

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ (Τ.Ε.Ι.)



Μελέτη του μηχανισμού μη έμμονης μετάδοσης του ιού Υ της πατάτας (PVY), από το έντομο-φορέα *Myzus persicae*, με έμφαση στο φαινόμενο της νηστείας

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΤΑΘΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2009

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
(Τ.Ε.Ι.)



Μελέτη του μηχανισμού μη έμμονης μετάδοσης του ιού Υ της πατάτας (PVY), από το έντομο-φορέα *Myzus persicae*, με έμφαση στο φαινόμενο της νηστείας

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ , 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή.....	1
Πρόλογος.....	1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΙΟΙ

1.1 Γενικά.....	2
1.2 Διαδικασία σύνθεσης των ιών και ο ρόλος του RNA.....	3
1.2.1 Ο ρόλος του RNA στην διαδικασία σύνθεσης των ιών.....	3
1.2.2 Η διαδικασία σύνθεσης των ιών.....	4
1.3 Τρόποι μετάδοσης των ιών.....	4
1.3.1 Άμεση μετάδοση μέσω του αγενούς πολλαπλασιαστικού φυτικού υλικού.....	5
1.3.2 Μετάδοση μέσω του εμβολιασμού.....	5
1.3.3 Μετάδοση μέσω των σπερμάτων.....	5
1.3.4 Μετάδοση μέσω της γύρης.....	6
1.3.5 Μετάδοση των φυτοίων μηχανικά, μέσω του φυτικού χυμού.....	6
1.3.6 Μετάδοση με σπερματοφύτα παράσιτα (κουσκούτα).....	7
1.3.7 Μετάδοση μέσω διαφόρων οργανισμών.....	7
1.3.8 Η μετακίνηση και κατανομή των ιών στα φυτικά κύτταρα.....	8
1.3.9 Η διείσδυση των ιών στο κύτταρο.....	9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

Μετάδοση ιώσεων με έντομα- φορείς

2.1 Έντομα- φορείς.....	11
2.2 Μετάδοση του ιού με μη- έμμονο τρόπο από το φορέα αφίδα.....	12
2.3 Ξενιστές-ζημιά.....	13
2.4 Μορφολογία-ανατομία της αφίδας.....	13
2.5 Κύκλος ζωής αφίδας.....	15
2.6 Η πράσινη αφίδα της ροδακινιάς (<i>Myzus persicae</i>).....	16
2.7 Ο τρόπος διατροφής της αφίδας.....	18
2.8 Ο τρόπος μετάδοσης του ιού από την αφίδα.....	19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

Ο ιός Y της πατάτας, χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με την μετάδοση του από έντομα και η διάγνωση των φυτοπαθογόνων ιών

3.1 Γενικά.....	22
3.2 Ο ιός Y της πατάτας.....	23
3.3 Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα.....	25
3.4 Κύκλος μόλυνσης των Potyvirus.....	25
3.5 Ο πολλαπλασιασμός των Potyvirus.....	26
3.6 Οι πρωτεΐνες των Potyvirus.....	27
3.7 Ο ρόλος του σιέλου.....	28

3.8 Διάγνωση φυτοπαθογόνων ιών.....	30
3.8.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης(PCR).....	31
ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	34
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	35

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο αριθμός των ασθενειών ανθρώπων, ζώων και φυτών που αποδίδονται στους ιούς καθημερινά, όλο και αυξάνονται. Οι ιοί μεταδίδονται με αρκετούς τρόπους. Στην παρούσα εργασία δόθηκε έμφαση, στην μετάδοση των ιώσεων με έντομα φορείς και ειδικότερα στην αφίδα *myzus persicae*. Η συγκεκριμένη αφίδα μελετάτε επί σειρά ετών γιατί είναι από τους πιο αποτελεσματικούς φορείς ιώσεων, κυρίως του ιού Υ της πατάτας. Έχει βοηθήσει πολύ στην κατανόηση του τρόπου μη έμμονης μετάδοσης από έντομα φορείς και έχει δώσει μια βάση για να απαντηθούν τα εξής ερωτήματα: πώς διατηρεί τον ιό, πώς τον μεταδίδει, πως επιδρά η νηστεία της αφίδας στην μετάδοση του ιού και τέλος πως βοηθούν οι πρωτεΐνες των ιών, σε συνδυασμό με την αφίδα στην μετάδοση των ιών.

Κάνουμε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση σε αυτά που έχουν μελετηθεί αν και δεν έχουν διευκρινιστεί κάποια θέματα όπως, το πως συνδέονται τα ισοωμάτια με τις πρωτεΐνες των ιών, πώς ακριβώς λειτουργεί ο σίελος της αφίδας καθώς και πως επιδρά ακριβώς η νηστεία στην αποτελεσματικότητα της μετάδοσης.

Οφείλω να ευχαριστήσω, για την πολύτιμη βοήθεια που μου έδωσε στην πτυχιακή μου εργασία, την Πέττα Κατερίνα, τεχνολόγο γεωπόνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΙΟΙ

1.1 Γενικά

Είναι ένα άθροισμα ενός ή περισσοτέρων γονιδίων, μορίων νουκλεϊνικού οξέος, που περιβάλλονται από ένα προστατευτικό κάλυμμα ή καλύμματα πρωτεΐνης ή λιποπρωτεΐνης. Η αναπαραγωγή τους γίνεται σε διάφορες θέσεις, όπως το πρωτόπλασμα ή ο πυρήνας των κυττάρων. Οι ιοί σε αντίθεση με όλες τις κυτταρικές δομές, έχουν RNA ή DNA. Ποτέ και τα δυο μαζί. Επίσης δεν έχουν ριβόσώματα και ένζυμα που είναι απαραίτητα για την πρωτεϊνσύνθεση. Μπορούν να αναπαραχθούν μόνο στο εσωτερικό περιβάλλον των ζωντανών κυττάρων που μολύνουν. Η επιφάνεια των ισωματίων περιέχει συγκεκριμένο αριθμό πρωτεϊνικών υπομονάδων, τα **καψομερή**, δηλαδή τα μόρια των πρωτεϊνών που αποτελούν το καψίδιο. Το καψίδιο καθορίζει τον τρόπο μεταδοτικότητας των ισωματίων από τους φορείς του ιού ως και το είδος των συμπτωμάτων που προκαλεί. Η καψιδιακή πρωτεΐνη δεν έχει μολυσματικότητα αλλά η παρουσία της, την διευκολύνει. Οι φυτικοί ιοί συμπεριφέρονται όπως και τα άλλα παρασιτικά παθογόνα, προκαλώντας ποικιλία συμπτωμάτων στα φυτά ξενιστές. Η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται αποκλειστικά μέσα στο φυτό, χρησιμοποιώντας τις απαραίτητες χημικές ενώσεις, τα κατάλληλα ενζυμικά συστήματα και τα αναγκαία οργανίδια των κυττάρων, κατατάσσει τους ιούς στα υποχρεωτικά παράσιτα.

Η συστηματική κατάταξη των ιών, στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στο σχήμα και το μέγεθος, παράγοντες οι οποίοι είναι αντιληπτοί μόνο με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Εξαιτίας των λιγοστών γνώσεων για την εξέλιξη των ιών, συνήθως κατατάσσονται βάσει τεσσάρων κριτηρίων: το μέγεθος, το σχήμα, την παρουσία ή απουσία εξωτερικού καλύμματος και τέλος με την παρουσία RNA ή DNA και αν αυτό είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο. Το **σχήμα** των ισωματίων μπορεί να είναι: νηματόμορφο, σφαιρικό και ραβδόμορφο. Το **μέγεθος** τους ποικίλει από περίπου 10 μέχρι 400nm.

Για να γίνει πιο κατανοητό το μέγεθος τους, οι μικρότεροι ιοί είναι λίγο μεγαλύτεροι από τα ριβοσώματα, ενώ οι μεγαλύτεροι είναι λίγο μικρότεροι, από τα μικρότερα βακτήρια και είναι ορατοί με οπτικό μικροσκόπιο.

1.2 Διαδικασία σύνθεσης των ιών και ο ρόλος του RNA

1.2.1 Ο ρόλος του RNA στην διαδικασία σύνθεσης των ιών

Τα σωματίδια των φυτικών ιών συνίστανται από RNA ή DNA ή σπάνια και από τα δύο μαζί. Τα RNA ή DNA που έχουν βρεθεί στους ιούς συντίθενται από τα 4 βασικά νουκλεοτίδια που απαντούν στα αντίστοιχα νουκλεϊνικά οξέα των κυττάρων του ξενιστή. Όλοι οι ιοί κωδικοποιούν μια ή περισσότερες πρωτεΐνες, που είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του καψιδίου και για τον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος του ιού, δρώντας σαν ένζυμα. Σε ορισμένους ιούς αυτά τα ένζυμα είναι παρόντα μέσα στο ιοσωμάτιο.

Το RNA έχει το χαρακτηριστικό να δρα ως εκμαγείο είτε ως αγγελιοφόρο. Κάθε ιδιότητα του ιού καθορίζεται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων σε συγκεκριμένο τμήμα αυτού του RNA. Τα γονίδια αυτά καθορίζουν την RNA-πολυμεράση, την πρωτεΐνη του καψιδίου, αλλά και την σύνθεση προϊόντων που είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση συγκεκριμένων συμπτωμάτων στο φυτό ξενιστή. Τα συμπτώματα δεν οφείλονται μόνο στο γεγονός ότι η σύνθεση του ιού καταναλώνει συστατικά από το φυτικό κύτταρο αλλά και στο ότι ο ιός κατευθύνει την σύνθεση βιολογικά ενεργών ουσιών που δεν προϋπήρχαν στα υγιή φυτά ή τουλάχιστον, όχι στις ίδιες ποσότητες (Τζάμος,2004).

