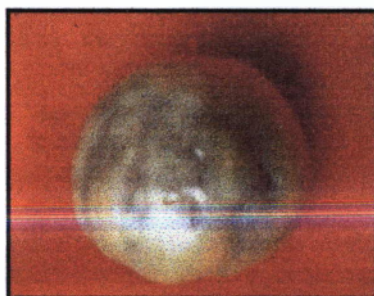


Τ.Ε.Ι ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΑΦΙΔΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΩΝ ΙΩΝ ΣΕ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

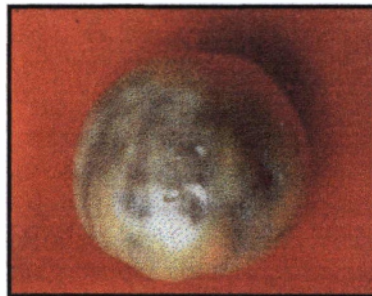


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΓΙΑΝΝΟΥΣΟΠΟΥΛΟΥ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 1999

Τ.Ε.Ι ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΑΦΙΔΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΩΝ ΙΩΝ ΣΕ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΟΜΑΤΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΓΙΑΝΝΟΥΣΟΠΟΥΛΟΥ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 1999

Τ.Ε.Ι ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΑΦΙΔΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΩΝ ΙΩΝ ΣΕ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΟΜΑΤΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΓΙΑΝΝΟΥΣΟΠΟΥΛΟΥ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 1999

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της πρακτικής μου εξάσκησης στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο στο τμήμα Ιολογίας με σκοπό την μελέτη του ρόλου των αυτοφυών φυτών στην επιδημιολογία αφιδομεταδιδόμενων ιών σε καλλιέργειες τομάτας.

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των καλλιεργητών τομάτας στη χώρα μας είναι η μόλυνση των φυτών τους από ιώσεις οι οποίες μεταδίδονται με τις αφίδες, με συνέπεια τη μείωση της παραγωγής, λόγω καταστροφής μεγάλου ποσοστού της καλλιέργειας (φτάνει μέχρι 70%) και μεγάλες οικονομικές ζημιές.

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των αυτοφυών φυτών στην επιδημιολογία των συγκεκριμένων ιών έγιναν τυχαίες δειγματοληψίες από την περιοχή του Ακραιφνίου Θηβών σε αυτοφυή φυτά που γειτνιάζαν με καλλιέργειες τομάτας οι οποίες είχαν προσβληθεί από τους αφιδομεταδιδόμενους ιούς CMV και PVY. Η εξέταση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια της Ένζυμο-άνοσο δοκιμής ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) με υλικά και εξοπλισμό που παρείχε το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.

Η παρούσα μελέτη αποτελείται από δύο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό. Στο θεωρητικό μέρος αρχικά γίνεται μια γενική αναφορά στους παθογόνους ιούς της τομάτας και αναλύονται οι δύο σημαντικότεροι και αναφέρονται οι υπόλοιποι. Στη συνέχεια περιγράφονται οι τρόποι μετάδοσης των φυτικών ιών και τέλος γίνεται περιγραφή των μεθόδων ανίχνευσής τους. Στο πειραματικό μέρος γίνεται μια αναφορά στο πρόβλημα που δημιουργούν οι αφιδομεταδιδόμενοι ιοί, περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, αναφέρονται και αναλύονται τα αποτελέσματα του πειράματος και τελικώς εξάγονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη.

Για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης θέλω να ευχαριστήσω την Δρ. Χ. Βαρβέρη η οποία ήταν και η εμπνεύστρια αυτού του πειράματος, καθώς επίσης τον Δρ. Φ. Μπεμ, και την Χριστίνα Παναγιωτίδη για την συνεργασία τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ (ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ)

ΟΙ ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

1.1	ΟΙ ΙΟΙ ΩΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΑΙΤΙΑ.....	8
1.1.1	Ιστορική αναδρομή	8
1.1.2	Μορφολογικά χαρακτηριστικά	9
1.1.3	Παθογένεση	9
1.2	ΙΩΣΕΙΣ ΤΟΜΑΤΑΣ	11
1.2.1	Ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV)	11
1.2.1.1	Διάδοση.....	11
1.2.1.2	Συμπτώματα	12
1.2.1.3	Χαρακτηριστικά του ιού	15
1.2.1.4	Διάγνωση.....	15
1.2.1.5	Αντιμετώπιση.....	16
1.2.2	Ιός Y της πατάτας (potato virus Y, PVY)	18
1.2.2.1	Διάδοση.....	18
1.2.2.2	Συμπτώματα	18
1.2.2.3	Χαρακτηριστικά του ιού	19
1.2.2.4	Διάγνωση.....	19
1.2.2.5	Αντιμετώπιση.....	20
1.2.3	Ιός του μωσαϊκού της τομάτας (tomato mosaic virus, ToMV).....	21
1.2.3.1	Αίτιο - Συνθήκες αναπτύξεως	24
1.2.4	Ιός του μαρασμού μετά κηλιδώσεως της τομάτας (tomato spotted wilt virus, TSWV).....	25
1.2.5	Ιός του θαμνώδους νανισμού της τομάτας (tomato bushy stunt virus, TBSV).....	27
1.2.6	Ιός του κίτρινου καρουλιάσματος των φύλλων της τομάτας (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)	28
1.2.7	Ιός του ίκτερου των νεύρων της τομάτας (tomato vein yellowing	

virus, TVYV).....	28
1.3 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΩΝ	30
1.3.1 Γενικά.....	30
1.3.2 Μηχανική μετάδοση στον αγρό.....	30
1.3.3 Μετάδοση με έντομα	31
1.3.3.1 Μετάδοση με αφίδες.....	32
1.3.3.2 Μετάδοση με έντομα των οικογενειών Cicadellidae, Delphacidae και Membracidae	35
1.3.3.3 Μετάδοση με αλευρώδεις.....	36
1.3.4 Μετάδοση με ακάρεα.....	36
1.3.5 Μετάδοση με νηματώδεις.....	37
1.3.6 Μετάδοση με μύκητες.....	37
1.3.7 Μετάδοση με εμβολιασμό.....	37
1.3.8 Μετάδοση με το σπόρο.....	37
1.3.9 Μετάδοση με τη γύρη.....	38
1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΙΩΝ.....	39
1.4.1 Ορολογικές δοκιμές	39
1.4.1.1 Γενικά.....	39
1.4.1.2 Παραγωγή αντιορού.....	40
1.4.1.3 Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA	41
1.4.1.4 Δοκιμές καθίζησης σε δοκιμαστικό σωλήνα (Tube agglutination test) ..	43
1.4.1.5 Ανοσοδιάχυση (μέθοδος Ouchterlony).....	44
1.4.1.6 Ανοσοπροσροφητική ηλεκτρονική μικροσκοπία (Immunosorbent electron microscopy, ISEM).....	44
1.4.1.7 Μέθοδος "Decoration".....	45
1.4.1.8 Σήμανση με κολλοειδή χρυσού.....	46
1.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)	46
1.4.3 Ανάλυση μοριακού υβριδισμού	48
1.4.4 Βιολογική δοκιμή.....	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ (ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ)

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΑΦΙΔΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΩΝ ΙΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

2.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	51
2.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	54
2.2.1	Δειγματοληψία.....	54
2.2.2	Δοκιμή ELISA	54
2.2.2.1	Περιγραφή της δοκιμής ELISA	54
2.2.2.2	Διάταξη-Χρησιμοποίηση.....	56
2.2.2.3	Υλικά για τη δοκιμή ELISA.....	57
2.2.2.4	Προετοιμασία δειγμάτων	60
2.2.3	Μετάδοση με αφίδες <i>Myzus persicae</i> και <i>Aphis craccivora</i>	61
2.2.4	Έλεγχος μετάδοσης του CMV από σπόρο του <i>Sisymbrium officinalis</i>	61
2.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
2.3.1	Συχνότητα εμφάνισης των CMV και PVY σε ζιζάνια και άλλες καλλιέργειες	62
2.3.2	Μετάδοση του CMV με αφίδες	64
2.3.3	Μετάδοση του CMV από σπόρο του <i>Sisymbrium officinalis</i>	64
2.4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ
(ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ)
ΟΙ ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

1.1 ΟΙ ΙΟΙ ΩΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΑΙΤΙΑ

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Οι ιολογικές ασθένειες ή ιώσεις των φυτών απασχόλησαν τους επιστήμονες μόλις προς το τέλος του 18^{ου} αιώνα, όταν έγιναν οι πρώτες περιγραφές για το καρούλιασμα των φύλλων της πατάτας και το μωσαϊκό του καπνού. Γρήγορα όμως το ενδιαφέρον μεγάλωσε και το 1886 ο Γερμανός Adolf Mayer διαπίστωσε τη δυνατότητα μηχανικής μετάδοσης (με τριβή) των συμπτωμάτων του μωσαϊκού σε υγιή φυτά καπνού χρησιμοποιώντας ως μόλυσμα χυμό από συμπτωματικά φύλλα. Λίγα χρόνια αργότερα το 1898, ο Ολλανδός Martinus Beijerinck απέδειξε ότι το αίτιο του μωσαϊκού πολλαπλασιάζεται στα φυτά και θεώρησε ότι είναι ένας καινούργιος τύπος παθογόνου οργανισμού. Αρκετά αργότερα το 1931 το παθογόνο που προκαλεί το μωσαϊκό στον καπνό, ονομάστηκε ιός (virus) και στη συνέχεια αποδείχτηκε ότι αποτελείται από πρωτεΐνη και νουκλεϊκό οξύ, ενώ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχει τη μορφή ραβδόμορφων σωματιδίων.

Για τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς οι πρώτες αναφορές έγιναν από τους Doolittle και Jagger το 1916 οι οποίοι μελέτησαν τα συμπτώματα που προκαλούσε ο ιός σε φυτά αγγουριάς στις Η.Π.Α και στη συνέχεια τον ονόμασαν ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV). Για τον ιό Υ της πατάτας οι πρώτες αναφορές έγιναν αργότερα το 1931 και ο πρώτος που παρατήρησε τα συμπτώματα σε φυτά πατάτας ήταν ο ερευνητής Smith. Τα επόμενα χρόνια οι επιστήμονες μελέτησαν το ρόλο που διαδραματίζουν οι αφίδες στη μετάδοση των ιών σε διάφορα φυτά. Πιο συγκεκριμένα ο Simons το 1955 μελέτησε πρώτος την μετάδοση του ιού PVY και του ιού CMV σε φυτά πιπεριάς με τη βοήθεια των αφίδων.

Στις δεκαετίες που ακολούθησαν οι γνώσεις για τους φυτικούς ιούς επεκτάθηκαν και οι πληροφορίες για τη δομή και τη σύστασή τους, τη φύση των συστατικών τους, τις σχέσεις ιών-φυτών και ιών-φυσικών φορέων (έντομα, μύκητες, νηματώδεις), τις δυνατότητες εξυγίανσης μολυσμένων φυτών ή πολλαπλασιαστικού υλικού, πλήθυναν

σε σημείο να αποτελούν ουσιαστικό στήριγμα για την ανάπτυξη των άλλων βιολογικών επιστημονικών κλάδων όπως η Μοριακή Βιολογία, η Βιοτεχνολογία και η Γενετική. Τα τελευταία χρόνια περισσότεροι από 600 φυτικοί ιοί έχουν μελετηθεί διεθνώς και για ένα σημαντικό ποσοστό έχει αναφερθεί τεκμηριωμένα η ζημιογόνος επίπτωσή τους στις καλλιέργειες. Ταυτόχρονα καρποφόρησαν οι μελέτες για την κατανόηση της ενδότατης φυσικοχημικής δομής και του μηχανισμού αναπαραγωγής των ιών, ενώ επιτεύχθηκε η ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών και η δημιουργία ανθεκτικών, γενετικά τροποποιημένων φυτών (διαγονιδιακών) με ενσωμάτωση γονιδίων που προέρχονται από τους ίδιους τους ιούς.

1.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Οι φυτικοί ιοί είναι οντότητες υπομικροσκοπικές και ενδοκυτταρικά υποχρεωτικά παράσιτα. Η χημική τους σύσταση είναι αρκετά απλή, αφού αποτελούνται από ένα είδος πρωτεΐνης (σπάνια από περισσότερες), από νουκλεϊκά οξέα (ριβονουκλεϊκό, RNA ή δεοξυριβονουκλεϊκό, DNA) και λιπίδια (σε περιορισμένο αριθμό ιών). Οι πρωτεΐνες συγκροτούν το περίβλημα-καψίδιο που περιβάλλει το γενετικό υλικό (RNA ή DNA) και χαρακτηρίζουν συγκεκριμένες ιδιότητες (αντιγονικές και αλληλεξαρτήσεις με τους φορείς ή ξενιστές) των ιών. Το πρωτεϊνικό καψίδιο αποτελεί το κυρίαρχο τμήμα του ισωματίου (50-95% του βάρους). Στους φυτικούς ιούς το νουκλεϊκό οξύ είναι ενός τύπου (RNA ή DNA) και με σταθερή περιεκτικότητα από 0,6 έως 44%. Η περισσότεροι των φυτικών ιών (περίπου το 95%) έχουν ssRNA (απλής έλικας), αλλά υπάρχουν και ιοί με dsRNA (διπλής έλικας), ssDNA και dsDNA. Οι ιοί των φυτών έχουν διάφορες μορφές και διαστάσεις.

1.1.3 Παθογένεση

Η πορεία μιας ιολογικής ασθένειας διακρίνεται σε τρεις διαδοχικές φάσεις:

- α) Μόλυνση του κυττάρου (διείσδυση)
- β) "Πολλαπλασιασμός" του ιού εντός του κυττάρου
- γ) Διάδοση από το μολυσμένο σε άλλα κύτταρα

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο είναι πάντοτε μια παθητική διαδικασία και για την πραγμάτωσή της απαιτείται η παρουσία μικρορωγμών στο κυτταρικό τοίχωμα. Τα μικροτραύματα επιτρέπουν στα ισωμάτια να έλθουν σε επαφή με το κυτόπλασμα, αλλά δε θα πρέπει να έχουν συνέπειες στη βιωσιμότητα του κυττάρου. Θεωρητικά ένα ισωμάτιο θα ήταν αρκετό για την έναρξη της μόλυνσης, που μπορεί να παραμείνει περιορισμένη στις γύρω περιοχές του σημείου διείσδυσης (τοπική μόλυνση) ή να διαδοθεί σε ολόκληρο το φυτό (διασυστηματική μόλυνση).

Το ισωμάτιο από τη στιγμή που έρχεται σε επαφή με το κυτόπλασμα αποσυναρμολογείται και έτσι το νουκλεϊκό οξύ απελευθερώνεται από το πρωτεϊνικό καψίδιο. Ο "πολλαπλασιασμός" του ιού, δηλαδή η αριθμητική αύξηση της συγκέντρωσης των νουκλεοπρωτεϊνών του ιού στο κύτταρο, πραγματοποιείται διαμέσου μιας διαδικασίας στην οποία το νουκλεϊκό οξύ του ιού αναδιπλασιάζεται με τη βοήθεια ενζύμων RNA πολυμεράση ή ρεπλικάση, ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει και τη σύνθεση της καψιδιακής πρωτεΐνης, αξιοποιώντας τα αμινοξέα του πρωτοπλάσματος και τα οργανίδια σύνθεσης πρωτεϊνών του κυττάρου (ριβωσώματα). Θεωρητικά η διαδικασία αναδιπλασιασμού των ισωματίων θα μπορούσε να συνεχιστεί επ' άπειρον στο ίδιο κύτταρο ξενιστή.

Μετά τον πολλαπλασιασμό ακολουθεί η **διάδοση του ιού** διαμέσου των πλασμοδεσμάτων σε άλλα γειτονικά κύτταρα, γύρω από το αρχικά μολυσμένο, όπου θα συνεχιστεί η διαδικασία αναδιπλασιασμού. Εάν τα γειτονικά κύτταρα εξαιτίας της αντίδρασης υπερευαισθησίας (μια μορφή ανθεκτικότητας των φυτών), νεκρωθούν, τότε η διάδοση περιορίζεται τοπικά. Σε αντίθετη περίπτωση, ο ιός μετακινείται και συνεχίζει να αναδιπλασιάζεται στους φυτικούς ιστούς του ξενιστή. Το φαινόμενο αυτό επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που ρυθμίζουν τη ζωή του φυτού (θερμοκρασία, υγρασία, λιπάνσεις, φωτοπερίοδος). Βέβαια η παρουσία του ιού στο φυτό δεν είναι ομοιόμορφη και εξαρτάται από τη δυνατότητα διάδοσης των ισωματίων στους διάφορους φυτικούς ιστούς.

1.2 ΙΩΣΕΙΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

Παρακάτω περιγράφονται οι κυριότερες ιώσεις της τομάτας και δίδεται ιδιαίτερη έμφαση στους ιούς (cucumber mosaic virus, CMV) και (potato Y virus, PVY) που είναι και οι πιο σημαντικοί και διαδεδομένοι στις καλλιέργειες τομάτας της χώρας μας τουλάχιστον τα τελευταία χρόνια.

1.2.1 Ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV)

1.2.1.1 Διάδοση

Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) είναι ευρέως διαδεδομένος σ' όλες τις χώρες του κόσμου. Η πρώτη φορά που αναφέρθηκε ο ιός ήταν το 1916 από τους Doolittle και Jagger και ήταν ο κύριος παράγοντας για μια ασθένεια στο αγγούρι στο Μίσιγκαν στις Η.Π.Α και στη Νέα Υόρκη επίσης στις Η.Π.Α. Αυτοί οι δυο επιστήμονες περιέγραψαν και την δομή του ιού. Από τότε ο CMV έχει εντοπιστεί στις περισσότερες χώρες του κόσμου σε μικρότερο ποσοστό στην εύκρατη ζώνη και σε μεγαλύτερο στην τροπική ζώνη. Τα τελευταία χρόνια εξαπλώνεται συνεχώς και προκαλεί προβλήματα στις καλλιέργειες τομάτας. Ο ιός εμφανίστηκε στην Ιταλία το 1988, στην Ισπανία το 1989, στην Ιαπωνία το 1984 και στην Ελλάδα (στην Τίρυνθα) το 1987 (Φ. Μπέμ, 1987). Ο ιός προκαλεί τριών ειδών συμπτώματα. Στη χώρα μας αποτελεί το σοβαρότερο φυτοπαθολογικό πρόβλημα των σολανωδών όπως η τομάτα και η πιπεριά και των κολοκυνθοειδών όπως η αγγουριά, η κολοκυθιά και η πεπονιά (Κυριακοπούλου και Μπέμ, 1982 Κατής και Αυγελής, 1991). Από τα μέσα της δεκαετίας του 1980, ο CMV εμφανίζει στην τομάτα μια επιδημική και βίαιη συμπεριφορά. Σαρώνει τις καλλιέργειες της βιομηχανικής αλλά και της υπαίθριας επιτραπέζιας τομάτας στην Πελοπόννησο (Ηλεία, Μεσσηνία, Λακωνία, Αργολίδα, Κορινθία), στην Κεντρική και στη Βόρειο Ελλάδα.

1.2.1.2 Συμπτώματα

Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV) έχει ευρύτατο κύκλο φυσικών ξενιστών και είναι διαδεδομένος σε όλο τον κόσμο. Προσβάλλει μεγάλο αριθμό καλλιεργειών κυρίως των οικογενειών *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Compositae*, *Chenopodiaceae*. Τα συμπτώματα που προκαλεί είναι ποικίλα όπως μωσαϊκό, ποικιλοχλώραση, παραμορφώσεις, ποικιλοχρώσεις, νεκρωτικά συμπτώματα, μείωση της ανάπτυξης ή και θάνατο του φυτού. Η εμφάνιση του ανάλογου συμπτώματος εξαρτάται από την φυλή, τις συνθήκες περιβάλλοντος και από την συνοδεία του ιού, από δορυφορικό RNA.

Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) προκαλεί ασθένειες διάφορης συμπτωματολογίας όπως: ποικιλοχλώραση-νημάτωση της τομάτας, συρρίκνωση της τομάτας και νέκρωση της τομάτας.

