

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΏΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Μοριακή & Εφαρμοσμένη Βιολογία Φυτών-Πράσινη Βιοτεχνολογία

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Μελέτη της απόκρισης φυτών Nicotiana benthamiana με δυσλειτουργικό το miRNA μονοπάτι της σίγησης, παρουσία ιών αγρονομικού ενδιαφέροντος

 $\mathsf{AN} \Delta \mathsf{PEA} \Sigma \textbf{-} \Sigma \mathsf{T} \mathsf{Y} \Lambda \mathsf{IA} \mathsf{NO} \Sigma \mathsf{MATTO} \Sigma$



Επιβλέπων: Κρίτων Καλαντίδης Καθηγητής, Π.Κ.

Ηράκλειο, 2023

Μελέτη της απόκρισης φυτών Nicotiana benthamiana με δυσλειτουργικό το miRNA μονοπάτι της σίγησης παρουσία ιών αγρονομικού ενδιαφέροντος

Ανδρέας-Στυλιανός Μάττος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καλαντίδης Κρίτων, Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία Φυτών, Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κοτζαμπάσης Κυριάκος, Καθηγητής, Βιοχημεία Φυτών και Φωτοβιολογία, Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τσαγρή Ευθυμία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Μοριακή Βιολογία Φυτών, Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Περίληψη

Οι φυτικοί οργανισμοί υπόκεινται σε ένα ευρύ φάσμα καταπονήσεων που περιορίζουν την αύξηση, ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των καλλιεργειών. Ως εκ τούτου, τα φυτά έχουν αναπτύξει εξελιγμένους αμυντικούς μηγανισμούς με την RNA σίγηση να αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών. Πρόκειται για μια συντηρημένη μεταξύ των ευκαρυωτών βιολογική διεργασία εξειδικευμένη ως προς την νουκλεοτιδική αλληλουγία. Ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση σε μεταγραφικό και μετά-μεταγραφικό επίπεδο διαμέσου των small RNAs (sRNAs) που κατέγουν κεντρικό ρόλο στην αναπτυξιακή στρατηγική του οργανισμού, την διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος και στην άμυνα των φυτών εναντίον των ιών. Σημαντικός παράγοντας του μηγανισμού της σίγησης αποτελεί η πολυλειτουργική πρωτεΐνη SERRATE, η οποία διασφαλίζει την πιστότητα της επεξεργασίας των miRNAs στο ενδογενές μονοπάτι. Δεδομένου της συμμετοχής του και σε άλλα βιοχημικά μονοπάτια και του πλειοτροπικού φαινοτύπου se μεταλλαγμάτων υπογραμμίζεται η σημασία του για τα φυτά. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, υποστηρίζεται η συσχέτιση της πρωτεΐνης SERRATE με την απόκριση των φυτών σε προσβολές παθογόνων όπως μύκητες και βακτήρια. Παράλληλα, μολύνσεις ιοειδών σε φυτά με μερική καταστολή του SERRATE υποδηλώνουν τον κρίσιμο ρόλο του miRNA μονοπατιού στην άμυνα των φυτικών οργανισμών. Μεταξύ των βιοτικών καταπονήσεων που υφίστανται τα φυτά ιδιαίτερα ζημιογόνοι θεωρούνται οι ιοί. Η μείωση της παραγωγικότητας, η μετασυλλεκτική υποβάθμιση των αγροτικών προϊόντων και η καταστροφή υψηλής αγρονομικής σημασίας καλλιεργειών αποτελούν επακόλουθα της έκθεσης τους σε ιικές μολύνσεις.

Στο πλαίσιο αυτό, στόχος της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η εμβάθυνση ως προς την λειτουργία του miRNA μονοπατιού της RNA σίγησης, των αλληλεπιδράσεων ξενιστών-παθογόνων και οι μεταβολές στην συσσώρευση των ιών σε φυτά με δυσλειτουργικά χαρακτηριστικά. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε το γενετικό υλικό αγρίου τύπου φυτών Nicotiana benthamiana και διαγονιδιακών φυτών (SE 5.1i) με δυσλειτουργικό το ενδογενές μονοπάτι της σίγησης, παρουσία του ιού μωσαϊκού του αγγουριού (CMV), του ιού κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας (TSWV) και του ιού μωσαϊκού του γογγυλιού (TuMV). Ως παράμετροι αξιολόγησης χρησιμοποιήθηκαν ο υπολογισμός του ιικού τίτλου στα φυτικά κύτταρα συγκριτικά μεταξύ των δύο

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν μεταβολές της συγκέντρωσης του φυτοπαθογόνου ιού CMV κατά την διάρκεια των δειγματοληψιών με αντιπροσωπευτικότερη τη μείωση του 28 μέρες μετά τις μηχανικές μολύνσεις σε διαγονιδιακά φυτά με μερική καταστολή του γονίδιου SERRATE συγκριτικά με τα αγρίου τύπου φυτά. Όσο αφορά τις μολύνσεις με τον ιό TSWV, παρατηρήθηκε αυξητική τάση του ιικού φορτίου στα διαγονιδιακά φυτά, ενώ μελετήθηκαν μόνο σε φαινοτυπικό επίπεδο φυτά μολυσμένα με τον TuMV. Αναφορικά με τη συμπτωματολογία, δεν διαπιστώθηκαν διαφοροποιήσεις στους υπό μελέτη γονοτύπους ως προς την εμφάνιση, το εύρος και την ένταση των συμπτωμάτων κατά τη διάρκεια των τριών διακριτών πειραμάτων.

Λέξεις κλειδιά: RNA σίγηση, SERRATE, Nicotiana benthamiana, βιοτικό στρες, ιοί, CMV, TSWV, TuMV

Abstract

Plants are subjected to a wide range of stresses that limit crop growth, development, and productivity. Therefore, plants have developed sophisticated defence mechanisms. a typical example of which is the RNA silencing, a sequence-specific biological process conserved in eukaryotes. RNA silencing regulates gene expression at transcriptional and post-transcriptional level through small RNAs (sRNAs) that play an important role in the organism's developmental strategy, the maintenance of genome integrity and plant defence against viruses. The SERRATE multifunctional protein is a key factor in the silencing mechanism, as it ensures the fidelity of miRNA processing at the endogenous pathway. Its importance for plants is highlighted by its involvement in other biochemical pathways and the pleiotropic phenotype of se mutants. According to literature, the SERRATE protein is associated with plant response to pathogen attacks such as fungi and bacteria. At the same time, viroid infections of plants with partial suppression of the SERRATE indicate the importance of the miRNA pathway for plant defence. Among the biotic stresses that plants are subjected to, viruses are considered particularly harmful since they can lead to crop productivity reduction, post-harvest deterioration of fruits and vegetables as well as the destruction of agronomic crops.

In this context, the aim of the present study was to delve into the function of the miRNA pathway of the RNA silencing, the host-pathogen interactions, and the changes of virus accumulation in plants with dysfunctional characteristics. For this reason, the genetic materials of wild-type *Nicotiana Benthamiana* plants and transgenic plants (SE 5.1i) with a dysfunctional endogenous RNA silencing pathway were studied in the presence of cucumber mosaic virus (CMV), tomato spotted wilt virus (TSWV) and turnip mosaic virus (TuMV). As evaluation parameters for the present study, we used the viral titer calculation in the plant cells as well as the phenotype control compared between the two treatments.

Overall, the results of the study demonstrated changes in the accumulation of the phytopathogenic virus CMV throughout the sampling, the most characteristic of which was the virus reduction 28 days after the mechanical infections in transgenic plants with partial suppression of the SERRATE gene compared to wild-type plants. Regarding TSWV infections, an increasing trend of viral load was observed in the transgenic plants, while TuMV infected plants were studied only at phenotypic level. Regarding the symptomatology, no differences were found among the studied genotypes in terms of the appearance, range and intensity of the symptoms during the three separate experiments.

Keywords: RNA silencing, SERRATE, Nicotiana benthamiana, biotic stress, viruses, CMV, TSWV, TuMV

Ευχαριστίες

Με το πέρας της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη σε όσους στάθηκαν αρωγοί για την εκπόνηση της.

Τον κ. Καλαντίδη Κρίτωνα, Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας που με ενέταξε στην ερευνητική του ομάδα και υπήρξε επιβλέπων της διατριβής, για την επιστημονική του καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη στο πρόσωπο μου αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα, τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις του που μου προσέφερε σε θεωρητικό και εργαστηριακό επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Τον κ. Κοτζαμπάση Κυριάκο Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας και την κ. Τσαγρή Ευθυμία Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας για τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσαν κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος και την συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Κρυοβρυσανάκη Νικολέτα για την άψογη συνεργασία μας, τη συνεχή υποστήριξη της εξασκώντας μου παράλληλα την κριτική σκέψη επί των πειραματικών διαδικασιών και για την διόρθωση της εργασίας μου.

Τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Anthony James για την καθοδήγηση και την όμορφη συνεργασία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Φυτών για την άψογη συνεργασία, τις υποδείξεις και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Τον κ. Μαυράκη Στέλιο που φρόντιζε σε καθημερινή βάση τα εκατοντάδες φυτά μου που χρησιμοποίησα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και τις συμβουλές του για την καλύτερη μεταχείριση τους.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την μεταπτυχιακή μου διατριβή στους γονείς μου που με στηρίζουν αδιάκοπα σε κάθε βήμα μου προς την γνώση.

Πίνακας Περιεχομένων

1	Εισαγωγή	12		
1.	RNA givngn	12		
1.1 1 1 2	Ιστορική αναδρομή ΡΝΑ σίνησης	12		
1.1.2	Μουοπάτια πις DNA σίνησης	13		
1.1.3	Μονοπατία της ΚΝΑ στησης			
1.1.3.1	Εξωγενες μονοπατι ΚΝΑ σιγησης			
1.1.3.2	Ενδογενές μονοπάτι RNA σίγησης			
1.1.3.3	Μονοπάτι RNA-εξαρτώμενης DNA μεθυλίωσης	17		
1.1.4	Παράγοντες της RNA σίγησης	18		
1.1.4.1	Dicer-like πρωτεΐνες	18		
1.1.4.2	Πρωτεΐνες Αργοναύτες	20		
1.1.4.3	RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες	20		
1.2	Το γονίδιο SERRATE	21		
1.2.1	Ο μοριακός ρόλος του SERRATE	23		
1.2.2	Φαινότυπος se μεταλλαγμάτων	25		
1.3	Βιοτική καταπόνηση	27		
1.3.1	Ιοί	27		
1311	Ο ιός μωσαικού του αγγουοιού	28		
1312	Γονιδίωμα του CMV	28		
1.3.1.2 1 3 1 3	Ο τός του κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας	20		
1.3.1.3 1 2 1 4	Γουιδίουσ του ΤSWV	2)		
1.3.1.4 1 2 1 5		21		
1.3.1.3	Ο ιος μωσαικού του γογγυλιού	22		
1.3.1.0	Ι ονισιωμα Τ μινι ν	32		
1.3.2	Καταστολείς της RNA σίγησης	32		
1.4	Σκοπός της μελέτης	34		
2.	Υλικά και Μέθοδοι	35		
2.1	Φυτικό υλικό-Συνθήκες ανάπτυξης	35		
2.1 2.2	μοτικό οπικό 2000 μως αταποσιμς	35		
2.2	$\frac{1}{2000} \frac{1}{1000} \frac{1}{1000}$	35		
2.3	Λ_{π}	35		
2.4		26		
2.4.1	Πα πατικα πο μαινολή χλωροφορμιο	27		
2.5		27		
2.0	$2\tau \upsilon \pi \omega \mu \alpha \kappa \alpha \tau \alpha$ Northern	3/		
2.6.1	Διαδικασια μη ραδιενεργου υβριδισμου	38		
2.6.1.2	Παρασκευη διαλυματος t-RNAs για την υβριδοποιηση	39		
2.7	Ποσοτικοποίηση των επιπέδων μολυσματικότητας	40		
3.	Αποτελέσματα	41		
3.1	Πειραματικό σχέδιο μολύνσεων με τον ιό CMV	41		
3.1.1	1° Πείραμα CMV	41		
3.1.1.1	Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με CMV	41		
3.1.1.2	Μοριακός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με CMV	43		
3.1.2	2ο Πείραμα CMV	46		
3.1.2.1	Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με CMV	46		
3.1.2.2	Μοριακός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με CMV	48		
3.1.3	Συνολικά στατιστικά αποτελέσματα 10 -20 Πείραμα CMV	51		
3.2	Πειραματικό σγέδιο φυτών μολυσμένων με τον ιό TSWV	52		

3.2.1	Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με TSWV	52
3.2.2	Μοριακός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με TSWV	54
3.3	Πειραματικό σχέδιο φυτών μολυσμένων με τον ιό TuMV	55
3.3.1	1ο Πείραμα ΤυΜV	55
3.3.1.1	Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με TuMV	55
4.	Συζήτηση	58
4.1	Απόκριση μολυσμένων φυτών με τον ιό CMV	60
4.2	Απόκριση μολυσμένων φυτών με τον ιό TSWV	62
4.3	Απόκριση μολυσμένων φυτών με τον ιό TuMV	63
5.	Βιβλιογραφία	64
6.	Παράρτημα	77

Πίνακας εικόνων

	1	
Εικόνα 1.1	Σχηματική απεικόνιση των κοινών πτυχών των μονοπατιών της RNA σίγησης (Carthew and Sontheimer, 2009)	13
Εικόνα 1.2	Σχηματική απεικόνιση της βιογένεσης των siRNAs (Waititu et., 2020)	15
Εικόνα 1.3	Βιογένεση και δραστικότητα των miRNAs (Sun et al., 2022)	17
Εικόνα 1.4	Γραμμική απεικόνιση της δομής των πρωτεϊνών Dicer (MacRae and Doudna, 2006)	18
Εικόνα 1.5	Γραμμική απεικόνιση της δομής των πρωτεϊνών AGO (Bologna and Voinnet, 2014).	20
Εικόνα 1.6	Έκφραση του SERRATE στο φυτό <i>A. thaliana</i> (Mou et al., 2021) και σχηματική απεικόνιση των επικρατειών του SE (Machida et al., 2011)	22
Εικόνα 1.7	Συμμετοχή της πρωτεΐνης SERRATE στο στάδιο επεξεργασίας των pri-miRNAs και των pre-miRNAs για το σχηματισμό των ώριμων miRNAs (Khrawresh et al., 2012)	24
Εικόνα 1.8	Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός φυτών αγρίου τύπου (Wild Type) και se μεταλλαγμάτων <i>A.thaliana</i> A-Γ. & <i>N.tabacum</i> Δ-Ζ (Prigge και Wagner, 2001; Kryovrysanaki et al., 2019)	26
Εικόνα 1.9	Γονιδιωματική οργάνωση του ιού CMV (Jacquemond, 2012)	28
Εικόνα 1.10	Συμπτώματα μόλυνσης με TSWV σε φυτά και καρπούς ντομάτας (Qi et al., 2021)	30
Εικόνα 1.11	Γονιδιωματική οργάνωση του ιού TSWV (Hull, 2002)	31
Εικόνα 1.12	Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος του ιού TuMV (Palukaitis and Kim, 2021).	32
Εικόνα 3.1	Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών με τους μάρτυρες κατόπιν μολύνσεως με τον ιό CMV καθ' όλη τη πειραματική διαδικασία	41
Εικόνα 3.2	Απεικόνιση συμπτωμάτων σε αγρίου τύπου (Α, Γ) και διαγονιδιακά φυτά (Β, Δ) μολυσμένα με τον ιό CMV	42
Εικόνα 3.3	Σύγκριση διαγονιδιακών και αγρίου τύπου φυτών Α.14 και Β. 28 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό CMV (Α, Β αντίστοιχα)	43
Εικόνα 3.4	Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 7dpi	43

Εικόνα 3.5	Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 14dpi	44
Εικόνα 3.6	Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 21dpi	45
Εικόνα 3.7	Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 28dpi	45
Εικόνα 3.8	Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών με τους μάρτυρες κατόπιν μολύνσεως με τον ιό CMV καθ' όλη τη πειραματική διαδικασία	46
Εικόνα 3.9	Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.	47
Εικόνα 3.10	Απεικόνιση συμπτωμάτων σε αγρίου τύπου (Α,Γ) και διαγονιδιακά φυτά (Β,Δ) κατόπιν μολύνσεως με τον ιό CMV	48
Εικόνα 3.11	Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 7dpi	48
Εικόνα 3.12	Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 14dpi	49
Εικόνα 3.13	Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 21dpi	50
Εικόνα 3.14	Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 28dpi	50
Εικόνα 3.15	Γραφική απεικόνιση των συνολικών αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης της μολυσματικότητας του ιού CMV για το Πείραμα 1 και 2	51
Εικόνα 3.16	Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών με τους μάρτυρες κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TSWV	52
Εικόνα 3.17	Απεικόνιση συμπτωμάτων κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TSWV 14dpi	53
Εικόνα 3.18	Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TSWV 14dpi	53
Εικόνα 3.19	Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών με τους μάρτυρες κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TSWV 35dpi και σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TSWV 35dpi	54

Εικόνα 3.20	Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα TSWV για τις 14dpi	55
Εικόνα 3.21	Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών με τους μάρτυρες κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TuMV καθ' όλη τη πειραματική διαδικασία	56
Εικόνα 3.22	Απεικόνιση συμπτωμάτων κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TuMV	56
Εικόνα 3.23	Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.	57

1. Εισαγωγή

1.1 RNA σίγηση

Η RNA σίγηση (RNA silencing ή RNA interference) είναι ένας εξελικτικά συντηρημένος ρυθμιστικός και αμυντικός μηχανισμός μεταξύ των ευκαρυωτών (Baulcombe, 2004; Wang and Metzlaff, 2005; Zhang et al., 2019). Πρόκειται για μια RNA-εξαρτώμενη διεργασία εξειδικευμένη ως προς την νουκλεοτιδική αλληλουχία. Στους φυτικούς οργανισμούς, δίκλωνα μόρια RNA (double stranded, ds) ή RNA δομής φουρκέτας (hairpin) ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης ενεργοποιούν την RNA σίγηση και υπόκεινται σε επεξεργασία από ενδονουκλεάσες τύπου ΙΙΙ (RNase-III) που ονομάζονται Dicer-like πρωτεΐνες (DCL), δημιουργώντας μικρά μόρια RNA (Small RNAs, sRNAs) μήκους 21-24 νουκλεοτιδίων. Με βάση την βιογένεση και τη λειτουργία τους διακρίνονται 2 κύριες κατηγορίες μορίων sRNA, τα microRNAs (miRNAs) και τα μικρά παρεμβαλόμενα RNA (short-interfering RNAs, siRNAs). Έπειτα, τα sRNAs ενσωματώνονται σε μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Αργοναυτών (AGO) προκειμένου να σχηματίσουν ένα RNA-επαγόμενο σύμπλοκο σίγησης (RNA-induced silencing complex, RISC) (Hammond et al., 2000, 2001; Carthew and Sontheimer, 2009; Wang et al., 2012; Zhao and Guo., 2021). Συγκεκριμένα, το RISC στοχεύει συγγενή νουκλεϊκά οξέα βασιζόμενα στην συμπληρωματικότητα της αλυσίδας-οδηγού για την άμεση αποικοδόμηση τους, την καταστολή της μετάφρασης ή την μεθυλίωση του DNA των ομόλογων γονιδίων-στόχων (Εικόνα 1.1) (Di Serio et al., 2022).

Η δράση της RNA σίγησης εναπόκειται στην δημιουργία και διατήρηση της ετεροχρωματίνης, στον έλεγχο περιοχών που περιέχουν επαναλαμβανόμενο DNA και μεταθετά στοιχεία, στην γονιδιακή ρύθμιση αναπτυξιακών διαδικασιών και άλλων ενδογενών λειτουργιών, αλλά πρωτίστως στην απόκριση σε συνθήκες βιοτικής καταπόνησης, στην άμυνα έναντι φυτοπαθογόνων παραγόντων, όπως βακτηρίων και κυρίως ιών (Hohn and Vazquez, 2011). Δρα σε μεταγραφικό επίπεδο (transcriptional gene silencing, TGS) αμβλύνοντας ή αποτρέποντας τη μεταγραφή μέσω RNA-επαγόμενης μεθυλίωσης του DNA και τροποποίηση της ετεροχρωματίνης ή σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο (post-transcriptional gene silencing, PTGS) μέσω τεμαχισμού του RNA ή καταστολής της μετάφρασης (Baulcombe, 2004; Wassenegger, 2005; Vaucheret, 2006).

Εντυπωσιακό χαρακτηριστικό του μηχανισμού της RNA σίγησης αποτελεί η δυναμική του δεδομένου πως ελάχιστα μόρια dsRNA ανά κύτταρο δύνανται να προκαλέσουν ισχυρή απόκριση του οργανισμού (Mello and Conte, 2004). Κομβικός θεωρείται ο ρόλος των πρωτεϊνών DCL, AGO και RDR στο μονοπάτι της RNA σίγησης, στα φυτά (Prakash et al., 2017).



Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση των κοινών πτυχών των μονοπατιών της RNA σίγησης. Κοπή δίκλωνων μορίων RNA από τις πρωτεΐνες DCL, πρόσδεση στις πρωτεΐνες AGO σχηματίζοντας το σύμπλοκο RISC, αναγνώριση RNA-στόχου μέσω της συμπληρωματικότητας των βάσεων (Carthew and Sontheimer, 2009).

1.1.2 Ιστορική αναδρομή

Το 1928, παρατηρήθηκε πως φυτά καπνού (Nicotiana tabacum) μολυσμένα με τον ιό της δακτυλιοειδούς κηλίδωσης του καπνού (Tomato ringspot virus, TRSV) παρουσίασαν συμπτώματα μόνο στα αρχικώς μολυσμένα φύλλα, ενώ τα διασυστηματικά φύλλα παρέμεναν ασυμπτωματικά και ανθεκτικά σε δευτερογενή μόλυνση, κάνοντας λόγο για κάποιο μηχανισμό ανοσίας (Wingard, 1928). Σε μεταγενέστερη μελέτη, ο Jorgensen και οι συνεργάτες του μελετούσαν σε φυτά πετούνιας το γονίδιο της συνθάσης της χαλκόνης (CHS) που αποτελεί βασικό ένζυμο στο βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής μορίων ανθοκυανινών, τα οποία είναι συστατικά γρωστικής στα άνθη. Παρατηρήθηκε πως κατά την εισαγωγή ενός αντίγραφου του γονιδίου σε φυτά πετούνιας υπό τον έλεγγο ενός ισγυρού υποκινητή (promoter), αν και αναμενόταν βαθύτερο ιώδες χρώμα, το χρώμα των πετάλων αντιθέτως παρουσίαζε μεγάλη διακύμανση από βαθύ ιώδες έως πλήρως λευκό (έμοιαζε τα επίπεδα της συνθάσης να μεταβάλλονται και σε ορισμένα σημεία των πετάλων να είγαν ελαττωθεί). Το φαινόμενο αυτό, της μειωμένης έκφρασης ενός γονιδίου κατόπιν εισαγωγής στον οργανισμό πολλαπλών αντιγράφων του, ονομάστηκε συγκαταστολή (co-suppresion) (Napoli et al., 1990). Μια άλλη ερευνητική ομάδα, ανέφερε πως δίκλωνο RNA εξωγενούς προέλευσης με πανομοιότυπη ή παραπλήσια αλληλουχία σιγεί στοχευμένα γονίδια μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται μονοπάτι παρεμβολής του RNA (RNAi) (Fire et al., 1998). Το 1999, αποδείχθηκε πως η σίγηση στα φυτά συνοδεύεται από την παρουσία μορίων RNA μήκους 20-25 νουκλεοτιδίων που παρουσιάζουν

συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία που πυροδότησε την σίγηση (Hamilton and Baulcombe, 1999; Tomari and Zamore, 2005). Επιπλέον, ευρήματα μελετών υποστηρίζουν πως οι ιικές μολύνσεις στους φυτικούς οργανισμούς ενεργοποιούν τον RNA-μεσολαβούμενο αμυντικό μηχανισμό, ο οποίος στοχεύει το ιικό γονιδίωμα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω με εξειδικευμένο ως προς την νουκλεοτιδική αλληλουχία τρόπο. Στα τελευταία στάδια της μόλυνσης, η προαναφερθείσα διαδικασία θεωρείται υπεύθυνη για τη προοδευτική επιβράδυνση της ιικής συσσώρευσης (Ratcliff et al., 1999).

1.1.3 Μονοπάτια RNA σίγησης

Σύμφωνα με τον Baulcombe, 2004 η RNA σίγηση κατέχει καθοριστικό ρόλο στους φυτικούς οργανισμούς καθώς ελέγχει βασικές βιολογικές διεργασίες όπως η ανάπτυξη, απόκριση στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Κατόπιν γενετικής και μοριακής ανάλυσης, ο μηχανισμός της RNA σίγησης μπορεί να διακριθεί σε 3 μονοπάτια. Το πρώτο είναι το κυτταροπλασματικό μονοπάτι της RNA σίγησης των siRNAs, το οποίο στοχεύει dsRNAs εξωγενούς προελεύσεως νουκλεϊκά οξέα όπως ιούς και ιοειδή. Το δεύτερο μονοπάτι αφορά τη δράση των miRNAs που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, μέσω του κατακερματισμού ενδογενών μεταγράφων (mRNAs) ή την αναστολή της μετάφρασης τους. Το τρίτο μονοπάτι της σίγησης στα φυτά εκτελείται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου και σχετίζεται με την μεθυλίωση του DNA και την καταστολή της μεταγραφής σε μεταγραφικό επίπεδο (Transcriptional gene silencing, TGS) (Rosa et al., 2018; Gao et al., 2020; Di Serio et al., 2022).