1.2.2 Η διαδικασία σύνθεσης των ιών

Σε μια απλοποιημένη περιγραφή της διαδικασίας αντιγραφής ενός RNA ιού, όπως ο Υ της πατάτας, αρχικά το νουκλεινικό οξύ απελευθερώνεται από το πρωτεϊνικό καψίδιο. Επάγει την σύνθεση της ιικής RNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί το ιικό RNA ως εκμαγείο (μήτρα) για να σχηματισθεί το συμπληρωματικό RNA. Η σχηματιζόμενη αλυσίδα RNA είναι το είδωλο του αρχικού ιικού RNA (συμπληρωματικό αντίγραφο). Το συμπληρωματικό RNA συνδέεται προσωρινά με την αρχική θετική ιική αλυσίδα, αλλά οι 2 μορφές του δίκλωνου RNA διαχωρίζονται ταχέως, και η συμπληρωματική αλυσίδα, η οποία στην συνέχεια έχει το ρόλο του εκμαγείου, οδηγεί στη σύνθεση νέου ιικού RNA για να παραχθούν τα θετικά ιικά RNA. Στους μονόκλωνους ραβδόμορφους RNA ιούς, το RNA δεν είναι από μόνο του μολυσματικό ως αντικωδικό. Η μολυσματικότητα εκφράζεται, αφού γίνει μεταγραφή εντός του ξενιστή μέσω του ένζυμου της μεταγραφάσης και ακολουθήσει η αντιγραφή του RNA σε κωδικό. Στους δίκλωνους ισοδιαμετρικούς RNA ιούς, το RNA είναι χωρισμένο εντός του ίδιου ισωματίου, είναι μολυσματικό και η αντιγραφή του στο ξενιστή, εξαρτάται από το ένζυμο της μεταγραφάσης που πρέπει να συνυπάρχει εντός του ιού (Τζάμος,2004).

1.3 Τρόποι μετάδοσης των ιών

Οι ιοί δεν μπορούν να προσβάλουν τα φυτά «ενεργητικά», δηλαδή να δημιουργήσουν μέσω κάποιου μηχανισμού, τις προϋποθέσεις εισόδου στον ξενιστή. Για την εξάπλωση των ιών είναι απαραίτητη η λύση της συνέχειας της επιδερμίδας του ξενιστή και να γίνει εισαγωγή των ισωματίων, στο εσωτερικό των κυττάρων. Πληγές, ώστε να εισαχθεί ο ιός μπορεί να προκύψουν είτε μηχανικά ή με βοήθεια

φυσικών φορέων, ζωικοί(έντομα, νηματώδεις) ή μύκητες. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι τρόποι μετάδοσης των ιών.

1.3.1 Άμεση μετάδοση μέσω του αγενούς πολλαπλασιαστικού φυτικού υλικού

Όλοι οι φυτοί μεταδίδονται με τα όργανα αγενούς πολλαπλασιασμού των φυτών. Η διασυστηματική μετακίνηση των ισοματίων συμβάλει, ώστε οι προσβεβλημένοι ιστοί του φυτού να διατηρούν τον ιό καθόλη την διάρκεια της ζωής τους.

1.3.2 Μετάδοση μέσω του εμβολιασμού

Είναι εφικτή μέσω μολυσμένου υποκειμένου προς το εμβόλιο είτε μέσω μολυσμένου εμβολίου προς το υποκείμενο. Σε ορισμένες περιπτώσεις η παρουσία ιού μπορεί να προκαλέσει αποτυχία του εμβολιασμού. Μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί μετάδοση και μέσω των ριζών παρακείμενων φυτών που έρχονται σε επαφή, κυρίως μεταξύ δένδρων.

1.3.3 Μετάδοση μέσω των σπερμάτων

Η μετάδοση ιών με το εγγενές πολλαπλασιαστικό υλικό και ειδικά με τα σπέρματα προσεγγίζει το 20% των γνωστών μέχρι σήμερα ιών. Η παρουσία του ιού στα σπέρματα, εξασφαλίζει απευθείας μεταφορά του στον αγρό και δημιουργεί διάσπαρτες θέσεις διαδόσεως του παθογόνου.

Διακρίνονται 2 είδη μετάδοσης με τον σπόρο:

- Μετάδοση λόγω παρουσίας του ιού στα καλύμματα των σπερμάτων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μόλυνση των βλαστηνόντων φυταρίων με μηχανικό τρόπο.
- Μετάδοση λόγω παρουσίας του ιού στους ιστούς του εμβρύου. Η μόλυνση του εμβρύου επιτυγχάνεται μέσω της ωοθήκης ή της γύρεως.

Η μετακίνηση των ιών είναι ανέφικτη στα σπέρματα, λόγω απουσίας πλασμοδεσμάτων.

1.3.4 Μετάδοση μέσω της γύρης

Η μετάδοση μέσω της γύρεως απαντάται σε πολλούς από τους σπορομεταδιδόμενους ιούς. Όταν μόνο η γύρη είναι μολυσμένη, τότε ο ιός δεν μεταδίδεται στο μητρικό φυτό, αλλά παραμένει στο μολυσμένο σπόρο, προφανώς λόγω της απουσίας των πλασμοδεσμάτων.

1.3.5 Μετάδοση των φυτοίων μηχανικά, μέσω του φυτικού χυμού

Μερικοί ιοί μπορούν να μεταφερθούν με μηχανικό τρόπο μέσω του χυμού ασθενούς φυτού σε υγιές. Όταν φύλλα γειτονικών φυτών φέρονται σε επαφή με τον άνεμο, λόγω μικροτραυματισμών, όπως θραύσεις τριχών της φυλλικής επιφάνειας, έρχεται σε επαφή ο χυμός του ενός φυτού, με ζωντανό το πρωτόπλασμα του άλλου. Μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί μετάδοση με τις καλλιεργητικές φροντίδες του ανθρώπου ή και με τα ζώα. Η ικανότητα μετάδοσης ενός ιού εξαρτάται από το είδος του φυτού που έχει μολυνθεί καθώς και από τον ιό που θα μεταδοθεί.

1.3.6 Μετάδοση με σπερματοφύτα παράσιτα (κουσκούτα)

Τα ισωμάτια μεταφέρονται με το χυμό που κινείται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Όταν η κουσκούτα εξαποστείλει μυζητήρες και διεισδύσουν στους βλαστούς του ξενιστή, οι δεσμίδες της ενώνονται με του ξενιστή και έτσι παραλαμβάνεται παθητικά χυμός και συγχρόνως τα ισωμάτια. Προφανώς, ο βλαστός της κουσκούτας αποτελεί γέφυρα για την μετάδοση του ιού σε γειτονικό συγγενές ή μη φυτό, στο οποίο το παράσιτο θα αποστείλει μυζητήρες.

1.3.7 Μετάδοση μέσω διαφόρων οργανισμών

Μετάδοση με ακάρεα φορείς

Ακάρεα που ανήκουν στις οικογένειες Eriophyidae και Tetranychidae μπορούν να μεταδώσουν 9 διαφορετικούς ιούς. Η σχέση ιού-ακάρεος είναι εξειδικευμένη. Η μετάδοση αυτή διευκολύνεται από τον άνεμο, που παρασύρει τους φορείς από φυτό σε φυτό.

Μετάδοση με νηματώδεις φορείς

Περίπου 20 φυτοιοί μεταδίδονται με ένα ή περισσότερα από 3 γένη εκτοπαρασιτικών νηματωδών. Μεταδίδουν τους ιούς καθώς τρέφονται στις ρίζες μολυσμένων φυτών και στην συνέχεια σε ρίζες υγιών φυτών, όπου μετακινούνται.

Μετάδοση με μύκητες φορείς

Πρόκειται για πρωτόζωα, που είναι υποχρεωτικά παράσιτα ριζών και έχουν κοινά στάδια ανάπτυξης. Επιβιώνουν ως υψοσπόρια εκ των οποίων προέρχονται ζωοσπόρια, που μολύνουν τους ξενιστές.

Ο θαλλός είναι βυθισμένος στο κυτταρόπλασμα, από το οποίο διαχωρίζεται με μια μόνο μεμβράνη, στα πρώτα στάδια της διαδικασίας μολύνσεως. Υποτίθεται ότι η μεταφορά των ισοωματίων μεταξύ του φυτού-ξενιστή και του μύκητα –φορέα, γίνεται μέσω αυτής της μεμβράνης, πριν από το σχηματισμό κυτταρικού τοιχώματος. Τα ισοωμάτια που μεταφέρονται με τα ζωοσπόρια και απελευθερώνονται κατά την διείσδυση των ζωοσπορίων, σε ένα ζωντανό κύτταρο της ρίζας του ξενιστή, πολλαπλασιάζονται και στην συνέχεια μετακινούνται σε όλο το φυτό. Τελευταίος και πολύ σημαντικός τρόπος μετάδοσης των ιών, είναι η μετάδοση με έντομα φορείς. Για το λόγο αυτό γίνεται στο επόμενο κεφάλαιο ανάλυση του τρόπου αυτού, με ιδιαίτερη έμφαση στο έντομο - φορέα, αφίδα.

1.3.8 Η μετακίνηση και κατανομή των ιών στα φυτικά κύτταρα

Η ιδέα ότι οι ιοί μεταφέρονται μέσα στα φυτά με 2 τρόπους καθιερώθηκε από τον Samuel (1934) σε μια αναφορά που περιέγραφε, την μεταφορά του μωσαϊκού του καπνού (TMV) σε ξενιστές της οικογένειας Solanaceae. Στηρίχθηκε στην θεωρία της αργής κίνησης των ιών από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των **πλασμοδεσμάτων**, σε συνδυασμό με την γρήγορη διανομή σε όλο το φυτό, μέσω του φλοιώματος. Υποστηρίζεται ότι οι φυτοιοί κινούνται από κύτταρο σε κύτταρο και σε μακρύτερες αποστάσεις, προωθώντας και τροποποιώντας τις προϋπάρχουσες διόδους (ηθμαγγειώδεις δεσμίδες) για μακρομοριακή κίνηση μέσα στα κύτταρα, ανάμεσα στα κύτταρα και μεταξύ των διάφορων ξενιστών. Οι ιοί μετακινούνται τοπικά ή διασυστηματικά εντός των μολυσμένων φυτών. Μερικοί ιοί παραμένουν στο μολυσμένο φύλλο, ενώ άλλοι κινούνται διασυστηματικά. Εάν ο ιός πολλαπλασιάζεται στο κύτταρο που διείσδυσε αρχικά αλλά αδυνατεί να μετακινηθεί προς τα γειτονικά κύτταρα, τότε μπορεί να μην ανιχνευθεί η σύνθεση νέων ισοωματίων. Η τοπική μετακίνηση πραγματοποιείται μέσω των πλασμοδεσμών των κυττάρων από την θέση

της αρχικής εισόδου και είναι βραδεία(Carrington et al,1996) . Η διασυστηματική μετακίνηση είναι ταχύτερη και συνήθως πραγματοποιείται μέσω των αγγείων του ηθμού.

Σε έρευνες που έχουν διεξαχθεί φαίνεται ότι, η κίνηση σε διασυστηματική μόλυνση από ιούς, που φαίνεται σε εγκάρσια τομή μολυσμένου φυτού, γίνεται σε διάφορους τύπους κυττάρων και ιστών.