ι. Ποικιλοχλώραση, νημάτωση της τομάτας



Εικόνα 1. Ποικιλοχλώραση, νημάτωση της τομάτας (Γεωργία και κτηνοτροφία, 4 1990).

Το χαρακτηριστικότερο σύμπτωμα της ασθένειας είναι η στένωση των φυλλιδίων του φύλλου και βλαστών, έτσι ώστε να δίνεται η εντύπωση φύλλου φτέρης. Η στένωση είναι δυνατό να φτάσει μέχρι και τη νημάτωση των φύλλων, φαινόμενο ιδιαίτερα έντονο και χαρακτηριστικό της ασθένειας. Τα φυτά επίσης είναι δυνατό να εμφανίζουν μωσαϊκό, μειωμένη ανάπτυξη και καρποφορία και αλλοιώσεις του χρώματος και της ποιότητας των καρπών. Πολλά άνθη παραμένουν στείρα. Ένα από τα πρώτα συμπτώματα στα παλαιότερα φύλλα είναι η ποικιλοχλώραση των

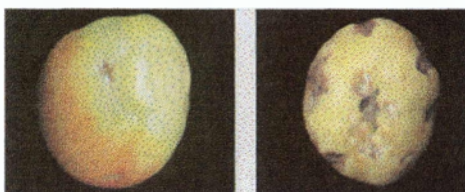
φύλλων, ιδιαίτερος κατά μήκος των νευρώσεων.

ii. Συρρίκνωση της τομάτας (tomato shrinkage)

Τα φυτά εμφανίζουν γενικό ελαφρό αποχρωματισμό, ιώδη μεταχρωματισμό κυρίως των νευρώσεων της κάτω επιφάνειας των φύλλων, σκληρό καρούλιασμα των



Εικόνα 2. Συρρίκνωση της τομάτας (tomato shrinkage). Το αριστερό φυτό είναι υγιές, ενώ το δεξί είναι το μολυσμένο (Χ. Γ. Παναγόπουλος Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών).



Εικόνα 3. Συμπτώματα συρρίκνωσης σε καρπούς (Χ. Γ. Παναγόπουλος Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών).

φύλλων προς τα άνω και ελαφρά στένωση χάνοντας το λαμπερό πράσινο χρώμα τους. Προς τη βάση τους τα φύλλα μπορούν να κιτρινίσουν και να νεκρωθούν στη βάση των κεντρικών νεύρων. Οι μίσχοι και οι βλαστοί συστρέφονται, με συνέπεια το "μάζεμα" (συρρίκνωση) του φυτού. Τα φυτά παρουσιάζουν όχι μόνο ανάσχεση της αναπτύξεως, αλλά και σμίκρυνση του όγκου τους λόγω της συστροφής του μίσχου και των βλαστών. Τα φυτά αποκτούν συμπαγή μορφή και η τελική κατάληξη του σχήματος του φυτού είναι ο νανισμός. Οι καρποί είναι δυνατόν να εμφανίζουν συμπτώματα παρόμοια με τον καστανό μεταχρωματισμό. Πιο συγκεκριμένα οι πράσινοι καρποί που πλησιάζουν το στάδιο της ωρίμανσης παρουσιάζουν διαφανείς τεφροκαστανές σκληρές περιοχές, συνήθως στην

περιοχή των ώμων του καρπού. Σε τομή φαίνεται κάτω από την επιφάνεια των κηλίδων αυτών ιστός καστανός, σκληρός, φελλοποιημένος.

Η ασθένεια έχει λάβει τεράστιες επιδημικές διαστάσεις σ' όλη τη χώρα. Ολόκληρες καλλιέργειες τομάτας εγκαταλείφθηκαν στο μέσο της καλλιεργητικής περιόδου, αφού το ποσοστό των ασθενών φυτών είναι συνήθως 100% και η παραγωγή εκμηδενίζεται ή μειώνεται σε ασύμφορα επίπεδα. Εξ αιτίας της ασθένειας αυτής πολλοί παραγωγοί αποθαρρύνονται από την καλλιέργεια της τομάτας.

iii. Νέκρωση της τομάτας

Οφείλεται στον CMV, στο σωματίδιο του οποίου όμως υπάρχει ένα πέμπτο RNA, το RNA 5 ή CARNA 5. Στην Ελλάδα η θανατηφόρος φυλή του CARNA 5



Εικόνα 4. Συμπτώματα της νέκρωσης της τομάτας (tomato necrosis) σε φύλλα (Χ. Γ. Παναγόπουλος Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών).



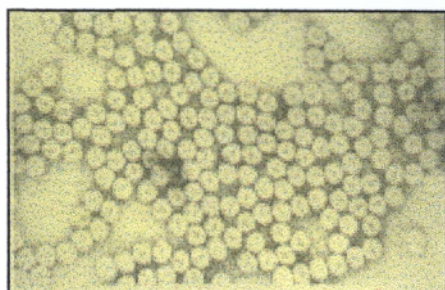
Εικόνα 5. Συμπτώματα της νέκρωσης των καρπών (Χ. Γ. Παναγόπουλος Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών).

εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Αργολίδα το Καλοκαίρι του 1987 όπου προκάλεσε καταστροφή. Ήδη έχει επεκταθεί και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας.

Τα φυτά εμφανίζουν αναστολή της αναπτύξεως, τραχύτητα των φύλλων και ελαφρό κατσάρωμα. Στο έλασμα των φύλλων σχηματίζονται ασαφείς χλωρωτικές κηλίδες που γρήγορα αποκτούν σκούρο χρώμα, γίνονται νεκρωτικές και συνενούμενες καταλήγουν στη ξήρανση ολόκληρου του φύλλου. Επίσης παρατηρούνται μαύρες νεκρωτικές ραβδώσεις στο στέλεχος και στους μίσχους των φύλλων και ακολουθεί νέκρωση του φυτού από τη κορυφή προς τη βάση. Τα προσβεβλημένα φυτά τομάτας ξηραίνονται μέσα σε 1-2 εβδομάδες. Οι καρποί στην επιφάνειά τους εμφανίζουν λευκές ή μπες ή καστανές βυθισμένες νεκρώσεις μορφής κηλίδων, δακτυλίων ή μεγαλύτερων περιοχών. Τα συμπτώματα αυτά δίνουν την

εντύπωση τοξικότητας από καυστικές ουσίες. Τέλος στους καρπούς παρατηρούνται παραμορφώσεις και εσωτερική αλλοίωση. Επειδή τα συμπτώματα της προσβολής μοιάζουν με τα προκαλούμενα από άλλα αίτια (π.χ αδρομυκώσεις, αδροβακτηριώσεις, τοξικότητα φυτοφαρμάκων ή λιπασμάτων) η διάγνωση της ασθένειας πρέπει να γίνεται στο εργαστήριο.

1.2.1.3 Χαρακτηριστικά του ιού



Εικόνα 6. Ιοσωμάτια του CMV στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Προσφορά Π. Κυριακοπούλου).

Το υπεύθυνο παθογόνο της προαναφερθείσης συμπτωματολογίας είναι ένας σφαιρικός (πολυεδρικός) ιός διαμέτρου 28-30 nm, που ανήκει στο γένος *Cucumovirus* της οικογένειας *Bromoviridae*. Το 18% του βάρους των ιοσωματίων εκπροσωπείται από ssRNA και το υπόλοιπο 82% από το πρωτεϊνικό καψίδιο. Το γένομα είναι διηρημένο συνήθως σε τέσσερα τμήματα [RNA-1 (M.B $1,27 \times 10^6$ d), RNA-2 ($1,13 \times 10^6$ d), RNA-3 ($0,82 \times 10^6$ d), RNA-4 ($0,35 \times 10^6$ d)]. Το σημείο θερμικής αδρανοποίησης είναι 55-70° C, η διάρκεια ζωής *in vitro* 1-10 ημέρες και η οριακή αραιώση 10^{-3} έως 10^{-6} .

Πηγές του ιού αποτελούν μολυσμένα φυτά διάφορων καλλιεργούμενων φυτικών ειδών (αγγουριά, κολοκυθιά, πιπεριά, τομάτα) και κοινών ζιζανίων. Η διαίωσιση του ιού στηρίζεται συνήθως σε πολυετή ζιζάνια.

Στον αγρό η εξάπλωση του ιού γίνεται με περισσότερα από 75 είδη αφίδων με μη έμμοно τρόπο (η πρόσληψη και η μετάδοση του ιού πραγματοποιείται σε χρόνο λίγων λεπτών). Η αποτελεσματικότητα μετάδοσης του CMV από τα διάφορα είδη αφίδων διαφέρει.

1.2.1.4 Διάγνωση

Για τη διάγνωση του CMV χρησιμοποιούνται οι παρακάτω μέθοδοι:

1. Μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών. Για τη βιολογική διάγνωση του χρησιμοποιούνται συνήθως τα είδη:

- i. *Cucumis sativus*, *Cucumis melo*: Εμφανίζουν μωσαϊκό
- ii. *Nicotiana tabacum*: Συνήθως δεν εμφανίζουν χαρακτηριστικά τοπικά συμπτώματα σε αντίθεση με τα διασυστηματικά συμπτώματα, που είναι το μωσαϊκό, δακτυλιώσεις και έντονες παραμορφώσεις.
- iii. *Chenopodium quinoa*: Τοπικές χλωρωτικές ή νεκρωτικές κηλίδες

2. Με ορολογικές δοκιμές, όπως η ανοσοενζυμική δοκιμή (ELISA). Η δοκιμή μπορεί να γίνει με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα, με τα οποία μπορεί να γίνει η ταξινόμηση σε δύο ορολογικές ομάδες.

3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Η PCR δίνει και αυτή τη δυνατότητα ταξινόμησης των απομονώσεων του CMV σε δύο υποομάδες, ενώ η αυξημένη ευαισθησία της επιτρέπει την ανίχνευση ελάχιστων ποσοτήτων του ιού.

1.2.1.5 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση του CMV είναι αρκετά δύσκολη. Εξαιτίας της ταχείας μετάδοσης του ιού με τα δοκιμαστικά νύγματα των αφίδων (1-2 λεπτά) οι επεμβάσεις με αφιδοκτόνα δεν έχουν σχεδόν καμιά πρακτική αποτελεσματικότητα. Η ικανοποιητική μείωση του ποσοστού προσβολής και των απωλειών της παραγωγής μπορεί να επιτευχθεί μόνο με την εφαρμογή προγραμμάτων ολοκληρωμένης καταπολέμησης, για τα οποία όμως απαιτείται επαρκής γνώση των περίπλοκων σχέσεων ιού-ξενιστών-αφίδων φορέων-περιβάλλοντος.

Επειδή δεν υπάρχουν ανθεκτικές ποικιλίες τομάτας έναντι του CMV τα προληπτικά μέτρα που συνιστώνται είναι:

➤ Καταστροφή των ζιζανίων στον περίγυρο των σπορίων τομάτας και των καλλιεργειών τομάτας πριν από την μεταφύτευση των φυτών τομάτας.

➤ Κάλυψη των σπορείων τομάτας με εντομοστεγή δίχτυα, για να αποτραπεί η είσοδος των αφίδων. Κατά τη διενέργεια των καλλιεργητικών εργασιών στο σπορείο, πρέπει να καταβάλλεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η είσοδος των αφίδων. Επιπλέον να γίνονται τακτικοί ψεκασμοί για την παρεμπόδιση εγκατάστασης αφίδων. Να γίνεται συστηματικός έλεγχος των σπορείων και απομάκρυνση των τυχόν ασθενών φυτών. Ο χειρισμός των υγιών φυτών του σπορείου να γίνεται με φρεσκοπλυμένα χέρια, ιδιαίτερα αν έχει προηγηθεί επαφή με ασθενή φυτά. Τελευταία γίνεται χρήση λεπτού εντομοστεγούς δικτύου (οργαντίνα) που εξασφαλίζει στην καλλιέργεια προστασία από τον αφιδομεταδιδόμενο ιό CMV, αλλά και πρωιμότητα στην ανάπτυξη και στην καρποφορία. Το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος του δικτύου. Σχετικά πρόσφατα, όμως, αναφέρθηκε και στη Σαουδική Αραβία, στην Κύπρο και στην Ελλάδα η χρησιμοποίηση τέτοιων εντομοστεγών δικτύων χαμηλού κόστους

για την προστασία υπαίθριων καλλιεργειών από τις μεταδιδόμενες με εναέριους φορείς ιώσεις. Αξίζει, επομένως, να εξετασθεί η δυνατότητα παραγωγής ενός τέτοιου δικτύου και στην Ελλάδα.

➤ Μεταφύτευση μόνο των υγιών φυταρίων

➤ Καλλιέργεια περιφερειακά ή σε σειρές ενός άνοσου στον CMV ξενιστή, όπως για παράδειγμα ο ηλίανθος.

➤ Αποφυγή εγκατάστασης της καλλιέργειας της τομάτας κοντά σε ευπαθείς καλλιέργειες Κολοκυνθοειδών (αγγουριά, κολοκυθιά, πεπονιά) και Σολανωδών (πιπεριά)

➤ Μετατόπιση της εποχής μεταφύτευσης με πρόωμη σπορά, ώστε να αποφευχθούν οι υψηλοί πληθυσμοί των αφίδων-φορέων στα πρώτα στάδια της καλλιέργειας. Η επιτυχία των μέτρων μεταφύτευσης προϋποθέτει την ύπαρξη μελετών παρακολούθησης της διακύμανσης των πληθυσμών των αφίδων στη συγκεκριμένη περιοχή για αρκετά χρόνια, οι οποίες επιτρέπουν την ανάπτυξη ενός συστήματος προειδοποιήσεων για την εκτίμηση του κινδύνου από την εμφάνιση των αφίδων. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την αντιμετώπιση άλλων αφιδομεταδιδόμενων ιών που δημιουργούν προβλήματα στην τομάτα, όπως ο ιός Y της πατάτας (potato virus Y, PVY).

➤ Εδαφοκάλυψη με αντανάκλαστικές επιφάνειες (π.χ λωρίδες αλουμινίου) των γραμμών φύτευσης στον αγρό. Εξαιτίας της απωθητικής δράσης στις φτερωτές αφίδες μειώνεται σημαντικά η διάδοση του ιού. Το μειονέκτημα της μεθόδου όμως είναι το υψηλό κόστος, που καθιστά την εφαρμογή της στην καλλιέργεια της τομάτας ουσιαστικά ασύμφορη.

➤ Ψεκασμοί με ειδικά λάδια ή συνδυασμός λαδιών με διάφορα εντομοκτόνα μειώνουν τα ποσοστά προσβολής από τον CMV. Η μεθοδολογία όμως αυτή δεν διαδόθηκε στην τομάτα εξαιτίας του υψηλού κόστους εφαρμογής και της συχνής φυτοτοξικότητας στις περισσότερες ποικιλίες.

1.2.2 Ιός Y της πατάτας (potato virus Y, PVY)

1.2.2.1 Διάδοση

Έχει ευρεία διάδοση σε όλες τις χώρες, όπου καλλιεργείται πατάτα, καπνός και τομάτα. Στην καλλιέργεια τομάτας, ο ιός Y της πατάτας (PVY), δεν δημιουργεί τόσο μεγάλα προβλήματα όσο δημιουργεί ο CMV, αλλά διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην μείωση της παραγωγής και προκαλεί σοβαρά οικονομικά προβλήματα, σε συνδυασμό με τον CMV. Σε πειράματα που έκαναν οι B. Raccach και F. Eastop για το ρόλο των αφίδων στην μετάδοση των ιών CMV και PVY το 1959 στο Ισραήλ σε φυτά πιπεριάς έβγαλαν το συμπέρασμα ότι πάνω από το 80% της μόλυνσης των φυτών πιπεριάς οφειλόταν σε συνδυασμό των δύο παραπάνω ιών που μεταδόθηκαν με αφίδες. Ο ιός PVY αναφέρθηκε το 1955 από τον Simons ότι είναι υπεύθυνος για τις μολύνσεις που είχαν προκληθεί σε σολανώδη (πιπεριά, τομάτα) στην Φλόριντα των Η.Π.Α. Η μετάδοση είχε γίνει με αφίδες. Πρώτη φορά περιγράφηκε από τον Smith το 1931, ο οποίος ανακάλυψε τα χαρακτηριστικά του ιού και την δομή του. Η ασθένεια στην Ελλάδα είναι αρκετά διαδεδομένη σε πολλές περιοχές.

1.2.2.2 Συμπτώματα



Εικόνα 7. Πάνω επιφάνεια φύλλου τομάτας μολυσμένο από τον PVY (Γεωργία και κτηνοτροφία, 5 1995).

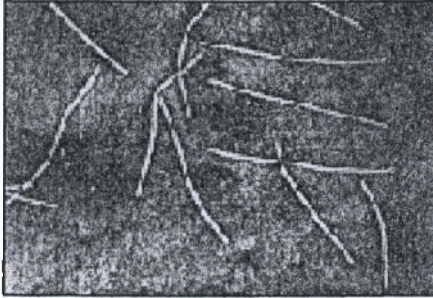
Η συμπτωματολογία του ιού στην τομάτα ποικίλλει αρκετά και εξαρτάται από την ποικιλία, αλλά και από τη φυλή του ιού και κυμαίνονται από ελαφρό μωσαϊκό μέχρι έντονες νεκρώσεις. Ο περινεύριος μεταχρωματισμός των φύλλων αποτελεί την κοινή συμπτωματολογική εικόνα της μόλυνσης από όλες τις φυλές του ιού.

Λόγω της ποικιλομορφίας των συμπτωμάτων, η διάγνωση της ασθένειας αυτής θα πρέπει να βασίζεται σε εργαστηριακές δοκιμές πάνω σε φυτά δείκτες, με την ανοσολογική μέθοδο ELISA και με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

1.2.2.3 Χαρακτηριστικά του ιού

Ο ιός Y της πατάτας (potato Y virus, PVY) ανήκει στην οικογένεια Potyviridae, στο γένος Potyvirus. Τα ισοσώματα έχουν μήκος 750 nm και πάχος 11 nm και περιέχουν

5,4-6,4% απλής έλικας RNA (M.B $3,1 \times 10^6$ d ή $3,2 \times 10^6$ d) και 93,4-94,6% καψιδιακή πρωτεΐνη (M.B 34.000 d).



Εικόνα 8. Ισοσώματα του PVY στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Γεωτεχνικά επιστημονικά θέματα, 4).

Έχουν χαρακτηριστεί τρεις φυλές του PVY, ανάλογα με τα συμπτώματα που προκαλούν σε ορισμένους φυτοδείκτες, όπως *Nicotiana tabacum* και *Physalis floridana*. Οι φυλές σημειώνονται με ειδικούς εκθέτες και ονομάζονται φυλή O, N και C του ιού Y της πατάτας. Η πρώτη είναι ευρύτατα

διαδεδομένη και προκαλεί ήπια συμπτώματα στην πατάτα, ενώ η δεύτερη εμφανίζεται στην Ευρώπη, σε περιοχές της Αφρικής και στη Νότια Αμερική. Η τρίτη φυλή του PVY εντοπίζεται στην Αυστραλία, στην Ινδία και σε μερικές περιοχές της Μεγάλης Βρετανίας. Στον αγρό η διάδοση των δύο πρώτων φυλών γίνεται πολύ γρήγορα (η πρόσληψη και η μετάδοση διαρκεί 1-2 λεπτά) με τη βοήθεια τουλάχιστον 30 ειδών αφίδων. Ο πιο αποτελεσματικός φορέας είναι το είδος *Myzus persicae*. Η εξάπλωση του ιού στον αγρό γίνεται κυρίως από τις φτερωτές μεταναστευτικές αφίδες που επισκέπτονται για σύντομο χρονικό διάστημα την καλλιέργεια και λιγότερο από τις αφίδες που αποικίζουν στην τομάτα. Στο εργαστήριο ο ιός μεταδίδεται μηχανικά σε διάφορους δείκτες.

Στη φύση πηγές του ιού αποτελούν τα μολυσμένα φυτά πατάτας, τομάτας, πιπεριάς, καθώς και ορισμένα ζιζάνια. Δε μεταδίδεται με το σπόρο των ξενιστών του.