1.1.3.1 Εξωγενές μονοπάτι της RNA σίγησης

Η επαγωγή του αμυντικού μηχανισμού της RNA σίγησης πραγματοποιείται με την δημιουργία και παρουσία δίκλωνων μορίων RNA (dsRNAs) εξωγενούς προέλευσης όπως ιούς αλλά και μεταθετά στοιχεία (τα οποία πιθανώς προέρχονται από αρχέγονους ρετροϊούς) και σε ορισμένες περιπτώσεις από την έκφραση διαγονιδίων, που αναγνωρίζονται από το φυτό κατά κάποιο τρόπο ως «ξένα» (Mello and Conte, 2004; Carthew and Sontheimer, 2009; Pyott and Molnar, 2015).

Το γονιδίωμα των φυτικών ιών είναι κατά πλειοψηφία RNA μορφής και τα παραγόμενα dsRNAs είναι αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού του ιικού γονιδιώματος μέσω της RNA-εξαρτωμένης RNA πολυμεράσης. Ενναλακτικά, σγηματίζονται ιικής δευτεροταγείς δομές του ιικού RNA (στις οποίες περιέχονται δίκλωνες περιοχές) επάγοντας την σίγηση (Boualem et al., 2016). Όσο αφορά τους DNA ιούς, λόγω της αμφίδρομης μεταγραφής του ιικού γονιδιώματος δημιουργούνται αλληλουχίες αλληλοεπικαλυπτόμενες συμπληρωματικές **RNA** μεταγράφων σχηματίζοντας dsRNA μόρια ενεργοποιώντας την σίγηση (Baulcombe, 2004).

Τα dsRNAs αναγνωρίζονται και πέπτονται από τις DCL πρωτεΐνες για το σχηματισμό των siRNAs. Συγκεκριμένα, οι DCL4 και DCL2 επεξεργάζονται τα dsRNA δημιουργώντας αλληλουχίες 21 και 22 νουκλεοτιδίων αντίστοιχα οι οποίες ενσωματώνονται στο σύμπλοκο RISC με την δράση της πρωτεΐνης AGO1 με

αποτέλεσμα τον κατακερματισμό της αλληλουχίας-στόχου (Εικόνα 1.2) (Wang et al., 2012). Το μονοπάτι των siRNAs θεωρείται πως είναι ένας φυσικός μηχανισμός άμυνας των φυτών προς τις ιολογικές προσβολές, που δρα σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο με τους ιούς να ενεργοποιούν την RNA σίγηση, η οποία στρέφεται κατά της αντιγραφής τους (Morel et al., 2002; Wang and Metzlaff, 2005).

Όσο αφορά την επαγόμενη RNA σίγηση από διαγονίδιο, θεωρείται πως το "παρεκκλίνον" (aberrant) RNA που προκύπτει από μεταγραφή του διαγονιδίου αναγνωρίζεται από μια κυτταρική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRP) και οδηγεί στην σύνθεση dsRNAs (Baulcombe, 2004). Οι DCL4 πρωτεΐνες πέπτουν τα dsRNA και με την δράση των AGO1, AGO4 και RDR2 γίνεται σίγηση του διαγονιδίου σε μεταγραφικό επίπεδο (Chan et al., 2004).



Εικόνα 1.2 Σχηματική απεικόνιση της βιογένεσης των siRNAs. Τα δίκλωνα μόρια RNA (dsRNAs) προερχόμενα από ιικά νουκλεικά οξέα, μεταθετά στοιχεία ή διαγονίδια υπόκεινται σε επεξεργασία από τις DCL και σταθεροποιούνται από την HEN1, σχηματίζοντας τα siRNAs. Ακολούθως, το σύμπλεγμα RISC-AGO καθοδηγεί την επιλεγμένη αλυσίδα των siRNAs για την μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (PTGS) ή μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (TGS) (Waititu et al., 2020)

1.1.3.2 Ενδογενές μονοπάτι της RNA σίγησης

Το ενδογενές μονοπάτι της RNA σίγησης αναφέρεται στη σίγηση μέσω της δράσης μιας κατηγορίας sRNAs, των miRNAs. Τα miRNAs συνθέτουν μια μεγάλη οικογένεια από μικρά, ενδογενή μη κωδικά RNAs, τα οποία έχουν εντοπιστεί σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα φυτικά miRNAs είναι μήκους 20-24 νουκλεοτιδίων και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, κατέχοντας σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως αναπτυξιακές διαδικασίες

(παραδείγματος χάρη ρύθμιση του σχηματισμού φυτικών οργάνων) και απόκρισης σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Εκτός της προστασίας έναντι ιολογικών προσβολών τα miRNAs εμπλέκονται επίσης σε σημαντικά αγρονομικά γνωρίσματα, όπως τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων καρπών, το ύψος παραγωγής (Voinnet, 2009; Fischer et al., 2013; Zeng et al., 2018; Chen et al., 2018). Συνεπώς, τα miRNAs κατέχουν αναντικατάστατο και σημαντικό βιολογικό ρόλο στα φυτά καθώς ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Wu et al., 2009; Anjali et al., 2019). Οι ιδιότητες του αυτές, τα καθιστούν χρήσιμα εργαλεία της βιοτεχνολογίας για την βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργούμενων φυτών.

Στους φυτικούς οργανισμούς, τα γονίδια των miRNAs (MIR γονίδια) μεταγράφονται αρχικά σε πρωτογενή μόρια RNA (primary miRNA, pri-miRNA) μέσω της DNA επαγόμενης RNA πολυμεράσης ΙΙ (Pol II). Χαρακτηριστικό των συγκεκριμένων μεταγράφων είναι ότι σχηματίζουν ατελείς ως προς τη συμπληρωματικότητα δευτεροταγείς δομές (Yin et al., 2014). Στη συνέχεια, μέσω της δράσης του Microprocessor complex το οποίο συγκροτείται από την πυρηνική ενδονουκλεάση Dicer-like 1 (DCL1), μία πρωτεΐνη με δυνατότητα πρόσδεσης δίκλωνων RNA (dsRNA binding, Hyponastic leaves 1, HYL1) και μια πρωτεΐνη (zinc-finger) SERRATE, τα primiRNA υπόκεινται σε επεξεργασία σε δυο διαδογικές αντιδράσεις, όπου αρχικά δημιουργούνται τα πρόδρομα miRNAs (precursor miRNA, pre-miRNA) με δομή φουρκέτας μήκους περίπου 100 νουκλεοτιδίων. Κατά το δεύτερο στάδιο, κατόπιν δεύτερης πέψης σγηματίζεται το σύμπλοκο miRNA/miRNA* (όπου * αναπαριστά τη συμπληρωματική miRNA αλληλουχία) κυρίως 21 νουκλεοτιδίων με δύο νουκλεοτίδια να προεξέχουν από κάθε 3' άκρο της κάθε αλυσίδας (Fang and Spector, 2007; Voinnet, 2009; Bajczyk et al., 2020). H DCL1, HYL1 και SERRATE εντοπίζονται στον πυρήνα σε ειδικές δομές, γνωστές ως dicing bodies (D-bodies). Κατόπιν μεθυλίωσης του συμπλόκου στο ΟΗ κατάλοιπο του 3΄ τελικού άκρου από την HUA ENHANCER (HEN1), γεγονός που εμποδίζει την αποικοδόμηση του, (Yu et al., 2005) μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της δράσης HASTY (Jones-Rhoades et al., 2006; Voinnet, 2009). Ακολούθως, το σύμπλοκο miRNA/miRNA* αποχωρίζεται με το miRNA* να αποικοδομείται ταγέως, ενώ το miRNA ενσωματώνεται στη πρωτεΐνη AGO1 που έγει δράση ενδονουκλεάσης, για τον σχηματισμό του συμπλόκου RISC (RNA induced silencing complex). Τέλος, η αλυσίδα του miRNA καθοδηγεί το σύμπλοκο RISC για την ανεύρεση του μετάγραφου-στόχου με αποτέλεσμα είτε την παρεμπόδιση της μεταγραφής του είτε την αναστολής της μετάφρασης του με βάση την πλήρη ή μερική συμπληρωματική αλληλουχία (Εικόνα 1.3) (Voinnet et al., 2009; Vazquez et al., 2010; Khraiwesh et al., 2012).

Σύμφωνα με τους Iwakawa και Tomari, 2013 σε φυτά Arabidopsis thaliana (A. thaliana), το AGO1-RISC έχει την ικανότητα να καταστείλει την μετάφραση χωρίς τον κατακερματισμό του mRNA, μέσω της πρόσδεσης του είτε στην 5' αμετάφραστη περιοχή του είτε στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) παρεμποδίζοντας την πολυαδενυλίωση, τη στρατολόγηση ή την κίνηση των ριβοσωμάτων.



Εικόνα 1.3 Βιογένεση και δραστικότητα των miRNAs. Αρχικά, τα γονίδια MIR μεταγράφονται από την Pol II, σχηματίζονται τα πρωτογενή miRNA (pri-miRNA) δομής φουρκέτας τα οποία σταθεροποιούνται από την δράση της RNA-biding πρωτεΐνης, DAWDLE. Το μάτισμα και η κοπή των pri-miRNA πραγματοποιείται στα πυρηνικά dicing bodies από την συντονισμένη δράση των DCL1, HYL1, SE και τις cap-biding πρωτεΐνες (CBP) CBP20 and CBP80. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο miRNA/miRNA* μεθυλιώνονται από την HEN1 και μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα μέσω της HST1. Η αλυσίδα-οδηγός ενσωματώνεται και σταθεροποιείται από την AGO1. Απόρροια του σχηματισμού του συμπλόκου RISC, ο κατακερματισμός του mRNA-στόχου ή την αναστολή της μετάφρασης του (Sun et al., 2022).

1.1.3.3 Μονοπάτι RNA-εξαρτώμενης DNA μεθυλίωσης

Το τρίτο μονοπάτι της RNA σίγησης είναι αυτό της RNA-εξαρτώμενης DNA μεθυλίωσης (RNA-directed DNA methylation, RdDM). Οι πρώτες ενδείξεις για αυτού του είδους της σίγηση ήταν τα ευρήματα που κατέδειξαν ότι τα διαγονίδια και τα ιικά RNA καθοδηγούν την μεθυλίωση του DNA (Wassenegger et al., 1994; Mette et al., 2000; Jones et al., 2001). Το μονοπάτι της RdDM είναι μοναδικό στους φυτικούς οργανισμούς και κατέχει καθοριστικό ρόλο στην σίγηση των μεταθετών στοιχείων και των επαναλαμβανομένων DNA αλληλουχιών για την διαφύλαξη της σταθερότητας και ακεραιότητας του γονιδιώματος.

Συγκεκριμένα, δίκλωνα μόρια RNA που συντέθηκαν από την δράση της φυτοειδικής DNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης IV (Pol IV) και της RDR2 πέπτονται από την DCL3 σε μόρια 24 νουκλεοτιδίων siRNAs τα οποία σχηματίζουν σε συνεργασία με την AGO4 το πρωτεϊνικό σύμπλοκο RITS (RNA induced transcriptional complex)

(Matzke et al., 2009; Haag and Pikaard, 2011). Το RITS αλληλεπιδρά με τα μετάγραφα που προέκυψαν από την δράση της Pol V και λόγω συμπληρωματικότητας επάγει την δράση μεθυλοτσανσφερασών (DRM2) καταλύοντας την de- novo μεθυλίωση των κυτοσινών. Χαρακτηριστικό αυτού του τύπου της μεθυλίωσης είναι πως επέρχεται μεθυλίωση σε όλες τις κατηγορίες περιεχόμενων αλληλουχιών (CG, CHG και CHH, όπου Η αντιπροσωπεύει A, C ή T), δηλαδή και στις "ασύμμετρες" CHH θέσεις.

Ο μηχανισμός αυτός οδηγεί στη μεταγραφική σίγηση των γονιδιακών τόπων που μεταγράφονται από την Pol V, διενεργείται ιδιαιτέρως στις περιοχές μεταθετών στοιχείων και κατ' επέκταση επαναλαμβανομένων αλληλουχιών DNA και εμπλέκεται στην επικοινωνία μεταξύ αλληλόμορφων. Σε κυτταρικό επίπεδο συμμετέχει στην αναπαραγωγή, άμυνα έναντι φυτοπαθογόνων και απόκριση σε αβιοτικές καταπονήσεις (Matzke and Mosher, 2014).

1.1.4 Παράγοντες της RNA σίγησης

1.1.4.1 Dicer-like πρωτεΐνες

Οι φυτικές πρωτεΐνες Dicer-like (DCL) ή Dicer στα ζώα είναι ενδονουκλεάσες τύπου III οι οποίες πέπτουν δίκλωνα μόρια RNA (dsRNAs) σε μικρότερα μόρια sRNAs (μήκους 21-24 νουκλεοτιδίων) που φέρουν προεξοχές 2 νουκλεοτιδίων και μια υδροξυλομάδα στο 3' άκρο και μια φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο (η χαρακτηριστική «υπογραφή» του ενζύμου DCL) (Bernstein et al., 2001; Bologna and Voinnet, 2014).

Οι Dicer και DCL πρωτεΐνες αποτελούνται από τις εξής επικράτειες: DEAD/DEXD μοτίβο, ελικάση-C, DUF283 (περιοχή άγνωστης λειτουργίας 283), επικράτεια PAZ (PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE), επικράτεια RNάση-III και επικράτεια πρόσδεσης δίκλωνου RNA (dsRNA binding domain, dsRBD) (Εικόνα 1.4) (Bologna and Voinnet, 2014).Τα φυτικά γονίδια των DCL συγκροτούν μια μονοφυλετική ομάδα που σχηματίστηκε μετά των διαχωρισμό φυτών και ζώων αλλά πριν την διαφοροποίηση των φυτών σε μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα πριν από 150 εκατομμύρια χρόνια (Bologna and Voinnet, 2014). Το γονιδίωμα του *A. thaliana*, του *N. benthamiana* και πιο πρόσφατα του αμπελιού (*Vitis vinifera*) βρέθηκε πως κωδικοποιούν 4 DCL πρωτεΐνες (DCL1-DCL4) ενώ στην ντομάτα (*Solanum lycopersicum*) ταυτοποιήθηκαν 7 γενετικοί τόποι (Deleris et al., 2006; Nakasugi et al., 2013; Zhao et al., 2015).



Εικόνα 1.4 Γραμμική απεικόνιση της δομής των πρωτεϊνών Dicer (MacRae and Doudna, 2006).

Στο γονιδίωμα μυκήτων (Neurospora crassa και Magnaporthe oryzae) έχουν απομονωθεί 2 γονίδια των Dicer. Στα ζώα, ένα γονίδιο Dicer έχει εντοπιστεί στον άνθρωπο, το ποντίκι και τους νηματώδεις το οποίο ρυθμίζει αναπτυξιακές διεργασίες μέσω των miRNAs, τροποποιεί τη δομή της χρωματίνης και συμμετέχει στο μηχανισμό της RNA αποσιώπησης (RNA interference, RNAi) ενώ στο γονιδίωμα των εντόμων (Drosophila melanogaster) έχουν απομονωθεί 2 γονίδια των Dicer (Schauer et al., 2002; Finnegan and Matzke, 2003; Catalanotto et al., 2004).

Η πρωτεΐνη DCL1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι βιογένεσης των miRNAs και από την δράση της παράγονται μικρά μόρια RNA μήκους 21 νουκλεοτιδίων (Xie et al., 2014). Σύμφωνα με αναφορές τα miRNAs εμπλέκονται σε πολλαπλές βιολογικές και μεταβολικές διεργασίες. Σε φυτά με μειωμένη έκφραση της DCL1 παρατηρείται ευρύ φάσμα αναπτυξιακών ανωμαλιών ενώ η πλήρης καταστολή της οδηγεί σε θνησιμότητα του οργανισμού σε εμβρυικό στάδιο υπογραμμίζοντας τον ουσιώδη ρόλο της (Schauer et al., 2002; Lobbes et al., 2006).

Κάθε κλάση πρωτεϊνών DCL έγει εξελιγθεί ώστε να κατέγει διακριτό ρόλο αλλά οι τρεις DCL2-DCL4 που συμμετέχουν στη δημιουργία των siRNAs, λειτουργούν με αλληλοεπικαλυπτόμενο τρόπο ώστε να αντισταθμιστούν από άλλη κλάση πιθανές δυσλειτουργίες τους (Gasciolli et al., 2005; Mukherjee et al., 2013). Παρά το γεγονός πως όλες οι DCL πρωτεΐνες δύνανται να επεξεργαστούν dsRNAs εξωγενούς προέλευσης υπό κατάλληλες γενετικές συνθήκες, οι DCL4 και DCL2 είναι οι πρωταργικές πρωτεΐνες στην αντιική άμυνα με ιεραργικό και εξειδικευμένο ρόλο (Deleris et al., 2006). Ειδικότερα, η DCL4 παράγει siRNAs μήκους 21 νουκλεοτιδίων που λειτουργούν ως υπόστρωμα καθοδηγώντας το σύμπλοκο RISC κατά του ιού. Δευτερευόντως, η αντιική δράση της DCL2 είναι περισσότερο ευδιάκριτη απουσία της DCL4, όταν η τελευταία απενεργοποιείται γενετικά ή καταστέλλεται. Κατά την απουσία και των 2 ενδονουκλεασών DCL2/DCL4 σε φυτά παρατηρήθηκε υπερευαισθησία σε ιικές μολύνσεις υπογραμμίζοντας το γεγονός της συνδυαστικής τους δράσης σε φυτά A.thaliana (Deleris et al., 2006) και σε φυτά N. benthamiana (Katsarou et al., 2018). Επιπλέον, η DCL4 συμμετέχει στο σχηματισμό trans-acting siRNAs (ta-siRNAs) που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση (Gasciolli, et al., 2005; Rosa et al., 2018). Από την δράση της DCL3 παράγονται μόρια RNA 24 νουκλεοτιδίων τα οποία σχετίζονται με την σίγηση των μεταθετών στοιχείων και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (repetitive elements). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζεται πως δρα επίσης κατά των DNA ιών και κατά των ιοειδών (που πολλαπλασιάζονται στον πυρήνα) με τη συντονισμένη δράση της DCL2 (Moissiard and Voinnet, 2006; Katsarou et al., 2016).

Αναμφίβολα, η παρουσία και η δραστικότητα των πρωτεϊνών της οικογένειας Dicer σε κυτταρικό επίπεδο αποτελούν ζωτικής σημασίας διεργασιών για πλήθος βιολογικών μηχανισμών που απαιτούν προσαρμογές της γονιδιακής έκφρασης και που σχετίζονται με την ανάπτυξη, οργανογένεση, κιρκαδικό ρυθμό, καταπονήσεις, άμυνα του οργανισμού έναντι ιών και μεταθετών στοιχείων (Fukudome and Fukuhara, 2017).

1.1.4.2 Πρωτεΐνες Αργοναύτες

Οι πρωτεΐνες ονομάστηκαν από τον χαρακτηριστικό φαινότυπο που προκαλεί η έλλειψη τους σε μεταλλάγματα του γονιδίου AGO1 σε φυτά *A. thaliana* που έμοιαζε με πλοκάμια καλαμαριού του γένους Argonautus (Bohmert et al., 1998). Ανήκουν σε μια συντηρημένη οικογένεια πρωτεΐνών οι οποίες είναι το βασικό και καταλυτικά ενεργό στοιχείο για την δράση του RISC. Στο σύμπλοκο RISC, το sRNA (η αλυσίδαοδηγός) φορτώνεται σε μια πρωτεΐνη AGO, η οποία στοχεύει συμπληρωματικά μόρια RNA με βάση την συμπληρωματικότητα των βάσεων, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του RNA ή την αναστολή της μετάφρασης του (Wei et al., 2012).

Όσο αφορά την δομή τους, οι AGO χαρακτηρίζονται από την παρουσία 4 επικρατειών: την επικράτεια PAZ (όπως στις DCL), την επικράτεια PIWI που απαντάται αποκλειστικά στην οικογένεια των Αργοναυτών, την αμινοτελική και κεντρική επικράτεια (Εικόνα 1.5) (Carthew and Sontheimer, 2009). Η PAZ επικράτεια αναγνωρίζει και δεσμεύεται στα 2 νουκλεοτίδια που προεξέχουν από το 3΄ άκρο των sRNAs που προέκυψαν από την δράση των DCL και η κεντρική επικράτεια αγκιστρώνεται στη φωσφορική ομάδα του 5΄ άκρου (Hutvagner et al., 2008). Σημαντική ανακάλυψη αποτέλεσε πως η PIWI επικράτεια υιοθετεί δομή RNάσης H like και παρουσιάζει δραστηριότητα ενδονουκλεάσης η οποία καταλύει την ενδονουκλεολυτικη κοπή του συμπληρωματικού RNA-στόχου (Song et al., 2004; Wei et al., 2012).



Εικόνα 1.5 Γραμμική απεικόνιση της δομής των πρωτεϊνών AGO (Bologna and Voinnet, 2014).

Ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν τις AGO πρωτεΐνες ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ειδών και κυμαίνεται μεταξύ των οργανισμών που έχουν μελετηθεί από ένα, στο Schizosaccharomyces pombe, μέχρι 27 στο Caenorhabditis elegans. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν εντοπιστεί 8 γονίδια. Στους φυτικούς οργανισμούς έχει ταυτοποιηθεί μεγάλος αριθμός AGO πρωτεϊνών με διακριτές λειτουργίες και βιοχημικές δραστηριότητες με τα A.thaliana και N. benthamiana να κωδικοποιούν 10 και 7 γονίδια, αντίστοιχα (Sasaki et al., 2003; Nakasugi et al., 2013).

Σύμφωνα με μελέτες, οι πρωτεΐνες AGO συσχετίζονται και με τα 3 μονοπάτια της RNA σίγησης σε ζώα, φυτά και μύκητες (Baulcombe, 2004). Μέλη της οικογένειας των αργοναυτών έχουν ταυτοποιηθεί ότι εμπλέκονται στη μεταγραφική και στην μεταμεταγραφική σίγηση γονιδίων (Höck and Meister, 2008).

1.1.4.3 RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες

Οι RNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (RNA-dependent RNA polymerase, RDRs) χαρακτηρίζονται από μια συντηρημένη καταλυτική επικράτεια η οποία απαιτείται για την αντιγραφή του ssRNA σε dsRNA. Στην συνέχεια υπόκεινται σε επεξεργασία από τις DCL σε δευτερογενή siRNAs. Η δευτερογενής δεξαμενή siRNAs λειτουργεί ως υπόστρωμα για την διατήρηση και ενίσχυση της απόκρισης, συμβάλλοντας στην συστηματική σίγηση και κατ' επέκταση στην αντιική άμυνα του οργανισμού (Baulcombe, 2004; Carthew and Sontheimer, 2009).

Οι RDRs έχουν εντοπιστεί σε φυτά, μύκητες, πρώτιστα και στο C. elegans, αλλά απουσιάζουν από τη D. melanogaster και τα θηλαστικά (Bologna and Voinnet, 2014). Σε φυτικούς οργανισμούς έγει ταυτοποιηθεί μεταβαλλόμενος αριθμός γονιδίων RDR με πληθώρα βιολογικών δράσεων. Συγκεκριμένα, στο γονιδίωμα των A. thaliana και πιπεριάς (Capsicum annuum) έχει εντοπιστεί πως κωδικοποιούνται 6 πρωτεϊνες RDR ενώ στο N. benthamiana και Citrus sinensis 3 και 7, αντίστοιγα. (Wassenegger and Krczal. 2006: Qin al.. 2018: Sabbione et et al.. 2019). Σε φυτά, συμπεριλαμβανομένου του A.thaliana, έγει ανιγνευθεί η αντιική δράση των πρωτεϊνών RDR1 και RDR6 (Hunter et al., 2016) και αξίζει να αναφερθεί πως παρατηρήθηκε αυξημένη ευαισθησία φυτών σε μολύνσεις με DNA και RNA ιούς απουσίας των RDR1, RDR2, RDR6 (Pumplin and Voinnet, 2013).

1.2 Το γονίδιο SERRATE

Το γονίδιο SERRATE (SE) προσδιορίστηκε για πρώτη φορά στο φυτό A. thaliana, εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 και το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη τύπου C₂H₂ (zinc-finger) μήκους 720 αμινοξέων. Σύμφωνα με τους νόμους του Mendel, πρόκειται για ένα υπολειπόμενο αλληλόμορφο γονίδιο, μεταλλάγματα του οποίου εμφανίζουν θνησιμότητα κατά το εμβρυικό στάδιο σε ομόζυγη κατάσταση (Prigge and Wagner, 2001; Lobbes et al., 2006).

Η δομή της πρωτεΐνης SERRATE αποτελείται από 4 περιοχές : την αμινοτελική επικράτεια (N-terminal), την καρβοζυτελική επικράτεια (C-terminal), την κεντρική επικράτεια (Central domain) και την επικράτεια δακτυλίων ψευδαργύρου (zinc-finger) (Machida et al., 2011) όπου ένα ιόν ψευδαργύρου δεσμεύεται από δύο κατάλοιπα κυστεϊνης και δύο κατάλοιπα ιστιδίνης (Εικόνα 1.6 A) (Englbrecht et al., 2004).

