καθότι, όμως, ο στόχος ενίσχυσης της πλήρους αλληλουχίας δεν επετεύχθη, έγινε προσπάθεια ενίσχυσης της πλήρους *RTLE* αλληλουχίας με μήτρα το γενωμικό DNA του φυτού *N.benthamiana* (Εικόνα 37). Χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών RTLE-F – RTLE-1R (το οποίο ορίζει το τμήμα *E1*, όπως συμβολίζεται στην εικόνα 37) και iFW-RTLE – RTLE-R (το οποίο ορίζει το τμήμα *E2*, όπως συμβολίζεται στην εικόνα 37). Παρόλα αυτά, δεν προέκυψε κάποιο προϊόν. Επομένως, η ενίσχυση της πλήρους αλληλουχίας της RTLE δεν ήταν δυνατή στα πλαίσια της παρούσας μελέτης και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης στο μέλλον.

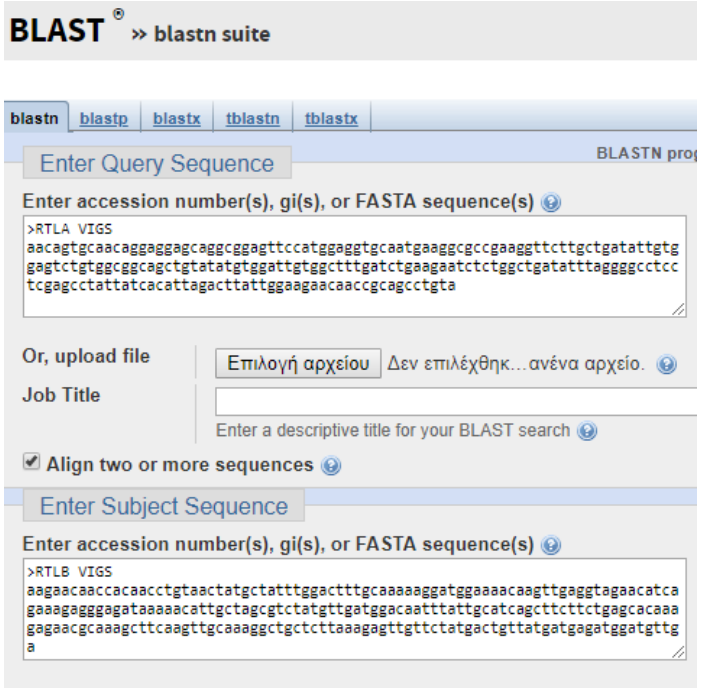


Εικόνα 37. PCR για την ενίσχυση της RTLE από γενωμικό DNA του φυτού N. benthamiana.

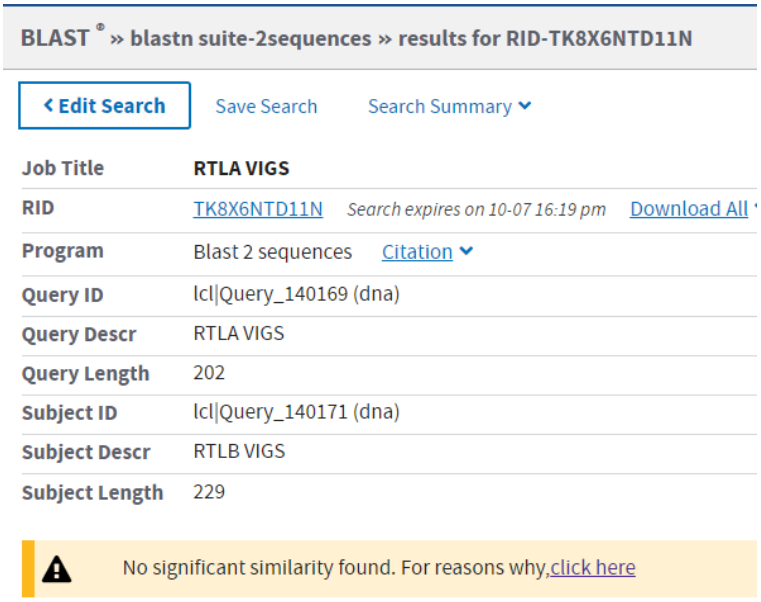
3.4 Προετοιμασία πλασμιδιακών κατασκευών για τα πειράματα VIGS

Για τα πειράματα VIGS χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές των RTLA και RTLB στο φορέα TRV-pTV00, ενώ, όπως περιγράφεται παρακάτω, έγινε και προσπάθεια κλωνοποίησης τμήματος της RTLE στο φορέα TRV-pTV00, το οποίο όμως δε χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα VIGS.

Τα τμήματα που επιλέχθηκαν για την καταστολή με τη μέθοδο VIGS των RTLA και RTLB ονομάστηκαν ως "*RTLA VIGS*" και "*RTLB VIGS*", αντίστοιχα, και ορίστηκαν με βάση το γεγονός ότι δεν παρουσίαζαν ομοιότητα με κάποιο τμήμα άλλων RNAse III πρωτεϊνών. Ο έλεγχος αυτός έγινε με BLAST (NCBI) των δύο τμημάτων. Επιπλέον, ήταν σημαντικό να επιβεβαιωθεί ότι και τα δύο αυτά κομμάτια μεταξύ τους δεν παρουσιάζουν ομοιότητα τέτοια ώστε να υπάρχει περίπτωση στόχευσης της RTLA κατά την προσπάθεια καταστολής



Εικόνα 38. BLAST (NCBI) των αλληλουχιών RTLA VIGS και RTLB VIGS – στιγμιότυπο από την αρχική οθόνη της ιστοσελίδας του προγράμματος.

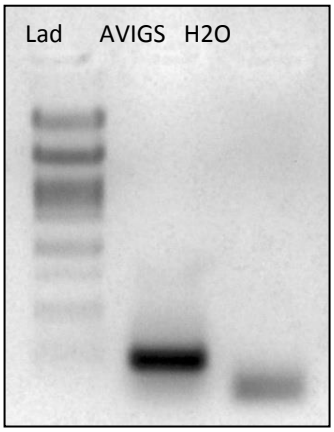


Εικόνα 39. Αποτελέσματα BLAST (NCBI) των αλληλουχιών RTLA VIGS και RTLB VIGS – στιγμιότυπο από την εμφάνιση αποτελεσμάτων της ιστοσελίδας του προγράμματος.

της RTLB και το αντίστροφο. Στις εικόνες 38 και 39 παρουσιάζεται η διαδικασία ελέγχου ομοιότητας των δύο αλληλουχιών στο BLAST (NCBI), όπου τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει σημαντική ομοιότητα.

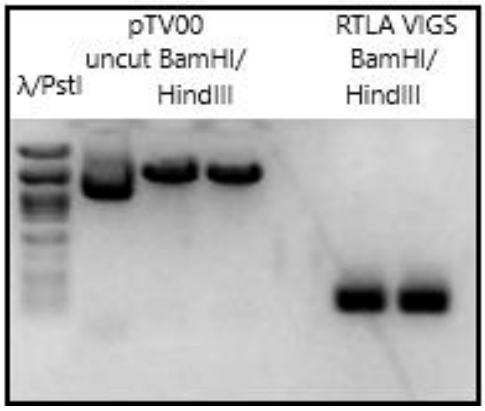
Κλωνοποίηση τμήματος της RTLA για τη δοκιμασία VIGS

Το τμήμα που ενισχύθηκε για την καταστολή της RTLA με τη μέθοδο VIGS (συμβολίζεται ως *RTLA VIGS* ή *AV*) ορίζεται από το ζεύγος εκκινητών iFW2-RTLA – iREV2-RTLA. Οι θέσεις των εκκινητών υπάρχουν στην εικόνα 14, όπου παρουσιάζεται η δομή της RTLA και οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών κατά μήκος της αλληλουχίας. Η ενίσχυση του τμήματος *RTLA VIGS* μήκους 201bp (Εικόνα 40) έγινε με σκοπό την κλωνοποίησή του στον πλασμιδιακό φορέα pTV00.



Εικόνα 40.PCR για την ενίσχυση του τμήματος RTLA VIGS.

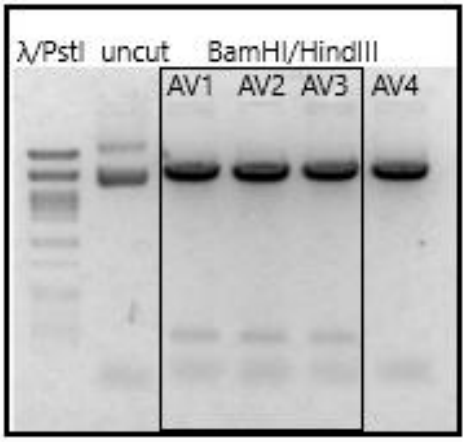
Για την κλωνοποίηση με τη δράση του ενζύμου λιγάση, έγινε αρχικά η πέψη του φορέα και του ενθέματος με τα ένζυμα *Bam*HI και *Hind*III. Οι πέψεις, στην περίπτωση του φορέα pTV00, έδωσαν ως αποτέλεσμα ένα γραμμικό πλασμιδιακό φορέα με άκρα που περιέχουν τις θέσεις κοπής των ενζύμων *Bam*HI και *Hind*III και, στην περίπτωση του τμήματος *RTLA VIGS*, έδωσαν ως αποτέλεσμα μία ζώνη μήκους περίπου 200bp που φέρει επίσης άκρα που περιέχουν τις θέσεις κοπής των ενζύμων *Bam*HI και *Hind*III (Εικόνα 41). Ακολούθησε εξαγωγή από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός των ζωνών αυτών με τη χρήση



Εικόνα 41. Πέψεις του φορέα pTV00 και του ενθέματος RTLA VIGS με τα ένζυμα BamHI και HindIII.

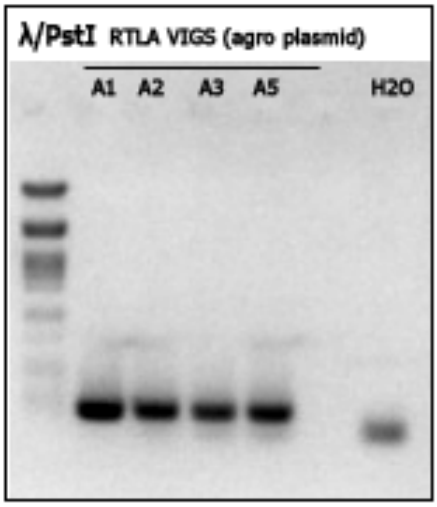
κολόνας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί αντίδραση λιγάσης και μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli*.

Μετά το μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli*, οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ελέγχθηκαν ως προς την ύπαρξη του σωστού μεγέθους ενθέματος με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Hind*III. Τα αναμενόμενα αποτελέσματα των πέψεων ήταν η εμφάνιση δύο ζωνών στο πήκτωμα αγαρόζης, μήκους 2557bp, που αντιστοιχεί στο μέγεθος του κομμένου πλασμιδιακού φορέα pTV00, και μία ζώνη μήκους περίπου 200bp, , που αντιστοιχεί στο μέγεθος του ενθέματος *RTLA VIGS* (Εικόνα 42).



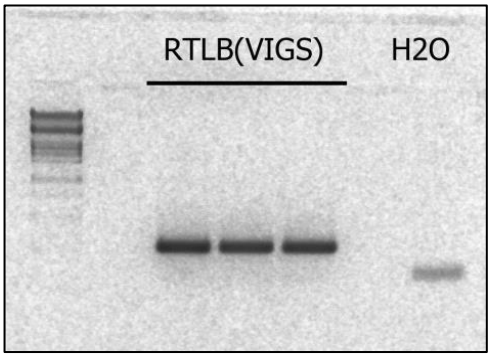
Εικόνα 42. Πέψεις πλασμιδιακών κατασκευών RTLA VIGS (pTV00) με τα ένζυμα BamHI και HindIII.. Οι διαφορετικοί κλώνοι συμβολίζονται ως AV1, AV2, AV3, AV4.

Ακολούθησε καθαρισμός των ορθών πλασμιδίων με τη μέθοδο φαινόλη – χλωροφόρμιο, ώστε να χρησιμοποιηθούν για το μετασχηματισμό αγροβακτηρίων. Έπειτα, έγινε απομόνωση των πλασμιδίων των αποικιών που αναπτύχθηκαν. Τα πλασμίδια που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για εκ νέου μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli*. Οι κλώνοι των αποικιών που αναπτύχθηκαν ελέγχθηκαν, στη συνέχεια, με PCR ως προς την ύπαρξη ή μη του ενθέματος. Συγκεκριμένα, στην PCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών iFW2



Εικόνα 43. PCR με το ζεύγος εκκινητών iFW2 RTLA – iREV2 RTLA, για την επιβεβαίωση της ύπαρξης του ενθέματος RTLA VIGS (200bp) στα πλασμίδια που απομονώθηκαν μετά τον εκ νέου μετασχηματισμό των E.coli.

RTLA – iREV2 RTLA ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα πλασμίδια που απομονώθηκαν μετά τον εκ νέου μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli* περιείχαν το ένθεμα *RTLA VIGS* (200bp) (Εικόνα 43). Με τον τρόπο αυτό, καθώς και με την αλληλούχηση των πλασμιδίων που προέκυψαν μετά τον τελευταίο μετασχηματισμό, ολοκληρώθηκε ο έλεγχος των κατασκευών. Η αλληλούχηση έδειξε 97% ομοιότητα με την προβλεπόμενη αλληλουχία (Παράρτημα ΙΙ). Τέλος, αλληλουχήθηκε και η πλασμιδιακή κατασκευή RTLA VIGS (pTV00) των αγροβακτηρίων που χρησιμοποιήθηκε για τον αγροεμποτισμό κατά την διάρκεια των πειραμάτων VIGS (Παράρτημα ΙΙ).

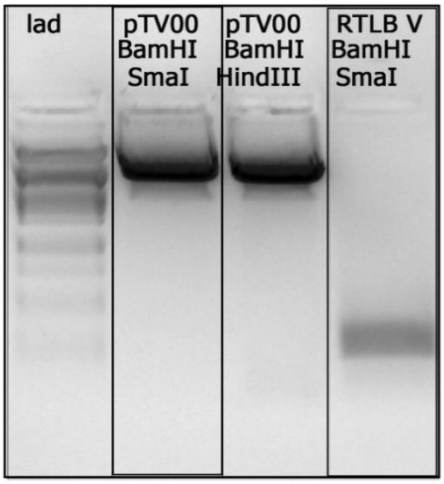


Εικόνα 44. PCR για την ενίσχυση του τμήματος RTLB VIGS.

<u>Κλωνοποίηση τμήματος της RTLB για τη δοκιμασία VIGS</u>

Το τμήμα που ενισχύθηκε για την καταστολή της RTLB με τη μέθοδο VIGS (συμβολίζεται ως *RTLB VIGS* ή *BV*) ορίζεται από το ζεύγος εκκινητών iFW-RTLB – iREV-RTLB. Οι θέσεις των εκκινητών υπάρχουν στην εικόνα 21, όπου φαίνεται η δομή της RTLB και οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών κατά μήκος της αλληλουχίας. Η ενίσχυση του τμήματος *RTLB VIGS* μήκους 234bp (Εικόνα 44) έγινε με σκοπό την κλωνοποίησή του στον πλασμιδιακό φορέα pTV00.

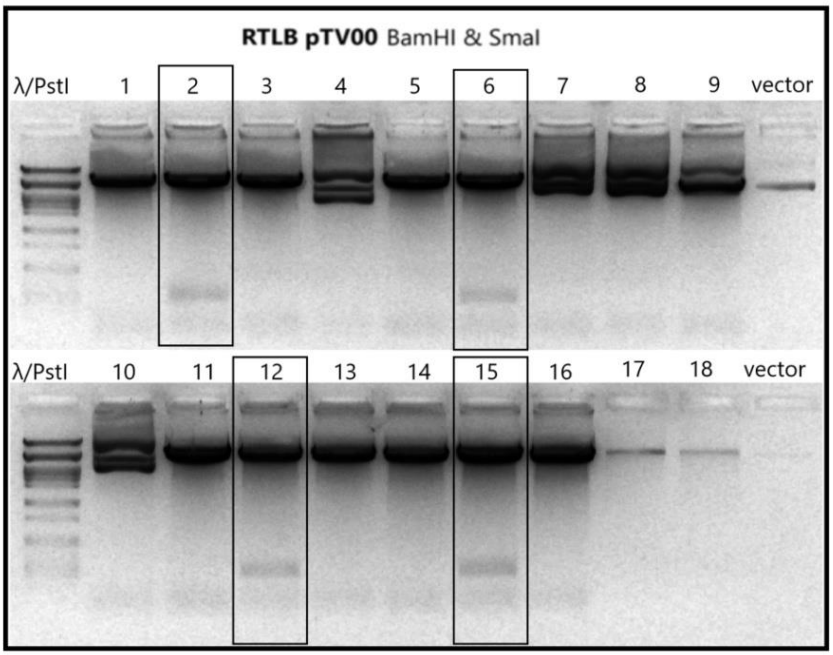
Για την κλωνοποίηση με τη δράση του ενζύμου λιγάση, έγινε πέψη του φορέα



Εικόνα 45. Πέψη του φορέα pTV00 και του ενθέματος RTLB VIGS με τα ένζυμα BamHI και SmaI.