1.2.2.4 Διάγνωση

i. Μηχανική μόλυνση φυτοδεικτών. Στους φυτοδείκτες *Nicotiana tabacum* και *Physalis floridana* παρατηρούνται συμπτώματα από τον ιό, τα οποία διαφέρουν ανάλογα τη φυλή του. Έτσι στις φυλές PVY^O και PVY^C παρατηρούνται συμπτώματα νέκρωσης και ποικιλόχρωσης των φύλλων για τον καπνό και το *Physalis floridana*

αντίστοιχα, ενώ στη φυλή PVY^N παρατηρείται νέκρωση των νεύρων των φύλλων του καπνού και ποικιλόχρωση των φύλλων στο *Physalis floridana*.

ii. Ορολογικές δοκιμές. Κυρίως ανοσοενζυμική δοκιμή (ELISA) με πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα. Τα τελευταία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την ορολογική διαφοροποίηση των φυλών του ιού, κάτι που δεν μπορεί να γίνει με πολυκλωνικά αντισώματα. Έχει αυξημένη ευαισθησία.

iii. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Η PCR σε συνδυασμό με την τεχνική RFLP (restriction fragment length polymorphism) δίνει τη δυνατότητα ταξινόμησης των απομονώσεων του PVY, ενώ η αυξημένη ευαισθησία της επιτρέπει την ανίχνευση ελάχιστων ποσοτήτων του ιού.

1.2.2.5 Αντιμετώπιση

Για την αντιμετώπιση του PVY στις καλλιέργειες τομάτας συνιστώνται τα παρακάτω μέτρα:

➤ Εγκατάσταση των σπορείων σε μεγάλη απόσταση (τουλάχιστον 1000 μ.) από καλλιέργειες πατάτας, οι οποίες αποτελούν τις κύριες πηγές του ιού. Στη χώρα μας αρκετά συχνά τα σπορεία εγκαθίστανται κοντά σε οικιακούς λαχανόκηπους πατάτας, συνήθως μολυσμένους από τον PVY, με αποτέλεσμα την ταχεία μεταφορά του ιού στο σπορείο. Σε κάθε περίπτωση τα σπορεία πρέπει να καλύπτονται με εντομοστεγές δίκτυο.

➤ Μεταφύτευση μόνο των υγιών φυταρίων. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό μέτρο, γιατί επιτρέπει την έναρξη της καλλιέργειας με υγιή φυτά και συνεπώς χωρίς μολύσματα του ιού. Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν γειτονικές καλλιέργειες πατάτας, αυξάνονται σημαντικά οι πιθανότητες να παραμείνει η καλλιέργεια τομάτας υγιής.

➤ Συστηματική καταπολέμηση των αφίδων-φορέων. Αν και η ικανοποιητική αντιμετώπιση των μη-έμμονων ιών, όπως ο PVY, με τη χρήση εντομοκτόνων είναι αρκετά δύσκολη, η εφαρμογή τους κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να περιοριστούν οι άμεσες ζημιές των αφίδων.

➤ Αποφυγή εγκατάστασης καλλιέργειας τομάτας κοντά σε καλλιέργεια πατάτας. Απόσταση μερικών εκατοντάδων μέτρων από άλλες γνωστές πηγές του PVY μειώνει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισής του.

➤ Έγκαιρος μακροσκοπικός έλεγχος με απομάκρυνση και καταστροφή των πρώτων μολυσμένων φυτών. Η εκρίζωση μέχρι και 5% των φυτών από μία καλλιέργεια δεν επηρεάζει την τελική παραγωγή.

➤ Χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών. Τα τελευταία χρόνια δημιουργήθηκαν γενετικά τροποποιημένα φυτά που εκδηλώνουν διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα οφείλεται είτε στο γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης είτε στο γονίδιο της ρεπλικάσης.

1.2.3 Ιός του μωσαϊκού της τομάτας (tomato mosaic virus, ToMV)

Το μωσαϊκό είναι μια πολύ σοβαρή ασθένεια που ήταν γνωστή στην Ευρώπη τουλάχιστον από τα μέσα του 19ου αιώνα. Η μεταδοτική φύση της ασθένειας στον καπνό ανακαλύφθηκε το 1886, ενώ η ιολογική της αιτιολογία διαπιστώθηκε το 1898. Στις Η.Π.Α. αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στο καπνό το 1899 και ως ασθένεια της τομάτας από το 1909. Σήμερα είναι διαδεδομένος σ' όλες τις περιοχές του κόσμου που καλλιεργούνται ευπαθή φυτά.



Εικόνα 9. Συμπτώματα του ιού του μωσαϊκού του καπνού σε καρπούς τομάτας (Χ. Γ. Παναγόπουλος Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών).



Εικόνα 10. Συμπτώματα του TMV σε φύλλα τομάτας (Χ. Γ. Παναγόπουλος Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών)

Στη χώρα μας ο ιός είναι πολύ διαδεδομένος και προκαλεί διάφορες σοβαρές ασθένειες, ιδιαίτερα στην τομάτα, πιπεριά, μελιτζάνα, πατάτα και καπνό αλλά και σε άλλες καλλιέργειες και σε αυτοφυή φυτά. Στην τομάτα προκαλεί διάφορες ασθένειες οι κυριότερες από τις οποίες είναι: α) Κοινό μωσαϊκό και κίτρινο μωσαϊκό της τομάτας (common mosaic and yellow mosaic), β) Απλή ράβδωση (tomato single streak), γ) Διπλή ράβδωση (tomato double-virus streak), δ) Εσωτερικός καστανός μεταχρωματισμός (tomato internal browning).

Σοβαρές ζημιές προκαλούνται στις υπαίθριες, αλλά και στις υπό κάλυψη καλλιέργειες

της τομάτας. Η σοβαρότητα της ασθένειας επηρεάζεται από τη φυλή του ιού, την ηλικία του φυτού όταν μολύνεται, την καλλιεργητική ποικιλία και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Οι ζημιές προκαλούνται λόγω μείωσης της παραγωγής, αλλά και της ποιότητας των καρπών (παραμορφώσεις, αλλοίωση χρώματος και γευστικών χαρακτηριστικών). Στις όψιμες μολύνσεις των φυτών η ασθένεια συνδέεται με έντονα συμπτώματα στους καρπούς.

i. Κοινό μωσαϊκό και κίτρινο μωσαϊκό της τομάτας (common mosaic and yellow mosaic)

Οφείλεται στην τυπική (κοινή) φυλή του ιού και εκδηλώνεται με μεγάλη ποικιλία συμπτωμάτων στα ευπαθή φυτά. Τα συμπτώματα εμφανίζονται στα φύλλα, τα στελέχη ή τους καρπούς και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία ανάλογα με την ποικιλία, τη φυλή του ιού, την ηλικία των φυτών και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Τα πλέον εμφανή συμπτώματα περιλαμβάνουν μωσαϊκό, νανισμό των φυτών, μικροφυλλία, στένωση μέχρι νημάτωση, ποικιλοχλόρωση, παραμόρφωση, μερικές φορές νεκρώσεις και τέλος ποικιλόχρωση καρπών.



Εικόνα 11. Συμπτώματα "απλής ραβδώσης" (TMV strain) σε βλαστό και φύλλα τομάτας (Προσφορά Π. Κυριακοπούλου).

Άλλα συμπτώματα είναι ο αποχρωματισμός των νεύρων (διαφάνεια νεύρων), κατά θέσεις κατσάρωμα του ελάσματος, νεύρα σε πολύ οξείες γωνίες, φύλλα μικρότερα και στενότερα. Το έλασμα των φύλλων είναι πολύ στενό και οξύ. Σε μερικές περιπτώσεις τα φύλλα γίνονται τόσο στενά και επιμήκη που μοιάζουν με νήματα ή κορδόνια.

ii. Απλή ραβδώση (tomato single streak)

Η ασθένεια οφείλεται στην ομόνυμη φυλή (tomato streak strain) του ιού TMV. Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της προσβολής εκδηλώνονται με νεκρωτικές κηλίδες ή ραβδώσεις στα φύλλα, στους μίσχους, στα στελέχη

και στους καρπούς της τομάτας. Στα στελέχη η προσβολή έχει τη μορφή σκοτεινών επιμηκών ραβδώσεων οι οποίες μπορεί να είναι λίγες και κοντές ή πολυάριθμες και μακρές. Τέτοιοι βλαστοί είναι εύθραυστοι και εμφανίζουν καστανές περιοχές στο φλοιό και την εντεριώνη. Τα φύλλα εμφανίζουν νεκρωτικές κηλίδες οι οποίες αυξάνονται σε μέγεθος και τελικά προκαλούν το μαρασμό και ξήρανση του ελάσματος. Στους καρπούς σχηματίζονται μικρές κυκλικές ή ακανόνιστες καστανές ή μαύρες κηλίδες.

iii. Διπλή ράβδωση (tomato double-virus streak)

Η ασθένεια εκδηλώνεται με σοβαρές νεκρώσεις στα στελέχη, τους μίσχους, τα φύλλα και τους καρπούς. Τα πλέον εμφανή συμπτώματα είναι οι μεγάλες επιμήκειες καστανές μέχρι μαύρες ραβδώσεις που σχηματίζονται στους μίσχους, στα μεγάλα νεύρα των φύλλων και στα στελέχη. Οι νεκρωτικές ραβδώσεις στο στέλεχος και στα φύλλα είναι παρόμοιες με εκείνες της απλής ραβδώσεως. Τα προσβεβλημένα στελέχη συχνά παρουσιάζουν νανισμό, και εμφανίζουν μαρασμό και καρούλιασμα του φυλλώματος. Στους καρπούς σχηματίζονται διαφόρου μεγέθους, ακανόνιστες, επιφανειακές, καστανές, νεκρωτικές κηλίδες οι οποίες συχνά συνενώνονται και όταν ωριμάσουν αποκολλώνται (απολεπίζονται).

iv. Εσωτερικός καστανός μεταχρωματισμός (tomato internal browning)



Εικόνα 12. Εσωτερικός καστανός μεταχρωματισμός σε καρπούς τομάτας (Προσφορά Π. Κυριακοπούλου).

Τα συμπτώματα του εσωτερικού καστανού μεταχρωματισμού εμφανίζονται όταν οι καρποί είναι ακόμη πράσινοι, πριν από την ωρίμασή τους, ιδιαίτερα στην περιοχή προσφύσεως του καρπού στον ποδίσκο. Οι ιστοί των αγγείων του ξύλου ή και του

παρεγχύματος γύρω από αυτά γίνονται καστανοί, φελλώδεις και νεκρώνονται. Ο μεταχρωματισμός των αγγείων διακρίνεται ευχερώς λόγω διαφάνειας μέσω της επιδερμίδας του καρπού. Καθώς ο καρπός ωριμάζει, οι προσβεβλημένες περιοχές παραμένουν πράσινες και σκληρές και τελικά συχνά γίνονται χλωρωτικές ή κίτρινες, ενώ το υπόλοιπο του καρπού έχει λάβει το κόκκινο χρώμα της ωριμάνσεως. Σε τομή ασθενών καρπών ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων παρατηρείται σε διάφορες θέσεις ή σ' ολόκληρο τον καρπό. Το τοίχωμα και η σάρκα στις μεταχρωματισμένες περιοχές είναι σκληρή, καστανή, φελλώδης και συχνά μικρότερου πάχους.

1.2.3.1 Αίτιο - Συνθήκες αναπτύξεως

Οι προαναφερθείσες ασθένειες οφείλονται σε διάφορες φυλές του ιού tobacco mosaic virus (TMV) ή του tomato mosaic virus (ToMV). Είναι ιοί πολύ συγγενείς έως ταυτόσημοι. Τα σωματίδια του ιού είναι κυλινδρικά διαστάσεων 18 x 300 nm και περιέχουν RNA μονονηματικό. Ο ιός ανήκει στην ομάδα Tobamovirus, της οποίας αποτελεί το τυπικό είδος. Σε ξηρά μολυσμένα φύλλα στο εργαστήριο είναι δυνατόν να διατηρεί τη μολυσματικότητά του για περισσότερα από 50 χρόνια. Διατηρεί επίσης τη μολυσματικότητά του σε τέτοια ξηρά φύλλα ακόμη κι όταν αυτά εκτεθούν σε θερμοκρασία 120°C επί 30' λεπτά. Εντός φυσικού φυτικού χυμού διατηρεί την μολυσματικότητά του επί 4-6 εβδομάδες και σε χυμό απηλαγμένο βακτηρίων (στείρο) ο ιός μπορεί να επιβιώσει επί 5 χρόνια. Έχει ευρύτατο κύκλο ξενιστών και προσβάλλει περισσότερα από 150 γένη καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών.

Υπάρχουν πολλές φυλές του ιού που διαφέρουν ως προς το είδος και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων, καθώς επίσης ως προς τις αντιγονικές ιδιότητες και τη συμπεριφορά τους σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες. Ο ιός μεταδίδεται πολύ εύκολα μηχανικώς (δια επαφής, δια του χυμού, δια τριβής). Μεταδίδεται πολύ αποτελεσματικά μεταξύ φυτών με επαφή και με τους χειρισμούς των εργαζομένων, τα ενδύματά τους και τα καλλιεργητικά εργαλεία. Μεταδίδεται επίσης με το σπόρο (μόλυνση σπόρου μέχρι 50%) κατά τρόπο άτυπο (στα περιβλήματα του σπόρου). Τις πρωταρχικές εστίες μόλυνσης για τις νέες καλλιέργειες τομάτας αποτελούν ακόμη τα

υπολείμματα της καλλιέργειας (στα υπολείμματα ο ιός μπορεί να επιβιώσει επί πολλά χρόνια), τα μεταφυτευμένα μολυσμένα φυτάρια, άλλοι μολυσμένοι ξενιστές εντός ή πλησίον της καλλιέργειας (καλλιεργούμενοι ή αυτοφυείς), ο μολυσμένος καπνός και τα τσιγάρα. Δεν υπάρχει γνωστός ζωικός φορέας του ιού. Εν τούτοις είναι δυνατό, σε μικρό βαθμό να μεταδοθεί ο ιός από μερικά έντομα με παθητικό τρόπο (π. χ. με τα πόδια τους, ή με τα στοματικά μόρια εντόμων μασητικού τύπου- ορθόπτερα, κολεόπτερα) όπως δηλαδή γίνεται με τα ρούχα και τα χέρια των εργαζομένων στις καλλιέργειες.

Η είσοδος του ιού γίνεται από τους τραυματισμένους ιστούς των φυτών (ελαφρότατα τραυματισμένα κύτταρα). Προκαλεί σχεδόν πάντοτε διασυστηματικές μολύνσεις και προσβάλλει όλα τα παρεγχυματικά κύτταρα του φυτού. Ο ιός μετακινείται από κύτταρο σε κύτταρο δια των πλασμοδεσμάτων. Ο χρόνος επώασης της ασθένειας στα νεαρά φυτά ανάλογα με τη θερμοκρασία είναι 4-7 ημέρες.

1.2.4 Ιός του μαρασμού μετά κηλιδώσεως της τομάτας (tomato spotted wilt virus, TSWV)



Εικόνα 13. Συμπτώματα του μαρασμού μετά της κηλιδώσεως της τομάτας (Χ. Γ. Παναγόπουλος Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών)

Η ασθένεια που είναι γνωστή ως κηλιδωτός μαρασμός (spotted wilt) περιγράφηκε για πρώτη φορά στην Αυστραλία το 1915 και αρκετά αργότερα, το 1930, διαπιστώθηκε η ιολογική της αιτιολογία. Προσβάλλει μεγάλο αριθμό καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών. Προκαλεί σοβαρές ασθένειες στην τομάτα και τον καπνό. Προσβάλλει όμως και την πατάτα, μελιτζάνα, πιπεριά, σέλινο, λάχανο, πιζέλι, φασόλι, μαρούλι, κ.ά. Έχει ευρύτατο κύκλο ξενιστών (περίπου 560 είδη φυτών ανήκουν σε 50 οικογένειες) στον οποίο περιλαμβάνονται σημαντικές καλλιέργειες δενδρωδών, κηπευτικών και καλλωπιστικών φυτών. Περισσότερα από 100 είδη ξενιστών φυτών ανήκουν στις οικογένειες Solanaceae

και Compositae.

Ο ιός ήταν γνωστός στην Βόρειο Ελλάδα τουλάχιστον από τη δεκαετία του 1960, στον καπνό, προκαλώντας τη σοβαρή ίωση κηλιδωτή νέκρωση του καπνού. Στην τομάτα εμφανιζόταν σπανίως. Η ασθένεια παρουσιάστηκε σε επιδημική μορφή στην τομάτα (επιτραπέζια και βιομηχανική σε υπαίθριες και υπό κάλυψη καλλιέργειες) για πρώτη φορά το 1990 στην Ξάνθη και την Κομοτηνή (Κατής, 1991). Η ασθένεια παρουσιάστηκε πρόσφατα και στην πιπεριά (Κατής & Βασιλειάδης, 1993).

Οι συμπτωματολογικές εκδηλώσεις της ιώσεως στην τομάτα είναι οι ακόλουθες: Τα νεαρά φύλλα εμφανίζουν ένα ορειχάλκινο (μπρούτζινο) μεταχρωματισμό στην επάνω επιφάνεια του ελάσματος (ο μεταχρωματισμός αυτός ενίοτε εμφανίζεται υπό μορφή δακτυλίων), ο οποίος συχνά συνοδεύεται από καρούλιασμα των φυλλαρίων προς τα κάτω. Αργότερα στα φύλλα εμφανίζονται πολυάριθμες μικρές κυκλικές καστανές μέχρι μαύρες νεκρωτικές κηλίδες. Το έλασμα των προσβεβλημένων φύλλων γίνεται καστανό, ξηραίνεται και κρέμεται πάνω στο βλαστό. Παρατηρείται ανάσχεση της αναπτύξεως της κορυφής του φυτού, χλώρωση, μαρασμός και νέκρωση των επακρίων βλαστών. Ενίοτε παρατηρείται γενικός νανισμός των φυτών. Στους καρπούς σχηματίζονται διάφορες ποικιλοχρώσεις (δηλ. ακανόνιστες κηλίδες με εναλλασσόμενες αποχρώσεις του ανοικτού κόκκινου, κίτρινου ή πράσινου χρώματος χωρίς σαφή όρια διαχωρισμού των αποχρώσεων) ή συγκεντρωτικές κηλίδες (διαμέτρου περίπου 1 cm) των ιδίων αποχρώσεων.

Υπάρχουν πολλές φυλές του ιού και είναι δυνατόν στις φυσικές μολύνσεις να συνυπάρχουν στο ίδιο φυτό πολλές φυλές του παθογόνου. Στην Ελλάδα βρέθηκαν 3 φυλές και κάθε μια απ' αυτές προκαλεί διαφορετικά τοπικά "τοπικές κηλίδες" και διασυστηματικά συμπτώματα επί φυτών τομάτας, καπνού και *Nicotiana glutinosa*. Αναλόγως του είδους και της εντάσεως των συμπτωμάτων οι φυλές αυτές χαρακτηρίστηκαν σαν νεκρωτική (necrotic), δακτυλιωτή (ringspot) και ήπια (mild). Ο ιός αδρανοποιείται σε θερμοκρασία 45-46° C και δεν επιβιώνει σε ξηρούς φυτικούς ιστούς. Στη χώρα μας διαπιστώθηκε στον καπνό, τη τομάτα, τη πιπεριά, *Vigna sinensis*, *Nicotiana glufinosa*, *Dahlia*, *Petunia*, *Zinnia*, *Datura*.

Κύριος φορέας του ιού είναι διάφορα είδη θρίπα (*Thrips fabaci*, *T. setosus*, *Frankliniella fusca*, *F. occidentalis*, *F. schultzei* και *Scirtothrips dorsalis*, έντομα

μυζητικά). Ο θρίπας προσλαμβάνει τον ιό με απομύζηση χυμού ασθενούς φυτού, τον μεταφέρει στο σώμα του και στη συνέχεια τον μεταδίδει στα υγιή φυτά όταν τραφεί πάνω σ' αυτά. Φορείς του ιού γίνονται μόνο τα άτομα που προσλαμβάνουν τον ιό ως προνύμφες. Τα έντομα αυτά μπορούν να μεταδώσουν τον ιό στα υγιή φυτά, είτε ως προνύμφες είτε, κυρίως, ως ακμαία.