Το SERRATE εκφράζεται σε πληθώρα φυτικών ιστών του *A. thaliana*, με τα υψηλότερα επίπεδα mRNA SERRATE να ανιχνεύονται στα άνθη ενώ η χρώση GUS αποκάλυψε περαιτέρω την ιστο-ειδική έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου (Εικόνα 1.6 Γ). Ειδικότερα, βρέθηκε πως το SERRATE εκφράζεται σε όλο το εύρος των νεοαναπτυσσόμενων φύλλων, στα μεγαλύτερης ηλικίας φύλλα εκφράζεται μόνο περιφερειακά του ιστού (κυρίως στην κορυφή), ενώ δεν ανιχνεύθηκε στα ώριμα φύλλα. Σε επίπεδο ταξιανθίας, ανιχνεύθηκε σε αναπτυσσόμενα άνθη, ιδιαίτερα σε νεαρά κεράτια (siliques) και στην γύρη. Από τα παραπάνω υποδηλώνεται πως το SERRATE εκφράζεται σταθερά σε διάφορα φυτικά όργανα υποδηλώνοντας πιθανή συμμετοχή του σε αναπτυξιακούς μηχανισμούς και αποκρίσεις σε συνθήκες καταπονήσεων (Εικόνα 1.6 B) (Mou et al., 2021). Παρόμοια στοιχεία προέκυψαν και με την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων (Yang et al., 2006).



Εικόνα 1.6 Έκφραση του SERRATE στο φυτό *A. thaliana*. Α. Σχηματική απεικόνιση των επικρατειών του SE: Αμινοτελικό άκρο (N), Κεντρική επικράτεια (Mid), επικράτεια δακτύλων ψευδαργύρου (Zn Finger) Τρισδιάστατη δομή του SE (μορφή κορδέλας). Αμινοτελική επικράτεια (πράσινο χρώμα), Κεντρική επικράτεια (Κυανό χρώμα), Επικράτεια δακτύλων ψευδαργύρου (Μωβ χρώμα) (Machida et al., 2011) B) Στύπωμα κατά northern Γ) Χρώση β-γλυκουρονιδάσης (GUS) του SE: a) Φύλλο b) Άνθος c) Ρίζα d) Σπορόφυτο 20 ημερών e) Ταξιανθία (Mou et al, 2021).

Όσο αφορά το πλήθος των αντιγράφων του SERRATE, στο γονιδίωμα των φυκών εντοπίστηκε ένα μοναδικό αντίγραφο του γονιδίου, ενώ σε ορισμένα εμβρυόφυτα (βρύα, φτέρες) ο γενετικός τόπος έχει υποστεί διπλασιασμό. Φυτικοί οργανισμοί όπως το Gingko και το ρύζι περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα του SERRATE στο γονιδίωμα τους, και αυτό του αραβόσιτου να κωδικοποιεί τουλάχιστον 4 γονίδια (Wang et al., 2021).

Σύμφωνα με μελέτες, στους ζωικούς οργανισμούς, το ορθόλογο γονίδιο του SERRATE, το ARS2 (Arsenite Resistance Gene 2), προσδίδει ανθεκτικότητα στο αρσενικό. Ορθόλογα γονίδια εντοπίζονται στα γονιδιώματα των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών, (εξαιρουμένου του Saccharomyces cerevisiae) με την κωδικοποιημένη πρωτεΐνη να θεωρείται εξαιρετικά συντηρημένη καθώς εμφανίζει στα θηλαστικά 98% ομολογία (identity) αμινοξέων (Rossman and Wang, 1999; Wilson et al., 2008). Μεταλλάξεις του γονιδίου στο zebrafish (Danio rerio) έχει ως αποτέλεσμα θνησιμότητα του οργανισμού σε εμβρυικό στάδιο (Golling et al., 2002). Ομοίως, απουσία έκφρασης του γονιδίου ARS2 στην Drosophila οδηγεί σε νέκρωση υπογραμμίζοντας την αναπτυξιακή του αναγκαιότητα (Sabin et al., 2009).

Σε επίπεδο φυτικών οργανισμών, το γονιδίωμα της σόγιας (Glycine max) και του σόργου (Sorghum bicolor) κωδικοποιούν τρία ομόλογα γονίδια του A. thaliana SERRATE, τα οποία εμφανίζουν 75% και 50-67% ομοιότητα αλληλουχίας, αντίστοιχα (Liu et al., 2014). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η αλληλουχία των αμινοξέων στα μονοκοτυλήδονα φυτά κυμαίνεται στο 90% και στα δικοτυλήδονα περίπου στο 60% (Prigge and Wagner, 2001). Κατόπιν στοίχισης των αλληλουχιών του SERRATE σε

φυτά της οικογένειας Solanaceae Nicotiana benthamiana, Nicotiana tabacum και Solanum lycopersicum με αυτής του A. thaliana κατέδειξε σημαντική ομολογία της τάξης 66%, 67% και 69%, αντίστοιχα (Κρυοβρυσανάκη, 2019).

Παρά το γεγονός της μικρής ομολογίας μεταξύ ζώων, φυτών και μυκήτων σε επίπεδο αμινοξέων (11-15%) παρατηρείται πως η αλληλουχία και η διάταξη των 4 επικρατειών στα ορθόλογα γονίδια είναι συντηρημένη.

1.2.1 Ο μοριακός ρόλος του SERRATE

Τα βασικά στάδια της έκφρασης των γονιδίων περιλαμβάνουν την μεταγραφή, την ωρίμανση του RNA, μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα και την μετάφραση του (Taiz et al, 2015; Speth et al., 2018). Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης θεωρείται θεμελιώδης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τροποποιήσεις στην γονιδιακή έκφραση ως απόρροια περιβαλλοντικών ερεθισμάτων ή αναπτυξιακών διεργασιών κατέχουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη, αύξηση και άμυνα των φυτών. Σύμφωνα με μελέτες, το SERRATE, είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που βρέθηκε πως συμβάλλει στην γονιδιακή έκφραση μέσω συμμετοχής στην ωρίμανση των miRNAs και τροποποιήσεων της χρωματίνης. Ειδικότερα, ρυθμίζει το μήκος των αναπτυξιακών φάσεων και την οργάνωση του μεριστώματος. Συμμετέχει στο σχηματισμό των νεαρών φύλλων, στον έλεγχο ανάπτυξης του φυλλώματος, στην καταστολή της άνθισης και στην αρχιτεκτονική της ταξιανθίας (Prigge and Wagner, 2001; Clarke et al., 2002; Grigg et al., 2005).

Όπως αναφέρθηκε, στους φυτικούς οργανισμούς η DCL1, SERRATE και HYL1 σχηματίζουν το Microprocessor complex και εντοπίζονται στα Dicing-bodies. Συγγρόνως, το SERRATE ανιγνεύεται και στις ειδικές δομές nuclear speckles όπου περιέχονται splicing factors, πρωτεΐνες πλούσιες σε σερίνη/αργινίνη (Ali et al., 2003; Fang and Spector, 2007). Μέσω της συντονισμένης δράσης των SERRATE και HYL1 διασφαλίζεται η πιο αποτελεσματική, ταχύτερη και λεπτομερής επεξεργασία των primiRNAs και pre-miRNAs από την DCL1 συνθήκη που επιβεβαιώνεται από μελέτες σε μεταλλάγματα se και hyll στο A. thaliana καθώς παρατηρείται συσσώρευση των primiRNAs και μείωση των ώριμων miRNAs (Yang et al., 2006; Lobbes et al., 2006; Han et al., 2004; Dong et al., 2008; Iwata et al., 2013). Σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές, το SERRATE αλληλεπιδρά με το RNA μέσω του συντηρημένου αμινοτελικού άκρου του και προσδένεται στην DCL1 μέσω της αμινοτελικής και δακτύλων ψευδαργύρου επικρατειών του προάγοντας την πιστότητα της επεξεργασίας (Εικόνα 1.7) (Iwata et al., 2013). Παράλληλα, υποστηρίζεται πως το SERRATE λειτουργεί ως υπόστρωμα των κινασών SnRK2 συνδέοντας τη βιογένεση και τη συσσώρευση των miRNAs με τα σηματοδοτικά μονοπάτια του αμπσισικού οξέος (ABA) και οσμωτικής καταπόνησης (Yang et al., 2017).





Cleavage or translational inhibition

Εικόνα 1.7 Συμμετοχή της πρωτεΐνης SERRATE στο στάδιο επεξεργασίας των pri-miRNAs και των pre-miRNAs για το σχηματισμό των ώριμων miRNAs (Khraiwesh et al., 2012).

Επίσης, υποστηρίζεται ο διττός ρόλος του SERRATE συμμετέχοντας τόσο στην ωρίμανση όσο και στην αποικοδόμηση των pri-miRNAs αλληλεπιδρώντας με το σύμπλοκο NEXT (nuclear exosome targeting) στο φυτό *A. thaliana* (Bajczyk et al., 2020). Αξίζει να σημειωθεί, πως η RNA-biding πρωτεΐνη MAC5 αλληλεπιδρά με το SERRATE και προσδένεται σε pri-miRNAs αναστέλλοντας το κατακερματισμό τους διαμέσου της δράσης των εξωριβουνουκλεασών XRN2/XRN3 (Li et al., 2020).

Δεδομένου του κρίσιμου ρόλου του SERRATE στο μεταβολισμό του RNA, η λειτουργία του είναι καθοριστικής σημασίας για την διασφάλιση της απαιτούμενης συσσώρευσης και επεξεργασίας των miRNAs και των μετάγραφων-στόχων τους. Αποδείχθηκε πως η πρωτεΐνη PRP4KA (pre-mRNA processing 4 kinase A) φωσφορυλιώνει το SERRATE. Μόλις υπερφωσφορυλιωθεί, παύει να δεσμεύεται με τη HYL1 και αποικοδομείται τάχιστα από το 20S πρωτεόσωμα, ρυθμίζοντας κατ' επέκταση την απαιτούμενη ποσότητα του στο κύτταρο. Η ρύθμιση του μεταβολισμού του RNA είναι εφικτή μέσω του ελέγχου της συσσώρευσης των κύριων παραγόντων του Microprossecor complex, συμπεριλαμβανομένου του SERRATE, στους ευκαρυώτες σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο (Wang et al., 2022). Σύμφωνα με μελέτες, το SERRATE βρέθηκε πως συμμετέχει και σε άλλα μοριακά μονοπάτια, όπως αυτού του ματίσματος και του εναλλακτικού ματίσματος των pre-miRNAs καθώς αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες CBP20, CBP80 του CBC (cap-binding protein complex) (Laubinger, 2008; Raczynska et al., 2014). Ακόμα, υποστηρίζεται πως se μεταλλάγματα σε φυτά *A. thaliana* επηρεάζουν την έκφραση μεταθετών στοιχείων (transposable elements, TEs) και μεγάλου μήκους ενδογενών μη κωδικών περιοχών (long non-coding RNAs, lncRNAs) (Laubinger et al., 2010; Liu et al., 2012). Επιπλέον, το SERRATE αλληλεπιδρά με τις μεθυλοτρανσφεράσες ATXR5 και ATXR6 που προάγουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος του *A. thaliana* και την καταστολή της έκφρασης των TEs. Παράλληλα δρα ως καταστολέας της RDR6-εξαρτώμενης σίγησης προστατεύοντας τα μετάγραφα των TEs (Ma et al., 2018). Ουσιαστικά, το SERRATE λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας μεταξύ της RNA σίγησης και των επιγενετικών μηχανισμών για την έκφραση των μεταθετών στοιχείων στοιχείων

Σε επίπεδο καταπονήσεων, αναφέρεται η συσχέτιση του SERRATE σε μεταγραφικό επίπεδο με πληθώρα γονιδίων που δεν περιέχουν εσώνια (introns), πολλά από τα οποία σχετίζονται με την απόκριση σε καταπονήσεις (Speth et al., 2018), όπως συνθήκες υψηλής αλατότητας (Mou et al., 2021) και ξηρασίας (Li et al., 2020). Ταυτόχρονα, το SERRATE προτείνεται ως θετικός ρυθμιστής στην άμυνα έναντι του μύκητα *Botrytis cinerea* δρώντας συνεργιστικά με γονίδια που σχετίζονται με την επιδερμίδα του *A. thaliana* καθώς μεταλλάγματα se-1 είναι πιο ευαίσθητα σε μολύνσεις με μύκητες (Voisin et al., 2009). Σε βακτηριακές μολύνσεις με το *Pseudomonas syringae*, κατά τα τελευταία στάδια της μόλυνσης το mir863 αλληλεπιδρά με το SERRATE μειώνοντας την έκφραση του προκειμένου να καταστείλλει τον αμυντικό μηχανισμό μετά την επιτυχημένη απόκριση του φυτού έναντι του παθογόνου (Niu et al., 2016). Επίσης, υπογραμμίζεται ο κρίσιμος ρόλος του ενδογενούς μονοπατιού της RNA σίγησης καθώς σε διαγονιδιακά φυτά με μειωμένη έκφραση του SERRATE παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του τίτλου των ιοειδών PSTVd και HSVd σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου *N. benthamiana* και *N. tabacum* (Kryovrysanaki et al., 2019).

1.2.2 Φαινότυπος se μεταλλαγμάτων

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές το γονίδιο SERRATE συμμετέχει στα αναπτυξιακά στάδια των φυτικών οργανισμών όπως η οργανογένεση και εκφράζεται από το εμβρυικό στάδιο έως την άνθιση. Φυτά *A. thaliana* με κατεσταλμένο το γονίδιο παρουσιάζουν πλειοτροπικό φαινότυπο με το σύνολο των χαρακτηριστικών να κυμαίνεται μεταξύ θνησιμότητας σε εμβρυικό στάδιο έως φαινότυπο ανάλογο φυτών αγρίου τύπου. Αναλυτικότερα, καταγράφηκε σε se μεταλλάγματα μείωση του ρυθμού ανάπτυξης της ρίζας και του φυλλώματος, αποκλίσεις στον αριθμό των κοτυληδόνων και του μήκους των μεσογονάτιων διαστημάτων (Prigge and Wagner, 2001). Σε φυτά με μειωμένη έκφραση του SERRATE παρατηρήθηκε καθυστερημένη έκπτυξη του φυλλώματος, μειωμένος αριθμός φύλλων και φυλλικής επιφάνειας παρουσία οδοντώσεων στο έλασμα (Εικόνα 1.8 Β, Γ). Επίσης, γεγονότα όπως η ρύθμιση του μήκους των αναπτυξιακών φάσεων και η απουσία του πρώιμου νεανικού σταδίου V1 των φύλλων υπογραμμίζουν το ρόλο του SERRATE στη μετάβαση από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση των φυτών.

Ταξιανθίες παρουσίασαν μεγαλύτερο αριθμό ανώριμων ανθέων (υποδηλώνοντας βραδύτερο ρυθμό ωρίμανσης τους) αυξημένη τάση παραγωγής σέπαλων και πέταλων και μικρότερο αριθμό στημόνων συγκριτικά με αγρίου τύπου φυτά. Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω δεν αποτυπώθηκε διαφορά στο χρόνο άνθισης μεταξύ των μεταχειρίσεων, ανεξαρτήτως φωτοπεριόδου (Clarke et al., 2002). Παράλληλα, σε se-1 μεταλλάγματα παρατηρήθηκε υπερευαισθησία στην αναστολή της βλάστησης λόγω του αμπσικικού οξέος (ABA) ενώ σε φυτά με υψηλότερη καταστολή του γονιδίου SERRATE (se-2 se-3) παρουσιάζονται σοβαρότερα συμπτώματα όπως παραμορφώσεις φύλλων, καθοδική κύρτωση αυτών, τα οποία συσχετίζονται με τα επίπεδα microRNAs (Bezzera et al., 2004; Grigg et al., 2005).



Εικόνα 1.8 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός φυτών αγρίου τύπου (Wild Type) και se μεταλλαγμάτων A. thaliana A-Γ. και N. tabacum Δ-Z A. Περίγραμμα φύλλων ροζέτας σε φυτά αγρίου τύπου και se μεταλλαγμάτων με τα τελευταία να παρουσιάζουν μικρότερο αριθμό φύλλων και οδοντώσεις στο ελασμα. Β. Απεικόνιση φυλλώματος φυτών αγρίου τύπου και se μεταλλαγμάτων. Γ. Σύγκριση ταξιανθιών φυτών αγρίου τύπου και se μεταλλαγμάτων. Το βέλος υποδεικνύει μια μη φυσιολογική συστάδα ανθέων (Prigge and Wagner, 2001). Δ. Σύγκριση ανάπτυξης κεντρικού στελέχους Ε. Άνω και κάτω επιφάνεια φύλλων Ζ. Παράθεση αναπτυξιακών χαρακτηριστικών μεταξύ SE 5.1i διαγονιδιακών και αγρίου τύπου τύπου φυτών (Kryovrysanaki et al., 2019).

Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά διαγονιδιακών φυτών *N. tabacum* με καταστολή της έκφρασης του SERRATE ήταν κυρίως μειωμένη ανάπτυξη του κεντρικού στελέχους, κοντύτερα μεσογονάτια διαστήματα και καθυστερημένη ανθοφορία σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου. Συμπληρωματικά, παρατηρήθηκε σε ορισμένα φυτά κύρτωση των νεότερων φύλλων προς τα κάτω και μερικώς αυξημένη ανάπτυξη πλευρικών βλαστών (Εικόνα 1.8 Δ, Z) (Kryovrysanaki et al., 2019).

1.3 Βιοτική καταπόνηση

Οι φυτικοί οργανισμοί υπόκεινται σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών καταπονήσεων που επενεργούν αρνητικά στην αύξηση, την ανάπτυξη και τελικά την παραγωγικότητα των καλλιεργειών. Οι καταπονήσεις κατηγοριοποιούνται σε δύο ειδών, τις αβιοτικές και βιοτικές. Αβιοτικές καταπονήσεις μπορούν να χαρακτηριστούν η ξηρασία, η αλατότητα, οι ακραίες θερμοκρασίες, η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών κλπ. ενώ στις βιοτικές συγκαταλέγονται οι προσβολές από ζωντανούς οργανισμούς όπως ιοί, βακτήρια, έντομα, φυτοπαθογόνους μύκητες, νηματώδεις και μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές απώλειες είτε προ- είτε μετασυλλεκτικά. Δεδομένης της αδυναμίας των φυτών να μετακινηθούν προς ευνοϊκότερα περιβάλλοντα έχουν αναπτύξει μηγανισμούς απόκρισης έναντι των συνθηκών που παρεμποδίζουν την εύρυθμη λειτουργία τους. Κατά την έκθεση των φυτικών οργανισμών σε συνθήκες βιοτικής καταπόνησης ενεργοποιούνται πολύπλοκοι μηγανισμοί σηματοδότησης που περιλαμβάνουν σειρά αποκρίσεων που εκφράζονται σε μορφολογικό, βιογημικό και μοριακό επίπεδο όπως η τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση, κυτταρικός μεταβολισμός, αλλαγές στον ρυθμό αύξησης, μείωση αποδόσεων (Gull et al., 2019; Chen et al., 2020) Παρά τις γεωργικές πρακτικές, τη χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων και ανθεκτικών ποικιλιών υπολογίζεται πως το 20-40% της παγκόσμιας φυτικής παραγωγής καταστρέφεται προσυλλεκτικά λόγω προσβολών από φυτοπαθογόνους οργανισμούς (Dangl et al., 2013; Khan et al., 2021).

1.3.1 Ioí

Οι ιοί είναι υπογρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα που εξαρτώνται πλήρως από τους ξενιστές τους για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής τους. Έχουν την ικανότητα να μολύνουν είτε φυτά είτε και ζώα και αποτελούν σοβαρή απειλή για την παραγωγικότητα των καλλιεργειών και την ανθρώπινη υγεία. Οι ιοί έχουν την δυνατότητα για να δημιουργούν μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων που τους επιτρέπουν τάχιστα να προσαρμοστούν σε νέες περιβαλλοντικές συνθήκες. Όσο αφορά τη δομή του γονιδιώματος τους, οι φυτικοί ιοί έγουν σγετικά μικρά γονιδιώματα που συνίστανται από DNA ή RNA, μονόκλωνης ή δίκλωνης μορφής, από το οποίο κωδικοποιείται μικρός αριθμός πρωτεϊνών για να υποστηρίξουν τον κύκλο ζωής και την μετάδοση τους. Αναδιπλασιάζονται μόνο μέσα σε ζωντανά κύτταρα των οργανισμών ξενιστών χρησιμοποιώντας RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση ή αντίστροφη μεταγραφάση που κωδικοποιείται από το δικό τους γονιδίωμα (οι DNA ιοί αξιοποιούν τη DNA ρεπλικάση των ξενιστών τους) και τα ιοειδή χρησιμοποιούν την DNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση που κωδικοποιείται από τον ξενιστή (Wang et al., 2012; Prasad and Prasad, 2021). Οι ιοί προκαλούν πληθώρα συμπτωμάτων στους φυτικούς οργανισμούς όπως μείωση ρυθμού ανάπτυξης, μάρανση, αναπτυξιακές ανωμαλίες, μωσαϊκό, χλωρώσεις και νεκρωτικές κηλίδες (Hull, 2002).

Οι φυτικοί οργανισμοί διαθέτουν πληθώρα αμυντικών μηχανισμών έναντι ιολογικών προσβολών είτε σε μορφολογικό/δομικό είτε σε βιοχημικό επίπεδο. Αναλυτικότερα, τα φυτά έχουν αναπτύξει φυσικούς φραγμούς (ύπαρξη κήρων και τριχιδίων, πάχος εφυμενίδας και κυτταρικών τοιχωμάτων) προκειμένου να αποτρέψουν την μετάδοση

μέσω των φορέων εντόμων. Επιπλέον, ανέπτυξαν μηχανισμούς όπως η αναγνώριση μέσω εξωκυττάριων υποδοχέων υψηλής συγγένειας εξελικτικά συντηρημένων τμημάτων των συστατικών των παθογόνων (μοριακών μοτίβων παθογόνων ή μικροβίων, pathogen or microbial–associated molecular patterns, PAMPs or MAMPs). Κατόπιν αναγνώρισης των συστατικών αυτών ενεργοποιείται ένας ενδογενής αμυντικός μηχανισμός (PAMP-triggered immunity, PTI). Επίσης, η επαγωγή του μηχανισμού της RNA σίγησης, μέσω της οποίας τα φυτικά κύτταρα-ξενιστές προστατεύονται από εξωγενή νουκλεϊκά οξέα και μεταθετά στοιχεία, καθώς δίκλωνα RNA μόρια τους (double strand RNA, dsRNA) υπόκεινται σε επεξεργασία από ενδονουκλεάσες σε μικρά RNA μεγέθους 21-24 νουκλεοτιδίων τα οποία χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την σίγηση των παθογόνων οργανισμών (Bari and Jones, 2008; Dangl et al., 2013; Leoneti et al., 2021).

1.3.1.1 Ο ιός του μωσαϊκού του αγγουριού

Ο ιός του μωσαϊκού του αγγουριού (Cucumber Mosaic Virus, CMV) ανήκει στο γένος Cucumovirus της οικογένειας Bromoviridae. Είναι από τους πιο διαδεδομένους φυτικούς ιούς παγκοσμίως με εύρος ξενιστών που ξεπερνάει τα 1200 είδη σε 100 οικογένειες, συμπεριλαμβανομένου μονοκότυλα και δικότυλα φυτά, οπωροκηπευτικά πόες, δέντρα και θάμνους ενώ είναι υπεύθυνος για τεράστιες αγρονομικές απώλειες. (Scholthof et al., 2011; Ohshima et al., 2016). Χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό ποικιλότητας το οποίο επιβεβαιώνεται από πλήθος απομονώσεων που διαφέρουν τόσο σε βιολογικές όσο και σε μοριακές ιδιότητες. Η μετάδοση του ιού μπορεί να επιτευχθεί μέσω των σπόρων, μηγανικά ή μέσω αφίδων με μη έμμονο τρόπο. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 80 είδη αφίδων ως φορείς του CMV ενώ δεν αναπαράγεται στο φορέα του και δεν μεταδίδεται στους απογόνους του εντόμου. Επιπλέον, η μηχανική μετάδοση και η υψηλή συσσώρευση του σε μολυσμένους ξενιστές είναι γαρακτηριστικά τα οποία διευκολύνουν τον πειραματικό του γειρισμό και καθιστούν τον CMV ιδανικό μοντέλο για έρευνα (Jacquemond, 2012; Li et al., 2020). Το εύρος της συμπτωματολογίας συσχετίζεται με το είδος του ξενιστή, το στέλεγος του CMV και τις περιβαλλοντικές συνθήκες με την εμφάνιση χλώρωσης, μωσαϊκού, δυσπλασιών στα φύλλα νανισμό και ολική νέκρωση να αποτελούν τυπικά συμπτώματα (Moshizuki and Ohki, 2011).



1.3.1.2 Γονιδίωμα του CMV

Εικόνα 1.9 Γονιδιωματική οργάνωση του ιού CMV (Jacquemond, 2012).