Αν η μόλυνση ξεκινήσει σε ένα επιδερμικό κύτταρο, ο ιός θα κινηθεί από κύτταρο σε κύτταρο **διαδοχικά: στο μεσόφιλο, στο ξύλωμα, στο παρεγχυμα του φλοιώματος και στην συνέχεια στα γειτονικά κύτταρα**. Η μακρινή μεταφορά στα άλλα φύλλα διευκολύνεται από το αγγειακό παρέγχυμα (Leisner and Turgeon,1993).

1.3.9 Η διείσδυση των ιών στο κύτταρο

Οι φυτοιοί στερούνται της δυνατότητας μιας ενεργούς συμμετοχής, στην αρχική φάση της εισβολής του κυττάρου. Για να εδραιωθεί η μολυσματική διαδικασία είναι απαραίτητο τα ισομάτια ή το νουκλειικό οξύ να έρθουν σε απευθείας επαφή με το κυτόπλασμα του ευπαθούς κυττάρου. Για να πραγματοποιηθεί όμως αυτό, θα πρέπει να περαστεί το κυτταρικό τοίχωμα. Το κυτταρικό τοίχωμα δεν είναι συνεχές και σε πολλά κύτταρα, εμφανίζονται διακοπές, οι **πλασμοδέσμες**, που επιτρέπουν την επικοινωνία γειτονικών κυττάρων. Στην φύση, η διείσδυση των ισοματίων στα φυτικά κύτταρα γίνεται διαμέσου των μικρορωγμών του κυτταρικού τοιχώματος από την δραστηριότητα των φυσικών φορέων, (άνθρωπος, έντομα, ακάρεα, νηματώδεις, μύκητες) αλλά και από τις τριβές των φυτικών επιφανειών, με ήδη μολυσμένα φυτά ή με άλλα ξένα σώματα.

Η ζωτικότητα του κυττάρου είναι η θεμελιώδης κατάσταση που επιτρέπει την αναπαραγωγή των ισοματίων και συνεπώς την ανάπτυξη της μόλυνσης. Η απαίτηση αυτή ικανοποιείται από τα κύτταρα του δρυφακτοειδούς παρεγχύματος, τα οποία,

απελευθερωμένα από μέρος του κυτταρικού τοιχώματος, διαθέτουν κατάλληλα σημεία εισόδου για τα ισωμάτια.

Τα σημεία αυτά είναι πρόσκαιρα, μετά από 2 δευτερόλεπτα χάνεται το 70% των δεκτικών σημείων ενώ το υπόλοιπο 30% σε περίπου μια ώρα

Η συμβολή των πλασμοδεσμών έχει αποδειχθεί με την ηλεκτρονική μικροσκοπία, στην οποία είναι εμφανής η παρουσία ισωματίων. Επειδή τα ριβοσώματα, που έχουν παραπλήσιο μέγεθος με τους μικρούς ιούς, δεν μετακινούνται μέσω των πλασμοδεσμών, φαίνεται ότι οι ιοί μεταβάλλουν τις ιδιότητες των πλασμοδεσμών, μεταξύ των οποίων και την διάμετρό τους, ώστε να επιτρέπεται η μετακίνησή τους από κύτταρο σε κύτταρο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

Μετάδοση ιώσεων με έντομα- φορείς

2.1 Έντομα- φορείς

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, οι μετάδοση ιώσεων με έντομα φορείς θεωρείται σημαντικός τρόπος μετάδοσης των ιώσεων γιατί είναι αποτελεσματικός και είναι συχνό φαινόμενο στις ελληνικές καλλιέργειες. Οι πολυπληθέστεροι και σοβαρότεροι φορείς των φυτοικών, ανήκουν στην τάξη Homoptera και κυρίως στις οικογένειες Aphididae, Aleurodidae, Coccidae, Membracidae. Στην τάξη Heteroptera της οικογένειας Cicadellidae αλλά και στις τάξεις Hemiptera, Thysanoptera, Coleoptera και Orthoptera. Οι πλέον κατάλληλοι φορείς μετάδοσης των ιών είναι οι αφίδες, τα τζίτζικακία, οι αλευρώδεις και οι θρίπες, διότι τα έντομα αυτά έχουν στοματικά μόρια, νύσσοντος μυζητικού τύπου, σε αντίθεση με τα Coleoptera-Orthoptera που έχουν μασητικού τύπου.

Τα έντομα με μυζητικά στοματικά μόρια άλλοτε φέρουν τον ιό μόνο στα στοματικά τους όργανα (προβοσκίδα, **στιλέτο**), οπότε πρόκειται για μη μόνιμο ιό και άλλοτε συγκεντρώνουν και διατηρούν τον ιό στο εσωτερικό τους, οπότε ο ιός λέγεται μόνιμος. Στους **έμμονους ιούς** ο φορέας πρέπει να τραφεί στο μολυσμένο ή το υγιές φυτό για αρκετό χρόνο ώστε να προσλάβει / μεταδώσει τον ιό αντίστοιχα (άριστος χρόνος 6-24 ώρες). Η ύπαρξη λανθάνουσας περιόδου είναι απαραίτητη. Ο φορέας παραμένει ιοφόρος για αρκετό χρόνο και συνήθως για όλη του τη ζωή. Τέλος υπάρχουν και οι ημιμόνιμοι ιοί που μπορούν να μεταδίδονται για ένα ενδιάμεσο χρονικό διάστημα, αφού τα έντομα τραφούν για αρκετά λεπτά ή ώρες. Η ιδιότητα του ιού να είναι μόνιμος ή μη-μόνιμος εξαρτάται αποκλειστικά από τον ιό και όχι από το έντομο-φορέα. Το έντομο μεταδίδει τους μη έμμονους ιούς αμέσως με το στιλέτο του, αρκεί να βοσκήσει έστω για λίγα δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά. Το έντομο πρέπει να τραφεί από ένα μολυσμένο φυτό για αρκετά λεπτά ή μερικές ώρες για να μπορεί να τους μεταδώσει. Ο χρόνος αυτός ονομάζεται **χρόνος βοσκήσεως**, διατροφής ή προσλήψεως. Εξαρτάται από την θερμοκρασία και από άλλους παράγοντες και φαίνεται ότι αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται για να περάσουν τα ιοσωμάτια, τα τοιχώματα του πεπτικού σωλήνα

του εντόμου, να εισέρθουν στο κυκλοφοριακό σύστημα και τελικά να φτάσουν στους σιελογόνους αδένες (Κατής,1996).

2.2 Μετάδοση του ιού με μη- έμμοно τρόπο από το φορέα αφίδα

Οι αφίδες αποτελούν την πιο σημαντική ομάδα φορέων που μεταδίδει 250 περίπου ιούς. Αρκετά είδη αφίδων μπορούν να μεταδώσουν με το σπλέτο τους τον ίδιο ιό, ενώ ένα είδος αφίδας μπορεί να μεταδώσει αρκετά είδη ιών. Σε πολλές περιπτώσεις η σχέση φορέα-ιού είναι εξειδικευμένη. Αρκεί να βυθίσουν το σπλέτο τους σε ένα μολυσμένο φυτό και να τραφούν μόνο για λίγα δευτερόλεπτα για να μεταδώσουν τον ιό μετά από μερικά δευτερόλεπτα βοσκήσεως επάνω σε υγιή φυτά. Ο ιός βρίσκεται δεσμευμένος στον οισοφάγο της αφίδας και ελευθερώνεται στο φυτικό κύτταρο, κατά την διάρκεια της απομυζήσεως των φυτικών χυμών. Ο ιός δεν μεταφέρεται στις αφίδες κατά την έκδυση ή στα ωά της. Είναι έντομα που ανήκουν στην τάξη Homoptera και στην οικογένεια Aphididae. Απαντώνται σε πολλές καλλιέργειες και είναι γνωστές με αρκετά ονόματα όπως: μελίγκρες, ψείρες, ψύλλες, φυτοφθείρες, μέλερη.

Στην παρούσα εργασία ασχολούμαστε με τον αφιδομεταδιδόμενο ιό Y της πατάτας. Οι αφιδομεταδιδόμενοι ιοί διακρίνονται σε μη-έμμοноυς και έμμοноυς χρησιμοποιώντας ως κριτήριο το χρόνο διατήρησης της ιοφόρου ικανότητας του φορέα εντόμου. Έχει αναφερθεί ότι ακόμη και δοκιμαστικά νύγματα διάρκειας 5-10 δευτερολέπτων αρκούν για την πρόσληψη και μετάδοση μη έμμοноων ιών. Η μετάδοση των μη-έμμοноων μπορεί να γίνει αμέσως μετά την πρόσληψη τους (δεν απαιτείται λανθάνουσα περίοδος).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στα προηγούμενα κεφάλαια, ο ιός Y της πατάτας είναι από τους πιο μελετημένους ιούς. Κατά συνέπεια, έχουν διεξαχθεί σημαντικά συμπεράσματα όσον αφορά την κατανόηση του τρόπου μετάδοσης των ιώσεων από έντομα-φορείς. Η αφίδα είναι ο σπουδαιότερος φορέας ιώσεων και παρακάτω γίνεται μια προσπάθεια εξήγησης του φαινομένου της μεταφοράς, μετάδοσης και διατήρησης του ιού με μη- έμμοноο τρόπο.

2.3 Ξενιστές-ζημιά

Είναι εξαιρετικά πολυφάγα έντομα και προσβάλλουν περισσότερα από 400 είδη φυτών.



Εικόνα 1: Διάφορα είδη αφίδας

Από τα καλλιεργούμενα είδη προσβάλλει των Rosaceae, Rutaceae, Solanaceae, Malvaceae, Compositae, Chenopodiaceae, Umbeliferae, Papilionaceae, Cruciferae. Προσβάλλει κατά προτίμηση τις κορυφές τρυφερών βλαστών και τρυφερά φύλλα, που συστρέφονται από τη προσβολή. Τα μελιτώδη αποχωρήματα της, ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς. Εκτός από την αξιόλογη άμεση ζημιά στα φυτά,

η αφίδα θεωρείται ο πιο σοβαρός φορέας ιών, αφού μπορεί να μεταδώσει αποτελεσματικά πάνω από 100 ιούς φυτών (Kennedy et al. 1962). Μερικοί από τους έμμονους ιούς που μεταδίδει, είναι του ήπιου κίτρινισμού των τεύτλων (BMV), της παραμόρφωσης των νεύρων του καπνού (TVDDV), του καρουλιάσματος των φύλλων μπιζελιού (PLRV) και του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας (PLRV) (Blackman and Eastop 1984). Ακόμα το είδος αυτό μεταδίδει πολύ αποτελεσματικά και πολλούς μη έμμονους ιούς. Μερικοί από τους μη έμμονους ιούς που μεταδίδει είναι του κίτρινου μωσαϊκού της κοινής κολοκυθιάς (ZYMV), του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), της κίτρινης στιγμάτωσης της κολοκυθιάς (ZYMV), του Y της πατάτας (PVY), του A της πατάτας (PVA) (Brunt et al. 1996).