και του ενθέματος με τα ένζυμα *Bam*HI και *Sma*I. Στην εικόνα 45 φαίνονται τα αποτελέσματα των πέψεων. Συγκεκριμένα παρατηρείται η ζώνη του γραμμικού φορέα pTV00 μήκους 5581bp που φέρει άκρα στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι θέσεις κοπής των ενζύμων *Bam*HI και *Sma*I και η ζώνη του ενθέματος *RTLB VIGS*, μήκους περίπου 230bp, που επίσης φέρει άκρα με τις θέσεις κοπής των ενζύμων *Bam*HI και *Sma*I. Έπειτα, έγινε εξαγωγή από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός των ζωνών αυτών με τη χρήση κολόνας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί αντίδραση λιγάσης και μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli*.

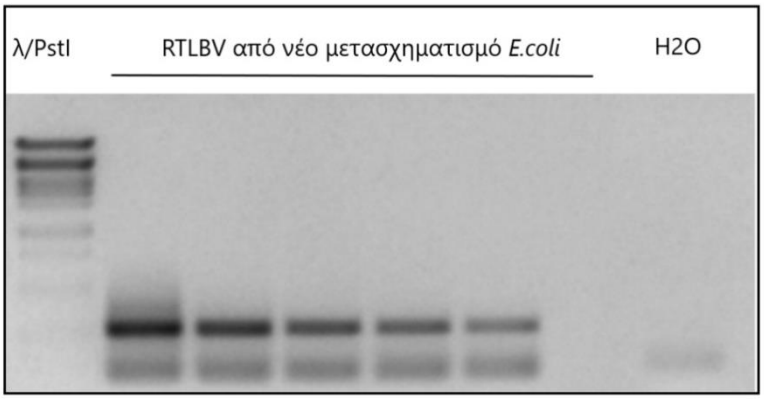
Μετά το μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli*, οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ελέγχθηκαν ως προς την ύπαρξη του σωστού μεγέθους ενθέματος με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Sma*I. Ειδικότερα, τα αναμενόμενα αποτελέσματα από τις πέψεις αυτές ήταν η εμφάνιση μίας ζώνης μήκους 5581bp, που αντιστοιχεί στον πλασμιδιακό φορέα pTV00, και μίας ζώνης μήκους περίπου 230bp, που αντιστοιχεί στο μήκος του ενθέματος *RTLB VIGS*. Τα αποτελέσματα των πέψεων αυτών



Εικόνα 46. Πέψη των πλασμιδιακών κατασκευών RTLB VIGS (pTV00) με τα ένζυμα BamHI και SmaI.. Οι ορθές πλασμιδιακές κατασκευές επισημαίνονται με τη χρήση ορθογώνιου περιγράμματος.

παρουσιάζονται στην εικόνα 46. Οι ορθές πλασμιδιακές κατασκευές επισημαίνονται με τη χρήση ορθογώνιου περιγράμματος (Εικόνα 46).

Ακολούθως, έγινε καθαρισμός των ορθών πλασμιδίων, που φαίνονται στην εικόνα 46, με τη μέθοδο φαινόλη – χλωροφόρμιο και μετασχηματισμός αγροβακτηρίων με αυτά. Τα πλασμίδια που απομονώθηκαν, στη συνέχεια, από τις αποικίες των αγροβακτηρίων που αναπτύχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για εκ νέου μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli*. Από τις αποικίες των εκ νέου μετασχηματισμένων *E.coli* που αναπτύχθηκαν έγινε απομόνωση των πλασμιδίων και ο έλεγχος για την ορθότητά τους πραγματοποιήθηκε με PCR. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών iFW-RTLB – iREV-RTLB ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα πλασμίδια που απομονώθηκαν μετά τον εκ νέου μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli* περιείχαν το ένθεμα *RTLB VIGS* μήκους περίπου 230bp (Εικόνα 47).



Εικόνα 47. PCR για τον έλεγχο ύπαρξης του ενθέματος RTLB VIGS.

Εκτός από την επιβεβαίωση με PCR έγινε και αλληλούχηση των πλασμιδίων που προέκυψαν μετά τον τελευταίο μετασχηματισμό κι έτσι ολοκληρώθηκε ο έλεγχος των κατασκευών. Η αλληλούχηση έδειξε 99% ομοιότητα με την προβλεπόμενη αλληλουχία (Παράρτημα ΙΙ). Τέλος, αλληλουχήθηκε και η πλασμιδιακή κατασκευή RTLB VIGS (pTV00) των αγροβακτηρίων που χρησιμοποιήθηκε για τον αγροεμποτισμό κατά την διάρκεια των πειραμάτων VIGS (Παράρτημα ΙΙ).

Κλωνοποίηση τμήματος της RTLE για τη δοκιμασία VIGS

Η παράγραφος 3.3.5 αναφέρεται στις προσπάθειες ενίσχυσης με PCR της πρωτεΐνης RTLE. Έγινε σαφές ότι, παρά την αδυναμία ενίσχυσης της πλήρους αλληλουχίας, αποκτήθηκε μία πλασμιδιακή κατασκευή που περιείχε το μικρό τμήμα που συμβολίστηκε ως *RTLE int.*, μήκους περίπου 400bp, στο φορέα pBSSKm (Εικόνα 36).

Κατά την προετοιμασία των κατασκευών για τη χρήση σε πειράματα VIGS, έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης του τμήματος *RTLE int.* από το φορέα pBSSKm στο φορέα pTV00. Συγκεκριμένα, ο σχεδιασμός περιλάμβανε την πέψη της πλασμιδιακής κατασκευής RTLE int. (pBSSKm) και του φορέα pTV00 με το ένζυμο BamHI, προκειμένου να γίνει ένθεση του τμήματος *RTLE int.* στον πλασμιδιακό φορέα pTV00 με αντίδραση λιγάσης. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη δε συμπεριλαμβάνονται πειράματα καταστολής της RTLE, καθώς τελικά δεν ήταν δυνατή η κατασκευή του RTLE (pTV00), η οποία αποτελεί μελλοντικό στόχο.

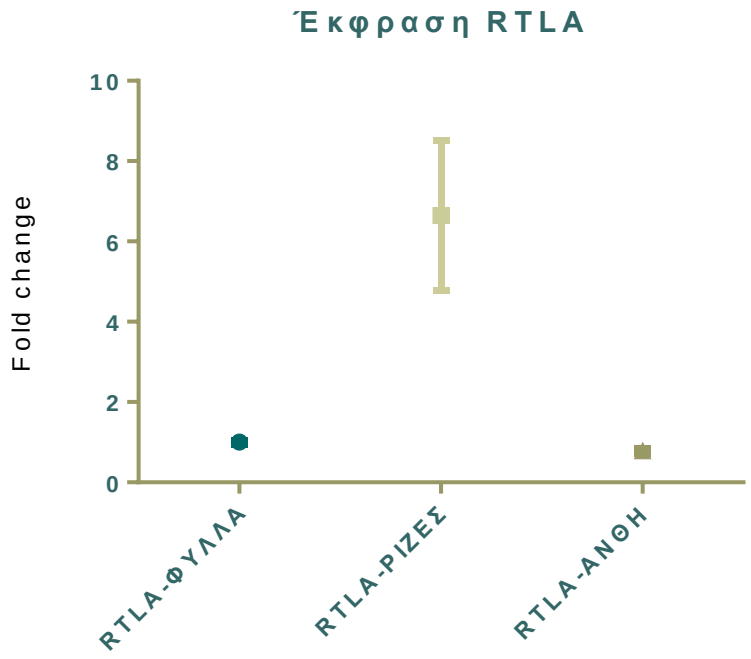
3.5 Πειραματικός σχεδιασμός

Ως απόρροια των αποτελεσμάτων δημιουργίας πλασμιδιακών κατασκευών στο φορέα pTV00 μόνο για τις RTLA και RTLB, ακολουθεί η περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού και τα αποτελέσματα της καταστολής των RTLA και RTLB πρωτεϊνών.

3.5.1 Έλεγχος έκφρασης των RTL στα διάφορα μέρη του φυτού

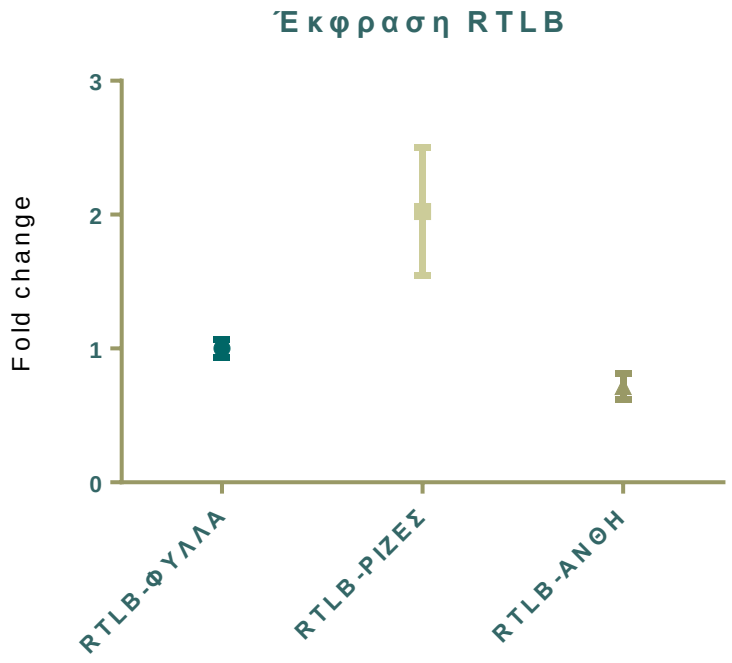
Με qPCR ελέγχθηκε η έκφραση των RTLA και RTLB σε φύλλα, ρίζες και άνθη του φυτού *N.benthamiana.* Για την ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της qPCR χρησιμοποιήθηκαν τρία γονίδια αναφοράς : L23, PP2A και FBox (D. Liu et al., 2012).

Στο σχήμα 1 παρουσιάζεται η διαφορά στην έκφραση της RTLA στα διάφορα τμήματα του φυτού. Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι σε σχέση με τα φύλλα υπάρχει μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης στα άνθη. Από την άλλη, φαίνεται πολύ μεγαλύτερη έκφραση στις ρίζες, συγκριτικά με τα φύλλα. Ωστόσο, το μεγάλο σφάλμα του μέσου όρου των μετρήσεων προδίδει ότι πιθανά το αποτέλεσμα που αφορά την έκφραση στις ρίζες δεν είναι ιδιαίτερα αξιόπιστο. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στο ότι τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν, παρότι είναι ιδανικά για τον ιστό των φύλλων, για τον ιστό των ριζών θα έπρεπε μάλλον να δοκιμαστούν διαφορετικά γονίδια αναφοράς.



Σχήμα 1. Διαφορές στην έκφραση της RTLA σε φύλλα, ρίζες και άνθη. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Ο αριθμός δειγμάτων είναι N=4 για τα φύλλα και τα άνθη και N=3 για τις ρίζες.

Ομοίως, στο σχήμα 2 παρουσιάζεται η διαφορά στην έκφραση της RTLB στα διάφορα τμήματα του φυτού. Και σε αυτή την περίπτωση προκύπτει το ίδιο αποτέλεσμα χαμηλότερης έκφρασης στα άνθη σε σχέση με τα φύλλα και υψηλότερης στης ρίζα, όπου υπάρχει όμως πάλι μεγάλο σφάλμα του μέσου όρου των μετρήσεων. Συνεπώς, παρότι προκύπτει μία εικόνα για την αξιολόγηση της έκφρασης της RTLB σε διαφορετικά τμήματα του φυτού, η περίπτωση της έκφρασης στις ρίζες θα πρέπει να διερευνηθεί παραπάνω, με τη χρήση διαφορετικών γονιδίων αναφοράς.



Σχήμα 2. Διαφορές στην έκφραση της RTLB σε φύλλα, ρίζες και άνθη. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Ο αριθμός δειγμάτων είναι N=4 για τα φύλλα και τα άνθη και N=3 για τις ρίζες.

3.5.2 Μελέτη των RTL κατά τη διάρκεια μολύνσεων με το ιοειδές PSTVd

Η σίγηση του κάθε γονιδίου κατά τη διάρκεια μόλυνσης με PSTVd έγινε σε φυτά N. benthamiana με τους εξής τρόπους, όπως παρουσιάζονται και παρακάτω:

Α) μόλυνση με το ιοειδές, η οποία προηγείται της μόλυνσης με TRV για την επαγωγή σίγησης του κάθε γονιδίου κατά μία εβδομάδα,

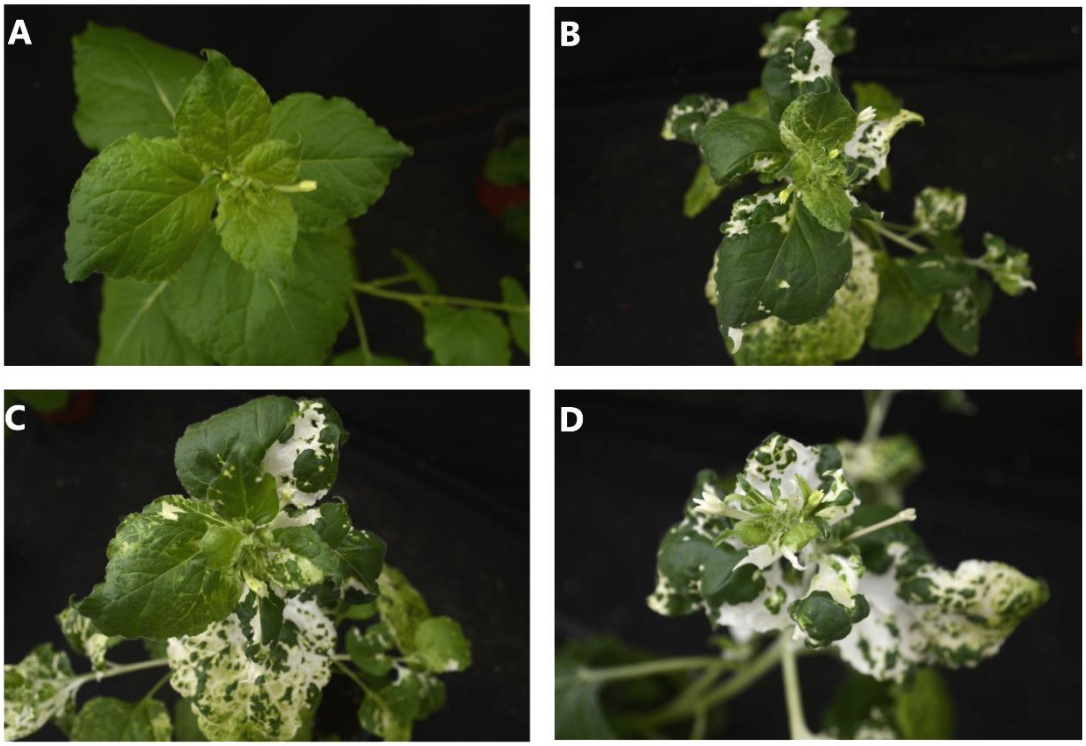
Β) μόλυνση με TRV για την επαγωγή σίγησης του κάθε γονιδίου που προηγείται της μόλυνσης με το ιοειδές κατά μία εβδομάδα και

Γ) ταυτόχρονη μόλυνση με το ιοειδές και τον TRV για την επαγωγή σίγησης του κάθε γονιδίου.