Τα σωματίδια του CMV είναι εικοσαεδρικά και έχουν διάμετρο 29nm, το καθένα από τα οποία αποτελείται από 180 υπομονάδες μιας καψιδιακής πρωτεΐνης (Coat protein, CP) μεγέθους 24kDa και ένα από τα τρία γενωμικά RNAs. Με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία, τα στελέχη του CMV μπορούν να διαχωριστούν σε 2 βασικές υποκατηγορίες (Ι και ΙΙ) με τα στελέγη που ανήκουν στην υποκατηγορία Ι να κατηγοριοποιούνται σε 2 υποομάδες (Α και Β). Το γονιδίωμα του CMV αποτελείται από τρία γραμμικά, μονόκλωνα θετικής πολικότητας γενωμικά RNAs (RNA1, RNA2, RNA3) και τα υπογενωμικά RNAs 4 και 4Α (Εικόνα 1.9). Ως εκ τούτου ο CMV είναι ένας ιός, όπου απαιτούνται τριών ειδών σωματίδια για επιτυγείς μολύνσεις σε φυτά. Οι πρωτεΐνες 1a και 2a συμμετέγουν στην αναπαραγωγή του ιού, ενώ η 2b πρωτεΐνη είναι καταστολέας της RNA σίγησης. Οι πρωτεΐνες 3a και CP είναι καθοριστικής σημασίας για την μετακίνηση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο, αλλά και για την μεταφορά του σε μακρινές αποστάσεις, διεργασία που επηρεάζεται από όλες τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τον ιό. Οι πρωτεΐνες 2b και CP εκφράζονται από τα υπογενωμικά RNAs, RNA 4A και RNA 4 αντίστοιχα (Scholthof et al., 2011). Το RNA5 είναι παρόν σε κάποια στελέγη του CMV και αποτελείται από μικτό πληθυσμό μήκους περίπου 300 νουκλεοτιδίων που προέργονται από το ατελώς συντηρημένο 3' άκρο των γενωμικών RNAs 2 και 3 (Blanchard et al., 1996; Galliteli, 2000). Επίσης, ο ιός φέρει δορυφορικά RNA 330-390 νουκλεοτιδίων, μερικά από τα οποία προκαλούν θανατηφόρα νέκρωση στην ντομάτα, γλώρωση στον καπνό, την πιπεριά ή την ντομάτα. Αξίζει να αναφερθεί πως μερικά δορυφορικά RNAs εξασθενούν τα συμπτώματα που προκαλεί ο CMV στους περισσότερους ξενιστές που εξετάστηκαν (Palukaitis and García-Arenal, 2003).

1.3.1.3 Ο ιός του κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας

Ο ιός του κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV) ανήκει στο γένος Orthotospovirus της οικογένειας Tospoviridae (ICTV, 2020), το μοναδικό γένος της οικογένειας που δύναται να μολύνει φυτικούς οργανισμούς (Pappu, et al., 2009). Το εύρος ξενιστών του ξεπερνάει τα 1000 είδη σε 85 οικογένειες, συμπεριλαμβανομένου μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά, υψηλής αγρονομικής σημασίας καλλιέργειες όπως ντομάτα, πιπεριά, μαρούλι, φιστικιά κλπ. (Parella et al, 2003; Scholthof et al., 2011). Τα συμπτώματα παθογένειας που μπορεί να προκαλέσει είναι χλώρωση, νεκρωτικές κηλίδες, αναστολή βλαστητικής ικανότητας, νέκρωση νεαρών φυταρίων. Αν και πρώιμη μόλυνση φυτών μπορεί να προκαλέσει ολική καταστροφή καλλιεργειών, συχνότερο φαινόμενο είναι η μείωση των συνολικών αποδόσεων και προσυλλεκτική υποβάθμιση των καρπών (Sevik and Arli-Sokmen, 2012). Η εμφάνιση και η ένταση των συμπτωμάτων ποικίλλει ανάλογα το γονότυπο, το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, το στέλεχος του ιού και τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η θερμοκρασία (Nilon et al., 2021). Όσο αφορά την καλλιέργεια της ντομάτας, φυτά μολυσμένα με τον TSWV σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης παρατηρείται νανισμός, νέκρωση οφθαλμών, πορτοκαλόγρους μεταχρωματισμός και συστροφή των σύνθετων φύλλων. Στη συνέχεια, τα νεύρα των φύλλων αποκτούν μωβ απόχρωση και σχηματίζονται σκουρόχρωμες κηλίδες στην επιφάνεια των φύλλων. Στο στάδιο του πράσινου καρπού, εμφανίζονται βυθισμένοι γλωρωτικοί δακτύλιοι και ξεθωριασμένες νεκρωτικές κηλίδες ενώ κατά την ωρίμανση του καρπού, οι δακτύλιοι είναι κίτρινου-λευκού χρώματος (Εικόνα 1.10) (Qi et al.,

2021). Κατά την διάρκεια μηχανικών μολύνσεων σε φυτά όπως *N. benthamiana, N. Glutinosa, N. tabacum*, η συμπτωματολογία αφορά κυρίως την εμφάνιση μωσαϊκού και τελικά νέκρωση ολόκληρου του φυτού ειδικά στα *N. benthamiana* (Parella et al., 2003). Ο TSWV μεταδίδεται αποκλειστικά μέσω των εντόμων-φορέων που ανήκουν στην οικογένεια Thripidae (θρίπες) με έμμονο τρόπο, ενώ ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως οι θρίπες είναι ικανοί φορείς του ιού όταν έχουν τραφεί με μολυσμένο ιστό στο πρώτο ή δεύτερο προνυμφικό στάδιο (Van De Wetering et al., 1996; Pappu et al., 2009). Ο ιός πολλαπλασιάζεται στο μέσο έντερο και τους παρακείμενους ιστούς, μεταφέρεται και παραμένει στους σιελογόνους αδένες των φυτοφάγων εντόμων, μολύνοντας το φυτό-ξενιστή κατά την διάρκεια της σίτισης του θρίπα (Nagata et al., 1999). Έχουν αναγνωριστεί 9 είδη θριπών ως φορείς του TSWV (*Frankliniella bispinosa F. cephalica F. fusca F. gemina F. intonsa F. occidentalis F. schultzei Thrips setosus T. tabaci*). Είναι δυνατόν ο TSWV να μεταδοθεί μηχανικά σε πειραματικές συνθήκες με αυξημένο βαθμό δυσκολίας, ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να μεταδοθεί μέσω σπόρων (Whitfield et al., 2005; Pappu et al., 2009; Rotenberg and Whitfield, 2018).



Εικόνα 1.10 Συμπτώματα μόλυνσης με TSWV σε φυτά και καρπούς ντομάτας (Qi et al., 2021)

1.3.1.4 Γονιδίωμα του TSWV

Ο TSWV χαρακτηρίζεται από σφαιρικά ιοσωμάτια διαμέτρου 80-120mm που περιβάλλονται από μια λιπιδική μεμβράνη προερχόμενη από τον ξενιστή στην επιφάνεια της οποίας είναι αγκυροβολημένες 2 ιικές γλυκοπρωτεΐνες (GN και Gc) που σχηματίζουν ακίδες και είναι απαραίτητες για την μεταδοτικότητα του ιού μέσω τον θριπών φορέων. Το εσωτερικό του ιοσωματίου περιέχει τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RNPs) οι οποίες αποτελούνται από τρία γενωμικά μόρια RNA που περιβάλλονται από την νουκλεοκαψιδιακή πρωτεΐνη (N) και από μόρια της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RdRP) (Turina et al., 2016). Το ιικό γονιδίωμα αποτελείται από 3 αρνητικής ή αμφίπλευρης πολικότητας RNAs που ορίζονται ως L (large ~8,9kb) M (medium ~4.8kb) και S (small ~2,9kb), σύμφωνα με τα μεγέθη τους (Εικόνα 1.11) (Adkins, 2001). Τα πρώτα 8 νουκλεοτίδια στα άκρα όλων των τμημάτων RNA είναι εξαιρετικά συντηρημένα και συμπληρωματικά (5'-AGAGCAAU and 3'-UCUGCUUA), γεγονός που είναι σύνηθες για τους RNA ιούς αρνητικής πολικότητας

που αποτελούνται από πολλά μόρια Το L RNA είναι αρνητικής πολικότητας και περιέχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) που κωδικοποιεί τη RdRP. Αμφότερα το M και το S RNA, ακολουθούν μια διπλή στρατηγικής έκφραση (ambisense polarity), κωδικοποιώντας δύο μη αλληλο-επικαλυπτόμενα ORF, τα οποία διαχωρίζονται από μια σύντομη ενδιάμεση αλληλουχία (intergenic region, IR). Η IR είναι πλούσια σε Α και U, η οποία διπλώνει και σχηματίζει μια σταθερή δομή φουρκέτας (hairpin). Συνεπάγεται πως το ιικό γονιδίωμα κωδικοποιεί 5 πρωτεΐνες. Το M RNA κωδικοποιεί στη θετικής πολικότητας αλυσίδας του μια 34 kDa μη δομική πρωτεΐνη NSM, η οποία συμμετέχει στην μετακίνηση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο ενώ από της αρνητικής πολικότητας αλυσίδα κωδικοποιείται μια 127 kDa πρωτεΐνη, που αποτελεί το πρόδρομο μόριο των γλυκοπρωτεϊνών (GN και Gc) που σγηματίζουν τις ακίδες στην επιφάνεια του ιοσωματίου. Το γενωμικό S RNA του TSWV κωδικοποιεί τη δεύτερη μη δομική πρωτεΐνη NSs, η οποία δρα σαν καταστολέας της ενώ από τη συμπληρωματική αλυσίδα κωδικοποιείται η RNA σίγησης, νουκλεοκαψιδιακή πρωτεΐνη (N) (Hull, 2002; Turina et al., 2016). Η σύσταση του ιοσωματίου είναι 5% νουκλεϊκό οξύ (RNA), 70% πρωτεΐνη, 5% υδατάνθρακας και 20% λιπίδια (Parrella et al., 2003).



Εικόνα 1.11 Γονιδιωματική οργάνωση του ιού TSWV (Hull, 2002)

1.3.1.5 Ο ιός μωσαϊκού του γογγυλιού

Ο ιός μωσαϊκού του γογγυλιού (Turnip Mosaic Virus, TuMV) ανήκει στο γένος Potyvirus της οικογένειας Potyviridae (ICTV, 2021). Το εύρος ξενιστών του ξεπερνάει τα 318 είδη συμπεριλαμβανομένου ζιζανίων, μονοκότυλων και δικότυλων φυτών. Θεωρείται υψηλής αγρονομικής σημασίας παγκοσμίως καθώς φυτά της οικογένειας Brassicaceae (καλλιεργούμενα και διακοσμητικά) είναι οι βασικοί ξενιστές του. Τα συμπτώματα παθογένειας συμπεριλαμβάνουν την αναστολή της ανάπτυξης, μωσαϊκό, ανθόρροια, αναπτυξιακές ανωμαλίες φυλλώματος, όπως κατσάρωμα (Martin et al., 1999). Σε περιοχές της Ευρώπης, Ασίας και Βόρεια Αμερικής έχουν αναφερθεί προσβολές του TuMV με μείωση των τελικών αποδόσεων των καλλιεργειών έως 70%. Σύμφωνα με μελέτες βρέθηκε πως μεταδίδεται από τουλάχιστον 89 είδη αφίδων με μη έμμονο τρόπο (Edwardson and Christie, 1986; Ohshima et al., 2002; Walsh and Jenner, 2002). Παράγοντες όπως το ευρύ φάσμα ξενιστών, η υψηλή γενετική μεταβλητότητα και ο τρόπος με τον οποίο μεταδίδεται ο TuMV καθιστούν τον έλεγχο του δύσκολο με τις παραδοσιακές τεχνικές όπως η χρήση χημικών εντομοκτόνων (Li et al., 2019).

1.3.1.6 Γονιδίωμα ΤυΜΥ

Τα ιοσωμάτια των Potyvirus είναι εύκαμπτα νηματοειδούς μορφής, μήκους 700-750nm, στα οποία περιέχεται ένα αντίγραφο του γονιδιώματος. Το γονιδίωμα του TuMV αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας μήκους 9830 νουκλεοτιδίων. Στο 5' άκρο του μορίου είναι συνδεδεμένη ομοιοπολικά η ιική πρωτεΐνη VPg και το 3' είναι πολυαδενυλιωμένο. Περιέχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη, η οποία υπόκειται σε επεξεργασία από τρεις πρωτεάσες ιικής προελεύσεως παράγοντας 10 ώριμες πρωτεΐνες P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, NIb και CP (Εικόνα 1.12) (Walsh & Jenner, 2002; Tomimura et al., 2004). Επιπλέον, υπάρχουν και 1-2 μικρά ORFs σε διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης. Ο ιός χαρακτηρίζεται επίσης από υψηλή ποικιλομορφία παθοτύπων λόγω υψηλού βαθμού παραγωγής μεταλλάξεων του γονιδιώματος του. Εκτός από τις P1, P3 οι υπόλοιπες παραγόμενες πρωτεΐνες θεωρούνται σχετικά συντηρημένες μεταξύ των γονιδιωμάτων του γένους Potyvirus (Tan et al., 2004). Η σύσταση του ιοσωματίου είναι 95% καψιδιακή πρωτεΐνη και 5% νουκλεϊκό οξύ (RNA).



Εικόνα 1.12 Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος του ιού TuMV. Το γονιδίωμα του ιού πλαισιώνεται από την 5΄ και 3΄ αμετάφραστη περιοχή (απεικονίζονται ως μαύροι ράβδοι). Επιπλέον, δύο ακόμα πρωτεΐνες προκύπτουν από την κωδική περιοχή της P3 σε μικρή ποσότητα κατά τη διάρκεια της αντιγραφής (Palukaitis and Kim, 2021).

1.3.2 Καταστολείς της RNA σίγησης

Αναφέρθηκε προηγουμένως πως η RNA σίγηση στους φυτικούς οργανισμούς λειτουργεί ως αμυντικός μηχανισμός έναντι των ιών, κατά την οποία παράγονται μικρά παρεμβαλλόμενα RNA, προερχόμενα από τον ιό λειτουργώντας ως υπόστρωμα καθοδήγησης (συγκεκριμένων) συμπλόκων της σίγησης. Απόρροια της RNA σίγησης είναι η αδρανοποίηση του ιικού γονιδιώματος. Ως απάντηση σε αυτή την άμυνα, οι ιοί κωδικοποιούν πολυλειτουργικές πρωτεΐνες που στοχεύουν διάφορα τμήματα του μηχανισμού της σίγησης (Viral suppressor of RNA silencing, VSR) και παράλληλα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού όπως αντιγραφή, ενθυλάκωση ή μετακίνηση του (Shimura and Pantaleo, 2011; Wang et al., 2012; Incarbone and Dunoyer, 2013). Επιπλέον, ένας μεμονωμένος τύπος ιού μπορεί να κωδικοποιεί περισσότερους από έναν διακριτούς VSRs όπως στην περίπτωση του ιού της τριστέζας εσπεριδοειδών (Citrus tristeza virus, CTV) (Lu et al., 2004).

Πριν την ανακάλυψη του μηχανισμού της σίγησης, οι πρωτεΐνες VSR ήταν γνωστές ως παράγοντες παθογονικότητας ή/και πρωτεΐνες μετακίνησης του ιού. Η ποικιλομορφία στην νουκλεοτιδική αλληλουχία και τη δομή των VSR εντός αλλά και μεταξύ των βασιλείων υπογραμμίζει το γεγονός της ανεξάρτητης εξέλιξης τους. Ορισμένα σημεία του μονοπατιού της σίγησης καταστέλλονται από την δράση των VSRs μέσω ποικίλλων μηχανισμών (Csorba et al., 2015; Li and Wang, 2019). Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η πρόσδεση σε μεγάλου μήκους dsRNA με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης Dicer (Incarbone and Dunoyer, 2013), η παρεμπόδιση του σχηματισμού του συμπλόκου RISC μέσω των πρωτεϊνών AGO και της πρόσδεσης των siRNA ή miRNA σε αυτό, η διατάραξη του μονοπατιού αποσύνθεσης του RNA και της αυτοφαγίας, η μεταγραφική ρύθμιση ενδογενών παραγόντων που ελέγχουν την σίγηση και κατ' επέκταση τη σηματοδότηση ορμονών ή την ανοσία βασιζόμενη σε πρωτεΐνες (Csorba et al., 2015; Li and Wang, 2018; Yang et al., 2018).

Η παρουσία των VSR σχεδόν σε κάθε τύπο φυτικών ιών υποδεικνύει τον εξέχοντα ρόλο τους στην συσσώρευση και την εξάπλωση τους στα φυτά-ξενιστές (Moissiard and Voinnet, 2004). Ο ιός TSWV, κωδικοποιεί τη NSs πρωτεΐνη που δρα ως καταστολέας της RNA σίγησης στα φυτά. Η δράση της έγκειται στην ικανότητα πρόσδεσης της σε long dsRNAs και siRNAs, αναστέλλοντας τον μηχανισμό της RNA σίγησης σε 2 στάδια, πριν και μετά την πέψη των dsRNAs από τις DCL (Takeda et al., 2002; Schnettler et al., 2010). Η 2b πρωτεΐνη που κωδικοποείται από το γονιδίωμα του CMV ήταν από τις πρώτες VSR που καταγράφηκε και βρέθηκε πως αλληλεπιδρά με την επικράτεια PAZ και μέρος της PIWI της AGO1 αναστέλλοντας την δραστηριότητα της (Brigneti et al., 1998; Zhang et al., 2006). Οι VSR που κωδικοποιούνται από τους ιούς της οικογένειας Potyviridae ονομάζονται HC-Pro (Helper Component-proteinase) και είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες. Η δράση τους έγκειται στο γεγονός της αποσταθεροποίησης ή πρόσδεσης τους στα siRNAs εμποδίζοντας το σχηματισμό του συμπλόκου RISC και στην τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης των φυτικών οργανισμών επηρεάζοντας την συσσώρευση των miRNAs, παρεμβαίνοντας στο ενδογενές μονοπάτι της σίγησης (Mallory et al., 2002; Kasschau et al., 2003; Burgyán and Havelda, 2011).

1.4 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη δύο γονοτύπων φυτών Nicotiana benthamiana, ενός αγρίου τύπου και ενός διαγονιδιακού SE 5.1i με μερική καταστολή του γονιδίου SERRATE, το οποίο έχει δυσλειτουργικό ενδογενές μονοπάτι της RNA σίγησης. Τα φυτά μελετήθηκαν κατόπιν μεμονωμένων μολύνσεων με τρεις διαφορετικούς ιούς, των CMV (Cucumovirus), TSWV (Orthotospovirus), TuMV (Potyvirus). Οι μηχανικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν στο αναπτυξιακό στάδιο των 4-6 πραγματικών φύλλων. Η απόκριση του υπό μελέτη γενετικού υλικού αξιολογήθηκε συγκριτικά με ανάλυση του RNA με υβριδοποιήσεις κατά northern και με φαινοτυπική παρατήρηση κατά την μόλυνση.

Συγκεκριμένα μελετήθηκε:

- Η επίδραση της μειωμένης έκφρασης του SERRATE στη μολυσματικότητα του ιού μωσαϊκού του αγγουριού (CMV) σε NbSEi φυτά
- Η επίδραση της μειωμένης έκφρασης του SERRATE στη μολυσματικότητα του ιού κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας (TSWV) σε NbSEi φυτά
- Η επίδραση της μειωμένης έκφρασης του SERRATE στη μολυσματικότητα του ιού μωσαϊκού του γογγυλιού (TuMV) σε NbSEi φυτά

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό-Συνθήκες ανάπτυξης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου N. benthamiana και ομόζυγα διαγονιδιακά φυτά T4 γενιάς που καταστέλλουν το γονίδιο SERRATE. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε κομπόστα και καλύφθηκαν με τη χρήση μεμβράνης για την αποφυγή απώλειας υγρασίας. Η αρχική βλάστηση και ανάπτυξη των φυταρίων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, υγρασία 40% και φωτοπερίοδος 8hrs φως/ 16 ώρες σκοτάδι) και σταδιακά αφαιρέθηκε η μεμβράνη προκειμένου να σκληραγωγηθούν. Στο στάδιο των 3 πραγματικών φύλλων, ακολούθησε η μεταφορά των σπορόφυτων σε θάλαμο του θερμοκηπίου (ελεγχόμενη θερμοκρασία 23οC) και πραγματοποιήθηκε η μεταφύτευση τους σε φυτοδοχεία με εδαφικό μείγμα κομπόστα-τύρφη-περλίτη σε αναλογία 3-2-1 και κατάλληλη ποσότητα λιπάσματος (12 N-12 P-7K). Ακολούθησε μια περίοδος ανάκαμψης, περίπου 10 ημερών, με σκοπό να ξεπεράσουν τα φυτά το στρες της μεταφύτευσης και της έκθεσης στις περιβαλλοντικές συνθήκες.

2.2 Μηχανικές Μολύνσεις- Συλλογή Ιστού

Στο στάδιο των 4-6 πραγματικών φύλλων ακολούθησαν οι μηγανικές μολύνσεις με τον ιό του κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας (Tomato wilt spotted virus, TSWV), με τον ιό του μωσαϊκού του αγγουριού (Cucumber mosaic virus, CMV) και με τον ιό μωσαϊκού του γογγυλιού (Turnip mosaic virus, TuMV). Συγκεκριμένα, οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση λειοτριβημένου ιστού προερχόμενο από μολυσμένο φυτό (μόλυσμα) με τον εκάστοτε ιό, διαλυμένο σε 50μΜ διάλυμα φωσφορικών (NaPO4 pH 6,8) σε αναλογία 1:4 και διατηρείται σε πάγο όλη τη διάρκεια της μόλυνσης. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε καρβίδιο του πυριτίου (carborundum) στην αξονική πλευρά των 2 νεαρότερων φύλλων του φυτού και με την γρήση πιπέτας τοποθετήθηκαν 30μL μολύσματος ανά φύλλο, στην περίπτωση του CMV και 15μL για τον TSWV και TuMV. Ακολούθησε επάλειψη με το χέρι και με το πέρας 5-10 λεπτών πραγματοποιείται ξέπλυμα της επιφάνειας του φύλλου με υδροβολέα, ώστε να μην καταστραφεί ολοκληρωτικά. Οι δειγματοληψίες έγιναν παρουσία αζώτου λαμβάνοντας κάθε φορά 2-3 διασυστηματικά φύλλα, ενώ προηγούνταν φαινοτυπική παρατήρηση και φωτογράφηση τυχαιοποιημένων φυτοδογείων. Όσο αφορά το πείραμα με τον CMV, πραγματοποιήθηκαν συνολικά 4 δειγματοληψίες, 7, 14, 21 και 28 μέρες μετά τις μηγανικές μολύνσεις (7, 14, 21, 28 days post infection, dpi αντίστοιγα) ενώ για τον TuMV ιστός συλλέχθηκε 7 και 14 μέρες μετά τις μολύνσεις (7, 14dpi) και τον TSWV 14 μέρες μετά τις μολύνσεις (14dpi).

2.3 Λειοτρίβιση ιστού

Η λειοτρίβιση του συλλεχθέντος ιστού έγινε με την χρήση γουδιών παρουσία υγρού αζώτου. Ωστόσο, 2 δειγματοληψίες από τα πειράματα του TSWV (1° και 2°) έγιναν με σημασμένα Eppendorf που περιείχαν 1 ατσάλινο bead και με την χρήση του TissueLyzer II (Qiagen) για 20s στα 29Hz λειοτριβήθηκαν δις. Όλα τα δείγματα

αποθηκεύτηκαν	σε	βαθιά	κατάψυξη	(-80oC)	για	περαιτέρω	χρήση.
				· · · · ·		1 1	7 1 1

Trizol	Τελική Συγκέντρωση
Φαινόλη	38%
Ισοθειοκυανική γουανιδίνη	0.8M
Ισοθειοκυανικό αμμώνιο	0,4M
Οξικό νάτριο pH 5.0 3M stock	0,1M
Γλυκερόλη	5%

2.4 Απομόνωση ολικού RNA

Η μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν με την χρήση Trizol και αποτελεί προσαρμογή του πρωτοκόλλου (Chomczynski and Sacchi, 2006). Για κάθε 100mg φυτικού ιστού προστίθεται Trizol σε αναλογία 1:10 ιστός: Trizol. Πραγματοποιείται έντονη ανάμιξη με vortex και επώαση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5min. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 15min στις 12600rpm και γίνεται μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο Eppendorf, όπου προστίθενται 200μL γλωροφορμίου. Ακολουθεί έντονη ανάμιξη με vortex, επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 15min στις 12600rpm, συλλογή του υπερκειμένου (χωρίς την μεσόφαση) και μεταφορά του σε νέο Eppendorf. Η κατακρήμνιση του RNA πραγματοποιείται με την προσθήκη 500μL ισοπροπανόλης και επώασης των δειγμάτων σε βαθιά κατάψυξη (-80oC) τουλάγιστον για 1h. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα, φυγοκεντρούνται στις 12000rpm για 30min στους 4oC, αφαιρείται το υπερκείμενο και ακολουθεί προσθήκη 70% v/v αιθανόλης για καθαρισμό του ιζήματος και φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 5min στους 4oC. Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίπτεται, τα δείγματα μεταφέρονται στους 65oC για 2-3 min προκειμένου να στεγνώσει η πελέττα και επαναδιαλύεται με 52μL αποστειρωμένου νερού. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρονται εκ νέου στους 65oC για 5min για καλύτερη διάλυση του περιεχόμενου RNA.