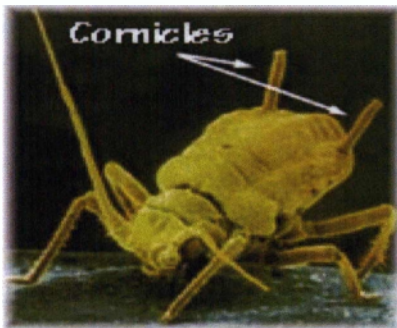
2.4 Μορφολογία-ανατομία της αφίδας

Είναι μικρά έντομα μήκους 1-3 εκατοστών, έχουν κεραίες με 3-6 άρθρα. Έχουν μακριά πόδια και μακρύ μυζητικό ρύγχος. Υπάρχουν πτερωτά και άπτερα άτομα. Κατά κανόνα, πτέρυγες έχουν μόνο τα αρσενικά άτομα και μερικά

παρθενογενετικά θηλυκά. Χαρακτηριστικό των πτερύγων είναι ότι φέρουν μόνο ένα ευδιάκριτο επιμήκεις νεύρο.

Η κοιλία φέρει 2 χαρακτηριστικές πλευρικές αποφύσεις, τα **κεράτια** ή σιφώνια που εκκρίνουν κηρώδη ουσία, χρήσιμη για την άμυνα του εντόμου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό του, είναι η έκκριση μελιτώματος(εκκρίνει μια σταγόνα κάθε 30 λεπτά) πάνω στο οποίο αναπτύσσονται σαπρόφυτοι μύκητες (καπνιές).

Το σπλέτο του τροφικού καναλιού πλαισιώνει την φαρυγγική αντλία μέσα στο κεφάλι της αφίδας και αυτό μεταφέρει την τροφή στο πρόσθιο έντερο. Το πρόσθιο έντερο είναι ένας αγωγός ο οποίος ανοίγει δια της βαλβίδας του οισοφάγου, αυτό αναφέρεται ως **στομάχι**. Το δεύτερο μέρος του στομάχου, το έντερο είναι το μεγαλύτερο μέρος του διατροφικού καναλιού.



Εικόνα 2: Απεικόνιση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της αφίδας. Παρατηρούνται εδώ τα σιφώνια, στο πίσω μέρος της αφίδας



Εικόνα 3: Έκκριση μελιτώματος



Εικόνα 4: Συμβίωση αφίδας και μυρμηγκιών

2.5 Κύκλος ζωής αφίδας

Έχουν ασυνήθιστο και περίπλοκο **κύκλο ζωής** που τους επιτρέπει να δημιουργούν τεράστιους πληθυσμούς σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ορισμένα είδη είναι ριζόβια και άλλα κηκιδόβια, ζουν δηλαδή μέσα σε κηκίδες που οι ίδιες δημιουργούν στο φύλλωμα των ξενιστών. Ζουν συνήθως σε ομάδες, η μια κοντά στην άλλη, με το κεφάλι προς την βάση του βλαστού ή του φύλλου. Οι αφίδες περιλαμβάνουν μόνοικα και δίοικα είδη. Τα μόνοικα συμπληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο, στο ίδιο είδος ξενιστή ενώ τα δίοικα περνούν ένα μέρος του κύκλου τους σε άλλον από το κύριο ξενιστή.

Κατά την διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου παρατηρούμε:

- Έμφυλα ή αμφιγονικά άτομα: είναι αρσενικά και θηλυκά. Το θηλυκό μετά από σύζευξη γεννά ένα αυγό (χειμέριο).

- Παρθενογενετικά άτομα: είναι άτομα που είναι προϊόντα παρθενογένεσης, είτε τα ίδια γεννούν παρθενογενετικά, είτε γεννήθηκαν και γεννούν παρθενογενετικά.

Τρέφονται με τρυφερά φύλλα και βλαστούς, γι' αυτό και είναι άφθονες την άνοιξη και το φθινόπωρο. Ευνοούνται με μετρίως θερμό και υγρό καιρό.

Είναι σημαντικός εχθρός για τις καλλιέργειες γιατί προκαλούν άμεσες και έμμεσες ζημιές. Άμεσα αφαιρούν μεγάλες ποσότητες χυμού από τα φυτά και τα νύγματα πολλών ειδών, προκαλούν συστροφή των φύλλων. Εκκρίνουν άφθονα μελιτώδη αποχωρήματα που ρυπαίνουν το φυτό και τους καρπούς και ευνοούν το μύκητα της καπνιάς και την παρουσία μυρμηγκιών, τα οποία τις προστατεύουν.



Εικόνα 5: Ακμαίο myzus persicae

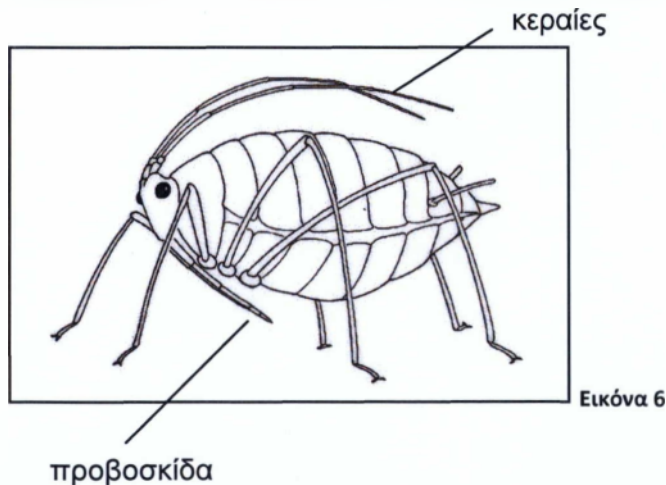
2.6 Η πράσινη αφίδα της ροδακινιάς (*Myzus persicae*)

Η πράσινη αφίδα της ροδακινιάς, με την οποία ασχολούμαστε, εμφανίζεται σε ολόκληρο τον κόσμο. Έχει περισσότερες από 5 γενεές το χρόνο και η ανάπτυξη της είναι ταχεία. Μία πλήρη γενιά χρειάζεται από 10 έως 12 ημέρες. Σε ήπια κλίματα έχει πάνω από 20 γενεές ετησίως. Ιδεώδης θερμοκρασία, είναι των 26°C. Σε θερμοκρασία 24°C, ο κύκλος διαρκεί 7 ημέρες. Όταν υπερβεί τους 30°C, το έντομο δεν αναπαράγεται (Belda, 1991). Διαχειμάζει ως χειμέριο αυγό στο φλοιό των κύριων ξενιστών (ροδακινιάς ή άλλων πυρηνοκάρπων).

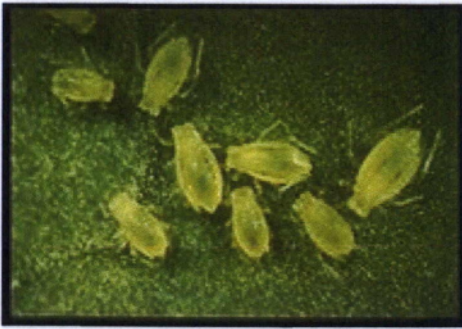
Τα χειμερινά αυγά συνήθως 4-6 ανά θηλυκό, βρίσκονται στους οφθαλμούς ή στις εσοχές του φλοιού. Στο τέλος του χειμώνα με αρχές άνοιξης, βγαίνουν από τα αυγά άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά, τα λεγόμενα θεμελιωτικά.

Ακολουθούν 2 παρθενογενετικές γενεές στη ροδακινιά και μετά τα πτερωτά άτομα σε δευτερεύοντες ξενιστές(ποώδη φυτά), όπου κατά την διάρκεια της περιόδου βλάστησης των φυτών, η μια παρθενογενετική γενιά διαδέχεται την άλλη. Το φθινόπωρο με αρχές χειμώνα, παράγονται στα ποώδη ή άλλα φυτά, πτερωτά θηλυκά άτομα που μεταναστεύουν στη ροδακινιά. Εκεί τα θηλυκά άτομα γεννούν θηλυκά που συζευγνύονται με τα αρσενικά και στην συνέχεια γεννούν τα χειμερινά αυγά. Σε περιοχές με σχετικά ζεστό χειμώνα, το έντομο αναπαράγεται παρθενογενετικά όλες τις εποχές του έτους, χωρίς να χρειάζεται να γεννηθούν χειμέρια αυγά. Παρθενογενετικά πολλαπλασιάζεται και σε πιο ψυχρές περιοχές, σε προστατευόμενους χώρους, όπως θερμοκήπιο (Mueller 1954, 1958, Waldhauer 1953, 1957, van Endem et al. 1969, Blackman 1971).

Ενήλικο. Το άπτερο παρθενογενετικό ζωοτόκο θηλυκό έχει σώμα σχετικά λεπτό, μήκους 1,5-2,5mm και χρώμα πράσινο, πρασινοκίτρινο, ρόδινο, ή κίτρινο. Καμιά φορά έχει στα νώτα κατά μήκος, καστανές ζώνες.



Τα σιφώνια είναι λεπτά και μακριά μήκους 0,4mm αλλά δε ξεπερνούν την άκρη της κοιλιάς. Η ουρίτσα ή cauda είναι στενόμακρη, μήκους 0,2mm και με 3 ζευγάρια τριχών. Τα χειμερινά αυγά γεννιούνται κυρίως στη ροδακινιά και δευτερεύοντος σε άλλα πυρηνόκαρπα (βερικοκιά, δαμασκηλιά, κερασιά, αμυγδαλιά), που αποτελούν



Εικόνα 7: Ενήλικα άτομα της *myzus persicae*

τους κύριους ξενιστές. Εκτός από πολλά καρποφόρα δέντρα, η αφίδα αυτή προσβάλλει και πολλά ποώδη καλλιεργούμενα φυτά, όπως καπνό, πατάτα, τομάτα, μαρούλι, σιτάρι, καρότο.