Οι δειγματοληψίες φυτικού ιστού έγιναν στις τρεις ή τέσσερις εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd, ανάλογα με το χρόνο εμφάνισης του αναμενόμενου

φαινοτύπου σε φυτά – μάρτυρες, στα οποία έγινε η σίγηση του γονιδίου PDS (Εικόνα 40). Ο PDS – εξαρτώμενος φαινότυπος εμφανίστηκε σε όλα τα πειράματα σε δύο ή τρεις εβδομάδες μετά τη μόλυνση με TRV. Σε κάθε περίπτωση παρουσιάζονται ενδεικτικά αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των φυτών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των φυτών ανά περίπτωση είναι τουλάχιστον 15, ώστε να μπορούν να διεξαχθούν σχετικά ασφαλή στατιστικά συμπεράσματα. Η επιλογή προέκυψε έπειτα από φαινοτυπική παρατήρηση των φυτών – μαρτύρων, στα οποία έγινε σίγηση του γονιδίου PDS χωρίς μόλυνση με PSTVd. Τα φυτά αυτά, παρότι μεταχειρίστηκαν με τον ίδιο τρόπο ακριβώς, εμφάνισαν διαφορετικής έντασης συμπτώματα έλλειψης της έκφρασης του PDS, ύστερα από τρεις εβδομάδες. Στην εικόνα 48 παρουσιάζονται τέσσερα τέτοια διαφορετικά φυτά (A, B, C και D) που, καθ’ όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, μεταχειρίστηκαν με τον ίδιο τρόπο. Στην εικόνα 48 παρατηρείται ότι υπάρχει ξεκάθαρη διαφορά έντασης των συμπτωμάτων σίγησης του PDS. Στο φυτό A φαίνεται να μην υπάρχουν σχεδόν καθόλου συμπτώματα, πράγμα που σημαίνει ότι η σίγηση μπορεί να είναι εντελώς ανεπιτυχής. Αντίθετα, στα B, C και D φαίνονται αυξανόμενης έντασης συμπτώματα καταστολής του PDS. Συνεπώς, η μέθοδος VIGS φαίνεται να μην είναι μια σταθερή μέθοδος, αλλά επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, οι οποίοι δεν μπορούν να ελεγχθούν. Επομένως, ο μεγάλος αριθμός δειγμάτων είναι απαραίτητος για τη σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 48. PDS - εξαρτώμενος φαινότυπος στις 3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με TRV σε διαφορετικά φυτά N.benthamiana..

Σε κάθε περίπτωση τα δείγματα φυτικού ιστού χρησιμοποιηθήκαν σε στυπώματα northern, με σκοπό την ποσοτικοποίηση των επιπέδων του PSTVd και τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ των φυτών – μαρτύρων και των φυτών με καταστολή των RTL γονιδίων – στόχων. Η εμφάνιση όλων των στυπωμάτων northern έγινε με το μηχάνημα Sapphire Biomolecular Imager της Azure Biosystems (https://www.azurebiosystems.com/sapphire-biomolecular-imager/), το οποίο παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία ανίχνευσης σήματος και παρέχει ψηφιακή απεικόνιση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του λογισμικού Sapphire Capture. Όλες οι ποσοτικοποιήσεις των στυπωμάτων northern πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού AzureSpot Analysis (https://www.azurebiosystems.com/software-downloads/azurespot/), το οποίο μπορεί να ανιχνεύσει αυτόματα ζώνες σε

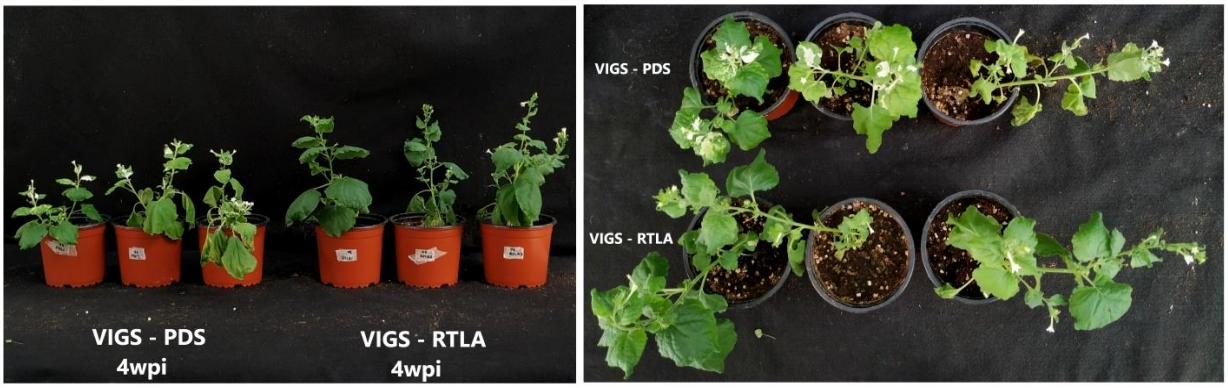
πηκτώματα, ακόμη και αν υπάρχουν παραμορφώσεις, και εφαρμόζει επιλεγμένες μεθόδους ανίχνευσης του φόντου για ακριβή ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Τέλος, ελέγχθηκε με qPCR το ποσοστό καταστολής του εκάστοτε γονιδίου – στόχου. Για την ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της qPCR χρησιμοποιήθηκαν τρία γονίδια αναφοράς : L23, PP2A και FBox (D. Liu et al., 2012). Σε κάθε περίπτωση έγινε έλεγχος της εγκυρότητας των τριών γονιδίων αναφοράς με τα λογισμικά Norm finder και Best Keeper.

3.5.3 Σίγηση του γονιδίου RTLA

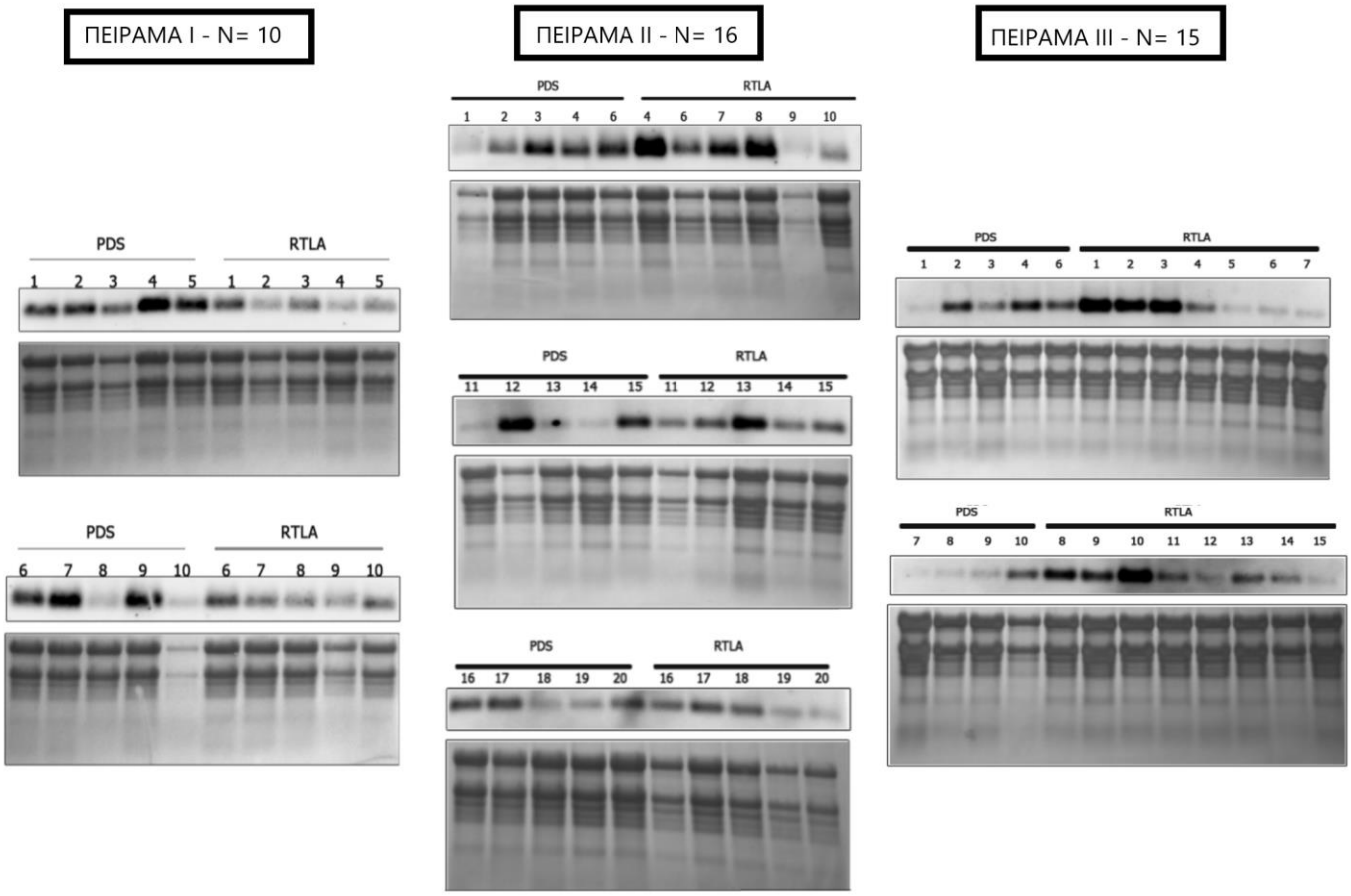
3.5.3.1 Πρώτη μόλυνση: PSTVd – Δεύτερη μόλυνση: TRV

Στην περίπτωση που έγινε πρώτα μόλυνση με το PSTVd κι έπειτα με τον ιό TRV για τη σίγηση του γονιδίου RTLA εξετάστηκαν συνολικά 41 δείγματα από τρία τεχνικώς πανομοιότυπα πειράματα, που συλλέχθηκαν τη χρονική στιγμή των τεσσάρων εβδομάδων μετά τη μόλυνση με το ιοειδές. Στην εικόνα 49 παρουσιάζονται



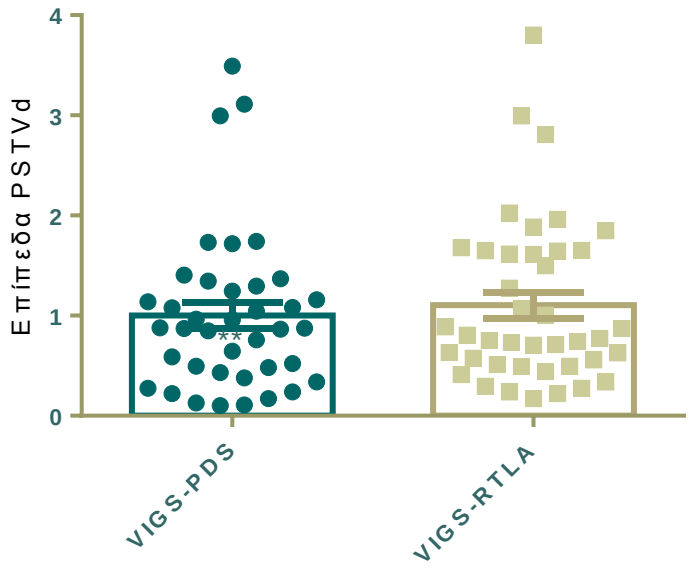
Εικόνα 49. Ενδεικτικές φωτογραφίες από φυτά VIGS – PDS και VIGS - RTLA, 4 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd.

ενδεικτικές φωτογραφίες των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις με στυπώματα τύπου northern. Η εκτίμηση των επιπέδων του PSTVd έγινε με την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από τα στυπώματα northern (Εικόνα 50).



Εικόνα 50. Στυπώματα northern για την ανίχνευση του PSTVd σε δείγματα από φυτά VIGS – PDS και VIGS - RTLA, 4 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd.

Με βάση τις ποσοτικοποιήσεις των στυπωμάτων northern που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού AzureSpot Analysis, σχεδιάστηκε τα παρακάτω διάγραμμα που απεικονίζει τη διαφορά των επιπέδων του PSTVd, μεταξύ των φυτών – μαρτύρων VIGS – PDS και των VIGS –RTLA, στα οποία έχει γίνει καταστολή της έκφρασης RTLA με τη μέθοδο VIGS, στο σύνολο των τριών πειραμάτων (Σχήμα 3).



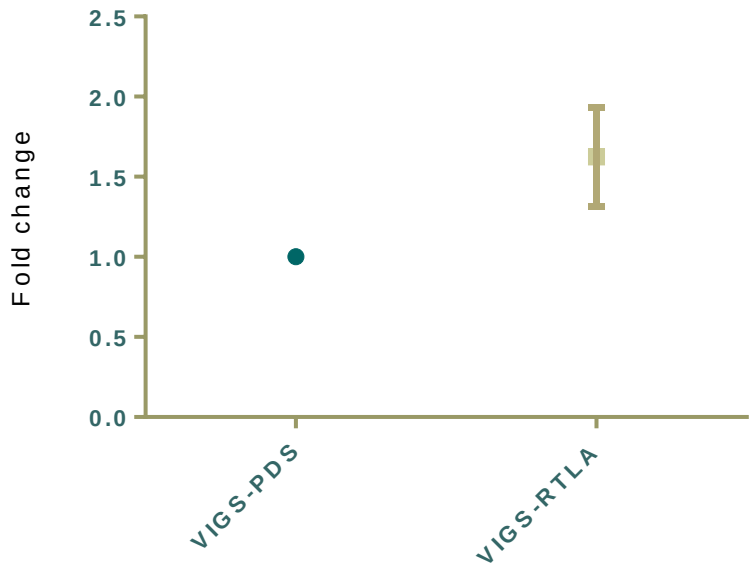
Σχήμα 3. *Επίπεδα PSTVd σε VIGS – PDS και VIGS – RTLA φυτά, μέσος όρος με το τυπικό σφάλμα μέσου όρου.*

Επιπλέον, έγινε στατιστική ανάλυση με τη χρήση της δοκιμασίας Mann Whitney, η οποία έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων. Συνεπώς, τα αποτελέσματα δείχνουν σχετική σταθερότητα στη συγκέντρωση του ιοειδούς στο σύνολο των δειγμάτων.

Εν συνεχεία, έγινε αξιολόγηση του ποσοστού αλλαγής της έκφρασης της RTLA μεταξύ δειγμάτων των φυτών – μαρτύρων VIGS – PDS και των VIGS –RTLA. Για την qPCR χρησιμοποιήθηκαν τα τρία γονίδια αναφοράς L23, PP2A και FBox, τα οποία ελέγχθηκαν με τα λογισμικά Norm finder και Best Keeper, ως προς τη σταθερότητά τους. Η qPCR για τον έλεγχο του ποσοστού έκφρασης της RTLA έγινε με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών iFW-RTLA – iREV-RTLA, οι θέσεις πρόσδεσης των οποίων έχουν παρουσιαστεί στην εικόνα 14. Οι εκκινητές αυτοί στοχεύουν σε ένα τμήμα μήκους 80bp κατά μήκος του μεταγράφου της RTLA. Όλα τα παραπάνω ισχύουν για όλες τις qPCR που έγιναν για την RTLA.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ελέγχθηκαν 9 VIGS - PDS και 9 VIGS - RTLA δείγματα (3 VIGS - PDS και 3 VIGS - RTLA από κάθε ένα από τα τρία πειράματα),

προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό αλλαγής έκφρασης της RTLA σε σχέση με τα δείγματα – μάρτυρες, με τη μέθοδο qPCR. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν, σχεδιάστηκε το παρακάτω διάγραμμα που παρουσιάζει τις διαφορές στην έκφραση της RTLA μεταξύ των φυτών VIGS - PDS και VIGS – RTLA. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών της qPCR με το τυπικό σφάλμα (SE) (Σχήμα 4).

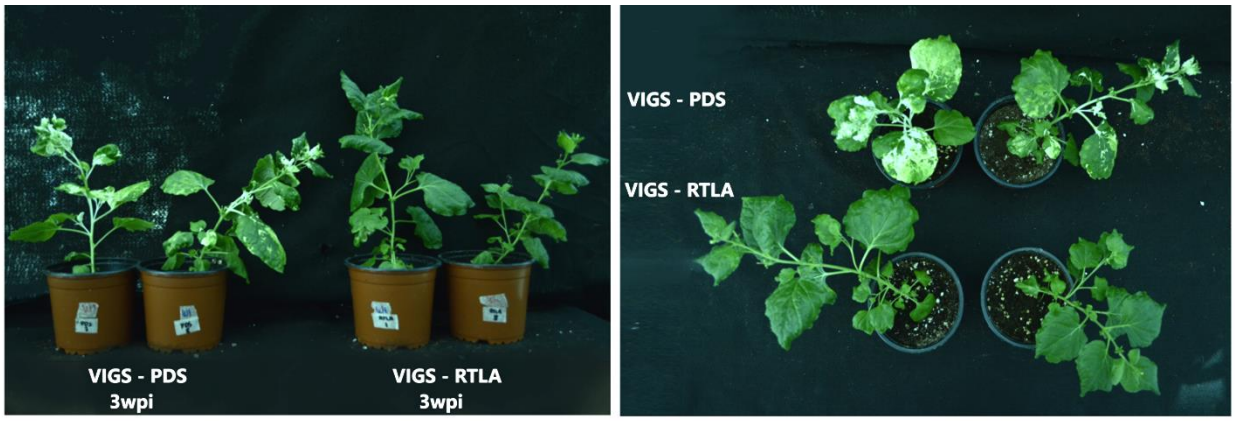


Σχήμα 4. Αλλαγές *στην έκφραση της RTLAμεταξύ των φυτών VIGS - PDS και VIGS – RTLA: Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών της qPCR με το τυπικό σφάλμα (SE).*

Η αλλαγή που παρατηρείται αφορά την αυξημένη έκφραση της RTLA στα υπό εξέταση δείγματα συγκριτικά με τα δείγματα – μάρτυρες, γεγονός που αντιτίθεται στις προσδοκίες της μεθόδου VIGS και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Συνεπώς, στο συγκεκριμένο πείραμα, με βάση τα φυτά που ελέχθησαν, φαίνεται να μην ήταν αποτελεσματική η καταστολή του γονιδίου μέσω VIGS.