2.4.1 Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη χλωροφόρμιο

Επιπλέον, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο καθαρισμού με φαινόλη-χλωροφόρμιο σε δείγματα τα οποία σχημάτιζαν ίζημα ή δεν θεωρήθηκαν διαυγή κατόπιν της εξαγωγής του RNA. Αναλυτικότερα, έγινε επαναδιάλυση της πελλέτας σε 300μL αποστειρωμένου H20, προστέθηκε ίσου όγκου φαινόλης και μέσω vortex έγινε έντονη ανάδευση. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12000rpm για 4min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο όπου έγινε προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης αναλογίας 24:1 και έγινε έντονη ανάδευση τους. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 12000rpm για 4min, μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο φιαλίδιο και προσθήκη 1/10 του όγκου οξικού νατρίου (CH3COONA 3M pH 5.0) και αιθανόλης 100% σε αναλογία 2:1 αιθανόλη: υπερκείμενο για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους -20οC για τουλάχιστον 30min και φυγοκέντρηση τους για 30min στις 12000rpm στους 4οC. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 1500μL αιθανόλης 70% και φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου για 5min στις 12000rpm.
Αφαιρείται το υπερκείμενο, ακολουθεί στέγνωμα πελλέτας για 2-3min στους 65oC και επαναδιάλυση της σε αποστειρωμένο H20.

2.5 Ποσοτικοποίηση του RNA

Ο έλεγχος της ποιότητας και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του απομονωθέντος RNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους/ορατού (UV/Vis) (Nanodrop, ThermoFisher Scientific).

2.6 Στύπωμα κατά Northern

10x MOPS	
MOPS	0.2M pH 7.0
CH3COONa	20mM
EDTA 10mM pH 8.0	
Ρύθμιση pH με 2N NaOH (pH 7.0)	

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer 1L)

ddH20	882ml	
MOPS	100ml	
Φορμαλεΰδη	18ml	

Αποδιατακτικό Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης RNA (100ml)

ddH20	88.2ml
10x MOPS	10ml
Φορμαλεΰδη	1.8ml
Αγαρόζη	1gr (1% για ιούς, 1,5% για ιοειδή)
Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)	7μL (1mg/ml)

5x Χρωστική (loading buffer) 10ml

Φορμαλεΰδη720 μlΦορμαμίδη3084 μlEDTA 500mM pH 8.080μlBromophenol blue0.25% w/vΓλυκερόλη2ml		
Φορμαμίδη3084 μlEDTA 500mM pH 8.080μlBromophenol blue0.25% w/vΓλυκερόλη2ml	Φορμαλεΰδη	720 μl
EDTA 500mM pH 8.0 80μl Bromophenol blue 0.25% w/v Γλυκερόλη 2ml	Φορμαμίδη	3084 µl
Bromophenol blue 0.25% w/v Γλυκερόλη 2ml	EDTA 500mM pH 8.0	80µl
Γλυκερόλη 2ml	Bromophenol blue	0.25% w/v
	Γλυκερόλη	2ml
10x MOPS 4ml	10x MOPS	4ml
ddH20 Μέχρι τελικό όγκο 10ml	ddH20	Μέχρι τελικό όγκο 10ml

20x SSC, pH 7.0 (2L)	Methylene blue	
Χλωριούχο νάτριο (NaCl) 3Μ	CH ₃ COONa pH 5.0	0.3M
Κιτρικό νάτριο (Na-citrate) 0.3M	Methylene blue	0.03%
Ρύθμιση pH με HCl 1N (pH 7.0)		

Τα δείγματα ολικού RNA αναλύθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, φορτώθηκαν 5μg για κάθε δείγμα με αποστειρωμένο H20 και κατάλληλη ποσότητα γρωστικής (loading buffer 5x). Τα δείγματα επωάστηκαν για 5min στους 100oC ώστε να αποδιαταχθούν πιθανές δίκλωνες δομές και αφού έμειναν για 2-3min στον πάγο, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης στα 100V για περίπου 1h. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε επώαση του πηκτώματος σε απιονισμένο H20 ώστε να ξεπλυθεί η φορμαλεΰδη για 10 min δις και φωτογράφηση με UV. Εφόσον, τα φορτωμένα RNA είναι ισοφορτωμένα και καλής ποιότητας ακολουθεί επώαση του πηκτώματος σε 10x SSC για τουλάγιστον 15min υπό συνεγή ανάδευση. Έπειτα, το πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρθηκε από την ανάποδη πλευρά σε ειδική συσκευή, η οποία δημιουργεί γέφυρα από χαρτί Whatman που ήταν βυθισμένο σε 10x SSC διαλύματος και μέσω του τριχοειδούς φαινομένου επιτυγγάνεται η μεταφορά των RNA σε μεμβράνη νάιλον (Whatman, Nytran® N, 0.2 μm) εμβαπτισμένη σε 2x SSC διαλύματος όπως και 3 διηθητικά χαρτιά Whatman 3MM διαστάσεων 12,8cm x 13,8cm. Τέλος, τοποθετήθηκαν χαρτοπετσέτες και επιπλέον βάρος. Η μεταφορά των RNA ολοκληρώνεται με το πέρας 16-20hrs. Την επόμενη μέρα, και αφού έχει στεγνώσει η μεμβράνη νάιλον, τα μόρια RNA μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (RNA cross-linking) μέσω της συσκευής Stratalinker, Stratagene, USA συνολικής ενέργειας 1200 μJ/cm2. Πραγματοποιήθηκε ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση του ακινητοποιημένου RNA στην μεμβράνη υβριδισμού μέσω χρώσης με κυανό του μεθυλενίου (Methylene blue) και στη συνέχεια ξεπλύθηκε 5-10min uε απιονισμένο υπό ανάδευση. H20 συνεγή

Διάλυμα Προϋβριδισμού	Stock	Τελική Ποσότητα
SSC	20x	12,5ml
SDS	20%	2,5ml
Denhardt's	50x	1ml
t-RNA	5mg/ml	2,5ml
Φορμαμίδη	50% v/v	25ml
ddH20		Μέχρι τελικό όγκο 50ml

2.6.1 Διαδικασία μη ραδιενεργού υβριδισμού

Όσο αφορά την διαδικασία του υβριδισμού, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του μη ραδιενεργού υβριδισμού με κατάλληλο RNA ανιχνευτή (probe) σημασμένο με διγοξιγενίνη (Digoxygenin, DIG) και ανίχνευση του με τη βοήθεια ειδικού αντισώματος (anti-Dig). Αρχικά η μεμβράνη μεταφέρεται σε κύλινδρο υβριδισμού και επωάζεται για τουλάχιστον 1hr σε διάλυμα προϋβριδισμού στους 65oC υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, το διάλυμα απορρίπτεται και προστίθεται νέο στο οποίο έχει προστεθεί ειδικά σημασμένος με DIG ανιχνευτής (για τον εκάστοτε υπό μελέτη ιό) συγκέντρωσης 100ng/μL ο οποίος προηγουμένως επωάστηκε για 5min στους 100oC ώστε να αποδιαταχθούν πιθανές δίκλωνες δομές του και έμεινε στον πάγο για 3-5min. Στην περίπτωση του TSWV λόγω χαμηλής απόδοσης του northern η συγκέντρωση που εφαρμόστηκε ήταν περίπου 1900ng/μL. Η μεμβράνη επωάζεται για 16hrs στο διάλυμα υβριδισμού στις ίδιες συνθήκες. Την επόμενη ημέρα, το διάλυμα υβριδισμού αφαιρείται, μεταφέρεται σε falcon και αποθηκεύεται στους -20oC για

επαναχρησιμοποίηση (1-2 φορές). Στο Παράρτημα Ι αναφέρονται οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για τον υβριδισμό με DIG για τον εκάστοτε ιό. Ακολουθούν τα εξής πλυσίματα στους 65οC:

- > 2x SSC yia 5min
- 2x SSC, 0,2% SDS για 30min x2
- 0.2x SSC, 0.2% SDS για 15min
- 2x SSC για 5min

Έπειτα, ακολουθείται η εξής διαδικασία επώασης με το anti-dig αντίσωμα με πλυσίματα σε θερμοκρασία δωματίου

Διάλυμα	Σύσταση
Washing buffer	1x μαλεϊκού οξέος, 0.3% v/v Tween-20
Blocking solution	3% w/v Regilait σε 1x μαλεϊκού οξέος
Detection buffer	0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5
Antibody's solution	1% w/v (Regilait) σε 1x μαλεϊκού οξέος και αραίωση αντισώματος (1:20000 για το anti-DIg (ROCHE)).
Maleic acid buffer	0.1Μ μαλεϊκού οξέος, 0.15Μ NaCl Ρύθμιση pH 7.5 με πελλέτες Na0H

-Εξισορρόπηση της μεμβράνης σε διάλυμα πλυσίματος (washing buffer) για 5-10min -Προσθήκη 1x διαλύματος μπλοκαρίσματος (blocking solution) για τουλάχιστον 30min

-Επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα (antibody solution) για τουλάχιστον 30min -Προσθήκη διαλύματος πλυσίματος 15min x3 για -Προσθήκη μαλεϊκού οξέος 5min 1xγια -Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα ανίχνευσης (detection buffer) για 5min Για την εμφάνιση του σήματος χρησιμοποιήθηκε CDP – star,(σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή) σε διάλυμα ανίχνευσης σε αναλογία 1:100 CDP-star : διάλυμα ανίχνευσης. Τέλος, η μεμβράνη μεταφέρθηκε στο Azzure για την μέτρηση της γημειοφωταύγειας.

2.6.1.2 Παρασκευή διαλύματος t-RNAs για την υβριδοποίηση

Για τον σχηματισμό t-RNAs ζυγίζονται 100mg ριβονουκλεϊκού οξέος, αραιώνονται σε 15ml απιονισμένου H20 και αφήνονται 16-20hrs στους 50oC υπό συνεχή ανάδευση. Προστίθεται ίσου όγκου phenol-TEMS και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση με vortex. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 20min στις 3400rpm στους 4oC. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο falcon, προστίθεται εκ νέου ίσου όγκου phenol-TEMS και ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση για 20min στις 3400rpm στους 4oC. Στη συνέχεια, γίνεται μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο falcon και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 20min στις 3400rpm στους 4oC. Πραγματοποιείται μεταφορά του υπερκειμένου και προστίθεται οξικό νάτριο (CH3COONa pH 5.2) σε αναλογία 1:10 οξικό νάτριο:υπερκείμενο και αιθανόλη 100% (EtOH) σε αναλογία 2:1 αιθανόλη: υπερκείμενο. Έπειτα, το διάλυμα φυγοκεντρείται για 30min στις 3400rpm στους 4oC, η σχηματιζόμενη πελέττα ξεπλένεται με 10ml 70% αιθανόλης και φυγοκεντρείται εκ νέου για 10min στις 3400rpm στους 4oC. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, και αφήνεται η πελέττα να στεγνώσει. Τέλος, γίνεται επαναδιάλυση της πελέττας με 10ml απιονισμένου H20 και γίνεται υπολογισμός της συγκέντρωσης των t-RNAs με την χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους/ορατού (UV/Vis) (Nanodrop, ThermoFisher Scientific). Αποθήκευση του διαλύματος στους -20oC σε μικρές ποσότητες (aliquots).

2.7 Ποσοτικοποίηση των επιπέδων μολυσματικότητας.

Οι ποσοτικοποιήσεις των RNA πραγματοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος AzzureSpot (Azure Biosystems Inc.), όπου υπολογίσθηκε σε κάθε δείγμα η ένταση της ζώνης του ιού όπως αυτή προέκυπτε από το στύπωμα κατά northern, ενώ από τη χρώση της μεμβράνης με methylene blue κατόπιν σκαναρίσματος η ζώνη του 25s ριβοσωμικού RNA του φυτού. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων διαιρέθηκαν τα αποτελέσματα της methylene blue με αυτά του στυπώματος κατά northern για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, όλες οι τιμές διαιρέθηκαν με τον μέσο όρο που προέκυψε από τα φυτά αγρίου τύπου. Η αφαίρεση του υποβάθρου (backround noise) έγινε χρησιμοποιώντας την επιλογή Rolling ball του λογισμικού. Οι τιμές που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση (student's t-test) και γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου και των διαγονιδιακών χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 8.

3. Αποτελέσματα

3.1 Πειραματικό σχέδιο μολύνσεων με τον ιό CMV

Προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα το επίπεδο της μολυσματικότητας του CMV και πως αυτό διαμορφώνεται με δυσλειτουργικό το μονοπάτι miRNA της σίγησης στα διαγονιδιακά SE 5.1i φυτά συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου διεξήχθησαν 2 επαναλαμβανόμενα πειράματα. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκαν μηγανικές μολύνσεις σε διαγονιδιακά SEi φυτά και φυτά αγρίου τύπου Nicotiana benthamiana στο στάδιο των 4-6 φύλλων. Για κάθε γονότυπο υπήρχαν 20 επαναλήψεις, όπου 4 φυτά αποτελέσαν τους μάρτυρες (mock) καθώς μολυνθήκαν μόνο με διάλυμα φωσφορικών άνευ μολύσματος. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 4 δειγματοληψίες (7, 14, 21, 28dpi) ενώ προηγούνταν φαινοτυπικός χαρακτηρισμός και φωτογράφιση των φυτοδογείων. Έπειτα, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο εξαγωγής του ολικού φυτικού RNA και με τη μέθοδο του northern αναλύθηκε ο τίτλος του εκάστοτε ιού σε διασυστηματικά φύλλα των διαγονιδιακών και φυτών αγρίου τύπου.

3.1.1 1º Πείραμα CMV

3.1.1.1 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με CMV

Σύμφωνα με τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις προέκυψε πως ο CMV προκαλεί πληθώρα συμπτωμάτων στο φυτό *N. benthamiana* με την ένταση τους να αυξάνεται αναλογικά με την πάροδο του χρόνου. Από το σύνολο των φυτών, αγρίου τύπου μολύνθηκαν επιτυχώς 13/16 (81,2%) και των διαγονιδιακών φυτών 16/16 (100%).



Εικόνα 3.1 Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών με τους μάρτυρες κατόπιν μολύνσεως με τον ιό CMV καθ' όλη τη πειραματική διαδικασία. Α-Β αφορούν την δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στις 7dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα., Γ-Δ στις 14dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα, Ε-Ζ στις 21dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα.

Το σύνολο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών στις 7dpi αφορούσε την εμφάνιση συμπτωμάτων όπως μωσαϊκό, συστροφή των νεότερων φύλλων, χλώρωση και μικρότερα μεσογονάτια διαστήματα τα οποία αποτελούν τυπικά συμπτώματα μολυσματικότητας με τον ιό CMV (Εικόνα 3.1 A, B)

Στις 14dpi, παρατηρήθηκε πως η ένταση των συμπτωμάτων στον κάθε υπό μελέτη γονότυπο παρουσίασε αυξητική τάση. Τα συμπτώματα μωσαϊκού ήταν εντονότερα, οι χλωρώσεις εκτείνονταν στην επιφάνεια του φύλλου και διακρίθηκε ανομοιόμορφη ανάπτυξη των διασυστηματικών φύλλων (Εικόνα 3.1 Γ, Δ)

Όσο αφορά το φαινότυπο των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου φυτών στις 21dpi, καταγράφηκαν μειωμένη ανάπτυξη κεντρικού στελέχους, έντονη ανάπτυξη πλευρικών βλαστών, αποχρωματισμοί στην επιφάνεια των φύλλων με κατεύθυνση από το μίσχο προς την κορυφή, χλωρωτικά διασυστηματικά φύλλα και καρούλιασμα συγκριτικά με τα φυτά-μάρτυρες (Εικόνα 3.1 E, Z). Χαρακτηριστικά συμπτώματα απεικονίζονται στην εικόνα 3.2 A, B φυτών αγρίου τύπου και διαγονιδιακών, αντίστοιχα.

Τέλος, στις 28dpi τα συμπτώματα είναι ακόμα εντονότερα με το μωσαϊκό και τους αποχρωματισμούς να έχουν επεκταθεί σε ολόκληρη την επιφάνεια των φύλλων. Επίσης, παρατηρήθηκε έντονη ανάπτυξη πλευρικών βλαστών δημιουργώντας θαμνώδη διάταξη στο υπέργειο τμήμα του φυτού, ανομοιόμορφη ανάπτυξη και συστροφή των νεότερων φύλλων τα οποία παραμένουν μικρά σε μέγεθος (Εικόνα 3.1 Η,Θ). Ο φαινότυπος των μολυσμένων φυτών αποτυπώνεται στην εικόνα 3.2 Γ,Δ.

Αξίζει να σημειωθεί πως αμφότεροι γονότυποι δεν παρουσίασαν ετερογένεια μεταξύ τους ως προς το εύρος της συμπτωματολογίας, το χρονικό διάστημα εμφάνισης των συμπτωμάτων παθογένειας και την δριμύτητα αυτών κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.2 Απεικόνιση συμπτωμάτων σε αγρίου τύπου (A, Γ) και διαγονιδιακά φυτά (B, Δ) μολυσμένα με τον ιό CMV.



Εικόνα 3.3 Σύγκριση διαγονιδιακών και αγρίου τύπου φυτών Α.14 και Β. 28 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό CMV (A, B αντίστοιχα).

3.1.1.2 Μοριακός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με CMV

Μετά από κάθε δειγματοληψία, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο εξαγωγής του ολικού RNA των φυτικών κυττάρων και συγχρόνως του γενωμικού RNA των ιών στα μολυσμένα φυτά. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο ιικός τίτλος μέσω ανάλυσης κατά northern με την χρήση DIG σημασμένου ανιχνευτή και ποσοτικοποιήθηκε μέσω του Azzure Spot. Ύστερα, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση μέσω του λογισμικού GraphPad Prism 8 (student's t-test) και υπολογίστηκε το επίπεδο μολυσματικότητας του CMV συγκριτικά και στους 2 γονότυπους. Όσο αφορά την συσσώρευση του CMV 7dpi στην εικόνα 3.4 Α παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες northern για κάθε γονότυπο που αναλύθηκε. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του CMV στα μολυσμένα φυτά κατέδειξε μη στατιστικά σημαντικές διαφορές στα διαγονιδιακά φυτά σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 3.4 B). Ομοίως, τα επίπεδα μολυσματικότητας του CMV 14dpi κατόπιν ανάλυσης κατά northern (Εικόνα 3.5 A) δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα διαγονιδιακά φυτά έναντι των φυτών αγρίου τύπου (Εικόνα 3.5 B)



Εικόνα 3.4 A) Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 7dpi. Ως μάρτυρας ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η ζώνη του 25s του ριβοσωμικού RNA του κάθε δείγματος μετά από χρώση της μεμβράνης με τη χρωστική methylene blue. Η ανίχνευση του ιού πραγματοποιήθηκε με την χρήση ειδικού DIG RNA ανιχνευτή συμπληρωματικού στην αλληλουχία του CMV (υβριδισμός). Η ποσοτικοποίηση της συσσώρευσής του ιού από τις northern αναλύσεις πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Azzure spot ενώ η αφαίρεση του υποβάθρου έγινε χρησιμοποιώντας την επιλογή Rolling ball. B) Γραφική παράσταση της ποσοτικοποίησης των επιπέδων μολυσματικότητας του CMV. Με την χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 8 έγινε η στατιστική ανάλυση των τιμών (student's t- test.) και το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως p<0.05.



Εικόνα 3.5. Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 14dpi A) Χρώση της μεμβράνης με τη χρωστική methylene blue και οπτικοποίηση του μολυσματικού παράγοντα CMV σε διαγονιδιακά και φυτά αγρίου τύπου μετά τον υβριδισμό. Β) Γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων από τις τιμές που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιώντας το λογισμικό Azzure Spot και το GraphPad Prism 8 για την στατιστική ανάλυση (student's t-test).

Στην συνέχεια, ακολούθησε ποσοτικοποίηση του επιπέδου μολυσματικότητας του CMV 21dpi κατόπιν ανάλυσης κατά northern (Εικόνα 3.6 A) μέσω του λογισμικού Azzure Spot. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση εξάγεται το συμπέρασμα πως η συσσώρευση του CMV αυξήθηκε κατά 34% στα διαγονιδιακά φυτά έναντι των φυτών αγρίου τύπου. Ωστόσο, η αύξηση του ιικού φορτίου δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.6 B). Αντιθέτως, στις 28dpi οι τιμές που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση των δεδομένων υποδηλώνουν μείωση του ιικού τίτλου του παθογόνου στα διαγονιδιακά φυτά σε σχέση με αυτά του αγρίου τύπου κατά 39%, διαφορά στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.7 B) ενώ στην εικόνα 3.7 Α παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση κατά northern.



Εικόνα 3.6 Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 21dpi. A) Χρώση της μεμβράνης με χρωστική και οπτικοποίηση του μολυσματικού παράγοντα CMV σε διαγονιδιακά και φυτά αγρίου τύπου μετά τον υβριδισμό. B) Γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων από τις τιμές που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση κατόπιν στατιστικής ανάλυσης.



Εικόνα 3.7 Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 28dpi A) Χρώση της μεμβράνης με methylene blue και οπτικοποίηση των επιπέδων συγκέντρωσης του ιού σε διαγονιδιακά και αγρίου τύπου φυτά μετά τον υβριδισμό. Β) Γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων από τις τιμές που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση κατόπιν στατιστικής ανάλυσης.

3.1.2 2º Πείραμα CMV

3.1.2.1 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με CMV

Προκειμένου να μελετηθεί καλύτερα ο ρόλος που διαδραματίζει το SERRATE στην αλληλεπίδραση του φυτού με τον μολυσματικό παράγοντα CMV διεξήχθη και 2° πείραμα με μηχανικές μολύνσεις με τον ιό σε διαγονιδιακά φυτά SE 5.1i και σε φυτά αγρίου τύπου με την ίδια μεθοδολογία. Από το σύνολο των φυτών αγρίου τύπου επιτυχώς μολύνθηκαν 13/15 (87%) ενώ από τα διαγονιδιακά φυτά 11/14 (79%). Ακολούθησαν 4 δειγματοληψίες, κατόπιν φωτογράφησης των φυτοδοχείων και φαινοτυπικής παρατήρησης.

Συγκεκριμένα, 7dpi το σύνολο της συμπτωματολογίας αφορούσε την εμφάνιση μωσαϊκού, χλωρώσεων στα νεότερα φύλλα και κοντά μεσογονάτια διαστήματα στους υπό μελέτη γονότυπους σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες (Εικόνα 3.8 A, B). Στις 14dpi παρατηρήθηκε αύξηση της δριμύτητας των συμπτωμάτων σε διαγονιδιακά και φυτά αγρίου τύπου. Τα συμπτώματα μωσαϊκού και χλωρώσεων ήταν εντονότερα, καταγράφηκε καρούλιασμα στο φύλλωμα και μείωση ανάπτυξης του κεντρικού στελέχους σε σχέση με τους μάρτυρες από κάθε γονότυπο όπως προκύπτει τις εικόνες 3.8 Γ,Δ και 3.10 A,B.



Εικόνα 3.8 Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών με τους μάρτυρες κατόπιν μολύνσεως με τον ιό CMV καθ' όλη τη πειραματική διαδικασία. Α-Β αφορούν την δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στις 7dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα , Γ-Δ στις 14dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα, Ε-Ζ στις 21dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα, Η-Θ στις 28dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα.

Όσο αφορά, τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου φυτών 21dpi κατόπιν παρατήρησης διακρίθηκε έντονος σχηματισμός πλευρικών βλαστών ενώ και η μειωμένη σε μέγεθος ανάπτυξη των νεότερων φύλλων συνθέτουν μια θαμνώδη εικόνα. Επιπλέον, εντοπίστηκαν σε όλο το υπέργειο μέρος των μολυσμένων φυτών με τον ιό CMV περιοχές αποχρωματισμού και καρούλιασμα ολόκληρων φύλλων. Χαρακτηριστικά συμπτώματα μολυσματικότητας απεικονίζονται στην εικόνα 3.10 Γ, Δ.

Τέλος, σε επίπεδο φαινοτύπου 28dpi παρατηρήθηκε κλιμάκωση στην ένταση των συμπτωμάτων με τις χλωρώσεις και το μωσαϊκό να καλύπτουν ολόκληρη την επιφάνεια των φύλλων. Η μειωμένη ανάπτυξη του βλαστού, το καρούλιασμα και ο αποχρωματισμός των κεντρικών νεύρων συμπληρώνουν την συμπτωματολογία (Εικόνα 3.8 H, Θ).

Εντούτοις, δεν εντοπίστηκε ετερογένεια ως προς την πληθώρα και την δριμύτητα των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών συγκριτικά σε διαγονιδιακά και σε φυτά αγρίου τύπου κατά την διάρκεια των δειγματοληψιών (Εικόνες 3.8, 3.9).



Εικόνα 3.9 Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών καθ όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Α αφορά την δειγματοληψία στις 7dpi, B αφορά την δειγματοληψία στις 14dpi, Γ αφορά την δειγματοληψία στις 21dpi, Δ αφορά την δειγματοληψία στις 28dpi.



Εικόνα 3.10 Απεικόνιση συμπτωμάτων σε αγρίου τύπου (Α,Γ) και διαγονιδιακά φυτά (Β,Δ) κατόπιν μολύνσεως με τον ιό CMV.