2.7 Ο τρόπος διατροφής της αφίδας

Οι αφίδες μεταδίδουν τους μη-έμμονους ιούς κατά την διάρκεια των νυγμάτων δοκιμασίας, παρόλα αυτά υπάρχει ανεπαρκής πληροφόρηση όσον αφορά τη συμπεριφορά τους κατά την διάρκεια των νυγμάτων δοκιμασίας, εκτός από το βαθμό της διείσδυσης του στιλέτου και την έκκριση του σάλιου. Οι αφίδες αφού προσγειωθούν σε ένα φυτό, μετακινούνται πάνω στην επιφάνεια, ελέγχοντας με τις κεραίες τους και πραγματοποιώντας νύγματα δοκιμασίας με τα στοματικά τους μόρια. Οι κεραίες είναι εφοδιασμένες με πολλά αισθητήρια μεταξύ των οποίων ανήκουν και ορισμένα που η δομή τους και οι ηλεκτροφυσιολογικές αντιδράσεις, υποδεικνύουν ότι χρησιμοποιούνται για την λήψη χημικών ερεθισμάτων, τους χημειοποδοχείς. Αυτοί χρησιμοποιούνται για την αίσθηση της γεύσης και την αντίληψη της φυλλικής επιφάνειας.

Τα αισθητήρια όργανα στο άκρο της προβοσκίδας είναι 2 τύπων: υποδοχείς αφής και υποδοχείς χημικών ερεθισμάτων. Οι **υποδοχείς αφής** αντιδρούν στην επαφή και την δομή της επιφάνειας. Επίσης επιτρέπουν στις αφίδες να επιλέξουν το περίγραμμα των νεύρων, τα προτιμητέα σημεία διατροφής. Οι **υποδοχείς των χημικών ερεθισμάτων** πιθανώς αναγνωρίζουν το προϊόν της αλληλεπίδρασης, μεταξύ του σιέλου των αφίδων και της επιδερμίδας των φυτών.

Στο νωτιαίο τοίχωμα του καναλιού διατροφής στην βάση των στιλέτων και προσθίως του διαστολέα μυός της αντλίας λήψεως τροφής, υπάρχει ένα ειδικό όργανο που παρουσιάζει την τυπική δομή ενός τυπικού υποδοχέα επαφής. Το όργανο αυτό βρίσκεται σε άμεση επαφή με το υγρό στο κανάλι διατροφής και πιθανώς εντοπίζει χημικές ουσίες στο χυμό που λήφθηκε, κατά την τροφική δραστηριότητα των αφίδων.

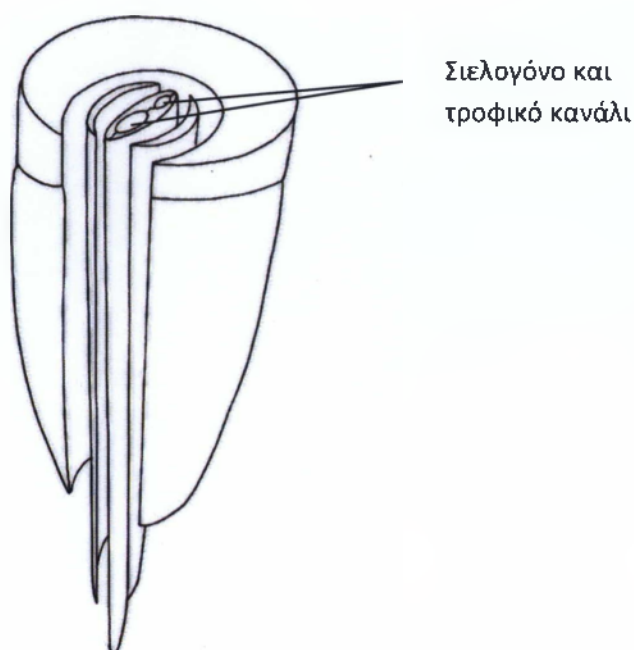
2.8 Ο τρόπος μετάδοσης του ιού από την αφίδα

Οι αφίδες συνήθως τρέφονται στο φλοίωμα των φυτών- ξενιστών τους, μπορεί δε, να απαιτηθούν 15 λεπτά ή και περισσότερο, έως ότου βυθίσουν τα σιλέτα τους μέσα στο φλοίωμα πριν να επιχειρήσουν να διατραφούν. Συνήθως βυθίζουν τα σιλέτα τους μια ή και περισσότερες φορές μέσα στο ξενιστή. Αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα συμπεριφοράς που επιτρέπει την ιδανική μετάδοση των μη έμμονων ιών. Τα μεγαλύτερης διάρκειας νύγματα δοκιμασίας έχουν σαν αποτέλεσμα, φτωχότερη μετάδοση και οι αφίδες που μόλις διέκοψαν την διατροφή τους επί του φλοιώματος των μολυσμένων φυτών σπάνια μεταδίδουν ιούς, εκτός αν επιχειρήσουν εκ νέον σύντομα δοκιμαστικά νύγματα.

Η εισαγωγή του σιλέτου πραγματοποιείται με δύναμη, αλλά και τα ένζυμα που εκκρίνονται με το σάλιο παίζουν πιθανότατα κάποιο ρόλο. Η αφίδα εκκρίνει πάνω στην επιφάνεια του φυτού ξενιστή μια σταγόνα σάλιο, διαμέσου της οποίας διεισδύουν τα σιλέτα. Το σάλιο περιέχει δυο συστατικά, το ένα εκ των οποίων στερεοποιείται για να σχηματίσει το σιελογόνο περίβλημα, ενώ το άλλο παραμένει υγρό. Το υγρό συστατικό πιθανώς περιέχει τα ένζυμα πεκτινάση, οξειδάση πολυφαινόλης, φαινολικές ενώσεις και ένα αραιό διάλυμα αιμολέμφου. Η πεκτινάση πιθανώς συνεισφέρει στη διείσδυση του σιλέτου με τη δράση της, στο μέσο λεπτό στρώμα του παρεγχύματος των φύλλων και οι αφίδες, οι οποίες δεν εκκρίνουν πεκτινάση, συνήθως εισαγάγουν τα σιλέτα τους μεταξύ των κυττάρων.

Παρόλα αυτά, η έκταση της ζημιάς η οποία προκαλείται στα κυτταρικά τοιχώματα από την εισαγωγή του σιλέτου δια μέσου των κυττάρων δεν είναι γνωστή και τα σιλέτα μπορεί να πραγματοποιήσουν άμεση επαφή με το κυτόπλασμα.

Εικόνα 8: Προβοσκίδα



Η *myzus persicae* που εκκρίνει πεκτινάση με το σάλιο της, έχει αναφερθεί ότι πραγματοποιεί νύγματα δοκιμασίας, μεταξύ και διαμέσου των κυττάρων ή και κατά τους 2 τρόπους. Αξίζει να αναφερθεί ότι διαφορετικοί πληθυσμοί του ίδιου είδους, μπορεί να συμπεριφέρονται με διαφορετικό τρόπο. Έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την πρόσληψη του φυτικού χυμού. Αυτό πραγματοποιείται με την εσωτερική πίεση ή με την δράση της φαρυγγικής αντλίας λήψης τροφής. Μια οισοφαγική βαλβίδα, η οποία βρίσκεται στην είσοδο του στομάχου μπλοκάρει το άνοιγμα, όταν το στομάχι είναι πλήρες. Σε αυτή την βαλβίδα οφείλεται η μη παλινδρόμηση του υλικού, που ήδη καταπόθηκε από το έντομο. Σε διαφορετική περίπτωση, θα ήταν ανέκδοτο να ελέγξει τα υλικά που εισέρχονται ή απομακρύνονται από το πρόσθιο έντερο.



Εικόνα 9:Απεικόνιση του στίλετου της αφίδας που προεξέχει από την προβοσκίδα και διεισδύει ενδοκυττάρια στα κύτταρα του μεσοφίλου και στην συνέχεια στις αγγειώδεις δεσμίδες, στο μικροσκόπιο. Πηγή:Gray and Banerjee,2008

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

Ο ιός Y της πατάτας

3.1 Γενικά

Έχει μια μεγάλη σειρά ξενιστών που περιλαμβάνει όχι μόνο σολανώδεις καλλιέργειες αλλά και πολλά σολανώδη και μη ζιζάνια. Έχει μια παγκόσμια



Εικόνα 10: Φύλλο πατάτας με προσβολή από τον ιό Y

κατανομή και είναι από τα σημαντικότερα παθογόνα (Milne, 1988). Ευθύνεται για μεγάλες απώλειες σε καλλιέργειες (πατάτα, καπνός, τομάτα, πιπεριά) και σε καλλωπιστικές καλλιέργειες π.χ πετούνια.

Έχει πολλές φυλές, παραλλαγές και παθότυπους που έχουν διαφοροποιηθεί. Οι κύριες φυλές είναι PVY^O και PVY^N. Στην πατάτα προκαλεί μια ασθένεια γνωστή ως μωσαϊκό.

Τα συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με την προερχόμενη από τον ιό φυλή, την ποικιλία του ξενιστή, τις κλιματολογικές συνθήκες και από το στάδιο στο οποίο ήταν το φυτό, όταν μολύνθηκε (Praper et al, 2002).

Ο PVY^O προκαλεί απώλειες 40-70 %. Γενικά προκαλεί μείωση της παραγωγής και μείωση του μεγέθους των κονδύλων, επηρεάζοντας και την ποιότητά τους. Σοβαρά συμπτώματα παρατηρούνται όταν ο PVY εμφανίζεται σε συνδυασμό με άλλους ιούς όπως οι X και A της πατάτας. Ο PVY είναι καταστροφικός και στις καλλιέργειες καπνού (Blancard, 1998). Αναφέρθηκε μια επιδημία στην Κίνα (Lee et al, 2001), όπου προκαλεί μείωση του ύψους των φυτών και τροποποιεί την χημική σύνθεση των φύλλων, ειδικά την περιεκτικότητα σε νικοτίνη (Latore & Flores, 1984). Οι απώλειες των καπνών μπορούν να φτάσουν το 100%.

Αναγνωρίστηκε αρχικά στην πατάτα, το 1931, σαν μέλος μιας ομάδας παθογόνων που συνδέθηκαν με τον εκφυλισμό της πατάτας. Είναι ένας από τους πιο μελετημένους ιούς.

Ο PVY ανήκει στο γένος *potyvirus*, ένα από τα έξι γένη της οικογένειας *potyviridae* (Shulka et al, 1998). Τα ισωμάτια είναι ινώδης ράβδοι, 730-740 nm μήκος, 11-12nm διάμετρο με την ελικοειδή συμμετρία να περιέχει νουκλεϊκό οξύ 6% περίπου. Το γονιδίωμα αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA. Ο PVY διαβιβάζεται με τις αφίδες, με μη έμμονο τρόπο. Η *myzus persicae* είναι η αποδοτικότερη.