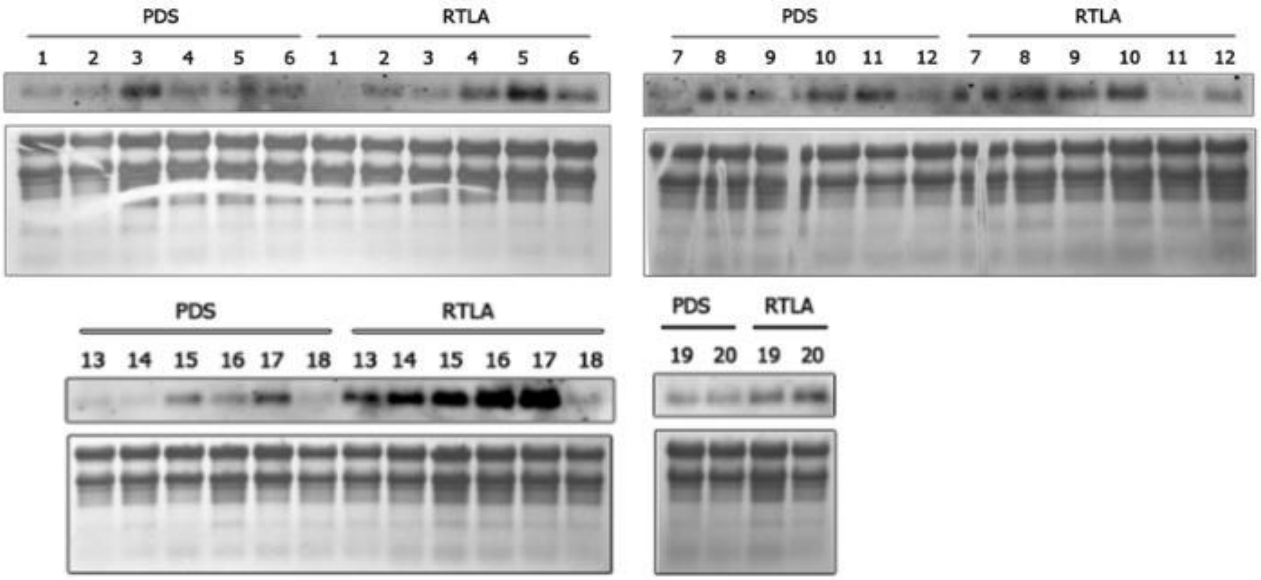
3.5.3.2 Πρώτη μόλυνση: TRV – Δεύτερη μόλυνση: PSTVd

Στην περίπτωση που έγινε αρχικά μόλυνση με TRV για την επαγωγή σίγησης του γονιδίου RTLA και ακολούθησε η μόλυνση με το ιοειδές, εξετάστηκαν 20 δείγματα, προερχόμενα από ένα μοναδικό πείραμα, τα οποία συλλέχθηκαν τρεις εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd. Στην εικόνα 51 παρατίθενται ενδεικτικές φωτογραφίες των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα.



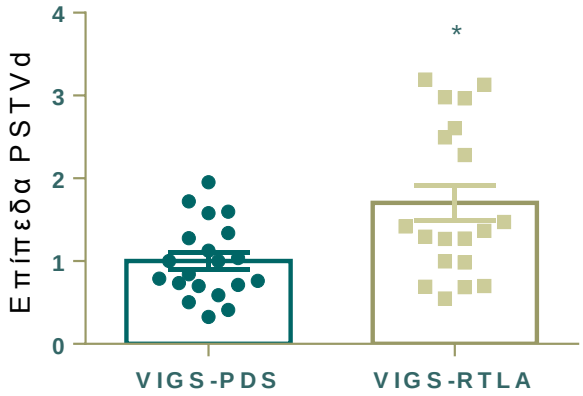
Εικόνα 51. Ενδεικτικές φωτογραφίες από φυτά VIGS – PDS και VIGS - RTLA, 3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δειγμάτων με στυπώματα northern (Εικόνα 52), κατά τα οποία αξιολογήθηκαν τα επίπεδα του PSTVd. Αυτό έγινε ακριβώς όπως περιγράφηκε παραπάνω, με βάση την ποσοτικοποίηση των στυπωμάτων northern που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού AzureSpot Analysis.



Εικόνα 52. Στυπώματα northern για την ανίχνευση του PSTVd σε δείγματα από φυτά VIGS – PDS και VIGS - RTLA, 3εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd.

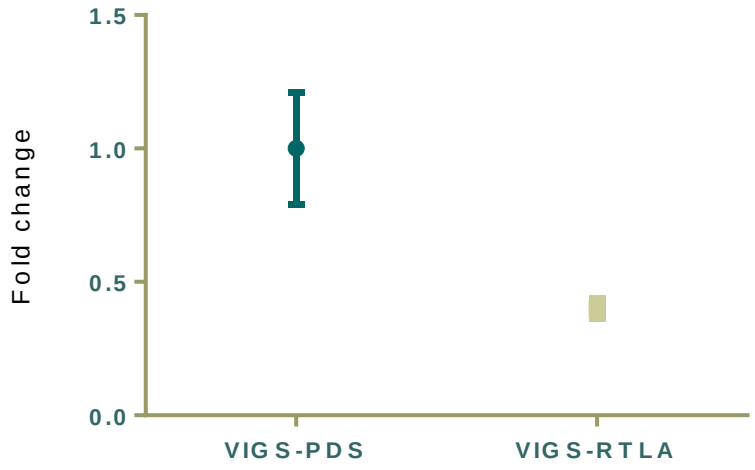
Έπειτα σχεδιάστηκε το παρακάτω διάγραμμα που απεικονίζει τη διαφορά των επιπέδων του PSTVd, μεταξύ των φυτών – μαρτύρων VIGS – PDS και των VIGS – RTLA (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Επίπεδα PSTVd σε VIGS – PDS και VIGS – RTLA φυτά, μέσος όρος με το τυπικό σφάλμα μέσου όρου με N=20.

Τα δείγματα με σίγηση του γονιδίου RTLA φαίνεται να έχουν υψηλότερα επίπεδα ιοειδούς σε σχέση με το μάρτυρα. Η εφαρμογή της δοκιμασίας Mann Whitney έδειξε ότι η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική.

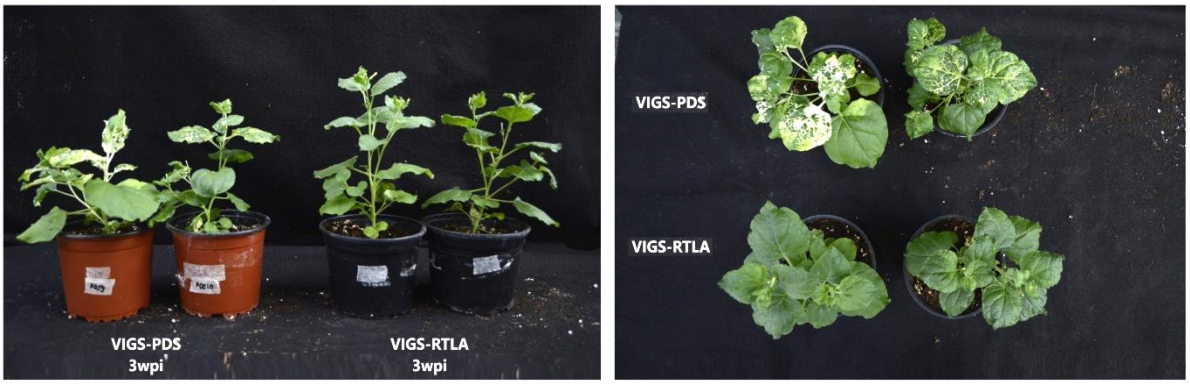
Ακολούθως, έγινε ο έλεγχος του ποσοστού καταστολής του γονιδίου – στόχου σε τρία αντιπροσωπευτικά VIGS - PDS και VIGS - RTLA δείγματα με τη μέθοδο της qPCR, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η qPCR έγινε με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών iFW-RTLA – iREV-RTLA. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι είχε επιτευχθεί καταστολή ποσοστού 60%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σχηματικά στο παρακάτω γράφημα (Σχήμα 6).



Σχήμα 6. Αλλαγές στην έκφραση της RTLA μεταξύ των φυτών VIGS - PDS και VIGS – RTLA: Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών της qPCR με το τυπικό σφάλμα (SE).

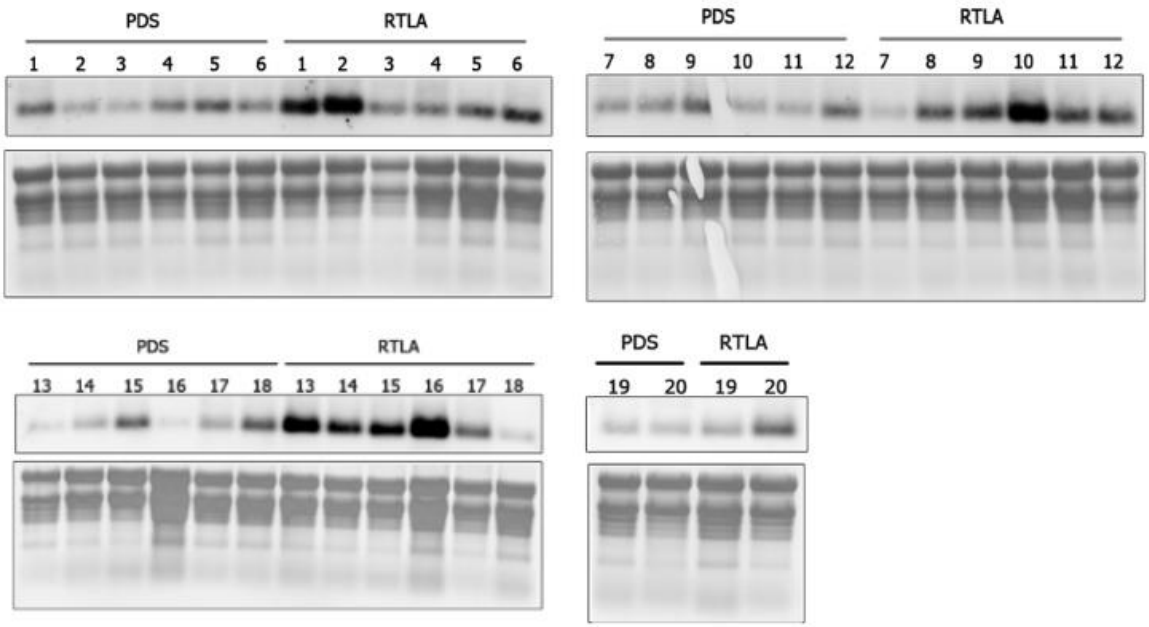
3.5.3.3 Ταυτόχρονη μόλυνση TRV και PSTVd

Στην περίπτωση ταυτόχρονης μόλυνσης TRV και PSTVd εξετάστηκαν 20 δείγματα, προερχόμενα από ένα μοναδικό πείραμα, που συλλέχθηκαν τρεις εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το ιοειδές. Η εικόνα 53 περιλαμβάνει ενδεικτικές φωτογραφίες φυτών VIGS - PDS και VIGS – RTLA του πειράματος.



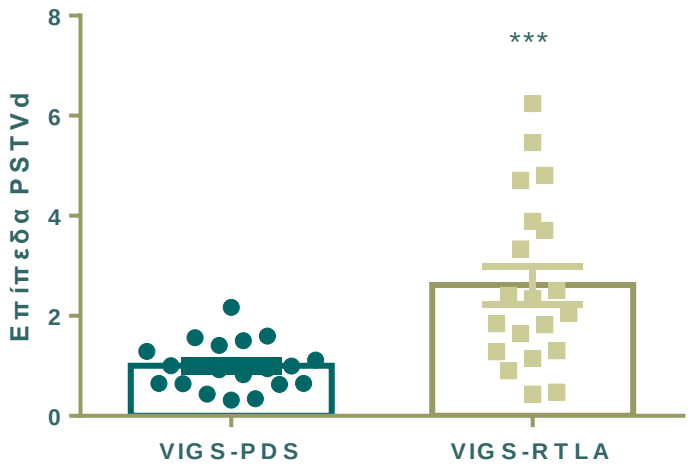
Εικόνα 16. Ενδεικτικές φωτογραφίες από φυτά VIGS – PDS και VIGS - RTLA, 3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd.

Τα επίπεδα του PSTVd υπολογίστηκαν μετά από ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από τα στυπώματα northern (Εικόνα 54), όπως ακριβώς περιγράφηκε στα παραπάνω πειράματα, με τη χρήση του λογισμικού AzureSpot Analysis.



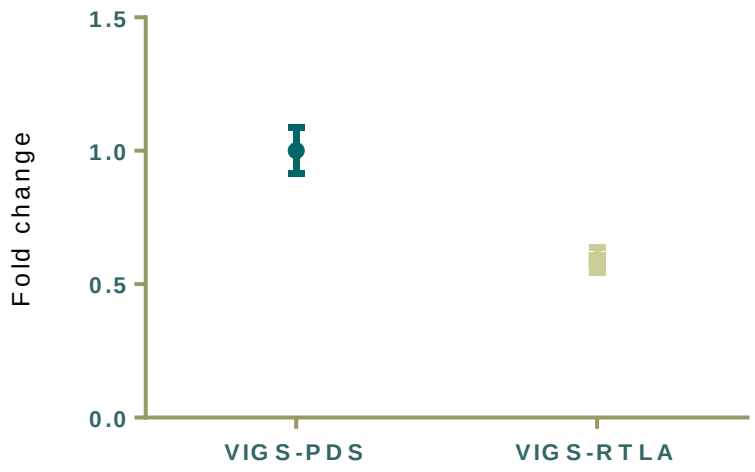
Εικόνα 54. Στυπώματα northern για την ανίχνευση του PSTVd σε δείγματα από φυτά VIGS – PDS και VIGS - RTLA, 3εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα που απεικονίζουν τις διαφορές μεταξύ των φυτών – μαρτύρων VIGS – PDS και των VIGS –RTLA (Σχήμα 7). Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με τη χρήση της δοκιμασίας Mann Whitney, η οποία έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συνόλων. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του PSTVd είναι στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη στα δείγματα με σίγηση του γονιδίου RTLA.



Σχήμα 7. Επίπεδα PSTVd σε VIGS – PDS και VIGS – RTLA φυτά, μέσος όρος με το τυπικό σφάλμα μέσου όρου με N=20.

Ακόμη, έγινε έλεγχος του ποσοστού καταστολής του γονιδίου – στόχου σε τρία αντιπροσωπευτικά PDS και RTLA δείγματα με τη μέθοδο της qPCR, όπως περιγράφηκε παραπάνω, με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών iFW-RTLA – iREV-RTLA. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι είχε επιτευχθεί καταστολή ποσοστού 42% στην έκφραση της RTLA (Σχήμα 8).



Σχήμα 8. Αλλαγές στην έκφραση της RTLA μεταξύ των φυτών VIGS - PDS και VIGS – RTLA: Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών της qPCR με το τυπικό σφάλμα (SE).