3.1.2.2 Μοριακός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με CMV

Μετά από κάθε δειγματοληψία, ακολούθησε λειοτρίβηση ιστού διασυστηματικών φύλλων από μολυσμένα φυτά και εφαρμογή του πρωτοκόλλου εξαγωγής του ολικού RNA από τα κύτταρα. Τα επίπεδα του παθογόνου παράγοντα υπολογίστηκαν ως η ένταση του σήματος μέσω της ανάλυσης κατά northern με την χρήση DIG σημασμένου ανιχνευτή και ποσοτικοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Azzure Spot. Τέλος, έγινε η στατιστική ανάλυση των τιμών που προέκυψαν με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 8. Αναλυτικότερα, για τις αναλύσεις northern που αφορούν τη δειγματοληψία 7dpi με τον ιό CMV (Εικόνα 3.11 A) η στατιστική ανάλυση κατέδειξε πως ο τίτλος του ιού στα διαγονιδιακά SE 5.1i φυτά σε σχέση με τον αντίστοιχο στα φυτά αγρίου τύπου δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 3.11 B).



Εικόνα 3.11 Ανάλυση κατά κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 7dpi. A) Χρώση της μεμβράνης με την χρωστική methlyne blue και οππτικοποίηση της συσσώρευσης του ιού σε κύτταρα διαγονιδιακών SE 5.1i και αγρίου τύπου φυτών. B) Γραφική παράσταση των τιμών που προέκυψαν ύστερα από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω του λογισμικού GraphPad Prism 8

Όσο αφορά τη ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης του παθογόνου παράγοντα CMV 14dpi, τα ευρήματα παρουσίασαν πτωτική τάση στα διαγονιδιακά φυτά κατά 27% σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, σημαντική στατιστική διαφορά (Εικόνα 3. 12 B) όπως προκύπτει από την ανάλυση κατά northern (Εικόνα 3.12 A).



Εικόνα 3.12 Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 14dpi A) Χρώση της μεμβράνης με την χρωστική methlyne blue και οππτικοποίηση της συσσώρευσης του ιού σε κύτταρα διαγονιδιακών SE 5.1i και αγρίου τύπου φυτών B) Γραφική παράσταση των τιμών που προέκυψαν ύστερα από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Ύστερα από την διαδικασία που ακολουθήθηκε όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.7, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την η ποσοτικοποίηση των επιπέδων μολυσματικότητας 21dpi (Εικόνα 3.13 A) υπολογίστηκε σημαντική μείωση κατά 24% στα διαγονιδιακά φυτά συγκριτικά με τα αγρίου τύπου, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.13 B.

Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των τιμών που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων διασυστηματικών φύλλων που συλλέχθησαν 28dpi (Εικόνα 3.14 A) υπολογίστηκε πως ο ιικός τίτλος στα διαγονιδιακά φυτά δεν παρουσιάζει σημαντική στατιστική διαφορά με τον αντίστοιχο στα φυτά αγρίου τύπου όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.14 B.



Εικόνα 3.13 Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 21dpi A) Χρώση της μεμβράνης με την χρωστική methlyne blue και οππτικοποίηση της συσσώρευσης του ιού σε κύτταρα διαγονιδιακών SE 5.1i και αγρίου τύπου φυτών B) Γραφική παράσταση των τιμών που προέκυψαν ύστερα από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 3.14 Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα CMV για τις 28dpi A) Χρώση της μεμβράνης με την χρωστική methlyne blue και οππτικοποίηση της συσσώρευσης του ιού σε κύτταρα διαγονιδιακών SE 5.1i και αγρίου τύπου φυτών B) Γραφική παράσταση των τιμών που προέκυψαν ύστερα από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

3.1.3 Συνολικά στατιστικά αποτελέσματα 1°-2° Πείραμα CMV

Τα επίπεδα μολυσματικότητας του ιού CMV στο Πείραμα 1 και 2 προσδιορίστηκαν μέσω των αναλύσεων northern, ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Azzure Spot και ακολούθησε η στατιστική τους ανάλυση. Συγκεντρωτικά, παρατηρείται πως η συσσώρευση του CMV 7dpi στα διαγονιδιακά φυτά σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, δεν παρουσιάζει διαφορές (Εικόνα 3.15 A). Ομοίως, δεν καταγράφηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ποσοτικοποίηση του ικού τίτλου, όσο αφορά στις δειγματοληψίες 14dpi με τις τιμές να υποδεικνύουν πτωτική πορεία στα διαγονιδιακά φυτά συγκριτικά με τα αγρίου τύπου (Εικόνα 3.15 B). Σχετικά με το σύνολο των δειγματοληψιών που έλαβαν χώρα 21dpi, παρά την έλλειψη στατιστικά σημαντικών διαφορών, παρατηρήθηκε ανοδική τάση της συσσώρευσης του παθογόνου στα διαγονιδιακά φυτά σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.15 Γ. Ωστόσο, τα ευρήματα από τις αναλύσεις northern 28dpi υποδηλώνουν πως ο ιικός τίτλος παρουσιάσε, στατιστικά σημαντική μείωση 31% στα διαγονιδιακά φυτά έναντι των αγρίου τύπου (Εικόνα 3.15 Δ).



Εικόνα 3.15 Γραφική απεικόνιση των συνολικών αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης της μολυσματικότητας του ιού CMV για το Πείραμα 1 και 2 για τις 7, 14,21,28dpi (A, B, Γ, Δ, αντίστοιχα) σε διαγονιδιακά φυτά και φυτά αγρίου τύπου *N.benthiamana* κατόπιν στατιστικής ανάλυσης με την χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 8.

3.2 Πειραματικό σχέδιο φυτών μολυσμένων με τον ιό TSWV

Προκειμένου να διασαφηνιστεί ο ρόλος που διαδραματίζει το SERRATE ως παράγοντας του ενδογενούς μονοπατιού της RNA σίγησης σε συνθήκες ιικών μολύνσεων και πως διαμορφώνονται τα επίπεδα συσσώρευσης παθογόνων στους φυτικούς ιστούς συγκριτικά σε φυτά με δυσλειτουργικό μονοπάτι πραγματοποιήθηκαν εκ νέου πειράματα με τον ιό του κηλιδωτού μαρασμού της ντομάτας (TSWV). Αναλυτικότερα, διεξήχθησαν 4 επαναλαμβανόμενα πειράματα μηχανικών μολύνσεων με τον TSWV σε διαγονιδιακά SE 5.1i και αγρίου τύπου φυτά *N. benthamiana*. Για κάθε γονότυπο υπήρχαν 28 επαναλήψεις με τα φυτά να μολύνονται στο στάδιο των 4-6 πραγματικών φύλλων. Τρία φυτά από κάθε γονότυπο αποτέλεσαν τους μάρτυρες. Σε κάθε πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε μια δειγματοληψία, στις 14 ημέρες μετά τις μολύνσεις (14dpi) ενώ προηγούνταν παρατήρηση των φυτοδοχείων. Τέλος, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο εξαγωγής του ολικού RNA των φυτικών κυττάρων και με την μέθοδο του northern υπολογίστηκε η συσσώρευση του TSWV σε διασυστηματικά φύλλα των υπό μελέτη γονοτύπων.

3.2.1. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με TSWV

Σύμφωνα με τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις των δύο γονοτύπων, το ποσοστό επιτυχημένων μολύνσεων κατά την διάρκεια των 4 επαναλήψεων του πειράματος κυμαινόταν για φυτά αγρίου τύπου μεταξύ 24-32% και για διαγονιδιακά φυτά 12-36%. Χαρακτηριστικά όπως η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και κατακόρυφη κάμψη του κεντρικού στελέχους, καρούλιασμα, έντονα συμπτώματα χλώρωσης σε διασυστηματικά φύλλα με κατεύθυνση από το μίσχο του φύλλου προς την κορυφή του και χλωρωτικές κηλίδες στα παλιότερα φύλλα συνθέτουν την εικόνα της συμπτωματολογίας στο *N. benthamiana* (Εικόνα 3.16). Συμπτώματα παθογένειας του ιού απεικονίζονται στην εικόνα 3.17 A, B.



Εικόνα 3.16 Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών με τους μάρτυρες κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TSWV. Α-Β αφορούν την δειγματοληψία του 1^{ου} πειράματος που πραγματοποιήθηκε στις 14dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα, Γ-Δ το 2^ο πείραμα στις 14dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα, Ε-Ζ το 3^ο πείραμα στις 14dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα.



Εικόνα 3.17 Απεικόνιση συμπτωμάτων κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TSWV 14dpi . Α αφορά φυτά αγρίου τύπου και Β αφορά NbSEi φυτά.



Εικόνα 3.18 Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TSWV 14dpi. Α αφορά την δειγματοληψία του 1^{ου} πειράματος, Β αφορά την δειγματοληψία του 2^{ου} πειράματος, Γ αφορά την δειγματοληψία του 3^{ου} πειράματος.

Αξίζει να αναφερθεί πως 35dpi, ο φαινότυπος των φυτών αποτυπώνει τη σπουδαιότητα της μόλυνσης με τον ιό TSWV καθώς διαπιστώθηκαν συμπτώματα όπως αναστολή ανάπτυξης του κεντρικού στελέχους, μείωση σπαργής και λευκός μεταχρωματισμός των κεντρικών νεύρων του φυλλώματος. Τη συμπτωματολογία συμπληρώνει η κάλυψη ολόκληρης της επιφάνειας του ελάσματος με μεταχρωματισμούς πορτοκαλοκίτρινης απόχρωσης και ολική νέκρωση του οργανισμού όπως απεικονίζεται στην εικόνα 3.19 Γ.



Εικόνα 3.19 Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών με τους μάρτυρες κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TSWV 35dpi A, B αντίστοιχα. Γ Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TSWV 35dpi

Τέλος, κατά την διάρκεια των πειραμάτων δεν καταγράφηκε ετερογένεια ως προς το χρόνο εμφάνισης των συμπτωμάτων, το εύρος και την ένταση αυτών μεταξύ των γονοτύπων 14 και 35 ημέρες μετά τις μηχανικές μολύνσεις (Εικόνες 3.18, 3.19 A, B).

3.2.2 Μοριακός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με TSWV

Ύστερα από κάθε δειγματοληψία ακολούθησε λειοτρίβηση των δειγμάτων παρουσία υγρού αζώτου και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο εξαγωγής του ολικού RNA των φυτικών κυττάρων και συγχρόνως του ικού RNA από κάθε υπό μελέτη γονότυπο. Ο ικός τίτλος υπολογίστηκε ως η ένταση του σήματος μέσω της ανάλυσης κατά northern με την χρήση DIG σημασμένου ανιχνευτή και ποσοτικοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Azzure Spot. Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των τιμών χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 8.

Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις northern παρουσιάζονται ενδεικτικά (Εικόνα 3.20 A) καθώς δεν κατέστη εφικτή η ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης του ιού TSWV περαιτέρω δειγμάτων μολυσμένου ιστού φυτών αγρίου τύπου και διαγονιδιακών εξαιτίας τεχνικών θεμάτων κατά την διεξαγωγή των 4 πειραμάτων. Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση, εξάγεται το συμπέρασμα πως ο τίτλος του μολυσματικού παράγοντα στα διαγονιδιακά φυτά ήταν 123% αυξημένος σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, μη στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 3.20 B).



Εικόνα 3.20 Ανάλυση κατά northern του μολυσματικού παράγοντα TSWV για τις 14dpi A) Χρώση της μεμβράνης με την χρωστική methlyne blue και οππτικοποίηση της συσσώρευσης του ιού σε κύτταρα διαγονιδιακών SE 5.1i και αγρίου τύπου φυτών B) Γραφική παράσταση των τιμών που προέκυψαν ύστερα από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

3.3 Πειραματικό σχέδιο φυτών μολυσμένων με τον ιό TuMV

Τέλος, προκειμένου να σχηματιστεί ολοκληρωμένη εικόνα για τον ρόλο που διαδραματίζει το SERRATE ως παράγοντας του ενδογενούς μονοπατιού της σίγησης παρουσία βιοτικών καταπονήσεων πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις με τον ιό μωσαϊκού του γογγυλιού (TuMV). Συγκεκριμένα, έλαβε χώρα ένα πείραμα μηχανικών μολύνσεων με τον υπό μελέτη ιό σε διαγονιδιακά SE 5.1i και αγρίου τύπου φυτά *N. benthamiana*. Για κάθε γονότυπο υπήρχαν 20 επαναλήψεις από τα οποία 4 φυτά ήταν οι μάρτυρες. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 2 δειγματοληψίες, 7 και 14 μέρες μετά τις μηχανικές μολύνσεις (7,14dpi) παρουσία υγρού αζώτου, ενώ προηγούνταν φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των φυτών και φωτογράφηση αυτών. Λόγω περιορισμένου χρόνου δεν διενεργήθηκαν μοριακές αναλύσεις στα φυτά που μολύνθηκαν με τον TuMV.

3.3.1 1º Πείραμα

3.3.1.1 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός φυτών μολυσμένων με TuMV

Από το σύνολο των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν 16/16 (100%) φυτά αγρίου τύπου και 15/16 (94%) διαγονιδιακά παρουσίασαν συμπτώματα μολύνσεων. Όσο αφορά την δειγματοληψία 7dpi, παρατηρήθηκε μείωση ανάπτυξης του κεντρικού στελέχους, καρούλιασμα, χλωρώσεις, μωσαϊκό και σχηματισμός ομόκεντρων κηλίδων στο φύλλωμα σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες (Εικόνα 3.21 A, B). Στην εικόνα 3.22 A, B απεικονίζονται χαρακτηριστικά συμπτώματα μολύνσεως με τον ιό σε αγρίου τύπου και διαγονιδιακά φυτά, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με το φαινότυπο των μολυσμένων φυτών, 14dpi καταγράφηκαν συμπτώματα κάμψης και κιτρινίσματος ολόκληρου του ελάσματος, κοντά μεσογονάτια διαστήματα και συστροφή φύλλων σε σχέση με τους μάρτυρες (Εικόνα 3.21 Γ, Δ). Στην εικόνα 3.22 Γ, Δ αποτυπώνεται ο φαινότυπος φυτών αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών, αντίστοιχα.

Ωστόσο, και στις δύο δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στο εύρος και ένταση των συμπτωμάτων για κάθε υπό μελέτη γονότυπο (εικόνα 3.23 A, B).



Εικόνα 3.21 Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών με τους μάρτυρες κατόπιν μόλυνσεως με τον ιό TuMV καθ' όλη τη πειραματική διαδικασία. Α-Β αφορούν την δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στις 7dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα, Γ-Δ στις 14dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα.



Εικόνα 3.22 Απεικόνιση συμπτωμάτων κατόπιν μολύνσεως με τον ιό TuMV. Α-Β αφορούν την δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στις 7dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα. Γ-Δ στις 14dpi για τα αγρίου τύπου και NbSEi φυτά αντίστοιχα.



Εικόνα 3.23 Σύγκριση αγρίου τύπου και διαγονιδιακών φυτών καθ όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Α αφορά την δειγματοληψία στις 7dpi, Β αφορά την δειγματοληψία στις 14dpi.

4. Συζήτηση:

Οι φυτικοί οργανισμοί αναπτύσσονται σε πληθώρα αντίξοων περιβαλλοντικών συνθηκών που περιλαμβάνουν τόσο αβιοτικές καταπονήσεις όπως η ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας, υψηλή αλατότητα, υπερσυσσώρευση βαρέων μετάλλων στο εδαφικό διάλυμα, όσο και βιοτικές καταπονήσεις με κυριότερες τα βακτήρια, ιούς, μύκητες, νηματώδεις και προσβολές από φυτοφάγα έντομα. Αδιαμφισβήτητο είναι το γεγονός πως, οι ιοί αποτελούν σημαντική απειλή για καλλιέργειες υψηλής αγρονομικής σημασίας. Σύμφωνα με υπολογισμούς θεωρείται πως ο οικονομικός αντίκτυπος ξεπερνά ετησίως τα 30 δις σε παγκόσμια κλίμακα επηρεάζοντας τόσο το ύψος της παραγωγής αλλά και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των καρπών απειλώντας την επισιτιστική ασφάλεια. Παράλληλα, το μέγεθος των απωλειών σε δενδροκομικές καλλιέργειες δεν περιορίζεται στην προσβολή των ετήσιων παραγωγών αλλά και στο γρονικό διάστημα και το κόστος που απαιτούνται για την ανάπτυξη νέων καλλιεργειών. (Nicaise, 2014; Sastry and Zitter, 2014; Gimenez et al., 2018). Συμπληρωματικά, αναφέρεται πως η έκθεση των φυτικών οργανισμών σε ιικές μολύνσεις δρα συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά στην απόκριση των καλλιεργειών σε αβιοτικές καταπονήσεις που λαμβάνουν γώρα, όπως η λειψυδρία υποδηλώνοντας την σημασία προσβολής των καλλιεργειών από παθογόνα (Xu et al., 2008; Atkinson and Urwin, 2012).

Προκειμένου τα φυτά να υπερκεράσουν τις δυσμενείς συνέπειες των στρεσογόνων αυτών παραγόντων έχουν αναπτύξει πολύπλοκους αμυντικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν σειρά αποκρίσεων που εκφράζονται σε μορφολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο (Gimenez et al., 2018; Gull et al., 2019). Μεταξύ των μηχανισμών αυτών συγκαταλέγεται και η RNA σίγηση, που κατέχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του οργανισμού ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση αλλά έχει αποσαφηνιστεί και ο αντιικός ρόλος της κυρίως μέσω του εξωγενούς μονοπατιού των siRNAs όπως έχει αναφερθεί αναλυτικά στην Ενότητα 1.3.1.1.

Αν και τα μονοπάτια της RNA σίγησης θεωρούνται διακριτά ως προς τον ρόλο που κατέχουν στους φυτικούς οργανισμούς παράλληλα υποστηρίζεται το γεγονός της αλληλεπικαλυπτόμενης δράσης τους (Baulcombe, 2004; Voinnet, 2005). Την άποψη αυτήν επιβεβαιώνουν έρευνες κατά τις οποίες η συσσώρευση των miRNAs φάνηκε πως μεταβάλλεται κατά την ιική μόλυνση. Συγγρόνως, υποστηρίζεται η άποψη της συμπληρωματικής δράσης του miRNA μονοπατιού στην αντιική άμυνα των φυτών κατόπιν βιοπληροφορικής ανάλυσης (Perez-Quintero et al., 2010). Συγκεκριμένα, στο ρύζι εντοπίστηκαν 14 και 16 πρότυπα miRNAs στα φύλλα και στο ριζικό σύστημα αντίστοιγα τα επίπεδα των οποίων μεταβάλλονται σημαντικά ως απόκριση στη μόλυνση με τον ιό Rice black streaked dwarf virus (RBSDV). Ομοίως στην οικογένεια των Σολανωδών, βρέθηκε σε φυτά ντομάτας πως η έκφραση 53 miRNAs υφίσταται αλλαγές κατά τη διάρκεια μολύνσεων με τον Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) και στο N.benthamiana 129 miRNAs κατόπιν μόλυνσης με τον Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) (Sun et al., 2015; Pradhan et al., 2015; Liu et al., 2020). Παράλληλα, έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος ορισμένων miRNAs στις αλληλεπιδράσεις ξενιστή-φυτοπαθογόνου, όπως το miR528, το οποίο σχετίστηκε με την AGO18, την αυξημένη δραστικότητα της L-ασκορβικής οξειδάσης, αυξημένης συσσώρευσης ROS (Reactive Oxygen Species) και ενισχυμένη αντιική άμυνα στο ρύζι (Wu et al., 2017). Επιπλέον, υποστηρίζεται πως το miR444 λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής των πρωτεϊνών MADS23, MADS27, και MADS5 που δρουν ως μεταγραφικοί καταστολείς του γονιδίου της RDR1. Η υπερέκφραση του miR444 στο ρύζι συνδέεται με μειωμένα επίπεδα συσσώρευσης του ιού RSV και με ηπιότερα συμπτώματα (Wang et al., 2016). Όσο αφορά ευρήματα από πειράματα συν-επιμολύνσεων με τους ιούς PVX-PVY και PVX-PPV αυτά υποδεικνύουν τροποποίηση του μεταβολισμού των υπό μελέτη miRNAs και των mRNA-στόχων τους μεταβάλλοντας την συσσώρευση τους είτε σε μεγαλύτερο βαθμό είτε ως προς την αντίθετη κατεύθυνση προκαλώντας εντονότερα συμπτώματα στο N.benthamiana συγκριτικά με μεμονωμένες μολύνσεις (Pacheco et al., 2012). Επίσης, παρουσιάζεται συσγετισμός μεταξύ φαινοτύπου και μοριακών αναλύσεων καθώς αναφέρεται πως ιοί που προκαλούν εντονότερα συμπτώματα επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό τη συσσώρευση των miRNAs ενισχύοντας την, συγκριτικά με ιούς που προκαλούν ηπιότερα (Bazzini et al., 2007; Lang et al., 2011). Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί το γεγονός αν οι τροποποιήσεις στη miRNA-εξαρτώμενη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ξενιστή αποτελεί στρατηγική για την επιτυγημένη εγκαθίδρυση και αντιγραφή του ιού ή παρενέργεια που προκαλείται από παρεμβολή στο miRNA μονοπάτι από καταστολέα της σίγησης ιικής προέλευσης (Qu and Morris, 2005; Bazzini et al., 2007; Cillo et al., 2009). Για το λόγο αυτό, αποτελεί αναγκαιότητα η εμβάθυνση του τρόπου λειτουργίας των φυτικών αμυντικών μηγανισμών και η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων φυτών-παθογόνων (Miller et al., 2017). Με βάση τα παραπάνω υποδηλώνεται πως το miRNA μονοπάτι της RNA σίγησης συμπράττει στην απόκριση του φυτού στις προσβολές από ιούς. Δεδομένου αυτού, απαραίτητη κρίθηκε η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου που διαδραματίζει έναντι μολύνσεων φυτοπαθογόνων ιών, της ανάλυσης του ιικού τίτλου σε φυτά με δυσλειτουργικό το ενδογενές μονοπάτι και η λειτουργικότητα πρωτεϊνών που συμμετέγουν σε αυτό.

Σύμφωνα με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές, σημαντικός παράγοντας της βιογένεσης των miRNA αποτελεί η πρωτεΐνη DCL1, η οποία με την συνδυαστική δράση των SERRATE και HYL1 προωθείται η αποτελεσματικότερη λειτουργία της (Dong et al., 2008; Khraiwesh et al., 2012) υπογραμμίζοντας τον καίριο ρόλο τους στο ενδογενές μονοπάτι της σίγησης. Καθώς η ισχυρή καταστολή της DCL1 στα φυτά οδηγεί στη θνησιμότητα σε εμβρυικό στάδιο και έχει γίνει αναφορά του SERRATE ως ρυθμιστή της άμυνας του οργανισμού έναντι βακτηριακών μολύνσεων και προσβολών μυκήτων (Voisin et al., 2009; Niu et al., 2016) χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά στα οποία επετεύχθη μειωμένη καταστολή του γονιδίου SERRATE διαταράσσοντας το miRNA μονοπάτι προκειμένου να αναλυθεί ο αντίκτυπος του στα επίπεδα μολυσματικότητας των ιών.

Σε αυτό το πλαίσιο, σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της απόκρισης γονοτύπων *N. benthamiana* παρουσία βιοτικών καταπονήσεων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Το γενετικό υλικό περιλάμβανε φυτά αγρίου τύπου και διαγονιδιακά φυτά SE 5.1i τα οποία μολύνονταν μηχανικά κατά το στάδιο των 4-6 πραγματικών φύλλων. Για κάθε ανεξάρτητο πείραμα πραγματοποιούνταν σειρά δειγματοληψιών για τους υπό μελέτη ιούς όπως αναλύθηκε εκτενέστερα στην ενότητα 2.2. Η γονοτυπική αξιολόγηση υπό συνθήκες βιοτικών καταπονήσεων έγκειται κυρίως

στον μοριακό προσδιορισμό του ιικού τίτλου συγκριτικά στα φυτικά κύτταρα φυτών αγρίου τύπου και φυτών με δυσλειτουργικό το ενδογενές μονοπάτι της RNA σίγησης και παράλληλα πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός έλεγχος της δριμύτητας των συμπτωμάτων.

4.1 Απόκριση μολυσμένων φυτών με τον ιό CMV

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο καταστολέας της σίγησης που κωδικοποιείται από το γονιδίωμα του CMV, 2b πρωτεΐνη υποστηρίζεται πως διαταράσσει το miRNA μονοπάτι καθώς αλληλεπιδρά με την AGO1 για την παρεμπόδιση σχηματισμού του συμπλόκου RISC απόρροια του οποίου αποτελεί η ανεμπόδιστη εξάπλωση του ιού (Zhang et al., 2006). Παράλληλα, η τροποποίηση της miRNA-εξαρτώμενης γονιδιακής έκφρασης υποστηρίζεται από μελέτες σε φυτά ντομάτας κατόπιν μολύνσεων με τον CMV καθώς εντοπίστηκε μεταβολή στη μεταγραφή 79 miRNAs σε σχέση με φυτά-μάρτυρες, με ορισμένα εξ αυτών να παρουσιάζουν αύξηση στην συγκέντρωση τους έως και 10 φορές (Feng et al., 2014). Βάσει των ανωτέρω, μελετήθηκε περαιτέρω η συσχέτιση του παθογόνου με το miRNA μονοπάτι της σίγησης προσδιορίζοντας τη συσσώρευση του στα φυτικά κύτταρα διαγονιδιακών φυτών συγκριτικά με αγρίου τύπου.