Ο ιός διαχειμάζει εντός των ζωντανών ξενιστών φυτών (π.χ. ετήσια ή πολυετή ζιζάνια) ή μέσα στο σώμα των μολυσμένων και διαχειμαζόντων θριπών. Αναφέρεται μετάδοση του ιού με το σπόρο της τομάτας και του φυτού *Cineraria*. Ο χρόνος επώσεως της ασθένειας είναι 7-20 ημέρες.

Η διάγνωση της ασθένειας γίνεται με φυτά δείκτες (π.χ. *Petunia hybrida*, *Cucumis sativus*, *Nicotiana tabacum*), με ορολογικές δοκιμές, με ορροηλεκτρονική μικροσκοπία και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

1.2.5 Ιός του θαμνώδους νανισμού της τομάτας (tomato bushy stunt virus, TBSV)

Η ομώνυμη ασθένεια διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα (Κρήτη) το 1980 (Αυγελής, 1983) σε θερμοκήπια. Πρόκειται για μάλλον σπάνια ασθένεια που, εκτός απ' την τομάτα, προσβάλλει τη μελιτζάνα και την πιπεριά. Σύμφωνα πάντως με νεώτερα δεδομένα η ίωση αυτή αποτελεί μια μελλοντική απειλή για την καλλιέργεια της τομάτας στη Κρήτη (Avgelis, 1986). Διάφορες φυλές του ιού (ιδιαίτερα η φυλή BS-3) είναι διαδεδομένες στην Ευρώπη, τις Μεσογειακές χώρες και τη Βόρειο και Νότιο Αμερική.

Τα χαρακτηριστικότερα συμπτώματα της ασθένειας είναι ο θαμνώδης νανισμός των φυτών λόγω της νεκρώσεως της κορυφής των βλαστών, η παραμόρφωση των νέων φύλλων και οι χλωρωτικοί δακτύλιοι στους καρπούς. Τα παλαιά φύλλα είναι χλωρωτικά ή ελαφρώς ιώδη, ενώ τα νέα φύλλα εμφανίζουν κιτρινωπούς δακτυλίους. Τα συμπτώματα στη μελιτζάνα είναι ποικιλοχλώρωση και νανισμός.

Ο ιός του θαμνώδους νανισμού της τομάτας (tomato bushy stunt virus, TBSV) ανήκει στην ομάδα Tombusvirus, της οποίας αποτελεί το τυπικό είδος. Έχει σωματίδια ισομετρικά διαμέτρου 30 nm που περιέχουν μονονηματικό RNA. Είναι γνωστοί 16 φυσικοί ξενιστές-φυτά του ιού, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η τομάτα, η

πιπεριά, το σπανάκι, το πελαργόνιο, η κερασιά, η μηλιά, η άμπελος και το ζιζάνιο *Stellaria media*.

Μεταδίδεται εύκολα με το χυμό (μηχανικά). Αναφέρεται μετάδοση με το σπόρο σε μικρά ποσοστά. Φαίνεται ότι μεταδίδεται με το έδαφος, αλλά δεν είναι γνωστός ζωικός φορέας. Η διάγνωση της ασθένειας γίνεται με φυτά-δείκτες όπως το *Chenopodium amaranticolor*, ή με ορροδιαγνωστική (συνήθως διπλή διάχυση σε άγαρ ή ELISA) και με ορροηλεκτρονική μικροσκοπία (ISEM).

1.2.6 Ιός του κίτρινου καρουλιάσματος των φύλλων της τομάτας (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)

Πρόκειται για πολύ σοβαρή ασθένεια της τομάτας που είναι εξαπλωμένη στην Κύπρο και σε πολλές περιοχές της ανατολικής Μεσογείου και προκαλεί μεγάλες ζημιές. Προκαλείται από τον ομώνυμο ιό tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) που ανήκει στην ομάδα geminivirus.

Τα προσβεβλημένα φυτά εμφανίζουν έντονο νανισμό, είναι χλωρωτικά και έχουν φυλλίδια μικρά, εύθραυστα και καρουλιασμένα προς τα επάνω. Παρατηρείται έντονη ανθόπτωση και μικρή μέχρι καθόλου καρπόδεση.

Μεταδίδεται με τον αλευρώδη *Bemisia tabaci*, ενώ δεν μεταδίδεται με τον αλευρώδη των θερμοκηπίων *Trialeurodes vaporariorum*. Δεν μεταδίδεται επίσης με την επαφή (μηχανικά), ούτε με το σπόρο. Φυσιικοί ξενιστές του ιού είναι επίσης τα φυτά *Malva nicaeensis* και *Datura stramonium* και ο καπνός χωρίς όμως ο τελευταίος να εμφανίζει συμπτώματα.

Στην Ελλάδα η ασθένεια αυτή της τομάτας δεν έχει αναφερθεί, έχει όμως αναφερθεί πρόσφατα η παρουσία του *Bemisia tabaci*.

1.2.7 Ιός του ίκτερου των νεύρων της τομάτας (tomato vein yellowing virus, TVYV)

Ο ιός του ίκτερου των νεύρων της τομάτας (tomato vein yellowing virus, TVYV) διαπιστώθηκε πρόσφατα (1993) στην Ελλάδα σε καλλιέργειες βιομηχανικής και επιτραπέζιας τομάτας στις περιοχές Ηλείας, στην Εύβοια και στην Αιτωλοακαρνανία.

Οι ώριμοι καρποί εμφανίζουν χαρακτηριστικές λαμπρές κίτρινες, περίπου κυκλικές, βυθισμένες κηλίδες με σαφή όρια, διαμέτρου 3-6 mm. Κάτω από την επιφάνεια των κηλίδων το περικάρπιο παρουσιάζει ξηρή, σπογγώδη, λευκή ή κιτρινώλευκη αλλοίωση. Τα φύλλα παρουσιάζουν κιτρίνισμα και νεκρώσεις του ελάσματος. Ο ιός είναι βακιλλόμορφος διαστάσεων 66 x 220 nm, περιέχει μονόκλωνο RNA και ανήκει στο άθροισμα Rhabdovirus. Μεταδίδεται μηχανικά με το χυμό. Είναι άγνωστος ο φορέας του.

Ο TVYV και ο ιός του ποικιλογλωρωτικού νανισμού της μελιτζάνας (eggplant mottled dwarf virus, EMD) θεωρούνται πολύ συγγενείς ή ταυτόσημοι ιοί ή φυλές του ιού του ίκτερου των νεύρων της αγγελικής (pittosporum vein yellowing virus, PVYV). Οι εν λόγω ιοί προσβάλλουν τη μελιτζάνα, καθώς και είδη των γενών *Lonicera* και *Pittosporum*. Συμπτώματα και των δύο αυτών ιών έχουν σημειωθεί στην Ελλάδα στη μελιτζάνα και στην αγγελική.



Εικόνα 14. Ίκτερος των νεύρων της τομάτας (Χ. Γ. Παναγόπουλος Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών)

1.3 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΩΝ

1.3.1 Γενικά

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι ιοί δεν μπορούν να "εισβάλουν" από μόνοι τους σε άθικτους ιστούς, αλλά χρησιμοποιούν γι' αυτό το λόγο τις διάφορες πληγές, οι οποίες είτε προκαλούνται μηχανικά, με επαφή και τριβή γειτονικών φυτών ή όπως συνήθως συμβαίνει, από οργανισμούς που μεταδίδουν ιούς. Ο οργανισμός ο οποίος μεταφέρει τον ιό από ασθενές σε υγιές φυτό ονομάζεται φορέας. Αν και είναι πιθανό όλοι οι φυτικοί ιοί να είχαν φορέα σε κάποια φάση της εξέλιξής τους, σήμερα αυτό δε συμβαίνει. Επειδή οι τρόποι μετάδοσης των ιών έχουν ιδιαίτερη σημασία στην επιδημιολογία και στην αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούν, περιγράφονται στη συνέχεια οι τρόποι μετάδοσης των ιών στον αγρό.

1.3.2 Μηχανική μετάδοση στον αγρό

Η μετάδοση των ιών μηχανικά στον αγρό είναι μάλλον περιορισμένη και μικρής οικονομικής σημασίας. Εντοπίζεται κυρίως σε σταθερούς ιούς, που βρίσκονται στα φυτά-ξενιστές σε υψηλές συγκεντρώσεις και σε φυτά που πληγώνονται εύκολα και είναι ιδιαίτερα ευπαθή στη μόλυνση. Ο ιός X της πατάτας μεταδίδεται σε καλλιέργεια πατάτας, μετά από επαφή και προστριβή των φύλλων ή των ριζών υγιών και ασθενών φυτών. Οι φυλές του ιού που αναπτύσσουν υψηλές συγκεντρώσεις στα μολυσμένα φυτό διαδίδονται ευκολότερα στον αγρό. Με παρόμοιο τρόπο, ο ιός του μωσαϊκού της τομάτας μεταδίδεται από τα υπολείμματα της προηγούμενης καλλιέργειας στα νεαρά φυτά τομάτας. Στην περίπτωση αυτή ο ιός εισέρχεται στα κύτταρα των ριζών από πληγές που δημιουργούνται κατά την ανάπτυξη των ριζών μέσα στο έδαφος.

Ο πιο κοινός τρόπος μηχανικής μετάδοσης των ιών στον αγρό είναι με διάφορες καλλιεργητικές εργασίες (μεταφύτευση, βοτάνισμα, δέσιμο των φυτών, κλάδεμα). Η μετάδοση μπορεί να γίνει από τους ίδιους τους καλλιεργητές (χέρια, ρούχα, παπούτσια) ή με τα εργαλεία κατά την εκτέλεση των διαφόρων καλλιεργητικών εργασιών. Έτσι

μεταδίδονται ο ιός του μωσαϊκού της τομάτας και ο ιός της πράσινης ποικιλόχρωσης του αγγουριού σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας και αγγουριού αντίστοιχα. Μερικοί ιοί, όπως ο ιός του μωσαϊκού του *Trifolium repens* (είδος τριφυλλίου) και ο ιός της ποικιλόχρωσης του *Trifolium pratense* (είδος τριφυλλίου), διαδίδονται στον αγρό με τα μηχανήματα κοπής χόρτου. Άλλοι μεταδίδονται στον αγρό με μη αποστειρωμένα εργαλεία κατά τη διάρκεια των κλαδεμάτων ή την κοπή μοσχευμάτων. Ο ρόλος των μη αποστειρωμένων λεπίδων στη μετάδοση ιών της γαριφαλιάς μελετήθηκε πρόσφατα. Το ποσοστό μόλυνσης από τον ιό της δακτυλιωτής κηλίδωσης της γαριφαλιάς ανέρχεται στο 36%, όταν αποστειρωμένες λεπίδες χρησιμοποιήθηκαν για την κοπή μολυσμένων μοσχευμάτων πριν από την κοπή υγιών. Επίσης ο ιός S της πατάτας μεταδίδεται κατά τον τεμαχισμό των κονδύλων με μαχαίρια που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως για την κοπή μολυσμένων κονδύλων.

1.3.3 Μετάδοση με έντομα

Τα έντομα αποτελούν τους κυριότερους φορείς των φυτικών ιών για δύο λόγους. Πρώτο, γιατί μεταδίδουν μεγάλο αριθμό ιών και δεύτερο γιατί οι εντομομεταδιδόμενοι ιοί είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας. Από τα 381 είδη ζωικών φορέων φυτικών ιών περίπου το 94% ανήκει στο φύλο Αρθρόποδα και το 6% στο φύλο των Νηματωδών. Από τα Αρθρόποδα-φορείς το 99% είναι έντομα. Περισσότερα από το 70% των εντόμων-φορέων ανήκουν στην τάξη των Ομοπτέρων. Οι Αφίδες (οικογένεια Aphididae) είναι οι σπουδαιότεροι φορείς αυτής της τάξης. Ακολουθούν κατά σειρά σπουδαιότητας οι οικογένειες Jassidae, Membracidae και Delphacidae. Άλλα έντομα φορείς είναι οι αλευρώδεις, ορισμένα κοκκοειδή (Pseudococcidae), τα κολεόπτερα (Coleoptera) και οι θρίπες. Από τις υπόλοιπες ομάδες Αρθροπόδων μόνο τα ακάρεα, που ανήκουν στην κλάση Arachnida, είναι σημαντικοί φορείς ιών. Συνήθως οι φορείς ενός ιού ανήκουν σε μια ταξινομική ομάδα, αν και όπως συμβαίνει σε κάθε κανόνα υπάρχουν και εξαιρέσεις. Για παράδειγμα ο ιός της δακτυλιωτής κηλίδωσης του καπνού μεταδίδεται με θρίπες, ακάρεα καθώς και με νηματώδεις.

1.3.3.1 Μετάδοση με αφίδες

Δύο συστήματα ταξινόμησης έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μετάδοση των ιών με έντομα. Το πρώτο σύστημα βασίζεται στη χρονική διάρκεια που οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες, ενώ το δεύτερο σύστημα βασίζεται στον τρόπο και τη θέση που βρίσκεται ο ιός στο έντομο κατά τη μεταφορά. Το πρώτο σύστημα που είναι και το παλαιότερο προτάθηκε από τους Watson και Roberts (1939). Σύμφωνα με αυτό το σύστημα οι ιοί που μεταδίδονται με αφίδες ταξινομούνται ως εξής:

1. **Μη-έμμονοι** όταν οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες για λίγα λεπτά
2. **Έμμονοι** όταν οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες μερικές εβδομάδες έως όλη τη διάρκεια ζωής τους.

Ο όρος **ημι-έμμονος** χρησιμοποιήθηκε αργότερα (1956) για να καλύψει τις περιπτώσεις εκείνες που τα έντομα μένουν ιοφόρα από μία έως μερικές ημέρες. Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι στηρίζεται σε μια ιδιότητα, όπως η διάρκεια που οι αφίδες παραμένουν ιοφόρες, που εκτιμάται αρκετά εύκολα ενώ από την άλλη πλευρά είναι γνωστό ότι η ιδιότητα αυτή επηρεάζεται από ορισμένους παράγοντες όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος και η δραστηριότητα των αφίδων πριν και μετά την πρόσληψη του ιού.

Το δεύτερο σύστημα προτάθηκε από τους Kennedy κ.ά, 1962 και έδωσε έμφαση στη θέση του ιού του φορέα. Σύμφωνα με αυτό οι ιοί που μεταδίδονται με αφίδες ταξινομούνται ως:

1. **Φερόμενοι επί των στιλέτων**
2. **Κυκλοφορούντες**

Στους *φερόμενους επί των στιλέτων* ιούς ανήκουν οι μη-έμμονοι, μικρός αριθμός των ημι-έμμονων και μερικοί έμμονοι σύμφωνα με το προηγούμενο σύστημα ταξινόμησης. Οι *κυκλοφορούντες* ιοί περιλαμβάνουν τη πλειονότητα των έμμονων ιών. Ο όρος *κυκλοφορούντες* αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία ο ιός προσλαμβάνεται με το μολυσμένο χυμό, προσροφάται διαμέσου του εντερικού τοιχώματος, μεταφέρεται στους σιελογόνους αδένες και τελικά μεταφέρεται στα υγιή φυτά. Οι *κυκλοφορούντες* ιοί οι οποίοι πολλαπλασιάζονται στο σώμα των αφίδων-φορέων ονομάζονται *κυκλοφορούντες-πολλαπλασιαζόμενοι ιοί*. Αυτό το σύστημα

έχει υιοθετηθεί από πολλούς ερευνητές, αλλά δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι οι "μεταδιδόμενοι μέσω των σιλήτων ιοί" μεταδίδονται πραγματικά με αυτόν τον τρόπο. Υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να στηρίζουν την άποψη ότι οι ορισμένοι έμμονοι ιοί κυκλοφορούν στο σώμα των φορέων. Υπάρχει και ένα ακόμα σύστημα που προτάθηκε τελευταία και διαιρεί τους ιούς σε δύο κατηγορίες: στους μη-κυκλοφορούντες (περιλαμβάνει τους μη-έμμορους και ημι-έμμορους) και στους κυκλοφορούντες, όπου περιβάλλονται μόνο οι έμμονοι. Οι κυκλοφορούντες υποδιαιρούνται στους κυκλοφορούντες-πολλαπλασιαζόμενους όπου περιλαμβάνει τους ιούς που πολλαπλασιάζονται στο φορέα και στους κυκλοφορούντες-μη πολλαπλασιαζόμενους όπου τα μέλη δεν πολλαπλασιάζονται στο φορέα. Στην εργασία αυτή θα χρησιμοποιηθούν οι όροι μη-έμμονος, ημι-έμμονος και έμμονος.

i. Μη-έμμονοι ιοί

Περισσότεροι από 100 ιοί, από τους οποίους ορισμένοι είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας, μεταδίδονται με μη έμμονο τρόπο. Με αυτόν τον τρόπο μεταδίδονται και οι ιοί PVY και CMV. Η μετάδοση με αυτόν τον τρόπο έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Η πρόσληψη του ιού επιτυγχάνεται μετά από νύγματα δοκιμασίας των αφίδων στα ασθενή φυτά διάρκειας λίγων δευτερολέπτων ή λεπτών
2. Τα ιοφόρα άτομα έχουν τη δυνατότητα άμεσης μετάδοσης του ιού σε υγιή φυτά μετά από νύγματα δοκιμασίας διάρκειας λίγων δευτερολέπτων ή λεπτών
3. Οι αφίδες διατηρούν τη μολυσματικότητα για λίγα λεπτά έως μερικές ώρες μετά την απομάκρυνσή τους από το ασθενές φυτό, γι' αυτό οι μεταδιδόμενοι με αυτόν τον τρόπο ιοί ονομάζονται μη-έμμονοι .
4. Οι μη-έμμονοι ιοί μεταφέρονται επάνω ή κοντά στα στοματικά μόρια των εντόμων και δεν πολλαπλασιάζονται στους ιστούς του φορέα. Ο ιός δεν εισέρχεται στο μεσοέντερο του φορέα, γι' αυτό οι αφίδες χάνουν την ιοφόρα ικανότητα μετά την έκδυση.

Η αποτελεσματικότητα μετάδοσης των μη-έμμονων ιών αυξάνεται όταν τα έντομα υποβάλλονται σε νηστεία (για λίγα λεπτά ή μερικές ώρες) πριν τους επιτραπούν

νύγματα δοκιμασίας σε μολυσμένα φυτά. Τα νύγματα δοκιμασίας των εντόμων μετά από νηστεία, είναι συνήθως μικρής διάρκειας (δευτερολέπτων ή λίγων λεπτών), πράγμα που ευνοεί την πρόσληψη των μη-έμμονων ιών. Επειδή η πρόσληψη αυτή, αλλά και η μετάδοση των μη-έμμονων ιών από τις αφίδες-φορείς επιτυγχάνεται με νύγματα δοκιμασίας διάρκειας ακόμη και 10 δευτερολέπτων, πιστεύεται ότι τόσο η πρόσληψη όσο και η μετάδοση των ιών αυτών γίνεται στα επιδερμικά κύτταρα του ξενιστή. Η παρουσία των ιών αυτών στα επιδερμικά κύτταρα των ξενιστών τους δικαιολογεί την σχετικά εύκολη μετάδοσή τους μηχανικά (με χυμό) στο εργαστήριο.

ii. Ημι έμμονοι ιοί

Περίπου 15 ιοί μεταδίδονται με ημι έμμονο τρόπο. Απ' αυτούς οι καλύτερα μελετημένοι είναι ο ίκτερος των τεύτλων και η τριστέσα των εσπεριδοειδών. Βασικά οι ιοί αυτοί είναι μη έμμονοι, με την έννοια ότι δεν κυκλοφορούν στο σώμα των εντόμων, αλλά τα έντομα φορείς διατηρούν την ικανότητα μετάδοσης μέχρι τρεις έως τέσσερις ημέρες. Ο ελάχιστος χρόνος πρόσληψης των ημι έμμονων ιών είναι 30 λεπτά, αν και η αποτελεσματικότητα μετάδοσης είναι μεγαλύτερη όταν ο χρόνος πρόσληψης αυξάνεται σε μερικές ώρες. Όπως και οι έμμονοι ιοί, οι ημι έμμονοι εντοπίζονται στο φλοιώμα των ασθενών φυτών και συνεπώς οι αφίδες πρέπει να έλθουν σε επαφή μ' αυτούς τους ιστούς προκειμένου να προσλάβουν και να μεταδώσουν τους ιούς αυτούς.

iii. Έμμονοι ιοί

Οι ιοί που μεταδίδονται με έμμονο τρόπο έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

1. Για την πρόσληψη του ιού απαιτείται περίοδος μεγάλης διάρκειας διατροφής στο μολυσμένο ξενιστή. Αν και μερικά είδη αφίδων μεταδίδουν έμμονους ιούς, όταν διατρέφονται στο μολυσμένο ξενιστή για 20 μόνο λεπτά, η αποτελεσματικότητα μετάδοσης αυξάνεται όταν ο χρόνος διατροφής κυμαίνεται από 6 έως 24 ώρες.