3.5.4 Σίγηση του γονιδίου RTLB

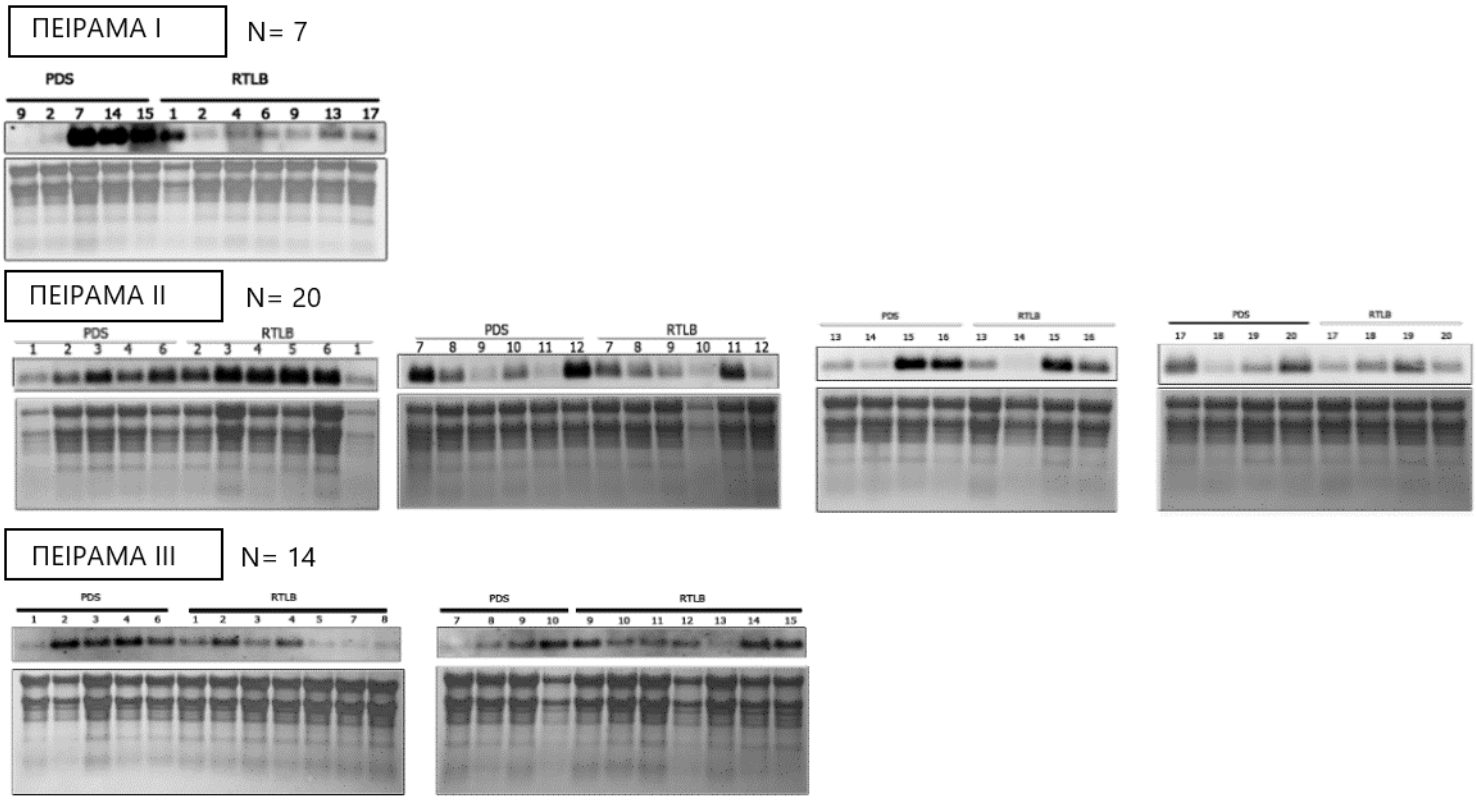
3.5.4.1 Πρώτη μόλυνση: PSTVd – Δεύτερη μόλυνση: TRV

Στην περίπτωση που έγινε πρώτα μόλυνση με το PSTVd κι έπειτα με τον ιό TRV για τη σίγηση του γονιδίου RTLB εξετάστηκαν συνολικά 41 δείγματα φυτών από τρία διαφορετικά πειράματα. Τα δείγματα του πειράματος I συλλέχθηκαν τρεις εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το ιοειδές, ενώ τα δείγματα από τα πειράματα II και III συλλέχθηκαν τέσσερις εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το ιοειδές. Αυτό συνέβη διότι στα δύο από τα τρία πειράματα καθυστέρησε η εμφάνιση του PDS – εξαρτώμενου φαινοτύπου, κατά μία εβδομάδα. Επιπλέον, η ένταση των

Εικόνα 55. Ενδεικτικές φωτογραφίες από Φυτά VIGS – PDS και VIGS – RTLB,3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd.

συμπτωμάτων στα φυτά VIGS – PDS ήταν μειωμένη. Στην εικόνα 55 παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα.

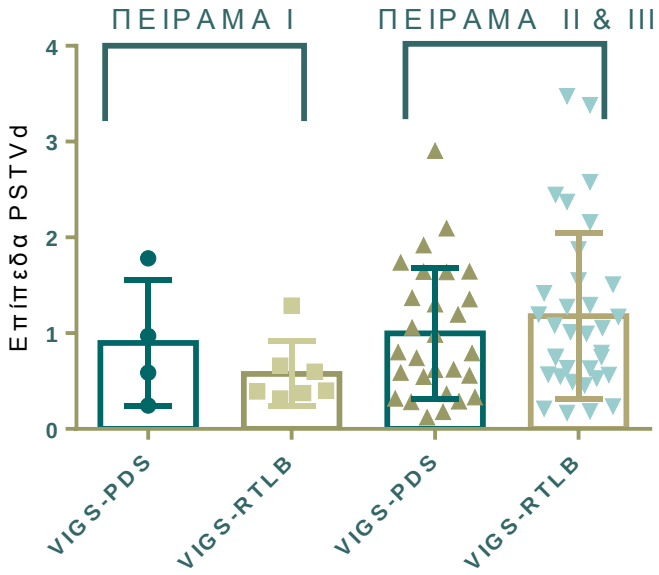
Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις με στυπώματα τύπου northern. Η εκτίμηση των επιπέδων του PSTVd έγινε με την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από τα στυπώματα northern. Όπως έχει προαναφερθεί, τα δείγματα του πειράματος I



Εικόνα 56. Στυπώματα northern για την ανίχνευση του PSTVd σε δείγματα από φυτά VIGS – PDS και VIGS - RTLB, 3 (Πείραμα I) και 4 (Πειράματα II και III) εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd.

συλλέχθηκαν τρεις εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το ιοειδές, ενώ τα δείγματα από τα πειράματα II και III συλλέχθηκαν τέσσερις εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το ιοειδές. Κατά συνέπεια, η γραφική παράσταση στο σχήμα 9 απεικονίζει σε χωριστές στήλες τα δείγματα που συλλέχθηκαν στις τρεις και στις τέσσερις εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Ειδικότερα, η αξιολόγηση των επιπέδων PSTVd έγινε ακριβώς όπως περιγράφηκε παραπάνω, με βάση την ποσοτικοποίηση των στυπωμάτων northern που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού AzureSpot Analysis. Στο σχήμα 9 φαίνονται οι διαφορές στα επίπεδα του ιοειδούς μεταξύ των φυτών – μαρτύρων VIGS – PDS και των VIGS – RTLB. Στο πείραμα I παρατηρείται ελάχιστα μειωμένη συγκέντρωση PSTVd στα VIGS –RTLB δείγματα σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου, ενώ στην περίπτωση των πειραμάτων II και III φαίνεται να υπάρχει μια μικρή αύξηση

στα VIGS – RTLB δείγματα. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με τη χρήση της δοκιμασίας Mann Whitney, η οποία έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του PSTVd μεταξύ των φυτών – μαρτύρων VIGS – PDS και των φυτών VIGS –RTLB σε κανένα πείραμα.

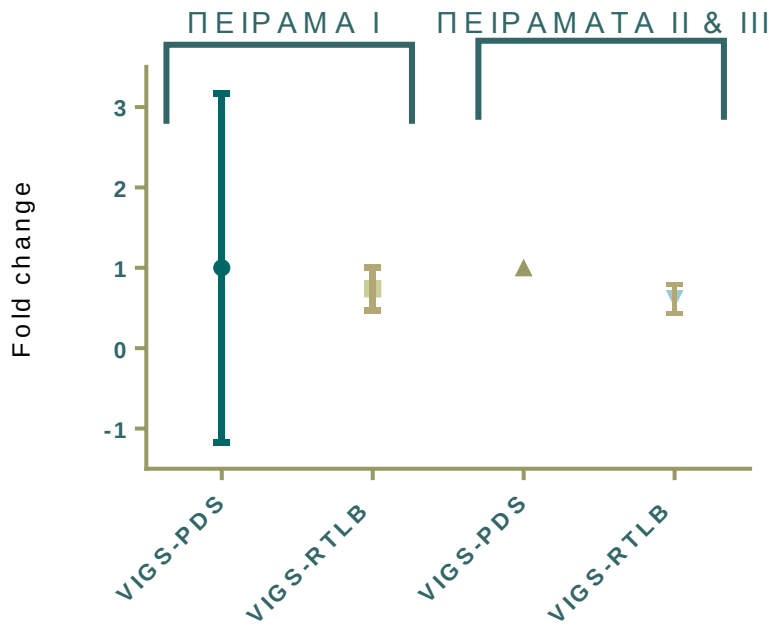


Σχήμα 9. Επίπεδα PSTVd σε VIGS – PDS και VIGS – RTLB φυτά, μέσος όρος με το τυπικό σφάλμα μέσου όρου με N=7 για το Πείραμα Ι και N= 34 για τα Πειράματα ΙΙ και ΙΙΙ.

Έπειτα, μετά από επιλογή 3 δειγμάτων VIGS – PDS και 3 δειγμάτων VIGS –RTLB από κάθε πείραμα (συνολικός αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν: 9 VIGS – PDS και 9 VIGS –RTLB), πραγματοποιήθηκε έλεγχος του ποσοστού καταστολής του στόχου RTLB με τη μέθοδο της qPCR. Στην qPCR χρησιμοποιήθηκαν τα τρία γονίδια αναφοράς L23, PP2A και FBox, τα οποία ελέγχθηκαν με τα λογισμικά Norm finder και Best Keeper, ως προς τη σταθερότητά τους. Η qPCR για τον έλεγχο του ποσοστού έκφρασης της RTLB έγινε με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών RTLB-F – qRTLB-R, οι θέσεις πρόσδεσης των οποίων έχουν

παρουσιαστεί στην εικόνα 21. Συγκεκριμένα, οι εκκινητές αυτοί ενισχύουν ένα τμήμα μήκους 138bp κατά μήκος του μεταγράφου της RTLB. Όλα τα παραπάνω ισχύουν για όλες τις qPCR που παρουσιάζονται στη συνέχεια για τον έλεγχο καταστολής της RTLB στα επόμενα πειράματα.

Τα αποτελέσματα της qPCR στη συγκεκριμένη περίπτωση απεικονίζονται στο παρακάτω γράφημα, όπου παρουσιάζονται ξεχωριστά τα αποτελέσματα που αφορούν τα δείγματα που συλλέχθηκαν στις τρεις (Πείραμα I) και στις τέσσερις εβδομάδες (Πειράματα II και III) μετά τη μόλυνση (Σχήμα 10).



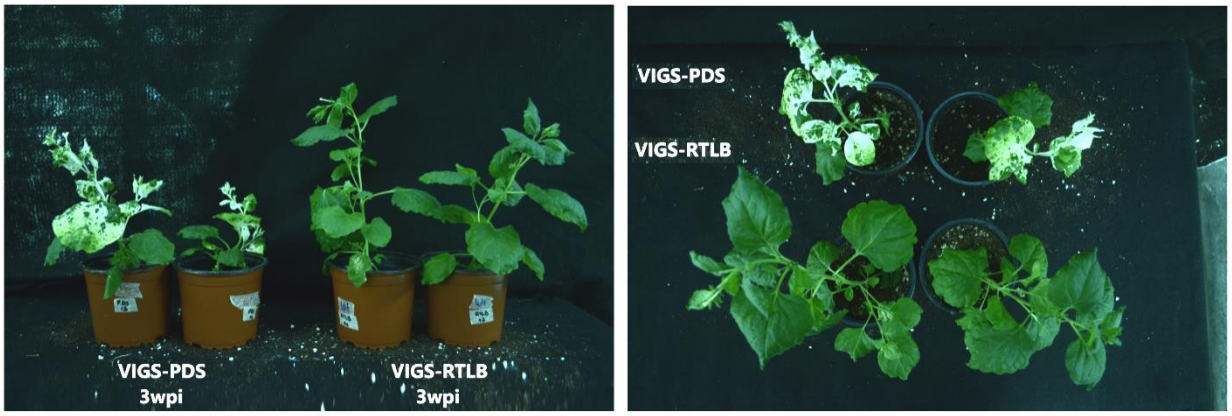
Σχήμα 10 Αλλαγές στην έκφραση της RTLB μεταξύ των φυτών VIGS - PDS και VIGS – RTLA. Παρουσιάζονται ξεχωριστά τα αποτελέσματα που αφορούν τα δείγματα που συλλέχθηκαν στις τρεις (Πείραμα I) και στις τέσσερις εβδομάδες (Πειράματα II και III) μετά τη μόλυνση. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών της qPCR με το τυπικό σφάλμα (SE).

Τα ποσοστά αλλαγής όπως προέκυψαν από τα αποτελέσματα της qPCR για το πείραμα I ήταν 26%, για το πείραμα II 57% και για το πείραμα III 21% καταστολή του γονιδίου – στόχου. Εντούτοις, τα αποτελέσματα του πειράματος I δεν

κρίνονται αξιόπιστα, καθώς τα δείγματα ελέγχου VIGS – PDS έχουν πολύ μεγάλο τυπικό σφάλμα μέσου όρου, με αποτέλεσμα να φαίνεται ότι σε αυτή την περίπτωση δεν υπήρξε πραγματικά καταστολή της RTLB, σε αντίθεση με τα πειράματα ΙΙ και ΙΙΙ.

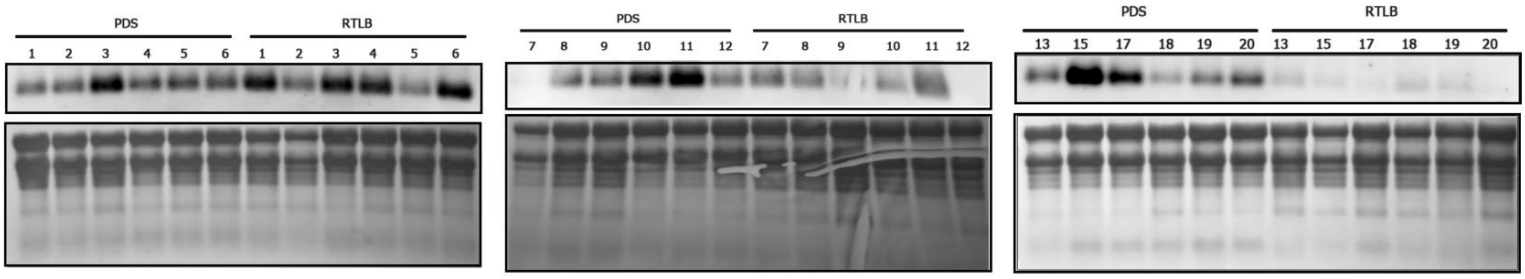
3.5.4.2 Πρώτη μόλυνση: TRV – Δεύτερη μόλυνση: PSTVd

Στην περίπτωση που έγινε πρώτα η μόλυνση με TRV για την επαγωγή σίγησης του γονιδίου RTLB και ακολούθησε η μόλυνση με το ιοειδές, εξετάστηκαν 20 δείγματα, προερχόμενα από ένα πείραμα, τα οποία συλλέχθηκαν τρεις εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd. Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά οι φωτογραφίες φυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του συγκεκριμένου πειράματος (Εικόνα 57).



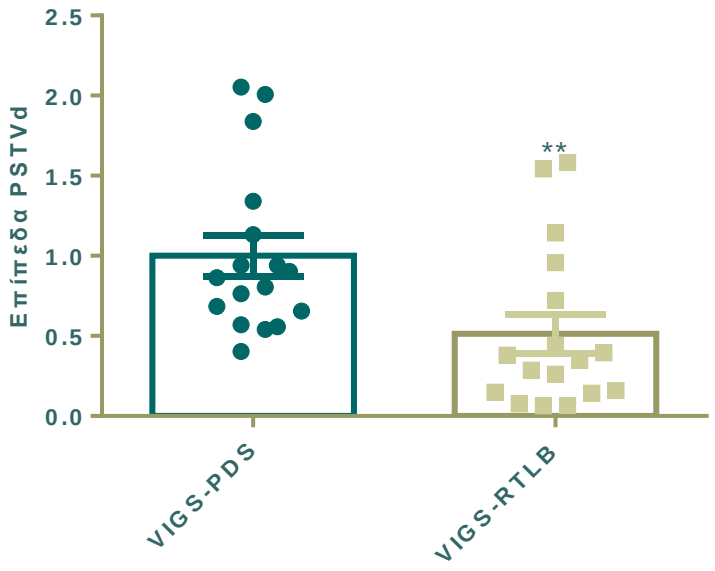
Εικόνα 57. Ενδεικτικές φωτογραφίες από φυτά VIGS – PDS και VIGS – RTLB,3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd.