Κατά την πειραματική διαδικασία μηχανικών μολύνσεων φυτών N. benthamiana με το φυτοπαθογόνο παράγοντα CMV, καταγράφηκαν συμπτώματα όπως μωσαϊκό, καρούλιασμα και χλωρώσεις φύλλων, μειωμένη ανάπτυξη κεντρικού στελέχους και έντονος σχηματισμός πλευρικών βλαστών συγκριτικά με τους μάρτυρες τα οποία αποτελούν τυπικά συμπτώματα μόλυνσης με τον ιό. Σε επίπεδο γονοτύπων, δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις ως προς το εύρος και το χρονικό διάστημα εμφάνισης των συμπτωμάτων μολυσματικότητας του ιού κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών.

Αναφορικά με τις μοριακές αναλύσεις, παρατηρήθηκε μεταβολή των επιπέδων της ιικής συσσώρευσης συγκριτικά στους υπό μελέτη γονοτύπους. Αναλυτικότερα, κατά την διεξαγωγή του πρώτου πειράματος, παρατηρήθηκε διακύμανση στα επίπεδα συσσώρευσης του CMV στα διαγονιδιακά φυτά σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά μεταξύ των τεσσάρων δειγματοληψιών. Συγκεκριμένα, 7dpi καταγράφηκε αυξητική τάση του ιικού τίτλου στα διαγονιδιακά φυτά, ενώ 14dpi παρατηρήθηκε το αντίθετο φαινόμενο, χωρίς να υπάρχουν στατιστικές διαφορές εκατέρωθεν. Αξίζει να αναφερθεί πως στις 21dpi υπολογίστηκε πως μεταξύ των γονοτύπων, η μολυσματικότητα του ιού παρουσίασε αύξηση κατά 34% στα διαγονιδιακά φυτά, δίχως να προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση διαφορές. Ωστόσο, στις 28dpi η συγκέντρωση παρουσίασε σημαντική μείωση κατά 39% στα SE 5.1i φυτά συγκριτικά με του αγρίου τύπου. Όσο αφορά το δεύτερο πείραμα, καταδεικνύεται πως καθ' όλη τη διάρκεια του ο ιικός τίτλος στα διαγονιδιακά φυτά παρουσίασε φθίνουσα πορεία σε σχέση με του αγρίου τύπου, με το σύνολο των δειγμάτων 14dpi και 21dpi να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική μείωση κατά 27% και 24% αντίστοιχα. Παραθέτοντας τα αποτελέσματα, διακρίνεται η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών ως προς την πορεία που ακολουθεί η συσσώρευση του ιού στα διαγονιδιακά φυτά σε σύγκριση με του αγρίου τύπου. Η ανομοιογένεια αυτή ενδεχομένως να οφείλεται στην καθυστερημένη εγκατάσταση του ιού και μετακίνηση του σε διασυστηματικά φύλλα είτε λόγω τεχνικών θεμάτων κατά την διαδικασία των μηχανικών μολύνσεων είτε των συνθηκών που επικρατούσαν την συγκεκριμένη χρονική περίοδο.

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν την ύπαρξη ικανοποιητικής συσχέτισης μεταξύ φυτών με μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης SERRATE και της συγκέντρωσης του CMV στα κύτταρα αυτών. Ελλείψει στατιστικών διαφορών, κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης (7dpi και 14dpi) διαπιστώνονται μειωμένα επίπεδα του μολυσματικού παράγοντα στα διαγονιδιακά φυτά σε σχέση με του αγρίου τύπου, ενώ στις 21dpi παρατηρείται ανοδική πορεία. Στην συνέχεια, ευρήματα της μοριακής ανάλυσης κατέδειξαν σημαντική μείωση του ιικού τίτλου στα διαγονιδιακά φυτά SE 5.1i. στις 28dpi επί του συνόλου των δειγμάτων που αναλύθηκαν, συνθήκη που ενδέχεται να οφείλεται σε μερική ανθεκτικότητα των διαγονιδιακών φυτών στο στάδιο αυτό χωρίς ωστόσο να σχετίζεται με αισθητές διαφορές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μεταξύ των γονοτύπων. Ευρήματα μελέτης που αφορούν διαφορετική κατηγορία παθογόνου οργανισμού όπως τα ιοειδή PSTVd και HSVd της οικογένειας Pospiviroidae, υπολογίστηκε πτωτική τάση του τίτλου των ιοειδών σε μεταλλάγματα se στο N.benthamiana 21dpi (Kryovrysanaki et al., 2019). Αξιοσημείωτο είναι πως αποτελέσματα που προκύπτουν από προηγούμενες αναφορές δεν παρουσιάζουν αντίστοιχη τάση σχετικά με άλλους σημαντικούς παράγοντες του ενδογενούς μονοπατιού της σίγησης όπως οι AGO πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα, σε μεταλλάγματα ago1 φυτών A. thaliana υποστηρίζεται υπερευαισθησία έναντι του CMV με την συσσώρευση αυτού να υπολογίζεται έως 6 φορές πάνω 21 μέρες μετά τις μολύνσεις (Morel et al., 2002).

Η μεταβολή των επιπέδων του ιού σε αγρίου τύπου φυτά οφείλεται στην επαγωγή των μηγανισμών εκατέρωθεν προκειμένου να επικρατήσει είτε το παθογόνο είτε ο φυτικός οργανισμός. Κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης ο ιός εγκαθίσταται και εξαπλώνεται στα φυτά τα οποία στην συνέχεια ενεργοποιούν τους μηχανισμούς άμυνας τους με σκοπό τη μείωση των επιπέδων του ιού. Η εύρυθμη λειτουργία των μηγανισμών αυτών παρεμποδίζεται μετέπειτα από τους καταστολείς της σίγησης προκειμένου να αυξηθεί εκ νέου η συσσώρευση του με την δράση τους να έγκειται στην καταστολή ορισμένων συντελεστών της. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, σε επίπεδο πειραμάτων διακρίνεται η μεταξύ τους αναντιστοιχία. Κατά την διεξαγωγή του πρώτου πειράματος παρουσιάζεται διακύμανση των απόλυτων τιμών της συσσώρευσης του ιού σε διαγονιδιακά και αγρίου τύπου φυτά ακολουθώντας το πρότυπο μόλυνσης. Σε αντιπαραβολή με τα παραπάνω, δεδομένα που προκύπτουν από το δεύτερο πείραμα υποστηρίζουν πως ο ιικός τίτλος 7 και 14dpi παραμένει σε παρόμοια χαμηλά επίπεδα και σε μεταγενέστερα στάδια οι γονότυποι ακολουθούν αντίστοιχη ανοδική πορεία γεγονός όπως εξηγήθηκε μπορεί να οφείλεται σε αστοχία κατά την διάρκεια του πειράματος (Παράρτημα II).

Δεδομένου των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ξενιστών-παθογόνων, οι οποίες διαταράσσονται επιπλέον σε φυτά με δυσλειτουργικό το ενδογενές μονοπάτι της σίγησης και της μερικής ανομοιογένειας ως προς την συσσώρευση του ιού συγκριτικά σε διαγονιδιακά φυτά σε σχέση με του αγρίου τύπου κατά την διάρκεια των πειραματικής διαδικασίας κρίνεται σημαντική η επανάληψη των πειραμάτων μολυσματικότητας με τον CMV.

4.2 Απόκριση μολυσμένων φυτών με τον ιό TSWV

Σχετικά με τις μηχανικές μολύνσεις με το φυτοπαθογόνο ιό TSWV, πραγματοποιήθηκε αρχικά φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των μολυσμένων φυτών. Σε επίπεδο φυλλώματος διακρίθηκαν καρούλιασμα και έντονες χλωρώσεις με κατεύθυνση από το μίσχο προς την κορυφή των φύλλων και στα μεγαλύτερης ηλικίας φύλλα χλωρωτικές κηλίδες σε σχέση με τους μάρτυρες. Την συμπτωματολογική εικόνα συμπληρώνει η αναστολή ανάπτυξης του κεντρικού στελέχους και τελικώς η ολοκληρωτική νέκρωση του φυτού, φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τα οποία συμβαδίζουν με ευρήματα άλλων μελετών (Goodin et al., 2008). Σε επίπεδο μεταχειρίσεων, δεν διακρίθηκαν διαφοροποιήσεις ως προς την συμπτωματολογία μεταξύ διαγονιδιακών και αγρίου τύπου φυτών.

Όσο αφορά τις μοριακές αναλύσεις, σε αγρίου τύπου και διαγονιδιακά φυτά παρατηρήθηκε επίσης συσχετισμός της μειωμένης έκφρασης του SERRATE και της συγκέντρωσης του παθογόνου στα φυτικά κύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, ελλείψει σημαντικών διαφορών, υπολογίστηκε αυξητική τάση κατά 123% στα διαγονιδιακά φυτά SE 5.1i συγκριτικά με του αγρίου τύπου. Ωστόσο, λόγω του περιορισμένου αριθμού μολυσμένων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη τα συμπεράσματα που εξάγονται θεωρούνται επισφαλή. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.2.1, παρά το γεγονός πως αξιοποιήθηκε μεγάλος αριθμός φυτών για μηγανικές μολύνσεις από κάθε γονότυπο, παρατηρήθηκε μειωμένο ποσοστό επιτυγίας αυτών κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των 4 ανεξάρτητων πειραμάτων με το ποσοστό να κυμαίνεται για διαγονιδιακά φυτά 12-36% και για φυτά αγρίου τύπου 24-32%. Εν μέρει το φαινόμενο αυτό αιτιολογείται καθώς τα πειράματα έλαβαν χώρα καλοκαιρινούς μήνες όπου επικρατούν υψηλότερες θερμοκρασίες, περιβαλλοντικές συνθήκες που δεν θεωρούνται ευνοϊκές για την εγκαθίδρυση μόλυνσης και λόγω της δυσκολίας μετάδοσης του ιού μέσω μηχανικών μολύνσεων (Mandal et al., 2002; Mandal et al., 2008). Ταυτόγρονα, τεχνικά ζητήματα κατά τη διεξαγωγή των μοριακών αναλύσεων αποτέλεσαν τροχοπέδη για την ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης του ιού στα φυτικά κύτταρα και κατ' επέκταση δεν κατέστη δυνατή η ανάλυση περαιτέρω δεδομένων.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζεται πως ο ιός TSWV κωδικοποιεί τον καταστολέα της σίγησης NSs, ο οποίος προσδένεται σε long dsRNAs και siRNAs (Schnettler et al., 2010) προάγοντας την απρόσκοπτη εξάπλωση του ιού στον οργανισμό παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του συμπλόκου RISC και το εξωγενές μονοπάτι της σίγησης. Συμπληρωματικά, προηγούμενες μελέτες καταδεικνύουν πως το miRNA μονοπάτι της σίγησης εμπλέκεται στην μολυσματικότητα του ιού καθώς σε μολυσμένα φυτά πιπεριάς καταγράφηκε μεταβολή συγκεντρώσεων 101 miRNAs, εκ των οποίων μικρός αριθμός εντοπίστηκε ότι σχετίζονται με την άμυνα του οργανισμού και με διαμεσολαβούμενες μέσω ορμονών οδών σηματοδότησης (Tao et al., 2022). Ειδικότερα, συσχετίζεται η διακύμανση του miR167a με μολύνσεις με τον ιό TSWV συνδέοντας την αντιική άμυνα με την φυτοορμόνη αυξίνη διαμέσου της ρύθμισης του γονιδίου ARF8 (Bouzroud et al., 2018; Werghi et al., 2021). Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, υπολογίστηκε αύξηση του ιικού τίτλου στα διαγονιδιακά φυτά με μειωμένη έκφραση του SERRATE συγκριτικά με του αγρίου τύπου. Δεδομένης της έλλειψης περισσότερων στοιχείων σχετικά με την απόκριση του γενετικού υλικού σε συνθήκες βιοτικής καταπόνησης, προτείνεται πως η εν λόγω αύξηση της συσσώρευσης του TSWV συνδέεται με την μειωμένη λειτουργικότητα του miRNA μονοπατιού της σίγησης στα διαγονιδιακά φυτά λόγω της μερικής καταστολής του SERRATE και των επιμέρους μηχανισμών με συμβολή στην άμυνα των φυτών που διαταράσσονται.

Συνεπώς, τα αποτελέσματα της μελέτης υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα αξιολόγησης των γονοτύπων μέσω περισσότερων επαναλήψεων των πειραμάτων.

4.3 Απόκριση φυτών μολυσμένων με τον ιό TuMV

Τέλος, διεξήχθησαν μηχανικές μολύνσεις με τον ιό TuMV, ο οποίες περιορίστηκαν στην φαινοτυπική παρατήρηση καθώς λόγω περιορισμένου χρόνου ο μοριακός χαρακτηρισμός τους δεν κατέστη εφικτός. Σε επίπεδο φυλλώματος καταγράφηκαν μωσαϊκό, καρούλιασμα, χλωρώσεις και σχηματισμός ομόκεντρων λευκών κηλίδων με την ένταση των συμπτωμάτων να αυξάνεται με την εξάπλωση κίτρινου μεταχρωματισμού σε ολόκληρη την επιφάνεια της μεγαλύτερης ηλικίας φύλλων. Σε επίπεδο οργανισμού παρατηρήθηκε κάμψη και μείωση ανάπτυξης του κεντρικού στελέχους. Ευρήματα παλιότερων αναφορών παρουσιάζουν αντίστοιχα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Martin et al., 1999).

Σε επίπεδο γονοτύπων, το εύρος της συμπτωματολογίας, το χρονικό διάστημα εμφάνισης και δριμύτητας των συμπτωμάτων δεν παρουσίασε αποκλίσεις κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

5. Βιβλιογραφία

Adkins, S. (2001) Tomato spotted wilt virus—positive steps towards negative success Molecular Plant Pathology/ Volume 1, Issue 3/ p 151-157 https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00022.x

Ali, GS. Golovkin, M. Reddy, AS. (2003) Nuclear localization and in vivo dynamics of a plant-specific serine/arginine-rich protein. Plant J , 36:883–893.

Anjali, N. Nadiya F, Thomas J, Sabu KK (2019) Identification and characterization of drought responsive microRNAs and their target genes in cardamom (Elettaria cardamomum Maton). Plant Growth Regul 87:201–216

Atkinson, NJ. Urwin, PE. (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. J Exp Bot 63: 3523–3543

Bajczyk, M. Lange, H. Bielewicz Szewc, L. Bhat, S.S Dolata, J. Kuhn, L. Szweykowska-Kulinska, S. Gagliardi, D. Jarmolowski, A. (2020) SERRATE interacts with the nuclear exosome targeting (NEXT) complex to degrade primary miRNA precursors in Arabidopsis Nucleic Acids Research, Vol. 48, No. 12

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

Bazzini A.A. Hopp H.E. Beachy R.N. Asurmendi S. (2007) Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 104, pp. 12157-12162

Blanchard, C. Boyce, P. Anderson B.J. (1996) Cucumber mosaic virus RNA5 is a mixed population derived from the conserved 3'-terminal regions of genomic RNAs 2 and 3 Virology, 217 pp. 598-601

Bernstein, E. Caudy, A. A. Hammond, S. M. Hannon, G. J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference Nature 409, 363

Bezerra, I. Michaels, Schomburg, F. Amasino, R. (2004) Lesions in the mRNA cap-binding gene ABA HYPERSENSITIVE 1 suppress FRIGIDA-mediated delayed flowering in Arabidopsis The Plant Journal 40, 112-119

Bohmert, K. Camus, I. Bellini, C. Bouchez, D. Caboche, M. Benning, C. (1998) AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development EMBO J., 17, pp. 170-180

Bologna, N.G. Voinnet, O. (2014) The Diversity, Biogenesis and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis Ann Rev Plant Biol. 2014;65:473–503.

Bouzroud, S. Gouiaa, S. Hu, N. Bernadac, A. Mila, S. Bendaou, N. Smouni, A. Bouzayen, M Zouine, M. (2018) Auxin Response Factors (ARFs) are potential mediators of auxin action in tomato response to biotic and abiotic stress (Solanum lycopersicum) PLOS ONE February 28, 2018

Brigneti, G. Voinnet, O. Li, W.X. Ji, L,H. Ding, S.W. Baulcombe, D. (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in Nicotiana benthamiana EMBO J., 17, pp. 6739-6746

Burgyán, J Havelda, Z. (2011) Viral suppressors of RNA silencing Trends in Plant Science Volume 16, Issue 5, May 2011, Pages 265-272

Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., (2009) Review Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell 136, 642–655. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035

Catalannoto, C. Pallotta, M. ReFalo, P. Sachs, M.S. Vayssie. L. Macino, G. Cogoni, C. (2004) Redundancy of the two Dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in Neurospora crassa Mol. Cell Biol., 24, pp. 2536-2545

Chan, S.W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E. (2004) Silencing genes control de Novo DNA methylation. Science, 303, 1336.

Chen, C. Zeng, Z. Liu, Z. Xia, R. (2018) Small RNAs, emerging regulators critical for the development of horticultural traits Horticulture Research, Volume 5, https://doi.org/10.1038/s41438-018-0072-8

Chen, Y.L.Fan, K.T. Hung, S.C. Chen, Y.R. (2020) The role of peptides cleaved from protein precursors in eliciting plant stress reactions New Phytol., 225 (6) pp. 2267-2282,

Chomczynski, P. Sacchi, N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction : twenty-something years on 1, 581–585. <u>https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83</u>

Cillo, F. Mascia, T. Pasciuto, M. Gallitelli, D. (2009) Differential Effects of Mild and Severe Cucumber mosaic virus Strains in the Perturbation of MicroRNA-Regulated Gene Expression in Tomato Map to the 3' Sequence of RNA 2 Mol. Plant Microbe Interact., 10 (2009), pp. 1239-1249

Clarke, J. Tack, D. Findlay, K. Montagu, M.V. Lijsebettens, M.V. (2002) The SERRATE locus controls the formation of the early juvenile leaves and phase length in Arabidopsis The Plant JournalVolume 20, Issue 4 p. 493-501 https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00623.x

Csorba, T. Kontra, L. Burgyan, J. (2015) Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence Review Virology Volumes 479–480, May Pages 85-103

Dangl, J. Horvathand, D. Staskawicz, B. (2013) Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment SCIENCE Vol 341, Issue 6147 pp. 746-751

Di Serio, F. Owens, R. Navarro, B. Serra, P., Martinez de Alba, A.E. Delgado, S. Carbonell, A. Gago-Zachert, S. (2022) Role of RNA silencing in plant-viroid interaction and in viroid pathogenesis

Deleris, A. Gallego-Bartolome, J. Bao, J. Kasschau, K. Carrington, J. Voinnet, O (2006) Hierarchical Action and Inhibition of Plant Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense Science <u>https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.1128214</u>

Dong Z., Han, M.H. and Fedoroff, N. (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 105, 9970–9975.

Edwardson J. R., Christie R. G. (1986) Turnip mosaic virus. In: Edwardson J. R., editor. Viruses infecting forage legumes. Vol. II. University of Florida; Gainesville, FL, USA: pp. 438–453.

Englbrecht, CC. Schoof, H. Böhm, S. (2004) Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the Arabidopsis thaliana genome. BMC Genomics. 5:39

Fang, Y. Spector, D.L. (2007) Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants Curr. Biol., 17, pp. 818-823

Feng, J. Liu, S. Wang, M. Lang, Q. Jin, C. (2014) Identification of microRNAs and their targets in tomato infected with Cucumber mosaic virus based on deep sequencing. Planta 240, 1335–1352 <u>https://doi.org/10.1007/s00425-014-2158-3</u>

Finnegan, E.J. Matzke M.A. (2003) The small RNA world J. Cell Sci., 116, pp. 4689-4693

Fire, A, Xu, S. Montgomery, M. Kostas, S. Driver, S. Mello, C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans Nature Vol 391 | 19 February

Fischer, J. J., Beatty, P. H., Good, A. G. & Muench, D. G. (2013) Manipulation of microRNA expression to improve nitrogen use efficiency. Plant Sci. 210, 70–81

Fukudome, A. Fukuhara, T. (2017) Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis J Plant Res 130, 33–44 https://doi.org/10.1007/s10265-016-0877-1

Gao, Z. Niel, J. Wang, H. (2020) MicroRNA biogenesis in plant. Plant Growth Regulation 93:1–12

https://doi.org/10.1007/s10725-020-00654-9

Gasciolli, V. Mallory, AC. Bartel, DP. Vaucheret H. (2005). Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. Curr. Biol. 15:1494–500

Galliteli, D. (2000) The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture Virus Research Volume 71 Issues 1-2, Pages 9-21

Gimenez, E. Salinas, M. Manzano-Agugliaro, F. (2018) Worldwide Research on Plant Defense against Biotic Stresses as Improvement for Sustainable Agriculture Sustainability 10(2), 391 https://doi.org/10.3390/su10020391

Goodin, M. Zaitlin, D. Naidu, R. Lommel, S. (2008) Nicotiana benthamiana: Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions The American Phytopathological Society

Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W. Hopkins, N. (2002) Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. Nature Genetics, 31(2), 135–140. doi:10.1038/ng896

Grigg, S.P., Canales, C., Hay, A., et al., (2005) SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in Arabidopsis. Nature 437, 1022e1026.

Gull, A. Lone, A.A and Wani, N.U.I (2019). Biotic and abiotic stresses in plants, Chapter 1 : Biotic and abiotic stresses in plants Alexandre Bosco de Oliveira, Intech Open Doi:10.5772/intechopen.8583

Hamilton, A. Baulcombe, D. (1999) A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. Science, New Series, Vol. 286, No. 5441 Oct. 29, pp. 950-952 : http://www.jstor.org/stable/2899496

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature 404, 293–296. https://doi.org/10.1038/35005107 Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. Science 293, 1146–1150. https://doi.org/10.1126/science.1064023

Han, MH. Goud, S. Song, L. Fedoroff, N. (2004) The Arabidopsis double-stranded RNAbinding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation.Proc Natl Acad Sci USA101:1093–1098

Hock, J. Meister, G. (2008) The Argonaute protein family Genome Biology volume 9, Article number: 210

Hohn, T Vazquez, F. (2011) RNA silencing pathways of plants: Silencing and its suppression by plant DNA viruses Biochimica et Biophysica Acta 1809 588–600

Hull, R. (2002) Matthew's Plant Virology Fourth edition

Hunter, J. Brockington, S. Murphy, A, Pate, A. Gruden, K, MacFarlane, Palukaitis, P. Carr, J. (2016) RNA-dependent RNA polymerase 1 in potato (Solanum tuberosum) and its relationship to other plant RNA-dependent RNA polymerases ci Rep 6, 23082

Hutvagner. G. Simard, M.J. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 9

Incarbone, M. Dunoyer, P. (2013) RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses Trends in Plant Science Volume 18, Issue 7, July 2013, Pages 382-392

Iwakawa, H.O. Tomari, Y. (2013) Molecular Insights into microRNA-Mediated Translational Repression in Plants Molecular Cell Volume 52, Issue 4, 21 November Pages 591-601

Iwata, Y. Takahashi, M. Fedoroff, N. Hamdan, S. (2013) Dissecting the interactions of SERRATE with RNA and DICER-LIKE 1 in Arabidopsis microRNA precursor processing Nucleic Acids Research Advance Access published August 5

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. Curr. Biol. 11, 747–757

Kasschau K, Xie, Z. Allen, E. Llave, C. Chapman, E. Krizan, K. Carrington, J. (2003) P1/HC-Pro, a Viral Suppressor of RNA Silencing, Interferes with Arabidopsis Development and miRNA Function Developmental Cell Volume 4, Issue 2, February Pages 205-217

Katsarou, K. Mavrothalassiti, E. Dermauw, W. Van Leeuwen, T, Kalantidis, K. (2016)Combined Activity of DCL2 and DCL3 Is Crucial in the Defense against Potato Spindle TuberViroidPLOSOctober12https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005936

Katsarou, K. Mitta, E. Bardani, E. Oulas, A. Dadami, E. Kalantidis, K. (2018) DCL-suppressed Nicotiana benthamiana plants: valuable tools in research and biotechnology Molecular Plant Pathology

https://doi.org/10.1111/mpp.12761

Khan, M. Khan, A.U Hasan, M.A., Yadav, K.K.. Pinto, M. Malik, N Yadav, V.K. Khan, A.H. Islam, S. Sharma, G.K. (2021) Agro-Nanotechnology as an Emerging Field: A Novel Sustainable Approach for Improving Plant Growth by Reducing Biotic Stress Applied Sciences

Khraiwesh, B. Zhu, Z.K. Zhu, Z. (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms Volume 1819, Issue 2, February, Pages 137-148

Kryovrysanaki, N. Alexiadis, A. Grigoriadou, M. Katsarou, K. Kalantidis, K. (2019) SERRATE, a miRNA biogenesis factor, affects viroid infection in Nicotiana benthamiana and Nicotiana tabacum Virology Volume 528, February, Pages 164-175

Lang, Q. Jin, C. Lai, L. Feng, J. Chen, S. Chen, J. (2011) Tobacco microRNAs prediction and their expression infected with Cucumber mosaic virus and Potato virus X Molecular Biology Reports volume 38, pages1523–1531

Liu, J. Fan, H. Wang, Y. Han, C. Wang, X. Yu, J. Li, D. Zhang, Y. (2020) Genome-wide microRNA profiling using oligonucleotide microarray reveals regulatory networks of microRNAs in Nicotiana benthamiana during beet necrotic yellow vein virus infection Viruses 12(3),310

https://doi.org/10.3390/v12030310

Laubinger, S. Sachsenberg, T. Zeller, G. Busch, W. Lohmann, J.U. Ratsch, G. Weigel, D. (2008) Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105, 8795–8800

Laubinger, S. Zeller, G. Henz, S.R. Buechel, S. Sachsenberg, T. Wang, J.W. Ratsch, G. Weigel, D. (2010) Global effects of the small RNA biogenesis machinery on the Arabidopsis thaliana transcriptome Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107 (2010), pp. 17466-17473

Li, F. Wang, A. (2019) RNA-Targeted Antiviral Immunity: More Than Just RNA Silencing Review Trends in Microbiology Volume 27, Issue 9, September, Pages 792-805 Li, F. Wang, A. (2018) RNA decay is an antiviral defense in plants that is counteracted by viral RNA silencing suppressors. PLoS Pathog 14 doi.org/10.1371/journal.ppat.1007228

Li, G. Lv, H. Zhang, S. Zhang, S. Li, F. Zhang, H. Qian, W. Fang, Z. Sun, R. (2019) Plant Pathology Volume 68, Issue 6 p. 1035-1044

Li, N. Yu, C. Yin, Y. Gao, S. Wang, F. Jiao, C. Yao, M (2020) Pepper Crop Improvement Against Cucumber Mosaic Virus (CMV): A Review Front. Plant Sci., 10 December

Li, S. Castillo-Gonzalez, C. Yu, B. Zhang, X. (2016) The functions of plant small RNAs in development and in stress responses Plant J., 90, pp. 654-670, <u>https://doi.org/10.1111/tpj.13444</u>

Li, S. Li, M. Liu, K. Zhang, H. Zhang, S. Zhang, C. Yu, B. (2020) MAC5, an RNA-binding protein, protects pri-miRNAsfrom SERRATE-dependent exoribonuclease activities PNAS National Acad Sciences https://doi.org/10.1073/pnas.2008283117

Li, X., Chen, P., Xie, Y., Yan, Y., Wang, L., Dang, H. Guan, Q. (2020). Apple SERRATE negatively mediates drought resistance by regulating MdMYB88 and MdMYB124 and microRNA biogenesis. Horticultureresearch, 7

Liu, J. Jung, C. Xu, J. Wang, H. Deng, S. Bernad, L. Arenas-Huertero, C. Chua, N.H. (2012) Genome-wide analysis uncovers regulation of long intergenic noncoding RNAs in Arabidopsis Plant Cell, 24, pp. 4333-4345 Liu, X. Lu, T. Dou, Y. Yu, B. Zhang, C. (2014) Identification of RNA silencing components in soybean and sorghum BMC Bioinformatics 15:4

Lobbes, D. Rallapalli, G. Schmidt, D.D. Martin, C. Clarke, J. (2006) SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. EMBO Rep. 7, 1052–1058. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400806.