2. Απαιτείται λανθάνουσα περίοδος, μεγαλύτερη των 12 ωρών από την πρόσληψη του ιού από το φορέα μέχρι τη στιγμή που γίνεται μολυσματικός.

3. Τα έντομα διατηρούν την ικανότητα μετάδοσης των ιών τουλάχιστον για μια εβδομάδα ή στις περισσότερες περιπτώσεις, για όλη τη διάρκεια της ζωής τους.

4. Τα ιοφόρα άτομα διατηρούν τη μολυσματικότητα και μετά την έκδυση, ένα χαρακτηριστικό που ονομάζεται "μετάδοση του ιού από στάδιο σε στάδιο".

Οι έμμονοι ιοί εμφανίζουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης στη σχέση τους με το φορέα, σε αντίθεση με τους μη-έμμορους ιούς, οι οποίοι μεταδίδονται με μεγάλο αριθμό ειδών αφίδων, τα περισσότερα των οποίων δεν έχουν ως ξενιστή τον ξενιστή του ιού. Η αποτελεσματικότητα μετάδοσης δεν αυξάνεται, όταν τα έντομα υποβληθούν σε νηστεία πριν τραφούν στα ασθενή φυτά. Οι έμμονοι ιοί εντοπίζονται κυρίως στο φλοίομα των φυτών. Αυτός είναι και ο λόγος που οι περισσότεροι δε μεταδίδονται μηχανικά με χυμό.

1.3.3.2 Μετάδοση με έντομα των οικογενειών Cicadellidae, Delphacidae και Membracidae

Μετά τις αφίδες τα έντομα των οικογενειών Cicadellidae, Delphacidae και Membracidae αποτελούν τους σπουδαιότερους φορείς ιών. Περισσότερα από 30 είδη της οικογένειας Cicadellidae αναφέρθηκαν ως φορείς τουλάχιστον 30 διαφορετικών ιών, 22 είδη της οικογένειας Delphacidae είναι υπεύθυνα για τη μετάδοση περισσότερων από 23 ιούς, ενώ μόνο ένα είδος της οικογένειας Membracidae έχει καταγραφεί ως φορέας.

Τα τυπικά συμπτώματα που προκαλούνται από τους ιούς αυτούς είναι ίκτερος ή καρούλιασμα των φύλλων. Οι περισσότεροι δε μεταδίδονται μηχανικά. Οι ιοί αυτοί είναι κυκλοφορούντες και αρκετοί πολλαπλασιάζονται στο σώμα του φορέα. Εξαιρεση αποτελούν ο ιός του χλωρωτικού νανισμού του καλαμποκιού και ο ιός tungro του ρυζιού που μεταδίδονται με ημι-έμμονο τρόπο.

Πειράματα έδειξαν ότι για τη μετάδοση ιών με Cicadellidae εμπλέκεται μια βοηθητική πρωτεΐνη (helper component), πιθανόν παρόμοια μ' αυτή που απαιτείται για τη μετάδοση ιών των ομάδων Poty και Caulimo με αφίδες. Η παραγωγή της ουσίας αυτής στο μολυσμένο ξενιστή επάγεται από τον ιό.

1.3.3.3 Μετάδοση με αλευρώδεις

Οι ιοί που μεταδίδονται με αλευρώδεις (Aleurodidae) είναι διαδεδομένοι κυρίως σε τροπικές χώρες, αν και αναφέρθηκαν και σε υποτροπικές ή εύκρατες χώρες. Προσβάλλουν κυρίως ψυχανθή (φασόλι, σόγια), καρότο, ορισμένα κολοκυνθοειδή (αγγούρι, καρπούζι, πεπόνι), μαρούλι, τεύτλο, τομάτα, βαμβάκι, καπνό και πιπεριά, στο οποία προκαλούν νανισμό, μωσαϊκό, κίτρινο μωσαϊκό των νευρώσεων, καρούλιασμα και παραμόρφωση των φύλλων και ίκτερο. Ως φορείς των ιών αυτών αναφέρθηκαν τουλάχιστον τρία είδη (*Bemisia tabaci*, *Trialeurodes abutilonea* και *T. vaporarium*) και είναι πιθανό ότι μέλη τουλάχιστον επτά ομάδων μεταδίδονται με αυτόν τον τρόπο. Από τους αλευρώδεις φορείς το είδος *B. tabaci* θεωρείται ο κυριότερος φορέας. Οι αλευρώδεις τρέφονται στο φλοιώμα των ξενιστών. Οι ιοί που μεταδίδονται με αλευρώδεις συνήθως δε μεταδίδονται μηχανικά.

Για την πρόσληψη των ιών οι αλευρώδεις πρέπει να τρέφονται στο μολυσμένο ξενιστή για τουλάχιστον 5 ώρες. Το ποσοστό μετάδοσης αυξάνει όταν αυξάνει και ο χρόνος διατροφής (μέγιστη αποτελεσματικότητα μετάδοσης μετά από διατροφή στο μολυσμένο ξενιστή για 24 ώρες). Τον ιό προσλαμβάνουν τόσο οι προνύμφες όσο και τα ενήλικα άτομα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο χρόνος που απαιτείται για τη μετάδοση είναι συνήθως μικρότερος από αυτόν που απαιτείται για την πρόσληψη. Η λανθάνουσα περίοδος κυμαίνεται από 4-8 ώρες. Τα έντομα διατηρούν την ικανότητα μετάδοσης 2-25 ημέρες.

Η μετάδοση με αλευρώδεις μοιάζει με τη μετάδοση των ιών της ομάδας *Luteovirus* με αφίδες. Τα έντομα παραμένουν ιοφόρα μετά την έκδυση, αλλά ο ιός δε μεταδίδεται με τα αυγά τους. Οι ιοί δεν πολλαπλασιάζονται στα κύτταρα του ξενιστή-φορέα.

1.3.4 Μετάδοση με ακάρεα

Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταδόσεως φυτικού ιού με ακάρεα είναι εκείνο του ιού του ραβδωτού μωσαϊκού του σιταριού και του ακάρεως-φορέως του *Aceria tulipae* της οικογένειας Eriophyidae.

1.3.5 Μετάδοση με νηματώδεις

Οι φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις αποτελούν σημαντικούς φορείς των φυτικών ιών και ανήκουν στα γένη *Xiphinema*, *Longidorus* και *Trichodorus*. Η μόλυνση γίνεται από τις ρίζες που βρίσκονται μέσα στο έδαφος. Μεγάλη ομάδα ιών μεταδιδόμενων με νηματώδεις αποτελεί η ταξινομική ομάδα *Neronivus* (πολυεδρικοί ιοί μεταδιδόμενοι με αφίδες).

1.3.6 Μετάδοση με μύκητες

Ορισμένοι κατώτεροι μύκητες, μονοκύτταροι, που παράγουν ζωοσπόρια, είναι γνωστοί ως φορείς φυτικών ιών. Η μόλυνση γίνεται από τις ρίζες. Παράδειγμα αποτελεί ο μυξομύκητας *Polymyxa betae*, φορέας του ιού του νεκρωτικού ικτέρου των τεύτλων.

1.3.7 Μετάδοση με εμβολιασμό

Ο εμβολιασμός αποτελεί κλασσικό τρόπο μετάδοσης των ιών των φυτών από το μολυσμένο εμβόλιο στο υγιές υποκείμενο και αντιστρόφως. Ο τρόπος αυτός έχει ιδιαίτερη σημασία στη γεωργική πράξη, κυρίως για τις δενδρώδεις καλλιέργειες και το αμπέλι.

1.3.8 Μετάδοση με το σπόρο

Για αρκετά χρόνια η μετάδοση των ιών με το σπόρο εθεωρείτο μάλλον εξαίρεση. Σήμερα είναι γνωστό πως η μετάδοση με το σπόρο είναι εσωτερική ιδιότητα ιών-μελών τουλάχιστον 21 από τις γνωστές ομάδες ιών. Περίπου το 18% των ιών, που περιγράφηκαν από το Commonwealth Mycological Institute (CMI/AAB), μεταδίδονται με το σπόρο ενός τουλάχιστον ξενιστή. Η μετάδοση με το σπόρο αποτελεί σημαντικό επιδημιολογικό παράγοντα για δύο κυρίως λόγους: 1) το φυτό-ξενιστής είναι μολυσμένο από την αρχή του βιολογικού του κύκλου με αποτέλεσμα την εμφάνιση έντονων συμπτωμάτων 2) τα μολυσμένα σπορόφυτα διασκορπισμένα μέσα στην καλλιέργεια αποτελούν πηγές του ιού για δευτερογενείς μολύνσεις.

Η μετάδοση ενός ιού με το σπόρο γίνεται με δύο τρόπους. Στην πρώτη περίπτωση ο ιός εντοπίζεται μόνο στο εξωτερικό περίβλημα του σπόρου (nonembryonic transmission), ενώ στη δεύτερη η μετάδοση γίνεται μέσω του εμβρύου (embryonic transmission).

1.3.9 Μετάδοση με τη γύρη

Οι περισσότεροι ιοί που μεταδίδονται με το σπόρο μεταδίδονται επίσης και με τη γύρη. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι 37 ιοί μεταδίδονται με τη γύρη. Οι περισσότεροι μεταδίδονται "κάθετα" από τη γύρη στο σπόρο, ενώ σε ορισμένους από αυτούς παρατηρείται και "οριζόντια" μετάδοση, (με τη μολυσμένη γύρη στα υγιή φυτά). Μετά από κριτική επανεξέταση της βιβλιογραφίας ο αριθμός των ιών που μεταδίδεται με τη γύρη μειώθηκε σε 19, από τους οποίους μόνον 5 μεταδίδονται με τη γύρη από φυτό σε φυτό. Αργότερα, αναφέρθηκε μετάδοση 4 ακόμη ιών με τη γύρη στον αγρό.

1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΙΩΝ

Οι μέθοδοι ανίχνευσης είναι οι εξής:

i. Ορολογικές δοκιμές στις οποίες υπάγονται οι δοκιμές καθίζησης σε δοκιμαστικό σωλήνα, η ανοσοδιάχυση, η ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA, η ανοσοπροσροφητική ηλεκτρονική μικροσκοπία, η μέθοδος "Decoration", και η σήμανση με κολλοειδή χρυσού.

ii. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

iii. Ανάλυση μοριακού υβριδισμού

iv. Βιολογική δοκιμή

1.4.1 Ορολογικές δοκιμές

1.4.1.1 Γενικά

Είναι γνωστό από αιώνες ότι όταν κάποιο ζώο θεραπεύεται από κάποια μολυσματική ασθένεια, σπάνια ξαναρρωσταίνει από την ίδια. Δηλαδή η πρώτη μόλυνση παρέχει ανοσία έναντι μελλοντικών μολύνσεων από το ίδιο παθογόνο. Οι περισσότερες αντιδράσεις ανοσίας των ζώων έχουν την ίδια βάση. Ο ανοσογόνος παράγοντας δηλαδή αυτός που προκαλεί ανοσία στο ζώο καλείται αντιγόνο ή ανοσογόνο (στην περίπτωσή μας ο ιός) προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων στο αίμα. Τα αντισώματα αντιδρούν εξειδικευμένα με το αντιγόνο (ιό) που προκάλεσε την παραγωγή τους (ομόλογο αντιγόνο). Αντισώματα εναντίον ενός ιού μπορούν να προκαλέσουν απώλεια της μολυσματικότητας ομόλογου αντιγόνου (ιού) ή καθίζηση όταν ενωθούν μ' αυτό, ενώ αντισώματα εναντίον μιας αποικίας βακτηρίων προκαλούν συγκόλληση των βακτηρίων. Για να προκαλέσει την παραγωγή αντισωμάτων ένας ιός δεν είναι απαραίτητο να προσβάλλει το ζώο στο οποίο εισάγεται. Έτσι, όταν καθαρό παρασκεύασμα ενός φυτικού ιού εισαχθεί με ένεση στο αίμα ενός θηλαστικού προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων. Οι περισσότεροι φυτικοί ιοί είναι πολύ καλά ανοσογόνα.

1.4.1.2 Παραγωγή αντιορού

Βασική προϋπόθεση για την παραγωγή αντιορού καλής ποιότητας είναι η ανοσοποίηση των ζώων, να γίνει με όσο το δυνατόν πιο καθαρό παρασκεύασμα του ιού απαλλαγμένο από πρωτεΐνες του φυτού που χρησιμοποιείται ως πηγή του ιού για τον καθαρισμό του.

Οι περισσότεροι ιοί είναι πολύ καλά ανοσογόνα και η παραγωγή αντιορού με υψηλή περιεκτικότητα αντισωμάτων μπορεί να παραχθεί σχετικά εύκολα. Μερικοί ευαίσθητοι (ασταθείς) ιοί διασπώνται μέσα στο σώμα των ζώων και αυτό μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή σημαντικής ποσότητας αντισωμάτων ειδικών για τα προϊόντα της διάσπασης και όχι εναντίον άθικτων ισωματίων. Στην περίπτωση αυτή εάν ο παραγόμενος αντιορός χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση ορολογικών δοκιμών εναντίον άθικτων ισωματίων, τότε η αντίδραση είναι ασθενής. Η αντιγονική εξειδίκευση των τμημάτων ενός ιού είναι συχνά διαφορετική από αυτή των άθικτων σωματιδίων και έτσι τα αντισώματα τα οποία παράγονται εναντίον "σπασμένων" δεν "αναγνωρίζουν" ή "αναγνωρίζουν" με δυσκολία άθικτα ισωμάτια.

Για την παραγωγή αντιορών εναντίον φυτικών ιών συνήθως χρησιμοποιούνται κουνέλια (*Oryctolagus cuniculis*), γιατί είναι εύκολη η διατήρησή τους στα ιολογικά εργαστήρια. Κουνέλια ηλικίας 3-6 μηνών (2-4 κιλά) είναι ιδανικά και παράγουν σημαντική ποσότητα αντιορών.

Για την παραγωγή αντιορών το αντιγόνο χορηγείται ενδοφλέβια ενδοπεριτιναϊκά, ενδομυϊκά ή υποδόρπια. Στην περίπτωση της ενδομυϊκής χορήγησης στο αντιγόνο (ιό) προστίθεται ανοσοενισχυτικό Freund. Αυτό αποτελείται από γαλάκτωμα ελαίου και παραφίνη και νεκρά μυκοβακτήρια. Το πιο διαδεδομένο πρόγραμμα ανοσοποίησης περιλαμβάνει μια σειρά ενδομυϊκών χορηγήσεων με ανοσοενισχυτικό Freund κάθε δύο εβδομάδες.

Η ποσότητα καθαρού ιού (αντιγόνου) που χρησιμοποιείται για την ανοσοποίηση ποικίλει. Οι περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποιούν δόσεις 0,1-1 mg ιού για κάθε χορήγηση, αλλά δεν έχει μελετηθεί επακριβώς η ποσότητα αντιγόνου που απαιτείται για την πρόκληση της ανοσοαπόκρισης.

1.4.1.3 Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA

Η χρησιμοποίηση ενζύμων για τη σήμανση αντισωμάτων αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1966 και αναπτύχθηκε για τον εντοπισμό αντιγόνων σε ιστολογικά παρασκευάσματα, τόσο σε οπτικό όσο και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η σύζευξη ενζύμων-αντισωμάτων αποδείχτηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές ποσοτικού προσδιορισμού με ευαισθησία συγκρίσιμη με αυτή των ραδιοανοσοδοκιμασιών. Ο Voller κ.ά., το 1974 εισήγαγε για πρώτη φορά την ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA η οποία στη συνέχεια εφαρμόστηκε για την ανίχνευση μεγάλου αριθμού αντιγόνων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την ταυτοποίηση σοβαρών παθογόνων του ανθρώπου και των ζώων, ενώ από το 1977 (Clark και Adams, 1977) άρχισαν οι εφαρμογές στη φυτοπαθολογία, αρχικά για τη διάγνωση ιών και αργότερα για τη διάγνωση βακτηρίων και μυκήτων και φυτοπλάσμάτων.

Η ELISA είναι σήμερα η πλέον διαδεδομένη ορολογική μέθοδος για τη διάγνωση φυτικών ιών στα φύλλα, σε βλαστούς, σε ρίζες και σε σπόρους.

Σαν ανοσολογική μέθοδος βασίζεται στο ότι όλα τα ξένα σώματα τα οποία εισέρχονται σε έναν οργανισμό, ενεργοποιούν ένα σύστημα προστασίας και άμυνας που είναι λιγότερο ή περισσότερο πολύπλοκο ανάλογα με το βαθμό εξέλιξης του ζώου. Λαμβάνοντας τον αντιορό από το θερμόαιμο ζώο το οποίο έχει ανοσοποιηθεί, δηλαδή έχει δεχτεί το αντιγόνο, μπορούμε να απομονώσουμε αντισώματα εξειδικευμένα στο αντίστοιχο αντιγόνο και να τα χρησιμοποιήσουμε για να ταυτοποιήσουμε διάφορες ασθένειες. Με την παρουσία του αντίστοιχου αντισώματος, το παθογόνο στοιχείο (ιός), αν είναι παρόν, θα σχηματιστεί ένα ανοσολογικό σύμπλοκο. Με την μέθοδο ELISA η αποκάλυψη του συμπλόκου γίνεται μέσω μιας ενζυμικής αντίδρασης.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής έναντι άλλων ορολογικών δοκιμών είναι τα εξής:

1. Είναι ευαίσθητη, με δυνατότητες ανίχνευσης πολύ μικρών ποσοτήτων (συνήθως 1-10 ng /ml) αντιγόνου (ιού).
2. Είναι γρήγορη. Τα αποτελέσματα είναι συνήθως διαθέσιμα μέσα σε 6-24 ώρες.
3. Έχει δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

4. Μπορεί να εφαρμοσθεί τόσο σε εκχύλισμα φυτών (ορισμένοι ιοί, όπως οι ιοί δένδρων, βρίσκονται στους ιστούς του ξενιστή σε μικρές συγκεντρώσεις) όσο και σε παρασκευάσματα ιών.

5. Μπορεί να γίνει εξειδίκευση, για τη διαφοροποίηση οροτύπων ενός ιού.

6. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση "τεμαχισμένων", αλλά και άθικτων ιοσωματίων.

7. Μπορεί να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός του αντιγόνου (ιού).

8. Υπάρχει η δυνατότητα αυτοματοποίησης και παραγωγής kit (αυτόματο πλύσιμο των μικροπλακών, ταυτόχρονη διανομή των αντιδραστηρίων σε όλα τα φρεάτια.

9. Χαμηλό κόστος και διατήρηση των αντιδραστηρίων για μεγάλο χρονικό διάστημα.

10. Δεν απαιτείται ακριβός εργαστηριακός εξοπλισμός (το πιο ακριβό όργανο είναι το φωτόμετρο).

11. Χρήση μικρών ποσοτήτων αντισωμάτων και αντιορών.

Αυτά τα πλεονεκτήματα έχουν συμβάλει στην ευρύτατη αποδοχή της και χρήση της από όλα τα ιολογικά εργαστήρια.