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις με στυπώματα northern, τα οποία παρουσιάζονται στην εικόνα 58. Για την αξιολόγηση των επιπέδων του PSTVd έγινε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από τα στυπώματα northern, με τη χρήση του λογισμικού AzureSpot Analysis, όπως περιγράφηκε στα προηγούμενα πειράματα.



Εικόνα 58. Στυπώματα northern για την ανίχνευση του PSTVd σε δείγματα από φυτά VIGS – PDS και VIGS – RTLB, 3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd, με αριθμό δειγμάτων N=20.

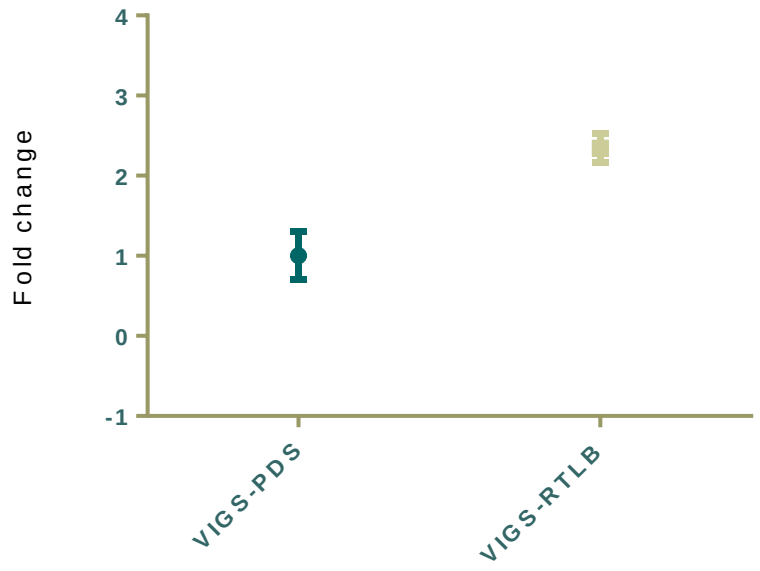
Τα αποτελέσματα των ποσοτικοποιήσεων χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή γραφημάτων που απεικονίζουν τις διαφορές μεταξύ των δειγμάτων των φυτών – μαρτύρων VIGS – PDS και των VIGS –RTLB (Σχήμα 11). Στο συγκεκριμένο γράφημα παρατηρείται μείωση των επιπέδων ιοειδούς στα δείγματα των φυτών VIGS –RTLB, συγκριτικά με τα δείγματα VIGS – PDS.



Σχήμα 11. Επίπεδα PSTVd σε VIGS – PDS και VIGS – RTLB φυτά, μέσος όρος με το τυπικό σφάλμα μέσου όρου με N=20.

Η εμφανής μείωση των επιπέδων PSTVd, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 11, αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική μετά από στατιστική ανάλυση με τη δοκιμασία Mann –Whitney.

Στη συνέχεια ελέγχθηκαν 3 δείγματα VIGS – PDS και 3 δείγματα VIGS – RTLB φυτών, ως προς την αλλαγή έκφραση του γονιδίου – στόχου RTLB. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος qPCR, ακριβώς όπως έχει περιγραφεί στα προηγούμενα πειράματα. Ο έλεγχος της αλλαγής έκφρασης της RTLB μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων έδειξε ότι τα VIGS – RTLB δείγματα που εξετάστηκαν δεν παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του γονιδίου – στόχου. Αντίθετα, στο σχήμα 12 φαίνεται ότι τα VIGS – RTLB δείγματα εμφάνισαν αυξημένη έκφραση του εν λόγω γονιδίου που στοχεύθηκε με τη μέθοδο VIGS.

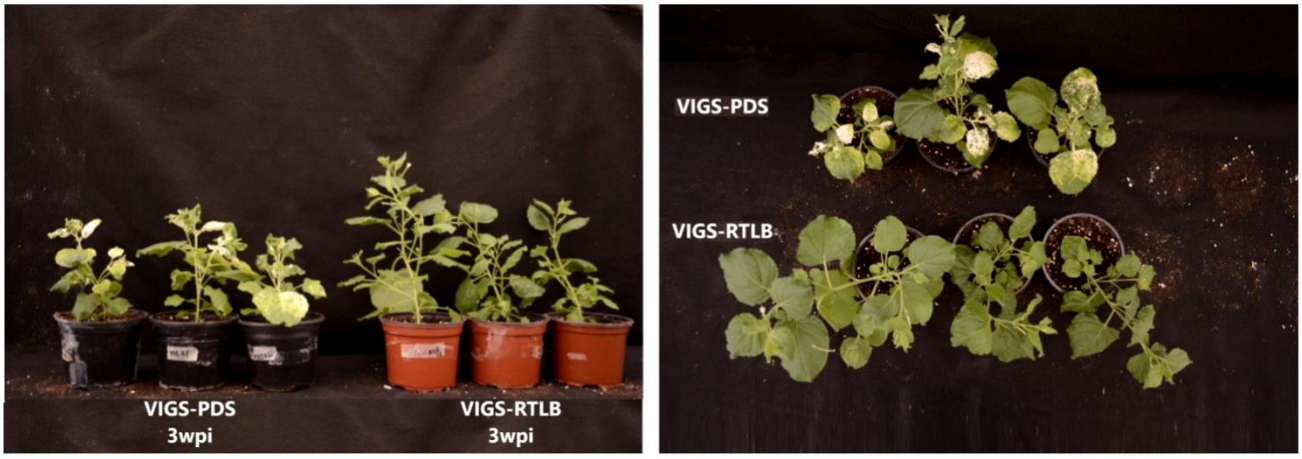


Σχήμα 12. Αλλαγές στην έκφραση της RTLB μεταξύ των φυτών VIGS - PDS και VIGS – RTLA, 3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών της qPCR με το τυπικό σφάλμα (SE).

Το αποτέλεσμα αυτό προδίδει ότι είτε η μέθοδος VIGS δεν έχει επιφέρει αποτελεσματική καταστολή στα υπό εξέταση δείγματα ή θα πρέπει να επαναληφθεί η qPCR στα ίδια και σε διαφορετικά δείγματα. Πάντως, σε κάθε περίπτωση η αύξηση αυτή είναι μη αναμενόμενη και η περίπτωση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

3.5.4.3 Ταυτόχρονη μόλυνση TRV και PSTVd

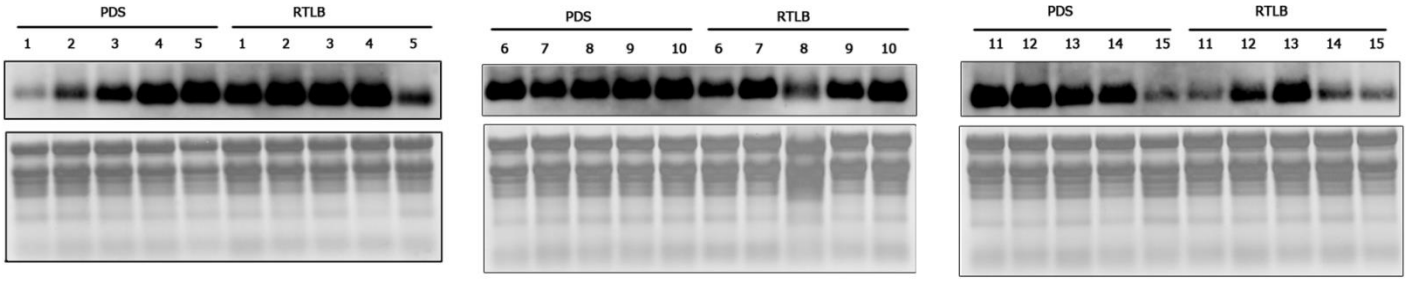
Η ταυτόχρονη μόλυνση με TRV και PSTVd πραγματοποιήθηκε σε 15 δείγματα φυτών VIGS – PDS και VIGS – RTLB. Τα δείγματα συλλέχθηκαν τρεις εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το ιοειδές. Στην εικόνα 59 φαίνονται ενδεικτικές φωτογραφίες των φυτών του συγκεκριμένου πειράματος.



Εικόνα 59. Ενδεικτικές φωτογραφίες από φυτά VIGS – PDS και VIGS – RTLB,3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd.

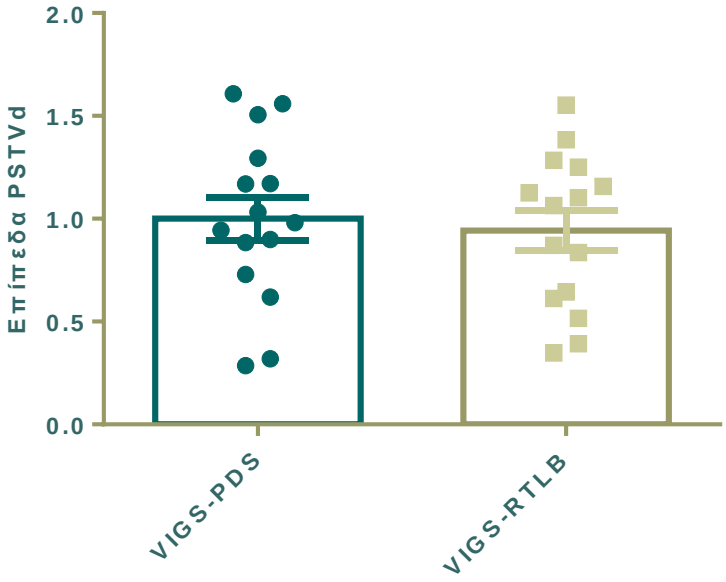
Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με στυπώματα τύπου Northern. Τα στυπώματα northern χρησιμοποιήθηκαν έπειτα για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων του PSTVd (Εικόνα 60).

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από τα στυπώματα northern έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στα προηγούμενα πειράματα, με τη βοήθεια του λογισμικού AzureSpot Analysis. Με βάση αυτά, κατασκευάστηκε το γράφημα που απεικονίζει τις διαφορές των επιπέδων ιοειδούς μεταξύ των δειγμάτων φυτών – μαρτύρων VIGS – PDS και των δειγμάτων VIGS –RTLB (Σχήμα 13).



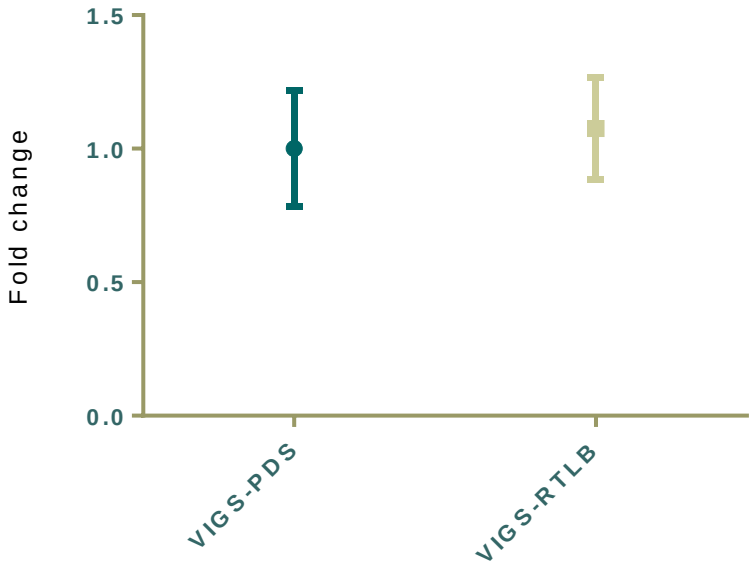
Εικόνα 60. Στυπώματα northern για την ανίχνευση του PSTVd σε δείγματα από φυτά VIGS – PDS και VIGS – RTLB, 3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με PSTVd, με αριθμό δειγμάτων N=15.

Στο σχήμα 13 παρατηρείται ότι δεν υπάρχει κάποια εμφανής διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων. Πράγματι, η στατιστική ανάλυση με τη χρήση της δοκιμασίας Mann Whitney έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συνόλων.



Σχήμα 13. Επίπεδα PSTVd σε VIGS – PDS και VIGS – RTLB φυτά, μέσος όρος με το τυπικό σφάλμα μέσου όρου με N=15.

Επιπρόσθετα, έγινε ο έλεγχος του ποσοστού καταστολής του γονιδίου – στόχου RTLB σε τρία VIGS - PDS και 3 VIGS - RTLB δείγματα με τη μέθοδο της qPCR. Η μέθοδος εφαρμόστηκε με τον τρόπο που περιγράφηκε στα προηγούμενα πειράματα. Τα αποτελέσματα της qPCR παρουσιάζονται σχηματικά παρακάτω (Σχήμα 14).



Συγκεκριμένα, στο σχήμα 14, φαίνεται ότι και σε αυτή την περίπτωση η μέθοδος VIGS δε δούλεψε επιτυχώς στα συγκεκριμένα δείγματα που αναλύθηκαν με qPCR, καθώς δεν παρατηρείται καταστολή του γονιδίου στόχου στα VIGS - RTLB δείγματα συγκριτικά με τα δείγματα VIGS – PDS. Συνεπώς και αυτή η περίπτωση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

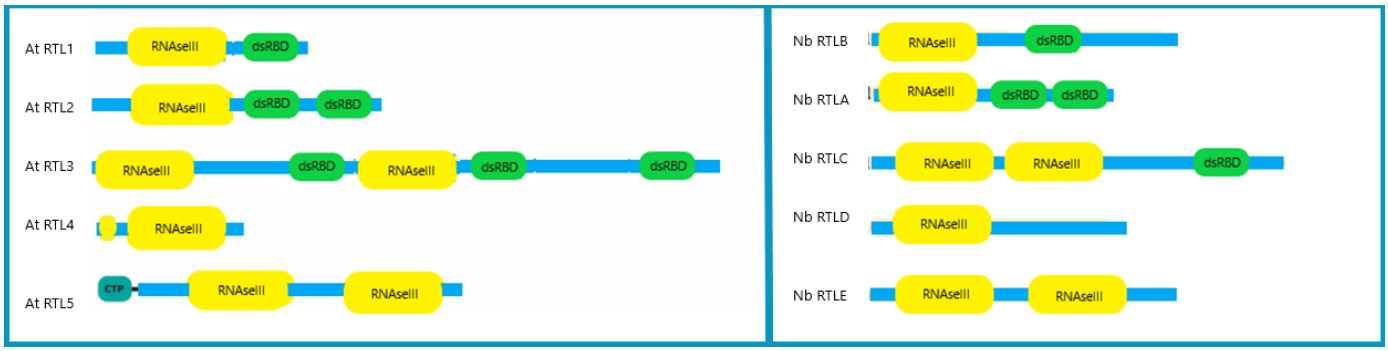
3.6 Συζήτηση - Συμπεράσματα

Τα ιοειδή είναι τα μικρότερα και δομικά απλούστερα παθογόνα των φυτών, αποτελούμενα από ομοιοπολικά κλειστά κυκλικά μόρια RNA απλής αλυσίδας (single stranded RNA, ssRNA) και δε φέρουν πρωτεϊνικό καψίδιο. Για τον πολλαπλασιασμό τους στηρίζονται σχεδόν αποκλειστικά στον ξενιστή, καθώς δεν κωδικοποιούν καμία πρωτεΐνη (Daros, 2016). Κατά τον αναδιπλασιασμό των ιοειδών προκύπτουν ενδιάμεσα μόρια dsRNA, που δύνανται επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση στον ξενιστή και να επάγουν το μηχανισμό της RNA σίγησης στο προσβεβλημένο φυτό (Dalakouras, Dadami, & Wassenegger, 2015; Katsarou, Rao, Tsagris, & Kalantidis, 2015; Wang et al., 2004).