Lu, R. Folimonov, A. Shintaku, M. Li, W.X. Falk, B Dawson, W. Ding, S.W. (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral genome. Proc. Natl Acad. Sci. USA 101, 15742–15747

Ma, Z. Castillo-Gonzalez, C. Wang, Z. Sun, D. Hu, X. Shen, X. Potok, M. Zhang, X. (2018) Arabidopsis Serrate Coordinates Histone Methyltransferases ATXR5/6 and RNA Processing Factor RDR6 to Regulate Transposon Expression Developmental Cell Volume 45, Issue 6, 18 June 2018, Pages 769-784.e6

Machida, S. Chen, H.Y. Yuan, A. (2011) Molecular insights into miRNA processing by Arabidopsis thaliana SERRATE Nucleic Acids Research, Volume 39, Issue 17, 1 September Pages 7828–7836,

https://doi.org/10.1093/nar/gkr428

MacRae, I.J. Doudna, J. (2007) Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes Current Opinion in Structural Biology Volume 17, Issue 1, February, Pages 138-145

Mallory, A. Reinhart, B. Bartel, D. Vance, V. Bowman, L. (2002) A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco PNAS Vol 99 No 23 https://doi.org/10.1073/pnas.232434999

Mandal, B., Pappu, H. R., Culbreath, A. K., Holbrook, C. C., Gorbet, D. W., and Todd, J. W. (2002) Differential response of selected peanut (Arachis hypogaea) genotypes to mechanical inoculation by Tomato spotted wilt virus. Plant Dis. 86:939-944.

Mandal, B. Csinos, A.S. Martinez-Ochoa, N. Pappu, H. (2008) A rapid and efficient inoculation method for Tomato spotted wilt tospovirus Journal of Virological Methods Volume 149, Issue 1, April, Pages 195-198

Martín ÁM, y Poch HLC, Herrera DM, Ponz F. (1999) Resistances to Turnip mosaic potyvirus in Arabidopsis thaliana. Molecular Plant–Microbe Interactions 12: 1016–1021.

Matzke, M.A. Mosher, R.A. (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity Nature reviews | Genetics Volume 15 June

Meena, M. Yadav, G. Sonigra, P. Nagda, A Mehta, T Swapnil, P Avinash, H. Marwal, A, (2022) Role of elicitors to initiate the induction of systemic resistance in plants to biotic stress Plant Stress

Mello, C.C. Conte Jr. D. (2004) Revealing the world of RNA interference Nature, 431 pp. 338-342

Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A. & Matzke, A. J. (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. EMBO J. 19, 5194–5201 Miller, R. Alves, G. Van Sluys, M.A. (2017) Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses Annals of Botany, Volume 119, Issue 5, March, Pages 681-687 https://doi.org/10.1093/aob/mcw284

Mochizuki, T. Ohki, S. (2011) Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00749.

Moissiard, G. Voinnet, O. (2006) RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins PNAS

Moissiard, G. Voinnet, O. (2004) Viral suppression of RNA silencing in plants Molecular plant pathology

https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00207.x

Morel, J.B. Godon, C. Mourrain, P. Béclin, C. Boutet, S. Feuerbach, F. Proux, F. Vaucheret, H. (2002) Fertile Hypomorphic ARGONAUTE (ago1) Mutants Impaired in Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance, The Plant Cell, Volume 14, Issue 3, March Pages 629-639, https://doi.org/10.1105/tpc.010358

Mou, M. Wang, Q. Chen, Y. Yu, D. Chen, L. (2021) Functional characterization of the Arabidopsis SERRATE under salt stress Plant Diversity Volume 43, Issue 1, February Pages 71-77

Mukherjee, K. Campos, H. Kolaczkowski, B. (2013) Evolution of animal and plant dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants. Molecular Evolution 30:627-641 Biology and https://doi.org/10.1093/molbev/mss263

Nagata, T. Inoue-Nagata, A. Smid, H.M. Goldbach, R. Peters, D. (1999) Tissue tropism related to vector competence of Frankliniella occidentalis for tomato spotted wilt tospovirus Journal of General Virology, February Volume 80, Issue 2

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 PLOS ONE https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059534

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 The Plant Cell, Vol. 2, 279-289, April

Nilon, A. Robinson, K. Pappu, H. Mitter, N. (2021) Current Status and Potential of RNA Interference for the Management of Tomato Spotted Wilt Virus and Thrips Vectors Pathogens, 10(3), 320 https://doi.org/10.3390/pathogens10030320

Niu, D. Lii, Y.E. Chellappan, P. Lei, L Peralta, K. Jiang, C. Guo, J. Coaker, G. Jin, H. (2016) miRNA863-3p sequentially targets negative immune regulator ARLPKs and positive regulator SERRATE upon bacterial infection Nature Communications volume 7, Article number: 11324

Ohshima, K. Matsumoto, K. Yasaka, R. Nishiyama, M. (2016). Temporal analysis of reassortment and molecular evolution of Cucumber mosaic virus : Extra clues from its segmented genome. Virology, 487, 188–197

Ohshima, K. Yamaguchi, Y. Hirota, R. Hamamoto, T. Tomimura, K. Tan, Z. Sano, T. Azuhata, F. Walsh, J.A. Fletcher, J. Chen, J. Gera, A. Gibb A. (2002) Molecular evolution of Turnip mosaic virus; evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread Journal of General Virology 83 pp. 1511-1521

Pacheco, R. Garcia-Marcos, A. Barajas, D. Martianez, J. Tenllado, F. (2012) PVX–potyvirus synergistic infections differentially alter microRNA accumulation in Nicotiana benthamiana Virus Research Volume 165, Issue 2, May 2012, Pages 231-235 https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.02.012

Palukaitis, P. and García-Arenal, F. (2003) Cucumoviruses. Adv. Virus Res. 62, 241-323

Palukaitis, P Kim, S. (2021) Resistance to Turnip Mosaic Virus in the Family Brassicaceae TheplantPathologyJournalFeb1;37(1):1-23https://doi.org/10.5423%2FPPJ.RW.09.2020.0178

Park, W. Li, J. Song, R. Messing, J. Chen, X. (2002) CARPELFACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. Curr. Biol., 12, 1484–1495.

Pappu, H.R. Jones, R.A.C Jain, R.K. (2009) Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead Virus Research Volume 141, Issue 2, May, Pages 219-236

Parrella, G. Gognalons, P. Gebre-Selassiè, K. Vovlas, C, Marchoux, G. (2003) An update of the host range of tomato spotted wilt virus Journal of Plant Pathology Vol. 85, No. 4, Special Issue pp. 227-264

Pérez-Quintero, ÁL. Neme, R. Zapata, A. Lopez, C. (2010) Plant microRNAs and their role in defense against viruses: a bioinformatics approach. BMC Plant Biol 10:138

Pradhan, B. Naqvi, AR. Saraf, S. Mukherjee, SK. Dey, N. (2015) Prediction and characterization of Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) responsive novel microRNAs in Solanum lycopersicum. Virus Res 195: 183–195

Prakash, V. Devendran, R. Chakraborty, S. (2017) Overview of plant RNA dependent RNA polymerases in antiviral defense and gene silencing Indian Journal of Plant Physiology volume 22, pages493–505

Prasad, A. Prasad, M. (2021) Host-virus interactions mediated by long non-coding RNAs Virus Research Volume 298,

Prigge, M. Wagner, D. (2001) The Arabidopsis SERRATE Gene Encodes a Zinc-Finger Protein Required for Normal Shoot Development The Plant Cell, Volume 13, Issue 6, June , Pages 1263–1280,

https://doi.org/10.1105/TPC.010095

Pumplin, N. Voinnet, O. (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. Nat. Rev. Genet. 2013, 11, 745–760.

Pyott, D. Molnar, A. (2015) Going mobile: Non-cell-autonomous small RNAs shape the genetic landscape of plants https://doi.org/10.1111/pbi.12353 Qi, S. Zhang, S. Islam, M.M. El-Sappah, A. Zhang, F. 1 Liang, Y. (2021) Natural Resources Resistance to Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) in Tomato (Solanum lycopersicum) International Journal of Molecular Biology

Qin. L Mo, N. Muhammad, T, Liang, Y (2018) Genome-Wide Analysis of DCL, AGO, and RDR Gene Families in Pepper (Capsicum Annuum L.) International Journal of Molecular Sciences 19(4), 1038

https://doi.org/10.3390/ijms19041038

Qu, F. Morris, J. (2005) Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections FEBS Letters Volume 579, Issue 26, 31 October 2005, Pages 5958-5964 <u>https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.041</u>

Raczynska, K.D. Stepien, A. Kierzkowski, D. Kalak, M. Bajczyk, M. McNicol, J. Simpson, C.G. Szweykowska-Kulinska, Z. Brown, J.W.S., Jarmolowski, A., (2014) The SERRATE protein is involved in alternative splicing in Arabidopsis thaliana. Nucleic Acids Res 42, 1224–1244. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkt894</u>

Ratcliff, F. MacFarlane, S. David Baulcombe, C. (1999) Gene Silencing without DNA: RNA-Mediated Cross-Protection between Viruses, The Plant Cell, Volume 11, Issue 7, July, Pages 1207–1215

https://doi.org/10.1105/tpc.11.7.1207

Rosa, C. Kuo, Y.W. Wuriyanghan, H. Falk, B.W. RNA Interference Mechanisms and Applications in Plant Pathology (2018) Annual Review of Phytopathology

Rossman, T. G., and Wang, Z. (1999) Expression cloning for arsenite-resistance resulted in isolation of tumor-suppressor fau cDNA: possible involvement of the ubiquitin system in arsenic carcinogenesis. Carcinogenesis 20:311-316.

Rotenberg, D. Whitfield, A.E. (2018) Molecular interactions between tospoviruses and thrips vectors Current Opinion in Virology Volume 33, December , Pages 191-197

Sabin, L.R. Zhou, R. Gruber, J.J. Lukinova, N. Bambina, S. Berman, A. Lau, C-K. Thompon, C.B. Cherry, S. (2009) Ars2 Regulates Both miRNA- and siRNA- Dependent Silencing and Suppresses RNA Virus Infection in Drosophila Cell Volume 138, Issue 2, 23 July, Pages 340-351

Sabbione, A., Daurelio, L., Vegetti, A. Talon, M. Tadeo, F. Dotto, M. (2019) Genome-wide analysis of AGO, DCL and RDR gene families reveals RNA-directed DNA methylation is involved in fruit abscission in Citrus sinensis. BMC Plant Biol 19, 401 <u>https://doi.org/10.1186/s12870-019-1998-1</u>

Sasaki, T. Shiohama, A. Minoshima, S. Shimizu, N. (2003) Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome Genomics, 82, pp. 323-330

Sastry, S. K., and Zitter, T. A. (2014) Management of virus and viroid diseases of crops in the tropics. Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics, Vol. 2, Epidemiology and Management (Dordrecht: Springer), 149–480.

Schauer, S.E. Jacobsen S.E. Meinke, D.W. Ray, A (2002) DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development Trends Plant Sci, 7 pp 487-491

Schnettler, E. Hemmes, H. Huismann, R. Goldbach, R. Prins, M. Kormelink, R. (2010) Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules Journal of Virology 84 pp. 11542-11554
Scholthof, KB. Adkins, S. Czosnek, H. Palukaitis, P. Jacquot, E. Hohn, T. Hohn, B. Saunders, K. Candresse, T. Ahlquist, P. Hemenway, C. Foster, GD. (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Mol Plant Pathol 12:938–954.

Sevik, M.A. Arli-Sokmen, M. (2012) Estimation of the Effect of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Infection on Some Yield Components of Tomato. Phytoparasitica 40, 87–93

Shimura, H. Pantaleo, V. (2011) Viral induction and suppression of RNA silencing in plants Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms Volume 1809, Issues 11–12, November–December , Pages 601-61

Song, J.J. Smith, S.K. Hannon, G. Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity Science, 305, pp. 1434-1437

Speth, C. Szabo, EX. Martinho, C. Collani, S. Oven-Krockhaus, S. Richter, S. (2018). Arabidopsis RNA processing factor SERRATE regulates the transcription of intronless genes. Elife 7:e37078. doi: 10.7554/eLife.37078

Sun, M. Xu, S. Mei, Y Li, J. Gu, Y Zhang, W. Wang, J (2022) MicroRNAs in Medicinal Plants International Journal of Molecular Sciences 23(18), 10477 https://doi.org/10.3390/ijms231810477

Sun Z, He Y, Li J, Wang X, Chen J (2015) Genome-wide characterization of rice black streaked dwarf virus-responsive microRNAs in rice leaves and roots by small RNA and degradome sequencing. Plant Cell Physiol 56: 688–699

Taiz, L. Zeiger, E. Max Møller, I. Murphy, A. (2015) Plant Physiology and Development 6η edition Chapter 1 Cell and Plant architecture

Takeda, A. Sugiyama, K. Nagano, H. Mori, M. Kaido, M. Mise, K. Tsuda, S. Okuno, T. (2002) Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus FEBS Letters Volume 532, Issues 1–2, 4 December Pages 75-79 https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03632-3

Tan, Z. Wada, Y. Cehn, J. Ohshima, K (2004) Inter- and intralineage recombinants are common in natural populations of Turnip mosaic virus Free Journal of general Virology Volume 85, Issue 9

https://doi.org/10.1099/vir.0.80124-0

Tao, H. Jia, Z. Gao, X. Gui, M. Li, Y. Liu, Y. (2022) Analysis of the miRNA expression profile involved in the tomato spotted wilt orthotospovirus–pepper interaction Virus Research Volume 312, 15 April, 198710

Tomari, Y. Zamore, P.D. (2005) Perspective: machines for RNAi Genes Dev.19, pp. 517-529

Tomimura, K. Špak, J. Katis, N. Jenner, C. Walsh, J. Gibbs, A. Ohshima, K (2004) Comparisons of the genetic structure of populations of Turnip mosaic virus in West and East Eurasia, Virology, Volume 330, Issue 2

Turina, M. Kormelink, R. Resende R.O. (2016) Resistance to Tospoviruses in Vegetable Crops: Epidemiological and Molecular Aspects The Annual Review of Phytopathology

Van de Wetering, F. Goldbach, R. Peters, D. (1996) Tomato Spotted Wilt Tospovirus Ingestion by First Instar Larvae of Frankliniella Occidentalis Is a Prerequisite for Transmission. Phytopathology, 86, 900–905. Vaucheret, H. (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. Genes and Development 20, 759–771. https://doi.org/10.1101/gad.1410506

Voinnet, O. (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infectionsNatureReviewsGenetics6,(206-220)https://doi.org/10.1038/nrg1555

Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell, 136, 669-687

Voisin, D. Nawrath, C. Kurdyukov, S. Franke, R.B. Reina-Pinto. J.J. Efremova, N. Will, I Schreiber, L. Yephremov, A. (2009) Dissection of the Complex Phenotype in Cuticular Mutants of Arabidopsis Reveals a Role of SERRATE as a Mediator PLOS Genetics <u>https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000703</u>

Waititu, J.K. Zhang, C. Liu, J. Wang, H (2020) Plant Non-Coding RNAs: Origin, Biogenesis, Mode of Action and Their Roles in Abiotic Stress International Journal of Molecular Science 21(21), 8401

https://doi.org/10.3390/ijms21218401

Walsh, J.A. Jenner, C.E. (2002) Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance Molecular Plant Pathology Volume 3, Issue 5 p. 289-300

Wang, H. Jiao, X. Kong, X. Hamera, S. Wu, Y. Chen, X. Fang, R. Yan, Y. (2016) A Signaling Cascade from miR444 to RDR1 in Rice Antiviral RNA Silencing Pathway. Plant Physiology, Volume 170, Issue 4, April , Pages 2365–2377 https://doi.org/10.1104/pp.15.01283

Wang, L., Yan, X., Li, Y., Wang, Z. Chhajed, S. Shang, B. Wang, Z. Choi, S. Zhao, H, Chen, S., and Zhang, X. (2022). PRP4KA phosphorylates SERRATE for degradation via 20S proteasome to fine-tune miRNA production in Arabidopsis. Sci Adv 8, eabm8435

Wang, M.B. Masuta, C. Smith, N. Shimura, H. (2012) RNA Silencing and Plant Viral Diseases Molecular Plant-Microbe Interactions® The American Phytopathological Society https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0093-CR

Wang, M.B. Metzlaff, M. (2005) RNA silencing and antiviral defense in plants Current Opinion in Plant Biology Volume 8, Issue 2, April , Pages 216-222 https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.01.006

Wang, S. Liang, H. Xu, Y. Li, L. Wang, H. Sahu, D.N. Petersen, M. Melkonian, M. Sahu, S.K. Liu, H. (2021) Genome-wide analyses across Viridiplantae reveal the origin and diversification of small RNA pathway-related gene Communications Biology volume 4, Article number: 412

Wassenegger, M. Heimes, S., Riedel, L. & Sanger, H. L. (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. Cell 76, 567–576

Wassenegger, M. Gmbh, R. (2005). The Role of the RNAi Machinery in Heterochromatin Formation. Cell 122, 13–16

Wassenegger, M. & Krczal, G. (2006)Nomenclature and functions of RNA-directed RNApolymerases.TrendsinPlantScience11,142–151

Wei, KF. Wu, LJ. Chen, J. Chen, YF. Xie, DX. (2012) Structural evolution and functional diversification analyses of Argonaute protein J. Cell. Biochem.113:2576–85

Werghi, S. Herrero, F.A. Fakhfakh, H. Gorsane, F. (2021) Auxin drives tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance through epigenetic regulation of auxin response factor ARF8 expression in tomato GeneVolume 804, 15 December, 145905

Whitfield, A.E. Ullman, D.E. German, T.L. (2005) Tospovirus-Thrips Interactions Annual Review Phytopathology 43:459–89

Wingard, S. A. (1928) Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. J. Agric. Res. 37, 127–153

Wilson, M.D. Wang, D. Wagner, R. Breyssens, H., Gertsenstein, M. Lobe, C. Lu, X., Nagy, A., Burke, R.D. Koop, B.F. Howard, P.L. (2008a) ARS2 Is a Conserved Eukaryotic Gene Essential for Early Mammalian Development. Mol Cell Biol 28, 1503–1514.https://doi.org/10.1128/MCB.01565-07

Wu, G. Park, MY. Conway, SR. Wang, JW. Weigel, D. Poethig, RS. (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. Cell 138:750–759

Wu, J. Yang, R. Yang, Z. Yao, S. Zhao, S. Wang, Y. Li, P. Song, X. Jin, L. Zhou, T. Lan, Y. Xie, L. Zhou, X. Chu, C. Qi, Y. Cao, X. Li, Y. (2017) ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice Nat. Plants, 3 p. 16203.

Xie, M. Zhang, S. Yu, B. (2014) microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. Cell Mol Life Sci.

Yan, J. Wang, P Wang B. (2017) The SnRK2 kinases modulate mirna accumulation in Arabidopsis PLoS Genet., 13 Article e1006753

Yang, L. Liu, Z. Lu, F. (2006) SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis Plant J., 47 pp. 841-850

Yang, M. Zhang, Y. Xie, X. Yue, N. Li, J. Wang, X.B. Han, C. Yu, J. Liu, Y. Li, D. (2018) Barley stripe mosaic virus gammab protein subverts autophagy to promote viral infection by disrupting the ATG7-ATG8 interaction Plant Cell, 30 pp. 1582-1595

Yin, Z. Chrzanowska, M. Michalak, K. and Zimnoch-Guzowska, E. (2014) Alteration of hostencoded miRNAs in virus infected plants—experimentally verified, Plant Virus

Yu, B. Yang, Z. Li, J.S Minakhina, S. Yang, M. Padgett, R., Steward R. Chen, X. (2005) Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis SCIENCE 11 Feb Vol 307, Issue 5711 pp. 932-935

Zhang, X. 1 Yuan, Y. Pei, Y. Lin, S.S. Tuschl, T. Patel, D.J. Chua1, N. H. (2006), Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense Genes Dev., 20 pp. 3255-3268

Zhang, X. Lai ,T. Zhang P. Zhang, X. Yuan, C. Jin, Z. Li, H. Yu, Z. Qin, C. Tör, M. Ma, P. Cheng, Q. Hong, Y. (2019) Mini review: Revisiting mobile RNA silencing in plants Plant Science Volume 278, January, Pages 113-117

Zhao, H. Zhao, K Wang, J. Chen, X. Chen, Z. Cai, R. Xiang, Y. (2015) Comprehensive Analysis of Dicer-Like, Argonaute, and RNA-dependent RNA Polymerase Gene Families in Grapevine (Vitis Vinifera) Plant Growth Regul 34, 108–121 (2015). https://doi.org/10.1007/s00344-014-9448-7 Zhao, J.H. Guo, H.S. (2021) RNA silencing: From discovery and elucidation to application and perspectives

https://doi.org/10.1111/jipb.13213

Zeng, Z., Liu, Z. & Xia, R. (2018) Small RNAs, emerging regulators critical for the development of horticultural traits. Hortic. Res. 5, 63

Xu, P. Chen, F. Mannas, J. Feldman, T. Summer, L. Roossinck, M. (2008)Virus infection improves drought tolerance New Phytologist, 2008, vol. 180 (pg. 911-921

Ελληνική βιβλιογραφία

Κρυοβρυσανάκη, Ν. (2019) Μελέτη του ρόλου του SERRATE στην απόκριση των φυτών σε βιοτικές καταπονήσεις στα Ν. benthamiana & N.tabacum, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιστοσελίδες

https://ictv.global/

6. Παράρτημα

Ι) Ανιχνευτές

Το μίγμα των DIG σημασμένων ριβονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DIG-RNA labeling kit (ROCHE). Οι RNA ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή παρασχέθηκαν από το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και από την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Κρυοβρυσανάκη Νικολέτα.

CMV

Εκκινητές	Μήκος αλληλουχίας	Γονιδίωμα 10ύ	Γονίδιο	Αλληλουχία
3' CP - CMV	850bp	RNA 3, RNA 4	Καψιδιακή πρωτεΐνη (CP)	5' – GGCGAATTCGAGC TCGCCGTAAGCTGGATGGACC -3'
5'CP - CMV				5' -CTCGAATTCGG ATCCGCTTCTCCGCGAG -3'

TSWV

Εκκινητές	Μήκος αλληλουχίας	Γονιδίωμα 10ύ	Γονίδιο	Αλληλουχία
TSWV L1			RNA εξαοτώμενης	AATTGCCTTGCAACCAATTC
TSWV L2	273bp	L RNA	RNA πολυμεράσης (RdRp)	CAGTCGAAATGGTCGGCA

ΙΙ) Εξελικτική Πορεία Μόλυνσης του ιού CMV



1º Πείραμα CMV

2º Πείραμα CMV