Η μέθοδος ELISA στηρίζεται τόσο στη συγγένεια αντιγόνου-αντισώματος όσο και στη συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος. Η διπλή αυτή εξειδίκευση οφείλεται στην παρασκευή ενός αντιδραστηρίου (conjugate), στο οποίο ένα ένζυμο συνδέεται με το ειδικό υπόστρωμα. Η ενζυμική δραστηριότητα στο τελικό υπόστρωμα μετριέται με την αλλαγή του χρώματος, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του αντιγόνου, δηλαδή του ιού.

Για να ανιχνεύσουμε την παρουσία ενός συγκεκριμένου ιού σε ένα φυτό αρκεί να φέρουμε σε επαφή ένα δείγμα από το φυτό με τα εξειδικευμένα αντισώματα του ιού που ψάχνουμε, αντισώματα τα οποία προηγουμένως έχουν συζευχθεί με ένα ένζυμο. Τα ενδεχόμενα είναι τα εξής:

1. Αν το αντιγόνο είναι παρόν: Έχουμε σχηματισμό του ανοσολογικού συμπλόκου όπου συμμετέχει το συζευγμένο με το αντίσωμα ένζυμο. Με την παρουσία του υποστρώματος του ενζύμου, συμβαίνει υδρόλυση αυτού του υποστρώματος που γίνεται αντιληπτή με την αλλαγή χρώματος.

2. Αν το φυτό είναι υγιές: Δεν θα σχηματιστεί σύμπλοκο, ούτε θα εμφανιστεί χρωματισμός.

3. Αν το δείγμα είναι μολυσμένο από άλλο ιό, αυτός δεν θα αναγνωριστεί από τα αντισώματα που χρησιμοποιούμε και συνεπώς δεν θα αποκαλυφθεί.

Η μέθοδος ELISA, τέλος, στηρίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να ακινητοποιούνται πάνω στις πλαστικές επιφάνειες (προσροφητική ικανότητα). Μπορούμε έτσι να συγκρατήσουμε τα αντιγόνα με την προσρόφηση σε μια πλαστική επιφάνεια ενός πρώτου στρώματος αντισωμάτων που δεν είναι συζευγμένα με ένζυμο. Το πρώτο σύμπλοκο θα σχηματιστεί με την προσθήκη του αντίστοιχου αντιγόνου. Η προσθήκη ενός δεύτερου στρώματος αντισωμάτων, αυτή τη φορά συζευγμένων με το ένζυμο, μας επιτρέπει να αναγνωρίσουμε το τελικό σύμπλεγμα "αντίσωμα - αντιγόνο - σημασμένο αντίσωμα".

1.4.1.4 Δοκιμές καθίζησης σε δοκιμαστικό σωλήνα (Tube agglutination test)

Σ' αυτή τη δοκιμή διάφορες αραιώσεις του αντιορού και του αντιγόνου (ιού) αναμιγνύονται και επωάζονται σε δοκιμαστικό σωλήνα και το μίγμα παρατηρείται για το σχηματισμό ιζήματος. Η μορφή του ιζήματος που σχηματίζεται εξαρτάται από τη μορφολογία του αντιγόνου. Οι νηματοειδείς ιοί παράγουν πυκνό θρομβώδες ίζημα (bulk flocculent) παρόμοιο μ' αυτό που σχηματίζουν τα βακτήρια με μαστίγιο ενώ οι ισοδιαμετρικοί (σφαιρικοί) ιοί ή οι "τεμαχισμένοι" νηματοειδείς ιοί (που τεμαχίσθηκαν με χημικά μέσα ή με υπερήχους) δίνουν πυκνό κοκκώδες ίζημα (granular precipitates) όπως αυτά των σωματικών βακτηρίων.

Η δοκιμή αυτή δεν χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση ιών. Αυτό οφείλεται κυρίως στη σπατάλη του αντιορού καθώς και στη μικρή ευαισθησία της δοκιμής. Όμως χρησιμοποιείται σε αρκετές περιπτώσεις, για του υπολογισμό του τίτλου του αντιορού ή του αντιγόνου.

1.4.1.5 Ανοσοδιάχυση (μέθοδος Ouchterlony)

Αρκετά χρήσιμη ορολογική μέθοδος, απλή στην εκτέλεσή της και σχετικώς οικονομική (απαιτείται μικρότερη ποσότητα αντιορού σε σύγκριση με τις δοκιμές καθίζησης σε δοκιμαστικό σωλήνα).

Οι δοκιμές ανοσοδιάχυσης είναι δοκιμές ιζηματιναντίδρασης που εκτελούνται σε πήκτωμα αγαρόζης αντί για ελεύθερο υγρό. Στη μέθοδο αυτή το αντιγόνο και το αντίσωμα διαχέονται το ένα προς το άλλο από δύο αντικριστά φρεάτια σε πήκτωμα αγαρόζης και στο σημείο συνάντησης των δύο αντιδραστηρίων σχηματίζεται μια γραμμή ιζήματος. Η δοκιμασία αυτή μπορεί να γίνει σε τρυβλία Petri ή αντικειμενοφόρους πλάκες. Η πηκτή αγαρόζης περιέχει 0.7-1.5% άγαρ ή αγαρόζη σε κατάλληλο για το αντιγόνο ρυθμιστικό διάλυμα (συνήθως η συγκέντρωσή του δεν υπερβαίνει την 0.1 M). Στην περίπτωση των νηματοειδών ειδών η συγκέντρωση του πηκτώματος σε ηλεκτρολύτες μπορεί να επηρεάσει τη διαδικασία διάχυσης και το σχηματισμό της γραμμής ιζήματος.

Το μέγεθος αρκετών ιών επιτρέπει τη διάχυσή τους στο άγαρ. Όλοι οι σφαιρικοί ιοί διαχέονται με μεγάλη ευκολία, ενώ ικανοποιητικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί ακόμη και για ορισμένους νηματοειδείς ιούς-μέλη των ομάδων rotexvirus (μήκος ιοσωματίων 470-580 nm) και carlavirus (μήκος ιοσωματίων περίπου 650 nm). Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι μεγαλύτερου μήκους νηματοειδείς ιοί δεν διαχέονται με μεγάλη δυσκολία στην πηκτή αγαρόζης και οι γραμμές καθίζησης σχηματίζονται πολύ κοντά στα φρεάτια του αντιγόνου. Για τη διάχυση των νηματοειδών ιών απαιτείται διάσπασή τους σε μικρότερες μονάδες πριν από την εκτέλεση της δοκιμασίας. Αυτό μπορεί να γίνει είτε χημικώς με σουλφοδωδεκυλικό νάτριο (sodium dodecyl sulphate, SDS) ή φυσικώς με τη χρήση υπερήχων

1.4.1.6 Ανοσοπροσοφθητική ηλεκτρονική μικροσκοπία (Immunosorbent electron microscopy, ISEM)

Βασικά η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την παγίδευση των ιών πάνω στα πλέγματα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου τα οποία προηγουμένως έχουν καλυφθεί με αντιγό. Τα πλέγματα αμέσως μετά την παρασκευή τους αφήνονται να "επιπλεύσουν"

για 30 περίπου λεπτά σε αραιωμένο αντιορό έτσι ώστε ένα στρώμα αντισωμάτων προσκολλάται πάνω στο πλαστικό που καλύπτει το πλέγμα. Στη συνέχεια, αφού προηγουμένως απομακρυνθεί η περίσσεια αντιορού, τα πλέγματα τοποθετούνται για 1-2 ώρες πάνω σε εκχύλισμα μολυσμένου φυτικού ιστού ή σε καθαρό παρασκεύασμα του ιού. Έτσι τα αντισώματα που είχαν προσκολληθεί πάνω στο πλέγμα "παγιδεύουν" τα ισοσώματα του ομόλογου αντιγόνου (ιού). Μετά από πλύσιμο των πλεγμάτων και "αρνητική χρώση" τα "παγιδευμένα" ισοσώματα παρατηρούνται, μετά από αρνητική χρώση, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Για την εκτίμηση της εξειδικευμένης "παγίδευσης" απαιτείται η χρήση καταλλήλων μαρτύρων.

Η ISEM έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη διάγνωση νηματοειδών και σφαιρικών ιών καθώς και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ιών στους φυτικούς ιστούς. Η μέθοδος είναι αρκετά ικανοποιητική για εφαρμογές σε ερευνητικό επίπεδο αλλά δεν συστήνεται για τον έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε δουλειές ρουτίνας γιατί απαιτούνται επενδύσεις υψηλού κόστους για την αγορά ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και τη λειτουργία του.

Για την αύξηση της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης της μεθόδου έχουν γίνει διάφορες τροποποιήσεις. Για παράδειγμα, όταν τα πλέγματα καλύπτονται με πρωτεΐνη A (*Staphylococcus aureus*) σε συγκέντρωση 10-100 $\mu\text{g/ml}$, πριν από τη κάλυψη με αντιορό, "παγιδεύεται" μεγαλύτερος αριθμός ισοσωματίων. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα της πρωτεΐνης A να προσκολλάται μη εξειδικευμένα πάνω στα αντισώματα και έτσι να παγιδεύεται μεγαλύτερος αριθμός ισοσωματίων.

1.4.1.7 Μέθοδος "Decoration"

Η μέθοδος αυτή που αποτελεί μια παραλλαγή της κλασσικής μεθόδου ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αναπτύχθηκε από τους Milne και Luisoni το 1977. Μετά την προσκόλληση των ισοσωματίων πάνω στο πλέγμα του H. M., τα ισοσώματα καλύπτονται με ομόλογο αντιορό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία γύρω από το ισοσώματιο μιας "άλω" από μόρια γ -σφαιρίνης. Η "άλως" αυτή είναι ορατή στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετά από "αρνητική χρώση". Αυτή η μέθοδος αποτελεί την πιο πειστική απόδειξη της σύζευξης αντιγόνου (ιού) και γ -σφαιρίνης.

1.4.1.8 Σήμανση με κολλοειδή χρυσού

Τα σωματίδια χρυσού έχουν πολλά ηλεκτρόνια και έτσι δείχνουν τη θέση στα πλέγματα του H. M. των ιοσωματίων στο οποίο έχουν προσκολληθεί. Η πρωτεΐνη A σχηματίζει ένα αρκετά σταθερό σύμπλοκο με τα κολλοειδή χρυσού. Αυτό το σύμπλοκο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό μορίων γ-σφαιρίνης προσκολλημένης στο πρωτεϊνικό καψίδιο στο πλέγμα του H. M.

Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά χρήσιμη για τον εντοπισμό ιών, σε λεπτές τομές μολυσμένων κυττάρων.

1.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) είναι μια πρόσφατη ανακάλυψη στην τεχνολογία του DNA που άνοιξε νέους δρόμους στη μοριακή βιολογία και την ανίχνευση ιών. Είναι μια απλή μέθοδος που επιτρέπει την παραγωγή απεριόριστου αριθμού αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA ή RNA, με σύνθεση *in vitro* σε μικρό χρονικό διάστημα. Αυτό γίνεται με τη χρησιμοποίηση δυο τεχνητών αλληλουχιών (primers) συμπληρωματικών γνωστών αλληλουχιών του DNA σε αντίθετες αλυσίδες που απέχουν μεταξύ τους τουλάχιστον 150-500 ζεύγη βάσεων. Ο σχεδιασμός των αλληλουχιών είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της μεθόδου. Για να εφαρμοσθεί η PCR θα πρέπει να είναι γνωστή η αλληλουχία του DNA ή του RNA "στόχου".

Η μέθοδος PCR περιλαμβάνει τρία στάδια.

- i. Τήξη (melting) του δίκλωνου DNA "στόχου" για τον διαχωρισμό των δυο κλώνων παρουσία των τεχνητών αλληλουχιών (ολιγονουκλεοτιδίων υποκινητών) (primers)
- ii. Σύνδεση (annealing) των δύο ολιγονουκλεοτιδίων υποκινητών στις αποδιαταγμένες (denatured) αλυσίδες DNA
- iii. Επέκταση του υποκινητή με τη χρήση θερμοάντοχης πολυμεράσης. Στη συνέχεια, οι αλυσίδες του νεοσυντεθειμένου DNA "λειτουργούν" ως "στόχοι" για

περαιτέρω σύνθεση DNA καθώς τα τρία στάδια που αναφέρθηκαν παραπάνω μπορούν να επαναληφθούν έως 50 φορές. Η επανάληψη των κύκλων "τήξης" και "σύνθεσης" έχει ως αποτέλεσμα την λογαριθμική μεγέθυνση του DNA ή του RNA στόχου. Ως αρχή, κάθε νέος κύκλος διπλασιάζει την ποσότητα του νουκλεϊκού οξέος "στόχου". Όμως, οι ακριβείς συνθήκες επώασης των αντιδραστηρίων μπορούν να έχουν αξιοσημείωτες επιπτώσεις στην ποσότητα του παραγόμενου νουκλεϊκού οξέος. Η εξειδίκευση της μεθόδου προέρχεται από τους συνθετικούς υποκινητές, οι οποίοι ζευγαρώνουν και καθορίζουν τα άκρα της αλληλουχίας "στόχος" που πρέπει να αναπαραχθεί. Η μέθοδος βρήκε εφαρμογές στη διαγνωστική των φυτοπαθογόνων μετά την απομόνωση της DNA πολυμεράσης από το *Thermus aquaticus* (Taq). Το ένζυμο αυτό εμφανίζει σχετική σταθερότητα στις θερμοκρασίες τήξης του DNA, η οποία μειώνει την αναγκαιότητα του ενζύμου μετά από κάθε κύκλο, μειώνει το κόστος της μεθόδου και επιτρέπει την αυτοματοποίηση της θερμικής ανακύκλωσης (thermal cycling).

Η μέθοδος PCR έχει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες διαγνωστικές μεθόδους:

i. Είναι εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος με δυνατότητα ανίχνευσης, θεωρητικά τουλάχιστον, ενός μόνον μορίου ιικού RNA ή DNA. Αυτό είναι αρκετά σημαντικό πλεονέκτημα ιδιαίτερα για ιούς που περιορίζονται στο φλοιώμα ή για αρκετούς ιούς των δένδρων και του αμπελιού ή ακόμη για ανίχνευση ιών απευθείας στο σώμα των ζωικών φορέων τους (αφίδες, νηματώδεις, κ.λ.π.) (όπου συνήθως βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις).

ii. Δε χρησιμοποιεί ραδιενεργούς ανιχνευτές (αυτό καθιστά τη μέθοδο φιλική προς το περιβάλλον).

iii. Είναι ταχεία και ευέλικτη μέθοδος.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα της PCR είναι η πιθανότητα πολλαπλασιασμού (μεγέθυνσης) αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων που δεν αποτελούν "στόχο" με αποτέλεσμα τη λήψη ψευδών θετικών αποτελεσμάτων.

Τα τελευταία χρόνια η μέθοδος PCR έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη φυτοπαθολογία για τη διάγνωση ιών, βακτηρίων, μυκήτων και των φυτοπλάσμάτων .

1.4.3 Ανάλυση μοριακού υβριδισμού

Η μέθοδος του μοριακού υβριδισμού χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα για την αναγνώριση και ταυτοποίηση του συνολικού γενώματος του ιού. Η ανάλυση μοριακού υβριδισμού που αναφέρεται επίσης και ως "υβριδισμός κηλίδας" ή τεχνική "dot blot" έχει αποδειχθεί ότι είναι αρκετά ευαίσθητη, αλλά και εξειδικευμένη μέθοδος για τη διάγνωση RNA και DNA ιών καθώς και ιοειδών. Η μέθοδος περιλαμβάνει την παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση καθαρού παρασκευάσματος ιϊκού νουκλεϊκού οξέος ή του ιοειδούς.

1.4.4 Βιολογική δοκιμή

Οι μέθοδοι *in vivo* (βιολογική δοκιμή) αφορούν στη μόλυνση φυτών-δεικτών. Η μόλυνση δύναται να γίνει με εμβολιασμό, μηχανικά (με το χυμό ή με την τριβή) και με φορείς (έντομα, νηματώδεις, μύκητες κλπ). Τα φυτά-δείκτες διατηρούνται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους από συνθήκες αποφυγής των τυχαίων μολύνσεων και καλής αναπτύξεως. Στις περισσότερες περιπτώσεις διατηρούνται εντός θερμοκηπίου, κλιματιζόμενου θαλάμου ή εντομοστεγούς κλουβιού, ενώ σε λίγες περιπτώσεις (π.χ. σε μερικές ώσεις μηλοειδών και πυρηνοκάρπων) είναι δυνατόν να διατηρούνται σε ειδικούς αγρούς στο ύπαιθρο. Οι αντιδράσεις των φυτών-δεικτών (συμπτώματα) αποδεικνύουν ότι το φυτό από το οποίο προήλθε το μόλυσμα φέρει πράγματι μόλυνση από ιό. Τα πλεονεκτήματα των *in vivo* μεθόδων είναι:

- Η δυνατότητα ανίχνευσης οποιασδήποτε μολύνσεως του φυτού από παθογόνα ιών, γνωστά ή άγνωστα
- Η πρακτικότητα της εφαρμογής τους χωρίς τα απαιτούμενα εξειδικευμένα εργαστηριακά όργανα.

Μειονεκτήματα αποτελούν:

- Η βραδύτητα λήψεως των αποτελεσμάτων (λίγες ημέρες έως μήνες, ανάλογα με την περίπτωση παθογόνου-δείκτη)
- Το υψηλό κόστος της αποκτήσεως του χώρου αναπτύξεως και της διατηρήσεως των φυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ
(ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ)
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ
ΑΦΙΔΟΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΩΝ ΙΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ
ΤΟΜΑΤΑΣ

Περίληψη

Η παρούσα πειραματική εργασία αφορά στη μελέτη του ρόλου ορισμένων ζιζανίων στη διατήρηση και μετάδοση των ιών PVY και CMV σε καλλιέργειες τομάτας.

Για το σκοπό αυτό έγινε συλλογή ζιζανίων από το Ακράϊφνιο Θηβών το 1997 των ειδών *Amaranthus spp.*, *Chenopodium album*, *Cichorium intybus*, *Datura stramonium*, *Medicago sativa*, *Sinapis spp.*, *Sisymbrium officinalis*, *Convolvulus arvensis*, *Zea mays*. Είχε προηγηθεί συλλογή ζιζανίων στην ίδια τοποθεσία το 1996 από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο στα πλαίσια του προγράμματος ΕΠΕΤ II 453 και βρέθηκαν με υψηλά ποσοστά μόλυνσης για τον CMV το *Amaranthus spp.*, το *Sisymbrium officinalis*, το *Sinapis spp.* και το *Zea mays*, ενώ για τον PVY βρέθηκαν το *Cardaria draba* και το *Hordeum murinum*. Τα δείγματα από τα ζιζάνια και τα καλλιεργούμενα φυτά εξετάστηκαν με τη μέθοδο ELISA για να διαπιστωθεί το ποσοστό εμφάνισης των υπό μελέτη ιών. Επίσης έγιναν πειράματα μετάδοσης των ιών με τις αφίδες *Myzus persicae* και *Aphis craccinora* και πειράματα μετάδοσης του ιού CMV με το σπόρο.

Διαπιστώθηκε ότι τα είδη των ζιζανίων *Amaranthus spp.* (19,5% και 27%), *Chenopodium album* και *Cichorium intybus* (2%), *Datura stramonium* (20%) και *Sisymbrium officinalis* (6,5%) φέρουν τον ιό CMV και τα είδη *Amaranthus spp.* (0,5%), *Chenopodium album* (1,5%), *Cichorium intybus* (3%), *Convolvulus arvensis* (32,8%), *Datura stramonium* (2%), *Sisymbrium officinalis* (1%), *Zea mays* (36,6%), φέρουν τον ιό PVY με τα αντίστοιχα ποσοστά μέσα στην παρένθεση. Επίσης έγινε μετάδοση του ιού CMV με την αφίδα *Myzus persicae* σε ποσοστό τρία φυτά στα δέκα το οποίο θεωρείται πολύ μεγάλο. Αποδείχτηκε ακόμα ότι ο ιός CMV δεν μεταδίδεται με τον σπόρο.