Εικόνα 11:Ισωμάτια του ιού Y της πατάτας στο μικροσκόπιο

3.2 Φυσικοί ξενιστές και συμπτώματα

Ο PVY έχει μεγάλη ποικιλία ξενιστών και μεταδίδεται μηχανικά σε 120 περίπου φυτικά είδη 5 οικογενειών: *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Leguminosae* και *Solanaceae*. Σημαντικοί ξενιστές του PVY είναι : *Capsicum spp.* (πιπεριά), *Lycopersicon esculentum* (τομάτα), *Nicotiana spp.*(καπνός), *Physalis floridana*, *Solanum spp.* (αγριοντοματιά), και η πατάτα.

Τα συμπτώματα της αρχικής μόλυνσης εμφανίζονται με στίγματα, κιτρίνισμα, ριτίδιασμα και νέκρωση των φύλλων, ενώ εκείνα της δευτερεύουσας (μολυσμένος κόνδυλος) είναι νανισμός και εύθραυστο φύλλωμα. Η έκφραση των συμπτωμάτων εξαρτάται από τη φυλή του ιού, την καλλιεργούμενη ποικιλία πατάτας, την ηλικία κατά τη μόλυνση και τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Τα συμπτώματα είναι εντονότερα και σοβαρότερα σε περίπτωση διπλής μόλυνσης (συνδυασμός των PVY και PVX της πατάτας), όπου προκύπτει το λεγόμενο “ τραχύ μωσαϊκό ”. Μέρος μόνο των κονδύλων μολύνεται στην αρχική μόλυνση, επειδή οι μικρότεροι κόνδυλοι (< 30 gr) σε ποσοστό περίπου 50 % δεν φιλοξενούν τον ιό.



Εικόνα 12: Εμφάνιση καφέ στιγμάτων σε φυτό πατάτας από τον ιό Y.

Οι De Bokx και Huttinga (1981) αναφέρουν περίπου 25 είδη αφίδων φορείς του ιού Y της πατάτας. Άλλες βιβλιογραφικές αναφορές εμφανίζουν περίπου 50 είδη αφίδων ως φορείς του PVY. Οι αφίδες μολύνονται με τον PVY σε λιγότερο από 5 δευτερόλεπτα, ενώ η αποτελεσματικότητα μετάδοσης διαρκεί από 10 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό τροφικής δραστηριότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν μια αφίδα τρέφεται για περισσότερο από 5 έως 10 λεπτά παρατηρείται μειωμένη μεταδοτικότητα. Σύμφωνα με τον Bradley (1953), μόνο οι αφίδες που κάνουν σύντομη μύζηση μεταδίδουν αποτελεσματικά τον PVY. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι οι πεινασμένες αφίδες μεταδίδουν αποτελεσματικότερα τον ιό.

Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι οι αφίδες σε νηστεία τσιμπούν με μεγαλύτερη συχνότητα, σε σχέση με τις μη πεινασμένες, όταν μετακινούνται από τους ξενιστές, στα φυτά δείκτες.

Η συχνότητα μετάδοσης ποικίλει ανάμεσα στα είδη των αφίδων. Η πράσινη αφίδα του ροδάκινου *Myzus persicae* είναι ο πιο ικανός φορέας του ιού Y της πατάτας, αλλά η ικανότητα μετάδοσης κυμαίνεται από 8% έως 64%. Άλλα είδη που αποικίζουν την πατάτα και μεταδίδουν τον PVY είναι: *Aphis nasturtii* (31%), *Aulacorthum solani* (4%), *Macrosiphum euphorbiae* (2-45%).

Είδη αφίδων που δεν αποικίζουν την πατάτα και μεταδίδουν τον PVY σε μεγάλο ποσοστό είναι : *Myzus certus* μεταδίδει τον ιό με μεγάλη ικανότητα (54%) στον Καναδά, ενώ η *Brachycaudus helichrysi* είναι ένας αποτελεσματικός φορέας (15-34%) στην Ευρώπη. Άλλες αφίδες που δεν αποικίζουν την πατάτα και μεταδίδουν τον PVY σε σχετικά μικρά ποσοστά είναι : *Acyrtosiphon pisum* (0-12%), *Aphis*

citricola (6%), *Aphis fabae* (0-12%), *Capitophorus elaeagni* (2%), *Ropalosiphum maidis* (2%), *Ropalosiphum padi* (0-11%), *Schizaphis graminum* (4-5%), *Sitobion avenae* (0-2%).

3.3 Κύκλος μόλυνσης των Potyvirus

Ο ιός PVY που μελετάμε ανήκει στην οικογένεια POTYVIRUS. Η οικογένεια αυτή έχει μονομερές, μονόκλωνες θετικά φορτισμένες αλυσίδες RNA, οι οποίες έχουν μέγεθος περίπου 9.7 kb. Κατά προσέγγιση, έχει 2000 υπομονάδες από την μονή καψιδιακή πρωτεΐνη που βρίσκεται γύρω από το γένωμα του ιού, στο RNA με ελικοειδή διάταξη (Shulka et al. 1994). Μια γραμμή γενώματος ικής πρωτεΐνης, VPg είναι ομοιοπολικά δεσμευμένη στο 5' άκρο (Siaw et al. 1985, Murphy et al. 1990,1991) και μια πολυA ακολουθία βρίσκεται στο 3' άκρο του γενώματος (Hari et al.1979). Οι πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από 9 γενώματα των Potyvirus.

Ο κύκλος μετάδοσης των Potyvirus μπορεί να διαιρεθεί σε 3 βήματα. Αρχικά ο ιός πολλαπλασιάζεται στα αρχικά μολυσμένα κύτταρα. Οι ιοί απόγονοι μολύνουν το φυτό διασυστηματικά και κινούνται από τα αρχικά μολυσμένα στα γειτονικά κύτταρα και στα διάφορα μέρη του φυτού. Στα νέα φυτά, ο ιός μεταδίδεται από τις αφίδες.

3.4 Ο πολλαπλασιασμός των Potyvirus

Ο πολλαπλασιασμός των Potyvirus, περιλαμβάνει δύο διαδικασίες. Αυτές είναι η μετάφραση του ιικού γενώματος RNA που παράγει πρωτεΐνες, οι οποίες χρειάζονται για την αντιγραφή. Μετά την εισαγωγή των ισοσωματίων στα κύτταρα, το RNA των potyvirus απελευθερώνεται από τις υπομονάδες της καψιδιακής πρωτεΐνης. Αυτή η διαδικασία ελέγχει την αποκάλυψη ή την αποσυναρμολόγηση. Ο μηχανισμός αυτός γενικά δεν είναι γνωστός. Αλλά υποθέτουμε ότι ακολουθεί μια στρατηγική, κατά την

οποία τα ριβοσώματα και ο συνδυασμός της μετάφρασης του ξενιστή βρίσκονται στο τέλος του 5' άκρο του ιικού γένωματος και η μετάφραση είναι στην αρχή, ενώ το RNA γίνεται γνωστό από ένα κομμάτι (Wilson 1984, 1985). Επειδή το γένωμα των roty έχει m-RNA πολικότητα, μπορεί αμέσως να μεταφραστεί μετά την αποκάλυψη και να παράγει τις ιικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούν και χρειάζονται στην αντιγραφή. Η μετάφραση κανονικά αρχίζει από το πρώτο AUG κωδικόνιο.

3.5 Οι πρωτεΐνες των Potyvirus

Στο γένωμα των roty υπάρχει ένα μακρύ, ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που αποκωδικοποιεί ένα υψηλό μοριακό βάρος πολυπρωτεΐνης (κατά προσέγγιση 340 kDa).

Οι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες του ιού παράγονται από πολυπρωτεΐνη μέσα από co και post μετάφραση πρωτεολυτικό διαχωρισμό που μεταφέρεται έξω από 3 ιικές-κωδικοποιημένες πρωτεϊνάσες. Η Nαι πρωτεΐνη, η βοηθητική πρωτεϊνάση (HC-Pro) και P1 πρωτεϊνάση (Carrington and Dourherty 1987α ,1987β ,Carrington et al. 1989, Verchot et al. 1991.)

Η αντιγραφή γίνεται στο κυτόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων εξαγόμενο από το ενδοπλασμικό δίκτυο. Η 6K πρωτεΐνη είναι πιθανό να προσδένεται στο συνδυασμό αντιγραφής στις μεμβράνες (Schaad et al. 1997.)

Η παρουσία της πρωτεΐνης b (Nib), βρίσκεται στο αρχικά αντιγραμμένο ιικό γένωμα της αρνητικής αλυσίδας. Η παρουσία της εξαρτάται από το ιικό RNA- RNA πολυμεράση (Allison et al 1986). Η εκκίνηση της πολυμεράσης για την έναρξη της σύνθεσης της αρνητικής αλυσίδας γίνεται στις δευτερεύουσες δομές της 3' μη μεταφρασμένης περιοχής (Hardeman – Cahill et al. 1998).

Η CL πρωτεΐνη, το πιθανό είναι ξετυλίγει την διπλή αλυσίδα χρησιμοποιώντας το ένζυμο ρεπλικάση (Lain et al. 1990, Eagles et al. 1994.) Η ρεπλικάση χρειάζεται στην παραγωγή της αρνητικής αλυσίδας, σαν εκμαγείο για να

παράγει τις προγονικές αλυσίδες. Κατά την διάρκεια της διασυστηματικής μόλυνσης στο φυτό, ο ιός κινείται πρώτα από κύτταρο σε κύτταρο μέσα στα αρχικά μολυσμένα φύλλα. Ο ιός εισέρχεται στον αγγειώδη ιστό, στα ηθμώδη αγγεία και μετά στο φλοίομα όπου μετακινείται παθητικά μέσα στο ίδιο φύλλο και ανάμεσα στα διάφορα οργανίδια του φυτού. Οι CP, CL, HC-Pro και VPg πρωτεΐνες, διευκολύνουν την κύτταρο σε κύτταρο κίνηση των Poty μέσω των πλασμοδεσμών (Revers et al. 1999).