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στον κύκλο αναπαραγωγής του ιοειδούς PSTVd της οικογένειας *Pospiviroidae*. Το PSTVd πολλαπλασιάζεται στον κυτταρικό πυρήνα, από την DNA- εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II (Pol II) με το μηχανισμό του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου (Branch & Robertson, 1984), ώστε από το θετικής πολικότητας γραμμικό PSTVd (+) προκύπτει το πολυμερές γραμμικό PSTVd (-). Το PSTVd (-) αποτελεί μήτρα για τη σύνθεση γραμμικού PSTVd (+), που κόβεται, στη συνέχεια, από RNase III ενδονουκλεάσες. Τελικά, τα μονομερή γραμμικά PSTVd (+) που προκύπτουν συνδέονται με τη δράση λιγάσης για τη δημιουργία του ώριμου κυκλικού PSTVd (+) (Flores et al., 2014; Rao & Kalantidis, 2015; Tabler & Tsagris, 2004). Οι RNase III ενδονουκλεάσες που πέπτουν τα δίκλωνα RNA (double stranded RNA, dsRNA) ενδιάμεσα της αντιγραφής του PSTVd δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη. Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι η DCL4 θα μπορούσε να επηρεάσει τη συγκέντρωση του PSTVd σε φυτά *N. benthamiana,* αποτελώντας την RNAse III ενδονουκλεάση που συμμετέχει στον αναδιπλασιασμό του ιοειδούς (Dadami et al., 2013). Ωστόσο αυτό δεν έχει αποδειχθεί. Η DCL4

φαίνεται πως απλά δεν έχει σημαντικό κατασταλτικό ρόλο κατά τη διάρκεια μόλυνσης με PSTVd, αλλά δρα μάλλον προστατευτικά στον κατακερματισμό του RNA του ιοειδούς από τις DCL2 και DCL3 (Katsarou et al., 2016). Έτσι, δεδομένου ότι δεν είναι γνωστό ποιες είναι τελικά οι RNAse III ενδονουκλεάσες που κόβουν τα dsRNA ενδιάμεσα μόρια της αντιγραφής του PSTVd, εξετάστηκε η επίδραση των RNAse Three – Like (RTL) πρωτεϊνών στο βιολογικό κύκλο του ιοειδούς στον οργανισμό *N.benthamiana.*

Συγκεκριμένα, έγινε ανίχνευση πέντε πιθανών RTL πρωτεϊνών στο μεταγράφωμα της *N. benthamiana*, που ονομάστηκαν NbRTLA, NbRTLB, NbRTLC, NbRTLD και NbRTLE, οι οποίες στη συγκεκριμένη μελέτη αναφέρονται ως RTLA-E, κατά αντιστοιχία με τις RTL 1-5 του φυτού *A. thaliana* (Εικόνα 61). Η αντιστοιχία αυτή φαίνεται στην ομοιότητα των δομικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών ή λόγω ποσοστού ομοιότητας μεταξύ των αλληλουχιών, στην περίπτωση των RTLA και RTLB.



Εικόνα 61. Δομικά χαρακτηριστικά AtRTLκαι NbRTLπρωτεϊνών.

Με τη φυλογενετική ανάλυση των RTL και DCL πρωτεϊνών των οργανισμών *N. benthamiana* και *A. thaliana*, φαίνεται ότι οι RTL πρωτεΐνες και των δύο οργανισμών αποτελούν μια μονοφυλετική οικογένεια πρωτεϊνών, διακριτή της

οικογένειας των DCL. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία (Comella et al., 2008). Εντούτοις, παρατηρείται ότι οι AtRTL2 και 4 εμφανίζονται στον ίδιο κλάδο με κάποιες από τις DCL, αν και η θέση τους δείχνει ότι δεν αποτελούν ορθόλογα γονίδια των DCL. Συνεπώς, όλες οι DCL αποτελούν ξεχωριστή οικογένεια πρωτεϊνών από τις RTL και στους δύο οργανισμούς.

Η φυλογενετική ανάλυση των RTL μεταξύ διαφόρων φυτικών οργανισμών έδειξε ότι οι NbRTL ομαδοποιούνται με αυτές των άλλων ειδών του γένους *Nicotiana* και φυτών της οικογένειας Solanaceae (*Solanum tuberosum* και *Solanum lycopersicum*), αλλά και των οργανισμών *Oryza sativa* (Poaceae) και *Populus trichocarpa* (Salicaceae). Δυστυχώς, πέρα από τις RTL του φυτού *A. thaliana*, στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τις RTL πρωτεΐνες άλλων φυτικών οργανισμών. Ωστόσο, η συγκεκριμένη ανάλυση δείχνει ότι υπάρχει εξελικτική σχέση μεταξύ των RTL του οργανισμού *N. benthamiana* και των RTL άλλων φυτικών οργανισμών, οι οποίοι, μάλιστα, ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες. Όσον αφορά την εξελικτική σχέση των NbRTL με τις AtRTL, στον ίδιο κλάδο με τις NbRTL εμπίπτουν μόνο οι RTL3 και 5. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη ομολογία παρατηρείται μεταξύ των RTL5 και RTLE, κάτι το οποίο φαίνεται λογικό καθώς και οι δύο παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά ομολογίας (74% - 80%) με την πρωτεΐνη RNC1 του φυτού *Zea mays* (Watkins et al., 2007). Η RTL3 βρίσκεται εξελικτικά πιο κοντά στις RTLC και D, που ίσως υποδηλώνει κάποια συσχέτιση στο λειτουργικό ρόλο των πρωτεϊνών αυτών. Παραδόξως, οι RTL1 και 2 εμφανίζονται σε διαφορετικό κλάδο από τις RTLA και B. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να οφείλονται στον αλγόριθμο του λογισμικού που χρησιμοποιήθηκε. Παρόλα αυτά, μπορούν να ληφθούν υπόψη για περαιτέρω διερεύνηση, πιθανά με τη χρήση διαφορετικών μοντέλων υποκατάστασης.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια ενίσχυσης των πέντε RTL, που ανιχνεύθηκαν στο μεταγράφωμα του φυτού *N. benthamiana*. Έπειτα, ακολούθησε η κλωνοποίησή τους σε κατάλληλους φορείς, με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου τους στο βιολογικό κύκλο του ιοειδούς PSTVd με τη μέθοδο VIGS. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις κατέστη δυνατή η ενίσχυση της πλήρους αλληλουχίας των πρωτεϊνών, γεγονός που επιβεβαιώνει την ύπαρξή τους, όπως αυτές εντοπίστηκαν, στο μεταγράφωμα του φυτού *N. benthamiana*. Οι πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων έχουν αλληλουχηθεί και τα αποτελέσματα αλληλούχησής τους παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα ΙΙ.

Ειδικότερα, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε ενίσχυση των RTLA και RTLB, οι πλήρεις αλληλουχίες των οποίων κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς. Βέβαια, το γεγονός ότι και στις δύο περιπτώσεις έγινε τμηματικά η ενίσχυση της πλήρους αλληλουχίας κάθε πρωτεΐνης, θα μπορούσε να προβληματίσει ως προς το αν το τελικό μέγεθος που ενισχύεται είναι το πραγματικό ή αν υπολείπεται κάποια ενδιάμεση αλληλουχία στα σημεία σύνδεσης. Όμως, όπως αναφέρθηκε στις αντίστοιχες παραγράφους, ο σχεδιασμός των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχει αλληλεπικάλυψη των δύο τμημάτων. Αυτό εξασφάλισε ότι το ένα τμήμα διαδέχεται το άλλο και δε λείπει κάποια ενδιάμεση αλληλουχία στο τελικό προϊόν.

Όσον αφορά τις RTLC και RTLD, δεν ήταν δυνατό να ενισχυθεί ούτε η πλήρης αλληλουχία τους ούτε τμήματά τους. Αυτό, όμως, συνάδει με τα δεδομένα που υπάρχουν για τις RTL3 και RTL4 του φυτού A. thaliana. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, είναι γνωστό ότι η AtRTL3 δεν έχει ανιχνευθεί ποτέ σε κανέναν ιστό (Comella et al., 2008), με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται ως ψευδογονίδιο. Από την άλλη, η AtRTL4 (ή Nuclear Defective Protein, NFD) φαίνεται

να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Όμως, η λειτουργία της παραμένει άγνωστη, καθότι σε μεταλλάγματα rtl4 καταστρέφεται η ικανότητα δημιουργίας αρσενικών και θηλυκών γαμετοφύτων (Portereiko et al., 2006). Αναφορικά με την RTLE, στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, κατέστη δυνατή η ενίσχυση μόνο ενός τμήματος αυτής, μήκους περίπου 400 ζευγών βάσεων. Η ομόλογη πρωτεΐνη RNC1 του φυτού *Zea mays* έχει βρεθεί να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ενώ είναι επίσης γνωστό ότι εμπλέκεται στη διαδικασία ματίσματος εσωνίων στους χλωροπλάστες (Watkins et al., 2007).

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, στη συνέχεια, αποφασίστηκε η μελέτη των πρωτεϊνών RTLA και RTLB, οι οποίες κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, για τη διερεύνηση του ρόλου τους στο βιολογικό κύκλο του PSTVd. Ο λειτουργικός προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο VIGS, με τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις: Α) μόλυνση με το ιοειδές, η οποία προηγείται της μόλυνσης με TRV για την επαγωγή σίγησης του κάθε γονιδίου κατά μία εβδομάδα, Β) μόλυνση με TRV για την επαγωγή σίγησης του κάθε γονιδίου που προηγείται της μόλυνσης με το ιοειδές κατά μία εβδομάδα και Γ) ταυτόχρονη μόλυνση με το ιοειδές και τον TRV για την επαγωγή σίγησης του κάθε γονιδίου. Οι διαφορετικές μεταχειρίσεις έγιναν με σκοπό την αποφυγή εξαγωγής εσφαλμένων συμπερασμάτων που θα μπορούσαν να οφείλονται στην αλληλεπίδραση του PSTVd με τον ιό TRV που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα VIGS. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν περισσότερα του ενός πειράματα, προκειμένου να αυξηθεί ο αριθμός των φυτών που μελετήθηκαν και να διεξαχθούν περισσότερο ακριβή στατιστικά συμπεράσματα. Η επιτυχής καταστολή των γονιδίων στόχων ανά πείραμα ελέγχθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου qPCR σε επιλεγμένο αριθμό δειγμάτων.

Στους παρακάτω πίνακες 6 και 7 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των πειραμάτων VIGS, ανά περίπτωση, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Επιπλέον παρουσιάζεται ανά περίπτωση η αλλαγή της έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου – στόχου, όπως αξιολογήθηκε με τη μέθοδο qPCR. Το γονίδιο – στόχος αναγράφεται σε κάθε πίνακα επάνω αριστερά.

Πίνακας 6. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πειραμάτων VIGS κατά τα οποία έγινε καταστολή της RTLA.

VIGS – RTLA δείγματα	Στατιστικά σημαντική αλλαγή επιπέδων PSTVd	Αλλαγή έκφρασης RTLA
1η μόλυνση: PSTVd 2η μόλυνση: TRV	Δεν υπάρχει	Αύξηση
1η μόλυνση: TRV 2η μόλυνση: PSTVd	Αύξηση	Μείωση
Ταυτόχρονη μόλυνση PSTVd & TRV	Αύξηση	Μείωση

Πίνακας 7. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πειραμάτων VIGS κατά τα οποία έγινε καταστολή της RTLB.

VIGS – RTLB δείγματα	Στατιστικά σημαντική αλλαγή επιπέδων PSTVd	Αλλαγή έκφρασης RTLB
1η μόλυνση: PSTVd 2η μόλυνση: TRV	Δεν υπάρχει	Μείωση
1η μόλυνση: TRV 2η μόλυνση: PSTVd	Μείωση	Αύξηση
Ταυτόχρονη μόλυνση PSTVd & TRV	Δεν υπάρχει	Δεν υπάρχει

Οι παραπάνω πίνακες παρέχουν, μεταξύ άλλων, την πληροφορία για την επιτυχή ή μη καταστολή των γονιδίων - στόχων ανά περίπτωση, με βάση τα

αποτελέσματα της qPCR. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η καταστολή με τη μέθοδο VIGS ήταν επιτυχής σε ορισμένο αριθμό πειραμάτων, τα οποία μπορούν ασφαλώς να ληφθούν υπόψη για τον λειτουργικό προσδιορισμό των RTLA και RTLB. Μολαταύτα, ακόμη και τα πειράματα που φάνηκε να μην παρουσιάζουν καταστολή του γονιδίου – στόχου αλλά εμφανίζουν μεταβολές των επιπέδων PSTVd, μπορούν να αποτελέσουν μέρος της διαμόρφωσης των τελικών συμπερασμάτων. Παράδειγμα αποτελεί το πείραμα VIGS για την καταστολή της RTLB ($1^η$ μόλυνση: TRV – $2^η$ μόλυνση: PSTVd). Ειδικότερα, με qPCR ελέγχθηκαν 3 δείγματα ανά πείραμα, αριθμός μικρός σχετικά με το μέγεθος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των επιπέδων PSTVd (τουλάχιστον 15 για κάθε περίπτωση). Ακόμη, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί με qPCR η πιθανότητα στόχευσης της RTLA σε πειράματα VIGS για την καταστολή της RTLB και το αντίστροφο.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης των επιπέδων PSTVd στα στυπώματα northern οδηγεί στα παρακάτω συμπεράσματα:

Πειράματα VIGS-RTLA

Αρχικά, ο Πίνακας 6 δείχνει ότι στις περιπτώσεις που υπάρχει καταστολή της RTLA, με βάση τα δείγματα που ελέγχθηκαν με qPCR, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα ιοειδούς συγκριτικά με τα δείγματα ελέγχου. Στην περίπτωση που η qPCR έδειξε αυξημένη έκφραση του γονιδίου – στόχου δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική αλλαγή των επιπέδων PSTVd. Η αύξηση της έκφρασης μπορεί να αποδοθεί σε τεχνικά ζητήματα που αφορούν τη διεξαγωγή της qPCR. Πιθανώς τα δείγματα VIGS – RTLA που ελέγχθηκαν με qPCR να μην παρουσίασαν διαφορές στην έκφραση της RTLA συγκριτικά με τα VIGS – PDS δείγματα.

Η έκβαση των πειραμάτων αυτών θα μπορούσε να υποδεικνύει ότι η RTLA δρα καταπολεμώντας την εξάπλωση του ιοειδούς. Η εκδοχή αυτή συμφωνεί με τις πληροφορίες του αντι – ιικού ρόλου της AtRTL1 (Shamandi et al., 2015). Η AtRTL1 κόβει μεγάλου μήκους τέλεια ή σχεδόν τέλεια δίκλωνα μόρια RNA πριν την επεξεργασία τους από τις DCL2, DCL3 και DCL4 και η υπερέκφρασή της οδηγεί σε παρεμπόδιση της συσσώρευσης όλων των μεγεθών siRNA μορίων (Shamandi et al., 2015). Συνεπώς, η RTLA πιθανά έχει έναν αμυντικό ρόλο κατά τη μόλυνση με PSTVd, με αποτέλεσμα η καταστολή της να οδηγεί σε μειωμένη ανοχή του φυτού και, κατ' επέκταση, αυξημένη συγκέντρωση του ιοειδούς σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου.

Πειράματα VIGS-RTLB

Ο Πίνακας 7 δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του PSTVd μόνο στο πείραμα VIGS για την καταστολή της RTLB με 1η μόλυνση: TRV – 2η μόλυνση: PSTVd. Ωστόσο, η qPCR έδειξε αυξημένη έκφραση του γονιδίου – στόχου στην περίπτωση αυτή. Επομένως, στη συγκεκριμένη περίπτωση, δεν μπορούν να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Παρόλα αυτά, αν υποθέσουμε ότι τα αποτελέσματα για την αξιολόγηση της καταστολής οφείλονται σε τεχνικές δυσκολίες της qPCR, θα ήταν αποδεκτός ο σχολιασμός της μείωσης των επιπέδων του ιοειδούς, με μεγάλη επιφύλαξη.

Σε αντίθεση με την RTLA, η καταστολή του μεταγράφου RTLB φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη συγκέντρωση του PSTVd σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου, αν και η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική (περίπτωση « 1η μόλυνση: PSTVd – 2η μόλυνση: TRV). Συνεπώς, περαιτέρω διερεύνηση αυτής της περίπτωσης ίσως υποδεικνύει ότι η RTLB χρησιμοποιείται από το ιοειδές με κάποιο

τρόπο που δεν μπορεί να προσδιοριστεί ακόμη. Θα μπορούσε να αποτελεί την άγνωστη ριβονουκλεάση που κόβει το PSTVd κατά τον αναδιπλασιασμό του ή να έχει κάποιο ρόλο στη διασυστηματική μετακίνηση του ιοειδούς. Πάντως, στο φυτό *A.thaliana* έχει δειχθεί ότι η πέψη dsRNA μορίων από την RTL2 οδηγεί σε παραγωγή μικρών RNA μήκους 21-25 νουκλεοτιδίων(Kiyotaetal., 2011), ενώ φέρεται να ρυθμίζει τη συγκέντρωση των siRNA που παράγονται από την DCL3 (Elvira-Matelotetal., 2016). Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα των πειραμάτων VIGS – RTLB θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω.