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια τα προβλήματα των υπαιθρίων καλλιεργειών που απορρέουν από προσβολές αφιδομεταδιδόμενων ιών παρουσιάζονται ιδιαίτερα οξυμένα. Ειδικότερα στην τομάτα από το 1990, ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) και ο ιός Y της πατάτας (potato virus Y, PVY) έχουν κάθε χρόνο επιδημικό χαρακτήρα με πολύ σοβαρές επιπτώσεις στην παραγωγή.



Εικόνα 15. Ο αγρός στην περιοχή του Ακραιφνίου που έγιναν οι δειγματοληψίες (Προσφορά Δρ. Χ. Βαρβέρη).

Συγκεκριμένα ο CMV απαντάται σε 775 φυτικά είδη και τα πιο πολλά ανήκουν στις οικογένειες Solanaceae, Compositae, Papilionaceae και Cucurbitaceae. Περίπου είκοσι από τα είδη εμφανίζουν και μετάδοση με το σπόρο σε διάφορα ποσοστά. Η μετάδοση ακόμη επιτυγχάνεται με 75 διαφορετικά είδη αφίδων.

Ο PVY έχει μικρότερο εύρος ξενιστών, αλλά και αυτός έχει αναφερθεί να προσβάλλει 126 φυτικά είδη που ανήκουν κυρίως στις οικογένειες Solanaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae και Compositae και μεταδίδεται από περίπου 25 είδη αφίδων.

Ειδικά στην περιοχή του Ακραιφνίου όπου εδώ και μερικά χρόνια γίνεται μελέτη της επιδημιολογίας τους από το εργαστήριο Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, οι αγροί παρουσιάζουν την εικόνα που βλέπουμε στην εικόνα 15. Πολύ συχνά οι ιοί αυτοί απαντώνται σε μικτές μολύνσεις και οι διάδρομοι μεταξύ των φυτών τομάτας που έχουν φυτευτεί στον αγρό καταλαμβάνονται από μη εμπορεύσιμους καρπούς οι οποίοι εμφανίζουν μεταχρωματισμούς, παραμορφώσεις και σκλήρυνση έως φελλοποίηση των ιστών. Τα φυτά έχουν ποικίλη συμπτωματολογία όπως απλό μωσαϊκό στα φύλλα, νημάτωση ή και εμφανίζουν τα κλασικά πλέον

συμπτώματα της συρρίκνωσης δηλαδή της ανάσχεσης της ανάπτυξής τους. Η επίπτωση στην παραγωγή σχετίζεται με το χρόνο μόλυνσης. Όταν αυτή γίνει νωρίς μπορεί να έχουμε καθολική καταστροφή διότι τα φυτά δεν παράγουν καθόλου καρπούς. Στην περιοχή του Ακραιφνίου οι συλλεγόμενοι καρποί είναι πολύ υποβαθμισμένης ποιότητας, η καλλιεργούμενη με τομάτα έκταση χρόνο με το χρόνο μειώνεται και οι παραγωγοί στρέφονται σε άλλες καλλιέργειες.

Η ακριβής γνώση της οικολογίας και επιδημιολογίας των ιών αυτών στις ελληνικές συνθήκες είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τον σχεδιασμό προγραμμάτων αντιμετώπισής τους. Το γεγονός ότι οι δύο παραπάνω ιοί και κυρίως ο πρώτος, έχουν εξαιρετικά ευρύ φάσμα ξενιστών, συνετέλεσε παραπέρα στην ανάγκη έρευνας πολλών ειδών ζιζανίων και καλλιεργειών για τον εντοπισμό εκείνων που θα μπορούσαν να έχουν κάποια επιδημιολογική σημασία.

Σε συλλογή που έγινε το 1996, από το εργαστήριο Ιολογίας στο Ακραιφνιο Θηβών, βρέθηκαν με υψηλά ποσοστά μόλυνσης για τον CMV το *Amaranthus spp.* με ποσοστό 19,5%, το *Sisymbrium officinalis* με ποσοστό 46,2%, το *Sinapis spp.* με 12,5% και το *Zea mays* με 14,4%, ενώ για τον PVY βρέθηκαν το *Cardaria draba* με 2,1% και το *Hordeum murinum* με 13%. Έγινε προσπάθεια τα ποσοστά αυτά να επαληθευτούν το 1997 ή και βρεθούν καινούργια ζιζάνια ή καλλιεργούμενα φυτά που να διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη μετάδοση των ιώσεων.

Έτσι έγιναν νέες δειγματοληψίες στην ίδια περιοχή ζιζανίων και καλλιεργούμενων φυτών που γειτνιάζαν σε καλλιέργειες τομάτας (οι οποίες ήταν μολυσμένες από τους δύο παραπάνω ιούς) για να εξετασθούν τα δείγματα στο εργαστήριο με τη βοήθεια της ανοσοενζυμικής δοκιμής ELISA και να διαπιστωθεί πιθανή μόλυνσή τους από τους CMV και PVY. Ο μοναδικός τρόπος που θα μπορούσε να μεταφερθεί το μόλυσμα ήταν με τη βοήθεια εντόμων και πιο συγκεκριμένα με τις αφίδες, αφού αυτές έχουν την ικανότητα να προσλάβουν, να μεταφέρουν και να μεταδώσουν ιούς. Έτσι για να διαπιστωθεί ο πραγματικός ρόλος του ζιζανίου *Sisymbrium officinalis* ως πηγής μόλυνσης του CMV με τον οποίο βρέθηκε σε μεγάλα ποσοστά μολυσμένο το 1996, έγιναν πειράματα μετάδοσης του ιού σε φυτάρια τομάτας. Χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη αφίδων που είναι οι *Myzus persicae* και *Aphis craccivora*,

οι φορείς του CMV που έχουν βρεθεί στην περιοχή του Ακραιφνίου. Ελέγχθηκε ακόμη η πιθανότητα μετάδοσης του CMV με το σπόρο μολυσμένου *Sisymbrium officinalis*.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Δειγματοληψία

Οι δειγματοληψίες ζιζανίων και άλλων καλλιεργούμενων φυτών έγιναν στην περιοχή του Ακραιφνίου Θηβών σε μέρη που γειτνιάζαν με καλλιέργειες τομάτας μολυσμένες με τους CMV και PVY. Συλλέχτηκαν 200 τυχαία δείγματα περίπου από το κάθε ζιζάνιο ή καλλιεργούμενο φυτό. Οι δειγματοληψίες έγιναν σε δύο χρονικές περιόδους: Η πρώτη ήταν τον Απρίλιο, Μάιο και η δεύτερη τον Ιούλιο.

Αφού γινόταν προσδιορισμός του γένους ή και του είδους του ζιζανίου, δείγματα φύλλων ζυγίζονταν, ομαδοποιούνταν και μετά τοποθετούνταν στους $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.2 Δοκιμή ELISA

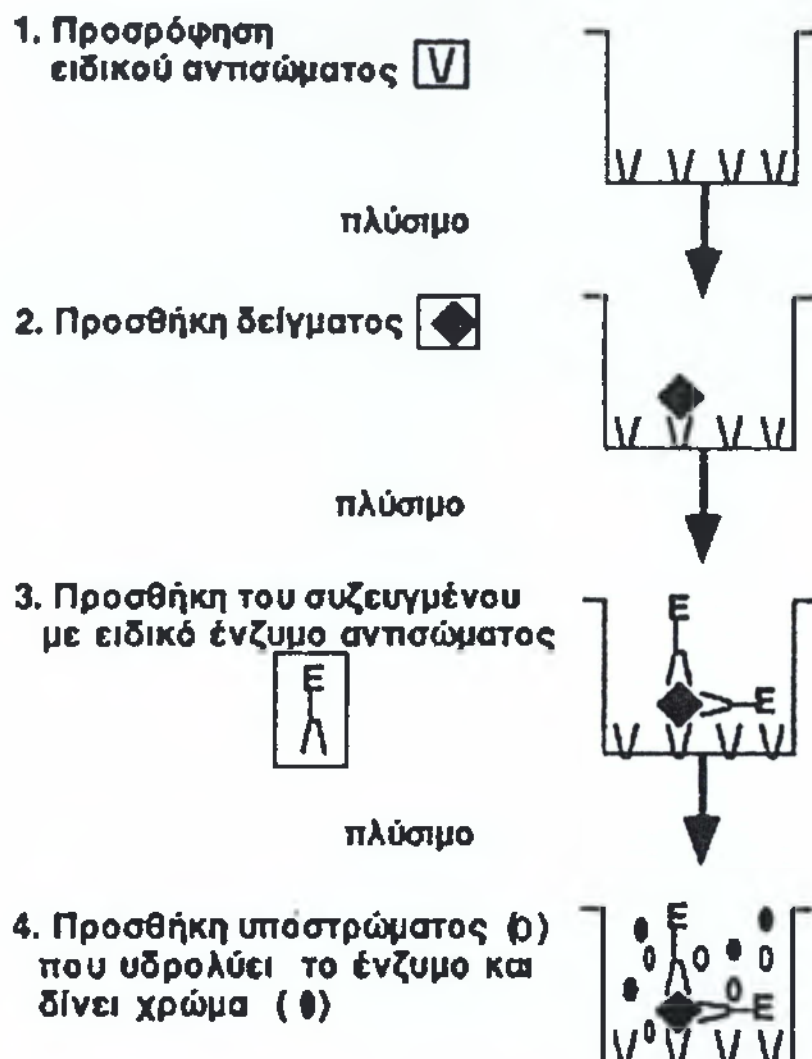
2.2.2.1 Περιγραφή της δοκιμής ELISA

Η δοκιμή περιλαμβάνει τέσσερα διαδοχικά στάδια (πίνακες 1,2) τα οποία μπορούν να πραγματοποιηθούν σε 48 ώρες:

1. Προσρόφηση των αντισωμάτων πάνω στην πλάκα
2. Τοποθέτηση του αντιγόνου (τοποθέτηση του φυτικού δείγματος)
3. Τοποθέτηση του συζεύγματος πάνω στο αντιγόνο
4. Τοποθέτηση του υποστρώματος του ενζύμου: υδρόλυση ή μη υποστρώματος (με την κατά περίπτωση εμφάνιση ή μη χρωματισμού) θα μας δώσει το αποτέλεσμα.

Πίνακας 1. Περιγραφή (στάδια) της δοκιμής ELISA

<p style="text-align: center;">1</p> <p>Προσρόφηση των αντισωμάτων (IgG) πάνω στην πλάκα</p>	<p>200μl / κυψελίδα (ανθρακικό ρυθμιστικό διάλυμα) Χρόνος επώασης 3-6 h στους 37 °C</p>
<p style="text-align: center;">2</p>	<p>Πλύσιμο της πλάκας: 3 φορές από 5 min με PBS-Tween</p>
<p style="text-align: center;">3</p> <p>Δημιουργία του συμπλόκου αντιγόνου-αντίσωμα</p>	<p>Προσθήκη 190 μl φυτ. δείγματος /κυψελίδα (Διάλυμα ομογενοποίησης: PBS-Tween-PVP) Χρόνος επώασης 18 h στους 4 °C</p>
<p style="text-align: center;">4</p>	<p>Πλύσιμο της πλάκας όπως στο 2</p>
<p style="text-align: center;">5</p> <p>Προσκόλληση του συζεύγματος πάνω στο σύμπλοκο</p>	<p>Προσθήκη συζεύγματος 190μl / κυψελίδα (Διάλυμα PBS-Tween-PVP-ovalbumine) Χρόνος επώασης 3-4 h στους 37 °C</p>
<p style="text-align: center;">6</p>	<p>Πλύσιμο της πλάκας όπως στο 2</p>
<p style="text-align: center;">7</p> <p>Αποκάλυψη</p>	<p>Προσθήκη υποστρώματος 200μl / κυψελίδα (Διάλυμα διαιθανολαμίνης) Χρόνος επώασης 5 min-2h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος</p>
<p style="text-align: center;">8</p>	<p>Η αντίδραση μπορεί να σταματήσει με την προσθήκη 50 μl NaOH 3M σε κάθε κυψελίδα της πλάκας</p>
<p style="text-align: center;">9</p>	<p>Οπτική εκτίμηση ή ανάγνωση της οπτικής πυκνότητας με τη χρησιμοποίηση ειδικού φωτόμετρου για τη δοκιμή ELISA</p>



Πίνακας 2. Στάδια της ανοσοενζυμικής δοκιμής ELISA (Πηγή: M.F. Clark και A.N. Adams, J. Gen. Virol. 34: 475-483)

2.2.2.2 Διάταξη-Χρησιμοποίηση

Μια πλάκα περιέχει 96 κυψελίδες. Χωρίς τη χρησιμοποίηση των περιθωρίων μένουν 60 διαθέσιμες κυψελίδες, που χρησιμεύουν για τον έλεγχο των διαφόρων δειγμάτων. Μερικές από τις κυψελίδες χρησιμοποιούνται για την τοποθέτηση δειγμάτων από υγιή και ασθενή φυτά (μάρτυρες υγείς και ασθενείς). Τα δείγματα του μάρτυρα πρέπει να είναι της ίδιας φύσεως (φύλλα, βλαστός) και του ίδιου φυτικού

είδους με τα φυτικά δείγματα που ελέγχονται. Ένας άλλος μάρτυρας που τοποθετείται πάνω στην πλάκα είναι ο μάρτυρας του τυφλού (blanc), δηλαδή οι αντίστοιχες κυψελίδες περιέχουν όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το χυμό του φυτού (μόνο το διάλυμα ομογενοποίησης).

Οι κυψελίδες του περιθωρίου δεν πρέπει να μείνουν άδειες. Σε κάθε χειρισμό πρέπει να συμπληρώνεται με υγρό (π.χ H₂O). Κάθε ελεγχόμενο δείγμα τοποθετείται σε δύο κυψελίδες. Μπορούμε να αναπαραστήσουμε τη διάταξη μιας πλάκας όπως παρακάτω:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		B	3	9	15	21	27	33	39	45	51	
C		B	4	10	16	22	28	34	40	46	52	
D		Y	5	11	17	23	29	35	41	47	53	
E		Y	6	12	18	24	30	36	42	48	54	
F		1	7	13	19	25	31	37	43	49	⊕	
G		2	8	14	20	26	32	38	44	50	⊕	
H												

B: Τυφλός μάρτυρας

Y: Υγιές δείγμα

⊕: Θετικό δείγμα

2.2.2.3 Υλικά για τη δοκιμή ELISA

Για την πραγματοποίηση της δοκιμής ELISA χρειάζονται ένα πλαστικό υποστήριγμα (πλάκα πολυστυρενίου Corning), τα εξειδικευμένα αντισώματα του ιού που αναζητούμε (ανοσοσφαιρίνες G: IgG), τα ίδια αντισώματα συζευγμένα με ένα ένζυμο και ένα υπόστρωμα του ενζύμου. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για τον CMV παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού

Ινστιτούτου και χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1μl/ml και το σύζευγμα σε αραιώση 1/1000. Για τον PVY χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια του εμπορίου (Loewe Biochemie GmbH), σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή σε αραιώσεις 1/200, τόσο στην περίπτωση επίστρωσης του αντισώματος όσο και στην περίπτωση του συζεύγματος. Η ομογενοποίηση των δειγμάτων έγινε σε αναλογία 1/10 με το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης (πίνακας 2).

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 φρεατίων παρουσία θετικών (μολυσμένων) και αρνητικών (υγιών) μαρτύρων και ουδέτερων μαρτύρων αναφοράς αντιδραστηρίων (χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το *Chenopodium quinoa*. Οι τιμές απορρόφησης μετρήθηκαν με φωτόμετρο (Dynatech MR-5000) σε μήκος κύματος 405 nm και θετικές μετρήσεις θεωρήθηκαν εκείνες των οποίων η αντίδραση υπερέβαινε τουλάχιστον τρεις φορές το μέσο όρο της αντίδρασης των υγιών μαρτύρων. Εξετάστηκαν συνολικά 2.778 δείγματα κατά τη δειγματοληψία του 1997.

Η πλειοψηφία των χειρισμών πραγματοποιείται σε ένα φωσφορικό διάλυμα 0,02 M, στο οποίο έχει προστεθεί NaCl με pH ουδέτερο (PBS). Με την προσθήκη του Tween (απορρυπαντικό με αμμωνία) μέσα στο διάλυμα, αποφεύγεται κάθε απορρόφηση πάνω στα τοιχώματα της πλάκας. Το polyvinyl-pyrrolidone (PVP) έχει σαν σκοπό τη σταθεροποίηση του ιού, ενώ η ovalbumine προστίθεται στο διάλυμα του συζεύγματος με σκοπό την προστασία του ενζύμου που είναι προσκολλημένο στα αντισώματα.

Το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης των αντισωμάτων είναι ένα ανθρακικό διάλυμα (χωρίς Tween) με pH βασικό 9,6 που επιτρέπει την προσκόλληση των αντισωμάτων πάνω στην πλάκα. Κατά τον ίδιο τρόπο το διάλυμα του υποστρώματος έχει ένα pH σχετικά υψηλό (9,8) για να επιτρέψει τη δράση του ενζύμου (αλκαλική φωσφατάση). Η συντήρηση και η χρησιμοποίηση των αντιδραστηρίων και η σύνθεση των χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων παρουσιάζονται στους πίνακες 3, 4.

Πίνακας 3. Σύνθεση χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων

Διάλυμα PBS	x10 (g)
NaCl	80
KH ₂ PO ₄	2
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	29
KCl	2
NaN ₃	2

Προσθήκη απεσταγμένου H₂O έως τελικό όγκο 1000 ml, pH: 7,4

Διάλυμα PBS-Tween: Διάλυμα PBS + Tween 0,05% (Ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος)

Διάλυμα PBS-Tween-PVP: Διάλυμα PBS + Tween 0,05% + PVP 2% (Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης ή Extraction Buffer)

Διάλυμα PBS-Tween-PVP-ovalbumine: Διάλυμα PBS-Tween-PVP + ovalbumine 0,2% (Conjugate Buffer)

Ανθρακικό διάλυμα	(g)
Na ₂ CO ₃	1,59
NaHCO ₃	2,93
NaN ₃	0,2

Προσθήκη απεσταγμένου H₂O έως τελικό όγκο 1000 ml, pH: 9,6

Διάλυμα διαιθανολαμίνης

Διαιθανολαμίνη	97 ml
H ₂ O	800ml
NaN ₃	0,2 gr

Προσθήκη απεσταγμένου H₂O έως τελικό όγκο 1000 ml, pH: 9,8

Πίνακας 4. Συντήρηση και χρησιμοποίηση των αντιδραστηρίων

	Συντήρηση	Διαλύματα (συντηρούνται στους 4 °C)	Συνθήκες χρήσης
Βιολογικά αντιδραστήρια	Στο PBS		
Ανοσοσφαιρίνες (IgG)	-20 °C	Ανθρακικό διάλυμα PH 9,6	1μg-5μg / ml
Σύζευγμα	4 °C	PBS+Tween 0,05% +PVP 2%+Ovalb.0,2%	1/500-1/2000
Χημική αντίδραση			
Υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης (p-NPP)	-20 °C	Διαθανολαμίνη 10% pH 9,8	1mg/ml
Φυτικό υλικό	4 °C	PBS-Tween 0,05% +PVP 2%	

PBS: phosphate buffer saline

PVP: polyvinyl pyrrolidone

2.2.2.4 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα προς έλεγχο δείγματα προέρχονται από την ομογενοποίηση του φυτικού ιστού με ένα διάλυμα PBS-Tween-PVP, σε αναλογία w/v=1/10 σε ειδικά σακουλάκια με τη βοήθεια ειδικού ομογενοποιητή (Homex 5, Bioreba). Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας των δειγμάτων πρέπει να αποφεύγεται κάθε μόλυνση ή επαφή του ενός δείγματος με το άλλο. Το υγιές δείγμα ομογενοποιείται πάντα πρώτο και το μολυσμένο τελευταίο. Τα δείγματα παραμένουν στους 4 °C πριν τοποθετηθούν στην πλάκα.