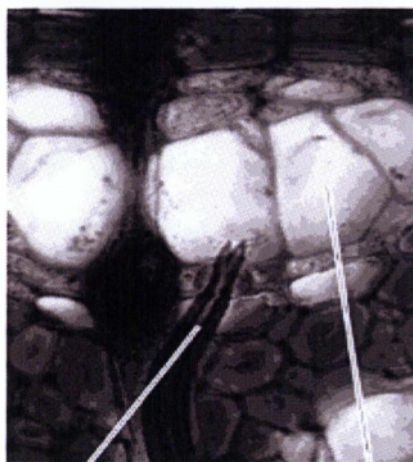
Οι CP και HC-Pro πρωτεΐνες αυξάνουν το μέγεθος των πλασμοδεσμάτων σε απαγορευμένα όρια, τα οποία είναι απαραίτητα για την μετακίνηση του ιού στα abjament κύτταρα (Rojas et al. 1997). Το πώς μεταφέρονται στα πλασμοδέσματα είναι άγνωστο. Οι CP, HC-Pro, VPg και 6K πρωτεΐνες χρειάζονται για τις μακρινές αποστάσεις του ιού στο φλοίομα. Η εισαγωγή και εξαγωγή από το αγγειακό σύστημα να γίνεται με την βοήθεια της HC-Pro και χρειάζεται για την μετάδοση των poty- ιών από τις αφίδες- φορείς. Γίνεται μια υπόθεση ότι η HC-Pro δημιουργεί μια γέφυρα ανάμεσα στο ισωμάτιο και το θεωρούμενο υποδοχέα, δηλαδή στο τροφικό κανάλι του σπλέτου της αφίδας (Pirone and Blanc 1996).

3.6 Ο ρόλος του σιέλου

Καθώς οι αφίδες μετακινούνται και πραγματοποιούν νύγματα δοκιμασίας πάνω στην επιφάνεια του φυτού, συλλέγουν πληροφορίες όσον αφορά τις φυσικές ιδιότητες και την χημεία της επιφάνειας, καθώς και την εσωτερική χημεία του φυτού. Η αρχική έρευνα αυτή στην επιφάνεια, εμπεριέχει μικρή ή και καθόλου διείσδυση του σιέλου, αλλά συχνά επιτρέπει σε μια αφίδα να αισθανθεί την καταλληλότητα ενός φυτού, μέσα σε διάστημα 60 sec. Αυτό το διάστημα απαιτείται για να διεισδύσει στην επιδερμίδα και να εκκρίνει το σάλιο στην επιφάνεια. Αφότου εγκατασταθεί μια αφίδα επί της φυλλικής επιφάνειας, πραγματοποιεί βαθιά νύγματα μέσα στο φυτό. Τα μέρη του στόματος είναι πολύ λεπτά, ώστε να μην δημιουργήσουν πρόβλημα κατά την διάρκεια εισαγωγής.

Παράλληλα, καθώς οι αφίδες κάνουν τα δοκιμαστικά νύγματα στους φυτικούς ιστούς, εκκρίνουν σάλιο το οποίο σχηματίζει ένα στεφάνι γύρω από τα στιλέτα. Το σιελογόνο στεφάνι προσφέρει σταθερότητα στα πολύ εύκαμπτα στιλέτα και επιτρέπει στις αφίδες να ελέγχουν την κατεύθυνση του νύγματος δοκιμασίας, εμποδίζοντας την κάμψη των στιλέτων, εκτός από το άκρο τους. Το στεφάνι των στιλέτων συνήθως καταλήγει στο φλοιώμα, υποδηλώνοντας ότι οι αφίδες τρέφονται από τους ηθμώδεις σωλήνες.

Αναισθητοποιημένες αφίδες διακόπτουν την έκκριση σιέλου και δεν παρουσιάζουν διαρροή, ούτε διόγκωση του στιλέτου τους. Αυτό αποδεικνύει ότι οι αφίδες τρέφονται παθητικά.



Εικόνα 13: (α) στιλέτο αφίδας (β) ηθμαγγειώδεις δεσμίδες

3.7 Επίδραση της νηστείας που προηγείται της πρόσληψης του ιού

Οι ρυθμοί μετάδοσης των μη- έμμονων ιών αυξάνονται με την υποβολή των αφίδων σε νηστεία πριν την πρόσληψη, ακόμα και για περιόδους τόσο σύντομης διάρκειας. Μικρές μόνο αυξήσεις σημειώνονται με περιόδους νηστείας, μεγαλύτερης της μίας ώρας και το αποτέλεσμα αυτών υποβαθμίζεται όταν στις νηστεύουσες αφίδες, επιτραπεί να πραγματοποιήσουν νύγματα δοκιμασίας σε ένα φύλλο, για περισσότερο από λίγα λεπτά. Έχουν γίνει πολλές υποθέσεις στην προσπάθεια να εξηγηθεί το φαινόμενο αυτό. Σύμφωνα με Watson και Roberts (1939), η μετάδοση από αφίδες, που δεν υποβλήθηκαν σε νηστεία, παρεμποδίζεται από μια ουσία που αδρανοποιεί τον ιό, την

οποία εκκρίνουν οι αφίδες στο σάλιο τους, κατά την διατροφή τους. Διατηρώντας τις αφίδες εκτός των φυτών για κάποιο χρονικό διάστημα, αδρανοποιείται ή επιβραδύνεται η παραγωγή αυτής της ουσίας και η μετάδοση του ιού παραμένει σχετικά ανεπηρέαστη, μέχρις ότου η δραστηριότητα των νυγμάτων δοκιμασίας, ενεργοποιήσει την παραγωγή του αδρανοποιητή.

Η νηστεία επηρεάζει επίσης τη συμπεριφορά διατροφής των αφίδων. Έτσι όταν οι αφίδες μετά από νηστεία τοποθετούνται πάνω σε ένα φύλλο, σχεδόν πάντοτε πραγματοποιούν ένα ή περισσότερα σύντομης διάρκειας δοκιμαστικά νύγματα, κατά την διάρκεια των οποίων μπορεί να λαμβάνουν δείγματα χυμού, ώστε να εξακριβώσουν την κατάσταση του ξενιστή.

Αντιθέτως οι αφίδες που δεν υποβλήθηκαν σε νηστεία πραγματοποιούν συχνά μακράς διάρκειας νύγματα ώστε να αρχίσουν να διατρέφονται. Μπορούν να προσλάβουν τον ιό κατά την διάρκεια νυγμάτων σύντομων όσο 5 δευτερόλεπτα (Swenson 1968, Harris 1977a). Παρόλα αυτά μη- διακοπτόμενα δοκιμαστικά νύγματα, διάρκειας 15-60 δευτερολέπτων είναι γενικότερα ιδανικά, ενώ η μεγαλύτερης διάρκειας επαφή στα προσβεβλημένα φύλλα έχει σαν αποτέλεσμα φτωχή πρόσληψη. Έτσι, μόνο 5 άτομα της *myzus persicae* από τα 45 που δοκιμάστηκαν, μετέδωσαν τον ιό Y της πατάτας μετά από διαδικασία πρόσληψης, διάρκειας 4 ωρών ενώ 25 άτομα μετέδωσαν τον ιό μετά από διάρκεια πρόσληψης μόλις 2 λεπτών (Watson και Robert, 1939).

Ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για μόλυνση, είναι λίγο συντομότερος από ότι αυτός που απαιτείται για την πρόσληψη του ιού (Sylvester, 1950, Hamlyn, 1953, Sylvester, 1955, Hodges και McLean, 1969), αλλά σε αντίθεση με τα μακράς διάρκειας δοκιμαστικά νύγματα πρόσληψης, προσδίδουν υψηλούς βαθμούς μόλυνσης (Bradley, 1964). Παρόλα αυτά οι ιοφόρες αφίδες, γενικά καθίστανται μη μολυσματικές μετά από ιδιαίτερα μεγάλης διάρκειας νύγματα δοκιμασίας πάνω σε υγιή φυτά (Hashiba και Misawa, 1969).

3.8 Διάγνωση φυτοπαθογόνων ιών

3.8.1 Γενικά

Τα τελευταία 15 χρόνια υπάρχει μια έξαρση των φυτοιών και αυτό οφείλεται κυρίως στις ανθρώπινες δραστηριότητες και στην κλιματική αλλαγή. Η παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας έχει επηρεάσει τα συστήματα καλλιέργειας, τις ποικιλίες των φυτών και τη φυσική βλάστηση όπως είναι τα δάση, οι λειμώνες και οι δασικές εκτάσεις, επειδή το κλίμα είναι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας για τη γεωγραφική τους διάδοση. Σήμερα η πίεση στη γεωργία και στη δασοκομία από επιβλαβή έντομα και νόσους που μεταδίδονται από έντομα είναι μικρότερη σε μεγαλύτερα υψόμετρα, λόγω των λιγότερο ευνοϊκών κλιματικών συνθηκών. Στις βόρειες γεωγραφικές περιφέρειες τα προβλήματα τόσο των επιβλαβών οργανισμών που δεν χρήζουν απομόνωσης όσο και των επιβλαβών οργανισμών που χρήζουν απομόνωσης θεωρούνται ότι είναι μικρότερα, από αυτά που παρατηρούνται στο Νότο.

Ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, η διακύμανση της θερμοκρασίας και οι αλλαγές στη συχνότητα βροχοπτώσεων αρχίζει και επιφέρει παρατεταμένες και/ή πιο συχνές ξηρασίες ή πλημμύρες. Ενδογενή φυτά υπόκεινται σε μεγαλύτερη περιβαλλοντική πίεση και θα καταστούν πιο ευπαθή σε επιβλαβείς οργανισμούς και νόσους.

Καταρχήν, εστίες μυκήτων και βακτηρίων, έχουν αυξηθεί σε αριθμό και σε σοβαρότητα κρουσμάτων, σε περιοχές με αυξημένες βροχοπτώσεις.

Ωστόσο, θερμότερα καλοκαίρια μπορούν επίσης να ευνοήσουν ορισμένους θερμόφιλους μύκητες. Υψηλές θερμοκρασίες το χειμώνα και την άνοιξη παρατείνουν την περίοδο βλάστησης με αποτέλεσμα την μεταβολή των κύκλων ανάπτυξης των φυτών ξενιστών και τη μείωση της ανεκτικότητάς τους. Αρχίζουν και υπάρχουν περισσότερες γενεές εντόμων ανά περίοδο βλάστησης. Τόσο ο πληθυσμός των εντόμων όσο ο αριθμός των *μυκήτων* που επιζούν κατά τη χειμερινή περίοδο αυξάνονται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία περισσότερων εστιών μόλυνσης κατά την επόμενη καλλιεργητική περίοδο.

Στοιχεία δείχνουν ότι στη διάρκεια θερμών καλοκαιριών, ορισμένα είδη εντόμων έχουν επεκτείνει τη γεωγραφική τους εξάπλωση προς το Βορρά. Συνεπώς γίνεται πιο δύσκολη η παραγωγή απαλλαγμένου από ιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, όπως γεωμήλων προς σπορά, ακόμη και σε βόρεια γεωγραφικά πλάτη επειδή οι ζεστοί χειμώνες ευνοούν την επιβίωση των ειδών αφίδας και θα διευκολύνουν τη

διάδοση ιογενών νόσων, στη διάρκεια του καλοκαιριού. Κατά συνέπεια περισσότερα επιβλαβή έντομα, έχουν την δυνατότητα να καταστούν πιο καταστροφικά λόγω της υπερθέρμανσης του πλανήτη.