Συμπεράσματα

Τα παραπάνω στοιχεία υποδεικνύουν ότι οι RTLAκαι RTLB του φυτού *N.benthamiana* πιθανά διαδραματίζουν κάποιο ρόλο κατά τη διάρκεια μόλυνσης με PSTVd. Παρόλα αυτά, οι υποθέσεις για τον αμυντικό ρόλο της RTLA και το ρόλο της RTLB στον αναδιπλασιασμό ή τη μετακίνηση του ιοειδούς στο φυτό στηρίζονται αποκλειστικά σε ένα σύνολο ενδείξεων. Η καταστολή των γονιδίων με τη μέθοδο VIGS εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα επίπεδα μόλυνσης με τον ιό TRV. Επομένως, το ποσοστό καταστολής από κύτταρο σε κύτταρο είναι λογικό να ποικίλλει, συντελώντας στην ανομοιομορφία των αποτελεσμάτων.

Οι παραπάνω ενδείξεις, όμως, δίνουν το εναρκτήριο λάκτισμα για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των RTL, με μεθόδους των οποίων τα αποτελέσματα θα δώσουν σαφείς εξηγήσεις. Μελλοντικά, θα πρέπει να γίνει δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με καταστολή των γονιδίων που εκφράζουν τις RTLA και RTLB. Τα φυτά αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα νέων μολύνσεων με PSTVd, με στόχο την κατανόηση της εμπλοκής των κατασταλμένων γονιδίων στο βιολογικό κύκλο του ιοειδούς. Η κατανόηση του κύκλου ζωής τόσο

σημαντικών φυτοπαθογόνων όπως το PSTVd μπορεί να οδηγήσει στην καλύτερη διαχείριση και αντιμετώπισή τους. Επιπλέον, στη διαμόρφωση των συμπερασμάτων θα ήταν χρήσιμος ο υποκυτταρικός εντοπισμός των RTL. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η διερεύνηση του ρόλου των RTL στο φυτό, κάτι που ως τώρα παραμένει άγνωστο.

Βιβλιογραφία

Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., & Carrington, J. C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, *121*(2), 207–221. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.004

Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, *431*(7006), 356–363. https://doi.org/10.1038/nature02874

Blaszczyk, J., Tropea, J. E., Bubunenko, M., Routzahn, K. M., Waugh, D. S., Court, D. L., & Ji, X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure*, *9*(12), 1225–1236. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00685-2

Bologna, N. G., & Voinnet, O. (2014). The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis . *Annual Review of Plant Biology*, *65*(1), 473–503. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035728

Bond, D. M., & Baulcombe, D. C. (2015). Epigenetic transitions leading to heritable, RNA-mediated de novo silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(3), 917–922. https://doi.org/10.1073/pnas.1413053112

Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R., & Zhu, J. K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*, *123*(7), 1279–1291. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.035

Bouckaert, R. R., & Drummond, A. J. (2017). bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC Evolutionary Biology*, *17*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12862-017-0890-6

Branch, A. D., & Robertson, H. D. (1984). *A Replication Cycle for Viroids and Other Small Infectious RNA ' s*. *223*(19).

Brodersen, P., & Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, *22*(5), 268–280. https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.003

Chapman, E. J., & Carrington, J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics*, *8*(11), 884–896. https://doi.org/10.1038/nrg2179

Charbonnel, C., Niazi, A. K., Elvira-Matelot, E., Nowak, E., Zytnicki, M., de Bures, A., … Sáez-Vásquez, J. (2017). The siRNA suppressor RTL1 is redox-regulated through glutathionylation of a conserved cysteine in the double-stranded-RNA-binding domain. *Nucleic Acids Research*, *45*(20), 11891–11907. https://doi.org/10.1093/nar/gkx820

Comella, P., Pontvianne, F., Lahmy, S., Vignols, F., Barbezier, N., DeBures, A., … Sáez-Vásquez, J. (2008). Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3′ETS in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, *36*(4), 1163–1175. https://doi.org/10.1093/nar/gkm1130

Dadami, E., Boutla, A., Vrettos, N., Tzortzakaki, S., Karakasilioti, I., & Kalantidis, K. (2013). DICER-LIKE 4 But Not DICER-LIKE 2 may have a positive effect on potato spindle tuber viroid accumulation in nicotiana benthamiana. *Molecular Plant*, *6*(1), 232–234. https://doi.org/10.1093/mp/sss118

Dalakouras, A., Dadami, E., Bassler, A., Zwiebel, M., Krczal, G., & Wassenegger, M. (2015). Replicating potato spindle tuber viroid mediates de novo methylation of an intronic viroid sequence but no cleavage of the corresponding pre-mRNA. *RNA Biology*, *12*(3), 268–275. https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1017216

Dalakouras, A., Dadami, E., & Wassenegger, M. (2013). Viroid-induced DNA methylation in plants. *Biomolecular Concepts*, *4*(6), 557–565. https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0030

Dalakouras, A., Dadami, E., & Wassenegger, M. (2015). Engineering viroid resistance. *Viruses*, *7*(2), 634–646. https://doi.org/10.3390/v7020634

Dalakouras, A., Dadami, E., Wassenegger, M., Krczal, G., & Wassenegger, M. (2016). RNA-directed DNA methylation efficiency depends on trigger and target sequence identity. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *87*(2), 202–214. https://doi.org/10.1111/tpj.13193

Dalakouras, A., & Wassenegger, M. (2013). Revisiting RNA-directed DNA methylation. *RNA Biology*, *10*(3), 453–455. https://doi.org/10.4161/rna.23542

Daros, J.-A. (2016). *Viroids : Small Noncoding Infectious RNAs with the Remarkable Ability of Autonomous Replication*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2

Daròs, J. A., Marcos, J. F., Hernández, C., & Flores, R. (1994). Replication of avocado sunblotch viroid: Evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(26), 12813–12817. https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12813

De la Peña, M., Gago, S., & Flores, R. (2003). Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO Journal*, *22*(20), 5561–5570. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg530

Di Serio, F., Flores, R., Verhoeven, J. T. J., Li, S.-F., Palla´s, V., Randles, J. W., … Owens, R. A. (2014). *Current status of viroid taxonomy*. 3467–3478. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2200-6

Di Serio, F., Martinez de Alba, A.-E., Navarro, B., Gisel, A., & Flores, R. (2010).

RNA-Dependent RNA Polymerase 6 Delays Accumulation and Precludes Meristem Invasion of a Viroid That Replicates in the Nucleus. *Journal of Virology*, *84*(5), 2477–2489. https://doi.org/10.1128/JVI.02336-09

Diener, T. O. (1971). Potato Spindle Tuber "Virus" IV. A Replicating, Low Molecular Weight RNA. *Virology*, *45*, 411–428.

Diener, T. O., & Raymer, W. B. (1967). Potato Spindle Tuber Virus: A Plant Virus with Properties of a Free Nucleic Acid. *Science*, *158*, 378–381.

Ding, B. (2010). *Viroids: self-replicating, mobile, and fast-evolving noncoding regulatory RNAs*. (December). https://doi.org/10.1002/wrna.22

Ding, B., & Itaya, A. (2007). Viroid: A useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *20*(1), 7–20. https://doi.org/10.1094/MPMI-20-0007

Ecker, J. R., & Davis, R. W. (1986). Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(15), 5372–5376. https://doi.org/10.1073/pnas.83.15.5372

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, *411*(6836), 494–498. https://doi.org/10.1038/35078107

Elvira-Matelot, E., Hachet, M., Shamandi, N., Comella, P., Vásquez, J. S.-, Zytnicki, M., & Vaucheret, H. (2016). Arabidopsis RNASE THREE LIKE2 modulates the expression of protein-coding genes via 24-nucleotide small interfering RNA-directed DNA methylation. *The Plant Cell*, *28*(9), 2276–2290. https://doi.org/10.1105/tpc.16.00540

Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., & Gill, S. S. (1999). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*, *245*(1), 213–221. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00571-5

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*, *391*(February), 806–811.

Flores, R., Gago-Zachert, S., Serra, P., Sanjuán, R., & Elena, S. F. (2014). Viroids: Survivors from the RNA World? *Annual Review of Microbiology*, *68*(1), 395–414. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103416

Giguere, T., Adkar-Purushothama, C. R., & Perreault, J.-P. (2014). Comprehensive Secondary Structure Elucidation of Four Genera of the Family Pospiviroidae. *PLoS ONE*, *9*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098655

Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, *286*(5441), 950–952. https://doi.org/10.1126/science.286.5441.950

Henderson, I. R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B. C., Green, P. J., & Jacobsen, S. E. (2006). *Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing , gene silencing and DNA methylation patterning*. *38*(6), 721–725. https://doi.org/10.1038/ng1804

Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., … Ding, B. (2007). *A Structured Viroid RNA Serves as a Substrate for Dicer-Like Cleavage To Produce Biologically Active Small RNAs but Is Resistant to RNA-Induced Silencing Complex-Mediated Degradation* . *81*(6), 2980–2994. https://doi.org/10.1128/JVI.02339-06

Jones, L., Ratcliff, F., & Baulcombe, D. C. (2001). RNA-directed transcriptional gene

silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Current Biology*, *11*(10), 747–757. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00226-3

Kalantidis, K., Schumacher, H. T., Alexiadis, T., & Helm, J. M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, *58*(4), 328–342. https://doi.org/10.1111/jipb.12423

Katsarou, K., Mavrothalassiti, E., Dermauw, W., Van, T., & Kalantidis, K. (2016). *Combined Activity of DCL2 and DCL3 Is Crucial in the Defense against Potato Spindle Tuber Viroid*. 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005936

Katsarou, K., Rao, A. L. N., Tsagris, M., & Kalantidis, K. (2015). Infectious long non-coding RNAs. *Biochimie*, *117*, 37–47. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.05.005

Kiyota, E., Okada, R., Kondo, N., Hiraguri, A., Moriyama, H., & Fukuhara, T. (2011). An Arabidopsis RNase III-like protein, AtRTL2, cleaves double-stranded RNA in vitro. *Journal of Plant Research*, *124*(3), 405–414. https://doi.org/10.1007/s10265-010-0382-x

Kotakis, C., Vrettos, N., Kotsis, D., Tsagris, M., Kotzabasis, K., & Kalantidis, K. (2010). Light intensity affects RNA silencing of a transgene in Nicotiana benthamiana plants. *BMC Plant Biology*, *10*(1), 220. https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-220

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., … Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*(21), 2947–2948. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404

Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D., & Zhang, Y. (2012). Validation of Reference

Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected Nicotiana benthamiana Using Quantitative Real-Time PCR. *PLoS ONE*, *7*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046451

Liu, Q., Feng, Y., & Zhu, Z. (2009). *Dicer-like (DCL) proteins in plants*. 277–286. https://doi.org/10.1007/s10142-009-0111-5

MacRae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., … Doudna, J. A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*, *311*(5758), 195–198. https://doi.org/10.1126/science.1121638

Margis, R., Fusaro, A. F., Smith, N. A., Curtin, S. J., Watson, J. M., Finnegan, E. J., & Waterhouse, P. M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters*, *580*(10), 2442–2450. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.072

Matzke, M. A., Primig, M., Trnovsky, J., & Matzke, A. J. M. (1989). Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *The EMBO Journal*, *8*(3), 643–649. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03421.x

Matzke, Marjori A., & Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, *15*(6), 394–408. https://doi.org/10.1038/nrg3683

Meister, G., & Tuschi, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, *431*(September), 343–349. https://doi.org/10.1038/nature02873

Mette, M. F., Aufsatz, W., Van der Winden, J., Matzke, M. A., & Matzke, A. J. M. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO Journal*, *19*(19), 5194–5201. https://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5194

Misquitta, L., & Paterson, B. M. (1999). Targeted disruption of gene function in Drosophila by RNA interference (RNA-i): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(4), 1451–1456. https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1451

Molnar, A., Melnyk, C., & Baulcombe, D. C. (2011). *Silencing signals in plants : a long journey for small RNAs*. 1–8.

Nakasugi, K., Crowhurst, R. N., Bally, J., Wood, C. C., Hellens, R. P., & Waterhouse, P. M. (2013). *De Novo Transcriptome Sequence Assembly and Analysis of RNA Silencing Genes of Nicotiana benthamiana*. *8*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059534

Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H., & Fukuhara, T. (2007). The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway. *Plant Molecular Biology*, *63*(6), 777–785. https://doi.org/10.1007/s11103-006-9125-8

Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, *2*(4), 279–289.

Navarro, B., Pantaleo, V., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., … Burgyan, J. (2009). *Deep Sequencing of Viroid-Derived Small RNAs from Grapevine Provides New Insights on the Role of RNA Silencing in Plant-Viroid Interaction*. *4*(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007686

Olmedo, G., & Guzmán, P. (2008). Processing precursors with RNase III in plants. *Plant Science*, *175*(6), 741–746. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.07.001

Parent, J.-S., Bouteiller, N., Elmayan, T., & Vaucheret, H. (2015). *Respective*

contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing. 223–232. https://doi.org/10.1111/tpj.12720

Parent, J. S., de Alba, A. E. M., & Vaucheret, H. (2012). The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Frontiers in Plant Science*, *3*(AUG), 1–9. https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00179

Pélissier, T., Thalmeir, S., Kempe, D., Sänger, H., Wassenegger, M., Biochemie, M., … Martinsried, D.-. (1999). *Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation*. *27*(7), 1625–1634.

Peter M. Waterhouse, Michael W. Graham, A. M.-B. W. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *18*(4), 336–345.

Portereiko, M. F., Sandaklie-Nikolova, L., Lloyd, A., Dever, C. A., Otsuga, D., & Drews, G. N. (2006). NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1 encodes the arabidopsis RPL21M protein and is required for karyogamy during female gametophyte development and fertilization. *Plant Physiology*, *141*(3), 957–965. https://doi.org/10.1104/pp.106.079319

Pumplin, N., Sarazin, A., Jullien, P. E., Bologna, N. G., Oberlin, S., & Voinnet, O. (2016). DNA methylation influences the expression of DICER-LIKE4 isoforms, which encode proteins of alternative localization and function. *Plant Cell*, *28*(11), 2786–2804. https://doi.org/10.1105/tpc.16.00554

Qi, Y., & Ding, B. (2003). *Differential Subnuclear Localization of RNA Strands of Opposite Polarity Derived from an Autonomously Replicating Viroid The Plant Cell*. *15*(November), 2566–2577. https://doi.org/10.1105/tpc.016576.erately

Rao, A. L. N., & Kalantidis, K. (2015). Virus-associated small satellite RNAs and

viroids display similarities in their replication strategies. *Virology*, *479–480*, 627–636. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.018

Redko, Y., Bechhofer, D. H., & Condon, C. (2008). Mini-III, an unusual member of the RNase III family of enzymes, catalyses 23S ribosomal RNA maturation in B. subtilis. *Molecular Microbiology*, *68*(5), 1096–1106. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06207.x

Schmitz, M., & Steger, G. (2007). Potato spindle tuber viroid (PSTVd). In *Plant Viruses* (Vol. 1, pp. 106–115).

Shamandi, N., Zytnicki, M., Charbonnel, C., Elvira-Matelot, E., Bochnakian, A., Comella, P., … Vaucheret, H. (2015). Plants Encode a General siRNA Suppressor That Is Induced and Suppressed by Viruses. *PLoS Biology*, *13*(12), 1–28. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002326

Tabler, M., & Tsagris, M. (2004). Viroids: Petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends in Plant Science*, *9*(7), 339–348. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.05.007

Tanner, N. K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., & Linder, P. (2003). The Q Motif. *Molecular Cell*, *11*(1), 127–138. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00006-6

Tolia, N. H., & Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the Argonautes. *Nature Chemical Biology*, *3*(1), 36–43. https://doi.org/10.1038/nchembio848

Tournier, B., Tabler, M., & Kalantidis, K. (2006). Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP Nicotiana benthamiana plants. *Plant Journal*, *47*(3), 383–394. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02796.x

Van Der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. M., & Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may

lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, *2*(4), 291–299.

Vaucheret, H. (2006). *Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations*. 759–771. https://doi.org/10.1101/gad.1410506.GENES

Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, *13*(7), 350–358. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.007

Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, *136*(4), 669–687. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046

Wang, M., Bian, X., Wu, L., Liu, L., Smith, N. A., Isenegger, D., … Waterhouse, P. M. (2004). *On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites*.

Wargelius, A., Ellingsen, S., & Fjose, A. (1999). Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *263*(1), 156–161. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1343

Wassenegger, M, Heimes, S., Riedel, L., & Sanger, H. L. (1994). RNA-directed De-Novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, *76*(3), 567–576. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90119-8

Wassenegger, Michael, & Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in Plant Science*, *11*(3), 142–151. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.01.003

Watkins, K. P., Kroeger, T. S., Cooke, A. M., Williams-Carrier, R. E., Friso, G., Belcher, S. E., … Barkan, A. (2007). A ribonuclease III domain protein functions in group II intron splicing in maize chloroplasts. *Plant Cell*, *19*(8), 2606–2623. https://doi.org/10.1105/tpc.107.053736

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*, 134. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134