2.2.3 Μετάδοση με αφίδες *Myzus persicae* και *Aphis craccivora*

Για τα πειράματα μετάδοσης του CMV από μολυσμένο ζιζάνιο *Sisymbrium officinalis* σε φυτά τομάτας χρησιμοποιήθηκαν τα είδη αφίδων *Myzus persicae* και *Aphis craccivora*. Η διατήρηση των αφίδων, έγινε μέσα σε ειδικά κλουβιά. Για τις αφίδες του είδους *Myzus persicae* η διατήρηση γινόταν σε μικρά φυτά καπνού, πιπεριάς και μελιτζάνας. Για τις αφίδες του είδους *Aphis craccivora* η διατήρηση γινόταν σε φυτό κουκιού. Η ανανέωση των αποικιών των αφίδων γινόταν μια φορά την εβδομάδα με μεταφορά ομάδων αφίδων σε καινούργια φυτά.

Η μετάδοση έγινε ως εξής : Άτομα των δύο ειδών αφίδων υποβλήθηκαν σε νηστεία περίπου μια ώρα μέσα σε ένα τρυβλίο Petri. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε ζιζάνιο *Sisymbrium officinalis*, (το οποίο έχει μολυνθεί μηχανικά από φυτό καπνού με τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς) για τριάντα λεπτά έως μια ώρα (το πείραμα επαναλήφθηκε με διαφορετικούς χρόνους) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε φυτά τομάτας, 5 αφίδες ανά φυτό. Η μεταφορά των αφίδων έγινε με πινέλο ζωγραφικής του οποίου η άκρη υγραίνονταν με νερό. Έγιναν τέσσερις επαναλήψεις. Σε κάθε επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν 10 φυτάρια τομάτας.

Αφού αφήνονταν πάνω στα φυτά για μία μέρα, ακολουθούσε ψεκασμός τους με αφιδοκτόνο Confidor. Στη συνέχεια τοποθετούνταν τα νεαρά φυτά τομάτας μέσα σε ειδικό θάλαμο θερμοκηπίου. Η θερμοκρασία μέσα στο χώρο ήταν περίπου 25°C.

2.2.4 Έλεγχος μετάδοσης του CMV από σπόρο του *Sisymbrium officinalis*

Παράλληλα με το πείραμα για τη μετάδοση του ιού με αφίδες έγινε επίσης σπορά των σπόρων του μολυσμένου ζιζανιού *Sisymbrium officinalis* από τον ιό CMV για να διαπιστωθεί αν γίνεται μετάδοση του μολύσματος μέσω σπόρου. Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 100 σπόροι από το μολυσμένο ζιζάνιο και τα νεαρά ζιζάνια αφέθηκαν να αναπτυχθούν περίπου 50 ημέρες, οπότε και έγινε έλεγχός τους με την τεχνική της DAS-ELISA.

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1 Συχνότητα εμφάνισης των CMV και PVY σε ζιζάνια και άλλες καλλιέργειες

Εξετάστηκε μεγάλος αριθμός ζιζανίων (2.778) στην περιοχή του Ακραιφνίου σε τομέα ο οποίος είχε ποσοστό μόλυνσης σε τομάτες άνω του 60% για τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV) και άνω του 30% για τον ιό Y της πατάτας (potato virus Y, PVY). Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα δίνονται στους δύο παρακάτω πίνακες :

Πίνακας 5. Αποτελέσματα για τον CMV σε δειγματοληψία ζιζανίων στο Ακραιφνιο Θηβών

Είδος	Ημερ. συλλογής	Αρ. θετικών δειγμάτων	Ποσοστό %	Εύρος απορρόφησης (A _{405nm})	Πρ. Βιβλ. Αναφορά
		Συνολικός αριθμός			
<i>Amaranthus spp.</i>	7/1997	39/200	(19,5%)	0,192-0,571	+
	7/1997	54/200	(27%)	0,100-0,325	
<i>Chenopodium album</i>	4/1997	4/200	(2%)	0,125-0,142	+
<i>Cichorium intybus</i>	7/1997	4/200	(2%)	0,096-0,106	+
<i>Datura stramonium</i>	7/1997	40/200	(20%)	0,154-1,609	+
<i>Medicago sativa</i>	7/1997	0/200	(0%)		
<i>Sinapis spp.</i>	4/1997	0/105	(0%)		
<i>Sisymbrium officinalis</i>	4/1997	13/200	(6,5%)	0,102-1,742	+

Πίνακας 6. Αποτελέσματα για τον ιό PVY σε δειγματοληψία ζιζανίων στο Ακραιφνιο Θηβών

Είδος	Ημερ. συλλογής	Αρ. θετικών δειγμάτων	Ποσοστό %	Εύρος απορρόφησης (A _{405nm})	Πρ. Βιβλ. Αναφορά
		Συνολικός αριθμός			
<i>Amaranthus spp.</i>	7/1997	1/200	(0,5%)	0,092	
<i>Chenopodium album</i>	7/1997	3/200	(1,5%)	0,090-0,097	+
<i>Cichorium intybus</i>	4/1997	6/200	(3%)	0,091-0,153	
<i>Convolvulus arvensis</i>	4&5/1997	46/140	(32,8%)	0,213-0,3	+
<i>Datura stramonium</i>	7/1997	4/200	(2%)	0,104-0,137	+
<i>Sisymbrium officinalis</i>	4/1997	2/200	(1%)	0,095-0,132	
<i>Zea mays</i>	7&9/1997	122/333	(36,6%)	0,098-0,779	

Ο πρώτος πίνακας αφορά τον CMV και αναφέρονται ζιζάνια ή καλλιέργειες που βρέθηκαν να ξενίζουν τον CMV. Στα είδη *Amaranthus spp.* και *Datura stramonium*, βρέθηκαν αρκετά υψηλά ποσοστά μόλυνσης, ενώ στο *Sisymbrium officinalis* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 6,5 % αρκετά χαμηλότερο όμως σε σχέση με τα αποτελέσματα του 1996.

Ο δεύτερος αφορά τον PVY και βρέθηκαν 7 ζιζάνια και καλλιεργούμενα είδη με τον ιό. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το *Convolvulus arvensis* με ποσοστό 32,8% το οποίο σαν πολυετές ζιζάνιο μπορεί να αποτελεί μόνιμη πηγή μόλυνσης. Πέντε (5) από τα 7 αναφερόμενα είδη δεν έχουν αναφερθεί ως ξενιστές του PVY και ειδικά το *Zea mays* (αραβόσιτος) έδωσε μεγάλα ποσοστά μόλυνσης (36,6%) και υψηλές απορροφήσεις.

Επομένως στην εξεταζόμενη περιοχή η έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου εντόπισε κάποια είδη, που πιθανόν να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην επιδημιολογία των CMV και PVY, σαν ξενιστές που εμφανίζουν σημαντική συχνότητα εμφάνισης των ιών αυτών.

Για τον CMV είναι τα *Amaranthus spp.*, *Datura stramonium* και για τον PVY είναι το *Convolvulus arvensis*. Ο ρόλος του *Convolvulus arvensis* (πολυετούς ζιζανίου πολύ κοινού), που εμφάνισε και το υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης πολύ πιθανόν να είναι σημαντικός για τη διατήρηση και την εξάπλωση του μολύσματος του ιού. Για τον αραβόσιτο θα πρέπει να επαληθευτούν τα αποτελέσματα των μεθόδων ανίχνευσης με μετάδοση του ιού μηχανικά ή με αφίδες.

2.3.2 Μετάδοση του CMV με αφίδες

Έγινε επιτυχής μετάδοση του CMV από μολυσμένα φυτά *Sisymbrium officinalis* σε φυτά τομάτας με τις αφίδες. Τα αποτελέσματα ήταν τρία από τα δέκα φυτά τομάτας θετικά στον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV).

2.3.3 Μετάδοση του CMV από σπόρο του *Sisymbrium officinalis*

Τα δείγματα που εξετάστηκαν με την με την τεχνική της DAS-ELISA, για την μετάδοση του CMV με σπόρο βρέθηκαν αρνητικά στον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic virus, CMV).

2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι υπαίθριες καλλιέργειες τομάτας αντιμετωπίζουν τα τελευταία χρόνια σοβαρά ιολογικά προβλήματα που οφείλονται σχεδόν αποκλειστικά στους αφιδομεταδιδόμενους ιούς CMV και PVY. Η ευρεία εξάπλωση τους αποδίδεται κυρίως σε δύο γεγονότα :

1. Ότι είναι κοσμοπολίτικοι με ευρύτατο εύρος ξενιστών.
2. Μεταδίδονται με μη έμμονο τρόπο με πολλά είδη αφίδων.

Η επιδημική μορφή που έχουν πάρει οι δύο αφιδομεταδιδόμενοι ιοί CMV και PVY, με καταστροφικές συνέπειες στις καλλιέργειες τομάτας τα τελευταία χρόνια, έθεσε το θέμα του εντοπισμού των πηγών μόλυνσεων των ιών αυτών.

Το γεγονός ότι οι δύο ιοί και κυρίως ο πρώτος, έχουν εξαιρετικά ευρύ φάσμα ξενιστών, συνετέλεσε παραπέρα στην ανάγκη έρευνας πολλών ειδών ζιζανίων και καλλιεργειών για τον εντοπισμό εκείνων που θα μπορούσαν να έχουν κάποια επιδημιολογική σημασία.

Κατά τη διάρκεια του έτους 1997 έγινε συλλογή και εξέταση με τη μέθοδο ELISA συνολικά 2.778 δειγμάτων φυτών που βρίσκονταν σε γειτνίαση με μολυσμένους αγρούς τομάτας στην περιοχή του Ακραιφνίου Θηβών. Εξετάστηκαν συνολικά 9 είδη ζιζανίων και καλλιεργούμενων φυτών, που ήταν αντιπροσωπευτικότερα της περιοχής και από τα οποία 5 έδωσαν θετικά αποτελέσματα για τον CMV και 7 για τον PVY.

Συχνότητα εμφάνισης του CMV άνω του 6% έδωσαν τα ζιζάνια *Amaranthus spp.*, *Chenopodium album*, *Datura stramonium*, *Sisymbrium officinalis*. Στην περίπτωση του PVY θετικές αντιδράσεις σε υψηλό ποσοστό έδωσαν τα *Convolvulus arvensis* και ο αραβόσιτος. Τα είδη αυτά δεν συμπεριλαμβάνονται στον κατάλογο ξενιστών του PVY και η πιθανή σημασία τους στην επιδημιολογία του ιού τελεί υπό μελέτη. Έτσι θα πρέπει να επαναληφθούν τα πειράματα για αυτόν τον ιό.

Στα πλαίσια της πρακτικής μου εξάσκησης στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου επιλέχτηκε το ζιζάνιο *Sisymbrium officinalis* ώστε να γίνουν πειράματα για τη μετάδοση του ιού CMV. Η εκλογή του *Sisymbrium officinalis* για περαιτέρω μελέτη έγινε λόγω των υψηλών ποσοστών μόλυνσης με τον CMV που είχε δώσει κατά την δειγματοληψία στο Ακραιφνιο Θηβών το 1996 (46,2%). Έγιναν πειράματα

μετάδοσης με αφίδες και πράγματι αποδείχθηκε ότι οι αφίδες είναι ικανές να προσλάβουν τον ιό από το συγκεκριμένο ζιζάνιο και να τον μεταδώσουν. Επίσης έγιναν πειράματα μετάδοσης του ιού με το σπόρο. Αποδείχτηκε ότι ο ιός δεν μεταδίδεται με το σπόρο.

Το ποσοστό μετάδοσης ήταν πολύ υψηλότερο από το αναμενόμενο, αφού συνήθως εργαστηριακά η μετάδοση ιού με αφίδες από ζιζάνια σε φυτά έχει ποσοστά μετάδοσης που κυμαίνονται κάτω από 15%, στις περισσότερες περιπτώσεις. Η διαφορά στα ποσοστά εξαρτάται από το είδος του ζιζανιού, το είδος του φυτού και το είδος της αφίδας που χρησιμοποιείται στο κάθε πείραμα.

Τα αποτελέσματα (τρία στα δέκα φυτά τομάτας μολυσμένα), αν και θεωρούνται ικανοποιητικά θα πρέπει να γίνουν κι άλλα πειράματα, αφού το συγκεκριμένο που πραγματοποιήθηκε είναι από τα πρώτα που έγιναν στον συγκεκριμένο τομέα μετάδοσης των αφιδομεταδιδόμενων ιών σε καλλιέργειες τομάτας, έτσι ώστε να αποδειχτεί και εργαστηριακά η μετάδοση αυτών των ιών με τη βοήθεια των αφίδων και τελικά να εξάγουμε ακριβή αποτελέσματα για το ποσοστό μετάδοσης των συγκεκριμένων ιών με τη βοήθεια των αφίδων.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα τα στοιχεία δείχνουν ότι τα ζιζάνια βοηθούν στην κατανόηση της οικολογίας και επιδημιολογίας των ιών, έτσι ώστε να προκύψουν ασφαλείς τρόποι για την επιτυχή αντιμετώπισή τους. Συνήθως αυτή προκύπτει από συνδυασμό διαφόρων μέσων και μεθόδων μια από τις οποίες είναι και η καταπολέμηση των συγκεκριμένων ζιζανίων - ξενιστών.

Οι ακριβείς τρόποι αντιμετώπισης των δύο σημαντικότερων ιών (CMV και PVY) για τις καλλιέργειες τομάτας δεν έχουν ακόμη βρεθεί, ώστε να μπορέσουν να καταπολεμηθούν, αφού είναι ακόμα στο πειραματικό στάδιο.

Οι δυνατότητες της σύγχρονης βιοτεχνολογίας σε άμεση συσχέτιση με τα προαναφερθέντα εμφανίζονται να ενθαρρύνουν την προοπτική μιας ικανοποιητικότερης λύσης στο πρόβλημα των αφιδομεταδιδόμενων ιών. Ήδη η χρησιμοποίηση γενετικά τροποποιημένων φυτών που διαθέτουν γονίδια μη συμβατικής ανθεκτικότητας (στην περίπτωσή μας έχουν ανθεκτικότητα προερχόμενη από το γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης του CMV και του PVY) αξιολογούνται θετικά στις συνθήκες αγρού και

αναμένεται στο κοντινό μέλλον να αντιμετωπίσουν επιτυχώς τις προσβολές των κυριότερων αφιδομεταδιδόμενων ιών (Fucks *et al.* 1996, Lomonossoff 1995).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ΑΥΓΕΛΗΣ, Α., 1987. Αποτελεσματικότητα της αμοιβαίας προστασίας σε τομάτα θερμοκηπίου για την αντιμετώπιση του ιού του μωσαϊκού της τομάτας. *Γεωργική έρευνα*, **11** : 87-95.
- BADAMI, R.S., 1958. Changes in transmissibility by aphids of a strain of cucumber mosaic virus. *Ann. Appt. Biopathology*, **46** : 554-562.
- ΒΑΡΒΕΡΗ, Χ., 1990. Ταχεία διάγνωση φυτικών ιώσεων. Πρακτικά 1^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρίας Ιολογίας, 101-105.
- BROADBENT, L., 1976. Epidemiology and control of tomato mosaic virus. *Annu. Rev. Phytopathology*, **14** : 76-96.
- CLARK, M.F., ADAMS A.N., 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Virology*, **34** : 475-483.
- COMMONWEALTH AGRICULTURAL BUREAUX/ASSOCIATION OF APPLIED BIOLOGISTS, 1979. Cucumber mosaic virus. *Descriptions of Plant Viruses*, **213**.
- COMMONWEALTH AGRICULTURAL BUREAUX/ASSOCIATION OF APPLIED BIOLOGISTS, 1981. Potato virus Y. *Descriptions of Plant Viruses*, **242**.
- COOPER, J.I., EDWARDS, M.L., 1986. Variations and limitations of enzyme-amplified immunoassays. *Developments and Applications in Virus Testing*, 139-154.
- CRESCENZI, A., BARBAROSSA, L., GALLITELLI, D., MARTELLI, G.P., 1993. Cucumber mosaic cucumivirus populations in Italy under natural epidemic conditions and after a satellite-mediated protection test. *Plant Disease*, **77**: 28-33.
- FUCHS, M., PROVVIDENTI, J.L., 1995. Evaluation of transgenic tomato plants expressing the coat protein gene of cucumber mosaic strain WL under field conditions. *Pl. Disease* **80** : 270-275
- FULTON, R.W., 1986. Practices and precautions in use of cross protection for plant virus disease control. *Annual Review Phytopathology*, **24** : 67-81.
- HOLLINGS, M., HUTTINGA, H., 1976. Tomato mosaic virus. *Descriptions of Plant*

Viruses, No. 156. Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, England, 6pp.

- ΚΑΤΗΣ, Ν. Ι., ΑΥΓΕΛΗΣ, Α.Δ., 1991. Προσβολή καρπών τομάτας από τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς. *Γεωτεχνικά επιστημονικά θέματα*, 4 : 17-22.
- KEARNEY, C.M., GONSALVES, D., PROVVIDENTI, R., 1990. A severe strain of cucumber mosaic virus from China and its associated satellite RNA. *Plant Disease*, 74 : 819-823.
- ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ, Π.Η., ΜΠΕΜ, Φ., ΒΑΡΒΕΡΗ, Χ.Α., 1991. Συρρίκνωση της τομάτας και σκλήρυνση των καρπών της τομάτας, δύο νέες ιώσεις της τομάτας. *Χρονικά Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου*, 16 : 167-173.
- ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ, Π.Η., ΜΠΕΜ, Φ., 1990. Οι σοβαρές ιώσεις της τομάτας στην Ελλάδα. *Γεωργία-Κτηνοτροφία*, 4 : 15-26.
- ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ, Π.Η., ΜΠΕΜ, Φ., 1982. Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς στα κολοκυνθοειδή και σε άλλα καλλιεργούμενα φυτά στην Ελλάδα. *Χρονικά Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου*, 13 : 157-171.
- ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ, Ρ.Ε., 1992. Tomato shrinkage: due to cucumber mosaic virus (pp.37-39). 7th Conference ISHS, Recent Advances in Vegetable Virus Research, Athens July 12-16, 1992.
- LOMONOSSOFF, G.P., 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol* 33 : 323-343.
- ΜΠΟΥΤΣΙΚΑ, Κ., 1993. *Ένζυμο-ανοσο δοκιμή ELISA*, 1-9.
- ΜΠΕΜ, Φ., 1989. Νέκρωση της τομάτας: μια σοβαρή θανατηφόρα ασθένεια στις υπαίθριες καλλιέργειες τομάτας στο νομό Αργολίδας. Εις περιλήψεις Ανακοινώσεων 5^{ου} Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, 11-13 Απρ. 1989, Θεσσαλονίκη, σελ 32-33.
- NELSON, R.S., MCCORMICK, S.M., DELANNAY, X., DUBE, P., LAYTON, J., ANDERSON, E.J., KAWIEWSKA, M., BEACHY, R.N., 1988. Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Biotechnology*, 6 : 403-409.
- NORMAND, R.A., PIRONE, T.P., 1968. Differential transmission of strains of Cucumber mosaic virus by aphids, *Virology*, 36 : 538-544.

- PALUKAITIS, P., ROOSSINCK, M.J., DIETZGEN, R.G., FRANCKI R.B., 1992. Cucumber mosaic virus. *Advances in virus research*, **41** : 281-320.
- ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ, Χ.Γ., 1995. Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών. Αθήνα, εκδόσεις Σταμούλη, σελ. 476.
- PIRONE, T.P., 1964. Aphid transmission of purified stylet-borne virus acquired through a membran. *Virology*, **23** : 107-108.
- RACCAH, B., GAL-ON, A., EASTOP, V.F., 1984. The role of flying aphid vectors in the transmission of cucumber mosaic virus and potato virus Y to peppers in Israel. *Biopathology*, **106** : 451-460.
- SAYAMA, H., SATO, T., KOMINATO, M., NATSUAKI, T., KAPER, J.M., 1993. Field testing of satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology*, **83** : 405-410.
- SIMONS, J.N., 1959. Variation in Efficiency of Aphid Transmission of Southern Cucumber mosaic virus and Potato virus Y in pepper. *Virology*, **9** : 612-623.