Για τους παραπάνω λόγους, θα πρέπει να ελέγχονται τα έντομα φορείς με τα κατάλληλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και να προστατεύονται οι φυσικοί εχθροί, έτσι ώστε να υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ τους. Ένας άλλος σημαντικός τρόπος αντιμετώπισης είναι η έγκαιρη διάγνωση του ιού ώστε να μπορέσουμε να εμποδίσουμε την εξάπλωση του.

Σε κάποιες ιώσεις γίνεται διάγνωση από τα συμπτώματα. Σε κάποιες άλλες εφαρμόζονται κάποια τεστ. Τα διαγνωστικά τεστ πρέπει να είναι γρήγορα, έγκυρα και οικονομικά. Οι ευρέως διαδεδομένες μέθοδοι μοριακής ανίχνευσης είναι: η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και η μέθοδος ELISA. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται στα διάφορα πειράματα σε εργαστήρια για ταυτοποίηση των ιών. Ο ιός Y της πατάτας συνήθως ανιχνεύεται με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, γι αυτό παρακάτω θα κάνουμε μια περιγραφή της διαδικασίας αυτής.

3.8.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης(PCR)

Με την PCR, μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί, μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή DNA θραύσματος) είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητήρες πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του DNA θραύσματος που πρόκειται να ενισχυθεί.

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινητήρων στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητήρων (extension).

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται στις μέρες μας αυτόματα από ειδικά μηχανήματα τους θερμοκυκλωτές (thermal cyclers).



Εικόνα 14:Θερμοκυκλωτής. Πηγή: www.carleton.edu

Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95° C. Στη συνέχεια οι εκκινητές σε περίσσια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου, με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60° C. Ακολουθεί επώαση στους 72° C για την επιμήκυνση των εκκινητήρων από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα που το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητήρων απόσταση.

Στη πράξη 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται.

Η όλη διαδικασία κλωνοποίησης ενός DNA θραύσματος σε ένα *in vitro* σύστημα (χωρίς κύτταρα) διαρκεί μερικές ώρες, σε σχέση με τις μερικές μέρες που απαιτούνται για τις *in vivo* διαδικασίες κλωνοποίησης.



Εικόνα 15:Σωληνίσκος (tubes) στον οποίο τοποθετείται το κάθε δείγμα

Πηγή:www.extrogene-web.com

Στην συνέχεια πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση, όπου γίνεται διαχωρισμός των στερεών σωματιδίων από το υγρό ενός κολλοειδούς, στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι αγαρόζη

Με τη μέθοδο αυτή διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων στην αγαρόζη μέσα στην οποία βρίσκονται τα προϊόντα της PCR σε ειδικούς σωληνίσκους, με αποτέλεσμα τα στερεά σωματίδια που περιέχει να συγκεντρώνονται σε ένα ηλεκτρόδιο. Έτσι έχουμε απομόνωση του DNA που μας ενδιαφέρει. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από τον ιό που ανιχνεύουμε. Συγκεκριμένα για τον PVY διαρκεί μια ώρα.

Τέλος, τοποθετείται το δείγμα αυτό σε ειδικό μηχάνημα που φωτογραφίζει και δείχνει το DNA που έχουμε τοποθετήσει σαν μάρτυρα, αν υπάρχει και στα δείγματα που μας ενδιαφέρουν. Είναι μια από τις πιο έγκυρες μεθόδους, παρόλα αυτά είναι πολύ ευαίσθητη και θέλει προσοχή.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Σχεδόν όλοι οι ιοί των φυτών χρησιμοποιούν εξειδικευμένους φορείς για τη μετάδοσή τους στη φύση, συνηθέστεροι από τους οποίους είναι τα έντομα και κυρίως οι αφίδες. Ενώ συχνά έχουν προσδιοριστεί οι ιϊκοί παράγοντες που συμμετέχουν στο φαινόμενο αυτό, τα σημεία πρόσδεσής τους στο έντομο φορέα παραμένουν άγνωστα. Πιθανολογείται ότι στην μετάδοση του ιού παίζουν σημαντικό ρόλο οι πρωτεΐνες των ιών *roty* και πιο συγκεκριμένα η *HC-pro*. Ο ρόλος της είναι να συνδέει τα ισωμάτια με τα στοματικά μόρια του εντόμου, με αποτέλεσμα να βοηθά στην διατήρηση του ιού.

Ένας άλλος παράγοντας που πιστεύετε ότι παίζει κάποιο εξειδικευμένο ρόλο στην μετάδοση, είναι η νηστεία των αφίδων. Επιτρέπει σε μια αφίδα να αισθανθεί την καταλληλότητα ενός φυτού, μέσα σε διάστημα 60 sec. Από συνεχή πειράματα, έχει εξαχθεί το συμπέρασμα πως οι αφίδες και συγκεκριμένα η *myzus persicae*, μεταδίδουν τον ιό Υ της πατάτας πιο αποτελεσματικά, αν προηγουμένως έχουν υποστεί νηστεία και όταν τα νύγματα είναι διάρκειας ως 60 δευτερόλεπτα. Περισσότερος χρόνος μειώνει την αποτελεσματικότητα της μετάδοσης. Μολύνονται με τον PVY σε λιγότερο από 5 δευτερόλεπτα, Όταν μια αφίδα τρέφεται για περισσότερο από 5 έως 10 λεπτά παρατηρείται μειωμένη μεταδοτικότητα. Η μετάδοση από αφίδες, που δεν υποβλήθηκαν σε νηστεία, παρεμποδίζεται από μια ουσία που αδρανοποιεί τον ιό, την οποία εκκρίνουν οι αφίδες στο σάλιο τους, κατά την διατροφή τους. Η νηστεία επηρεάζει επίσης τη συμπεριφορά διατροφής των αφίδων. Έτσι όταν οι αφίδες μετά από νηστεία τοποθετούνται πάνω σε ένα φύλλο, σχεδόν πάντοτε πραγματοποιούν ένα ή περισσότερα σύντομης διάρκειας δοκιμαστικά νύγματα, κατά την διάρκεια των οποίων μπορεί να λαμβάνουν δείγματα χυμού, ώστε να εξακριβώσουν την κατάσταση του ξενιστή. Αντιθέτως, οι αφίδες που δεν υποβλήθηκαν σε νηστεία πραγματοποιούν συχνά μακράς διάρκειας νύγματα ώστε να αρχίσουν να διατρέφονται. Μπορούν να προσλάβουν τον ιό κατά την διάρκεια νυγμάτων σύντομων όσο 5 δευτερόλεπτα (Swenson 1968, Harris 1977a). Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έξαρση των ιώσεων με καταστροφικές συνέπειες γι αυτό η διάγνωση θα πρέπει να έγκαιρη και έγκυρη. Για τους παραπάνω λόγους θα πρέπει να δοθεί μεγαλύτερη σημασία στα έντομα- φορείς ιώσεων, από ότι στις ίδιες τις ιώσεις, αφού μόνο προληπτικά μπορούμε να δράσουμε.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrios, G.N. 1997. Plant pathology. Fourth edition. Academic Press, London, U.K. 635 pp.
- **Blanc, S. López-Moya, J.J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P.**1997. A specific interaction between coat protein and helper-component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 231: 141-147.
- **Blanc, S., J. J. Lopez Moya, R. Wang, S. Garcia Lampasona, D. W. Thornbury, and T. P. Pirone.** 1997. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**:141-147
- **Blancard**, in *Maladies du Tabac*, p. 325, ed. D. Blancard, Paris: INRA, 1998.
- **De Bokx, J.A. & Huttinga, H.** 1981. Potato virus Y. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No.
- **Dunford S.** Sampling phloem sap. Plant physiology online
- **Jerzy Syller.** The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyviruses and caulimoviruses . ^aPlant Breeding and Acclimatization Institute, Centre Młochów 19 Platanowa Str, 05-831 Młochów, Poland 2006
- **Kanavaki, O. M., Margaritopoulos, J. T., Katis, N. I., Skouras, P., and Tsitsipis, J. A.** 2006. Transmission of *Potato virus Y* in tobacco plants by *Myzus persicae nicotianae* and *M. persicae* s.str. *Plant Dis.* 90:777-782.
- **Kasschau, K.D., Cronin, S. & Carrington, J.C.** 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228, 251-262
- **Lain, S., Riechmann, J.L. & Garcia, J.A.** 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein coded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acid Research* 18: 7003-7006
- **Latore & Flores,** *Plant Diseases* 68: 884, 1984
- **Lee, J.-Y. & Lucas, W.J.** 2001. Phosphorylation of virial movement proteins-regulation of cell-to-cell trafficking. *TRENDS in Microbiology* 9, 5-7.
- **Martin B. ,Collar J.L. , Tjallingii and Fereres A.** Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *Journal of General Virology*(1997), 78,2701-2705

- **PETER W. MILES.** Aphid saliva. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society (1999), 74:41-85 Cambridge University Press
- **Pirone, T. P., and S. Blanc.** 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:227-247
- **Pirone, T.P. & Blanc, S.** 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 34: 227-247.
- Προσαρμογή στην αλλαγή του κλίματος: ένα ευρωπαϊκό πλαίσιο δράσης- Επιπτώσεις της αλλαγής του κλίματος στην υγεία των ανθρώπων, των ζώων και των φυτών Βρυξέλλες, 1.4.2009
- **Power Alison G.** Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. *Current Opinion in Plant Biology* 2000, 3:336–340
- **S. urcuqui-Inchima, Haemi A. and Bernardi F.** Potyvirus proteins: a wealth functions. Volume 74, Issues 1-2 p.157-175 (2001)
- **Schaad, M.C., Lellis, A.D. & Carrington, J.C.** 1997b. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology* 71, 8624-8631.
- **Stewart M. Gray and Nanditta Banerjee.** Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, March 1999, p. 128-148, Vol. 63
- **Τζάμος Ε.** φυτοπαθολογία.(2004)εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα
- **Wang, R. Y., E. D. Ammar, D. W. Thornbury, J. J. Lopez Moya, and T. P. Pirone.** 1996. Loss of potyvirus transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. *J. Gen. Virol.* 77:861-867
- **Webster Graig G., Wylie Stephen J. and Jones Michael G. K. ,** Diagnosis of plant viral pathogens. *CURRENT SCIENCE*, VOL. 86, NO.12,25 June 2004
- www.extrageneweb.com.
- www.serccarleton.edu
- www.wikipedia.com